

藤森科学技術振興財団
研究実施概要報告書

(西暦) 2024年 5月 28日

公益財団法人藤森科学技術振興財団
理事長 藤森 明彦 殿

藤森科学技術振興財団の助成金による研究が終了しましたので、下記のとおり報告をいたします。

所属機関 大阪公立大学
職名 准教授
氏名 松本 拓也 

【提出書類】

(1) 研究実施概要報告書（本紙）

添付書類（A4版3枚以内）：研究状況を示す写真等の資料

(2) 収支報告書

添付書類：助成金を充当した経費の領収書

領収書を添付しない場合：支払一覧表と支払部門担当者確認署名

(1) テーマ

※スペースが足りない場合は、
枠を追加いただいて構いません。

PET 分解酵素を表層提示した大腸菌による廃 PET のアップサイクル

(2) 本研究の期間

(西暦) 2023 年 4 月 ~ 2024 年 3 月

(3) 本研究の目的

本研究では、PET 分解酵素を細胞表層に提示した大腸菌を菌体触媒として用いることで、ポリエチレンテレフタレート（PET）および分解物（BHET, MHET, TPA）をプロトカテク酸に変換する技術を開発する。このことで、廃 PET を原料として高付加価値の化合物の合成を可能にするアップサイクル技術の開発を目指した。

本研究では、微生物（大腸菌）により温和な条件で PET を分解する。さらには微生物の代謝機構を利用して PET 分解物を高付加価値な化合物（本研究ではプロトカテク酸）に変換する。以上により、環境に配慮した条件下で廃プラスチック処理しながら、有用化合物に変換し新たな付加価値を与える点で、プラスチックのアップサイクルのさきがけになると期待できる。日本容器包装リサイクル協会の年次レポートによると令和 3 年度の引取分のおよそ 6 割がケミカルリサイクルを経て高炉化学原料として利用される。一方、残りの 4 割がマテリアルリサイクルされ再生プラスチックとして利用されているが用途は限られている。例えば、PET は化学分解により BHET まで分解し、エチレングリコールと重合させることで PET 樹脂として再生する技術が開発されている。化学的にモノマー やオリゴマーまで分解することは技術的に可能であるが、再び同じもの（PET）に再生する以外の用途は既往の技術ではあまりなく、単に高コストなリサイクルとなってしまっているのが現状である。

申請者は、大腸菌の細胞表面において PET を分解する酵素を提示することで、PET や BHET をモノマーであるテレフタル酸（TPA）に分解する技術の開発に成功している。本研究では、大腸菌の代謝機構に TPA を変換する人工経路を導入することで TPA を有用化合物であるプロトカテク酸（PCA）に変換することを目的とする。結果として、PET や BHET を基質に有用化合物 PCA へと変換できる菌体触媒の開発を行う。PCA はムコン酸、カテコール、やバニリンといった繊維、医薬品、香料の原料に変換できる基幹化合物である。つまり、本研究において廃 PET を PCA に変換する技術を確立することができれば、将来的には廃 PET を様々な形、用途でアップサイクルできることにもつながり、波及効果は非常に大きい。現在、PETase に関する研究が世界中で精力的に進められている。しかしながら、一般的に酵素触媒は調製や精製にコストがかかり、耐久性の改善も求められるため実用にはまだ至っていない。また、PETase を產生する元々の宿主 *Ideonella sakaiensis* は PET を分解し、分解されて生じたモノマーを栄養として利用する。つまり、PET を原料に CO₂ まで分解してしまう。つまり、既往の生体触媒を用いた PET リサイクルのほとんどは「分解」にしかまだ目を向けられていない。

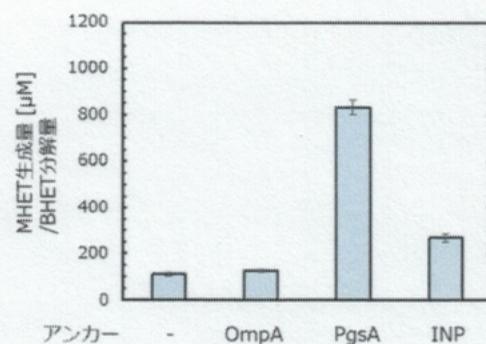
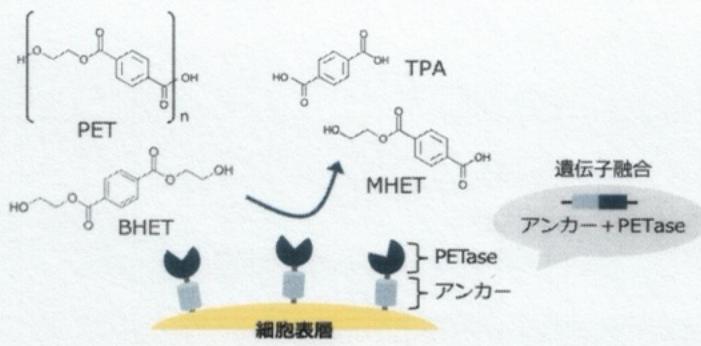
それに対して本研究では、モノマーを食べない微生物である大腸菌の細胞表面に PETase を発現させるため、1. モノマー化が可能である。かつ、様々な有用化合物の生産に用いられる大腸菌を宿主としているため、遺伝子組換えにより外来の人工経路を導入することで2. 分解したモノマーを有用化合物に変換できる。本研究においては、両者を組み合わせて利用する基盤技術を確立することで PET を「分解」し、違うものに「変換」する工程を実証することを目指した。

(4) 本研究の概要

1. PET および BHET の分解機構の構築

申請者はこれまでの研究において、糖化酵素を大腸菌の細胞表層に提示することでセロビオースを原料にメバロン酸などの有用化合物を生産する技術の開発を行なってきた。糖化酵素を細胞表面で機能させることで、細胞表面で大腸菌が本来基質として利用できないセロビオースを利用可能なグルコースに分解し、大腸菌が利用できるようになることが可能になる。当該技術を細胞表層提示技術と称している。

ここで、表層提示を行うには細胞表面に発現するタンパク質（アンカー）と目的の酵素を融合発現する必要があり、アンカーとの組み合わせや発現量の調整が酵素活性（分解能力）に大きく影響する。申請者は、上記知見を利用して **PETase を表層提示することで、BHET を高効率で分解可能な発現系（アンカーとの組み合わせ）を見出した**。下図の結果より、仕込み基質量 1 mM に対して 48 h 後におよそ 90% の BHET を分解可能な大腸菌を作成した。本研究では、更なる分解速度の向上や改善のために遺伝子発現量の活性向上に向けた酵素改変に着手した。本研究では、PET 分解能を更に改善した大腸菌株を元にプロトカテク酸の合成を試みようと考えた。



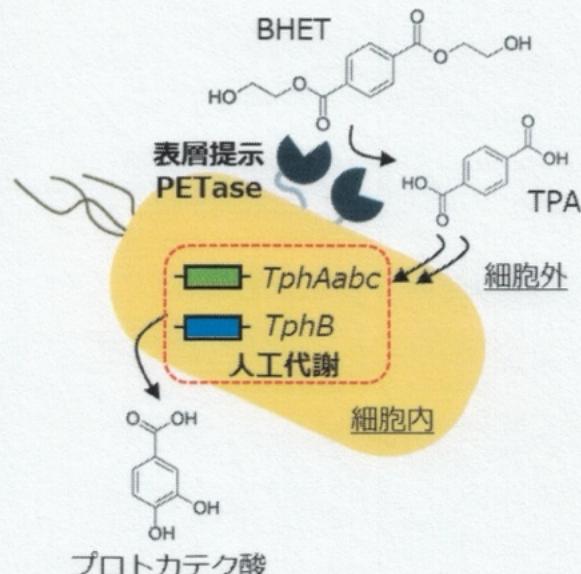
2. TPA (テレフタル酸) を初発基質としたプロトカテク酸生産機構の構築

2-1. TPA 代謝経路の導入

申請者はこれまでの研究において大腸菌を基とした様々な微生物を宿主として利用し、多様な有用化合物を生産する代謝改変微生物の開発を行なってきた。本研究では、その知見を活かして **本来は TPA を資化できない大腸菌に対して、TPA 資化経路を導入する**。具体的には、TPA 分解細菌 *Comamonas.sp* に由来する TPA 1,2-ジオキシゲナーゼ酵素に関連する遺伝子 *TphAabc* (*TphA123*)、1,2-ジヒドロキシ-3,5-シクロヘキサジエン-1,4-ジカルボン酸デヒドロゲナーゼ酵素に関連する遺伝子 *TphB* を大腸菌に導入し、TPA からプロトカテク酸を合成する経路を構築を試みた。

2-2. BHET を基質としたプロトカテク酸生産

導入した人工代謝が機能するためには、細胞内の酸化還元バランスの調整や生育に関する影響を調査する必要がある。実際に、BHET を炭素源に含む培地で構築した大腸菌を培養することで代謝物や遺伝子発現に与する影響を調査し、本大腸菌触媒を更なる代謝改変を行うことで **BHET からプロトカテク酸生産に適した株へと最適化することを目指した**。

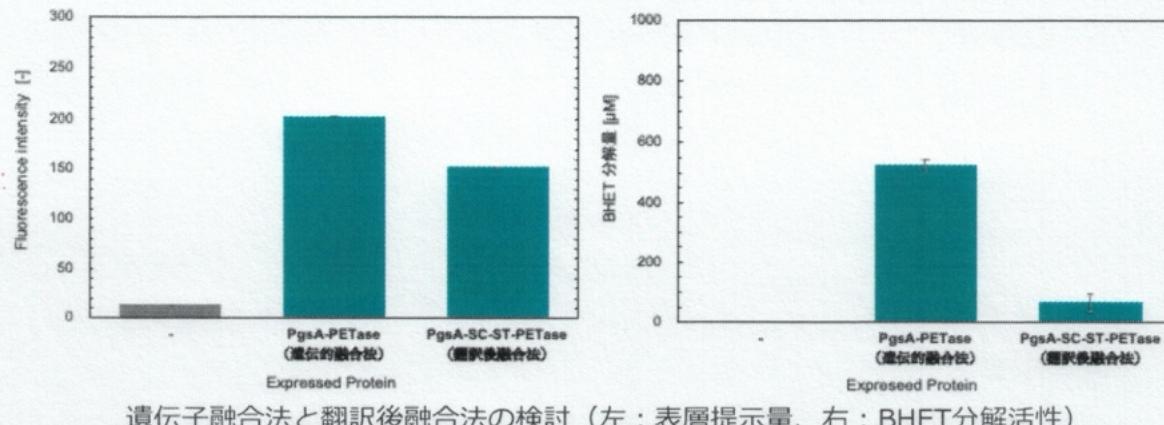


(5) 本研究の内容及び成果

1. PET および BHET の分解機構の構築

1-1. 表層提示法の検討

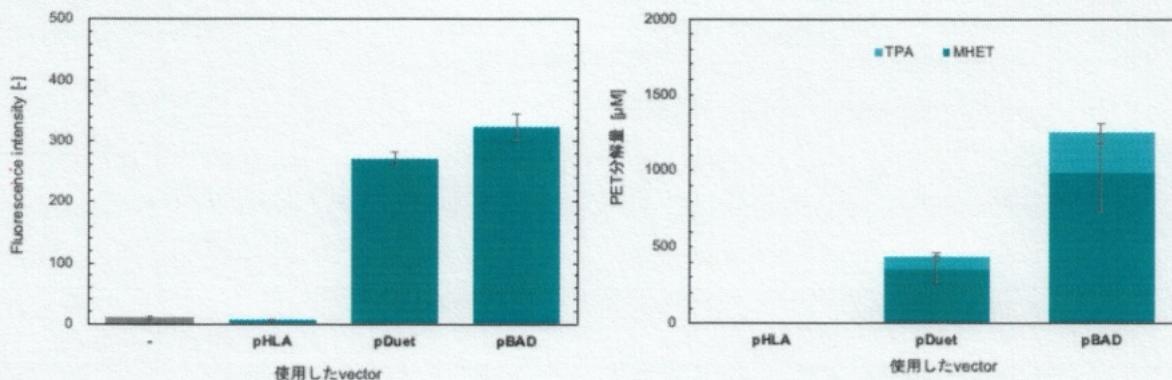
本研究では、更なる PET および BHET 分解能の改善を図って、表層提示法について検討した。各表層提示手法を用いて PgsA-PETase を発現した場合の発現量の比較を行った。具体的には、遺伝子融合によりアンカータンパク質と PETase を融合させる方法と、SpyCatcher システムを用いて翻訳後に融合する方法について検討した。下左図に免疫蛍光染色により表層提示された PETase の提示量を比較した結果を示す。遺伝子融合の方が、細胞表層に提示された PETase の量が高いことが分かる。また、BHET 分解活性に関しても遺伝子融合法の方が高かった。



遺伝子融合法と翻訳後融合法の検討（左：表層提示量、右：BHET分解活性）

1-2. 発現条件の検討

遺伝子融合法を用いて PgsA-PETase を発現する際のプロモーターに関する検討を行った。下図に表層提示量および PET 分解活性を示す。本研究においては、pBAD ベクターを用いてアラビノースを誘導剤として発現した際に、最も高い表層提示量および PET 分解活性を示した。結果として、PET フィルム (15 mm × 15 mm) を基質とした場合に、30°C、72h でおよそ 1.5 mM の MHET および TPA を產生し、PET 分解活性を大きく改善することに成功した。



プロモーター（プラスミド）の影響（左：表層提示量、右：PET分解活性）

2. TPA を初発基質としたプロトカテク酸生産機構の構築

2-1. TPA 代謝経路の導入

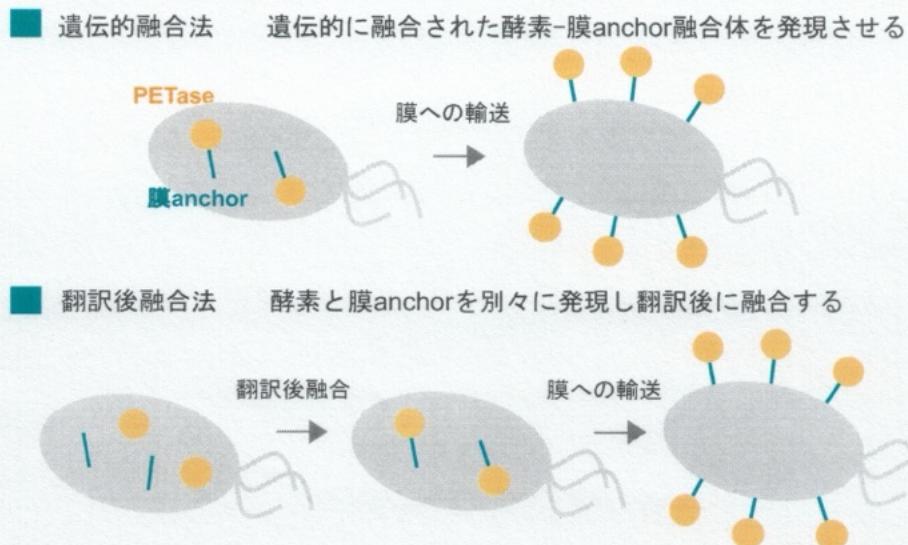
PET を分解可能な大腸菌株に成功したので、本研究では複製起点の異なるプラスミドを用いて TPA をプロトカテク酸に変換する代謝経路の導入を試みた。まず、TphA123 および TphB を含むプラスミドで大腸菌株を形質転換し、TPA を代謝可能かどうか検討した。しかしながら、TPA を炭素源として含む M9 最小培地を用いて本大腸菌株を培養したところ、TPA はほとんど代謝されず、遺伝子発現量の調節や培養条件の検討が必要であることが示唆された。引き続き種々の実験条件の検討を行い、TPA を代謝可能な大腸菌株の開発を試みている。

(6) 本研究の考察

1. PET および BHET の分解機構の構築

1-1. 表層提示法の検討

遺伝子融合法および翻訳後融合法による表層提示系の模式図を下に示す。免疫蛍光染色の結果では、遺伝的融合法の方が蛍光強度が高く、PETase 提示量が多いことが示唆された。これは、SpyCatcher/SpyTag によって融合タンパク質のサイズが大きくなつたことで、融合タンパク質の外膜への輸送量が減少したことが原因として示唆される。また、BHET 分解量においても遺伝的融合法の方が高かった。これは、細胞表層に提示された PETase の量が減少、または、SpyCatcher/SpyTag の付与による PETase 活性の低下が原因と考えられる。以上の結果より、本研究においては遺伝的融合法を用いて PgsA-PETase を発現することとした。



1-2. 発現条件の検討

各ベクターを用いて PgsA-PETase を発現した場合の発現量の比較を行った。発現誘導後の各細胞の全細胞画分を用いて SDS-PAGE を行ったところ、pBAD ベクターを用いた場合に発現量が最大になり、pHLA ベクターを用いた場合に発現量が最小になった。細胞膜には栄養の取り込みに重要な内在性タンパク質が数多く存在するため、恒常発現型のプロモーターを含む pHLA ベクターでは PETase の恒常的な表層提示により、生育に悪影響を与えたことが懸念される。同様に IPTG 誘導系では、発現の漏出が原因で分解活性が低下したと考えられる。一方で、発現制御が厳密なアラビノース誘導型のベクターが本研究においては PETase の表層発現に適していたと考えられる。

2. TPA を初発基質としたプロトカテク酸生産機構の構築

2-1. TPA 代謝経路の導入

本研究で導入を試みた人工代謝経路では、TPA を代謝するために NADPH 等の補酵素が必要になる。そのため、TPA を单一炭素源とした培地では大腸菌の生育が困難であると考え、グルコースやグリセロールを含む混合培地での培養を検討した。しかしながら、本研究で作成した大腸菌株では TPA をほとんど代謝することができなかった。そのため、プロモーター等の検討による遺伝子発現量の調整が今後必要になると考えられる。

また、本研究では PET の分解は pH8~9 のアルカリ条件下で進行したが、当該条件下では大腸菌の生育に悪影響が及ぶと考えられる。今後、中性付近で PET を分解可能な PETase の開発など、酵素の改変も求められ、それらを総合的に踏まえた更なる研究開発が求められる。

(7) 共同研究者（所属機関名、役職、氏名）

- 該当無し

(8) 本研究の成果の公表先

- 酵素工学研究会第 90 回講演会（2023 年 11 月、東京）、山下拓真、松本拓也、山田亮祐、荻野博康、「PETase を細胞表層に提示した大腸菌の開発」

[注] この報告書を当財団のホームページ等に掲載します。予めご了承ください。