

酵素による効率的な
poly(ethylene terephthalate)分解手法の開発

2019 年度

古川 洵

学位論文 博士（工学）

酵素による効率的な
poly(ethylene terephthalate)分解手法の開発

2019 年度

慶應義塾大学大学院理工学研究科

古川 洵

目次

序論.....	1
人工高分子(プラスチック)の利用と問題点	2
プラスチックの生分解.....	4
PET 分解菌の発見と PET 分解酵素	5
PET 分解酵素の活性改善に向けて	6
本研究の目的	7
参考文献.....	9
本論.....	12
1 章.....	12
1-1. 緒言	13
1-2. 界面活性剤の添加による PETase の PET 分解活性変化	16
1-3. 界面活性剤の添加による PET 表面への酵素吸着量変化	25
1-4. 界面活性剤存在下での長時間反応.....	30
1-5. アニオン性界面活性剤との相互作用部位の同定	32
1-6. 活性部位周辺への変異導入による活性向上	36
1-7. 結論	39
参考文献.....	40
2 章.....	42
2-1. 緒言	43
2-2. 界面活性剤存在下での TfCut2 の PET 分解活性.....	45

2-3. 界面活性剤存在下での PET 表面への酵素吸着量変化	50
2-4. TfCut2 による長時間反応	52
2-5. 変異導入による TfCut2 の活性改善	53
2-6. 二重変異体による長時間反応	57
2-7. 高結晶性 PET の分解反応	59
2-8. 結論	60
参考文献	61
<i>結論</i>	<i>63</i>
<i>実験の部</i>	<i>66</i>
使用した試薬・キット類	67
使用機器	69
第 1 章 界面活性剤を利用した PET 分解酵素の活性改善	71
第 2 章 界面活性剤の添加と変異導入による耐熱性 PET 分解酵素の活性改善	81
公刊論文目録および口頭発表目録	
謝辞	

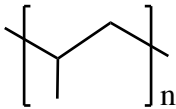
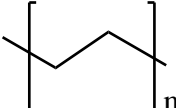
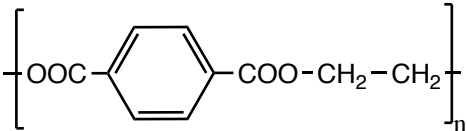
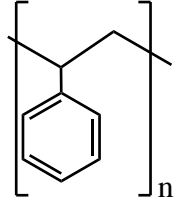
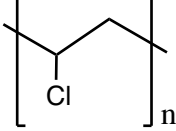
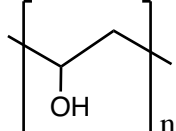
序論

人工高分子(プラスチック)の利用と問題点

プラスチックとは、人工的に作製された高分子ポリマーを指し、主に石油を原料として安価に製造できる。プラスチックは、その構成単位である”モノマー”と比較して、様々な物理的、化学的特性を示すため、人間生活に深く根付いている。例えば、スーパーのレジ袋や商品の包装、自動車部品やシャンプーボトルなどが代表的なプラスチック製品として挙げられる。これら製品の素材として主に、ポリビニルアルコール(PVA)やポリスチレン(PS)、ポリエチレン(PE)、ポリプロピレン(PP)、ポリエチレンテレフタレート(PET)が使用されており、引張強度や耐熱性、ガスバリア性などにおいて優れた性質を示す。また、その成型過程において、密度を調製することで硬度も自在に変化させることが可能である。このようなプラスチックの利用は、PVA や PS が発明された 1920 年代初頭から急速に発展し、一切衰退することなく 2016 年には世界計約 3 億トン製造されている^{1,2}。現在製造されている主なプラスチックの構造と、その用途について表 1 に示す。

このような利便性の一方で、近年ではプラスチックが与える環境への悪影響が懸念されている。例えば、回収されたプラスチックの処理には、高温高圧や強塩基条件下などでの反応によるモノマー化や土壌中への埋め立てなど、環境負荷の大きな手法が未だ採用されている³。また、海洋中に流出したプラスチックは、水や光によって微細化(マイクロプラスチック化)し、それによる魚類等の生態系への影響は極めて深刻であるとされている⁴。そのため、これらプラスチック汚染の解決に向けて、環境低負荷な新たなプラスチック処理技術の確立は、環境保全の観点から極めて重要である。近年注目されている技術の 1 つとして、微生物や生体触媒を利用したプラスチックの生分解が挙げられる⁵。本論文では特に、環境低負荷かつエネルギー効率の良い技術である生分解に着目した。

表 1. 主なプラスチックの構造とその用途

名称	構造	主な用途
ポリプロピレン (PP)		電子レンジの外装 自動車のバンパー
ポリエチレン (PE)		農業用シート シャンプーボトル
ポリエチレンテレフタレート (PET)		飲料容器 食品トレイ
ポリスチレン (PS)		メガネのフレーム プラスチックコップ
ポリ塩化ビニル (PVC)		窓枠 パイプ ホース
ポリビニルアルコール (PVA)		接着剤 真空包装

プラスチックの生分解

プラスチックの生分解に関する研究の多くは、1970–80年代に始まっており、その代表例の1つとして、Albertsson らによる PE の土壌埋設実験がある⁶。1988年、Albertsson らは、10年間土壌中に埋設させた低密度の PE(LDPE)の重量が、埋設前と比較して約 0.2%低下することを報告している。このとき、埋設させた LDPE 表面に存在するカルボニル基や $-C=C-$ 結合の経時変化を調べたところ、通常の紫外線による酸化プロセスとは異なる挙動を示したことから、この重量変化には少なからず微生物分解が関与していることが示唆された。この研究報告以来、PE の微生物分解(酸化型生分解)に関する研究は幅広く行われ、2019 年までに、*Brevibacillus* 属、*Bacillus* 属、*Arthrobacter* 属、*Pseudomonas* 属など、様々な微生物が PE 分解能を持つことが明らかになっている⁷。また、2018 年の報告によれば *Bacillus cereus* による PE 生分解速度は、16 週間の培養で 35%(厚さ 30 μm のうち約 10 μm 分解)と 1988 年の報告と比較して大幅に進歩している⁸。しかしながら、従来の熱分解法と比較すると、この酸化型生分解は著しく低速であり、なおかつその分解機構が不明なため、未だ非実用的な技術である。また、類似した構造を持つ PP に関しても同様に、これらプラスチックの生分解の実現には長い時間がかかると考えられている⁹。

一方で PE や PP の構造とは異なり、エステル結合を有する PET は、難分解性プラスチックとして知られているものの、比較的生分解が容易なプラスチックである。1987年、Smith らは PET を trypsin、chymotrypsin、papain および esterase とともにインキュベートしたところ、esterase で分解反応が進行していることを見出した¹⁰。2005 年には、Müller らによって esterase の一種である cutinase を用いることで、厚さ 200 μm の PET フィルムを 50°C、三週間で 50%以上分解できること¹¹、さらに 2009 年には、Ronkvist らによって *Humicola insolens* cutinase (HiC)が 70°Cの条件下、わずか 96 時間で厚さ 250 μm の PET フィルムが完全分解されることを報告している¹²。上記のような耐熱性 cutinase による PET 分解は、その反応効率の高さに加えて、反応生成物として PET の原料であるテレフタル酸(TPA)を生成することから新たなリサイクルへの応用が最も期待されている反応系の 1 つである。

PET 分解菌の発見と PET 分解酵素

先述したように、数多くの PET 分解酵素が発見され応用に向けた研究がなされていく中、2016 年には当研究室と京都工芸繊維大の小田耕平名誉教授らの共同研究によって、世界で初めて PET 資化性菌 *Ideonella sakaiensis* を発見した¹³。本菌株の最大の特徴は、30℃での培養において、60 日ほどで PET フィルム(厚さ 200 μm)を水と二酸化炭素まで完全分解できる独自の代謝経路を有することである。先行研究では、本菌株のゲノム解析から、その独自の代謝経路が明らかになった(図 1)。

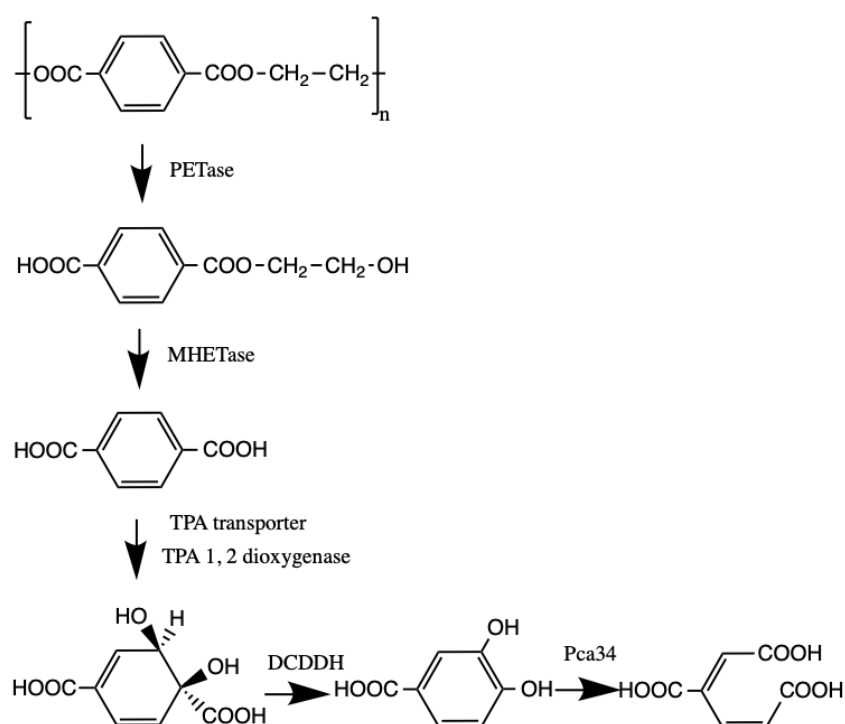


図 1. *Ideonella sakaiensis* による PET 代謝経路¹¹

PETase: PET 加水分解酵素

MHETase: mono(2-hydroxyethyl terephthalate)加水分解酵素

TPA transporter: terephthalic acid transporter

TPA 1,2 dioxygenase: terephthalic acid 1,2 dioxygenase

DCDDH: 1,2-dihydroxy-3,5-cyclohexadiene-1,4-dicarboxylate de- hydrogenase

Pca34: 1,2- dihydroxy-3,5-cyclohexadiene-1,4-dicarboxylate dehydrogenase

この時、基質である PET フィルムは、PET 分解酵素(PETase)によって遊離酸である mono(2-hydroxyethyl terephthalate) (MHET)まで分解され、生成した MHET は MHETase によって TPA へと分解されたのち、菌体内で既知の代謝経路を経て、水と二酸化炭素まで分解される。この系において、PETase および MHETase の既存酵素との相同性は、それぞれ 51% (*Thermobifida fusca* cutinase (TfCut2))、18.9% (feruloyl esterase homolog FaeB from *Aspergillus oryzae*)と低い¹⁴。そのため、ここには既存の酵素にはない、効率的な PET 分解を達成するための機構が隠されていることが示唆された。

これまで、特に PET 特異的に進化した酵素である PETase に着目し、工業利用に向けた検討が行われてきた。まず、吉田らによって本酵素の諸性質が解明された¹³。本酵素は、pH9.0、30 °Cの条件下で最大の活性を示し、この温度において他の cutinase と比較して圧倒的に高活性を示す特徴を持つことがわかった。その後、2016 年の報告以来数多くのグループによって本酵素の結晶構造解析や、それを基にした変異導入による活性向上が報告されている^{15,16,17,18,19,20}。しかし、その活性改善率は、1.8 倍～4.3 倍程度で、先述した HiC などの耐熱性酵素を用いた高温条件下での活性にも未だ及ばない。

PET 分解酵素の活性改善に向けて

一般に、酵素による PET 分解反応は、酵素が基質表面に吸着したのちに進行する。しかしこの系において、親水的な酵素が疎水的な PET 表面とは相反する性質を有し、これらの間では相互作用が起こりにくいと考えられている²¹。したがって、これが酵素活性を制限している原因であれば、これらの間の相互作用を改善することが PET 分解酵素の活性向上につながると思われる。

非天然の化合物である PET と酵素との間の相互作用の改善手法として、酵素そのものの疎水化や結合モジュールの付加などが挙げられる^{22, 23, 24}。しかし、どちらの手法も変異体、モジュールの最適化においてスクリーニングが必要な点、発現精製系の難化や構築した酵素ごとの結合能評価等、非常に時間のかかるプロセスであることが問題点として挙げられる^{24, 25}。そのため、酵素そのものには手を加えることなく、酵素の吸着を改善する

手法の開発は、酵素による PET 生分解の実現可能性を広げると考えた。

実用化に向けた酵素による PET 分解

化学処理による PET 分解では、表面から内部に分子が浸透し、加水分解されることに対して、酵素による PET 分解は PET 表面から分解が進行していく。この特徴を生かした具体的な酵素の利用法として、リサイクルにおける、使用済み PET の表面洗浄過程への応用が期待されている。実際に、回収された PET の表面には健康被害を及ぼすような有害な疎水性分子が付着、浸透している可能性が報告されており、共同研究企業による SML6 を用いたシミュレーションでは、家庭園芸用殺虫剤であるスミチオン乳剤 50% が PET に保存されていた場合を想定した、スミチオンの内部への浸透レベルが評価されている²⁶。これによると 40°C、10 日間、スミチオン乳剤 50% を保存した PET ボトルは表面からおおよそ 8 μm ほどまでスミチオンが浸透する。そのため、この報告を基にして本研究では、10 μm 以上 PET フィルムの厚さを数時間スケールで減少させることを目標値として設定した。

本研究の目的

以上のように、酵素による PET 分解反応は実現可能性の高い技術の 1 つであるものの、反応速度の観点では未だに課題が残る。そこで本研究では、酵素活性の向上に向けて、酵素と PET の相互作用に着目し、これを改善する、新たな手法の開発を目的として研究を行った。また、リサイクルにおける回収された PET の洗浄フローに組み込めるように 10 μm を数時間スケールで分解可能な活性を目指す。このとき、低結晶性 PET および高結晶性 PET それぞれで活性を評価する。

本論の 1 章では、界面活性剤改善の添加による PET 表面の親水化手法を開発し、本手法が PETase の活性の改善に寄与するか否かについて検討した。さらにその作用機構について PET 表面への酵素吸着量変化や変異体を構築し、解析した。また、構築した最適条件下で高結晶性 PET への分解を評価した。

本論の 2 章では、さらに実用的な PET 分解反応系の構築に向けて、耐熱性 PET 分解酵素 (*Thermobifida fusca* cutinase (TfCut2)) の活性に関して、

1 章で構築した手法と変異導入を組み合わせることで改善できるかを検討した。さらに、最も高い活性を示す条件で、高結晶性 PET への分解を評価した。

参考文献

- (1) I. Taniguchi, S. Yoshida, K. Hiraga, K. Miyamoto, Y. Kimura, K. Oda, *ACS Catal.* 2019, 9, 4089–4105.
- (2) PlasticsEurope, *Plastics - the Facts 2017: An Analysis of European Plastics Production, Demand and Waste Data*; https://www.plasticseurope.org/application/files/5715/1717/4180/Plastics_the_facts_2017_FINAL_for_website_one_page.pdf, accessed Jan 10, 2020.
- (3) B. Geyer, G. Lorenz, A. Kandelbauer, *eXPRESS Polym. Lett.* 2016, 10, 559–586.
- (4) PlasticsEurope, *World Plastic Production 1950–2015*; <https://committee.iso.org/files/live/sites/tc61/files/The%20Plastic%20Industry%20Berlin%20Aug%202016%20-%20Copy.pdf>, accessed Jan 10, 2020.
- (5) R. Wei, W. Zimmermann, *Microb. Biotechnol.* 2017, 10, 1308–1322.
- (6) A. C. Albertsson, S. Karlsson, *J. Appl. Polym. Sci.* 1988, 35, 1289–1302.
- (7) R.S. Devi, R. Ramya, K. Kannan, A.R. Antony, V.R. Kannan, *Mar. Pollut. Bull.* 2019, 138, 549–560.
- (8) C. N. Muhonja, H. Makonde, G. Magoma, M. Imbuga, *PLoS One* 2018, 13, e0198446.
- (9) A. Lee, M. S. Liew, *J. Mater. Cycles Waste Manage.* 2019, doi:10.1007/s10163-019-00931-4.
- (10) R. Smith, C. Oliver, D. F. Williams, *J. Biomed. Mater. Res.* 1987, 21, 991–1003.
- (11) R. J. Müller, H. Schrader, J. Profe, K. Dresler, W-D. Deckwer, *Macromol. Rapid Commun.* 2005, 26, 1400–1405.
- (12) Å. M. Ronkvist, W. Xie, W. Lu, R. A. Gross, *Macromolecules* 2009, 42, 5128–5138.
- (13) S. Yoshida, K. Hiraga, T. Takehana, I. Taniguchi, H. Yamaji, Y. Maeda, K. Toyohara, K. Miyamoto, Y. Kimura, K. Oda, *Science* 2016, 351, 1196–

1199.

- (14) G. J. Palm, L. Reisky, D. Böttcher, H. Müller, E. A. P. Michels, M. C. Walczak, L. Berndt, M.S. Weiss, U. T. Bornscheuer, G. Weber, *Nat. Commun.* 2019, 10, 1–10.
- (15) X. Han, W. Liu, J. W. Huang, J. Ma, Y. Zheng, T. P. Ko, L. Xu, Y. S. Cheng, C. C. Chen, R. T. Guo, *Nat. Commun.* 2017, 8, 2106.
- (16) S. Joo, I. J. Cho, H. Seo, F. S. Son, H. Y. Sagong, T. J. Shin, S. Y. Choi, S. Y. Lee, K. J. Kim, *Nat. Commun.* 2018, 9, 382.
- (17) B. Liu, L. He, L. Wang, T. Li, C. Li, H. Liu, Y. Luo, R. Bao, *ChemBioChem* 2018, 19, 1–6.
- (18) T. Fecker, P. Galaz-Davison, F. Engelberger, Y. Narui, M. Sotomayor, L. P. Parra, C. A. Ramírez-Sarmiento, *Biophys. J.* 2018, 114, 1302–1312.
- (19) H. P. Austin, M. D. Allen, B. S. Donohoe, N. A. Rorrer, F. L. Kearns, R. L. Silveira, B. C. Pollard, G. Dominick, R. Duman, K. E. Omari, V. Mykhaylyk, A. Wagner, W. E. Michener, A. Amore, M. S. Skaf, M. F. Crowley, A. W. Thorne, C. W. Johnson, H. L. Woodcock, J. E. McGeehan, G. T. Beckham, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2018, 115, 4350–4357.
- (20) H. F. Son, I. J. Cho, S. Joo, H. Seo, H. Y. Sagong, S. Y. Choi, S. Y. Lee, K.-J. Kim, *ACS Catal.* 2019, 9, 3519–3526.
- (21) A. N. Shirke, D. Basore, S. Holton, A. Su, E. Baugh, G. L. Butterfoss, G. Makhatadze, C. Bystroff, R. A. Gross, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2016, 100, 4435–4446.
- (22) E. H. Acero, D. Ribitsch, A. Dellacher, S. Zitzenbacher, A. Marold, G. Steinkellner, K. Gruber, H. Schwab, G. M. Guebitz, *Biotechnol. Bioeng.* 2013, 110, 2581–2590.
- (23) D. Ribitsch, A. O. Yebra, S. Zitzenbacher, J. Wu, S. Nowitsch, G. Steinkellner, K. Greimel, A. Doliska, G. Oberdorfer, C. C. Gruber, K. Gruber, H. Schwab, K. Stana-Kleinschek, E. H. Acero, G. M. Guebitz, *Biomacromolecules* 2013, 14, 1769–1776.
- (24) Y. Zhang, L. Wang, J. Chen, J. Wu, *Carbohydr. Polym.* 2013, 97, 124–129.
- (25) Y. Ma, M. D. Yao, B. Z. Li, M. Z. Ding, B. He, S. Chen, X. Zhou, Y. J. Yuan, *Engineering*, 2018, 4, 888–893.

(26) Palmetrics corporation, Technical note,
http://www.palmetrics.co.jp/userdata/AKTS_SML_02.pdf, 2018.

本論

1 章

界面活性剤を利用した PET 分解酵素の活性改善

1-1. 緒言

PET は、化学的安定性、ガスバリア性が高く安価であることから、最も汎用的に利用されている合成高分子の 1 つである。市場の拡大に伴って PET 製品の生産量は増大していく一方で、使用済み PET の処理方法には、未だ環境負荷の大きなアルカリ処理やグリコリシス反応などが採用されており、問題となっている^{1,2}。これらの手法に代わりうる環境負荷の少ない新たな PET 処理手法として、生体触媒の利用が注目を集めている。中でも特に esterase の一種である cutinase は、図 1-1 に示すように PET 分解反応を触媒し、実現可能性の高い反応系として期待されている³⁻¹¹。実際に、*Thermobifida fusca* cutinase (TfCut2)^{8,9} や Leaf branch compost cutinase (LCC)^{10,11} など、様々な酵素が環境中より同定され、変異導入等による活性の改善が行われてきた。

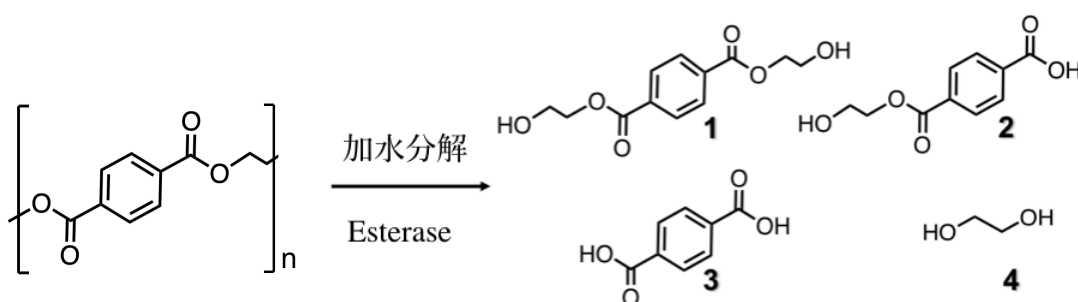


図 1-1. Esterase による PET 分解機構

(1: Bis(2-hydroxyethyl) terephthalate (BHET), 2: MHET, 3: TPA, 4: Ethylene glycol)

当研究室と京都工芸繊維大の共同グループでも、温和な条件下での PET 生分解の達成を目指した研究を行ってきた。2016 年には、PET 資化性菌 *Ideonella sakaiensis* の発見に成功し、さらにそのゲノム解析から、PET 特異的分解酵素(PETase; 図 1-2)を同定している¹²⁻²⁰。本酵素は PET に対して高い特異性を示し、常温で最も高効率に PET を分解できるものの、工業利用に向けて未だその活性は十分ではなく(24 時間あたり重量変化<1%)、活性向上が必要とされている。

本酵素の活性改善に向けて、筆者は、酵素と基質の相互作用に着目した。

疎水的な PET 表面に対して、PETase はその等電点($pI=9.4$)から分かるようにカチオン性を示す(図 1-2a, b)。そのため、相反する性質を持つこれらの間では相互作用が起こりにくく、それが原因となって活性が制限されているのではないかと考えた。したがって、この相互作用を改善することが PETase の活性向上につながると考えられる。

相互作用の改善手法として、一般に変異導入による基質結合部位の疎水化や結合モジュールの付加などが挙げられるが、変異体の構築や構造の最適化、発現精製等に極めて長い時間が必要である上に、大幅な活性の改善に成功した例はない^{21,22,23}。これら手法の特徴は、総じて PET 表面の疎水性を利用した相互作用の改善手法である点である。ここで筆者は、これら手法とは異なり、界面活性剤を用いることで疎水的な PET 表面を親水化することができれば、酵素の改変などの時間のかかるプロセスを必要とせず、簡便に酵素活性を改善することができるのではないかと考えた。このとき、添加された界面活性剤は、その疎水部が PET 表面と相互作用することで、親水部を水溶液側に配向することが予想される(図 1-2c)²⁴。したがって、使用する界面活性剤が PET 表面と相互作用できる疎水部および、PETase と相互作用できる親水部を有した場合、添加した界面活性剤は PETase と PET との相互作用を仲介、促進することができると考えた。

本手法において最も重要な点は、酵素と界面活性剤の間で特異的な相互作用を生み出せるか否かである。そこで筆者は、PETase が持つ特徴的な表面電荷に着目した。PETase は、図 1-2a, b に示されているように、カチオン性の表面を持つ。そのため、もし PET 表面をアニオン化することができれば、静電的相互作用によって PETase を誘引することができると考えた(図 1-2c)。

本研究では、PETase の表面電荷に着目して、アニオン性界面活性剤を利用することで、静電相互作用による PETase の誘引可能性を検討した(図 1-2a-c)。アニオン性界面活性剤として、疎水度の調節が容易であるアルキル鎖を持つ、アニオン性アルキル界面活性剤を選んだ(図 1-3)。またアニオン性アルキル界面活性剤は、安価で数多くの種類を手に入れられるため、構造に多様性を持たせることができる。さらに、分子サイズが小さいため、酵素と PET 表面の相互作用を仲介する際、双方の距離を近く保つことが可能であり、効率的な分解が期待できる(図 1-2c)。

以上より、本研究では基質である PET を事前に図 1-3 に示す界面活性剤とインキュベートしておくことが、PETase の活性にどのような影響を与えるのかを検討した。また、界面活性剤の作用を明らかにするために、水溶性基質への影響や、PET 表面上の PETase 吸着量変化、界面活性剤との相互作用部位の同定に向けて変異導入を行なった。以降、それらの結果について記す。

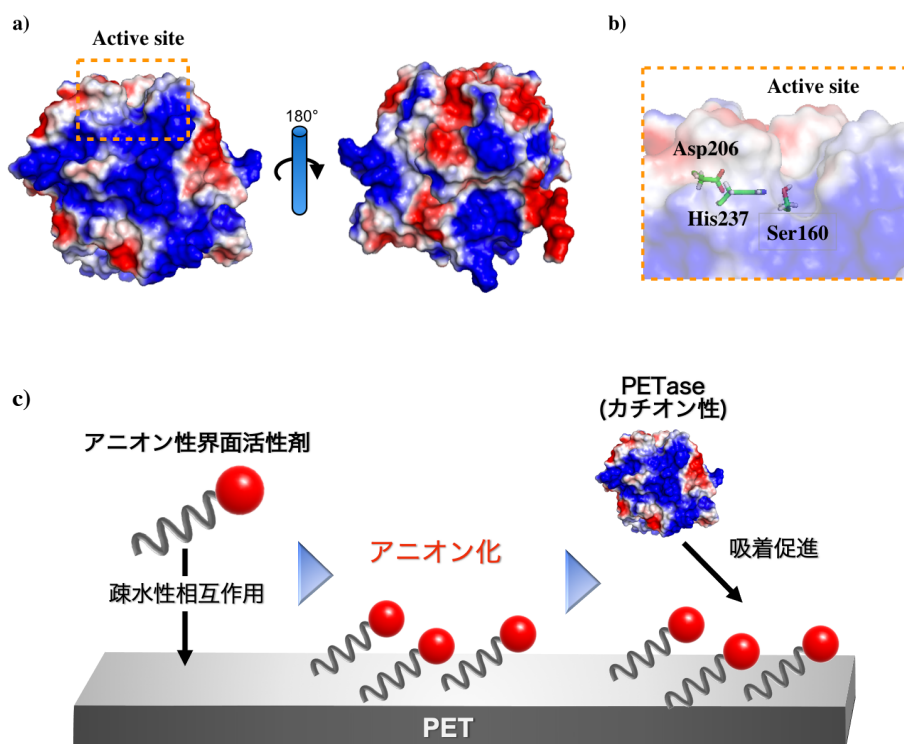


図 1-2. a) PETase の表面電荷分布(PDBID: 6EQE)²⁰
b) 活性部位周辺の電荷分布、スティックモデルは触媒三残基を示す
c) 本研究のコンセプト

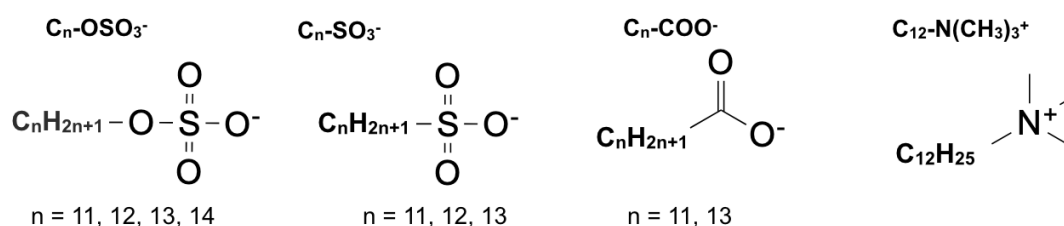


図 1-3. 本章で使用した界面活性剤シリーズ

1-2. 界面活性剤の添加による PETase の PET 分解活性変化

まず、生化学実験で汎用的なアニオン性界面活性剤 sodium dodecyl sulfate (SDS, $C_{12}\text{-OSO}_3^-$)を用いて、PET 分解反応への影響を評価した。基質には、低結晶性 PET シート(結晶化度 3–5 %, 厚さ 200 μm (製造規格), lcPET)を直径 6 mm になるように穴あけパンチで作製した PET フィルムを使用した。PET フィルムを各濃度の $C_{12}\text{-OSO}_3^-$ を含む 50 mM bicine バッファー (pH9.0)に沈め、30°Cで 1 時間プレインキュベートした。その後酵素を添加し、さらに 3 時間インキュベートした。図 1-4a は、添加した $C_{12}\text{-OSO}_3^-$ 濃度ごとの PET 分解活性の変化を示している。このように、 $C_{12}\text{-OSO}_3^-$ とともにインキュベートした PET フィルムで反応を行なった場合、活性は著しく向上した。最適条件である 0.025% $C_{12}\text{-OSO}_3^-$ 存在下での活性は、界面活性剤非存在下では $0.074 \text{ nmol cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$ であることに對して、 $3.2 \text{ nmol cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$ となり、およそ 40 倍向上した。この時、最適界面活性剤濃度は 0.025%と極めて低く、それ以上の濃度では活性は低下した。これはおそらく、PET 表面上に一定数以上の界面活性剤が吸着すると PETase の吸着を阻害するように作用した、もしくは酵素の変性に寄与したことが原因であると考えられる。

また、本反応系で採用した“界面活性剤と PET のプレインキュベート”は、効率的な PET 分解反応の加速に必要不可欠であった (図 1-4b)。界面活性剤と 1 時間プレインキュベートした PET フィルムと、プレインキュベートしなかった PET フィルムに PETase を添加し、反応速度を比較したところ、プレインキュベートをした方で、明らかに反応速度が速いことがわかった(p 値=0.00047, Student's t-test)。これはすなわち、界面活性剤による PET 表面のアニオン化が PETase の活性改善に寄与していることを示し、筆者の仮説を強く支持する結果である。

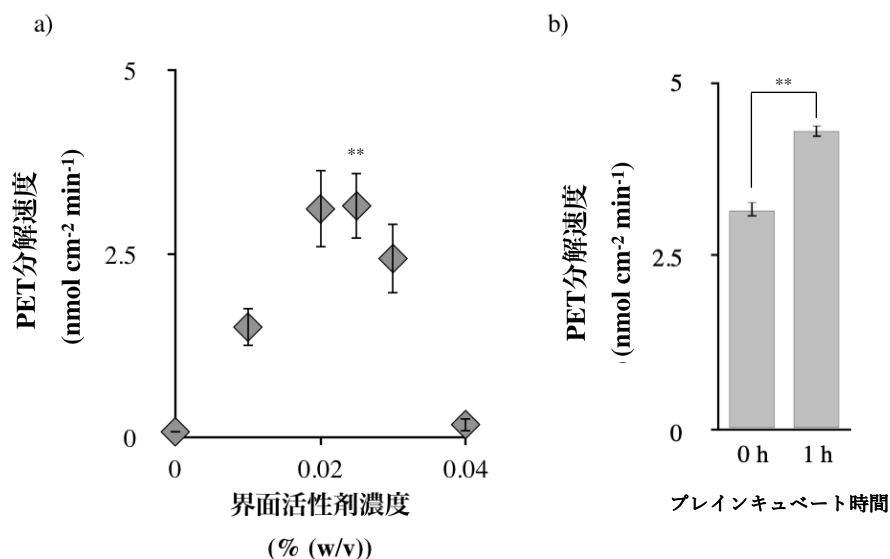


図 1-4. a) 各濃度のアニオン性界面活性剤 ($C_{12}\text{-OSO}_3^-$) 存在下での PETase(500 nM)による PET 分解速度変化(50 mM bicine pH9.0, $1.2 \text{ cm}^2 \text{ mL}^{-1}$ lcPET) (**; vs. ctrl $p < 0.01$, Student's t-test)

b) プレインキュベート時間(0 h もしくは 1 h)の違いが与える PETase(500 nM)による PET 分解速度への影響(50 mM bicine pH9.0, $1.2 \text{ cm}^2 \text{ mL}^{-1}$ lcPET) (**; $p < 0.01$, Student's t-test)

各エラーバーは標準偏差を示す(n=3)。

一方で、反対の電荷であるカチオン性界面活性剤 (dodecyltrimethylammonium chloride ($C_{12}\text{-N}(\text{CH}_3)_3^+$))を添加した条件では、著しく活性低下した(図 1-5a)。また、アニオン性界面活性剤のときと同様に、プレインキュベートの影響を調べたところ、活性はプレインキュベート時間に応じて低下し(図 1-5b, p 値=0.0090, Student's t-test)、添加する界面活性剤の電荷が変わると、全く逆の傾向を示した。

これらの結果から、添加した界面活性剤の電荷に応じて PET 表面が正または負の電荷を帯びた表面へと変化し、カチオン性の PETase と静電的に相互作用していることが示唆される。したがって、アニオン性界面活性剤を添加した場合は、PETase を PET 表面に誘引することで効率的な分解を可能にし、カチオン性界面活性剤を添加した場合は、反対に PETase と反発したことで活性が低下したと考えられる。

以上の結果より、酵素活性の改善には、酵素の表面電荷を考慮した界面活性剤の選択や極めて低濃度での使用が重要であることが明らかになった。これまでも界面活性剤の添加が与える酵素による PET 分解活性への影響は研究されているものの、それらの研究では酵素と界面活性剤の電荷や濃度の検討が行われておらず、また活性の改善も 1.5 倍程度と本件研究と比較するとわずかな改善であった^{25,26}。そのため、本研究は、界面活性剤による PET 分解酵素の活性改善には電荷の検討と低濃度での使用が鍵となることを初めて示した例である。

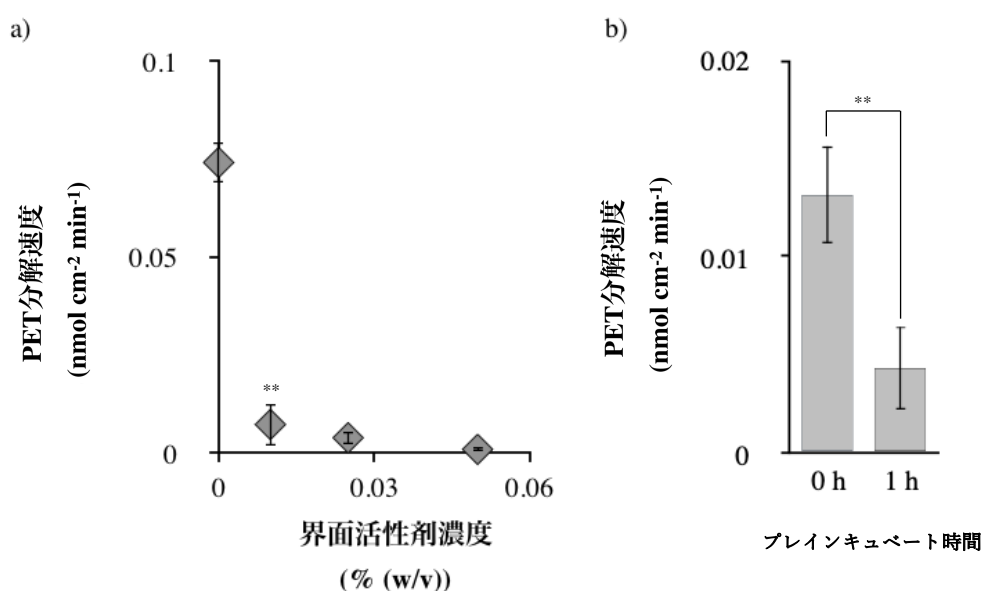


図 1-5. a) 各濃度のカチオン性界面活性剤($C_{12}-N(CH_3)_3^+$)存在下での PETase(500 nM)による PET 分解速度変化(50 mM bicine pH9.0, 1.2 cm² mL⁻¹ lcPET) (**; vs. ctrl $p < 0.01$, Student's t-test)

b) プレインキュベート時間(0 h もしくは 1 h)の違いが与える PETase(500 nM)による PET 分解速度への影響(50 mM bicine pH9.0, 1.2 cm² mL⁻¹ lcPET) (**; $p < 0.01$, Student's t-test)

各エラーバーは標準偏差を示す(n=3)。

次に、界面活性剤による反応加速機構の解明とさらなる活性の向上に向けて、使用した界面活性剤のヘッドグループとアルキル鎖長を最適化した。まず、界面活性剤のヘッドグループについて、硫酸基の他に、スルホ基、カルボキシ基、リン酸基を持つ炭素数 12 の界面活性剤を使用して酵素活性への影響を調べた。このうち、リン酸系界面活性剤は、PETase の精製過程より持ち込まれる 1 mM のカルシウムと塩を形成したため、正確に活性評価はできなかった。それぞれの界面活性剤を添加し活性測定を行ったところ、このような活性向上は $C_{12}-OSO_3^-$ の添加のみで引き起こされる特異的な現象ではなく、他のアニオン性ヘッドグループであるスルホ基、カルボキシ基を持つ界面活性剤でも同様に活性が向上することが確認された(図 1-6)。これは、反応の加速には添加した界面活性剤がアニオン性であることが重要であり、カチオン性の PETase とアニオン性界面活性剤が静電相互作用していることをさらに支持する結果である。また、使用した界面活性剤のヘッドグループによって活性が変化していることもわかった。これは、界面活性剤の pK_a または構造に依存して PETase 表面のカチオン性アミノ酸との相互作用の強さが変化している可能性が考えられる。

以上の結果から、アニオン性界面活性剤のヘッドグループは、酵素表面との静電相互作用に寄与しており、構造または pK_a に依存して酵素の誘引している可能性が強く示唆された。

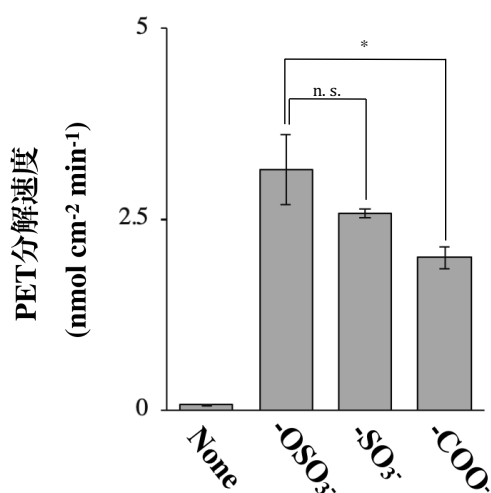


図 1-6. 各アニオン性界面活性剤が与える PETase (500 nM) による PET 分解速度への影響 (炭素数: 12, 50 mM bicine pH9.0, 1.2 cm² mL⁻¹ lcPET) 各エラーバーは標準偏差を示す(n=3)。(*; $p < 0.05$, n.s.; not significant, Student's t-test)

次に、アルキル鎖長の変化による反応系への影響を評価した(図 1-7a-c)。まず、反応条件の検討として、添加する界面活性剤濃度の最適化を行なったところ、興味深いことにアルキル鎖長の増加に伴って最大活性を与える界面活性剤濃度は低下した。硫酸基を持つ界面活性剤を例に挙げると、C₁₁の場合、0.09%が最適濃度であることに對し、C₁₄ではその 1/18 となる、わずかに 0.005%が最適濃度であった。一般にアルキル鎖の増加は、界面活性剤の疎水性の増加に直結する。そのため、界面活性剤の疎水性の増加に伴って PET 表面との疎水性相互作用が促進されたことが、活性を十分に向上させるために必要な界面活性剤濃度の低下につながったのではないかと考えられる。

また、それぞれの最適濃度条件での酵素活性は、アルキル鎖長依存的に向上した。このとき、最大活性は、0.005% Sodium tetradecyl sulfate (C₁₄-OSO₃)存在下の場合、界面活性剤非存在下のおよそ 120 倍となる、9.0 nmol cm⁻² min⁻¹を示した(図 1-8a,b)。この活性は、現在広く研究されている耐熱性酵素である TfCut2 や LCC に匹敵した(表 1-1)。このように、ごくわずかな量の界面活性剤を添加するだけで 100 倍以上の活性改善を達成できたことから、*Ideonella sakaiensis* は PET を効率的に分解するために、類似した機構を有しているのではないかと考えられる。

これまでの結果をまとめると、添加したアニオン性界面活性剤はプレインキュベーションを行うことで疎水性相互作用を介して PET 表面に吸着し、吸着した界面活性剤はそのヘッドグループを介して静電相互作用によって酵素を PET 表面に誘引していると考えられる。

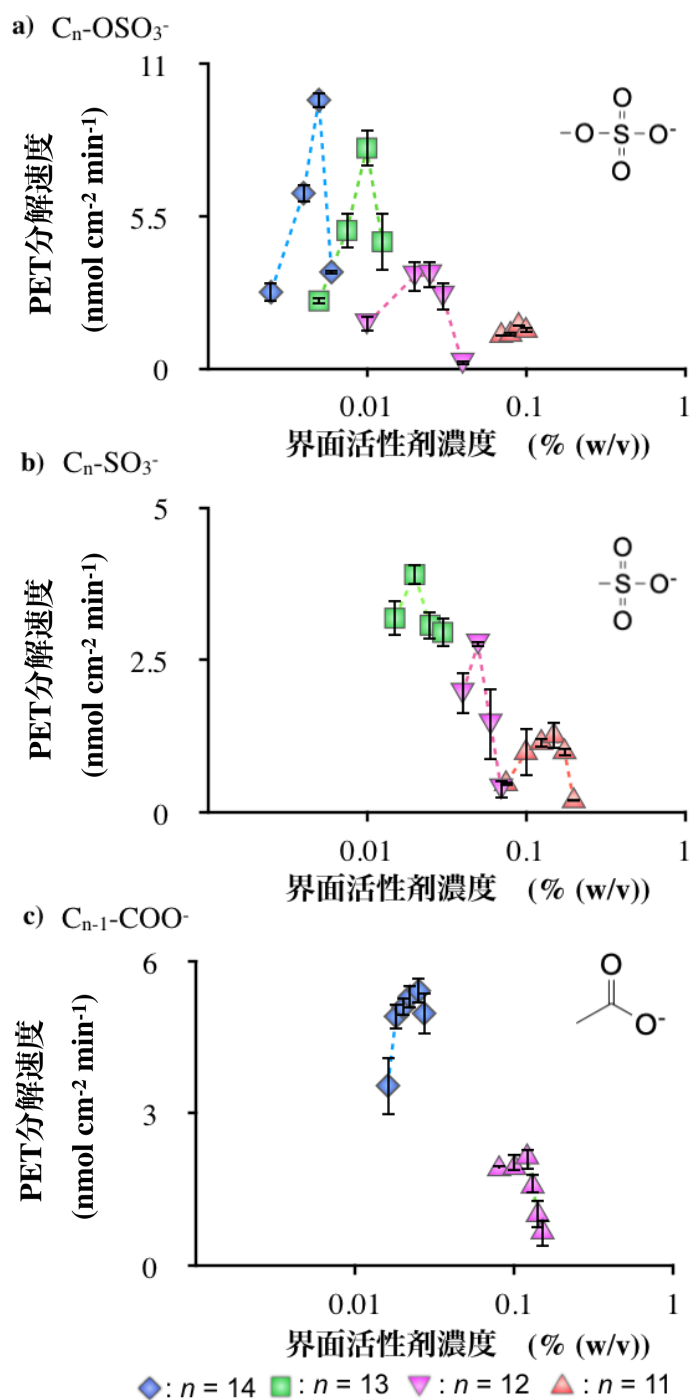


図 1-7. 各濃度のアニオン性界面活性剤存在下での PETase (500 nM) による PET 分解速度変化 (50 mM bicine pH9.0, $1.2 \text{ cm}^2 \text{ mL}^{-1}$ lcPET)

a) 硫酸基, b) スルホ基, c) カルボキシ基

各エラーバーは標準偏差を示す($n=3$)。

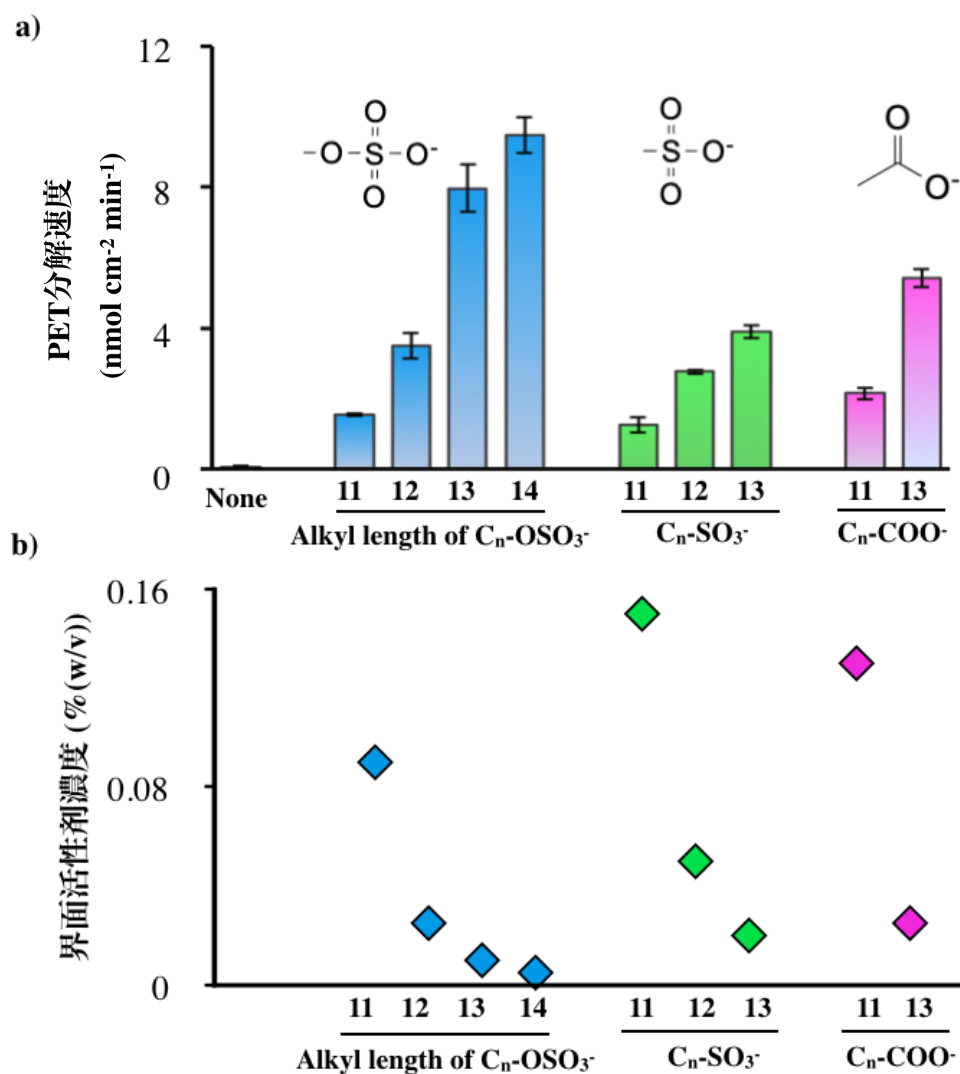


図1-8. a)各アニオン性界面活性剤の最適濃度条件下における PETase (500 nM)の PET 分解速度 (50 mM bicine pH9.0, 1.2 cm² mL⁻¹ lcPET)

b) 最大活性を与えるときの界面活性剤濃度 (blue：硫酸基、green：スルホ基、magenta：カルボキシ基)

各エラーバーは標準偏差を示す(n=3)。

表 1-1. PETase の活性と耐熱性酵素 TfCut2 および LCC の温度別 PET 分解速度 (50 mM bicine pH9.0, 1.2 cm² mL⁻¹ lcPET, 500 nM 酵素) (n=3)。

	反応温度 (°C)	PET 分解速度 ± SD (nmol cm ⁻² min ⁻¹)
PETase	30	0.074 ± 0.01
PETase + C ₁₄ -OSO ₃ ⁻	30	9.0 ± 0.5
TfCut2	30	Not determined.
	40	0.010 ± 2.0×10 ⁻³
	50	0.34 ± 0.01
	60	2.2 ± 0.2
	70	0.40 ± 0.1
LCC	30	0.017 ± 0.01
	40	0.12 ± 0.01
	50	1.1 ± 0.2
	60	15 ± 0.6
	70	51 ± 1

もし、界面活性剤が筆者の仮説通り PET 表面に吸着し、PETase を誘引したことで分解速度を向上させているのであれば、界面活性剤の添加手法は PET 特異的(もしくは疎水性固体基質)に反応を加速させると考えられる。そこでこれを検証するために、水溶性基質でありエステラーゼのモデル基質である *p*-nitrophenyl butyrate (*p*NPB)を用いた加水分解反応が界面活性剤の添加によって加速されるかを検討した (図 1-9)。本反応系は、加水分解によって生成された *p*-nitrophenol を吸光度測定で容易に検出することができる。もし、界面活性剤が酵素に作用することで活性を向上させている場合、*p*NPB 加水分解活性も変化する可能性が高い。しかし結果は、カチオン性界面活性剤を含む、どの界面活性剤を添加した条件であっても、活性はほぼ変化しなかった。そのため、添加した界面活性剤は酵素のコンホメーションに影響を与えていないと考えられる。したがってこの結果は、界面活性剤は PETase の活性を直接向上させているのではなく、PET 表面をコートし、PETase を誘引したことで分解速度を向上させていることを示唆している。

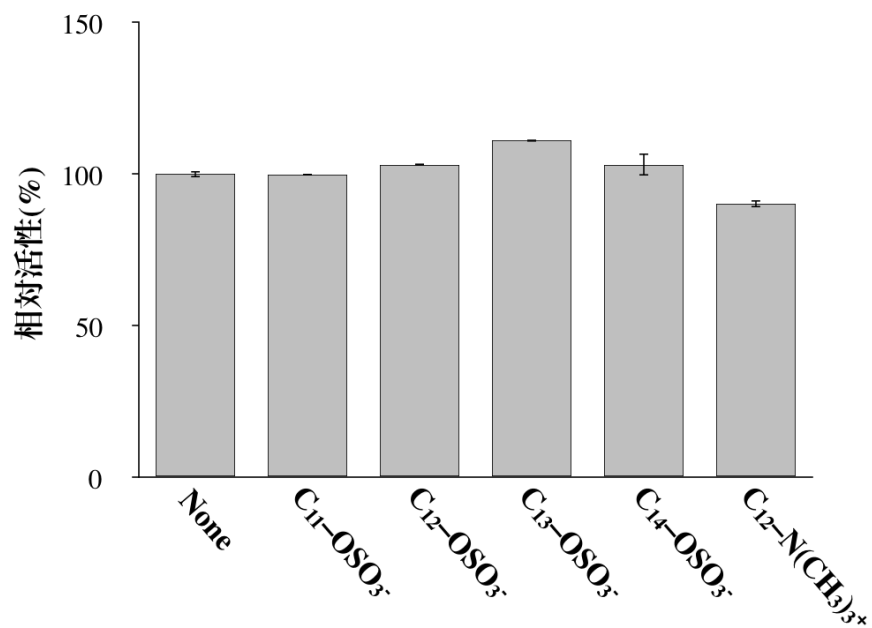


図 1-9. 界面活性剤存在下、非存在下での PETase (500 nM) の *p*NPB 分解活性 (界面活性剤なしを 100%としたときの相対活性)
各エラーバーは標準偏差を示す(n=3)。

1-3. 界面活性剤の添加による PET 表面への酵素吸着量変化

1-2 で得られた実験結果は、一貫して PETase が静電的に PET 表面に誘引されていることを示唆している。そのため、実際に酵素が誘引されている場合、PET 表面への酵素吸着量は増加していると考えられる。そこで次に、酵素吸着量の変化、および酵素活性と酵素吸着量の関係について検討した。

酵素吸着量を測定するために、界面活性剤存在下または非存在下で 1 時間 PET フィルムをプレインキュベートしたのち、酵素を添加し 1 時間 PET 分解反応を行うことで、酵素が吸着した PET フィルムを獲得した。この PET フィルムを、milliQ 水で洗浄したのち、65°C で 1 時間乾燥させた。その後、5% SDS を含む SDS-PAGE サンプルバッファを添加して、吸着した酵素を溶出し、SDS-PAGE を用いて吸着した酵素を分離した。吸着した酵素量は、染色後のバンド強度をもとに相対値として算出した。図 1-10a に示すように、得られたバンド強度は使用した界面活性剤ごとに異なり、界面活性剤の添加が酵素吸着量に影響を与えていることが明らかになった。さらに、硫酸系界面活性剤存在下では、アルキル鎖長依存的に吸着量は向上し、カチオン性界面活性剤存在下では吸着量が低下する、酵素活性と類似した傾向が観察された。そこで、図 1-10b に示すように、これらの相対バンド強度と酵素活性を 1 つのグラフにプロットしたところ、両者に相関関係があった。したがって、アニオン性界面活性剤の添加は酵素吸着量を増加させることで酵素活性を向上させていることが示唆された。

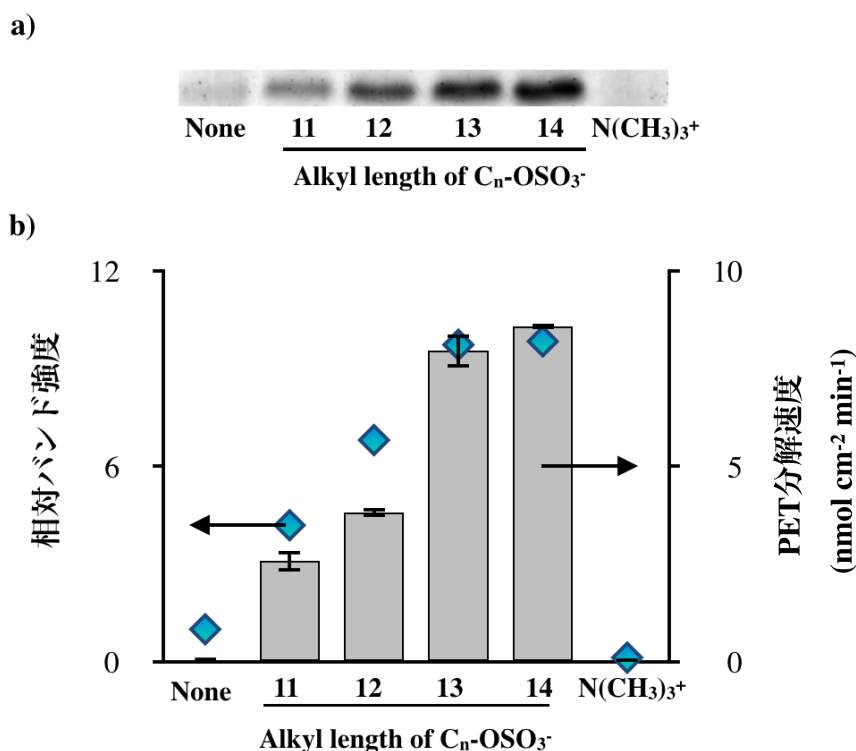


図 1-10. a) SDS-PAGE より得られた、各界面活性剤存在下で PET 表面に吸着した PETase (50 mM bicine pH9.0, $0.6 \text{ cm}^2 \text{ mL}^{-1}$ lcPET)

b) 各界面活性剤存在下での PETase (500 nM)による PET 分解速度と図 1-10a より得られた相対バンド強度 (50 mM bicine pH9.0, $1.2 \text{ cm}^2 \text{ mL}^{-1}$ lcPET)

各エラーバーは標準偏差を示す(n=3)。

酵素活性との関係をさらに詳しく調べるために、最適条件である 0.005% $\text{C}_{14}\text{-OSO}_3^-$ 存在下で、様々な酵素濃度条件(100 nM–1500 nM)における、酵素吸着量および酵素活性の経時変化を定量し、比較した。図 1-11a, b に示しているように、酵素吸着量および酵素活性ともに初期酵素濃度および反応時間依存的に吸着量が増加しており、これらのグラフの形状は類似していた。そこで同一の条件で得られたそれぞれの結果を図 1-11 c にまとめると、これら間には明確な相関関係(相関係数 = 0.90)が存在することが明らかになった。

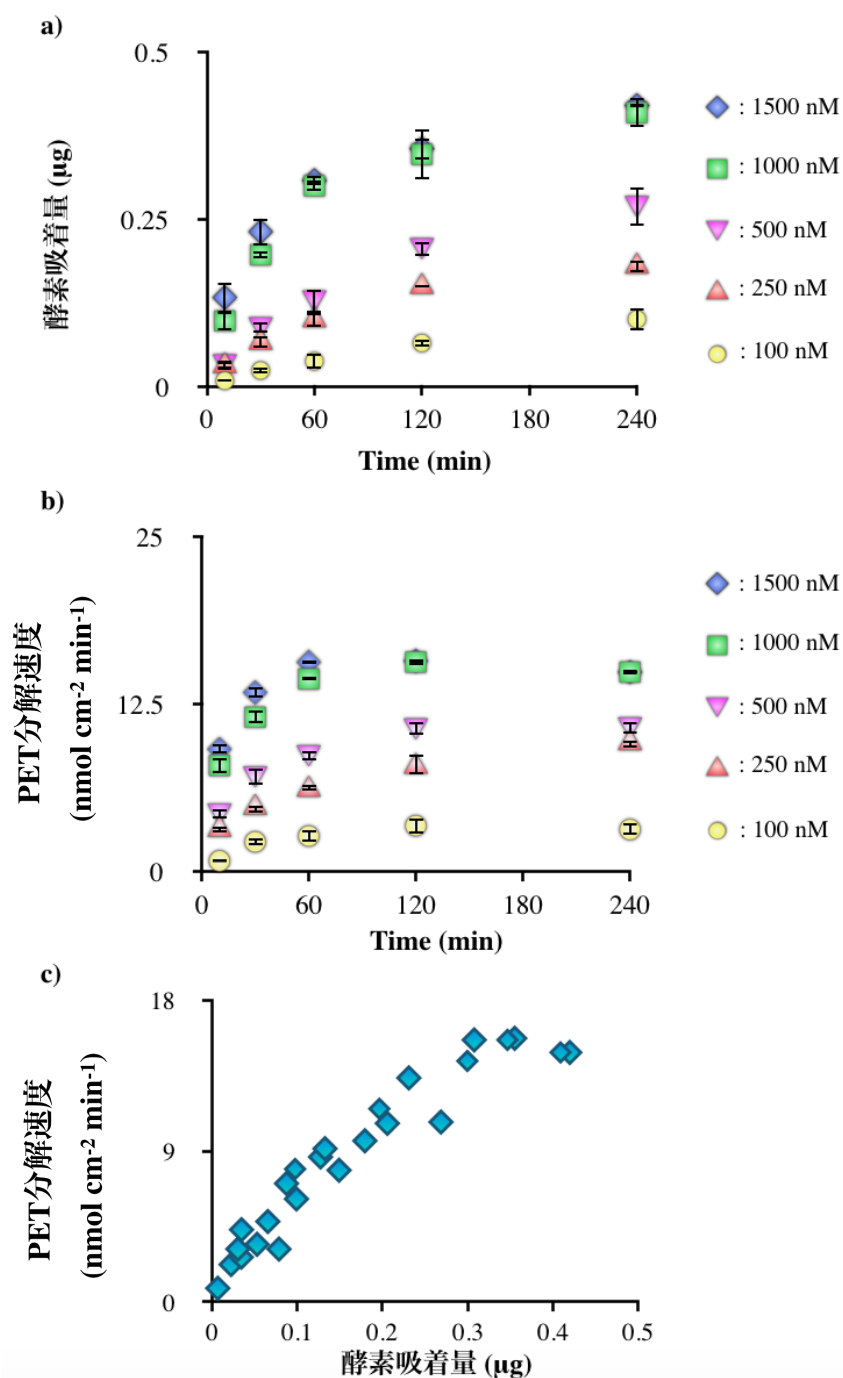


図 1-11. 0.005% C₁₄-OSO₃⁻存在下(50 mM bicine pH9.0, 1.2 cm² mL⁻¹ lcPET)での、各反応時間(10–240 min)および各 PETase 濃度(100–1500 nM)における
a) 酵素吸着量変化, b)PET 分解速度変化, c)PET 分解速度と酵素吸着量の関係 (相関係数 = 0.90)

各エラーバーは標準偏差を示す(n=3)。

図 1-11c に示すように、酵素吸着量が 0.30 μg となるまで酵素吸着量と酵素活性との間には相関関係があるものの、それ以降は酵素活性が飽和したため相関はない。この活性の飽和はおそらく、PET 表面が完全に酵素で被覆され尽くしたことが原因となっていると考えられる。実際に、PETase 表面の面積を基に計算した理論飽和吸着量は(式 1-1, 図 1-12)、0.26 μg となり、実験より得られた 0.30 μg と近い値となった。したがって、酵素吸着量と酵素活性の相関がなくなったのは、PET 表面で、酵素が単層でなく、複層で堆積したことが原因ではないかと考えられる。

PET 表面での理論酵素吸着量: $\text{Ads}_{\text{PETase}}$

$$\text{Ads}_{\text{PETase}} = \text{PET}_{\text{area}} \times E_{\text{MW}} / (N_{\text{A}} \times E_{\text{area}}) \quad \cdot \cdot \cdot \quad \text{式 1-1}$$

PET_{area} , E_{MW} , N_{A} , E_{area} はそれぞれ、PET フィルムの表面積(0.60 cm^2)、PETase の分子量(31.5 kDa)、アボガドロ数($6.0 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$)、PETase の表面積($1.22 \times 10^{-13} \text{ cm}^2$)を示している。PETase の表面積は、図 1-12 より I208 と N73 の α -炭素の距離(40.0 Å)を長軸、N114 と T279 の α -炭素の距離(38.9 Å) を短軸として算出した。

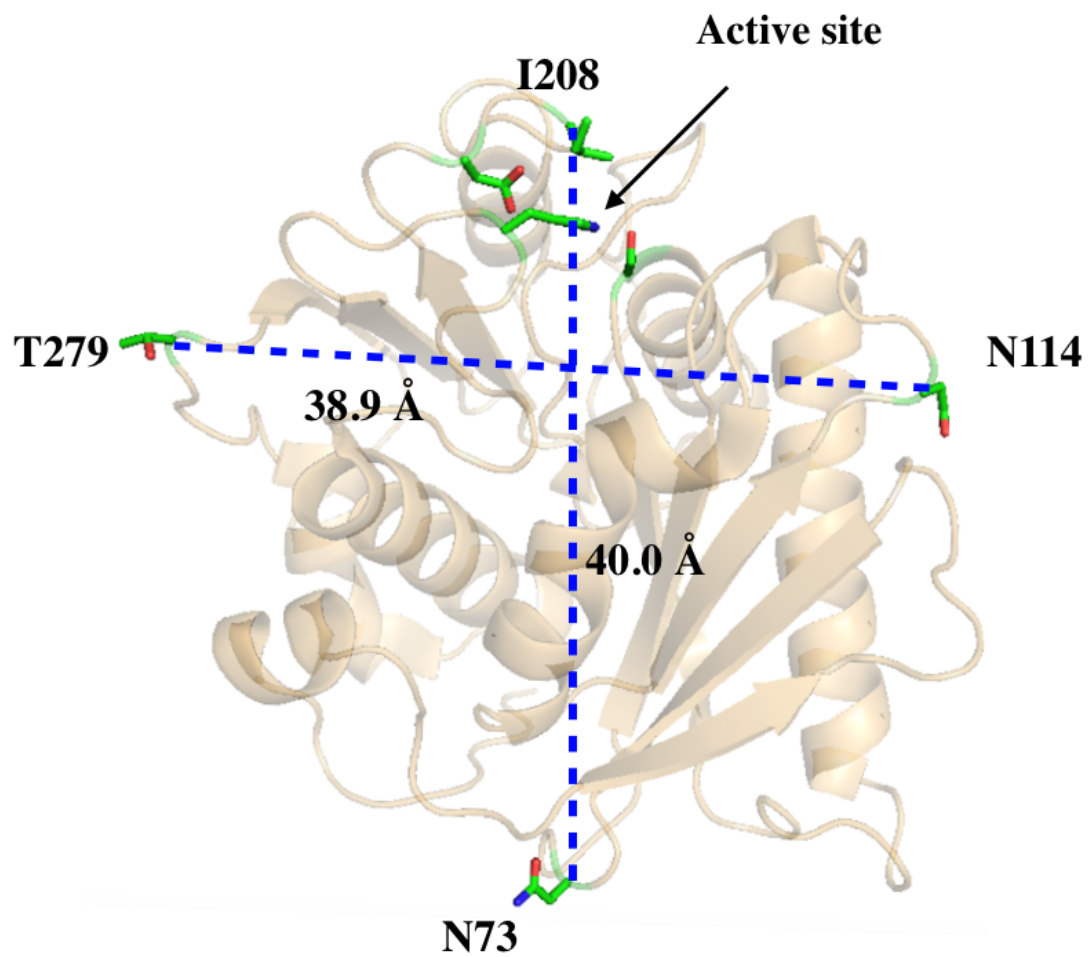


図 1-12. PETase 表面に存在する最も表面積の広い領域 (PDBID: 6EQE)
(図中の距離は、各末端のアミノ酸の α -炭素を基に算出した。)

1-4. 界面活性剤存在下での 36 時間反応

これまでの反応系は 3 時間の短いスケールで行なっていたが、界面活性剤の添加が与える PETase の安定性への影響について調べるために、反応時間を 36 時間まで延長し、PET 分解量の時間変化を調べた。反応は、最大活性を示す 30°C、0.005% C₁₄-OSO₃⁻存在下で行った。その結果、TPA、MHET、BHET の合算で表される PET 分解産物量は、0–6 時間までは安定的に増加し(0.82 μmol cm⁻² h⁻¹)、その後徐々にその速度は低下するものの、6–18 時間の間であっても 0.51 μmol cm⁻² h⁻¹ と、反応初速度の 60%程度の活性を保持していた(図 1-13a)。それ以降の 18–36 時間でも 0.25 μmol cm⁻² h⁻¹ と、活性はさらに低下したものの分解は依然として進行していることから、一般にタンパク質の変性剤として知られるような界面活性剤であっても、0.005%と低濃度であれば強い変性作用は示さないことがわかった。

次に、長時間反応後の PET フィルムの分解率を定量した。分解率は、PET フィルムの重量変化や厚さ変化を調べることで定量できる。しかし、mg 単位のわずかな重量変化の場合、天秤等で正確に計測することは難しいため、本章では厚さ変化によって定量した。PET フィルムの厚さは、反応前および反応 36 時間後の PET フィルムを 5%SDS で洗浄、乾燥させたのち、2 つに破断し、その破断面を倒立顕微鏡で観察することで測定した。破断面を撮影し、撮影した画像のピクセル数とスケールバーをもとに厚さを求めた。その結果、反応開始前が 177 ± 4 μm (n = 8)であることにに対し、反応後は 140 ± 3 μm (22%分解; 図 1-13b , n = 8)であった。この反応速度は、従来の常温では分解が困難とされてきた PET を、常温で極めて効率よく分解できた初めての例である。また、有害分子が浸透するとされる 10 μm(片面)までの分解にはおよそ 12 時間必要であり、さらなる改善が必要である。一方で、界面活性剤非存在下でインキュベートしたフィルムでは、分解量が著しく少ないため、厚さ変化量を測定することができなかった。

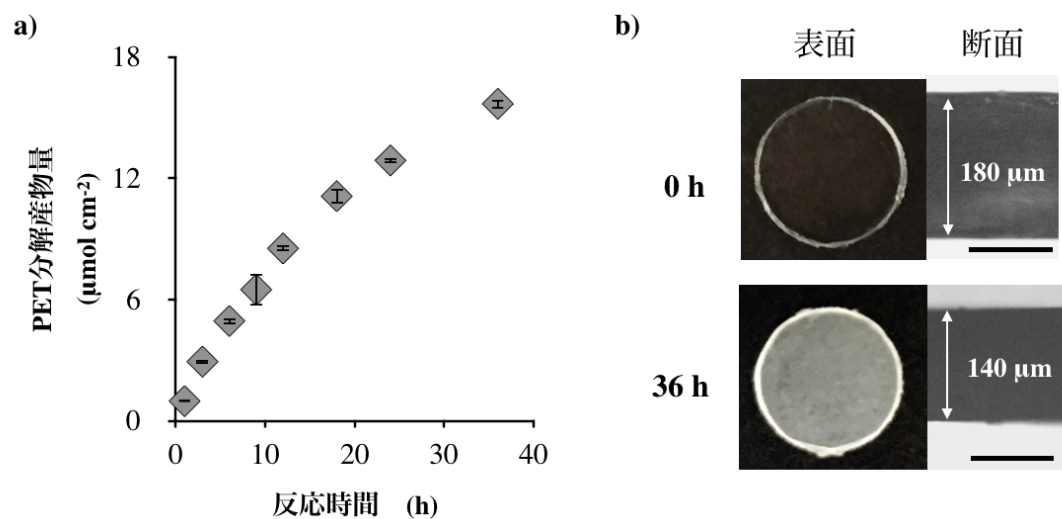


図 1-13.a) 0.005% $\text{C}_{14}\text{-OSO}_3^-$ 存在下、PETase (1000 nM) による長時間反応後の PET 分解産物量変化 (TPA、MHET、BHET の合算) (50 mM bicine pH9.0, $1.2 \text{ cm}^2 \text{ mL}^{-1}$ lcPET)

b) 分解反応後の PET フィルムの変化 (表面:目視による観察、断面:それぞれのフィルムの破断面の顕微鏡像) (スケールバー = 100 μm)
各エラーバーは標準偏差を示す(n=3)。

1-5. アニオン性界面活性剤との相互作用部位の同定

これまでのデータは、カチオン性の PETase が、PET 表面に吸着したアニオン性界面活性剤と静電相互作用していることを明確に示している。そのため、PETase の表面には、アニオン性界面活性剤と相互作用するカチオン性領域が存在すると考えられる。もしこれらの静電相互作用によって反応が加速されているのであれば、表面に存在するカチオン性アミノ酸の変異によって、界面活性剤存在下での酵素活性は著しく阻害されると思われる。そこで、PETase の表面に存在する 4 つのカチオン性アミノ酸(R34, R53, R90, K95)を対象に変異導入を検討した。R53、R90、K95 は、PETase の基質結合部位が存在する面と同じ面に位置しており、これらは大きなカチオン性領域を形成している。一方で R34 は、基質結合部位とは反対の位置に存在している。これらのアミノ酸をアニオン性アミノ酸であるグルタミン酸に替えた変異体(R34E, R53E, R90E, K95E)を作製し、その影響を調べた(図 1-14)。

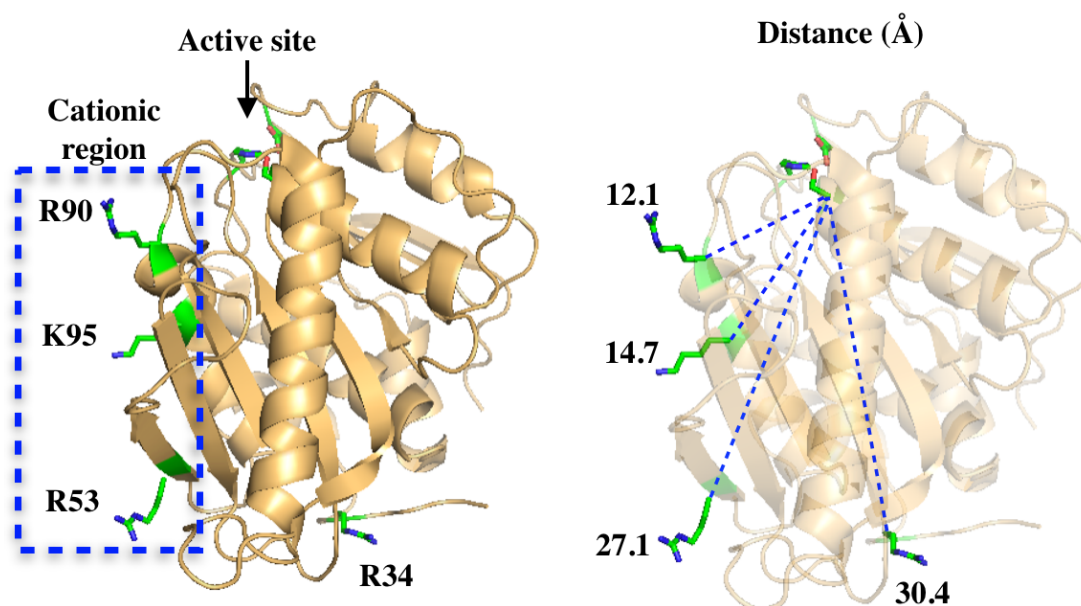


図 1-14. 変異導入箇所と活性部位からの距離(PDBID: 6EQE)
変異導入箇所および触媒三残基をスティックモデルで示す。

作製した変異体の加水分解活性が維持されているか否かは、*p*NPB 加水分解活性をモニターし確認した。その結果、4つの変異体でそれぞれ、加水分解活性には大きな変化はなく、その構造が十分維持されていた(図 1-15a)。しかし、興味深いことに界面活性剤非存在下での PET 分解活性は、一部の変異体において低下していた。低下した変異体は、活性部位近くに変異導入した R90E、K95E 変異体であり、それぞれ野生型の活性の 10%、47%と著しく低下していた(図 1-15b)。一方で活性部位から遠い領域に変異を導入した R34E、R53E 変異体の活性は、それぞれ野生型とほぼ同等の 108%、117%の活性を示した(図 1-15b; 有意差なし、それぞれ p 値 = 0.053, 0.15; t 検定)。R90E および K95E 変異体において、*p*NPB 加水分解活性には変化がなく、PET 分解活性のみ著しく低下したことから、これらのアミノ酸によるカチオン性領域は PET 表面との相互作用に関わっている面が存在している可能性を示唆している。おそらく、この領域はこれら残基の側鎖によって塩基性を示すものの、反応条件が pH9.0 とこれら側鎖の pK_a と近い数値であることから、比較的中性に近い性質を示すことで、疎水的な PET 表面との相互作用に寄与すると考えられる。そして、変異導入によって導入されたグルタミン酸によって負電荷を帯びたことで、PET 表面との相互作用が低下し、活性も低下したのではないかと考えられた。実際に、変異体の反応 pH をより酸性条件に近い 8.0 にした場合、これらの変異体は pH9.0 の条件よりも高い PET 分解活性を示した。そのため、90 番目と 95 番目の残基が PET との相互作用に関わっている可能性が高いと考えられる(図 1-16)。

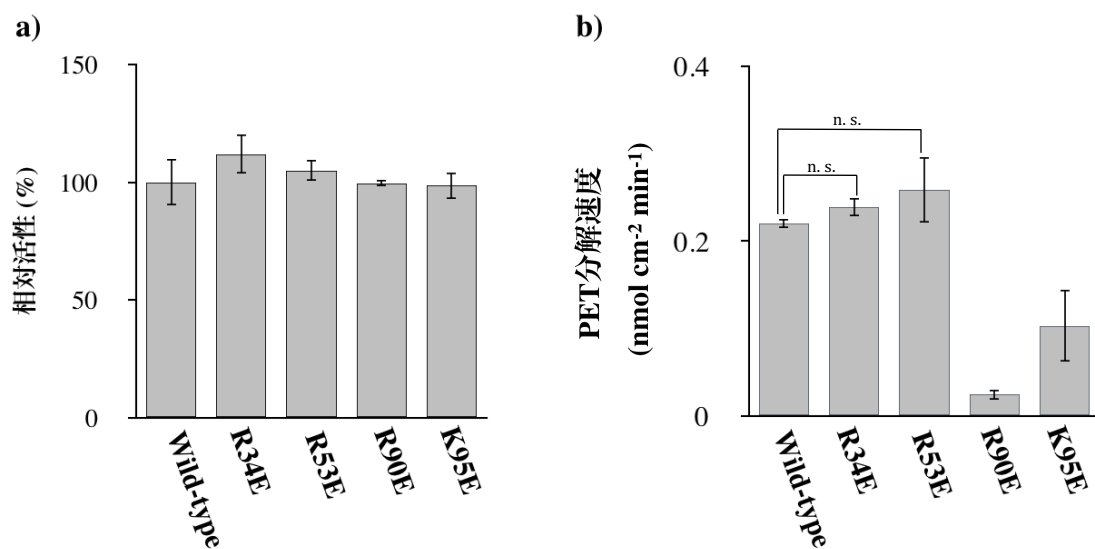


図 1-15. a) 各変異体 PETase(500 nM)の *p*NPB 加水分解活性(wild-type を 100%とした時の相対活性)

b) 界面活性剤非存在下での各変異体 PETase (50 nM)による PET 分解速度 (50 mM bicine pH9.0, 1.2 cm² mL⁻¹ lcPET)

各エラーバーは標準偏差を示す(n=3)。(n.s.; not significant, Student's t-test)

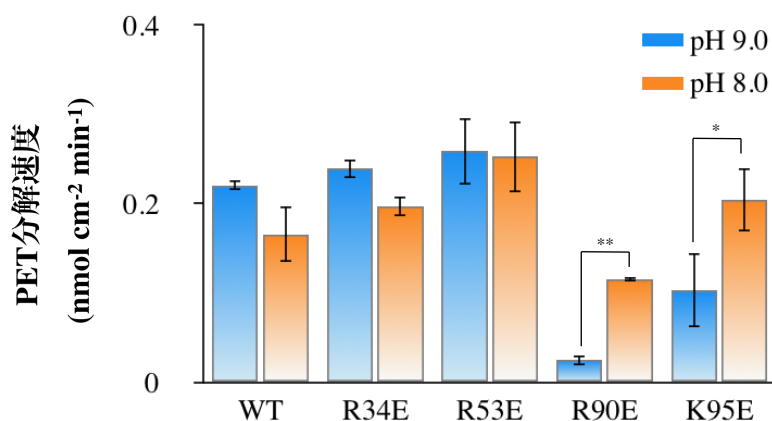


図 1-16. pH9.0 もしくは pH8.0 における、各変異体 PETase の PET 分解活性 (50 nM) (50 mM bicine, 1.2 cm² mL⁻¹ lcPET)

各エラーバーは標準偏差を示す(n=3)。(*; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$, Student's t-test)

次に、これら変異体を用いて、0.005% $C_{14}\text{-OSO}_3^-$ 存在下での PET 分解活性を測定した。その結果、活性部位から最も遠い R34E 変異体が野生型と同等の活性(p 値 = 0.28; Student's t-test)を示したことに對して、R53E、R90E、K95E 変異体では野生型よりも低い活性を示した(図 1-17)。さらに興味深いことに、その活性低下率は、活性部位との距離依存的に変化していることがわかった(図 1-14, 1-17)。これらの結果は、変異導入による電荷の中和が、界面活性剤の添加による反応速度の加速に大きな影響を与えること、そして R53、R90、K95 によって形成されるカチオン性領域がアニオン性界面活性剤と相互作用する領域であることを示唆している。したがって、PET 表面に吸着したアニオン性界面活性剤は、R53、R90、K95 によって形成されるカチオン性領域と相互作用し、PETase の活性部位を基質側に配向させることで反応活性の大幅な向上に寄与しているものと考えられる。このように PET 分解酵素において、PET 表面との相互作用する領域を同定できた例や、活性部位を配向させることに成功した例はなく、界面活性剤でコートされた PET 表面と PETase の間で生じる特異的な静電的相互作用がこれを初めて示すことができた。

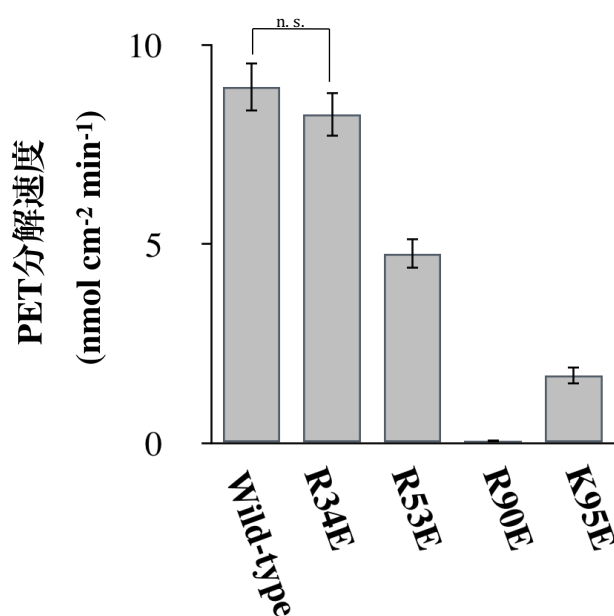


図 1-17. 0.005% $C_{14}\text{-OSO}_3^-$ 存在下での各変異体 PETase(500 nM)による PET 分解速度 (50 mM bicine, $1.2 \text{ cm}^2 \text{ mL}^{-1}$ lcPET)
各エラーバーは標準偏差を示す($n=3$)。 (n.s.; not significant, Student's t-test)

1-6. 活性部位周辺への変異導入による活性向上

以上の結果より、界面活性剤の添加による活性の改善は、PETase と PET 間の相互作用の改善に起因することがわかった。1-3 節より、酵素が PET 表面を十分に被覆したことによる活性の飽和が観測されていることから、さらなる活性向上に向けて、酵素そのものの機能改変が必要であると考えた。そこで、すでに多数報告されている PETase 変異体を構築し、界面活性剤の添加効果を調べることで、変異体にも本手法が適用可能か、およびさらなる活性の改善を検討した。

すでに、活性の改善された変異体 PETase は多数報告されているものの、それらの変異体の活性測定に関して、反応条件や使用した PET の結晶化度、PET の調製方法が一貫しておらず、同一の変異体であっても、傾向が異なる報告例が多い^{16, 17, 18, 20}。そこでまず、活性が改善したとされる変異体を複数作製し、野生型と比較した。作製した変異体は、Y87A、W159H、R280A、二重変異体 W159H/S238F およびその元となった S238F の 5 つである。これらの変異体を反応 pH9.0、低結晶性 PET(lcPET: 結晶化度 3–5%)を用いて反応初速度を測定した。その結果、R280A 変異体でのみ活性は向上し、それ以外の変異体 Y87A、W159H、S238F、W159H/S238F ではそれぞれ、野生型の 13、19、43、12%の活性だった(図 1-18a)。そのため、PET の結晶化度もしくは調製方法が活性に著しく影響を与えている可能性が高いと考えた。そこで次に、高結晶性 PET(hcPET: 結晶化度 40%)を用いて、結晶性の違いが与える活性への影響を調べた。その結果、結晶性の増加によって PET 分解活性は著しく低下するものの、各変異体における活性の傾向は結晶性によらず、一貫していた(図 1-18b)。以上の結果より、PET の調製方法の違いによる、平均分子量や密度の差が活性に影響を及ぼしているのではないかと考えた。

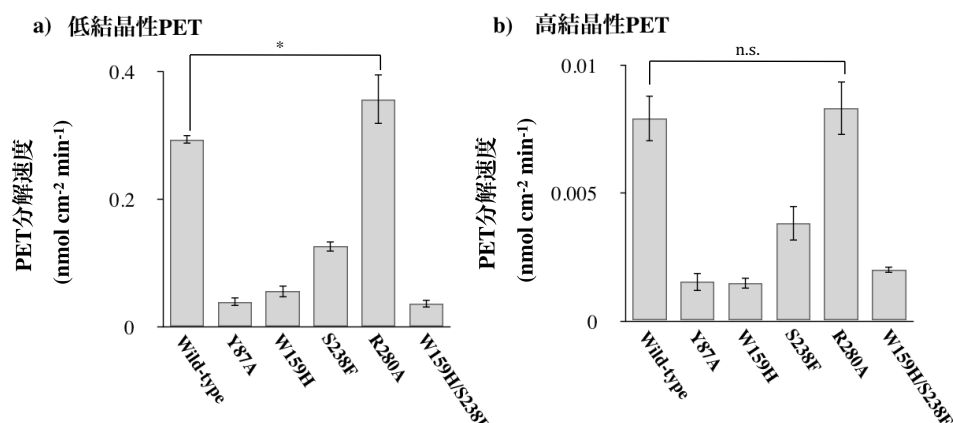


図 1-18. a) 各変異体 PETase (50 nM)の低結晶 PET 分解速度 (50 mM bicine, 1.2 cm² mL⁻¹ lcPET)

b) 各変異体 PETase (50 nM)の高結晶 PET 分解速度(50 mM bicine, 1.2 cm² mL⁻¹ hcPET)

各エラーバーは標準偏差を示す (n=3)。(*; $p < 0.05$, n.s.; not significant, Student's t-test)

また、作製した変異体の活性が、界面活性剤の添加によって向上するか否かについて検討した。最適条件である 0.005% C₁₄-OSO₃⁻存在下 1 時間反応を行い、活性を測定した。その結果、界面活性剤の添加によって全ての変異体の活性は、 36 ± 5 倍程度向上した(図 1-19a,b)。これは、変異導入によって活性部位の構造が変化したとしても、界面活性剤の添加は酵素の吸着を加速するのみで、独立に活性向上に寄与していることを示している。そのため、筆者が確立した手法は、変異導入と組み合わせることが可能であることがわかった。

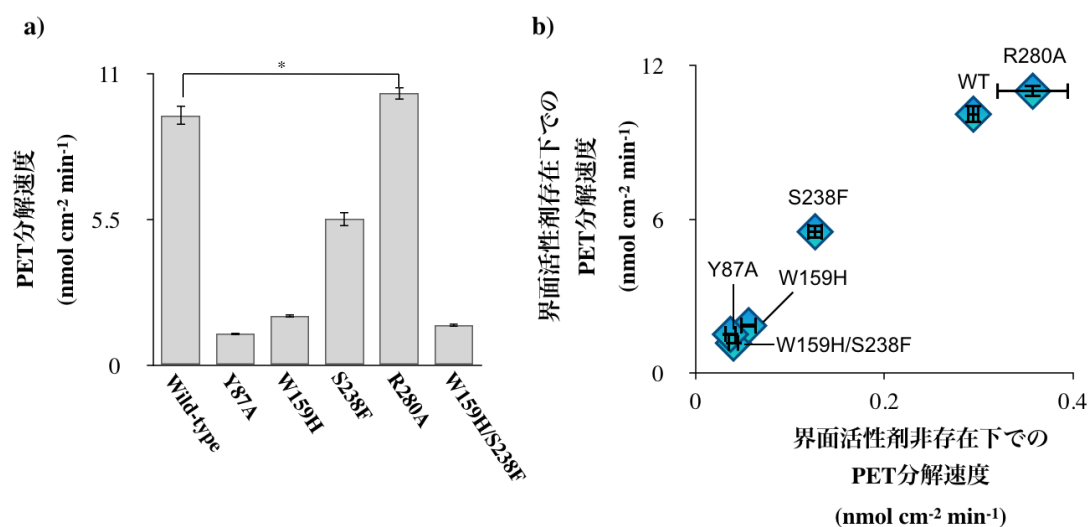


図 1-19. a) 0.005% C₁₄-OSO₃⁻存在下での界面活性剤存在下での各変異体 PETase による PET 分解速度 (50 mM bicine, 1.2 cm² mL⁻¹ lcPET)

c) 各変異体 PETase における界面活性剤存在下および非存在下での PET 分解速度の関係

各エラーバーは標準偏差を示す (n=3)。(*; $p < 0.05$, Student's t-test)

1-7. 結論

本章ではアニオン性界面活性剤と PET フィルムをプレインキュベートすることで PETase の活性を $0.074 \text{ nmol cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$ から $9.0 \text{ nmol cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$ までおよそ 120 倍向上させることに成功した。この分解速度は、従来の耐熱性酵素に匹敵する。活性の改善の鍵となる発見は、極低濃度の長いアルキル鎖(>C11)とアニオン性を持つ界面活性剤が、PET 表面と相互作用したことで PET 表面のアニオン化に寄与し、これによってカチオン性の PETase を効果的に PET 表面へと誘引することが可能となったことである。また、変異導入によって同定された、PETase の表面に存在する 3 つのカチオン性アミノ酸(R53、R90、K95)からなるカチオン性領域がアニオン性界面活性剤と相互作用し、PETase の活性部位を基質側に配向させることで効率的な PET 分解反応を可能にしていることが明らかになった。さらに、本手法は、従来の活性改善手法である、活性部位周辺への変異導入と組み合わせることができ、さらに活性を改善することも可能である。一方で、長期的な PET 分解反応への応用に向けて、PETase の安定性や、改善された活性であっても目標値とした数時間での $10 \text{ }\mu\text{m}$ (フィルム片面あたり)分解には未だ到達していない。そのため、安定性の改善や、変異導入によるさらなる活性の改善が必要であるだろう。

これまでに、界面活性剤の添加による酵素活性の改善はいくつかの酵素で報告されている。例えば、セルロース分解酵素であるセルラーゼは、非イオン性界面活性剤を添加することで、長時間反応における安定性が向上した例などがある^{27,28}。しかし、本研究で示したような疎水性固体基質と酵素との相互作用を、添加物を用いて改善した例はない。そのため、本手法が他の酵素もしくは他の疎水性固体基質分解に有効か否かについても興味深い。

参考文献

- (1) B. Geyer, G. Lorenz, A. Kandelbauer, *eXPRESS Polym. Lett.* 2016, 10, 559–586.
- (2) A. Aguado, L. Martínez, L. Becerra, M. Arieta-araunabeña, S. Arnaiz, A. Asueta, I. Robertson, *J. Mater. Cycles Waste Manage.* 2014, 16, 201–210.
- (3) R. J. Müller, H. Schrader, J. Profe, K. Dresler, W-D. Deckwer, *Macromol. Rapid Commun.* 2005, 26, 1400–1405.
- (4) T. Nimchua, H. Punnapayak, W. Zimmermann, *Biotechnol. J.* 2007, 2, 361–364.
- (5) M. A. M. E. Vertommen, V. A. Nierstrasz, M. V. D. Veer, M. M. C. G. Warmoeskerken, *J. Biotechnol.* 2005, 120, 376–386.
- (6) Å. M. Ronkvist, W. Xie, W. Lu, R. A. Gross, *Macromolecules* 2009, 42, 5128–5138.
- (7) R. Wei, W. Zimmermann, *Microb. Biotechnol.* 2017, 10, 1302–1307.
- (8) S. Chen, L. Su, S. Billig, W. Zimmermann, J. Chen, J. Wu, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 2010, 63, 121–127.
- (9) C. Roth, R. Wie, T. Oeser, J. Then, C. Föllner, W. Zimmermann, N. Sträter, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2014, 98, 7815–7823.
- (10) S. Sulaiman, S. Yamato, E. Kanaya, J. J. Kim, Y. Koga, K. Takano, S. Kanaya, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2012, 78, 1556–1562.
- (11) A. N. Shirke, C. White, J. A. Englaender, A. Zwarycz, G. L. Butterfoss, R. J. Linhardt, R. A. Gross, *Biochemistry* 2018, 57, 1190–1200.
- (12) S. Yoshida, K. Hiraga, T. Takehana, I. Taniguchi, H. Yamaji, Y. Maeda, K. Toyohara, K. Miyamoto, Y. Kimura, K. Oda, *Science* 2016, 351, 1196–1199.
- (13) S. Yoshida, K. Hiraga, T. Takehana, I. Taniguchi, H. Yamaji, Y. Maeda, K. Toyohara, K. Miyamoto, Y. Kimura, K. Oda, *Science* 2016, 353, 759.
- (14) S. Tanasupawat, T. Takehana, S. Yoshida, K. Hiraga, K. Oda, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2016, 66, 2813–2818.
- (15) U.T. Bornscheuer, *Science* 2016, 351, 1155–1156.
- (16) X. Han, W. Liu, J. W. Huang, J. Ma, Y. Zheng, T. P. Ko, L. Xu, Y. S.

- Cheng, C. C. Chen, R. T. Guo, *Nat. Commun.* 2017, 8, 2106.
- (17) S. Joo, I. J. Cho, H. Seo, F. S. Son, H. Y. Sagong, T. J. Shin, S. Y. Choi, S. Y. Lee, K. J. Kim, *Nat. Commun.* 2018, 9, 382.
- (18) B. Liu, L. He, L. Wang, T. Li, C. Li, H. Liu, Y. Luo, R. Bao, *ChemBioChem* 2018, 19, 1–6.
- (19) T. Fecker, P. Galaz-Davison, F. Engelberger, Y. Narui, M. Sotomayor, L. P. Parra, C. A. Ramírez-Sarmiento, *Biophys. J.* 2018, 114, 1302–1312.
- (20) H. P. Austin, M. D. Allen, B. S. Donohoe, N. A. Rorrer, F. L. Kearns, R. L. Silveira, B. C. Pollard, G. Dominick, R. Duman, K. E. Omari, V. Mykhaylyk, A. Wagner, W. E. Michener, A. Amore, M. S. Skaf, M. F. Crowley, A. W. Thorne, C. W. Johnson, H. L. Woodcock, J. E. McGeehan, G. T. Beckham, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2018, 115, 4350–4357.
- (21) D. Ribitsch, A. O. Yebra, S. Zitzenbacher, J. Wu, S. Nowitsch, G. Steinkellner, K. Greimel, A. Doliska, G. Oberdorfer, C. C. Gruber, K. Gruber, H. Schwab, K. Stana-Kleinschek, E. H. Acero, G. M. Guebitz, *Biomacromolecules* 2013, 14, 1769–1776.
- (22) Y. Zhang, L. Wang, J. Chen, J. Wu, *Carbohydr. Polym.* 2013, 97, 124–129.
- (23) Y. Ma, M. D. Yao, B. Z. Li, M. Z. Ding, B. He, S. Chen, X. Zhou, Y. J. Yuan, *Engineering*, 2018, 4, 888–893.
- (24) R. N. Ward, D. C. Duffy, P. B. Davies, *J. Phys. Chem.* 1994, 98, 8536–8542.
- (25) A. Gao, H. Shen, H. Zhang, G. Feng, K. Xie, *J. Cleaner Prod.* 2017, 164, 277–287.
- (26) S. H. Lee, W. S. Song, *Fibers Polym.* 2010, 11, 54–59.
- (27) T. Eriksson, J. Börjesson, F. Tjerneld, *Enzyme Microb. Technol.* 2002, 31, 353–364.
- (28) S. Bhagia, R. Dhir, R. Kumar, C. E. Wyman, *Sci. Rep.* 2018, 8, 1350.

本論

2 章

界面活性剤の添加と変異導入による
耐熱性 PET 分解酵素の活性改善

2-1. 緒言

第 1 章では、アニオン性界面活性剤の添加によって疎水的な PET とカチオン性の PETase との相互作用が改善され、酵素活性が大幅に向上することを発見した¹。これによって改善された PET 分解速度は、24 時間あたりの厚さ減少率にして 18%に達した。しかし改善された分解速度であっても、従来の耐熱性 PET 分解酵素、例えば変異体 TfCut2(G62A)、HiC、LCC などには未だ及ばない(表 2-1)^{2,3,4}。

表 2-1. 各 PET 分解酵素による 24 時間あたりの PET 分解率^{3,5,6}

	分解率(%/24 h)
PETase + C ₁₄ -OSO ₃ ⁻	18
Mutant TfCut2 (G62A)	20
HiC	24
LCC	48

さらに、PETase の問題点は酵素活性だけでなく、その低い安定性(T_m = 46.8°C)⁷にもある。上記の耐熱性酵素は、48 時間以上インキュベート後であっても安定的に反応が進行する一方で、PETase の活性は 36 時間のインキュベートによってほぼ完全に失活した。そのため、PETase の工業への応用に向けて、さらなる活性の改善に加えて、安定性の改善が必須である。しかし一方で、もし上記の耐熱性酵素に対して界面活性剤の添加手法を応用することができれば、速く安定な PET 分解反応が実現できると考えた。

そこで、第 2 章では、第 1 章で開発した界面活性剤の添加手法を耐熱性酵素へ応用することを検討する。応用する酵素として、PETase と最も相同性の高く (51% (アミノ酸配列の相同性))、そして一般的な大腸菌発現系を用いて容易に大量発現および精製可能である TfCut2 を選択した⁸。

TfCut2 は PETase (pI = 9.4)とは異なり、表面が負に帯電している酵素(pI = 6.1)である(図 2-1)。そこで、本研究では、カチオン性界面活性剤を添加物として選択し、TfCut2 の活性が向上するかを検討した。また、活性部位周辺への変異導入を組み合わせることでさらなる活性向上を検討した。

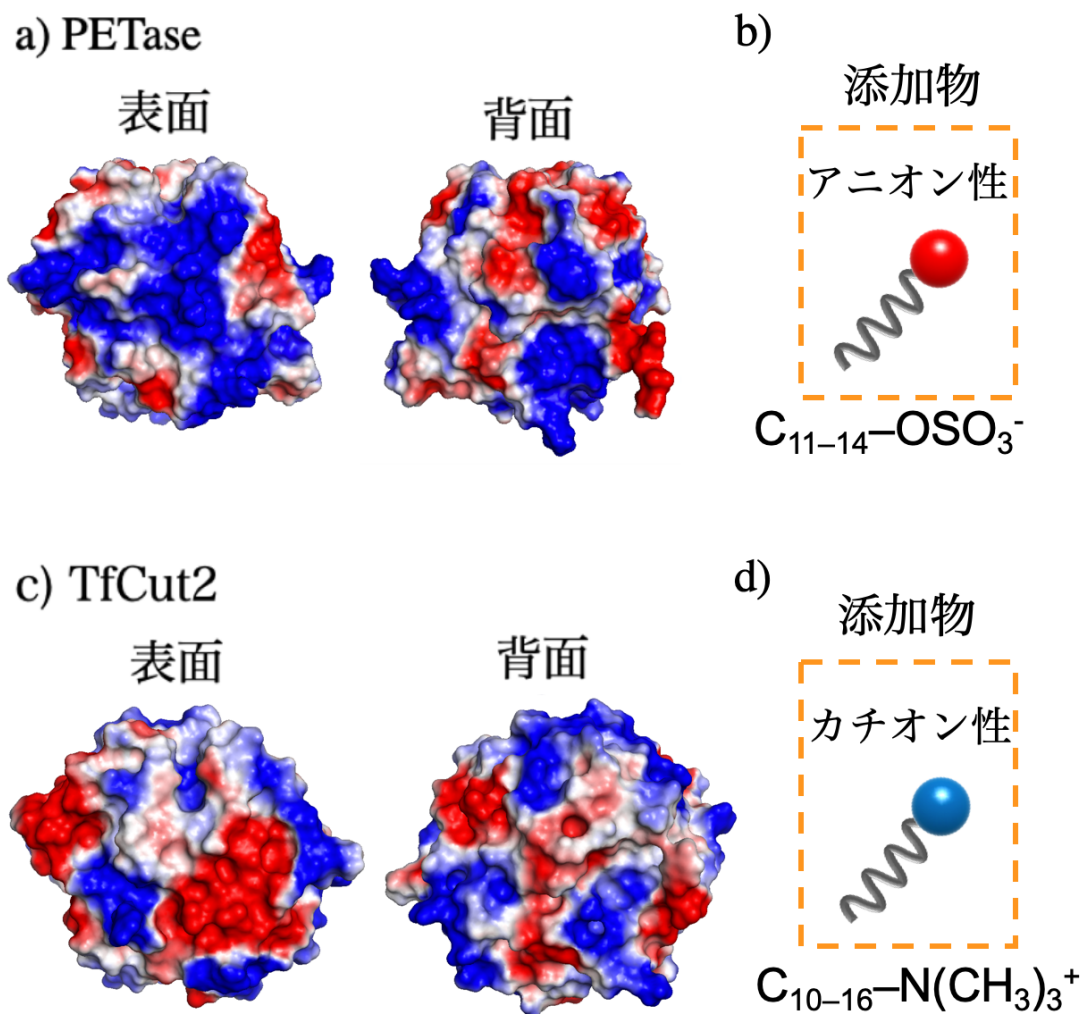


図 2-1. a) PETase (6EQE)⁹ の電荷分布
 b) PETase の活性を向上させる界面活性剤
 c) TfCut2(4CG1)⁸ の電荷分布
 d) 本章で使用する界面活性剤

2-2. 界面活性剤存在下での TfCut2 の PET 分解活性

まず初めに、TfCut2 の活性がカチオン性界面活性剤(dodecyl trimethyl ammonium ($C_{12}\text{-N}(\text{CH}_3)_3^+$))の添加によって変化するかを検討した。 $C_{12}\text{-N}(\text{CH}_3)_3^+$ 存在下、非存在下で1時間、 40°C でPETフィルムをインキュベートしたのち、TfCut2 (終濃度 $1\ \mu\text{M}$)を添加し、反応開始より3時間の活性を測定した。ここでの界面活性剤濃度には、第1章でアルキル鎖12の界面活性剤において最適化された濃度(0.025%)を採用した¹。その結果、 $C_{12}\text{-N}(\text{CH}_3)_3^+$ の添加によって活性は13倍向上し、界面活性剤の添加手法がPETaseとは反対の電荷を持つTfCut2に対しても有用であることが示唆された(図2-2)。また、同時にアニオン性界面活性剤である $C_{12}\text{-OSO}_3^-$ を添加した時の活性も測定したところ、こちらの条件でも活性は向上した。PETaseの場合、PETaseと同じ電荷の界面活性剤の添加は反応活性の著しい低下につながったものの、アニオン性を示すTfCut2の活性は $C_{12}\text{-OSO}_3^-$ の添加によって4.3倍向上した。これは、TfCut2の表面に部分的に存在するカチオン性領域が、アニオン性界面活性剤と相互作用したためであると考えられる。

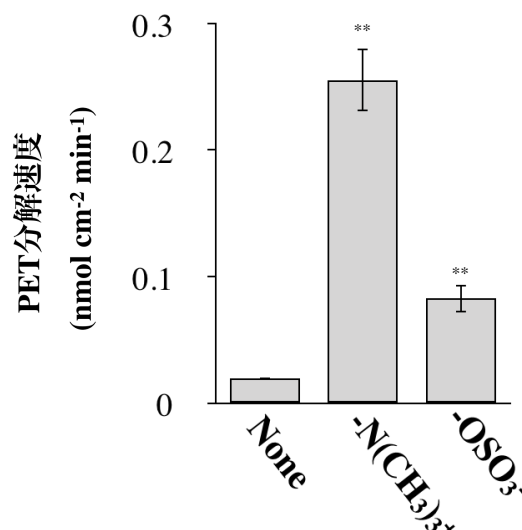


図 2-2. $C_{12}\text{-N}(\text{CH}_3)_3^+$ 、 $C_{12}\text{-OSO}_3^-$ の存在下(0.025%)、非存在下での TfCut2 ($1\ \mu\text{M}$)による PET 分解速度 (50 mM bicine, 10 mM CaCl_2 , $1.2\ \text{cm}^2\ \text{mL}^{-1}$ lcPET, 40°C)

各エラーバーは標準偏差を示す($n=3$)。(**; vs. ctrl $p < 0.01$, Student's t-test)

以上の結果から、カチオン性界面活性剤が、TfCut2 の活性を特に効果的に加速することが明らかになった。そこで次に、TfCut2 がより高活性を示す高温条件にて、界面活性剤を最適化した(図 2-3)。それぞれの温度において、アルキル鎖長(C₁₀-C₁₆)ごとに最大の活性を与える界面活性剤濃度を検討した。図 2-3 に示す通り、第 1 章で見られた傾向と同様に、最適界面活性剤濃度はアルキル鎖の伸展に伴って常に減少した。さらに興味深いことに、温度の上昇に伴って最適界面活性剤濃度も低下していくことが明らかになった(表 2-2)。一般に、界面活性剤は温度が上がるほど親油性が増加する。そのため、界面活性剤と PET 表面との間の疎水性相互作用が温度の上昇で促進されたことによって、PET 表面のコートに必要な界面活性剤濃度が低下した可能性が高い。一方で第 1 章とは異なり、40–65°Cにおいて、酵素活性のアルキル鎖長依存性は観測されなかった。使用した酵素、界面活性剤の電荷、反応温度などが第 1 章とは異なるため、一貫した議論は困難であるが、本条件ではアルキル鎖長に関係なく全ての界面活性剤で酵素を効率的に誘引できることが示唆された。しかし、70°Cにおいてはアルキル鎖長の長い界面活性剤において活性が低下する傾向が見られていた。これは、特に高温条件下であることから酵素の変性に寄与していると考えられる。

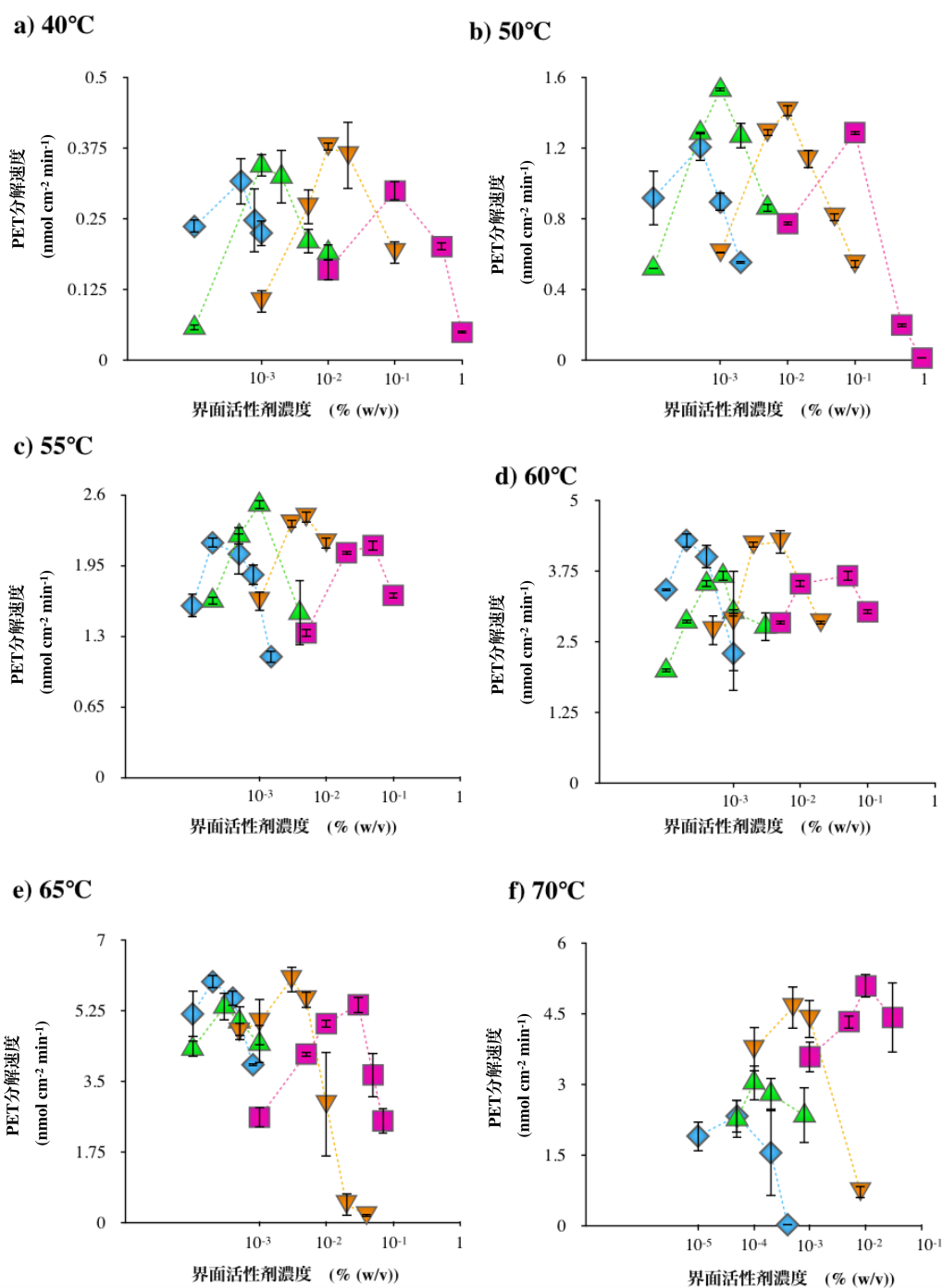


図 2-3. C₁₀–C₁₆-N(CH₃)₃⁺存在下での TfCut2 (1 μM)による PET 分解速度(50 mM bicine, 10 mM CaCl₂, 1.2 cm² mL⁻¹ lcPET) (C₁₀: magenta, C₁₂: orange, C₁₄: green, C₁₆: blue)

a) 40°C, b) 50°C, c) 55°C, d) 60°C, e) 65°C, f) 70°C

各エラーバーは標準偏差を示す(n=3)。

表 2-2. 各温度における最適カチオン性界面活性剤濃度

	C10 (%)	C12 (%)	C14 (%)	C16 (%)
70°C	0.01	0.0005	0.0001	0.00005
65°C	0.03	0.003	0.0003	0.0002
60°C	0.05	0.005	0.0007	0.0002
55°C	0.05	0.005	0.001	0.0002
50°C	0.1	0.01	0.001	0.0005
40°C	0.1	0.01	0.001	0.0005

図 2-3 で得られた結果のうち、それぞれの温度における界面活性剤存在下での最大活性および界面活性剤非存在下での PET 分解活性を図 2-4a に示した。これより、全ての温度で界面活性剤の添加が活性を向上させていることがわかる。また、反応温度 65°C、0.003% C₁₂-N(CH₃)₃⁺存在下のときに最大活性(6.0 nmol cm⁻² min⁻¹)を示した。これは、同温度での界面活性剤非存在下(2.5 nmol cm⁻² min⁻¹)の条件よりも 2.4 倍高かった。また、最大活性ではないものの、65°Cにおいて、C₁₆-N(CH₃)₃⁺はわずか 0.0002%で酵素活性を大幅に向上させることが可能で第 1 章で使用した 0.005%の濃度のさらに 1/25 と、極めて効率的に反応を加速させられることがわかった。一方で、界面活性剤の添加によって水溶性基質である *p*NPB の加水分解活性は向上しなかったことから(図 2-4b)、界面活性剤の添加による活性向上は、PET と TfCut2 との相互作用の促進に起因している可能性が高い。

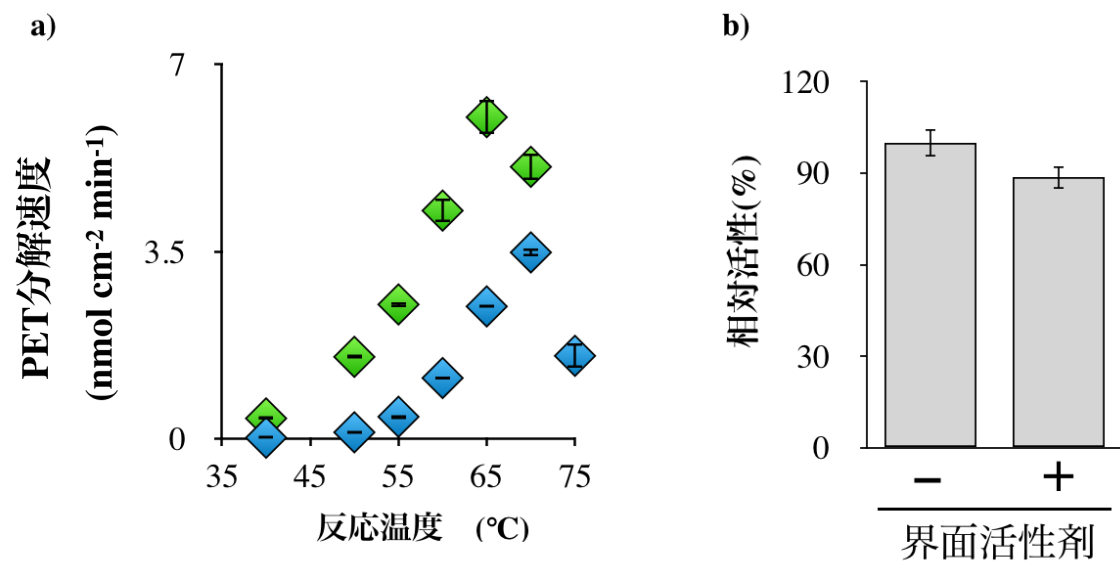


図 2-4. a) 40–70°Cにおける TfCut2 (1 μ M)による PET 分解速度(50 mM bicine, 10 mM CaCl₂, 1.2 cm² mL⁻¹ lcPET) (blue:界面活性剤非存在下、green：界面活性剤存在下)

b) C₁₂-N(CH₃)₃⁺存在下、非存在下での *p*NPB 加水分解活性 (5 nM TfCut2) 各エラーバーは標準偏差を示している(n=3)。

2-3. 界面活性剤存在下での PET 表面への TfCut2 吸着量

これまでの結果より、界面活性剤の添加による活性向上は、PET 表面と TfCut2 の吸着を促進した結果である可能性が高い。そこで次に、PET 表面への酵素吸着量が界面活性剤存在下、非存在下で変化するかを検討した。また同時に、反応温度の違いが酵素の吸着に与える影響も検討した。界面活性剤存在下でも TfCut2 が安定であると考えられる 40–65°Cにおいて、界面活性剤存在下または非存在下で 1 時間 PET フィルムをインキュベートしたのち、TfCut2 を添加し 3 時間反応を行なった。反応終了後の PET フィルムから、吸着した TfCut2 を溶出し、SDS-PAGE を用いて吸着した TfCut2 量を調べた¹⁾。それぞれの条件での界面活性剤濃度は、図 2-3 に示す最大活性を与える濃度を用いた。その結果、全ての温度において界面活性剤の添加が TfCut2 吸着量の増加に寄与した(図 2-5)。さらに、界面活性剤存在下、非存在下問わず、温度の上昇に伴って TfCut2 吸着量が増加した。この結果は、TfCut2 と PET 表面との間で起こる疎水性相互作用が反応温度の上昇によって促進されている可能性を示している。以上の結果を踏まえると、カチオン性界面活性剤の添加による PET 表面のカチオン化が、アニオン性の TfCut2 を誘引することで PET 表面付近の局所的酵素濃度を向上させ、その後の PET と TfCut2 の疎水性相互作用を効率化させているのではないかと考えられる。

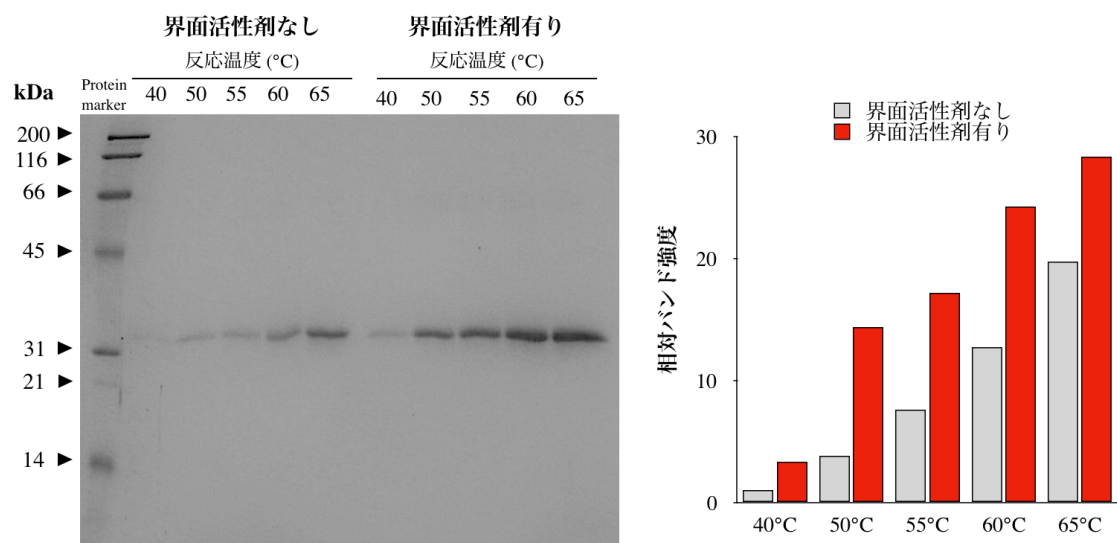


図 2-5. 各温度において最適化された界面活性剤存在下、または非存在下での TfCut2 吸着量(1 μ M TfCut2, 50 mM bicine, 10 mM CaCl_2 , 1.2 $\text{cm}^2 \text{mL}^{-1}$ lcPET) および、ImageJ による相対吸着量解析

2-4. TfCut2 による 48 時間反応

耐熱性酵素である TfCut2 は、高温条件下においても 24 時間以上安定的に PET 分解反応を行うこと報告されている⁵。そこで、最適条件下において、界面活性剤が TfCut2 の安定性に影響を与えるかを検討した。この反応において、PET 分解で生成される多量の TPA や MHET による反応溶液の酸性化を防ぐために Bicine バッファの濃度を 50 mM から 150 mM に変更した。界面活性剤存在下、非存在下で 1 時間のプレインキュベート後、酵素を添加し、反応を行なった。その結果、界面活性剤非存在下の場合、24 時間では重量減少率は 7.5%、界面活性剤存在下の場合では 15%に達した(図 2-6)。また、界面活性剤存在下における分解量は PETase+ 界面活性剤系(18% / 24 時間)と同程度であったものの、活性の低下を伴うことなく 48 時間まで安定的に反応が進行したことから PETase の系で問題となった界面活性剤の安定性への影響は、耐熱性酵素を利用することでクリアできたと考えられる¹。

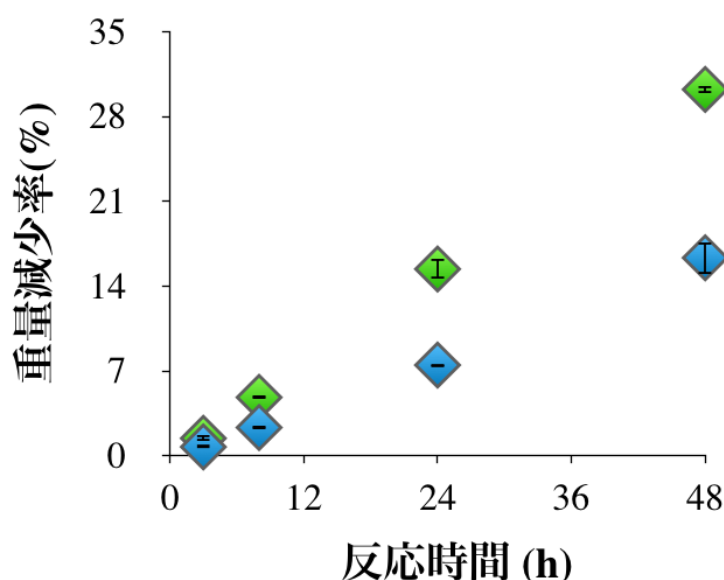


図 2-6. 反応温度 65°C、0.003% C₁₂-N(CH₃)₃⁺存在下(Green)または非存在下(Blue)での TfCut2 (1 μM)による 48 時間反応 (150 mM bicine, 10 mM CaCl₂, 1.2 cm² mL⁻¹ lcPET)
各エラーバーは標準偏差を示す(n=3)。

2-5. 変異導入による TfCut2 の活性改善

第1章で、界面活性剤による活性向上は、変異体酵素に対しても適用可能であることを示した。そこで、TfCut2 の活性のさらなる向上に向けて、活性部位周辺への変異導入を検討した。変異導入箇所は、PETase と TfCut2 の活性部位周辺のアミノ酸配列の比較より決定した。これより、PETase と TfCut2 の活性部位周辺を構成するアミノ酸には保存されていないアミノ酸が3つ(G62(A89)、H129(W159)、F209(S238): 括弧内は PETase のアミノ酸番号)存在することが明らかになった(図 2-7)⁹。PETase は、常温での反応であるにもかかわらず、界面活性剤存在下でのその反応初速度($9.0 \text{ nmol cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$) は、改善された TfCut2 の活性($6.0 \text{ nmol cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$)よりも高い。そのため、上記の3つのアミノ酸を導入することで、TfCut2 の活性をさらに向上できると考えた。また、G62A の変異に関しては、すでに Wei らが LCC との構造比較より見出し、TfCut2 の活性向上に寄与することを報告している⁵。以上より、TfCut2 のこれらのアミノ酸をアラニン、もしくは PETase と同一のアミノ酸に置換することが活性向上に寄与する可能性について検討することにした。

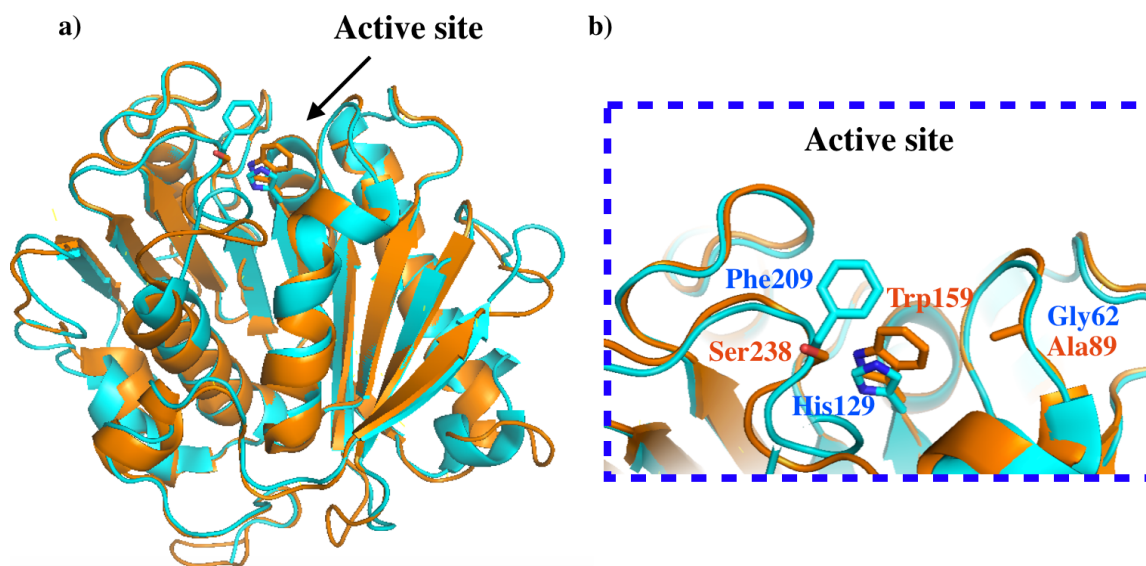


図 2-7. a) PETase (orange)⁹ と TfCut2(cyan)⁸ の構造の pymol 上での重ね合わせ

b) 活性部位周辺の非保存のアミノ酸 (スティックモデルで表示)

まず、G62A、H129W、H129A、F209S、F209A 変異体を作製し、65°C、界面活性剤非存在下で活性を測定した。その結果、H129A 変異体を除く、4 つの変異体 TfCut2 において 1.5–2.9 倍活性は向上した(図 2-8a)。G62A 変異体に関して、活性上昇率(2.1 倍)は Wei らによる先行研究(2.4 倍)とほぼ同等であった⁵。作成した変異体の中でも、最も活性が向上した変異体は、F209 をセリンもしくはアラニンに置換した変異体で、それぞれ 2.5 nmol cm⁻² min⁻¹ から 5.4、7.2 nmol cm⁻² min⁻¹ となった。これより、209 番目のフェニルアラニンの嵩高い側鎖は、活性部位への PET 分子鎖のアクセスを妨げている可能性が示唆された。そこで、F209 をサイズの異なるバリン、ロイシン、トリプトファンに置換し、活性への影響を検討したところ、側鎖の疎水性の違いよりも、側鎖のサイズに依存して活性は変化することが明らかになった(図 2-8b)。また、H129W 変異体も野生型よりも高活性を示した。これはおそらく、疎水的なトリプトファンの方が、ヒスチジンよりも PET 分子鎖の芳香環との相互作用しやすいためであると考えられる。一方、H129A 変異体が著しく低い活性を示し、PET 分子鎖の芳香環との相互作用(ex. T-stacking)が、PET 分解に必須である可能性を示している¹⁰。これらの結果は、活性部位周辺に PETase と同様のアミノ酸を導入することで活性を向上させられることに加え、この 3 つの残基が基質との相互作用を制御している可能性を示唆している。

次に、界面活性剤存在下でそれぞれの変異体の活性を測定した。その結果、著しく活性が低下していた H129A に関しては活性が低下したものの、それ以外の 4 つの変異体ではさらに 1.8–2.7 倍活性は向上し(7.2–14.2 nmol cm⁻² min⁻¹)、TfCut2 の変異体に関しても、界面活性剤の添加が効果的であることがわかった(図 2-8a)。

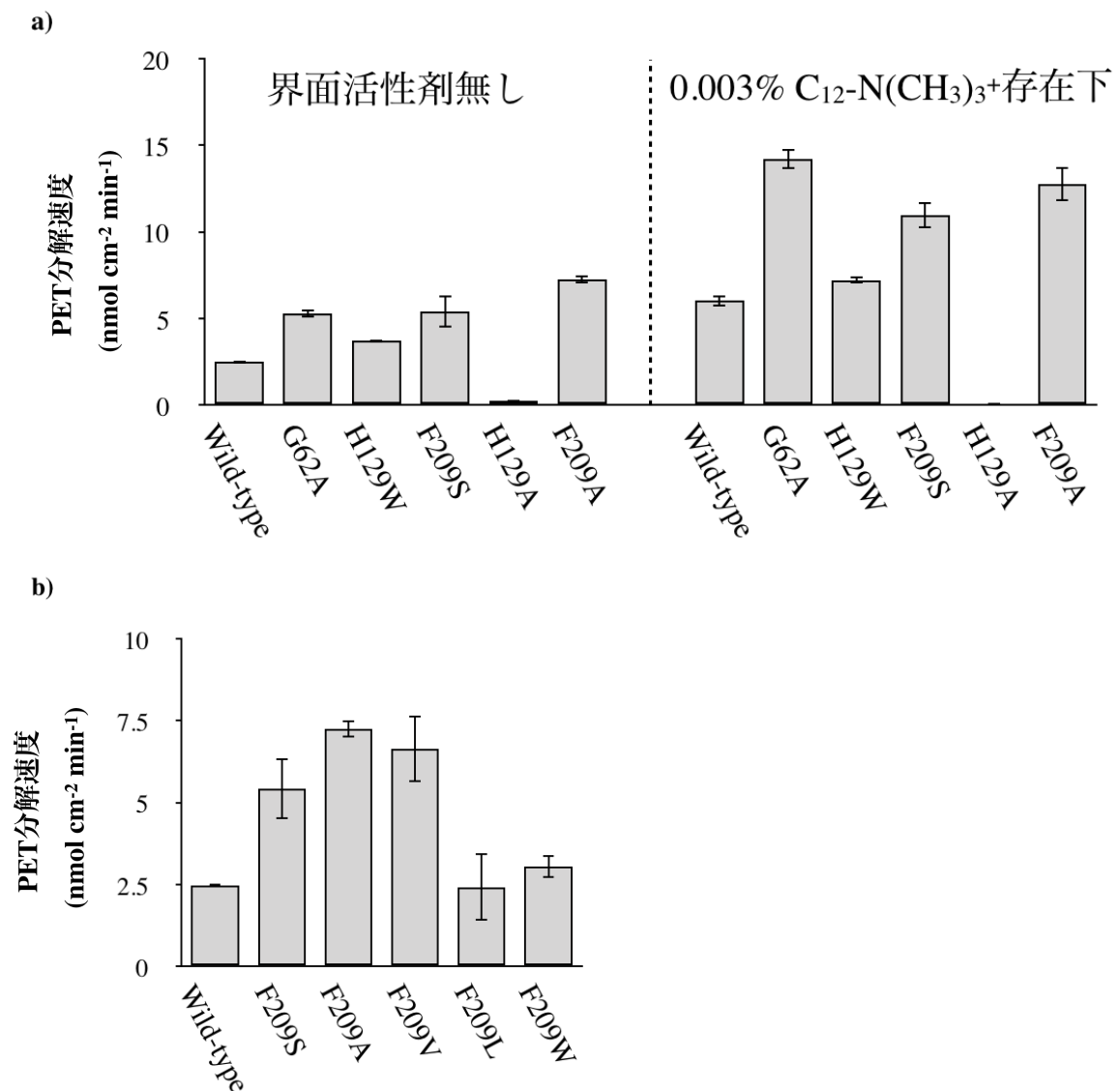


図 2-8. a) 各 TfCut2 の変異体(1 μM)による PET 分解速度(50 mM bicine, 10 mM CaCl_2 , 0.6 $\text{cm}^2 \text{mL}^{-1}$ lcPET)

b) F209 に着目して作成した変異体(1 μM)による PET 分解速度への影響 (50 mM bicine, 10 mM CaCl_2 , 1.2 $\text{cm}^2 \text{mL}^{-1}$ lcPET)

各エラーバーは標準偏差を示す (n=3)。

続いて、活性の低下した H129A を除く 4 つの変異を基に、5 つの二重変異体 (G62A/H129W、G62A/F209S、G62A/F209A、H129W/F209S、H129W/F209A) を作製した。まずそれぞれの変異体に関して、界面活性剤

非存在下での活性を測定したところ、G62A/H129W、G62A/F209S、G62A/F209A 変異体に関して、それぞれの単一の変異よりも高い活性を示した(図 2-9;それぞれ 6.5、8.7、15 nmol cm⁻² min⁻¹)。さらに、これらの変異体は界面活性剤の添加によって反応活性は向上し、最大活性は G62A/F209A 変異体の 31 nmol cm⁻² min⁻¹ であり、界面活性剤非存在下での野生型の 12.7 倍上回った。また、これは PETase の最大活性である 9.0 nmol cm⁻² min⁻¹ よりも 3 倍以上高かった。一方でこれらの変異体とは異なり、活性の向上した F209A または F209S 変異体に、同じく活性の向上した H129W 変異を導入したところ、酵素活性は低下した。これはおそらく、これらの変異を同時に導入することで、活性部位に基質がアクセスできなくなるような大きな構造変化が引き起こされた可能性がある。

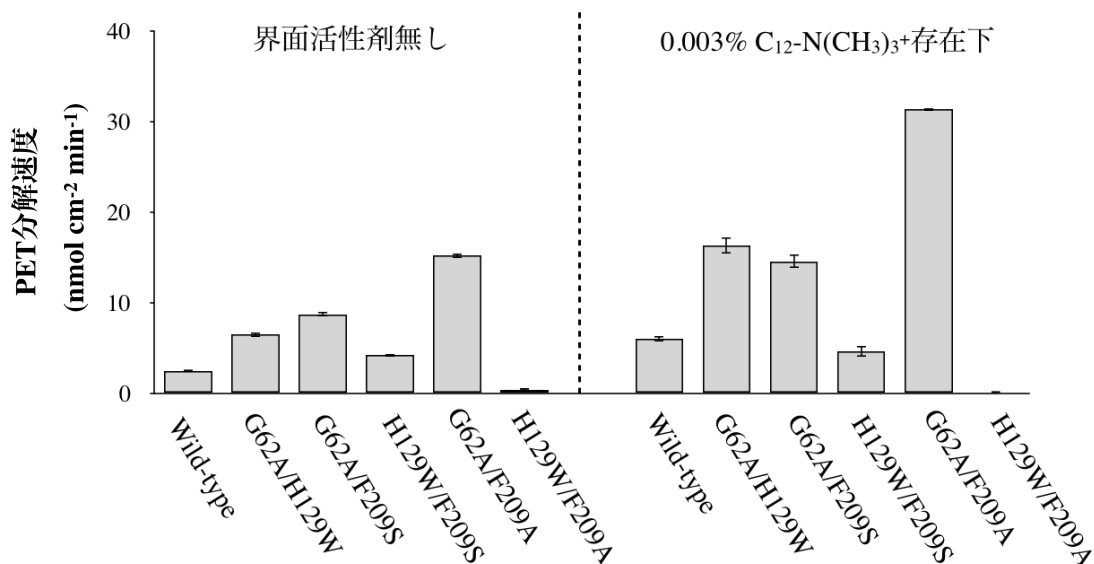


図 2-9. 図 2-8 をもとに作成した各 TfCut2 の二重変異体(1 μM)による PET 分解速度(50 mM bicine, 10 mM CaCl₂, 1.2 cm² mL⁻¹ lcPET) 各エラーバーは標準偏差を示す(n=3)。

2-6. 二重変異体による長時間反応

次に、最も高い活性を示した G62A/F209A 変異体を用いて、最適条件である 65°C、0.003% C₁₂-N(CH₃)₃⁺存在下で 48 時間反応を行なった。その結果、24 時間の反応で重量減少率は 73%に達した。しかしその後、活性が著しく低下し、48 時間では 82%分解に留まった(図 2-10a)。先行研究では、TfCut2 の活性は PET 分解産物である MHET によって阻害されることが報告されている^{5, 11, 12, 13}。そこでこの改善に向けて、反応溶液中の MHET 濃度を低下させるために、基質の量(PET フィルム 1 枚: 1.2 cm²)は変化させず、反応ボリュームを 1000, 500, 300 μL(基質濃度: 0.6, 1.2, 2.0 cm² mL⁻¹)として長時間反応を行なった。その結果、反応溶液量を 1000 μL とした条件では、24 時間まで線形に分解産物量が増加し、24 時間後には重量減少率が 90%に達すること、30 時間後にはほぼ完全に PET フィルムが分解された(図 2-10b)。また、これは分解速度にして 90 μm/day であり、従来の PET 分解酵素(LCC; 48 μm/day)と比較して 2 倍程度高い値である。この結果より、500 μL 以下の反応系での 24 時間以降の活性低下は、反応溶液中の生成物濃度によって TfCut2 の活性が阻害されたためであると考えられる。また、生成物による反応 pH の変化も活性低下の要因となりうるが、バッファ濃度を高めた条件であっても、分解率に大きな変化がなかったため、反応溶液の酸性化は活性低下の主たる要因ではないと考えられる(図 2-10c)。この時、10 μm(片面あたり)の分解に要する時間は、およそ 2.7 時間と、本研究の目標値として定めた数時間スケールでの 10 μm(片面あたり)分解を達成することができた。

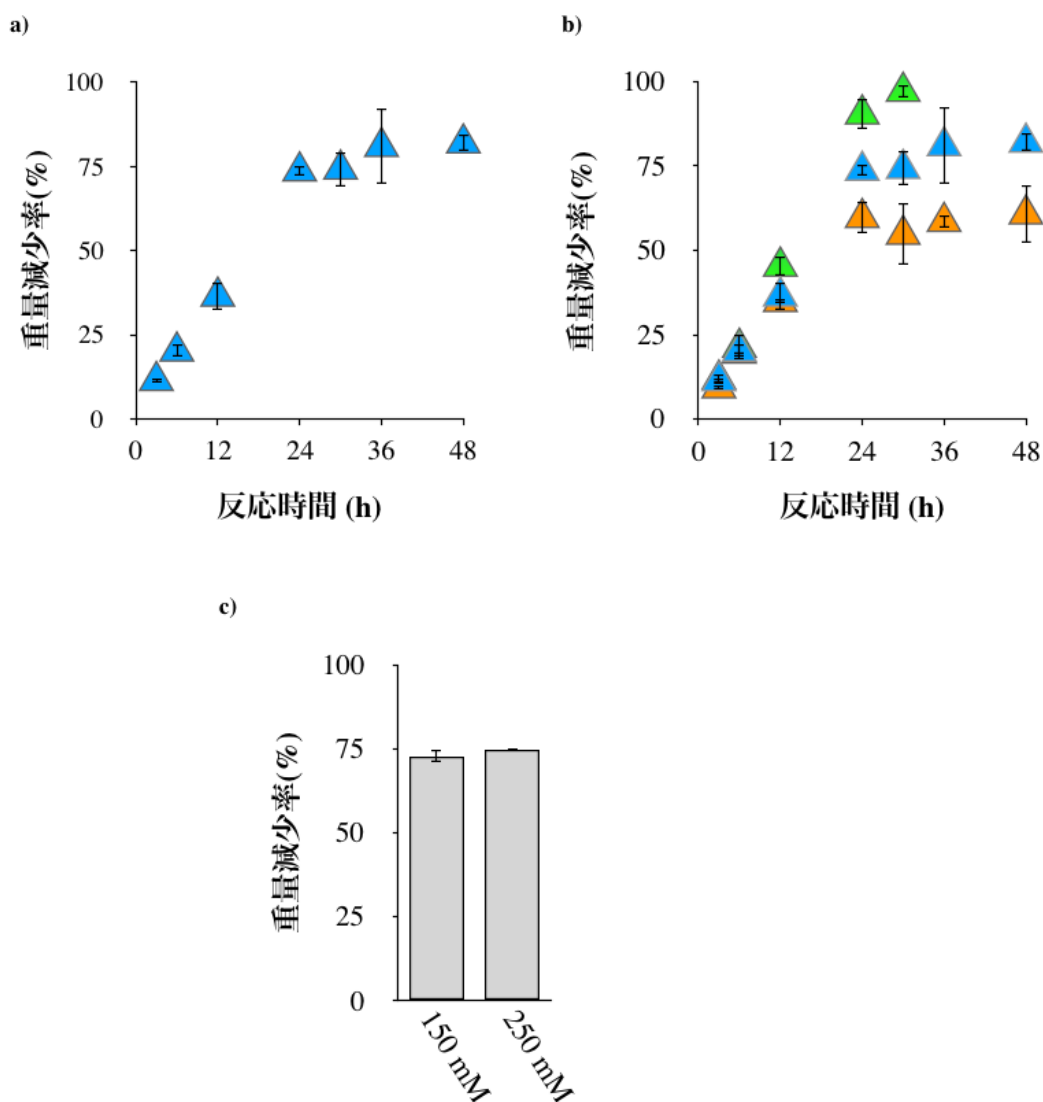


図 2-10. **a)** 65°C、0.003% $C_{12}-N(CH_3)_3^+$ 存在下、G62A/F209A 変異体による 48 時間反応(150 mM bicine, 10 mM $CaCl_2$, 1.2 $cm^2 mL^{-1}$ lcPET)
b) 反応ボリュームが活性に与える影響 (green: 1000 μL (0.6 $cm^2 mL^{-1}$ lcPET)、blue: 500 μL (1.2 $cm^2 mL^{-1}$ lcPET)、orange: 300 μL (2.0 $cm^2 mL^{-1}$ lcPET) (150 mM bicine) (150 mM bicine, 10 mM $CaCl_2$, 65°C)
c) 250、150 mM の Bicine バッファを用いた際の、G62A/F209A 変異体(1 μM)による 24 時間反応後の重量減少率 (10 mM $CaCl_2$, 0.6 $cm^2 mL^{-1}$ lcPET, 65°C)
 各エラーバーは標準偏差を示す (n=3)。

2-7. 高結晶性 PET の分解反応

一般に使用されている高結晶性 PET(hcPET: 結晶化度 40%)は、ポリマー分子鎖同士が強固に相互作用しているためその運動性は低く、酵素での分解は困難である¹⁴。そこで、筆者が構築した G62A/F209A 変異体 + 界面活性剤の系を用いた時の hcPET 分解速度を調べた。結晶化度 40%の PET フィルムを基質として、界面活性剤存在下または非存在下で野生型 TfCut2、G62A/F209A 変異体を用いて 3 時間反応させた。その結果、野生型 TfCut2 の活性は界面活性剤の添加で、低結晶性 PET(lcPET:結晶化度 3–5%)を基質とした場合と同様に、2.4 倍改善した(0.011 から 0.026 nmol cm⁻² min⁻¹ まで向上)。また変異体を利用することでさらに活性は向上し、0.066 nmol cm⁻² min⁻¹ となった(図 2-11)。このように界面活性剤の添加と変異導入によって高結晶性 PET の分解活性は確かに改善したものの、その分解速度は著しく遅く、分解反応を効率化には高結晶性 PET の結晶性を低下させるような、新たなアプローチが必要であると考えられる。

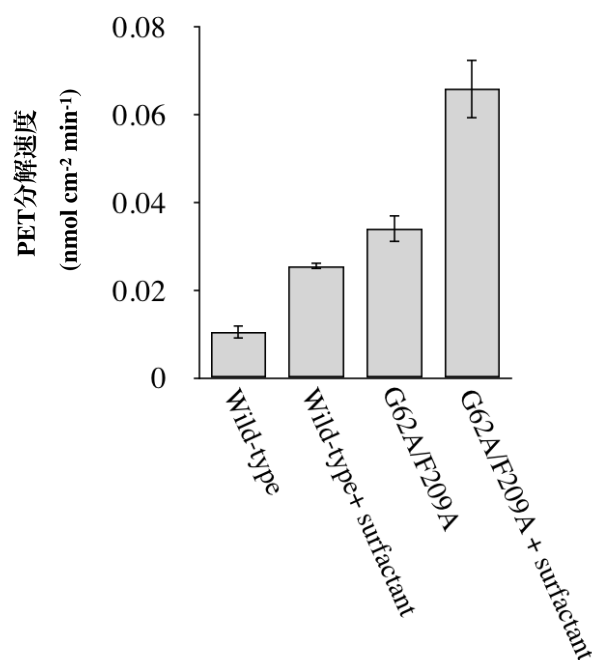


図 2-11. 65°C、0.003% C₁₂-N(CH₃)₃⁺存在下または非存在下での野生型 TfCut2 および G62A/F209A 変異体による hcPET 分解速度(50 mM bicine, 10 mM CaCl₂, 1.2 cm² mL⁻¹ lcPET)
各エラーバーは標準偏差を示す(n=3)。

2-8. 結論

本章では、第 1 章で開発した界面活性剤の添加による活性向上手法が、耐熱性酵素である TfCut2 にも応用可能であることを示した。また、第 1 章と同様に、添加する界面活性剤の電荷デザインによって、PET 表面と酵素との相互作用を加速させることが可能であり、これがその後の加水分解を効率的に進行させるために重要であることを示した。結果として、0.003% $\text{C}_{12}\text{-N}(\text{CH}_3)_3^+$ の添加によって 65°C における野生型 TfCut2 の活性は 2.5 から $6.0 \text{ nmol cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$ まで向上し、さらに G62A/F209A の変異を導入することで $31 \text{ nmol cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$ まで、最大 12.7 倍向上させることに成功した。加えて、G62A/F209A + 界面活性剤の系を利用することで、24 時間で重量減少率 90% を達成することができた。また、有害分子の浸透が認められる 10 μm までの PET 分解は、低結晶性の PET に限られるが、およそ 2.7 時間で達成することが可能である。以上の結果から、筆者が開発した手法を Barth らによって構築されたフローリアクター¹³ と組み合わせることで、生成される PET 分解産物を除去しながら反応を行うことができれば、高い安定性を有する TfCut2 による効率的な反応を長時間維持でき、工業的に有用であると考えられる。

参考文献

- (1) M. Furukawa, N. Kawakami, K. Oda, K. Miyamoto, *ChemSusChem* 2018, 11, 4018–4025.
- (2) Å. M. Ronkvist, W. Xie, W. Lu, R. A. Gross, *Macromolecules* 2009, 42, 5128–5138.
- (3) E. H. Acero, D. Ribitsch, G. Steinkellner, K. Gruber, K. Greimel, I. Eiteljoerg, E. Trotscha, R. Wei, W. Zimmermann, M. Zinn, A. Cavaco-Paulo, G. Freddi, H. Schwab and G. Guebitz, *Macromolecules* 2011, 44, 4632–4640.
- (4) S. Sulaiman, S. Yamato, E. Kanaya, J. J. Kim, Y. Koga, K. Takano, S. Kanaya, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2012, 78, 1556–1562.
- (5) R. Wei, T. Oeser, J. Schmidt, R. Meier, M. Barth, J. Then, W. Zimmermann, *Biotechnol. Bioeng.* 2016, 113, 1658–1665.
- (6) A. N. Shirke, C. White, J. A. Englaender, A. Zwarycz, G. L. Butterfoss, R. J. Linhardt, R. A. Gross, *Biochemistry* 2018, 57, 1190–1200.
- (7) S. Joo, I. J. Cho, H. Seo, F. S. Son, H. Y. Sagong, T. J. Shin, S. Y. Choi, S. Y. Lee, K. J. Kim, *Nat. Commun.* 2018, 9, 382.
- (8) C. Roth, R. Wei, T. Oeser, J. Then, C. Föllner, W. Zimmermann, N. Sträter, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2014, 98, 7815–7823.
- (9) H. P. Austin, M. D. Allen, B. S. Donohoe, N. A. Rorrer, F. L. Kearns, R. L. Silveira, B. C. Pollard, G. Dominick, R. Duman, K. E. Omari, V. Mykhaylyk, A. Wagner, W. E. Michener, A. Amore, M. S. Skaf, M. F. Crowley, A. W. Thorne, C. W. Johnson, H. L. Woodcock, J. E. McGeehan, G. T. Beckham, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2018, 115, 4350–4357.
- (10) X. Han, W. Liu, J. W. Huang, J. Ma, Y. Zheng, T. P. Ko, L. Xu, Y. S. Cheng, C. C. Chen, R. T. Guo, *Nat. Commun.* 2017, 8, 2106.
- (11) M. Barth, T. Oeser, R. Wei, J. Then, J. Schmidt, W. Zimmermann, *Biochem. Eng. J.* 2015, 93, 222–228.
- (12) M. Barth, A. Honak, T. Oeser, R. Wei, M. R. Belisário-Ferrari, J. Then, J. Schmidt, W. Zimmermann, *Biotechnol. J.* 2016, 11, 1082–1087.
- (13) M. Barth, R. Wei, T. Oeser, J. Then, J. Schmidt, F. Wohlgemuth, W.

- Zimmermann, *J. Membr. Sci.* 2016, 494, 182–187.
- (14) R. Wei, D. Breite, C. Song, D. Gräsing, T. Ploss, P. Hille, R. Schwerdtfeger, J. Matysik, A. Schulze, W. Zimmermann, *Adv. Sci.* 2019, 6, 1900491.
- (15) D. J. Cosgrove, *Nature* 2000, 407, 321–326.

結論

PET 分解酵素の利用先として、回収された PET のリサイクルにおける洗浄プロセスでの応用が考えられる。実際に、共同研究先の企業による解析では、PET 表面から浸透する有害分子はその表面からおよそ 10 μm にまで達する。そのため、PET 分解酵素が PET 表面のみを分解する特性を利用して、10 μm 分解を数時間スケールで行うことを目標として、PET 分解酵素の活性改善について研究した。

第 1 章では、カチオン性を示す PETase の PET 分解活性が、アニオン性界面活性剤を添加するだけで大幅に改善されることを明らかにした。またその PET 分解量は、厚さ減少率(180 μm から 140 μm)にして 36 時間で 22% に達した。そしてこの活性改善は、アニオン性界面活性剤が基質である PET 表面をコートすることで、疎水的な表面からアニオン化された表面への変化に起因することをプレインキュベートの影響、界面活性剤添加による *p*NPB 加水分解反応への影響、界面活性剤添加による PET 表面の酵素吸着量への影響を検討することによって明らかにした。さらに、界面活性剤と PETase の相互作用部位について、変異導入によって同定を検討したところ、3 つのカチオン性アミノ酸(R53、R90、K95)からなるカチオン性領域が関わっていることを明らかにした。しかし、その安定性ゆえに、長期的な反応が困難であることや分解速度が問題であることがわかった。実際に、目標値とした 10 μm 分解にはおよそ 12 時間必要であり、さらなる改善が必要であった。この改善策としては、変異導入による耐熱化や、アルギニン等の酵素の変性を抑制する化合物を添加する手法が有効であると考えられるが、コストや検討にかかる時間が問題となるだろう。

第 2 章では、PETase の問題点を改善するべく、耐熱性酵素である TfCut2 の活性改善を検討した。アニオン性を示す TfCut2 へのカチオン性界面活性剤の添加、そして PETase との配列比較によって同定された G62 と F209 への変異導入が活性を著しく改善することを明らかにした。その分解量は、24 時間で重量減少率にして 90%と PETase の系よりも効率的である上に、48 時間以上安定であることが明らかになった。また、目標値とした 10 μm 分解は 2.7 時間で達成されたことから、本系が低結晶性 PET の表面処理技術として効果的であることがわかった。しかし、市販されている PET 製品に用いられているような高結晶性 PET の分解には、さらなる検討が必要であることがわかった。

今後、さらに高結晶性 PET の分解に向けた活性の改善が必要となるが、それに向けた具体的な案は未だ提案されていない。高結晶性 PET における分解のボトルネックとなっている現象は、PET 分子同士が強固に相互作用し、酵素の活性部位が分子鎖と相互作用できない点である。そのため、変異導入による高結晶分解性 PET 分解酵素の構築や、結晶性を下げる添加物の使用が必要となってくるだろう。例えば、植物細胞が持つ expansin というタンパク質は、結晶性セルロースの持つ密な水素結合ネットワークを破壊し、結晶化度を下げる機能があると報告されている¹⁵。実際にこの添加によって、高結晶性セルロースの cellulase による分解が促進される。そのため、もし PET に関しても、これと類似した機構で分子鎖同士の相互作用を緩めることが出来れば、高結晶性 PET の分解もより効率化できると考えられる。実際に、*Ideonella sakaiensis* は、日常で使用される日常で使用される PET(結晶化度 15%~)が廃棄されている PET リサイクル工場から発見されており、高結晶性 PET が多数存在する環境であった。そのため、*I. sakaiensis* はこれら PET を炭素源として生育していたと考えられ、高結晶性 PET をも分解する機構を有している可能性が高いと考えられる。今後の研究では、高結晶性 PET の分解に向けて、低結晶性および高結晶性 PET を炭素源として与えた時の *I. sakaiensis* の発現量解析などを基にして、*I. sakaiensis* が持つ機能をさらに解析していくことが高結晶性 PET 分解の実現可能性を開く鍵となるだろう。

また、本界面活性剤の添加系は PET に限らず、他の疎水性個体基質に対しても応用できる可能性がある。これまでの結果より、界面活性剤と酵素が静電相互作用することで、基質表面に誘引されることを複数の酵素で明らかにした。そのため、基質表面と界面活性剤が相互作用することができれば、反応活性は向上しうる。したがって、対象とする基質に対して使用する界面活性剤を適切に選択することができれば、その基質の分解活性を向上させられる可能性がある。そのため今後は、他の基質に対しても界面活性剤の添加効果を検証することで、本手法の応用性を広げられるだろう。

これらの研究が、工業的な PET をはじめとするプラスチック生分解の実現可能性を広げる基盤技術となることを願っている。

実験の部

使用した試薬・キット類

培養関連

LB 培地 (nacalai tesque)

精製寒天 (nacalai)

Ampicillin (nacalai tesque)

Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (Wako)

遺伝子操作

Nde I (TaKaRa)

Xho I (TaKaRa)

Tks Gflex (TaKaRa)

1 kbp DNA Ladder One (nacalai tesque)

100 bp DNA Ladder One (nacalai tesque)

CH₃COOH

プラスミド抽出

DNA/RNA EXTRACTION KIT (BIOGENE) Gel/PCR isolation system
(BIOGENE)

サンガーシーケンス

BigDyeTM Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher)

EtOH (nacalai tesque)

Ethylenediaminetetraacetic acid (nacalai tesque)

CH₃COONa (nacalai tesque)

タンパク質精製

Tris(hydroxymethyl)aminomethane (nacalai tesque)

HCl (nacalai tesque)

NaOH (nacalai tesque)

Urea (nacalai tesque)

Imidazole (nacalai tesque)

Dithiothreitol (nacalai tesque)

Arginine (nacalai tesque)
CaCl₂ (nacalai tesque)
Ethylenediaminetetraacetic acid (nacalai tesque)
Protein assay CBB solution (nacalai)
Mercaptoethanol (nacalai tesque)
Acrylamide (BIO RAD)
Ammonium Peroxodisulphate (Wako)
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (Wako)
Glycine (nacalai tesque)
Protein Markers (nacalai)
CBB stain one (nacalai)

HPLC

Formic acid (nacalai tesque)
Acetonitrile (nacalai tesque)

酵素反応

Bicine (nacalai tesque)
p-Nitrophenyl butyrate (nacalai tesque)
p-Nitrophenol (nacalai tesque)
Dimethyl sulfoxide (nacalai tesque)
低結晶性 PET シート (NOACRYSTAL-V, 厚さ 200 μm, 結晶化度 3–5%, RP
TOPLA)
高結晶性 PET シート (厚さ 190 μm, 結晶化度 3–5%, FP CORPORTION)

界面活性剤

硫酸塩

C₁₁-OSO₃⁻, Sodium 1-undecyl sulfate (Alfa Aesar)
C₁₂-OSO₃⁻, Sodium dodecyl sulfate (nacalai tesque)
C₁₃-OSO₃⁻, Sodium n-tridecyl sulfate (Alfa Aesar)
C₁₄-OSO₃⁻, Sodium tetradecyl sulfate (Wako)

スルホン酸塩

$C_{11}-SO_3^-$, Sodium 1-undecanesulfonate (東京化成)

$C_{12}-SO_3^-$, Sodium 1-dodecanesulfonate (東京化成)

$C_{13}-SO_3^-$, Sodium 1-tridecanesulfonate (東京化成)

カルボン酸塩

$C_{11}-COO^-$, Sodium laurate (東京化成)

$C_{13}-COO^-$, Sodium myristate (東京化成)

リン酸塩

$C_{12}-OPO_3^-$, Sodium monododecyl phosphate (東京化成)

トリメチルアンモニウム塩

$C_{10}-N(CH_3)_3^+$, Decyltrimethylammonium chloride (東京化成)

$C_{12}-N(CH_3)_3^+$, Lauryltrimethylammonium chloride (東京化成)

$C_{14}-N(CH_3)_3^+$, tetradecyltrimethylammonium chloride (東京化成)

$C_{16}-N(CH_3)_3^+$, hexadecyltrimethylammonium chloride (東京化成)

使用機器

- オートクレーブ装置には LSX-500 (TOMY 精工)を用いた。 フィルター滅菌には、MILLIPORE 社製 MILLEX GV Filter Unit(孔径 0.22 μm)と、 TERUMO 社製テルモシリンジ ss-10SZ 10 mL を用いた。
- 濁度測定には UV-2100S (SHIMADZU)を用いた。
- 石英セルは HELLMA 社製を用いた。
- 超音波発生装置には UD-201 (TOMY 精工)使用した。
- 高速遠心分離機は、himac CR20GII(日立)を、ロータは R15A 高速冷却遠心機ロータ(日立) を用いた。
- エッペンチューブスケールの遠心分離には MX-100 (TOMY)、BugCrashuer GM-01 (TAITEC)を用いた。
- ボルテックスミキサーは、VORTEX-GENIE2 (Scientific Industries)を用いた。 エッペンチューブスケールの溶媒除去には Micro Vac TM MV100 (TOMY)を用いた。

- pH 測定には pH METER F-52 (HORIBA)を用いた。
- タンパク濃度測定には BioSpec-mini (SHIMAZU)を用いた。
- *p*NPB を用いた加水分解の吸光度測定機には、UV-1650PC (SHIMADZU)を用いた。
- 電気泳動装置はラピダス二連ミニスラブ電気泳動装置 AE6500W クロスパワー1000AE8400 を用いた。
- 逆相高速液体クロマトグラフィーには、LC2010AHT (SHIMAZU)を用いた。
- サーマルサイクラーは、Bio-Rad 社製 MJ Research PTC-200、C1000 Thermal Cycler を用いた。
- アガロース電気泳動には、COSMO BIO 社製 Mupid J ミニゲル泳動槽、MyRUNNC を用いた。
- SDS-PAGE には、ATTO 社製 AE-6500 型ラピダス・ミニスラブ電気泳動層を用いた。

第1章 界面活性剤を利用した PET 分解酵素の活性改善

遺伝子構築

大腸菌用ベクターpET21-b を H buffer (TaKaRa)存在下、NdeI および XhoI で切断した。Gel/PCR isolation system (BIOGENE)を用いて、切断された pET21-b を精製した。また同時に、N 末端に NdeI、C 末端に XhoI の切断配列を含む、大腸菌にコドン最適化された PETase、TfCut2、LCC の遺伝子を NdeI および XhoI で切断し、アガロースゲル電気泳動で分離、精製した。切断された両遺伝子を 16°C、6 時間ライゲーションし、pET21-b-PETase、TfCut2、LCC を作製した。作製した遺伝子は、大腸菌 XL-10 Gold に導入し、DNA/RNA EXTRACTION KIT (BIOGENE)を用いてプラスミド抽出したのち、サンガーシーケンスによって配列を確認した(表 4-1, 2, 3)。

表 4-1. PETase の遺伝子配列とアミノ酸配列(太字下線は NdeI、XhoI の配列)

PETase の 遺伝子配列	<u>CATATG</u>CAAACAAACCCGTATGCGCGTGGTCCGAATCCGAC TGCTGCCAGCCTTGAAGCCTCTGCTGGCCCTTTCACCGTACG CTCGTTCACGGTTTCGCGTCCATCGGGCTATGGTGCAGGCAC CGTGTATTACCCGACAAATGCTGGCGGGACTGTAGGTGCCA TTGCGATTGTTCCGGGCTATACGGCTCGTCAGTCAAGCATCA AATGGTGGGGTCCACGTCTGGCAAGCCATGGCTTTGTGGTC ATCACCATTGACACGAATTCTACGCTGGATCAGCCGAGCAG TCGGAGCTCACAGCAGATGGCCGCCTTACGCCAAGTTGCAT CGTTAAACGGAACATCCTCATCGCCAATCTACGGGAAAGTG GATACTGCCCCGCATGGGAGTGATGGGCTGGAGTATGGGTGG TGGTGGCAGTCTCATTTCGCGGGCGAACAATCCCTCTCTGAA AGCGGCAGCGCCGCAAGCGCCCTGGGATTCAAGCACCAACT TTTCCAGTGTTACCGTCCCGACCTTGATCTTTGCGTGCGAAA ACGACAGCATTGCACCTGTGAACAGCTCTGCTCTGCCTATTT ACGATAGCATGTCCCGCAATGCAAAGCAGTTCCTGGAGATC AACGGTGGGTCACACTCGTGTGCCAATTCCGGCAATAGCAA TCAGGCGCTGATTGGCAAGAAAGGAGTGGCCTGGATGAAAC GCTTCATGGATAACGATACCCGCTATTCCACCTTTGCGTGTG AAAACCCGAATAGTACCCGTGTCAGTGACTTTCGCACGGCG AACTGCTCT<u>CTCGAG</u>
PETase の アミノ酸配列	<u>HM</u>QTNPYARGPNPTAASLEASAGPFTVRSFTVSRPSGYGAGTV YYPTNAGGTVGAIAIVPGYTARQSSIKWWGPRLASHGFVVITID TNSTLDQPSSRSSQQMAALRQVASLNGTSSSPIYGKVD TARMG VMGWSMGGGGLISAANNPSLKAAAPQAPWDSSTNFSSVTVP TLIFACENDSIAPVNSSALPIYDSMSRNAKQFLEINGGSHSCANS GNSNQALIGKKGVAWMKRFMDNDTRYSTFACENPNSTRVSDF RTANCS<u>LE</u>

表 4-2. TfCut2 の遺伝子配列とアミノ酸配列(太字下線は NdeI、XhoI の配列)

TfCut2 の 遺伝子配列	<u>CATATG</u>GCGAACCCCTATGAACGCGGGCCGAATCCTACAGATGCGCTTC TGGAAGCGCGTTCTGGCCCGTTTAGTGTGTCTGGAGGAAAACGTTTCGCGT CTGTCAGCGTCTGGATTTGGCGGTGGTACGATTTACTATCCGCGTGAGAA CAACACCTATGGTGCAGTCGCCATTTGCCGGGCTATACCGGAACTGAG GCCTCCATTGCCTGGTTAGGGGAACGCATTGCCTCTCATGGGTTTGTGGT CATCACGATTGATACGATCACCACCCTTGATCAGCCCGATAGTCGGGCAG AACAGCTGAATGCCGCTCTGAACCACATGATCAATCGCGCGTCTAGTACC GTTCGTAGCCGCATTGACAGCAGTCGCTTAGCGGTAATGGGCCATTCCAT GGGTGGTGGTGGTAGCTTACGTTTGGCGAGTCAACGGCCAGACCTGAAA GCGGCCATTCCGCTGACACCCTGGCACTTGAACAAGAATTGGTCCTCCGT CACTGTGCCAACCCTGATTATTGGCGCCGACCTCGATACTATCGCACCCGG TTGCAACGCATGCCAAACCGTTCTACAATTCGCTGCCTTCAAGCATTTCA AAAGCCTACCTCGAACTGGATGGCGCTACGCACTTTGCGCCTAATATCCC GAATAAGATTATCGGCAAATACTCGGTAGCGTGTTGAAACGCTTCGTG GACAACGATACCCGCTATACCCAGTTTCTGTGTCCAGGACCGCGTGACGG CCTGTTTCGGTGAAGTTGAGGAATATCGCTCAACATGCCCGTTCTATCCGA ACAGCAGCAGCGTGGACAAACTCGCAGCTGCTCTGGAA<u>CTCGAG</u>
TfCut2 の アミノ酸配列	<u>HM</u>ANPYERGPNP TDALLEARSGPFSVSEENVSRLSASGFGGGTIYYP RENNTYGAV AISPGYTGTEASIAWLGERIA SHGFVVITIDTIT TLDQPD SRAEQLNAALNHMINRASSTVRSRIDSSRLAVMGHSMGGGGSLRLA SQRPD LKAAIPLTPWHLNKNWSSVTVP TLIIGADLDTIAPVATHAKPF YNSLPSSISKAYLELDGATHFAPNIPNKIIGKYSVAWLKRFVDNDTRY TQFLCPGPRDGLFGEVEEYRSTCPFYPNSSSVDKLAAALE<u>LE</u>

表 4-3. LCC の遺伝子配列とアミノ酸配列(太字下線は NdeI、XhoI の配列)

LCC の 遺伝子配列	<u>CATATG</u>AGTAACCCGTATCAACGTGGCCCCAATCCGACACGTAGTGCCT TAACTGCTGATGGGCCGTTTTTCAGTGGCGACGTATACCGTGTCACGGCTG AGTGTGAGCGGGTTTGGTGGCGGTGTGATCTACTATCCGACCGGCACCTC TCTGACATTTGGCGGCATTGCGATGAGCCCAGGGTATACTGCCGATGCGT CAAGCCTGGCATGGTTAGGTCGCCGTCTTGCCTCACACGGCTTTGTTGTG CTCGTTATCAACACGAACCTCGCGCTTCGACTACCCTGATTCTCGTGCGAG CCAGTTATCTGCGGCGTTGAACTACTTGCGTACGTCCAGCCCTAGCGCAG TACGCGCTCGTCTGGATGCCAATCGGCTGGCAGTTGCGGGCCATTTCGATG GGTGGAGGTGGTACCCTCCGCATTGCTGAGCAGAATCCTTCCCTTAAAGC AGCCGTTCCGTTGACTCCGTGGCATAACCGATAAGACCTTCAACACCTCCG TTCCGGTCCTGATTGTAGGAGCCGAAGCCGATACGGTAGCTCCAGTGTCC CAGCATGCGATTCCGTTCTACCAGAATCTGCCGAGCACGACACCGAAAG TCTATGTGCGAACTGGACAATGCGTCGCACTTTGCGCCAAACTCGAATAAC GCCGCAATTAGCGTGTACACCATCTCTTGGATGAAACTGTGGGTCGACAA CGATACCCGCTATCGCCAGTTCCTGTGCAATGTGAACGATCCCGCACTGA GTGACTTTTCGCACGAACAATCGCCACTGTCAA<u>CTCGAG</u>
LCC の アミノ酸配列	<u>HMS</u>NPYQRGPNPTRSALTADGPFVSATYTVSRLSVSGFGGGVIYYPT GTSLTFGGIAMSPGYTADASSLAWLGRRRLASHGFVVLVINTNSRFDY PDSRASQLSAALNYLRTSSPSAVRARLDANRLAVAGHSMGGGGTLRI AEQNPSLKAAVPLTPWHTDKTFNTSVPVLIVGAEDTVAPVSQHAIP FYQNLPTTPKVYVELDNASHFAPNSNNAAISVYTISWMKLWVDND TRYRQFLCNVNDPALSDFRTNNRHC<u>QLE</u>

変異導入

構築したプラスミドに対して、表 4-4 に示すプライマーを用いて変異体を作製した。DNA ポリメラーゼ Tks Gflex (TaKaRa)を用いて、PCR によって変異導入したのち、DpnI で鋳型プラスミドを消化した。大腸菌 XL-10 Gold にこの PCR 産物を導入し、DNA/RNA EXTRACTION KIT (BIOGENE)を用いてプラスミド抽出したのち、サンガーシーケンスによって配列を確認した。

表 4-4. 使用した PETase 用プライマー配列

	Sequence
R34E forward	5'- ATTCGGACCTTCCGCATACGGGTTTGT -3'
R34E reverse	5'- ACAAACCCGTATGCGGAAGGTCCGAAT -3'
R53E forward	5'- GAACGACTCTACGGTGAAAGG -3'
R53E reverse	5'- CCTTTCACCGTAGAGTCGTTC -3'
R90E forward	5'- GATGCTTGACTGCTCAGCCGTATAGCCCGG -3'
R90E reverse	5'- CCGGGCTATACGGCTGAGCAGTCAAGCATC -3'
K95E forward	5'- ACCCCACCATTCGATGCTTGA -3'
K95E reverse	5'- TCAAGCATCGAATGGTGGGGT -3'

PETase の発現、精製

大腸菌コンピテントセル BL21(DE3) RIPL に作製したプラスミド(変異体を含む)を導入した。形質転換された大腸菌は、Ampicillin (50 µg/mL)を含む LB- Amp プレート上で 37°C、12 時間培養した。プレートに形成された大腸菌のシングルコロニーを爪楊枝でピックし、前培養として 3 mL LB-Amp 液体培地が入った試験管に植菌し、37°C で 10 時間振とう培養した。続いて本培養として、試験管内で前培養した培養液 1 mL を 100 mL LB-Amp 液体培地の入った坂口フラスコに植菌し、37°C で振とう培養した。培養時間ごとに OD600 を測定し、0.4 付近でタンパク質発現誘導剤である Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)を終濃度 1 mM となるように添加し、さらに 6 時間培養した。

培養後、培養液を 50 mL 遠沈管に移し、遠心分離(4°C, 10,000 rpm, 10 min)し

た。培養上清を除き、菌体に破碎バッファー(50 mM Tris-HCl, 1 M Urea, pH8.3)を加え、氷上で超音波破碎(Output 3, Duty 30, 10 min × 3)した。破碎液を遠心分離(4°C, 10,000 rpm, 10 min)し、上清を捨て封入体を含む不溶性画分を獲得した。

次に、不溶性画分に可溶化バッファー(50 mM Tris-HCl, 6 M Urea, 1 mM DTT, pH8.3)を加え、3 時間 4°C でインキュベートし、封入体を溶解させた。その後、遠心分離(4°C, 10,000 rpm, 10 min)によって、PETase を含む可溶化上清を得た。

得られた可溶化上清を Ni-NTA agarose カラム(Qiagen)に添加した。洗浄バッファー(50 mM Tris-HCl, 6 M Urea, 20 mM Imidazole, pH8.3)で、非特異的に結合したタンパク質を洗浄した。カラムと結合した PETase は溶出バッファー(50 mM Tris-HCl, 6 M Urea, 200 mM Imidazole, pH8.3)で溶出した。

溶出したタンパク質は、高濃度の条件で透析すると再度凝集してしまうため、0.25~0.35 mg/mL 程度まで希釈して透析する必要があった。そこで透析の前に、タンパク質濃度を調製した。タンパク質の濃度は、ウシ血清アルブミン(BSA)をコントロールとするブラッドフォード法で測定した。1.5 mL チューブに蒸留水(780 µL)、5 × Protein assay CBB solution (200 µL)、1 mg/mL ~ 0.2 mg/mL の濃度で調製した BSA 溶液(20 µL)を加えコントロール溶液とした。各溶液をセルに移し、595 nm の吸光度を測定し、得られた吸光度をもとに検量線を作製した。その後同様の手順で溶出したタンパク質溶液の吸光度を測定し、検量線からタンパク質濃度を定量した。定量したタンパク質濃度から、溶出したタンパク質溶液を 0.25~0.35 mg/mL になるように希釈した。

濃度を調製したタンパク質溶液をセルロースチューブ内に入れ、リフォールディングバッファー (50 mM Tris-HCl, 200 mM Arginine, 50 mM CaCl₂, pH 7.0)に浸し、4°C で透析を行った。2 時間ごとに 2 回リフォールディングバッファーを交換した後、終夜透析した。

TfCut2 の発現、精製

PETase の場合と同様に、BL21(DE3)に pET21-b-TfCut2 を導入し、前培養を行なった。前培養した培養液 1 mL を 100 mL LB-Amp 液体培地の入った坂口フラスコに植菌し、37°C で振とう培養した。培養時間ごとに OD600 を測定し、0.4 付近でタンパク質発現誘導剤である IPTG を終濃度 0.1 mM となるように添加し、さらに 4 時間培養した。発現した TfCut2 を含む菌体に破碎バッファー(20 mM Tris-HCl, pH8.0)を加え、氷上で超音波破碎(Output 3, Duty 30, 10 min × 3)した。破

碎液を遠心分離(4°C, 10,000 rpm, 10 min)し、TfCut2 を含む上清を得た。得られた上清を Ni-NTA agarose カラムに添加し、洗浄バッファー(20 mM Tris-HCl, 40 mM Imidazole, pH8.0)で、非特異的に結合したタンパク質を洗浄した。カラムと結合した TfCut2 は溶出バッファー(20 mM Tris-HCl, 100 mM Imidazole, pH8.0)で溶出した。溶出したタンパク質はセルロースチューブに入れ、透析溶液中(20 mM Tris-HCl, pH 8.0)で終夜透析した。

LCC の発現、精製

PETase の場合と形質転換、タンパク質の発現を行なった。培養した菌体を遠心分離(4°C, 10,000 rpm, 10 min)で回収した。LCC は培養上清中に存在するため、培養上清のみを回収した。回収した培養上清は、透析溶液(20 mM Tris-HCl, pH8.0)で終夜透析し、培地成分を取り除いた。透析した溶液は TfCut2 と同様に Ni カラムで精製、透析した。

基質(PET)の調製

PET シート(低結晶性および高結晶性)は 20% エタノールおよび milliQ 水で洗浄したのち、35°Cで 24 時間乾燥させた。乾燥させたシートから、穴あけパンチで直径 6 mm となるように切断したサンプルを、基質(PET フィルム)とした。作製した PET フィルムは常温で保存した。

界面活性剤の調製

使用した界面活性剤は、全て蒸留水に 1%(w/v)となるように溶解した。溶解度が低い界面活性剤($C_{13}\text{-OSO}_3^-$, $C_{14}\text{-OSO}_3^-$, $C_{13}\text{-SO}_3^-$, $C_{11}\text{-COO}^-$, $C_{13}\text{-COO}^-$)は、70°Cで 5 分間加熱し溶解した。

PET 分解反応

エッペンドルフチューブ中の 50 mM Bicine (pH9.0)、各濃度の界面活性剤を含むバッファーに PET フィルム 1 枚(高結晶性および低結晶性)を沈め(1.2 cm² mL⁻¹)、ボルテックスでよく混合し、スピンドウンした。その後反応溶液を、30°Cで 1 時間インキュベートした。その後 PETase(終濃度 500 nM)を添加し(トータル 500 μ L)、さらに 3 時間インキュベートし、PET 分解を行なった。3 時間後、反応溶液に 500 μ L の反応停止溶液(70% (v/v) MilliQ water, 20% (v/v) acetonitrile, and 10%

(v/v) formic acid)を添加し、反応を停止させた。PET 分解活性は高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によって分析した。また PET 分解量が多い場合、反応停止溶液の添加による pH の低下によって分解産物が析出するため 100 μ L の反応溶液と 900 μ L の反応停止溶液を混合し、分析した。

界面活性剤とのプレインキュベートの効果を確認するために、界面活性剤を含めて 1 時間インキュベートした反応溶液と界面活性剤を含めずにインキュベートした反応溶液を用意した。その後、前者には酵素のみを、後者には界面活性剤と酵素を同時に添加し、さらに 1 時間インキュベートし、PET 分解反応を行なった。その後反応停止溶液を添加し、HPLC で分析した。

耐熱性酵素による PET 分解反応

エッペンドルフチューブ中の 50 mM Bicine (pH9.0) バッファーに PET フィルム 1 枚を沈め(1.2 cm² mL⁻¹)、ボルテックスでよく混合し、スピンドウンした。その後、TfCut2、LCC を終濃度 500 nM となるように添加し(トータル 500 μ L)、30–70°C で 3 時間反応を行なった。反応後、反応停止溶液を加え、HPLC で分析した。

界面活性剤存在下での変異体 PETase による PET 分解反応

作製した各種変異体を用いて 0.005% C₁₄-OSO₃⁻存在下で 1 時間 PET 分解反応を行なった。PET 分解活性が著しく低下する変異体が存在したため、界面活性剤非存在下の反応は PETase の最適酵素濃度である 50 nM で行った。界面活性剤存在下の反応は、野生型と同様に 500 nM で行った。

HPLC による分析

LC-2010A HT に Cosmosil 5C18-AR-II guard column および Cosmosil 5C-18 ARII を装着した。展開溶媒(70% MilliQ, 20% acetonitrile, 10% formic acid)を流路に充填し、カラム温度 40°C、流速 1 mL/min、波長 254 nm として分析を行った。分解産物である TPA、MHET、BHET は、検量線を作製し、定量した。

TPA、MHET、BHET の検量線

検量線を作成するため、各種濃度の TPA(0.00025, 0.0005, 0.05, 0.05, 0.1 mM) および BHET、MHET (0.001, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 mM)溶液を作製した。TPA は溶解

度が低いため、0.2 M NaOH に 5 mM となるように溶かしたのち展開溶媒で希釈して調製した。BHET はペレット、乳鉢、乳棒を用いて粉碎し、蒸留水に終濃度 10 mM となるように蒸留水に添加した。その後展開溶媒で希釈して調製した。

MHET は、BHET を PETase で加水分解することで調製した。反応溶液(50 mM MES, 10 mM BHET, pH7.0)に終濃度 1 μ M となるように PETase を添加し、30°C で 1 時間インキュベートした。その後限外濾過によって PETase を取り除き、MHET 溶液を獲得した。作製した MHET 溶液には、一部 BHET と TPA を除いた MHET 濃度(10 mM - (TPA 濃度+BHET 濃度))を定量した。その後、展開溶媒で希釈し各濃度に調製した。

界面活性剤の水溶液基質加水分解反応への影響

Para-nitrophenyl butyrate(*p*NPB)を終濃度 10 mM となるように dimethyl sulfoxide (DMSO)に溶解した。続いて、DMSO に溶解させた *p*NPB を終濃度 100 μ M となるように pH9.0 50 mM Bicine バッファーに溶解させた。ここに、各界面活性剤 (C_{11} -OSO₃⁻- C_{14} -OSO₃⁻、 C_{12} -N(CH₃)₃⁺)をそれぞれの至適濃度条件となるように添加した。最後に、PETase を終濃度 500 nM となるように添加し、反応を開始した。また、界面活性剤を添加していない条件でも同様の実験を行い、界面活性剤の有無による活性を比較した。*p*NPB が加水分解されると 415 nm で吸収極大を持つ *p*-nitrophenol に変化するため、反応活性は反応開始から 20 秒間、415 nm での吸光度測定によって定量した。

酵素吸着量と活性の比較

アニオン性界面活性剤である C_{11} - C_{14} -OSO₃⁻、カチオン性界面活性剤である C_{12} -N(CH₃)₃⁺を添加した条件で 1 時間のプレインキュベート後、1 時間反応を行なった。反応後、PET フィルムをピンセットで取り出し、MilliQ で軽くゆすぎ、65°C のインキュベーター内でフィルムを乾燥させた。乾燥したフィルムに、5% SDS を含むバッファーを 20 μ L 添加し、フィルムに吸着している酵素を解離させた。解離させた酵素を含むバッファーを遠心分離によって集め、SDS-PAGE した。泳動後、ゲルを CBB stain one で染色したのち、蒸留水で脱色した。この際、並行して同一の条件で PET 分解活性を測定した。

SDS-PAGE によって得られたゲルの画像をスキャナーで取り込み、取り込んだ画像を 32 bit に変換したのち、バックグラウンドを取り除いた。分離されたバ

ンド強度を ImageJ で定量し、酵素活性と比較することで相関関係があるか否かを検討した。

酵素吸着量の定量と活性との相関関係

最適反応条件である 0.005% C_{14} -OSO₃⁻存在下で、酵素濃度を 100、250、500、1000、1500 nM として PET 分解反応を行なった。また、その時、反応時間は 10、30、60、120、240 分とした。それぞれの反応後、PET フィルムより吸着した酵素を溶出し、SDS-PAGE で分離した。この時、既知の濃度の BSA 溶液(0.05、0.25、0.5 μg)を流し、バンド強度と BSA 濃度からそれぞれのゲル中で検量線を作製した。そして得られた検量線から吸着した酵素量を定量した。また、並行して、それぞれの条件で酵素活性を測定した。

界面活性剤存在下での長時間反応

0.005% C_{14} -OSO₃⁻存在下で 30°C、1 時間インキュベートしたのち、PETase を終濃度 1 μM となるように添加し、反応を開始させた。その後、1、3、6、9、12、18、24、36 時間反応させた。反応は、反応溶液 10 μL に反応停止溶液 490 μL を加えることで停止させた。

反応終了後の PET フィルムを回収し、5%SDS 溶液、蒸留水の順で洗浄し、65°Cで 1 時間乾燥させた。その後、乾燥させた PET フィルムを半分に切断し、その断面を倒立顕微鏡で観察した。フィルムの断面を撮影し、撮影した断面の厚さを、ピクセルサイズとスケールバーを基に測定した。

第 2 章 界面活性剤の添加と変異導入による耐熱性 PET 分解酵素の活性改善

遺伝子構築

第 1 章で作製した TfCut2 のプラスミドをそのまま利用した。

変異導入に用いたプライマーは表 4-5 に示す。

表 4-5. 使用した TfCut2 用プライマーの配列

G62A forward	5'-GGCTATA CCGCA ACTGAGGCC-3'
G62A reverse	5'-GGCCTCAGTT GCGG TATAGCC-3'
H129A forward	5'-GCGGTAATGGG CGCG TCCATGGGT-3'
H129A reverse	5'-ACCCATGGAC CGCG CCCATACCGC-3'
H129W forward	5'-GCGGTAATGGG CTGG TCCATGGGT-3'
H129W reverse	5'-ACCCATGGAC CCAG CCCATACCGC-3'
F209A forward	5'-GGCGCTACGCAC GCTG CGCCTAAT-3'
F209A reverse	5'-ATTAGG CGC AGCG TGCGTAGCGCC-3'
F209S forward	5'-GGCGCTACGCAC AGTG CGCCTAAT-3'
F209S reverse	5'-ATTAGGCGC ACTGT GCGTAGCGCC-3'
F209L forward	5'-TGCGCTACGCAC CTGG CGCCTAATA-3'
F209L reverse	5'-CGGGATATTAGGCGCC AGGT GCGTAG-3'
F209V forward	5'-TGCGCTACGCAC GTGG CGCCTAATA-3'
F209V reverse	5'-CGGGATATTAGGCGCC ACGT GCGTAG-3'
F209W forward	5'-GGCGCTACGCA CTGGG CGCCTAAT-3'
F209W reverse	5'-ATTAGGCGCC CCAGT GCGTAGCGCC-3'

TfCut2 の発現、精製

野生型 TfCut2 および G62A/F209A 変異体を除く変異体の精製は、第 1 章と同様に行なった。

TfCut2 (G62A/F209A) の発現、精製

培養は TfCut2 と同様に行ない、培養した菌体を遠心分離(4°C, 10,000 rpm, 10 min)で回収した。酵素は培養上清中に存在するため、培養上清のみを回収した。回収した培養上清は、透析溶液(20 mM Tris-HCl, pH8.0)で終夜透析し、培地成分を取り除いた。透析した溶液は TfCut2 と同様に精製、透析した。

基質(PET)の調製

第 1 章と同様に行なった。

界面活性剤の調製

第 1 章と同様に行なった。

TfCut2 による PET 分解反応

エッペンドルフチューブ中の 50 mM Bicine (pH9.0、10 mM CaCl₂) バッファーに PET フィルム 1 枚を沈め(1.2 cm² mL⁻¹)、ボルテックスでよく混合し、スピンドウンした。その後、TfCut2 を、終濃度 1 μM となるように添加し(トータル 500 μL)、40–70°C で 3 時間反応を行なった。反応後、反応停止溶液を加え、HPLC で分析した。

HPLC による分析、TPA、MHET、BHET の検量線

第 1 章と同様に行なった。

界面活性剤存在下での野生型 TfCut2 および変異体による PET 分解反応

エッペンドルフチューブ中の 50 mM Bicine (pH9.0、10 mM CaCl₂) バッファーに PET フィルム 1 枚を沈め(1.2 cm² mL⁻¹)、界面活性剤を各濃度で添加した。その後ボルテックスでよく混合し、スピンドウンし、40–70°C で 1 時間インキュベートした。インキュベート後、TfCut2 を、終濃度 1 μM となるように添加し(トータル 500 μL)、40–70°C で 3 時間反応を行なった。反応後、反応停止溶液を 500

μL 加え、HPLC で分析した。

界面活性剤の水溶液基質加水分解反応への影響

第 1 章と同様にして行なった。

酵素吸着量の確認

40–65°Cの条件において、各温度で最適化した界面活性剤存在下または非存在下で 3 時間反応を行なった。70°Cでの反応は、界面活性剤添加時に活性が低下していたため行わなかった。反応後、PET フィルムをピンセットで取り出し、MilliQ で軽くゆすぎ、65°C のインキュベーター内でフィルムを乾燥させた。乾燥したフィルムに、5% SDS を含むバッファーを 20 μL 添加し、フィルムに吸着している酵素を解離させた。解離させた酵素を含むバッファーを遠心分離によって集め、SDS-PAGE した。泳動後、ゲルを CBB stain one で染色したのち、蒸留水で脱色した。

界面活性剤存在下での野生型 TfCut2 および変異体による長時間反応

長時間反応においては、pH の酸性化を防ぐため、バッファー濃度を 50 から 150 mM に変更した。150 mM Bicine (pH9.0、10 mM CaCl₂)、65°C、0.003% C₁₂-N(CH₃)₃⁺存在下または非存在下で 1 時間 PET フィルムをインキュベートした。その後終濃度 1 μM となるように酵素を添加し(トータル 500 μL)、65°Cで 3、8、24、48 時間 (野生型 TfCut2)または 3、6、12、24、30、36、48 時間(TfCut2 G62A/F209A)反応させた。反応終了後、10 μL の反応溶液を別のチューブに移し、490 μL の反応停止溶液を加え、HPLC で分析した。

重量減少率の計算に関しては、1 枚の PET フィルムから生成される分解産物量を基に計算した。500 μL の 2M NaOH に 1 枚の PET を加え、100°Cで 5 日間インキュベートすることで完全に分解させた。この反応溶液 5 μL を反応停止溶液 995 μL で希釈し、HPLC で分析した。生成された TPA は 84 mM であり、これをもとに重量減少率を算出した。

長時間反応におけるバッファー濃度および反応ボリュームの影響

1 枚の PET フィルムを 500 μL の 250mM Bicine (pH9.0、10 mM CaCl₂、0.003% C₁₂-N(CH₃)₃⁺)中に沈め、65°Cで 1 時間インキュベートした。その後

TfCut2 G62A/F209A を加え、さらに 24 時間反応を行なった。反応終了後、10 μL の反応溶液を別のチューブに移し、490 μL の反応停止溶液を加え、HPLC で分析した。

並行して、1 枚の PET フィルムを 300、500、1000 μL の 150mM Bicine (pH9.0、10 mM CaCl_2 、0.003% $\text{C}_{12}\text{-N}(\text{CH}_3)_3^+$) 中に沈め、65°C で 1 時間インキュベートした。その後 TfCut2 G62A/F209A を加え、3、6、12、24、30、36、48 時間反応を行なった。反応終了後、10 μL の反応溶液を別のチューブに移し、490 μL の反応停止溶液を加え、HPLC で分析した。

高結晶性 PET の分解反応

1 枚の高結晶性 PET フィルムを 500 μL の 50mM Bicine (pH9.0、10 mM CaCl_2 、0.003% $\text{C}_{12}\text{-N}(\text{CH}_3)_3^+$ 存在下または非存在下で 65°C において 1 時間インキュベートした。その後野生型 TfCut2 または TfCut2 G62A/F209A を加え、3 時間反応させた。反応後、反応停止溶液を 500 μL 加え、HPLC で分析した。

用いた統計

全ての有意差検定は Student's t-test を用いた。等分散であるとして、両側検定を行った。

公刊論文目録および口頭発表目録

定期刊行誌掲載論文(主論文に関連する原著論文)

- (1) M. Furukawa, N. Kawakami, K. Oda, K. Miyamoto, Acceleration of Enzymatic Degradation of Poly(ethylene terephthalate) by Surface Coating with Anionic Surfactants. *ChemSusChem* 2018, 11, 4018–4025.
- (2) M. Furukawa, N. Kawakami, A. Tomizawa, K. Miyamoto, Efficient Degradation of Poly(ethylene terephthalate) with *Thermobifida fusca* Cutinase Exhibiting Improved Catalytic Activity Generated using Mutagenesis and Additive-based Approaches. *Sci. Rep.* 2019, 9, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52379-z>.

国際会議発表

- (1) M. Furukawa, N. Kawakami, K. Miyamoto, Acceleration of Enzymatic Degradation of Poly(ethylene terephthalate) by Coating its surface with Anionic Surfactants, 9th International Congress on Biocatalysis, Germany, August, 2018.

国内学会発表

- (1) 古川 洵, 川上了史, 宮本憲二, 添加物存在下での固体基質の酵素的分解反応, 第 18 回生体触媒化学シンポジウム, 東京都, 2016 年 12 月.
- (2) 古川 洵, 川上了史, 宮本憲二, 両親媒性分子の添加による poly(ethylene terephthalate)分解反応の加速, 第 1 回慶應ライフサイエンスシンポジウム, 神奈川県, 2017 年 8 月.
- (3) 古川 洵, 川上了史, 宮本憲二, 両親媒性分子の添加による poly(ethylene terephthalate)分解反応の加速, 第 19 回生体触媒化学シンポジウム, 長崎県, 2017 年 12 月.
- (4) 古川 洵, 川上了史, 宮本憲二, Acceleration of Enzymatic Degradation of Poly(ethylene terephthalate) by Surface Coating with Anionic Surfactants, 日本化学会 第 98 春季年会, 千葉県, 2018 年 3 月.
- (5) 古川 洵, 川上了史, 宮本憲二, Poly(ethylene terephthalate)の効率的酵素分解法の開発, 第 13 回学生発表討論会, 東京都, 2018 年 10 月.
- (6) 古川 洵, 川上了史, 宮本憲二, Efficient Enzymatic Degradation of Poly(ethylene terephthalate) Using Amphiphilic Molecules, The 20th Biocatalysis Symposium of Japan, 神奈川県, 2018 年 12 月.

- (7) 古川 洵, 川上了史, 富沢温, 宮本憲二, Development of a novel method for accelerating the enzymatic degradation of poly(ethylene terephthalate), 日本農芸化学会 2019 年度大会, 東京都, 2019 年 3 月.
- (8) 古川 洵, 川上了史, 富沢温, 宮本憲二, 耐熱性酵素を用いた効率的 poly(ethylene terephthalate)分解反応系の開発, 第 21 回生体触媒化学シンポジウム, 石川県, 2019 年 8 月.
- (9) 古川 洵, 川上了史, 富沢温, 宮本憲二, 耐熱性酵素を利用した効率的な poly(ethylene terephthalate)分解反応, 第 14 回学生発表討論会, 東京都, 2019 年 11 月.

その他

- (1) M. Furukawa, N. Kawakami, K. Miyamoto, Development of a Novel Method for Efficient Enzymatic Degradation of Poly(ethylene terephthalate) Using Amphiphilic Molecule, The 4th Joint Conference Keio & Kaohsiung Medical University, Kaohsiung, Taiwan, September, 2019.

謝辞

本研究は、学部から博士課程まで 5 年間、慶應義塾大学理工学部教授 宮本憲二博士の御指導、御鞭撻のもとおこなってきました。ご多忙の中、丁寧な指導と不自由のない研究環境を整えて頂いたことに、心より御礼申し上げます。

慶應義塾大学理工学部専任講師 川上史博士には、研究方針の議論や論文の執筆等で多大な指導を頂き、研究者としての基礎を教えて頂きました。また、研究以外でも一人の人間として多くのことを学ばせて頂きました、心より御礼申し上げます。

副査として本研究に対して適切なお助言とご指導をいただきました、慶應義塾大学理工学部教授 岡浩太郎博士、佐藤智典博士、土居信英博士に、心より御礼申し上げます。

研究室生活において日々競い合い、励ましあっただけではなく、私生活でも非常にお世話になりました、浅野 壮澄修士、近藤 宏 紀修士、平山 莉帆学士、堀内 祐貴修士、南口 智宏修士に深く感謝致します。

本研究を行うにあたり、良き先輩として指導いただきました黄 穎修士、加納 満大修士、五十嵐 康輔修士、佐々木 槇子修士、逸見 莉沙修士、門間 玲奈修士に深く感謝致します。

後輩として、研究室生活をより楽しいものとしてくださった今井 惟 学士、江川 夏子修士、関田 美沙修士、早坂 薫修士、松澤 祐樹修士、山口 紘武修士、大石 悠起子学士、寺家 大輔学士、富沢 温学士、那須 英里圭学士、大原 直也学士、坂田 陸郎学士、砂子 望学士、林 慶一学士、山田 浩平学士、安達 拓君、本村 壮太君、松木 理紗さん、三井 菜々子さん、山下 舞佳さんに深く感謝致します。

共に博士課程に進学し、多くの苦楽を共有してきた院田 雅裕修士、佐藤 裕太修士、杉浦 健太修士、徳岡 雄大修士をはじめとする同期の方々

に深く感謝いたします。

学部より共に学び、遊び、多くの時間を共にしてきた生命情報学科の同期の方々に深く感謝いたします。

最後に、研究生生活に集中させて頂き、サポートして頂いた、父 勝行、母 香代子、兄 悟に心から感謝します。