

# 木質由来バイオマスポリマー分解酵素の探索とモノマーリサイクルシステムの構築

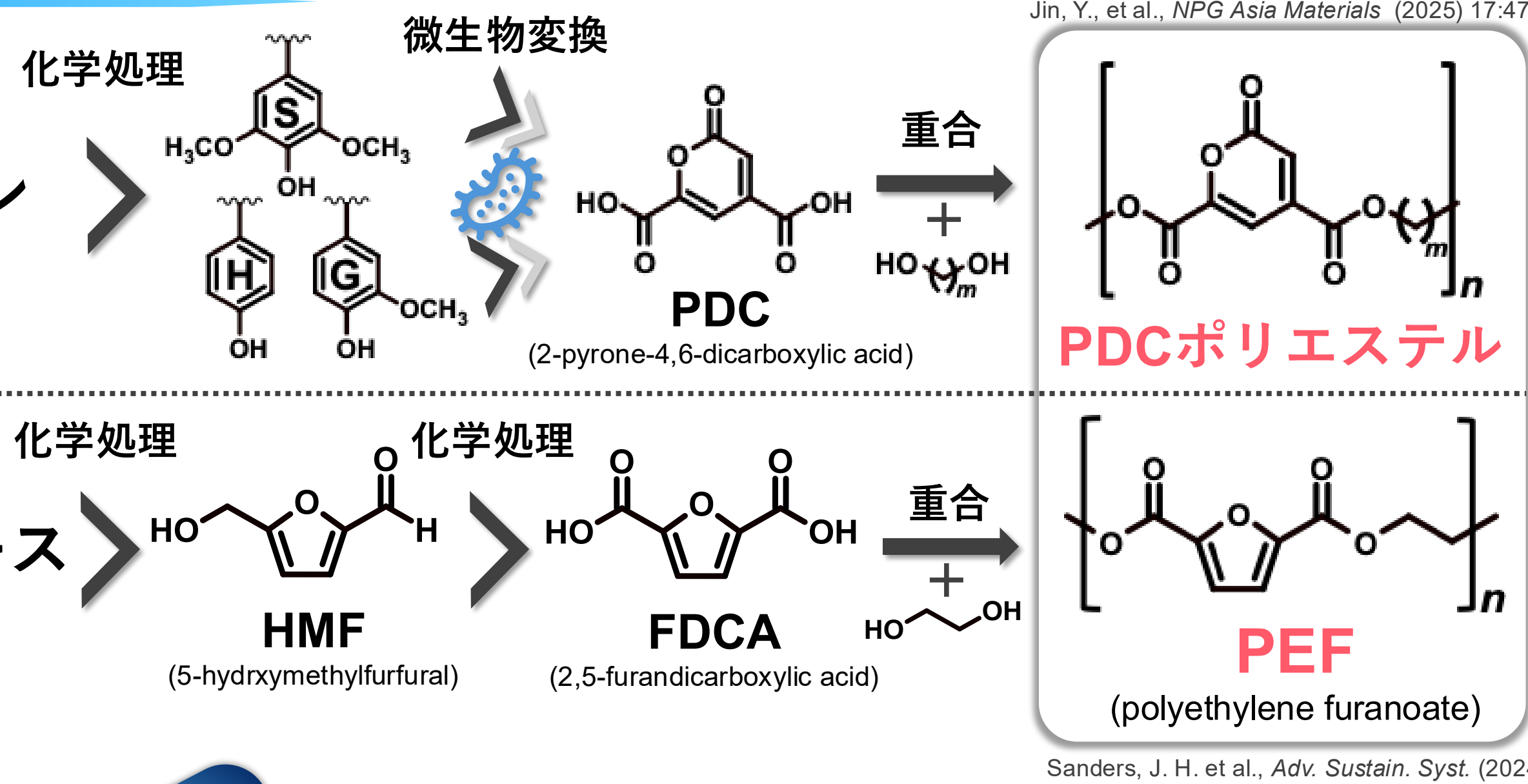
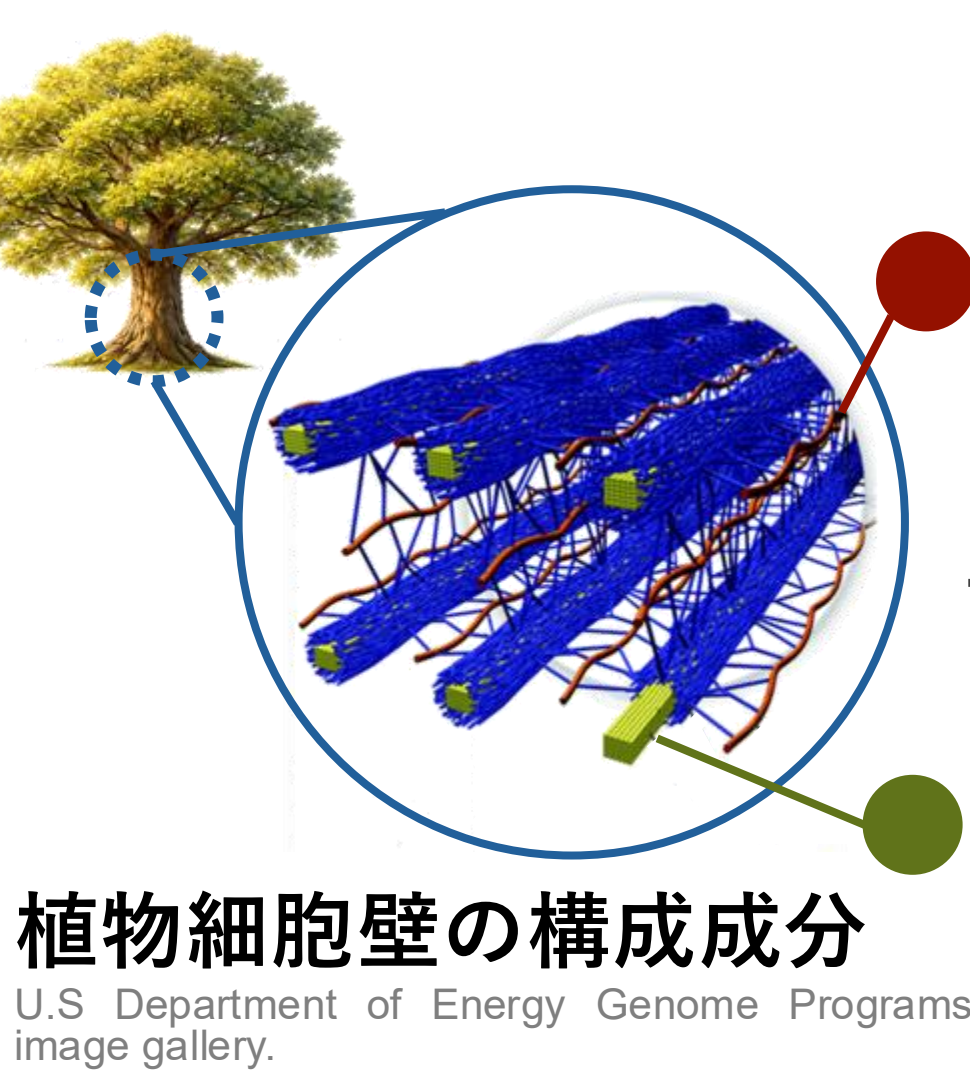
○小林 未歩<sup>1</sup>、加藤 諒<sup>1</sup>、金 易介<sup>2</sup>、藤田 雅也<sup>1</sup>、道信 剛志<sup>2</sup>、上村 直史<sup>1</sup>、政井 英司<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>長岡技科大・物生、<sup>2</sup>東京科学大学・物質理工)



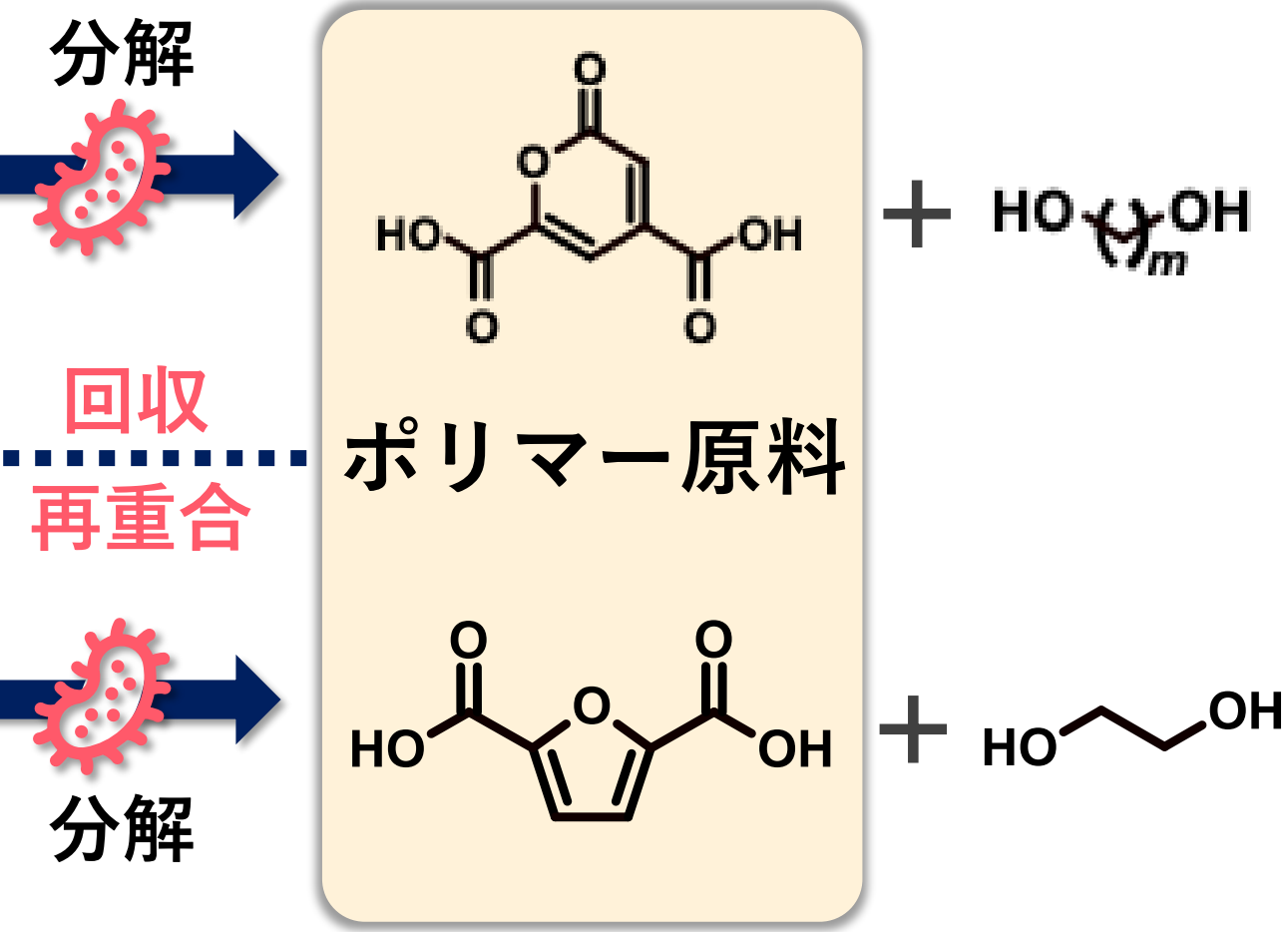
## Introduction

### 1. 木質由来バイオマスポリマーを基盤とする循環型資源利用

プラスチックの大量生産と廃棄による深刻な環境問題の有効な解決手段として、木質バイオマスであるリグニンやセルロースから生産したポリマー原料を用いた、**2-pyrone-4,6-dicarboxylic acid (PDC)**ポリエステルや**polyethylene furanoate (PEF)**といった種々の生分解性ポリマーの開発が進められている。今後は、循環型資源利用を高度化するために、微生物変換による木質バイオマスポリマーのモノマーリサイクル技術を確認することが望まれる。

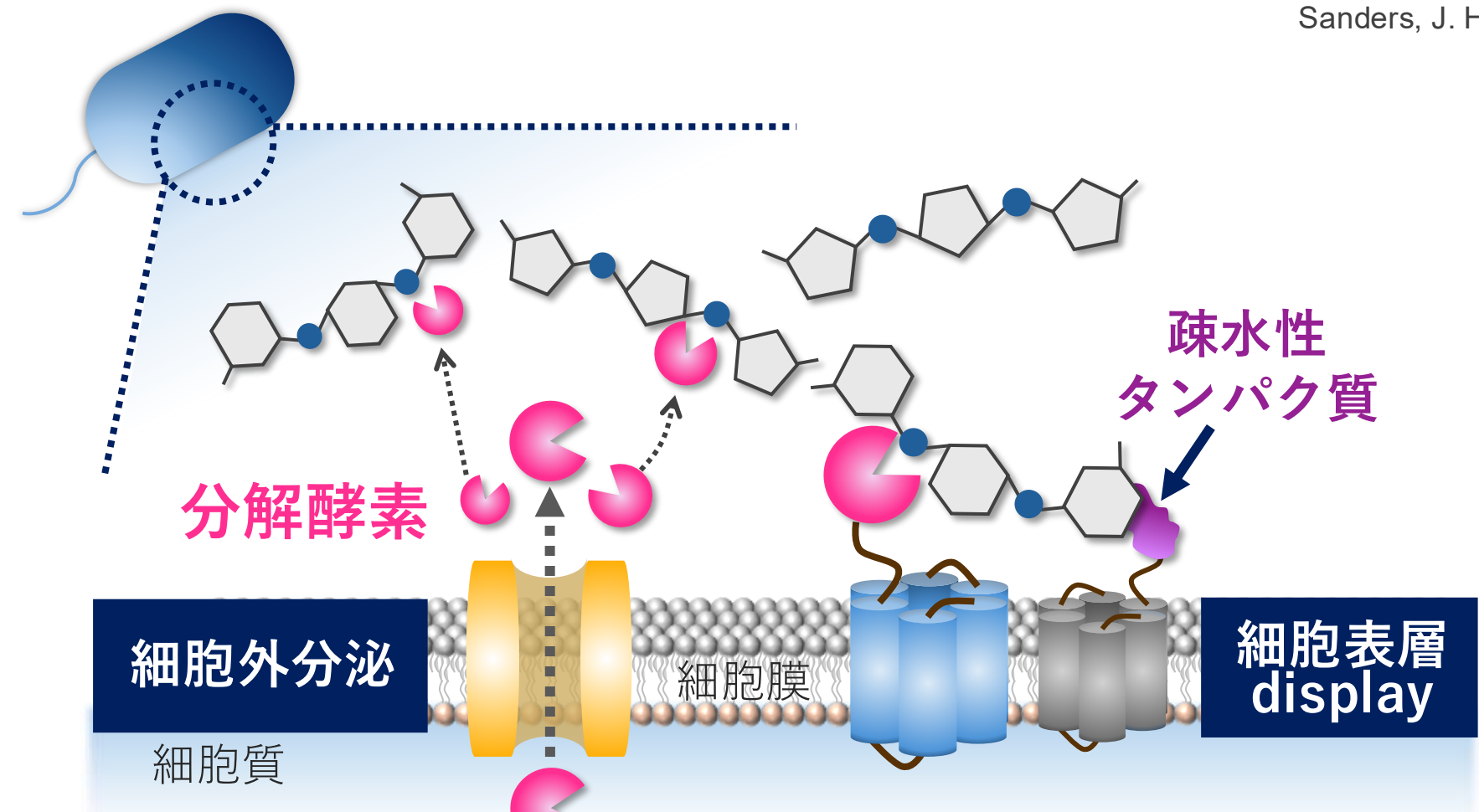
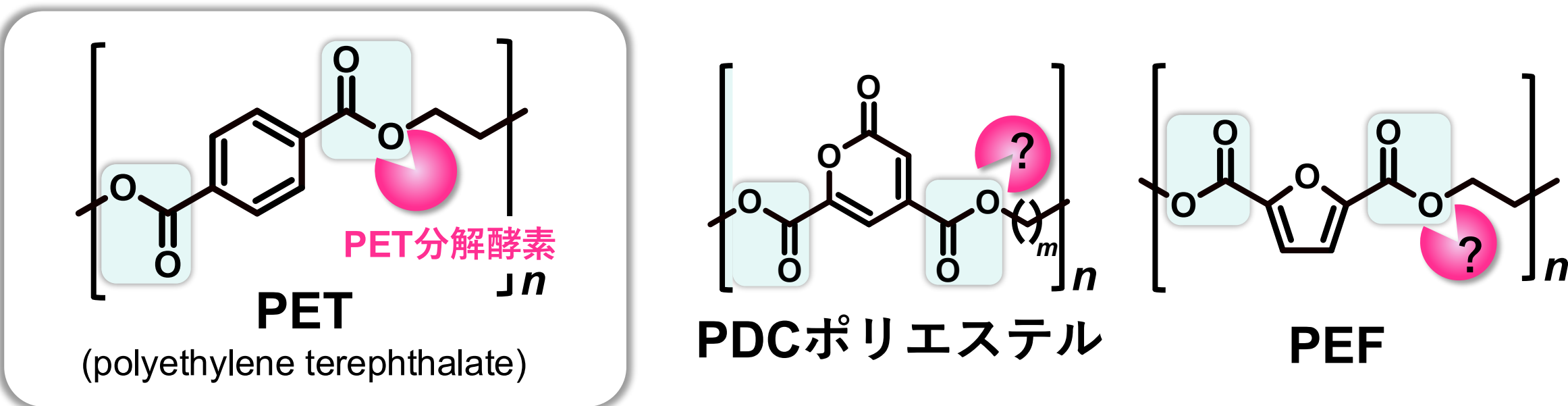


### 微生物を用いた循環型資源利用



### 2. PET分解酵素を用いたポリエステル分解

PDCポリエステルおよびPEFの基本骨格がpolyethylene terephthalate (PET)と類似していることから、**PET分解酵素による分解**に着目した。



### ●●● 本研究の目的 ●●●

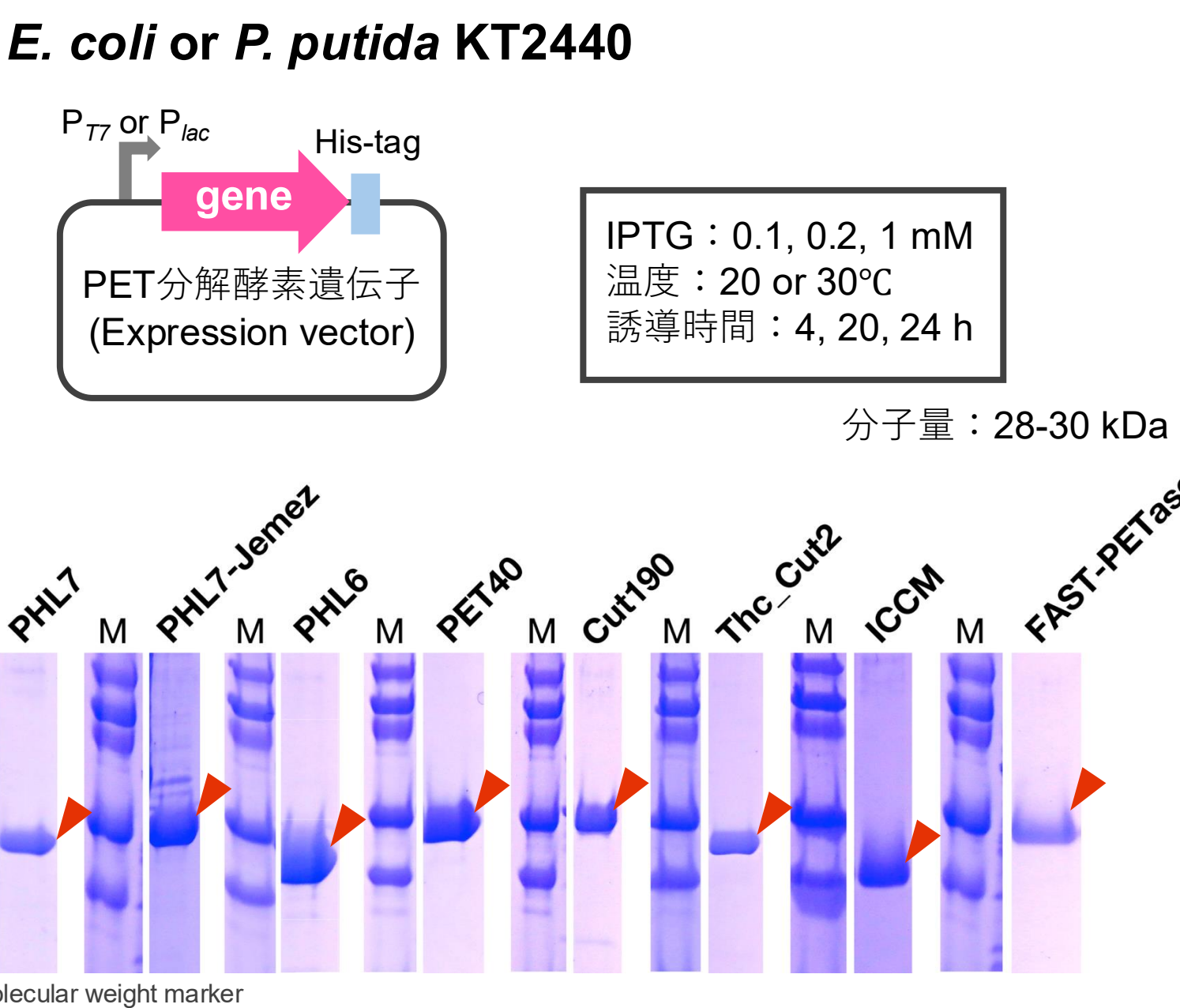
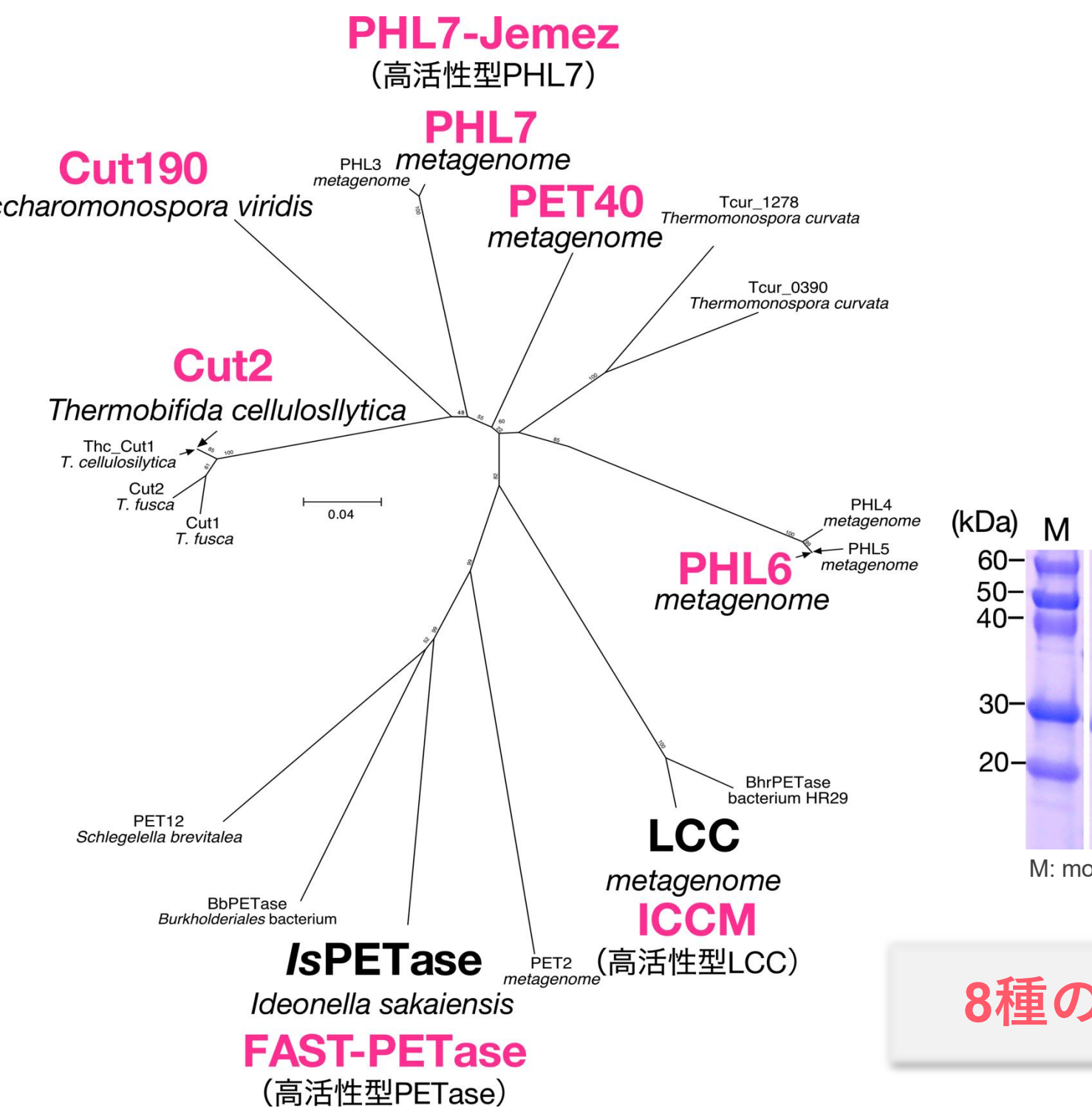
1. 木質由来バイオマスポリマー分解性を示す酵素の探索
2. 微生物を用いたモノマーリサイクルシステムの基盤構築

## Results and Discussion

### 1. PET分解酵素の精製

既知のPET分解酵素から、高いPET分解性を示し、系統的に離れた8種の酵素遺伝子を選抜した。精製酵素を用いたPDCポリエステルおよびPEF分解試験を実施するために、C末端にHis-tagを付加したPET分解酵素遺伝子を *Escherichia coli* または *Pseudomonas putida* KT2440 で発現させ、Ni-affinity chromatographyおよびサイズ排除クロマトグラフィーにより精製した。

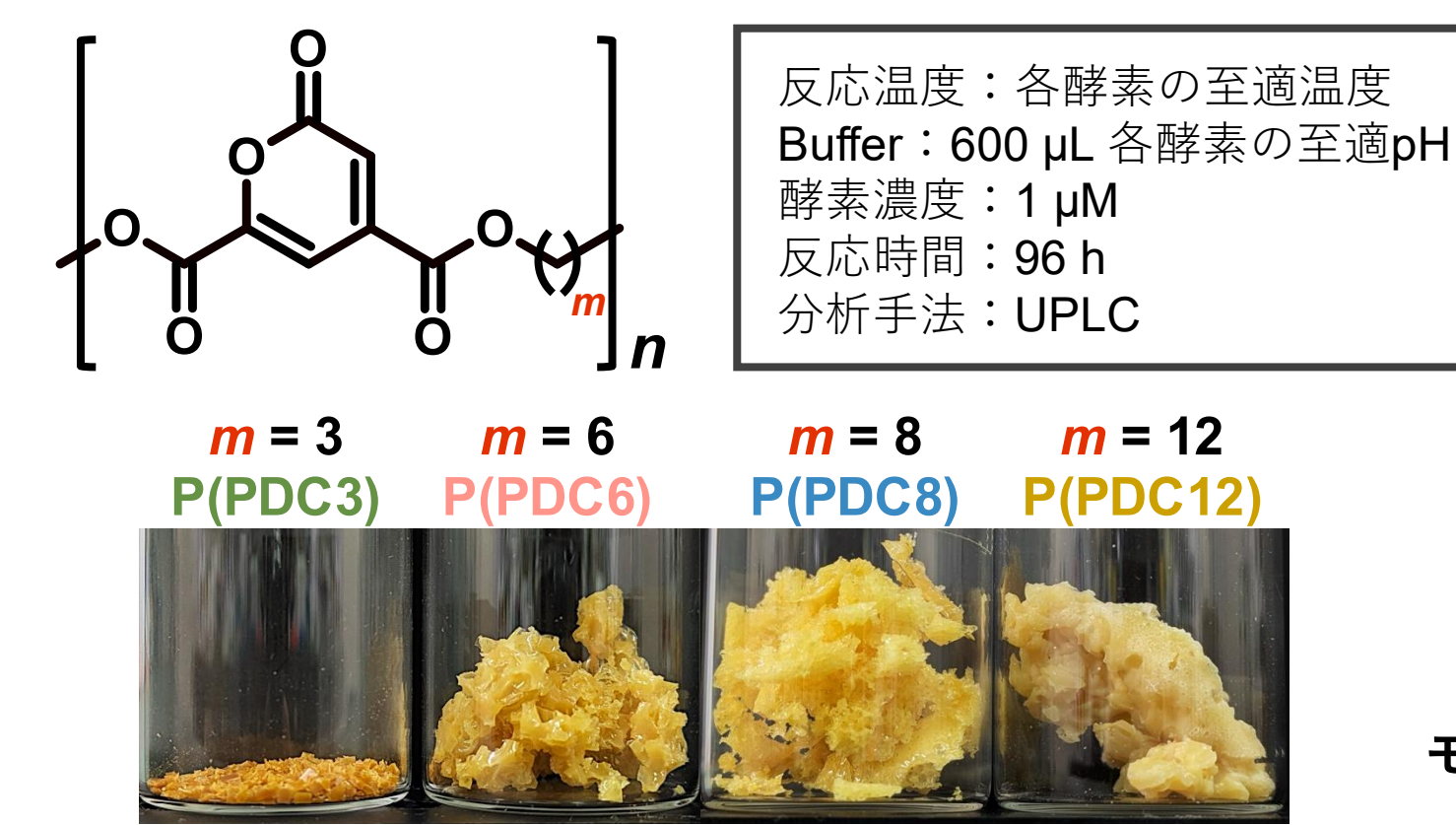
#### ■ 代表的なPET分解酵素の系統樹



8種の精製PET分解酵素を取得 ※ PET分解活性は確認済み

### 2. PET分解酵素のPDCポリエステル分解

PHL7-Jemez以外の7種の精製PET分解酵素1 μMを用いて、各PET分解酵素の至適温度および至適pHでPDCポリエステル分解活性を評価した。

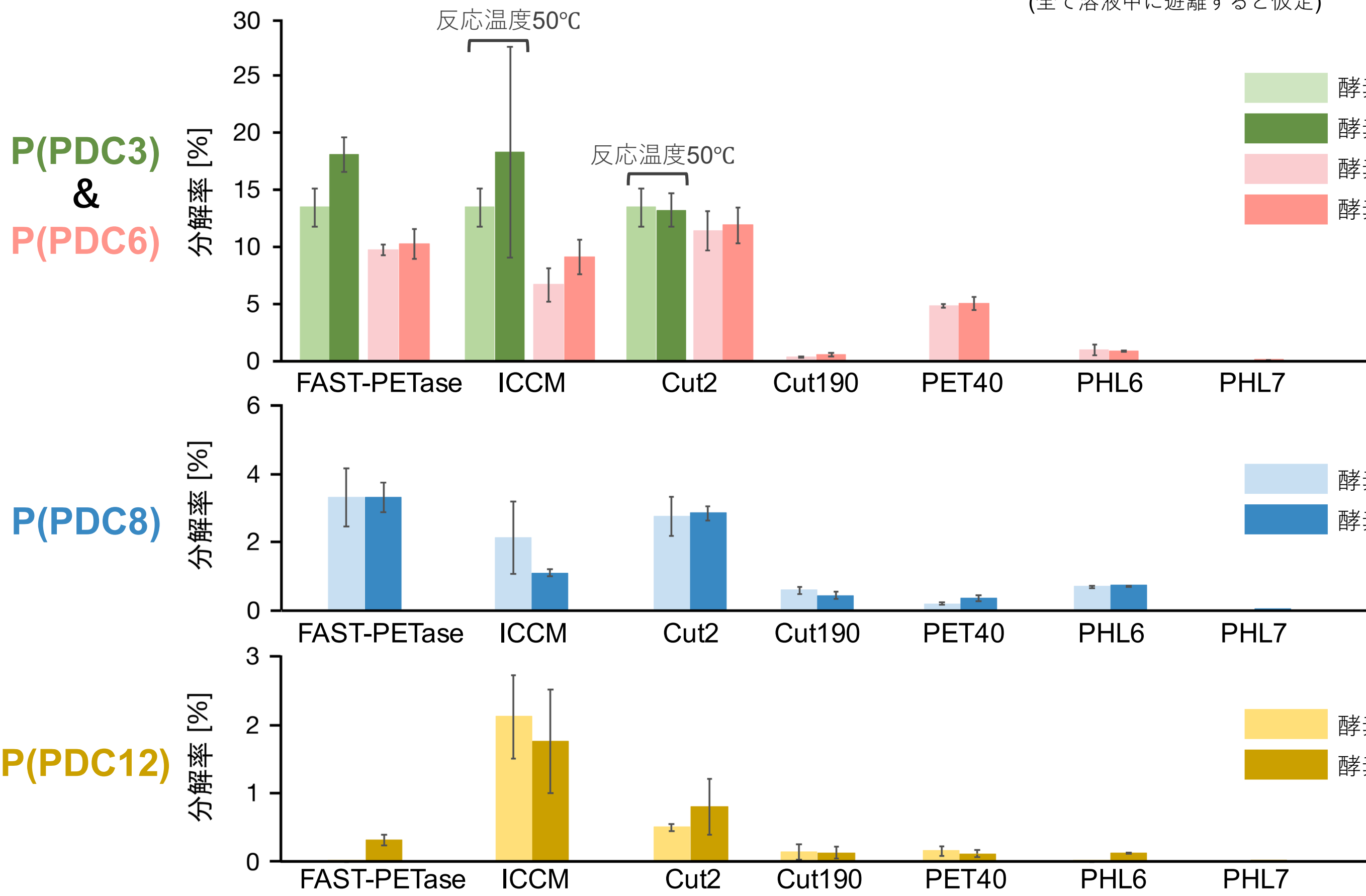


#### ■ 各酵素の至適温度および至適pH

	Buffer	反応温度
PET40	100 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -NaOH (pH 8.0)	40°C
Cut190	50 mM Tris-HCl+30 mM CaCl <sub>2</sub> (pH 8.2)	50°C
FAST-PETase	100 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -NaOH (pH 8.0)	50°C
Cut2	100 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (pH 7.0)	50°C
PHL6	1M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -NaOH (pH 8.0)	55°C
PHL7	1M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -NaOH (pH 8.0)	70°C
PHL7-Jemez	1M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -NaOH (pH 8.0)	70°C
ICCM	100 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -NaOH (pH 8.0)	72°C

$$\text{モノマー生成率 [\%]} = \frac{\text{遊離したモノマー濃度}}{\text{ポリマー中のモノマー濃度}} \times 100$$

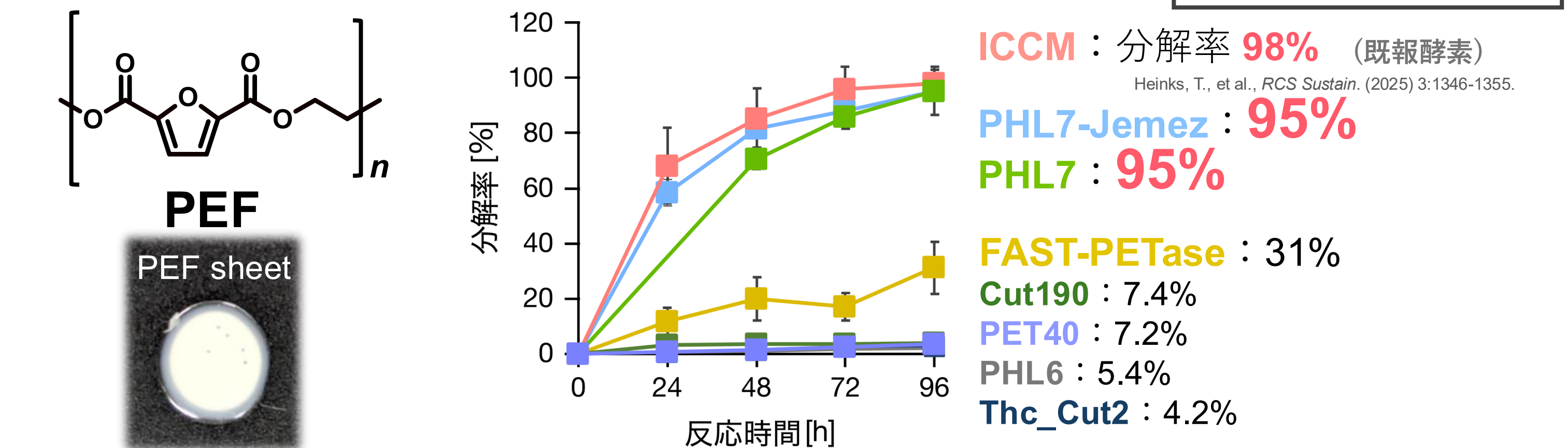
(全て溶液中に遊離すると仮定)



7種のPET分解酵素は顕著なPDCポリエステル分解能を示さなかった

### 3. PET分解酵素のPEF分解

8種の精製PET分解酵素1 μMを用いて、各PET分解酵素の至適温度および至適pHでPEF分解活性を評価した。

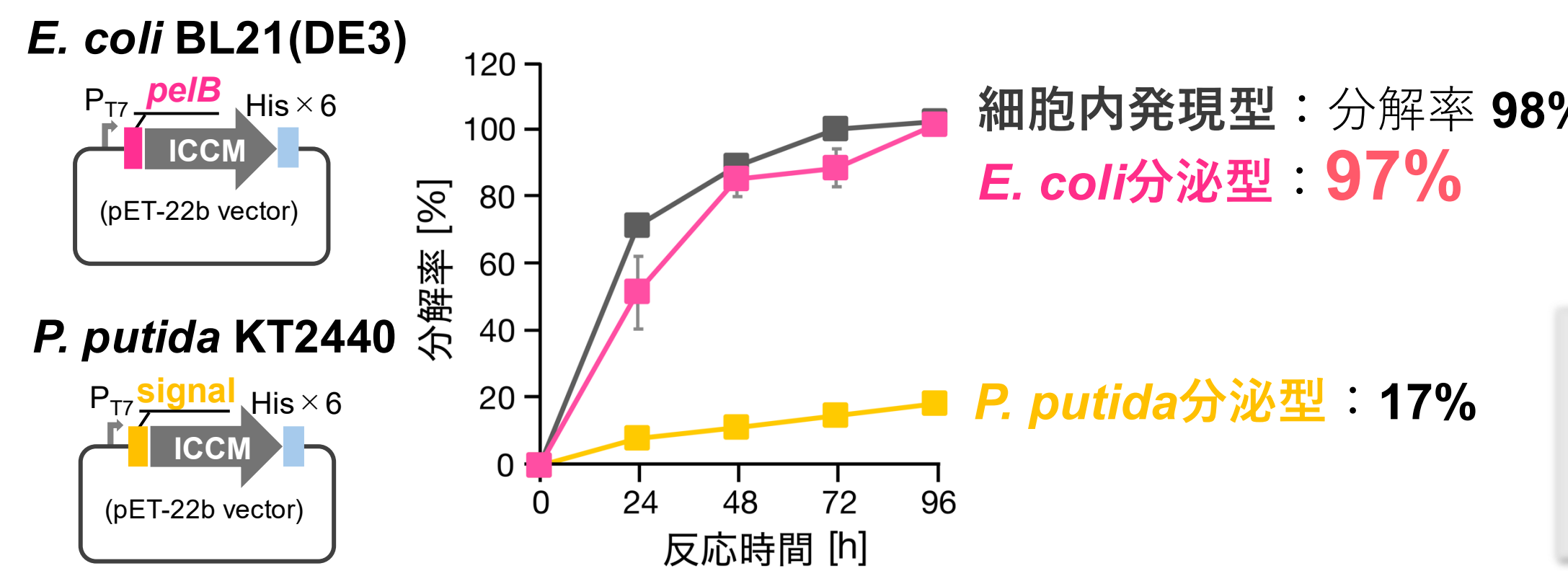


ICCM, PHL7, PHL7-Jemezが96時間以内に95%以上のPEF分解率を示した

### 4. PET分解酵素の細胞外分泌システムの構築

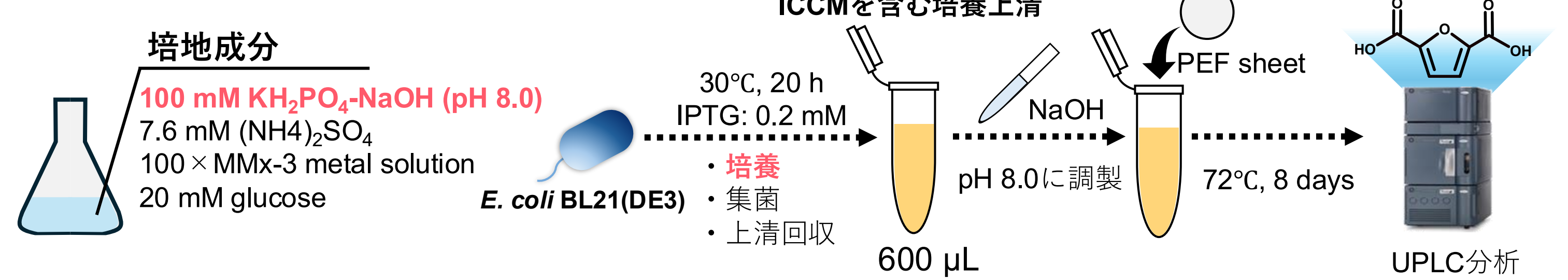
#### ■ 分泌されたICCMの精製酵素によるPEF分解

*E. coli* BL21(DE3)株と *P. putida* KT2440株を宿主とし、分泌シグナルを融合したICCMの細胞外発現を実施した。C末端にHis-tagを付加し細胞外に分泌したICCMを精製し、PEF分解活性を評価した。



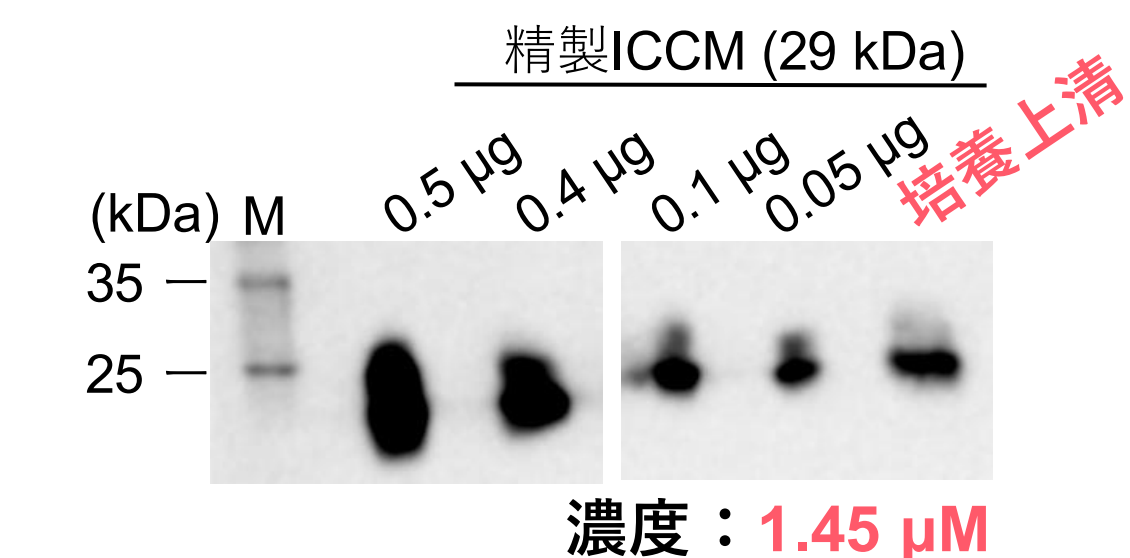
#### ■ ICCMを含む培養上清を用いたPEF分解

抗His-tag抗体を用いたWestern blot解析によって、培養上清中のICCM濃度を定量した。また、至適buffer成分を培地としてICCM分泌株を培養し、pH 8.0に調製した培養上清をそのまま用いたPEF分解を実施した。

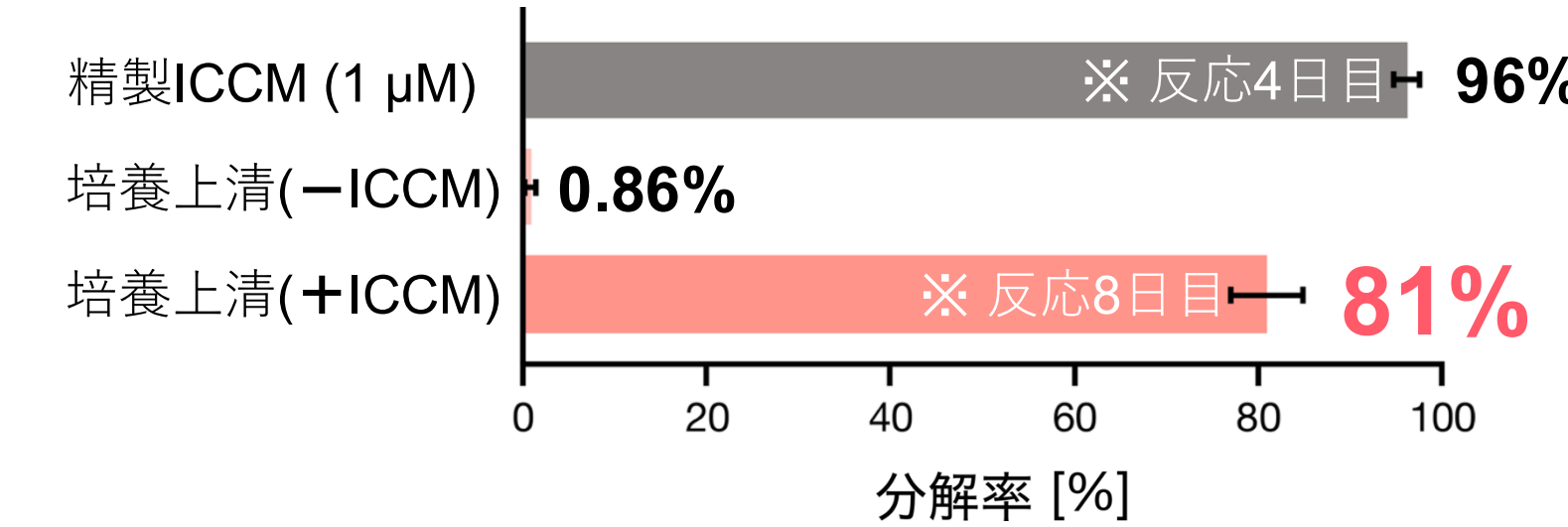


#### ● Western blot解析

一次抗体: 抗His-tag polyclonal抗体 (rabbit)  
二次抗体: horse radish-peroxidase融合抗体  
検出方法: 化学発光



#### ● PEF分解活性の評価



ICCMを含む培養上清が81%のPEF分解率を示した

## Conclusions

- 7種のPET分解酵素はPDCポリエステルに対して有意な分解性を示さなかった。
- ICCM, PHL7、PHL7-JemezがPEFに対して高い分解性を示した。
- ICCM分泌株の培養上清を用いたPEF分解において81%の分解率を達成した。

## Acknowledgments

本研究はJST CREST(JPMJCR23L4)の支援を受けて実施した。