

第 66 回高分子討論会に参加して

田中雄規

Yuki TANAKA

物質化学専攻修士課程 1年

1. はじめに

私は今回、2017年9月20日から9月22日にかけて松山市の愛媛大学 城北キャンパスで開催された高分子学会の「第66回高分子討論会」に参加した。今回は「*P. putida* による主鎖の炭素数が異なるフェニルアルカン酸を用いたポリエステル生合成」と題して、ポスター発表を行った。

2. 諸言

微生物の中には Poly (3-hydroxyalkanoate) (PHA) をエネルギー貯蔵物質として菌体内に蓄積するものがある。微生物の生合成では、通常炭素源にグルコースや脂肪酸を用いることが多いが、炭素源に5-フェニルペンタン酸を用いて *Pseudomonas oleovorans* を培養すると PHA の側鎖にフェニル基を含む構造のホモポリマーが生合成されることが報告されている。また、炭素源としてペンタン酸で培養したあと、グルコースの入った培地で *Ralstonia eutropha* 培養すると二元ブロック共重合体ができる。本研究では *Pseudomonas putida* (*P. putida*) による炭素源に炭素数の異なるフェニルアルカン酸を用いたポリエステル生合成、および炭素源にノナン酸と5-フェニルペンタン酸を用いたブロック共重合体について検討した。

3. 実験操作

微生物 *P. putida* (JCM NO: 6160) を有機培地中で 26°C, 120 rpm, 24 h で振とう培養したのち、炭素源に主鎖の炭素数の異なるフェニルアルカン酸を用いて 72 h 振とう培養を行った。また、ノナン酸で 24 h 振とう培養したのち、培地を完全に除去し5-フェニルペンタン酸で 24, 48, 72 h 振とう培養

を行った。微生物内に蓄積された PHA はクロロホルムを用いて抽出した。

4. 結果と考察

炭素源に主鎖の炭素数が 5-8 のフェニルアルカン酸を用いた生合成では主鎖の炭素数が長くなるとポリマー収量・収率が高くなった。これは *P. putida* は炭素源として脂肪酸を用いた時、炭素数が 8-10 の時に収率は高いが、炭素数が 5, 6 の時はあまり高くないことが報告されている。したがって本研究で用いたフェニルアルカン酸はアルキル鎖の炭素数が 5 より 8 の時に、得られたポリマー収量・収率は高かったと考えられる。また、Fig. 1 に主鎖の炭素数の異なるフェニルアルカン酸を用いた生合成で得られたポリエステルの¹³C NMR 測定結果を示した。

125.0-126.0 ppm 付近のピークはフェニル基の p 位のピークに帰属され、3-ヒドロキシフェニルアルカノエート (3HPA) が確認された。炭素数が奇数の5-フェニルペンタン酸と7-フェニルヘプタン酸を用いた場合は、126.0 ppm 付近に大きなピークが見られ、主鎖の炭素数が5のユニットであると帰属される。また7-フェニルヘプタン酸を用いた時、126.0 ppm より高磁場側にピークが観測されたピークは炭素数が7のユニットと考えられる。同様にして主鎖の炭素数が偶数の6-フェニルヘキサン酸と8-フェニルオクタン酸の場合は、125.8 ppm, 125.6 ppm, 125.4 ppm 付近のピークはそれぞれ主鎖の炭素数が6, 8, 10に対応すると考えられる。主鎖の炭素数が長くなっても生合成されるポリエステルの

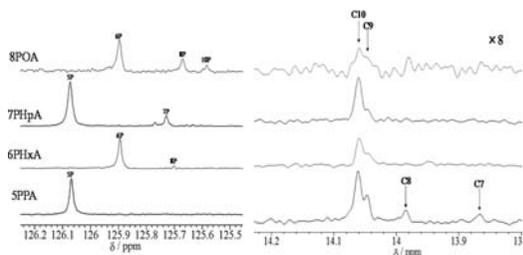


Fig. 1 ¹³C NMR spectrum of polyester biosynthesized from phenylalkanoic acids with different numbers of carbons.

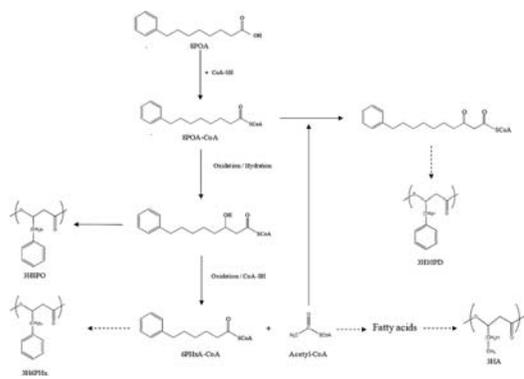


Fig. 2 Metabolic pathway using 8-phenyloctanoic acid.

は3 H5PP ユニットと3H6PHx ユニットが多くなった。以上のことからフェニルアルカン酸を炭素源とすることで側鎖にフェニル基を導入することができ、ポリマーの分子鎖中では炭素数5と6のユニットが最も安定であると考えられる。また、14.0 ppm 付近のピークはメチル基のピークに帰属され、3-ヒドロキシアルカノエート (3HA) が確認された。このことより、フェニルアルカン酸を用いるとP3 HPA/P3HA 共重合体が生合成された。次に8-フェニルオクタン酸の代謝経路を Fig. 2 に示した。

8-フェニルオクタン酸が代謝内でアルキル鎖の炭素数が8のアシル CoA になり、酸化されたのち、水和されβ-ヒドロキシアシル CoA になる。これが結合して3H8PO ユニットが生合成された。また、β-ヒドロキシアシル CoA が酸化されたのち、補酵素によってアルキル鎖の炭素数が6のアシル CoA とアセチル CoA になり、このアシル CoA から3H6PHx ユニットが生合成された。一方、アセチル CoA はアセチル CoA と結合を繰り返すことで、脂肪酸になり、その脂肪酸から3HA ユニットが生合成された。また、アルキル鎖の炭素数が8のアシル CoA とアセチル CoA よりアルキル鎖の炭素数が10のアシル CoA となり、これが結合することで3H10PD ユニットが生合成された。このことより、P3 HPA/P3HA 共重合体が生合成されたと考えられる。

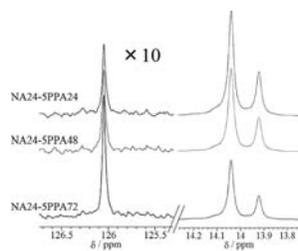


Fig. 3 ^{13}C NMR spectra of PHA the block copolymers metabolized from 5 PPA for different cultivation time after accumulatory NA for 24 h.
 — : NA 24-5 PPA 24-
 — : NA 24-5 PPA 48
 — : NA 24-5 PPA 72

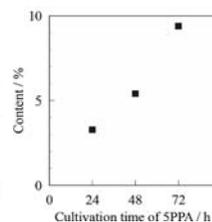


Fig. 4 5 PPA fraction in the block copolymers metabolized from 5 PPA for different cultivation time after accumulatory NA for 24 h.

ノナン酸で24 h 培養したのち、5-フェニルペンタン酸で培養を行ったブロック共重合体の生合成では5-フェニルペンタン酸の培養時間が増加してもポリマー収量・収率ともにほぼ一定となった。また、ポリマー収量・収率ともに高かったことからノナン酸の影響を大きく受けていると考えられる。得られたブロック共重合体の ^{13}C NMR 測定結果を Fig. 3 に示し、ブロック共重合体中の3HPP ユニット分率を Fig. 4 に示した。

5-フェニルペンタン酸の培養時間を長くすると3 H5PP ユニット分率は増えた。しかし、90% 以上がノナン酸由来の3HA ユニットであるため、3HA ユニットの影響が大きいと考えられる。

5. 評価

今回で3回目の学会となり、緊張よりも楽しむことができました。また、今回の学会では今までで一番多くの人に助言をいただいたポスター発表となりました。常日頃考えても出てこない考え方や多くの指摘をいただき、今後の研究に活かしていきたいと感じました。これまで学んできたことやこれから学んでいくことは今後の研究生活だけでなく、これから先、大切になっていくと感じましたので、常日頃から立ち止ることなく取り組みたいと思います。