

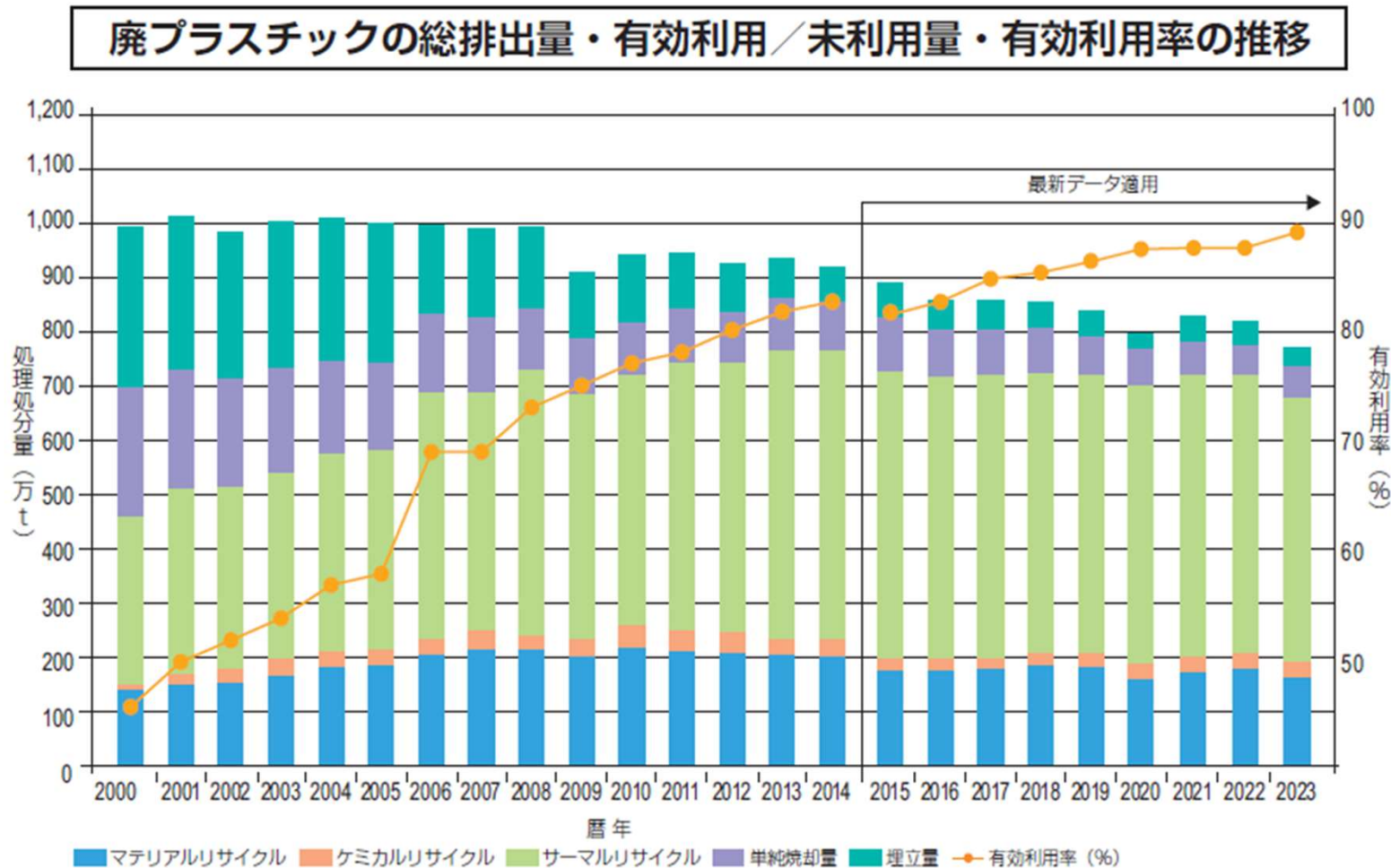
NBR分解菌の 遺伝子組換え用ベクターの開発

岩手大学 農学部 応用生物化学科
教授 山田 美和

2025年3月6日



プラスチックくずの排出量とリサイクル率の推移



一般財団法人プラスチック循環利用協会「2023年プラスチック製品の生産・廃棄・資源化処理処分の状況」

プラスチックくずの排出量は減少傾向であり、リサイクル率は90%に迫る。
しかし、リサイクル内訳の大部分はサーマルリサイクル（熱回収）である。ケミカルリサイクル率は低い。

ケミカルリサイクル

使用済みの資源を化学的に分解し、原料に変えてリサイクルする



化学処理

- ・高温高压
- ・実用化しやすい一方で、
得られる分解物が一定ではないことも

酵素処理

- ・常温常圧
- ・酵素反応によってモノマーが
一定して得られる利点がある

処理法が環境低負荷であるという観点からも酵素処理法が注目されているが、実用化に足る能力を持ったプラスチック分解酵素の報告はほとんどない。

フランスでは酵素による PETのケミカルリサイクルを社会実装

- ・ 2005年 独) Helmholtz Centre for Infection Research
(Macromol. Rapid Commun.) : 10% (55℃)
- ・ 2016年 京都工繊大、慶応大、RITEら (Science): 0.23% (常温)
- ・ 2020年 仏) Toulouse大、Carbios社 (2011年創業したベンチャー企業)
(Nature): 30% → 90% (60℃)
- ・ 2021年 仏) ロレアル社・Carbios社: 20 m³実証プラント稼働
PETボトル10万本分 = 2トン (10~16 hで処理)

酵素によってケミカルリサイクルされたPETボトル

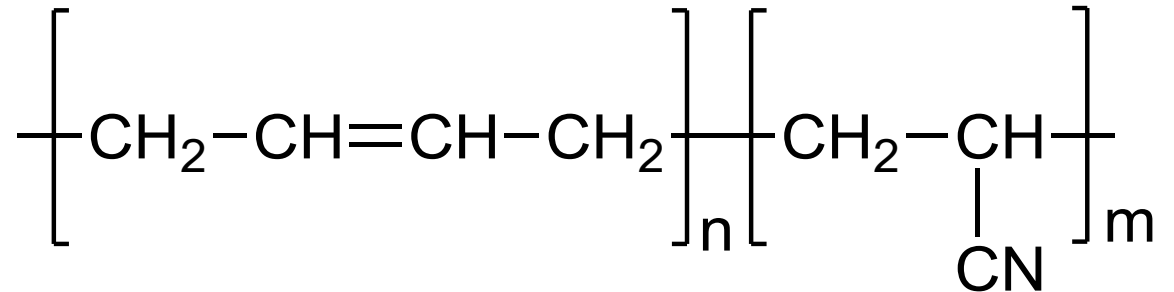
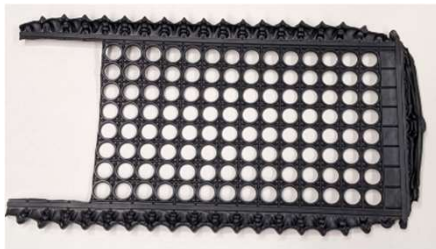
石油由来PETに比べて製造時のCO₂排出量を
約30%削減できる。
製造コスト：2セント (¥1.2) /本



2023年プラント建設開始。 2025年までに400 m³プラントを稼働予定。

酵素による合成高分子のケミカルリサイクルは良い酵素を開発すれば実現できる！

本技術でターゲットとする合成高分子 アクリロニトリルブタジエンゴム(NBR)



**生産量：95,784万トン 2022年
(石油化学製品全体の約1.4%)**

石油化学工業協会HPより

- ・サーマルリサイクル
- ・熱分解
- ・変形させて再利用
- ・再生ゴム
- ・粉末化

NBR分解菌 *Gordonia* sp. J1A

福島大学 杉森大助 教授らのグループが発見（特許出願済み）



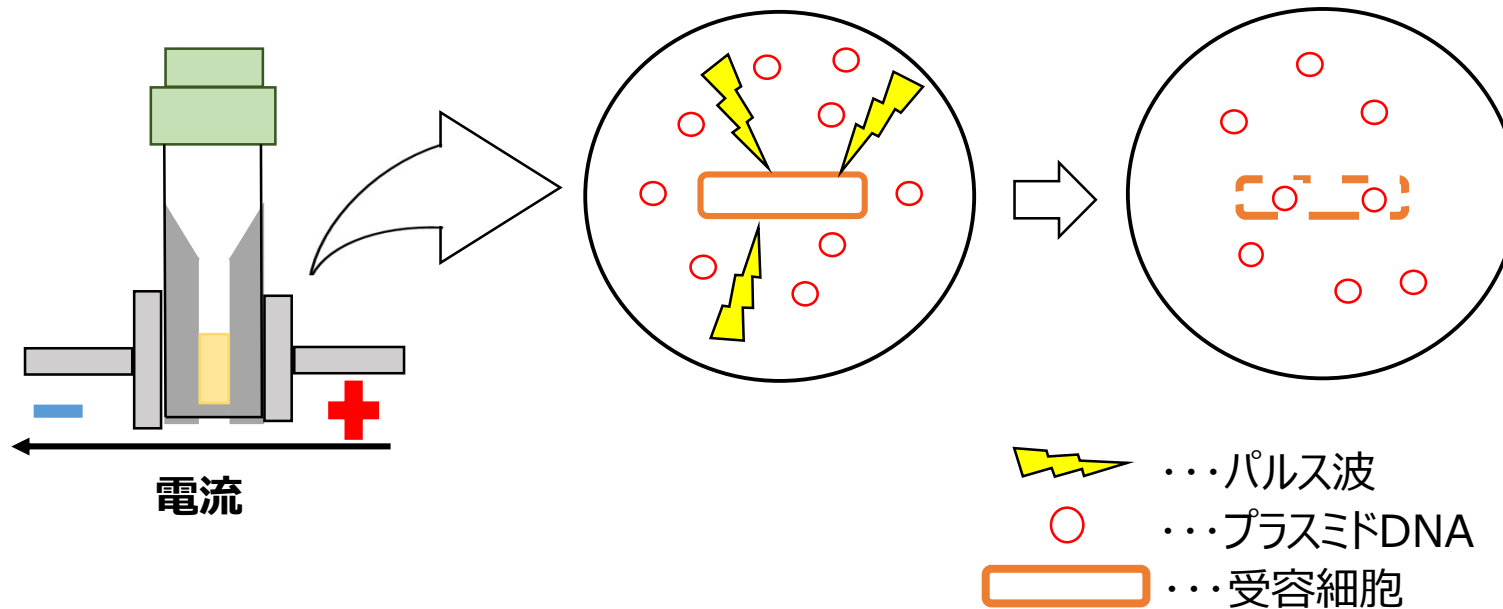
- ・ グラム陽性細菌 放線菌
- ・ UV照射・硫酸浸漬 などの前処理がなくNBRを分解可能
- ・ 分解に関わる酵素は未同定

**「本菌の詳細なNBR分解能力の解明や分解酵素の特定」
「本菌のNBR分解能力向上」
に向けて、本菌の遺伝子組換え技術は必須の技術**

従来技術とその問題点

エレクトロポレーション法による遺伝子組換え法

エレクトロポレーションは、電気パルスによって、瞬間的に細胞膜に孔をあけ、DNAなどの核酸を導入することで細胞へ外部からの遺伝子を導入できる。

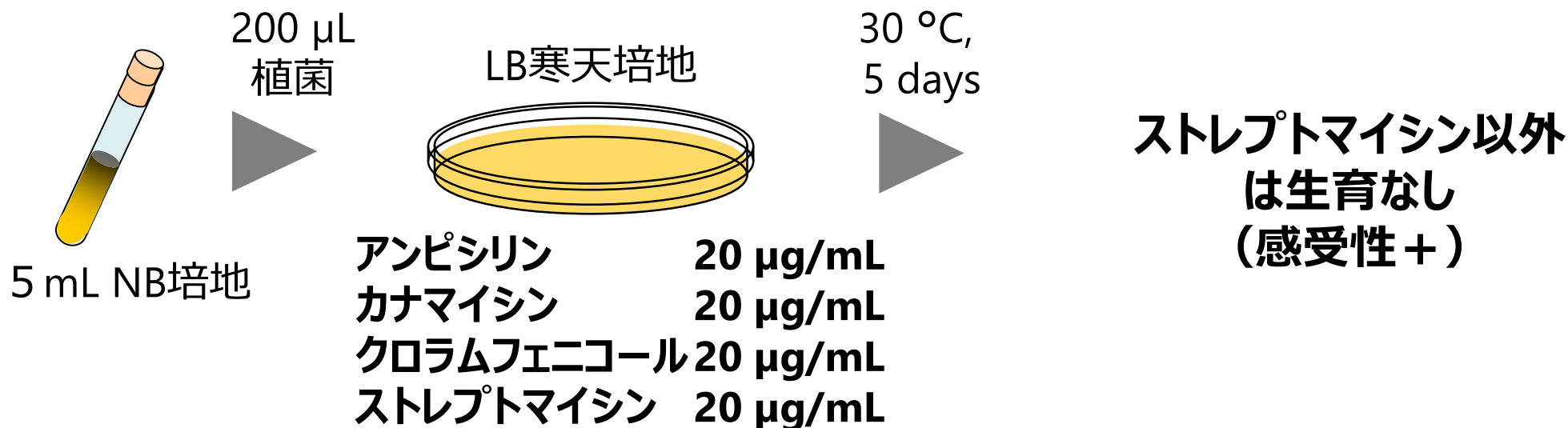


しかし、従来の方法では外来遺伝子が導入された遺伝子組換えJ1A株が作成できない…

本技術開発の目標

- 放線菌 *Gordonia* sp. J1A が複製可能なベクターの構築
- J1A の形質転換手法の確立

■ 薬剤感受性試験



■ クロラムフェニコール (Cm) での最小生育阻止濃度(MIC) の決定

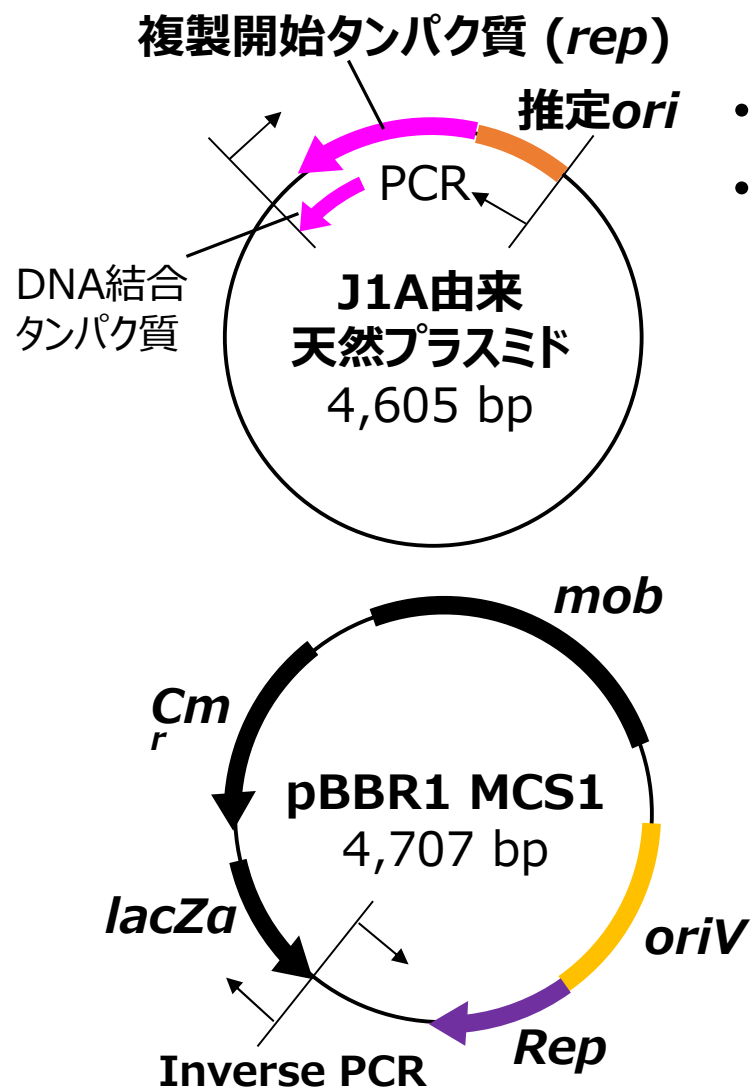
液体培地と寒天培地で培養

使用カセット; Cm^R
MIC; 液体5 µg/mL以上
寒天10 µg/mL以上

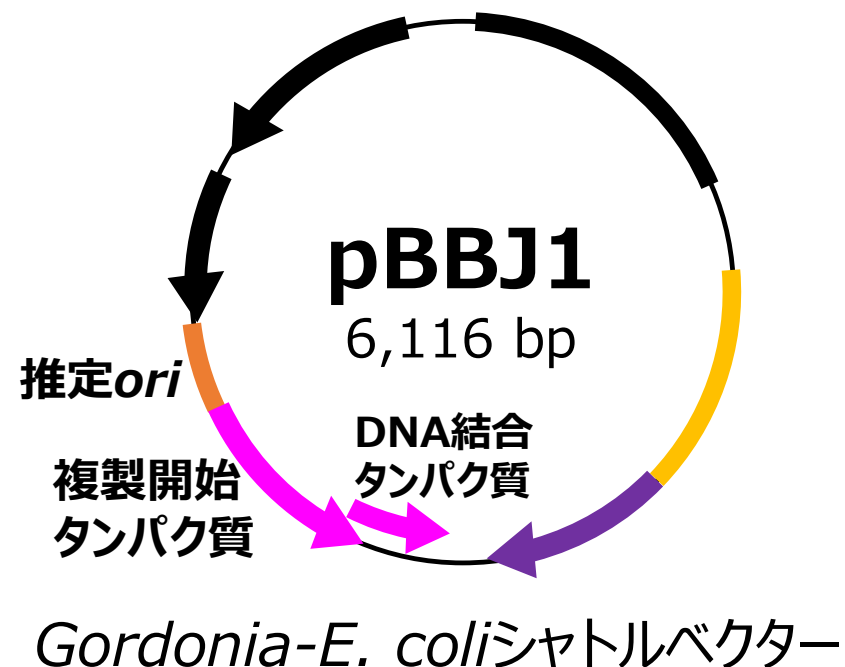
Media	Final concentration of Cm (µg/mL)	Cultivation time (days)				
		1	2	3	4	5
Liquid	1	-	+	+	+	+
	5	-	-	+	+	+
	10	-	-	-	-	-
	20	-	-	-	-	-
Agar plate	1	-	+	+	+	+
	5	-	+	+	+	+
	10	-	-	+	+	+
	20	-	-	-	-	-

*Gordonia-E. coli*シャトルベクターの構築

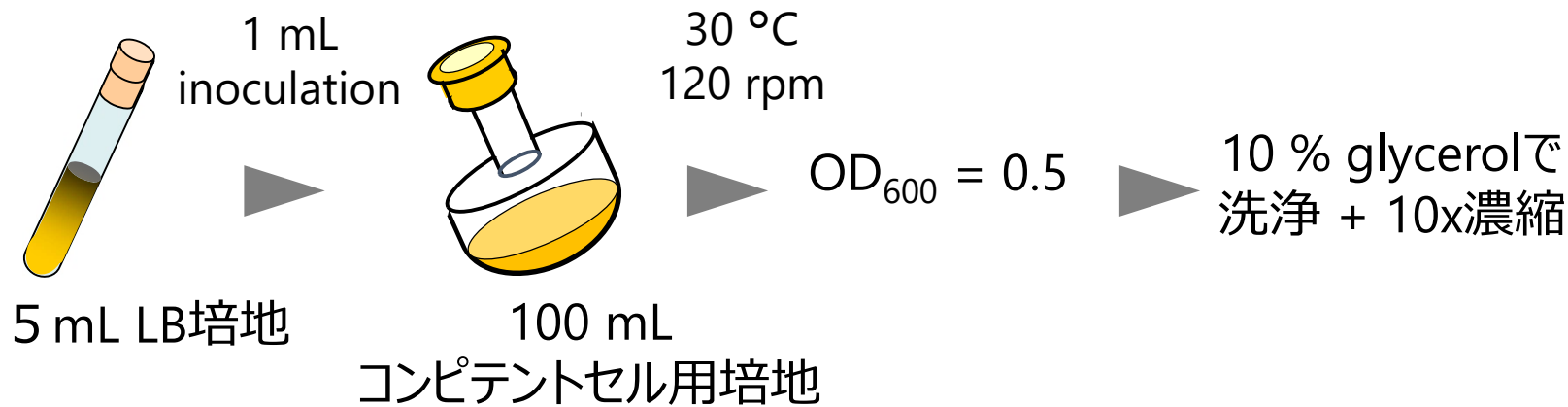
レプリコンのクローニング



- ・ORFの機能予測: BLAST検索
- ・*ori*の配列予測: Ori-Finder 2022プログラム



■ エレクトロコンピテントセルの調製

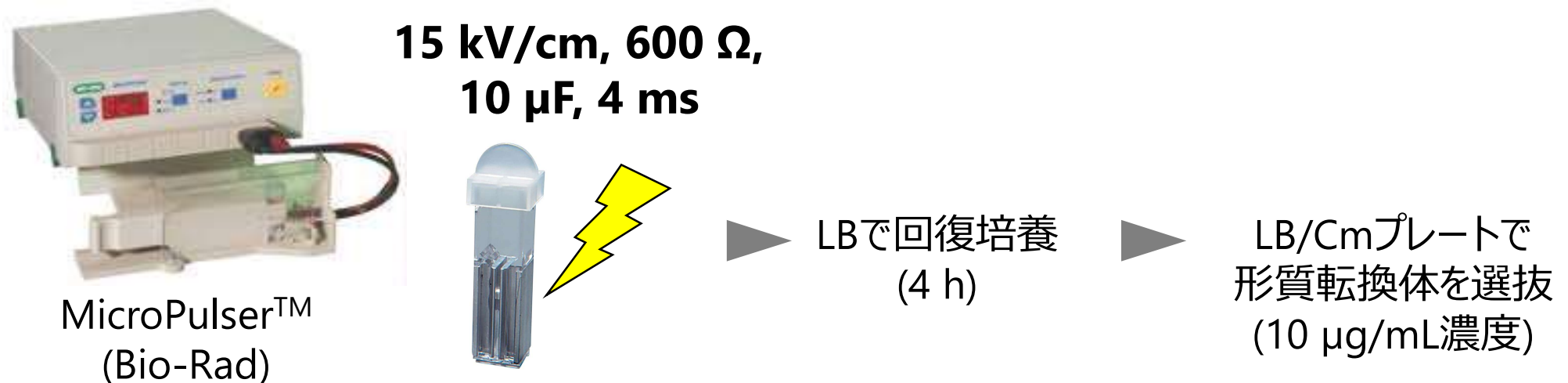


コンピテントセル用培地 (pH 7.0)

Tween 80	2.0 g
Sucrose	1.5 g
Tryptone	1.0 g
NaCl	1.0 g
Glycine	1.0 g
Yeast extract	0.50 g
Isoniazid	0.3 mg
Water	100 mL

P. Singh and P. Srivastava, (2013), *J. Microbiol. Methods*.

■ パルス



J1A形質転換体候補の取得と確認

形質転換体と思われるコロニーを取得 (培養一週間程度)

遺伝子導入前



形質転換体?



■ プラスミド抽出

▶ 抽出したプラスミドの塩基配列を確認したところ
pBBJ1配列と一致

■ 16S rRNA配列の確認

形質転換体は、*Gordonia* sp. J1A の形質転換体であることが確認された

J1Aの形質転換に成功した

作製したpBBJ1プラスミドの細胞内コピー数: 40~180コピー
(一般的なプラスミドのコピー数と同程度)

新技術の特徴・従来技術との比較

- 従来技術の問題点であった、新規なNBR分解菌への外来遺伝子導入法を改良し、NBR分解菌の形質転換体の作成に成功した。
- 本技術によって、新規なNBR分解菌の遺伝子組換えが可能となる。

想定される用途

- 多様な *Gordonia* 属菌の遺伝子組換えで利用できる可能性がある（基礎研究機関での用途）。
- 本技術によって、未知のNBR分解酵素の特定やNBR分解菌の分解能力向上を行うことで、NBRケミカルリサイクルや廃棄NBR処理の新たな技術開発に貢献することが期待できる。
- 上記以外に、NBR分解菌を利用して、廃棄NBRを原料としたアップサイクル技術の開発にも貢献できる可能性がある。

実用化に向けた課題と企業への期待

- 今回の技術は今後の研究開発に必須の基盤技術が開発できたのみである。
- 廃棄NBRのバイオ処理方法やアップサイクル技術の開発を目指す企業と共同研究することで、今後の新たな技術開発へと展開できると考えている。

企業への貢献、PRポイント

廃棄NBRの処理や有効活用に興味があり、非常にチャレンジングではあるが、環境低負荷な新技術開発を目指して、長い目に取り組んでくださる企業様がいらっしゃれば、貢献できる可能性があると考えている。

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : プラスミドベクター、
シャトルベクターおよび
タンパク質の製造方法
- 出願番号 : 特願2024-182543
- 出願人 : 国立大学法人岩手大学
- 発明者 : 山田美和、石田拓真

産学連携の経歴

- ・ 本研究テーマに関しては産学連携しておりませんが、他の研究テーマにて、複数の企業様と共同研究させていただいております。

お問い合わせ先

岩手大学

研究支援・産学連携センターURAユニット

T E L 019－621－6689

e-mail urapj@iwate-u.ac.jp