

氏名(本籍)	しげのえ 茂野 ゆき枝 (茨城県)		
学位の種類	博士(農学)		
学位記番号	博甲第2286号		
学位授与年月日	平成12年3月24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	Comamonas acidovorans TB-35株由来のポリウレタン分解酵素の解析		
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	祥雲 弘 文
副査	筑波大学教授	農学博士	日下部 功
副査	筑波大学教授	理学博士	山根 國 男

### 論文の内容の要旨

本研究は、ポリウレタン (PUR) 分解菌として探索された *Comamonas acidovorans* TB-35 株の生産する PUR 分解酵素の諸性質を解析し、その PUR 分解機構を明らかにすることを目的としている。

まず、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、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が存在することを明らかにした。そのうち菌体付着型酵素のみが PUR を分解した。また、菌体からの酵素抽出に用いる界面活性剤は、0.2% の deoxy-BIGCHAP が最も有効であった。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。その結果、本酵素は分子量約 62,000Da の単量体であり、至適 pH6.5、至適温度 45℃、30 分間の加熱に対して 55℃ まで安定であった。本酵素は、PUR および PUR の構成成分であるポリ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成した。このことから、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ものと考えられた。本酵素による PUR 分解活性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 PUR 付着部位を有することが示唆された。また、過剰量の酵素の存在下で反応させると 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すると考えられ、PHB テポリメラーゼの場合と異なっていた。

続いて、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検討した。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 を分解せず、低い疎水性を示した。このことに基づき、PUR エステラーゼにおいて存在が示唆された 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察した。

本酵素の性質をより詳細に解明するため、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解析を行った。TB-35 株の全 DNA よりクローニングされた約 2.5kb の DNA 断片は 1644bp からなる ORF を含み、PUR エステラーゼの N 末端アミノ酸配列およびエステラーゼの活性中心と思われる配列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 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。さらに、組換え型の PUR エステラーゼを精製したところ、PUR 分解活性と疎水性の異なる種類のエステラーゼが得られ、

一方はCBSエステラーゼ、他方は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により、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起因するものであることが改めて示唆された。PURエステラーゼ遺伝子を他の酵素の遺伝子と比較検討したところ、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と、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およびHis423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とは、二次構造モチーフに相同性が高く、立体構造が類似していると考えられた。

以上、CacidovoransTB-35株の生産するPUR分解酵素について、生化学的及び分子生物学的手法を用いて解析を進め、本酵素が特有のPUR付着部位を持つこと、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を明らかにした。これらの研究成果はプラスチック分解酵素研究にとって重要な知見である。

## 審査の結果の要旨

年々増加するプラスチック廃棄物は深刻な社会問題を引き起こしており、環境にとって低負荷の生物学的処理技術の開発が望まれている。このような社会的ニーズを背景に、本研究は、合成プラスチックの微生物分解・処理に関する基礎的知見を得るために行われた。すなわち、ポリウレタン(PUR)を対象として、PUR分解菌Comamonas acidovorans TB-35株の生産するPUR分解酵素の諸性質を解析し、そのPUR分解機構を明らかにすることを目的としたものである。

TB-35株は、菌体付着型エステラーゼ(PURエステラーゼ)と菌体外遊離型エステラーゼ(CBSエステラーゼ)の2種類のエステラーゼを生産し、PURエステラーゼのみがPURを分解することを明らかにした。次に、2種類のエステラーゼの精製に成功し、諸性質を調べた。両酵素の酵素化学的、速度論的検討の結果、PURエステラーゼのみがPUR付着部位を有すること、両酵素は同一ポリペプチドであることを示した。これらの知見は極めて興味深い。

本酵素の性質をより詳細に解明するため、PUR分解酵素遺伝子のクローニングを行い、全塩基配列を決定し、解析を行った。その結果、クローニングしたDNA断片が1644bpからなるORFを含むこと、両酵素が同一遺伝子産物であること、本酵素が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と活性中心(Ser,Glu,His)付近の配列に高い相同性があること、Torpedo californica由来のアセチルコリンエステラーゼとは、二次構造モチーフに高い相同性を持ち、立体構造が類似していることなど、多くの新しい知見を得ている。本酵素は、触媒部位と固体表面認識部位の2つの機能ドメインを持つ全く新しい酵素の一群であることが初めて示された。タンパク質工学分野への新たな素材となり得ると考えられる。今後、これらの知見が応用面でも生かされることが期待できる。

以上、本研究は生物の新機能獲得に関する進化学的研究や高機能プラスチック分解酵素の創製等、基礎・応用の両面において大きなインパクトを与え、極めて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。