

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4117646号  
(P4117646)

(45) 発行日 平成20年7月16日(2008.7.16)

(24) 登録日 平成20年5月2日(2008.5.2)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N 15/09	(2006.01)	C 12 N 15/00	Z N A A
C 08 J 11/10	(2006.01)	C 08 J 11/10	
C 08 J 11/18	(2006.01)	C 08 J 11/18	
C 12 N 1/20	(2006.01)	C 12 N 1/20	F
C 12 N 9/00	(2006.01)	C 12 N 1/20	Z A B A

請求項の数 26 (全 28 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号

特願2003-55409 (P2003-55409)

(22) 出願日

平成15年3月3日(2003.3.3)

(65) 公開番号

特開2004-261102 (P2004-261102A)

(43) 公開日

平成16年9月24日(2004.9.24)

審査請求日

平成17年3月9日(2005.3.9)

(73) 特許権者 503360115

独立行政法人科学技術振興機構

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

(74) 代理人 100089705

弁理士 社本 一夫

(74) 代理人 100092886

弁理士 村上 清

(74) 代理人 100076691

弁理士 増井 忠式

(74) 代理人 100075270

弁理士 小林 泰

(74) 代理人 100080137

弁理士 千葉 昭男

(74) 代理人 100096013

弁理士 富田 博行

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】エステル結合含有プラスチック分解微生物、プラスチック分解酵素および該酵素をコードするポリヌクレオチド。

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

バークホルデリア属に属し、エステル結合含有プラスチック分解能を有する微生物、またはエステル結合含有プラスチック分解能を有するその変異株。

## 【請求項 2】

バークホルデリア属に属する微生物がバークホルデリア セパシアである、請求項1記載の微生物。

## 【請求項 3】

バークホルデリア属に属する微生物が、バークホルデリア セパシア T B - 6 2 株、バークホルデリア セパシア T B - 6 3 株、またはバークホルデリア セパシア T B - 6 5 株である、請求項1記載の微生物。 10

## 【請求項 4】

エステル結合含有プラスチックがポリブチレンアジペート、ポリエチレンアジペート、ポリエチレンブチレンアジペート、またはポリジエチレンアジペートである、請求項1乃至3のいずれか一項に記載の微生物。

## 【請求項 5】

エステル結合含有プラスチックがポリウレタンである、請求項1乃至3のいずれか一項に記載の微生物。

## 【請求項 6】

請求項1乃至3のいずれか一項に記載の微生物をエステル結合含有プラスチックと接触

させる工程を含む、エステル結合含有プラスチックの分解方法。

【請求項 7】

エステル結合含有プラスチックがポリブチレンアジペート、ポリエチレンアジペート、ポリエチレンブチレンアジペート、またはポリジエチレンアジペートである、請求項 6 記載の分解方法。

【請求項 8】

エステル結合含有プラスチックがポリウレタンである、請求項 6 記載の分解方法。

【請求項 9】

バークホルデリア属の微生物由来エステル結合含有プラスチック分解酵素を生産する方法であって、10

バークホルデリア属の微生物を培養する工程：

前記培養物から前記酵素を分離・精製する工程：

からなる、前記酵素の生産方法。

【請求項 10】

配列番号 1 乃至 3 のいずれかに示すペプチド配列、または該ペプチド配列に 1 ないし数個のアミノ酸の、欠失、置換、挿入または付加を有するペプチド配列であって、エステル結合含有プラスチック分解酵素活性を維持したペプチド配列からなる、エステル結合含有プラスチック分解酵素。

【請求項 11】

請求項 10 に記載のエステル結合含有プラスチック分解酵素であって、配列番号 1 乃至 3 のいずれかに示すペプチド配列の最初のアミノ酸から 19 番目アミノ酸までが欠失したペプチド配列、または該ペプチド配列に 1 ないし数個のアミノ酸の、欠失、置換、挿入または付加を有するペプチド配列であって、エステル結合含有プラスチック分解酵素活性を維持したペプチド配列からなる、エステル結合含有プラスチック分解酵素。20

【請求項 12】

エステル結合含有プラスチックがポリブチレンアジペート、ポリエチレンアジペート、ポリエチレンブチレンアジペート、またはポリジエチレンアジペートである、請求項 10 または 11 記載の酵素。

【請求項 13】

エステル結合含有プラスチックがポリウレタンである、請求項 10 または 11 記載の酵素。30

【請求項 14】

(a)、(b)、または(c)に示す塩基配列を含む、ポリヌクレオチド：

(a) 配列番号 1 乃至 3 のいずれかに示すアミノ酸配列、または該アミノ酸配列の最初のアミノ酸から 19 番目アミノ酸までが欠失したアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド、またはそれらの相補配列からなるポリヌクレオチド；

(b) ポリエステル分解活性を有するポリペプチドをコードし (a) の塩基配列の一部が欠失、置換、挿入若しくは付加された配列、またはその相補配列からなるポリヌクレオチド；

(c) ポリエステル分解活性を有するポリペプチドをコードし、ストリンジエントな条件下で (a) または (b) の塩基配列にハイブリダイズする、ポリヌクレオチド。40

【請求項 15】

配列番号 4 乃至 6 のいずれかに示される塩基配列を有する、ポリヌクレオチド。

【請求項 16】

エステル結合含有プラスチックがポリブチレンアジペート、ポリエチレンアジペート、ポリエチレンブチレンアジペート、またはポリジエチレンアジペートである、請求項 14 または 15 記載のポリヌクレオチド。

【請求項 17】

エステル結合含有プラスチックがポリウレタンである、請求項 14 または 15 記載のポリヌクレオチド。50

**【請求項 18】**

請求項 10 または 11 記載の酵素をエステル結合含有プラスチックと接触させる工程を含む、エステル結合含有プラスチックの分解方法。

**【請求項 19】**

エステル結合含有プラスチックがポリブチレンアジペート、ポリエチレンアジペート、ポリエチレンブチレンアジペート、またはポリジエチレンアジペートである、請求項 18 記載の方法。

**【請求項 20】**

エステル結合含有プラスチックがポリウレタンである、請求項 18 記載の方法。

**【請求項 21】**

請求項 10 または 11 記載の酵素を発現する遺伝子組換え細胞を培養する工程、前記細胞を破碎する工程、そして前記細胞破碎液をエステル結合含有プラスチックと接触させる工程を含む、エステル結合含有プラスチックの分解方法。

**【請求項 22】**

該細胞が大腸菌である、請求項 21 記載のエステル結合含有プラスチックの分解方法。

**【請求項 23】**

エステル結合含有プラスチックがポリブチレンアジペート、ポリエチレンアジペート、ポリエチレンブチレンアジペート、またはポリジエチレンアジペートである、請求項 21 または 22 記載の方法。

**【請求項 24】**

エステル結合含有プラスチックがポリウレタンである、請求項 21 または 22 記載の方法。

**【請求項 25】**

遺伝子組換え酵素の生産方法であって、

( i ) 請求項 10 または 11 記載の酵素をコードしているポリヌクレオチド配列を含むベクターを含有する宿主細胞を、該宿主細胞の生育に適した条件下で培養する工程；

( j ) 該酵素を該培養物から分離・精製する工程；

を含む、遺伝子組換え酵素の生産方法。

**【請求項 26】**

生分解性を評価すべきポリエステルを、請求項 1 乃至 3 のいずれかに記載の微生物、請求項 10 または 11 に記載の酵素、または請求項 10 あるいは 11 記載の酵素を発現する遺伝子組換え細胞の破碎液と接触させて、該ポリエステルの分解程度によりポリエステルの生分解性を評価する方法。

**【発明の詳細な説明】****【0001】****【発明の属する技術分野】**

本発明は、新規なエステル結合含有プラスチック分解微生物、該プラスチック分解酵素および該酵素をコードするポリヌクレオチド、並びに該微生物、該酵素または該酵素を発現している微生物を利用したプラスチックの分解方法に関する。

**【0002】****【従来の技術】**

近年、プラスチック廃棄物の処理が問題になっている。プラスチック廃棄物の処理方法としては焼却や埋め立てが主であるが、焼却は地球温暖化の促進、埋め立ては埋立地の減少等の問題を抱えている。例えばポリウレタンは、全世界で年間約 600 万 t，国内では約 55 万 t が消費されている。このうち、その発泡緩衝体は断熱性に優れることから冷蔵庫等の断熱材として大量に利用されている。現在、このポリウレタン廃棄物は不燃ゴミとして埋め立て処分される場合が多いが処分場の不足ならびに環境汚染の問題が生じている。一方、自然環境の点から好ましいものに微生物を利用した生分解法があるが、プラスチックは一般に生分解性ではない。

**【0003】**

10

20

30

40

50

プラスチックを分解することのできる微生物に関する報告は限られている。ポリウレタンは分子内にウレタン結合及びエステル結合またはエーテル結合を含み、それらの結合が切断されることによって分解が進む。ポリオール部分のエステル結合はカビや細菌によって切斷されるという報告が数例ある。Darby (Darby R.T. and Kaplan A.M.: Appl. Microbiol., 16, 900-905 (1968)) らはカビによる種々のポリウレタン分解試験を行い、エーテル系よりもエステル系ポリウレタンの方が分解を受け易いことや、イソシアネートやポリオールの種類によって分解特性が異なることを報告している。Kay (Kay, M.J., McCabe, R.W., Morton, L.H.G.: Int. Biodegrad. Biodegrad., 31, 209-225 (1991).) らはエステル系ポリウレタン分解菌として 15 種類の菌を単離し、分解力の強かった *Corynebacterium* 属菌について分解特性を検討した結果について報告している。  
10

## 【0004】

## 【非特許文献 1】

Darby R.T. and Kaplan A.M. 著、Appl. Microbiol., 16, 900-905 (1968)

## 【非特許文献 2】

Kay, M.J., McCabe, R.W., Morton, L.H.G. 著、Int. Biodegrad. Biodegrad., 31, 209-225 (1991)

ポリエステルの微生物分解に関しては、生分解性プラスチックとして知られているポリエステル樹脂を中心に数多くの報告がある。しかし、ウレタンの合成原料として一般的に使用されている液状のポリエステルの分解に関する報告は少ない。常盤らは各種の液状ポリエステルを分解するカビを報告しているが (Tokiwa, Y. and Suzuki, T. (1977) Purification and some properties of polyethylene adipate-degrading enzyme produced by *Penicillium* sp. strain 14-3. Agric. Biol. Chem. 41, 265-274)、これらを分解資化する細菌についてはほとんど知られていない。  
20

## 【非特許文献 3】

Tokiwa, Y. and Suzuki, T. (1977) Purification and some properties of polyethylene adipate-degrading enzyme produced by *Penicillium* sp. strain 14-3. Agric. Biol. Chem. 41, 265-274  
30

更に、プラスチックを分解することのできる酵素に関する報告は、アシドボラックスデラフィルディ (Acidovorax delafieldii) 由来のポリブチレンサクシネート分解酵素 (Uchida H, Nakajima-Kambe T, Shigeno-Akutsu Y, Nomura N, Tokiwa Y, Nakahara T (2002) Cloning and sequence analysis of poly(tetramethylene succinate) depolymerase from Acidovorax delafieldii strain BS-3. J. Biosci. Bioeng. 93: 245-247)、コマモナスアシドボランス (*Comamonas acidovorans*) 由来のポリウレタン分解酵素、アミコラトプシス (*Amycolatopsis*) 属菌 (Pranamuda H, Tsuchii A, Tokiwa Y (2001) Poly(L-lactide)-degrading enzyme produced by *Amycolatopsis* sp. Macromol. Biosci. 1: 25-29, Nakamura K, Tomita T, Abe N, Kamio Y (2001) Purification and characterization of an extracellular poly(L-lactic acid) depolymerase 40 50

e from a soil isolate, *Amycolatopsis* sp. strain K104-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 345~353) およびバチラススミッティ (*Bacillus smithii*) 由来 (Sakai K, Kawano H, Iwami A, Nakamura M, Moriguchi M (2001) Isolation of a thermophilic poly-L-lactide degrading bacterium from compost and its enzymatic characterization. *J. Biosci. Bioeng.* 92: 298~300) のポリ乳酸分解酵素に限られている。

## 【非特許文献4】

Uchida H, Nakajima-Kambe T, Shigeno-Akutsu Y, Nomura N, Tokiwa Y, Nakahara T著、Cloning and sequence analysis of poly(tetramethylene succinate) depolymerase from Acidovorax delafieldii strain BS-3. *J. Biosci. Bioeng.* 93: 245~247、2002年

10

## 【非特許文献5】

Pranamuda H, Tsuchii A, Tokiwa Y著、Poly(L-lactide)-degrading enzyme produced by *Amycolatopsis* sp. *Macromol. Biosci.* 1: 25~29、2001年

20

## 【非特許文献6】

Nakamura K, Tomita T, Abe N, Kamio Y著、Purification and characterization of an extracellular poly(L-lactic acid) depolymerase from a soil isolate, *Amycolatopsis* sp. strain K104-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 345~353、2001年

## 【非特許文献7】

Sakai K, Kawano H, Iwami A, Nakamura M, Moriguchi M著、Isolation of a thermophilic poly-L-lactide degrading bacterium from compost and its enzymatic characterization. *J. Biosci. Bioeng.* 92: 298~300、2001年

30

また、酵素を用いた液状ポリエステルの分解については、動物やカビ、細菌由来のリバーゼ、エステラーゼによるものが多く知られているが(例えば、Tokiwa Y, Suzuki T (1977) Hydrolysis of polyesters by lipases. *Nature* 270: 76~78)、これらの酵素は液状ポリエステルを本来の基質とするものではないため、環境中の分解とは無関係である。

## 【非特許文献8】

40

Tokiwa Y, Suzuki T (1977) Hydrolysis of polyesters by lipases. *Nature* 270: 76~78

## 【0005】

## 【発明が解決しようとする課題】

本発明は、新規なエステル結合含有プラスチック分解微生物、該プラスチック分解酵素および該酵素をコードするポリヌクレオチド、並びに該微生物、該酵素または該酵素を発現している微生物を利用したプラスチックの分解方法を提供することを目的とする。

## 【0006】

## 【課題を解決するための手段】

本発明は、プラスチック、特に分子構造中にエステル結合を有するプラスチックを分解す

50

る能力を有する、平成15年2月26日付で、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに寄託申請し拒否された、バークホルデリア セパシア (*Burkholderia cepacia*) TB-62株、バークホルデリア セパシア TB-63株、またはバークホルデリア セパシア TB-65株、および該微生物が生産するエステル結合含有プラスチック分解能を有する酵素、該酵素をコードするポリヌクレオチドである。また本発明は、該ポリヌクレオチドを組み込んだ微生物にエステル結合含有プラスチック分解能を有する酵素を発現させ、該酵素を精製取得する方法である。尚、バークホルデリア属に属する微生物がエステル結合含有プラスチックの分解能を有することはこれまで知られていなかった。

## 【0007】

10

更に本発明は、該微生物、酵素もしくは該酵素を発現する微生物を用いるエステル結合含有プラスチックの分解方法である。

本発明の酵素は、プラスチック、特に分子構造中にエステル結合を有するプラスチックを分解する能力を有する。より具体的には、本発明の酵素は、バークホルデリア セパシアに由来する、新規なプラスチック分解酵素であり、エステラーゼ活性を有する。

## 【0008】

## 【発明の実施の形態】

微生物

バークホルデリア属に属し、エステル結合含有プラスチック分解能を有する微生物は、既に公知の微生物であってもよく、新たにスクリーニングされた微生物であってもよい。微生物のスクリーニングの一例を示せば、エステル系ポリウレタンを一定期間地面に埋設した後取り出し、該ポリウレタン小片を生理食塩水に加え、ボルテックスで微生物を抽出したものを適宜希釈して、ニュートリエント平板培地にエマルジョン化したポリエステル（例えばポリエチレンアジペート）寒天溶液5mlを重層した平板に塗布する。これを30で3日間培養し、コロニー周辺にポリエステルの分解で生じるクリアーゾーンを生成したコロニーを取得することにより行うことができる。

20

## 【0009】

本発明の微生物は、エステル結合含有プラスチックを分解する能力を有するバークホルデリア属菌であればよい。具体的には、代表例として、平成15年2月26日付で、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに寄託申請し拒否された、バークホルデリア セパシア TB-62株、バークホルデリアセパシア TB-63株、またはバークホルデリア セパシア TB-65株が挙げられる。尚、これらの菌株は自己寄託とし、申請により分譲を認めることとする。バークホルデリア属菌の菌学的性質は、バージーズ・マニュアル・オブ・システムティック・バクテリオロジー (*BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC Bacteriology*) (第1巻1984年、第2巻1986年、第3巻1989年、第4巻1989年) に記載されている。

30

## 【0010】

更に本発明の微生物は、エステル結合含有プラスチックを分解する能力を有するバークホルデリア属菌であれば、野生株、変異株のいずれでも良い。

変異株は、従来からよく用いられている変異剤であるエチルメタノスルホン酸による変異処理、ニトロソグアニジン、メチルメタノスルホン酸などの他の化学物質処理、紫外線照射、或いは変異剤処理なしで得られる、いわゆる自然突然変異によって取得することも可能である。

40

## 【0011】

バークホルデリア属に属する微生物の培養に用いる培地としては、バークホルデリア属に属する微生物が生育できる培地であれば特に制限なく用いることができ、例えば、LB培地 (1%トリプトン、0.5%酵母エキス、1%NaCl) が挙げられるがこれらに限定されない。本発明の微生物の生育に使用する培地は、具体的には、本発明の微生物が資化し得る炭素源、例えばグルコース等、及び本発明の微生物が資化し得る窒素源を含有し、窒素源としては有機窒素源、例えばペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーン・スチープ

50

・リカーや無機窒素源、例えば硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム等を含有することができる。さらに所望により、ナトリウムイオン、カリウムイオン、カルシウムイオン、マグネシウムイオン等の陽イオンと硫酸イオン、塩素イオン、リン酸イオン等の陰イオンとからなる塩類を含んでもよい。さらに、ビタミン類、核酸類等の微量要素を含有することもできる。炭素源の濃度は、例えば0.1～10%程度であり、窒素源の濃度は、種類により異なるが、例えば0.01～5%程度である。また、無機塩類の濃度は、例えば0.001～1%程度である。

#### 【0012】

本微生物が分解できるエステル結合含有プラスチックは、分子構造中にエステル結合を有するものであればよい。制限的でない例としては、ポリウレタン、ポリブチレンアジペート、ポリエチレンアジペート、およびポリエチレンブチレンアジペートが挙げられる。10

#### 【0013】

ポリウレタンとは、分子中にウレタン結合(-NHCOO-)を有する高分子化合物の総称で、多官能イソシアネートとヒドロキル基含有化合物との反応により得られ、エステル、エーテル、アミド、ウレア、カルバメートなどの基を有するポリマーである。ヒドロキシル基もしくはイソシアネート基の官能性数を変化させることで多種多様の分岐あるいは架橋ポリマーを調製することができる。用いるポリオールの種類によってエステル系とエーテル系に大別できる。ポリウレタンは、易加工性、耐腐敗性、耐変質性、低比重等の優れた特性により、弾性体、発泡体、接着剤、塗料、繊維、合成皮革など幅広い用途を持っており、自動車部品としても広く使用されている。本発明の分解方法において適用し得るポリウレタン樹脂の数平均分子量は、特に制限はない。20

#### 【0014】

本発明の微生物または酵素により分解されるエステル結合含有プラスチックの数平均分子量は、特に制限はない。ポリエチレンアジペート分子量約2000、ポリブチレンアジペート分子量約2000、ポリエチレンブチレンアジペート分子量約2000、ポリジエチレンアジペート分子量約2500の分解については実施例に示している。

#### 【0015】

##### 酵素

本発明の酵素は306のアミノ酸から構成され、分子量32121、32193、32145のポリペプチドであり、配列番号1～3のアミノ酸番号1～306で示されるアミノ酸配列により特定される。このアミノ酸配列は、それぞれ配列番号4～6に記載されている塩基配列の、オープンリーディングフレーム(読み枠)部分によりコードされるポリペプチドのアミノ酸配列である。30

#### 【0016】

尚、配列番号1～3のアミノ酸配列はシグナルペプチド部分を有しており、その切断点は配列番号1～3のアミノ酸番号19番目とアミノ酸番号20番目の間であると推定される。このことから成熟型酵素は287のアミノ酸からなるそれぞれ分子量30454、30536、30488のポリペプチドである。これらの酵素はプラスチック以外にエステラーゼの活性測定用の基質であるパラ-ニトロフェニルアセテート(p-nitrophenyl acetate)に対しても分解活性が認められることから、エステラーゼの一種であると考えられる。40

#### 【0017】

本発明のアミノ酸配列には、配列番号1、2または3に示したアミノ酸配列、ならびにその類似体および誘導体が含まれる。さらに、他の微生物に由来する対応するアミノ酸相同配列も本発明に包含される。また、配列番号1、2または3のヌクレオチド配列がコードするいかなるポリペプチドも本発明の範囲に含まれる。

#### 【0018】

配列番号1、2または3に示すポリペプチドのアミノ酸の一部が欠失、置換、挿入若しくは付加されたポリペプチド、例えば配列番号1、2または3に示すアミノ酸配列において、20個以下、好ましくは10個以下、更に好ましくは5個以下のアミノ酸が置換された50

ポリペプチドも、同じ酵素活性を示すことがありうる。従って、同じ酵素活性を有する限り、それらのペプチドも、本発明の酵素に含まれる。また、その様なポリペプチドと配列番号1、2または3に示すアミノ酸配列とは、70%以上、好ましくは80%以上、更に好ましくは90%以上の相同性を有する（相同性の計算は、例えばBLAST（Basic Local Alignment Search Tool）検索を用いることにより行うことができる。）。その様なポリペプチドも、エステル結合含有プラスチック分解反応を触媒するという特徴を有する限り、本発明の範囲に含まれる。

#### 【0019】

本酵素が分解できるプラスチックは、プラスチックの分子構造中にエステル結合を有するものであればよい。制限的でない例としては、ポリウレタン、ポリブチレンアジペート、10 ポリエチレンアジペート、およびポリエチレンブチレンアジペートが挙げられる。

#### 【0020】

##### 遺伝子

次に本発明の酵素をコードする遺伝子は、配列番号4、5または6のオーブンリーディングフレームがコードするアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドである。例えば配列表の配列番号4、5または6に示す、塩基番号1-918で示される塩基配列を含むポリヌクレオチドである。

#### 【0021】

本発明のポリヌクレオチドは、その縮重を含むことができる。縮重とは、異なるヌクレオチドコドンによって1つのアミノ酸がコードされ得る現象をいう。かくして、本発明のプラスチック分解酵素をコードする核酸分子のヌクレオチド配列は縮重により変化することができる。20

#### 【0022】

本発明には、配列番号4、5または6に示したDNA配列、配列番号4、5または6に示したDNA配列の相補配列に高度にストリンジェントな条件下で〔たとえば0.5M NaHPO<sub>4</sub>、7%ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）、1mM EDTA中、65℃でフィルター結合DNAにハイブリダイゼーション、そして0.1×SSC/0.1% SDS中、68℃で洗浄（Ausubel, F. M. et al.編, 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. I, Green Publishing Associates社, およびJohn Wiley & Sons社, ニューヨーク, p. 2.10.3）〕ハイブリダイズするヌクレオチド配列により、コードされるタンパク質も同じ酵素活性を示すことがありうる。従って、同じ酵素活性を有する限り、それらのヌクレオチド配列も、本発明の範囲に含まれる。さらに、配列番号4、5または6に示したDNA配列の相補配列に中程度にストリンジェントな条件下で〔たとえば0.2×SSC/0.1% SDS中、42℃で洗浄（Ausubel, et al., 1989, 前掲）〕ハイブリダイズするヌクレオチド配列により、コードされるタンパク質も同じ酵素活性を示すことがありうる。従って、同じ酵素活性を有する限り、それらのヌクレオチド配列も、本発明の範囲に含まれる。30

#### 【0023】

遺伝子組み換え技術によれば、基本となるDNAの特定の部位に、当該DNAの基本的な特性を変化させることなく、あるいはその特性を改善する様に、人為的に変異を起こすことができる。本発明により提供される天然の塩基配列を有するポリヌクレオチド、あるいは天然のものとは異なる塩基配列を有するポリヌクレオチドに関しても、同様に人為的に挿入、欠失、置換、付加を行う事により、天然のポリヌクレオチドと同等のあるいは改善された特性を有するものとすることが可能であり、本発明はそのような変異ポリヌクレオチドを含むものである。即ち、配列表の配列番号4、5または6に示すポリヌクレオチドの一部が挿入、欠失、置換若しくは付加されたポリヌクレオチドとは、配列番号2に示す塩基配列において、20個以下、好ましくは10個以下、更に好ましくは5個以下の塩基が置換されたポリヌクレオチドである。また、その様なポリヌクレオチドと配列番号2に示す塩基配列とは、70%以上、好ましくは80%以上、更に好ましくは90%以上の相4050

同性を有する（相同性の計算は、例えばBLAST（Basic Local Alignment Search Tool）検索を用いることにより行うことができる。）。その様なポリヌクレオチドも、プラスチックを分解する能力を有するという特徴を有するポリペプチドをコードしている限り、本発明の範囲に含まれる。

#### 【0024】

BLASTによるホモロジー検索の結果、配列番号4に記載されている塩基配列はラルストニア ソラナセラム (*Ralstonia solanacearum*) 由来のリゾホスホリパーゼをはじめとするいくつかの遺伝子と相同性が認められる（図2）。しかし、その相同性は40%以下と低く、また相同性を持つ遺伝子はすべてゲノムプロジェクトからもたらされた推定遺伝子で、タンパク質として翻訳されていることが証明されているものはない。また、配列番号5および6に記載されている塩基配列は、配列番号4に記載されている塩基配列と高い相同性を有する。

10

#### 【0025】

##### 酵素の生産方法

本発明の酵素は、バークホルデリア属に属し、エステル結合含有プラスチック分解能を有する微生物を培養し、該微生物中の酵素を分離・精製することにより、あるいは、本発明のポリヌクレオチド配列を組み込んだ宿主細胞を培養し、該宿主から酵素を分離・精製することにより、生産することができる。

#### 【0026】

バークホルデリア属に属し、エステル結合含有プラスチック分解能を有する微生物は、公知の微生物であってもよく、新たにスクリーニングされた微生物であってもよい。具体的には、代表例として、バークホルデリア セパシアTB-62株、バークホルデリア セパシアTB-63株、またはバークホルデリア セパシアTB-65株が挙げられる。

20

#### 【0027】

バークホルデリア属に属する微生物の培養に用いる培地としては、バークホルデリア属に属する微生物が生育できる培地であれば特に制限なく用いることができ、例えば、LB培地（1%トリプトン、0.5%酵母エキス、1%NaCl）が挙げられるがこれらに限定されない。本発明の微生物の生育に使用する培地は、具体的には、本発明の微生物が資化し得る炭素源、例えばグルコース等、及び本発明の微生物が資化し得る窒素源を含有し、窒素源としては有機窒素源、例えばペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーン・スチーブ・リカーや等、無機窒素源、例えば硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム等を含有することができる。さらに所望により、ナトリウムイオン、カリウムイオン、カルシウムイオン、マグネシウムイオン等の陽イオンと硫酸イオン、塩素イオン、リン酸イオン等の陰イオンとからなる無類を含んでもよい。さらに、ビタミン類、核酸類等の微量要素を含有することができる。炭素源の濃度は、例えば0.1~10%程度であり、窒素源の濃度は、種類により異なるが、例えば0.01~5%程度である。また、無核酸類の濃度は、例えば0.001~1%程度である。ペニバチルス属に属する微生物の培養は、好気条件で、静置培養、振盪培養あるいは通気培養により行うことができる。好ましくは回転振盪培養が良く、回転数は30~250回転/分の範囲であるのが良い。培養温度は10~50℃、特に30℃付近が好ましい。また、培地のpHは4~10の範囲、好ましくは7付近であるのが良い。

30

#### 【0028】

本発明の酵素を、遺伝子組換え細胞により生産する方法は以下の通りである。まず、ポリヌクレオチド分子を宿主細胞に導入して組換え微生物を形成することができる何れかのベクターに挿入する。ベクターはRNAまたはDNA何れか、原核生物または真核生物何れかであり得るが、典型的にはウイルスまたはプラスミドである。ベクターは染色体外エレメント（例えば、プラスミド）として発現させることができるか、あるいはそれを染色体に組込むことができる。組込まれたポリヌクレオチド分子は、染色体プロモーター制御した、天然もしくはプラスミドプロモーター制御下、または幾つかのプロモーター制御の組合せ下とすることができます。ポリヌクレオチド分子の単一または複数コピーを染色体に組

40

50

み込むことができる。次に、該ベクターを宿主細胞にトランスフェクトして組換え細胞を形成させる。トランスフェクトするための適当な宿主細胞はトランスフェクトできる何れかの細菌、菌類（例えば酵母）、昆虫、植物または動物細胞を含む。本発明で使用される好ましい宿主細胞は、限定されるものではないが、例えば大腸菌、バークホルデリア属菌、枯草菌、酵母等を含めた、本発明の酵素の発現に適した何れの微生物細胞も含む。更に、該宿主を、該宿主に適した培養条件にて培養することにより、本発明の酵素を含有した遺伝子組換え細胞を得ることができる。該宿主に適した培養条件は、当業者に周知である。

#### 【 0 0 2 9 】

バークホルデリア属に属しエステル結合含有プラスチック分解能を有する微生物、あるいは本発明のポリヌクレオチド配列を組み込んだ宿主細胞からの本発明の酵素の分離・精製は、通常細胞からの蛋白質の分離・精製に用いられる方法を用いることにより行うことができる。具体的には、細胞を破壊後、通常用いられる分離精製手段を用いることにより行うことができる。細胞の破壊には、制限的でない例として、超音波処理、高圧ホモジナイザー処理、浸透圧ショック法が挙げられる。分離精製手段は、例えば塩析、ゲルろ過法、イオン交換クロマトグラフィーなどの方法を適宜組み合わせて用いればよい。更に、遺伝子組換えによる酵素の生産では、組み換え型酵素のC末端にHis-tagを有するよう20に生産させ、培養菌体を遠心集菌し、ペリプラズム画分を浸透圧ショック法にて抽出し、組み換え型酵素はC末端にHis-tagを有しているため、ニッケルをキレートしたカラムによって容易に精製できる。

#### 【 0 0 3 0 】

##### プラスチック分解方法

更に、本発明は、本酵素により、もしくは該酵素を発現する微生物を利用した、エステル結合含有プラスチックを分解する方法を提供する。つまり、本発明のエステル結合含有プラスチックを分解する方法は、酵素のエステル結合含有プラスチックを分解する作用を利用するものの、該酵素を発現する微生物の増殖過程でエステル結合含有プラスチックが分解され栄養源として消費されることを利用する、あるいは該酵素を発現する微生物菌体、例えば休止菌体を利用するものである。

#### 【 0 0 3 1 】

あるいは、本発明の酵素を発現する微生物菌体を常法により凍結乾燥した粉末状、その粉末と各種ビタミンやミネラル、必要な栄養源、例えば酵母エキス、カザミノ酸、ペプトン等を配合した後に打錠した錠剤等固形状の形態の調製物としてプラスチックの処理に提供しても良い。また、該酵素を発現する微生物菌株を活性汚泥およびコンポストの成分として利用することもできる。

#### 【 0 0 3 2 】

本発明の酵素を、該酵素を含有する錠剤等として利用に供することもできる。酵素の粗酵素液、粗酵素粉末、または精製酵素の他に、通常酵素錠剤等に用いられる他の成分、例えば安定化剤、賦形剤、pH調整剤、增量剤、結合剤等を適宜配合してもよい。また、剤型も特に限定されず、用途に応じて散財、顆粒剤、錠剤等の剤型を選択すればよい。

#### 【 0 0 3 3 】

本発明の方法に用いる酵素は、バークホルデリアセバシアTB-62株、バークホルデリアセバシアTB-63株、またはバークホルデリアセバシアTB-65株から調製される酵素に限定されるわけではなく、組換えDNA技術によって創製された微生物、例えば発現ベクターに接続された該酵素をコードするポリヌクレオチドが導入された宿主、例えば大腸菌、バークホルデリア属菌、枯草菌、酵母等により生産された酵素を使用することも可能である。

#### 【 0 0 3 4 】

組換えDNA技術による微生物の創製は、当該分野において通常用いられている方法により行うことができる。例えば、エステル結合含有プラスチック分解酵素遺伝子の高効率発現系の構築は、現在最も効率的なポリペプチド発現用宿主-ベクター系の一つであるpE

10

20

30

40

50

Tシステムを用いて構築することができる。

**【0035】**

本発明の方法で使用する酵素は、必ずしも十分に精製する必要はないが、酵素の精製が望まれるときは、通常蛋白質の精製に用いられる方法、例えば塩析、ゲルろ過法、イオン交換クロマトグラフィーなどの方法を適宜組み合わせて用いればよい。一例を示せば、組み換え型酵素のC末端にHis-tagを有するように生産させ、培養菌体を遠心集菌し、ペリプラズム画分を浸透圧ショック法にて抽出する。組み換え型酵素はC末端にHis-tagを有しているため、ニッケルをキレートしたカラムによって容易に精製できる。

**【0036】**

本発明のエステル結合含有プラスチックを分解する方法により分解できるプラスチックは  
10  
、前記した通り、プラスチックの分子構造中にエステル結合を有するものであればよい。  
制限的でない例としては、ポリウレタン、ポリブチレンアジペート、ポリエチレンアジペート、およびポリエチレンブチレンアジペートが挙げられる。

**【0037】**

分解に共されるエステル結合含有プラスチックは、例えば液体の培地中にエマルジョンとして、あるいは液状、粉体の形で加えても良いし、フィルム、ペレット等の塊として加えても良い。なお、培地に対するエステル結合含有プラスチックの投入量は、0.01~10重量%が望ましい。添加する酵素あるいは微生物量は極少量であってもよいが、分解効率を考慮してエステル結合含有プラスチックに対して湿重量として、酵素の場合は0.001重量%以上、微生物の場合は0.1重量%以上が好ましい。また、分解に供するエス  
20  
テル結合含有プラスチックは、1種類であっても複数種類であっても良い。

**【0038】**

精製酵素あるいは粗精製酵素のエステル結合含有プラスチックを分解する作用を利用する態様では、エステル結合含有プラスチックの分解に際し、緩衝液にエステル結合含有プラスチックを添加した培地などであっても良いが、その他に窒素源、無機塩、ビタミンなどを添加しても良い。緩衝液としては、例えばリン酸緩衝液が挙げられる。

**【0039】**

本発明の酵素を発現する微生物の増殖過程でエステル結合含有プラスチックが分解され栄養源として消費されることを利用する態様では、エステル結合含有プラスチックを単一の炭素源として与えることも、他の炭素源とともに与えることもできる。使用し得る培地としては、用いる微生物に適した培地であれば特に制限はないが、炭素源としては、グルコース等、及び該微生物が資化し得る窒素源を含有し、窒素源としては有機窒素源、例えばペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーン・スチーブ・リカー等、無機窒素源、例えば硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム等を含有することができる。さらに所望により、ナトリウムイオン、カリウムイオン、カルシウムイオン、マグネシウムイオン等の陽イオンと硫酸イオン、塩素イオン、リン酸イオン等の陰イオンとからなる無機塩を含んでもよい。さらに、ビタミン類、核酸類等の微量要素を含有することもできる。炭素源の濃度は、例えば0.1~10%程度であり、窒素源の濃度は、種類により異なるが、例えば0.01~5%程度である。また、無機塩類の濃度は、例えば0.001~1%程度である。

**【0040】**

微生物の有する酵素のエステル結合含有プラスチックを分解する作用を利用する態様、すなわち増殖した後の微生物菌体、例えば休止菌体を利用する態様では、エステル結合含有プラスチックの分解に際し、該微生物の増殖を伴わないため、緩衝液にエステル結合含有プラスチックを添加した培地などであっても良いが、その他に窒素源、無機塩、ビタミンなどを添加しても良い。緩衝液としては、例えばリン酸緩衝液が挙げられる。

**【0041】**

本発明において、酵素を発現する増殖中の微生物をエステル結合含有プラスチックの分解を利用する場合は、好気条件で、静置培養、振盪培養あるいは通気培養を行えばエステル結合含有プラスチックの分解がみられる。好ましくは回転振盪培養が良く、回転数は30~250回転/分の範囲であるのが良い。培養条件としては、培養温度は10~50°  
50

特に 30 付近が好ましい。また、培地の pH は 4 ~ 10 の範囲、好ましくは 7 付近であるのが良い。

**【 0042 】**

エステル結合含有プラスチックの分解に要する時間は、分解に供するプラスチックの種類、組成、形状及び量、使用した微生物の種類及び樹脂に対する相対量、その他種々の培養条件等に応じて変化しうる。

**【 0043 】**

培地中のエステル結合含有プラスチックの分解の確認は、例えば、分解に供したプラスチックの重量減少の測定、エマルジョンとして供する場合はプラスチックの分解によるクリアーゾーンの形成により測定することができる。

10

**【 0044 】**

**ポリエステルの生分解性評価方法**

さらに本発明は、請求項 1 乃至 3 のいずれかに記載の微生物、請求項 9、11 または 12 に記載の酵素、または請求項 9、11 あるいは 12 記載の酵素を発現する遺伝子組換え細胞を用いる、ポリエステルの生分解性評価方法である。

**【 0045 】**

上記微生物、酵素および細胞は、天然より分離された微生物および酵素を含有するため、分解試験に供するポリエステルが自然界において分解されるのかの評価に用いることができる。

**【 0046 】**

例えば、請求項 9、11 または 12 に記載の酵素をリン酸緩衝液に適量入れ、そこに評価サンプルとしてポリエステルを投入し、数日間 30 にて培養し、ポリエステルの分解を測定することにより、該評価サンプルの生分解性を評価することができる。

20

**【 0047 】**

本発明のポリエステルの生分解性評価方法は、生分解性を有する新規ポリエステルの設計にも有用である。

**【 0048 】**

**【 実施例 】**

本発明を実施例によってさらに詳しく説明するが、本発明の範囲はこれらのみに限定されるものではない。

30

**実施例 1 エステル結合含有プラスチック分解菌のスクリーニング**

**実験材料**

平均分子量の異なる数種類のポリジエチレンアジペート (MW = 554、935、2,500、2,690) とトリレン - 2,4-ジイソシアネート (2,4-TDI) をOH基とイソシアネート基の比が 1 : 1 になるように無水状態で混合し、エステル系ポリウレタンを合成した。これら各種ポリウレタンを一定期間地面に埋設した後取り出し、微生物の分離源とした。

**【 0049 】**

**検索方法**

ニュートリエント平板培地 (肉エキス 3 g / 1、ペプトン 5 g / 1、寒天 20 g / 1) にエマルジョン化した各種ポリエステル (ポリエチレンアジペート、ポリブチレンアジペート、ポリエチレンブチレンアジペート、ポリジエチレンアジペート) 寒天溶液 5 ml を重層した。分離源のポリウレタン小片を生理食塩水に加え、ボルテックスで微生物を抽出したものを適宜希釀して平板に塗布した。これを 30 で 3 日間培養し、コロニー周辺にポリエステルの分解で生じるクリアーゾーンを生成したコロニーをポリエステル分解菌とした。

40

**【 0050 】**

**スクリーニング結果**

70 種類の土壤埋設ポリウレタン小片から、高いポリエステル分解活性を持った細菌を 3 株取得した。これらをそれぞれ TB - 62、TB - 63、TB - 65 とし、-80 にて

50

凍結保存した。

【0051】

分離微生物の同定

生理学的試験は一般的な方法に従って行った。同定には *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Baltimore: WILLIAMS & WILKINS Co., (1984) を参考にした。また、米国 BIOLOG 社製の微生物同定システム (Microlog 3) も使用した。16S rDNA の配列決定と解析はダイレクト PCR 法を用い、プライマーには真正細菌 16S rDNA のほぼ全長を增幅することのできる 27F および 1492R のプライマーセットを使用した。

10

【0052】

TB-62、TB-63、TB-65 について生理試験を行った結果、すべてグラム陰性の桿菌であり、運動性を有していた。また、BIOLOG の結果より、TB-63、TB-65 の 2 株がバークホルデリア属、TB-62 株がバークホルデリアセパシアに近縁との結果を得た。

【0053】

【表 1】

表1 BIOLOG 同定結果 (TB-62)

20

TB-62

	可能性 (%)
<i>Burkholderia cepacia</i>	92
<i>Burkholderia spinosa</i>	8
<i>Burkholderia multivorans</i>	0
<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	0
<i>Burkholderia glathei</i>	0

30

【0054】

【表 2】

表2 BIOLOG 同定結果 (TB-63)

TB-63

	可能性 (%)
<i>Burkholderia spinosa</i>	98
<i>Burkholderia multivorans</i>	2
<i>Burkholderia cepacia</i>	0
<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	0
<i>Pseudomonas synxantha</i>	0

40

【0055】

【表 3】

表3 BIOLOG同定結果 (TB-65)

TB-65

	可能性 (%)	
<i>Burkholderia spinosa</i>	92	
<i>Burkholderia multivorans</i>	8	
<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	0	
<i>Burkholderia cepacia</i>	0	10
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0	

## 【0056】

さらに、コロニーダイレクトPCRによって本菌株の16S rDNAのほぼ全長を増幅し、そのうちの上流領域と下流領域それぞれ約500bpの塩基配列を決定した。3菌株の上流領域475bpの配列を配列表に示す（それぞれ配列番号7、8、9）。この配列に基づいてBLASTにより相同性検索を行ったところ、3株すべてがバーカホルデリアセパシアであると同定された。

## 【0057】

20

実施例2 得られた微生物によるポリエステルの分解試験

実施例1のスクリーニングの場合と同様に、ニュートリエント平板培地にエマルジョン化した各種ポリエステル（ポリエチレンアジペート分子量約2000、ポリブチレンアジペート分子量約2000、ポリエチレンブチレンアジペート分子量約2000、ポリジエチレンアジペート分子量約2500）寒天溶液5mlを重層したものを用いた。ここに供試菌を塗布した。これを30℃で3日間培養し、コロニー周辺にポリエステルの分解で生じるクリアーゾーンの大きさにより、分解力を判定した。

## 【0058】

実験結果を表4に示した。分解力はTB-62株が最も強く、また、TB-63株の基質特異性は他の2株と異なっていた。

30

## 【0059】

## 【表4】

表4 各種ポリエステルの対する分離菌の分解活性

	TB-62	TB-63	TB-65
polyBA	++	-	+
polyEA	++	+	+
polyEBA	++	+	+
polyDEA	++	+	+

BA, ブチレンアジペート; EA, エチレンアジペート;  
EBA, エチレンブチレンアジペート; DEA, ジエチレンアジペート

## 【0060】

実施例3 バークホルデリア セパシアTB-62株由来エステル結合分解酵素遺伝子のクローニング

## 方法

エステル結合分解酵素遺伝子の取得を目的として、バークホルデリア セパシアTB-62株の遺伝子ライブラリー作成を行った。定法によりゲノムDNAを調製し、制限酵素S 30 a u 3 A 1による部分分解を行った。これをアガロースゲル電気泳動に供し、約4~6 kb pの大きさの断片を回収した。この回収されたpUC18ベクターのマルチクローニングサイト上BamH1サイトに連結した。これをE.coli DH10B株にエレクトロポレーションで導入し、得られた形質転換体を遺伝子ライブラリーとした。

## 【0061】

これを、乳化させた0.5%ポリエチレンブチレンアジペートを重層したLB(10 μg / mlアンピシリンを含む)平板培地にて、37、1~3日間培養した。コロニー周辺にクリアゾーンが確認された形質転換体をピックアップし、候補株として保存した。

## 【0062】

## 結果

約2万のコロニーを検索した結果、1株の候補クローンを取得した。プラスミド抽出して解析した結果、約2.5kb pのインサートを確認した。この2.5kb pの断片をシーケンスした結果、3つのオープンリーディングフレーム(ORF)が認められ(図1)、そのうちの1つ(ebaA1)が細菌由来のリバーゼと30~35%の相同性が認められた。本ORF部分のみをPCRによって增幅し、再度大腸菌に導入した結果、ポリエチレンブチレンアジペートを重層寒天平板上でクリアゾーンの形成が認めたことから、本ORFがポリエステル分解酵素本体であると断定した。本遺伝子の全塩基配列を配列番号4に示した。本酵素は306アミノ酸からなり、N末端から19アミノ酸がシグナル配列であると推定された(配列番号1)。分子量は前駆体で32,121Da、シグナルを除いた成熟(mature)型で30,454Daと計算された。BLASTによるホモ

10

20

30

40

50

ロジー検索の結果、本遺伝子はラルストニア ソラナセラム由来のリゾホスホリパーゼをはじめとするいくつかの遺伝子と相同性が認められた（図2）。しかし、その相同性は40%以下と低く、また相同性を持つ遺伝子はすべてゲノムプロジェクトからもたらされた推定遺伝子で、タンパク質として翻訳されていることが証明されているものはなかった。

#### 【0063】

#### 実施例4 発現ベクターを用いた配列番号4のヌクレオチド配列(e b a A)の高発現方法

高発現ベクターへの配列番号4のヌクレオチド配列の組み込み

配列番号4のヌクレオチド配列の開始コドンから停止コドンまでをPCRで増幅し、発現ベクターpET21a(+) (Novagen, USA)のNheI/XhoIサイトに挿入、pEBA-PETを作成した。これをE.coliBL21(DE3)株に形質転換し、LB(10μg/mlアンピシリンを含む)培地へ植菌、32℃、4時間培養後、IPTGを添加（終濃度0.1mM）し、3時間酵素の発現を誘導した。これを集菌、超音波にて破碎、遠心して得た上清を、粗酵素液とした。

#### 【0064】

#### 活性測定法

エステラーゼ活性の測定は、基質としてp-ニトロフェニルアセテートを用い、酵素反応によって生じたp-ニトロフェノールの量を、405nmの吸光度を測定することにより定量した。1分間に1μmolのp-ニトロフェノールを生じさせる酵素量を1unitとした。

#### 【0065】

ポリエステル分解活性は基質としてポリエチレンブチレンアジペートをエマルジョン化したもの用いた。100mlの蒸留水(200ppmのPlaysurf A210Gを含む)に、ジクロロメタンに溶解した0.5gのポリエチレンブチレンアジペートを添加し、10,000rpm、5分間モジナイザーで攪拌した。80℃で1~2時間加温し、溶液中のジクロロメタンを除去した。これをエマルジョン溶液とした。1.8mlのエマルジョン溶液に、0.2mlの1Mリン酸カリウム緩衝液(pH7.0)、0.1mlの酵素溶液を添加し、30℃で1時間反応を行った。反応終了後、580nmの吸光度を測定した。吸光度の減少量を、ポリエチレンブチレンアジペート分解活性とした。

#### 【0066】

#### 結果

常法によりペリプラズム画分を回収し、酵素活性を測定したところ、エステラーゼ活性(13.6U/ml)が認められた。また、ポリエチレンブチレンアジペート分解活性は、1時間で98%のOD減少率が認められた。また、本画分をSDS-PAGEに供したところ、分子量約33,000の位置に太いバンドが観察され、これは配列番号4の配列に基づく推定分子量とほぼ一致した。

#### 【0067】

一方、コントロール系（配列番号4のヌクレオチド配列を含まない空のプラスミド）において、エステラーゼ活性はほとんど見られず、ポリエチレンブチレンアジペート分解活性は全く観察されなかった。また、SDS-PAGEにおいても、強く発現したバンドは認められなかった。

#### 【0068】

#### 実施例5 バークホルデリア セパシアTB-63株およびTB-65株由来エステル結合分解酵素遺伝子のクローニング

#### 方法

バークホルデリア セパシアTB-62株由来の配列番号4記載のヌクレオチド配列を基にして、遺伝子の全体を増幅可能なプライマーを作成し、バークホルデリア セパシアTB-63株およびTB-65の全染色体DNAに対してPCRを行った。得られたバンドを、前述と同様の方法で発現ベクターpET21a(+)に挿入した。これをE.coliBL21(DE3)株に形質転換し、乳化ポリエチレンブチレンアジペートを重層し

10

20

30

40

50

た L B ( 10  $\mu$  g / ml アンピシリンおよび 0.1 mM IPTG を含む ) 平板培地へ植菌した。

【 0 0 6 9 】

結果

PCRを行ったところ、両方の菌株において特定なバンドの増幅が認められた。そこで、これらの PCR 産物を発現ベクターに組み込み、ポリエチレンブチレンアジペート分解活性を調べた。その結果、どちらの PCR 産物からも、ポリエチレンブチレンアジペート分解酵素活性が認められた。そこで、バークホルデリア セパシア TB - 6 3 株由来のエステル結合分解酵素遺伝子を配列番号 5、バークホルデリア セパシア TB - 6 5 株由来のエステル結合分解酵素遺伝子を配列番号 6 とし、それぞれシーケンスを行った。その結果、これらの遺伝子はバークホルデリア セパシア TB - 6 2 株由来のエステル結合分解酵素遺伝子である配列番号 4 記載の配列と同一ではなかったが、高い相同意を持っていた(図 3)。10

【 0 0 7 0 】

【 配列表 】

## SEQUENCE LISTING

〈110〉 科学技術振興事業団

〈120〉 エステル結合含有プラスチック分解微生物、プラスチック分解酵素および該酵素をコードするポリヌクレオチド

10

〈130〉 022986

〈160〉 6

〈210〉 1

〈211〉 306

〈212〉 PRT

20

〈213〉 Burkholderia cepacia TB-62

〈400〉 1

Met Thr Ala Thr Thr Pro Ala Ala Ala Pro Ala Thr Ala Gly Pro

1 5 10 15

Ala Pro Ser Ser Pro Pro Ala Pro Thr Met Gly Arg Leu Arg Thr Ala

20 25 30

30

Asp Gly Leu Glu Leu Ala Ser Tyr Arg Trp Pro Ala Gly Asp Gly Thr

35 40 45

Glu Gln Pro Arg Ala Thr Ile Ala Leu Val His Gly Leu Ala Glu His

50 55 60

Ala Gly Arg Tyr Ala Ala Leu Ala Gly Arg Leu Asn Ala Ala Gly Ile

65 70 75 80

40

Glu Val Leu Ala Val Asp Leu Arg Gly His Gly Gln Ser Pro Gly Lys

85 90 95

Arg Ala Trp Val Glu Arg Phe Asp Gly Tyr Leu Asn Asp Ala Asp Ala  
           100                 105                 110  
 Leu Val Ala Glu Ala Ala Arg Gly Asn Ser Pro Leu Phe Leu Met Gly  
           115                 120                 125  
 His Ser Met Gly Gly Ala Val Ala Ala Leu Tyr Ala Ile Glu Arg Ala  
           130                 135                 140  
 Pro Ala Arg Gly His Gly Leu Ser Gly Leu Val Leu Ser Ser Pro Ala      10  
  145                 150                 155                 160  
 Leu Ala Pro Gly Arg Asp Val Pro Arg Trp Met Leu Ala Val Ser Arg  
           165                 170                 175  
 Val Ile Ser Arg Ile Trp Pro Thr Phe Pro Ala Ile Arg Ile Asp Ala  
           180                 185                 190  
 Ala Leu Leu Ser Arg Asp Pro Ala Ile Val Ala Ala Asn Arg Ala Asp      20  
           195                 200                 205  
 Pro Leu Val His His Gly Ala Val Pro Ala Arg Thr Gly Ala Glu Ile  
           210                 215                 220  
 Leu Asp Ala Met Ala Arg Ile Glu Ser Gly Arg Gly Ala Leu Arg Val  
  225                 230                 235                 240  
 Pro Val Leu Val Tyr His Gly Thr Glu Asp Lys Leu Thr Glu Pro Asp  
           245                 250                 255  
 Gly Ser Arg Ala Phe Gly Ala His Ala Gly Ser Pro Asp Arg Thr Leu      30  
           260                 265                 270  
 Thr Leu Tyr Glu Gly Gly Phe His Glu Thr Met Asn Asp Leu Glu Arg  
           275                 280                 285  
 Asp Arg Val Ile Asp Ala Leu Ile Ala Trp Ile His Ala Arg Val Pro  
           290                 295                 300  
 Ala Arg   40

〈211〉 306

〈212〉 PRT

〈213〉 Burkholderia cepacia TB-63

〈400〉 2

Met Thr Ala Thr Thr Pro Ala Ala Ala Pro Ala Thr Ala Gly Ser

1	5	10	15	10
---	---	----	----	----

Ala Pro Ser Ser Pro Pro Ala Pro Lys Met Gly Arg Leu Arg Thr Ala

20	25	30
----	----	----

Asp Gly Leu Glu Leu Ala Ser Tyr Arg Trp Pro Ala Gly Asp Ser Thr

35	40	45
----	----	----

Ala Pro Ser Arg Ala Thr Ile Ala Leu Val His Gly Leu Ala Glu His

50	55	60
----	----	----

Ala Gly Arg Tyr Ala Ala Leu Ala Gly Arg Leu Asn Ala Ala Gly Ile

65	70	75	80	20
----	----	----	----	----

Asp Val Leu Ala Ile Asp Leu Arg Gly His Gly Gln Ser Pro Gly Lys

85	90	95
----	----	----

Arg Ala Trp Val Glu Arg Phe Asp Gly Tyr Leu Asn Asp Ala Asp Ala

100	105	110
-----	-----	-----

Leu Val Ala Glu Ala Ala Arg Gly Asn Ala Pro Leu Phe Leu Met Gly

115	120	125
-----	-----	-----

His Ser Met Gly Gly Ala Val Ala Ala Leu Tyr Ala Ile Glu Arg Ala

130	135	140
-----	-----	-----

Pro Ala Ser Gly Arg Ala Leu Thr Gly Leu Val Leu Ser Ser Pro Ala

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

Leu Ala Pro Gly Arg Asp Val Pro Arg Trp Met Leu Ala Val Ser Arg

165	170	175
-----	-----	-----

Val Ile Ser Arg Ala Trp Pro Thr Phe Pro Ala Ile Arg Ile Asp Ala

180	185	190
-----	-----	-----

40

30

10

Ala Leu Leu Ser Arg Asp Pro Ala Ile Val Ala Ala Asn Arg Ala Asp  
                  195                 200                 205  
 Pro Leu Val His His Gly Ala Val Pro Ala Arg Thr Ser Ala Glu Ile  
                  210                 215                 220  
 Leu Asp Ala Met Ala Arg Ile Glu Arg Gly Arg Asp Ala Leu Arg Val  
                  225                 230                 235                 240  
 Pro Val Leu Val Tyr His Gly Thr Glu Asp Lys Leu Thr Glu Pro Asp      10  
                  245                 250                 255  
 Gly Ser Arg Ala Phe Gly Ala Arg Val Gly Ser Pro Asp Arg Thr Leu  
                  260                 265                 270  
 Thr Leu Tyr Glu Gly Gly Phe His Glu Thr Met Asn Asp Leu Glu Arg  
                  275                 280                 285  
 Asp Arg Val Ile Asp Ala Leu Ile Ala Trp Ile His Ala Arg Val Pro      20  
                  290                 295                 300  
 Ala Arg

<210> 3  
 <211> 306  
 <212> PRT  
 <213> Burkholderia cepacia TB-65      30

<400> 3  
 Met Thr Ala Thr Thr Pro Ala Ala Ala Pro Ala Thr Ala Gly Ser  
       1              5                 10                 15  
 Ala Pro Ser Ser Pro Pro Ala Pro Lys Met Gly Arg Leu Arg Thr Ala  
       20                 25                 30  
 Asp Gly Leu Glu Leu Ala Ser Tyr Arg Trp Pro Ala Gly Asp Ser Thr      40  
       35                 40                 45

Ala Pro Pro Arg Ala Thr Ile Ala Leu Val His Gly Leu Ala Glu His  
 50 55 60  
 Ala Gly Arg Tyr Ala Ala Leu Ala Gly Arg Leu Asn Ala Ala Gly Ile  
 65 70 75 80  
 Asp Val Leu Ala Ile Asp Leu Arg Gly His Gly Gln Ser Pro Gly Lys  
 85 90 95  
 Arg Ala Trp Val Glu Arg Phe Asp Gly Tyr Leu Asn Asp Ala Asp Ala 10  
 100 105 110  
 Leu Val Ala Glu Ala Ala Arg Gly Asn Ala Pro Leu Phe Leu Met Gly  
 115 120 125  
 His Ser Met Gly Gly Ala Val Ala Ala Leu Tyr Ala Ile Glu Arg Ala  
 130 135 140  
 Pro Ala Ser Gly Arg Ala Leu Thr Gly Leu Val Leu Ser Ser Pro Ala 20  
 145 150 155 160  
 Leu Ala Pro Gly Arg Asp Val Pro Arg Trp Met Leu Ala Val Ser Arg  
 165 170 175  
 Val Ile Ser Arg Ala Trp Pro Thr Phe Pro Ala Ile Arg Ile Asp Ala  
 180 185 190  
 Ala Leu Leu Ser Arg Asp Pro Ala Ile Val Ala Ala Asn Arg Ala Asp  
 195 200 205  
 Pro Leu Val His His Gly Ala Val Pro Ala Arg Thr Gly Ala Glu Ile 30  
 210 215 220  
 Leu Asp Ala Met Ala Arg Ile Glu Arg Gly Arg Asp Ala Leu Arg Val  
 225 230 235 240  
 Pro Val Leu Val Tyr His Gly Thr Glu Asp Lys Leu Thr Glu Pro Asp  
 245 250 255  
 Gly Ser Arg Ala Phe Gly Ala Arg Val Gly Ser Pro Asp Arg Thr Leu 40  
 260 265 270  
 Thr Leu Tyr Glu Gly Gly Phe His Glu Thr Met Asn Asp Leu Glu Arg

275	280	285
Asp Arg Val Ile Asp Ala Leu Ile Ala Trp Ile His Ala Arg Ala Pro		
290	295	300
Ala Arg		

<p><b>&lt;210&gt; 4</b></p> <p><b>&lt;211&gt; 921</b></p> <p><b>&lt;212&gt; DNA</b></p> <p><b>&lt;213&gt; Burkholderia cepacia TB-62</b></p> <p><b>&lt;400&gt; 4</b></p> <p>atgaccggcca ccaccacgcc ggccgcccgc cctgccacccg ccggaccggc accatcgicc 60      ccgccccgcgc cgacgatggg ccgcctgcgt accgcgcacg ggctcgaact ggcgtcgta 120      cgctggccgg ctggcgacgg caccgagcag ccgcgcgcga cgatcgcact cgtacatggc 180      ctgccgaac acgcgggtcg ttagcccgcc tcgcgggcc ggctgaatgc ggccggcatc 240      gaggttgtcg cggtcgaccc ggcgcggcac ggccagtcac cgggcaagcg cgccctgggtc 300      gagcgcctcg acggctaccc gaacgatgctg gatgcgcctgg tcgcgaagg cgacgcggc 360      aattcgccgc tgttccctgat gggcacagc atggcgagg cggtcgcggc gctgtacgct 420      atcgaacgtg caccggcacg cggccacggg ctgagcggcc tcgtgcgtc gagccggcg 480      ctgcgcggc gacgtgacgt gccgcgcctgg atgcgcgcgc tgagccgcgt catcagccgc 540      atatggccga cttccccgc aatcaggatc gacgcgcgc tgctgtcgct cgatccggcc 600      atcgtcgacg ccaatcgatc cgatccgcgc gtccatcacg gcgcggtgcc cgcgccacc 660      ggccgcggaga ttctcgacgc gatggcacgc atcggaaagcg gtcgcggcg gttgcgcgtt 720      ccggtgtcg tctatcacgg caccgaggac aagctgaccg aacccgacgg cagccgtcg 780      ttccggtcgc acgcggcgc gcccgcgc acgcgtgacgc tatacgaagg aggtttcac 840      gaaacgatga acgatctcgatc acgcgtgcgtc gtgatgcgtc cgctgtatcgatc 900      ggcgcgtgc cggcgcgtgc a   </p>	10 20 30 40
--	----------------------

**<210> 5**

**<211> 921**

**<212> DNA**

**<213> Burkholderia cepacia TB-63**

**<400> 5**

atgaccggcca ccaccacgcc ggccgcgcgcg cctgccacccg ccggatcgcc gccttcgtcg 60 10  
 ccgccccgcgc cgaaaatggg ccggctgcgc accgcggacg ggctcgaact ggcgtcgta 120  
 cgcgtggccgg ccggcgacag caccgcgcgc tcgcgcgcaa cgatcgcgt cgttacggc 180  
 ctcgcgcgaac acgcgggtcg ttagccgcg ctcgcggcc ggctgaacgc ggccggcatc 240  
 gacgtgtcg cgatcgatct gcgcgggcac ggccagtcgc ccggaaagcg agccgtggtc 300  
 gagcggttcg acggtaacct gaacgatgcg gatgcgtgg tcgcggaagc cgccgcgcgc 360  
 aatgcaccgc tgttccctgat gggacacagc atggcgccgc ccgtcgccgc gctgtacgcg 420  
 atcgaacgcg cgccggccag cggccgcgcg ctgacgggcc tcgtactgtc gagccggcg 480 20  
 ctcgcaccgg ggcgacgt gcccgcgtgg atgcgtcggt tgagccgcgt catcagccgc 540  
 gctgtggccga cttccccgc gattcggtac gacgcggcgc tgctgtcgcg cgatccggcc 600  
 atcgtcgccg ccaatcgccgc cgatccgcgc gtgcatacg ggcgggtgcc cgcacgcacc 660  
 agcgcggaga ttctcgatgc gatggcgctg atcgaacgcg gccgcgtatgc gctgcgcgtc 720  
 ccggtgtcg tctatcacgg caccgaggac aagctgaccg aaccggacgg cagccgcgcg 780  
 ttccggcgccg gtgtcggttc gcccgcgtgc acgcgtacgc tatacgaagg cggcttccac 840  
 gaaacgatga acgatctcga acgcgtacgc gtgtacgcg cgctgtacgc gtggattcac 900 30  
 ggcgcgtgc cggcgccgt a

**<210> 6**

**<211> 921**

**<212> DNA**

**<213> Burkholderia cepacia TB-65**

**<400> 6**

40

atgaccggcca ccaccacgccc ggccgcccgcg cctgccaccc cgatcgcc gccttcgtcg 60  
ccgccccgcgc cggaaaatggg cggctgcgc acccgccgacg ggctcgaact ggcgtcgta 120  
cgctggccgg cggcgacag caccggccg cgcgcgcaaa cgatcgccgt cgttcacggc 180  
ctcgccagaac acgggggtcg ttatgccgcg ctgcggccgc ggctgaacgc ggccggcatc 240  
gacgtgtcg cgatcgatct gcgcggcac ggccagtcgc cggaaagcg agcctgggtc 300  
gagcggttgc acggtaacct gaacgatgcg gatgcgtgg tcgcggaaagc cgccgcggc 360  
aatgcaccgc tggccctgat gggacacagc atggccggcg ccgtcgccgc gctgtacgcg 420  
atcgaacgcg cggccggccag cggccgcgcg ctgacggccc tcgtactgtc gagcccgccg 480  
ctcgccaccgg ggcgcgacgt gccgcgttg atgcgtcgcc tgagccgcgt catcagccgc 540  
gcgtggccga cttccccgc gattcggtatc gacgcggcgc tgctgtcgcg cgatccggcc 600  
atcggtcgcc ccaatcgccgc cgatccgcgc gtgcatacg gcgcggtgcc cgcacgcacc 660  
ggcgcggaga ttctcgatgc gatggcgacgt atcgaacgcg gccgcgtatgc gctgcgtgc 720  
ccggtgtcg tctatcacgg caccgaggac aagctgaccg aaccggacgg cagccgcgcg 780  
ttcggcgccgc gtgtcggttc gcccgcgtatgc acgctgacgc tatacgaagg cggcttcac 840  
gaaacgatga acgatctcgatgc acgcgtatgc gtgatcgacg cgctgatgcgttgcgtac 900  
gcgcgcgcgc cggcgccgtg a

(210) 7

〈211〉 475

⟨212⟩ DNA

〈213〉 *Burkholderia cepacia* TB-62

(400) 7

tagagtttga tccggctca gattaacgc tggcgcatg cttacacat gcaagtcaa 60

cggcagcacg ggtgcttgca cctggggcgtt agtggcgaac gggtagatcc tacatcgaa 120  
catgtccgtt agtggggat agcccccgtttt aagccggatt aataccgtt acgtatctacg 180  
gtatggaaagcg ggggacccttc gggccctcgcg ctatagggtt ggccgatggc tgatttagcta 240  
gtttgggggg taaaggccta ccaaggcgac gatcagtgac tggcttgaga ggacgaccag 300

ccacactggg actgagacac ggcccagact cctacggag gcagcagtgg ggaattttgg 360  
 acaatggcg aaagcctgat ccagcaatgc cgctgtgtg aagaaggct tcgggttgta 420  
 aagcacttt gtccgaaag aaatccttgg ctctaataaca gccggggat gacgg

⟨210⟩ 8

⟨211⟩ 475

⟨212⟩ DNA

⟨213⟩ Burkholderia cepacia TB-63

10

⟨400⟩ 8

tagagtttga tccctggctca gattgaacgc tggcggcatg ctttacacat gcaagtcgaa 60  
 cggcagcacg ggtgcctgca cctggggcg agtggcgaac gggtgagtaa tacatcgaa 120  
 catgtccctgt agtggggat agcccgccga aagccggatt aataccgcat acgatctacg 180  
 gatgaaagcg ggggaccccttc gggcctcgcg ctatagggtt ggccgatggc tgattagcta 240  
 gtggggggg taaaggccta ccaaggcgac gatcagtagc tggtctgaga ggacgaccag 300  
 ccacactggg actgagacac ggcccagact cctacggag gcagcagtgg ggaattttgg 360  
 acaatggcg aaagcctgat ccagcaatgc cgctgtgtg aagaaggct tcgggttgta 420  
 aagcacttt gtccgaaag aaatccttgg ttctaataata gccggggat gacgg

20

⟨210⟩ 9

⟨211⟩ 475

⟨212⟩ DNA

⟨213⟩ Burkholderia cepacia TB-65

30

⟨400⟩ 9

tagagtttga tccctggctca gattgaacgc tggcggcatg ctttacacat gcaagtcgaa 60  
 cggcagcacg ggtgcctgca cctggggcg agtggcgaac gggtgagtaa tacatcgaa 120  
 catgtccctgt agtggggat agcccgccga aagccggatt aataccgcat acgatctacg 180  
 gatgaaagcg ggggaccccttc gggcctcgcg ctatagggtt ggccgatggc tgattagcta 240  
 gtggggggg taaaggccta ccaaggcgac gatcagtagc tggtctgaga ggacgaccag 300

40

ccacactggg actgagacac ggcccagact cctacggag gcagcagtgg ggaattttgg 360  
 acaatggcg aaagcctgat ccagcaatgc cgctgtgtg aagaaggct tcgggttgta 420  
 aagcacttt gtccgaaag aaatccttgg ttctaataata gccggggat gacgg

50

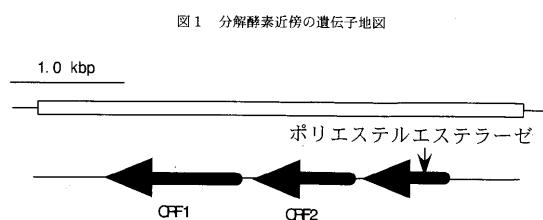
## 【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、候補クローンのプラスミド抽出して解析して得た約2.5 kbpのインサート中の、シーケンス結果に基づく遺伝子地図を示す。3つのオープンリーディングフレーム(ORF)が認められた。

【図2】 図2は、BLASTによるホモロジー検索の結果を示す。ホモロジーの認められた遺伝子は、全てゲノムプロジェクトから得られた推定タンパク質(リパーゼまたはリゾホスホリパーゼ)である。図ではその遺伝子を持つ菌株名で示してある。

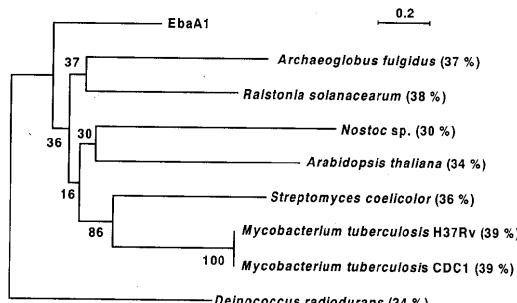
【図3】 図3は、配列番号1、配列番号2、配列番号3記載の配列を比較した図である。

【図1】



【図2】

図2 BLASTによる配列番号4記載の配列のホモロジー検索



【図3】

図3 ホモロジー検索(アミノ酸レベル)

```

1
配列番号1 NTATTTTPAAAATAGPAPSSPPAPTMGRLLTADGLELASYRWPAGDGTEQPRATIALVHG
配列番号2 MTATTTTPAAAATAGSAPSSPPAPKMGRLLTADGLELASYRWPAGDSTAPSRATIALVHG
配列番号3 NTATTTTPAAAATAGSAPSSPPAPKMGRLLTADGLELASYRWPAGDSTAPPRATIALVHG
*****  

61
LAEHAGRYAAALAGRILNAAGI1DVLIAIDLRLGHGQSPGKRAWVERFDGYLNDA DALVAEAARG
LAEHAGRYAAALAGRILNAAGI1DVLIAIDLRLGHGQSPGKRAWVERFDGYLNDA DALVAEAARG
LAEHAGRYAAALAGRILNAAGI1DVLIAIDLRLGHGQSPGKRAWVERFDGYLNDA DALVAEAARG
*****  

121
NSPLFLMGSMSGGAVAALYAIERAPARSHGLSGLVLSPALAPGRDVPRWMLAVSRVISR
NAPLFLMGSMSGGAVAALYAIERAPASGRAITGLVLSSPALAPGRDVPRWMLAVSRVISR
NAPLFLMGSMSGGAVAALYAIERAPASGRAITGLVLSSPALAPGRDVPRWMLAVSRVISR
*,*****  

181
IWPPTFAIRIDAALLSLRDPAIVAANRADPLVHHGAVPARTGAEILDAMARIESGRGALRV
AWPTTFPAIRIDAALLSLRDPAIVAANRADPLVHHGAVPARTSAEILDAMARIERGRDALRV
AWPTTFPAIRIDAALLSLRDPAIVAANRADPLVHHGAVPARTGAEILDAMARIERGRDALRV
*****  

241
PVLYVHGTEDKLTEPDGSRAFGAHAGSPDRTLTYEGGFHETMNDLERDRVIDALIAWIH
PVLYVHGTEDKLTEPDGSRAFGARVGGSPDRTLTYEGGFHETMNDLERDRVIDALIAWIH
PVLYVHGTEDKLTEPDGSRAFGARVGGSPDRTLTYEGGFHETMNDLERDRVIDALIAWIH
*****  

301
ARVPAR
ARVPAR
ARAPAR
**,***
```

---

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
**C 1 2 Q 1/02 (2006.01)** C 1 2 N 9/00  
**C 0 8 L 75/04 (2006.01)** C 1 2 Q 1/02  
C 0 8 L 75:04

(72)発明者 神戸 敏明  
茨城県つくば市並木2丁目208-301  
(72)発明者 茂野 ゆき枝  
茨城県つくば市手子生浦山1108-2

審査官 長井 啓子

(56)参考文献 特開2000-166588 (JP, A)  
日本農芸化学会大会講演要旨集, vol.2002, p.13, 2-2Ga13 (2002)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 1/00, 15/00  
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq  
SwissProt/PIR/Geneseq  
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)  
JMEDPlus(JDream2)  
JST7580(JDream2)  
JSTPlus(JDream2)