

# ラン藻由来アルカン合成関連酵素の複合体構造の SAXS 解析

## SAXS Analysis of the Complex Structure of Cyanobacterial Enzymes for Alkane Biosynthesis

張マリ<sup>1</sup>, 工藤恒<sup>2</sup>, 大岡紘治<sup>1</sup>, 季高駿士<sup>2</sup>, 佐野美桜<sup>2</sup>, 林勇樹<sup>2</sup>, 新井宗仁<sup>1,2,\*</sup>

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

<sup>2</sup> 東京大学大学院総合文化研究科, 〒153-8902 目黒区駒場 3-8-1

Mari CHANG<sup>1</sup>, Hisashi KUDO<sup>2</sup>, Koji OOKA<sup>1</sup>, Shunji SUETAKA<sup>2</sup>, Mio SANNO<sup>2</sup>,  
Yuuki HAYASHI<sup>2</sup>, Munehito ARAI<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Physics, The University of Tokyo, 3-8-1 Komaba, Meguro, Tokyo 153-8902, Japan

<sup>2</sup>Dept. of Life Sciences, The University of Tokyo, 3-8-1 Komaba, Meguro, Tokyo 153-8902, Japan

### 1 はじめに

石油に代替する再生可能エネルギーとして現在注目されているのが、植物が作り出すバイオエネルギーである。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ため、地球温暖化の防止に有効な再生可能エネルギーの生産源として期待されている。これまでの研究から、ラン藻による炭化水素の合成は、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 つの酵素による 2 段階反応で起きることが明らかになっている [1-5]。この反応ではまず、AAR が基質であるアシル ACP をアルデヒドに還元した後、ADO がこれをアルカンに変換する。また、その反応の途中で AAR と ADO が結合し、AAR が作り出すアルデヒドを ADO に効率的に受け渡すと考えられている。これまでに ADO 単独の結晶構造は既知であるが、AAR 単独の立体構造、および、AAR と ADO との複合体構造については未解明である。

2017 年度に我々は、AAR 単独での X 線溶液散乱 (SAXS) 測定を行い、概形構造のモデリングを行った。その結果、AAR は 3 つのかたまりからなる構造を持つことがわかった。これは AAR が 3 つのドメインから構成されていることと一致していた。そこで 2018 年度には、AAR と ADO との複合体構造の解明を目指して SAXS 測定を行った。

### 2 実験

大腸菌を用いてラン藻 *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 由来 AAR と ADO のタンパク質を大量発現し、Ni 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 と ADO はともに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

SEC-SAXS 法により、AAR 単独、ADO 単独、AAR と ADO の混合液のそれぞれについて測定を行った。2017 年度までに既に、AAR と ADO が凝集しない測定条件 (最適なタンパク質濃度等) を見出していたため、これらの単量体の散乱データを得ることができた。AAR と ADO の混合液の SEC-SAXS 測定においては、AAR 単独でのピークよりも早い溶出時間に AAR-ADO 複合体に相当するピークが見られた。このピークのうち、AAR 単独のピークと重ならない領域を用いて、AAR-ADO 複合体の構造解析を行った。DAMMIF ソフトウェアを用いて三次元立体構造概形のモデリングを行った結果、2017 年度に得られた AAR 単独構造の片側に、ADO に相当するかたまりが結合したような構造概形が得られた。

我々はこれまでに、網羅的な変異解析により、ADO 上の AAR 結合部位を同定している (Chang *et al.* 論文投稿中)。その知見と本研究の成果を組み合わせることによって、AAR と ADO の複合体構造についての具体的なモデルを描けるようになった。

### 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).
- [4] Arai *et al.* *Adv. Exp. Med. Biol.* **1080**, 119 (2018).
- [5] Kudo *et al.* *Biotechnology for Biofuels*, **12**, 89 (2019).

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