

立体構造に基づく超好熱始原菌由来 Rubisco の 常温での高活性化

Structure-Based Enhancement of the Catalytic Activity of Rubisco from a Hyperthermophilic Archaeon at Ambient Temperatures

桐山智博¹、西谷優一¹、山田耕造²、藤橋雅宏¹、福田青郎²、佐藤喬章³、
跡見晴幸³、今中忠行²、三木邦夫¹

1 京大・院理、2 立命館大・生命科、3 京大・院工

Rubisco (Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase) は、カルビン回路において炭酸固定反応を触媒する唯一の酵素である。この反応の速度は著しく低く、光合成の律速段階となっていることから、機能改良により高い炭酸固定能をもつ Rubisco を作り出す試みが広く行われている。Rubisco はその四次構造の特徴から、Type I ~ IV の4つのグループに分けられる。超好熱始原菌 *Thermococcus kodakarensis* 由来 Rubisco (Tk-Rubisco) は Type III に分類され、90°C 付近の高温環境下にて、既存の Rubisco よりも高い炭酸固定能を示す。これまでに我々の研究室では、この Tk-Rubisco を改変し、基質認識に関わる loop 6 とそれに続く α -helix 6 のアミノ酸配列をホウレンソウ (spinach) 由来のものに置き換えることで、常温での炭酸固定能が上昇した SP5-V330T 変異体を得ていた。本研究ではこの SP5-V330T 変異と加算的に作用し、さらに炭酸固定能が上昇した変異体を得ることを目指した。

高活性化の具体的な方法として、常温で機能する Type I Rubisco (ホウレンソウなど) と Tk-Rubisco の属する Type III Rubisco のアミノ酸配列を比較し、Type 毎に保存されており、かつ両 Type で異なるアミノ酸残基に着目した。これらの中で、立体構造の情報から基質結合部位付近に位置する残基について、遺伝子操作により変異の導入を行った。作製した変異体について活性測定を行ったところ、新たに野生型 Tk-Rubisco よりも常温において高い炭酸固定能を示す T289D 変異体を得ることができた。この T289D 変異体について、活性上昇の理由を変異導入部位周辺の構造の変化から探るため、X 線結晶構造解析を行った。その結果、野生型 Tk-Rubisco に比べ、T289D に隣接する基質結合残基 H285 が基質の方向に約 0.5Å 移動していることがわかった。我々はこの変化が SP5-V330T 変異とは独立に活性の上昇に寄与したと考え、SP5-V330T 変異と T289D 変異を組み合わせた T289D+SP5-V330T 変異体を作製した。その結果、T289D+SP5-V330T 変異体は、SP5-V330T 変異体を上回る、これまでで最も高い炭酸固定能を示した。