

研究課題別評価

1. 研究課題名：ポリウレタン分解酵素の修飾と機能改変

2. 研究者氏名：中島 (神戸) 敏明

ポスドク研究員 茂野 ゆき枝 (研究期間 平成 12 年 10 月 ~ 平成 15 年 9 月)

ポスドク研究員 和田 裕 (研究期間 平成 13 年 1 月 ~ 平成 14 年 6 月)

ポスドク研究員 豊島 貴英子 (研究期間 平成 14 年 5 月 ~ 平成 15 年 9 月)

3. 研究の狙い：

プラスチックの中には、その構成単位中にエステル結合や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。これらの結合が解かれることによって、プラスチックはその構成単位に分解される。構成単位であるカルボン酸やアルコール、アミン等は化学合成原料や発酵原料として再利用可能である。しかし、プラスチックのような不溶性の固体を直接分解できる酵素はほとんどない。酵素が固体基質を分解するためには、固体表面をいかに認識し、そこに「取りつく」かが鍵となる。エステル系の固体ポリウレタン (PUR) 分解菌、*Comamonas acidovorans* TB-35 株由来の PUR 分解酵素は、活性部位の他に、PUR 表面に疎水的に付着する部位を有する。また、この触媒部位と固体表面付着部位は互いに独立して機能しているということが示唆されている。このことは、逆に、固体高分子に対して分解活性を持たない他の酵素に、本酵素の固体基質付着部位を付加することによって、固体分子を基質とできる分解酵素を創製できる可能性を示唆している。本研究では、TB-35 株と同様な分解能力をもつ各種プラスチック分解酵素遺伝子を自然界より取得し、その系統進化について解析するとともに、それらの固体表面付着部位を低分子のエステル結合やウレタン結合を分解できる酵素と融合させることにより、新たなプラスチック分解酵素の創製を試みた。

4. 研究結果：

(1) *Comamonas* を宿主とした大量発現系の構築

Comamonas を宿主とした大量発現系の構築を目的として、まずポリウレタン(PUR)分解酵素生産株 (TB-35 株) の PUR 分解酵素遺伝子(*pudA*)を破壊したところ、PUR の分解産物であるアジピン酸代謝能の低下が認められた。このことから、その結果、PUR 分解酵素とアジピン酸資化能との間に何らかの相関があることが示唆された。また、高いアジピン酸資化能を持つ *C. teststeroni* IFO12048 株に *pudA* を導入した結果、宿主として有用であることが示唆された。

(2) ポリウレタン分解酵素の活性中心の同定とその置換による機能改変

PCR を用いた部位特異的変異法により、PUR 分解酵素において活性中心であると推察された Ser199、Glu324 及び His433 を、他のアミノ酸へ置換した。その結果、各アミノ酸の変異酵素ではエステラーゼ活性が完全に失われたことから、本酵素はこれまで真核生物でしか見つかっていない Ser-Glu-His 型エステラーゼの一種であることが明らかとなった。さらに、Glu324 を Asp へ変換したときのみ、エステラーゼ活性が約 1.7 倍増加したことから、本酵素は AChE ファミリー (Ser-Glu-His 型) に属しながら、原核生物由来のエステラーゼとしての特徴 (Ser-Asp-His 型) を有する酵素であることが示唆された。

(3) 各種ポリエステル分解酵素生産菌のスクリーニング

固体 PUR を基質として検索を行った結果、以前取得した *Paenibacillus amylolyticus* TB-13 株由来のポリ乳酸分解酵素に、高い固体 PUR 分解活性が認められた。本酵素は TB-35 株由来のものよりも高い分解活性を有していたが、分解後の PUR 表面の様子や分解産物を検討した結果、両酵素は異なる PUR 分解様式を有していることが示唆された。また、その主要な分解産物はオリゴマーであった。さらに、PUR の構成成分である5種類のポリエステルを分解可能な菌株が8株得られ、全て *Burkholderia cepacia* と同定された。分解酵素遺伝子のクローニングを行い、2株からポリエステル分解酵素遺伝子を取得した。これらの遺伝子をホモロジー検索にかけたところ、新規なエステル分解酵素であることが明らかとなった。

(4) ウレタン結合分解菌の検索

PUR の原料として一般的なイソシアネートを用いて合成した低分子ウレタン化合物を用いて、ウレタン結合切断能を有する微生物を自然界より取得し、これを固体 PUR の分解に応用することを目的として検討を行った。その結果、ウレタン化合物を含む液体培地中でアミンを生成する菌株 (TB-60 株) を選抜した。本菌株はウレタン結合切断活性と同時に高いアミダーゼ活性を持っていた。

(5) TB-35 株由来 PUR 分解酵素を用いた融合タンパクの作製

TB-35 株由来 PUR 分解酵素と他のポリエステル分解酵素等の融合による新規プラスチック分解酵素の創製を目指して、TB-13 由来の PUR 分解酵素との融合を試みた。本酵素は高い PUR 分解活性を有するが、これまでの実験結果から、ウレタン表面への付着能が低いことが示唆されている。そこで、融合により分解能の向上を目指した。TB-35 株由来 PUR 分解酵素の N 末側、C 末側に TB-13 由来の PUR 分解酵素を融合したプラスミドをそれぞれ作製し、大腸菌での発現を試みた。その結果 C 末側に TB-13 由来の PUR 分解酵素を融合した場合に融合タンパクの発現が認められた(図 5)。しかしその発現量は低く、ほとんどが封入体を形成していた。

5. 自己評価 :

ポリエステル型のポリウレタン(PUR)が微生物の作用によって分解するという事は、古くから知られており多くの文献がある。しかし、そのほとんどは PUR を劣化させる程度であり、完全分解に至るほど強力な分解菌は TB-35 株のみであった。一般的に固体の PUR はコロイドやエマルジョンよりもはるかに分解を受けにくい。PUR の酵素分解についても医用素材開発の観点から多くの報告があるが、そのほとんどは固体 PUR を分解できないか、多少分解できたとしても極めて膨大な酵素量を必要とする。

本研究提案では以前取得した TB-35 株由来の酵素を中心に、その改変を行うこととしたが、融合酵素の創製については困難を極めた。当初 TB-35 株由来 PUR 分解酵素の PUR 結合部位のみを取り出して行うことを試みたが、付着能を保ったまま部分的に取り出すのが困難であったため、まず酵素全体を融合し、そこから不要部分を削ることを考えた。しかし、融合酵素の機能的発現には成功したが、その発現量は低く、融合酵素を用いた実験を行うには不十分であった。当時固体 PUR 分解酵素は本酵素以外に無かったため、他の酵素を用いることはできなかったが、研究の過程で TB-13 株から新たな PUR 分解酵素を見出した。本酵素は分子量が TB-35 株由来酵素の 1/3 程度であり、大腸菌で良好に発現するため、融合酵素創製の素材として有望である。今回新たに取得したポリエステル分解酵素やウレタン結合切断酵素との融合を行い、新規酵素の創製を

試みたい。特にウレタン結合切断酵素については、現在酵素分解が不可能なポリエーテル型の PUR の分解にもつながることから、有効性が高い。また、これとは別にクローニングされたポリエステル分解酵素も、固体 PUR の分解活性こそなかったが、新規酵素であることが明らかとなった。このことから、今後スクリーニングを継続することによって、これまで知られていなかった新たな酵素の一群が自然界より見出せる可能性がある。プロジェクトの研究成果の発表を通じて、プラスチックを扱う多くの化学メーカーや自動車メーカーの方と話をする機会が多々あった。その一部からは共同研究の要望もいただいております、彼らとのディスカッションを通じて業界の動向をうかがう中で、本研究提案の必要性を強く感じている。

本研究の評価を、当初掲げた目標の達成度から見れば 50 点程度の出来ではないかと考えるが、この3年間で様々な基礎的知見を蓄えることができた。特に極めて有望な微生物を新たに自然界から多数得ることができたことは大きく、今後本テーマをライフワークとするに十分な土台を固めることができたと考えている。今後の継続研究において大きな成果を挙げることによって、アドバイザーの方々にご恩返しをしたい。

また、本研究はポスドク参加型であり、延べ3名のポスドクに参加していただいた。率直な感想としては、3年間は短いと感じられた。一般的に若手研究者はベテラン研究者と異なり、特に人材の発掘や再就職先の斡旋等における研究者間ネットワークが貧弱であるため、ポスドクが研究に打ち込める期間は意外と短い。特に再就職先についてのサポート体制の整備をお願いしたい。

6. 研究総括の見解：

本研究は固体のプラスチックを分解する酵素に関するもので、もし実現すれば廃棄物処理の興味ある手段となり得るため採択された。提案者はこの分野でユニークな成果を上げており、発展が期待された。遺伝子解析の手法を用い、実験的にスクリーニングされた菌からポリウレタン分解酵素、ポリエステル分解酵素を得て、解析を進め機能向上を図り好結果を得た。さらに付着能と結合切断能をそれぞれ制御することで新しい発展の端緒をつかんでいる。本テーマは容易なものではないが、今後の発展につながる重要な結果を得ており、高い成果を得たと評価される。

7. 主な論文等：

論文

1. H. Uchida, Y. Shigeno-Akutsu, N. Nomura, T. Nakahara and T. Nakajima-Kambe: Cloning and sequence analysis of poly(tetramethylene succinate) depolymerase from *Acidovorax delafieldii* Strain BS-3. *J. Biosci. Bioeng.*, 93, 245-247 (2002)
2. Y. Akutsu-Shigeno, T. Teeraphatpornchai, K. Teamtison, N. Nomura, H. Uchiyama, T. Nakahara, T. Nakajima - Kambe: Cloning and sequencing of a poly(DL-lactic acid) depolymerase gene from *Paenibacillus amylolyticus* strain TB-13 and its functional expression in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 2498-2504 (2003)
3. T. Teeraphatpornchai, T. Nakajima-Kambe, Y. Shigeno-Akutsu, M. Nakayama, N. Nomura, T. Nakahara, and H. Uchiyama: Isolation and characterization of a bacterium that degrades various polyester-based biodegradable plastics. *Biotechnol. Lett.*, 25, 23-28 (2003)

総説

1. N. Nomura, T. Deguchi, Y. Shigeno-Akutsu, T. Nakajima-Kambe, T. Nakahara: Gene structures and catalytic mechanisms of microbial enzymes able to biodegrade the synthetic solid polymers nylon and polyester polyurethane. *Biotechnol. genet. eng. rev.*, 18, 125-147 (2001)
2. 茂野(坏)ゆき枝、中原忠篤、中島(神戸)敏明: ポリウレタンの微生物分解～固体プラスチック分解酵素の巧妙な戦略. *バイオサイエンスとインダストリー*, 60 (3), 17-22 (2002)
3. 中島(神戸)敏明: グリーンプラと微生物. *生物工学会誌*, 80(12), 591 (2002)

口頭発表(国内)

1. 茂野(坏)ゆき枝、野村暢彦、中島(神戸)敏明、中原忠篤: *Comamonas acidovorans* TB-35 株のポリウレタンエステラーゼ遺伝子破壊株の諸性質 (日本農芸化学会 2001 年度大会)
2. 茂野(坏)ゆき枝、野村暢彦、中原忠篤、中島(神戸)敏明: ポリウレタンエステラーゼ発現系の構築とその解析 (日本生物工学会 2001 年度大会)
3. 坏(茂野)ゆき枝、中島(神戸)敏明、内田裕美、野村暢彦、中原忠篤、内山裕夫: ポリブチレンサクシネート分解酵素の精製とその性質 (日本生物工学会 2002 年度大会)
4. 藤田智大、坏(茂野)ゆき枝、野村暢彦、内山裕夫、中原忠篤、中島(神戸)敏明: 新規ポリエステル分解酵素によるポリウレタン分解 (日本農芸化学会2003年度大会)
5. 安達祐介、中島(神戸)敏明、坏(茂野)ゆき枝、野村暢彦、中原忠篤、内山裕夫: ウレタン結合切断能を有する微生物の探索 (日本農芸化学会 2003 年度大会)
6. 坏(茂野)ゆき枝、和田 裕、豊島 貴英子、野村 暢彦、内山 裕夫、中原 忠篤、中島(神戸)敏明: ポリエステル分解菌の探索とその分解酵素遺伝子の解析 (日本農芸化学会 2003 年度大会)
7. 坏(茂野)ゆき枝、山田智盛、豊島貴英子、野村暢彦、内山裕夫、中島(神戸)敏明: *Rhodococcus equi* A1 株が生産するウレタン結合切断酵素の諸性質 (日本生物工学会 平成 15年度大会)
8. 深山 和幸、中島(神戸)敏明、坏(茂野)ゆき枝、野村 暢彦、内山 裕夫: 有機物存在下における固体ポリブチレンサクシネート分解菌の探索 (日本生物工学会 平成 15年度大会)

口頭発表(海外)

1. 坏(茂野)ゆき枝、和田裕、豊島貴英子、野村暢彦、内山裕夫、中島(神戸)敏明: Isolation and genetic analysis of polyester-degrading bacteria (American Society for Microbiology 2003 年大会)
2. 中島(神戸)敏明、茂野ゆき枝、藤田智大、Teerawat Teeraphatpornchai、野村暢彦、内山裕: Degradation of polyester-polyurethanes by poly(lactic acid) depolymerase (American Society for Microbiology 2003 年大会)

口頭発表(招待講演)

1. 中島(神戸)敏明、茂野ゆき枝: ポリウレタンの微生物分解 (高分子学会 02-1 エコマテリアル研究会)

特許出願

1. 特願 2002 - 334162、中島 (神戸) 敏明、茂野ゆき枝、新規プラスチック分解菌、11月 18 日
2. 特願 2002 - 334151、中島 (神戸) 敏明、茂野ゆき枝、新規なプラスチック分解酵素および該酵素をコードする遺伝子、11月 18日
3. 特願 2003 - 055421、中島 (神戸) 敏明、茂野ゆき枝、新規ウレタン結合分解菌、3月 3日
4. 特願 2003 - 055409、中島 (神戸) 敏明、茂野ゆき枝、エステル結合含有プラスチック分解微生物、プラスチック分解酵素および該酵素をコードするポリヌクレオチド 3月 3日