

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H03794

研究課題名(和文)細菌の栄養獲得戦略から紐解く適応進化の分子機構

研究課題名(英文)Elucidating the molecular mechanisms of adaptive evolution from bacterial nutrient acquisition strategies

研究代表者

吉田 昭介(Yoshida, Shosuke)

奈良先端科学技術大学院大学・研究推進機構・特任准教授

研究者番号：80610766

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：Ideonella sakaiensisはPETを分解して栄養とすることが可能である。本研究では、I. sakaiensisが効率的にPETを分解する仕組みを探り、以下のことが明らかとなった。(1)PETaseの基質結合部位に変異導入を行い、PETaseの高いPET基質特異性はこれらのアミノ酸残基の影響が大きいことが明らかとなった。(2)I. sakaiensis遺伝子破壊系の構築に成功し、petase株、mhetase株を構築した。(3)プロテオミクス解析から、新たにPETオリゴマーに加水分解活性を有する酵素を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

(1)PETaseのPETに対する基質特異性の高さに貢献するアミノ酸残基が明らかとなった。これらを他のPET加水分解酵素に置換導入することで、機能改良につながることを期待できる。(2)I. sakaiensis遺伝子破壊系により、本菌の持つ遺伝子の生理学的な機能解析を行うことが可能となった。また、本菌の代謝系を人工的に改良し、有用物質生産につなげるなど、代謝工学への応用が可能となった。(3)新酵素の発見により、本菌のPET代謝への理解を進めることができるようになった。

研究成果の概要(英文)：Ideonella sakaiensis is capable of growing on PET as a carbon nutrition. In this study, we explored the mechanism of efficient PET degradation by I. sakaiensis and found things as follows. (1) Mutations were introduced into the substrate binding site of PETase, and it was found that the high PET substrate specificity of PETase is greatly influenced by these amino acid residues. (2) We succeeded in constructing a gene disruption system for I. sakaiensis, and created petase and mhetase strains. (3) Proteomic analysis revealed an enzyme with hydrolytic activity against PET oligomers.

研究分野：応用微生物学

キーワード：PETase Ideonella sakaiensis 遺伝子破壊

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ポリエチレンテレフタレート (PET) は、ペットボトルや衣服の繊維などに汎用される主要なプラスチックのひとつである。石油を原料に製造される PET は化学的に非常に安定で、自然界では分解されないとされ、埋め立て地などから環境に流出した PET は蓄積して環境問題となっている。申請者らは、ペットボトル廃棄場に生息する微生物を探索することによって、世界で初めて PET を分解・代謝する新種細菌 (*Ideonella sakaiensis* と命名) を発見し、さらにその PET 分解メカニズムを解明した (Yoshida et al., *Science*, 2016)。 *I. sakaiensis* は PET と共に培養すると、PET に接着して分解する。その際に PET 分解・代謝に必要な遺伝子群の発現を急激に増加させる。これらの遺伝子産物の中で、PET 加水分解活性を持つ酵素 (PETase) と、PETase による加水分解物 MHET に対して加水分解活性を持つ酵素 (MHETase) は共役して PET をテレフタル酸とエチレングリコールにまで分解する。さらに *I. sakaiensis* はこれらの単量体を CO₂ と水にまで代謝することができた。 以上のような PET に対する分解・代謝の挙動から、*I. sakaiensis* は人工物である PET を栄養源として利用できる機構を獲得したと考えられた。

2. 研究の目的

Ideonella sakaiensis はポリエチレンテレフタレート (PET) を戦略的に分解して栄養とできることが判明した唯一の菌である。これまでの研究で PET 分解に寄与する 2 種類の酵素は明らかになったが、その詳細なメカニズムや *I. sakaiensis* が効率的に PET を分解する仕組みについてはほとんど明らかになっていない。本研究では *I. sakaiensis* の栄養獲得における適応進化を「PET 分解酵素」と「PET 分解関連因子」に焦点をあてて、その全容を探った。

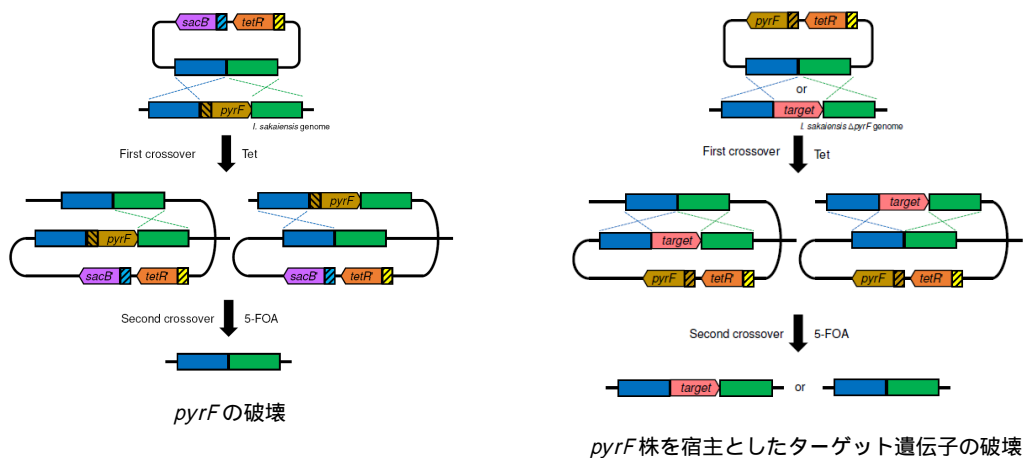
3. 研究の方法

(1) PETase と耐熱性クチナーゼ間の相互変異導入と機能解析

PETase は PET に対して高い加水分解活性と基質特異性を示すが、安定性が低い。一方で、好熱性放線菌が有する天然の脂肪族エステル加水分解酵素 (クチナーゼなど) の一部は、副活性として PET 加水分解能を持つ (Taniguchi and Yoshida et al., *ACS Catal.*, 2019)。これらは常温域における PET 分解活性は低い、耐熱性が高く、高温域において高い PET 加水分解活性を発揮する。PETase と PET 分解性クチナーゼの結晶構造比較では、基質 (PET) とのドッキングシミュレーション解析により、PET との相互作用が予想されるアミノ酸に一部相違が認められることが判明した (Joo et al., *Nat. Commun.*, 2018)。PETase と、そのホモログである耐熱性クチナーゼ (LCC) の結晶構造比較から予測される基質結合部位周辺に認められた PETase においてユニークなアミノ酸残基に着目し、これらアミノ酸残基への変異導入を相互に行って得られた変異酵素について、その PET 分解活性、脂肪族エステルに対する分解活性 (直鎖脂肪族カルボン酸と発色団 *p*-ニトロフェノールが脱水縮合した人工基質を利用)、基質特異性 (上記 2 種の基質に対する活性の比)、protein thermal shift を用いたタンパク質の安定性について調べた。

(2) *I. sakaiensis* 遺伝子破壊系の開発と PETase、MHETase 遺伝子破壊

本菌の有する遺伝子の PET 分解への関与を調べるため、遺伝子破壊系の構築を試みた。遺伝子破壊ベクターは、*Ideonella* 属細菌と同科の *Comamonas* 属細菌での成功例から pT18mobsacB ベクターを基盤とした。まず宿主株として、orotidine 5'-phosphate decarboxylase 遺伝子 (*pyrF*) 遺伝子破壊株の取得を試みた。*pyrF* およびその周辺領域を含むベクターを構築し、*Escherichia coli* S17-1 株に導入したのち、接合伝達により *I. sakaiensis* へ導入した。目的の個所へのベクターの導入は、テトラサイクリン耐性株に対する PCR によって選抜した。これらプラスミド導入株を 5-fluoroorotic acid (5-FOA) を含む培地上で増殖したコロニーを遺伝子破壊株 (*pyrF* 株) として選抜した。破壊株の確認は PCR によって行った。次に、この遺伝子破壊株 (*pyrF* 株) を宿主とし、PETase 遺伝子 (*petase*)、MHETase 遺伝子 (*mhetase*) 破壊株の構築を試みた。マーカーとして *pyrF* およびそのプロモーター、ターゲット領域およびその周辺領域を含むベクターを構築し、*I. sakaiensis* に導入した。次に 5-FOA を含む寒天培地上で増殖したコロニーを対象に PCR を実施し、ターゲット領域が欠損した変異体を選抜した。さらにウエスタンブロットによるターゲット遺伝子の発現確認により、遺伝子破壊の検証を行った。得られた遺伝子破壊株を PET、そのモノマーであるテレフタル酸 (TPA)、エチレングリコール (EG) を炭素源として培養することで、これら酵素の PET 代謝における重要性を検証した。



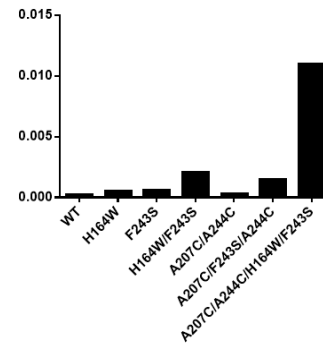
(3) PET 分解に関する因子の探索と機能解析

I. sakaiensis は PET フィルムと共に培養すると、菌体外に特徴的な構造物を形成する。このことから、これら構造物の PET 分解への機能的関与が示唆された。そこで、その手がかりを得るため、*I. sakaiensis* を PET フィルムとともに培養し、そのフィルム画分と培養液画分からタンパク質を抽出し、定量的プロテオミクス解析 (DIA-MS 解析) を実施した。

4. 研究成果

(1) *I. sakaiensis* 由来 PET 加水分解酵素 PETase と耐熱性クチナーゼの機能比較解析

PETase に LCC 型変異を導入すると、総じて PET 分解活性は低下し、PET に対する基質特異性はわずかに低下した。また、タンパク質の安定性は向上する傾向にあった。一方で、LCC に PETase 型変異を導入すると、PET 分解活性は概ね維持されたが、2-3 倍程度に上昇する変異体も存在した。一方、PET に対する基質特異性は、全体的に顕著に向上し、50 倍に達する変異体も存在した。タンパク質の安定性は全体的にわずかに低下した。以上のことから、両タンパク質の基質結合部位のアミノ酸は、とくに基質認識に関わることが明らかとなった。そして、PETase はこれらのアミノ酸残基により PET への基質特異性を高めていると考えられた。

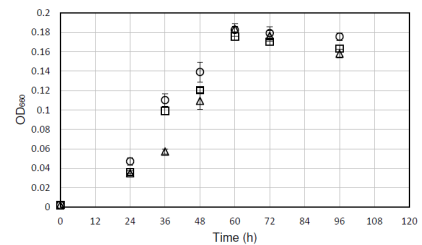


LCC 変異体の PET 基質特異性

(2) *I. sakaiensis* 遺伝子破壊系の開発と PETase、MHETase 遺伝子破壊

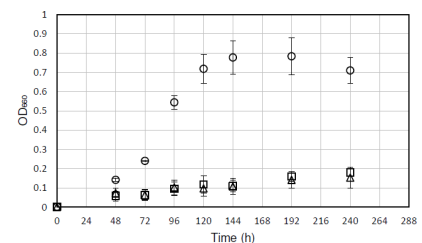
遺伝子破壊系の構築：*I. sakaiensis* における遺伝子破壊の宿主として、*pyrF* 株を取得することができた。また、*pyrF* 株を宿主とし、*petase* 株、*mhetase* 株を構築した。以上のことから、*I. sakaiensis* における遺伝子破壊系の構築に成功した。本系によって得られた遺伝子破壊株は、遺伝子マーカーである *pyrF* がゲノム上に残存しないため、遺伝子の多重破壊に利用することができる。本菌の様々な遺伝子の機能検証、また代謝工学への応用などが考えられる。

petase 株、*mhetase* 株の増殖：TPA を炭素源とすると両株は、宿主株と同様の増殖性を示した。一方で、PET を炭素源とすると、両株とも宿主株と比べて著しく増殖性が減少し、炭素源なし時と同等となった。以上の結果から、*I. sakaiensis* の PET 代謝において PETase と MHET が極めて重要であることが明らかとなった。



TPA を炭素源とした *I. sakaiensis* の増殖

○*pyrF*株; △*petase*株; □*mhetase*株

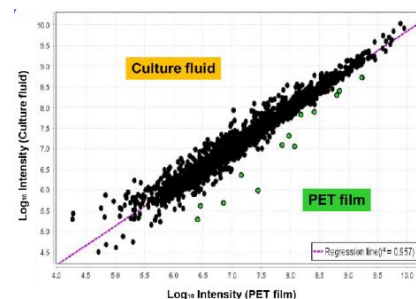


PET を炭素源とした *I. sakaiensis* の増殖

○*pyrF*株; △*petase*株; □*mhetase*株

(3) PET 分解に関する因子の探索と機能解析

DIA-MS 解析の結果、得られた 3072 個のタンパクの定量データについて、PET フィルム上と培養液中における存在量を比較した。まず、PET フィルム上での存在比が特に大きい (PET フィルム / 培養液 = 33) 推定エステラーゼタンパクに着目した。ゲノムより本 ORF をクローニングし、組換えタンパクを大腸菌において発現させ、アフィニティ精製により粗精製タンパクを得た。次に、PET やそのオリゴマーに対する活性を行ったところ、bis(2-



各タンパク質の PET フィルム上および培養液中における存在量のプロット

hydroxyethyl) terephthalate に対する加水分解活性を見出した。現在、本酵素の詳細な機能解析を行うとともに、その遺伝子破壊株を作製することで、本酵素の PET 代謝における役割の解明に取り組んでいる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hiraga Kazumi, Taniguchi Ikuo, Yoshida Shosuke, Kimura Yoshiharu, Oda Kohei	4. 巻 21
2. 論文標題 Biodegradation of waste PET	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 EMBO reports	6. 最初と最後の頁 e49826
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embr.201949826	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ishikawa Raga, Yoshida Shosuke, Sawada Shin-ichi, Sasaki Yoshihiro, Akiyoshi Kazunari	4. 巻 -
2. 論文標題 Preparation of engineered extracellular vesicles with full-length functional PD-1 membrane proteins by baculovirus expression system	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.03.187	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Taniguchi Ikuo, Yoshida Shosuke, Hiraga Kazumi, Miyamoto Kenji, Kimura Yoshiharu, Oda Kohei	4. 巻 9
2. 論文標題 Biodegradation of PET: Current Status and Application Aspects	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Catalysis	6. 最初と最後の頁 4089 ~ 4105
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acscatal.8b05171	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 吉田昭介、小田耕平	4. 巻 91
2. 論文標題 ポリエチレンテレフタレート分解菌・分解酵素の発見とその応用展望	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 科学と工業	6. 最初と最後の頁 113 ~ 119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshida Shosuke, Hiraga Kazumi, Taniguchi Ikuo, Oda Kohei	4. 巻 648
2. 論文標題 Ideonella sakaiensis, PETase, and MHETase: From identification of microbial PET degradation to enzyme characterization	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Methods in Enzymology	6. 最初と最後の頁 187 ~ 205
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/bs.mie.2020.12.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 小田耕平、吉田昭介	4. 巻 76
2. 論文標題 Poly(ethylene terephthalate)の微生物による分解	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 繊維学会誌	6. 最初と最後の頁 113 ~ 118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2115/fiber.76.P-113	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件 (うち招待講演 13件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 吉田昭介
2. 発表標題 ポリエチレンテレフタレート代謝細菌のメカニズムの解明と利用
3. 学会等名 第20回 酵素応用シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉田昭介
2. 発表標題 プラスチック分解細菌のエネルギー獲得戦略
3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉田昭介
2. 発表標題 細菌によるPET代謝と、その有用化合物生産への利用展望
3. 学会等名 第68回高分子討論会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉田昭介
2. 発表標題 ポリエチレンテレフタレート資化菌の代謝機構とその利用展望
3. 学会等名 19-2エコマテリアル研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shosuke Yoshida
2. 発表標題 Bacterial poly(ethylene terephthalate) metabolism by Ideonella sakaiensis
3. 学会等名 ASP-19 Fifth International Symposium on Advances in Sustainable Polymers（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高山暁生、吉田昭介
2. 発表標題 Ideonella sakaiensisのPETを炭素源とした培養における網羅的遺伝子発現解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉田昭介
2. 発表標題 ポリエチレンテレフタレート分解細菌の発見、およびその代謝機構の解明
3. 学会等名 「化学コミュニケーションのフロンティア」第4回若手シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西井太郎、蜂須賀真一、吉田昭介
2. 発表標題 Ideonella sakaiensisにおけるPcaG遺伝子破壊株の性状解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 蜂須賀真一、高山暁生、藤原毅、吉田昭介
2. 発表標題 PET 分解細菌 Ideonella sakaiensis における aldehyde dehydrogenase 遺伝子の機能解明
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉田昭介
2. 発表標題 PET資化細菌の発見とメカニズムの解明、及びその応用への展開
3. 学会等名 酵素工学研究会第81回講演会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉田昭介
2. 発表標題 PET分解菌～その分解の仕組みと利用展望と・・・～
3. 学会等名 第1回創発マテリアル研究会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shosuke Yoshida
2. 発表標題 A bacterium that metabolizes poly(ethylene terephthalate)
3. 学会等名 The 10th symposium on International Collaborative Laboratories BioTechnology Institute, U. Minnesota & Grad School BioScience, NAIST（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉田昭介
2. 発表標題 ポリエステル分解菌～その分解の仕組みと利用展望～
3. 学会等名 第6回奈良まほろば産学官連携懇話会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉田昭介
2. 発表標題 PET樹脂を代謝する細菌
3. 学会等名 BioJapan 2017（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Shosuke Yoshida
2. 発表標題 Bioprospection of plastic degrading bacteria for the sustainable environment
3. 学会等名 International Forum on Life Sciences and Education (IFoLSE) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉田昭介
2. 発表標題 Poly(ethylene terephthalate)分解菌の代謝メカニズムとその利用
3. 学会等名 第84回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 吉田昭介	4. 発行年 2019年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 291
3. 書名 ポリエチレンテレフタレート (PET) 分解酵素の発見と構造解析 (生分解性プラスチックの環境配慮設計指針)	

1. 著者名 吉田昭介	4. 発行年 2020年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 560
3. 書名 細菌の代謝能力によるPETの分解 (生分解, バイオマスプラスチックの開発と応用)	

1. 著者名 吉田昭介	4. 発行年 2019年
2. 出版社 情報機構	5. 総ページ数 306
3. 書名 第7節 既存プラスチックの生分解（マイクロプラスチック問題等各種環境汚染と規制強化に向けたプラスチックの環境対応技術 ～バイオマスプラスチック・生分解性プラスチック・リサイクル・代替～）	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 ポリヒドロキシアルカン酸の製造方法及び製造用組成物	発明者 吉田昭介、福居俊昭	権利者 奈良先端科学技術大学院大学、 東京工業大学
産業財産権の種類、番号 特許、2020-186432	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------