

シトクロム P450 BM-3 の X 線小角散乱測定 Small Angle X-ray Scattering Measurement of Cytochrome P450 BM-3

杉島正一^{1,*}

¹久留米大学医学部, 〒830-0011 福岡県久留米市旭町 67

Masakazu SUGISHIMA^{1,*}

¹Kurume University School of Medicine, 67 Asahi-machi, Kurume, 830-0011, Japan

1 はじめに

シトクロム P450 はヒト体内でのステロイドホルモンの合成などの脂質代謝、薬物・異物代謝に関わる重要な酵素である。本酵素はヘム鉄に結合した酸素分子を他者から供給された還元力を使って活性化し、基質に対して酸素添加反応を行う。その反応機構は古くから研究されており、立体構造も最初に決定された P450cam 以外に、ヒトを含めた様々な生物種由来のものが報告されている。酸素分子の活性化に必要な還元力は、ヒト由来の P450 の場合、アドレノドキシニン(Adx)と呼ばれる Fe-S タンパク質、あるいは FMN と FAD を結合している NADPH-シトクロム P450 還元酵素(CPR)から受け渡される。Pdx(Adx ホモログ)-P450cam の立体構造は既に報告されているが[1,2]、CPR-P450 複合体の立体構造は報告がなく、両者がどのように相互作用して、電子移動がなされるのかについては不明である。

我々は P450 と同様に CPR から還元力を受け取ることによって、酵素反応を駆動するヘムオキシゲナーゼ(HO)と CPR の複合体について結晶構造解析を行い、その立体構造を報告している[3]。CPR は FMN 結合ドメイン、FAD 結合ドメイン、両者の連結ドメインの 3 つのドメインから構成されるが、CPR-HO 複合体中で、CPR は FMN と FAD が大きく離れた構造を取っており(open 型)、FMN と HO 中のヘムが近接するようになっていた。このような構造変化は CPR-P450 複合体においても期待されるが、実態は不明である。

2 実験

我々は CPR-P450 複合体の立体構造情報を得るために、天然の融合タンパク質である *Bacillus megaterium* 由来 P450-BM3 に着目し、その X 線小角散乱測定を行った。測定を行った試料は野生型に加えて、CPR ドメインが open 型に固定されることが期待される FAD 結合ドメインと連結ドメインの間のループ領域に変異を加えた蛋白質二種類(BM3-del5, BM3-ΔTGEE)である。

これらの試料の X 線溶液散乱の測定は、高エネルギー加速器研究機構・放射光科学研究施設 BL-10C で行った。カメラ長は 2 m、波長は 1.5 Å 程度、検出器は PILATUS を用いた。q レンジは 0.00538-0.286

Å⁻¹である。試料の凝集体形成を防ぐために、HPLC (サイズ排除クロマトグラフィー)と組み合わせた SAXS 測定および MALS 測定を行った。SAXS 測定の結果、得られた散乱曲線は SAngler と ATSAS パッケージを用いて解析した。

3 結果および考察

MALS 測定の結果、野生型および BM3-del5 は二量体、BM3-ΔTGEE は単量体であることが分かった。散乱曲線からも BM3-ΔTGEE のみが大きく異なる構造をとっていることが分かる。一方で Guinier 解析や P(r)関数の解析から得られた 3 者の Rg はいずれも約 49 Å であった。

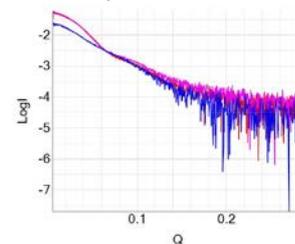


図 1 : BM3(赤), BM3-del5(マゼンタ), BM3-ΔTGEE(青)の X 線散乱曲線。

4 まとめ

今回、P450-BM3 について概形を得るための基礎的なデータ収集に成功した。今後、基質や補酵素の添加などでコンホメーション変化が誘起されるかどうか、引き続き検討が必要である。

謝辞

測定および解析において高エネルギー加速器研究機構の米澤健人先生、清水伸隆先生には大変お世話になりました。P450-BM3 の発現系は名古屋大学の 荘司長三先生、米イリノイ大の Stephen Sligar 先生に提供いただきました。この場をお借りして感謝申し上げます。

参考文献

- [1] S. M. Tripathy *et al.*, *Science* **340**, 1227-30 (2013)
- [2] Y. Hiruma *et al.*, *J. Mol. Biol.* **425**, 4353-65 (2013)
- [3] M. Sugishima *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111**, 2524-9 (2014).

* sugishima_masakazu@med.kurume-u.ac.jp