

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19195

研究課題名（和文）担子菌由来新規リパーゼのポリエステル分解性の検証と発展

研究課題名（英文）Polyester degradation by novel lipases from Basidiomycetes

研究代表者

堀 千明（Hori, Chiaki）

北海道大学・地球環境科学研究院・准教授

研究者番号：50722948

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、担子菌 *Phlebiopsis gigantea* から針葉樹に多く含まれる脂質類を分解する新規高機能性リパーゼについて、pHや温度依存性や、界面活性剤や有機溶媒の種類や濃度への感受性を明らかにした。さらに、脂肪酸の炭素鎖の長さが違うモデル基質に対する活性を測定し、基質特異性を明らかにした。バイオプラスチックの分解性について検討した結果、一部のポリエステルへの分解性が高いことを見出した。さらにリパーゼ生産・精製条件を検討することで大量に取得することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって得られた研究成果により、本担子菌由来リパーゼがバイオプラスチック分解において有用であることが示された。このような例は、真菌が持つ天然ポリマーの分解酵素を合成ポリマー分解へと応用することができる好例となる。今後も社会実装までには、実際のポリマー分解条件においては安定性や他の機能も必要となることが予想されるため、萌芽的研究のまず第一歩として社会的意義があると考えている。

研究成果の概要（英文）：In this study, we elucidated the optimal pH and temperature, as well as the sensitivity to different types and concentrations of surfactants and organic solvents, of a novel high-functionality lipase derived from the basidiomycete *Phlebiopsis gigantea*. Furthermore, we measured the activity towards pNP model substrates with varying lengths of fatty acid carbon chains, revealing substrate specificity. Detailed analysis revealed the high degradability of the enzyme toward one of bioplastics. Additionally, large scale acquisition of the enzyme was achieved by investigating lipase production and purification conditions.

研究分野：森林生化学

キーワード：リパーゼ 酵素分解 担子菌 プラスチック

1. 研究開始当初の背景

樹木は、天然の複雑なポリマーであるセルロース・ヘミセルロース・リグニン・脂質類・ポリフェノール類を高次に含有することで難分解性を示す。自然界でこの樹木分解の中心的な役割を果たしているのが、キノコに代表される担子菌類と呼ばれる真菌である。これまで申請者は、樹木の多様化に合わせて、長い進化の過程で、担子菌は多様なポリマー分解機構を獲得してきたことを明らかにした。その過程で、針葉樹分解へと進化した珍しい担子菌 *Phlebiopsis gigantea* から針葉樹に多く含まれる脂質類を分解する新規高機能性リパーゼを同定・特徴解析した (Hori *et al.* *PLoS Genet.* 2014; Iwata *et al.* *Sci. Rep.* 2021*責任著者;堀 千明,特許出願 2021-024557「担子菌由来の新規な高機能性リパーゼの利用」2021)。

一方、石油由来から様々な合成プラスチックが大量に作製・使用されてきたが、環境負荷低減のために、バイオマス由来のプラスチック(バイオプラスチック)が作製されると共に、作製されたバイオプラスチックの分解性の向上が求められている。そのような背景の中、合成ポリマーのエステル結合開裂およびそのモノマー資化による重量減少について、微生物や酵素を用いて生分解性が検証されている。しかしながらそのほとんどはバクテリアを対象としており、天然ポリマーの分解力が高い真菌による分解性についての報告例は少ない。

2. 研究の目的

本研究では、上述した真菌由来リパーゼが合成ポリマーのエステル結合を分解するかを詳細に検討し、固体プラスチックの分解についても条件検討することで、バイオプラスチック分解の効率化を目指す。さらに本リパーゼ生産条件を検討することで高生産化することも目標としている。

3. 研究の方法

1. 酵素の大量調整

まず、本酵素を大量生産することを目標に、酵母用にコドンをおプティマイズし、N末端またはC末端にヒスタグを付加させた発現用ベクターを構築した。そのベクターを用いてメタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* を形質転換した。優良形質転換体コロニーを選抜し、選抜した形質転換体を培養し菌体外酵素についてパラニトロフェノール(pNP)モデル基質を用いてリパーゼ活性を測定した。さらに、得られたヒスタグ付加リパーゼについて、アフィニティカラムで精製を行った。

2. エステル分解の生化学的特徴の比較解析

本酵素のポリエステル結合分解について特徴解析を行い、商業的リパーゼと比較した。pH や温度依存性や、界面活性剤や有機溶媒の種類や濃度への感受性を測定した。さらに、脂肪酸の炭素鎖の長さが違う pNP モデル基質に対する活性を測定し、基質特異性を明らかにした。

3. 種々のポリエステル分解性の検証

バイオプラスチックとしてポリブチレンサクシネート (PBS) とポリ乳酸 (PLA)、ポリブチレンアジペートテレフタレート (PBAT) の分解性について検証した。この際、生分解性が高い石油由来のポリカプロラクトン (PCL) をコントロールとして使用した。これらを有機溶媒に溶解させ、本酵素を反応させ、反応物解析を行うことで分解活性を測定した。さらに、商業的リパーゼについても分解活性を測定し、本酵素による分解性と比較した。さらに上記条件から得た情報を基に、ポリエステル固体を分解するか検討した。酵素による分解性については重量変化や表面変化を観察した。

4. 研究成果

1. 酵素の大量調整

まず、酵母用にコドンオプティマイズした、N 末端または C 末端にヒスタグを付加させた発現用ベクターを用いてメタノール資化性酵母 *P. pastoris* を形質転換し、菌体外酵素液について活性測定を行った。その結果、N 末端にヒスタグを付加したリパーゼが C 末端にヒスタグを付加したリパーゼよりも活性が比較的高かった。そこで、アフィニティカラムで精製を行ったが、当初の精製条件では非特異的なタンパク質バンドが観察されたため、精製条件の検討を行い精製酵素を取得することに成功した。また、本酵素の特許化により生産を酵素会社に委託することができ、販売酵素を用いて精製することにも成功した。以上から、本リパーゼの精製酵素を大量に入手することができた。

2. エステル分解の生化学的特徴の比較解析

まず、精製酵素に対して pH や温度依存性を測定したところ、ヒスタグを付加していないリパーゼと同様の傾向を示した。さらに界面活性剤や有機溶媒の種類や濃度への感受性を測定した結果、界面活性剤の耐性については顕著な特徴が他真菌由来リパーゼと比較して見られない一方、有機溶媒については 15%アセトンやエタノール、ターシャルブチルエーテルを添加することで 2 倍以上の活性の増加を示すことを見出した。また、常温低 pH において、基質特異性を比較したところ、天然で活性を示す C16 などの長い炭素鎖と比較して、C2-C6 の脂肪酸のエステル結合を分解する活性が高いことを明らかにした。合成ポリマーのモノマーの炭素鎖は短いことから、このような特徴は合成ポリマーの分解に優位に働くと考えられる。

3. 種々のポリエステル分解性の検証

次に、精製酵素に対してポリブチレンサクシネート (PBS) とポリ乳酸 (PLA)、ポリブチレンアジペートテレフタレート (PBAT) の分解性について検証した。この際、生分解性が高い石油由来のポリカプロラクトン (PCL) をコントロールとして使用した。まず最初に有機溶媒に溶かしたポリエステルの分解性を検証した結果、常温で PCL および PBS について高い分解性を示すことを見出した。この傾向は長時間反応させるほど大きくなり、その理由として、他真菌由来リパーゼと比較して酸性条件での分解が保持する特徴のためと考えられた。さらに分解物について詳細に調査するため、HPLC を用いて分子量解析技術を構築した。本解析によって、本酵素によるポリマー分解や分子量の低下を定量化することに成功した。次に、固体ポリエステル固体を分解するか検証した結果、本リパーゼが最も重量減少を引き起こすことが確認でき、本リパーゼの合成ポリマーにおける有用性を示すことができた。

以上、本研究を通して担子菌由来リパーゼが合成ポリマー分解においても有用である知見が得られた。現在、これら結果について特許および論文投稿を目指している。今後は、本酵素を対象として、基質特異性や高活性化、安定化を付与することでさらに高機能化することができると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 Kato Hiroyuki, Takahashi Yasushi, Suzuki Hiromitsu, Ohashi Keisuke, Kawashima Ryunosuke, Nakamura Koki, Sakai Kiyota, Hori Chiaki, Takasuka Taichi E., Kato Masashi, Shimizu Motoyuki	4. 巻 90
2. 論文標題 Identification and characterization of methoxy- and dimethoxyhydroquinone 1,2-dioxygenase from <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Applied and Environmental Microbiology	6. 最初と最後の頁 e01753-23
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/aem.01753-23	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 -

1. 著者名 Matsumoto Ruy, Mehjabin Jakia Jerin, Noguchi Hideki, Miyamoto Toshizumi, Takasuka Taichi E., Hori Chiaki	4. 巻 89
2. 論文標題 Genomic and Secretomic Analyses of the Newly Isolated Fungus <i>Perenniporia fraxinea</i> SS3 Identified CAZymes Potentially Related to a Serious Pathogenesis of Hardwood Trees	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Applied and Environmental Microbiology	6. 最初と最後の頁 e00272-23
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/aem.00272-23	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2件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 堀千明
2. 発表標題 きのこ由来リパーゼの新規機能を支えるタンパク質構造のダイナミクス解析
3. 学会等名 北大部局横断シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 堀千明
2. 発表標題 森林生態系の微生物による樹木分解機構の解明
3. 学会等名 植物学会北日本支部会（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 Use of novel highly functional lipase from Basidiomycetes	発明者 堀千明	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2022/6467	出願年 2022年	国内・外国の別 外国

〔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
---------	---------