

公開資料

戦略的創造研究推進事業 S O R S T

「酵素によるプラスチックの化学的再資源化」

## 研究終了報告書

研究期間 平成15年10月～平成18年3月

中島 敏明

(筑波大学 大学院生命環境科学研究所  
生命産業科学専攻 助教授)

## 1 研究実施の概要

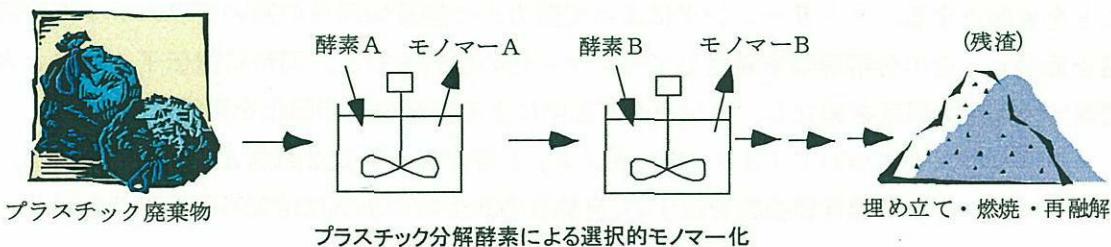
プラスチックは、その優れた特性と廉価さのため、基礎資材として広く使用されている。なかでも、ポリエステル系のプラスチックは、近年生分解性プラスチックとしての用途が開発され、現在ではそのほとんどを占めている。生分解性プラスチックは、最終的には全プラスチックの半分以上がこれに置き換わると試算されていることからも、その重要性はますます高くなるのは間違いない。

その一方で、近年環境汚染問題において製造者サイドの責任が問われつつあり、今後その傾向は一層強まると予想される。この様な情勢から、プラスチック産業界においても、単なる生分解性の向上だけでなく、生産・利用・処理すべてを含んだグローバルな製品開発が必要とされる時代が到来している。登場当初は「生分解性」を前面に押し出していた生分解性プラスチックだが、近年では植物を原料にすることによって「カーボンニュートラル」としての面が強調され、焼却処理が推奨されているような風潮がある。しかし、今後の需要増を考慮すれば、植物のみに頼った生産にはおのずと限界があり、リサイクルは避けて通れないと考える。

リサイクルは、プラスチック廃棄物の処理方法として極めて有効な方法といえるが、現在では廃プラスチックを再融解して再生する物理的方法が主である。しかし、この方法では品質の低下が避けられないため、再生品の用途は限られてしまう。

一方で、廃プラスチックを化学的にモノマーまで分解し、これを回収、再合成するモノマーリサイクルは、一次生産品と全く同等のプラスチック製品を作ることができる。これは各構成成分が加水分解をうけやすいエステル結合でつながっているポリエステル系プラスチックでは、特に有効な処理方法である。また、通常プラスチック廃棄物は複数種類の混合物であるため、酸やアルカリなどの一般的な化学分解ではモノマーも混合物で得られてしまう。これを精製するには多くのプロセスを必要とし、コストの面できわめて不利である。加えて、反応に高温を必要とするため、省エネルギーという点で好ましくない。廃棄物の分別回収も呼ばれているが、実際には排出者の意識やそれにかかるコスト等を考えると完全実施は困難である。このため化学分解によるモノマーリサイクルは、その有効性に反して、ほとんど実用化されていない。

本提案では、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を狙う。上記の化学分解リサイクル法における問題点を解決するため、プラスチック、特にポリエステル系生分解性プラスチックの分解に酵素を用いた新プロセスを導入する。酵素を用いることによ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、混合物の中からでも高純度のモノマーを効率よく取り出すことができる。以上のように、従来の酸・アルカリ加水分解では解決不可能な問題点を一挙に解決できる。



このためには高い基質特異性を持つた、さまざまなポリエステル系プラスチック分解酵素の存在が前提となる。生分解性プラスチックは、「使用中は通常のプラスチックと同様に使って、使用後は自然界の微生物によって水と二酸化炭素に分解され、自然にかえるプラスチック」と定義されている。すなわち、生分解性プラスチックは自然界において微生物の分泌する酵素によって分解されることが明らかであるため、リサイクルに適した分解酵素の検索がしやすいというメリットがある。

生分解性プラスチックはそのほとんどがポリエステル系であるため、市販のリパーゼやプロテアーゼによっても分解を受けることが知られているが、その分解性は極めて低く、分解には通常常識外の大量の酵素を必要とする。市販酵素は本来脂質やタンパク質を基質とするため、生分解性プラスチックに対しての分解性は低いことは十分予想できる。

当研究グループはこれまでに固体ポリウレタン分解菌 *Comamonas acidovorans* TB-35 株をはじめ、さまざま固体ポリエステル系プラスチックを強力に分解する微生物を自然界から取得し、その分解酵素、分解遺伝子についての検討を行ってきた。生分解性プラスチックの分解菌はグラム陽性、陰性菌と多種多様にわたっており、多くの分解菌が分離され、報告されている。しかし、残念なことにそのほとんどがエマルジョン化したプラスチックを基質として分解可能であるが、フィルムやペレット状の固体プラスチックを直接分解できない。このため、固体分解能を持ったプラスチック分解酵素は一部を除いてあまり知られていない。この理由のひとつとして、生分解性プラスチックが固体基質であることが挙げられる。すなわち、固体を基質とした酵素反応の場合、酵素反応は基質表面のみで起こるため、基質と酵素の会合の確率は水溶性基質の場合に比べて格段に低くなることが挙げられる。そのため、固体を基質とする酵素反応の見かけの反応速度は極めて遅くなる。ところが、固体プラスチックを基質として自然界から分解菌を取得し、その分解酵素を調べてみると、この問題を克服するため、酵素分子が基質に積極的に付着するための機能を持っていることが明らかになった。すなわち固体プラスチックの分解酵素は、酵素のプラスチック表面への付着とそれに続く加水分解という2段階反応によって引き起こされることが明らかになった。

本研究では前プロジェクトで得た種々のポリエステル系プラスチック分解酵素を用い、酵素を用いたポリエステル系プラスチックの新規化学リサイクルシステムを構築し、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実施した。

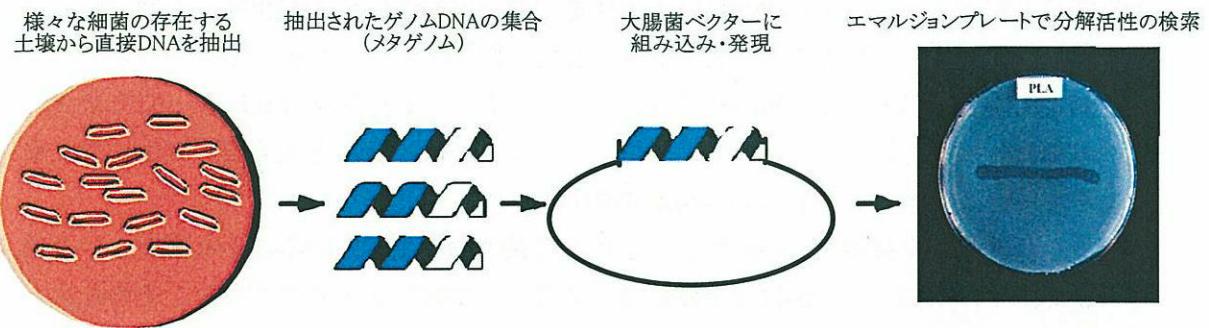
## 2 研究構想

### 1) プラスチック分解菌・分解酵素・遺伝子の検索

強力な固体プラスチック分解菌を取得し、プラスチックのモノマーリサイクルに用いることを目的とする。スクリーニングによって強力かつ基質特異性の高いプラスチック分解菌を取得し、その分解酵素を特定してモノマー化の検討を行う。同時に遺伝子の取得と大腸菌での大量発現系を確立し、タンパク質工学による酵素の機能強化を可能にする。

スクリーニングについて「メタ（超）ゲノム」と呼ばれる新たな概念と手法を導入する。スクリーニングでは通常微生物を探すが、自然界の微生物の99%は培養不可能であるため、

プラスチック分解酵素のような希少酵素を得るのは難しい。そこで土壤より直接DNAを抽出し、これ（メタゲノム）を大腸菌に組み込んで発現させ、この大腸菌に対してプラスチック分解活性を検索する。この方法を用いると、原理的にはすべての土壤微生物が検索対象となる上、分解活性を持った大腸菌が得られた時点で、遺伝子クローニングもほぼ完了しているため、短時間で目的遺伝子が取得できる。



メタゲノムを用いたプラスチック分解酵素スクリーニングのスキーム

こうして得られた新規ポリエステル系プラスチック分解酵素遺伝子を用いて、大腸菌での大量発現を行う。これを用いて、基質特異性や分解能力について検討を行い、ポリエステル系プラスチックの選択的モノマー化に適した酵素を選出する。

なお、研究の過程において、自然界におけるプラスチックの分解にかかる微生物叢についての知見がほとんど無かったことから、これらを分子生態学的手法で明らかにすることにより、新たな分解酵素・遺伝子の獲得につなげることを目標に加えた。

## 2) プラスチック分解遺伝子の機能強化

得られた各種固体生分解性プラスチック分解酵素について、遺伝子改変による機能強化を行う。遺伝子の配列情報を元に酵素の活性や基質特異性に関わる部分を推定し、部位特異的変異をPCRにて導入する。得られた改変酵素の性質を検討し、有効な変異遺伝子を選択し、さらに変異を導入する。これを繰り返して大幅な機能強化を試みる。また類似の配列をもつ分解酵素遺伝子同士をもちいて、DNAシャッフルリングを行い、高い活性、安定性、基質特異性を持たせた有用変異タンパク質を創生する。さらに、error-prone PCRや大腸菌ミューターゼを用いてランダムミューテーションを試み、基質特異性や活性、大腸菌での生産性等の機能が強化された遺伝子を選択する。

これらの機能強化遺伝子の基質特異性についての検討を行い、廃生分解性プラスチックからの選択的モノマーリサイクルに最適な組み合わせ、および各酵素の添加順序を検討する。

## 3) ポリエステル系プラスチックの選択的モノマー化によるリサイクル技術の確立

得られた分解酵素を用いて選択的モノマー化の実証試験を行う。ポリエステル系プラスチックを含んだ廃棄物にプラスチック分解酵素Aを加えてモノマーAを回収する、次に酵素Bを加えモノマーBを回収する。以下同様の手順でモノマーの回収を行う。酵素を加える順序はそれぞれの基質特異性の広さを勘案して、高純度のモノマーを取り出せるように工夫し、実用化への可能性を探る。

### 3 研究内容

#### 3. 1 新規プラスチック分解菌の取得と利用

##### 3.1.1 ウレタン結合切断酵素の性質とその利用

###### (1) 実施の内容

ポリウレタンはその優れた性質からさまざまな分野で利用されている。しかしその一方で廃棄量も年々増加し、高い燃焼熱による焼却炉の損傷や埋立地の飽和等、深刻な環境問題を起こしている。これらの廃棄物の対策として、低コスト、かつ省エネルギー型プロセスである微生物分解・酵素分解が注目されている。ポリウレタンを酵素によってモノマーに分解できれば、これを回収、再合成することにより一次生産品と全く同等のポリウレタンを作ることができ、リサイクルへの道が開ける。

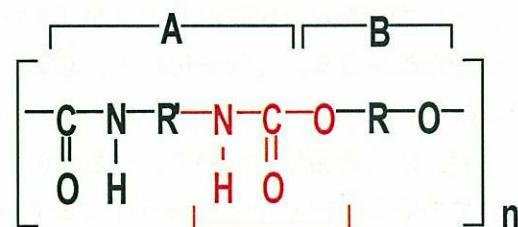
ポリウレタンの生分解性については、これまで微生物や生体内酵素による劣化という面での研究が主体であり、いかに生分解を防止するかが主要なテーマであった。そのため、ポリウレタン分解微生物自身やその分解酵素についての研究は進んでいない。

ポリウレタンの分解は、ウレタン結合の分解と、ポリオール部分の分解とに大別される。このうちウレタン結合はすべてのポリウレタンに共通に存在する結合である。

しかし、ポリウレタン中のウレタン結合の分解に関する知見はほとんどない。微生物分解に伴って、ウレタン結合が加水分解を受けているという報告はいくつかあるが(1,2)、ウレタン結合の切断と微生物との因果関係は明らかでない。

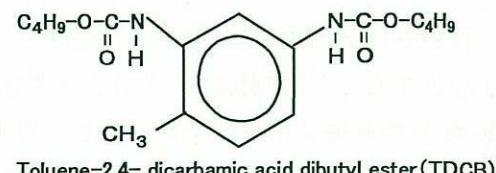
一方、低分子のウレタン化合物が微生物によって分解されることはすでに報告されており、その分解はエステラーゼによるものであることが知られている。しかし、そのほとんどは酒類の品質改良やカルバメート系農薬の分解浄化に関するものであり、ポリウレタンの分解に利用できる技術ではない。ポリウレタン原料となり得る物質の分解菌としてはカビによるもの(3)があるが、その分解酵素は特定されていない。

これまでに報告のあ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。そこで、ポリウレタンの原料として一般的なイソシアネートを用いて合成した低分子ウレタン化合物を用いて、ウレタン結合切断能を有する微生物を自然界より取得し、これを固体ポリウレタンの分解に応用することを目的として検討を行った。これまでの研究で、ウレタン化合物(toluene-2,4-dicarbamic acid dibutyl ester : TDCB)をモデル化合物として、これを含む液体培地中でアミンを生成する菌株 (*Rhodococcus equi* TB-60 株) を選抜した。そこで本プロジェクトでは、



A:ポリイソシアネート  
B:ポリオール  
ポリエステル(エステル型PUR)  
ポリエーテル(エーテル型PUR)

ポリウレタンの基本構造



Toluene-2,4-dicarbamic acid dibutyl ester (TDCB)

本菌株が生産するウレタン結合切断酵素を精製しその諸性質について検討を行うとともに、これを用いたエーテル型ポリウレタンの分解を検討した。また同時に遺伝子のクローニング、大腸菌での大量発現を行い、今後の遺伝子改変・大量生産への基礎とした。

## (2) 得られた研究成果の状況及び今後期待される効果

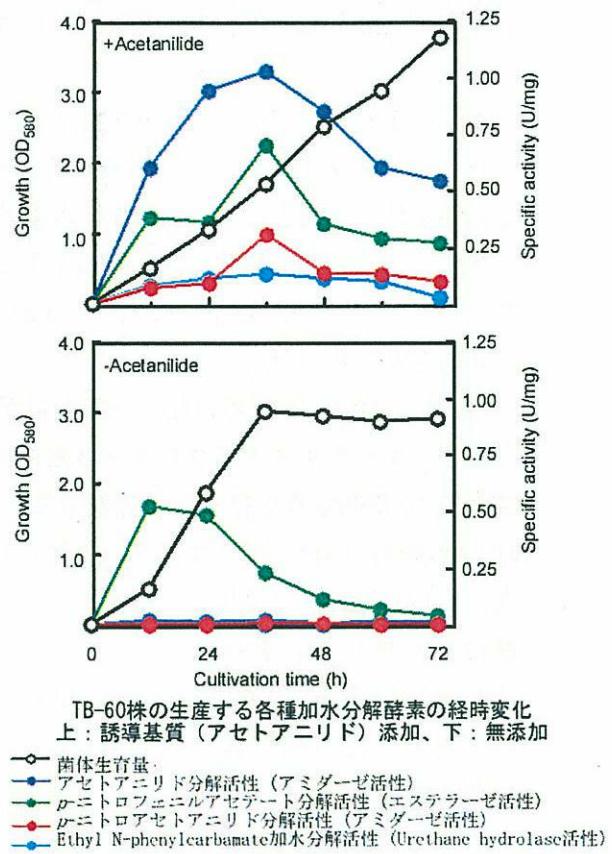
誘導物質としてアニリンを添加したときの、*R. equi* TB-60 株の生育量、ウレタン加水分解活性、アミダーゼ活性、及びエステラーゼ活性を経時的に測定した結果を下図に示した。

誘導物質としてアセトアニリドを用いたとき、Urethane hydrolase 活性が認められた。それと同時にアミダーゼ活性、エステラーゼ活性が認められた。ただし、エステラーゼ活性は、アセトアニリドを添加しない培養においても認められた。Urethane hydrolase 活性、アミダーゼ活性ともに、培養 36 時間に最も高い活性を示した。これらの結果より、本菌株の Urethane hydrolase は、アセトアニリドによって誘導されることが明らかとなった。また、本酵素はアミダーゼの一種であることが示唆された。

酵素誘導条件下で培養した菌体を破碎し、硫酸アンモニウム分画、陰イオン交換クロマトグラフィーを用いて、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。本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認められた。ポリウレタンの合成に用いられている各種イソシアネートを原料とした低分子ウレタン化合物に対する加水分解活性を検討したところ、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。

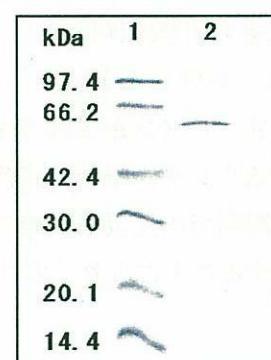
これまで、固体ポリウレタンを分解可能な酵素としては、前プロジェクトにおいて当グループが取得したポリエステル型のポリウレタン分解酵素である TB-35 株由来酵素 (4) 及び TB-13 株由来酵素 (5) が知られている。しかしこれらの酵素はエステラーゼであり、ポリウレタン中のエステル結合は分解するが、ウレタン結合はほとんど分解しないため、低分子のウレタン化合物が最終産物として残る。本酵素をこれらのポリウレタン分解酵素と共に存させることにより、ポリウレタンの完全分解が可能になる。

次に、精製されたウレタナーゼ(Urethane hydrolase)



TB-60株の生産する各種加水分解酵素の経時変化  
上：誘導基質（アセトアニリド）添加、下：無添加

- 菌体生育量
- アセトアニリド分解活性（アミダーゼ活性）
- N,N-二フェニルアセトアセテート分解活性（エステラーゼ活性）
- N,N-二フェニルアセトアニリド分解活性（アミダーゼ活性）
- Ethyl N-phenylcarbamate加水分解活性（Urethane hydrolase活性）



精製ウレタナーゼのSDS-PAGE

レーン1：分子量マーカー

レーン2：精製組換型ウレタナーゼ

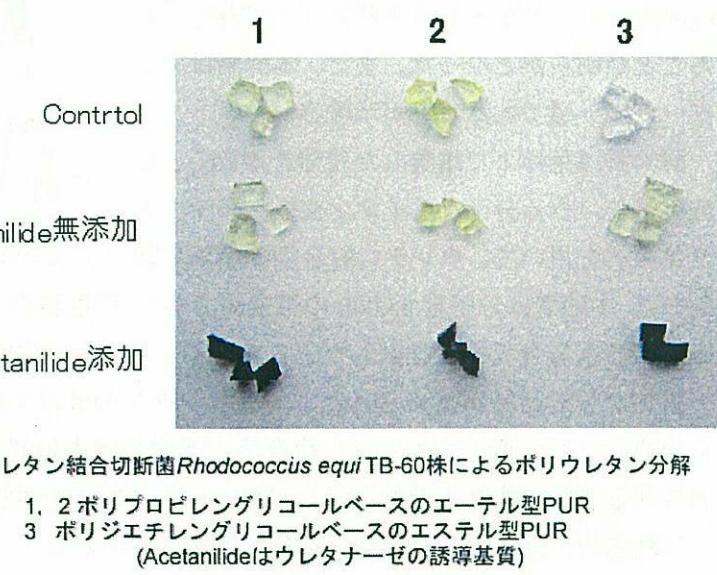
を用いて、N末端及び内部アミノ酸配列の決定を行い、その配列情報をもとに *Rhodococcus equi* TB-60 株のゲノム DNA に存在する当該酵素遺伝子のクローニングを行った。TB-60 株の遺伝子をランダムに導入した大腸菌からコロニーハイブリダイゼーションによって当該酵素遺伝子を含むクローンを抽出した。本酵素遺伝子は 1,419 bp のスクレオチドからなり、472 残基のアミノ酸をコードしていた（推定分子量 50,699 Da）。N 末端から 20 残基のアミノ酸配列 (Met<sup>1</sup>-Ser<sup>20</sup>) は精製した TB-60 株由来ウレタナーゼの 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 (pET25b(+)) に導入し、*E. coli* BL21 (DE3) を宿主として当該タンパクを大量発現させた。菌体を超音波破碎し、遠心して得られた粗酵素液のウレタナーゼ活性を測定したところ、TB-60 株由来のウレタナーゼと同一の性質を示した。

本酵素遺伝子の相同性検索を行ったところ、1 例（文献 6：学位論文のため詳細は不明）を除いてすべて 40%以下の相同性しか示さず、本酵素は極めて特異な新規遺伝子であることが明らかとなった。

最後に、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。写真にその結果を示す。エーテル型ポリウレタン 2 種とエステル型ポリウレタン 1 種を合成し TB-60 株を加えて 10 日間培養を行った。その結果、ウレタナーゼ誘導物質であるアセトアニリ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。このことから、本酵素はポリウレタン中のウレタン結合を切断可能なことが強く示唆された。

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）の違いに関わらず同様に認められた。このことから、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できる可能性が高い。現時点では、本酵素の高分子ポリウレタンに対するウレタン結合切断活性はまだ弱く、実用性に乏しい。しかし、今回遺伝子が得られ、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できる。



## 引用文献

- 1) Darby, R.T., Kaplan, A.M.: Fungal susceptibility of polyurethanes. *Appl. Microbiol.*, **16**, 900-905(1968).

- 2) Jansen, B., Schumacher-Perdreau, F., Peters, G., Pulverer, G.: Evidence for degradation of synthetic polyurethanes by *Staphylococcus epidermidis*. *Zbl Bakter.*, **276**, 36-45 (1991).
- 3) ステファンオーエン, 大谷丘士, 正岡諭, 大江達彦 (発明者) : ウレタン化合物の分解方法および該化合物を分解する菌, 特開平 09-192633 (出願人: レンゴー株式会社)
- 4) Nakajima-Kambe, T., Onuma, F., Kimpara, N., Nakahara, T.: Isolation and characterization of a bacterium which utilizes polyester polyurethane as a sole carbon and nitrogen source. *FEMS Microbiol. Lett.*, **129**, 39-42 (1995).
- 5) Teeraphatpornchai, T., Nakajima-Kambe, T., Shigeno-Akutsu, Y., Nakayama, M., Nomura, N., Nakahara, T., Uchiyama, H.: Isolation and characterization of a bacterium that degrades various polyester-based biodegradable plastics. *Biotechnol. Lett.*, **25**, 23-28 (2003).
- 6) St. John, T.L.: Studies on an amide hydrolase enzyme. *Thesis*, Department of Biology and Biochemistry, University of Bath, UK (2003)

### 3. 1. 2 ポリエステル型プラスチック分解菌の取得と利用

#### (1) 実施の内容

近年環境問題に対する意識の高まりから、プラスチックのリサイクルが注目されている。プラスチック廃棄物の再資源化技術のうち、モノマーリサイクルは、一次生産品と全く同等のプラスチック製品を再生することができる利点がある。特に生分解性プラスチックは、そのほとんどがポリエステル系であり、モノマーリサイクルが容易である。しかし廃棄物は「混合物」であり、一般的な化学分解ではモノマーも混合物で得られてしまう。これを解決するため、本プロジェクトでは分解に酵素を用い、そ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でも高純度のモノマーを効率よく取り出す新たな処理プロセスを提案した。しかし、ポリエステル系プラスチックの微生物分解については、土壤中や活性汚泥中の分解は詳細に検討されており、分解微生物の取得に関する報告もされているが、その分解酵素、遺伝子に関する知見はほとんどない。

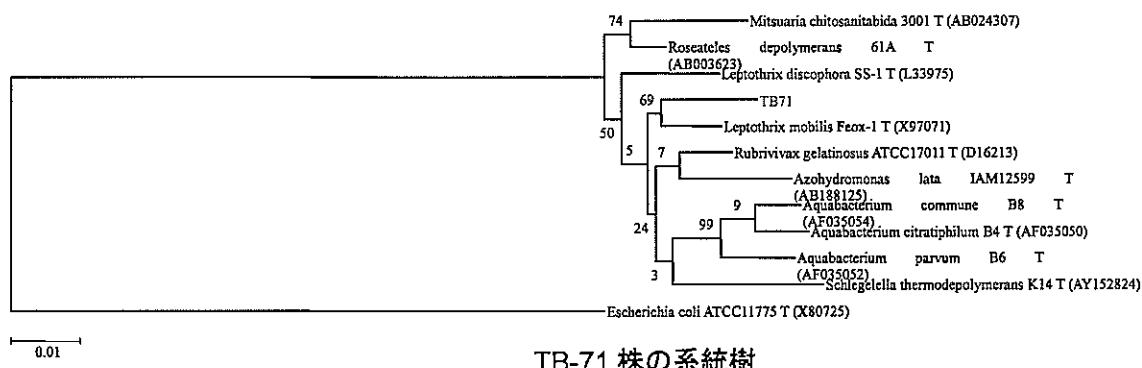
また、すでに取得されている微生物についても、分解対象はエマルジョンや極薄フィルムの分解がほとんどであり、ペレットやディスク状の固形ポリエステル系プラスチックを高効率で分解可能なものはほとんど無い。また、多くの分解微生物が当該プラスチックを唯一の炭素源として利用しており、他の有機物が高濃度に存在すると分解能が著しく低下するか、または消失してしまう。このような微生物は生ごみ処理機への添加や、コンポスト化といった応用を考えた場合、分解活性を失ってしまうために実用化に向かない。このため、他の有機物が高濃度で存在する環境中で高い分解能力を発揮する微生物の取得が期待されていた。

そこで、本プロジェクト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。次いでその分解酵素、分解遺伝子の特定、ならびに大腸菌での大量生産を試みた。スクリーニングに当たっては、コンポスト等の処理にも応用できるように、他の有機物が存在する中でも高い分解活性を維持可能な微生物を検索した。

## (2) 得られた研究成果の状況及び今後期待される効果

### (PBSA 分解菌の取得)

培地として有機物を豊富に含む(乾燥重量で約 8g/l)肉汁培地を用いた。土壤、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(ハロー形成)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 ペレットを添加した肉汁培地に接種し、固体 PBS を分解する菌株 (TB-71 株) を取得した。16S rDNA 塩基配列を用いた同定の結果、本菌株は *Leptothrix* 属の細菌であり、なかでも *L. mobilis* 近縁の新種であると考えられた。

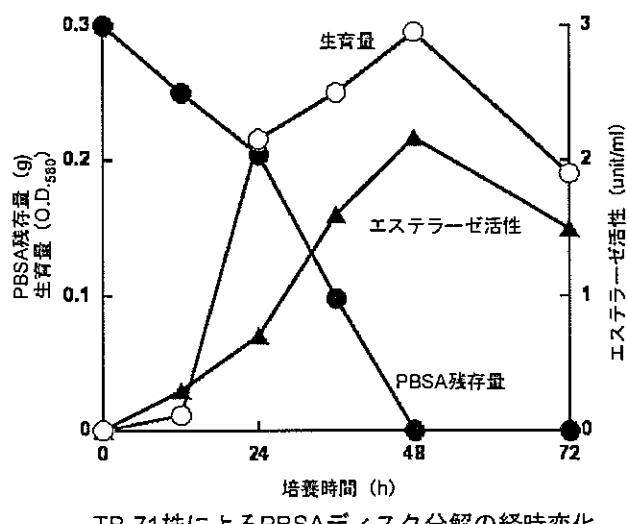


TB-71 株の系統樹

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、ポリブチレンサクシネート-co-アジペート (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。これまでに当グループが取得した PBSA ペレット分解菌 *Acidovolax delafieldii* BS-3 株 (1-3) は、PBSA ペレットを 7 日間で約 150mg 分解しているが、本菌株はそれに比べて 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。また、分解に伴って培養液中に強いエステラーゼ活性が認められ、これが PBSA 分解酵素であることが強く示唆された。

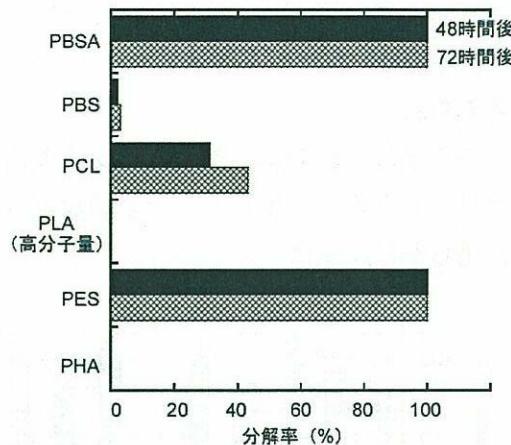
PBSA 以外の各種ポリエステル系生分解性プラスチックに対する分解活性を検討したところ、本菌株は PBSA、ジエチレングリコールサクシネート(PES)、ポリカプロラクトンに対して分解活性を示した。一方ポリブチレンサクシネート(PBS)、ポリヒドロキシアルカノエート(PHA)、ポリ乳酸(PLA)には全く分解活性を示さなかった。

本菌株は培地に有機物を多量に含む場合でも分解活性に全く影響を受けなかった一方で、



TB-71 株による PBSA ディスク分解の経時変化

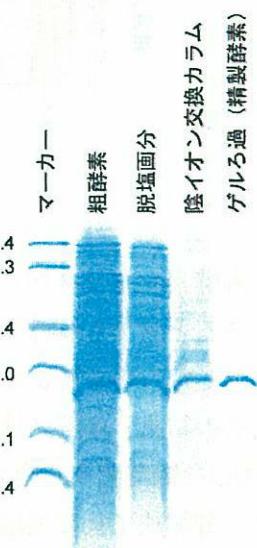
PBSA を唯一の炭素源として与えた場合には逆に全く生育できなかった。このため、コンポスト化や生ごみ処理機への投入には有効であるが、プラスチックのみを基質として用いるモノマーリサイクルには直接応用できない。そこで本菌株からプラスチック分解酵素を精製し、酵素によるモノマーリサイクルの可能性を探った。



TB-71株による各種固体 (300mgのディスク状) プラスチックの分解

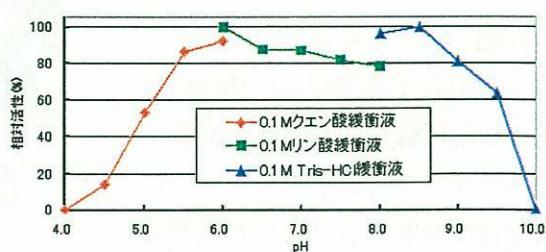
#### (PBSA 分解酵素の精製)

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できることが明らかになった。そこで、固体 PBSA を加えた肉汁培地で TB-71 株を培養し、培養終了後培養液を 8,000rpm で 5 分間遠心、菌体を得た。これを、0.1M リン酸緩衝液 10ml に懸濁し、そこに等量の 0.4% deoxy-BIGCHAP (界面活性剤) 溶液を加え氷上で 30 分間激しく攪拌し、菌体表面に付着したタンパク質を抽出した。その後懸濁液を 15,000rpm で 10 分間遠心し、上清を得た。等量の 0.1M リン酸緩衝液を上清に加えた後、上清に 40% 飽和となるよう硫安を加え氷上で 30 分間攪拌した。遠心して沈殿を除いた後、60% 飽和となるよう硫安を加え同じく攪拌した後、遠心して得られた沈殿を 0.1M リン酸緩衝液 2ml に溶解し、粗酵素液を得た。次いで、粗酵素液を脱塩カラムした後、陰イオン交換カラムに供し、素通り画分を回収して 80% 飽和濃度となるよう硫安を加え氷上で 30 分間攪拌し、22,000rpm、30 分間遠心した。得られた沈殿を 2ml の 0.1M リン酸緩衝液に溶解し、ゲルろ過カラムに供した。活性を有する画分を回収し、80% 飽和濃度となるよう硫安を加えて攪拌し、遠心して得られた沈殿を 1ml の 0.1M リン酸緩衝液に溶解し、精製酵素液を得た。最終的に 2 ℥ の培養液から約 11mg の精製酵素が得られた。



各精製段階での SDS-PAGE

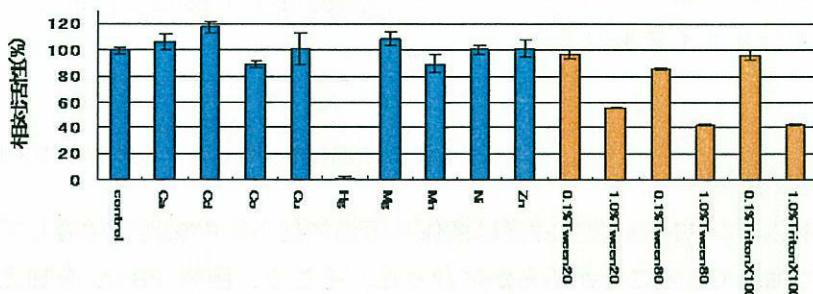
次に得られた酵素を用いて各種性質の検討を行った。SDS-PAGE およびゲルろ過の結果から、本酵素は分子量約 2.7 万の単量体であることが明らかとなった。また、本酵素はポリエステル系プラスチック以外にも p-ニトロフェニルアセテートなどの低分子エステルを分解し、カルボン酸とアルコールを生じることから、エステラーゼの一種であることが明らかになった。至適 pH について検討したところ、本酵素は pH5.0-9.5 の広い範囲で比較的高い活性を維持していることが明らかになった。また至適温度は



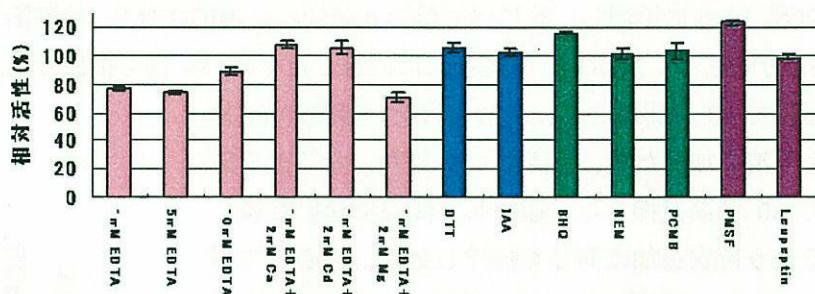
TB-71株由来 PBSA 分解酵素の至適pH

50°Cであり、60°Cでは失活したが、40°Cでは数日間にわたって安定であった。これらの結果から、本酵素はモノマーリサイクルに応用するのに十分な活性 pH 範囲、安定性を持っていいると考えられた。

さらに各種金属、阻害剤に対する感受性の検討を行った。その結果本酵素は水銀イオン以外ではほとんど影響を受けず、一般的なエステラーゼ阻害剤に対しても耐性を持っていることが明らかになった。



2価金属イオン・界面活性剤の影響

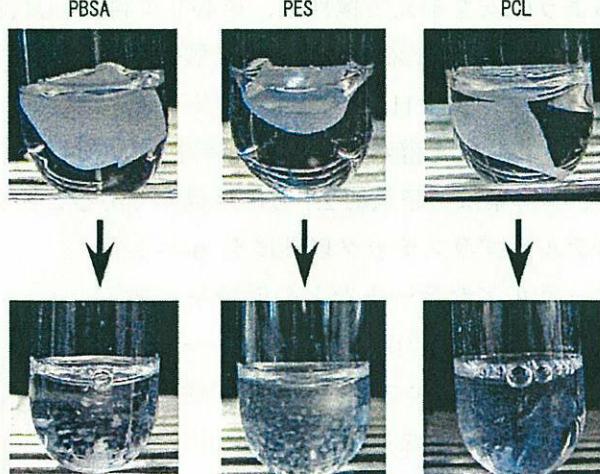


各種阻害剤の影響

本酵素をプラスチックのモノマーリサイクルに用いるためには明確な基質特異性が必要であると考えられる。そこで、各種ポリエステル系生分解性プラスチックをフィルム状に整形したものを基質として分解試験を行った。

その結果、本酵素は固体 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。また、分解終了後の反応液を HPLC にて分析した結果、プラスチックのほぼすべてがモノマーにまで分解されていることが確認された。

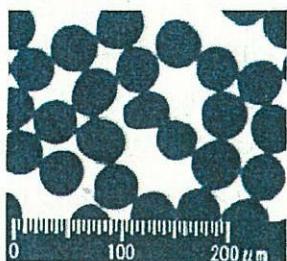
一方、ポリブチレンサクシネート(PBS)、ポリヒドロキシアルカノエート(PHA)およびポリ乳酸(PLA)には全く活性を示さなかった。このことから本酵素は高い基質特異性と分解活性を持ち、かつ固体プラスチックを対応するモノマーにまで完全分解することが可能であった。



TB-71株由来PBSA分解酵素による各種プラスチックの分解  
酵素0.2unit(0.048mg)/ml, 30°C, 1時間反応

### (磁性ビーズを用いた酵素の固定化)

酵素は固定化することにより、扱いが容易になるばかりでなく回収、再利用が簡便になる。そこで、本酵素を磁性ビーズ表面に固定することによって回収・再利用する試みを行った。担体としてはトライアル社製の、粒径が 30~40μm で、カルボキシル基が付加されているポリプロピレンコーティングされた磁性ビーズを用いた。架橋試薬に



磁性ビーズ顕微鏡写真

1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide, hydrochloride を用いて単体表面に本酵素を固定化した。

固定化反応終了後のビーズに *p*-ニトロフェニルアセテートを加えると、速やかに黄色を呈し、強いエステラーゼ活性を有することが確認され、固定化による失活はほとんど認められなかった。

しかし、PBSA フィルム分解実験の結果から、固定化酵素は free の精製酵素に比べ、PBSA フィルムに対する分解産活性が 0.18 倍、エマルジョンに対しても 0.53 倍と、分解能が極端に低下していた。固定化酵素では、重量が重く粒径が大きい磁性ビーズ表面に酵素が結合している。このため free の酵素に比べ、PBSA フィルムのような固体基質との吸着を持続することが困難であることが、分解効率の低下につながったと考えられる。一方で基質が水溶性の場合には活性の低下はほとんど起らなかったことから、本固定化酵素はプラスチック分解以外の他分野への応用を考える必要がある。

### (基質特異性についての基礎的検討)

これまでの検討結果から、本酵素は高い基質特異性を持つことが明らかとなったが、それが何に起因するかについての検討を行った。本酵素は PBSA をモノマーにまで完全分解するが、PBSA と化学構造の似ている生分解性プラスチックである PBS を全く分解しない。PBSA と PBS の違いは、ポリマー内のアジピン酸の存在の有無である。このことからアジピン酸の有無で分解性に差が生じるか確認すべく、PBSA や PBS を構成するオリゴマーを基質とした分解試験を行った。基質としてジエステルであるアジピン酸ジエチル、アジピン酸ジブチル、コハク酸ジエチル、コハク酸ジブチルを用いて、37°C で 24 時間反応を行った。その後、反応液を液体クロマトグラフィーによって分析した。その結果、本酵素はアジピン酸の有無にかかわらず、各種オリゴマーをほとんど分解した。このことから、アジピン酸の存在の有無で PBSA と PBS の分解性の違いが出るわけではなく、基質の化学構造が分解性に直接関係しないということが示唆された。

#### オリゴマーの化学構造と分解率

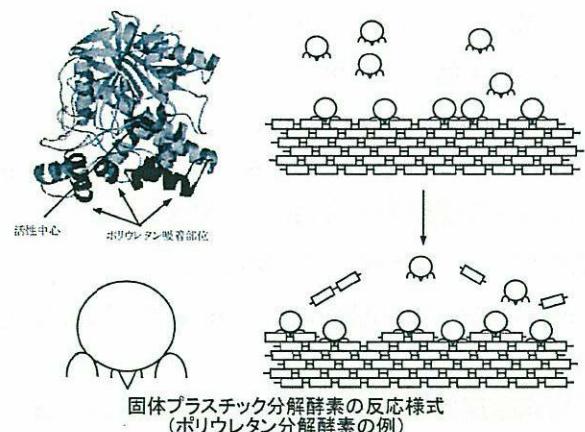
基質	化学構造	分解率
PBSA	—B-S-B-S-B-A—	100%
PBS	—B-S-B-S-B-S—	0%
コハク酸ジブチル	B-S-B	91%
アジピン酸ジブチル	B-A-B	94%

B: ブチル基、S: コハク酸、A: アジピン酸

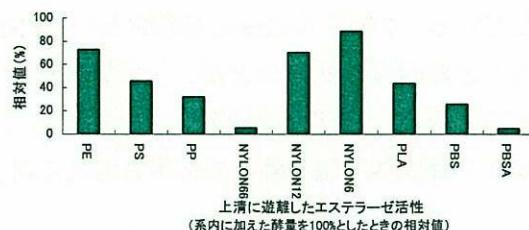
これまでの知見から、プラスチックのような固体基質を分解する酵素は固体表面への結合とその後に起こる分解の 2 段階によって分解されることが知られている。そこで、本酵素の基質への吸着性が分解性に関連しているかを確認するため、各種プラスチックフィル

ムを基質とした吸着試験を行った。実験には、代表的な一般プラスチックであるポリエチレン(PE)、ポリスチレン(PS)、ポリプロピレン(PP)、ナイロン66、ナイロン12、ナイロン6及び、ポリエステル系生分解性プラスチックであるPLA、PBS、PBSAを用いた。

フィルム状に成型した各プラスチックを緩衝液に浸し、酵素を加えて37°Cで15分間反応を行った。その後反応液上清内に遊離している酵素活性を測定した。またプラスチックの分解活性を、反応液上清のTOCを測定することによって求めた。その結果を図に示す。各種フィルムのうち、分解が確認されたものはPBSAのみであった。本酵素はPBSAに強く吸着する一方で、分解性の無いPBSやPLAに対してもある程度吸着した。さらに、まったく分解の見られないNYLON66に対しも強い吸着を示した。このことから、少なくともPBSの分解性と吸着との間には直接的な関係はないと考えられた。今後本酵素の立体構造や活性中心部分等の詳細な解析が必要であると思われる。



固体プラスチック分解酵素の反応様式  
(ポリウレタン分解酵素の例)



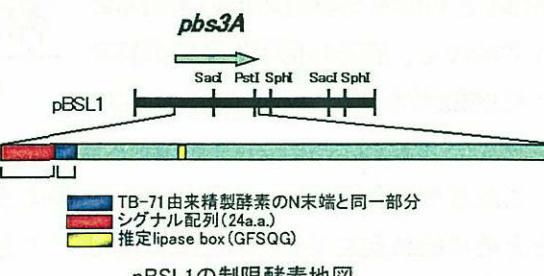
#### (PBSA分解酵素遺伝子の取得)

本酵素について更なる解析を行うと同時に、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。ショットガンクローニングTB-71株のゲノムライブラリーを構築し、ここからエマルジョン化したPBSAを重層した検定培地を用いて分解酵素遺伝子を発現しているクローンを取得した。

約35,000株の形質転換体よりエマルジョンのPBSが分解され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。この形質転換体のプラスミドを抽出し、pBSL1と名付けた。DNA塩基配列を決定したところ、1つのORFが確認され、これを`pbs3A`とした。本遺伝子は849塩基からなり、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。また、ORFのN末端の24アミノ酸はシグナルペプチドに特有の配列がみとめられ、シグナル切断位置から下流の10アミノ酸の配列は、上記のTB-71株由来のPBSA分解酵素の精製標品由來の



PBSA分解酵素を発現した大腸菌  
(周囲のエマルジョンが分解されて透明になっている)



pBSL1の制限酵素地図

配列と完全に一致した。成熟型のタンパク質の分子量は 27190.61 であり、これは SDS-ポリアクリルアミド電気泳動から求めた精製酵素標品の推定分子量とほぼ一致した。またセリンを活性中心とするリパーゼやエステラーゼに特有の配列 (lipase box) の存在が認められた。これらことから本 ORF が TB-71 株の PBSA 分解酵素をコードしている遺伝子であると考えられた。また等電点は 8.42 であった。

得られた遺伝子のアミノ酸配列を元に NCBI の遺伝子データベースに対して BLAST 解析を行った。その結果本酵素遺伝子は既知のいかなる遺伝子とも有意な相同意を示さない、全く新規の遺伝子であることが明らかになった。

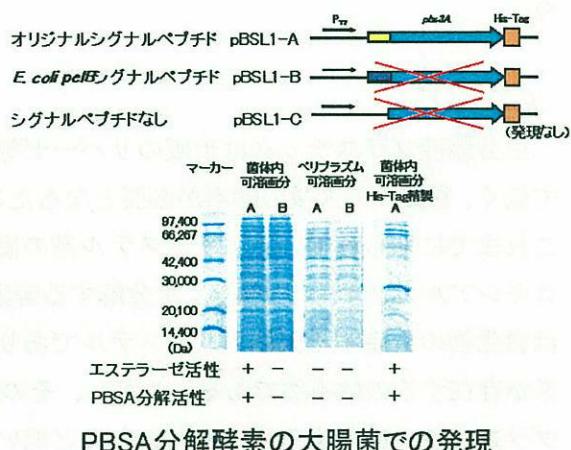
#### (PBSA 分解酵素遺伝子の大腸菌での大量発現)

PBSA 分解酵素遺伝子の大腸菌での大量発現を目的として、本遺伝子を大腸菌発現ベクター、pET 21a(+)に連結した。なお、連結した本遺伝子の下流にはその後の精製を簡便にするために、6×His-Tag が付加されている。これを用いて、大腸菌 BL21(DE3)を形質転換し、30°C にて一晩培養した。得られた形質転換体を大量培養し、酵素精製に用いた。

大量発現に用いた遺伝子には以下の 3 種を用いた。1) オリジナルのシグナル配列を付加したもの、2) 大腸菌由来のシグナル配列(*perB*)を付加したもの、3) シグナル配列を完全に除去したもの。これらを用いて大腸菌での大量発現を試みた。

その結果、本遺伝子はオリジナルのシグナル配列を付加した場合にのみ発現が認められた。しかしながらこの場合でも酵素活性は菌体外、ペリプラズムいずれにもほとんど分泌されず、菌体内に蓄積していた。ただし、シグナルペプチド自体は切断、除去されていた。なお、本実験に使用した大腸菌発現ベクターは IPTG を添加することによって発現量が増大する。しかし本酵素の場合は IPTG を添加することによって逆に酵素活性が低下した。これは IPTG の添加により発現量が増大したタンパクが菌体内で封入体を形成し、失活したものと考えられた。

上記発現系を用いて大腸菌内で発現させた組換え型酵素を精製し、PBSA フィルムの分解実験を行った。その結果本酵素は PBSA フィルムを完全分解し、その活性は TB-71 株から精製した PBSA 分解酵素とほぼ等しかった。



#### (PBSA 分解酵素遺伝子下流の解析)

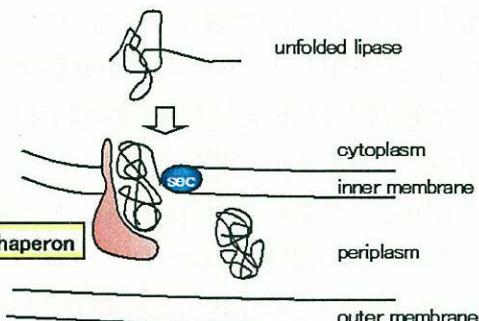
本遺伝子配列の 83bp 下流に、3'側が途切れた不完全な ORF が確認された。BLAST での相同性検索により、本 ORF は細菌由来リパーゼシャペロンタンパクとの相同意が示唆された。そこで、サザンハイブリダイゼーションにより、TB-71 株の全 DNA から完全長の遺伝子をスクリーニングし、その全塩基配列を決定した。この遺伝子がコードするタンパクはアミノ酸 340 残基、分子量 37,052Da であった。またリパーゼシャペロンの特徴である N 末

端側の疎水領域を有していた。このタンパクを Lim3A と命名した。決定したアミノ酸配列を元に再度 BLAST 解析を行ったところ、本遺伝子は *Pseudomonas* 類縁菌のリバーゼシャペロンと 20-30% の相同性が認められた。

これまでに報告されている上記のリバーゼ／リバーゼシャペロンの機能について図に示した。リバーゼシャペロンは当該リバーゼ遺伝子の下流に位置し、リバーゼと一緒に発現すると考えられている。リバーゼは細胞内では不活性型の状態で存在し、シャペロンタンパクが活性型へのリフォーリング内膜通過の補助をしていると考えられている。このため、このタイプのリバーゼシャペロンを持つリバーゼは、単独では活性型のコンフォメーションをとることができない。しかし、TB-71 株由来の PBSA デポリメラーゼ (Pbs3A) は単独で大腸菌内で活性型となることが明らかになっている。このため Lim3A は本酵素の分泌にのみ関わっている可能性が示唆された。そこで、大腸菌発現ベクターに *lim3A* を組み込み、発現を試みたが、発現は認められなかった。現在 TB-71 株の遺伝子破壊によって *lim3A* を破壊した変異株を作成中である。本タンパクの機能を解析することにより大腸菌における組換え型 PBSA 分解酵素の大量発現に有効な知見が得られると考えている。

Lim3Aと他のリバーゼシャペロンとの相同性

<i>Pseudomonas mendocina</i>	25%
<i>Burkholderia cepacia</i>	23%
<i>Chromobacterium violaceum</i>	27%
<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	23%
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	23%



リバーゼシャペロンの働き<sup>(4)</sup>

### (まとめ)

生分解性プラスチックは市販のリバーゼ等によっても分解されるが、その分解性は極めて低く、常識外の大量の酵素が必要となるため、モノマーリサイクルの用途には適さない。これまでに知られているポリエステル系の固体プラスチック分解酵素としては、ポリヒドロキシアルカノエート (PHA) を分解する酵素、PHA デポリメラーゼが挙げられる<sup>(5)</sup>。PHA は微生物の生産する天然ポリエステルであり、これを分解してエネルギー生産を行う代謝系が存在するのは当然である。しかし、その反面本酵素は PHA 以外の他のポリエステル系プラスチックに対する反応性はほとんど無いため、他のプラスチックに応用可能な分解酵素必要とされる。

これまでに当グループで取得されたプラスチック分解酵素としては、*Comamonas acidovorans* 由来のエステル系ポリウレタンの分解酵素<sup>(6-9)</sup>がある。本酵素は、エステル系固体ポリウレタンのエステル結合を切断し、水溶性モノマーを生成する。また *Paenibacillus amylolyticus* TB-13 株由来のポリ乳酸分解酵素<sup>(10,11)</sup>もポリウレタン、PBSA を分解可能である。

すでに取得済みのこれらの分解酵素を適宜組み合わせることにより、混合プラスチック廃棄物からの高純度モノマーの取出しが可能になると考へる。特に本プロジェクトで得ら

れた PBSA 分解酵素は、広い pH 範囲において高い活性を維持する上、安定性が高く失活がほとんど無いことから、モノマーリサイクルの酵素としての利用に向いている。また、基質特異性が厳密であり、反応するプラスチックと反応しないプラスチックがはっきりしている点も、プラスチック混合物からの選択的モノマー化に適している。さらに、本酵素をコードする遺伝子は既知のいかなる遺伝子とも有意な相同性を持たない全く新規な遺伝子であり、その構造と機能の解明を行うことにより、細菌由来リパーゼ／エステラーゼの新たな研究分野の構築に貢献できる可能性が高い。現在本酵素の結晶化、および立体構造の解析を目指して共同研究を始めている。さらに、本酵素は磁性ビーズ等に容易に固定化でき、かつ非常に高い安定性を持つため、たとえばエステル交換反応等によるバイオディーゼルオイルの生産等、新たな応用分野への利用も期待される。

### 引用文献

- 1) 神戸(中島)敏明, 中原忠篤 (発明者) : 生分解性ポリマー分解酵素及びその製造方法, 特開平 11-225755 (出願人: 三菱化学株式会社)
- 2) Uchida, H., Nakajima-Kambe, T., Shigeno-Akutsu, Y., Nomura, N., Tokiwa, Y., Nakahara, T.: Properties of a bacterium which degrades solid poly(tetramethylene succinate)-co-adipate, a biodegradable plastic. *FEMS Microbiol. Lett.*, **189**, 25-29 (2000).
- 3) Uchida, H., Shigeno-Akutsu, Y., Nomura, N., Nakahara, T., Nakajima-Kambe, T.: Cloning and sequence analysis of poly(tetramethylene succinate) depolymerase from *Acidovorax delafieldii* strain BS-3. *J. Biosci. Bioeng.*, **93**, 245-247 (2002).
- 4) Jaeger, F. R. K. E.: Bacterial lipases from Pseudomonas : Regulation of gene expression and mechanisms of secretion. *Biochimie*, **82**, 1023-1032 (2000)
- 5) Jendrossek, D., Schirmer, A., Schlegel, H.G.: Biodegradation of polyhydroxyalkanoic acids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **46**, 451-463 (1996).
- 6) Nakajima-Kambe, T., Onuma, F., Kimpara, N., Nakahara, T.: Isolation and characterization of a bacterium which utilizes polyester polyurethane as a sole carbon and nitrogen source. *FEMS Microbiol. Lett.*, **129**, 39-42 (1995).
- 7) Nakajima-Kambe, T., Onuma, F., Akutsu, Y., Nakahara, T.: Determination of the Polyester Polyurethane Breakdown Products and Distribution of the Polyurethane Degrading Enzyme of *Comamonas acidovorans* Strain TB-35. *J. Ferment. Bioeng.*, **83**, 456-460 (1997).
- 8) Akutsu, Y., Nakajima-Kambe, T., Nomura N., Nakahara, T.: Purification and Properties of Polyester Polyurethane Degradation Enzyme from *Comamonas acidovorans* TB-35. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 62-67 (1998)
- 9) Nomura, N., Akutsu, Y., Nakajima-Kambe T., Nakahara, T.: Cloning and Sequence Analysis of Polyurethane Esterase of *Comamonas acidovorans* TB-35. *J. Ferment. Bioeng.*, **86**, 339-345 (1998)
- 10) Teeraphatpornchai, T., Nakajima-Kambe, T., Shigeno-Akutsu, Y., Nakayama, M., Nomura, N., Nakahara, T., Uchiyama H.: Isolation and characterization of a bacterium that degrades various polyester-based biodegradable plastics. *Biotechnol. Lett.*, **25**, 23-28 (2003)

- 11) Akutsu-Shigeno, Y., Teeraphatpornchai, T., Teamtisong, K., Nomura, N., Uchiyama, H., Nakahara, T., Nakajima-Kambe T.: Cloning and sequencing of a poly(DL-lactic acid) depolymerase gene from *Paenibacillus amyolyticus* strain TB-13 and its functional expression in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 2498-2504 (2003).

### 3. 2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

#### 3.2.1 土壌埋設プラスチック表層微生物叢の解析

##### (1) 実施の内容

前述のように、これまでに取得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できない。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。この矛盾はどこから来るのであろうか？残念ながらこれまで自然界での生分解性プラスチック分解と、そこに生息する微生物の挙動との関連についての知見はほとんどなかった。一般的に土壌1グラム中には $10^8$ の微生物がいるといわれているが、実は人間の手で培養可能な微生物は数%に過ぎない。しかしここ数年の分子生物学的手法の発達で、培養不可能な微生物を含む微生物叢全体の挙動解析が可能になった。そこで、この技術を用いて生分解性プラスチック埋設土壌の微生物生態系の解析を試みた。

##### (2) 得られた研究成果の状況及び今後期待される効果

供試土壌としては、つくば市およびさいたま市の畑土壌を用いた。室温において保存されている土壌を3日間30°Cの恒温条件下に静置し自然乾燥させ、供試土壌とした。ポリプロピレン容器中に土壌500g(乾燥重量)をいれ、150mlの滅菌蒸留水を散布し、定期的に散水することで水分量を一定に保った。ここにディスク状に成型した各種プラスチックを埋設した。ここから定期的にプラスチック片を回収して、その表面より培養法にて細菌数の計測を培養法を用いて行った。

その結果生分解プラスチックと非生分解性プラスチックの間では埋設のごく初期の段階からその表面の細菌数が100倍以上異なっていることが明らかになった。一方、ポリ乳酸表面の生菌数は生分解性プラスチック群と非生分解性プラスチック群のちょうど中間であった。この結果はポリ乳酸の生分解性が低いという事実と矛盾しない。

次に埋設プラスチック表面からDNAを抽出し、ここから細菌の分類の指標となっている遺伝子配列(16S rDNA)を、PCRによって特異的に増幅した後、DGGE(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)法にて解析した。これは、DNAの1塩基の配列の違いも移動度の差として見分けることのできる特殊な電気泳動法であり、異なる1つのバンドにはそれぞれ最低1種の異なる細菌が存在する。本法によって培養困難な微生物を含む全微生物叢の解析が可能となる。



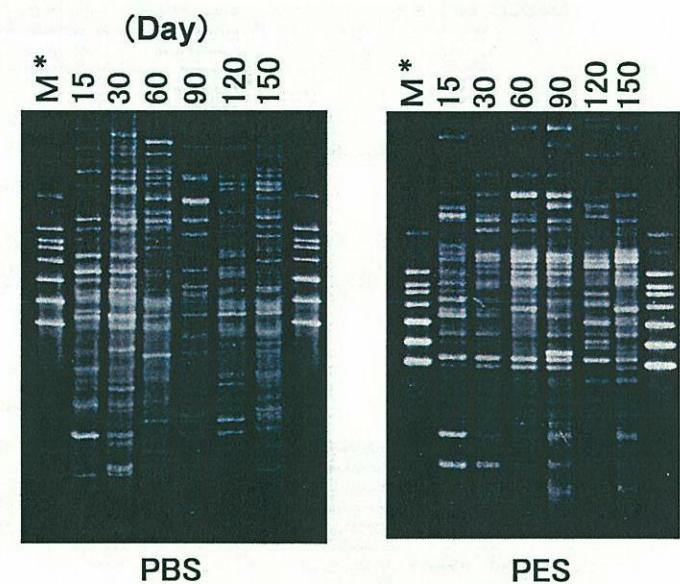
土壌埋設系と埋設したディスク

生分解性プラスチックとしてポリブチレンサクシネート-*co*-アジペート (PBSA) とポリエチレンサクシネート(PES)を用いた場合の泳動パターンを下の写真に示した。生分解性プラスチックの表面には埋設数週間で多数の細菌が住み着き、その後分解に伴い、微生物叢が大きく変動していることがわかる。また、同一の土壤に埋設したにもかかわらず、その菌相は生分解性プラスチックの種類によって大きく異なっていた。さらに、図中のMで示されているレーンは、同じ土壤から PBSA エマルジョンを添加した平板を用いた培養法によって取得した PBSA 分解菌由来 (8種) のバンドである。これをみると、培養法で得られたいわゆる「分解菌」は実際の埋設プラスチック表面にはほとんどないか、また存在していたとしても優占種ではないことがわかる。すなわち、自然界において実際の分解に関与しているのは、培養不可能な菌が多いことが予想される。このため、固体プラスチックを分解可能な高機能分解酵素を取得するには、培養を介さないスクリーニング方法が必要であると思われた。

さらに、得られた PCR 産物 (16S rDNA) を HaeIII、Rsa I の 2種類の制限酵素処理によるバンドパターンの違いから約 15~50 個のクラスターに分類した上で、各クラスターから 1 つ以上の試料について塩基配列を解読し、BLAST 検索により網羅的に菌種を特定した。各日数における存在比を図に示した。

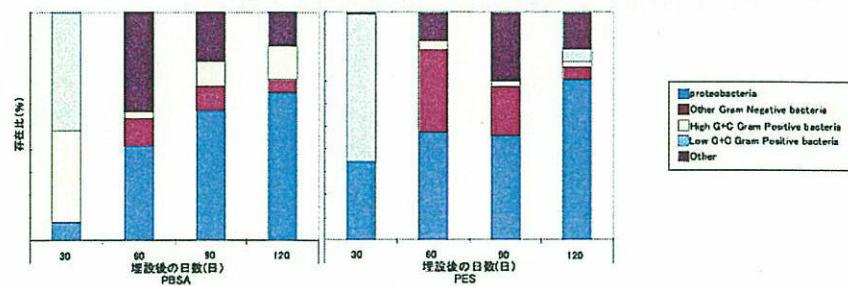
PBSA 表面において、分解初期である 30 日目では低 G C 含量グラム陽性菌が 5 割、次いで高 G C 含量グラム陽性菌が 4 割を占め、大部分がグラム陽性菌であった。中期である 90 日目ではグラム陽性菌の割合が大幅に減少し、グラム陰性菌が約 6 割に増加した。30 日目のように特定の属の菌が優占するようなことはなかった。分解が進み、残存量が初めの 2 割程度になる 120 日目では低 G C 含量グラム陽性菌は認められず、高 G C 含量グラム陽性菌が 1 割、グラム陰性菌が 7 割程を占めるようになり、30 日目の存在比と完全に逆転した。

次に PES 表面において、30 日目では低 G C 含量グラム陽性菌が 7 割を占め、次いで  $\beta$ -Proteobacteria が 3 割を占めていた。



土壤埋設生分解性プラスチック表面の DGGE 解析

畑土壤にプラスチック片(厚さ 0.5mm 直径 40mm)を埋設し、15~150 日後の微生物相を解析した。両プラスチックとも 180 日程度で完全に分解された。PBS:ポリブチレンサクシネート-*co*-アジペート、PES:ポリエチレンサクシネート、M:供試土壤から培養法で単離した PBSA 分解菌 (8種) 由来



埋設プラスチック(PBSA, PES)表面の 微生物群集構造の経時変化

続いて 90 日目ではグラム陰性菌が 6 割弱を占め、内約半数を *α-Proteobacteria* が占めていた。グラム陽性菌は認められず、*Bacteroidetes* や *Acidobacteria* が 3 割を占めていた。PESにおいても、30 日目のように特定の属の菌が優占するようなことはなかった。120 日目になるとグラム陰性菌は 7 割を占めるようになり、その内の 4 割弱を *γ-Proteobacteria* が占めるようになった。グラム陽性菌は減少し、初期には 7 割を占めた低 G+C 含量グラム陽性菌が 5 % にまで減少した。

	30	60	90	120
<b>Alphaproteobacteria</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ <i>Rhodopseudomonas palustris</i></li> <li>➤ <i>Aloisium broomeae</i></li> <li>➤ <i>Devasia</i> sp.</li> <li>➤ <i>Mesorhizobium</i> sp.</li> <li>➤ <i>Nitrobacter</i> sp.</li> <li>➤ <i>Rhizobium</i> sp.</li> <li>➤ <i>Spingomonas</i> sp.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ <i>Arcospirillum</i> sp.</li> <li>➤ <i>Bradyrhizobium</i> sp.</li> <li>➤ <i>Devasia</i> sp.</li> <li>➤ <i>Hypnevicrobium fuscis</i></li> <li>➤ <i>Methylobacterium</i> sp.</li> <li>➤ Uncultured alpha proteobacterium</li> <li>➤ Uncultured Methylobacteriaceae bacterium</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ <i>Asticcacaulis</i> sp</li> <li>➤ <i>Bradyrhizobium</i> sp.</li> <li>➤ <i>Mesorhizobium</i> sp.</li> <li>➤ <i>Phenylobacterium</i> sp.</li> <li>➤ <i>Rhizobium</i> sp.</li> </ul>	
<b>Betaproteobacteria</b>	—	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ <i>Oxalabacteraceae bacterium</i></li> <li>➤ <i>Pseudomonas luteinigens</i></li> <li>➤ <i>Pandoraea pneumoniae</i></li> <li>➤ <i>Ralstonia pickettii</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ <i>Aquabacterium</i> sp.</li> <li>➤ <i>Burkholderia caryophylli</i></li> <li>➤ <i>Herbaspirillum</i> sp.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ <i>Bordetella</i> sp.</li> <li>➤ <i>Herbaspirillum</i> sp.</li> <li>➤ <i>Pandoraea</i> sp.</li> <li>➤ <i>Rhodoflexus</i> sp.</li> </ul>
<b>Gammaproteobacteria</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ <i>Rhodanobacter</i> sp.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ <i>Xanthomonadaceae bacterium</i></li> <li>➤ <i>Xanthomonas</i> sp.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ <i>Aquicella ciphonif</i></li> <li>➤ Gamma proteobacterium</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Arsenic resistant soil bacterium</li> <li>➤ <i>Sphaerotilus</i> sp.</li> </ul>
<b>Deltaproteobacteria</b>	—	—	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ <i>Cytophaga ferruginea</i>*</li> <li>➤ Uncultured Myxococcales</li> </ul>	—
<b>Other Gram Negative bacteria</b>	—	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ <i>Acidobacteria</i> bacterium</li> <li>➤ <i>Bacteroidetes</i> bacterium*</li> <li>➤ <i>Flexibacter tractus</i>*</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ <i>Bacteroidetes</i> bacterium</li> <li>➤ <i>Flexibacter aggregans</i>*</li> <li>➤ Uncultured Bacteroidetes bacterium</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ <i>Bacteroidetes</i> bacterium</li> <li>➤ Uncultured <i>Geobacter</i> sp.*</li> </ul>
<b>High G+C Gram Positive bacteria</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ <i>Arthrobacter chlorophenolicus</i></li> <li>➤ <i>Streptomyces</i> sp.</li> <li>➤ <i>S. nandinisticum</i></li> <li>➤ <i>Streptomyces flavospinosus</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ <i>Mycobacterium magerense</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ <i>Armatimonas pretoriensis</i></li> <li>➤ Uncultured actinobacterium</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ <i>Actinomyces</i> sp.</li> <li>➤ <i>Ferrimicrobium acidiphilum</i>*</li> <li>➤ <i>Mycobacterium casei</i></li> <li>➤ <i>Nocardioides</i> sp.</li> </ul>
<b>Low G+C Gram Positive bacteria</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ <i>Agrobacterium tumefaciens</i></li> <li>➤ <i>Bacillus anthracis</i></li> <li>➤ <i>Bacillus megaterium</i></li> <li>➤ <i>Bacillus mucilaginosus</i></li> <li>➤ <i>Bacillus pumilus</i></li> <li>➤ <i>Bacillus</i> sp.</li> <li>➤ <i>Paenibacillus amylyticus</i></li> </ul>	—	—	—
<b>Other</b>	—	ES(16)*	ES(8)* uncultured bacterium	ES(5)*

### クローンライブリ法による PBSA 表面の微生物の同定結果

16S rDNA の一部(約 520b)を BLAST に供し、95%以上で最も高い相同意を示した菌に特定した。

\*印の付いているものは相同意が最も高いものでも 95%未満を示したもの。

PBSA 分解菌として報告のある属の菌は赤字で示した。

	SO	60	SO	120
<b>Alphaproteobacteria</b>	—	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ <i>Afrix felis</i> sp.</li> <li>➤ <i>Devosia</i> sp.</li> <li>➤ <i>Nirbacter</i> sp.</li> <li>➤ <i>Oligotrophus carbonicivorans</i></li> <li>➤ <i>Rhizobium</i> sp.</li> <li>➤ Uncultured alphaproteobacterium</li> <li>➤ Uncultured Nitrobacter sp.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ <i>Afrix felis</i> sp.</li> <li>➤ <i>Phenylobacterium</i> sp.</li> <li>➤ <i>Rhizobium</i> gen.sp.</li> <li>➤ <i>Sphaeromonas</i> sp.</li> <li>➤ Uncultured alpha proteobacterium</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ <i>Afrix</i> sp.</li> <li>➤ Endosymbiont of Acanthamoeba polyphaga*</li> <li>➤ Rhizobiales bacterium</li> <li>➤ <i>Sphaeromonas</i> sp.</li> </ul>
<b>Betaproteobacteria</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ <i>Burkholderia</i> sp.</li> <li>➤ <i>Ralstonia picketii</i></li> <li>➤ <i>Pseudomonas lemoignei</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ <i>Bordetella</i> sp.</li> <li>➤ <i>Burkholderia</i> sp.</li> <li>➤ <i>Pandoraea pneumoniae</i></li> <li>➤ <i>Pandoraea pulmonicola</i></li> <li>➤ <i>Ralstonia picketii</i></li> <li>➤ <i>Dyamonas todii</i></li> <li>➤ <i>Fretvilia aurantica</i>*</li> <li>➤ Gamma proteobacterium</li> <li>➤ <i>Nevskia ramosa</i>*</li> <li>➤ Uncultured gamma proteobacterium</li> <li>➤ Uncultured gamma proteobacterium</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ <i>Alcaligenes</i> sp.</li> <li>➤ Beta proteobacterium</li> <li>➤ <i>Pandoraea</i> sp.</li> <li>➤ <i>Ralstonia picketii</i></li> <li>➤ <i>Thiobacillus</i> sp.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ <i>Herbaspirillum</i> sp.</li> <li>➤ <i>Ralstonia</i> sp.</li> <li>➤ <i>Thiobacillus</i> sp.</li> </ul>
<b>Gammaproteobacteria</b>	—			
<b>Deltaproteobacteria</b>	—			<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ <i>Chondromyces</i> sp.</li> </ul>
Other Gram Negative bacteria	—	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Acidobacteria bacterium</li> <li>➤ Flavobacteria symbiont of <i>Aeromymex oboesinus</i></li> <li>➤ <i>Gemmatimonas aurantica</i>*</li> <li>➤ <i>Mitospira</i> sp.</li> <li>➤ Uncultured Acidobacteriales bacterium</li> <li>➤ Uncultured Bacteroidetes bacterium*</li> <li>➤ Uncultured Halophaga sp.*</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Bacteroidetes bacterium</li> <li>➤ <i>Flexibacter aggregans</i>*</li> <li>➤ Flavobacteria symbiont of <i>Aeromymex</i></li> <li>➤ <i>Optitutus</i> sp.*</li> <li>➤ Uncultured <i>Geothrix</i> sp.*</li> <li>➤ Uncultured <i>Halophaga</i> sp.*</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Bacteroidetes bacterium</li> <li>➤ <i>Oscillatoriopsis</i> sp.*</li> </ul>
High G+C Gram Positive bacteria	—	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ <i>Macrococcus</i> sp.</li> <li>➤ <i>Rubrobacter</i></li> <li>➤ Uncultured Chloroflexi bacterium</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ <i>Microbacterium brisbanense</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ <i>Mycobacterium</i> sp.</li> </ul>
Low G+C Gram Positive bacteria	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ <i>Bacillus clausii</i></li> <li>➤ <i>Bacillus drentensis</i></li> <li>➤ <i>Bacillus sporothermophilus</i></li> <li>➤ <i>Pseudobacillus laetus</i></li> </ul>	—	—	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ <i>Pseudobacillus</i> sp.</li> </ul>
Other	ES(1)*	ES(7)* Unclassified bacterium	ES(14)*	ES(6)*

### クローンライブラリ法による PES 表面の微生物の同定結果

このように埋設プラスチック表面にはプラスチックの種類ごとに異なる微生物叢が形成され、分解の進行とともに大きく変化することが明らかとなった。また先ほどの結果から、培養困難な微生物が分解の中心的役割を果たしている可能性が高いことから、プラスチック表面の DNA(メタゲノム)から分解遺伝子の直接検索を行うことによって未知の基質特異性の高いプラスチック分解遺伝子が取得可能ではないかと考えられた。

### 3.2.2 メタゲノムスクリーニングによる新規プラスチック分解酵素の取得

#### (1) 実施の内容

近年、「メタ(超)ゲノム」スクリーニングと呼ばれる新たな概念と手法が米国を中心に広まりつつある。これまでの古典的なスクリーニングでは通常微生物を探すが、この方法

では培養可能なごく一部の微生物しか得られない。自然界の微生物の99%は培養不可能であるため、従来型のスクリーニングでは新規酵素を得るのは難しい。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できる。

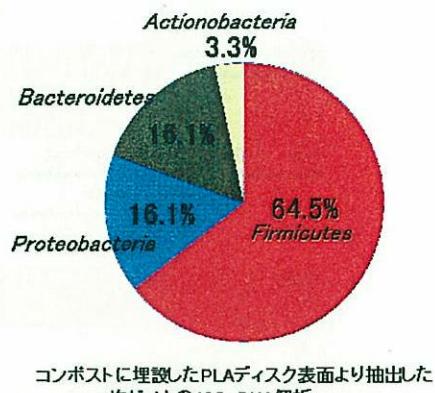
メタゲノムスクリーニングは、培養不可能な微生物をも検索対象とできる反面、母集団が極めて大きくなるため、目的遺伝子を探し出すための手間も比例して大きくなる。このためその特徴とは裏腹に、これまでに報告されている成功例の多くは既知遺伝子と極めて類似したものであり、新規な遺伝子は（網羅的に検索した場合を除いて）ほとんど無い。本プロジェクトでは前述の知見を元に、土壌に埋設した生分解性プラスチックの表面からDNAを抽出し、プラスチック分解酵素遺伝子のメタゲノムスクリーニングを行った。この方法では対象となる母集団（DNA源）がプラスチック表面に集積したものののみであり、闇雲に土壌全体を対象とした場合に比べて非常に高効率で目的遺伝子を探し出すことができる。さらにプラスチック表面には培養困難な分解菌の存在が示唆されており、新規遺伝子を取得できる可能性が非常に高い。本プロジェクトではポリエステル系生分解性プラスチックのうち特に微生物分解が困難であるポリ乳酸を対象とした。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スクリーニング源に用いた。

## (2) 得られた研究成果の状況及び今後期待される効果

ディスク状に成形したPLAをコンポストへ埋設し、65°Cにて10日間静置した後、PLAディスクを採取し、その表面に付着した菌のDNAを直接抽出した。メタゲノムスクリーニングに先立ち、埋設したPLAディスク表面の微生物叢の解析を前項と同様の方法で行った。PLAの表層にはFirmicutes門の細菌が優占していた。これは、コンポストが高温（60°C）であるため中等度高熱菌の多くが含まれる同門が優占したのではないかと思われた。

次に、取得したDNAをSau3AIにて限定分解し、pUC18ベクターを用いたメタゲノムライブラリーを構築した。PLA分解活性のスクリーニングは、PLAエマルジョンを重層したLuria-Bertani(LB)寒天培地上で、clear zone形成能を有する株を検出することにより行った。

メタゲノムライブラリー40,000株のスクリーニングの結果、PLA分解活性を示す株を7株取得した。その株が有するプラスミドをそれぞれpLA-M4, 5, 7, 8, 9, 10, 11とした。各プラスミドの有するinsert DNAの塩基配列を決定した結果、PLA分解酵素遺伝子と思われる



プラスチック分解酵素を発現した大腸菌コロニー（コロニー周辺にクリアーゾーンが形成される）

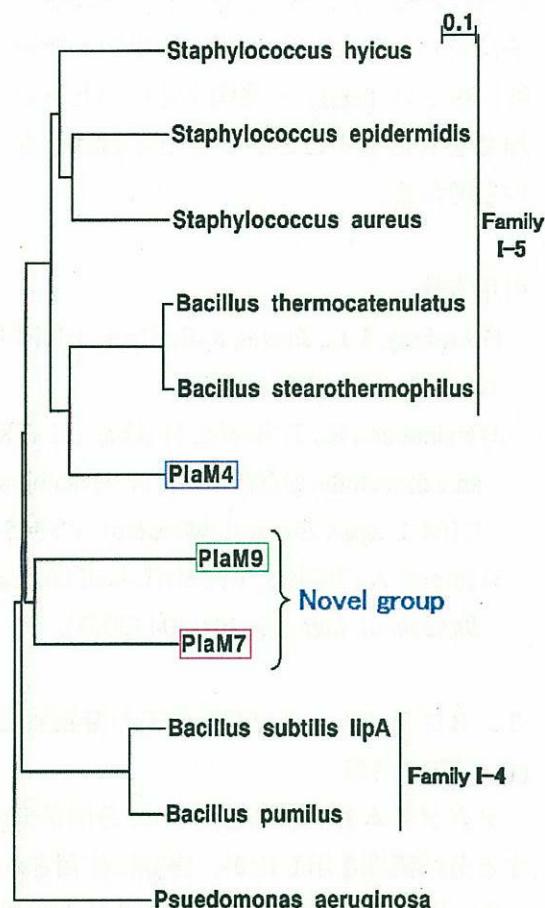
ORFを見出し、これらをそれぞれ *plaM4*, *M5*, *M7*, *M8*, *M9*, *M10*, *M11*とした。BLAST解析の結果、これらの遺伝子はいずれも *Bacillus* 属のリパーゼ遺伝子と最も高い相同意を示したが、アミノ酸配列においても 50%以上の相同意を示す既知遺伝子は見られなかった。これら 7 種の遺伝子のうち *plaM4* と *M5*, *M10*、および *plaM7* と *M8*, *M11* は互いに 90~95%の相同意を有していた。しかし、その上流および下流の遺伝子配列は全く異なっているところから、これらはすべて異なる菌から得られたものと推察された。

さらにこれらの遺伝子を相同意の認められた *Bacillus* 属菌のリパーゼとともに相同意解析を行い、系統樹を作成した（右図）。

細菌由来のリパーゼについては Arpigny と Jaeger(1)によって大きく 8 つのファミリーに分類されている。このうち *Bacillus* 由来のリパーゼは family I-4 および I-5 に属しており、それぞれ常温性、好熱性菌由来のリパーゼが含まれている。系統樹解析の結果、今回得られたものの内 *plaM4* グループは family I-5 に含まれていたが、ほかの 2 グループは family I-4, I-5 のどちらにも属さず、独自のグループを形成していた。このことから、これらの遺伝子はまったく新規の family を構成すると考えられた。

次に、これらのうち最も耐熱性の高かった *plaM4* を発現ベクター pET21a(+)に導入し、*E. coli* BL21(DE3)にて大量発現および発現タンパク質の精製を行った。精製 PlaM4 は 70°Cにおいて最も高いエステラーゼ活性を有し、50°Cにて 2 時間のインキュベーションを行つた後でも、その活性を 70%保持していた。このことから、PlaM4 は熱安定性・好熱性の PLA 分解酵素であることが明らかとなった。そこで、本酵素を用いた固体 PLA 分解試験を行つた。その結果本酵素は分子量 20,000 までのポリ乳酸粉末を分解可能あることが示された。しかし、一般的な製品に使用される分子量 130,000 の高分子 PLA にはほとんど活性を示さなかつた。

ポリエステル系生分解性プラスチックのうち PLA は自然環境中での分解活性が低いことが知られており、その分解菌の報告も極めて少ない、特に高分子量のポリ乳酸の分解菌、分解酵素についての知見はほとんど無く、わずかに数種の放線菌が分泌するプロテアーゼによる分解が報告されている(2,3)。しかし、プロテアーゼはタンパク質分解酵素であるため、モノマーリサイクルに応用する場合には自己分解等の問題を起こす可能性がある。ポリ乳酸は水分が存在すれば高温下で自己触媒的に加水分解され低分子化することが知られている。このため高温条件下で十分な活性、安定性を持たせることができれば本研究で得られ



た酵素が利用可能ではないかと考えられる。

本研究では前項の成果を踏まえて新規プラスチック分解遺伝子のメタゲノムスクリーニングによる直接取得を試み、これまで同法では困難であった新規遺伝子の取得に成功した。また、得られた分解遺伝子はリバーゼに関するこれまでの研究分野に新しい family を提唱するにいたる新知見をもたらすことができた意義は大きいと考える。

#### 引用文献

- 1) Arpigny, J. L., Jaeger, K-E.: Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochem. J.*, **343**, 177—183 (1999).
- 2) Nakamura, K., T. Tomita, N. Abe, and Y. Kamio. 2001. Purification and characterization of an extracellular poly(L-lactic acid) depolymerase from a soil isolate, Amycolatopsis sp. strain K104-1. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 345—353
- 3) Jarerat, A., Tokiwa, Y.: Poly(L-lactide) degradation by Saccharothrix waywayandensis. *Biotechnol. Lett.*, **25**, 401-404 (2003).

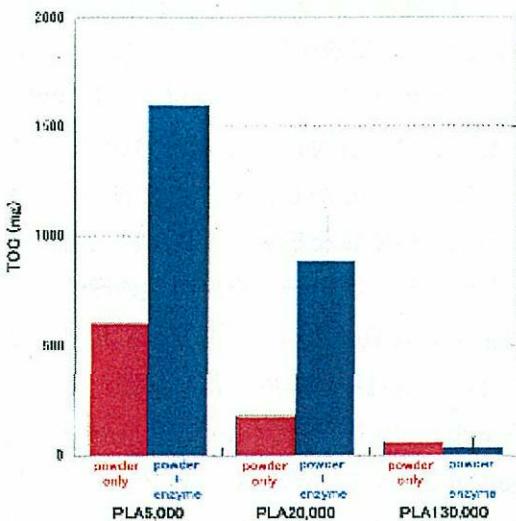
### 3. 3 プラスチック分解遺伝子の機能強化

#### (1) 実施の内容

メタゲノムより取得した PLA 分解酵素(PlaM4)は熱安定性の性質を示し、固体 PLA に対する分解活性を示したが、実際に使用される高分子の PLA を直接分解することはできなかった。酵素法によるモノマーリサイクルを現実のものとするためには高分子 PLA を分解することが必須条件であるため、DNA shuffling による *plaM4* の進化工学的改変を行うこととした。

本プロジェクトでは *plaM4* と同時に *plaM4* と約 90%の相同性を示す *plaM5* を取得しているため、この 2 種の遺伝子を用いて DNA shuffling を行った。DNA-shuffling は相同性の高い数種の配列間で相同組換えをおこさせる手法である。一般的には DNase I による限定分解を行うが、条件設定が困難であるので Miyazaki(1)によって開発された endonuclease V を使った新しい簡便な方法を用いた。

PLA は高温条件下では非酵素的に加水分解を起こしやすい高分子ポリマーであるため、高温条件下で放置すると PLA は自然に低分子化する。低分子化した PLA ならば PlaM4 はこれを分解することができるため、本研究では 60°C 以上の長期高温条件下でもその活性を失わない PlaM4 変異体を取得することを目的とし、熱安定性の向上に重点を置いて変異体のスクリーニングを行った。



PlaM4 の固体PLAに対する分解能

## (2) 得られた研究成果の状況及び今後期待される効果

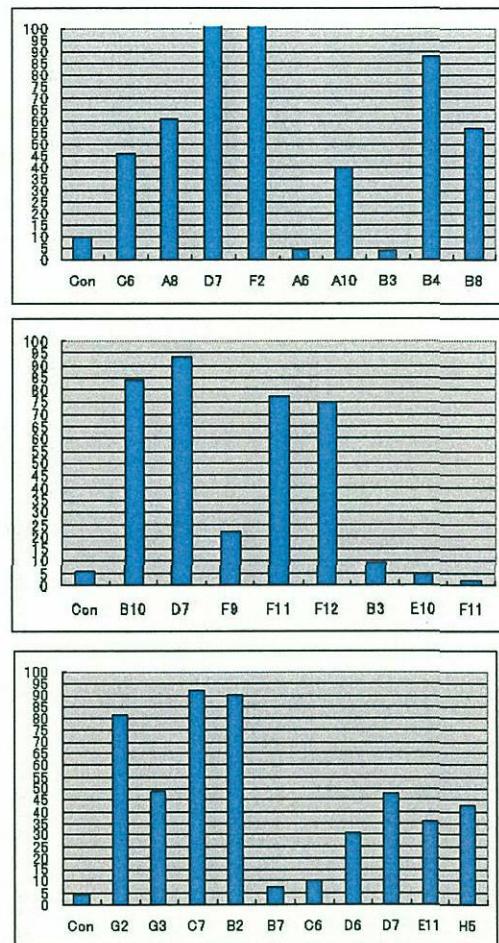
DNA-shufflingにはMiyazaki(1)の方法を用いた。まずPCR反応液に一定量のdUTPを加えることによって、テンプレートDNAのチミンをランダムにウラシルへ置換した。続いて、DNA中のウラシルから3~4塩基下流で塩基配列を切断するendonuclease VによりDNAを断片化した。200-300bpに断片化したplaM4およびplaM5をPCR反応によりre-assembleさせ、発現ベクターpET25b(+)へ挿入した。構築したプラスミドをE. coli BL21(DE3)へ導入し、生育したコロニーを1%PBSAエマルジョンを重層した検定用プレートへレプリカし、clear zoneの形成を確認した。

PBSAエマルジョンを重層したLB、Ap、IPTGプレートに生育したコロニーのうち、約8割のコロニーがclear zoneを形成した。さらに、clear zoneの形成能はコロニーによって大小または透明度が様々であり、shufflingにより多様な変異体が得られたことが確認できた。

次に、構築した変異体ライブラリーからの熱安定性向上株のスクリーニングを行った。構築したライブラリーを96 well microtiter plateで30°Cで一晩培養し、IPTGによる発現誘導後、50°Cで一晩の熱処理を行った。その後、controlとして用いたnative PlaM4と活性を比較した。

その結果、ライブラリー570株から、27株の熱安定性向上候補株が得られた。これら27株を培養後超音波破碎により粗酵素液を得、60°Cで2hrの熱処理後の残存活性を測定した。controlとして用いたnative plaM4の残存活性と比較した結果、その多くに耐熱性の向上が認められ、特にD7, F2の2種の変異体は全く失活が見られず、きわめて高い熱安定性を持つことが明らかとなった。

今回確立された方法は他のプラスチック分解酵素にも応用可能であり、今後対象を広めてさらに検索を行ってゆく予定である。また、DNAシャッフルングには塩基配列の類似した遺伝子が複数必要なため、TB-71株由来のPBSA分解酵素のようなきわめて特殊な配列を持つものには直接応用できないが、この場合にはerror-prone-PCRなどを併用して行うことを検討している。



DNAシャッフルングで得られた各種変異体の耐熱性  
60°C, 2時間処理後の残存活性、con:PlaM4

## 引用文献

- Miyazaki, K.: Random DNA fragmentation with endonuclease V : application to DNA shuffling. *Nucleic Acid. Res.*, 30, 139 (2002).

## 4 研究実施体制

### (1) 体制

本研究課題は、個人研究である「さきがけ研究」からの移行であるため、研究グループの構築は行っていない。

(2) メンバー表

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
茂野ゆき枝	筑波大学	SORST 研究員	プラスチック分解酵素のクローニングとタンパク質工学	平成15年10月～平成17年3月
豊島貴英子	筑波大学	SORST 研究員	GC-MS, LC-MS のオペレーションと管理	平成15年10月～平成17年9月
坂本恵美	筑波大学	研究補助員		平成17年4月～平成17年9月
真弓大介	筑波大学	大学院生	メタゲノム解析	平成17年9月～平成18年3月
佐藤愛美	筑波大学	大学院生	遺伝子解析	平成17年9月～平成18年3月
高口均	筑波大学	大学院生	酵素取得	平成17年9月～平成18年3月
結城裕子	筑波大学	大学院生	生態系の解析	平成17年9月～平成18年3月

5 研究期間中の主な活動

(1) ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要

(2) 招聘した研究者等

氏名(所属、役職)	招聘の目的	滞在先	滞在期間

6 主な研究成果 ※C R E S T 研究に係わるもの全て記載

(1) 論文発表 (国内2件、海外6件)

- 1) Akutsu-Shigeno, Y., Y. Adachi, C. Yamada, K. Toyoshima, N. Nomura, H. Uchiyama, and T. Nakajima-Kambe : Isolation of a bacterium that degrades urethane compounds and characterization of its urethane hydrolase. Appl. Microbiol. Biotechnol., 005 Jul 23, 1-8, 2005
- 2) Jin H., T. Nakajima-Kambe, Y. Akutsu-Shigeno, M. Nakashima, T. Shigeno, N. Nomura, H. Uchiyama : Effects of polylactate ester-type time-release electron donor on generating and maintaining reductive condition in river sand microcosms. Chikasui Gakkai Si, 47, 323-332, 2005

- 3) Jin H., T. Nakajima-Kambe, Y. Akutsu-Shigeno, M. Nakashima, T. Shigeno, N. Nomura, H. Uchiyama : Isolation and Characterization of Bacteria that Degrade Poly (Lactic Acid-Glycerol Ester)-Type Time-Release Electron Donor for Accelerated Biological Reductive Dechlorination. *Macromolecular Symposia*, 224, 155-166, 2005
- 4) Nakajima-Kambe, T., N. Okada, M., Takeda, Y. Akutsu-Shigeno, M. Matsumura, N. Nomura, and H. Uchiyama : Screening of Novel Cellulose-Degrading Bacterium and Its Application to Denitrification of Groundwater. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 99, 429-433, 2005
- 5) Akutsu-Shigeno, Y., T. Teeraphatpornchai, K. Teamtisong, N. Nomura, H. Uchiyama, T. Nakahara, T. Nakajima-Kambe : Cloning and sequencing of a poly(DL-lactic acid) depolymerase gene from *Paenibacillus amylolyticus* strain TB-13 and its functional expression in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 2498-2504, 2003
- 6) Teeraphatpornchai, T, T. Nakajima-Kambe, Y. Shigeno-Akutsu, M. Nakayama, N. Nomura, T. Nakahara, and H. Uchiyama : Isolation and characterization of a bacterium that degrades various polyester-based biodegradable plastics, *Biotechnology Letters*, 25, 23-28, 2003
- 7) 中島(神戸)敏明：プラスチック分解菌とモノマーリサイクル. *プラスチックス*, 57, 52-55, 2005
- 8) 中島(神戸)敏明：酵素によるプラスチックのバイオケミカルリサイクル. *化学工業*, 55, 678-682, 2004

(2) 口頭発表

- ①招待、口頭講演 (国内 10 件、海外 0 件)
- 1) 藤田智大、坪（茂野）ゆき枝、野村暢彦、内山裕夫、中島（神戸）敏明（筑波大学、SORST）：新規ポリウレタン分解酵素の固体基質分解機構の解析：日本農芸化学会 2004 年度大会（2004 年 3 月）
- 2) 坪（茂野）ゆき枝、山田智盛、豊島貴英子、野村暢彦、内山裕夫、中島（神戸）敏明（筑波大学、SORST）：*Rhodococcus equi* A1 株が生産するウレタン結合切断酵素の精製および諸性質：日本農芸化学会 2004 年度大会（2004 年 3 月）
- 3) 坪（茂野）ゆき枝、豊島貴英子、野村暢彦、内山裕夫、中島（神戸）敏明（筑波大学、SORST）*Rhodococcus equi* TB60 株由来のウレタナーゼ遺伝子のクローニングと発現：日本生物工学会平成 16 年度大会（2004 年 9 月）
- 4) 中島 誠、武 晓峰、茂野俊也、中島（神戸）敏明（筑波大学、SORST、国際航業）：CAHs の自然減衰促進における還元力についての基礎的検討（その 1）－ポリ乳酸エステル系有機物の添加による還元力生産の基本的特性－：日本地下水学会 2004 年秋季講演会（2004 年 11 月）
- 5) 佐藤愛美、坪（茂野）ゆき枝、野村暢彦、内山裕夫、中島敏明（筑波大学、SORST）：*Leptothrix* sp. 3A 株由来 PBSA デポリメラーゼの解析：日本生物工学会平成 17 年度大会（2005 年 11 月）
- 6) 高口均、坪（茂野）ゆき枝、野村暢彦、内山裕夫、中島敏明（筑波大学、SORST）：*Leptothrix* sp. 3A 株由来プラスチック分解酵素の諸性質：日本生物工学会平成 17 年度大会（2005 年 11 月）

- 7) 真弓大介、坪(茂野)ゆき枝、野村暢彦、内山裕夫、中島敏明(筑波大学、SORST)：メタゲノム由来新規生分解性プラスチック分解酵素遺伝子の性質：日本生物工学会平成17年度大会(2005年11月)
- 8) 中島敏明(筑波大学、SORST)：プラスチック分解遺伝子の探索とリサイクルへの利用：日本生物工学会平成17年度大会(2005年11月)
- 9) 中島敏明(筑波大学、SORST)：プラスチック分解遺伝子の探索とモノマーリサイクル：JST・SORSTジョイントシンポジウム(4)「クロスオーバーする生命と化学」千里ライフサイエンスセンター(2005年12月)
- 10) 土屋未来、結城裕子、野村暢彦、内山裕夫、中島敏明(筑波大学、SORST)：土壤に埋設したプラスチック表層の微生物群集動態の解析：日本農芸化学会2006年度大会(2006年3月)
- ②ポスター発表 (国内 9件、海外 2件)
- 1) 中島敏明、大森威宣、坪(茂野)ゆき枝、関口博之、野村暢彦、内山裕夫(筑波大学、SORST)：Assessment of Ecological Impact of Biodegradable Plastic in Soil Microbial Community : The 8th World Conference on Biodegradable Polymers and Plastics (BDPP8) ソウル(大韓民国)(2004年6月)
- 2) 金赫華、中島敏明、坪(茂野)ゆき枝、中島誠、茂野俊也、野村暢彦、内山裕夫(筑波大学、SORST、国際航業)：Isolation and Characterization of Bacteria that Degrade Polylactide-type Time-release Electron Donor for Accelerated Biological Reductive Dechlorination : The 8th World Conference on Biodegradable Polymers and Plastics (BDPP8) ソウル(大韓民国)(2004年6月)
- 3) 高口均、坪(茂野)ゆき枝、野村暢彦、内山裕夫、中島敏明(筑波大学、SORST)：ポリエステル系生分解性プラスチック分解酵素の精製とその諸性質：日本農芸化学会2005年度大会(2005年3月)
- 4) 佐藤愛美、坪(茂野)ゆき枝、野村暢彦、内山裕夫、中島敏明(筑波大学、SORST)：ポリエステル系生分解性プラスチック分解酵素遺伝子の解析：日本農芸化学会2005年度大会(2005年3月)
- 5) 結城裕子、坪(茂野)ゆき枝、野村暢彦、内山裕夫、中島敏明(筑波大学、SORST)：土壤埋設生分解性プラスチック表面の微生物群集動態の解析：日本農芸化学会2005年度大会(2005年3月)
- 6) 真弓大介、坪(茂野)ゆき枝、野村暢彦、内山裕夫、中島敏明(筑波大学、SORST)：メタゲノムからの生分解性プラスチック分解酵素遺伝子の探索：日本農芸化学会2005年度大会(2005年3月)
- 7) 結城裕子、土屋未来、野村暢彦、内山裕夫、中島敏明(筑波大学、SORST)：クローンライプラリー法による埋設プラスチック表層の微生物叢解析：日本微生物生態学会第21回大会(2005年11月)
- 8) 高口均、坪(茂野)ゆき枝、野村暢彦、内山裕夫、中島敏明(筑波大学、SORST)：*Leptothrix* sp. 3A株由来プラスチック分解酵素の諸性質：JST・SORSTジョイントシンポジウム(4)「クロスオーバーする生命と化学」千里ライフサイエンスセンター(2005年12月)

- 9) 佐藤愛美, 坪(茂野) ゆき枝, 野村暢彦, 内山裕夫, 中島敏明 (筑波大学、SORST) : *Leptothrix* sp. 3A 株由来 PBSA depolymerase の解析: JST・SORST ジョイントシンポジウム(4)「クロスオーバーする生命と化学」千里ライフサイエンスセンター (2005 年 12 月)
- 10) 結城裕子, 土屋未来, 野村暢彦, 内山裕夫, 中島敏明 (筑波大学、SORST) : DGGE 法による土壤埋設プラスチック表層の微生物叢解析: JST・SORST ジョイントシンポジウム(4)「クロスオーバーする生命と化学」千里ライフサイエンスセンター (2005 年 12 月)
- 11) 真弓大介, 坪(茂野) ゆき枝, 中島敏明 (筑波大学、SORST) : メタゲノム由来新規生分解性プラスチック分解酵素遺伝子の探索: JST・SORST ジョイントシンポジウム(4)「クロスオーバーする生命と化学」千里ライフサイエンスセンター (2005 年 12 月)

③プレス発表

(3) 特許出願 (国内 4 件、海外 3 件)

① 国内

特願 2004-237067

発明者: 中島敏明、茂野ゆき枝

発明の名称: 新規ウレタナーゼ遺伝子

出願人: (独) 科学技術振興機構

出願日: 2004 年 8 月 30 日

特願 2005-14744

発明者: 中島敏明、茂野ゆき枝

発明の名称: ポリエステル系プラスチック分解菌

出願人: (独) 科学技術振興機構

出願日: 2005 年 1 月 21 日

特願 2005-14761

発明者: 中島敏明、茂野ゆき枝

発明の名称: ポリエステル系プラスチック分解酵素および該酵素をコードする遺伝子

出願人: (独) 科学技術振興機構

出願日: 2005 年 1 月 21 日

特願 2005-58588

発明者: 中島敏明、茂野ゆき枝

題名: 生分解性プラスチックを分解する好熱性酵素をコードする新規遺伝子

出願人: 筑波大学

出願日: 2005 年 3 月 3 日

②海外

PCT/JP2004/002691

発明者: 中島敏明、茂野ゆき枝

発明の名称: 新規ウレタン結合切断菌

出願人: (独) 科学技術振興機構

出願日: 2005 年 1 月 31 日

PCT/JP2005/014950

発明者: 中島敏明、茂野ゆき枝

発明の名称: 新規ウレタナーゼ遺伝子

出願人: (独) 科学技術振興機構  
出願日: 2005年8月17日

PCT/JP2005/014950

発明者: 中島敏明、茂野ゆき枝

発明の名称: 新規ポリエステル系プラスチック分解菌、ポリエステル系プラスチック分解酵素およびその酵素をコードするポリヌクレオチド

出願人: (独) 科学技術振興機構

出願日: 2006年1月18日

(4) 受賞等

①受賞

②新聞報道

③その他

(5) その他特記事項

7 結び

これまでの検討で得られた各種プラスチック分解酵素の基質特異性を以下にまとめた。これらのうち、PHA 分解酵素を除くすべてが当グループによって得られている。これらを適切に組み合わせることにより、現状でも理論的には選択的モノマーリサイクルは可能である。しかし、個々の分解活性を見ると、TB-71 株の PBSA 分解酵素を除いていまだ実用化

酵素名	由来	分解性			
		PUR	PL	PBSA	PHA
ポリウレタン(PUR)分解酵素	<i>Candida</i> <i>oxidans</i>	++	-	-	-
PBS(A)分解酵素	<i>Aspergillus</i> <i>deglgetti</i>	-	-	++	-
ポリ酢酸(PL)分解酵素	<i>Pantococcus</i> <i>amylolyticus</i>	++	+	++	-
PHA デポリメラーゼ	<i>Pseudomonas</i> 等	-	-	-	++

に十分といえるほどの分解活性を得られていない。

一方で、当初は微生物のスクリーニングで比較的容易に得られると考えていた分解酵素の取得が困難だったことから端を発して、プラスチック表面の微生物叢の解析、難培養性分解菌の存在の可能性の示唆を経てメタゲノムスクリーニングにいたるまでの「回り道」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できたと考えている。特に、メタゲノムスクリーニングでの新規遺伝子取得の実績は今後の同分野の研究に大きなヒントを与えた。この知見をもとに汎用的なメタゲノムスクリーニングの効率化を目指して研究を行っている。

本プロジェクトでは新規のプラスチック分解酵素が多数得られた。これらはすべてエステラーゼの一種であった。エステラーゼやリパーゼは化学工業や食品加工の分野で応用範囲が広く、多くの研究が行われている。にもかかわらずこれまでのどの酵素とも異なる新規遺伝子を得ることができたことは想定外であった。しかし、その一方で機能ドメインの推定やそれを利用したタンパク工学が困難であったため、本流であるモノマーリサイクルの実用化までは今一歩になってしまった点は反省している。

本プロジェクトは、若手研究者を対象とした「さきがけ研究」からの継続である。前プロジェクトとあわせると足掛け 5 年がたち、すでに「若手」とは言えなくなった。本プロ

ジェクトで積み上げたものは研究成果だけではなく、プロジェクト管理・運営やポスドクの雇用、成果のまとめ方から特許戦略、企業との交渉など多くの経験を培うことができた。今後はこれらの財産を生かし、更なる研究に邁進したいと考えている。

(

(