

天然ゴムの生合成機構の解明

東北大学大学院工学研究科バイオ工学専攻 高橋 征司

【略歴】

1995年3月 東北大学工学部生物化学工学科 卒業
1997年3月 東北大学大学院修士課程工学研究科生物工学専攻 修了
2001年3月 筑波大学大学院博士課程生物科学研究科生物物理化学専攻 修了（理学博士）
2001年4月 理化学研究所植物分子生物学研究室 協力研究員
2001年11月 東北大学多元物質科学研究所融合システム研究部門 助手
2005年9月 東北大学大学院工学研究科バイオ工学専攻 助手
2007年4月 同 助教
2008年4月 同 准教授 現在に至る

天然ゴム生合成酵素のクローニング

天然ゴムは、高強度、低発熱といった特長を有する天然高分子であり、現代においても、その物性を全面的に代替できる合成高分子の開発には至っていない。その特性から天然ゴムはタイヤ製造に必須であるが、近年の世界レベルでのモータリゼーションの進展に伴い需要が年々伸び続け、今や世界の年間需給規模は1,200万トンを超えている。そのため、安定供給の確保が強く求められている。現在、工業利用されるNRの大部分は、パラゴムノキ (*Hevea brasiliensis*) から採取されるラテックスより生産されており、遺伝子工学的手法による天然ゴム高生産株の分子育種や、代替生物による生産系の開発が期待されているが、生合成酵素の実態は謎のままであった。そこで我々の研究グループでは、パラゴムノキのラテックスより天然ゴム生合成酵素のクローニングを行った。

天然ゴムの基本骨格は、炭素数5のイソペンテニルニリン酸 (IPP) が *cis*-1,4-重合したポリイソプレノイドであり、その ω 末端には数個の *trans* イソブレン単位が結合している。このような構造のポリイソプレノイドは、重合度に違いはあれ、すべての生物が普遍的に有する。それらは、数個の IPP が *trans*-1,4-重合したオリゴプレニルニリン酸を開始基質として IPP が連続的に *cis*-1,4-重合することで生合成されるが、その反応は *cis* 型プレニル鎖延長酵素 (cPT) と総称される酵素により触媒される。そこで、天然ゴム生合成酵素が cPT の一種であると仮定し、パラゴムノキのラテックスより2種の cPT 相同遺伝子 (*HRT1*, *HRT2*) を単離した¹。しかし、大腸菌内で異種発現させた組換え型酵素は単独では全く IPP 重合活性を示さなかった。一方、これらを異種発現させた出芽酵母や植物培養細胞の粗酵素抽出液を用いて反応を行うと重合活性が検出されたが、生成物は天然ゴムサイズではなく、宿主生物が有するポリイソプレノイドと同程度の炭素鎖長 (C₁₀₀ 程度) であった²。我々の研究グループでは、種々の生物種より多数の cPT を単離し比較機能解析を進めてきたが、真核生物 cPT の多くは、*HRT1*, *HRT2* と同様に、大腸菌内で異種発現させた際に活性を示さず、酵母などの真核生物で発現させた場合にのみ活性を示す^{3,4}。これらの結果から、*HRT1*, *HRT2* が天然ゴム生合成活性を示すためには、真核生物特有の活性化因子に加え、ラテックスに特有な反応生成物鎖長の制御因子が必要であるというモデルを提唱した。

活性型天然ゴム生合成酵素の試験管内再構成

ラテックス中では、天然ゴム分子はリン脂質一重層で覆われたゴム粒子 (rubber particle, RP) として存在している。天然ゴム生合成に寄与するタンパク質を同定するため、ショットガンプロテオミクス解析によりパラゴムノキの RP 結合タンパク質を網羅的に同定した⁵。同定されたタンパク質の中には、*HRT1*/*HRT2* に加え NgBR 相同タンパク質が見出された。NgBR はヒト cPT の相互作用タンパク質であり、それ自身では触媒活性を示さないものの、ヒト cPT の活性を安定化させることが報告されている。この NgBR

相同タンパク質は、ラテックスで特異的に発現している HRT1⁶ と相互作用することが示された。さらに、このタンパク質は、天然ゴム生合成への何らかの関与が示唆されていた RP 結合タンパク質である REF と相互作用することが分かった。そこで、この新規タンパク質を HRT1-REF BRDGING PROTEIN (HRBP) と名付けた。各種相互作用解析より、実際にこの 3 者が RP 上で複合体を形成していることが明らかになった。このタンパク質複合体について、酵素の触媒機能発現における膜環境の重要性を解析するため、無細胞タンパク質発現システムを利用し、3 種のタンパク質を導入したプロテオリポソームを作製したが、有意な活性は得られなかった。そこで、界面活性剤処理で結合タンパク質を極力除去した RP (washed-RP, WRP) を調製し、そこに無細胞タンパク質発現系を利用してタンパク質を導入する手法を開発した。驚いたことに、この系で導入した HRT1 は、それ単独で IPP 重合活性を示し、*trans* 型オリゴプレニルニリン酸を開始基質として分子量 10⁶ 以上のポリイソプレノイドを *de novo* 合成した。また、レタス由来 cPT をパラゴムノキの WRP に導入しても、HRT1 と同様に天然ゴム生合成活性を示した。本研究によって、組換え型酵素を用いて天然ゴム生合成酵素活性を再現することに初めて成功し、活性発現には、RP という特殊な細胞内小器官の膜上に cPT を正しく組み込まれることが重要であることが明らかとなった。さらに、WRP 上に 3 種のタンパク質を導入したところ、HRT1 の活性が顕著に安定化された。これらの結果から、RP 上に多く存在する REF の一部と結合することで HRT1-HRBP が RP 膜上で安定化され、それにより HRT1 の重合反応で伸長する疎水性ポリイソプレン鎖が効果的にゴム粒子内に収容されていくという生合成機構が想定された。以上より、複数のタンパク質で構成される天然ゴム生合成マシナリの存在を提唱し、HRT1-HRBP-REF 複合体がその中核となっているモデルを提案した。

今後の展望

本研究におけるブレークスルーをもとに天然ゴム生合成酵素の触媒機構の分子解明を進め、それを起点として、長年にわたり未解明であった天然ゴム生合成経路の全容解明を目指す。また、我々はパラゴムノキ培養細胞とその形質転換系も確立している⁷ため、そのプラットフォームを利用し、細胞レベルでの迅速な天然ゴム生合成解析系の開発と、生合成関連酵素の転写制御機構の解明も進めている。

謝辞

本研究は東北大学の多元物質科学研究所融合システム研究部門バイオ系応用システム研究分野（古山種俊名誉教授）および工学研究科バイオ工学専攻応用生命化学講座（中山亨教授）にて行われたものであり、ご指導頂きました先生方、共同研究者の皆様、研究室の学生の皆様に心より感謝申し上げます。

参考文献

1. K. Asawatreratanakul *et al.* Molecular cloning, expression and characterization of cDNA encoding cis-prenyltransferases from *Hevea brasiliensis* - A key factor participating in natural rubber biosynthesis. *Eur. J. Biochem.* **270**, 4671-4680, (2003).
2. S. Takahashi *et al.* Characterization of cis-prenyltransferases from the rubber producing plant *Hevea brasiliensis* heterologously expressed in yeast and plant cells. *Plant Biotechnol.* **29**, 411-417, (2012).
3. K. Kera *et al.* Identification and characterization of a cis,trans-mixed heptaprenyl diphosphate synthase from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS J.* **279**, 3813-3827, (2012).
4. S. Takahashi & Koyama, T. Structure and function of cis-prenyl chain elongating enzymes. *Chem. Rec.* **6**, 194-205, (2006).
5. S. Yamashita *et al.* Identification and reconstitution of the rubber biosynthetic machinery on rubber particles from *Hevea brasiliensis*. *eLife* **5**, e19022, (2016).
6. Y. Aoki *et al.* Identification of laticifer-specific genes and their promoter regions from a natural rubber producing plant *Hevea brasiliensis*. *Plant Sci.* **225**, 1-8, (2014).
7. Y. Aoki *et al.* Transcriptional responses of laticifer-specific genes to phytohormones in a suspension-cultured cell line derived from petioles of *Hevea brasiliensis*. *Plant Biotechnol.* **31**, 593-598, (2014).