

## エステラーゼ産生細菌の単離

岡南 政宏<sup>1</sup>、大池 達矢<sup>1</sup>、江邊 正平<sup>1</sup>、阿野 貴司<sup>1</sup>

### 要旨

生分解性プラスチックの効率的な分解を目指して、ポリエステル系生分解性プラスチック分解菌の単離を試みた。植物葉表面、土壌、自然水などから得られた微生物群を、生分解性プラスチックフィルムの分解を指標としてスクリーニングした結果、プラスチックフィルムを分解できる微生物群がいくつか得られた。それらの中で最も分解能力が高い微生物群 YH の中から、最も高いエステラーゼ活性を示す 4A 株を単離した。16S rRNA 遺伝子の塩基配列や抗生物質への耐性とグラム染色の結果から、4A 株は *Stenotrophomonas maltophilia* と判断された。4A 株が産生するエステラーゼは、60℃の熱処理後でも比較的高い活性を維持した。したがって、4A 株は生分解性プラスチックの効率的な分解に有用なエステラーゼをコードする遺伝子を持っている可能性が高い。

キーワード：生分解性プラスチック、生分解性プラスチック分解菌、エステラーゼ、*Stenotrophomonas maltophilia*

### 1. 結論

科学技術の進歩によって幾種類もの合成プラスチックが開発されてきた。とくに強度と加工に関する技術の進歩によって、またその軽量さによる輸送コストの削減効果によって、包装部材の多くがポリエチレン樹脂をはじめとする合成プラスチックに置き換わってきた。しかし、それにともなって分解されない廃棄物の蓄積と環境汚染が問題となってきた<sup>(1)</sup>。そこで、環境中に存在する微生物によって分解され得る生分解性プラスチックが開発された<sup>(2)</sup>。

生分解性プラスチックとは、環境中に生息する微生物がもつ分解酵素によって低分子化合物に分解されるプラスチックと定義されている<sup>(3)</sup>。生分解性プラスチックは、化学系、微生物系、天然物系に分類され、一般的に再生可能資源や化石資源から構成される<sup>(4)</sup>。再生可能資源を使ったものとして、多くの細菌によって産生される天然ポリマーのポリ-3-ヒドロキシブチレート (PHB)、発酵生産された乳酸の縮合重合によって合成されるポリ乳酸 (PLA) がある。化石資源を使ったものとして、 $\epsilon$ -カプロラク톤を開環重合させたポリカプロラクトン (PCL)、1,4-ブタンジオールとコハク酸から合成されるポリブチレンサクシネート (PBS) などがある。これらは、強度および分解速度を制御するために生分解性プラスチックどうしで様々に混合され、包装部材、文具や雑貨、医療資材、長期耐久が求められる電子機器、自動車の内装材など、幅広く展開されてきた<sup>(4)</sup>。しかし、使用期間内においては適切な性能を有していながらも、使用後には完全分解される生分解性プラスチックは確認されていない<sup>(5)</sup>。生分解性プラスチックの分解は環境条件に依存しており、容易に制御できないため、分解に向けた技術開発が必要である<sup>(4,6)</sup>。

生分解性プラスチックを分解できる微生物として、*Pseudomonas* 属、*Streptomyces* 属、*Bacillus* 属、*Corynebacterium* 属、*Arthrobacter* 属、*Micrococcus* 属など、様々な微生物が今日までに単離されている<sup>(7)</sup>。また、生分解性プラスチックを分解する可能性がある酵素としてプロテアーゼやエステラーゼが、同様に

原稿受付 2020年1月20日、受理日 2020年2月28日

本研究は近畿大学生物理工学部戦略的研究 No.12-IV-21, 2013 の助成を受けた。

1. 近畿大学生物理工学部 生物工学科 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

数多くの微生物から報告されている<sup>(8,9,10,11)</sup>。しかし、それらの酵素を大量精製し利用した報告は乏しい<sup>(12)</sup>。

そこで、PBS系樹脂のGS Pla（三菱化学株式会社、現三菱ケミカル株式会社）を分解する微生物の単離を試みた。植物葉表面や土壌中、自然水などから分離した微生物群を、GS Pla フィルムの分解を指標としてスクリーニングした。いくつかの微生物群が得られたが、それらの中で最も分解能力が高い微生物群 YHの中から、非常に高いエステラーゼ活性を示す4A株を単離した。4A株がもつエステラーゼの有用性を確かめるために熱安定性についても確認した。

## 2. 材料と方法

### 2. 1 生分解性プラスチック分解菌のスクリーニング

植物葉、土壌、井戸水から微生物を採集した。植物葉（バラ、栗、しそなど）については、葉をフラスコに入れリン酸ナトリウム緩衝液（10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.15 M NaCl）を加え、土壌については、土壌 0.2 g に対して 10 mL のリン酸ナトリウム緩衝液を加え、それぞれ 180 rpm（SCS.R、いわしやサンキ）で1時間程度、振とうしたのち、緩衝液をろ紙（Whatman グレード1）でこして微生物液を得た。これらの微生物液または井戸水 200 μL を、2%オリーブ油（ナカライ）を添加した 1.8 mL の最少ミネラル培地（0.2% NaNO<sub>3</sub>、0.05% KCl、0.01% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.001% MgSO<sub>4</sub>、0.001% FeSO<sub>4</sub>）に植菌した。さらに 9 mm 角の大きさに切断した GS Pla シート（AZ91TN、三菱化学株式会社）を添加し、30°C、200 rpm で2—3週間、振とう培養した。

### 2. 2 生分解性プラスチックシートの走査型電子顕微鏡での観察

GS Pla シートを分解した YH の培養液を 20 μL 取り、2%オリーブ油を添加した 2 mL の最少ミネラル培地に植菌した。さらに 9 mm 角の大きさに切断した GS Pla シートを添加し、30°C、200 rpm で振とう培養した。14日後、プラスチックシートを取り出し、99.5%エタノールで殺菌後、乾燥させた。アルミニウム製試料台にシートを張り付け、イオンスパッター装置（E-1010、HITACHI）で白金コーティングを行った。その後、走査型電子顕微鏡（S-2250N、HITACHI）を用い、加速電圧 25 kV で観察し、撮影を行った。

### 2. 3 生分解性プラスチック分解菌候補株の単離

GS Pla シートを分解した YH の培養液を、滅菌水で 10 倍ごとに 10<sup>-6</sup> 倍まで希釈し、TSA 培地（2.0% Polypepton-S（ニッスイ）、0.25% Glucose、0.25% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.5% NaCl、1.5% Agar）に塗布した。外観の異なる細菌をそれぞれ TSA 培地にストリークし、さらに、TSB 培地（2.0% Polypepton-S（ニッスイ）、0.25% Glucose、0.25% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.5% NaCl）に植菌し、30°C、200 rpm で培養し、その大まかな増殖速度を調べ、分解菌候補株の分類および単離を行った。単離の確認には西岡法に従ってグラム染色を行った<sup>(13)</sup>。

### 2. 4 エステラーゼ活性の測定

単離菌のエステラーゼ活性測定は、基本的に Jaouani らの方法に従った<sup>(14)</sup>。単離菌を TSB 培地に植菌し、30°C、200 rpm、24 時間、前培養を行った。2%オリーブ油を添加した 2 mL TSB 培地に、前培養液を 1% 植菌したのち、30°C、200 rpm、5 日間、本培養を行った。培養後、培養上清を得るため、15,000 rpm（5417R、Eppendorf）、5 分間、遠心分離を行った。酵素の熱安定性を調べる際は、さらに、得られた培養上清を 40°C、50°C、60°C、70°C、80°C、90°C で 10 分間、熱処理した。反応は、得られた培養上清 200 μL を、0.5% Triton X-100 を添加したリン酸ナトリウム緩衝液 1.8 mL に加え、DMSO（dimethylsulfoxide）に溶解した 50 mM *p*-nitrophenyl palmitate（Sigma）溶液 20 μL を添加することによって開始し、30°C、200 rpm、30 分間、振とうしながら行った。反応後、電子レンジで 10 秒間ほど加熱し、酵素反応を停止させた。15,000 rpm、3

分間、遠心を行い、クリアな水層部分の 410 nm における吸光度を分光光度計 (Ultrospec 1100 pro、GE ヘルスケア) で測定した。なお、エステラーゼ活性は、1 分間に 1  $\mu\text{mol}$  の *p*-nitrophenol を生成する酵素量を 1U として表され、エステラーゼ活性値 (U/mL) は、以下の式に当てはめて算出した<sup>(14)</sup>。

$$\text{エステラーゼ活性 (U/mL)} = (\text{OD}_{410} + 0.0044) / 0.0555$$

## 2. 5 菌種同定

滅菌水にごく少量の 4A 株を懸濁し、95°C で 5 分間ボイルしたのちに PCR を行った。PCR には、装置として iCycler (Bio-Rad) を、酵素として *TaKaRa Ex Taq* (TaKaRa) を用いた。ボイルした 1  $\mu\text{L}$  の菌液を鋳型溶液として用い、各 1  $\mu\text{M}$  のプライマー、16S-V3-357FWD-Bam (5'-GGGGATCCTCCTACGGGGAGGCA GC) および 16S-V8-1100RV-Bam (5'-CCGGATCCGGGTTGCGCTCGTTG)、2.5U の *TaKaRa Ex Taq* を含む 50  $\mu\text{L}$  の反応液にて PCR を行った。PCR は、95°C を 2 分間、61°C を 1 分間、72°C を 1 分 30 秒間からなる反応を 1 サイクルとして、25 サイクル行った。その後、PCR 産物を、NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (TaKaRa) を用い、付属のプロトコールに従って精製した。精製した PCR 産物を *Bam*HI により処理し、pUC19 にクローニングした。精製したプラスミドを 50 ng/ $\mu\text{L}$  になるよう調製し、タカラバイオ株式会社に塩基配列解析を依頼した。

## 3. 結果と考察

### 3. 1 生分解性プラスチック分解菌候補株の単離

植物葉表面や土壌中や井戸水に生息する微生物の中に *GS* Pla を分解することができる微生物が含まれているか否かを調べるために、これらの微生物を含む微生物液を *GS* Pla シートを添加した最少ミネラル培地にて培養した。101 の微生物群を 3 週間培養したところ、バラ葉由来の No.2、青しそ葉由来の No.4、土壌由来の No.10、井戸水由来の YH が、シートの存在に依存して増殖が認められた (図 1)。それらのうちシートの著しい分解が認められた微生物群は、バラ葉由来の No.2 および井戸水由来の YH であり、とくに YH ではプラスチックを細かな破片にまで分解していた (図 1、B および H)。YH では、得られた他の 3 つの微生物群に比べて微生物の増殖があまり見られなかったにもかかわらずプラスチックの分解が最も速く進行していたことは、非常に強いエステラーゼ活性をもつ細菌が含まれていることを強く示唆した。また、微生物群 YH とともに 2 週間培養された *GS* Pla シートを走査型電子顕微鏡で観察したところ、微生物によると考えられる数多くの孔が見られ、微生物による分解が進んでいることが示された (図 2)。

そこで、微生物群 YH に含まれる生分解性プラスチック分解菌を単離するため、シート分解後の培養液に含まれる細菌を一般的な細菌培養用培地に塗布した。複数の希釈系列から得られた細菌を、その形状、色目、液体培養した際の増殖速度の違いから分類した結果、最終的に 12 の細菌が得られた。

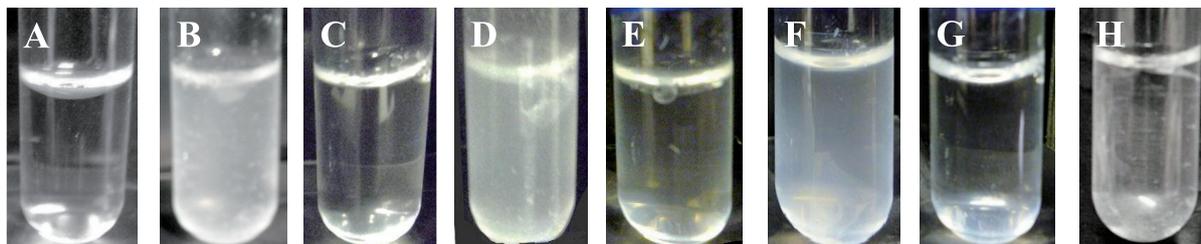


図 1 微生物群による生分解性プラスチックの分解

バラ葉由来微生物群 No.2 (A および B)、青しそ由来微生物群 No.4 (C および D)、土壌由来微生物群 No.10 (E および F)、井戸水由来微生物群 YH (G および H) を、オリーブ油を含む最少ミネラル培地でプラスチックシートなし (A、C、E、G) またはプラスチックシートあり (B、D、F、H) で、3 週間培養した。

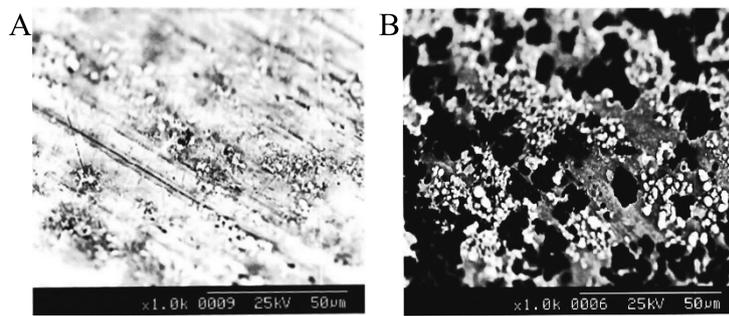


図2 微生物群 YH による生分解性プラスチックの分解

微生物群 YH を植菌しない(A)または植菌した(B)最少ミネラル培地で、14 日間、培養したのちの GS Pla シートを走査型電子顕微鏡で観察した。

### 3. 2 4A 株のエステラーゼ活性

得られた 12 の単離菌を 30°C で本培養し、その培養上清のエステラーゼ活性を測定した結果、いくつかの細菌でも非常に弱いエステラーゼ活性を示したが、4A 株で著しく高いエステラーゼ活性が見られた (図 3)。この活性は、一般的なエステラーゼ活性の測定方法を採用した本実験において数分で発色基質が強く呈色する程度であり、報告されているエステラーゼ活性より数~10 倍程度高いものであった<sup>(15,16)</sup>。したがって、4A 株がもつエステラーゼは、これまでに知られているエステラーゼと比べても高い活性を示したと言える。

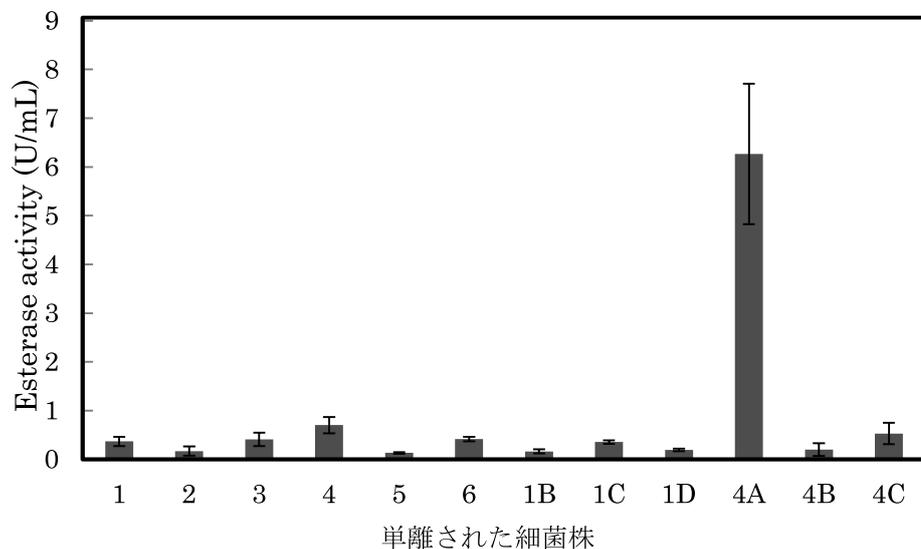


図3 微生物群 YH から単離された細菌のエステラーゼ活性

微生物群 YH から単離された 12 の微生物について、オリーブ油を添加した TSB 培地で培養した培養上清のエステラーゼ活性を測定した。活性値は 5 回の実験の平均値である。

### 3. 3 4A 株の菌種同定

4A 株の 16S rRNA 遺伝子の V3 領域から V8 領域までの領域を PCR で増幅し、得られた DNA 断片の塩基配列の情報を NCBI データベースと照合した結果、4A 株の配列は *Stenotrophomonas maltophilia* のそれと 100% の一致率を示した。*Stenotrophomonas maltophilia* は、オキシダーゼ活性については陽性との報告と陰

性との報告が混在しているが、 $\beta$ -ラクタム系抗生物質およびアミノグリコシド系抗生物質をはじめとして、多くの抗生物質に対して耐性をもつことが知られている<sup>(17)</sup>。そこで、オキシダーゼ活性は判断材料とはせず、 $\beta$ -ラクタム系抗生物質であるペニシリンおよびアミノグリコシド系抗生物質であるカナマイシンに対して耐性を示すか否かを調べた。4A 株をこれらの抗生物質を含む寒天培地に塗布したところ、いずれの寒天培地でも生育できた (図 4)。これらの結果および 4A 株がグラム陰性を示したことを合わせて、4A 株は *Stenotrophomonas maltophilia* であると判断した。

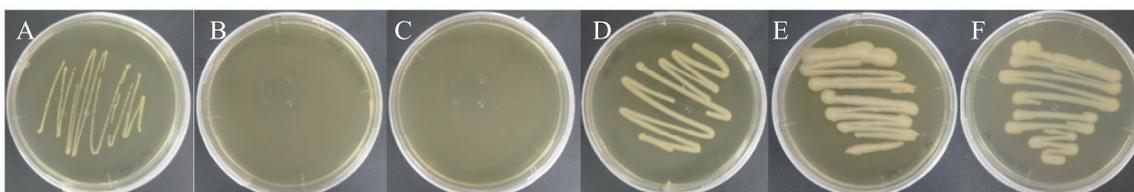


図 4 4A 株の抗生物質耐性

$\beta$ -ラクタム系抗生物質ペニシリン(100 U/mL) (B、E)またはアミノグリコシド系抗生物質カナマイシン(20  $\mu$ g/mL) (C、F)を含む、または、含まない(A、D) TSB 寒天培地に、大腸菌 JM109 株(A から C)または 4A 株(D から F)を塗布し、30°Cで培養した。

### 3. 4 4A 株がもつエステラーゼの熱安定性

有用なエステラーゼの指標の 1 つに、熱安定性が良いことが挙げられる。そこで、4A 株がもつエステラーゼの熱安定性を調べた。4A 株の培養上清を 40°C、50°C、60°C、70°C、80°C、90°Cで 10 分間の熱処理を行ったのちにエステラーゼ活性を測定した。その結果、活性は 70°C以上の熱処理を経ると著しいエステラーゼ活性の低下が認められるものの、60°Cの熱処理後も比較的高い活性を示した (図 5)。これまで好熱菌がもつエステラーゼ/リパーゼが、60°Cでも高い活性を示すことが報告されている<sup>(16)</sup>。なお、その場合でも 70°C以上になると 4A 株の場合と同様に、急激に活性の低下が見られることから、4A 株がもつエステラーゼは、それらと遜色なく熱安定性が良く、有用な酵素である可能性が高いことが分かった。

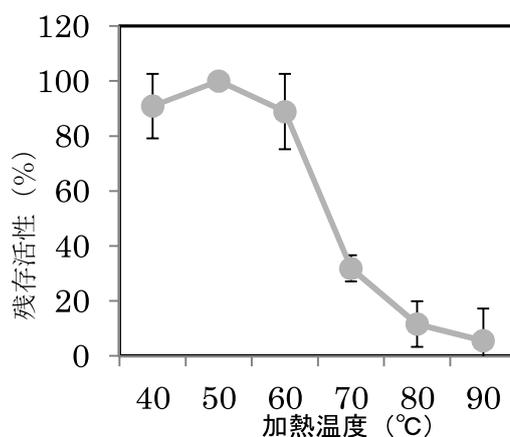


図 5 4A 株の培養上清のエステラーゼの熱安定性

オリーブ油を含む TSB 培地で培養した 4A 株の培養上清を 40°C、50°C、60°C、70°C、80°C、90°Cで 10 分間、熱処理を行ったのちエステラーゼ活性を測定した。相対残存活性は、9 回の実験の平均値で、50°Cでの結果を 100% とした平均値として表している。

#### 4. 結論

本研究では、生分解性プラスチックの効率的な分解を目指して、PBS系生分解性プラスチック分解菌の単離を試みた。その結果、自然環境中より *Stenotrophomonas maltophilia* 4A 株を分解菌として単離することができた。4A 株が産生するエステラーゼの熱安定性を調べた結果、活性は 60℃の熱処理後でも比較的高い活性を維持した。このことから、単離された *Stenotrophomonas maltophilia* 4A 株は、生分解性プラスチックの分解に極めて有用なエステラーゼを保持していると考えられる。今後は、これがもつエステラーゼ遺伝子のクローニングが望まれる。

#### 5. 謝辞

実験材料の、GS Pla (現 BioPBS) は、三菱化学株式会社 (現三菱ケミカル株式会社) から提供して頂いた。

#### 6. 参考文献

- (1) Moore, C. J. (2008) Synthetic polymers in the marine environment: a rapidly increasing, long-term threat. *Environ. Res.* 108, 131-139.
- (2) Pathak, V. M. and Navneet. (2017) Review on the current status of polymer degradation: a microbial approach. *Bioresour. Bioprocess.* 4, 1-15.
- (3) Doi, Y. and Fukuda, K. (1994) Biodegradable plastics and polymers. Vol.12, 1st eds, 11-14. Elsevier.
- (4) Tokiwa, Y., Calabia, B. P., Ugwu, C. U. and Aiba, S. (2009) Biodegradability of Plastics. *Int. J. Mol. Sci.* 10, 3722-3742.
- (5) 北本宏子(2009) 環境調和型プラスチックの研究現場と実用化—生分解性プラスチックと生物素材由来プラスチックの分解制御—、*農業および園芸* 84, 67-71.
- (6) Gross, R.A. and Kalra, B. (2002) Biodegradable polymers for the environment. *Science* 297, 803-807.
- (7) Kale, S. K., Deshmukh, A. G., Dudhare, M. S. and Patil, V. B. (2015) Microbial degradation of plastic: a review. *J. Biochem. Technol.* 6, 952-961.
- (8) Uchida, H., Shigeno-Akutsu, Y., Nomura, N., Nakahara, T. and Nakajima-Kambe, T. (2002) Cloning and sequence analysis of poly(tetramethylene succinate) depolymerase from *Acidovorax delafieldii* strain BS-3. *J. Biosci. Bioeng.* 93, 245-247.
- (9) Maeda, H., Yamagata, Y., Abe, K., Hasegawa, F., Machida, M., Ishioka, R., Gomi, K. and Nakajima, T. (2005) Purification and characterization of a biodegradable plastic-degrading enzyme from *Aspergillus oryzae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67, 778-788.
- (10) Shinozaki, Y., Morita, T., Cao, X.-h., Yoshida, S., Koitabashi, M., Watanabe, T., Suzuki, K., Sameshima-Yamashita, Y., Nakajima-Kambe, T., Fujii, T. and Kitamoto, H. (2013). Biodegradable plastic-degrading enzyme from *Pseudozyma antarctica*: cloning, sequencing, and characterization. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 2951-2959.
- (11) Charbonneau, D. M., Meddeb-Mouelhi, F. and Beauregard, M. (2010) A novel thermostable carboxylesterase from *Geobacillus thermodenitrificans*: evidence for a new carboxylesterase family. *J. Biochemistry.* 148, 299-308.
- (12) López, G., Chow, J., Bonggen, P., Lauinger, B., Pietruszka, J., Streit, W. and Baena, S. (2014) A novel thermoalkalostable esterase from *Acidicaldus* sp. strain USBA-GBX-499 with enantioselectivity isolated from an acidic hot springs of Colombian Andes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 8603-8616.
- (13) 西岡光夫 (1982) 新しいグラム染色法、*衛生検査* 31, 943-948.

- 
- (14) Jaouani, A., Neifar, M., Hamza, A., Chaabouni, S., Martinez, M. J. and Gtari, M. (2012) Purification and characterization of a highly thermostable esterase from the actinobacterium *Geodermatophilus obscurus* strain G20. *J. Basic Microbiol.* 52, 653-660.
- (15) Uchida, H., Nakajima-Kambe, T., Shigeno-Akutsu, Y., Nomura, N., Tokiwa, Y. and Nakahara, T. (2000) Properties of a bacterium which degrades solid poly(tetramethylene succinate)-co-adipate, a biodegradable plastic. *FEMS Microbiol. Lett.* 189, 25-29.
- (16) Chiş, L., Hriscu, M., Bica, A., Toşa, M., Nagy, G., Róna, G., Vértessy, B. G. and Irimie, F. D. (2013) Molecular cloning and characterization of a thermostable esterase/lipase production by a novel *Anoxybacillus flavithermus* strain. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 59, 119-134.
- (17) Brooke, J. S. (2012) *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging global opportunistic pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* 25, 2-41.

## 英文抄録

## Isolation of an esterase-producing bacterium from environment.

OKANAMI Masahiro<sup>1</sup>, OHIKE Tatsuya<sup>1</sup>, EBE Shohei<sup>1</sup> and ANO Takashi<sup>1</sup>

We aimed to isolate biodegradable plastic-degrading microorganisms, in order to degrade biodegradable plastics efficiently. We screened microorganism pools from plant leaf surfaces, soil and natural water for the ability to degrade the biodegradable poly(butylene succinate) (PBS) films, and subsequently several microorganisms were obtained. Among the obtained microorganism pools, a bacterial pool YH exhibited the highest degradation ability. The strain 4A showing the highest esterase activity was isolated from the YH pool. The nucleotide sequence of the 16S rRNA gene revealed that the strain 4A was a bacterium belonging to *Stenotrophomonas maltophilia* species. An esterase produced by the strain 4A retained a relatively high activity even after a 10-minute treatment at 60°C. Therefore, it is highly likely that the strain 4A has a gene encoding an esterase useful for efficient degradation of biodegradable plastic.

Key words: biodegradable plastic, biodegradable plastic-degrading microorganism, esterase, *Stenotrophomonas maltophilia*

---

Received 20 January 2020, Accepted 25 February 2020.

This work was supported in part by the Project Research of the Faculty of Biology-Oriented Science and Technology, Kindai University No.12-IV-21, 2013.

1. Department of Biotechnological Science, Faculty of Biology-Oriented Science and Technology, Kindai University, Wakayama 649-6493, Japan