

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：21K05387

研究課題名（和文）熱に強いポリエチレンテレフタレート（PET）分解酵素をつくる研究

研究課題名（英文）Study on the production of thermostable polyethylene hydrolase

研究代表者

峯 昇平（Shohei, Mine）

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：70415751

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）：プラスチック分解酵素の実用化に向けた研究開発を行なった。立体構造情報をもとに熱に弱い部分のアミノ酸を抽出し、適切なアミノ酸に改変することで、野生型に対し熱安定性を20℃以上、PET分解活性を10倍以上向上させることに成功した。本改変酵素は2022年にNatureに発表された改変酵素と比較しても、同等の活性を維持しながらも10℃以上熱安定性が高いため、長時間に渡り酵素反応に利用可能であることから、PET処理にかかるコストを大幅に減少させることができると考えられる。本研究開発は世界的にも競争力を持つ可能性を秘めた性能の良い酵素の作製に成功しており、当初想定を超えた成果であると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

難分解性プラスチックの有効利用については、資源循環型システムの構築が大きな社会課題である。例えば、PET廃棄物の一般的なリサイクルプロセスにおいては、複合材料や添加物などの混入で再生素材が劣化する点などがリサイクルへのハードルとなっている。本研究で開発された耐熱性PET分解酵素は70℃の温度でも利用可能であり、且つ、添加物存在下でもプラスチックをモノマー単位まで分解することができる。本研究で得られた酵素改良技術を利用することで品質劣化の少ないケミカルリサイクルの展開が期待される。

研究成果の概要（英文）：Research and development for the practical application of plastic degrading enzymes was carried out. By extracting the heat-sensitive amino acids based on the three-dimensional structural information and modifying them with appropriate amino acids, we succeeded in improving the thermostability by more than 20°C and the PET-degrading activity by more than 10-fold compared to the wild-type enzyme. Compared to the modified enzyme published in Nature in 2022, this modified enzyme is more than 10°C more thermostable while maintaining the same activity, allowing the enzymatic reaction to be carried out over a longer period of time, resulting in a significant reduction in the cost of PET degradation. This research and development is considered to be an achievement beyond initial expectations, as it has succeeded in producing an enzyme with good performance that has the potential to be globally competitive.

研究分野：タンパク質工学

キーワード：ポリエチレンテレフタレート プラスチック 酵素 安定性 立体構造

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

PETに代表されるプラスチックの資源循環利用については、海洋プラスチックごみ問題に対する国際的な意識の高まりや、国によるプラスチック資源循環促進法の施行など、循環型の仕組みづくりが大きな社会課題として認識されている。例えばPET廃棄物をマテリアル(メカニカル)リサイクルする場合には再生素材が劣化したり、染料を除くことができなかつたりするなどがリサイクルへのハードルとなっている。PET樹脂を一度モノマーまで分解して回収(ケミカルリサイクル)することで、劣化のないリサイクルを実現する技術開発が行われており、PET樹脂の化学プロセスによる原料化のための高性能な触媒反応系の研究が進められている。本研究で開発するプラスチック分解酵素を活用し、バイオプロセスを用いた過程で難分解性プラスチックをモノマー単位まで分解することができれば、新たなケミカルリサイクルへの展開が拓ける可能性がある。バイオプロセスは使用エネルギーが少なく、かつリサイクル量を増加させられる方法であり、化学プロセスとは用途によってお互いを相補することが期待される。バイオプロセスを用いた難分解性プラスチック分解は、*Ideonella sakaiensis*由来のPET分解酵素が報告された2016年以降、研究開発が加速しており、フランスでは酵素を用いたPET分解デモプラントの試みも行われている。しかしながら性能面に加え、コスト面での課題が大きい。したがって、より高活性で高安定な改変酵素の開発が必須の状況である。

2. 研究の目的

自然界から単離されたPET分解菌 *I. sakaiensis* はPET分解酵素を産出するが、本酵素は40°Cで至適活性を示し、かつPET分解率は著しく低い。PETを効率的に分解するにはPETのガラス転移温度である70°Cで反応を行うのが理想的である。そこで、PET分解酵素の立体構造情報をもとに、構造上、熱に弱い部分を抽出し、その部分のアミノ酸を適切なアミノ酸に変換する。作製した変異体の安定性ならびに活性を測定し、野生型よりも高機能な改変酵素を創出することを目的とする。

3. 研究の方法

(PET分解酵素の調製)

生化学的解析に必要な分量の目的酵素を得るために、様々な発現ベクターならびに大腸菌ホストの組み合わせの検討を行い、更に培養条件を詳細に検討した。

(PET分解酵素の高機能化)

PET分解酵素の立体構造情報を元に熱に弱い部分を約20箇所抽出。それぞれの箇所のアミノ酸を適切なアミノ酸に変換した。作製した変異体は上記の通り調製し、得られた酵素の熱安定性を測定した。安定性が向上した変異体については、市販のPET容器を基質として酵素反応を行い、分解物をHPLCで定量した。機能向上が見られた変異体を組み合わせることで、最終的に高機能なPET分解酵素を作製した。

(PET分解酵素の立体構造解析)

得られた変異体はX線結晶構造解析により立体構造を決定した。測定に必要な結晶は、結晶化スクリーニングキットを使用し、結晶化条件の最適化を行った。得られた結晶はSPRing-8にて測定を行った。

4. 研究成果

(可溶性タンパク質の調製法の検討) PET分解菌 *I. sakaiensis* 由来のPET分解酵素の生化学的解析ならびに結晶構造解析を行うには、大量のタンパク質を調製する必要がある。そのために最適な発現ベクターと大腸菌の組み合わせを検討した。まず pET ベクターと BL21 (DE3) の組み合

わせで発現を試みたが目視できるレベルでの発現量は認められなかった。これは本酵素が二つのジスルフィド結合を有しているためと考えられた。そこで発現ベクターを pCold 系、大腸菌を Rosetta-gami (DE3) に変えたところ可溶成分に有意な発現が認められた。更に培養条件を検討することで、最終的には 1 リットル培養当たり約 10mg の目的タンパク質を得ることができた。

(PET 分解酵素の高機能化)

PET 分解菌 *I. sakaiensis* は PET 分解酵素の PDB(6EQE) をベースに熱に弱いと考えられる箇所を 20 箇所抽出した。選出した箇所のアミノ酸を安定性の向上に寄与すると考えられる種々のアミノ酸に変換し、変異体を調製した。得られた変異体の熱安定性を Thermal Shift Assay により測定を行い、野生型よりも安定性が向上した変異体を 10 種類選び出した。これらの変異体の活性を市販の PET 容器を基質として、40°C で 48 時間分解反応を行い、その上清を HPLC で分析を行った。その結果、野生型よりも活性が向上した 4 種類の変異体まで絞り込むことができた。次にこれら 4 種類全ての変異体を持つ変異体を作製して機能を調べた。結果、改良 PET 分解酵素は野生型に比べ、熱安定性が 30°C、活性は 20 倍向上していることがわかった。そこで、本研究で作製した改良酵素が世界的に見てどのレベルに位置するかを確認するために、2022 年に Nature に報告された改良酵素である FAST-PETase と比較することにした。結果、両者とも同等の活性を有するが、安定性は本研究で作製した酵素の方が 10°C 高いことがわかった。すなわち、本研究開発は世界的にも競争力を持つ可能性を秘めた性能の良い酵素の作製に成功しており、当初想定を超えた成果であると考えられる。現在、特許出願に向けた準備ならびに論文発表の準備を進めているところである。

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 0件）

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Mine Shohei, Nakabayashi Makoto, Ishikawa Kazuhiko | 4. 巻 79 |
| 2. 論文標題 Crystal structure of thermostable acetaldehyde dehydrogenase from the hyperthermophilic archaeon Sulfolobus tokodaii | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications | 6. 最初と最後の頁 159 ~ 165 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1107/S2053230X23004430 | 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 - |

〔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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|