

ポリエチレンテレフタート加水分解活性を示す
超好熱アーキア由来 α/β ヒドロラーゼスーパーファミリータンパク質の
組換え発現及び精製

日大生産工(院) 小林 佑良、吉宗 一晃

1. まえがき

プラスチックは我々の生活に必要不可欠であるが、非常に安定であるため環境中に蓄積し、地球環境に対する深刻な脅威となる。過去65年（1950から2015年）のデータでは、83億トンものプラスチックが生産され使用されている。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¹⁾。代表的なプラスチックであるポリエチレンテレフタート(PET)はテレフタル酸とエチレンジリコールが交互にエステル結合したポリマーである。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。このような背景から、より効率的かつ環境負荷の少ないプラスチック処理技術が求められており、従来のリサイクルに代わる選択肢として、生物学的手法（バイオリサイクル）への関心が高まっている。その一つが分解酵素である。近年PETを加水分解する常温細菌 *Ideonella sakaiensis* が報告され、そのゲノムからPETポリマー鎖を低分子にするPETase (*IsPETase*)が報告された²⁾。また、PETの物性が柔らかくなるガラス転移温度は75°C程度であり、これ以上の温度では酵素による分解効率が上がることも考えられる。このことから80°C以上の高温に至適生育温度を有する超好熱アーキアからPETase遺伝子の探索を試みた。PETaseは α ヘリックスと β シート構造からなる共通の立体構造を有する加水分解酵素である α/β ヒドロラーゼスーパーファミリーに属する。このファミリーはアミノ酸配列レベルで相同性は低いものの、共通の立体構造を有するため触媒する反応も似ている可能性がある。このことから *I. sakaiensis* 由来 PETase 遺伝子と相同性を有する Open reading frame (ORF)を80°C以上の高温に至適生育温度を有する超好熱アーキアから探索した。この結果、生育至適温度が約90°Cである *Pyrodictium delaneyi* のゲノムから α/β ヒドロラーゼスーパーファミリータンパク質と予想されるPETaseとアミノ酸レベ

ルで21%の相同性を有するORFを発見した。この酵素とアミノ酸レベルで相同性を有するORFの多くは超好熱アーキアに存在することから、超好熱アーキア由来 α/β ヒドロラーゼスーパーファミリータンパク質の多くはPETを高温で加水分解できる可能性がある。耐熱性の高い、多くのPETaseが得られれば、ガラス転移温度を超える温度で効率的なPETの酵素加水分解が可能となり、アルカリや有機溶媒を用いない、環境負荷の少ないPETのリサイクル技術が開発できる。本研究では、超好熱アーキアである *P. delaneyi* 由来のPET分解推定酵素 α/β hydrolaseの組換え発現及び精製を行った。また、*IsPETase*の組換え発現及び精製も行った。

2. 実験方法および測定方法

2-1 *IsPETase* 遺伝子及び α/β hydrolase 遺伝子の增幅

データベース検索により、超好熱アーキア *P. delaneyi* のゲノム上にPET分解推定酵素遺伝子である α/β hydrolase 遺伝子(879 bp)を見出した。まず、各遺伝子部位を增幅するためのプライマーを作成した。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。遺伝子の增幅は、Polymerase Chain Reaction (PCR)により行った。

2-2 アガロースゲル電気泳動

アガロースゲル電気泳動を用いて、増幅した目的遺伝子の塩基長を確認した。DNAマークターは、100 bp DNA Ladder (タカラバイオ(株))を用いた。PCR産物10 μ Lと6 \times Loading Buffer 2 μ Lをパラフィルム上でピペッティングして混合し、静かにウェルに流し入れ、電気泳動(100 V、40 min)した。電気泳動後、アガロースゲルをエチジウムプロマイド溶液に浸し、3 min振盪した。振盪後、撮影してバンドの確認を行った。

2-3 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 min インキュベートした。その後、ライゲーション産物で *Escherichia coli* TOP10 を形質転換し、その培養菌体からプラスミドを抽出した。

2-4 プラスミド抽出

E. coli TOP10 のコロニーを 50 μ g/ml アンピシリン含有 LB 培地 5 ml/試験管に植菌し、一晩 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。

2-5 組換え *IsPETase* および α/β hydrolase の生産、精製

LB 培地を作成し、オートクレーブ滅菌(120 °C、20 min)を行った。オートクレーブ済み 50 mg/ml アンピシリン含有 LB 培地 5 mL を入れた試験管に *E. coli* BL21(DE3)のコロニーを 1 個植菌し、37°C で 6 h 培養した。その後、50 mg/ml アンピシリン含有 LB 培地 500 mL に継代し、37°C で 18h 培養した。Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) を 1.0 mM になるように添加して発現を誘導し、2 時間培養を継続した。遠心分離(5000 \times g、20 min、4°C) で集菌し、菌体に Tris-HCl Buffer pH 8.0 を加えた。氷上で菌体を超音波破碎した。遠心分離 (12000 \times g、10 min、4°C) して得られた上清を可溶性画分とした。精製では TALON Metal Affinity Resin を用いて、固定化金属アフィニティクロマトグラフィーを行った。ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) によって発現の有無を調べた。

2-6 ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

SDS-PAGE を用いて分子サイズを決定した。分子量マーカーとして Protein Marker (ナカライテスク(株)) を用いて、電気泳動を行った。ゲルを CBB 染色液で 30 min 染色し、バンドが確認できるまで脱色した。

3. 実験結果および検討

3-1 *IsPETase* 遺伝子及び α/β hydrolase 遺伝子の増幅及び挿入

作成した *IsPETase* 遺伝子及び α/β hydrolase 遺伝子のプライマーを用いて 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、870 bp (*IsPETase* 遺伝子)および 879 bp (α/β hydrolase 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 TOP10 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、1025 bp (*IsPETase* 遺伝子)および 1034 bp (α/β hydrolase 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 *IsPETase* 及び α/β hydrolase 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、34.96 kDa (*IsPETase*) および 35.11 kDa (α/β hydrolase) 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。

4. まとめ

IsPETase 遺伝子及び α/β hydrolase 遺伝子の増幅及びベクターへの挿入がアガロースゲル電気泳動により確認された。また、*IsPETase* 及び α/β hydrolase の発現も SDS-PAGE により確認された。今後、得られた各酵素を用いて PET に対する分解能の評価を行う。また最適分解条件および安定化条件の決定も行う。

参考文献

- 1) Geyer, R. et al. *Science Advances*, 2017, 3(7), e1700782.
- 2) Yoshida, S. et al. *Science*, 2016, 351(6278), 1196–1199.