

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26288085

研究課題名(和文)プラスチック分解酵素のポリマー分解機構の解明と機能強化

研究課題名(英文) Investigation of microbial polymer-degrading enzymes and their mechanism

研究代表者

中島 敏明 (Nakajima-Kambe, Toshiaki)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：80241777

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では微生物由来の生分解性プラスチック分解酵素の遺伝子構造、および基質特異性について詳細に検討を加えるとともに、その産業利用を目指した生産条件の検討も視野に入れて各種検討を行った。まずRoseateles depolymerans TB-87株の全ゲノム解析を行い、分解酵素遺伝子を特定するとともに、TB-71株由来の分解酵素とのホモロジーについて解析した。さらに、シャペロン様タンパクの機能解析や、近縁種の分解酵素についての解析を行い、アミノ酸配列と基質特異性との関連を明らかにした。さらに、これらの微生物酵素の高発現化を目指して培養条件、培地コストの検討を行った。

研究成果の概要(英文)：In this study, genetic structure and substrate specificity of biodegradable plastic-degrading enzymes derived from microorganisms and their industrial application were investigated. First, the whole genome analysis of Roseateles depolymerans TB-87 was performed to identify its degradation enzyme genes and analyzed the homology with the enzyme derived from TB-71. Furthermore, functional analysis of chaperone-like protein and related enzymes of other plastic-degrading bacteria were carried out to clarify the relationship between amino acid sequence and substrate specificity. Furthermore, culture conditions and medium cost were examined for high expression of these microbial enzymes.

研究分野：産業微生物資源学

キーワード：生分解性物質 微生物酵素

1. 研究開始当初の背景

プラスチックを代表とする合成ポリマーのほとんどは、それ自体の毒性は低く健康被害も無いため、環境汚染物質としては見落とされがちである。しかしその多くが難分解性で、環境中に残留する。このため、海鳥や海獣などが誤食することにより生態系に深刻な被害を与えている。

合成ポリマーの中には、その構成単位中にエステル結合やアミド結合、ウレタン結合といった加水分解を受けやすい構造を持ったものも多い。構成単位であるモノマーは化学合成原料や発酵原料としても再利用可能である。これはモノマーリサイクルとよばれ、持続可能な循環型社会システムの構築が重要課題とされる現代において、特に注目されている。

申請者はプラスチックの分解微生物、分解酵素について精力的に研究を行っており、これまでにポリウレタン分解酵素や PBS(ポリブチレンサクシネート)、PBSA(ポリブチレンサクシネート-coアジペート)分解酵素、さらには脂肪族-芳香族コポリマー系のプラスチック分解酵素の取得にまで成功している。その中で、*Leptothrix* sp. TB-71 株由来の PBSA 分解酵素が、固体 PBSA に対して極めて高い分解性を示すことを見だし、バイオケミカルリサイクルへの応用を検討していた。

2. 研究の目的

本研究では微生物由来の生分解性プラスチック分解酵素の遺伝子構造、および基質特異性について詳細に検討を加えるとともに、その産業利用を目指した生産条件の検討も視野に入れて各種検討を行う。

Roseateles depolymerans TB-87 株は脂肪族芳香族系プラスチック分解菌として分離された細菌であり、本研究室の保有する *Leptothrix* sp. TB-71 株の分解能を上回ることが明らかとなっている(1)。従って、本菌株由来の生分解性プラスチック分解酵素 Est-H、Est-L や、その遺伝子情報を明らかにする事で、強力な分解機構が解明できると考えた。また、将来的に Est-H、Est-L 両酵素を改変し、より特異的な性質をもつ酵素を取得するためにも、両酵素をコードする機能遺伝子領域を特定し、遺伝子を改変することが必要になってくる。この両酵素をコードする遺伝子領域を特定するため、N 末端アミノ酸配列等が試みられてきたが、N 末端側がブロックされており、成功しなかった。従って本研究では、Est-H、Est-L をコードする遺伝子について機能や構造を明らかにすることを目的とした。これは、生分解性プラスチック分解酵素特有の分解活性や基質特異性の解明に繋がり、酵

素を用いたモノマーリサイクルシステム構築を前進させると考えられる。

また、将来的なモノマーリサイクルシステム構築に向けて、分解菌、分解酵素について、の生産条件の低コスト化、高生産システムの構築についても検討する。

3. 研究の方法

本研究では、まず *Roseateles depolymerans* TB-87 株の全ゲノム解析を行い、分解酵素遺伝子を特定するとともに、TB-71 株由来の分解酵素とのホモロジーについて解析した。さらに、シャペロン様タンパクの機能解析や、近縁種の分解酵素についての解析を行い、アミノ酸配列と基質特異性との関連を明らかにし、プラスチック分解酵素のポリマーに対する基質特異性の変化についての総合的な知見を得た。

研究に用いた 2 菌株 (*Leptothrix* sp. TB-71 株と TB-87 株) は、互いに系統的に近縁である。また、両菌株ともに淡水サンプルから分離されており、生育環境も類似している。これらの菌株のうち、TB-71 株については全ゲノムのドラフト解析が終了しており、かつ分解酵素遺伝子も特定されている。一方で TB-87 株については、酵素は精製されているが遺伝子に関する知見はない。そこで、まず TB-87 株の全ゲノム解析を行い、精製酵素のアミノ酸配列を元に、本菌株の持つ 2 種の分解酵素の特定を行った。同時に分解酵素遺伝子周辺を検索し、シャペロン様タンパクの有無を調べた。その後、両者の分解酵素のホモロジー解析を行った研究にあたってはパキスタンの研究者 (A. A. Shah 博士) の協力を得た。

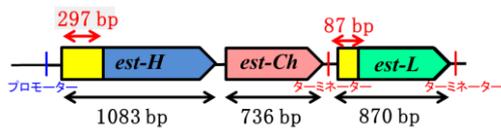
さらに、これらの微生物酵素の高発現化を目指して培養条件、培地コストの検討を行った。酵素の大量生産や簡便な精製法についてはインドの研究者 (N. R. Kamini 博士) の協力を得た。

4. 研究成果

本研究室保有の生分解性プラスチック分解菌 *Roseateles depolymerans* TB-87 株は、基質特異性や分解活性のよく似た 2 種類の分解酵素 Est-H、Est-L を分泌する(2)。そこで、TB-87 株のドラフトゲノム解析と精製酵素の内部アミノ酸配列分析による Est-H、L 遺伝子の特定、および周辺領域の解析を行った。また、それらと相同性のあるタンパク質を検索した。

内部アミノ酸配列解析の結果と TB-87 株全ゲノムデータより、酵素遺伝子の特定を行った。その結果、Est-H、L 遺伝子と考えられる

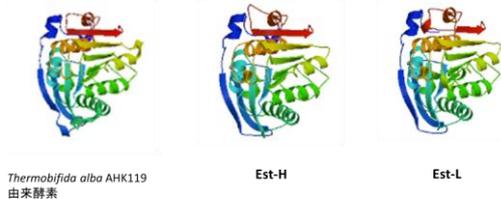
ORFそれぞれ 1083bp、870bp を特定した。両遺伝子は互いに高い相同性を持ち、それらはシャペロン様遺伝子を挟んで近接していた。



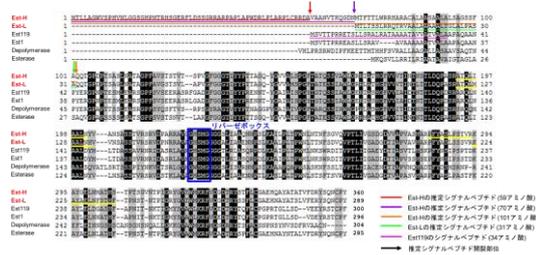
また周辺には多数の機能未知の遺伝子が確認された。当研究室保有の他の生分解性プラスチック分解菌 (TB-71 株) にも酵素遺伝子の近傍にシャペロン様遺伝子が存在するものがあり、Est-H、L 遺伝子とシャペロン様タンパク質の相互作用の解明は、生分解性プラスチック分解酵素遺伝子の発現機構解明につながる可能性がある。

BLAST によるアミノ酸相同性検索の結果、本酵素遺伝子は一部のクチナーゼやエステラーゼなど加水分解酵素と高い相同性を示した。中でも *Thermobifida alba* AHK119 株由来の好熱性の生分解性プラスチック分解酵素と高い相同性を持っていた(3)。両者の酵素タンパク質の構造上の類似点や差異を研究することで、生分解性プラスチックの耐熱化に関する情報が得られ、その応用に大きな進展をもたらすと考える。

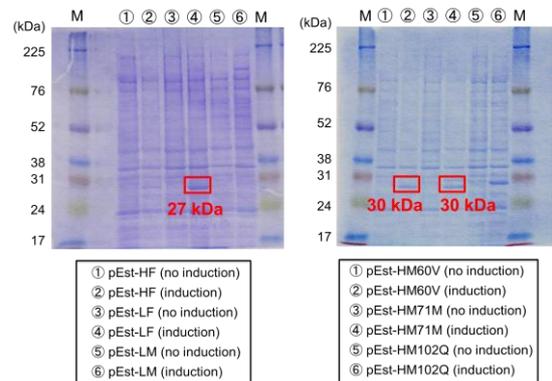
● Swiss-modelを用いた立体構造の推定



両酵素と他菌株由来酵素とのアミノ酸アライメントと特徴を下に示す。Est-H、Est-L の N-末端にはシグナルペプチド配列が存在している。Signal P および *T. alba* AHK119 株の Est119 (3) のシグナルペプチド配列を元に特定を行ったところ、Est-H は 102 aa、Est-L は 31 aa であると推定された。しかし Est-H において、推定したシグナル配列を除去した場合のタンパク質の分子量は 27 kDa となり、野生株由来酵素の分子量と異なっていた。さらに Est-H のシグナルペプチド配列について検討したところ、60 番目の V(Est119 の開始コドンに相当)もしくは 71 番目の M(Est-L の開始コドンに相当)の前でシグナルペプチドが開裂されると推定された。



推定したシグナルペプチド配列を除いた *est-H* および *est-L* を pET21b にクローニングし、*E. coli* Rosetta (DE3) に導入した。全長を導入した *est-L* (pEst-LF) は、発現が見られなかったのに対し、シグナル配列を除去した Est-L (pEst-LM) は推定分子量である 27 kDa にバンドが確認された。一方、全長を導入した *est-H* (pEst-HF) は *est-L* と同様に発現は見られなかったが、59 および 70 アミノ酸を除去した場合 (pEst-HM60V, pEst-HM71M)、推定される約 30 kDa にバンドが確認された。しかし、発現タンパクは封入体を形成し、活性は見られなかった。



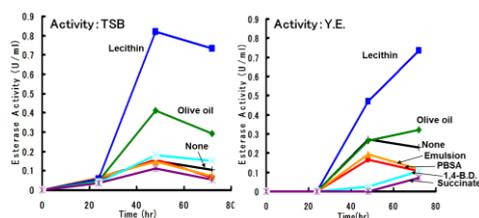
シグナルペプチドを除去することで発現

本酵素はプラスチックを分解する際に疎水的相互作用による表面への付着を行うための疎水性ドメインを有していると考えられる。しかし、その疎水性ドメインの存在が大腸菌での発現時のフォールディングを阻害している可能性が考えられた。そこで、誘導時期の検討と並行して界面活性剤の添加やヒートショックを試み、フォールディングの促進を促したところ、界面活性剤として deoxy-BIGCHAP を用いた場合に、わずかに活性が認められた。

またプラスチックリサイクルへの応用を目指し、他の微生物由来の分解酵素についても検討を行った。当研究室保有の *Leptothrix* sp. TB-71 株は栄養培地中でポリエステル系生分解性プラスチックであるポリブチレンサクシネート-co-アジペート(PBSA)分解酵素を生産する。この TB-71 株による酵素生産の最適条件の検討を行い、実用化に向けた酵素生産を試みた。

初めに、天然培地である NB、TSB、LB 培地と無機塩培地(M9)に Yeast Extract、Malt Extract を加えた培地(Y.E.培地、M.E.培地)を用いて TB-71 株を培養し、生育量と酵素活性の向上が認められる培地の検討を行なった。次に、向上の認められた培地を用いて固体 PBSA および PBSA エマルジョン、脂質であるオリーブオイル、リン脂質である大豆レシチン、PBSA 構成モノマーである 1,4-ブタンジオール、コハク酸をそれぞれ 1% となるように培地に添加し、更なる酵素活性の向上が

認められる添加基質の探索を行なった。検討の結果より、酵素活性の向上が認められた培養条件を用いて酵素生産のスケールアップを試み、改善点を検討した。その結果、TSB培地、Y.E.培地において生育量及びエステラーゼ活性が向上し、大豆レシチンやオリーブオイルを添加することでエステラーゼ活性が更に向上した。その要因として大豆成分、油脂、ビタミンなどが酵素生産に作用している可能性が考えられた。TSB大豆レシチン添加培地での酵素大量生産では、酸素供給と精製法の検討が必要であることが示された。



さらに、インドの研究者の協力を得て、高い分解性を持つ酵母を選択し、そのプラスチック分解能の検討を行った。さらに本酵素の低コストな発酵生産法を検討し、一定の成果を得た。

(引用文献)

(1) Shah, A. A., Eguchi, T., Mayumi, D., Kato, S., Shintani, N., Kamini, N. R., and Nakajima-Kambe, T.: Degradation of aliphatic and aliphatic-aromatic co-polyesters by depolymerases from *Roseateles depolymerans* strain TB-87 and analysis of degradation products by LC-MS, *Polym. Degrad. Stab.*, 98, 2722-2729 (2013).

(2) Shah, A. A., Eguchi, T., Mayumi, D., Kato, S., Shintani, N., Kamini, N. R., and Nakajima-Kambe, T.: Purification and properties of novel aliphatic-aromatic co-polyesters degrading enzymes from newly isolated *Roseateles depolymerans* strain TB-87, *Polym. Degrad. Stab.*, 98, 609-618 (2013).

(3) Hu X., et al. Diversity of polyester-degrading bacteria in compost and molecular analysis of a thermoactive esterase from *Thermobifida alba* AHK119. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87(2):771-779. (2010)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

①Thirunavukarasu, K., Purushothaman, S., Sridevi, J., Aarthy, M., Gowthaman, M. K., Nakajima-Kambe, T., and Kamini, N. R.:

Degradation of poly(butylene succinate) and poly(butylene succinate-co-butylene adipate) by a lipase from yeast *Cryptococcus* sp. grown on agro-industrial residues, *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 110, 99-107 (2016).

査読有

DOI: 10.1016/j.ibiod.2016.03.005

②Thirunavukarasu, K., Purushothaman, S., Gowthaman, M. K., Nakajima-Kambe, T., Rose, C., and Kamini, N. R.: Utilization of fish meal and fish oil for production of *Cryptococcus* sp. MTCC 5455 lipase and hydrolysis of polyurethane thereof, *J Food Sci Tech*, 52, 5772-5780 (2015).

査読有

DOI: 10.1007/s13197-014-1697-8

[学会発表] (計 3 件)

①中島鈴佳, 野中大輔, 森田穂, 内堀孝博, 清啓自, 中島敏明 (2016/09/30). テレフタル酸分解菌の取得とその性質. 日本生物工学会 68 回大会(富山国際会議場 富山県富山市).

②鈴木敏弘, Ahmad Azura, Dendi Nugraha, 中島敏明 (2015/10/28). *Roseateles depolymerans* が生産する生分解性プラスチック分解酵素の発現と機能. 日本生物工学会 67 回大会(城山観光ホテル 鹿児島県鹿児島市).

③中島敏明, 筒井敦司, 飯島俊, 鈴木敏弘 (2014/09/11). *Roseateles depolymerans* 由来の 2 種の生分解性プラスチック分解遺伝子のクローニング. 日本生物工学会 66 回大会(札幌コンベンションセンター 北海道札幌市).

[図書] (計 1 件)

①中島敏明: 生分解性プラスチックと微生物の話, 環境と微生物の辞典, 朝倉書店, 361-362 (2014).

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: テレフタル酸分解菌
 発明者: 中島敏明、中島鈴佳、内堀孝博、湯川孝男
 権利者: 筑波大学、パナック工業株式会社
 種類: 特許
 番号: 特願 2016-163026
 出願年月日: 平成 28 年 8 月 23 日
 国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等
 研究代表者ホームページ (研究成果を記載)

<http://researchmap.jp/nakajimatoshiaki/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中島 敏明 (NAKAJIMA Toshiaki)
筑波大学・生命環境系・教授
研究者番号：80241777

(2) 研究協力者

NUMBI Ramudu Kamini
Central Leather Research Institute (インド)・Department of Biotechnology・部門長

SHAH Aamer Ari
Quaid-i-Azam University (パキスタン)・
Department of Microbiology・准教授