

機関番号：84421

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21710086

研究課題名（和文） セルロース系バイオマスの酵素分解によるリサイクルモデルの構築

研究課題名（英文） Construction of the recycling model with enzymatic degradation of cellulose acetate

研究代表者

森芳 邦彦 (MORIYOSHI KUNIHICO)

地方独立行政法人大阪市立工業研究所・研究員

研究者番号：30416367

研究成果の概要（和文）：

セルロースアセテート（CA）は、繊維やフィルムなど広く使われている。CAの廃棄物を資源として有効利用するため、酵素での分解を検討した。CA分解菌が生産する分解酵素、および、この酵素と類似の好熱性菌由来の酵素を大腸菌で大量に生産させることができた。これにより、CAの酵素分解を効率よく行うことができ、CAの酵素分解物を化学工業の原料となるような有用物質に変換するといった利用技術の開発が可能となる。

研究成果の概要（英文）：

As for cellulose acetate (CA), the fiber and the film, etc. are widely used. To use the waste of CA effectively as a resource, the degradation by the enzyme was examined. A large amount of dialytic ferment, these enzymes that the CA degradation bacterium produced, and enzymes of a similar thermophilic bacterium origin were able to be produced with *E. coli* bacteria. As a result, the development of the technology used of being able to do the enzymatic degradation of CA efficiently, and converting the enzymatic degradation products of CA into useful materials that become the raw materials of the chemical industry become possible.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,100,000	630,000	2,730,000

研究分野：応用微生物

科研費の分科・細目：環境学、環境技術・環境材料

キーワード：廃棄物再資源化、酵素、バイオマス、糖、微生物

1. 研究開始当初の背景

| (1). 背景：持続可能な社会をめざし循

環型社会構築するため、省資源、省エネルギーの観点から、繊維やプラスチックの廃棄物を有効利用するための種々のリサイクル技術が開発され、処理生成物の利用が進められている。再生可能な資源であるバイオマス为原料にしているバイオマスプラスチックにおいても、廃棄資源の変換、モノマー回収などのリサイクル技術の開発が進められている。

バイオマスプラスチックのひとつであるセルロースアセテート（CA）は、地球上で一番豊富なバイオマスであるセルロースをアセチルエステル化して合成される半合成ポリマーである。CAは全世界で約80万トン、日本で約10万トン（2002年）生産されており、用途として、アセテート繊維、たばこのフィルター、写真などのフィルム、逆浸透膜、液晶ディスプレイ、生分解性プラスチックなどに使われている。この廃棄物、生産時の端材、セルロース系繊維などを回収して資源として有効利用するために、本研究ではCAを含むセルロース系廃棄物のリサイクル技術の開発を行う。

（2）. これまでの研究成果：CAの微生物分解についてはこれまでにいくつか報告されているが、その分解に関与する酵素や分解機構に関する報告はあまりない。我々は既に、CAの生分解性および分解物の安全性を確認するためにその分解機構を調べ、CAの分解がCAエステラーゼとCA分解酵素との協同作用によっておこることをはじめに明らかにした。CAエステラーゼの性質およびその脱アセチル化反応について調べ、その反応が位置特異的におこっていることを明らかにした。CAの分解に関与しているもうひとつの酵素であるCA分解酵素（グルカナーゼ）の性質についても明らかにし、これらの酵素遺伝子も取得した。また、このときの分解生成物は主に二糖であるセロビオースであることを明らかにした。この研究で得られた知見から、CA廃棄物を酵素分解することにより分解生成物としてセロビオースが得られ、これを資源として有効利用できると考えられる。

2. 研究の目的

（1）. 本研究の意義：バイオマスプラスチックは、将来的にその生産量が多くなると、その効率的なリサイクル法の開発も必要になることが予想される。バイオマスは再生可能な資源であるが、リサイクルすることによりエネルギー効率が向上すると考えられる。生分解性プラスチックを分解してリサイクルを行う場合、酸やアルカリなどの化学分解では、まず原料の厳密な分別を行う必要がある。また、原料素材の非特異的な分解がおこり生成物が混合物で得られるため精製する

必要があり、廃液処理の問題もある。これに対して酵素分解によるバイオリサイクルでは、酵素の基質特異性を利用して廃棄物中の特定の素材だけを分解し、また反応副産物を生じることなく、高純度の分解生成物を得ることができる。その際、材料を部分分解し化学構造を残した特定の物質を効率よく得ることが容易である。また、酵素反応は比較的温和な条件で行えるため、エネルギーコストがかからず、環境汚染の原因となる有機溶媒も必要としない。このようなリサイクルに用いる酵素は分解活性が高いことが必須であり、分解微生物・酵素のスクリーニングが必要である。また、分解機構およびその酵素の基質特異性を調べておくことが重要である。

（2）. 本研究の特色：CAは多くの分野で用いられているが、そのリサイクルは行われていない。我々が明らかにしたCA分解機構から、CA廃棄物の分解効率を良くするため熱に対する安定性が高い耐熱性の分解酵素を用いて分解を行う。CAを酵素分解によって分解生成物であるセロオリゴ糖類に変換し、これを資源として有効利用できると考えられる。最近ではバイオマスであるセルロースを分解してエタノールや乳酸などを生産するといった研究が盛んにおこなわれている。酵素法で分解を行った場合、分解途中でセロビオースを生じるが、これをさらに別の酵素などを利用してグルコースにまで分解して発酵に利用するといった方法がほとんどであり、セロビオースとしての利用はまだあまりない。本研究では、主生成物として得られるセロビオースをさらに分解することなくバイオマス資源としての利用途の開拓をおこなう。

具体的には、①CAの分解反応を効率よくおこなうため、耐熱性があり高活性の分解酵素を取得する。②この酵素を用いてCAの分解処理をおこない、分解生成物（セロビオースなど）を得る。③分解生成物を原料として、有用物質への変換・生産を試みる。たとえば、セロビオースを酵素で酸化することでセロビオン酸を得る。また、セロオリゴ糖は機能性食品素材としての生理機能が報告されており、これまで困難であったセロオリゴ糖の効率よい生産が可能になれば、新たな素材としての展開もできる。

このように、CAは地球上で一番豊富なバイオマスであるセルロースを原料とし、その誘導体としては一番生産量・利用途とも多い工業材料であり、その循環利用システムの構築を試みる。さらに、この研究によって得られた知見は、食糧と競合せず木材などあまり利用されないセルロース系バイオマス資源の分解・利用に関する研究につなげられると考えられる。

3. 研究の方法

CA分解生成物を得るため、分解効率の良い酵素の生産を行う必要がある。これまで、CA分解菌 *Neisseria sicca* SBが生産する2種類の酵素(CAエステラーゼおよびCA分解酵素(グルカナナーゼ))の性質および遺伝子を調べ、CAの分解はこれらの酵素の協同作用によっておきることを明らかにしている。本研究ではこれらの知見を生かし、①CA分解菌由来のCAエステラーゼの大量生産を行う、②耐熱性のCA分解関連酵素のスクリーニングを行う。耐熱性酵素を使用することで、高温での分解(糖化)反応が可能となり分解効率が高くなる。また酵素の安定性が高く工業への利用がしやすいと考えられる。さらに、高温でCAに作用させることでCAの高次構造が崩れ、酵素が作用しにくい高置換度のCAも効率よく分解できる可能性がある。

(1) CAの効率よい分解や特定の分解産物の調製には高活性で比較的多くの酵素が必要となる。既に取得しているCA分解菌 *N. sicca* SB由来のCA分解関連酵素は活性が高いけれども生産量が少ない。そこでこの酵素遺伝子を大腸菌で発現させCA分解関連酵素の量産化を図る。

(2) 耐熱性のCA分解関連酵素のスクリーニングを行う。その方法として、好熱菌由来のCA分解関連酵素遺伝子のクローニング、大腸菌での発現を行う。その具体的な方法として、DNA塩基配列が決定されている好熱菌遺伝子のデータベースの中から、CA分解菌のCAエステラーゼと相同性(30%以上)があり新規なものをいくつか選び出し、その遺伝子をPCR法によりクローニングする。得られた遺伝子を発現用プラスミドベクターに入れ、大腸菌で発現(酵素タンパク質の生産)を行う。またそれ以外では、(3) CA分解菌を種々の薬剤および紫外線処理により変異を誘発させ、高分解活性菌の選択をおこなう。(4) コンポストを60℃等で培養し、CA分解菌の単離、分解酵素の生産をおこなう、などが考えられる。これら4つのうち主に(1)と(2)について検討し高活性のものが得られなかった場合、(3)、(4)についても検討する。これらの酵素のうち活性の高いもの(不溶性CAを分解できるもの)について精製しその耐熱性、最適pHなどの性質およびCAの分解性を調べる。これらCAエステラーゼと市販のセルラーゼ酵素剤と組み合わせて効率のよい分解系を構築する。

4. 研究成果

(1) 半合成の生分解性ポリマーであるCAの生分解機構を解明するために種々検討を行ってきた。CA分解菌 *N. sicca* SBによるCAの分解は、CAエステラーゼとエンドグルカナナーゼの協同作用によっておこり、それぞれの酵素の性質および遺伝子について明らかにしてきた。またCAを酵素で分解させたときの分解生成物について調べてきた。CAの分解生成物を効率良く調製しこれを有効利用するには、CA分解活性が高く安定な酵素を大量調製する必要がある。好熱菌由来の酵素は耐熱性があると推測されるが、CAに対する分解活性については、CA分解菌由来のCA分解酵素のアミノ酸配列と相同性があるというだけでは、分解活性が低い可能性もある。そこでまず、CA分解菌 *N. sicca* SB由来のCA分解関連酵素の大量生産を試みた。この菌はスクリーニングにより得られた比較的活性が高いものであり、またその酵素のCA分解活性も既に確認しているが、この菌によるCA分解酵素の生産量は少ない。そこで、この酵素を大量生産することを目的として、大腸菌を用いたCAエステラーゼの生産を行い、その性質を調べた

①大腸菌で発現させた *N. sicca* SB由来CAエステラーゼの性質

・CA分解菌 *N. sicca* SB由来のCAエステラーゼのDNA塩基配列については既に調べている。この遺伝子をPCR法を用いて増幅し、大腸菌で発現しやすいようにシグナル配列を付け替えた組換え体プラスミドを構築した。CAエステラーゼは、そのDNA塩基配列の相同性から、触媒ドメインと糖質結合モジュールからなると推定している。そこで、2種類の組換え体CAエステラーゼ(rCAest: CAエステラーゼ本体(触媒ドメイン+糖質結合モジュール)からなるもの、rCAest-Cat: その触媒ドメインのみのもの)について大腸菌で発現(酵素タンパク質の生産)させ、精製を行った。SDS-電気泳動での分子量は、推定アミノ酸から計算した値とほぼ同じであった。次に発現させたCAエステラーゼのN末端アミノ酸配列について調べたところ、2種類の組換え体CAエステラーゼの配列は、*N. sicca* SBが生産したもの(wild-type)の配列と一致していた。このことから、CAエステラーゼ遺伝子の発現が確認でき、またシグナル配列部分は予想される切断部位で切断されていることが確認できた。

・組換え体CAエステラーゼの速度パラメーターについて、基質として可溶性のCA0.88、pNPAを用いて調べた。2種類の組換え体CAエステラーゼのKm、kcatはwild-typeのものと同等の値だった。このことから、この組換え体CAエステラーゼはwild-typeのもの

のと同様のCA分解活性を持っていることが確かめられ、また触媒ドメインは、相同性だけでなく、酵素活性からも触媒ドメインであることが確かめられた。

・不溶性の β -1,4-グルカンに対する吸着性について調べた。rCAestはアモルファスのセルロース、微結晶セルロースへの吸着が見られたが、rCAest-Catはこれらの糖への吸着は見られなかった。このことからCAエステラーゼ分子中の糖質結合モジュールはセルロースへの吸着能があることを明らかにした。

②組換え体CAエステラーゼの生産量

・CAエステラーゼの生産量を比較した。*N. sicca* SBの培養によるCAエステラーゼの生産の場合、培養期間は7日間であるのに対して、大腸菌の培養による組換え体CAエステラーゼの生産は、前培養を含めても2日間であった。また培養液あたりの酵素活性は大腸菌では*N. sicca* SBの約4倍であり、CAエステラーゼはこの大腸菌での生産系を用いることでより効率よく生産できると考えられた。

(2)次に、好熱菌由来エステラーゼの大腸菌での生産を試みた。好熱菌由来の酵素は耐熱性があり安定性が高い。特に高温下ではポリマーの高次構造が崩れ、効率がよく分解が進むと推測される。

①好熱菌由来エステラーゼ遺伝子の選別

・好熱菌の遺伝子ライブラリーの中からCAエステラーゼと同じ働きをすると考えられる酵素遺伝子の検索を行った。すなわち、まずゲノムDNA塩基配列の解読が既に完了している好熱性菌(80℃以上に至適生育温度を持つ超好熱性アーキア6種、好熱性アーキア2種、75℃などで生育する好熱性細菌3種)の遺伝子情報(アミノ酸配列情報)に基づいて、エステラーゼ類約100種を選び出した。これらの遺伝子から次の点に基づいて遺伝子の選別を行った。①*N. sicca* SB由来のCAエステラーゼと相同性があるもの、②CAエステラーゼと働きが似ているアセチルキシランエステラーゼと相同性があるもの。その結果、次の7種類のエステラーゼ遺伝子を選別した。*Thermotoga maritime* 由来の、1:TM0077、2:TM0435、3:TM0113、*Thermoanaerobacter tengcongensis* 由来の、4:TTE0866、5:TTE1386、6:TTE1551、*Aeropyrum pernix* 由来の、7:APE1244。

②好熱菌由来エステラーゼ遺伝子の取得(クローニング)

・選別した7種類のエステラーゼ遺伝子それぞれについて、PCR用のプライマーを作製した。その際、クローニングベクターにはpET22b(+)を用い、生産したタンパクのN末端にはネイティブのシグナルペプチドに換

えて大腸菌用シグナルペプチドであるPelB、C末端には6x histidineが融合するように設計した。なお、ネイティブのシグナルペプチドはシグナル予測ソフト(SigP)を用いて予測した。

・次に、PCR法で遺伝子の増幅を行った。いくつかの条件でPCRを行い、アガロース電気泳動でシングルバンドが得られるような条件を探した。そのとき得られたPCR産物の大きさは、遺伝子のDNA塩基配列から推定した大きさと一致していた。この条件でPCR産物の大量調製を行った。得られた産物を制限酵素で消化し、pET22b(+)ベクターとライゲーション(連結)した。構築した組換えプラスミドを大腸菌DH5 α 株に形質転換した。この大腸菌を培養して組換えプラスミドを大量調製した。得られた各遺伝子を発現(酵素タンパク質の生産)させるため、これらのプラスミドを発現用の大腸菌Rosetta-gami2(DE3)株に形質転換した。

得られたそれぞれの組換え体遺伝子をもつ7種のプラスミドについて、大腸菌での発現を試みた。これら大腸菌を培養し、IPTGで酵素タンパク質の発現の誘導を行った。遠心分離で集菌し、超音波破碎し遠心分離で無細胞抽出液と沈殿とに分けた。それぞれについてSDS電気泳動でタンパク質の発現量を調べたところ、いくつかのものについては、予想される大きさのところにバンドが見られ、タンパク質の発現が認められた。次にこれらの無細胞抽出液について酵素活性を調べた。基質に4-Methylumbelliferyl acetateを用い60℃で反応させたところ、*Thermotoga maritime* 由来の、1:TM0077について活性が認められた。以上のことから、好熱菌由来エステラーゼを大腸菌で生産させることができた。

今後これらの酵素を大量生産し、CAを分解させ、その産物で有用物質の生産について検討していく予定である。

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1件)

① Moriyoshi K, Koma D, Yamanaka H, Ohmoto T, Sakai K.,

“Functional analysis of the carbohydrate-binding module of an esterase from *Neisseria sicca* SB involved in the degradation of cellulose acetate.”, Biosci. Biotechnol. Biochem., 査読有, 74, (2010)1940-1942.

〔学会発表〕(計 13 件)

① 森芳邦彦、駒大輔、山中勇人、大本貴士、酒井清文

“好熱菌由来セルロースアセテートエステルラーゼ遺伝子の発現”，
日本農芸化学会 2011 年度大会，（京都女子大学→要旨集），2011 年 3 月

② 森芳邦彦、駒大輔、山中勇人、大本貴士、酒井清文

“*Neisseria sicca* SB 由来セルロースアセテートエステルラーゼ遺伝子の発現”，
日本農芸化学会 2010 年度大会，東京大学駒場 I キャンパス（東京都目黒区），2010 年 3 月

③ 森芳邦彦、駒大輔、山中勇人、大本貴士、酒井清文

“バイオリサイクルを目指したセルロースアセテートの分解に関与する酵素遺伝子の開発”，
第 1 回バイオプラスチックシンポジウム，池田市民文化会館（池田市），2009 年 10 月

④ 森芳邦彦、

おおさか A T C グリーンエコプラザ実行委員会主催，環境ビジネスシーズ発表会，
「バイオマスプラスチックの生分解とそのバイオリサイクル」，2009 年 9 月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森芳 邦彦 (MORIYOSHI KUNIHICO)
地方独立行政法人大阪市立工業研究所
・ 研究員
研究者番号：30416367

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：