

学 位 論 文 の 要 旨

中温性放線菌 *Rhodococcus* 属細菌による脂肪族芳香族ポリエステルを生分解（論文題目 和文）

(Biodegradation of aliphatic-aromatic polyester by the mesophilic actinobacteria *Rhodococcus fascians* (論文題目 英文))

氏 名 SOULENTHON Phouvilay 印

ポリ（ブチレンアジペート-ユブチレンテレフタレート）（PBAT）は、1,4-ブタンジオール、アジピン酸、及びテレフタル酸から構成された脂肪族芳香族ポリエステルであり、汎用性プラスチックの低密度ポリエチレン（LDPE）と類似する優れた機械的特性を有する代表的な生分解性プラスチックである。このため、PBATはLDPEの代替品の一つとして農業用プラスチックマルチの素材として期待されている。PBATの生分解性速度はコンポストなどの高温環境では大きい、生分解プラスチックマルチが使用される中温環境では小さい。中温環境土壌からいくつかのPBAT分解微生物が単離されている。一方で、中温性微生物によるPBATの生分解性評価やPBATの一次分解に関与する酵素の特徴付けなど、中温環境でのPBAT分解機構を詳細に調べた研究は少ない。PBATを素材にした生分解性プラスチックマルチが、使用後にオンサイト処理されることを想定すると、中温環境下でのPBATの分解機構について詳細に明らかにし、中温環境でのPBATの分解制御に資する知見を得ることが求められる。本博士論文では、土壌からあらたなPBAT分解細菌を単離し、分解に関与する酵素の生理学的性質と構造について詳しく調べ、中温環境下におけるPBATの生分解性機構の解明に取り組んだ。

第2章において、微生物による中温環境下でのPBATの生分解機構について明らかにするために、土壌から新たなPBAT分解細菌を単離し、その単離微生物によるPBATの分解能や分解の特徴について調べた。クリアゾーン形成法により、PBAT分解微生物NKCM2511株を単離した。生化学的生理学的性質特徴付け、系統発生解析およびゲノム解析から、本株は放線菌 *Rhodococcus fascians* に近縁な種であることがわかった。*R. fascians* は *Nicotian tabacum*（タバコ）といった植物の葉に腫瘍の形成を誘導する植物病原菌とよく知られているが、PBATに対する分解活性を示す報告については、本博士論文がはじめてとなる。本株は $16.3 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{d}$ の速度でPBATフィルムを分解した。本株によるPBATフィルムの生分解度を、生化学的酸素要求量（BOD）生分解度試験により評価したところ、 25°C で22日後には、PBATフィルムのBOD生分解度は7%であった。この結果は、本株がPBATを二酸化炭素まで無機化できる完全PBAT分解細菌であることを示唆している。また、本株のPBAT分解酵素の生産は、誘導的ではなく構成的であることがわかった。すなわち、NKCM2511株は中温環境でPBATを分解したが、PBATによって集積されないことが推定された。

第3章において、NKCM2511株による分解機構を詳細に理解するために、PBATの分解に関与する分解酵素を同定した。また組換え酵素を用いてPBAT分解機構解明を検討した。第2章で得られたゲノム解析の結果に基づき推定したPBAT分解酵素遺伝子(*pbath_{Rf}*)をクローニングし、組換え酵素PBATH_{Rf}を生産および精製した。組換え酵素PBATH_{Rf}は30°Cで、 0.10 ± 0.03 mg/cm²/dの速度でPBATフィルムを分解し、またPBATをモノマー構成成分まで加水分解した。系統樹解析から、PBATH_{Rf}は、真菌由来クチナーゼや*R. fascians* D188由来クチナーゼに高い相同性を示すことがわかった。PBATH_{Rf}のホモロジー3Dモデリングから、PBATH_{Rf}は活性部位を覆うリッドドメインを保持しない α/β 加水分解酵素であることがわかった。PBATH_{Rf}によるPBATオリゴマーモデル基質ビス(4-ヒドロキシブチル)アジペート(BAB)の分解速度は、ビス(4-ヒドロキシブチル)テレフタレート(BTB)のものに比べ約19倍大きかった。分子ドッキングから、PBATH_{Rf}の基質結合ポケットは、PBATオリゴマーモデル基質のBTBとBABを収容するのに十分な広さを保持していたが、ドッキングモデルの推定に基づくBABとPBATH_{Rf}の間の結合エネルギーが、BTBと酵素の間の結合エネルギーよりもはるかに低いことから、PBATH_{Rf}はBTBよりもBABに対して高い親和性を示すことがわかった。これら結果より、PBATH_{Rf}がPBATに対して低い分解活性を示す理由の一つとして、テレフタル酸とブタンジオール間のエステル結合が切断し難いためだと推定した。

第4章では、本博士論文を総括した。*R. fascians* NKCM2511株は、中温性で単独でPBATを無機化できる細菌であると推定された。一方、NKCM2511株によるPBATのBOD生分解度は低く、また、本株はPBATにより集積されなかったため、実際の中温環境下での*R. fascians*によるPBATの生分解への寄与は小さいと推定された。PBATは*R. fascians*のような土壌伝達性植物病原細菌により分解されるものの、この細菌種を集積しないことから、PBATを生分解性プラスチックマルチの素材として利用することを妨げないと結論付けた。本博士論文より、中温環境下で容易に分解されず分解細菌を集積しない性質を持つPBATの生分解を加速させるためには、PBAT分解微生物やその分解物を資化する微生物を含む、PBAT周辺全ての微生物数を増加させる必要があると考えられる。本論文の最後に、これを実現する方法として、堆肥や肥料と共にPBATプラスチックマルチを土壌にすきこむことを提案した。

学 位 論 文 の 要 旨

中温性放線菌 *Rhodococcus* 属細菌による脂肪族芳香族ポリエステル[®]の生分解（論文題目
和文）

(Biodegradation of aliphatic-aromatic polyester by the mesophilic actinobacteria *Rhodococcus fascians* (論文題目 英文))

氏 名 SOULENTHON Phouvilay 印

Poly(butylene adipate-*co*-terephthalate) (PBAT, Ecoflex[®]) is an aliphatic aromatic co-polyester distributed by BASF and composed of butanediol, adipic acid, and terephthalic acid. As PBAT has mechanical properties comparable to those of conventional low-density polyethylene (LDPE) besides its biodegradability, it gets attention as a biodegradable alternative to LDPE as mulching material in agricultural applications. Biodegradation of PBAT occurs rapidly in relatively high temperature (45–60 °C) environments, such as composts, compared to that in mild temperature (20–40 °C) environments, such as soil. Some studies have reported the presence of PBAT-degrading mesophiles. However, only a few studies have reported in detail the mechanism of PBAT degradation under mild temperature conditions, including the evaluation of the biodegradability of PBAT and identification of the enzymes involved in its primary degradation. In fact, biodegradable plastic mulch is used in a mildly acidic environment in soil, followed by on-site disposal after use. Therefore, it is necessary to clarify in detail the PBAT biodegradation mechanism in mild temperature environments to control its biodegradation under such a condition.

In this thesis, the author presents results of a novel PBAT-degrading bacterium isolate and investigations of the physiological properties and structure of the enzymes involved in PBAT primary degradation to elucidate in more detail the biodegradation of PBAT under mild temperature conditions.

In Chapter 2, to clarify the biodegradation mechanism of PBAT under mild temperature conditions such as soil, a novel PBAT-degrading bacterium was isolated from a soil sample. Moreover, the isolate characterization and biodegradation of PBAT were investigated. According to the clear-zone formation method, a PBAT degrading strain named NKCM2511 was isolated. The isolate was found to be closely related to *Rhodococcus fascians* based on genetic, biochemical, and genomic analyses. *R. fascians* is well known as a phytopathogen that induces leafy gall formation on leaves of plants such as *Nicotiana tabacum* (tobacco), while this is the first report of *R. fascians* showing degrading activity against PBAT. The strain degraded a PBAT film at a rate of $16.3 \pm 2.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{d}$. To evaluate the biodegradability of the PBAT film by the strain, a biochemical oxygen demand (BOD) biodegradability test was performed. At 25 °C, the BOD biodegradability of PBAT by the strain was 7% for 22 days. This result suggested that the strain alone mineralized the solid PBAT to CO₂. Moreover, the strain constitutively expressed PBAT hydrolytic activity. The NKCM2511 strain is a PBAT-degrading mesophile; however, it is not enriched by PBAT.

In Chapter 3, in order to understand the degradation mechanism of the NKCM2511 strain in more detail, the enzyme involved in the degradation of PBAT was identified. In addition, the elucidation of the mechanism of PBAT degradation by a recombinant enzyme was investigated. The gene (*pbath_{Rf}*) responsible for PBAT degradation was estimated based on the results of the genome analysis obtained in Chapter 2 and was cloned to produce and purify the recombinant enzyme PBATH_{Rf}. The PBATH_{Rf} enzyme hydrolyzed PBAT to its monomer constituents at a rate of 0.10 ± 0.03 mg/cm²/d at 30 °C. Phylogenetic tree analysis revealed that PBATH_{Rf} is highly homologous to fungal cutinases and a cutinase from *R. fascians* D188. Homology 3D modeling of PBATH_{Rf} revealed that the enzyme is an α/β hydrolase that lacks a lid domain covering the active site. The degradation rate of the PBAT oligomer model substrates bis(4-hydroxybutyl) adipate (BAB) by PBATH_{Rf} was approximately 19 times higher than that of bis(4-hydroxybutyl) terephthalate (BTB). According to molecular docking, the substrate-binding pocket of PBAT is wide enough to accommodate the PBAT model substrates BTB and BAB. However, the binding energy between PBATH_{Rf} and BAB based on the estimation of the docking model was much lower than that between the PBATH_{Rf} and BTB, demonstrating that PBATH_{Rf} showed higher affinity for BAB than for BTB. From these results, it was concluded that the ester bond between the terephthalic acid and butanediol was difficult to be cleaved by the enzyme, might be a reason why PBATH_{Rf} showed a low degradation rate of PBAT.

In Chapter 4, this thesis was summarized. The *R. fascians* NKCM2511 was found to be a mesophilic bacterium capable of mineralizing PBAT alone. In contrast, BOD biodegradation testing of PBAT by the NKCM2511 strain showed the strain could not degrade PBAT rapidly at a moderate condition, suggesting that the contribution of *R. fascians* to the biodegradation of PBAT in the actual field was small. Although PBAT is degraded by soil borne phytopathogenic bacteria such as *R. fascians*, it does not enrich this bacterial species, concluding that it does not prevent PBAT from being used as a material for biodegradable plastic mulch. According to this thesis, a mechanism to increase the number of various microbes, including PBAT-degraders around PBAT, might be necessary to accelerate biodegradation under these conditions. At the end of this thesis, the author proposed to pour PBAT plastic mulch into the soil along with compost and fertilizer as a way to achieve this purpose.