

機関番号：12601

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21760633

研究課題名 (和文) PCNA をプラットフォームとする P450-電子伝達タンパク質複合体の構築

研究課題名 (英文) PCNA-based P450-electron transfer proteins complex

研究代表者

平川 秀彦 (HIRAKAWA HIDEHIKO)

東京大学・大学院工学系研究科・助教

研究者番号：90451799

研究成果の概要 (和文)：細菌由来シトクロム P450 は2種類の電子伝達タンパク質を介した還元力の供給を必要とする。シトクロム P450 への高効率な電子伝達を目指して、ヘテロ3量体タンパク質を足場として利用することによりシトクロム P450-電子伝達タンパク質複合体を構築し、その触媒活性評価及び最適化を行い、複合体を大腸菌に発現させた生体触媒としての利用について検討した。

研究成果の概要 (英文)：Bacterial cytochrome P450s require electrons for its catalytic activities through two kinds of electron transfer proteins. To improve electron transfer efficiency, a protein complex composed of cytochrome P450 and its electron transfer proteins was constructed using a heterotimeric protein. Its catalytic activity was evaluated and the component fusion proteins were optimized. *E. coli* harboring the complex was examined to use as a biocatalyst.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：酵素工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：シトクロム P450、電子伝達タンパク質、ヘテロ3量体、古細菌、PCNA

## 1. 研究開始当初の背景

P450 は生体内で重要かつ多様な役割を担うヘム含有モノオキシゲナーゼであり、水酸化、エポキシ化、脱ハロゲン化、など幅広い酸化反応を穏和な条件下において立体選択的・位置選択的に触媒する。P450 の触媒反応では  $O_2$  が結合したヘムを compound I と呼ばれる活性種に変換するために電子伝達タンパク質を介した電子の供給を受ける必要がある。例えば、細菌由来 P450 は電子伝達タンパク質としてフェレドキシン及びフェレ

ドキシ還元酵素を必要とする。

P450 の選択的な酸化反応を利用したバイオトランスフォーメーションは既に薬剤分子の合成過程では工業的に利用されており、今後ますます P450 は物質生産用酵素として利用されていくと予想される。従って、目的反応を触媒する P450 を短期間に得る技術の開発は極めて重要である。

近年、ゲノム解析の進展により多くの P450 遺伝子が明らかにされつつあり、新規な水溶性 P450 はゲノム情報を元に大腸菌などの汎

用宿主による発現系を利用して解析が進められている。しかし、電子伝達パートナーをゲノム情報から特定することは困難であり、*Pseudomonas putida* 由来 P450 (P450cam) の電子伝達パートナーであるプチダレドキン (Pdx) とプチダレドキシ還元酵素 (Pdr) を代替利用することが多い。Pdx は本来の電子伝達パートナーでないために相互作用は弱く、電子伝達効率も低い。その結果、低い活性しか得られない、又は、活性が全く得られないということも多い。そこで、Pdx、Pdr、P450 からなる融合タンパク質を構築することができれば、P450 に対する Pdx の局所濃度の向上により、相互作用の低さに起因する低電子伝達効率の問題は解決可能であると考えられる。

しかし、遺伝子的に多数のタンパク質を連結し発現させた場合、正しくフォールディングさせることは難しい。また、末端以外に配置されるタンパク質は大きく自由度を失うことによる活性の低下も予想される。そこで、それぞれを(1)一個所だけで連結し自由度の低下を最低限にとどめる、(2)空間的に等配置する、(3)分子レベルで隣接させる、ことが異種 P450 への電子伝達効率の向上に有効であると考えられる。

古細菌 *Sulfolobus solfataricus* 由来核内増殖抗原(PCNA)はスライディング・クランプと呼ばれるリング状のDNA結合タンパク質である。真核生物由来 PCNA がホモ 3 量体を形成するのに対して、*S. solfataricus* 由来 PCNA はヘテロ 3 量体を形成する (図 1)。各サブユニットは大腸菌発現系により個別に発現・精製可能であり、N末端あるいはC末端の付加配列はヘテロ 3 量体の形成を阻害しないことも報告されている。従って、各サブユニットの末端に P450、Pdx、Pdr を融合したタンパク質を個別に発現・精製した後、ヘテロ 3 量体を形成させることにより上記の(1)~(3)の条件を満たす複合体の構築することが可能である。

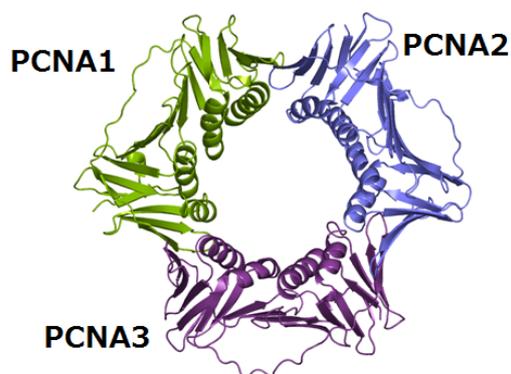


図 1 *S. solfataricus* 由来 PCNA の立体構造

## 2. 研究の目的

本研究課題では、(1)PCNA サブユニットと P450cam、Pdx、Pdr との融合タンパク質を個別に発現・精製した後、ヘテロ 3 量化させ、ヘテロ 3 量化複合体が触媒活性を有することを示し、(2)本ヘテロ 3 量化複合体が大腸菌内でも機能すること示し、(3)P450cam を CYP119 と置換した場合についても触媒活性を有することを示し、汎用的な P450-電子伝達タンパク質複合体の構築法を確立することを目的とする (図 2)。

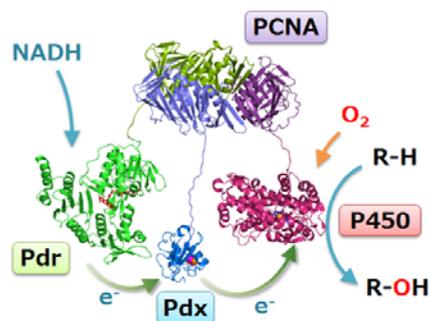


図 2 PCNA を利用した P450-電子伝達タンパク質複合体

## 3. 研究の方法

### (1)PCNA 融合タンパク質の構築

*S. solfataricus* 由来 PCNA のサブユニットである PCNA1、PCNA2、PCNA3 に *P. putida* 由来 P450 システムを構成する Pdr、Pdx、P450cam を遺伝的に連結した融合タンパク質 (PCNA1-Pdr、PCNA2-Pdx、PCNA3-P450cam) を構築した。それぞれの融合タンパク質は大腸菌により発現させ、カラムクロマトグラフィーにより精製した。

### (2)ヘテロ 3 量化及び精製

発現・精製した 3 つの融合タンパク質を混合した。氷上で 1 時間静置した後、サイズ排除クロマトグラフィーにより精製した。

### (3)酵素活性測定

複合体中の Pdr から Pdx への電子伝達活性はシトクロム c の還元速度を測定することにより評価した。複合体の P450cam 活性は *t*-camphor の水酸化に伴う酸素及び NADH の消費速度を測定することにより評価した。

### (4)PCNA と二重鎖 DNA 間の相互作用評価

ストレプトアビジンを固定化センサーチップにビオチン化 DNA を結合させた後、相補鎖 DNA を結合させることにより二重鎖 DNA を固定化したセンサーチップを調製した。このセンサーチップに精製した PCNA を流すことにより、二重鎖 DNA に対する PCNA の結合・解離を表面プラズモン共鳴現象測定装置により評価した。

### (5)融合タンパク質発現大腸菌による *t*-camphor の水酸化

共発現ベクターを構築し、3 つのタンパク質を発現する大腸菌を調製した。各融合タン

パク質の発現はウエスタンブロッティングにより行った。大腸菌を *d*-camphor を含む培地中で培養し、培養上清の有機溶媒抽出物をガスクロマトグラフィーにより分析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) PCNA 融合タンパク質の触媒活性評価

PCNA サブユニットに Pdr, Pdx, P450cam を遺伝子的に融合した PCNA1-Pdr, PCNA2-Pdx, PCNA3-P450cam はそれぞれ Pdr, Pdx, P450cam に由来する特有の UV-vis スペクトルを示した。これらの触媒活性は Pdr, Pdx, P450cam 単独の触媒活性とほとんど変わらなかった。従って、PCNA サブユニットとの融合は Pdr, Pdx, P450cam の機能に影響を与えないことが明らかとなった。

##### (2) PCNA 融合タンパク質の 3 量化

PCNA1-Pdr, PCNA2-Pdx, PCNA3-P450cam を等モル量混合し、サイズ排除クロマトグラフィーを行ったところ、それぞれ単独に比べて高分子量領域にメインピークが現れた。このメインピークは PCNA1-Pdr, PCNA2-Pdx, PCNA3-P450cam を含むことを SDS-PAGE 解析により確認した。メインピークの UV-vis スペクトルは PCNA1-Pdr, PCNA2-Pdx, PCNA3-P450cam の 1 対 1 対 1 のスペクトル和にほぼ一致した。以上の結果より、それぞれの PCNA 融合タンパク質を 1 分子ずつ含むヘテロ 3 量体(PCNA-utilized potent heterotrimeric complex of P450cam and its electron transfer proteins, PUPPET)を得ることに成功した。

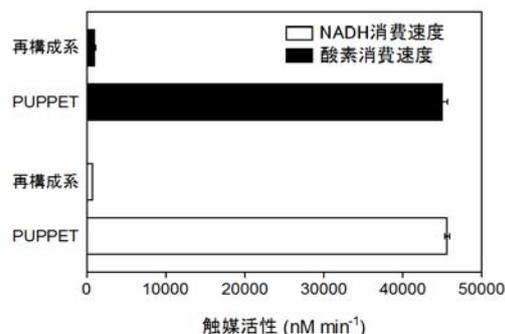


図3 ヘテロ 3 量体 (90 nM) の触媒活性

##### (3) ヘテロ 3 量体の触媒活性評価

ヘテロ 3 量体 PUPPET の触媒活性を *d*-camphor の水酸化に伴う酸素と NADH の消費速度によって評価した (図 3)。酸素と NADH の消費速度は一致し、NADH に由来する電子によって *d*-camphor の水酸化が進行していることが明らかになった。Pdr, Pdx, P450cam を等モル濃度含む再構成系と比較すると、触媒活性は 5 0 倍程度向上し、ヘテロ 3 量化により Pdr, Pdx, P450cam を分子レベルで近接さ

せることが P450cam の触媒活性の向上に極めて有益であることが明らかとなった。

PUPPET の比活性は PUPPET 濃度に依存性を示した (図 4)。PCNA は PCNA1-PCNA2 ヘテロ 2 量体と PCNA3 に解離しやすいことが報告されている。従って、低濃度領域での PUPPET の比活性の低下は PCNA3-P450cam の解離による Pdx-P450cam 間の電子伝達効率の低下が原因であると考えられる。

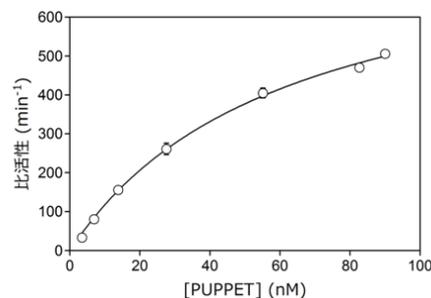


図4 比活性の PUPPET 濃度依存性

##### (4) 最適化

得られた PUPPET の最大比活性 ( $\sim 500 \text{ min}^{-1}$ ) は P450cam 自体の比活性 ( $\sim 2400 \text{ min}^{-1}$ ) に及ばなかった。この要因として①PCNA3 の解離、②PCNA と各タンパク質を連結するペプチドリンカーの長さが不十分、であるということが考えられる。

① *S. sorfataricus* PCNA では安定な PCNA1-PCNA2 ヘテロ 2 量体に PCNA3 が結合することによりヘテロ 3 量体を形成することが知られている。PCNA3 はヘテロ 3 量体から解離し易いということも知られている。そこで、PCNA3 のインターフェースに変異を導入し、ヘテロ 3 量体の安定化を狙った。変異導入はヘテロ 3 量体の安定化には寄与しなかったものの、変異導入により PCNA3-P450cam の精製収率が大きく向上した。PCNA3 の N 末端に導入している His<sub>6</sub> タグは PCNA3 をオリゴマー化し凝集させるという知見が得られている。変異導入はそのオリゴマー化を防ぎ、収率を向上させたものと考えられる。

② PCNA と各タンパク質を連結するペプチドリンカーは各タンパク質の空間配置に大きな及ぼすと考えられることから、ペプチドリンカーの最適化を行った。Pdx は Pdr と P450cam のどちらとも相互作用することを考慮して、PCNA2-Pdx のペプチドリンカーの最適化を行った。柔軟なリンカーとして知られている (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>n</sub> 配列をリンカーとして用いた場合、リンカーの長さは触媒活性に大きな影響を与えなかった。それに対して、剛直なリンカーとして知られているポリプロリン配列をリンカーとして用いた場合、リンカーの長さは触媒活性に大きな影響を与えた (図 5)。プロリンの繰り返し回数が 20 の時、最大の触媒活性が得られた。最適化により

2.4 倍の触媒活性の向上に成功した。

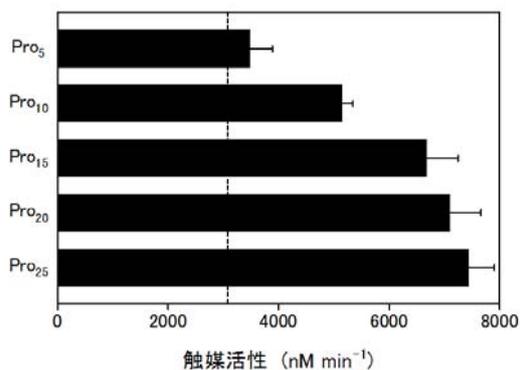


図 5 ポリプロリンリンカーの長さが PUPPET (18 nM) の触媒活性に与える影響 (破線: 最適化前の触媒活性)

#### (5) PCNA と二重鎖 DNA 間の相互作用

PCNA は DNA 結合タンパク質として知られていることから、菌体内で PUPPET を利用する際、宿主ゲノム DNA に結合し宿主に対して毒性を示すことが考えられる。そこで PCNA と二重鎖 DNA 間の相互作用を表面プラズモン共鳴現象測定装置により評価した。PCNA1 は二重鎖 DNA と結合したのに対して、PCNA2 と PCNA3 は結合しなかった。興味深いことに PCNA1-PCNA2 ヘテロ 2 量体は二重鎖 DNA に結合しなかった。さらに PCNA1-PCNA2-PCNA3 ヘテロ 3 量体も二重鎖 DNA に結合しなかったことから、PCNA1-Pdr、PCNA2-Pdx、PCNA3-P450cam を大腸菌に共発現させてもゲノム DNA に結合することはないと考えられる。

#### (6) PUPPET 発現大腸菌による *d*-camphor の水酸化

PCNA1-Pdr、PCNA2-Pdx、PCNA3-P450cam を大腸菌内でヘテロ 3 量化するためには、それぞれの発現を個別に制御する必要がある。そこで、① PCNA1-Pdr をアラビノース、PCNA2-Pdx を IPTG で誘導可能な共発現ベクター、及び② PCNA3-P450cam を無水テトラサイクリンで誘導可能な発現ベクターを構築した。これらの発現ベクターで大腸菌を共形質転換することにより、PCNA1-Pdr、PCNA2-Pdx、PCNA3-P450cam を共発現可能な、即ち、PUPPET を発現可能な大腸菌を調製した。

ウェスタンブロッティングにより融合タンパク質の発現はアラビノースと無水テトラサイクリンでは制御可能であることを確認した。しかし、PCNA2-Pdx は IPTG 非依存的に発現した。

誘導物質により PUPPET を発現させた大腸菌に *d*-camphor を加えたところ、*d*-camphor の水酸化が進行することをガスクロマトグラフィーにより確認した (図 6)。しかし、誘導物質を添加しなくても *d*-camphor の水酸

化は進行した。これは誘導物質非存在下で発現が完全に抑制できておらず、ごくわずかに発現した PUPPET が *d*-camphor の水酸化を触媒したものと考えられる。

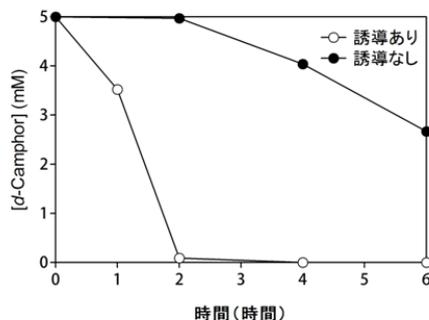


図 6 共発現大腸菌による *d*-camphor の水酸化

以上をまとめると、PCNA サブユニットに Pdr、Pdx、P450cam を融合することにより自発的な Pdr-Pdx-P450cam 複合体 PUPPET を構築することに成功した。PUPPET では Pdr、Pdx、P450cam が分子レベルで近接するため、効率の良い電子伝達により再構成系と比べて高い触媒活性を有することが明らかとなった。この触媒活性は既報の P450 と電子伝達タンパク質から成る人工的な融合タンパク質に比べてもはるかに高いことから、極めて有用な手法を確立することに成功したと言える。さらに、大腸菌内で共発現させることによって生体触媒として利用可能であることを示せた。さらに、P450cam を由来の異なる P450 に置換することにより汎用的な P450-電子伝達タンパク質複合体になるものと期待される。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

① Hidehiko Hirakawa, Teruyuki Nagamune, Molecular Assembly of P450 with Ferredoxin and Ferredoxin Reductase by Fusion to PCNA, ChemBioChem, Vol. 11, 2010, 1517-1520, 査読有

[学会発表] (計 1 4 件)

① 平川秀彦、長棟輝行、「ボトムアップアプローチによるタンパク質間相互作用検出系の構築」、化学工学会第 76 年会、平成 23 年 3 月 24 日、東京

② 鈴木里沙、平川秀彦、長棟輝行、「自己組織的複合化 PdX-PdR-CYP119 の活性評価」、化学工学会第 76 年会、平成 23 年 3 月 24 日、東京

- ③ 芳賀智亮、平川秀彦、長棟輝行、「PCNA 融合シトクロム P450cam システムの最適化」、化学工学会第 76 年会、平成 23 年 3 月 24 日、東京
- ④ 鈴木里沙、平川秀彦、長棟輝行、「*Sulforobus solfataricus* 由来 PCNA と 2 本鎖 DNA の相互作用」、BMB2010、平成 22 年 12 月 8 日、神戸
- ⑤ 平川秀彦、長棟輝行、「細菌由来シトクロム P450 システムを利用した分子間相互作用の検出」、酵素工学会第 64 回講演会、平成 22 年 11 月 19 日、東京
- ⑥ 芳賀智亮、平川秀彦、長棟輝行、「PCNA 融合 P450cam-電子伝達タンパク質複合体の最適化」、酵素工学会第 64 回講演会、平成 22 年 11 月 19 日、東京
- ⑦ 鈴木里沙、平川秀彦、長棟輝行、「CYP119 の非天然ドナーとの活性評価」、酵素工学会第 64 回講演会、平成 22 年 11 月 19 日、東京
- ⑧ 平川秀彦、長棟輝行、「PCNA 融合 P450cam/電子伝達タンパク質共発現系の構築」、化学工学会第 75 年会、平成 22 年 3 月 20 日、鹿児島
- ⑨ 鈴木里沙、平川秀彦、石井洋一、長棟輝行、「大腸菌の増殖に及ぼす PCNA 発現の影響」、化学工学会第 75 年会、平成 22 年 3 月 20 日、鹿児島
- ⑩ 垣谷彩乃、平川秀彦、長棟輝行、「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」、化学工学会第 75 年会、平成 22 年 3 月 20 日、鹿児島
- ⑪ 鈴木里沙、平川秀彦、石井洋一、長棟輝行、「超好熱古細菌由来 PCNA の大腸菌発現系の構築」、酵素工学会第 62 回講演会、平成 21 年 11 月 13 日、東京
- ⑫ 平川秀彦、長棟輝行、「リング状タンパク質を利用した P450cam-電子伝達タンパク質複合体の構築」、酵素工学会第 62 回講演会、平成 21 年 11 月 13 日、東京
- ⑬ 垣谷彩乃、平川秀彦、長棟輝行、「共有結合による安定な PCNA ヘテロ 3 量体の構築」、酵素工学会第 62 回講演会、平成 21 年 11 月 13 日、東京
- ⑭ 平川秀彦、長棟輝行、「核内増殖抗原を利用した P450-電子伝達タンパク質複合体の構築」、日本生物工学会平成 21 年度大会、平成 21 年 9 月 24 日、名古屋

[その他]

ホームページ等

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/nagamune/EEG.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

平川 秀彦 (HIRAKAWA HIDEHIKO)  
東京大学・大学院工学系研究科・助教  
研究者番号：90451799

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし