

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が生分解

群馬大学大学院 理工学府 理工学専攻 物質・生命理工学領域

環境調和型材料科学研究室

Soulenthone Phouvilay

目次

第1章:序論	5
農業用プラスチックマルチ	6
生分解性を有する脂肪族芳香族共重合ポリエステルの開発	7
ポリ(ブチレンアジペート-コ-テレフタレート)(PBAT)とは	8
生分解性ポリエステルの微生物分解	9
PBATの分解	10
PBAT分解微生物	10
PBATの一次分解に関与する酵素	11
<i>Rhodococcus fascians</i> について	13
本研究の目的	14
第2章:好気性中温性アクチノバクテリア <i>Rhodococcus fascians</i> による脂肪族芳香族ポリエステルの分解	15
緒言	16
実験	17
試薬	17
培地	18
PBAT分解微生物の単離	18
クリアゾーン形成法による単離株の各ポリエステル分解評価	18
単離株による脂肪族ポリエステルフィルム分解評価	17
単離株によるPBATフィルム分解評価	18
単離株の生育とPBAT分解能に対する温度の影響	19
ゲノムDNA(gDNA)抽出	19
単離細菌の遺伝子的解析	19
生理学および生化学的性質	20
ガスクロマトグラフィー(GC)による脂肪酸メチルエステル(FAME)解析	20
グアニン+シトシン(G+C)含率解析	20
表面形態観察	21
単離株による1,4-ブタンジオール、アジピン酸、テレフタル酸およびPBAT フィルムの生化学的酸素要求量(BOD)生分解度測定	21
各炭素源による生育およびPBAT分解に与える影響	21
培養上清におけるポリエステル分解活性の評価	22
ザイモグラム(酵素活性染色)	22
ドラフトゲノムDNA解析	23
DNAアクセッション番号	23

結果および考察	24
中温性 PBAT 分解細菌 NKCM2511 株の特徴づけ	24
NKCM2511 株による PBAT の生分解性	27
炭素源による NKCM2511 株の生育および PBAT フィルムの分解速度への影響	29
ザイモグラム解析	30
NKCM2511 株のゲノム解析	32
まとめ	34
第 3 章： <i>Rhodococcus fascians</i> NKCM2511 株由来 PBAT 分解酵素の特徴づけ	35
緒言	36
実験	37
試薬	37
微生物、プライマー、プラスミドおよび培養条件	38
ゲノム DNA 抽出	40
遺伝子操作	40
DNA シーケンシング	43
PBATH _{Rf} のアミノ酸配列解析	43
酵素精製	43
ザイモグラム解析	44
PBATH _{Rf} の変異解析	45
PBATH _{Rf} の特徴づけ	45
PBATH _{Rf} によるポリエステルフィルムの解析	46
表面形態観察	46
LC-MS を用いた PBAT フィルム分解物の同定	47
PBAT によるオリゴマーPBAT モデル基質の分解	47
PBATH _{Rf} の 3D モデリングおよび分子ドッキング	47
DNA アクセッション番号	48
結果	49
<i>Rhodococcus fascians</i> NKCM2511 株由来の遺伝子のクローニングおよび異種発現	49
組換酵素 PBATH _{Rf} の精製	52
組換酵素 PBATH _{Rf} の特徴づけ	53
PBATH _{Rf} における触媒三残基の同定	54
PBATH _{Rf} によるポリエステルフィルムの分解	55
LC-MS による PBATH _{Rf} による PBAT 分解物の同定	58
PBATH _{Rf} による PBAT オリゴマーモデル基質(BAB および BTB)の加水分解	59
PBATH _{Rf} の 3D モデリングおよび分子ドッキング	59

考察	63
まとめ	66
第4章：総括	67
参考文献	72

第 1 章

序論

農業用プラスチックマルチ

マルチ (Mulch)とは、土壌を覆う物質を指す [1]。農業において、タールをコーティングした紙マルチフィルムは、1800 年代後半から使用され始めた [2]。一方で、ポリエチレン (PE) は、柔軟性、耐久性および低毒性の性質を持つため、1957 年から PE の農業分野におけるマルチ材としての利用が始まった [3]。これ以降、世界各国で農業用プラスチックマルチの利用が拡大した[4-6]。現在、PE (低密度、直鎖状低密度、および高密度 PE を含む) の他には、ポリ塩化ビニル (PVC) などの汎用プラスチックが農業用プラスチックマルチの材料として利用されている [7]。

汎用プラスチックマルチには、地温の上昇 [8]、土壌水分蒸発量の制御 [9]、雑草の防除 [10]の効果が、落花生[8]、ベビーコーン[10]、トマト[11]、イチゴ[12]などの様々な農作物の生産安定性の維持または向上に有効である。地球規模での世界人口増加に伴い、安定に食糧が供給できるよう、農業分野でプラスチックマルチの使用が提案されている [13]。これらを受け、農業分野におけるプラスチックマルチの使用量は増加しており、中国でのマルチフィルムの使用量は、1991 年から 2017 年にかけて、年間 319 千トンから 1,500 千トン近くまで増大した [14]。

このように汎用プラスチックマルチは、農業分野において様々な利点をもたらしている。一方で、使用後には、圃場から回収され、埋立て [15]、焼却 [16]またはリサイクル [17]等の方法で処分される必要がある。このことは、農家に対し、労働力や経済的な面で大きな負担となっている [18]。また、プラスチックマルチの一部は、プラスチック残渣として、数十年間にわたって圃場に残留し、環境に対して様々な影響を与える[19,20]。中国の Xinjiang では、プラスチックマルチを長期間使用した土壌中では、0~502.2 kg ha^{-1} のプラスチック残渣の蓄積が見られた[21]。土壌に蓄積する汎用プラスチックマルチ残渣自身は生物学的あるいは化学的に不活性であるが、間接的に土壌のバルク密度や多孔性などの物理的性質に影響を与え[22]、植物の成長に必要な水および硝酸塩の移動を低下させることが報告されている [23]。また、プラスチック残渣が含まれる土壌で栽培した綿の収穫量は低下した[24]。これらのことは、農業での汎用プラスチックマルチの使用における負の側面となっている[25, 26]。

汎用プラスチックマルチの代替物として、生分解性プラスチックから作られるマルチ (生分解性プラスチックマルチ) が注目されている[2, 27-29]。生分解性プラスチックは環境中の微生物により最終的に水や二酸化炭素に変換されるため、使用後にオンサイト処理が可能である[30](Fig. 1)。そのため、生分解性プラスチックマルチの利用は、汎用プラスチックマルチにより引き起こされる諸問題の解の一つとして期待されている[2]。また、循環型社会の構築のために、2017 年から国家間のプラスチック廃棄物の移動が制限され、プラスチック廃棄物のより厳しい管理が求められている [31]。これに対応し、日本では、農林水産省生産局が農業由来廃プラスチックの排出抑制のために、生分解性プラスチックマルチの使用を推奨している [31]。このため、現在、生分解性プラスチックマルチに対する注目がより一層高まっている [32]。

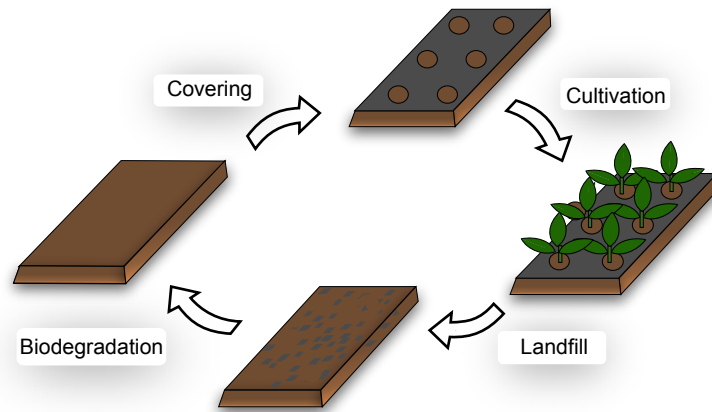


Fig. 1. An ideal life-cycle of biodegradable plastic mulch on actual field.

生分解性を有する脂肪族芳香族共重合ポリエステルの開発

生分解性を有する高分子として、デンプンなどの天然高分子、ポリ(3-ヒドロキシブタン酸) (P(3HB))などの微生物産生脂肪族ポリエステル、ポリ(ϵ -カプロラクトン) (PCL) やポリ(エチレンサクシネート) (PESu)などの化学合成脂肪族ポリエステルがあげられる [33]。脂肪族ポリエステルは優れた生分解性を示すため、汎用プラスチックの代替品として注目されているが、熱的性質や機械的性質が劣るため、その用途は限られている [34, 35]。一方で、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)などの芳香族ポリエステルは環境中の微生物により容易には生分解されないが、優れた機械特性および熱安定性を示すため、その使用用途は広い [36, 37]。このような背景から、生分解性を維持しつつ優れた熱的性質および機械的性質を両立するポリエステルを開発するため、Wittらは、3種類の脂肪族芳香族共重合ポリエステル：(1) ポリ(エチルアジペート-コ-テレフタレート) (PEAT)、(2) ポリ(プロピレンアジペート-コ-テレフタレート) (PPAT)、および(3) ポリ(ブチレンアジペート-コ-テレフタレート) (PBAT)を合成し、その生分解性および機械的性質について調べた [38, 39]。これらの脂肪族芳香族共重合ポリエステルは、脂肪族ポリエステルである P(3HB)や PCL よりも、優れた機械的性質を持つ一方で、土壌やコンポスト中で重量減少することがわかった。3種類の脂肪族芳香族共重合ポリエステルのうち、PBATは、1998年にドイツの BASF 社により *ecoflex*[®] (当時 *Ecoflex*[®]) という商標で、工業生産に至っている [40, 41]。現在、ポリ(ブチレンサクシネート) (PBSu)、ポリ(ブチレンサクシネート-コ-ブチレンアジペート) (PBSA) およびポリ(乳酸) (PLA) などの生分解性プラスチックが市販されており、European Bioplastic 協会の調査によると、2020年におけるバイオプラスチック(生分解性プラスチックとバイオベースプラスチックの総称)の生産能力は、世界全体で約 211 万トンであった [42]。その内、PBAT の生産量は、13.5 %程度を占めており、生分解性プラスチックのうち 3 番目に生産量が大きい [42]。

ポリ（ブチレンアジペート-コ-テレフタレート）（PBAT）とは

PBAT は、1,4-ブタンジオール、アジピン酸およびテレフタル酸の縮合反応により得られる脂肪族芳香族共重合ポリエステルである [39]。PBAT の熱的性質や機械的性質は、その共重合組成によって変化する [39]。また、PBAT の引張強度は、テレフタル酸のモル分率が 34 % 以上になると上昇し、39 % 以上ではほぼ一定になる。対照的に、破断強度は、テレフタル酸のモル分率が 34 % から 44 % の間で、ほぼ一定であり、44 % 以上では低下する。Gan らは、異なる組成割合の溶融結晶化 PBAT フィルムの結晶化度を広角 X 線回折により評価し、ポリ（ブチレンアジペート）（PBA）とポリ（ブチレンテレフタレート）（PBT）の共重合体である PBAT は、PBA に由来する結晶と PBT に由来する結晶を保持することを見出した。テレフタル酸のモル分率が 10 % から 27.5 % に増加すると、PBA に由来する結晶化度が低下する。また、30 % 以上になると PBT に由来する結晶化度が上昇する [43]。現在、ecoflex[®] として市販されている PBAT は、汎用プラスチックの低密度 PE（LDPE）と同等の優れた柔軟性と熱的性質を持ち、LDPE の代替材料として、生分解性包装材や生分解性プラスチックマルチに使用される [27, 44, 45]。また、日本バイオプラスチック協会によると、日本国内で販売されている生分解性プラスチックマルチ 35 種類のうち、28 種類が PBAT を原材料として使用しており、PBAT は農業分野において、重要な材料の一つとなっている [46]。

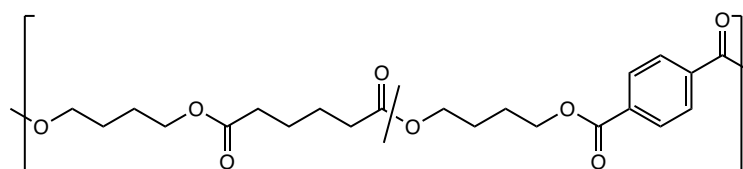


Fig. 2. Chemical structure of poly(butylene adipate-co-terephthalate) copolyester (PBAT).

Table 1. Thermal and mechanical properties of biodegradable polyesters and LDPE

Polymers	T_g (°C)	T_m (°C)	Tensile strength (Nmm ⁻²)	Elongation at break (%)	Ref.
PLA	57	169	60	3	[47]
PESu	-10	104	10	200	[48]
PBSu (Bionolle #1000) ^a	-32	114	52	323	[48, 49]
PBSA (Bionolle #3000) ^a	-45	96	38	780	[48]
PCL	(-65) – (-60)	56 – 65	4 – 785	20 – 1000	[50]
P(3HB)	4	180	62	58	[51]
PBAT (ecoflex [®]) ^a	-30	110 – 115	36	820	[45]
LDPE	-120	111	20	600	[45]

^a trade names of the polymers are given in parentheses.

生分解性ポリエステルを微生物で分解する

微生物による生分解性ポリエステルの完全分解は、2つの過程を経て生じる[52, 53] (Fig. 3)。

- 1) 菌体外に分泌した酵素によるポリエステルの加水分解 (一次分解、Primary degradation)
- 2) 微生物が、一次分解で生成した分解物 (オリゴマー、ダイマー、またはモノマー) を二酸化炭素または水に無機化する。分解物の一部は、微生物体内で同化によりバイオマスに変換されるものもある (最終分解、Ultimate degradation)。

不溶性ポリマーの生分解の指標を以下に示す [52]。

分解後の材料から得られる指標：

- 1) 残存重量または重量損失
- 2) 分子量変化
- 3) 材料特性 (強度、熱的特性) 変化
- 4) 形状 (ホモロジー) 変化

分解後の材料以外から得られる指標：

- 1) 溶存有機炭素量 (DOC) または総有機炭素量 (TOC)
- 2) 生物化学的酸素要求量 (BOD)
- 3) 二酸化炭素発生量
- 4) 生物ガス発生量
- 5) pH

分解後の材料から得られる指標は一次分解の評価に用いることができるが、最終分解の評価に利用できない。一般的には微生物による最終分解 (生分解) は、分解後の材料以外から得られる指標 2) 生物化学的酸素要求量 (BOD)、3) 二酸化炭素の発生量および 4) 生物ガス発生量により評価されることが多い [52]。

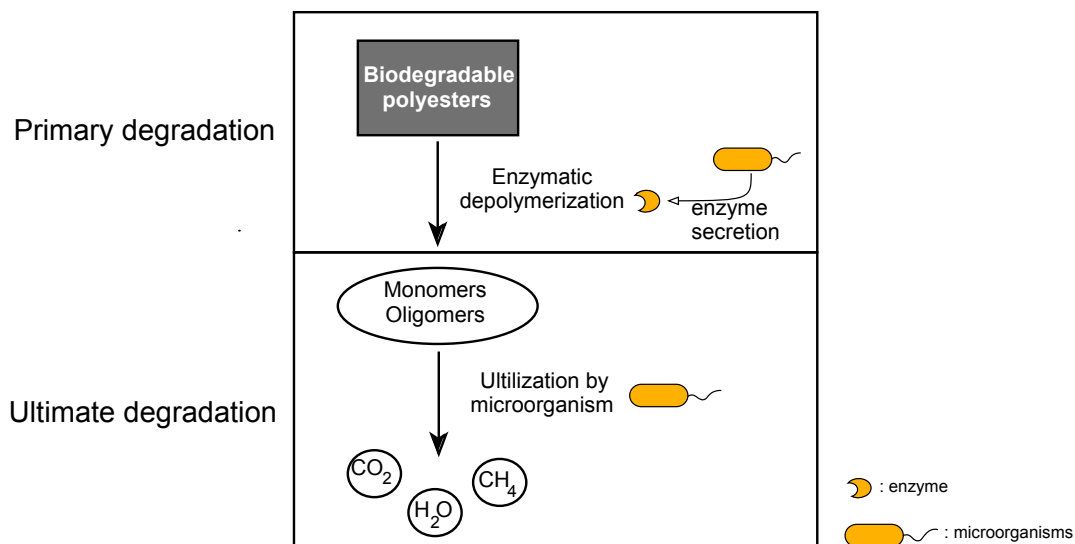


Fig. 3. A typical biodegradation process of biodegradable polyesters by microorganisms.

PBAT の分解

微生物による PBAT の分解速度は、テレフタル酸の割合が増加するほど低下する [54]。また、PBAT の生分解度は、コンポスト(堆肥)の様な高温環境下(58 °C)の方が、土壌の中温環境下(30 °C)よりも 3 倍ほど大きい [55, 56]。高温環境下で生じる PBAT の非生物的加水分解は、PBAT の加水分解による低分子量化を誘導する [57]。また、PBAT を日光に暴露させると、紫外線によりラジカルが生成され、PBAT 内部に光酸化が生じることが知られている [58]。日光暴露させた PBAT フィルムは、未処理のものとは比べて、土壌中での重量減少速度が低い [58]。この場合の PBAT の分解速度低下の原因として、ラジカルが分子間架橋を導入することにより加水分解酵素によるエステル結合の切断を阻害するためであると推定されている [59]。

PBAT 分解微生物

Table 2 に各環境から単離された PBAT 分解微生物を示す。Kleierberg らは、コンポスト(好気高温)環境から、クリアゾーン形成法(一次分解確認法)により 20 株以上の PBAT 分解微生物を単離した [60]。それらのほとんどがアクチノバクテリア門に属する *Thermobifida* 属の好気性好熱性細菌であった。これらの好気性好熱性 PBAT 分解細菌のうち、*T. fusca* K13g 株は、PBAT フィルムを最も大きい速度で分解した [60]。さらに、*T. fusca* DSM 43793 株による PBAT の資化性が調べられた [61]。*T. fusca* は固体 PBAT を構成成分まで分解するものの、それらの分解物を利用できず、PBAT の一次分解のみに寄与していることがわかった [61]。このことから、コンポストにおける PBAT の完全分解は、*T. fusca* 以外の周辺の共生者により生じると推定されている [61]。また、Hu らがコンポストから単離した細菌 *T. alba* AHK119 株は、PBAT 乳化培地においてクリアゾーンを形成した [62]。

嫌気汚泥から、クリアゾーン形成法により、ファミキューテス門に属する偏性嫌気性細菌 *Propionispora hippie* KS 株が PBAT 分解菌として単離された [63, 64]。偏性嫌気性細菌である *Clostridium hathewayi* 株と PBAT を共に培養した際、構成成分であるテレフタル酸が生成されたため、本株は PBAT の一次分解に関与すると推定された [65]。

好気的中温環境からは、プロテオバクテリア門に属する *Leptothrix* sp. TB-71 株およびファミキューテス門に属する *Bacillus pumilus* NKCM3201 株は、PBAT 分解細菌として単離された [66, 67]。同じくファミキューテス門に属する *B. subtilis* ATCC21332 株は、PBAT を低分子量化できることが明らかとなった [68]。農地から単離されたプロテオバクテリア門に属する *Stenotrophomonas* sp. YCj1 株は、PBAT を分解した [69]。これら細菌以外に、子囊菌門に属する *Isaria* sp. NKCM1712 株および *Isaria* sp. NKCM1711 株が PBAT 分解真菌として報告されている [70]。また、空気中から単離された酵母の *Cryptococcus* sp. MTCC5455 株も中温条件下で、PBAT フィルムを重量減少させた [71, 72]。これら PBAT 分解微生物の内、*Isaria* sp. NKCM1712 株は、他の微生物種のものとは比べ、最も大きな PBAT フィルム分解速度を示した。この株は、単独で PBAT を炭素源として利用できることから、PBAT 完全分解微生物であると結論付けられた [70]。一方、*B. pumilus* NKCM3201 株は、PBAT の構成成分を炭素源として利用できない。そのため *B. pumilus* NKCM3201 株は PBAT の一次分解にのみ寄与して

いると考えられる [66]。また、*Lepothrix* sp. TB-71 株は PBAT の構成成分のアジピン酸を資化したが、1,4-ブタンジオールを資化しなかった [73]。

Table 2. PBAT-degrading microbes.

Strain	Descriptions	Source of isolates	Ref
Bacteria			
Actinobacteria			
<i>T. fusca</i> K13g	Aerobic thermophile	Compost	[60]
<i>T. alba</i> AHK119	Aerobic thermophile	Compost	[62]
Firmicutes			
<i>Clostridium hathewayi</i> DSM13479	Anaerobic mesophile	Effluent treatment plant	[65]
<i>Propionispora hippie</i> KS	Anaerobic mesophile	Sludge	[63, 64]
<i>B. subtilis</i> ATCC21332	Aerobic mesophile	-	[68]
<i>B. pumilus</i> NKCM3201	Aerobic mesophile	Soil	[66]
Proteobacteria			
<i>Lepothrix</i> sp. TB-71	Aerobic mesophile	Freshwater	[67]
<i>Stenotrophomonas</i> sp. YCj1	Aerobic mesophile	Soil	[69]
Fungi			
<i>Isaria</i> sp. NCKM1712	Aerobic mesophile	Soil	[70]
<i>Cryptococcus</i> sp. MTCC5455	Aerobic mesophile	Air	[71, 72]

PBAT の一次分解に関与する酵素

加水分解酵素(EC. 3-)に分類されるカルボキシルエステル加水分解酵素 (エステラーゼ) (EC 3.1) [65, 74]、アリルエステラーゼ (EC 3.1.1.2) [75]、リパーゼ (EC 3.1.1.3) [66, 76]、クチナーゼ (EC.3.1.1.74) [77-81]およびクチナーゼ様酵素 [82, 83]は、固体の PBAT を加水分解できる。これら PBAT の一次分解に関与する酵素のアミノ酸配列中には、コンセンサス配列であるリパーゼボックス(G-X-S-X-G または A-X-G-X-G)が含まれる。さらに、酵素の活性部位には触媒三残基の Ser, Asp (または Glu) および His が含まれている。Table 3 に、現在までに報告されている PBAT 加水分解酵素をまとめた。

好熱性アクチノバクテリア *T. fusca* DSM43797 株は、BTA hydrolase 1 (TfH)を分泌し固体 PBAT を分解した[77, 84]。さらに TfH は、天然ポリエステルのクチンに対しても分解活性を示すことから、クチナーゼであると分類された[77, 85]。*T. alba* AHK119 株は、2 種類の PBAT 加水分解酵素 (Est1 および Est119) を生産した [86, 87]。*T. cellulositytica* DSM44535 株由来のクチナーゼ Thc_Cut1 [78]および *Saccharomonospora viridis* AHK190 株由来変異酵素 Cut190*が PBAT 分解活性を示した [79]。これらの好熱性細菌以外に、コンポストから単離された好熱性真菌 *Humicola insolens* 由来クチナーゼ HiC も、固体 PBAT を分解できた [78]。これらの好熱性微生物由来の PBAT 分解酵素は、45 °C 以上でも活性を安定して保持し、高温環境下における PBAT の一次分解で重要な役割を果たしている。これらの加水分解酵素は、汎用芳香族ポリエステルの PET に対しても加水分解活性を示すことから、PET のバイオリサイクルへの応用が期待されている [88]。Est119 [87]、Thc_Cut1 [89]、Cut190* [90]および HiC [91]の結晶構造解析が行われ、その高次構造について詳しく調べられた。これらの酵素の高次構造は、 α -ヘリックスおよび β シートから構成される、 α/β hydrolase スーパーファミリーに属する酵素であった。これら酵素の触媒三残基は表面に存在しており、これをカバーするリッド (蓋) ドメインを保持していなかった。

また、汚泥由来の偏性嫌気性中温性細菌 *Clostridium hathewayi* DSM13479 株はエステラーゼを (Chath_Est1) [65]、*C. botulinum* ATCC3520 は 2 つのエステラーゼ (Cbotu_EstA と Cbotu_EstB) [74]を生産し、PBAT を分解した。地下水から単離した通性嫌気性中温性細菌 *Pelosinus fermentans* DSM17108 株由来リパーゼ Pfl1 [76]は、固体 PBAT 分解活性を示した。Chath_Est1、Cbotu_EstA および Pfl1 の結晶構造解析が行なわれ、これらの酵素が、耐熱性アクチノバクテリア由来の PBAT 加水分解酵素と同様に α/β hydrolase スーパーファミリーに属しているものの、いくつかの相違点があることがわかった。Cbotu_EstA と Pfl1 は、活性部位を覆うリッドドメインを保持していた。一方、Chath_Est1 はリッドドメインを保持しないが、触媒活性部位は、表面ではなく、基質を収容する溝の底に位置していた。

好気性中温性真菌の *Paraphoma* sp. B47-9 株由来クチナーゼ様酵素 PCLE [82]、*Cryptococcus flavus* GB-1 株由来クチナーゼ様酵素 CfCLE [83]、および *Fusarium solani* 由来クチナーゼ FsC [80, 92]が PBAT に対して加水分解を示した。一方、好気性中温性細菌 *B. pumilus* NKCM320 株由来リパーゼ PBATH_{Bp} および *Pseudomonas pseudoalcaligenes* DSM50188 株由来アリアルエステラーゼ PpEst [75]が固体 PBAT に対して加水分解活性を示した。中温性微生物由来 PBAT 加水分解酵素 PCLE、CfCLE、FsC および PBATH_{Bp} は 40 °C 以下で高い活性を保持した。PpEst は 80 °C まで熱安定性を示し、50 °C 以上でも PBAT を分解した。これらの中温性微生物由来 PBAT 加水分解酵素のうち、真菌 *F. solani* 由来クチナーゼ FsC のみ、結晶構造解析が行われた。FsC の構造は、好熱性真菌 *H. insolence* 由来 PBAT 加水分解酵素 HiC のものと類似していた。FsC の触媒三残基は、酵素分子表面に存在しており、これをカバーするリッドドメインを保持していなかった。

Table 3. Microbial enzymes having PBAT hydrolytic activity.

Enzymes	Accession number or PDBj code	Microorganisms	Enzymatic classification	PBAT degrading temperature test (°C)	Ref.
PCLE	BAN51852	<i>Paraphoma</i> sp. B47-9 [AMF] ^a	Cutinase-like enzyme	30	[82]
FsC	1CEX	<i>Fusarium solani</i> [AMF] ^a	Cutinase	40	[80]
CfCLE	BCL64964	<i>Cryptococcus flavus</i> GB-1[AMF] ^a	Cutinase-like enzyme	30	[83]
PBATH _{Bp}	LC189557	<i>Bacillus pumilus</i> NKCM3201 [AMB] ^c	Lipase	30	[66]
PpEst	AMW89397	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> [AMB] ^c	Arylesterase	50, 65, 85	[75]
HiC	4OYY	<i>Humicola insolens</i> [ATF] ^b	Cutinase	50	[78]
Cut190*	5ZNO	<i>Saccharomonospora viridis</i> AHK190 [ATB] ^d	Cutinase	45	[79]
Est119	BAI99230	<i>Thermobifida alba</i> AHK119 [ATB] ^d	Cutinase	37	[81]
Est1	BAK48590	<i>T. alba</i> AHK119 [ATB] ^d	Cutinase	37	[81]
BTA-hydrolase1(Tfh)	CAH17553	<i>T. fusca</i> DSM43797 [ATB] ^d	Cutinase	22-80	[77]
The_Cut1	ADV92526	<i>T. cellulosilytica</i> DSM13479 [ATB] ^d	Cutinase	50	[78]
Chath_Est1	ALS54749	<i>Clostridium hathewayi</i> DSM13479 [AnMB] ^e	Esterase	37	[65]
Cbotu_EstB	KP859620	<i>C. botulinum</i> ATCC3520 [AnMB] ^e	Esterase	37, 50	[74]
Cbotu_EstA	KP859619	<i>C. botulinum</i> ATCC3520[AnMB] ^e	Esterase	37, 50	[74]
Pfl1	EIW29778	<i>Pelosinus Fermentans</i> DSM17108 [AnMB] ^e	Lipase	50	[76]

AMF^a: aerobically mesophilic fungus; ATF^b: aerobically thermophilic fungus; AMB^c: aerobically mesophilic bacterium; ATB^d: aerobically thermophilic bacterium; AnMB^e: anaerobically mesophilic bacterium.

Rhodococcus fascians について

R. fascians (*Corynebacterium fascians* [93]) は、アクチノバクテリア門に属する土壌伝達性グラム陽性細菌であり、Tilfordらにより、1936年にスイートピーの奇形(*Lathyrus odoratus* L.) から初めて単離された [94]。 *R. fascians* は、植物の葉に腫瘍や帯化の形成を誘導する *Rhodococcus* 属細菌の中で唯一の植物病原性細菌として知られている [95, 96]。 *R. fascians* は、植物ホルモンのサイトカイニン、またはその誘導體であるメチルサイトカイニンを生産し、ホスト植物のホルモンバランスを崩し、腫瘍を形成させる [97–99]。病原性の発現は、直線性プラスミド上にある病原性遺伝子クラスターによって制御されている [100, 101]。一方、その病原性直線状プラスミドを持たない *R. fascians* は、病態発症せず、そのうちいくつかの株では、植物の成長を促進することが知られている [102, 103]。また、*R. fascians* を活用したバイオレメディエーションが注目されている。 *R. fascians* SDRB-G7 株は生物系界面活性剤であるラムノリピッドを生産し、土壌中の多環芳香族環炭化水素の除去を容易にする [104]。 *R. fascians* は、フルーツジュース由来の苦み成分であるリモニンを分解するため、食品産業への応用も期待されている [105]。

本研究の目的

生分解性プラスチックマルチは、使用後にそのまま圃場へすき込むことで、環境中の微生物により無機化されるため、PE の様な汎用プラスチックマルチが引き起こす廃棄物処理や環境負荷の問題の解決策として期待されている [2]。

PBAT は汎用プラスチックの LDPE と同等に優れた機械的特性および熱的性質を示すため、農業用生分解性プラスチックマルチの材料として利用されている [44, 46]。しかし、PBAT の生分解速度は、暴露環境によって差があり、中温環境下ではコンポストの様な高温環境下と比べて、その分解速度が小さい [55, 56]。中温環境における PBAT 生分解に関する研究と比較して、コンポストの様な高温環境での PBAT 一次分解に関与する分解酵素の報告例は多く、高温環境における PBAT 分解機構は比較的よく研究されている [79]。しかし、PBAT を素材とする生分解性プラスチックマルチが使用後に好気性中温環境の圃場でオンサイト処理されたり環境拡散することを想定すると、中温環境での PBAT の生分解機構を明らかにすることは重要となる。

これまでに、好気中温環境下において真菌 *Isaria* sp. NKCM1712 が完全分解 PBAT 分解微生物として報告されている。また、その他にプロテオバクテリア門に属する 2 株の細菌 [66, 68] およびファミキューテス門に属する 2 株の細菌 [67, 69] が PBAT の一次分解に関与していると報告されている。また、土壌中から、複数の好気性中温性 PBAT 分解微生物が単離されている。一方、このうちファミキューテス門に属する *B. pumilus* NKCM3201 株のみ、一次分解に関与する酵素がクローニングされ、酵素による PBAT 分解機構について詳細に研究されている [66]。

本博士論文では、好気中温環境下での PBAT の生分解機構を解明し、中温環境での PBAT 分解制御に資する知見を得るため、土壌から単離された PBAT 分解細菌 *R. fascians* NK2511 株に着目した。まず第 2 章において、本株の特徴付けおよび PBAT 分解機構についてしらべる。さらに第 3 章において、この細菌が生産する PBAT 分解に関与する酵素の構造と特徴を調べ、土壌の中温環境での PBAT 生分解機構について考察する。

第2章

好気性中温性アクチノバクテリア *Rhodococcus fascians*
による脂肪族芳香族ポリエステルの分解

緒言

BASF 社が製造販売している PBAT（商品名 ecoflex[®]）は、モノマー構成成分として、1,4-ブタンジオール、アジピン酸およびテレフタル酸の共重合体であり、生分解性と機械的性質のバランスがとれた生分解性プラスチックである[40, 41]。PBAT は低密度ポリエチレン (LDPE) と類似した機械的特性を備えており、微生物により分解され難い LDPE の生分解性代替品として、食品業界におけるプラスチック包装材や農業用マルチフィルムの材料として使用されている[21, 44-46]。

PBAT はコンポストのような高温環境下（45 °C 以上）において、優れた生分解性を示すことが知られている[55, 56]。このような高温環境において、好熱性細菌である *Thermobifida* 属細菌が固体 PBAT の低分子量化に寄与することが報告されている[60, 62]。*T. fusca* は、PBAT の低分子量化に寄与することができるものの、その加水分解物やモノマー構成成分を増殖に利用できなかった[61]。この系では、PBAT の完全生分解（無機化）は、*T. fusca* 以外の共生菌により生じると推定されている [61]。高温環境下での PBAT の加水分解は、非生物作用でも生じ、PBAT の低分子量化が誘導されることが知られている [57]。

一方で、土壌のような中温環境（20 – 40 °C）での PBAT の環境分解速度は、高温環境と比べ、小さいことがわかっている[55, 56]。また、中温域環境では複数の微生物が PBAT の生分解に寄与していることが報告されている。好気性中温性環境ではファミキューテス門に属する *Bacillus* 属[66, 68]、プロテオバクテリア 門に属する *Leptothrix* 属[67]および *Stenotrophomonas* 属[69]の細菌が、PBAT 生分解に関与していることがわかっている。これら細菌以外に、酵母の *Cryptococcus* 属および子嚢菌門に属する *Isaria* 属の真菌類が、中温域における好気性 PBAT 分解真菌として報告されている[70, 71]。これらの中温性 PBAT 分解微生物は、土壌、河川または空気中から見つかっている。これらのうち、*Isaria* sp. NKCM1712 株は、PBAT を完全分解できることが報告されている[70]。*Leptothrix* sp. TB-71 株は PBAT のモノマー構成成分であるアジピン酸を増殖に利用したが、1,4-ブタンジオールは利用しなかった[73]。一方、*B. pumilus* NKCM3201 株は、PBAT の一次分解のみに寄与することが報告されている[66]。このように、中温域での PBAT の環境分解速度は低く、不明な点も多い。PBAT を生分解プラスチックマルチとして利用し、使用後の土壌でのオンサイト処理を想定すると、中温環境下での PBAT の生分解に関与する微生物について詳細に理解する必要がある。

そこで、本章は土壌から、あらたな PBAT 分解細菌を単離し、この細菌の PBAT の生分解への寄与を詳しく調べる。また、中温環境下での PBAT の生分解機構を考察する。

実験

試薬

ポリ (51 mol%ブチレンアジペート-co-49 mol%テレフタレート) (PBAT: ecoflex[®], $M_n = 1.0 \times 10^4$, $M_w/M_n = 1.6$) は BASF 社、ポリブチレンサクシネート (PBSu, $M_n = 3.7 \times 10^4$, $M_w/M_n = 4.5$) およびポリ (ブチレンサクシネート-co-アジペート) (PBSA, $M_n = 3.4 \times 10^4$, $M_w/M_n = 5.1$) は三菱ケミカル株式会社、ポリエチレンサクシネート (PESu, $M_n = 1.5 \times 10^4$, $M_w/M_n = 2.8$) は日本触媒株式会社、ポリ (ϵ -カプロラクトン) (PCL, $M_n = 1.5 \times 10^4$, $M_w/M_n = 1.4$) は株式会社ダイセル、ポリ乳酸 (PLA, $M_n = 5.6 \times 10^4$, $M_w/M_n = 2.4$) は三井化学株式会社、ポリ (3-ヒドロキシブタン酸) (P(3HB), $M_n = 6.8 \times 10^4$, $M_w/M_n = 2.1$) は三菱ガス化学株式会社から、それぞれ提供された。これらのポリエステルは、使用前に、クロロホルムに溶解させ、その溶液をメタノールに加えることで再沈殿された。沈殿したポリエステルは、吸引ろ過により回収され、減圧乾燥させた。ポリエステルの分子量は3つのカラム (TSKgelGMHXL, TSKgelG1000HXL, TSKgelG200HXL、東ソー株式会社) を使用したゲル浸透クロマトグラフィー (GPC、HLC-8220GPC) により解析された。クロロホルムを移動相として用いた。カラム温度は 40 °C、流速は 1.0 mL/min とした。ポリスチレンスタンダードを用い較正曲線を作成した。ポリエステルフィルムは、メルトプレス法またはソルベントキャスト法により作成された。メルトプレス法によるポリエステルフィルムは以下の方法で作成された。厚さ 0.1 mm の金型にポリエステルを入れ、mini Test Press-10(株式会社東洋精機製作所)を用い、各温度 (PBAT:130°C, PBSu: 120°C, PBSA: 120 °C, PESu: 110 °C および PCL: 70 °C) で、1 分間、15 MPa でプレスした。その後、20 °C で徐冷させた。ソルベントキャスト法によるポリフィルムは以下の方法で作成された。ポリエステル (0.5 g) をクロロホルム (10 mL) に溶解させた。溶液をガラス製シャーレ (直径 88 mm) に入れ、局所排気装置内で、クロロホルムを蒸発させた。フィルムは使用前に、メタノールと蒸留水で洗浄し、凍結乾燥させた。6-ヒドロキシヘキサン酸 (6-HH) は ϵ -カプロラクトンを水酸化ナトリウムで加水分解させることにより得られた [106]。6-HH の生成は ¹H NMR で確認された。その他の試薬は、市販の特級試薬をそのまま使用した。粉末 PESu は、再沈殿処理後の PESu (0.5 g) をジクロロメタン (10 mL) に溶解させ、その溶液をアセトン:メタノール (1:1) 混合溶液 (300 mL) に加えることにより得られた。

培地

Luria-Bertani (LB) 培地の試薬組成 [107]を Table 4 に、ミネラル培地の試薬組成を Table 5 に、それぞれ示す。ポリエステルの乳化液は、ポリエステル (1 g) をクロロホルム (12 mL) に溶かし、その溶液を、乳化剤 Plysurf[®] (終濃度 0.01 % (v/v)) を添加した蒸留水に加え、超音波処理 (TOMY ultrasonic disruptor UD-200、OUTPUT level 6) を 10 分間行うことにより得られた [108]。乳化液中のクロロホルムは、局所排気装置内にて、溶液を室温で一晩攪拌させることで除去された。この乳化液に Table 7 に示した試薬を加え、ポリエステル乳化培地を得た。一方、オリーブオイル含有培地は、オリーブオイルをミネラル培地溶液に加

え、超音波処理を行うことにより得られた。培地を固化させるために、寒天 1.5 % (w/v) を加えた。培地は使用前に、121 °C で 15 分間オートクレーブされた。

Table 4. Components of LB medium (pH 7.5) (g/L)

HIPOLYPEPTON	10.0
Yeast extract	5.0
NaCl	5.0

Table 5. Components of mineral medium (pH7.0) (g/L)

KH ₂ PO ₄	4.6
NaH ₂ PO ₄ •12H ₂ O	11.6
MgSO ₄ •7H ₂ O	0.5
NH ₄ Cl	1.0
FeCl ₃ •7H ₂ O	0.1
Yeast extract	0.5

PBAT 分解微生物の単離

群馬県桐生市（群馬大学：緯度: 36.42'36.16", 経度: 139.34'84.51"）から採取した土壌を微生物摂取源として、PBAT 分解微生物を単離した。土壌（1 g）を滅菌生理食塩水（10 mL）に懸濁し、10 分間静置した。ポリエステル乳化固体培地に、この土壌懸濁液の上清（50 μL）を均一に塗布した。その培地を 30 °C で培養し、クリアゾーン形成株を選択した。微生物の純化は、LB 固体培地上で画線法により行った [70]。

クリアゾーン形成法による単離株の各ポリエステル分解評価

各ポリエステル（PBAT, PBSu, PBSA, PESu, PLA および P(3HB)）乳化固体培地およびオリブオイル含有培地に単離株および標準株（*R. fascians* NBRC100625 株）を植菌し、30 °C で培養後、クリアゾーン形成の様子を観察した。

単離株による脂肪族ポリエステルフィルム分解評価

単離株を LB 液体培地（3 mL）に植菌し、30 °C で 2 日間培養した。ミネラル液体培地（3 mL）に前培養液（30 μL）と、メタノール、滅菌超純水の順に浸漬させ滅菌した各ポリエステルフィルム（PBSu, PBSA, PESu, および PCL, 1×1 cm, 厚み 0.1 mm）を添加し、10 日間、振とう培養した（25 °C、120 strokes/min）。培養液から回収した各ポリエステルフィルムをメタノール、滅菌超純水の順で洗浄後、一晚減圧乾燥させた。その後、各フィルムの初期重量から分解後の重量を引き、重量減少量を計算した。コントロールとして単離株を加えずに、同様に振とう培養を行ない、各ポリエステルフィルムの分解量を計算した。分解速度は、重量減少量を培養日数で除することにより算出された。

単離株による PBAT フィルム分解評価

単離株を LB 液体培地（3 mL）に植菌し、30 °C で 2 日間培養した。ミネラル液体培地（3 mL）に前培養液（30 μL）と、メタノール、滅菌超純水の順に浸漬させ滅菌した PBAT フィルムを添加し、振とう培養した（25 °C、120 strokes/min）。5、10、15、および 20 日間培養後、培養液から PBAT フィルムを回収した。フィルムをメタノール、滅菌超純水の順で洗浄後、一晚減圧乾燥させた。その後、他のポリエステルフィルムと同様に重量減少量を計算し

た。コントロールとして単離株を加えずに、同様に振とう培養を行ない、PBAT フィルムの分解量を計算した。

単離株の生育と PBAT 分解能に対する温度の影響

PBAT 乳化固体培地に単離株および標準株を植菌し、2 週間、異なる温度 (4, 20, 25, 30, 37 および 50 °C) で培養した。コロニーの大きさに基づき、温度が単離株の生育に与える影響を評価した。また、コロニーの中心からクリアゾーンまでの距離に基づき、温度が単離株の PBAT 分解能に与える影響を評価した。

ゲノム DNA (gDNA) 抽出

単離株の gDNA 抽出は、以下の手順により行われた [109]。LB 液体培地 (1.7 mL) に単離株を植菌し、30 °C で一晩、振とう培養した。LB 液体培地 (100 mL) に、前培養液 (1 mL) を加え、30 °C で一晩、振とう培養した (120 strokes/min)。遠心分離 (6000 rpm, 10 min, 4 °C) により菌体を回収した。得られた菌体を、Tris-EDTA (TE) バッファー (pH 8, 8.5 mL) に懸濁させた。懸濁液にリゾチーム (8.5 mg) を加え 37 °C で 1 時間保温した。10 % (w/v) SDS (450 µL)、20 mg/mL Proteinase K (50 µL) を加え、50 °C で 3 時間保温した。これにフェノール (4.5 mL)、クロロホルム:イソアミルアルコール=24:1 (4.5 mL) を加え室温で 30 分間混和し、フェノール/クロロホルム抽出を行った。その後、遠心分離 (8000 rpm, 30 min, 25 °C) し、上層を回収した。回収した上層に 5 M NaCl (2 mL) および 2-プロパノール (10 mL) を加え、2-プロパノール沈殿処理により gDNA を回収した。gDNA を、70 % (v/v) エタノールで 3 回洗浄した。TE バッファー (8.5 mL) に gDNA 溶解させ、ここに 10 mg/mL RNase (1 µL) を加え、37 °C で 1 時間保温した。再度フェノール/クロロホルム抽出を行い、2-プロパノール沈殿により gDNA を回収した。gDNA は TE バッファーに溶解させた。gDNA の濃度はアガロースゲル電気泳動および紫外可視分光光度計 Nabi (MicroDigital 社製) により算出された。

単離細菌の遺伝学的解析

単離細菌の 16S rDNA 配列はポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法により増幅された。増幅に用いたプライマーは 16Sf (5'-GTTTGATCATGGCTCAG-3') (大腸菌の 16S rDNA 配列の 36-53 位置に対応する) および 16Sr (5'-TACCTTGTTACGACTTCA-3') (1517-1533 位置に対応する) であった [110]。PCR 試薬組成は以下の通りである。NKCM2511 株の gDNA (100 ng)、Ex Taq[®] DNA polymerase (1.0 U, Takara Bio Inc., Japan)、100 nM の各プライマー、4.0 mM dNTP Mixture、10× Ex Taq バッファー (2 µL, Takara Bio Inc., Japan) および滅菌超純水を混合し、20 µL までメスアップした。PCR サーマルサイクルは以下の通りである。94 °C、5 分を 1 サイクル、94 °C、30 秒間、50 °C、30 秒間および 72 °C、2 分間を 25 サイクル、72 °C、5 分間を 1 サイクルとした。1.5 % (w/v) アガロースゲル電気泳動で PCR 産物の増幅および長さを確認した後、PCR 産物を DNA Ligation Kit <Mighty Mix> (TaKaRa bio) を用い、T-vector pMD20 (TaKaRa Bio) に挿入した。16S rDNA 配列は Eurofins genomics 株式会社にて

ダイデオキシ法で決定された。National Center for Biotechnology Information (NCBI) サイト上のプログラム nucleotide BLAST を用いて、GenBank データと単離株の 16Sr DNA 配列とを比較した。16S rDNA 配列のアライメントには、DNA Data Bank of Japan (DDBJ) サイト上のプログラム ClustalW (<https://clustalw.ddbj.nig.ac.jp>) を用いた。進化系統樹は、近隣結合法 [111]によりソフトウェア MEGA 7 [112]を用いて作成された。

生理学および生化学的性質

単離株および標準株 [93]のグラム染色を Color Gram2 キット (ビオメリューバイテック社製)、アミノペプチダーゼ、およびオキシダーゼ生産をアミノペプチダーゼテストおよびオキシダーゼテスト (メルク社製) を用いて調べた。その他の生理学的性質および炭素源資化性は、API 20NE (ビオメリューバイテック社製) を用いて調べた。菌株の酵素生産は、半定量性酵素活性キット API ZYM (ビオメリューバイテック社製) を用いて調べられた。

ガスクロマトグラフィー (GC) による脂肪酸メチルエステル (FAME) 解析

MIDI法により各細菌の FAME を調整した [113]。単離株と標準株をそれぞれ LB 液体培地 (200 mL) に植菌し、30 °C で一晩振とう培養した。遠心分離 (4 °C, 6000 rpm, 10 min) により菌体を回収した後、滅菌生理食塩水で菌体を再懸濁し、再度遠心分離により菌体を回収した。この操作を 2 回繰り返して、菌体を洗浄した。湿菌体 (40 mg) にアルカリけん化液(メタノール:超純水=1:1、15 % (w/v) NaOH) (1 mL) を加えた。これを 100 °C で 5 分間保温した後、10 秒間ほど激しく振り、さらに 100 °C で 25 分間保温した。静置後に有機層をピペットで採取し、測定サンプル溶液とした。その溶液と当量の 0.1 % (v/v) カプリル酸メチル溶液とを混合したものを内部標準物質として測定した。そのサンプル溶液に含有する脂肪酸を、ガスクロマトグラフィー (GC) を用いて解析した。GC の測定条件は、ディテクター温度 260 °C、インジェクター温度 255 °C、カラムオープン初期温度 150 °C、昇温最終温度保持時間 20 分に設定した。測定カラムはニュートラボンド-1 (GLサイエンス社製, 30×25 mm) を用い、ピークの検出は Flame Ionization Detector を用いた。ピークの同定には、バクテリア同定用標準物質脂肪酸メチルエステル (BAME) ミックス (スペルコ社製) を用いた。

グアニン+シトシン (G+C) 含率解析

0.4 mg/mL に調整した単離株の gDNA を 100 °C で 5 分間加熱した後、氷水中で急冷した。そのゲノム溶液に、ヌクレアーゼ P1 溶液 (0.1 mg/mL, 20 µL) を加え、50 °C で 1 時間保温し、熱変性した DNA を分解させた。これにアルカリフォスファターゼ (エビ由来、1 µL) を加え、37 °C で 1 時間保温し、脱リン酸化させる事により、ヌクレオシド試料を得た。その試料を高性能液体クロマトグラフィー (HPLC, 島津製作所製) により分析した [114]。分離カラムは、LICHROSPHERE 100 RP-8 (C8, 0.4×25 cm, 10 nm, Merk 社製) を用いた。0.02 M NH₄H₂PO₄/アセトニトリル (20:1, v/v) を移動相に用い、流速を 1.0 mL/min とした。オートインジェクト SIL-10AD (島津製作所製) を用いて試料 (50 µL) をカラムに注入し

た。また、SPD-10A 検出器を用い、波長 260 nm で溶出物を検出した。標準物質に λ DNA を用い、同様に測定した。

表面形態観察

単離株を LB 液体培地 (200 mL) に植菌し、30 °C で一晩振とう培養した。NKCM2511 株の培養液 (100 μ L) を、滅菌 PBAT フィルムを静置させた LB 固体培地上に植菌し、30 °C で 2 日間培養した。NKCM2511 株が付着したフィルムを、2.5 % (v/v) グルタルアルデヒド (走査電子顕微鏡グレード) 溶液に浸漬させ、固定化した。このフィルムを、濃度を順次変化させた 50, 60, 70, 80, 90, 99.5 % (v/v) エタノール水溶液に 20 分間ずつ浸漬させ、脱水を行った。その後、フィルムを *tert*-ブチルアルコールに 1 時間浸漬し、自然乾燥させ、一晩凍結乾燥を行った。これに、日本電子製イオンコーター JFC1600 を用いて白金蒸着させ、電界放出型走査型電子顕微鏡 (JSM-6700F、日本分光株式会社) を用い、電圧 15 kV、高真空条件下で観察した。

分解試験前後の PBAT フィルムもまた、上記の方法で、固定化および脱水処理した。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 で蒸着させ、走査型電子顕微鏡 (SEM) (SSX-550、島津製作所製) を用い、電圧 15 kV、高真空条件下で観察した。

単離株による 1,4-ブタンジオール、アジピン酸、テレフタル酸および PBAT フィルムの生化学的酸素要求量 (BOD) 生分解度測定

フラン瓶に、A 液 (KH_2PO_4 : 8.5, K_2HPO_4 : 21.75, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 33.4, NH_4Cl : 0.5 g/L)、B 液 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 22.5 g/L)、C 液 ($\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$: 36.4 g/L)、および D 液 ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 0.25 g/L) をそれぞれ 200 μ L ずつ加え、蒸留水で 200 mL までメスアップした。炭素源としてソルベント・キャスト法により作成した PBAT フィルム、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 4 mg ずつ加え、オートクレーブした。そこにミネラル液体培地で前培養した単離株の培養液 (50 μ L) を加えた。また、BOD の基準として、炭素源を含まないコントロールも同様に作成した。 CO_2 の吸収剤として、4.0 % (w/v) 水酸化ナトリウム水溶液を用い、吸収剤容器に 1 mL を加えた。その後、BOD TESTER (タイテック社製) にフラン瓶をセットし、攪拌させた後に 30 分間静置させた。酸素量の目盛りを 0 に調節し、25 °C で 22 日間、1 日ごとに BOD を測定した [115]。各試料の BOD 生分解性は、試料を添加した溶液 (BOD_t) の BOD からコントロール (BOD_b) の BOD を差し引き、その値 (BOD_t-BOD_b) を試料の理論酸素要求量 (ThOD) で除することにより算出された。

各炭素源による生育および PBAT 分解に与える影響

単離株を LB 液体培地 (1.7 mL) に植菌し、25 °C で 2 日間振とう培養した。前培養液 (30 μ L) と滅菌した PBAT フィルム (1×1 cm、厚さ 0.1 cm、1 枚) を、各炭素源 (グルコース、フルクトース、アジピン酸、コハク酸、テレフタル酸、クエン酸、エチレングリコール、オリーブオイル、6-HH、16-ヒドロキシヘキサデカン酸 (16-HHD) および粉末の PCL) を

0.2 % (w/v) の割合で添加した液体ミネラル培地 (3mL) および LB 液体培地に入れ、25 °C で 7 日間振とう培養した (120 strokes/min)。培養後、フィルムを回収し、分解試験前後のフィルムの重量減少を算出した (n=5)。各培地における単離株の増殖度は、各培養液 (1 mL) の波長 600 nm における濁度 (OD₆₀₀) で評価された。

培養上清におけるポリエステル分解活性の評価

単離株を LB 液体培地 (1.7 mL) に植菌し、25 °C で 2 日間振とう培養した。LB 液体培地 (100 mL) に前培養液 (1 mL) を加え、25 °C で 2 日間振とう培養した (120 stroke/min)。遠心分離 (6000 rpm, 15 min, 4 °C) により培養上清を回収した。培養上清 (20 mL) を 10 mM 2,2',2"-ニトリロトリエタノール (pH 7.0, 1 L) 中で透析した後、AQUA KEEP(吸水性樹脂、住友化学工業社製)を用いて約 10 mL まで濃縮した。濃縮した培養上清 (10 mL)を凍結乾燥し、滅菌超純水 (400 µL) で溶解させた。これを 50 倍濃縮培養上清液とした。培地作成手法に準拠して、50 mM ナトリウムリン酸バッファーを基剤とした各ポリエステル (PBAT, PBSu, PBSA, PCL および PESu) 乳化固体プレートを作成した。濃縮液 (10 µL) を、カナマイシン塗布した各ポリエステル (PBAT, PBSu, PBSA, PCL および PESu) 乳化固体プレートに滴下し、30 °C で 5 日間静置させ、クリアゾーン形成を評価した。

ザイモグラム (酵素活性染色)

単離株の培養上清に含まれるポリエステル分解酵素は トリシンバッファーを用いた PESu 含有-ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)-ポリアクリルアミドゲル上でのザイモグラム解析によって検出された [116, 117]。PESu 含有-SDS-ポリアクリルアミドゲルは以下の手順で作成された。粉末 PESu (0.1 %) を SDS-15 % (w/v) アクリルアミド溶液 (14.945 mL) に加え、超音波処理 (TOMY ultrasonic disruptor UD-200, OUTPUT level 4) により、分散させた。10 % (w/v) 過硫酸アンモニウム水溶液 (50 µL) および N, N, N', N'-テトラメチルエチレンジアミン (5 µL) を加え、ゲル化させた。LB 培地での培養液の 50 倍濃縮溶液 (10 µL) を、6× SDS ローディング緩衝液 (0.375 M Tris-HCl, 60 % (v/v) glycerol, 12 % (w/v) SDS, 0.06 % (w/v) bromophenol blue, and 0.6 M dithiothreitol) (2 µL) と混合させ、20 °C で 30 分間静置した。この溶液 (10 µL) を PESu 含有-SDS-ポリアクリルアミドゲルにアプライした。0.1 M Tris, 0.1 M トリシンおよび 0.1 % (w/v) SDS 含有溶液 (pH 未調整) を陰極に、0.2 M Tris-HCl (pH 8.45) を陽極に入れ、4 °C で 3 時間泳動 (WSE-1010/25 コンパクト PAGE Ace, アトー社製) した。その後、ゲルに含まれる SDS を除去するために、ゲルを 50 mM ナトリウムリン酸バッファー (pH 7.0) に浸透させ、30°C で 1 週間振とうした。濃縮溶液の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 分析は、Laemmli の方法に従い、15 % (w/v) アクリルアミドゲルを用いて行われた [118]。ゲル中のタンパク質は、Rapid CBB Kanto (関東化学株式会社) のクマシーブリリアントブルー-R-250 で染色された。ExcelBand™ All Blue Regular Range Protein Marker PM1500 (SMOBIO) を各ゲルのタンパク質分子量マーカーとして用いた。

ドラフトゲノム DNA 解析

単離株のドラフトゲノム DNA は、以下の手順でシーケンシング解析された（生物技研株式会社）。Covaris を用い断片長が 500 bp になる条件で gDNA を断片化した。MGIEasy Universal DNA Library Prep Set を用いライブラリーを作製した。作成した DNA ライブラリーを基に MGIEasy Circularization Kit を用い環状化 DNA を作製した。MGISEQ-2000RS High-throughput Sequencing Set を用いて、DNA nanoball（DNB）を作製した。DNBSEQ-G400 を用いて 150 bp ペアエンドの条件で作製された DNB をシーケンシング解析した。その後、シーケンシング解析された DNA 断片のデータ（Raw read data）を KBase プラットフォーム（<http://kbase.us>）上で解析した。Raw read data（FASTQ 形式）を KBase にアップロードした。Raw read data からシーケンシング解析に用いられたアダプター配列を Trimmomatic アプリケーションにより除去した [119]。その後、SPAdes アプリケーション(v3.13.0) [120]を用いて、リードをアセンブルし、コンティグ配列（ドラフトゲノム配列）を得た。FastANI アプリケーション [121]を用い、ドラフトゲノム配列と KBase 上で登録された *R. fascians* NBRC 12155（Kbase accession number: GCF_001894785）および *R. fascians* D188（Kbase accession number: GCF_001620305.1）のドラフトゲノム配列と比較した。ドラフトゲノム配列上の推定タンパク質のアノテーションには、Prokka ソフトウェア（v1.12）[122]を用いた。Table 5 に示した既知の PBAT 加水分解酵素のアミノ酸配列と相同性を持つ推定タンパク質を、KBase プラットフォーム上の BLASTp prot-prot Search - v2.7.1 プログラムを用い解析した。

DNA アクセッション番号

NKCM2511 株の 16S rDNA 遺伝子の塩基配列は AB591807 のアクセッション番号で DDBJ nucleotide sequence database に登録された。NKCM2511 株のホールゲノムショットガンシーケンスデータは、DDBJ Sequence Read Archive (DRA)に以下の番号で登録された：BioProject ID PRJDB10459、Whole Genome Shotgun(WGS) accession number: BNHJ00000000。

結果および考察

中温性 PBAT 分解細菌 NKCM2511 株の特徴づけ

土壌サンプルを植種源として、PBAT 分解微生物を 1 株単離した。本株を NKCM2511 と命名した。Fig. 4 は PBAT 乳化培地上で NKCM2511 株のコロニー周囲に形成されたクリアゾーンを示した。

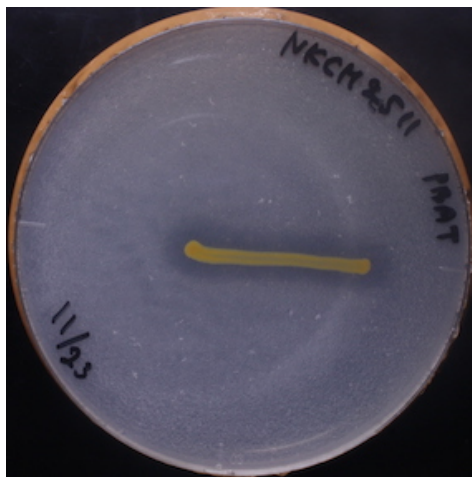


Fig. 4. Clear zone formation by strain NKCM2511 on PBAT emulsified plate.

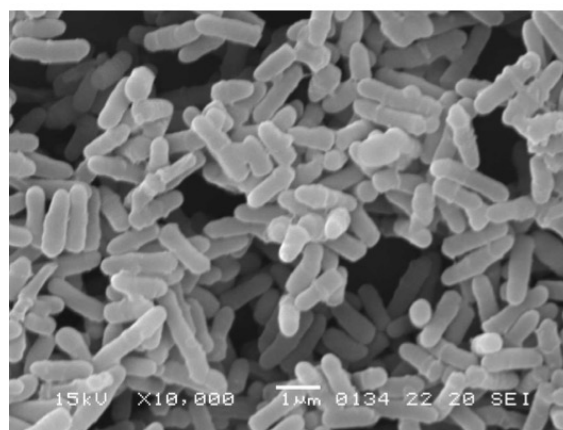


Fig. 5. A field emission scanning electron microscope image of strain NKCM2511 on PBAT film. The white bar indicates 1 μm in length.

NKCM2511 株は、コリネ型細菌であった (Fig. 5)。また FAME 分析から iso-C_{18:0}、C_{16:0} および iso-C_{16:0} が本株の主な脂肪酸であることがわかった (Table 6)。16S rDNA 配列に基づく遺伝系統学的解析から NKCM2511 株はアクチノバクテリア門 (放線菌門) に属する *R. fascians* NBRC100625 と高い相同性を示すことがわかった (Fig. 6)。

Table 7 に、本株および標準株の生化学的・生理学的性質を示す。本株はウレアーゼ試験陽性であったが、標準株 *R. fascians* NBRC100625 は、陽性を示さなかった。また本株はアルカリホスファターゼ、エステラーゼ、エステラーゼリパーゼ、リパーゼ、ロイシンアシルアミダーゼ、バリンアシルアミダーゼ、システインアシルアミダーゼ、トリプシンおよびナフトール AS-BI ホスホハイドロラーゼ活性を有していた。本株の酵素的特徴は、標準株のそれらとほぼ一致した。さらに、本株の gDNA の G+C 含率は 67.7% であり、標準株と比較し、わずかに高かった (66.4%)。生理学的・生化学的性質および遺伝系統学的解析の結果から、本株は *R. fascians* の近縁種であることが示唆された。

NKCM2511 株と標準株は 20 - 30 °C の温度範囲で生育し、37 °C では生育できなかった。また、本株は 20 - 30 °C の温度範囲で、PBAT 乳化固体培地上にクリアゾーンを形成した。さらに、本株は 25 - 30 °C の温度範囲で最も大きなクリアゾーンを形成した (Table 8)。また、NKCM 2511 株は好気および嫌気性条件では増殖しなかった。このことから NKCM2511 株は好気性中温性 PBAT 分解細菌であることが示唆された。

クリアゾーン法より、本株および *R. fascians* NBRC100625 株は PBAT 以外に、PBSu、PBSA、PCL、PESu およびオリーブオイルに対して加水分解活性を示したが、P(3HB)および

PLA に対しては加水分解活性を示さなかった (Table 9)。また、本株は、PESu、PBSA、PCL、PBAT および PBSu のフィルムを、それぞれ 105.7 ± 3.6 , 74.3 ± 6.4 , 22.1 ± 7.2 , 16.3 ± 2.0 および $3.3 \pm 1.8 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{d}$ の速度で分解した。これまでに単離された PBAT 分解細菌は、アクチノバクテリア門、ファミキュテス門およびプロテオバクテリア門の 3 つに属していた [60, 64-67, 86]。これらの PBAT 分解細菌は、コンポスト、土壌、池および嫌気汚泥などの幅広い環境から単離されている。このことは、PBAT の生分解が環境非依存的であることを示唆している。しかしながら、中温性の PBAT 分解細菌の PBAT 分解速度 (中温性細菌; NKCM2511: $16.3 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{d}$, *B. pumilus* NKCM3201: $12.2 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{d}$ [66]、*Leptothrix* sp. TB-71: $57.1 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{d}$ [67]) は、好熱性細菌 *T. fusca* DSM 44341: $2.94 \text{ mg}/\text{cm}^2/\text{d}$ [60] のものと比較するとはるかに低い。加えて土壌から単離された中温性 PBAT 分解真菌 *Isaria* sp. NKCM1712 および NKCM1713 株の PBAT 分解速度 ($67 - 84 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{d}$) を考慮すると、中温環境における PBAT の分解では、真菌が分解者として支配的であると推定される。

R. fascians が属する *Rhodococcus* 属細菌は陸地および水生環境から見つかった [104, 123, 124]。 *Rhodococcus* 属細菌の多くは、多環芳香族環炭化水素や長鎖飽和炭化水素といった難分解性化合物を分解することが知られている [125, 126]。また、北極圏 (スピッツベルゲン島) から単離された *Rhodococcus* sp. 23B 株は PCL を分解した [127]。本学位論文は、脂肪族芳香族ポリエステル分解活性を示す *R. fascians* に関する初めての報告である。

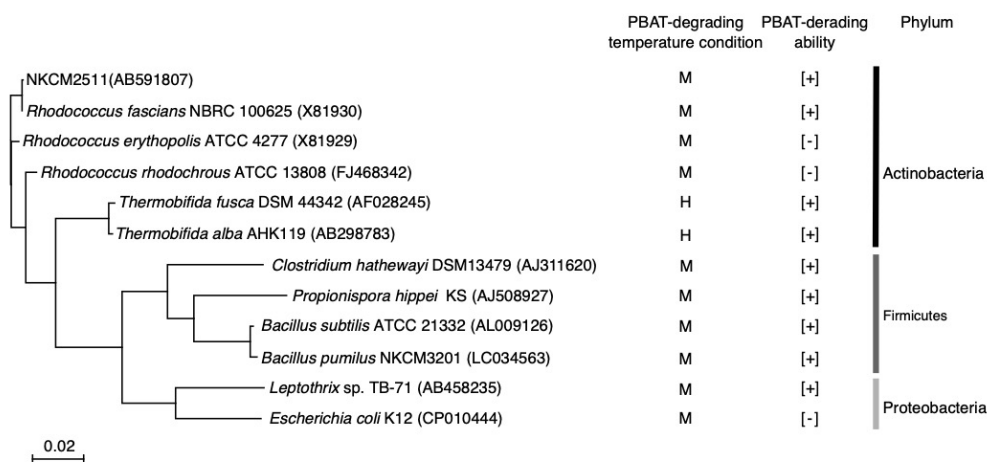


Fig. 6. Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences of NKCM2511, PBAT-degrading bacteria and related species. The phylogenetic tree was constructed with software MEGA7 using neighbor-joining method based on 16S rDNA sequences, after the multiple sequence alignment was performed with program ClustalW at DNA data bank of Japan (DDBJ). The scale bar indicates 0.02 substitutions per nucleotide. M: Mesophiles (optimum temperatures: 25 °C to 40 °C). H: Thermophiles (optimum temperatures: above 45 °C). +: PBAT-degrading activity is positive. -: PBAT-degrading activity is negative.

Table 6. Cellular fatty acid profiles of strain NKCM2511 and *R. fascians* NBRC100625.

	NKCM2511	<i>R. fascians</i> NBRC100625
C14:0	5.41	6.17
C15:0	3.19	10.74
α-C15:0	-	0.45
C16:0	21.89	18.43
C16:ln9c	18.70	15.77
C17:0	6.26	9.40
α-C17:0	1.48	8.61
C18:0	0.93	0.18
C18:ln9c	42.14	30.25

Table 7. Biochemical and physiological properties of strain NKCM2511 and the reference strain.

	NKCM2511	<i>Rhodococcus fascians</i> NBRC100625
Biochemical properties ^{a)}		
Gram stain	Pos.	Pos.
Oxidase	-	-
Aminopeptidase	-	-
Nitrates reduction	-	-
Indole production	-	-
Oxidation of glucose to gluconate	-	-
Arginine dihydrolase	-	-
Urease	+	-
Hydrolysis of esculin	-	-
Hydrolysis of gelatin	-	-
Enzyme activities ^{b)}		
Alkaline phosphatase	+	+
Esterase (C4)	+	+
Esterase lipase (C8)	++	++
Lipase (C14)	+	+
Leucine arylamidase	+	+++
Valine arylamidase	+	+
Cystine arylamidase	++	+
Trypsin	++	-
Chymotrypsin	-	-
Acid phosphatase	-	+
Naphthol AS-BI phosphohydrolase	+	+
α -galactosidase	-	-
β -galactosidase	-	-
β -glucuronidase	-	-
α -glucosidase	-	+
β -glucosidase	-	-
N-acetyl- β -glucosamidase	-	-
α -mannosidase	-	-
α -fucosidase	-	-
Utilization of carbon sources ^{a)}		
Glucose	-	+
L-Arabinose	+	+
D-Mannose	+	+
D-Mannitol	+	+
N-Acetyl-D-glucosamine	-	+
Maltose	-	+
Gluconate	-	+
<i>n</i> -Capric acid	-	-
<i>dl</i> -Malate	-	+
Citrate	+	-
Phenyl acetate	-	-
1,4-butandiol ^{c)}	+	+
Adipic acid	-	-
Terephthalic acid ^{c)}	-	-
G+C content	67.7	66.4

a) These properties were determined using the API 20NE system. b) Enzyme activities were determined using the API ZYME system. - means that the activity was not detected. c) Utilization of 1,4-butandiol and terephthalic acid was evaluated by optical density after incubation for 48 h at 30 °C in the mineral medium supplemented with each carbon source. + means that the weak activity was detected, ++ means that the moderate activity was detected, +++ means that the strong activity was detected.

Table 8. Effect of temperature on the growth and clear zone formation on the PBAT emulsified plates of strain NKCM2511 and the reference strain.

Temperature (°C)	NKCM2511		<i>R. fascians</i> NBRC100625	
	Growth	Clear zone formation	Growth	Clear zone formation
4	-	-	-	-
20	++	+	++	+
25	+++	++	+++	++
30	+++	++	+++	++
37	-	-	-	-
40	-	-	-	-
60	-	-	-	-

+++ : colony size was larger than 0.2 cm, or radius of clear zone was larger than larger than 0.5 cm.
 ++ : colony size was between 0.1 and 0.2 cm, or radius of clear zone was between 0.2 and 0.5 cm
 + : colony size was smaller than 0.1 cm, or radius of clear zone was smaller than 0.2 cm.
 - : no growth, or a clearing zone was not formed.

Table 9. The ability of forming clear zone on the plates containing emulsified polyesters by strain NKCM2511 and the reference strain at 25 °C.

	NKCM2511	<i>R. fascians</i> NBRC100625
PBAT	++	++
PBSu	+	+
PBSA	+++	+++
PCL	+++	+++
PESu	+++	+++
PLA	-	-
P(3HB)	-	-
Olive oil	+++	+++

+++ : radius of clear zone was larger than larger than 0.5 cm.
 ++ : radius of clear zone was between 0.2 and 0.5 cm.
 + : radius of clear zone was smaller than 0.2 cm.
 - : clear zone was not formed.

NKCM2511 株による PBAT の生分解

NKCM2511 株による固体 PBAT の分解の経時変化を調べた。Fig. 7 (A)は、NKCM2511 株を添加した場合と添加していない場合の PBAT フィルムの重量減少量を示した。NKCM2511 株を添加した場合の PBAT フィルムの重量減少量は、培養時間に伴って増加した。培養開始 20 日間後には、PBAT フィルムの重量は初期重量の 91 %にまで低下した。一方で、NKCM2511 株を添加していないコントロールでは、フィルムの重量減少は確認されなかった。Fig. 7 (B) は NKCM2511 株の純粋培養による PBAT フィルム、1,4-ブタンジオール、アジピン酸およびテレフタル酸の BOD 生分解度曲線を示す。本株による 1,4-ブタンジオールの生分解度は、22 日間で約 55 % に達した。一方、アジピン酸、テレフタル酸、および PBAT フィルムの生分解度はそれぞれ 5 %、7 %および 7 %であった。

本株による PBAT フィルムの低い BOD 生分解度は、本株がアジピン酸およびテレフタル酸を容易に利用できないためであると考えられる。また、本株による PBAT フィルムの BOD 生分解度 (7%) は、本株と PBAT フィルムを 25 °C で 20 日間培養した後の重量減少量 (9 %) とほぼ一致した。この結果は、NKCM2511 株が PBAT を分解し、一部生成した分解物を利用したことを示している。したがって、NKCM2511 株は PBAT 分解真菌 *Isaria* sp. NKCM1712 株 [70]と同様、単体で PBAT を二酸化炭素と水に無機化できることが示唆された。一方、PBAT 分解細菌の *Leptothrix* sp. TB-71 株はアジピン酸を利用するが、1,4-ブタンジオールを利用せず[67, 73]、*B. pumilus* NKCM3201 [66]株および *T. fusca* DSM43793 株 [77]は、全ての PBAT 構成成分を利用しなかった。

Fig. 8 に、培養前と、NKCM2511 株と共に 5, 10, および 20 日間培養した後の PBAT フィルムの表面形態を示す。培養 5 日後の PBAT フィルム表面には、小さな亀裂がみられた。その後、培養時間の経過に伴い、PBAT フィルム表面に亀裂が増加し、表面の粗さが増加した。Table 10 は分解前後の PBAT フィルムの分子量を示す。25 °C で 30 日間 PBAT フィルムと NKCM2511 株を共に培養した結果、本株の添加有無にかかわらず、分解試験後の PBAT フィルムの数平均分子量は初期のものと比較し減少した。PBAT, PCL および PBSu 等のポリエステルフィルムの分解には微生物が生産する加水分解酵素による表面分解が寄与していることが報告されており、これら酵素による表面分解ではポリエステルフィルムの分子量変化は見られない [66, 128, 129]。表面形態および分子量変化の結果を考えると、本株を添加した液体培地中における PBAT フィルムの分解は、本株が分泌した菌体外酵素の作用による表面分解と非生物的な塊状分解の双方により生じると示唆された。

以前の研究で中温性 PBAT 分解真菌 *Isaria* sp. NKCM1712 株は PBAT 存在下で集積され、菌株を土壌へ添加した場合には、PBAT の分解が加速することを明らかにした [70]。一方、本章で特徴付けた中温性 PBAT 分解細菌 NKCM2511 株は PBAT 存在下で集積されなかった。また、PBAT 存在下での NKCM1712 株の増殖速度と比較し、NKCM2511 株の増殖速度は、本株がテレフタル酸およびアジピン酸を容易に利用できないため、1/5 程度と低かった。これらの結果は、実際の土壌環境下では、真菌が主要な PBAT 分解微生物であり、一方で、NKCM2511 株による PBAT の分解への寄与は小さいことを示唆している。

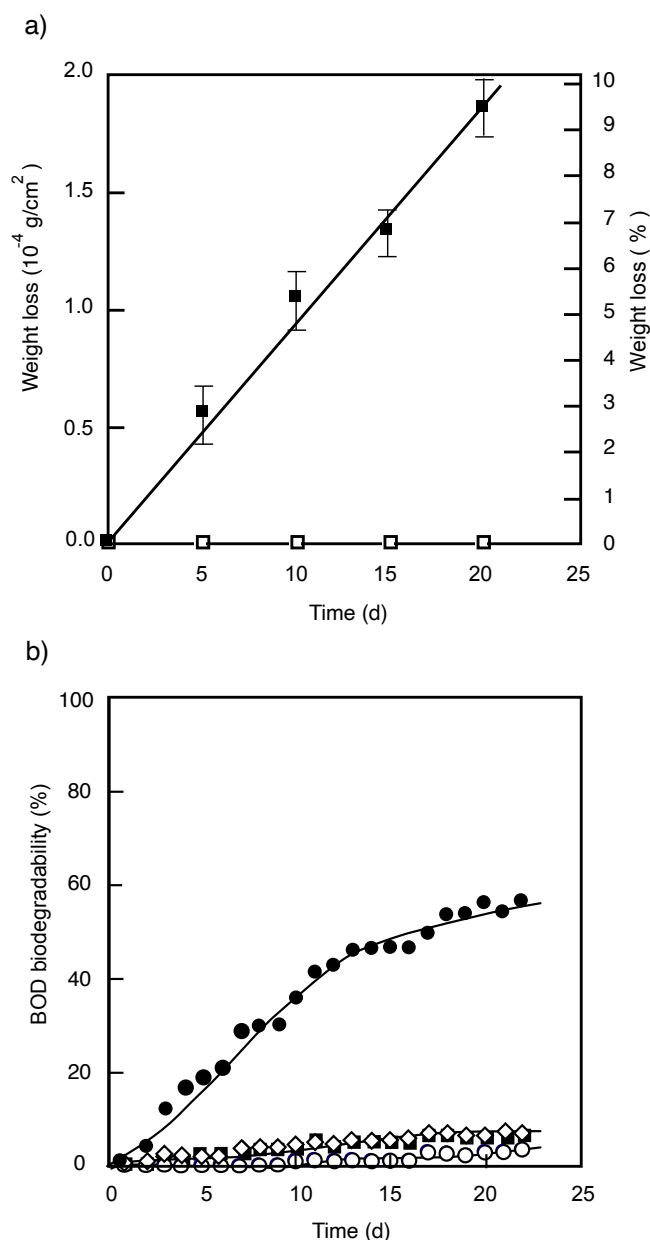


Fig. 7. a) Change in weight loss of PBAT films. The films were aerobically incubated with (filled square) and without (white square) the strain NKCM2511 in mineral medium at 25 °C. b) BOD degradation curves of PBAT and its constituents. The BOD biodegradation testing was performed in mineral media supplemented with the strain NKCM 2511 at 25 °C. Filled circle, white circle, white rhombus and filled square indicate the BOD biodegradability of 1,4-butanediol, adipic acid, terephthalic acid, and PBAT respectively.

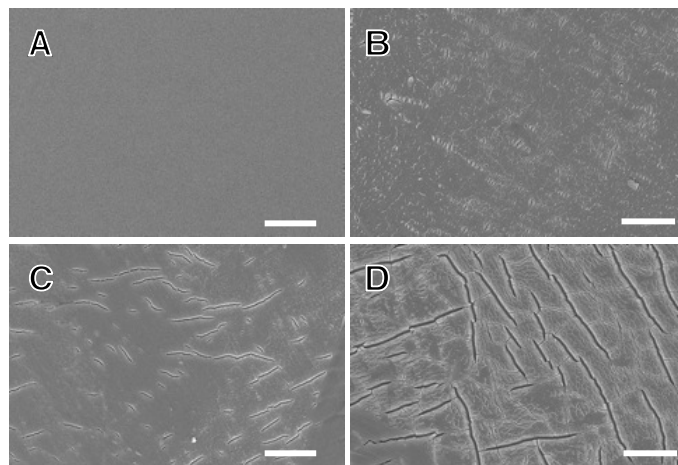


Fig. 8. Scanning electron microscopic images of PBAT films surface before (A) after incubation with strain NKCM2511 for 5 (B), 10 (C) and 20 days at 25 °C. The white bars indicate 20 μm in length.

Table 10. Time-dependent change in molecular mass of PBAT with and without NKCM2511 in the mineral medium

Conditions	Time (d)	$M_n \times 10^{-3}$	M_w/M_n
Before degradation test	0	10.0	1.6
Incubated with NKCM2511	30	9.3	1.6
Incubated without NKCM2511	30	9.5	1.6

炭素源による NKCM2511 株の生育および PBAT フィルムの分解速度への影響

Table 11 は、LB 培地およびそれぞれの炭素源を添加したミネラル培地における NKCM2511 株の増殖度と PBAT フィルムの分解速度を示す。本株は、フルクトース、グルコース、クエン酸、コハク酸、オリーブオイルを添加したミネラル培地および LB 培地において、よく増殖した ($\text{OD}_{600} > 2.0$)。本株は 6-HH を添加した培地において、中程度 ($1.0 < \text{OD}_{600} < 2.0$) 増殖した。一方、本株は 1,4-ブタンジオール、アジピン酸、テレフタル酸、エチレングリコール、16-HHD および PCL を添加した培地において、低い増殖度を示した ($\text{OD}_{600} < 1.0$)。本株は、オリーブオイル、コハク酸、クエン酸、6-HH を添加したミネラル培地において、高い PBAT 分解活性を示した (PBAT 分解速度 $> 20.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{d}$)。フルクトースおよびグルコースを添加したミネラル培地での PBAT 分解活性は中程度だった ($20.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{d} > \text{PBAT 分解速度} > 18.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{d}$)。一方、1,4-ブタンジオール、アジピン酸、エチレングリコール、16-HHD および PCL を添加したミネラル培地での PBAT 分解活性は低かった (PBAT 分解速度 $< 18.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{d}$)。

PBAT 分解微生物 *Isaria* sp. NKCM1712 株および *T. fusca* DSM43793 株は、PBAT およびその構成物の存在下で PBAT 分解活性が誘導される [70, 77]。一方、14 種類中 13 種類の培地中で NKCM2511 株の増殖度と PBAT 分解活性は比例関係を示した。このことから、本株において PBAT 分解酵素の生産は構成的 (非誘導的) であることが示唆された。

R. fascians は、*Nicotian tabacum* や *Arabidopsis thaliana* などの高等植物の葉において腫瘍 (Leafy gall) の形成を誘導する植物病原菌として知られている [98, 102]。そのため、農業用マルチフィルムとして PBAT を使用する場合には、PBAT 分解活性を有する *R. fascians* が集

積し植物に悪影響を与える可能性がある。しかし、本研究の結果より、*R. fascians* NKCM2511 株は、PBAT を炭素源として容易に利用できず、PBAT 構成成分（1,4-ブタンジオール、テレフタル酸およびアジピン酸）が PBAT 分解活性の誘導物質として機能しないため、PBAT 存在下で集積されないことがわかった。Muroi らは PBAT フィルムを数ヶ月間土壌中に埋設した後、植物病原性細菌の集積が観察されなかったことを報告しており、このことは本研究結果とよく一致した[130]。最終的に PBAT 分解物は様々な土壌微生物によって利用され、土壌環境には蓄積しないと考えられる。

Table 11. Growth and PBAT film degradation activity of strain NCKM2511 on various media

Media	Growth level ^{a)}	PBAT weight loss ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{d}$)
MM + PBAT	+	16.3 \pm 2.0
MM + Glucose + PBAT	+++	18.1 \pm 2.1
MM + Fructose + PBAT	+++	18.2 \pm 2.9
MM + Olive oil + PBAT	+++ ^{b)}	24.2 \pm 5.4
MM + Citric acid + PBAT	+++	22.4 \pm 2.2
MM + Succinic acid + PBAT	+++	27.0 \pm 3.3
MM + Adipic acid + PBAT	+	16.7 \pm 3.1
MM + Terephthalic acid + PBAT	+	12.0 \pm 1.7
MM + Ethylene glycol + PBAT	+	9.5 \pm 1.5
MM + 1,4 butanediol + PBAT	+	16.0 \pm 0.7
MM + 6-hydroxyhexanoic acid + PBAT	++	20.3 \pm 1.9
MM + 16-hydroxyhexadecanoic acid + PBAT	+ ^{b)}	1.9 \pm 1.5
MM + PCL + PBAT	+	12.1 \pm 1.0
LB + PBAT	+++	50.7 \pm 10.7

All experiments were performed in pentaplicate. Errors (\pm) indicate the width of experiment data.

a) +++ means the strain grew well ($\text{OD}_{600} > 2.0$), ++ means the strain grew ($2.0 > \text{OD}_{600} > 1.0$), + means the strain hardly grew ($\text{OD}_{600} < 1.0$)

b) growth was evaluated by naked-eyes observation.

ザイモグラム解析

Fig. 9 (A)は、本株の LB 培地での濃縮培養上清のポリエステル加水分解活性染色（ザイモグラム）を示した。一方、Fig. 9 (B)は CBB で染色したポリアクリルアミドゲルを示す。PESu を添加したポリアクリルアミドゲル上に、相対分子量が 180 kDa と 15 kDa のクリアゾーンのバンドが出現した[Fig. 8 (A)]。CBB 染色タンパク質のバンドは、ザイモグラムのクリアゾーンバンドと同一の分子量で検出された[Fig. 9 (B)]。この結果より本株は、2つ以上のポリエステル分解酵素を分泌することが示唆された。また、本株の LB 培地での濃縮培養上清は PBAT、PBSu、PBSA、PCL および PESu に対する分解活性を示した (Fig. 10)。また、LB 培地での培養上清がポリエステル分解活性を示したため、本株はポリエステル非存在下でポリエステル分解酵素を分泌していることが示唆された。

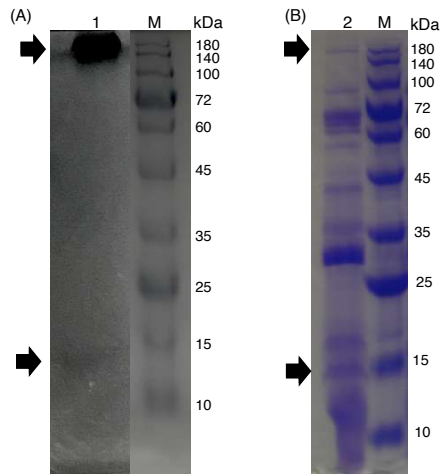


Fig. 9. Zymogram of poly(ethylene succinate) (PESu) hydrolytic activity of concentrated supernatant (A), and SDS-PAGE analysis (B). Lane M was applied with protein molecular mass standard. Lane 1 and 2 were applied with the concentrated supernatant of strain NKCM2511.

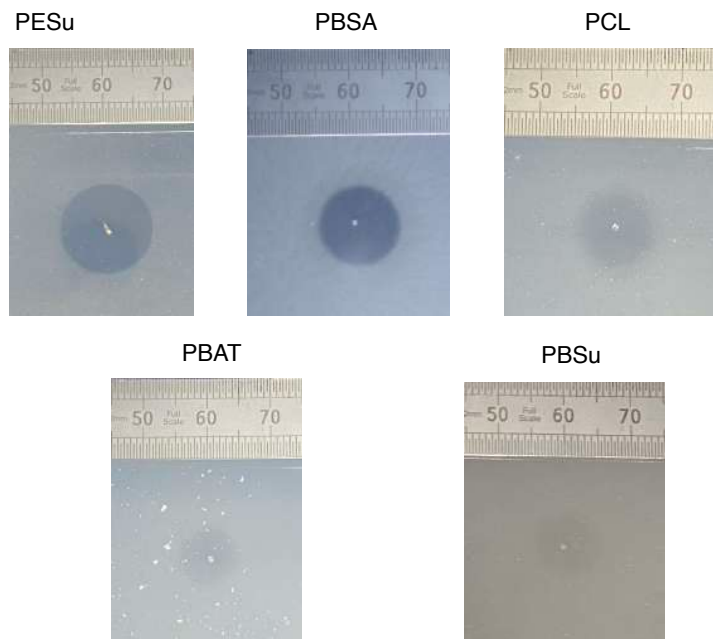


Fig. 10. Clear zone formation on polyesters emulsified plated, on which the concentrated supernatant was dropped. Ten microliters of 50-fold concentrated supernatant of strain NKCM2511 were dropped there and incubated at 30 °C for 3 days.

NKCM2511 株のゲノム解析

Raw read 配列の *de novo* アセンブリにより、26 本のコンティグ配列が得られた。最大コンティグ配列の長さは 3,544,843 bp であった。アセンブリゲノムの全長は 5,285,001 bp であり、G+C 含率は 64.6 % であった。推定タンパク質をコードする遺伝子数は 4,976 個であった。本株のゲノム配列と *R. fascians* NBRC100625 および *R. fascians* D188 のゲノム配列とのヌクレオチド同一性値(ANI estimated)は 97.7 % であった。ANI value が 95 % 以上相同性を示すゲノムは同一種のものであると定義されている [121] ことから、本株は *R. fascians* に属することが示唆された。この結果は、生理学的・生化学的性質および 16S rDNA 配列に基づく系統学的解析の結果とも一致した。

Table 12 は NKCM2511 株のゲノム DNA 配列上にある既知の PBAT 加水分解酵素のアミノ酸配列 (Table 12) と 20 % 以上の相同性を持つ推定タンパク質の locus_tag 番号、アミノ酸配列の長さ、PBAT 分解酵素アミノ酸配列との相同性、シグナルペプチド配列の有無およびリパーゼボックス配列を示す。RN2511_009450, RN2511_012570 および RN2511-38250 の推定タンパク質のアミノ酸配列は高温性細菌由来 PBAT 加水分解酵素: Est1 (*Thermobifida alba* AHK119)、Est119 (*T. alba* AHK119)、BTA1 (*T. fusca* DSM4379) [77] および The_Cut1 (*T. cellulositytica* DSM44535) [78] とそれぞれ 23 % 以上の相同性を示した。RN2511-038120 の推定タンパク質のアミノ酸配列は真菌由来 PBAT 加水分解酵素: CfCLE (*Cryptococcus flavus* GB-1) [83]、HiC (*Humicola insolens*) [78]、PCLE (*Paraphoma* sp. B47-9) [82] および FsC (*Fusarium solani*) [91] のアミノ酸配列と 27 % 以上の相同性を示した。RN2511-038530, RN2511-022110, RN2511-010100 および RN2511-046520 は *B. pumilus* NKCM3201 株由来 PBAT 加水分解酵素 PBATH_{bp}[66] のアミノ酸配列とそれぞれ 33.9 %, 27.7 %, 30.5 % および 28.3 % の相同性を示した。また、RN2511-038120, RN2511-038530, RN2511-022110, RN2511-010100 はアミノ酸配列上に既知の PBAT 加水分解酵素に共通するリパーゼボックス配列(G-X-S-X-G)を有する。加えて、RN2511-038120, RN2511-038530, RN2511-022110, RN2511-010100 のアミノ酸配列の N 末端にはシグナルペプチドが存在していた。一方、*Clostridium* 属由来の PBAT 分解酵素: Chath_Est1[65]、Cbotu_EstB[74] および Cbotu_EstA[74]、*Pseudomonas pseudoalcaligenes* 由来 PBAT 分解酵素: PpEst[75] および *Pelosinus Fermentans* 由来 PBAT 分解酵素: Pfl1[76] のアミノ酸配列と相同性を示す推定タンパク質は見出されなかった。

また、既知の PBAT 加水分解酵素のアミノ酸配列と相対的に高い相同性を示した仮想タンパク質のうち、RN2511-038120 は、ザイモグラム解析から推定されるポリエステル加水分解酵素の分子量 15 kDa と最も近い分子量 18.9 kDa を示した。一方、ザイモグラム解析から推定される分子量 180 kDa のポリエステル加水分解酵素と近い分子量の仮想タンパク質は、ゲノム上には見られなかった。

Table 12. Known PBAT hydrolases and their homologous proteins in genomic DNA of the strain NKCM2511.

Locus tag	Protein length (A.A.)	amino acid identity											lipase box		
		Est1 (BAK48590) ^a	Est119 (BAI99230) ^a	BTA1 (CAH17554) ^a	The_Cut1 (ADV92526) ^a	PBATH _{bp} (BAV72205) ^a	CfCLE (BAT32793) ^a	HiC (4OYY) ^a	PLCE (BAN51852) ^a	FsC (ICEX) ^a	signal peptide				
RN2511_009450	286	33.8	33.1	30.9	30.9	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
RN2511_012570	459	23.3	25.4	29.2	28.9	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	GFSFG
RN2511_038250	363	ND	ND	25	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	GVSFG
RN2511_028120	216	ND	ND	ND	ND	ND	ND	28.1	32.7	29	27.6	Yes	Yes	Yes	GYSQG
RN2511_038530	264	ND	ND	ND	ND	33.9	ND	ND	ND	ND	ND	Yes	Yes	Yes	GHSKG
RN2511_010100	327	ND	ND	ND	ND	30.5	ND	ND	ND	ND	ND	Yes	Yes	Yes	GHSQG
RN2511_046520	269	ND	ND	ND	ND	28.3	ND	ND	ND	ND	ND	Yes	Yes	Yes	GYSAG
RN2511_022110	326	ND	ND	ND	ND	27.7	ND	ND	ND	ND	ND	Yes	Yes	Yes	GYSQG

^a: Accession number of each protein was given in parentheses

A.A.: Amino acid

ND: No data was detected

まとめ

本章では、土壌のような中温環境下における PBAT の生分解機構を理解するために、土壌試料からクリアゾーン法により PBAT 分解細菌 NKCM2511 株を単離した。生化学的・生理学的特徴付け、系統発生解析およびゲノム解析から、本株は *R. fascians* の近縁種であることがわかった。*R. fascians* による PBAT の生分解に関する報告は、これが初めてとなる。本株は 25-30 °C の温度範囲でよく増殖し、固体の PBAT を分解した。加えて、本株が好気性条件でのみ生育できることから、本株は好気性中温性 PBAT 分解細菌であることがわかった。本株と共に液体培地中で振とう培養した PBAT フィルム表面には亀裂が確認された。このことから、本株が生産する酵素により PBAT 表面に分解が生じたと推定した。また、本株を含まない液体培地で培養した PBAT フィルムの分子量が低下したことから、中温環境における PBAT の分解は生物分解だけでなく非生物分解も生じていることが示唆された。本株は PBAT のモノマー構成成分である 1,4-ブタンジオールを資化したが、一方本株のアジピン酸およびテレフタル酸の資化速度は低かった。PESu を基質とした本株の培養上清のザイモグラム解析により、本株は、少なくとも分子量 180 kDa および 15 kDa の 2 つのポリエステル分解酵素を生産していることがわかった。また、ゲノム上の推定タンパク質のうち、8 個の推定タンパク質のアミノ酸配列が、既知の PBAT 分解酵素のアミノ酸配列と 20 %以上の相同性を示した。このうち、locus_tag RN2511_028120 のタンパク質が、ザイモグラム解析により求めたポリエステル分解酵素の分子量(15 kDa) と最も近い推定分子量(18,992 Da)を示した。

R. fascians は好気性中温環境下で PBAT の一次分解および二次分解に寄与しており、完全な PBAT 分解細菌であると推定される。しかし、本株による PBAT の生分解度 (BOD) は、真菌の場合と比較して低い。また本株は、PBAT によって集積されないことから、実際の中温環境下における *R. fascians* による PBAT の生分解への寄与は小さいと推定される。つまり、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、このような細菌種を集積しないことから、PBAT を生分解性マルチフィルムの材料として利用することを妨げないと、結論付けることができる。

第 3 章

Rhodococcus fascians NKCM2511 株由来 PBAT 分解酵素 の特徴づけ

緒言

生分解性プラスチックは、環境中の微生物により、最終的に二酸化炭素、水、あるいはバイオマス等に変換される[52, 53]。しかし、微生物はプラスチックのような巨大分子を体内に直接取り込むことができない。そのため微生物は体外に酵素を分泌生産し、プラスチックのような巨大分子を低分子量化させ、これを取り込む。この酵素による巨大分子の低分子量化の過程は、生分解における一次分解と定義されている[52, 53]。

PBAT の一次分解に主として寄与する酵素は、カルボキシルエステル加水分解酵素(EC 3.1)群に属する酵素である。コンポストから単離された複数の好熱性アクチノバクテリアや真菌が生産するエステル加水分解酵素であるクチナーゼは 45 °C で高い安定性を示し、高温条件下における PBAT の一次分解に寄与していることが報告されている[77-79, 81]。一方、好気中温環境での微生物由来の PBAT 分解酵素は、クチナーゼと類似した構造および性質を示すクチナーゼ様酵素[82, 83]、脂質分解酵素リパーゼ[66]、またアシルリパーゼ[75]などが報告されている。これらの酵素は、子囊菌門に属する真菌 *Paraphoma* 属[82]、酵母 *Cryptococcus* 属[83]、プロテオバクテリア門に属する細菌 *Pseudomonas* 属[75]、およびファミキュテス門に属する *Bacillus* 属[66]などの中温性微生物により生産される。

第 2 章において、土壌からあらたな好気性中温性 PBAT 分解細菌としてアクチノバクテリア門に属する *R. fascians* NKCM2511 株を単離した。ザイモグラム解析や、固体の PBAT フィルムを用いた分解実験より、本株が PBAT 分解酵素を生産し、これらを分解していることが強く示唆された。

本章では、第 2 章において中温性 PBAT 分解アクチノバクテリアとして特徴付けた *R. fascians* による PBAT の分解機構を理解するために、PBAT の一次分解に関与する PBAT 分解酵素の性質を調べ、PBAT 酵素分解機構を明らかにすることを、目的としている。そのため、第 2 章で推定した、仮想タンパク質 locus_tag RN2511_028120 をコードする遺伝子をクローニングし、本株において、PBAT の一次分解に関与する遺伝子を特定する。また、組換え PBAT 分解酵素の精製を行い、その機能を評価する。また、酵素における構造と機能との関係について議論する。

実験

試薬

ポリ(3-ヒドロキシブチレート-*co*-ヒドロキシヘキサノエート) (以下、PHBH) は株式会社カネカにより提供された。ポリ(エチレンテレフタレート) (PET) フィルム(フィルム厚 0.2 cm、NOVACLEAR[®] A3020) は三菱化学株式会社から購入した。1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロ-2-プロパノールに溶解させた PET の化学構造を ¹H NMR で測定した (Fig. 11)。RIGAKU RINT2200VF により測定された PET フィルムの広角 X 線回折 (WAXD) スペクトルを Fig. 12 に示した。その PET フィルムの XRD スペクトルラインには、アモルファス散乱によるブロードなピークのみが観測され、また結晶性 PET において結晶 (010), (110), (100) の反射に対応する $2\theta = 18^\circ$ 、 $2\theta = 23^\circ$ 、 $2\theta = 27^\circ$ それぞれの回折ピークが観測されなかったため[131, 132]、本研究で用いた PET フィルムはアモルファス性であった。オリゴマー PET モデル基質: モノ(2-ヒドロキシエチル)テレフタレート (ET) およびビス(2-ヒドロキシエチル)テレフタレート (ETE) を、Sigma-Aldrich japan から購入し、精製することなく用いた。オリゴマー PBAT モデル基質であるテレフタル酸ビス(4-ヒドロキシブチル) (BTB)、アジピン酸ビス(4-ヒドロキシブチル) (BAB) は、参考文献[66]に従い合成された。¹H NMR スペクトルは、内部標準としてテトラメチルシランを含む重水素化クロロホルム中にて、JNM-ECX400 NMR 分光計 (JEOL Ltd.) を用い 400 MHz で記録された (BTB; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.12 (s, 4H), 4.40 (t, $J=6.5$ Hz, 4H), 3.75 (t, $J=6.4$ Hz, 4H), 1.93-1.86 (m, 4H), 1.78-1.71 (m, 4H) ppm, BAB; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.12 (t, $J=6.4$ Hz, 4H), 3.68 (t, $J=6.2$ Hz, 4H), 2.34-2.31 (m, 4H), 1.77-1.60 (m, 12H))。その他の高分子および試薬は、第 2 章 実験、試薬の項を参照。

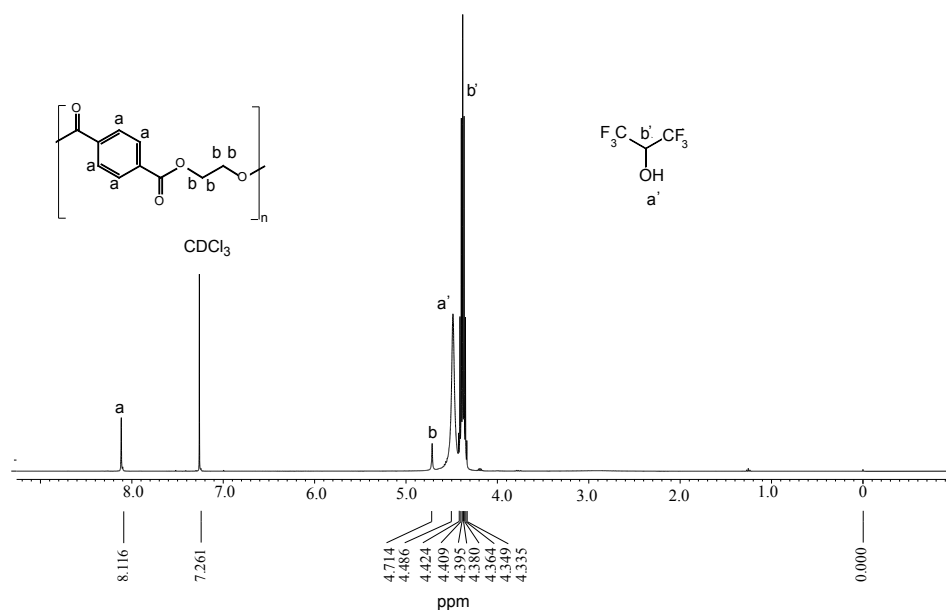


Fig. 11. ¹H NMR spectrum of NOVACLEAR[®] A302, determined as polyethylene terephthalate (PET), dissolved in 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol.

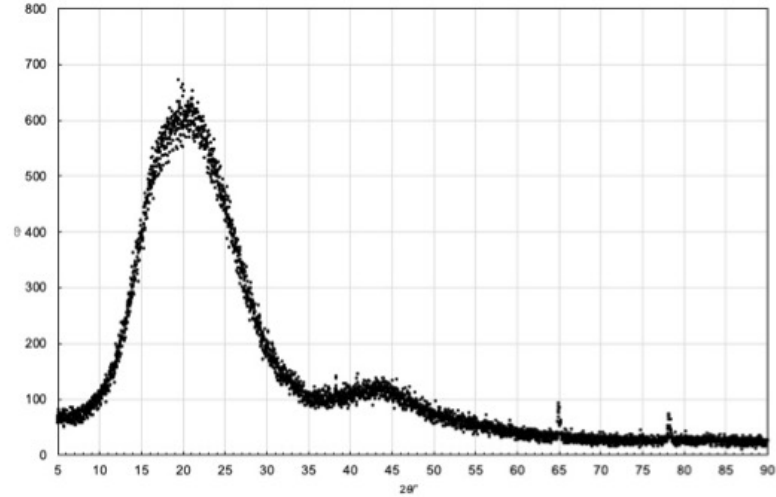


Fig. 12. Wide-angle X-ray (WAX) scattering spectrum pattern of PET used in this study.

微生物、プライマー、プラスミドおよび培養条件

Table 13 に、本実験で使用した微生物およびプラスミドを示した。Table 14 に、本実験で使用したプライマーを示した。LB 培地（組成は第 2 章 実験、培地の項を参照）、栄養培地（pH 7.0; 組成 (g/L) : トリプトン, 10; イーストエキストラクト, 5; NaCl, 5; グルコース, 10）および M9 培地（pH 7.0; 組成 (g/L) : KH_2PO_4 , 3.0; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 6.0; NH_4Cl , 1.0; 1M MgSO_4 , 1 ; 1 % vitamin B₁, 1; 1M CaCl_2 , 0.1; 2M glucose, 5.6)は、微生物の培養に用いられた。ポリマー乳化培地の作成手法、培地の固化手法および滅菌条件については、第 2 章 実験、培地の項を参照。

Table 13. Bacterial strains and plasmid DNAs that were used in this study.

Strains and plasmids	Genotype or description	Reference or source
Strains		
<i>Rhodococcus fascians</i> NKCM2511	PBAT-degrading actinobacteria isolated from soil.	Chapter 2, [70]
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	<i>deoR, endA1, gyrA96, hsdR17(rk-,mk+), phoA, recA1, relA1, supE44, thi-1, $\Delta(lacZYA-argF)U169, \phi80dlacZ\Delta M15, F^-$, λ</i>	TOYOBO., LTD.
<i>Escherichia coli</i> Rosetta-gami TM B	<i>F- ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm lacY1 ahpC gor522::Tn10 trxB pRARE (Cam^R, Kan^R, Tet^R)</i>	Merck
<i>E. coli</i> pMD- <i>pbath_{Rf}</i>	<i>E. coli</i> DH5 α harboring plasmid pMD- <i>pbath_{Rf}</i> .	This study
<i>E. coli</i> pMD- <i>pbath_{Rf}xx</i>	<i>E. coli</i> DH5 α harboring plasmid pMD- <i>pbath_{Rf}xx</i> .	This study
<i>E. coli</i> pMAL- <i>pbath_{Rf}</i>	<i>E. coli</i> Rosetta-gami TM B harboring plasmid pMAL- <i>pbath_{Rf}</i> .	This study
<i>E. coli</i> pMAL- <i>pbath_{Rf}</i> -S114A	<i>E. coli</i> Rosetta-gami TM B harboring plasmid pMAL- <i>pbath_{Rf}</i> -S114A.	This study
<i>E. coli</i> pMAL- <i>pbath_{Rf}</i> -D181N	<i>E. coli</i> Rosetta-gami TM B harboring plasmid pMAL- <i>pbath_{Rf}</i> -D181N.	This study
<i>E. coli</i> pMAL- <i>pbath_{Rf}</i> -H194N	<i>E. coli</i> Rosetta-gami TM B harboring plasmid MAL- <i>pbath_{Rf}</i> -H194N.	This study

Plasmids		
T-vector pMD20	Amp ^r , use for cloning of PCR products	Takara Bio Inc.
pMD- <i>pbath_{Rf}</i>	Recombinant pMD20 having a DNA fragment containing PBAT hydrolase (PBATH _{Rf}) gene (<i>pbath_{Rf}</i>) from NKCM2511.	This study
pMD- <i>pbath_{Rf}Δx</i>	Recombinant pMD20 having a DNA fragment containing codon optimized <i>pbath_{Rf}</i> gene, <i>pbath_{Rf}Δx</i> .	This study
pMAL-p2	<i>Amp^r</i> , a maltose binding protein (MBP) gene fusion expression vector. MBP fusion protein will be transported to the periplasmic space across the inner membrane in host strains.	NEW ENGLAND Biolabs Japan Inc.
pMAL- <i>pbath_{Rf}</i>	Recombinant pMAL-p2 having open reading frame (ORF) of mature PBATH _{Rf} whose codons were optimized for <i>E. coli</i> codon usage and DNA fragment encoding six histidine residues were added in the upstream of termination codon.	This study
pMAL- <i>pbath_{Rf}</i> -S114A	Recombinant pMAL-p2 containing ORF of mature PBATH _{Rf} whose Ser114 was replaced by Ala and DNA fragment encoding six histidine residues were added in the upstream of termination codon.	This study
pMAL- <i>pbath_{Rf}</i> -D181N	Recombinant pMAL-p2 containing ORF of mature PBATH _{Rf} whose Asp181 was replaced by Asn and DNA fragment encoding six histidine residues were added in the upstream of termination codon.	This study
pMAL- <i>pbath_{Rf}</i> -H194N	Recombinant pMAL-p2 containing ORF of mature PBATH _{Rf} whose His194 was replaced by Asn and DNA fragment encoding six histidine residues were added in the upstream of termination codon.	This study

Table 14. Primers that used in this study.

Primers	Sequence
hp-F	GCAACAGGCGTTGAGAAACC
gk-R	TCGATCACCATGATGCGAGAACC
cut3F	ATGAAGAGACGCCTGATCGCC
cut3R	TAATCAGCTGCGTACCTGAGCG
g123c-R	GGAAGTTCACCGGTGCCGCGAGCGAACGA
c141g-F	GGCACCGGTGAACTTCCGGGTCTCGGC
cut3F- <i>ecoRI</i> ^a	ATCAAGAATTCGCGCCGTGTTCCGGAT
cut3R- <i>hishind</i> ^b	ACATTAAGCTTTCAATGATGATGATGATGATGGCTGCGTACCTGAGCGG
ser85-F	GGCGGTTACGCACAGGGGGCGACCGTGG (Mutation of Ser114 to Ala)
ser85-R	CGCCCCCTGTGCGTAACCGCCGATCAG (Mutation of Ser114 to Ala)
asp152-F	AACTTCGGCAATCCGGTGTGCCAGATCG (Mutation of Asp181 to Asn)
asp152-R	GCACACCGGATTGCCGAAGTTGCAGAAG (Mutation of Asp181 to Asn)
his165-F	ACCTTCGCTAATCTGACCTACGGCACCA (Mutation of His194 to Asn)
his165-R	GTAGGTCAGATTAGCGAAGGTGTTGAAG (Mutation of His194 to Asn)
M13-M4	GTTTTCCCAGTCACGAC
M13-RV	CAGGAAACAGCTATGAC
MBP-F	GATGAAGCCCTGAAAGACGCGCAG
MBP-R	TGCTGCAAGGCGATTAAGTT

^a Underline indicates *EcoRI* site.

^b Underline indicates *HindIII* site, double underline does the gene encoding His tag.

ゲノム DNA 抽出

第 2 章 実験、ゲノム DNA (gDNA) 抽出の項を参照。

遺伝子操作

・ pMD-*pbath_{Rf}* プラスミドの作成

第 2 章にて解析した NKCM2511 株ゲノム DNA 配列上の PBAT 加水分解酵素 (locus tag: RN2511_028120) の推定タンパク質のオープンリーディングフレーム (ORF) を含む遺伝子 (*pbath_{Rf}*) を、NKCM2511 株のゲノム配列に基づき設計されたプライマーを用い、PCR 法で増幅させた。PCR 反応溶液の試薬組成を以下に示す。NKCM2511 株の gDNA (100 ng)、Gotaq[®] long Master Mix (Promega KK)、Primer hp-F および gk-R (10 pmol) を混合し、20 μ L まで滅菌超純水でメスアップした。サーマルサイクルは次のとおりである。98 °C 2 分を 1 サイクル、98 °C 30 秒、55 °C 30 秒および 72 °C 2 分 30 秒を 25 サイクル、72 °C 10 分を 1 サイクル。PCR 法で増幅された DNA 断片は、DNA Ligation Kit<Mighty Mix>を用い、pMD20 に連結させた (Fig. 13(b))。得られたプラスミドを pMD-*pbath_{Rf}* とした (Table 13)。pMD-*pbath_{Rf}* を保持する組換え *E. coli* DH5 α (*E. coli* pMD-*pbath_{Rf}*) の PBAT 加水分解活性は、37 °C、5 日間、M9 ベースの PBAT 含有培地上でのクリアゾーン形成によって確認された。

・ pMD-*pbath_{Rf}xx* プラスミドの作成

R. fascians NKCM2511 株由来の PBAT 加水分解酵素 (PBATH_{Rf}) をコードする遺伝子 (*pbath_{Rf}*) は、大腸菌での異種発現のために、変異原性プライマーを用いたオーバーラップ PCR 法によりコドン最適化が行われた。PCR 反応溶液の試薬組成を以下に示す。プラスミド pMD-*pbath_{Rf}* (100 pg)、5 \times Q5 buffer (4 μ L)、2.5 mM dNTP (2 μ L)、5 \times Q5 High GC enhancer buffer (4 μ L)、Q5[®] High Fidelity DNA Polymerase (0.25 μ L, 0.01 U) (New England Biolabs[®] Japan Inc.)、Primer (cut3F および G123C-R、C141G-F および cut3R、10 pmol、Table 14) および 滅菌超純水を 20 μ L までメスアップした。サーマルサイクルは次のとおりである。98 °C 2 分を 1 サイクル、98 °C 30 秒、55 °C 30 秒および 68 °C 20 秒を 25 サイクル、および 68 °C 5 分を 1 サイクル。

2つの DNA フラグメントを連結させるために、オーバーラップ PCR [133] を実施した (Fig. 14)。PCR 混合物は次の通りである。各 DNA フラグメント (1 μ L)、5 \times Q5 Buffer (4 μ g)、2.5 mM dNTP (2 μ L)、5 \times Q5 High GC enhancer buffer (4 μ L)、Q5[®] High Fidelity DNA Polymerase (0.25 μ L, 0.01 U) を混合し、18 μ L まで滅菌超純水でメスアップした。サーマルサイクルは次のとおりである。98 °C 2 分を 1 サイクル、98 °C 30 秒および 68 °C で 50 秒間を 10 サイクル。PCR 反応溶液に、プライマー (cut3F および cut3R) (それぞれ、1 μ L) を添加した。その後のサーマルサイクルは次のとおりである。98 °C 30 秒、55 °C 30 秒および 68 °C 20 秒を 20 サイクル、68 °C 5 分を 1 サイクル。Taq DNA polymerase (1 U, New England Biolabs[®] Japan Inc.) を PCR 反応溶液に加え、72 °C で 10 分間保温し、PCR 産物の両端に単一の 3'-アデニンを付加した。DNA Ligation Kit <Mighty Mix> により、PCR 産物を

pMD20 に連結させ、プラスミド (pMD-*pbath_{Rf}xx*) を得た。コドンの変化は、DNA シーケンシングにより確認された。

・ pMAL-*pbath_{Rf}* プラスミドの作成

SignalP-5.0 Server により推定したシグナルペプチドを除くコドン最適化遺伝子 *pbath_{Rf}xx* は、*EcoRI* の制限酵素サイトを含むフォワードプライマー (cut3F-*ecoRI*) および、*HindIII* 制限酵素サイトおよび停止コドンの前に 6 つのヒスチジン残基をコードするヌクレオチド含むリバーズプライマー (cut3R-*hishind*) を用い、PCR 法により増幅された。PCR サーマルサイクルは次のとおりである。98 °C 2分を 1 サイクル、98 °C 30 秒、55 °C 30 秒および 68 °C 20 秒を 25 サイクル、68 °C 5分を 1 サイクル。PCR 産物を、pMAL-p2 ベクターのマルチクローニングサイトの *EcoRI* および *HindIII* 制限酵素サイトに挿入し、プラスミド DNA (pMAL-*pbath_{Rf}*) を作成した (Fig. 15)。 *E. coli* Rosetta-gami™ B 株に pMAL-cut3 を挿入し、組換え株 *E. coli* pMAL-*pbath_{Rf}* を得た。 *E. coli* pMAL-*pbath_{Rf}* 株は、PBATH_{Rf} の N 末端にマルトース結合タンパク質 (MBP) を、C 末端に 6 つのヒスチジン残基 (His6-tag) をそれぞれ融合したタンパク質 MBP-PBATH_{Rf} を発現した。

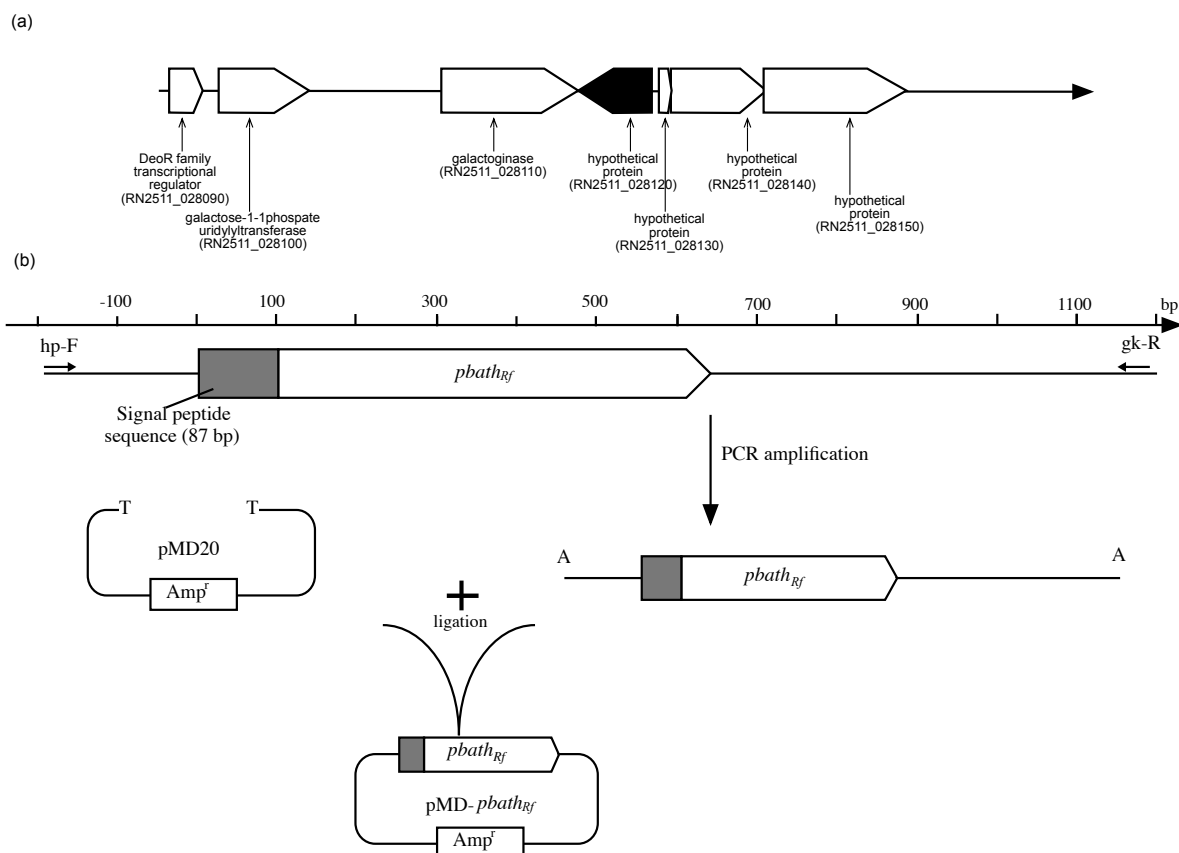


Fig. 13. (a) Physical map of the hypothetical protein with locus tag RN2511_028120 and neighboring proteins in the annotated draft genomic DNA sequence of the strain NKCM2511. Locus tags were given in parenthesis. (b) Construction of recombinant plasmid, pMD-*pbath_{Rf}*. Primers, hp-F, and gk-R designed on the basis of gDNA sequence were used to amplify *pbath_{Rf}* and the peripheral region. The PCR product was ligated to pMD20 vector.

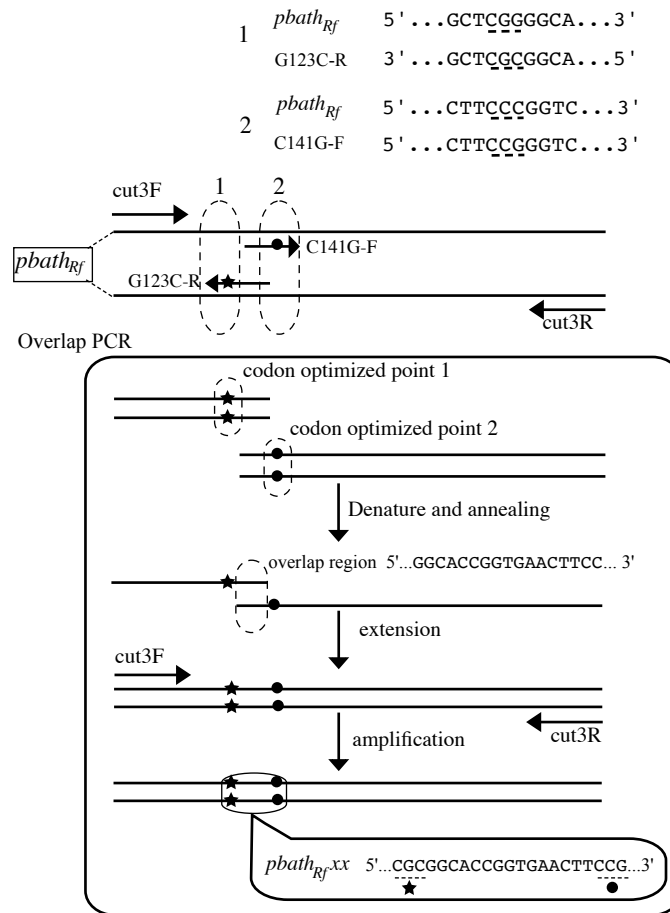


Fig. 14. Overlap PCR to construct and amplify codon optimized gene of *pbath_{Rf}*, *pbath_{Rf}-xx*.

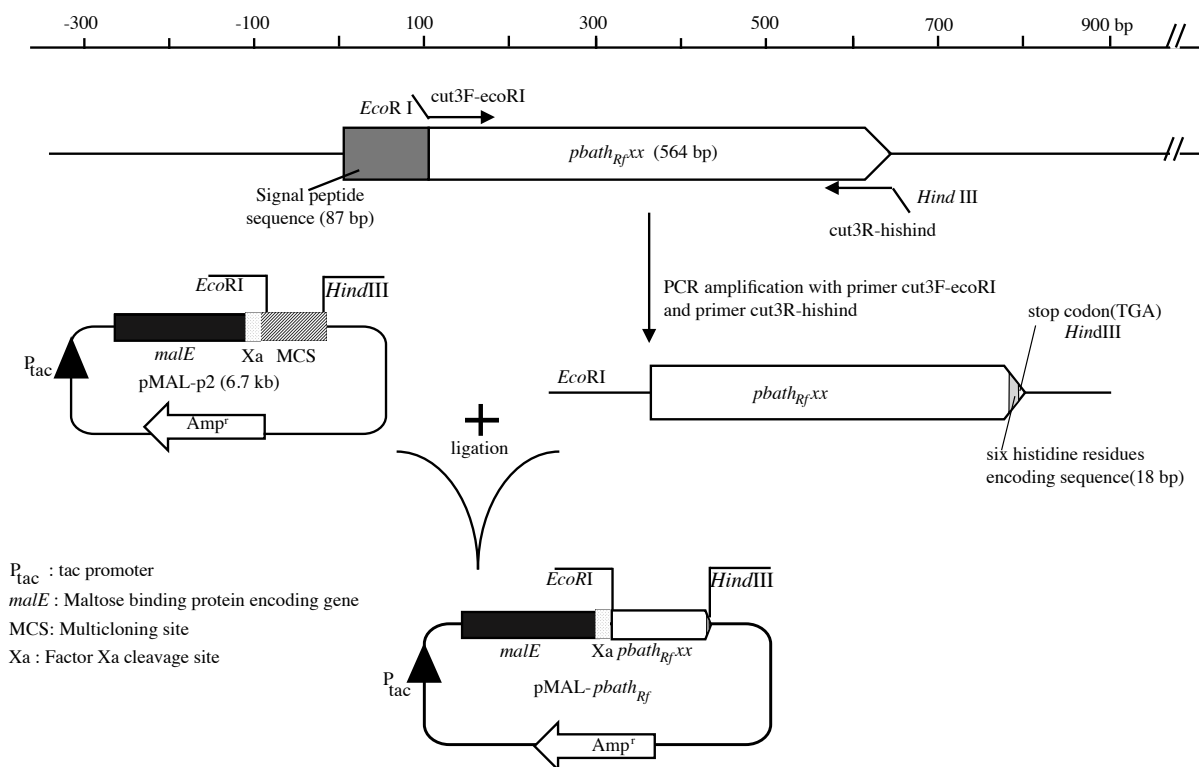


Fig. 15. Construction of plasmid, pMAL-*pbath_{Rf}*. The gene encoding six histidine residues was added in the upstream of the stop codon TGA of *pbath_{Rf}xx* excluding the gene encoding its deduced signal peptide, was ligated into restriction site (*EcoRI* and *HindIII*) of pMAL-p2.

DNA シーケンシング

各 DNA 配列は、ダイデオキシ法（Eurofins genomics 株式会社）によって決定された。

PBATH_{Rf} のアミノ酸配列解析

PBATH_{Rf} のアミノ酸配列を、*pbath_{Rf}* の DNA 配列に基づき、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_{Rf} のシグナルペプチドを、SignalP 5.1 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) を用いて予測した。PBATH_{Rf} および相同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、MEGA 7 [112]を用いて構築された。

酵素精製

組換え株 *E. coli* pMAL-*pbath_{Rf}* を、0.005 % (w/v) アンピシリン含有の栄養培地 (6 mL) に植菌し、37 °C で一晩、振とう培養をした。培養液 (6 mL) を 0.005 % (w/v) アンピシリン含有の栄養培地 (600 mL) に加え、37 °C で波長 600 nm における濁度 (OD₆₀₀) が 0.4 - 0.6 になるまで好氣的に培養した。組換えタンパク質の発現を誘導させるために、イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド (IPTG) を最終濃度 1 mM になるように培養液に添加し、37 °C で 3 時間培養した。大腸菌のペリプラズム空間からの組換えタンパク質 MBP-PBATH_{Rf} の抽出は、pMAL タンパク質融合および精製システムのマニュアル (New England Bio Labs®

Japan Inc.) に準拠した。培養液から *E. coli* pMAL-pbath_{Rf} 株を遠心分離 (4 °C, 6000 rpm, 15 min) により回収した。回収した菌体を 20% (w/v) スクロースを含む 30 mM Tris-HCl (200 mL, pH8.0) および 0.5 M EDTA (0.4 mL, pH 8.0) に再懸濁させた後、室温で 10 分間振とう (120 strokes/min) させた。懸濁液を遠心分離 (4 °C, 8000 rpm, 20 min) し得られたペレットを、氷冷した 5 mM MgSO₄ (200 mL) に再懸濁し、氷浴中で 10 分間振とうさせた。サンプルを再度同条件で遠心分離し、上清を回収した。1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (4 mL, pH 7.4) を上清に加え、終濃度 20mM のリン酸ナトリウム溶液とした。これを、30 mM イミダゾールおよび 500 mM NaCl を含有する 20 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (10 mL, pH 7.4) で洗浄した 1 mL HisTrap-FF カラム (GE Healthcare 社製) にアプライした。カラムに結合したタンパク質は、500 mM NaCl および 300 mM イミダゾールを含む 20 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) を用い、溶出させた。回収した各画分の溶液 (5 μL) を 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液ベースにした PESu 乳化プレートに滴下し、37 °C で 12 - 14 時間保温した。PESu 乳化プレート上にクリアゾーン形成が見られた画分を収集した。組換えタンパク質 (MBP-PBATH_{Rf}) から MBP を切断するため、タンパク質溶液にプロテアーゼ Factor Xa (New England Biolab® Japan Inc.) (10 μg) を添加し、4 °C で 5 日間保温した。タンパク質溶液を 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (200 mL, pH7.0) 中で、4 °C で 2 時間、2 回透析した。タンパク質溶液を HiTrap Q カラム (GE healthcare 社製) にアプライし、MBP および Factor Xa を除去した。タンパク質を、0-100 mM NaCl の濃度勾配を使用し、NaCl を含む 10 mM リン酸ナトリウムバッファー (pH 7.0) で溶出した。各画分の加水分解活性は PESu 乳化プレート上におけるクリアゾーン形成で決定された。加水分解活性が見られた画分を回収し、AQUA KEEP 60 (住友精化化学株式会社) を用い濃縮させた後、50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (1 L, pH 7.0) 中で、一晚、4 °C で透析した。

精製タンパク質の純度を確認するために、15% (w/v) アクリルアミド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) を行った。ゲル中のタンパク質は Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB) 染色溶液 (Rapid CBB KANTO, Kanto chemical co.,inc.) で染色された。タンパク質濃度は、ウシ血清アルブミン (BSA, New England Biolap Japan Inc.) を標準物質として用いた Bradford protein assay [134] に従い決定された。

ザイモグラム解析

精製したタンパク質 PBATH_{Rf} のザイモグラムを行った。第 2 章 実験 ザイモグラムを参照。

PBATH_{Rf}の変異解析

PBAT加水分解酵素のうち、PBATH_{Rf}と最も高い相同性を示す真菌 *Humicola insolens* 由来 PBAT 分解酵素 HiC[91]およびシグナルペプチド配列を除いた本酵素のアミノ酸配列を ClustalW によりアライメントし、PBATH_{Rf}の触媒三残基を推定した。推定の触媒三残基である Ser114、Asp181 および His194 をそれぞれ Ala、Asn および Asn に置換した。変異遺伝子 (*pbath_{Rf}-S114A*、*pbath_{Rf}-D181N* および *pbath_{Rf}-H194N*) は、変異プライマーを用いたオーバーラップ PCR 法 (第3章 実験 遺伝子操作の pMD-*pbath_{Rf}xx* プラスミドの作成を参照) により構築された。部分的変異の導入のためのプライマー (Table 14) として、*pbath_{Rf}-S114A* 変異遺伝子の構築においては cut3F と ser85-R および ser85-F と cutR を、*pbath_{Rf}-D181N* 変異遺伝子の構築においては cut3F と asp152-R および asp152-F と cutR を、*pbath_{Rf}-H194N* の構築においては cut3F と his165-R および his165-F と cutR をそれぞれ使用した。増幅された遺伝子は、pMAL-p2 ベクターのマルチクローニングサイトの *EcoRI* および *HindIII* 制限酵素サイトに挿入され、プラスミド DNAs : pMAL-*pbath_{Rf}-S114A*、pMAL-*pbath_{Rf}-D181N* および pMAL-*pbath_{Rf}-H194N* が得られた。遺伝子の変異導入は、DNA シーケンシングにより確認された。化学法 [135] により作成された *E. coli* Rosetta gami™ 株のコンピテントセルに、これら3種の変異導入プラスミドを導入し、形質転換体 *E. coli* pMAL-*pbath_{Rf}-S114A* 株、*E. coli* pMAL-*pbath_{Rf}-D181N* 株および *E. coli* pMAL-*pbath_{Rf}-H194N* 株を得た。各形質転換体を M9 培地ベースのポリエステル乳化固体培地上で、37 °C で 5 日間培養し、クリアゾーン形成によりポリエステルの加水分解活性を評価した。各変異タンパク質 (MBP-PBATH_{Rf}S114A、MBP-PBATH_{Rf}D181N および MBP-PBATH_{Rf}H194N) は、形質転換体より、MBP-PBATH_{Rf}と同じ手順で精製された (第3章 実験 酵素精製項を参照)。変異タンパク質の加水分解活性は、ポリエステル乳化プレート上でのクリアゾーン形成の有無により評価された。

PBATH_{Rf}の特徴付け

PBATH_{Rf}のエステル加水分解活性を評価するため、6種のアシル鎖長の異なる *p*-ニトロフェニルエステル (*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)) を用いた。基質溶液 (1% (w/v) *p*-nitrophenyl esters を 1,4-ジオキサン : ノナエチレングリコールモノドデシルエーテルを 1 : 1 に溶解) (100 μL)、PBATH_{Rf} (0.2 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 5 分間、吸収波長 405 nm における溶液の吸光度を測定した。酵素単位(U)は、1 μmol の *p*-ニトロフェニルエステルを緩衝液中で、30 °C、1 分間加水分解する酵素活性として定義した。*p*-ニトロフェノール (PNP) のモル数は、ランベルトベールの法則 ($C = A/\epsilon l$, A: 405 nm における吸光度 C: 遊離した PNP の濃度, ϵ : モル吸光係数, $1.85 \times 10^4 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, l: cell length (1 cm)) により決定された [66]。

酵素 PBATH_{Rf}の熱安定性を調べるために、PBATH_{Rf} (0.2 μg) を 4、10、20、25、30、37、50 および 60 °C で 30 分間保温した。その後、基質 PNPB を用いて PBATH_{Rf}酵素の残存活性を測定し、相対活性を評価した。酵素 PBATH_{Rf}の pH 安定性を調べるために、PBATH_{Rf}

(0.2 μg) を 100 mM の各バッファー (Glycine-HCl buffer: pH 3.0 – 4.0, Citrate-NaOH buffer: pH 4.0 – 5.0, Phosphate-NaOH: pH 6.5 – 7.0, Tris-HCl buffer: pH 7.0 – 8.5, Borate-NaOH buffer: pH 9.0 – 10.0, および Glycine-NaOH buffer: 10.0 – 10.5) 中、30 °C で 3 時間保温した。その後、基質 PNPB を用いて PBATH_{Rf} 酵素の残存活性を測定し、相対的活性を評価した。金属イオンが酵素活性に与える影響を調べるために、PBATH_{Rf} (0.2 μg) を等量の mol 数の金属イオン (KCl, MgCl₂, CaCl₂, CaCl₂ および EDTA, MnCl₂, および FeCl₃) と混合し、30 °C で 5 分間保温した。その後、基質 PNPB を用いて PBATH_{Rf} 酵素の残存活性を測定し、相対的活性を評価した。化学物質が酵素活性に与える影響を調べるために、PBATH_{Rf} (0.2 μg) を様々な濃度の各化学物質 (phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), diisopropyl fluorophosphate (DFP), dithiothreitol (DTT), sodium dodecyl sulfate (SDS), および ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)) と混合し、30 °C で 30 分間保温した。その後、基質として PNPB を用いて PBATH_{Rf} 酵素の残存活性を測定し、相対的活性を評価した。

PBATH_{Rf}によるポリエステルフィルムの分解

10 mL のガラス製試験管瓶に、50 mM リン酸バッファートリウム (1 mL, pH 7.0)、酵素 PBATH_{Rf} (3.1 μg) およびポリエステルフィルム (PBAT、PBSu、PBSA、PCL、PESu、PHBH、PLA および アモルファス PET) (1×1 cm、アモルファス PET 除き、各ポリエステルフィルムの厚さ 0.1 cm) を加えた。ネガティブコントロールとして酵素を添加せず、ポリエステルフィルムをリン酸バッファートリウムに加えた。それらを、30 °C で振とうした (50 strokes/min)。脂肪族ポリエステル (PBSu, PBSA, PCL, PESu, PHBH および PLA) フィルムは、24 時間後に回収された。PBAT とアモルファス PET フィルムは、1 日ごとに新しい溶液に移され、30 °C で 5 日間振とう後に回収した。回収したフィルムを、メタノール、超純粋の順で洗浄した。凍結乾燥後、フィルムの重量を測定した。分解速度 ($\text{mg}/\text{cm}^2/\text{d}$) は重量減少量 (mg) を、見かけのフィルム表面積 (cm^2) および保温日数 (d) で除することにより算出された。

アモルファス PET フィルムの酵素分解試験後の (第 3 章、実験、ポリエステルフィルムによる PBATH_{Rf} の分解を参照) 上清に含まれる分解物を、逆相高速液体クロマトグラフィー (HPLC、LC-2000Plus シリーズ (PU-2080 Plus; LG-2080; AS-2051 Plus; CO-2060 Plus; UV-2075 Plus 日本分光株式会社製) を用いて解析した。分離カラムには、Inert-Sustain® C18 カラム (3.0 μm , 2.1×150 mm) (GL Science Inc.) を用いた。0.1 % (v/v) リン酸溶液 (溶液 A) およびアセトニトリル (溶液 B) を移動相に用いた。流速は 0.2 mL/min、カラムオーブン温度を 40 °C に設定した。クロマトグラムプログラムは以下の通りである: (1) 0 – 5 min (溶液 A: 92 %, 溶液 B: 8 %)、(2) 5 – 6 min (直線的に溶液 A を 80 % まで減少)、(3) 6 – 13 min (直線的に溶液 A を 70 % まで減少)、(4) 13 – 23 min (直線的に溶液 A を 20 % まで減少) および (5) 23 – 26 min (溶液 A 20 %, 溶液 B 80 %)。溶出した分解物は、波長 254 nm おける UV を用い、検出された。

表面形態観察

第 2 章 実験 表面形態観察を参照。

LC-MS を用いた PBAT フィルム分解物の同定

PBAT フィルムの酵素分解試験後（第 3 章、実験、ポリエステルフィルムによる PBATH_{Rf} の分解を参照）の上清溶液に含まれる PBAT フィルム 分解物は、液体クロマトグラフィー質量分析（LC/ESI-MS）により同定された。分離システムは Waters Acquity H-class UPLC system（日本ウォーターズ株式会社）を用いた。0.1 %（v/v）ギ酸水溶液（溶液 A）および 0.1 %（v/v）ギ酸を含むアセトニトリル溶液（溶液 B）を移動相に、ACQUITY UPLC BEH C18 カラム（1.7 μm, 2.1 × 100 mm）（日本ウォーターズ株式会社）を固定相に用いた。注入量は 5 μL、カラム温度は 30 °C、流量は 0.4 mLmin⁻¹ であった。クロマトグラムプログラムは以下の通りである：(1) 0 – 8.0 分、100 %から 50 %まで直線的に A を減少、(2) 8.0 – 9.0 分、50 %から 5 %まで直線的に A を減少、(3) 9.0 – 12.0 分、5 %の A で保持。MS 検出は、maXis HD 超高溶液四重極時間型質量分析計を使用して、ポジティブおよびネガティブ ESI モードでエレクトロスプレーイオン化質量（ESI）分光分析を行った。最適化されたソースパラメータは以下の通りであった。キャピラリー電圧、2.5 kV; コーン電圧、20 V; コーンガス流量、50 L/h; ソース温度、120 °C; 脱溶媒温度、350 °C; 脱溶媒ガス流量、350 L/h; スキャン時間、0.1 s。

PBATH_{Rf}によるオリゴマーPBAT モデル基質の分解

BAB および BTB の酵素加水分解条件は以下の通りである。ガラス製試験管に、ジメチルスルホキシドで調整した基質溶液（10 mM BAB もしくは BTB、100 μL）、50 mM リン酸ナトリウム緩衝液（900 μL、pH 7.0）および酵素 PBATH_{Rf}（1 μg）を入れ、30 °C、120 strokes/min で、20、40、60、120、180 分間振とうさせた。ネガティブコントロールとして 1 mM のモデル基質を、酵素を含まない 10 %（v/v）DMSO 50 mM リン酸ナトリウムバッファ（pH 7.0）に添加した。5 μL リン酸を加え、反応を停止させた。HPLC により、反応溶液に残存する BAB および BTB を解析した（HPLC 条件は第 3 章実験、HPLC を用いたアモルファス PET フィルム分解物の同定の項を参照）。波長 210 nm の吸光度にて BAB および BTB を検出した。

PBATH_{Rf}の 3D モデリングおよび分子ドッキング

PBATH_{Rf}の 3D モデリングは、SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org>) [136]で予測された。RCSB Protein Data Bank に登録されたタンパク質のアミノ酸列の中で PBATH_{Rf}のアミノ酸配列と最も高い相同性（40.1 %）を有した、真菌 *Trichoderma reesei* 由来のクチナーゼ Cut-Tr（PDB code: 4PSC）[137]のデータをテンプレートとして用いた。得られたモデルは USCF Chimera program により可視化された。推定された PBATH_{Rf}モデリングと BTB および BAB との分子ドッキングを、SwissDock (<http://www.swissdock.ch>) でそれぞれ発生させた [138]。BTB の分子データは、ZINC データベース (<http://zinc.docking.org>) から、BAB の分子

データは、ChemSpider (<http://www.chemspider.com/>) から取得した。得られたモデルは USCF Chimera program により可視化された。

DNA アクセション番号

pbath_{Rf} 遺伝子、*pbath_{Rxx}* 遺伝子および *pbath_{Rf}* の変異遺伝子 (*pbath_{Rf}S114A*, *pbath_{Rf}D185N*, および *pbath_{Rf}H194N*) の DNA 配列は、それぞれ LC582818、LC582819、LC582820、LC582820 および LC582822 のアクセション番号で DDBJ に登録された。

結果

R. fascians NKCM2511 株由来の遺伝子のクローニングおよび異種発現

R. fascians NKCM2511 株由来 *pbath_{Rf}* 遺伝子を有するプラスミド pMD-*pbath_{Rf}* を保持する組換え大腸菌 *E. coli* pMD-*pbath_{Rf}* は、PBAT、PBSu、PBSA、PCL および PESu 乳化培地上でクリアゾーンを形成した。Fig. 16 はクローニングした遺伝子配列を示している。遺伝子配列の全長は 1465 base pairs(以下 bp)であり、そこに *pbath_{Rf}* (651 bp) のオープンリーディングフレーム (ORF) が含まれていた。ORF は長さ 216 amino acid (以下 a.a.) のタンパク質 (PBATH_{Rf}) をコードしていた。SignalP 5.0 server を用いたアミノ酸配列解析により、PBATH_{Rf} の N 末端には長さ 29 a.a. のシグナルペプチド配列が含まれていることが推定された。アミノ酸配列に基づく成熟タンパク質の分子量は 18,992 Da であった。PBATH_{Rf} と真菌由来 PBAT 分解酵素である HiC のアミノ酸配列との比較から、本酵素のアミノ酸残基 S114、D181 および H194 が触媒三残基と推定された。また、S114 を含むリパーゼボックス G-X-S-X-G が PBATH_{Rf} のアミノ酸配列に見られた。

Fig. 17 は PBATH_{Rf} と他のポリエステル加水分解酵素とのアミノ酸配列の相同性に基づいて構築した樹形図を示している。PBATH_{Rf} は真菌由来 PBAT 分解酵素と相対的に高い相同性を示した。さらに、PBATH_{Rf} は *R. fascians* D188 由来クチナーゼ (AET25222) [101] と 30.3% の相同性を示した。一方、PBATH_{Rf} は、これまでに報告された細菌由来 PBAT 分解酵素 (*Thermobifida* 属由来 BTA-hydrolase1 [77]、Est1、Est119 [81]、*Bacillus* 属由来 PBATH_{Bp} [66]、*Pseudomonas* 属由来 PpEst [75]、*Clostridium* 属由来 Cbotu_EstA、Cbotu_EstB、Chath_Est [65, 74]) との相同性は低かった。

-184 GCAA -181

-180 CAGGCGTTGAGAAAACAGGCTTGGCAGTGGATTACCGACACATCCCAGATACGGCCTCCCGGACCCGCTCGATAACCGACCGGGCGTCTG -91

-90 TAATCAAATGTTGACGACCCCTGTGAATGCGACGTCGCAGCGGTTATGGTTCGTTTCGATGCTCCTCCCCGAAACCACAAGGACTCGCC -1

(SD)

1 ATGAAGAGACGCCTGATCGCCTATTCCATTGCTGCACTTGTATCTCCGCCACCCGAGTGGCGCTTCCCACCGGAGTGGCGTCCGGCCGG 90

M K R R L I A Y S I A A L A I S A T A V A L P T G V A S A A

91 CCGTGTTCGGATGTGGACGTCTCGTTCGCTCGGGGCACCCGGTGAACCTCCCGGTCTCGGCATCACGGGTACTCCTTTTGTGAACAGCGTC 180

P C S D V D V S F A R G T G E L P G L G I T G T P F V N S V

181 AAATCGCAACTCTCGGATCGCTCGGTTCAGCACGTACGCCGTGAACCTACGCCGCGACTTCACCCAAAGCCAGCAGCCGGACCCGGATCTCGC 270

K S Q L S D R S V S T Y A V N Y A A D F T Q A S A G P G S R

271 GACCTCGTGGCTCATCTCAATFCCGTTGCGGCATCGTGCCCGTCGACGAAATTCGTGATCGGCGGTTACTCGCAGGGGGCGACCGTGGTG 360

D L V A H L N S V A A S C P S T K F V I G G Y S Q G A T V V

361 ACCAACGCGAGTGGGTCTGCGCACTCCAGCAGCTTCACCGGTGCCGTCTCCCGCCGCGATCGCCGACCGTATCGAGGCCGTTTGTGGTG 450

T N A V G L R T P S S F T G A V I P A A I A D R I E A V V V

451 TTCGGCAACCCATTCGGGCTTACCGGCAGGAAGATCGAGACAGCCAGCAGCACATACGGTTTCACGCACCAACAGCTTCTGCAACTTCGGC 540

F G N P F G L T G R K I E T A S S T Y G S R T N S F C N F G

541 GACCCGGTGTGCCAGATCGGTGGCTTCAACACCTTCGCTCACCTGACCTACGGCACCAACGGCTCGACGACGAGGGTGCCTCGTTCGCG 630

D P V C Q I G G F N T F A H L T Y G T N G S T T Q G A S F A

631 GCCGCTCAGGTACGACGCTGAATCGACTCACCGAAATCGGTGCGCGGGGCCCGATGGTTCTGCGGATAGAAAAGTTCGGTTCGGTAGCCC 720

A A Q V R S *

721 GGATTGCTGTGCGCTCGTACAGATTTCTCAGCGACTGCATCGACCCGAGCTATCGGAACCAACGCAATGGCAGAACCCCGAACCCCCC 820

821 ACCAGTCATACGGGCCCCGTATGCCCGGGCTCGCAGCGCAGCATCGACGGCGCTGTCCAGCTCGGGGGAACCTGACCTCGTAGTCTGCTCG 900

900 AAGCGAGACGTGCGACGCGCTCATCAGGTCGCCGAGTTCGGTACCGATGTCACCGCGCTCCAGMAACGCTACTGCCCGCTCGACTCGTCTG 1080

1080 TATCTCGCTGGTGACGTGACGAACTCGGGGAACGAGAGCCTGATCGACGAGCCCCGATACCGCCCGCTCGGGGTCGAGTCCGCGCAGCGA 1170

1170 CGACACACCCAGCTCCAGGTAGGCCCGGTTCGAGGGCGGCCGGCGGGCACCGTACTGGCCGTCGACCAGACGGTGGCGAGCGTTGGTGTC 1260

1261 GATCACCATGATGCGAGAACC 1281

Fig. 16. Nucleotide sequence, *pbath_{Rf}* and its amino acid sequence, PBATH_{Rf}. Gray boxed sequenced indicates a signal peptide deduced with signalP 5.0 server. Lipase box is shown in a rectangular frame.

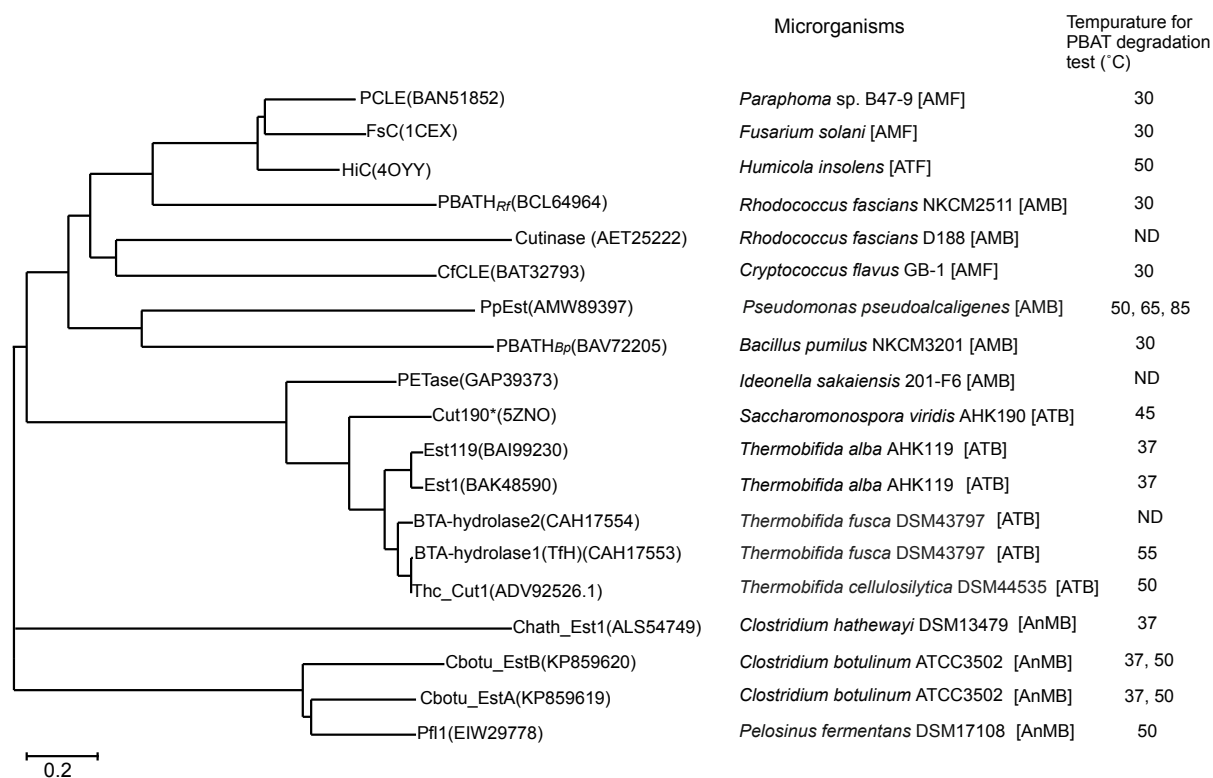


Fig. 17. A dendrogram based on the amino acid sequences of PBAT-degrading enzymes and other polyester hydrolases. AMB: aerobically mesophilic bacterium; AMF: aerobically mesophilic fungus; AnMB: anaerobically mesophilic bacterium; ATF: aerobically thermophilic fungus; ATB: aerobically thermophilic bacterium; and ND: not determined. Genebank accession numbers or PDBj codes are given in the parentheses. The scale bar represents 0.2 substitutions per amino acid position.

組換え酵素 PBATH_{Rf}の精製

組換え株 *E. coli* pMAL-*pbath_{Rf}* から組換え酵素 PBATH_{Rf} を精製した。Table 15 に精製表を示した。精製されたタンパク質溶液を SDS-PAGE により解析したところ、MBP を融合した PBATH_{Rf} タンパク質、MBP-PBATH_{Rf} の分子量に相当する 60 kDa 付近に単一バンドがみられた (Fig. 18 (a) lane 2)。Factor Xa を用い、融合タンパク質の MBP-PBATH_{Rf} から PBATH_{Rf} を切りだした。タンパク質の切断程度を SDS-PAGE 解析により確認したところ、MBP および PBATH_{Rf} の分子量に相当する二つのバンドが出現した (Fig. 18 (a) lane 3)。その後、HiTrap Q カラムを用いて精製したところ、18 kDa 付近に単一なバンドが確認された (Fig. 18 (a) lane 4)。このタンパク質の分子量は、His6-tag を融合させた PBATH_{Rf} の分子量に相当した (Fig. 18 (a) lane 4)。最終的に PBATH_{Rf} は、浸透圧ショックによる抽出画分から 30 % の最終回収率および 5.2 倍に精製された。PBATH_{Rf} のザイムグラム解析の結果、15 kDa 付近にクリアゾーンが出現した (Fig. 18 (b))。

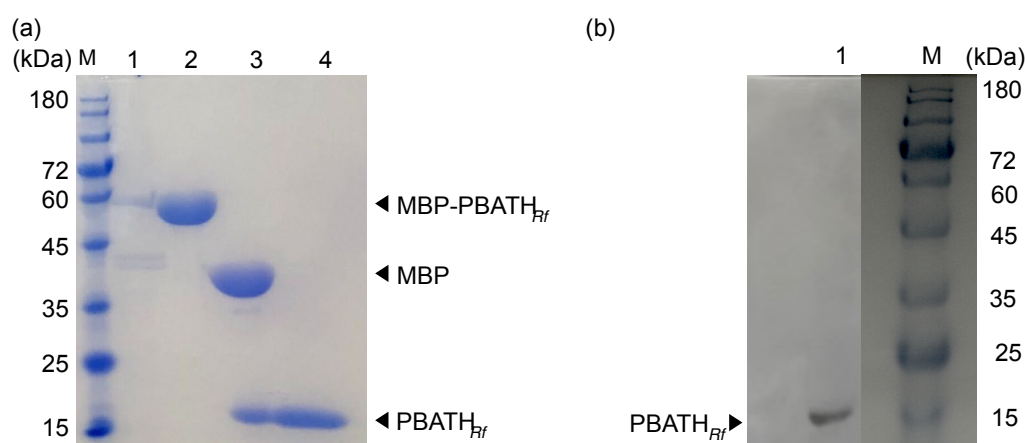


Fig. 18. (a) SDS-PAGE analysis of PBATH_{Rf} heterologously expressed in *E. coli* pMAL-*pbath_{Rf}*. M: protein marker, lane 1: osmotic shock extracted fraction, lane 2: purified using HisTrap FF column, lane 3: Factor Xa treated fraction, and lane 4: purified using HiTrap Q column. (b) Zymogram analysis of recombinant PBATH_{Rf}. M: protein marker, lane 1: recombinant PBATH_{Rf}. (b). Zymogram of poly(ethylene succinate)(PESu) hydrolytic activity of the recombinant PBATH_{Rf}. Lane M: protein marker, Lane 1: purified PBATH_{Rf}.

Table 15. Purification step of PBATH_{Rf}.

Samples	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Purification fold	Total activity (U) ^a	Recovery (%)
Osmotic shock extracted fraction	21	5.2	1	110	100
HisTrap fraction	5.4	9.1	1.7	49	44
Factor Xa treatment fraction	5.4	8.9	1.7	48	43
HiTrap Q fraction	1.2	27.4	5.2	33	30

^aU is defined as the amount of the enzyme that catalyzes *p*-nitrophenyl butyrate 1 μmol per 1 minute under 50 mM phosphate buffer (pH 7.0).

組換酵素 PBATH_{Rf}の特徴づけ

His6-tag と融合した PBATH_{Rf}の特徴づけを行った。PBATH_{Rf}は PNPA、PNPB および PNPC などの比較的短いアルキル鎖を有する *p*-nitrophenyl ester を相対的に速く分解した (Fig. 19)。PBATH_{Rf}は PNPB に対して最も高い分解活性を示した。PBATH_{Rf}は、4–30 °C の温度範囲で高い安定性を示した (Fig. 20)。一方で、PBATH_{Rf}の活性は、50 °C で 30 分間保温した後に 5%まで低下し、さらに 60 °C で 30 分間保温させた後に完全に消失した。

PBATH_{Rf}は、中性から弱塩基性バッファー中 (pH 7.0 – 9.0) で、比較的高い安定性を示した。一方、酸性バッファー中 (pH 3.0–6.0) で、活性が低下した (Fig. 21)。

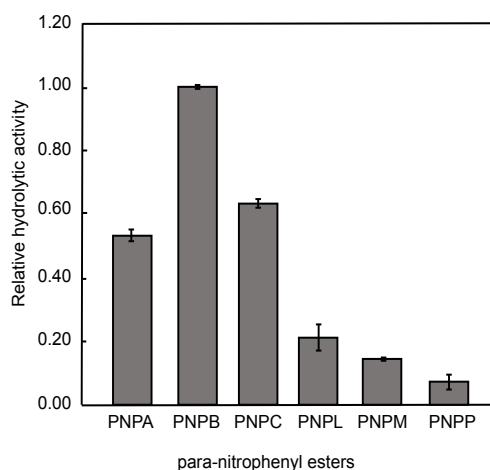


Fig. 19. Relative esterase activity of PBATH_{Rf} to 6 *p*-nitrophenyl esters: *p*-nitrophenyl acetate (PNPA), *p*-nitrophenyl butyrate (PNPB), *p*-nitrophenyl caprylate (PNPC), *p*-nitrophenyl laurate (PNPL), *p*-nitrophenyl myristate (PNPM), and *p*-nitrophenyl palmitate (PNPP). The experiment was done in triplicate. Error bars indicate the width of experimental data.

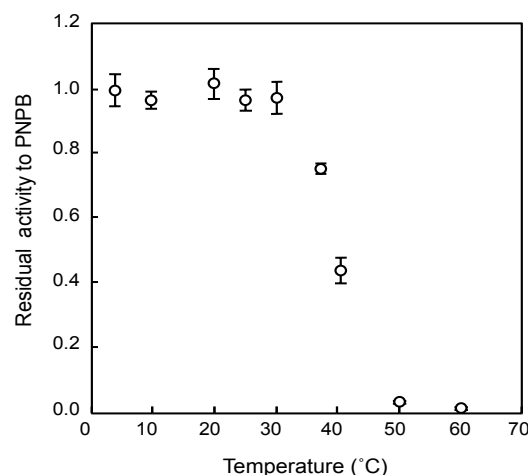


Fig. 20. Thermostability of PBATH_{Rf} at 4, 10, 20, 25, 30, 37, 40, 50, and 60 °C. The experiment was performed in triplicate. Error bars indicate the width of experimental data.

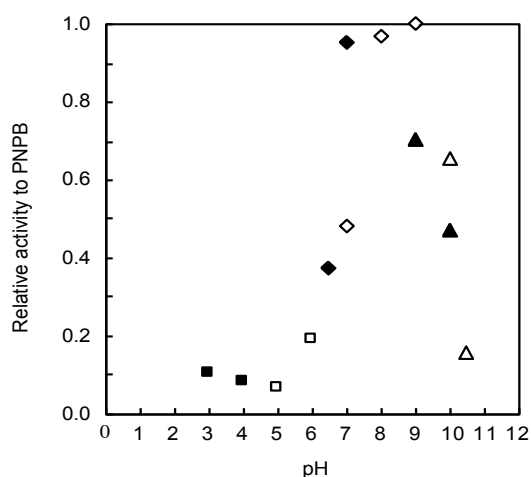


Fig. 21. Stability of PBATH_{Rf} in several pH solutions. (■: Glycine-HCl, □: Citrate-NaOH, ◆: Phosphate-NaOH, ◇: Tris-HCl, ▲: Borate-NaOH, △: Glycine-NaOH)

Table 16 および Table 17 に、様々な化合物および金属イオンが与える酵素活性への影響をまとめた。EDTA および SDS は PBATH_{Rf} の PNPB に対する活性に殆ど影響を与えなかった。一方、本酵素は DFP、PMSF および DTT に対して感受性を示した。

酵素量に対して等モルの K⁺ および Mg²⁺ イオン存在下で、PBATH_{Rf} の活性には、ほとんど変化が見られなかった。一方、Ca²⁺、Mn²⁺、Fe³⁺ の添加は、酵素活性に影響を与えた。等モルの Ca²⁺ イオンの存在下では、活性がわずかに (104 %) 上昇したが、ここに二価金属イオンキレート剤である EDTA を添加したところ活性が低下した。

Table 16. Effect of several inhibitors on the enzymatic activity of PBATH_{Rf}.

Reagents	Final concentration (mM)	Residual activity (%)
None		100.0 ± 3.6
DFP	0.005	88.9 ± 3.5
	0.05	14.6 ± 0.1
PMSF	0.05	98.6 ± 5.8
	0.5	87.6 ± 4.7
	1.0	77.1 ± 0.7
	5.0	22.4 ± 4.1
DTT	1.0	73.8 ± 4.1
	5.0	102.0 ± 5.5
SDS	1.0	102.0 ± 5.5
	5.0	92.2 ± 11.1

The experiment was performed in triplicate. Errors indicate the width of experimental data.

Table 17. Effect of several metal ion on the PNPB hydrolytic activity of PBATH_{Rf}.

Regents	Residual activity (%)
	Enzyme : metal ion (mol) = 1 : 1
None	100.0 ± 3.6
KCl	95.0 ± 1.3
CaCl ₂	104.3 ± 12.0
EDTA	100.9 ± 1.6
EDTA + CaCl ₂	96.1 ± 3.4
MgCl ₂	100.8 ± 7.7
MnCl ₂	92.5 ± 4.2
FeCl ₃	91.0 ± 15.6

The experiment was performed in triplicate. Errors indicate the width of experimental data.

PBATH_{Rf}における触媒三残基の同定

Fig. 22 に、ClustalW によりアライメントされたシグナルペプチド配列を除いた、PBAT 分解酵素 HiC と本酵素のアミノ酸配列を示す。HiC の触媒三残基の S105、D150 および H163 の位置がそれぞれ本酵素を構成するアミノ酸 S114、D181、および H194 の位置と一致していることから、本酵素の触媒三残基は S114、D181、および H194 であると推定した。Table 18 は、MBP-PBATH_{Rf}、PBATH_{Rf} および MBP-PBATH_{Rf} の推定触媒三残基の変異体 (MBP-PBATH_{Rf}S114A、MBP-PBATH_{Rf}D181N および MBP-PBATH_{Rf}H194N) の PBAT、PBSA、PBSu、PCL、PHBH および PLA 乳化固体プレートおよびオリーブオイル含有固体プレート上でのクリアゾーン形成能力を示している。MBP-PBATH_{Rf} および PBATH_{Rf} は、PBAT、PBSA、PBSu、PCL 乳化固体プレートおよびオリーブオイル含有固体プレート上にクリアゾーンを形成した。一方 MBP-PBATH_{Rf}S114A、MBP-PBATH_{Rf}D181N および MBP-PBATH_{Rf}H194N はポリエステ

ル乳化固体プレートおよびオリーブオイル含有固体プレート上にクリアゾーンを形成しなかった。

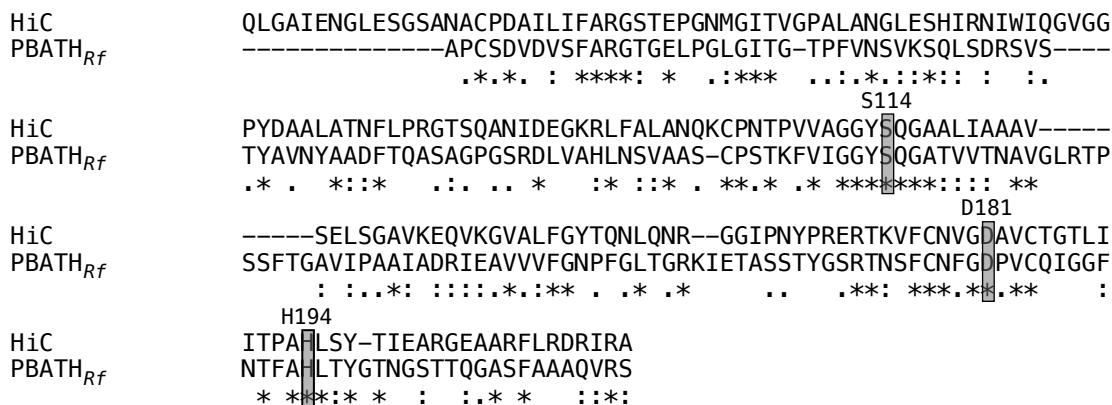


Fig. 22. Comparison between amino acid sequence of HiC and PBATH_{Rf} generated by ClustalW. Two of the alignment were excluding deduced signal peptide. Identical residues, highly similar residues, and similar residues are marked below with asterisks, colon, and dot respectively. The catalytic triad was marked in rectangular frames with gray color.

Table 18. Clear zone formation on polyesters, and olive oil containing plates of PBATH_{Rf} and its variants.

	PBAT	PBSA	PBSu	PCL	PESu	PHBH	PLA	Olive oil
MBP-PBATH _{Rf}	++	+++	++	+++	+++	-	-	+
PBATH _{Rf}	++	+++	++	+++	+++	-	-	+
MBP-PBATH _{Rf} S114A	-	-	-	-	-	-	-	-
MBP-PBATH _{Rf} D181N	-	-	-	-	-	-	-	-
MBP-PBATH _{Rf} H194N	-	-	-	-	-	-	-	-

The plate was dripped with 5 μ L of each sample solution, followed by incubation at 30 $^{\circ}$ C for 24 h, except for PHBH and PLA which were incubated at 30 $^{\circ}$ C for 5 d.

+++ : radius of clear zone was larger than 1.0 cm.

++ : radius of clear zone was between 0.5 to 1.0 cm.

+ : radius of clear zone was smaller than 0.5 cm.

- : a clearing zone was not formed.

PBATH_{Rf}によるポリエステルフィルムの分解

PBATH_{Rf}のポリエステル (PBAT、PESu、PBSA、PCL および PBSu) フィルムの重量減少速度 (分解速度) は、それぞれ 0.10 ± 0.03 、 2.51 ± 0.31 、 2.42 ± 0.04 、 1.92 ± 0.23 、および 0.34 ± 0.05 mg/cm²/dであった (Fig. 23)。一方、PLA および PHBH フィルムの分解速度は、これらと比べて非常に低かった。この結果は PBATH_{Rf}のポリエステル乳化固体プレート上でのクリアゾーン形成の結果と一致した (Table 18)。酵素を含まないリン酸バッファー中で保温した PBAT フィルムの形態は、分解前と比較しほとんど変化しなかった。一方、酵素を含むリン酸バッファー中で保温した PBAT フィルムは白く変色した (Fig. 24 (1))。Fig. 24 (2) は、酵素分解前後の PBAT フィルムと PBATH_{Rf}添加および未添加で1 および5日間保温した PBAT フィルム表面の SEM 像を示す。酵素が含まれるリン酸バッファー中で1日間保温した PBAT フィルム表面には、亀裂が確認され、5日間保温した後には亀裂がさらに増加した。5日間酵素と共に保温された PBAT フィルムの分子量は、保温前のものと比べわずかに低下した (Table 19)。

PBATH_{Rf} は、アモルファス PET、PLA および PHBH フィルムをほとんど分解しなかった (0.01 ± 0.005 、 0.02 ± 0.01 、 0.00 ± 0.01 mg/cm²/d) (Fig. 23)。HPLC 分析の結果、酵素分解試験 1 日後のアモルファス PET フィルムの上清にはテレフタル酸 (0.82 ± 0.13 μM)、ET (4.22 ± 0.65 μM) および ETE (0.42 ± 0.04 μM) が存在することがわかった(Fig. 25)。しかしながら、酵素と共に保温した後のアモルファス PET フィルムの表面形態は、保温前のアモルファス PET フィルムのものとほとんど変わらなかった。

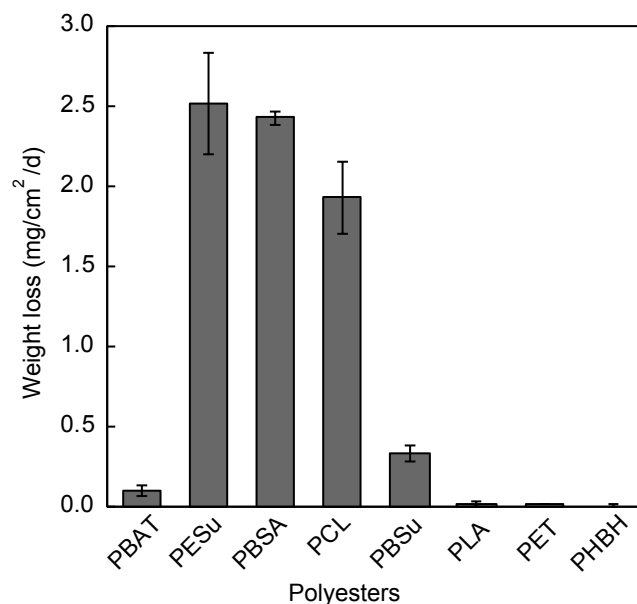


Fig. 23. Degradation rate of polyesters films by PBATH_{Rf}. The films were incubated with PBATH_{Rf} (3.1 μg) in 50 mM phosphate buffer (pH 7.0) solution at 30 °C. The experiment was performed in pentaplicate. Error bars indicate the width of experimental data.

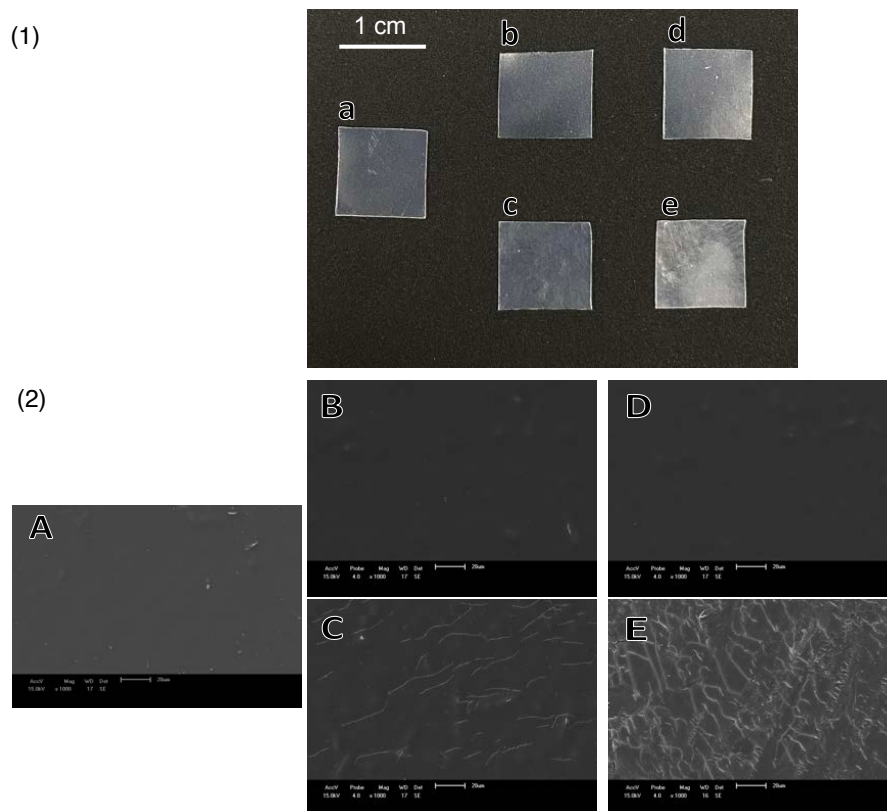


Fig. 24. Changes of the PBAT film surface after the treatment with $PBATH_{Rf}$ determined by the naked-eye observation (1) and SEM analysis (2). Macroscopic and microscopic surface images of PBAT films are shown taken before the incubation (a and A), after the incubation for 1 d (b and B) and 5 d (d and D) without the enzyme, and after the incubation for 1 d (c and C) and 5 d (e and E) with the enzyme, respectively, in phosphate buffer (pH 7.0) at 30 °C. The white bars indicates 1 cm and 20 μm in length in (1) and (2), respectively.

Table 19. Change of molecular weight of PBAT film after treatment with $PBATH_{Rf}$.

	0 d	1 d		5 d	
		Without- $PBATH_{Rf}$	With- $PBATH_{Rf}$	Without- $PBATH_{Rf}$	With- $PBATH_{Rf}$
$M_n(\times 10^{-4})$	3.9	4.0	3.9	3.9	3.7
M_w/M_n	2.1	2.0	2.0	2.0	2.1

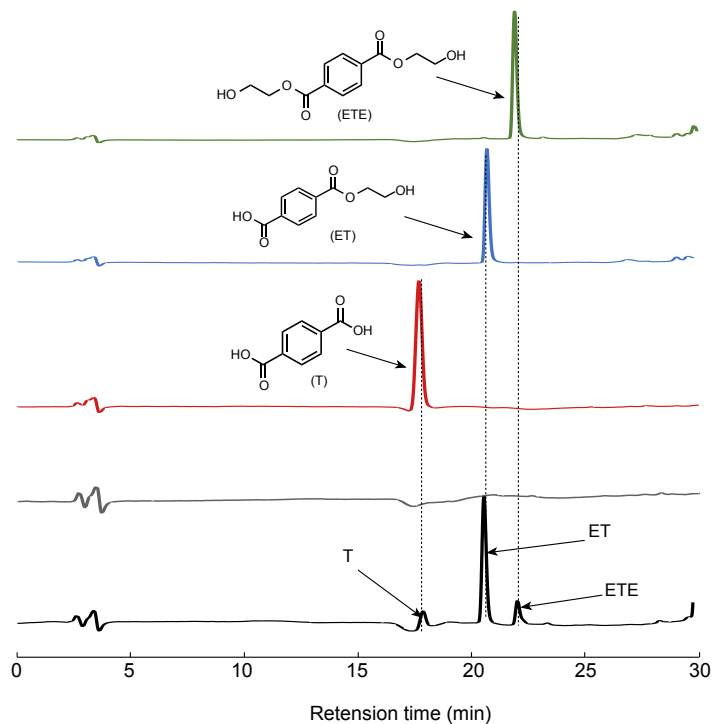


Fig. 25. HPLC chromatograms of PET film degrading supernatant using PBATH_{Rf} in the black curve, negative control in the gray curve, terephthalic acid (T) in the red curve, ET in blue curve, and ETE in green curve, detected using UV at a wavelength of 254 nm.

LC-MS による PBATH_{Rf} による PBAT 分解物の同定

PBATH_{Rf} による PBAT 分解物を同定するために、PBAT フィルムの酵素分解後の上清を ESI 法のポジティブイオンモード/ネガティブイオンモードで LC-MS により解析した。上清中には、ブタンジオール (B)、テレフタル酸 (T)、アジピン酸 (A) およびオリゴマー (AB, TB, BTB, ABA, TBA, TBT, BTBA/TBAB, および TBTB) が含まれていた (Fig. 26)。

Substrates	m/z spectra by negative mode ESI (m/z spectra by positive mode ESI)	Chemical structures
Butanediol (B)	(91.1)	
Adipic acid (A)	145.0	
Terephthalic acid (T)	165.0	
AB	217.1	
TB	237.1	
BTB	309.0	
ABA	345.2	
TBA	365.1	
TBT	385.1	
BTBA/TBAB	437.2	
TBTB	457.1	

Fig. 26. Water-soluble products after incubation of PBAT film with PBATH_{RF} for 1d at 30 °C, which were determined by means of LC/MS.

PBATH_{Rf}による PBAT オリゴマー モデル基質 (BAB, および BTB) の加水分解

PBATH_{Rf}と共に BAB および BTB を保温した際の、それぞれの化合物の残存率を経時的に調べた。BTB の量は保温時間に伴って減少したものの、180 分間保温した後にその 95 % が残存していた。一方、BAB は 20 分間保温の後に、20 % 以上減少し、また 180 分間保温した後、BAB に由来するピークはほとんど消失した (95 % 以上) (Fig. 27 (a))。

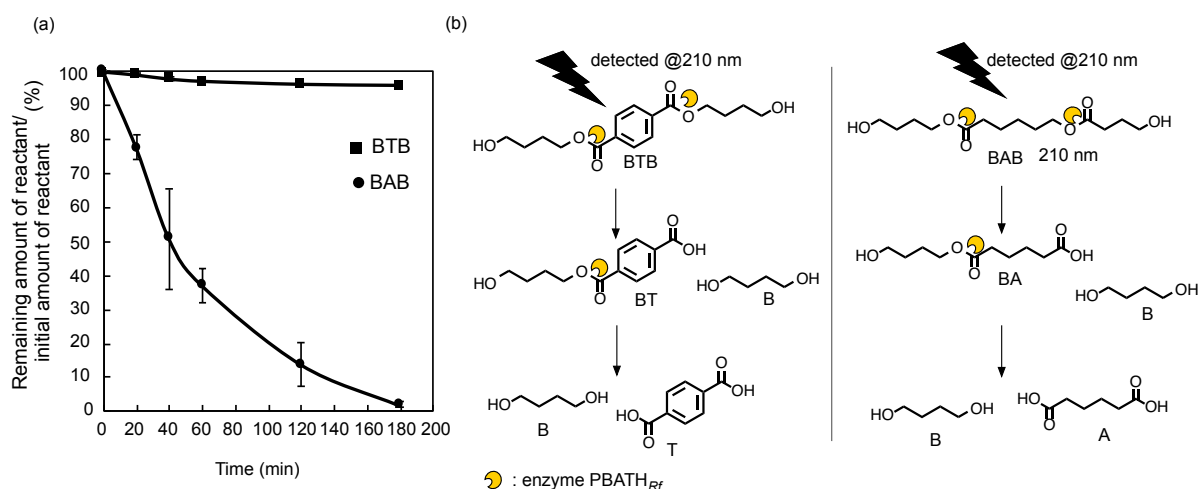


Fig. 27. (a) Time-dependent change in the amounts of substrates BTB and BAB following enzymatic treatment with PBATH_{Rf} at 30 °C. The experiment was done in triplicate. Error bars indicate the width of experiment data. (b) Enzymatic degradation pathway of BTB and BAB by PBATH_{Rf}.

PBATH_{Rf}の 3D モデリングおよび分子ドッキング

Fig. 28 (a) は、クチナーゼ Cut-Tr をテンプレート構造として用い、予測した PBATH_{Rf} のリボンモデル構造を示している。PBATH_{Rf} と Cut-Tr のアミノ酸配列の比較から、PBATH_{Rf} は Cut-Tr の N 末端に存在するリッドドメイン相同領域を欠如していることがわかった (Fig. 29)。PBATH_{Rf} は、4 つの α ヘリックスおよび 5 つの β シート を有しており、 α/β 加水分解酵素フォールドファミリーに属していることがわかった。推定触媒三残基 S114、D182 および H194 は本酵素の表面に存在していた。また、N 末端付近の C32–C103 および、活性部位付近の C177–C184 に位置するアミノ酸がジスルフィド結合を形成する可能性が示された (Fig. 28 (a))。

SwissDock による分子モデルドッキングは、BTB と BAB は、最もエネルギーが小さい $\Delta G = -7.24$ kcal/mol と -38.76 kcal/mol の結合モードでそれぞれ実施された。UCSF Chimera program により予測されたドッキングモデルは、BTB および BAB は活性部位 S114 と疎水性アミノ酸 T43、F80、V183、F189 および L195 と極性アミノ酸 E45 および N 190 から構成された溝に収容されることを示した (Fig. 28 (b) と (c))。

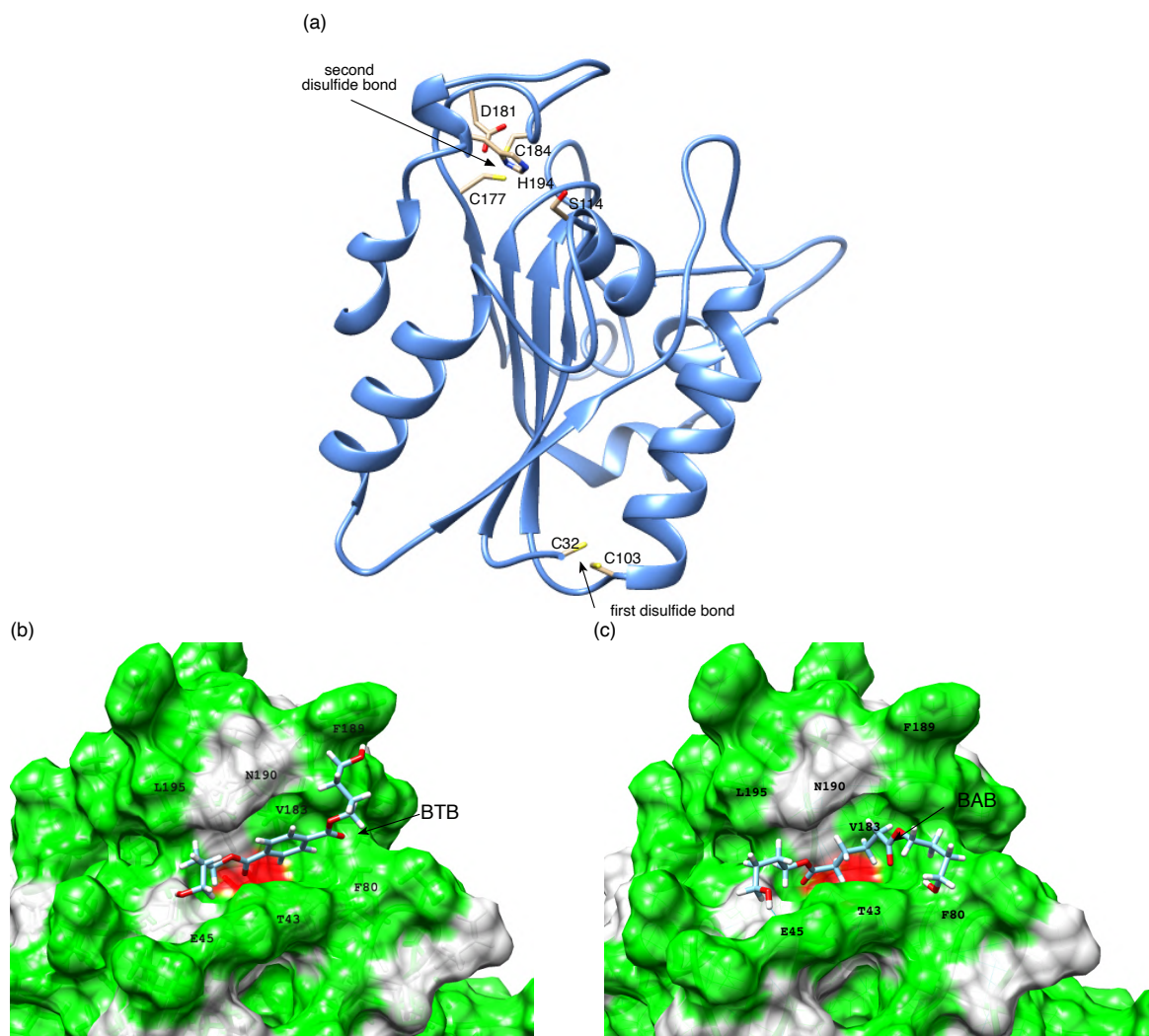


Fig. 28. 3D model structure of PBATH_{Rf} and molecular docking. (a) The predicted model structure of PBATH_{Rf} was constructed with the SWISS-MODEL server by using cutinase Cut-Tr (PDBj code: 4PSC) from fungus *Trichoderma reesei* which shares 40.1 % amino acid sequence identity with PBATH_{Rf}, as a template. The catalytic triad (S114, D181, and H194) determined by the mutational analysis and predicted disulfide bonds (C32-C103 and C177-C184) are shown in the model. (b) Molecular docking simulation performed by using SwissDock with BTB as a ligand. Active site S114 is marked in red. Hydrophobic amino acid residues observed in the vicinity of the active site are marked in green. The structure was analyzed by using UCSF Chimera program.

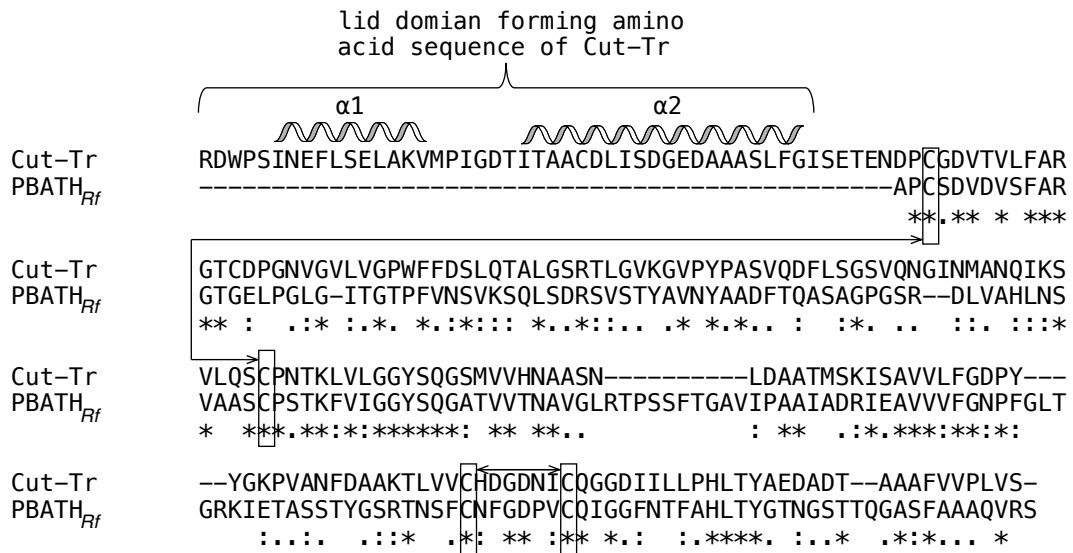


Fig. 29. Comparison between amino acid sequence of Cut-Tr and PBATH_{Rf} generated by ClustalW. Two of the alignment were excluding deduced signal peptide. Identical residues, highly similar residues, and similar residues are marked below with asterisks, colon, and dot respectively. Disulfide bonds forming cysteine residues were marked in rectangular frames.

考察

第 2 章の NKCM2511 株のゲノム解析の結果に基づき推定されたタンパク質 (locus tag : RN2511_028120)、PBATH_{Rf} をコードする遺伝子 (*pbath_{Rf}*) を含有するプラスミド DNA は、PBAT 乳化固体培地上で宿主に対してクリアゾーン形成能を付与した。このことから *pbath_{Rf}* 遺伝子産物である PBATH_{Rf} が宿主株に PBAT 加水分解活性を与えたことが示唆された。すなわち、*pbath_{Rf}* は NKCM2511 株の PBAT 加水分解活性の原因遺伝子である。変異導入の結果より、PBATH_{Rf} 内の S114、D181 および H194 が触媒三残基を形成していることがわかった。加えて、本酵素 PBATH_{Rf} のエステラーゼ活性は、PMSF や DFP と行ったセリン加水分解酵素阻害剤に対して感受性を示した [139, 140]。これらの結果は、PBATH_{Rf} がセリン加水分解酵素であることを示唆している。PBATH_{Rf} のホモロジー 3D モデリングは、PBATH_{Rf} が活性部位を覆うリッドドメインを欠如していることを示した。一般的に、リッドドメインは油-水界面にて、リパーゼの酵素活性を促進する [141]。一方で、その基質が水不溶性物質であるクチナーゼや PBATH_{Bp} におけるリッドドメインの欠如は、固-液界面での加水分解活性に有利にはたらく [66, 142, 143]。BTB のような PBAT オリゴマーモデル基質と PBATH_{Rf} との分子ドッキングモデルは、活性部位 S114 の周辺にある基質結合ポケットがオリゴマー基質を収容するのに十分な大きさであることを明らかにした。このことが、PBATH_{Rf} が PBAT を加水分解できる理由の一つと考えられる。

短鎖のアルキル鎖に対する高い基質特異性、オリーブオイルに対する加水分解活性および塩基性環境での安定性、分子量の大きさ等、PBATH_{Rf} のいくつかの性質は、クチナーゼや最も小さい大きさのリパーゼ (サブファミリー I.4 リパーゼ) のものと一致していた [66, 144, 145]。加えて、PBATH_{Rf} のアミノ酸配列はリパーゼ (PBATH_{Bp} [66]) のものよりもクチナーゼ (HiC [91], FsC [92]) のものと相同性が高かった (Fig. 17)。以上の結果から、PBATH_{Rf} はクチナーゼ様酵素と考えられる。

PBATH_{Rf} は、固体基質である PBAT フィルムを 30 °C の中温環境下で分解した。30 °C 以下の中温環境で、PBATH_{Rf} の活性が保持されることを考慮すると、本酵素は実環境中で PBAT 加水分解活性を発現すると考えられる。加えて、酵素と共に保温した PBAT フィルムの表面形態の変化は、NKCM2511 株と共に培養した PBAT フィルム表面のものと類似していた (第 2 章参照)。また、ザイモグラムの結果により、PBATH_{Rf} が形成したクリアゾーンバンドの位置は、第 2 章で得られた濃縮培養上清のザイモグラム解析で検出されたクリアゾーンバンドの位置とほぼ一致していた (Fig. 18)。これらのことから、中温域での実環境下での NKCM2511 株による PBAT の分解は、PBATH_{Rf} によるものであると結論づけた。

還元剤である DTT によって酵素活性が低下することから、本酵素の活性型の高次構造の保持に寄与するジスルフィド結合が存在することが示唆された [146]。このことは、PBATH_{Rf} のモデル構造により推定された PBATH_{Rf} の高次構造において、N 末端の C32 と C103 との間と、活性部位に近い C177 と C184 との間にジスルフィド結合が形成されていることと一致している。PETH_IDESA (*I. sakaiensis* 由来 PET 加水分解酵素、PETase) や ThCut2 (*T. fusca* KW3 由来クチナーゼ) の様な菌体外酵素において、ジスルフィド結合は酵素の熱安定性を制御している [147, 148]。加えて、PETH_IDESA の活性部位近傍のジスルフィド結合は、

中温条件下（40 °C 以下）での酵素の高い柔軟性に寄与しており、このことが、PETH_IDESA が、活性部位近傍のジスルフィド結合を持たない PET 加水分解酵素と比べて高活性を発現する要因であると考えられる[147,149]。ジスルフィド結合を持つ PBATH_{Rf} の PBAT 分解速度（0.10±0.03 mg/cm²/d）は、同様に分子内にジスルフィド結合を持つ中温性 PBAT 加水分解酵素 PCLE のものに匹敵する [82]。PBATH_{Rf} の PBAT 分解速度(0.10±0.03 mg/cm²/d)は、ジスルフィド結合を持たない中温性 *B. pumilus* NKCM3201 株由来 PBATH_{Bp} の PBAT 加水分解速度の 7.1 倍であった [66]。一方、PBATH_{Rf} の PBAT 分解速度は、*S. viridis* AHK190 由来 Cut190*（9 倍） [79]や *T. fusca* 由来 Tfh [84]の様な好熱性 PBAT 加水分解酵素（34 倍）のものとはるかに小さい。これらの知見は、PBAT がコンポスト内の様な高温環境下で優れた生分解性を示すものの、農地の様な中温環境下では極めて低い分解性を示すことと関連している可能性がある。

HPLC 解析の結果、PBATH_{Rf}が芳香族ポリエステルのアモルファス PET フィルムに対し、30 °C で、弱い加水分解活性を示すことがわかった。PBAT 加水分解活性をもつ真菌由来クチナーゼ FsC もまた、中温域でアモルファス PET フィルムに対する加水分解活性をもつ [150, 151]。しかしながら、PBATH_{Rf}に暴露させた PET フィルムの重量減少量（0.01 ± 0.005 mg/cm²/d）は、PBAT フィルムのもの（0.10±0.03 mg/cm²/d）と比べ、非常に小さく、その表面形態にも変化は見られなかった。PBATH_{Rf}の極めて低い PET 分解速度は、PET のガラス転移温度が 70 °C であり、中温環境（30 °C）では、PET 分子鎖の運動性が低く、PBATH_{Rf}による加水分解を受けにくいことに起因すると考えられる [130]。したがって、PBATH_{Rf}処理後の PET フィルムより上清中に遊離された化合物は、中温環境でポリマー主鎖よりも高い運動性を有するポリマー分子鎖の末端あるいはフィルム表面から突き出たループ部分の分解により生じると考えられる [152]。Kawai らの先行研究によれば、PBATH_{Rf}は PET 表面改質酵素に分類することができる [152]。

脂肪族芳香族ポリエステルである PBAT の加水分解活性に加え、PBATH_{Rf}は PESu、PBSA、PCL および PBSu といった脂肪族ポリエステルの加水分解活性も示し、これら脂肪族ポリエステルを、PBAT よりも大きな速度で加水分解した。Est1 [81, 86]、PCLE [82]、CfCLE [83]、PBATH_{Bp} [66]および Cut190* [79]などの PBAT 加水分解酵素も、芳香族ユニットを含む PBAT よりも、脂肪族ポリエステルをより大きな速度で分解しており、PBATH_{Rf}と共通の性質を示した。PBATH_{Rf}による PESu の分解速度は、これらのポリエステルのうち最も高く、PBAT の約 25 倍であった。この結果は、PBATH_{Rf}による A-B 間のエステル結合が、T-B 間のエステル結合開裂速度の 19 倍の速さであることから支持された。さらに、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。これらの結果は、PBATH_{Rf}が PBAT よりも脂肪族ポリエステルを効率的に加水分解する理由である可能性がある。

PBAT の酵素分解試験後の上清の LC-MS による定性解析により、PBATH_{Rf}が T-B 間のエステル結合よりも A-B 間のエステル結合をより効率的に分解するにもかかわらず、PBAT オリゴマーに加え、1,4-ブタンジオール、アジピン酸およびテレフタル酸の様なモノマー化合

物を遊離させることが明らかになった。このことは、本酵素は PBAT をモノマー構成物にまで分解できることを示唆している。第 2 章にて、PBATH_{Rf}を生産する NKCM2511 株は、テレフタル酸およびアジピン酸を含む培地よりも、1,4-ブタンジオールを含む培地でよく生育した。これらのことから、中温環境にて NKCM2511 株が単独で、PBATH_{Rf}を用い PBAT を分解したとしても、分解物は十分に速い速度で無機化されず、分解物の最終的な無機化は、環境中の共生生物によって達成されると考えられる。

まとめ

本章は、NKCM2511 株による PBAT 分解機構をより詳細に明らかにするために、ゲノム解析の結果に基づき推定した PBAT 加水分解酵素遺伝子 (locus_tag: RN2511_028120, PBATH_{Rf}) をクローニングし、さらに組換え酵素を精製し、その生化学性質を調べた。クローニングした遺伝子 (pbath_{Rf}) は *E. coli* に PBAT 分解活性を与えた。系統解析から、PBATH_{Rf} は、リパーゼや *Thermobifida* 属由来クチナーゼよりも、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した。本酵素のホモロジー3D モデリングから、本酵素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。また、分子ドッキングから、本酵素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ることがわかった。PBATH_{Rf} は、30 °C まで高い活性を保持した。また、PBATH_{Rf} は、30 °C で、PBAT フィルムを $0.10 \pm 0.03 \text{ mg/cm}^2/\text{d}$ の速度で分解し、PBAT フィルムの表面の亀裂の形成を引き起こした。PESu を基質としたザイモグラムの結果から、本酵素が形成したクリアゾーンバンドの位置が、第 2 章で得られた濃縮培養上清のザイモグラム解析で検出されたクリアゾーンバンドの位置とほぼ一致した。これらのことから、中温域実環境下での *R. fascians* NKCM2511 株による PBAT の分解は、PBATH_{Rf} によるものと結論づけた。また、液体クロマトグラフィー質量分析を用いた PBAT フィルムの分解物の定性解析により、PBATH_{Rf} は PBAT を構成成分モノマーのアジピン酸、テレフタル酸および 1,4-ブタンジオールにまで分解することが示された。

本酵素は高温域で不安定だが、30 °C 以下では *B. pumilus* 由来 PBAT 分解酵素 PBATH_{Bp} よりも PBAT を速く分解した。本酵素の PBAT 分解速度は、真菌由来 PBAT 分解酵素 PCLE によるそれとほぼ同等であった。

第 4 章

総括

プラスチックマルチは農作物生産性の維持および向上に有効である。しかし、汎用プラスチックマルチは、使用後に廃棄物処理が必要であり、農家に対し、労働力や経済的な面での負担が大きい。また土壌中のプラスチックマルチ残渣は、土壌の物理的性質および農作物の生育に影響を及ぼす。そこで、使用後にその場で処理可能な、生分解性プラスチックマルチに対する注目が集まっている。

PBATは、生分解性プラスチックマルチの原材料として使用されており、農業分野における重要な素材の一つである。コンポスト等の高温環境において、PBATの生分解性は高いが、実際に生分解プラスチックマルチが使用される中温環境では低いことがわかっている。一方で、中温環境の土壌からもいくつかのPBAT分解微生物が単離されている。しかし、それらの中温性微生物によるPBATの生分解性評価や、PBATの一次分解過程に関わ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例は少ない。PBATを素材にした生分解性プラスチックマルチが、使用後にその場で処理されることを考慮すると、中温環境下でのPBATの分解機構を詳細に明らかにし、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、土壌からあらたな中温性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、中温環境でのPBATの生分解性機構の解明に取り組んだ。

第1章では、農業におけるプラスチックマルチの重要性、汎用プラスチックマルチにより引き起こされる問題と、その解決策の一つである生分解性プラスチックマルチについて述べた。生分解性プラスチックマルチの原料として使用される生分解性脂肪族芳香族ポリエステルであるPBATの物性、環境分解性、およびこれらの分解種について述べた。また、土壌放線菌 *R. fascians* について述べた。最後に、本論文の目的を明確にした。

第2章では、土壌試料から、PBATを分解する細菌NKCM2511株を単離した。生化学的・生理学的特徴付け、系統発生解析およびゲノム解析から、本株は *R. fascians* に近縁であることがわかった。*R. fascians* によるPBATの分解に関する研究例は、本学位論文が初めての報告となる。本株は、培地中でPBATフィルムを、 $16.3 \pm 2.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{d}$ の速さで分解した。本株は25-30 °Cの温度範囲でよく生育し、PBATをよく分解した。加えて、本株が好気条件下のみで生育できることから、本株は好気性中温性PBAT分解細菌であることがわかった。本株と共に液体培地中で振とう培養したPBATフィルム表面には亀裂が生じた。本株は、PBAT構成成分の一つである1,4-ブタンジオールを資化したが、その他の構成成分であるアジピン酸およびテレフタル酸は容易に資化できなかった。また、本株の増殖度とPBAT分解活性が比例していたことから、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推定された。本株によるPBATフィルムのBOD生分解度は、25 °Cで22日の保温後には約7%であった。*R. fascians* は菌体外にPBAT分解酵素を生産し、単独でPBATをCO₂に無機化するが、PBATにより集積されなかった。PESuを基質とした培養上清のザイモグラム解析により、本株は少なくとも、分子量180 kDaおよび15 kDaの2つのポリエステル分解酵

素を生産していることがわかった。また、ゲノム上の推定タンパク質の内、8個の推定タンパク質のアミノ酸配列が、既知の PBAT 分解酵素のアミノ酸配列と 20 %以上相同性を示した。このうち、locus_tag RN2511_028120 が、ザイモグラム解析により求めたポリエステル分解酵素の分子量 (15 kDa) と、最も近い推定分子量 (18,992 Da) を示した。

第 3 章では、NKCM2511 株による PBAT 分解機構をより詳細に明らかにするために、第 2 章で行われたゲノム解析の結果に基づき推定した PBAT 加水分解酵素遺伝子 (locus_tag: RN2511_028120, PBATH_{Rf}) をクローニングし、組換え酵素の精製およびその生化学性質を調べた。クローニングした遺伝子 (*pbath_{Rf}*) は宿主である *E.coli* に PBAT 分解活性を与えた。デンドログラム解析から、PBATH_{Rf} は、リパーゼや *Thermobifida* 属細菌由来クチナーゼよりも、真菌由来クチナーゼや *R. fascians* D188 株由来クチナーゼに高い相同性を示した。本酵素のホモロジー3D モデリングから、本酵素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。また、分子ドッキングから、本酵素の基質結合ポケットは、PBAT オリゴマーモデル基質の BTB を収容するのに十分な広さを保持していた。PBATH_{Rf} は、30 °C まで高い活性を保持した。また、PBATH_{Rf} は、30 °C で、PBAT フィルムを 0.10 ± 0.03 mg/cm²/d の速度で分解し、PBAT フィルムの表面に亀裂の形成を引き起こした。さらに、PBATH_{Rf} と共に保温した PBAT フィルムの表面形態の変化は、NKCM2511 株と共に培養した PBAT フィルム表面のものと類似していた。PESu を基質としたザイモグラムの結果から、本酵素が形成したクリアゾーンバンドの位置が、第 2 章で得られた濃縮培養上清のザイモグラム解析で検出されたクリアゾーンバンドの位置とほぼ一致した。これらのことから、中温域実環境下での *R. fascians* NKCM2511 株による PBAT の分解は、PBATH_{Rf} によるものと結論づけた。本酵素は、脂肪族芳香族ポリエステル PBAT 以外に、脂肪族ポリエステルの PESu、PBSA、PCL および PBSu に対して、それぞれ 2.51 ± 0.31 、 2.42 ± 0.04 、 1.92 ± 0.23 および 0.34 ± 0.05 mg/cm²/d の速度で分解した。また、アモルファス PET に対して弱い加水分解活性を示した。本酵素による PBAT オリゴマーモデル基質 BAB の分解速度は、BTB のものと比べ約 19 倍大きかった。この結果より、PBATH_{Rf} は、テレフタル酸とブタンジオール (T-B) 間のエステル結合よりもアジピン酸とブタンジオール (A-B) 間のエステル結合をよく切断することがわかった。本酵素によるエステル基質の選択性が、脂肪族ポリエステル (PESu, PBSA, PCL および PBSu) フィルムに比べ、本酵素の PBAT フィルムの分解速度が低い原因であると考えられる。また、液体クロマトグラフィー質量分析を用いた PBAT フィルムの分解物の定性解析により、本酵素は、T-B 間エステル結合によりも、A-B 間エステル結合を効率的に切断するにも関わらず、PBAT フィルムの一部を、アジピン酸、テレフタル酸および 1,4-ブタンジオールにまで分解した。

以上の結果から、中温域実環境下での PBAT の分解には、土壌細菌である *R. fascians* NKCM2511 株が寄与するとわかった。*R. fascians* NKCM2511 由来 PBAT 分解酵素 (PBATH_{Rf}) は、真菌由来のクチナーゼとその性質が類似していた。多くの植物病原真菌は、宿主の植物へ侵入するために、表面を覆うクチクラ膜の一つの成分であるクチンを分解 (破壊) する酵素のクチナーゼを生産する [153]。また、クチナーゼの多くは PBAT に対して分解活性を示

す。また、クチナーゼを生産する植物病原菌が、PBAT により集積されることは、農作物にとって好ましくない。一方で、本論文での結果から、植物病原細菌として知られる *R. fascians* に属する本株は、PBAT により集積されないことが判明した。さらに、PBAT やその構成成分は、*R. fascians* NKCM2511 株に対して PBATH_{Rf} の生産を誘導しなかった。Muroi らは、中温条件下で土壌埋設した PBAT は、PBAT 周辺土壌に生育する細菌叢にほとんど影響を及ぼさないことを明らかにしている [130]。本研究の結果を踏まえると、環境中での PBAT は、本株の様な植物病原菌を含め、環境中の細菌の多様性に影響を及ぼさないと推定される。PBAT が土壌中の特定細菌を集積しないことは、PBAT を、生分解性プラスチックマルチの様な農業用資材の原料として用いることができることを示唆している。また *R. fascians* NKCM2511 株が生産する酵素 PBATH_{Rf} は、PBAT をモノマー構成成分である 1,4-ブタンジオール、アジピン酸およびテレフタル酸にまで分解した。しかし、それらのモノマー構成成分の内、1,4-ブタンジオールのみが *R. fascians* NKCM2511 株により利用された。これらのことより、土壌の様な好気的中温環境で *R. fascians* NKCM2511 株が単独で、PBATH_{Rf} を用いて PBAT を分解したとしても、分解物は十分に早い速度で無機化されず、分解物の最終的な無機化は、環境中の共生系により達成されると考えられる (Fig. 30)。また、PBAT 分解酵素 PBATH_{Rf} の活性は比較的低い。このため、中温環境下で生分解速度が極めて低い PBAT プラスチックマルチを、使用後に速やかに生分解させるためには、PBAT 周辺の微生物総数を増加させる必要があると考えられる。

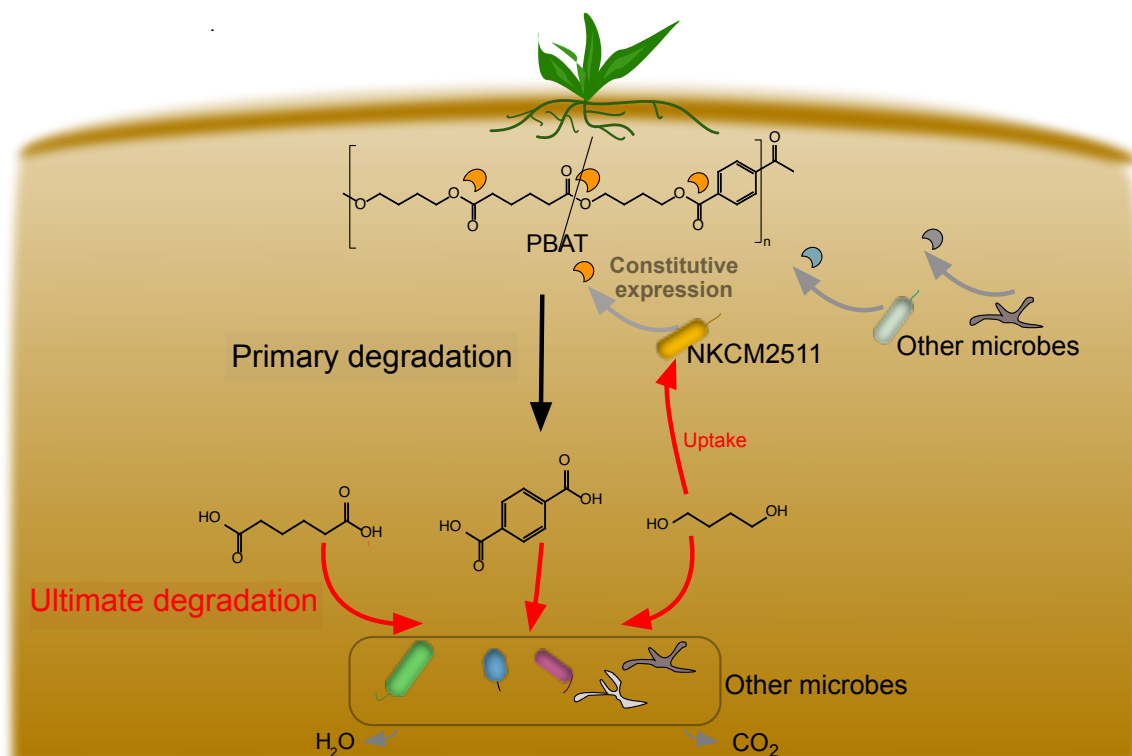


Fig. 30. Predicted biodegradation mechanism of PBAT on actual field by NKCM2511 strain and symbionts.

本株を含む PBAT 存在下で集積しない土壌 PBAT 分解細菌は、その菌体量と PBAT の分解活性が比例する。つまり、中温環境下で PBAT プラスチックマルチの分解速度を上昇させるためには、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。土壌中の微生物数の増加は、微生物の栄養源（窒素、リン酸、炭素等）の添加により達成できると考えられる。そこで、PBAT 周辺および土壌微生物数を増加させるために、植物用の堆肥や肥料と共に PBAT プラスチックマルチを土壌にすきこむことを提案する (Fig. 31)。これにより、中温環境下で PBAT プラスチックマルチの分解速度を上昇させることが可能となる。一方で、栄養源と PBAT を土壌に添加した際の実際の微生物数や、PBAT 分解微生物数、土壌微生物の菌叢変化については、モニタリングが必須である。この手法として、土壌中の微生物叢のメタオミックス解析が有効な手段となる。

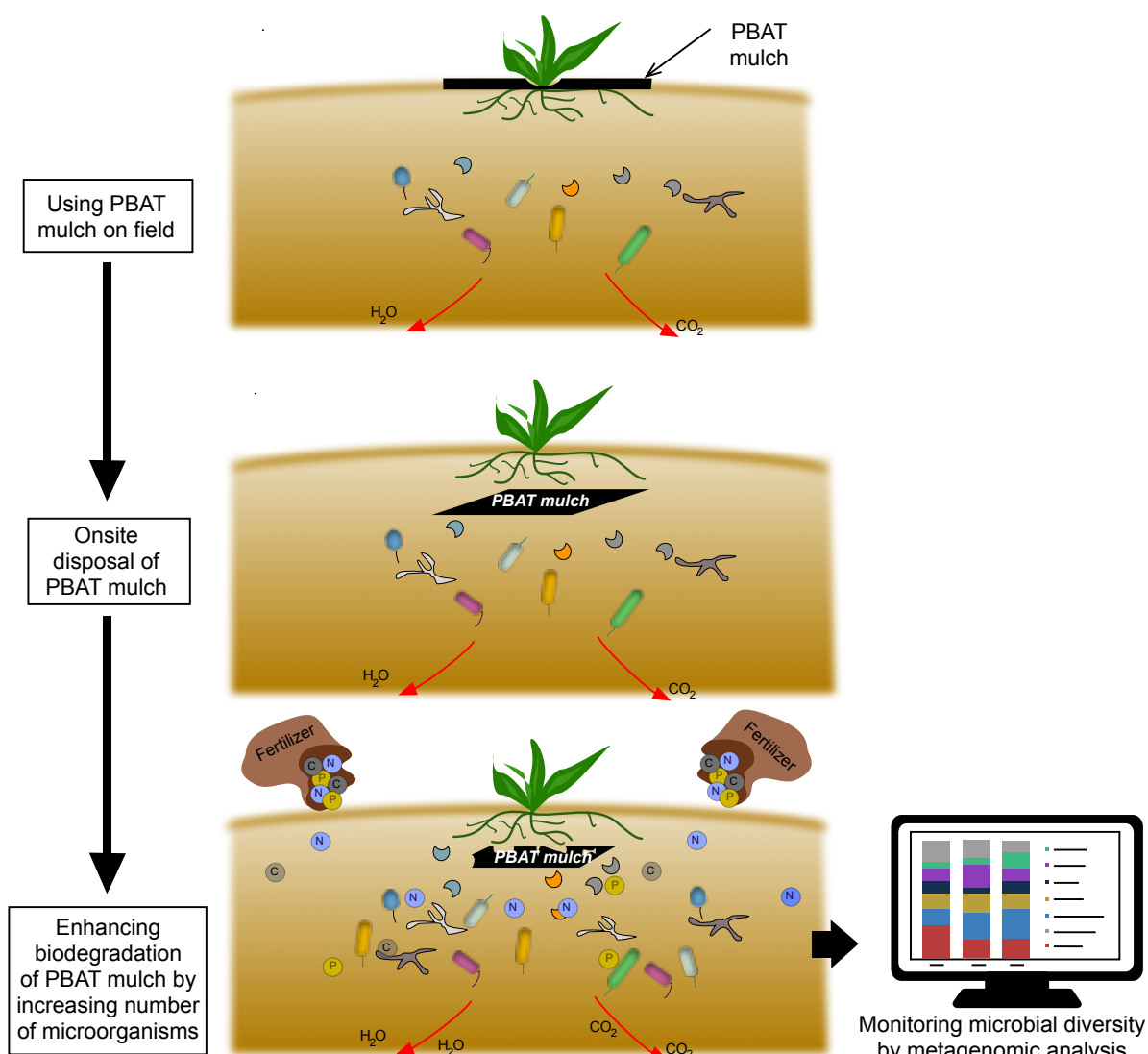


Fig. 31. A proposal of enhancing biodegradation of PBAT mulch by increasing number of microorganisms on a field.

参考文献

- [1] J.W. Courter, J.S. Vandemark, H.J. Hopen, Mulching vegetables: practices and commercial applications, 1009 (1969) p. 3.
- [2] S. Kasirajan, M. Ngouajio, Polyethylene and biodegradable mulches for agricultural applications: a review, *Agron. Sustain. Dev.* 32 (2012) 501–529.
- [3] W.J. Lamont, Plastic mulches for the production of vegetable crops, *Horttechnology* 3 (1993) 35–39.
- [4] W. Schnathorst, Reinfection possibilities for angular leaf spot pathogen in California cotton, *Calif. Agric.* 23 (1969) 17–18.
- [5] G. He, Z. Wang, S. Li, S.S. Malhi, Plastic mulch: Tradeoffs between productivity and greenhouse gas emissions, *J. Clean. Prod.* 172 (2018) 1311–1318.
- [6] 石本正一, 土壤環境調節資材—マルチ, 繊維学会誌, 49 (1993) 286–290.
- [7] D.J. Sarkar, M. Barman, M. De, D. Chatterjee, *Agriculture : Polymers in crop production mulch and fertilizer*, (2018) p. 1-2.
- [8] A. Ramakrishna, H.M. Tam, S.P. Wani, T.D. Long, Effect of mulch on soil temperature, moisture, weed infestation and yield of groundnut in northern Vietnam, *Field Crops Res.* 95 (2006) 115–125.
- [9] W. Zribi, R. Aragiés, E. Medina, J.M. Faci, Efficiency of inorganic and organic mulching materials for soil evaporation control, *Soil Tillage Res.* 148 (2015) 40–45.
- [10] G. Mahajan, R. Sharda, A. Kumar, K. G. Singh, Effect of plastic mulch on economizing irrigation water and weed control in baby corn sown by different methods., *Afr. J. Agr. Res.* 2 (2006) 19–26.
- [11] C. Miles, C., R. Wallace, A. Wszelaki, J. Martin, J. Cowan, T. Walters, D. Inglis, Deterioration of potentially biodegradable alternatives to black plastic mulch in three tomato production regions, *HortScience* 47 (2012) 1270–1277.
- [12] S. Kumar, P. Dey, Effects of different mulches and irrigation methods on root growth, nutrient uptake, water-use efficiency and yield of strawberry, *Sci. Hortic-Amsterdam* 127(2011) 318–324.
- [13] H. C. J. Godfray, J. R. Beddington, I. R. Crute, L. Haddad, D. Lawrence, J. F. Muir, J. Pretty, S. Robinson, S. M. Thomas, C. Toulmin, Food security: The challenge of the feeding 9 billion people, *Science* 327 (2010) 812–818.
- [14] F. Shah, W. Wu, Use of plastic mulch in agriculture and strategies to mitigate the associated environmental concerns, *Adv. Agron.* 164 (2020) 231–287.
- [15] H.R. Hard, M. Brusseau, M. Ramirez-Andreotta, Assessing the feasibility of using a closed landfill for agricultural graze land, *Environ. Monit. Assess.* 191 (2019) 458.
- [16] W.P. Linak, J. V. Ryan, E. Perry, R.W. Williams, D.M. DeMarini, Chemical and biological characterization of products of incomplete combustion from the simulated field burning of agricultural plastic, *JAPCA J. Air Waste Ma.* 39 (1989) 836–846.

- [17] 平成16年度 マーケティング調査支援事業成果報告書 <https://www.icon-nagano.or.jp/report/market/kiduki.pdf>.
- [18] J. Moore, A. Wszelaki, Plastic mulch in fruit and vegetable production: challenges for disposal, Washington State University Extension Fact Sheet , (2016), 1-4.
- [19] D. Briassoulis, E. Babou, M. Hiskakis, I. Kyrikou, Analysis of long-term degradation behaviour of polyethylene mulching films with pro-oxidants under real cultivation and soil burial conditions, *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 22 (2015) 2584–2598.
- [20] L. Ramos, G. Berenstein, E.A. Hughes, A. Zalts, J.M. Montserrat, Polyethylene film incorporation into the horticultural soil of small periurban production units in Argentina, *Sci. Total Environ.* 523 (2015) 74–81.
- [21] D. Zhang, H. B. Liu, W. L. Hu, X. H. Qin, X. W. Ma, C. R. Yan, H. Y. Wang, The status and distribution characteristics of residual mulching film in Xinjiang, China, *J. Integr. Agric.* 15 (2016) 2639–2646.
- [22] Y. Qi, N. Beriot, G. Gort, E. H. Lwanga, H. Gooren, X. Yang, V. Geissen, Impact of plastic mulch film debris on soil physicochemical and hydrological properties, *Environ. Pollut.*, 266 (2020) 115097.
- [23] L. Yuanqiao, Z. Caixia, Y. Changrong, M. Lili, L. Qi, L. Zhen, H. Wenqing, Effects of agricultural plastic film residues on transportation and distribution of water and nitrate in soil, *Chemosphere*, 242 (2020) 125131.
- [24] D. Hegan, L. Tong, H. Zhiquan, S. Qinming, L. Ru, Determining time limits of continuous film mulching and examining residual effects on cotton yield and soil properties, *J. Environ. Biol.*, 36 (2015) e677–e684.
- [25] E.K. Liu, W.Q. He, C.R. Yan, “White revolution” to “white pollution” –agricultural plastic film mulch in China, *Environ. Res. Lett.* 9 (2014) 091001.
- [26] Z. Steinmetz, C. Wollmann, M. Schaefer, C. Buchmann, J. David, J. Tröger, K. Muñoz, O. Frör, G.E. Schaumann, Plastic mulching in agriculture. Trading short-term agronomic benefits for long-term soil degradation?, *Sci. Total Environ.* 550 (2016) 690–705.
- [27] T. Kijchavengkul, R. Auras, M. Rubino, M. Ngouajio, R.T. Fernandez, Assessment of aliphatic–aromatic copolyester biodegradable mulch films. Part II: Laboratory simulated conditions, *Chemosphere* 71 (2008) 1607–1616.
- [28] A.P. Bilck, M.V.E. Grossmann, F. Yamashita, Biodegradable mulch films for strawberry production, *Polym. Test.* 29 (2010) 471–476.
- [29] T. Kijchavengkul, R. Auras, M. Rubino, M. Ngouajio, R.T. Fernandez, Assessment of aliphatic – aromatic copolyester biodegradable mulch films . Part I : Field study, *Chemosphere* 71 (2008) 942–953.
- [30] A. Rangarajan, B. Ingall, Biodegradable mulch product testing 2006, Department of horticulture, Cornell University, Ithaca, NY, USA, 2006.
- [31] 農林水産省 農業分野から排出されるプラスチック をめぐる情勢 平成31年2月,

- https://www.maff.go.jp/j/seisan/pura-jun/pdf/haipura_josei.pdf
- [32] 令和元年度 脱炭素社会を支えるプラスチック等資源循環システム構築実証事業 (2019), http://www.env.go.jp/recycle/R01_010_Mitsubishi.pdf
- [33] J. C. Huang, A.S. Shetty, M. S. Wang, Biodegradable plastics: A review, *Adv. Polym. Tech.* 10 (1990) 23–30.
- [34] G.Q. Chen, *Plastics completely synthesized by bacteria: polyhydroxyalkanoates*, *Plastics from bacteria*. Springer, Berlin, Heidelberg, (2010) 17–37.
- [35] K. Van De Velde, P. Kiekens, *Biopolymers: Overview of several properties and consequences on their applications*, *Polym. Test.* 21 (2002) 433–442.
- [36] Y. Tokiwa, T. Suzuki, Hydrolysis of copolyesters containing aromatic and aliphatic ester blocks by lipase, *J. Appl. Polym. Sci.* 26 (1981) 441–448.
- [37] R. Koshti, L. Mehta, N. Samarth, Biological recycling of polyethylene terephthalate: A mini-review, *J. Polym. Environ.* 26 (2018) 3520–3529.
- [38] U. Witt, R.J. Müller, W.D. Deckwer, New biodegradable polyester-copolymers from commodity chemicals with favorable use properties, *J. Environ. Polym. Degr.* 3 (1995) 215–223.
- [39] U. Witt, R.J. Müller, W.D. Deckwer, Biodegradation behavior and material properties of aliphatic/aromatic polyesters of commercial importance, *J. Environ. Polym. Degr.* 5 (1997) 81–89.
- [40] U. Witt, M. Yamamoto, U. Seeliger, R.J. Müller, V. Warzelhan, Biodegradable polymeric materials - Not the origin but the chemical structure determines biodegradability, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 38 (1999) 1438–1442.
- [41] BASF SE ホーム ページ , https://plastics-rubber.basf.com/global/en/performance_polymers/products/ecoflex.html.
- [42] European bioplastic home page , bioplastic market data, <https://www.european-bioplastics.org/market/>
- [43] Z. Gan, K. Kuwabara, M. Yamamoto, H. Abe, Y. Doi, Solid-state structures and thermal properties of aliphatic-aromatic poly(butylene adipate-*co*-butylene terephthalate) copolyesters, *Polym. Degrad. Stabil.* 83 (2004) 289–300.
- [44] A. Sangroniz, L. Sangroniz, N. Aranburu, M. Fernández, A. Santamaria, M. Iriarte, A. Etxeberria, Blends of biodegradable poly(butylene adipate-*co*-terephthalate) with poly(hydroxi amino ether) for packaging applications: Miscibility, rheology and transport properties, *Eur. Polym. J.*, 105 (2018) 348–358.
- [45] M. Yamamoto, U. Witt, G. Skupin, D. Beimborn, R.J. Müller, Biodegradable aliphatic-aromatic polyesters: “Ecoflex[®]”, *Biopolymer Online*, Weinheim, Germany, Part 4, 2005.
- [46] 日本バイオプラスチック協会, <http://www.jbpaweb.net/m-film/>.
- [47] D. Garlotta, A literature review of poly(lactic acid), *J. Polym. Environ.* 9 (2002) 63–84.
- [48] T. Fujimaki, Processability and properties of aliphatic polyesters, “BIONOLLE”, synthesized

- by polycondensation reaction, *Polym. Degrad. Stabil.* 59 (1998) 209–214.
- [49] Y. Ichikawa, T. Mizukoshi, Bionolle (polybutylenesuccinate), (2011) 285–313.
- [50] M. Labet, W. Thielemans, Synthesis of polycaprolactone: A review, *Chem. Soc. Rev.* 38 (2009) 3484–3504.
- [51] K. Sudesh, H. Abe, Y. Doi, Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: Biological polyesters, *Prog. Polym. Sci.* 25 (2000) 1503–1555.
- [52] 辻秀人, 生分解性高分子材料の科学 (2002) p.1, p.88–102.
- [53] K. Numata, H. Abe, T. Iwata, Biodegradability of poly(hydroxyalkanoate) materials, *Materials* 2 (2009) 1104–1126.
- [54] E. Marten, R.J. Müller, W.D. Deckwer, Studies on the enzymatic hydrolysis of polyesters. II. Aliphatic-aromatic copolyesters, *Polym. Degrad. Stabil.* 88 (2005) 371–381.
- [55] Z. Saadi, G. Cesar, H. Bewa, L. Benguigui, Fungal degradation of poly(butylene adipate-*co*-terephthalate) in soil and in compost, *J. Polym. Environ.* 21 (2013) 893–901.
- [56] P. Svoboda, M. Dvorackova, D. Svobodova, Influence of biodegradation on crystallization of poly (butylene adipate-*co*-terephthalate), *Polym. Adv. Technol.* 30 (2019) 552–562.
- [57] T. Kijchavengkul, R. Auras, M. Rubino, S. Selke, M. Ngouajio, R.T. Fernandez, Biodegradation and hydrolysis rate of aliphatic aromatic polyester, *Polym. Degrad. Stabil.* 95 (2010) 2641–2647.
- [58] T. Kijchavengkul, R. Auras, M. Rubino, E. Alvarado, J.R. Camacho Montero, J.M. Rosales, Atmospheric and soil degradation of aliphatic-aromatic polyester films, *Polym. Degrad. Stabil.* 95 (2010) 99–107.
- [59] G.X. De Hoe, M.T. Zumstein, G.J. Getzinger, I. Rügsegger, H.P.E. Kohler, M.A. Maurer-Jones, M. Sander, M.A. Hillmyer, K. McNeill, Photochemical transformation of poly(butylene adipate-*co*-terephthalate) and its effects on enzymatic hydrolyzability, *Environ. Sci. Technol.* 53 (2019) 2472–2481.
- [60] I. Kleeberg, C. Hetz, R.M. Kroppenstedt, R.J. Müller, W.D. Deckwer, Biodegradation of aliphatic-aromatic copolyesters by *Thermomonospora fusca* and other thermophilic compost isolates, *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (1998) 1731–1735.
- [61] U. Witt, T. Einig, M. Yamamoto, I. Kleeberg, W.D. Deckwer, R.J. Müller, Biodegradation of aliphatic–aromatic copolyesters: evaluation of the final biodegradability and ecotoxicological impact of degradation intermediates, *Chemosphere* 44 (2001) 289–299.
- [62] X. Hu, U. Thumarat, X. Zhang, M. Tang, F. Kawai, Diversity of polyester-degrading bacteria in compost and molecular analysis of a thermoactive esterase from *Thermobifida alba* AHK119, *Appl. Microbiol. Biot.* 87 (2010) 771–779.
- [63] D.M. Abou-Zeid, R.J. Müller, W.D. Deckwer, Biodegradation of aliphatic homopolyesters and aliphatic-aromatic copolyesters by anaerobic microorganisms, *Biomacromolecules* 5 (2004) 1687–1697.
- [64] D.M. Abou-Zeid, H. Biebl, C. Spröer, R.J. Müller, *Propionispora hippei* sp. nov., a novel Gram-positive, spore-forming anaerobe that produces propionic acid, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54

- (2004) 951–954.
- [65] V. Perz, A. Hromic, A. Baumschlager, G. Steinkellner, T. Pavkov-Keller, K. Gruber, K. Bleymaier, S. Zitzenbacher, A. Zankel, C. Mayrhofer, C. Sinkel, U. Kueper, K. Schlegel, D. Ribitsch, G.M. Guebitz, An esterase from anaerobic *Clostridium hathewayi* can hydrolyze aliphatic-aromatic polyesters, *Environ. Sci. Technol.* 50 (2016) 2899–2907.
- [66] 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 (2017) 11–22.
- [67] T. Nakajima-Kambe, F. Ichihashi, R. Matsuzoe, S. Kato, N. Shintani, Degradation of aliphatic-aromatic copolyesters by bacteria that can degrade aliphatic polyesters, *Polym. Degrad. Stabil.* 94 (2009) 1901–1905.
- [68] F. Trinh Tan, D.G. Cooper, M. Marić, J.A. Nicell, Biodegradation of a synthetic *co*-polyester by aerobic mesophilic microorganisms, *Polym. Degrad. Stabil.* 93 (2008) 1479–1485.
- [69] H. Jia, M. Zhang, Y. Weng, Y. Zhao, C. Li, A. Kanwal, Degradation of poly(butylene adipate-*co*-terephthalate) by *Stenotrophomonas* sp. YCJ1 isolated from farmland soil, *J. Environ. Sci.* 103 (2021) 50–58.
- [70] K. Kasuya, N. Ishii, Y. Inoue, K. Yazawa, T. Tagaya, T. Yotsumoto, J. Kazahaya, D. Nagai, Characterization of a mesophilic aliphatic–aromatic copolyester-degrading fungus, *Polym. Degrad. Stabil.* 94 (2009) 1190–1196.
- [71] M. Aarthy, P. Puhazhselvan, R. Aparna, A.S. George, M.K. Gowthaman, N. Ayyadurai, K. Masaki, T. Nakajima-Kambe, N.R. Kamini, Growth associated degradation of aliphatic-aromatic copolyesters by *Cryptococcus* sp. MTCC 5455, *Polym. Degrad. Stabil.* 152 (2018) 20–28.
- [72] H. Iefuji, Y. Iimura, T. Obata, Isolation and characterization of a yeast *Cryptococcus* sp. S-2 that produces raw starch-digesting α -amylase, xylanase, and polygalacturonase, *Biosci. Biotech. Bioch.* 58 (1994) 2261–2262.
- [73] T. Nakajima-Kambe, K. Toyoshima, C. Saito, H. Takaguchi, Y. Akutsu-Shigeno, M. Sato, K. Miyama, N. Nomura, H. Uchiyama, Rapid monomerization of poly(butylene succinate)-*co*-(butylene adipate) by *Leptothrix* sp., *J. Biosci. Bioeng.* 108 (2009) 513–516.
- [74] V. Perz, A. Baumschlager, K. Bleymaier, S. Zitzenbacher, A. Hromic, G. Steinkellner, A. Pairitsch, A. Łyskowski, K. Gruber, C. Sinkel, U. Küper, D. Ribitsch, G.M. Guebitz, Hydrolysis of synthetic polyesters by *Clostridium botulinum* esterases, *Biotechnol. Bioeng.* 113 (2016) 1024–1034.
- [75] P.W. Wallace, K. Haernvall, D. Ribitsch, S. Zitzenbacher, M. Schittmayer, G. Steinkellner, K. Gruber, G.M. Guebitz, R. Birner-Gruenberger, PpEst is a novel PBAT degrading polyesterase identified by proteomic screening of *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, *Appl. Microbiol. Biot.* 101 (2017) 2291–2303.
- [76] A. Biundo, A. Hromic, T. Pavkov-Keller, K. Gruber, F. Quartinello, K. Haernvall, V. Perz, M.S.

- Arrell, M. Zinn, D. Ribitsch, G.M. Guebitz, Characterization of a poly(butylene adipate-*co*-terephthalate)-hydrolyzing lipase from *Pelosinus fermentans*, *Appl. Microbiol. Biot.* 100 (2016) 1753–1764.
- [77] I. Kleeberg, K. Welzel, J. VandenHeuvel, R.J. Müller, W.D. Deckwer, Characterization of a new extracellular hydrolase from *Thermobifida fusca* degrading aliphatic-aromatic copolyesters, *Biomacromolecules* 6 (2005) 262–270.
- [78] 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, *N. Biotechnol.* 33 (2016) 295–304.
- [79] F. Kawai, M. Oda, T. Tamashiro, T. Waku, N. Tanaka, M. Yamamoto, H. Mizushima, T. Miyakawa, M. Tanokura, A novel Ca²⁺-activated, thermostabilized polyesterase capable of hydrolyzing polyethylene terephthalate from *Saccharomonospora viridis* AHK190, *Appl. Microbiol. Biot.* 98 (2014) 10053–10064.
- [80] M.T. Zumstein, D. Rechsteiner, N. Roduner, V. Perz, D. Ribitsch, G.M. Guebitz, H.P.E. Kohler, K. McNeill, M. Sander, Enzymatic hydrolysis of polyester thin films at the nanoscale: effects of polyester structure and enzyme active-site accessibility, *Environ. Sci. Technol.* 51 (2017) 7476–7485.
- [81] U. Thumarat, R. Nakamura, T. Kawabata, H. Suzuki, F. Kawai, Biochemical and genetic analysis of a cutinase-type polyesterase from a thermophilic *Thermobifida alba* AHK119, *Appl. Microbiol. Biot.* 95 (2012) 419–430.
- [82] K. Suzuki, M.T. Noguchi, Y. Shinozaki, M. Koitabashi, Y. Sameshima-Yamashita, S. Yoshida, T. Fujii, 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. Biot.* 98 (2014) 4457–4465.
- [83] T. Watanabe, K. Suzuki, Y. Shinozaki, T. Yarimizu, S. Yoshida, Y. Sameshima-Yamashita, M. Koitabashi, H.K. Kitamoto, A UV-induced mutant of *Cryptococcus flavus* GB-1 with increased production of a biodegradable plastic-degrading enzyme, *Process Biochem.* 50 (2015) 1718–1724.
- [84] N. Sinsereekul, T. Wangkam, A. Thamchaipenet, T. Sriksirin, L. Eurwilaichitr, V. Champreda, Recombinant expression of BTA hydrolase in *Streptomyces rimosus* and catalytic analysis on polyesters by surface plasmon resonance, *Appl. Microbiol. Biot.* 86 (2010) 1775–1784.
- [85] P.E. Kolattukudy, Biopolyester membranes of plants: Cutin and suberin, *Science* 208 (1980) 990–1000.
- [86] U. Thumarat, T. Kawabata, M. Nakajima, H. Nakajima, A. Sugiyama, K. Yazaki, T. Tada, T. Waku, N. Tanaka, F. Kawai, Comparison of genetic structures and biochemical properties of tandem cutinase-type polyesterases from *Thermobifida alba* AHK119, *J. Biosci. Bioeng.* 120 (2015) 491–497.
- [87] K. Kitadokoro, U. Thumarat, R. Nakamura, K. Nishimura, H. Karatani, H. Suzuki, 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 (2012) 771–775.
- [88] F. Kawai, T. Kawabata, M. Oda, Current state and perspectives related to the polyethylene terephthalate hydrolases available for biorecycling, *ACS Sustain. Chem. Eng.* 8 (2020) 8894–8908.
- [89] A. Pellis, V. Ferrario, B. Zartl, M. Brandauer, C. Gamerith, E. Herrero Acero, C. Ebert, L. Gardossi, G.M. Guebitz, Enlarging the tools for efficient enzymatic polycondensation: Structural and catalytic features of cutinase 1 from *Thermobifida cellulositytica*, *Cat. Sci. Tec.* 6 (2016) 3430–3442.
- [90] N. Numoto, N. Kamiya, G.J. Bekker, Y. Yamagami, S. Inaba, K. Ishii, S. Uchiyama, F. Kawai, N. Ito, M. Oda, Structural dynamics of the PET-degrading cutinase-like enzyme from *Saccharomonospora viridis* AHK190 in substrate-bound states elucidates the Ca²⁺-driven catalytic cycle, *Biochemistry* 57 (2018) 5289–5300.
- [91] D. Kold, Z. Dauter, A.K. Laustsen, A.M. Brzozowski, J.P. Turkenburg, A.D. Nielsen, H. Koldsø, E. Petersen, B. Schiøtt, L. De Maria, K.S. Wilson, A. Svendsen, R. Wimmer, Thermodynamic and structural investigation of the specific SDS binding of *Humicola insolens* cutinase, *Protein Sci.* 23 (2014) 1023–1035.
- [92] S. Longhi, M. Czjzek, V. Lamzin, A. Nicolas, C. Cambillau, Atomic resolution (1.0 Å) crystal structure of *Fusarium solani* cutinase: Stereochemical analysis, *J. Mol. Biol.* 268 (1997) 779–799.
- [93] M. Goodfellow, Reclassification of *Corynebacterium fascians* (Tilford) Dowson in the Genus *Rhodococcus*, as *Rhodococcus fascians* comb. nov., *Syst. Appl. Microbiol.* 5 (1984) 225–229.
- [94] P. E. Tilford, Fasciation of sweet peas caused by *Phytomonas fascians* n. sp., *J. Agric. Res.* 53 (1936) 383–394.
- [95] K. S. Bell, J. C. Philp, D. W. Aw, N. Christofi, N.. The genus *Rhodococcus*, *J. Appl. Microbiol.* 85(1998), 195-210..
- [96] K. Goethals, D. Vereecke, M. Jaziri, M. Van Montagu, M. Holsters, Leafy gall formation by *Rhodococcus fascians*, *Annu. Rev. Phytopathol.* 39 (2001) 27–52.
- [97] P.E. Jameson, Virulent *Rhodococcus fascians* produce unique methylated cytokinins, *Plants* 8 (2019) 10–13.
- [98] E. Stes, I. Francis, I. Pertry, A. Dolzblasz, S. Depuydt, D. Vereecke, The leafy gall syndrome induced by *Rhodococcus fascians*, *FEMS Microbiol. Lett.* 342 (2013) 187–194.
- [99] M. Naseem, M. Wölfling, T. Dandekar, Cytokinins for immunity beyond growth, galls and green islands, *Trends Plant Sci.* 19 (2014) 481–484.
- [100] M. Crespi, E. Messens, A.B. Caplan, M. Van Montagu, J. Desomer, Fasciation induction by the phytopathogen *Rhodococcus fascians* depends upon a linear plasmid encoding a cytokinin synthase gene, *EMBO J.* 11 (1992) 795–804.
- [101] I. Francis, A. De Keyser, P. De Backer, C. Simón-Mateo, J. Kalkus, I. Pertry, W. Ardiles-Diaz,

- R. De Rycke, O.M. Vandeputte, M. El Jaziri, M. Holsters, D. Vereecke, pFiD188, the linear virulence plasmid of *Rhodococcus fascians* D188, *Mol. Plant Microbe In.* 25 (2012) 637–647.
- [102] I.M. Francis, E. Stes, Y. Zhang, D. Rangel, K. Audenaert, D. Vereecke, Mining the genome of *Rhodococcus fascians*, a plant growth-promoting bacterium gone astray, *N. Biotechnol.* 33 (2016) 706–717.
- [103] A.L. Creason, O.M. Vandeputte, E.A. Savory, E.W. Davis, M.L. Putnam, E. Hu, D. Swader-Hines, A. Mol, M. Baucher, E. Prinsen, M. Zdanowska, S.A. Givan, M. El Jaziri, J.E. Loper, T. Mahmud, J.H. Chang, Analysis of genome sequences from plant pathogenic *Rhodococcus* reveals genetic novelties in virulence loci, *Plos One* 9 (2014) e101996.
- [104] C.H. Kim, D.W. Lee, Y.M. Heo, H. Lee, Y. Yoo, G.H. Kim, J.J. Kim, Desorption and solubilization of anthracene by a rhamnolipid biosurfactant from *Rhodococcus fascians*, *Water Environ. Res.* 91 (2019) 739–747.
- [105] S.S.M. Puri, Munish, Lakhwinder Kaur, Partial purification and characterization of limonate dehydrogenase from *Rhodococcus fascians* for the degradation of limonin, *J. Microbiol. Biotechn.* 12 (2002) 663–673.
- [106] G. Zhao, C. Yang, B. Li, W. Xia, A new phenylethyl alkyl amide from the *Ambrostoma quadriimpressum* Motschulsky, *Beilstein J. Org. Chem.* 7 (2011) 1342–1346.
- [107] G. Sezonov, D. Joseleau-Petit, R. D’Ari, *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth, *J. Bacteriol.* 189 (2007) 8746–8749.
- [108] N. Ishii, N.Y. Inoue, K. I. Shimada, Y. Tezuka, H. Mitomo, K. Kasuya, Fungal degradation of poly (ethylene succinate), *Polym. Degrad. Stabil.* 92 (2007) 44–52.
- [109] K. Wilson, Preparation of genomic DNA from bacteria, *Curr. Protoc. Mol. Biol.*, 56 (2001) 2–4.
- [110] Y. Tezuka, N. Ishii, K. Kasuya, H. Mitomo, Degradation of poly(ethylene succinate) by mesophilic bacteria, *Polym. Degrad. Stabil.* 84 (2004) 115–121.
- [111] N. Saitou, Nei, M. Nei, The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees, *Mol. Biol. Evol.* 4 (1987) 406–425.
- [112] S. Kumar, G. Stecher, K. Tamura, MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets, *Mol. Biol. Evol.* 33 (2016) 1870–1874.
- [113] M.F. Fernandes, Fatty acid profiling of soil microbial communities: A comparison of extraction methods and temporal dynamics in plant amended, Chapter 1 (2006) 5–36.
- [114] M. Mesbah, U. Premachadran, W.B. Whitman, Precise measurement of the G+C content of deoxyribonucleic acid by high-performance liquid chromatography, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39 (1989) 159–167.
- [115] K. Kasuya, K. Takagi, S.I. Ishiwatari, Y. Yoshida, Y. Doi, Biodegradabilities of various aliphatic polyesters in natural waters, *Polym. Degrad. Stabil.* 59 (1998) 327–332.
- [116] M. Suzuki, Y. Tachibana, K. Oba, R. Takizawa, K. Kasuya, Microbial degradation of poly(ϵ -caprolactone) in a coastal environment, *Polym. Degrad. Stabil.* 149 (2018) 1–8.
- [117] H. Schägger, Tricine–SDS–PAGE, *Nat. Protoc.* 1 (2006) 16–22.

- [118] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680–685.
- [119] A.M. Bolger, M. Lohse, B. Usadel, Trimmomatic: A flexible trimmer for illumina sequence data, *Bioinformatics* 30 (2014) 2114–2120.
- [120] A. Bankevich, S. Nurk, D. Antipov, A.A. Gurevich, M. Dvorkin, A.S. Kulikov, V.M. Lesin, S.I. Nikolenko, S. Pham, A.D. Prjibelski, A. V. Pyshkin, A. V. Sirotkin, N. Vyahhi, G. Tesler, M.A. Alekseyev, P.A. Pevzner, SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing, *J. Comput. Biol.* 19 (2012) 455–477.
- [121] C. Jain, L.M. Rodriguez-R, A.M. Phillippy, K.T. Konstantinidis, S. Aluru, High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries, *Nat. Commun.* 9 (2018) 1–8.
- [122] T. Seemann, Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation, *Bioinformatics* 30 (2014) 2068–2069.
- [123] V. Gesheva, Production of antibiotics and enzymes by soil microorganisms from the windmill islands region, Wilkes Land, East Antarctica, *Polar Biol.* 33 (2010) 1351–1357.
- [124] R. Boden, E. Thomas, P. Savani, D.P. Kelly, A.P. Wood, Novel methylotrophic bacteria isolated from the River Thames (London, UK), *Environ. Microbiol.* 10 (2008) 3225–3236.
- [125] L. Martínková, B. Uhnáková, M. Pátek, J. Nešvera, V. Křen, Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus*, *Environ. Int.* 35 (2009) 162–177.
- [126] A.K. Bej, D. Saul, J. Aislabie, Cold-tolerant alkane-degrading *Rhodococcus* species from Antarctica, *Polar Biol.* 23 (2000) 100–105.
- [127] A.K. Urbanek, W. Rymowicz, M.C. Strzelecki, W. Kociuba, Ł. Franczak, A.M. Mirończuk, Isolation and characterization of Arctic microorganisms decomposing bioplastics, *AMB Express* 7 (2017) 1–10.
- [128] Z. Gan, D. Yu, Z. Zhong, Q. Liang, X. Jing, Enzymatic degradation of poly(ϵ -caprolactone)/poly(DL-lactide) blends in phosphate buffer solution, *Polymer* 40 (1999) 2859–2862.
- [129] C. Gamerith, M. Vastano, S.M. Ghorbanpour, S. Zitzenbacher, D. Ribitsch, M.T. Zumstein, M. Sander, E.H. Acero, A. Pellis, G.M. Guebitz, Enzymatic degradation of aromatic and aliphatic polyesters by *P. pastoris* expressed cutinase 1 from *Thermobifida cellulosilytica*, *Front. Microbiol.* 8 (2017) 938.
- [130] 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 (2016) 338–346.
- [131] J.E. Johnson, X-ray diffraction studies of the crystallinity in polyethylene terephthalate, *J. Appl. Polym. Sci.* 2 (1959) 205–209.
- [132] A. Wlochowicz, A. Jeziorny, Determination of crystallinity in polyester fibers by X-Ray methods, *J. Polym. Sci. A2* 10 (1972) 1407–1414.

- [133] L. Ge, P. Rudolph, Simultaneous introduction of multiple mutations using overlap extension PCR, *Biotechniques* 22 (1997) 28–30.
- [134] 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 (1976) 248–254.
- [135] H. Inoue, H. Nojima, H. Okayama, High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96 (1990) 23–28.
- [136] A. Waterhouse, M. Bertoni, S. Bienert, G. Studer, G. Tauriello, R. Gumienny, F.T. Heer, T.A.P. De Beer, C. Rempfer, L. Bordoli, R. Lepore, T. Schwede, SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes, *Nucleic Acids Res.* 46 (2018) W296–W303.
- [137] A. Roussel, S. Amara, A. Nyssölä, E. Mateos-Diaz, S. Blangy, H. Kontkanen, A. Westerholm-Parvinen, F. Carrière, C. Cambillau, A cutinase from *Trichoderma reesei* with a lid-covered active site and kinetic properties of true lipases, *J. Mol. Biol.* 426 (2014) 3757–3772.
- [138] A. Grosdidier, V. Zoete, O. Michielin, SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADock DSS, *Nucleic Acids Res.* 39 (2011) 270–277.
- [139] S. Chen, X. Tong, R.W. Woodard, G. Du, J. Wu, J. Chen, Identification and characterization of bacterial cutinase, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 25854–25862.
- [140] M. Miyagi, F. Sakiyama, I. Kato, S. Tsunasawa, Complete covalent structure of porcine liver acylamino acid-releasing enzyme and identification of its active site serine residue, *J. Biochem.* 118 (1995) 771–779.
- [141] F.I. Khan, D. Lan, R. Durrani, W. Huan, Z. Zhao, Y. Wang, The lid domain in lipases: Structural and functional determinant of enzymatic properties, *Front. Bioeng. Biotechnol.* 5 (2017) 16.
- [142] S. Chen, L. Su, J. Chen, J. Wu, Cutinase: Characteristics, preparation, and application, *Biotechnol. Adv.* 31 (2013) 1754–1767.
- [143] B.C. Knott, E. Erickson, M.D. Allen, J.E. Gado, R. Graham, F.L. Kearns, I. Pardo, E. Topuzlu, J.J. Anderson, H.P. Austin, G. Dominick, C.W. Johnson, N.A. Rorrer, C.J. Szostkiewicz, V. Copié, C.M. Payne, H.L. Woodcock, B.S. Donohoe, G.T. Beckham, J.E. McGeehan, Characterization and engineering of a two-enzyme system for plastics depolymerization., *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 117 (2020) 25476–25485.
- [144] F. Kovacic, N. Babic, U. Krauss, K.-E. Jaeger, Classification of lipolytic enzymes from bacteria, Aerobic utilization of hydrocarbons, oils and lipids, Chapter 14, 2019, 3.
- [145] C. Ruiz, F.I.J. Pastor, P. Diaz, Isolation and characterization of *Bacillus* sp. BP-6 LipA, a ubiquitous lipase among mesophilic *Bacillus* species, *Lett. Appl. Microbiol.* 37 (2003) 354–359.
- [146] G. M. Whitesides, J. E. Lilburn, R. P. Szajewski, Rates of thiol-disulfide interchange reactions between mono- and dithiols and Ellman's reagent, *J. Org. Chem.*, 42 (2002) 332–338.
- [147] S. Joo, I.J. Cho, H. Seo, H.F. Son, H.Y. Sagong, T.J. Shin, S.Y. Choi, S.Y. Lee, K.J. Kim, Structural insight into molecular mechanism of poly(ethylene terephthalate) degradation, *Nat. Commun.* 9 (2018) 1–12.
- [148] J. Then, R. Wei, T. Oeser, A. Gerdt, J. Schmidt, M. Barth, W. Zimmermann, A disulfide bridge

- in the calcium binding site of a polyester hydrolase increases its thermal stability and activity against polyethylene terephthalate, *FEBS Open Bio* 6 (2016) 425–432.
- [149] I. Taniguchi, S. Yoshida, K. Hiraga, K. Miyamoto, Y. Kimura, K. Oda, Biodegradation of PET: current status and application aspects, *ACS Catal.* 9 (2019) 4089–4105.
- [150] Å.M. Ronkvist, W. Xie, W. Lu, R.A. Gross, Cutinase-catalyzed hydrolysis of poly(ethylene terephthalate), *Macromolecules* 42 (2009) 5128–5138.
- [151] S. Yoshida, K. Hiraga, T. Takehana, I. Taniguchi, H. Yamaji, Y. Maeda, K. Toyohara, K. Miyamoto, Y. Kimura, K. Oda, A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate), *Science* 351 (2016) 1196–1199.
- [152] F. Kawai, T. Kawabata, M. Oda, Current knowledge on enzymatic PET degradation and its possible application to waste stream management and other fields, *Appl. Microbiol. Biot.* 103 (2019) 4253–4268.
- [153] C.M.L. Carvalho, M.R. Aires-Barros, J.M.S. Cabral, Cutinase: From molecular level to bioprocess development, *Biotechnol. Bioeng.* 66 (1999) 17–34.

業績目録

関連論文

第 2 章 好気性中温性アクチノバクテリア *Rhodococcus fascians* による脂肪族芳香族ポリエステル分解

Phouvilay Soulethone, Yuya Tachibana, Fumihiro Muroi, Miwa Suzuki, Nariaki Ishii, Yukari Ohta, Ken-ichi Kasuya, Characterization of a mesophilic actinobacteria that degrades poly (butylene adipate-co-terephthalate), Polym. Degrad. Stabil. 181 (2020) 109335.

第 3 章 *Rhodococcus fascians* NKCM2511 株由来 PBAT 分解酵素の特徴づけ

Phouvilay Soulethone, Yuya Tachibana, Miwa Suzuki, Tsukasa Mizuno, Yukari Ohta, Ken-ichi Kasuya, Characterization of a poly(butylene adipate-co-terephthalate) hydrolase from the mesophilic actinobacteria *Rhodococcus fascians*, Polym. Degrad. Stabil. (2021) 109481.

参考文献

Fumihiro Muroi, Yuya Tachibana, Phouvilay Soulethone, Kiriko Yamamoto, Tsukasa Mizuno, Takanori Sakurai, Yukiko Kobayashi, Ken-ichi Kasuya, Characterization of a poly (butylene adipate-co-terephthalate) hydrolase from the aerobic mesophilic bacterium *Bacillus pumilus*, Polym. Degrad. Stabil. 137 (2017) 11-22.

Yohko Tachibana, Senri Hayashi, Miwa Suzuki, Phouvilay Soulethone, Yuya Tachibana, Ken-ichi Kasuya, Identification of *Cellulosimicrobium* sp., a poly(3-hydroxybutyrate)-degrading bacterium isolated from washed rind cheese, Pont-l'évêque lait cru, J. Polym. Res. 24 (2017) 1-9.

謝辞

本学位論文の作成にあたり、熱心にご指導頂きました、群馬大学学術研究院、粕谷健一教授に、ここに深謝の意を表するとともに、心より感謝申し上げます。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、若松馨教授、同、山延健教授、同、浅川直紀教授、同、大嶋孝之教授に心より感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、化学合成や分析に関する実験を懇切丁寧にご指導頂きました群馬大学学術研究院、橘熊野准教授、同、大田ゆかり講師に感謝申し上げます。また、材料物性に関わる実験において、有益なご助言ご協力を頂きました群馬大学学術研究院、武野宏之准教授に心から感謝申し上げます。本論文の執筆にあたり多大なご指導頂きました群馬大学食健康科学教育研究センター、鈴木美和助教に心より感謝申し上げます。

また、本研究の遂行にあたり、分析業務で協力いただきました群馬大学食健康科学教育研究センター、清水若奈氏に心より感謝を申しあげます。本研究の遂行にあたり、実験のご指導を頂きました筒馬豊和博士に心より感謝申し上げます。

研究のご指導とご協力を頂き、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感謝申し上げます。特に、本研究を遂行するにあたり、実験のご協力を頂きました先輩方、室井文篤博士、石井成明博士、林千里博士および水野司氏に心より感謝申し上げます。

日本へ留学する機会を頂き、経済的に支えて下さった日本文部科学省に感謝を申しあげます。また、大学院で生活を送るのにあたり、経済的にも精神的にも支えて下さった、ロータリー米山記念奨学会、辻国際奨学財団、岩谷直治記念財団に心から感謝申しあげます。

最後に、生活を支えてくれた両親や、いつも暖かい励ましをいつも送り続けてくれたラオスの家族全員に心より感謝申しあげます。