# プラスチック資化細菌の環境適応戦略

吉田　昭介
（慶應義塾大学 理工学部／現所属：京都大学大学院 工学研究科）

## 研究の目的

ポリエチレンテレフタレート (PET)は PET ボトルの素材として知られる極めて安定な物質であり、生分解を受けないとされてきた。京都工芸繊維大学の小田らは自然環境中からの探索研究の結果、世界に先駆けて PET を単独で完全分解する新種の菌株 *Ideonella* sp. No.201-F6 株を単離することに成功した。この発見により、本菌がいかにしてこの天然には存在しない物質である PET を資化する能力を獲得したのか興味が持たれた。本研究では No. 201-F6 株のゲノム情報を解読し、その環境適応能力を酵素学的な視点で明らかにすることを目的とした。

## 方法

(1) *Ideonella* sp. No. 201-F6 株の全ゲノム解析

No. 201-F6 株を栄養培地で培養し、ゲノム DNA を抽出した。このゲノム DNA をアコースティックソルビライザー（コバリス社）により、断片化し、Paired-End Sample preparation kit（イルミナ社）により次世代シーケンス用サンプルを調製した。次世代シーケンスは Genome Analyzer IIx（イルミナ社）を用い、シングルリードで 80 塩基を解読した。得られたリードのアッセンブルは CLC Genomics Workbench（CLC bio 社）を用いて行った。遺伝子のアノテーションは RAST サーバー上で行った。

(2) PET 分解酵素の探索

推定遺伝子から、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 in silico で探索した。また、これまでに PET を副次的に分解すると報告されているクチナーゼ遺伝子[1][2][3]のホモログ探索を行った。

(3) 組み換え型酵素の機能解析

ORF2645 遺伝子を大腸菌での発現用にコドンを最適化したものを合成し、pET21-b(+)ベクターに組み込んだ。これを大腸菌 BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL 株（Agilent 社）に導入し、タンパク質の発現を行った。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。PET 分解アッセイには、基質として、PET フィルム、Bis (2-Hydroxyethyl) Terephtalic Acid (BHET)、*para*-nitorophenyl (*p*NP)-butyrate を用いて評価した。

## 結果

(1) *Ideonella* sp. No. 201-F6 株の全ゲノム解析

次世代シーケンスにより、約 5100 万リード（平均長 74.9 塩基）を得た。そして、denovo assembly の結果、93,997 塩基（最長）～187 塩基（最短）から構成される 2892 の contig 配列を得た。さらに RAST サーバーによる遺伝子アノテーションの結果、3960 個の遺伝子を同定した。これは、近縁種のゲノム上の遺伝子と同水準であり、No. 201-F6 株の遺伝子の多くを同定できたと考えられる。

(2) PET 分解酵素の探索

3960 個の遺伝子から、42 個の推定エステラーゼ、8 個の推定リパーゼが見つかった。推定リパーゼのうち一つ（ORF2645 タンパク質）は *Thermobifida fusca* 由来クチナーゼと 51%の相同性があることが分かった。また、ORF2645 タンパク質は *Acidovorax delafiedii* 由来 PBSA (Poly{(tetramethylene succinate)-co-adipate}) depolymerase [4]と最も近縁（相同性 82%）であることが分かった。PBSA は生分解性のある脂肪酸ポリエステルである。

(3) 組み換え型酵素の機能解析

精製 ORF2645 タンパク質を PET フィルムとインキュベートしたところ、経時的にフィルム表面のひびの増加が認められた。電子顕微鏡で観察したところ、フィルム表面にクレーター状のくぼみが認められた（図 1）。また、精製 ORF2645 タンパク質は BHET を加水分解し、Mono(2-Hydroxyethyl) Terephtalic Acid を生成することが分かった。分解速度は 6.3 回転 ($s^{-1}$)であった。*p*NP-butyrate に対しては 30 回転 ($s^{-1}$)の分解活性を示した。

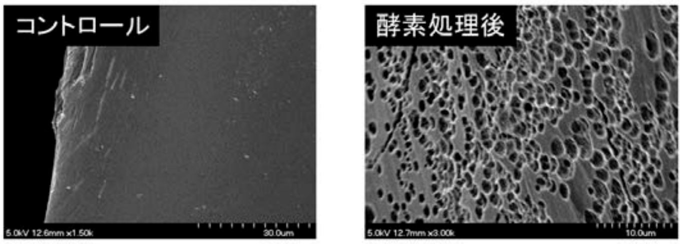


図1 ORF2645タンパク質によるPETフィルム表面の分解（走査型電子顕微鏡写真）

## 結論

本研究により、PET 資化菌 *Ideonella* sp. No. 201-F6 株の生産する PET 加水分解酵素を同定することができた。本酵素が現在知られている PET 分解性のクチナーゼとの相同性は 50%程度と低く、新規性が高い。現在、本酵素の詳細な機能解析を進めているところである。また、次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析（RNA-Seq 解析）により、本株より更なる PET 分解酵素の探索を試みている。

## 文献

1） S. Sulaiman, S. Yamato, E. Kanaya, J.-J. Kim, Y. Koga, K. Takano, and S. Kanaya, (2012) Isolation of a novel cutinase homolog with polyethylene terephthalate-degrading activity

from leaf-branch compost by using a metagenomic approach. *Appl. Environ. Microbiol.* **78:** 1556–62.

2） R.-J. Müller, H. Schrader, J. Profe, K. Dresler, and W.-D. Deckwer, Enzymatic Degradation of Poly(ethylene terephthalate): Rapid Hydrolyse using a Hydrolase from *T. fusca*, (2005). *Macromol. Rapid Commun.* **26:** 1400–1405.

3） A. Eberl, S. Heumann, T. Brückner, R. Araujo, A. Cavaco-Paulo, F. Kaufmann, W. Kroutil, and G. M. Guebitz, (2009) Enzymatic surface hydrolysis of poly(ethylene terephthalate) and bis(benzoyloxyethyl) terephthalate by lipase and cutinase in the presence of surface active molecules. *J. Biotechnol.* **143:** 207–12.

4） H. Uchida, Y. Shigeno-Akutsu, N. Nomura, T. Nakahara, T. Nakajima-Kambe, (2002) Cloning and Sequence Analysis of Poly (tetramethylene succinate) Depolymerase from *Acidovorax delafieldii* Strain BS-3. *J. Biosci. Bioeng.* **93:** 245-247