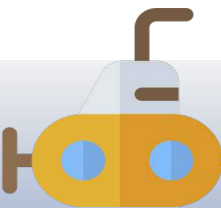
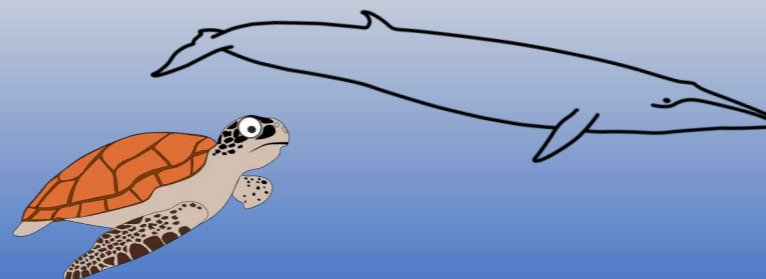
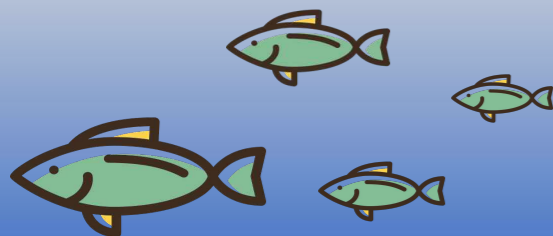


生分解開始スイッチ機能を有する海洋分解性 プラスチックの研究開発



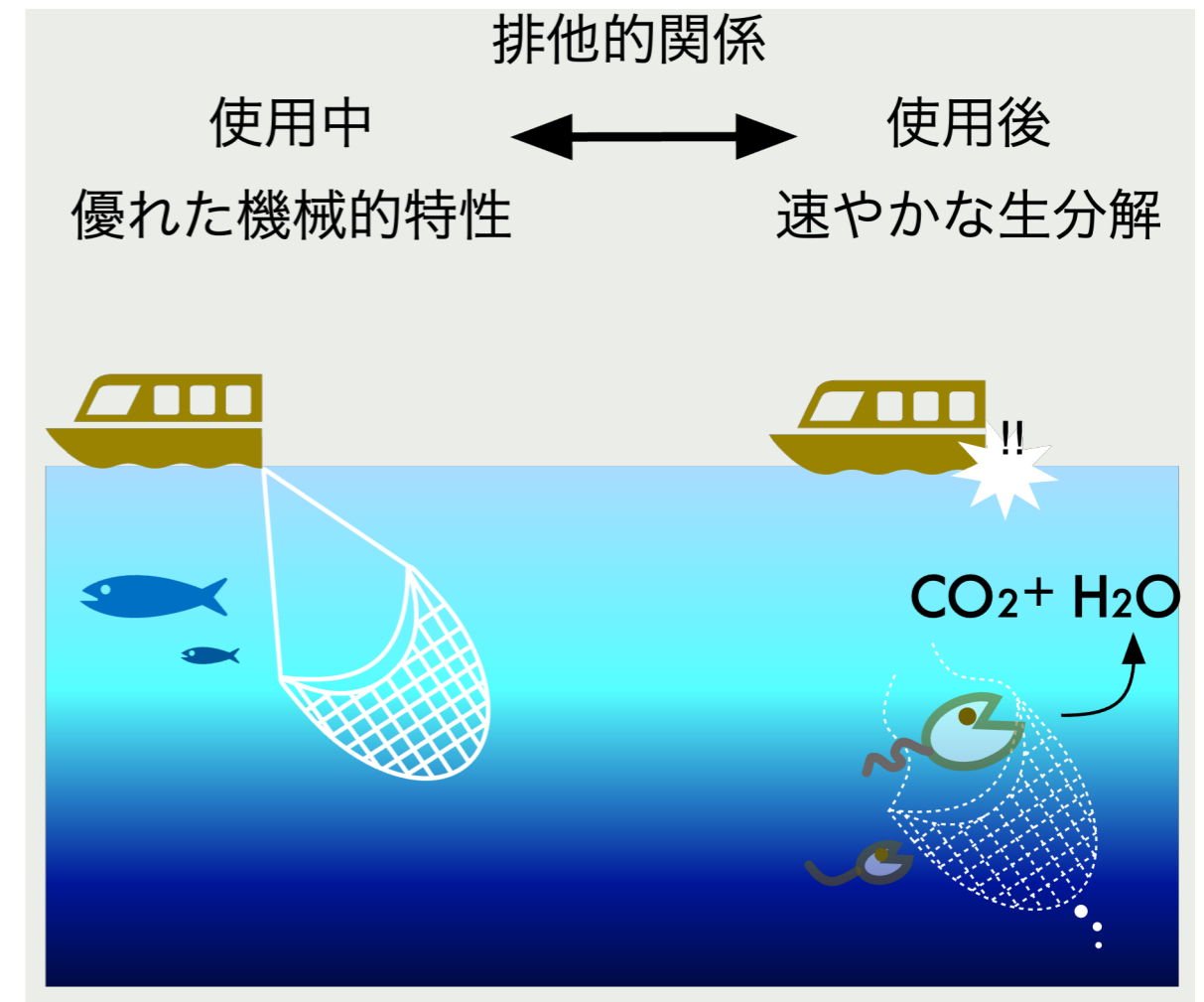
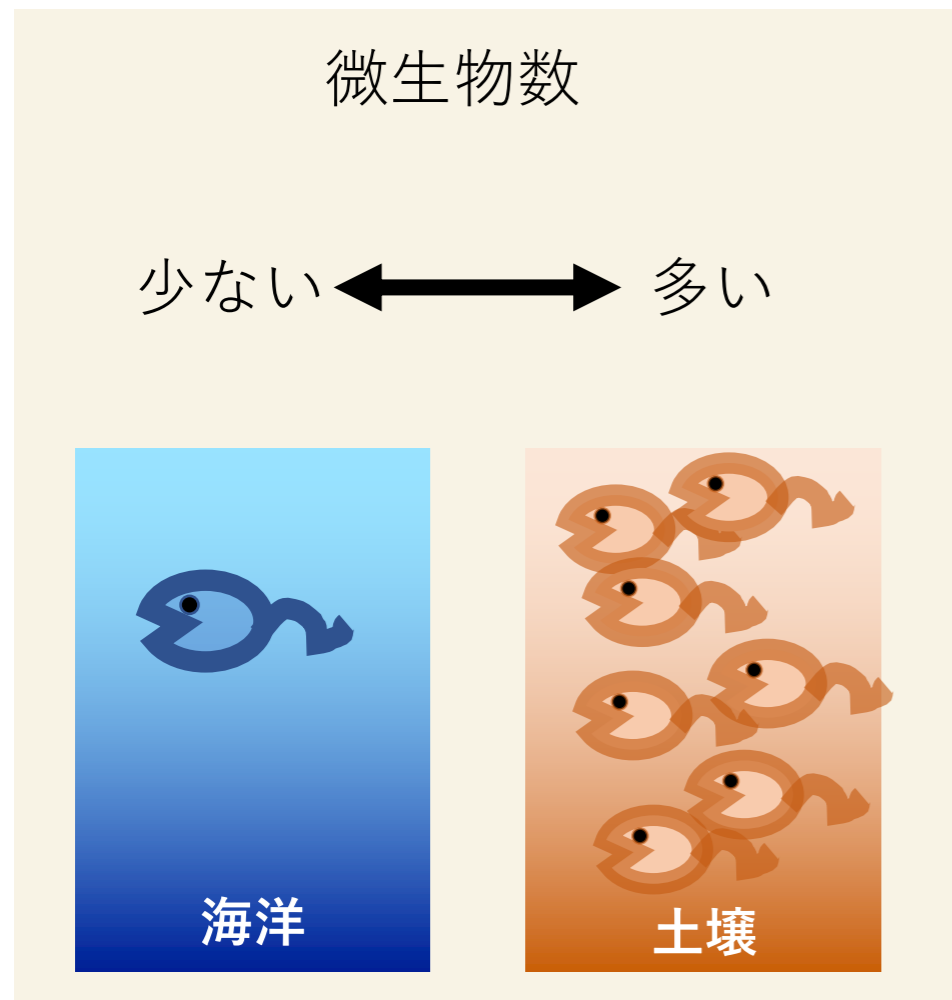
PM：粕谷健一
国立大学法人群馬大学 教授
PJ参画機関：群馬大学、東京大学、
東京工業大学、理化学研究所、海洋
研究開発機構

生分解開始スイッチ機能を有する海洋分解性プラスチックの研究開発



PM：粕谷健一
国立大学法人群馬大学 教授
PJ参画機関：群馬大学、東京大学、
東京工業大学、理化学研究所、海洋
研究開発機構

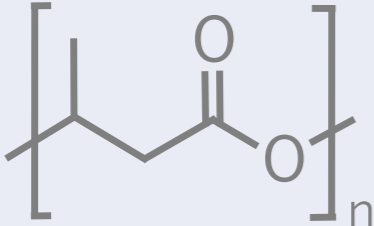
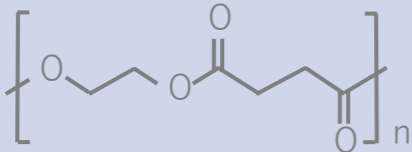
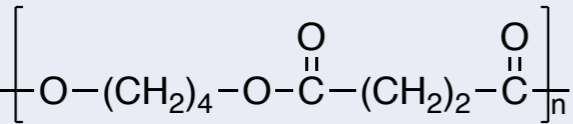
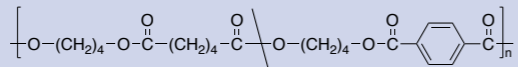

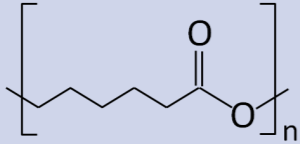
a. プロジェクト研究開発背景ー2つの課題



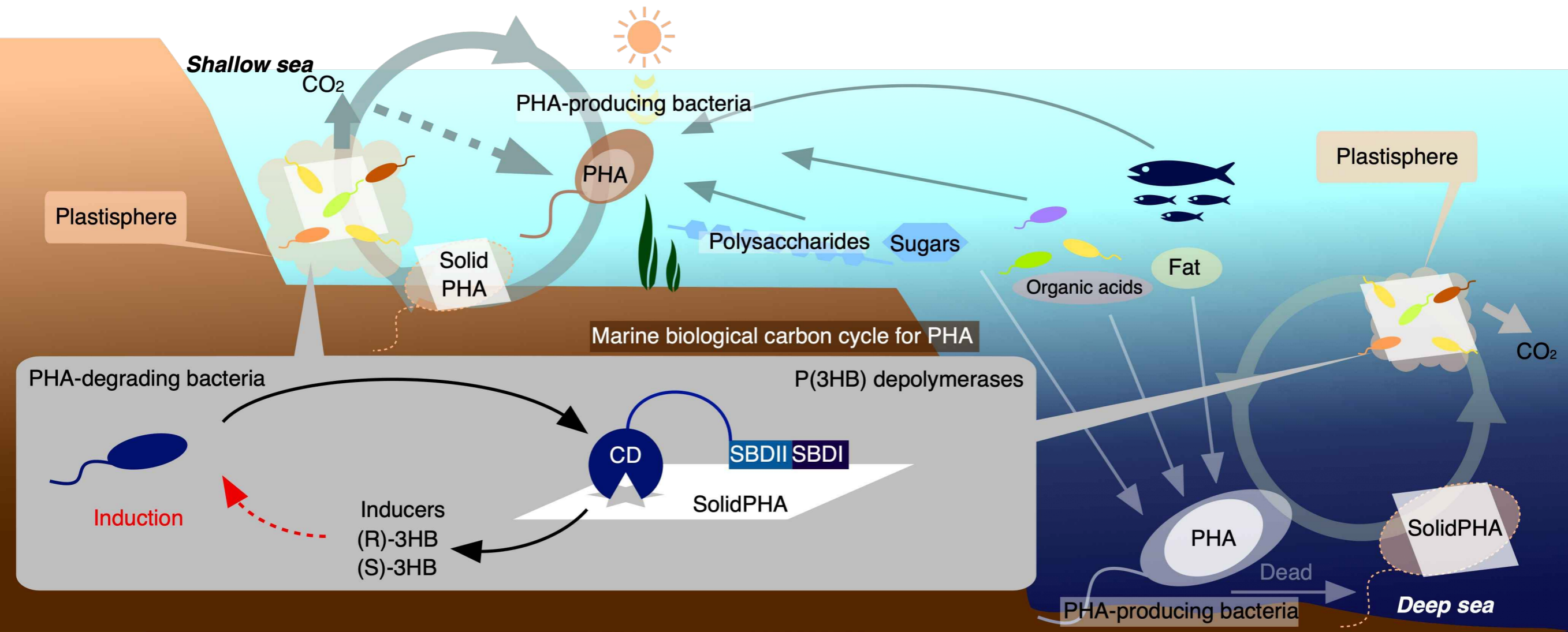
- 海洋の微生物が少ない。
- 海洋では生分解性プラスチックが生分解しづらい。

- 生分解性プラスチックは使用中徐々に生分解する。

a. プロジェクト研究開発背景ー海洋生分解性プラは少ない

生分解性プラスチック	環 境 分 解 性		
	分解する	場所による	分解しない
PHAs  海洋分解 OK	分解する 土壌 淡水 汽水 海洋 活性汚泥 嫌気汚泥 コンポスト	-	-
PESu 	土壌 淡水 コンポスト 活性汚泥	-	海洋
PBSu 	コンポスト	土壌	海洋 活性汚泥 淡水
PBAT 	コンポスト	土壌	淡水 海洋
PLA 	コンポスト	土壌	海洋
PCL  海洋分解 OK	土壌 淡水 海洋 コンポスト	-	-

a. プロジェクト研究開発背景—PHAは海洋で分解する



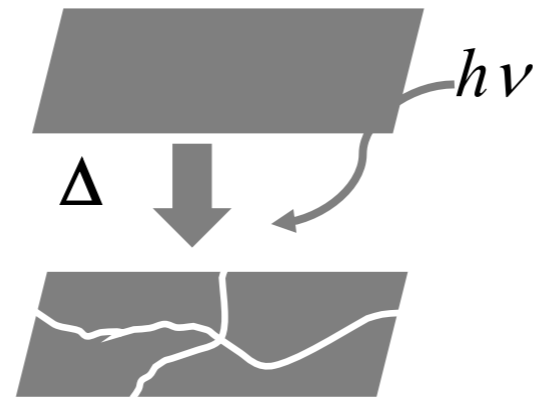
Polym J 53, 47–66 (2021)

PHAは海洋で生産され、生分解される。海洋での生物学的な炭素サイクルが成立している。

a. プロジェクト研究開発背景—生分解の仕組みと開発戦略

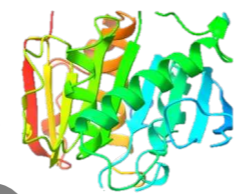
0. インタクト

1. 生物劣化, 非生物劣化 Abiotic and biotic



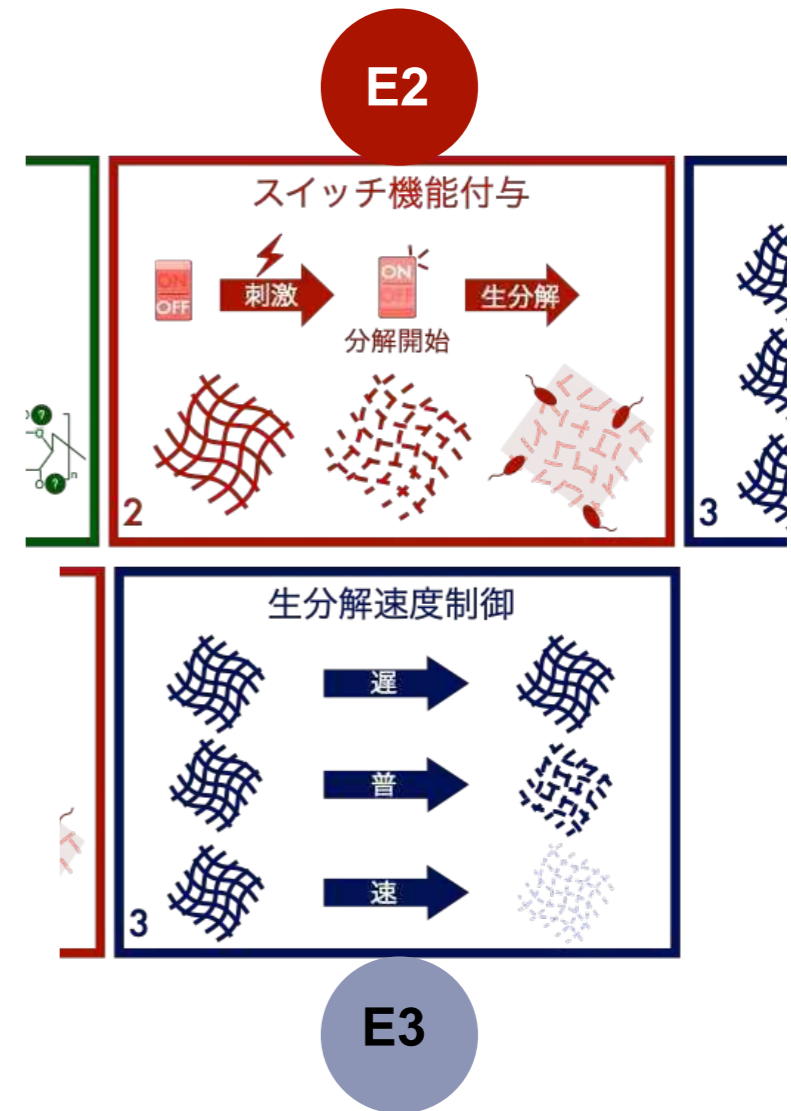
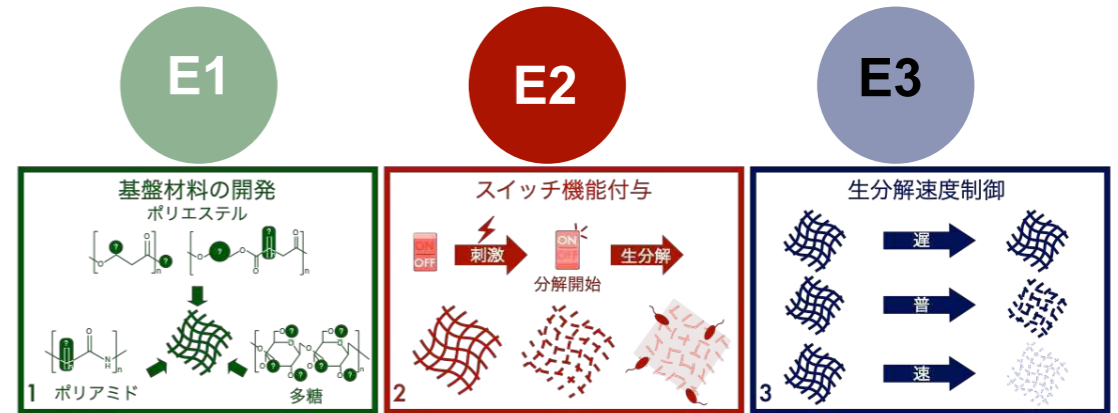
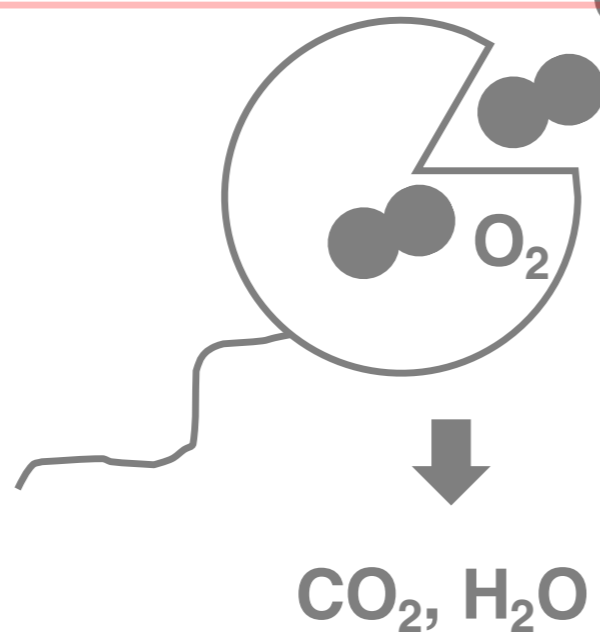
2. 低分子量化

Abiotic and biotic

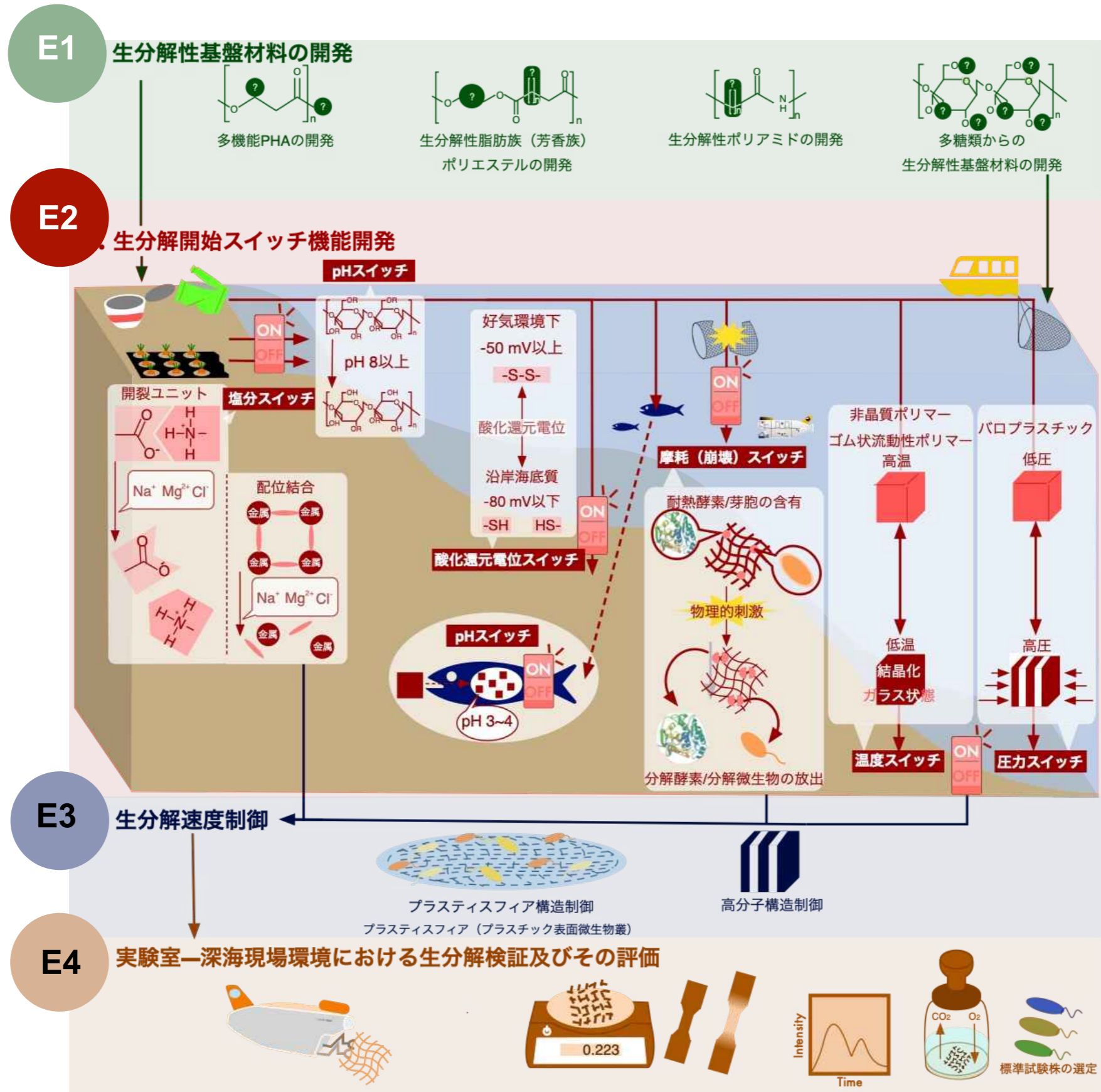


3. 無機化

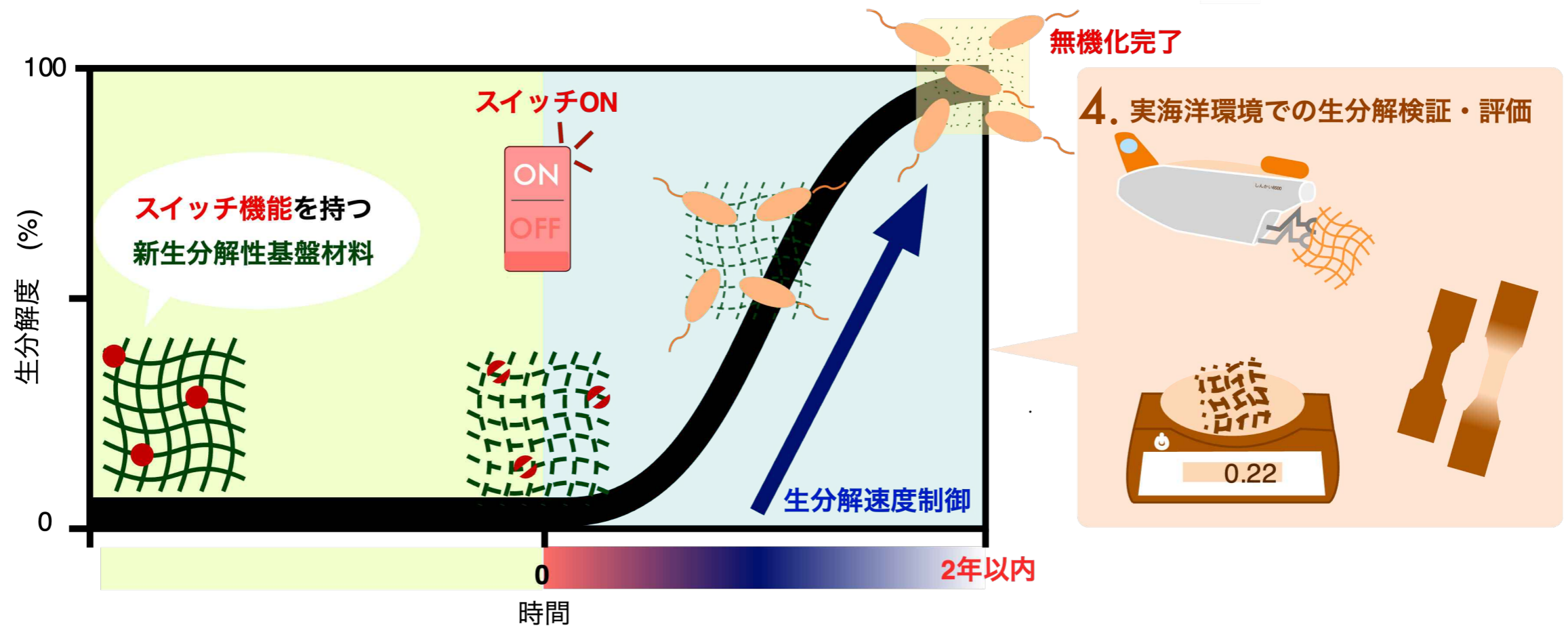
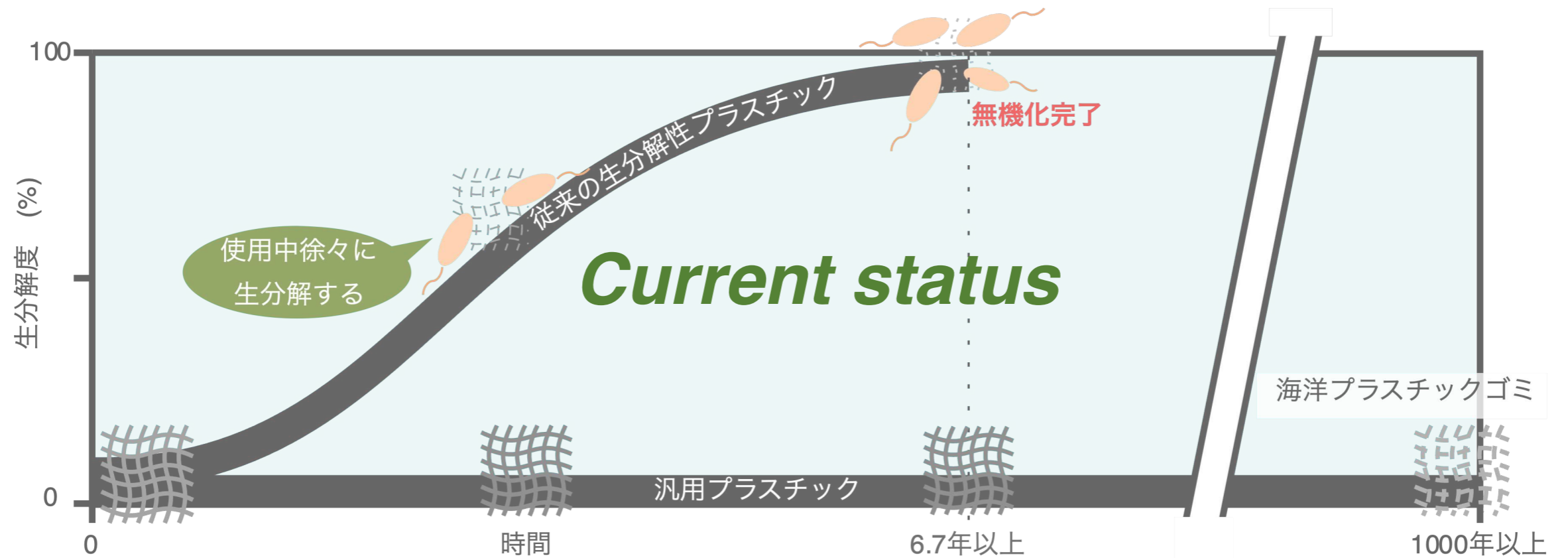
Microbial



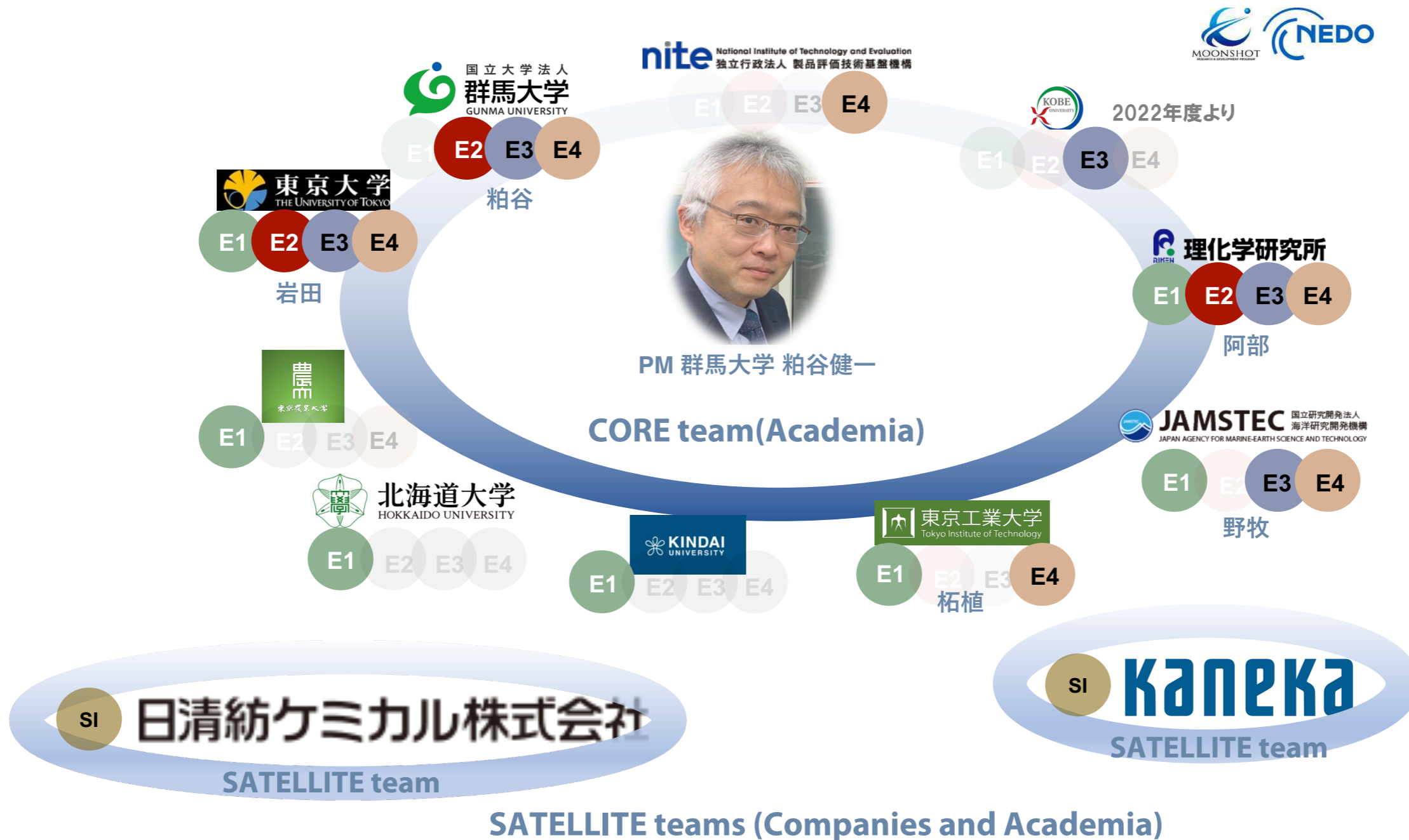
1. プロジェクト研究開発項目 (E1, E2, E3, E4)



2. プロジェクトが目指す未来像



3. プロジェクト実施体制



2022年度より、開発技術の社会実装を加速するため、産学連携サテライトチームを結成

PMがプロジェクト内の要素技術のシステム化を推進するとともに、成果の最大化を目指し、チーム再編、テーマの選択と集中を行う。

4. 国際連携および国民との科学・技術対話

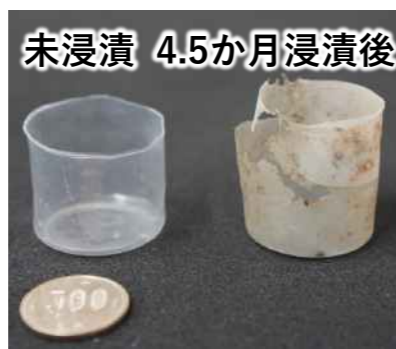


海洋プラスチック汚染研究でも世界をリードする**アメリカ海洋大気庁 (NOAA)**と協力し、海洋表層での生分解プラスチック分解評価を実施。

MOUを結ぶNOAAとJAMSTECが保有する海洋プラスチック分布や海流、海洋環境、付着微生物叢に関する知見を活かし、浮遊プラスチックごみが蓄積している西太平洋海ごみベルトに設置した海洋観測ブイを生分解性プラスチック分解試験場として運用を開始した。1年ごとのブイの入れ替え時に生分解性プラスチックを回収、新規設置し、海洋表層環境での分解度を国際共同研究の一環として検証していく。



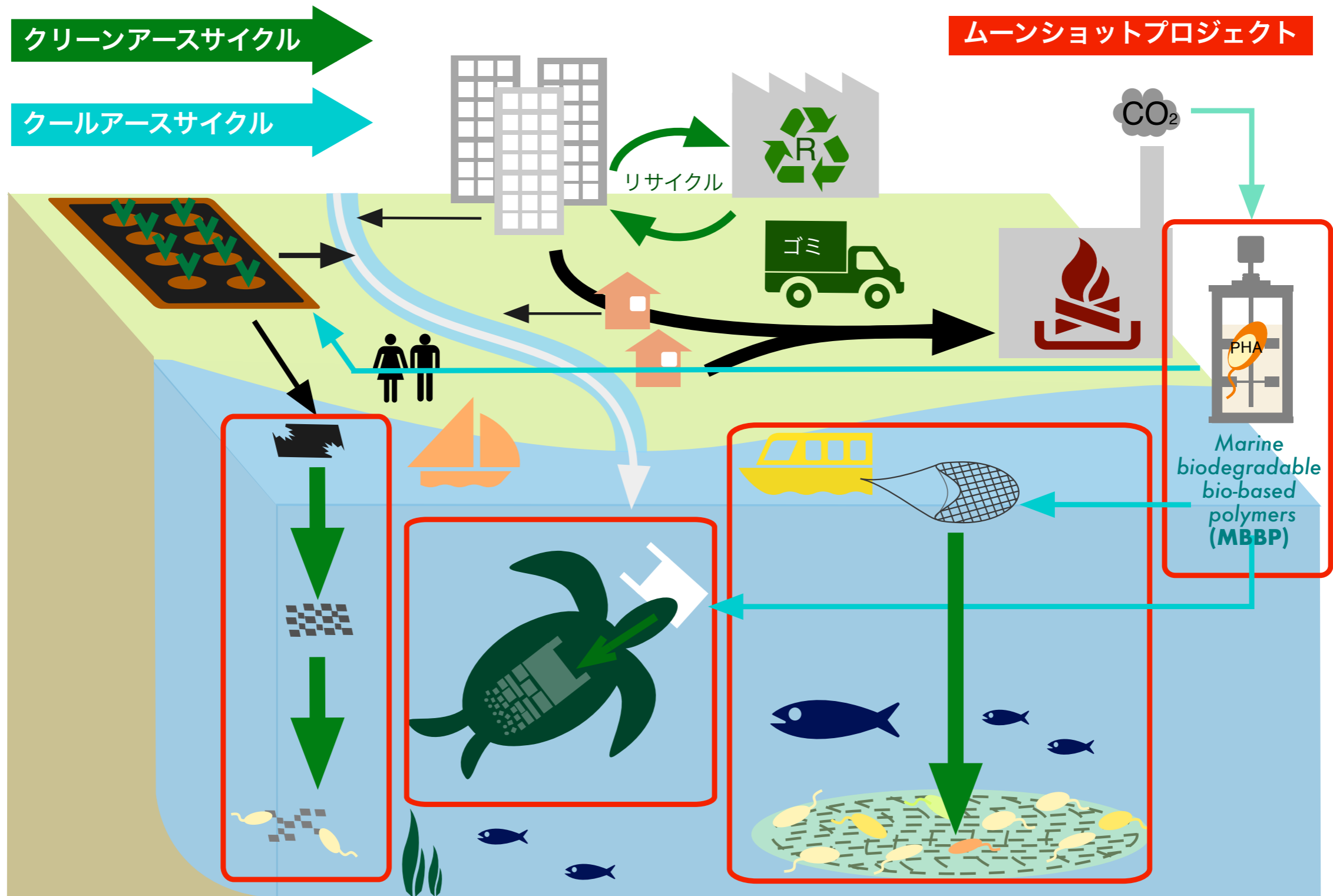
GIGAスクール×深海の一環として、全国の小学生2万4千人以上と、文部科学大臣らとオンライン生中継を行いながら、初島沖855 mに新規生分解性素材を設置。海洋プラスチック問題に対する意識を高めるとともに、新規生分解性プラスチックによる環境負荷低減を訴えた。



上：4か月半の深海設置実験後の分解の様子。
右：本事業で開発し、現場生分解性を実証した素材の成果を報告したニュースサイト。全国紙16紙に掲載されたほか、TBS News23などでもニュース報道された。

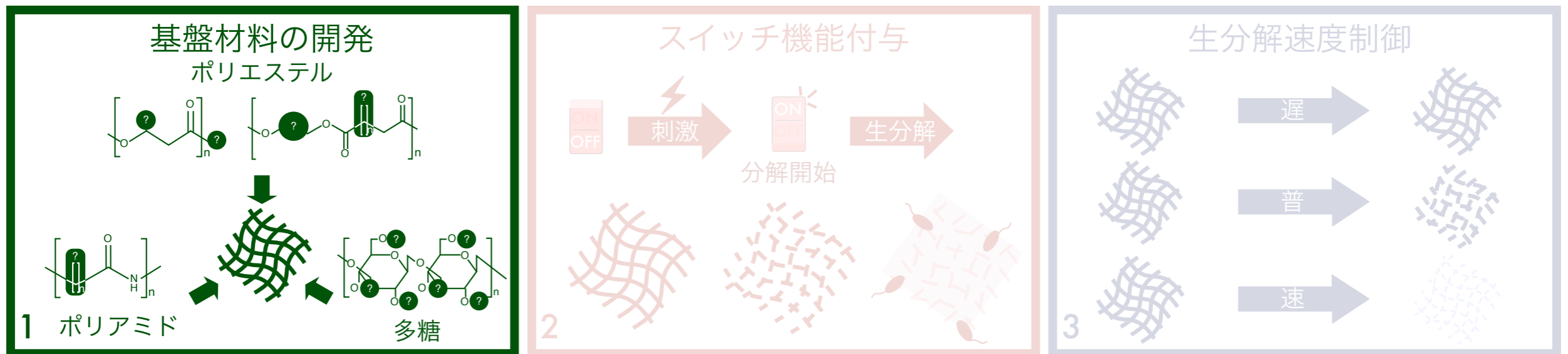


7. 社会実装のイメージ



8. 現時点の主な成果

海洋生分解性基盤素材の開発 (E1)



E1：基盤樹脂開発

PHA

機能化
強靱化
CO₂固定

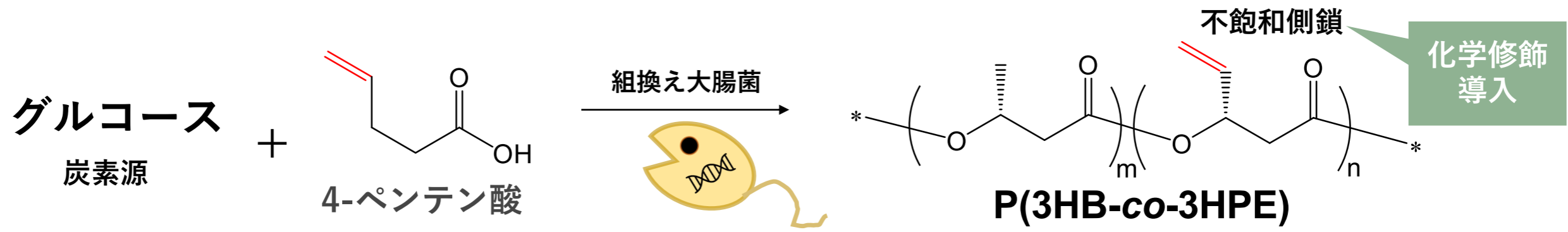
多糖

可塑化/生分解性
強靱化（成形性向上）

合成高分子

生分解性ビルディングブロック
ブロックポリマー

E1 スイッチング機能を組み込むための基盤材料開発

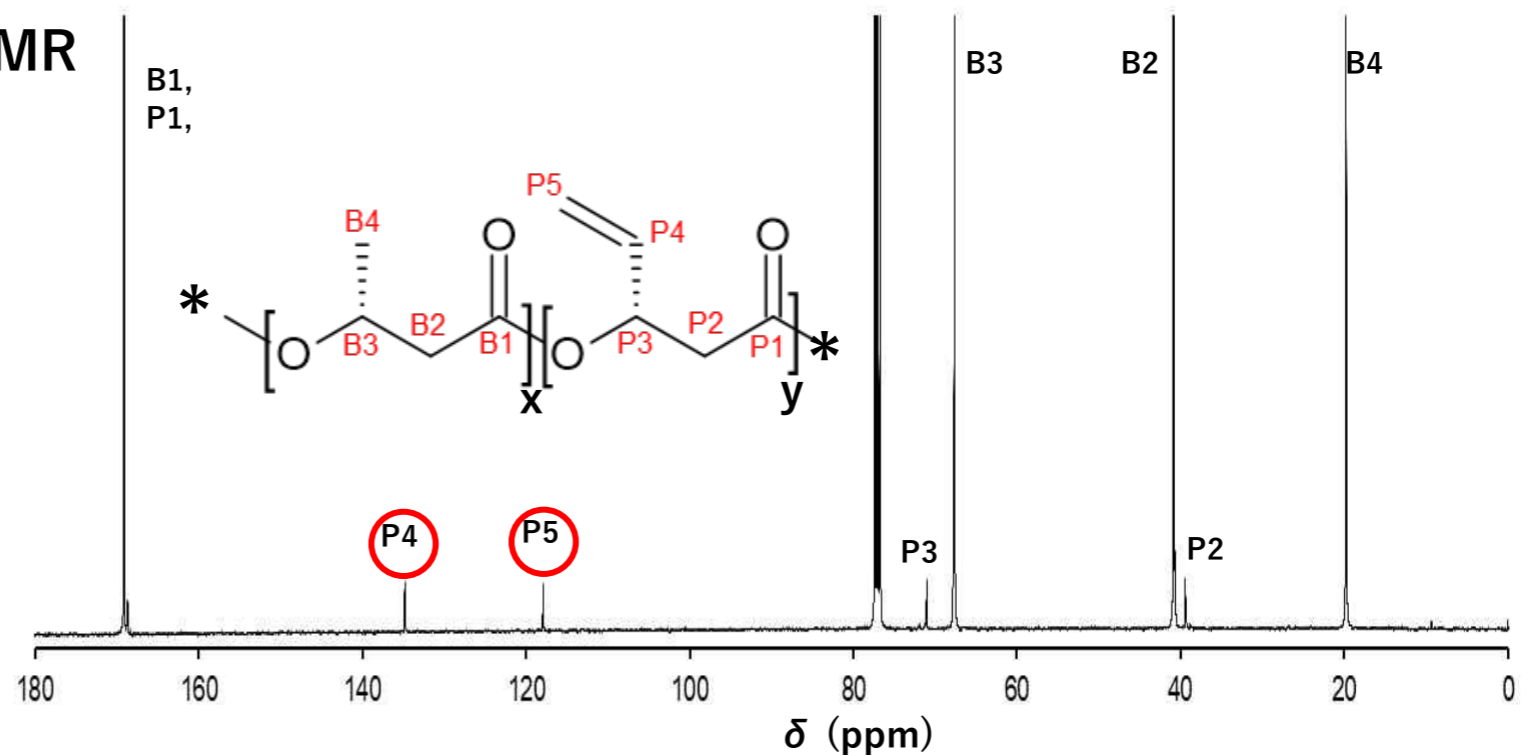


合成条件： LB培地 + 4-ペンテン酸 + グルコース, 30°C, 72 h

大型
フラスコ
培養
(2L)



¹³C NMR



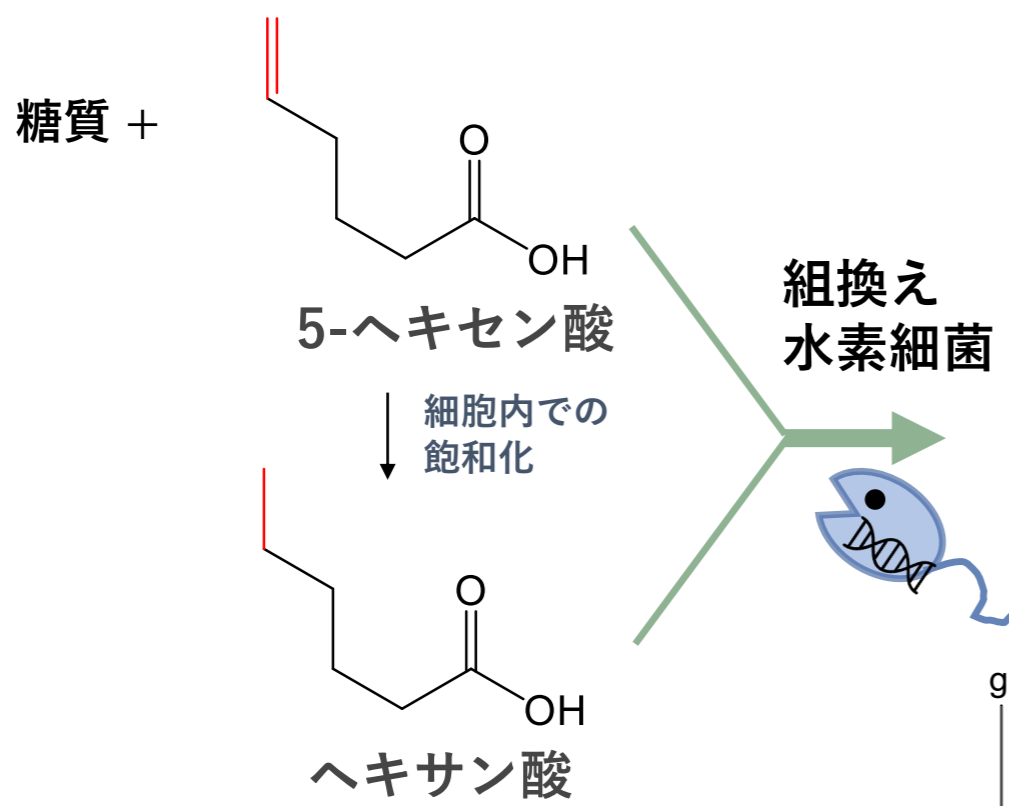
精製



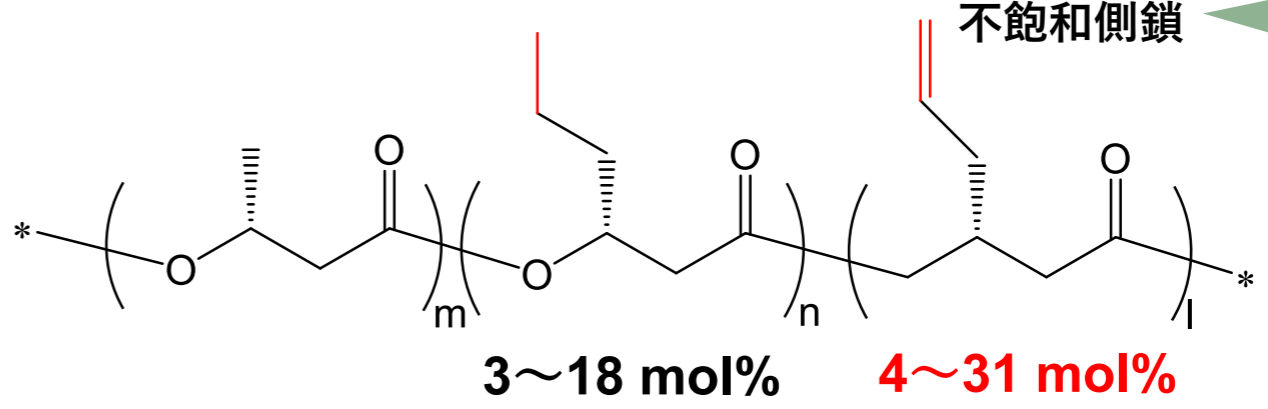
大量培養により、
3H4PEポリマーを **200 g以上合成**

→ 生分解スイッチの組み込みへ

E1 スイッチング機能を組み込むための基盤材料開発

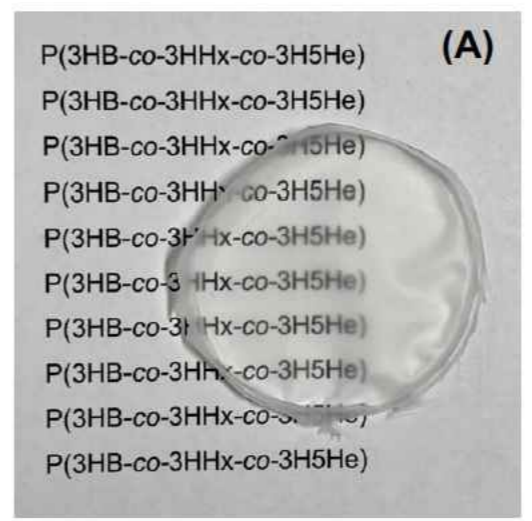
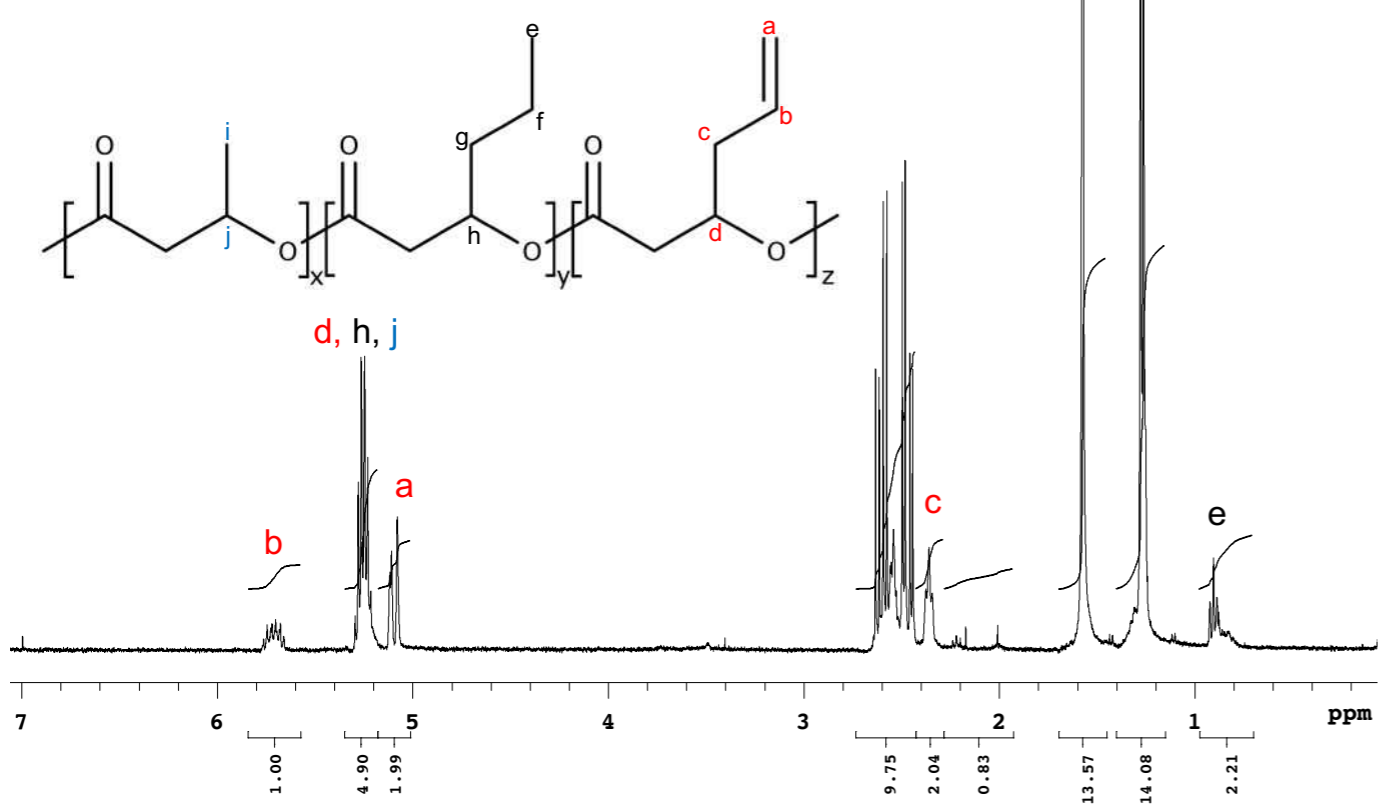


P(3HB-co-3HHx-co-3H5HE)

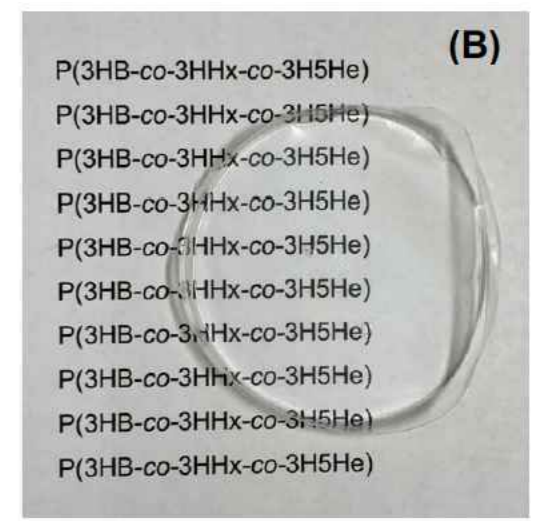


5-ヘキセン酸では、水素酸化細菌において効率よく3H5HEと変換され、ポリマー内に取り込まれることが分かった。

P(3HB-co-13mol% 3HHx-co-27mol% 3H5HE)



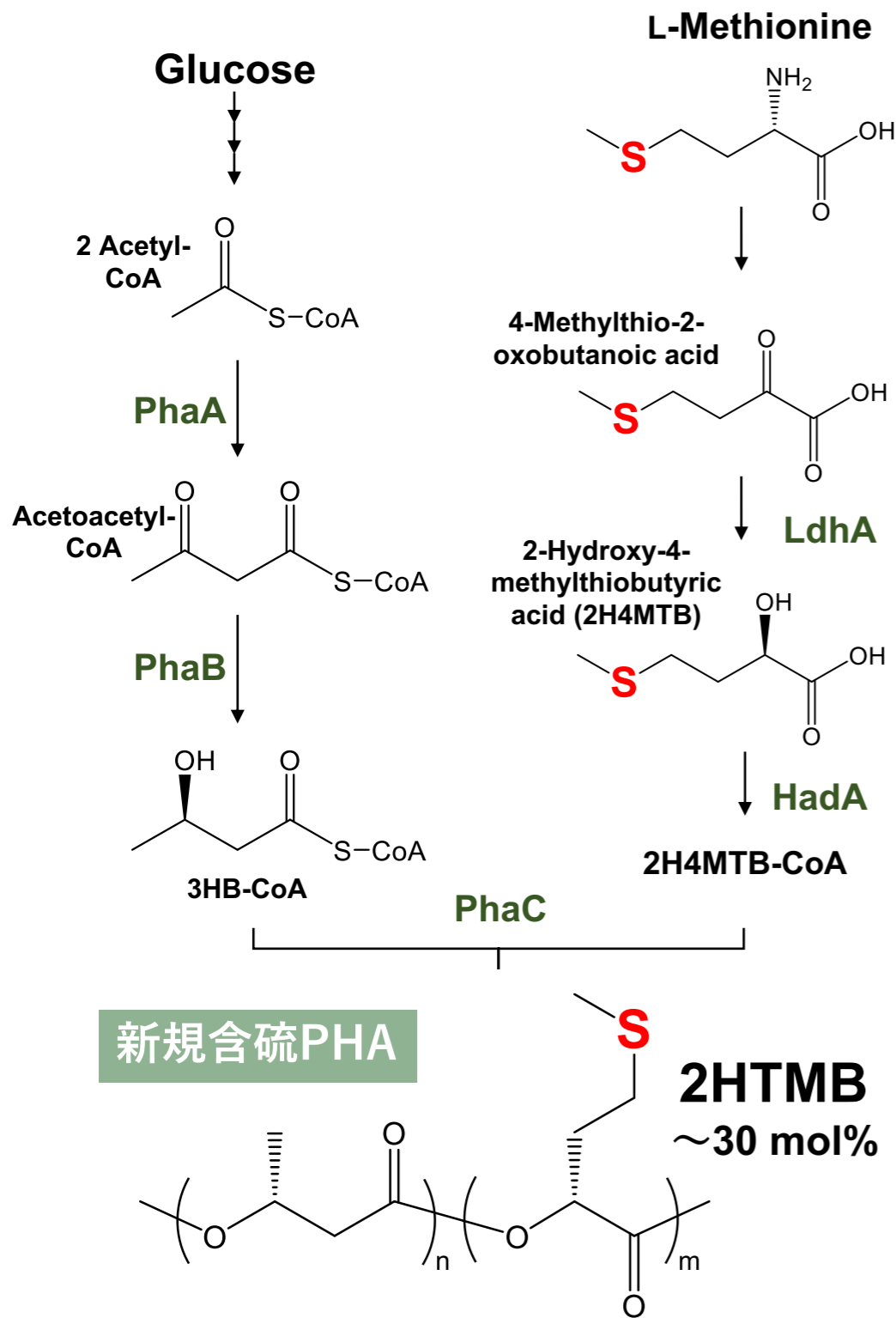
(A) P(3HB-co-4.9 mol% 3H5He-co-5.2% 3HHx)



(B) P(3HB-co-13.9 mol% 3H5He-co-16.3% 3HHx)

E1

スイッチング機能を組み込むための基盤材料開発



酸化実験

スルホキシド化

スルホン化

メチオニン誘導体 2H4MTB

[O]

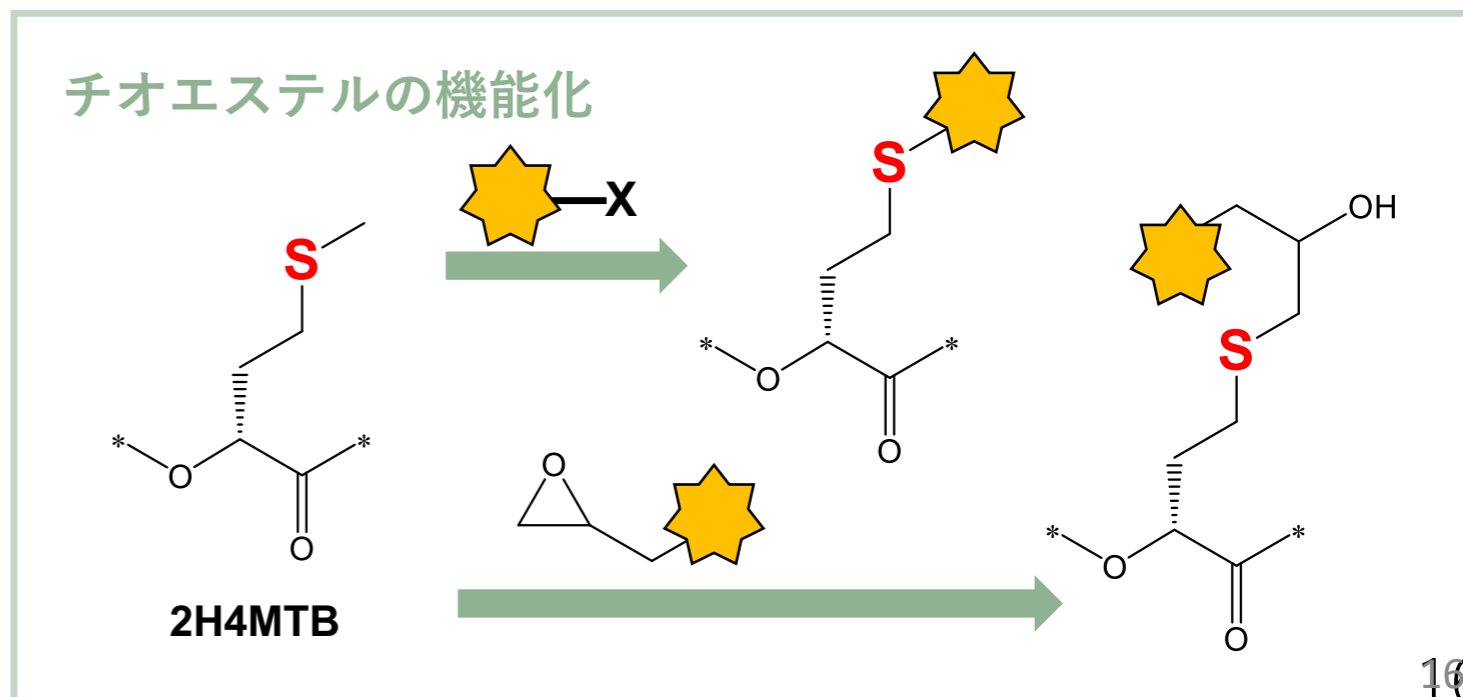
[O]

79°

酸化による接触角の低下

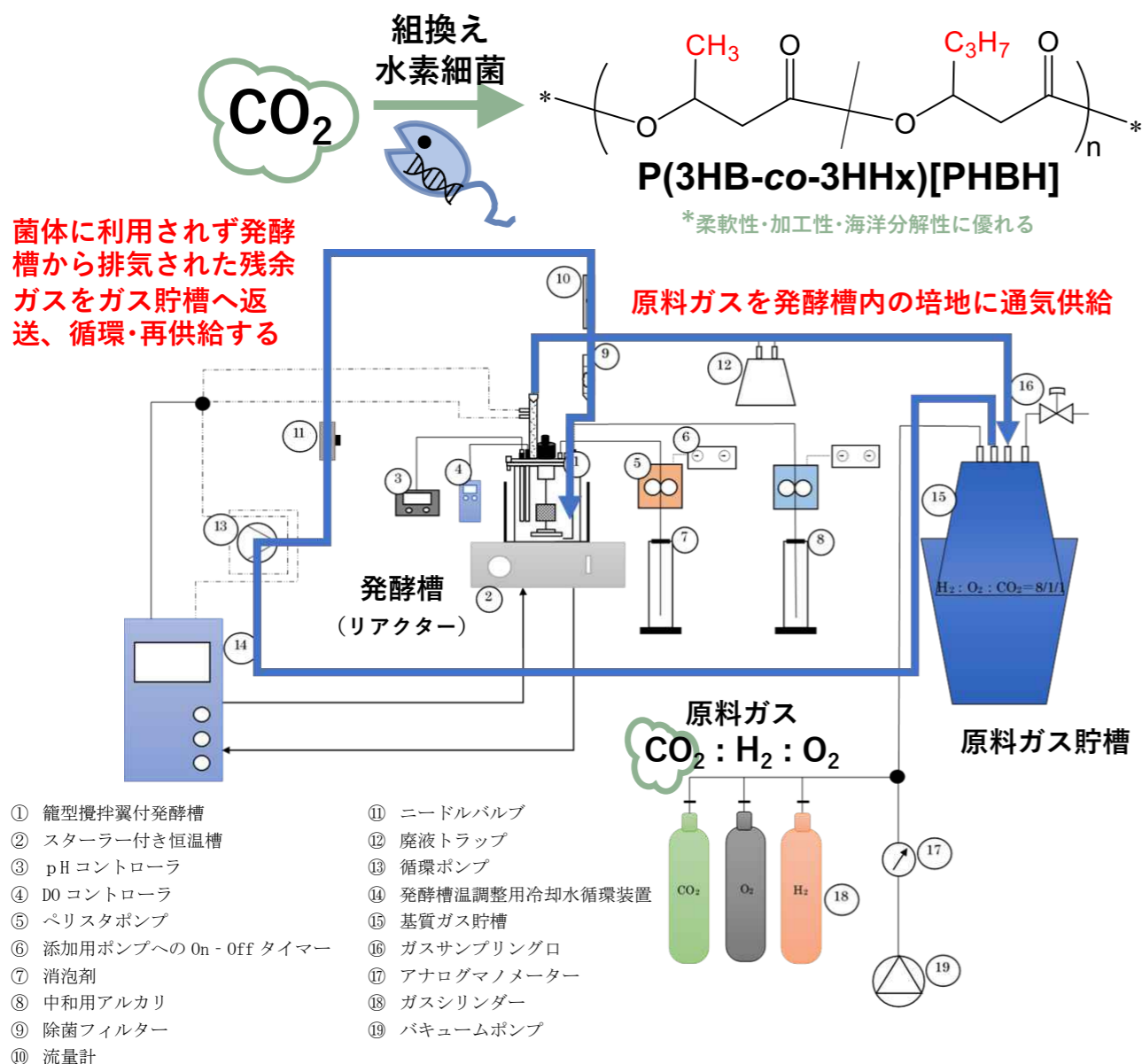
60°

親水化



E1 新規PHA の効率的合成手法の確立

- H₂ : O₂ : CO₂ガスを原料基質として水素細菌の遺伝子組換え株を培養し、海洋分解性に優れた新規ポリエステル^①の生産試験を行う。
- 組換え株の培養特性を明らかにし、CO₂からポリエステルを効率よく生産するための技術開発を行う。
- とくに生産濃度の向上と高速化、原料ガスの完全な消費利用を可能にする培養法の開発に重点を置く。



閉鎖循環式ガス培養システムでの水素細菌の培養 (ラボスケール)

① 各種組換え株のPHBH生産能比較 (フラスコ培養)

宿主株/組換えプラスミド	菌体濃度 (g/l)	PHBH含有率 (wt%)	ユニット組成 (mol%)	
			3HB	3HHx
<i>C.necator</i> H16 (野生株)	17.16	68.2	100.0	0
MF01/ pBPP-ccr _{Me} J4a-emd	12.18±0.40	64.0±3.4	94.8±1.1	5.3±1.1
MF01ΔB1/ pBPP-ccr _{Me} J4a-emd	10.65±1.35	61.7±4.6	52.3±6.2	47.7±6.2
MF01/ pBPP-ccr_{Me}JAc-emd*	11.22±2.67	64.6±8.1	88.7±6.4	11.3±6.4
MF01ΔB1/ pBPP-ccr _{Me} JAc-emd	8.52±1.00	67.8±1.8	87.1±2.3	11.1±1.3

*3HHx 10mol%のPHBHが最も物性が良いことが知られている。(～2020年度)

② *C.necator* MF01/JAc株によるPHBH生産 (ジャー培養)

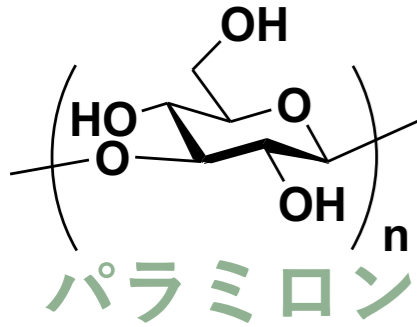
菌体濃度 (g/L)	PHBH濃度 (g/L)	3HB (mol%)	3HHx (mol%)	培養時間 (h)	菌体生産性 (g/L/h)
61.4	51.5	94.6	5.4	205	0.300
71.0	58.4	86.2	13.8	119	0.594

- PHBH合成に適した無機塩培地組成の探索および培養中の無機栄養塩濃度の制御 (2021年度 最高値)
- 発酵槽攪拌性能の向上等による生産性改善

(2022年度11月現在 最高値)

E1

多糖類からの生分解性基盤材料の開発



抽出 熱成形加工

- ・精密なエステル化
- ・新規加工法開発

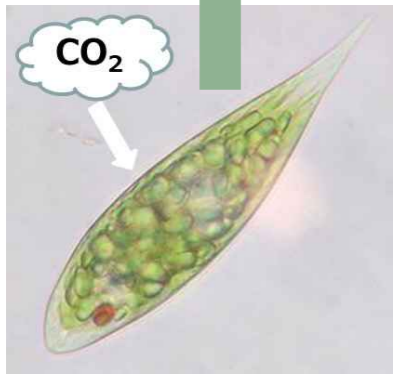


射出成形



溶融紡糸

- ・酸やアルカリに強い
- ・PP以上の耐衝撃性
- ・添加剤なしで紡糸可能
- ・高強度



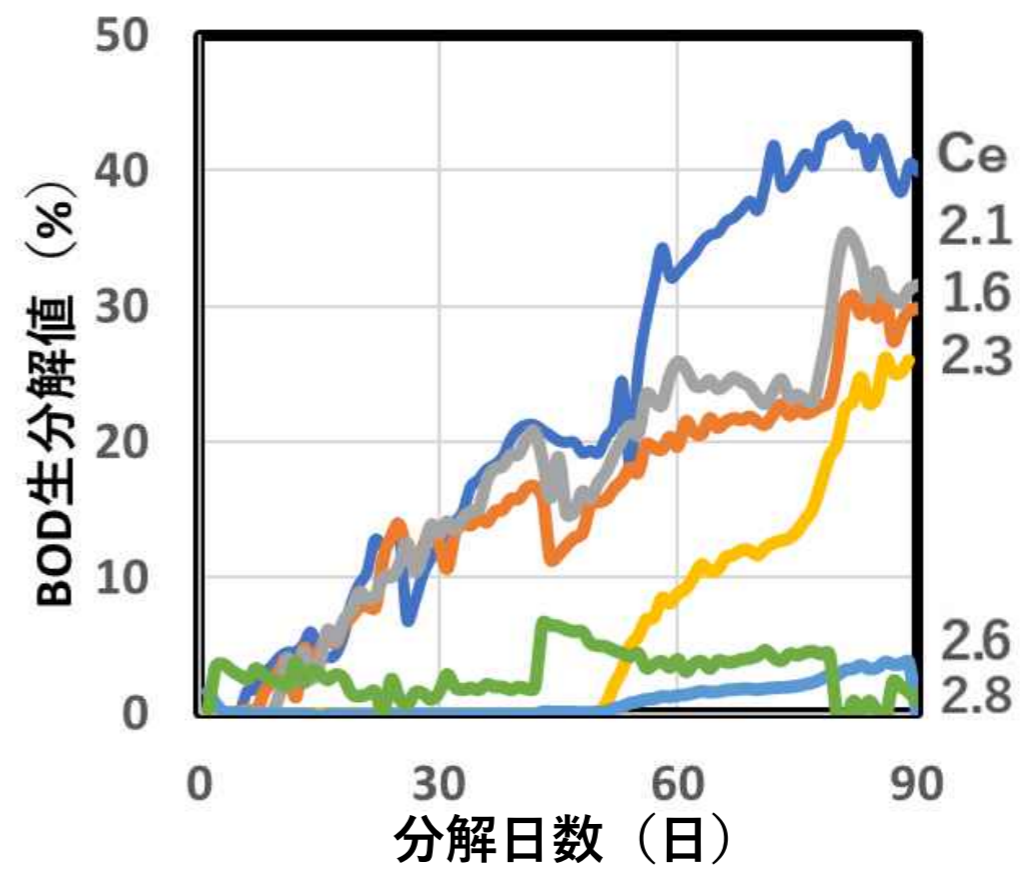
ミドリムシ

海洋分解性評価

東京湾の海水を用いた生分解試験

置換度1.6~2.3では、セルロースの約75%の分解速度

多糖から海洋分解性の制御された高性能な新素材の開発に成功

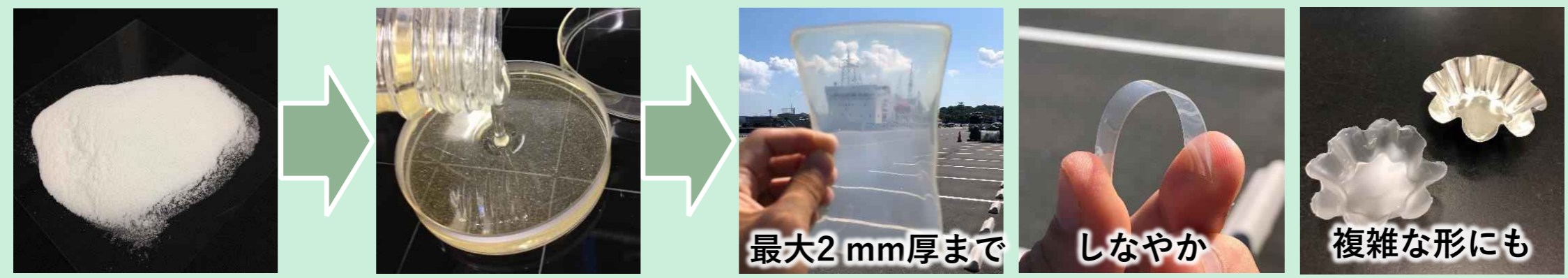


良好な海洋分解性

海洋分解性の制御

E1

多糖類からの生分解性基盤材料の開発



粉末状の原料（木の主成分であるセルロース）を溶かして固める PCT/JP2020/039874

最大2 mm厚まで しなやか 複雑な形にも

紙と完全に同一の素材でそれ以上の機能性

セルロースのみからなる透明カップ



加工前 加工後 乾燥


撥水フィルムなどを内面に貼り付けせずとも、水やホットコーヒーなど液体が漏れない



加工前 加工後 乾燥

課題であった脆さを成形・加工技術の改良により克服し、完全にキチンのみからなる複雑な形状の部材の調製に成功した

社会実装に不可欠な高い加工性を達成するため、成形・加工技術を改良し 高い深海分解性を維持したまま 完全にセルロースのみ・完全にキチンのみ からなるより複雑な形状の部材の調製に成功した。



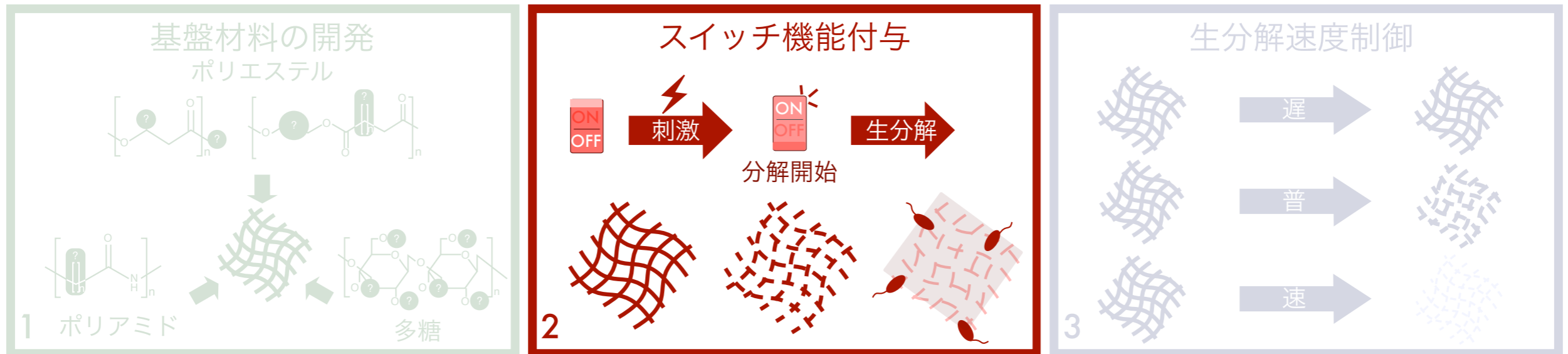
着色も容易

深海で

- 2ヶ月で分解 (キチンのストロー)
- 10ヶ月で分解 (セルロースのカップ)

8. 現時点の主な成果

生分解開始スイッチ機能の開発 (E2)



E2：スイッチ機能開発

pH

塩濃度

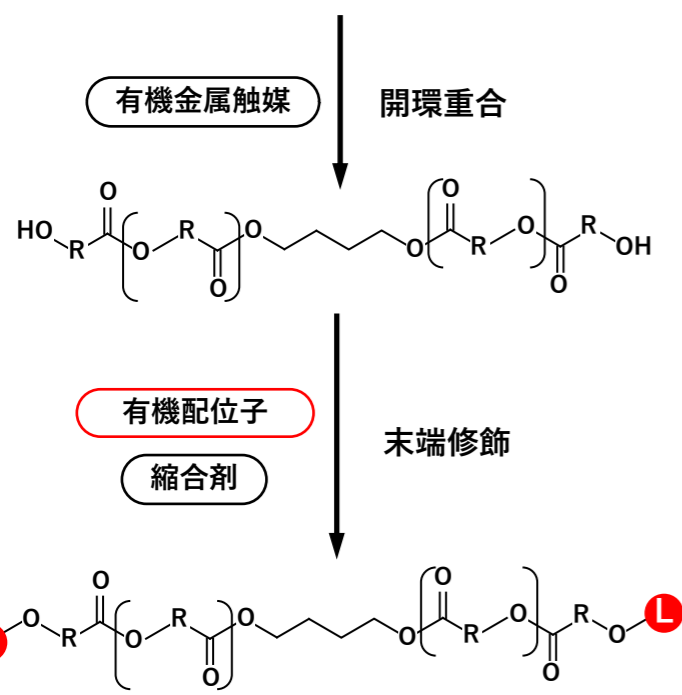
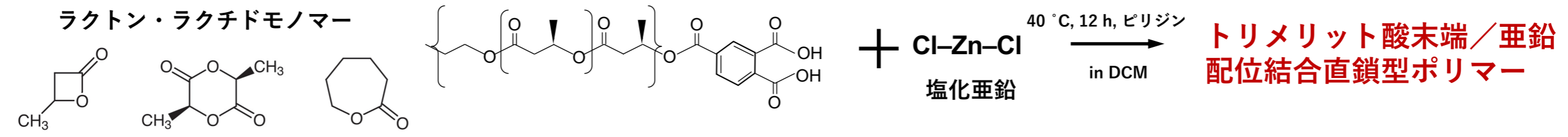
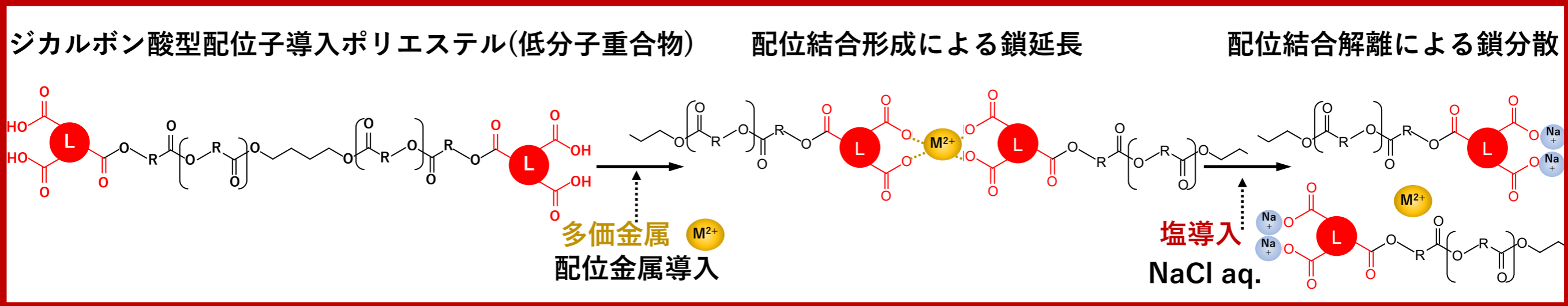
酸化還元電位

圧力

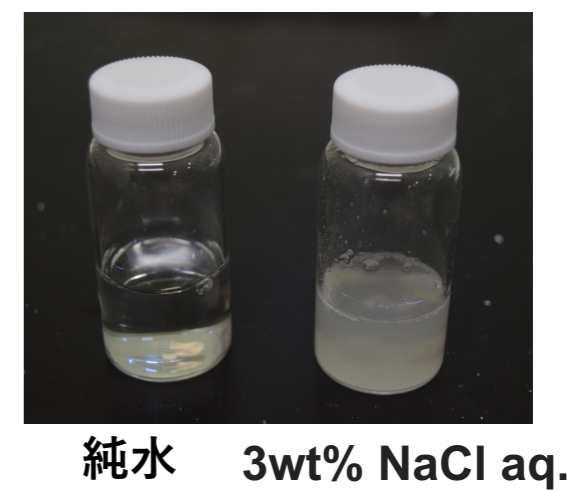
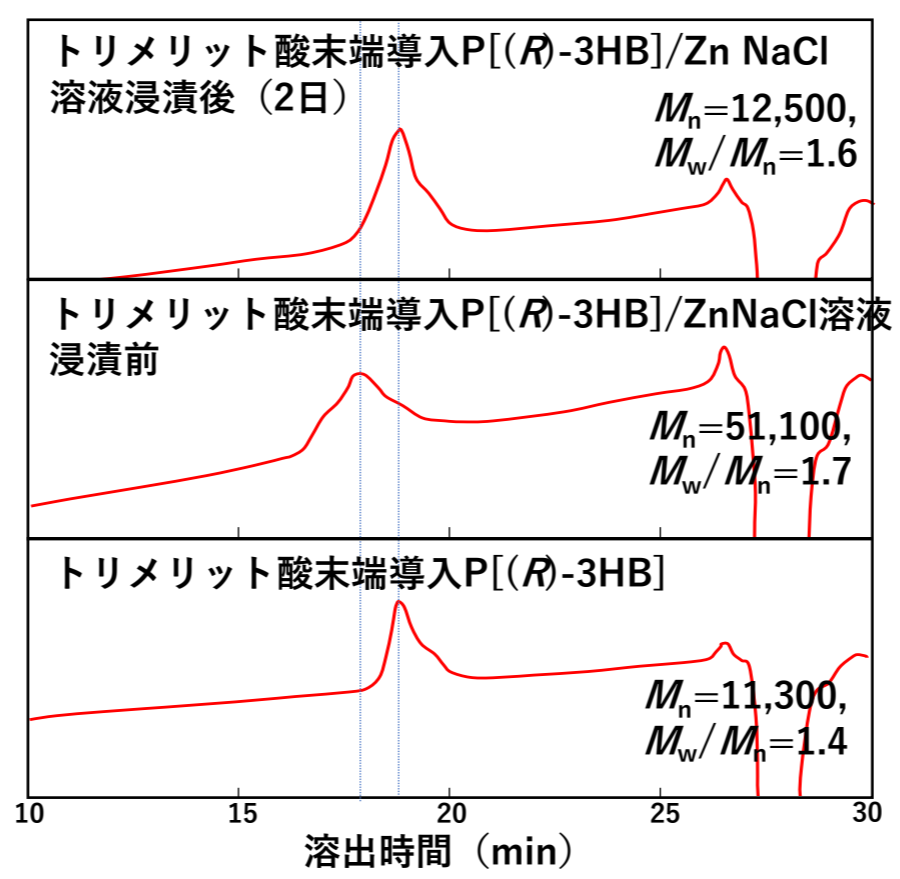
温度

摩耗

E2 塩濃度スイッチ

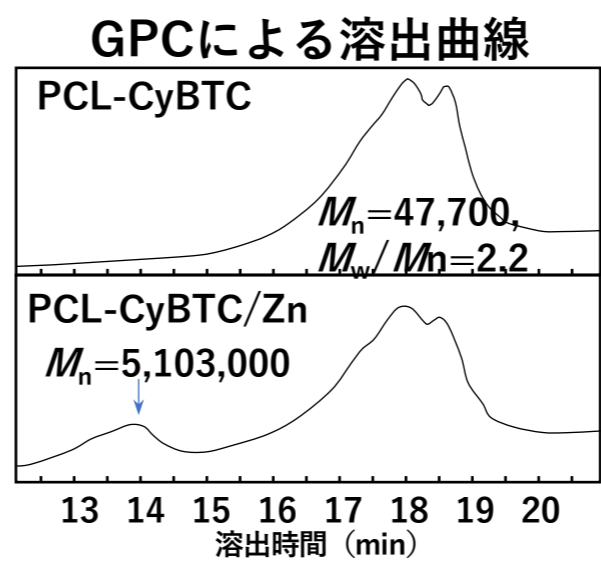
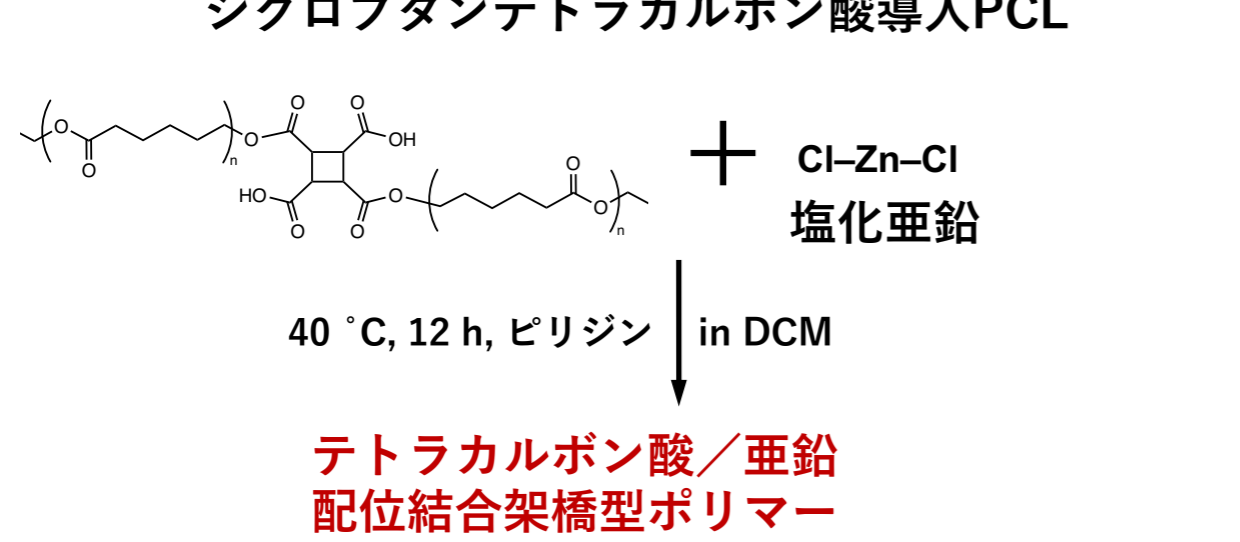
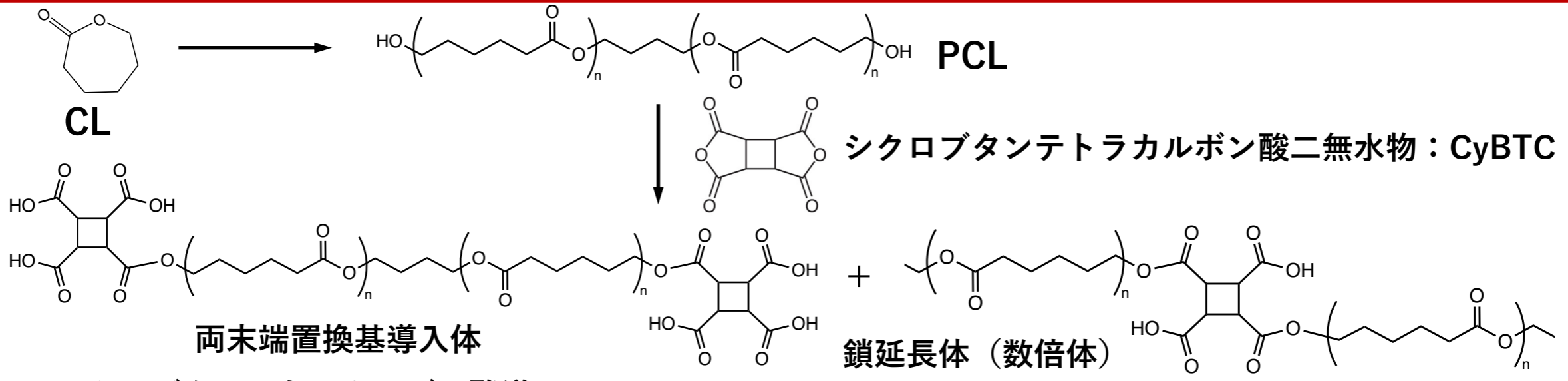
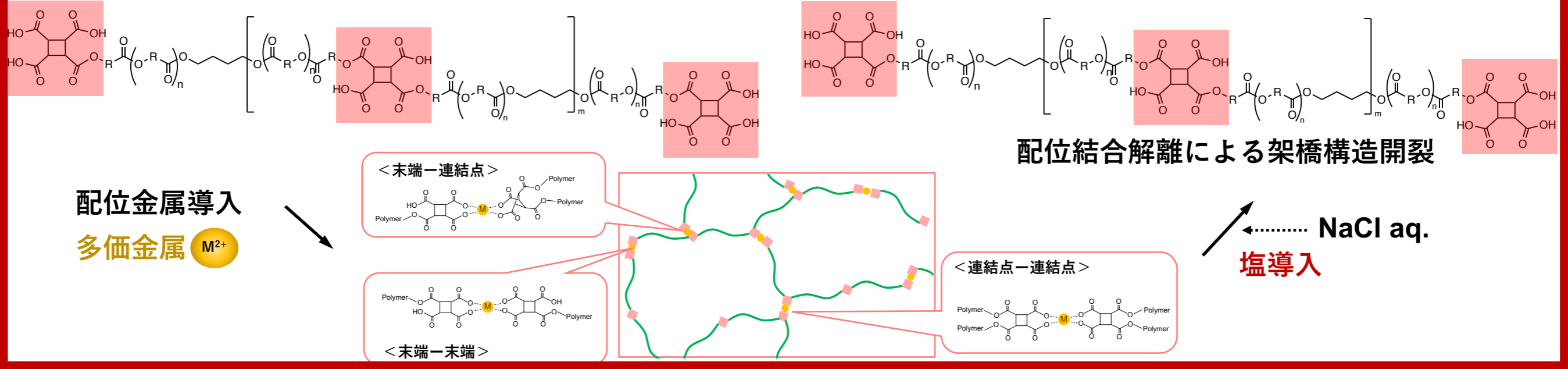


GPC測定による分子量変化確認



両末端配位子導入型ポリエステル
脂肪族ポリエステルの分子鎖末端へ配位結合誘導型官能基の導入に成功

E2 塩濃度スイッチ

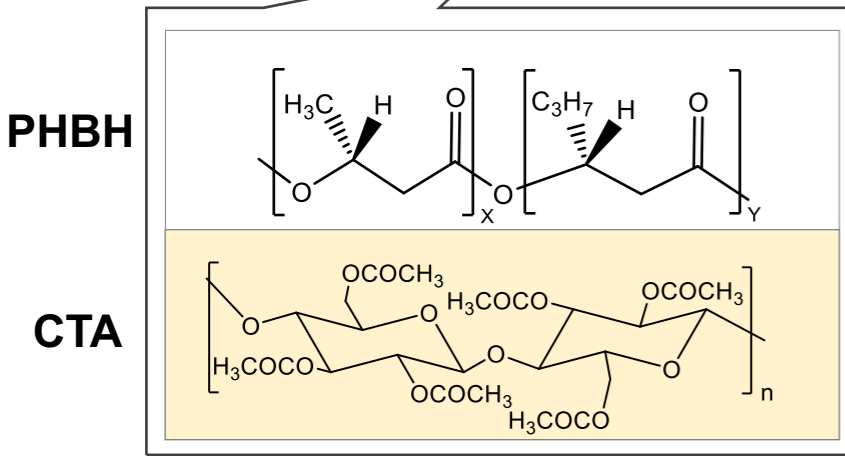
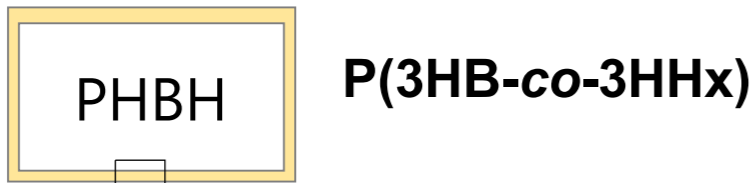


分子鎖末端および分子鎖中にテトラカルボン酸ユニットを導入したポリマーと金属化合物とを混合すると、架橋構造形成による高分子凝集構造が部分的に生成することを確認

海に流れ込むと分解が始まる

E2 pHスイッチ

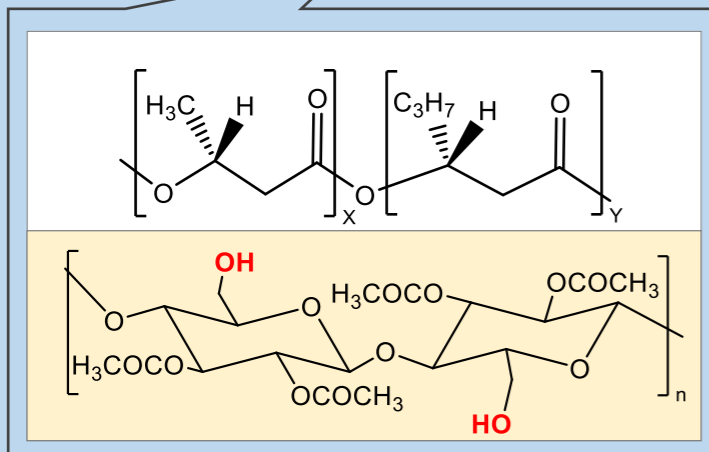
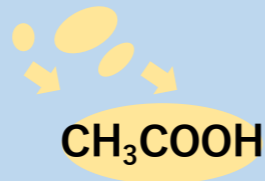
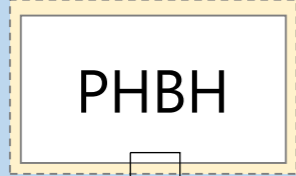
CTA セルローストリアセテート



アセチル基の置換度 (DS) が高いため分解しない

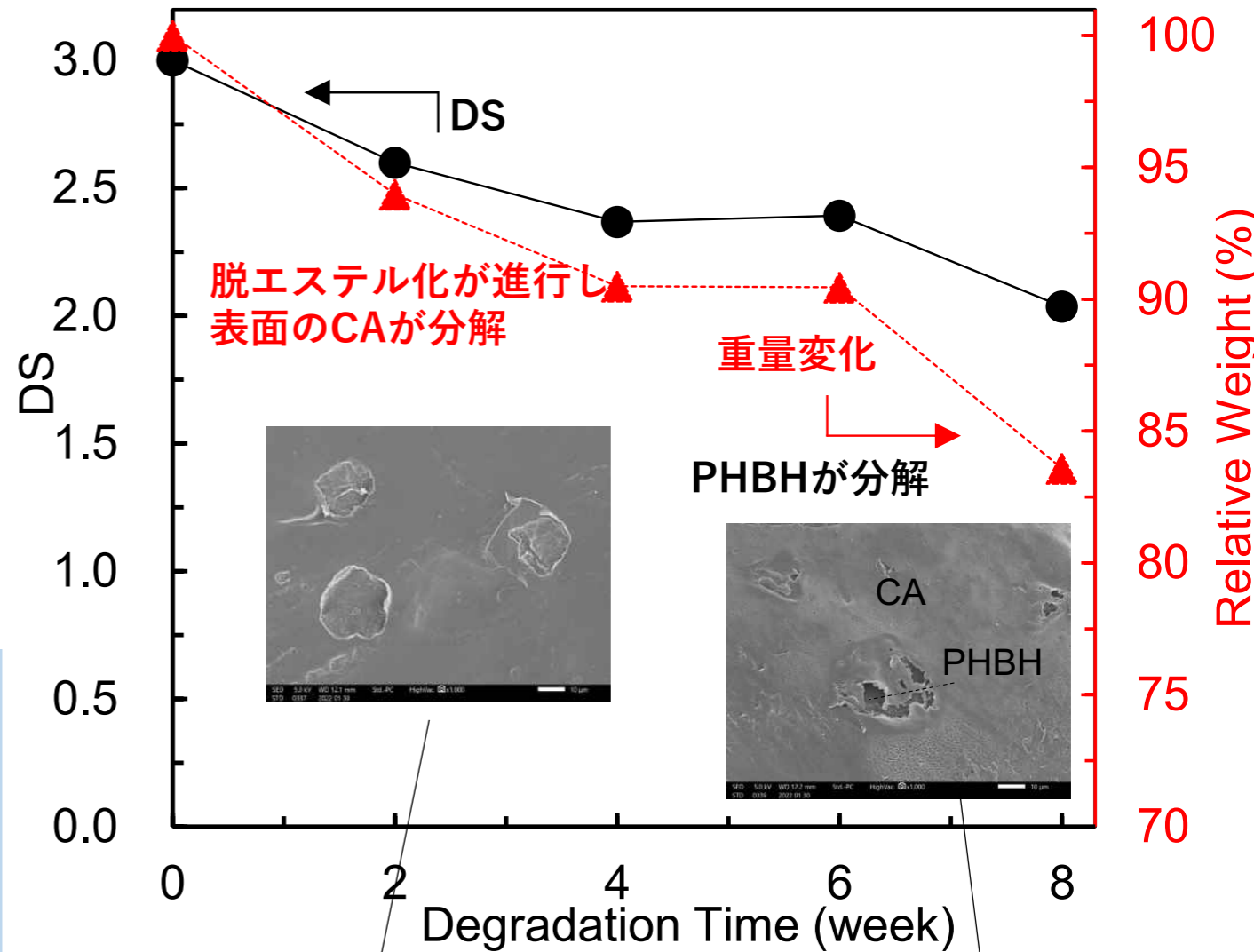
スイッチON ↓ 海水のpH (7.5 ~ 8.3) によって脱エステル

CA (DS < 2.5)

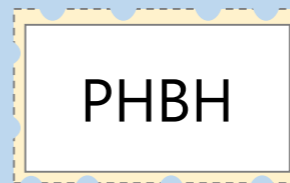


アセチル基が一定まで脱離するとCAの生分解性が発現

海水を用いた分解試験



4週後



8週後

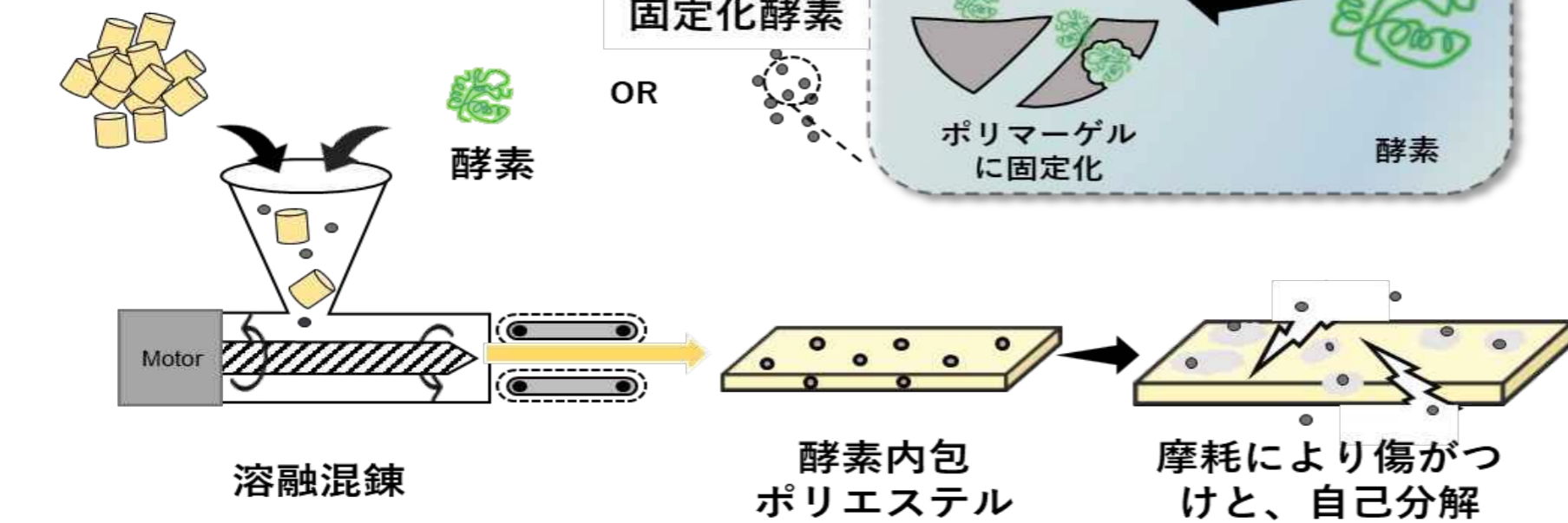


CAの分解が進行し、PHBHの分解が開始

材料が古くなると分解が始まる

E2 摩耗スイッチ(酵素)

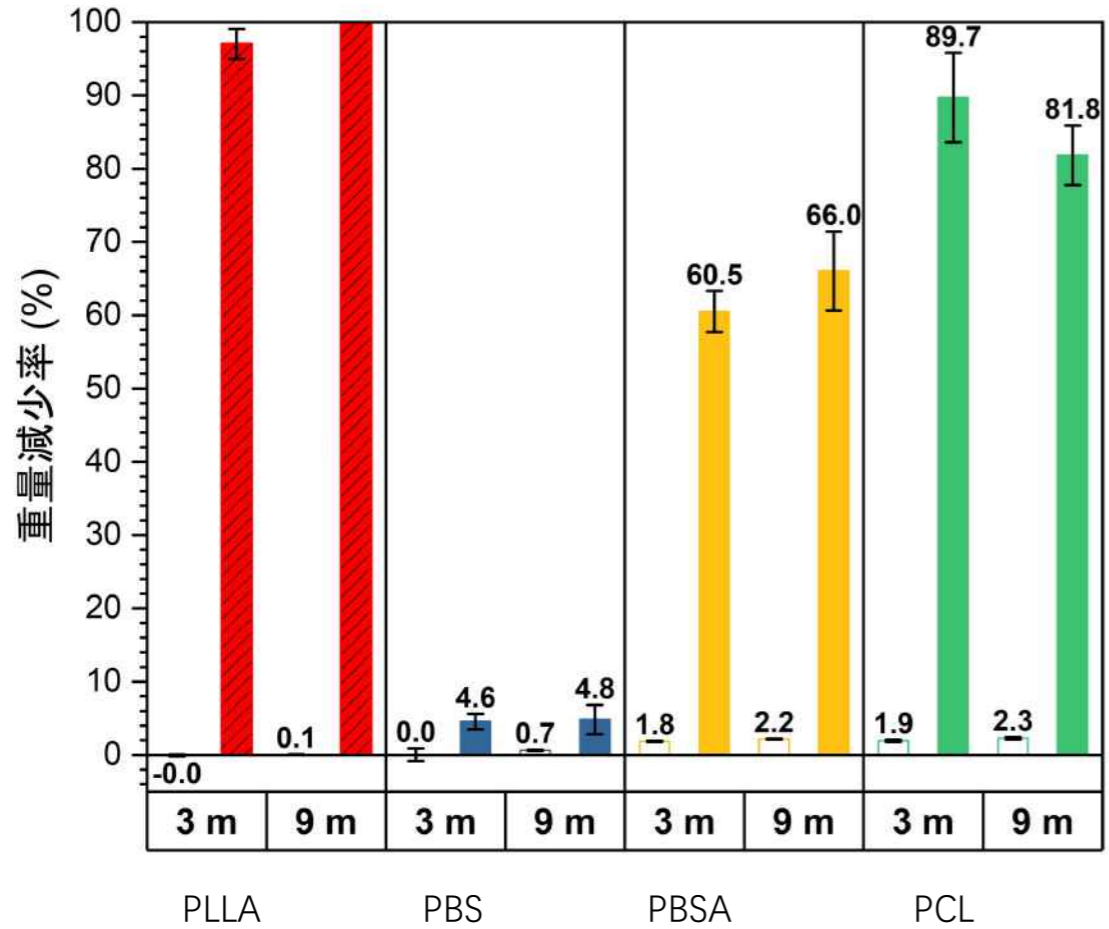
ポリエステルペレット



本来海洋分解性がない生分解性プラスチックに分解酵素を内包



海洋中での摩耗により酵素分解が開始

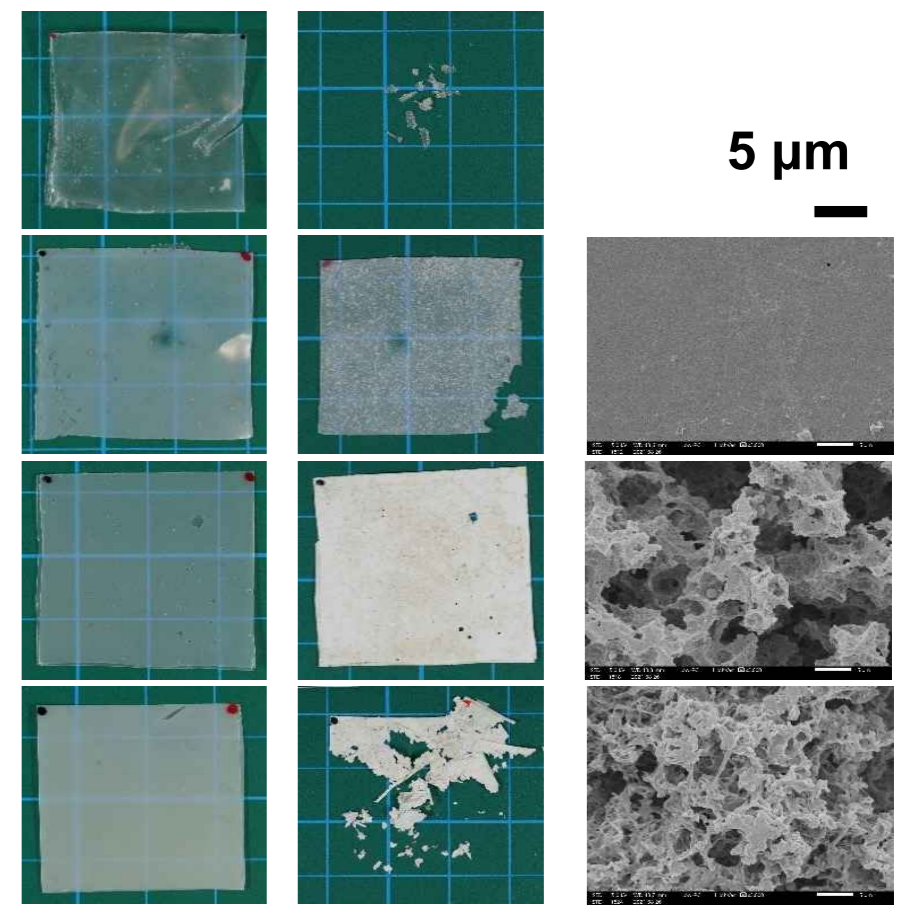


酵素内包 PLLA

酵素内包 PBS

酵素内包 PBSA

酵素内包 PCL

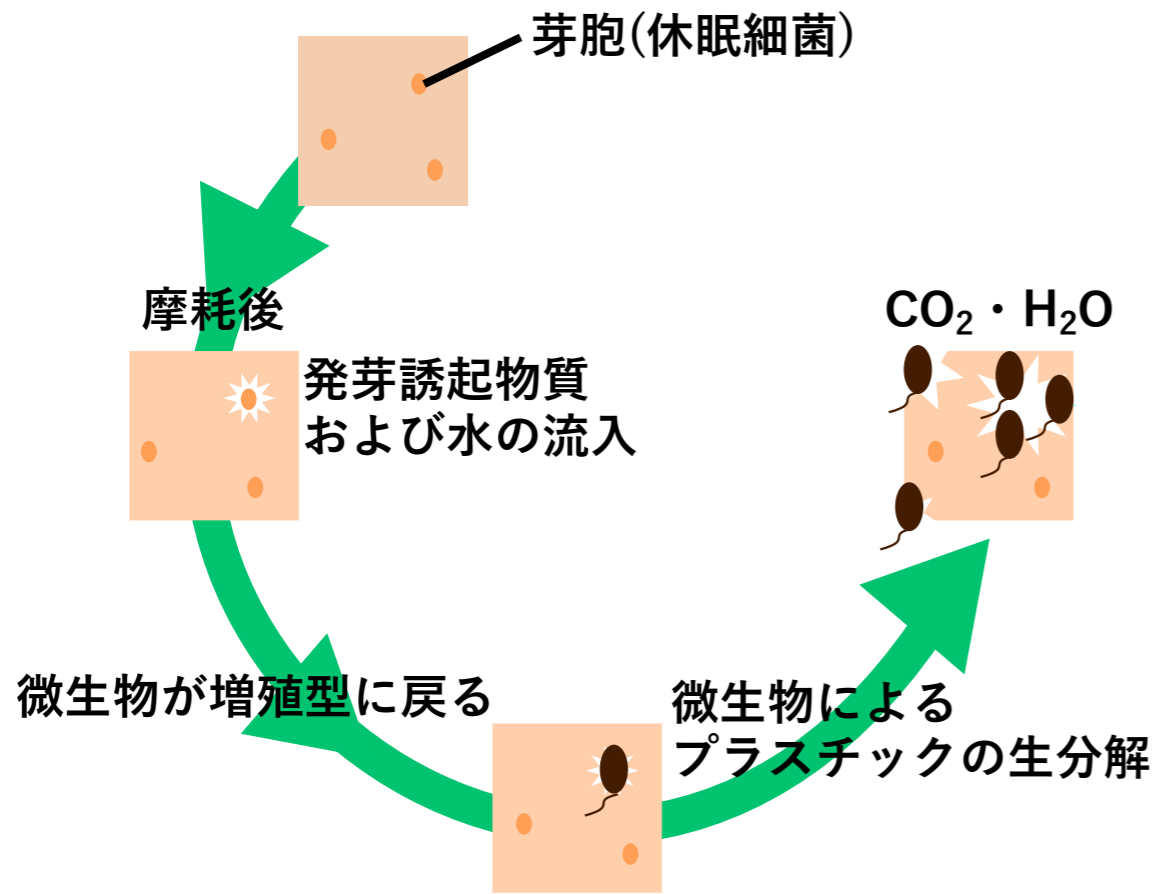


設置前

3か月設置後

初島沖深海設置(海水, 15-20°C, 3か月,9か月)

E2 摩耗スイッチ(芽胞)



生分解速度が遅い材料(潜在的生分解性プラスチック)に当該材料の分解微生物を内包させる

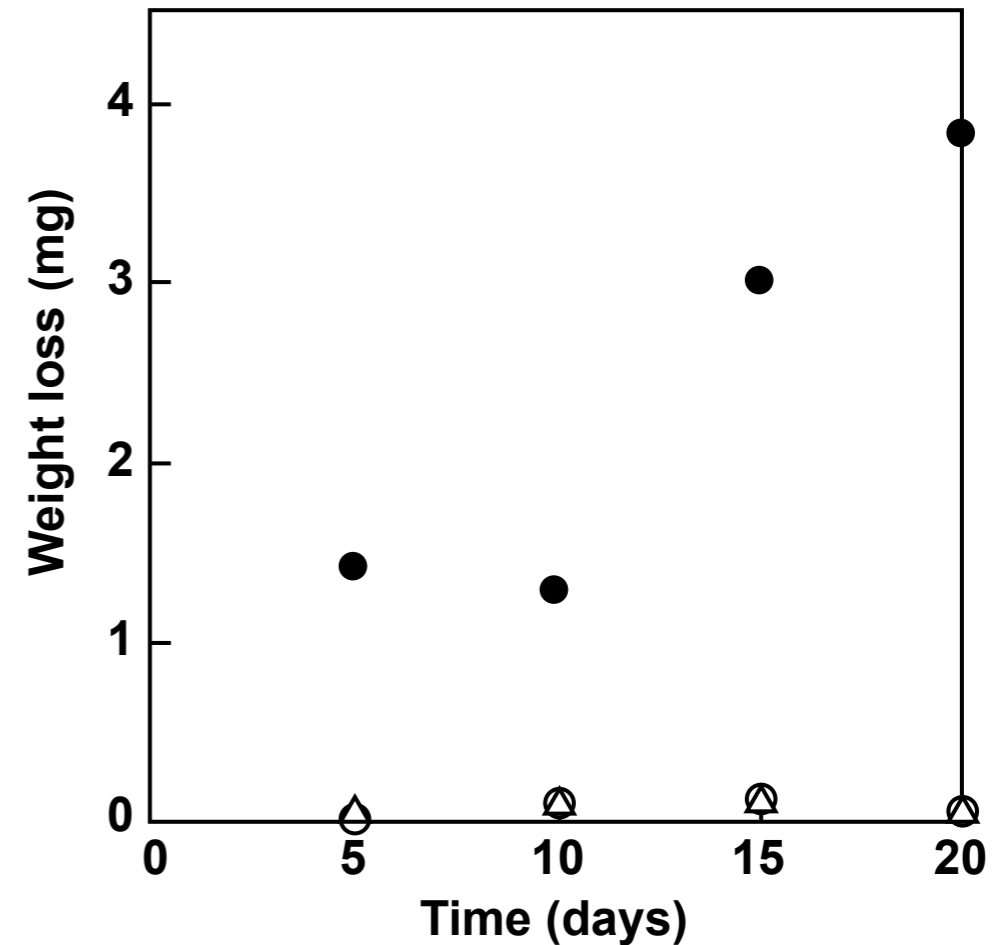


図. 芽胞内包生分解性PESuフィルム分解試験
●：YE存在下での芽胞内包PESuフィルムの分解試験結果。
○：YE存在下でのPESuフィルムの分解試験結果。
△：YE非存在下での芽胞内包PESuフィルムの分解試験結果。

8. 現時点の主な成果

生分解速度制御技術の開発 (E3)



E3：生分解速度制御技術

加速

生物環境制御

高分子構造制御

減速

高分子構造制御

E3

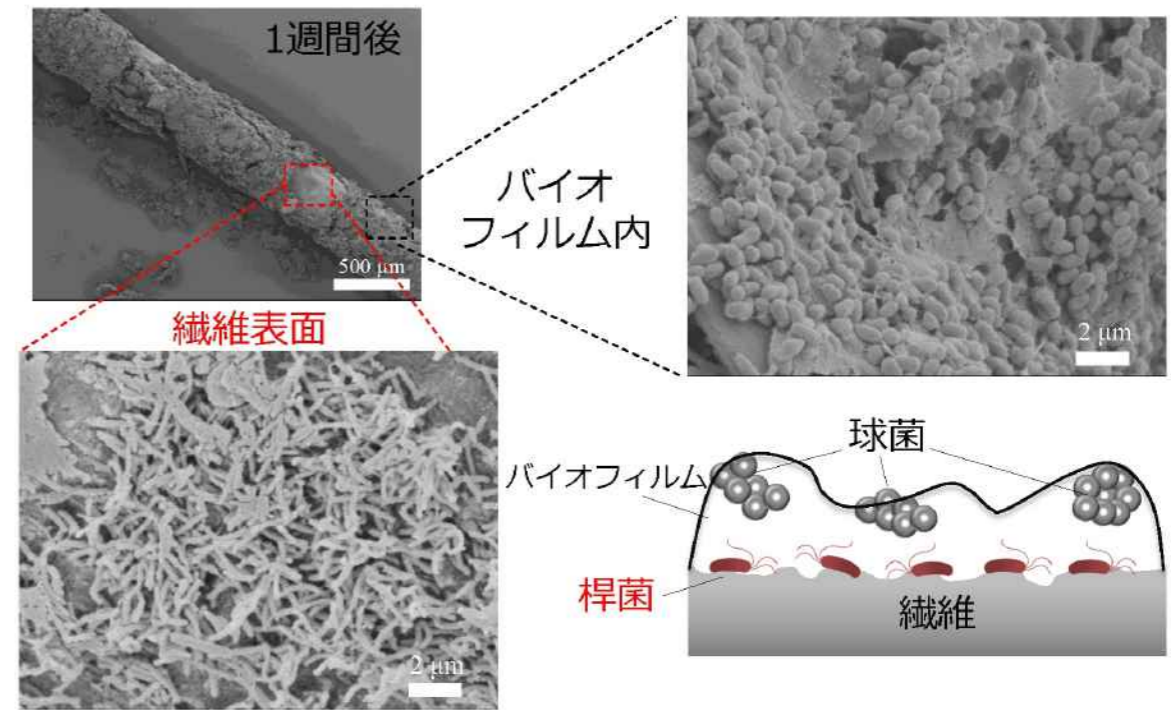
材料科学的観点からの生分解性速度因子の解明

PHA高強度・高弾性率繊維（微結晶核延伸法）

Microbial polyester fibers	Mechanical properties		
	Tensile strength /MPa	Young's modulus /GPa	Elongation at break /%
P(3HB)	1320	18.1	35
P(3HB-co-8 mol%-3HV)	1065	8.0	40
P(3HB-co-9 mol%-3HH)	552	3.8	48



海水での繊維の生分解性の様子



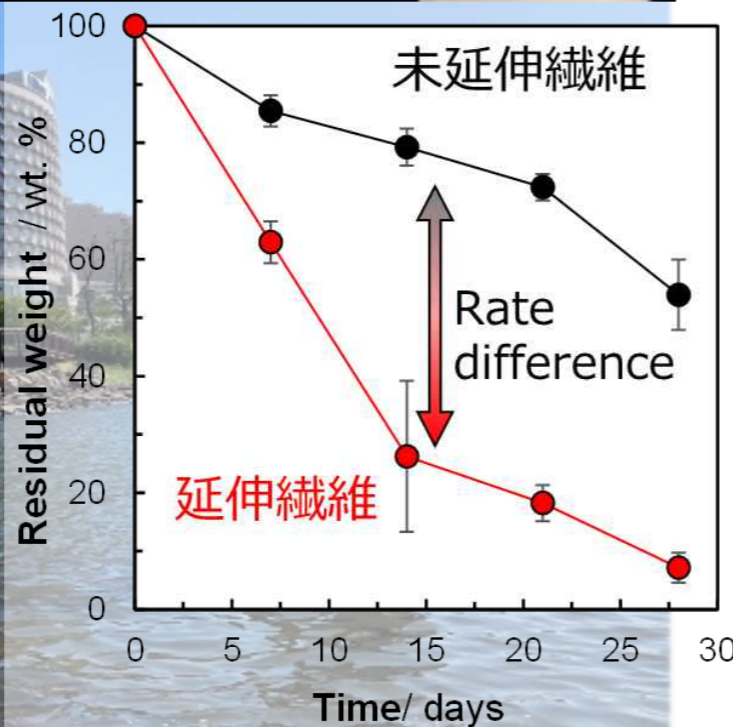
繊維表面近傍に存在する桿菌が主に酵素分解をしている可能性

延伸すると、伸びきり鎖結晶形態（β晶）の割合が増す。

- 生分解速度は、結晶形態に依存している。
- 生分解速度は、延伸倍率で制御可能である。

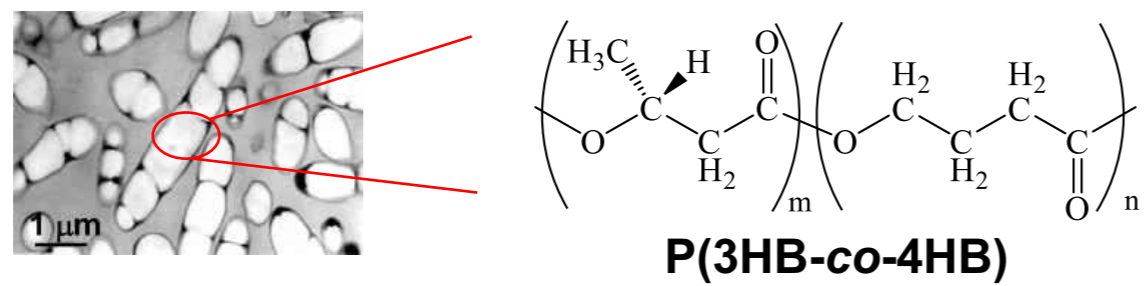


Seawater

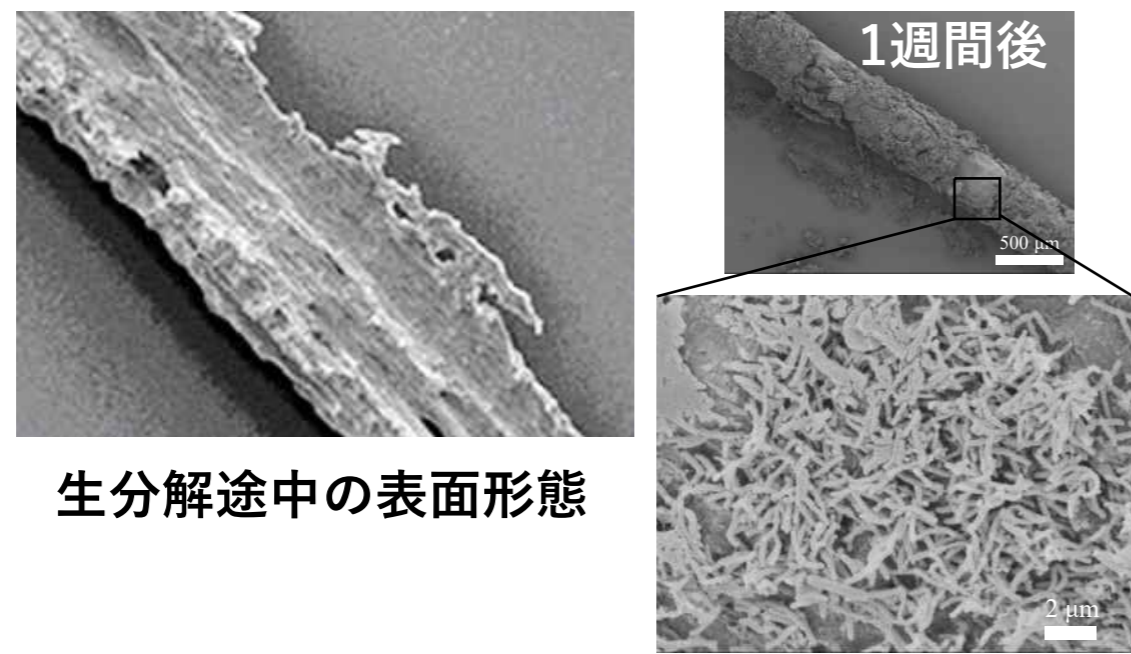


E3 材料科学的観点からの生分解性速度因子の解明

伸縮性能のある生分解性繊維の開発に成功



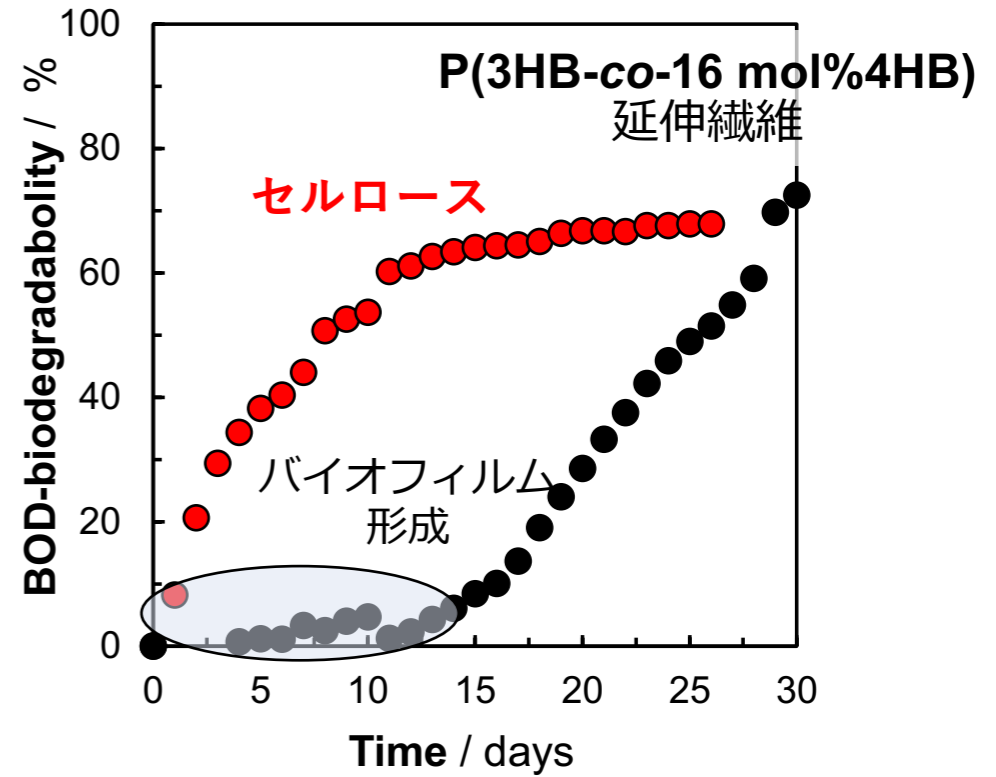
海水中での分解形態



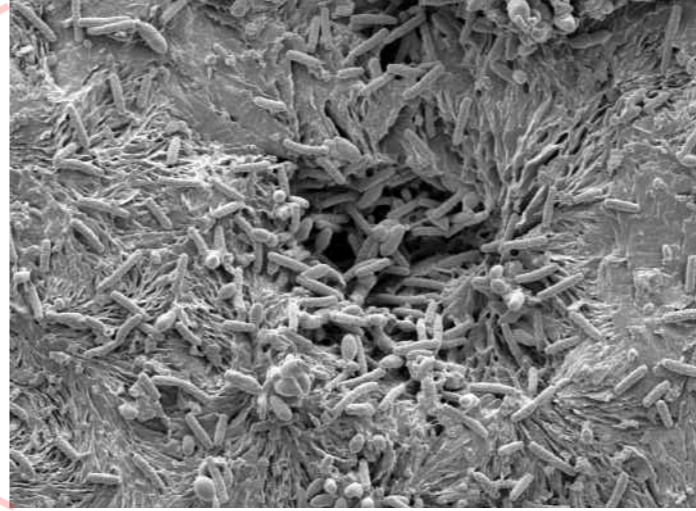
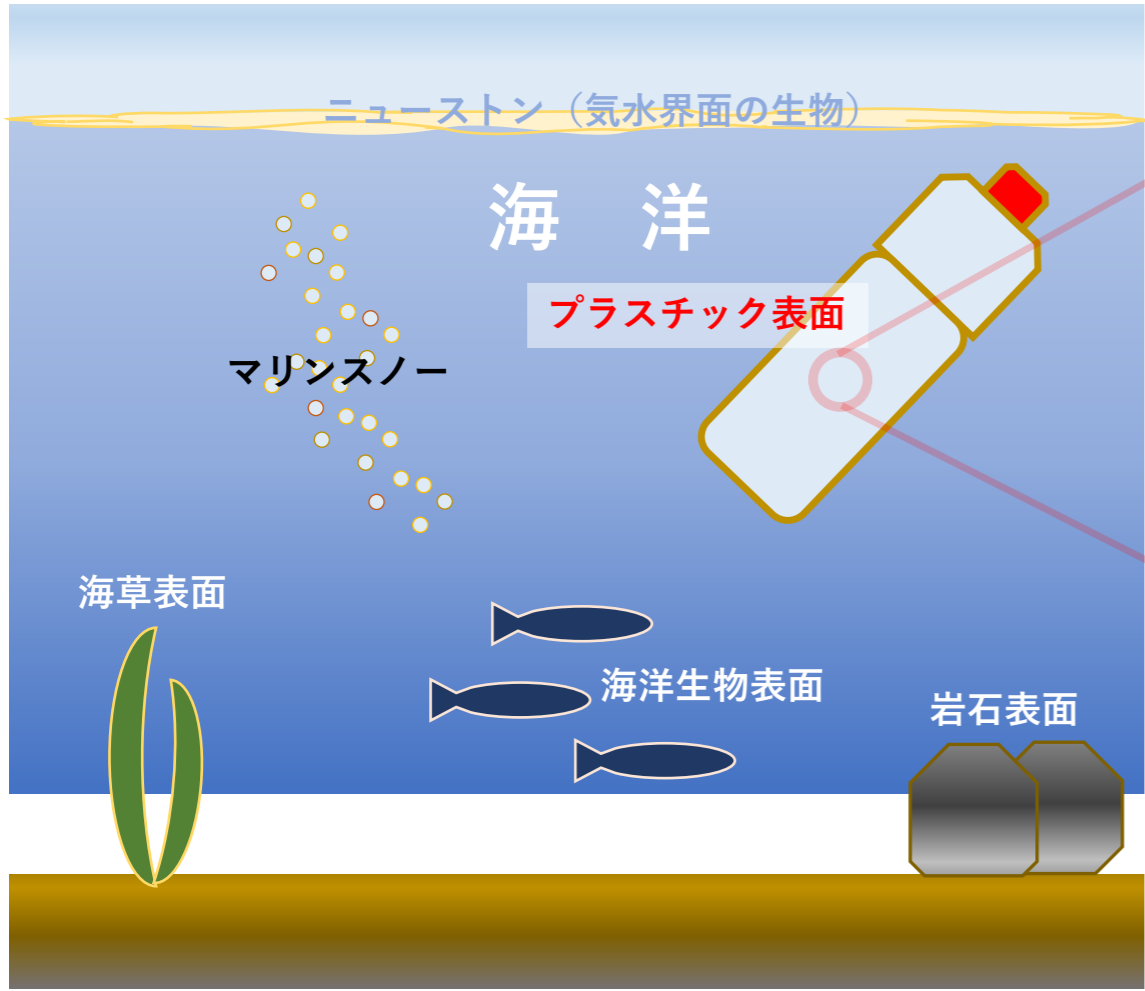
生分解途中の表面形態

分解途中の繊維に
付着した微生物

繊維の海水でのBOD生分解度



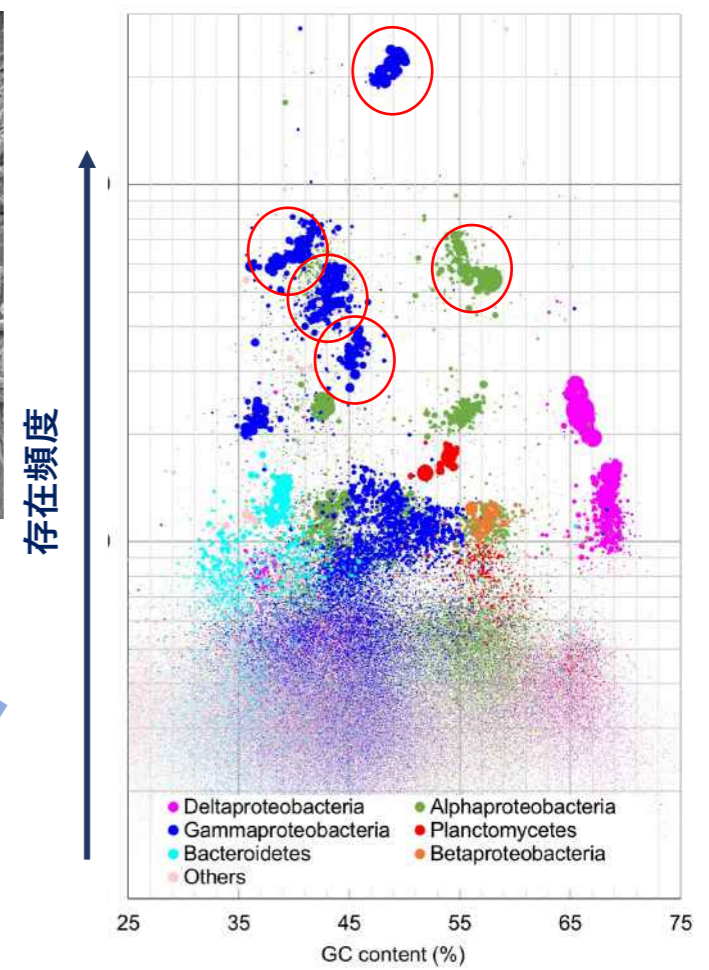
E3 プラスティスフィア：プラスチック表面の微生物フローラ



プラスティスフィアの電子顕微鏡写真.

メタゲノム解析

プラスティスフィア内の微生物集積



存在頻度が高い微生物
 = **プラスチックの生分解に関わる微生物のゲノム情報**が得られる

プラスチックの生分解機構の解明し分解制御へ

海洋以外の環境(淡水)でも同様の実験を実施中

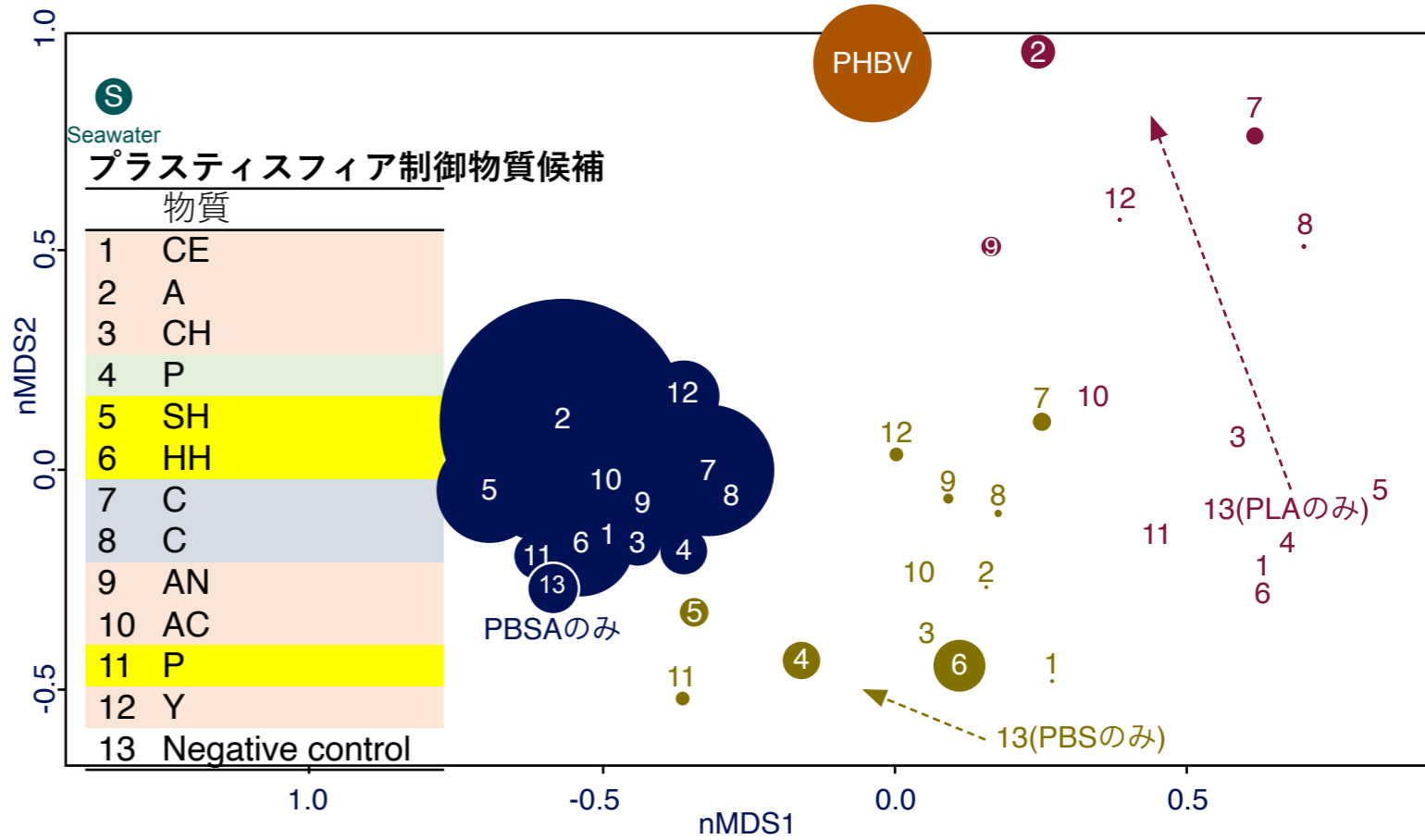
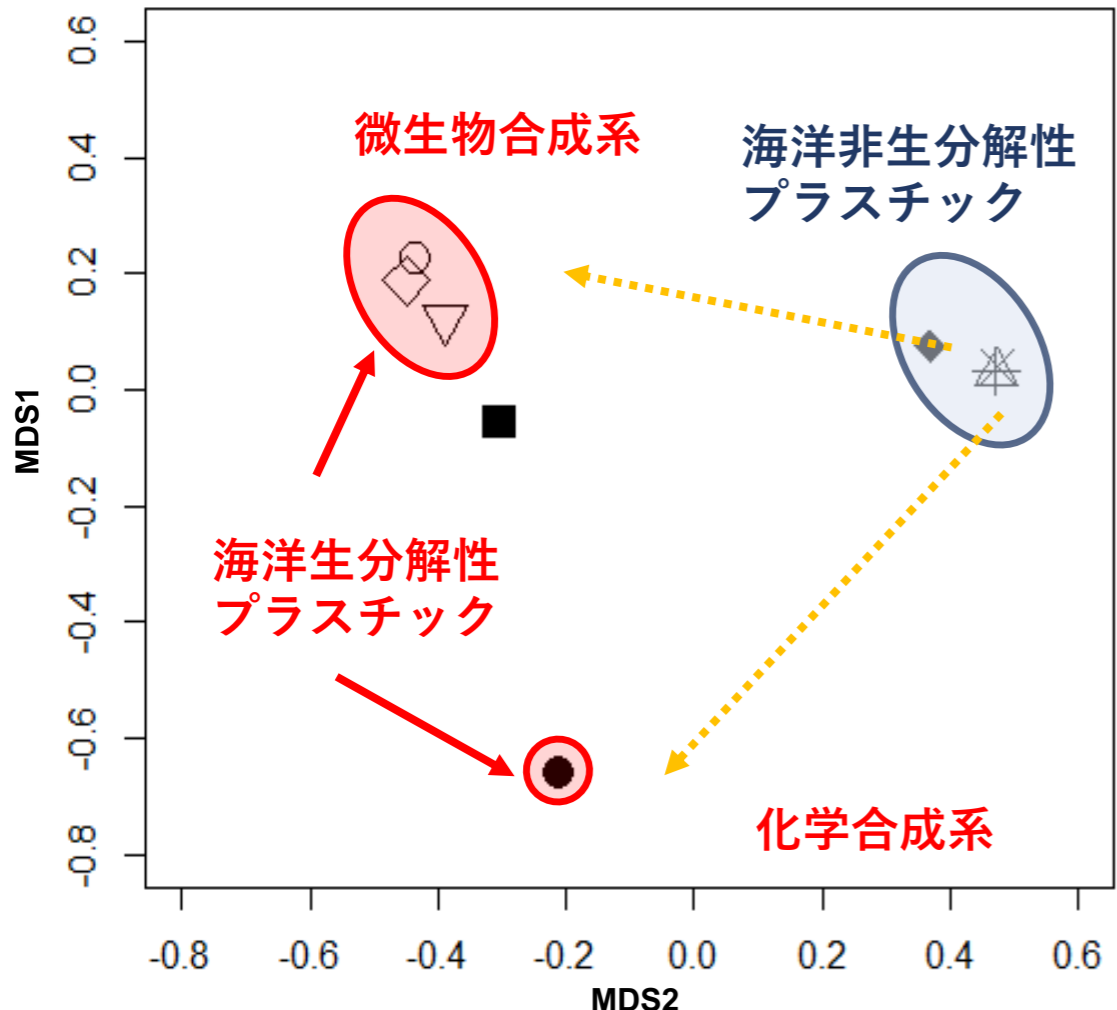


プラスチックネットに生分解性プラスチックを入れ、池に暴露



E3 プラスティスフィア：プラスチック表面の微生物フローラ

生分解性基盤樹脂にプラスティスフィア制御物質候補を10%混練。フィルムを海水に曝露させ、重量減少量および表面微生物叢を評価。



海洋非生分解性プラスチックのプラスティスフィアを生分解プラスチックのものに近づける。

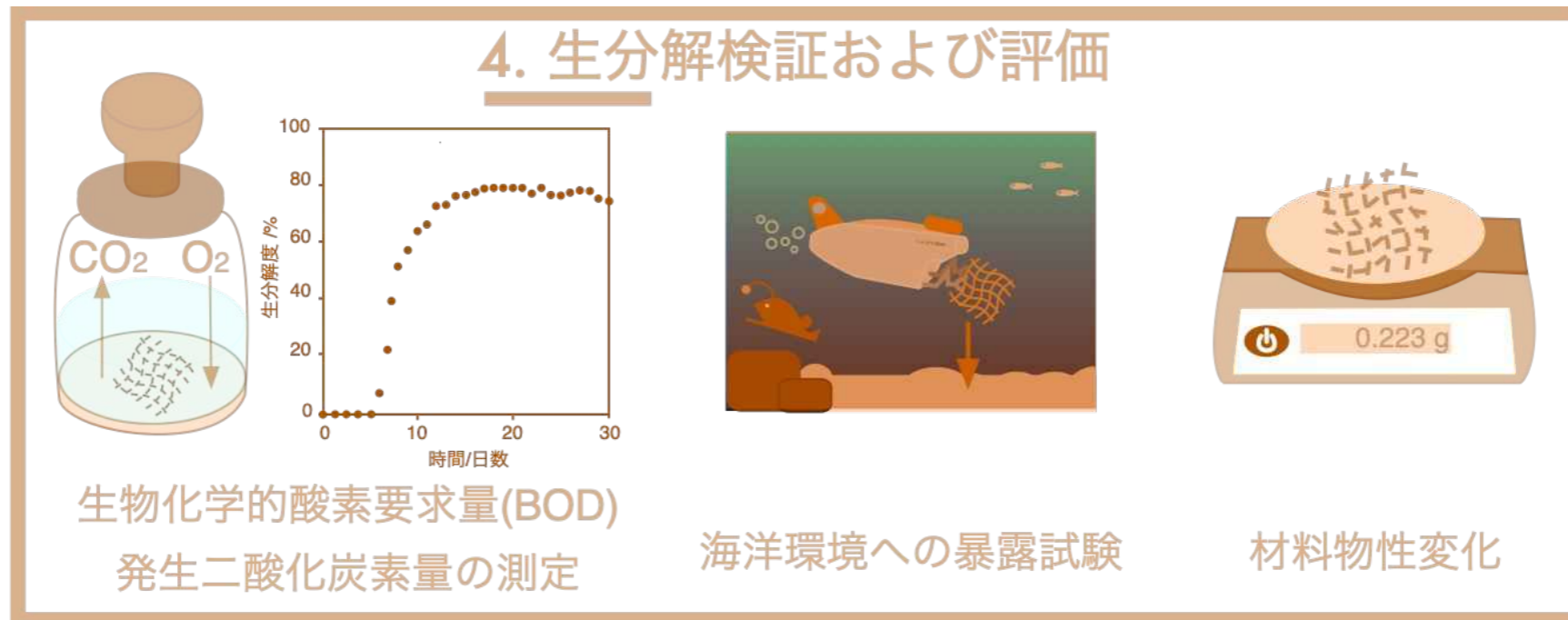
Bray-Curtis指数に基づく非計量多次元尺度法(nMDS)による各フィルム表面微生物叢の類似性。

→ 生分解性が向上する

- PBSA**
No.2、No.5、No.6、No.7
 - PBS**
No.5、No.6
 - PLA**
No.2、No.7、No.9
- に対して分解速度上昇効果があった。

8. 現時点の主な成果

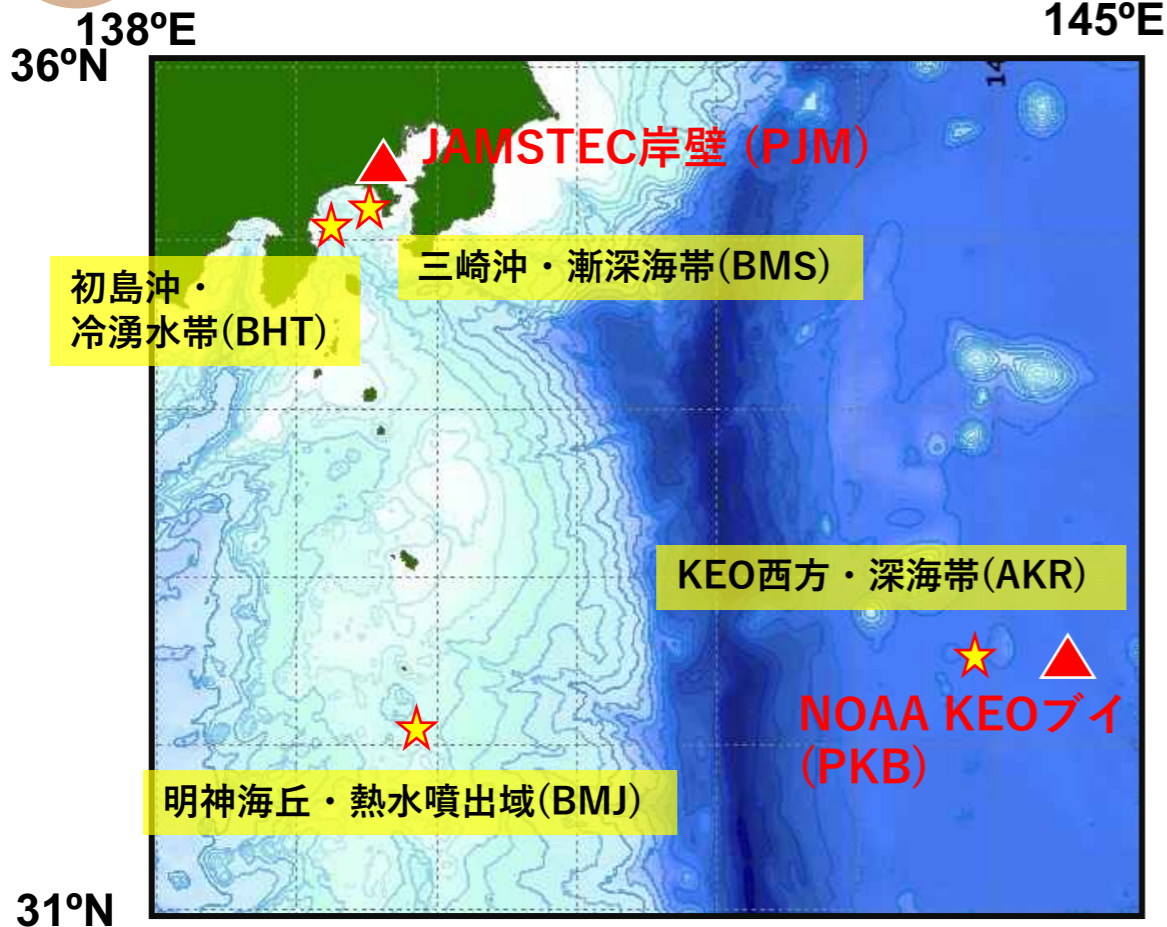
海洋生分解性の試験と評価 (E4)



E4：海洋生分解性試験と評価	実験室内	BOD試験系 人工海洋環境系
	海洋環境	沿岸海域 深海海域 表層海域

E4

海洋現場での生分解性検証実験



■2020-2022年度に計6航海を行い、深海底に40種類以上の新規生分解性素材を設置。プラスチックごみの蓄積量が多い深海底での評価実験を行っているのは世界でも本プロジェクトのみであり、深海実環境での新素材の分解度を唯一正確に評価することができる。

■2022年4月には北西太平洋の海洋表層に6種類の新規生分解性素材を設置。

■一部については回収し、7項目の物性・化学試験の他、付着微生物のメタオミクス解析も行い、分解度とその分解プロセスの評価を進めている。



潜水船による設置・回収作業



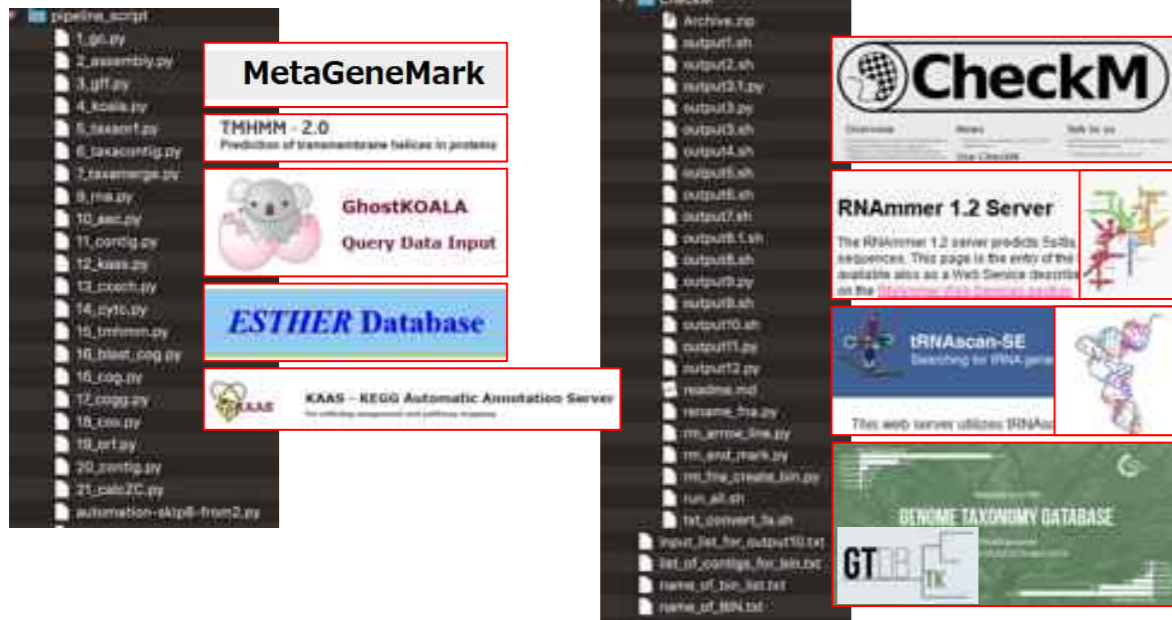
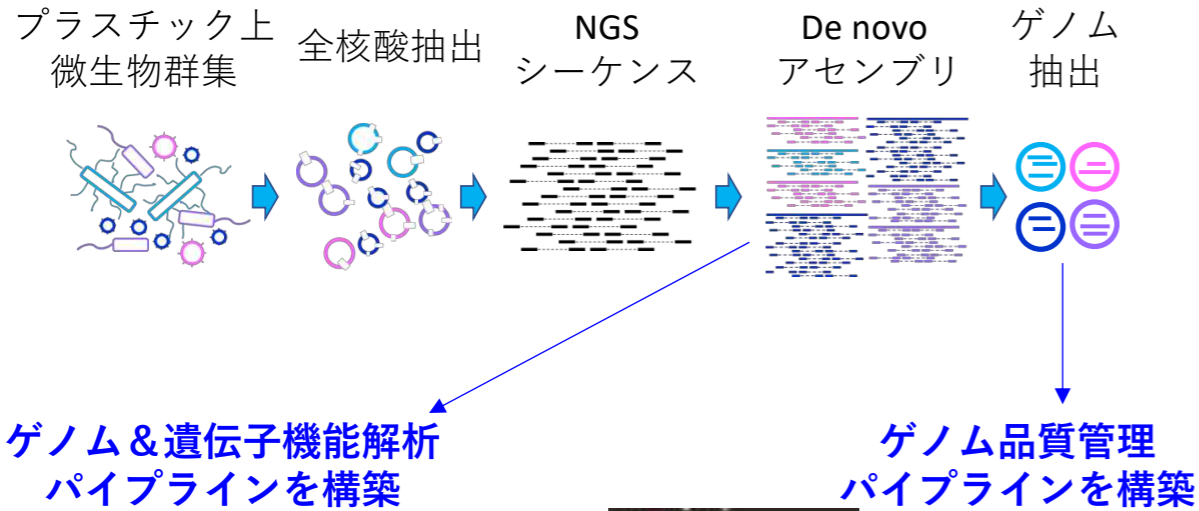
深海底に設置された新素材を含むチャンバー



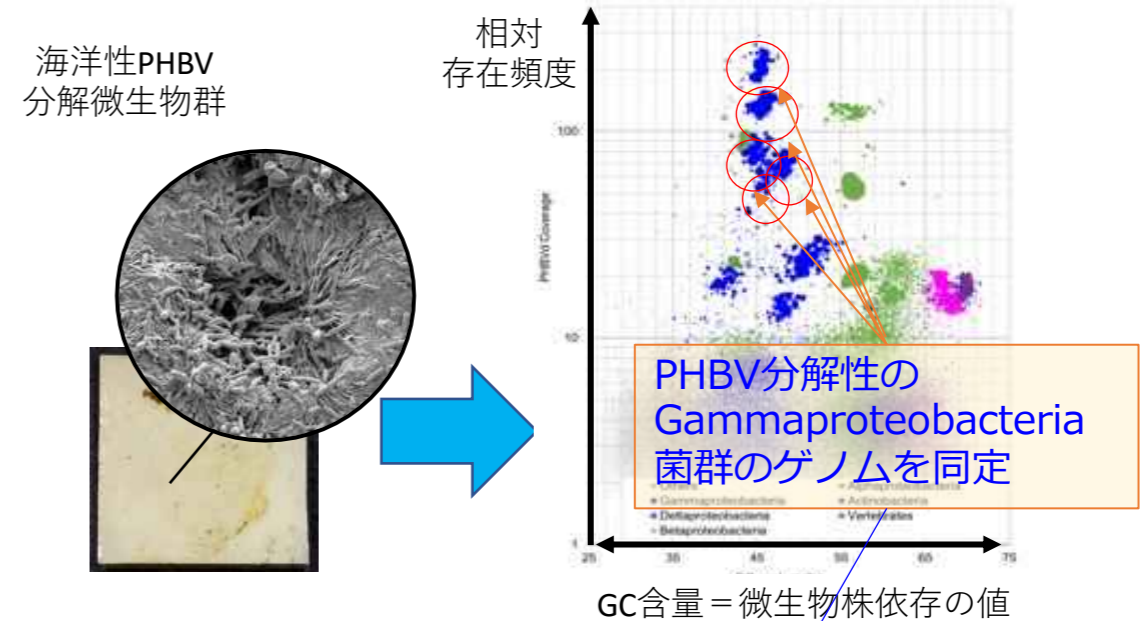
表層係留ブイに取り付けられた生分解性プラチャンバー

生分解を引き起こす微生物叢のメタオミックス解析

解析パイプラインの構築



プラスチックフェアのメタゲノム解析



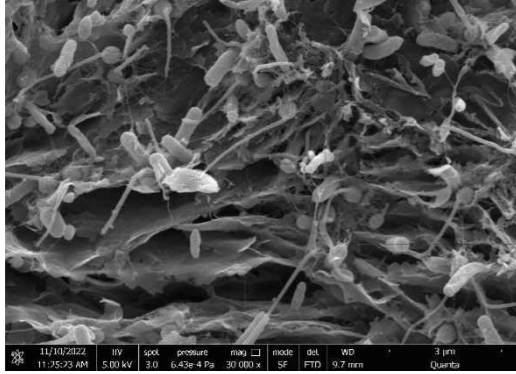
Function	ESTHER ID	Gamm1	Gamm2	Gamm3	Gamm4	Gamm5	Gamm6	Gamm7	Gamm8	Gamm9	Gamm10	Alph1	Alph2	Alph3	Alph4	Alph6	Act1	Delt1	Alph5
Esterase_phb	Esterase_phb	23	13	19	20	18	14	1	0	3	1	0	0	0	0	0	1	6	0
Abhydrolase_6	PHB_depolymerase_PhaZ	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0
Esterase_phb_PHAZ	Esterase_phb_PHAZ	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Thioesterase	Thioesterase	9	9	4	4	8	8	13	5	0	0	1	0	0	0	0	2	2	6
Lipase_2	Lipase_2	10	2	6	10	11	5	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Abhydrolase_6	6_AlphaBeta_hydrolase	15	12	12	18	19	14	14	32	11	15	9	6	16	32	24	50	31	0
Bacterial_lipase	Bacterial_lip_Fam1.3	4	0	1	3	2	1	2	2	2	1	5	5	10	0	25	1	0	3
AlphaBeta_hydrolase	AlphaBeta_hydrolase	2	5	2	2	4	4	1	3	3	0	6	3	5	3	4	9	8	0
Hormone-sensitive_lipase	Hormone-sensitive_lipase_like	1	0	1	2	1	4	0	1	8	1	2	0	1	9	7	12	6	0
Epoxide-hydrolase_like	Epoxide_hydrolase	2	2	1	2	1	1	1	0	5	0	0	0	1	3	3	10	5	0
Peptidase_S9	Prolyl_oligopeptidase_S9	3	1	3	4	3	0	2	10	0	1	0	0	0	4	0	0	3	2
Hydrolase_4	Proline_iminopeptidase	3	1	1	3	2	2	1	4	1	1	1	1	1	1	1	3	8	0
Dienelactone_hydrolase	Dienelactone_hydrolase	1	1	0	1	2	1	1	2	1	1	0	0	1	2	1	8	3	0

PHB depolymeraseを多くコードしている

大量のデータを効率よく、高速に解析する手法を構築できた

メタオミックス解析により、海洋でPHBVを分解している Gammaproteobacteria とその分解遺伝子の候補を同定できた

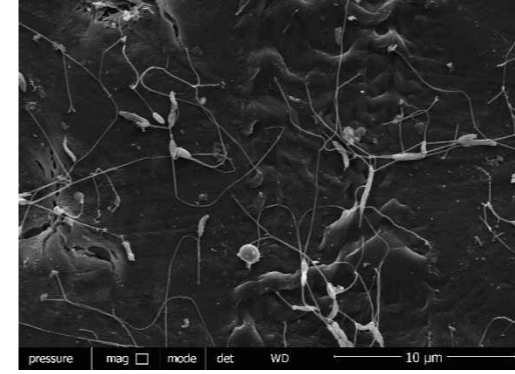
生分解を引き起こす微生物叢のメタオミックス解析



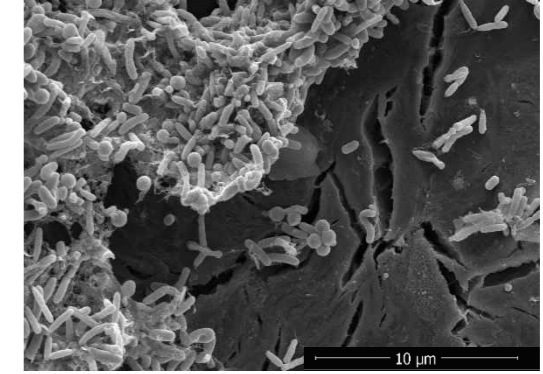
三崎沖・漸深海帯 (BMS)



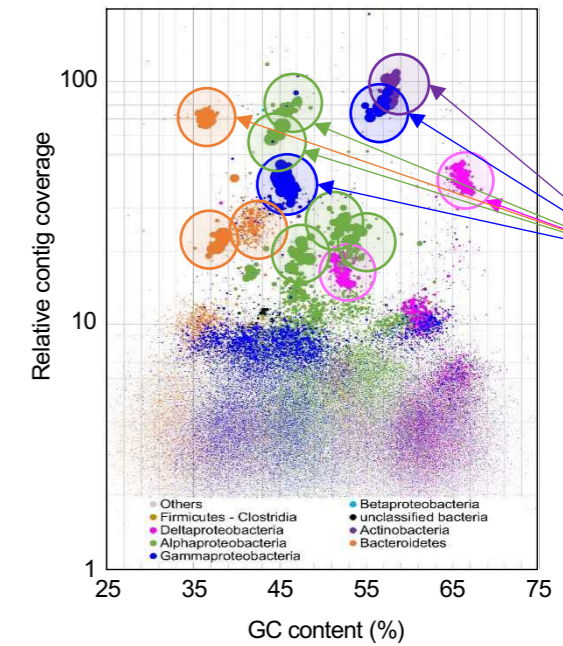
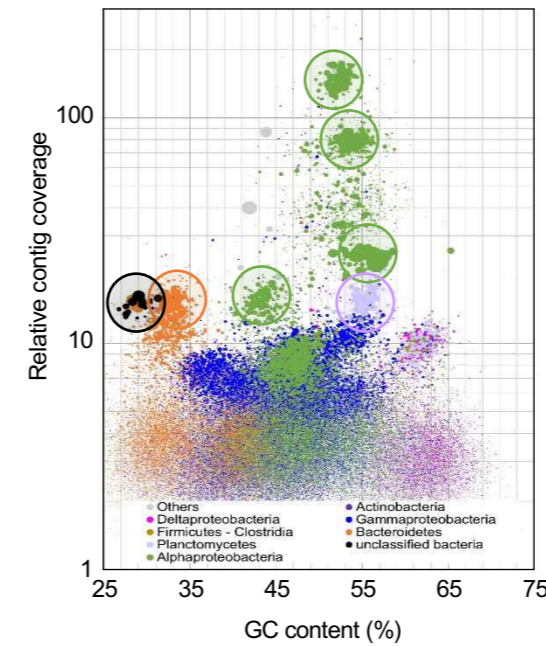
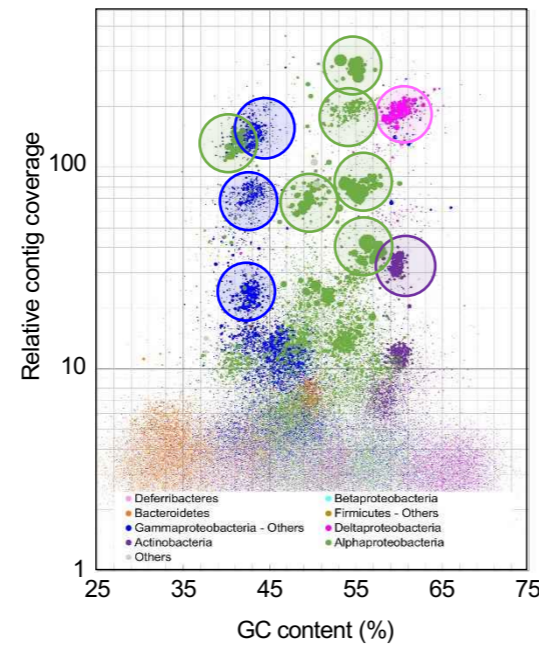
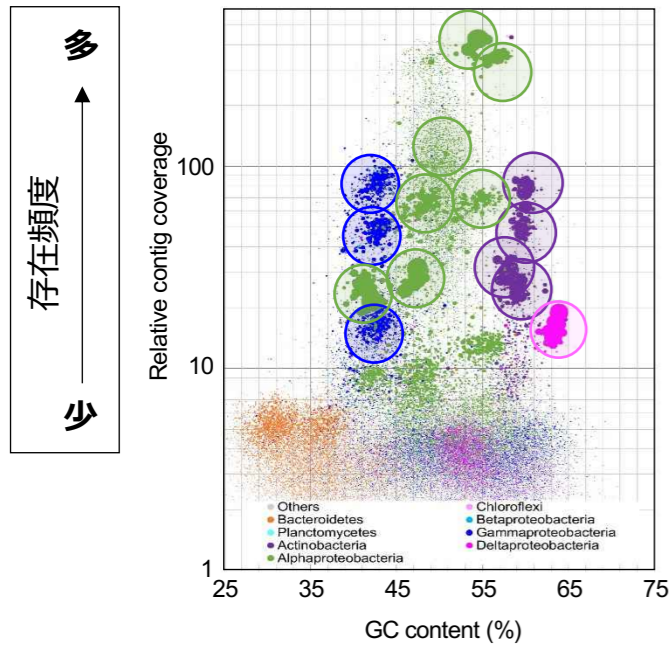
初島沖・冷湧水帯 (BHT)



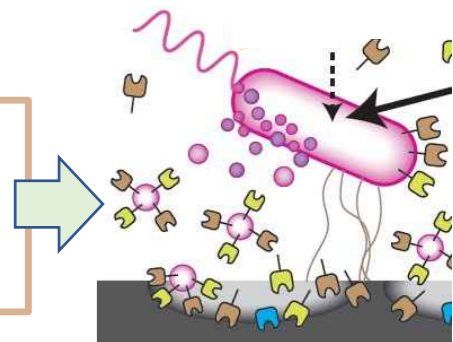
KEO西方・深海帯 (AKR)



明神海丘・熱水噴出域 (BMJ)



- ✓ 各海域で異なる種類の微生物を有するバイオフィルムが形成されていた
- ✓ これらの微生物群集中の存在頻度が高い微生物のゲノム情報 (Metagenome-assembled genomes, MAGs) が得られた
 - ➔ 生分解に“直接”関与する微生物の増殖が起こっていると考えられる
 - ➔ プラスチックの分解に関わる酵素を同定し、生分解機構を明らかにする



実験室内での生分解度評価



生分解性プラスチック
有機炭素含有量
20%以上

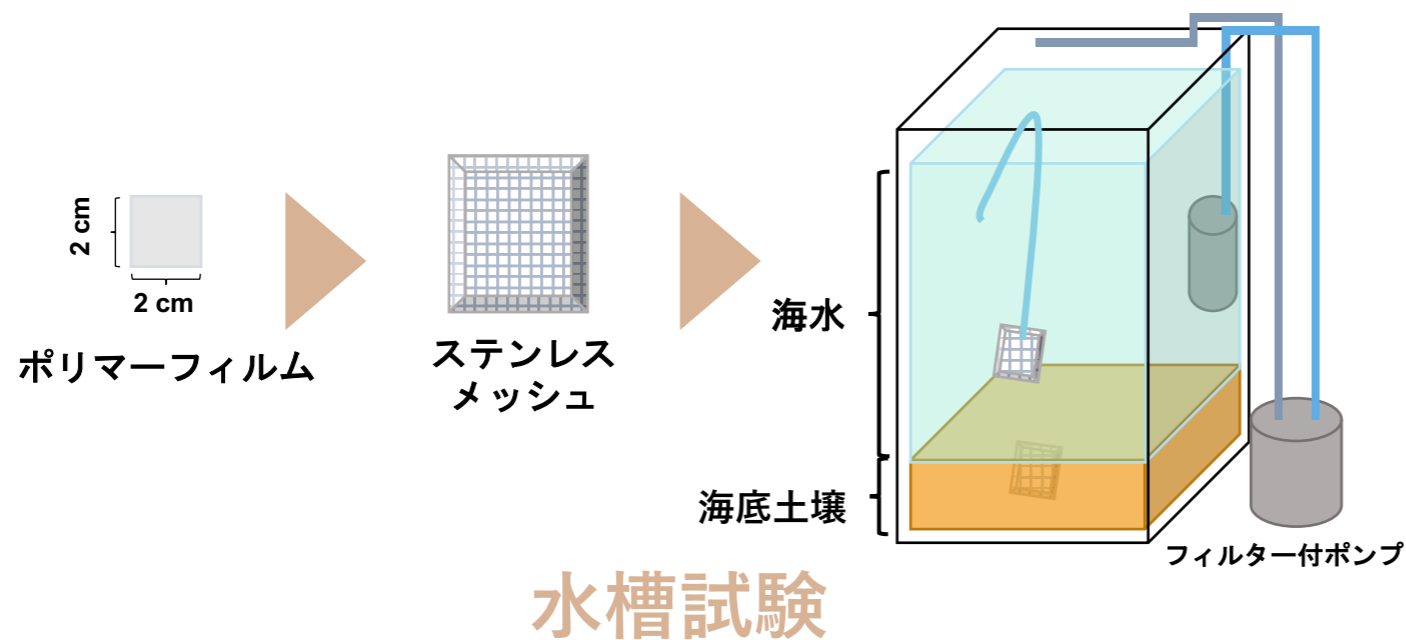


$$\text{生分解度}\% = \frac{O_2}{ThOD} \times 100$$

O_2 : 試験化合物の異化に使用された酸素要求 (BOD)

$ThOD$: 理論的酸素要求量

BOD生分解度測定



- 崩壊度評価
- 表面形態観察
- 材料物性評価
- プラスティスフィア解析

実験室内での生分解度評価（至適条件の検討）

① 基盤樹脂分解細菌の取得に適したバイオフィーム形成方法の検討及び菌株の分離

実験室浸漬（4ヶ月間）

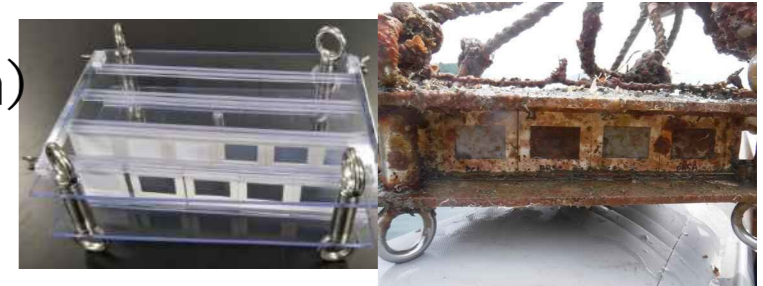
・PBSA、PBAT各フィルム小片を4採取地の海水中で振とう



実海域浸漬（5ヶ月間）

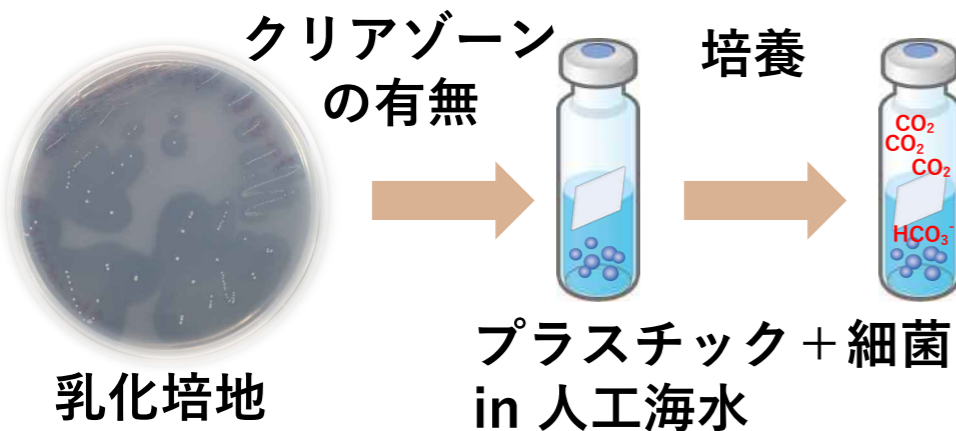
（広島県尾道市、水深約10 m）

PBSA、PBS、PBAT、PCL各フィルムをフィルムマウントに挟んで治具にセットし浸漬

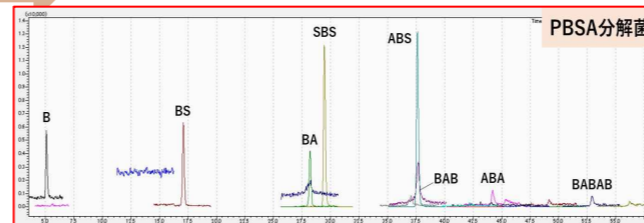


●形成されたバイオフィームからPBSA、PBAT分解菌を230株分離

② 分離菌株の分解特性解析及び生分解評価用カクテル菌株の選抜



気相 → 発生CO₂量のGC分析
液相 → 遊離分解物のLC-MS分析



細菌A-FのPBSA生分解特性（赤：高検出）

bacteri	clear zone/ CO ₂	monome			dimer		trimer, tetramer								
		B	S	A	BS	BA	BSB	SBS	SBA	BAB	ABA	BSBS			
A	++														
	++														
	++														
B	++														
	++														
	++														
C	++														
	++														
	++														
D	-														
	+														
	+														
	-														
E	-														
	-														
	+														
F	+														

細菌E：クリアゾーンを形成しないが生分解性有りと判定

●プラスチック生分解への寄与が期待される菌株を分解試験に供し、評価用カクテル菌株の選抜

クリーンアースな未来のために



ご清聴ありがとうございました

