

## XB118

## 複合酵素反応系のナノアーキテクチャー

(東大)○長棟輝行\*, 一幡賢太郎、平川秀彦

## 【はじめに】

酵素は立体・位置選択的の反応を触媒するため、有機合成では複数の反応ステップを必要とするような反応でも1段階で行うことが可能である。さらに、生体内では非リボソームペプチド合成酵素のように複数の酵素がモジュールとして複合体を形成し、多段階反応を効率良く触媒している。したがって、複数の酵素の人工的な複合化により、高効率な多段階反応系触媒の創製が可能となる。

遺伝子を連結する遺伝子融合によって、融合タンパク質として酵素を複合化することが可能である。しかし、多種類の酵素を遺伝子的に連結した場合、タンパク質ミスフォールディング等の問題により触媒活性を有した酵素複合体を得ることは難しい。そこで、酵素の末端に複合化を補助するペプチドタグまたはタンパク質を1つまたは2つ付加した状態で発現させた後、複合化するアプローチが有効となる。

## 【翻訳後修飾酵素を利用したタンパク質の複合化】

シトクロム P450 は電子伝達タンパク質を介した電子伝達を必要とするモノオキシゲナーゼである。特に微生物由来のシトクロム P450 はフェレドキシン(Fdx)及びフェレドキシン還元酵素(Fdr)を必要とし、Fdr-Fdx、Fdx-シトクロム P450 間で一時的な複合体形成をすることにより、電子が Fdr からシトクロム P450 へ伝達される。しかし、複合体形成は確率的であるため、比較的高濃度の電子伝達タンパク質が必要となる。そこで、各構成タンパク質を連結し、1分子化することができれば、分子内での複合体形成の促進が期待できる。我々は翻訳後修飾酵素であるトランスグルタミナーゼを利用して、本酵素の基質となるペプチドタグを付加した Fdx とペプチドタグをリンカーとした Pdr-シトクロム P450 融合タンパク質を部位特異的に架橋化し、分岐型構造を有する分岐型 P450 システムを構築した(図 A)。この分岐型 P450 システムでは、異なる微生物由来のシトクロム P450 と電子伝達タンパク質の組み合わせでも効率的な分子内電子伝達が可能であり、高い触媒活性を示した<sup>1)</sup>。分子内電子伝達の効率は各タンパク質を連結するペプチドタグの長さや自由度の影響を大きく受けた。すなわち、分子内での複合体形成の促進にはナノメートルスケールで各タンパク質を近接させるだけでなく、ペプチドタグの最適化により、各構成タンパク質の空間配置を制御することが重要であった。

## 【足場タンパク質会合を利用したタンパク質の複合化】

ほ乳類由来のシトクロム P450 の場合には、小胞体膜を足場とすることにより配向性、局在性が制御されるため、膜結合型電子伝達タンパク質との複合体形成効率が高い。したがって、人工的な足場の導入は、複合体形成を促進するアプローチの一つと考えられる。そこで、リング状のヘテロ

オリゴマーを形成する超好熱古細菌由来核内増殖抗原(PCNA)を足場タンパク質として利用した足場会合型 P450 システムの構築を行った(図 B)。PCNA を構成する3つのタンパク質 PCNA1, 2, 3 の C 末端にシトクロム P450、電子伝達タンパク質をそれぞれ遺伝子融合し、融合タンパク質を大腸菌で発現させ、精製した。これらを等モル混合するとヘテロ3量体を自己組織的に形成し、非常に高い触媒活性を示した。このように、複数の酵素を複合化する方法として、足場タンパク質が極めて有効であることが明らかとなった。

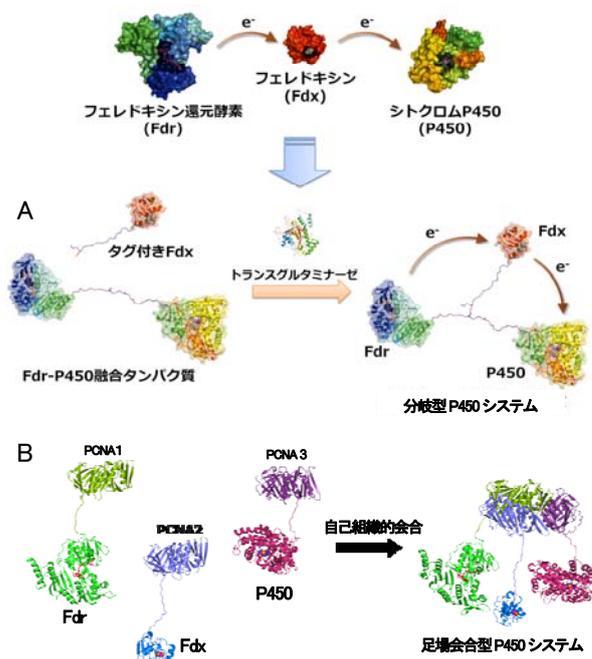


図 複合化シトクロム P450-電子伝達タンパク質

## 【展望】

電子伝達タンパク質とシトクロム P450 を単に混合しただけでは分子間の電子伝達効率が低いため、シトクロム P450 の基質のスクリーニングや機能性評価には困難が伴う。ここで示した共有結合的、非共有結合的な複合体形成の促進方法は、この問題に対する解決法の一つとなろう。非共有結合的な複合化法として、ここでは安定な複合体形成のため強い相互作用を持つ足場タンパク質を利用したが、逆ミセルのようなナノ空間では、解離定数が数 $\mu\text{M}$ 程度のペプチドやタンパク質間の相互作用も利用できるため、より複雑な酵素複合体を含有する機能性ナノ粒子構築が可能となり、工業的生体触媒としての幅広い応用が期待できる。

## 【参考文献】

(1) *Protein Eng. Des. Sel.* **20**, 453-459 (2007)

連絡先 E-mail: nagamune@bioeng.t.u-tokyo.ac.jp