

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05160

研究課題名（和文）難分解性プラスチックの高速分解を志向したナノ空間精密配置酵素の創製

研究課題名（英文）Development of Enzymes Precisely Immobilized in Nanospace for Rapid Degradation of Persistent Plastics

研究代表者

松浦 俊一（Matsuura, Shun-ichi）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・材料・化学領域・主任研究員

研究者番号：80443224

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：ポリエチレンテレフタレート（PET）に代表される難分解性プラスチックのリサイクル技術の進展は急務である。本研究では、新規のバイオリサイクル法として、固定化酵素を利用した「高速PET分解システム」を提案し、ナノ空間材料の規則性細孔に2種類のPET分解酵素を高密度かつ配向的に固定化し、酵素間の物質移動距離をサブナノメートルオーダーまで短縮することによって飛躍的な分解速度の向上を実現した。さらに、シリカ細孔表面の疎水性を制御することで疎水的な反応基質との近接作用による酵素との接触頻度の向上を達成し、高効率かつ低環境負荷型の難分解性プラスチック分解システムの基盤技術を構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

有機溶媒を用いない低環境負荷型のバイオリサイクル法として、PETを短時間で分解し高品質の原料モノマーの回収を可能にするPET分解酵素が発見されているが、酵素自身の「安定性」と「反応性」が低く、現状では実用レベルに至っていない。本研究では、制御されたPET分解酵素の集積反応場の創出を目的としており、メソポーラスシリカの規則性細孔への酵素の精密配置による「飛躍的な反応速度の向上」と、疎水的なシリカ表面とPETとの近接作用による「接触頻度の向上」を達成することで高効率の難分解性プラスチック分解システムを開発した。本研究開発により産業利用に向けた酵素触媒機能の新たな利用価値を見出せる。

研究成果の概要（英文）：There is an urgent need to advance recycling technology for persistent plastics such as polyethylene terephthalate (PET). In this study, we proposed a "fast PET degradation system" using immobilized enzymes as a novel bio-recycling method. Two types of PET-degrading enzymes were immobilized densely and oriented in the ordered pores of nanospace materials. The degradation rate was dramatically improved by shortening the mass transfer distance between the enzymes to the sub-nanometer order. Furthermore, by controlling the hydrophobicity of the silica pore surface, the contact frequency between the hydrophobic reaction substrate and the enzyme was improved, thereby establishing a fundamental technology for a highly efficient and environmentally friendly degradation system for persistent plastics.

研究分野：複合新領域

キーワード：難分解性プラスチック ポリエチレンテレフタレート分解酵素 ナノ空間材料 固定化酵素 バイオリサイクル法

### 1. 研究開始当初の背景

世界的に問題となっている海洋プラスチック汚染において、ポリエチレンテレフタレート (PET) に代表される難分解性プラスチックのリサイクル技術の進展は急務である。PETのリサイクル技術は、飲料用ボトルや繊維等への再利用のために進展しているが、現行のケミカルリサイクル法ではメタノール等を用いてPETを分解して原料モノマー (エチレングリコールおよびテレフタル酸) に戻す際、リサイクル可能な状態にするための工程が多いなど課題が残されている。一方、有機溶媒を用いない低環境負荷型のバイオリサイクル法として、PETを短時間で分解し、高品質の原料モノマーの回収を可能にするPET分解菌が発見され、注目を浴びている。ここで、PET分解に関与している酵素群を商用化し、これらの酵素を利用した低環境負荷型のPET分解技術が有望視されているが、酵素自身の「安定性」と「反応性」が低く、現状では実用レベルに至っていない。

酵素を固体表面に適切に固定化することで安定性を向上させる手法が提案されているが、固定化される酵素の配向制御が困難であるため、酵素の向きによっては、立体障害などによって本来の活性を発揮できなくなるものが生じる。これまで研究代表者は、シリカ結合タンパク質 (Si-tag) を酵素と融合させ、Si-tagをナノ空間材料 (メソポーラスシリカ) の細孔表面と酵素の間の接着分子として利用することで、酵素本来の活性を維持しながら安定的に固定化することに成功している。本研究では、このSi-tagをPET分解酵素に融合し、メソポーラスシリカの細孔に異種酵素を高密度かつ配向的に固定化し、酵素間の物質移動距離をサブナノメートルオーダーまで短縮することによって、PET分解速度を飛躍的に向上させる (図1)。また、酵素自身は親水性の高い生体高分子であるために、反応基質となるPETの疎水性表面に対して酵素が積極的に相互作用できるかどうか重要なポイントになる。ここで、メソポーラスシリカは疎水性表面を有していることから、研究代表者らは、シリカ材料側の疎水性を高度に制御することで酵素とPETとの接触頻度を向上できる可能性に着目した。

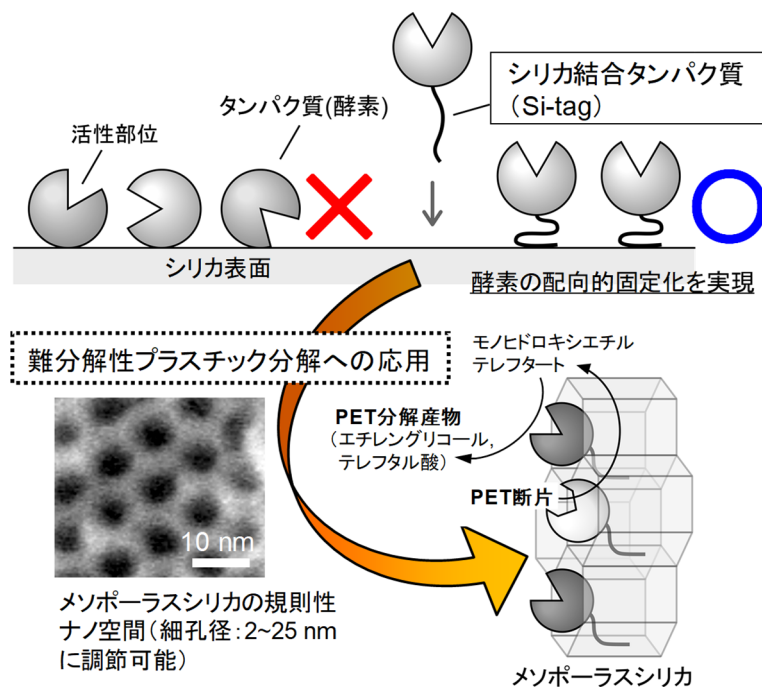


図1 シリカ表面への酵素の配向的固定と難分解性プラスチック (PET) 分解への応用

### 2. 研究の目的

本研究では、新規のバイオリサイクル法として、固定化酵素を利用した「高速PET分解システム」を提案する。精密に制御されたPET分解酵素の集積反応場の創出を目的としており、ナノ空間材料 (メソポーラスシリカ) が有する規則性細孔への異種酵素の精密配置による「飛躍的な反応速度の向上」と、疎水的なシリカ表面とPETとの近接作用による「接触頻度の向上」を同時に達成することによって、高効率かつ低環境負荷型の難分解性プラスチック分解システムを開発する。酵素を工業的な物質生産に利用する場合、製造コスト削減の観点から、酵素を不溶性の担体に固定化することで反応後の酵素を回収して再利用することが求められている。しかし、現行法では、固定化された酵素の「安定性」と「反応性」に課題が残されており、これらの

課題解決が酵素のバイオプロセスへの利用拡大に向けて極めて重要である。これまでにメソポーラスシリカの規則性細孔が酵素の安定性向上場として好適であることを見出しているが、反応性の向上に向けたシリカ細孔表面での酵素の配向制御が課題であった。この課題を克服する方法として、シリカ結合タンパク質(S i e t a g)を2種類のPET分解酵素に個別に融合し、S i e t a gをシリカ細孔表面と酵素の間の接着分子として利用する。これにより、酵素本来の活性を維持しながら配向的に固定化し、酵素の「安定性向上」と「反応性向上」、さらに「再利用性向上」を同時に達成する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 各種のナノ空間材料の合成・物性評価

PET分解酵素の固定化担体として、細孔径・表面親疎水性などの異なる各種ナノ空間材料(メソポーラスシリカ、メソポーラスアルミナ)の合成と細孔構造の解析を行った。

#### (2) 大腸菌タンパク質発現システムを用いたPET分解酵素の発現・精製

PET分解酵素(*Ideonella sakaiensis*由来)として、PETを特異的に加水分解する「PETase」、および、PET分解中間産物であるモノヒドロキシエチルテレフタート(MHET)を特異的に加水分解する「MHETase」を適用し、これらの酵素のN末端側にS i e t a gを付加した遺伝子配列を挿入したタンパク質発現用ベクターを設計・作製した。次に、遺伝子組換え大腸菌によるタンパク質発現システムを利用して、上記のPET分解酵素(S i e t a g融合PETaseおよびS i e t a g融合MHETase)の発現と精製を行った。

#### (3) 固定化PET分解酵素の調製およびエステラーゼ活性評価

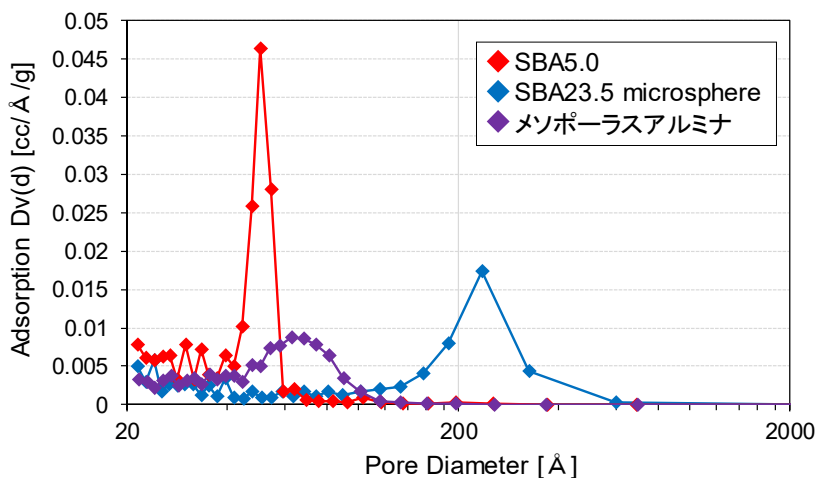
作製した2種類のS i e t a g融合PET分解酵素(PETase及びMHETase)の各種ナノ空間材料(メソポーラスシリカ、メソポーラスアルミナ)また非多孔質球状シリカ(KE-S100)への吸着・固定化を実施し、S i e t a g特異的な結合を評価した。

また、ここで得られたPET分解酵素-ナノ空間材料複合体(固定化PET分解酵素)のうち、S i e t a g融合PETaseの活性(反応速度)を酢酸p-ニトロフェニルなどを基質とした加水分解により評価し、各種ナノ空間材料また非多孔質球状シリカにおける酵素活性を比較検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) 各種のナノ空間材料の合成・物性評価

SBA型メソポーラスシリカ(2種類)およびメソポーラスアルミナの合成と細孔特性を評価した結果、ロッド状のメソポーラスシリカ(SBA5.0 [細孔径: 5 nm])、球状のメソポーラスシリカ(SBA23.5 microsphere [細孔径: 23.5 nm])、また、メソポーラスアルミナ [細孔径: 6.3 nm]を得た(図2)。



担体名	細孔径 (nm)	比表面積 (m <sup>2</sup> /g)	全細孔容積 (cm <sup>3</sup> /g)
SBA5.0(ロッド状)	5.029	813.6	0.801
SBA23.5 microsphere(球状)	23.487	609.1	2.441
メソポーラスアルミナ	6.265	346.8	0.496

図2 各種のナノ空間材料の細孔径分布および細孔特性

(2) 大腸菌タンパク質発現システムを用いたPET分解酵素の発現・精製  
 遺伝子組換え大腸菌によるタンパク質発現システムを用いて上述のS i - t a g融合PET分解酵素の発現を試みた結果、2種類の酵素ともに大量生産と高純度での精製に成功した。

(3) 固定化PET分解酵素の調製およびエステラーゼ活性評価

2種類のS i - t a g融合PET分解酵素(PETase及びMHETase)の各種ナノ空間材料(メソポーラスシリカ、メソポーラスアルミナ)また非多孔質球状シリカ(KE-S100)への吸着・固定化評価を実施した。高濃度の塩および界面活性剤存在下(pH 8.0)で各種の材料とS i - t a g融合PET分解酵素を混和したところ、メソポーラスアルミナ(細孔径: 6.3 nm) < 非多孔質球状シリカ(KE-S100) < ロッド状メソポーラスシリカ(SBA5.0, 細孔径: 5 nm) < 球状メソポーラスシリカ(SBA23.5 microsphere, 細孔径: 23.5 nm)の順に酵素の固定化量が増大した。これより、シリカや金属酸化物であるアルミナ表面へのS i - t a g特異的な結合が確認され、全体としては細孔径や細孔容積の増大にともない酵素の固定化量が増大する傾向が認められた。金属酸化物であっても高濃度の塩および界面活性剤存在下においてS i - t a g特異的な結合が可能であることなど、当初の計画では予想できなかった新たな知見を得ることができた。

次に上述のナノ空間材料(SBA5.0, SBA23.5 microsphere, メソポーラスアルミナ)および非多孔質球状シリカ(KE-S100)に吸着・固定化したS i - t a g融合PET分解酵素(PETase)のエステラーゼ活性を評価した。反応基質には酢酸p-ニトロフェニルを用い、当該酵素による加水分解産物であるp-ニトロフェニルの生成における初期反応速度を解析した結果、メソポーラスアルミナ < 未固定の遊離酵素 < KE-S100 < SBA23.5 microsphere < SBA5.0の順に酵素の反応速度が増大した(図3)。特にメソポーラスシリカ(SBA5.0, 細孔径: 5 nm)に固定化したPETaseの反応速度が大幅に向上することを確認した(未固定の遊離酵素の2~3倍の速度)。

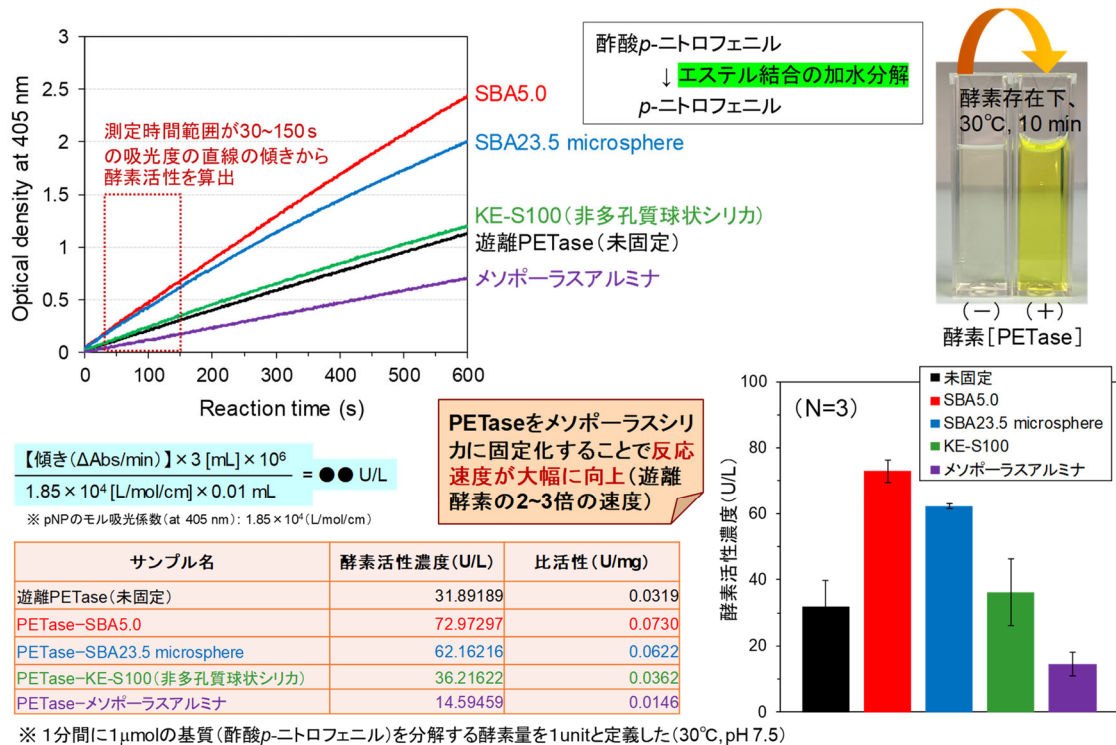


図3 固定化S i - t a g融合PETaseのエステラーゼ活性評価 (pNPA→pNP)

以上より、S i - t a g融合PETaseによる酵素反応に好適な固定化条件およびナノ空間材料の細孔構造などの最適条件に関する知見を得た。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shun-ichi Matsuura, Tomoya Baba, Takuji Ikeda, Katsutoshi Yamamoto, Tatsuo Tsunoda, Aritomo Yamaguchi	4. 巻 14
2. 論文標題 Highly precise and sensitive polymerase chain reaction using mesoporous silica-immobilized enzymes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Applied Materials & Interfaces	6. 最初と最後の頁 29483 ~ 29490
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acscami.2c01992	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
研究分担者	三村 直樹  (Mimura Naoki)  (50358115)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・材料・化学領域・主任研究員    (82626)	
研究分担者	佐藤 修  (Satou Osamu)  (20357148)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・材料・化学領域・主任研究員    (82626)	

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
---------	---------