

研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名： 酵素によるプラスチックの化学的再資源化

2. 研究代表者： 中島 敏明（筑波大学 応用生物化学系 助教授）

3. 研究内容及び成果：

本研究ではさきがけプロジェクトで得られた種々のプラスチック分解酵素を用い、特にモノマー回収による新規化学リサイクルシステムを開発し、省エネルギー循環型社会システムの構築に貢献することを目的としている。

ここで、酵素を用いるメリットとしては、1) 反応が常温常圧で行えるため、エネルギーコストがかからない 2) 酵素の高い基質特異性を利用することにより、混合物の中からも高純度のモノマーを効率よく取り出すことが出来ること、が挙げられる。研究期間は2年半であり、(A)ポリウレタンの酵素分解、(B)ポリエステル酵素分解、及び(C)メタゲノムシステムによるスクリーニング手法の開発を行った。

以下、成果の要点をまとめる。

A. ポリウレタンの酵素分解

A-1 ウレタン結合を切断する菌の取得

これまで知られているポリウレタン分解菌はいずれもポリオール部分のエステル結合を分解するものであり、固体ポリウレタン中のウレタン結合を切断する菌の報告はない。ポリウレタン中のウレタン結合を切断する酵素があれば、これまで分解不可能だったエーテル型ポリウレタンの分解が可能になる。本研究において、ウレタン結合を分解し、アミンを生成する有望な菌株(*Rhodococcus equi* TB-60 株)が得られた。

A-2 ウレタン結合切断酵素の精製と基質特性

酵素誘導条件下で培養した菌体を破碎し、ウレタン結合切断酵素を精製した。本酵素は分子量 55,000 の単量体であり、至適温度は 45°C、至適 pH は 5.5 であった。この酵素の基質特異性を検討したところ、ウレタン化合物の他に、アミド、エステルに対しても加水分解活性があり、また芳香族系のみならず脂肪族系化合物に対してもウレタン結合切断活性が認められた。

A-3 酵素遺伝子のクローニングと大量発現

TB-60 株の遺伝子をランダムに導入した大腸菌からコロニーハイブリダイゼーションによって当該酵素遺伝子を含むクローンを抽出した。本酵素遺伝子は 1,419bp のヌクレオチドからなり、472 残基のアミノ酸をコードしていた（推定分子量 50,699Da）。N 末端から 20 残基のアミノ酸配列 (Met¹-Ser²⁰) は TB-60 株由来ウレタナーゼの N 末端アミノ酸配列と完全に一致した。

本遺伝子を発現ベクターに導入し、*E. coli* BL21(DE3) を宿主として当該タンパク質を大量発現させた。得られた粗酵素液のウレタナーゼは、TB-60 株由来のウレタナーゼと同一の性質を示した。酵素遺伝子の相同性検索を行ったところ、1 例を除いて全て 40% 以下の相同性しか示さず、本酵

素遺伝子は極めて特異であることが明らかとなった。

A-4 ポリウレタンの分解試験

TB-60 株を用いたエーテル型ポリウレタンの分解試験を行ったところ、ウレタナーゼ誘導物質であるアセトアニドを添加した場合にのみポリウレタンの著しい褐変が認められ、約 20%の重量減少が認められた。本酵素はポリウレタン中のウレタン結合を選択的に切断している。さらに、この変化はポリウレタンのポリオール部位(ポリエーテル・ポリエステル)の違いに関わらず生じたので、本酵素はおそらく現在市販されているほとんど全てのポリウレタンを分解出来る可能性が高い。

以上の結果より遺伝子の同定と大腸菌での発現系が確立されたことから、今後タンパク質工学的改変によって分解性を付与することにより、ポリウレタンの酵素的モノマーリサイクルに応用出来る。

B. ポリエステル型プラスチックの酵素分解

ポリエステル系プラスチックの微生物分解については、土壌中や活性汚泥中での分解は詳細に検討されており、分解微生物の単離に関する報告もされている。ただし、今までの分解対象はエマルジョンや極薄フィルムであり、ペレットやディスク状の固形ポリエステル系プラスチックを高効率で分解するものはほとんど無い。また、コンポスト化のように不純物が多い場合、分解活性を失ってしまうために実用化に向かない。

そこで、本研究ではポリエステル系プラスチックのモノマーリサイクルに適した、強力かつ基質特異性の高い分解酵素を生産する微生物のスクリーニングを行った。

B-1 ポリエステル分解菌の取得

土壌、活性汚泥、河川水などを分離源として、乳化したポリブチレンサクシネート-*co*-アジペート(PBSA)を重層した肉汁寒天平板培地に塗布し、コロニー周辺が透明になったものを分解菌として単離した。このうち、特に大きなハローを形成した菌について、PBS ペレットを添加し、固体 PBS を分解する菌株(TB-71 株)を取得した。

TB-71 株を用い、各種ポリエステル系プラスチックのペレット分解試験を行った結果、PBSA に高い分解活性を持つことが明らかになった。本菌株はPBSA ペレット約 300mg を2日間で完全に分解した。この菌はこれまでの当グループが取得したPBSA ペレット分解菌BS-3株に比べて6倍以上の強力な分解力を持つ。この分解力は現時点では世界最高クラスである。

B-2 PBSA 分解酵素の精製と基質特異性

次に酵素を精製して特性を探った。検討の結果、本菌株のPBSA 分解酵素は菌体の表面に何らかの機構で付着しており、界面活性剤の添加で抽出出来ることが明らかになった。そこで、固体PBSA を加えた培地でTB-71 株を培養し、菌体表面に付着したタンパク質を抽出した。その後カラム精製を繰り返し、精製酵素液を得た。最終的に20の培養液から約 11mg の精製酵素が得られた。

本酵素は分子量約 27,000 の単量体であり、高分子以外にも低分子エステルを分解し、カルボン酸とアルコールを生成させるエステラーゼの一種である。pH については高範囲での許容性を有し、また40℃では数日間にわたって安定なことから、本酵素はモノマーリサイクルに応用するのに十分な性質を持っている。

B-3 ポリエステルの分解試験

本酵素の基質特異性について調べたところ、固体 PBSA、ポリエチレンサクシネート(PES)、ポリカプロラクトン(PCL)を数時間で完全分解した。一方、ポリブチレンサクシネート(PBS)、ポリヒドロキシアルカノエート(PHA)およびポリ乳酸(PLA)には全く活性を示さなかった。この明確な基質特異性について、その理由を解析中である。

B-4 PBSA 分解酵素遺伝子の取得と大量発現

今後のタンパク質工学的改良を可能にするために、本酵素遺伝子のクローニング、および大腸菌での大量発現を試みた。TB-71 株のゲノムライブラリーよりコロニーの周囲にクリアゾーンを形成した株を1株取得した。このプラスミドを抽出し、DNA 塩基配列を決定したところ、1つの ORF(Open Reading Frame)が確認された (*pbs3A*)。本遺伝子は 283 のアミノ酸からなる分子量 29,812.58 のタンパク質をコードしていた。シグナル切断位置から下流の10アミノ酸の配列は、TB-71 株由来の PBSA 分解酵素の配列と完全に一致した。分子量は 27190.61 であり、これは精製酵素標品の推定分子量とはほぼ一致した。得られた遺伝子のアミノ酸配列を元に相同性解析を行ったところ、全く新規の遺伝子であることが明らかになった。

次に獲得遺伝子をもとに大腸菌発現ベクターで大量発現を行ったが、現在のところ酵素活性が高い状態での大量発現には至っていない。

C.メタゲノムスクリーニングによるプラスチック分解遺伝子の取得

これまでに単離された生分解性プラスチック分解菌の多くは、エマルジョンの分解は可能であるが、固体のプラスチックを分解出来ない。しかし、自然界において固体プラスチックは確実に分解され、消失する。これは土壌1グラム中には 10^8 個もの微生物が存在して分解を促進するのに、培養可能な微生物は数%に過ぎないことによる。従って従来型のスクリーニング法では自ずと限界があり、このためにメタゲノム法が開発されてきた。メタゲノムスクリーニングでは土壌より直接DNAを抽出し(メタゲノム)、これを大腸菌に組み込んで発現させ、この大腸菌に対してスクリーニングを行う。この方法によって、培養不可能な微生物由来の有用酵素遺伝子を直接得ることが出来る。

本研究では、土壌に埋設した生分解性プラスチックの表面からDNAを抽出し、プラスチック分解酵素遺伝子のメタゲノムスクリーニングを行った。この方法では対象となる母集団(DNA源)がプラスチック表面に集積したもののみであり、非常に高効率で目的遺伝子を探し出すことが出来る。対象として微生物分解が困難なポリ乳酸(PLA)に絞られ、また耐熱性酵素の取得を狙って、比較的高温環境になるコンポストに埋設したものを DNA 源に用いた。その結果、PLA分解酵素遺伝と思われる数種の ORFを見出し、遺伝子解析の結果リパーゼ遺伝子と高い相同性を示したので、系統樹解析を行ったところ新規の family を構成するものが見つかった。このうち PlaM4 遺伝子を発現ベクターに導入し、大量発現をさせてタンパク質の精製を行った。この酵素は高温でも分解活性を有し、また固体 PLA 分解試験の結果、分子量 20,000 までの PLA は分解可能であった。

次に実際のポリマー分解に作用させるため、高温耐熱性を付加するための遺伝子再構築(DNA-shuffling)を行い、60℃でも安定な変異体を作成出来た。

以上のことは他の酵素スクリーニング等へ応用可能であり、キット化も含めて現在検討している。

4. 事後評価結果

4-1 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

- ・発表論文 6件
- ・その他著作、レビュー 2件
- ・口頭発表 21件
- ・特許出願 国内 4件・外国 2件

本研究はさきがけ「変換と制御」領域の研究の成果から発展し、レベルアップを図る研究を平成15年10月より平成18年3月まで、2年6ヶ月に渡って行ったものである。

本研究結果は、ポリエステル系プラスチックの新しい省エネルギー・低コストの再資源化プロセスの確立(特に酵素を用いてのモノマー回収)を図るものであり、現在まで新規のプラスチック分解酵素が多数得られたこと、またその酵素の遺伝子解析等が進んで、特定化出来たことは評価出来る。しかし個々の分解活性を見ると、TB-71 株の PBSA 分解酵素を除いては未だ実用化に十分といえるほどの活性が得られていない。これはタンパク工学等のサポート研究が進まなかったためであろう。

一方、幅広くかつ効率的に微生物を探索する方法論として独自のメタゲノムスクリーニング法を編み出したことは、今後の生分解性プラスチックの開発や分解性評価、環境影響評価に貢献出来、他の酵素工学分野へもインパクトを与えるものであり、今後の展開が待たれる。ただ、研究期間の大部分がスクリーニングに追われた観があり、口頭発表に比して原著論文が若干物足りない。成果を論文化していくことも重要である。

4-2 成果の戦略目標・科学技術への貢献

地球環境・資源問題が益々重要となる世界的潮流にあつて、酵素のようなバイオ触媒を用いるグリーンプロセスの開発、応用が待たれている。本研究はそのような流れの一環として捉えられ、若い研究者が独自の研究を推進する好機を与えられた。

研究代表者は農芸化学をバックグラウンドにした生化学を、高分子物質の分解リサイクルプロセスに応用出来る微生物と酵素の探索に展開した。そして、新しいポリエステル加水分解酵素をいくつか見つけ出し、遺伝子レベルまで調べ、中でも TB-71 株は高い活性を示すことを明らかにした。また研究期間中構築したメタゲノムスクリーニング法は、汎用の技術としての可能性があると考えられる。酵素のようなバイオ触媒を用いるグリーンプロセスの開発、応用という分野において日本は立ち遅れ気味なので、世界に向けて優れた成果を出すことが、学術面はもとより経済発展に対しても必須である。