

ポリウレタン分解酵素の修飾と機能改変

「変換と制御」領域 中島(神戸) 敏明

要 旨

酵素を用いたポリウレタン (PUR) のバイオケミカルリサイクルを最終目標として、エステル系の固体PUR分解菌、*Comamonas acidovorans* TB-35株由来のPUR分解酵素の機能強化を試みるとともに、新たな分解酵素の検索を行った。部位特異的変異による解析結果から、本酵素の活性中心はSer199、Glu324及びHis433の3つのアミノ酸残基であり、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へ変換することによって、エステラーゼ活性が約1.7倍増加した。

また、自然界から取得したポリ乳酸分解菌、*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PUR分解酵素よりも高い分解活性を有していたが、その物理化学的性質やPUR分解様式は異っていた。さらにPUR原料として用いられるポリエステルや、ウレタン結合を分解・切断する新規な微生物・分解酵素遺伝子が複数得られた。

さらに、TB-35株由来のPUR分解酵素とTB-13由来のPUR分解酵素との融合を試みた。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。

1. はじめに

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。

低分子化合物（オリゴマー等）においては、エステル結合やウレタン結合は酵素によって容易に加水分解を受ける。しかし、その基質が不溶性の固体ポリマーである場合には、これを分解できる酵素はほとんど報告されていない。

酵素が固体基質を分解するためには、触媒活性はもちろんであるが、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る。これを用いて、各種プラスチック（合成高分子）廃棄物のモノマー化を行い、資源としての再利用の道を探る。

2. 研究内容

2-1 *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。本酵素遺伝子の中央付近の制限酵素サイトに、テトラサイクリン耐性遺伝子を挿入したプラスミドを構築し、エレクトロポレーションにてTB-35株に導入、相同組換によって*pudA*破壊変異株を得た。この変異株のエステラーゼ活性(PUR分解活性)は完全に失われていた。また、*pudA*を含むDNA断片を有したベクターを*pudA*破壊変異株に導入したところ、活性が回復した。

しかし、Nutrient brothで培養したときは親株と同程度のエステラーゼ活性を示したものの、PURを唯一炭素源として培養したときには、活性が完全に回復しなかった。これらの結果より、PURを唯一炭素源としたときには何らかの調節機構が働いている可能性が示唆された。そこで、他の炭素源を用いたときの活性について検討を行った。

TB-35 Δ *pudA*::tet株へ、*pudA*を含むプラスミドであるpTS-PURをエレクトロポレーションを用いて導入した。TB-35 Δ *pudA*::tet及びpTS-PUR/TB-35 Δ *pudA*::tetを、PURの分解産物のひとつであるアジピン酸を炭素源として培養を行った。その結果、これらの株において、アジピン酸の資化性が著しく低下していることが明らかとなった。この結果より、PURを炭素源としたときにpTS-PUR / TB-35 Δ *pudA*::tetの活性が低い理由として、PURの分解産物であるアジピン酸の代謝能が低下している可能性が示唆された。また、PUR分解活性を示さない3種類の*Comamonas*属菌へ、pTS-PURをエレクトロポレーションを用いて導入

した。その結果、アジピン酸資化能の高い *C. teststeroni* IFO12048株にpTS-PURを導入した場合に、PUR培地で活性を有することが明らかとなった(図1)。

2-2 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

これまでの研究結果から、TB-35株由来のPUR分解酵素は真核生物である *Torpedo californica* (シビレエイ) 由来のアセチルコリンエステラーゼ (AChE) と立体構造の相同性が高いことが推察されている。特に、AChEの活性中心である Ser、Glu 及び His 付近の配列は、両者において高度に保存されている。そこで、PUR分解酵素の活性中心と推測されるアミノ酸残基を置換し、活性へ与える影響について検討した。また、AChEをもとに本酵素の立体構造のモデリングを行い(図2)、活性中心付近の構造を比較した。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らない 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。AChEと立体構造の相同性が高いとされるファミリーには、このように Glu→Aspの変異によって活性が上昇する例はなく、本酵素は

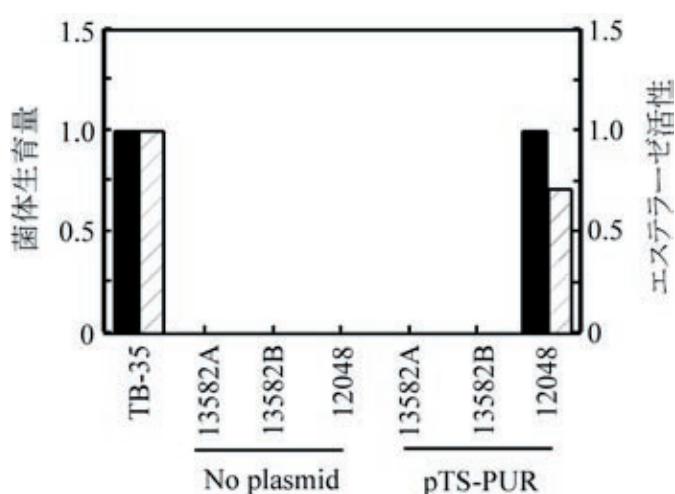


図1 各種 *Comamonas* 属菌を宿主としたポリウレタン分解酵素の発現
培養はポリウレタンを唯一炭素源として30℃、5日間行った。菌体生育量、エステラーゼ活性はTB-35野生株のものを1とした場合の相対活性で示した。13582A,Bは *C. acidovorans*、12048は *C. teststeroni*。

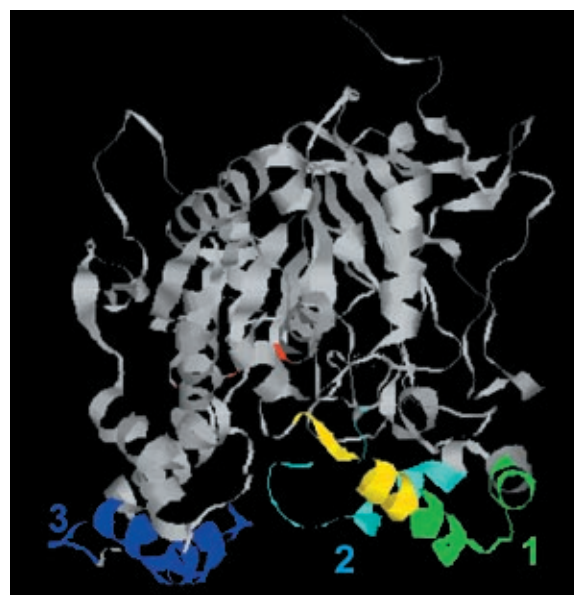


図2 TB-35株由来ポリウレタン分解酵素の推定立体構造
図中の赤色部分は活性中心、1~3がポリウレタン表面付着部位と予想される。York大学のWhittingham博士らとの共同研究。

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。

また、大腸菌ミューテーター（*E. coli* XL 1 -Red）を用いたPUR分解酵素のランダム変異による機能強化を試みた。得られた20,000コロニーに対して、分解能力、基質特異性の変化を調べたが、positiveな変異酵素は得られなかった。

2-3 各種ポリエステル分解酵素生産菌のスクリーニング

複数の異なるポリエステルを主成分とする各種エステル型PURを用いて、新規PUR分解菌の探索を行った。約1ヶ月間土壌中に埋設したPUR表面に付着した細菌を、Nutrient agar平板にて培養・単離を行った。それらの菌株を用いて、10種類のPURを唯一炭素源として培養を行ったところ、いずれのPURにおいても分解菌は取得できなかったが、それらの構成成分である5種類のポリエステルを分解可能な菌株が8株得られた。各種同定試験の結果、全ての菌株が*Burkholderia cepacia*と同定された。その内の1株(3-43-1株)について、ショットガン法にて分解酵素遺伝子のクローニングを行った。得られたポリエステル分解酵素の遺伝子配列より設計したプライマーを用いてPCRを行い、他の7株のポリエステル分解菌に対して分解酵素遺伝子のクローニングを試みた結果、2株から同様なポリエステル分解酵素遺伝子が取得された。これらの遺伝子をホモロジー検索にかけたところ、*Ralstonia solanacearum*のゲノムプロジェクトから得られたリゾホスホリパーゼ（推定）と、アミノ酸レベルで約38%の相同性を有していた。しかし実際にタンパク質として発現したものとしては、新規なエステル分解酵素であることが明らかとなった。

また、既に自然界より取得済みの各種ポリエステル型生分解性プラスチック分解菌、およびその分解酵素遺伝子を用いて、PUR分解能を有する酵素の検索を行った。固体PURを基質として酵素反応を行い、PUR重量減少、及びTOC増加量を測定した結果、*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。一方、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。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、その主要な分解産物はオリゴマーであった(図3)。また、数種の異なるポリエステルをポリオール成分とする各種PURを用い、その分解活性を測定した。

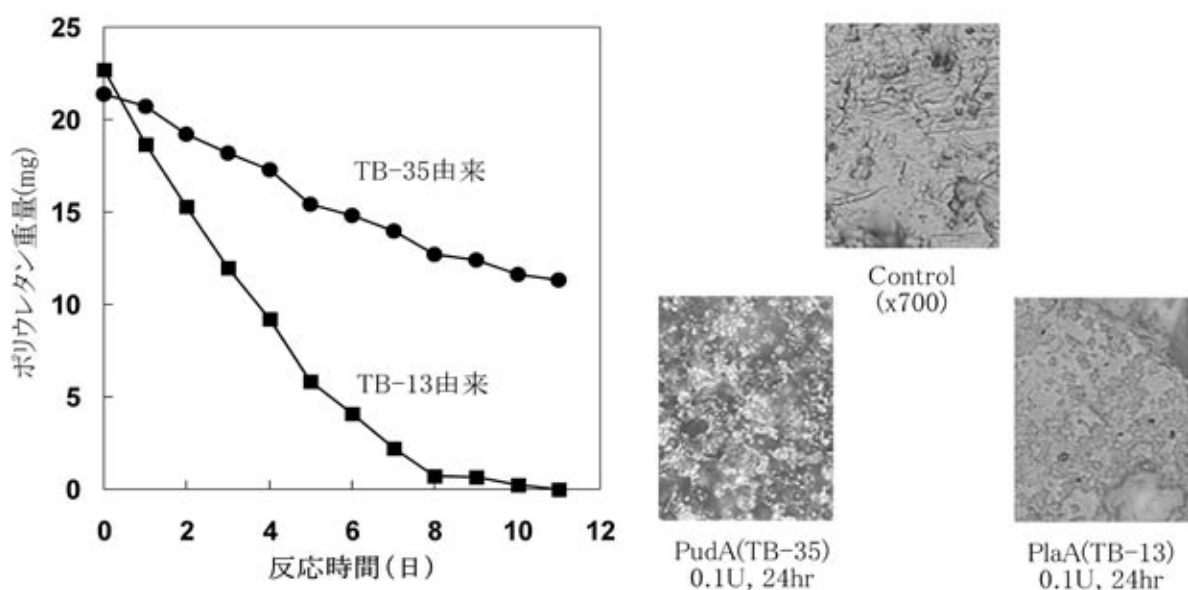


図3 TB-13株由来のポリウレタン分解酵素(ポリ乳酸分解酵素)とTB-35株由来酵素との比較
 左：約4×4×1mm角のPURに、酵素量0.1unitを含む0.1Mリン酸buffer(pH7.0)を加えて30℃にて反応。反応24時間ごとに重量を測定し、酵素液を交換。右：分解24時間後のポリウレタン表面。

2-4 ウレタン結合分解菌の検索

これまでに報告のあるPUR分解菌はいずれもポリオール部分を分解するものであり、固体PUR中のウレタン結合を切断する菌の報告はない。PUR中のウレタン結合を切断する酵素があれば、これまで分解不可能だったエーテル型PURの分解も可能になる。そこで、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。

スクリーニング源にはつくば市近辺の土壌を用い、合成したウレタン化合物を炭素源として集積培養を行った。生育の見られたものについて、平板培地上で菌を単離し、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(A1株)を選抜した。本菌株は、唯一炭素源、及び唯一窒素源の条件下でToluene-2,4-dicarbamic acid dibutyl esterを分解し2,4-toluene diamineを生成した(図4)。A1株は、16S rDNA配列を用いた同定試験により *Rhodococcus equi* と同定された。

ウレタン結合切断酵素生産のための培養条件の検討を行ったところ、炭素源としてカルバミン酸ブチルを用いた培地中に0.1%のアセトアニリドを添加した際に、最も高いウレタン結合切断活性が認められた。本培地にA1株を植菌し、30℃で回転振盪培養を行い経時的に菌体破砕液の各種酵素活性を測定した。その結果、ウレタン結合切断活性と同時に高いア

ミダーゼ活性が検出された。これらの結果より、本菌株の生産するウレタン結合切断酵素は誘導酵素であり、アミダーゼの一種であることが示唆された。

2-5 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、融合酵素の作製と発現を試みた。対象として、はじめにGFPを用いた。GFPは発光能を有するため、融合酵素の基質付着能の解析が容易である。TB-35株由来PUR分解酵素のC末端側にGFPを直接融合またはリンカーを介して融合したプラスミドを構築し、大腸菌を宿主として発現を試みた。その結果どちらの場合においても Cell-free extract において融合タンパクの発現が見られ、エステラーゼ活性、発光能を有していた。しかし、その発現量は低く、融合酵素の精製はできなかった。

続いて、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末端側、C末端側に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末端側にTB-13由来のPUR分解酵素を融合した場合に融合タンパク

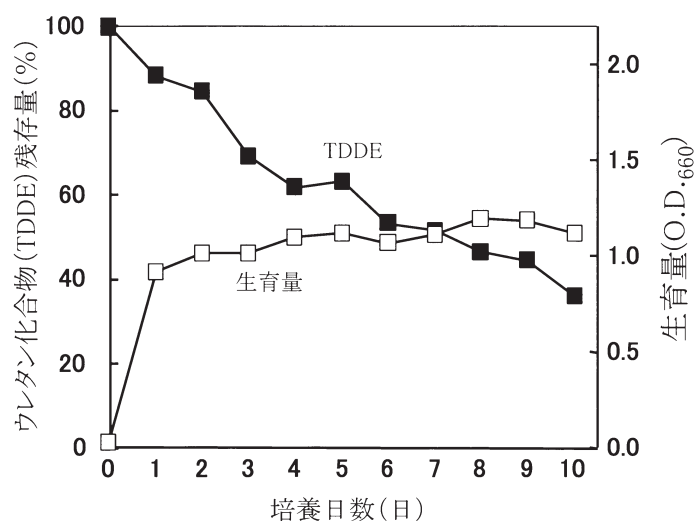


図4 ウレタン結合切断菌 *Rhodococcus equi* A1株によるウレタン化合物分解の経時変化

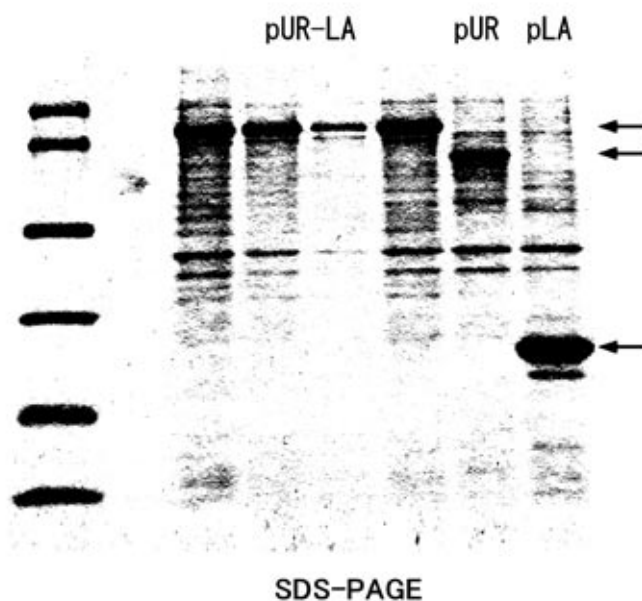


図5 融合タンパクの発現
 図中の→部分がポリウレタン分解酵素。pUR : TB-35株由来、pLA : TB-13株由来、PUR-LA : 融合酵素。

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。

3. 考 察

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の報告はほとんどない。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。

これまで固体PURを炭素源として完全分解する微生物はTB-35株のみしか知られていなかったが、今回新たにTB-13株のポリ乳酸分解酵素にTB-35株を上回る分解活性を見出した。本酵素はTB-35株由来のPUR分解酵素とはその生化学的性質や分子量に至るまで全く異なっていることから、その固体PUR分解機構について興味を持たれる。本酵素のアミノ酸配列は*Bacillus*属菌由来のリパーゼと一部相同性が見られたが、その値は50%以下であるうえ、進化的にも離れており、新規の酵素であるといえる。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。

融合酵素の創製については、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。今後宿主を大腸菌から*Comamonas*の系に切り替え、より効率的な発現を目指したい。さらに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も融合を行い、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。

研究業績リスト

(出願特許)

- 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, 2002年11月18日
- 2) 特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, 2002年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, 2003年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, 2003年3月3日

(原著論文)

- 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
Journal of Bioscience and Bioengineering, 93, 245-247 (2002)
- 2) Y. Akutsu-Shigeno, T. Teeraphatpornchai, K. Teamtisong, 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*
Applied and Environmental Microbiology, 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
Biotechnology Letters, 25, 23-28 (2003)

(総説・著書)

- 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
Biotechnology and genetic engineering reviews, 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) 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

4) 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

5) 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

6) 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

7) 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

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

日本農芸化学会2003年度大会

8) 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 A 1 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

9) 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, 内山裕夫

Degradation of polyester-polyurethanes by poly(lactic acid) depolymerase

American Society for Microbiology 2003年大会