

第1章 序論

第1節 微生物によって分解されるプラスチック

1970年代はプラスチックの時代と言われている。プラスチックの生産量は石油化学工業の発達に伴い急速に増大し、様々なプラスチックが開発された。これらのプラスチックは難分解性という特性ゆえに、ひとたび廃棄物となると処理が困難となる。プラスチック廃棄物の総量は1995年には884万トンに達しているが、38%は埋め立て、51%は焼却、11%はリサイクルによって処理されている(1)。しかし、プラスチックは燃焼熱が大きいため焼却炉を傷めやすい、また体積が大きいため埋立地の飽和が促進される等の問題を生じ、新たな処理方法への転換が求められている。

そこで、プラスチックを環境に負荷を与えない化合物（水、二酸化炭素やその他の低分子化合物）にまで分解する微生物についての研究が進められるようになった。表1-1に、天然の高分子化合物、及び微生物による分解が確認されている化学合成高分子化合物を示した。そのうち、プラスチックとして利用できる化合物は大きく3つに分類される。第一は、微生物が合成するポリエステルであるPoly(hydroxyalkanoate) (PHA)である。PHAは、特異的な酵素であるPHAデポリメラーゼによって分解される。第二は、微生物に分解され易いように設計された化合物である。これらは主に脂肪族ポリエステルであり、Poly(lactic acid)、Polycaprolactone、Poly(butylene succinate)、Poly(ethylene succinate)等が挙げられる。第三は、新たに微生物による分解が確認されている既存のプラスチックである。これまでに、Poly(ethylene glycol)(3)-(6)、Polyvinylalcohol(7)-(9)、Poly(ethylene adipate)(10), (11)等の微生物分解が報告されている。

微生物によって分解される合成高分子化合物は、天然の高分子化合物に類似した化学結合（エステル結合、グリコシド結合、アミド結合等）を有している（ウレタン結合を除く）。それゆえ、天然高分子化合物と類似した化学構造を有する合成高分子化合物は、既

表1-1 天然及び合成高分子とその分解酵素⁽⁷⁾

Chemical bond	Macromolecule		Degrading enzyme
	Natural	Synthetic	
Ester-bond	PHA	Aliphatic polyesters PLA PCL PBS PES	Esterase, lipase
Glycoside-bond	Polysaccharides	-	Peptidase, amidase
Amide-bond	Polypeptides	Nylon Polyaspartate	
Ether-bond	Lignin	PEG PPG	Cleavage of ether-bond
Urethane-bond	-	Polyurethane Polyester-polyurethane Polyether-polyurethane	Esterase, amidase
C-C-bond	Paraffin	PVA	β -Oxidation

PHA; Poly(hydroxyalkanoate), PLA; Poly(lactic acid), PCL; Polycaprolactone,
 PBS; Poly(butylene succinate), PES; Poly(ethylene succinate),
 PEG; Poly(ethylene glycol), PPG; Poly(propylene glycol), PVA; Poly(vinyl alcohol)

知の分解酵素によって分解されると考えられている。

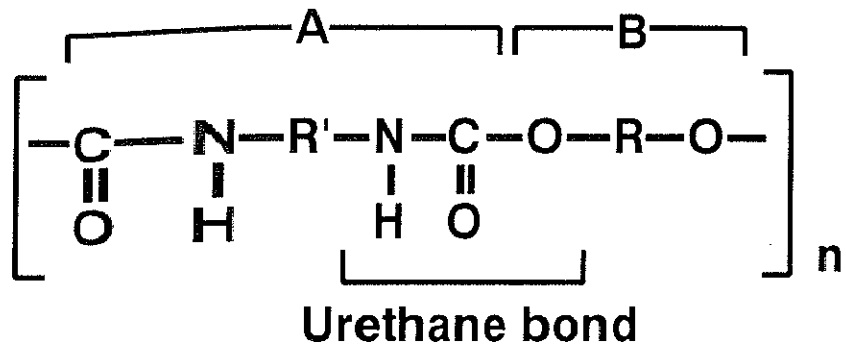
第2節 ポリウレタンとは

ポリウレタン (PUR) とは分子中にウレタン結合 (-NHCOO-) を有する高分子化合物の総称である (図1-1)。ポリオール (ソフトセグメント) とポリイソシアネート (ハードセグメント) を無水条件下で重付加することにより合成され、用いるポリオールの種類によってエステル系とエーテル系に大別できる。ポリオールの中では、エーテル系のポリオキシプロピレングリコールが現在最も多量に使用されている。ポリイソシアネートは芳香族系と脂肪族系に分類されるが、トリレンジイソシアネート (TDI) とジフェニルメタンジイソシアネートが最もよく用いられている。イソシアネート基は水と反応すると炭酸ガスを発生するため、PUR合成時に少量の水を添加すると発泡体が得られる。

PURは、易加工性、耐腐敗性、耐変質性、低比重等の優れた特性により、幅広い分野 (弾性体、接着剤、繊維、塗料等) で使用され、その生産量はプラスチック総生産量の約2%を占める。これらの中で最も需要が多いものは発泡体である。軟質フォームはクッション性、通気性に優れ、マットレス、クッション、パッキング、スポンジ等に使用されている。日本国内におけるPURの需要は、その過半数が自動車の部品としての用途に集中し、一台の自動車に使用されるPUR製品は80品目を越えている(12)。これらの生産・消費量の増大に伴い、廃棄物処理を巡って様々な問題が生じている。

第3節 ポリウレタンの微生物分解

他の既存合成プラスチックが比較的分解を受けにくいのに対し、PURは環境中で劣化を受けことが知られており、その微生物分解に関する研究は古くから行なわれてきた。表1-2に、これまでに報告されたPUR分解微生物を示した。1968年にDarbyらは約100種類



A : Isocyanate

B : Polyester-polyol or polyeter-polyol

図 1-1 ポリウレタン (PUR) の構造

表 1-2 ポリウレタンを分解する微生物⁽¹³⁾

Microorganisms	PUR	Putative degrading enzyme
Fungi		
<i>Aspergillus niger</i>	PS, PE	Unknown
<i>A. flavus</i>	PS, PE	Unknown
<i>A. fumigatus</i>	PS	Esterase
<i>A. versicolor</i>	PS, PE	Unknown
<i>Aureobasidium pullulans</i>	PS, PE	Unknown
	PS	Unknown
<i>Chaetomium globosum</i>	PS, PE	Unknown
	PS	Esterase, protease, urease
<i>Cladosporium</i> sp.	PS	Unknown
<i>Curvularia senegalensis</i>	PS	Esterase
<i>Fusarium solani</i>	PS	Unknown
<i>Gliocladium roseum</i>	PS	Esterase, protease, urease
<i>Penicillium citrinum</i>	PS	Esterase, protease, urease
<i>P. funiculosum</i>	PS, PE	Unknown
<i>Tricoderma</i> sp.	PS, PE	Unknown
Bacteria		
<i>Corynebacterium</i> sp.	PS	Esterase
<i>Enterobacter agglomerans</i>	PS	Unknown
<i>Serratia rubidaea</i>	PS	Unknown
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PS	Unknown
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	PE	Unknown

PS; polyester polyurethane
PE; polyether polyurethane

のPURを合成し、7種類のカビの生育試験を行なった(14)。その結果、エーテル系よりもエステル系PURの方が分解を受けやすいこと、またイソシアネートやポリオールの種類によって分解特性が異なることを報告した。このほかにも、Pathiranaら及びCrabbeらがエステル系PURを分解するカビを数種取得している(15)-(17)。細菌についても、わずかながら分解菌が単離されている (*Corynebacterium* sp. 及び *Enterobacter agglomerans*) (18)。しかし、これらの菌株はいずれも他の栄養源の添加を必要とし、PURを唯一炭素源とはできなかった。現在汎用されているPURの大部分はエーテル系PURであるが、エーテル系PURにエステル系PURをブレンドすることによって生分解性を付与する試みも行われている(19)。

Pathiranaらは、エステル系PURを用いてカビの培養を行った際、培養液にプロテアーゼ、ウレアーゼ及びエステラーゼ活性が認められたことを報告している(15)。Crabbeらは、コロイド状のPURを分解するカビの培養液より、エステラーゼ活性を有する画分を得た(17)。バクテリアについては、Kayらにより *Corynebacterium* sp.の培養液中にエステラーゼ活性が検出されたという報告がなされているのみである(20)。これらの報告においては、PUR分解とエステラーゼの関係は明らかとなっておらず、PUR分解酵素を精製しその諸性質について検討したという報告はない。また、PURの分解経路や分解酵素遺伝子についてもほとんど知見がない。

第4節 *Comamonas acidovorans* TB-35株について

Comamonas acidovorans TB-35株は、Nakajima-Kambeらによってエステル系PURを唯一炭素源として土壌よりスクリーニングされたグラム陰性細菌である(21)。これまで報告のあるPUR分解菌はいずれも生育に他の栄養源の添加を必要とするが、本菌株は唯一炭素源として約50 mgのPURを7日間で完全に分解資化することができた。また、培養上清にジエチレングリコールとアジピン酸が検出された(22)。これらの化合物は、実験に用いたPURのポリオールであるポリジエチレングリコールアジペートを構成する化合物である。ポリ

ジエチレングリコールアジペートはジエチレングリコールとアジピン酸がエステル結合を介して重合したポリエステルであることから、本菌株によるエステル系PUR分解には、分解酵素としてエステラーゼ様の酵素が関与していることが示唆された。

第5節 高分子分解酵素について

ポリウレタンを含め、プラスチックとして使用されている高分子化合物のほとんどは水に不溶性の固体である。そのような不溶性固体を基質とする酵素は、ある共通の機能を有していると考えられている。

水溶性の物質を基質とした酵素反応においては、基質は容易に酵素分子内に入り込むことができるため、酵素反応は酵素量に比例して迅速に進む。一方、プラスチックなどの固体を基質とした場合、酵素が作用する部位は基質の表面に限られてしまう。そのため、単位基質量あたりの反応速度は、水溶性基質と比較すると非常に遅くなる。しかし、このような酵素には特別な機能が備えられている。例えば、天然高分子化合物であるセルロースを分解する酵素であるセルラーゼには、酵素分子内にセルロース付着部位 (cellulose binding domain, CBD) が存在することが知られている(23)。また、微生物の生産する天然ポリエステルであるPoly(hydroxyalkanoate) (PHA)を分解する酵素、PHAデポリメラーゼのC末端には、PHA表面に付着する部位が存在することが明らかとなっている(24)。このような基質付着部位の機能によって、酵素は固体基質に積極的に付着し反応効率を高めることが可能となる。

PHA付着部位については、PHAの一種であるPoly(3-hydroxybutyrate) (PHB)を分解する酵素 (PHBデポリメラーゼ) を用いて詳細な検討が行われている。Fukuiらは、精製したPHBデポリメラーゼのC末端側をトリプシンによって分解除去し、エステラーゼ活性は残存するがPHB付着能を欠損した酵素を作成した(24)。Behrendsらも遺伝子工学的な手法を用いて同様の結果を得た(25)。またShinomiyaらは、PHBデポリメラーゼの基質付着部位と思われるC末端部位を他のタンパク質に融合させ、本来PHB付着能を示さないタンパク質

をPHB結晶粒子表面に付着させた(26)。さらにMukaiらは、PHB分解は酵素のPHB表面への付着とそれに続く加水分解という2段階反応によって引き起こされるというPHB分解機構モデルを提唱した(27)。

リパーゼは広義にはエステラーゼの一種であり、トリグリセリドを基質とする酵素であるが、数種の脂肪族ポリエステルを加水分解することもできる。Tokiwaらはポリエチレンアジペート、ポリカプロラクトン等の脂肪族ポリエステルが*Rhizopus delemar*由来のリパーゼにより加水分解されることを報告した(28)。リパーゼは本来合成高分子化合物を認識する酵素ではないが、疎水性の高い脂質を基質としている。そのため、リパーゼには基質へ接近しそれを取り込むための疎水領域が存在する(29), (30)。この疎水領域の存在が、固体基質へのアタックを容易にしているのではないかと考えられている。

これまで、基質付着部位について詳細に検討されているポリエステル分解酵素は、PHBデポリメラーゼのみである。プラスチックの一種である化学合成ポリエステルを分解する酵素の報告例は数少ないため、その反応機構についての知見は得られていない。

第6節 本研究の目的

C. acidovorans TB-35株はPUR分解菌として単離された細菌であり、その強力なPUR分解能力はこれまで報告されてきたPUR分解菌をはるかに上回るものである。上述のように、プラスチックのような固体基質を分解する酵素には、活性部位の他に酵素が基質に付着する部位が存在すると考えられている。TB-35株のPUR分解活性は非常に高いため、その分解酵素にはPURを強力に分解するための機能が備えられていると思われる。ポリエステル分解酵素においては、唯一PHBデポリメラーゼによるPHB分解の機構が明らかにされつつあるが、それがプラスチックの酵素分解機構一般に適用され得るかは、議論されていない。

そこで本研究は、TB-35株由来のPUR分解酵素を精製し、基質付着部位の検索を含めそのPUR分解特性を明らかにすることを目的とした。また、PUR分解酵素遺伝子のクローニ

ングを行ない、分子生物学的な観点も踏まえて本酵素のPUR分解機構の全容を明らかにすることを目的とした。第2章では、TB-35株の生産するエステラーゼについて、その局在とPUR分解活性を確認した。第3章では、菌体表面に付着するエステラーゼの精製を行い、その至適反応条件やPUR分解特性の検討を行った。第4章では、培養上清に遊離するエステラーゼの精製を行い、その諸性質を菌体付着型エステラーゼと比較した。第5章では、PUR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た。第6章では、組換え型のPUR分解酵素を精製し、その諸性質をTB-35株由来のエステラーゼと比較した。第7章では、PUR分解酵素遺伝子の詳細な解析を行い、PUR分解酵素の機能を検証した。