

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 28 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2011～2015

課題番号：23510110

研究課題名(和文) 生分解性高分子周辺環境における微生物生態系解析と微生物叢制御

研究課題名(英文) Control and analyses of microbiota that exist in the surface region of biodegradable polymers

研究代表者

粕谷 健一 (KASUYA, KENICHI)

群馬大学・理工学府・教授

研究者番号：60301751

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、農業資材に利用可能な生分解性高分子材料を開発するために、生分解性高分子と表面上の分解微生物叢との関係を解明した。生分解性高分子の多くは植物病原菌によっても分解することが知られている。一方、本研究で、生分解性高分子の一種である脂肪族芳香族ポリエステル分解時の表面微生物叢をメタゲノム解析により経時的に解析したところ、7ヶ月後には病原菌が検出された。一方、この土壌を用いて、植物を育成したところ全く影響しないことがわかった。

研究成果の概要(英文)：In this study, to develop novel biodegradable polymers that could use as agricultural gears, we investigated the relationship between biodegradable polymers and polymer-degrading microbiota. A kind of biodegradable polymers are also degraded by plant-pathogens. Phylogenetic analyses of metagenome on the surface of biodegradable polymers revealed that some plant-pathogens appeared on the soil after incubation at 30 degree celsius for 7 months. On the other hand, the growth on a plant was never effected by the soil.

研究分野：高分子科学, 微生物学

キーワード：生分解性高分子 酵素 微生物 微生物叢

様式 C-19、F-19、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1)合成高分子材料は、機械的性質の向上を目指して開発されてきたために、その廃棄物の処理処分が問題となってきた。これに対して、平成12年に施行された循環型社会形成推進基本法において、これらのプラスチック廃棄物は、(a)減容化、(b)再使用、(c)リサイクル、(d)サーマルリサイクル、および(e)適性処分の順序で処理されるべきであると定められ、社会においても共通の認識ができてきた。一方で、使用後、回収困難な用途(漁網、農業資材、環境資材)においては、環境中で生分解する「生分解性高分子材料」の使用が望ましい。日本においては、日本バイオプラスチック協会が、生分解性を有する高分子材料商品に対して、JIS6950や、毒性基準など、いくつかの規格を設けて、それをパスしたものに対して、グリーンプラマークを与えている。その中でも、農業用資材は最もマーク取得数が多く、特に農業用マルチフィルム(土壌被覆フィルム)に関しては、同マークを取得している生分解性製品が1割に達している。

(2)生分解性高分子材料が、生分解される際に、まず環境中でその表面に分解微生物が付着し、さらにそれらの分解微生物の生産する分解酵素により生分解することがわかっている。つまり、環境中で生分解性高分子材料表面においては、図に示すように、分解微生物が関与する生分解経路Iおよび分解酵素が関与する生分解経路IIを経て、分解が起こっていることになる。現在までに、生分解性高分子の種類(構造)とそれらに対応する分解微生物種との間に、特異的な相関があることが報告されている。

(3)一方で、生分解性高分子材料をマルチフィルムなどの農業用資材として使用する場合には、これを分解する微生物種に注意する必要がある。例えば、生分解性高分子であるポリ(ε-カプロラクトン)(PCL)は、その構造が植物表層のクチクラに類似しているために、ある種の植物病原真菌がPCL分解種の一つとなることが報告されている。つまり、農業用途生分解性高分子では、種々の生分解性高分子材料と外部環境(土壌)との界面における対応微生物叢を十分に理解し、制御する必要がある。

2. 研究の目的

(1)現在までに我々は、生分解性高分子である、脂肪族ポリエステル類の分解微生物種を分子系統学的に調査してきた。また、現在は、生分解性高分子材料の生分解性速度制御という観点から、界面微生物叢を制御すべく研究を進めている。

(2)本研究では、生分解性高分子の農業用途利用の観点から、種々の生分解性高分子の環境分解時における、生分解性高分子圏の環境微生物叢を解明することを目的とする。さらには、これらの知見に基づいて、作物の増産に寄与するような環境(土壌)微生物叢を環境中に形成するための基材としての機能を有する、生分解性高分子材料開発を行う。

3. 研究の方法

(1)生分解性高分子圏の微生物叢群集解析。生分解性高分子材料のうち最もよく利用されている脂肪族芳香族ポリエステル(ポリブチレンテレフタレートアジペート(PBTA))を、基質として土壌環境下における分解時の界面微生物叢変化を、ポリメラーゼチェーンリアクション-変性濃度勾配ゲル電気泳動(PCR-DGGE; Muyzerら *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 695-700, 1993)法により経時的に調べた。この際、生分解性高分子圏に形成されるバイオフィルムマトリクス量を、クリスタルバイオレット法により定量した。これらに実験から、生分解性高分子の種類と、その表面環境に形成される微生物群集構造との相関を明らかにする。

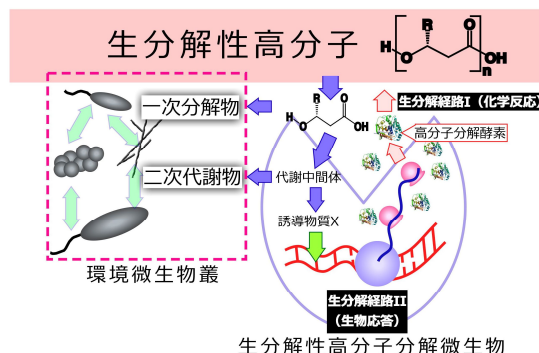


図1. 生分解性高分子圏の生態系

(2)生分解性高分子圏(微生物-高分子分解物間)ケミカルコミュニケーションの解析
材料の生分解の際、材料界面に形成される微生物叢(バイオフィルム)と材料間(低

分子オリゴマーおよび高分子材料表面)でのケミカルコミュニケーションに関わる化合物(図1.の一次分解物、および二次代謝物に相当する物質)を、液体クロマトグラフィおよび、飛行型時間型質量分析法等により探索した。

4. 研究成果

(1)脂肪族芳香族ポリエステル PBAT は、優れた物性を有しているため農業用途としての利用可能性を有している。一方で PBAT は、現在までに植物病原性発現との相関が示唆されている酵素、クチナーゼにより分解することがわかっている。そこで、実際の PBAT 分解時の、フィルム表面、およびフィルム周辺土壌の微生物叢変化をメタゲノム解析により詳細に調べた。

(2)PBAT フィルムを土壌に埋設したところ7ヶ月間で1cm²あたり約2mg分解した。また、分子量変化を環境暴露前後で調べたところ、若干の低下が見られた。この結果は、PBAT 自体の相対的に低い生分解性速度が原因となり、塊状分解が全体の分解に影響を及ぼしていることを示唆している。また、フィルム表面の走査型電子顕微鏡像から、フィルムは時間とともに亀裂が生じ分解が進行することがわかった(図2)。

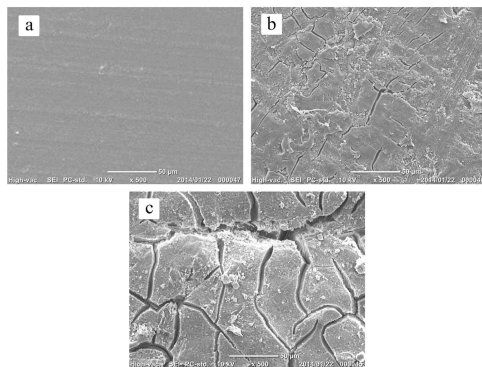


図2. a)分解前のPBATフィルム表面、b)土壌埋設3ヶ月、c)6ヶ月

(3)PBAT フィルム周辺土壌およびPBAT フィルム表面では、7ヶ月後の培養を経て約2倍程度の微生物数に差が現れた。フィルム表面は、炭素源がより豊富であり、またバイオフィルム形成におけるコンディショニングフィルム形成の基盤としての役割を果たすためにより高い微生物密度となったと考えられる。一方で、初期土壌の微生物密度と7ヶ月後のPBAT フィルム周辺土壌のそれとでは有意の差はなかった(図3)。

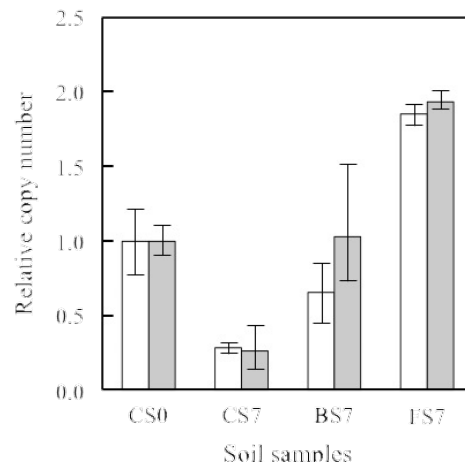


図3. 土壌の微生物数、CS0:対照土壌、CS07:7ヶ月対照土壌、BS7:7ヶ月後周辺土壌、FS7:7ヶ月後フィルム表面

(4)PBAT フィルムを含まない土壌(対照土壌)、PBAT 周辺土壌、およびPBAT フィルム表面から、それぞれメタゲノムDNAを抽出し、16S rDNA配列をターゲットとしてDGGE解析を行ったところ、PBAT フィルムを埋設後3ヶ月で、コントロール、土壌およびフィルム試料で同様なバンドが観察された。7ヶ月間のフィルム埋設後、フィルムに付着した土壌と、コントロールやPBAT埋設土壌の細菌叢と異なるバンドが出現した。これらの結果より、7ヵ月後のフィルム表面では、土壌中と異なる細菌叢が形成されていることがわかった。検出された細菌は、Firmicutes門や-プロテオバクテリア綱、-プロテオバクテリア綱、アシドバクテリア門に属していた。Firmicutes門に属する細菌としては、*Bacillus*属の微生物が、コントロール、PBAT添加土壌、およびPBATフィルム表面土壌全てから検出された。今回PBAT分解菌として*Bacillus*属の細菌を単離しており、土壌中におけるPBATの分解には*Bacillus*属の細菌が分解に関与していることが示唆された。今回検出されたバンドからは、植物病原菌に近縁な種の存在は確認されなかった。

(5)一方、真菌類の菌叢解析はITS配列をターゲットとしたPCR-DGGE法により行われた。バンド多様性は時間経過とともに失われ、集積が進んでいることがわかった。特に、フィルム表面で多様性が低下していることがわかった。検出された菌種はAscomycota門とBasidiomycota門に大別さ

れた。検出された菌の中に、植物病原菌である *Verticillium* 属と近縁な種が検出された。

(6)これらのフィルム分解後の土壌を用いて植物の育成実験を行った。その結果、植物の生育には全く影響ないことが判明した。このことから PBAT は、その分解に伴い土壌菌叢構造を変化させるものの、植物生育にとって負の効果をもたらさないことが示された。以上の結果より、PBAT は農業用生分解性資材の基材として用いることが可能であることがわかった。

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3件)

室井文篤, 橘熊野, 小林由起子, 櫻井喬典, 粕谷健一, Influences of poly(butylene adipate-co-terephthalate) on soil microbiota and plant growth, Polym. Degrad. Stabil, 129: 338-346, 2016, 査読有, 10.1016/j.polymdegradstab.

2016.05.018

宋君哲, 橘熊野, 鈴木美和, 謝文権, 粕谷健一, Identification of a poly(3-hydroxybutyrate)-degrading bacterium isolated from coastal seawater in Japan as *Shewanella* sp., Polym. Degrad. Stabil, 129: 268-274, 2016, 査読有, 10.1016/j.polymdegradstab.

2016.05.008

宋君哲, 橘熊野, 粕谷健一, Characterization of a thermolabile poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase from the marine bacterium *Shewanella* sp. JKCM-AJ-6,1, Polym. Degrad.

Stabil, 129: 212-221, 2016, 査読有, 10.1016/j.polymdegradstab.2016.04.022

粕谷健一, 室井文篤, 宋君哲, 鈴木美和, 橘熊野, ポリエステル分解酵素の構造と機能, 酵素工学ニュース, 73: 17-21, 2015年05月, 査読無, www.enzyme-eng.com/modules/pico02/index.php?content_id=80

〔学会発表〕(計4件)

粕谷健一, 鈴木美和, 稲垣佳那, 橘熊野, Environmental degradation of aliphatic polyesters, ICBP 2015, Singapore, 2015年06月26日

粕谷健一, 高分子の環境分解性発現, 14-1 エコマテリアル研究会「バイオマスプラスチックの研究最前線」, 東京, 2014年07月04日

粕谷健一, 高分子材料の分解性発現, 52回関西バイオポリマー研究会, 産総研関西センター, 2014年03月10日

室井文篤, 小林由紀子, 櫻井喬典, 橘熊野, 粕谷健一, ポリ(ブチレンアジペート-co-テレフタレート)生分解時の周辺環境微生物叢解析, 第62回高分子学会年次大会, 京都, 2013年05月29日

〔その他〕

ホームページ:

greenpolymer.chem-bio.st.gunma-u.ac.jp

6 . 研究組織

(1)研究代表者

粕谷健一 (KASUYA, Ken-ichi)
群馬大学・大学院理工学府・教授
研究者番号：6 0 3 0 1 7 5 1

(2)研究分担者

橘熊野 (TACHIBANA, Yuya)
群馬大学・大学院理工学府・助教
研究者番号：6 0 5 0 4 0 2 4