

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：82107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450502

研究課題名(和文) コスモポリタン真菌種からの生分解性プラスチック分解菌の探索と分解機構の解明

研究課題名(英文) Degradation of biodegradable plastics by cosmopolitan fungi and elucidation of degradation mechanisms

研究代表者

小板橋 基夫 (Koitabashi, Motoo)

国立研究開発法人 農業環境技術研究所・その他部局等・研究員

研究者番号：10355662

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：日本の様々な地域の試料から生分解資材の分解菌を探索した結果、167菌株の分解菌が分離された。それらを形態やITS1-5.8S rDNA領域の配列解析により同定したところ、Cladosporium属菌31株、Alternaria属菌17株、Aspergillus属菌13株のような汎存種が分離された。冷涼な気候や亜熱帯のような地理的条件に関わらず、日本各地から生ブラ分解菌が分離されることが示された。

研究成果の概要(英文)：Biodegradable plastic degrading fungi were isolated from plant surface and gasket seal of refrigerator and window. A total of 167 strains of cosmopolitan fungi were isolated in various areas of Japan (Tsukuba, Sapporo and Ogasawara Island). Those were identified by the morphological characteristics and sequence analysis of ITS1-5.8S rDNA region. The most frequently isolates, isolated every area, were Cladosporium spp. (31strains). Other genera isolated were Alternaria spp. (17strains) and Aspergillus spp. (13strains). It was demonstrated that biodegradable plastic degrading fungi were isolated from different geographical conditions, such as the cool climate and subtropical.

研究分野：微生物生態学

キーワード：生分解性資材 汎存種 真菌 マルチフィルム

1. 研究開始当初の背景

農業現場で使用済みのプラスチック廃棄物を削減するため、生分解性プラスチック(生プラ)の製品開発が行われている。しかし、生プラは分解制御が難しく、分解速度の制御は困難で、使用途中に早期に分解したり、使用後に分解が不完全な場合があるなど普及への妨げとなっている。申請者らは植物の表面のクチン層の長鎖脂肪酸エステルと、生プラ成分の有機酸ポリエステルの構造が類似していることに着目し、作物表面から生プラ分解菌を効率よく選抜する手法を開発した。申請者らは、この手法に基づき選抜した糸状菌の一種 *Paraphoma* 類縁菌が生産する生プラ分解酵素を単離し、その菌株とアミノ酸配列や遺伝子に関する特許を取得した。また、酵母の一種 *Pseudozyma antarctica* が生産する生プラ分解酵素を単離し、そのアミノ酸配列とその酵素をコードする遺伝子についても解析を行って特許を取得するなど成果をあげている。しかし、生プラ資材の分解制御の実用化に向けた技術の開発には、より強力な分解能を有する生プラ分解菌の取得が必要となっている。

2. 研究の目的

申請者が保存していた葉面から分離された糸状菌 1227 菌株の中から、55 菌株の生プラ性マルチフィルム分解菌が選抜された。分解菌には酵母や糸状菌などの真菌類が多数含まれたが、特に糸状菌には多様な種類が含まれていた。分解菌の同定を行った結果、24 属 30 種以上の種類が含まれていたが、その中には *Alternaria* 属菌、*Cladosporium* 属菌、*Fusarium* 属菌および *Penicillium* 属菌などの植物の表面以外にも土壌、室内の汚れ、空気中などから高頻度に分離される菌類が含まれていた。これらの菌は、コスモポリタン真菌種として、砂漠や極地を除く世界中の陸地のどこからでも分離される汎存種として知られている。ところが、それらの菌の中でも形態的には全く同種とされている菌株間においても、生プラ分解能が全く異なる菌株が存在していることが申請者の研究を通じて明らかになり始めている。これは、自然界にはこれまでに知られていない分解機作を有する生プラ分解菌がまだ存在している可能性を示唆しており、分離源や採集地など探索の範囲を広げ、生プラ分解制御法の開発のために、さらに強力な分解菌の探索を行うという本研究の着想に至った。

3. 研究の方法

(1) 多様な環境からの真菌類の分離と生プラ分解菌の選抜

ツバキ科やユリ科などのワックス成分が多い植物の葉面や室内の汚れ(窓枠や冷蔵庫のパッキン)などから真菌を採集した。それらの菌株を、申請者らが開発した唯一の炭素源として生プラエマルジョンを添加した、生

プラ分解菌選抜培地でスクリーニングした。分離された真菌は、形態学的観察と ITS1-5.8S rDNA 領域の塩基配列の解析によって分類・同定を行った。なお、多様な真菌を収集するため、北海道のような冷涼地や亜熱帯の離島(小笠原諸島)などの様々な環境から菌株の採集を行った。

(2) 各種生プラマルチフィルムの分解試験

生プラマルチフィルム(生プラマルチ)として使用される生プラポリマーにはポリブチレンサクシネート(PBS)、ポリブチレンサクシネート/アジペート(PBSA)、ポリ乳酸(PLA)およびポリテトラメチレンアジペート/テレフタレート(PBAT)などがあるが、その分解性はそれぞれ異なる上に、多くの生プラ製品はその組み合わせで製作されている。本申請では、まず多くの生プラマルチの原料に使われている易分解性の PBSA フィルムを用いて、分解菌の二次選抜を行った(図1)。

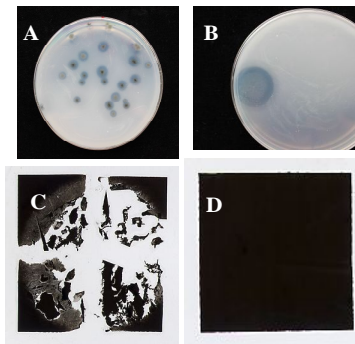


図1. 生プラ分解菌の選抜

- A: 培地による一時選抜(冷蔵庫分離菌)
- B: 培地による一時選抜(シラン分離菌)
- C: 生プラマルチによる二次選抜
- D: 無処理の生プラマルチ

(3) 分解菌の特性解析

選抜された分解菌による生プラマルチの分解の状態を、走査型電子顕微鏡を用いて微細構造の解析を行った。また、分解菌の生プラ分解酵素の特性解析のため、分解菌の選抜培地と同組成の液体培地による振とう培養によって活性のある状態の培養液の取得を行った。活性の認められた培養液については SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。

(4) 強力な分解能を持つ菌株の複数個所の遺伝子解析による同定

本研究を通して、最も強い生プラ分解能を持つ真菌は、オオムギ葉面から分離された孢子形成の認められない未同定の菌株 B47-9 であった。しかし、rDNA の解析で *Paraphoma* 属に近縁であることは明らかとなっていたが、その所属は不明のままであった。本菌の産生する酵素を圃場等に利用する場合、菌株情報として分類・同定を行うことは不可欠である。

そこで、複数の遺伝子部位の small subunit 18S rDNA (SSU)と large subunit 28S rDNA (LSU)の配列を用いた多座遺伝子座および ITS 領域の解析を最尤推定法と近隣結合法の二つの系統樹を作成し、分類的位置づけを行った。

4. 研究成果

(1) 分解菌の分類・同定

今回の研究で、各種の試料から分離された分解菌は 167 菌株であった。形態と遺伝子解析の結果により、163 菌株の分類・同定を行った。それらの菌株のうち、複数株が分離されたものを表 1 と 2 に示した。分解菌は 44 属と多岐にわたっていたが、最も多く分離されたのは *Cladosporium* 属菌で、総数 31 菌株が、全ての調査で分離された。そのほかには *Alternaria* 属菌が 17 菌株、*Aspergillus* 属菌が 13 菌株と、コスモポリタン菌として知られている菌に分解能があり、多様な環境に生育していることが明らかとなった。地域的には北海道（札幌市藻岩山）のような冷涼な地域から *Lewia* 属のような他では分離されなかった菌種が分離されたり、亜熱帯地域の小笠原諸島では、他では分離されなかった *Hortaea* 属菌が多数分離されるなどの地域的な特徴も明らかとなった。

表 1. 生ブラ分解菌の属名と分離数

菌種(属名)	総菌株数	つくば(植物)	つくば(窓)	つくば(冷蔵庫)
<i>Alternaria</i>	4	4		
<i>Chaetomium</i>	4	2	2	
<i>Cladosporium</i>	18	5	2	11
<i>Fusarium</i>	6		6	
<i>Paraconiothyrium</i>	2	2		
<i>Paraphaeosphaeria</i>	2	2		
<i>Pestalotiopsis</i>	3	3		
<i>Phoma</i>	8	5	3	
<i>Phomopsis</i>	2	2		

表 2. 生ブラ分解菌の属名と分離数

菌種(属名)	総菌株数	小笠原(植物)	小笠原(冷蔵庫)	札幌(窓)
<i>Alternaria</i>	13			13
<i>Aspergillus</i>	13	2		11
<i>Chaetomium</i>	2	2		
<i>Cladosporium</i>	13	2	5	6
<i>Epicoccum</i>	3			3
<i>Hortaea</i>	12	12		
<i>Lewia</i>	5			5
<i>Penicillium</i>	5	5		
<i>Phoma</i>	2			2

(2) 分解菌の特性調査

各種分解菌の分解様式や分解酵素の解析を行った。走査型電子顕微鏡の観察により、札幌市藻岩山から分離された *Aspergillus* 属菌の分解は、菌糸の伸長部位より幅広く分解されている様子などが観察された(図 2.) また、*Alternaria* 属菌の分解では、生ブラマルチの表面に深い溝状の分解痕が認められた(図 3.)

各種分解菌の液体培地中に産生された生ブラ分解酵素の解析を行った。分解菌を生ブラ分解菌の選抜に用いた培地から寒天を除いた液体培地中で振とう培養した結果、

Alternaria 属菌と *Penicillium* 属菌で倍地中の PBSA エマルジョンを資化して透明になる菌株が認められた(図 4.)

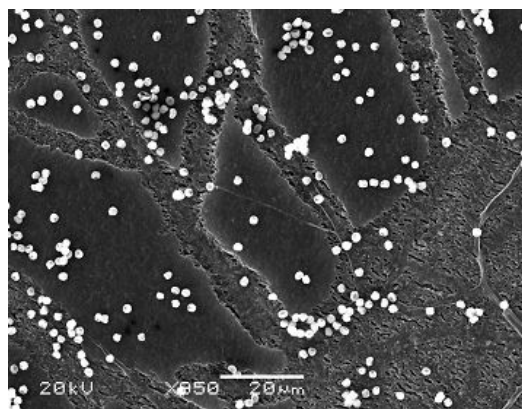


図 2. *Aspergillus* 属菌により分解された生ブラマルチ表面の微細構造

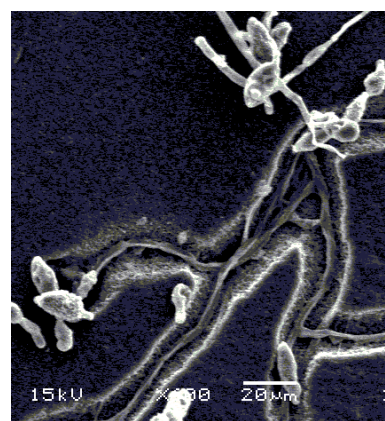


図 3. *Alternaria* 属菌により分解された生ブラマルチ表面の微細構造

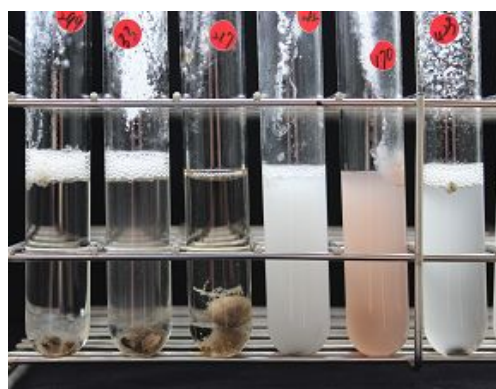


図 4. 液体培地中の生ブラ分解酵素の産生の確認

それら 3 菌株の培養液を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で解析したが、いずれの菌株においても明瞭な酵素のバンドを得ることができなかった。

(3) *Paraphoma* 属菌の分類と特性調査

今回の結果を含めて、今までの生ブラ分解真菌研究を通して、200 菌株以上の数多くの分解菌が分離された。それらの分解菌の中で、最も分解能の高かった菌株が、未同定の真菌 B47-9 であった。この菌株は PBSA より難分解

性のPBSのマルチフィルムを面積率で90%以上分解することができた。本菌は、*Phoma* 属から新しく独立された *Paraphoma* 属に近縁であると考えられたが、*Phoma* 属の分類は分生子の形成様式とその形態および分生子殻の特徴で行われており、それらを形成しない B47-9 については遺伝子解析から行う必要がある。そのため、37 菌株の類縁菌との多座遺伝子解析を SSU と LSU の二つの遺伝子配列について行った。さらに、ツルマメやホソバオケラから分離された *Paraphoma* 属菌 6 菌株を含む 23 菌株の類縁菌の ITS 領域の系統樹を作成し、B47-9 の分類・同定を行った。

多座遺伝子解析の最尤推定法の結果、B47-9 は *Paraphoma chrysanthemicola* と同じクレードに含まれていた (図 5.)。さらに ITS 領域の近隣結合法でも同様に *P. chrysanthemicola* と同じクレードに含まれた (図 6.)。以上の結果から、B47-9 は孢子形成が認められないため、完全には種の同定が困難であるが、*Paraphoma* 属菌であることはあきらかであり、ほぼ *P. chrysanthemicola* であると判断していいことが明らかになった。

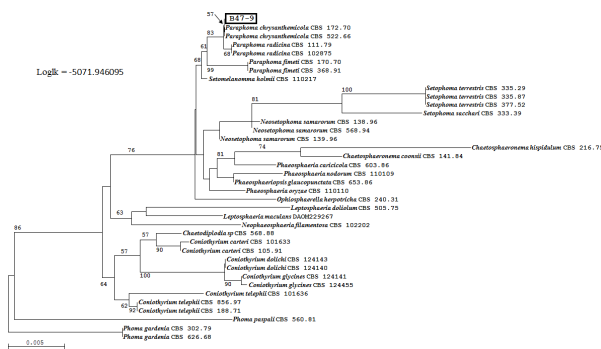


図 5. SSU と LSU 領域の最尤推定法による系統樹

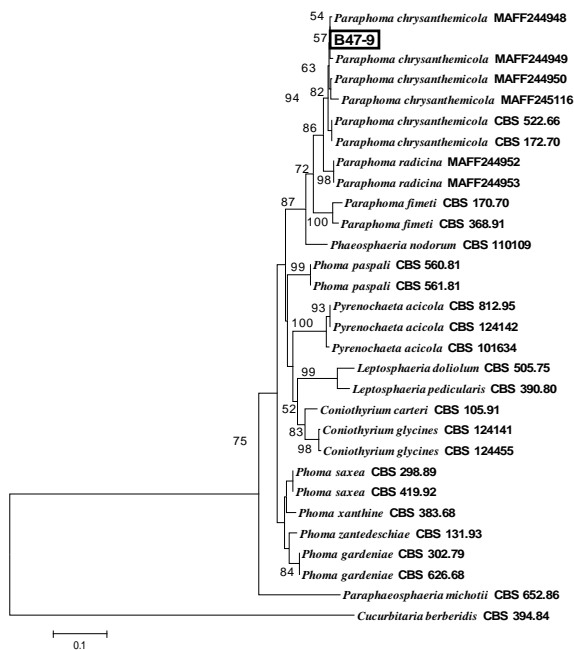


図 6. ITS 領域の近隣結合法による系統樹

今後は、さらに培地組成の調整や、植物体への接種などによる孢子形成のための培養条件を検討する必要がある。

今回用いた *Paraphoma* 属の 6 菌株の PBSA と PBS の生プラマルチの分解能を調査したところ、B47-9 の分解能が最も高いことが明らかになった (図 7. g)。

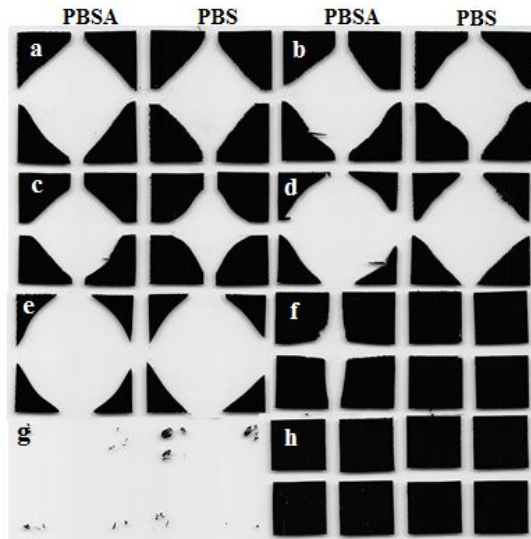


図 7. *Paraphoma* 属菌による生プラマルチフィルムの分解

a ~ c : *P. chrysanthemicola*, d, e : *P. radicina*
f : *P. chrysanthemicola*, g : B47-9 h : Control

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Koitaishi M., Sameshima-Yamashita Y., Koike H., Sato T., Moriwaki J., Morita T., Watanabe T., Yoshida, S. and Kitamoto, H., Biodegradable plastic-degrading activity of various species of *Paraphoma*, Journal of Oleo Science、査読有、2016、65、(in press)

〔学会発表〕(計 3 件)

小坂橋基夫、吉田重信、山下結香、渡部貴志、鈴木透、北本宏子、汎存種の真菌による農業用生分解性マルチフィルムの分解、日本菌学会、第 59 回大会講演要旨集、2015、88.

Koitaishi M., "Agro-environmental microorganisms inventory" -Application to biocontrol and the degradation of plastic and mycotoxin-、Proceedings of the 2014 International Meeting of the Federation of Korean Microbiological Societies、The Federation of Korean Microbiological Societies、2014、29-30、韓国微生物連合学会国際学会招待講演、韓国、高陽市

Koitaishi M., H. K. Kitamoto, S. Yoshida, T. Fujii, S. Tsushima. Degradation of biodegradable plastics by plant pathogenic fungi、XI International Fungal Biology Conference、2013、227、第 11 回国際菌学会議、ドイツ、

カールスルーエー

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小板橋 基夫 (KOITABASHI, Motoo)

国立研究開発法人・農業環境技術研究所・生物生態機能研究領域・主任研究員

研究者番号：10355662

(2) 研究分担者

吉田 重信 (YOSHIDA, Shigenobu)

国立研究開発法人・農業環境技術研究所・生物生態機能研究領域・主任研究員

研究者番号：90354125