

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26630419

研究課題名(和文) DNA鎖上での逐次的な酵素複合体形成

研究課題名(英文) Sequential enzyme complex formation on DNA

研究代表者

平川 秀彦(Hirakawa, Hidehiko)

東京大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90451799

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：高効率かつ高度な多酵素反応を行う酵素複合体の構築を目指して、数珠を作るようにDNA鎖に酵素を順番に結合させ、任意の順番で酵素を配置するための技術を開発するために研究を進めた。DNAに結合する「滑る留め金タンパク質」を利用することにより、DNA鎖への酵素の結合を試みた。まず、安定な滑る留め金タンパク質を古細菌より見出し、その諸性質を明らかにした。次に、DNAに結合させた酵素が抜け落ちないようにするために、酵素複合体の形成開始点には DNA 結合タンパク質に見出した滑る留め金タンパク質を融合し、DNA上に酵素複合体を形成させることに成功した。

研究成果の概要(英文)：We tried to develop a method that arrange the order of multiple enzymes on DNA to construct artificial multienzyme complexes that catalyze sophisticated sequential or concerted reactions. To retain enzymes on DNA, we focused on a DNA sliding clamp. A stable DNA sliding clamp was discovered from a archaeon and then characterized. A DNA-binding protein was immobilized on DNA at the starting point of complex formation to avoid drop-off of proteins fused to the DNA sliding clamp. As a result, we successfully constructed multienzyme complexes on DNA.

研究分野：酵素工学

キーワード：酵素複合体 核内増殖抗原 古細菌 Metallosphaera sedula DNA

1. 研究開始当初の背景

酵素は優れた触媒として分析や食品工業、物質生産などに広く利用されているものの、主に利用されているのは単一酵素による単一反応である。一方、生体内では複数の酵素による逐次反応や共役反応、すなわち、多酵素反応により様々な化合物が高効率に生産されている。さらに、多酵素反応として有名な TCA サイクルなどではメタボロンと呼ばれる酵素複合体を形成している。複合体形成は各酵素を分子レベルで近接させることにより、酵素間の物質移動効率を向上させ、その結果、全体の反応速度を大きく向上させるだけでなく、中間生成物の分解を防ぐと考えられている。そこで、近年、複数の酵素を人工的に複合体形成させることにより高効率な多酵素反応を行うことが盛んに試みられている。中でも DNA を足場分子とする方法は、酵素の配置制御ができるという利点を有しているものの、化学修飾により一本鎖 DNA を酵素に付加する必要があり、普及性・実用性に乏しい。そこで、DNA と混合するだけで酵素を順番に DNA 鎖上に配置する技術が求められている。

核内増殖抗原 (PCNA) はリング状三量体タンパク質であり、リングの穴に DNA 鎖を通して結合し、さらに DNA ポリメラーゼなどの DNA 関連酵素と結合し、これらの酵素を DNA 鎖上で安定に保持する役割を担う。そこで、数珠を作るように DNA 鎖に PCNA を順番に通していくことができれば、DNA 配列を認識することなく PCNA を介して DNA 鎖上に酵素を順番に配置することが期待できる。

2. 研究の目的

本研究では酵素と融合した古細菌由来 PCNA を DNA 鎖に順番に通していくことにより、配列特異的な DNA 結合ドメインを付加しなくても酵素を DNA 鎖上に任意の順序で配置できることを明らかにする。さらに、得られる酵素複合体の触媒活性を評価し、本手法が多酵素反応に有用であることを示すことも目的とする。

3. 研究の方法

(1) DNA 結合タンパク質の評価

逐次的に DNA 上に酵素を集積していくための開始点として、DNA 配列を認識し、強く結合するタンパク質を利用することとした。*Xanthomonas* 由来 transcription activator-like effector (TALE) は DNA 塩基を認識するモジュールの繰り返しから構成されており、モジュールの並び換えにより結合する DNA 配列を制御することができる。そこで、異なる DNA 配列を認識する三種類の TALE タンパク質をデザインし、大腸菌により発現させた後、クロマトグラフィー精製を行った。

得られた TALE タンパク質の DNA 結合性を

表面プラズモン共鳴現象 (SPR) 測定により評価した。また、TALE タンパク質に *Pseudomonas putida* 由来シトクロム P450 システムを構成する P450cam、プチダレドキシリン (PdX)、プチダレドキシリン還元酵素 (PdR) を遺伝子的に連結した融合タンパク質を構築した。DNA 上で目的的位置に各タンパク質が配置されることを確認するために、これらの融合タンパク質と DNA を混合し、PdR から PdX への電子伝達と PdX から P450cam への電子伝達を評価した。

(2) 安定なリング状ヘテロ三量体タンパク質の探索

PCNA リングの穴に DNA を通すよりも、DNA 上で PCNA リングを形成させる方が効率良く PCNA に融合したタンパク質を DNA 上に配置できると考えられる。また、PCNA 三量体を介して DNA 上に酵素を配置することができたとしても、PCNA が三量体状態を維持できなければ、配置した酵素が抜け落ちてしまう。そこで、単独では単量体として存在し、混合により安定なヘテロ三量体を形成する PCNA を探索することとした。ゲノム情報より三つの PCNA 遺伝子を有する古細菌をリストアップし、配列情報に基づいて PCNA を調製した。調製した PCNA のヘテロ三量化能を調べ、目的に適した PCNA を決定した。さらに、ヘテロ三量体状態を安定化させるために変異導入を行った。

(3) リング状ヘテロ三量体タンパク質を利用したタンパク質の人為的な複合体形成

決定した PCNA が安定なヘテロ三量体を形成することを確認するために、P450cam、PdX、PdR と融合し、これら三つのタンパク質が近接した集積体の触媒活性のタンパク質濃度依存性を調べた。

(4) DNA 上での酵素複合体の構築

PCNA サブユニットの一つを TALE に遺伝的に連結した融合タンパク質を DNA に結合させた後、残り二つの PCNA サブユニットを添加することにより DNA 上での PCNA リングの固定化を試みた。PCNA リングの穴が DNA を通していることを確認するために、PCNA との結合により反応性を向上させる DNA リガーゼ 1 により DNA のニック修復反応を評価した。

さらに、二つの PCNA サブユニットを遺伝的に連結した融合タンパク質、残りの PCNA サブユニットに PdR または PdX を遺伝的に連結した融合タンパク質を順次、DNA を固定したビーズに添加し、DNA 上に集積させた。融合タンパク質を添加する順番を変えることにより PdR と PdX の配置を制御できること調べるために、PdR から PdX への電子伝達を評価した。

4. 研究成果

(1) DNA 結合タンパク質の評価

異なる配列 5' -TTATTTCTGTATCTTTGTT-3' (配列 1)、5' -TCACTCCCGCACCCCTCGCC-3' (配列 2)、5' -TGAGTGC GGAGCGTGGGG-3'

(配列)を認識する TALE タンパク質(TALE1、TALE2、TALE3)は大腸菌により水溶性タンパク質として発現させることができた。ただし、低塩濃度下では凝集しやすいことが判明した。

DNA を固定化したセンサーチップを用いて DNA との結合性を評価したところ、デザインした TALE タンパク質は配列特異的に DNA と結合し、さらに DNA からの解離速度は極めて遅いことが明らかとなった。また、DNA の結合性は高塩濃度下では低下することも明らかとなった。

TLAE1 に PdR を融合した TALE1-PdR タンパク質、TALE2 に PdX を融合した TALE2-PdX、TALE3 に P450cam を融合した TALE3-P450cam タンパク質はそれぞれ PdX、PdR、P450cam の補因子に由来する吸収スペクトルを示したことから、TALE タンパク質との融合は PdR、PdX、P450cam の活性に悪影響を与えないことが示唆された。

PdR によって還元された PdX はシトクロム c を還元できるという性質を利用し、PdR と PdX の配置制御を評価した。配列 1 と配列 2 を含む DNA 二重鎖と TALE1-PdR、TALE2-PdX を混合したところ、DNA 非存在下と比べてシトクロム c は速く還元された。配列 1 と配列 2 の間に挿入する配列を長くするほど、シトクロム c の還元速度が低下することが明らかとなった。このことは配列 1 と配列 2 の間の距離が PdR - PdX 間相互作用に影響を及ぼしていることを示唆している。さらに、配列 1、配列 2、配列 3 を含む Y 字型 DNA を足場として TALE1-PdR、TALE-PdX、TALE-P450cam を集積したところ、分岐点から認識配列までの距離が PdR による PdX の還元および PdX から P450cam への伝達に影響を及ぼした。以上より、TALE タンパク質によって DNA 配列特異的にタンパク質を DNA 上に配置できることが明らかとなった。

(2)安定なリング状ヘテロ三量体タンパク質の探索

既往の研究より、クレン古細菌の一部は三つの PCNA を有し、それらはヘテロ三量体を形成することが知られている。ゲノム情報より、三つの PCNA 遺伝子を有するクレン古細菌をリストアップし、実際に合成遺伝子を利用して PCNA を発現させた。水溶性タンパク質としての発現が困難であったり、単独で多量体を形成する PCNA がある中で、*Metallosphaera sedula* 由来 PCNA は単独では単量体として存在することを見出した。そこで、*M. sedula* 由来 PCNA に関して諸性質を調べた。

三つの *M. sedula* 由来 PCNA (MsePCNA1、MsePCNA2、MsePCNA3) を等モル濃度で混合するとヘテロ三量体を形成することがサイズ排除クロマトグラフィーにより明らかとなった。プルダウンアッセイにより MsePCNA1 と MsePCNA2 は結合するものの、MsePCNA3 は

MsePCNA1 あるいは MsePCNA2 には結合しないことが明らかとなった。しかし、MsePCNA3 は MsePCNA1 存在下では MsePCNA2 に、MsePCNA2 存在下では MsePCNA1 に結合した。したがって、MsePCNA1 と MsePCNA2 がヘテロ二量体を形成した後、その二量体に対して MsePCNA3 が結合して、段階的にヘテロ三量体を形成すると考えられる。

黄色蛍光タンパク質とシアン色蛍光タンパク質を *M. sedula* 由来 PCNA 末端に融合し、蛍光共鳴エネルギー移動現象 (FRET) を評価することにより、*M. sedula* 由来 PCNA 間の相互作用を評価した。その結果、MsePCNA1 の C 末端と MsePCNA2 の N 末端、MsePCNA2 の C 末端と MsePCNA3 の N 末端が近接していることが明らかとなり、*M. sedula* 由来 PCNA は head-to-tail 様式のヘテロ三量体であることが明らかになった。

M. sedula 由来 PCNA サブユニット間の相互作用を定量的に評価するために SPR 測定を行った。MsePCNA2 をセンサーチップに固定化したところ、MsePCNA1 - MsePCNA2 間の解離定数は 0.3 nM であり、MsePCNA3 - MsePCNA1・MsePCNA2 ヘテロ二量体間の解離定数は 43 nM であった。同様にヘテロ三量体を形成する *Sulfolobus solfataricus* 由来 PCNA において、ヘテロ三量体の解離定数が 200 nM であったことから、*M. sedula* 由来 PCNA はより安定なヘテロ三量体を形成することが明らかとなった。

ヘテロ三量体構造をさらに安定化させるために、サブユニット間へのジスルフィド結合の形成を試みた。システイン残基を導入した変異体を構築し、ヘテロ三量化させた後、酸化型グルタチオン存在下でインキュベートしたところ、選択的なジスルフィド結合の形成を SDS-PAGE により確認した。

(3)リング状ヘテロ三量体タンパク質を利用したタンパク質の人為的な複合体形成

MsePCNA1 に PdR を融合した MsePCNA1-PdR タンパク質、MsePCNA2 に PdX を融合した MsePCNA2-PdX タンパク質、MsePCNA3-P450cam タンパク質を構築した。これらのタンパク質を等モル濃度で混合するとヘテロ三量体を形成した。PdR による PdX の還元および PdX から P450cam への電子伝達は、各タンパク質が近接したこのヘテロ三量体内で主に起こるため、効率良く P450cam が活性化され、高い触媒活性を示した。*S. solfataricus* 由来 PCNA を利用して PdR、PdX、P450cam を複合体形成させた場合と比べて、高い見かけの比活性を示した。*M. sedula* 由来 PCNA は *S. solfataricus* 由来 PCNA よりも安定性の高いヘテロ三量体を形成するため、ヘテロ三量体を形成している割合が高いためと考えられる。したがって、*M. sedula* 由来 PCNA は安定な複合体形成に有用であることが明らかとなった。

(4)DNA 上での酵素複合体の構築

M. sedula 由来 PCNA ヘテロ三量体は *M.*

*sedula*由来DNAリガーゼ1はニック修復活性を向上させることを確認した。このことは *M. sedula* 由来 PCNA ヘテロ三量体 DNA スライディングクランプとして機能することを示唆している。すなわち、*M. sedula* 由来 PCNA のリングの穴に DNA を通すことができることを示唆している。一方、SPR 測定により MsePCNA1、MsePCNA2、MsePCNA3 は DNA 二重鎖に自発的には結合しないことを確認した。

TALE2 に MsePCNA1 を融合した TALE2-MsePCNA1 タンパク質は配列 2 を含む DNA に結合することを確認した。ビーズに固定した DNA に TALE2-MsePCNA1 を結合させた後、MsePCNA2 に PdR を融合した MsePCNA2-PdR、MsePCNA3 に MsePCNA1 を融合した MsePCNA3-MsePCNA1、MsePCNA2 に PdX を融合した MsePCNA2-PdX を順次添加し、DNA 上に PdR と PdX を集積させた。この集積体によるシトクロム c の還元速度は、MsePCNA2-PdR と MsePCNA2-PdX のみを含む反応溶液の還元速度よりも速く、DNA 上に集積していることが示唆された。

DNA に結合させた TALE2-MsePCNA1 に対して、MsePCNA2-PdR を結合させた後、MsePCNA3-MsePCNA1 と MsePCNA2 を交互に添加、最後に MsePCNA2 の代わりに MsePCNA2-PdX を添加し、PdR - PdX 間の距離の制御を試みた。MsePCNA3-MsePCNA1 と MsePCNA2 の交互の添加を繰り返す回数が増えるほど、シトクロム c の還元速度は低下した。MsePCNA3-MsePCNA1 と MsePCNA2 の交互の添加を繰り返す回数が増えるほど、MsePCNA2-PdX の結合量が低下したことから、シトクロム c の還元速度が低下したのは、配置制御により PdR - PdX 間距離が長くなったためだけでなく、集積効率が低下したことも一因と考えられる。集積効率を向上させるためには、DNA に対する MsePCNA サブユニットの配向や MsePCNA3-MsePCNA1 融合タンパク質における MsePCNA3 と MsePCNA1 の空間配置を制御する必要があると考えられる。したがって、MsePCNA3 と MsePCNA1 を連結しているペプチドリンカーの最適化などの課題に取り組む必要がある。

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)

Fumiya Iwata, Hidehiko Hirakawa, Teruyuki Nagamune, Three proliferating cell nuclear antigen homologues from *Metallosphaera sedula* form a head-to-tail heterotrimer, Scientific Reports, 6, 26588, 2016, 査読有
DOI: 10.1038/srep26588

[学会発表](計 10 件)

畠山洋平、平川秀彦、長棟輝行、「配列特異的な DNA 結合タンパク質を利用したシト

クロム P450 システムの再構成」、化学工学会第 81 年会、平成 28 年 3 月 13 日、関西大学(大阪府、吹田市)

岩田史也、平川秀彦、長棟輝行、「PCNA ヘテロ三量体を利用した DNA 上への多酵素集積」、第 67 回日本生物工学会大会、平成 27 年 10 月 28 日、城山観光ホテル(鹿児島県、鹿児島市)

畠山洋平、平川秀彦、長棟輝行、「DNA 結合タンパク質を介したシトクロム P450 システムの再構成」、第 67 回日本生物工学会大会、平成 27 年 10 月 28 日、城山観光ホテル(鹿児島県、鹿児島市)

岩田史也、平川秀彦、長棟輝行、「PCNA ヘテロ三量体を利用した DNA 上への多酵素集積」、酵素工学会第 74 回講演会、平成 27 年 10 月 16 日、東京大学(東京都、文京区)

Yohei Hatakeyama, Hidehiko Hirakawa, Teruyuki Nagamune, 「Reconstitution of a Bacterial Cytochrome P450 System on DNA Scaffold」、RIKEN Symposium “Metals in Biology” in Wako, 平成 27 年 6 月 17 日、理化学研究所(埼玉県、和光市)

Yohei Hatakeyama, Hidehiko Hirakawa, Teruyuki Nagamune, 「Reconstitution of cytochrome P450 system utilizing DNA binding protein」、19th International Conference on Cytochrome P450, 平成 27 年 6 月 13 日、国立オリンピック記念青少年総合センター(東京都、渋谷区)

Fumiya Iwata, Hidehiko Hirakawa, Teruyuki Nagamune, 「Stable multienzyme complex formation using PCNA from *Metallosphaera sedula*」、19th International Conference on Cytochrome P450, 平成 27 年 6 月 13 日、国立オリンピック記念青少年総合センター(東京都、渋谷区)

畠山洋平、平川秀彦、長棟輝行、「DNA 結合タンパク質を用いたシトクロム P450 システムの再構成」、化学工学会第 80 年会、平成 27 年 3 月 19 日、芝浦工業大学(東京都、江東区)

岩田史也、平川秀彦、長棟輝行、「クレン古細菌由来核内増殖抗原の DNA 結合性の評価」、第 87 回日本生化学会大会、平成 26 年 10 月 18 日、京都国際会館(京都府、京都市)

平川秀彦、畠山洋平、岩田史也、長棟輝行、「DNA 結合タンパク質を利用した細菌由来シトクロム P450 システムの再構成」、第 66 回日本生物工学会大会、平成 26 年 9 月 9 日、札幌コンベンションセンター(北海道、札幌市)

[その他]

ホームページ等

http://researchmap.jp/hidehiko_hirakawa

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