

プラスチック分解酵素の高機能化を目指したアンカーペプチド評価法の開発

1. まえがき

プラスチックは世界経済において不可欠な役割を示している。高い耐久性と化学的および微生物的分解に対する耐性により無数の用途に理想的な材料になるが、環境中の残留性汚染物質でもある。過去65年(1950から2015年)のデータでは、83億トンもの高分子材料が生産され使用されます。そのうちのわずか9%の6億トンがリサイクルされ、12%の8億トンが焼却、78%の49億トンが廃棄されていると示されている。リポリエチレンテレフタレート (PET)は、最も広く応用されている合成ポリマーの一つであり、PETは生産量に対する廃棄量から廃棄率が97%と言われている。つまり、使用期間が短く、生産したものはほとんど廃棄されていることになる。また、PETの骨格には芳香族基が存在し、それが高い化学的不活性と環境安定性につながる。したがって、PET廃棄物は環境に深刻な負荷をかけている。バイオプロセスは持続可能なプラスチックリサイクルの有望な手段であると示されている。近年、安定性や活性を高めた加水分解酵素を設計するために、多くの研究が行われている。その中でも分解酵素のプラスチックに対する親和性が、その活性にとって非常に重要であることが示されている。様々なPET分解酵素の基質に対する親和性の低さが大きな課題となっている。親和性を高める方法として、基質結合モジュールやアンカーペプチド(疎水性表面ペプチド)、疎水性タンパク質などが注目されている。これらのドメインにより酵素が基質表面への結合を促進し、酵素の活性向上が可能であることが明らかになっている。Liuらの研究では、基質結合タンパク質であるダーマセプチンSI (DSI)と*Thermobifida fusca*由来のPET分解酵素であるクチナーゼ(Tfuc2)によって構築された融合タンパク質がPETの分解効率をTfuc2のみの条件と比べ、22.7倍に向上させることが報告されている。²⁾ Dorisらの研究では、基質結合モジュールである*Hypocrea jecorina*由来のセロバイオヒドロラーゼI (CBM)と*Thermomyces cellulosylitica*由来のPET分解酵素であるクチナーゼ(The_Cut1)によって構築された融合タンパク質および*Alcaligenes faecalis*由来のポリヒドロキシアルカノエートデポリマーゼ(PBM)とThe_Cut1によって構

日大生産工(院) 小林 佑良、吉宗 一晃
築された融合タンパク質がPETの分解効率をThe_Cut1のみの条件と比べ、それぞれで1.4倍、3.8倍に向上させることが報告されている。³⁾ したがって、基質結合モジュールやアンカーペプチド(疎水性表面ペプチド)は合成ポリマー上での酵素の最適な活性を設計する試みに役立つ。

アンカーペプチドとDNA結合タンパク質についての研究を行った。アンカーペプチドはHWGMWSYを用いた。このアンカーペプチドは既存の研究においてポリスチレン(PS)に結合することが報告されている。⁴⁾ DNA結合タンパク質は*Escherichia coli* JM109由来の二本鎖DNA結合タンパク質TraMを用いる。TraMに結合した発現ベクターの配列を読むことで、PETに結合したアンカーペプチドの配列を特定することができる。この手法が可能であれば、プラスチック分解酵素の高機能化を目的とするアンカーペプチドの結合性を評価することができる。

本報告では、既存のものよりPETに高い親和性を有するアンカーペプチドの探索を試みた。

2. 実験方法および測定方法

2-1 TraM 遺伝子及び HWGMWSY-TraM (anchor-TraM)遺伝子の増幅

大腸菌 *Escherichia coli* JM109 の TraM 遺伝子 (384 bp)を増幅するためのプライマーおよび anchor-TraM 遺伝子 (417 bp)を増幅するためのプライマーを作成した。クローニングは、Champion™ pET Directional TOPO® Expression Kits (Invitrogen, Carlsbad California USA) を用いた。挿入遺伝子の方向性を決めるために5'末端にCACC配列を加えた。

2-2 発現プラスミドの構築

遺伝子の増幅は、PCRにより行った。DNAポリメラーゼはKOD-Plus-Neoを用いた。目的遺伝子の増幅をアガロース電気泳動で確認後、TOPO クローニングキットによりpET101にライゲーションした。反応液を穏やかに混合した後、室温で30分インキュベートした。その後、ライゲーション産物で*E. coli* JM109を形質転換し、その培養菌体からプラスミドを抽出した。

2-3 プラスミド抽出

JM109のコロニーを50 µg/ml アンピシリン含有 LB 培地 5 ml/試験管に植菌し、一晚 37°C で培養した。培養液を集菌し、ISOSPIN Plasmid((株)ニッポンジーン)を用いて、プラスミド抽出を行った。

2-4 TraM 及び anchor-TraM の発現

得られたプラスミドで *E. coli* BL21 (DE3) を形質転換した。*E. coli* BL21 (DE3) のコロニーを植菌し、培養した。その後、Isopropyl-β-D-1-Thiogalactopyranoside (IPTG) を 2 mM になるように添加して発現を誘導し、培養を 3 時間行った。遠心分離 (12000×g、10 min、4°C) で集菌し、氷上で菌体を超音波破碎した。遠心分離 (13500×g、10 min、4°C) して得られた上清を可溶性画分とした。SDS-PAGE によって発現の有無を調べた。

2-5 プラスチック結合実験

対象プラスチックとして PET ボトル、ポリエステル 100%濾過マット、発泡スチロールを用いた。これらのプラスチックは日常生活に存在している状態での結合の確認を行うため、結晶化度は変えずに行った。TraM および anchor-TraM を含む各可溶性画分に各プラスチックを浸した。一定時間後、各プラスチックを Tris-HCl (pH7.5) で一回洗浄し、TE (pH7.5) に浸した。加熱 (5 min、95°C) 及び遠心分離 (12000×g、10 min、室温) を行い、上清を用いて PCR を行った。増幅をアガロースゲル電気泳動で確認した。anchor-TraM においてバンドを確認することができれば、プラスチックにペプチドが結合していること及び TraM にプラスミドが結合していることが確認できる。

3. 実験結果および検討

3-1 TraM 遺伝子及び anchor-TraM 遺伝子の増幅

作成した TraM 遺伝子のプライマーおよび anchor-TraM 遺伝子のプライマー、DNA テンプレートとして *E. coli* JM109 のゲノム DNA を用いて PCR を行った。PCR 産物を用いてアガロースゲル電気泳動を行い、384 bp (TraM 遺伝子) および 417 bp (anchor-TraM 遺伝子) 付近にバンドを確認した。これにより二種の目的遺伝子が増幅されていることが確認できた。

3-2 発現プラスミドの構築

E. coli JM109 を形質転換し、培養菌体からプラスミドを抽出した。目的遺伝子の pET101 へのライゲーションの有無を確認するために T-7 プライマーを用いて PCR を行った。アガロースゲル電気泳動を行い、639 bp (TraM 遺伝子) および 672 bp (anchor-TraM 遺伝子) 付近にバンドを確認した。これにより、ライゲーションによって目的遺伝子が pET101 に挿入されたことが示唆された。

3-3 TraM 及び anchor-TraM の発現

発現プラスミドを有する *E. coli* BL21 (DE3) から得られたタンパク質溶液を用いて SDS-PAGE を行い、14 kDa (TraM) および 15.07 kDa (anchor-TraM) 付近にバンドが得られた。これにより二種のタンパク質が発現していることが確認できた。

3-4 プラスチック結合実験

各タンパク質溶液に対象プラスチックを浸した。アガロースゲル電気泳動を行ったが、各プラスチックにおいてバンドは確認できなかった。

4. まとめ

TraM 及び anchor-TraM の発現を SDS-PAGE によって確認できたが、プラスチックへの結合を確認することができなかった。アガロースゲル電気泳動を行ったため、プラスミドの有無の確認のみであった。タンパク質のみが結合している可能性があるため、プラスミドが TraM 及び anchor-TraM に結合していることを確認する必要がある。また、タンパク質にプラスミドが結合している場合、プラスチックにタンパク質が結合していないことから結晶化度が関与していると考え、結晶化度を下げた条件で行う必要がある。

参考文献

- 1) Roland, G. *et al.*, *Sci. adv.*, **2017**, 3(7), e1700782
- 2) Zhanzhi, L. *et al.*, *Enzyme Microb. Technol.*, **2022**, 156, 110004
- 3) Doris, R. *et al.*, *Biomacromolecules*, **2013**, 14(6), 1769-1776
- 4) Vodnik, M. *et al.* *Anal. Biochem.*, **2012**, 424(2), 83-86