

生分解性ポリアミド(PA)分解酵素研究による 環境中のPA生分解機構解明

岩手大学 農学部 生命科学科 山田 美和

はじめに

軽くて丈夫なプラスチック製品の普及は、我々の生活を豊かとした。しかし、その丈夫さが原因となり、廃棄プラスチックの環境中における蓄積が深刻な問題を引き起こしている。この問題の解決策として、環境中で速やかに生分解されるプラスチックの開発が盛んに行われている。我々は、生分解性ポリアミドであるポリアミド4(PA4)に着目した。PA4は、広く利用されている難生分解性プラスチックのナイロン6と化学構造が類似するにも関わらず陸海の両環境で良好な生分解性を示し、バイオマスを原料とできるバイオプラスチックでもあることから、PA4の実用化が強く期待されている。しかし、環境中からPA4分解酵素が特定された例はこれまでになかった。そこで、本研究では、陸海の両環境から新たなPA4分解菌の単離と世界初のPA4分解酵素の特定・諸性質解明を試みた。

自然界からのPA4分解菌の探索

多数の土壌サンプルや、PA4フィルムを実海域へ浸漬し回収したフィルムの表面から、PA4粉含有寒天培地でのクリアゾーン形成能力を指標としてPA4分解菌の単離を試みた。その結果、陸海の両環境から複数のPA4分解菌を単離することに成功した^(1, 2)。これまでPA4分解能力を有する海洋細菌は1種しか報告されていなかったが⁽³⁾、本研究では海からPA4分解菌を新たに14種単離することに成功した⁽⁴⁾。また、単離したPA4分解菌の培養液上清をそれぞれ、PA4含有ゲルによるザイモグラフィー分析に供し、各菌から分泌されるPA4分解酵素の構造を比較した。その結果、異なる位置にバンドが確認され、海洋環境のPA4分解菌が産生するPA4分解酵素の構造には多様性があることを示した。

世界初となるPA4分解酵素の特定とその諸性質解明

酵素の精製法を検討し、土壌より単離した *Pseudoxanthomonas* sp. TN-Nと、海洋より単離した *Pseudoalteromonas* sp. Y-5の培養液からPA4分解酵素の精製に成功した^(1, 2)。さらに、両酵素はPA4のアミド結合を加水分解してγ-アミノ酪酸(GABA)オリゴマー(2~4量体)へと分解するエンド型の分解酵素であることを明らかとした(図)。これらの酵素は、PA4分解酵素を世界で初めて特定した報告であったが、さらに詳しく調べていくと興味深いことが明らかとなった。両酵素の全アミノ酸配列を比較すると、海と陸由来のPA4分解酵素間のアミノ酸配列は非常に類似していたが、両酵素のアミノ酸配列は、データベース上の既知酵素のアミノ酸配列と比較すると相同性が高いものがほとんどなく、PA4分解酵素は新規酵素であると示唆された。そこで、両酵素のアミノ酸配列をAlphaFold2に供して立体構造を予測したところ、本酵素はPA4と結合する基質結合ドメインと、PA4を加水分解する触媒ドメインを持つと推定され、これらのドメインを利用してPA4を酵素分解していると示唆された。

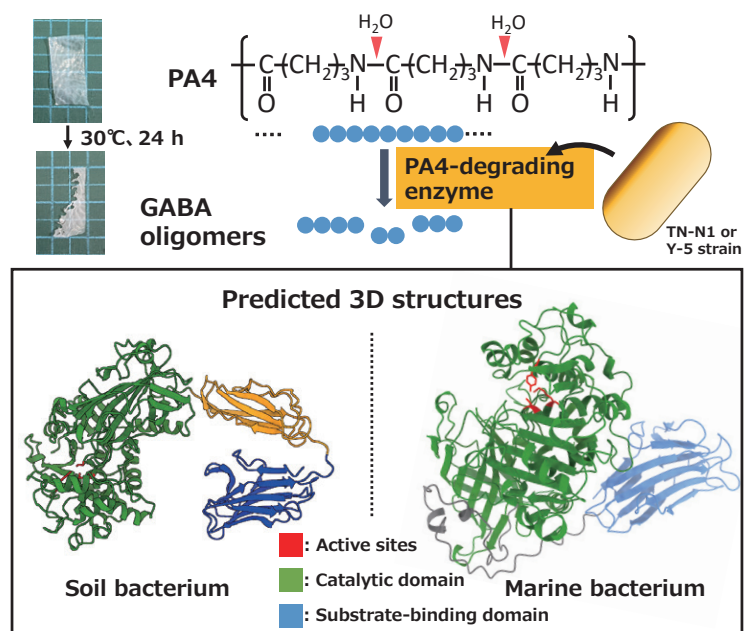


図. 発見した世界初の陸・海由来PA4分解酵素

今後の展望

今後は、我々が見出した陸海由来のPA4分解酵素の立体構造を解明し、基質との結合様式を追求することで、酵素によるPA4分解機構を詳細に解析したい。また、新たなPA4分解酵素の探索を進めると共に、PA4分解酵素のホモログが環境中にどの程度広く分布しているかを調査し、各環境中におけるPA4生分解の予測シミュレーション等への貢献を目指す。さらに、環境中にPA4が存在しないにも関わらず、PA4分解酵素が存在している意味(PA4分解酵素は環境中ではどんな役割を持っているのか?)についても迫りたい。

謝辞

本研究は、岩手大学で行われました。研究の遂行には、山下哲郎教授(岩手大学)、阿部英喜博士(理化学研究所)、加藤太一郎教授(鹿児島大学)、本田正義講師(東京大学)、外村彩夏講師(東海大学)をはじめとして多くの研究者の皆様、岩手大学農学部応用微生物学研究室の学生の皆様、スタッフの皆様に多大なるご支援・ご協力を賜りました。心より感謝申し上げます。そして、自然界から微生物を探求することの楽しさを教えてくださった、磯部公安名誉教授(岩手大学)にこの場をお借りして深く感謝申し上げます。

参考文献

1. Sasanami, Y. et al., (2022) Polymer Degradation and Stability, Vol. 197: 109868-109868
2. Saito, Y. et al., (2023) Polymer Degradation and Stability, Vol. 215,110446-110446
3. Yamano, N. et al., (2019) Polymer Degradation and Stability, Vol. 166, 230-236
4. Saito, Y. et al., (2024) The Journal of General and Applied Microbiology, Vol. 70: 136-140

略歴

- 2008年 4月 日本学術振興会特別研究員(DC2)
- 2010年 3月 北海道大学大学院工学研究科生物機能高分子専攻 博士課程 修了
- 2010年 4月 独立行政法人理化学研究所バイオマス工学研究プログラム 特別研究員
- 2011年10月 岩手大学農学部 助教
- 2015年10月 岩手大学農学部 准教授
- 2023年 5月 岩手大学農学部 教授(現在に至る)
- 2026年 4月 岩手大学 副学長(現在に至る)

Elucidation of the mechanism of polyamide (PA) biodegradation in the environment through research on biodegradable PA-degrading enzymes

Miwa Yamada, Faculty of Agriculture, Iwate University

Introduction

The accumulation of plastic waste in the environment has become a serious problem. To address this issue, there is active research into the development of biodegradable plastics. We focused on polyamide 4 (PA4) that exhibits good biodegradability in both terrestrial and marine environments. However, no PA4-degrading enzymes had been identified from the environments until now. In this study, we attempted to isolate new PA4-degrading bacteria from both terrestrial and marine environments and to identify and characterize the PA4-degrading enzymes.

Screening for PA4-degrading bacteria in the natural environments

From soil samples and PA4 films immersed in the sea, we succeeded in isolating multiple PA4-degrading bacteria using the ability to form clear zones on agar plate media containing PA4 powder^(1,2). Furthermore, the cultivation solutions of the PA4-degrading bacteria isolated from marine environment were subjected to zymography analysis using a gel containing PA4⁽³⁾. As a result, bands indicating PA4-degrading enzyme were found at different positions in the gel, which suggests that structural diversity of the PA4-degrading enzymes in the marine environment.

Identification of the first PA4-degrading enzymes and investigation of their properties

We constructed a purification method for the PA4-degrading enzymes from the cultivation solutions of *Pseudoxanthomonas* sp. TN-N isolated from soil, and *Pseudoalteromonas* sp. Y-5 isolated from the sea^(1,2). Furthermore, we demonstrated that both enzymes are endo-type depolymerases that hydrolyze the amide bonds of PA4 into γ -aminobutyric acid (GABA) oligomers (2–4-mers) (Figure). In addition, a comparison of the full amino acid sequences of the two enzymes revealed that the sequences of the terrestrial and marine PA4-degrading enzymes were highly similar. However, these sequences showed low homology compared to the amino acid sequences of known enzymes in databases, indicating that the PA4-degrading enzymes are novel enzymes. The predicted three-dimensional (3D) structures suggested that the PA4-degrading enzymes possess substrate-binding domain and catalytic domain.

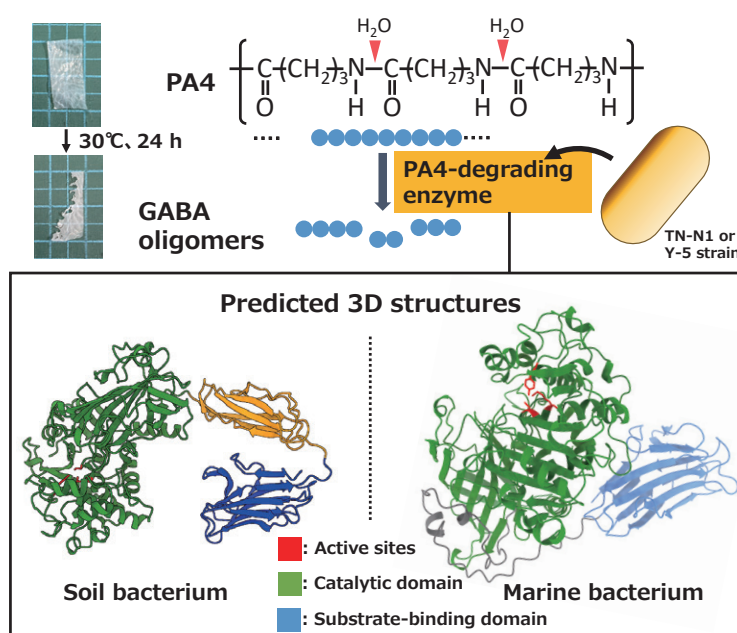


Figure. The PA4-degrading enzymes from terrestrial and marine bacteria

Prospectives

In our future work, to conduct a detailed analysis of the enzymatic mechanism underlying PA4 degradation, we are aiming to elucidate the 3D structures of the terrestrial and marine PA4-degrading enzymes. Furthermore, we are continuing to screen new PA4-degrading enzymes and investigate the distribution of the PA4-degrading enzymes in the natural environment. We also intend to explore the role of PA4-degrading enzymes in the natural environment.

Acknowledgements

This research was conducted at Iwate University. I sincerely thank many researchers such as Professor Tetsuro Yamashita (Iwate University), Dr. Hideki Abe (RIKEN), Professor Dai-ichiro Kato (Kagoshima University), Dr. Masayoshi Honda (Tokyo University), Dr. Ayaka Hokamura (Tokai University) and so on, as well as from the students and staff of the Laboratory of Applied Microbiology, Iwate University for tremendous support and cooperation. I would also like to express my deepest gratitude to Professor Emeritus Kimiyasu Isobe (Iwate University).

References

1. Sasanami, Y. et al., (2022) *Polymer Degradation and Stability*, Vol. 197: 109868-109868
2. Saito, Y. et al., (2023) *Polymer Degradation and Stability*, Vol. 215, 110446-110446
3. Saito, Y. et al., (2024) *The Journal of General and Applied Microbiology*, Vol. 70: 136-140

Brief Biography

April	2008	Research Fellow (DC2), Japan Society for the Promotion of Science
March	2010	Ph.D. in Faculty of Engineering, Hokkaido University
April	2010	Research Fellow, Biomass Engineering Research Program, RIKEN
October	2011	Assistant Professor, Faculty of Agriculture, Iwate University
October	2015	Associate Professor, Faculty of Agriculture, Iwate University
May	2023-	Professor, Faculty of Agriculture, Iwate University
April	2026-	Vice Dean, Iwate University