

深海由来の生プラ分解菌におけるエステラーゼに関する研究

○座間千夏・関口峻允（海洋大院，海洋研究開発機構），藤岡明日香・石田真巳・榎牧子（海洋大院），濱島裕輝（立教大院），加藤千明（海洋研究開発機構）

近年、汎用プラスチックの代用品として生分解性プラスチック（生プラ）が注目されているが、海洋、特に深海における分解機構に関する知見はまだ少ない。日本海溝から分離された *Moritella* sp. JT01 株が生産するエステラーゼは、深海環境に適応しており、低温・高圧力下で活性を示す。先行研究より、本酵素は熱に対して比較的安定であり、150MPa 圧力下で最大活性を示すことがわかっている。本研究は、好冷好圧性の生プラ分解細菌 JT01 株が生産するエステラーゼの、遺伝子解析および大腸菌における遺伝子の発現を目的としている。

JT01 株の染色体 DNA をランダムに切断し、ベクター pUC119 に挿入した後、*Escherichia coli* JM109 株に導入した。トリブチリンを懸濁させた寒天培地に植菌し、37°C で 1 日培養した後、15°C に移し、数日間でハローを形成するコロニーを探索した。エステラーゼ遺伝子をコードする部分が導入された株であれば、酵素の働きによりトリブチリンが分解され、ハローを形成する（写真参照）。ハローの大きさに関わらず、判別できたものは全て選抜し、エステラーゼ遺伝子の存在を確認するために網羅的にシーケンスを行った。得られたクローンのうち、エステラーゼ・リパーゼ遺伝子を含むものについて、発現条件を検討した。遺伝子をベクター pQE70 に組み込み、*E. coli* BL21 株に導入して、His タグによる発現・精製を行った。

導入断片のシーケンス解析により、5 種類の遺伝子を含むクローンが得られた。うち 3 つは、他の細菌のゲノムから推定したリパーゼ・エステラーゼと、低いながらも有意な相同性を示した。15°C でハローを形成していること、推定リパーゼ・エステラーゼと低い有意な相同性を示したこと、*Moritella* sp. JT01 株の培養液にエステラーゼの存在が確認されていることから、3 つの遺伝子は、新規のエステラーゼまたはリパーゼをコードしている可能性が高い。これらのうち、遺伝子サイズが既知のエステラーゼ・リパーゼに近い、サンプル No. E21 について、エステラーゼ遺伝子発現の条件を検討した。温度 37・30・25°C（24 時間培養）、16・8°C（3 日間培養）で培養を試みた結果、16°C で 3 日間培養した場合の細胞破碎上清が、他の場合に比べて 2~10 倍のエステラーゼ活性を示した。現在、細胞破碎上清を Ni アフィニティーカラムを用いて精製した後、得られた酵素液の性質を調べている。