

フジシール財団 研究助成事業
成果報告書

公益財団法人フジシール財団
理事長 岡 崎 裕 夫 殿

報告日 2024 年 5 月 28 日

研究課題	PET 分解酵素を表層提示した菌体触媒	助成金額
		200 万円
助成名	特別長期研究助成・○研究助成・若手研究助成	
ふりがな	まつもと たくや	研究助成申請年度
研究者氏名	松本 拓也	2023 年度
所属機関	大阪公立大学	研究期間
		2023 年 4 月～2024 年 3 月
役 職	准教授	

下記の通り、研究成果を報告いたします。
記

1. 研究成果の概要

研究目的 〈表層提示技術を用いて PETase を細胞表面に発現した大腸菌触媒の開発と評価〉

本研究においては、右図 3 つの戦略を用いて、PET 分解可能な大腸菌触媒の開発に着手した。

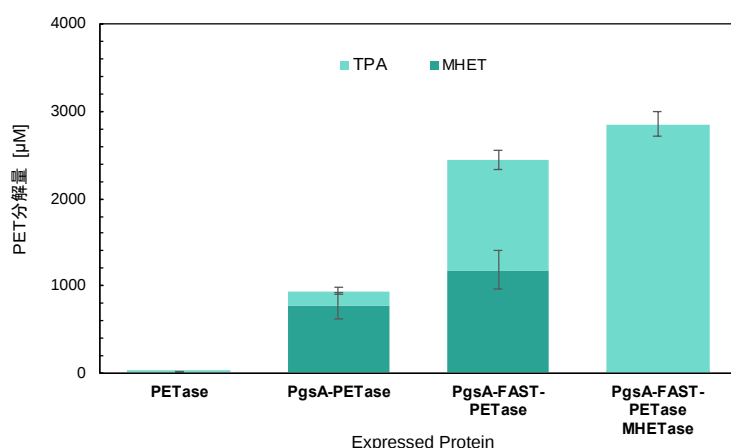
① PETase 表層提示大腸菌の開発

大腸菌の細胞表面にあるタンパク質（アンカー）と目的酵素（PETase）を融合発現することで、細胞表面に酵素を提示することが可能になる。細胞表面に PETase が存在することで、菌体表面で分解反応を行える。つまり、酵素の分離精製が不要で菌体自体を触媒としてそのまま利用することができる。

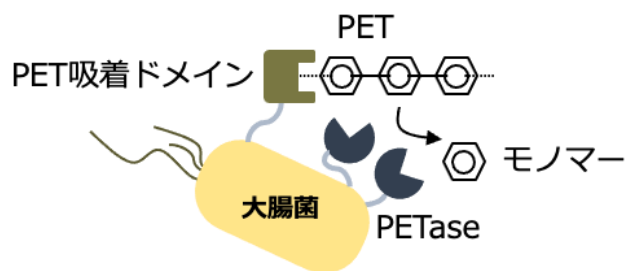
申請者はこれまで表層提示を用いた微生物生産に関する研究に携わっており、先行研究を参考にいくつかのアンカーと PETase を組み合わせることで PET の分解反応を検討した。PET 分解の中間物質である BHET を基質として実験を行った。アンカーの種類によって、表層提示された PETase の活性が大きく異なったが、PgsA をアンカーとした場合、60 min で仕込み BHET 量のおよそ 95%を分解可能な大腸菌株の開発に成功した（論文発表(2)）。

② MHETase の分泌発現の検討

本研究では、更なる分解活性の改善を図って、右上図②のように PETase を表層提示した大腸菌株に MHETase を更に分泌発現する株の構築を試みた。MHETase は PET 分解の中間生成物である MHET をテ



レフタル酸（TPA）に分解する酵素である。PETase の表層提示のみでは、MHET が多く残存していたが、MHETase を共発現することで、本研究においては PET を全て TPA まで分解することが可能な大腸菌株の開発に成功した。

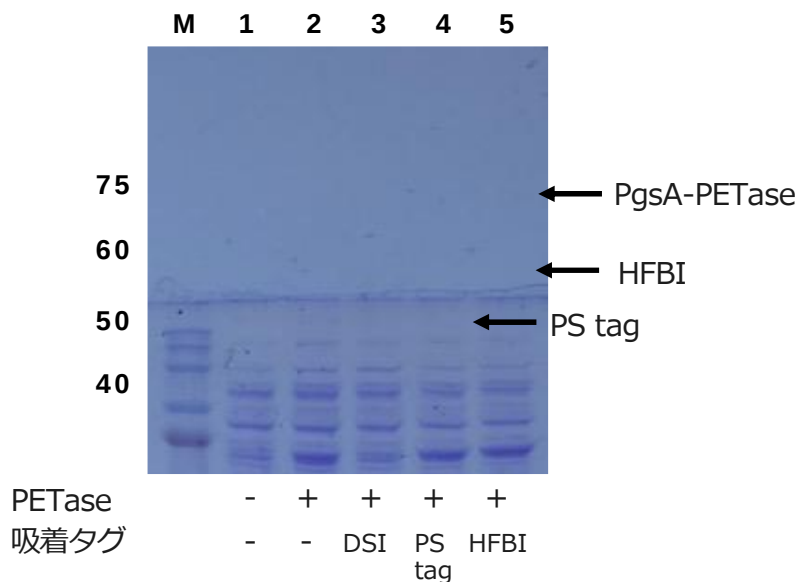


③ PET 接着性の改善、PET 吸着ドメインの表層提示

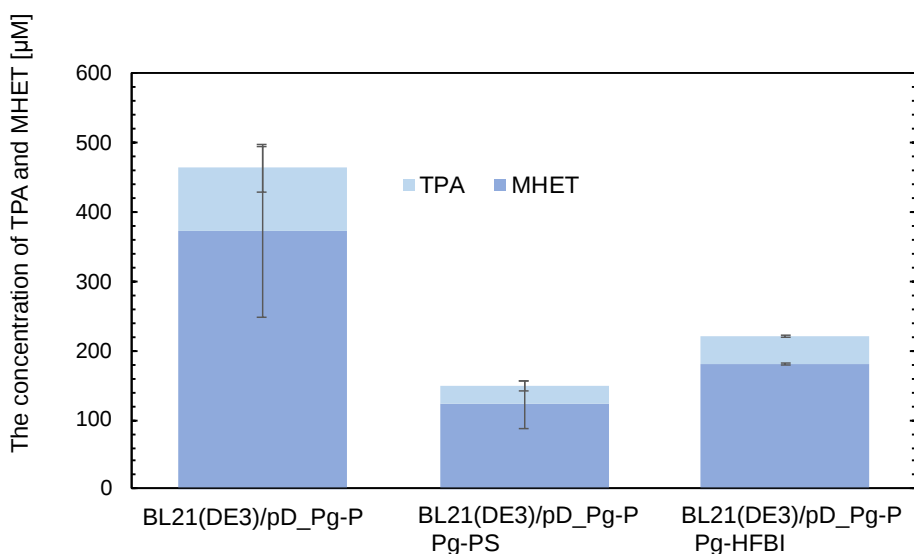
本研究では MHETase を共発現する株の構築と並行して、大腸菌自体の基質（PET）への接着性を改善することで PET 分解を促進することについても検討を行った。発表論文では、PET 分解の中間物質である BHET を高効率で分解できるアンカーとの組み合わせを見出せた一方で、PET の分解効率は著しく低かった。その理由の一つとして、菌体と PET の接触が十分に確保できていないことが原因だと推察した。実際に先行文献では酵素分解において酵素が PET から剥離することが原因で分解効率の低下が示唆されている。それを解決する手段として、本研究では PET 吸着ドメインの利用を検討した。菌体触媒である利点を生かし、PET 吸着ドメインを更に表層提示することで PET に吸着しながら分解が可能になる（右上図）。種々の PET 吸着ドメインの表層提示に関して検討・調査した。

・PET 吸着タグの発現確認

本研究では、*Phyllomedusa nordestina* 由来の両親媒性ペプチドである Dermaseptin SI (DSI)、疎水性ポリマーに高い吸着性を示す合成ペプチドである PS Tag、*Trichoderma reesei* 由来の両親媒性タンパク質である Hydrophobin I (HFBI) を吸着タグとして選定し、①で開発した大腸菌株に更に表層提示することで PET の吸着性および分解活性の改善を図った。右図 SDS-PAGE の結果から、PS tag および HFBI に関しては発現が見られたが、DSI は発現が確認



できなかった。本研究では、発現が確認できた PS tag および HFBI を共表層提示した株において、PET フィルム（15 mm×15 mm）を基質として分解反応を行った。Tris-HCl 緩衝液（pH 9.0）、30℃で 72 h 静置反応後の分解物を HPLC で測定した結果を右に示す。右図より、PET 吸着タグを共提示した場合、いずれも PET 分解量が低下した。BHET の分解活性に関してもそれぞれ低下していたことから、PET 吸着タグの共発現により PETase の発現量が低下したこと、あるいは吸着タグが機能していないことなどが考えられる。今後の研究により、プロモーターや表層提示アンカーなどを検討することで、発現量の調整や他の吸着タグを検討する必要があると考えられる。



2. 研究成果のパッケージ産業への貢献の可能性

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る。今後、パッケージを含めたプラスチックリサイクルを進めるには、より付加価値を高めたアップサイクルが求められる。本研究では、微生物を菌体触媒として用いることでPETを主にモノマーあるいはオリゴマーまで分解する技術の開発を行った。PETを分解する酵素を微生物の細胞表面に提示し、酵素を精製する手間を省き、安価にかつ環境に優しい（温和な条件下で）ケミカルリサイクルを目指した。本技術によって分解したモノマーは、他の用途にも利用可能であり必ずしもPETとして再利用する必要はない。また、環境に配慮した条件下で得られたリサイクル原料として新たな付加価値を与えうる点で、プラスチックパッケージのアップサイクルのさきがけになると期待できる。

酵素は一般的にシリカやポリマー粒子などに固定化することで再利用性を改善し、利用することが多いがプラスチックの分解反応においては基質となるプラスチックが固体であるため固固反応になってしまい、水系で働く酵素にとって不利である。また、基質と酵素の接触面積が小さくなることから固定化PETaseはあまり実用的ではない。それに対して本研究では、分解した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、モノマー化が可能である。また、大腸菌を酵素固定の足場としてみなすことで再利用性を担保できかつ、酵素精製の手間を省くことができる。さらには、微生物のプラスチック付着性を逆手にとることで反応効率の向上も期待できる。本研究では、種々の戦略を組み合わせることで、フィルムを含むPETを分解可能な大腸菌株の開発を行い、反応速度等の改善はまだ必要ではあるが、実際にPETフィルムを分解することに成功した。今後、PET分解活性の更なる改善やPET以外の分解酵素を提示することなどで様々なパッケージゴミのリサイクルに展開すること期待できる。更には、大腸菌は安価な培地、必要最小限の栄養で容易に生育するため、生ゴミや排水を含むパッケージゴミを前処理なしでリサイクルするなど新たなリサイクルシステムの開発にも展開が期待でき、学術的意義も非常に大きい。

3. 学会発表、学会誌等への論文掲載、産業財産権出願などの実績（現時点で未発表・未掲載・未出願のため、上記「1. 研究成果の概要」、「2. 研究成果のパッケージ産業への貢献の可能性」の当財団ホームページ上の公開の延期を希望される場合、その旨記載してください。）

- (1) 酵素工学会第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」
- (2) Display of PETase on the cell surface of *Escherichia coli* using the anchor protein PgsA. T. Yamashita, T. Matsumoto*, R. Yamada, H. Ogino, Applied Biochemistry and Biotechnology, 1-13 (2024)

成果報告書の作成上の留意事項

- (1) 当財団指定の様式（A 4 サイズ）を用い、報告書の様式は変更しないでください。「1．研究成果の概要」、「2．研究成果のパッケージ産業への貢献の可能性」、「3．学会発表、学会誌等への論文掲載、産業財産権出願などの実績」の間での行数の変更は可能ですが、総ページ数を3ページとしてください（本留意事項を除く）。
- (2) 日本語で作成してください。但し、英語での業績、論文、成果は英語のまま記入してください。
- (3) フォントは MS明朝の10.5ポイントを使用してください。
- (4) すべてのページのフッター部分に研究者の氏名を記入してください。

以上