

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21324

研究課題名（和文）生分解性ポリマーPHBを高効率で分解する真菌由来新奇酵素に関する研究

研究課題名（英文）Research on a novel fungal enzyme that degrades biodegradable polymer PHB

研究代表者

井上 晶（Inoue, Akira）

北海道大学・水産科学研究院・教授

研究者番号：70396307

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：石油系プラスチックの代替素材として、生分解性ポリマーである3-ヒドロキシ酪酸（3HB）のポリエステルポリヒドロキシ酪酸や3HBと3-ヒドロキシヘキサン（3HH）の共重合ポリエステルのPHBHがある。本研究では、PHBを唯一炭素源として増殖可能な新奇の真菌SEA-51株を海砂から単離し、そのPHB分解酵素が少なくとも2種類のタンパク質の重合体であることを明らかにした。さらに、それらのうち1つのタンパク質がPHBおよびPHBH分解を担うことを見出した。また、昆虫細胞を用いて活性をもつ組換え分解酵素の分泌発現系を構築し、それによって得られる酵素が天然のものと同等の活性をもつことを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、PHB(H)を素材とする生分解性プラスチックの生産と需要が年々増大している。これらが自然界に流出すると、生物による分解が期待されるものの、地球上の生物がもつ分解能力は無限ではない。分解能力を超えた場合には、石油系プラスチックと同様の問題や生態系にネガティブな影響を与えられられる。そのような問題が生じる前に、優れた分解能をもつPHB(H)分解酵素を探索し、組換え酵素として選択的かつ大量に生産する技術開発が重要となる。本研究では、活性型PHB(H)分解酵素の分泌発現系の構築に成功した。このように、将来懸念される課題の解決に貢献する基盤技術の構築に成功した意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：As an alternative material to petroleum-based plastics, there are polyhydroxyalkanoates (PHA) such as polyhydroxybutyrate (PHB) and copolymers of 3-hydroxybutyrate (3HB) and 3-hydroxyhexanoate (3HH), which are biodegradable polymers. In this study, a novel fungus strain SEA-51 was isolated from beach sand, which can grow solely using PHB as a carbon source, and it was revealed that its PHB-degrading enzyme consists of at least two types of oligomers. Furthermore, one of these proteins was found to be responsible for the degradation of both PHB and PHBH. In addition, an expression system for recombinant degradation enzymes with activity using insect cells was constructed, and it was demonstrated that the obtained enzyme has activity equivalent to that of the natural enzyme.

研究分野：海洋生物学

キーワード：生分解性ポリマー ポリヒドロキシアリカン酸 ポリヒドロキシブチレート 分解酵素 異種細胞発現組換え酵素

### 1. 研究開始当初の背景

近年、地球規模の環境変化が顕出するのに伴って、人類が今後も豊かな未来を享受するためにはどうすべきか、多くの注目が集まっている。そのような状況下で、2015年に持続可能な開発目標 (Sustainable Development Goals, SDGs) が、国連加盟国の全会一致で採択された。これは、環境、経済、および社会の3つの側面から、貧困削減、飢餓解消、教育、健康増進、クリーンエネルギー、持続可能な都市開発、気候変動対策などに取り組み、人類の持続可能な未来を目指すものであり、そのためには科学技術の応用や発展的利用が不可欠である。

20世紀以降、人類は化石燃料を大量に消費してその恩恵を受けてきたが、その一つとして石油を原料としたポリマーを利用した石油系プラスチックの大量生産と消費がある。しかしながら、地球に生存する生物は同プラスチックの分解能力をもたないか、極めて分解能が乏しいため、一度、自然界に流出するとほとんど分解されることはない。また、物理的に破砕された5mm以下のものはマイクロプラスチックと呼ばれ、目視で確認することは困難であるが、波や風によって容易に移動するため、海洋、陸上問わず分布することが知られている。また、生物がそれを摂取することによって生態系を含めた環境へのネガティブな影響も引き起こされていることが様々な調査により明らかになった。

一方、このような問題を解決し得る方法として、生分解性ポリマーの利用が検討され、多くの研究が進められてきた。石油系プラスチックの代替としては、耐久性や強度などに多くの問題があったが、それらの改善や克服が進められてきた。その結果、一部の細菌類がエネルギー物質として貯蔵するポリヒドロキシアルカン酸がプラスチック素材として利用できる可能性が示された。特に3-ヒドロキシブタン酸 (3HB) のポリエステルポリヒドロキシ酪酸 (PHB) や3HBと3-ヒドロキシヘキサノ酸 (3HH) の共重合ポリエステル PHBH は使い捨てストローの素材としてなど、広く普及しつつある (図1)。

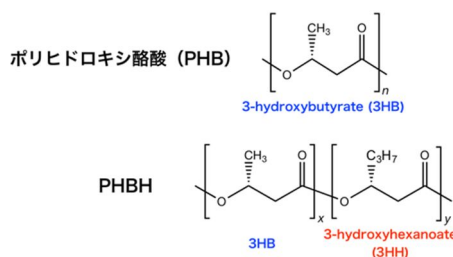


図1. PHBとPHBHの構造

の共重合ポリエステル PHBH は使い捨てストローの素材としてなど、広く普及しつつある (図1)。今後もその生産と消費は拡大することが予測されているが、地球上の生物がこれらを分解する能力は無限では無い。そのため、生物の分解能力を超えた量が自然界に大量に流出することが懸念され、その場合には、従来の石油系プラスチックと同じ問題を引き起こすことに繋がりがかねない。また、PHBおよびPHBH(以後、PHB(H)と称する)を分解する生物はそれをエネルギー源として利用するため、PHB(H)分解生物が大量に増殖し、予測していなかった生態系の破壊なども予測される。このような将来的に危惧される問題は、実際に起きてからでは手遅れとなる場合が多く、生分解性ポリマーの普及の促進と共に、その対策技術を確立しておくことが重要である。期待される方法の一つとして、生物の増殖を伴わずにPHBを分解するために、優れた分解活性をもつPHB分解酵素を組換えタンパク質として大量生産し利用することが挙げられる。しかしながら、これまでに活性をもつPHB分解酵素については、異種細胞発現系を用いて大量発現する手法は十分に確立されているとは言い難い。

### 2. 研究の目的

本研究は、PHAのうち、特にPHB(H)を効率的に分解するシステムを構築するための基盤技術として必須のPHB(H)分解酵素の大量生産発現系の確立を目的としている。そのために、新たにPHB分解能をもつ生物を単離および同定し、それがもつPHB分解酵素の精製、性状解析、および遺伝子クローニングを行い、酵素の機能と一次構造を解明する。さらクローニングした遺伝子を用いて、組換え酵素を作出し、機能的に天然由来のものと同等の活性をもつか評価する。さらに、天然および組換え酵素のPHBHに対する分解活性も明らかにする。以上の結果を取りまとめることにより、PHB(H)の分解に必要な酵素だけを選択的に生産する技術を確立し、PHB(H)の効率的な分解処理の礎を築くことを目指す。

### 3. 研究の方法

PHB(H)分解能をもつ微生物は、PHBを唯一炭素源とした培地を用いて培養した。分離源として、北海道北斗市沿岸の海水および同砂浜の海砂(いずれも2018年10月に採取)を用いた。PHBを含む液体培地で25°C、1週間静置培養した後、遠心分離後の上清をPHB含有寒天培地に塗布し、25°Cでコロニーが生じるまで培養した。生じたコロニーは、再度液体培地で培養と寒天培地で培養した。この操作を合計3回繰り返し、単離したコロニーを用いて以後の実験に使用した。単離した微生物の同定は、ITSおよび5.8S rDNAの塩基配列を決定することにより行った。また、PHB含有培地で培養した後、mRNAを抽出、精製し、次世代シーケンサーを用いてRNA-Seq解析を行い、トランスクリプトームデータベースを構築した。

PHB分解酵素活性の測定は、不溶性PHBが分解に伴って可溶化することを指標として行った。定性的な分析法として、PHBを含むポリアクリルアミドゲルに試料を供し、PHB分解によって生

じたハローを検出した。定量的に比活性を測定する方法として、pH および NaCl 濃度を調整した 0.01% PHB を含む溶液に酵素溶液を添加し、650 nm における濁度変化を経時的に調べた。同じ方法により、PHBH に対する分解能も至適条件下で調べた。

活性をもつ組換え酵素の生産は、バキュロウィルス-昆虫細胞発現系により行った。すなわち、目的酵素の cDNA を RT-PCR 法によりクローニングした後、Bac-to-Bac 法 (Thermo Fisher Scientific) により、各組換えバキュロウィルスを作成した。組換えタンパク質の発現は、Sf9 細胞を用いて行い、培養液中にタンパク質を分泌させた。次いで、遠心分離後の培養液上清を硫酸分画およびニッケルアフィニティークロマトグラフィーに順次供することにより精製した。タンパク質を含むフラクションは、1 mM リン酸ナトリウム (pH 7.0) および 150 mM NaCl を含む溶液に透析し、活性評価に使用した。

また、海洋性軟体動物のホタテガイの公開されているトランスクリプトームデータベース上に、既知の PHB 分解酵素を有意な相同性を示すタンパク質が見出されたため、ホタテガイが PHB 分解酵素をもつのかについても調べた。粗酵素としてホタテガイ中腸腺を非変性条件下でホモジナイズし、遠心分離によって不要物を除去した溶液を使用し、上述した微生物の PHB 分解酵素と同様の方法により活性を測定した。

#### 4. 研究成果

海水と海砂をそれぞれ PHB 含有液体培地に加えて培養した結果、後者を加えた場合に限り、培養液の白濁が確認された。次に、その培養液の一部を分取し、PHB 含有寒天培地に塗布し培養したところ、白色のコロニーが出現し、その周囲に透明なハローの形成が確認された。これは、コロニーを形成する微生物から PHB 分解酵素が分泌されたことを示唆している。このコロニーを釣菌し、再び液体培地と寒天培地を用いて培養を繰り返し、単離されたコロニーを取得した。これを PHB 分解微生物 SEA-51 株として、本研究では使用した。顕微鏡で観察した結果、糸状の細胞であることが明らかになり、分生子の存在も確認 (図 2) されことから、本菌は真菌に属するものと推定された。SEA-51 株の ITS および 5.8S rDNA の各塩基配列を解析した結果、*Verticillium* 様菌類に属する真菌であることが明らかになった。なお、その近縁種ではこれまでに PHB 分解能をもつことは報告されていない。



図2. SEA-51株の顕微鏡観察像  
矢印は、分生子を示す。

また、海洋動物が PHB 分解酵素をもつことは知られていないが、既知の細菌由来 PHB 分解酵素の相同タンパク質と推定される酵素の存在がホタテガイトランスクリプトームデータベース上に見出された。そのため、ホタテガイ中腸腺から抽出したタンパク質溶液を粗酵素として、その PHB 分解能を調べたが、分解活性は検出できなかった。一方、コントロール実験として使用した基質のうち、半人工合成ポリマーであるセロウロン酸 (グルクロン酸が -1,4-結合で連なった酸性多糖) が良く分解されることを見出した。これまでに、海洋環境でセロウロン酸を分解する生物の報告は無いため、この点に着目し研究を進めた結果、ホタテガイのセロウロン酸分解酵素を同定した。これは、海洋でセロウロン酸が分解されることを示した初めて示しただけでなく、動物がセロウロン酸分解能をもつことを報告した最初の事例である。

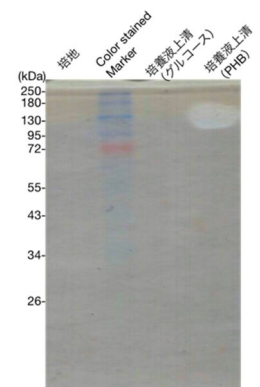


図3. 培養液上清のPHB分解活性

次に、SEA-51 株の PHB 分解酵素を同定するために、グルコースまたは PHB を含む液体培地で培養し、その培養上清を PHB 含有ゲルに供し、SDS-PAGE を行った。電気泳動後、PHB 含有培養液上清のレーン上には透明なハローが生じた (図 3) が、グルコース含有培養液上清のものには検出されなかった。この結果から、SEA-51 株は分子量約 120,000 の PHB 分解酵素をもつことが示唆された。同条件で泳動したゲルのタンパク質をクマシーブリリアントブルー R250 で染色すると、PHB 含有培養液上清は分子量約 120,000 のタンパク質が検出されたが、グルコース含有培養液上清では確認できなかった。これらの結果から、SEA-51 株の PHB 分解酵素は PHB の存在下で誘導分泌発現していると推測された。また、各上清をゲルろ過スピンカラムに供し、約 10 倍に濃縮後、0.01%PHB 溶液に加えて 25°C でインキュベートした。PHB 含有培養液上清では、反応前の濁度が 0.86 であったが、120 分後には 0.06 となった (図 4)。一方、グルコース含有培養液上清を加えた溶液では濁度の変化は実質的になかった。

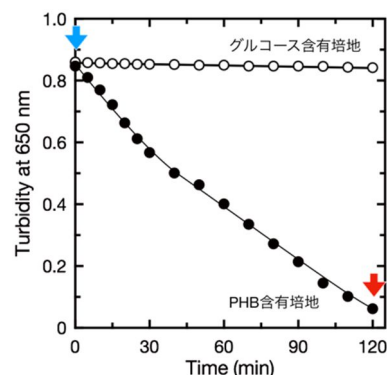


図4. 培養液上清のPHB分解活性

次に、PHB 含有培養液上清の Native-PAGE を行った結果、分子量約 66,000 のウシ血清アルブミンより移動度が小さいタンパク質が PHB を分解することが分かった。また、この分解活性は試料を 100°C で 15 分間加熱することによりほぼ失活した。この加熱試料を SDS-PAGE に供すると、分子量約 120,000 のタンパク質が消失し、新たに分子量約 38,000 と約 34,000 と見積もられる 2 つのタンパク質のバンドが確認された。さら

に、各タンパク質の N 末端の部分アミノ酸配列解析を行った結果、互いに異なっていたことから、これらはいずれも異なるタンパク質であると考えられた。そのため、SEA-51 株が分泌している PHB 分解酵素は、少なくとも 2 つの異なるタンパク質が重合したオリゴマー構造を形成すると推測された。さらに、PHB 含有培地で培養した SEA-51 株のトランスクリプトーム解析を行い、各タンパク質の部分アミノ酸配列をコードする遺伝子の有無を調べたところ、それぞれ 1 つずつ対応するアミノ酸配列をコードする遺伝子が存在していた。そこで、各遺伝子の 5' -および 3' -非翻訳領域に相当する塩基配列からプライマーを設計し RT-PCR を行い、各目的遺伝子をクローニングした。塩基配列解析の結果、336 アミノ酸と 402 アミノ酸がそれぞれ演繹された (図 5)。また、いずれも N 末端の 19 および 21 アミノ酸は、分泌シグナル配列と推測された。

クローン化した各 cDNA を用いて、組換え酵素の発現を分泌発現が可能な宿主である枯草菌 *Bacillus brevis*、酵母 *Pichia pastoris*、および昆虫細胞



図5. SEA-51株のPHB分解酵素を構成するタンパク質の模式図

*Spodoptera frugiperda* を用いて試みた。枯草菌を使用した場合には、いずれの組換え酵素も分泌発現しなかった。一方、酵母を用いた場合には、分子量が大きい方が組換えタンパク質として分泌発現していることがウェスタンブロットングにより確認できたが、その発現量が少なく精製が困難であった。また、発現タンパク質の一部が分解していることが分かった。しかしながら、昆虫細胞を使用した場合では、いずれの組換えタンパク質も精製可能な量を分泌発現することができた。そのため、以後の実験では昆虫細胞発現系を用いて、その培養液から各組換えタンパク質の精製したものを使用した。

各組換え酵素の PHB 分解活性を Native-PAGE で調べた結果、分子量が大きい方の組換えタンパク質だけが酵素活性もつことが分かった。また、濁度を指標とした酵素活性測定においても同様の結果が得られた。このように SEA-51 株は少なくとも 2 種類の異なるタンパク質から構成される複合体を PHB 分解酵素としてもっているが、PHB の分解を担うものはそのうち一方のものであることを明らかにした。精製組換え酵素を用いて基本性状を解析した結果、至適温度、同 pH、および NaCl 濃度は、それぞれ 35、6.0、および 150 mM と決定された。これらの至適条件は、SEA-51 株の培養上清を粗酵素として測定した場合と同等であった。また、56°C で 30 分間インキュベートすることにより残存活性が 50% となり、70°C 以上で 30 分間処理すると完全に失活した。さらに、PHBH を至適条件下で分解実験を行った結果、PHB の場合と比較して、98% に相当する比活性が検出された。

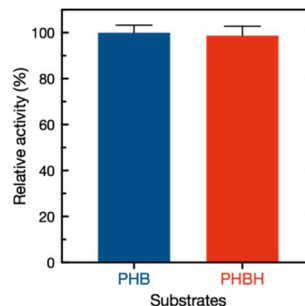


図6. SEA-51株PHB分解酵素によるPHBとPHBHの分解活性の比較

以上、本研究の遂行により新奇の PHB 分解真菌を単離し、それがもつ PHB(H)分解酵素の同定と活性をもつ組換え酵素の発現系を構築した。これらの成果は、天然微生物に依存せずに PHB(H) を組換え酵素を用いて分解する技術の基盤となり得るものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 井上 晶	4. 巻 21
2. 論文標題 半合成多糖セロウロン酸の海洋生分解性の解明と未利用素材としての可能性	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 月刊MATERIAL STAGE	6. 最初と最後の頁 50-54
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 井上 晶、尾島孝男
2. 発表標題 海砂から単離した真菌のPHBデポリメラーゼの同定と組換え酵素の発現
3. 学会等名 令和4年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井上晶、尾島孝男
2. 発表標題 海砂から単離したポリヒドロキシ酪酸（PHB）分解性真菌
3. 学会等名 令和3年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 井上 晶、他83名	4. 発行年 2022年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 548
3. 書名 容器包装材料の環境対応とリサイクル技術	

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------