

養成技術者の研究・研修成果等

1. 養成技術者氏名： 及川 栄作

2. 養成カリキュラム名： 組換え微生物を利用した発泡スチロール廃棄物ゼロエミッション処理技術の開発

3. 養成カリキュラムの達成状況

本年度の研究目標は大きく分けて二つあり、一つは発泡スチロールリサイクル処理やコンポスト処理に用いる減容剤リモネンの遺伝子組換え体の生産効率を、昨年度よりさらに上げることである。二つ目はリモネンで減容した発泡スチロールのコンポスト処理のために最も効果的であると考えられる、スチレンおよびポリスチレンの両方を分解する能力を持った微生物種の同定、並びにこの微生物を用いたリモネンで溶かした発泡スチロールの分解を試みることである。これらの点を目標に研究を進めた結果、リモネン生産を高めるために新規遺伝子やプロモーター変換などの方法を試みたが、生産効率を大きく向上させることはできなかった。この理由の一つとして、導入遺伝子と宿主細胞の不和合性なども考えられた、一方、スチレンとポリスチレン両方の分解微生物の同定を試みたところ、ヒト病原菌ではない *Bacillus thuringiensis* であることが分かり、この微生物の取り扱いが安全であると判明した。さらに、この両方分解菌はリモネンで溶かした発泡スチロールも分解できることが示され、今後発泡スチロールを水や炭酸ガスまで分解する、コンポスト処理に有効である可能性が高いことが示された。

4. 成果（A4版3枚程度）

4.1 研究目的

発泡スチロールを微生物によってマテリアルリサイクルを可能にしたり、水や炭酸ガスとしてコンポスト（堆肥）化する方法の開発を目標としている。この目標達成のための研究課題としては、遺伝子組換え大腸菌によって、発泡スチロール減容剤リモネンの生産性向上と、リモネンで溶かした発泡スチロールの、微生物によるコンポスト化条件の確立が挙げられる。

本年度は具体的に、昨年度作製した組換え大腸菌のリモネン生産性をさらに向上させるために、新規遺伝子やプロモーター導入による組換え体の構築、および昨年度までにポリスチレン分解能が確認されたポリスチレン分解微生物の、リモネンやジクロロメタンで溶かした際に生じる溶解物の分解能を測定することである。これらの2つの研究目標の達成は、発泡スチロールの生物学的リサイクル法や、ゼロエミッション処理法の開発に大きな貢献が期待される。

4.2 研究内容

4.2.1 リモネン高生産性組換え大腸菌の構築

1) 研究方法

a) *dxr* 遺伝子を用いた方法

発泡スチロールの生物学的処理プロセス中の発泡スチロール減容剤リモネンの大腸菌による生産

工程において、これまで構築した遺伝子組換え大腸菌のリモネン生産性を向上するために、新たにリモネンサイクラーゼ遺伝子の基質であるゲラニル2リン酸合成を高める働きがあると考えられる、大腸菌のデオキシキルロース5リン酸レダクトイソメラーゼ(*dxr*)遺伝子をクローン化して用いた。

b) 大腸菌高発現用プロモーターを用いた方法

大腸菌で外来遺伝子を発現する際に、高い活性が期待できる *trc* プロモーターの挿入されている p

2) 結果および考察

dxr 遺伝子や *trc* プロモーターを導入した組換え大腸菌のリモネン生産量は、これまで作製した組換え体の生産量を上回るものではなかった。この理由として、導入遺伝子と宿主細胞の不和合性が考えられることから、今後は他の宿主-ベクター系の構築も試みる計画である。

4.2.2 スチレンとポリスチレンの両方の分解能を有する STR-Y-0 株の同定

(1) 方法

これまで、発泡スチロール構成成分の一つであるスチレンを分解する能力を持った微生物は知られていたが、もう一つの構成成分であるスチレンが重合したポリスチレンを分解する能力を持った微生物は知られていなかった。しかし、本研究によってポリスチレンや、スチレンとポリスチレンの両方を分解する能力を持った微生物を世界で始めて発見し、昨年度報告した。このうちのスチレンとポリスチレンの両方を分解する能力を持った微生物 STR-Y-0 株は 16S リボソーム(r)DNA 塩基配列に基づく相同性解析の結果、*Bacillus* 属の *B. anthracis*、*B. cereus*、*B. thuringiensis* の3種と相同性が同レベルで判別はできなかった。*B. anthracis* と *B. cereus* はヒト病原菌であるために、今後の実験を進める上で好ましくなく、種レベルでの分類の必要が生じた。そこで、本年はさらなる分類法として、ゲノム上の 16SrDNA と 23SrDNA のスペーサー部位の塩基配列決定と比較や *gyrB* 遺伝子の塩基配列決定と種特異的 PCR を試みた。

(2) 結果および考察

STR-Y-0 株のゲノム上の 16SrDNA と 23SrDNA 間の約 400 塩基を PCR によって増幅し、塩基配列決定し、相同性解析を行ったところ、3箇所4塩基に *B. anthracis* 存在しないで、*B. cereus*、と *B. thuringiensis* にのみ存在する塩基があることが示された。さらに、*gyrB* 遺伝子を標的とした PCR を試みたところ、*B. cereus* を検出することができるプライマーを用いた場合は PCR 産物が得られず、*B. thuringiensis* のみを検出するプライマーを用いた場合に PCR 産物が得られたことから、ヒト病原菌でない *B. thuringiensis* であると同定できた。この結果より、この微生物の取り扱いが安全であると判明した。

4.2.3 ポリスチレン分解経路予測

(1) 方法

ポリスチレン分解菌のポリスチレン分解経路は、昨年度の研究により分解菌すべてにスチレンモノオキシゲナーゼ(SMO)活性が検出されたことから、スチレン分解菌と同様に *sty* オペロンによって、スチレンを酸化させてスチレンオキシドを生成し、その後フェニルアセトアルデヒドを経由してフェニルアセチル-CoA に至る分解経路を経る可能性があるが、未だ特定できてない。そこで、SMO 酵素をコードする *styA* 遺伝子の存否を PCR 法によって確認した。

(2) 結果および考察

これまで知られる3つの *styA* 遺伝子と相同性が高い部位をプライマーとした PCR を試みたところ、PCR 増幅産物は検出されなかった。この結果より、ポリスチレン分解菌は新規の SMO 酵素を有する可能性があることが示された。また、ポリスチレン分解経路にはポリスチレンの側鎖に反応して低

分子化するメカニズムも含まれている可能性もあり、今後は分解遺伝子群全体の構造解析を試みる必要がある。もし、異なる遺伝子や分解経路が明らかになれば、微生物学的にも興味深い知見となる。

4.2.4 リモネンやジクロロメタンで溶かした発泡スチロールの微生物分解

(1) 実験方法

昨年度までに単離した分解微生物を用いて、リモネンやジクロロメタンで溶かした発泡スチロールの分解を試みた。実験のフローは下記の通りである。分解菌 PSD-1 株、PSD-2 株、PSD-6 株、STR-Y-0 株の液体培養。0.3 mg/ml の発泡スチロール溶液(リモネンまたはジクロロメタンで減容した EPS) 200 μ l (60 μ g) の添加。培養時間の 0、2、5、8 日目に、ジクロロメタンによって抽出。高速液体クロマトグラフ分析計(HPLC)を用いた発泡スチロール溶解物濃度の測定。

(2) 結果および考察

PSD-1 株、PSD-2、PSD-6 株、STR-Y-0 株を用いて、リモネンで溶解した発泡スチロールの分解実験を試みた。この内の STR-Y-0 株を用いた場合は 8 日目までに、約 67% (40 μ g) の分解が示された。しかしながら、他の株による分解は認められなかった。一方で、ジクロロメタンで減容した発泡スチロールの分解結果はすべての株で発泡スチロール溶解物の分解が示された。特に STR-Y-0 株は 8 日目までに初期濃度の約 61% (37 μ g) の分解が示された。

リモネンで溶解した場合に、STR-Y-0 株のみに分解が認められた理由は、STR-Y-0 株の培養液のみに精油成分の一つでもあるリモネンの培養液海面の浮遊消失が確認される点との関係が考えられた。リモネンが培地中に浮遊した状態では、発泡スチロール溶解物の分解を阻害するのではないかと推測された。また、STR-Y-0 株は何らかの反応によって、培養液中のリモネンの浮遊状態を解く能力を有していると考えられる。従って、STR-Y-0 株はリモネンで溶解した EPS の微生物分解処理に特に有用な微生物であることが示された。今後はコンポスト槽にリモネンで溶かした発泡スチロールを混合し、これに分解菌を導入した場合の発泡スチロールの分解や、コンポスト化についての実験を試みる予定である。

これらの研究成果の一部は 2003 年 11 月に特許出願済みであり、また土木学会環境工学研究論文集の 2003 年 11 月に掲載された。

5. 成果の対外的発表等

(1) 論文発表 (論文掲載済、または査読済を対象。)

及川栄作、リン キン チダ、遠藤剛、石橋良信(2003, 11) 発泡スチロールゼロエミッション処理構築のためのポリスチレン分解微生物の単離と分解特性、第 40 回土木学会環境工学研究フォーラム、査読あり

(2) 口頭発表 (発表済を対象。)

a) 及川栄作、石橋良信(2004, 3) 発泡スチロール(EPS)の微生物によるリサイクル法、第 2 回発泡スチロール再資源化協会技術発表会

b) 遠藤剛、及川栄作、石橋良信(2004, 3) 発泡スチロール溶解物の微生物分解、平成 15 年度土木学会東北支部技術研究発表会

c) 及川栄作、リン キン チダ、遠藤剛、石橋良信(2003, 11) 発泡スチロールゼロエミッション処理構築のためのポリスチレン分解微生物の単離と分解特性、第 40 回土木学会環境工学研究フォーラム

(3) 特許等

1 件