

## 遠くの親戚より近くの他人～融合タンパク質による酵素変換～

田島 誉久

細胞内の生体分子は多様な構造を構成し、機能を発揮する。酵素も代謝反応をはじめとして生命を維持すべく必要な時に機能できるようにうまく制御されている。そのような酵素を利用した物質変換を効率化するためには細胞内への基質の取り込みや複数の酵素反応を律速段階なく行うことが課題としてあげられる。

さて、表題の諺は、「困ったときには遠くの親戚よりも近くにいる他人が頼りになる」という意味として用いられるが、細胞内の酵素も同じようなことがいえるのであろうか。生体内ではさまざまな酵素が発現し、それぞれ特定の基質と結合することで反応が起こる。それぞれの濃度が低ければそれらが出会う頻度は低くなり、反応効率は低下する。多段階の酵素反応による物質変換の場合、各酵素を単独で発現させるよりも、共に近くに配置して反応させることで反応産物が細胞内に分散することなく、次の酵素に順次受け渡されて目的産物まで連続的に変換されると想像される。変換酵素を精製するなどして十分量を確保すればその必要はないが、生細胞そのものを触媒として利用する場合は前述のような基質と酵素が出会う頻度を高める工夫も効果があると考えられる。自然界にはセルロース分解酵素複合体であるセルロソームやポリケチド合成酵素のように多段階反応を連続して行えるように足場に酵素が結合した複合体や複数の触媒機能を行う単一酵素が存在する。それでは人工的に複数のタンパク質をどのように融合させると反応効率が向上するのであろうか。

これまでさまざまなタンパク質について融合化が行われ、その効果が示されているが、異種タンパク質間をどのようにつなげばよいのであろうか。Liらは蛍光タンパク質CFPとYFPをフレキシブルなリンカーとリジッドなリンカーの二種類を用いて連結した場合の立体構造とタンパク質間の蛍光共鳴エネルギー移動 (fluorescence resonance energy transfer: FRET) により融合タンパク質を評価した<sup>1)</sup>。分子動力学 (molecular dynamics: MD) 法と散逸粒子動力学 (dissipative particle dynamics: DPD) 法による分子構造シミュレーションによりフレキシブルとリジッドのリンカー単位を組み合わせることでタンパク質間の距離だけでなく方向も変わり、両者がタンパク質分子間の構造変化に影響することが示された。リジッドリンカーが増えるとリンカー部分の $\alpha$ -ヘリックス度が高くなり水素結合の数が増加し安定化するため、リンカーの種類や数がその剛性を決めていると考

えられていた。しかし、組み合わせるリンカーの順番もタンパク質間の配向を変えることがシミュレーションにより示され、これまでタンパク質間の距離において矛盾していたシミュレーション値とFRET実験値の相関を説明することができた。

また、酵素反応が連続しないタンパク質間の融合がアミノ酸合成経路の制御を効率化している。Nazmiらは芳香族アミノ酸の生合成を担う二つの酵素が融合した天然の酵素 (3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase: DAH7PS) を報告した<sup>2)</sup>。Geobacillus sp.のDAH7PSはDAH7PSドメインとコリスミ酸ムターゼ (CM) ドメインを持ち、それぞれのドメインは単独でも酵素活性を有する。どちらもコリスミ酸の合成に関わるものの、隣接した反応ではなく7段階離れた反応を触媒する。CMは芳香族アミノ酸合成経路の分岐点を担い、チロシンとフェニルアラニンの前駆物質プレフェン酸を生成する。プレフェン酸がその最上流の変換酵素であるDAH7PS活性をフィードバック阻害する。つまり、両者が融合することでアミノ酸合成の前駆物質蓄積を感知してその生合成反応にアロステリックな制御をかけることを可能としている。これらは結晶構造解析によるタンパク質構造の解明とその動態解析により明らかにされた。DAH7PSには多様性があり、Thermotoga maritimaのDAH7PSはACT-likeドメインと融合している。このACT-likeドメインはコリスミ酸から分岐して合成されるトリプトファンによりアロステリック制御を受ける。前述のプレフェン酸で制御されるCMドメインと入れ替えてDAH7PSと融合させたキメラタンパク質はそれぞれ制御ドメインに依存した制御を受けることが示された<sup>3)</sup>。したがって、制御ドメインをレゴブロックのように自由に組み合わせることで芳香族アミノ酸の合成経路を制御できることが明らかとなった。

今後、生物の巧みなメカニズムを有するタンパク質ドメインをパーツとし、立体構造の情報やシミュレーションを基に合成生物学的に酵素をデザインする物質変換触媒の構築が期待される。

- 1) Li, G. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **100**, 215 (2016).
- 2) Nazmi, A. R. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **291**, 21836 (2016).
- 3) Fan, Y. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, 3006 (2018).