

令和元年6月21日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2018

課題番号：16K00608

研究課題名（和文）海洋漂流マイクロプラスチック削減を目指す海洋環境時限分解性高分子材料創製

研究課題名（英文）Development of time-degradable plastics in marine environments, aiming to reduce marine drifting microplastics

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：60301751

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：脂肪族ポリエステルAとBにおいて、誘導物質の添加による分解速度の上昇がみられた。Aに誘導物質を添加したフィルムの一部においても、分解速度の上昇がみられた。CとDにおいて、誘導物質の添加量が1%から10%まで増加するにしたがって、形成されるバイオフィルム量は増加した。本研究により、脂肪族ポリエステルCを始めとした潜在的海洋生分解性高分子において、分解酵素誘導物質の添加によって、表面微生物叢構造が誘導物質のそれに近づくこと、特定の種類の微生物の集積やバイオフィルムの増加が生じる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題において、海洋環境で分解しない潜在的生分解性高分子を誘導物質を添加し、バイオフィルム制御することにより分解させることに成功した。この結果により、生分解性プラスチックの弱点と考えられていた、使用中の物性低下を低減させながら分解開始時期を決めることが可能となった。本知見は、海洋での次世代の時限生分解高分子材料設計の基礎となる可能性が高い。

研究成果の概要（英文）：In aliphatic polyesters, A and B, the degradation rate increased with the addition of the inducers. In polyesters, C and D, the amount of biofilm formed increased as the loading of inducers increased from 1% to 10%. According to this study, in the potential marine biodegradable polymers such as aliphatic polyester C, the addition of a degrading enzyme inducer makes the surface microbiota structure approach that of the inducer, accumulation of a specific type of microorganism.

研究分野：生分解性高分子

キーワード：海洋生分解性 生分解性プラスチック 時限生分解性 バイオフィルム

様式 C-19, F-19-1, Z-19, CK-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

合成高分子材料は、物性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、(1)減容化、(2)再使用、(3)リサイクル、(4)サーマルリサイクル、および(5)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。これとは別に、毎年プラスチック生産量の約0.1%程度(日本では1-2万トン/年間程度、環境省調べ)は、環境流失していることがわかっている。これら流出プラスチックは、海洋表層ゴミの70%を占めるまでになっている。一方、海底のゴミの多くは漁具由来のプラスチックであることが報告されている(平成26年度環境省報道資料)。さらに、これらの漁具由来のプラスチックは、非生分解性のため「マイクロプラスチック」となり、大量に環境に蓄積していることが報告されている(RC Thompsonら, *Science*, 2004)。加えてこれらの「マイクロプラスチック」は、環境に低濃度で存在する難分解性有機化合物(多環性芳香族化合物など)を吸着し濃縮する(LM Riosら, *Mar. Pollu. Bull.*, 2007)。これを摂取した生物に由来し、生態系に深刻な影響を与えていることが近年多く指摘されている(O. Setäläら, *Environ. Pollu.*, 2014など)。化学合成高分子の歴史はたかだか1世紀程度であるにもかかわらず、いつまでも環境中に残存するという性質は、ヒトを含めたすべての生物の存在に対する脅威となっている。

この喫緊課題を解決するためには、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」の利用が不可欠であると考えられる。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、それをパスしたのものに対して、グリーンプラマークを与え、その普及に努めている。

しかしながら、現状の生分解性高分子材料は、遅すぎるあるいは速すぎる生分解速度により、使用中の物性制御が困難な場合が多く、その用途に限られる。理想的な生分解性高分子材料は、使用中は分解を受けず十分な機械的強度を保ち、不要になった後速やかに分解することが望まれる。これには、生分解開始時期の厳密な制御が必要である(時限分解性)。生分解性材料の時限分解性を実現するためには、高分子分解微生物が分解種である高分子分解酵素をどの時期に発現するかを制御する必要が出てくる。つまり、高分子分解酵素と高分子分解微生物の酵素生産機構の両方を十分に理解する必要がある。このような観点から、申請者を含む多くの研究者は、種々の高分子分解酵素や分解微生物の詳細な研究に取り組んできた(粕谷ら, *酵素工学ニュース*, 2015、Jendrosekら *Ann. Rev. Microbiol.* 2002など)。特に、微生物が生産する生分解性高分子、ポリ(3-ヒドロキシアルカン酸)(P(3HA))の分解酵素、分解微生物については多くの研究例がある(粕谷ら *Polym. Degrad. Stab.* 2009, など)。さらに申請者は、海洋での生分解性高分子利用を想定し、海洋細菌による生分解性高分子分解に関する研究も行ってきた。その結果、深海底にも生分解性高分子分解微生物が生息していることを世界で初めて発見した(粕谷ら *Biomacromol.*, 2000)。

ところで、実環境中において生分解性高分子材料は、まずその表面に分解微生物が付着しバイオフィルムを形成することが報告されている(BI Sangら *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2002)。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(DY Kimら *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2003、石井ら *Polym. Degrad. Stab.* 2007, など)。現在までに、我々の研究グループでは、生分解速度制御(基盤研究C, 2008-2010)および農業用途に資するような生分解性材料開発を目指して生分解性高分子周辺微生物叢の解析および制御に取り組んできた(粕谷、基盤研究C, 2011-2015)。ここで得られた成果の一つとして、芽胞形成細菌を利用して積極的に微生物叢構造を制御することにより高分子の時限分解の可能性を示した(粕谷、橘ら 特願2012-123280)。

一方、最近になって、海洋に漂流するポリエチレンやポリプロピレンのマイクロプラスチック表面が微生物にとっての新たな環境を提供し、海洋とは異なる微生物叢を形成することが報告された(ER Zetterら *Environ. Sci. Technol.*, 2013)。しかしながら、海洋環境中での生分解性高分子材料での微生物叢に関する報告は現在までにない。そこで、本研究において、生分解性高分子材料の海洋中での時限分解システム構築のために、海洋中の生分解性高分子表面微生物叢構造を明らかにし、さらに、微生物叢構造を制御することにより、マイクロプラスチック汚染問題の解決を目指す。

## 2. 研究の目的

海洋に漂流するプラスチック廃棄物問題は、経済活動や、生物に対して大きな影響を与えている。中でもマイクロプラスチック漂流物は、その表面に多環芳香族などの化合物を高濃度に吸着させ、海洋生物から我々を含む生態系にとっての脅威となっている。このような背景から、漁網などオンサイトで回収不能となる可能性のあるもの、すなわちマイクロプラスチック源となりうるようなものは、生分解性高分子材料で製造されるべきである。そのためには、生分解性高分子の海洋中での精密な時限分解の実現が必要となる。本研究課題において、海洋中での生分解性プラスチックの精密時限分解実現のため、その鍵を握る海洋中での生分解性高分子表面に形成される微生物叢構造の解明を行う。さらに、これらの微生物叢情報に基づき、海洋中での時限分解可能な生分解性高分子材料開発を目指す。

### 3. 研究の方法

H28 年度\_\_海洋中での生分解性高分子分解時の表面微生物叢の解析：脂肪族ポリエステル（ポリ乳酸(PLA), ポリエチレンスクシナート(PESu), ポリブチレンスクシナート(PBSu), ポリカプロラクトン(PCL), P(3HA)など）多糖類ベースのもの（セルロース（置換基のあるものを含む）、キチン, キトサン）、およびその他（ポリビニルアルコール(PVA)）を、基質として海洋環境下における分解時の表面微生物叢組成変化を、次世代DNAシーケンシング解析法により定性的に解明する（ER Zetterら Environ. Sci. Technol., 2013, 47, 7137）。また、リアルタイムポリメラーゼチェーン法によりバイオフィルムの定量解析を行う。海洋中での生分解性高分子材料物性変化評価：上記各種生分解性材料の海洋環境中における物性の経時的変化を各種機器（核磁気共鳴, 赤外線測定装置, ゲルパーミュエーションクロマトグラフィー, 走査型電子顕微鏡, 原子間力顕微鏡, 動的粘弾性測定装置, 示差走査熱量計等）を用いて追跡する。海洋中からの各種生分解性高分子分解菌のスクリーニング：日本各地の海水および上記各種生分解性高分子を一定期間海水に浸漬させ表面にバイオフィルム形成させたものを、微生物源として用いて、各種生分解性高分子乳化海洋培地, および生分解性フィルムを唯一の炭素源とする海洋液体培地より集積, クリアゾーン法により海洋性生分解性高分子分解微生物をスクリーニングする。菌の同定は、生化学的性質, rDNA配列, 脂肪酸組成解析, キノン組成解析, グアニンシトシン含率解析, DNA-DNA交雑解析等により行われる（粕谷ら Biomacromol., 2000, 1, 194）。

H29 年度\_\_続き—海洋中からの各種生分解性高分子分解菌のスクリーニング：引き続き、分解菌のスクリーニングおよび菌の同定を行う。海洋性生分解性高分子分解菌の分解酵素遺伝子クローニング：各種高分子を分解する海洋性細菌の分解酵素遺伝子のクローニングを行う。菌種の同定により、すでに近縁種のゲノムDNA情報が入手可能な場合は、ポリメラーゼチェーン法によりクローニングを行う。また遺伝子発現に関しては、基本的には当該遺伝子破壊株を作成し、セルフクローニング法により行う。また、構造の詳細解析および進化遺伝学的解析は、Clustal Wプログラム（JD Thompsonら Curr. Protoc. Bioinformatics, 2002, chapter 2）を用いて行う。海洋性生分解性高分子分解菌の分解酵素発現機構解析：各種高分子を分解する海洋性細菌の分解酵素発現メカニズムを、明らかにする。各高分子分解酵素発現の誘導物質の特定は、分解酵素遺伝子転写量をリアルタイムポリメラーゼチェーン法により定量する。

H30 年度\_\_海洋中での時限分解生分解性高分子材料の創製：前年度までの研究結果、および今までの我々の知見から得られた海洋環境中では生分解性が不活性な材料：例えば PESu など（粕谷ら Polym. Degrad. Stab. 1998, 59, 327）を基材として用いて、芽胞形成菌種を利用することにより、その表層の微生物叢を積極的に制御し、海洋環境中での時限分解可能な材料創製を目指す（粕谷, 橘ら 特願 2012-123280）。

### 4. 研究成果

プラスチック廃棄物が引き起こす環境汚染問題の解決策として、生分解性高分子が注目されている。一方で、多くの生分解性高分子の環境分解性は、曝露環境に依存する。また、現在市販の生分解性高分子では、その生分解速度および分解開始時期が制御されていない。本研究課題では、潜在的な生分解性高分子に何らかの生分解トリガーを与えることで、潜在的な生分解性高分子の分解開始時期や分解速度を制御を検討した。

脂肪族ポリエステル D が微生物産生脂肪族ポリエステル(PHA)分解酵素である、ポリ(3-ヒドロキシブタン酸)[P(3HB)]分解酵素によって酵素加水分解されることに着目し、D と P(3HB)の環境分解性が異なる原因を、詳しく調べた。P(3HB)分解微生物は、環境を問わず存在しているものの、D 分解微生物は、海水中からは検出されなかった。また、P(3HB)分解細菌として単離された全ての株が、D を分解しなかった。一方で、D 分解細菌の大部分は、*Bacillus* 属であった。この *Bacillus* 属の D 分解細菌は、P(3HB)を分解しなかった。これらのことから、D が P(3HB)と異なり海水中で生分解されない原因は、D が P(3HB)分解細菌にとっての P(3HB) 分解酵素誘導物質として機能しないためであり、加えて D 分解細菌の属種および環境中の分布の偏りにあることがわかった。

D が化学合成脂肪族ポリエステルである E と同一の酵素（クチナーゼ）および微生物種により分解される性質に着目し、海洋環境から単離した E および D 分解細菌 TKCM64 株の特徴づけを行い、これに基づき D と E の海水中での環境分解性の差が生じる原因を考察した。TKCM64 株は、*P. pachastrellae* に近縁な細菌種であった。本株は、E を  $1.39 \pm 0.09 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{day}^{-1}$  の速度で分解した。これに対して、本株は、D を、E 分解速度の 1/50 の速度でしか分解できなかった。また、各種炭素源存在下での菌体増殖レベルと、その培養上清の E および D 分解活性との関係を調べたところ、本株は、脂肪族ポリエステル E、E 加水分解物および主要なクチン構成物(16-ヒドロキシヘキサドデカン酸)の存在下で、菌体増殖と E 加水分解酵素の生産誘導が見られた。一方、D および D 構成物であるエチレングリコールの存在下では、菌体増殖および培養上清の E 分解活性が見られなかった。また、各培養上清の D 分解活性は、E 分解活性と比較して極めて小さかった。これらのことから、本株が生産するポリエステル加水分解酵素は、E に対して基質特異性が大きく、他方 D に対して小さいことがわ

かった。これらを総合的に判断すると、高い E 分解活性を有する TKCM64 株は、海洋中での D の分解には関与していないことが推定される。

D の主たる分解者が *Bacillus* 属の細菌であることがわかった。また、海水中での D 分解速度が極めて低い原因を明らかにした。*Bacillus* 属細菌は芽胞と呼ばれる D の融点以上で耐熱性をもつ細胞形態をとる。この高い耐熱性から、D 分解細菌の芽胞は、生分解トリガーとして利用可能であると考えた。そこで、*Bacillus* 属細菌の芽胞と海洋環境中での潜在的な生分解性高分子である D に着目し、これらを用いて海洋環境中での時限生分解性高分子の創製を検討した。海砂中から、D 分解活性を有する芽胞形成細菌、YKCMOA1 株を単離した。本株は、人工海水中で、D を、 $141 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{day}^{-1}$  の速度で分解した。遺伝系統学および生化学的解析の結果、YKCMOA1 株は *Bacillus pumilus* に近縁な種であることがわかった。本株の芽胞は、 $110^\circ\text{C}$  で耐熱性を持ち、YE およびアスパラギンとカラメルを含む人工海水中で発芽することがわかった。本株の芽胞を含有した D フィルムは、人工海洋環境および実際の海水中で、分解することがわかった。以上より、芽胞を利用することで、海洋中での D の分解促進の可能性を示した。

本研究課題では「潜在的な生分解性高分子」に、生分解を開始させる環境を与えることで、「時限生分解性高分子」を創製した。この潜在的な生分解性高分子候補は、D 以外にも存在している。そこで、各ポリエステルの環境分解性を、その環境中の菌叢や菌のポリエステル分解活性と共に考察する必要がある。また、芽胞による分解開始時期の制御方法以外の手法として、生分解性高分子加水分解酵素誘導物質の導入を提案した。これにより、高分子の流出環境中の微生物の活性により分解が開始される時限生分解性高分子が創製可能となる。

脂肪族ポリエステル A と B において、誘導物質の添加による分解速度の上昇がみられた。A に誘導物質を添加したフィルムの一部においても、分解速度の上昇がみられた。C と D において、誘導物質の添加量が 1% から 10% まで増加するにしたがって、形成されるバイオフィルム量は増加した。qPCR の結果、16S rDNA のコピー数は、C と D において、誘導物質の添加量が 10% まで増加するにともない、上昇した。また 18S rDNA のコピー数は、C-5%F および C-10%F が突出して大きく、その他のサンプルでは小さかった。これらのことは、誘導物質の添加が、C 表面で微生物の集積を促進していることを示唆している。非計量多次元尺度法 (NMDS) の結果から、全てのフィルムにおいて、分解酵素誘導物質を添加することで、表面の微生物群集構造が変化することがわかった。本研究により、脂肪族ポリエステル C を始めとした潜在的な海洋生分解性高分子において、分解酵素誘導物質の添加によって、表面微生物叢構造が誘導物質のそれに近づくこと、特定の種類の微生物の集積やバイオフィルムの増加が生じる可能性が示された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 11 件)

### 1. Microbial composition and polymer hydrolytic activity of Japanese washed-rind cheeses

Tachibana, Y.; Kageyama, K.; Suzuki, M.; Koshigumo, H.; Takeno, H.; [Tachibana, Y.](#); [Kasuya, K.-i.](#)  
Polymer Degradation and Stability, 160, 264-272, 2019 年 1 月 (査読有)

### 2. Synthesis, Physical Properties, and Biodegradability of Biobased Poly(butylene succinate-co-butylene oxabicyclate)

[Tachibana, Y.](#); Yamahata, M.; Kimura, S.; [Kasuya, K.-i.](#)  
ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 6(8), 10806 2018 年 8 月 (査読有)

### 3. Biobased Poly(Schiff-Base) Composed of Bifurfural

[Tachibana, Y.](#); Hayashi, S.; [Kasuya, K.-i.](#)  
ACS Omega, 3(5), 5336 2018 年 5 月 (査読有)

### 4. Microbial degradation of poly(epsilon-caprolactone) in a coastal environment

Suzuki, M.; [Tachibana, Y.](#); Oba, K.; Takizawa, R.; [Kasuya, K.-i.](#)  
Polymer Degradation and Stability, 149, 1-8 2018 年 1 月 (査読有)

### 5. Difference in environmental degradability between poly(ethylene succinate) and poly(3-hydroxybutyrate)

Suzuki, M.; [Tachibana, Y.](#); Kazahaya, J.-i.; Takizawa, R.; Muroi, F.; [Kasuya, K.-i.](#)  
Journal of Polymer Research, 24(12), 217 2017 年 (査読有)

### 6. Identification of *Cellulosimicrobium* sp., a poly(3-hydroxybutyrate)-degrading bacterium isolated from washed rind cheese, Pont-l'evêque lait cru

Tachibana, Y.; Hayashi, S.; Suzuki, M.; Soulethone, P.; [Tachibana, Y.](#); [Kasuya, K.-i.](#)  
Journal of Polymer Research, 24(10), 159 2017 年 (査読有)

### 7. Characterization of a poly(butylene adipate-co-terephthalate) hydrolase from the aerobic mesophilic

bacterium *Bacillus pumilus*

Muroi, F.; Tachibana, Y.; Soulethone, P.; Yamamoto, K.; Mizuno, T.; Sakurai, T.; Kobayashi, Y.; Kasuya, K.-i.

Polymer Degradation and Stability, 137, 11-22 2017 年 (査読有)

8. Composite properties and biodegradation of biologically recovered P(3HB-co-3HHx) reinforced with short kenaf fibers

Joyyi, Lee; Thirmizir, Mohd Zharif Ahmad; Salim, Muhamad Saifuddin; Han, Lizhu; Murugan, Paramasivam; Kasuya, K.-i.; Maurer, Frans H. J.; Arifin, Mohd Ishak Zainal; Sudesh, Kumar

Polymer Degradation and Stability, 137, 100-108 2017 年 (査読有)

9. Biodegradability of polyesters comprising a bio-based monomer derived from furfural

Tachibana, Y.; Yamahata, M.; Ichihara, H.; Kasuya, K.-i.

Polymer Degradation and Stability, 146, 121-125 2017 年 (査読有)

10. Environmental biodegradation control of polymers by cleavage of disulfide bonds

Tachibana, Y.; Baba, T.; Kasuya, K.-i.

Polymer Degradation and Stability, 137, 67-74 2017 年 (査読有)

11. Evaluation of environmental degradability based on the number of methylene units in poly(butylene *n*-alkylenedionate)

Baba, T.; Tachibana, Y.; Suda, S.; Kasuya, K.-i.

Polymer Degradation and Stability, 138, 18-26 2017 年 (査読有)

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 環境中での有機リサイクルを実現する時限生分解性プラスチックの提案

粕谷 健一

第 14 回包装材料セミナー 2019 年 1 月 25 日 日本包装技術協会

2. 「時限」生分解プラスチックの実現に向けて

粕谷 健一

SPE 日本支部講演会 2018 年 11 月 29 日 SPE

3. Difference in environmental degradability between microbially and chemosynthetically biodegradable polyesters

粕谷 健一

MoDeSt2018 2018 年 9 月

〔図書〕(計 2 件)

1. 海洋プラスチックゴミ問題を解決する，生分解性プラスチックを活用した有機リサイクル実現に向けて

鈴木美和; 橘熊野; 粕谷健一

都市清掃 72(347) 33-38 2019 年 1 月, 全国都市清掃会議

2. 有機合成化学者のための化合物データベース ~ バイオベース化合物データベース構築に向けて ~

橘熊野; 林千里; 粕谷健一

日本化学会情報化学部会誌 35(1) 127-132 2017 年, 日本化学会 情報化学部会

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

○取得状況 (計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://greenpolymer.chem-bio.st.gunma-u.ac.jp/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：橋 熊野

ローマ字氏名：Tachibana, Yuya

所属研究機関名：群馬大学

部局名：大学院理工学府

職名：准教授

研究者番号（8桁）：60504024

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※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、研究者個人に帰属されます。