

生分解性ポリマー合成酵素の X 線結晶構造解析 X-ray crystallographic analysis of enzymes involved in biodegradable polymer biosynthesis

中村 顕¹, 田之倉 優^{1,*}

¹ 東京大学大学院農学生命科学研究科, 〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1

Akira NAKAMURA¹ and Masaru TANOKURA^{1,*}

¹ Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo,
1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-8657, Japan

1 はじめに

微生物産生ポリエステルであるポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) は生分解性を有し、バイオマス由来成分を原料とできることから環境低負荷型のプラスチックとして有望であり、実際に日本、アメリカ、ブラジル、中国などにおいて大規模微生物生産が検討されている。また、生体適合性を有し、体内では速やかに分解されてその場の組織に置き換えられることから、縫合糸や心臓弁、癒着防止剤、軟骨修復用の足場としての利用やドラッグデリバリーシステムなど医療分野への応用も期待されている。PHA 合成酵素 PhaC は PHA 生合成における最も重要な鍵酵素であり、3-ヒドロキシシアルル-CoA モノマーの重合を触媒する。また、PhaC は細胞内で PHA 顆粒表面に結合し、固液界面で不溶性高分子を合成するという興味深い酵素である。これらのことから、PhaC の触媒機構解明のための立体構造解析が切望されてきたが、これまで達成されていなかった。本研究では好熱性細菌由来の PHA 合成酵素 PhaC の立体構造を決定し、その反応機構を明らかにするとともに、酵素機能改変に重要な情報を得ることを目的とした。反応の分子機構が未解明である PHA 重合反応の詳細を明らかにすることは基礎的な酵素科学の観点から有意義である。また、PHA はモノマーユニットの側鎖と主鎖の構造や分子量、共重合体の場合はさらに組成や連鎖分布によって物性が大きく変化するが、これらは重合酵素である PhaC の触媒特性に依存しているため、PhaC における基質結合部位と反応機構の詳細が明らかになれば、酵素改変により PhaC の触媒特性を制御し、工業や医療の用途に応じた様々な物性の PHA を高効率で生産する技術への展開が可能となる。

2 実験

N 末端に His タグを付加させた PhaC を大腸菌で大量発現させ、Ni アフィニティ精製の後にタグを切断し、陰イオン交換クロマトグラフィーおよびゲル濾過を行うことによって高純度に精製した。また、PhaC の触媒活性に重要と考えられるシステイン残基をセリン残基へ置換した CS 変異体および、立体

構造上のディスオーダーが予想される末端の欠失変異体を調製し、同様の手法で精製した。精製試料は蒸気拡散法により結晶化し、複数の条件で取得した結晶を用いて Photon Factory ビームラインにおいて X 線回折実験を行った。

3 結果および考察

PhaC は結晶化の再現性が低く、得られた結晶も有意な回折点を与えなかった。そこで、PhaC に対して CS 変異および末端欠失変異を導入したが、いずれの場合も結晶化の再現性および結晶の回折能の改善は見られなかった。試料調製の過程で PhaC の C 末端領域がフォールディングに必要な不可欠であることが分かった。また、PhaC は陰イオン交換における塩濃度勾配により、複数の溶出ピークが検出された。これらをゲル濾過によって解析すると会合状態が異なる PhaC (単量体、二量体、多量体) であり、その会合状態は非平衡状態にあることが分かった。さらに、PhaC の各試料は熱処理によって、二量体化あるいは多量体化が促進されるものと、単量体化が促進されるものがあった。これらの実験結果に基づき、均一な会合状態の試料の調製を目指して条件を検討し、結晶化実験を行ったが、期間内に PhaC の良質な結晶を取得することはできなかった。

4 まとめ

ポリヒドロキシアルカン酸合成酵素 PhaC の X 線結晶構造解析を行うために、コンストラクトや精製条件を検討したが、構造解析が可能となる良質な結晶を得ることはできなかった。引き続き条件検討を行っている。

謝辞

X 線回折実験を行うにあたってご支援いただきました Photon Factory のビームラインスタッフの皆様に感謝致します。

* amtanok@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp