

2H17-2 葉面生息酵母は生分解性プラスチックを効率よく分解する
○北本 宏子¹, 多胡 香奈子¹, 曹 曉紅¹, 小板橋 基夫¹, 對馬 誠也¹, 森田 友岳², 中島 敏明³
(¹農環研, ²産総研, ³筑波大)

廃棄物のバイオリサイクルによる環境負荷低減を目的に、生分解性プラスチック（生プラ）の導入が図られている。生プラ製品には、使用中は分解しない強度を持ち、使用後は速やかな分解が求められるが、その制御が、生プラ普及上の問題である。
ポリブチレンサクシネート（PBS）、ポリブチレンサクシネート／アジペート（PBSA）、ポリカプロラクトン（PCL）等、生プラの多くは、長鎖脂肪酸エステル結合の構造を持つ。一方、自然界では植物や動物の体表面を覆うワックスが、長鎖脂肪酸エステル結合の構造を持つ。我々は植物表面に接着する常在菌が、接着するために、ワックスを分解する能力を持つと考えた。これらの菌が、生プラも分解する可能性を検討した。
一般的な葉面常在酵母である *Pseudozyma* 属酵母の機能保存株 10 株のうち、4株が、PBSおよびPBSAのエマルジョンと膜を効率よく分解した。油を炭素源に用いた時に、特異的に生プラ分解酵素が生産され、糖を炭素源に用いると、生産が抑制された。生プラ分解酵素は、植物病原菌等が生産するクチナーゼと同様に強陽イオン交換体に結合し、精製することができた。精製した酵素は、PBS、PBSA、PCLだけでなく、生分解が困難なバイオマスプラスチックであるポリ乳酸（PLA）も分解した。さらに、植物バイオマスから生プラ分解能力を持つ酵母を探索した結果、効率よく分解菌が分離され、多くが *P. antarctica* であった。

The epiphytic yeasts degrade bio-degradable plastics
○Hiroko KITAMOTO¹, Kanako TAGO¹, Xiaohong CAO¹, Motoo KOITABASHI¹, Seiya TSUSHIMA¹, Tomotake MORITA², Toshiaki NAKAJIMA-KAMBE³
(¹NIAS, ²AIST, ³University of Tsukuba)

Key words biodegradable plastic, yeast

2H17-4 *Sphingobium* sp.TCM1株によるリン酸トリス2-クロロエチルの分解特性
○森 慎吾, 土居 由佳, 森 淳一, 高橋 祥司, 解良 芳夫
(長岡技科大)

【目的】
リン酸トリス 2-クロロエチル (TCEP) 等の含塩素有機リン酸トリエステルの、可塑剤や難燃剤として幅広く利用されている。しかしその一方で、高い化学的安定性かつ難分解性から、様々な環境中で検出されており、特に廃棄物埋立て処分場浸出水において高濃度に検出されている。また近年、神経毒性や発癌性などの毒性が報告されたことからヒトや生態系に与える影響が懸念されている。我々は既に TCEP 分解菌の単離に成功し、16S rRNA遺伝子配列解析により *Sphingobium* 属に属することを確認し、TCM1株と名づけた。そこで本報告では、TCM1株によるTCEP分解の諸特性について述べる。
【方法と結果】
TCM1株は、20 μ MのTCEPを唯一のリン源とした最小培地で培養した時、7時間でTCEPを完全消失させた。GC/MS分析により、2-クロロエタノール (2-CE) が分解産物として生成することが明らかとなり、72時間後に化学量論的に一致する60 μ Mの2-CEの生成が確認された。一方、2-CEの分解は確認できなかった。従って、TCM1株はTCEP分解能を有するが、2-CE分解能を有していないことが明らかとなった。また、無機リン酸存在下におけるTCEP分解速度について解析したところ、2 mMの無機リン酸の添加は分解速度に影響を与えなかったが、20 mMの無機リン酸は分解速度を若干低下させた。また、TCM1株は、リン源としてTCEPを利用することができるが、炭素源としてTCEPを利用できないことが明らかとなった。

Degradation characteristics of tris(2-chloroethyl) phosphate by *Sphingobium* sp.strain TCM1
○Shingo MORI, Yuka DOI, Junichi MORI, Shouji TAKAHASHI, Yoshio KERA
(Nagaoka Univ. Tech.)

Key words tris(2-chloroethyl) phosphate, microbial degradation, *Sphingobium*

2H17-3 *Arthrobacter nicotinovorans*が生産するカドミウムキレートタンパク質分解プロテアーゼ遺伝子のクローニングと発現
○原口 由美子, 田中 みち子, 曾根 輝雄, 浅野 行蔵
(北大院・農・応用歯学)

【目的】 ホタテガイの加工で生ずる廃棄物、中腸腺（ウロ）にはカドミウムが蓄積しており、その処理が問題になっている。カドミウムを除去できればタンパク質源としてウロを有効利用できる。カドミウムは中腸腺内でメタロチオネイン様タンパク質と結合しているため、イオン化・遊離するには結合タンパク質を分解する必要がある。当研究室のスクリーニングの結果、土壌より単離した *Arthrobacter nicotinovorans* 23-0-11 が、ウロからカドミウムを特異的に解離させるプロテアーゼを生産することが明らかになった。本研究では詳細な解析と大量生産のためにプロテアーゼ遺伝子のクローニングと大腸菌を用いた大量発現を行った。
【方法と結果】 *A.nicotinovans* 23-0-11の培養上清から精製した酵素のN末端及び内部アミノ酸配列を決定し、縮重プライマーを用いたPCRを行って460 bp の部分塩基配列を得た。部分塩基配列をプローブとした Southern hybridizationとInverse PCRを行い、ORF全長（990 bp）と近傍の塩基配列を決定した。この酵素は111残基のPrepro配列を持っており、既知プロテアーゼとのアミノ酸配列での相同性は30-40%であった。Prepro配列を含むORF全長を発現ベクター pDEST14に挿入し、大腸菌を宿主とした大量発現を行った。組換え酵素は脱脂・粉末化したホタテガイのウロからカドミウムを遊離させる活性を示した。

Cloning and expression of protease gene from *Arthrobacter nicotinovorans* for proteolysis of cadmium chelating protein
○Yumiko HARAGUCHI, Michiko TANAKA, Teruo SONE, Kouzou ASANO
(Lab. Appl. Microbiol., Grad. Sch. Agric., Hokkaido Univ.)

Key words serine protease, *Arthrobacter nicotinovorans*, cadmium, fishery waste

3H09-1 *Sphingomonas* sp. TDK1 株によるリン酸トリス (1,3-ジクロロ-2-プロピル) 分解に影響を及ぼす諸因子について
○盛野 淳, 徐 紅徳, 小沼 功, 高橋 祥司, 解良 芳夫
(長岡技科大)

含塩素有機リン酸トリエステルであるリン酸トリス (1,3-ジクロロ-2-プロピル) (TDCPP) は、物理化学的に安定であることから、難燃剤などとして幅広く使用されている。しかし、近年毒性を有することが報告され、様々な環境中に検出されたことから、生態系への悪影響が懸念されている。これまでに我々は、TDCPPを唯一のリン源とした集積培養により、TDCPP分解能を有する *Sphingomonas* sp. TDK1株の単離に成功し、その粗抽出液の分解特性について解析してきた。今回は、TDK1株および粗抽出液を用いて、TDCPP分解に影響を及ぼす可能性のある諸因子について解析したので報告する。
TDK1株はTDCPPを唯一のリン源とした場合に分解することは示されていたが、より利用しやすいリン源の共存下での分解は明らかではなかった。そこで、20 μ M TDCPPを含む最少培地に最大 2 mM の無機リン (NaH₂PO₄) を添加し、TDCPP分解へ及ぼす影響を解析した。その結果、2 mM NaH₂PO₄を添加した場合、TDCPP完全消失に要する時間が約3倍に延びたことから、TDK1株は利用しやすいリン源を優先的に用いる可能性が考えられた。また、既知の有機リン化合物分解酵素の多くが金属酵素であることから、本酵素についてその可能性を検討した。酵素反応系に終濃度50 μ Mの2価金属塩を添加して活性を測定した結果、CoCl₂により活性は約1.8倍に増加し、EDTAの添加により活性が減少した。従って、TDCPP分解酵素は金属酵素である可能性が示唆された。

Factors that influence the degradation of tris (1,3-dichloro-2-propyl) phosphate by *Sphingomonas* sp. strain TDK1
○Jun MORINO, Hongde XU, Isao KONUMA, Shouji TAKAHASHI, Yoshio KERA
(Nagaoka Univ. Tech.)

Key words *Sphingomonas*, tris (1,3-dichloro-2-propyl) phosphate