

複数の電子伝達経路を有する人工シトクロム P450 複合体

東京大学 大学院工学系研究科 平川秀彦



【略歴】

2005年4月～2007年3月 カンザス大学 ヒグチバイオサイエンスセンター 博士研究員

2007年4月～2009年1月 東京大学 ナノバイオ・インテグレーション研究拠点 特任研究員

2009年1月～2010年3月 東京大学 ナノバイオ・インテグレーション研究拠点 特任助教

2010年4月～現在 東京大学 大学院工学系研究科 化学生命工学専攻 助教

はじめに

シトクロム P450 (P450) はステロイド・脂肪酸の生合成や薬物代謝に関与するヘム含有モノオキシゲナーゼであり、主に C-H 結合に酸素原子を挿入する反応を触媒する。様々な部位特異的・立体選択的なエポキシ化、水酸化、酸化的脱アルキル化などの酸化反応を触媒する P450 種が発見されており、ファインケミカルの合成用触媒として興味を持たれている。

P450 の触媒サイクルでは、外部からの二電子供与を必要とする。多くの細菌由来 P450 では、この二電子はフェレドキシン (FdX) を介してフェレドキシン還元酵素 (FdR) から P450 へ伝達される。FdX から P450 への電子伝達過程が律速段階となっているため、P450 が十分な触媒活性を発揮するには、高濃度 ($\sim 100 \mu\text{M}$) の FdX、及び FdX を十分に還元できる濃度 ($\sim \text{数} \mu\text{M}$) の FdR が必要となる。P450 は単独では触媒活性を発揮しないという性質により、取り扱いが難しい酵素とされてきた。そこで、我々はヘテロ三量体タンパク質である *Sulfolobus solfataricus* 由来核内増殖抗原 (PCNA) を利用した P450-FdX-FdR 複合体形成を提案している [1]。

S. solfataricus 由来 PCNA を利用した酵素複合体形成

PCNA はリング状構造をした対称性の高い構造を有しており、リングの穴を利用して DNA と結合することにより DNA ポリメラーゼやリガーゼなどが DNA と安定に結合するための足場を提供している。多くの PCNA がホモ三量体タンパク質であるのに対して、クレンアーキアである *S. solfataricus* 由来 PCNA はヘテロ三量体タンパク質であり (図 1)、各サブユニット (PCNA1、PCNA2、PCNA3) は単独では単量体タンパク質として存在できる。したが

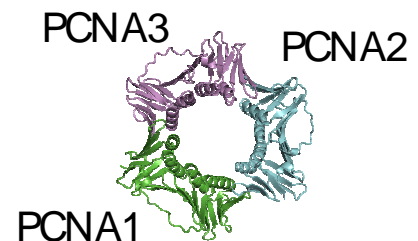


図 1 *S. solfataricus* 由来 PCNA の立体構造

って、各サブユニットに P450、FdX、FdR を遺伝子的に連結した融合タンパク質 PCNA1-FdR、PCNA2-FdX、PCNA3-P450cam は個別に発現・精製した後に、等モル濃度で混合することにより自発的にヘテロ三量体、すなわち、FdR-FdX-P450 複合体を形成することができる (図 2)。我々はモデル系として *Pseudomonas putida* が有する α -camphor モノオキシゲナーゼシステムを構成する P450cam、プチダレドキシン (PdX)、プチダレドキシン還元酵素 (PdR) の PdR-PdX-P450cam 複合体形成を報告している。この複合体では PdR から P450cam への電子伝達は複合体内の PdX を介して行われるため、複合体単独でモノオキシゲナーゼ活性を有する単一酵素として利用することができる。さらに、複合体内では PdR

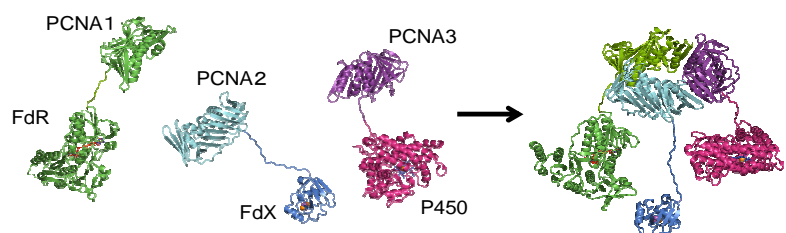


図 2 PCNA を利用した FdR-FdX-P450 複合体形成

及び P450cam に対する PdX の局所濃度が極めて高くなるため、PdR、PdX 及び P450cam を単純に混合した場合と比べて 50 倍程度高いモノオキシゲナーゼ活性を有する。

電子伝達経路の追加

P450 の触媒サイクルでは二電子が必要であるのに対して、一分子の FdX は一電子しか運ぶことができない。したがって、PdR、PdX、P450cam を一分子ずつ含む複合体では、一分子の *l*-camphor を水酸化するためには、PdX は PdR-P450cam 間を二往復する必要がある。また、複合体中において P450cam に対する PdX の実効濃度は一分子では飽和に達していない可能性もある。さらに、本複合体では NADH 非存在下で P450cam と PdX が会合した際に生じる UV-vis スペクトル変化が観察されたことから、反応サイクルに関与しない酸化型 PdX-P450cam 会合状態が安定に存在すると予想される。これらの要因により PdR、PdX、P450cam を一分子ずつ含む複合体では P450cam に十分な速度で電子を供給できていないと考えられる。そこで、我々は複数の PdX を含む複合体を構築することにより、PCNA を利用した PdR-PdX-P450cam 複合体の活性向上を目指した。

PdX の C 末端カルボキシル基は P450cam との相互作用に大きく関わっていることから、PCNA との融合には PdX の N 末端を利用する必要がある。そこで二つの PCNA サブユニットの C 末端に PdX を融合することにより PdX を二分子含む複合体を構築した。融合タンパク質 PCNA1-PdX、PdR-PCNA2-PdX、PCNA3-P450cam を混合して得られる PdR-PdX_{1,2}-P450cam 複合体 (図 3 a) は PCNA1-PdX、PdR-PCNA2、PCNA3-P450cam から得られる PdR-PdX₁-P450cam 複合体 (図 3 b) 又は PCNA1、PdR-PCNA2-PdX、PCNA3-P450cam から得られる PdR-PdX₂-P450cam 複合体 (図 3 c) に比べて 2 倍程度高い触媒活性を有することが明らかとなった (図 4)。我々は PdX を三分子含む複合体を構築し、さらなる活性向上を図っている。

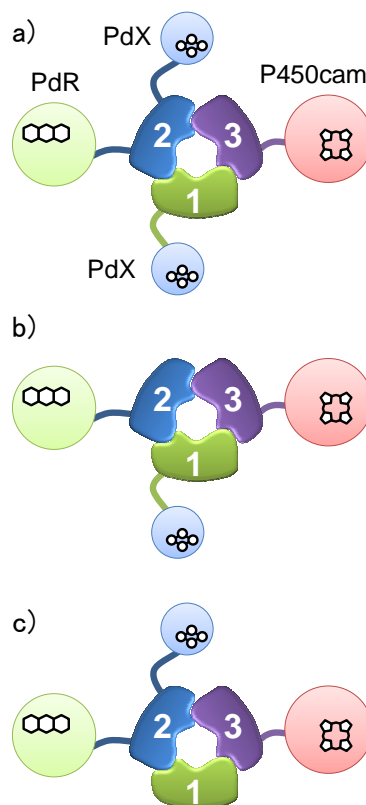


図 3 PdR-PdX-P450cam 複合体

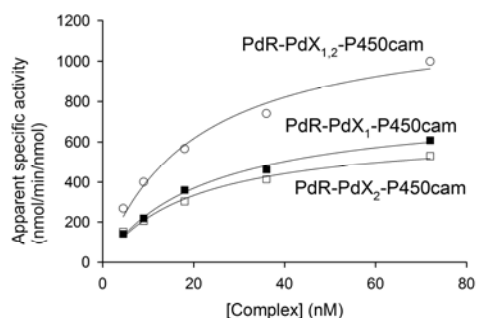


図 4 複合体濃度と比活性の関係

終わりに

我々は PCNA サブユニット間に選択的なジスルフィド結合を導入することにより複合体を安定化させること [2] や PCNA 同士を選択的に架橋化することにより PdR-PdX-P450cam 複合体をゲル化させ、P450 を固定化酵素として利用することに成功している。これらの研究をさらに発展させることにより、今後、P450 が物質生産用酵素として実用的な酵素となることを期待している。

参考文献

- [1] H. Hirakawa and T. Nagamune, "Molecular Assembly of P450 with Ferredoxin and Ferredoxin Reductase by Fusion to PCNA", *ChemBioChem*, 11, 1517-1520 (2010).
- [2] H. Hirakawa, A. Kakitani and T. Nagamune, "Introduction of selective intersubunit disulfide bonds into self-assembly protein scaffold to enhance an artificial multienzyme complex's activity", *Biotechnol. Bioeng.* In press.