

令和 4 年 10 月 24 日現在

機関番号：14603

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19177

研究課題名（和文）PET代謝が実現するポリエステルリファイナリー技術の開発

研究課題名（英文）Development of polyester refinery technology using microbial metabolism

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） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：PET分解菌Ideonella sakaiensisを用いたPETの有用化合物への転換を目指した。先行研究から、本菌はPET加水分解産物であるterephthalic acid (TPA)をprotocatechuic acid (PCA)を経て代謝すると予測された。そこで、I. sakaiensisの推定TPA代謝経路におけるPCA芳香環開裂を担うPCA 3,4-dioxygenase遺伝子(pcaHG)を、シングルクロスオーバー相同組み換えにより破壊した。最少培地に非晶性PETを炭素源として加え、破壊株を培養したところ、培養液上清にPCAが認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

I. sakaiensisを遺伝子工学的に改良することによって、PETを有用化合物への変換可能な株の構築を図った。今回はモデル実験として、PETからprotocatechuic acidへ変換する株を作製した。これにより、微生物発酵の原料として、廃棄され環境汚染要因となっているPETを用いることが可能であることがわかった。現時点で、その変換効率は低いですが、培養条件の最適化などにより、実用化に耐えうるレベルへの収率の向上が求められる。

研究成果の概要（英文）：We aimed to convert PET into useful compounds using the PET-degrading bacterium Ideonella sakaiensis. Previous studies have predicted that this bacterium metabolizes terephthalic acid (TPA), a PET hydrolyzate, via protocatechuic acid (PCA). PCA 3,4-dioxygenase gene (pcaHG) responsible for PCA aromatic ring cleavage in the putative TPA metabolic pathway of I. sakaiensis was disrupted by single crossover homologous recombination. The disruptant strain was cultured on the minimal medium with amorphous PET as a carbon source, resulting in the detection of PCA in the culture supernatant.

研究分野：応用微生物学

キーワード：遺伝子破壊 protocatechuic acid 代謝工学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

石油化学製品であるプラスチックは、高い機能性とコストパフォーマンスを兼ね備えた素材である。しかしその便利さの反面、近年の急激な生産量の増加による負の側面が顕著となってきた。たとえば包装容器として使われるプラスチックは、短時間の使用で廃棄され、焼却、埋め立て、環境への流出の経路を辿っている。環境に流出したプラスチックは、化学的に非常に安定で、自然界では分解されないため、景観を破壊し、生態系にも悪影響を与え、地球レベルで社会問題となっている。

ポリエチレンテレフタレート (ポリエステル、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。廃棄された PET の一部はリサイクルされているが、従来のリサイクル手法は、膨大なエネルギーを消費し、激烈な薬剤を使用するなど、高コスト・高環境負荷である。研究代表者らは、ペットボトルリサイクル工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 を完全に分解・代謝する新種細菌 *Ideonella sakaiensis* を発見し、さらに PET のモノマー化が 2 種類の新規酵素 (PETase と MHETase と命名) によって進行することを明らかにした (Yoshida *et al.*, *Science*, vol.351, 1196-1199, 2016)。

## 2. 研究の目的

*I. sakaiensis* による PET 代謝は、微生物発酵による廃棄 PET の有効利用の可能性がはじめて生じたことを意味する。そこで本研究では、低エネルギー且つ環境に優しく、廃棄 PET を再資源化、高付加価値化するため、*I. sakaiensis* に対し、代謝工学的な手法を用いて、PET から有用な化合物を生産する株の育種を目的とした。

## 3. 研究の方法

PET を発酵原料とした有用性の高い化合物の生産を実現するためのプラットフォームとして、PETase と MHETase の宿主であり、PET を完全代謝する代謝系を有する *I. sakaiensis* を用いる。これまでの研究で、*I. sakaiensis* が PET フィルム存在下で、これら 2 酵素が過剰発現 (全遺伝子の中で最も発現量が多い) することを確認している。一方で、大腸菌や枯草菌などのモデル微生物を用いたこれら 2 酵素の可溶性タンパク質の発現は、極めて少量であった。以上のことから、*I. sakaiensis* は最適な宿主であると考えた。*I. sakaiensis* が PET の加水分解により生じるエチレングリコール (EG) は *I. sakaiensis* の増殖のエネルギー源として利用させ、同時に生じるテレフタル酸 (TPA) を有用化合物へと転換させる。本研究では、TPA の代謝産物であるプロトカテク酸 (医薬合成原料) の発酵生産を目指した。

### *I. sakaiensis* 遺伝子破壊系の構築:

PET 代謝産物の蓄積は、目的化合物の代謝酵素遺伝子を破壊することによって作製する。*Ideonella* 属の細菌で利用可能な遺伝子破壊系は存在しない。そこで、*Ideonella* 属細菌と近縁の *Comamonas* 属細菌で使用されている広宿主域プラスミドを用いた相同組換えによる遺伝子破壊技術 (Sasoh *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol.72, 2006) を基に開発した。ゲノムに組み込むための選択マーカーには *I. sakaiensis* の抗生物質感受性を利用した。

*pcaG* 破壊株の作製: *I. sakaiensis* の推定 TPA 代謝経路における PCA 芳香環開裂を担う PCA 3,4-dioxygenase 遺伝子 (*pcaHG*) に着目し、シングルクロスオーバー相同組み換えによる遺伝子破壊

壊を試みた。広域宿主ベクターpT18mobsacB の Sma 部位に *pcaG* 相同領域の一部を組み込んだ *pcaG* 破壊ベクターを作製し、*E. coli* S17-1 株を介した接合伝達により *I. sakaiensis* に導入した。次に *I. sakaiensis* ゲノムおよび破壊ベクターにアニールするプライマーを用いたコロニーダイレクト PCR により、ゲノムの目的の部位への破壊ベクターの導入を確認した。

*pcaG* 破壊株の性状解析：

最少培地に TPA、EG、TPA と EG の混合 (TPA+EG)、非晶性 PET を炭素源としてそれぞれ加え、*pcaG* 破壊株または野生株を植菌し培養した。次に培養上清を回収し、HPLC による成分分析を行った。

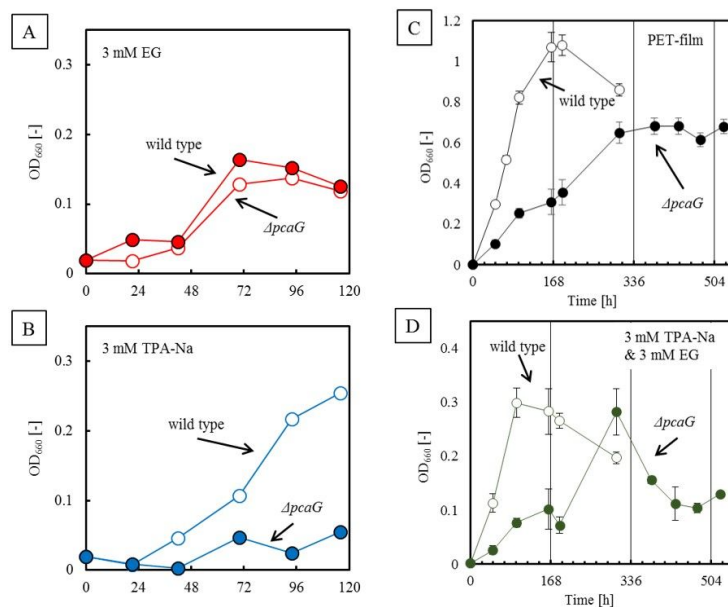
#### 4. 研究成果

*pcaG* 破壊株の作製：

破壊ベクターを導入した *E. coli* S17-1 株を、*I. sakaiensis* 野生株と混合し 48 h 共培養した。その後 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  tetracycline および 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  kanamycin 含有 802 プレートに塗布した。ベクターを持たない (N)、または空ベクターを有する (E) *E. coli* S17-1 株を用いた場合は、コロニーが生じなかった。一方、破壊ベクター (D) を有する *E. coli* S17-1 株の場合には数十個のコロニーを得た。得られたコロニーをコロニーダイレクト PCR に供し、目的の位置にバンドを得た。得られた株を抗生物質プレート上で単離し、*pcaG* 破壊株とした。

*pcaG* 破壊株の増殖特性：

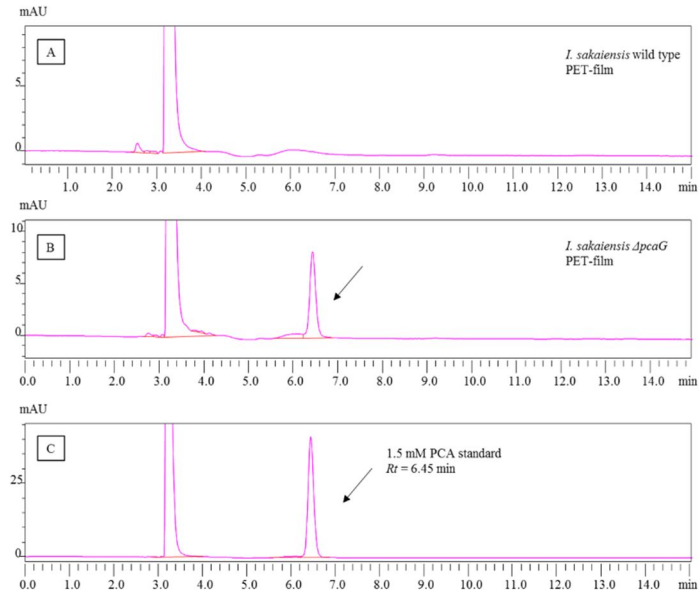
*I. sakaiensis* 野生株と *pcaG* 破壊株を PET フィルム、3 mM TPA-Na、3 mM EG、3 mM TPA-Na + 3 mM EG を炭素源として培養し、増殖曲線を作成した。各株を EG のみ炭素源として培養した場合、破壊株は野生株と同様の挙動を示した。しかし、TPA-Na のみを炭素源とした場合、破壊株の増殖は顕著に抑制された。PET を炭素源に培養した場合、破壊株の増殖は野生株の場合より明らかに抑制された。3 mM TPA-Na + 3 mM EG を炭素源とした場合、野生株と比べ、破壊株の増殖の立ち上がりは大幅に遅れが生じた。



Growth of *I. sakaiensis* wild type (open circles) and *pcaG* (closed circles) in YSV medium with 3 mM EG (A), 3 mM TPA-Na (B), PET film (C), and 3 mM TPA-Na/EG as carbon sources. Error bars  $\pm$  SD (n = 3).

PcaG 破壊株の培養上清に対する HPLC 解析：

PET を炭素源に野生株を 4 日培養した培養上清、および破壊株を 9 日培養した培養上清を HPLC に供した。その結果、破壊株では PCA 標準試料と同様の保持時間にピークが検出された。野生株では同様のピークは観察されなかった。PCA 標準試料より作成した検量線を用いて検出された PCA を定量したところ、PCA 濃度は 0.31 mM と推算された。



HPLC chromatograms of supernatant of *I. sakaiensis* wild type (A) and *pcaG* strain (B) grown on YSV media with PET as a carbon source. HPLC chromatogram of PCA is shown in (C).

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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<br>Taniguchi Ikuo, Yoshida Shosuke, Hiraga Kazumi, Miyamoto Kenji, Kimura Yoshiharu, Oda Kohei | 4. 巻<br>9               |
| 2. 論文標題<br>Biodegradation of PET: Current Status and Application Aspects                              | 5. 発行年<br>2019年         |
| 3. 雑誌名<br>ACS Catalysis   | 6. 最初と最後の頁<br>4089-4105 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1021/acscatal.8b05171   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

|   |                      |
|---|----------------------|
| 1. 著者名<br>Hiraga Kazumi, Taniguchi Ikuo, Yoshida Shosuke, Kimura Yoshiharu, Oda Kohei | 4. 巻<br>21           |
| 2. 論文標題<br>Biodegradation of waste PET  | 5. 発行年<br>2020年      |
| 3. 雑誌名<br>EMBO reports  | 6. 最初と最後の頁<br>e49826 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.15252/embr.201949826                                    | 査読の有無<br>有           |
| オープンアクセス<br>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<br>-            |

|   |                       |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Ishikawa Raga, Yoshida Shosuke, Sawada Shin-ichi, Sasaki Yoshihiro, Akiyoshi Kazunari   | 4. 巻<br>526           |
| 2. 論文標題<br>Preparation of engineered extracellular vesicles with full-length functional PD-1 membrane proteins by baculovirus expression system | 5. 発行年<br>2020年       |
| 3. 雑誌名<br>Biochemical and Biophysical Research Communications 967   | 6. 最初と最後の頁<br>967-972 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.bbrc.2020.03.187   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>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<br>-             |

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 10件 / うち国際学会 2件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>吉田昭介                           |
| 2. 発表標題<br>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<br>酵素工学研究会第81回講演会（招待講演）           |
| 4. 発表年<br>2019年                           |

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

|                                     |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>吉田昭介                     |
| 2. 発表標題<br>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<br>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<br>2018年                     |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>吉田昭介   |
| 2. 発表標題<br>A bacterium that metabolizes poly(ethylene terephthalate)  |
| 3. 学会等名<br>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<br>2018年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>吉田昭介                          |
| 2. 発表標題<br>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<br>第20回 酵素応用シンポジウム（招待講演）         |
| 4. 発表年<br>2019年                          |

|                                 |
|---------------------------------|
| 1. 発表者名<br>吉田昭介                 |
| 2. 発表標題<br>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<br>第71回日本生物工学会大会 (招待講演) |
| 4. 発表年<br>2019年                 |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>吉田昭介                        |
| 2. 発表標題<br>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<br>第68回高分子討論会 (招待講演)           |
| 4. 発表年<br>2019年                        |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>吉田昭介                         |
| 2. 発表標題<br>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<br>19-2エコマテリアル研究会 (招待講演)        |
| 4. 発表年<br>2019年                         |

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

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>高山暁生、吉田昭介                                       |
| 2. 発表標題<br>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<br>第42回日本分子生物学会年会                                  |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>吉田昭介                                  |
| 2. 発表標題<br>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<br>「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<br>2019年                                  |

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

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>蜂須賀真一、高山暁生、藤原毅、吉田昭介  |
| 2. 発表標題<br>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<br>日本農芸化学会2020年度大会  |
| 4. 発表年<br>2020年   |



〔図書〕 計3件

|  |                 |
|--|-----------------|
| 1. 著者名<br>吉田昭介   | 4. 発行年<br>2019年 |
| 2. 出版社<br>シーエムシー出版   | 5. 総ページ数<br>291 |
| 3. 書名<br>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<br>吉田昭介                                   | 4. 発行年<br>2020年 |
| 2. 出版社<br>技術情報協会                                 | 5. 総ページ数<br>560 |
| 3. 書名<br>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<br>吉田昭介   | 4. 発行年<br>2019年 |
| 2. 出版社<br>情報機構   | 5. 総ページ数<br>306 |
| 3. 書名<br>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～） |                 |

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(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 |
|---------|---------|
|---------|---------|