

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(A)（一般）

研究期間：2018～2022

課題番号：18H03857

研究課題名（和文）難分解性プラスチック分解菌の探索とその機能を利用した加工・リサイクル技術の開発

研究課題名（英文）Exploration of persistent plastic-degrading bacteria and development of processing and recycling technologies using their functions

研究代表者

宮本 憲二（Miyamoto, Kenji）

慶應義塾大学・理工学部（矢上）・教授

研究者番号：60360111

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 33,900,000円

研究成果の概要（和文）：PET分解活性を有する酵素は、固体で疎水性のプラスチックに接触しなければ分解反応は起こらない。そこで、酵素の表面電荷とは逆の電荷を持つ界面活性剤を添加することで、プラスチック表面の親水化と酵素との親和性の改善を行うことで分解活性の劇的な改善を達成した。低分子化したPEやPPの分解菌の探索を行った。その結果、海洋を含む多くの環境から分解菌の単離に成功し、そのタイプを明らかにした。さらに、様々な条件検討を行うことで効率の良いPP分解系の構築に成功した。また、直鎖アルカンを原料に、有用物質を生産できる菌株を見いだした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現代社会は、プラスチックに強く依存しており、2050年の生産量は現在の3倍に達すると予測されている。そして、環境に流出したプラスチックは、分解されることなく蓄積して大きな社会問題となっている。そこで、使用済プラを確実回収して、環境に優しい条件で処理する技術の開発が求められている。しかし、現在用いられている方法は、廃液の処理や二酸化炭素の排出など問題点が多いプロセスである。そこで、環境負荷の少ない微生物や酵素を用いた新たな手法の開発を目的とした。本課題では、PET分解酵素の劇的な活性向上法や新規なポリアルカン系プラスチックの分解菌の発見など、問題の解決に向けた多くの成果が得られた。

研究成果の概要（英文）：PET-degrading enzymes do not undergo decomposition reactions unless they come into contact with solid, hydrophobic plastics. Therefore, by adding a surfactant with a charge opposite to the surface charge of the enzyme, the plastic surface is hydrophilized and the affinity with the enzyme is improved, resulting in a dramatic improvement in the degradation activity. We searched for bacteria degrading low-molecular-weight PE and PP. As a result, we succeeded in isolating degrading bacteria from many environments, including the ocean, and clarified their types. Furthermore, we succeeded in constructing an efficient PP decomposition system by examining various conditions. We also found strains that can produce useful substances from straight-chain alkanes.

研究分野：プラスチックの微生物分解

キーワード：プラスチック 微生物 分解 バイオリサイクル

### 1. 研究開始当初の背景

現代社会は、プラスチックに強く依存しており、大量に生産・消費している。2014年のプラスチック製品の世界総生産量は約3億トンであり、2050年の生産量は現在の3倍に達すると予測されている。また既に、1億6500万トンもの使用済プラが自然界に流出しており、2050年には海中の魚の重量を超えるとの予測もある。さらに問題視されているのがマイクロプラスチックである。これは、環境に流出したプラスチックが、UVや波・風等の物理的な作用により5mm以下に微細化したものである。疎水性のマイクロプラスチックは、海を漂うダイオキシンなどの疎水性有害物質を吸着する性質を有する。そして、これを小魚が誤食することで食物連鎖を介した有害物質の生物濃縮が起こり、最終的にはヒトへの影響が懸念されている。

環境流出したプラスチックを広大な海洋中から回収することは、コストやエネルギーの面から不可能である。そこで、使用済プラを確実に分別・回収して資源循環系を構築することが必要不可欠である。現在用いられているリサイクル方法には、ケミカルリサイクル法、メカニカルリサイクル法、サーマルリサイクル法がある。しかし、いずれも廃液処理や二酸化炭素の発生などの問題点を抱えていた。そこで、環境低負荷の新規手法の開発が急務であった。

### 2. 研究の目的

我々の研究グループでは、世界で初めてPET樹脂を食べる微生物 *Ideonella sakaiensis* を見だし、ゲノム解析によりPET分解に関与する2種類の新酵素 (PETase と MHEase) を発見した。先行技術では、PETを副次的に分解する酵素(クチナーゼ等)の報告はあったが、PETaseはそれらより圧倒的に高活性であった。しかし、PETaseに代表される親水性の酵素は、疎水性のPET樹脂と接触しなければ、分解反応は起こらない。そこで、接触頻度の改善による酵素活性の向上を目的とした。

一方、使用済プラの半分以上を占めるポリオレフィン系プラスチックであるPEやPPは、主鎖がメチレンの繰り返し構造であることから化学的に極めて安定で生物分解を極めて受けにくい。一方で、PEを食べる微生物や芋虫(ワックスワーム)が報告されてはいるが、分解速度は数ヶ月で数%程度と極めて遅い。また、PPに至っては、その分岐構造が原因なのか分解菌の報告すらない。そこで、PEやPPを低分子化することで、分解速度の向上が行えるのではないかと考えた。そして、この様な低分子化プラスチックを炭素源として生育する微生物を海洋等の様々な環境から探索を行った。

### 3. 研究の方法

複数のPET分解酵素の表面電荷に注目し、その電荷と逆の電荷を持つ界面活性剤を用いた。界面活性剤は、疎水部分と親水部分を持つ分子である。したがって、界面活性剤の疎水部分は、プラスチックと相互作用し、親水部分は静電的な引力により酵素と相互作用するのではないかと期待した。結果として、プラスチックと酵素を近づき、分解活性が向上するのではないかと考えた。3種類の酵素と複数の界面活性剤について検討を行った。

ポリオレフィン系プラスチックの低分子化方法として、UV照射と熱分解を採用した。そして、得られた低分子化プラスチックを炭素源として、深層水や表層水、ワームの腸内細菌などを微生物源として、分解微生物の探索を行った。

### 4. 研究成果

#### 1) PETaseの酵素活性の改善

PET樹脂を食べる微生物 *I. sakaiensis* から見いだされたPET分解酵素 (PETase, pI=9.4) の立体構造から、その酵素表面がカチオン性を有していることが分かった。そこで、PETaseの表面電荷とは逆の電荷を持つ、SDSに代表されるアニオン性界面活性剤に注目した。図1に示すような相互作用により、吸着促進が起こり、分解速度が向上することを期待した。

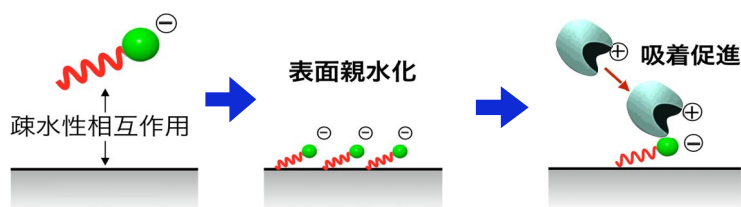


図1 界面活性剤を介したPET分解の概念図

反応系にアニオン性とカチオン性の界面活性剤を添加して、その分解速度を測定した。その結果、期待通りアニオン性界面活性剤を添加すると反応速度は上昇した。一方で、PETaseの表面電荷と同じカチオン性の界面活性剤を用いたところ、分解活性は激減した。これら結果から、当初のもくろみ通り、適切な界面活性剤を用いることで酵素とプラスチックを近づけ、活性を改善することが可能であることが明らかとなった。続いて、界面活性剤のアルキル鎖長や添加量の最

適化を行ったところ、分解速度は無添加と比較して 120 倍もの向上を達成した ( 図 2 )。

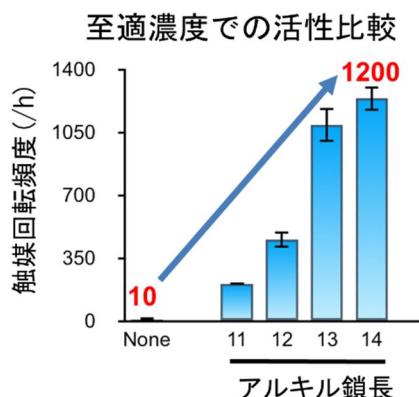


図 2 界面活性剤の構造と分解活性の関係

### 2) 耐熱性 PET 分解酵素の活性向上

PETase は室温に於いて優れた PET 分解活性を示すが、30 度以上になると速やかに変性が起こり酵素活性を失う。プラスチックの分解反応は、温度が高い条件ほど向上すると考えられる。そこで、耐熱性 PET 分解酵素 ( TfCut2 等 ) を用いて、界面活性剤添加条件における PET 分解を検討した。TfCut2 の表面電荷を調べたところ、PETase とは逆に負に帯電 ( pI=6.1 ) していた。そこで、反応系にカチオン性界面活性剤を添加して反応を行ったところ、分解活性が 4.3 倍向上した。また、PETase が完全に失活する 65 度においても、TfCut2 は高い PET 分解活性を示した。さらに TfCut2 と PETase の立体構造を比較し、PETase のアミノ酸を TfCut2 に挿入した変異体を作成して、酵素活性の改善を検討した。その結果、TfCut2 の二重変異体 ( G62A/F209A ) において、酵素活性の向上が見られた。さらに、この変異体に界面活性剤を添加して、65 度で分解反応を行ったところ、30 時間で PET フィルムの完全分解を達成した ( 図 3 )。これは、現在報告されている酵素による PET 分解速度の中で世界最高値であった。

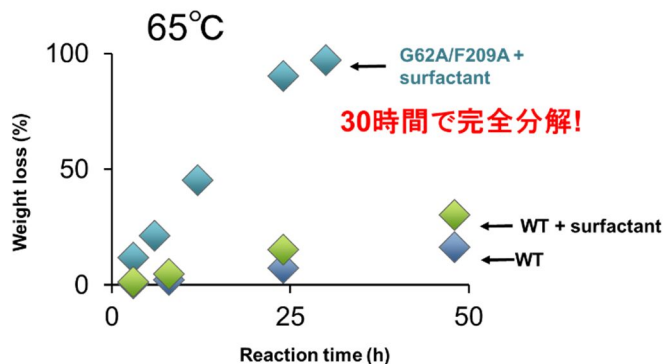


図 3 TfCut2 変異体による PET フィルムの分解

### 3) 海洋や土壌からの PP 分解菌の同定

海洋環境で、直鎖アルカン分解菌を用いて、添加剤の入っていない PE の分解を試みた。この PE は、無処理では分解が見られず、UV 処理して断片化や酸化されるようにし分解されやすいようにした。しかし、重さで検出できるほど分解は見られなかった。PE を熱処理し低分子化してできた多様な長さの直鎖アルカンや直鎖アルケンは、直鎖アルカン分解菌を用いて予想通り完全分解できた ( 図 4 )。PP の構造に似た分岐アルカンであるプリスタンの分解菌を用いて、PP ( UV 処理したもの ) の分解も試みたが、これも重さで検出できるほど分解は見られなかった。

PP も熱分解すると多様な長さに低分子化した。PP の構造が生分解されるかは不明だったが、生分解されることをこの低分子化した PP を用いることで明らかにした ( 図 5 )。この低分子化した PP を炭素源に、深層海水 10 度 ( 使用した深層水そのものの温度 )、表層海水 50 度で集積培養した。深水 10 度の培養では、PP 分解菌は数種得られ、分解しやすい PP の長さが異なった。表層海水 50 度の培養では、PP 分解菌は 2 種得られたが、PP は長さに関係なく一様に分解されているように見えた。いずれの菌も PP 分解させるのに、様々な条件検討を行い、効率よく PP 分解させる条件を見出した。また、直鎖アルカンを原料に、有用物質を生産できる菌を見いだした。

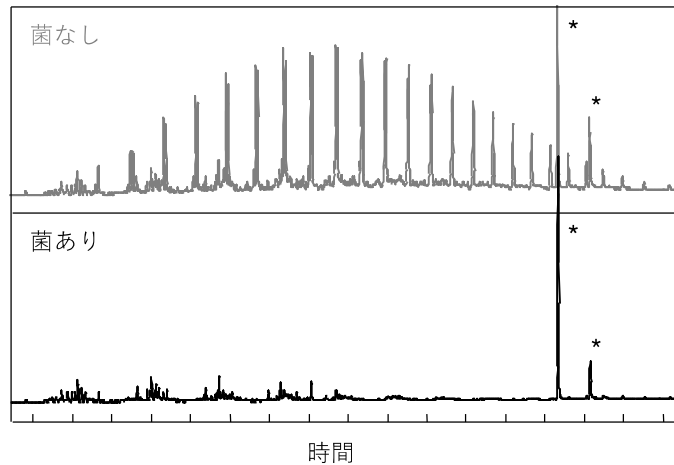


図4 菌による熱処理したPEの完全分解(GCのTotal ion chromatograms) 熱処理し低分子化したPE(直鎖アルカンと直鎖アルケン; \*以外のピーク)(上段)が菌によって分解された(下段)。

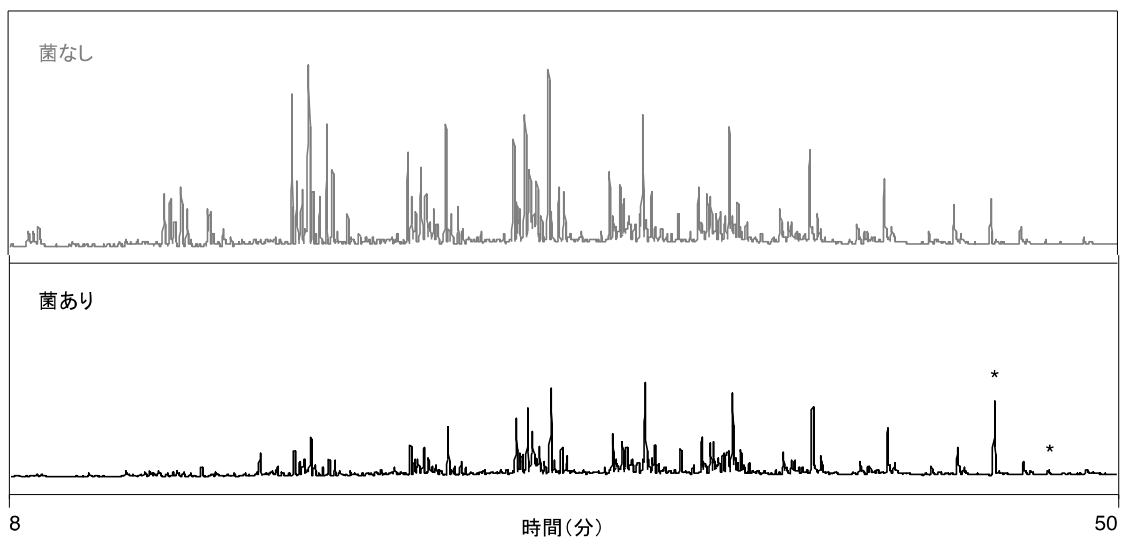


図5 菌による熱処理したPPの生分解(GCのTotal ion chromatograms) 熱処理し低分子化したPP(\*以外のピーク)(上段)が菌により分解された(下段)。

土壌環境では、PEを食べるブドウ虫から、直鎖アルカンやプリスタン炭素源にこれらの分解菌を集積培養した。その結果、ブドウ虫でPEを分解するとされていた既知の菌とは異なる分解菌が集積された。この分解菌は、低分子化したPPも分解した。この分解菌を用いて、添加剤の入っていないPE(UV処理したもの)の分解を試みたが、重さで分解は検出できなかった。しかし、酸素添加など分解の兆候は見られた。また、川や土からも、低分子化したPPを炭素源にPP分解菌を集積し、同定した。川と土のどちらからも同様な分解菌が得られた。海洋細菌の場合と同様に、いずれの菌もPP分解させるのに、様々な条件検討を行い、効率よくPP分解させる条件を見出した。また土壌からも、直鎖アルカンを原料に、有用物質を生産できる菌を見いだした。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Furukawa Makoto, Kawakami Norifumi, Tomizawa Atsushi, Miyamoto Kenji	4. 巻 9
2. 論文標題 Efficient Degradation of Poly(ethylene terephthalate) with Thermobifida fusca Cutinase Exhibiting Improved Catalytic Activity Generated using Mutagenesis and Additive-based Approaches	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-52379-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Furukawa, Makoto; Kawakami, Norifumi; Oda, Kohei; Miyamoto, Kenji	4. 巻 11
2. 論文標題 Acceleration of Enzymatic Degradation of Poly(ethylene terephthalate) by Surface Coating with Anionic Surfactants	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ChemSusChem	6. 最初と最後の頁 4018-4025
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cssc.201802696	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Taniguchi, Ikuo; Yoshida, Shosuke; Hiraga, Kazumi; Miyamoto, Kenji; Kimura, Yoshiharu; Oda, Kohei	4. 巻 9
2. 論文標題 Biodegradation of PET: Current Status and Application Aspects	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Catalysis	6. 最初と最後の頁 4089-4105
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acscatal.8b05171	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 5件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 宮本憲二
2. 発表標題 非天然化合物に作用する新規酵素の発見 医薬品合成とプラスチック分解への応用
3. 学会等名 富士フィルム和光純薬主催セミナー・酵素が有機化学を変えるープロセス合成・フロー合成への展開（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮本憲二
2. 発表標題 PET分解酵素の発見と活性向上
3. 学会等名 日本化学会関東支部主催講演会・プラスチック問題 資源循環社会に向けての化学からの新たな取り組みー (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮本憲二
2. 発表標題 PET分解酵素の発見と活性向上
3. 学会等名 第12回川崎国際環境技術展 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古川洵, 川上了史, 富沢温, 宮本憲二
2. 発表標題 耐熱性酵素を用いた効率的poly(ethylene terephthalate)分解反応系の開発
3. 学会等名 第21回生体触媒化学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 M. Furukawa, N. Kawakami, K. Miyamoto
2. 発表標題 Development of a Novel Method for Efficient Enzymatic Degradation of Poly(ethylene terephthalate) Using Amphiphilic Molecule
3. 学会等名 The 4th Joint Conference Keio & Kaohsiung Medical University (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古川洵, 川上了史, 富沢温, 宮本憲二
2. 発表標題 耐熱性酵素を利用した効率的な poly(ethylene terephthalate)分解反応
3. 学会等名 第14回学生発表討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大原直也, 川上了史, 宮本憲二
2. 発表標題 Poly(ethylene terephthalate)分解酵素の可溶化と熱安定性向上変異体のスクリーニング系構築
3. 学会等名 第20回生体触媒化学シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 富沢温, 古川洵, 川上了史, 宮本憲二
2. 発表標題 界面活性剤存在下での耐熱性酵素による poly(ethylene terephthalate) の分解
3. 学会等名 第20回生体触媒化学シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Makoto Furukawa, Norifumi Kawakami and Kenji Miyamoto
2. 発表標題 Efficient enzymatic degradation of poly(ethylene terephthalate) using amphiphilic molecules
3. 学会等名 第20回生体触媒化学シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 古川 洵, 川上了史, 富沢 温, 宮本憲二
2. 発表標題 酵素によるpoly (ethylene terephthalate) 分解反応を加速する方法の開発
3. 学会等名 日本農芸化学会2019 年度 (平成31 年度) 大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮本憲二
2. 発表標題 PET樹脂を分解する微生物 分解メカニズムと活性向上
3. 学会等名 日本学術振興会産学協力研究委員会「日本におけるケミカルバイオロジーの新展開 第189委員会」第3回定例会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮本憲二
2. 発表標題 PET分解酵素の発見と活性向上
3. 学会等名 公益社団法人 新化学技術推進協会JACI戦略低減部会資源チーム勉強会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Makoto Furukawa, Norifumi Kawakami, Kenji Miyamoto
2. 発表標題 Acceleration of Enzymatic Degradation of Poly (ethylene terephthalate)
3. 学会等名 9th INTERNATIONAL CONGRESS ON BIOCATALYSIS (国際学会)
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 太田 貴将, 海老名 芹紗, 下浦 穂貴, 宮本 憲二, 寺本 真紀
2. 発表標題 ポリエチレンを食む虫からのアルカン分解菌
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Norifumi Kawakami, Makoto Furukawa, Atsushi Tomizawa and Kenji Miyamoto
2. 発表標題 Acceleration of enzymatic degradation of poly(ethylene terephthalate) by pre-treatment with surfactants
3. 学会等名 Pacifichem 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kurumi Ishiguro, Sota Honmura, Norifumi Kawakami, Kenji Miyamoto
2. 発表標題 Analysis of the relationship between the degradation pattern of PETase, enzyme activity, and enzyme concentration
3. 学会等名 Active enzyme molecule 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022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	寺本 真紀  (Teramoto Maki)  (60545234)	高知大学・教育研究部総合科学系複合領域科学部門・准教授    (16401)	

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
---------	---------