

機関番号：12301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20510090

研究課題名（和文）新規生分解性高分子設計を指向した微生物由来高分子分解酵素の発現機構の解明

研究課題名（英文）Control of environmental degradation rate of an aliphatic polyester based on microbial degradation mechanism of a natural polyester.

研究代表者

粕谷 健一（KASUYA KENICHI）

群馬大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：60301751

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、生分解性高分子の分解開始時期を制御するために、生分解性高分子分解微生物の生産する高分子分解酵素発現メカニズムを解析した。さらに、これらの生物学的側面を、材料設計に応用し、分解開始時期が制御された「時限分解性高分子」の創製を検討した。

研究成果の概要（英文）：We investigated expression mechanism of polymer-degrading enzyme by biodegradable polymer-degrading microorganisms in order to control the degradation start point of biodegradable polymer. Further we tried to prepare “the timed degradation polymer”, which of the degradation start point would be controlled on the basis of expression mechanism of their degrading enzymes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生分解性高分子

科研費の分科・細目：環境学・環境技術・環境材料

キーワード：P(3HB), PESu, 生分解性制御, 時限分解, DGGE

1. 研究開始当初の背景

耐久性を追求し作り出されたプラスチックは、我々の生活に多大な恩恵をもたらした反面、分解しないため、プラスチック廃棄物の処理処分は、国際的に社会問題化している。日本においては、平成12年に循環型社会推進基本計画が策定され、これに基づき容器リサイクル法を含む各種リサイクル法が公布

された。これらの法整備により、プラスチック廃棄物のより適切な処理法に関する社会通念として、廃棄物の減容化-リサイクルは、既定路線となりつつある。一方、農水産業資材や、土木資材など、使用后その一部が回収困難な用途に関しては、使用后、微生物により分解され環境に取り込まれる「生分解性プラスチック」の使用も選択肢の一つと考えら

れる。

生分解性プラスチックは、(A)使用中は十分な機械的強度を持ち、(B)不要になった際に、微生物により速やかに分解されなければならない。日本バイオプラスチック協会は、「生分解性プラスチック」を、ISO14851, ISO14852,あるいは ISO14853 (ISO 法)に基づいて、好氣的条件下、一定期間で、60%以上の生分解度を示す高分子材料、と定義付けている。(A)の高物性を指向した生分解性プラスチックの研究開発は活発に行われている。一方、(B)十分に生分解性発現が制御された材料の開発は、それ程進んでいない。生分解性プラスチックの開発において、材料寿命を十分に制御するためには、材料側からだけではなく、生物側からも研究すなわち、高分子分解微生物の生態をよく理解する必要がある

現在までに、いくつかの生物由来あるいは化学合成脂肪族ポリエステル分解微生物が単離されている。特に生分解性に優れる生物由来ポリヒド(3-キシブタン酸)(P(3HB))を分解する微生物は詳しく調べられており、非常に多様な種の微生物(細菌、カビ類)が分解に関与することがわかってきた。一方、化学合成生分解性ポリエステルであるポリエチレンサクシネート(PESu)は、比較的製造コストが低くまた、優れた物性を有するため注目されている。しかしながら、PESuの環境中での生分解性は、一定しないことが知られている。そこで、我々は、環境中よりPESu分解微生物の単離同定を試みた。その結果、意外なことに、PESu分解微生物の多くは、P(3HB)分解微生物群の範疇に含まれることがわかった。さらに、PESu分解カビ*Aspergillus clavatus*の培養上清よりPESu分解に関与する加水分解酵素を精製し、その性質を詳細に調べたところ、PESu加水分解酵素は、P(3HB)分解酵素であることがわかった。

PESu生分解を引き起こす酵素が、P(3HB)分解酵素であるにも関わらず、PESuの環境分解性は、P(3HB)と比較して低い。このように、分解菌種および分解酵素が共通しているにもかかわらず、P(3HB)およびPESu間には、環境分解挙動に違いが見られる。この結果は、生分解性プラスチックの環境分解性が、酵素

分解性と必ずしも一致しないことを示している。

2. 研究の目的

生分解性プラスチックの材料寿命を制御するためには、酵素加水分解に関わる「生分解経路 I」と分解微生物が関与する部分の「生分解経路 II」の双方を知る必要がある、と考えられる。生分解経路 Iにおいて、我々の研究グループは、世界で初めて、P(3HB)分解酵素の結晶構造を解明し、酵素がどのように高分子基質を認識し、加水分解するのかを明らかにした。

一方、材料の環境分解性を理解するためには、分解微生物内での酵素誘導のメカニズムの解明に関わる、生分解経路 IIの解明が鍵となる。しかしながら、生分解経路 IIの詳細な研究例は、ほとんどない。そこで、本研究課題では、生分解経路 IIに焦点を当て、分子レベルでの生分解性プラスチック分解酵素の生産メカニズムを解明することを目的とする。さらには、酵素生産に関与する誘導物質を明らかにし、高分子構造にこれを新たに組み込むことにより、微生物の酵素生産システムを利用した環境中での、高分子の自在生分解システムの構築が可能となる。

本研究課題は、P(3HB)分解酵素生産システムを、明らかにする。また、この結果は、前述の通り、材料設計における生分解性因子の明白化にもつながり、新しい生分解性ポリエステルの創出に役立つ。また、P(3HB)(生物由来)/PESu(化学合成)のように同じ酵素が分解に関与する例は、絹タンパク/ポリ乳酸などでも知られている。このように本研究課題で用いられる方法論は、様々な生分解性プラスチック開発に適用できる可能性がある。

3. 研究の方法

遺伝子配列解析

単離したバクテリアのゲノムDNAをコロニーPCR法により増幅した。変性剤濃度勾配ゲル電気泳動(DGGE)バンドから回収したDNAを、PCR法により増幅した。PCR産物を、T-Vector pMD20に連結し、大腸菌に導入した。

得られたクローンをシーケンシング解析した。塩基配列及び相同性解析は、プログ

ラム GENETYX あるいはプログラム blastn を用いて行われた。

変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (DGGE) 法

PCR-DGGE には、D-code System (BIO-Rad 社製) を用いた。PCR 試料を、58°C 一定、200V の定電圧で 4 時間泳動した。DGGE バンドの濃度はプログラム ImageJ を用いて定量した。

生化学的酸素要求量 (BOD) 生分解度測定

環境水を植種源として、P(3HB)、PESu およびこれらのブレンドの BOD 生分解度を測定した。

4. 研究成果

様々な環境中の全生菌数に対する P(3HB) および PESu 分解菌数の割合は、それぞれ、0.28-35%、0-17% であった。また、すべての環境サンプル中で P(3HB) 分解菌数は、PESu 分解菌数を上回っていた。P(3HB) 分解菌はすべてのサンプルで見られたが、PESu 分解菌は海水には見られなかった。環境サンプルの水分含率、pH と分解菌数間において相関は見られなかった。一方、海水を除く環境サンプルでは生菌数が増加するに従い、分解菌数も増加していた。これらのことから、海水以外では生菌数を調べることでこれらのポリエステルの分解予測が可能であると考えられる。環境サンプルを接種源として、ポリエステルの乳化固体培地を用いたクリアゾーン法により、P(3HB) および PESu 分解菌を単離した。その結果、P(3HB) 分解菌を土壌から 11 株、淡水から 6 株、海水から 4 株単離した。一方、PESu 分解菌は土壌から 12 株、淡水から 1 株単離されたが、海水からは単離されな

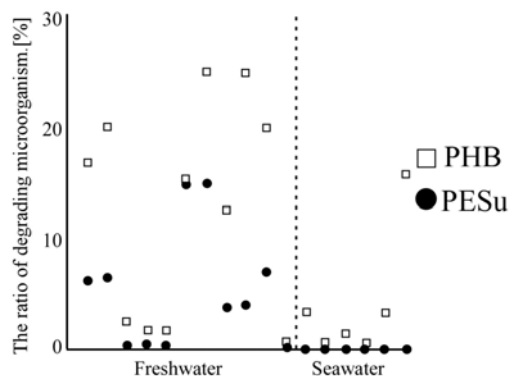


図. 淡水および海水における P(3HB) および PESu 分解微生物割合

かった。これらの菌を、コロニー形態に基づき分類し、さらに遺伝系統的解析した。P(3HB) のみの分解菌種は、*Streptomyces* 属、*Kitasatosporia* 属、*Acidovorax* 属、*Comamonas* 属、*Stenotrophomonas* 属、*Microbacterium* 属、*Alcanivorax* 属および *Shewanella* 属に近縁であり、PESu のみの分解菌種は、*Pseudomonas* 属に近縁であることがわかった。また、*Bacillus* 属と *Variovorax* 属は、両ポリエステルを分解するものがあつた。また、海水から単離された *Microbacterium* sp.、*Shewanella* sp. および *Alcanivorax* sp. はこれまでに P(3HB) 分解菌として報告されていない菌種だった。これらの単離株のうち、P(3HB) 分解活性でスクリーニングした 21 株のうち PESu の分解が見られたのは 18 株だったが、一方 PESu 分解活性でスクリーニングした 13 株のうち P(3HB) の分解が見られたのは 8 株いた。海水から単離された株は P(3HB) および PESu の両方にクリアゾーンを形成することが出来た。このことから、海水中でも潜在的に PESu を分解することが可能であると考えられる。

P(3HB) と PESu の混合比を変えても土壌では PESu の分解に差はほとんど見られなかった。P(3HB) 分解菌による PESu 分解を見るために、PESu 分解菌が存在しないサンプルを用いて PESu の BOD 生分解度を調べた。系内で PESu に P(3HB) を加えた方が PESu のみの場合に比べより高い BOD 生分解度を示すことがわかった。ある種の環境下では、PESu のみの場合は全く分解しなかった。一方、同一の環境下でも、PESu に、P(3HB) を加えた場合、PESu が分解した。これらの結果から PESu 分解微生物がいない条件の自然環境下でも PESu に P(3HB) をブレンドすることにより PESu 分解の促進が可能であることがわかった。この集積培養液を用いて変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (DGGE) 法を用いて群集解析を行った。この結果、どのサンプルでも同じようなバンドパターンが観察された。このことから、P(3HB) 分解菌が PESu の分解に関与していることが示唆された。DGGE バンド解析より、*Enterobacter* sp.、*Aeromonas* sp.、*Stenotrophomonas maltophilia*、*Proteobacterium Ellin181*、*Pseudomonas* sp.、

Lysinibacillus fusiformis、*Flavobacteriales bacterium* および *Chryseobacterium wanjuese* が含まれていることが判明した。DGGE バンドの濃度を ImageJ で解析した結果、PESu80%および PESu50%において、S-6 のバンドは集積培養液のバンドに比べ、濃くなっていることが分かる。したがって、S-6 バンドと高い相同性を示した *Bacillus* sp. が P(3HB)-PESu ブレンドした際の分解に重要な役割を持っていることが示唆された。

生分解性プラスチックの研究室内での分解実験と、実際の環境中での分解との間には、不一致がある。一方で、生分解性プラスチックの実用化に向けて、物性のさらなる改善とともに、材料の分解予測情報が、不可欠となる。分解予測を可能にするためには、どのような微生物が、分解に関与しているかを明らかにすることが重要である。本研究では、生分解性プラスチックの研究室内での分解実験と、実際の環境中での分解との間の不一致を是正し、分解予測を可能にするために、P(3HB) 分解酵素によって分解することが知られている PESu と P(3HB) の中温域での分解微生物の分布を比較し、PESu に P(3HB) をブレンドすることによる PESu 分解が制御可能であることを示した。

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 7 件)

1. 加藤泰三, 竹村章夫, 岩田忠久, 田中稔久, 粕谷健一, 伊藤和輝, 高田昌樹, ポリ [(R)-3-ヒドロキシブチレート-co-(R)-3-ヒドロキシヘキサノエート] のゲルフィルム作成, 高次構造解析および酵素分解性, 繊維学会誌, 66, 253-260 (2010). (査読有)
2. K. Kasuya, N. Ishii, Y. Inoue, K. Yazawa, T. Tagaya, T. Yotsumoto, J. Kazahaya and D. Nagai, Characterization of a Mesophilic

Aliphatic-aromatic Copolyester-degrading Fungus. *Polym. Degrad. Stab.* **94**, 1190-1196 (2009). (査読有)

3. N. Ishii, Y. Inoue, T. Tagaya, H. Mitomo, D. Nagai and K. Kasuya, Isolation and Characterization of Poly(butylene succinate)-degrading Fungi, *Polym. Degrad. Stab.* **93**, 883-888 (2008). (査読有)

[学会発表] (計 31 件)

1. K. Kasuya, Characterization of aliphatic aromatic polyester-degrading microorganisms, International Focused Group Symposium on Biobased Polymer, 2011. 1. 21, USM, Penang, Malaysia
2. 粕谷健一, 生分解性高分子の材料寿命制御を目指して -生物学からのアプローチ-, 2010. 7. 9, 高分子学会 エコマテリアル研究会, 東京
3. K. Kasuya, Aliphatic-aromatic polyester-degrading microorganisms, 2009. 12. 4, Workshop on Biodegradable Biomass Plastics, 2009, Yuan Ze Univ., Taiwan

6. 研究組織

(1) 研究代表者

粕谷 健一 (KASUYA KENICHI)
群馬大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号: 60301751

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

米山 賢 (Yoneyama Masaru)
群馬大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号: 40230841