

研究 成 果 報 告 書

(国立情報学研究所の民間助成研究成果概要データベース・登録原稿)

研究テーマ (和文)	環境汚染プラスチック PET を分解する酵素の反応機構の理解、耐熱性と分解活性の改善		
研究テーマ (英文)	Elucidation of reaction mechanism and improvement of thermostability and catalytic activity of an enzyme which hydrolyzes environment-polluting plastic PET		
研究期間	2019年 ~ 2020年		研究機関名 自然科学研究機構分子科学研究所
研究代表者	氏名	(漢字)	飯野 亮太
		(カタカナ)	イイノ リョウタ
		(英文)	Iino, Ryota
	所属機関・職名		自然科学研究機構分子科学研究所・教授
共同研究者 (1名をこえる場合は、別紙追加用紙へ)	氏名	(漢字)	中村 彰彦
		(カタカナ)	ナカムラ アキヒコ
		(英文)	Nakamura, Akihiko
	所属機関・職名		静岡大学農学部・テニュアトラック准教授

概要 (600字~800字程度にまとめてください。)

メタゲノム解析で発見された新規 PET 分解酵素 PET2 の熱安定性と活性の改善に成功した。PET 分解菌から以前単離された IsPETase を鋳型としたホモロジーモデリングで得た PET2 の構造に対し、タンパク質合理設計ソフトウェア Rosetta を用いて構造最適化を行い、変異導入箇所の選定を行った。構造を安定化させるために α ヘリックス末端およびループ上へのプロリン変異、主鎖構造安定化変異、およびジスルフィド結合導入変異の効果を調べた。さらに PET 分解活性を上昇させるため、IsPETase の構造に基づき酵素表面に正電荷を付与する変異を導入しその効果を調べた。変性温度 (T_m) および PET 分解活性が向上した変異の統合を行った結果、最終的に T_m が 75.7°C に向上し、PET 分解の至適温度が 68°C に向上した。この耐熱高活性化 PET2 変異体は、天然型 PET2 の至適温度 60°C での分解活性と比較して 6.8 倍高い活性を示した。また、耐熱高活性化 PET2 変異体を結晶化して X 線結晶構造解析を行った。 $1.8 \text{ \AA}$ での構造解析に成功し、7 つの変異が確かに導入されていることを確認した。特に N 末端側に導入した Cys47 と Cys89 がジスルフィド結合を形成していることを確認し、耐熱性が向上した理由を解明できた。さらに、活性向上の機構を調べるため、PET2 の 1 分子蛍光計測で結合速度定数および解離速度定数の解析を行った。天然型 PET2 および耐熱高活性化 PET2 の C 末端側にシステイン残基を導入し、マレイミド基を介して蛍光色素標識を行った。PET フィルムを溶媒に溶解して自家蛍光性の夾雑物を除去した後、ガラス基板上に PET 繊維を再生することで 1 分子蛍光計測を可能にする手法を開発した。明視野観察で PET 繊維の位置を確認し、 10 nM の蛍光標識酵素により PET 繊維が特異的に染色されることを確認した。また 50 pM の酵素を滴下することで 1 分子の結合解離を計測することに成功した。解析の結果、耐熱高活性化 PET2 の結合速度定数は天然型よりも 2.7 倍高く、これが高活性化の機構であると考えられた。

発表文献（この研究を発表した雑誌・図書について記入してください。）						
雑誌	論文課題	Thermostabilizing and positively charging mutations enhance polyethylene terephthalate hydrolysis by lipase				
	著者名	A. Nakamura ら	雑誌名	投稿中		
	ページ	～	発行年		巻号	
雑誌	論文課題					
	著者名		雑誌名			
	ページ	～	発行年		巻号	
雑誌	論文課題					
	著者名		雑誌名			
	ページ	～	発行年		巻号	
図書	書名					
	著者名					
	出版社		発行年		総ページ	
図書	書名					
	著者名					
	出版社		発行年		総ページ	

英文抄録（100 語～200 語程度にまとめてください。）

A thermostable lipase PET2, found in a metagenome library, has been engineered to improve its hydrolytic activity against polyethylene terephthalate (PET) toward better recycling of the PET. The PET2 wild-type (WT) showed the melting temperature at 69.0°C and produced water-soluble reaction products from an amorphous PET film at 0.40 min⁻¹ at 60°C. Mutations for surface charge modification, backbone stabilization, and formation of additional disulfide bond improved melting temperature and hydrolytic activity of PET2 to 75.7°C and 1.3 min⁻¹ (at 60°C), respectively. The X-ray crystal structures of PET2 mutants showed that introduced arginine and lysine residues oriented to the solvent, similar to a PET hydrolase from *Ideonella sakaiensis*, and these positively charged residues on the enzyme surface increased the binding rate constant 2.7 times. Single-molecule fluorescence imaging revealed that the higher activity of PET2 mutant was mainly caused by the increase of the binding rate constant to the PET surface. Optimal temperature (68°C) for PET hydrolysis by PET2 mutant was 8°C higher than that of WT (60°C), and PET hydrolytic activity at the optimal temperature was 6.8 times higher than that of WT. Furthermore, PET2 mutant generated reaction products with a constant rate for 24 hours at 68°C, indicating long-term stability at the optimal temperature.

共同研究者	氏名	(漢字)	古賀 信康	
		(カタカナ)	コガ ノブヤス	
		(英文)	Koga, Nobuyasu	
	所属機関・職名		自然科学研究機構生命創成探究センター・准教授	
	氏名	(漢字)	平岡 聡史	
		(カタカナ)	ヒラオカ サトシ	
		(英文)	Hiraoka, Satoshi	
	所属機関・職名		海洋研究開発機構海洋機能利用部門・特任研究員	
	氏名	(漢字)		
		(カタカナ)		
		(英文)		
	所属機関・職名			
	氏名	(漢字)		
		(カタカナ)		
		(英文)		
	所属機関・職名			
	氏名	(漢字)		
		(カタカナ)		
		(英文)		
	所属機関・職名			
	氏名	(漢字)		
		(カタカナ)		
		(英文)		
	所属機関・職名			
氏名	(漢字)			
	(カタカナ)			
	(英文)			
所属機関・職名				
氏名	(漢字)			
	(カタカナ)			
	(英文)			
所属機関・職名				