

リモネン産生遺伝子組換え大腸菌を主体とする発泡スチロールの
ゼロエミッション処理への提案

The proposal for zero emission treatment of expanded polystyrene with the genetically
engineered *Escherichia coli* producing limonene

及川 栄作 ¹	○ 鈴木 祐介 ²	Khin Thida Linn ²
Eisaku Oikawa	Yusuke Suzuki	
及川 胤昭 ³	石橋 良信 ⁴	
Taneaki Oikawa	Yoshinobu Ishibashi	

ABSTRACT: It is well known that expanded polystyrene is completely taking into the liquid and is turned into polystyrene in limonene. In this research, genetically engineered *Escherichia coli* producing limonene were constructed with the genes encoding the production of acting precursors in limonene synthesis in the non-mevalonic acid pathway. The large amount of production of limonene was estimated with aid of gas chromatography. In addition, during this study, soil bacteria that decomposed styrene into inorganic matters were found out. The bacteria were identified as *Pseudomonas* sp. and *Bacillus thuringensis* by an analysis of 16S ribosomal RNA. Even though the bacteria which decompose polystyrene into styrene are being searched in the present time, zero emission process may be proposed by making the system together with genetically engineered *E. coli* and the soil bacteria. Moreover, if the melted polystyrene is reproduced to expanded polystyrene by this study, the recycling system of the expanded polystyrene may be constructed in near future.

KEYWORD; Zeo Emission, Expanded Polystyrene, Recycling, Genetically Engineered *Escherichia coli*

1. はじめに

発泡ポリスチレン（発泡スチロール）はポリスチレンビーズを蒸気で過熱することによって形成され、衝撃緩衝性に優れ、任意の形に加工することが容易で、安価であることから、食品トレイや家電製品の梱包剤として大量に使用されている。発泡スチロールの再生利用と処理・処分の現状はリサイクル化が 58%、埋め立て処理が 29%、焼却処分が 13%である。このうち、リサイクル化の内訳は、発泡スチロール再生やビデオカセットなどのプラスチック製品に利用されるマテリアルリサイクルが 35%、温水プールなど焼却熱エネルギーに利用されるサーマルリサイクルが 23%となっている¹⁾。

マテリアルリサイクル工程の始めは発泡スチロールを有機溶剤などによって溶かすことにより（溶剤減容）または熱などによって粉碎されることによって減容される。溶剤減容された場合は、溶剤とポリスチレンがそれぞれ分離精製され両者が再利用される。粉碎減容された場合は、インゴット（ポリスチレン塊）として再び発泡スチロールの原料とされたり、ポリスチレンペレットとしてプラスチック製品に再利用される。

¹ 東北学院大学工学部環境防災研究所 Institute for Research in Environmental Protection Engineering, Tohoku Gakuin University

² 東北学院大学大学院工学研究科土木工学専攻 Department of Civil Engineering, Graduate School of Engineering, Tohoku Gakuin University

³ (株) 創造的生物工学研究所 Research Institute of Creative Biotechnology

⁴ 東北学院大学工学部土木工学科 Department Civil Engineering, Tohoku Gakuin University

このような溶剤を用いたマテリアルリサイクル工程において、リサイクル企業の独創性が見られる点は、より低コストで、高速で、狭い面積で多量の発泡スチロールを溶かすことができる溶剤を用いた減容装置の開発にある。オレンジの皮などから精製されるリモネンは人体に影響なく、安全で、減容スピードも速く溶剤に適した物質として利用する企業も知られてきた。なおリサイクルに用いられているリモネンはオレンジの皮から精製された輸入製品である。

演者らはリモネンをバイオ技術を用いて、大腸菌で大量生産することができれば、より低コストでまた、一連のリサイクル工程が一つの建物の中で連続的に行うことができるのではないかと推測した。一方、いままで汚れたものなどリサイクルできないために埋め立て処理していた発泡スチロールを、生分解する処理方法についても検討している。この方法は前述のリモネン生産菌の生産したリモネンを用いた減容の後に、溶出したスチレンをスチレン分解微生物を用いてコンポスト化するものである。

これらの減容剤リモネンの大腸菌生産とスチレン分解微生物を利用した発泡スチロール処理法を確立することができれば、発泡スチロールのリサイクル効率を高めるだけでなく、発泡スチロールのゼロエミッション処理法の開発につながるものと考えられる(図-1)。

このような構想の中で、本研究では大腸菌でリモネンを生産する方法を確立すること、および環境中からスチレン分解菌を取得することを目的とした。

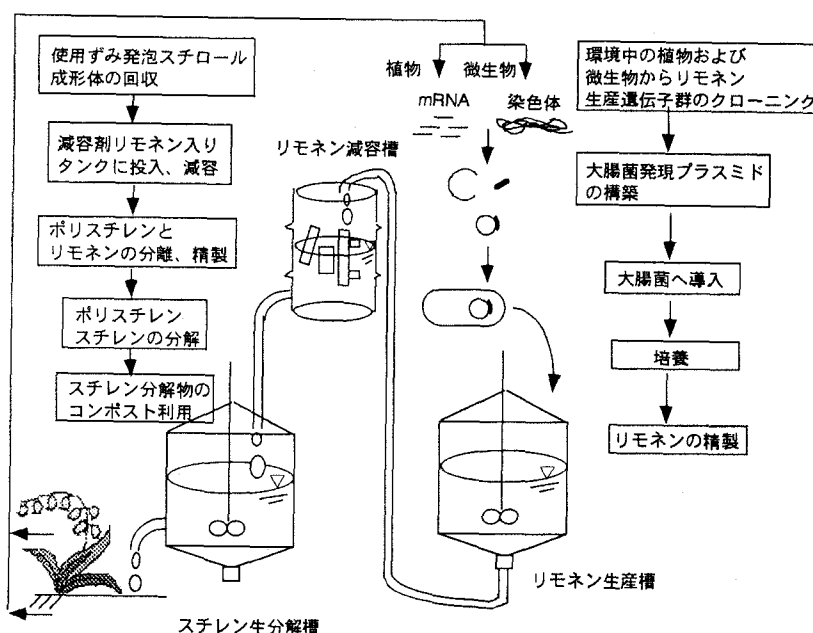


図-1 発泡スチロールのゼロエミッション処理構想

2. リモネン合成経路と遺伝子

リモネンはテルペノイド化合物に属する物質で果物やハーブ系の植物で産生される物質である。植物におけるリモネン合成経路はプラスチドの非メバロン酸経路によって合成され则认为られている。経路では1-デオキシキシルロース-5-リン酸合成遺伝子を始めとする7つ以上の遺伝子が関与した後、イソペンテニルリン酸はイソペンテニルリン酸キナーゼ遺伝子(*ipk*)によって、リン酸化されイソペンテニルニリン酸(IPP)に転換される。IPPはさらにIPPイソメラーゼ遺伝子(*idf*)によって異性化さ

れ、ジメチルアリルニリン酸(DMAPP)に転換される。次ぎに IPP と DMAPP はゲラニルニリン酸合成遺伝子(*gpps*)の基質となって重縮合され GPP に転換される。最終的に GPP はリモネン合成遺伝子(*lms*)によって環化されてリモネンが合成される (図-2)。

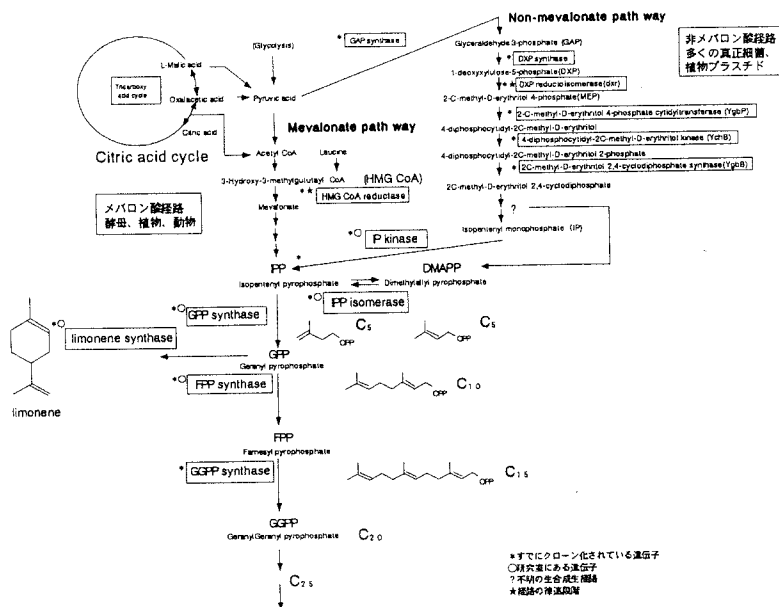


図-2 リモネン合成経路

大腸菌でリモネンを生産させるためには大腸菌に存在しない遺伝子 *gpps* および *lms* を導入することが必要であると考えられる。そこで、*gpps* 遺伝子としては GPP 合成活性を有する *Bacillus stearothermophilus* の変異体ファルネシルニリン酸合成遺伝子²⁾を用いた (以下 *gpps*)。 *lms* 遺伝子はスペアミントのリモネン合成遺伝子³⁾を用いた。また、大腸菌の *ipk* 遺伝子⁴⁾は *gpps* 遺伝子の基質である IPP 量を増やし、リモネン生産量を増加させる目的で用いた。

3. 研究方法

1) スチレン分解菌の単離

スチレン資化菌の単離は O' connor らの方法⁵⁾に従った。この方法はスチレン分解における初期段階で働くスチレンモノオキシダーゼがインドール (無色) をインディゴブルー (青色) に酸化させる反応も触媒することを原理としたもので、スチレン資化菌はインドールを塗抹した寒天培地上に青色のコロニーとして容易に識別できる。

スチレン資化菌の単離に用いた土壌試料は仙台市内の国道 4 号線の路肩または山形市大字八森より採取した。20 g の土は生理食塩水で懸濁し、遠心した。遠心後の上清をスチレンを炭素原とする最小培地に植え、30℃で一週間振とう培養した。濁りが確認された培養液をインドールの塗抹したプレートに塗抹し、室温で暗所に 7 日から 10 日間静置培養した。青くなったコロニーを 50 ml の 1xLB 培地に植え継ぎ一晩培養した。菌体は遠心分離して集めた。トータル DNA は菌体にリゾチーム処理、SDS-proteinase K 処理、フェノール:クロロホルム処理、エタノール沈澱処理を行って調製した。DNA は 20~100 μl の TE 溶液に溶解した。PCR は次の条件で行った。94℃ 1 分, 60℃ 45 秒, 72℃ 45 秒

を 25 サイクル、72℃ 10 分を 1 サイクル。PCR プライマーは全微生物の 16S リボソーム RNA に対応する 520F プライマーおよび 1400R プライマーを用いた。PCR 産物は pGEM-Tvector (プロメガ) に挿入し、大腸菌に導入してクローン化した。塩基配列は 310 Genetic Analyzer(ABI) を用いて決定し、データベースとの相同性解析は遺伝情報解析ソフトウェア Genetyx MAC ver.8 を用いて行った。

2) スチレン分解実験

スチレン分解実験は 16S-rRNA の塩基配列より分類された微生物のうち SD-10 株および STR-Y-O 株を用いて行った。-85℃でグリセロール溶液に保存しておいた菌株は M9 寒天培地に画線植菌して、30℃で一晩静置培養した。単一のコロニーをかき取り、これを酵母エキスを 0.001%(w/v)添加した上記の最小培地に植え継ぎ、供栓付き三角フラスコを用いて、30℃で振とう培養した。培養液の吸光度 OD600nm が 0.2 になったところで、ヘキササンで希釈した 0.1 µl/ml の濃度のスチレンを 200 µl(18ng) 添加した。その後、30℃で 8 日間振とう培養を続けた。培養液は 24 時間おきに 4 ml 分取し、2 mL のヘキササンと混合した。混合した溶液は遠心分離し、ヘキササン層を回収した。回収したヘキササン溶液はガスクロマトグラフ分析までふた付きのバイアルビンに移して 4℃で保存し、この内の 5 µl をガスクロマトグラフ(GC)分析に用いた。GC 装置は島津の GC-9A を用いた。コントロールは培地のみにスチレンを添加したものを用いた。

3) リモネン生産大腸菌の作製

lms 遺伝子は RT-PCR 法によって、スペアーマントの葉より単離した。この際のトータル RNA 調製は AGPC 法⁹⁾により行った。poly(A)+mRNA の調製は oligotex-dT30 (ロシュ・ダイアグノスティックス) を用いて行った。*Bacillus stearothermophilus* 由来の *gpps* 遺伝子は大沼ら²⁾から譲与された。大腸菌の *lpk* 遺伝子は DH5 α株のゲノミック DNA より PCR 法によってクローニングした。これらの遺伝子はプラスミド pBluescript KS⁻ (ストラタジーン) ベクターまたは pACYC184(ニッポンジーン) ベクターに挿入した。作製したプラスミドは大腸菌 DH5 α株に導入した。

4) リモネン生産量の測定

-85℃でグリセロール溶液に保存しておいた組換え体は LB 寒天培地に画線植菌し、37℃で一晩静置培養した。単一のコロニーを LB 液体培地に植え、37℃で一晩振とう培養した。この培養液 200 µl は M9 最小培地 20 ml に植え継ぎ、30℃で 3 日間振とう培養した。ガスクロマトグラフ分析計を用いた大腸菌培養液中のリモネン生産量の測定は上記のスチレン測定と同様に行った。

4. 研究結果および考察

1) スチレン分解菌の単離および分類結果

環境中からスチレン分解菌の単離を試みた結果、インドール(無色)をインディールゴブルー(青色)に酸化させる反応を示す、10 株以上の細菌を単離することができた。単離した細菌のうち、6 株の 16S リボソーム RNA 塩基配列に基づく分類を試みた結果を表-1 に示す。SD-1、SD-4 および SD-9 株は いずれも *Aureobacterium testaceum*, *Microbacterium arborescens*, *Microbacterium arborescens imperial*, *Microbacterium laevaniformans* と 94.7%の相同性が示された。SD-2 株は *Arthrobacter* sp.と 94.7%、SD-10 株は *Pseudomonas* sp.と 98.9%、STR-Y-O 株は *Bacillus thuringiensis* および *Bacillus cereus* と 99%の相同性が示された。

表-1 16S リボソーム RNA に基づく分類結果

菌 株 名	分 類 結 果	相 同 性	単 離 場 所
SD-1、SD-4、SD-9	<i>Aureobacterium testaceum</i>	94.7%	仙台市 国道 4 号線
	<i>Microbacterium arborescens</i>	94.7%	
	<i>imperial</i>	94.7%	
	<i>laevaniformans</i>	94.7%	
SD-2	<i>Arthrobacter</i> sp.	94.7%	
SD-10	<i>Pseudomonas</i> sp.	98.9%	山形市 大字八森
STR-Y-O	<i>Bacillus thuringiensis</i>	99%	
	<i>cereus</i>	99%	

2) スチレン分解能実験結果

2 株の単離した菌株を用いてスチレン分解能実験を試みた結果を図-3 に示す。SD-10 株は 8 日間で初期濃度の 50%の分解を示した。また、STR-Y-O 株は初期濃度の 40%の分解を示した。これらの菌株のポリスチレン分解能については今後の課題である。

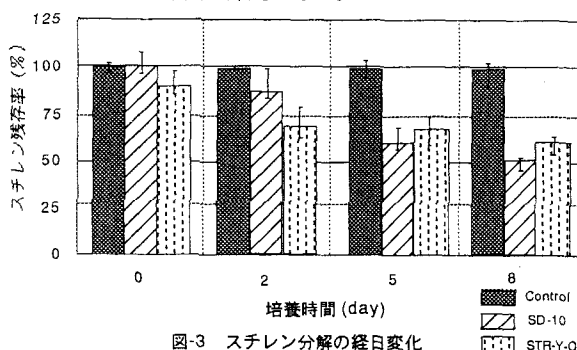


図-3 スチレン分解の経日変化

3) リモネン生産能実験結果

lms 遺伝子と *ipk* 遺伝子を共発現させた大腸菌の増殖度とリモネン生産量の関係は、対数増殖期にあたる 24 時間目に最大の生産量が示された (図-4)。その後、リモネン生産量は菌数が増えても減少傾向にあった。*lms* 遺伝子のみを保有する大腸菌のリモネン生産量は確認できなかった (図-5)。 *gpps* 遺伝子を導入した大腸菌のリモネン生産量は検討中である。今後、実用化するためにはさらにリモネン生産量を高める必要がある。そこで、*lms* 遺伝子の基質となる GPP や IPP 量を高める効果のある、遺伝子を同時に大腸菌に導入した実験を検討している。

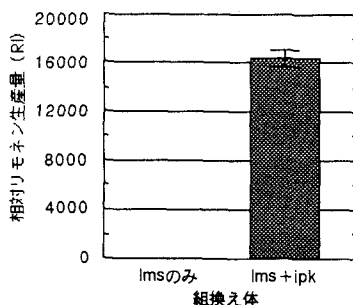


図-4 組換え体の最大リモネン生産量比較

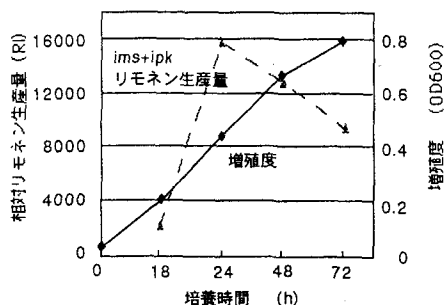


図-5 増殖度とリモネン生産量の関係

5. おわりに

発泡スチロールリサイクル協会では 2005 年までに発泡スチロールリサイクル効率を現在の 58% から 70%に上げることを目標にしている¹⁾。そのためにも本研究のバイオ技術と微生物分解を組み合わせたゼロエミッション処理構想が実現して、リサイクル効率の上昇に貢献することを期待している。

6. 参考文献

- 1) 発泡スチロール再資源化協会, <http://www.jepsra.gr.jp/>
- 2) Narita K., Ohnuma S., and Nishino T. (1999) Protein design of geranyl diphosphate synthase. Structural features that define the product specificities of prenyltransferase. J. Biochem. (Tokyo) 126, 566-571.
- 3) Colby, S. M., Alonso, W. R., Katahira, E. J., McGavey, D. J., and Croteau, R. (1993) 4S-Limonene Synthase from the Oil Glands of Spearmint (*Mentha spicata*). J. Biol. Chem. 268, 23016-23024.
- 4) Lange B. M. and Croteau. R. (1999) Isopentenyl diphosphate biosynthesis via a mevalonate-independent pathway: Isopentenyl monophosphate kinase catalyzes the terminal enzymatic step. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 13714-13719.
- 5) O'connor K. E., Dobson A. D. W., and Hartmans S. (1997) Indigo formation by microorganisms expressing styrene monooxygenase activity. Appl. Environ. Microbiol. 63, 4287-4291.
- 6) Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Anal. Biochem. 162, 156-159.