

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26850053

研究課題名(和文) ポリエチレンテレフタレート分解菌酵素群の高度利用に向けた基盤研究

研究課題名(英文) Fundamental research for advanced use of polyethylene terephthalate-degrading enzymes

研究代表者

吉田 昭介 (Yoshida, Shosuke)

京都大学・白眉センター・特定准教授

研究者番号：80610766

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：難生分解性プラスチックpoly(ethylene terephthalate)(PET)分解菌より見出した2種の新規酵素PET加水分解酵素(PETase)、mono(hydroxyethyl)terephthalate(MHET)加水分解酵素(MHETase)の利用に向けた基盤研究を行った。酵素の機能同定、可溶性タンパク質調製法の開発、及び機能向上を目指した。その結果、PETaseの詳細な機能を同定し、またその熱安定性が向上した変異体を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：For the advanced use of two novel enzymes PET hydrolase (PETase) and mono (hydroxyethyl) terephthalate (MHET) hydrolase (MHETase) found from a poly(ethylene terephthalate) (PET)-degrading bacterium, these enzymes have been functionally identified, developed for the abundant soluble protein expression, and functionally improved. As a result, detailed functions of PETase has been identified and PETase mutants with improved thermal stability has been obtained.

研究分野：応用微生物学

キーワード：ポリエチレンテレフタレート PETase MHETase 加水分解酵素 ゲノム解析

1. 研究開始当初の背景

Poly(ethylene terephthalate) (PET) は、石油由来成分であるテレフタル酸とエチレングリコールが縮重合した芳香族ポリエステルである。加工性や耐久性に優れ、安価なことから、フィルム、繊維、ボトルなどに汎用されている。しかし、PET は自然界では通常分解されないため、使用後は埋め立てなどの処理が行われており、環境に多大な負荷を与えている。小田らは、これら使用済み PET を環境に負荷をかけずに処理することを目指し、数千の土壌や工場廃水サンプルなどを対象に PET 分解菌のスクリーニングを行った。その結果、工場廃水に含まれる微生物群が PET を分解することを世界で初めて発見し、さらに単独で二酸化炭素と水まで PET を完全分解する新種の細菌 (*Ideonella sakaiensis* 201-F6 株) の分離に成功した。つづいて申請者は *I. sakaiensis* の de novo 全ゲノム解析を行った。これにより 5529 個の遺伝子を推定し、*I. sakaiensis* が芳香族化合物の代謝遺伝子を数多く含むことなどを明らかにした。また、本菌を種々の単一炭素源を含む無機塩培地で培養したのち、次世代シーケンサーを用いてトランスクリプトーム解析を行った。それぞれの培地における遺伝子の発現プロファイルと比較したところ、PET を炭素源に用いた時に発現が上昇する遺伝子を多数見出した。これらの情報を基に、PET 分解酵素の探索を行い、以下の 2 種の新規酵素を発見した。

(1) PET 加水分解酵素 (PET hydrolase, PETase): PET フィルム加水分解活性を示した。

(2) mono(hydroxyethyl) terephthalate (MHET) 加水分解酵素 (MHET hydrolase, MHETase): PETase による PET フィルム分解産物 MHET に加水分解活性を示した。

PETase は PET を加水分解するが、MHET には作用しなかった。また、MHETase は MHET 以外の基質を分解しなかった。これらの結果から、*I. sakaiensis* が PET 分解・代謝に優れた機構を有することが明らかとなってきた。

2. 研究の目的

PET は非常に安定性に優れており、生分解性を持たないと考えられてきた素材である。しかし世界に先駆けて自然界から単離された PET 分解菌 *I. sakaiensis* はこの定説をくつがえした。申請者は *I. sakaiensis* のゲノム解析を実施し、ゲノムを基盤とした探索研究により、本菌の PET 代謝の中核を担うと考えられる極めて新規性の高い酵素群を見出すことに成功した。本研究では、これら酵素群の詳細な機能と構造を明らかにすることにより、本菌の PET 代謝機構の全容を解明することを目的としている。さらにプラスチックのリサイクルや表面高機能化へ向けた PET 加水分解酵素の機能向上 (安定性、活性など) を目的としている。

3. 研究の方法

主に以下の 3 点について研究を進めた。

(1) PETase の生化学的解析

PETase は PET を特異性高く分解する新規酵素である。本酵素が固体基質に作用するユニークなメカニズムを理解するためには、多面的なアプローチが必要である。本研究では生化学的解析として、組み換え型 PETase に対し、温度や酵素濃度、界面活性剤が PETase 活性に与える影響について調べた。

(2) 可溶性タンパク質調製法の開発

PETase, MHETase はともに新規機能を持つ酵素であり、結晶構造の解明はそのユニークな機能を理解するうえで必要である。しかしながら、両酵素はこれまで異種発現においてその多くがインクルージョンボディを形成し、極めて少量の可溶性タンパク質のみを得ることができのみである。これがタンパク質結晶化スクリーニングの実施に当たって大きな障害となっている。そこで、様々な発現ベクターや、発現宿主の組み合わせ、あるいはケミカルリフォールディングにより、大量に可溶性かつ機能性タンパク質を獲得することを目指した。

(3) PETase の高機能化

I. sakaiensis の PET 分解においてその第一段階を担い、律速酵素であると考えられる PETase に着目した。本酵素の産業応用を見据えた場合、酵素の機能向上、安定性向上が必須である。PETase は、PET が上市されて 50 年ほどの間に進化した酵素であると仮説を立てた。その進化は未熟であり、さらに PET に対する活性を向上させる余地が大きいと考えた。よって、自然進化を模したランダム遺伝子変異ライブラリーを作成し、宿主菌に導入後、ハイスループット機能性スクリーニングによって目的クローンを選抜する、あるいはホモログとのアライメントを基盤とした合理的な変異導入による機能向上を目指した。

4. 研究成果

(1) PETase の生化学的解析

① 温度プロファイル

組み換え型 PETase、及びそのホモログのうち PET 加水分解活性が報告されている 3 種の組み換え型酵素を作製し、PET フィルムに対する活性の温度プロファイルを測定した。その結果、PETase は他の 3 種の酵素と比べ、耐熱性が低いことが判明した。その一方で、PET ポリマーのモビリティが低い常温帯での活性が格段に高いことが判明した (図 1)。これらの性質が、自然界において、*I. sakaiensis* が PET 分解性を発揮できる一因であると考えられた。

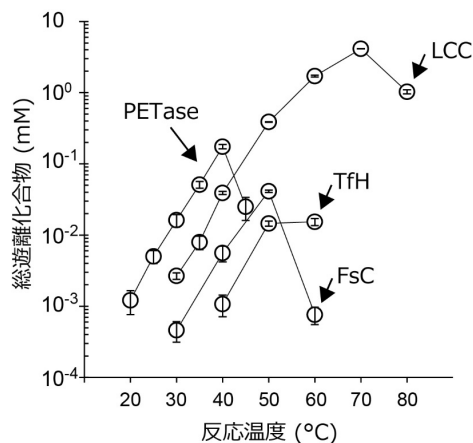


図1 PET フィルムの酵素分解への温度の影響

PET フィルムと PETase (50 nM), *Thermobifida fusca* 由来 TfH, 未培養生物由来 LCC, *Fusarium solani* 由来 FSC (各 200 nM) をそれぞれ pH9.0 で 1 時間インキュベートし、遊離化合物を測定した。

② 酵素濃度プロファイル

本酵素は、他の PET 分解性酵素と比べ、低酵素濃度において活性のピークがあることが判明した(図2)。このことから PETase は PET に高い親和性を有していることが示唆された。

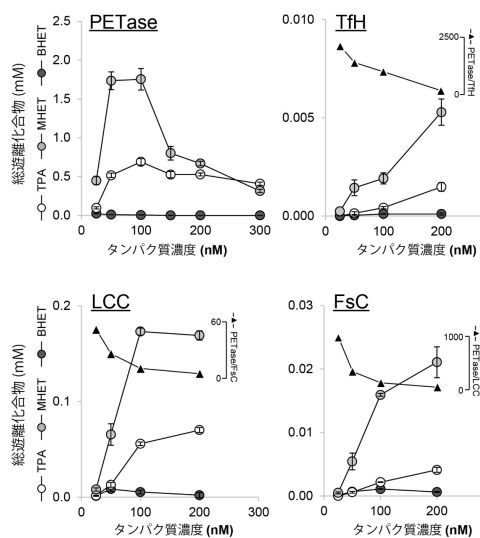


図2 PET フィルムの酵素分解における PET 分解酵素濃度の影響

各濃度に調製した PETase, TfH, LCC, FSC を PET フィルムと pH9.0、30°C で 18 時間インキュベートし、遊離化合物を測定した。

③ 界面活性剤添加の効果

PETase は凝集しやすい性質を示したため、界面活性剤の凝集抑制効果による PETase 活性の増減を検討した。その結果、SDS などのアニオン性の界面活性剤、TritonX-100 などの非イオン性の界面活性剤が PETase の PET 加水分解活性を顕著に向上させることがわかった。

これら界面活性剤はタンパク質の凝集抑制効果に加え、酵素の疎水的な固体基質への接触性を向上させていると考えられるが詳細は明らかではない。現在、この結果を基に PETase の酵素化学的メカニズムについて解析を行っている。

(2) 可溶性タンパク質調製法の開発

両酵素の組み換え型タンパクは通常、大腸菌を発現宿主としている。しかし、可溶性タンパク質の発現効率が非常に低く、結晶構造解析への適用に大きな制約がある。まずは、PETase に対して、可溶性タンパク質の大量調整法の検討を行った。各種ベクター、大腸菌ホスト、培養条件の組み合わせにおいて良好な条件を見出すには至らなかった。そこで尿素を用いてタンパク質を変性・可溶化し、透析によりリフォールディングさせた。その結果、酵素活性を保持した PETase を得た。しかし、可溶化率が低かったため、リフォールディングにおいて種々の小分子を加えて可溶性の向上を試みた。その結果、塩化カルシウムとアルギニンが有効であることがわかった。次に、タンパク質結晶化スクリーニングを試みた。現在までのところ、結晶化に適した条件を見出せていないため、精製タンパク質の調整方法やスクリーニング条件の見直しを進めている。同様に、MHETase に対しても、可溶性タンパク質の大量調整法の検討を行った。各種ベクター、大腸菌ホスト、培養条件の組み合わせにおいて良好な条件を見出すには至らなかった。しかし、尿素を用いたケミカルリフォールディングで有効な条件を見出した。同条件で調製した精製タンパク質を用いて結晶化スクリーニングを実施している。

(3) PETase の高機能化

① ランダム PETase 遺伝子変異ライブラリーの機能性スクリーニングによる熱安定性 PETase の創製

進化分子工学の手法を用いることで、産業利用に適した耐熱性の高い PETase 変異体の創出を目的とした。まず耐熱性 PET 分解酵素のハイスループットスクリーニング手法の構築を試みた。PETase の発現ホストとして大腸菌よりも生育温度が高く、分泌発現システムが開発されているグラム陽性細菌 *Brevibacillus* を用いることで、耐熱性酵素のスクリーニングが可能であることを見出した。本発現系において、PETase の発現量の大幅な改善が認められたことから、スクリーニング感度の向上が期待された。*Brevibacillus* を基質を含むプレート上に塗布してコロニーを形成させ、基質分解によるハロの大きさを活性の指標とした。次に、Mutazyme II DNA polymerase を用いて、PETase 遺伝子の変異ライブラリーの構築を試みた。その結果、1 遺伝子当たり 5.75 塩基の変異が導入される変異ライブラリーを作製した。このライブラリーを宿主に導入し、1st スクリーニングを試み

たところ、およそ 2.0×10^4 個の *Brevibacillus* クローンから 515 個の活性変異株を獲得した。そして 515 個の活性変異体を用いて 2nd スクリーニングを試みたところ、2 個の熱安定性向上変異体を獲得した。これら変異体の酵素活性の温度依存性を測定したところ、野生型よりも高い熱安定性を示した。

②合理的変異導入による熱安定性 PETase の創製

PETase と PETase ホモログのうち耐熱性タンパクとのアライメントから、PETase において保存されていないアミノ酸残基に着目した。また PETase のホモロジーモデルを作製し、表面の疎水性アミノ酸に着目した。これらのアミノ酸に種々の変異導入を行い、その熱安定性を測定した。その結果、活性部位周辺のトリプトファンをヒスチジンに置換した変異体は PET 分解活性が野生型と比べ低下したものの、耐熱性が向上していることが分かった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

① Tanasupawat, S., Takehana, T., Yoshida, S., Hiraga, K., and Oda K., “*Ideonella sakaiensis* sp. nov., isolated from a microbial consortium that degrades PET.” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 査読有, vol. 66, 2016, 2813–2818
DOI: 10.1099/ijsem.0.001058

② Yoshida, S., Hiraga, K., Takehana, T., Taniguchi, I., Yamaji, H., Maeda, Y., Toyohara, K., Miyamoto, K., Kimura, Y., and Oda, K., “Response to Comment on “A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate).”” *Science*, 査読有, vol. 353, 2016, 759
DOI: 10.1126/science.aaf8625

③ Yoshida, S., Hiraga, K., Takehana, T., Taniguchi, I., Yamaji, H., Maeda, Y., Toyohara, K., Miyamoto, K., Kimura, Y., and Oda, K., “A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate).” *Science*, 査読有, vol. 351, 2016, 1196–1199
DOI: 10.1126/science.aad6359

④ 吉田昭介, 宮本憲二, 小田耕平, PET を分解する細菌の発見、新着論文レビュー、査読無、2016
DOI: 10.7875/first.author.2016.023

⑤ 平賀和三, 宮本憲二, 吉田昭介, 小田耕平, ポリエチレンテレフタレート (PET) 分解菌の

発見、解析とその応用への展望、バイオサイエンスとインダストリー「解説」、査読無、74 巻、2016、492–496
http://www.jba.or.jp/pc/archive/2016/vol74_no6.html

⑥ 吉田昭介, 小田耕平, ペットボトルを食べる細菌、バイオサイエンスとインダストリー「目で見るバイオ」、査読無、74 巻、2016、474–475
http://www.jba.or.jp/pc/archive/2016/vol74_no6.html

⑦ 平賀和三, 吉田昭介, 宮本憲二, 小田耕平, ポリエチレンテレフタレート分解・代謝細菌の発見とそのメカニズムの解明、酵素工学ニュース「トピックス」、査読無、76 巻、2016、16–20
http://www.enzyme-eng.com/modules/pico02/index.php?content_id=83

⑧ Yoshida, S., Enoki, J., Kourist, R., and Miyamoto, K., “Engineered hydrophobic pocket of (S)-selective arylmalonate decarboxylase variant by simultaneous saturation mutagenesis to improve catalytic performance.” *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 査読有, vol. 79, 2015, 1965–1971
DOI: 10.1080/09168451.2015.1060844

⑨ Yoshida, S., Enoki, J., Hemmi, R., Kourist, R., Kawakami, N., and Miyamoto, K., “Draft genome sequence of *Bordetella bronchiseptica* KU1201 the first isolation source of Arylmalonate Decarboxylase.” *Genome Announcements*, 査読有, vol. 3, 2015
DOI: 10.1128/genomeA.00373-15

⑩ Yuki, K., Ikeda, M., Yoshida, S., Ohno, O., Suenaga, K., Yamada, K., Uemura, D., and Miyamoto, K., “Isolation of monovalerianester A, an inhibitor of fat accumulation, from *Valeriana fauriei*.” *Natural Product Communications*, 査読有, vol. 10, 2015, 1333–1334
<http://real.mtak.hu/27303/1/NPC-10-8-1413-2015.pdf>

⑪ Schmid, J., Koenig, S., Pick, A., Steffler, F., Yoshida, S., Miyamoto, K., and Sieber, V., “Draft genome sequence of *Kozakia baliensis* SR-745, the first sequenced Kozakia strain from the family Acetobacteraceae.” *Genome Announcements*, 査読有, vol. 2, 2014
DOI: 10.1128/genomeA.00594-14

〔学会発表〕（計 4件）

① 吉田昭介、PETをたべるバクテリア、京都大学テックコネク2017、2017年3月10日、京都大学工学研究科イノベーションプラザ（招待講演）

② 吉田昭介、捧開維、村上拓也、小田耕平、宮本憲二、ポリエチレンテレフタレート加水分解酵素の機能解析、環境バイオテクノロジー学会2016年度大会、2016年6月13日、サテライトキャンパスひろしま（広島県民文化センター）

③ 吉田昭介、平賀和三、竹花稔彦、谷口育雄、山地広尚、前田康人、豊原清綱、宮本憲二、木村良晴、小田耕平、“ポリエチレンテレフタレート資化菌の分離・同定と分解機構の解明”、日本農芸化学会平成28年度大会、2016年3月30日、札幌コンベンションセンター

④ 吉田昭介、小田耕平、宮本憲二、新規ポリエチレンテレフタレート加水分解酵素群の機能解析、第66回日本生物工学会大会、2014年9月11日、札幌コンベンションセンター

〔図書〕（計 1件）

① 吉田昭介、宮本憲二、丸善出版、有機合成実験法ハンドブック第2版、23章 生物化学的合成法、7節 特殊環境からの新規酵素のスクリーニング、2015

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1件）

名称：芳香族ポリエステル分解酵素及び該酵素を用いた芳香族ポリエステル分解方法
発明者：宮本憲二、吉田昭介、小田耕平、木村良晴、平賀和三
権利者：学校法人慶応義塾
種類：特許出願
番号：PCT/JP2014/071701
出願年月日：2014年8月20日
国内外の別：国際

○取得状況（計 1件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.hakubi.kyoto->

[u. ac. jp/jpn/02_mem/07yoshida. shtml](https://www.kyoto-u.ac.jp/jpn/02_mem/07yoshida.shtml)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田昭介 (YOSHIDA SHOSUKE)

京都大学・白眉センター・特定准教授

研究者番号：80610766