

## D304

## PCNA 融合 P450cam/電子伝達タンパク質共発現系の構築

(東大工/CNBI)O(正)平川 秀彦・(正)長棟 輝行\*

## 【緒言】

シトクロム P450 (P450) はヘム含有モノオキシゲナーゼであり、様々な立体選択的・位置選択的な酸化反応を触媒することができるため、不斉合成用触媒としての利用が期待されている。ヘム鉄に結合した酸素分子を活性種に変換するために分子間電子伝達により NAD(P)H から電子の供給を受ける必要があり、ほとんどの P450 は単独では触媒活性を示さない。ゲノムプロジェクトの進展により細菌由来の P450 遺伝子が数多く見出されているが、その多くは [2Fe-2S] クラスター含有フェドキシシ及び FAD 含有フェドキシシ還元酵素を介した電子伝達を必要とするクラス I P450 に属する。クラス I P450 では十分な電子伝達のために P450 に対して過剰量の電子伝達タンパク質を必要とする。それに対して電子伝達タンパク質との天然の融合タンパク質である *Bacillus megaterium* 由来 P450 はホモ2量体を形成し、サブユニット間での高効率な電子伝達により単独で高い触媒活性を有する "self-sufficient" P450 である。したがって、クラス I P450 でも電子伝達タンパク質を常に P450 近傍に配置することができれば、単独で触媒活性を有する "self-sufficient" P450 となりうる。

核内増殖抗原 (PCNA) は DNA ポリメラーゼやヘリカーゼなどの DNA の転写・複製に関わる酵素を二重鎖 DNA 上に安定に保持させる役割を担う DNA スライディングクラップの一種である。真核生物ではないにも関わらず古細菌は DNA スライディングクラップとして PCNA を有する。特にクレンアーキオータでは3つの PCNA (PCNA1、PCNA2、PCNA3) を有し、それらはヘテロ3量体を形成する。

我々はクレンアーキオータ由来の PCNA の末端に *Pseudomonas putida* 由来の P450 (P450cam) 及びその電子伝達タンパク質であるプチダレドキシシ (PdX) とプチダレドキシシ還元酵素 (PdR) を融合することによって、非共有結合的に P450cam、PdX、PdR をヘテロ3量化することに成功した (図1)。このヘテロ3量体は3量体内での電子伝達により単独で高い触媒活性を有することも明らかとなっている。自発的にヘテロ3量化するため、3つの融合タンパク質を共発現する大腸菌は菌体触媒として利用可能である。本研究では、融合タンパク質の共発現ベクターの構築及び発現条件について検討した。

## 【結果及び考察】

古細菌と大腸菌とではコドン出現頻度が異なるため、クローニングした PCNA 遺伝子と融合しても大腸菌では

過剰発現させることはできなかった。そこでコドンは大腸菌に最適化した合成遺伝子と P450cam、PdX、PdR 遺伝子を連結することにより PCNA 融合タンパク質 (PCNA1-PdR、PCNA2-PdX、PCNA3-P450cam) 遺伝子を得た。さらに検出用のタグとして His タグ、Strep タグ、S タグをそれぞれの N 末端に導入した。

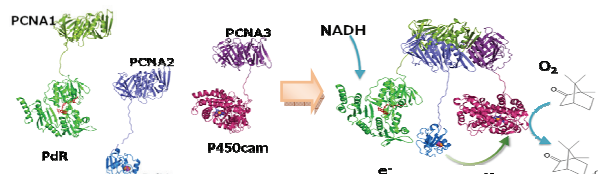


図1 PCNA を利用したヘテロ3量化

次に、異なるプロモーター (*tet*、T5、*araBAD*) を有するプラスミド (pASK-IBA3 plus、pQE80L-Kan、pBAD202/D/lacZ) のマルチクローニングサイトにそれぞれの融合タンパク質遺伝子を挿入した発現ベクター (pASK-P1R、pQE-P2X、pBAD-P3C) を構築した。これらの発現ベクターで形質転換した大腸菌はそれぞれ無水テトラサイクリン、IPTG、アラビノースによって PCNA1-PdR、PCNA2-PdX、PCNA3-P450cam を発現した。

さらに、pQE-P2X のプロモーターからターミネーターまでの領域を pASK-P1R のターミネーターの後ろに挿入することにより、PCNA1-PdR と PCNA2-PdX の共発現ベクター (pASK-P1R-P2X) を構築した。この発現ベクターで形質転換した大腸菌 BL21 Star (DE3) は無水テトラサイクリン (無水 Tet) により PCNA1-PdR、IPTG により PCNA2-PdX を発現し (図2)、本ベクターはそれぞれを個別に発現可能なベクターであることが示された。

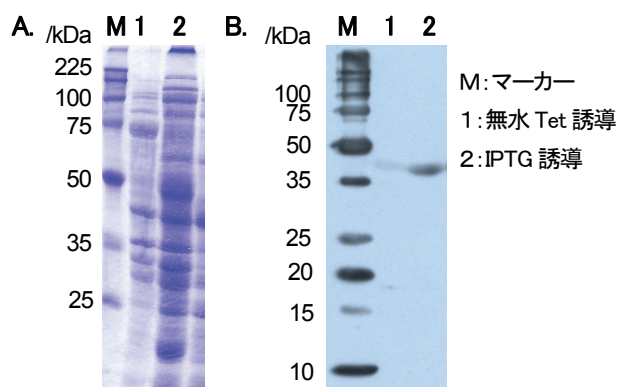


図2 可溶性画分の SDS-PAGE 解析: (A) CBBR 染色、及び (B) ストレプトタクチン-HRP による検出

\* E-mail: nagamune@bioeng.t.u-tokyo.ac.jp