

研究終了報告書

「固相基質分解酵素複合体の分子設計基盤の確立」

研究期間：2020年12月～2023年3月

研究者：吉本 将悟

1. 研究のねらい

プラスチックやゴムといった高分子材料は我々の生活に不可欠であるが、ひとたび環境中に排出されると長期間にわたり残存し生態系へ大きな影響をもたらすため、また最近ではカーボンニュートラル実現に向けて、適切に処理する方法が求められている。近年、環境負荷の低い処理方法として、生体触媒(酵素)による分解が注目されている。例えば、日本で発見されたポリエチレンテレフタレート(PET)を炭素源として利用できる細菌 *Ideonella sakaiensis* 由来の酵素 PETase は元々難生分解性とされてきた PET を、*Arthrobacter* 由来の NylC はナイロンを常温常圧で加水分解できることが知られている。このような酵素による分解では高分子を最終的には原料となるモノマーに戻すことができるため、燃やしてエネルギーを回収するか破砕又は溶解して別の材料として利用するしかなかったこれまでの主要なリサイクル方法と異なる循環型のリサイクルとして期待されている。

しかし現状では、これらの酵素は分解速度が著しく遅い(または高濃度の酵素が必要)という問題がある。酵素による高分子材料の分解が遅い原因のひとつに、「酵素と固相基質の接触頻度の低さ」挙げられる。古くから自然界に存在する固相基質セルロースを分解する酵素セルラーゼはセルロースと結合する部位を持つうえ、中にはセルロソームとして複合体化することで酵素が基質の表面に局在化し高い分解能力を示すことが知られている。一方、生物にとって比較的新しい基質であるプラスチックやゴムを分解できる酵素にはこのような仕組みはない。従って、何らかの方法で高分子材料分解酵素を固相基質表面近傍に濃縮できれば、基質と酵素の接触頻度を高め分解速度を飛躍的に向上できると考えられる。

そこで本研究では、固相基質表面に対して親和性を示すタンパク質を酵素に連結して基質に対する結合性を付与するとともに、タンパク質工学により酵素を複合体化して高分子材料の表面近傍に酵素を濃縮することで、分解速度を飛躍的に向上することを試みる。その結果として、固相基質を高速分解するための酵素複合体の分子設計基盤を確立することが本研究の目的である。

2. 研究成果

(1) 概要

プラスチックやゴムなどの高分子材料はひとたび環境中に排出されると長期間にわたり残存するため、またカーボンニュートラルの観点からも、適切に処理する方法が求められている。近年、環境負荷の低い処理方法として生体触媒(酵素)による分解が注目されているが、分解速度が著しく遅いという問題がある。本研究では、基質に対する親和性を酵素に付与するとともに、酵素の複合体化を行うことで固相基質である高分子材料の表面近傍に酵素を濃縮



し、分解速度の向上を目指した。まず、接着性のタンパク質に SpyCatcher を、PET 分解酵素 LCC に SpyTag を付加したタンパク質を大腸菌細胞質でそれぞれ生産し、各種クロマトグラフィーにより精製した。これらを試験管内で混合することで両者を連結させ、接着タンパク質-LCC 連結体を構築した。連結体を用いて PET 分解試験を行ったところ、接着タンパク質と連結していない LCC に比べ PET 分解活性が低下することが明らかになった。続いて、SpyCatcher が 5 個つながったタンパク質を生産、精製し、SpyTag を付加した LCC を連結することで LCC が 5 個つながった酵素複合体を構築した。構築した酵素複合体を用いて PET 分解試験を行ったところ、複数個連結していない LCC に比べ PET 分解活性がわずかではあるが向上することが明らかになった。以上より、固相基質の分解速度向上に資する酵素複合体の設計に関する知見が得られた。また、領域内外の研究者と研究室相互訪問や実験技術に関する情報交換を行い、交流を深めた。本研究で得られたこれらの成果は、関連する独自のアイデアに基づく研究を加速・発展させるため基盤となるとともに、本領域が目指すバイオテクノロジー分野における新分野開拓や新価値創造に貢献することが期待される。

(2) 詳細

研究項目 1. 酵素への接着タンパク質連結による固相基質表面への濃縮と分解速度向上

1. 接着タンパク質-LCC 連結体の構築

現在報告されている PET 分解酵素の中で最も活性が高い未培養細菌由来の酵素 LCC に、SpyTag/SpyCatcher システムを用いて接着タンパク質を連結することを試みた。まず LCC に (EAAAK)₅ リンカーまたは (GGGS)₅ リンカーを介して SpyTag を付加したものと、接着タンパク質に SpyCatcher を付加したものを大腸菌細胞質でそれぞれ生産し、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーにより精製した。これらを試験管内で混合することで両者を連結させ、(EAAAK)₅ リンカーを用いたコンストラクトで接着タンパク質-LCC 連結体を構築することに成功した。さらにオンカラムで連結反応を行うことで、より純度の高い連結体を得られた。構築した接着タンパク質-LCC 連結体が本来のエステラーゼ活性を失っていないことは p-ニトロフェニル酢酸の分解試験により確認した。

2. 固相基質分解評価系の確立

PET 分解速度の評価系確立を目的として、PET フィルムを酵素処理した反応溶液に含まれる分解物を液相クロマトグラフィー (LC) で検出することを試みた。まず、PET フィルムの酵素分解産物である BHET (ビス-2-ヒドロキシエチルテレフタレート)、MHET (モノヒドロキシエチルテレフタレート)、TPA (テレフタル酸) のうち標品が市販されていない MHET を、BHET と LCC を混合して 42°C で 48 時間分解反応することで得た。濃度既知の BHET、MHET、TPA を C18 固定相、メタノール/リン酸緩衝液 (pH 2.5) (35:65) 移動相で分離し紫外吸光をモニタリングすることで、それらの検量線を作成した。次に、20 nM の LCC 溶液に PET フィルムを浸漬し 70°C で 1 日静置した。PET フィルムを取り除いた後限外ろ過により酵素を除去し、ろ液に含まれる PET 分解物を LC で分離、検出した。結果として、主生成物とされている MHET がメジャーピークとして得られた。

3. 接着タンパク質-LCC 連結体の PET 分解活性評価

構築した接着タンパク質-LCC 連結体を用いて、PET の分解試験を行った。方法としては、20 nM に調製した LCC 溶液に直径 6 mm の PET シートを入れ、70°C で 18 時間反応させた後、分解産物の主成分であるモノヒドロキシエチルテレフタレート (MHET) を HPLC により検出した。酵素を加えていない試料では MHET は検出されなかったが、接着タンパク質-LCC 連結体を加えた試料では MHET が検出され、PET 分解活性が見られた。一方、接着タンパク質を連結していない LCC を加えた試料では、より多くの MHET が検出された。続いて、接着タンパク質-LCC 間の自由度が分解活性に与える影響を調べるため、長さや柔軟性の異なるリンカー連結した接着タンパク質-LCC を複数構築した。同様に PET の分解試験を行ったところ、いずれのリンカーで連結した接着タンパク質-LCC も接着タンパク質を連結していない LCC に及ばなかった。これらの結果から、酵素を接着タンパク質に連結するだけでは不十分であることが明らかになった。

研究項目2. 酵素の複合体化による分解速度向上

1. 酵素複合体構築に向けた各モジュールの作製

100 kDa を越えるタンパク質や分岐したタンパク質を細菌で生産することは難しいため、モジュールごとに分けて生産した後に連結することで複合体化を試みた。まず、LCC と SpyCatcher、その亜種である SnoopCatcher をコードする DNA 断片を PCR 法で増幅し、Golden Gate 法により 5 つの LCC と SpyCatcher または SnoopCatcher、ベクターの計 7 断片をつなぎ合わせ、SpyTag-(LCC)₅-SnoopCatcher-His または SnoopTag-(LCC)₅-SpyCatcher-His をコードする約 10 kbp の発現プラスミドを構築した。同様の手法で SpyCatcher または SnoopCatcher が 5 個つながった SnoopTag-(SpyCatcher)₅-His、SpyTag-(SnoopCatcher)₅-His をコードする発現プラスミドも構築した。これら大腸菌で発現したところ、LCC が 5 個つながったコンストラクトは生産が確認できなかった。一方 SpyCatcher と SnoopCatcher が 5 個つながったコンストラクトについては各種クロマトグラフィーにより精製後、SpyTag または SnoopTag 融合タンパク質との結合試験により、活性を確認した。

2. 酵素複合体の PET 分解活性評価

SnoopTag-(SpyCatcher)₅-His に SpyTag-LCC を混合することで調製した LCC を 5 個連結した酵素複合体を用いて、PET の分解試験を行った。酵素溶液に直径 6 mm の PET シートを入れ、70°C で 18 時間反応させた後、分解産物の主成分である MHET を HPLC により検出した。連結していない酵素を加えた試料に比べ、LCC を複数連結したものを加えた試料では約 1.3 倍の MHET が検出された。よって、酵素を連結することによりわずかではあるが PET 分解活性が向上することが明らかになった。

研究項目3. 多様な固相基質分解酵素における接着タンパク質連結/複合体化効果の検証

PET 以外の固相基質を対象とした実験系の構築を目指して、ナイロン分解酵素 NylC を用いたナイロン分解の検証を試みた。Arthrobacter 由来の NylC に SpyTag を付加したタンパク質を大腸菌で発現させたところ生産が確認できず、複合体化効果の検証には至らなかった。

LCC と異なり、テトラマーを形成する性質があることや、自己分解活性があるため生産がうまくいかなかった可能性がある。

その他

領域内外の研究者と研究室相互訪問や実験技術に関する情報交換を行い、交流を深めた。また、本課題の3年度目には所属大学で助教に昇任し、本研究に関連する独自のアイデアに基づく研究を加速・発展させる基盤を固めることができた。それらの結果、本研究に関連する研究課題が2022年度科研費基盤(C)に採択された。

3. 今後の展開

本研究では、酵素の複数連結により固相基質の分解速度がわずかではあるが向上することが明らかになった。この手法が他の幅広い酵素においても有効であるかどうかは重要な点であるため、引き続き異なる酵素について、複数連結により分解活性向上が見られるか検証を進める。また、複数連結により分解速度が向上したメカニズムを理解することは、分解速度をより高めていく上で重要である。しかし、①各酵素のもつ固相基質表面への弱い親和性が複数連結により「avidity」として強まった、②固相基質表面の一部分を集中的に分解することで固い表面を「ほぐす」ような効果が得られた、など様々な可能性が考えられる。そのため今後は、固相基質表面で酵素やその連結体がどのようなステップで分解を進めるのかを動的に評価し、界面においてどのような現象が起きているのかを詳細に解明していく必要があると考えられる。将来的には、タンパク質と固体表面の相互作用が重要な役割を果たしているバイオミネラリゼーションやバイオマテリアル分野、現象のモデル化を得意とする化学工学や計算科学分野の研究者らと「タンパク質界面科学」のような新しい切り口での研究展開を進めたい。

4. 自己評価

本研究は、酵素を複合体化することで固相基質の酵素分解速度を向上することを目指した研究である。研究目的の達成状況については、上記の研究項目①と②については一部で当初の予想に反する結果が得られたものの、わずかではあるが分解速度を向上することに成功した。酵素への基質表面に対する接着性タグの付加よりも酵素の単純な複数連結の方が効果的だったことは予想外であり、その機構については引き続き検証が必要である。研究項目③については現在検証中であり、研究期間の終了までにデータの取得を完了する予定である。また、研究の実施体制及び研究費執行については当初の計画通りであり、適切に研究を遂行できたと考えられる。本研究で得られた成果は、プラスチック等の生分解が難しい材料の酵素分解速度を向上するうえで重要な知見であり、本領域が目指すバイオテクノロジー分野における新分野開拓や新価値創造に貢献することが期待される。また個人的な面でも、これまで扱ってこなかった低分子やその解析手法を身につけるとともに異分野の研究者とのネットワークを構築でき、所属大学では助教に昇任したことから、今後より独創的な研究を遂行していくための基盤を固めることができた。

これらの観点より、本研究は概ね適切に遂行でき一定の成果を得たと考えられる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数:0件

(2) 特許出願

研究期間全出願件数:0件(特許公開前のもも含む)

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

総説論文

Katsutoshi Hori, Shogo Yoshimoto, Tomoko Yoshino, Tamotsu Zako, Gen Hirao, Satoshi Fujita, Chikashi Nakamura, Ayana Yamagishi, Noriho Kamiya, Recent advances in research on biointerfaces: From cell surfaces to artificial interfaces, *Journal of Bioscience and Bioengineering* 133(3) 195–207, 2022

学会発表

プラスチックの分解速度向上を目指した酵素複合体の構築, 澤田 美波, 吉本 将悟, 堀 克敏, 第 16 回バイオ関連化学シンポジウム 2022 年 9 月

PET 加水分解酵素と高付着性タンパク質の連結体構築, 澤田 美波, 吉本 将悟, 堀 克敏, 第 15 回バイオ関連化学シンポジウム 2021 年 9 月