

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26850060

研究課題名(和文)芳香族主鎖型ポリマー加水分解酵素の探索と機能解析

研究課題名(英文) Screening and analysis of aromatic polymer-hydrolyzing enzymes

研究代表者

老沼 研一(Oinuma, Ken-Ichi)

大阪市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：20635619

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：芳香族ポリマーはプラスチック原料として有用であるが、生物学的に極めて難分解性であり、分解菌や分解酵素に関する報告は非常に少ない。本研究では、芳香族ポリマーの一種である4CDPをモデル基質として、未発見の芳香族ポリマー分解菌・酵素の探索を試みた。結果、アスペルギルス属のカビが、4CDPの加水分解活性を有する何らかの酵素を産生していることを発見した。更に、分解酵素をアスペルギルス由来の材料から精製し、遺伝子を特定することに成功した。本酵素に関する知見は、将来実現されるべき芳香族ポリマーのリサイクルシステムの構築に活かされるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Aromatic polymers are widely used in plastic industries. One property common to these polymers is their resistance to bio-degradation and, despite its importance, there are only a few reports on aromatic polymer-degrading microorganism or enzymes. In this study, we used 4CDP, a recently developed aromatic polymer, as a model substrate and screened for microorganisms or enzymes that can degrade aromatic polymers. We found that a fungus in the genus *Aspergillus* produces some enzyme that hydrolyzes 4CDP. Moreover, we succeeded in purifying the enzyme from an *Aspergillus*-originated material and identifying the gene encoding the enzyme. We expect that knowledge on this enzyme will contribute to development of aromatic polymer-recycling system, which is to be materialized in the future.

研究分野：応用微生物学

キーワード：芳香族ポリマー 加水分解酵素 *Aspergillus niger*

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 生分解性バイオマスプラスチックの開発

**現状:** 近年、石油資源の枯渇や大気中の二酸化炭素濃度上昇の問題への対策として、既存の石油由来プラスチックをバイオマス由来品に置き換える試みが活発化している。また、廃棄に伴う環境汚染や生態系への影響が少ない低環境負荷型の生分解性プラスチックや、リサイクル可能なプラスチックへの代替が期待されている。既にいくつかのバイオマス由来の生分解性プラスチックが開発されているが、これらは脂肪族ポリエステルを主成分とするものであり、耐熱性や耐衝撃性が低いという欠点を有している。例えば、唯一、バイオマス由来の汎用プラスチックとして実用化されているポリ乳酸は、物性の低さから用途は食品容器や包装材等の使い捨て製品に限られている。

### (2) 芳香族バイオプラスチックの開発: 申請者が開発に携わっている

poly(4HCA-co-DHCA) ポリマー(4CDP)は、リグニンの生合成中間体として知られる 4-hydroxycinnamic acid (4HCA)と 3,4-dihydroxycinnamic acid (DHCA)を構成単位として持つ芳香族ポリエステルである(文献)。4CDPは優れた耐熱性(軟化温度 169°C)と機械的性能(曲げ強度 63 MPa、弾性率 16 GPa)を有しており、エンジニアリングプラスチック素材としての実用化が期待される。この他、共同研究者らとともに、発酵生産可能な化合物を原料としたバイオポリアミドやポリイミドを開発することにも成功している。いずれも優れた耐熱性や力学性能を有しており、バイオエンジニアリングプラスチック素材として有望と考えられる。

### (3) 芳香族ポリマーの加水分解酵素: 微生物は、様々な加水分解酵素を用いて天然または人工の高分子ポリマーを分解する。これらの酵素は、主鎖がアルキル鎖からなるポリマーを基質とするものがほとんどであり、主成分として主鎖に芳香環を含むポリマーの加水分解酵素に関する知見は非常に限られている。例えば、代表的な芳香族ポリエステルであるポリエチレンテレフタレート(PET)を効率よく分解する菌や酵素は、ごく最近発見されるまで全く例がなかった(文献)。PETに限らず様々な芳香族ポリマーの加水分解酵素を発見し、分解機構に関する知見を収集できれば、学問的基礎が確立されるとともに、芳香族ポリマーのリサイクルシステムの構

築に向けた取り組みが大きく進展するものと期待される。

## 2. 研究の目的

上述の 4CDP は、分子機構は不明であるものの、土壌中で生分解されることが示されていた。そこで、申請者らは 4CDP を単一炭素源としたスクリーニングを行い、結果、土壌から 4CDP 分解菌 *Myrothecium* sp. T09 を単離することに成功した。一方、タンパク質や様々な多糖類を基質とする市販の加水分解酵素試薬を検討した結果、クロコウジカビ (*Aspergillus niger*)由来のペクチナーゼ試薬が 4CDP 分解活性を有することを発見した。しかし、この活性が当該酵素そのものによるものか、試薬が不純物として含む他の酵素によるものなのかは不明であった。以上の経緯に基づき、本研究では以下の課題に取り組むこととした。

### (1) 4CDP 分解酵素の精製・同定と分解機構の

**解明:** 4CDP 分解酵素を *Myrothecium* sp. T09 や市販のペクチナーゼ試薬から精製し、アミノ酸配列を解析し遺伝子を同定する。更に、酵素の産生菌や酵素そのものに対し、遺伝子・タンパク質レベルで種々の解析を実施し、4CDP の生物学的分解機構を解明する。

### (2) リサイクルシステムの構築: 発見した酵素、あるいはそれらの遺伝子を導入した組換え微生物を作出し、様々な条件で分解効率や回収率等を検討する。得られたデータに基づき、実験室スケールで試験的なりサイクルシステムの構築を試みる。

## 3. 研究の方法

### (1) *Myrothecium* sp. T09 培養液とペクチナーゼ試薬からの 4CDP 分解酵素の精製と同定:

*Myrothecium* sp. T09 の培養液には、4CDP の存在下で培養した場合のみ、4CDP 分解活性が認められる。そこで、本菌を 4CDP 存在下で培養し、得られた培養上清からの酵素の精製を試みた。具体的には、硫酸アンモニウムによる分画、および、陰イオン交換カラム (HiTrap Q HP [GE Healthcare])による分離の検討を行った。ペクチナーゼ試薬からの酵素精製には、硫酸アンモニウム分画、疎水カラム (TOYOPEARL Butyl-650M [TOSOH])および HiTrap Butyl HP [GE Healthcare]、陰イオン交換カラム (HiTrap Q HP [GE Healthcare])、ゲルろ過カラム (Superdex 200 [GE Healthcare])を用いた。タンパク質の同

定は、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析(MALDI-TOF MS)を用いて定法に従って行った。

(2) **4CDP 分解酵素の糖性質の解析** : Superdex 200 を用いたゲルろ過カラムクロマトグラフィーにより、酵素の分子量を概算した。糖鎖修飾の有無は、糖鎖切断酵素である Glycopeptidase F による処理前後の変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)のバンドパターンの変化から判断した。反応機能に関する手掛かりを得るため、組成の異なるポリマーや、ポリマーの部分構造に類似した化合物(基質アナログ)に対する活性を検討した。具体的には、組成の異なるポリマーとして、4HCA が直線的に結合した poly4HCA と、DHCA のみから成る polyDHCA を用いた。4CDP の基質アナログとしては、Methyl cinnamate, Methyl caffeate, Phenyl acetate, *p*-Nitrophenyl acetate, Phenyl acrylate, 2-Phenylethyl acetate の 6 種類の化合物を用いた。

(3) ***A. niger* の 4CDP 分解活性の検討** : 市販のペクチナーゼの生産株は入手が困難であったため、その代替物として研究室保有の *A. niger* ATCC 1015 株を対象として実験を行った。ポテトデキストロース培地や炭素源の異なる最小培地で本菌を培養し、培養上清の 4CDP 分解活性を測定した。次に、検出された活性が EHA22274 によるものであるかを検証するため、いくつかの培養条件における EHA22274 遺伝子の発現量をリアルタイム PCR により測定し、酵素活性の出現パターンと比較した。実際には、iQ SYBR Green Supermix と MiniOpticon リアルタイム PCR システム(いずれも Bio-Rad)を用い、マニュアルに従って実験を行った。レファレンス遺伝子としてアクチン遺伝子(*actA*)を使用した。プライマーは Primer3 (プライマー設計用ソフトウェア)を用いて設計した。

(4) **リサイクルシステムの構築に向けた分解菌の作出** : 既存のタンパク質分泌発現系(文献)を利用し、4CDP 分解酵素(*A. niger* 由来 EHA22274)の分泌発現菌の作出を試みた。まず、4CDP 含有培地で培養した *A. niger* の菌体から RNA を回収後、cDNA を調製し、EHA22274 遺伝子をクローニングした。次いで、当該遺伝子を専用のベクターに組み込み、発現用プラスミドを構築した。本プラスミドをコウジカビの一種である *Aspergillus*

*oryzae* RIB40 株に導入し、ピリチアミン耐性を指標に形質転換体を選択した。更に、純化のため、ピリチアミン入りの固体培地で複数回の植え継ぎ操作を行った。

#### 4. 研究成果

(1) ***Myrothecium* sp. T09 培養上清からの酵素精製の試み** : *Myrothecium* sp. T09 の培養上清からの 4CDP 分解酵素の精製を試みた。硫酸沈殿による分画の検討を行った結果、目的の活性因子の大部分は、20%飽和という比較的低濃度の硫酸の添加により沈殿することが判明した。20%硫酸沈殿画分を陰イオン交換カラムに供したところ、目的の因子はカラムに強固に結合し、通常の溶出条件ではほとんど回収することができなかった。上記の挙動はいずれもタンパク質としては非典型的であり、当該因子が非タンパク質であるか、または、特異な性質を有するタンパク質である可能性が考えられた。

(2) **ペクチナーゼ試薬からの 4CDP 分解酵素の精製** : ペクチナーゼ試薬を SDS-PAGE で解析したところ、本製品は未精製のクルードな状態であることが確認された。そこで、4CDP 分解活性を指標とした、試薬からの酵素精製を試みた。結果、硫酸アンモニウム分画に加え、疎水カラム、陰イオン交換カラム、ゲルろ過カラムを含めた計 4 回のクロマトグラフィーを実施することにより、酵素を高純度に精製することに成功した。

(3) **分子量と糖鎖修飾の有無の検討** : ゲルろ過カラムからの溶出パターンから、目的の酵素の分子量は 100,000 程度と概算された。精製後の標品を SDS-PAGE で解析したところ、スメア状の複数のバンドが観察され、酵素が糖鎖で修飾されている可能性が示唆された。Glycopeptidase F による糖鎖切断処理を行った結果、複数のスメア状のバンドが一本の明瞭なバンドに収束し、酵素が糖鎖による修飾を受けているという仮説が裏付けられた。

(4) **酵素および遺伝子の同定** : 糖鎖切断処理後に SDS-PAGE で確認されたバンドを、MALDI-TOF MS 解析に供した。結果、本タンパク質は、GDSL ファミリーに属するタンパク質と相同性を有する機能未知タンパク質(EHA22274)であることが示された。GDSL ファミリーには、芳香族エステルに作用する酵素が多く含まれており、そのいくつかは広い基質特異性や多機能性を有するこ

とで知られている。これらのことから、EHA22274 は芳香族ポリマーに作用する新規なエステラーゼであると推察した。

(5) **A. niger の 4CDP 分解活性の検討** : A. niger ATCC 1015 株を様々な培地で培養し、培養上清の 4CDP 分解活性を測定した。結果、ポテトデキストロースなどの一般的な培地で培養した場合は活性が検出されず、4CDP を含む合成培地で培養した場合にのみ有意な 4CDP 分解活性が検出された。

(6) **4CDP 分解活性と EHA22274 の発現量の相関性** : 上記結果を受け、菌が 4CDP 分解活性を示さないポテトデキストロース培地と、活性を示す 4CDP 含有培地にて、EHA22274 遺伝子の発現量を経時的に比較・検討した。結果、遺伝子の発現パターンは、4CDP 分解活性の出現パターンと一致し、培養上清中に検出された 4CDP 分解活性が EHA22274 の遺伝子産物によるものであることが強く示唆された。

(7) **EHA22274 の分泌発現系の構築** : 4CDP の試験的リサイクルシステムでの利用を見据え、EHA22274 の分泌発現菌の作出を試みた。「研究の方法」に記載の方法に従って実験を進めた結果、発現用プラスミドがゲノムに組み込まれたと考えられる形質転換体が複数株得られた。そこで、これらの純化を進め、最終的に 4 株の候補株を得た。これらの株に対し、酵素活性の検討を行った結果、4 株中 1 株が培地中に目的の酵素を分泌していることが確認された。

(8) **A. niger 由来 4CDP 分解酵素の基質特異性の検討** : ペクチナーゼ試薬から精製した酵素標品を用いて、基質特異性の検討を行った。4HCA または DHCA のみから成るポリマー標品を基質として酵素アッセイを行ったところ、分解活性は認められず、EHA22274 は 4HCA と DHCA が連結した構造部分の特異的に切断している可能性が示唆された。また、4CDP と部分的に構造が類似した 6 種類の小分子化合物を用意し、これらを基質とした酵素アッセイを行ったが、いずれの化合物についても分解は認められなかった。

(9) **総括と今後の展望** : 本研究により、新規な芳香族ポリマーの分解酵素が発見されるとともに、その性質の一部が明らかとなった。今回発見した酵素に類似したタンパク質を

コードする遺伝子は、多くの菌に分布しているが、その機能はほとんど分かっていない。今回の発見は、本タンパク質ファミリーの新しい機能を示した点においても意義が大きい。一方で、酵素の反応機構にはまだ不明な点が多く、また、目標であったリサイクルシステムの構築も達成には至らなかった。これらの課題は、基礎・応用の両面から極めて重要であり、関連研究分野への波及効果も大きいと考えられる。長期的な展望を見据え、今後も継続的に研究に取り組んでいきたい。

#### < 引用文献 >

Kaneko T., Thi T.H., Shi D.J. and Akashi M. "Environmentally degradable, high-performance thermoplastics from phenolic phytomonomers" *Nature Materials*, **5**, 966-970 (2006)

Yoshida S., Hiraga K., Takehana T., Taniguchi I., Yamaji H., Maeda Y., Toyohara K., Miyamoto K., Kimura Y. and Oda K. "A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate)" *Science*, **351**, 1196-1199 (2017)

Zhou S., Fushinobu S., Kim S.W., Nakanishi Y., Wakagi T. and Shoun H. "Aspergillus oryzae flavohemoglobins promote oxidative damage by hydrogen peroxide" *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **394**, 558-561 (2010)

#### 5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 10 件)

Itoh E., Odakura R., Oinuma K., Shimizu M., Masuo S. and Takaya N. "Sirtuin E is a fungal global transcriptional regulator that determines the transition from the primary growth to the stationary phase" *The Journal of Biological Chemistry*, 査読有, in press (2017), DOI: 10.1074/jbc.M116.753772

Itoh E., Shigemoto R., Oinuma K., Shimizu M., Masuo S. and Takaya N. "Sirtuin A regulates secondary metabolite production by *Aspergillus nidulans*" *The Journal of General and*

*Applied Microbiology*, 査読有, in press (2017), DOI: 10.2323/jgam.2016.11.002  
Sato K., Oinuma K., Niki M., Yamagoe S., Miyazaki Y., Asai K., Yamada K., Hirata K., Kaneko Y. and Kakeya H. "Identification of a novel *Rhizopus*-specific antigen by screening with a signal sequence trap and evaluation as a possible diagnostic marker of mucormycosis" *Medical Mycology*, 査読有, in press (2017), DOI: 10.1093/mmy/myw146  
Akiyama T., Ishii M., Takuwa A., Oinuma K., Sasaki Y., Takaya N. and Yajima S. "Structural basis of the substrate recognition of hydrazidase isolated from *Microbacterium* sp. strain HM58-2, which catalyzes acylhydrazide compounds as its sole carbon source" *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 査読有, **482**, 1007-1012 (2017), DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.11.148  
Oinuma K., Suzuki M., Sato K., Nakaie K., Niki M., Takizawa E., Niki M., Shibayama K., Yamada K., Kakeya H. and Kaneko Y. "Genome sequence of an *Acinetobacter baumannii* strain carrying three acquired carbapenemase genes" *Genome Announcements*, 査読有, **4**, e01290-16 (2016), DOI: 10.1128/genomeA.01290-16  
Akiyama T., Ishige T., Kanesaki Y., Ito S., Oinuma K., Takaya N., Sasaki Y. and Yajima S. "Draft genome sequence of *Microbacterium* sp. strain HM58-2, which hydrolyzes acylhydrazides" *Genome Announcements*, 査読有, **4**, e00554-16 (2016), DOI: 10.1128/genomeA.00554-16  
Masuo S., Kobayashi Y., Oinuma K. and Takaya N. "Alternative fermentation pathway of cinnamic acid production via phenyllactic acid" *Applied Microbiology and Biotechnology*, 査読有, **100**, 8701-8709 (2016), DOI: 10.1007/s00253-016-7623-4

〔学会発表〕(計 10 件)

老沼 研一 他「ゲノム情報に基づくアシネトバクター属臨床分離株の分子疫学解析」第91回 日本感染症学会総会・学術講演会, 2017年4月8日, 京王プラザホテル(東京都新宿区)

老沼 研一 他「POT法およびMLST法によるアシネトバクター属臨床分離株の遺伝子型解析」第51回緑膿菌感染症研究会学術集会, 2017年2月11日, レンブラントホテル大分(大分県大分市)

老沼 研一 他「アシネトバクター属臨床分離株の薬剤感受性試験と分子疫学解析」第59回 日本感染症学会中日本地方会学術集会, 2016年11月25日, 沖縄コンベンションセンター(沖縄県宜野湾市)

Oinuma K. 他 "Discovery and analysis of a novel *Rhizopus* antigen as a potential diagnostic marker for mucormycosis" 2016 International Symposium on New Frontiers in Microbiology and Biotechnology, 2016年7月6日, 筑波大学(茨城県つくば市)

老沼 研一 他「*Aspergillus niger* 由来芳香族ポリエステル分解酵素の発見と解析」日本農芸化学会 2015 年度大会, 2015年3月28日, 岡山大学津島キャンパス(岡山県岡山市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

老沼 研一 (OINUMA, Ken-Ichi)  
大阪市立大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号: 20635619

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

該当なし

### (4) 研究協力者

高谷 直樹 (TAKAYA, Naoki)  
金子 達雄 (KANEKO, Tatsuo)  
木澤 良恵 (KIZAWA, Yoshie)