

## 論文の内容の要旨

論文題目 自在に配置制御可能な多酵素複合体の構築

氏 名 岩田 史也

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。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、協奏的効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。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ない、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。この PCNA リングを足場として逐次的に連結していくことにより、足場にペ

プチドリ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。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、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) 6 種類のクレン古細菌由来 PCNA のヘテロ三量化能をサイズ排除クロマトグラフィによりそれぞれ評価した。そして *Metallosphaera sedula* 由来の PCNA (MsePCNA) が SsoPCNA よりも安定なヘテロ三量体を形成する事を見出した。次に、2) MsePCNA 及び SsoPCNA を用いて、*Psuedomonas 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ン還元酵素(PdR)、プチダレドキシン(PdX)を各 PCNA サブユニットに融合した多酵素複合体を構築した。これらの多酵素複合体の比活性と複合体濃度の関係を調べることで、PCNA の安定性が多酵素複合体に与える影響を評価し、多酵素複合体構築には MsePCNA の方が適していることを明らかにした。最後に、3) MsePCNA1-MsePCNA3 融合タンパク質を連結ドメインとして用いて逐次的に PCNA リングを伸長することで、段階的な PCNA 超分子形成方法の開発を試みた。この手法では、PdR および PdX をモデル酵素として用いて、複数の酵素の配置・数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、MsePCNA2-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。