

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

平成 28 年度 8 月

2016 年 8 月

群馬大学大学院理工学府

博士後期課程 物質・生命理工学領域

13802181 宋 君哲 (Sung, Chun-Che)

目次

第1章 序論	1
1-1 海洋におけるプラスチック汚染.....	2
1-2 ポリ(3-ヒドロキシブタン酸) [P(3HB)]の生合成.....	5
1-3 海洋における P(3HB)の分解	7
1-4 海洋性 <i>Shewanella</i> 属細菌	9
1-5 本研究の目的.....	9
第2章 海洋環境からの P(3HB)分解 <i>Shewanella</i> 属細菌の単離と特徴付け	11
2-1 実験方法.....	12
2-1-1 試薬.....	12
2-1-2 培地.....	12
2-1-3 微生物, ベクターおよびプライマー	13
2-1-4 海洋性 P(3HB)分解菌のスクリーニング	13
2-1-5 P(3HB)分解微生物の遺伝学的解析.....	14
2-1-6 ゲノム DNA(gDNA)抽出.....	15
2-1-7 GC 含率	15
2-1-8 グラム染色.....	15
2-1-9 生化学・生理学的性質.....	16
2-1-10 形態観察.....	16
2-1-11 培養塩濃度の菌体増殖への影響	17
2-1-12 培養温度の菌体増殖とクリアゾーン形成能への影響	17
2-1-13 各種ポリエステルおよびオリーブオイル分解能力	17
2-1-14 P(3HB)分解活性測定(濁度法).....	17
2-1-15 炭素源の菌体増殖および培養上清の活性への影響	18
2-1-16 P(3HB)フィルムの分解.....	18
2-2 結果と考察.....	19
2-2-1 P(3HB)分解微生物の単離.....	19
2-2-2 P(3HB)分解微生物の同定.....	19
2-2-3 培養塩濃度の菌体増殖への影響	22
2-2-4 培養温度の菌体増殖とクリアゾーン形成能への影響	22
2-2-5 各種ポリエステルおよびオリーブオイルの分解能力	23
2-2-6 炭素源の菌体増殖および培養上清の活性への影響	24
2-2-7 P(3HB)フィルムの分解.....	25
第3章 海洋性 <i>Shewanella</i> 属細菌由来の熱不安定性 P(3HB)分解酵素の特徴付け	26
3-1 実験方法.....	27

3-1-1	試薬.....	27
3-1-2	培地.....	27
3-1-3	微生物, ベクターおよびプライマー.....	27
3-1-4	JKCM-AJ-6,1 α 株の菌体外 P(3HB)分解酵素遺伝子のクローニング.....	29
3-1-5	P(3HB)分解酵素の遺伝子破壊.....	31
3-1-6	P(3HB)分解酵素(PhaZ _{She})の精製.....	33
3-1-7	P(3HB)分解活性測定(濁度法).....	35
3-1-8	タンパク質の分析.....	35
3-1-9	Na ⁺ 濃度, pH および温度の活性への影響.....	36
3-1-10	各金属イオンの濃度および阻害剤における活性の影響.....	36
3-1-11	基質特異性.....	36
3-1-12	速度論的解析.....	36
3-2	結果と考察.....	37
3-2-1	JKCM-AJ-6,1 α 株の菌体外 P(3HB)分解酵素遺伝子のクローニング.....	37
3-2-2	<i>phaZ_{She}</i> の塩基配列およびアミノ酸配列の決定.....	37
3-2-3	P(3HB)分解酵素の遺伝子破壊.....	41
3-2-4	野生株および大腸菌 BL21 株由来の PhaZ _{She} の精製および特徴付け.....	41
3-2-5	速度論的解析.....	46
第4章	総括.....	48
	参考文献.....	52
	業績目録.....	65
	謝辞.....	66

第1章 序論

1-1 海洋におけるプラスチック汚染

我々の身の回りでは、石油由来の汎用性プラスチックを用いた多くの製品が使用されている。2014年現在、全世界で3億1100万トンのプラスチックが生産されている[1]。先進国では使用後のプラスチックの大部分は、資源として回収され、マテリアルリサイクルやサーマルリサイクル等として有効活用されている。一方、少量ではあるが意図せずにその一部は環境中に流出していることがわかっている。また、発展途上国では、先進国と比較するとプラスチックが環境へ流出する割合はずっと多い[2-4]。長期安定性という特性を有する汎用性プラスチックは、このように年々環境中に蓄積し、深刻な環境問題となっている。特に懸念されているのは、海洋環境中に流出しているプラスチックで、驚く速さで(年間530 - 1430万トン)蓄積していることがわかってきた[1, 2, 5]。1972年に初めて多くのプラスチック破片が北大西洋上に存在していることが報告された[6]。1988年にアメリカ海洋大気庁が太平洋ゴミベルト(Great Pacific Garbage Patch)の存在を推定した[7]。さらに Moore らの海洋漂流プラスチックに関する研究により、この問題は、世界的に注目されるようになった[8]。海域中におけるプラスチック破片の存在密度は最大で、1平方キロメートルあたり334,271枚であり、その質量は、プランクトンのその約6倍もあった。このような太平洋ゴミベルトは、高密度のプラスチックの破片から構成されているため、「世界最大のゴミ捨て場」と呼ばれている。太平洋においては、北太平洋環流によりプラスチック破片は、主に二ヶ所に蓄積することがわかった。一つは日本の東側：Western Garbage Patch であり、もう一つはハワイとカリフォルニアの間：Eastern Garbage Patch である[9] (Figure 1)。また、太平洋ゴミベルトは、唯一のゴミベルトではなく、アメリカの東海岸沖合である北大西洋でも同様な現象により、海洋ゴミ集積地域が出現しているとの報告がある。さらに、その他の海洋域、すなわちインド洋、南太平洋、南大西洋にも同様な場所の存在が予測されている[10]。

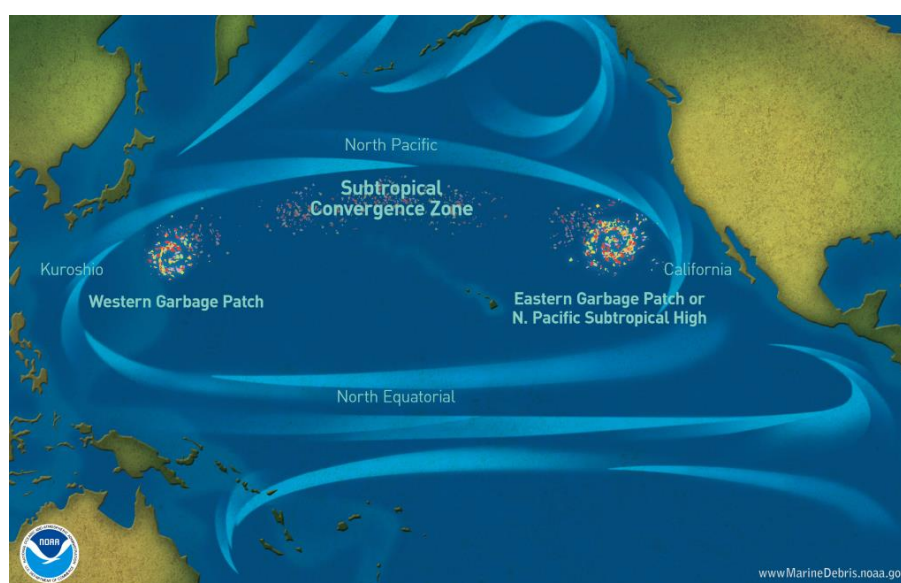


Figure 1. The Great Pacific Garbage Patch in the North Pacific Ocean[11].

1980年代には、プラスチック廃棄物に対して、プラスチック生産者は、プラスチック廃棄物は多種の廃棄物のうちのごく一部という認識しかなく、問題視してこなかった[12]。しかしながら、最近の研究によって海に流出したプラスチック廃棄物は、ただのゴミ問題ではなく、生態系、環境毒性、公衆衛生および経済など広範囲に影響を及ぼしていることがわかってきた。海洋環境におけるプラスチック廃棄物は、周りの汚染物を吸収および濃縮する能力を持ち、残留性有機汚染物質(POPs)や重金属の供給源となる[13]。Riosらの報告によると、海洋から収集したプラスチック廃棄物は、50%以上がポリ塩化ビフェニル(PCBs)、40%が農薬およびほぼ80%が多環芳香族炭化水素(PAHs)を含有していた[14]。また、これらのプラスチック中の汚染物質の濃度は、海水より高く、海洋食物連鎖への汚染物質として、生態毒性の問題をはらんでいる。

海洋中に蓄積したプラスチック廃棄物は、主に polyethylene(PE)および polypropylene (PP)である[15, 16]。これらは、海水の密度よりも低い熱可塑性樹脂であり、包装、漁網、ロープ、糸およびブイなどとして最も一般的に使用されている。また、これらの汎用性プラスチックの長期安定性は、一旦、それらが海洋中に放出されれば蓄積する原因にもなっている[14]。海洋におけるプラスチック廃棄物は、摂取または絡まりにより海鳥、哺乳類およびウミガメに直接的な被害を引き起こしている[4, 17, 18] (Figure 2)。

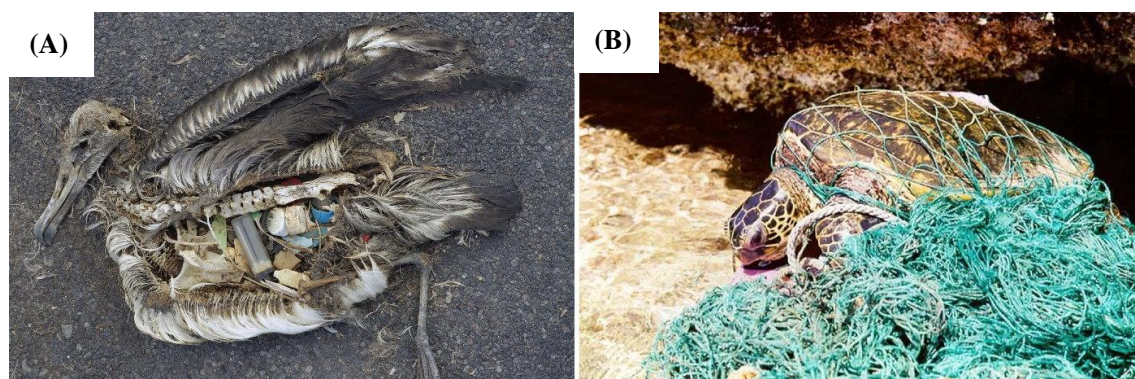


Figure 2. Examples of ingestion and entangle: (A) plastic in seabirds stomach[19]; (B) turtle entangled in fishing nets[20].

大きなプラスチック廃棄物は、サンゴ礁または藻場の漂流経路を遮断することによりそれらの死滅を引き起こす[21]。特に、漁業が行われている海域において大量に廃棄された漁具、網および釣り糸などは、廃棄されても海洋中の生物を捕獲し続け、「幽霊漁業」(ghost fishing)と呼ばれている[22, 23]。Matsuoka らの統計により、一つの廃棄された漁網あたり、幽霊漁業を続ける時間は、30-328 日であり、84-455 匹の魚を捕獲すると推定されている。一方、甲殻類および大きな刺し網を含む場合、幽霊漁業を続ける時間は、30-586 日であり、4.4-1823 匹の魚および甲殻類を捕獲する[24]。また、近年、大きなプラスチック廃棄物に加えて、プラスチックの破片や袋も注目されている。多くの海洋生物は、これらの破片や袋を摂取している[4, 25, 26]。海洋生物と海鳥は、小さいプラスチックを間違えて食べ物として摂取する。ウミガメは、薄いプラスチック袋を大好物のクラゲと間違えて食べてしまう[17]。これらの海洋生物は、プラスチックを摂取することにより胃の貯蔵容量および食欲の低下を引き起こし、最終的に死に至る[5]。Laist の報告によると、プラスチック摂取は全てのウミガメの 86%、海鳥の 44% および海洋哺乳類の 43% を含む 267 種の生物で認められた。この様にプラスチック廃棄物は、非常に多くの海洋生物に対して潜在的な脅威となっている可能性がある[27]。

海水より低密度なプラスチックの場合、それらの破片は、海水中で分解されず、海流により移動することができる。これらの破片は、小さな移動体として付着した生物を新しい場所に運ぶ[28]。Rees らは、これらの移動体となりうるプラスチック破片は、*Perforatus perforatus* というフジツボの群集の北上に関わっていると指摘している[29]。また、これらの廃棄物の表面の生物群集を調べたところ、珪藻、フジツボ、コケムシおよび様々な細菌が検出された[30]。このように、プラスチック廃棄物(移動体)は、種々の生物に新たな生息地を提供するため、外来種の新たな導入経路として非常に大きな存在だと考えられる[31]。また、このような原因で生物混合が生じることは、海洋生物の多様性に対しても潜在的な脅威となりうる[32]。

プラスチックの廃棄物は、生態系への影響だけではなく、人間たちの経済活動に対しても大きな影響を与えている。Takehama の報告によると、日本におけるプラスチックの廃棄物による漁船への損害は、年間 66 億円であることが推定されている[33]。2005 年の米国国立海洋大気庁(NOAA's)の報告によれば、プラスチックの廃棄物により 269 件のボート事故があり、死亡 15 人、怪我 116 人および 300 万ドルの経済損失があった[12]。アジア太平洋地域の海洋産業でも、このような損害は、年間 10 億ドルであると推定されている[34-36]。

1-2 ポリ(3-ヒドロキシブタン酸) [P(3HB)]の生合成

自然環境中の細菌の多くは、糖、アルコールおよび油を原料とし、エネルギーを細胞内貯蔵ポリエステルであるポリ(3-ヒドロキシアルカン酸)(PHA)として蓄えている[37, 38]。微生物は、外部に炭素源が不足すると、菌体内 PHA 分解酵素により菌体内の PHA をアセチル CoA に分解し、エネルギー源として利用することができる。つまり、PHA は、ヒトにおける脂肪に相当する貯蔵物質と考えることができる。1925 年に、パスツール研究所の Lemoignei により、*Bacillus megaterium* から、P(3HB) (Figure 3)が抽出された[39]。それ以降、多くの細菌で PHA を菌体内に蓄積することが明らかとなった[40]。

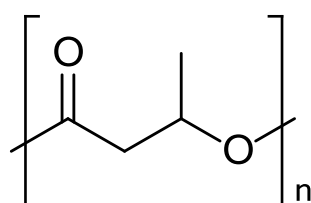


Figure 3. Chemical structure of poly(3-hydroxybutyrate):P(3HB)

側鎖にメチル基を有する P(3HB)は、最も代表的な PHA の一種である。P(3HB)は、ポリプロピレン(PP)と類似した性質を有するため(Table 1)、汎用プラスチックとしての応用が期待されている。しかしながら、P(3HB)単体は、結晶化し易く堅くて脆い性質を持つため、その使用用途は制限される[41, 42]。P(3HB)の物性向上のため、共重合体やその他の PHA 類の研究が検討されてきた[40]。その結果、これまでに 150 種類以上もの構造の異なる PHA 類が報告されている[43]。PHA 類は、その組成を変えることによって、Table 1 に示すように様々な物性を発現することが知られている。特に 3-ヒドロキシペンタン酸(3HV)との共重合体：poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV)および 3-ヒドロキシヘキサノ酸(3HHx)との共重合体：poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) (PHBH)は、優れた機械的性質と生分解性を両立させた材料として多くの研究報告がある[44-49]。また現在までに PHBV および PHBH は、商業生産されている[50, 51]。日本においては、株式会社カネカが PHBH を、年間約 1000 トン生産している。これらの P(3HB)およびその共重合体は、環境にやさしい材料としての利用が期待されている。

Table 1. Physical properties of P(3HB) copolymer and general-purpose plastics.

	Melting temperature (Tm)	Glass Transition temperature (Tg)	Tensile strength (Mpa)	Elongation at break (%)	Reference
P(3HB)	177	4	43	5	[52]
P(3HB-co-20mol% 3HV)	145	-1	20	50	[52]
P(3HB-co-12mol% 3HHx)	125	0	7	400	[53]
LDPE	130	-	11.9	496	[54]
HDPE	132	-	24	810	[55]
PP	175	-10	34	400	[52]

3HV: 3-hydroxyvalerate

3HHx: 3-hydroxyhexanoate

4HB: 4-hydroxybutyrate

LDPE: low density polyethylene

HDPE: high density polyethylene

PP: polypropylene

P(3HB)およびその共重合体は、地圏環境に生息する多種多様な細菌により合成される[56]。一方、最近になって海洋環境からも例は少ないが、以下に示す細菌が P(3HB)合成菌として報告されてる：*Bacillus*, *Colwellia*, *Halomonas*, *Moritella*, *Oceanimonas*, *Paracoccus*, *Pseudoaltermonas*, *Saccharophagus*, *Shewanella* および *Vibrio* 属細菌[57-63]。これらの海洋性細菌が P(3HB)を作っているという事実によって、P(3HB)は地圏のみならず海洋環境中にも存在することが知られるようになってきた。海洋細菌による P(3HB)の合成は、以下の利点があるため注目されている。(1)培養する際、塩が必要であるために、コンタミネーションの恐れが少ない。(2)海水を用いて培地を調整することが可能であり、培養にかかるコスト低減が見込まれる[60, 64, 65]。また、海洋環境は、典型的な貧栄養状態であるため、一般的に海洋性細菌は、多種多様な炭素源を異化することができる。例えば、海洋性細菌である *Alcanivorax* 属および *Oceanobacter* 属細菌は、アルカン[66, 67]、*Cycloclasticus* 属細菌は、芳香族化合物[68]を利用してエネルギー生産することができる。これらの特殊な異化経路を有する海洋性細菌のうち、さらに P(3HB)を合成することができる細菌も存在する。例えば *Oceanimonas doudoroffii* 株は、リグニンを異化すると同時に、P(3HB)を合成することができる[60]。*Saccharophagus degradans* ATCC 43961 株は、テキーラバガス由来セルロース廃棄物を利用して P(3HB)を合成することができる[69]。

1-3 海洋における P(3HB)の分解

P(3HB)は、様々な環境中で優れた生分解性を示す[70]。現在までに、P(3HB)は、汚泥[71, 72]、河口堆積物[46, 73]、土壌[74-76]、淡水[77, 78]および海水[79, 80]など多くの環境において分解することが報告されている。海洋における P(3HB)の分解速度は、温度、材料の面積、溶存酸素量、塩濃度および微生物の種類など種々の因子に影響される[79, 81-83]。また、深海での高圧、低温、および低酸素溶存量などの条件は、P(3HB)の生分解速度を低下させる[84]。

環境中に存在する P(3HB)は、微生物が菌体外に分泌する P(3HB)分解酵素により加水分解する。微生物が、分解により生じたモノマーやオリゴマーなどの水溶性分解産物を栄養源として利用し、最終的には二酸化炭素と水に分解する。これまでに、数多くの P(3HB)分解菌が、様々な自然環境から単離されている[73, 74, 76, 77, 80, 85, 86]。さらに、それらの P(3HB)分解微生物から菌体外 P(3HB)分解酵素が精製され、その性質が詳細に研究されてきた[80, 85, 87-93]。最近になって、遺伝子クローニング技術の目覚ましい進歩により P(3HB)分解酵素の分子レベルでの理解も進んできており、酵素による基質分解メカニズム解明に大きく寄与している[94-96]。

P(3HB)分解酵素は、活性中心にセリン残基を含むカルボキシルエステル加水分解酵素(EC 3.1.1.X)の一種である。P(3HB)分解酵素タンパク質のアミノ酸配列は、Figure 4A に示すように、3つの領域から構成されている：リパーゼボックスを含む触媒ドメイン(CD)；高分子基質への吸着を媒介する基質結合ドメイン(SBD)；CD と SBD を連結するリンカードメイン(LD)[97, 98]。CD は、リパーゼボックスの位置により、Type A (CD の中央に位置する)および Type B (アミノ末端に近いところに位置する)に大別される[99]。LD には、フィブロネクチン III 型(fibronectin type III)、トレオニン型(threonine)およびカドヘリン型(cadherin)の3つのタイプが存在している[98]。SBD には、PHB および PHV タイプが存在する[100, 101]。また、P(3HB)分解酵素には、以下に示す、共通の生化学的な特徴が見られる。(1)分子量は約 40 - 60 kDa, (2)大部分の酵素の等電点は弱塩基性領域 pH7.5 - 9.8 の間である、(3)中性のバッファー中で陰イオン交換担体と結合せず、疎水性担体と強く結合する、(4)pH 値、温度またはイオン強度の広い範囲で安定である、(5)Diisopropyl fluorophates (DFP)あるいは Phenylmethane sulfonyl fluoride (PMSF)のような典型的なセリン加水分解酵素阻害剤によって失活される[102, 103]。

P(3HB)は、前述の通り幅広い環境中で分解することが知られているが、現在までに単離されている分解菌としては、ほとんどが土壌や淡水中を単離源としたものに限られていた。一方で、海洋環境を単離源とした P(3HB)分解菌の研究例は少ない。Table 2 に、現在までに海洋環境中から単離、同定された P(3HB)分解微生物を示す。さらに、P(3HB)分解酵素タンパク質配列まで解析された研究は、*Alcaligenes faecalis* AE122[104]、*Pseudomonas stutzeri* YM1006[105]、*Marinobacter* sp. NK-1[106]および *Bacillus* sp. NRRL B-14911[107]4 株に限られている。一方で、これらの海洋を単離源とする分解菌の中にも、淡水中や土壌中にも生息している菌もあるために、海洋特有の P(3HB)分解細菌の報告例は、ほぼ *Marinobacter* 属[108]

および *Pseudoalteromonas* 属[109]細菌のみと言ってもよい。その中でも、分解菌の同定、分解酵素の解析など、生分解機構が明らかにされた研究は、*Marinobacter* 属だけである。現在までに構造解析されたすべての海洋由来の P(3HB)分解酵素は、Figure 4B に示すように、2 つ SBD, 相対的に高い分子量(>60kDa)を有していた。これらの特徴は、海洋の P(3HB)分解酵素が、土壌や淡水中の P(3HB)分解酵素とは異なっており、異なる機構で海洋中で P(3HB)を分解していることを示唆している。

Table 2. P(3HB)-degrading bacteria from the marine environment.

Year of publication	Strain	Ref.
1995	<i>Alcaligenes faecalis</i> AE122	[110]
1997	<i>Pseudomonas stutzeri</i> YM1006	[93]
2000	<i>Marinobacter</i> sp. NK-1	[108]
2000	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. NRRL B-30083	[109]
2001	<i>Streptomyces</i> sp. SNG9	[111]
2005	<i>Nocardiopsis aegyptia</i> sp. nov. DSM 44442 ^T	[112]
2010	<i>Enterobacter</i> sp. IBP-VN1, <i>Bacillus</i> sp. IBP-VN2, <i>Gracilibacillus</i> sp. IBP-VN3, <i>Enterobacter</i> sp. IBP-VN4, <i>Enterobacter</i> sp. IBP-VN5 and <i>Enterobacter</i> sp. IBP-VN6.	[113]
2011	<i>Bacillus</i> sp. NRRL B-14911	[107]

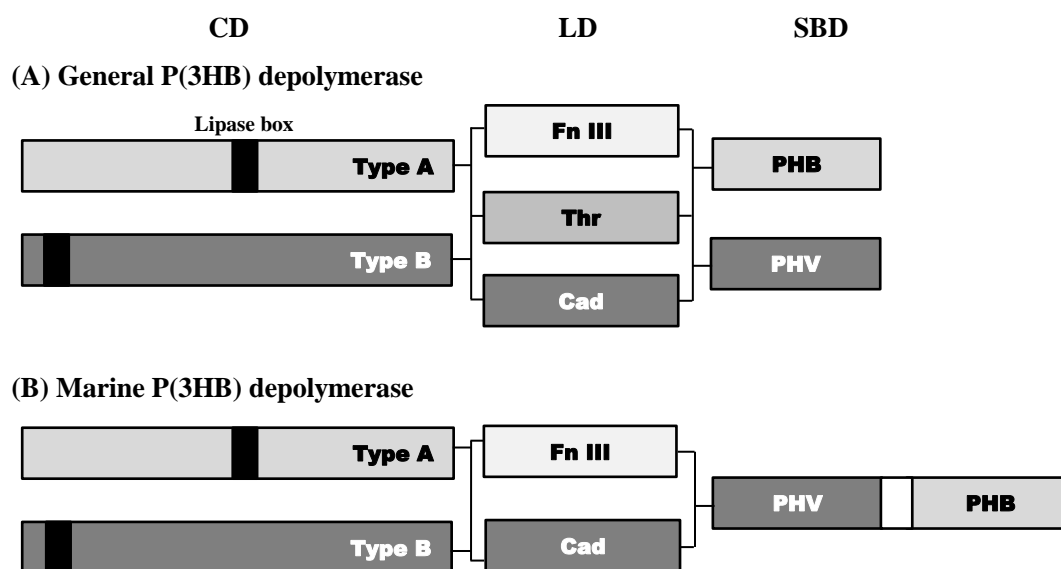


Figure 4. Domain structure of P(3HB) depolymerases. (A) General P(3HB) depolymerase[97]. (B) Marine P(3HB) depolymerase. Fn III, fibronectin type III; Thr, threonine; Cad, cadherin; PHV, PHV type SBDP; PHB, PHB type SBD.

1-4 海洋性 *Shewanella* 属細菌

海洋性細菌としてよく知られる *Shewanella* 属細菌は、*Gamma Proteobacteria* 綱(class)に属している。また、*Shewanella* 属細菌は、*Shewanellaceae* 科(family)に属する唯一の属(genus)であり、20 種類以上の種(species)から構成されている属(genus)である[114]。*Shewanella* 属細菌は、海水、食品(海洋からの)、海洋生物、海洋油田、あるいは深海の堆積物など幅広い海洋環境から単離されている[115-117]。そのうち一部の種は、人間または魚の病原菌として報告されている[118, 119]。病原菌として有名である *Shewanella* 属細菌は、*Shewanella putrefaciens* である。*S. putrefaciens* は、魚の腐敗に関わっている[120]。この細菌には、嫌気呼吸能力、耐塩性、低温適合性があるため、魚または魚の食品、製品および発酵品にも存在していることが報告されている[121]。また、最近の研究において *Shewanella* 属細菌は、微生物燃料電池への応用が期待されている[122, 123]。また、*Shewanella* 属細菌では、嫌気条件下で鉄を含む様々な物質を電子受容体として利用することが可能である。例えば、フマル酸塩、硝酸塩、ジメチルスルホキシド(DMSO)、トリメチルアミン N-オキシド(TMAO)、亜硝酸塩および酸化マンガンなどを電子受容体として利用できる[124]。それ以外、ウラン[U(VI)][125]、クロム[Cr(VI)][126]、ヨウ素酸[127]、テクネチウム[128]、ネプツニウム[129]、プルトニウム[130]、ゼイラーシラミ[131]、亜テルル酸塩[131]、バナジン酸塩[132]およびニトロ芳香族化合物[133, 134]などを電子受容体として利用できることが報告されている。この様に、*Shewanella* 属細菌は、汎用性の高い電子受容能力を持つため、様々な有機物の分解に関わっている。また、多様な異化能力を有するため、海洋環境における炭素循環に重要な役割を果たしている[135]。

1-5 本研究の目的

汎用プラスチックは、軽く、加工しやすく、値段が安いことから現代社会の中でさまざまな場面で活躍している。しかしながら、汎用プラスチックは長期安定性を有しており、長い期間を過ぎても分解されず、深刻な環境問題を引き起こしている。最新のデータによれば 2014 年現在、192 沿岸国(世界人口の 93%)から、530 - 1430 万トンのプラスチックが海洋環境に流出している[1, 2, 5]。特に、廃棄された様々なプラスチック製品が、海洋に流出し、海洋生態系を脅している[12, 16, 136]。また、漁業が行われている海域においては大量の廃棄された漁具が確認され[137]、「幽霊漁業」(ghost fishing)により、水産資源に大きなダメージを与える深刻な経済問題を引き起こしている[138, 139]。さらに、海洋環境中で漂流するマイクロプラスチックには PCBs, PAHs などの毒物が付着しやすいことが知られている。海洋生物がこれらのマイクロプラスチックを取り込むことにより、毒物は海洋生物の体内に蓄積し、最終的には、ヒトに取り込まれることで、甚大な影響を与える可能性が示唆されている[140, 141]。このように、年々増加するプラスチックの廃棄物をどのように管理して処理すべきかが、大きな環境問題の 1 つとなっている。

このような背景から、自然環境で分解する生分解性プラスチックは環境負担を軽減する材料として注目され始めた。生分解性プラスチックとして実用化の対象となっている代表的な材料の一つは P(3HB)である。海洋環境で P(3HB)あるいはその共重合体の実用性を高めるためには、物性のさらなる改善とともに、海洋環境中での生分解速度を精密に制御する必要がある。現在まで、土壌環境や、淡水環境における P(3HB)の分解性は詳細に研究され、P(3HB)分解微生物の同定、分解酵素の構造と機能が明確になっている。しかしながら、海洋環境中での P(3HB)の生分解に関する研究は少ない。海洋特有の低温および高塩濃度の環境下は、一般的な陸生分解細菌の生育にとっては至適環境ではない。このような海洋環境中での P(3HB)生分解機構を解明すれば、海洋環境中において最適な生分解性プラスチックを分子設計する上で重要な知見を得る可能性がある。

本博士論文では、海洋環境での P(3HB)分解機構を明らかにするために、海洋性 P(3HB)分解細菌を単離し、その P(3HB)分解酵素の構造と性質を調べる。さらに、海洋環境での P(3HB)分解メカニズムを考察する。

第1章では、本博士論文の背景と先行の研究例を述べ、研究目的を明確にする。

第2章では、新たに焼津港海水から海洋性 P(3HB)分解菌を単離・同定し、その生育条件、ポリエステル分解特性および生化学的特徴を明らかにする。

第3章では、単離された海洋性 P(3HB)分解菌の P(3HB)分解酵素遺伝子をクローニングし、酵素タンパク質の一次構造を明らかにする。また、野生株および組み換え体由来の酵素を精製し、それらの構造と機能との関係を調べる。

第4章では、各章の研究結果を総括し、今後の課題について議論する。

第2章

海洋環境からの P(3HB)分解 *Shewanella* 属 細菌の単離と特徴付け

2-1 実験方法

2-1-1 試薬

ポリ(3-ヒドロキシブタン酸)[P(3HB)]は、三菱ガス化学(株)から提供された。ポリ(ヒドロキシブタン酸-co-3-ヒドロキシ吉草酸)[P(3HB-co-3HV)]は ICI 社、ポリ乳酸(PLA)は島津製作所、ポリ(ϵ -カプロラクトン) (PCL)はダイセル化学工業社、ポリ(ブチレンアジペート-co-ブチレンテレフタレート)(PBAT)は BASF 社、ポリエチレンサクシネート(PESu)は日本触媒(株)、ポリブチレンサクシネート(PBSu)、およびポリブチレンサクシネートアジペート(PBSA)は昭和高分子株式会社から各々提供された。それぞれの高分子をクロロホルムに溶解し、メタノールで再沈させた。沈殿物を、濾紙(FILTER PAPER No.2, ADVANTEC 社製)により回収した。少量の溶媒を含む濾過物を、そのまま乳鉢でパウダーになるまですり潰した。パウダー状にした高分子を、減圧乾燥させた後、使用した。その他の試薬は、市販の特級試薬をそのまま使用した。高分子フィルムを作製するために、再沈殿した高分子粉末 0.5 g をクロロホルム 30 mL に溶解し、ガラス製のフラットシャーレに流し込んだ。それを、アルミ箔で覆い、小さい穴を 1 つ開け、溶媒を蒸発させた。溶媒が完全に蒸発した後、結晶状態が平衡に達するまで 3 週間室温で放置した。

2-1-2 培地

実験で使用した各種培地の組成を Table 3 および Table 4 に示す。固体培地を作製する際は、さらに 1.5%の寒天を加えた。マリン培地を作製する際は、さらに 3%の NaCl を加えた。ポリエステルの乳化は、ポリエステル 1 g をクロロホルム 100 mL に溶かし、Plysurf (第一工業株式会社製) 0.01% (wt/v)、および蒸留水 500 mL を加え、超音波処理(Tomy UD-200, OUTPUT level 8)を 3 分間行った。乳化液中のクロロホルムを、室温で攪拌し続けることにより除去した。この乳化液に Table 2-2 に示した試薬および 1.5%の寒天を加えポリエステル乳化培地とした。培地を 121°C, 15 分間オートクレーブ滅菌し、その後、滅菌シャーレに流し込んだ。

Table 3. The composition of LB medium(pH7.5)

Polypeptone	10.0 g/L
Yeast extract	5.0 g/L
NaCl	5.0 g/L

Table 4. The composition of mineral medium(pH7.0)

KH ₂ PO ₄	4.6 g/L
NaHPO ₄ · 12H ₂ O	11.6 g/L
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5 g/L
NH ₄ Cl	1.0 g/L
FeCl ₃ · 6H ₂ O	0.1 g/L
Yeast Extract	0.5 g/L

2-1-3 微生物, ベクターおよびプライマー

実験で使用した微生物, ベクターおよびプライマーを Table 5 に示す。プライマーの位置を Figure 5 に示す。

Table 5. Microbial strains, vectors and primers used in this study.

	Relevant characteristic or sequence	Reference
Strains		
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>supE44 ΔlacU169(φ80lacZΔM15) hsdR17 recA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Toyobo
JKCM-AJ-6,1 α	P(3HB)-degrading bacterium	This study
Vectors		
pMD20	Cloning vector; <i>Amp^r</i> , <i>lacZ</i>	Takara
16S-JKCM-AJ-6,1 α	pMD20 containing 16S rDNA of strain JKCM-AJ-6,1 α ; <i>Amp^r</i> , <i>lacZ</i>	This study
Primers		
M13M4	GTAAAACGACGGCCAG	Takara
M13RV	CAGGAAACAGCTATGAC	Takara
16Sf	GTTTGATCATGGCTCAG	[142]
16Sr	TACCTTGTTACGATTCA	[143]
522f	CAGCMGCCGCGGTAATWC	[144]
943r	ACCGCTTGTGCGGGCCC	[145]

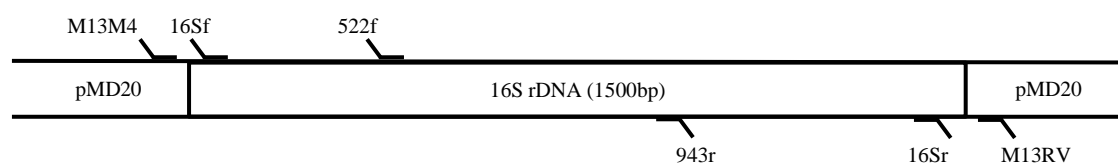


Figure 5. Position of primers used for 16S rDNA.

2-1-4 海洋性 P(3HB)分解菌のスクリーニング

50 μ L の焼津港の海岸海水(34°52'09.8"N 138°19'30.4"E)をマリン P(3HB)乳化培地上に塗布し, 30°C で培養した。出現したコロニー周辺のクリアゾーン形成により P(3HB)分解菌をスクリーニングした[74, 99, 146]。さらに, 単離菌の純化はマリン LB 固体培地上で画線法により行われた。

2-1-5 P(3HB)分解微生物の遺伝学的解析

単離株の 16S rDNA をコロニーPCR 法により増幅した[142, 147]。使用したプライマーは、16Sf/16Sr (Table 5)であり、これらを各々20pmol ずつ用いた。爪楊枝で LB 固体培地上の菌株を採取し、滅菌超純水にこれを再懸濁し、テンプレートとして用いた。PCR の条件を、Table 6 に示す。PCR 産物を、T-Vector pMD20 (TaKaRa 社製)に連結した(Table 7)。塩化カルシウム法を用いて、組み換えプラスミドを大腸菌 DH5 α 株(Table 5)に形質転換した。その培養液を 5000 rpm, 1 分間遠心し、菌体を回収した。回収した大腸菌をアンピシリン 50 μ L (100 mg/mL) , Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG 1mM) 25 μ L , 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-gal 0.1mM) 30 μ L を塗布した LB 培地に、塗布し、37 $^{\circ}$ C で培養した。プレート上に形成されたコロニーの中から、白色コロニーを選択し、これらからプラスミド DNA をアルカリ法[148]により抽出した。プラスミド DNA の消化は、*EcoRI* 0.5 μ L, buffer O + 1 μ L (Fermentas 社製), および抽出したプラスミド DNA 5 μ L, 滅菌超純水 3.5 μ L を 37 $^{\circ}$ C で 2 時間、保温することにより行った。インサートの存在が確認された組換えプラスミド DNA を持つ組換え大腸菌株を、レプリカコロニーから LB 培地に植菌し、37 $^{\circ}$ C で一晩培養した。プラスミド DNA をアルカリ法により抽出した。精製プラスミド DNA の濃度および純度は、分光光度計 GeneQuant pro (Pharmacia Biotech 社製)を用いて定量された。得られたクローンをダイデオキシ法によりシーケンシング解析した。塩基配列及び相同性解析は、プログラム GENETYX(Genetyx Inc., Tokyo, Japan)あるいはプログラム blastn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)を用いて行われた。DNA 配列のアライメントに対して、プログラム ClustalW[149]を用いた。進化系統樹は、近隣結合法(neighbor-joining method)[150]によりプログラム MEGA5[151]を用いて構築された。

Table 6. PCR experiment.

PCR condition		Thermal cycles	
Template (bacterial cells in ddH ₂ O)	5 μ L	98 $^{\circ}$ C	10 min(pre heat)
16Sr (20pmol)	0.2 μ L	25 cycles {	94 $^{\circ}$ C 20 sec.
16Sf (20pmol)	0.2 μ L		55 $^{\circ}$ C 30 sec.
10 \times Ex Taq Buffer	1 μ L		72 $^{\circ}$ C 2 min.
dNTP	1 μ L		
Ex Taq	0.1 μ L		
ddH ₂ O	2.5 μ L		
Total	10 μ L	4 $^{\circ}$ C	∞

Table 7. Ligation mixture (total 10 μ L)

2 \times Rapid Ligation Buffer	5 μ L
T-Vector pMD20 (5-50 ng/ μ L)	1 μ L
ddH ₂ O	1.5 μ L
T4 DNA ligase (3 U/ μ L)	1.0 μ L
PCR product	1.5 μ L

2-1-6 ゲノム DNA(gDNA)抽出

ゲノム DNA 抽出は, Pitcher らの方法[142, 152]に準拠して行われた。坂口フラスコ中, 100 mL の LB 培地に菌株を植菌し, 30°C で一晚培養した。培養液を遠心分離(6000 rpm, 15 min, 4°C)し, 菌体を回収した。得られた菌体ペレットを, TE バッファー(Table 8) 8.5 mL に再懸濁させた。懸濁液にリゾチーム 85 mg を加え, 37°C で 1 時間保温した。その後, 10% SDS 水溶液 450 μ L, Proteinase K (20 mg/mL) 50 μ L を加え, 50°C で 5 時間保温した。これに等量のフェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール(25:24:1, v/v)を加え, 室温で 30 分間穏やかに振とうした。遠心分離(6000 rpm, 30 min, 25°C)により上層を回収した。回収した上層に, 等量のイソプロパノール, 1/10 量の 5M NaCl を加え, gDNA を沈殿させて回収した。これを 70%エタノール 1 mL で洗浄し, gDNA を減圧乾燥させた。その後 TE バッファー 9 mL に溶かし, RNase 1 μ L を加え, 37°C で 1 時間保温した。再度フェノール/クロロホルム抽出を行い, イソプロパノール沈殿により gDNA を回収した。減圧乾燥させた後, TE バッファーに溶かした。

Table 8. The composition of TE buffer(pH8.0)

Tris-HCl	10mM
EDTA	1mM

2-1-7 GC 含率

GC 含率測定は, Wakizaka らの方法[153-156]に準拠して行われた。100 μ L の JKCM-AJ-6,1 α 株の gDNA (1 μ g/mL)を用いて 100°C で 5 分加熱し, 氷水で急冷した。その後, ヌクレアーゼ P₁ 1 μ L (500 U/mL)を添加し, 50°C で 1 時間保温した。その後, 溶液を HPLC で分析した。測定条件は, カラム: InertSustain C18, 溶出溶媒: 0.02M NH₄H₂PO₄ 溶液-アセトニトリル(200:1, v/v), 流速: 0.2 mL/min, 検出波長: 270nm である。測定試料は, GC 含量測定用試薬キット(ヤマサ醤油株式会社製)を用いて調製した。標準物質(dCMP, dTMP, dGMP, および dAMP, 各々 50 μ M ずつ)は, 各々 3.5, 5.8, 6.3, および 11 min の順で溶出した。GC 含率(Mol%) は, (1)式を用いて決定された。

$$GC (Mol\%)=100 \times (G_S/G_R+C_S/C_R)/(A_S/A_R+G_S/G_R+C_S/C_R+T_S/T_R) \quad (1)$$

ここで, N_S は試料を分析したクロマトグラムにおけるピーク面積値, N_R は標準物質を分析したクロマトグラムにおけるピーク面積値を示している。Excel を使用して, GC 含率のデータを解析した。

2-1-8 グラム染色

グラム染色を, カラーグラム 2 キット (bioMérieux 社製)を用いて行った。LB 固体培地に菌株を画線法により植菌し, 30°C で 24 時間振とう培養した。爪楊枝で LB 固体培地上の菌株を取ってスライドガラスに薄く塗り, 火炎の上部でスライドガラスをすばやく数回通

過させ火炎固定した。その後、固定した標本上に 1 滴の R1 液を滴下し 1 分間放置した後、蒸留水で静かに洗い流した。次に、1 滴の R2 液を滴下し 1 分間放置した後、蒸留水で静かに洗い流した。さらに、数滴の R3 液で脱色した後、蒸留水で静かに洗い流した。最後は 1 滴の R4 液を滴下し 1 分間反応させた後、蒸留水で静かに洗い流した。自然乾燥した後、光学顕微鏡で観察した。

2-1-9 生化学・生理学的性質

単離株の生化学的および生理学的性質を、API 20NE (ビオメリューバイテック社製)を用いて評価した。菌株を API 20NE キットに附属のカップ内において、30°C で好氣的に培養し、24 時間および 48 時間後に、自発反応、および試薬添加による呈色反応を読み取った。単離株の酵素プロファイルは、半定量性酵素活性キット API ZYM (ビオメリューバイテック社製)を使用して作成された。JKCM-AJ-6,1 α 株のコロニーを、白金耳に 1 ループ採取し、2 mL の 0.85%滅菌生理的食塩水に懸濁させた。懸濁液を API ZYM プレートのカップに接種し、37°C で約 4 時間保温した。ZYM A 試薬と ZYM B 試薬を、カップに 1 滴ずつ添加した後、蛍光灯をコントロールカップ溶液の黄色い発色がなくなるまで照射した。呈色程度は、判定表に基づき半定量的に評価された。

2-1-10 形態観察

観察用のサンプルは、Kasuya らの方法[108]に準拠して前処理した。LB 固体培地に JKCM-AJ-6,1 α 株を画線法により植菌し、30°C で 24 時間保温した。菌体が付着した固体培地を、1 cm×1 cm の大きさに切り出し、2.5%のグルタルアルデヒド溶液中、室温で 1 時間保持した。その後、超純水で洗浄し、50, 60, 70, 80, 90 および 100%のエタノールに順次、それぞれ 20 分間浸し、脱水した。最後に酢酸イソアミルで 1 時間置換し、その後真空乾燥した。この試料を金で真空蒸着し、走査型電子顕微鏡(Tabletop microscope TM3030, Hitachi High-Technologies Corporation, Japan)で観察した。

2-1-11 培養塩濃度の菌体増殖への影響

LB 培地 200 mL に、JKCM-AJ-6,1 α 株を植菌し、30°C で 16 時間振とう培養した。この培養液を、10 mL/L の割合で、各 NaCl 濃度の(0M, 0.2M, 0.4M, 0.6M, 0.8M, 1.0M, 1.2M, 1.4M, 1.6M, 2.0M, 5.0M および飽和状態)栄養培地 100 mL (Table 9)に菌を植菌して 30°C で振とう培養した。それぞれの塩濃度における菌株の増殖度合を調べた。培養開始から 2 時間あるいは 1 時間毎に、培養液 1 mL を採取し、濁度(600nm)を測定した。増殖速度定数 μ は、(2)式を用いて決定された。

$$dN/dt=\mu N \quad (2)$$

ここで、N は濁度、t は時間を示している。Excel を使用して、菌体増殖のデータを解析した。

Table 9. The composition of nutrient medium (pH7.0).

Polypeptone	10.0 g/L
Yeast extract	5.0 g/L

2-1-12 培養温度の菌体増殖とクリアゾーン形成能への影響

P(3HB)乳化培地の上に JKCM-AJ-6,1 α を植菌し、4°C, 15°C, 25°C, 30°C, 37°C, 50°C および 60°C で保温した。それぞれの温度における菌株の増殖度合とクリアゾーン形成能力を観察した。

2-1-13 各種ポリエステルおよびオリーブオイル分解能力

各種ポリエステルおよびオリーブオイル[P(3HB), P(3HB-co-3HV), PLA, PCL, PBAT, PESu, PBSu, および Olive oil]乳化培地上に JKCM-AJ-6,1 α 株を画線し、30°C および 15°C で保温した。コロニー周辺に形成されたクリアゾーンの大きさにより各種基質の分解能力を評価した。

2-1-14 P(3HB)分解活性測定(濁度法)

P(3HB)微粒子は、使用前に以下の手順で精製された。まず始めに、P(3HB)微粒子に対して、30 倍の体積の超純水を加え、室温で 2 時間攪拌した。その後 4°C で 10 分間、5000 rpm で遠心し、上清を取り除いた(ステップ 1)。続いて、回収した P(3HB)微粒子に対して 30 倍の体積のアセトンを加え、室温で 2 時間攪拌した。その後 4°C で 10 分間、5000 rpm で遠心し、上清を取り除いた(ステップ 2)。P(3HB)微粒子に対して、30 倍の体積のヘキサンを加え、室温で 2h 攪拌した。その後 4°C で 10 分間、5000 rpm で遠心し、上清を取り除いた(ステップ 3)。ステップ 1-3 の操作を 2 回繰り返した。最後に P(3HB)微粒子に対して、30 倍の体積の超純水を加え、室温で 2 時間攪拌した。その後 4°C で 10 分間、5000 rpm で遠心し、上清を取り除き、その後風乾し、微粒子を室温で保存した。

P(3HB)分解酵素活性を、精製した P(3HB)微粒子を基質として濁度法で決定した[99]。P(3HB)基質は、精製した P(3HB)微粒子を超音波処理し、バッファー(Table 10)中に懸濁させた。この中に所定量の培養上清あるいは酵素を注入することにより分解反応を開始した。P(3HB)分解酵素により、水に不溶性の P(3HB)微粒子は水溶性オリゴマーへと分解される。酵素分解中の反応溶液濁度の時間変化を 650nm の光の透過度の減少から測定した。1 Unit は、1 分間に 650nm の濁度を 1 減少させるために必要な酵素量とし、培養上清あるいは酵素中の活性は U/mL で表した。

Table 10. The composition of P(3HB) matrix(pH7.5)

Tris-HCl	6.057 g/L
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.147 g/L
P(3HB) granule	0.4 g/L

2-1-15 炭素源の菌体増殖および培養上清の活性への影響

LB 培地 200 mL に、菌株を植菌し、30°C で 16 時間振とう培養した。D-グルコース、コハク酸、(R)-3-ヒドロキシブタン酸、(S)-3-ヒドロキシブタン酸、乳酸、D-ソルビトール、ぶどう糖、アジピン酸、D-(+)-マンノース、スクロースあるいは P(3HB)を唯一の炭素源として 0.2% (wt/v)および 0.2M NaCl 含むミネラル培地に、前培養液を 10 mL/L の割合で植菌し、15°C で 48 時間振とう培養した。上清の酵素活性は、0.5M NaCl を含む P(3HB)基質を用いて濁度法[2-1-14]により評価された。

2-1-16 P(3HB)フィルムの分解

P(3HB)フィルムの分解は、Kasuya らの方法[99]に準拠して行われた。0.2M NaCl の栄養培地およびミネラル培地 20 mL に P(3HB)のフィルムを入れ、121°C、15 分間オートクレーブ滅菌した。その後 JKCM-AJ-6,1α 株を植菌し、15°C および 30°C で 5、10、15 および 20 日間振とう培養した。培養後、回収したフィルムは、メタノールと超純水で洗浄され、その後真空乾燥された。分解前のフィルムの重量から分解後のフィルム重量を減算することによって、P(3HB)分解量を決定した。

2-2 結果と考察

2-2-1 P(3HB)分解微生物の単離

焼津港の海水を植種源として、マリン P(3HB)乳化培地を用いたクリアゾーン法により、P(3HB)分解菌を単離した。その結果、1 株の P(3HB)分解菌を単離した。単離株を JKCM-AJ-6,1 α と命名した。JKCM-AJ-6,1 α 株は、マリン P(3HB)乳化培地上でコロニー周辺に明瞭なクリアゾーンを形成した(Figure 6)。



Figure 6. Clearing zone by strain JKCM-AJ-6,1 α on the P(3HB) containing marine mineral plate. The strain formed clear zone after incubation at 15°C for 72h.

2-2-2 P(3HB)分解微生物の同定

JKCM-AJ-6,1 α 株の形態を走査型電子顕微鏡(SEM)を用いて観察した。Figure 7 に顕微鏡像を示す。JKCM-AJ-6,1 α 株は、長桿状で、長さはおおよそ 0.85~2.6 μm 程度であることがわかった。また、JKCM-AJ-6,1 α 株について遺伝系統的解析が行われた。P(3HB)分解菌 JKCM-AJ-6,1 α 株の 16S rDNA 配列に基づき作製した系統樹を、Figure 8 に示す。JKCM-AJ-6,1 α 株は、*Shewanella* sp.の高い相同性を示した。また、Figure 8 示すように、本株を含む海洋に特有な種は、他の P(3HB)分解菌種とは、遺伝学的距離があった。

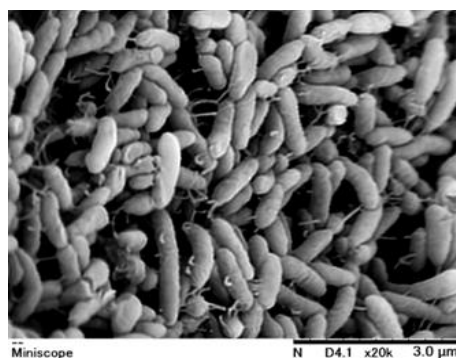


Figure 7. A scanning electronic micrograph of the strain. The bar indicates 3.0 μm in length.

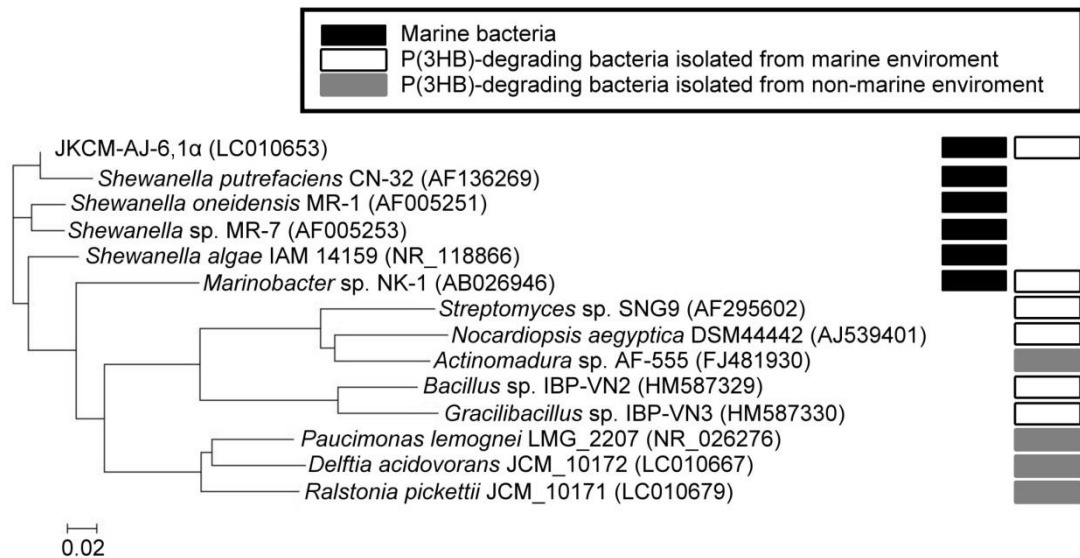


Figure 8. Phylogenetic tree of the P(3HB)-degrading isolates and related bacteria based on 16S rDNA sequence comparisons. Accession numbers are given in parentheses. The bar indicates 2% estimated sequence divergence.

さらに、本単離株の GC 含率、グラム染色および生化学的、生理学的性質を調べた。その際、*Shewanella putrefaciens* (ATCC 8071)[157]を比較株として用いた。JKCM-AJ-6,1 α 株は、グラム陰性であり、GC 含率は 48.8%であった。また、本株は、オキシダーゼ、硝酸還元試験、エスクリンおよびゼラチンの加水分解試験において陽性を示し、グルコース、L-アラビノース、N-アセチル-D-グルコサミン、マルトース、n-カプリン酸および dl-リンゴ酸を同化した(Table 11)。本株は、比較株に加えてグルコース、マルトースおよび n-カプリン酸を同化した。また、本株は、アルカリフォスファターゼ、エステラーゼ(C4)、エステラーゼリパーゼ(C8)、ロイシンアリルアミダーゼ、トリプシン、キモトリプシン、酸性ホスファターゼ、ナフトール-AS-BI-フォスフォヒドロラーゼおよび N-アセチル- β -グルコサミニダーゼ活性を示したが、リパーゼ(C14)活性を有していなかった(Table 12)。本株の酵素プロファイルは、比較株を含めた *Shewanella* 属の菌株と類似していた。この結果からも、本株が *Shewanella* 属細菌と近縁種であることが示唆された。*Shewanella* 属細菌は、海洋性細菌としてよく知られており、今までに海水[127]、海底堆積物[158]、海洋生物[159] などから単離されている。*Shewanella* 属細菌は海洋環境で種々の有機化合物を使用する能力を持っているため、海洋炭素循環に重要な役割を果たしている可能性がある[135]。また、*Shewanella* 属は環境汚染のバイオレメディエーション[160, 161]または微生物燃料電池[122, 162]としての応用例が報告されている。*Shewanella* 属細菌には、ゲノム DNA 完全に解析された 31 株の中 3 株[*Shewanella* sp. MR-7 (accession no. NC_008322), *Shewanella* sp. MR-4 (NC_008321), and *Shewanella* sp. HN-41 (NZ_AFOZ01000000)]のゲノム DNA 上に推定の P(3HB)分解酵素の遺伝子が存在する。一方、このような推定遺伝子の発見にもかかわらず、P(3HB)を分解できる *Shewanella* 属細菌は今までに報告例はない。今回、我々は、はじめて

P(3HB)を分解する *Shewanella* 属細菌を単離した。このことから、*Shewanella* 属細菌は、海洋中において汚染物質のバイオレメディエーション[160, 161]のためだけではなく、P(3HB)の炭素循環における重要な細菌群の一つであることが示唆された。

Table 11. Biochemical and physiological properties of strain JKCM-AJ-6,1 α .

	JKCM-AJ-6,1 α	<i>Shewanella putrefaciens</i> ATCC 8071
Characteristics		
Gram strain	Negative	Negative
Oxidase	+	+
Nitrate reduction	+	+
Indole production	-	-
Oxidation of glucose to gluconate	-	-
Arginine dehydrolase	-	-
Urease	-	-
Hydrolysis of esculin	+	+
Hydrolysis of gelatin	+	+
β -Galactosidase	-	-
Utilization of carbon source		
Glucose	+	-
L-Arabinose	+	+
D-mannose	-	-
D-mannitol	-	-
N-Acetyl-D-glucosamine	+	+
Maltose	+	-
Gluconate	-	-
n-Capric acid	+	-
Adipic acid	-	-
dl-Maleic acid	+	+
Citrate	-	-
Phenyl acetate	-	-

Table 12. Enzyme production profile of strain JKCM-AJ-6,1 α .

Enzyme	JKCM-AJ-6,1 α	<i>Shewanella putrefaciens</i> ATCC 8071	<i>Shewanella spongiae</i> sp. nov. HJ039 ^T [163]	<i>Shewanella aquimarina</i> sp. nov. SW-117 ^T [164]
Alkaline phosphatase	+	+	+	+
Esterase (C4)	+	(+)	+	+
Esterase lipase (C8)	(+)	+	+	+
Lipase (C14)	-	-	-	-
Leucine arylamidase	+	+	+	(+)
Valine arylamidase	-	(+)	(+)	-
Cystine arylamidase	-	-	-	-
Trypsin	+	+	-	-
Chymotrypsin	+	+	-	+
Acid phosphatase	+	+	+	+
Napthtol AS-BI phosphohydrolase	(+)	(+)	+	+
α -Galactosidase	-	-	-	-
β -Galactosidase	-	-	-	-
β -Glucuronidase	-	-	-	-
α -Glucosidase	-	-	-	-
β -Glucosidase	-	-	-	-
N-Acetyl- β -glucosamidase	+	-	-	+
α -Mannosidase	-	-	-	-
α -Fucosidase	-	-	-	-

+: means present.

(+): means weakly present.

-: means negative.

2-2-3 培養塩濃度の菌体増殖への影響

異なる NaCl 濃度(0M から飽和まで)の栄養培地中での JKCM-AJ-6,1 α の好気条件下 30°C での増殖を観察した(Figure 9)。JKCM-AJ-6,1 α 株は, NaCl 濃度 0.1M~0.2M で最も高い比増殖速度(0.96~0.99)を示し, 0.6M 以上では比増殖速度は大幅に低下した。さらに, 本株は, NaCl 濃度 1M 以上の培地中で, 増殖しなかった。この結果から, JKCM-AJ-6,1 α 株は, 既知の海洋性 P(3HB)分解菌と同様に, 0M~0.8M の Na⁺存在下で増殖可能な海洋性耐塩細菌であることが示唆された[165]。

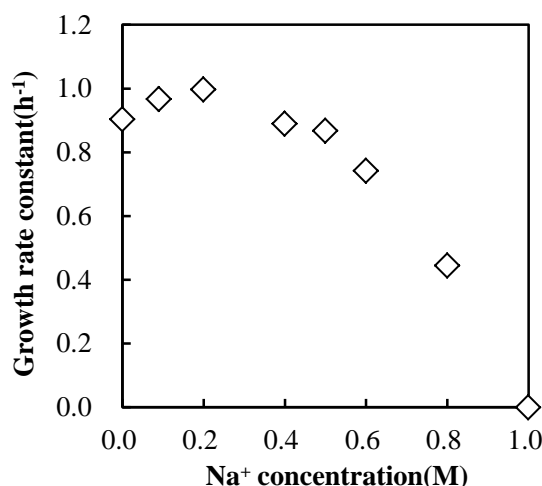


Figure 9. Specific growth rates of strain JKCM-AJ-6,1 α at different Na⁺ concentrations at 30°C in a nutrient medium.

2-2-4 培養温度の菌体増殖とクリアゾーン形成能への影響

培養温度 4-60°C において, JKCM-AJ-6,1 α 株の菌体増殖程度およびクリアゾーン形成能を調べた(Table 13)。JKCM-AJ-6,1 α 株は, 50°C 以上では増殖せず, 30-37°C で最もよく増殖した。一方, 本株が形成するクリアゾーンは, 低温域(15°C)で最も大きくなった。これらの結果は, JKCM-AJ-6,1 α 株は中温性であるが, JKCM-AJ-6,1 α 株の生産する酵素は熱に対して安定が低い(熱不安定性)ことを示唆している。このことは, 一般的に海洋細菌の生産する酵素が熱不安定性であるという特徴と一致している[166, 167]。このような, 海洋生酵素の熱不安定性は, 海洋平均温度[168]が地圏平均温度と比較して相対的に低いことが原因であると考えられている。一方, 地圏環境から単離された細菌の P(3HB)分解酵素の多くは, 中温領域で安定であることが報告されている[78, 169]。

Table 13. Effect of temperature on the growth and clear zone formation on the P(3HB) emulsified plates of strain JKCM-AJ-6,1 α .

Temperature(°C)	JKCM-AJ-6,1 α	
	Growth	Clearing zone formation
4	—	—
15	+	++
25	++	+
30	+++	+
37	+++	+
50	—	—
60	—	—

+++: means growth was excellent, or a large clearing zone was formed.

++: means growth was good, or a medium clearing zone was formed.

+: means growth was poor, or a small clearing zone was formed.

—: means not growing, a clearing zone was not formed.

2-2-5 各種ポリエステルおよびオリーブオイルの分解能力

Table 14 に、JKCM-AJ-6,1 α 株の種々のポリエステル、およびオリーブオイル乳化培地上でのクリアゾーン形成能を示す。本株は、P(3HB)および P(3HB-co-3HV)に対して分解活性を示した。一方で、PCL およびオリーブオイルを含む培地上ではクリアゾーンを形成しなかった。これらの結果から、JKCM-AJ-6,1 α 株は P(3HB)分解酵素を生産するが、リパーゼを生産しないことが示唆された。

Table 14. Effect of temperature on the clear zone formation on various polyester or olive oil emulsified plates of strain JKCM-AJ-6,1 α .

Substrate	Growth temperature (°C)	
	15	30
P(3HB)	++	+
P(3HB-co-3HV)	+	—
PLA	—	—
PCL	—	—
PBAT	—	—
PESu	—	—
PBSu	—	—
Olive oil	—	—

++: means a medium clearing zone was formed.

+: means a small clearing zone was formed.

—: means a clearing zone was not formed.

2-2-6 炭素源の菌体増殖および培養上清の活性への影響

Table 15 に、さまざまな炭素源を含む終濃度 0.2M NaCl のミネラル培地および 0.2M NaCl に調整された栄養培地中での JKCM-AJ-6,1 α 株の増殖程度および培養上清の P(3HB)分解活性を示す。JKCM-AJ-6,1 α 株は、10 種類の炭素源のうち、P(3HB)、(R)-3-ヒドロキシブタン酸、D-グルコース、コハク酸および乳酸の存在下で良好な増殖を示した。また、本株は、P(3HB)および(R)-3-ヒドロキシブタン酸の存在下で P(3HB)分解酵素活性を発現した。このことから、P(3HB)および P(3HB)の分解物である(R)-3-ヒドロキシブタン酸が本株の P(3HB)分解酵素の発現誘導に関わっていることが示唆された。さらに、栄養培地に P(3HB)を添加した場合、あるいはグルコースと P(3HB)を同時に炭素源として用いた場合は、P(3HB)を単一の炭素源として用いた場合と比較して、本株の P(3HB)分解酵素活性が低下した。この結果は、グルコースなどの易資化性物質(炭素)が存在する場合、本株がそれらを先に利用するため P(3HB)分解酵素発現が抑制されることを示唆している。

Table 15. P(3HB) depolymerase relative activity by strain JKCM-AJ-6,1 α grown various media and the growth levels.

Carbon source	Growth	P(3HB) depolymerase activity (U/mL) ^d
P(3HB) + MM(0.2) ^a	++	0.047
(R)-3-Hydrobutyric acid + MM(0.2) ^a	++	0.031
(S)-3-Hydrobutyric acid + MM(0.2) ^a	+	0
D-Glucose + MM(0.2) ^a	+++	0
D-Glucose+ P(3HB) + MM(0.2) ^a	+++	0.017
Succinic acid + MM(0.2) ^a	+++	0
Lactic acid + MM(0.2) ^a	+++	0
D-sorbitol + MM(0.2) ^a	+	0
Adipic acid + MM(0.2) ^a	+	0
D-Mannose + MM(0.2) ^a	+	0
Sucrose + MM(0.2) ^a	+	0
NM(0.2) ^b	+++	0
P(3HB) + NM(0.2) ^b	+++	0.008
None ^c + MM(0.2) ^a	+	0

+++: means growth was excellent.

++: means growth was good.

+: means growth was poor.

a MM(0.2): mineral medium supplemented with 0.2M NaCl.

b NM(0.2): nutrient medium supplemented with 0.2M NaCl.

c None: without carbon source.

d The activities were determined by turbidimetric method with P(3HB) granules.

2-2-7 P(3HB)フィルムの分解

JKCM-AJ-6,1 α 株による P(3HB)フィルムの重量減少量を経時的に調べた。P(3HB)フィルムを含む終濃度 0.2M NaCl の液体栄養培地およびミネラル培地中で、JKCM-AJ-6,1 α 株を 5, 10, 15 および 20 日間、15°C で培養した後、フィルムを取り出して重量減少量を評価した。Figure 10 に示すように、本株によるフィルムの重量減少量は、栄養培地中と比較して、ミネラル培地中の方が、大きかった。Table 16 に、栄養培地およびミネラル培地中で JKCM-AJ-6,1 α 株を培養時の最大菌体増殖度および P(3HB)分解活性を示している。JKCM-AJ-6,1 α 株は、栄養培地では、低栄養のミネラル培地中での増殖度の約 3 倍程度増殖した。一方で、本株による P(3HB)フィルム分解活性は、栄養培地と比較して、ミネラル培地中では、約 2.9 倍の大きさであった。すなわち、このことは、他の P(3HB)分解菌と同様に、易資化性栄養の存在下において、本株の P(3HB)分解活性発現が抑制されることを示唆している[170, 171]。

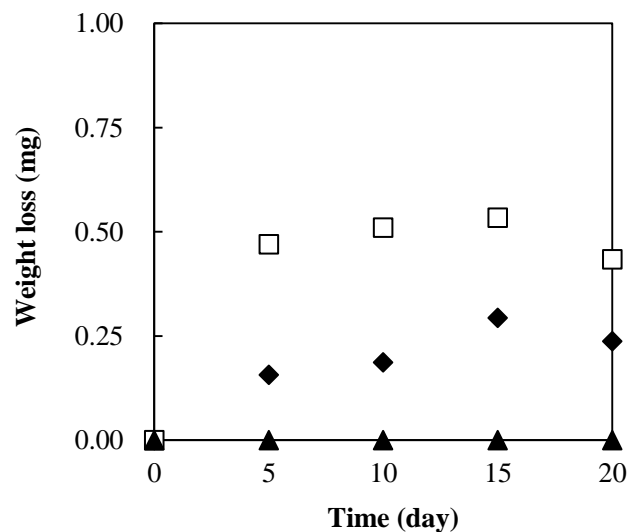


Figure 10. The biodegradation of P(3HB) film blended with strain JKCM-AJ-6,1 α . P(3HB) film (10×10×0.15mm) was incubated with strain JKCM-AJ-6,1 α at 15°C in the nutrient and mineral medium with NaCl supplemented to a final concentration of 0.2 M. Weight loss of P(3HB) film after degradation by strain JKCM-AJ-6,1 α in the nutrient medium (◆). Weight loss of P(3HB) film after degradation by strain JKCM-AJ-6,1 α in the mineral medium (□);control(▲).

Table 16. P(3HB) film degradation by strain JKCM-AJ-6,1 α grown on 2 types of media:NM(0.2) and MM(0.2).

Media	Growth ^a	Rate of P(3HB) film degradation ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{day}$) ^b
P(3HB) film + NM(0.2) ^c	1.6	16
P(3HB) film + MM(0.2) ^d	0.49	47

a the growth levels after incubation at 15°C for 10 days were evaluated by OD₆₅₀.

b these values indicate the average rates of the film weight losses for incubation for 10 days.

c MM: mineral medium supplemented with 0.2M NaCl.

d NM: nutrient medium supplemented with 0.2M NaCl.

第3章

海洋性 *Shewanella* 属細菌由来の熱不安定性 P(3HB)分解酵素の特徴付け

3-1 実験方法

3-1-1 試薬

2-1-1 参照。

3-1-2 培地

実験で使用した M9 培地の組成を Table 17 に示す。他の培地および調整方法は 2-1-2 参照。

Table 17. The composition of M9 medium(pH7.0)

KH ₂ PO ₄	3.0 g/L
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	6.0 g/L
NH ₄ Cl	1.0 g/L
NaCl	0.5 g/L
Plysurf	0.1 g/L
P(3HB)	2.0 g/L
1M MgSO ₄ *	1.0 mL
2M Glucose*	5.6 mL
1% Thiamine*	1.0 mL
1M CaCl ₂ *	0.1 mL

*Addition after autoclaved

3-1-3 微生物, ベクターおよびプライマー

実験で使用した微生物, ベクターおよびプライマーを Table 18 に示す。プライマーの位置を Figure 11 に示す。

Table 18. Strains and plasmids used in this study.

Strains or plasmids	Relevant characteristic	Source or reference
Strains		
<i>E. coli</i> DH5a	F ⁻ , Φ80d <i>lacZ</i> ΔM15, Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (r _K ⁻ m _K ⁻), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , λ ⁻ , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	Takara
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻), <i>gal</i> (λcI 857, <i>ind1</i> , <i>Sam7</i> , <i>nin5</i> , <i>lacUV5-T7gene1</i>), <i>dcm</i> (DE3)	Takara
JKCM-AJ-6,1α	Wild type, the strain has P(3HB)-degrading activity.	This study
JKCM-AJ-6,1α-D	<i>phaZ_{She}::Tn5</i> , <i>Km^r</i> , the strain lost in P(3HB)-degrading activity.	This study
Plasmids		
pUC18	Cloning vector; <i>Amp^r</i>	Takara
pUC18-6000	pUC18 carrying <i>EcoRI/EcoRI</i> fragment of gDNA containing <i>phaZ_{She}</i>	This study
pMD20-2049-kan	Disruption vector; <i>Amp^r</i> , <i>Km^r</i>	This study
pColdIV	pMB1 replicon, expression vector; <i>Amp^r</i>	Takara
pColdIV2049	pColdIV carrying <i>NdeI/BamHI</i> fragment of <i>phaZ_{She}</i>	This study
Primers		
she03F	GTNCCNGAYGCNATGAAAYAA	This study
she08R	GCRTTYTGTYGRTTRTARCA	This study
She17	TAAATCACGCTGCGAATCCTACGCGGGTAGCTAC	This study
She18	ATTAATGCTGCCCTGCCAATAGGACCAACAGC	This study
She19	AAGTGTTGACCGTAGTGTCCGGCCTTGCCAT	This study
She20	CTGACGCCATGAATAAGGCAGGCTACAGCT	This study
She23	ATGGCAAGGCCGACACTACGGTCAACACTT	This study
She24	AGCTGTAGCCTGCCTTATTCATGGCGTCAG	This study
She25	CCGTGATTGCGATGGATAGCACGCAACTCT	This study
She26	ATAGTGACCACGCTGCATGCCGCCATTTCGC	This study
She27	TTAGTTCTGGTCAGCAAGTCAGCGCGAGCA	This study
She28	ATGTCTCTTCGGCAAGACCGAACGCCGAGTA	This study
She29	TGCATTGGCTTGGGTGGATGGATGGCGGGA	This study
She30	TGATTCTTCTTCGGTGAATACAGAGGACC	This study
She31	ATTAGGTGAAAGCCCTAACGGGGTGATCTA	This study
She32	AGTTCACATAAGAACCCCGCTAAGCGCTCGC	This study
She33	AGGGCAAATCGCATTGACGGTAATTCCTGCT	This study
She34	TAGACCCACGTCAGATTGGCGAGTTTGTGCT	This study
She35	TCAGGCTTTGGCCCGCACCGTCGAGCAAAT	This study
She36	TGCCATCGGCAACCCACTGACATTGCGAGCT	This study
She37	ACCATAAGGTTTCGCTTTGTTATCAAGCCTA	This study
She38	AGTTGCCCCACCAATGGCATCGGCCACCTT	This study
She39	AGGTTGCCGCACAAATGCTCAAGCAACATGGT	This study
She40	TTATTAGGTGGCGCAATATCCACTGTATTA	This study
She42	AAGCTACTCGGCGTTCGGTCTTGCCGAAGA	This study
She43	TTAAGGGGAAGCGTTTTGGCGTACCGCGCA	This study
SheD-f	ATTTTGCCAGGATCCATCGGTTATCCGCACCAGTGACATT	This study
SheD-r	TGGCAAAGCGAATTCTCATATGCCAATGTCACTGGTGCGG	This study
pJB861-Bam	CCGATGGATCCTGGCAAATCCTGTATATCGTGCGA	This study
pJB861-Eco	TATGAGAATTCGCTTTGCCACGGAACGGTCTGCGT	This study
SheCold-r	AAAGCGGATCCTTAGTTAGGACAGCTACCAACCACA	This study
SheClod-f	TGCCACATATGAAATGGAACAAATCGTGTCTCGTCG	This study

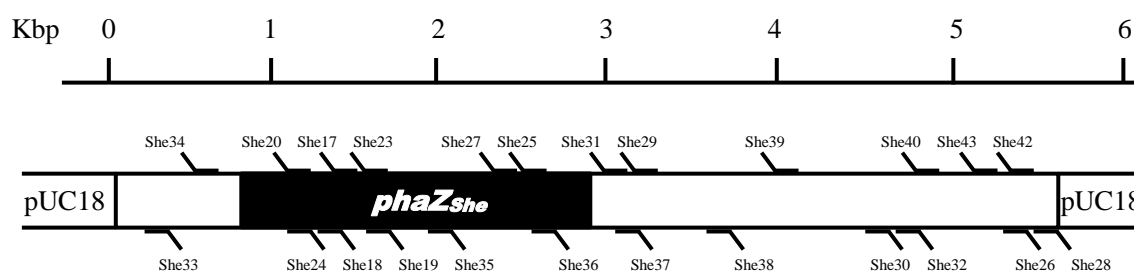


Figure 11. Position of primers used for *phaZ_{She}*.

3-1-4 JKCM-AJ-6,1 α 株の菌体外 P(3HB)分解酵素遺伝子のクローニング

ゲノム DNA 抽出は 2-1-5 参照。サザンハイブリダイゼーションは、Southern の方法[172] に準拠して行われた。サザンハイブリダイゼーションに用いたバッファーおよび溶液の組成を Table 19 に示す。

Table 19. The composition of buffer and solution.

<u>10× Maleic acid buffer(pH7.5)</u>		<u>Washing buffer</u>	
Maleic acid	116 g/L	10× Maleic acid buffer	100 mL/L
NaCl	88 g/L	Tween 20	3 mL/L
<u>20× SSC buffer(pH7.0)</u>		<u>Hybridization buffer</u>	
Sodium citrate	88 g/L	20× SSC buffer	250 mL/L
NaCl	176 g/L	1% N-lauryl sarcosine	100 mL/L
<u>Blocking solution</u>		10% SDS	2 mL/L
10× Maleic acid buffer	50 mL/L	skim milk	40 g/L
skim milk	20 g/L		

JKCM-AJ-6,1 α 株近縁種の P(3HB)分解酵素遺伝子(accession nos.: ABI41661, ABI40356, EGM70854, EGM76427)から設計されたオリゴ DNA をプライマーとして JKCM-AJ-6,1 α 株のゲノム DNA をテンプレートとして、PCR により目的配列を増幅した(Table 20)。その後、電気泳動を行い、400 bp の目的遺伝子部分を切り出し、スピнкаラムを用いて精製した。また、エタノール沈殿を行い、13 μ L の滅菌超純水で溶かした後、その中の 3 μ L を電気泳動でチェックした。その後 10 μ L (1 μ g)のサンプルに 6 μ L の滅菌超純水を加えて 10 分間 98°C で加熱して変性した後、氷水中で急冷して 4 μ L DIG High Prime (Enzo 社製)を加えてよく混合し、37°C で一晩静置保温した。その後、2 μ L 0.2M EDTA 溶液(pH8.0)を加え、10 分間 65°C で加熱して反応を終止した後-20°C で保存した。使用する前に 10 分間 98°C で加熱した後、氷水中で急冷した。DIG ラベリングの確認を、以下の手順で行った。サンプルを 10-10⁵ 倍希釈してメンブレンに 1 μ L ずつブロットしたメンブレンをろ紙で挟み、80°C で 60 分間、オーブンでのベイキングにより DNA を固定させ、抗体反応・発色反応により、シグナル強度を確認し、ラベリング効率を判断した。

Table 20. PCR experiment.

PCR condition		Thermal cycles	
Template gDNA (50 ng/ μ L)	2 μ L	94°C	10 min(pre heat)
Primer she 03F	2 μ L	↓	
Primer she 08R	2 μ L	94°C	30 sec.
10× ThermoPol Reaction Buffer	5 μ L	↓	
dNTP	4 μ L	66°C	30 sec.
Deep Vent	0.2 μ L	↓	
ddH ₂ O	34.8 μ L	72°C	40 sec.
Total	50 μ L	↓	
		4°C	∞

25 cycles {

さらに、10 µg のゲノム DNA を制限酵素 *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, *Sph*I および *Pst*I で一晩保温した後、失活処理した。その後、10 分間 55°C で保温し、室温で 20 分間徐冷の熱処理を三回繰り返した。サンプルは、60V/10cm gel で 2 時間 30 分間、アガロース電気泳動された。泳動が終了したゲルを、0.25N HCl で 15 分間処理(depurination)した後、超純水で洗浄した。その後、0.5N NaOH に 30 分間処理(DNA 変性)した。ゲルからメンブレンへの DNA 転写は、Model 785 Vacuum Blotter (BioRad 社製)を用いて行われた。メンブレンフィルターとして、ニュートラボンドプラスチャージ(アマシャム社製)を用いた。転写手順は、マニュアルに従い標準法で行われた。DNA を固定化したナイロンメンブレンフィルターを hybridization buffer 中で、60 分間 37°C プレハイブリダイゼーション処理された。5 µL のプローブを加えた hybridization buffer 中で、メンブレンフィルターを穏やかに揺らしながら一晩 37°C で保持した。ハイブリダイゼーション後のフィルターを、0.1% SDS を含む 2× SSC buffer で室温中 15 分間 2 回洗浄した。その後、0.1% SDS を含む 0.1× SSC buffer で 65°C, 15 分間, 2 回, 洗浄した。その後、フィルターを Blocking Solution で 30 分間振とうした後、さらに 5 µL の Anti-Digoxigenin-AP Conjugate (Enzo 社製)を添加した Blocking Solution で 30 分間振とうした。その後、フィルターを、Washing buffer で 15 分間 3 回洗浄した後、BCIP/NBT 溶液中(SIGMA 社製)で発色させた。発色反応を、TE buffer 中で反応停止させた。その後、フィルターを超純水で洗浄し、風乾した後、フィルターを保存した。

ゲノム DNA と *Eco*RI を制限酵素処理した後、Annealing と電気泳動を行った。その後、サザンハイブリダイゼーションの結果により、ゲルから 6500 bp と 4000 bp 間の DNA 断片を切り出し、目的の DNA 断片を回収した。その後、DNA を同じ制限酵素で処理されたプラスミド DNA, pUC18 を DNA T4 ligase を混合し 16°C で一晩保温し、連結した(Table 21)。新たに構築した組換えプラスミドを pUC18-6000 と命名した。10 µL (500 ng)の組換えプラスミドを用いて 100 µL のコンピテントセル(*E. coli* DH5α)に導入した。組換え大腸菌を X-Gal (10 µg/mL), IPTG (0.1mM), およびアンピシリン (50 µg/mL)を含む LB 固体培地上に塗布した。白色コロニーを滅菌爪楊枝で突き、IPTG (0.1mM), およびアンピシリン (50 µg/mL)および 0.2% P(3HB)を含む M9 固体培地上に画線した。30°C でクリアゾーンを形成するまで保温した。クリアゾーンを形成した株を選択した。プラスミドはアルカリ法[148]を用いて抽出した。得られたプラスミドをテンプレートにして、ダイターミネーター法によりシーケンシングサンプルを作製した。シーケンシング解析は、オペロンバイオテクノロジー株式会社に外注した。使用プライマーを Table 18 および Figure 11 に示した。塩基配列および相同性解析は、プログラム GENETYX あるいはプログラム tblastx (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)を用いて行われた。

Table 21. Ligation mixture (total 10 µL).

10× T4 Ligation Buffer	1.0 µL
T4 DNA Ligase	1.0 µL
pUC18 (500 ng/µL)	1.0 µL
DNA fragmentation	3.0 µL
ddH ₂ O	4.0 µL

3-1-5 P(3HB)分解酵素の遺伝子破壊

遺伝子破壊は, Smith らの方法[173]に準拠して行われた。P(3HB)分解酵素遺伝子上流を(a), 下流を(b), pJB861 由来カナマイシン耐性遺伝子を(c)とし, (各フラグメントのマップを Figure 12 に示す)下記(Figure 12)のプライマーの組み合わせによりこれらの遺伝子断片を得た。遺伝子破壊用プラスミドの作製は3つのステップにより行われた(Figure 13)。ステップ 1 では, 1st PCR (Table 22)によって(a), (b)および(c)フラグメントを増幅し, これらを Hetero duplex 法によりつなげた(a)+(c)フラグメントを形成させた(1st Hetero Duplex, Table 23)。ステップ 2 では, PCR によって(a)+(c)フラグメントを増幅した(2nd PCR, Table 24)。その PCR 産物を電気泳動し, 目的のバンドをゲルから切り出し, エタノール沈殿後, ステップ 1 同様に Hetero duplex 法をもちいて(a)+(c)+(b)フラグメントを形成させた(2nd Hetero Duplex, Table 23)。ステップ 3 では 2nd Hetero Duplex 産物を滅菌超純水で 50 倍に希釈した。この希釈液をテンプレートとして PCR を行い(3rd PCR, Table 24), 得られた PCR 産物を pMD20 vector に連結した。ライゲーションは PCR 産物 3 μ L, pMD20 vector 1 μ L, buffer 1 μ L, T4 DNA ligase 1 μ L, ddH₂O 4 μ L の 10 μ L の系で行われた。塩化カルシウム法を用いて, 組み換えプラスミドを *E.coli* DH5 α に形質転換した。これを X-Gal (10 μ g/mL), IPTG (0.1mM), およびアンピシリン (50 μ g/mL)を含む LB 固体培地上に組換え大腸菌株を塗布し, 37 $^{\circ}$ C で培養した。その後, 出現した白色コロニーを滅菌爪楊枝で突き, カナマイシン(50 μ g/mL)を含む LB 固体培地上に画線し, 37 $^{\circ}$ C で培養した。これによりカナマイシン耐性株を選択した。

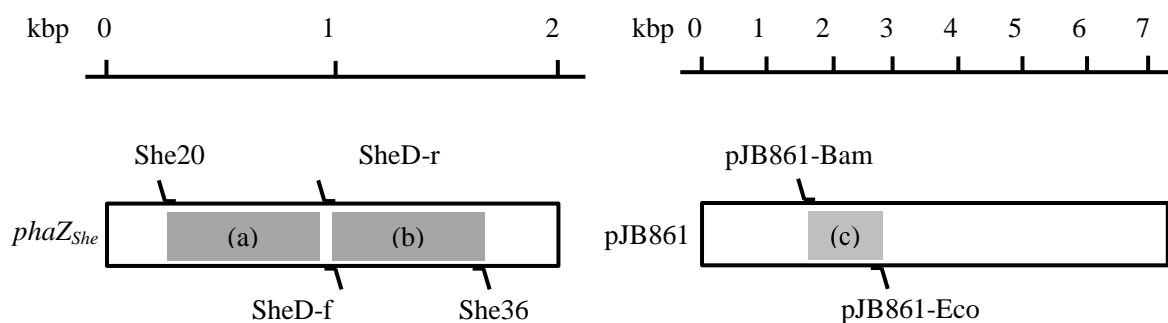


Figure 12. Position of primers used for PCR.

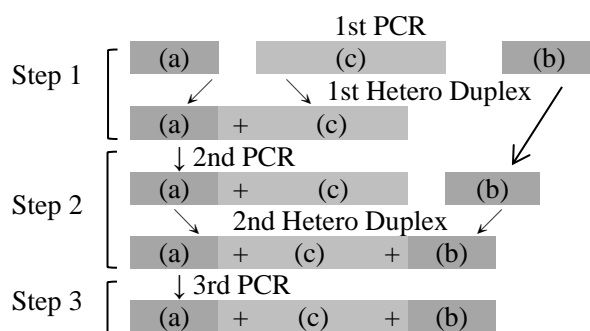


Figure 13. Hetero Duplex

Table 22. 1st PCR condition.

	1st PCR condition			Thermal cycles	
	(a)	(b)	(c)		
Template (40 ng/ μ L)	1 μ L	1 μ L	1 μ L	98 $^{\circ}$ C	10 min (pre heat)
Primer She20 (10pmol)	1 μ L	-	-	25 cycles	94 $^{\circ}$ C 30 sec.
Primer SheD-f (10pmol)	1 μ L	-	-		58 $^{\circ}$ C 30 sec.
Primer SheD-r (10pmol)	-	1 μ L	-		72 $^{\circ}$ C 1 min 30 sec.
Primer She36 (10pmol)	-	1 μ L	-		4 $^{\circ}$ C ∞
Primer pJB861-Bam (10pmol)	-	-	1 μ L		
Primer pJB861-Eco (10pmol)	-	-	1 μ L		
2 \times PrimerSTAR Buffer	12.5 μ L	12.5 μ L	12.5 μ L		
dNTP	2 μ L	2 μ L	2 μ L		
PrimerSTAR DNA polymerase	0.1 μ L	0.1 μ L	0.1 μ L		
ddH ₂ O	7.4 μ L	7.4 μ L	7.4 μ L		
Total	25 μ L	25 μ L	25 μ L		

Table 23. 1st and 2nd Hetero Duplex condition.

	Hetero Duplex condition		Thermal cycles	
	1st	2nd		
1st PCR product (a) (400 ng/ μ L)	1 μ L	-	98 $^{\circ}$ C	10 min (pre heat)
1st PCR product (c) (400 ng/ μ L)	1 μ L	-	Decrease 1 $^{\circ}$ C	1 min.
1st PCR product (b) (400 ng/ μ L)	-	1 μ L	60 cycles	
2nd PCR product (400 ng/ μ L)	-	1 μ L		
2 \times PrimerSTAR Buffer	12.5 μ L	12.5 μ L	37 $^{\circ}$ C	12 min.
dNTP	2 μ L	2 μ L	72 $^{\circ}$ C	*Add PrimerSTAR DNA polymerase
*PrimerSTAR DNA polymerase	0.1 μ L	0.1 μ L		10 min.
ddH ₂ O	8.4 μ L	8.4 μ L	4 $^{\circ}$ C	∞
Total	25 μ L	25 μ L		

Table 24. 2nd and 3rd PCR condition.

	PCR condition		Thermal cycles	
	2nd	3rd		
1st Hetero Duplex product	1 μ L	-	98 $^{\circ}$ C	10 min (pre heat)
2nd Hetero Duplex product (50 \times dilution)	-	1 μ L		
Primer She20 (10 pmol)	1 μ L	1 μ L	25 cycles	94 $^{\circ}$ C 30 sec.
Primer pJB861-Eco (10 pmol)	1 μ L	-		65 $^{\circ}$ C 30 sec.
Primer She36 (10 pmol)	-	1 μ L		72 $^{\circ}$ C 3 min.
2 \times PrimerSTAR Buffer	12.5 μ L	-		4 $^{\circ}$ C ∞
10 \times Ex Taq Buffer	-	2.5 μ L		
PrimerSTAR DNA polymerase	0.1 μ L	-		
Ex Taq	-	0.1 μ L		
dNTP	2 μ L	2 μ L		
ddH ₂ O	7.4 μ L	17.4 μ L		
Total	25 μ L	25 μ L		

カナマイシン耐性株からプラスミドを抽出し、得られたプラスミド(pMD20-2049-kan)を用いて野生株 JKCM-AJ-6,1 α 株のゲノム DNA 上の目的遺伝子を破壊した(Figure 20A)。前培養した JKCM-AJ-6,1 α 株を 10 mL の LB 培地に植菌し、50 mL ファルコンチューブを用いて 25°C で 1 日培養した。4°C, 5000 rpm, 10 分間遠心し、菌体を洗浄した。これに 4°C の滅菌超純水 10 mL を加え、ボルテックスミキサーを用いて菌体を再懸濁させた。再び 4°C, 5000 rpm, 10 分間遠心し菌体を洗浄した。これに 4°C の滅菌超純水 2 mL を加え懸濁させた。pMD20-2049-kan 1 μ L (1 g/L)をあらかじめ冷やしておいたマイクロチューブに入れ、40 μ L の JKCM-AJ-6,1 α 株懸濁液を加え、氷上で混合した。この混合液全量をあらかじめ冷やしておいたエレクトロポレーターにセットした。5 ms, 1700V で電圧をかけ、すぐに冷やしておいた LB 培地 1 mL を加えてピペティングした。キュベット内の混合液を回収し、LB 培地に戻して 37°C で 1 時間振とう培養した。その後 5000 rpm, 1 分遠心して菌体を回収し、カナマイシン(25 μ g/mL)を含む LB 固体培地上に塗布した。37°C, 24 時間培養を行った。出現したコロニーを滅菌爪楊枝で突き、カナマイシン(50 μ g/mL)を含む LB 固体培地上に画線し、37°C で 24 時間培養した。その後、得られたカナマイシン耐性株に対して、カナマイシン(50 μ g/mL)を含む P(3HB)乳化培地上でクリアゾーン試験を行った。クリアゾーンを形成しないカナマイシン耐性菌を選択した。

3-1-6 P(3HB)分解酵素(PhaZ_{She})の精製

野生株(JKCM-AJ-6,1 α 株)由来の酵素(wPhaZ_{She})の精製は、Miyazaki らの方法[174]に準拠して行われた。LB 培地 200 mL に、JKCM-AJ-6,1 α 株を植菌し、15°C で 50 時間振とう培養した。この培養液を、5 mL/L の割合で、液体培地(Table 25)に植えかえ、15°C で 50 時間振とう培養した。培養液を遠心分離(6000 rpm, 20 min, 4°C)し、上清を回収した。酵素の精製方法は、以下の手順で行った。上清に、0.5M となるように硫酸アンモニウムを加えた。これを予め 0.5M 硫酸アンモニウムを含む 10mM リン酸緩衝液(pH7.5)で平衡化した Butyl-Toyopearl カラム(疎水性クロマト担体, TOSHO 製)に吸着させた。次に 10mM リン酸緩衝液を 20 mL 流した後、0.5M 硫酸アンモニウムの割合を 100~0%に減少させ、エタノールの割合を 0~40%に変化させて、酵素を溶出させた。P(3HB)分解活性のある画分を集め、所定の緩衝液中で透析した後、AQUA KEEPTM(吸水性ポリマー, 住友化学工業)を用いて濃縮した。濃縮した酵素を 4°C で保存した。

Table 25. The composition of media for enzyme expression (pH7.5).

KH ₂ PO ₄	4.6 g/L
NaHPO ₄ · 12H ₂ O	11.6 g/L
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5 g/L
FeCl ₃ · 6H ₂ O	0.1 g/L
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.05 g/L
NH ₄ Cl	1.0 g/L
P(3HB)	3.0 g/L

大腸菌内で組換え酵素を生産するため、*phaZ_{She}* 含むプラスミドを構築した。使用するプライマーの位置を Figure 14 に示す。pUC18-6000 をテンプレートとして目的遺伝子を PCR により増幅した (Table 26)。増幅した DNA は、制限酵素 *Nde* I および *Bam*H I を用いて切断された。その後、DNA を同じ制限酵素で処理されたプラスミド DNA、pCold IV を DNA T4 ligase で連結した。新たに構築した組換えプラスミドを pCold-2049 と命名した。10 μ L (300 ng) の組換えプラスミドを塩化カルシウム法により *E.coli* DH5 α に導入した。組換え大腸菌をアンピシリン (50 μ g/mL) を含む LB 固体培地上に塗布した。白色コロニーを滅菌爪楊枝で突き、IPTG (0.1mM)、およびアンピシリン (50 μ g/mL) を含む M9 P(3HB) 乳化培地上に画線した。37°C で一晩保温した後、15°C でクリアゾーンを形成するまで保温した。また、クリアゾーン形成株を選択し、プラスミドを抽出した。

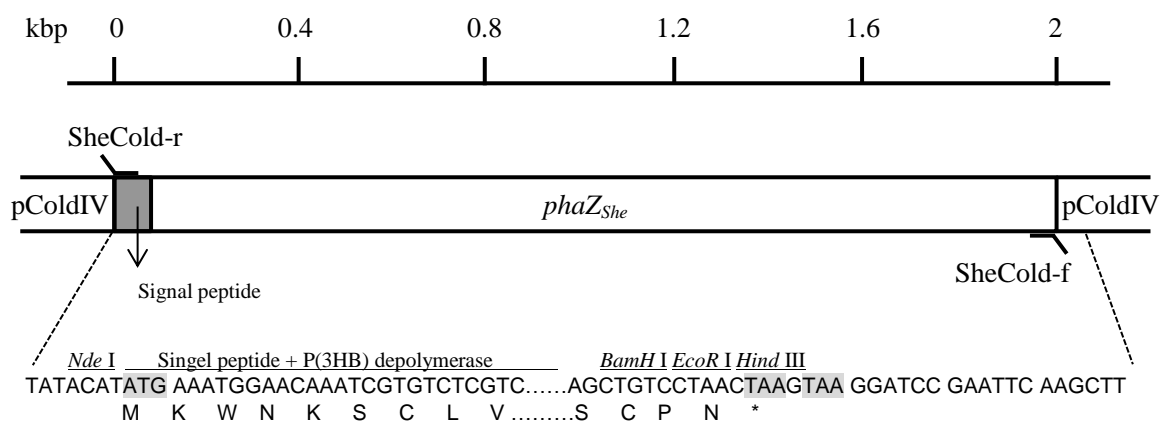


Figure 14. Position of primers used for *phaZ_{She}*.

Table 26. PCR experiment.

PCR condition		Thermal cycles	
pUC18-6000 (50 ng/ μ L)	1 μ L	94°C	10 min (pre heat)
Primer pCold-f	2 μ L	25 cycles {	94°C 30 sec.
Primer pCold-r	2 μ L		62°C 30 sec.
2 \times PrimerSTAR GC Buffer	25 μ L		72°C 2min 30 sec.
dNTP	4 μ L		
PrimerSTAR HS DNA Polymerase	0.5 μ L		
ddH ₂ O	15.5 μ L		
Total	50 μ L	4°C	∞

得られたプラスミド pCold-2049 を用いて大腸菌 DH5 α または BL21 に形質転換した。形質転換した大腸菌株は、アンピシリン(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)を含む M9 培地に植菌し、30 $^{\circ}\text{C}$ で OD₆₀₀ 0.5 まで培養した。その後、濃度 0.5mM となるように IPTG を入れ、15 $^{\circ}\text{C}$ で 48 時間振とう培養した。その後、酵素の精製は野生株と同様の手順を行った。大腸菌 DH5 α および大腸菌 BL21 に発現した P(3HB)分解酵素を、rdPhaZ_{She} および rbPhaZ_{She} と命名した。

3-1-7 P(3HB)分解活性測定(濁度法)

2-1-14 参照

3-1-8 タンパク質の分析

Laemmli 法[175]により、Sodium dodecyl sulfate-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)を行った。電気泳動後のタンパク質を、Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB R-250)法を用いて染色した。分子量の基準には、プレステインドマーカールOW(アプロサイエンス社製)を用いた。タンパク質濃度を、Bradford 法[176](Bio-Rad Protein Assay)により、牛血清アルブミン(BSA)を標準物質として決定した。また、以下の手順で、酵素を活性染色法により解析した(ザイモグラム法)。酵素に 6 \times SDS 試料変性液(Table 27)を加え、37 $^{\circ}\text{C}$ で 10 分変性させた。この試料を P(3HB)微粒子を含む SDS-ポリアクリルアミドゲル中で電気泳動した。電気泳動は、4 $^{\circ}\text{C}$ で行われた。泳動後、ゲルを、0.3 M の NaCl を添加した 0.01 M リン酸ナトリウム緩衝液(pH7.5)に浸し、37 $^{\circ}\text{C}$ で 5 時間保温した。酵素の存在する箇所はクリアゾーンとして検出された。

Table 27. The composition of 6 \times SDS sample buffer (pH6.8).

Tris-HCl	0.375 M
Glycerol	60%
SDS	12%
Bromophenol Blue	0.06%
Dithiothreitol (DTT)	0.6 M

3-1-9 Na⁺濃度, pH および温度の活性への影響

0.0-1.0M Na⁺濃度調整した P(3HB)基質溶液に酵素(wPhaZ_{She} または rbPhaZ_{She})を加えた。Na⁺濃度の酵素活性への影響を濁度法によって評価した。pH2.0-10.5 の 0.1M 各種バッファー(グリシン, クエン酸ナトリウム, リン酸ナトリウム, トリス-塩酸, ホウ酸ナトリウム)に, 等量の酵素溶液を添加し, 4°C で 5 時間保持した。その後, 混合溶液の残存活性を各々の酵素の至適 Na⁺濃度にて, 濁度法により測定し酵素の pH 安定性を評価した。pH 2.0-10.5 の 1M 各種バッファー(同上)100 μL に, 精製した P(3HB)微粒子を基質として懸濁液を加え, 超純水で 1 mL を調整した。その後, 酵素を添加し, 各々の酵素の至適 Na⁺濃度にて濁度法により活性を測定し, 酵素の至適 pH を評価した。酵素を, 0.01M リン酸緩衝液中(pH7.5), 4-80°C の一定温度で 30 分間保持した。その後, 酵素溶液の残存活性を各々の酵素の至適 Na⁺濃度にて濁度法により測定し, 酵素の温度安定性を評価した。

3-1-10 各金属イオンの濃度および阻害剤における活性の影響

さまざまな濃度の各種金属イオン(CaCl₂, MgCl₂, MnCl₂, KCl あるいは FeCl₃)または各種阻害剤 [Diisopropyl fluorophates (DFP), Diazoacetyl-DL-norleucine methyl ester (DAN), Phenylmethane sulfonyl fluoride (PMSF), Tosyl-L-phenylalanine Chloromethyl ketone (TPCK), Dithiothreitol (DTT), Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), Tween 20 あるいは sodium dodecyl sulfate (SDS)]を P(3HB)基質溶液に加えた後, wPhaZ_{She} または rbPhaZ_{She} を加えた。その後, 酵素活性を, 各々の酵素の至適 Na⁺濃度にて濁度法により測定した。

3-1-11 基質特異性

10mM リン酸バッファー(pH7.4) 3 mL にポリエステルフィルム(10×10×0.15 mm)と酵素を加え, 15°C で 48 時間保温した。その後, フィルムをメタノールと超純水で洗浄し, 真空乾燥した後, 秤量した。フィルムの重量減少量を, 2-1-16 と同様の方法で算出した。

3-1-12 速度論的解析

精製酵素の分解の速度論的解析を行った。P(3HB)基質とする濁度法により, 基質分解速度を測定した。P(3HB)の酵素加水分解速度(R)は, (3)式を用いて決定された。

$$R=ksK[E]/(1+K[E])^2 \quad (3)$$

ここで, ks は酵素による P(3HB)鎖の加水分解速度定数, K は酵素の見掛けの吸着平衡定数, $[E]$ は酵素濃度を示している。Excel (Microsoft Corp., Bellevue, WA, USA)を用いて, 速度論データを解析した。

3-2 結果と考察

3-2-1 JKCM-AJ-6,1 α 株の菌体外 P(3HB)分解酵素遺伝子のクローニング

Shewamella 属細菌の推定 P(3HB)分解酵素タンパク質に基づいて設計された縮退 DNA プライマー(she03F および she08R)を用いて, JKCM-AJ-6,1 α 株のゲノム DNA をテンプレートとして PCR したところ, 400bp の DNA 断片が得られた。この断片をシーケンシング解析したところ, P(3HB)分解酵素遺伝子の一部をコードしていることが判明した。この断片にジゴキシゲニン(DIG)をラベルしたものをプローブとして, JKCM-AJ-6,1 α 株のゲノム DNA に対して, サザンハイブリダイゼーション解析を行った。その結果, Figure 15 に示すように, 制限酵素 *EcoRI* により消化された約 6000bp のゲノム DNA 断片と DNA プローブがハイブリッド形成した。また, 制限酵素 *HindIII* 消化された約 5500bp のゲノム DNA 断片も DNA プローブとハイブリッド形成した。前者を, アガロースゲルより分取し, *EcoRI* 処理した pUC18 に連結した。*E. coli* DH5 α に, この連結 DNA を導入し, ゲノムのサブライブラリーを構築した。サブライブラリーを含む形質転換体を, P(3HB)を含む M9 培地上に塗布したところ, コロニー周辺にクリアゾーンを形成する株を検出した。この株より, 目的の *phaZ_{She}* 遺伝子を含むプラスミド DNA (pUC18-6000)を回収し, シーケンシング解析を行った。

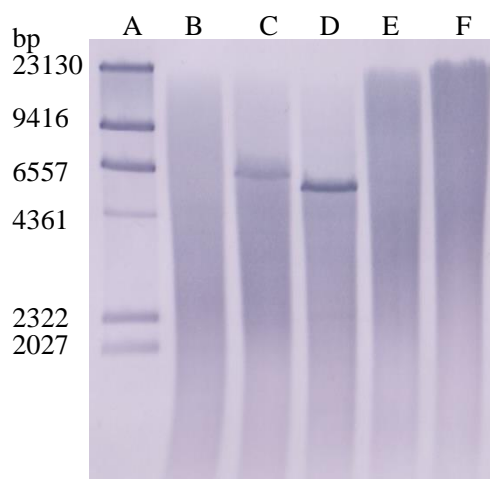


Figure 15. Identification of genomic DNA fragment of JKCM-AJ-6,1 α with a DIG-labeled *phaZ_{She}*. Lane A, λ -*HindIII* digest; Lane B, *BamHI*-digest of gDNA; Lane C, *EcoRI*-digest of gDNA Lane D, *HindIII*-digest of gDNA Lane E, *SphI*-digest of gDNA Lane F, *PstI*-digest of gDNA.

3-2-2 *phaZ_{She}* の塩基配列およびアミノ酸配列の決定

phaZ_{She} 遺伝子を含む pUC18-6000 を配列解析した。遺伝子配列解析より, P(3HB)分解酵素タンパク質(*PhaZ_{She}*)をコードする遺伝子, *phaZ_{She}* [オープンリーディングフレーム(ORF), 2049bp]を決定した。推定の ORF は 683 アミノ酸残基からなり, 推定されるポリペプチドの分子量は 70,382Da であった。また, ORF の最初の 26 アミノ酸残基中, 2 位に正に荷電したアミノ酸(リシン残基)が存在し, 疎水的な残基が続いていた。この配列の 26 位と 24 位にア

ラニン残基という小型の中性側鎖を持つ残基が存在しており、さらに、ORFの最初の26アミノ酸を分泌前駆体のシグナルペプチドであると推定した。

本酵素遺伝子に基づき推定されるアミノ酸配列を、既知のP(3HB)分解酵素およびその他のタンパク質に対してホモロジー検索したところ、本酵素タンパク質は、P(3HB)分解酵素に共通して見られるリパーゼボックス(白色 GLSSG)を含む触媒ドメイン(黒, CD), 推定の基質結合ドメイン(灰色, 2ヶ所, SBD IおよびSBD II), リンカードメイン(白色, LD)の3種類のドメインから構成されていることがわかった。本酵素のSBDは2回繰り返し存在していた(Figure 16)。

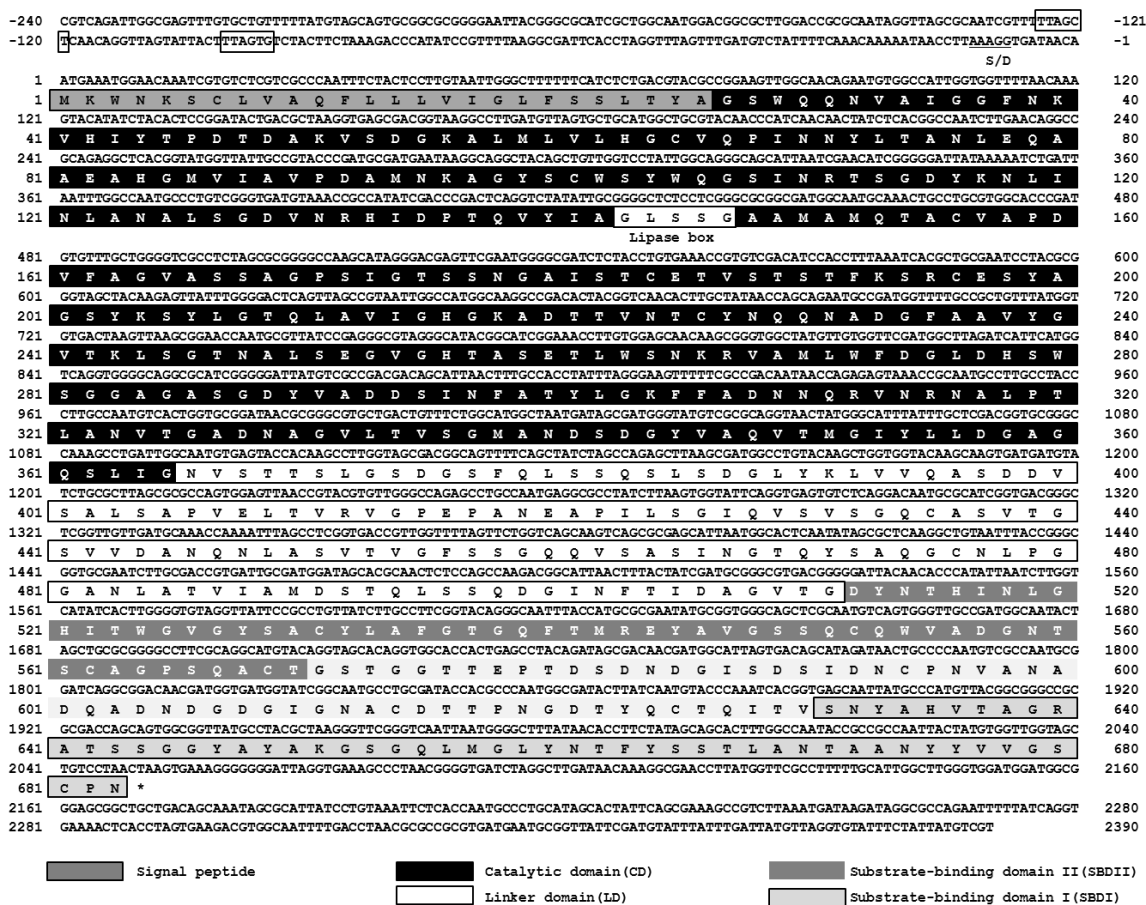


Figure 16. Nucleotide sequence of the *phaZ_{She}* gene and deduced amino acid sequence of the gene product. A putative ribosome-binding (Shine-Dalgarno [S/D]) site and the -35 and -10 regions of a possible promoter sequence are boxed.

本酵素遺伝子の上流域には、ORFX1が位置していた(Figure 17)。ORFX1は、*Shewanella* sp. ANA-3(YP_871095)のD-3-hydroxybutyrate dehydrogenase (HBDH)の一部である3-ヒドロキシブタン酸デヒドロゲナーゼのアミノ酸配列と有意な相同性を示した。3-ヒドロキシブタン酸デヒドロゲナーゼは、(R)-3-ヒドロキシブタン酸を触媒する酸化還元酵素である[177]。

また、本酵素遺伝子の下流域には、ORFX2およびORFX3が位置していた(Figure 17)。ORFX2は、*Shewanella* sp. MR-4 (YP_735412)のアグマチンデイミナーゼのアミノ酸配列と相同性を

示した。アグマチンデイミナーゼは、アグマチンを触媒する加水分解酵素である[178]。この酵素は、尿素回路およびシアノアミノ酸代謝に関係している。ORFX3は、*Shewanella* sp. MR-7 (YP_736720)のアミダーゼのアミノ酸配列の一部と相同性を示した。アミダーゼは、モノカルボン酸アミドを触媒する加水分解酵素である。この酵素は、尿素回路、フェニルアラニン代謝、トリプトファン代謝、シアノアミノ酸代謝などの代謝経路ではたらく[179]。

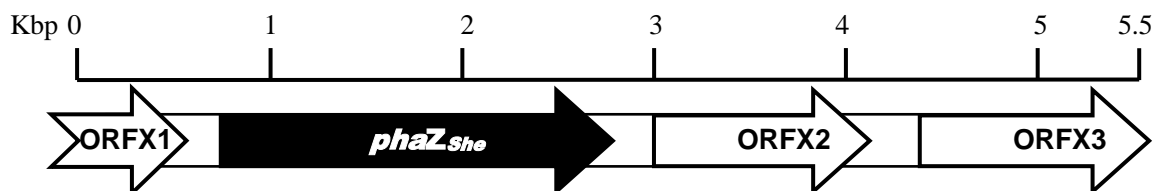


Figure 17. Genetic structure. The arrows show the open reading frames.

本酵素タンパク質(PhaZ_{She})を、相同性の高いP(3HB)分解酵素のCDと比較した。Figure 18に示すように、本酵素は、触媒3残基としてセリン(Ser145)、ヒスチジン(Asp220)、およびアスパラギン酸(His278)残基と、反応中間体において負電荷を帯びた酸素原子を安定化するためのオキシアニオンホール(His63)が保存されていることが推定された。このことから、PhaZ_{She}がカルボキシルエステル加水分解酵素(EC 3.1.1.X)の一種であることが示唆された。PhaZ_{She}の推定のSBD 631-683位(C末より)は、PHBタイプと、512-570位(C末より)は、PHVタイプに対して相同性を示した(Figure 19)。また、PhaZ_{She}のCDとSBD間においては、不溶性高分子基質加水分解酵素のLDのモジュールとして共通に見られるフィブロネクチンタイプIII(fnIII)様配列が存在した(Figure 19)。

PhaZ_{She}のアミノ酸配列全長は、PhaZ_{AfaAE122}のそれと高い相同性(50%)を示した[104]。相対的に高い分子量をもち、2つのSBDを有するという特徴は、海洋環境から単離された細菌が生産するP(3HB)分解酵素PhaZ_{Msp}[106]、PhaZ_{Pst}[105]およびPhaZ_{BspNRRL}[107]と共通していた。また、リパーゼボックスの位置からPhaZ_{She}は、PhaZ_{AfaAE122}、PhaZ_{Msp}、PhaZ_{Pst}、PhaZ_{BspNRRL}およびPhaZ_{Rpi}と同様にType Aに属すると推定された[99]。Type AおよびType BのP(3HB)分解酵素は、互いに循環置換(circular permutation)であり、PhaZ_{She}は、 α/β hydrolase familyの一員と考えられる[94]。fnIIIのLDは、いくつかの細菌の水不溶性ポリマーの加水分解酵素のモジュールとして見出されている。細菌は、はじめ動物源からfnIII遺伝子を取得し、その後この遺伝子は細菌間で水平伝達により広がったと推定されている[180]。PhaZ_{She}の推定のLDは、このfnIIIタイプであり、PhaZ_{AfaAE122}、PhaZ_{Dac}およびPhaZ_{Rpi}においても見られる。また、PhaZ_{She}のSBD Iには、P(3HB)分解酵素のPHBタイプSBD[101, 181]に見られる共通モチーフsNxxHxxAgRAが存在した。一方で、SBD IIには、P(3HB)分解酵素のPHVタイプSBD[101, 181]に見られる共通モチーフxxxxHIxaGrが存在した。

3-2-3 P(3HB)分解酵素の遺伝子破壊

相同的組換により野生株 JKCM-AJ-6,1 α のゲノム DNA 上の *phaZ_{She}* 遺伝子を破壊した。破壊株のスクリーニングは、カナマイシン耐性の有無により判定された。その結果、172 株のカナマイシン耐性株を取得した。そのうち 1 株が、P(3HB)乳化培地上でクリアゾーン形成能を持たなかったため、これを遺伝子破壊株として選択した(JKCM-AJ-6,1 α -D)。プライマー SheCold-f および SheCold-r を用いて JKCM-AJ-6,1 α -D 株および野生株の *phaZ_{She}* 遺伝子を PCR 法により解析した(Figure 20B)。その結果、JKCM-AJ-6,1 α -D 株のゲノム DNA をテンプレートとした際に約 3300bp の PCR 産物を得た。一方、野生株からは、2000bp の PCR 産物を得た。このことから、JKCM-AJ-6,1 α -D 株のゲノム DNA 上の *phaZ_{She}* 遺伝子は、カナマイシン耐性遺伝子挿入により破壊されたことがわかった。また、*phaZ_{She}* の破壊によりクリアゾーン形成能を失ったため、JKCM-AJ-6,1 α 株は、そのゲノム DNA 上に唯一の P(3HB)分解酵素遺伝子を有することが示された。

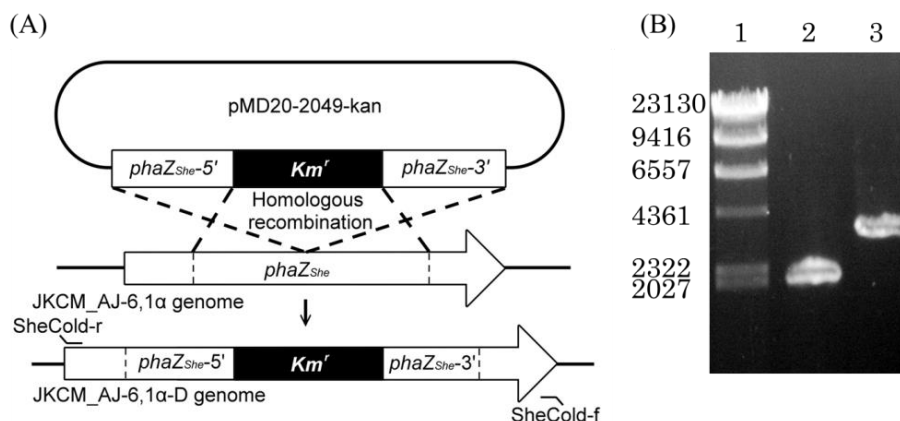


Figure 20. Preparation of the *phaZ_{She}* gene disruptant. (A) The *phaZ_{She}* gene disruptant was prepared by homologous recombination. (B) Electropherogram of DNA fragments amplified with a set of primers: SheCold-f and SheCold-r by PCR method for stain JKCM-AJ-6,1 α : wild type and JKCM-AJ-6,1 α -D: a disruptant. (Lane 1: DNA molecular mass marker (λ /HindIII marker), lane 2: DNA band with JKCM-AJ-6,1 α , lane 3: DNA band with JKCM-AJ-6,1 α -D).

3-2-4 野生株および大腸菌 BL21 株由来の PhaZ_{She} の精製および特徴付け

野生株由来の P(3HB)分解酵素(wPhaZ_{She})および大腸菌 BL21 由来の P(3HB)分解酵素(rbPhaZ_{She})を精製した。酵素の精製表を Table 28 に示す。

Table 28. Purification of P(3HB) depolymerase from wild-type and recombinant PhaZ_{She}.

Stain	Step	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Recovery (%)
wPhaZ _{She} ^a	Supernatant	14.40	6.45	2.23	100
	Butyl Toyopearl	3.38	0.22	15.34	24
rbPhaZ _{She} ^b	Supernatant	10.12	4.15	2.44	100
	Butyl Toyopearl	5.10	0.087	58.35	50

^a wPhaZ_{She} (wild type enzyme) was purified from strain JKCM-AJ-6,1 α .

^b rbPhaZ_{She} (recombinant enzyme) was purified from the *E. coli* BL21(DE3) carrying pColdIV2049.

最終的に wPhaZ_{She} の回収率は 24%、精製度は 6.9 倍であった。また、rbPhaZ_{She} の回収率は 50%、精製度は 23.9 倍であった。wPhaZ_{She} および rbPhaZ_{She} を、SDS-PAGE 電気泳動したところ 47 kDa および 70 kDa 付近に単一バンドを確認した(Figure 21A)。この結果は、ザイムグラムの結果とほぼ一致していた。一方、ザイムグラム解析から、大腸菌 DH5α 株由来の酵素(rdPhaZ_{She})は、それぞれ wPhaZ_{She} の 47 kDa および rbPhaZ_{She} の 70 kDa と一致する分子量に各々二つのクリアゾーンを示した(Figure 21B)。

PhaZ_{She} の遺伝子情報に基づく分子量 67,453 Da は、既知の海洋性 P(3HB)分解酵素 PhaZ_{Msp} の 58,244 Da および PhaZ_{AfaAE122} の 62,526 Da より大きいことがわかった。また、遺伝子情報に基づく分子量と、SDS-PAGE により得られた rbPhaZ_{She} の分子量約 70 kDa と類似していた。しかし、SDS-PAGE により得られた野生型酵素(wPhaZ_{She})の分子量約 47 kDa とは、大きな差異があった。一方、ザイムグラムにおける rdPhaZ_{She} の二つのクリアゾーンが出現したことを考慮すると、野生株培養上清において、wPhaZ_{She} の LD の末端で、上清に存在するプロテアーゼによりプロセッシングを受けている可能性が示唆された。培養上清での P(3HB)分解酵素の SBD の切断例は、培養上清中にエンド型プロテアーゼを発現する *Paucimonas lemoignei* の PhaZ5 においても報告されている[91]。また、破壊株の結果より、野生株は唯一の P(3HB)分解酵素遺伝子のみをゲノム DNA 上に有していたため、wPhaZ_{She} および rbPhaZ_{She} は、同一の遺伝子(*phaZ_{She}* から)由来であると結論付けた。

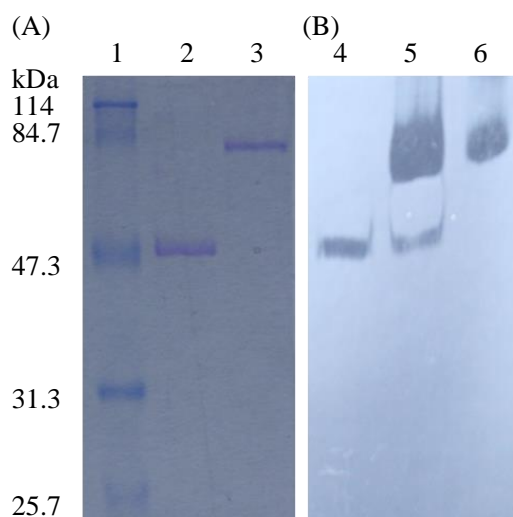


Figure 21. SDS-PAGE image of PhaZ_{She} (A), and P(3HB)-hydrolytic zymogram by PhaZ_{She} (B) (Lane 1: Molecular mass marker, lane 2 and 4: wPhaZ_{She}, lane 3 and 6: rbPhaZ_{She}, lane 5: rdPhaZ_{She}). Deduced domain structures of wPhaZ_{She} and rbPhaZ_{She}

0-0.8M の NaCl 濃度における酵素活性への影響を調べた。wPhaZ_{She} および rbPhaZ_{She} の至適 NaCl 濃度は、それぞれ 0.5M および 0M であった。wPhaZ_{She} の活性は、NaCl 濃度 0.4M 以下で、酵素活性は低下し、0M の場合、活性が消失した。対照的に、rbPhaZ_{She} の活性は、NaCl 濃度の上昇と共に低下した(Figure 22)。活性汚泥から単離された *Ralstonia pikettii* T1 由来 P(3HB)分解酵素では、活性発現において、Na⁺要求性がなく、活性は、イオン強度と共に低下することが報告されている[169]。また、海水と同等の高 Na⁺濃度環境で、海洋性酵素では、その活性が促進されることが報告されている[182-184]。また、SBD を欠損した wPhaZ_{She} は、NaCl が存在しないと P(3HB)を分解できなかつた。この結果は、海洋性細菌 *Marinobacter* sp. NK-1 株が生産する PhaZ_{Msp} が、その SBD 欠損により固体 P(3HB)分解能力を消失するという結果と一致している[106]。これらことは、PhaZ_{She} は、耐塩性酵素であり、wPhaZ_{She} を P(3HB)の表面に結合するために、相対的に高い NaCl 濃度で非特異的疎水性結合能力が必要であるということを示している(Figure 23)。

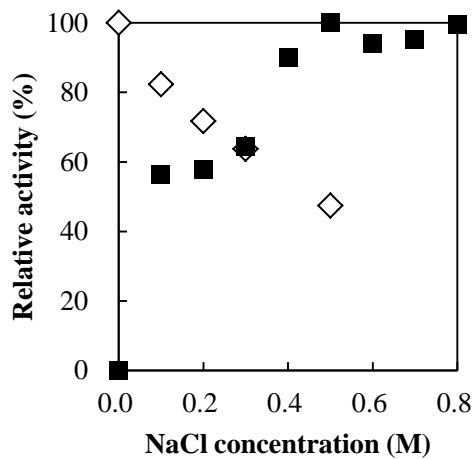


Figure 22. Effect of NaCl concentration on enzymatic activity. The enzymatic activity was measured in the reaction mixture (50mM Tris-HCl (pH7.5), 400 μ g of P(3HB) granule, 1mM CaCl₂) at 37°C containing various concentrations of NaCl. (■: wPhaZ_{She}, ◇: rbPhaZ_{She}).

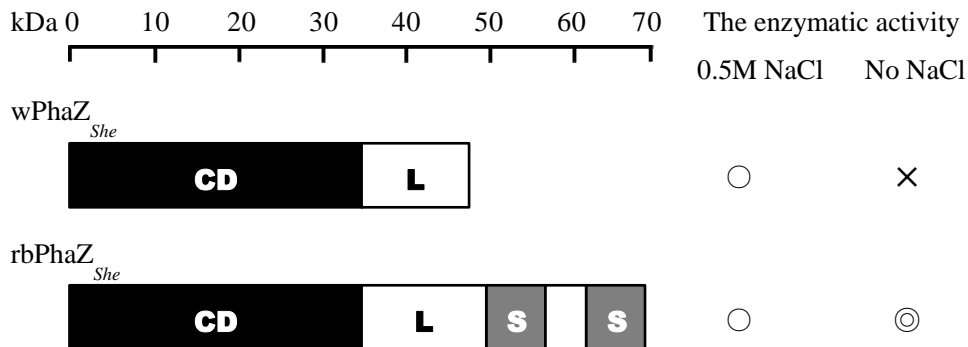


Figure 23. Deduced domain structures of wPhaZ_{She} and rbPhaZ_{She} (CD: catalytic domain, L: linker domain, S: substrate-binding domain, ◎: The activity was excellent, ○: The activity was normal, ×: The activity can't be measured).

さらに、wPhaZ_{She} および rbPhaZ_{She} の温度安定性、pH 安定性、至適 pH を調べた。Figure 24 に示すように、rbPhaZ_{She} と wPhaZ_{She} の温度安定性、pH 安定性および至適 pH は、ほぼ一致していた。これらの酵素は、15°C 以下 30 分保温後 90% 以上の残存活性を示したが、それ以上の温度では著しく活性が低下した。一方、pH7-10.5 の間は 4°C で 5 時間保温後、残存活性は、ほぼ 80% 以上であった。また、至適 pH は 7.5 であった。このような wPhaZ_{She} および rbPhaZ_{She} 間での結果の類似性は、これらの特性が CD 由来であることを示唆している。一方で、陸上から単離された P(3HB)分解細菌由来の P(3HB)分解酵素の多くは、中温領域で安定である[78, 80, 169]が、本酵素は、他の海洋環境からの酵素[185-187]と同じく熱不安定性を示すことがわかった。

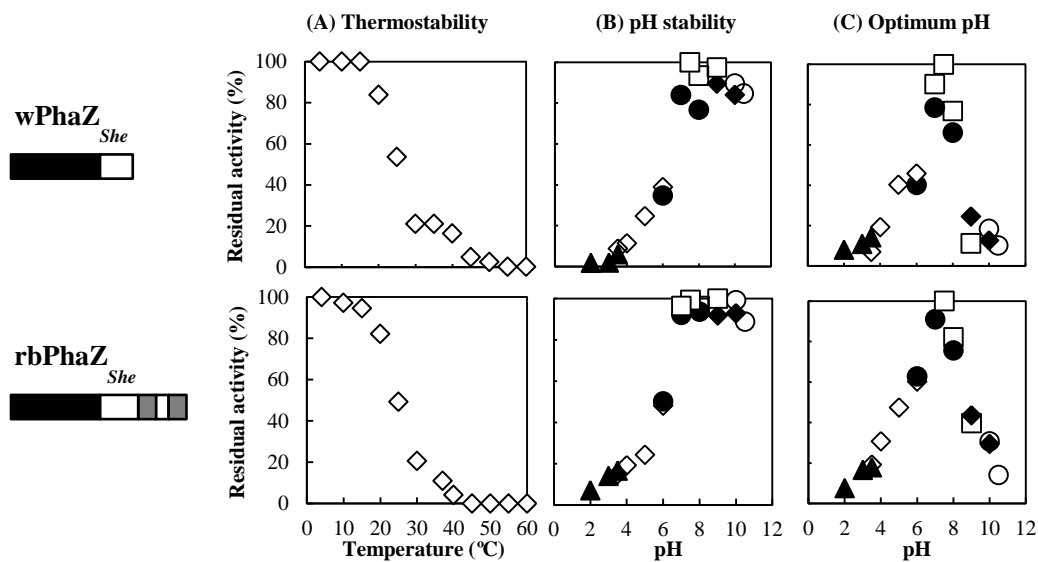


Figure 24. Effect of thermostability (A), pH stability (B) and pH (C) on the enzymatic activity. (A) The wPhaZ_{She} and rbPhaZ_{She} was incubated in 0.01M sodium phosphate buffer (pH7.5) for 30 min at different temperatures, and the residual activity was measured. (B) The enzyme was incubated at 4°C for 5h at different pH value, and the residual activity was measured at pH7.5. (C) The residual activity was measured in various buffers at different pH values. All the measurements of wPhaZ_{She} were supplemented with 0.5M NaCl. (▲: Glycine-HCl, ◇: Na-citrate, ●: Na-phosphate, □: Tris-HCl, ◆: Na-borate, ○: Na-glycine)

各金属イオンおよび阻害剤の wPhaZ_{She} および rbPhaZ_{She} の P(3HB)分解活性への影響を調べた(Table 29)。wPhaZ_{She} および rbPhaZ_{She} は、CaCl₂、MgCl₂ または MnCl₂ の添加により、賦活化することがわかった。また、低濃度 Ca²⁺ が酵素活性を賦活化したことから、本酵素にアロステリック効果をもたらすエフェクターとして作用する可能性が示唆された。また、FeCl₃ の添加により、活性が抑制されることがわかった。一方、wPhaZ_{She} および rbPhaZ_{She} は、DFP、PMSF、DTT、Tween 20、SDS または EDTA の添加により、完全に失活した。また、10mM DAN の添加により、残存活性は、8% および 52% までに低下した。これらの結果は、PhaZ_{She} は、その活性発現にセリン残基およびアスパラギン酸残基が関与し、他の P(3HB)分解酵素と同様に、典型的なセリン加水分解酵素であることがわかった[104, 106]。加えて、DTT による失活は、本酵素分子内における、ジスルフィド結合の存在を示唆している。EDTA による失活により、PhaZ_{She} の活性発現に金属イオンが関与していることが示唆された。これは、CaCl₂、MgCl₂ または MnCl₂ の添加により、PhaZ_{She} の活性を賦活化するという結果と一致していた。さらに、非イオン性界面活性剤である Tween 20 および陰イオン性界面活性剤である SDS の添加により、酵素の分解活性が完全に失われたことから、PhaZ_{She} が、P(3HB)分解時に P(3HB)表面への吸着が必須であることを示唆している。

Table 29. Effects of several ions and reagents on the P(3HB) depolymerase activity.

Reagent	Final concentration (mM)	Relative activity (%)	
		wPhaZ _{She} **	rbPhaZ _{She}
None*	—	100	100
CaCl ₂	0	52	20
	1	100	100
	2	121	110
MgCl ₂	1	104	106
	5	107	120
MnCl ₂	1	111	125
	5	p.	p.
KCl	1	98	100
	5	105	96
FeCl ₂	1	6	12
	5	p.	p.
DFP	2×10 ⁻³	0	24
	5×10 ⁻³	-	17
	1×10 ⁻²	-	0
DAN	1	77	100
	5	28	100
	10	8	52
PMSF	0.1	4	30
	1	0	0
DTT	1	12	40
	5	0	0
EDTA	1	3	0
	5	0	0
Tween 20 (% , v/v)	0.1	0	0
SDS (% , v/v)	0.1	0	0

* Reaction mixture contains 50mM Tris-HCl (pH7.5), 400 μg of P(3HB) granule and 1mM CaCl₂.

** Reaction mixture was supplemented with 0.5M NaCl.

p. means precipitation.

wPhaZ_{She} および rbPhaZ_{She} の基質特異性を調べた(Figure 25)。両酵素とも P(3HB), P(3HB-co-3HV)および PESu フィルムを分解した。一方, PBSu, PCL および PLA フィルムを分解しなかった。さらに, 両酵素のフィルムの分解速度は, P(3HB-co-3HV) > P(3HB) >> PESu の順で低下した。P(3HB-co-3HV) の分解速度が P(3HB)のそれより大きかった理由として, 3HV モノマーユニットが 3HB 結晶形成に対する欠陥因子として作用し, 結晶化度の低下が起こっているためである可能性がある。また, wPhaZ_{She} および rbPhaZ_{She} の基質特異性は類似しているが, 基質特異性の決定因子が CD であるためであると推測される。

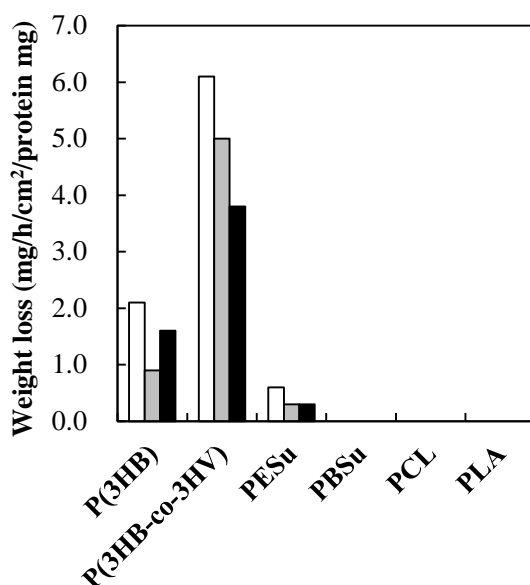


Figure 25. Substrate specificity of PhaZ_{She}. Six polyester films (10×10×0.15 mm) were used as the substrate. The reaction mixture contained a film, 1mM CaCl₂, and 0.1 M potassium phosphate buffer (pH7.4). Enzymatic degradation was performed at 15 °C for 48 h. The enzymatic activity was expressed as the weight loss of the film per unit surface area per hour (mg/cm²/h). (□): rbPhaZ_{She} and reaction mixture was supplemented with 1 μg/mL of enzyme. (▣): rbPhaZ_{She} and the reaction mixture supplemented with 0.5M NaCl and 1 μg/mL of enzyme. (■): wPhaZ_{She} and the reaction mixture supplemented with 0.5M NaCl and 4 μg/mL of enzyme.

3-2-5 速度論的解析

wPhaZ_{She} および rbPhaZ_{She} の速度論解析を行った(Figure 26)。それぞれの P(3HB)分解の最高速度は, 酵素濃度 4.3 μg/mL および 1.1 μg/mL で観測された。NaCl の非存在下で rbPhaZ_{She} の活性は, 自己阻害を受けた。一方, NaCl の非存在下では wPhaZ_{She} は, 分解活性を示さなかった。また, 0.5M の NaCl の存在下で rbPhaZ_{She} の活性は, より強い自己阻害を受けた。一方, 0.5M の NaCl の存在下では wPhaZ_{She} の分解活性が発現し, 一方で自己阻害は観察されなかった。Table 30 に, wPhaZ_{She} および rbPhaZ_{She} の速度定数 k_s および吸着平衡定数 K を示す。同じ塩濃度下では, 両酵素の K 値から, wPhaZ_{She}-P(3HB)表面間の親和性は, rbPhaZ_{She} のそれよりもずっと小さいことがわかった(0.18 ± 0.01 vs. 1.53 ± 0.11 mL/μg)。このことは, SBD を欠損した wPhaZ_{She} は, P(3HB)表面との親和性が弱いために自己阻害を生じなかった

と説明できる。一方で、wPhaZ_{She} が大きな速度で基質を分解するためには、相対的に強い疎水性結合により、ポリエステル表面へ吸着する[99, 188]必要がある。rbPhaZ_{She} の K (1.07 ± 0.04 mL/μg)は、海洋性酵素 PhaZ_{Pst} (0.17 ± 0.02 mL/μg)[174]より高いことと、非海洋性細菌由来の酵素 PhaZ_{RpIT1} (1.60 ± 0.11 mL/μg)[189]より低いことがわかった。このことは、海洋性酵素 PhaZ_{She} は、他の海洋性 P(3HB)分解酵素より P(3HB)表面への親和力が強いといえる。一方、PhaZ_{She} が SBD を失って wPhaZ_{She} になった理由に対しては、生理学的な合理性により説明できない。しかしながら、相対的に高い NaCl 濃度の海洋環境下での強い非特異的疎水的相互作用により wPhaZ_{She} は、他の P(3HB)分解酵素と同様に P(3HB)の表面に吸着し、P(3HB)を分解することができる。

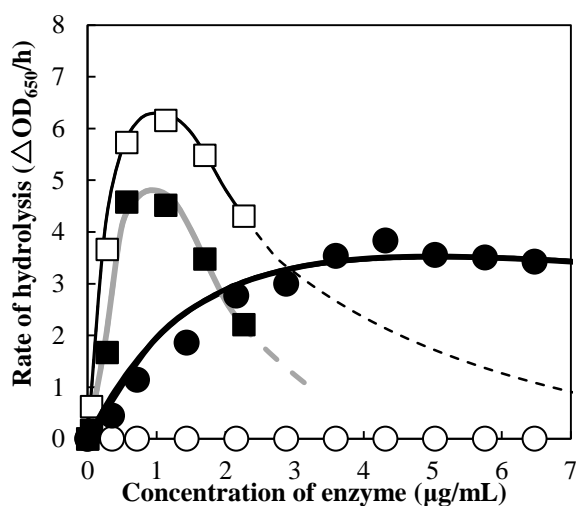


Figure 26. Effect of enzyme concentration on the rate of P(3HB) degradation in reaction mixture (50mM Tris-HCl (pH7.5), 400 μg of P(3HB) granule, 1mM CaCl₂) at 37°C during enzymatic degradation. (□): rbPhaZ_{She} and reaction mixture was supplemented with 0.11- 2.21 μg of enzyme. (■): rbPhaZ_{She} and reaction mixture was supplemented with 0.5M NaCl and 0.11- 2.21 μg of enzyme. (○): wPhaZ_{She} and reaction mixture was supplemented with 0.32- 6.5 μg of enzyme. (●): wPhaZ_{She} and reaction mixture was supplemented with 0.5M NaCl and 0.32- 6.5 μg of enzyme.

Table 30. The Kinetic parameters of enzyme.

Enzymes	K (mL/μg)	k _s (U)
wPhaZ _{She} + 0.5M NaCl	0.18±0.01	0.24±0.01
rbPhaZ _{She}	1.07±0.04	0.40±0.02
rbPhaZ _{She} + 0.5M NaCl	1.53±0.11	0.28±0.03

第4章 総括

海洋に流出したプラスチックは、年々海洋環境に蓄積し、深刻な環境問題を引き起こしている。環境中で微生物により分解される生分解性プラスチックは、このような問題に対する一つの解として、注目を集めている。本博士論文では、生分解性プラスチックの中で最も代表的なポリ(3-ヒドロキシブタン酸) [P(3HB)]に着目し、P(3HB)の海洋環境中での実用化を目的とし、その環境分解メカニズムの解明に取り組んだ。具体的には、海洋性 P(3HB) 分解細菌の単離と特徴付けを行い、さらにこの細菌が生産する P(3HB)分解酵素の機能と、その構造が P(3HB)の分解に与える影響について詳しく調べた。

第1章【序論】では、プラスチックの環境流出により生じる海洋汚染や海洋生態系への悪影響について概観した。さらに海洋環境における細菌による P(3HB)生合成、環境分解性、P(3HB)分解菌およびその分解酵素に関する先行研究例を述べ、本博士論文における主題を明確にした。また、現在までに明らかになっている海洋性 *Shewanella* 属細菌の性質についてまとめた。最後に、本博士論文の目的を述べた。

第2章【海洋環境からの P(3HB)分解 *Shewanella* 属細菌の単離と特徴付け】では、静岡焼津港の海水から海洋性 P(3HB)分解細菌 *Shewanella* sp. JKCM-AJ-6,1 α 株を単離・同定し、その株の生化学、生理学的な特徴付けを行った。単離株は、P(3HB)を唯一の炭素源とするマリンミネラル培地でよく増殖した。単離株は、50°C 以上では増殖せず、30-37°C で最もよく増殖した。一方、本株による P(3HB)分解の至適温度は 15°C であった。培地に 0.2M NaCl を添加した際に、本株は最大の比増殖速度($\mu=1.0\text{ h}^{-1}$)を示し、0.8M NaCl の存在下でも増殖した。このことは、本株が、典型的な海洋細菌であることを示している。これは、海洋性 *Shewanella* 属細菌の P(3HB)分解性に言及した初めての例となる。*Shewanella* 属細菌は、海洋環境中で様々な有機物の分解過程に関わっていることが報告されていたが、今回の研究により海洋環境における P(3HB)-カーボンサイクルに関する重要な細菌群の1つでもあると結論付けた。

第3章【海洋性 *Shewanella* 属細菌由来の熱不安定性 P(3HB)分解酵素の特徴付け】では、第2章で単離された *Shewanella* sp. JKCM-AJ-6,1 α 株由来の酵素(wPhaZ_{She})、および組み換え体由来の酵素(rbPhaZ_{She})の構造と機能との関係を調べた。P(3HB)分解酵素(PhaZ_{She})をコードする遺伝子 *phaZ_{She}* は、2049bp であった。推定のアミノ酸配列は、683 アミノ酸残基からなり、推定されるポリペプチドの分子量は 70,382Da であった。相同性解析の結果から推定される酵素タンパク質の構造は、シグナルペプチド、触媒ドメイン(CD)、フィブロネクチン III 型リンカードメイン(LD)および 2 つの基質結合ドメイン(SBD)から構成されていた。また、野生株由来の P(3HB)分解酵素(wPhaZ_{She})の分子量(47 kDa)は、アミノ酸配列に基づく分子量より小さかった。wPhaZ_{She} の活性は、熱に対して高い感受性を示し、15°C 以上で徐々に低下した。また 0.5 M NaCl の添加により相対的に高い酵素活性を発現した。このことから、本酵素は、熱不安定性および耐塩性であることがわかった。また、wPhaZ_{She} では、自己阻害

による酵素活性の低下は見られなかった。対照的に、組換え型酵素($rbPhaZ_{She}$)は、配列から推定される分子量とほぼ同じ 70kDa を有し、自己阻害現象の発現が観測された。このことから $rbPhaZ_{She}$ は、P(3HB)との間で、 $wPhaZ_{She}$ と比較して、より強い親和性を有することがわかった。これらのことを総合的に判断すると、海洋環境では、陸上および淡水環境と比較してより高い NaCl 濃度であるため、SBD を持たない $wPhaZ_{She}$ でも P(3HB)表面に対して非特異的な結合が生じており、また自己阻害現象が消失することにより結果的に $wPhaZ_{She}$ が P(3HB)を分解することにおいて SBD 欠損が有利に働いていると考えられる。

以上の結果をまとめて、今後の研究課題を考えると、海洋環境における P(3HB)およびその共重合体を利用するためには、それらの物性を改善するとともに、海洋環境中における生分解速度の制御技術が重要となる。本博士論文では、海洋環境における P(3HB)およびその共重合体の分解速度制御を目的として、海洋性 P(3HB)分解菌を特徴付けし、さらにその P(3HB)分解酵素の構造と機能との関係を詳しく調べた。本酵素は、今までに報告されている海洋性 P(3HB)分解酵素 $PhaZ_{AfaAE122}$ 、 $PhaZ_{Msp}$ および $PhaZ_{Pst}$ と違い、塩濃度による酵素の賦活化および熱に対する高い感受性(熱不安定性)を示すことが明らかになった。既知の海洋性 P(3HB)分解酵素を、塩および温度に対する応答性によりまとめた(Figure 27)。海洋性 P(3HB)分解酵素には、塩に対して非感受型、好塩型(塩により賦活化される)および耐塩型(塩により活性が低下する)が存在している。また、温度に対する応答性では、熱安定型および熱不安定型が存在した。結果としてこれらは、図に示す計 6 種類のタイプの酵素に分類できた。さらに、 $PhaZ_{She}$ が SBD を欠損することにより($wPhaZ_{She}$)好塩性が発現したが、このような報告例は、本博士論文が初めてである。塩濃度が高くなると $PhaZ_{She}$ の SBD は切断され($wPhaZ_{She}$)、塩濃度が低い時はインタクトな状態($rbPhaZ_{She}$)で存在しているとすれば合理的な解釈が可能であるが、このことを実証のためにはさらなる研究が必要である。

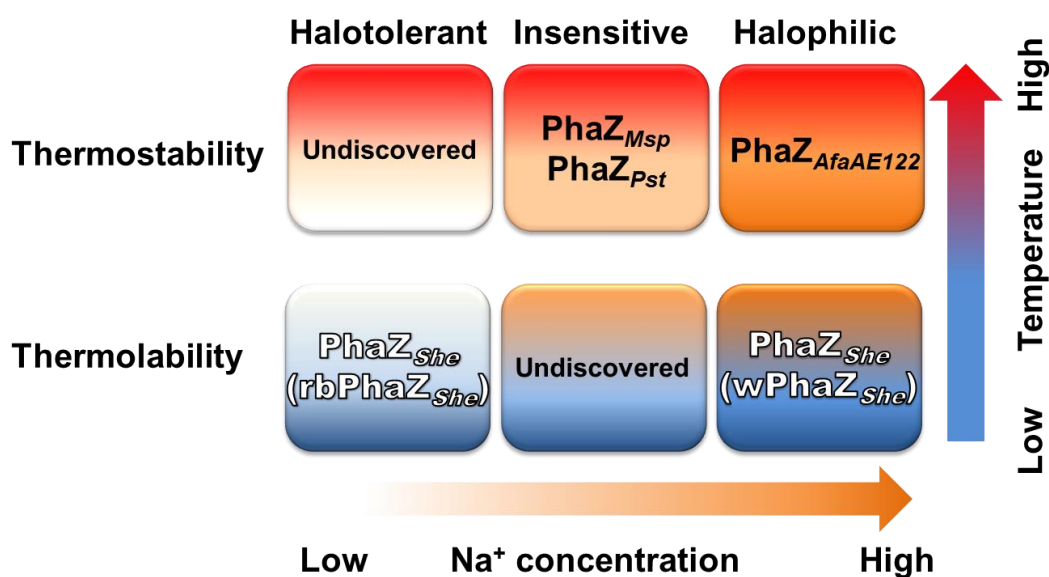


Figure 27. The putative types of of marine P(3HB) depolymerases.

本博士論文では、海洋中でプロセッシングされた野生型酵素(wPhaZ_{She})が、Na⁺イオン存在下において、初めてP(3HB)を加水分解できるようになることを示した。海洋中のNa⁺イオンは、溶媒である水の誘電率を下げ、結果的に酵素-P(3HB)間での静電的相互作用を小さくして、疎水的相互作用等により結合力を増していることが予想される。一般に、陸生酵素では、高い塩濃度が、酵素酵素間の凝集や、酵素自体の高次構造変化を誘発し、活性の低下をもたらすことが知られている。一方で、本酵素のような海洋性酵素は、そのような影響を受けにくい。これらのことを、総合的に判断すると、海洋環境でP(3HB)を基盤とする生分解性プラスチックの生分解速度制御をするためには、材料表面の疎水性が一つの鍵になる可能性がある。つまり、Figure 28に示すように、表面を親水加工すれば、酵素分解速度は低下し、疎水加工すれば上昇すると予想される。また、これらの組み合わせによる複合材料化は、海洋環境中での生分解性プラスチックの自在分解に対する解を提案するかもしれない。

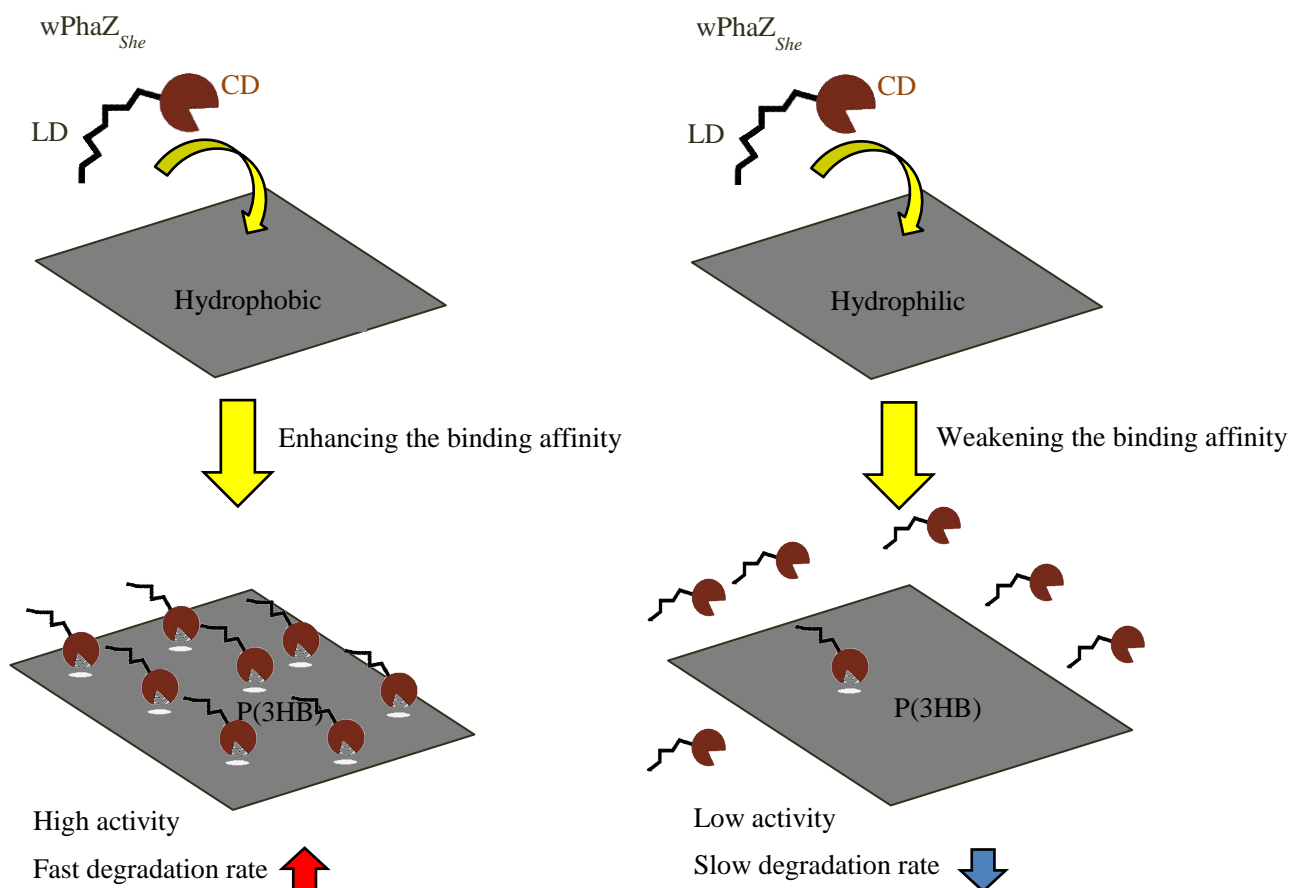


Figure 28. A strategy in material design to control the biodegradation rate in marine environments.

参考文献

- [1] Plastics Europe. Plastic-the facts 2015:An analysis of European plastics production, demand and waste data. 2015.
- [2] Jambeck JR, Geyer R, Wilcox C, Siegler TR, Perryman M, Andrady A, Narayan R, Law KL. Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science*. 2015;347:768-71.
- [3] Thompson RC. Plastic debris in the marine environment: consequences and solutions. *Mar Nat Conserv Eur*. 2006;193:107-15.
- [4] Gregory MR. Environmental implications of plastic debris in marine settings—entanglement, ingestion, smothering, hangers-on, hitch-hiking and alien invasions. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2009;364:2013-25.
- [5] Derraik JGB. The pollution of the marine environment by plastic debris: a review. *Mar Pollut Bull*. 2002;44:842-52.
- [6] Carpenter EJ, Smith KL. Plastics on the Sargasso Sea surface. *Science*. 1972;175:1240-1.
- [7] Day RH, Shaw DG, Ignell SE. Quantitative distribution and characteristics of neustonic plastic in the North Pacific Ocean, Final Report to US Department of Commerce, National Marine Fisheries Service, Auke Bay Laboratory. Auke Bay, Alaska US. 1988.
- [8] Moore CJ, Moore SL, Leecaster MK, Weisberg SB. A comparison of plastic and plankton in the North Pacific central gyre. *Mar Pollut Bull*. 2001;42:1297-300.
- [9] Young LC, Vanderlip C, Duffy DC, Afanasyev V, Shaffer SA. Bringing home the trash: do colony-based differences in foraging distribution lead to increased plastic ingestion in Laysan albatrosses? *PLoS ONE*. 2009;4:e7623.
- [10] Kaiser J. The dirt on ocean garbage patches. *Science*. 2010;328:1506.
- [11] NOAA. Marine debris accumulation locations in the North Pacific Ocean. 2010, from wiki media commons: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Pacific-garbage-patch-map_2010_noaamdp.jpg.
- [12] Moore CJ. Synthetic polymers in the marine environment: A rapidly increasing, long-term threat. *Environ Res*. 2008;108:131-9.
- [13] Koelmans AA, Besseling E, Wegner A, Foekema EM. Plastic as a carrier of POPs to aquatic organisms: a model analysis. *Environ Sci Technol*. 2013;47:7812-20.
- [14] Rios LM, Jones PR, Moore C, Narayan UV. Quantitation of persistent organic pollutants adsorbed on plastic debris from the Northern Pacific Gyre's “eastern garbage patch”. *J Environ Monit*. 2010;12:2226-36.
- [15] Morét-Ferguson S, Law KL, Proskurowski G, Murphy EK, Peacock EE, Reddy CM. The size, mass, and composition of plastic debris in the western North Atlantic Ocean. *Mar Pollut Bull*. 2010;60:1873-8.
- [16] Thompson RC, Olsen Y, Mitchell RP, Davis A, Rowland SJ, John AWG, McGonigle D, Russell AE. Lost at sea: where is all the plastic? *Science*. 2004;304:838.

- [17] Mrosovsky N, Ryan GD, James MC. Leatherback turtles: the menace of plastic. *Mar Pollut Bull.* 2009;58:287-9.
- [18] Gall SC, Thompson RC. The impact of debris on marine life. *Mar Pollut Bull.* 2015;92:170-9.
- [19] Jordan C. Remains of an albatross containing ingested flotsam. 2009, from wikipedia:
https://en.wikipedia.org/wiki/Marine_debris#/media/File:Albatross_at_Midway_Atoll_Refuge_%288080507529%29.jpg.
- [20] NOAA. A turtle trapped in a ghost net, an abandoned fishing net. 2005, from wikipedia:
https://en.wikipedia.org/wiki/Marine_debris#/media/File:Turtle_entangled_in_marine_debris_%28ghost_net%29.jpg.
- [21] Gunn R, Hardesty BD, Butler J. Tackling 'ghost nets': local solutions to a global issue in northern Australia. *Ecol Manage Restor.* 2010;11:88-98.
- [22] Sheldon WW, Dow RL. Trap contribution of losses in the American lobster fishery. *Fish Bull.* 1975;73:449-51.
- [23] High WL. Escape of dungeness crabs from pots. *Mar Fish Rev.* 1976;38:19-23.
- [24] Matsuoka T, Nakashima T, Nagasawa N. A review of ghost fishing: scientific approaches to evaluation and solutions. *Fish Sci.* 2005;71:691-702.
- [25] Bond AL, Provencher JF, Daoust PY, Lucas ZN. Plastic ingestion by fulmars and shearwaters at Sable Island, Nova Scotia, Canada. *Mar Pollut Bull.* 2014;87:68-75.
- [26] Possatto FE, Barletta M, Costa MF, do Sul JAI, Dantas DV. Plastic debris ingestion by marine catfish: an unexpected fisheries impact. *Mar Pollut Bull.* 2011;62:1098-102.
- [27] Laist DW. Impacts of marine debris: entanglement of marine life in marine debris including a comprehensive list of species with entanglement and ingestion records. *Marine Debris.* New York: Springer; 1997. p. 99-139.
- [28] Carson HS, Colbert SL, Kaylor MJ, McDermid KJ. Small plastic debris changes water movement and heat transfer through beach sediments. *Mar Pollut Bull.* 2011;62:1708-13.
- [29] Rees E, Southward A. Plastic flotsam as an agent for dispersal of perforatus perforatus (Cirripedia: Balanidae). *Mar Biodivers Rec.* 2009;2.
- [30] Reisser J, Shaw J, Hallegraeff G, Proietti M, Barnes DK, Thums M, Wilcox C, Hardesty BD, Pattiaratchi C. Millimeter-sized marine plastics: a new pelagic habitat for microorganisms and invertebrates. *PLoS ONE.* 2014;9:e100289.
- [31] Hidalgo-Ruz V, Gutow L, Thompson RC, Thiel M. Microplastics in the marine environment: a review of the methods used for identification and quantification. *Environ Sci Technol.* 2012;46:3060-75.
- [32] McKinney ML. On predicting biotic homogenization: species - area patterns in marine biota. *Global Ecol Biogeogr Lett.* 1998;7:297-301.
- [33] Takehama S. Estimation of damages to fishing yessels caused by marine debris, based on insurance statistics. *Proc of the Second International Conference on Marine Debris, US Dept of Commerce* 1990.

- [34] McIlgorm A, Campbell HF, Rule MJ. The economic cost and control of marine debris damage in the Asia-Pacific region. *Ocean Coast Manage.* 2011;54:643-51.
- [35] Conservancy O. Trash travels. From our hands to the sea, around the globe, and through time. International Coastal Cleanup. 2010.
- [36] McIlgorm A, Campbell HF, Rule MJ. Understanding the economic benefits and costs of controlling marine debris in the APEC region (MRC 02/2007). A report to the Asia-Pacific Economic Cooperation Marine Resource Conservation Working Group by the National Marine Science Centre (University of New England and Southern Cross University), Coffs Harbour, NSW, Australia, December. 2008.
- [37] Doi Y. *Microbial polyesters*. New York: VCH Publishers; 1990.
- [38] Anderson AJ, Dawes EA. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol Rev.* 1990;54:450-72.
- [39] Lemoigne M. Products of dehydration and of polymerization of β -hydroxybutyric acid. *Bull Soc Chim Biol.* 1926;8:770-82.
- [40] Steinbüchel A, Valentin HE. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiol Lett.* 1995;128:219-28.
- [41] Williamson DH, Wilkinson JF. The isolation and estimation of the poly- β -hydroxy-butyrate inclusions of *Bacillus* Species. *Microbiology.* 1958;19:198-209.
- [42] Pedrós-Alió C, Mas J, Guerrero R. The influence of poly- β -hydroxybutyrate accumulation on cell volume and buoyant density in *Alcaligenes eutrophus*. *Arch Microbiol.* 1985;143:178-84.
- [43] Chen GQ, Wu Q. Microbial production and applications of chiral hydroxyalkanoates. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2005;67:592-9.
- [44] Doi Y, Kitamura S, Abe H. Microbial synthesis and characterization of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). *Macromolecules.* 1995;28:4822-8.
- [45] Song C, Zhao L, Ono S, Shimasaki C, Inoue M. Production of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from cottonseed oil and valeric acid in batch culture of *Ralstonia* sp. strain JC-64. *Appl Biochem Biotechnol.* 2001;94:169-78.
- [46] Luzier WD. Materials derived from biomass/biodegradable materials. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992;89:839-42.
- [47] Wang YW, Mo W, Yao H, Wu Q, Chen J, Chen GQ. Biodegradation studies of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). *Polym Degrad Stab.* 2004;85:815-21.
- [48] Reischwitz A, Stoppok E, Buchholz K. Anaerobic degradation of poly-3-hydroxybutyrate and poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate. *Biodegradation.* 1997;8:313-9.
- [49] Shimamura E, Kasuya K, Kobayashi G, Shiotani T, Shima Y, Doi Y. Physical properties and biodegradability of microbial poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). *Macromolecules.* 1994;27:878-80.

- [50] Chen GQ. Industrial production of PHA. *Plastics from bacteria*. Berlin - Heidelberg: Springer; 2010. p. 121-32.
- [51] Chanprateep S. Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. *J Biosci Bioeng*. 2010;110:621-32.
- [52] Zhu C, Chiu S, Nakas JP, Nomura CT. Bioplastics from waste glycerol derived from biodiesel industry. *J Appl Polym Sci*. 2013;130:1-13.
- [53] Meng DC, Shi ZY, Wu LP, Zhou Q, Wu Q, Chen JC, Chen GQ. Production and characterization of poly (3-hydroxypropionate-co-4-hydroxybutyrate) with fully controllable structures by recombinant *Escherichia coli* containing an engineered pathway. *Metab Eng*. 2012;14:317-24.
- [54] Bahattab MA, Mosnáček J, Basfar AA, Shukri TM. Cross-linked poly (ethylene vinyl acetate)(EVA)/low density polyethylene (LDPE)/metal hydroxides composites for wire and cable applications. *Polym Bull*. 2010;64:569-80.
- [55] Chiu FC, Yen HZ, Lee CE. Characterization of PP/HDPE blend-based nanocomposites using different maleated polyolefins as compatibilizers. *Polym Test*. 2010;29:397-406.
- [56] Luengo JM, García B, Sandoval A, Naharro G, Olivera ER. Bioplastics from microorganisms. *Curr Opin Microbiol*. 2003;6:251-60.
- [57] Arun A, Arthi R, Shanmugabalaji V, Eyini M. Microbial production of poly- β -hydroxybutyrate by marine microbes isolated from various marine environments. *Bioresour Technol*. 2009;100:2320-3.
- [58] Shrivastav A, Mishra SK, Shethia B, Pancha I, Jain D, Mishra S. Isolation of promising bacterial strains from soil and marine environment for polyhydroxyalkanoates (PHAs) production utilizing *Jatropha* biodiesel by product. *Int J Biol Macromol*. 2010;47:283-7.
- [59] Numata K, Morisaki K, Tomizawa S, Ohtani M, Demura T, Miyazaki M, Nogi Y, Deguchi S, Doi Y. Synthesis of poly-and oligo (hydroxyalkanoate) s by deep-sea bacteria, *Colwellia* spp., *Moritella* spp., and *Shewanella* spp. *Polym J*. 2013;45:1094-100.
- [60] Numata K, Morisaki K. Screening of marine bacteria to synthesize polyhydroxyalkanoate from lignin: Contribution of lignin derivatives to biosynthesis by *Oceanimonas doudoroffii*. *ACS Sustain Chem Eng*. 2015;3:569-73.
- [61] González-García Y, Nungaray J, Córdova J, González-Reynoso O, Koller M, Atlic A, Braunegg G. Biosynthesis and characterization of polyhydroxyalkanoates in the polysaccharide-degrading marine bacterium *Saccharophagus degradans* ATCC 43961. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2008;35:629-33.
- [62] Wang Q, Zhang H, Chen Q, Chen X, Zhang Y, Qi Q. A marine bacterium accumulates polyhydroxyalkanoate consisting of mainly 3-hydroxydodecanoate and 3-hydroxydecanoate. *World J Microbiol Biotechnol*. 2010;26:1149-53.
- [63] López-Cortés A, Rodríguez-Fernández O, Latisnere-Barragán H, Mejía-Ruíz HC, González-Gutiérrez G, Lomelí-Ortega C. Characterization of polyhydroxyalkanoate and the *phaC* gene of

- Paracoccus seriniphilus* E71 strain isolated from a polluted marine microbial mat. *World J Microbiol Biotechnol.* 2010;26:109-18.
- [64] Wei YH, Chen WC, Wu HS, Janarthanan OM. Biodegradable and biocompatible biomaterial, polyhydroxybutyrate, produced by an indigenous *Vibrio* sp. BM-1 isolated from marine environment. *Mar Drugs.* 2011;9:615-24.
- [65] Numata K, Doi Y. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates by a novel facultatively anaerobic *Vibrio* sp. under marine conditions. *Mar Biotechnol.* 2012;14:323-31.
- [66] McKew BA, Coulon F, Osborn AM, Timmis KN, McGenity TJ. Determining the identity and roles of oil - metabolizing marine bacteria from the Thames estuary, UK. *Environ Microbiol.* 2007;9:165-76.
- [67] Teramoto M, Suzuki M, Okazaki F, Hatmanti A, Harayama S. Oceanobacter-related bacteria are important for the degradation of petroleum aliphatic hydrocarbons in the tropical marine environment. *Microbiology.* 2009;155:3362-70.
- [68] Harayama S, Kasai Y, Hara A. Microbial communities in oil-contaminated seawater. *Curr Opin Biotechnol.* 2004;15:205-14.
- [69] Munoz A, Esteban L, Riley MR. Utilization of cellulosic waste from tequila bagasse and production of polyhydroxyalkanoate (PHA) bioplastics by *Saccharophagus degradans*. *Biotechnol Bioeng.* 2008;100:882-8.
- [70] Tokiwa Y, Calabia BP, Ugwu CU, Aiba S. Biodegradability of plastics. *Int J Mol Sci.* 2009;10:3722-42.
- [71] Briese BH, Jendrossek D, Schlegel HG. Degradation of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by aerobic sewage sludge. *FEMS Microbiol Lett.* 1994;117:107-11.
- [72] Mergaert J, Swings J. Biodiversity of microorganisms that degrade bacterial and synthetic polyesters. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 1996;17:463-9.
- [73] Janssen PH, Harfoot CG. *Ilyobacter delafieldii* sp. nov., a metabolically restricted anaerobic bacterium fermenting PHB. *Arch Microbiol.* 1990;154:253-9.
- [74] Delafield FP, Doudoroff M, Palleroni NJ, Lusty CJ, Contopoulos R. Decomposition of poly- β -hydroxybutyrate by *Pseudomonads*. *J Bacteriol.* 1965;90:1455-66.
- [75] Mergaert J, Anderson C, Wouters A, Swings J, Kersters K. Biodegradation of polyhydroxyalkanoates. *FEMS Microbiol Rev.* 1992;103:317-21.
- [76] Mergaert J, Webb A, Anderson C, Wouters A, Swings J. Microbial degradation of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in soils. *Appl Environ Microbiol.* 1993;59:3233-8.
- [77] Mergaert J, Wouters A, Swings J, Anderson C. In situ biodegradation of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in natural waters. *Can J Microbiol.* 1995;41:154-9.

- [78] Kasuya K, Inoue Y, Tanaka T, Akehata T, Iwata T, Fukui T, Doi Y. Biochemical and molecular characterization of the polyhydroxybutyrate depolymerase of *Comamonas acidovorans* YM1609, isolated from freshwater. *Appl Environ Microbiol.* 1997;63:4844-52.
- [79] Doi Y, Kanesawa Y, Tanahashi N, Kumagai Y. Biodegradation of microbial polyesters in the marine environment. *Polym Degrad Stab.* 1992;36:173-7.
- [80] Mukai K, Yamada K, Doi Y. Enzymatic degradation of poly(hydroxyalkanoates) by a marine bacterium. *Polym Degrad Stab.* 1993;41:85-91.
- [81] Thellen C, Coyne M, Froio D, Auerbach M, Wirsén C, Ratto JA. A processing, characterization and marine biodegradation study of melt-extruded polyhydroxyalkanoate (PHA) films. *J Polym Environ.* 2008;16:1-11.
- [82] Feng L, Wang Y, Inagawa Y, Kasuya K, Saito T, Doi Y, Inoue Y. Enzymatic degradation behavior of comonomer compositionally fractionated bacterial poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)s by poly(3-hydroxyalkanoate) depolymerases isolated from *Ralstonia pickettii* T1 and *Acidovorax* sp. TP4. *Polym Degrad Stab.* 2004;84:95-104.
- [83] Voinova O, Gladyshev MI, Volova TG. Comparative study of PHA degradation in natural reservoirs having various types of ecosystems. *Macromol Symp.* 2008;269:34-7.
- [84] Gonda KE, Jendrossek D, Molitoris HP. Fungal degradation of the thermoplastic polymer poly- β -hydroxybutyric acid (PHB) under simulated deep sea pressure. *Hydrobiologia.* 2000;426:173-83.
- [85] Mukai K, Yamada K, Doi Y. Efficient hydrolysis of polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas stutzeri* YM1414 isolated from lake water. *Polym Degrad Stab.* 1994;43:319-27.
- [86] Ohura T, Aoyagi Y, Takagi KI, Yoshida Y, Kasuya K, Doi Y. Biodegradation of poly(3-hydroxyalkanoic acids) fibers and isolation of poly(3-hydroxybutyric acid)-degrading microorganisms under aquatic environments. *Polym Degrad Stab.* 1999;63:23-9.
- [87] Jendrossek D, Knoke I, Habibian RB, Steinbüchel A, Schlegel HG. Degradation of poly(3-hydroxybutyrate), PHB, by bacteria and purification of a novel PHB depolymerase from *Comamonas* sp. *J Polym Environ.* 1993;1:53-63.
- [88] Jendrossek D, Schirmer A, Schlegel HG. Biodegradation of polyhydroxyalkanoic acids. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1996;46:451-63.
- [89] Kasuya K, Doi Y, Yao T. Enzymatic degradation of poly[(R)-3-hydroxybutyrate] by *Comamonas testosteroni* ATSU of soil bacterium. *Polym Degrad Stab.* 1994;45:379-86.
- [90] Oda Y, Osaka H, Urakami T, Tonomura K. Purification and properties of poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase from the fungus *Paecilomyces lilacinus* D218. *Curr Microbiol.* 1997;34:230-2.
- [91] Nakayama K, Saito T, Fukui T, Shirakura Y, Tomita K. Purification and properties of extracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerases from *Pseudomonas lemoignei*. *Biochim Biophys Acta.* 1985;827:63-72.

- [92] Tanio T, Fukui T, Shirakura Y, Saito T, Tomita K, Kaiho T, Masamune S. An extracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase from *Alcaligenes faecalis*. *Eur J Biochem*. 1982;124:71-7.
- [93] Uefuji M, Kasuya K, Doi Y. Enzymatic degradation of poly[(R)-3-hydroxybutyrate]: secretion and properties of PHB depolymerase from *Pseudomonas stutzeri*. *Polym Degrad Stab*. 1997;58:275-81.
- [94] Hisano T, Kasuya K, Tezuka Y, Ishii N, Kobayashi T, Shiraki M, Oroudjev E, Hansma H, Iwata T, Doi Y, Saito T, Miki K. The crystal structure of polyhydroxybutyrate depolymerase from *Penicillium funiculosum* provides insights into the recognition and degradation of biopolyesters. *J Mol Biol*. 2006;356:993-1004.
- [95] Jiang Y, Ye J, Wu H, Zhang H. Cloning and expression of the polyhydroxyalkanoate depolymerase gene from *Pseudomonas putida*, and characterization of the gene product. *Biotechnol Lett*. 2004;26:1585-8.
- [96] Takaku H, Kimoto A, Kodaira S, Nashimoto M, Takagi M. Isolation of a Gram-positive poly(3-hydroxybutyrate) (PHB)-degrading bacterium from compost, and cloning and characterization of a gene encoding PHB depolymerase of *Bacillus megaterium* N-18-25-9. *FEMS Microbiol Lett*. 2006;264:152-9.
- [97] Handrick R, Reinhardt S, Kimmig P, Jendrossek D. The “intracellular” poly(3-hydroxybutyrate)(PHB) depolymerase of *Rhodospirillum rubrum* is a periplasm-located protein with specificity for native PHB and with structural similarity to extracellular PHB depolymerases. *J Bacteriol*. 2004;186:7243-53.
- [98] Shimao M. Biodegradation of plastics. *Curr Opin Biotechnol*. 2001;12:242-7.
- [99] Kasuya K, Ohura T, Masuda K, Doi Y. Substrate and binding specificities of bacterial polyhydroxybutyrate depolymerases. *Int J Biol Macromol*. 1999;24:329-36.
- [100] Briese BH, Schmidt B, Jendrossek D. *Pseudomonas lemoignei* has five poly(hydroxyalkanoic acid) (PHA) depolymerase genes: A comparative study of bacterial and eukaryotic PHA depolymerases. *J Polym Environ*. 1994;2:75-87.
- [101] Jendrossek D, Frisse A, Behrends A, Andermann M, Kratzin HD, Stanislawski T, Schlegel HG. Biochemical and molecular characterization of the *Pseudomonas lemoignei* polyhydroxyalkanoate depolymerase system. *J Bacteriol*. 1995;177:596-607.
- [102] Jendrossek D, Handrick R. Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates*. *Annu Rev Microbiol*. 2002;56:403-32.
- [103] Tokiwa Y, Calabia BP. Review degradation of microbial polyesters. *Biotechnol Lett*. 2004;26:1181-9.
- [104] Kita K, Mashiba SI, Nagita M, Ishimaru K, Okamoto K, Yanase H, Kato N. Cloning of poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase from a marine bacterium, *Alcaligenes faecalis* AE122, and characterization of its gene product. *Biochim Biophys Acta*. 1997;1352:113-22.

- [105] Ohura T, Kasuya K, Doi Y. Cloning and characterization of the polyhydroxybutyrate depolymerase gene of *Pseudomonas stutzeri* and analysis of the function of substrate-binding domains. *Appl Environ Microbiol.* 1999;65:189-97.
- [106] Kasuya K, Takano T, Tezuka Y, Hsieh WC, Mitomo H, Doi Y. Cloning, expression and characterization of a poly (3-hydroxybutyrate) depolymerase from *Marinobacter* sp. NK-1. *Int J Biol Macromol.* 2003;33:221-6.
- [107] Ma WT, Lin JH, Chen HJ, Chen SY, Shaw GC. Identification and characterization of a novel class of extracellular poly (3-hydroxybutyrate) depolymerase from *Bacillus* sp. strain NRRL B-14911. *Appl Environ Microbiol.* 2011;77:7924-32.
- [108] Kasuya K, Mitomo H, Nakahara M, Akiba A, Kudo T, Doi Y. Identification of a marine benthic P (3HB)-degrading bacterium isolate and characterization of its P (3HB) depolymerase. *Biomacromolecules.* 2000;1:194-201.
- [109] Leathers TD, Govind NS, Greene RV. Biodegradation of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by a tropical marine bacterium, *Pseudoalteromonas* sp. NRRL B-30083. *J Polym Environ.* 2000;8:119-24.
- [110] Kita K, Ishimaru K, Teraoka M, Yanase H, Kato N. Properties of poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase from a marine bacterium, *Alcaligenes faecalis* AE122. *Appl Environ Microbiol.* 1995;61:1727-30.
- [111] Mabrouk MM, Sabry SA. Degradation of poly (3-hydroxybutyrate) and its copolymer poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by a marine *Streptomyces* sp. SNG9. *Microbiol Res.* 2001;156:323-35.
- [112] Ghanem NB, Mabrouk MES, Sabry SA, El-Badan DES. Degradation of polyesters by a novel marine *Nocardiopsis aegyptia* sp. nov.: Application of Plackett-Burman experimental design for the improvement of PHB depolymerase activity. *J Gen Appl Microbiol.* 2005;51:151-8.
- [113] Volova TG, Boyandin AN, Vasiliev AD, Karpov VA, Prudnikova SV, Mishukova OV, Boyarskikh UA, Filipenko ML, Rudnev VP, Bá Xuân B, Việt Dũng V, Gitelson II. Biodegradation of polyhydroxyalkanoates (PHAs) in tropical coastal waters and identification of PHA-degrading bacteria. *Polym Degrad Stab.* 2010;95:2350-9.
- [114] Nealson KH, Scott J. *Ecophysiology of the genus Shewanella.* The prokaryotes: Springer; 2006. p. 1133-51.
- [115] Semple K, Westlake D. Characterization of iron-reducing *Alteromonas putrefaciens* strains from oil field fluids. *Can J Microbiol.* 1987;33:366-71.
- [116] Stenström IM, Molin G. Classification of the spoilage flora offish, with special reference to *Shewanella putrefaciens*. *J Appl Bacteriol.* 1990;68:601-18.
- [117] Nealson K, Myers C, Wimpee B. Isolation and identification of manganese-reducing bacteria and estimates of microbial Mn (IV)-reducing potential in the Black Sea. *Deep Sea Res A.* 1991;38:S907-S20.

- [118] Butt AA, Figueroa J, Martin DH. Ocular infection caused by three unusual marine organisms. *Clin Infect Dis.* 1997;24:740-.
- [119] Brink A, Van Straten A, Van Rensburg A. *Shewanella (Pseudomonas) putrefaciens* bacteremia. *Clin Infect Dis.* 1995;20:1327-32.
- [120] Gram L, Melchiorsen J. Interaction between fish spoilage bacteria *Pseudomonas* sp. and *Shewanella putrefaciens* in fish extracts and on fish tissue. *J Appl Bacteriol.* 1996;80:589-95.
- [121] Gram L, Huss HH. Microbiological spoilage of fish and fish products. *Int J Food Microbiol.* 1996;33:121-37.
- [122] Kim HJ, Park HS, Hyun MS, Chang IS, Kim M, Kim BH. A mediator-less microbial fuel cell using a metal reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens*. *Enzyme Microb Technol.* 2002;30:145-52.
- [123] Ringeisen BR, Henderson E, Wu PK, Pietron J, Ray R, Little B, Biffinger JC, Jones-Meehan JM. High power density from a miniature microbial fuel cell using *Shewanella oneidensis* DSP10. *Environ Sci Technol.* 2006;40:2629-34.
- [124] Saffarini DA, Schultz R, Beliaev A. Involvement of cyclic AMP (cAMP) and cAMP receptor protein in anaerobic respiration of *Shewanella oneidensis*. *J Bacteriol.* 2003;185:3668-71.
- [125] Caccavo F, Blakemore RP, Lovley DR. A hydrogen-oxidizing, Fe (III)-reducing microorganism from the Great Bay Estuary, New Hampshire. *Appl Environ Microbiol.* 1992;58:3211-6.
- [126] Wielinga B, Mizuba MM, Hansel CM, Fendorf S. Iron promoted reduction of chromate by dissimilatory iron-reducing bacteria. *Environ Sci Technol.* 2001;35:522-7.
- [127] Farrenkopf AM, Dollhopf ME, Chadhain SN, Luther GW, Nealon KH. Reduction of iodate in seawater during Arabian Sea shipboard incubations and in laboratory cultures of the marine bacterium *Shewanella putrefaciens* strain MR-4. *Mar Chem.* 1997;57:347-54.
- [128] Wildung RE, Gorby YA, Krupka KM, Hess NJ, Li S, Plymale AE, McKinley JP, Fredrickson JK. Effect of electron donor and solution chemistry on products of dissimilatory reduction of technetium by *Shewanella putrefaciens*. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66:2451-60.
- [129] Lloyd JR, Yong P, Macaskie LE. Biological reduction and removal of Np (V) by two microorganisms. *Environ Sci Technol.* 2000;34:1297-301.
- [130] Boukhalfa H, Icopini GA, Reilly SD, Neu MP. Plutonium (IV) reduction by the metal-reducing bacteria *Geobacter metallireducens* GS15 and *Shewanella oneidensis* MR1. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73:5897-903.
- [131] Klonowska A, Heulin T, Vermeglio A. Selenite and tellurite reduction by *Shewanella oneidensis*. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71:5607-9.
- [132] Carpentier W, Sandra K, De Smet I, Brige A, De Smet L, Van Beeumen J. Microbial reduction and precipitation of vanadium by *Shewanella oneidensis*. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69:3636-9.

- [133] Zhao JS, Manno D, Beaulieu C, Paquet L, Hawari J. *Shewanella sediminis* sp. nov., a novel Na⁺-requiring and hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine-degrading bacterium from marine sediment. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2005;55:1511-20.
- [134] Zhao J-S, Manno D, Thiboutot S, Ampleman G, Hawari J. *Shewanella canadensis* sp. nov. and *Shewanella atlantica* sp. nov., manganese dioxide-and hexahydro-1, 3, 5-trinitro-1, 3, 5-triazine-reducing, psychrophilic marine bacteria. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2007;57:2155-62.
- [135] Fredrickson JK, Romine MF, Beliaev AS, Auchtung JM, Driscoll ME, Gardner TS, Neelson KH, Osterman AL, Pinchuk G, Reed JL. Towards environmental systems biology of *Shewanella*. *Nat Rev Microbiol.* 2008;6:592-603.
- [136] Lusher AL, McHugh M, Thompson RC. Occurrence of microplastics in the gastrointestinal tract of pelagic and demersal fish from the English Channel. *Mar Pollut Bull.* 2013;67:94-9.
- [137] 後藤友明. 着底トロール調査から推定された岩手県沖合大陸斜面上における海洋ゴミの分布とゴーストフィッシングの実態. *日本水産学会誌.* 2006;72:501-6.
- [138] Humborstad OB, Løkkeborg S, Hareide NR, Furevik DM. Catches of Greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*) in deepwater ghost-fishing gillnets on the Norwegian continental slope. *Fish Res.* 2003;64:163-70.
- [139] Tschernij V, Larsson PO. Ghost fishing by lost cod gill nets in the Baltic Sea. *Fish Res.* 2003;64:151-62.
- [140] Rios LM, Moore CJ, Jones PR. Persistent organic pollutants carried by synthetic polymers in the ocean environment. *Mar Pollut Bull.* 2007;54:1230-7.
- [141] Teuten EL, Saquing JM, Knappe DRU, Barlaz MA, Jonsson S, Björn A, Rowland SJ, Thompson RC, Galloway TS, Yamashita R, Ochi D, Watanuki Y, Moore CJ, Viet PH, Tana TS, Prudente M, Boonyatumanond R, Zakaria MP, Akkhavong K, Ogata Y, Hirai H, Iwasa S, Mizukawa K, Hagino Y, Imamura A, Saha M, Takada H. Transport and release of chemicals from plastics to the environment and to wildlife. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2009;364:2027-45.
- [142] 鈴木健一郎, 平石明, 横田明. 微生物の分類・同定実験法. シュプリンガー・フェアラーク, 東京; 2001.
- [143] Tezuka Y, Ishii N, Kasuya K, Mitomo H. Degradation of poly(ethylene succinate) by mesophilic bacteria. *Polym Degrad Stab.* 2004;84:115-21.
- [144] Weidner S, Arnold W, Puhler A. Diversity of uncultured microorganisms associated with the seagrass *Halophila stipulacea* estimated by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Appl Environ Microbiol.* 1996;62:766-71.
- [145] Reysenbach AL, Wickham GS, Pace NR. Phylogenetic analysis of the hyperthermophilic pink filament community in Octopus Spring, Yellowstone National Park. *Appl Environ Microbiol.* 1994;60:2113-9.

- [146] Chowdhury AA. Poly- β -hydroxybuttersäure abbauende Bakterien und Exoenzym. Arch Microbiol. 1963;47:167-200.
- [147] Hiraishi A. Direct automated sequencing of 16S rDNA amplified by polymerase chain reaction from bacterial cultures without DNA purification. Lett Appl Microbiol. 1992;15:210-3.
- [148] Bimboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. 1979;7:1513-23.
- [149] Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 1994;22:4673-80.
- [150] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol. 1987;4:406-25.
- [151] Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol Biol Evol. 2011;28:2731-9.
- [152] Pitcher DG, Saunders NA, Owen RJ. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. Lett Appl Microbiol. 1989;8:151-6.
- [153] Wakizaka A, Kurosaka K, Okuhara E. Rapid separation of DNA constituents, bases, nucleosides and nucleotides, under the same chromatographic conditions using high-performance liquid chromatography with a reversed-phase column. J Chromatogr B Biomed Sci Appl. 1979;162:319-26.
- [154] Katayama-Fujimura Y, Komatsu Y, Kuraishi H, Kaneko T. Estimation of DNA base composition by high performance liquid chromatography of its nuclease P1 hydrolysate. Agric Biol Chem. 1984;48:3169-72.
- [155] Mesbah M, Premachandran U, Whitman WB. Precise measurement of the G+ C content of deoxyribonucleic acid by high-performance liquid chromatography. Int J Syst Evol Microbiol. 1989;39:159-67.
- [156] Kumagai M, Fujimoto M, Kuninaka A. Determination of base composition of DNA by high performance liquid chromatography of its nuclease P1 hydrolysate. Nucleic acids symposium series 1987. p. 65-8.
- [157] Holt HM, Gahrn-Hansen B, Bruun B. *Shewanella algae* and *Shewanella putrefaciens*: clinical and microbiological characteristics. Clin Microbiol Infect. 2005;11:347-52.
- [158] Brettar I, Höfle MG. Nitrous oxide producing heterotrophic bacteria from the water column of the central Baltic: abundance and molecular identification. Mar Ecol Prog Ser. 1993;94:253-65.
- [159] Satomi M, Vogel BF, Venkateswaran K, Gram L. Description of *Shewanella glacialipiscicola* sp. nov. and *Shewanella algidipiscicola* sp. nov., isolated from marine fish of the Danish Baltic Sea, and proposal that *Shewanella affinis* is a later heterotypic synonym of *Shewanella colwelliana*. Int J Syst Evol Microbiol. 2007;57:347-52.

- [160] Hau HH, Gralnick JA. Ecology and biotechnology of the genus *Shewanella*. *Annu Rev Microbiol.* 2007;61:237-58.
- [161] Marshall MJ, Beliaev AS, Dohnalkova AC, Kennedy DW, Shi L, Wang Z, Boyanov MI, Lai B, Kemner KM, McLean JS. c-Type cytochrome-dependent formation of U (IV) nanoparticles by *Shewanella oneidensis*. *PLoS Biol.* 2006;4:e268.
- [162] Rabaey K, Verstraete W. Microbial fuel cells: novel biotechnology for energy generation. *Trends Biotechnol.* 2005;23:291-8.
- [163] Yang SH, Kwon KK, Lee HS, Kim SJ. *Shewanella spongiae* sp. nov., isolated from a marine sponge. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2006;56:2879-82.
- [164] Yoon JH, Yeo SH, Kim IG, Oh TK. *Shewanella marisflavi* sp. nov. and *Shewanella aquimarina* sp. nov., slightly halophilic organisms isolated from sea water of the Yellow Sea in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2004;54:2347-52.
- [165] MacLeod RA. The question of the existence of specific marine bacteria. *Bacteriol Rev.* 1965;29:9.
- [166] Haard NF. A review of proteolytic enzymes from marine organisms and their application in the food industry. *J Aquat Food Prod Technol.* 1992;1:17-35.
- [167] Feller G, Narinx E, Arpigny JL, Aittaleb M, Baise E, Genicot S, Gerday C. Enzymes from psychrophilic organisms. *FEMS Microbiol Rev.* 1996;18:189-202.
- [168] Ingleby B, Huddleston M. Quality control of ocean temperature and salinity profiles—Historical and real-time data. *J Mar Syst.* 2007;65:158-75.
- [169] Kasuya K, Inoue Y, Yamada K, Doi Y. Kinetics of surface hydrolysis of poly[(R)-3-hydroxybutyrate] film by PHB depolymerase from *Alcaligenes faecalis* T1. *Polym Degrad Stab.* 1995;48:167-74.
- [170] Thomsson E, Larsson C, Albers E, Nilsson A, Franzén CJ, Gustafsson L. Carbon starvation can induce energy deprivation and loss of fermentative capacity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69:3251-7.
- [171] Giuliano B, Donzelli G, Harman GE. Interavction of ammonium, glucose, and chitin regulates the expression of cell wall-degrading enzymes in *Trichoderma atroviride* strain P1. *Appl Environ Microbiol.* 2001;67:5643-7.
- [172] Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol.* 1975;98:503-17.
- [173] Smith JA, Zou H, Rothstein R. PCR-based gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Mol Cell Biol.* 1995;5:270-7.
- [174] Miyazaki S, Takahashi K, Shiraki M, Saito T, Tezuka Y, Kasuya K. Properties of a poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase from *Penicillium funiculosum*. *J Polym Environ.* 2000;8:175-82.
- [175] Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227:680-5.

- [176] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.
- [177] Bergmeyer HU, Gawehn K, Klotzsch H, Krebs HA, Williamson DH. Purification and properties of crystalline 3-hydroxybutyrate dehydrogenase from *Rhodopseudomonas spheroides*. *Biochem J.* 1967;102:423.
- [178] Nakada Y, Itoh Y. Identification of the putrescine biosynthetic genes in *Pseudomonas aeruginosa* and characterization of agmatine deiminase and N-carbamoylputrescine amidohydrolase of the arginine decarboxylase pathway. *Microbiology.* 2003;149:707-14.
- [179] Bray HG, James SP, Raffan IM, Ryman BE, Thorpe WV. The fate of certain organic acids and amides in the rabbit. 7. An amidase of rabbit liver. *Biochem J.* 1949;44:618.
- [180] Bork P, Doolittle RF. Proposed acquisition of an animal protein domain by bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992;89:8990-4.
- [181] Schober U, Thiel C, Jendrossek D. Poly(3-hydroxyvalerate) depolymerase of *Pseudomonas lemoignei*. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66:1385-92.
- [182] Mohapatra BR, Banerjee UC, Bapuji M. Characterization of a fungal amylase from *Mucor* sp. associated with the marine sponge *Spirastrella* sp. *J Biotechnol.* 1998;60:113-7.
- [183] Hu Y, Fu C, Huang Y, Yin Y, Cheng G, Lei F, Lu N, Li J, Ashforth EJ, Zhang L, Zhu B. Novel lipolytic genes from the microbial metagenomic library of the South China Sea marine sediment. *FEMS Microbiol Ecol.* 2010;72:228-37.
- [184] Winterhalter C, Liebl W. Two extremely thermostable xylanases of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* MSB8. *Appl Environ Microbiol.* 1995;61:1810-5.
- [185] Hårdeman F, Sjöling S. Metagenomic approach for the isolation of a novel low-temperature-active lipase from uncultured bacteria of marine sediment. *FEMS Microbiol Ecol.* 2007;59:524-34.
- [186] Cavicchioli R, Siddiqui KS, Andrews D, Sowers KR. Low-temperature extremophiles and their applications. *Curr Opin Biotechnol.* 2002;13:253-61.
- [187] Watanabe S, Takada Y, Fukunaga N. Purification and characterization of a cold-adapted isocitrate lyase and a malate synthase from *Colwellia maris*, a psychrophilic bacterium. *Biosci, Biotechnol, Biochem.* 2001;65:1095-103.
- [188] Fukui T, Narikawa T, Miwa K, Shirakura Y, Saito T, Tomita K. Effect of limited tryptic modification of a bacterial poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase on its catalytic activity. *Biochim Biophys Acta.* 1988;952:164-71.
- [189] Hiraishi T, Hirahara Y, Doi Y, Maeda M, Taguchi S. Effects of mutations in the substrate-binding domain of poly [(R)-3-hydroxybutyrate](PHB) depolymerase from *Ralstonia pickettii* T1 on PHB degradation. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72:7331-8.

業績目録

関連論文

第2章 【海洋環境からの P(3HB)分解 *Shewanella* 属細菌の単離と特徴付け】

Sung CC., Tachibana Y., Suzuki M., Hsieh WC., Kasuya K. Identification of a poly(3-hydroxybutyrate)-degrading bacterium isolated from coastal seawater in Japan as *Shewanella* sp., *Polym. Degrad. Stabil.* 2016; 129: 268-274.

第3章 【海洋性 *Shewanella* 属細菌由来の熱不安定性 P(3HB)分解酵素の特徴付け】

Sung CC., Tachibana Y., Kasuya K. Characterization of a thermolabile poly (3-hydroxybutyrate) depolymerase from the marine bacterium *Shewanella* sp. JKCM-AJ-6,1 α ., *Polym. Degrad. Stabil.* 2016; 129: 212-221.

参考論文

Hsieh WC., Chen GC., Sung CC., Kasuya K., Tachibana Y., Chen CH., Chen M., Ling TR., Chang CP. Thermolability, enzymatic degradation and aminolysis of solution-grown single crystals of novel poly (ethylene succinate-co-5mol% trimethylene succinate)s. *J. Polym. Res.* 2015; 22:1-9.

謝辞

本研究を遂行し本博士論文をまとめるにあたり、5年前の来日以来、博士前期・後期課程を通して、終始ご指導ご鞭撻を頂きました、群馬大学大学院理工学府理工学専攻物質・生命理工学領域、粕谷健一教授に心より感謝申し上げます。また、本博士論文の審査の労をねぎらうとともに、ご指導頂きました、群馬大学大学院理工学府理工学専攻物質・生命理工学領域、土橋敏明教授、同、山延健教授、群馬大学大学院理工学府理工学専攻環境創生理工学領域、渡邊智秀教授、群馬大学大学院理工学府理工学専攻物質・生命理工学領域、行木信一准教授に心より感謝申し上げます。

本博士論文の執筆にあたっては、実験の指導や、建設的なコメントを頂きました、群馬大学大学院理工学府理工学専攻物質生命理工学領域、橘熊野助教および群馬大学への留学のお手伝いや、日本で生活するための貴重なご助言を頂いた、台湾の義守大学医学院生物科技学系、謝文権准教授に心より感謝致します。また、最後まで一緒に頑張ってきた環境調和型材料科学研究室の同期の皆様、研究を手伝ってくれた後輩達に深く感謝しております。

最後に、研究者の道を志している筆者に理解を示し、日本での留学生活を支えてくれた両親や、温かい励ましをいつも送り続けてくれた台湾の家族全員に心より感謝します。