



プラスチックを食べる細菌

奈良先端科学技術大学院大学
研究推進機構研究推進部門／先端科学技術研究科
吉田 昭介

1. はじめに

石油化学によって生み出されるプラスチックは高い機能性とコストパフォーマンスを兼ね備えた素材であり、様々な製品において重要なパーツとなっている。プラスチックの世界生産は今や 3.1 億トン／年に達し、50 年前と比較して約 20 倍、20 年後にはさらに倍増すると試算されている。しかし便利さの反面、現在のプラスチック経済は化石資源を原資とした非循環型であり、持続可能性が低い。¹⁾

プラスチックの用途の中で最も需要が大きいのは包装容器であり、容積比にして 26% を占める。プラスチック容器包装材は、多くの場合、一回限りの使用で消費が速い。そして廃棄後、リサイクルされるごくわずかなものを除き、焼却、埋め立て、環境への流出といった経路を辿る。これまでに、使用済みプラスチックの利用方法の開発、環境への流出の阻止、化石資源に依存しないプラスチックの開発など、循環型経済を志向した様々なレベルでの取り組みが行われている。¹⁾

環境に流出したプラスチックは微生物による分解を受けずに蓄積し、景観の破壊や生物への物理的・化学的な悪影響をもたらす。海洋におけるマイクロプラスチックの小生物への影響も懸念されている²⁾。しかし本当にプラスチックは生分解されないのだろうか？実は近年、微生物によるプラスチックの分解に関する報告が増加傾向にある。ここに二例挙げる。Zettler らは海洋で採取されたポリエチレンやポリプロピレンのプラスチック片を調べ、独特な微生物叢の形成と、プラスチック片に陥入する微生物の存在を認めた³⁾。Yang らは蛾の幼虫からポリエチレンを分解する腸内細菌を分離している⁴⁾。ただ他を含め、いずれの報告も予備的な結果に留まっており、今後の研究の発展が期待される。

プラスチックを分解する微生物がいれば、喫緊のゴミ問題を解決する手段になるかもしれない。また我々人類にプラスチックとの上手な付き合い方を教えてくれるかもしれない。本稿著者らは最近、プラスチックの一種、ポリエチレンテレフタレート (PET) を分解・代謝する微生物を発見し、さらに PET の分解に関わる酵素を同定した^{5,6)}。本稿では、PET 資化細菌の探索と発見、これまでにわかった本菌の PET 代謝メカニズムについて紹介し、さらに PET 生分解の進化的な成り立ちについて考察する。

2. PET 資化細菌 *Ideonella sakaiensis* の発見

ペットボトルや食品用トレー、衣類等に汎用されているポリエチレンテレフタレート (PET、世界生産量：約 5,600 万トン) は、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリビニルクロライド、ポリスチレンと並ぶ主要なプラスチックの一つである。しかしその化学構造は主鎖が C-C 結合を延々と繰り返すほかの 4 つと根本的に異なる。PET はテレフタル酸とエチレングリコールが縮重合した芳香族ポリエステルである (図 1)。自然界にはエステル結合を加水分解する微生物由来酵素が豊富かつ多様に存在するため、PET を加水分解する酵素が存在する可能性が期待できる。しかし実際には、PET の生分解性は極めて低いとされている^{7, 8)}。微生物による PET 分解については報告例が極めて少なく、*Fusarium* 属の真菌が PET を炭素源として分解、生育するというわずかな記述が認められるくらいである^{9, 10)}。

我々は PET を分解する微生物は、PET が豊富に存在し、且つ、微生物にとって利用しやすい炭素源が不足している場所に存在するのではないかと考えた。そのアイデアに該当する場所の一つとしてペットボトルリサイクル工場を選び、PET の破片が混在した土壌や堆積物、処理水などの様々なサンプルを採取し、微生物分離源とした。これらサンプルを非晶性の PET フィルムを主炭素源とする液体培地に投入し、培養した。その結果、PET フィルム上に細菌、酵母様細胞、原生動物など多種多様な微生物から構成される凝集塊を見出した (図 2 a)。この微生物凝集塊を取り除くと、顕著な PET フィルムの分解の進行が確認できた (図 2 b)。次に、PET 分解微生物群に対し、限界希釈と、PET フィルムを主炭素源とする培養を行うことで、PET 分解菌の分離を試みた。一連の実験によって、PET フィルム分解活性を示す菌株の純粋分離に成功した。本菌株は PET フィルム (20×15×0.2 mm, 60 mg) と接着し、6 週間でその原型をほぼ消失させた (図 3)。後に本菌は 16S rRNA 解析などから *Ideonella* 属に分類される新種と判明し、*Ideonella sakaiensis* 201-F6 株と命名した¹¹⁾。

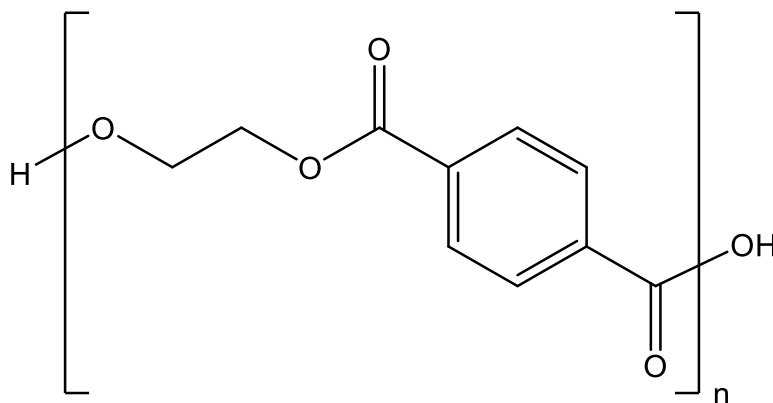


図 1 PET の化学構造式

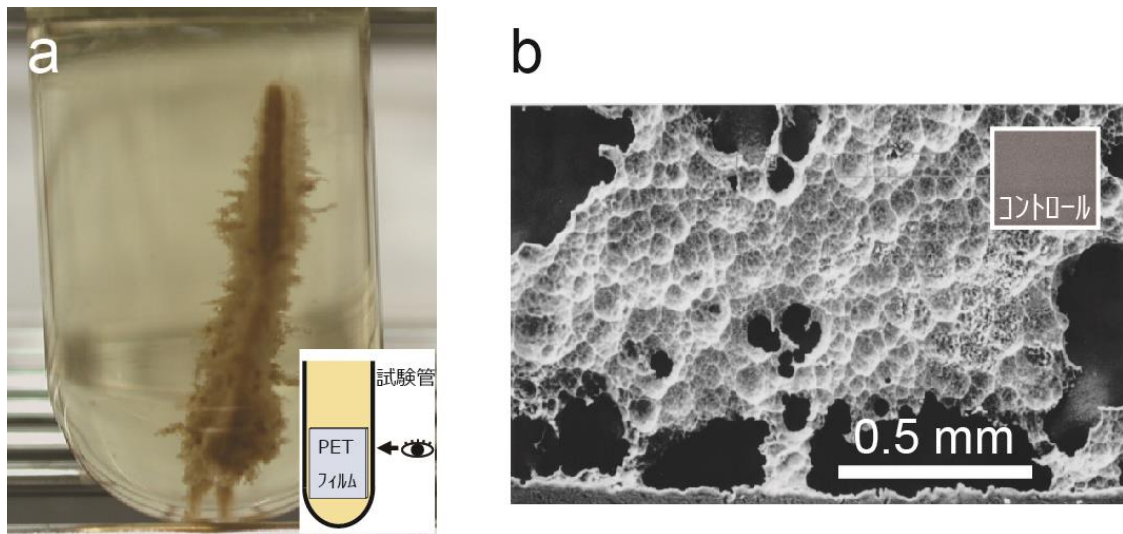


図1 微生物群による PET フィルムの分解 (a)PET フィルム上に微生物塊を形成する様子 (b)分解された PET フィルムの SEM 画像 フィルムが薄くなり、貫通（黒い部分）が認められる。

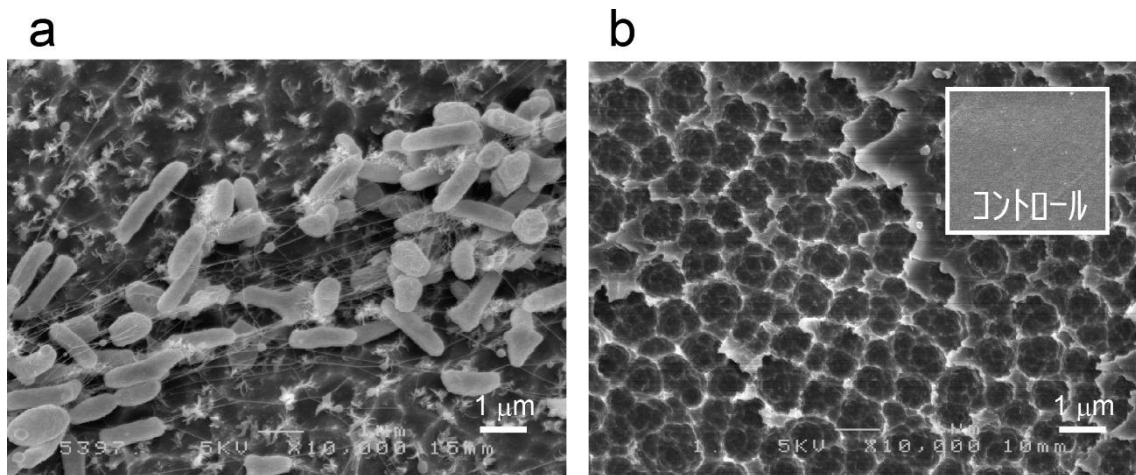


図3 PET フィルムを主炭素源とする培地で生育した *I. sakaiensis* の FE-SEM 画像 (a)PET フィルム上に付着した菌体 (b)菌体除去後の PET フィルム 分解痕が明瞭に観察できる。

3. *I. sakaiensis* の PET 分解メカニズムの解明

3-1 PET 加水分解酵素の探索と機能解析

PET 分解酵素に関する情報を得るため、*I. sakaiensis* の次世代シーケンサーを用いた全ゲノムシーケンスを実施し、解析の結果 5527 個のタンパク質コード領域と考えられる読み

粹 (ORF) を見出した。近年、一部のリパーゼ、クチナーゼといった脂肪酸エステル加水分解酵素がわずかな PET 分解活性を示すことが多数報告されている^{12, 13)}。これら PET 加水分解活性が報告されていた酵素の配列を手掛かりとして用いて ORF を探索したところ、*Thermobifida fusca* 由来の加水分解酵素 TfH¹⁴⁾と 51%の相同性を有する配列をコードする ORF ISF6_4831 を見出した。そこで本 ORF に着目し、大腸菌を用いて組換えタンパク質を調製し、PET フィルムと共にインキュベートした。その結果、PET フィルム表面に無数のクレーター状分解痕が認められた (図 4 a)。さらにその反応溶液を逆相 HPLC で分析したところ、分解産物と考えられるテレフタル酸、モノヒドロキシエチルテレフタレート (MHET)、ビスヒドロキシエチルテレフタレート (BHET) に対応するピークが認められた (図 4 b)。これらの結果から、ISF6_4831 が PET 加水分解活性を有する酵素をコードする遺伝子であることがわかった。次に、本酵素と既報の PET 加水分解活性をもつ酵素との機能比較を試みた。まず、これら既報酵素のうちアミノ酸配列が公開されていた 11 配列との進化系統樹を作製した (図 5 a)。本系統樹上でそれぞれ進化的に分岐した好熱性放線菌由来酵素 TfH¹⁴⁾、枝葉コンポストのメタゲノム由来酵素 LCC¹⁵⁾、真菌由来酵素 FsC¹⁶⁾の 3 種を比較対象として選択した。これらの組換えタンパク質を調製し、ISF6_4831 タンパク質と同条件下 (pH7.0、30°C) で活性測定を行った。まず、リパーゼやクチナーゼの基質となる脂肪酸エステルとして、炭素鎖長 2、4、6、8 の直鎖脂肪族カルボン酸と発色団 *para*-nitrophenol が脱水縮合した人工基質を用いた。これらの基質に対し、ISF6_4831 タンパク質は 3 種の酵素と比べ、総じて低活性であった (図 5 b 左)。一方、PET フィルムに対しては、TfH の 120 倍、LCC の 5.5 倍、FsC の 88 倍の活性を示した (図 5 b 右)。

$$\text{PET に対する基質特異性} = \frac{\text{PET フィルム加水分解活性}}{\text{脂肪酸エステル加水分解活性}}$$

と定義すると、ISF6_4831 タンパク質の PET に対する基質特異性は TfH の 380 倍、LCC の 48 倍、FsC の 400 倍であった。このように、本酵素は PET に対してより高い基質特異性を持つことから、PET hydrolase (PETase) と命名した。最近、国際生化学分子生物学連合 (IUBMB) により、新しいカルボン酸エステル加水分解酵素として酵素番号 EC 3.1.1.101 が PETase に割り当てられた。

次に、PETase、TfH、LCC、FsC の PET 加水分解活性に対する温度の影響を調べた。PETase は 3 種の酵素と比べ、40°C 以下で高い PET 分解活性を示し (図 5 c)、45°C では熱変性の兆候を示した。Marten らは、ポリエステル鎖の可動性は、その融点と実際の温度の差と連動するとし、この差が小さいほど、酵素分解されやすいことを報告している^{17, 18)}。PET のガラス転移点は約 75°C であり、常温では流動性が低下したガラス状態にある。よって PETase はガラス状態の PET にも作用しやすい機構を有していると考えられた。

PETase の PET に対する高い基質特異性、常温域における高活性は *I. sakaiensis* が環境中で PET を炭素源として生存するために有利な性質と考えられる。

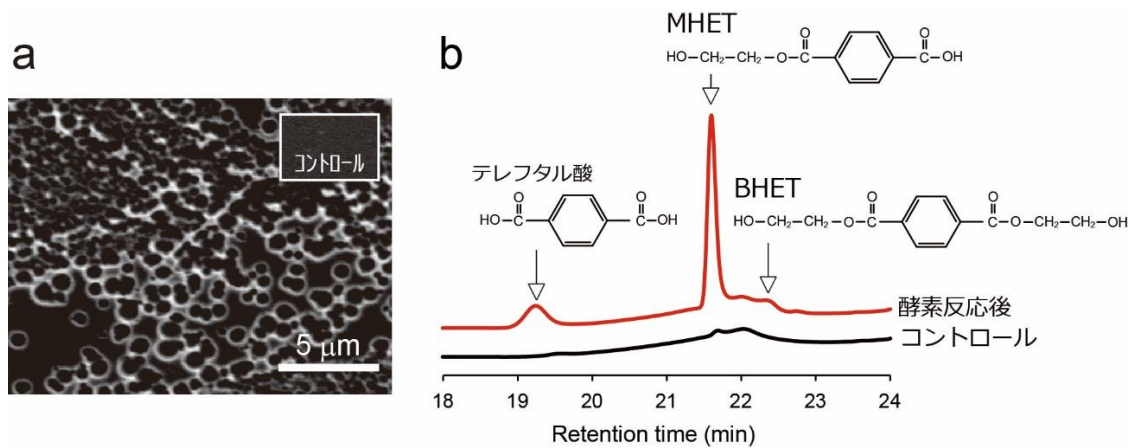


図4 ISF6_4831 タンパク質 (PETase) による PET フィルムの分解 PET フィルムと精製 ISF6_4831 タンパク質 (50 nM) を 30°C で 18 時間インキュベートした。(a)PET フィルム表面の SEM 画像 直径 1 μm 程度の分解痕が認められる。(b)反応溶液の逆相 HPLC による分析チャート

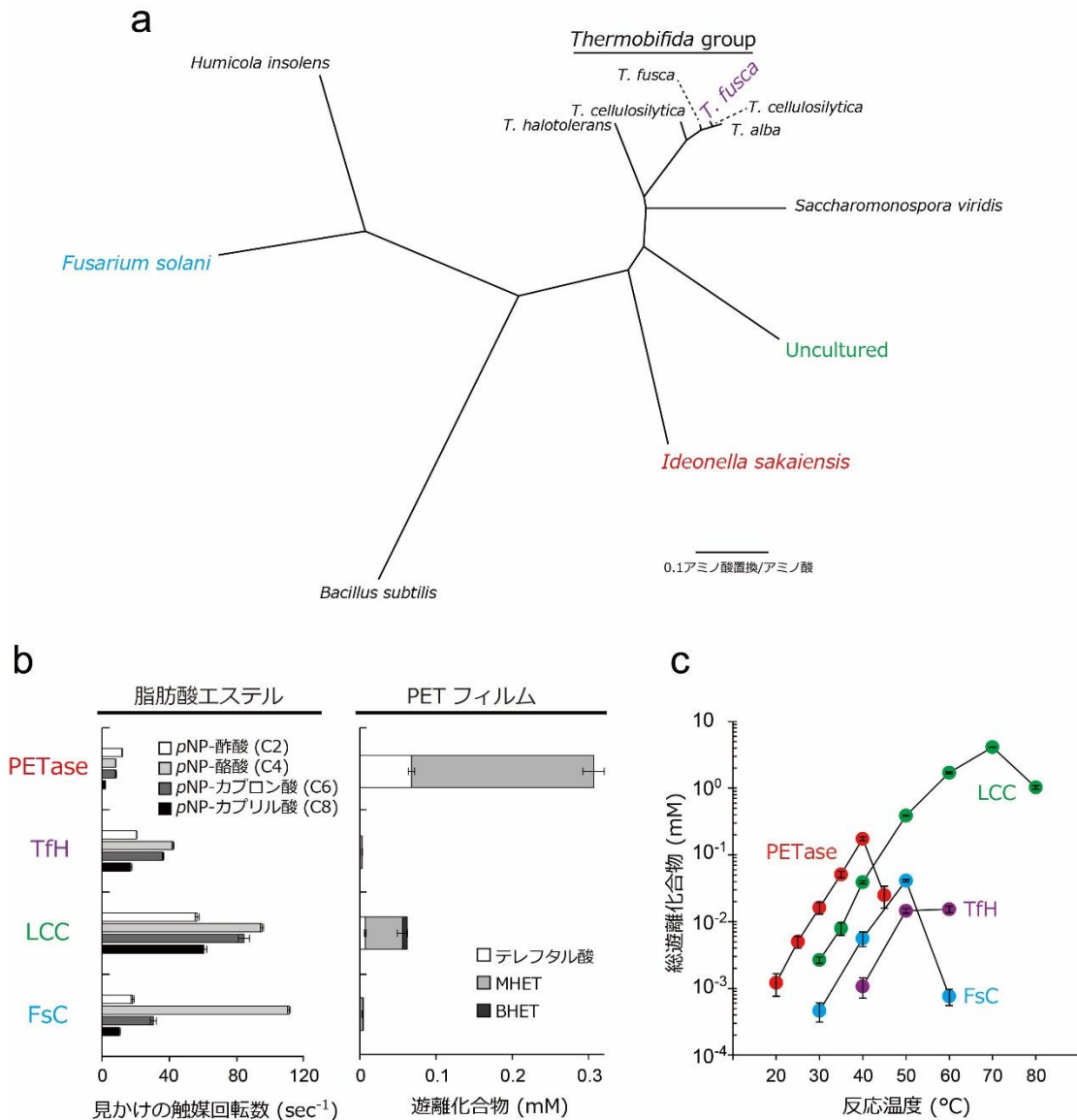


図5 ISF6_4831 タンパク質 (PETase) の比較機能解析 (a)PET 加水分解活性をもつ酵素の無根系統樹 葉部分に該当酵素の由来生物を示した。*T. fusca* 由来 TfH (紫)、未培養生物由来 LCC (緑)、*Fusarium solani* 由来 FsC (シアン) を *I. sakaiensis* 由来 PETase (赤) との比較に用いた。(b)PET 加水分解活性を持つ 4 酵素の基質特異性 酵素反応は pH7.0、30°C で行った。PET フィルムに 50 nM 精製酵素を加えて 18 時間インキュベートした。(c) PET 酵素分解への温度の影響 PET フィルムと PETase (50 nM)、TfH、LCC、FsC (各 200 nM) をそれぞれ pH9.0、各温度下で 1 時間インキュベートした。

3-2 MHET 加水分解酵素の探索と機能解析

PETase は PET フィルムを加水分解し、主に MHET とテレフタル酸を反応溶液中に遊離した。PETase はこの MHET に対して加水分解活性を示さなかった。一方で、*I. sakaiensis* を PET フィルムとともに培養し、その培養上清中の MHET 濃度を測定したところ、その濃度は分解された PET 量に相当する MHET ユニットと比べ、極めて低濃度であった。以上の事実から、*I. sakaiensis* は菌体内に MHET を取り込み、その代謝酵素として MHET 加水分解酵素を有していると推察した。これまでに PET 加水分解活性を持つ一部の酵素において MHET 加水分解活性が報告されている¹⁹⁻²¹⁾。しかし、*I. sakaiensis* ドラフトゲノム上でそれらのホモログをコードする ORF は PETase 遺伝子のみである。したがって、これらの既知酵素とは全く配列の異なるタンパク質が MHET の加水分解を担っていると考えられた。そこで、*I. sakaiensis* の網羅的な遺伝子発現解析による MHET 加水分解酵素遺伝子情報の獲得を試みた。まず、*I. sakaiensis* をマルトース、テレフタル酸ナトリウム、BHET、PET フィルムをそれぞれ主炭素源として培養した。テレフタル酸、BHET は *I. sakaiensis* の PET 中間代謝物である。マルトースは PET 代謝の陰性対照として用いた。それぞれ対数増殖期中期にある菌体から mRNA を回収し、次世代シーケンサーにより網羅的に配列を解読後、*I. sakaiensis* ドラフトゲノム上へマッピングして各 ORF の発現量を見積もった。次に、各 ORF の 4 種の培地における発現パターンをクラスタリング解析により分類した。その結果から、PETase 遺伝子と同クラスターに分類された ORF ISF6_0224 に注目した。両 ORF は、PET フィルムを主炭素源とする培地において最も高発現であった。これらのことから、ISF6_0224 は PETase 遺伝子と類似の発現制御を受けていると推測され、同時に代謝経路を共有している可能性が示唆された。また、ISF6_0224 タンパク質の一次配列は没食子酸エステルやフェルラ酸エステル、クロロゲン酸などの芳香族化合物のエステル結合を加水分解する酵素の一群 tannase ファミリーに属し、本ファミリーの触媒三残基 (Ser、His、Asp)、及び特徴的な二つのシステイン残基は保存されている²²⁾。以上の理由から、ISF6_0224 を MHET 加水分解酵素候補遺伝子とした。ISF6_0224 組換えタンパク質を製作し、MHET に対する活性を測定したところ、明瞭な加水分解活性を示した。本酵素は MHET に対して Michaelis-Menten 型の反応速度論的挙動を示し、そのパラメーターは $k_{cat} = 31 \text{ s}^{-1}$ 、 $K_m = 7.3 \text{ }\mu\text{M}$ と極めて触媒効率が高かった。その一方で、ISF6_0224 タンパク質は tannase ファミリーに属する酵素が基質とする典型的な化合物や、PET フィルム、脂肪酸エステル人工基質には活性を示さなかった。以上のように、本酵素が極めて高い MHET に対する基質特異性を示したことから、MHET hydrolase (MHETase) と命名した。最近、PETase 同様、本酵素にも新たな酵素番号 EC 3.1.1.102 が付与された。

4. PET 生分解の進化的な成立についての考察

I. sakaiensis は PET を唯一の炭素源とし、PETase と MHETase の新規両酵素を用いることでテレフタル酸とエチレングリコールにまで加水分解し、それらを資化することで生



育することができた。我々は、①*I. sakaiensis* が自然界には元来存在しない PET を分解すること、②PETase、MHETase はそれぞれの PET 分解における触媒機能の役割分担がはっきりと分かれていること、から PET 分解経路の進化的な成立について興味を持った。そこで、自然界における PET 分解経路の存在を調べるために、ゲノムが明らかになっている微生物を対象として、PET 代謝に必須と考えられる PETase、MHETase、テレフタル酸ジオキシゲナーゼ、プロトカテク酸ジオキシゲナーゼ (図6) のホモログ遺伝子を検索した。その結果、これらの遺伝子セットを完全に有する微生物は *I. sakaiensis* 以外に見出されなかった。一方で MHETase ホモログを持つ微生物のうち約 36%はテレフタル酸ジオキシゲナーゼ、プロトカテク酸ジオキシゲナーゼを共に有することがわかった。このことから、MHET アナログに対する代謝系の成立は比較的早く、最近になって PETase ホモログが追加されることで、代謝系の拡張がなされたのではないかと考えている。これまでに *Ideonella* 属の type strain として *I. dechloratans* CCUG 30898^T と *I. azotifigens* JCM 15503^T の 2 株が報告されている。しかし、これら 2 株は *I. sakaiensis* と同様の条件において PET フィルムを分解しなかった。このことから PETase ホモログの追加は次世代への継代 (垂直伝播) ではなく、他生物からの水平伝播ではないかと考えている。一方で、酵素の分子進化による基質特異性の向上も本経路の成立に必須である。自然界や試験管内での PET が豊富且つ他の炭素源が乏しい環境が、これら代謝遺伝子セットの自然選択、酵素の分子進化を促進したのではないかと推察している。

5. おわりに

PET を食べる細菌の発見と、その分解・代謝メカニズムについて述べてきた。酵素の生化学的解析、系統学的解析からは、*I. sakaiensis* の PET に対するアプローチの軌跡を垣間見ることができた。我々は本細菌から、人間が開発したプラスチックを人間社会でうまく循環させる手段を見つけられたであろうか。その答えは今後、様々なプラスチック分解・代謝微生物が分離され、その詳細なメカニズムが解明されることにより、微生物が我々人間にさらなる学びを与えてくれることで発展すると考えている。

本稿で紹介した研究は、京都工芸繊維大学、慶應義塾大学、帝人株式会社、株式会社 ADEKA との共同で行われました。共同研究者の皆様に深く御礼申し上げます。

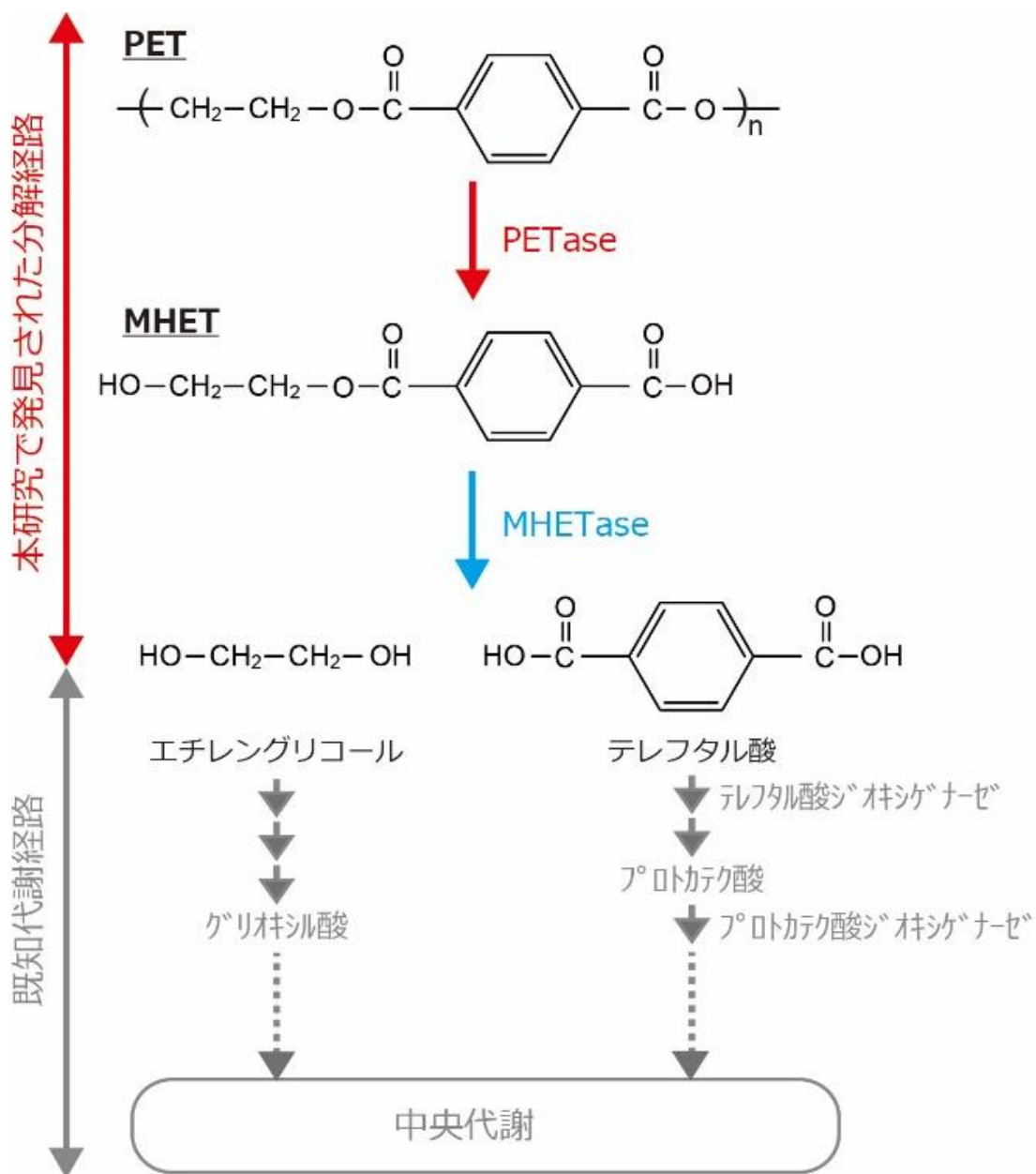


図6 *I. sakaiensis* による予想 PET 代謝機構

参考文献

- 1) L. Neufeld, F. Stassen, R. Sheppard, T. Gilman, Eds., *World Economic Forum*, 2016, www3.weforum.org/docs/WEF_The_New_Plastics_Economy.pdf. (2016).
- 2) K. L. Law, R. C. Thompson, *Science*, **345**, 144 (2014).
- 3) E. R. Zettler, T. J. Mincer, L. A. Amaral-Zettler, *Environ Sci Technol*, **47**, 7137 (2013).
- 4) J. Yang, Y. Yang, W. M. Wu, J. Zhao, L. Jiang, *Environ. Sci. Technol.*, **48**, 13776 (2014).



- 5) S. Yoshida, K. Hiraga, T. Takehana, I. Taniguchi, H. Yamaji, Y. Maeda, K. Toyohara, K. Miyamoto, Y. Kimura, K. Oda, *Science*, **351**, 1196 (2016).
- 6) S. Yoshida, K. Hiraga, T. Takehana, I. Taniguchi, H. Yamaji, Y. Maeda, K. Toyohara, K. Miyamoto, Y. Kimura, K. Oda, *Science*, **353**, 759 (2016).
- 7) R. J. Müller, I. Kleeberg, W. D. Deckwer, *J. Biotechnol.*, **86**, 87 (2001).
- 8) D. Kint, S. Munoz-Guerra, *Polym. Int.*, **48**, 346 (1999).
- 9) T. Nimchua, H. Punnapayak, W. Zimmermann, *Biotechnol. J.*, **2**, 361 (2007).
- 10) T. Nimchua, D. E. Eveleigh, U. Sangwatanaroj, H. Punnapayak, *J. Ind. Microbiol. Biot.*, **35**, 843 (2008).
- 11) S. Tanasupawat, T. Takehana, S. Yoshida, K. Hiraga, K. Oda, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **66**, 2813 (2016).
- 12) D. Ribitsch, E. H. Acero, K. Greimel, I. Eiteljoerg, E. Trotscha, G. Fredd, H. Schwab, G. M. Guebitz, *Biocatal. Biotransform.*, **30**, 2 (2012).
- 13) W. Zimmermann, S. Billig, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, **125**, 97 (2010).
- 14) R. J. Müller, H. Schrader, J. Profe, K. Dresler, W. D. Deckwer, *Macromol. Rapid Commun.*, **26**, 1400 (2005).
- 15) S. Sulaiman, S. Yamato, E. Kanaya, J. J. Kim, Y. Koga, K. Takano, S. Kanaya, *Appl. Environ. Microbiol.*, **78**, 1556 (2012).
- 16) C. M. Silva, F. Carneiro, A. O'Neill, L. P. Fonseca, J. S. M. Cabral, G. Guebitz, A. Cavaco-Paulo, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, **43**, 2448 (2005).
- 17) E. Marten, R. J. Müller, W. D. Deckwer, *Polym. Degrad. Stab.*, **80**, 485 (2003).
- 18) E. Marten, R. J. Müller, W. D. Deckwer, *Polym. Degrad. Stab.*, **88**, 371 (2005).
- 19) A. Eberl, S. Heumann, T. Bruckner, R. Araujo, A. Cavaco-Paulo, F. Kaufmann, W. Kroutil, G. M. Guebitz, *J. Biotechnol.*, **143**, 207 (2009).
- 20) E. H. Acero, D. Ribitsch, G. Steinkellner, K. Gruber, K. Greimel, I. Eiteljoerg, E. Trotscha, R. Wei, W. Zimmermann, M. Zinn, A. Cavaco-Paulo, G. Freddi, H. Schwab, G. Guebitz, *Macromolecules*, **44**, 4632 (2011).
- 21) D. Ribitsch, S. Heumann, E. Trotscha, E. Herrero Acero, K. Greimel, R. Leber, R. Birner-Gruenberger, S. Deller, I. Eiteljoerg, P. Remler, T. Weber, P. Siegert, K. H. Maurer, I. Donelli, G. Freddi, H. Schwab, G. M. Guebitz, *Biotechnol. Prog.*, **27**, 951 (2011).
- 22) K. Suzuki, A. Hori, K. Kawamoto, R. R. Thangudu, T. Ishida, K. Igarashi, M. Samejima, C. Yamada, T. Arakawa, T. Wakagi, T. Koseki, S. Fushinobu, *Proteins*, **82**, 2857 (2014).