

高分子ナイロンを加水分解する酵素 (NylC) の発見

加藤太一郎・武尾 正弘・根来 誠司*

はじめに

地球温暖化への対策として、環境負荷の低減化は重要な検討課題であり、その解決策の一つとして、「生分解性プラスチック」の開発が重要視されている。一方、 ϵ -カプロラクタムの開環重合により合成される6-ナイロンや、アジピン酸とヘキサメチレンジアミンとの縮重合により合成される6,6-ナイロンは、強靱で耐熱性・耐薬品性に優れている。繊維・プラスチックとして広く利用されており合成ポリアミド全体の約90%を占めるが、生物分解をほとんど受けない素材であるため、利用後は焼却あるいは埋立て処分されている。ナイロンに対して生分解性を示す生体触媒として白色腐朽菌類が知られているが、これらの分解様式はラジカル反応によるメチレン鎖の切断であり再利用可能なモノマーへと戻すものは見いだされていない¹⁾。資源の再利用・有効利用という観点から、モノマー原料へと戻すナイロンリサイクル系の構築が望まれている。これまでにイオン性液体を用いたケミカル分解法などが報告されているが、300°Cという高温が必要である²⁾。

分解反応を室温付近の温和な条件下にて行うことは、ナイロンの特性上そう簡単ではない。つまり強靱性と柔軟性とを併せ持ったナイロン固有の特性は、各ポリマー分子鎖が規則正しく並び水素結合により安定化した結晶性領域と不規則な非晶領域とが適切に混在していることで引き出される。ナイロンの結晶化度は20–50%であり、結晶化度によって融点・強度などの物性は変化する。結晶性領域として各分子鎖が相互に逆平行に並んだ α 結晶と平行に並んだ γ 結晶が知られているが、6-ナイロンでは、 α 結晶が安定である³⁾。

我々はこれまで、ナイロン工場排水などを分離源として、6-アミノカプロン酸 (Ahx) オリゴマーを加水分解する約10種類の微生物を取得してきた⁴⁻⁷⁾。いずれも、6-ナイロン構成ユニットである Ahx オリゴマーを唯一の炭素源・窒素源とした培地で増殖する。また代表的な微生物についてオリゴマーの分解に関わる酵素の同定を行い、分解様式の異なる3種の酵素、NylA (環状2量体分解酵素)⁸⁾、NylB (エキソ型オリゴマー分解酵素)⁹⁻¹⁴⁾、

NylC (エンド型オリゴマー分解酵素)^{15,16)}を見いだしている。我々は、これら酵素のオリゴマー分解特性について解析を行ってきたが、実は耐熱化したNylC変異体が、高分子ナイロンに対しても作用でき、室温付近であってもモノマーへと戻す加水分解活性を有する事を発見した¹⁷⁾。現在NylCはナイロン加水分解酵素 (nylon hydrolase) として認定されている。本稿では、ナイロン加水分解酵素NylCの特徴とこれを用いたナイロン産業への応用展望について述べる。

NylCの特徴と耐熱化

ナイロン加水分解酵素NylCは、土壌細菌 *Arthrobacter* (プラスミド pOAD2 上にコード) や好アルカリ性細菌 *Agromyces*, *Kocuria* から見いだされている (各々, NylC_{p2}, NylC_A, NylC_K と命名)。本酵素は直鎖あるいは環状の3量体以上の Ahx オリゴマーに対してエンド型の加水分解活性を示す。アミノ酸配列の相同性から N-末端求核性 (N-tn) ファミリーに分類される。いずれも前駆体 (分子量約36,000) として発現し、Asn266/Thr267 間で自己分断され、 α 鎖 (分子量約27,000) と β 鎖 (分子量約9,000) に分かれる (図1A)。認識配列のC-末端

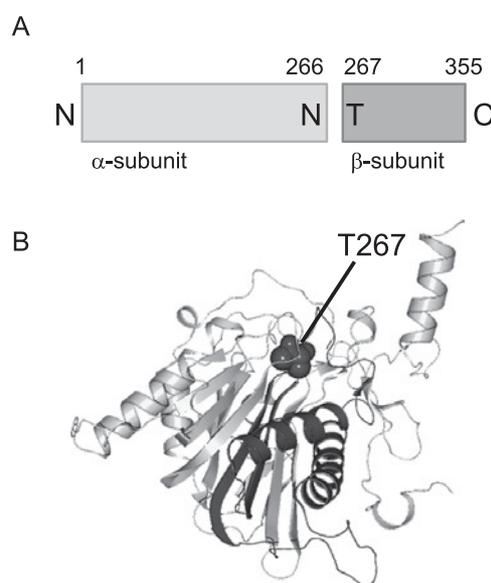


図1. NylCのサブユニット構造

*著者紹介 兵庫県立大学大学院工学研究科物質系工学専攻 (教授) E-mail: negoro@eng.u-hyogo.ac.jp

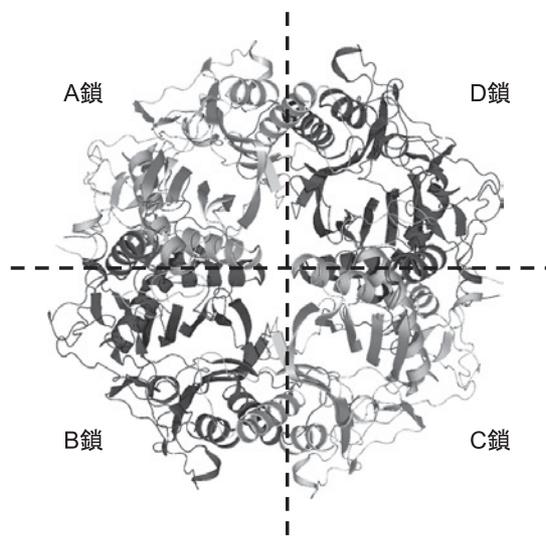


図2. NylCテトラマーの構造。ヘテロ2量体（A-D鎖）が4分子会合したドーナツ型の分子構造。破線は対称軸を示す（D2対称）。

Enzymes	T_m	Positions of amino acid sequence															
		36	41	50	60	62	111	122	130	137	225	230	231	257	263	354	
NylC _{p2}	52 °C	D	A	M	I	A	G	D	H	L	V	T	V	V	E	G	
NylC _A	60 °C	D	A	M	I	A	S	G	Y	A	M	T	V	V	E	G	
NylC _K	67 °C	A	V	T	V	S	S	G	Y	A	M	G	I	L	Q	A	
GYAQ-NylC	88 °C	A	A	M	I	A	G	G	Y	L	V	T	V	V	Q	G	

図3. 各種NylCタンパク質のアミノ酸配列の違いと T_m 値の関係。

側残基（Thr267）が自己分断を触媒するとともに、自己分断後は基質分解における触媒求核残基となる。また立体構造解析からNylCは α 鎖と β 鎖がヘテロ2量体を形成し、4本の α ヘリックスが2枚の β シートを挟んだ $\alpha\beta\alpha$ サンドイッチフォールドをとることが明らかとなった（図1B）。さらに、ネイティブ酵素では、4分子のヘテロ2量体が会合してドーナツ型の分子構造を形成する（図2）。

NylC_Aのアミノ酸配列は、NylC_{p2}の配列と5か所で異なり、NylC_Kでは、共通する5か所以外に、さらに10か所で異なっている（図3）⁹⁾。NylC_AとNylC_Kの熱安定性はNylC_{p2}よりも、各々、8–15°C高い。3酵素のアミノ酸配列の違いを基に、NylC_{p2} ($T_m = 52^\circ\text{C}$) に、NylC_AおよびNylC_K型のアミノ酸置換を行い熱安定性の変化を確認した（図4）。その結果、サブユニットA/D界面（D122G, H130Y, L137A, G111S, D36A）、およびA/B

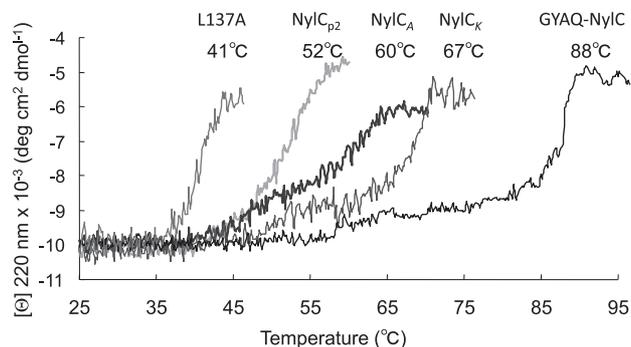


図4. 各種NylCタンパク質の熱変性曲線。

界面（V225M, E263Q）のアミノ酸置換で大きく変化することが明らかとなった。たとえば、1アミノ酸置換（L137A）によって耐熱性は11°C低下した（ $T_m = 41^\circ\text{C}$ ）一方、4アミノ酸置換（D36A/D122G/H130Y/E263Q）によって、耐熱性は36°C上昇した（ $T_m = 88^\circ\text{C}$ ）。つまり5アミノ酸の置換によって、47°Cの温度範囲で熱安定性が変化することがわかった¹⁷⁾。またこれらサブユニット間相互作用は、タンパク質の構造安定性とも密接に関連していると推測された。以下に述べるナイロン分解反応では、もっとも耐熱性の向上した4アミノ酸置換NylC_{p2}（G¹²²Y¹³⁰A³⁶Q²⁶³）を用いている（GYAQ-NylC）。

ナイロン微粒子の酵素分解

ナイロンポリマーの分子量解析にはGPC（gel permeation chromatography）を用いる事が一般的である。我々はより簡便なナイロン分解評価系を構築すべく、ガスクラスター二次イオン質量分析法（GC-SIMS）の適用を試みた。SIMS（secondary ion mass spectrometry）とはイオン照射によるスパッタリング現象によって試料の外部に放出された二次イオンの質量を計測する手法であり、材料の表面分析に有効な手法である。さらにGC-SIMSでは、低エネルギーのクラスターアルゴンを照射して試料を励起するため、より温和な条件にてイオン化することができる。つまり高分子材料であっても試料分子の破壊を極力抑制した状態を観察できるため、固相表面上でのナイロン試料の分解挙動を追跡することが可能である。本装置を用いて酵素反応前後のナイロン試料の分子量分布を測定したところ、反応後のピークが低分子量域へシフトしており、GYAQ-NylCが明らかに6-ナイロンや6,6-ナイロンを分解していることを確認できた¹⁷⁾。

一方、溶液中へ遊離してくるオリゴマーを、トリニト

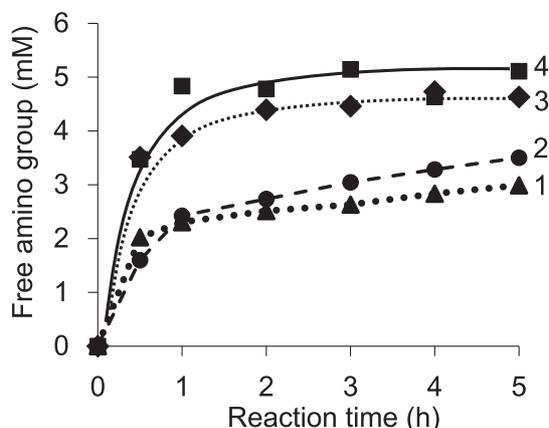


図5. 6,6-ナイロン, コハク酸共重合-6,6-ナイロンの酵素分解. 反応温度60°C. 1. 6,6-ナイロン (▲); 2. コハク酸共重合(0.12)-6,6-ナイロン (●); 3. コハク酸共重合(0.28)-6,6-ナイロン (◆); 4. コハク酸共重合(0.32)-6,6-ナイロン (■).

ロベンゼンスルホン酸比色法 (TNBS法) を用いたアミノ基検出によって定量した. しかし, 6-ナイロンや6,6-ナイロンの分解率 (すべてのアミド結合が加水分解された時に生じるアミノ基に対して, 実際に遊離するアミノ基の割合) は1-2%にとどまっていた. これは, ポリマー会合体の一部の結合が切断されても, 周囲のアミド結合は他の分子と水素結合を形成しているため, 分子量は低下しても高分子本体からのオリゴマー離脱が進まないためではないかと考えられた. 言い換えれば, 分解産物の連続的な離脱が進むニック数 (崩壊のための閾値) を超えるまでは, ポリマーは酵素反応に抵抗性を示すと予想された.

そこで我々は, 遊離するオリゴマーの割合を増やすために反応温度を30°Cから60°Cに上昇させてみた. 期待通り, 遊離アミノ基の量は約2倍にまで上昇した. また, 一定間隔でポリマー分子間の水素結合を攪乱するモノマーを挿入した共重合体を作成しその分解性を調べた¹⁸⁾. 具体的には, 6,6-ナイロンの界面重合反応時に炭素数が4のコハク酸ユニットを0.12-0.32 mol当量の範囲で導入されるように添加した. これらにGYAQ-NylCを作用させたところ, コハク酸モノマーの割合が増えるにしたがって分解率が向上した (図5).

一方, 重合度を低くすれば崩壊のための閾値が低くなることが予想され, 分解速度も向上すると期待できる. そこで6-ナイロンに対してギ酸による化学的限定分解を行うことで分子量を低下させGYAQ-NylCによる分解率を算出した (図6). 未処理のものは1.3%の分解率にとどまるが, ギ酸処理の時間によって分解率は上昇し, 50時間処理サンプル (重合度30~40) では40%以上の

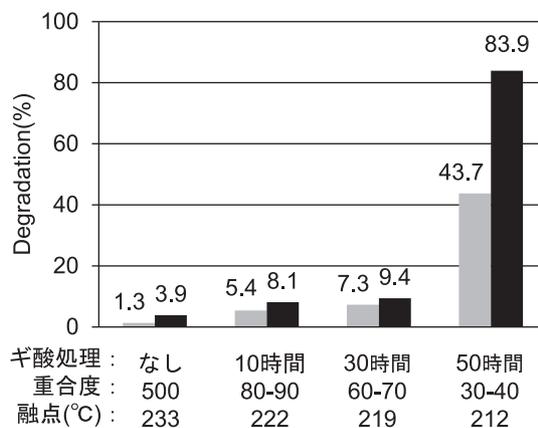


図6. ギ酸による限定分解処理を行った6-ナイロンの分解率. GYAQ-NylCのみ (グレー), GYAQ-NylC+NylB 複合系 (黒) での比較.

分解率を示すことが確認された. 一方, 重合度が30程度にまで低下してもポリマー融点に大きな変化は見られず, このことから分解率が向上しながらも強度を保ったポリマーを構築することも可能ではないかと期待させる結果を得ている.

ところで, GYAQ-NylCは2量体を分解することができず, 系中にはダイマーが残存してしまう. そこでモノマーへの完全分解を目指し, GYAQ-NylCによる反応後に, 直鎖状オリゴマーをエキソ型に切断する酵素NylBを添加し, ナイロン分解を行った. その結果, 期待通り分解率は飛躍的に向上し, ギ酸処理を50時間行ったものでは84%の分解率を示した (図6). ギ酸処理を150時間行ったものについては97%というほぼ完全分解を達成している.

ナイロン薄膜の酵素分解

これまで述べてきたように, GYAQ-NylC単体, あるいはNylBとの複合反応系にて高分子ナイロンを分解できることは確かめてきたが, 本分解の反応速度を測定する手法は開発されていなかった. そのため, 異なるナイロン基質間の分解速度の差異を定量化することは困難であった. 反応速度算出のためには, 基質や生成物の増減量を測定することが一般的であるが, 固体であるナイロン微粉末の減少量を測定することは困難である. また, 微粒子の粒度がばらばらで反応速度は一定とならない. そこで我々は, 酵素と基質の接触面積が常に一定となるナイロン薄膜を用いた活性測定系を構築することとした¹⁸⁾. 本薄膜反応系では一定速度にて酵素反応が進行するのみならず, 膜厚変化を測定することによって反応速

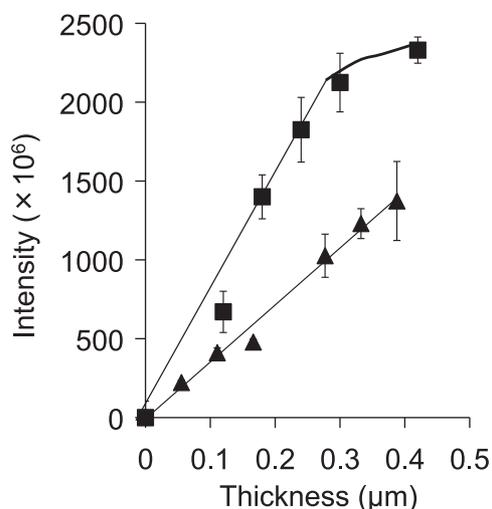


図7. ナイロン薄膜の膜厚と反射光強度の関係. コハク酸共重合(0.32)-6,6-ナイロン (■); 6-ナイロン (▲).

度の定量化も可能になると期待された.

実験では, 作成したナイロン薄膜の膜厚を原子間力顕微鏡 (AFM) で実測するとともに, イメージングアナライザー (CCDカメラ装着) で撮影した薄膜の画像を, 反射光強度として数値化した. その結果, 膜厚の実測値と反射光強度の間には相関関係があることがわかった (図7). この性質を利用することで酵素反応前後の膜厚の変化を算出することができるようになった. またナイロンの結晶構造や結晶化度の情報からポリマー鎖間距離を推測し, 薄膜中のポリマーレイヤー数を見積もった. たとえば, 膜厚260 nmの6-ナイロン薄膜ではナイロンポリマーが600レイヤー積み重なっていると推測できた.

TNBS法による遊離アミノ基の定量結果と, 6-ナイロンおよびコハク酸共重合-6,6-ナイロン薄膜の膜厚の変化を図8に示す. 期待通り, 遊離アミノ基量が一定の速度で増加するとともに, 膜厚も直線的に減少していくことが確認できた. 薄膜分解速度は1 mg/mlの酵素濃度の場合, 6-ナイロン, コハク酸共重合-6,6-ナイロンの何れも同等で, 2.2 nm/hと算出された (図8A). 膜厚の減少と相関して遊離アミノ基量の増加も見られた. また3 mg/mlの酵素濃度の場合, 分解速度も増大するが, 薄膜がすべて可溶化した後も遊離アミノ基濃度の増加が確認された. したがって, 高分子のポリマーが分解された後も, オリゴマーの低分子化やモノマーへの分解が, 継続して進行すると考えられた (図8B).

さらに, GYAQ-NylCとNylBを混在させた反応では, GYAQ-NylC単独の場合と比較して薄膜の分解速度の向上が見られた. これはGYAQ-NylCの反応により遊離

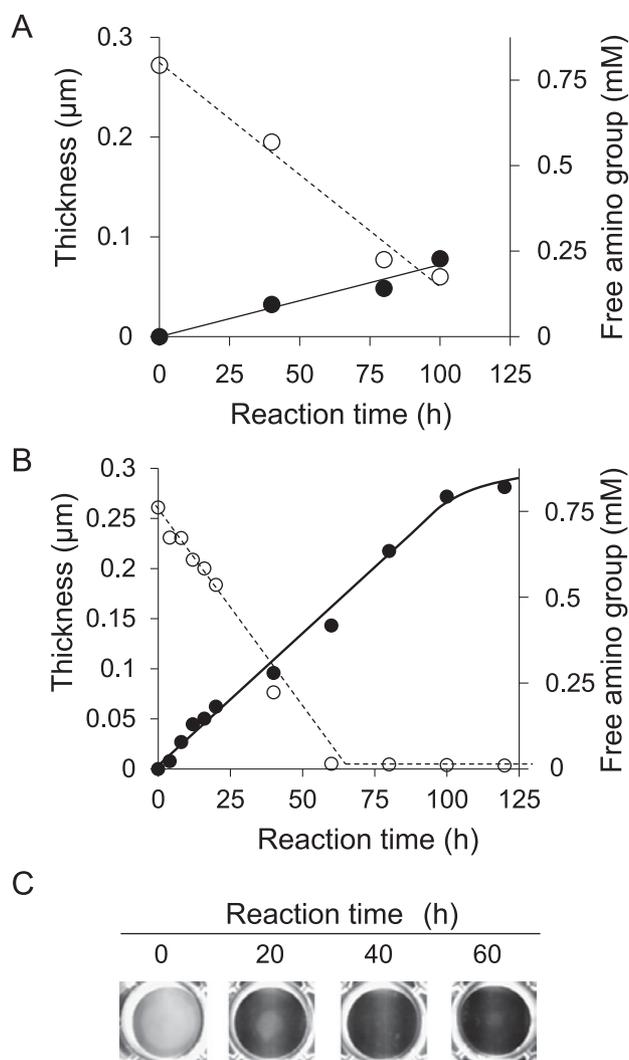


図8. ナイロン薄膜を用いた酵素反応. A. 6-ナイロン (酵素濃度1 mg/ml), B. コハク酸共重合(0.32)-6,6-ナイロン (酵素濃度3 mg/ml), 遊離アミノ基 (●), 膜厚 (○) C. コハク酸共重合(0.32)-6,6-ナイロン薄膜外見の経時変化.

した可溶性画分のオリゴマー分解がNylBによってサポートされるため, ポリマー分解に作用するGYAQ-NylCの量が増加するためであると考えている.

NylCの産業応用への展開を目指して

繊維工業において酵素による繊維加工は古くから行われている. 綿, レーヨンなどの繊維の減量, 風合い改良剤としてセルラーゼ, 羊毛の改質剤にはプロテアーゼが用いられている. 合成繊維への酵素の利用としてはポリエステルへの酵素利用が研究されている¹⁹⁾. 一方, 酵素によるナイロン繊維の加工はこれまで例がない. そこで, ナイロン繊維の表面加工GYAQ-NylCが適用可能かどうかを確認するために, 市販のナイロンファイバーを酵

素反応に供し、ファイバーの状態をSEMにより観察した。酵素反応前のファイバー表面は滑らかであることが確認された一方、酵素反応後のナイロンファイバー表面には凹凸が確認された(未発表データ)。このことから、酵素反応によりナイロンファイバーの表面形状を改変できる可能性を見いだすことができた。

まとめ

我々は、オリゴマー分解酵素として同定されていたエンド型加水分解酵素NylC変異体(GYAQ-NylC)が、高分子ナイロンをも加水分解できることを発見した。ナイロンポリマー分子間の水素結合を攪乱するモノマーを挿入した共重合体や、融点を保ちながら重合度を低く抑えたポリマーを化学的限定分解にて調製することによって、酵素分解反応を効率よく進めることもできるようになった。モノマーへと完全分解可能な条件も見いだすことができています。他の酵素反応と組み合わせることで、原理的にはナイロンから有機酸やアルコールなど、他の有用物質への酵素変換も可能であると思われる。

また、反応速度を定量化するための新しい測定系(薄膜分解系)を開発することもできた。現行のナイロン生分解性試験では、1か月(活性汚泥法)から4か月(土壌分解性試験)という長期間を有するが、GYAQ-NylCによる分解性を指標とすれば、数時間の酵素反応で判定できるため、生分解性ポリアミド開発における迅速スクリーニングとして利用できる可能性がある。さらに、ナイロン繊維の表面加工など同酵素の産業利用可能性を期

待させる結果も得ている。今後、より高温反応が可能な耐熱性酵素の取得や、単位鎖長当たり多くのニックを与える高活性酵素の取得を行うとともに、GYAQ-NylCを用いたナイロンリサイクル経路を社会に提案できればと考えている。

文 献

- 1) Deguchi, T. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 1366 (1998).
- 2) Kaminuma, A. *et al.*: *Org. Lett.*, **9**, 2533 (2007).
- 3) Dasgupta, S. *et al.*: *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 12291 (1996).
- 4) Negoro, S.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **54**, 461 (2000).
- 5) Kato, K. *et al.*: *Microbiol.*, **141**, 2585 (1995).
- 6) Yasuhira, K. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 7099 (2007).
- 7) Yasuhira, K. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **104**, 521 (2007).
- 8) Yasuhira, K. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **285**, 1239 (2010).
- 9) Negoro, S. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **280**, 39644 (2005).
- 10) Ohki, T. *et al.*: *FEBS Lett.*, **580**, 5054 (2006).
- 11) Negoro, S. *et al.*: *J. Mol. Biol.*, **370**, 142 (2007).
- 12) Ohki, T. *et al.*: *Protein Sci.*, **18**, 1662 (2009).
- 13) Kawashima, Y. *et al.*: *FEBS J.*, **276**, 2547 (2009).
- 14) Kawashima, Y. *et al.*: *J. Mol. Cat. B: Enzym.*, **64**, 81 (2010).
- 15) Kakudo, S. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 3978 (1993).
- 16) Negoro, S. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **174**, 7948 (1992).
- 17) Negoro, S. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **287**, 5079 (2012).
- 18) Nagai, K. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, in press.
- 19) Tanaka, M. *et al.*: *J. Human Environ. Eng.*, **6**, 118 (2004).