

課 題	環境低負荷を目指した新規生分解性高分子材料の酵素重合と生分解メカニズムの解明
代 表 者	中沖 隆彦 (理工学部・助教授)
研究組織	林 久夫 (理工学部・教授)

1. 研究発表

- (1) T. Nakaoki, M. Kitoh, and R. A. Gross, Enzymatic Ring Opening Polymerization of ϵ -Caprolactone in Super Critical CO₂, *Polymer Biocatalysis and Biomaterials (ACS Symposium Series 900)*, 393 (2005).
- (2) T. Nakaoki, M. Kitoh and R. A. Gross, Enzymatic Ring Opening Polymerization of ϵ -Caprolactone in Super Critical CO₂, IUPAC MACRO France フランス (2004).
- (3) T. Nakaoki, N. Kataoka, Degradation Mechanism of Polylactide, 14th International Symposium on Fine Chemistry and Functional Polymers 中国 (2004).
- (4) 中沖隆彦、水田智之、固定化酵素による脂肪族ポリエステルの重合と鎖長依存性、高分子研究発表会 (2004)。
- (5) 中沖隆彦、川島弘行、 ϵ -カプロラクトンの酵素重合における固定化酵素のマトリックスの影響、高分子研究発表会 (2004)。
- (6) 辰巳育広、笹尾茂広、林久夫、側面固定型メソゲンをもつ新規側鎖型液晶ポリマーの合成と相転移、高分子討論会 (2004)。
- (7) 村田一樹、笹尾茂広、林久夫、種々の主鎖型液晶ポリエステルのスペーサーによる相転移の変化とせん断応力場での配向挙動、高分子討論会 (2004)。

2. 2004年度の研究計画

2003年度に引き続いてプロジェクトを遂行し酵素活性の高い固定化酵素の開発と高収率を得る反応条件を見出すことである。

(1) ϵ -カプロラクトンをを用いた固定化酵素の酵素活性

平成15年度の研究成果としてポリスチレンをマトリックスとしてCALを固定化したとき比較的孔径の大きいものが高活性を与えた。当該年度はより疎水性の高いポリテトラフルオロエチレン、フッ化ビニリデン、ポリメタクリル酸メチルなどを多孔質マトリックスとしてCALを固定化する。これらの試料のたんぱく質分率を紫外吸収スペクトルから求める。固定化した酵素の総重量が一定となるようにして ϵ -カプロラクトンの開環重合を行い酵素活性を確かめる。反応動力学についてはinsitu ¹H NMRにより求めて速度論的に比較検討を行う。最も酵素活性の高いCALとマトリックスの系を化学触媒とを比較して実用化についても検討する。

(2) マトリックス上に固定化された酵素の二次構造解析

酵素はアミノ酸がペプチド結合した高分子であり分子量は数万になる。ポリスチレンのような多孔質に酵素を固定化するとき、酵素は疎水性連鎖部分でマトリックスと接して親水性連鎖部分を外側に向けて吸着する。したがってマトリックスの材質によって酵素の分子構造が変わり酵素活性に重要な影響を与えたと考えられる。固定化に使用するマトリックスは通常半径1mm程度のビーズ状であり、そのままでは赤外スペクトルを測定することは不可能である。電子顕微鏡測定で用いられるマイクロームにより薄くスライスした断面を顕微赤外スペクトルを測定する。さらに吸着した酵素のたんぱく二次構造解析を行って α ヘリックスと β シートの分率を求める。マトリックスの違いによる高次構造の違いと(1)で求めた酵素活性を比較する。

(3) 合成された生分解性ポリ(ϵ -カプロラクトン)の分子物性と生分解性

様々なマトリックスに固定化した酵素を用いて重合を行った ϵ -カプロラクトンの分子キャラクタリゼーションを行い、酵素の速度論的な有効性ばかりでなく分子量や分子量分布の検討により機能性の高い材料となっているかを確認する。現在のポリ(ϵ -カプロラクトン)の分子量はせいぜい数万程度で分子量の低いことが物性向上の面でネックとなっている。分子量とその分布についてゲルパーミエーションクロマトグラフ(GPC)を測定して確かめる。その結果を(1)にフィードバックして固定化するマトリックスを再検討する。生分解性についてはアルカリ水溶液と分解酵素を含む水溶液の2種類について行う。生分解速度の制御は実用面においても極めて重要なファクターであるので結晶化度やモルフォロジーを制御して分解速度のコントロールを行う。

以上の研究を通して本プロジェクトでは、より酵素活性の高い固定化酵素を開発すること、酵素活性を制御する酵素の分子構造の解明、合成された生分解性高分子のキャラクタリゼーションを明らかにする。

3. 研究実績の概要(研究経過と成果)

(緒言) 現在、社会的に地球環境に対する問題意識が高まっており、化学者にとって環境にやさしい材料開発が強く望まれるようになってきた。20世紀型の高分子材料開発は耐久性や高機能性を指向したものであったが、その結果として焼却炉で燃やしたときに出る有毒ガスや酸性雨、またごみとして埋立地などでかさばって半永久的に残存するなど、問題点が大きくクローズアップされるようになってきた。このようなことから燃焼熱が小さく、埋め立てたときに微生物によって分解される生分解性高分子が脚光をあびている。しかし現在実用化が進んでいる生分解性高分子はポリ乳酸のみであり、パソコンの筐体や携帯電話の一部で使用されているにすぎない。他にも生分解性高分子としていくつもの候補があがっているが、より機能性が高く環境にやさしい合成プロセスや物性面での向上という問題が残っている。合成プロセスに関して、近年有機金属を含む化学触媒の代わりに、環境に配慮した生体由来触媒である酵素を用いる方法が注目されている。しかし酵素の重合活性や再利用性の観点から実用化はほとんどされていない。このようなことから本プロジェクトでは、より活性の高い酵素触媒を開発し生分解性高分子の実用化を目指すものである。

酵素活性は酵素単体で用いるよりも高分子などの多孔体に吸着させた固定化酵素の方がより高くなることが知られている。初年度の研究では、まず Porcine Pancreatic Lipase (PPL) をポリスチレン多孔質マトリックス上に固定化を試みた。このときマトリックス上に吸着した酵素の重量分率は酵素活性の比較には重要なファクターとなるので紫外吸収法を用いた校正曲線を作成して求めた。PPL については、繰り返し固定化を試みたが固定化は確認されなかった。次に酵素を PS30 に変更して行ったが、PPL 同様固定化は確認できなかった。さらに酵素として *Candida Antarctica Lipase B* (CAL) を用いて実験を行った結果、固定化が確認された。当初は固定化が数%と低かったが改良を重ねることにより 20% を超える固定化に成功した。多孔質マトリックスの孔のサイズを 50 Å、200 Å、400 Å と変えて ϵ -カプロラクトンの開環重合を行ったところ、孔径の大きい方が酵素活性の高いことがわかった。

これらの結果に基づいて、良好な結果の得られた CAL を用いてさらに詳細な固定化酵素の研究を予定していたが、メーカー側の事情により CAL の入手が不可能となったため、他の酵素および CAL を固定化した固定化酵素 Novozyme435 を用いて研究を進めた。

(実験) ^1H NMR 測定は Bruker Biospin DPX400 を用いた。In situ ^1H NMR 測定は溶媒としてトルエン d_6 を用いて固定化酵素を NMR 5mm 管に入れ ϵ -カプロラクトン(ϵ -CL)を加えた時間を 0 分として直ちに NMR の測定を積算回数 16 で開始した。測定後の時間は FID の scan 回数 0 を基準とした。NMR の測定を約 7 分おきに 2 時間ほど行った。

(結果と考察) CAL が入手不可能となったため、*Aspergillus niger* (リパーゼ AS アマノ)、*Phizopus oryzae* (リパーゼ F-AP15 アマノ)、*Candida rugosa* (リパーゼ AYS アマノ)、*Pseudomonas fluorescens* (リパーゼ AK アマノ) の 4 種類のリパーゼを Rohm & Hass 社の Amberlite に固定化を試みた。前年度に確立した可視紫外による固定化定量法で酵素の固定化を確認したところ数%程度の固定化しかできず、これらの固定化酵素ではラクトン類の開環重合は起こらなかった。

そこで以下の実験では Novozyme 社で CAL を様々なマトリックスに固定化した酵素を用いて検討した。用いた固定化酵素は表 1 に示した。マトリックスとしてはアクリル、ポリプロピレン、ポリスチレンなどである。固定化された酵素の重量が同じになるようにして、トルエン中で ϵ -カプロラクトンの酵素重合過程の insitu ^1H NMR 測定を行った。 ^1H NMR スペクトルではモノマーのカプロラクトンとポリマーの(O-CH₂)の化学シフトが異なるため重合過程を測定することによりモノマー変換率を容易に見積もることができる。Fig. 1 に異なるマトリックスの固定化酵素

を用いたモノマー変換率を反応時間に対してプロットした。Novozyme-435は市販されている酵素でアクリル樹脂に固定化されている。このNovozyme-435より3つの固定化酵素で重合速度が高くなった。これらの試料はマトリックスとしてポリプロピレン、ポリスチレンを用いたものである。一方Novozyme-435より重合活性が低下した酵素のマトリックスはシリカなど親水性のものであった。このことは酵素の疎水性の部分とマトリックスが吸着し酵素のコンフォメーション変化により活性部位がより基質と反応しやすい空間配置になったことが示唆される。またFig. 2に分子量を反応時間に対してプロットした。時間とともに分子量は大きくなったが、最大でも15,000程度であり、あまり高分子量のポリエステルは合成できなかった。

次に固定化酵素の高温での酵素活性の失活について検討した。Fig. 3はキシレン中100°C以上で2時間熱処理したNovozyme-435を70°Cで ϵ -CLの重合プロセスをin situ ^1H NMR測定を行い酵素の不活性化について検討したものである。110°Cを越えると急速にモノマー変換率が低下し酵素活性が下がっていることがわかる。ポリマーが得られなくなる温度を外挿して求めると139°Cになった。同様にしてマトリックスがポリプロピレンであるAccurelとQDE2-3-4について不活性化する温度を見積もると、それぞれ136°Cと150°Cになった。このことは選択するマトリックスにより酵素活性に影響するばかりでなく高温での酵素の安定性にも影響することを示している。しかしいずれにしても100°C以下ではこれら固定化酵素は実用に十分耐えうるということがわかった。

熱処理前後の酵素の二次構造の変化を確かめるために、ペプチド結合のカルボニルC=O伸縮振動に注目したたんぱく二次構造解析ソフトを用いて検討した。その結果、熱処理後には α ヘリックスの量が著しく減少していることがわかった。このことは酵素を固定化するときに α ヘリックスを保つ工夫をすると酵素活性が維持できることを示唆している。

さらに我々は環境低負荷を目指すべく、反応媒体として通常用いられているトルエンなどの有機溶媒の代わりに超臨界二酸化炭素を用いて、酵素重合が維持されるかを検討した。超臨界二酸化炭素の使用は

- (1) マイルドな条件で超臨界状態になる
- (2) 反応後の生成物との分離が容易

などの特徴があり、他の合成反応でも注目されている。しかし本研究テーマでは触媒として酵素を用いていることから高圧下では失活する可能性がある。70°C、10MPaの条件下で ϵ -カプロラクトンの酵素重合を行った結果がFig. 4である。参照のためにトルエン中での単量体変換率も併せてプロットしている。両者を比較するとほぼ同じ変換率であるため、超臨界二酸化炭素も十分に有機溶媒の代替として使用できることがわかった。

最後に重合したポリカプロラクトン(PCL)とポリ乳酸(PLLA)のブレンドフィルムを作成して酵素分解実験を行った。Fig. 5はPLLA:PCL=9:1のブレンドフィルムをプロテアーゼKの水溶液に入れて酵素分解した後の重量残存率を示している。その結果およそ20時間で全てのフィルムが分解された。一方PLLA:PCL=5:5のブレンドでは(Fig. 6)8時間程度で分解が完了しており、分解速度の制御が可能であることがわかった。

(まとめ) 本プロジェクトは2003年度、2004年度の2年間行われた。得られた結果は以下のようにまとめられる。

- (1) 固定化酵素は酵素だけで使用するより酵素活性を高めることができ、固定化するマトリックスの材質に強く依存し、疎水性の素材が有効である。
- (2) 固定化酵素のマトリックスは多孔質の形態にも大きな相関が見られ、細孔径はある程度大きいほうがよい。
- (3) 固定化酵素の α ヘリックスを保つ方がよい。
- (4) 環境低負荷を目指すために超臨界二酸化炭素を有機溶媒の代替として使用可能である。
- (5) ポリ(ϵ -カプロラクトン)とポリ乳酸のブレンドから分解速度制御可能なフィルムの試作を行った。

Table 1. Characterization of immobilized lipases (activity, protein content, surface area, and pore diameter)*

	Matrix	Activity (PLu/g)	Protein content (w/w)	Surface Area (m^2g^{-1})	Pore diameter (Å)	Water content (w/w)
Novozyme435	Acrylic resin		0.200	110–150	140–170	1.30
Amberlite XAD 7HP	Acrylic resin	8.723	0.190	420	450	1.70
Accurel	Polypropylene	13.139	0.220	80–100	50–500	1.90
QDE2-3-4	Polypropylene-silic a composite	13.231	0.130	106	Appr. 100	1.90
Purolite AP1090	Polystyrene	4.893	0.082	20–25	1600–2300	0.82
Amberlite XAD 1180	Polystyrene	8.723	0.200	550	400–450	1.50
Deloxan HAP	Polysiloxane	13.958	0.290	400–800	200–2000	4.30

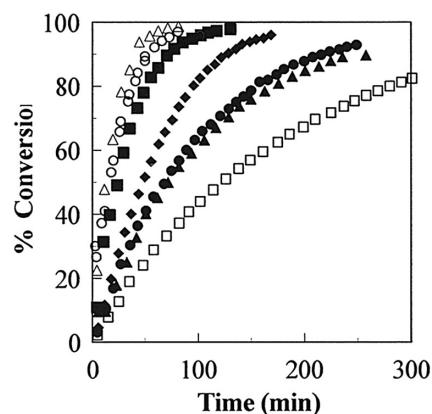


Fig. 1. Monomer conversion depending on reaction time determined by ^1H NMR.

○: Accurel, ●: Amberlite XAD1180, △: QDE2-3-4,
▲: Amberlite XAD 7HP, □: Deloxan HAP,
■: Purolite AP1090, ◆: Lewatit.

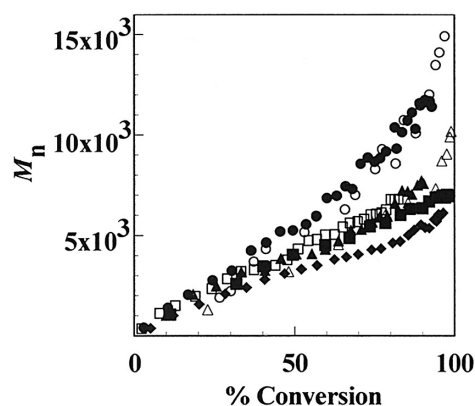


Fig. 2. Plots of M_n versus conversion.

○: Accurel, ●: Amberlite XAD1180, △: QDE2-3-4,
▲: Amberlite XAD 7HP, □: Deloxan HAP,
■: Purolite AP1090, ◆: Lewatit.

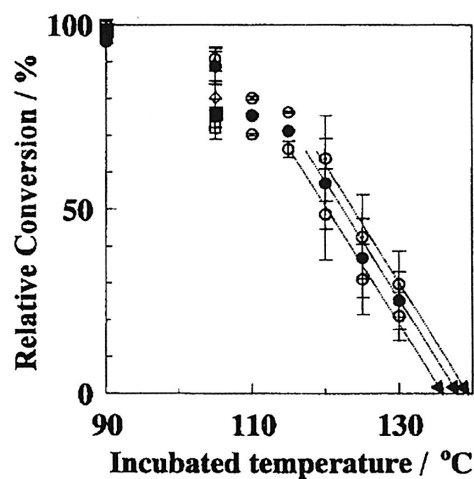


Fig. 3. Relative conversion depending on incubated temperature.

Toluene; □: 30 min, ■: 60 min, ◇: 90 min, p-xylene;
○: 30min, ●: 60min, ◎: 90 min.

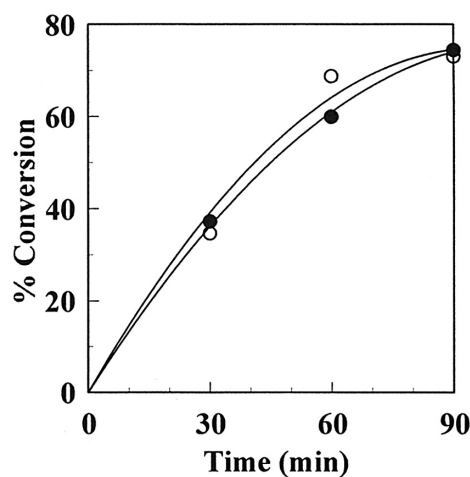


Fig. 4. Monomer conversion of ϵ -CL as a function of reaction time in toluene (closed circles) and scCO_2 (open circles). All reaction conditions are the same except reaction media used.

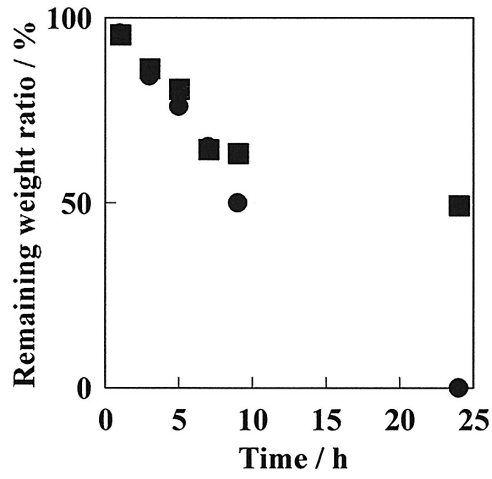


Fig. 5. Remaining weight ratio during proteinase K hydrolysis process.

● : PLLA film, ■ : PLLA/PCL (9/1) film.

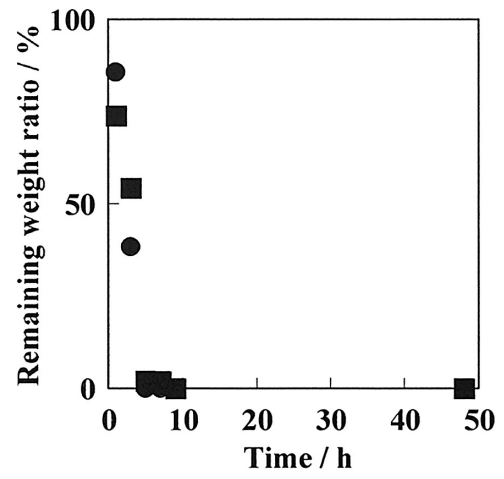


Fig. 6. Remaining weight ratio during proteinase K hydrolysis process.

● : PLLA/PCL (5/5) turbid film,
 ■ : PLLA/PCL (5/5) clear film.