

氏名(国籍)	ティーラパットポンチャイ ティーラワット (タイ)		
学位の種類	博士(農学)		
学位記番号	博甲第3098号		
学位授与年月日	平成15年3月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	農学研究科		
学位論文題目	Biodegradation of Poly (lactic acid) and Poly (butylene succinate-co-adipate) by <i>Paenibacillus amylolyticus</i> Strain TB-13 (<i>Paenibacillus amylolyticus</i> TB-13株によるポリ乳酸及びポリブチレンサクシネート-co-アジペートの分解)		
主査	筑波大学教授	農学博士	内山 裕 夫
副査	筑波大学教授	農学博士	小澤 哲 夫
副査	筑波大学教授	農学博士	小林 達 彦
副査	筑波大学教授	農学博士	木村 俊 範

論文の内容の要旨

我が国におけるプラスチック廃棄物量は膨大で、焼却処理によるダイオキシン等の有害ガスの発生は社会問題となっている。また、埋め立て処分において処分場の確保、及び処分跡地の利用が困難であり、リユースやリサイクルが検討されている。

ポリ乳酸 (PLA) 及びポリブチレンサクシネート-co-アジペート (PBSA) はポリエステル的一种で、土壌中やコンポスト化によって微生物分解を受ける生分解性プラスチックであり、また、その優れた物性から、将来性の高い高分子素材として注目されている。PLA と PBSA の生分解性については、土壌中への埋設試験等で既に証明されているが、これを分解する微生物自体についての知見は少ない。これまでに報告されている PLA 分解菌のほとんどは *Actinomyces* であるが、PLA 以外のポリエステルに対する分解活性については検討されていない。さらに、分解に関与する遺伝子についての知見は全くない。そこで本研究では、自然界より PLA と PBSA を分解する細菌をスクリーニングし、それらの分解特性を検討した。また、その分解酵素、及び分解酵素遺伝子の解明を行った。

スクリーニングの結果、最も分解能が優れた菌株として TB-13 株が得られ、*Paenibacillus amylolyticus* と同定された。本菌株は PLA・PBSA 以外にもポリブチレンサクシネート (PBS)、ポリカプロラクトン (PCL) とポリエチレンサクシネート (PES) などの他のポリエステルも分解することが可能であった。しかし、TB-13 株はこれらのポリエステルを炭素源として利用する事はできなかった。TB-13 株による PLA と PBSA の分解に伴って培養上清及び菌体表面に、プロテアーゼ及びエステラーゼ活性が認められ、これらの酵素が TB-13 株による PLA 及び PBSA の分解に関与している事が示唆された。そこで、これらの酵素と PLA・PBSA 分解との関連を明らかにするため、プロテアーゼとエステラーゼの誘導条件を検討した。しかし、これらの活性は、casein, gelatin 及び tributyrin によって誘導されたが、PLA, PBSA 等のポリエステルでは誘導されなかった。

次いで、TB-13 株由来の分解酵素遺伝子の解明を行った。ショットガンクローニングを行った結果、PLA 及び PBSA に分解活性を示す形質転換体が 1 株得られた。さらにサブクローニングを行い、分解酵素遺伝子をコードする最少領域を決定し、その塩基配列を解読した。本酵素遺伝子は 606bp のヌクレオチドからなり、21, 661Da のタ

ンパク質をコードしていた。推定アミノ酸配列のホモロジー検索を行ったところ、PLA & PBSA分解酵素は*Bacillus* 属細菌のリパーゼに対して40-50%の相同性を示した。また、組換えPLA & PBSA分解酵素の精製を行い、至適条件や基質特異性などの諸性質を検討し、明らかにした。

以上より、PLA分解酵素遺伝子のクローニングに初めて成功し、その諸性質を明らかにする事により、生分解性プラスチックの分解様式を知る貴重な知見を得た。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究ではポリ乳酸 (PLA) 及びポリブチレンサクシネート-co-アジペート (PBSA) を対象として両化合物を分解する細菌の検索を行い、分解菌の分解特性を明らかにすると共に分解酵素・遺伝子を解明する事を目的とした。スクリーニングの結果、優良分解菌として*Paenibacillus amylolyticus* TB-13株の単離に成功し、これまでに報告されているPLA分解菌の殆どが*Actinomycetes*属であるのに対し、新しいタイプの細菌も優れた分解能を有している事を示して、自然環境中における多様な分解菌の分布を示唆した。本知見は、生分解性プラスチックの土壌環境中に生息する微生物による処理に有用な情報と成り得る。また、各種高分子ポリマー化合物に対する分解能を検討し、PLA・PBSA以外にもポリブチレンサクシネート (PBS), ポリカプロラクトン (PCL) とポリエチレンサクシネート (PES) などの他のポリエステルも分解する事を明らかにし、本菌株の処理施設等での利用に際しての有用な知見を提供した。一方、分解活性はPLAやPBSA等のポリエステル化合物によって誘導されず、従って、本菌株を処理に用いる際には、別途、活性の恒常的発現化を検討する必要がある、今後の課題として残された。続いて、本菌株の分解特性を分子生物学的に解明する為、分解酵素遺伝子の単離、及び組換え体により生成された分解酵素を用いてその諸特性を明らかにした。PLA・PBSA分解酵素は幅広い基質特異性を示す新しいリパーゼの一種であり、特に、PLAを乳酸に、またPBSAを完全に無機化する事を明らかにし、生分解性プラスチックの処理に有効であると判断された。

以上のように、本研究は生分解性プラスチック (ポリ乳酸及びポリブチレンサクシネート-co-アジペート) の分解菌に関して新しい事実を見出し、その実用化に貴重な提案を行ったのみならず、分解酵素・遺伝子の解明についても有用な新知見を提供しており、評価に値する。

よって、著者は博士 (農学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。