

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月30日現在

機関番号：82706

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580106

研究課題名（和文）生分解性プラスチックを低温、高圧下で分解する微生物の分離と分解評価法の確立

研究課題名（英文）Isolation of the bio-degradable plastic degrading bacteria at low temperature and high-pressure conditions, and discovery of the evaluation system of the plastic degradation.

研究代表者 加藤 千明 (Kato Chiaki)

独立行政法人海洋研究開発機構・海洋・極限環境生物圏領域・上席研究員

研究者番号：90360750

研究成果の概要（和文）：潜水調査船「しんかい 6500」および「かいこう 7000II」にて、千島海溝深度 3500~4800m、日本海溝深度 5000~7000m の海底より採取された底泥サンプルから、生分解性プラスチック分解微生物を分離した。得られた微生物は、低温、高圧下といった条件でよく成育し、そうした条件下でも同プラスチック分解活性を良好に保持していた。また、分離された微生物を使って、低温・高圧下での同プラスチック分解性を評価するための「連続加圧培養分解評価装置」を新規に開発し、その有用性について明らかとした。

研究成果の概要（英文）：Several bio-degradable plastic degradation bacteria were isolated from Kuril-Trench (depth 3500-4800m) and Japan-Trench (depth 5000-7000m). The isolated bacteria were shown as psychrophilic and piezophilic growth properties, and were able to degrade the bio-plastics at low temperature and high-pressure conditions. Using those isolates, the “continuous high-pressure cultivation and bio-plastic degradation evaluation system” was developed, and we elucidated it’s availability.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：微生物利用学

1. 研究開始当初の背景

近年生分解性プラスチックは、環境に優しい素材として急速に開発され利用されるようになってきた。しかしながらこれらの素材の分解性は陸上環境でのみ確認されており、地球上の大部分を占める海洋、なかんずく深海環境での分解性を保証したものではない。そこで、深海に生息する微生物が、既に利用されている生分解性素材を分解できるのかと

いうことを調べ、低温・高圧といった深海の環境でもその分解性が保証できる素材を評価できるようになることが重要な課題である。

2. 研究の目的

(1) 深海微生物が低温・高圧下での条件で生分解性プラスチック素材の分解ができるかを確認するために、新規のプラスチック

分解性深海微生物を分離する。

(2) 分離された微生物を利用して、生分解性プラスチック素材の深海環境での分解評価システムの構築を行う。

3. 研究の方法

(1) 深海調査航海に参加し、深海底泥サンプルを得る。得られたサンプルから、低温・高圧下の条件で良好に生分解性プラスチック素材を分解できる微生物を分離する。

(2) 分離された微生物の性質を調べ、その成育や、プラスチック分解の至適条件を明らかにする。

(3) 分離された微生物から、性能の高い微生物をえらび、これを利用した、連続高圧培養システムを構築する。

(4) 構築されたシステムを利用して、生分解性素材の低温・高圧下での分解性評価を行う。

(5) プラスチック分解を促進する酵素を特定し、その性質を調べる。

4. 研究成果

(1) 新規生分解性プラスチック分解深海微生物の分離。

千島海溝、日本海溝調査で得られた底泥サンプルから 13 株のポリカプロラクトン(以下 PCL、生分解性プラスチックの 1 種)分解性微生物の分離に成功した。分離株の中から、低温・高圧下で良好な生育と分解活性を示した株をえらび、以降の実験に供した。分離株の中から 2 株の新種の微生物が確認され、それぞれ、*Moritella polymerulytica* JT01、*Moritella kaikoa* JT04 と命名した。培養実験の結果、JT01 株は好冷性の好圧性細菌、JT04 株は、好冷性の耐圧性細菌であることが明らかとなった。

(2) 連続加圧培養分解評価装置の開発

既存の加圧装置を改良し容器の内外で溶液循環ができるようにした。溶液の循環には、液体クロマトグラフィーで用いる高圧ポンプを利用し、背圧弁をかますことにより、容器内の圧力を一定にすることに成功した。本装置(図 1)を利用して、連続加圧培養分解実験を行った。その結果、低温、高圧下の条件で PCL 素材を良好に分解評価できることがわかった。本装置のネックは、培地循環時の微生物コンタミ問題であったが、ラインの洗浄滅菌を繰り返すこと、低温状態でクリーンベンチの中で連続培養を行うこと等の工夫で、この問題を克服することができた。

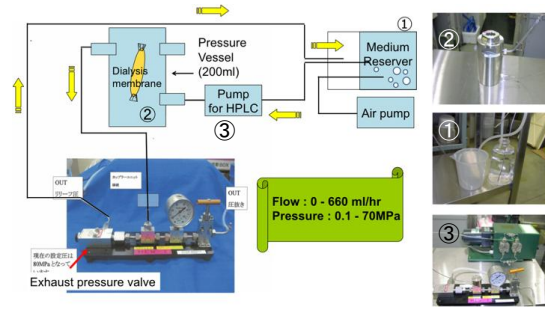


図 1. 連続加圧培養分解評価装置システム図。

(3) PCL 分解酵素の精製と性質

M. polymerulytica JT01 より、PCL 分解活性を示す酵素の精製に成功した。本酵素は、分子量約 4 万 5 千で、約 150MPa の圧力下で最も活性が高い好圧性の酵素であることがわかった。加圧下での構造安定性を調べた結果、大気圧下に適応した微生物から生成された酵素と比較して、非常に高い圧力安定性を示した(図 2)。

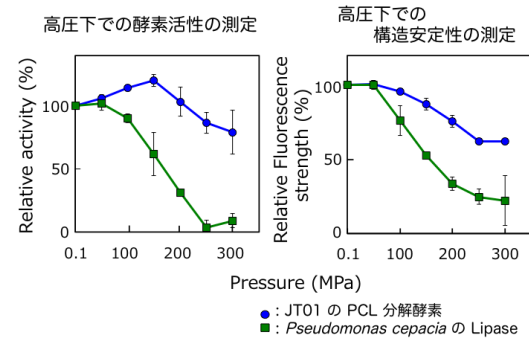


図 2. JT01 株由来の酵素と通常の酵素との加圧下における活性と構造安定性の比較

JT01 株の本酵素におけるこうした高い圧力安定性は、いったいどのような構造的な特徴によるものであるか検討するため、同遺伝子の取得を行った。

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 Kato, C. (2012) Microbiology of piezophiles in deep-sea environments. In: "Extremophiles: Microbiology and Biotechnology" (Ed. Roberto P. Anitori), Caister Academic Press, Norfolk, UK, pp. 233-263.
- ② Hiraki, T., Sekiguchi, T., Kato, C., Hatada, Y., Maruyama, T., Abe, F. and Konishi, M. (2012) New type of pressurized cultivation method providing oxygen for piezotolerant yeast. J. Biosci. Bioeng., 113 (2), 220-223.
- ③ Kato, C. (2011) 5.1 Distribution of

- piezophiles. In: "Extremophiles Handbook" (Eds. Horikoshi, K., Antranikian, G., Bull, A., Robb, F. and Stetter, K.), Springer-Verlag, Tokyo, pp. 643-655.
- ④ Sekiguchi, T., Saika, A., Nomura, K., Watanabe, T., Watanabe, T., Fujimoto, Y., Enoki, M., Sato, T., Kato, C. and Kanehiro, H. (2011) Biodegradation of aliphatic polyesters soaked in deep seawaters and isolation of poly(ϵ -caprolactone)-degrading bacteria. *Polym. Deg. Stab.*, 96, 1397-1403.
 - ⑤ Sekiguchi, T., Sato, T., Enoki, M., Kanehiro, H. and Kato, C. (2010) Procedure of isolation of the plastic degrading piezophilic bacteria from deep-sea environments. *J. Jpn. Soc. Extremophiles*, 9, 25-30.
 - ⑥ Sekiguchi, T., Sato, T., Enoki, M., Kanehiro, H. and Kato, C. (2010) Isolation and characterization of biodegradable plastic degrading bacteria from deep-sea environments. *JAMSTECR*, 11, 33-41.
 - ⑦ 加藤千明, 関口峻允 (2010) 生分解性プラスチックの深海微生物による分解性。イノベーションニュース、Vol. 12, 6-7.
- 〔学会発表〕 (計 35 件)
- ① 加藤千明 (2011 年 11 月) 深海微生物によるポリマー分解と連続加圧培養システムの構築。第 52 回高圧討論会、沖縄キリスト教学院、沖縄県西原町 (招待講演)。
 - ② 座間千夏、関口峻允、藤岡明日香、石田真巳、榎牧子、加藤千明 (2011 年 11 月) 生分解性プラスチック分解微生物に由来するエステラーゼ遺伝子の解析。第 12 回極限環境生物学会年会、長崎大学良順会館、長崎市。
 - ③ 開俊樹、関口峻允、加藤千明、秦田勇二、丸山正、阿部文快、小西正朗 (2011 年 11 月) 継続的な酸素供給を可能にした高圧培養装置の開発と深海由来酵母を用いた装置評価。第 12 回極限環境生物学会年会、長崎大学良順会館、長崎市。
 - ④ 加藤千明 (2011 年 10 月) 深海バイオの展開：深海微生物によるバイオポリマーの分解と生産。明治大学科学技術研究所公開講演会、明治大学生田キャンパス、川崎市 (招待講演)。
 - ⑤ 座間千夏、関口峻允、藤岡明日香、石田真巳、榎牧子、加藤千明 (2011 年 10 月) 生分解性プラスチック分解微生物が生産するエステラーゼの遺伝子解析。日本農芸化学会関東支部 2011 年度大会、東洋大学、群馬県板倉町。
 - ⑥ 座間千夏、関口峻允、藤岡明日香、榎牧子、石田真巳、兼廣春之、加藤千明 (2011 年 5 月) 深海性の生分解性プラスチック分解微生物が生産するエステラーゼに関する研究。第 14 回マリンバイオテクノロジー学会大会、静岡県コンベンションアーツセンター、静岡市。
 - ⑦ 加藤千明、関口峻允、山中茂、兼廣春之、榎牧子 (2011 年 5 月) 深海環境に適応した微生物の探索と利用。第 14 回マリンバイオテクノロジー学会大会、静岡県コンベンションアーツセンター、静岡市。
 - ⑧ 関口峻允、座間千夏、坂本詩織、緒方垂実、榎牧子、兼廣春之、伊藤吹夕、山中茂、多米晃裕、植松勝之、宮崎征行、佐藤孝子、河戸勝、能木裕一、加藤千明 (2011 年 5 月) 深海由来の生分解性プラスチック分解微生物および細胞外高分子物質産生微生物の分離。第 14 回マリンバイオテクノロジー学会大会、静岡県コンベンションアーツセンター、静岡市。
 - ⑨ 関口峻允、宮崎征行、座間千夏、緒方垂実、坂本詩織、伊藤吹夕、山中茂、佐藤孝子、河戸勝、植松勝之、榎牧子、能木裕一、兼廣春之、加藤千明 (2010 年 11 月) 深海からの好圧性有用細菌の探索とその性質。第 11 回極限環境生物学会年会、京都大学、宇治市。
 - ⑩ 座間千夏、Mona Windmeisser、関口峻允、藤岡明日香、榎牧子、兼廣春之、加藤千明 (2010 年 11 月) 深海微生物による脂肪族ポリエステルの生分解について。第 11 回極限環境生物学会年会、京都大学、宇治市。
 - ⑪ Kato, C. (September, 2010) Possible application of deep-sea piezophilic microorganisms for plastic degradation and polymer production. 2nd Deep-sea Microbiology Workshop. Brest, France (招待講演) .
 - ⑫ Kato, C. (September, 2010) Investigation of piezophilic microorganisms and their application for environmental protection. 8th International Congress on Extremophiles. Azores, Portugal (招待講演) .
 - ⑬ 関口峻允・藤岡明日香・宮崎征行・河戸勝・佐藤孝子・榎牧子・能木裕一・兼廣春之・加藤千明 (2010 年 9 月) 好圧性生分解性プラスチック分解微生物の分離。高分子討論会、北海道大学高等教育機能開発総合センター、札幌市。
 - ⑭ Chiaki Kato, Takayoshi Sekiguchi, Makiko Enoki, Haruyuki Kanehiro, Fuyu Ito and Shigeru Yamanaka (August, 2010) Investigation of useful piezophilic microorganisms from deep-sea environments. 6th International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology. Technische Universitat Munchen, Germany.
 - ⑮ Takayoshi SEKIGUCHI, Asuka FUJIOKA,

Masayuki MIYAZAKI, Masaru KAWATO, Takako SATO, Makiko ENOKI, Yuichi NOGI, Haruyuki KANEHIRO, Chiaki KATO (August, 2010) Isolation and characterization of piezophilic biodegradable-plastic-degrading bacteria from deep-sea environments. 6th International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology. Technische Universitat Munchen, Germany.

- ①⑥ 加藤千明 (2010年7月) 深海好圧性細菌の有用性について。特殊環境微生物セミナー。京都大学、宇治市。
- ①⑦ 関口峻允、宮崎柁行、能木裕一、開俊樹、小西正朗、佐藤孝子、榎牧子、兼廣春之、加藤千明 (2010年7月) 好氣的加圧培養装置の開発。特殊環境微生物セミナー。京都大学、宇治市。
- ①⑧ Mona Windmeisser, Takayoshi Sekiguchi, Asuka Fujioka, Makiko Enoki, Haruyuki Kanehiro and Chiaki Kato (July, 2010) Biodegradation of aliphatic polyesters by deep -sea microorganisms. 特殊環境微生物セミナー。京都大学、宇治市。
- ①⑨ Takayoshi Sekiguchi, Masayuki Miyazaki, Yuichi Nogi, Toshiki Hiraki, Masaaki Konishi, Takako Sato, Makiko Enoki, Haruyuki Kanehiro and Chiaki Kato (June, 2010) Development of a continuously high-pressure cultivation system for a degradability evaluation of biodegradable plastics in deep-sea. 11th Asian and Oceanian Conference on Transcription. Okinawa, Japan.
- ②⑩ Mona Windmeisser, Takayoshi Sekiguchi, Asuka Fujioka, Makiko Enoki, Haruyuki Kanehiro and Chiaki Kato (June, 2010) Biodegradation of aliphatic polyesters by deep-sea microorganisms. 11th Asian and Oceanian Conference on Transcription. Okinawa, Japan.

他 15 件 (うち 5 件、招待講演)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称：新規微生物、及び該微生物を使用して生分解性プラスチックの生分解性を試験する方法。

発明者：加藤千明、兼廣春之、佐藤孝子、関口峻允

権利者：独立行政法人海洋研究開発機構、国立大学法人東京海洋大学

種類：特願

番号：2009-051211

出願年月日：2009年3月4日

国内外の別：国内

名称：新規有用深海細菌。

発明者：加藤千明、山中茂、伊藤吹夕、榎牧子、関口峻允、兼廣春之

権利者：独立行政法人海洋研究開発機構、国立大学法人東京海洋大学、国立大学法人信州大学

種類：特願

番号：2011-76600

出願年月日：2011年3月30日

国内外の別：国内、国外

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤千明 (Chiaki Kato)

独立行政法人海洋研究開発機構・海洋・極限環境生物圏領域・上席研究員

研究者番号：90360750

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし