

天然物由来PET分解酵素に関する研究

大阪公立大学 農学研究科 生命機能化学専攻
准教授 上田 光宏

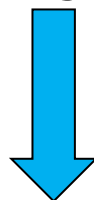
2024年7月18日

PET(ポリエチレンテレフタレート)とは

- ・ PETボトルの原料は石油からつくられる**テレフタル酸**と**エチレングリコール**を原料にして、高温・高真空下で化学反応させてつくられる樹脂のひとつで、合成繊維やテープ素材など幅広い用途に用いられている。(PETボトル推進協議会)
- ・ 便利に利用されてきたが、プラスチック廃棄物が環境問題を引き起こしている。
- ・ PETは分解されにくい。

従来のPETの分解方法とその問題点

- ・ 高温水処理: 約300°Cの加熱が必要で大量のエネルギーを要とする
- ・ アルカリ処理: 廃水処理が必要となり、環境に負荷がかかる



低温環境下で生育している**ミミズ**に着目した

ミミズを用いてPETを分解することの利点

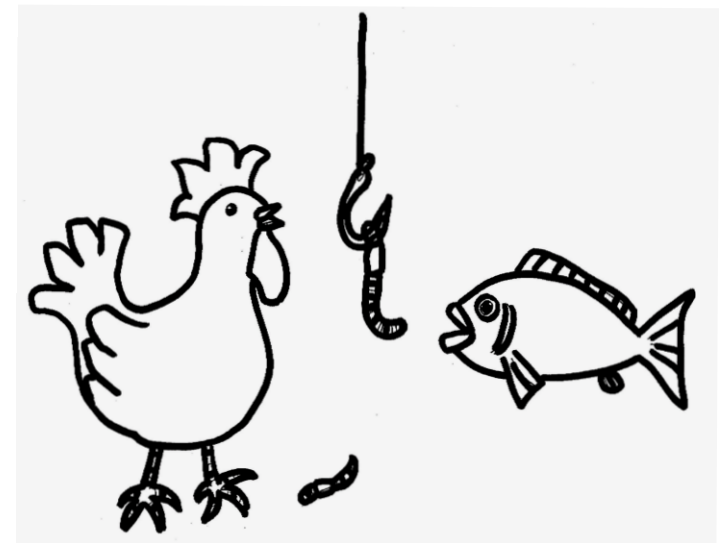
- ・低温条件下でのPETの分解が可能
(ミミズ由来のPET分解酵素も低温活性を有する)
- ・エネルギー消費量が少なく、コストを削減できる
- ・高温高圧水処理やアルカリ処理よりも環境に負荷がかからない

ミミズ (Earthworm) の生命体としての歴史

- ・**トリ**や**魚**等はミミズを好んで食べる。(飼料や食材として利用)
- ・ミミズは**有機物**(枯葉や小枝など)を**分解**する能力が高い。
- ・ミミズは多くの**生理活性物質**を有する。
(漢方薬(**地龍**)として利用)
- ・**溶血作用**を示す物質が単離(**医学**への応用)

コオリミミズ

- ・生育温度: $-7^{\circ}\text{C} \sim 10^{\circ}\text{C}$
- ・凍結融解を繰り返しても元気
- ・アラスカのショールズ氷河だけで**70億匹**のコオリミミズが生息している。



シマミミズの体成分

タンパク質	56.4%
脂質	7.8%
非窒素分	18.0%
繊維質	1.6%
灰分	8.8%

ビタミン含量 (γ/g)	
ビタミンB1	96
ビタミンB2	27
ビタミンB6	3.4
ビタミンB12	9.7
パントテン酸Ca	3.7
葉酸	19

(東ら 1958)

アミノ酸 (%)	
アルギニン	7.0
ロイシン	8.7
アラニン	5.8
アスパラギン酸	11.4
グルタミン酸	14.5
セリン	5.3

(Yoshida&Hoshii 1978)

ミミズ由来のユニークな性質を有する酵素に関する研究

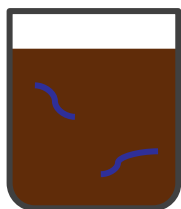
- ・ミミズを用いた**PETの分解**に関する研究
- ・**低温適応性糖質分解酵素**(生デンプン分解酵素, セルラーゼ, キチナーゼ, マンナーゼ等)に関する研究
- ・**抗植物ウイルス活性を有する酵素**(プロテアーゼ)に関する研究

ミミズをPETで暴露した

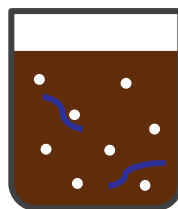
研究グループ保有のコンポストからミミズを取り出し、
湿らせたろ紙上で24 h静置

コンポスト内の土壌を500 mL ビーカーに入れ
各濃度 %(w/w)になるよう PET と混合

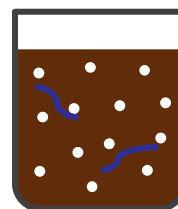
処理ごとにシマミミズを15 匹を30 日間暴露 ($20 \pm 2^\circ\text{C}$)



0%PET

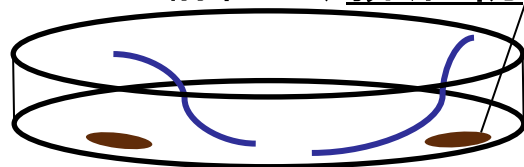


5%PET



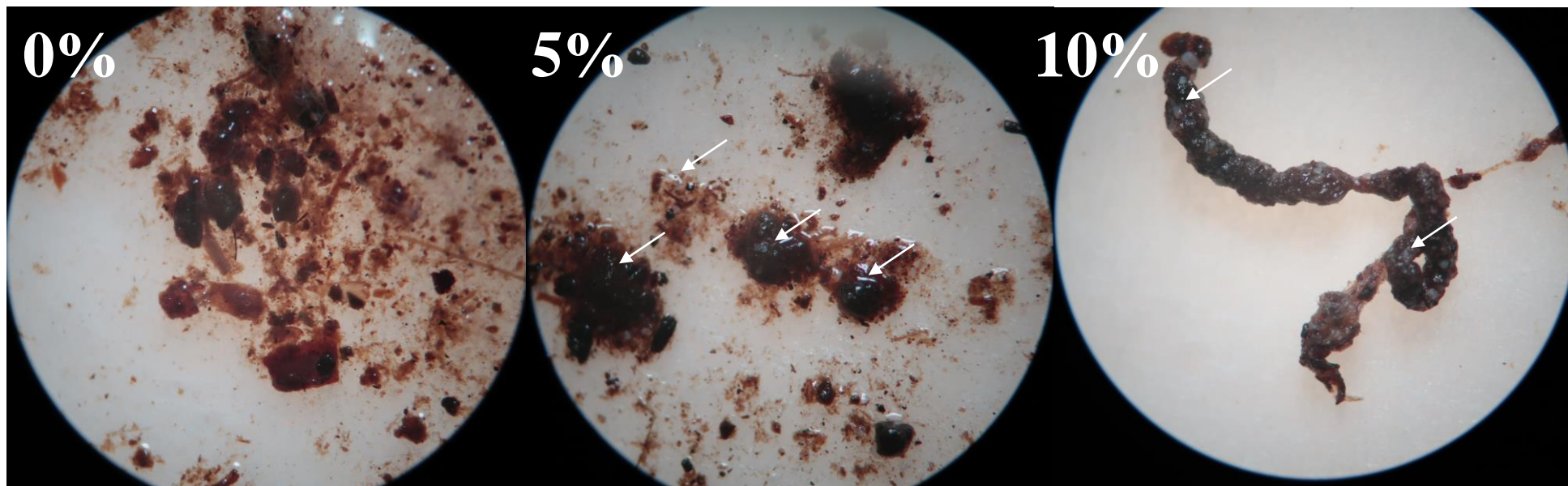
10%PET

サンプリングしたミミズを
湿らせたろ紙上で24 h静置し、排泄物を回収



排泄物を観察

体内へのプラスチックの取り込みを確認するため、
曝露開始10日目のミミズ排泄物を実体顕微鏡を用いて観察した



- ・排泄物中にPET粒子が多数含まれる
→ PETが体内に取り込まれている

シマミミズ体内へのPETの取り込みを確認

ミミズから粗酵素液の調製

0-15% PET含有土壤に30日間曝露したミミズ凍結サンプルを液体窒素を用いて破砕

↓
4倍量のBufferに懸濁

↓
15,000 rpm、4°C、10 min遠心

↓
上清を回収 (ミミズ粗酵素液サンプル)

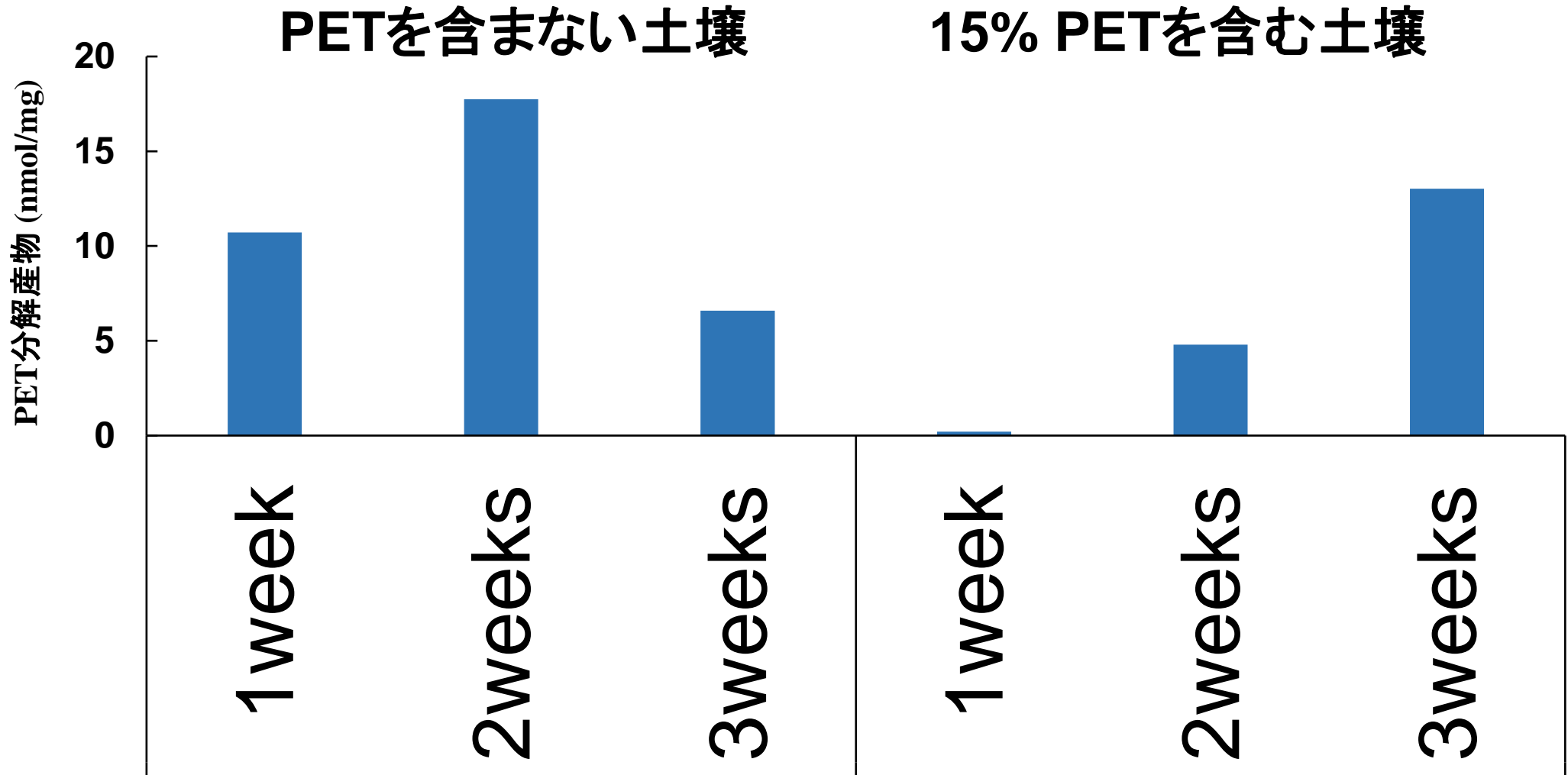
< 酵素反応 >

100 μ L の破砕抽出液と 900 μ L の buffer を混合

↓
基質として50 mgの PETを用いて30°Cでインキュベート

↓
上清を回収し、C18固相抽出

↓
LC/MS



PETを含まない土壌のミミズからもPET分解産物が検出された。
ミミズの体内で恒常的に発現している酵素がPETの分解に関与している可能性が示された。

これまでの研究からPET分解酵素は α/β -hydrolase であることが明らかにされている



ミミズのトランスクリプトーム解析データより恒常的に発現している α/β -hydrolaseを探した



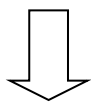
恒常的に発現している α/β -hydrolase として c6556 を見出した



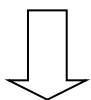
C6556遺伝子を異種宿主発現させてPET分解活性を調べることにした

C6556遺伝子の酵母による異種発現

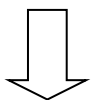
c6556の配列をpPICZα Aベクターに挿入



メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* GS115株を
形質転換

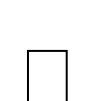


グルコースを炭素源とした培地で前培養



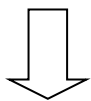
28°C、2日間培養

メタノールを炭素源とした培地で本培養

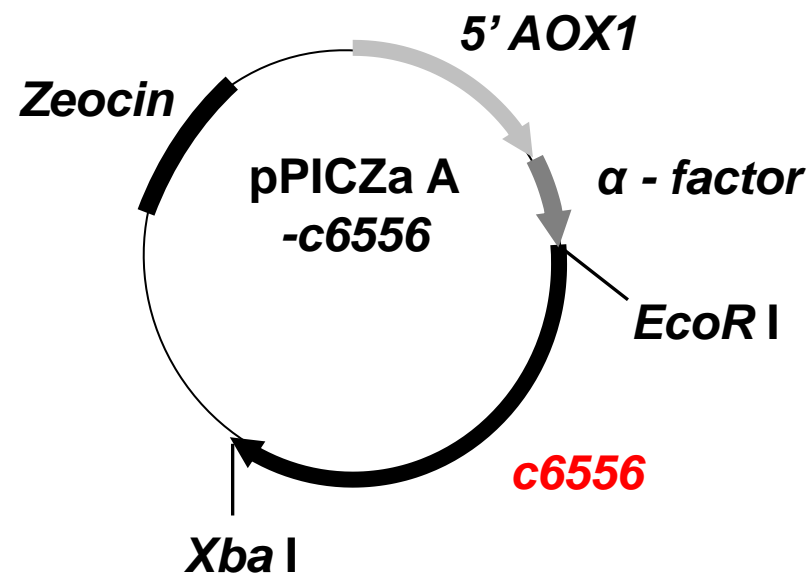


17°C、7日間培養
(終濃度 0.5%となるようにメタノール添加)

培養上清を回収



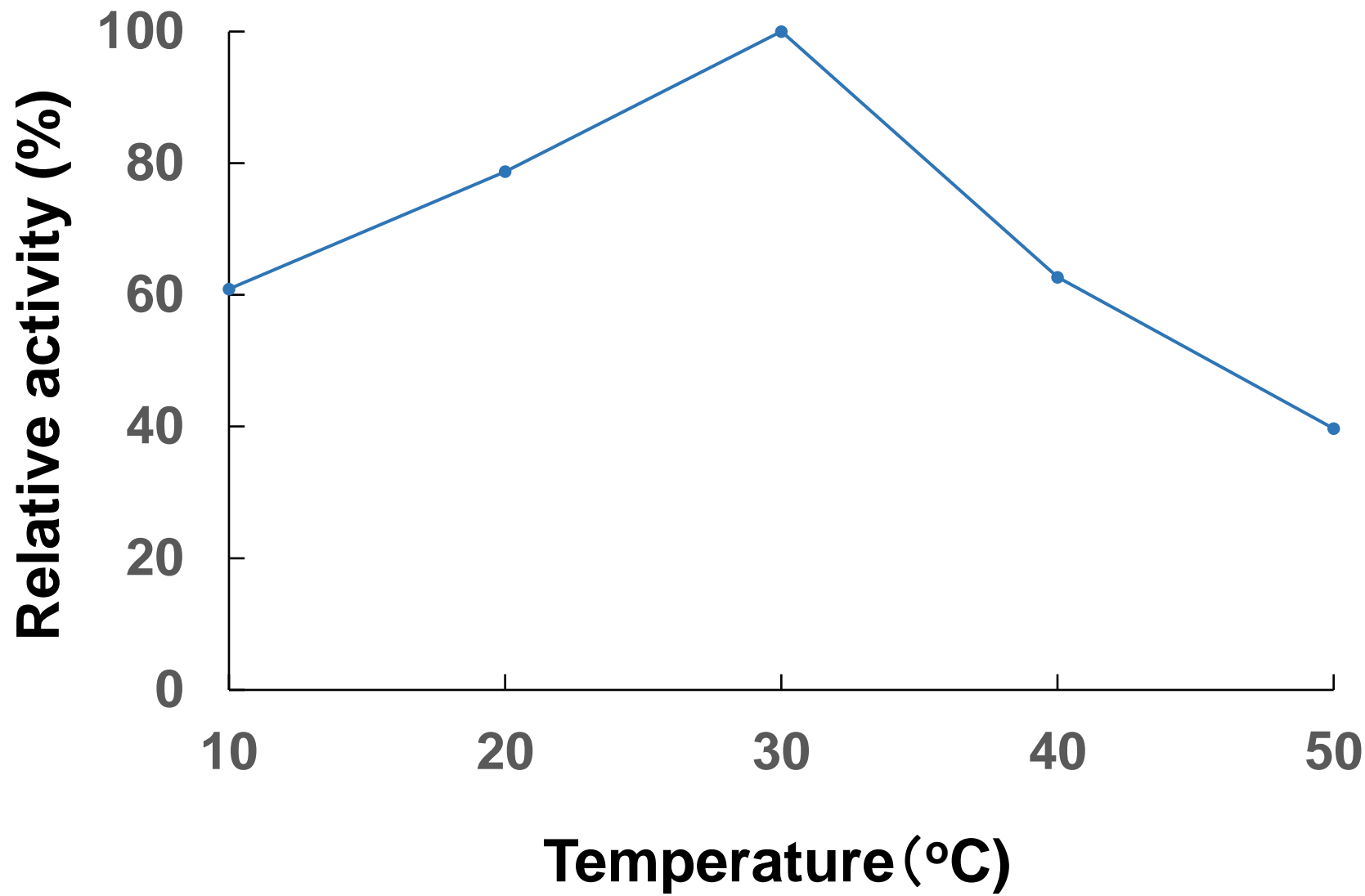
HisTrap カラムで酵素を精製



pPICZα Aベクター

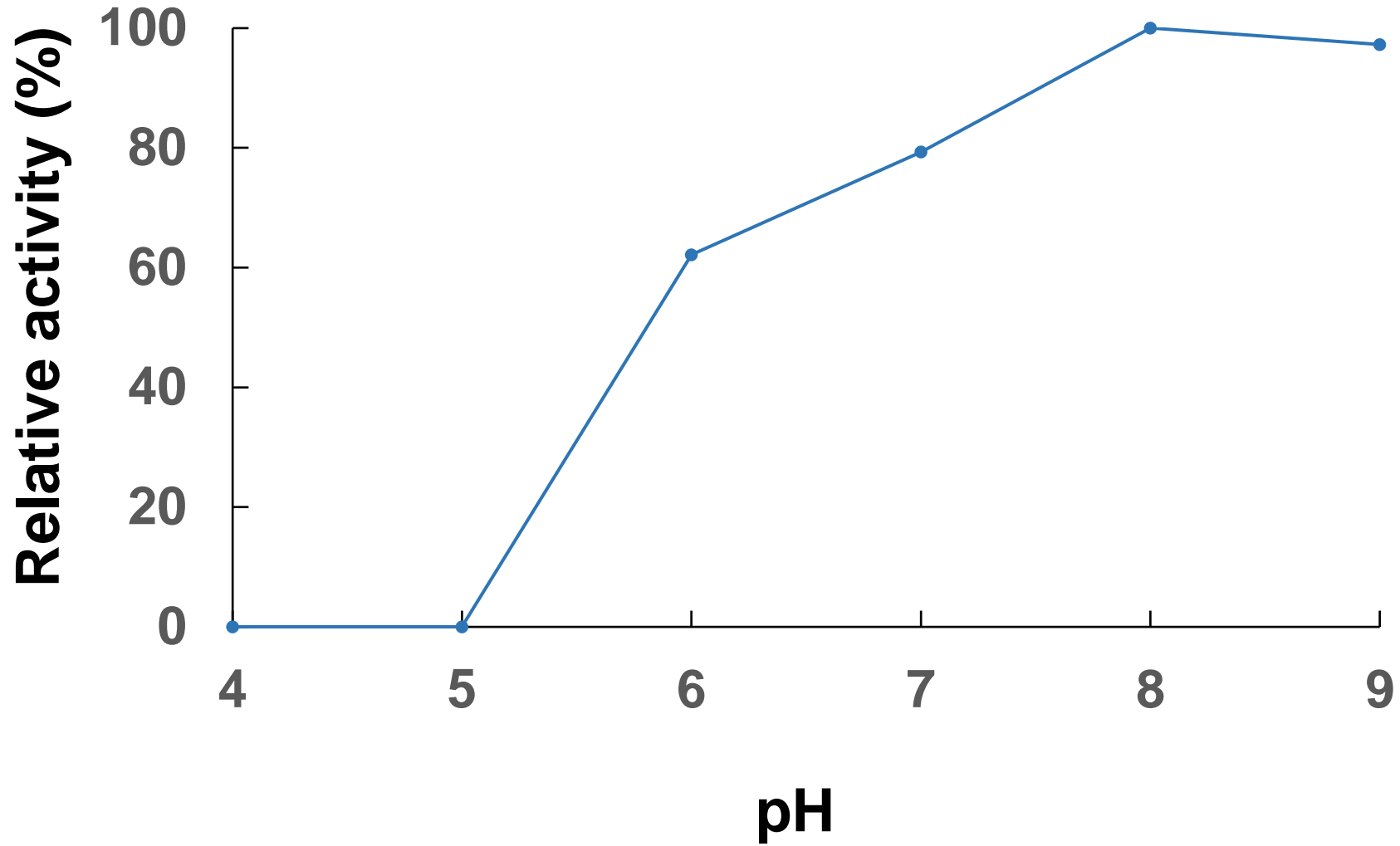
- ・メタノールにより発現誘導を行う
- ・細胞外に発現タンパクを分泌

最適作用温度

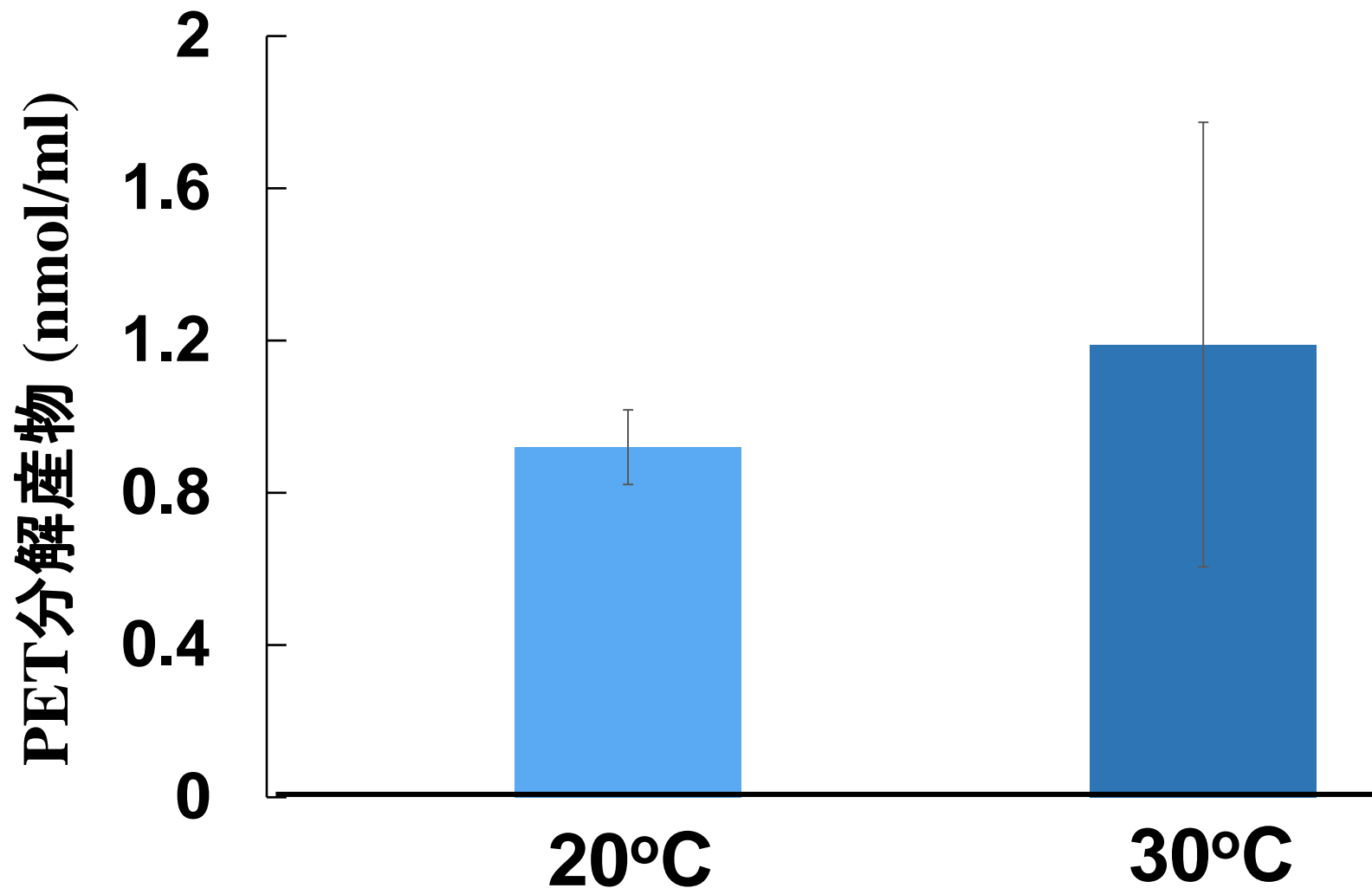


基質: *p*-nitrophenyl butyrate

最適作用 pH



PET分解産物の確認



従来のPETの分解方法とその問題点

- 高温水処理：約300°Cの加熱が必要で大量のエネルギーを要とする
- アルカリ処理：廃水処理が必要となり、環境に負荷がかかる

ミミズを用いてPETを分解することの利点

- ・低温条件下でのPETの分解が可能
(ミミズ由来のPET分解酵素も低温活性を有する)
- ・エネルギー消費量が少なく、コストを削減できる
- ・高温高圧水処理やアルカリ処理よりも環境に負荷がかからない

想定される用途

- 循環型社会構築に向けたPETのリサイクル
- 環境中に存在する天然物を用いた低コストでのPET処理
- 土壌改良

実用化に向けた課題

- 現在，ミミズ由来PET分解酵素を異種宿主発現させるところまで成功している。
- 今後，構造情報に基づき酵素に変異を導入し，機能性の向上を図る。
- ミミズには，c6556よりPET分解活性の高い酵素が存在する事を見出している。実用化に向けて、PET分解酵素カクテルを作成するなどして，低温下でのPET分解を目指す。ミミズそのものを用いた処理も検討する必要がある。

企業への期待

- 酵素処理の難しい場所では、ミミズそのものを用いたPET処理が可能と考えている。PET分解産物であるモノヒドロキシテレフタレートはさらにグリオキシル酸やプロトカテク酸へと代謝される。ミミズを用いた環境保全が可能となる。
- PETを破砕・粉末化する技術を持つ、企業との共同研究を希望。
- また、循環型社会構築する上で、酵素法を用いて得られたPET分解産物を原料にPETを再合成することは有用なので、将来の地球のことを考えている企業と共同研究希望。

企業への貢献、PRポイント

- 本技術は循環型社会構築に有用な技術となることから、PETをリサイクルすることで企業イメージのアップに貢献できると考えている。
- 本技術の導入にあたり必要な追加実験を行うことで科学的な裏付けを行うことが可能。
- 本格導入にあたっての技術指導等

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : ポリエチレンテレフタレート
の分解方法およびポリエチレンテレフタ
レートの分解剤
- 出願番号 : 特願2024-084352
- 出願人 : 公立大学法人大阪
- 発明者 : 上田 光宏、辻本 健登、
黒木 智香子

産学連携の経歴

- 2007年-2009年 奈良の製薬会社と共同研究実施
 - 2019年-2024年 きのこ生産会社と共同研究実施中
 - 2020年-2022年 エネルギー商社と共同研究
 - 2020年-2022年 ハムメーカーと共同研究
 - 2024年～ サプリメント生産会社と共同研究中
- など

お問い合わせ先

大阪公立大学

URAセンター 池田 雅彦

T E L 072-254 - 9128

e-mail gr-knky-uracenter@omu.ac.jp