

## 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25年 5月30日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22350067

研究課題名（和文） 安定同位体標識法による生分解性プラスチック分解菌の環境動態解析

研究課題名（英文） Stable-Isotope Probing of plastics film for investigation of surface microbial community

研究代表者

中島 敏明 (NAKAJIMA TOSHIAKI)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：80241777

研究成果の概要（和文）：

本研究では、実環境中での生プラ分解に関する微生物群の動態解析を目的として、 $^{13}\text{C}$  でラベル化した生プラを用い解析を行った。 $^{13}\text{C}$  でラベル化した PHB フィルム ( $^{13}\text{C}$ -PHB) を灰色低地土壌に埋設し、7日ごとにプラスチック表面から DNA を抽出し、 $^{13}\text{C}$ -DNA のみを選択的に回収した。これらの DNA を T-RFLP 解析に供し、PHB 分解菌の経時的な微生物群集構造の変化を調べた。その結果、この DNA は、ほぼ  $^{13}\text{C}$ -DNA で構築されていることが明らかとなった。このことより、PHB フィルム表面に存在する微生物のほとんどが、PHB を資化していることが示唆された。 $^{13}\text{C}$ -DNA を T-RFLP 解析に供した結果、埋設7日目から特異的な微生物叢が確認できた。クローン解析の結果、本土壌では PHB 分解菌は、ほぼ単一の種によって優先されていることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

In this study, stable isotope probing of PHB film with  $^{13}\text{C}$  in order to explore the PHB degraders from different soil samples. The DNA Extracted from  $^{13}\text{C}$  labeled PHB film was subjected to ultracentrifugation. The resultant DNA was found labeled with  $^{13}\text{C}$ . It indicates that most of the microbes present on the surface of film might be PHB degraders. This  $^{13}\text{C}$  DNA was analyzed through 16S rRNA gene based T-RFLP and clonal analysis to identify different microbial communities. The results indicated the presence of different microbial communities on the surface of PHB films.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
2011年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2012年度	2,800,000	840,000	3,640,000
年度			
年度			
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：複合化学・環境関連化学

キーワード：生分解性物質

## 1. 研究開始当初の背景

一般的に土壌1グラム中には  $10^8$  の微生物がいるといわれているが、実は人間の手で培養可能な微生物は数%に過ぎない。しかしこ

こ数年の分子生物学的手法の発達で、培養不可能な微生物を含む微生物叢全体の挙動解析が可能になった。これまでに申請者らはこの技術を用いて生分解性プラスチック埋設

土壌の微生物生態系の解析を試み、以下の成果を得た。生分解性プラスチックを埋設した土壌及び埋設したプラスチック表面の微生物由来の全 DNA を直接抽出し、細菌の分類の指標である 16S rDNA を PCR によって特異的に増幅、DGGE(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)法にて解析した。その結果、生分解性プラスチックの表面には埋設数週間でバイオフィルムの形成が観察された。また、同一の土壌に埋設したにもかかわらず、その菌叢は生分解性プラスチックの種類によって大きく異なっていた。さらに、いずれのプラスチック表面においても、その分解に伴い、微生物叢が大きく変動していることが明らかになった。また、この研究成果によって、これまで数多く報告されている、培養法で得られたいわゆる「分解菌」は、実際の埋設プラスチック表面にはほとんどいないか、また存在していたとしても優占種ではないことが初めて明らかになった。

このことから、自然界において実際の分解に関与しているのは、従来の培養法では取得できない菌が多いことが予想された。さらに申請者は、プラスチック表面の微生物の全 DNA からのメタゲノムスクリーニングを試み結果、これまでに知られていない新規のプラスチック分解酵素遺伝子を実際に取得することに成功している。しかし、この方法では、この遺伝子がどのような微生物由来のものであるか、また実際に分解に関与しているかどうかは明らかにできないという問題があった。

## 2. 研究の目的

これまでに申請者を含む多くの微生物学者らによって、生分解性プラスチックを強力に分解する微生物が培養法によって得られており、それらは廃プラスチックの迅速分解やモノマリーサイクルへの応用が期待されている。しかし、前述の研究成果において、これまで報告された「分解菌」の多くは自然界での実際の生分解性プラスチック分解には関わっておらず、分解にかかわる微生物は他に存在する可能性が指摘された。さらに、メタゲノムスクリーニングの結果から、これらの培養困難な分解菌は、これまで知られていない新規な分解酵素(遺伝子)を持つ可能性が示唆されている。

上記の可能性を検証するには、自然界において「実際に分解に関与」している微生物が何であるかを明らかにする必要がある。しかし、前項で用いた方法ではプラスチック表面に存在する全微生物の DNA を対象とするため、分解に直接関与しない微生物の DNA まで対象としてしまうという欠点があった。

しかし近年、安定同位体を利用することによって、土壌から特定の機能を持った微生物

群由来の遺伝子のみを選択的に回収することが可能になりつつある。安定同位体の微生物生態学への導入は、2000年に Murrell らが  $^{13}\text{C}$ -メタノールを用いて初めて行った(Nature,403,646-649)。この手法を用いて土壌中に  $^{13}\text{C}$  ラベルしたプラスチックを埋設することにより、その表面上でプラスチックを実際に分解・資化している微生物の菌体構成成分のすべて(DNA も含まれる)を  $^{13}\text{C}$  でラベルする。ここから DNA を抽出し、セシウム密度勾配遠心によって  $^{12}\text{C}$  と  $^{13}\text{C}$  の DNA を分ける(写真)この手法は RNA にも適応可能である。ここから  $^{13}\text{C}$  ラベルされた DNA のみを分析対象とすることにより、環境中で実際に働くプラスチック分解菌のみを解析することが出来る。本手法はメタン、フェノール等でも応用されているが、これをプラスチック表面の微生物叢解析に応用した例は無い。

## 3. 研究の方法

### 1) 供試土壌

茨城県坂東市の畑より採取した黒ボク土壌を用いた。10 ml 容のシリンジの先をガーゼで覆い、各供試土壌を充填した。このシリンジに蒸留水を 10 ml 流し、蒸留水が自然に流れきるまで放置した。その後、シリンジごと重さを測定し、飽和状態まで水を含んだ土壌の重さを求めた。次に、シリンジを  $120^{\circ}\text{C}$  で 24 時間乾燥させ、再度シリンジの重さを測定することで、乾土の重さを求めた。これらの値から、飽和水分含有率および水分含有率を求めた。

### 2) PHB フィルムの埋設

$^{13}\text{C}$ -PHB は *Alcaligenes eutrophus* に、炭素源として  $^{13}\text{C}_6$ -glucose を与え生産させたものを精製して作成した。PHB 1.5 g を 50 ml のクロロホルムに湯煎しながら溶解した。次にガラス製のシャーレに PHB 含有クロロホルム溶液を流し入れ、ドラフト内でクロロホルムを揮発させた。その後、PHB を 0.05 g (約 25 mm×25 mm) になるよう成形し、ポリエチレン製のネットに挟み、ヒートシールを行った(写真)。作製したフィルムを 70% エタノールに浸しながら、両面を 15 分間ずつ UV 照射し滅菌した。同様にポリエチレン片(非生分解性)を埋設し、対照とした。



供試土壌 900 g を 1 リットル容ポリプロピレン容器に入れ、水分含有率が飽和水分含有率の 50% となるように滅菌水を加えた。そして 25°C にて 3 日間放置し、微生物叢を安定させた。加工した PHB を埋設し、25°C にて 10 週間放置した。1 週間ごとに PHB を回収し、表面に付着した土壌を払い落とした後、DNA 抽出を行った。

回収したサンプルと、土壌サンプルからの全 DNA の抽出には、FastDNA® SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals) を用いた。方法は付属のプロトコルに準拠した。抽出した DNA の測定は、Qubit™ fluorometer (Invitrogen) を用いた。また、Lysing Matrix E tube 内に残った DNA 抽出後の PHB は、PHB 残存量の測定に用いた。<sup>12</sup>C および <sup>13</sup>C-PHB 表面より抽出した DNA の分離は、塩化セシウム密度勾配遠心にて行った。

### 3) PHB 残存量の測定

DNA 抽出後の Lysing Matrix E tube にクロロホルムを 1 ml 加え、1 分間激しく攪拌し、上清を回収した。同様の操作を再度行い、PHB 含有クロロホルムを 2 ml 回収した。次に、ねじ口試験管に回収した PHB 含有クロロホルム 0.4 ml、クロロホルム 1.1 ml、1%安息香酸含有クロロホルム 0.5 ml、5%塩化水素メタノール溶液 2 ml を加え、メチルエステル化を行った。反応は 100°C で 4 時間行った。反応後、室温まで冷却し、超純水を 1 ml 加えて 10 分間激しく攪拌した。サンプルをしばらく放置し、有機層と水層に分離した後、有機層のみを回収した。この有機層を GC-MS に供した。なお、測定は、PHB の加水分解、メチル化で生じる 3-ヒドロキシ酪酸メチルに由来する分子量 74.0 のピークをモニタリングした。

### 4) Real-time PCR

抽出した DNA を鋳型として、16S rRNA 遺伝子をターゲットとした Real-time PCR を行い、最適サイクル数を決定した。プライマーには真正細菌の 16S rRNA 遺伝子をターゲットとしたプライマー (10F) の 5' 末端に C を付加し、BODIPY® 修飾を施した蛍光プライマー Q-10F および 907R を用いた。BODIPY® 修飾プライマーの作製は日鉄環境エンジニアリング株式会社 (旧株式会社 J-Bio21) に依頼した。サンプルおよび外部標準 DNA を PCR に供し、タイムコースをリアルタイムで測定した。最適サイクル数は、PCR バイアスがかからない指数関数的増幅期において検量線を作成し、蛍光消光率を求め決定した。

### 5) T-RFLP 解析

得られた PCR 産物に Hha I を用いて制限酵素処理を行った。制限酵素処理後の PCR 産物

2 μl、Hi-Di formamide 15 μl、スタンダードサイズマーカー (GeneScan-500 Liz size standard, Applied Biosystems) 0.1 μl を混合し、95°C で 2 分間熱処理を行った。熱処理後、氷冷し、ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer に供した。データの解析には、ソフトウェア GeneMapper (Applied Biosystems) を用いた。

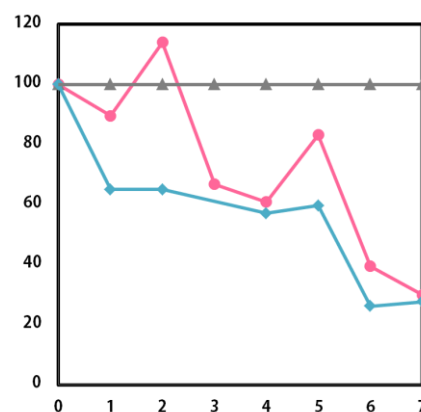
### 5) クローン解析

得られた PCR 産物を pGEM-T Easy cloning vector (Promega) に挿入し、これを *E. coli* DH10B へ導入した。形質転換後、LB (Ap, IPTG, X-gal) 平板培地上に塗布し、取得したコロニーをコロニーダイレクト PCR に供した。得られた PCR 産物の塩基配列解析を行った。得られた塩基配列は、Fastgroup II および Ribosomal Database Project、BLAST に供し、塩基配列に由来する細菌および真菌を門または綱、種レベルで同定した。

## 4. 研究成果

### 1) PHB 残存量の経時変化

PHB および PE の残存量の経時変化を下図に示す。土壌に埋設した <sup>13</sup>C-PHB および <sup>12</sup>C-PHB は、時間経過とともに分解されることが確認された。また、<sup>13</sup>C-PHB よりも <sup>12</sup>C-PHB の方が若干早く分解された。対照として用いたポリエチレン (PE) の分解は確認されなかった。

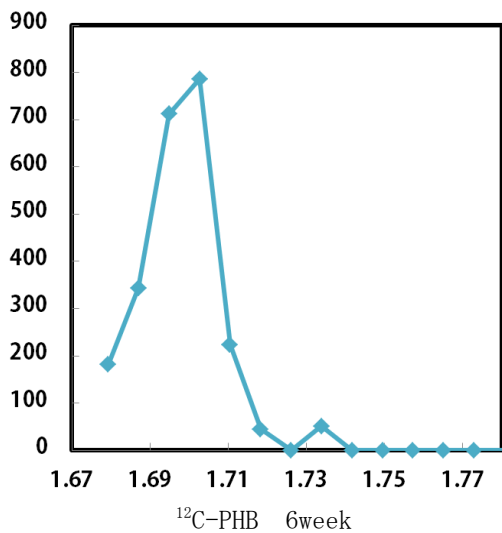
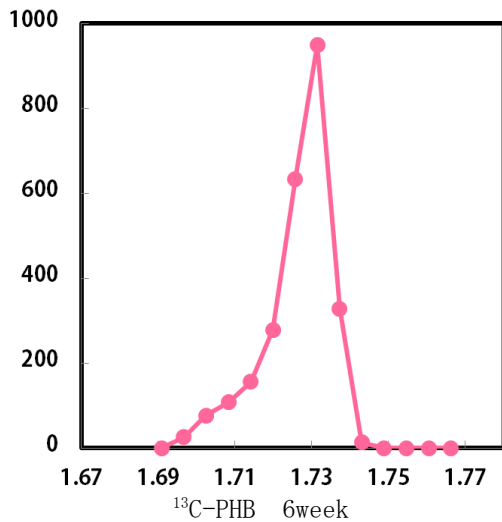


PHB 残存量の経時変化

● <sup>13</sup>C-PHB ◆ <sup>12</sup>C-PHB ▲ PE

### 2) 塩化セシウム密度勾配遠心による DNA の分布

各塩化セシウム濃度の <sup>12</sup>C-PHB および <sup>13</sup>C-PHB 由来 DNA の分布を次図に示す。<sup>13</sup>C-PHB 由来 DNA のピークは、全ての週において、1.73 から 1.75 g/ml に確認された。また、<sup>12</sup>C-PHB 由来 DNA のピークは、1.70 g/ml に確認された。

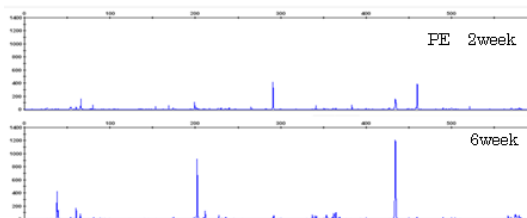
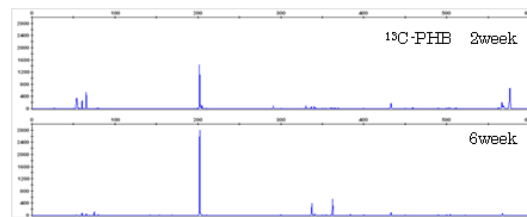
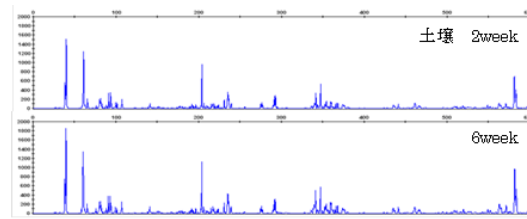


$^{13}\text{C}$ -DNA 中に  $^{12}\text{C}$ -DNA が存在する場合、塩化セシウム中の DNA 分布において、ピークが 2 つ検出されると考えられる。しかし、全ての週における  $^{13}\text{C}$ -DNA の塩化セシウム中の DNA 分布は、ピークが 1 つしか確認されなかったため、 $^{13}\text{C}$ -PHB 表面由来の DNA は、 $^{12}\text{C}$ -DNA をほとんど含んでいないと考えられる。したがって、PHB 表面に存在するほとんどの微生物が、PHB の分解・資化に関与していることが示唆された。

### 3) T-RFLP 解析

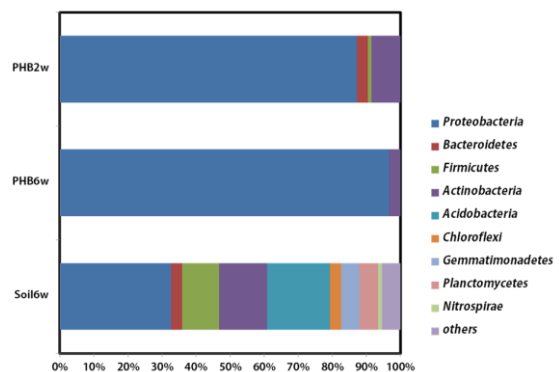
細菌の T-RFLP プロファイルを示す。土壌サンプルにおける経時変化は確認されなかった。 $^{13}\text{C}$ -PHB 表面の T-RFLP プロファイルにおいて 201 bp に大きなピークが確認された。また、2 週目から 6 週目にかけて微生物群集構造の変化は確認されなかった。PE の T-RFLP プロファイルにおいて、201 bp および 434 bp のピークの増加が確認された。その他のピークは、ピーク面積がわずかではあ

るが土壌サンプルと同様の傾向を示した。



### 4) クローン解析結果

細菌のクローン解析結果を、次図に示す。土壌サンプル 2 週目において、全 92 クローンのうち、*Proteobacteria* 門が 33%、*Firmicutes* 門が 11%、*Actinobacteria* 門が 14% の割合を示した。PHB 表面上 2 週目において、全 94 クローンのうち *Proteobacteria* 門が 87%、*Bacteroidetes* 門が 3%、*Actinobacteria* 門が 9% となった。PHB 表面上 6 週目において、*Proteobacteria* 門が 96%、*Actinobacteria* 門が 4% となった。



本研究では、<sup>13</sup>C-PHB を用いて PHB 表面の微生物群集構造解析を行い、その構造を明らかにすることと、取得したメタゲノムを用いて有用遺伝子の探索・機能解析を行うことを目的とした。

その結果、PHB 表面の細菌の群集構造は、PHB 埋設後早期に形成され、PHB 分解後期まで持続することが明らかとなった。また、<sup>13</sup>C-PHB 表面から抽出したメタゲノムを用いて、T-RFLP による微生物群集構造の解析を行った結果、PHB 埋設後のすべての期間において、<sup>13</sup>C-PHB 表面より抽出した DNA はすべて <sup>13</sup>C-DNA に置換されていることが示唆された。よって、PHB 表面に存在する微生物は、PHB の分解段階に関わらず、PHB の分解・資化に関与していると考えられた。PHB 表面の細菌の群集構造は、PHB 埋設 1 週目から形成され持続することから、特定の微生物が PHB の分解・資化に関与することが明らかとなった。

これまでに、SIP を用いた実環境中における生分解性プラスチック表面上の微生物群集構造の解析に関する報告はないため、本研究が初の報告と言える。今後は、RNA を用いた解析、また生分解性プラスチック表面に形成されると考えられるバイオフィルムの解析を行うことで、生分解性プラスチックの分解性制御や微生物からの生分解性プラスチック開発へのアプローチに貢献できると考える。

#### 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 6 件)

① Y. Shinozaki, T. Watanabe, T. Nakajima-Kambe, H. K. Kitamoto (2013) Rapid and simple colorimetric assay for detecting the enzymatic degradation of biodegradable plastic films. *J. Biosci. Bioeng.* 115:111-114. 査読あり

10.1016/j.jbiosc.2012.08.010

② Y. Shinozaki, Y. Kikkawa, S. Sato, T. Fukuoka, T. Watanabe, S. Yoshida, T. Nakajima-Kambe, H. K. Kitamoto (2013) Enzymatic degradation of polyester films by a cutinase-like enzyme from *Pseudozyma antarctica*: surface plasmon resonance and atomic force microscopy study. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 査読あり

10.1007/s00253-012-4673-0

③ A. A. Shah, T. Eguchi, D. Mayumi, S. Kato, N. Shintani, N. R. Kamini, T. Nakajima-Kambe (2013) Purification and properties of novel aliphatic-aromatic co-polyesters degrading enzymes from newly isolated *Roseateles*

depolymerans strain TB-87. *Polym. Degrad. Stab.* 98:609-618. 査読あり

10.1016/j.polymdegradstab.2012.11.013

④ Y. Shinozaki, T. Morita, X. H. Cao, S. Yoshida, M. Koitabashi, T. Watanabe, K. Suzuki, Y. Sameshima-Yamashita, T. Nakajima-Kambe, T. Fujii, H. K. Kitamoto (2012) Biodegradable plastic-degrading enzyme from *Pseudozyma antarctica*: cloning, sequencing, and characterization. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 査読あり

10.1007/s00253-012-4188-8

⑤ T. Nakajima-Kambe, N. G. Edwinoliver, H. Maeda, K. Thirunavukarasu, M. K. Gowthaman, K. Masaki, S. Mahalingam, N. R. Kamini (2012) Purification, cloning and expression of an *Aspergillus niger* lipase for degradation of poly(lactic acid) and poly(epsilon-caprolactone). *Polym. Degrad. Stab.* 97:139-144. 査読あり

10.1016/j.polymdegradstab.2011.11.009

⑥ H. K. Kitamoto, Y. Shinozaki, X. H. Cao, T. Morita, M. Konishi, K. Tago, H. Kajiwara, M. Koitabashi, S. Yoshida, T. Watanabe, Y. Sameshima-Yamashita, T. Nakajima-Kambe, S. Tsushima (2011) Phyllosphere yeasts rapidly break down biodegradable plastics. *AMB Express* 1:44. 査読あり

10.1186/2191-0855-1-44

[学会発表] (計 11 件)

① Y. Shinozaki, Y. Kikkawa, S. Sato, T. Fukuoka, D. Kitamoto, T. Watanabe, T. Nakajima-Kambe, H. K. Kitamoto (2012) Enzymatic Degradation of Polyester Films by Cutinase-Like Enzyme from a Yeast *Pseudozyma antarctica*: a Surface Plasmon Resonance Analysis. The 9th SPSJ International Polymer Conference (兵庫県神戸市). 2012.12.14.

② 羽尾純一, 中島敏明, 野村暢彦, 内山裕夫 (2012) *Leptothrix* sp. TB-71 と *Roseateles depolymerans* TB-87 の共培養による poly(butylene succinate adipate)(PBSA) 分解速度の向上. 環境バイオテクノロジー学会 2012 年度大会 (京都府宇治市). 2012.6.25

③ A. A. Shah, T. Eguchi, F. Ichihashi, D. Mayumi, S. Kato, N. Shintani, T. Nakajima-Kambe (2012) Purification and properties of novel aliphatic-aromatic copolyester degrading enzymes from newly isolated *Roseateles depolymerans* strain TB-87. The 1st Biotechnology World Congress (Dubai, UAE).

2012.2.14

④M. Ohshima, N. Nomura, H. Uchiyama, T. Nakajima-Kambe (2012) Stable-Isotope Probing of plastics film for investigation of surface microbial community. The 1st Biotechnology World Congress (Dubai, UAE).

2012.2.14

⑤Y. Matsumoto, H. Uchiyama, N. Nomura, T. Nakajima-Kambe (2012) Degradation of PBSA by PBSA depolymerase from Leptothrix sp.TB-71, and analysis of degradation products. The 1st Biotechnology World Congress (Dubai, UAE).

2012.2.14

⑥大嶋恵, 齋藤真理, 眞弓大介, 野村暢彦, 内山裕夫, 中島敏明 (2011) 埋設生分解性プラスチックの微生物群集構造と有用遺伝子の解析. 2011年度土壌微生物学会大会 (宮城県大崎市).

2011.11.26

⑦大嶋恵, 齋藤真理, 眞弓大介, 野村暢彦, 内山裕夫, 中島敏明 (2011) 埋設生分解性プラスチックの微生物群集構造と有用遺伝子の解析. 第27回日本微生物生態学会大会 (京都府京都市).

2011.10.08

⑧大嶋恵, 野村暢彦, 内山裕夫, 中島敏明 (2011) SIP法を用いた生分解性プラスチック分解菌の動態解析. 第60回高分子学会年次大会 (大阪府大阪市).

2011.05.26

⑨松本唯, 中島敏明 (2011) Leptothrix sp.TB-71株由来PBSA depolymeraseの生産と分解機構の解明. 第60回高分子学会年次大会 (大阪府大阪市).

2011.05.26

⑩松本唯, 中島敏明 (2011) 細菌由来PBSA分解酵素の分解機構の解明. 高分子学会 (グリーンケミストリー研究発表会) (東京都千代田区).

2011.01.14

⑪齋藤真理, 野村暢彦, 内山裕夫, 中島敏明 (2010) 安定同位体ラベル法による生分解性プラスチック分解菌の動態解析. 日本微生物生態学会第26回大会 (茨城県つくば市).

2010.11.25

[図書] (計1件)

中島敏明 (2012). "微生物酵素による生分解

性プラスチックのモノマーリサイクル." リサイクル・廃棄物事典 (産業調査会). 503頁

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計3件)

①名称: 生分解性プラスチック分解酵素をコードする遺伝子の取得方法、それにより得られる新規遺伝子および酵素

発明者: 中島敏明

権利者: 独) 科学技術振興機構

種類: 特許

番号: 4670048

取得年月日: 2011. 1. 28

国内外の別: 国内

②名称: 新規ウレタン結合分解菌

発明者: 中島敏明

権利者: 独) 科学技術振興機構

種類: 特許

番号: 1621608

取得年月日: 2010. 12. 08

国内外の別: 国外 (EU)

③名称: 新規ウレタン結合分解菌

発明者: 中島敏明

権利者: 独) 科学技術振興機構

種類: 特許

番号: 2517520

取得年月日: 2010. 4. 20

国内外の別: 国外 (カナダ)

[その他]

ホームページ等

<http://researchmap.jp/nakajimatoshiaki>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中島 敏明 (NAKAJIMA TOSHIAKI)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号: 80241777