

論文の内容の要旨

論文題目 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

氏 名 芳賀 智亮

自然界には、酸化還元タンパク質から電子を受け取って初めて触媒活性を示す酵素が存在することが知られている。それらの酵素の中には、有用物質の合成が可能なシトクロムP450など、実用化が期待されているものが多くある。しかし、一般的に、最大の触媒活性を発揮するために高濃度の酸化還元タンパク質を必要とすることが、実用化の難点である。この問題の解決のために、酸化還元タンパク質が酵素の近傍に集積した多酵素複合体を人工的に構築し、酸化還元タンパク質の局所濃度を向上させ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））を足場とした、酵素と酸化還元タンパク質の集積が報告されている。この報告では、*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）をそれぞれ各PCNAサブユニット（PCNA1、PCNA2及びPCNA3）に遺伝子工学的に融合することにより、PdR、PdX及びP450camがPCNA上に集積し、PdRからPdXを経由してP450camへ効率的に電子が伝達されることが示されている。しかし、この多酵素複合体の触媒活性は、遊離のP450camの最大触媒活性には達していなかった。触媒活性を向上させるためには、より効率的にドメイン間で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が、その一般的な設計指針は十分には明らかにされていなかった。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して、PCNAを足場としたPdR/PdX/P450cam複合体を再設計し、電子伝達活性を向上できるかを確かめた。

まず、酸化還元ドメインの空間配置の制御による電子伝達活性の向上を試みた。タンパク質ドメイン間の電子伝達は、ドメインどうしが相互作用して起こるため、それらがより相互作用しやすい空間配置に置かれることで、電子伝達活性が向上すると期待される。空間配置の制御のために、酸化還元ドメインと足場を連結するペプチドリンカーを改変することにした。既往の報告では酸化還元ドメインと足場の間には柔軟なリンカーが用いられていたが、末端間の距離がペプチド鎖長に大きく依存するような剛直なリンカーを用いる

ことで、空間配置をより厳密に制御できると予想した。そこで、PdR/PdX/P450cam複合体のPCNA2とPdXの間のリンカーを、様々な長さの剛直なポリプロリン及び柔軟なGly₄-Ser繰り返しペプチドに置換し、リンカーの剛直性の違いが触媒活性に与える影響を評価した。その結果、いずれの剛直性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するが、鎖長を最適化した剛直なポリプロリンをリンカーにもつ複合体の方が、鎖長を最適化した柔軟なGly₄-Ser繰り返しペプチドをリンカーにもつ複合体よりも高い触媒活性を示すことが分かった。この結果の解釈のために、PCNAヘテロ3量体の共結晶構造及びPdXとP450camの共結晶構造をもとに、多酵素複合体におけるPdXとP450camの結合モデルを構築した。このモデルより、適切な鎖長の剛直なポリプロリンを用いた場合には、PdXを足場から最適な距離だけ離すことができたために、PdXがP450camの相互作用部位に近づきやすくなり、PdXからP450camへの電子伝達活性が向上したと考察した。一方で、Gly₄-Ser繰り返しペプチドを用いた場合には、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ため、ポリプロリンで実現された空間配置にPdXを置くことができなかつたと考察した。以上より、適切な鎖長の剛直なリンカーを用いるなど酸化還元ドメインの空間配置をより厳密に制御することが、多酵素複合体の電子伝達活性の向上に重要であることが示唆された。

次に、複数の酸化還元ドメインの導入による電子伝達活性の向上を試みた。既往の報告の多酵素複合体の多くは、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が、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、ドメイン間の電子伝達活性が向上すると予想した。そこで、PdR及びPdXの分子数を変えたPdR/PdX/P450cam複合体を構築し、酸化還元ドメインの数が触媒活性に与える影響を評価した。その結果、期待通りPdR及びPdXの分子数が多いほど触媒活性が高くなり、最も多くのPdR及びPdXを導入した複合体は、遊離のP450camの最大触媒活性の約90%という非常に高い活性を示した。複合体の吸収スペクトル解析及び酵素アッセイの数値モデル解析より、還元型PdXとP450cam及び酸化型PdXとPdRの電子伝達複合体の形成は、還元型PdXがP450camに電子を渡して生じる酸化型PdXがP450camと結合することにより阻害されてしまうものの、PdR及びPdXの分子数を増やすことで各電子伝達複合体の形成速度を増大できて、その結果PdRからPdX及びPdXからP450camへの電子伝達速度が向上したと考察した。以上より、すべての種類の酸化還元ドメインの数を増やすこともまた、多酵素複合体の電子伝達活性の向上に重要であることが示唆された。

以上本研究において、酸化還元ドメインの空間配置および数の制御により、より効率的なドメイン間電子伝達を行う多酵素複合体を構築できることが示された。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有用な酵素群にも適用できると期待される。