

天然ゴム合成機構から考える次世代の植物工学

高橋 征司

バイオエコノミー社会の早期実現に向け、産業的に有用な化合物やタンパク質を合成生物学的なアプローチにより高生産するための技術開発が進められている。なかでも、ポリマーなどの機能性化学品の生産を化石燃料ベースからバイオベースへと転換することは重要な課題の一つである。これまでに研究開発されたバイオ生産系の多くは、医薬品や生理活性物質など単価の高い化合物を標的としていたが、今後は、比較的安価な工業材料・原料を低コストで大量にバイオ生産するシステムの開発も重要となる。その観点において、植物を宿主とした生産系は、大気中のCO₂を炭素源として有機化合物を生産する点と、生産規模の拡大が比較的容易である点などで有利である。しかし、植物代謝工学により化学品を工業レベルで生産させるためには、一個体あたりの生産・蓄積量(単位面積当たりの年間生産量)の低さが問題となる。ところが、すでに機能性ポリマー供給源として産業的に成立している植物生産系が存在する。それが、パラゴムノキにおける天然ゴム(NR)生産である。本稿では、近年著しく解明が進んだパラゴムノキのNR合成機構¹⁾について概説するとともに、そこから見えてきた新しい植物生産系への展望についても述べる。

パラゴムノキにおける天然ゴム生産

天然ゴム NRは、cis型二重結合を有するイソプレン単位(炭素数5, C₅)が1,4-重合した、cis-1,4-ポリイソプレンを基本骨格とする(図1)。ゴム工業に用いられるNRの大部分は、熱帯~亜熱帯地域で大規模栽培されるパラゴムノキ(*Hevea brasiliensis*)から採取されるラテックスを原料としている。パラゴムノキ由来NRは平均分子量が約100万であり、その特異な物性からタイヤ製造に不可欠な材料である。NRに匹敵する分子量を有する多様な構造の石油化学ポリマーが開発されているが、それらでNRを完全代替するのはいまだに困難である。たとえば、化学合成cis-1,4-ポリイソプレンは、重合反応の際に、ごくわずかに形成されてしまうtransイソプレン単位がNRとの物性の差の要因となっている。また、NRをエステル交換処理することで分子量分布が低分子側にシフトすることから、NRは複数のポリイソプレン鎖が末端で結合した複合体として存在し、その構

造が特異な物性の要因の一つとなっているとも考えられている²⁾が、その詳細については未解明な点が多い。

ラテックス 多くのNR産生植物では、NRはラテックスに含まれる。ラテックスとは、篩部組織で管状に分化した細胞である乳管(laticifer)の細胞質である。乳管を発達させている植物は12,500種以上存在するが、NRを生産する植物はその一部である³⁾。一般に、乳管には生体防御に関与する特化代謝産物や機能タンパク質が蓄積している。動物による食害などで乳管が破壊されると、その細胞質たるラテックスが流出することで防御的な効果を示す。一部の特化代謝産物は宿主植物に対しても強い生理活性を示してしまうため、乳管はそのような化合物を隔離的に貯蔵するのに適した細胞である。ラテックス内におけるNRの生理学的意義については不明な点が多い。植物内にはNRの分解経路は見いだされておらず、貯蔵炭素源としての役割はないと考えられる。乳管が破

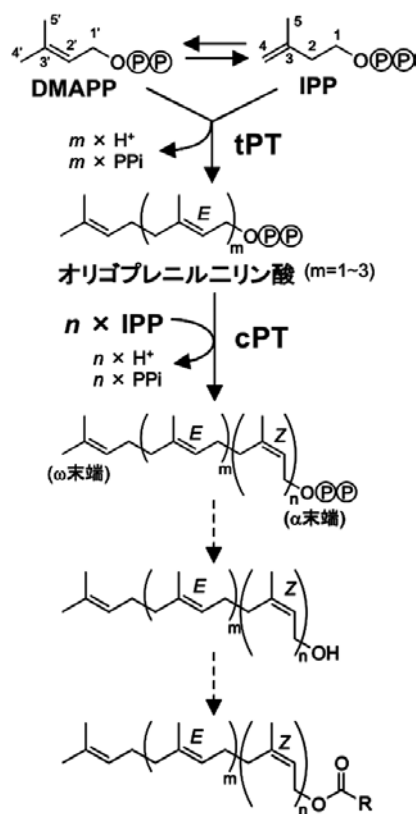


図1. 天然ゴム合成経路. 推定経路は破線で示す.

壊されラテックスが滲出すると、そこに含まれるNRが酸化し傷害部位を被覆するように凝集する。そのため、NRは植物の絆創膏のような役割を担っているとも考えられている。

ゴム粒子 細胞内において、NR分子はゴム粒子 (rubber particle, RP) と呼ばれる直径0.1~10 μmのオルガネラ内に蓄積されている (図2)。RPは疎水性ゴム分子がリン脂質一重層と膜タンパク質で覆われた構造である。構造的に類似した脂質一重層オルガネラとしては、トリアシルグリセロールやステロールを内包する脂肪滴 (lipid droplet, LD) がよく知られている。LDが小胞体 (ER) 膜より発生することから、RPもERに由来するオルガネラであると考えられているが、両者の膜タンパク質分布における共通性は低く、RPの発生や形態制御機構の詳細は未解明である。パラゴムノキの新鮮ラテックスから分画されたRPは *in vitro* でNR合成活性を示すことが1960年代から示されており、また、近年、RPの膜上のNR合成酵素 (後述) が同定された^{4,5)} ことから、RPはNR合成における重合反応の場であると同時に、生成した炭化水素ポリマーを細胞に悪影響を与えずに隔離的に貯蔵可能なシンクオルガネラでもある。

パラゴムノキ 自然界に2500種以上知られているNR産生植物⁶⁾のなかで、産生するNRの物性だけでなく、生産量、採取の簡便性・持続性においてもパラゴムノキはもっとも優れている。パラゴムノキからのラテックス回収は、基本的にはタッピング (幹の表面を薄く削る操作) により滲出するものを容器に受けるだけであり、一度の操作でNRを30~50% (w/v) 含むラテックスを数百ml程度回収できる。また、その操作は数日ごとに、

数十年間繰り返すことが可能である。温帯地域で生育可能なグアユール (*Parthenium argentatum*) やロシアタンポポ (*Taraxacum koksaghyz*) は、パラゴムノキと同程度の分子量のNRを生産するため、代替供給源として開発が進められているが、いずれも植物体中のNR含量は非常に少ない。それらからNRを得るためには、植物個体の刈り取り、粉碎、溶媒抽出、精製、溶媒除去の工程が必要となる。パラゴムノキからのNR収量は、育種や栽培方法、ラテックス採取方法などの改良を経て、1960から2000年代にかけて2.2倍に増大したが (現在、約1.2 t/ha/year)、それ以降は顕著な伸びがない。近年、途上国での自動車普及率増大に伴いNRの需要は伸び続けており (2017年時点で 14×10^6 t/year)、それに対応するため栽培面積が年々拡大されているが、それにも限界があることから、生合成機構の解明とNR高生産品種の開発が強く求められている。

NR生合成機構

NR生合成経路 NRの基本骨格である *cis*-1,4-ポリイソプレンのω末端には数個の *trans* イソプレン単位が結合しており、その反対側のα末端は、一級アルコール、あるいはカルボン酸エステルとなっている (図1)⁷⁻⁹⁾。この構造から、NR炭素骨格生合成は次の2段階で進行すると考えられる (図1)。第一段階では、イソプレノイドの共通前駆体 (重合単位) であるイソペンテニル二リン酸 (IPP, C₅) が、その異性体であるジメチルアリル二リン酸 (DMAPP, C₅) に対し数回1,4-縮合することで、C₁₀~C₂₀のオリゴプレニル二リン酸が生成する。IPPが一単位重合する際に二重結合が一つ形成されるが、ここで形成さ

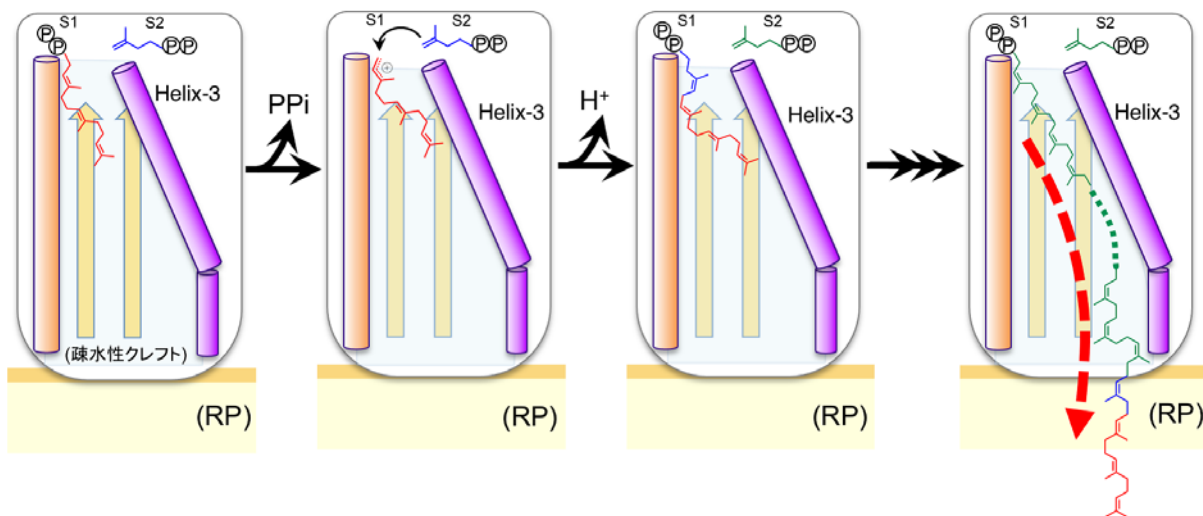


図2. 天然ゴム生合成機構. ※学会HPのPDFではカラーで表示されます。

れる二重結合はすべて *trans* である。第二段階では、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1,4-重合する。この際に形成される二重結合の立体配置はすべて *cis* である。

プレニルトランスフェラーゼ NRの炭素骨格生合成経路は、いずれもIPPの重合によりプレニルニリン酸を生成する反応であるが、それを触媒する酵素は、プレニルトランスフェラーゼ (*prenyltransferase*, PT) と総称される。PTは、IPP重合で新たに形成される二重結合の立体配置から、*trans*型PT (*tPT*) と *cis*型PT (*cPT*) に大別される。一見、両者の触媒する反応は同じであるが、*tPT*と*cPT*は構造上まったく異なるタンパク質ファミリーに属する。NR生合成経路の第一段階では*tPT*が、そして、第二段階では*cPT*が反応を触媒している(図1)。この*cPT*は、DMAPP (C_5) を開始基質として受け入れられないため、生成する*cis*-ポリプレニルニリン酸の ω 末端には開始基質に由来する数個の*trans* イソプレン単位が含まれることになる。PTは、二重結合の立体配置を厳密に制御するとともに重合度も制御しており、重合度特性が異なる多様な*tPT*、*cPT*が見いだされている。PTはC-C結合による炭化水素重合反応を触媒するユニークな酵素ファミリーであり、その重合度制御機構が注目されてきた。

cPTの反応機構 *cPT*は全生物が普遍的に有する酵素であり、細胞維持に必須な役割を果たしている¹⁰⁾。真正細菌や古細菌は C_{55} 前後のポリプレニルニリン酸を合成する中鎖型*cPT*を有し、真核生物は、 C_{75-100} 程度のポリプレニルニリン酸を合成するER局在型の長鎖型*cPT*を有する。これらのポリプレニルニリン酸は、いずれも糖鎖合成において必須な足場脂質(ポリプレノール、ドリコール)の前駆体である。多くの真核生物は1、2個の長鎖型*cPT*を有するのに対し、高等植物ではドリコール生合成に必須な長鎖型*cPT*に加え、細胞内局在性や生成物鎖長特性の異なる複数の*cPT*を有する。RPがERから発生するオルガネラと考えられているため、NR生合成に寄与する*cPT*は長鎖型*cPT*の一種であると予想されていた。

細菌の中鎖型*cPT*の結晶構造解析¹¹⁾から、*cPT*には二つの α -ヘリックスと二つの β -ストランドで構成された疎水性クレフトが存在することが示されている(図2)。クレフトの端には、開始基質となるオリゴプレニルニリン酸が Mg^{2+} を介して結合するS1サイトと、IPPが結合するS2サイトが存在する。重合反応では、まず、S1サイトで開始基質のニリン酸基が脱離し、カチオン中間体が生じる。そこにS2サイトのIPPが付加するとともに

S1サイトに移行するため、1ユニット伸長したプレニル鎖は、疎水性クレフト内を進行する。次のIPPがS2サイトに結合し、同様の重合反応が繰り返されることで、プレニル鎖は順次クレフト内を進行することになる。中鎖型*cPT*では、疎水性クレフトが収容可能なプレニル鎖のサイズで生成物の炭素鎖長が決定される機構が提案されており、クレフト構成残基の置換による生成物鎖長改変にも成功している¹⁰⁾。一方、長鎖型*cPT*の反応生成物のサイズ(C_{75-100})は疎水性クレフトのサイズを超過しているため、疎水性クレフトを突き抜けたプレニル鎖は、*cPT*が結合する膜の脂質二重層内に導入され、ある段階で酵素からリリースされると予想される。そのため、生成物のサイズは、IPP重合反応の触媒効率と、伸長プレニル鎖の膜内への導入効率、つまり膜の特性とで決定されていると考えられている。また、大腸菌内で発現させた長鎖型*cPT*は活性を示さないのに対し、それを異種発現させた酵母の膜画分(ミクロソーム)には明確な活性が示されることから、長鎖型*cPT*の活性発現には真核生物特有の膜成分との相互作用が必要であると考えられている。

In vitroにおけるNRの酵素合成 パラゴムノキより単離された*cPT*遺伝子*HRT1*、*HRT2*¹²⁾を皮切りに、タンポポ、レタス、グアユールなど種々のNR産生植物から乳管(ラテックス)特異的に発現する*cPT*がクローニングされている¹⁾。それらは長鎖型*cPT*と同様の特徴を示し、大腸菌内で異種発現させた組換え型酵素は活性を示さず¹²⁾、酵母系で発現させた酵素は、 C_{100} 程度のポリプレニルニリン酸を合成する¹³⁾。しかし、コムギ胚芽由来無細胞タンパク質発現系により、翻訳・折り畳みと共役させながらRP膜に導入された*HRT1*は、 C_{100} 程度のポリイソプレノイドは生成せず、代わりにNRに相当する分子量約100万の超長鎖ポリイソプレノイドを生成した⁴⁾。さらに、この系でRP膜上に導入したレタスやタンポポ由来*cPT*も同様の活性を示した。これらの結果は、長鎖型*cPT*の生成物鎖長制御の主因が酵素ではなく膜側にあることを示している。RPは、伸長するポリイソプレニル鎖を収容するための疎水性空間が脂質二重層より大きい点で有利であるだけでなく、何らかの疎水性鎖の内部への取込みを補助する機構を有している可能性がある。

パラゴムノキを宿主とした物質生産系への展望

パラゴムノキの乳管におけるNR生産系の優れた点は以下のようにまとめられる。①生産性がすでに工業レベルに達した成熟した系である、②目的化合物回収時に植物を伐採する必要のない、低コストで簡便な持続性の高

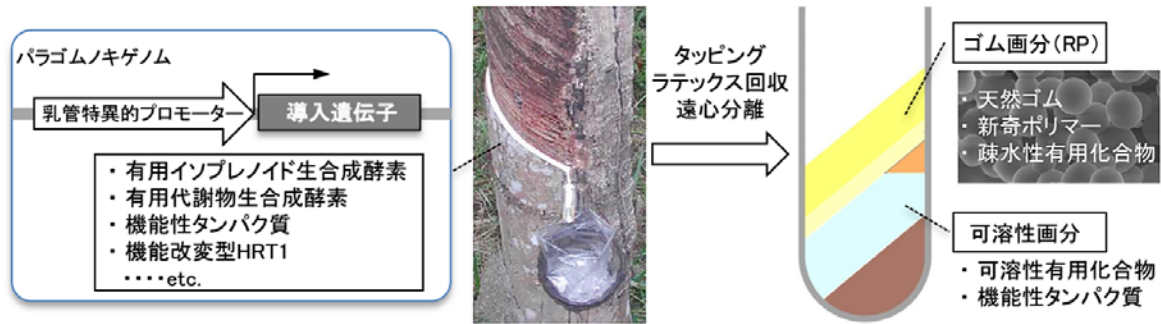


図3. パラゴムノキにおける有用物質生産系. ※学会HPのPDFではカラーで表示されます.

い系である, ③ラテックス内に化合物を高蓄積させることで, 宿主植物の生育への悪影響が抑えられる, ④RP内に疎水性化合物を蓄積させる機構により, 代謝物高蓄積による細胞毒性を回避できる. 現在, NR生産量の増大が求められている一方で, その単価は安く (~170円/kg), 生産者にとって必ずしも魅力的な作物ではない. そこで, パラゴムノキの一部を, より高付加価値な物質の生産に適用することも想定される (図3).

パラゴムノキにおけるNR生産性の高さは, IPP供給経路の強さを示唆している. そこで, パラゴムノキにおいて, *HRT1*などのNR生合成酵素の遺伝子発現を抑制し, 代わりに他の有用イソプレノイド生合成経路を導入することで, きわめて生産性・持続性に優れた有用イソプレノイド合成・回収システムが構築可能となる. IPPを共通前駆体とするイソプレノイドは自然界に55,000種以上存在しているが, その中には, 医薬品 (アルテミシニン, パクリタキセルなど), 生理活性物質 (脂溶性ビタミンなど), 工業原料 (リモネン, ビネンなど) として活用されているものも多く, 産業的意義は非常に高い. また, 代謝物だけでなく機能性タンパク質の生産系としても応用可能である. 乳管代謝工学の達成のためには, 外来遺伝子を乳管特異的に発現させる遺伝子発現システムの開発が必要となる. NR生合成関連タンパク質の多くは乳管特異的な発現を示すが, なかでも *HRT1* の発現はきわめて乳管限定的であり¹⁴⁾, それを制御する転写調節配列とそこに作用する転写調節タンパク質の探索が進められている.

*HRT1*などの長鎖型cPTの機能改変は, NR以外の新奇バイオポリマー生合成のための有望なアプローチである. 筆者らは, cPTの基質認識と疎水性クレフト内における疎水性生成物伸長の制御機構の解明を進めており,

それを基にした新奇酵素のデザインにも取り組んでいる. また, RP膜上にNR以外の疎水性有用化合物の生合成酵素を配置することで, 目的化合物を内部に蓄積させながら高生産させることが可能となると考えられる. そのためには, タンパク質のRP膜への移行機構の解明が必要となる. 筆者らが開発した, 無細胞タンパク質合成系とカップルさせたRPへのタンパク質導入法³⁾は, cPT以外のRP膜タンパク質にも適用可能であったことから, この *in vitro*系を利用することで, RP膜への移行に必要なタンパク質構造モチーフの迅速な探索が可能となる.

文 献

- 1) Yamashita, S. and Takahashi, S.: *Annu. Rev. Biochem.*, **89**, 821 (2020).
- 2) Tanaka, Y. and Sakdapipanich, J. T.: *Biopolymers vol. 2, Polyisoprenoids* (Koyama, T. and Steinbüchel, A. Ed), pp. 1–25, Wiley-VCH Verlag GmbH: Weinheim (2005).
- 3) Hagel, J. M. et al.: *Trends Plant Sci.*, **13**, 631 (2008).
- 4) Yamashita, S. et al.: *eLife*, **5**, e19022 (2016).
- 5) Yamashita, S. et al.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **82**, 1011 (2018).
- 6) van Beilen, J. B. and Poirier, Y.: *Trends Biotechnol.*, **25**, 522 (2007).
- 7) Kitaura, T. et al.: *Macromol. Chem. Phys.*, **219**, 1700331 (2018).
- 8) Oouchi, M. et al.: *Biomacromolecules*, **20**, 1394 (2019).
- 9) Tanaka, Y.: *Prog. Polym. Sci.*, **14**, 339 (1989).
- 10) Takahashi, S. and Koyama, T.: *Chem. Rec.*, **6**, 194 (2006).
- 11) Fujihashi, M. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 4337 (2001).
- 12) Asawatreratanakul, K. et al.: *Eur. J. Biochem.*, **270**, 4671 (2003).
- 13) Takahashi, S. et al.: *Plant Biotechnol.*, **29**, 411 (2012).
- 14) Aoki, Y. et al.: *Plant Sci.*, **225**, 1 (2014).