

博士論文

自在に配置制御可能な多酵素複合体の構築

岩田 史也

1. 緒言

温和な反応条件下で高い反応特異性・基質特異性・位置選択性を示す酵素は、強力な触媒として利用されてきた。一つの酵素は単一の反応を触媒するものであるが、医薬品やそのリード化合物などの有用天然化合物は複数の酵素による触媒反応（多酵素反応）を経て合成されている。生体内の多酵素反応においては、自発的な複合体形成や膜局在、コンパートメント化などにより多酵素反応に関わる酵素の大部分が分子レベルで近接・集積化している^[1]。この近接により、酵素間の物質移動効率向上や中間生成物の分解防止、協奏的效果の発現などが達成され、高効率な多酵素反応を実現している。人工的な多酵素複合体構築の報告も多くなされており、人為的な酵素の近接により多酵素反応の反応効率が向上することが知られている^[2]。人工的な多酵素複合体は、タンパク質又は核酸など酵素への悪影響の少ない生体分子を利用した足場を用いて構築されている。酵素の精密な配置制御のためには直交性のあるタンパク質相互作用を用いる必要があるがその数には限りがある。また、その際に用いる足場は一つの融合タンパク質として調製する必要があるため、固定化する酵素の数が増えるほど調製が困難になるという問題点がある。一方、特異的な相互作用を設計可能な DNA を足場として用いた場合でも、酵素の DNA 修飾に手間とコストがかかる等の問題がある。これら足場を用いる手法では固定化する酵素それぞれに独立な相互作用ドメインを利用するため、形成される複合体は足場の設計によって一意的に決定される。それ故、酵素の配置順・数が全体の活性に与える影響を吟味する際には足場を再設計しなければならず、複合体の種類と同数の足場が必要となってしまう。それに対して、直交性のある二つのタンパク質相互作用を利用し逐次的にタンパク質を超分子化することができれば、添加順や回数により酵素の配置・数を決定できるため、共通のコンポーネントタンパク質を用いて様々な酵素複合体を構築することが可能となる。

クレン古細菌 *Sulfolobus solfataricus* 由来の核内増殖抗原（PCNA）は段階的にリング状のヘテロ三量体（SsoPCNA1:SsoPCNA2:SsoPCNA3）を形成することが知られている（**図 1A**）。この PCNA リングを足場として段階的に連結していくことにより、足場にペプチドリンカーを介して融合した酵素の動きを抑制することなく、望みの順で望みの数の酵素を複合化できると期待される（**図 1B**）。しかし、SsoPCNA ヘテロ三量体においては SsoPCNA1:SsoPCNA2 ヘテロ二量体からの SsoPCNA3 の解離が非常に速く^[3]、効率的な超分子形成のためにはより強固な PCNA が必要であると考えた。そこで本研究

ではまず、1) より安定なヘテロ三量体を形成する PCNA を探索した。そして、2) その安定性が多酵素複合体に与える影響を明らかにした。最後に、3) 逐次的に PCNA リングを伸長することで段階的な超分子形成方法の開発を試みた。実際に、この系を用いることで複数の酵素の配置を添加する順番で制御できることを明らかにした。本手法ではコンビナトリアルに酵素の種類・配置順・数を最適化できるため、様々な多酵素反応系に適した複合体を迅速に得られると期待される。

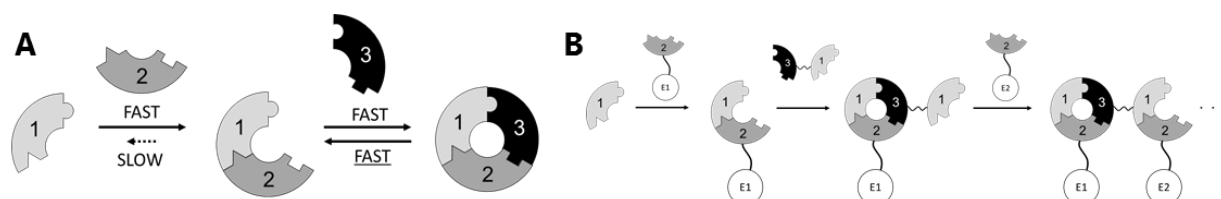


図1 A) SsoPCNA の段階的ヘテロ三量化、B) 逐次的 PCNA 超分子化による多酵素複合体構築

2. 安定なヘテロ三量体 PCNA の発見

現在までに発見されているヘテロ三量体 PCNA は *S. solfataricus* 由来の PCNA のみであるが、SsoPCNA3 の SsoPCNA1:SsoPCNA2 ヘテロ二量体からの解離が非常に速く、複合体の安定性に欠ける。本研究のように PCNA をビルディングブロックとして逐次的に巨大な複合体を構築する際には、より強い相互作用が望ましい。一部のクレン古細菌のみが三つの異なる PCNA 遺伝子を有しているが、既存の報告から、PCNA 遺伝子を三つ有することとヘテロ三量体を形成する否かは関連がなく、またアミノ酸配列とその三量化能にも明確な関係性はないことが明らかとなっている。つまり、実験的に評価する他、ヘテロ三量体タンパク質を見出す手段はない。そこで、6つのクレン古細菌由来の PCNA をそれぞれ大腸菌により発現し、リコンビナントタンパク質を精製した。それらの三量体形成能をサイズ排除クロマトグラフィによって評価した (Table 1)。その結果、*Metallosphaera sedula* 由来の PCNA (MsePCNA1、MsePCNA2 及び MsePCNA3) のみ、SsoPCNA と同様に段階的ヘテロ三量化能を有することが明らかとなった。そこで、MsePCNA に関して、それぞれの相互作用を表面プラズモン共鳴法によって評価した。MsePCNA1:MsePCNA2 の相互作用は、結合が非常に速く ($ka=(2.8\pm0.6)\times10^5\text{ M}^{-1}\text{ S}^{-1}$)、解離は非常に遅い ($kd=(9.0\pm3.5)\times10^{-4}\text{ S}^{-1}$) という結合様式であり、解離定数は 320 pM と非常に安定な相互作用であることが分かった。一方、MsePCNA1:MsePCNA2 ヘテロ二量体と MsePCNA3 間の相互作用は結合・解離ともに速いものの、MsePCNA3 の MsePCNA1:MsePCNA2 ヘテロ二量体か

らの解離は SsoPCNA3 の SsoPCNA1:SsoPCNA2 ヘテロ二量体からの解離よりも遅く、解離定数は 42 nM と SsoPCNA の場合 (200 nM) よりも五倍以上安定であることが明らかとなった。*M. sedula* 由来の PCNA は *S. solfataricus* 由来 PCNA よりも高い安定性を有するため、多酵素複合体を構築するのにより適していると期待できる。

Table 1 Crenarchaea with three PCNA genes in their genome

Species	Complex formation	references
<i>Desulfococcus kamchatkensis</i>	Homotrimer	My thesis
<i>Desulfococcus mucosus</i>	–	–
<i>Thermosphaera aggregans</i>	–	–
<i>Staphyrothermus marinus</i>	Homotrimer/Heterotrimer	My thesis
<i>Staphyrothermus hellenicus</i>	–	–
<i>Ignicoccus hospitalis</i>	Homotrimer/Heterotrimer	My thesis
<i>Aeropyrum pernix</i>	Homotrimer/Heterotrimer	2007 ^[4]
<i>Acidilobus saccharovorans</i>	–	–
<i>Hyperthermus butylicus</i>	Homotrimer	My thesis
<i>Pyrolobus fumarii</i>	–	–
<i>Ignisphaera aggregans</i>	–	–
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	Heterotrimer	2003 ^[3]
<i>Sulfolobus tokodaii</i>	Heterotrimer/Tetramer	2008 ^[5] /2011 ^[6]
<i>Acidianus hospitalis</i>	Heterotrimer/two heterodimers	My thesis
<i>Metallosphaera sedula</i>	Heterotrimer	My thesis
<i>Metallosphaera cuprina</i>	–	–

3. PCNA の安定性が多酵素複合体に与える影響の評価

MsePCNA ヘテロ三量体と SsoPCNA ヘテロ三量体の安定性の差が酵素複合体形成に与える影響を評価するため、*Pseudomonas putida* 由来のシトクロム P450cam(P450cam)、その活性化に必要なプチダレドキシシン還元酵素(PdR)、プチダレドキシシン(PdX)を各 PCNA サブユニットに融合した^[7]。個別に調整した各融合タンパク質を混合することで、PCNA の三量化により自発的に酵素複合体が形成される(図 2)。この多酵素複合体は単純に三つの酵素を混合した場合と比べ、50 倍以上の活性を示すことが知られているため、触媒活性を指標にヘテロ三量体の安定性の影響度を評価した。多酵素複合体の触媒活性は、基質であるカンファー依存的な酸素消費の初速度によって評価した。MsePCNA を用いた場合においても非共有結合的であるため、濃度依存的に多酵素複合体は解離し、見かけの比活性は低下した。しかし、どの濃度においても SsoPCNA を用いた場合より比活性は高く、約 40 nM という低濃度で見かけの比活性が飽和した。これらの結果から MsePCNA の高い安定性は、完全な三量体を構築するために重要であることが示された。

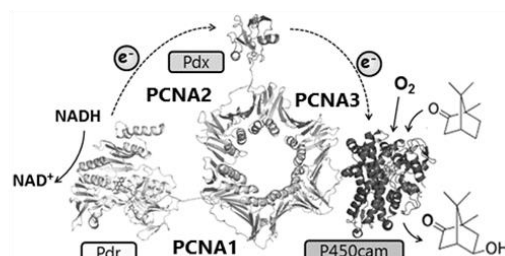


図 2 構築した多酵素複合体.

4. 担体上での逐次的多酵素複合体構築

逐次的に PCNA リングを連結していくために、まずマルトース結合タンパク質 (MBP) を介して直接 MsePCNA1 を担体 (アミロース磁気ビーズ) 上に固定化する。その後 MsePCNA2 又は酵素融合 MsePCNA2 と MsePCNA3-MsePCNA1 融合タンパク質の添加・洗浄を繰り返すことで望みの多酵素複合体が構築できると考えた。この手法を実現するため、1) PCNA リングのさらなる安定化、2) PCNA リングの連結ドメインとして機能する MsePCNA3-MsePCNA1 融合タンパク質の最適化を行った。その後、3) PdR、PdX を用いて、複数の酵素が望みの位置に固定化された多酵素複合体を構築できることを示した。

4.1. MsePCNA ヘテロ三量体へのジスルフィド結合導入

前章の結果を鑑みるに、添加・洗浄を繰り返す際にタンパク質濃度が低下するため、PCNA リングが解離してしまう可能性が高いと考えられる。そこで、MsePCNA1-MsePCNA3 間及び MsePCNA2-

MsePCNA3 間にジスルフィド結合を導入することを考えた。既往の報告において、SsoPCNA_{G108C}, SsoPCNA2_{L171C} 及び SsoPCNA3_{R112C/T180C} 変異体を用いることで SsoPCNA1-SsoPCNA3 間及び SsoPCNA2-SsoPCNA3 間にジスルフィド結合を導入できることが知られている[8]。そこで、アミノ酸配列のアライメントに基づき MsePCNA1_{G107C}, MsePCNA2_{V169C} 及び MsePCNA3_{R112C/M180C} の三つの変異体を調製した。野生型または変異型 MsePCNA の等モル量混合溶液を酸化剤存在下でインキュベーションした後、非還元 SDS-PAGE によってジスルフィド結合形成を解析した。その結果、MsePCNA1-MsePCNA3 間及び MsePCNA2-MsePCNA3 間にジスルフィド結合を導入できることが分かった。以後の実験においてはこれら三つの変異体を用いた。

4.2. 連結ドメインの設計と複合体形成効率の評価

連結ドメインとして機能する三種の融合タンパク質を設計した。単純に MsePCNA3 の C 末端と MsePCNA1 の N 末端を連結したもの (M3PM1)、結晶構造に基づき、MsePCNA3 の N 末端と MsePCNA1 の C 末端を、トリプトファンジッパーを含むリンカーで

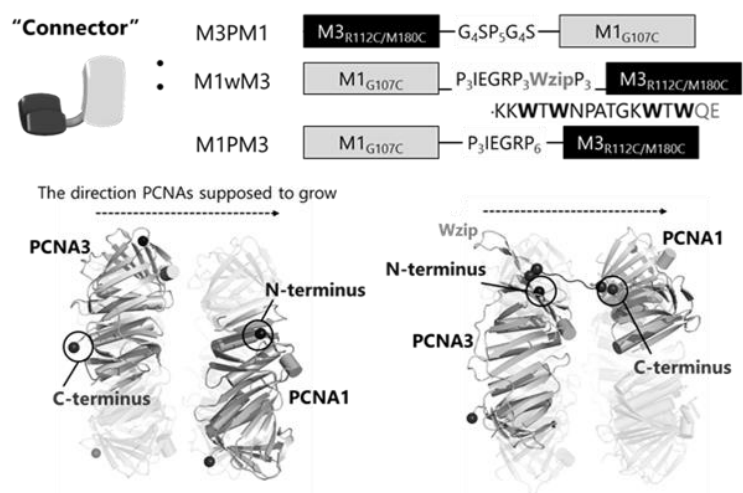


図3 連結ドメインとして機能する融合タンパク質の設計

連結したもの (M1wM3) 及びターン構造を含まないリンカーで連結したもの (M1PM3) の三つである (図3)。これらを用いて、PCNA の逐次的連結が可能であるか評価したところ、M1wM3 を用いた場合の各連結ユニットのバンド強度が他と比較して高いため、最も効率的に PCNA リングが連結できることが示唆された。M1MBP:(M2:M1wM3)_n を担体上に形成させ、M2 及び M1wM3 の添加回数 “n” を変えたサンプルを SDS-PAGE 解析し、M1MBP と M1wM3 のバンド強度比 (M1wM3/M1MBP) を比較した。少量の非特異吸着はあるものの、n 依存的にバンド強度比が線形増加していることが分かった。つまり、本系において担体上で逐次的に PCNA リングを連結できることが示された。

4. 3. 逐次的 PCNA 連結による多酵素複合体の構築

実際に MsePCNA2-PdR 融合タンパク質 (M2R) 及び MsePCNA2-PdX 融合タンパク質 (M2X) を用いて、M1MBP:(M2:M3PM1)_n:M2R:M3PM1:(M2:M3PM1)_{4-n}:M2X:M3 を調製した。PdR-PdX 間の PCNA リングの個数と電子伝達活性の関係を調べ、活性の PdR-PdX 間の距離依存性を評価し、添加順に酵素を配置できるか検証した。異なる担体間での電子伝達活性のコントロールとして、M1MBP:(M2:M3PM1)₅:M2R:M3 固定化ビーズと M1MBP:(M2:M3PM1)₅:M2X:M3 固定化ビーズの混合溶液 (M2R+M2X) を用いた。また、電子伝達活性評価はシトクロム c の還元アッセイによって行った。M2R+M2X や磁気ビーズのみでは活性は見られなかったのに対し、M1MBP:(M2:M3PM1)_n:M2R:M3PM1:(M2:M3PM1)_{4-n}:M2X:M3 では n の増加に伴い吸光度比 (Abs₅₅₀/Abs₅₀₄) が増加した。これは、複合体内における PdR と PdX の配置は添加順によって制御されており、n の増加に伴い PdR が PdX に近づいたことで活性が上昇したことを反映している。以上の結果より、担体上で逐次的に PCNA リングを連結することによって配置制御可能な多酵素複合体を構築することができることが示された。

5. 結言

M. sedula 由来の PCNA は段階的に最も安定なヘテロ三量体を形成することが明らかとなった。MBP を介して担体上に固定化された MsePCNA1_{G107C} に対して、MsePCNA2_{V169C} 又は酵素融合 MsePCNA2_{V169C} およびトリプトファンジッパーを用いて連結された MsePCNA1_{G107C}-MsePCNA3_{R112C/M180C} 融合タンパク質を順次添加・洗浄するという手法により、逐次的な多酵素複合体構築に成功した。本手法では、MsePCNA2_{V169C}-酵素融合タンパク質という共通のパーツで酵素固定を行うため、コンビナトリアルに複合体を調製することができる。そのため、様々な多酵素反応系に適した複合体を迅速に得られると期待される。

6. 引用文献

- [1] Ellis, R. J. *Trends Biochem. Sci.* 2001, 26, 597-604
- [2] R. Chen, *et al.*, *Current Opinion in Biotechnology* 2014, 28, 59-68

- [3] I. Dionne, *et al.*, *Molecular Cell* 2003, Vol. 11, 275–282
- [4] K. Imamura, *et al.*, *Molecular Microbiology*, 2007, 64, 308-318
- [5] S. Lu, *et al.*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008, 376, 369-374
- [6] A. Kawai, *et al.*, *Journal of Structural Biology* 2011, 174, 443-450
- [7] H. Hirakawa, *et al.*, *ChemBioChem*, 2010, 11, 1517–1520
- [8] H. Hirakawa, *et al.*, *Biotechnology and Bioengineering*, 2013, 110, 1858-1864

7. 発表状況

1. Iwata, F., Hirakawa, H., Nagamune, T. *Scientific Reports*, 2016, 6, 26588.