

## Type III Rubisco の構造に基づいた活性最適化

○西谷 優一,<sup>1</sup> 藤橋 雅宏,<sup>1</sup> 土井 崇嗣,<sup>1</sup> 吉田 昭介,<sup>2</sup>  
跡見 晴幸,<sup>2</sup> 今中 忠行,<sup>3</sup> 三木 邦夫<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>京大・院理, <sup>2</sup>京大・院工, <sup>3</sup>立命館大・生命科

カルビン回路は、全ての緑色植物や藻類、藍藻において炭酸固定系として機能している。この回路の炭酸固定酵素は ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) のみであり、ribulose 1,5-bisphosphate と二酸化炭素、水から 2 分子の 3-phosphoglycerate を生成する反応を触媒する。Type III に属する超好熱始原菌 *T. kodakaraensis* 由来 Rubisco (Tk-Rubisco) は、高温領域で高い炭酸固定能力を示す。これまでに当研究室で Tk-Rubisco のアポ型構造を決定した (Kitano *et al. Structure* **9**, 473-481, 2001)。また、基質結合部位にハウレンソウ由来の残基を導入した変異体について、常温領域で優れた活性を示すことが分かった (Yoshida *et al. Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 6254-6261, 2007)。本研究では、Tk-Rubisco の野生型と変異型の基質結合型構造から、構造と酵素活性との関連性を明らかにし、より高活性型の変異体を創製することを目標として、構造解析に取り組んだ。

阻害剤である 2-carboxyarabinitol 1,5-bisphosphate (2-CABP) との複合体の構造解析を行った。複合体を作成するために、反応中心にあるリシンをカルバミン酸とする活性化を行った。これにより、Rubisco と阻害剤は結合することができる。複合体の結晶はポリエチレングリコールを沈殿剤とする条件で得られ、最高で 2.09 Å 分解能の良好な回折データも得ることができた。解析の結果、活性部位に阻害剤の電子密度を確認でき、活性ループの電子密度も初めて確認することができた。アポ型構造と比較すると、阻害剤結合型構造では全体的に 2-CABP を包み込むような構造変化が起きていた。また、野生型と変異型の構造を比較したところ、変異を導入したヘリックス部位に若干のゆらぎが確認された。このゆらぎは 4 つの要因によって生じており、実際この領域の温度因子を比較すると、変異型の方が野生型に比べて高いことも分かった。これらのことから、変異型では変異導入部位およびそれに直結する活性ループの柔軟性が増大したと考えられ、これが Rubisco の活性に影響を与えるのではないかと思われる。