

Ideonella sakaiensisのPET分解

西大和学園高等学校 前中蒼 石川美音

背景、目的

これまで不可能だと考えられていたプラスチックの生分解を、複数の生物が行えるということが明らかになってきている。その中でも *Ideonella sakaiensis* という細菌はPETの生分解が可能で、世界的に注目されている。



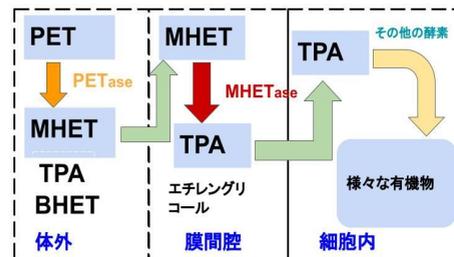
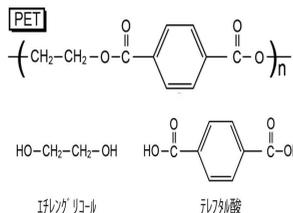
この細菌の代謝経路に関わる複数の物質のうち、TPA、MHET、BHETの濃度や酵素反応の速度に差があると予想。

→ *I. sakaiensis* の光学顕微鏡写真



1. PETはポリエステル系のプラスチックの一種で、エチレングリコール(EG)とテレフタル酸(TPA)が一つずつ繋がったMHETが多数連結して出来た物質。

2. *I. sakaiensis*はPETaseを体外に放出しPETをMHETに変えた後、それを二重膜の間に取り込む。次にMHETaseを使ってMHETをEGとTPAに分解し、それらを自らの代謝に利用する。



*I. sakaiensis*のPET分解の様子→

<Biodegradation of PET: Current Status and Application Aspects>
Taniguchi & Yoshida et al, ACS Catalysis 2019

実験手法

1. 菌体混濁液を2つ用意し片方に超音波破碎を行い、菌体破碎液と菌体混濁液を作った。

2. 30μMのPETase液、菌体混濁液、菌体破碎液を作り、直径6mmのPETフィルムを沈めた。それらに50mM Phosphate buffer (pH7.5)に加えて3種類のサンプルを作り、30°Cで24時間反応させた。

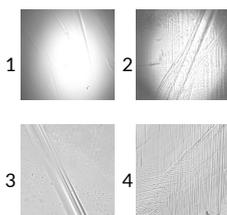
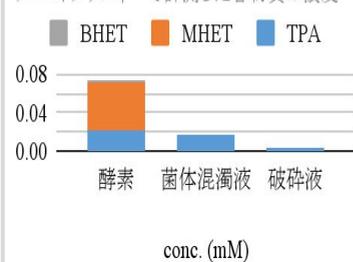
3. 各サンプルの上清を逆相クロマトグラフィーにかけ、MHET、TPA、BHETの濃度を調べた。またそれぞれのPETフィルムの表面を、光学顕微鏡で観察した。

サンプルに含まれる酵素の種類

	PETase液	混濁液	破碎液
PETase	○	○	○
MHETase	×	○ (膜内)	○
TPA分解酵素	×	○ (細胞内)	○

結果

クロマトグラフィーで計測した各物質の濃度



* 1bufferのみ、2酵素、3混濁液、4破碎液の溶液に入ってたフィルムの写真

1. PETase液ではMHET、TPA、BHETの三種類が見られたが、混濁液、菌体破碎液ではTPAのみでMHET及びBHETが全く検出されなかった。

2. 菌体混濁液と菌体破碎液で、TPAの濃度に差があった。

3. 分解後の写真を観察すると、1以外のすべての写真に分解の痕跡が見られた。

考察

1. 結果1より

(MHETの分解速度) > (MHETの生成速度) だと言える。

2. 結果3よりいずれのサンプルでも酵素反応は起こっていた。

3. 結果2、考察2より2つの可能性を考えた。

<1> 菌体破碎によって菌の外膜に存在する、菌がPETの表面に付着することを助ける構造が壊れ、酵素反応の効率下がった。

<2> 菌体破碎によって膜内のMHETaseやTPAの分解に関わる酵素が上清に含まれる、このときそれぞれの上清に含まれるTPAの量は、

混: (PETaseの生成するTPA) - (TPAが細胞に取り込まれた量)

破: (PETaseの生成するTPA) + (MHETaseの作るTPA) - (酵素分解されたTPAの量)

で表せるので、

(TPA分解酵素によるTPA分解速度) > (MHETaseがTPAを生成速度)

であった。

* 今回は *I. sakaiensis* が膜外のTPAを取り込み分解している可能性を考慮したが、確実ではなくその量も少ないと思われる。

結論

1. (MHETの分解速度) > (MHETの生成される速度) であり、各物質の分解速度に差があるという仮説は正しいとわかった。

2. 菌体混濁液と菌体破碎液でTPA量に差が見られたがこれらは、
・超音波破碎による外膜上の構造の破壊による酵素反応の効率低下。

・超音波破碎による、本来膜内にも存在するはずの、MHETaseやTPA分解酵素の上清中への拡散による可能性がある。

展望

考察3で言及した2つの可能性の内、<2>について詳しく調べ、その真偽を確かめたい。また今回の実験ではEGやその他の生成物については濃度を測定しなかったため、次の実験では行いたい。

謝辞

NAISTの吉田昭介先生、和気様、南様、引率に来ていただいた先生方には貴重な体験やアドバイスを頂き感謝申し上げます。