

学位論文

脂肪族芳香族ポリエステルの中温環境下での生分解

群馬大学大学院理工学府

室井 文篤

目次

はじめに	3
第1章 序論	4
脂肪族芳香族共重合ポリエステル開発の歴史	5
ポリ（ブチレンアジペート-コーテレフタレート）（PBAT）の材料特性	6
PBAT の環境分解性	7
PBAT 分解微生物および分解酵素	7
PBAT の使用用途	9
微生物と植物の相互作用	10
本研究の目的	11
第2章 好気性中温性細菌 <i>Bacillus pumilus</i> 由来ポリ（ブチレンアジペート-コーテレフタレート）加水分解酵素の特徴づけ	13
2-1 実験	14
試薬	14
微生物，プライマー，およびベクター	14
PBAT 分解細菌の単離と同定	15
単離株の各種ポリエステル分解能評価	16
PBAT 分解菌の PBAT フィルム分解能評価	16
PBAT 分解細菌 NKCM3201 株の特徴づけ	16
遺伝子操作	17
PBATH _{Bp} のアミノ酸配列解析およびホモロジーモデリング	18
PBATH _{Bp} の変異解析	18
酵素精製	19
PBATH _{Bp} の特徴づけ	20
PBATH _{Bp} による PBAT および他のポリエステルフィルム分解試験	20
PBAT フィルム分解物の同定	21
PBATH _{Bp} の PBAT 水溶性分解物に対する分解能力	21
DNA 配列のアクセッション番号	22
2-2 結果	23
PBAT 分解細菌の単離および同定	23
PBAT 加水分解酵素（PBATH _{Bp} ）遺伝子（ <i>pbath_{Bp}</i> ）のクローニング	27

PBATH _{Bp} の 3D モデリング	29
推定触媒三残基の変異解析	29
PBATH _{Bp} の精製および特徴づけ	30
PBATH _{Bp} による PBAT フィルムおよび他のポリエステルフィルムの分解	33
PBATH _{Bp} による PBAT 分解物の同定および定量	35
2-3 考察	37
第 3 章 ポリ (ブチレンアジペート-コ-テレフタレート) が土壤微生物叢および植物の生育に及ぼす影響	39
3-1 実験	40
試薬	40
微生物, プライマーおよびベクター	40
PBAT フィルムの作製	43
土壤埋設試験	43
土壤埋設した PBAT フィルムの表面形態観察	44
土壤埋設した PBAT フィルムの分子量測定	44
ポリマーゼ連鎖反応-変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (PCR-DGGE) 解析	44
DGGE バンドの DNA 解析	45
植物栽培試験	46
3-2 結果	47
PBAT フィルムの土壤分解	47
PBAT フィルム分解土壤の微生物叢解析	48
土壤中の細菌および真菌の存在比率	52
<i>Brassica rapa</i> var. <i>chinesis</i> 栽培試験	53
3-3 考察	54
第 4 章 総括	56
参考文献	60
業績目録	71
謝辞	72

はじめに

ポリエチレン (PE) やポリプロピレン (PP) などの汎用プラスチックは、軽く、丈夫であり、食品容器や包装用資材、自動車部品、ならびに建築材など様々な用途に用いられている。農業分野において、プラスチックは、ビニールハウス、灌水チューブ、および土壤被覆材 (マルチフィルム) として利用されている。

マルチフィルムは、1960 年前半から農作物の商業生産に用いられており[1]、現在の農作物生産において重要な農業資材の一つとなっている (Fig. 1-a)。マルチフィルムを使用することにより、地温の調整[2-4]、土壤水分の保持[4,5]、雑草の生育抑制[4]、および病害虫の防除[6]が可能となるため、農作物の生産量増加および質の向上が望める。これまでに、ブロッコリ[2]、キュウリ[3]、落花生[4]、オクラ[5]、チンゲンサイ[7]、イチゴ[8]、トマト[9]、メロン[10]、およびナス[11]など、多くの農作物の栽培にマルチフィルムが使用されている。近年、世界的な人口の増加に伴う食料需要の増大や[12]、気候変動に伴う農作物の不作など[13]、食料を取り巻く環境が変化する中で、安定的に食料を供給するための農業技術を確認することが求められている。農林水産省が発行した農業技術の基本指針 (平成 28 年) では、農作物の栽培において、マルチフィルムを有効利用することが謳われている。一方で、汎用プラスチックでできたマルチフィルムは自然環境中で分解されないため、使用後のマルチフィルムを回収、および処分しなければならず、労力ならびに費用がかかるため、農家への大きな負担になっている[14,15]。また、ポリ塩化ビニル製マルチフィルムの焼却処分に伴い放出される、ダイオキシンなどの有害物質による環境汚染も問題となっている[15]。加えて、マルチフィルムの回収後、土壤に残留したマルチフィルムが、土壤環境に様々な悪影響をもたらすことにより、持続可能な農業を維持できなくなることが懸念されている[16,17]。土壤残留マルチフィルムは、土壤の物理的構造を破壊することで、土壤中の毛管水や自然水の浸透を妨げ、土壤の吸水率に影響を及ぼす可能性がある。このことが原因で、土壤中の栄養分ならびに水分の移動が遅くなる恐れがある。また、残留マルチフィルムは農作物の根系の生育を阻害する可能性があることや、種子の出芽率に影響を与えることが示されている。実際に、残留マルチフィルムを多く含む土壤で、栽培された農作物 (綿および小麦) の生産量は減少した。この他に、耕運機や播種機にマルチフィルムが絡まり、作業性が低下することや、景観が損なわれることも問題となっている[17]。

このような背景から、生分解性プラスチックを用いて作製された、生分解性マルチフィルムに注目が集まっている[18-23]。生分解性マルチフィルムは、使用後に農作物の残渣と共に土壤にすき込むことにより、土壤中に存在する微生物により水と二酸化炭素に無機化されるため [24-25]、オンサイト処理が可能である (Fig. 1-b)。従って、生分解性マルチフィルムは非生分解性マルチフィルムの代替品として期待されている。

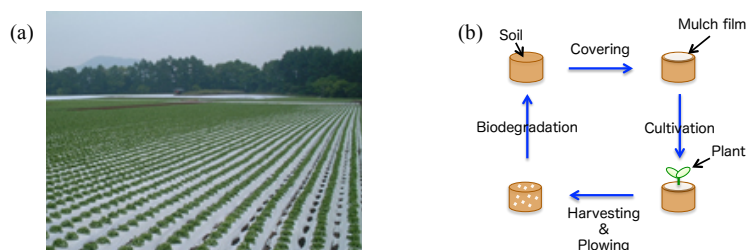


Fig. 1. Plastic mulch films (a)(JBPA home page : http://www.jbpaweb.net/gp/gp_product.htm) and onsite disposal of biodegradable plastic mulch films (b).

第1章

序論

脂肪族芳香族共重合ポリエステル開発の歴史

PE や PP などの汎用プラスチックは、丈夫であり安定性を有している。一方で、脂肪族ポリエステルは、微生物により分解されることが知られている[26-29]。一般的にプラスチックには長期安定性が求められているため、微生物により分解されることは、望ましくない[30,31]。しかし、汎用プラスチックは、自然環境中に放出された後も、分解されずに蓄積され、深刻な環境問題を引き起こすことが明らかになってきた[32,33]。このような背景から、微生物により分解される脂肪族ポリエステルが再び注目されている[34-42]。1980年代には、微生物が生産する脂肪族ポリエステルであるポリヒドロキシアルカン酸（製品名:Biopol）の商業生産が始まっている[43]。これに加えて、合成技術の改良により、1980年代から1990年代にかけて、化学合成脂肪族ポリエステルである、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-コアジペート）（PBSA）も生分解性プラスチックとして商業生産され始めた[42]。しかしながら、脂肪族ポリエステルは熱的・機械的特性に制限があるため、様々な用途に利用することは困難であった[39,44]。一方、ポリエチレンテレフタレート（PET）やポリブチレンテレフタレート（PBT）のような芳香族ポリエステルは、生分解性を示さないが、優れた熱的・機械的特性を有する[45]。Wittらは、優れた材料特性を有する生分解性ポリエステルの創製を目指して、脂肪族芳香族共重合ポリエステルである、ポリ（ブチレンアジペート-コアジペート-コアジペート）（PBAT）、ポリ（エチレンアジペート-コアジペート）（PEAT）、およびポリ（プロピレンアジペート-コアジペート）（PPAT）を合成した[44]。これら脂肪族芳香族共重合ポリエステルは土壌環境およびコンポスト環境中で、生分解性を示すことがわかった[44]。これらポリエステルの中で、特に優れた材料特性を有する PBAT は[46]、Ecoflex という商品名で、現在 BASF 社から生産、販売されている（Fig. 2-a）。

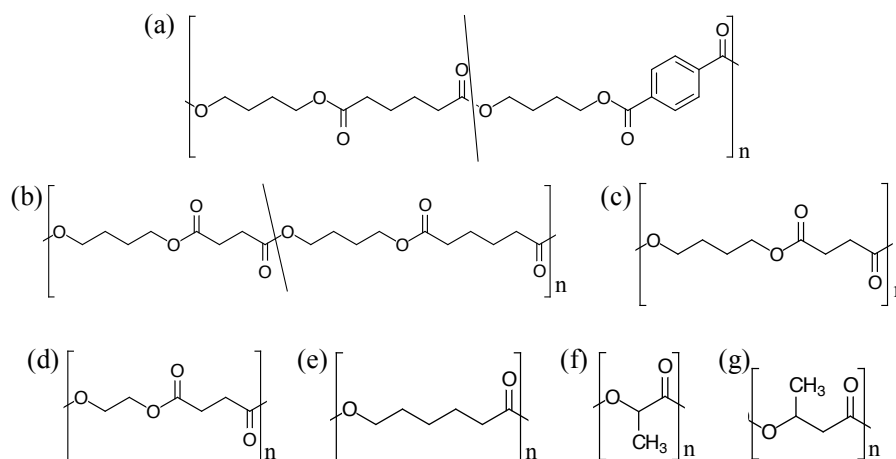


Fig. 2. Chemical structures of poly(butylene adipate-co-terephthalate) (PBAT) (a), poly(butylene succinate-co-adipate) (PBSA) (b), poly(butylene succinate) (PBSu) (c), poly(ethylene succinate) (PESu) (d), and polycaprolactone (PCL) (e), poly(lactic acid) (PLA) (f), and poly(3-hydroxy butyrate) (P(3HB)) (g).

ポリ（ブチレンアジペート-コ-テレフタレート）（PBAT）の材料特性

アジピン酸ユニット（脂肪族ユニット，A）およびテレフタル酸ユニット（芳香族ユニット，T）の組成比（A:T）が異なるPBAT（A:T=69:31~52:48）が合成され，材料特性評価が行われた[46]。PBATの融点は，テレフタル酸ユニットの割合と共に上昇した（Table 1）。組成比（A:T）が，69:31および52:48のPBATの融点は，それぞれ80°Cおよび137°Cであった[46]。一方，PBATの引張り強度は，芳香族ユニットの割合増加に伴い（A:T=69:31~61:39）大きくなった（Table 1）。しかし，芳香族ユニットの割合が39 mol%以上（A:T=69:31~52:48）のPBATの引張り強度は，ほぼ同じ値であった。対照的に，PBATの破断伸度はテレフタル酸ユニットの割合が45 mol%未満までは，ほぼ一定であったが，45 mol%以上では低下し，堅い材料になることがわかった。Table 2にPBAT（Ecoflex）およびPEの熱的・機械的特性を示す。PBAT（Ecoflex）は，PEと同等の融点を持ち，PE以上の引張り強度および破断伸度を有している[47]。加えて，優れたフィルム加工性を有することから，汎用プラスチックの代替として期待される[47]。

Table 1. Relationship between melting temperature, mechanical properties, and content of terephthalic acid (mol %) of PBAT [46].

Polyester ^a	M_w (g/mol) ^b	M_w/M_n	T_m (°C)	σ_R (N/mm ²) ^c	ϵ_R (%) ^c	ΔH (J/g)	Θ (deg) ^c
BTA 31/69	43,100	1.9	79	7.8 ± 0.2	650 ± 50	7.7	57.9 ± 1.8
BTA 34/66	45,500	1.9	89	7.8 ± 1.6	440 ± 140	9.1	62.9 ± 1.2
BTA 36/64	43,800	2.0	93	8.9 ± 0.9	500 ± 130	12.0	68.3 ± 1.1
BTA 38/62	51,000	1.8	106	9.8 ± 0.8	430 ± 100	13.1	70.5 ± 1.4
BTA 39/61	47,100	1.9	110	12.1 ± 1.6	470 ± 100	15.6	71.6 ± 1.5
BTA 42/58	48,900	1.8	115	12.3 ± 1.3	450 ± 150	16.0	71.8 ± 2.2
BTA 44/56	45,000	1.9	119	13.9 ± 0.2	550 ± 100	17.5	74.3 ± 1.8
BTA 45/55	50,500	1.8	122	12.2 ± 1.2	380 ± 170	17.2	75.9 ± 2.2
BTA 47/53	49,500	1.8	129	11.7 ± 1.6	320 ± 120	21.4	79.6 ± 1.5
BTA 48/52	54,000	2.1	137	12.3 ± 0.1	180 ± 50	24.9	81.4 ± 0.9

^aStoichiometric compositions according to ¹³C-NMR analysis [4]. The copolyesters are abbreviated BTA (1,4-butanediol, terephthalic acid, adipic acid). Their nomenclature is as follows: poly(tetramethylene terephthalate)-co-(tetramethylene hexandioate). The ratio of the two acid components (mol%) is noted after the abbreviation (e.g., BTA 39/61: 39 mol% terephthalic acid and 61 mol% adipic acid).

^bBased on polystyrene calibration.

^cDetermined by use of melt pressed films.

Table 2. Thermal and mechanical properties of PBAT (Ecoflex) and general polymers

	Melting temperature (°C)	Tensile strength at break (MPa)	Elongation at break (%)	References
Ecoflex	110-115	36	820	[47]
LDPE	111	20	600	[47]

PBATの環境分解性

芳香族ユニットの割合が、PBATの生分解性に与える影響が評価された[44,46]。コンポスト環境中でのPBATフィルムの重量減少速度は、テレフタル酸ユニットの割合の増加に伴い低下した[44,46]。PBAT馴化培養により得られた微生物を用いて組成の異なるPBATフィルムを分解させたところ、重量減少速度は、テレフタル酸ユニットの割合と反比例し低下した[46]。また、土壌環境中においても、テレフタル酸ユニットの増加と共に、PBATの分解速度は低下した[44]。これらの結果から、テレフタル酸ユニットの割合が、PBATの生分解性に影響を及ぼすことが明らかとなった。また、環境条件がどのようにPBATの生分解性および加水分解性に影響を与えるかを評価するため、異なる組成のコンポストを用いて、PBATの分解試験が行われた。その結果、コンポスト中の微生物活性、およびコンポストの炭素と窒素の割合が、PBATの生分解速度に影響を及ぼすことが明らかとなった[48]。加えて、高温条件下では、非生物的加水分解もPBATの分解に寄与することが示された[48]。

PBAT分解微生物および分解酵素

一般に、生分解性ポリエステル完全分解では、微生物が生産した加水分解酵素により生分解性ポリエステルが分解された後（1次分解）、分解に伴い放出された分解物が、微生物体内に取り込まれ、代謝によって水と二酸化炭素に変換される（2次分解）（Fig. 3）[49]。

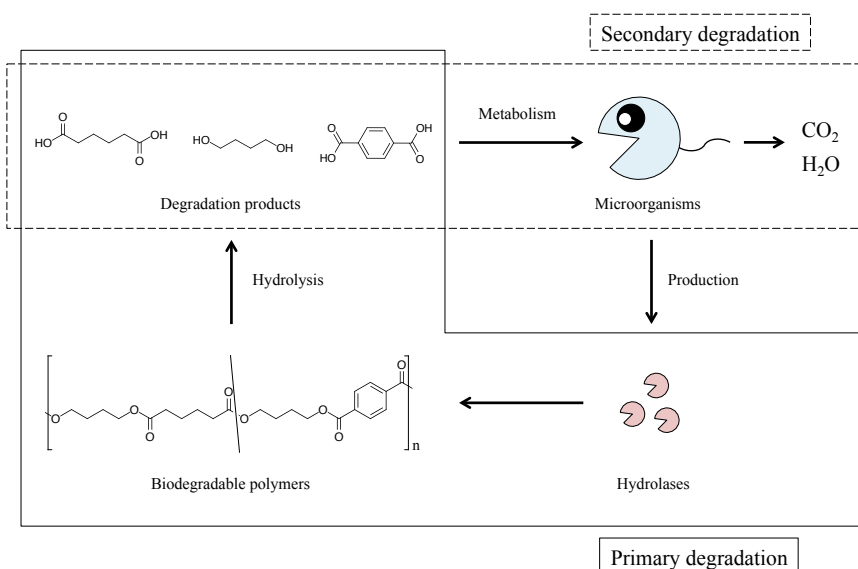


Fig. 3. Biodegradation mechanisms of biodegradable polymers. Primary and secondary degradations are surrounded by solid and broken lines, respectively.

Kleebergらは、高温コンポスト環境中におけるPBATの生分解機構を解明するため、コンポスト中から、PBATの分解に関与する微生物の単離を行った[50]。この実験によって高温コンポスト環境下では、好熱性放線菌がPBATの1次分解で重要な役割を担うことがわかった[50]。これら放線菌の中で、高いPBAT分解能を有する*Thermobifida fusca* K13g株の

特徴づけが行われた[50,51]。K13g 株は PBAT を分解する能力を有していたが、PBAT 分解物として生じるオリゴマーおよびモノマーを代謝しなかった[50,51]。コンポスト中で PBAT および PBAT モノマー（1,4-ブタンジオール、テレフタル酸、およびアジピン酸）は、無機化されるため[48,51]、コンポスト中における PBAT の完全分解は、K13g 株および他の微生物との共生系により達成されると結論づけられた[51]。より詳細な、PBAT の生分解機構を明らかにするため、*T. fusca* DSM 43793 株由来 PBAT 加水分解酵素が特徴づけされた。本酵素は、リパーゼなどの加水分解酵素のアミノ酸配列中にみられるコンセンサス配列（-GXSXG-）を有する、分子量 28.2 kDa のタンパクであった[52]。また、本酵素は、植物のクチクラ層に存在する、脂肪族ポリエステルであるクチンを分解する酵素（クチナーゼ）であることが明らかとなった[53,55]。河合らは、コンポストから単離された、ポリエステル分解細菌 *T. alba* AHK119 株が生産する、PBAT 分解酵素（Est119）のクローニングおよび特徴づけを行った[56,57]。Est119 は、コンセンサス配列である-GXSXG-を有する、分子量約 30 kDa のクチナーゼであった。Est119 の X 線結晶構造解析が行われ、Est119 は 9 つのヘリックス、および 9 つの β -シートからなる α/β ハイドロラーゼフォールドを有する、加水分解酵素であることがわかった（Fig. 4）[58]。Est119 は活性部位を覆うリッドドメインを有していなかった[58]。さらに、Est119 の遺伝子配列（*est119*）の上流に存在する、遺伝子配列（*est1*）がクローニングされ、Est1 の特徴づけが行われた。Est1 も Est119 と同様にクチナーゼであり、PBAT を加水分解した[59]。その他に、好熱性細菌、*Saccharomonospora viridis*[60]、*T. cellulolytica*[61]、および好熱性真菌 *Humicola insolens*[61]由来クチナーゼの PBAT 加水分解能が評価され、好熱性微生物が生産するクチナーゼは PBAT 加水分解活性を有していることが示された。

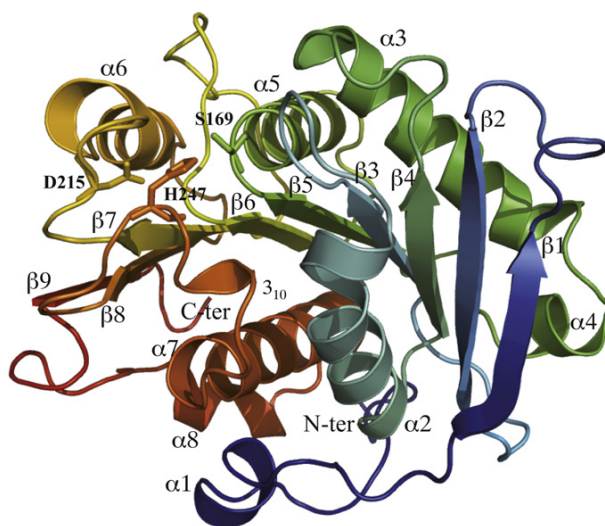


Fig. 4. Higher-order structure of Est119 [58].

ところで、PBAT が農業用途で用いられ、オンサイト処理されることを考えると、中温条件下での PBAT 分解に関与する微生物を知ることは重要である[62-64]。以前、我々の研究グループは、環境土壌から単離した真菌 *Isaria fumisorosea* NKCM1712 が中温条件下で PBAT フィルムを分解することを明らかにした[62]。 *I. fumisorosea* NKCM1712 株は優れた PBAT

フィルム分解能を有し、構成成分である 1,4-ブタンジオール、アジピン酸、およびテレフタル酸を資化することから、本株単独で PBAT を完全分解できることが示された[62]。これとは別に 29 種類の細菌および真菌による PBAT の分解試験が行われ、中温条件下でこれらの微生物により PBAT の分解が生じることが示された[63]。北本らは、真菌である *Paraphoma* B47-9 株、および *Cryptococcus flavus* GB-1 由来クチナーゼ様酵素が、中温条件下で PBAT を分解することを報告している[65,66]。最近になって、嫌気性細菌である *Pelosinus fermentans* および *Clostridium botulinum* 由来の PBAT 加水分解活性を有する酵素が特徴づけられた[67,68]。これらの株のうち *C. botulinum* 由来の酵素は、中温条件下で PBAT を加水分解することが可能で、リッドドメインを有する α/β ハイドロラーゼスーパーファミリーに属していた[68]。Table 3 および Table 4 に、現在までに特徴付けされている PBAT 分解微生物および加水分解酵素を示す。

Table 3. PBAT-degrading microorganisms.

Microorganisms	Phyla	Characteristics	Sources	References
<i>Thermobifida fusca</i> K13g	Actinobacteria	Thermophile	Compost	[50]
<i>Bacillus subtilis</i>	Firmicutes	Mesophile	ATCC*	[63]
<i>Leptothrix</i> sp. TB-71	Proteobacteria	-	-	[64]
<i>Isaria fumisorosa</i>	Ascomycota	Mesophile	Soil	[62]

*ATCC : American type culture collection

Table 4. PBAT hydrolases from microorganisms.

Microorganisms	PBAT hydrolases	Type	Reaction temperature	References
<i>T. fusca</i> DSM 43793	TfH	Cutinase	55 °C	[52,53]
<i>T. alba</i> AHK119	Est119	Cutinase	50 °C	[57]
<i>T. alba</i> AHK119	Est1	Cutinase	37 °C	[59]
<i>T. cellulosilytica</i>	The_Cut1	Cutinase	50 °C	[61]
<i>Humicola insolens</i>	HiC	Cutinase	50 °C	[61]
<i>Saccharomonospora viridis</i> AHK190	Cut190	Cutinase	48 °C	[60]
<i>Paraphoma-related fungal strain B47-9</i>	PCLE	Cutinase-like enzyme	30 °C	[65]
<i>Cryptococcus flavus</i> GB-1	CfCLE	Cutinase-like enzyme	30 °C	[66]
<i>Pelosinus fermentans</i> DSM 17108	PfL1	Lipase	50 °C	[67]
<i>Clostridium botulinum</i> ATCC 3502	Cbotu_EstA	Esterase	37 °C, 50 °C	[68]
<i>C. botulinum</i> ATCC 3502	Cbotu_EstB	Esterase	37 °C	[68]

PBATの使用用途

PBAT は、ゴミ袋、買い物袋、食品用容器、農業用容器、マルチフィルム、および燻蒸用シート等に使用されている[23,47,69]。現在、日本国内においては、35 種類のマルチフィルムが日本バイオプラスチック協会 (JBPA) に、生分解性マルチフィルムとして登録されている。PBAT は、15 種類の生分解性マルチフィルム製品に用いられており、他の生分解性プラスチック (ポリ乳酸 : PLA, PBSu, および PBSA) 由来の製品と比べて、より多くの用途で利用されている[69]。

微生物と植物の相互作用

土壌中には、植物の生育を促進する微生物（植物生育促進根圏細菌：PGPR および菌根菌）や、植物に病気をもたらす微生物（植物病原微生物）など、多種多様な微生物が存在している。これら微生物の中で、植物病原微生物は、農作物の病気を引き起こし、収穫量を低下させる原因となるため[70,71]、古くから研究の対象となってきた[72-76]。植物病原微生物は、セルラーゼやクチナーゼなどの細胞壁溶解酵素を生産し、植物組織を溶解して植物内に侵入する[77,78]。その後、屍体栄養性病原微生物は、植物細胞を壊死させ、その細胞に含まれる栄養素を吸収し増殖する[79]。一方、生体栄養性病原微生物は、植物細胞を壊死させずに、生かしたまま宿主の細胞から栄養成分を吸収する[79]。我が国においては、植物病原真菌による病害が最も多いことが報告されている[80]。

一方、植物は体内に侵入した植物病原微生物に対応するための免疫系をもつことが知られている[81-83]。植物は、病原微生物が侵入した際に植物の細胞壁の分解により生じた分解物[82]、あるいはフラジェリン、ペプチドグリカン、およびキチンなどの病原微生物の構成要素を認識し[84]、抗菌物質であるファイトアレキシンの生産[85,86]、グルカナーゼやクチナーゼの生産[87,88]、および活性酸素種の生産[89]を行う。また、植物は、病原微生物を検知した部位にカロースやリグニンなどで構成されるパピラを形成することで、病原微生物の侵入を物理的に抑制することも知られている[83]。

植物生育促進根圏細菌（Plant growth-promoting rhizobacteria : PGPR）は、植物の根に定着し[90]、窒素固定[91,92]、リン酸塩の水溶化[93,94]、および植物ホルモンの生産[95]をすることにより、植物の生育を促進することが知られている。加えて、PGPR は、抗生物質生産や植物病原微生物の生育に必要なミネラルを制限することにより、植物病原微生物の生育を阻害することも報告されている[96,97]。菌根菌は、植物の根の内部あるいは外部に付着し、菌糸を用いて土壌中のミネラルおよび水分を植物に提供し、植物の生育を補助する[98,99]。これら植物生育促進作用を有する微生物は、植物から光合成により得られた炭素源を受け取っており、植物と相利共生の関係にある。

個々の植物および微生物間の相互作用に焦点が当てられる一方で、土壌微生物の集団（土壌微生物叢）が植物の生育に及ぼす影響についても研究が行われている。土壌微生物叢は、植物の花の数や開花時期、クロロフィルの量、および植物バイオマスに影響をもたらすことが知られている[100,101]。植物の二次代謝物量に対しても、土壌微生物叢の多様性が影響を及ぼすことが報告されている[102]。植物病原微生物による植物病の抑制に、土壌微生物叢が重要な役割を担っていることが示唆されている[103,104]。

本研究の目的

PBATは、生分解性マルチ材として利用されている生分解性プラスチックである。生分解性プラスチックは、使用中は安定であり使用後は速やかに生分解される必要がある。しかし、未だに生分解速度あるいは分解開始時期の制御は困難である。このため詳細な PBAT の生分解機構を明らかにすることは重要である。これまで、PBAT の生分解機構を解明するために、多くの研究が行われてきた。特に、コンポスト中における PBAT の生分解動態が調べられ、高温環境下で PBAT の分解に関与する微生物や酵素が見出された[50-53,57-61]。一方、PBAT は自然環境中でマルチ材として利用され、オンサイト処理されることを想定すると、中温条件下での PBAT 分解に関与する分解微生物や酵素についても理解する必要がある。以前粕谷らは、真菌 *Isaria fumisorosea* NKCM1712 が、中温条件下で PBAT を完全分解することを明らかにした[62]。また、細菌も中温条件下において PBAT の分解に関与することが示唆されている[63]。加えて、真菌および嫌気性細菌由来の酵素が中温条件下で PBAT の分解に関与することが明らかとなった[65,66,68]。一方、好気性細菌による詳細な PBAT の分解機構は明らかとなっていない生分解マルチは好気的な中温環境下で分解されるため、そのような環境で PBAT の分解に関与する好気性細菌および酵素を調べることは重要であると考えられる。

他方では、土壌への炭素源添加が、土壌微生物叢を変化させることが報告されている[105,106,107]。生分解性マルチ材の分解物は土壌中で炭素源となりうるため、生分解性プラスチックの土壌埋設が、土壌微生物叢へ与える影響を調べる必要がある[108,109,110]。しかしながら、今まで PBAT の土壌埋設による土壌微生物叢への影響は明らかになっていない。PBAT は植物病原微生物が生産するクチナーゼにより分解されることが知られており、植物病原微生物が PBAT を分解、資化することにより土壌中で集積される可能性がある。他方では、汎用プラスチック表面に、環境中の微生物叢とは異なる微生物叢が形成されることが明らかとなっている[111,112]。そのため、海洋においてプラスチックは、微生物の輸送体となり、微生物を広く拡散させ、生態系に影響を及ぼす可能性が示唆されている[111,112]。土壌においても、土壌埋設された PBAT フィルム近傍に、土壌微生物叢とは異なる微生物叢が形成され、土壌生態系に影響を及ぼす可能性が考えられる。さらに、PBAT の埋設により形成された土壌微生物叢が、植物に悪影響をもたらす可能性もあるが、詳細は不明である。

これらのことを踏まえて、本博士論文では、自然環境中での PBAT の生分解機構を解明するため、PBAT の分解に関与する、好気性中温性 PBAT 分解細菌およびその株が生産する PBAT 加水分解酵素を明らかにする。また、PBAT の土壌埋設が土壌微生物叢に与える影響を明らかにする。

第 1 章では本研究の背景ならびに目的を述べる。

第 2 章では PBAT 分解微生物として、好気性中温性 PBAT 分解細菌を単離し、特徴づけを行う。加えて、好気性中温性 PBAT 分解細菌由来 PBAT 加水分解酵素のクローニングおよび特徴づけを行い、酵素による PBAT 分解機構について議論する。

第 3 章では、PBAT を土壌埋設し、その分解に伴う微生物叢変化をポリメラーゼ連鎖反応-変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (PCR-DGGE) 法を用いて評価する。また、PBAT の土壌微生物叢が植物の生育に与える影響を評価する。

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

好気性中温性細菌*Bacillus pumilus*由来ポリ(ブチレンアジペート-コ-
テレフタレート)加水分解酵素の特徴づけ

2-1 実験

試薬

ポリ（ブチレンアジペート-コーテレフタレート）（PBAT）は BASF 社製 Ecoflex[®]を用いた。ポリカプロラクトン（PCL）はダイセル株式会社製，ポリエチレンサクシネート（PESu）は日本触媒株式会社製，ポリブチレンサクシネート（PBSu），およびポリ（ブレンサクシネート-コアジペート）（PBSA）は昭和高分子社製，ポリ（3-ヒドロキシブタン酸）（P(3HB)）は三菱ガス化学株式会社製，およびポリ乳酸（PLA）は島津製作所株式会社製を用いた（Fig. 2）。これらポリエステルは使用前に，クロロホルムに溶解し，メタノール中に再沈殿させ精製した。ポリエステルフィルム（1×1×0.1 cm³）は，ポリエステルを mini TEST PRESS-10（東洋精機製作所株式会社製）を用いて溶融プレス後，20 °C まで冷却することにより作製された。ポリエステルフィルムは，超純水およびメタノールで洗浄後，乾燥させて使用した。TaKaRa Ex Taq[®]，PrimeSTAR[®] HS DNA Polymerase，T-Vector pMD20，T4 DNA ligase，制限酵素および *Brevibacillus* 発現ベクター pNCMO2 はタカラバイオ株式会社から購入した。オリゴヌクレオチドはユーロフィンジェノミクス株式会社から購入した。その他の試薬は和光純薬工業株式会社および Sigma-Aldrich 株式会社から購入した。

微生物，プライマー，およびベクター

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 および Table 6 に示す。また，クローニングする PBAT 加水分解酵素（PBATH_{Bp}）遺伝子（*pbath_{Bp}*）の図を Fig. 5 に示す。

Table 5. Strains and plasmids used in this study.

Strains or plasmid DNAs	Genotype or description	References or sources
Strains		
<i>Bacillus pumilus</i> NKCM3101	PBAT-degrading bacterium isolated from soil	This study
<i>B. pumilus</i> NKCM3201	PBAT-degrading bacterium isolated from soil	This study
<i>B. pumilus</i> NKCM3202	PBAT-degrading bacterium isolated from soil	This study
<i>B. pumilus</i> KT1012	PESu-degrading bacterium	[144]
<i>Escherichia coli</i> DH5α	<i>supE44 ΔlacU169(φ80lacZΔM15) hsdR17 recA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	TOYOBO CO., LTD.
<i>E. coli</i> PBATH	<i>E. coli</i> DH5α harboring pMDLDP	This study
<i>Brevibacillus choshinensis</i> SP3	<i>Δimp Δemp</i>	Takara Bio Inc.
<i>B. choshinensis</i> PBATH	<i>B. choshinensis</i> SP3 harboring plasmid pNCLP	This study
<i>B. choshinensis</i> S77A	<i>B. choshinensis</i> SP3 harboring plasmid pNCLP-S77A	This study
<i>B. choshinensis</i> D133N	<i>B. choshinensis</i> SP3 harboring plasmid pNCLP-D133N	This study
<i>B. choshinensis</i> H156N	<i>B. choshinensis</i> SP3 harboring plasmid pNCLP-H156N	This study
Plasmids		
T-vector pMD20	Amp ^r , cloning of PCR products amplified with <i>Ex Taq[®]</i> DNA polymerase	Takara Bio Inc.
pMDLDP	pMD20 containing 1289 base pairs of cloned DNA sequence containing PBAT hydrolase (PBATH _{Bp}) gene from NKCM3201	This study
pNCMO2	Amp ^r , Nm ^r , <i>E. coli</i> - <i>B. choshinensis</i> shuttle vector, use for <i>Brevibacillus</i> expression system	Takara Bio Inc.
pNCLP	pNCMO2 containing open reading frame (ORF) of mature PBATH _{Bp} from NKCM3201	This study
pNCLP-S77A	pNCMO2 containing ORF of mature PBATH _{Bp} , whose Ser77 was changed to Ala	This study
pNCLP-D133N	pNCMO2 containing ORF of mature PBATH _{Bp} , whose Asp133 was changed to Asn	This study
pNCLP-H156N	pNCMO2 containing ORF of mature PBATH _{Bp} , whose Asp156 was changed to Asn	This study

Table 6. Primers used in this study.

Primer	Sequence	Position
Dep1	ATGAAAGTGWYGTAKTKAWGAAAAGGAGTTT	1 to 32
Dep2	TTAATTCGTATTYTGTCTCCRCCGYTCAGT	618 to 648
Dep3	CTTGTTCAAGAAGTGAATCTTCGTTTGAT	-543 to -513
Dep4	AATCAGATACGTATCAAAGCCAAGA	1405 to 1427
Dep5	TCTATGAAATCGATAGCATATAATTGG	204 to 230
Dep6	CAAATCAGAAAATTCTTTACACATCC	458 to 483
Dep7	AAGCATGTTCTACCTTACAAAATTCGG	-515 to -489
Dep8	TAATGATATTGTTATTACAAAACGGGACT	746 to 774
BrlipF	TCAGGACTGCAGAGCATAATCCAGTTGTGATG (<i>Pst</i> I)	103 to 129
BrlipR	AGAGTAGAATTCTTAATTCGTATTCTGTCCTC (<i>EcoR</i> I)	621 to 660
S77A-R	GTGGCTCATGCAATGGGCGGGGCGAACA (Mutation of Ser77 to Ala)	322 to 349
S77A-F	CCCGCCCATGTCATGAGCCACAATATCT (Mutation of Ser77 to Ala)	315 to 342
D133N-R	AGTTCAGCCAAATCTCATCGTCGTAACA (Mutation of Asp133 to Asn)	490 to 517
D133N-F	GACGATGAGATTGGCTGAACATAAACG (Mutation of Asp133 to Asn)	483 to 510
H156N-R	GCGTTGGCAATATCGGTCTATTAACCT (Mutation of His156 to Asn)	559 to 586
H156N-F	TAGACCGATATTGCCAACGCCATGGATC (Mutation of His156 to Asn)	552 to 579

Primers Dep1 to Dep8 were used for cloning of the PBAT hydrolase gene. Primers Dep1 to Dep4 were designed on the basis of genome sequence from *B. pumilus* strain SAFR-032 (Locus: CP000813, BPUM_2613) and lipase gene from *B. licheniformis* (Accession: CAB95850). Primers Dep5 to Dep8 were designed on the basis of sequence data of amplified DNA from *B. pumilus* strain NKCM3201. BrlipF and BrlipR were used for amplification of PBATH_{Bp} gene excluding its signal peptide sequence to construct a PBATH_{Bp} expression vector. Primers S77A-R, S77A-F, D133N-R, D133N-F, H156N-R, and H156N-F were used for mutation analyses of catalytic triad of PBATH_{Bp}.

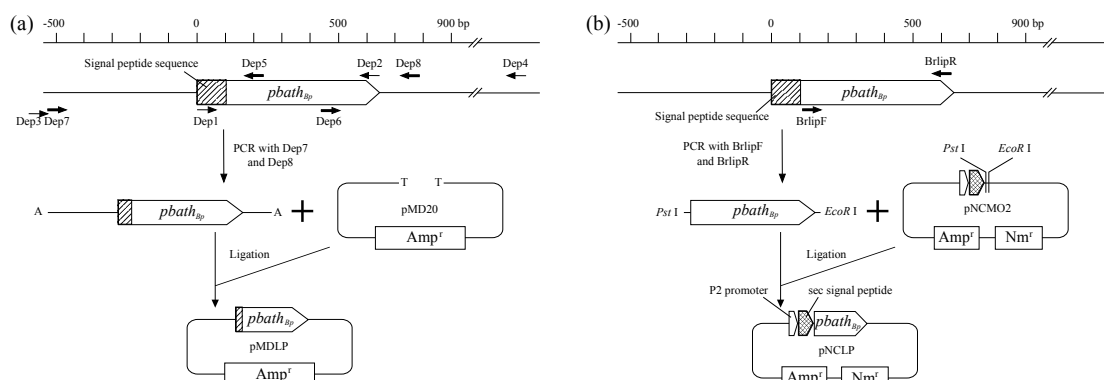


Fig. 5. Scheme of plasmid DNAs construction. (a) To clone PBATH_{Bp} gene (*pbath_{Bp}*), 8 primers were designed. Primers Dep1, Dep2, Dep3, and Dep4 were designed on the basis of genome DNA of *B. pumilus* SAFR-032 and lipase gene from *Bacillus licheniformis* (CAB95850). Primers Dep 5, Dep6, Dep7, and Dep8 were designed on the basis of sequence data of amplified DNA from strain NKCM3201. DNA amplified by PCR with a primer pair (Dep7 and Dep8) was ligated into pMD20. (b) To construct *Brevibacillus* expression system of PBATH_{Bp}, its gene excluding its signal peptide sequence was ligated into restriction sites (*Pst* I and *EcoR* I) of pNCMO2.

PBAT分解細菌の単離と同定

2 地点の畑地（群馬県渋川市：緯度 36 度 31 分 55.952 秒，経度 139 度 0 分 40.013 秒，および沖縄県南城市：緯度 26 度 8 分 31.8 秒，経度 127 度 44 分 57.7 秒）から採取した環境土壌（それぞれ黒ボク土および礫質土）を微生物摂取源として，クリアゾーン法[62]により PBAT 分解細菌を単離した。土壌（1 g）を超純水（10 mL）に懸濁し，この混合液を 10 分間静置した。その後，上清（100 μ L）を PBAT 乳化培地（KH₂PO₄（4.6 g/L），Na₂HPO₄ · 12H₂O（11.6 g/L），NH₄Cl（1.0 g/L），MgSO₄ · 7H₂O（0.5 g/L），FeCl₃ · 6H₂O（0.1 g/L），dried yeast extract（0.5 g/L），Plysurf（0.1 g/L），乳化 PBAT（0.2 %（w/v）），および寒天（1.5 %（w/v）），pH 7.0）[62]に塗布し，30 $^{\circ}$ C で保温した。コロニーの周辺にクリアゾーンを形成した細菌を

PBAT 分解細菌として選択し、固体 LB 培地 (dried yeast extract (5.0 g/L), polypeptone (10 g/L), NaCl (5.0 g/L), および寒天 (1.5 % (w/v)), pH 7.5) [62] を用いて、画線培養により純化した。PBAT 分解細菌を同定するため、単離株の 16S rDNA 配列を PCR 法により増幅した[144]。まず、PBAT 分解細菌のコロニーを滅菌超純水 (5.0 μL) で懸濁し、98 °C で 10 分間加熱後、氷水で急冷した。この懸濁液 (5.0 μL), *TaKaRa Ex Taq*[®] (0.5 units), 10×Ex Taq Buffer (1.0 μL), dNTP Mixture (1.0 μL : 各々 2.5 nmol), Primer 16Sf (0.2 μL : 4.0 pmol), および Primer 16Sr (0.2 μL : 4.0 pmol) を混合し、滅菌超純水でメスアップした (計 10 μL)。サーマルサイクルは 94 °C, 5 分を 1 サイクル, 94 °C, 20 秒 ; 55 °C 30 秒 ; 72 °C 90 秒を 25 サイクル, 72 °C 10 分を 1 サイクルとした。PCR 産物を T-Vector pMD20 に連結後、ダイデオキシ法により DNA 配列を解析した (ユーロフィンジェノミクス株式会社)。単離株に近縁な種を調べるため、NCBI のプログラムである nucleotide BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) を用いて、得られた 16S rDNA 配列を GenBank に登録されているデータと比較した。その後、DNA Data Bank of Japan (DDBJ) のプログラム ClustalW (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp>) を用いて、塩基配列のアラインメントを行い、プログラム MEGA6[113] を用いて、近隣結合法[114]により系統樹を発生させた。

単離株の各種ポリエステル分解能評価

単離株を各種ポリエステル (PBAT, PBSA, PCL, PESu, PHB, および PLA) 乳化培地に植菌し、30 °C で 2 週間培養後、クリアゾーン形成の有無を確認した。

PBAT分解菌のPBATフィルム分解能評価

単離株を液体 LB 培地 (3 mL) に植菌し、30 °C で一晩培養した。この前培養液 (30 μL) を、PBAT フィルムを含む液体基本培地 (KH₂PO₄ (4.6 g/L), Na₂HPO₄ · 12H₂O (11.6 g/L), NH₄Cl (1.0 g/L), MgSO₄ · 7H₂O (0.5 g/L), FeCl₃ · 6H₂O (0.1 g/L), および dried yeast extract (0.5 g/L), pH 7.0) (3 mL) に植菌し、30 °C で 10 日間振とう培養した (120 ストローク/分)。培養液からフィルムを回収し、メタノールおよび超純水で洗浄後、一晩減圧乾燥した。その後、フィルムの重量を測定した。コントロールとして分解株を含まない系を用意し、同様に行った。

PBAT分解細菌NKCM3201株の特徴づけ

PBAT 分解細菌 NKCM3201 株の詳細な特徴づけを行った。温度が本株の増殖に及ぼす影響を評価するため、本株を PBAT 乳化培地に植菌し、4, 20, 25, 30, 37, 40 および 50 °C で培養した。その後、コロニーおよびクリアゾーン形成の有無を確認した。本株の生理学および生化学的特性を API 20NE および API ZYM (bioMérieux 社製) を用いて評価した[144]。加えて、本株の PBAT モノマー (テレフタル酸, 1,4-ブタンジオール, およびアジピン酸) 資化能を評価した。PBAT モノマーをそれぞれ 0.2 % (w/v) 含む液体基本培地 (50 mL) に本株を植菌し、30 °C で振とう培養した。コントロールとして PBAT モノマーを含まない液体基本培地 (50 mL) に本株を植菌し、30 °C で振とう培養した。本株の資化能力は、24 時間培養後の培養液の濁度測定 (波長 600 nm) により評価された。

遺伝子操作

NKCM3201 株由来の PBAT 加水分解酵素 (PBATH_{Bp}) 遺伝子 (*pbath_{Bp}*) をクローニングした。本株由来ゲノム DNA (gDNA) を抽出し[144], この gDNA をテンプレートとして PCR 法により, *pbath_{Bp}* を増幅した。*pbath_{Bp}* を増幅するため, *B. pumilus* strain SAFR-032 由来ゲノム配列 (ロッカス: CP000813, BPUM_2613) および *B. licheniformis* 由来リパーゼ遺伝子 (アクセッション番号: CAB95850) に基づき, 4 種のプライマー (Dep1, Dep2, Dep3, および Dep4; Table 6, Fig. 5-a) を設計した。プライマー Dep1 および Dep2, gDNA, および TaKaRa Ex Taq[®] を用い, 説明書 (タカラバイオ株式会社) に従い PCR を行い, トリアシルグリセロール遺伝子の翻訳領域 (ORF) を増幅した (Fig. 5-a)。Table 7 に PCR のサーマルサイクルを示す。増幅した DNA 断片の配列解析を行い, その配列に基づき ORF の上流および下流配列を増幅するためのプライマー (Dep5 および Dep6) を設計した (Table 6, Fig. 5-a)。上流および下流配列の増幅にはそれぞれプライマー Dep3, Dep5 およびプライマー Dep4, Dep6 を用いた (Table 7, Fig. 5-a)。得られた DNA 断片の配列に基づき設計したプライマー (Dep7 および Dep8; Table 6) を用い, ORF の上流から下流配列を含む DNA 断片を増幅した (Table 7, Fig. 5-a)。最終的に得られた PCR 産物を, pMD20 にライゲーションした (本構築プラスミドを pMDLP とする。; Fig. 5-a)。pMDLP を有する形質転換体 *E. coli* DH5α の PBAT 加水分解活性を, 37 °C における PBAT 乳化培地上へのクリアゾーン形成の有無により確認した。

PBATH_{Bp} の発現系は *Brevibacillus choshinensis* SP3 株 (タカラバイオ株式会社) を用いて構築された。まず, 制限酵素部位 (*Pst* I および *Eco* R I) をそれぞれ含むプライマー BrlipF および BrlipR (Table 6) を用いて, SignalP 4.1 サーバーにより推測されたシグナルペプチド配列を除く PBATH_{Bp} をコードしている遺伝子配列を, PCR 法により増幅した (Fig. 5-b)。gDNA (300 ng), 5×PrimeSTAR Buffer (Mg²⁺ plus) (4.0 μL), dNTP Mixture (2.5 mM each; 1.6 μL), プライマー BrlipF および BrlipR (それぞれ 10 pmol), PrimeSTAR HS DNA polymerase (0.25 U), および滅菌超純水 (11.3 μL) を混合した。サーマルサイクルは, 98 °C, 3 分を 1 サイクル, 98 °C, 10 s; 55 °C, 15 s; 72 °C, 1 min を 30 サイクル, 72 °C, 5 分を 1 サイクルとした。PCR 産物を *Pst* I および *Eco* R I を用いて消化後, シャトルベクターである pNCMO2 のシグナルペプチド配列の下流に位置する *Pst* I および *Eco* R I 部位[115]にライゲーションし, pNCLP を構築した (Table 5, Fig. 5-b)。pNCLP をエレクトロポレーション法により *B. choshinensis* SP3 株に導入した。作業手順は, 製品説明書に従った (TaKaRa *Brevibacillus choshinensis* Electro-Cells, タカラバイオ株式会社)。PBATH_{Bp} 生産能を有する形質転換体 (*B. choshinensis* PBATH 株, Table 5) を PBAT 乳化培地上へのクリアゾーン形成能により選択した。また, *B. choshinensis* PBATH 株の他のポリエステルに対する分解能を, クリアゾーン法を用いて評価した。

Table 7. Thermal cycles for amplification of PBAT hydrolase gene.

PCR using Dep1 and Dep2		PCR using Dep3 and Dep5		PCR using Dep4 and Dep6	
94 °C for 120 s	1 cycle	94 °C for 120 s	1 cycle	94 °C for 120 s	1 cycle
↓		↓		↓	
94 °C for 30 s		94 °C for 30 s		94 °C for 30 s	
58 °C for 30 s	25 cycles	55 °C for 30 s	30 cycles	53 °C for 30 s	30 cycles
72 °C for 130 s		72 °C for 90 s		72 °C for 130 s	
↓		↓		↓	
72 °C for 600 s	1 cycle	72 °C for 600 s	1 cycle	72 °C for 600 s	1 cycle

PCR using Dep7 and Dep8		PCR using BrlipF and BrlipR	
94 °C for 120 s	1 cycle	98 °C for 180 s	1 cycle
↓		↓	
94 °C for 30 s		98 °C for 10 s	
57 °C for 30 s	25 cycles	55 °C for 15 s	30 cycles
72 °C for 130 s		72 °C for 60 s	
↓		↓	
72 °C for 600 s	1 cycle	72 °C for 300 s	1 cycle

PBATH_{Bp}のアミノ酸配列解析およびホモロジーモデリング

pbath_{Bp} の DNA 配列に基づき、PBATH_{Bp} のアミノ酸配列を GENETYX-MAC Ver.16 (ゼネティックス株式会社製) を用いて予測した。PBATH_{Bp} のシグナルペプチドを、SignalP 4.1 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) を用いて予測した。PBATH_{Bp} および相同的タンパク質のデンドログラムは、それらのアミノ酸配列を ClustalW (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp>) でアラインメントした後、MEGA6[113]を用いて構築された。PBATH_{Bp} のホモロジーモデリングは、PBATH_{Bp} のアミノ酸配列と 81%の相同性を有する *B. subtilis* lipase A (LipA ; li6w) のデータをテンプレートとして用い、SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org>) で行われた[116]。得られたモデルをプログラム VMD 1.9.2[117]、および UCSF Chimera[118]で可視化した。

PBATH_{Bp}の変異解析

PBATH_{Bp} の触媒三残基を決定するため、推定の触媒三残基である Ser77, Asp133, および His156 をそれぞれ Ala, Asn および Asn に置換した。3 種の変異遺伝子 S77A, D133N, および H156N は変異プライマーを用いたオーバーラップ PCR 法[119]により構築された (Fig. 6)。gDNA (300 ng), 5×PrimeSTAR buffer (Mg²⁺ plus) (4.0 μL), dNTP mixture (2.5 mM each, 1.6 μL), プライマーペア (S77A を構築するために BrlipF および S77A-R, BrlipR および S77A-F を用いた。D133N を構築するために BrlipF および D133N-R, BrlipR および D133N-F を用いた。H156N を構築するために BrlipF および H156N-R, BrlipR および H156N-F を用いた。) (各々 10 pmol), PrimeSTAR HS DNA polymerase (0.25 U) (タカラバイオ株式会社), および滅菌超純水 (11.3 μL) を混合した。サーマルサイクルは 98 °C, 3 min を 1 サイクル, 94 °C, 30 s ; 55 °C, 15 s ; 72 °C, 1 min を 25 cycle, 72 °C, 5 min を 1 サイクルした。増幅された各ペアの PCR 産物を連結するために、オーバーラップ PCR を行った (Fig. 6)。各々の DNA 断片 (1.0 μL ずつ), 5×PrimeSTAR Buffer (Mg²⁺ plus) (4.0 μL), dNTP Mixture (2.5 mM

each ; 1.6 μ L), PrimeSTAR DNA polymerase (0.25 U) および ddH₂O (11.3 μ L) を混合し, 98 °C, 3 min, 98 °C, 30 s ; 68 °C, 1 min を 5 サイクルした。この溶液にプライマー (BrlipF および BrlipR ; 10 pmol ずつ) を加え, 98 °C, 3 min, 98 °C, 30 s ; 68 °C, 1 min を 25 サイクルした。増幅した DNA を pNCMO2 に連結し, pNCLP-S77A, pNCLP-D133N, および pNCLP-H156N (Table 5) を構築した。該当遺伝子への変異導入は, DNA 配列解析により確認された。これら 3 種の変異導入プラスミドを *B. choshinensis* SP3 株に導入した。変異導入酵素の表現型は, 各組組換株の PBAT 乳化培地上でのクリアゾーン形成能の有無により評価された。

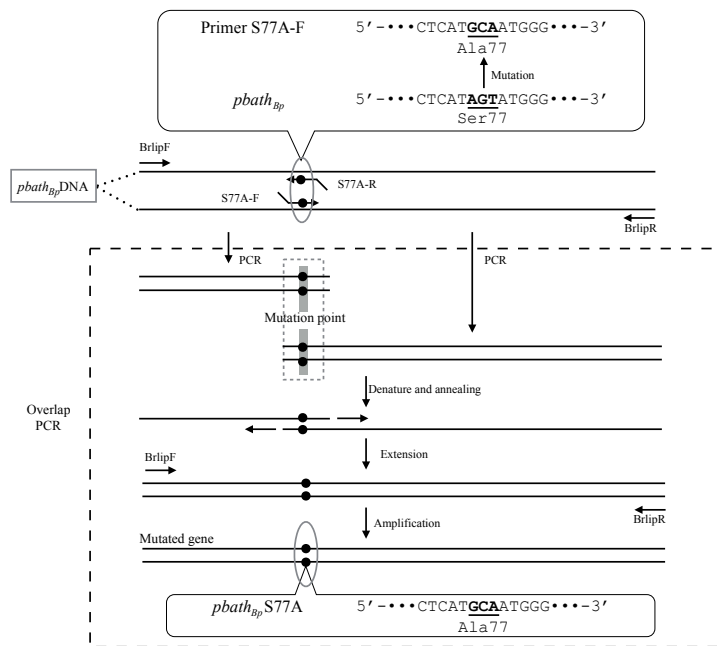


Fig. 6. Overlap PCR to amplify mutated gene of *pbath_{Bp}*.

酵素精製

PBATH_{Bp} 発現組換株である, *B. choshinensis* PBATH 株を, LB 培地 (15 mL) に植菌し, 30 °C で一晩振とう培養した。この前培養液 (200 μ L) を LB 培地 (500 mL) に植菌し, 37 °C で 24 時間振とう培養した。培養液を遠心分離し, 培養上清を回収した。60%硫酸アンモニウム沈殿により PBATH_{Bp} を含むタンパク質を沈殿させ, その沈殿物を遠心分離 (8000 rpm, 4 °C, 15 min) により回収した。沈殿物を 10 mM リン酸バッファー (pH 7.0) (5 mL) に溶解した。同バッファー (1 L) 中で透析後, 2 mL までアクアキープ (住友精化株式会社) を用いて濃縮し, HiLoad™ 16/60 Superdex™ 75 prep grade column (GE ヘスルケア株式会社製) にアプライした。移動相には 250 mM NaCl を含む 10 mM リン酸バッファーを用い, 流速を 0.8 mL/min とした。*p*-nitrophenyl acetate (PNPA) 加水分解活性を有するフラクションを回収し, 10 mM リン酸バッファー (1 L) 中で透析した。Laemmli 法を用いたドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) により純度を確認した[120]。また, BSA タンパク質を標準物質として, ブラッドフォード法を用いてタンパク質を定量した[121]。

PBATH_{Bp}の特徴づけ

PBATH_{Bp}の加水分解活性を評価するために、*p*-nitrophenyl ester 基質である *p*-nitrophenyl acetate (PNPA), *p*-nitrophenyl butyrate (PNPB), *p*-nitrophenyl caprylate (PNPC), *p*-nitrophenyl laurate (PNPL), *p*-nitrophenyl myristate (PNPM), および *p*-nitrophenyl palmitate (PNPP) に対する PBATH_{Bp}の加水分解活性を評価した。基質溶液 (*p*-nitrophenyl esters (1 mg), 1,4-ジオキサン (49.5 μL), およびノナエチレングリコールモノドデシルエーテル (49.5 μL)), PBATH_{Bp} (0.53 μg), および 50 mM リン酸バッファー (pH 7.0) (900 μL) を混合し, 30 °C で 30 分間, 吸収波長 405 nm における溶液の吸光度を測定した。コントロールとして基質溶液 (100 μL) および 50 mM リン酸バッファー (900 μL) の 405 nm における吸光度も同時に測定した。30 °C の 50 mM リン酸バッファー (pH 7.0) 中で, 1 分あたりに 1 μmol の *p*-nitrophenyl ester を加水分解する酵素活性を 1 Unit と定義した。加水分解に伴い発生した *p*-nitrophenol の mol 数を, *p*-nitrophenol の吸光係数を $1.85 \times 10^4 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ として, ランベルト・ベールの法則から求めた ($\text{Abs} = \epsilon c l$)。

PBATH_{Bp}の熱安定性を評価するため, PBATH_{Bp} (0.53 μg) を 4, 10, 20, 30, 40, 45, 50, および 60 °C で 30 分間保温した。また, pH 安定性を評価するため, 各種 1M バッファー (Glycine-HCl buffer : pH 2.0 ~ 3.0, Citrate-HCl buffer : pH 3.5 ~ 4.0, Citrate-NaOH buffer : pH 5.0 ~ 6.0, Phosphate-NaOH buffer : pH 6.0 ~ 8.0, Tris-HCl buffer : pH 7.0 ~ 9.0, Borate-NaOH buffer : pH 9.0 ~ 10.0, および Glycine-NaOH buffer : pH 10.0 ~ 10.5), および PBATH_{Bp} (0.53 μg) を混合し, 30 °C で 5 時間保温した。これら酵素の残存活性を, PNPA 基質を用いて評価した。

化学物質および金属イオンが酵素活性に与える影響も評価した。50 mM リン酸バッファー中で, PBATH_{Bp} (0.53 μg), および 5 種類の化学物質 (phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF ; 終濃度 0.2 mM), diazoacetyl-D,L-norleucine methyl ester (DAN ; 終濃度 1 mM), diisopropyl fluorophosphate (DFP ; 終濃度 0.2 mM), dithiothreitol (DTT ; 終濃度 5 mM), および EDTA (10 mM)) を混合し, 30 °C で 30 分保温した。その後, PNPA に対する PBATH_{Bp}の残存分解活性を評価した。加えて, PBATH_{Bp} (0.53 μg : 2.6 μmol) を等量および 2 等量の mol 数の金属イオン (KCl, MgCl₂, CaCl₂, CaCl₂ および EDTA, FeCl₂, MnCl₂, および ZnCl₂) と混合し, 30 °C で 5 分間保温した。化学物質および金属イオンの酵素活性に対する影響評価を, PBATH_{Bp}の残存分解活性評価により行った。

PBATH_{Bp}のリパーゼ活性をクリアゾーン法により評価した。PBATH_{Bp} (1.8 μg) を, 乳化オリーブオイルを含む寒天ゲル (0.2% 乳化オリーブオイル, 50 mM KH₂PO₄, 1.5%(w/v) 寒天, pH 7.0) に滴下し, 30 °C で 24 時間保温した。その後, クリアゾーン形成の有無を確認した。

PBATH_{Bp}によるPBATおよび他のポリエステルフィルム分解試験

ポリエステルフィルム (PBAT, PBSA, PESu, PCL, および P(3HB)) を, PBATH_{Bp} (3.5 μg) を含む 50 mM リン酸バッファー (pH 7.0) (1 mL) に浸漬させた。コントロールとして, PBATH_{Bp} を含まないリン酸バッファー (1 mL) にフィルムを入れた。これらを 30 °C で保温した。PBAT および P(3HB)フィルムは, 1 日ごとに新しい溶液に移され, 4 日間保温された。PBSA, PESu, および PCL は 1 日保温された。その後フィルムを回収し, 減圧乾燥後,

重量を測定した。分解速度 ($\text{mg}/\text{cm}^2/\text{day}$) は重量減少量 (mg) を見かけのフィルム表面積 (cm^2) および保温時間 (day) で除すことにより算出された。ゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) 法を用いて、フィルムの分子量を測定した。測定装置に HLC-8220GPC (東ソー株式会社製) を用い、カラムには TSKgelGMHXL, TSKgelG1000HXL, および TSKgelG2000HXL (東ソー株式会社製) を用いた。移動相にクロロホルムを用い、流速を $1.0 \text{ mL}/\text{min}$, カラムオーブンを 40°C として測定した。標準曲線は、ポリスチレンスタンダードを用いて作成された。マグネトロンスパッタ MSP-1S (真空デバイス株式会社製) を用いて Au-Pd コートされたフィルム表面形態を、走査型電子顕微鏡 (SEM) (SSX-550, 島津株式会社製) を用い、加速電圧 15 kV , 高真空条件下で観察した。

PBATフィルム分解物の同定

PBAT フィルム (3 枚) を, PBAT 分解酵素 ($7.0 \mu\text{g}$) を含むリン酸バッファー ($\text{pH}7.0$) (1 ml) に入れ, 30°C で 2 日間保温した。フィルムを回収後, 溶液に含まれる PBAT フィルム分解物を, 液体クロマトグラフィー質量分析 (LC/ESI-MS) により同定した。アセトニトリル/ 0.1% 蟻酸水溶液 ($30/70 \text{ (v/v)}$) (溶液 A) およびアセトニトリル (溶液 B) を移動相に用い, InertSustain™ C18 カラム ($2.1 \times 150 \text{ mm}$) (ジューエルサイエンス株式会社製) を固定相に用いた。流速を $0.2 \text{ mL}/\text{min}$, カラムオーブン温度を 40°C とし, Waters 1515 Isocratic HPLC Pump (日本ウォーターズ株式会社) を用いたグラジエント法により, 分解物を分離した。溶出プログラムは以下に示す通りである。測定開始から 10 分後まで, 溶液 A を送液し, 20 分後に溶液 B が 100% となるように直線的なグラジエントをかけた。その後, 30 分まで溶液 B を送液した。Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector を用い, 波長 254 nm における吸光度を測定し, 分解物を検出した。分解物は, ESI-MS により同定された。測定条件を以下に示す。(Capillary voltage 2.5 kV , Cone voltage 20 V , Source temperature 120°C , Desolvation temperature 350°C , Cone gas flow $50 \text{ L}/\text{h}$, および Desolvation gas flow $350 \text{ L}/\text{h}$)。MS で検出されなかった, ビス (4-ヒドロキシブチル) テレフタレート (BTB) は, テレフタル酸および 1,4-ブタンジオールから合成された, BTB の HPLC チャートおよび酵素分解物の HPLC チャートを比較することで, 同定された。BTB の合成は下記の通り行われた[122]。濃硫酸 ($100 \mu\text{L}$, 0.55 mmol) をテレフタル酸 (890 mg , 5.0 mmol) および 1,4-ブタンジオール (10.0 mL , 112 mmol) の混合液に加え, 100°C で 15 時間攪拌した。その溶液を室温まで冷却し, 5% 炭酸ナトリウム水溶液を加えた後, 酢酸エチルで抽出した。有機層を水および鹹水で洗浄し, 無水硫酸マグネシウムで乾燥した。酢酸エチルを減圧除去後, 996 mg (64%) の BTB を白色個体として得た。($^1\text{H NMR}$ (400 MHz , CDCl_3), δ 8.12 (4H, s), 4.41 (4H, t, $J = 6.8\text{Hz}$), 3.76 (4H, t, $J = 6.8\text{Hz}$), 1.95-1.88 (4H, m), 1.79-1.73 (4H, m), 1.45 (2H, brs) ppm.) 芳香環を含む分解物の定量は, テレフタル酸を標準物質として用い, LC-2000Plus シリーズ (PU-2080 Plus; LG-2080; AS-2051 Plus; CO-2060 Plus; UV-2075 Plus, 日本分光株式会社) を用いた HPLC により行われた。

PBATH_{Bp}のPBAT水溶性分解物に対する分解能力

PBAT 分解物を含むバッファー ($500 \mu\text{L}$) に PBATH_{Bp} ($3.5 \mu\text{g}$) をさらに加え, 30°C で保温した。その後, HPLC を用いて分解物を定量した。

DNA配列のアクセッション番号

単離した3株（NKCM3101, NKCM3201, およびNKCM3202株）の16S rDNA配列をそれぞれLC034565, LC034563, およびLC034564のアクセッション番号でDDBJに登録した。
pbath_{Bp} および変異遺伝子(S77A, D133N, およびH156N)のDNA配列は、それぞれLC189557, LC189558, LC189559, およびLC189560のアクセッション番号でDDBJに登録した。

2-2 結果

PBAT分解細菌の単離および同定

PBAT 乳化培地へのクリアゾーン形成能により (Fig. 7), 自然環境中より 3 株の PBAT 分解細菌 (NKCM3101, NKCM3201, および NKCM3202 株) を単離した。Fig. 8 は, 単離した PBAT 分解細菌および近縁種の 16S rDNA 配列に基づき発生させた系統樹を示す。これら 3 株は, Firmicutes 門に属する *Bacillus pumilus* に近縁であることが明らかとなった。



Fig. 7. Clearzone formation on PBAT-containing plate by PBAT-degrading bacteria.

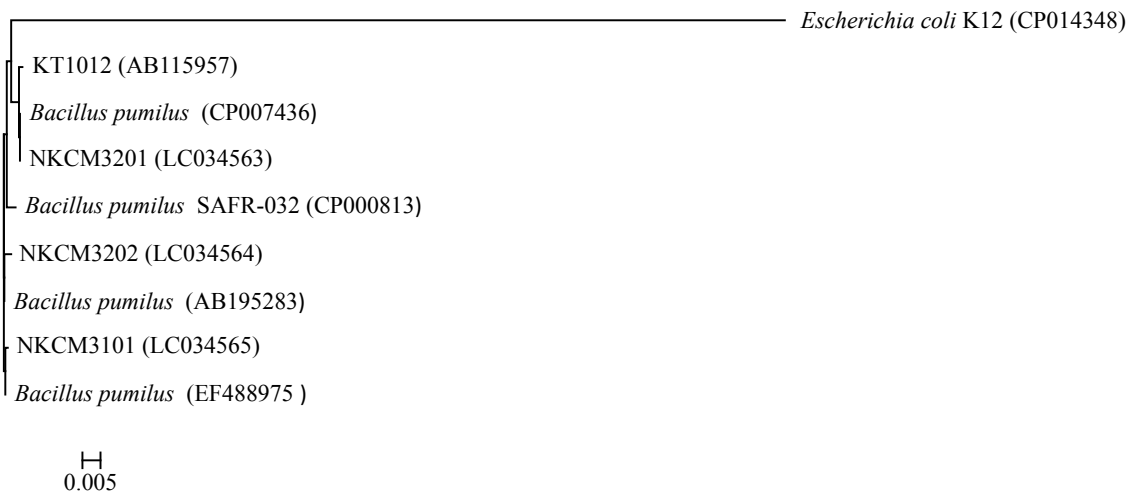


Fig. 8. Phylogenetic tree of 16S rDNA sequences of PBAT-degrading isolates and the related species. The phylogenetic tree was constructed with MEGA6 using the neighbor-joining method on the basis of 16S rDNA sequences, after the multiple sequence alignment was performed with program ClustalW at DNA databank of Japan (DDBJ). 16S rDNA sequence data of *Escherichia coli* was contained in the tree as an outgroup. Black bar indicates 0.5 % estimated sequence divergences.

これら 3 株は P(3HB)および PLA 乳化培地上にクリアゾーンを形成しなかったが, PBAT, PBSu, PBSA, PCL, および PESu 乳化培地上にクリアゾーンを形成した。一方, 以前粕谷らが PESu 分解菌として単離した KT1012 株は PBAT 乳化培地上にクリアゾーンを形成しなかった。加えて, これら 3 株は固体 PBAT フィルムを分解した (Table 8)。3 株の単離株のうち, 最も高い PBAT フィルム分解活性 ($12.2 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{day}$) を有する NKCM3201 株について詳細な特徴づけを行った。NKCM3201 株は 30°C から 40°C でよく育ち, 30°C から 37°C

で PBAT 乳化培地上にクリアゾーンを形成した (Table 9)。

Table 8. Clear zone formation on the polyester-containing plates and degradation rate of PBAT film by 9 bacteria.

Strains	Clear zone formation							Degradation rates of PBAT film ($\mu\text{g}/\text{day}/\text{cm}^2$)
	PBAT	PBSA	PBSu	PCL	PESu	P(3HB)	PLA	
<i>Bacillus pumilus</i> NKCM3101	+	+	+	+++	+++	-	-	$6.4 \pm 0.9^*$
<i>B. pumilus</i> NKCM3201	+	++	++	+++	+++	-	-	$12.2 \pm 0.7^*$
<i>B. pumilus</i> NKCM3202	+	++	++	+++	+++	-	-	$10.6 \pm 0.6^*$
<i>B. pumilus</i> KT1012 [144]	-	+	-	++	+++	-	-	ND
<i>Brevibacillus choshinensis</i> PBATH	+	++	++	+++	+++	-	-	ND
<i>B. choshinensis</i> S77A	-	-	-	-	-	-	-	ND
<i>B. choshinensis</i> D133N	-	-	-	-	-	-	-	ND
<i>B. choshinensis</i> H156N	-	-	-	-	-	-	-	ND
<i>B. choshinensis</i> SP3	-	-	-	-	-	-	-	ND

After these bacteria were cultured on the polyesters-containing plates at 30 °C, clear zones formed on the plate were confirmed. +++: Large clear zone was formed. ++: Clear zone was formed. +: Small clear zone was formed. ND: Not determined. *PBAT film degradation tests by 3 isolates were performed in n=5.

Table 9. Effects of temperatures on growth and clear zone formation of strain NKCM3201 on PBAT-containing plate.

Temperature (°C)	Growth	Clear zone formation
4	-	-
20	+	-
25	++	+
30	+++	++
37	+++	++
40	+++	+
50	+	-

+++: Growth was very well. Large clear zone was formed.

++: Growth was well. Clear zone was formed.

+: Growth was poor. Small clear zone was formed.

Fig. 9 は PBAT 構成成分である 1,4-ブタンジオール, アジピン酸, およびテレフタル酸をそれぞれ含む培地および含まない培地 (コントロール) で 30 °C, 24 時間 NKCM3201 株を培養した後, 培養液の濁度測定を行った結果を示している。培養後, PBAT モノマーを添加した培養液の濁度は, コントロールの濁度とほぼ同じであることから, 本株は PBAT 構成成分である 1,4-ブタンジオール, アジピン酸, およびテレフタル酸をほとんど資化しないことがわかった。API ZYM および API 20NE を用いて, NKCM3201 株の生理学的および生化学的特徴づけを行った結果を Table 10 および Table 11 に示す。

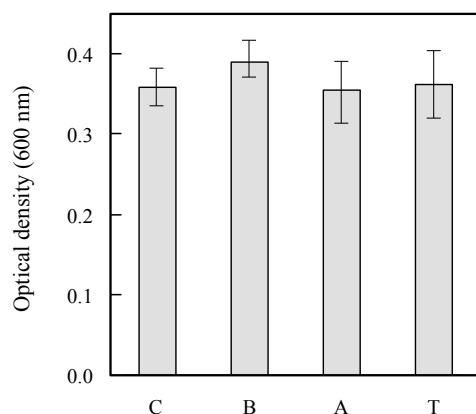


Fig. 9. Optical density of culture of *Bacillus pumilus* strain NKCM3201 cultivated in liquid media with or without PBAT monomers. After *B. pumilus* strain NKCM3201 was cultured in the media containing PBAT monomers, 1,4-butane diol (B), adipic acid (A), and terephthalic acid (T), individually, at 30 °C for 24 h under shaking culture condition (120 strokes per minute), optical densities (600 nm) of the cultures were measured. As a control, the strain was cultured in the medium without PBAT monomers (C). (n = 3)

Table 10. Physiological and biochemical properties of strain NKCM3201.

	NKCM3201	<i>B. pumilus</i> KT1012 [144]
Characteristics		
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-malic acid	+	+
Citrate	+	-
Phenyl acetate	-	-

Table 11. Enzyme production profile of strain NKCM3201.

Enzyme	NKCM3201	<i>B. pumilus</i> KT1012 [144]
Alkaline phosphatase	+	+
Esterase (C4)	+	+
Esterase lipase (C8)	+	+
Lipase (C12)	-	-
Leucine arylamidase	+	-
Valine arylamidase	-	-
Cysteine arylamidase	-	-
Trypsin	-	-
Chymotrypsin	-	-
Acid phosphatase	+	-
Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase	+	+
α -galactosidase	+	-
β -galactosidase	-	-
β -glucuronidase	-	-
α -glucosidase	-	-
β -glucosidase	-	-
N-acetyl- β -glucosaminidase	-	-
α -mannosidase	-	-
α -fucosidase	+	-

PBAT加水分解酵素 (PBATH_{Bp}) 遺伝子 (*pbath_{Bp}*) のクローニング

高次構造が解かれた *Thermobifida alba* AHK119 由来 PBAT 加水分解酵素は、リッドドメインを持たないリパーゼの一種であるクチナーゼと高い相同性を有している。この情報に基づき、NKCM3201 株由来 gDNA 上のオルソログな遺伝子をターゲットとしてクローニングした。既に全ゲノム情報が解明されており、NKCM3201 株と遺伝学的に近縁な *B. pumilus* SAFR-032 の gDNA 配列上に、LipA と高い相同性 (80 %) を有するリパーゼ遺伝子 (遺伝子座: BPUM_2613) を見出した。そこで、このリパーゼ遺伝子 (BPUM_2613) の DNA 配列に基づき、NKCM3201 株由来 *pbath_{Bp}* 増幅用のプライマーを設計した。

これらのプライマーを用いて増幅した遺伝子を有する組み換えプラスミド pMDLP を構築した (Table 5, Fig. 5-a)。本プラスミドを有する *E. coli* (*E. coli* PBATH, Table 5) は、PBAT 乳化培地上にクリアゾーンを形成した。さらに組み換え酵素の生産を最適化するため、組み換えプラスミド pNCLP を構築し、これを *Brevibacillus choshinensis* SP3 株に導入した (*B. choshinensis* PBATH 株)。*B. choshinensis* PBATH 株は、PBAT 乳化培地上にクリアゾーンを形成した (Table 8)。このことは、本遺伝子産物がこれら宿主株に PBAT 加水分解活性を付与したことを示している。Fig. 10 に、クローニングされた遺伝子配列を示す。648 bp のトリアシルグリセロールリパーゼ遺伝子 (PBAT 加水分解酵素遺伝子: *pbath_{Bp}* と表記する。) を含む 1289 bp の DNA がクローニングされた。PBATH_{Bp} の ORF は 215 アミノ酸残基で構成されており、*B. subtilis* lipase (LipA) のアミノ酸配列と 81% の相同性があった。本アミノ酸残基のうち、N 末端側から 34 アミノ酸残基がシグナルペプチド配列であると推測された。成熟タンパク質の分子量は 19.2 kDa と見積もられ、本酵素のアミノ酸配列および LipA のアミノ酸配列の比較から Ser77, Asp133, および His156 が触媒三残基であると推測された。加えて、中温性 *Bacillus* 由来 lipase のアミノ酸配列に特異的な A-X-S-X-G からなる、リパーゼボックスが確認された (Fig. 10)。

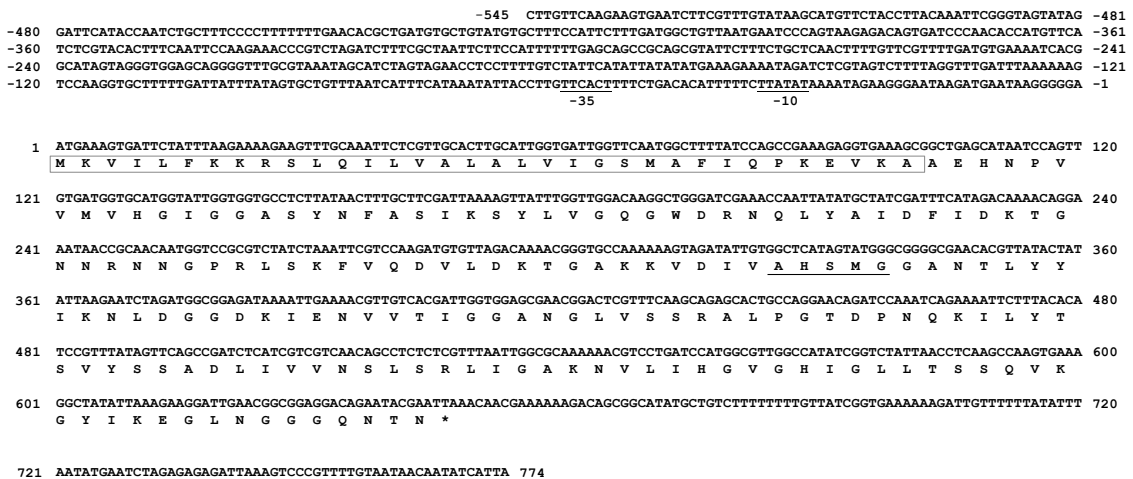


Fig. 10. Nucleotide sequence coding for PBATH_{Bp} from NKCM3201 and its amino acid sequence. White boxed sequence indicates a signal peptide deduced with SignalP 4.1 server. A consensus sequence of *Bacillus* lipases (A-X-S-X-G) is underlined.

Fig. 11 は、種々の加水分解酵素のアミノ酸配列に基づき作成された樹形図を示している。PBATH_{Bp} は、他の微生物由来 PBAT 加水分解酵素である、BTA1 (CAH17553), BTA2 (CAH17554), Est1[59], Est119[57], Cbotu_EstA[68], Cbotu_EstB[68], PCLE[65], および Pfl1[67]との相同性を示さない一方で、*Paenibacillus amylolyticus* poly(DL-lactic acid)分解酵素 (PlaA) [123], LipA[124], および *B. licheniformis* lipase[125]と高い相同性を示した (それぞれ 51, 81, および 97%)。

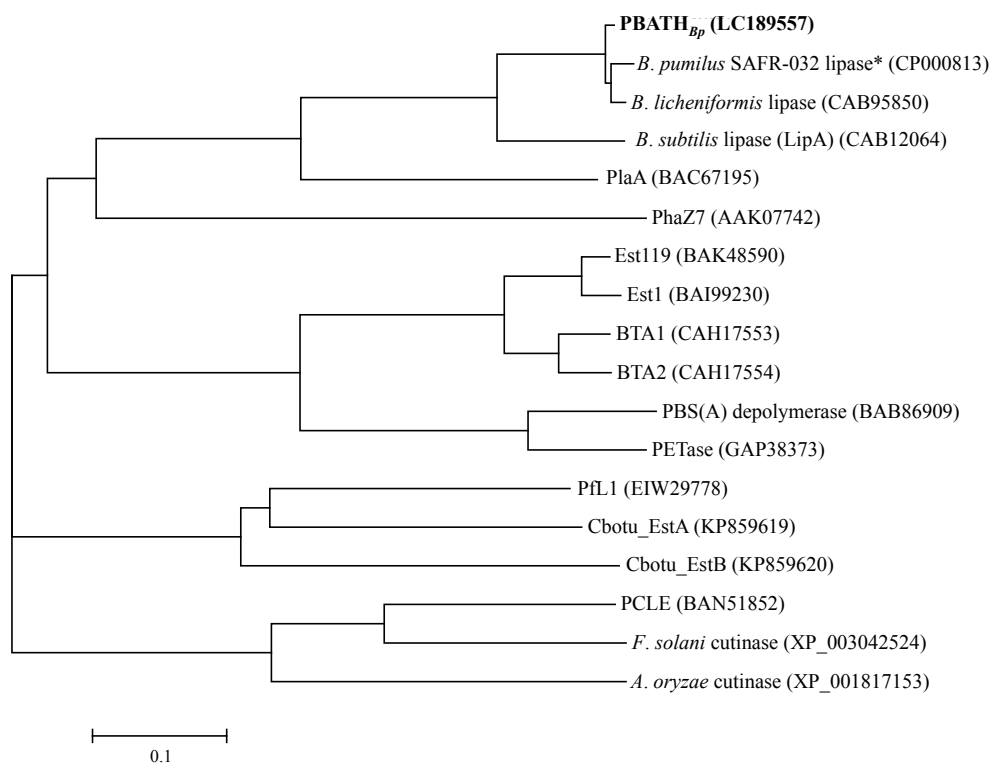


Fig. 11. Dendrogram of amino acid sequences of PBATH_{Bp} and the homologous proteins. Amino acid sequences of PBATH_{Bp} and the homologous proteins were aligned with program ClustalW. A dendrogram was constructed with MEGA6 on the basis of the alignment data. Black bar indicates 10% estimated sequence divergences (0.1). * It is encoded by a gene that is annotated as a lipase.

PBATH_{Bp}の3Dモデリング

テンプレートとして LipA の構造を用い、SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org>) で、PBATH_{Bp} の 3 次構造を予測した。PBATH_{Bp} のリボンおよびスペースフィリングモデルを Fig. 12 に示す。本酵素は、5 つの α ヘリックス、および 6 つの β シート構造を有する、 α/β 加水分解酵素フォールドファミリーに属していた (Fig. 12-a)。推測された触媒三残基である、Ser77, Asp133, および His156 は、PBATH_{Bp} の表面に存在することがわかった (Fig. 12-a)。また、PBATH_{Bp} はリッドドメインを持たないことがわかった (Fig. 12-a)。加えて、活性部位近傍に、脂質の脂肪鎖を収容する溝を有していた (Fig. 12-b) [124]。その溝には、疎水的アミノ酸残基である Ile12, Met78, Leu108, Leu134, Ile135, Val136, Val137, Leu140, Ile157, および Leu160 が存在した (Fig. 12-b)。

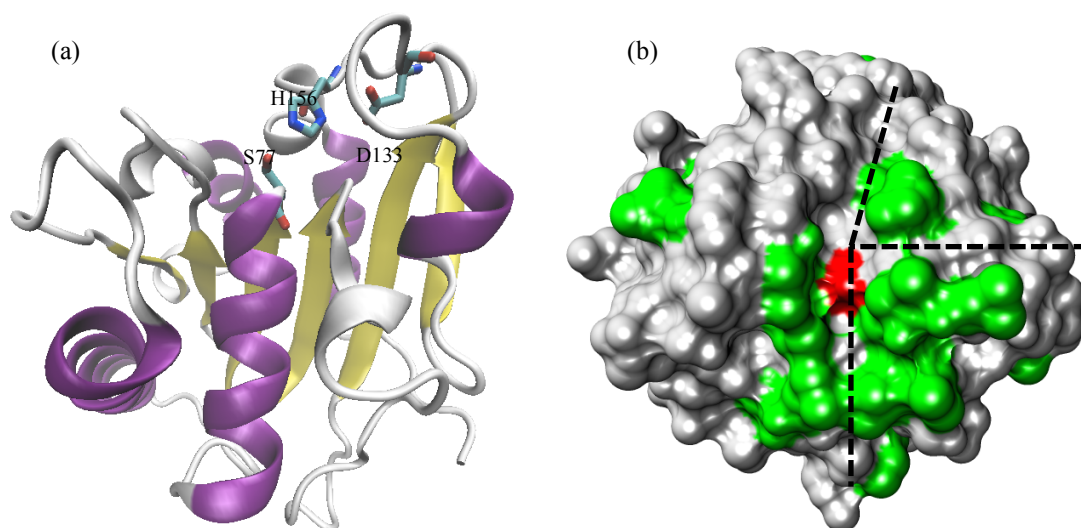


Fig. 12. Prediction model of PBATH_{Bp}. Model was constructed at SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org>) using *Bacillus subtilis* lipase (1i6w.1.A), which shares 81% amino acid sequence identity with PBATH_{Bp}, as a template. Ribbon model of PBATH_{Bp} was depicted in (a) using program VMD 1.9.2. Alpha helix and beta sheet structures were marked with purple and yellow, respectively. Catalytic triad, Ser77, Asp133, and His156, which were determined by mutational analysis, were shown in the model. Space-filling model of PBATH_{Bp}, which was observed from upper site of active site (Ser77 was marked with red), was depicted in (b) using program UCSF chimera. Dashed line shows groove formed in the vicinity of active site. Hydrophobic amino acid residues, which were marked with green, were observed in the vicinity of the active site.

推定触媒三残基の変異解析

PBATH_{Bp} の触媒三残基を決定するため、推定上の触媒三残基である Ser77, Asp133, および His156 をそれぞれ Ala77, Asn133, および Asn156 に置換した。変異タンパク質を発現する *B. choshinensis* S77A, D133N, および H156N 株は PBAT 乳化培地上にクリアゾーンを形成しなかった (Table 8)。従って、これら 3 残基が PBATH_{Bp} の触媒活性に必須であると結論付けた。

PBATH_{Bp}の精製および特徴づけ

精製された PBATH_{Bp} の特徴づけを行なうため、異種タンパク質の菌体外分泌生産に適している、*Brevibacillus* 発現系を用いた[115]。推測される成熟 PBATH_{Bp} タンパク質をコードする DNA 配列を pNCMO2 の制限酵素部位 (*Pst* I および *EcoR* I) に連結し、プラスミド pNCLP を構築した (Table 5, Fig. 5-a)。pNCLP を有する *B. choshinensis* PBATH 株は PBATH_{Bp} を分泌した。本株の培養上清から、硫酸アンモニウム沈殿およびゲルろ過クロマトグラフィーにより、PBATH_{Bp} を精製した。Fig. 13 に、ゲルろ過クロマトグラフィーによる PBATH_{Bp} の溶出曲線を示す。PNPA 加水分解活性を示したフラクションを回収した。Table 12 に PBATH_{Bp} の精製表を示す。最終的に得られた PBATH_{Bp} の収率は 4.0 % であり、精製度は 6.8 倍であった。Fig. 14 は、SDS-PAGE の電気泳動図を示している。レーン 3 に、約 19 kDa の分子量をもつ単一なバンドが確認された。このことから、電気泳動的に均一な PBATH_{Bp} を得ることができたと判断した。

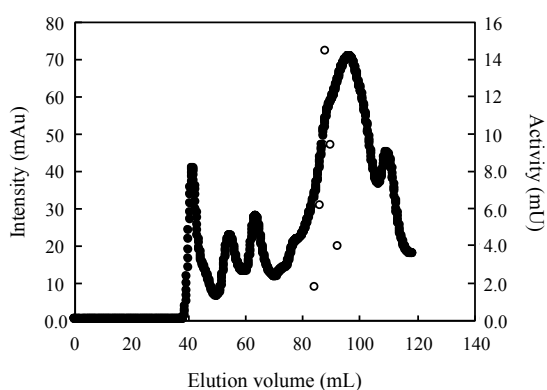


Fig. 13. Elution profile of PBATH_{Bp} using gel filtration chromatography. Closed circles showed eluate absorbance. Open circles showed PNPA hydrolytic activity of fractions (mU). Fractions which had PNPA hydrolytic activity were collected.



Fig. 14. SDS-PAGE analysis of PBATH_{Bp} heterologously expressed in *B. choshinensis* PBATH. M: protein marker, lane 1: culture supernatant, lane 2: ammonium sulfate fraction, lane 3: PBATH_{Bp} purified using gel filtration chromatography.

Table 12. Purification step of PBATH_{Bp} from *B. choshinensis* PBATH.

Sample	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Purification fold	Total activity (U)	Yield (%)
Culture supernatant	100	0.4	1	40	100
Ammonium sulfate fraction	48	0.7	1.8	34	85
Gel filtered fraction	0.6	2.7	6.8	1.6	4

温度および pH が PBATH_{Bp} の活性に与える影響を評価した。4, 10, 20, 30, および 40 °C で 30 分間保温では, PBATH_{Bp} の活性は安定であった (Fig. 15)。一方, 45 °C で保温された場合は, PBATH_{Bp} の活性は約 92%失われた。50 および 60 °C で保温後, 活性は完全に消失した。本酵素の活性は, pH 6.0 から 10.5 の範囲で安定していた (Fig. 16)。一方で, 低い pH (pH2.0 から 4.0) では, その活性は失われた。

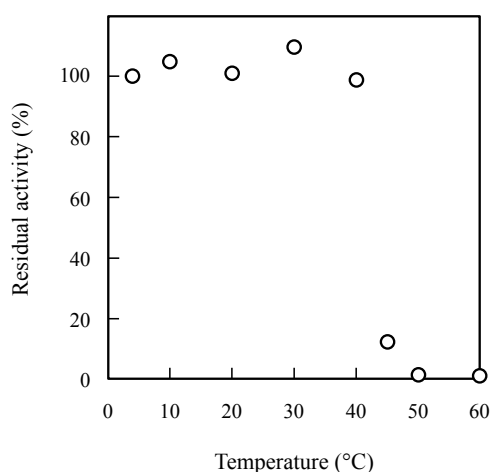


Fig. 15. Thermostability of PBATH_{Bp}. After PBATH_{Bp} was incubated at 4, 10, 20, 30, 40, 45, 50, and 60 °C for 30 min, hydrolytic activity toward PNPA was measured.

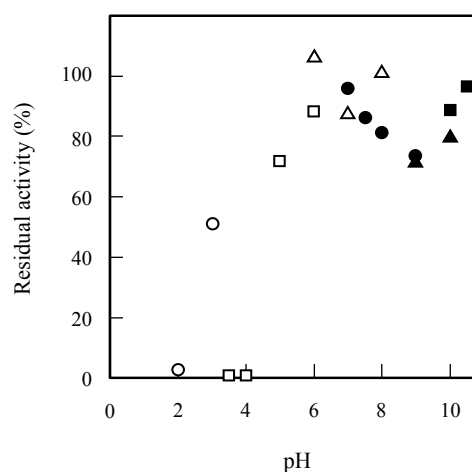


Fig. 16. pH stability of PBATH_{Bp}. After PBATH_{Bp} was incubated in several pHs buffers at 30 °C for 5 h, hydrolytic activity toward PNPA was measured. (Opened circle: glycine-HCl buffer; pH 2.0 to 3.0, opened square: citrate-HCl buffer; pH3.5 to 4.0, Citrate-NaOH buffer; pH 5.0 to 6.0, opened triangle: phosphate-NaOH buffer; pH 6.0 to 8.0, closed circle: tris-HCl buffer; pH 7.0 to 9.0, closed triangle: borate-NaOH buffer; pH 9.0 to 10.0, and closed square: glycine-NaOH buffer; pH 10.0 to 10.5).

様々な化学物質 (PMSF, DAN, DFP, DTT, および EDTA) が PBATH_{Bp} の加水分解活性に与える影響が評価された。3 種の化学物質, DAN, EDTA, および DTT はほとんど PBATH_{Bp} の加水分解活性に影響を与えなかった (それぞれ 92, 99, および 100 %の残存活性)。一方で, DFP および PMSF は, 本酵素の加水分解活性をそれぞれ 7 および 3 %まで低下させた (Table 13)。KCl および ZnCl₂ として添加された 2 種の金属イオンは PBATH_{Bp} の活性に大きな影響を与えなかった (それぞれ 88 および 90 %の残存活性)。本酵素が 2 等量の MgCl₂, FeCl₂, および MnCl₂ と保温された際は, 加水分解活性はそれぞれ 82, 68, および 73 %まで低下した。対照的に, 等量の CaCl₂ および EDTA の存在下において, 加水分解活性は変化しなかったが, CaCl₂ の存在下で, 本酵素の活性は 113 %まで上昇した (Table 14)。

Table 13. Effect of chemicals on hydrolytic activity of PBATH_{Bp}.

Chemicals	Residual activity (%)
None	100 ± 3
PMSF	3.0 ± 0.1
DFP	7.0 ± 0.8
DAN	92 ± 2
DTT	100 ± 2
EDTA	99 ± 4

After PBATH_{Bp} was incubated with metal ions for 5 min at 30 °C, hydrolytic activity toward PNPA was measured. (n = 5).

Table 14. Effect of metal ions on hydrolytic activity of PBATH_{Bp}.

Chemicals	Residual activity (%)	
	Enzyme : metal ion = 1 : 1	Enzyme : metal ion = 1 : 2
None	100 ± 3	100 ± 3
KCl	89 ± 5	88 ± 3
MgCl ₂	84 ± 2	82 ± 5
CaCl ₂	112 ± 4	113 ± 10
CaCl ₂ (EDTA)*	94 ± 4	99 ± 13
FeCl ₂	89 ± 2	68 ± 1
MnCl ₂	83 ± 2	73 ± 7
ZnCl ₂	91 ± 8	90 ± 17

After PBATH_{Bp} was incubated with metal ions for 5 min at 30 °C, hydrolytic activity toward PNPA was measured. (n = 5).

*PBATH_{Bp} was incubated with CaCl₂ in the presence of equal mol of EDTA.

PBATH_{Bp}の基質特異性を、*p*-nitrophenyl esters を本酵素の基質として用い、評価した。Fig. 17は、30 °Cにおける本酵素の様々な *p*-nitrophenyl esters に対する加水分解活性を示している。本酵素は最も短い炭素鎖長 (C = 2) を有する PNPA に対して最も高い加水分解活性を示した。本酵素の加水分解活性は、*p*-nitrophenyl esters の炭素長が長くなるにつれて低下した。PNPL, PNPM, および PNPP に対する本酵素の加水分解活性は、PNPA に対する活性より19倍低かった。また、本酵素は、30 °Cで24時間保温後、オリーブオイル含有寒天上にクリアゾーンを形成した (Fig. 18)。この結果は、本酵素がリパーゼ活性を有することを示している。

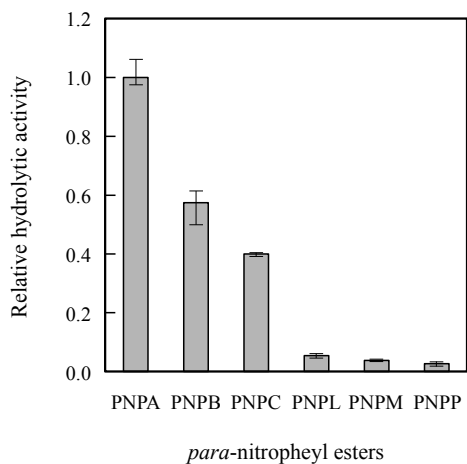


Fig. 17. Relative hydrolytic activity of PBATH_{Bp} to 6 *para*-nitrophenyl esters (PNPA, PNPB, PNPC, PNPL, PNPM, and PNPP). PBATH_{Bp} was incubated in 50 mM phosphate buffer (pH 7.0) under the presence of 6 *para*-nitrophenyl esters at 30 °C for 30 min. Absorbance at 405 nm of the solution was monitored. Relative hydrolytic activity was calculated from change of the absorbance. Error bars indicate ranges of experimental data (n = 3).



Fig. 18. Clear zone formed on olive oil containing plate. PBATH_{Bp} was incubated on the plate for 24 h at 30 °C. Clear zone formation was observed.

PBATH_{Bp}によるPBATフィルムおよび他のポリエステルフィルムの分解

PBATH_{Bp}のPBATフィルム分解能を、重量減少法により評価した (Fig. 19)。本酵素のPBATフィルム分解速度は $14.3 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{day}$ であった。一方で、フィルムがPBATH_{Bp}と共に保温される前後において、フィルムの分子量はほとんど変化しなかった (Table 15)。フィルム表面のSEM像から、PBATH_{Bp}を含まないバッファー中で保温される前後のフィルム表面は滑らかであるのに対し (Fig. 20-a および b), PBATH_{Bp}と共に保温されたフィルム表面では亀裂が確認された (Fig. 20-c)。

本酵素の他のポリエステルフィルム (PBSA, PESu, PCL, および P(3HB)) に対する分解能も評価された (Fig. 19)。本酵素は、細菌ポリエステルである P(3HB)フィルムを分解しなかったが、PBSA, PESu および PCL をそれぞれ $3.3 \times 10^2 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{day}$, $7.0 \times 10^2 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{day}$, および $1.1 \times 10^2 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{day}$ の速度で分解した。これらのポリエステルに対する分解速度はPBATの分解速度と比較して、著しく大きかった。また、PBAT同様にこれら3つのポリエステルフィルムの分子量も、PBATH_{Bp}を含むリン酸バッファー溶液中における保温前後でほとんど変化しなかった (Table 15)。

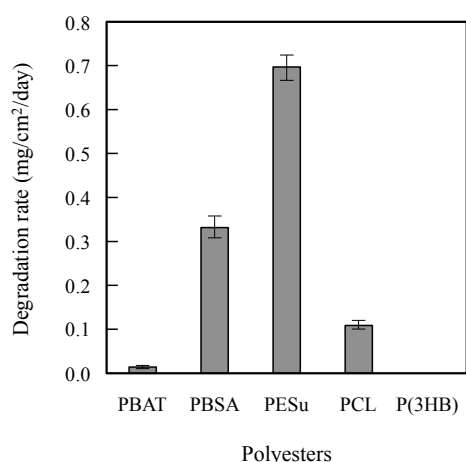


Fig. 19. The ability of PBATH_{Bp} to degrade polyesters films (PBAT, PBSA, PESu, PCL, and P(3HB)). Five films were incubated in 50 mM phosphate buffer solution (pH 7.0) with PBATH_{Bp} at 30 °C for 4 days (PBAT and PHB), or 1 day (PBSA, PESu, and PCL). Degradation rates of films were evaluated by weight loss method. Error bars indicate ranges of experimental data (n = 5).

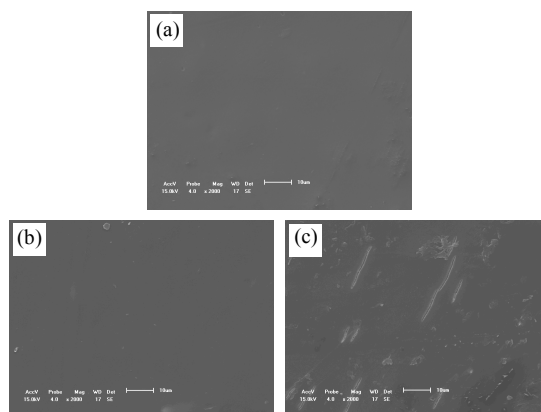


Fig. 20. Scanning electron micrographs of PBAT film surfaces before incubation (a), after incubation without PBATH_{Bp} (b), and after incubation with PBATH_{Bp} in phosphate buffer solution (pH 7.0) for 4 days (c). White bars correspond to 10 μm in length.

Table 15. Molecular masses of polyesters before and after incubation with or without PBATH_{Bp} at 30 °C in phosphate buffer solution (pH 7.0).

Polyesters	Before degradation		After incubation with PBATH _{Bp}		Control (without PBATH _{Bp})	
	Mn × 10 ⁴	Mw/Mn	Mn × 10 ⁴	Mw/Mn	Mn × 10 ⁴	Mw/Mn
PBAT	3.5	2.7	3.5	2.7	3.4	2.8
PBSA	2.8	3.6	2.6	4.1	2.9	3.5
PESu	2.5	3.3	2.4	3.3	2.6	3.2
PCL	5.5	2.1	5.3	2.1	5.5	1.9
PBSu	2.6	1.9	-	-	-	-
P(3HB)	13	2.1	-	-	-	-
PLA	9.5	1.6	-	-	-	-

PBAT films were incubated with or without PBATH_{Bp} for 4 days at 30 °C in phosphate buffer (pH 7.0). Other polyester films were incubated with or without PBATH_{Bp} for a day at 30 °C in the buffer. The molecular masses were determined by GPC.

PBATH_{Bp}によるPBAT分解物の同定および定量

PBATH_{Bp}によるPBAT分解物を同定するために、PBATフィルム-酵素溶液中の上清をESI-MSにより分析した (Fig. 21)。テレフタル酸 (T)、アジピン酸 (A)、1,4-ブタンジオール (B)、AB、TB、ABA、ABT、BTB、BABT (BABTあるいはBTBA)、ABABA、およびABABT (ABTBAあるいはABABT) (Fig. 22) が、分解物としてESI-MSにより検出された。加えて、UV検出器 (検出波長: 254 nm) を用い、HPLCにより芳香環を含む分解物を定量した。T、TB、ABT、BTB、BABT (BABTあるいはBTBA)、およびABABT (ABTBAあるいはABABT) の濃度はそれぞれ 3.0、50、50、18、59、および 13 nmol/μLであった (Fig. 23; 灰色)。本酵素のPBAT分解物 (TB、ABT、BTB、BTBA、およびABABT) に対する分解能を評価するため、フィルムを反応液から取り除いた後、その反応液に酵素を加え、30 °Cで22時間保温した (Fig. 21)。保温前と比べて、ABT、BABT (BABTあるいはBTBA)、およびABABT (ABTBAあるいはABABT) の量はそれぞれ 5.4、5.7 および 0 nmol/μLに低下した。一方で、T、BT、およびBTBの量はそれぞれ 9.8、121、および 58 nmol/μLに増加した (Fig. 23; 斜線)。これらの結果は、PBATH_{Bp}によってA-B結合よりもB-T結合は容易に切断されないことを示唆している。

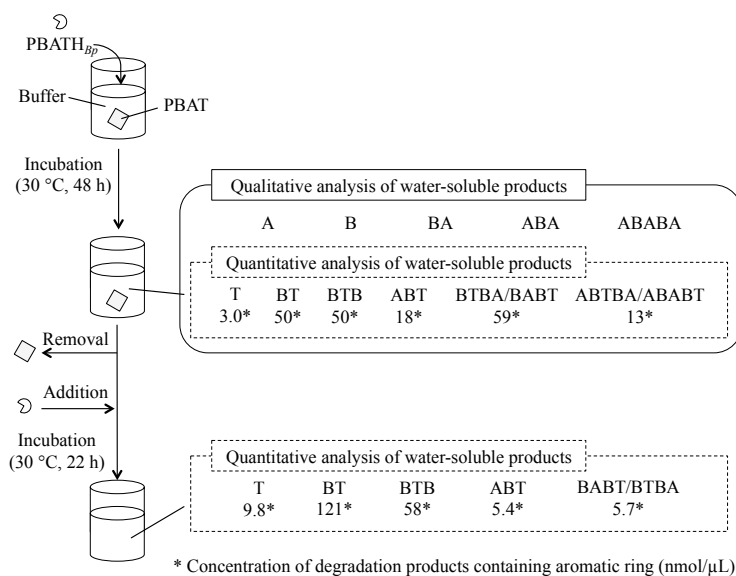


Fig. 21. Degradation of PBAT and its degradation products by PBATH_{Bp}. PBAT film was incubated with PBATH_{Bp} in phosphate buffer solution (pH7.0) for 48 hours at 30 °C. The degradation products were identified by LC/MS. In addition, the products containing aromatic ring were determined using HPLC at the wavelength of 254 nm. After the film was removed, PBATH_{Bp} was further added to the buffer. The solution was incubated for 22 hours at 30 °C. Degradation products containing aromatic ring were determined. A, B, and T were constituents of PBAT (A: adipic acid, B: 1,4-butanediol, and T: terephthalic acid).

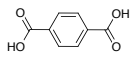
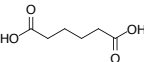
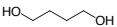
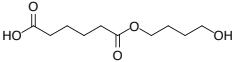
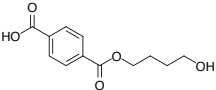
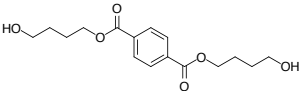
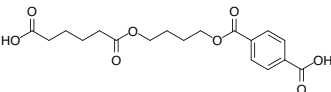
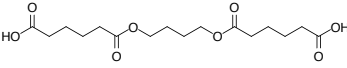
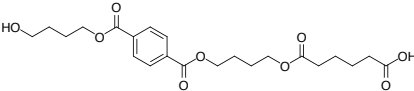
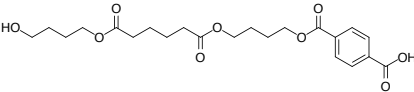
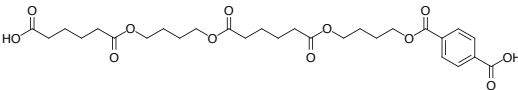
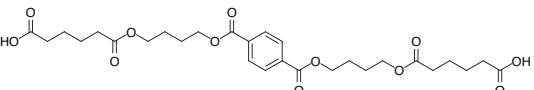
Name	Structure
Terephthalic acid (T)	
Adipic acid (A)	
1,4-butane diol (B)	
AB	
TB	
BTB	
ABT	
ABA	
BTBA	
BABT	
ABABT	
ABTBA	

Fig. 22. Chemical structures of water-soluble products detected in the reaction mixture after incubation of PBAT film with PBATH_{BP}.

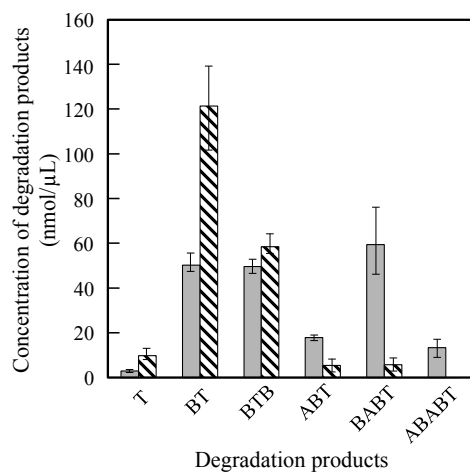


Fig. 23. Amounts of degradation products that contains aromatic ring (terephthalic acid (T), BT (B: 1,4-butanediol), BTB, ABT, BABT(BABT/BTBA), and ABABT(ABABT/ABTBA)) after PBAT degradation by PBATH_{bp} were determined using HPLC. Grey bars indicate products in the buffer after PBAT film was incubated with PBATH_{bp} in the phosphate buffer solution for 48 hours at 30 °C. After the film was recovered, PBATH_{bp} was further added to the buffer, which was incubated at 30 °C for 22 hours and degradation products were determined (slashed bars). Error bars indicate ranges of experimental data (n = 5).

2-3 考察

高温環境下での PBAT 生分解機構に関する研究が多く行われている一方で [44,46,48,50,53,56,57,59-61], 中温環境下での生分解機構に関しては理解が不十分である [62-68]。特に, 好気性中温性 PBAT 分解細菌が生産する PBAT 加水分解酵素に関する報告例はない。しかしながら, PBAT が農業用資材として広く用いられることを考慮すると, 中温環境における PBAT の生分解機構を解明することは重要である。そこで, 私は好気性中温性 PBAT 分解細菌を単離し, PBAT 加水分解酵素に対応している遺伝子のクローニングおよび酵素の特徴づけを行った。

3 株の PBAT 分解細菌 (NKCM3101, NKCM3201, および NKCM3202 株) は, 土壌環境で発見される Firmicutes に属する *Bacillus pumilus* に近縁であった [126-128]。NKCM3201 株は PBAT フィルムの分解において最も高い活性を示したので, 本株をさらに詳細に特徴づけした。NKCM3201 株は, 30 °C から 40 °C で相対的に速く増殖する, 典型的な好気性中温性細菌であった。本株由来の PBATH_{Bp} は PBAT をオリゴマーあるいはモノマーまで分解したが, 本株は PBAT モノマーを資化できなかった。本株は中温環境下で PBSA, PBSu, PCL, PESu, および PCL に対する分解能も有していた。さらに, NKCM3201 株において PBAT の分解に関与する酵素の特徴づけを行なうため, 私はこの酵素をコードする遺伝子をクローニングした。

pbath_{Bp} 遺伝子を有する 2 種類の形質転換株 (*E. coli* PBATH および *B. choshinensis* PBATH) が PBAT を分解したことから, *pbath_{Bp}* は NKCM3201 株において PBAT の加水分解活性のための原因遺伝子の一つであることが示唆された。PBATH_{Bp} は *B. subtilis* リパーゼ (LipA) および *B. licheniformis* リパーゼ (Fig. 11) に近縁であることから, 本酵素が小さな分子量を有するリパーゼのグループであるリパーゼファミリー I.4 に属する酵素であることが示された [124,125]。PBATH_{Bp} は, セリン加水分解酵素阻害剤である DFP および PMSF に感受性を示したため, 活性部位にセリン残基を有することが推測された。加えて, 変異体解析により, 本酵素の触媒三残基が Ser77, Asp133, および His156 であることがわかった。ホモロジー 3D モデリングから, 本酵素が疎水ポケットを覆うリッドドメインを持たないことが示唆された。同様に, クチナーゼや P(3HB)デポリメラーゼのような他のポリエステル分解酵素はリッドドメインを持たない [58,129,130]。一般に, 多くのリパーゼで見られるリッドドメインは, 固液界面ではなく液液界面で活性を増加させるために機能する。固液界面において, リッドドメインは必要ないため, PBATH_{Bp} を含むポリエステル分解酵素が, 本構造を持たないことは予想できる。反対に, 基質がこれら酵素の活性部位により容易に収容されうるため [131], このようなリッドのない構造は固体ポリエステルの分解においては優位にはたらくと考えられる。

PBATH_{Bp} は生分解性ポリエステル (PBAT, PBSA, PBSu, PCL, および PESu) に対して広い基質特異性を示した (Table 8, Fig. 19)。このような幅広い基質特異性は, ポリエステル基質および本酵素の疎水性残基を含む溝との間に働く疎水的相互作用により, 本酵素が基質を認識するためであると考えられる [132]。一方で, 本酵素は P(3HB) および PLA を加水分解しなかったことから, 構造中に側鎖を有するため, これらポリエステルは基質として不適當である可能性がある [133]。

今回の結果から, PBATH_{Bp} が, 中温性および好塩基性酵素であることが示された (Fig. 15,

Fig. 16)。本酵素と等モルのカルシウムイオンは、本酵素に 1.12 倍の PNPA 加水分解活性をもたらす、EDTA の添加はカルシウムイオン非存在下における分解活性とほぼ同じレベルまで低下させた (Table 14)。これらの結果は、カルシウムイオンが本酵素に結合し、立体構造を変化させることにより、本酵素を調節する可能性を示唆している[60,134]。

PBATH_{bp} は、短鎖および中鎖長の *p*-nitrophenyl esters (PNPA, PNPB, および PNPC) に対して比較的高い基質特異性を示した (Fig. 17)。加えて、本酵素は固体基質を分解した (Fig. 19)。固体基質を分解する一般的なクチナーゼが、短鎖および中鎖長の *p*-nitrophenyl esters に対して高い活性を示すことを考慮すると[135,136], 本酵素はリパーゼではなくクチナーゼとして分類したほうがより適切であると考えられる。

PBAT フィルムの重量減少および SEM 解析は (Fig. 19, Fig. 20), PBATH_{bp} が PBAT フィルムを分解することを示した。一方、PBATH_{bp} と共に保温されたフィルムの分子量は変化しなかったことから (Table 15), 相対的に短い保持時間における PBAT フィルムの分解は、フィルム表面および内部が均一に分解される塊状分解ではなく、本酵素によりフィルム表面が優先的に分解される表面分解機構により進むことが示唆された。

PBATH_{bp} により生じた PBAT 分解物の解析は、モノマーやオリゴマーが放出されることを明らかにした。芳香環を有するオリゴマーの分解を定量解析した。アジピン酸、ブタンジオール、および A-B 結合を含むオリゴマーの量は減少した。一方で、極少量の T が蓄積されたけれども、テレフタル酸およびブタンジオール、および B-T 結合のみを有するオリゴマーは増加した (Fig. 23)。これらの結果は、B-T 結合は A-B 結合よりも PBATH_{bp} によって容易に切断されないことを示している。この B-T 結合よりもむしろ A-B 結合に対する優先性は、HiC および Cbotu_EstA のような他の脂肪族芳香族共重合ポリエステル分解酵素のそれと類似していた[61,68]。今回の結果より、PBATH_{bp} による PBAT フィルムの分解速度は、構造中に芳香環を持たない PBSA, PCL, および PESu のようなポリエステルフィルムのそれと比較して著しく低いことが示された。同様に、Est1, PCLE, および CfCLE のような PBAT 分解活性を有する酵素は、PBAT と比べて脂肪族ポリエステルに対してより高い分解活性をもつことがわかっている[59,65,66]。PBATH_{bp} を含めた PBAT 加水分解酵素によるそのような PBAT 分解速度の遅さは、脂肪族鎖中に存在するエステル結合と比べて切断困難な B-T 結合の存在による可能性が高い。

自然環境中においては、PBAT は様々な機構 (酸化分解や加水分解を含む物理的、化学的および生物学的な反応) を経て分解されることが考えられる[25,63,137]。本研究では、*B. pumilus* NKCM3201 株はモノマー資化能を有さないが、本株由来 PBATH_{bp} が PBAT をオリゴマーやモノマーまで分解することを示した。このことは、本株が PBAT の加水分解過程のみを行なうことが可能であることを示唆している。一方で、PBAT モノマーが自然環境中で無機化されることを考えると[138], PBAT の完全分解は NKCM3201 株および他の微生物との共生系で達成されることが考えられる。

まとめると、本研究は、好気性中温性細菌由来 PBAT 加水分解酵素に関する最初の報告であり、中温域における PBAT の生分解を理解する上で役立つであろう。

第3章

ポリ（ブチレンアジペート-コ-テレフタレート）が土壤微生物叢
および植物の生育に及ぼす影響

3-1 実験

試薬

ポリ (ブチレンアジペート-co-テレフタレート) (PBAT) は BASF 社から提供された。¹H NMR を用い, PBAT に含まれるアジピン酸ユニットおよびテレフタル酸ユニットの割合を調べた結果, それぞれ 52 mol% および 48 mol% であった。TaKaRa Ex Taq[®], plasmid pMD20, T4 DNA ligase および SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (Perfect Real Time) はタカラバイオ株式会社から購入した。オリゴヌクレオチドは, ユーロフィンジェノミクス株式会社から購入した。他の試薬は, 和光順薬工業株式会社およびロシュ・ダイアグノスティックス株式会社から購入した。

微生物, プライマーおよびベクター

実験で使用した微生物, プライマー, およびベクターをそれぞれ Table 16, Table 17, および Table 18 に示す。また, プライマーのアニーリング部位を Fig. 24 に示す。

Table 16. Strain used in this study.

Strain	Description	Reference
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	<i>supE44 ΔlacU169(ϕ80lacZΔM15) hsdR17 recA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	TOYOBO CO., LTD.

Table 17. Primers used in this study.

Primer	Sequence	Reference
M13 primer M4	GTAAAACGACGGCCAG	Takara Bio Inc.
M13 primer RV	CAGGAAACAGCTATGAC	Takara Bio Inc.
For 16S rDNA		
341F-GC	CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGTCCC GCCGCCCCCGCCCG	[139]
907R	CCTACGGGAGGCAGCAG	[139]
341F	CCGTCAATTCCTTTRAGT	[139]
341F	CCTACGGGAGGCAGCAG	[139]
518R	ATTACCGCGGCTGCTGG	[140]
EUB338	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	[141]
Eub518	ATTACCGCGGCTGCTGG	[141]
For ITS		
JB206c	CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGG	[142]
	GAAGTAAAAGTCGTA	
ITS 1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	[143]
ITS 4	TCCTCCGCTTATTGATATG	[142]
GM2	CTGCGTTCATCATCGAT	[143]
For 18S rDNA		
nu-SSU-1196F	GGAAACTCACCAGGTCCAGA	[141]
nu-SSU-1536R	ATTGCAATGCYCTATCCCCA	[141]

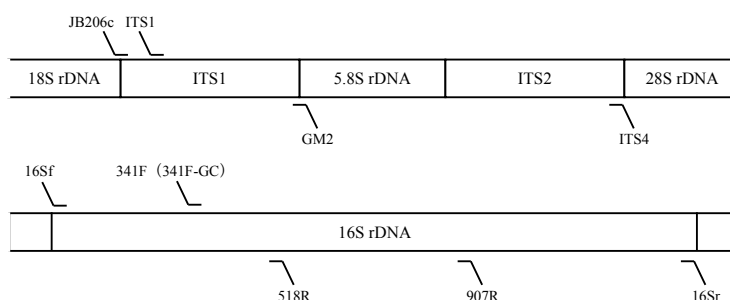


Fig. 24. Position of primer used in this study.

Table 18. Plasmids used in this study.

Plasmids	Genetic Marker	Description	Reference
pMD20	<i>Amp^r, lacZ</i>	cloning vector	Takara Bio Inc.
p16S-NKCM2511	<i>Amp^r, lacZ</i>	pMD20 containing 16S rDNA of strain NKCM2511	This study
p18S-NKCM3301	<i>Amp^r, lacZ</i>	pMD20 containing ITS region of strain NKCM3301	This study
p16S-DGGE1	<i>Amp^r, lacZ</i>	pMD20 containing 16S rDNA recovered from band 1 in DGGE profile of PBAT-degrading soil.	This study
p16S-DGGE2	<i>Amp^r, lacZ</i>	pMD20 containing 16S rDNA recovered from band 2 in DGGE profile of PBAT-degrading soil.	This study
p16S-DGGE3	<i>Amp^r, lacZ</i>	pMD20 containing 16S rDNA recovered from band 3 in DGGE profile of PBAT-degrading soil.	This study
p16S-DGGE4	<i>Amp^r, lacZ</i>	pMD20 containing 16S rDNA recovered from band 4 in DGGE profile of PBAT-degrading soil.	This study
p16S-DGGE5	<i>Amp^r, lacZ</i>	pMD20 containing 16S rDNA recovered from band 5 in DGGE profile of PBAT-degrading soil.	This study
p16S-DGGE6	<i>Amp^r, lacZ</i>	pMD20 containing 16S rDNA recovered from band 6 in DGGE profile of PBAT-degrading soil.	This study
p16S-DGGE7	<i>Amp^r, lacZ</i>	pMD20 containing 16S rDNA recovered from band 7 in DGGE profile of PBAT-degrading soil.	This study
p16S-DGGE8	<i>Amp^r, lacZ</i>	pMD20 containing 16S rDNA recovered from band 8 in DGGE profile of PBAT-degrading soil.	This study
p16S-DGGE9	<i>Amp^r, lacZ</i>	pMD20 containing 16S rDNA recovered from band 9 in DGGE profile of PBAT-degrading soil.	This study
p16S-DGGE10	<i>Amp^r, lacZ</i>	pMD20 containing 16S rDNA recovered from band 10 in DGGE profile of PBAT-degrading soil.	This study
p16S-DGGE11	<i>Amp^r, lacZ</i>	pMD20 containing 16S rDNA recovered from band 11 in DGGE profile of PBAT-degrading soil.	This study
p16S-DGGE12	<i>Amp^r, lacZ</i>	pMD20 containing 16S rDNA recovered from band 12 in DGGE profile of PBAT-degrading soil.	This study
p16S-DGGE13	<i>Amp^r, lacZ</i>	pMD20 containing 16S rDNA recovered from band 13 in DGGE profile of PBAT-degrading soil.	This study
p16S-DGGE14	<i>Amp^r, lacZ</i>	pMD20 containing 16S rDNA recovered from band 14 in DGGE profile of PBAT-degrading soil.	This study
p16S-DGGE15	<i>Amp^r, lacZ</i>	pMD20 containing 16S rDNA recovered from band 15 in DGGE profile of PBAT-degrading soil.	This study
p16S-DGGE16	<i>Amp^r, lacZ</i>	pMD20 containing 16S rDNA recovered from band 16 in DGGE profile of PBAT-degrading soil.	This study
p16S-DGGE17	<i>Amp^r, lacZ</i>	pMD20 containing 16S rDNA recovered from band 17 in DGGE profile of PBAT-degrading soil.	This study
p16S-DGGE18	<i>Amp^r, lacZ</i>	pMD20 containing 16S rDNA recovered from band 18 in DGGE profile of PBAT-degrading soil.	This study
p16S-DGGE19	<i>Amp^r, lacZ</i>	pMD20 containing 16S rDNA recovered from band 19 in DGGE profile of PBAT-degrading soil.	This study
p16S-DGGE20	<i>Amp^r, lacZ</i>	pMD20 containing 16S rDNA recovered from band 20 in DGGE profile of PBAT-degrading soil.	This study
p16S-DGGE21	<i>Amp^r, lacZ</i>	pMD20 containing 16S rDNA recovered from band 21 in DGGE profile of PBAT-degrading soil.	This study
p16S-DGGE22	<i>Amp^r, lacZ</i>	pMD20 containing 16S rDNA recovered from band 22 in DGGE profile of PBAT-degrading soil.	This study
p16S-DGGE23	<i>Amp^r, lacZ</i>	pMD20 containing 16S rDNA recovered from band 23 in DGGE profile of PBAT-degrading soil.	This study
p16S-DGGE24	<i>Amp^r, lacZ</i>	pMD20 containing 16S rDNA recovered from band 24 in DGGE profile of PBAT-degrading soil.	This study
p16S-DGGE25	<i>Amp^r, lacZ</i>	pMD20 containing 16S rDNA recovered from band 25 in DGGE profile of PBAT-degrading soil.	This study
p16S-DGGE26	<i>Amp^r, lacZ</i>	pMD20 containing 16S rDNA recovered from band 26 in DGGE profile of PBAT-degrading soil.	This study
p16S-DGGE27	<i>Amp^r, lacZ</i>	pMD20 containing 16S rDNA recovered from band 27 in DGGE profile of PBAT-degrading soil.	This study
p16S-DGGE28	<i>Amp^r, lacZ</i>	pMD20 containing 16S rDNA recovered from band 28 in DGGE profile of PBAT-degrading soil.	This study
p16S-DGGE29	<i>Amp^r, lacZ</i>	pMD20 containing 16S rDNA recovered from band 29 in DGGE profile of PBAT-degrading soil.	This study
p16S-DGGE30	<i>Amp^r, lacZ</i>	pMD20 containing 16S rDNA recovered from band 30 in DGGE profile of PBAT-degrading soil.	This study

pITS-DGGE25	<i>Amp^r, lacZ</i>	pMD20 containing ITS resion recoverd from band 25 in DGGE profile of PBAT-degrading soil.	This study
pITS-DGGE26	<i>Amp^r, lacZ</i>	pMD20 containing ITS resion recoverd from band 26 in DGGE profile of PBAT-degrading soil.	This study
pITS-DGGE27	<i>Amp^r, lacZ</i>	pMD20 containing ITS resion recoverd from band 27 in DGGE profile of PBAT-degrading soil.	This study
pITS-DGGE28	<i>Amp^r, lacZ</i>	pMD20 containing ITS resion recoverd from band 28 in DGGE profile of PBAT-degrading soil.	This study
pITS-DGGE29	<i>Amp^r, lacZ</i>	pMD20 containing ITS resion recoverd from band 29 in DGGE profile of PBAT-degrading soil.	This study
pITS-DGGE30	<i>Amp^r, lacZ</i>	pMD20 containing ITS resion recoverd from band 30 in DGGE profile of PBAT-degrading soil.	This study
pITS-DGGE31	<i>Amp^r, lacZ</i>	pMD20 containing ITS resion recoverd from band 31 in DGGE profile of PBAT-degrading soil.	This study
pITS-DGGE32	<i>Amp^r, lacZ</i>	pMD20 containing ITS resion recoverd from band 32 in DGGE profile of PBAT-degrading soil.	This study
pITS-DGGE33	<i>Amp^r, lacZ</i>	pMD20 containing ITS resion recoverd from band 33 in DGGE profile of PBAT-degrading soil.	This study
pITS-DGGE34	<i>Amp^r, lacZ</i>	pMD20 containing ITS resion recoverd from band 34 in DGGE profile of PBAT-degrading soil.	This study

PBATフィルムの作製

PBAT をクロロホルムに溶解後、メタノール中で再沈殿した[62]。得られた沈殿物をろ紙 (FILTER PAPER No.2, ADVANTEC 社製) を用いてろ取し、減圧乾燥した。精製した PBAT をカプトンポリイミドフィルム (東レ・デュポン株式会社製) で覆い、金型をスパーサーとして用い、mini Test Press-10 (東洋精機製作所株式会社製) で熔融プレス成型 (130 °C, 1 分, 14 MPa) した。その後、熔融した PBAT を室温で一晩保温した。得られた PBAT フィルムを 2×2×0.1 cm³ に切断後、このフィルムをメタノールおよび超純水で洗浄し、一晩減圧乾燥した。

土壌埋設試験

環境土壌 (群馬県渋川市中郷: 緯度 36 度 31 分 56.258 秒, 経度 139 度 0 分 40.230 秒) を採取し、2 mm メッシュの篩にかけ、粒子や雑草を取り除いた。採取土壌は有機微量元素 (水素, 炭素, および窒素) および水をそれぞれ 2.05%, 9.88%, 0.90%, および 22% 含んでいた。有機微量元素は、マイクロコーダー JM10 (ヤナコテクニカルサイエンス株式会社製) を用いて調べられた。30 mL の基本培地 (4.6 g/L of KH₂PO₄, 11.6 g/L of Na₂HPO₄ · 12H₂O, 1.0 g/L of NH₄Cl, 0.5 g/L of MgSO₄ · 7H₂O, 0.1 g/L of FeCl₃ · 6H₂O, and 0.5 g/L of Dried yeast extract, pH 7.0) [62] を含む水分含率 30% の土壌 (300 g) を調整し、ポリプロピレン製のボトル (500 mL) に入れた。この土壌に、26 枚 (1.8 g) の PBAT フィルムを加え、ボトルの蓋を閉め、30 °C で保温した。好氣的環境を維持するため、1 日に 1 度滅菌したスパチュラを用いて土壌を穏やかに攪拌した。また、2 週間ごとに土壌の水分含量を確認し、滅菌蒸留水を用いて 30% に維持した。コントロール土壌 (CS) として PBAT フィルムを含まない土壌を同様に 30 °C で保温した。土壌微生物叢解析を行うため、定期的に CS およびバルク土壌 (BS) (Fig. 25) を回収した。加えて、定期的にフィルムを回収し、フィルム表面に付着する土壌 (フィルム表面近傍土壌: FS) (土壌の厚みはフィルム表面から 1 mm 以内であった。) も回収した。(本論文では X ヶ月後に回収した各土壌をそれぞれ CSX, BSX, および FSX と記す。Fig. 25)。土壌サンプルは、使用するまで -80 °C で保存した。土壌から回収した PBAT フィ

ルムは、メタノールおよび蒸留水で洗浄し、1日乾燥した。各系は n=3 で行われた。

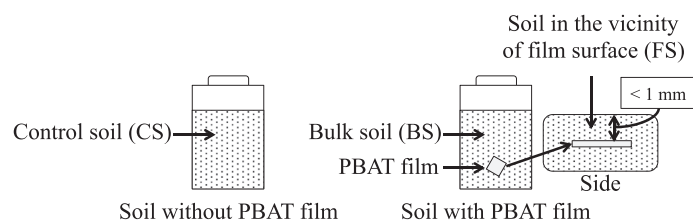


Fig. 25. Schematic diagram of soil burial test. Three soil samples: control soil (CS), soil that is remote from PBAT film (BS), and soil in the vicinity of film surface (FS), which attached to PBAT film (thickness of the soil was within 1 mm from film surface), were recovered periodically. In the analysis of soil microbiota, these soils were respectively denoted as CSX, BSX, and FSX (X indicates elapsed months; e.g. control soil recovered after incubation for 3 months is designated as CS3).

土壌埋設したPBATフィルムの表面形態観察

PBAT フィルムの表面形態を、走査型電子顕微鏡 (SEM) (JCM-6000; JEOL Co., Ltd.) を用いて観察した。表面形態観察を行うにあたり、PBAT フィルムの固定化を行った[144]。まず、2.5% (v/v) グルタルアルデヒド溶液に PBAT フィルムを浸し、室温で1時間保温した。このフィルムを超純水で洗浄し、50, 60, 70, 80, 90, および 100 %エタノールに 20 分間ずつ、順次浸し脱水した。脱水したフィルムを酢酸イソアミルに入れ、1時間室温で保温した後、フィルムを一晩減圧乾燥した。このフィルムを Au-Pd で覆い、SEM を用いてフィルム表面形態観察を行った。

土壌埋設したPBATフィルムの分子量測定

LC-2000 Plus Series system (日本分光株式会社製) を用いたゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) 法により、PBAT フィルムの分子量が測定された。PBAT フィルム (4 mg) をクロロホルム (1 mL) に溶解後、その溶液を PTFE フィルター (孔径 0.45 μm , Kurabo Co., Ltd.) を用いて濾過し、試料を調整した。GPC の移動相にクロロホルムを用い、流速を 0.8 mL/min, カラム温度を 40 $^{\circ}\text{C}$ とし、試料をカラム (TSKgelGMHXL, TSKgelG1000HXL, および TSKgelG2000HXL (東ソー株式会社製)) にアプライした。PBAT の検出には屈折率検出器を用いた。標準曲線の作製には、ポリスチレンスタンダードを用いた。

ポリメラーゼ連鎖反応-変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (PCR-DGGE) 解析

回収した、7 種類の土壌サンプル (保温前の土壌: CS0, 30 $^{\circ}\text{C}$ で 3 ヶ月間保温した後のコントロール土壌: CS3, バルク土壌: BS3, およびフィルム周辺土壌: FS3, および 7 ヶ月間保温した後のコントロール土壌: CS7, バルク土壌: BS7, およびフィルム周辺土壌: FS7; Fig. 25) の微生物叢解析を、PCR-DGGE 法を用いて行った。Power Soil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories 社製) を用いて、回収した 7 種類の土壌からメタゲノム DNA を抽出した。抽出手順は Power Soil DNA Isolation Kit の説明書に従った。抽出したメタゲノム DNA は、微生物叢解析に用いるまで -80 $^{\circ}\text{C}$ の冷凍庫で保存した。細菌由来 16S rDNA および真菌由来 ITS 領域を iCyclerTM Thermal Cycler (Bio-Rad laboratories 社製) を用いて PCR により

増幅した。抽出したメタゲノム DNA をテンプレートとして用いて PCR を行った。反応液は、メタゲノム DNA 溶液 (1.0 μ L) *TaKaRa Ex Taq*[®] (0.1 μ L : 0.5 U), 10 \times Ex Taq Buffer (2.5 μ L), dNTP Mixture (2.5 μ L : 各々 2.5 mM), フォワードプライマーおよびリバースプライマー (10 pmol ずつ) を混合し、超純水を用いて総量を 25 μ L にした。16S rDNA はプライマー 341F-GC および 907R を用いて増幅され、ITS 領域はプライマー JB206c および GM2 を用いて増幅された。メタゲノム DNA は 98 $^{\circ}$ C で 10 分間加熱後、氷水で急冷したものを用いた。16S rDNA を増幅するためのサーマルサイクルは、95 $^{\circ}$ C 3 分を 1 サイクル、94 $^{\circ}$ C 30 秒 ; 64 $^{\circ}$ C 10 秒 ; 72 $^{\circ}$ C 45 秒を、アニーリング温度を 1 サイクルごとに 0.5 $^{\circ}$ C 下げながら 14 サイクル、94 $^{\circ}$ C 30 秒 ; 57 $^{\circ}$ C 10 秒 ; 72 $^{\circ}$ C 45 秒を 16 サイクル、72 $^{\circ}$ C 2 分を 1 サイクルとした。ITS 領域を増幅するためのサーマルサイクルは、95 $^{\circ}$ C, 5 分を 1 サイクル、94 $^{\circ}$ C 30 秒 ; 58 $^{\circ}$ C 30 秒 ; 72 $^{\circ}$ C 30 秒をアニーリング温度を 1 サイクルごとに 0.5 $^{\circ}$ C 下げながら 20 サイクル、94 $^{\circ}$ C 1 分 ; 48 $^{\circ}$ C 1 分 ; 72 $^{\circ}$ C 45 秒を 10 サイクル、72 $^{\circ}$ C 2 分を 1 サイクルとした。目的 DNA の増幅は、アガロースゲル電気泳動により確認した。

変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (DGGE) は、DCode[™] Universal Mutation Detection System (Bio-Rad 社製) を用いて行われた。実験手順は「DCode システム (DGGE 法) を用いた微生物群集解析アプリケーションガイド」に従った。変性剤濃度が 100 % の 6 % アクリルアミド溶液は、40 % アクリルアミド/ビス溶液 (アクリルアミド (5.48 M) および *N,N'*-メチレン-ビス-アクリルアミド (69 mM)) (7.5 mL), 50 \times TAE バッファー (トリス塩基 (2.0 M), 酢酸ナトリウム (0.25 M), およびエチレンジアミン四酢酸 (EDTA, 63 mM)) (0.5 mL), ホルムアミド (20 mL), 尿素 (21 g), および超純水を混合し、総量を 50 mL にすることで調整された。10 % 過硫酸アンモニウム (400 μ L) および *N,N,N',N'*-テトラメチルエチレンジアミン (45 μ L) は、アクリルアミド溶液をゲル化させるために用いられた。土壌細菌叢および真菌叢を解析するため、model 75 gradient delivery system (Bio-Rad laboratories, Inc.) を用いて、それぞれ 30 %–55 % および 30 %–35 % の変性剤濃度勾配をもつアクリルアミドゲルが作製された。PCR 産物 (15 μ L) をゲルのウェルに流し込み、58 $^{\circ}$ C の 0.5 \times TAE バッファー中で、EPS 601 (GE ヘルスケア・ジャパン社製) を用いて 200 V の電圧を印加し、4 時間電気泳動した。泳動後、ゲルを SYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain (ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社) で染色し、UV トランスイルミネーター (フナコシ株式会社製) で DNA バンドを可視化した。DNA バンドを切り出し、DNA 回収バッファー (酢酸アンモニウム (5 M) および EDTA (2.0 μ M)) (600 μ L) 中で 37 $^{\circ}$ C で一晩保温後、ゲルから DNA を抽出した。エタノール沈殿により抽出した DNA を沈殿させ、超純水 (10 μ L) に溶解させた。

DGGE バンドの DNA 解析

ゲルから抽出した DNA をテンプレートとして用い、セミネスト PCR により DNA を増幅した。DNA 溶液 (5.0 μ L) と滅菌超純水 (13.4 μ L) を混合し、98 $^{\circ}$ C で 10 分間プレヒート後、氷水で急冷した。この溶液に、*TaKaRa Ex Taq*[®] (0.1 μ L : 0.5 U), 10 \times Ex Taq Buffer (2.5 μ L), dNTP Mixture (2.0 μ L : 各々 2.5 mM), およびプライマー (16S rDNA の増幅にはプライマー 341F および 518R, ITS 領域の増幅にはプライマー ITS1 および GM2 をそれぞれ 1.0 μ L (1.0 pmol) 用いた。) を混合した。16S rDNA を増幅するためのサーマルサイクルは、94 $^{\circ}$ C,

5分を1サイクル、94 °C 30秒 ; 55 °C 30秒 ; 72 °C 30秒を30サイクル、72 °C 10分を1サイクルとした。また、ITS領域を増幅するためのサーマルサイクルは、94 °C、5分を1サイクル、94 °C 30秒 ; 55 °C 30秒 ; 72 °C 30秒を30サイクル、72 °C 10分を1サイクルとした。ダイデオキシ法を用いて RCR 産物の DNA 配列解析を行った (ユーロフィンジェノミクス株式会社)。近縁種を調べるため、NCBI の nucleotide BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) を用いて GenBank に登録されている DNA 配列のデータ, および本配列解析により得られた DNA 配列のデータを比較した。

土壌細菌および真菌由来 DNA の定量[141]

土壌細菌由来 DNA (16S rDNA) および真菌由来 DNA (18S rDNA) のコピー数を定量 PCR (qPCR) 法により定量した。qPCR は、iCycler™ Thermal Cycler および MyiQ™ Single Color Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories 社製) を用いて行われた。メタゲノム DNA 溶液 (1.0 μL) および滅菌超純水 (21.0 μL) を混合した。この溶液を、98 °C で10分間プレヒートし、氷水で急冷した。その後、SYBR® *Premix Ex Taq*™ (25.0 μL), およびプライマー (16S rDNA の定量にはプライマー-EUB338 および Eub518, 18S rDNA の定量にはプライマー-nu-SSU-1196F および nu-SSU-1536R をそれぞれ 1.0 μL (1.0 pmol) 用いた。) を混合した。16S rDNA を増幅するためのサーマルサイクルは、95 °C 10秒を1サイクル、95 °C 5秒 ; 61 °C 25秒を45サイクル、95 °C 1分を1サイクル、55 °C 10秒 (1サイクルごとに0.5 °C 上昇) を80サイクルとした。18S rDNA を増幅するためのサーマルサイクルは、95 °C 10秒を1サイクル、95 °C 5秒 ; 56 °C 25秒を45サイクル、95 °C 1分を1サイクル、55 °C 10秒 (1サイクルごとに0.5 °C 上昇) を80サイクルとした。検量線の作成には、既知の濃度のプラスミド DNA (p16S-NKCM2511 および p18S-NKCM3301) を用いた (Fig. 26, Fig. 27)。

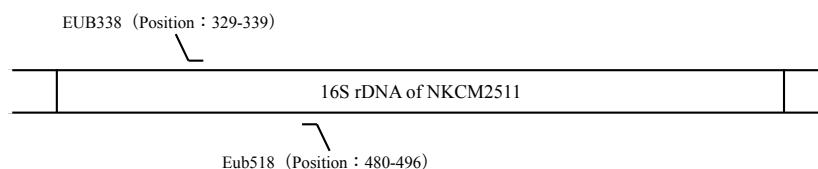


Fig. 26. Position of primer used for quantification of bacterial rDNA.

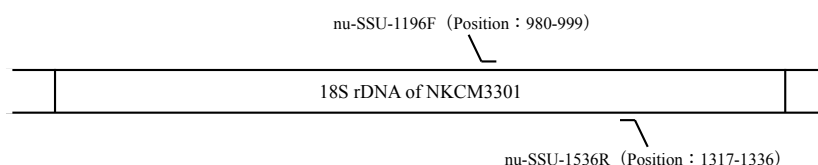


Fig. 27. Position of primer used for quantification of fungal DNA.

植物栽培試験

30 °C で7ヶ月間保温した、PBAT 埋設土壌およびコントロール土壌に *Brassica rapa var. chinesis* の種子を播種し、人工気象器を用いて 25 °C で1ヶ月間栽培した。日照時間は1日あたり12時間とした。栽培後、植物を収穫し、根についた土壌を水で洗浄し、取り除いた。*B. rapa var. chinesis* を一晩凍結乾燥し、乾燥重量を測定した。

3-2 結果

PBATフィルムの土壌分解

Fig. 28 に、土壌中で 30 °C で保温した PBAT フィルムの重量減少量を示す。時間の経過に伴い、PBAT フィルムの重量は徐々に減少し、埋設 6 ヶ月で、 1.81 mg/cm^2 (初期重量の 22 %) の重量損失が確認された。Fig. 30 に、土壌埋設前後の PBAT フィルムの SEM 像を示す。土壌埋設前のフィルム表面は滑らかであったが (Fig. 30-a)、土壌埋設 3 ヶ月後のフィルム表面には、小さな亀裂が見られた (Fig. 30-b)。土壌埋設 6 ヶ月後のフィルム表面にはおおきな亀裂が生じ、フィルム表面はより粗くなっていた (Fig. 30-c)。Fig. 29 に、土壌埋設した PBAT フィルムの GPC クロマトグラムを示す。土壌埋設前の PBAT フィルムの分子量 (Mn) および多分散度はそれぞれ 3.9×10^4 、および 1.6 であった。土壌埋設 6 ヶ月後、フィルムの分子量 (Mn) は 2.7×10^4 に低下し、多分散度は 2.0 に上昇した。

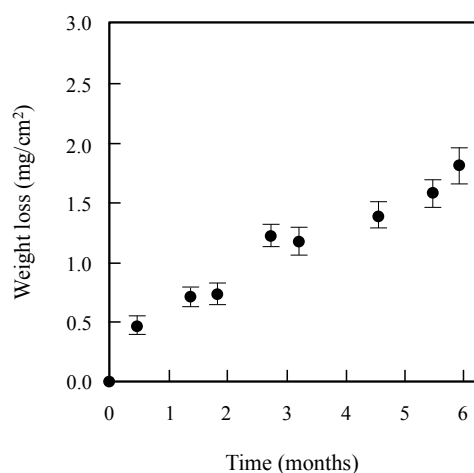


Fig. 28. Weight loss of PBAT film in a soil environment during incubation at 30 °C. Error bar indicates the ranges of experimental data (n = 3).

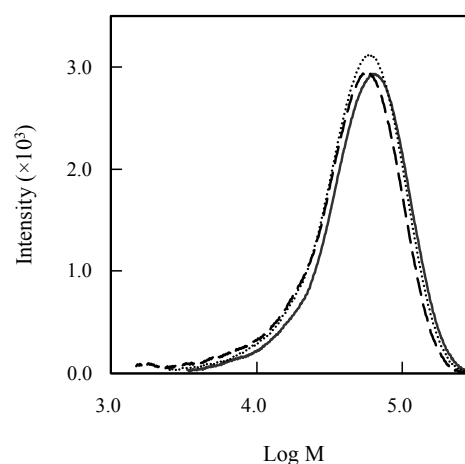


Fig. 29. Gel permeation chromatograms of PBAT film before incubation (solid line), after incubation in soil for 3 months (dotted line), and for 6 months (dashed line).

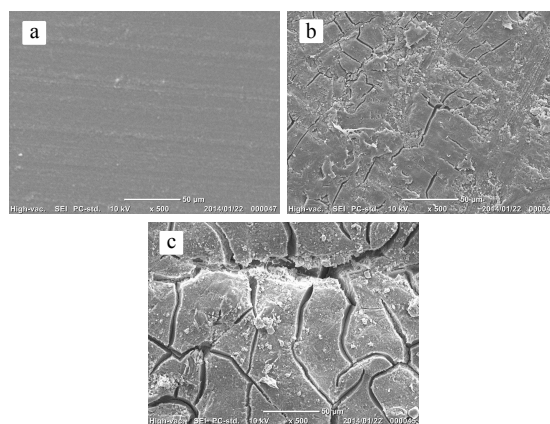


Fig. 30. Scanning electron micrographs of PBAT film surfaces before incubation (a), after incubation in soil for 3 months (b), and for 6 months (c). White bars indicate 50 μm in length.

PBATフィルム分解土壌の微生物叢解析

サンプリングしたコントロール土壌 (CS0, CS3, および CS7), バルク土壌 (BS3 および BS7), および PBAT フィルム周辺土壌 (FS3 および FS7) の微生物叢を PCR-DGGE 法により解析した。Fig. 31 は, 細菌 16S rDNA の V3-V5 領域の PCR アンプリコンの DGGE (PCR-DGGE) 像を示している。泳動図より, 38 個の異なるバンドが検出された。検出されたバンドに, 上部 (ウェル) からゲルの下部に向かって順番に番号をつけた。Table 19 は各バンド由来の DNA 配列解析結果より得られた細菌の分類群を示している。本解析により, 本土壌中には, 土壌環境に生息する細菌門である [105], Proteobacteria 門 (α - Proteobacteria, β - Proteobacteria, γ - Proteobacteria, および δ -Proteobacteria), Actinobacteria 門, および Gemmatimonadetes 門に属する細菌が存在することが明らかとなった。PCR-DGGE 像より, CS0 レーンでは 21 バンド (1-2, 5-8, 10-12, 14-16, 18-20, 22-23, 25-27, および 31) が確認された。CS3 レーンでは, これら 21 バンドに加えて, 14 バンド (4, 9, 13, 21, 28-30, および 32-38) が検出された。CS3, CS7, BS3, および BS7 レーンのバンドパターンを比較した結果, これらのバンドパターンは類似していた。一方で, FS3 および FS7 レーン上に, 他のレーン (CS0, CS3, CS7, BS3, および BS7) で検出されなかったバンド 3 が検出された。加えて, FS3 では他のレーンで検出されなかったバンド 17 も検出された。本試験土壌中には, 植物の生育促進に関与する植物生育促進根圏細菌 (PGPR) である *Azospirillum* sp. (バンド 12) および *Mesorhizobium* sp. (band 11) [145]が, 全ての土壌サンプル (CS0, CS3, CS7, BS3, BS7, FS3 および FS7) で検出された。一方, PBAT 分解細菌として単離された, *B. pumilus* は検出されなかった。また, 本試験土壌からは植物病原細菌は検出されなかった。



Fig. 31. PCR-DGGE profile of bacterial flora in the soil samples. (M: DGGE marker, CS: control soil, BS: bulk soil, FS: soil in the vicinity of film surface).

Table 19. Identification of bands corresponding to band numbers in Fig. 31 based on the 16S rDNA analysis.

Band number (Accession number)	Closest relative species (Accession number)	Identity (%)	Phylum
1 (LC122290)	Uncultured bacterium (AB552000)	100	-
2 (LC122291)	<i>Hyphomicrobium aestuarii</i> (NR_104954)	100	Proteobacteria
3 (LC122292)	<i>Hyphomicrobium</i> sp. (AF408954)	98	Proteobacteria
4 (LC122293)	Uncultured bacterium (JQ370308)	99	-
5 (LC122294)	<i>Cupriavidus taiwanensis</i> (NR_074823)	100	-
6 (LC122295)	<i>Lysobacter</i> sp. (HM063960)	97	Proteobacteria
7 (LC122296)	<i>Blastochloris gulmargensis</i> (NR_115056)	98	Proteobacteria
8 (LC122297)	<i>Bradyrhizobium</i> sp. (KR779531)	99	Proteobacteria
9 (LC122298)	<i>Lysobacter</i> sp. (KF441669)	97	Proteobacteria
10 (LC122299)	<i>Acidovorax delafieldii</i> (KC252710)	99	Proteobacteria
11 (LC122300)	<i>Mesorhizobium</i> sp. (JN848795)	98	Proteobacteria
12 (LC122301)	<i>Azospirillum</i> sp. (GQ369056)	99	Proteobacteria
13 (LC122302)	<i>Reyranella soli</i> (NR_109674)	100	Proteobacteria
14 (LC122303)	<i>Aquabacterium limnoticum</i> (NR_108739)	98	Proteobacteria
15 (LC122304)	Uncultured bacterium (JQ371645)	98	Proteobacteria
16 (LC122305)	Uncultured bacterium (HQ114187)	96	-
17 (LC122306)	<i>Caenimonas</i> sp. (HM156151)	99	Proteobacteria
18 (LC122307)	Uncultured gamma proteobacterium (GU016233)	99	Proteobacteria
19 (LC122308)	<i>Caenimonas</i> sp. (HM156151)	99	Proteobacteria
20 (LC122309)	Uncultured beta proteobacterium (HM592577)	99	Proteobacteria
21 (LC122310)	<i>Thermomonas brevis</i> (KM199275)	98	Proteobacteria
22 (LC122311)	Uncultured bacterium (KR921124)	99	-
23 (LC122312)	<i>Hyphomicrobium aestuarii</i> (NR_104954)	100	Proteobacteria
24 (LC122313)	Uncultured bacterium (JN644170)	99	-
25 (LC122314)	<i>Lysobacter cookii</i> (NR_112881)	98	Proteobacteria
26 (LC122315)	<i>Acetobacter pasteurianus</i> (LK024186)	99	Proteobacteria
27 (LC122316)	<i>Oceanibaculum indicum</i> (LN650478)	97	Proteobacteria
28 (LC122317)	Agricultural soil bacterium (HQ132692)	97	-
29 (LC122318)	Uncultured bacterium (HM988822)	100	-
30 (LC122319)	<i>Actinophytocola burenkhanensis</i> (AB535095)	96	Actinobacteria
31 (LC122320)	Uncultured actinobacterium (FJ569299)	99	Actinobacteria
32 (LC122321)	Uncultured bacterium (JF028565)	99	-
33 (LC122322)	Uncultured bacterium (KC562911)	100	-
34 (LC122323)	Uncultured bacterium (FJ568375)	96	-
35 (LC122324)	Uncultured bacterium (LN680160)	100	-
36 (LC122325)	<i>Pseudonocardia</i> sp. (GQ924573)	99	Actinobacteria
37 (LC122326)	<i>Gemmatirosa kalamazoonesis</i> (CP007128)	95	Gemmatimonadetes
38 (LC122327)	Uncultured bacterium (KP156266)	99	-

Fig. 32 は真菌由来 DNA 配列の PCR アンプリコンの PCR-DGGE 像を示している。電気泳動像より、34 個の異なるバンドが検出された。検出されたバンドに、上部 (ウェル) からゲルの下部に向かって順番に番号をつけた。Table 20 は検出された真菌の分類群を示している。本解析により、本土壌には、Ascomycota 門, Basidiomycota 門, および Zygomycota 門に属する真菌が存在することが明らかとなった。PCR-DGGE 像より、CS0 レーンでは、29 バンド (1-9, 11-14, 16-28, 30-31 および 33) が検出された。CS3 レーンでは、新たに 29 および 32 番のバンドが出現したが、CS0 レーンで見られた 16 および 17 番のバンドがなかった。また、CS3 レーンの 11 および 13 番のバンドの強度は、CS0 のそれと比較して増加した。BS3 のバンドパターンはバンド 11 が検出されなかったこと、およびバンド 13 の強度が CS3 のバンド 13 の強度より低いことを除いて、CS3 のバンドパターンと類似していた。CS7 レーンでは、バンド 10 および 15 が出現した一方で、バンド 12, 23, 26, 28, および 30-33 が消失した。BS7 および CS7 レーンのバンドパターンは、BS7 レーンのバンド 12 および 24 の強度が、CS7 レーンの 12 および 24 の強度より強いことを除いては、大まかに類似していた。一方、FS7 レーンのバンドの数は CS7 および BS7 レーンのバンドの数よりも顕著に減少し、7 バンド (2, 4, 6, 8, 12, 21, および 24) が検出された。これら 7 つのバンドのうち、バンド 2, 8, 12, および 21 は Ascomycota 門に属する真菌由来 DNA であった (Table 5)。本試験土壌中から 7 種の植物病原真菌近縁種 (*Chaetomella raphigera*[146], *Saccharicola bicolor*[147], *Setophoma terrestris*[148], *Leptosphaerulina chartarum*[149], *Periconia* sp.[150], *Verticillium dahliae*[151], および *Plectosphaerella cucumerina*[152]) が検出された。7 ヶ月後の BS7 および FS7 中における *S. terrestris* (バンド 12) のバンド強度は、CS7 におけるそのバンド強度より大きかった (Fig. 32)。

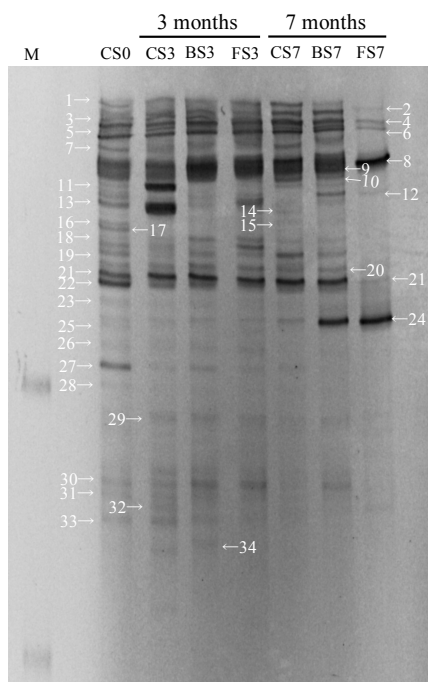


Fig. 32. PCR-DGGE profile of fungal flora in the soil samples. (M: DGGE marker, CS: control soil, BS: bulk soil, FS: soil in the vicinity of film surface)

Table 20. Identification of bands corresponding to band numbers in Fig. 32 based on the ITS region.

Band number (Accession number)	Closest relative species (Accession number)	Identity (%)	Phylum
1 (LC125599)	<i>Saccharicola bicolor</i> (KM979977)	98	Ascomycota
2 (LC125600)	<i>Apodus oryzae</i> (AY681200)	99	Ascomycota
3 (LC125601)	<i>Mortierella ambigua</i> (KP966612)	98	Zygomycota
4 (LC125602)	ND	ND	ND
5 (LC125603)	ND	ND	ND
6 (-)	NI	NI	NI
7 (LC125604)	<i>Chaetomella raphigera</i> (KF669891)	97	Ascomycota
8 (LC125605)	<i>Saccharicola bicolor</i> (KM979977)	98	Ascomycota
9 (LC125606)	<i>Chaetomella raphigera</i> (KF669891)	97	Ascomycota
10 (LC125607)	<i>Chaetomella raphigera</i> (KF669891)	100	Ascomycota
11 (LC125608)	<i>Tetracladium furcatum</i> (EU883432)	99	Ascomycota
12 (LC125609)	<i>Setophoma terrestris</i> (KF251246)	100	Ascomycota
13 (LC125610)	<i>Setophoma terrestris</i> (KF251246)	99	Ascomycota
14 (LC125611)	<i>Saccharicola bicolor</i> (KM979977)	98	Ascomycota
15 (LC125612)	<i>Mortierella elongata</i> (KF944459)	97	Zygomycota
16 (LC125613)	<i>Mortierella elongata</i> (JN943803)	97	Zygomycota
17 (LC125614)	<i>Mortierella alpina</i> (JN943803)	98	Zygomycota
18 (LC125615)	<i>Pseudaleuria</i> sp. (AB520861)	99	Ascomycota
19 (LC125616)	<i>Minimedusa polyspora</i> (KC176294)	95	Basidiomycota
20 (LC125617)	<i>Saccharicola bicolor</i> (AF455415)	98	Ascomycota
21 (LC125618)	<i>Humicola fuscoatra</i> (KJ767117)	100	Ascomycota
22 (LC125619)	<i>Leptosphaerulina chartarum</i> (KF445073)	99	Ascomycota
23 (LC125620)	<i>Humicola fuscoatra</i> (KJ767117)	100	Ascomycota
24 (LC125621)	ND	ND	ND
25 (LC125622)	<i>Periconia</i> sp. (KF227879)	99	Ascomycota
26 (-)	NI	NI	NI
27 (LC125623)	<i>Periconia</i> sp. (KF227879)	99	Ascomycota
28 (LC125624)	ND	ND	ND
29 (LC125625)	<i>Verticillium dahliae</i> (HQ839784)	99	Ascomycota
30 (LC125626)	Uncultured fungus (LC026314)	99	-
31 (LC125627)	ND	ND	ND
32 (LC125628)	Uncultured fungus (LC026314)	99	-
33 (LC125629)	<i>Plectosphaerella cucumerina</i> (JX431888)	100	Ascomycota
34 (LC125630)	<i>Mortierella</i> sp. (HQ608097)	98	Zygomycota

ND: not determined (Identity < 95% for ITS sequence in the Genbank), NI: There were no related species in data bank.

土壌中の細菌および真菌の存在比率

未処理土壌 (CS0) および 30 °C で 7 ヶ月間保温したコントロール (CS7), バルク (BS7), およびフィルム周辺土壌 (FS7) 中の, 細菌および真菌由来 rDNA のコピー数を定量 PCR 法により調べた[141]。CS0 の細菌および真菌由来 rDNA のコピー数は, 土壌 1 g あたりそれぞれ 1.7×10^9 および 3.3×10^{11} 個であった。これらの値を用いて 7 ヶ月後の各土壌 (CS7, BS7, および FS7) 中に含まれる細菌および真菌由来 rDNA の相対コピー数を算出した結果を, Fig. 33 に示す。CS7 の細菌および真菌由来 rDNA のコピー数は, CS0 の細菌および真菌由来 rDNA のコピー数と比較して減少した。BS7 の細菌由来 rDNA のコピー数は CS0 の細菌由来 rDNA のコピー数の約 0.7 倍であったが, CS7 の細菌由来 rDNA のコピー数の約 2.3 倍であった。BS7 の真菌由来 rDNA のコピー数は, CS0 とほぼ同じであり, CS7 の真菌由来 rDNA のコピー数の約 3.8 倍であった。FS7 の細菌および真菌由来 rDNA のコピー数は CS0, CS7 および BS7 のそれよりも多かった。

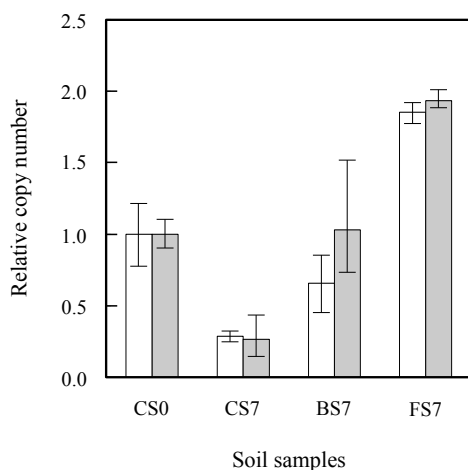


Fig. 33. Relative copy number of bacterial (16S) and fungal (18S) rDNA in initial soil (CS0), control soil (CS7), bulk soil (BS7), and soil in the vicinity of film surface (FS7) after 7 months. White and black bars indicate relative copy number of bacteria and fungi, respectively. Error bars indicate the ranges of experimental data (n = 3).

Brassica rapa var. *chinensis* 栽培試験

Fig. 34 は 30 °C で 7 ヶ月間保温した後のコントロール土壌 (CS7, (a)) および PBAT 埋設土壌 (BS7, (b)) で、25 °C で栽培した、*B. rapa* var. *chinensis* を示している。1 ヶ月間の栽培の間、*B. rapa* var. *chinensis* において、植物病原微生物によりもたらされる黒斑病や軟腐病などの病状は確認されなかった。Table 21 は、栽培した *B. rapa* var. *chinensis* の乾燥重量を示している。BS7 で栽培した *B. rapa* var. *chinensis* の乾燥重量は、CS7 で栽培した *B. rapa* var. *chinensis* の乾燥重量よりも僅かに大きかった (Table 21)。

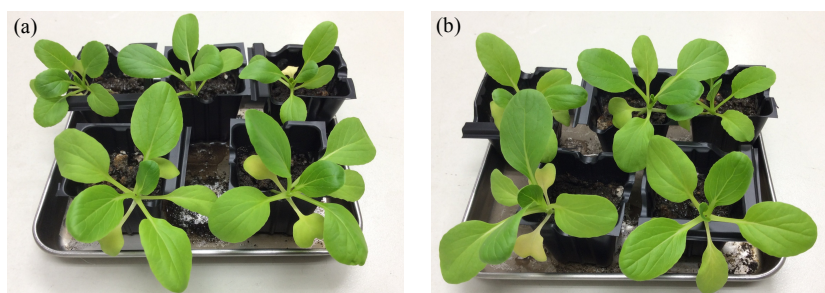


Fig. 34. *B. rapa* var. *chinensis* grown on control soil: CS7 (a), and bulk soil: BS7 (b). The plant was grown at 25 °C for 1 month on the either soil, CS7 or BS7 in the plant growth chamber.

Table 21. Dry weight of *B. rapa* var. *chinensis*.

Soil	Dry weight (g)
CS7 ^a	0.076±0.019
BS7 ^b	0.089±0.024

Plants were recovered after they were grown for 1 month at 25 °C (n = 5).
a CS7 indicates control soil after incubation for 7 months at 30 °C without PBAT films (cf. Fig. 25).

b BS7 indicates bulk soil after incubation for 7 months at 30 °C with PBAT films (cf. Fig. 25).

3-3 考察

PBATは生分解性農業用資材として用いられており、非生分解性マルチフィルムにより引き起こされる諸問題に解決策を提案できる。一方で、PBATは植物病原菌により生産されるクチナーゼにより分解されることがわかっている[52,53,57]。このことは、PBATを農業で用いる場合、植物病原菌がPBATを炭素源として利用し増殖した結果、農作物に悪影響を及ぼす可能性があるということを意味している。つまり、PBATを農業用途で安全に使うためには、PBATの土壌分解に伴う土壌微生物叢変化を知る必要がある。

土壌埋設したPBATフィルムでは重量減少が見られた (Fig. 28)。一方、粕谷らは、滅菌した土壌中ではPBATフィルムが分解されないことを明らかにした[62]。これらのことは、生物学的要因すなわちPBAT分解微生物が生産するクチナーゼ[52,53,57]あるいはパーゼ[67]などにより、PBATフィルム表面加水分解が生じたことを示唆している。一方で、土壌埋設したPBATフィルムの分子量低下が認められた (Fig. 29)。このような、非生物学的要因による、ポリエステルの分子量低下は、今までにも報告されている[48,153]。これは、環境中に存在する水分子がフィルム内部に侵入し、分子鎖を切断するために生じる（塊状分解）。従って、土壌埋設したPBATフィルムの分子量低下は、非生物的因子による塊状分解によりもたらされたと考えられる[153]。SEMを用いたフィルムの表面形態観察より、土壌埋設3ヶ月後に、フィルム表面に亀裂が確認された (Fig. 30)。土壌中の水分子は、フィルム表面に形成された亀裂から内部に侵入し、エステル結合を切断したと考えられる。以上のことから、土壌中におけるPBATフィルムの分解には酵素的および非酵素的加水分解が寄与すると考えられる。

PBATが土壌微生物叢に及ぼす影響を評価するため、PCR-DGGE解析を行った。3および7ヶ月後、コントロール土壌 (CS) およびバルク土壌 (BS) 中の細菌種は互いに類似していた (Fig. 31)。このことから、PBATフィルムの土壌埋設は、BSの細菌叢にほとんど影響を及ぼさないことが明らかとなった。この結果は、他の化学合成ポリエステルであるポリ乳酸 (PLA)、ポリカプロラクトン (PCL)、およびポリ (ブチレンサクシネート-コ-アジペート) (PBSA) が土壌細菌叢に影響を与えないという結果と一致していた[108]。一方で、*Caenimonas* 属および *Hyphomicrobium* 属の細菌が、3ヶ月後のフィルム周辺土壌 (FS) のみで検出された。このことから、FSの細菌叢はPBATによりわずかに影響を受けることがわかった。*Caenimonas* 属を含む *Comamonadaceae* の細菌がプラスチックフィルム表面に形成されたバイオフィーム中から検出されていることに加え[154]、*Hyphomicrobium* 属細菌はバイオフィーム形成能を有することから[155]、これら細菌はPBATフィルム周辺にバイオフィームを形成し、増殖したため、FSから検出されたと考えられる。本群集解析では、試験期間を通して、PBAT分解細菌である *B. pumilus* が検出されなかった。このことから、*B. pumilus* はPBATの分解において分解者の一部ではあるけれども、PBATの分解により集積されないことがわかった。これは、*B. pumilus* がPBATモノマーをほとんど資化しないことと関係があると推定される。

本研究では、7ヶ月後のFSにおいてCSおよびBSよりも真菌の多様性が低下することがわかった。同様の結果が、ポリエステルポリウレタン、PCL、PBSu、およびPBSAのフィルムを用いた真菌叢解析からも得られている[109,142]。また、Ascomycota門に属する真菌がポリエステルフィルム表面に集積されることが報告されている[109]。本研究においても、

FS7中に存在する7種の真菌種のうち、同定できたものは全て Ascomycota 門に属していた (Table 20)。これらのことから、Ascomycota 門に属する株が PBAT フィルム表面に集積されると考えられる。以前、我々は Ascomycota 門に属する *Isaria fumosorosea* が土壌環境における PBAT の分解において重要な役割を果たすことを明らかにした [62]。加えて、Ascomycota 門の真菌が生産するクチナーゼ様酵素が PBAT を分解することも明らかとなっている [65]。従って、FS 中で Ascomycota 門の真菌が、クチナーゼ様酵素を用いて PBAT を分解し、その分解物を炭素源として利用することで増殖し、FS 中で優勢種となったと考えられる。

CS7 および BS7 の真菌叢は、BS7 中の *S. terrestris* (バンド 12) および未同定種 (バンド 24) の存在量が CS7 中のそれより多かったことを除いて、互いに類似していた。このことから、PBAT は BS の真菌叢に大きな影響を与えないものの、ある種の真菌の増殖に影響を与える可能性がある。*S. terrestris* および未同定種が FS7 中で検出されたことを考慮すると、これら 2 株は土壌中で PBAT の分解に関与している可能性がある。

定量 PCR の結果から (Fig. 33)、BS7 における細菌および真菌数が CS7 におけるそれよりも多かったことから、土壌細菌および真菌が PBAT を炭素源として利用して増殖したと考えられる。さらに、FS7 における細菌および真菌数は BS7 よりも多かった。土壌微生物の量は糖、有機酸、アミノ酸、および植物残渣などの炭素源添加により増加することが知られている [141]。FS7 における炭素源としての PBAT 分解物の量は、BS7 のそれよりも相対的に多いと考えられる。従って、BS7 より FS7 に存在する細菌および真菌の量が多くなったと推定される。

本試験では、植物病原菌が 7 ヶ月後の CS, BS, および FS から検出された (Fig. 32, Table 20)。特に、植物病原真菌である *S. terrestris* 近縁種は、BS7 で増加した。しかしながら、CS7 および BS7 で栽培した *B. rapa* var. *chinensis* の生育には、大きな違いが見られなかった (Fig. 34, Table 21)。このことは、PBAT の土壌埋設は本植物の生育にほとんど影響を与えないことを示している。土壌微生物叢変化、特に真菌叢変化が確認されたにもかかわらず、負の影響が本植物に見られなかった理由として 2 つのことが考えられる。一つは、宿主と病原菌の関係性から説明できる。*S. terrestris* は、玉ねぎの病原菌として報告例があるがアブラナ科の植物に対する病原性の報告はないため、アブラナ科の植物である *B. rapa* var. *chinensis* には悪影響を及ぼさなかったと考えられる [148]。他の理由として、*B. rapa* var. *chinensis* と植物生育促進根圏細菌 (PGPR) の関係性から説明できる。本試験土壌には、PGPR である *Azospirillum*, および *Mesorhizobium* 属細菌が存在していた。これら PGPR は、窒素固定 [91,92], リン酸塩の水溶化 [93,94], 植物ホルモンの分泌 [95], および植物病原微生物と競合することにより [97], 植物の生育を促進する。PGPR が存在していたため、PGPR が植物病原微生物によりもたらされる植物への悪影響を相殺した結果、*B. rapa* var. *chinensis* に負の影響が及ぼされなかった可能性が考えられる。

他方では、PBAT の土壌埋設に伴い放出される分解物は、大根、コショウソウ、およびカラスムギの生育に悪影響をもたらさないことが報告されている [156]。分解物を与える生態毒性の観点から考えると、PBAT の分解物により形成された微生物叢だけでなく、上述のようにその分解物自体も *B. rapa* var. *chinensis* に対して悪影響を及ぼさない。以上の結果から、PBAT を含む農業資材は、農作物の栽培に適していると考えられる。

第4章

総括

農業用マルチフィルムを用いることにより、農作物の収穫量を高めることができる。このため農業用マルチフィルムは、食料の安定供給が望まれる現代において、重要な農業資材の一つである。しかし、汎用性マルチフィルムの使用により引き起こされる、経済あるいは環境への負担が問題となっている。このような問題の解決策の一つとして、使用後にオンサイト処理可能な、生分解性マルチフィルムが注目されている。本博士論文では、生分解性マルチ材として利用される、ポリ(ブチレンアジペート-コ-テレフタレート) (PBAT) の中温環境における微生物分解機構を明らかにするため、好気性中温性 PBAT 分解細菌の単離、特徴づけ、および PBAT 加水分解酵素の特徴づけを行った。また、PBAT の土壌分解に伴う、土壌微生物叢変化を調べ、植物生育に対する影響を明らかにした。

第 1 章では、脂肪族芳香族共重合ポリエステルである PBAT の開発の歴史を述べた。また、PBAT の機械的特性および生分解性について記述した。さらに、PBAT の分解に関与する微生物や PBAT 加水分解酵素について詳説した。加えて、土壌微生物および土壌微生物叢と植物の相互作用について説明した。最後に、本研究の目的を述べた。

第 2 章では、土壌環境より単離した PBAT 分解細菌の特徴づけを行った。また、単離株が生産する PBAT 加水分解酵素のクローニングおよび特徴づけを行った。土壌環境より、3 株の PBAT 分解細菌、NKCM3201, NKCM3202, および NKCM3101 を単離した。系統発生解析より、これらの株は *Bacillus pumilus* に近縁であることがわかった。これら 3 株は PBAT フィルムをそれぞれ 12.2, 10.6, および 6.4 $\mu\text{g}/\text{day}/\text{cm}^2$ の速度で分解した。最も早い PBAT フィルム分解速度を有する NKCM3201 株を詳細に特徴づけした。本株は、好気的環境下において 30 °C から 40 °C でよく増殖する、好気性中温性細菌であった。本株より、648 bp の PBAT 加水分解酵素 (PBATH_{bp}) 遺伝子 (*pbath_{bp}*) をクローニングした。*pbath_{bp}* は、34 アミノ酸残基からなるシグナルペプチドを有する 215 アミノ酸残基をコードしていた。アミノ酸変異解析から、PBATH_{bp} は Ser77, Asp133, および His156 からなる触媒三残基を有するセリン加水分解酵素スーパーファミリーに属することがわかった。本酵素のホモロジー 3D モデリングより、本酵素がリッドドメインを持たない α/β 加水分解酵素であることがわかった。本酵素は、PBAT, PBSA, PESu, および PCL フィルムをそれぞれ 14.3, 3.3×10^2 , 7.0×10^2 , および 1.1×10^2 $\mu\text{g}/\text{day}/\text{cm}^2$ の速度で加水分解した。本酵素による PBAT 分解産物の液体クロマトグラフィー質量分析より、本酵素はブタンジオールおよびテレフタル酸間に形成されるエステル結合を、アジピン酸およびブタンジオール間に形成されるエステル結合よりもはるかに遅い速度で分解することがわかった。このエステル結合に対する選択性が PBSA, PESu, および PCL の分解速度に比べて PBAT の分解速度が遅い原因であると考えられる。PBATH_{bp} は、PBAT を、構成成分である 1,4-ブタンジオール、アジピン酸、およびテレフタル酸まで分解する一方で、NKCM3201 株はこれら構成成分を資化しなかった。このことから、本株が存在する自然環境下での PBAT の分解では、本株は PBATH_{bp} を生産することにより PBAT の 1 次分解に寄与し、分解に伴い生じた分解物の無機化 (2 次分解) は、土壌中に存在する他の微生物との共生系により達成されると結論付けた (Fig. 35)。

第 3 章では、30 °C における PBAT フィルムの土壌分解に伴う土壌微生物叢変化をポリメラーゼ連鎖反応-変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (PCR-DGGE) 法により調査した。フィルム

表面近傍土壌 (FS) の真菌叢は、7ヶ月間の PBAT 埋設後、大きく変化した。系統発生解析より、FS には、Ascomycota 門に属する真菌が集積されることがわかった。加えて、PBAT の存在はバルク土壌 (BS) においてある種の真菌の増殖に影響を与えることがわかった。一方、PBAT は、BS および FS の土壌細菌叢にほとんど影響を及ぼさず、PBAT 分解菌である *B. pumilus* は集積されなかった。また、7ヶ月間にわたる保温期間中、BS および FS から、植物生育促進細菌 (PGPR) である、*Azospirillum* および *Mesorhizobium* 属の細菌が検出された。植物生育の観点から考えると、PBAT を埋設した土壌で栽培した *Brassica rapa* var. *chinensis* の生育は、コントロール土壌で栽培したその生育と比べた際に、負の影響を受けないことがわかった。このことから、PBAT の土壌埋設による土壌微生物叢変化は、*B. rapa* var. *chinensis* の生育に影響を及ぼさないことが明らかとなった (Fig. 35)。

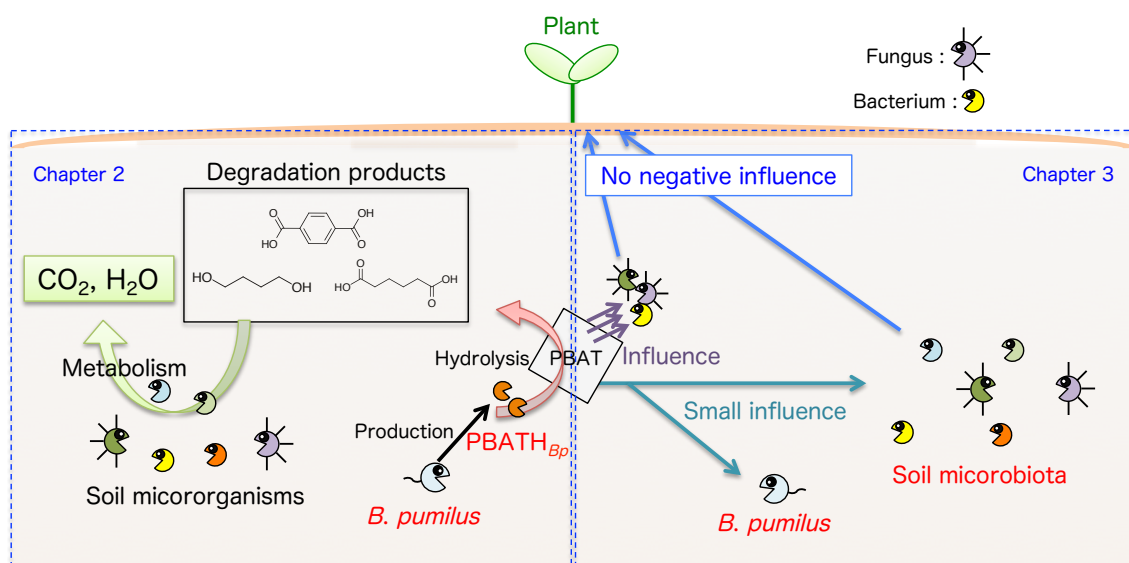


Fig. 35. Biodegradation mechanisms of PBAT in mild conditions (soil environments).

本研究を総括し、今後の課題について議論する。本研究では、中温環境下における PBAT の分解に、土壌細菌である *B. pumilus* が関与することが明らかとなった (Fig. 35)。PBAT 分解細菌 *B. pumilus* NKCM3201 株由来 PBAT 加水分解酵素 (PBATH_{Bp}) の特徴づけより、好気性中温性細菌由来の PBAT 分解酵素は、リッドドメインを持たない α/β 加水分解酵素であることが明らかとなった。この特徴は、嫌気性細菌由来 PBAT 加水分解酵素の特徴とは異なるものの、多くの好熱性細菌由来 PBAT 加水分解酵素 (クチナーゼ) の特徴と類似しており、細菌が生産する PBAT 加水分解酵素の多くは、リッドドメインを持たない α/β 加水分解酵素であると考えられる。一方、クチナーゼ様酵素は、植物病原微生物によって生産されることが報告されているため[77]、PBAT の土壌埋設は土壌微生物叢を変化させ、植物病原微生物を集積させること可能性がある。そこで、土壌微生物叢解析を行ったところ、中温条件下で土壌埋設された PBAT は、PBAT 周辺土壌における真菌叢に影響を及ぼすが、土壌全体の微生物叢にはほとんど影響を及ぼさないことがわかった (Fig. 35)。また、この結果から、PBAT 分解細菌 *B. pumilus* は土壌中で集積されないことが明らかとなった。これは、本株が PBAT の 1 次分解に関与するものの、PBAT モノマーを資化せず、PBAT の完全

分解が、本株と土壌微生物の共生系により達成されるためであると考えられる。このような、微生物共生系による生分解機構を持つ PBAT の土壌埋設は、植物病原微生物を含めた PBAT 分解微生物のみを土壌中に集積させることはほとんどないと考えられる。さらに、PBAT の土壌埋設により形成された微生物叢が *B. rapa* var. *chinensis* の生育を阻害しなかったという結果は、PBAT が生分解性マルチ材に適した材料であることを示している。一方で、PBAT のように分解菌が集積されない系では、材料の生分解速度は環境に因らず総じて遅く、また同時に材料の分解速度制御が困難である。このような問題を解決するために、本研究で単離された *B. pumilus* NKCM3201 株を土壌散布する方法を提案する。農作物を収穫後、農作物の残渣およびマルチフィルムをすき込み、その後、トラクターを用いて、この株を散布することにより、PBAT の分解が加速されることが考えられる (Fig. 36)。さらに、*B. pumilus* は、植物生育促進細菌としても報告例があるため[157]、この株を散布することにより、植物の生育促進作用も期待できる。

本博士論文により得られた結果は、土壌などの中温環境における PBAT の生分解機構解明において重要な、知見となるだろう。

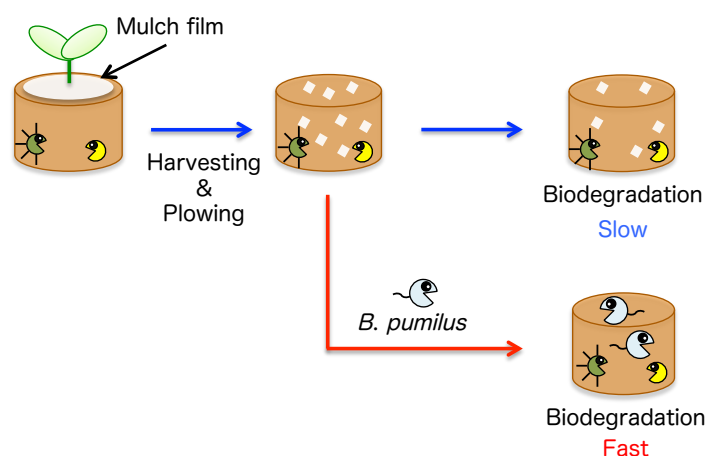


Fig. 36. Control of the biodegradation of biodegradable mulch films.

参考文献

- [1] W.J. Lamont. Plastics: Modifying the microclimate for the production of vegetable crops. *Horttechnology* 15, 477-481 (2005)
- [2] J.C. Díaz-Pérez. Root zone temperature, plant growth and yield of broccoli [*Brassica oleracea* (Plenck) var. *italica*] as affected by plastic film mulches. *Sci. Hort.* 123, 156-163 (2009)
- [3] L. Ibarra-Jimenez, A. Zermeño-González, J. Munguia-Lopez, and M.A. Rosario. Quezada-Martin, M. De La Rosa-Ibarra. Photosynthesis, soil temperature and yield of cucumber as affected by colored plastic mulch. *Acta Agr. Scand. B-S. P.* 58, 372-378 (2008)
- [4] A. Ramakrishna, H.M. Tam, S.P. Wani, and T.D. Long. Effect of mulch on soil temperature, moisture, weed infestation and yield of groundnut in northern Vietnam. *Field Crop. Res.* 95, 115-125 (2006)
- [5] G.G. Gordon, W.G. Foshee, S.T. Reed, J.E. Brown, and E.L. Vinson. The effects of colored plastic mulches and row covers on the growth and yield of okra. *Horttechnology* 20, 224-233 (2010)
- [6] J.E. Brown, J.M. Dangler, F.M. Woods, K.M. Tilt, M.D. Henshaw, W.A. Griffey, and M.S. West. Delay in mosaic virus onset and aphid vector reduction in summer squash grown on reflective mulches. *Hortscience* 28, 895-896 (1993)
- [7] L. Shi, L. Ao, H. Kang, and H. Su. Evaluation of biodegradable films made of waste mycelium and poly (vinyl alcohol) on the yield of Pak-Choi. *J. Polym. Environ.* 20, 492-500 (2012)
- [8] Kasperbauer, MJ. Strawberry yield over red versus black plastic mulch. *Crop Sci.* 40, 171-174 (2000)
- [9] J.C. Díaz-Pérez and K.D. Batal. Colored plastic film mulches affect tomato growth and yield via changes in root-zone temperature. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 127, 127-135 (2002)
- [10] L. Ibarra, J. Flores, and J.C. Díaz-Pérez. Growth and yield of muskmelon in response to plastic mulch and row covers. *Sci. Hort.* 87, 139-145 (2001)
- [11] W.H. Elmer. Comparison of plastic mulch and nitrogen form on the incidence of *Verticillium* wilt of eggplant. *Plant Dis.* 84, 1231-1234 (2000)
- [12] N. Alexandratos, and J. Bruinsma. World agriculture towards 2030/2050: the 2012 revision (No. 12-03, p. 4). Rome, FAO: ESA Working paper (2012)
- [13] A.P. Tai, M.V. Martin, and C.L. Heald. Threat to future global food security from climate change and ozone air pollution. *Nat. Clim. Chang.* 4, 817-821 (2014)
- [14] W.J. Lament. Plastic mulches for the production of vegetable crops. *Horttechnology* 3, 35-39 (1993)
- [15] S. Kasirajan, and M. Ngouajio. Polyethylene and biodegradable mulches for agricultural applications: a review. *Agron. Sustain. Dev.* 32, 501-529 (2012)
- [16] Y. Changrong, H. Wenqing, N. C. Turner, L. Enke, L. Qin, and L. Shuang. Plastic-film mulch in Chinese agriculture: Importance and problems. *World Agr.* 4, 32-36 (2014)
- [17] E. K. Liu, W. Q. He, and C. R. Yan. ‘White revolution’to ‘white pollution’—agricultural

- plastic film mulch in China. *Environmental Research Letters*, 9, doi: Artn 091001 10.1088/1748-9326/9/9/091001 (2014)
- [18] A. P. Bilck, M. V. Grossmann, and F. Yamashita. Biodegradable mulch films for strawberry production. *Polym. Test.* 29, 471-476 (2010)
- [19] A. Anzalone, A. Cirujeda, J. Aibar, G. Pardo, and C. Zaragoza. Effect of biodegradable mulch materials on weed control in processing tomatoes. *Weed Technol.* 24, 369-377 (2010)
- [20] H. K. Kitamoto, Y. Shinozaki, X. H. Cao, T. Morita, M. Konishi, K. Tago, H. Kajiwara, M. Koitabashi, S. Yoshida, T. Watanabe, Y. Sameshima-Yamashita, T. Nakajima-Kambe, and S. Tsushima. Phyllosphere yeasts rapidly break down biodegradable plastics. *AMB express*, 1, 1 (2011)
- [21] F. Touchaleaume, L. Martin-Closas, H. Angellier-Coussy, A. Chevillard, G. Cesar, N. Gontard, and E. Gastaldi. Performance and environmental impact of biodegradable polymers as agricultural mulching films. *Chemosphere.* 144, 433-439 (2016)
- [22] M. Koitabashi, Y. Sameshima-Yamashita, T. Watanabe, Y. Shinozaki, and H. Kitamoto. Phylloplane fungal enzyme accelerate decomposition of biodegradable plastic film in agricultural settings. *JARQ-Jpn. Agr. Res. Q.* 50, 229-234 (2016)
- [23] M. Ngouajio, R. Auras, R.T. Fernandez, M. Rubino, J.W. Counts, T. Kijchavengkul, Field performance of aliphatic-aromatic copolyester biodegradable mulch films in a fresh market tomato production system. *Horttechnology* 18, 605-610 (2008)
- [24] S. Kasirajan, and M. Ngouajio. Polyethylene and biodegradable mulches for agricultural applications: a review. *Agron. Sustain. Dev.* 32, 501-529 (2012)
- [25] T. Kijchavengkul, R. Auras, M. Rubino, M. Ngouajio, and R.T. Fernandez, Assessment of aliphatic-aromatic copolyester biodegradable mulch films. Part I: field study, *Chemosphere* 71, 942-953 (2008)
- [26] R.D. Fields, F. Rodriguez, and R.K. Finn. Microbial degradation of polyesters: polycaprolactone degraded by *P. pullulans*. *J. Appl. Polym. Sci.* 18, 3571-3579 (1974)
- [27] R. Kavelman, and B. Kendrick. Degradation of a plastic-poly epsilon-caprolactone-by *Hyphomycetes*. *Mycologia* 70, 87-103 (1978)
- [28] C.V. Benedict, W.J. Cook, P. Jarrett, J.A. Cameron, A.J. Huang, and J.P. Bell. Fungal degradation of polycaprolactones. *J. Appl. Polym. Sci.* 28, 327-334 (1983)
- [29] C.V. Benedict, J.A. Cameron, and S.J. Huang. Polycaprolactone degradation by mixed and pure cultures of bacteria and a yeast. *J. Appl. Polym. Sci.* 28, 335-342 (1983)
- [30] A.M. Kaplan, R.T. Darby, M. Greenberger, and M.R. Rodgers. Microbial deterioration of polyurethane systems. *Dev. Ind. Microbiol.* 82, 362-371 (1968)
- [31] 山野勝次. プラスチックおよび金属の微生物による劣化とその防止対策. 実務表面技術 28, 8-12 (1981)
- [32] J.G. Derraik. The pollution of the marine environment by plastic debris: a review. *Mar. Pollut. Bull.* 44, 842-852 (2002)
- [33] C.J. Moore. Synthetic polymers in the marine environment: A rapidly increasing, long-term threat. *Environ. Res.* 108, 131-139 (2008)
- [34] H.O.W. Eggin, J. Mills, A. Holt, and G. Scott. Biodeterioration and biodegradation of

- synthetic polymers. *Microbial Aspects of Pollution*, 267-279 (1971)
- [35] H. Brandl, R.A. Gross, R.W. Lenz, and R.C. Fuller. *Pseudomonas oleovorans* as a source of poly (β -hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 1977-1982 (1988)
- [36] J. Mergaert, A. Webb, C. Anderson, A. Wouters, and J. Swings. Microbial degradation of poly (3-hydroxybutyrate) and poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 3233-3238 (1993)
- [37] J. Mergaert, C. Anderson, A. Wouters, and J. Swings. Microbial degradation of poly (3-hydroxybutyrate) and poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in compost. *J. Environ. Polym. Degr.* 2, 177-183 (1994)
- [38] K. Kasuya, K. Takagi, S. Ishiwatari, Y. Yoshida, and Y. Doi. Biodegradabilities of various aliphatic polyesters in natural waters. *Polym. Degrad. Stabil.* 59, 327-332 (1998)
- [39] I. Noda, P.R. Green, M.M. Satkowski, and L.A. Schechtman. Preparation and properties of a novel class of polyhydroxyalkanoate copolymers. *Biomacromolecules.* 6, 580-586 (2005)
- [40] M. Labet, and W. Thielemans. Synthesis of polycaprolactone: a review. *Chem. Soc. Rev.* 38, 3484-3504 (2009)
- [41] R.A. Auras, L.T. Lim, S.E. Selke, and H. Tsuji. Poly (lactic acid): synthesis, structures, properties, processing, and applications. *John Wiley & Sons* 10, (2011)
- [42] T. Fujimaki. Processability and properties of aliphatic polyesters, 'BIONOLLE', synthesized by polycondensation reaction. *Polym. Degrad. Stabil.* 59, 209-214 (1998)
- [43] R.A. Gross, and B. Kalra. Biodegradable polymers for the environment. *Science* 297, 803-807 (2002)
- [44] U. Witt, R.J. Müller, and W.D. Deckwer. New biodegradable polyester-copolymers from commodity chemicals with favorable use properties. *J. Environ. Polym. Degr.* 3, 215-223 (1995)
- [45] R.J. Müller, I. Kleeberg, and W.D. Deckwer. Biodegradation of polyesters containing aromatic constituents. *J. Biotechnol.* 86, 87-95 (2001)
- [46] U. Witt, R.J. Müller, and W.D. Deckwer. Biodegradation behavior and material properties of aliphatic/aromatic polyesters of commercial importance. *J. Environ. Polym. Degr.* 5, 81-89 (1997)
- [47] M. Yamamoto, U. Witt, G. Skupin, D. Beimborn, and R.J. Müller. Biodegradable aliphatic-aromatic polyesters: "Ecoflex®". *Biopolymers Online.* (2005)
- [48] T. Kijchavengkul, R. Auras, M. Rubino, S. Selke, M. Ngouajio, and R. T. Fernandez. Biodegradation and hydrolysis rate of aliphatic aromatic polyester. *Polym. Degrad. Stabil.* 95, 2641-2647 (2010)
- [49] K. Numata, H. Abe, and T. Iwata. Biodegradability of poly (hydroxyalkanoate) materials. *Materials* 2, 1104-1126 (2009)
- [50] I. Kleeberg, C. Hetz, R. M. Kroppenstedt, R. J. Müller, and W. D. Deckwer. Biodegradation of aliphatic-aromatic copolyesters by *Thermomonospora fusca* and other thermophilic compost isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 1731-1735 (1998)
- [51] U. Witt, T. Einig, M. Yamamoto, I. Kleeberg, W.D. Deckwer, and R.J. Müller.

- Biodegradation of aliphatic-aromatic copolyesters: evaluation of the final biodegradability and ecotoxicological impact of degradation intermediates. *Chemosphere* 44, 289-299 (2001)
- [52] I. Kleeberg, K. Welzel, J. VandenHeuvel, R.J. Müller, and W.D. Deckwer. Characterization of a new extracellular hydrolase from *Thermobifida fusca* degrading aliphatic-aromatic copolyesters. *Biomacromolecules* 6, 262-270 (2005)
- [53] S. Chen, X. Tong, R.W. Woodard, G. Du, and J. Wu. Identification and characterization of bacterial cutinase. *J. Biol. Chem.* 283, 25854-25862 (2008)
- [54] A. Heredia. Biophysical and biochemical characteristics of cutin, a plant barrier biopolymer. *Bba-Gen Subjects* 1620, 1-7 (2003)
- [55] M. Shaykh, C. Soliday, and P.E. Kolattukudy. Proof for the production of cutinase by *Fusarium solani f. pisi* during penetration into its host, *Pisum sativum*. *Plant Physiol.* 60, 170-172 (1977)
- [56] X. Hu, U. Thumarat, X. Zhang, M. Tang, and F. Kawai. Diversity of polyester-degrading bacteria in compost and molecular analysis of a thermoactive esterase from *Thermobifida alba* AHK119. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87, 771-779 (2010)
- [57] U. Thumarat, R. Nakamura, T. Kawabata, H. Suzuki, and F. Kawai. Biochemical and genetic analysis of a cutinase-type polyesterase from a thermophilic *Thermobifida alba* AHK119. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 95, 419-430 (2012)
- [58] K. Kitadokoro, U. Thumarat, R. Nakamura, K. Nishimura, H. Karatani, H. Suzuki, and F. Kawai. Crystal structure of cutinase Est119 from *Thermobifida alba* AHK119 that can degrade modified polyethylene terephthalate at 1.76 Å resolution. *Polym. Degrad. Stabil.* 97, 771-775 (2012)
- [59] U. Thumarat, T. Kawabata, M. Nakajima, H. Nakajima, A. Sugiyama, K. Yazaki, T. Tada, T. Waku, N. Tanaka, and F. Kawai. Comparison of genetic structures and biochemical properties of tandem cutinase-type polyesterases from *Thermobifida alba* AHK119. *J. Biosci. Bioeng.* 120, 491-497 (2015)
- [60] F. Kawai, M. Oda, T. Tamashiro, T. Waku, N. Tanaka, M. Yamamoto, H. Mizushima, T. Miyakawa, and M. Tanokura. A novel Ca²⁺-activated, thermostabilized polyesterase capable of hydrolyzing polyethylene terephthalate from *Saccharomonospora viridis* AHK190. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 10053-10064 (2014)
- [61] V. Perz, K. Bleymaier, C. Sinkel, U. Kueper, M. Bonnekessel, D. Ribitsch, G. M. Guebitz. Substrate specificities of cutinases on aliphatic-aromatic polyesters and on their model substrates. *New Biotechnol.* 33, 295-304 (2016)
- [62] K. Kasuya, N. Ishii, Y. Inoue, K. Yazawa, T. Tagaya, T. Yotsumoto, J. Kazahaya, and D. Nagai. Characterization of a mesophilic aliphatic-aromatic copolyester-degrading fungus. *Polym. Degrad. Stabil.* 94, 1190-1196 (2009)
- [63] F.T. Tan, D.G. Cooper, M. Marić, and J.A. Nicell. Biodegradation of a synthetic co-polyester by aerobic mesophilic microorganisms. *Polym. Degrad. Stabil.* 93, 1479-1485 (2008)
- [64] T. Nakajima-Kambe, F. Ichihashi, R. Matsuzoe, S. Kato, and N. Shintani. Degradation of aliphatic-aromatic copolyesters by bacteria that can degrade aliphatic polyesters. *Polym. Degrad. Stabil.* 94, 1901-1905 (2009)

- [65] K. Suzuki, M. T. Noguchi, Y. Shinozaki, M. Koitabashi, Y. Sameshima-Yamashita, S. Yoshida, T. Fujii, and H. K. Kitamoto. Purification, characterization, and cloning of the gene for a biodegradable plastic-degrading enzyme from *Paraphoma*-related fungal strain B47-9. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 4457-4465 (2014)
- [66] T. Watanabe, K. Suzuki, Y. Shinozaki, T. Yarimizu, S. Yoshida, Y. Sameshima-Yamashita, M. Koitabashi, and H. K. Kitamoto. A UV-induced mutant of *Cryptococcus flavus* GB-1 with increased production of a biodegradable plastic-degrading enzyme. *Process Biochem.* 50, 1718-1724 (2015)
- [67] A. Biundo, A. Hromic, T. Pavkov-Keller, K. Gruber, F. Quartinello, K. Haernvall, V. Perz, M. S. Arrell, M. Zinn, D. Ribitsch, and G. M. Guebitz. Characterization of a poly (butylene adipate-co-terephthalate)-hydrolyzing lipase from *Pelosinus fermentans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 1753-1764 (2016)
- [68] V. Perz, A. Baumschlager, K. Bleymaier, S. Zitzenbacher, A. Hromic, G. Steinkellner, A. Pairitsch, A. Łyskowski, K. Gruber, C. Sinkel, U. Küper, D. Ribitsch, and G. M. Guebitz. Hydrolysis of synthetic polyesters by *Clostridium botulinum* esterases. *Biotechnol. Bioeng.* 113, 1024-1034 (2016)
- [69] 日本バイオプラスチック協会ホームページ : <http://www.jbpaweb.net/index.htm>
- [70] J. Flood, The importance of plant health to food security. *Food Sec.* 2, 215-231 (2010)
- [71] J. Popp, and K. Hantos. The impact of crop protection on agricultural production. *Stud. Agr. Econ.* 113, 47-66 (2011)
- [72] R.E. Smith. The parasitism of *Botrytis cinerea*. *Bot. Gaz.* 33, 421-436 (1902)
- [73] G.K. Link. A physiological study of two strains of *Fusarium* in their casual relation to tuber rot and wilt of potato. *Bot. Gaz.* 62, 169-209 (1916)
- [74] D. Atanasov. *Fusarium-blight (scab) of wheat and other cereals*. *J. Agric. Res.* (1920).
- [75] W.E. McKeen. Mode of penetration of epidermal cell walls of *Vicia faba* by *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*, 64, 461-467 (1974)
- [76] M. Shaykh, C. Soliday, and P.E. Kolattukudy. Proof for the production of cutinase by *Fusarium solani* f. *pisi* during penetration into its host, *Pisum sativum*. *Plant Physiol.* 60, 170-172 (1977)
- [77] J.D. Walton. Deconstructing the cell wall. *Plant Physiol.* 104, 1113 (1994)
- [78] G.E. Kikot, R.A. Hours, and T.M. Alconada. Contribution of cell wall degrading enzymes to pathogenesis of *Fusarium graminearum*: a review. *J. Basic Microb.* 49, 231-241 (2009)
- [79] P.N. Dodds, and J.P. Rathjen. Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nat. Rev. Genet.* 11, 539-548 (2010)
- [80] T Sato. Plant diseases and their pathogenic microbes in Japan. *Microbiol. Cult. Coll.* 29, 79-90 (2013)
- [81] J.L. Dangi, D.M. Horvath, and B.J. Staskawicz. Pivoting the plant immune system from dissection to deployment. *Science*, 341, 746-751 (2013)
- [82] S. Ferrari, D.V. Savatin, F. Sicilia, G. Gramegna, F. Cervone, and G. De Lorenzo. Oligogalacturonides: plant damage-associated molecular patterns and regulators of growth and development. *Front. Plant Sci.* 4, 49 (2013)

- [83] W. Underwood. The plant cell wall: a dynamic barrier against pathogen invasion. *Front. Plant Sci.* 3, 67-72 (2007)
- [84] B.P. Thomma, T. Nürnberger, and M.H. Joosten. Of PAMPs and effectors: the blurred PTI-ETI dichotomy. *Plant Cell*, 23, 4-15 (2011)
- [85] A.A. Gust, R. Biswas, H.D. Lenz, T. Rauhut, S. Ranf, B. Kemmerling, F. Götz, E. Glawischnig, J. Lee, G. Felix, and T. Nürnberger. Bacteria-derived peptidoglycans constitute pathogen-associated molecular patterns triggering innate immunity in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 282, 32338-32348 (2007)
- [86] K.R. Davis, A.G. Darvill, P. Albersheim, and A. Dell. Host-pathogen interaction. *Plant Physiol.* 80, 568-577 (1986)
- [87] E. Gaulin, N. Dramé, C. Lafitte, T. Torto-Alalibo, Y. Martinez, C. Ameline-Torregrosa, M. Khatib, H. Mazarguil, F. Villalba-Mateos, S. Kamoun, C. Mazars, B. Dumas, A. Bottin, M. Esquerré -Tugayé, and M Rickauer. Cellulose binding domains of a *Phytophthora* cell wall protein are novel pathogen-associated molecular patterns. *Plant Cell*, 18, 1766-1777 (2006)
- [88] K.R. Davis, and K. Hahlbrock. Induction of defense responses in cultured parsley cells by plant cell wall fragments. *Plant Physiol.* 84, 1286-1290 (1987)
- [89] R. Galletti, C. Denoux, S. Gambetta, J. Dewdney, F.M. Ausubel, G. De Lorenzo, and S. Ferrari. The AtrbohD-mediated oxidative burst elicited by oligogalacturonides in *Arabidopsis* is dispensable for the activation of defense responses effective against *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol.* 148, 1695-1706 (2008)
- [90] R.M. Zablotowicz, E.M. Tipping, R. Lifshitz, and J.W. Kloepper. Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers. *The rhizosphere and plant growth* 315-326 (1991)
- [91] O. Steenhoudt, and J. Vanderleyden. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiol. Rev.* 24, 487-506 (2000)
- [92] M. Hungria, L.H. Boddey, M.A. Santos, and M.A.T. Vargas. Nitrogen fixation capacity and nodule occupancy by *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii* strains. *Biol. Fert. Soils* 27, 393-399 (1998)
- [93] H. Rodriguez, T. Gonzalez, I. Goire, and Y. Bashan. Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. *Naturwissenschaften* 91, 552-555 (2004)
- [94] A. Peix, A.A. Rivas-Boyer, P.F. Mateos, C. Rodriguez-Barrueco, E. Martínez-Molina, and E. Velazquez. Growth promotion of chickpea and barley by a phosphate solubilizing strain of *Mesorhizobium mediterraneum* under growth chamber conditions. *Soil Biol. Biochem.* 33, 103-110 (2001)
- [95] T.M. Tien, M.H. Gaskins, and D.H. Hubbell. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). *Appl. Environ. Microbiol.* 37, 1016-1024 (1979)
- [96] P. Shanahan, D.J. O'Sullivan, P. Simpson, J.D. Glennon, and F. O'Gara. Isolation of 2,4-diacetylphlorogucinol from a fluorescent pseudomonad and investigation of physiological

- parameters influencing its production. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 353–358 (1992)
- [97] M.L. Tortora, J.C. Díaz-Ricci, and R.O. Pedraza. *Azospirillum brasilense* siderophores with antifungal activity against *Colletotrichum acutatum*. *Arch. Microbiol.* 193, 275-286 (2011)
- [98] P. Jeffries, S. Gianinazzi, S. Perotto, K. Turnau, and J.M. Barea. The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. *Biol. Fertil. Soils*, 37, 1-16 (2003)
- [99] U. Nehls. Mastering ectomycorrhizal symbiosis: the impact of carbohydrates. *J. Exp. Bot.* 59, 1097-1108 (2008)
- [100] J.A. Lau, and J.T. Lennon. Evolutionary ecology of plant-microbe interactions: soil microbial structure alters selection on plant traits. *New Phytol.* 192, 215-224 (2011)
- [101] K. Panke-Buisse, A.C. Poole, J.K. Goodrich, R.E. Ley, and J. Kao-Kniffin, J. Selection on soil microbiomes reveals reproducible impacts on plant function. *ISME J.* 9, 980-989 (2015)
- [102] A.E. Bennett, D. Grussu, J. Kam, S. Caul, and C. Halpin. Plant lignin content altered by soil microbial community. *New Phytol.* 206, 166-174 (2015)
- [103] R. Mendes, M. Kruijt, I. de Bruijn, E. Dekkers, M. van der Voort, J.H.M. Schneider, Y.M. Piceno, T.Z. DeSantis, G.L. Andersen, P.A.H.M. Bakker, and J.M. Raaijmakers. Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. *Science*, 332, 1097-1100 (2011)
- [104] M. van Agtmaal, G.J. van Os, W.G. Hol, M.P. Hundscheid, W.T. Runia, C.A. Hordijk, and W. De Boer. Legacy effects of anaerobic soil disinfestation on soil bacterial community composition and production of pathogen-suppressing volatiles. *Front. Microbiol.* 6, 701 (2015)
- [105] M.G. Bakker, J.M. Chaparro, D.K. Manter, and J.M. Vivanco. Impacts of bulk soil microbial community structure on rhizosphere microbiomes of *Zea mays*. *Plant Soil* 392, 115-126 (2015)
- [106] B.S. Griffiths, K. Ritz, N. Ebbelwhite, and G. Dobson. Soil microbial community structure: effects of substrate loading rates. *Soil Biol. Biochem.* 31, 145-153 (1999)
- [107] K. Sato, Y. Azama, M. Nogawa, G. Taguchi, and M. Shimosaka. Analysis of a change in bacterial community in different environments with addition of chitin or chitosan. *J. Biosci. Bioeng.* 109, 472-478 (2010)
- [108] A. Masui, S. Ikawa, N. Fujiwara, and H. Hirai. Influence for soil environment by continuing use of biodegradable plastic. *J. Polym. Environ.* 19, 622-627 (2011)
- [109] M. Koitabashi, M.T. Noguchi, Y. Sameshima-Yamashita, S. Hiradate, K. Suzuki, S. Yoshida, T. Watanabe, Y. Shinozaki, S. Tsushima, and H.K. Kitamoto. Degradation of biodegradable plastic mulch films in soil environment by phylloplane fungi isolated from gramineous plants. *AMB Express* 2, 1-10 (2012)
- [110] M. Kamiya, S. Asakawa, and M. Kimura. Molecular analysis of fungal communities of biodegradable plastics in two Japanese soils, *Soil Sci. Plant Nutr.* 53, 568-574 (2007)
- [111] E.R. Zettler, T.J. Mincer, and L.A. Amaral-Zettler. Life in the “Plastisphere”: Microbial communities on plastic marine debris. *Environ. Sci. Technol.* 47, 7137-7146 (2013)
- [112] C.A. De Tender, L.I. Devriese, A. Haegeman, S. Maes, T. Ruttink, and P. Dawyndt. Bacterial community profiling of plastic litter in the Belgian part of the North sea. *Environ. Sci. Technol.* 49,

9629-9638 (2015)

- [113] K. Tamura, G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, and S. Kumar. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725-2729 (2013)
- [114] N. Saitou, and M. Nei. The Neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406-425 (1987)
- [115] M. Mizukami, H. Hanagata, and A. Miyauchi. *Brevibacillus* expression system: host-vector system for efficient production of secretory proteins. *Curr. Pharm. Biotechnol* 11, 251-258 (2010)
- [116] K. Arnold, L. Bordoli, J. Kopp, and T. Schwede. The SWISS-MODEL Workspace: a web-based environment for protein structure homology modeling. *Bioinformatics* 22, 195-201 (2006)
- [117] W. Humphrey, A. Dalke, and K. Schulten. VMD: visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* 14, 33-38 (1996)
- [118] E.F. Pettersen, T.D. Goddard, C.C. Huang, G.S. Couch, D.M. Greenblatt, E.C. Meng, and T.E. Ferrin. UCSF Chimera visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* 25, 1605-1612 (2004)
- [119] S.N. Ho, H.D. Hunt, R.M. Horton, J.K. Pullen, and L.R. Pease. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77, 51-59 (1989)
- [120] U.K. Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685 (1970)
- [121] M.M. Bradford. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254 (1976)
- [122] Y. Tachibana, T. Masuda, M. Funabashi, and M. Kunioka. Chemical synthesis of fully biomass-based poly(butylene succinate) from inedible-biomass-based furfural and evaluation of its biomass carbon ratio. *Biomacromolecules* 11, 2760-2765 (2010)
- [123] Y. Akutsu-Shigeno, T. Teeraphatpornchai, K. Teamtisong, N. Nomura, H. Uchiyama, T. Nakahara, and T. Nakajima-Kambe. Cloning and sequencing of a poly (DL-lactic acid) depolymerase gene from *Paenibacillus amylolyticus* strain TB-13 and its functional expression in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2498-2504 (2003)
- [124] G. van Pouderoyen, T. Eggert, K.E. Jaeger, and B.W. Dijkstra. The crystal structure of *Bacillus subtilis* lipase: a minimal α/β hydrolase fold enzyme. *J. Mol. Biol.* 309, 215-226 (2001)
- [125] M.B. Nthangeni, H.G. Patterson, A. van Tonder, W.P. Vergeer, and D. Litthauer. Over-expression and properties of a purified recombinant *Bacillus licheniformis* lipase: a comparative report on *Bacillus lipases*. *Enzyme Microb. Tech.* 28, 705-712 (2001)
- [126] N. Hayase, H. Yano, E. Kudoh, C. Tsutsumi, K. Ushio, Y. Miyahara, S. Tanaka, and K. Nakagawa. Isolation and characterization of poly (butylene succinate-co-butylene adipate)-degrading microorganism. *J. Biosci. Bioeng.* 97, 131-133 (2004)
- [127] J.P. Hernandez, L.E. de-Bashan, D.J. Rodriguez, Y. Rodriguez, and Y. Bashan. Growth promotion of the freshwater microalga *Chlorella vulgaris* by the nitrogen-fixing, plant growth-promoting bacterium *Bacillus pumilus* from arid zone soils. *Eur. J. Soil Biol.* 45,

- 88-93 (2009)
- [128] G. Ahmadian, G. Degrassi, V. Venturi, D.R. Zeigler, M. Soudi, and P. Zanguinejad. *Bacillus pumilus* SG2 isolated from saline conditions produces and secretes two chitinases. *J. Appl. Microbiol.* 103, 1081-1089 (2007)
- [129] S. Sulaiman, D.J. You, E. Kanaya, Y. Koga, and S. Kanaya. Crystal structure and thermodynamic and kinetic stability of metagenome-derived LC-cutinase. *Biochemistry* 53, 1858-1869 (2014)
- [130] T. Hisano, K. Kasuya, Y. Tezuka, N. Ishii, T. Kobayashi, M. Shiraki, E. Oroudjev, H. Hansma, T. Iwata, Y. Doi, T. Saito, and K. Miki. The crystal structure of poly hydroxybutyrate depolymerase from *Penicillium funiculosum* provides insights into the recognition and degradation of biopolyesters. *J. Mol. Biol.* 356, 993-1004 (2006)
- [131] S. Chen, L. Su, J. Chen, and J. Wu. Cutinase: characteristics, preparation, and application. *Biotechnol. Adv.* 31, 1754-1767 (2013)
- [132] Z.S. Derewenda. Structure and function of lipases. *Adv. Protein Chem.* 45, 1-52 (1994)
- [133] K.E. Jaeger, A. Steinbüchel, and D. Jendrossek. Substrate specificities of bacterial polyhydroxyalkanoate depolymerases and lipases: bacterial lipases hydrolyze poly (omega-hydroxyalkanoates). *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3113-3118 (1995)
- [134] T. Miyakawa, H. Mizushima, J. Ohtsuka, M. Oda, F. Kawai, and M. Tanokura. Structural basis for the Ca²⁺-enhanced thermostability and activity of PET-degrading cutinase-like enzyme from *Saccharomonospora viridis* AHK190. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 4297-4307 (2015)
- [135] M. Schué, D. Maurin, R. Dhouib, V. Delorme, G. Lambeau, F. Carrière, and S. Canaan. Two cutinase-like proteins secreted by *Mycobacterium tuberculosis* show very different lipolytic activities reflecting their physiological function. *FASEB J.* 24, 1893-1903 (2010)
- [136] M.B. Rubio, R.E. Cardoza, R. Hermosa, S. Gutiérrez, and E. Monte. Cloning and characterization of the *Thcut1* gene encoding a cutinase of *Trichoderma harzianum* T34. *Curr. Genet.* 54, 301-312 (2008)
- [137] T. Kijchavengkul, R. Auras, M. Rubino, E. Alvarado, J.R.C. Montero, and J.M. Rosales. Atmospheric and soil degradation of aliphatic-aromatic polyester films. *Polym. Degrad. Stabil.* 95, 99-107 (2010)
- [138] M. Siotto, E. Sezenna, S. Saponaro, F. Degli Innocenti, M. Tosin, L. Bonomo, and V. Mezzanotte. Kinetics of monomer biodegradation in soil. *J. Environ. Manage.* 93, 31-37 (2012)
- [139] K. Ishii, M. Fukui, and S. Takii, Microbial succession during a composting process as evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *J. Appl. Microbiol.* 89, 768-777 (2000)
- [140] C.H. Nakatsu, V. Torsvik, and L. Øvreås. Soil community analysis using DGGE of 16S rDNA polymerase chain reaction products. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 64, 1382-1388 (2000)
- [141] M.A. De Graaff, A.T. Classen, H.F. Castro, and C.W. Schadt. Labile soil carbon inputs mediate the soil microbial community composition and plant residue decomposition rates. *New Phytol.* 188, 1055-1064 (2010)

- [142] L. Cosgrove, P.L. McGeechan, G.D. Robson, and P.S. Handley. Fungal communities associated with degradation of polyester polyurethane in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 5817-5824 (2007)
- [143] J.M. Guillamón, J. Sabaté, E. Barrio, J. Cano, and A. Querol. Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. *Arch. Microbiol.* 169, 387-392 (1998)
- [144] Y. Tezuka, N. Ishii, K. Kasuya, and H. Mitomo. Degradation of poly(ethylene succinate) by mesophilic bacteria. *Polym. Degrad. Stabil.* 84, 115-121 (2004)
- [145] J.K. Vessey. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil* 255, 571-586 (2003)
- [146] H.B. Singh, J.K. Johri, M. Singh, A. Singh, A. Tripathi, and S.P. Singh. A new leaf spot disease of *Cuphea* spp. caused by *Chaetomella raphigera*. *Bull. OEPP/EPPO Bull.* 29, 213-214 (1999)
- [147] O.E. Eriksson, and D.L. Hawksworth. *Saccharicola*, a new genus for two *Leptosphaeria* species on sugar cane. *Mycologia* 95, 426-433 (2003)
- [148] A.G.A. Orio, E. Brücher, and D.A. Ducasse. A strain of *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* shows a specific antagonistic activity against the soil-borne pathogen of onion *Setophoma terrestris*. *Eur. J. Plant Pathol.* 144, 217-223 (2016)
- [149] B. Tóth, M. Csösz, J. Dijksterhuis, J.C. Frisvad, and J. Varga. *Pithomyces chartarum* as a pathogen of wheat. *J. Plant Pathol.* 89, 405-408 (2007)
- [150] V. Macko, M.B. Stimmel, T.J. Wolpert, L.D. Dunkle, W. Acklin, R. Banteli, B. Jaun, and D. Arigoni. Structure of the host-specific toxins produced by the fungal pathogen *Periconia circinata*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 9574-9578 (1992)
- [151] R.G. Bhat, and K.V. Subbarao. Host range specificity in *Verticillium dahliae*. *Phytopathology* 89, 1218-1225 (1999)
- [152] A. Carlucci, M.L. Raimondo, J. Santos, and A.J.L. Phillips. *Plectosphaerella* species associated with root and collar rots of horticultural crops in southern Italy. *Persoonia* 28, 34-48 (2012)
- [153] H. Tsuji, A. Mizuno, and Y. Ikada. Properties and morphology of poly(L-lactide). III. Effects of initial crystallinity on long-term in vitro hydrolysis of high molecular weight poly(L-lactide) film in phosphate-buffered solution. *J. Appl. Polym. Sci.* 77, 1452-1464 (2000)
- [154] S. Xia, J. Li, S. He, K. Xie, X. Wang, Y. Zhang, L. Duan, and Z. Zhang. The effect of organic loading on bacterial community composition of membrane biofilms in a submerged polyvinyl chloride membrane bioreactor. *Bioresour. Technol.* 101, 6601-6609 (2010)
- [155] M.K. Banks, and J.D. Bryers. Bacterial species dominance within a binary culture biofilm. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 1974-1979 (1991)
- [156] P. Rychter, M. Kawalec, M. Sobota, P. Kurcok, and M. Kowalczyk. Study of aliphatic-aromatic copolyester degradation in sandy soil and its ecotoxicological impact. *Biomacromolecules* 11, 839-847 (2010)
- [157] P.N. Bhattacharyya and D.K. Jha. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence

in agriculture. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28, 1327-1350 (2012)

業績目録

関連論文

第2章 好気性中温性細菌 *Bacillus pumilus* 由来ポリ（ブチレンアジペート-コーテレフタレート）加水分解酵素の特徴づけ

F. Muroi, Y. Tachibana, P. Soulethone, K. Yamamoto, T. Mizuno, T. Sakurai, Y. Kobayashi, K. Kasuya. Characterization of a poly(butylene adipate-*co*-terephthalate) hydrolase from the aerobic mesophilic bacterium *Bacillus pumilus*. *Polym. Degrad. Stabil.* 137, 11-22 (2017)

第3章 ポリ（ブチレンアジペート-コーテレフタレート）が土壤微生物叢および植物の生育に及ぼす影響

F. Muroi, Y. Tachibana, Y. Kobayashi, T. Sakurai, K. Kasuya. Influences of poly(butylene adipate-*co*-terephthalate) on soil microbiota and plant growth. *Polym. Degrad. Stabil.* 129, 338-346 (2016)

謝辞

本研究の遂行，ならびに本論文の執筆にあたり，ご熱心なご指導ご鞭撻を頂きました，群馬大学学術研究院，粕谷健一教授に心より御礼申し上げます。本論文の審査の労を賜るとともに，ご指導頂きました群馬大学学術研究院，土橋敏明教授，同，園山正史教授，同，渡邊智秀教授，同，行木信一准教授に心より感謝申します。

本研究を遂行するにあたり，適切な助言や実験のご指導を頂きました，群馬大学学術研究院，橘熊野助教に心より御礼申し上げます。また，公私にわたりお世話になりました，環境調和型材料科学研究室の皆様，心より御礼申し上げます。

最後に，大学での研究生活において，経済的また精神的な面で支えてくれた家族に感謝します。