

平成21年 3月31日現在

研究種目：基盤研究 (B)  
 研究期間：2005～2008  
 課題番号：17350077  
 研究課題名 (和文) メタゲノムからの生分解性プラスチック分解遺伝子の探索とモノマーリサイクルへの応用  
 研究課題名 (英文) Screening of novel biodegradable-plastic-degrading genes from meta genome and their application to the monomer recycling  
 研究代表者  
 中島 敏明 (NAKAJIMA-KAMBE TOSHIAKI)  
 筑波大学・大学院生命環境科学研究科・准教授  
 研究者番号：80241777

## 研究成果の概要：

自然環境中の全微生物のうち、人類が培養できるものは1%程度といわれている。そこで、残り99%の微生物の持つDNAを自然界から直接精製し、これを用いて新規プラスチック分解遺伝子の取得を行った。得られた新規遺伝子をさらに進化学によって改変し、機能を強化した。これを用いてプラスチックの分解(モノマー化)を行い、プラスチックのバイオケミカルサイクルへの道を開いた。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	5,300,000	0	5,300,000
2006年度	3,800,000	0	3,800,000
2007年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2008年度	2,400,000	720,000	3,120,000
年度			
総計	14,700,000	1,680,000	16,380,000

## 研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・環境関連化学

キーワード：生分解性プラスチック、リサイクル、プラスチック分解菌、メタゲノム

## 1. 研究開始当初の背景

プラスチック廃棄物の再資源化技術のうち、モノマーリサイクルは、一次生産品と全く同等のプラスチック製品を再生することができる利点がある。特に生分解性プラスチックは、そのほとんどがポリエステル系であり、モノマーリサイクルが容易である。しかし廃棄物は「混合物」であり、一般的な化学分解ではモノマーも混合物で得られてしまう。これを解決するため、分解に酵素を用い、その高い基質特異性を利用することにより混合物の中からでも高純度のモノマーを効率よ

く取り出す新たな処理プロセスを提案した。特に、生分解性プラスチックは土壌細菌によって分解を受けてモノマー化するので、強力な分解酵素を自然界から得やすいというメリットがある。近年、メタゲノムスクリーニングと呼ばれる新たな概念と手法が広まりつつある。古典的なスクリーニングでは微生物を探すか、この方法では自然界の99%を占める培養不可能な微生物は対象とできない。そこで土壌より直接DNAを抽出し、これ(メタゲノム)を大腸菌に組み込んで発現させ、スクリーニングを

行うこととした。これまでの知見から、自然界で実際に生分解性プラスチックの分解に関わる菌の多くは培養不可能なことが明らかとなっていた。この方法で、プラスチック分解酵素遺伝子を直接取得することにより、培養不可能な分解菌から強力な分解酵素遺伝子を直接得ることができると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、酵素を用いて、混合物であるプラスチック廃棄物から分別作業を行うこと無しに、高純度のモノマーを効率よく取り出し、リサイクルに用いることを最終目的とした。具体的な目的を以下に示す。

- (1)メタゲノムスクリーニングによる新規生分解性プラスチック分解遺伝子の取得
- (2)分解遺伝子の機能強化
- (3)酵素の組み合わせによる混合物からの高純度モノマーの取得
- (4)スケールアップによる実用化への橋渡し

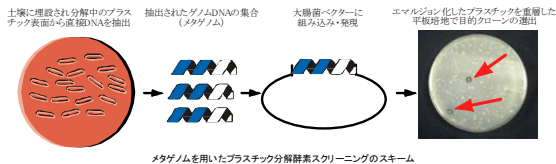
## 3. 研究の方法

### (1)メタゲノムスクリーニング

実験対象として、現在商品化されており入手可能なポリエステル系生分解性プラスチックであるポリ乳酸(PLA)を用いた。また、コンポスト中ではPLAは通常よりも容易に分解されるという知見から、スクリーニング源にはコンポストを採用した。

まず、PLA ディスクを用いたコンポストからのPLA分解菌(分解遺伝子)の集積を試みた。ディスク状に成形したPLAをコンポストへ埋設し、65℃にて10日間静置した後、PLAディスクを採取し、その表面に付着した菌のDNAを直接抽出した。

次に、取得したDNAを制限酵素にて限定分解し、汎用ベクターを用いたメタゲノムライブラリーを構築した。PLA分解活性のスクリーニングは、PLAエマルジョンを重ね層したLuria-Bertani (LB)寒天培地上で、clear zone形成能を有する株を検出することにより行った。



### (2)分解酵素遺伝子の改変と機能強化

得られた分解遺伝子の内、互いに相同性のあるものを用いてDNAシャッフリングを行い、機能強化が見られた変異体を取得した。さらに、これらに error-prone PCR を用いてラン

ダムに変異を導入し、機能が強化された変異体をスクリーニングした。機能強化株に選定に当たっては、ポリエステル分解活性、および熱安定性を指標とした。

- (3)プラスチック分解酵素の大量生産  
ジャーファーメンターによる大量培養、および酵素の大量生産を行った。

## 4. 研究成果

### (1)メタゲノムスクリーニング

メタゲノムライブラリー約40,000株をスクリーニングした結果、PLA分解活性を示す株を7株取得した。その株が有するプラスミドをそれぞれpLA-M4, 5, 7, 8, 9, 10, 11とした。

各プラスミドの有するinsert DNAの塩基配列を決定し、BLASTX検索を行った。その結果、PLA分解酵素遺伝子と思われるORFを見出し、これらをそれぞれ *plaM4*, 5, 7, 8, 9, 10, 11とした。これらの遺伝子はいずれも *Bacillus* 属の lipase 遺伝子と最も高い相同性を示したが、アミノ酸配列においても50%以上の相同性を示す既知遺伝子は見られず、新規な分解遺伝子であると推定された。

これらのうち、*plaM4*を発現ベクター導入し、大量発現および発現タンパク質の精製を行った。精製P1aM4は70℃において最も高いエステラーゼ活性を有し、50℃にて2時間のインキュベーションを行った後でも、その活性を70%保持していた。このことから、P1aM4は熱安定性のPLA分解酵素であることが明らかとなった。

これまでにポリ乳酸の分解菌は数多く報告されているが、分解酵素や遺伝子を特定したものは少ない。さらに、メタゲノムスクリーニングで取得した例は本研究が初めてであり、この研究分野へのインパクトは大きい。さらに、スクリーニングに当たって土壌に埋設したプラスチック表面微生物叢のDNAを用いることにより、分解遺伝子のヒット率を向上させた。そこで、得られた遺伝子のみならずスクリーニング方法についても特許出願した。

### (2)分解酵素遺伝子の改変と機能強化

得られた生分解性プラスチック分解酵素遺伝子(*plaM4*)について、遺伝子改変による機能強化を行った。同時に取得した*plaM4*と約90%の相同性を示す*plaM5*遺伝子を用いてDNAシャッフリングを行った。PLAは高温条件下では非酵素的に加水分解を起こしやすい高分子ポリマーであるため、高温条件下で放置するとPLAは自然に低分子化し、分解性は向上する。そこで、60℃以上の高温条件下でもその長期間活性を失わないP1aM4変異体を取

得することを目的とし、熱安定性の向上に重点を置いて変異体のスクリーニングを行った。その結果、ライブラリー570株から、27株の熱安定性向上候補株が得られた。これら27株を培養後超音波破碎により粗酵素液を得、60°Cで2時間の熱処理後の残存活性を測定した。controlとして用いた native PlaM4の残存活性と比較した結果、その多くに耐熱性の向上が認められ、特に D7, F2 の2種の変異体は全く失活が見られず、きわめて高い熱安定性を持つことが明らかとなった。

また、研究室保存の既存のプラスチック分解酵素遺伝子についても同様の検討を行った。*Paenibacillus amylolyticus* TB-13株由来ポリ乳酸分解遺伝子(*plaA*)にランダム変異を導入したところ、野生型の30倍の熱安定性を持つ変異遺伝子を有する大腸菌クローン(S2株)を得た。これをもとに更なる改変をおこなった結果、S2よりも熱安定性が3倍向上した変異タンパク、およびポリ乳酸分解性が7倍向上した変異タンパクを得た。これらの変異箇所を解析した結果酵素活性および熱安定性に関与するアミノ酸の位置が推定された。

今回確立された方法は他のプラスチック分解酵素にも応用可能であり、今後の本分野の発展に寄与すると考えられる。

### (3) プラスチック分解酵素の大量生産

ジャーファーメンターによる大量培養、および酵素の大量生産を行った。

### (4) 新規生分解性プラスチックに対する分解性の検討

近年、これまでの生分解性プラスチックの欠点を解消するために、従来脂肪族のみで構成されていたポリマー鎖の一部を芳香族ジカルボン酸に置き換えた脂肪族-芳香族ポリエステル系生分解性プラスチックが相次いで開発されている。今後このタイプのプラスチックが普及した場合に備え、保有している各種分解菌・酵素・遺伝子を用いて分解性の検討を行った。その結果、*Leptothrix* sp. TB-71株が脂肪族-芳香族ポリエステル系生分解性プラスチックをモノマーまで分解可能であり、かつ本菌株由来の一つの酵素がそれを行うことが明らかになった。また、イソフタル酸エステルはテレフタル酸に比較して分解性が遅い事が明らかとなった。また、新たに自然界から分解菌を2株取得した。これらは脂肪族-芳香族ポリエステル系生分解性プラスチックを分解したが、分解産物はオリゴマーであり、新規な酵素であると考えられた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計8件)

1) T. Nakajima-Kambe, K. Toyoshima, C. Saito, H. Takaguchi, Y. Akutsu-Shigeno, M. Sato, K. Miyama, N. Nomura, H. Uchiyama: Rapid Monomerization of Poly(Butylene succinate)-*co*-(Butylene adipate) by *Leptothrix* sp., *J. Biosci. Bioeng.*, *in press* (2009)、査読有

2) Mayumi, D., Y. Akutsu-Shigeno, H. Uchiyama, N. Nomura, T. Nakajima-Kambe: Identification and characterization of novel poly(dl-lactic acid) depolymerases from metagenome. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 79, 743-750 (2008)、査読有

3) 中島(神戸)敏明: 土壌中における生分解性プラスチックの分解と微生物叢~新規分解遺伝子の発見と利用. *日本生物工学会誌*, 85, 261-263 (2007)、査読無

4) Yoshida, N., T. Nakajima-Kambe, K. Matsuki, T. Shigeno: Novel plasmid transformation method mediated by chrysolite, sliding friction, and elastic body exposure. *Anal. Chem. Insights*, 2, 9-15 (2007)、査読有

5) Akutsu-Shigeno, Y., Y. Adachi, C. Yamada, K. Toyoshima, N. Nomura, H. Uchiyama, T. Nakajima-Kambe: Isolation of a bacterium that degrades urethane compounds and characterization of its urethane hydrolase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 70, 422-429 (2006)、査読有

6) Jin, H., T. Nakajima-Kambe, Y. Akutsu-Shigeno, M. Nakashima, T. Shigeno, N. Nomura, H. Uchiyama: Effects of polylactate ester-type time-release electron donor on generating and maintaining reductive condition in river sand microcosms. *Chikasu Gakkai Si*, 47, 323-332 (2005)、査読有

7) Jin, H., T. Nakajima-Kambe, Y. Akutsu-Shigeno, M. Nakashima, T. Shigeno, N. Nomura, H. Uchiyama: Isolation and characterization of bacteria that degrade poly(lactic acid-glycerol ester)-type time-release electron donor for accelerated biological reductive dechlorination. *Macromol. Symp.*, 224,

155-166 (2005)、査読有

8) 中島(神戸)敏明：プラスチック分解菌とモノマーリサイクル。プラスチック, 57, 52-55, 2005、査読無

〔学会発表〕(計19件)

1) 市橋 文恵、齋藤 知佳、野村 暢彦、内山 裕夫、中島 敏明  
新規脂肪族芳香族ポリエステル系生分解性プラスチックの微生物分解  
日本農芸化学会 2009 年度大会、2009 年 3 月 27~29 日 (福岡)

2) 齋藤 知佳、野村 暢彦、内山 裕夫、中島 敏明  
*Leptothrix* sp. TB-71 株が生産する二種のエステラーゼについて  
日本農芸化学会 2009 年度大会、2009 年 3 月 27~29 日 (福岡)

3) 佐々木 博之、眞弓 大介、野村 暢彦、内山 裕夫、中島 敏明  
メタゲノム由来ポリ乳酸分解酵素の熱安定性の改変  
日本農芸化学会 2009 年度大会、2009 年 3 月 27~29 日 (福岡)

4) *in situ* 集積法によるメタゲノムスクリーニングの効率化の検討  
三ツ橋 恭平、眞弓 大介、茂野 俊也、野村 暢彦、内山 裕夫、中島 敏明  
日本微生物生態学会第 24 回大会、2008 年 11 月 25~28 日 (札幌)

5) 市橋 あい、本多 陽子、鈴木 慶子、野村 暢彦、中島 敏明、内山 裕夫  
難培養性微生物のコロニー化に関する培養条件の予備検討  
日本微生物生態学会第 24 回大会、2008 年 11 月 25~28 日 (札幌)

6) 佐々木 博之、眞弓 大介、野村 暢彦、内山 裕夫、中島 敏明  
メタゲノム由来ポリ乳酸分解酵素の熱安定性の改変  
日本農芸化学会 2008 年度大会、2008 年 3 月 26~29 日 (名古屋)

7) 市橋 文恵、野村 暢彦、内山 裕夫、中島 敏明  
新規脂肪族芳香族ポリエステル系生分解性プラスチックの微生物分解  
日本農芸化学会 2008 年度大会、2008 年 3 月 26~29 日 (名古屋)

8) 齋藤 知佳、野村 暢彦、内山 裕夫、中島 敏

明

*Leptothrix* sp. TB-71 株由来 PBSA depolymerase の生産条件の検討  
日本農芸化学会 2008 年度大会、2008 年 3 月 26~29 日 (名古屋)

9) 北本 宏子、多胡 香奈子、曹 曉紅、小坂 橋 基夫、對馬 誠也、森田 友岳、中島 敏明  
葉面生息酵母は生分解性プラスチックを効率よく分解する  
日本生物工学会平成第 59 回大会、2007 年 9 月 25~27 日 (広島)

10) Hironori Sakamoto, Hiroko Kitamoto, Motoo Koitabashi, Ken Suzuki, Jun Tabata, Atsushi Mochizuki, Toshiaki Nakajima, Takeshi Fujii<sup>a</sup> and Seiya Tsushima  
Search of biodegradable plastic-degrading microorganisms from alimentary canals and body surfaces of insects  
4th Asia-Pacific Conference on Chemical Ecology 2007 年 9 月 10 日 (つくば)

11) 中島敏明、吉田ナオト  
微生物生態学からの基礎・応用研究の展開  
日本微生物生態学会第 22 回大会、2006 年 10 月 27~30 日 (東京)

12) 土屋 未来、結城 裕子、野村 暢彦、内山 裕夫、中島 敏明  
土壌に埋設したプラスチック表層の微生物群集動態の解析  
日本微生物生態学会第 22 回大会、2006 年 10 月 27~30 日 (東京)

13) 菅江 理子、眞弓 大介、野村 暢彦、内山 裕夫、中島 敏明  
ポリ乳酸分解酵素の進化工学的改変  
日本生物工学会平成第 58 回大会、2006 年 9 月 11~13 日 (大阪)

14) 中島 敏明  
土壌中におけるプラスチック分解と微生物叢~新規分解遺伝子の発見と利用  
日本生物工学会平成第 58 回大会、2006 年 9 月 11~13 日 (大阪)

15) 中島 敏明  
プラスチック分解遺伝子の探索とリサイクルへの利用  
日本生物工学会平成第 57 回大会、2005 年 11 月 15~17 日 (つくば)

16) 眞弓 大介、坪 (茂野) ゆき枝、野村 暢彦、内山 裕夫、中島(神戸) 敏明  
メタゲノム由来新規生分解性プラスチック分解酵素遺伝子の性質

日本生物工学会平成第 57 回大会、2005 年 11 月 15～17 日（つくば）

17)高口 均, 坪 (茂野) ゆき恵, 野村 暢彦, 内山 裕夫, 中島 敏明

*Leptothrix* sp. 3A 株由来プラスチック分解酵素の諸性質

日本生物工学会平成第 57 回大会、2005 年 11 月 15～17 日（つくば）

18)佐藤 愛美, 坪 (茂野) ゆき枝, 野村 暢彦, 内山 裕夫, 中島 (神戸) 敏明

*Leptothrix* sp. 3A 株由来 PBSA デポリメラーゼの解析

日本生物工学会平成第 57 回大会、2005 年 11 月 15～17 日（つくば）

19)結城裕子・土屋未来・野村暢彦・内山裕夫・中島敏明

ローンライブラリー法による埋設プラスチック表層の微生物叢解析

日本微生物生態学会第 21 回大会、2005 年 10 月 30～11 月 2 日（福岡）

〔図書〕（計 1 件）

渡邊信・西村和子・内山裕夫・奥田徹・加来久敏・広木幹也 編（中島敏明：共著）朝倉書店、微生物の辞典、576 頁（全 752 頁）2008 年

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：生分解性プラスチック分解酵素をコードする遺伝子の取得方法、それにより得られる新規遺伝子および酵素

発明者：中島敏明、茂野ゆき枝

権利者：筑波大学

種類：特許権

番号：特願 2005-142231

出願年月日：2005 年 5 月 16 日

国内外の別：国内

○取得状況（計 8 件）

名称：新規プラスチック分解菌

発明者：中島敏明、茂野ゆき枝

権利者：科学技術振興機構

種類：特許権

番号：特許 4214372

取得年月日：2009 年 1 月 28 日

国内外の別：国内

名称：新規ウレタン結合分解菌

発明者：中島敏明、茂野ゆき枝

権利者：科学技術振興機構

種類：特許権

番号：特許 226701

取得年月日：2008 年 12 月 23 日

国内外の別：国外（インド）

名称：エステル結合含有プラスチック分解微生物、プラスチック分解酵素および該酵素をコードするポリヌクレオチド

発明者：中島敏明、茂野ゆき枝

権利者：科学技術振興機構

種類：特許権

番号：特許 4117646

取得年月日：2008 年 7 月 16 日

国内外の別：国内

名称：新規ウレタン結合分解菌

発明者：中島敏明、茂野ゆき枝

権利者：科学技術振興機構

種類：特許権

番号：特許 4062520

取得年月日：2008 年 3 月 19 日

国内外の別：国内

名称：新規ウレタン結合分解菌

発明者：中島敏明、茂野ゆき枝

権利者：科学技術振興機構

種類：特許権

番号：特許 ZL200480001867.3

取得年月日：2007 年 9 月 19 日

国内外の別：国外（中華人民共和国）

名称：新規ポリエステル系プラスチック分解酵素およびその酵素をコードするポリヌクレオチド

発明者：中島敏明、茂野ゆき枝

権利者：科学技術振興機構

種類：特許権

番号：特許 3984616

取得年月日：2007 年 10 月 3 日

国内外の別：国内

名称：新規ポリエステル系プラスチック分解菌

発明者：中島敏明、茂野ゆき枝

権利者：科学技術振興機構

種類：特許権

番号：特許 3984615

取得年月日：2007 年 10 月 3 日

国内外の別：国内

名称：新規ウレタナーゼ

発明者：中島敏明、茂野ゆき枝

権利者：科学技術振興機構

種類：特許権

番号：特許 3899080

取得年月日：2007 年 3 月 28 日

国内外の別：国内

[その他]  
ホームページ等  
<http://www.sakura.cc.tsukuba.ac.jp/~toshi/pages/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中島 敏明 (NAKAJIMA-KAMBE TOSHIAKI)  
筑波大学・大学院生命環境科学研究科・准教授  
研究者番号：80241777

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし