

ポリヒドロキシアルカノエイトの新規分解酵素

大成建設技術研究所 正会員 伊藤雅子

同 上 正会員 斎藤祐二

1. はじめに

近年、石油原料から作られるプラスチックの廃棄物処理問題が深刻になり、生分解性のあるプラスチックの開発が求められている。微生物によって作られるポリヒドロキシアルカノエイト(PHA)は優れた物性と生分解性を示すことから¹⁾、生分解性プラスチック材料として注目されている。中でも3-ヒドロキシブチレート(3HB)と4-ヒドロキシブチレート(4HB)から成るP(3HB-co-4HB)は共重合組成比に応じて、弾性に富んだゴムから結晶性の高いプラスチックまで幅広い物性を示し¹⁾、今後様々な用途での利用が期待されている。また、P(3HB-co-4HB)共重合体はその分解に関しても酵素レベルで詳しく調べられている²⁾。しかしながら、その組成範囲は4HB分率50mol%以下の共重合体であり、4HB高分率の共重合体については研究事例が少ない。

本研究では、活性汚泥、土壌からP(4HB)分解菌の占有率を測定するとともに、P(4HB)に対して高い分解活性を有すグラム陽性桿菌の*Corynebacterium aquaticum*を単離した。さらに、*C. aquaticum*から菌体外P(4HB)分解酵素を精製してその一般的性質と基質特異性について調べた。

2. 試験方法

(1) P(4HB)分解菌の検出方法

P(4HB)分解菌の検出プレートは次のように作成した。 NH_4Cl 1g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3g/L、寒天 15g/Lを入れた0.1Mのリン酸緩衝液を滅菌後、*Comanomas acidovorans* DS-17³⁾で発酵合成したP(4HB) 1.5g/Lを熱アセトンで溶解させて培地に混濁し、シャーレに分注した。これに採取した海水、活性汚泥、土壌を分散させた各希釈液0.1mlを塗抹し、30℃で数日間培養した。そして、コロニー周辺にハローを形成したものをP(4HB)分解菌として検出した。同様の希釈液0.1mlをCGY培地で培養し、生菌数を測定した。

(2) P(4HB)分解菌の単離

極めて大きなハローを形成し、高活性であることが推測された分解菌を活性汚泥から単離した。その結果、この菌は、*Corynebacterium aquaticum*と同定した。

(3) 酵素の精製

*C. aquaticum*を、4-ヒドロキシ酪酸を唯一の炭素源とした液体培地で24時間通気培養した。培養液を遠心分離し、得られた上清を0.45 μm ミリポアフィルターでろ過し、限外ろ過膜(ダイセル; FB02-CC-FUYO3AI)で分画して分子量30000以上の濃縮液を得た。さらにSephadex-G50とトヨパールHW50で精製した。精製酵素はSDS-PAGE電気泳動で単一バンドであることが確認された。

(4) 酵素の一般的性質と分解性の試験

精製酵素を0.1Mリン酸緩衝液(pH6.5)に2500 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で溶解した。フィルム(1cm×1cm)1枚と緩衝液5.4mlを入れたガラス瓶に酵素液を0.6mlを入れて全量を6mlとし、37℃で試験を行った。経時的にフィルムから溶出する分解生成物をTOC(全有機炭素計)で測定した。

3. 結果および考察

(1) 各環境中のP(4HB)分解菌を測定した結果を表-1に示す。土壌から約1.0%、活性汚泥から0.0004%のP(4HB)分解菌の占有率が確認された。また、海水からP(4HB)分解菌は検出されなかった。土壌から検出した分解菌の形態を顕微鏡で観察したところ、28株中24株が放線菌または真菌であった。また、表-2に各菌体をP(3HB)寒天培地とオリーブオイル寒天培地に塗抹し、それぞれの特異性について調べた結果を示す。P(3HB)寒天培地にハローを形成した菌は28株中14株、オリーブオイル培地ではNo.17

キーワード; P(3HB-co-4HB)、PHA デポリメラーゼ、リパーゼ、*Corynebacterium aquaticum*

連絡先 (〒275 千葉県習志野市茜浜3-6-2 大成建設(株) 生物工学研究所 TEL0474-53-3901 FAX0474-53-3910)

表-1 土壌、活性汚泥および海水から単離した P (4HB) 分解菌

試料 ^a	生菌数(Cell/mg) ^b	P(4HB)分解菌(Cell/mg) ^c	分解菌の占有率(%) ^d
土壌-1	9.62×10^6	8.45×10^4	0.88
土壌-2	2.15×10^6	2.22×10^5	1.03
活性汚泥	1.90×10^{10}	7.75×10^4	0.0004
海水-1	1.76×10^7	-	-
海水-2	2.27×10^5	-	-

^a 土壌：乾燥重量1mg当り、活性汚泥：MLSS1mg当り、海水：SS1mg当り

^b CGY培地で検出したコロニー数

^c P(4HB)プレートで検出したコロニー数

^d 生菌数/P(4HB)分解菌数

株以外のすべての菌体がハローを形成した。No.1のように、P (3HB) を分解せず、P (4HB) やオリーブオイルを分解する微生物群は、リパーゼ類の分解酵素を分泌したと推測された¹⁾。

(2) 活性汚泥から単離した *C.aquaticum* の精製酵素の一般的性質を表-3に示す。酵素の至適pHは6.5~7.0、至適温度は37~42℃であった。この酵素は、一般にP (4HB) を分解すると言われているリパーゼ活性が無く、N-末端アミノ酸配列 (22残基) の解析を行った結果でも、これまでに明らかとなっているPHAデポリメラーゼ分解酵素のN-末端アミノ酸配列とは全く異なることが明らかとなった。さらに今まで確認されている酵素とのホモロジー検索でも、一致する既知酵素はなかった。

(3) モノマーの炭素数が3~6の ω -ヒドロキシアルカノエイト (ポリプロピラクトン P (3HP)、ポリバレルラクトン P (5HV)、ポリカプロラクトン P (6HH)) と、P (3HB-co-97mol%4HB)、さらに P (3HB) を用いて酵素の分解性を試験した結果を表-4に示す。各ポリエステルから溶出した分解生成物量は、P (3HB-co-97mol%4HB) が極めて高く、この酵素は4HBを高分率で含む共重合体に対して極めて高い特異性があることが明らかとなった。

4. まとめ

土壌、活性汚泥、海水の P (4HB) 分解菌を測定した結果、特に土壌中には多くの P (4HB) 分解菌が存在し、その主な微生物は糸状菌類であった。また、活性汚泥からは分解活性の高い菌株 *C.aquaticum* が発見された。この菌が生成する菌体外分解酵素の精製を行い分解性を調べた結果、この酵素は不斉炭素を持たない脂肪族ポリエステルを良く分解し、特にモノマーの炭素数が4の P (4HB) に対して極めて高い分解活性を持つことが明らかとなった。さらに、本酵素のN末端配列を調べたところ、既知酵素に全く該当せず、新規酵素であることが判明した。

【参考文献】

- 1) 土肥義治 編著, 生分解性高分子材料, 工業調査会 (1990)
- 2) B.H.Briese, B.Schmidt, and D. Jendrosseck, *J. Environ. Polym. Deg.*, 2, 2 (1994)
- 3) Y. Saito. and Y. Doi, *Int J. Biol. Macromol.*, 16, 99 (1994)

表-2 土壌から単離した分解菌の分解特性

No.	菌株	分解性		ポリマーの酸化性
		P(4HB)	P(3HB)	
1	糸状性(放線菌)	+++	-	++
3	糸状性	+++	+	++
5	糸状性	+	-	++
6	糸状性	++	-	+++
8	糸状性	+	+	+
9	糸状性	+	+	+++
10	糸状性	+	+	+++
11	糸状性	++	+	+++
13	糸状性	+++	-	+
14	糸状性	++	-	++
15	糸状性	+	-	+
16	糸状性	+++	+++	++
17	糸状性	+++	+++	-
18	糸状性	+++	+	++
19	桿 菌	++	-	++
20	糸状性(放線菌)	++	+++	+++
21	糸状性	++	++	+++
22	糸状性	++	-	+++
23	糸状性	+++	-	+++
24	桿 菌	+	-	+++
25	糸状性	+	-	+++
26	糸状性	+	+	+
27	糸状性	+++	+	++
28	糸状性	++	-	++
29	糸状性	+	+	+++
30	桿 菌	++	-	++
31	桿 菌	++	-	++
32	糸状性	++	+	++

表-3 分解酵素の一般的性質

分子量	33000
等電点	8.6 pl
至適pH	6.5~7.0
至適温度	37~42℃

表-4 各種PHAフィルムの酵素分解性

PHA ^a	TOC (μ g/ml/h) ^b
P(3HB)	0
P(3HP)	7
P(3HB-co-97mol%4HB)	154
P(5HV)	5
P(6HH)	3

^a 746 $\times$ 114 $\times$ 217 μ m(初期重量: 8mg, 746Aの厚さ: 10 $\times$ 10 $\times$ 0.07mm)

^b 746Aから酵素分解によって溶出した分解生成物の炭素量