

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：14603

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19151

研究課題名（和文）PETを発酵原料とした新規生分解性プラスチック生産技術の開発

研究課題名（英文）Development of biodegradable plastic production technology using PET as fermentation feedstock

研究代表者

吉田 昭介（Yoshida, Shosuke）

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・教授

研究者番号：80610766

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：ポリエチレンテレフタレート（PET）分解・代謝細菌 *I. sakaiensis* はPETを発酵原料として菌体内にポリヒドロキシアルカン酸（PHA）を著量蓄積する。そこで本研究では、本系のPHA生産量の向上、およびPHA物性向上を目指した。*I. sakaiensis* はPETを炭素源に良好に生育し、PHAを著量蓄積するが、テレフタル酸やエチレングリコールを炭素源とした増殖の菌体収率は低く、PHAをほとんど生産しないことに着目し、研究を進めた。その結果、*I. sakaiensis* が優先的にMHETを取り込むことを見出し、PETにMHETを添加することで、PHA生産量を増加させることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

I. sakaiensis によるPETを発酵原料としたの実装化には、菌体収率の向上が求められる。本研究で、本菌がPET代謝時に菌体外から取り込む基質を同定した。そして、この発見を利用することでPHAの増産に成功し、実装化への重要な知見を得ることができた。今後、本知見に基づくさらなる条件の最適化や、PHA共重合体の生産株を利用することで、実用化に耐えうるレベルへの収率の向上を進める必要がある。

研究成果の概要（英文）：*I. sakaiensis*, a polyethylene terephthalate (PET) degrading and metabolizing bacterium, accumulates significant amounts of polyhydroxyalkanoic acid (PHA) in its body using PET as a fermentation feedstock. In this study, we aimed to improve the PHA production and PHA properties of *I. sakaiensis*. We conducted the study focusing on the fact that *I. sakaiensis* grows well on PET as a carbon source and accumulates significant amounts of PHA, but the cell yield grown on terephthalic acid or ethylene glycol as a carbon source is low and produces little PHA. As a result, we found that *I. sakaiensis* preferentially uptakes MHET and were able to increase PHA production by adding MHET to PET in the medium.

研究分野：応用微生物学

キーワード：ポリヒドロキシアルカン酸 PET *Ideonella sakaiensis*

1. 研究開始当初の背景

環境流出したプラスチックが自然界では分解されず蓄積し、生態系や景観を破壊している。その解決策としてプラスチック分解菌が探索されたが、失敗に終わってきた。これを受け、微生物による生分解が可能なプラスチックの開発が行われてきた。微生物がエネルギー貯蔵物質として合成するポリヒドロキシアルカン酸(PHA)もその一つである。

このような背景の中、申請者らはペットボトルや衣服繊維などの素材であるポリエチレンテレフタレート(PET)を完全に分解、代謝する細菌 *Ideonella sakaiensis* と本菌が有する PET 分解酵素を発表し、「プラスチックは生分解されない」という常識を打ち破った。(Yoshida et al., *Science*, 2016)。本菌は PET の構成モノマーへの加水分解とモノマー代謝、両方を有する。最近、我々は、PET 存在下で培養した *I. sakaiensis* 菌体内に PHA の一種であるポリヒドロキシ酪酸(PHB)を著量蓄積する(菌体重量の約 50%) ことを見出した(Fujiwara et al., *Sci. Rep.*, 2021)。このことから、*I. sakaiensis* の PET 代謝能と PHA 合成能を活かした新規 PHA 生産システムの開発が可能となった。廃 PET の利用は、PHA 生産における安価な発酵原料の調達、ごみの資源化の観点から、PHA 生産に新たな価値を付与することができる。

2. 研究の目的

I. sakaiensis の PET を炭素源とした PHA 生産は、現状 0.8 g/L 程度であり、工業化に必要なレベル (>100 g/L) に及ばない。また生産される PHA は硬く脆い PHB であり、実用には適さないとされる。そこで本研究では、これら問題点を解決するため、*I. sakaiensis* の PET を炭素源とする増殖の改善による PHA 生産性の改善、および PHA の物性改良に取り組んだ。

3. 研究の方法

I. sakaiensis は PET を炭素源に良好に生育し、PHA を著量蓄積する。比べて、PET のモノマーであるテレフタル酸やエチレングルコールを炭素源とした増殖の菌体収率は 1/5-1/10 程度であり、また PHA をほとんど生産しない。このことから、本菌の PET 代謝時の炭素源の取り込みが、代謝全体の活性化に重要であることが示唆された。そこで、本菌の PET 成分取り込み系の解明、これを利用した菌体収率の向上を目指した。

I. sakaiensis の PET 分解産物に対する資化能、および取り込み能の検証：

I. sakaiensis の無機塩培地懸濁液に 3 mM TPA、3 mM EG、3 mM TPA/3 mM EG、3 mM MHET、3 mM TPA+3 mM MHET をそれぞれ添加後、振盪培養を行った。資化能の検証では菌の増殖をモニタリングした。取り込み能の検証では、初期菌体濁度を OD₆₆₀=0.2 と高く設定し、分解産物の HPLC により追跡した。

MHET 添加による *I. sakaiensis* の増殖：

前培養懸濁液に MHET (終濃度 3 mM)、PET 顆粒 (10 g)、PET+MHET (終濃度 3 mM) をそれぞれ加え、振盪培養した。PHA の蓄積の定性的な評価は、菌をスライドグラスに接着させ、

親油性蛍光色素 Nile red で染色の後、蛍光顕微鏡で観察した。また集菌後、乾燥菌体とし、メタノリシス処理の後、ガスクロマトグラフィーによりメチルエステルの定量を行った。

4. 研究成果

I. sakaiensis による PET 分解産物の炭素源としての利用可能性の評価

PET を炭素源とした *I. sakaiensis* の培養における増殖と PHA 生産量は TPA、EG と比べ、顕著に高い (Fujiwara et al., *Sci. Rep.*, 2021)。また、PET の PETase による主な分解産物は MHET であることから、本菌の PET 代謝は MHET 取り込み機構を介している可能性が考えられた。そこで、MHET、TPA、EG を炭素源とした本菌の菌体収率、比増殖速度から PET 分解産物の炭素源としての利用可能性を評価した。

I. sakaiensis を MHET (終濃度 3 mM)、TPA (終濃度 3 mM)、EG (終濃度 3 mM)、TPA (終濃度 3 mM)+EG (終濃度 3 mM)、炭素源なし (NCS) で培養し、24 h 毎に濁度を測定し、比増殖速度を算出した。3 mM MHET の菌体収率は完全加水分解産物である 3 mM TPA+3mM EG と比べて約 1.4 倍であった (Fig. 1A)。全条件で 48–72 h における比増殖速度が最大であったことから、本時間帯における比増殖速度を比較したところ、MHET が最も高く、他条件と比べ、約 2–6 倍であった (Fig. 1B)。

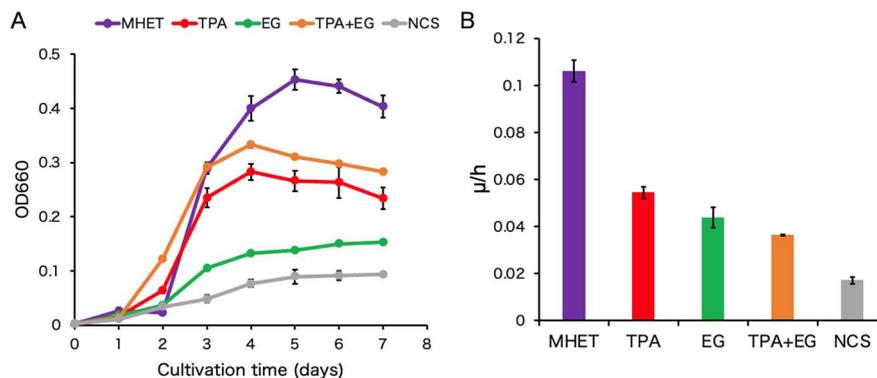


Fig. 1 MHET、TPA、EG を炭素源として培養した *I. sakaiensis* の増殖 (A)濁度と (B)比増殖速度 MHET (終濃度 3 mM)、TPA (終濃度 3 mM)、EG (終濃度 3 mM)、TPA (終濃度 3 mM)+EG (終濃度 3 mM)を炭素源として振盪培養 (30°C, 30°縦振り, 200 rpm, 遮光, 6 日間)した。A: 濁度 (OD₆₆₀)および B: 比増殖速度。n=3, 平均値±標準誤差。

I. sakaiensis の PET 分解産物に対する取り込み能の検証

PET 分解産物を炭素源として培養した *I. sakaiensis* の菌体収率、比増殖速度から、MHET 炭素源条件では、MHET を迅速に代謝し、他炭素源条件と比較して細胞の構成成分やエネルギーへの変換効率が高いことが示唆された。

そこで、本菌の各炭素源に対する取り込み能を検証するため、*I. sakaiensis* (OD₆₆₀=0.2) と PET 分解産物をインキュベートすることで、MHET、TPA、EG の取り込み能を検証した。それぞれの基質 3 mM と *I. sakaiensis* をインキュベートし、培養上清に含まれる PET 分解産物を 24 h モニタリングした。TPA のみ、EG のみの添加では、24 h の減少は共にわずかであった。TPA/EG 混合条件においても同様の傾向が認められた (Fig. 2A, B, C)。一方で、MHET 条件では MHET は 8 h までに検出されなくなり、TPA と EG が増加した。8 h までの TPA の増加幅は MHET の減少幅よりも低く推移していることから、MHET の分解と TPA の減少が同時に起こっているこ

とが示唆された。また、12-16 h までに TPA が検出されなくなったことから、本菌の TPA 代謝が機能していることが推測された。また、EG の増加幅は 24 h を通して MHET の減少幅とほぼ一致していることから、*I. sakaiensis* の EG 代謝レベルが TPA と比較して、極めて低いことが推測された。また、TPA/MHET 混合条件においても同様の傾向が認められ、24 h で 5 mM 以上の TPA が減少した。以上のことから、MHET 存在下で TPA の減少が顕著に向上することから、本菌の TPA 代謝が MHET によって活性化している可能性が示唆された (Fig. 2D, E)。

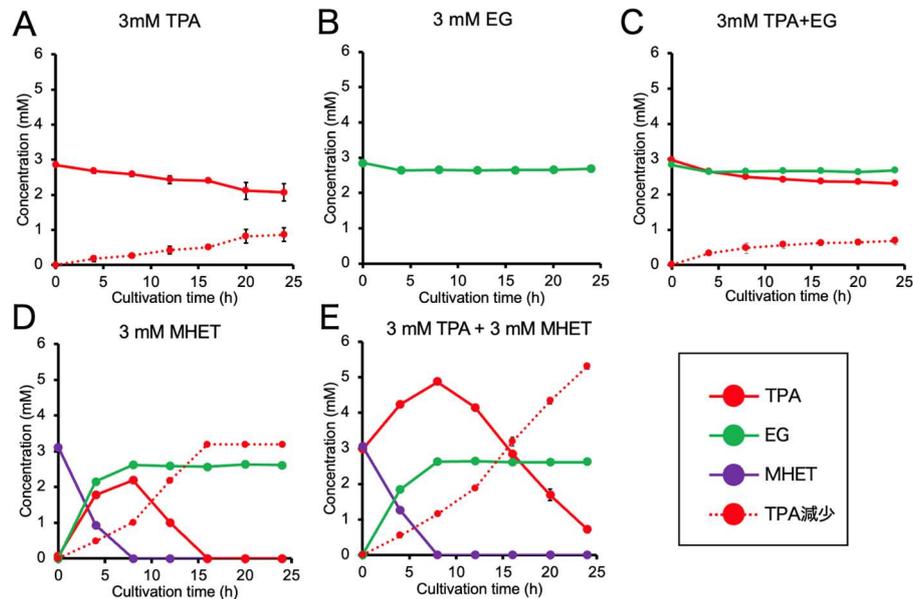


Fig. 2 *I. sakaiensis* による TPA、EG、MHET の取り込みと分解の経時変化

A: TPA (3 mM)、**B:** EG (3 mM)、**C:** TPA (3 mM)+EG (3 mM)、**D:** MHET (3 mM)、**E:** TPA (3 mM)+MHET (3 mM)を基質として、*I. sakaiensis* (OD₆₆₀=0.2)を振盪した。4 時間毎に培養上清を採取し、上清に含まれる TPA、EG、MHET を定量した。TPA 減少は、MHET の減少量と TPA 増加量の差を算出し、経時毎に積算した。n=3, 平均値±標準誤差。

MHET 存在下における *I. sakaiensis* の PHA 生産

I. sakaiensis が MHET を迅速に代謝し、TPA 代謝を活性化、タンパク質への変換効率が高いことから、MHET は本菌の増殖および PHA 生産を増加させる制御因子である可能性が示唆された。そこで、MHET が *I. sakaiensis* の増殖および PHA 生産に及ぼす影響を調べた。

MHET (終濃度 3 mM)、PETを炭素源として *I. sakaiensis* を培養した。培養開始から48時間毎に培養液を回収し、乾燥菌体重量と Nile red 染色後の細胞の蛍光顕微鏡による観察から脂溶性成分の蓄積を検証した。その結果、PET条件では脂溶性成分の蓄積が認められたが、MHET条件ではPET条件と比べて増殖性が低く、脂溶性成分の蓄積は認められなかった (Fig. 3A, B)。これまでに、PETを炭素源とすると *I. sakaiensis* は乾燥菌体重量の半分程度のPHAを蓄積することがわかっている。このことから、*I. sakaiensis* のPHA生産にはPET代謝には存在するが、MHET代謝には存在しない因子が必要であることが示唆された。そこで、PET代謝を基盤として、MHETを添加することによるTPA代謝のフラックスの向上、およびその結果としてのPHA生産の向上が期待された。そこで、PETにMHETを添加することによる増殖とPHA生産を検証したところ、培養6日でPET+MHET条件はPET条件と同程度の菌体収率であったものの、PET+MHET条件はPET条件と比べて、脂溶性成分を蓄積している細胞が多数認められた (Fig.

3B)。

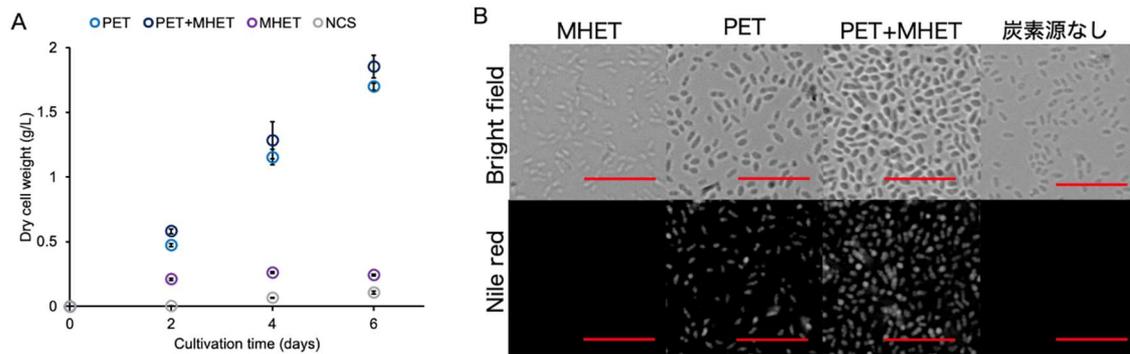


Fig. 3 MHET、PET、PET+MHET を炭素源として培養した *I. sakaiensis* の (A)増殖と (B)脂溶性成分の蓄積 **A**: 3 mM MHET、PET、PET+3 mM MHET を炭素源として、培養した。48 時間毎に乾燥菌体重量を測定した。n=3。 **B**: 培養 6 日目に培養液を採取し、Nile red で染色し、蛍光顕微鏡により、1000 倍で観察した。スケールバーは 10 μ m。

そこで次に、PET、PET+MHET を炭素源として培養した *I. sakaiensis* の PET の重量減少、乾燥菌体重量、PHA 蓄積率、PHA 生産量を比較した (Fig. 4 A, B, C, D)。6 日間の培養で、PET の重量減少は PET+MHET 条件で PET 条件の約 1.5 倍に達し、乾燥菌体重量は同程度であることがわかった。PET に MHET を添加すると PET の重量減少が促進した (Fig. 4A, B)。PHA 生産では、培養 6 日目には PHA 生産量、蓄積率は PET 条件で 1.00 ± 0.03 g/L、 59 ± 2.9 wt%、PET +MHET 条件で 1.30 ± 0.12 g/L、 70 ± 3.3 wt% に達し、MHET 添加によって PHA 生産が向上することがわかった (Fig. 4C, D)。

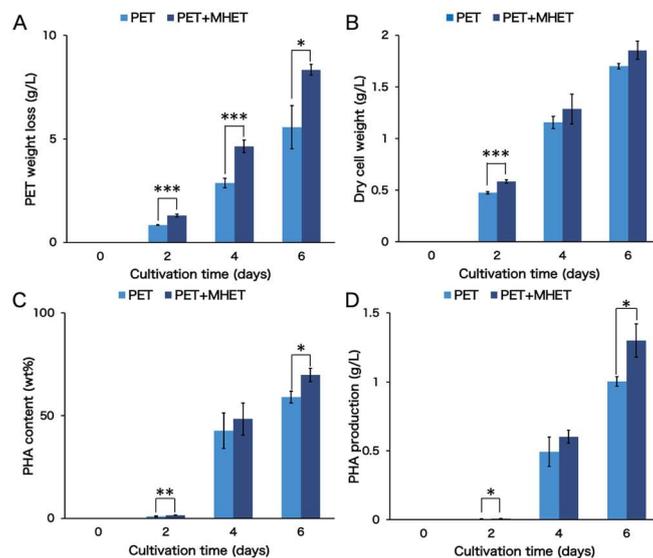


Fig. 4 PET、PET+MHET を炭素源として培養した *I. sakaiensis* の増殖と PHA 生産 **A**: PET、PET+MHET を炭素源とした培地での PET の重量減少。 **B**: PET、PET+MHET を炭素源とした培地での *I. sakaiensis* の増殖。 **C**: PET、PET+MHET を炭素源とした培地での *I. sakaiensis* の PHA 蓄積率。 **D**: PET、PET+MHET を炭素源とした培地での *I. sakaiensis* の PHA 生産量。YSVO 培地で PET、PET+MHET を炭素源として 30°C で 2、4、6 日間培養した。n=3, 平均値 \pm 標準誤差。PET 条件と PET+MHET 条件を比較して有意差のある値には、*印 ($p < 0.1$)、**印 ($p < 0.05$)、***印 ($p < 0.01$) を示した (スチューデント t 検定)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

| | |
|--|-------------------------------|
| 1. 著者名 Tan Hua Tiang, Chek Min Fey, Neoh Soon Zher, Ang Shaik Ling, Yoshida Shosuke, Hakoshima Toshio, Sudesh Kumar | 4. 巻 206 |
| 2. 論文標題 Characterization of the polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase from Ideonella sakaiensis, a bacterium that is capable of degrading and assimilating poly(ethylene terephthalate) | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Polymer Degradation and Stability | 6. 最初と最後の頁 110160 ~ 110160 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.polymdegradstab.2022.110160 | 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 該当する |
| 1. 著者名 Hachisuka Shin-ichi, Chong Jia Fong, Fujiwara Tsuyoshi, Takayama Akiyo, Kawakami Yumiko, Yoshida Shosuke | 4. 巻 106 |
| 2. 論文標題 Ethylene glycol metabolism in the poly(ethylene terephthalate)-degrading bacterium Ideonella sakaiensis | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Applied Microbiology and Biotechnology | 6. 最初と最後の頁 7867 ~ 7878 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00253-022-12244-y | 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 Ishikawa Raga, Yoshida Shosuke, Sawada Shin ichi, Sasaki Yoshihiro, Akiyoshi Kazunari | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 Development and single particle analysis of hybrid extracellular vesicles fused with liposomes using viral fusogenic proteins | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 FEBS Open Bio | 6. 最初と最後の頁 1178 ~ 1187 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/2211-5463.13406 | 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 Ishikawa Raga, Yoshida Shosuke, Sawada Shin-ichi, Sasaki Yoshihiro, Akiyoshi Kazunari | 4. 巻 14 |
| 2. 論文標題 Fusogenic Hybrid Extracellular Vesicles with PD-1 Membrane Proteins for the Cytosolic Delivery of Cargos | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Cancers | 6. 最初と最後の頁 2635 ~ 2635 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers14112635 | 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8件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 3件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 伊出 健太郎, 戸所 健彦, 佐貫 理佳子, 南はつね, 河野 恵美, 小高敦史, 吉田昭介, 石田 博樹 |
| 2. 発表標題 Aspergillus oryzaeによる Ideonella sakaiensis由来PET分解酵素の異種発現 |
| 3. 学会等名 日本生物工学会大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 吉田昭介 |
| 2. 発表標題 Ideonella sakaiensis由来PET加水分解酵素の正体を探る |
| 3. 学会等名 第95回 日本生化学会大会（招待講演） |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 吉田昭介 |
| 2. 発表標題 Ideonella sakaiensisによるPET分解機構の解明とその応用 |
| 3. 学会等名 第51回繊維学会 夏季セミナー（招待講演） |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Shosuke Yoshida |
| 2. 発表標題 Understanding a microbial polyethylene terephthalate (PET) metabolism and its application for the biodegradable plastic production |
| 3. 学会等名 Joint SBJ Meeting with Indonesia, Philippine and Thailand（招待講演）（国際学会） |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Jia Fong Chong, Min Fey Chek, Sun Yong Kim, Kazuma Yasuhara, Toshio Hakoshima, Shosuke Yoshida |
| 2. 発表標題 Identification and characterization of a novel BHET hydrolase from polyethylene terephthalate (PET) degrading bacterium, <i>Ideonella sakaiensis</i> |
| 3. 学会等名 Microbiology Society Annual Conference 2023 (国際学会) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 戸所健彦, 伊出健太郎, 佐貫理佳子, 河野恵美, 吉田昭介, 石田博樹 |
| 2. 発表標題 麹菌 <i>Aspergillus oryzae</i> による耐熱型PET分解酵素の発現 |
| 3. 学会等名 2023年度日本生物工学会大会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Shosuke Yoshida |
| 2. 発表標題 Bacterial poly(ethylene terephthalate) metabolism and its application for poly(hydroxyalkanoate) production |
| 3. 学会等名 The 14th TOYOTA RIKEN International Workshop (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Ardra Nandakumar, Akiyo Takayama, Min Fey Chek, Shosuke Yoshida |
| 2. 発表標題 Analysis of a two-component system of <i>Ideonella sakaiensis</i> expressed during PET degradation |
| 3. 学会等名 日本微生物生態学会 第36回大会 |
| 4. 発表年 2023年 |

〔図書〕 計1件

| | |
|-----------------------|-----------------|
| 1. 著者名 吉田昭介 | 4. 発行年 2024年 |
| 2. 出版社 シーエムシー出版 | 5. 総ページ数 7 |
| 3. 書名 高分子材料の分解制御技術 | |

〔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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|