

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 岩田 史也

酵素は温和な条件下で高い活性や反応選択性を発揮するため、低エネルギー・低環境負荷な触媒として着目・実用化がなされてきた。今までの酵素利用は、単一酵素による単一反応に着目した場合が主であり、複雑な構造を持つ有用物質生産での酵素応用例は少ない。一方、生体内での酵素反応は複数の酵素からなる多酵素反応によって構築されており、それら酵素の分子レベルでの配置制御を行うことで目的の多酵素反応系の制御や効率向上を達成している。こういった事実に基づくと、酵素の真価を発揮するためには複数の酵素を利用する必要があると考えられる。遺伝子組み換え生物を用いるが故の複雑さと隣り合わせである合成生物学的手法と比較して、生体外での人工的な多酵素反応系では制約が少ないため、容易に反応条件の最適化及び制御による目的化合物の合成量の向上ができる。また、異種生物由来酵素や指向的進化された酵素を自由に組み合わせて天然には存在しない化合物の合成も期待できる。しかし、生体外での多酵素反応のポテンシャルを引き出すための、“配置制御して複数の酵素を複合化する汎用的なシステム”は未だ確立していない。

本論文は、ヘテロ三量体 PCNA を用いたタンパク質の逐次的超分子化手法の確立し、自在に配置制御可能な多酵素複合体を構築することを目的とした研究であり、全五章から構成されている。

第一章では、本論文の背景として、まず、天然の多酵素反応系における効率向上のための戦略および人工多酵素複合体の構築に関する既往の研究とそれらの問題点を述べた。その後、より汎用的な多酵素複合体構築法として逐次的なタンパク質超分子化を利用する方法論を提案している。最後に、本論文の意義と目的を述べ、本論文の構成を示している。

第二章では、より安定なヘテロ三量体 PCNA を発見することを目的としている。既知のヘテロ三量体 PCNA は *S. solfataricus* 由来 PCNA だけであるが、解離が速いために逐次的超分子化を行う過程で、複合体が崩壊してしまう恐れがあった。そこで、6 種のクレン古細菌由来 PCNA のヘテロ三量体化能およびその安定性を評価し、*M. sedula* 由来の PCNA は SsoPCNA よりも安定なヘテロ三量体を段階的に形成することを見出している。さらに、SsoPCNA ヘテロ三量体の結合界面に存在するアミノ酸配列は MsePCNA でもよく保存されており、SsoPCNA サブユニットと MsePCNA サブユニットは互いに相互作用すること

を報告している。従って、安定性の違いはアミノ酸配列だけでは説明が付き、疎水的表面や構造変化もかかわっていると考察しており、理由を明らかにするためには結晶構造解析が必要であると結論付けている。

第三章では、安定な多酵素複合体構築を目的としている。第二章で見出した PCNA ヘテロ三量体を用いてプチダレドキシシン還元酵素(PdR):プチダレドキシシン(PdX):P450cam 複合体 (PUPPET) を構築し、それらの活性を評価している。そして、最も安定性の高い MsePCNA ヘテロ三量体を用いた PUPPET は 40 nM という低濃度でも複合体を維持でき、共有結合的に安定化した PUPPET と同等の比活性を示すことを明らかにしている。MsePCNA を用いた場合には、インキュベーションが必要なく、各コンポーネントを混合するだけで複合体を構築できる。従って、MsePCNA ヘテロ三量体の高い安定性は均一な多酵素複合体構築に非常に有用であると考えられる。

第四章では、逐次的な PCNA リング連結による多酵素複合体の構築を目指している。そのためにまず、サブユニット間ジスルフィド結合の導入による MsePCNA ヘテロ三量体の更なる安定化を行っている。次に、高効率な PCNA リングの逐次的連結のために、二つの PCNA リングを繋ぐ連結ドメインである MsePCNA3 と MsePCNA1 の融合タンパク質の合理的設計を行っている。具体的には、二つの PCNA リングをチューブ形成するように配置した際の MsePCNA3 の N 末端と MsePCNA1 の C 末端の方向性に基づき 180 度曲がったペプチドリンカーを導入した融合タンパク質を設計し、効率的な PCNA リングの逐次的連結の手法を確立している。さらに、PdR と PdX を異なる PCNA リング上に配置した複合体の電子伝達活性を評価し、本手法では添加順で酵素の配置制御が可能であることを明らかにしている。最後に、複合化する酵素の配置及び数を変えて PdR:PdX:P450cam 複合体の活性向上を試み、逐次的 PCNA リング連結による多酵素複合体構築の有用性を示している。

第五章では、本論文の総括と今後の展望を述べている。

以上、本論文は、自在に配置制御可能な多酵素複合体構築のプラットフォームを創出した研究である。酵素複合化を目的としたタンパク質の逐次的超分子化の開発例はなく、先験的な研究である。本手法では、複雑な設計を必要とせず、添加順で酵素の配置を制御することができる。そのため、天然の酵素や指向的進化を経た非天然の酵素を自在に組み合わせた多酵素反応の設計・最適化が可能である。従って、多酵素反応系による低エネルギー・低環境負荷型の有用化合物生産の実現へ大きく貢献できる。

よって本論文は博士（工学）の学位請求論文として合格と認められる。