

氏名(本籍)	うちだひろみ 内田裕美(東京都)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	博甲第2816号
学位授与年月日	平成14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	<i>Acidovorax delafieldii</i> BS-3株によるポリブチレンサクシネートの分解機構の解析
主査	筑波大学教授 農学博士 中原忠篤
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 星野貴行
副査	筑波大学教授 理学博士 山根國男

論文の内容の要旨

プラスチックはその機能性、利便性、経済性のゆえに広く利用され、それに伴いプラスチック廃棄物も年々増加し、深刻な社会問題になっている。この問題に対処するために、生分解性プラスチックの開発が精力的に進められているが、それらの生分解機構についての知見は少ない。

本研究では、将来、多様な用途が期待される生分解性プラスチックのポリブチレンサクシネート (PBS) およびポリブチレンサクシネート-*co*-アジペート (PBSA) の微生物分解の機構を明らかにする事を目的とした。

まず、PBS・PBSA分解菌として取得された *Acidovorax delafieldii* BS-3株のPBSおよびPBSAの分解特性について検討を行った。BS-3株は、乳化PBS、PBSAを唯一炭素源とした集積培養によって、著者が新規に牛糞施肥土壌から単離したものである。BS-3株は、乳化PBS、PBSAのみならず、固体のPBSAを唯一炭素源として分解資化を行い、その分解に際して高いエステラーゼ活性を示した。本酵素は、炭素源としてPBSまたはPBSAを与えた時のみ誘導的に生産され、PBSやPBSAを特異的に分解することからPBSAデポリメラーゼと考えられた。

次に、BS-3株由来のPBSAデポリメラーゼの諸性質を明らかにするために、本酵素の精製を行い、分子量が28kDaのPBSaseA28と29kDaのPBSaseB29を得た。両者ともPBS、PBSAの他、トリブチリンやポリエチレンサクシネートに対し高い分解活性を示した。PBSA分解生産物を分析したところ、PBSaseA28はモノマー型、PBSaseB29はオリゴマー型のデポリメラーゼであることが見出された。さらに、本酵素の固体PBSA分解活性が界面活性剤で阻害されたことより、本酵素が固体PBSAの表面に疎水的に付着するPBSA付着部位を有する事が示唆された。また、過剰量の酵素の存在下での反応において、分解活性が一定となったことより、本酵素のPBSA付着部位は活性部位の周辺に存在すると考えられ、ポリウレタン分解酵素型であった。両酵素の内部アミノ酸配列およびプロテアーゼ限定分解による分解パターンは非常に類似しており、これらの一次構造の相同性が高いことが示唆された。以上の結果、これらはアイソザイムであり、BS-3株のPBS、PBSA分解において主要な役割を担っていると推察された。

続いて、本酵素の性質をより詳細に解析するために、PBSA分解酵素遺伝子のクローニングを行い、その全塩基配列を決定し解析を行った。BS-3株の全DNAをもとにクローニングされた約4kbpのDNA断片は912bpからなるORFを含んでいた。推定された分子量は32.7kDa、成熟タンパクでは28.3kDaであり、PBSaseA28とPBSaseB29のSDS-PAGEの結果とほぼ一致した。精製酵素の内部アミノ酸配列に高い相同性を示す領域が127-150番目のアミ

ノ酸配列に認められ、酵素機能が同じであることから、これらの酵素はアイソザイムであることが示唆された。本酵素遺伝子を他の酵素遺伝子と比較検討したところ、Serを活性中心とした加水分解酵素に保存されているリパーゼボックス（-GX SXG-）に相当する塩基配列（-GWSMG-）が認められた。また、*Moraxella* sp. および数種の *Streptomyces* spp. 由来のリパーゼと 41 - 49% の相同性を示し、固体ポリマー分解酵素として報告されているポリヒドロキシアルカノエートやポリウレタンの分解酵素等には相同性を示さなかった。本酵素のリパーゼボックスの配列における Ser 残基の前には Trp 残基が保存されており、このことは本酵素と *Moraxella* sp. のリパーゼに特有のものである。本酵素は、リパーゼの基質であるトリオレインに対しては分解活性が低く、それを炭素源とした時には酵素活性が発現されず、PBS または PBSA によってのみ誘導生産されることを示す特殊な酵素であると考えられる。

以上、本研究は、*A. delafieldii* BS-3 株の生産する PBS・PBSA 分解酵素について酵素化学的および分子生物学的手法を用いて解析を進めたものである。自然界の PBS・PBSA 分解菌による PBS および PBSA の生分解を酵素・遺伝子レベルで解析したのは本研究が初めてであり、これらの研究成果はプラスチック分解酵素の研究にとって重要な知見である。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、合成生分解性プラスチックとして開発されたポリブチレンサクシネート (PBS) およびポリブチレンサクシネート-*co*-アジバート (PBSA) の微生物分解に関する基礎的情報を得るために行われた。具体的には、当該プラスチックの分解菌として取得された *Acidovorax delafieldii* BS-3 株の生産する分解酵素 (PBSA デポリメラーゼ) の諸性質を解析し、PBS および PBSA の生分解機構を明らかにする事を目的としたものである。

本研究において、BS-3 株が乳化 PBS や PBSA のみならず、固体 PBSA を分解する能力を持つこと、その分解酵素が PBS または PBSA により誘導的に生産され、特異的にそれらを分解することが明らかにされた。以上の結果より、本酵素は PBSA デポリメラーゼと考えられた。次に、微生物由来の PBSA デポリメラーゼの精製に初めて成功し、分子量が 28kDa の PBSaseA と 29kDa の PBSaseB29 を得た。両酵素の性質を酵素化学的および速度論的に検討した結果、PBSaseA28 はモノマー型、PBSaseB29 はオリゴマー型のデポリメラーゼであることを見出した。また、両酵素は PBSA 付着部位を介して固体 PBSA に疎水的に結合し、エステル結合を切断することが明らかになった。さらに、本酵素の付着部位と活性部位は、ポリウレタン分解酵素と同様にその構造上近接して存在すると推論された。これらの知見は、酵素化学的に極めて興味深い。

続いて、PBSA デポリメラーゼ遺伝子のクローニングを行い、全塩基配列を決定し、*E. coli* においてその活性を発現させることができた。本酵素遺伝子を解析した結果、クローニングした DNA 断片が 912bp からなる ORF を含むこと、リパーゼボックスに相当する塩基配列を持つこと、*Moraxella* sp. および *Streptomyces* sp. 由来のリパーゼに 41 - 49% の相同性を示すことなどの知見を得た。

以上、本研究は、生分解性プラスチックとして開発された PBS および PBSA の微生物分解機構について新知見を加えたものであり、優れた研究と高く評価できる。

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。