

令和 3 年 6 月 28 日現在

機関番号：52201
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2017～2020
課題番号：17K12852
研究課題名（和文）低炭素社会を実現するポリマー分解微生物のハイスループットスクリーニング法の開発

研究課題名（英文）Development of a high-throughput screening method of polymer degrading microorganisms for realization of low carbon society

研究代表者
高屋 朋彰（Kouya, Tomoaki）

小山工業高等専門学校・物質工学科・准教授

研究者番号：90515553
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、多孔質膜と発色試薬を組み合わせることでポリマー分解微生物を高感度で迅速に探索することが可能なハイスループットスクリーニング法の開発を行った。また、開発したハイスループットスクリーニング法を用いて、脂肪族ポリエステル（poly(butylene succinate-co-adipate) (PBSA) など）やポリオレフィン（poly(cis-1,4-isoprene) (PIP)）を対象とした微生物による各種ポリマーの分解性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

土壌から、PIPやPBSAを唯一の炭素源として増殖した微生物（主に放線菌）を複数種類単離した。単離した放線菌を用いて、複数種類のポリマーを対象としたハイスループットスクリーニング法による分解性試験を行い、その分解性についてGel Permeation Chromatography (GPC) による評価を行った。その結果、ハイスループットスクリーニング法を用いた分解処理によって、短期間でPIPの低分子化やPBSAやPCLの分解を評価することが可能となった。これらの研究成果は、産業利用される種々の汎用ポリマーの資源循環や環境保全に貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed the high-throughput screening (HTS) method by using microporous membrane and chromogenic substrate in combination that rapidly isolate the polymer degrading bacteria from soil. In addition, we investigated biodegradation of several polymers such as aliphatic polyester (poly (butylene succinate-co-adipate) (PBSA), etc.) and polyolefin (poly (cis-1,4-isoprene) (PIP)) by actinomycetes using HTS method.

研究分野：生物材料工学、生物機能工学、微生物工学

キーワード：放線菌 可視化 ポリオレフィン ハイスループットスクリーニング 脂肪族ポリエステル 生分解
低炭素社会

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

近年、バイオマス由来の発酵イソプレンによるオレフィン系ポリマー(合成ゴム)の開発など、低炭素・循環型社会の実現に向けた枯渇性資源の消費量削減、再生可能資源からのバイオベースポリマーの生産を目指した研究・産業の創成が切望されている。一方、世界のプラスチック・ゴム市場(31,600万t(2012年))に占めるバイオベースポリマーの割合はわずか3.7%(1,200万t(2012年))であり、また、その生産には多くの課題(生産コストの低減など)が残っているため、化石資源ベースポリマーの需要はいまだ大きい。さらに、バイオベースポリマーによる炭素循環の課題点として、①生産・輸送時に化石資源ベースの原材料やエネルギーが用いられてCO₂が増加する、②CO₂を吸収するためのバイオマス資源が減少の一途を辿っている(世界の森林面積の減少率:520万ha/年)、などが挙げられる。これらのポリマーの焼却処理を経由せずにバイオマス資源へのCO₂吸収負荷を軽減できる、環境負荷の少ない新規な資源循環の構築が求められており、難分解性ポリマーとして知られていたポリエチレンテレフタレート(PET)の分解微生物が報告されるなど、微生物を用いてポリマーを分解・変換する技術が脚光を浴びている。

2. 研究の目的

種々のポリマーを分解する微生物として、酵母、枯草菌、放線菌などが報告されている。また、著者らはこれまで従来のポリマー分解微生物の探索法であるハロー法を用いて、脂肪族ポリエステル的一种であるpoly(butylene succinate-co-adipate)(PBSA)を分解する微生物の単離に成功している。従来のハロー法では寒天培地への混釈が必要のため、ポリマーの種類ごとに乳化させる技術の検討が必要であり、また、寒天培地に混釈したポリマーの抽出や分解性評価が煩雑であった。また、ポリマーを土中に埋没してその分解性を評価する方法では、長期間の分解処理ののちに重量損失や材料強度の測定などが必要である。そこで本研究では、ポリマーを分解する微生物の迅速な『可視化』・『分解性評価』が実施できるハイスループットスクリーニング(HTS)法としてのワンポット法を開発し、また、本手法を用いてポリマー分解性を評価することを目的とした。具体的には1.ポリマー分解微生物の『可視化』と『分解性評価』を実現するワンポット法の開発、2.ポリマー分解微生物の迅速な探索および分解性の評価、3.様々なポリマーの経時的な分解性評価によるハイスループットスクリーニング法の高度化、について検討した。

3. 研究の方法

(1) ポリマー分解微生物を可視化する検出指示薬の検討

脂肪族ポリエステルの分解を検出する指示薬として、エステラーゼを対象とした発色基質(酢酸インドキシル)を用いた。また、poly(cis-1,4-isoprene)(PIP)の分解を検出する指示薬として、アルデヒド検出指示薬(Schiff試薬)、酸化還元指示薬(3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine, dihydrochloride, dihydrate)(TMBZ HCl)、N,N'-Bis(2-hydroxy-3-sulfopropyl)tolidine, disodium salt, tetrahydrate(SAT-3)、N-Ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3,5-dimethylaniline, sodium salt, monohydrate/4-aminoantipyrine(MAOS-4AA)、pH指示薬(プロモクレゾールパープル、フェノールレッド、ニュートラルレッド)を用いた。

(2) ポリマー分解微生物の単離・同定

合成寒天培地(W培地)とポリマー(PBSAまたはPIP)を組み合わせたポリマー分解微生物の単離を行った。培養は72h-120hの好気培養を行った。単離した菌株はISP-2培地を用いて再度培養した後、DNA抽出およびPCRによる増幅を行い、16S rRNA遺伝子配列を決定した。既存菌種の塩基配列との相同性検索は、GenBank/EMBL/DDBJデータベースを利用して行った。

(3) ワンポット法によるポリマー分解性の評価

熱誘起相分離法を用いてPBSAの多孔質膜を作製し、ワンポット法による分解性の評価を行った。合成寒天培地(W寒天培地)の上に、作製したPBSA膜(70%エタノールで15min消毒した後、滅菌水に15min浸漬)を設置し、前培養した菌株をPBSA膜上に播種して好気培養を行った。培養0日、4週間、8週間のサンプルについて、形態学的観察および走査型電子顕微鏡(SEM)による観察を行った。

(4) ガラスろ紙をポリマーの支持体としたワンポット法の高度化およびポリマー分解性の評価

① ガラスろ紙(難培養性足場材料)を支持体とした多孔質ポリマー膜の作製

ガラスろ紙(GA-55, ADVANTEC)へ各ポリマーのコーティングを行った。poly(butylene succinate-co-adipate)(PBSA)、polycaprolactone(PCL)、poly(L-lactic acid)(PLLA)、poly(cis-1,4-isoprene)(PIP)は、1wt%となるように常温でdichloromethaneに溶解させた。polyhydroxybutyrate(PHB)は、1wt%となるように50°Cでchloroformに溶解させた。調製した各ポリマー溶液にガラスろ紙を浸漬した後、取り出して金属網上に設置し、完全に溶媒がなくなるまでドラフト内

で風乾した。

②ポリマーコーティングしたガラスろ紙を用いたワンポット法によるポリマー分解性の評価

合成寒天培地 (W 培地) 上に各ポリマーをコーティングしたガラスろ紙 (70%エタノールで 15min 消毒, 滅菌水に 15 min 浸漬した後, さらに前培養した菌液 (集菌・洗浄処理済) に浸漬して 菌を播種) を設置し, 好気培養を行った。培養 0 日, 2 週間, 4 週間, 8 週間のサンプルについて, 形態学的観察, 走査型電子顕微鏡 (SEM) による観察, および Gel Permeation Chromatography (GPC) による分子量分布を評価した。

(5) 走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いた多孔質ポリマー膜の観察

ワンポット法で培養を行った多孔質膜およびポリマーコーティングしたガラスろ紙を, 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) と 20%グルタルアルデヒドを 9:1 で混合した液に 4°C で 2 h 以上浸漬し, 固定化処理を行った。サンプル片を固定化液から取り出し, 50%, 70%, 90%, および 100% エタノールに順次 15 min ずつ (合計 1h) 浸漬して, 脱水処理を行った。サンプル片を脱水液から取り出し, t-ブチルアルコールに浸漬して 4°C で一晩保管したのち, 凍結乾燥機で乾燥させた。乾燥を行ったサンプル片は, SEM 観察の直前に DC コーティング法を用いて Pt 蒸着を行った。各サンプル片の表面観察は, 走査型電子顕微鏡 (JSM-7800F, 日本電子) を用いて加速電圧 1.2 kV, 低倍率 (×200) と高倍率 (×3,000) で観察した。

(6) GPC を用いた分子量分布の測定とポリマー分解性の評価

ワンポット法で培養した各サンプルを滅菌水で洗浄して凍結乾燥した。凍結乾燥した各サンプルを 2 mL バイアル瓶に入れ, chloroform を 1 mL 添加して 50°C で 1 h の抽出処理を行ったのち, 0.20 μm の PTFE フィルターでろ過してから, GPC を用いて多孔質ポリマー膜の分子量分布を測定・評価した。ポリマーの分子量分布は, 示差屈折率 (RI) 検出器を備えた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて測定した。標準物質として chloroform に溶解したポリスチレンを用いて, クロマトグラムの保持時間およびピーク面積に基づいた較正曲線 (検量線) を作成し, ポリマーの分子量分布を評価した。カラムとして Shodex® GPC K-806L および Shodex® GPC K-802 (昭和電工) を 1 本ずつ連結して用いた。移動相 (溶媒: chloroform) の流速は 1.0 mL/min とし, カラムの温度は 40°C とした。数平均分子量 (M_n), 重量平均分子量 (M_w), および分子量分布 (M_w/M_n) を測定した。測定はそれぞれのサンプルについて 3 回ずつ行った。

4. 研究成果

(1) ポリマー分解微生物を可視化する検出指示薬の検討

エステラーゼを対象とした発色基質 (酢酸インドキシル) を 100 ppm で用いた場合, 合成寒天培地上で生育し PBSA を分解する放線菌や根圏菌を分離することが可能となった。PIP を分解する微生物の検出指示薬として用いた酸化還元指示薬 (TMBZ HCl, SAT-3, MAOS-4AA) や pH 指示薬 (プロモクレゾールパープル, フェノールレッド, ニュートラルレッド) では, 増殖した微生物の周囲の発色を確認することができなかった。そこで培養したサンプルから微生物を単離した後, Schiff 試薬によりサンプルの後染色を行った結果, PIP の生分解時に生じるアルデヒド基を検出することが可能となった。

(2) ポリマー分解微生物の単離・同定

PIP を唯一の炭素源として培養した結果, これまで分離していた 5 菌株 (放線菌 (*Streptomyces werraensis*, *Streptomyces flaveolus*, *Streptomyces* sp.) や根圏菌 (*Mesorhizobium amorphae*, *Rhizobium* sp.) の他に, 新たに 9 菌株を単離した。これらの 9 菌株はすべて放線菌 (*Streptomyces reticuli*, *Streptomyces achromogenes*, *Streptomyces rameus*, *Streptomyces* sp.) と高い相同性 (99%以上) を示した。

(3) ワンポット法によるポリマー分解性の評価

ワンポット法による多孔質 PBSA 膜の分解性評価を行った。その結果, 8 週間の好気培養を行うことによって, 各微生物 (*Streptomyces* sp., *Mesorhizobium amorphae*, *Rhizobium* sp.) を播種した多孔質 PBSA 膜は原型を留めない状態まで分解されることが, 形態学的観察および SEM 観察によって明らかとなった。しかし, PIP は老化防止剤や架橋剤, 発泡剤を用いずに多孔質化することが困難であった。また, PBSA 以外の脂肪族ポリエステルについても, それぞれのポリマーについて多孔質化の条件検討が必要となるため, ワンポット法の汎用性を高めることを目的として, 多孔質構造を有した様々なポリマー膜の簡便な作製方法について, さらなる検討を行った。

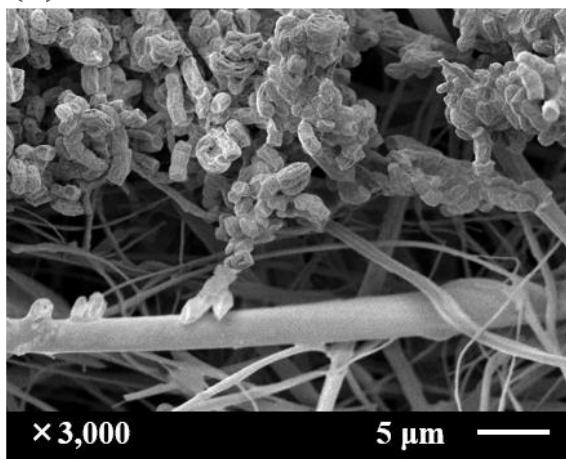
(4) ポリマーコーティングしたガラスろ紙を用いたワンポット法の改良およびポリマー分解性の評価

微生物の増殖に影響を与えず, かつ生分解されない難分解性の多孔質構造の支持体としてガラスろ紙を選択した。各ポリマー (PIP, PBSA, PCL, PLLA, PHB) を溶解させた 1wt% のポリマー溶液に浸漬・風乾させることによって, ポリマーコーティングしたガラスろ紙の作製に成功

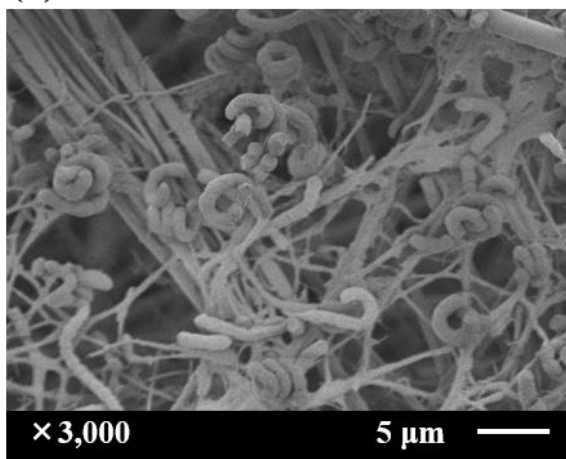
した。作製した膜を唯一の炭素源として、単離・同定した放線菌 (*Streptomyces* sp. ONCT 10002 株) を播種し、改良したワンポット法による各ポリマーの分解性評価を行った。その結果、SEM 観察によって *Streptomyces* sp. ONCT 10002 株は複数のポリマー (PIP, PBSA, PCL) においてらせん状の形態で増殖し、培養 2 週目にはその生育を確認することが可能であった (図 1, (A) ~ (C))。一方、今回の培養期間では PLLA や PHB の分解性は観察されなかった。また、GPC を用いて分子量分布を評価した結果、*Streptomyces* sp. ONCT 10002 株を播種しなかったコントロールの場合、培養 0 日目の Mn は 286,391, Mw は 940,128, 培養 2 週目の Mn は 259,581, Mw は 783,133, 培養 4 週目の Mn は 225,364, Mw は 618,842, 培養 8 週目の Mn は 188,874, Mw は 662,982 であり、また、培養期間における Mw/Mn は 2.75~3.51 の間であったことから、培養 8 週目においても顕著な分解性は確認されなかった。一方、*Streptomyces* sp. ONCT 10002 株を播種した場合、培養 0 日目の Mn は 264,295, Mw は 835,014, Mw/Mn は 3.16 であり、コントロールの場合とほぼ同等の値であったのに対し、培養 2 週目の Mn は 41,829, Mw は 269,213, Mw/Mn は 6.44, 培養 4 週目の Mn は 26,390, Mw は 243,395, Mw/Mn は 9.22, 培養 8 週目の Mn は 19,362, Mw は 181,260, Mw/Mn は 9.36 となった。このことから、培養 2 週目から PIP の低分子化を経時的に確認することができ、培養 8 週目まで低分子化が進行されていることが明らかとなった。また、*Streptomyces* sp. ONCT 10002 株を播種した PBSA や PCL は GPC による分析では培養 4 週目に不検出となったことから、これらのポリマーは生分解されたことが示唆され、*Streptomyces* sp. ONCT 10002 株は複数のポリマー (PIP, PBSA, PCL) の分解能を有していることが明らかとなった。

以上の結果から、ガラスろ紙 (難分解性足場材料) を支持体としたポリマーコーティングを行うことで、多孔質化が困難なポリマーに対しても改良したワンポット法によるハイスループットな分解性の評価が可能となった。本手法は、培地の種類、培養温度、通気条件 (酸素要求性)、光・紫外線の影響などを自在に調節した培養が可能であることから、今後は土中や水中など様々な環境に存在するポリマー分解微生物の探索やその分解性評価を進めていく予定である。

(A) PIP



(B) PBSA



(C) PCL

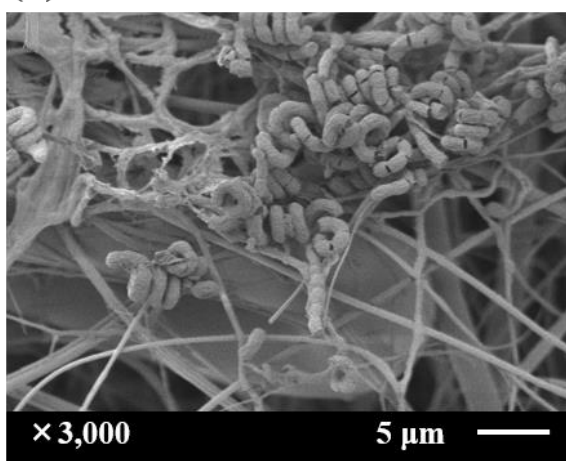


図 1 改良したワンポット法を用いて 2 週間培養した各ポリマーの分解性評価

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 田谷明香, 高屋朋彰
2. 発表標題 難分解性足場材料を支持体としたポリマー分解微生物の迅速評価法の開発
3. 学会等名 第6回関東磐越地区化学技術フォーラム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomoaki Kouya, Kei Nishii, and Satoru Izawa
2. 発表標題 Development of a new screening method for detection of polymer-degrading bacteria
3. 学会等名 10th International Conference of Modification, Degradation and Stabilization of Polymers (MoDeSt 2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高屋 朋彰, 伊澤 悟, 西井 圭
2. 発表標題 ポリマー分解細菌の迅速検出と生分解能評価のための新しいスクリーニング法の開発
3. 学会等名 第4回北関東磐越地区化学技術フォーラム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 福田 貴大, 和氣 佳洋, 吉川 宗孝, 倉持 圭佑, 伊澤 悟, 西井 圭, 加島 敬太, 飯島 道弘, 高屋 朋彰
2. 発表標題 ポリ(cis-1,4-イソブレン)分解微生物の探索および新規生分解評価法の検討
3. 学会等名 第3回北関東磐越地区化学技術フォーラム
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------