

《日本農芸化学会功績賞》

微生物による合成高分子の分解・代謝に関する生化学的・分子生物学的研究



岡山大学資源生物科学研究所 教授 河合 富佐子

筆者が過去 30 年以上にわたり表題研究を展開することになったきっかけは、環境問題が大きな注目を集めるようになり、全国的な研究プロジェクトとして科学研究費特定研究「微生物による環境浄化」が 1974 年にスタートしたことによる。筆者の学んだ京都大学農学部農芸化学科醗酵生理および醸造学研究室はその中で合成高分子の微生物分解に取り組むことになり、ちょうど学位を得たばかりの私がい実際に研究を担当することになった。以下に概要を記す。

1. 合成高分子の生分解評価と生分解特性

水溶性および液状高分子としてはポリエチレングリコール (PEG), ポリプロピレングリコール (PPG) などのポリエーテル, ポリアクリル酸 (PA), ポリビニルアルコール (PVA), PEG を含むコポリマーなど, プラスチックとしてはポリエチレン (PE), 変性ポリエチレンテレフタレート (PET) の資化/分解菌を分離した。とくに PEG 資化菌の *Sphingopyxis terrae* および *S. macrogoltabida* は新種として type culture になっている。これらの合成高分子については、代謝経路の確立あるいは推定を行った。その結果、合成高分子の分解は菌体外酵素による加水分解型分解 (endogenous: 分子鎖の at random な切断) と細胞内酵素による酸化型分解 (exogenous: 分子末端からユニットずつ解重合) に大別されることを明らかにした。前者にはポリエステルが、後者にはポリエーテルや炭素骨格を有する PA, PVA, PE が該当する。酸化型分解は細胞質膜の電子伝達系を通じてエネルギー代謝に関連するため、資化菌にとっては合理的な分解系であるが、高分子をペリプラズムに導入する取込み機構が必要となる。このような取込み機構の存在は 2 節で述べる。

PEG は単位分子当たり数倍以上の水分子と会合し、実際の分子サイズははるかに増大するので、資化限界は PEG 20,000 までであったが、実際の分子サイズは 10 万に近いと考えられる。PEG 6,000 以上は共生菌でのみ分解された。また、別に PEG・フタル酸コポリマーも共生菌でのみ分解されることを見いだした。これらの共生機構を解析し、それぞれ毒性代謝中間産物の除去、PEG 代謝とフタルエステル代謝の補完によることを解明し、共生機構の貴重な例を示すこととなった。

PE の生分解性が長く論議されていたが、資化菌を用いて、分子量約 3,000 以下 (PEwax) は資化可能であることを明らかにし、高分子 PE を光崩壊促進剤で低分子化させると、微生物分解が可能であることを示した。本研究に基づいて緩効性肥料カプセルが市販されている。

2. 合成高分子の分解代謝に関する生化学的/分子生物学的解明

PEG については三つの代謝酵素 (PEG 脱水素酵素 (PEGDH), PEG-アルデヒド脱水素酵素 (PEGALDH), PEG-カルボン酸脱水素酵素) のすべてが膜酵素であり、洗浄菌体でも分解可能な

ことから細胞内分解と結論づけた。これらの酵素を精製して解析するとともに、遺伝子をクローニングして、さらに詳細に解析した。その結果、PEGDH は GMC family の flavoprotein であることを明らかにし、このグループのアルコール脱水素酵素としては初めて酵素を精製し、反応機構を解析した。現在では GMC family の PEGDH subgroup として認知されている。PEGALDH は、NADP を内蔵する nicotinoprotein であったが、アルデヒド脱水素酵素では最初の報告例である。PPG 脱水素酵素は type I の quinoprotein alcohol dehydrogenase, PVA 脱水素酵素 (PVADH) は type II の quinoprotein alcohol dehydrogenase であることを、精製酵素と塩基配列から明らかにした。

菌体外加水分解酵素で分解可能なポリエステル以外はすべて菌体内 (ペリプラズム) に取り込まれて分解代謝される。そのためには細菌外膜を透過しなければならない。PEwax, PPG などは脂溶性で、細胞膜と親和性があり、非特異的に取り込まれる可能性が高い。しかし、PEG, PA, PVA は水溶性であり、他の取込み機構を必要とする。PEG および PVA については分解酵素遺伝子とオペロンを明らかにし、前者についてはオペロン中の TonB-dependent receptor が取込みに関与することをほぼ結論づけた。PVA オペロン周辺にはこのような遺伝子は存在しないが、PVA 存在下の細胞構造変化の電顕観察と、蛍光ラベルした PVA の取り込み実験から、PVA に誘導されて細胞表面に取込み機構が形成されることを示した。Murata らのアルギン酸の取込みに続き、合成高分子では最初の pit 様構造の発見であった。

PEG 分解オペロンは transposases に挟まれて、メガプラスミドに存在する。オペロンや PEGDH が他の Sphingomonads その他で広く保存されているので、オペロンの伝播が推測される。また、オペロンを正に制御する AraC-type regulator の発現は GalR-type regulator で repress されているが、PEG の存在下で derepress される、すなわち、PEG により間接的にオペロンが誘導発現されるという二重制御機構を解明した (図 1)。他方、PVA 分解オペロンもメガプラスミドに存在し、PVADH 遺伝子、酸化 PVA 加水分解酵素、チトクローム *c* の三つの遺伝子のみからなり、構成的に発現される。しかし、上記の取込み機構と *pva* オペロンの発現は PVA により活性化されることを明らかにした。本菌は当初、*Pseudomonas* 属と同定されていたが、*Sphingopyxis* 属細菌と再同定した。Sphingomonads は一般に数個のメガプラスミドを保有することが Basta ら (2004) により報告されていると同時に、合成基質に対する多様な分解活性が知られている。約 30 年前には高分子 PEG 分解菌の分離に苦労したが、その後私たち自身も Sphingomonads を含む分解菌を新たに分離できたことや、Sphingomonads に属する PVA 分解菌がいくつか報告されていることを考えると、

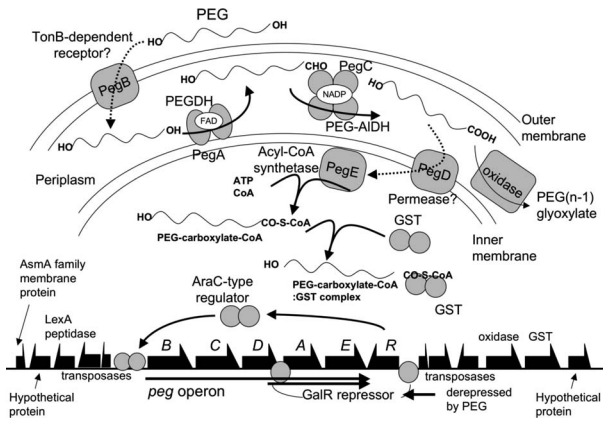


図1 *Sphingopyxis* 属細菌における PEG 分解機構

A: PEGDHDH 遺伝子 (*pegA*)
 B: TonB-dependent receptor 遺伝子 (*pegB*)
 C: PEG-ALDH 遺伝子 (*pegC*)
 D: permease 遺伝子 (*pegD*)
 E: acyl-CoA synthetase 遺伝子 (*pegE*)
 R: AraC-type regulator 遺伝子 (*pegR*). 発現は GalR repressor で抑制されているが、PEG により derepress される。*peg* オペロンのプロモーター領域に結合して、正に制御する。
 Oxidase: PEG 分解の第 3 酵素遺伝子。エーテル結合を切断。
 GST: glutathione S-transferase. PEG-carboxyl-CoA と結合して細胞質内取り込み、または細胞質内の解毒に関与する。

分解オペロンの伝搬が考えられる。本研究は *Sphingomonads* の多様な分解能力の一環にポリマー分解能を加えることとなった。

その他、これまでの報告では最も高融点ポリエステル（変性 PET）の耐熱性分解菌を堆肥より分離し、この菌による繊維製品の堆肥型分解システムを企業との共同研究で進めている（図 2）。分解酵素遺伝子のクローニングもほぼ終了した。ポリエステル混紡繊維は実用性から広く使用されているが、繊維製品にもエコプロダクツが求められるようになってきている。本研究が実用化できれば、生分解性高分子製品の普及とリサイクルへの波及効果は高い。耐熱性酵素や堆肥の微生物解析という観点からも貢献できると考える。

3. 合成高分子分解の数学解析

高分子は平均分子量で示されるように分子種が単一でなく、代謝産物の解析が困難である。オリゴマーが利用できる場合はモデル化合物として用いて、代謝産物を同定できるが、それ以外は代謝酵素の種類と活性および分子量変化のパターン（endogenous か exogenous か）などで代謝経路を推定するほかはない。このような場合に数学的手法で分解プロセスを追跡し、推定代謝経路を検証できないかと考えて、数学者との共同研究をスタートさせた。最初に手がけた PEwax はアルカンであるので、β酸化により解重合されると前提して数学モデルを構築した。GPC による分子量変化の実測値から分解率などを計算し、数値シミュレーションを実施すると、培養前後の GPC ピークとよく一致したので、前提が正しいと結論づけられた。同じ手法を他の解重合にも応用してみると、endogenous と exogenous な分解のそれぞれ複数例で実測値と数値シミュレーションが一致したので、広く生分解計測に利用できることを

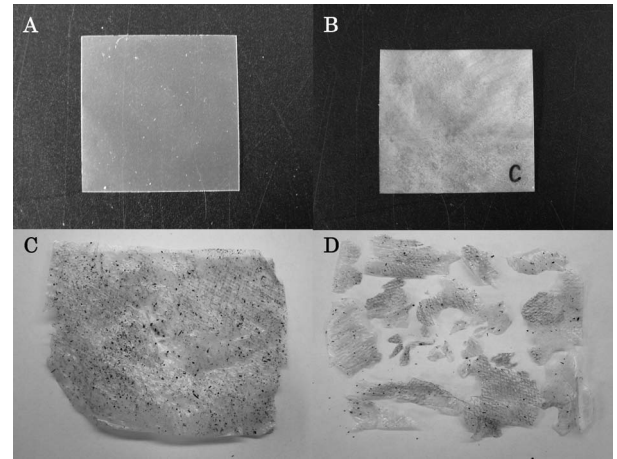


図2 変性 PET の分解

A: 無処理変性 PET
 B: 60°C で 4 週間保持
 C: 無接種で堆肥埋設後、2 週間保持
 D: 分解菌を接種した上で堆肥埋設後、2 週間保持

示したといえるだろう。

4. まとめ

これらの合成高分子の微生物分解研究から次のようなことが明らかになった。

- 1) 数万から約 10 万程度の高分子の細胞内（ペリプラズム）取り込み機構が存在する。
- 2) 菌体外加水分解酵素は速やかに分子量低下をもたらし、菌体内酵素は徐々に分子量を低下させるが、資化速度に大きな差はない。
- 3) 代謝酵素は類似構造を基質とする既存の酵素を鋳型に適応進化し、高分子特有の酵素として存在する。
- 4) *Sphingomonads* はメガプラスミド上の分解オペロンの伝播により、合成高分子分解に大きく貢献していると思われる。
- 5) 高分子の生分解は高分子の構造、物性と原核生物の機能の相互作用の結果である。

本研究は、筆者のオーバードクター時代にスタートし、ライフワークとして終わることになった。「継続は力なり」という言葉を変えて実感する。

学部、大学院時代を通じてご指導いただいた故緒方浩一教授には研究の厳しさを教えていただきました。このことが、神戸商科大学（現 兵庫県立大学）という研究環境で、20 年間研究を継続する原動力になりました。その後、現職では多くのスタッフ、院生、客員研究員、非常勤研究員などの方がたのご協力で研究を発展させることができました。また、数学解析の成果は全面的に、共同研究者である岡山大学の渡辺雅二教授のお陰であるといっても過言ではありません。国内外において、共同研究その他で助けていただいた多くの方がたにも心から感謝いたします。最後に本賞にご推薦いただいた岡山大学農学部の稲垣賢二教授および選考委員の先生方に厚くお礼を申し上げます。