

論文の内容の要旨

論文題目 自己集合する足場タンパク質を用いた
汎用的なP450活性化システムの構築

氏 名 鈴木 里沙

1. 緒言

シトクロム P450(P450)は、モノオキシゲナーゼ活性を示すために、NAD(P)H から、フェレドキシンとその還元酵素を介した電子供与が必要不可欠である。しかし、ほとんどの P450 はその特異的なパートナーとなるフェレドキシンとフェレドキシン還元酵素が解明されていないため、未だ機能が解明されていない P450 が数多く存在する。P450 の機能解明のために、有機過酸化物を用いた P450 の活性化が行われてきたが、有機過酸化物は P450 自体の失活を招くことから、還元酵素を用いた P450 への電子供与が望ましい。そのため、パートナーではない電子伝達タンパク質およびその還元酵素を大過剰に作用させる P450 の活性化方法が主流であった。しかし、この方法ではフェレドキシンと P450 との親和性が低いことから、P450 を活性化することが困難な場合もあった。そこで、パートナーではない電子伝達タンパク質およびその還元酵素からの高効率な電子伝達による P450 の活性化法が求められていた。

本論文では、*Sulfolobus solfataricus* 由来 核内増殖抗原 (PCNA) の足場を用いた複合体形成によって、パートナーではない電子伝達タンパク質を用いた汎用的な P450 の活性化システムの構築を行った (図 1)。



図 1. 研究の概略図

2. 天然の P450 融合タンパク質の再構築

2.1 緒言

Bacillus megaterium 由来 P450BM3 は、補因子として FAD および FMN を含む還元ドメイン (RD ドメイン) がヘムドメインの C 末端に融合した 119 kDa のポリペプチドであり、高い触媒活性を発揮することが知られている。変異体解析により、P450BM3 は二量体で活性を示し、RD ドメインは分子内の電子伝達が行われるが、FMN ドメインからヘムドメインへの電子伝達は、二量体中での分子間で行われることが報告されている。そのため、FAD ドメインと FMN ドメインを個別に発現させた後、混合しても RD ドメインの活性は再構成されず、RD ドメインとヘムド

インを個別に発現させた後、混合してもモノオキシゲナーゼの活性は発揮しない。すなわち、P450BM3 は各ドメインが近接した状態にあることにより大きな活性を示すが、各ドメインを解離すると不活化する。本項では、PCNA の近接効果の有用性を、P450BM3 の再構築によって確認する。

2.2 結果と考察

PCNA を利用した複合体形成により、還元ドメインの電子伝達活性および、P450BM3 のモノオキシゲナーゼ活性の再構成に成功した。また、P450BM3 は、ホモ二量体において各ドメインの空間配置が適切に制御され、活性を発揮すると考えられているが、PCNA を用いて人為的に各ドメインを近接する方法でも、電子伝達が可能となることが示された。

3. PCNA 融合 PdR、PdX による CYP119 の活性化

3.1 緒言

ほとんどのシトクロム P450 において、パートナーとなる電子伝達タンパク質とその還元酵素は解明されていない。その結果、P450 の機能が未解明なものが多く存在する。従来では、ほうれん草や *Pseudomonas putida* 由来のフェレドキシンおよびフェレドキシン還元酵素を用いて、電子伝達タンパク質パートナーが特定されていない P450 の活性化を行うことが多い。しかし、P450 とフェレドキシンとの親和性は必ずしも高くはないため、活性化が不可能であったり、活性化できても大過剰のフェレドキシンが必要であった。パートナーではないフェレドキシンと P450 の親和性の低さが問題であれば、前項で P450BM3 の再構成が PCNA により可能であったように、PCNA を用いて解決可能であると考えられる。

超好熱性古細菌 *Sulfolobus acidocaldarius* 由来の P450 (CYP119) は、熱安定性の高い P450 であるだけでなく、古細菌由来の P450 が初めて発見されたことから注目された。CYP119 は、パートナーのフェレドキシン還元酵素およびフェレドキシンが未だ解明されておらず、本来の基質も特定されていない。そこで、電子伝達タンパク質パートナーが特定されていない P450 のモデルとして CYP119 を用い、パートナーではない電子伝達タンパク質とその還元酵素との PCNA を介した複合体における P450 の活性化を目指した。

3.2 結果と考察

等モル量の PCNA1-PdR、PCNA2-PdX、PCNA3-CYP119_{T214V} から構成されたヘテロ三量体 RXC_{T214V} を用いてラウリン酸の水酸化活性を評価したところ、PCNA 融合のヘテロ三量体 RXC_{T214V} では、 $1.4 \pm 0.1 \mu\text{M}$ の水酸化ラウリン酸を生成した。一方、PCNA 融合せずに PdR、PdX、CYP119_{T214V} を混合した場合は不活性であった (図 2)。以上より、PCNA による各タンパク質間の近接効果により複合体形成が容易となり、その結果として電子伝達効率が向上し、活性化可能となったことが明らかとなった。さらに、RXC_{T214V} と RXC_{D77R/T214V} の活性を比較すると、RXC_{D77R/T214V} の方が約 3.3 倍の水酸化ラウリン酸を生成したことから (図 3)、近接効果を導入した複体内でも、フェレドキシンと P450 の相互作用が重要であり、フェレドキシンと P450 の安定な複合体形成が P450 活性化の鍵となることが明らかとなった。また、ラウリン酸の水酸

化反応が、反応開始から 40 分以内に停止していたのは、PdR が失活していたためであった（図 3）。PdR は、中温性細菌 *P. putida* 由来のタンパク質であり、37°C での反応温度に耐えられずに失活したと考えられる。

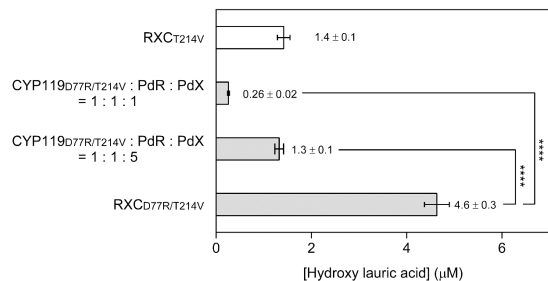


図 2. ラウリン酸の水酸化反応

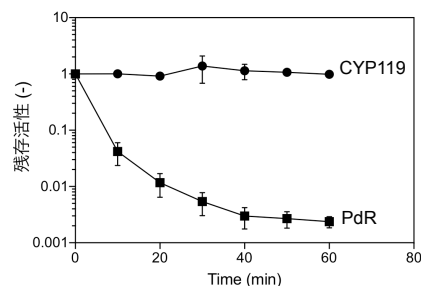


図 3. RXCD77R/T214V の残存活性

4. 熱安定性の高い電子伝達タンパク質による CYP119 の活性化

4.1 緒言

前項では、*P. putida* 由来のフェレドキシンとその還元酵素を用いて CYP119 を活性化することに成功した。しかし、フェレドキシン還元酵素の失活により、CYP119 による水酸化反応が停止していることが明らかとなった。したがって、熱安定性の高いフェレドキシンおよびその還元酵素を利用することで、効果的に CYP119 による水酸化反応を利用することができると期待される。

現在、既知の好熱性生物由来 P450 は、*S. acidocaldarius* 由来 CYP119、*Thermobifida fusca* 由来 CYP154、*Thermus thermophilus* 由来 CYP175A1 の 3 種類である。その中で、電子伝達タンパク質が特定されているのは *T. thermophilus* 由来 CYP175A1 のみで、[4Fe-4S]クラスターと、[3Fe-4S]クラスターの 2 つの鉄硫黄クラスターを含むフェレドキシン (tFdX) と、FAD を含む NADPH 依存型フェレドキシン還元酵素 (tFNR) を介した電子伝達により、CYP175A1 が β カロテンの 3 位と 3'位を水酸化することが知られている。tFNR と tFdX は高温でも活性を示すため、PdR、PdX の代わりに *T. thermophilus* の tFNR、tFdX を用いることで CYP119 を高温条件下で安定的に利用することが可能となり、より強化された汎用的な P450 の活性化システムの確立が期待できる。

4.2 結果と考察

PCNA2 と tFdX を結ぶポリプロリンリンカーの長さによって CYP119 のモノオキシゲナーゼ活性に大きな影響を及ぼすことが明らかとなった。熱安定性の高い電子伝達タンパク質およびその還元酵素を用いることで、CYP119 による反応を持続させることに成功したものの、NADPH の枯渇により反応は停止した。これは、tFNR から tFdX への電子伝達速度に比べ、tFdX から P450 への電子伝達速度が著しく遅いため、NADPH が効果的に利用されていなかったためだと考えられた。そこで、*Pseudomonas stutzeri* 由来亜リン酸エステル脱水素酵素 (PTDH) の熱安定変異体 Opt13 による NADPH の再生システムを用いることで、NADPH の不必要な消費が抑制され、反応時間を持続させることに成功した。以上より、PCNA による近接効果だけでは、フェレドキシンと P450 との親和性の低さは補えず、それに伴ったフェレドキシン還元酵素による NAD(P)H の必要以上の消費が起こることが明らかとなり、これを防ぐために、補酵素再生系は有用である

ことを明らかにした。

5. 電子伝達タンパク質ライブラリーを用いた P450 の活性化

5.1 緒言

第3項で明らかにしたように、PCNAを用いた複合化により、パートナーではない電子伝達タンパク質とその還元酵素からの電子の授受は可能であるものの、近接効果はフェレドキシンとP450との親和性の低さを補うには不十分であった。すなわち、フェレドキシンとP450の安定な複合体形成が重要である。フェレドキシンとP450の複合体形成は、静電相互作用によるものであり、相互作用表面の電荷分布が鍵となる。そこで、異なる性質をもつフェレドキシンの中から反応性の高いものを選出できるか否かを調べることにした。

P450に電子伝達可能なフェレドキシンとその還元酵素の報告は少なく、*P. putida*、*T. thermophilus*、*Rhodospseudomonas palustris*、*Novosphingobium aromaticivorans*、哺乳類ミトコンドリアなどから報告されているのみである。そこで、これまでに利用してきた*P. putida*由来のPdRとPdX、P450BM3のFADドメインとFMNドメイン、*T. thermophilus*由来のFdX-NAD(P)還元酵素(tFNR)とフェレドキシン(tFdX)に、*R. palustris*由来のFAD含有パルストリスレドキシン還元酵素(PuR)と[2Fe-2S]クラスター含有パルストリスレドキシン(PuXB)、*N. aromaticivorans*由来のFAD含有フェレドキシン還元酵素(ArR)と[2Fe-2S]クラスター含有フェレドキシン(ArX)を加えたライブラリーを利用してCYP119およびP450camの活性評価を行った。

5.2 結果と考察

CYP119では、反応温度によって活性を示す還元ドメインが異なり、P450camでも、活性を示したものと不活性だったものが存在した。これにより、PCNAによる近接効果に加え、電子伝達タンパク質ライブラリーからP450に効率良く電子伝達可能な電子伝達タンパク質を反応条件に合わせて選択することの重要性が明らかとなった。

基質によっては、高温条件下でのみ可溶であるものや、高温では不安定なため低温下での反応が必須となる化合物の反応を目的とする場合もあるため、活性化させるP450の反応温度条件だけでなく、反応の目的産物によっても反応温度条件の選択が必要となる。また、フェレドキシンの結晶構造が解かれていない場合や、結晶構造が解かれていても、その構造や表面電荷からP450を活性化することのできるフェレドキシンの選択は困難であるため、還元ドメインのバリエーションが必要であることも示唆された。

6. 結言

本論文では、PCNAの足場を用いた複合体形成により、パートナーではない電子伝達タンパク質からの電子伝達を可能とする、汎用的かつハイスループットなP450の活性化システムを構築した。このシステムは、未知P450の機能解明に役立つツールとしてのみならず、医薬品や物質生産のツールとして工業的にも応用可能であることが期待できる。