



プラスチック分解酵素変異体の結晶構造解析

中村彰彦
静岡大学

キーワード：プラスチック分解酵素，酵素表面電荷改変

1. 背景と研究目的

プラスチックの環境汚染及び石油資源の高騰により、プラスチックのリサイクルの重要性が増している。リサイクル方法の一つの選択肢として酵素を用いた解重合があり、特にポリエステル的一种であるポリエチレンテレフタレート(PET)を分解する酵素について、酵素表面電荷を正に改変することで分解活性が向上することを明らかにした¹。そこで更に正電荷を追加する変異を導入し活性の向上を試みたところ、精製途中に自己結晶化することが判明した。タンパク分子同士で相互作用をしてしまうと PET への吸着を阻害してしまうため、予期しない結晶化を防ぐための変異を導入する位置を特定するために生成してしまった結晶の構造解析を試みた。

2. 実験内容

メタゲノムライブラリー由来 PET 分解酵素 PET2 変異体を、大腸菌を宿主として発現させ、Ni-アフィニティカラムを用いて粗精製を行なった。溶出した酵素を濃縮したのちに陰イオン交換カラムで精製を行なった。塩化ナトリウム具ラジエントにより溶出してきた酵素液をフラクションに回収していたところ、チューブ中にキラキラとした沈澱が発生したため顕微鏡で観察したところ平行四辺形の結晶が多数生成していることが判明した。Izit crystal dye で染色したところ濃い青色に変化したため、30%グリセロールを抗凍結剤として X 線回折計測をおこなった。

3. 結果および考察

複数の結晶で計測をおこなったが、観測された回折は 8Å 程度であった。厳密な相互作用面の決定は難しいと考えられたが、格子定数の決定と対称単位中の分子数の見積りは可能であると判断し計測をおこなった。回折データの解析をおこなったところ、格子定数が $a=282.79\text{Å}$, $b=76.32\text{Å}$, $c=186.57\text{Å}$, $\alpha=90^\circ$, $\beta=121.71^\circ$, $\gamma=90^\circ$ の空間群 $C121$ の結晶であると考えられた。また PET2 変異体の分子量から計算すると 1 対象単位辺り 10-12 個の酵素分子が含まれている可能性が高いと推測された。すなわち結晶ではあるが通常の酵素結晶と比較すると規則性が低いと考えられる。導入した局所的な正電荷変異により、酵素表面の負電荷変異領域と相互作用をし、多数の分子がネットワークを形成することで結晶様の構造体を形成しているものと考えられ、これを防ぐために電荷導入部位を変える必要があると思われる。

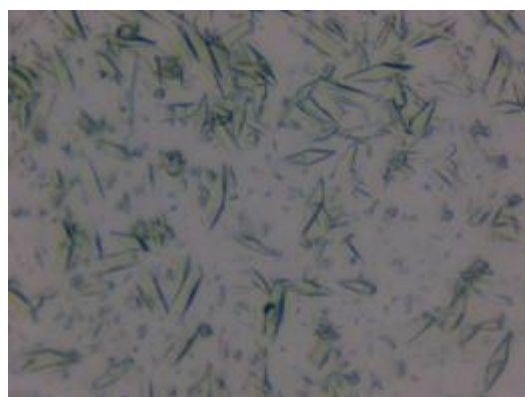


Fig.1 自然生成した結晶の様子

4. 参考文献

1. Nakamura A. et al., ACS Catalysis, 11, 8550-8564 (2021)