

有用ポリマー合成酵素の構造機能解析

Structure-function analysis of polymer synthases

(日本結晶学会推薦)

代表研究者 立命館大学

松村 浩由

Ritsumeikan University

Hiroyoshi MATSUMURA

Transpolyisoprene (TPI) is a natural rubber produced in higher plants. The biomass elastomers can be used in industrial applications as rubber, polymers, and chemical and medical products. Especially, TPI have been recently used as 3D printer filaments and golf ball coverings. However, the amount of TPI in the plant tissue limits their use; therefore, increase in TPI amount in plants will give new values in industrial applications.

Although previous expressed sequence tag analysis of *Eucommia ulmoides* identified five candidate genes (TPT1-5) responsible for synthesis of TPI, the molecular mechanism of TPI synthesis is still unknown. In this study, we designed expression constructs of TPT1-5, expressed, purified these enzymes for crystallization, collected the X-ray diffraction data, determined the structures, and made the mutants for functional analysis. Functional analysis and structural comparison of these enzymes shows that novel dimeric architecture of the enzyme enable production of ultra long chain TPI, despite the apparent homology with the monomeric architecture among these enzymes. Structure-based mutational study suggests how TPT elongates the ultra long-chain TPI.

研究目的

トランスポリイソプレン (TPI) ポリマーは陸上高等植物中で産出される天然ゴムの一種である。陸上植物のなかでも落葉高木のトチュウは、葉や樹皮等に多量の TPI を蓄積することが知られている。トチュウ TPI は、化学合成されたものに比べて重合度が高く分子量 100 万 Da を超える巨大分子であること、トランス選択性が高く分子量分布が狭い、加工や修飾がしやすいといった特徴をもつ。また、トチュウは、温帯性の耐乾性樹木のため荒廃地への大規模植林が容易であるため、工業的な利用価値が高い。したがって、最近でもトチュウ TPI はゴルフボールのカバー材や 3D プリンターのフィラメント材として工業的に利用されている。

一方で、トチュウ組織内に蓄積する TPI 量は、さらなる製品拡大という観点からは十分ではない。したがって、トチュウ内での TPI の蓄量を増やすことや、TPI 分子量とその分布を調節することによる新しい価値の付与などが求められる。しかし、これま

でそのような改良をするための基盤情報、つまり TPI 生合成の分子機構は未解明であった。

これまでの学術的研究で、TPI の生合成経路としては、出発物質であるジメチルアリルニリン酸 (DMAPP) と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 TPI が合成されていると考えられてきた (図 1) ¹。この一連の反応を触媒している酵素がファルネシルニリン酸合成酵素 (FPS) とトランスポリイソプレン合成酵素 (TPT) である。

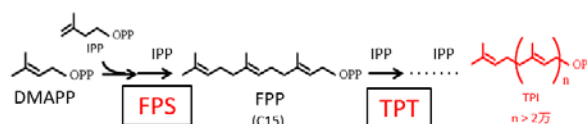


図 1 TPI 生合成経路

FP は、DMAPP と IPP から FPP を合成する反応を触媒する。FPS は、テルペノイドやステロイドの合成に関わる酵素の一種で全ての生物に存在する酵素

であることから、その機能と構造の解析が積極的に行われてきており、その反応機構も提案されている²。また、アミノ酸変異による活性部位スペースの拡大によって、FPS がある程度長鎖の TPI (炭素数が 40 程度) の合成を触媒できるようになることも示されてきた³。しかし、炭素数 40 程度の TPI は、トチュウ内で生産されている TPI の炭素数 10 万にはほど遠く、どのようにして TPT が巨大 TPI を合成するのかは不明である。そこで、本研究では、トチュウの EST (Expressed Sequence Tag) 解析⁴から明らかとなった TPT 候補遺伝子 5 種類の発現プラスミドの設計、生産、精製、結晶化、構造解析、ならびに機能解析を行うことによって、TPT の分子メカニズムの解明に取り組んだ。

研究経過

TPT の候補遺伝子 5 種類 (TPT1-5) の発現プラスミドの設計に取り組んだ。複数種類のプラスミドを設計し、そのプラスミドを用いて大腸菌を形質転換し、大腸菌内での生産を試みた。その結果、野生型については、TPT1-5 まで大腸菌破碎液の上清にタンパク質の存在を確認できた。つづいて、精製を行った。精製は、アフィニティークロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーを用いて行い、高純度のサンプルを調製することができた (図 1)。

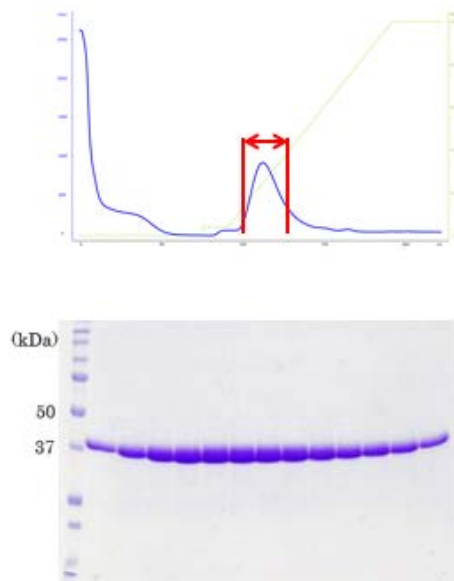


図 1 TPT 候補遺伝子のアフィニティークロマトグラフィーの精製結果 (上)、および得られた酵素の純度の高さを示す SDS-PAGE の結果 (下)。

つづいて、その精製サンプルをつかって TPT1-5 が FPS を合成する FPS なのか、あるいは長鎖 TPI を合成する酵素なのかを共同研究者らとともに調べた。その結果、TPT2, 4 が FPS で TPT1, 3, 5 が TPT であることが分かった (発表 1)。つづいて、同じ精製サンプルを用いて結晶化条件をスクリーニングしたところ、野生型については TPT2-4 において結晶を得ることができたが、再現性良く得られなかった。そこで、TPT1-5 と 40% 程度の配列相同性をもつヒト由来 FPS において阻害剤であるリセドロン酸結合型の立体構造が登録されており、この結晶構造をもとにホモロジーモデリングによって TPT1-5 の立体構造モデルを構築した。その結果、リセドロン酸と結合しているヒト由来 FPS のアミノ酸残基は、TPT1-5 においても全て保存されていることが明らかになった。そこで、TPT1-5 をリセドロン酸存在下で共結晶化したところ、これまでとは異なる条件において結晶が得られることが判明し再現性が大幅に向上した (図 2)。



図 2 TPT 候補遺伝子の結晶

得られた結晶の X 線回折実験を大型放射光施設 SPring-8 において行ったところ、最大分解能 2.5 Å 程度の X 線回折強度データの収集に成功した。続いて、既知の FPS の立体構造を用いて分子置換法による位相決定を行った。その結果、TPT および FPS ともに立体構造を決定することができた (次頁図 3)。

構造解析の結果、TPT および FPS ともにホモダイマーを形成していることが分かった。単量体は 14 本の α ヘリックスからなり、ダイマーの界面では、ヘリックスバンドルが形成されていた。また、両酵素ともに、触媒残基であるアスパラギン酸の位置はほぼ一致しており、これらの結果は、両酵素がアミノ酸配列の相同性が 80% 以上と高く、また化学的に

同一の反応を触媒することと合致している。

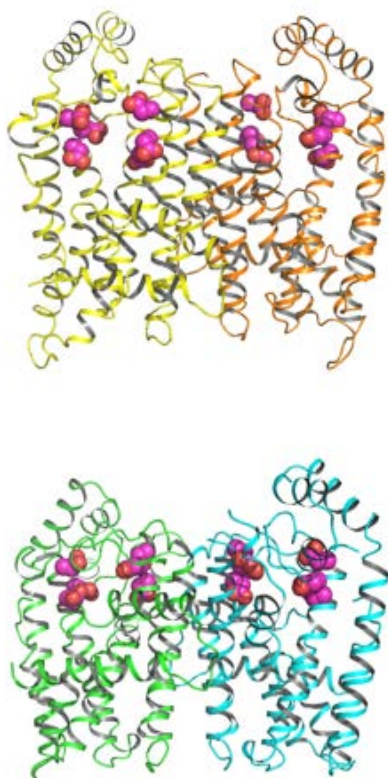


図3 TPTの立体構造(上)とFPSの立体構造(下)。活性残基であるアスパラギン酸残基を紫色でそれぞれ示す。

このように、両酵素は同じホモダイマー構造であることや触媒残基が立体構造的にも保存されていることから、TPTとFPSの触媒メカニズムは大きくは変わらないと予測された。

考察

しかし、TPTとFPSの生成物TPIの分子量は数千倍の違いとなる。本当に図3に示したような、共通点の多い立体構造をもつ二種類の酵素が、分子量が全く異なるポリマーを生成する理由を調べるべく、単量体の立体構造を詳細に比較した。

単量体の立体構造を比較したところ(図4)、大きく2つの部位において、顕著な立体構造の差があることが分かった。一つは、ダイマー界面での α ヘリックスの構造変化であり、もう一つは、分子表面に存在するループの突出がTPTにのみ見られたという点であった。

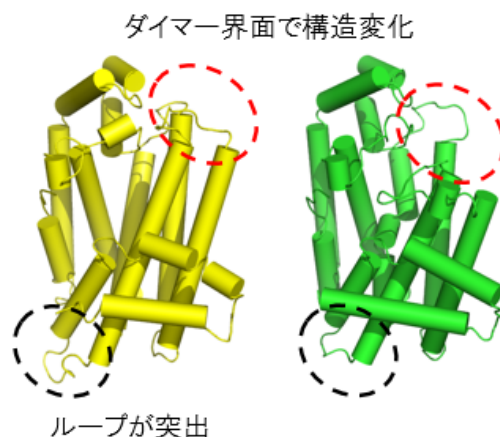


図4 TPT(左)とFPS(右)のモノマー構造の比較。ダイマー界面での α ヘリックスの構造変化を赤点線で示し、分子表面に存在するTPTのみ見られたループの突出を黒点線で示した。

ダイマー界面で大きく構造が異なっていることは、この構造変化が隣接分子に影響を与えることを示している。両酵素の一つのサブユニットを同一方向から観察すると、隣接分子の相対位置が違うことが分かった。このことで、TPTの二量体構造はFPSにくらべてコンパクトな箱形をしていることも分かった。次に、分子内の空間の有無を調べてみたところ、TPTのみ分子内から分子外に続くトンネルがあった。一方で、FPSの二量体構造はねじれて広がった形をしており、そのトンネルは隣接分子に塞がれていた。このことから「TPTはコンパクトな箱形の二量体を形成することでトンネルを作り、そこからTPIを連続して排出できるため、巨大分子量TPIを合成できているのではないか？」と推測するに至った。

さらに、分子表面で突出したループは両親媒性のアミノ酸からなっており、これらは膜に結合するために重要な役割を果たしていることが推察できた。つまり、TPTはこの両親媒性ループを使って膜と結合して、疎水性の高い生成物を膜間に排出する巧妙な仕組みが示唆された。

この「分子内にトンネルがあるかないか」と「分子表面にある両親媒性ループがあるかないか」のみが巨大TPI合成の鍵であるとすれば、FPS型の二量体構造をTPT型にしてトンネルを形成させて分子表面に同じ両親媒性ループをつけさえすれば、長鎖TPIポリマーを合成する新しい酵素が作れるかもしれない。先にも述べたが、FPSはTPTとは違って、

全ての生物に存在する。したがって、耐熱性の高いものや酵素反応速度の高い FPS を利用すれば、TPT にそうした特性を付与できる可能性もある。TPT と FPS のダイマー構造の違いの原因を調べてみたところ、FPS ではダイマー界面にチロシンやフェニルアラニンといったかさ高いアミノ酸が保存されている箇所において、TPT ではアラニンとシステインという小さなアミノ酸が保存されていることが分かった。コンピュータグラフィックス上で、仮にこれらの TPT の小さなアミノ酸をかさ高いアミノ酸に変異してみると、分子内で衝突することも分かった。そこで、立体構造を基に TPT の小さなアミノ酸（アラニンとシステイン）をかさ高いアミノ酸（フェニルアラニンとチロシン）に変異して、X 線構造解析を行った。その結果、TPT のダイマー構造が FPS 型へ変換することが分かった。つまり、TPT 型⇒FPS 型へのダイマー構造の変換は可能であることが証明できた。

現在、逆の変換、つまり、ダイマー構造の FPS 型⇒TPT 型への変換を目指して、変異体の作製、機能解析、構造解析を行っている。もしこの試みが成功すれば、様々な性質を有する TPT を作出できる可能性が高まり、TPI 蓄量を増やすことや、TPI 分子量とその分布を調節することも可能になるかもしれない。今後も本研究を引き続き行って、そのような新しい価値の創造に貢献したいと考えている。

参考文献

1. Nakazawa, Y., Bamba, T., Takeda, T., Uefuji, H., Harada, Y., Li, X., Chen, R., Inoue, S., Tutumi, M., Shimizu, T., Su, Y. Q., Gyokusen, K., Fukusaki, E., Kobayashi, A. Production of *Eucommia*-rubber from *Eucommia ulmoides* Oliv. (Hardy Rubber Tree), *Plant Biotech.*, 26, 71-79 (2009).
2. Wallrapp, F. H., Pan, J.-J., Ramamoorthy, G., Almonacid, D. E., Hillerich, B. S., Seidel, R., Patskovsky, Y., Babbit, P. C., Almo, S. C., Jacobson, M. P., Poulter, C. D. Prediction of function for the polyprenyl transferase subgroup in the isoprenoid synthase superfamily, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 110, E1196, (2013).
3. Tarshis, L. C., Proteau, P. J., Kellogg, B. A., Sacchettini, J. C., Poulter C. D. Regulation of product chain length by isoprenyl diphosphate synthases, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93, 15018-15023 (1996).
4. Suzuki, N., Uefuji, H., Nishikawa, T., Mukai, Y., Yamashita, A., Hattori, M., Ogasawara, N., Bamba, T., Fukusaki, E., Kobayashi, A., Ogata, Y., Sakurai, N., Suzuki, H., Shibata, D., Nakazawa, Y. Construction and analysis of EST libraries of the trans-polyisoprene producing plant, *Eucommia ulmoides* Oliver, *Planta*, 236, 1405-1417 (2012).

研究の発表

誌上発表

1. Kajiura, H., Suzuki, N., Tokumoto, Y., Yoshizawa, T., Takeno, S., Fujiyama, K., Kaneko, Y., Matsumura, H., Nakazawa, Y. Two *Eucommia* farnesyl diphosphate synthases exhibit distinct enzymatic properties leading to end product preferences *Biochimie*, 139, 95-106 (2017).