

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：24506

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23656533

研究課題名(和文)ナイロンの生分解とリサイクル

研究課題名(英文)Biodegradation of nylon and its recycle

研究代表者

根来 誠司(Negoro, Seiji)

兵庫県立大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90156159

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：ナイロン薄膜を用いた新規分解活性測定系を開発した。薄膜では、酵素と基質との接触面積が反応中一定となるため、6ナイロン(工業製品)の薄膜が、ナイロン加水分解酵素Ny1Cの濃度に依存した一定の速度で加水分解され、最終的には、全て可溶化することが分かった。さらに、ナイロンダイマーを分解するNy1Bを併用することで、モノマーへ完全分解可能な条件も見出すことができた。ナイロン微粒子を用いた場合でも、化学的限定分解を組み合わせると、モノマーへの変換収率が90%以上となった。66ナイロンに対する分解活性は6ナイロンの約50%であったが、炭素数の異なるモノマーを共重合させると分解性が向上した。

研究成果の概要(英文)：Nylon hydrolase degrades various aliphatic nylons, including nylon-6 and nylon-66. We synthesized a nylon-66 copolymer, in which a part of an adipoyl unit of nylon-66 was replaced with a succinyl unit by interfacial polymerization. To quantify the reaction rate of the enzymatic hydrolysis of nylons at the surface of solid polymers, we prepared a thin-layer of nylons on the bottom surface of each well in a polystyrene-based micro-assay plate. More than 99% of the copolymer with thicknesses of 260 nm were converted to water-soluble oligomers by nylon hydrolase. The degradation rate of the thin-layered nylon-6 was similarly analyzed. We demonstrate that this assay enables a quantitative evaluation of the reaction rate of hydrolysis at the interface between the solid and aqueous phases and a quantitative comparison of the degradability for various polyamides.

研究分野：プロセス工学

科研費の分科・細目：生物機能・バイオプロセス

キーワード：ナイロン 酵素 生分解 薄膜

1. 研究開始当初の背景

環境負荷低減化のため、「生分解性プラスチック」の開発が重要視されているが、現在普及している生分解性プラスチックは、ポリ乳酸などのポリエステル類に限定されている。これらは強度、耐熱性がナイロンに比べ低く、繊維としての加工特性を有さない。これに対して、合成ポリアミドは強靱で、耐熱性、耐薬品性に優れている。特に、6 ナイロンと 66 ナイロンは、合成ポリアミド全体の約 90% を占め、繊維・プラスチックとして広く利用されている。我々はこれまで、ナイロン工場排水などを分離源として、6-アミノカプロン酸 (Ahx)オリゴマーを加水分解する約 10 種類の微生物を取得してきた。Ahx オリゴマーをエンド型様式で分解する酵素 NyIC については、*Arthrobacter* (pOAD2 保持株)、*Agromyces*、*Kocuria* 属細菌に見出されている (各々、NyIC_{p2}、NyIC_A、NyIC_Kと命名)。これら 3 種の NyIC は、アミノ酸残基が 5~15 カ所まで異なり、熱安定性も 8~15°C 異なる。3 酵素のアミノ酸配列の違いを基に、NyIC_{p2} ($T_m=52$) に、NyIC_A および NyIC_K 型のアミノ酸置換を行い熱安定性の変化を確認した結果、4 アミノ酸置換 (D36A/D122G/H130Y/E263Q) によって、耐熱性が 36 上昇した変異体 (NyIC-GYAQ) の取得に成功した ($T_m=88$)。その結果、ナイロン分子間の水素結合が緩和される高温での分解が可能となった。

2. 研究の目的

ナイロン生分解の問題点は、ナイロン分子間の水素結合により、強固な構造が形成されているためである。本研究では、次の観点からこの問題について検討する。

(1) 高度耐熱化 NyIC 酵素の取得と高温における酵素反応：高温反応では、ナイロン分子間の水素結合が不安定化し、酵素作用を受け易くなることが期待できる(図 1)。そのため、NyIC の高度耐熱化を行う。

(2) 前処理条件の検討：微粉末化、熱水処理など有効な前処理条件を調べる。さらに、エキソ型分解酵素 NyIB を併用し、6-アミノカプロン酸として回収可能なリサイクルプロセスの構築を目標とする(図 1)。

3. 研究の方法

(1) 各種ナイロンの界面重合による合成

ナイロンアジピン酸クロリド (C6) とヘキサメチレンジアミン (C6) から成る 66 ナイロン界面重合反応において、アジピン酸とは炭素鎖長の異なるコハク酸クロリド (C4)、グルタル酸クロリド (C5)、または、2級アミンの *N,N*-ジエチルヘキサメチレンジアミンを混合し、コポリマーを合成した。未反応の原料モノマーおよび可溶性オリゴマーを除去するた

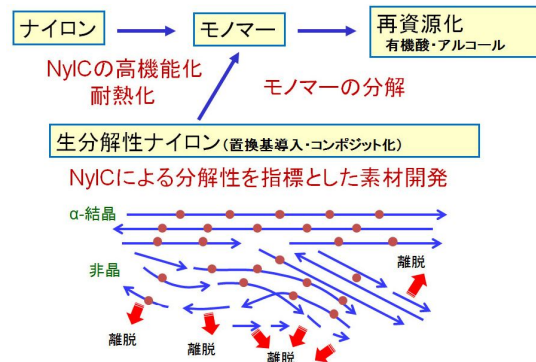


図 1. ナイロンの酵素分解と生分解性ナイロンの開発

め、水(2%の酢酸を含む)、メタノール、アセトン、酢酸エチルで洗浄した。ミキサーミルにより微粉末化し、超純水で5回洗浄した。さらに、超純水に懸濁した状態でオートクレーブ(120、20分)を行った。

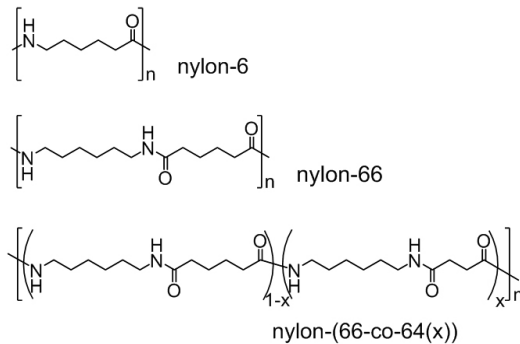


図 2. 各種ナイロンの構造

(2) 化学処理による限定分解

ギ酸に溶解させたサンプルを、100 で 0~50h 加熱し、凍結乾燥で、ギ酸を除去した。

(3) 酵素反応

各種ナイロンの微粉末化試料、または、薄膜化試料をナイロン加水分解酵素と反応させた後、トリニトロベンゼンスルホン酸ナトリウム(TNBS)を用いた発色法により、遊離アミノ基を測定した。

薄膜化試料については、マイクロプレート上にナイロンの薄膜を形成し、酵素反応後、薄膜を CCD カメラを装着したイメージングアナライザーで画像を取り込んだ。薄膜の透明度(濁度)を画像解析で定量化し、膜厚の変化速度を算出した。

4. 研究成果

(1) ナイロン分解に対する反応温度の効果

反応温度を 30 から 60 に上昇させると、遊離アミノ基の量は約 2 倍に上昇した(図 3 A)。また、一定間隔でポリマー分子間の水素結合を攪乱するモノマーを挿入した共重合体

を作成しその分解性を調べた。具体的には、66-ナイロンの界面重合反応時に炭素数が4のコハク酸ユニットを0.12-0.32 mol 当量の範囲で導入されるように添加した。これらに酵素を作用させたところ、コハク酸モノマーの割合が増えるにしたがって分解率が向上した(図3 B)。異種モノマーの分解性に及ぼす効果については、(2)節で詳細に述べる。

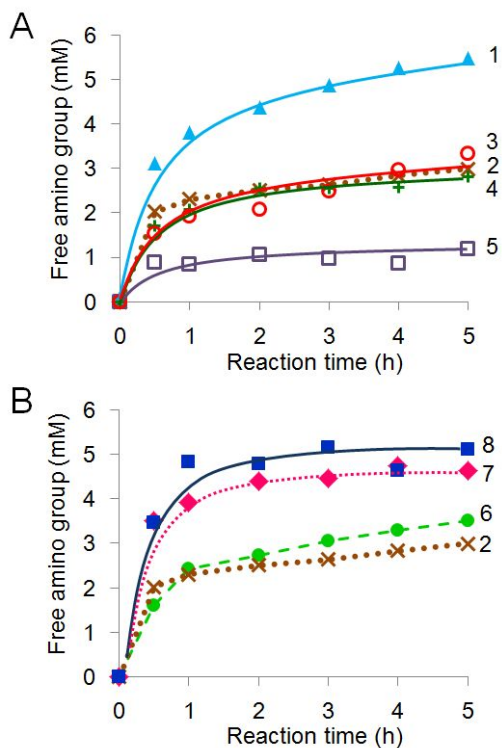


図3. ナイロンの酵素分解 **A**. 6-ナイロン、66-ナイロンの酵素分解. 反応温度 60 °C (1-3) 30 °C (4, 5). 1, nylon-6 (); 2, nylon-66_{Lab} (×); 3, nylon-66_{Ind}; (); 4, nylon-6 (+); 5, nylon-66_{Ind} (). **B**. コハク酸共重合-66-ナイロンの酵素分解 (反応温度 60 °C) 2, Nylon-66_{Lab} (×); 6 nylon-(66-co-64(0.12)) (); 7, nylon-66-co-64(0.28)) (); 8, nylon-(66-co-64(0.32)) ().

(2) 異種モノマー共重合66ナイロンの分解

アジピン酸クロリド(C6)とヘキサメチレンジアミン(C6)から成る66ナイロン界面重合反応において、アジピン酸とは炭素鎖長の異なるコハク酸クロリド(C4)、グルタル酸クロリド(C5)、または、2級アミンの *N,N*-ジエチルヘキサメチレンジアミンをモル比で10%混合したナイロンにおいて、分解性の向上が見られた。さらに、異種モノマーの混合割合を増加させたナイロンでは、分解性が一層向上しており、水素結合の緩和が、酵素分解に有効であることが示された。一方、炭素鎖長が7以上のモノマーを混合した場合や、ヘキサメチレンジアミンに炭素鎖長の異なるモノマーを混合した場合は、顕著な分解性の向上は認められなかった。

66ナイロンのジアミン側とジカルボン酸側の炭素鎖長の異なるモノマーを用いて、界面重合法により合成し、ナイロン加水分解酵素による分解性を検討した。アジピン酸クロリド(有機溶媒相)とペンタメチレンジアミン(水相)から合成した56ナイロンでは、高い分解性を示した。すなわち、微粉末化試料を20mM リン酸緩衝液 (pH7.3) に懸濁し(5mg/ml)、ナイロン加水分解酵素(耐熱化NylC 0.1mg/mL)を用いて60 で反応を行い、遊離アミノ基を、トリニトロベンゼンスルホン酸を用いた比色法で測定したところ、66ナイロンに比べて、分解率が約4倍上昇することが分かった(分解率: 6~7%)。一方、68ナイロン、6,10ナイロンでは逆に、分解性が低下した。これは、一定重量当たりのアミド結合数が低下するため水分子との親和性が低下したためと推定した。

以上の結果から、ジカルボン酸側の分子鎖長が、ナイロン分子と水分子の親和性に寄与すると考えられた。

(3) 前処理とNylB反応の併用効果

前処理による酵素分解性への効果を調べるため、6ナイロンを、100 でギ酸により限定分解した(10~50時間で、各々、分解率は4~15%)。凍結乾燥によりギ酸を除去後、上記と同条件で耐熱化NylCで分解した。しかし、NylC-GYAQは2量体を分解することができず、系中にはダイマーが残存してしまう。そこでモノマーへの完全分解を目指し、NylC-GYAQによる反応後に、直鎖状オリゴマーをエキソ型に切断する酵素NylBを添加し、ナイロン分解を行った。NylB(0.1mg/mL)を用いて30で反応を行ったところ、ナイロンポリマーの50~85%がモノマー化できた(図4)。

さらに、ギ酸処理条件を150時間まで延長すると、モノマー収率は95%に向上することが分かった。

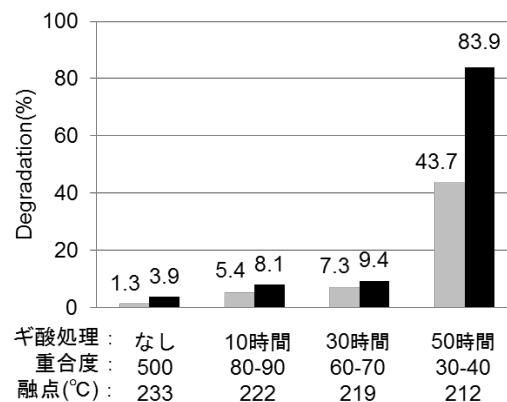


図4. ギ酸による限定分解処理を行った6-ナイロンの分解率. NylC-GYAQのみ(グレー), NylC-GYAQとNylB複合系(黒)での比較

(4) ナイロン薄膜を用いた分解速度の定量化

これまで述べてきたように、Ny1C-GYAQ 単体、あるいはNy1B との複合反応系にて高分子ナイロンを分解できることは確かめてきたが、本分解の反応速度を測定する手法は開発されていなかった。そのため、異なるナイロン基質間の分解速度の差異を定量化することは困難であった。反応速度算出のためには、基質や生成物の増減量を測定することが一般的であるが、固体であるナイロン微粉末の減少量を測定することは困難である。また、微粒子の粒度がばらばらで反応速度は一定とならない。そこで我々は、酵素と基質の接触面積が常に一定となるナイロン薄膜を用いた活性測定系を構築することとした。本薄膜反応系では一定速度にて酵素反応が進行するのみならず、膜厚変化を測定することによって反応速度の定量化も可能になると期待された。実験では、作成したナイロン薄膜の膜厚を原子間力顕微鏡(AFM)で実測すると共に、イメージンググアライザー(CCD カメラ装着)で撮影した薄膜の画像を、反射光強度として数値化した。その結果、膜厚の実測値と反射光強度の間には相関関係があることが分かった。この性質を利用することで酵素反応前後の膜厚の変化を算出することができるようになった。またナイロンの結晶構造や結晶化度の情報からポリマー鎖間距離を推測し、薄膜中のポリマーレイヤー数を見積もった。例えば、膜厚 260 nm の 6-ナイロン薄膜ではナイロンポリマーが 600 レイヤー積み重なっていると推測できた。

TNBS 法による遊離アミノ基の定量結果と、6-ナイロンおよびコハク酸共重合-66-ナイロン薄膜の膜厚の変化を図 5 に示す。期待通り、遊離アミノ基量が一定の速度で増加すると共に、膜厚も直線的に減少していくことが確認できた。薄膜分解速度は 1 mg/ml の酵素濃度の場合、6-ナイロン、コハク酸共重合-66-ナイロンの何れも同等で、2.2 nm/h と算出された(図 5A)。膜厚の減少と相関して遊離アミノ基量の増加も見られた。また 3 mg/ml の酵素濃度の場合、分解速度も増大するが、薄膜が全て可溶化した後も遊離アミノ基濃度の増加が確認された。従って、高分子のポリマーが分解された後も、オリゴマーの低分子化やモノマーへの分解が、継続して進行すると考えられた(図 5B)。

本研究で、Ny1C 変異体(GYAQ-Ny1C)が、高分子ナイロンをも加水分解できることを発見した。ナイロンポリマー分子間の水素結合を攪乱するモノマーを挿入した共重合体や、融点を保ちながら重合度を低く抑えたポリマーを化学的限定分解にて調製することによって、酵素分解反応を効率よく進めることもできるようになった。また、モノマーへ完全分解可能な条件も見出すことができた。

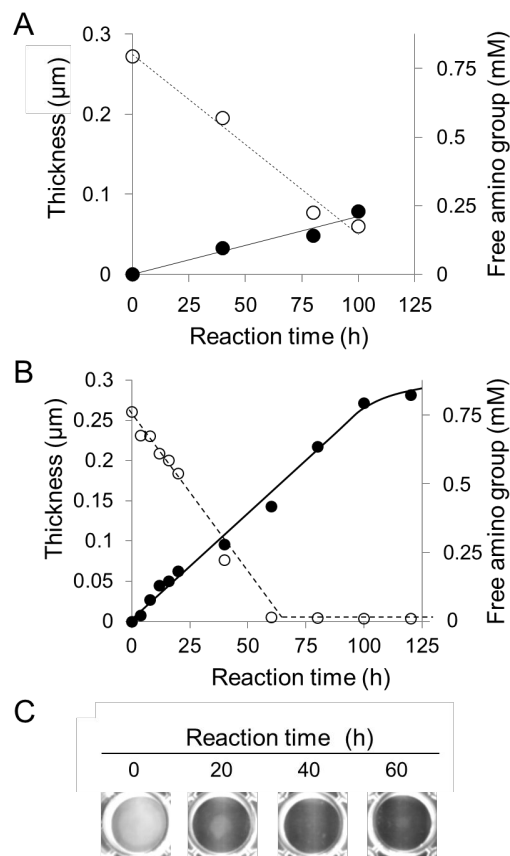


図 5. ナイロン薄膜を用いた酵素反応. A. 6-ナイロン (酵素濃度 1 mg/ml), B. コハク酸共重合 (0.32)-66-ナイロン (酵素濃度 3 mg/ml), 遊離アミノ基(○), 膜厚(●) C. コハク酸共重合 (0.32)-66-ナイロン薄膜外見の経時変化

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8 件)

1. Nagai, K., Iida, K., Shimizu, K., Kinugasa, R., Izumi, M., Kato, D., Takeo, M., Mochiji, K. & Negoro S. Enzymatic hydrolysis of nylons: quantification of the reaction rate of nylon hydrolase for thin-layered nylons. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 査読有 (in press) (2014)
2. Kamiya, K., Baba, T., Boero, M., Matsui, T., Negoro, S., & Shigeta, Y. Nylon-oligomer hydrolase promoting cleavage reactions in unnatural amide compounds. *J. Phys. Chem. Lett.*, 査読有 5, 1210-1216 (2014). doi.org/10.1021/jz500323y
3. Nagai, K., Yasuhira, K., Tanaka, Y., Kato, D., Takeo, M., Higuchi, Y., Negoro, S., & Shibata N. Crystallization and X-ray diffraction analysis of nylon hydrolase (Ny1C) from *Arthrobacter* sp. K172 *Acta Cryst.*, 査

- 読有、F69, 1151-1154 (2013)
doi: 10.1107/S1744309113024263
4. Negoro, S., Shibata, N., Tanaka, Y., Yasuhira, K., Shibata, H., Hashimoto, H., Lee, Y.-H., Oshima, S., Santa, R., Oshima, S., Mochiji, K., Goto, Y., Ikegami, T., Nagai, K., Kato, D., Takeo, M., & Higuchi, Y. Three-dimensional structure of nylon hydrolase and mechanism of nylon-6 hydrolysis. *J. Biol. Chem.*, 査読有、**287**, 5079-5090, (2012).
doi: 10.1074/jbc.M111.321992
 5. Yasuhira, K., Shibata, N., Tanaka, Y., Kumagai, N., Tanaka, Y., Nagai, K., Kato, D., Takeo, M., Negoro, S., Higuchi, Y. Crystallization and X-ray diffraction analysis of nylon oligomer hydrolase (NylC) from *Agromyces* sp. KY5R. *Acta Cryst.* 査読有、**F67**, 892-895 (2011).
doi: 10.1107/S1744309111022858
 6. Baba, T., Kamiya K., Matsui, T., Shibata, N., Higuchi, Y., Kobayashi, T., Negoro, S., & Shigeta Y. Molecular dynamics studies on the mutational structures of a nylon-6 byproduct-degrading enzyme. *Chem. Phys. Lett.* 査読有、**507**, 157-161 (2011).
doi.org/10.1016/j.cplett.2011.03.046
 7. 加藤太一郎、武尾正弘、根来誠司「高分子ナイロンを加水分解する酵素(NylC)の発見」(総説) 生物工学会誌、査読有、92巻特集「酵素の潜在能力を引き出す設計・戦略」(掲載決定)(2014年8月)
 8. 根来誠司、永井圭介、大島 祥平、飯田一希、加藤太一郎、武尾正弘、持地広造、柴田直樹、樋口芳樹「立体構造を基盤としたナイロン加水分解酵素の開発と耐熱化機構」(総説) 酵素工学ニュース 査読有、69号 pp.12-18 (2013年4月)

〔学会発表〕(計 20件)

1. 根来誠司「ナイロン加水分解酵素の分子設計と生分解性ポリアミド開発への展望」(シンポジウム)(招待講演) 2013年度日本農芸化学会大会、2013年3月28日、東北大学・川内キャンパス
2. 飯田一希、永井圭介、加藤太一郎、武尾正弘、根来誠司「各種ナイロンの酵素的モノマー化のための条件検討」 第65回日本生物工学会大会、2013年9月19日、広島国際会議場
3. 衣笠 凌、永井圭介、三田隆二、篠田昌宜、柴田 直樹、樋口芳樹、李 映昊、後藤祐児、加藤太一郎、武尾正弘、根来誠司「高

- 解像度 X 線結晶構造解析を基盤としたナイロン加水分解酵素 (NylC) の耐熱化機構の解明」第 65 回日本生物工学会大会、2013年9月19日、広島国際会議場
4. 永井圭介、大島祥平、柴田直樹、樋口芳樹、馬場 剛史、重田育照、加藤太一郎、武尾正弘、根来誠司 「分子動力学シミュレーションによるナイロン加水分解酵素 (NylC) の自己分断機構の解析」第65回日本生物工学会大会、2013年9月19日、広島国際会議場
 5. 矢部勇貴、西口拓紀、石和久 健、加藤太一郎、武尾正弘、根来誠司 「66 ナイロンダイマーの NylB 変異酵素を用いた分解挙動の解析」第65回日本生物工学会大会 2013年9月19日、広島国際会議場

他 15 件

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.eng.u-hyogo.ac.jp/msc/msc3/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

根来 誠司 (NEGORO, SEIJI)

兵庫県立大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：90156159

(2) 連携研究者

武尾 正弘 (TAKEO, MASAHIRO)

兵庫県立大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：40236443

加藤 太一郎 (KATO, DAI-ICHIRO)

兵庫県立大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：60423901