

令和 6 年 6 月 25 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：21K05284  
研究課題名（和文）ペプチドライゲーションを基盤としたポリエチレンテレフタレート分解酵素の高機能化  
  
研究課題名（英文）Backbone-circularization of PET depolymerase based on peptide ligation  
  
研究代表者  
宮房 孝光（MIYAFUSA, Takamitsu）  
  
国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員  
  
研究者番号：70760271  
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：持続可能な社会の実現にむけて、ポリエチレンテレフタレート(PET)のリサイクル技術の改良が求められている。酵素を用いて原料へと分解し、PETとして作り直す方法に期待が集まっている。ただし、酵素は高温下などで容易に機能を失うため、改良が必要である。本研究では、PET分解酵素の安定性を改良し、高機能化する手法を開発した。安定性・活性の向上した度合いは限定的であったが、今後の更なる改良に向けた基盤的な技術を開発することができた。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

酵素を用いたPETリサイクル技術の開発は近年世界的に競争の激しい分野である。中でも高安定、高活性な酵素の開発は盛んに進められており、多数の提案がなされている。本研究では、本来ヒモ状の蛋白質の両端を結んで環状にする主鎖環状化技術を用いてPET分解酵素の高安定化することに成功した。安定性・活性はこれまでに報告されている高機能PET分解酵素を凌駕するものではなかったが、主鎖環状化技術は従来の点変異導入による安定化と併用可能な技術であることから、それらを組み合わせた改良酵素の開発が期待できる。

研究成果の概要（英文）：Improved recycling technology for polyethylene terephthalate (PET) is needed to realize a sustainable society. Expectations are high for a method that uses enzymes to break down PET into raw materials and reconstitute it as PET. However, enzymes easily lose their function at high temperatures and other conditions, so improvements are needed. In this study, we developed a method to improve the stability and functionality of PET-degrading enzymes. Although the degree of improvement in stability and activity was limited, we were able to develop a fundamental technology for further improvement in the future.

研究分野：蛋白質科学

キーワード：蛋白質工学 主鎖環状化 Split intein PET分解酵素 リサイクル 酵素

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ポリエチレンテレフタレート(以下 PET)は、衣料繊維やボトルをはじめとする包装容器の原料として広く利用されており、世界で年間7,000万トン以上製造されている。その一部はリサイクルが進んでいるが、高熱処理やアルカリによってPETを分解するものであり環境負荷が大きい。環境負荷の小さい安全なPET処理技術の開発が求められている。2016年に大阪府のごみ処理場の土壌中からPETを栄養源として生育する微生物 *Ideonella sakaiensis* が単離され、PET分解酵素(PETase)が発見されて以来(Yoshida et. Al., 2016, Science)、PETの酵素分解に大きな注目が集まっている。ただし野生型のPETaseの安定性・活性は低く、実用に耐えうる高安定・高活性なPET分解酵素の開発が望まれていた。

### 2. 研究の目的

野生型PETaseの変性中点温度は46°Cと低く、常温であっても数時間で失活してしまうため耐熱化が必須である(Tournier et. Al., 2020, Nature)。またPETは水に不溶であるため、酵素による分解は固液界面での遅い反応となる。分解反応を加速する手法として、PET粒子の物理的な微細化、界面活性剤によるPET表面の親水化が有効である(Furukawa et. Al., 2018, ChemSusChem)。界面活性剤はタンパク質の構造を不安定化させる場合があり、耐薬品性という観点からも安定性を向上させた改変酵素の開発が求められる。翻って、界面活性剤のようにPETと酵素の接触効率を高める効果を持った改変を酵素に加えることができれば、高活性化に繋がることを期待できる。

### 3. 研究の方法

既報のPET分解酵素活性を持つと知られる3種の酵素について大腸菌を宿主とする発現系の構築を進めた。コドン最適化を施した各ORFをpeIB配列を含む発現ベクターpET25b(+)へクローニングし、特に発現が良好であったLCC(uniport ID: G9BY57)を対象として主鎖環状化を利用した高安定化改変、および点変異導入等を利用した高活性化改変を実施した。主鎖環状化にはスプリットインテインを共発現させて自発的に目的配列のN末端とC末端をペプチド結合で連結させるシステムを利用した。また点変異導入においては類似酵素との配列比較から正電荷を持つアミノ酸への置換が可能な箇所に対してリジン残基への網羅的な置換を実施した。

### 4. 研究成果

スプリットインテインによる主鎖環状化は大腸菌内においてタンパク質発現およびフォールディングと連続的に進行すると考えられ、その過程でpeIB配列は切断されてしまうことから培養上清への分泌は不可能であると当初予測していた。実際に、単純に共発現させた系においては菌体内に目的タンパク質が蓄積されている様子が観察された。そこでリンカー配列の調整などの改良を施したところ、環状化LCCを培養上清へ分泌させることに成功した。スプリットインテ

ンのフォールディング、会合の速度を効果的に遅らせることができたものと推察しているが、詳細なメカニズムの解明は今後の研究課題の一つである。精製した環状化 LCC の熱安定性を示差走査蛍光測定法 (DSF) を用いて評価したところ、編成中点温度が 1.6 度上昇していることが観察された。ただし、この安定化による反応効率の向上は観察されなかった。

また、リジン残基の置換導入による高活性化は、推定した 7 箇所全てを置換すると発現しなくなったが、1 箇所に戻し変異を加えた変異体において、野生型と比較して 2 倍程度の分解活性を有することが観察された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 宮房孝光、本田真也	4. 巻 22
2. 論文標題 抗体医薬品における凝集体評価：凝集化メカニズムの多様性と共通性	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pharm stage	6. 最初と最後の頁 57-61
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -
1. 著者名 Miyafusa Takamitsu, Watanabe Hideki, Honda Shinya	4. 巻 182
2. 論文標題 Local disorder of the C-terminal segment of the heavy chain as a common sign of stressed antibodies evidenced with a peptide affinity probe specific to non-native IgG	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Biological Macromolecules	6. 最初と最後の頁 1697 ~ 1703
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ijbiomac.2021.05.137	査読の有無 有
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 -
1. 著者名 Shibuya Risa, Miyafusa Takamitsu, Imamura Hiroshi, Ooishi Ayako, Honda Shinya	4. 巻 605
2. 論文標題 Effect of backbone circularization on colloidal stability: Compaction of unfolded structures improves aggregation resistance of granulocyte colony-stimulating factor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 120774 ~ 120774
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ijpharm.2021.120774	査読の有無 有
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 -
1. 著者名 Shinkai Yoichi, Kuramochi Masahiro, Miyafusa Takamitsu	4. 巻 9
2. 論文標題 New Family Members of FG Repeat Proteins and Their Unexplored Roles During Phase Separation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 eCollection
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2021.708702	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 宮房孝光	4. 巻 122
2. 論文標題 立体構造情報を利用した 環状化タンパク質のデザイン	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ペプチドニュースレター	6. 最初と最後の頁 9-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 Yasuzawa Yosuke, Shibuya Risa, Senga Yukako, Miyafusa Takamitsu, Honda Shinya	4. 巻 13
2. 論文標題 Determination of the optimal connector length to enhance stability of backbone circularized granulocyte colony stimulating factor	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 1910 ~ 1921
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/2211-5463.13692	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1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 宮房 孝光、渡邊 秀樹、千賀 由佳子、廣田 潔恵、本田 真也
2. 発表標題 人工タンパク質 AF.2A1 はストレスをうけた抗体 IgG が普遍的の持つ重鎖 C 末端の局所的な変性 構造を認識する
3. 学会等名 第22回 日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2022年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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