



岩手大学 山田美和

## 生分解性プラスチックの微生物による合成と分解に関する研究

## はじめに

私が2017年3月に「第1回農芸化学若手女性研究者賞」を頂戴した際、当時日本農芸化学会会長でいらっしゃった植田和光先生より、「次は農芸化学女性研究者賞を受賞できるよう、これからも励んでください」とのお言葉を頂いたことをよく覚えている。このお言葉が励みのひとつとなり、若手女性研究者賞を受賞後、私は研究テーマを新しく立案して注力してきた。今回、新たに立案した研究テーマである「海の資源として注目されている海藻を原料としたバイオプラスチックの微生物合成」と「自然環境中から単離した微生物によるバイオプラスチック生分解機構の解明」について、得られた成果をご紹介します。

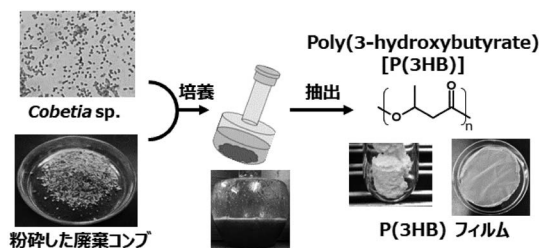
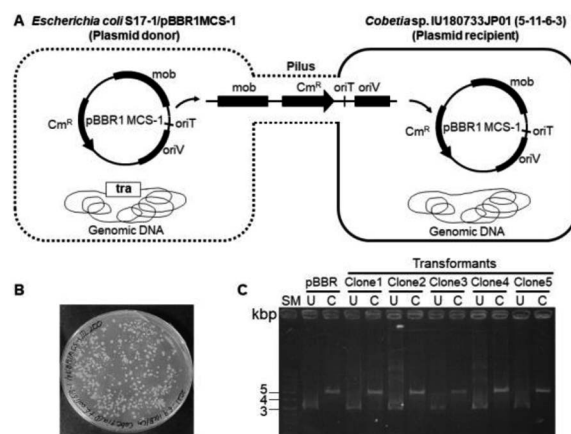
## 1. 海藻成分を利用した polyhydroxyalkanoate (PHA) の微生物合成

日本は海に囲まれた島国であり、全国の海域に海藻が豊富に生育している。また、日本では伝統的に海藻を食する習慣があり、海藻の養殖業が盛んであるため、海藻は我々日本人にとって馴染みの深い生物資源であるだろう。海藻は近年、食用以外の視点からも注目され始めている。世界的に喫緊の課題である温室効果ガス削減対策のひとつとして、海洋生態系による炭素貯留を利用するといった試みである。海藻は日射量が低くても生育でき、成長速度が速いことから、海に囲まれた日本では持続的な生育システムを構築しやすい。このような利点が注目され、国内では藻場・干潟等を増設することで二酸化炭素吸収量を向上させる取り組みが始まっている。つまり、今後の日本では、これまで以上に海藻類が豊富に存在することになると予想される。このような情勢を顧みて、我々は海藻を原料としたバイオプラスチックPHAの微生物合成に着目した。PHAは、植物由来の糖や油を原料として微生物が生成する生分解性の高いバイオプラスチックとして注目されており、すでに国内でも工業生産が開始され、その需要は年々高まっている。よって、PHAの原料となるバイオマスの選択肢を広げることに繋がる我々の研究は、将来PHAのさらなる生産量増強が必要となった際、利用価値の高い技術になると期待できる。

しかし、これまでの研究において、海藻をPHA合成の原料とした研究はほとんどなかった。そこで、我々は海藻成分を利用し、PHAを合成できる新たな微生物を探索した。自然環境から採取した多様な微生物源より目的のPHA合成微生物を探索した結果、我々は、マンニトールを単一炭素源とした際に、最も典型的なPHAであるpoly(3-hydroxybutyrate) [P(3HB)]を合成できる *Burkholderia* 属細菌と、アルギン酸を単一炭素源としてP(3HB)を合成できる *Cobetia* 属細菌を発見した(1, 2)。特に、*Cobetia* 属細菌 [*Cobetia* sp. IU180733JP01 (5-11-6-3)] (5-11-6-3株)は、乾燥後粉砕した廃棄コンブを添加した培地を用いて培養した際、微量ではあるがP(3HB)合成が確

認された(図1)(2)。さらに、5-11-6-3株は好塩性であることから、原料の海藻に付着している海水を洗浄する必要がなく、原料前処理に必要なコスト削減が期待できる。これらの特徴から、我々が発見した5-11-6-3株は、海藻を原料としたPHA合成に適した菌であると期待している。

しかし、本菌を用いた海藻からのPHA合成を応用するためには、PHA生産性の向上や、プラスチックとして汎用性の高いPHA共重合体合成能力の付与が必要である。これらを達成するためには、本菌の遺伝子組換え技術は必要不可欠である。これまでに *Cobetia* 属細菌の形質転換に成功した報告はなかったが、最近我々は、本菌の遺伝子組換え系の構築に成功した(図2)(3)。現在、構築した遺伝子組換え系を利用し、本菌のゲノム編集による代謝改変を試みている。また、興味深いことに本菌は海藻成分だけでなく、多様な炭素源をP(3HB)合成に利用可能であることがわかり、海藻以外の原料を用いたPHA合成にも利用できるかもしれない(4)。

図1 発見した *Cobetia* 属細菌による廃棄コンブからのPHA合成図2 *Cobetia* sp. IU180733JP01 (5-11-6-3) の接合伝達による外来プラスミドの導入(3) A. 接合伝達によるプラスミド導入の概略図 B. 抗生物質耐性を獲得した *Cobetia* 菌の形質転換体 C. ランダムに選抜した5株の形質転換体より抽出したプラスミドの電気泳動(導入したプラスミドが形質転換体に保持されていることが確認された)

## 2. Polyamide4 (PA4) 分解菌とその分解酵素による PA4 分解メカニズムの解明

生分解性プラスチックの分解機構は、プラスチック分解後の環境に対する影響の予測や、生分解性の制御を考慮した材料設計を進めるために重要な知見となる。また、生分解性プラスチックは、環境中の微生物酵素によって分解される酵素分解型 (PHA など) と、加水分解反応が主となる非酵素分解型 (ポリ乳酸など) がある。我々は、酵素分解型と考えられているが、まだ環境中から分解菌の報告が少ない生分解性プラスチックである PA4 に着目した。PA4 は多様な環境下で酵素的に生分解される可能性が報告されており、近年、実用化へ向けて合成・加工技術の開発が精力的に行われている。さらに、PA4 は、PHA と同様に海洋環境でも生分解性を示すユニークなバイオプラスチックでもある。PHA の陸や海における微生物分解に関する知見は数多くの報告があるのに対して、PA4 分解菌単離の報告はまだ数例であり、さらに、PA4 分解酵素を特定した例はこれまでにひとつもなかった。そこで、我々は、陸と海から PA4 分解菌の探索と PA4 分解酵素の特定を目指した。東海大学・外村先生が土壌より発見した *Pseudoxanthomonas* sp. TN-N1 (TN-N1 株) と、我々が海洋より単離した *Pseudoalteromonas* sp. Y-5 (Y-5 株) の培養液から PA4 分解酵素の精製・特定に成功した (5, 6)。各精製酵素の諸性質を検討した結果、両酵素は PA4 のアミド結合を加水分解して  $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) オリゴマー (2~4 量体) へと分解するエンド型の分解酵素であることを明らかとした (図3)。さらに、両酵素間のアミノ酸配列は類似していたが、他の既知酵素とは相同性が高いものがほとんどなく、PA4 分解酵素は珍しい新規酵素であると示唆された。そこで、両酵素のアミノ酸配列を AlphaFold2 に供し、サブユニット構造を予測した結果、本酵素は PA4 と結合する基質結合ドメインと、PA4 を分解する触媒ドメインを持つと推定された。続いて、タンパク質構造から相同性検索を行い、PA4 分解酵素と既知酵素との構造類似性を調査した結果、PA4 分解酵素の触媒ドメインの一部は、難分解性プラスチックの polyamide 6 (PA6, 一般名称はナイロン) 低分子量体の加水分解酵素 (NylB) と類似していた。本知見より、本酵素は PA6 やその低分子量体も分解できると期待したが、分解活性は確認されなかった。今後は、立体構造解明を通して、本酵素の PA4 に対する高い基質特異性の原因を解明していきたい。

おわりに

我々は、生分解性プラスチックの合成と分解に関して、ユニークな特徴を有する新しい菌や酵素を自然環境中から見出す

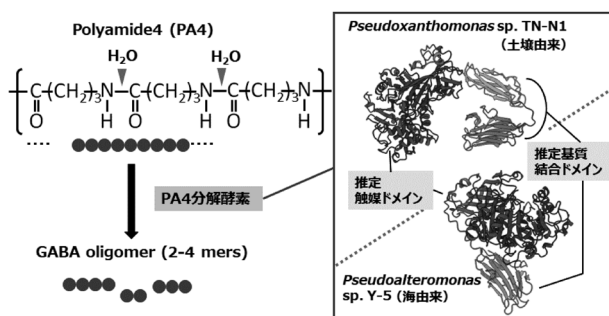


図3 TN-N1株とY-5株由来PA4分解酵素によるPA4分解

ことに成功した。しかし、どちらもまだユニークであるとわかったのみで、詳細は明らかとできていない。今後は、これらの菌や酵素の性質を詳細に解明すると同時に改良を加えることで、応用を見据えられる技術開発に挑戦していきたい。

(引用文献)

- 1) M. Yamada et al., Poly (3-hydroxybutyrate) production using mannitol as a sole carbon source by *Burkholderia* sp. AIU M5M02 isolated from a marine environment. *Fisheries Science* 84 : 405-412(2018)
- 2) H. Moriya et al., *Cobetia* sp. bacteria, which are capable of utilizing alginate or waste *Laminaria* sp. for poly (3-hydroxybutyrate) synthesis, isolated from marine environment. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8 : no 974(2021)
- 3) Y. Umebayashi et al., Construction of a conjugation method for the transformation of *Cobetia* sp. IU180733JP01(5-11-6-3) that accumulates poly (3-hydroxybutyrate) from seaweeds. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 69: 53-56(2022)
- 4) A. Matsumoto et al., Utilization of various carbon sources for poly (3-hydroxybutyrate) [P (3HB)] production by *Cobetia* sp. IU180733JP01(5-11-6-3) which is capable of producing P (3HB) from alginate and waste seaweed. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 68 : 207-211(2022)
- 5) Y. Sasanami et al., Purification and characterization of an enzyme that degrades polyamide 4 into gamma-aminobutyric acid oligomers from *Pseudoxanthomonas* sp. TN-N1. *Pol. Deg. Stab.* 197 : 109868-109876(2022)
- 6) Y. Saito et al., Marine bacterial enzyme degrades polyamide 4 into gamma-aminobutyric acid oligomers. *Pol. Deg. Stab.* 215: 110446-110457(2023)

謝辞 本研究は、岩手大学農学部応用生物化学科応用微生物学研究室において実施されました。また、研究の過程では「第1回農芸化学女性研究者チャレンジ助成金」, 「科研費基盤研究B (21H03639), C (18K11704)」, NEDO プロジェクト「海洋生分解性プラスチックの社会実装に向けた技術開発事業/海洋生分解性に係る評価手法の確立 (2020年度~2022年度)」等の助成によって研究を進めることができました。2011年に岩手大学に来た際、新たな分野に携わる機会を下さり、微生物スクリーニング、酵素精製等について基礎からご指導下さった岩手大学磯部公安先生、在職時は日頃から研究に関するご助言を下された下飯仁先生、海藻を原料としたPHA合成技術の産業化を一緒に目指して下さっているトヨタ紡織株式会社鈴木宏昭博士、河合盛進博士、梅林勇気様、分解活性の高いPA4分解菌を単離下さった東海大学外村彩夏先生、海のPA4分解菌の探索時にご助力下さった三陸やまだ漁協佐々木浩徳様、昆隆広様、製品評価技術基盤機構紙野圭博士、山口薫博士、三浦隆匡博士、PA4分解酵素の内部アミノ酸配列決定でご助力下さった岩手大学山下哲郎先生、PA4分解酵素による分解生成物等の分析で現在もご助力下さっている東京理科大学本田正義先生、理化学研究所阿部英喜先生、そして学生時代から所要所で重要なご助言をくださり、今回の応募のきっかけも下さった神戸大学田口精一先生をはじめ、これまで本研究に関わり多大なるご助力を賜りました全ての先生方、共同研究者の皆様へ厚く御礼申し上げます。最後に、困難にぶつかっても諦めずに卒業まで一緒に挑戦し続けて下さった(あるいは現在進行で「下さっている」)岩手大学応用微生物学研究室の卒業生・在校生・技術補助員の皆様に、心より御礼申し上げます。