

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：18K14265

研究課題名(和文) 生分解性ナイロン4分解酵素の同定と分解性評価

研究課題名(英文) Identification of enzymes that degrades nylon 4 and the biodegradation behaviors of nylon 4

研究代表者

外村 彩夏 (Hokamura, Ayaka)

東海大学・農学部・講師

研究者番号：50762704

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：これまでナイロン4分解菌として報告されていないPseudoxanthomonas属を単離することができた。単離した数種類の菌株を用いてナイロン4フィルムおよびナイロン4ベース共重合体の分解試験を行ったところ、フィルムの重量減少がみられた。ナイロン4分解試験後の培養液上清のLC/MS分析を行ったところ、GABAモノマーおよびオリゴマーが検出された。さらに、SEMによるフィルムの表面観察によりナイロン4は表面から分解されていると推測した。ナイロン4分解酵素同定については、全塩基配列の決定には至らなかったものの、酵素遺伝子の一部と予想される遺伝子をいくつか増幅することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

プラスチックは、軽くて丈夫であることや安価で易加工性であることから、我々の生活に欠かせない素材となっているが、その構造の安定性ゆえに使用後の廃棄方法や環境への影響が大きな問題となっている。ナイロン4を分解する新たな菌を発見し、その分解性の評価や酵素同定の一部を行った本研究は、分解制御可能な生分解性ナイロン4の実用化に向けて社会的意義のある研究といえる。単離した分解菌の酵素同定とその性質を決めることで、環境調和型で生産性の高いシステムが構築でき、今後ますます深刻化する環境問題の解決に貢献できると予測される。

研究成果の概要(英文)：In this study, Pseudoxanthomonas strains were isolated for the first time as nylon 4-degrading bacteria. GABA monomers and oligomers were detected by LC/MS analysis of supernatant after cultivation of isolated nylon 4-degrading strains using medium with nylon 4 film. Furthermore, it was suggested that nylon 4 was degraded from the surface by the SEM analysis. As regards the identification of enzyme degrades nylon 4, a part of genes that is expected to be the enzyme were amplified by PCR reaction.

研究分野：分子生物学

キーワード：ナイロン4 ポリアミド4 生分解性プラスチック 分解酵素

1. 研究開始当初の背景

プラスチックは、軽くて丈夫であることや、安価で易加工性であることから、我々の生活に欠かせない素材となっている。しかしながら、これらのプラスチックはその構造の安定性ゆえに使用後の廃棄方法や環境への影響が大きな問題となっている。そこで、持続可能な社会の実現に向けて、自然環境中に存在する微生物によって分解される生分解性プラスチックや再生可能資源を原料とするバイオマスプラスチックの実用化が求められている。これまで、生分解性プラスチックの代表的なものとして、ポリ乳酸のようなポリエステル類が多く研究されている。これらの多くは、比較的安価で大量に生産される汎用プラスチックの目的で開発されている。一方、ポリアミド(ナイロン)類は、耐薬品性に優れ、アミド結合間の水素結合により、より優れた耐熱性および力学強度を有する高機能なエンジニアリングプラスチックとして発展してきた。このようなエンジニアリングプラスチックは、金属代替可能なポリマーであり、自動車部品や家電製品をはじめ、多くの用途で使用されている。しかしながら、大部分のナイロンは、石油由来であり、その安定性から一般に自然環境中で分解することが難しい難分解性プラスチックの代表ともいえる。したがって、生分解性を有する環境調和型ナイロンの開発は、持続可能な社会の構築や産業上の利用価値の観点から重要な研究課題である。ナイロンの中でも、ナイロン4は、神経伝達物質で機能性食品としても知られる γ -アミノ酪酸(GABA)を原料として合成されるプラスチックであり、土壌中などで生分解することが報告されている。また、原料のモノマーとなる GABA は、細菌を用いて、グルタミン酸から生産することができるため、バイオマスプラスチックでもあり、環境調和型のプラスチックであるといえる。しかしながら、その生分解の反応機構が明らかになっていないことから、使用時や廃棄時の分解コントロールが実用化に向けての課題の1つであるといえる。使用時には、高性能・高機能を有しながらも、使用後には易分解性を示すといった、分解の制御が可能となれば、環境調和型ナイロン4の利用拡大に貢献できる。

2. 研究の目的

ナイロン4は、生分解性を有する上に、原料コストの観点からも、環境調和型ナイロンの開発において有用な素材である。しかしながら、ナイロン類の生分解に関して、これまでナイロン6のオリゴマーの分解酵素については報告されているが、ナイロンのポリマーを分解する天然の酵素については同定されていない。また、ナイロン4の分解菌については、いくつか報告はされているものの、ナイロン4を分解する酵素については同定されていない。そこで、本研究では、ナイロン4分解菌を単離し、その分解性を評価すること、単離した細菌よりナイロン4分解酵素を同定することを目的とした。また、今後、ナイロン4が実用化されるためには、それぞれの用途に応じた物性のプラスチックを合成することが重要である。ナイロン4をベースとして、他のモノマーと共重合させることで機械的特性や熱的特性の改善も期待できることから、ナイロン4ベースの共重合体を合成し、単離した細菌を用いて分解性評価を行うこととした。

3. 研究の方法

(1) ナイロン4分解菌の単離とその分解性評価

熊本県環境中の土壌よりナイロン4分解菌を60株以上単離し、これらの菌株の16S rRNAを行った。これらのうち、ナイロン4含有培地で生育がよく、明瞭なクリアゾーンを形成した菌株を用いて分解性評価を行った。ナイロン4分解菌の性質を調べるために、ナイロン4フィルム入りの液体培地に、分解菌を接種し、経時的に培養液上清およびフィルムを回収することで分解性の評価を行った。培養液上清についてはLC/MSにて分解生成物の分析を行い、フィルム残渣については重量を測定し重量減少率を算出するとともに表面構造をSEMにて観察した。

(2) 分解酵素の同定

単離した菌株のうち、ナイロン4含有培地での生育が良好で、明瞭なクリアゾーンを形成した菌株を用いて、分解酵素遺伝子のクローニングを試みた。プロテナーゼKの配列を参考に、プライマーを設計し、単離したナイロン4分解菌のゲノムDNAを鋳型として、degenerate PCRを行った。増幅した遺伝子の一部の配列から、さらにクローニングをすすめることで酵素遺伝子の全塩基配列の決定を試みた。

(3) ナイロン4ベース共重合体を用いた分解性評価

単離した菌株を用いて、ナイロン4ベース共重合体を用いた分解性評価も行った。生分解性プラスチックで生体適合性のある ϵ -カプロラクトンとの共重合体を用いた。

4. 研究成果

(1) ナイロン4分解菌の単離とその分解性評価

単離したナイロン4分解菌の16S rRNA解析を行ったところ、*Pseudomonas* 属や *Pseudoxanthomonas* 属と高い相同性がみられた。ナイロン4分解菌について、これまで

Pseudomonas 属は報告されているものの、*Pseudoxanthomonas* 属については報告されていない。*Pseudoxanthomonas* 属の1菌株について、高い分解活性もみられたため、形態・生化学的性質についても明らかにし、*Pseudoxanthomonas* sp. TN-N1 と命名した。

ナイロン4含有培地で生育がよく、明瞭なクリアゾーンを形成した6菌株を用いて分解性評価を行った。試験管を用いた分解試験を行ったところ、13.3%~22.4%の分解率を示した。しかしながら、分解試験開始後1週間以降、いずれの菌株においてもわずかながらナイロン4フィルム重量の減少はみられたものの、分解率が大きく変化することはなかった。そこで、分解試験を試験管からフラスコで行うこととし、さらに途中培地の添加を行い実施することとした。その結果、分解試験開始後、1週間後以降もフィルム重量の減少が見られ、いくつかの菌株においては、4週間後にはほぼ分解し、フィルムが回収できなかった。この時の培養液上清をLC/MSにて分析し、分解生成物について調べた。その結果、GABAモノマーおよびオリゴマーが検出された(図1)。

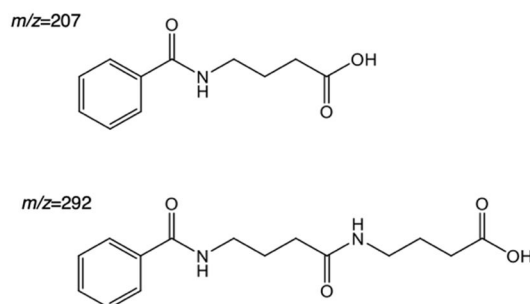


図1 分解試験後の培養液上清LC/MS分析

さらに、分解試験後のフィルム残渣を用いてSEM観察を行ったところ、フィルム表面に小さな穴がいくつも観察でき、分解が進んでいることがわかった。また、回収したフィルムの重量は減少しているものの、形状は保ったままうすくくなっており、ナイロン4の分解は、表面から起こっていると考えられた。

(2) 分解酵素の同定

ナイロン4分解に関与する酵素を単離するために、degenerate PCRによる一部の酵素遺伝子の増幅を試みた。ナイロン4はproteinase Kでも分解することが報告されていることから、プロテナーゼKの配列を参考にプライマーを設計し、単離したナイロン4分解菌のゲノムDNAを鋳型として、degenerate PCRを行った。様々なPCR条件を検討した結果、いくつかの菌株の一部の遺伝子を増幅させることができた。しかしながら、プライマーの再検討も行ったものの、degenerate PCRにより増幅した一部の遺伝子からさらなるクローニングを進めることが困難であった。proteinase Kは脂肪族アミノ酸、疎水性アミノ酸、芳香族アミノ酸のカルボキシ基側を主に切断する酵素であるため、別の部位を切断する酵素やナイロン6オリゴマー分解酵素も参考にクローニングを進めていく必要がある。分解酵素について、degenerate PCRによる全遺伝子の塩基配列決定には至らなかったが、*Pseudoxanthomonas* sp. TN-N1が合成する分解酵素を岩手大学の研究協力により精製することができた。分解試験において高い分解活性が期待できる菌株が他にもあるため、今後も継続して研究を進めていく予定である。

(3) ナイロン4ベース共重合体を用いた分解性評価

単離したナイロン4分解菌のうち、 ϵ -カプロラクトン共重合体含有培地でも生育が良好で、明瞭なクリアゾーンを形成した菌株を選抜し、分解試験を行った。ナイロン4の分解試験と同様、共重合体のキャストフィルムを作製し、まずは試験管培地にて試験を行った。その結果、試験開始後1週間で83.1%~90.1%の分解率を示し、ナイロン4より高い分解率を示した。ナイロン4より共重合体の方が分解率が高かったことに関して、2-pyrrolidoneが ϵ -caprolactoneと共重合することで結晶性が低下したことや、エステル結合が導入されたことにより、アミド結合間の加水分解性が向上したことが考えられる。本研究では、モノマー組成が2-pyrrolidone: ϵ -caprolactone = 81.5% : 18.5%の共重合体を用いたが、モノマー分率や組成によって分解性が異なることが予想されるため、今後、様々な組成の共重合体の分解性評価を行う必要がある。

また、この分解試験後の培養液上清をLC/MSにて分析した結果、帰属できたのは、1量体の2-pyrrolidoneと2量体の ϵ -caprolactoneが結合した物質のみであった。共重合体のモノマー組成は ϵ -caprolactoneが18.5%であるのに対し、分解産物には ϵ -caprolactoneの割合が高い物質が検出されていた。ナイロン4の分解試験同様、フラスコ培養や培地の添加も検討するとともに、本研究で用いた共重合体はランダム共重合体であるため、2-pyrrolidoneと ϵ -caprolactoneが均等に配列しているわけではないため、今後は沈殿物も含め培養液のさらなる解析が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yurika Sasanami, Masayoshi Honda, Haruka Nishiki, Koichiro Tachibana, Hideki Abe, Ayaka Hokamura, Miwa Yamada	4. 巻 197
2. 論文標題 Purification and characterization of an enzyme that degrades polyamide 4 into gamma-aminobutyric acid oligomers from Pseudoxanthomonas sp. TN-N1	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Polymer Degradation and Stability	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.polymdegradstab.2022.109868	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐々浪 由梨香、本田 正義、外村 彩夏、阿部 英喜、山田 美和
2. 発表標題 Pseudoxanthomonas sp. TN-N1由来生分解性プラスチックナイロン 4 分解酵素の諸性質解明
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐々浪 由梨香、外村 彩夏、河合 盛進、鈴木 宏昭、山田 美和
2. 発表標題 生分解性プラスチックナイロン4分解酵素の精製と諸性質解明
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 外村彩夏、森上佳衣子、橘弘一郎、山田美和、本田正義、阿部英喜、下田誠也
2. 発表標題 ナイロン4分解菌の単離とその分解性評価
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	阿部 英喜 (Abe Hideki)	理化学研究所・環境資源科学研究センター	
研究協力者	山田 美和 (Yamada Miwa)	岩手大学・農学部	
研究協力者	下田 誠也 (Shimoda Seiya)	熊本県立大学・環境共生学部	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------