様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　４年　６月１５日現在

機関番号：１２１０２
研究種目：基盤研究(B)（一般）
研究期間：2018～2021
課題番号：１８Ｈ０２１１８

研究課題名（和文）テレフタル酸分解性実用菌株の機能解明とその利用

研究課題名（英文）Functional analysis and application of terephthalate-degrading bacteria.

研究代表者
中島　敏明（Nakajima-Kambe, Toshiaki）

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：８０２４１７７７

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　13,400,000円

研究成果の概要（和文）：テレフタル酸はPETボトルやポリエステル繊維、液晶パネル用機能性フィルム等の原料として様々な分野で使用されている。これらのリサイクル等においてテレフタル酸を含む廃液が生じ、その処理が問題となっている。本研究では、テレフタル酸分解菌（TB-97株）について、テレフタル酸からの有用物質生産を念頭に、全ゲノム情報に基づく関連遺伝子の特定と代謝システムの解析をおこない、有用物質（PDC)への変換を行った。また本菌株の有する新規な金属回収物質（シデロフォア）の構造決定や、本菌株が分離された活性汚泥槽の微生物群集構造とテレフタル酸分解との関連解明についても検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
テレフタル酸廃棄物はそのまま回収しても市場価値が安く、精製及び再利用は採算が合わないため現在はコストをかけて焼却処分されている。本研究成果によってテレフタル酸含有廃液の高効率処理が行えるのみならず、高付加価値化も行うことができ、将来的にはPETのアップリサイクリングに貢献できる。またシデロフォアを用いたレアメタルの回収も同時に行える可能性がある。さらに、排水処理施設中の微生物叢の解析を行うことで、安定した処理を行うための管理・診断手法を提供できる。

研究成果の概要（英文）：Terephthalic acid is used in various fields as a raw material for PET bottles, polyester fibers, and functional films for LCD panels. In the recycling of these products, liquid waste containing terephthalic acid is generated, and its treatment has become a problem. In this study, we identified relevant genes and analyzed the metabolic pathways of terephthalic acid-degrading bacteria (strain TB-97) based on the whole genome information, with the aim of producing useful substances (e.g. PDC) from terephthalic acid. We also determined the structure of a novel metal-recovery substance (siderophore) produced by this strain, and investigated the relationship between the microbial community structure and terephthalic acid degradation in the activated sludge tank from which this strain was isolated.

研究分野：応用微生物学

キーワード：テレフタル酸　微生物分解　プラスチックリサイクル

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

テレフタル酸はポリアルキレンテレフタレートの構成原料として、PET ボトルやポリエステル繊維、液晶パネル用機能性フィルム等、様々な分野で使用されている。これらの加工やリサイクル等において、アルカリ処理が広く行われているが、その際に PET 自体の加水分解によって、高濃度のモノマーを含む廃液が生じ、その処理が問題となっている。

繊維業界においては、繊維の柔軟性、風合いの向上のためにポリエステル繊維のアルカリ分解（アルカリ減量処理）が行われており、その分解量は数％から、時には 50％にも達する。これは特に婦人用衣料素材などで実施されており、その処理量は膨大なものである。また機能性フィルムは、液晶パネル用としてスマートフォンやテレビ、パソコンモニター等に広く使われており、その需要は今後ますます拡大すると予想されている。これらは PET フィルムに各種の機能性コーティング剤を塗布して作られているが、製造過程で生じる端材や不良品等はコーティングを剥離し、フィルム基材としてリサイクルされている。現在はアルカリ剥離によりリサイクルを行っているが、この方法では基材である PET 自体の加水分解も避けられず、廃液へのモノマーの混入が生じる。上記のいずれにおいても、モノマーの主成分はテレフタル酸とジオールであるが、その後の廃液処理においてテレフタル酸が残存し、その処分が大きな問題となっている。

現状の処理法としてはモノマーを含むアルカリ廃液を中和して活性汚泥法にて他の有機物を処理した後、酸性にして不溶化させたテレフタル酸を固液分離により除去し、その後再度中和するという方法がとられており、極めて効率が悪い。さらに、回収したテレフタル酸は市場価値が安く、精製及び再利用は採算が合わないため現在はコストをかけて焼却処分されているが、酸性物質であるため一度に大量に焼却処理すると炉の損傷を起こす。このため大量処分が困難である。以上の点から高濃度のテレフタル酸を含む廃液の効率的処理は社会的にも喫緊の問題であり、実用レベルに達した優良微生物の生理･分解機構の知見は、この問題解決に向けて大きく貢献できる。テレフタル酸の微生物分解についての研究はいくつかの文献･特許があるが、ほとんどが数百～数千 ppm 程度の分解量にとどまっており、％オーダーの高濃度テレフタル酸の分解に関する報告はほとんど無い。また、実用化の成否についても不明である。焼却処理についても、中和剤との混合による炉へのダメージ軽減等の検討例があるが、決め手に欠ける現状である。

２．研究の目的

申請者はこれまでに PET フィルムのリサイクル工場の廃水処理施設から、好塩･好アルカリ性のテレフタル酸分解菌（TB-97 株）を取得している。TB-97 株は 15,000ppm (1.5%)までのテレフタル酸を 48 時間以内に、3％のテレフタル酸を 7 日以内に完全分解した。また 4％のテレフタル酸も 7 日で約 88％分解可能であった。

本研究では、上記の好塩･好アルカリ性のテレフタル酸分解菌（TB-97 株）について、全ゲノム情報に基づく関連遺伝子の特定と代謝システムの解析を行い、本菌株及びその分解酵素系の諸機能を解明する。これらの検討を通して、工場廃水処理施設等の特異な環境と微生物進化についての知見を得たい。さらに、それらの知見を元にその機能強化を進め、繊維産業等における廃棄物処理に応用することを目指す。

一方で、排出されるテレフタル酸を「資源」として再利用する道を探りたい。テレフタル酸をより付加価値の高い物質に変換できれば、新たな産業創出にもつながる。具体的にはテレフタル酸代謝の中間体であるプロトカテク酸や 2-ピロン-4,6-ジカルボン酸 (PDC)等について検討する。これらは機能性ポリマー原料としての需要が見込まれている。加えて、テレフタル酸は微生物のリグニン代謝の中間体でもある。リグニンの有効利用は近年注目を集めており、その有効利用の 1 ステップとして本菌を用いたバイオコンバージョンが適用可能か検討したい。

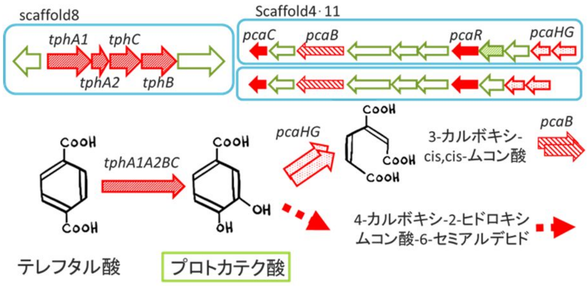
３．研究の方法

まず、本菌に対して遺伝子破壊や改変を行い、テレフタル酸からのプロトカテク酸や 2-ピロン-4,6-ジカルボン酸 (PDC)等の有用代謝中間体の生産を試みた。本菌株の全ゲノム解析を行い、解析されたデータとアミノ酸配列、データーベース解析を元にテレフタル酸分解関連遺伝子を特定した。これらを大腸菌にクローニングし、発現させて、以降の機能解析に用いた。また、本菌はテレフタル酸分解に鉄を必要とするが、本菌株が分離された活性汚泥槽には鉄がほとんど含まれていないことが明らかになったので、本菌株の鉄獲得機構についての解明も行った。

一方で、本菌株の分離された PET フィルムのリサイクル工場の廃水処理施設について、工場廃水処理施設等の特異な環境と微生物叢についての解析を目的として、活性汚泥槽の微生物群集構造と TPA 分解との関連解明と汚泥槽での主となる TPA 分解菌についても検討した

４．研究成果

TB-97 株全ゲノムの解析を行った結果、本菌株はテレフタル酸（TPA）分解の上流（プロトカテク酸：PCA まで）の分解遺伝子群 1 セット、PCA から下流の代謝遺伝子群を 2 セット持つことが明らかとなった。また下流の遺伝子群はいずれも PCA-3,4-ジオキシゲナーゼによる分解経路であるため、PCA-4,5-ジオキシゲナーゼ経由の経路を必要とする 2-ピロン-4,6-ジカルボン酸 (PDC)を生産するには、外部から遺伝子導入を行う必要が示された。

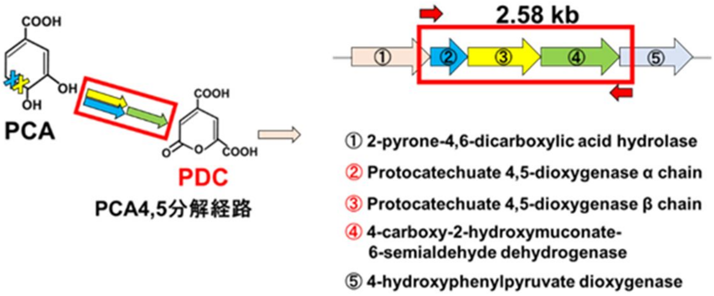


そこで、まずは大腸菌に TPA 分解遺伝子群を導入することで PCA 生産株の構築を試みることとした。TB-97 株のテレフタル酸分解関連遺伝子の上流（PCA まで）に関する遺伝子群

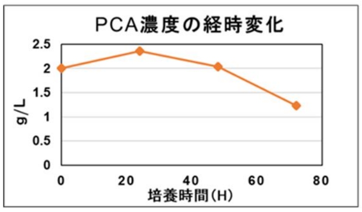
（tphR:regulator,tphA1A2:terephthalate 1,2-dioxygenaseαβsubunit,tphB:cis-1,2-dihydroxy-1,2-dihydroterephthalate dehydrogenase,tphC:ferredoxin oxidoreductasde,tphK:MSF transporter）を含む遺伝子領域を増幅し、大腸菌に導入したところ、TPA の分解が確認された。一方、組換え大腸菌株においては、TB-97 株では観察されない PCA の生産が確認された。これらの結果から、導入した遺伝子群が TPA→PCA までの分解遺伝子であり、かつ大腸菌で発現可能であることが確認された。また、ここからオリジナルプロモーターを除去し、lac プロモーターを導入して IPTG 制御下での発現に成功した。

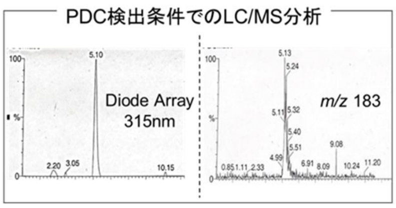
なお、解析の過程でその下流にある未知のポーリン様タンパクがテレフタル酸分解酵素群の一部であることが示唆された。そこで本遺伝子の大腸菌への導入、および TB-97 株における同遺伝子の破壊を行った。しかし、TPA の分解や取り込みにはほとんど変化が見られなかった。

次いで、PCA からの PDC の生産を検討した。検索の結果、当研究室保有のポリウレタン分解菌 TB-35 株が、PCA-4,5-ジオキシゲナーゼによる PCA 分解遺伝子群を持ち、かつ PDC までの経路を持つことを見いだした。広宿主域ベクター pHBR1 に TB-35 株由来の PCA→PDC 生産遺伝子 *pca45-pdc* を挿入したプラスミドを大腸菌に導入した形質転換体を用いて PCA からの PDC 生産を検討した結果、PDC 生産を HPLC にて確認した。



並行して TB-97 株の遺伝子破壊を試みた。本菌株に 2 セット存在する *meta*-開裂経路（PCA から下流の代謝遺伝子群）について検討した結果、上記 2 セットともに実際に発現・機能していることが確認されたため、両遺伝子の同時破壊を試みた。その結果、目的とする二重破壊株（TB97⊿⊿*pca H*）の取得に成功した。

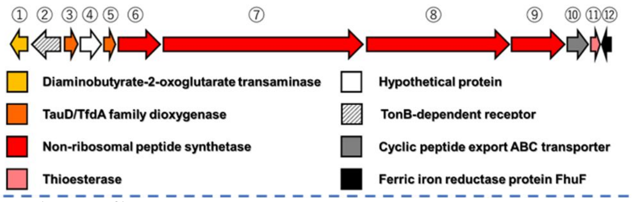




次いで、PCA からの PDC 生産を検討した。上記で作成したプラスミドを（TB97⊿⊿*pca H* に導入した形質転換体を用いて TPA からの PDC 生産を検討した。その結果、PCA の蓄積は見られたが、PDC の生産は観察されなかった。そこで、PCA→PDC 生産遺伝子遺伝子群を発現させた大腸菌との共培養による PDC 生産を行うこととした。まず、pET システムを用いた生産系増強の可能性を検討した。pET21b(+)の T7 プロモーター下流に PCA→PDC 生産遺伝子（*pca45-pdc*）を挿入し、発現用ホスト *E. coli*BL21(DE3)株に導入した。その結果、ベクターに pHBR1 を用いた時の約 10 倍の PDC 生産が認められた。またこの形質転換体と TPA→PCA 生産遺伝子を pET システムに導入した大腸菌との共培養も試みたが、生産性は低く、上流遺伝子の発現には二重破壊株（TB97⊿⊿*pca H*）が最適であると考えられた。そこで、TB97⊿⊿*pca H* と PCA→PDC 生産遺伝子（*pca45-pdc*）を導入した大腸菌を共培養したところ、著量の PDC 生産を確認した。今後は共培養する組換え大腸菌の遺伝子を変えることで、PDC 以外の物質生産に結び付けたいと考えている。

続いて、本菌株の鉄獲得機構についての解明を行った。TB-97 株はテレフタル酸分解に際して分解酵素の補因子として鉄イオンを要求する。本菌株は鉄欠乏下の活性汚泥槽から分離されたため、特異な鉄獲得を持つ可能性が考えられた。そこで、微生物が産生する金属キレーターであるシデロフォアに着目し、各種解析を行うことでその有効利用を目指した。培養試果、本菌株のシデロフォア生産がテレフタル酸を炭素源とし、かつ鉄制限条件下でのみ見られることを明らかにし、最適条件下で大量調製を行った。これと分光学的手法にて解析した結果、*Pseudomonas* 属細菌が産生するピオベルジン等とは異なる新規の蛍光性シデロフォアである可能性を見出した。さらに、ゲノム解析と RNA-seq の結果から、

生合成遺伝子系の一部を特定した。また、MALDI-TOF-MS による部分構造決定を行った結果、少なくとも新規のシデロフォアであることが確認された。さらに、本シデロフォアは鉄以外にもパラジウムなど複数の金属イオンに対してキレート活性を有していた。今後は、本シデロフォアを用いたレアメタルの回収を目指したい。



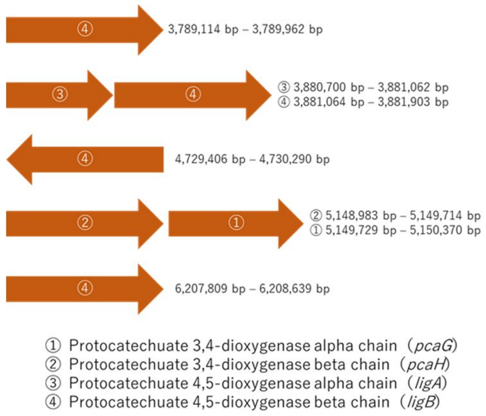
最後に、TB-97 株の分離源である活性汚泥のアンプリコン解析を行った結果から、現在の活性汚泥内には TB-97 株はほとんど検出されず、鉄添加により環境が変化したことで TB-97 株とは異なる TPA 分解菌が生育している可能性が考えられた。

そこで、活性汚泥における細菌叢変動について経時的に解析したところ、TPA 分解能には変化がないにも関わらず、活性汚泥の細菌叢はゆるやかに変遷しており、上位 20 種のうち半分以上は入れ替わりがみられた。また、継続して上位に見られる細菌群については、寒天培地上で生育したコロニーの菌叢解析ではほとんど検出されないことから、テレフタル酸分解の主力となる上位の細菌は培養困難、もしくは下位の細菌が協働してテレフタル酸を分解している可能性が示唆された。

活性汚泥における細菌叢変動（存在割合上位20種）

	2020		2021					
	12		3		6		9	
順位	科・属名	割合(%)	科・属名	割合(%)	科・属名	割合(%)	科・属名	割合(%)
1	Saprospiraceae	11.0457	Saprospiraceae	17.4884	*Caldilinea*	13.0237	Cytophagaceae	25.3262
2	*Stenotrophobacter*	9.8808	*Caldilinea*	10.4450	*Pseudolabrys*	6.9715	*Caldilinea*	8.7632
3	*Mycobacterium*	7.4436	*Stenotrophobacter*	10.4203	*Azoarcus*	6.8039	*Terrimicrobium*	7.9848
4	*Hydrogenophaga*	6.8306	*Mycobacterium*	6.6168	*Stenotrophobacter*	6.7320	Saprospiraceae	6.7215
5	*Caldilinea*	5.4069	*Pseudolabrys*	5.8916	Cytophagaceae	6.7117	*Defluviicoccus*	4.2971
6	*Pseudolabrys*	5.3629	*Terrimicrobium*	3.5228	Cytophagaceae	6.5515	*Aquamicrobium*	3.1167
7	Saprospiraceae	3.6559	Cytophagaceae	3.4083	*Defluviicoccus*	5.1623	*Mycobacterium*	2.9827
8	*Terrimicrobium*	3.4580	*Steroidobacter*	2.4227	Saprospiraceae	4.5414	*Pseudolabrys*	2.4628
9	Saprospiraceae	2.7987	Rhizobiales	2.1644	*Terrimicrobium*	4.5378	*Alicycliphilus*	1.9747
10	*Defluviicoccus*	2.6375	*Defluviicoccus*	2.1106	*Mycobacterium*	4.3701	Rhodobacteraceae	1.8024
11	Comamonadaceae	2.3127	Comamonadaceae	1.8815	*Alicycliphilus*	4.1859	Comamonadaceae	1.6429
12	Rhizobiales	2.2565	Cytophagaceae	1.8389	Phycisphaeraceae	1.8110	*Stenotrophobacter*	1.5281
13	Cytophagaceae	2.1833	Phycisphaeraceae	1.6795	*Steroidobacter*	1.6471	*Hydrogenophaga*	1.4132
14	Microbacteriaceae	1.9806	Comamonadaceae	1.2776	*Terrimicrobium*	1.5660	*Stenotrophobacter*	1.3016
15	Anaerolineae	1.9757	*Hydrogenophaga*	1.1361	*Hydrogenophaga*	1.1054	Phycisphaeraceae	1.2027
16	Alysiosphaera f	1.4921	*Mycobacterium*	1.0373	*Gemmata*	1.0115	*Propionicimonas*	1.0814
17	*Shinella*	1.4531	Anaerolineae	0.9924	Comamonadaceae	0.9801	Bacteria	1.0559
18	*Terrimicrobium*	1.2406	*Alicycliphilus*	0.8375	*Stenotrophobacter*	0.9286	*Steroidobacter*	1.0336
19	Parachlamydiaceae	1.2162	Rhizobiales	0.7679	*Mycobacterium*	0.8862	*Gemmata*	0.9985
20	*Stappia*	1.1991	*Stenotrophobacter*	0.7320	*Aquamicrobium*	0.7185	*Mycobacterium*	0.9219

そこで、新たな TPA 分解菌の取得を目的とし、活性汚泥からの新規スクリーニングを試みた結果、活性汚泥中の成分を補因子として TPA を分解する菌株 4 株を取得した。16S rDNA の配列決定を行ったところ、これらは *Pigmentiphaga* 属であると考えられた。単離下菌株（No.6）は PCA 3,4 開裂経路だけでなく PCA 4,5 開裂経路を経て代謝する遺伝子をも有していることが示唆された。*Pigmentiphaga* 属菌は下水処理施設などの汚泥に存在し、一部の菌株はフロックを形成するまた、芳香族分解能力を持つものが知られている。これらの配列をアンプリコン解析の結果と照合したところ、一致するものが認められたことから、本菌株は少なくとも現在の活性汚泥中で有効に TPA を分解する細菌の一部であることが示唆された。



５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計0件

〔学会発表〕　計3件（うち招待講演　0件／うち国際学会　1件）

１．発表者名 金森 拓，中島鈴佳，岡村匡浩，内堀孝博，中島(神戸) 敏明	
２．発表標題 Pseudomonas sp. TB-97 株によるテレフタル酸からの有用物質生産	
３．学会等名 第71回日本生物工学会大会（岡山）	
４．発表年 2019年	

１．発表者名 Nakajima Suzuka, Kanamori Taku, Okamura Masahiro, Uchibori Takahiro, Nakajima-Kambe Toshiaki	
２．発表標題 Terephthalate Degradation and Useful Substance Production by Bacteria.	
３．学会等名 The 14th Asian Congress on Biotechnology (ACB2019)（国際学会）	
４．発表年 2019年	

１．発表者名 中島(神戸)敏明，金森拓，中島鈴佳，岡村匡浩，内堀孝博	
２．発表標題 Pseudomonas sp. TB-98株によるテレフタル酸からのプロトカテク酸の生産	
３．学会等名 日本生物工学会第70回大会	
４．発表年 2018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

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