

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19550156

研究課題名（和文） バイオポリエステルと分解菌のリアルタイム相互作用解析

研究課題名（英文） Real time analysis of interactions between biopolyester and its degrading enzyme

研究代表者

山下 宏一（YAMASHITA KOICHI）

独立行政法人理化学研究所・化学分析チーム・専任研究員

研究者番号：90174672

研究成果の概要：バイオポリエステルと分解菌の相互作用を解析するために、培養槽と水晶発振子マイクロバランス（QCM）を組み合わせた循環システムを開発したが、気泡の混入と培地の吸着のために安定的なデータを得ることは困難であった。また、分解菌モデルとして菌表面に分解酵素を発現させた大腸菌を調製してバイオポリエステルとの相互作用を解析したところ、菌吸着によるフィルム重量の増加とフィルム表面の粘弾性変化を同時観測することに成功した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・環境関連化学

キーワード：環境材料・微生物・生分解性ポリエステル・QCM

## 1. 研究開始当初の背景

ポリ(ヒドロキシアルカン酸) (PHA)などのバイオポリエステルは、バイオマスを原料として微生物が産生する熱可塑性樹脂であり、使用後は微生物分解を受けて自然環境中に還元される資源循環型の低環境負荷材料である。これらバイオポリエステルの生分解性を用途に応じて制御するためには、微生物分解の機構と特性を理解する必要がある。

バイオポリエステルの生分解においては、分解菌が分泌するPHA分解酵素によるエステル加水分解反応が直接的な分解過程であることから、国内外において酵素分解機構が精

力的に調べられてきた。PHA分解酵素は、基質結合ドメイン・触媒ドメインおよび両者をつなぐリンカー領域から構成され、酵素分解は基質表面への酵素吸着と加水分解の2段階で進行する。研究代表者は、酵素吸着と加水分解によって基質重量が増減することに着目し、ngの重量変化追跡が可能な水晶発振子マイクロバランス(QCM)法を用いて固液界面で起こる酵素分解反応を高感度分析することに成功した。そして、酵素吸着は分解速度を決定する重要な過程であり、基質結合ドメインはエステル結合と強く相互作用して不可逆的に吸着するという特性を明らかにし

ている。また、分担者は、水溶性オリゴマーの酵素分解研究により、触媒サイトがポリエステルモノマーユニットを特異的に認識する3個以上のサブユニットから形成され、加水分解反応を触媒することを明らかにしている。

このように、バイオポリエステル酵素分解機構の全容がほぼ明らかになりつつある一方で、分解菌の作用メカニズムはほとんど解明されていない。すなわち、微生物分解においては、酵素を含む様々な物質が分泌され、分解菌の固体表面への接着・増殖、基質センシングと酵素分泌、酵素分解、分解生成物の取り込みなど、さまざまな現象が起こっていると考えられ、酵素分解研究だけでは、バイオポリエステル生分解の特性を理解することは不可能である。

## 2. 研究の目的

本研究では、バイオポリエステルの微生物分解を支配している因子を明らかにすることを目的として、分解菌とポリエステルとの相互作用をリアルタイム解析する手法を開発し、ポリエステルと分解菌との相互作用を菌体レベルあるいは分子レベルで解明することを目指す。

この目的を達成するためには、通常的手法では測定困難な固液界面で起こる現象を定量的にリアルタイム追跡できる測定技術が必要となる。また、微生物はサイズが大きくて柔らかいため、表面接着にともなう変形がおこり、それによって相互作用がさらに変化するという複雑な接着挙動をしめす。このため、微生物の接着挙動の定量分析は非常に難しく、顕微鏡観察などの半定量的な方法にほぼ限定されているのが現状である。本課題では、固液界面の優れたリアルタイム定量分析手段であるQCMを使用しながら、原子間力顕微鏡(AFM)による分解菌の形態観察を相補的に用いることによって、バイオポリエステルと分解菌との相互作用を多角的に定量評価する。QCM法は、発振子の共振周波数と共振抵抗測定によって表面に存在する物質の重さと粘弾性を同時に検出できることから、分解菌のような柔らかな物質の研究に適した手法である。また、AFMはポリエステルに吸着した分解菌の形状をナノメートルオーダーで観察できる手法である。申請者らは、これらの解析手法を駆使した酵素分解研究で上述の成果を上げており、本申請の予備実験においても、バイオポリエステルへの大腸菌の接着をQCMで検出することと、AFMによる接着した大腸菌の画像化に成功している。

本研究では、(1)分解菌を培養しながらの分解菌接着および基質分解の重量分析を可能とする培養槽とQCMセルを接続した循環型測定系を作製すること、(2)分解菌増殖速度

とポリエステルへの菌接着速度の相関を明らかにすること、(3)分解酵素分泌のトリガーとなるPHAまたはHAモノマーを添加して解析を行うことで、酵素分泌のタイミングを明らかにするとともに、分解菌増殖速度・分解酵素分泌量・ポリエステル分解速度の相関を調べることに、さらに、(4)AFM観察により基質への接着にともなう分解菌の形態変化を調べるとともに、(5)分解菌が作用した基質ポリエステルの表面観察によって生分解による基質表面の形状変化を調べ、QCM測定との相補的解析によって分解菌の作用機構を推察することを目的とした。

バイオポリエステルと分解菌の相互作用研究は、バイオポリエステル研究の初期に報告例があるが、分析手法の限界から定性的観察に留まっている。本研究は、培養とQCMによる微量重量分析ならびにAFMによる形態観察を組み合わせるバイオポリエステルの分解菌による分解を一元的に定量分析する初めての例である。

## 3. 研究の方法

### (1) 分解菌培養リアルタイム解析システム

バイオポリエステル分解菌培養槽と水晶発振子マイクロバランス(QCM)を組み合わせた循環システムを開発した(Fig. 1)。菌培養槽には全容500mL培養装置(バイオット・BMJ-50PI-S)を用い、ペリスタポンプにより、培養液を濁度モニター(ジーエルサイエンス・液体クロマトグラフ用UVモニター502U)を経て、ポリエステルフィルムを装着したQCM(SEIKO EG&G・QCA-917)に循環するように配管した。

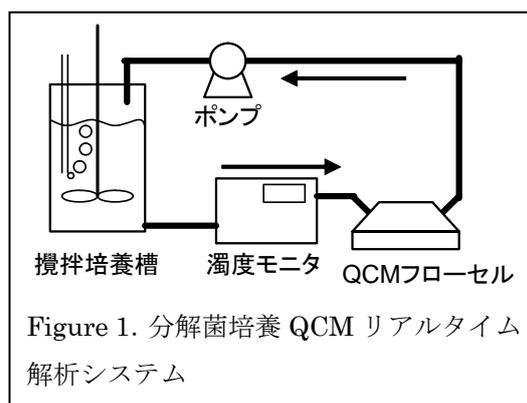


Figure 1. 分解菌培養 QCM リアルタイム解析システム

### (2) 分解菌モデルとバイオポリエステルとの相互作用解析

大腸菌は、野生型菌(*E. coli*)、膜タンパクに直接分解酵素がつながった菌(*E. coli* + PhaZ)、膜タンパクに1から3個の分解酵素由来のリンカー領域を導入した菌(*E. coli* + 1L + PhaZ, *E. coli* + 2L + PhaZ, *E. coli* + 3L + PhaZ)の5種類を調製した。実験には、それぞれの種類について、生きた菌体と菌体

を破碎して得た膜面分を使用した。

バイオポリエステルには、ポリ[(R)-3-ヒドロキシブタン酸] (P(3HB))の溶融結晶化フィルムを用いた。フィルムは、乾燥空気流下、4000 rpm で回転させた QCM 振動子に P(3HB)のクロロホルム溶液をスピンキャストし、これを 200° C で 60 秒間溶融後、110° C で 1 日結晶化させて作製した。

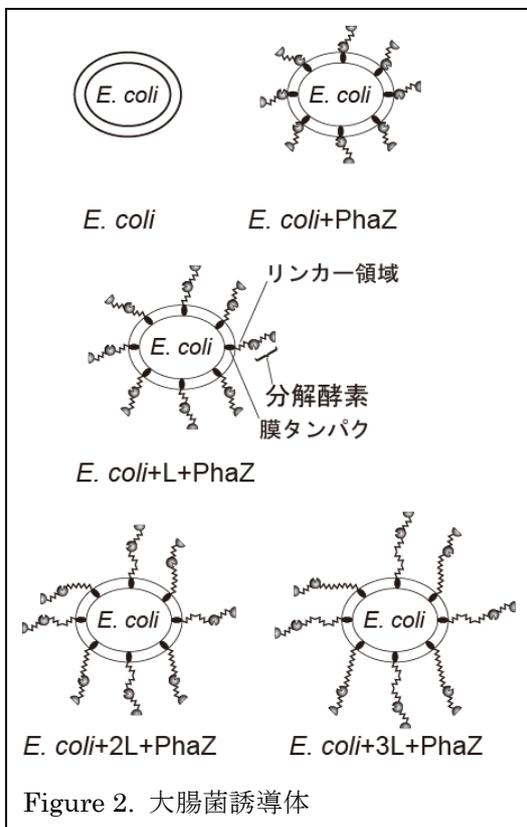
QCM測定には容量 0.2 mLのセルをつけた QCA-917 (SEIKO EG&G)を使用し、10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-NaOH緩衝溶液(pH 7.0)中、37 °Cで大腸菌を PHBフィルムに反応させた。なお、緩衝液は脱気せずに用いた。

#### 4. 研究成果

##### (1) 分解菌培養リアルタイム解析システム

バイオポリエステルの生分解において、分解菌を培養しながらの分解菌接着および基質分解の重量分析をリアルタイムで可能にするために、菌培養槽と水晶発振子マイクロバランス (QCM) を組み合わせた循環システムを開発した (Fig. 1)。

循環測定系の安定性評価と改良をおこなうため、菌体を含まない培地溶液を用いてテストを実施した。培養条件下では、培養槽のエアレーションによって発生する気泡の循環系への混入を完全に抑制することが難しく、また長時間の培養を行った場合には流路への培地等の吸着が生じ、さまざまな改良を試みたものの、濁度測定と QCM 測定において安定的なデータを得ることは非常に困難で



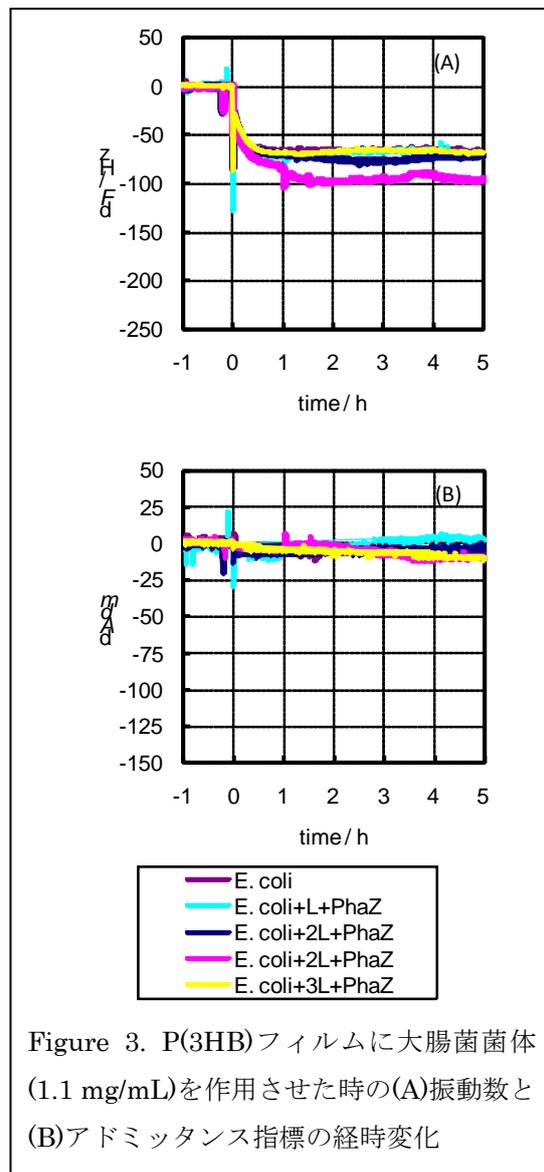
あった。

##### (2) 分解菌モデルとバイオポリエステルとの相互作用解析

分解菌の作用を単純なモデル化により理解することを目的として、操作性が良く特性も明らか大腸菌 (*E. coli*) の表面に PHA 分解酵素を導入した遺伝子組み換え菌を作製し、循環システムから独立した QCM 装置を使用して、バッチ式で大腸菌とバイオポリエステルとの相互作用評価を試みた。

大腸菌表面への分解酵素の導入には、*Ralstonia pickettii* T1 由来の PHA 分解酵素 (PhaZ) を融合させた膜タンパク質を用いた (Fig. 2)。また、分解酵素とタンパク質の間に挿入したフレキシブルなリンカー領域 (L) の長さによって、分解酵素部分の自由度を制御した。

##### ① 菌体と P(3HB) フィルムとの相互作用



P(3HB) フィルムに大腸菌体を作用させた時の振動数シフト ( $dF$ ) とアドミッタンス指標 (共振抵抗の逆数に比例する指数) シフト ( $dAdm$ ) の経時変化を Fig. 3 に示した。

いずれの菌体においても、振動数 ( $dF$ ) が減少したのに対し、吸着物質の粘弾性変化を反映するアドミッタンス指標 ( $dAdm$ ) は変化しなかった。したがって、振動数の変化量は、菌体の吸着によるフィルム重量の増加量を意味していると考えられる。分解酵素 (PhaZ) で修飾していない大腸菌でも振動数の減少が観測されたことから、天然型の大腸菌でも P(3HB) に吸着することがわかった。また、吸着量は、基質結合ドメインを持つ PhaZ の有無、あるいはリンカーの長さ (PhaZ 部分の自由度) の違いにかかわらず同じであった。このことから、PhaZ を導入した菌体においても菌表面の PhaZ の密度は小さく、PhaZ 導入の効果が現れなかったと推測される。さらに、PhaZ を導入した大腸菌の吸着後にフィルム重量の減少が検出されなかったことから、菌表面の PhaZ による P(3HB) の分解は非常に遅いことが分かった。これは、吸着過程と同様に、菌体表面の PhaZ の密度が小さいことが原因であると考えられる。

大腸菌誘導体の吸着量は、溶液中の菌体濃度が高くなるにつれて大きくなったが、菌体濃度 1.1 mg/mL 以上で一定となった。これは、P(3HB) フィルム表面が大腸菌で飽和するためであると考えられる。

## ② 大腸菌膜面分と P(3HB) フィルムとの相互作用

表面に分解酵素 PhaZ を導入した大腸菌の菌体と P(3HB) との相互作用は、菌体表面の PhaZ の密度が小さいために評価することができなかった。そこで、大腸菌誘導体を超音波破碎して得られた膜面分を用いて、P(3HB) 溶融結晶化フィルムとの相互作用を調べた (Fig. 4)。

膜面分の反応による振動数 ( $dF$ ) のシフト量は、菌体の場合と比べて、かなり大きかった。同時に測定されたアドミッタンス指標 ( $dAdm$ ) についても、負のシフトが観測されたことから、振動数の変化量には、膜面分の吸着による P(3HB) フィルム重量の増加に加えて、吸着物質の粘弾性の効果が含まれていると考えられる。膜面分の吸着では、振動数とアドミッタンス指標のいずれの変化量も、菌体の吸着よりも大きかったことから、膜面分の P(3HB) フィルムとの相互作用は、菌体よりも大きいことが明らかとなった。また、大腸菌誘導体の種類の違いの影響を見ると、アドミッタンス指標の変化量は、 $E. coli + PhaZ > E. coli + L + PhaZ > E. coli + 2L + PhaZ \sim E. coli + 3L + PhaZ \sim E. coli$  の順となっており、膜表面近傍に分解酵素部位がある

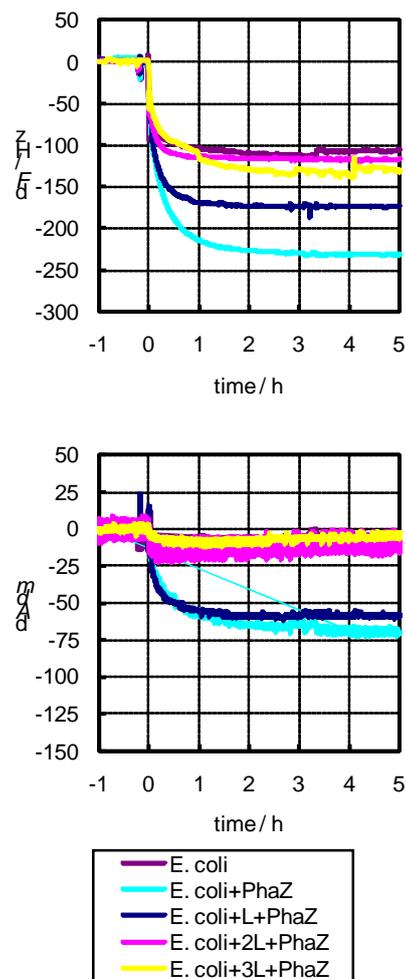


Figure 4. P(3HB) フィルムに大腸菌膜面分 (1.1 mg/mL) を作用させた時の (A) 振動数と (B) アドミッタンス指標の経時変化

方が、P(3HB) との相互作用が大きいことが分かった。

## 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 4 件)

- ① Keiji Numata, Koichi Yamashita, Masahiro Fujita, Takeharu Tsuge, Ken-ichi Kasuya, Tadahisa Iwata, Yoshiharu Doi, and Hideki Abe, "Adsorption and Hydrolysis Reactions of Poly(hydroxybutyric acid) Depolymerases Secreted from *Ralstonia pickettii* T1 and *Penicillium funiculosum* onto Poly[(R)-3-hydroxybutyric acid]", *Biomacromolecules*, **8**, 2276-2281, (2007), 査読有

- ② Kenji Kurokawa, Koichi Yamashita, Yoshiharu Doi and Hideki Abe, "Structural Effects of Terminal Groups on Nonenzymatic and Enzymatic Degradations of End-Capped Poly(L-lactide)", *Biomacromolecules*, **9**, 1071-1078, (2008), 査読有
- ③ Nobuhiko Matsumoto, Masahiro Fujita, Tomohiro Hiraishi, Hideki Abe, and Mizuo Maeda, "Adsorption characteristics of P(3HB) depolymerase as evaluated by surface plasmon resonance and atomic force microscopy", *Biomacromolecules*, **9**, 3201-3207, (2008), 査読有
- ④ Tomohiro Hiraishi, Eriko Masuda, Madoka Nagata, Naoki Kanayama, Yoshiharu Doi, Hideki Abe, and Mizuo Maeda, "Cloning of poly(aspartic acid) (PAA) hydrolase-1 gene from *Pedobacter* sp. KP-2 and hydrolysis of thermally synthesized PAA by its gene product", *Macromol. Biosci.*, **9**, 10-19, 2009, 査読有

[学会発表] (計 11 件)

- ① 山下宏一・城座彩子, 「ポリ乳酸のプロテアーゼによる分解機構」, 第 56 回高分子討論会, 2007 年 9 月 20 日, 名古屋市
- ② 山下宏一, 「生分解性ポリマー表面における酵素反応の解析」, 第 1 回日本化学会関東支部大会, 2007 年 9 月 27 日, 八王子市
- ③ Koichi Yamashita, "Enzymatic Degradation of Poly(L-lactide) by proteases", International Symposium on Polymers and The Environment, 2007 年 10 月 19 日, Vancouver, Washington, USA.
- ④ 山下宏一・黒川賢志・阿部英喜, 「ポリ乳酸表面へのタンパク質吸着の制御」, 第 57 回高分子学会年次大会, 2008 年 5 月 28 日, 横浜市
- ⑤ 平石知裕・舛田エリ子・阿部英喜・前田瑞夫, 「ポリアスパラギン酸分解酵素の性質とそれを用いたポリアミノ酸合成」, 第 57 回高分子学会年次大会, 2008 年 5 月 29 日, 横浜市
- ⑥ 阿部英喜・黒川賢志・山下宏一・土肥義治, 「ポリ乳酸の加水分解性に及ぼす末端官能基の構造効果」, 第 57 回高分子学会年次大会, 2008 年 5 月 28 日, 横浜市
- ⑦ 山下宏一, 「市販プロテアーゼによるポリ(L-乳酸)の酵素分解」, 第 57 回高分子討論会, 2008 年 9 月 26 日, 大阪市
- ⑧ 小宮直也・平石知裕・前田瑞夫, 「PHB 分解酵素吸着部位におけるアミノ酸置換が与える PHB 酵素分解挙動の変化」, 第 57 回高分子討論会, 2008 年 9 月 26 日, 大阪市
- ⑨ 阿部英喜・黒川賢志・山下宏一・土肥義

治, 「分子鎖末端修飾によるポリ乳酸の表面特性改変と高機能化」, 第 57 回高分子討論会, 2008 年 9 月 26 日, 大阪市

- ⑩ Koichi Yamashita, "Kinetics of Enzymatic Degradation of Poly(L-lactide) by commercially-available proteases", International Symposium on Biological Polyesters, 2008 年 11 月 26 日, Auckland, New Zealand.
- ⑪ Tomohiro Hiraishi, "Characteristics of poly(aspartic acid) hydrolase and its application", International Symposium on Biological Polyesters, 2008 年 11 月 26 日, Auckland, New Zealand.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山下 宏一 (YAMASHITA KOICHI)  
独立行政法人理化学研究所・化学分析チーム・専任研究員  
研究者番号：90174672

### (2) 研究分担者

平石 知裕 (HIRAISHI TOMOHIRO)  
独立行政法人理化学研究所・前田バイオ工学研究室・専任研究員  
研究者番号：20321804