



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Application of microbial consortium and recombinant microorganisms in polyethylene degradation [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	PUTCHA, Jyothi Priya
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第16097号
Issue Date	2024-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/93501
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Putcha_JyothiPriya_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（農学） 氏 名 PUTCHA Jyothi Priya

審査担当者	主査	客員准教授	北川	航
	副査	教 授	吹谷	智
	副査	客員教授	鎌形	洋一
	副査	客員准教授	菊池	義智
	副査	客員准教授	加藤	創一郎

学位論文題名

Application of microbial consortium and recombinant microorganisms in polyethylene degradation

(微生物群集および組換え微生物を用いたポリエチレンの分解)

本論文は英文 87 頁、図 16、表 7、4 章からなり、参考論文 1 編が付されている。

プラスチックはこれまで非常に大量に生産され様々な製品に使用されてきたが、一旦環境中に放出得されるとその安定性から非常に長く残存し、世界的に大きな環境問題となっている。一方、これまでにプラスチックの微生物による分解も多数報告されている。しかしながら、その分解速度は非常に遅く、単一の微生物で十分に分解するものは報告されていない。本論文では微生物による炭素循環としてのプラスチックのリサイクルを進めるため、ポリエチレン(PE)に的を絞り、1) ポリエチレンを分解する人工的な微生物群集を構築、また、2) ポリエチレン分解に必要な酵素遺伝子をもつ組換え体を構築、することで効果的な分解を試みた結果をまとめたものである。

1) 微生物コンソーシアムを用いた分解の試み

本手法では PE を分解するための人工細菌コンソーシアムを構築・試験したものである。コンソーシアムを構成する株は過去文献の PE 分解能力に基づいて選択し、これらの株のラッカーゼ、リパーゼ、エステラーゼ、アルカンヒドロキシラーゼの酵素活性を、特に細胞外発現に重点を置いて評価している。これらの結果に基づいて、人工細菌コンソーシアムが構築され PE 分解に使用している。PE ペレットをコンソーシアムとともに最大 200 日間培養したサンプルにおいて、走査型電子顕微鏡 (SEM) 検査では多層バイオフィームと表面に埋め込まれた細菌を確認している。バイオフィームを除去した後の PE サンプルの SEM 画像では、表面の劣化が発生していることを明らかにしている。フーリエ変換赤外分光法 (FTIR) 分析により、PE 酸化生成物の生成と消費の傾向を明らかにし、生分解をさらに裏付けている。次世代シーケンシング分析では、培養液と PE サンプルの両方で *Rhodococcus erythropolis* が優勢な細菌であることを明らかにした。さらに、*R. erythropolis* の単独培養においてもバイオフィーム形成および PE 表面の劣化を観察している。これ

らの結果から、人工微生物コンソーシアムは PE 分解に十分な可能性があるとして述べており、また *R. erythropolis* が組換え体を用いる場合の宿主として良い候補であると考察している。

2) 組換え微生物を用いた分解の試み

本手法では組換え微生物を用いた効果的な PE 分解を目指し研究したものである。望まれる宿主としては、導入された酵素を細胞外で発現し、PE 表面に効果的にコロニー形成をし、効率的な酵素分解を確実に行うことだと述べている。コンソーシアム研究に基づき、PE 上に強いコロニー形成能力を持つ *R. erythropolis* を宿主として選択している。*R. erythropolis* はエステラーゼ、リパーゼ、アルカンヒドロキシラーゼについて良好な酵素活性を示し、細胞外ラッカーゼ活性は示さないことを明らかにしている。そのため *R. erythropolis* 宿主における細胞外ラッカーゼの発現を目的としている。具体的には *S. griseus* の EpoA と *S. jumonjinensis* の 2 つのマルチ銅酸化酵素ファミリータンパク遺伝子、MCO1 と MCO2 を扱っている。3 つの推定ラッカーゼ遺伝子は、元のシグナルペプチドとともに発現ベクターにクローン化され解析されている。さらに、宿主での組み換えタンパク質発現においてシグナルペプチド(SP)との潜在的な不適合性を克服するため、元の *Streptomyces* の SP を *Rhodococcus* の SP 置き換えた解析をしている。置き換える SP は *R. erythropolis* のプロテオミクス研究で大量に発現していることが示されているタンパク質から、6 つのツインアルギニン転移(TAT)タイプの SP を使用したと述べている (T1-T6 としている)。さらに宿主内での組換えタンパク質の生産と分泌のバランスをとるため、TAT 分泌タンパクの遺伝子 *tatAC* をベクターに組み込んで解析を行っている。3 つの *Streptomyces* ラッカーゼのうち、元々の SP で細胞外活性が得られたのは MCO2 のみであり、EpoA は T4、T6 に、MCO1 は T3、T5 の SP に変更したときに強い活性が得られることを明らかにしている。これらの結果は、異種タンパク質分泌研究における SP 遺伝子適合性の重要性を強く示すと述べている。有効な SP を持つラッカーゼについて、*Rhodococcus* 組み換え体における PE 分解の効果については現在検証中であるが、組換え微生物による PE 分解には十分な可能性があるとして考察している。

酵素活性が明らかになっているバクテリアのみで構築した人工的な微生物コンソーシアムによる PE 分解の試み、また必要な全ての遺伝子や酵素活性を持つ組換え体の作製・分解の試み、の双方がこれまでにないものであり、それぞれその可能性を議論している。またバクテリアの細胞外ラッカーゼは研究例が少なく、産業利用価値の高いラッカーゼについて組換え体で有効な細胞外酵素を複数生産したという点でも価値があるといえる。以上の成果は、微生物による PE を初めとした難分解性物質の分解に関する研究、また微生物による酵素生産に関する基礎的な研究にも大きく寄与するものである。

よって審査員一同は、Putcha Jyothi Priya が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。