

学 位 論 文 の 要 旨

海洋性 *Shewanella* 属細菌によるポリ (3-ヒドロキシブタン酸) の分解機構
(Characterization of a poly(3-hydroxybutyrate)-degrading marine bacterium, *Shewanella* sp. from coastal seawater, and its poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase)

氏 名 宋 君 哲 印

プラスチック廃棄物は、世界中で年間 14,300 万トンも海洋に流出し、海洋環境を汚染している。生分解性プラスチックは、それらに対する有力な解決策の一つになる可能性がある。細菌が菌体内貯蔵物質として蓄積する、ポリ (3-ヒドロキシブタン酸) (P(3HB)) は、典型的な生分解性プラスチックの一つである。P(3HB)の生分解性機構は、土中や淡水中ではよく研究されているが、海洋環境中ではほとんど研究例がない。そこで、著者は、本博士論文において、海洋中での P(3HB)の生分解機構を明らかにするために 2 章において海洋から P(3HB)分解細菌を単離し、その性質を詳細に調べた。さらに 3 章においてその単離細菌が生産する P(3HB)分解酵素の構造と機能との関係を明らかにした。

1 章では、研究の背景を述べ、本博士論文の目的を述べた。

2 章では、海洋性 P(3HB)分解細菌 (JKCM-AJ-6,1 α 株) を、日本の静岡県焼津港の海岸海洋水から単離した。走査型電子顕微鏡により、単離株は 0.85 x 2.6 μm 程度の大きさの短桿菌であり、P(3HB)分解活性を示すことがわかった。単離株およびその近縁株の 16S リボゾーマル DNA 配列に基づき近接接合法により遺伝系統樹を発生させたところ、単離株は *Shewanella* 属の細菌であることがわかった。また、本株は系統樹解析から典型的な海洋性細菌に属していることが示された。単離株は 15°C で P(3HB)を最も速く分解した。本株の増殖における最適塩濃度を調べたところ、本株の最大比増殖速度は 0.2 M の NaCl 存在下で得られ($\mu = 1.0 \text{ h}^{-1}$)、0.8 M まで増殖することがわかった。これらの値は、典型的な海洋性細菌が示すものと類似していた。*Shewanella* 属細菌は、海洋中で様々な難分解性有機化合物を分解することで知られているが、本報告は、P(3HB)分解能力のある *Shewanella* 属細菌の初めての例である。このことから、*Shewanella* 属細菌は、海洋環境中において種々の有機化合物のみだけでなく、P(3HB)分解においても重要な役割を果たす微生物群の一つであると結論付けた。

3 章では、2 章で単離した *Shewanella* sp.のゲノム DNA からサザンハイブリダイゼーション法により P(3HB)分解酵素遺伝子をクローニングした。目的の P(3HB)分解酵素遺伝子

は、2,049 塩基対からなり 683 個のアミノ酸をコードしており、計算上 70,382 ダルトンの分子量を有していた。また、当該遺伝子を相同的組み換え法により破壊したところ、野生株の P(3HB)分解活性が消失したことから、野生株内に P(3HB)分解酵素遺伝子は単一コピーで存在し、アイソマーの存在が否定された。野生型酵素(wPhaZ_{She})、および、大腸菌内で生産された組み換え型酵素(rbPhaZ_{She})の温度安定性が 15 °C 以下であることから、両酵素ともに温度不安定性を示すことがわかった。野生型酵素(wPhaZ_{She})の分子量は、46 kDa であり、想定される分子量(70 kDa)よりも小さかった。一方、組み換え型酵素(rbPhaZ_{She})は、配列から推定される分子量と同程度の分子量を示した。酵素活性染色実験から、野生型酵素(wPhaZ_{She})は、インタクトな酵素の分解物であることがわかった。また時間飛行型質量分析法により、インタクトな酵素のリンカードメイン中に切断サイトがあることが判明した。このことから、野生型酵素(wPhaZ_{She})は、野生株内で発現後タンパク質分解的にプロセッシングを受けていることが推定された。野生型酵素(wPhaZ_{She})と組み換え型酵素(rbPhaZ_{She})の基質特異性を調べたところ、両酵素ともに、P(3HB)、その共重合体、およびポリエチレンスクシネートを分解した。このことは、両酵素とも同一の触媒ドメインを有しているためであると考えられる。野生型酵素(wPhaZ_{She})は、0.4 M 以下の低塩濃度では活性が低く、海洋での塩濃度に近い 0.5 M 付近で高い活性を示した。一方で、組み換え酵素(rbPhaZ_{She})は塩濃度が上がると活性は低下した。さらに野生型酵素(wPhaZ_{She})は、0.5 M 以上の高塩濃度でも自己阻害効果が見られなかった。このことは、野生型酵素(wPhaZ_{She})が海洋中で P(3HB)を分解する際に有利にはたらく。これらを総合的に考慮すると、野生型酵素(wPhaZ_{She})は、海洋中での活性を上昇させるためにプロセッシングを受けている可能性がある。

本論文で、著者は、高塩濃度下で基質結合ドメイン(SBD)を失うことによって高い活性を発現する新しいタイプの P(3HB)分解酵素を発見した。この発見は、P(3HB)の海洋での生分解メカニズムに対して新しい知見を与えうる。このことは、海洋で利用可能な新しい生分解性材料の設計の鍵になる可能性がある。

要旨 英訳

Plastic wastes are dumped into the ocean at a rate of 14.3 million tons each year, leading to the marine pollution. Biodegradable plastics have attracted considerable attention as a potential solution. Poly(3-hydroxybutyric acid) [P(3HB)] is one of typical biodegradable plastics. Biodegradable mechanism of P(3HB) have been well studied in terrestrial and freshwater environments, but less is known about those in marine environments. So I characterized a marine P(3HB)-degrading bacterium (2nd chapter) and further elucidated the relationship between structure and function of its P(3HB) depolymerase (3rd chapter) in this doctoral thesis.

In the 1st chapter, I described the background and objective of this study.

In the 2nd chapter, a marine P(3HB)-degrading bacterium (strain JKCM-AJ-6,1 α) was isolated from a coastal seawater of Japan. Phylogenetic analysis revealed that the strain JKCM-AJ-6,1 α belonged to the genus *Shewanella*. In the isolate, the optimum temperature for degradation of P(3HB) was 15°C. The maximum specific growth rate ($\mu = 1.0 \text{ h}^{-1}$) was attained at a NaCl concentration of 0.2 M, but the strain was able to grow even in the presence of 0.8 M NaCl. This is the first report showing P(3HB) depolymerase activity in a member of the genus *Shewanella*. It is concluded that the genus *Shewanella* may be one of the key bacterial groups involved in the P(3HB) cycle in marine environments.

In the 3rd chapter, a P(3HB) depolymerase gene (*phaZ_{She}*) was cloned from the genomic DNA of the marine bacterium *Shewanella* sp. strain JKCM-AJ-6,1 α (wild-type strain). The gene was 2049 bp and encoded 683-amino acids protein with a molecular mass of 70,382 Da. Meanwhile, both of P(3HB) depolymerases purified from wild-type strain (wPhaZ_{She}) and expressed in *Escherichia coli* BL21 (rbPhaZ_{She}) were unstable above 15°C, demonstrating that the enzyme is thermolabile. Besides, rbPhaZ_{She} had a similar molecular mass (70 kDa) compared with calculated one based on the sequence, whereas wPhaZ_{She} had a smaller molecular mass (47 kDa). wPhaZ_{She} activity was lower at concentrations < 0.4 M. In contrast, the activity of rbPhaZ_{She} decreased with increases in NaCl concentration. Moreover, wPhaZ_{She} did not show a self-inhibition effect, but rbPhaZ_{She} did it. These suggest that the wPhaZ_{She} has an advantage for P(3HB) degradation in marine environments

with relatively high NaCl concentrations owing to a less self-inhibitory effect.

In this thesis, I found a novel type of P(3HB) depolymerase, which changed to a halophilic form by losing the SBDs at high salt concentration. This finding would provide insights into a biodegradation mechanism of P(3HB) in marine environments, so that ones could acquire a clue to design new biodegradable materials used there.