

## D306

## ジスルフィド結合の導入による安定な PCNA ヘテロ 3 量体を用いた P450-電子伝達タンパク質複合体の構築

(東大工) ○ (学) 垣谷 彩乃, (正) 平川 秀彦, (正) 長棟 輝行\*

## 【緒言】

酸化酵素の一種であるシトクロム P450 は様々な物質を基質として立体選択的・位置選択的な反応を触媒するため、キラルな化合物の合成用触媒として魅力的である。*Pseudomonas putida* 由来の水溶性シトクロム P450(P450cam)は、単独で活性を示すことができず、電子伝達タンパク質であるプチダレドキシシン(PdX)及びプチダレドキシシン還元酵素(PdR)とともに 3 コンポーネントシステムを形成し、*d*-カンファーの水酸化を触媒する。この 3 種類のコンポーネントタンパク質を足場タンパク質に固定化し局所的に濃度を上げることにより、電子伝達タンパク質から P450cam へ電子の受け渡しを効率よく行うことが期待できる。

我々は、足場タンパク質として核内増殖抗原(PCNA)を利用し、P450cam-PdX-PdR 複合体の構築に成功している。PCNA は、リング状構造の DNA スライディングクランプであり、DNA 複製や修復に関わるタンパク質と相互作用する。真核生物由来の PCNA はホモ 3 量体を形成するのに対して、古細菌 *Sulfolobus solfataricus* 由来の PCNA は 3 つのサブユニット(PCNA1, PCNA2, PCNA3)から成るヘテロ 3 量体を形成する(図 1a)。各サブユニットの C 末端は、PCNA のリングの同一面上に位置するため、PCNA の C 末端に融合した電子伝達タンパク質と P450cam は相互作用しやすくなると考えられる。しかし、PCNA1-PCNA2-PCNA3 ヘテロ 3 量体は非共有結合で形成しており、低濃度では解離してしまうという問題点がある。そこで、本研究では PCNA の解離を防ぐためにサブユニット間にジスルフィド結合を導入し、安定なヘテロ 3 量体の形成を目指した。

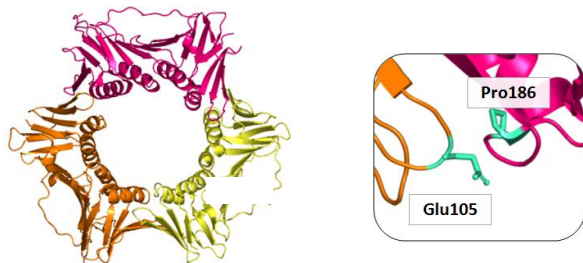


図 1 PCNA の結晶構造(a) 及び PCNA1-PCNA2 間のジスルフィド結合導入部位(b)

## 【結果及び考察】

各サブユニット間のインターフェースにおいて、空間的に近い位置にあり、複合体形成には関係していないと予想されるアミノ酸残基(図 1b)をシステインに置換した変異体を作製した。

まず、PCNA1 変異体(P186C)と PCNA2 変異体(E105C)がヘテロ 2 量体を形成することを確認した。また、PCNA1 変異体(P186C)、PCNA2 変異体(E105C)と野生型 PCNA3 はヘテロ 3 量体を形成することを確認し、導入したシステインは PCNA1-PCNA2 のヘテロ 2 量化、PCNA1-PCNA2-PCNA3 のヘテロ 3 量化に影響を与えないことが分かった。次に、グルタチオンを添加し、酸化的な環境にすることで PCNA1-PCNA2 ヘテロ 2 量体への分子間ジスルフィド結合の形成に成功したことを非還元 SDS-PAGE 解析により確認した。このジスルフィド結合の形成は 20°C、グルタチオン濃度 5mM の条件下で最も促進されることが分かった。

PCNA1 変異体(P186C)に PdR、PCNA2 変異体(E105C)に PdX を融合したタンパク質を発現・精製した。上述したようにヘテロ 2 量化させた後にジスルフィド結合を形成させた。PdR はシトクロム c(Cyt c)を還元できないのに対し、還元型 PdX は Cyt c を還元できることから、Cyt c の還元速度より PdR-PdX 間の電子伝達活性を評価した(図 2)。ジスルフィド結合を導入することによりジスルフィド結合を導入していない系と比べ、低濃度における電子伝達活性の低下を防ぐことに成功した(図 3)。従って、サブユニット間へのジスルフィド結合の導入は PCNA の解離を防ぎ、複合体を安定化させることが明らかとなった。

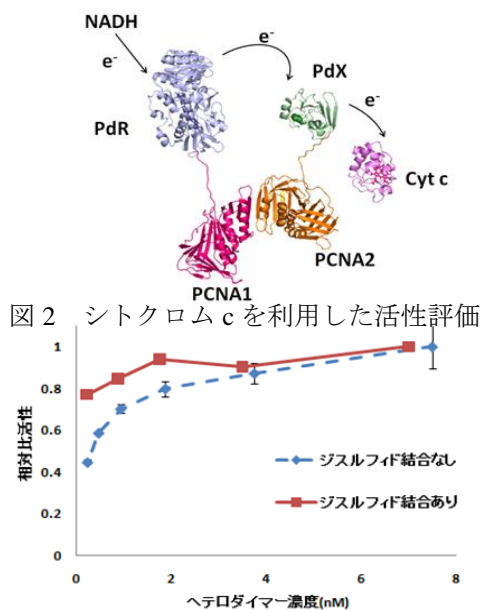


図 3 ヘテロ 2 量体濃度と比活性の関係

\*E-mail: [nagamune@bioeng.t.u-tokyo.ac.jp](mailto:nagamune@bioeng.t.u-tokyo.ac.jp)

Tel: 03-5841-7356, FAX: 03-5841-8657