

海洋漂着 PET プラスチック問題の鍵： 高度好塩菌と耐塩化酵素が切り拓く新たな分解法

八波 利恵

東京科学大学 生命理工学院

研究の目的

近年、海洋環境におけるプラスチックごみ汚染が地球規模で問題となっている。海洋環境に流出したプラスチックごみは、海水より比重の重いものは直ちに沈下して、海底に蓄積される。一方、ポリエチレンテレフタレート（PET）などの比重の軽いプラスチックごみはしばらく海上を漂ったあぐく一部は海岸に打ち上げられ、塩が付着した漂着プラスチックごみとなる。その後、紫外線により劣化してマイクロプラスチック化し、海洋に沈降していく。この漂着プラスチックごみは、回収後埋め立てあるいは、焼却処理される。しかしながら、埋め立てた場合にはごみに付着した塩が公共用水域に高濃度の塩化物イオンとして排出され、焼却の場合には塩化水素が発生し、焼却炉の劣化を引き起こしたりしている。

2016 年、*Ideonella sakaiensis* 201-F6 株より PET 分解酵素 (PETase) が発見され¹⁾、バイオリサイクルに向けて大きな期待が寄せられている。PETase は、PET をモノヒドロキシエチルテレフタレートへと加水分解する (Fig. 1)。また、*I. sakaiensis* は、PETase の他に、PET を加水分解して生じる MHET を分解する酵素 MHETase も有しており、両酵素が機能することで PET の完全分解を行なっている²⁾。しかしながら、漂着プラスチックごみには、塩が付着している (= 高濃度の塩を含む) ため、非耐塩性酵素である PETase では分解できない。また、PETase の反応至適温度は 40°C であり、耐熱性が低いことも産業利用における問題として挙げられている。そこで本研究では、塩付着プラスチックごみを分解する新規耐塩化 PETase を開発し、当該酵素を用いて PET を分解することを目的とした。

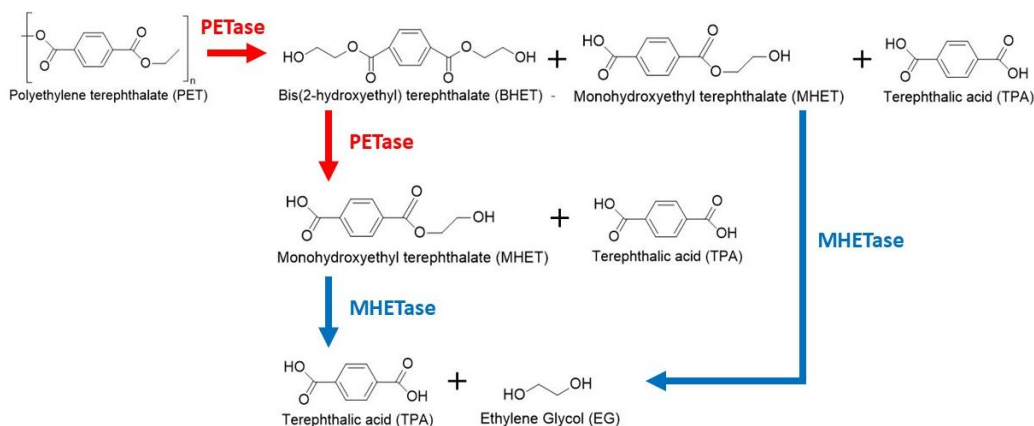


Fig. 1 PETase および MHETase による PET の分解

方法

野生型および変異型 PETase は、それぞれの発現型プラスミドを大腸菌に形質転換し、得られた形質転換体から組換え型酵素を精製することで調製した。組換え PETase の酵素活性は、酵素を pH 7.0 において 0-5.0 M の各 NaCl 濃度下で基質（酪酸 *p*- ニトロフェニル）と 30℃ で 30 秒間反応させ、415 nm で吸光度を測定することで評価した。野生型 PETase の溶媒露出度の算出は、タンパク質モデリングソフトを用いて行った。

結果

1. 野生型 PETase の性質検討

野生型 PETase の塩存在下での活性の有無を調べるため、精製酵素標品を用いて 0-5.0 M の各 NaCl 濃度条件下で基質と反応させ、活性を測定した。その結果、野生型 PETase は、0.5 M NaCl 存在下で最も高い活性を示した。また、3.0 M NaCl 存在下まではある程度活性を維持したが、4.0 M NaCl 存在下から急激に活性が低下した。次に、野生型 PETase の塩存在下における安定性を調べるため、0-5.0 M の各 NaCl 濃度条件下で 24 時間インキュベートした後、基質と反応させ活性を評価した。その結果、本酵素は高塩濃度下でのインキュベーションに伴い活性が低下し、5.0 M NaCl 存在下では最大活性の 4 割程度となった。これより本酵素は、高塩濃度下での耐塩性が低いことが明らかとなった。

2. 新規耐塩化 PETase の開発

高塩濃度下でも活性を有し、安定性が高い PETase を取得するため、新規耐塩化 PETase を開発することとした。その際、1) 耐塩性エステラーゼの基質特異性改変による耐塩化 PET 分解酵素の創出、および、2) PETase の耐塩性付与による耐塩化 PETase の創出、を行うこととした。

1) 耐塩性エステラーゼの基質特異性改変による耐塩化 PET 分解酵素の創出

プラスチックは脂肪族がエステル結合で高分子化したものである。そのため、PET 分解酵素はリパーゼやエステラーゼが進化したものと推定されており、プラスチックを分解するリパーゼやエステラーゼも報告されている³⁾。既に当研究室において高度好塩性アーキアの一種である *Haloarcula japonica* より耐塩性エステラーゼの取得および性質検討がなされている⁴⁾。そこで、本酵素を PET 分解に応用することを目指し、まず *H. japonica* のプラスチック資化能を調べた。その結果、本菌はプラスチックを唯一の炭素源として生育できないことがわかった。そこで、耐塩性エステラーゼに対し変異導入を行い、PET を分解する耐塩化 PETase の開発を行うこととした。現在、変異型 PETase のスクリーニング系を構築しているところである。

2) PETase の耐塩性付与による耐塩化 PETase の創出

耐塩化 PETase の創出ため、組換え型 PETase にアミノ酸置換を導入した変異型 PETase を作製することとした。既報により、好塩菌由来耐塩性タンパク質は分子表面に多量の酸性アミノ酸を有し、かつ塩基性アミノ酸が少ないことがわかっている⁵⁾。そこで、本酵素の耐塩性を向上させるために、本酵素の分子表面に酸性アミノ酸を導入する、あるいは塩基性アミノ酸を削除することとした。まず、本酵素が有するアミノ酸の溶媒露出度を算出し、その露出度が高いアミノ酸をアスパラギン酸へと置換した複数の変異型酵素を作製した。

各種変異型 PETase の塩存在下での活性の有無を調べるため、0 - 5.0 M の各 NaCl 濃度条件下で基質と反応させ、活性を測定した。その結果、32 番目のアルギニンのアスパラギン酸に置換した変異型酵素は 3.0 M NaCl の際に最大活性を示し、4.0, 5.0 M NaCl といった高塩濃度下でも野生型酵素より高い活性を示すことがわかった。

結論

塩付着プラスチックごみを分解する酵素の取得を目的とし、新規耐塩化 PETase の取得を試みた。既報の PETase に対し部位特異的変異導入を行うことで、至適塩濃度が上昇し、高塩濃度下での耐塩性が向上した変異型酵素を取得することに成功した。今後は、塩存在下における PET フィルムに対する変異型 PETase の活性を調べる予定である。本研究により、PETase に対し部位特異的変異導入することで耐塩化 PETase の取得が可能であり、この耐塩化酵素を用いることで塩付着プラスチックごみの完全分解達成への可能性が見出された。

文献

- 1) Yoshida, S., Hiraga, K., Takehana, T., Taniguchi, I., Yamaji, H., Maeda, Y., Toyohara, K., Miyamoto, K., Kimura, Y., and Oda, K. (2016) A bacterium that degrades and assimilates poly (ethylene terephthalate). *Science*. **351**: 1196-1199.
- 2) Hachisuka, S.-I., Nishii, T., and Yoshida, S. (2021) Development of a targeted gene disruption system in the poly (ethylene terephthalate)-degrading bacterium *Ideonella sakaiensis* and its applications to PETase and MHETase genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **87**: e0002021.
- 3) Chen, C.-C., Han, X., Ko, T.-P., Liu, W., and Guo, R.-T. (2018). Structural studies reveal the molecular mechanism of PETase. *The FEBS Journal*, **285**: 3717–3723.
- 4) Kato, K., Ambai, S., Ikeda, F., Abe, K., Nakamura, S., and Yatsunami, R. (2025). Characterization of a family IV esterase from the extremely halophilic archaeon *Haloarcula japonica*, *Extremophiles*, **29**:7.
- 5) Mevarech, M., Frolow, F., and Gloss, L. M. (2000) Halophilic enzymes: proteins with a grain of salt. *Biophys. Chem.*, **86**: 155-164.