

論文内容の要旨

申請者氏名 Chong Jia Fong

ポリエチレンテレフタレート (PET) を炭素源として増殖する能力を持つ *Ideonella sakaiensis* の PET 分解に関与する酵素として、PETase と MHETase が同定されている。しかし、本菌の効率的な PET 分解のメカニズムは未だ不明であった。

申請者は、*I. sakaiensis* の PET を炭素源とする培養において、PETase が PET フィルム表面に局在することを発見した。そこで、*I. sakaiensis* が PET 分解に重要なタンパク質を栄養体上に集合させていると仮説を立て、定量プロテオミクスを行ったところ、MHETase ホモログである IS3653 が PET フィルム表面に局在していることを見出した。本タンパクの機能解析の結果は大きく以下の四つに分けられる。

(1) マルトース結合タンパク融合 IS3653 は、ビス (2-ヒドロキシエチル) テレフタル酸 (BHET)、ビス (ベンゾイルオキシエチル) テレフタル酸 (BETEB)、安息香酸 2-ヒドロキシエチル (HEB) などの PET オリゴマーを加水分解したが、MHET や PET は加水分解しなかった。この基質特異性は、PETase、MHETase とは異なっていた。

(2) AlphaFold2 を用いた構造モデル化で、IS3653 が典型的な α/β -ヒドロラーゼドメインとリッドドメインを持ち、MHETase と類似していることがわかった。IS3653 の基質結合ポケットは MHETase よりも疎水性アミノ酸残基で構成されており、疎水性残基は BHET の脂肪族鎖を安定化させるが、MHET の極性カルボキシル基の位置を不安定化させると考えられた。

(3) IS3653 遺伝子破壊により、*I. sakaiensis* の PET フィルム上での増殖の遅れ、PET 分解量が減少が認められた。一方、BHET、MHET、テレフタル酸 (TPA)、エチレングリコール (EG) などの PET 構成成分では、顕著な増殖の差は観察されなかった。これらの結果から、IS3653 が *I. sakaiensis* の PET 分解に直接的に関与していることが示された。

(4) IS3653 のエキソ PETase 活性を調べるため、可溶性共重合体 PET を PETase で部分的に消化して末端を増加させた後、IS3653 を作用させると、分解産物として MHET のみが検出されるようになった。さらに、PETase と PET フィルムとの反応において、低濃度の IS3653 を加えることで、PETase のみの場合と比較して PET からの MHET の遊離が増加した。

以上の結果から、IS3653 は PET の EG 末端から攻撃し、MHET 単位ごとにエステル結合を切断できることが示された。また、IS3653 はエキソ PET 加水分解酵素であり、エンド型である PETase との相乗作用により効率的な PET 加水分解に寄与し、*I. sakaiensis* の PET 分解を促進する可能性が示唆された。

やむを得ない事由[図書出版, 学術雑誌等への掲載, 特許・実用新案出願, 個人情報等の保護, その他 ()]により本要旨を非公表とする。

【※該当する事由に○印をすること】

論文審査結果の要旨

申請者氏名 Chong Jia Fong

*Ideonella sakaiensis*201-F6 株は、ポリエチレンテレフタレート (PET) 分解細菌唯一の分離株であり、そのメカニズムの解明は基礎科学および応用科学的に重要な意味を持つ。これまでに PET 分解に関与する酵素として、PETase と MHETase が同定され、本菌による PET の酵素分解メカニズムが部分的に立証されてきた。そこで申請者は、*I. sakaiensis* の PET 分解メカニズムのさらなる解明を目的とした。申請者は、本菌の PET を炭素源とする培養において、PETase が PET フィルム表面に局在することを発見した。そしてこのことから着想を得て、プロテオミクス解析を行い、その結果、MHETase ホモログである IS3653 が同様の局在性を示すことに着目し、種々解析を行った。以下にその結果や知見を示す。

(1) IS3653 は、BHET、BETEB、HEB などの PET オリゴマーを加水分解することがわかった。その一方で、MHET や PET を分解しなかった。以上のことから、これまでに同定された PETase や MHETase と異なる基質特異性を有する新規酵素であることを示した。

(2) IS3653 の基質結合ポケットは MHETase よりも疎水性アミノ酸残基で構成されており、疎水性残基は BHET の脂肪族鎖を安定化させるが、MHET の極性カルボキシル基の位置を不安定化させることを示した。

(3) *Is3653* 遺伝子破株が PET 炭素源の時のみ顕著な増殖の遅れや PET 分解量の減少を示したことから、IS3653 が *I. sakaiensis* の PET 分解に直接関与している可能性を示した。

(4) IS3653 は、可溶性 PET を部分的に PETase で消化して末端を増加させることで活性を示した。またその分解産物として MHET のみを検出した。PETase と IS3653 をモル比で 100:1 で加えることで、PET フィルムからの MHET 遊離が顕著に増加した。

以上の結果から、IS3653 はエキソ PET 加水分解酵素であり、エンド型である PETase との相乗作用により効率的な PET 加水分解に寄与し、*I. sakaiensis* の PET 分解を促進しうる可能性が示唆された。

以上のように、本論文は PET 分解菌 *Ideonella sakaiensis* の効率的な PET 分解を担う新しい酵素の同定を行ったもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士 (バイオサイエンス) の学位論文として価値あるものと認めた。

やむを得ない事由 [図書出版, 学術雑誌等への掲載, 特許・実用新案出願, 個人情報等の保護, その他 ()] により本要旨を非公表とする。

【※該当する事由に○印をすること】