

令和 5 年 5 月 13 日現在

機関番号：51201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05819

研究課題名（和文）組換え酵素を用いた深海環境下における生分解性プラスチック分解機構の解明

研究課題名（英文）Study of bio-degradable plastics decomposition mechanisms in deep sea environment using recombinant enzymes

研究代表者

中川 裕子（Nakagawa, Yuko）

一関工業高等専門学校・その他部局等・准教授

研究者番号：70435577

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：精製方法の確立した組換えエステラーゼE21の大量精製を試みた。様々な発現系によるアプローチを行ったが、加圧試験に必要な量のタンパクを精製することはかなわなかった。常圧条件下では、E21はJT01の分泌タンパクの塩析画分と比較して非常に低い活性しか示さなかった。低温・高圧条件で活性を持つ可能性はあるものの、目的としていた生分解性プラスチック分解酵素の主成分がE21である可能性は低いと考えられた。E15に関しては、発現条件の最適化の段階であるが、発現量はやはり少ない。深海由来の細菌のタンパク質を異種発現させるには困難が伴うことが予想された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

耐圧・低温活性を持つPCL分解酵素を確定し、解析することができれば、常圧条件下で働くPCL分解酵素と比較することで、ほかの酵素を耐圧・低温活性を持つように改変したり、高圧・低温下で分解しやすいプラスチックを提案したりすることができたと考えられる。今回の結果から、深海細菌由来の酵素タンパク質を異種発現するには困難が伴うことが分かった。この目的を達成するためには、高圧・低温条件下で微生物がいかにして酵素の発現を可能にしているかを解明する必要があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We tried to purify a large amount of the recombinant esterase E21 with the previously established method. Various approaches were used for expression, however it is difficult to obtain enough amount of protein for the analysis under high pressure. Under the ambient pressure conditions, E21 showed very low activity compared to the fraction of JT01 secreted protein. The expression of the E15 is also low, although the expression conditions are still under optimize. It was expected that heterologous expression of proteins from deep-sea-derived bacteria would be difficult.

研究分野：酵素工学 遺伝子工学

キーワード：深海菌由来 組換え酵素 エステラーゼ 異種発現 生分解性プラスチック PCL

1. 研究開始当初の背景

プラスチックは化学的に安定で利便性が高く、加工が容易であることから、年々生産量が増加している。その一方で、廃棄物が大きな問題となっている。プラスチックは、人為的な処理を加えずに自然界へ廃棄されてしまうと最終的に海洋へ流出する。PET、PVC等の汎用プラスチックは海水より密度が高いため、海底へ沈み蓄積する。深海中では太陽光が遮蔽され、紫外線がほとんど届かない。さらに、温度も低く、酸素もほとんどないことから、陸上と比較してプラスチックの光分解、酸化、熱分解が困難となる。

この問題の解決方法として生分解性プラスチックが代用されはじめている。生分解の条件は、大きく分けて土壌、コンポスト、海洋の3つがあるが、海洋における分解機構の報告はほとんどない。地球の7割が海で、その海洋環境の95%以上の部分が深度1000m以上の深海環境であるということは、深海でのプラスチック分解機構を解析しないと、本当の意味で流出してしまった廃プラスチック分解の機構を解明したことにはならないと言える。

日本海溝深度5400mの海底から分離された *Moritella* sp. JT01 株は好冷好圧の海洋細菌で、農業用フィルムや釣り糸、漁網として使用されている生分解性プラスチックのひとつ、ポリ-ε-カプロラクトン (PCL) 分解酵素を分泌することがわかっている¹⁾。本酵素はエステル結合を加水分解するエステラーゼであると推定されている。また、ドラフトゲノムシーケンスの結果より、JT01は生分解性プラスチック分解に関わるリパーゼ様の遺伝子を少なくとも3つ持っていることがわかっている²⁾。

2. 研究の目的

好冷好圧の海洋細菌、*Moritella* sp. JT01 株由来の酵素を材料に、深海におけるプラスチックの分解機構を解明する。本研究結果より、環境浄化への応用、及び今後どのような生分解性プラスチックを使用すればよいのかを提案し、持続可能な社会に向けた貢献を行う。

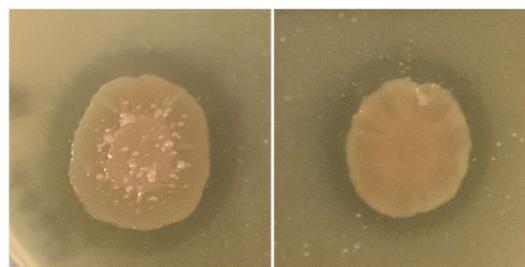
3. 研究の方法

本研究では、JT01 そのものから目的の酵素を単離する方法と、プレビバチルスの発現系を用いて、組換え酵素を得、それを解析する方法の2方向からのアプローチでJT01の酵素の機能解析を行う。

4. 研究成果

(1) *Brevibacillus* による発現系の構築

E21, E15 とともに複数個の組換え体が得られた。組換え体に関しては、トリブチリンの分解活性を持つことが確認できた。図1はE21を導入した2クローンの画像である。ベクターのみを導入したコントロールではこのようなハ口は形成されなかった。目的の大きさのタンパクは、通常の *Bacillus* の発現に用いられる温度ではほとんど発現せず、発現条件の検討を行う必要があった。E15は条件検討を行ってもSDS-PAGEで検出できる量のタンパク質は発現しなかったが、E21に関してはWestern blotで発現を確認することができた。His tagを付加した組換えタンパク質発現を試みたため、E21の精製にはニッケルカラムを用いた。



(2) コドン最適化による発現量向上の検討

プラスミド中の目的遺伝子の最初の33塩基を最適化することで発現量が増加することが知られている³⁾。そこで、プラスミド最適化ツール⁴⁾を用いて遺伝子の最適化を行ったが、発現は増加せず、発現しなくなったものもあった。

図1. E21 導入個体が示したトリブチリン混合培地上のクリアゾーン

(3) 大腸菌の低温誘導発現系の利用

Arctic express は低温誘導発現系にシャペロンを組み合わせたもので、高温での発現には向かない難しいタンパク質でも発現できる可能性が考えられた。そこで、E21, E15をpET28a (+)に組み込み、大腸菌を形質転換した。E21は *Bacillus* の系と比較して発現が非常に少なく、His tagの検出も困難だった。E15は発現条件の検討中である。

(4) E21のエステラーゼ活性測定

JT01由来の塩析画分と組換えタンパク質溶出画分と各塩析画分に対して吸光光度計を用い、エステラーゼ活性測定を行った。基質にはヘキサノ酸 *p*-ニトロフェニル (pNPH)、オクタン酸 *p*-ニトロフェニル (pNPO)、パルミチン酸 *p*-ニトロフェニル (pNPP) を用いた。それぞれのエステラーゼ活性を図2に示す。組換えタンパク質においてはpNPC, pNPOにおいてそれぞれの組換えタンパク質が活性を示したが、pNPPにおいては十分な活性は見られなかった。

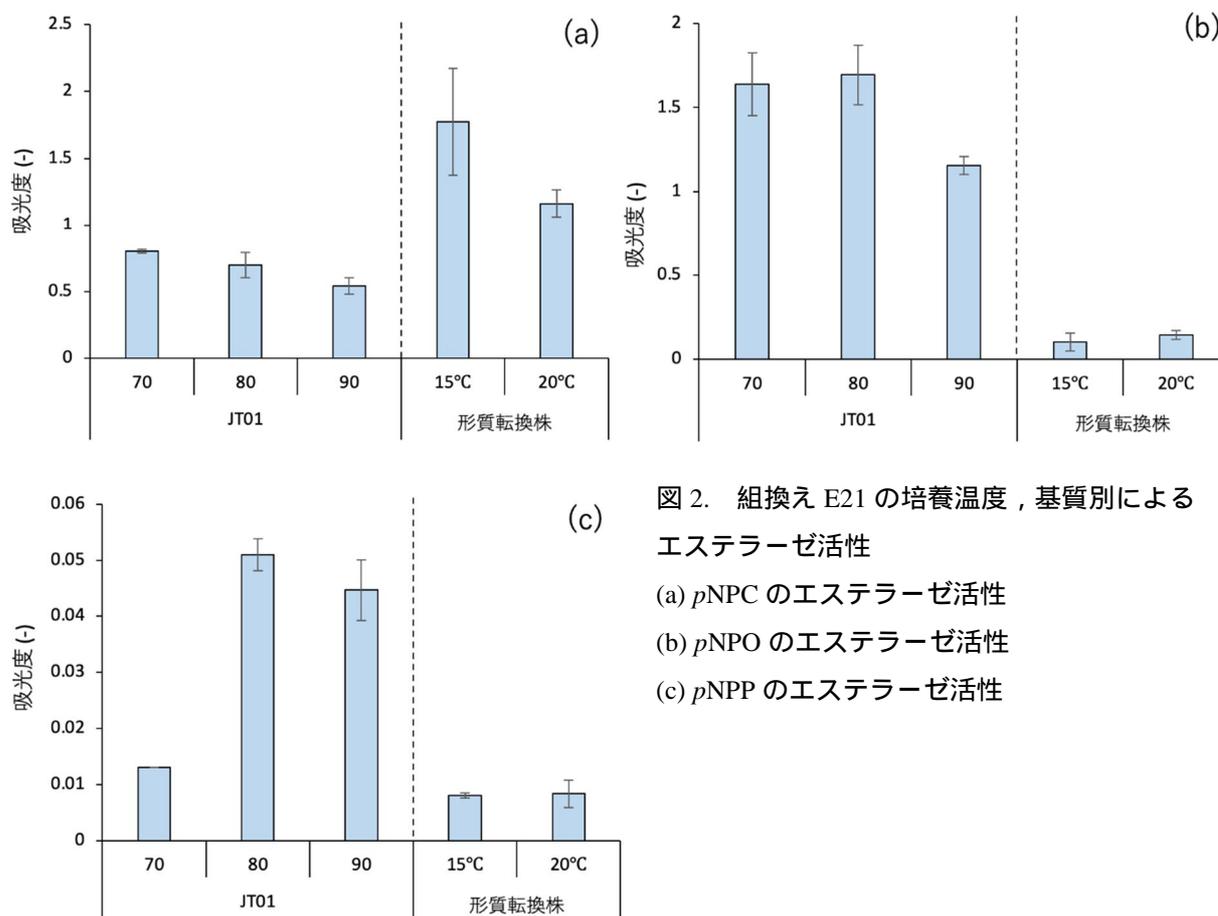


図2. 組換え E21 の培養温度，基質別によるエステラーゼ活性

- (a) *pNPC* のエステラーゼ活性
 (b) *pNPO* のエステラーゼ活性
 (c) *pNPP* のエステラーゼ活性

組換えタンパク質におけるエステラーゼ活性は比較的短い炭素鎖で活性が高かった。これは精製したエステラーゼが短い炭素鎖を分解する基質特異性を有していると考えられる。また、JT01の塩析画分においてはいずれの塩濃度においても組換えタンパク質と比較して *pNPO*, *pNPP* への活性が高かった一方で、*pNPC* への活性は低く、組換えタンパク質とは異なる基質特異性が見られた。今回標的にした E21 遺伝子はショットガンクローニング法によって発見されたものであり⁵⁾、JT01においてE21の発現は確認されていない。また、基質特異性の違いより、JT01で主に活性を示しているのは別のエステラーゼであると考えられ、このエステラーゼがE15の可能性もある。また、スクリーニングの際には、トリブチリンを使用していることから、E21が十分に *pNPO*, *pNPP* を分解できなくても矛盾はない。

上記の結果より、PLCを使用したスクリーニングを行う方が目的産物を得やすいと考え、培地にPCLを添加してスポットアッセイする方法も試みた。培地に粉末を直接添加、もしくはジクロロメタンに溶解後添加する方法では、PCLが凝集、沈殿してしまうため、培地を切り出して反転させる方法やPCL含有ジクロロメタンを加熱殺菌したコンラージ棒で塗布する方法を試した。クリアゾーンの確認はできなかったものの、PCLをジクロロメタンに溶解後添加して、培地を反転させる方法が最も適していることが分かった。

JT01株由来の酵素を材料に、深海におけるプラスチックの分解機構を解明することはかなわなかったが、既に文献で報告されているPCL分解酵素のH39²⁾も、発現及び精製できているタンパク量が非常に少ないことから、深海由来の細菌のタンパク質を異種発現させるには困難が伴うことが予想された。この理由を解明できれば、深海細菌の遺伝子発現の仕組みに関する知見が一気に広がる可能性がある。

<参考文献>

- 1) Sekiguchi T *et al.* (2010). *JAMSTEC Rep. Res. Dev.*, 11, 33-41.
- 2) Freitas RC *et al.* (2017). *Mar. Biotechnol.*, 19(5), 480-487.
- 3) Saito Y *et al.* (2019). *Scientific Rep.* 9, 8338
- 4) GitHub, https://github.com/yutaka-saito/codon_optimization (2021. 7.26 閲覧)
- 5) 座間千夏 修士論文 (2013). 東京海洋大学大学院 海洋科学技術研究科 海洋環境保全学専攻

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

環境報告書2020
https://www.kosen-k.go.jp/Portals/0/upload-file%20folder/09_%E6%96%BD%E8%A8%AD/%E3%81%9D%E3%81%AE%E4%BB%96/kankyo2020.pdf

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
研究 分 担 者	石田 真巳 (Ishida Masami) (80223006)	東京海洋大学・学術研究院・教授 (12614)	

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