

M02**生分解性プラスチック PHA 合成新規細菌の探索**

(北九州高専)○(学)山口 夏美・大田 彩・(正)水野 康平*
 (東工大院総理工)百武 真奈美・一宮 洋介・柘植 丈治

【緒 言】

近年、様々な環境由来微生物群の解析が盛んに行われている。そこで注目されているのが生分解性プラスチック合成細菌である。その背景には、環境に調和する物質の循環による人間社会の形成が大きな課題となっていることが挙げられる。生分解性プラスチックの1種である PHA(ポリヒドロキシアルカン酸)は、環境中の炭素源が豊富で窒素やリンが欠乏した時に細菌の細胞内で合成、貯蔵されることが知られている。PHA 合成酵素の遺伝子には、鍵酵素である *phaC* の配列に基づいて Type I ~ IV が既に知られている。そのうち、*Bacillus* 属に見られる Type IV の遺伝子群は、*Bacillus* 属の PHA 合成量が多くなったために、研究が比較的遅れているタイプである。また、現在利用されている酵素の多くには、高温で使用すると失活するという欠点があるため、耐熱性を有する酵素の発見が期待されている。

そこで本研究では、土壤中で最も多種多様に存在する *Bacillus* 属、特に耐熱性を有する *Geobacillus* 属をターゲットとして、耐熱性などの有用な特性を有する合成酵素を取得することを目的とする。

【方 法】

Glucose 添加 LB 寒天培地を作成し、寒天が固まる前に Nile-Red (0.25 mg/DMSO-ml) 溶液を 250 倍希釈で添加した。採取した土壤を 80°C で 60 分加熱処理し、10g を超純水 30 ml に懸濁し、ボルテックスミキサーで攪拌した後、40 µl を寒天に塗抹接種した。その後、30°C で 48 時間、静置培養した。培養後、生育したコロニーに紫外灯を照射し、蛍光発光するコロニーを分離保存した。

次に、菌体内に蓄積された P(3HB)を熱濃硫酸で細胞破碎すると同時にクロトン酸へと変換し、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて P(3HB)含率の測定を行った。分離保存した菌株を LB 培地にて 30°C、48 時間静置培養を行った。培養後、濃硫酸 200 µl を加えて 120°C、40 分間加熱した。反応終了後、室温まで冷却し、氷水中で 0.014 N 硫酸水溶液を 1ml 加えて攪拌し、0.45 µm 径の Millex-LHPTFE フィルター (Millipore) でろ過し、測定サンプルとした。HPLC 測定条件として、カラムはイオン型 H の架橋度 8 % 斯チレンジビニルベンゼン共重合体陽イオン交換樹脂カラム Aminex HPX-87H (300 × 7.8 mm、BIO-RAD) を用い、ガードカラムとして Micro-guard Cation H Cartridge (30 × 4.6 mm、BIO-RAD) を用いた。移動相には 0.014 N 硫酸を用い、流速は 0.7 ml/min となるようにした。圧力は 60 kgf/cm²、カラム温度は 60°C とし、UV-VIS 検出器で 210 nm の吸光度を測定した。P(3HB)含率は、ピークの積分値から決定した。また、検量線の作成には精製した P(3HB)を用いた。

【結 果】

(Nile-Red によるスクリーニング)

図1は生育したコロニーに紫外灯を照射したものである。コロニーの色は主に白、黄、オレンジで、紫外灯を照射すると PHA を合成したコロニーは赤く蛍光発光した。PHA を多く貯蔵しているコロニーは目視でも赤いことが分かった。表面に膜を張ったものや粘性があるものなど同じような形態のコロニーを重複しないように選別した。その結果、約 300 の分離株から Nile-Red 陽性株を計 68 株取得した。その内訳は、加熱処理していない土壤から 37 株、加熱処理(80°C、60 分)した土壤から 26 株、油汚染水から 5 株であった。

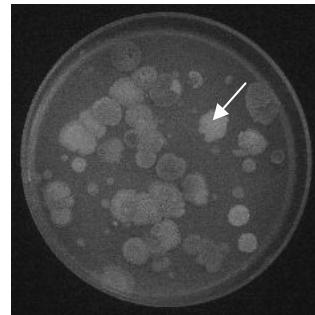


図1 蛍光発光の様子
 矢印で示した白色部分が Nile-Red 陽性コロニーである。

(HPLC による PHA 合成産物の確認)

精製 P(3HB)の HPLC 測定結果より、濃度は 0.02 mg/ml とした。リテンションタイム 2.992 min でのピークは、210 nm の波長の光に大きな吸収を有する不純物のピークであると考えられる。リテンションタイム 11.274 min でのピークは P(3HB)変換後のクロトン酸の存在を示すピークである。この結果をコントロールとし、保存していた Nile-Red 陽性菌について HPLC 測定を行った。保存株のうち 14 株について測定したところ、10 株からリテンションタイム 11 min 付近にピークが検出された。ピークが検出されたサンプルは、加熱処理していない土壤から 1 株、加熱処理した土壤から 7 株、油汚染水から 2 株であった。これにより PHA の合成が確認できた。

【結 論】

生分解性プラスチック PHA を合成する耐熱性細菌の探索の予備実験として、一般土壤を加熱処理してスクリーニングを行った。Nile-Red によるスクリーニングと HPLC による PHA 合成産物の確認で、26 株の耐熱性 PHA 合成細菌を取得した。

* Tel&FAX 093-964-7303
 E-mail : mizuno@kct.ac.jp