

2020 年 3 月 31 日

報告書

実施期間 2019 年 8 月 1 日～2020 年 2 月 28 日

微生物の分解機能を利用した熱可塑性樹脂
バイオリサイクルシステムの研究

慶應義塾大学理工学部教授 宮本憲二

日産自動車（株）

総合研究所 先端材料・プロセス研究所

丹羽 勇介



2019年度 研究報告書

(実施期間 2019 年 8 月 1 日～2020 年 2 月 28 日)

研究題目

微生物の分解機能を利用した熱可塑性樹脂 バイオリサイクルシステムの研究

2020 年 2 月 28 日慶應義塾大学理工学部教授 宮本憲二

研究概要

熱可塑性樹脂バイオリサイクルシステムの可能性を検討するため、昨年に引き続き既知の石油分解菌と新たに油田から採取した菌体を用いてポリプロピレン（以下 PP）を分解する微生物を探索した。その結果、昨年見出した石油分解菌よりも高い PP 分解能を有する菌体を見出すことはできなかった。このため、昨年見出した石油分解菌を用いて PP のケミカルリサイクルを検討した。この石油分解菌による PP 分解生成物を分析したところ、培養液中から生成物は全く検出されなかったことから PP 分解生成物は菌体内に取り込まれていると考えられた。菌体内で代謝されていれば、アセトンやイソプロパノールなどの出発物質であるアセチル-CoA の生成されるため、PP から有用物質を生成するバイオリサイクルの可能性が期待される。

目次

- 1) 石油分解菌の PP 分解能のスクリーニング
- 2) 油田から採取した菌体の PP 分解能のスクリーニング
- 3) 石油分解菌のゲノム解析
- 4) バイオリサイクルの可能性の検討

1) 石油分解菌の PP 分解能のスクリーニング

NBRC (NITE Biological Resource Center) と DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) から石油分解菌 No.1~7 (常温菌) と No.8~11 (好熱菌) の計 11 株を入手して PP 分解能を評価した (Table1)。PP には微生物による分解を促進するために UV 処理をしたフィルムを用いた。

Table 1 スクリーニングを行った石油分解菌

株番号	菌株保存機関 および番号	菌株名	培養温度
1	NBRC 112585	<i>Acinetobacter venetianus</i>	30 °C
2	NBRC 108238	<i>Gordonia paraffinivorans</i>	30 °C
3	NBRC 106261	<i>Kribbia dieselivorans</i>	30 °C
4	NBRC 110906	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	30 °C
5	NBRC 109087	<i>Hoyosella subflava</i>	30 °C
6	NBRC 103045	<i>Pseudomonas indica</i>	30 °C
7	NBRC 110486	<i>Aquabacterium olei</i>	30 °C
8	NBRC 107829	<i>Geobacillus jurassicus</i>	55 °C
9	DSMZ 11668	<i>Geobacillus thermoleovorans</i>	55 °C
10	DSMZ 16053	<i>Geobacillus thermoleovorans</i>	55 °C
11	DSMZ 5366	<i>Geobacillus thermoleovorans</i>	55 °C

UV 処理

あらかじめ重量を測定した PP フィルム(1×5 cm)を、UV 照射装置中で 36 時間 UV 処理をした。UV 処理済フィルムについては、70 %エタノールで滅菌した後十分に風乾した。

培養方法 (PP フィルムの分解)

石油分解菌を無機塩培 10 mL に誘導剤兼炭素剤としてヘキサデカン を 0.02 % (v/v) 添加した培地中で前培養を行った。培養はリム付試験管(φ 24×200 mm)で、No.1~7 株に関しては 30 °C、No.8~11 株に関しては 55 °C に於いて 200 rpm で振とう培養を行った。石油分解菌が増殖した培養液 (100 μL) を上記の UV 処理済の PP フィルムとヘキサデカンの入った培地 10 mL に植菌し、15 日間および 30 日間振とう培養を行った。なお、培養は各株、各フィルムに対して 3 本ずつ行った。また、コントロールとして培養液を加えていない未植菌サンプルを用意し、同じ条件で振とうした。培養後、培養液の濁度 (OD₆₀₀) を測定することで石油分解菌の増殖、および PP フィルムの状態を観察した。

PP 分解能の評価

PP フィルムの重量測定

試験管中の培養液を全て除去し、約 10 mL の 2 % (v/v) ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 水溶液を加えて、30 °C で 24 時間振とうした。その後、減圧濾過によりフィルムをメンブレン上に収集し、蒸留水で洗浄し、一晚ドラフト内で風乾させてからフィルム重量を測定した。

FT-IR 分析

30 日間微生物処理した PP フィルム表面の官能基変化を、FT-IR 測定を用いて観察した。測定方法は反射法とし、積算回数は 36 回とした。波長は 400~4000 cm⁻¹ の範囲で測定した。同一のフィルムに対して 2 回、それぞれ無作為に決定した微小領域に対して行った。以下に結果を示す。

PP 分解能の結果

No.1～7 株(常温菌)を 15 日間および 30 日間、PP フィルムを入れた培地で培養した後の試験管の様子を Figure 1 に示す。

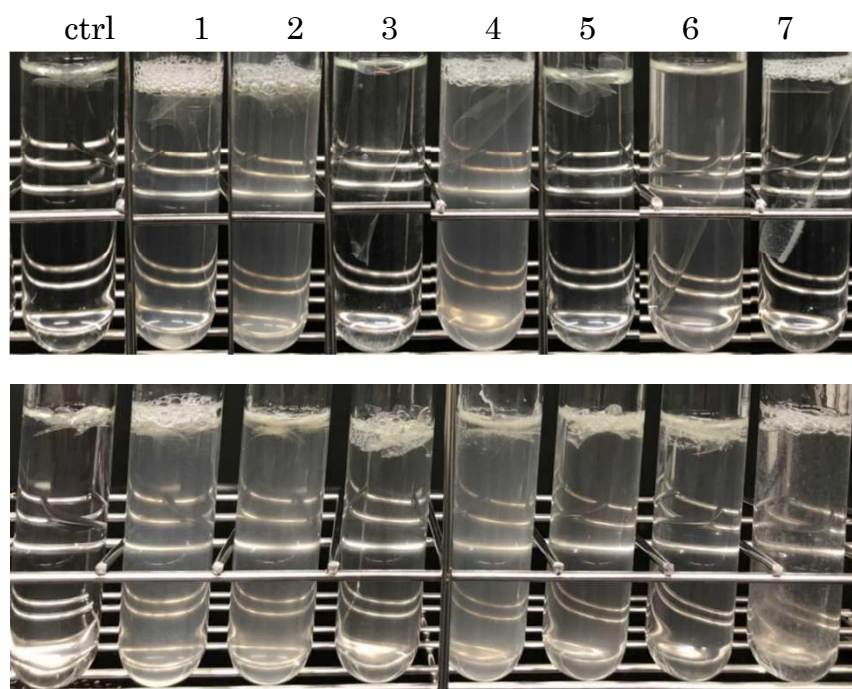


Figure 1 : 常温菌を培養した結果
(上 : 15 日間、下 : 30 日間)

コントロールも含めすべての PP フィルムが複数に分散していた。また、No.7 株と培養した PP フィルムについては、PP フィルムの一部にバイオフィルムの形成が見られた。これまでの経験からバイオフィルムが形成された場合はプラスチックの分解が起こっていることから、PP フィルムの分解が期待された。

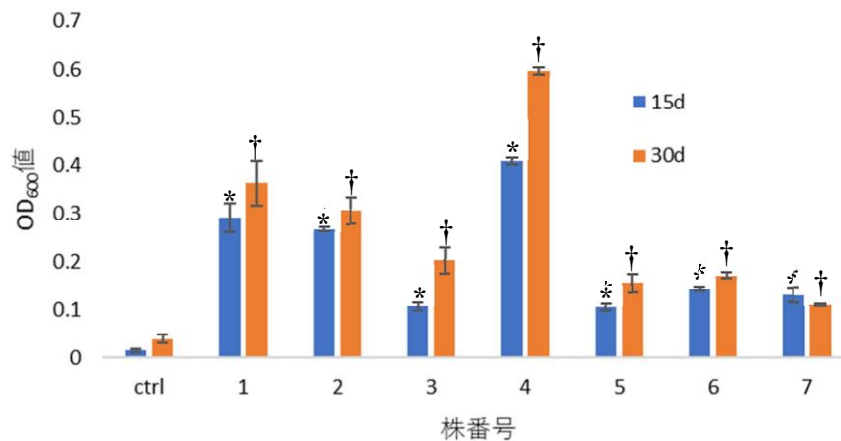


Figure 2 : PP 培地で常温菌培養後の OD₆₀₀ 値
(*p<0.05 vs ctrl15d, † p<0.05 vs ctrl30d)

常温菌の増殖を評価するため、培養液の濁度を測定した結果を Figure 2 に示す。No.7 株については 15 日と比較して 30 日の濁度が減少したが、その他の株については濁度が増加した。また、15、30 日間いずれの場合もコントロールの濁度に比べ有意な増加が見られ、常温菌候補株のすべてにおいて PP フィルム存在下での増殖が確認できた。

次に、No.8～11 株(好熱菌)を 15 日間および 30 日間、PP フィルムを入れた培地で培養した後の試験管の様子を Figure 3 に示す。

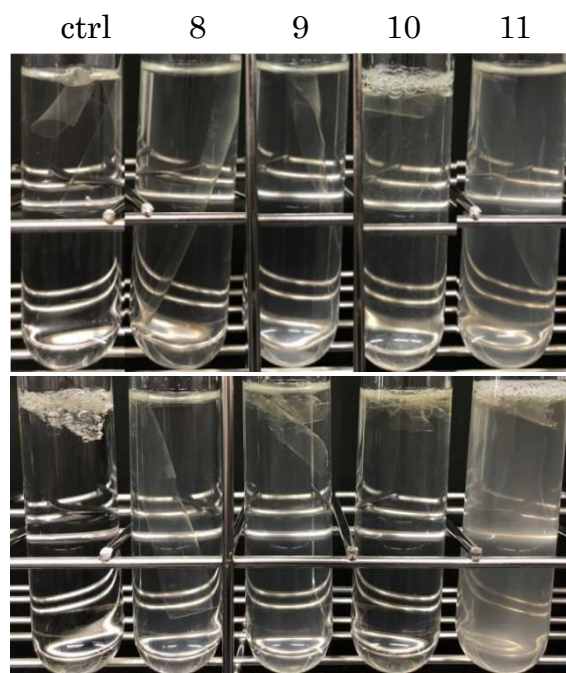


Figure 3 : 好熱菌を PP 培地で培養した結果
(上 : 15 日間、下 : 30 日間)

コントロールも含めすべての PP フィルムが複数に分散していた。しかし、いずれの PP フィルムにもバイオフィルムの形成は見られなかった。培養液の OD₆₀₀ 値を測定した結果を Figure 4 に示す。

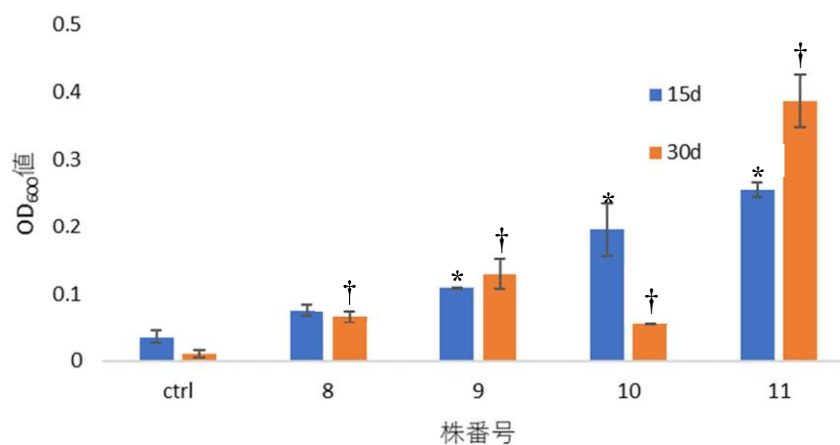


Figure 4 : PP 培地で好熱菌培養後の OD₆₀₀ 値
(*p<0.05 vs ctrl15d, † p<0.05 vs ctrl30d)

No.9、11 株については 15 日と比較して 30 日の濁度が増加し、コントロール、No.8、10 株については濁度が減少した。15 日間の培養では No.8 株のみはコントロールと比べ有意な増加はなかったが、30 日間の培養ではすべての培養液でコントロールの濁度と比べ有意な増加が見られ、好熱菌候補株すべてにおいて PP 存在下での菌の増殖が確認できた。

石油分解菌の増殖が確認できたので、No.1～7 株(常温菌)で処理を行った PP フィルムの重量変化率を Figure 5 に示す。コントロールも含め、ほとんどの PP フィルムで重量増加が見られた。30 日間の培養後に重量減少が見られたのは No.2 株で処理した PP フィルムのみであった。

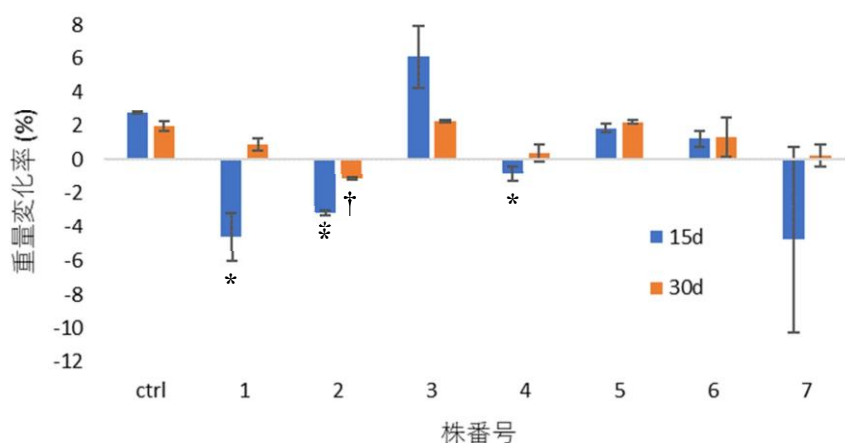


Figure 5 : PP フィルムの重量変化率(常温菌)

(*p<0.05 vs ctrl15d, † p<0.05 vs ctrl30d)

次に、No.8～11 株(好熱菌)で処理を行った PP フィルムの重量変化率を Figure 6 に示す。重量減少が見られたのは、No.11 株で 15 日間処理したフィルムのみで、その他の PP フィルムは重量増加が見られた。PP フィルムが分解しているにもかかわらず重量が増加する結果が得られた理由として、PP フィルムを洗浄する際にヘキサデカンの付着や石油分解菌が完全に除去できなかったことが考えられる。いずれにせよ、PP 分解能があまり高くないため、誤差として大きく影響したと判断した。

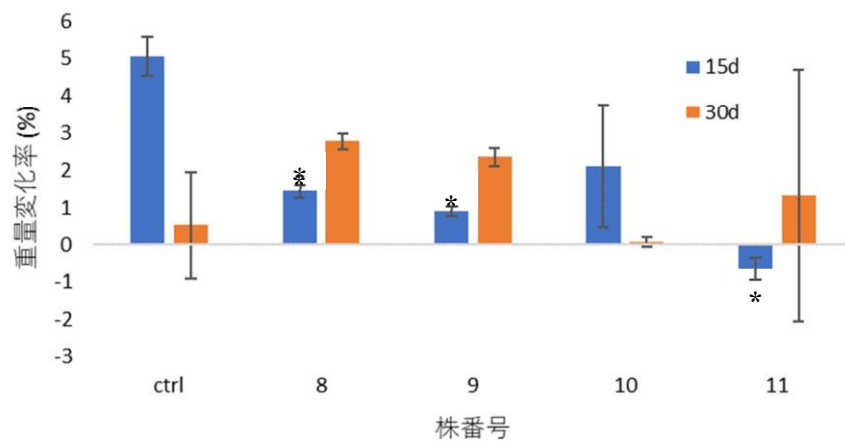


Figure 6 : PP フィルムの重量変化率(好熱菌)
(* $p < 0.05$ vs ctrl15d)

PP 分解能を表面分析からも評価した。常温菌で 30 日間処理をした PP フィルムについて、FT-IR 測定を行った結果を Figure 7 に示す。

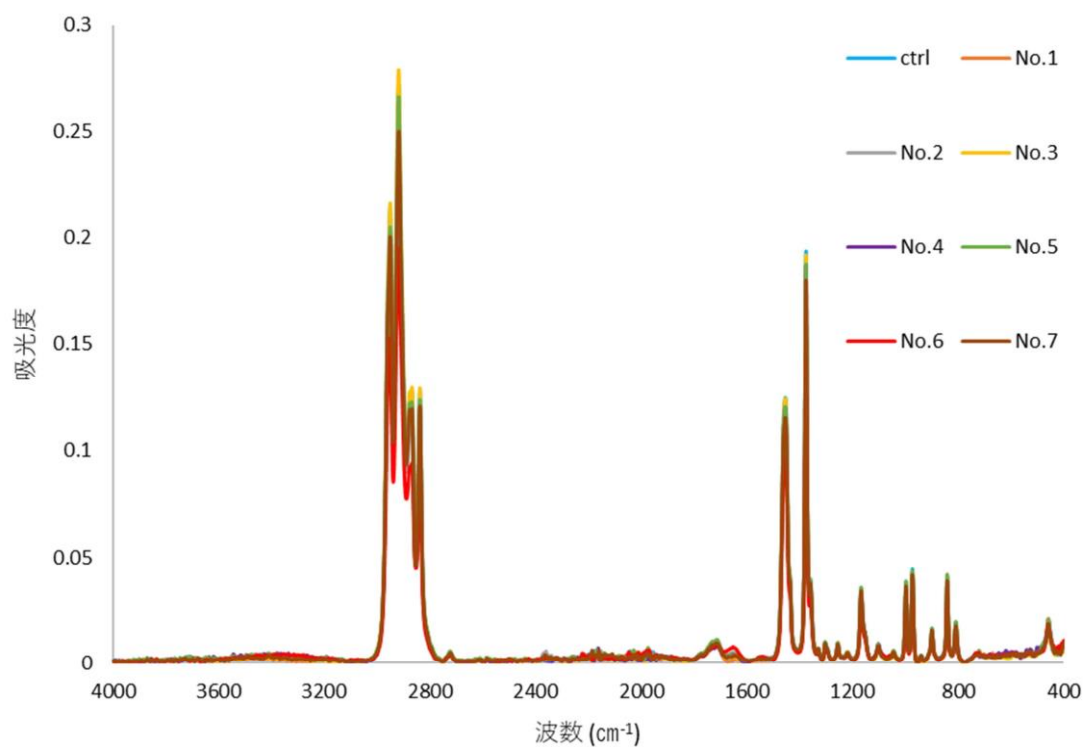


Figure 7 : PP フィルムの IR スペクトル(常温菌)

常温菌で処理を行った PP フィルムのスペクトルをコントロールのスペクトル(水色)と比較すると、新しいピークの出現やピークの消失はなかったが、吸光度の上昇がわずかに見られた。吸光度の上昇は、そのピークに由来する官能基が PP 分解により増加していると示唆される。次に、好熱菌で 30 日間処理をした PP フィルムについて、FT-IR 測定を行った結果を Figure 8 に示す。

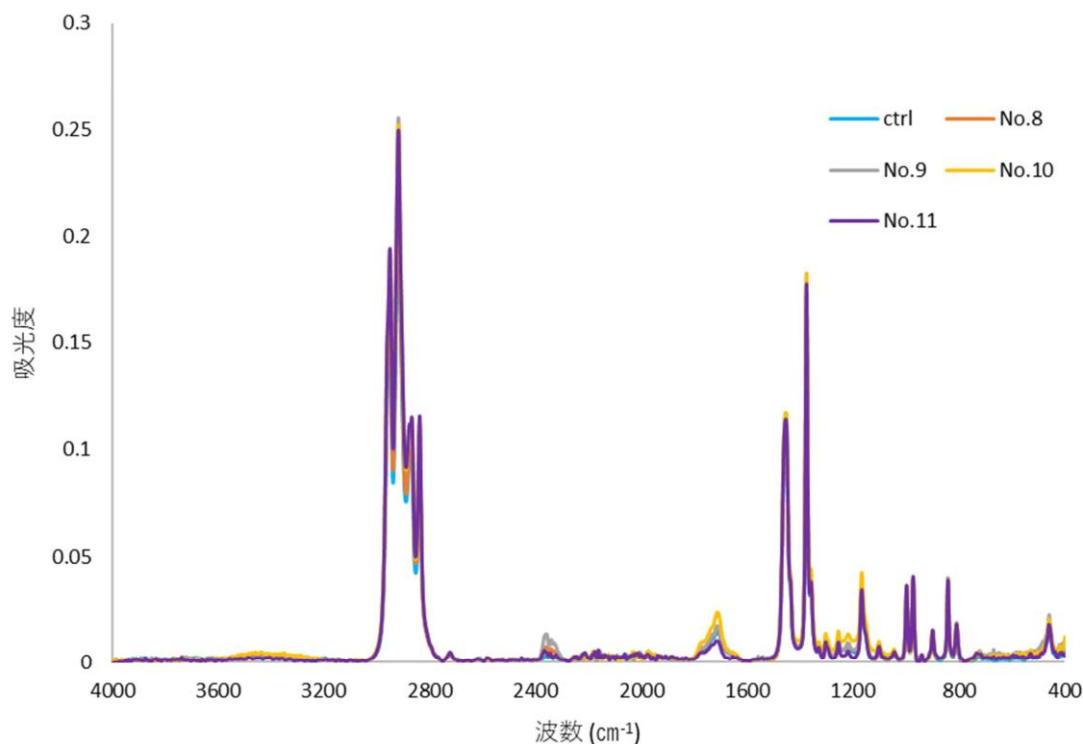


Figure 8 : PP フィルムの IR スペクトル(好熱菌)

好熱菌で処理を行った PP フィルムのスペクトルをコントロールのスペクトル(水色)と比較すると、常温菌で処理を行った場合と同様に、新しいピークの出現やピークの消失はなかったが、No.10 はカルボニル基に由来する 1650 cm^{-1} に明らかな吸光度の上昇が見られた。

以上の結果から、石油分解菌による PP 分解は重量変化率から定量できなかったが、FT-IR 測定からは定性的には起こっていると判断した。

2) 油田から採取した菌体の PP 分解能のスクリーニング

静岡の相良油田の 5 つの地点 (①から⑤) から採取した土壌サンプルを用いて PP 分解能のスクリーニングを行った。UV 処理をした PP フィルムを炭素源とした培地で、3 か月間培養した土壌中の菌を単菌化した。単菌化した株を、ヘキサ

デカンのみが炭素源である培地で2週間培養し、PP分解菌の候補株を選別した。この候補株は菌種が不明なために菌種同定を行った。また、PP分解後のPPフィルムについては、表面観察やFT-IR測定を行うことで分解能を評価した。

フィルムの UV 処理

スクリーニングには24時間UV処理したPPフィルムを用いた。

集積培養

集積培養は、無機塩培地10 mLと土壌サンプルを入れたリム付試験管(φ24×200 mm)に、ヘキサデカン0.2%(v/v)、UV処理済PPフィルムを加え、30℃で1ヶ月間振とう培養した。1か月後に新しい培地に植え継ぎを行った(植次は2回行った。培養時間は計3ヶ月)。また、コントロールとして土壌サンプルを加えていない未植菌サンプルを用意し、同じ条件で振とうした。培養後、培養液およびPPフィルムの観察を行った。

単菌化および候補株の選別

培養が完了した培養液中およびPPフィルム表面に付着した菌を単菌化した。培養液は、0.85%生理食塩水で $10^7 \sim 10^9$ 倍まで希釈し、その希釈液100 μLを微量の酵母エキスを炭素源とした無機塩寒天培地に播種し単菌化を行った。次に、単菌化で得られた菌の中からPP分解菌の候補株の選別を行った。無炭素培地10 mLを入れた試験管に、ヘキサデカンを0.02%(v/v)添加した。その後、単菌化によって得られたコロニーを白金耳で植菌し、2週間、30℃で振とう培養を行った。培養後、OD₆₀₀値を測定し、ヘキサデカンを炭素限として増殖が確認できたものを候補株とした。

候補株の菌種同定

候補株からPCRにより4f(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')と800r(5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3')をプライマーとして用いて16SrDNAの一部を増幅した。その後、DNAを精製後、シーケンスにより配列情報を得た。この配列をもとにBlast検索で候補株の菌種を同定した。

FT-IR 測定

培養後、試験管中の培養液を全て除去し、フィルムを2%(v/v)ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)水溶液および蒸留水で洗浄し、一晚ドラフト内で風乾させた。

回収したフィルム表面の官能基変化を、FT-IR 測定を用いて、IR スペクトルをコントロールと比較することで観察した。測定方法は反射法とし、積算回数は 36 回とした。波長は $400\sim 4000\text{ cm}^{-1}$ の範囲で測定した。

PP 分解能の結果

PP フィルムを入れた培地で集積培養を行った後の試験管の様子を Figure 9 に示す。

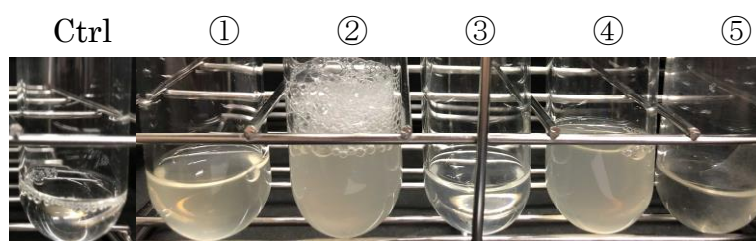


Figure 9 : PP フィルムを用いた集積培養結果

①、②、④、⑤の培養液には濁りが見られ、PP フィルム存在下で菌の増殖が確認できた。濁度が異なることから、異なる微生物が増殖していることが示唆された。また、すべての PP フィルムにバイオフィルムの形成は見られなかった。

候補株の菌種同定をするため、PP フィルムを入れた培地で集積培養を行った後、培養液中および PP フィルム表面に付着した菌を単菌化した。その結果、5 つのサンプルから計 24 株の菌を単菌化することができた。単菌化した 24 株の菌を、ヘキサデカンのみが炭素源である液体培地で培養した結果、1 株の菌の増殖が確認できた。この菌を PP 分解菌候補株 (PP1) とした。液体培養後の様子を Figure 10 に示す。

ctrl PP1
(OD:0.00) (OD:0.49)



Figure 10 : PP1 のヘキサデカンを炭素源とした培養液の様子

PP1 株の菌種同定

得られた候補株について、それぞれ 16S rDNA 解析により菌種の同定を行った。その結果、PP1 は *Variovorax* sp. と推定された。今まで *Variovorax* 属の微生物がアルカンを分解するという報告例はなく、これが最初の発見であった。培養後回収した PP フィルムについて、FT-IR 測定を行った結果を Figure 11 に示す。

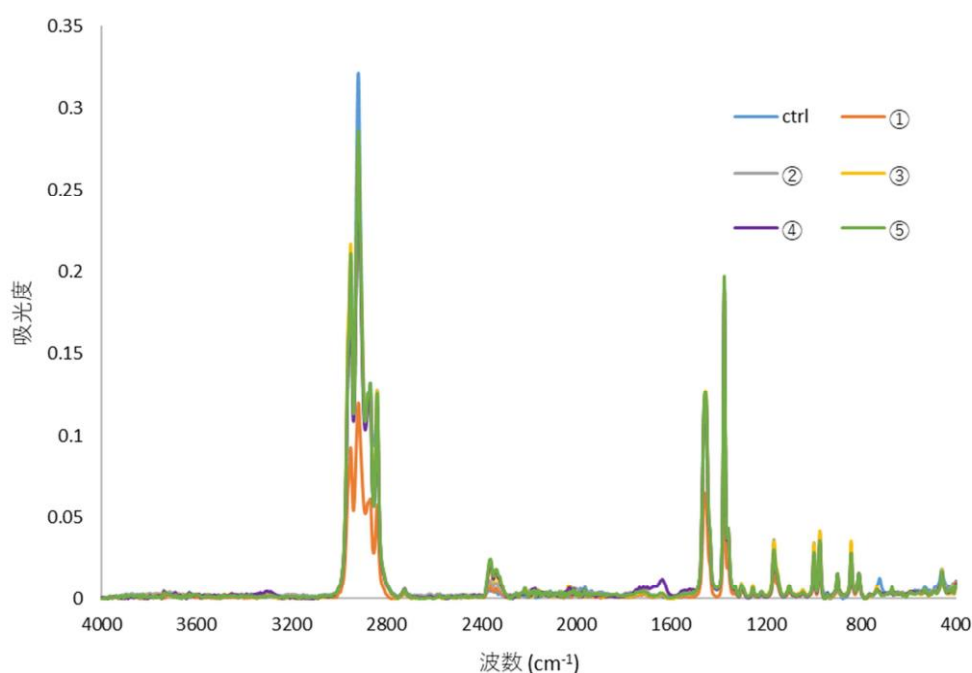


Figure 11 : PP フィルムの IR スペクトル

微生物処理を行った PP フィルムのスペクトルをコントロールのスペクトル(水色)と比較すると、コントロールでは見られなかった アルコールの OH 基に由来する 3350 cm^{-1} と カルボニル基に由来する 1650 cm^{-1} にピークが④でのみ見られた。その他の①、②、③、⑤については、コントロールとの顕著な差は見られなかった。

3) 石油分解菌のゲノム解析

石油分解菌は現時点で見出されている最も高い微生物である。また、我々の実験で、PP 分解の最有力候補株である。そこで、石油分解菌の分解機構を明らかにするために、ゲノム解析を実施した。また A29 と、同族同種でゲノムが既に解析されている SK2 株のゲノムの違いを検討することとした。アルカン分解

菌によるアルカン分解は、アルカンオキシゲナーゼによるアルカンの水酸化を皮切りに開始されることがわかっている。そこで、アルカンオキシゲナーゼに注目してゲノムを解析することとした。実際に SK2 株では、すでに二つのアルカンモノオキシゲナーゼをコードする遺伝子 (alkB1、alkB2) が知られている。石油分解菌はまだ全ゲノムが明らかになっていないため、今回は石油分解菌のゲノムシーケンスを行い、そこからアルカンモノオキシゲナーゼを探索した。

ゲノム抽出

2698 培地 10 ml を加えた試験管に、石油分解菌のプレートから白金耳を用いてコロニーを植菌し、30℃で振とう培養した。培養液を 1.5 mL チューブに取り、遠心して集菌した。DNA 抽出キットを用いて、湿重量約 40 mg の菌体からゲノム DNA を抽出した。

ゲノム解析

抽出し、精製したゲノムサンプルのシーケンスを、外部委託(GENEWIZ)して全ゲノムのリードデータを得た。このデータを前処理として cutadapt、Trimmomatic でアダプター配列の消去とクオリティが低い配列のトリミングを行った。その後 Unicycler assembly で、SK2 株のゲノムデータをリファレンスゲノムとして用いて、前処理したリードデータからコンティグを作製した。次に、Prokka でコンティグ配列に遺伝子予測情報をアノテーションした。そのアノテーションされたデータの中から、アルカンモノオキシゲナーゼを検索した。

結果と考察

SK2 株には二つのアルカンモノオキシゲナーゼ alkB1、B2 しかないが、石油分解菌には alkB1_1、B1_2、B2 の三つがあることがわかった。石油分解菌の alkB1_2、B2 はそれぞれ SK2 株の alkB1、B2 と配列相同性が 100%あることが BLAST によってわかったが、alkB1_1 はその他二つのアルカンモノオキシゲナーゼとの配列相同性が約 30%ほどであることがわかった。そこで BLAST によって配列相同性検索を行うと、完全に一致するものがヒットした (Table 2)。

Table 2 alkB1_1 と配列相同性の高い酵素

酵素名	配列相同性
alkanal monooxygenase [Alcanivorax sp. 97CO-5]	100.0%
alkane 1-monooxygenase [Alcanivorax sp. 97CO-6]	100.0%
alkane 1-monooxygenase [Marinobacter mobilis]	85.6%
alkane 1-monooxygenase [Marinobacter sp. NP-4(2019)]	80.8%

ヒットした株 *Alcanivorax* sp. 97CO-5、*Alcanivorax* sp. 97CO-6 はドラフトゲノムでしか存在せず、この酵素に関する研究もされていなかった。そのためこの酵素の基質特異性などはわからなかった。また、それ以外にも配列相同性が高い株として *Marinobacter* 属の株が持つ酵素が多くヒットしたが、これらの酵素に関しても研究はなかった。alkB1_1 やその周辺の遺伝子について、Figure12 に示す。



Figure 12 : alkB1_1 周辺の遺伝子

alkB1_1 はオペロン構造をとっているわけではなく、どのようにレギュレートされているかはわからなかった。だが、アルカン分解や PP 分解において、この遺伝子によって石油分解菌と SK2 株に差異が生じている可能性は十分に考えられる。

4) バイオリサイクルの可能性の検討

今回探索した石油分解菌と油田から採取した菌体の PP 分解能は、PP フィルムの表面分析から分解を確認できたものの、PP フィルムが細かい薄片で軽量であることに加え、分解能が十分でないために重量変化を正確に測定することができなかった。そこで、昨年見出した石油分解菌を用いてバイオリサイクルの可能性を検討した。石油分解菌により、PP フィルムの重量は 30 日間で約 10%減少している。

PP 分解生成物を分析するために、1 週間、2 週間後の培養上清をエーテル抽出して、GC-MS により分解物の解析を試みた。その結果、PP 由来と考えられる有機物のピークは全く見いだすことはできなかった。この原因として、PP 分解生成物は菌体内に取り込まれて速やかに代謝分解されたためと考えた。菌体内での代謝分解、 β 酸化によりアセチル-CoA などが生成する可能性がある。アセチル-CoA は様々な化合物の出発物質であることから、アセトンやイソプロパノールなどの有機溶媒、ポリヒドロキシアルカン酸などの生分解性プラスチックなどを合成することも可能である。PP 分解能が向上すれば、分解酵素の過剰生産やプラスチックの変性条件の最適化により、効率的なプラスチックの低分子化や有用物質への変換が期待できると考えている。