

第8章 総括

本研究は、ポリウレタン (PUR) 分解菌、*Comamonas acidovorans* TB-35株の生産するPUR分解酵素の性質を解析し、そのPUR分解機構を明らかにすることを目的とした。

第1章では、プラスチックを分解する微生物について概説し、中でも本研究で用いたPUR分解菌である*C. acidovorans* TB-35株について、これまで明らかとなっている事象について述べた。

第2章では、TB-35株の生産するエステラーゼの局在とPUR分解活性について検討した。TB-35株は培養上清に遊離するものと、菌体表面に付着するものの2種類のエステラーゼを分泌するが、そのうち菌体付着型のみがPURを分解可能であった。また、菌体からの酵素抽出に用いる界面活性剤は、dcoxy-BIGCHAP (0.2%) が最も有効であった。

第3章では、PUR分解酵素である菌体付着型エステラーゼ (PURエステラーゼ) の精製を行い、諸性質を検討した。本酵素は分子量約62,000 Daの単量体であり、至適pH6.5、至適温度45°C、30分間の加熱に対しては55°Cまで安定であった。本酵素はPUR及びPURの構成成分であるポリジエチレングリコールアジペートを分解し、ジエチレングリコールとアジピン酸を生じた。この結果より、本酵素によるPUR分解は、ポリジエチレングリコールアジペート中のエステル結合の開裂によることが明らかとなった。本酵素によるPUR分解が界面活性剤で阻害されたことより、本酵素はPUR表面に疎水的に付着する領域 (PUR付着部位) を有することが示唆された。また、過剰量の酵素を添加するとPUR分解活性が一定となったことより、本酵素のPUR付着部位は活性中心の周辺に存在し、PURへの付着と加水分解が同時に起こると考えられた。

第4章では、菌体外遊離型エステラーゼ (CBSエステラーゼ) の精製を行い、その諸性質をPURエステラーゼと比較した。CBSエステラーゼの分子量、至適条件、N末端アミノ酸配列、プロテアーゼ分解パターンがPURエステラーゼと一致したことから、両酵素は同一のポリペプチドであると考えられた。しかし、CBSエステラーゼはポリジエチレングリコールアジペートを分解するが、PURを分解しなかった。また、CBSエステラーゼはPUR

エステラーゼより低い疎水性を示した。このことより、PURエステラーゼにおいてその存在が指摘されたPUR付着部位が、CBSエステラーゼにおいては機能していないと考えられた。

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。TB-35株の全DNAより約2.5 kbpのDNA断片をクローニングし、この断片を有する*E. coli*がポリジエチレングリコールアジペート分解活性を有することが確認された。この断片は1644 bpからなるORFを含み、PURエステラーゼのN末端アミノ酸配列及びエステラーゼの活性中心と思われる配列 (-Gly-X₁-Ser-X₂-Gly-, X₁; Glu, X₂; Ala) に相当する塩基配列が認められた。これらの結果より、この1644 bpのORFがPURエステラーゼ遺伝子をコードしていることが示された。

第6章では、組換え型のPURエステラーゼの精製を行い、その諸性質を検討した。PUR分解酵素遺伝子を発現した*E. coli*の菌体破砕液を疎水クロマトグラフィーに供した結果、2種類のエステラーゼが得られた (エステラーゼ(I)及びエステラーゼ(II))。両酵素の基質特異性と疎水性度を測定したところ、エステラーゼ(I)はCBSエステラーゼに、エステラーゼ(II)はPURエステラーゼに相当すると考えられた。組換え体においてPUR分解活性の異なる2種類の酵素が発現したことより、両酵素が同一の遺伝子産物であることが示され、PUR分解活性の相違がPUR付着部位周辺の構造の変化によるものであることが改めて示唆された。

第7章では、PUR エステラーゼ遺伝子の詳細な解析を行った。PURエステラーゼは、真核生物由来のアセチルコリンエステラーゼやリパーゼに30%前後の相同性を示した。特に、活性中心 (Ser, Glu, His) 付近の配列に高い相同性が認められた。さらに、PURエステラーゼのSer¹⁹⁹、Glu³²⁴ 及びHis⁴³³についてアミノ酸置換を行い、活性中心であることを確認した。また、*Torpedo californica*由来のアセチルコリンエステラーゼ (T AChE) とは、二次構造モチーフが類似しており、立体構造が類似していると考えられた。しかし、PURエステラーゼには、T AChEには見られない疎水領域が存在し、この領域がPUR付着部位であると考えられた。

以上、*C. acidovorans* TB-35株の生産するPUR分解酵素について、生化学的あるいは分子生物学的手法を用い、様々な視点より解析を進めた。その結果、本酵素は特有のPUR付着部位を有することが明らかとなり、固体高分子の分解に関して既知のポリエステル分解酵素とは異なる系が存在することが明らかとなった。また、本酵素は既知の細菌由来のエステラーゼとは全く異なるSer-Glu-Hisを活性中心とするエステラーゼのファミリーに属することが明らかとなり、タンパク質工学分野への新たな素材となり得ると思われる。今後、本酵素の機能解明がプラスチック分解酵素研究の布石となり、新たな分野へ発展することを期待する。