

エラストマー合成酵素の分子機構の解明と機能改良

立命館大学生命科学部生物工学科 松村浩由

【研究内容および成果】

トランスポリイソプレンは、イソプレン分子が重合した高分子化合物であり、汎用工業製品への利用のほか、電子部品部材の原料としても利用される汎用プラスチック原料である。現在は主にナフサ等の熱分解産物から化学的に製造されるが、トチュウ、バラタゴムノキ等の植物は多量のトランスポリイソプレンを蓄積することが知られている。これら植物由来のトランスポリイソプレンは、化学合成されたもの比べて重合度が高く、トランス選択性が極めて高いという特徴をもつために幅広い用途が見込まれており、古くから電線用絶縁体や整形外科用装具材料として、最近ではゴルフボールや3Dプリンター用フィラメントとして利用されている。また、植物が産生するトランスポリイソプレンは、化学合成品に比べて高分子量かつ分子量分布が均一なため汎用化学品だけでなく高性能樹脂原料にもなる。

植物トチュウは、果皮にトランスポリイソプレンを蓄積することが知られている。このトランスポリイソプレンの生合成経路として、ジメチルアリルニリン酸 (DMAPP)、イソペンテニルニリン酸 (IPP) からファルネシルニリン酸 (FPP) が合成され、FPP にさらに IPP が縮合重合することでトランスポリイソプレンが合成されると考えられている (図 1)。FPP 合成酵素 (FPS) は、FPP を合成する反応を触媒する酵素であり、trans-polyisoprene transferase (TPT) は合成された FPP と IPP を基質としてトランスポリイソプレンを合成する反応を触媒する。

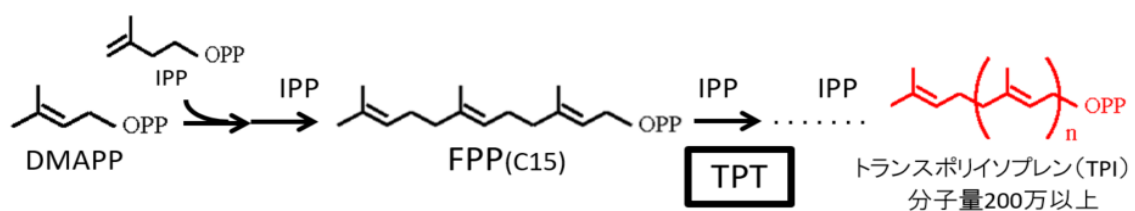


図 1 トランスポリイソプレンの生合成経路

FPS はこれまで様々な生物種において単離されている¹。1994年には初めてFPSの結晶構造が報告され、引き続いて、基質結合型の構造研究が報告されている²⁻⁴。そして、FPSについて通常ホモダイマーを形成し、疎水性の活性部位ポケットにおいてDDXXD配列のアスパラギン酸がMg²⁺を介して基質のリン酸基を結合していることが明らかになっている。一方で、TPTについては、その存在が確認されてきたが、その酵素の遺伝子が未同定で、酵素学的諸性質の解析や立体構造解析もなされてこなかった。

そこで本研究では、これらの酵素の詳細な触媒メカニズムを明らかにすることを目的と

して、TPT の酵素学的諸性質の解析、および構造生物学的研究に取り組んだ。酵素学的諸性質の解析および X 線結晶構造解析に成功し、これにより TPT と FPS で生成物の鎖長が異なる理由、また、二量体形成、生成物の鎖長伸長に影響を与えるアミノ酸を特定することができた。

【実験・結果・考察】

トチュウ TPT の候補遺伝子をコードした組み換えプラスミドを用いて JM109 (DE3) を形質転換し、これを 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ アンピシリンを含む LB 培地に植菌し、37°C、180 rpm で 3 時間振盪培養した。培養液を 4°C、5000 rpm で遠心分離機を用いて菌体を回収した。それらの菌体を破砕し、その上清を濾過したサンプルを Ni アフィニティーカラムクロマトグラフィー、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーにより精製した。カラムは HiLoad 16/600 Superdex 200 prep grade (GE Healthcare) を用いた。最終的に、回収サンプルを限外濾過により 5 - 10 mg/mL まで濃縮した。

つづいて結晶化を行った。結晶化スクリーニングキットの条件をもとに pH、PEG 濃度、塩濃度について条件を変えて温度 20°C、シッティングドロップ蒸気拡散法で行った結果、候補遺伝子のうち 3 種において X 線構造解析が可能な X 線回折能を有する結晶が得られた。その結晶を用いて大型放射光施設 SPring-8 にて X 線回折実験を行い、分解能 3.1 Å までの回折強度データ収集に成功し、構造精密化を行うことができた。

酵素の活性測定の結果、候補遺伝子 5 種のうち TPT が 3 種類、FPS が 2 種類であることが分かった。今回は、TPT と FPS の両方において X 線構造解析することができ、それらの立体構造を図 2 に示す。

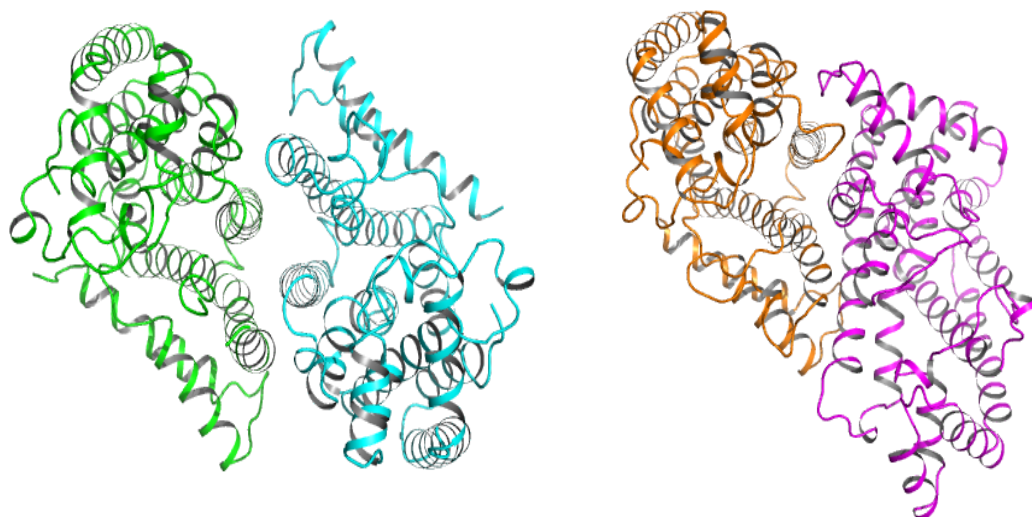


図 2 TPT (左) と FPS (右) の立体構造

FPS については、これまで構造解析されてきた FPS とモノマーの構造、およびダイマーの構造が一致した。例えば、FPS に特徴的な 2 つの DDXXD 配列 (FARM : First Aspartic

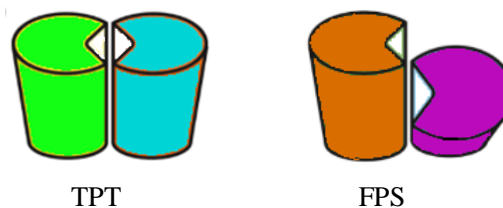


図 3 二量体の組み方の模式図

Rich Motif, SARM : Second Aspartic Rich Motif) も保存されていた。一方で、TPT については同様にダイマーとして存在していたが、FPS と比べるとひねられたような形で二量体を組んでいた。図 2 に示した、TPT の緑のサブユニットとオレンジのサブユニットはほぼ同じ方向から投影した図であるため、右の水色と紫のサブユニットの方向が異なることが図からも分かる。つまり、図 3 のように、TPT と FPS は二量体の組み方が異なっていることが明らかとなった。

一方で、TPT と FPS には立体構造的にも共通する部分が多かった。例えば、活性部位ポケットにおいては DDXXD 配列が保存されていて、その立体的な位置関係も同じであった。ホモダイマーを形成し、アスパラギン酸が Mg^{2+} を介して基質のリン酸基と結合するであろうという点も一致していることから、トランスポリイソプレンを合成する触媒メカニズムは同一であることが示唆された。

これらの結果から、触媒メカニズムは同一であるが、一方で生成物の排出メカニズムが異なる可能性が示唆された。つまり、TPT の生成物は二量体界面のトンネルを通して伸長し、炭素数数万のポリマーを合成することができ、一方で FPS はその排出するトンネルがふさがっているため生成物伸長が阻害され、炭素数十までしか伸長できないのではないかと予想された。

そこで、TPT のトンネルに位置するアミノ酸であるシステイン、アラニンを嵩高いアミノ酸であるチロシン、フェニルアラニンに変異させてトンネルを塞いだ変異体を作成し、活性測定を行った。その結果、想定通り、TPT 変異体はポリマーを合成できなくなっており、TPT と FPS の立体構造比較から得られた仮説を裏付ける結果を得ることができた。

【総括】

トチュウ TPT および FPS の酵素の諸性質の解析、およびの X 線結晶構造解析に成功し、これにより TPT と FPS で生成物の鎖長が異なる理由、また、二量体形成、生成物の鎖長伸長に影響を与えるアミノ酸を特定することができた。今回の研究で TPT と FPS の触媒メカニズム反応の共通点、およびトランスイソプレン排出メカニズムの相違点が明らかになったことから、FPS を TPT に改良できるきっかけを掴んだ研究と考えている。FPS は全ての生物に保存された酵素であるため、例えば、好熱菌 FPS を改良して、耐熱性を維持した TPT が開発できれば、産業への応用という面においても重要な成果となる。本酵素の合成

メカニズムは学術的にもインパクトが大きく、今後、本研究を基盤として、酵素改良などのさらなる発展的研究を計画している。

【参考文献】

1. Ogura, K. & Koyama, T. *Chem Rev.* **98**, 1263-1276 (1999)
2. Tarshis, L. et al *Biochemistry.* **33**, 10871-10877 (1994)
3. Tarshis, L. et al *PNAS.* **93**, 15018-15023 (1996)
4. Kajiura H. et al., *Biochim.* **139**, 95-106 (2017)