

令和 2 年 5 月 21 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K00619

研究課題名(和文) 分解機構に基づいた新規生分解性制御プラスチックの創製

研究課題名(英文) Creation of new biodegradability controlled plastics based on the degradation mechanism

研究代表者

大井 俊彦(Ooi, Toshihiko)

北海道大学・工学研究院・准教授

研究者番号：40223713

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：石油由来のプラスチックによる海洋汚染が世界的問題となっている。その中で自然環境中で分解し水と二酸化炭素まで分解できる生分解性プラスチックが注目されている。本研究課題では、我々が新規に開発したバイオプラスチックである乳酸コポリマー[P(LA-co-3HB)]の乳酸(LA)と3-ヒドロキシブタン酸(3-HB)のポリマー分子チユノ両モノマー組成と環境微生物による分解性を評価した。初めに乳酸コポリマーの微生物生産法を検討し、乳酸分率を制御した培養方法を確立した。得られたコポリマーをフィルム化して環境中での分解を評価するとともに、分解に関与する環境微生物の系統解析を実施した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乳酸分率を制御した乳酸コポリマーの微生物生産法を確立した。

乳酸分率の異なる乳酸コポリマーの環境分解性について評価した。土壌中では乳酸分率の上昇に伴い分解速度は遅くなった。土壌から単離した分解微生物の系統解析を行った結果、分解微生物はBarkholderia目に分類される細菌群に収束した。水圏における分解性でも同様の傾向であった。これらの成果は生分解性プラスチックは環境中で分解可能でありかつポリマーの組成を変化させることで分解速度を制御できることがわかった。これらの成果は、環境に配慮した石油由来の代替プラスチックとして利用できる高い可能性を持つ。

研究成果の概要(英文)：Marine pollution caused by petroleum-derived plastics has become a global concern. Among them, biodegradable plastics that can be decomposed in the natural environment into water and carbon dioxide are attracting attention. In this research project, we developed a newly developed bioplastic, lactic acid copolymer [P(LA-co-3HB)], which is a polymer molecule composed of lactic acid (LA) and 3-hydroxybutanoic acid (3-HB). And the degradability by environmental microorganisms was evaluated.

First, we investigated the microbial production method of lactic acid copolymer and established a culture method with controlled lactic acid content. The obtained copolymer were formed into a film to evaluate the degradation in the environment, and a phylogenetic analysis of the environmental microorganisms involved in the degradation was performed.

研究分野：応用微生物学

キーワード：生分解プラスチック PHA 環境分解 乳酸ベースポリマー 微生物合成

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

人間の生活で広範囲に利用されている石油由来のプラスチックは、使用後に廃棄されても安定な分子構造のため環境中で殆ど分解されることはない。膨大な量が投棄され最終的に海洋環境中に蓄積し続ける微粒子プラスチックのように、残留するプラスチックが食物連鎖に組み込まれ海洋生物に対する影響への大きな懸念が世界的にクローズアップされて来ている。このような非常に安定なプラスチックに環境分解性を付与することができれば、プラスチックによる環境問題にこれまでにない新しいプラスチック材料開発という視点から問題解決できることが期待できる。

2. 研究の目的

本研究課題では、生分解性プラスチックに注目し、我々が独自に開発した微生物産生乳酸ベースポリマー[p(LA-co-3HB)]を研究対象として、環境微生物に対する生分解制御を付与した新機能ポリマーの創製を目指す。そのために、ターゲットポリマーの生分解機構を分子レベルで詳細に解明することが必須となる。そこで、ポリマー分解酵素の固体基質に対する分解挙動を解明し、最終的には分解制御可能なプラスチックの設計を目指すことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 乳酸ベースポリマー微生物生産法の確立と乳酸コポリマーの分析

ポリマー生合成ポリマーの分解性を評価するために、必要量の乳酸分率の異なるコポリマー[P(LA-co-3HB)]を効率よく微生物生産する。これまでに蓄積してきた知見を基盤に、ポリマー生合成遺伝子群を保持する各種糖代謝関連遺伝子が欠損した大腸菌株を宿主に、ジャーファーマンターを用いて、培地中の炭素源の検討に加え、通気攪拌培養条件など各種培養条件を変えることにより、乳酸分率が異なるコポリマーの合成を検討した。各条件で培養した培養後の菌体を洗浄し、凍結乾燥の後クロロホルムにより乳酸コポリマーを抽出し精製した。異なる培養条件で得られた乳酸コポリマーの乳酸分率は、ガスクロマトグラフィーおよびNMRにより3HBとLAのシグナル強度比から算出し、分子量はGPCにより標準物質から作成した標準曲線より算出した。

(2) 分解酵素による乳酸コポリマー分解性の評価

乳酸ベースポリマー分解微生物としてすでに単離している、*Variovorax* sp. C34株由来の分解酵素である乳酸コポリマーデポリメラーゼ遺伝子をクローニングし、組換え大腸菌により発現系を構築して酵素生産させた。本乳酸コポリマーデポリメラーゼは、細胞外に分泌できるため、30℃で24時間振盪培養した培養液から遠心分離により菌体を除去した培養上清から精製した。精製は培養上清からデポリメラーゼを硫酸沈殿、脱塩した後、必要に応じてクロマトフォーカシングにより精製した。酵素活性の測定は、乳酸コポリマーから超音波処理によりエマルジョンを作成し基質として用い、濁度減少を測定することで測定した。また環境中での分解評価には作成したソルベントキャストフィルムを用い、分解過程におけるフィルムの形状変化の観察および重量減少を測定した。

(3) 乳酸コポリマー分解微生物の単離と乳酸コポリマーの分子動力学計算

乳酸コポリマーを唯一炭素源とした集積培養により、土壌を分離源に乳酸コポリマー分解微生物を環境中から単離した。単離したコロニーからPCRにより16S rRNA遺伝子を増幅し、得られた塩基配列情報から分解微生物の分類学上の位置を調査した。さらに分解基質となる化学合成した乳酸ホモオリゴマーの分解挙動に加え、分子動力学シミュレーションにより、重合度の違いによる分子の状態を計算した。

(4) 乳酸コポリマーの分解性の評価

乳酸分率の異なるコポリマーの酵素分解性は乳化したコポリマーを基質として、上記した組換え大腸菌より精製した分解酵素を用いて各種温度条件により反応させ、乳化コポリマーの濁度減少により評価した。さらに単離微生物の分解酵素の特性を調査するために、乳酸オリゴマーを化学合成し、その分解挙動を質量分析によって解析した。さらに、環境条件下における乳酸コポリマー分解性の評価には、乳酸分率の異なる各種コポリマーのソルベントキャストフィルムを作成し、重量減少と形態変化により評価した。二つの分解試験で得られた結果の相関を見た上で、コポリマーの乳酸分率と分解性の関係を調べた。さらに水圏環境中でのコポリマーの分解過程における微生物群集解析は、ポリマー表面に形成されたバイオフィームからサンプリングして実施した。

4. 研究成果

(1) 乳酸ベースポリマー微生物制御生産法の確立

乳酸分率の異なった乳酸コポリマーを微生物生産するために、使用培地、培養条件、改変ポリマー合成酵素、代謝改変宿主大腸菌の組み合わせを変えてジャーファーマンターによる培養の条件検討を行った。使用炭素源は、これまで用いていたグルコースと比較してキシロースを炭素源としたほうがコポリマー生産性は向上した。初めに、培養中の溶存酸素を制御するために通気量と攪拌速度について検討した。その結果、攪拌速度を300 rpmから500 rpmまで変化させて

もポリマー生産性にあまり影響しなかった。しかし、通気量を 1 v.v.m. から 2 v.v.m. まで変化させていくと、通気量に依存してポリマー生産性は菌体重量を伴って向上した。炭素源であるキシロースと攪拌速度との関係は、300rpm ではキシロースの初発濃度を上げるとポリマー生産量は細胞重量とともに減少するのに対し、500rpm まで攪拌速度を上げると、細胞重量およびポリマー生産量はキシロースの初発濃度に依存して上昇した。

代謝欠損宿主大腸菌を用いた場合、乳酸をピルビン酸に酸化する乳酸脱水素酵素の欠損株では、ポリマー生産性は大きく変化しなかったが、乳酸分率が野生株の 6 mol% から 20 mol% まで向上した。また、ピルビン酸をギ酸に変換する開裂酵素の欠損株では、わずかにコポリマーの乳酸分率は向上したが、乳酸脱水素酵素とピルビン酸開裂酵素の二重欠損株を宿主に用いた培養では、乳酸分率が上昇して 49 mol% となり、大幅な乳酸分率の向上に成功した。さらに、高乳酸分率のコポリマーを生産させるには、重合活性が向上したポリマー重合変異酵素(SF 変異酵素)を宿主大腸菌に導入することで、ポリマー生産量は若干減少したが乳酸分率が 67 mol% の乳酸コポリマーの生産を達成することができた。以上の多くの組み合わせによる培養試験の検討によって、いくつかの上記培養パラメーターと大腸菌宿主と改変控訴を組み合わせることによって、乳酸分率が 6 mol% から 67 mol% まで範囲で制御した乳酸コポリマーを微生物生産できる条件を見出すことに成功した。

(2) 分解酵素による乳酸コポリマー分解性の評価

乳酸分率が 64 mol% の乳酸コポリマー分解菌として単離した *Variovorax* sp. C34 細菌からクローニングしたコポリマー分解酵素遺伝子の、大腸菌による発現系を構築した。IPTG で誘導生産できるように設計され発現した分解酵素は、シグナル配列を有するため、菌体外に分泌された。培養液から菌体を遠心分離で除去した培養上清から、硫酸分画し、透析したのち、各種カラムクロマトグラフィーにより、電気泳動的に単一になるまで精製できた。乳酸コポリマーの分解物の分子量と組成から LA-LA の結合を含むすべてのエステル結合を分解可能であると予想された。そのことを確かめるために、40 量体までを含む乳酸ホモオリゴマーを化学合成し、その分解挙動を MALDI-TOF MS で解析したところ、本酵素は 20 量体程度までは比較的容易に分解できるが、それ以上のサイズになると極端に分解性が低下することが分かった。

(3) 乳酸コポリマー分解微生物の単離と解析

採取した土壌 216 サンプルから乳酸コポリマーを唯一炭素源とした無機塩培地で集積培養を複数回繰り返した後、乳化させた 64 mol% の乳酸コポリマーを含む寒天プレートに播種し、生じたコロニー周辺にクリアゾーンを形成した微生物をそれぞれ単離した。単離した微生物の 16s rRNA 遺伝子を PCR で増幅したのち塩基配列を解析し比較した。その結果 *Burkholderia* 目に分類される プロテオバクテリアの近縁種である *Variovorax* 種、*Acidovorax* 種、*Burkholderia* 種が同定された。これら単離した細菌を、乳酸ホモオリゴマーを含む無機塩培地で培養したところ、10 から 30 量体を含む乳酸ホモオリゴマーでは、炭素源として分離微生物は分解消費し生育することが出来たが、20 から 60 量体を含む乳酸ホモオリゴマーを炭素源とした場合では、分離微生物はほとんど生育できなかった。以上の結果から、微生物の賛成する分解酵素は、乳酸ホモオリゴマーの重合度に依存して分解性があることがわかった。次に、分解できるか否かの要因には基質となる乳酸ホモオリゴマーの培養液中の分子構造の状態にあると考え、分子動力学計算により乳酸ホモオリゴマーの水中でのコンフォメーション状態をシミュレーションした。その結果、乳酸ホモオリゴマーは 30 量体以上になると分子が凝集してタイトな構造となると計算され、乳酸ホモオリゴマーが凝集構造となるためにコポリマー分解酵素がアタックできずに分解できなくなるためと考えられた、この結果は単離微生物の分解可能なサイズとほぼ一致していた。

(4) 乳酸コポリマーの環境中での分解性の評価

酸分率の異なる各種コポリマーをフィルム化して分解実験に用いた。屋外環境中の土壌中にコポリマーフィルムを埋設して 1 か月間放置し、コポリマーフィルムの形状変化を観察した。その結果、コントロールとして用いた P(3HB)フィルムは分解が進行し、完全に消失し、分解が進行したと考えられた。一方コポリマーフィルムでは、P(3HB)フィルムと比較すると、分解が抑制されたと考えられ、ポリマーフィルムの縮小化断片化や縮小化などの形状変化が乳酸分率に応じて観察された。比較 tr 気高い乳酸分率のコポリマーフィルムでも細かく断片化され強度が極端に低下し非常に脆くなっていたことが確認された。以上のことから、環境土壌中における乳酸コポリマーの分解は乳酸分率に応じて分解が進行したことから、分解できた環境微生物での分解性と相関があることが分かった。本実験では、フィルムの分解が予想以上に早く進行してしまったため、分解されたコポリマーの分子量や、構造解析だけでなくコポリマー表面からの分解微生物の単離など同定などができなかったことが今後の課題として残った。

水圏におけるコポリマーの環境分解性試験は、4 つの河川水に浸漬した状態でポリマーの分解挙動およびポリマー表面の部生物群集について 4 週間にわたって調査した。試験したすべての河川水でポリマーフィルムの重量減少が進行したことから、ポリマーの分解は進行していると判断された。またポリマーフィルムの重量減少と、ポリマー表面の微生物数には逆相関を示したことから、ポリマーフィルム表面に環境微生物が付着しすることで分解を進行させると考えられた。このことは分解進行中のポリマー表面の電子顕微鏡による観察でも確認することが出来、ポ

リマーフィルム表面が滑面から粗面へと変化していた。以上の実験結果から、ポリマーフィルムは表面に付着した微生物により分解が進行していると考えることができた。ポリマーフィルム表面に生息する微生物の解析結果からは、培養可能な微生物として、先に述べた土壌からのコポリマー分解細菌と非常に類似した細菌種が多く同定された。一方、培養不可能な微生物の群集解析の結果からは、目や種レベルで非常に多様な微生物群衆がポリマー表面に存在していることが分かった。

以上すべての実験結果から、我々が開発した乳酸ベースポリマーは環境中で分解するという優れた特徴を有し、コポリマーの乳酸分率に応じて分解制御が可能であることが分かった。これらポリマーの物性（透明性、機械的強度、熱物性など）と環境分解性の相関を調べ評価をすることで、今後実用性のあるポリマーを開発できるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Tomohiro Sugiyama, Kodai Watanabe, Toshihiko Ooi, Chiaki Hori, Takuya Isono, Toshifumi Satoh and Ken'ichiro Matsumoto
2. 発表標題 EXPLORATION OF POLY(D-LACTATE)-DEGRADING BACTERIA AND ANALYSES OF THEIR DEPOLYMERASES
3. 学会等名 Degradation and Stabilization of Polymers (MoDeSt 2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 飯島翠、滝沢憲治、門屋亨介、堀千明、松本謙一郎、大井俊彦、田口精一
2. 発表標題 バイオマスを原料とした多元ポリ乳酸の微生物生産
3. 学会等名 第6回JACI/GSCシンポジウム (国際学会)
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
研究分担者	田口 精一 (Taguchi Seiichi) (70216828)	東京農業大学・生命科学部・教授 (32658)	
研究分担者	松本 謙一郎 (Matsumoto Ken'ichiro) (80360642)	北海道大学・工学研究院・准教授 (10101)	

