

博士論文

効率的なドメイン間電子伝達を行う
人工多酵素複合体の設計

芳賀 智亮

1. 緒言

生体内では様々な酵素が電子を受け取って触媒活性を発揮している。それらの酵素の中には、一酸素原子添加酵素であるシトクロムP450など、香料・医薬品・燃料の生産や難分解性物質の分解など産業への応用が期待されているものが多い^[1]。酵素への電子伝達は、酸化還元タンパク質が結合することで行われる場合があるが、高い回転数の実現のために酵素と酸化還元タンパク質の相互作用は一時的であり強くないことが多い^[1]。そのため、電子伝達が酵素反応の律速である場合には、最大活性を発揮するために反応系中に高濃度の酸化還元タンパク質を必要とし、このことが酵素の実用化の難点となりうる。

これまで、酵素と酸化還元タンパク質を遺伝子工学的に融合したり、核酸やタンパク質上に集積させたりすることにより、酵素と酸化還元タンパク質の局所濃度を向上させて効率的な電子伝達を実現することが試みられてきた。その方法の一つとして、*Sulfolobus solfataricus*由来のリング状ヘテロ三量体タンパク質である核内増殖抗原（Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA)）上への酵素と酸化還元タンパク質の集積が報告されている^[2]。モデルとして、*Pseudomonas putida*由来のシトクロムP450電子伝達系の構成タンパク質（プチダレドキシ還元酵素 (PdR)、プチダレドキシ (PdX) 及びP450cam) を各PCNAサブユニット (PCNA1、PCNA2及びPCNA3) にそれぞれ融合したところ、3種類の融合タンパク質 (PCNA1-PdR、PCNA2-PdX及びPCNA3-P450cam) は自発的にヘテロ3量化し、PdR、PdX及びP450camがPCNA上に集積した多酵素複合体が形成されることが示されている（**図 1**）。複合体内でのPdRからPdXを経由したP450camへの電子伝達を確認されたが、複合体の触媒活性は遊離のP450camの最大活性には達していなかった。P450camの触媒サイクルにおいて、PdXからP450camへの電子伝達が律速であるため^[3]、より高い触媒活性を示す複合体を得るためには、効率的にP450camへ電子が伝達されるように複合体を再設計する必要がある。

本論文では、より高い電子伝達活性を示す多酵素複合体の設計指針を得ることを目的と

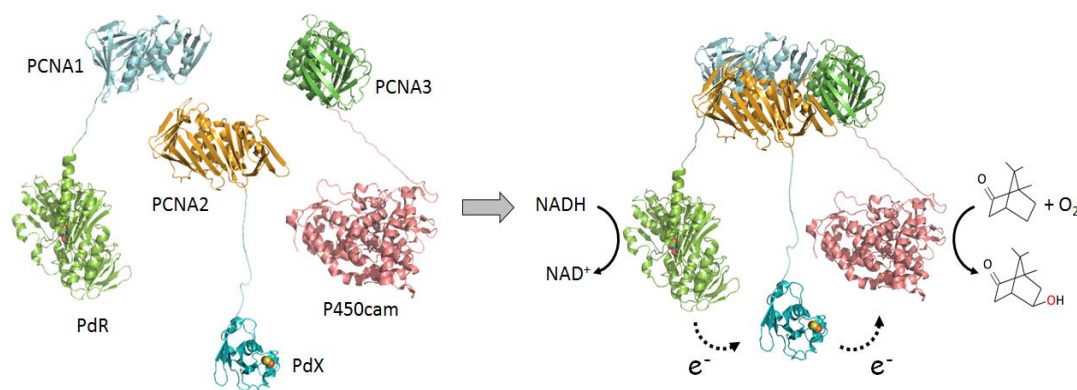


図 1. PCNA を足場とした多酵素複合体の形成.

して、モデルであるPdR/PdX/P450cam酵素複合体を再設計することにより、その電子伝達活性を向上させられるかを確かめた。そこでまず、酸化還元ドメインの空間配置の制御を試みた。タンパク質ドメイン間の電子伝達は、ドメインどうしが結合してから起こる。そのため、複合体内の酸化還元ドメインの空間配置の変化は、電子伝達を行うドメインどうしの結合のしやすさに影響を与え、その結果ドメイン間の電子伝達活性が変化すると予想される。これまでに、酸化還元ドメインと足場を連結するリンカーの長さを最適化して電子伝達活性を向上させた報告があった。しかし、リンカーの長さだけではなく、剛直さにも着目した研究はこれまで報告されていなかった。本研究では、末端間距離をより厳密に制御できる剛直なリンカーを用いることで、柔軟なリンカーを用いる場合よりも触媒ドメインへの電子伝達活性を向上させうることを示した。次に、複数の酸化還元ドメインの導入を試みた。これまでに報告された多酵素複合体のほとんどは、各種の酸化還元ドメインを1つずつのみ含むものであった。しかし、酸化還元ドメインの数を増やすことでドメインどうしの結合速度が増大し、ドメイン間での電子伝達活性が向上すると予想される。本研究では、複合体内のすべての種類の酸化還元ドメインの数を増やすことで、触媒ドメインへの電子伝達活性を向上させうることを示した。

2. 酸化還元ドメインの空間配置の制御

2-1. 多酵素複合体の設計と構築

PdXはPdR及びP450camの両方と相互作用し、PdRからP450camへと電子を渡している。そのため、PdXの空間配置は、PdRからPdXへの電子伝達活性及びPdXからP450camへの電子伝達活性の両方に影響を与えうると考えられる。そこで、PdXとPCNAサブユニットの間のペプチドリンカーを改変し、PdXの空間配置を制御することにより、電子伝達活性の向上を試みた。リンカーには、ヘリックス構造を形成するために剛直な^[4]ポリプロリン(Pro)を多く含むペプチドGly₄-Ser-(Pro)₅-Gly₄-Ser (n = 1-5)、及び側鎖が比較的小さいグリシン(Gly)と水分子との水素結合により水溶液中での安定性に寄与するセリン(Ser)を多く含むために柔軟な^[5]ペプチド(Gly₄-Ser)_n (n = 1-6)を用いた。各ペプチドリンカーを有するPCNA2-PdX融合タンパク質は、大腸菌により発現し、各種クロマトグラフィーにより精製した。各融合タンパク質の吸収スペクトルを解析した結果、可視光領域に遊離のPdXと同様のスペクトルが得られ、リンカーの違いは電子伝達に関わる鉄硫黄クラスターの保持にほとんど影響がないことが示唆された。続いて、各PCNA2-PdX融合タンパク質をPCNA1-PdR融合タンパク質及びPCNA3-P450cam融合タンパク質と混合し、PCNAの自発的ヘテロ3量化により多酵素複合体を形成させた。形成した複合体はサイズ排除クロマトグラフィーにより精製した。各複合体をSDS-PAGEにより解析した結果、目的の複合体が純度よく得られたことを確認した。

2-2. 多酵素複合体の活性評価

PCNA2 と PdX の間のリンカーを変えた各多酵素複合体の触媒活性を求め、リンカーの違いが電子伝達活性に与える影響を評価した。基質であるカンファー依存的に消費される酸素の濃度を測定し、酸素の消費初速度を触媒活性とした。Pro₅ 及び Gly₄-Ser 繰り返し配列のいずれのリンカーを用いた場合でも活性はペプチド鎖長に依存し、Pro₅ 繰り返しリンカーの場合は繰り返し数が 4 まで、Gly₄-Ser 繰り返しリンカーの場合は繰り返し数が 5 まで、鎖長を大きくするほど活性が増大した。

リンカーの違いによる触媒活性の変化が、PdR-PdX 間の電子伝達活性の変化によるものか、PdX-P450cam 間の電子伝達活性の変化によるものかを調べるため、PdR-PdX 間の電子伝達活性に依存するシトクロム c 還元活性を測定した。その結果、複合体のシトクロム c 還元活性はリンカーの違いによって互いに大きな差はなかった。このことから、リンカーは主に PdX-P450cam 間の電子伝達活性に影響を与えたと考えられる。

鎖長を最適化した Pro₅ 繰り返しリンカー (繰り返し数 = 4) を用いた複合体と、鎖長を最適化した Gly₄-Ser 繰り返しリンカー (繰り返し数 = 5) を用いた複合体の活性を比較すると、Pro₅ 繰り返しリンカーの方がより高い活性を与えた。ポリプロリンは、水溶液中でヘリックス構造を形成するため、ペプチド鎖の伸長に伴い末端間距離がほぼ比例的に増大し、Pro₅ の繰り返し数が 4 のとき末端間距離は約 50 Å にも及ぶことが先行研究により示唆されている^[6]。一方で、グリシンを多く含むリンカーは、ペプチド鎖を伸長してもポリプロリンと比較して末端間距離があまり大きくならないことが明らかにされている^[7]。PCNA2 と PdX の間のリンカーの末端間距離が PdX-P450cam 間の電子伝達にどのような影響を及ぼしたかを推定するために、PCNA ヘテロ 3 量体^[8]及び PdX-P450cam 複合体^[9]の共結晶構造をもとに、多酵素複合体における PdX の P450cam に対する結合のモデルを構築した (図 2)。このモ

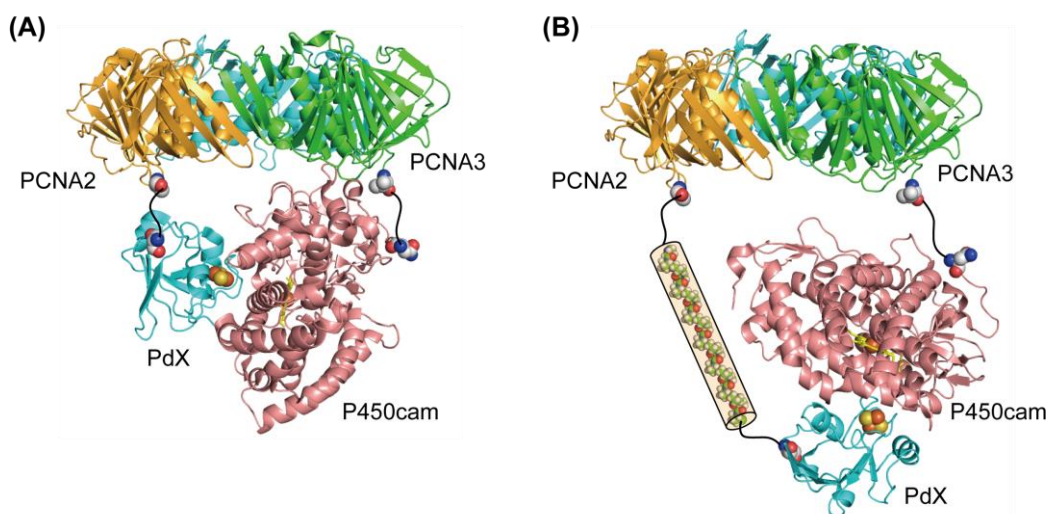


図 2. 多酵素複体内の PdX と P450cam の結合のモデル. (A) PdX-P450cam 相互作用界面が PCNA リングと垂直の場合. (B) PdX-P450cam 相互作用界面が PCNA リングと平行の場合.

デルでは、リンカーの末端間距離が比較的短い場合には、PdX-P450cam 相互作用界面が PCNA リングと垂直になるように、PdX が P450cam と相互作用する必要がある。一方、リンカーの末端間距離がより長い場合には、PdX-P450cam 相互作用界面が PCNA リングと平行になるように、PdX が P450cam と相互作用しうる。Pro₅ の繰り返し数を 1 から 4 まで増大させるのに伴い触媒活性が向上したことより、後者が PdX-P450cam 複合体の形成に望ましい空間配置であろう。しかし、柔軟な Gly₄-Ser 繰り返しリンカーを用いた場合には、上述のようにペプチド鎖を伸長しても末端間距離はさほど増大しないため、同様の鎖長の剛直な Pro₅ 繰り返しリンカーを用いた場合と比較して、PdX-P450cam 複合体の形成に望ましい空間配置に PdX を置くことができなかったと考えられる。このため、最適な鎖長の Gly₄-Ser 繰り返しリンカーを用いた場合に、最適な鎖長の Pro₅ 繰り返しリンカーを用いた場合の活性を達成できなかったのだろう。従って、多酵素複合体において触媒ドメインへの電子伝達活性を向上させるためには、剛直なリンカーを用いて酸化還元ドメインの空間配置を厳密に制御することが望ましいと言える。

3. 複数の酸化還元ドメインの導入

3-1. 多酵素複合体の設計と構築

酸化還元ドメインの数が電子伝達活性に与える影響を調べるため、PdR及びPdXの分子数を変えたPdR/PdX/P450cam複合体を設計した(図3)。PdRの分子数は1-3、PdXの分子数は1-2、P450camの分子数は1として、PdXをPCNA1またはPCNA2のC末端に、PdRをいずれかのPCNAサブユニットのN末端に、P450camをPCNA3のC末端にそれぞれ融合した。また、各PCNAサブユニットとして、PCNA1_{G108C}変異体、PCNA2_{L171C}変異体及びPCNA3_{R112C/T180C}変異体を用いた。これらの変異体を用いることで、酸化的条件下においてサブユニット間でジ

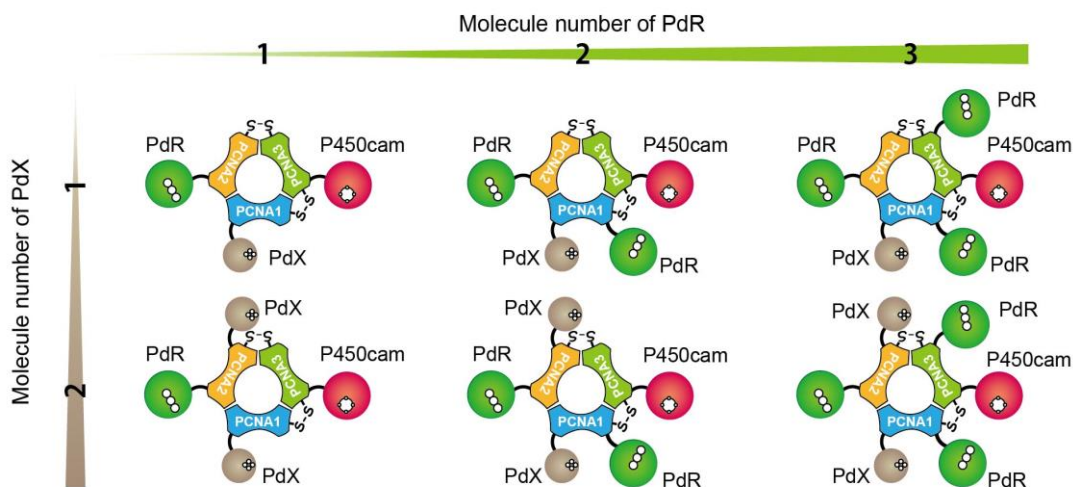


図 3. PdR 及び PdX の分子数の異なる多酵素複合体。

スルフィド結合を形成し、低濃度でのサブユニットの解離を防ぐことができる^[10]。

多酵素複合体の構築は、各融合タンパク質の混合によるヘテロ 3 量体の形成、酸化型グルタチオンの添加によるジスルフィド結合形成の促進、及びサイズ排除クロマトグラフィーによる精製の 3 ステップで行った。まず、還元 SDS-PAGE 解析により、各複合体が純度よく得られたことが確認された。また、還元 SDS-PAGE で見られた各融合タンパク質のモノマーに由来するバンドが、非還元 SDS-PAGE でほとんど見られなかったことから、ジスルフィド結合の形成が確認された。

続いて、多酵素複合体の吸収スペクトルを測定した。その結果、既往の報告と同様に^[2]、複合体形成前後において P450cam のスペクトルが変化していた。この原因は、酸化型 PdX (PdX^{ox}) が P450cam に結合することで P450cam が構造変化を起こし、P450cam のスピン状態が変わるためであると考えられている。PdR 及び PdX の分子数とスペクトル変化の関係を調べたところ、PdX の分子数を多くするとスペクトル変化が大きくなる一方、PdR の分子数を多くするとスペクトル変化が小さくなる傾向があった。このことより、多酵素複合体において、PdX^{ox} は PdR 及び P450cam と競合的に結合することが示唆された。

3-2. 多酵素複合体の活性評価

上述のように、吸収スペクトル解析より、多酵素複合体では PdX^{ox} の PdR への結合が、P450cam への結合と競合することが示唆された。PdR-PdX^{ox} 複合体では PdR から PdX^{ox} への電子伝達が行われる一方で、PdX^{ox}-P450cam 複合体では電子伝達が行われない。従って、PdX^{ox}-P450cam 間の相互作用が、PdR による PdX^{ox} の還元速度に影響する可能性がある。また、吸収スペクトル解析より、PdR 及び PdX の分子数によって PdR-PdX^{ox} 複合体及び PdX^{ox}-P450cam 複合体の形成のしやすさが変わることも示唆された。従って、PdR 及び PdX の分子数もまた、PdX^{ox} の還元速度に影響すると考えられる。

そこで、PdX^{ox}-P450cam 間の相互作用や PdR 及び PdX の分子数が PdX^{ox} の還元速度に影響を与えるかどうかを評価するため、各多酵素複合体のシトクロム c 還元速度を測定した。まず、多酵素複合体のシトクロム c 還元活性を、それと対応するような、P450cam だけをもたない多酵素複合体のシトクロム c 還元活性と比較したところ、前者の活性の方が小さかった。このことから、PdX^{ox}-P450cam 間の相互作用は実際に PdX の還元速度を低下させることが示唆された。また、より多くの PdR 及び PdX をもつ多酵素複合体の方が、高いシトクロム c 還元活性を示した。このことから、PdR 及び PdX の分子数の増加は、PdX の還元速度を向上させることが示唆された。以上のシトクロム c 還元アッセイの結果は、PdX^{ox} の P450cam への結合が PdR-PdX^{ox} 電子伝達複合体の形成を阻害するものの、PdR 及び PdX の分子数の増加が電子伝達複合体の形成を促進するような反応の数値モデルで説明できた。

以上のように、PdR 及び PdX の分子数の増加は PdX の還元速度を向上させることが示唆されたが、PdX の還元速度は P450cam への電子の供給速度に影響するため、PdX の還元速度が向上すると多酵素複合体の触媒活性は増大すると考えられる。これを確かめるため、

PdR 及び PdX の分子数が多酵素複合体の触媒活性に与える影響を調べた。触媒活性は、基質であるカンファー依存的に消費される NADH の消費初速度で評価した。その結果、期待通り PdR 及び PdX のいずれを増やしても触媒活性は向上した。PdR を 3 分子と PdX を 2 分子含む複合体が最も高い活性を示し、その活性は P450cam の最大活性の約 90% の値であり、効率的に電子を P450cam へ供給できていることが示唆された。以上の結果は、PdX^{ox} が P450cam へ結合することにより PdR-PdX^{ox} 電子伝達複合体及び PdX^{red}-P450cam 電子伝達複合体 (PdX^{red} は還元型 PdX を表す) の形成を阻害するものの、PdR 及び PdX の分子数の増加が各電子伝達複合体の形成を促進するような、シトクロム c 還元アッセイと同様の反応の数理モデルで説明できた。

以上より、多酵素複合体においては、すべての酸化還元ドメインの数を増やすことで、電子伝達複合体の形成を促進できて、触媒ドメインへの電子伝達活性を向上させることが示された。

4. 結論

本研究において、酸化還元ドメインの空間配置および数を制御することにより、より効率的なドメイン間電子伝達を行う多酵素複合体が構築できた。本研究で示した多酵素複合体の設計の指針は、水素の生産に関わるヒドロゲナーゼやアルカンの生産に関わるアルデヒド脱ホルミルオキシゲナーゼなど、シトクロム P450 と同様に酸化還元タンパク質からの電子の供給により活性化されるような有用な酵素群にも適用できることが期待される。

5. 引用文献

- [1] Bashir, Q.; Scanu, S.; Ubbink, M. *FEBS J.* **2011**, 278, 1391–1400.
- [2] Hirakawa, H.; Nagamune, T. *ChemBioChem* **2010**, 11, 1517–1520.
- [3] Brewer, C.B.; Peterson J.A. *J. Biol. Chem.* **1988**, 263, 791–798.
- [4] Schimmel, P.R.; Flory, P.J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1967**, 58, 52–59.
- [5] Argos, P. *J. Mol. Biol.* **1990**, 211, 943–958.
- [6] Hanson, J.A.; Brokaw, J.; Hayden, C.C.; Chu, J.-W.; Yang, H. *Chem. Phys.* **2012**, 396, 61–71.
- [7] Evers, T.H.; van Dongen, E.M.W.M.; Faesen, A.C.; Meijer, E.W.; Merckx, M. *Biochemistry* **2006**, 45, 13183–13192.
- [8] Hlinkova, V.; Xing, G.; Bauer, J.; Shin, Y.J.; Dionne, I. *et al. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2008**, 64, 941–949.
- [9] Hiruma, Y.; Hass, M.A.; Kikui, Y.; Liu, W.M.; Ölmez, B. *et al. J. Mol. Biol.* **2013**, 425, 4353–4365.
- [10] Hirakawa, H.; Kakitani, A.; Nagamune, T. *Biotechnol. Bioeng.* **2013**, 110, 1858–1864.

6. 発表

- [1] Haga, T.; Hirakawa, H.; Nagamune, T. *PLoS One* **2013**, 8, e75114.