

N209

アロステリック効果を有する分子認識ポリマー・酵素複合体の開発

(東工大資源研) ○(学)大柴 雄平・(正)田巻 孝敬・(正)大橋 秀伯・(東大院医疾患セ) (正)伊藤 大知
(東大院工) (正)平川 秀彦・(正)山口 哲志・(正)長棟 輝行・(東工大資源研) (正)山口 猛央*

1. 緒言

生体内での多くの反応は、リガンドが活性中心と異なる部位との結合により活性が変化するアロステリック調節により制御されており、これを人工的に模倣できればより生体に近い精緻な系を実現することができる。

先行研究では、遺伝子組み換えタンパク質にレセプタータンパク質を導入し、リガンドの結合により活性が変化する研究^[1]が行われている。しかし、他のタンパク質への応用が困難で汎用性に乏しい。

本研究では、遺伝子組み換え酵素の活性部位付近に分子認識で膨潤・収縮するポリマーをコンジュゲートするというシステム的アプローチにより、特定イオンシグナルで酵素活性を制御できる人工アロステリック酵素の開発を行う (Fig. 1)。特定イオン存在下ではポリマーは膨潤し、反応が通常通り行われる (Fig. 1左側) が、特定イオン非存在下ではポリマーは収縮し活性ポケットを覆い、基質の進入を阻害する (Fig. 1右側)。

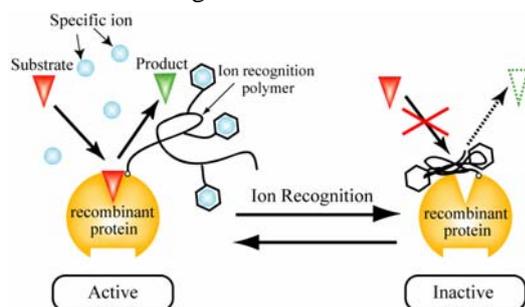


Fig. 1 Concept of this study

酵素はシントクロームP450camの遺伝子組み換え体を、ポリマーは感温性モノマー*N*-isopropyl acrylamide (NIPAM)と特定イオンを認識するBenzo-18-crown-6-acrylamide (BCAm)の共重合ポリマーを用いた。遺伝子組み換えによりP450camの活性ポケット付近に導入したシステインのチオール基と、ポリマー末端に導入したビニルスルホン基を両者の結合に利用した。自然界には様々な由来のP450が存在し、その一群の1つであるP450cam (*Pseudomonas putida*由来)で得られた知見を他のP450に適用できる。また、ポリマーはレセプター部位の変更で多くの分子シグナルに対応できる。本研究の手法により、目的の酵素機能に応じて要素材料の設計・開発ができる。

今回は、まず要素技術としての分子認識ポリマーの合成及びタンパク質の発現を行った。その後、変異体と野生型P450camの活性評価を行い、活性変化を見た。

2. 実験方法

2.1 分子認識ポリマーの合成

連鎖移動重合によりNIPAMとBCAmの共重合ポリマーを合成し、その後末端にビニルスルホン基を導入した。ポリマー分子量がコンジュゲート体の活性のオン・オフに与える影響を調べるために、分子量を制御する必要がある。そこで、合成後GPCにより分画を行った。

2.2 タンパク質の発現・精製

ポリメラーゼ連鎖反応により、P450cam表面に存在する3つのシステインをセリンに置換し、活性ポケット付近のアスパラギン酸をシステインに置換した。この変異体及び野生型P450camを大腸菌BL21star(DE3)pLysS内でそれぞれ発現し、各種クロマトグラフィーで精製を行った。P450camの触媒機能発現に必要な電子伝達タンパク質であるPutidaredoxin reductase (Pdr)、Putidaredoxin (Pdx)の発現・精製も行った。

2.3 活性評価

変異体及び野生型P450camの活性を、Pdx、Pdr、NADH、Camphorの存在下で測定した。活性は340nmの吸光度からNADHの消費量を測定することで評価した。活性は、コンジュゲート体のイオンシグナル応答を見る際に想定している37°Cで評価した。

3. 結果

末端修飾型ポリマーを合成し、末端にビニルスルホン基が導入されていることを¹H-NMRで確認した。また、合成ポリマーの分画により、Table 1に示すような M_w/M_n が1.3前後の狭い分子量分布を持つポリマーが得られた。

Table 1 Molecular weight and polydispersity index of the polymer

Fraction	M_n [kDa]	M_w/M_n
Before Cut off	10.6	2.78
3	155	1.14
4	87.7	1.22
5	46.4	1.30
6	24.6	1.33

変異体及び野生型P450cam、Pdx、Pdrをそれぞれ発現・精製し、SDS-PAGEにより目的のタンパク質が発現していることをそれぞれ確認した。37°Cにおいて変異型P450camは野生型P450camの7割程度の活性を保持しており、何れも25°Cでの活性と同程度であることが分かった。これは、次のポリマーとのコンジュゲート体やそのイオンシグナル応答を議論する上で十分な活性である。

4. 参考文献

[1] C. A. Brennan et al., *PNAS* **92** (13), 5783 (1995).

* TEL: 045-924-5254 E-mail: yamag@res.titech.ac.jp