

ラン藻由来アルカン合成関連酵素の立体構造解析 Structural Analysis of Cyanobacterial Enzymes for Alkane Biosynthesis

工藤恒¹, 張マリ², 河合秀信¹, 岡芳樹¹, 和田愛未¹, 季高駿士¹, 大岡紘治², 末松佑磨¹,
吉崎慧¹, 林勇樹¹, 新井宗仁^{1,2,*}

¹ 東京大学大学院総合文化研究科, 〒153-8902 目黒区駒場 3-8-1

² 東京大学大学院理学系研究科, 〒153-8902 目黒区駒場 3-8-1

Hisashi KUDO¹, Mari CHANG², Hidenobu KAWAI¹, Yoshiki OKA¹, Manami WADA¹, Shunji SUETAKA¹, Koji OOKA², Yuma SUEMATSU¹, Satoru YOSHIZAKI¹, Yuuki HAYASHI^{1,2},
Munehito ARAI^{1,2,*}

¹Dept. of Life Sciences, The University of Tokyo, 3-8-1 Komaba, Meguro, Tokyo 153-8902, Japan

²Dept. of Physics, The University of Tokyo, 3-8-1 Komaba, Meguro, Tokyo 153-8902, Japan

1 はじめに

石油に代わる再生可能エネルギーを効率的に生産できる基盤技術の開発は、人類の永続的繁栄のために必須の課題である。ラン藻は光合成によって、軽油や重油の主成分であるアルカンを生産できる。そのためラン藻がつくるバイオ燃料は、地球温暖化の防止に有効な再生可能エネルギーとして期待されている。最近、ラン藻による炭化水素の合成には、アシル ACP 還元酵素 (AAR) と、アルデヒド脱ホルミル化オキシゲナーゼ (ADO) という 2 つの酵素が関わる事が明らかになった [1,2,3]。AAR は補酵素 NADPH を用いて基質 (アシル ACP) をアルデヒドに還元し、ADO がこれをアルカンに変換する。これらの酵素があれば大腸菌でもアルカンを合成可能なことから、バイオ燃料生産の鍵となる酵素として世界的に注目されている。これまでに ADO 単独の結晶構造は既知であるが、AAR の立体構造は未知である。AAR の構造を解明し機能発現機構を明らかにすることは、AAR の高活性化に必要不可欠である。

そこで本研究では、ラン藻由来のアルカン合成関連酵素 AAR の立体構造概形を X 線溶液散乱 (SAXS) 法で求めることを目指した。

2 実験

大腸菌を用いて *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 由来 AAR のタンパク質を大量発現し、Ni-NTA カラムを用いた親和性クロマトグラフィーと、ゲル濾過クロマトグラフィーによって高純度精製した。AAR は凝集しやすいタンパク質であるため、高濃度にしすぎないように注意しながら濃縮し、X 線溶液散乱用の試料を調製した。測定は、高エネルギー加速器研究機構・放射光科学研究施設 BL-10C で行った。カメラ長は 2 m、波長は 1.5 Å 程度、検出器は PILATUS を用いた。試料の凝集体形成を防ぐために、Superdex 75 increase カラムを用い、HPLC とセルを連結させた SAXS (SEC-SAXS) 測定を行った。得られた散乱曲線は SAngler と ATSAS パッケージを用いて解析した。

3 結果および考察

当初、*Synechococcus elongatus* 由来 AAR を用いて SAXS 測定を行った結果、高濃度に濃縮することができず、比較的低濃度であっても凝集体を形成してしまった。そこで、好熱性シアノバクテリア由来の AAR を用いることにより、低濃度であれば凝集せずに SAXS 測定を実施可能であることがわかった。

次に、この AAR サンプルの X 線溶液散乱を、フローセルを用いて測定した。しかし、少量の凝集体が混在していた。フローセルでは凝集体を分離できず、単量体での散乱曲線を得ることができなかった。そこで SEC-SAXS 測定を行った結果、少量の凝集体 (二量体相当) と単量体を分離して測定することが可能になった。ただし、SEC-SAXS 測定では、カラム内でタンパク質濃度が希釈されて十分な強度の散乱が得られない場合があるので、同じ測定を複数回行うことにより、散乱強度を稼いだ。

三次元立体構造のモデリングを行った結果、AAR は 3 つのかたまりがあるような構造になっていた。これは AAR が 3 つのドメインから構成されていると予測した BLAST 検索の結果と一致している。さらに、我々が以前行った AAR の三次元立体構造の理論的な予測構造と矛盾しない構造概形が得られており、予測構造が妥当であることを示唆している。

謝辞

高エネルギー加速器研究機構の清水伸隆先生には大変お世話になりました。この場をお借りして感謝申し上げます。

参考文献

- [1] Schirmer *et al.* *Science*, **329**, 559 (2010).
- [2] Hayashi *et al.* *PLoS ONE*, **10**, e0122217 (2015).
- [3] Kudo *et al.* *Biotechnology for Biofuels*, **9**, 234 (2016).

* arai@bio.c.u-tokyo.ac.jp