

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780078

研究課題名(和文)芳香族ポリエステルPET分解菌の代謝解析と利用

研究課題名(英文)Metabolic analysis of a PET degradation bacterium

研究代表者

吉田 昭介(Yoshida, Shosuke)

慶應義塾大学・理工学部・助教

研究者番号：80610766

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：ポリエチレンテレフタレート(PET) 資化菌Ideonella sp. No. 201-F6株のPET代謝能に関与する酵素群の同定を目指した。本菌のゲノムを解読したところ、テレフタル酸を含む芳香族化合物の代謝に優れた菌株であることが示唆された。ゲノム、及びトランスクリプトーム情報を基に目的候補遺伝子を絞り込み、最終的に2種の新規酵素(PET加水分解酵素、モノヒドロキシエチルテレフタル酸加水分解酵素)の機能同定に成功した。本菌は、これらの加水分解酵素、およびテレフタル酸代謝系酵素群により、PET資化能を発揮していることが強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate the mechanism that Ideonella sp. No. 201-F6 strain grows on poly(ethylene terephthalate) (PET) as a carbon source, enzymes involved in the PET metabolism were explored. Whole genome analysis of this strain revealed the metabolic potential for various aromatic compounds containing terephthalic acid. Biochemical analyses for selected proteins through the genome/transcriptome information based screening identified two novel enzymes functioning as PET hydrolase and mono(2-hydroxyethyl) terephthalic acid hydrolase, respectively. These discoveries suggested the metabolic route from PET to carbon dioxide and water in this bacterium.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：ポリエチレンテレフタレート ゲノム解析 トランスクリプトーム解析 リパーゼ クチナーゼ クロロゲン酸エステラーゼ

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・耐久性・安全性に優れ、安価なことから、現在ではフィルム・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(京都工芸繊維大学)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て、PET分解菌の探索を行い、微生物群がPETを分解することを世界で初めて発見した(特開2006-187201)。さらに、この微生物群から、単独で二酸化炭素と水までPETを完全分解するNo.201-F6株の分離に成功した。

2. 研究の目的

No.201-F6株が生産する新規PET加水分解酵素群の同定を目的とした。また、これら酵素群の機能解析や、No.201-F6株の網羅的発現解析によるPET代謝機構の解明を目指した。同時にPET製品のバイオリサイクル技術、加工技術の開発を視野に入れて研究を進めた。

3. 研究の方法

(1) No.201-F6株の全ゲノム解析

No.201-F6株の菌体よりゲノムDNAを抽出し、Genome Analyzer IIx(イルミナ社)を用いたゲノムシーケンスを実施した。得られたリードをCLC Genomics Workbench(CLC bio社)を用いてアッセンブルし、ドラフトゲノム配列を決定した。得られた塩基配列データをRASTサーバー(<http://rast.nmpdr.org/>)にアップロードし、遺伝子のアノテーションを行った。

(2) ゲノム情報を基にしたPET加水分解酵素の探索

ゲノム解析により推定された遺伝子から、エステラーゼ、及びリパーゼをコードすると考えられる遺伝子を探索した。また、これまでにPET分解性が報告されているクチナーゼ(脂肪族エステルであるクチンの加水分解酵素)(Müller et al., *Macromol. Rapid Commun.*, 2005)に着目し、そのホモログ探索を行った。

(3) トランスクリプトーム解析によるPET代謝遺伝子群の探索

本菌が代謝可能なマルトース、テレフタル酸、bis(2-hydroxyethyl) terephthalic acid (BHET)、PETフィルムを主な炭素源として含む無機塩培地で本菌を培養した。対数増殖期の菌体を採取したRNAをGenome Analyzer IIxにより網羅的に配列決定を行った。得られたリード配列をゲノム配列上にマッピングし、それぞれの遺伝子の発現レベルを定量化した。

(3) 酵素の機能解析

大腸菌を用いた組み換え型タンパク質を作製した。タンパク質の精製はニッケルアフィニティクロマトグラフィーによって行った。

LipAの機能解析

基質として、PETフィルム、BHET、*para*-nitrophenyl (*p*NP)-butyrateを用い、活性および基質特異性を評価した。また、3種のPET分解性クチナーゼ(放線菌由来、メタゲノム由来、カビ由来)の組み換え型酵素を作製し、同様に活性測定を行った。

ClgAの機能解析

上記()基質に加え、mono(2-hydroxyethyl) terephthalic acid (MHET)に対する活性測定を行った。また、本酵素のMHETに対する反応速度論解析を行った。

4. 研究成果

(1) No.201-F6株の全ゲノム解析

合計6.1 Mbpの塩基配列、5529のCDSを同定した(Table 1)。近縁種のゲノム解析で同定されたゲノムサイズや遺伝子数と同等であったため、大多数の遺伝子情報を得ることができたと考えている。本ゲノムは多くの推定芳香族化合物代謝遺伝子を有しており、また、その中にはテレフタル酸代謝遺伝子群が見出された。これらのことから、本菌がテレフタル酸を含む様々な芳香族化合物の分解・代謝に優れた株であることが示唆された。

(Table 1) No.201-F6株のゲノム解析結果

	201-F6	Burkholderiales bacterium JOSHI_001	Leptothrix cholodni SP-6	Methylobium petroleiphilum PM1
16SrDNA identity		98%	96%	96%
Contigs	227	1	1	1
Genome size	6.1 Mbp	5.6 Mbp	4.9 Mbp	4.0 Mbp
GC content	71.5%	68.8%	68.9%	69.2%
Coding sequences	5529	4879	4142	4101
RNAs	47	46	56	72

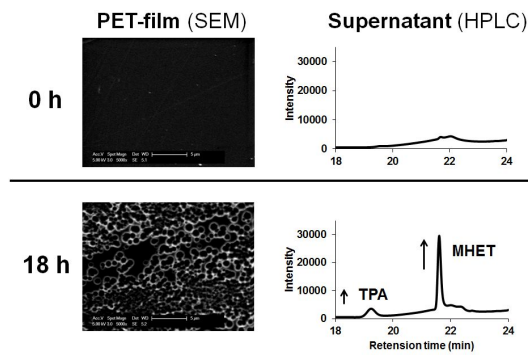
(2) ゲノム情報を基にしたPET加水分解酵素の探索

得られたゲノム情報を基に、PET主鎖加水分解酵素遺伝子候補の探索を行った。その結果、PET分解活性が報告されている*Thermobifida fusca*由来クチナーゼと51%の相同性を示すタンパク質(LipA)をコードする遺伝子を見出した。

(3) LipAの機能解析

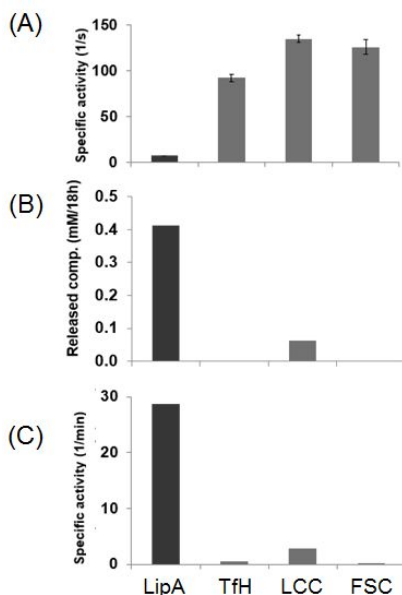
LipA組み換え型タンパク質をPETフィルムとインキュベートしたところ、フィルム上に直径約1 μmの無数の穴状分解痕が観察された(Fig. 1)。反応上清にはMHET、およびテレフタル酸(TPA)が検出された(Fig. 1)。また、LipAはBHETを加水分解したが、MHETをほとんど

ど分解しなかった。



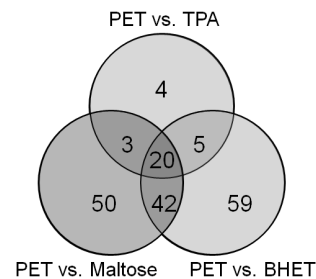
(Fig. 1) LipA の PET フィルムに対する活性 (上段: 反応前、下段: 反応後) 左) 走査型電子顕微鏡(SEM)による PET フィルム表面の観察 右) HPLC による反応上清の解析

また、PET分解性クチナーゼの活性測定を行い、LipAとの比較を行った(Fig. 2)。その結果、LipAは脂肪族エステルである *p*NP-butyrateにはPET分解性クチナーゼ3種と比べ、10分の1以下の活性を示すのみであった。一方で、PET(フィルム)、およびそのオリゴマーであるBHETに対してはPET分解性クチナーゼ3種よりも数倍から数百倍の活性を示した。これらの結果から、LipAがこれら既知のPET分解性酵素とは異なるPET特異性の高い酵素であることが強く示唆された。



(Fig. 2) LipA と PET 分解性クチナーゼ 3 種 (TfH: *Thermobifida fusca* 由来、LCC: メタゲノム由来、FSC: *Fusarium solani* 由来) の(A)*p*NP-butyrate、(B)PET フィルム、(C) BHET に対する活性測定結果

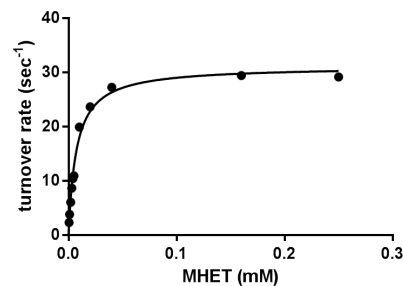
(4) 201-F6株のトランスクリプトーム解析 LipAはPETを加水分解し、MHEtを遊離した。しかし、MHEtを分解する活性を有していなかった。そこで、MHEt加水分解酵素の探索を行った。手がかりとして、ゲノム情報に加え、トランスクリプトーム情報の活用を考えた。201-F6株のトランスクリプトーム解析の結果、PETを主な炭素源とする培地で、多くの遺伝子が発現誘導されていることが判明した(Fig. 3)。この中にLipAも含まれていた。LipAはPETを炭素源とした時に、最も高発現である遺伝子のひとつであり、他条件ではその発現は著しく抑制されていた。クラスタリング解析の結果、LipAの発現パターンに酷似した挙動を示した推定クロロゲン酸エステラーゼ(ClgA)遺伝子に着目した。



(Fig. 3) PET 誘導性(>10-fold) 遺伝子数

(5) ClgAの機能解析

ClgA組み換え型タンパク質をMHEtとインキュベートしたところ、顕著な加水分解活性を確認した。PETやBHETは全く分解しなかった。ClgAのMHEtに対する反応速度論解析を試みた結果、[S]-vプロットはミカエリス-メンテン型の挙動を示した(Fig. 4)。反応速度論パラメーターは $k_{cat} = 31 \pm 0.8 \text{ s}^{-1}$ 、 $K_m = 7.3 \pm 0.6 \mu\text{M}$ であった。本結果により、本酵素がMHEt特異性の高い酵素であることが明らかとなった。



(Fig. 4) ClgA の反応速度論解析

本研究により、201-F6株のPET資化能が性質の異なる2種の新規酵素の一連の反応、および芳香族化合物代謝酵素群により達成されていることが強く示唆された。

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)

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 吉田昭介、捧開維、小田耕平、宮本憲二
“新規ポリエチレンテレフタレート代謝酵素群の同定と機能解析”、日本農芸化学会 2014 年度大会、明治大学生田キャンパス、2014 年 3 月 29 日
2. 小田耕平、平賀和三、吉田昭介、宮本憲二、
“難生分解性芳香族ポリマーPET の微生物分解”、日本化学会第 94 春季年会(招待講演)、名古屋大学東山キャンパス、2014 年 3 月 29 日
3. 吉田昭介、捧開維、小田耕平、宮本憲二
“Ideonella sp.No.201-F6 株が生産する新規ポリエチレンテレフタレート分解酵素群の同定” 日本農芸化学会関東支部 2013 年度支部大会、慶應義塾大学日吉キャンパス、2013 年 11 月 22 日

〔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：吉田昭介、宮本憲二、小田耕平、木村良晴、平賀和三
権利者：慶應義塾大学
種類：特許
番号：特願 2013-171745
出願年月日：2013 年 8 月 21 日
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉田昭介 (YOSHIDA SHOSUKE)
慶應義塾大学・理工学部・助教
研究者番号：80610766