

基質同一部位多段階酸化反応を担うシトクロム P450 酵素 RosC の構造解析 Structural study of RosC, a cytochrome P450 enzyme that catalyzed multistep oxidation reactions

鈴木浩典*, 飯坂洋平, 野口修治, 安齋洋次郎

東邦大学 薬学部

〒274-8510 千葉県船橋市三山 2-2-1

Hironori SUZUKI*, Yohei IIZAKA, Shuji NOGUCHI and Yojiro ANZAI

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Toho University

2-2-1 Miyama, Funabashi, Chiba 274-8510, Japan

1 はじめに

微生物由来のシトクロム P450 酵素 (P450) は 20 種類以上の酸化反応を触媒し、天然物の生合成に関与する。放線菌が生産するマクロライド系抗生物質 rosamicin の生合成に関与する P450 の RosC はラクトン環 C-20 位のヒドロキシ化、アルコール酸化、アルデヒド酸化の 3 段階の酸化反応を触媒する^{1,2)}。一般的な P450 は基質を 1 回のみ酸化修飾するのに対し、RosC は基質同一部位の多段階酸化修飾を可能とする³⁾。RosC は基質中のアミノ糖の N 原子が活性中心であるヘム鉄に配位し、それが触媒活性に重要な役割を果たしていることが示唆されている。

単一酵素でありながら複数回の酸化反応を触媒する RosC は、抗生物質をはじめとする天然物の構造と生物活性の多様性を生み出す魅力的な酵素である。しかしながら、その多段階触媒反応の詳細なメカニズムは明らかとなっていない。

2 実験

大腸菌を用いて RosC の N 末端 21 残基を除いた試料を発現させ、精製して結晶化スクリーニングを行った。24%PEG3350、0.1 M Bis-Tris pH 5.5 の沈殿剤を用いることで空間群 C222₁ に属する単結晶を得た。

得られた単結晶を用いて、分解能 2.15 Å までの X 線回折強度データを収集し、XDS を用いてデータ処理を行った。プログラム Phenix を使い、類似タンパク質である CYP109E1 の結晶構造 (PDB ID: 5L90) をモデルとして、分子置換法により初期位相を決定し、プログラム coot を用いたモデリングおよび Phenix を用いた構造精密化を進めることで結晶構造を決定した。

3 結果および考察

決定した RosC の全体構造は、他のシトクロム P450 酸化酵素と同様に三角プリズム型の安定なドメイン構造であった。ただし、基質を認識する際の入り口に相当する BC loop および、F helix と G helix の

間の loop 領域は相対的に温度因子が高く、柔軟性の高い領域であると考えられる。RosC は単一の酵素でありながら、多段階の反応を触媒することから、各基質の結合様式に差異があることが示唆される。現在、酸化反応を受ける各基質との結晶化を進めている。

4 まとめ

RosC の単体の結晶構造を決定することに成功した。得られた立体構造情報は、RosC の多段階触媒反応の過程を明らかにするために活用できると考えられる。

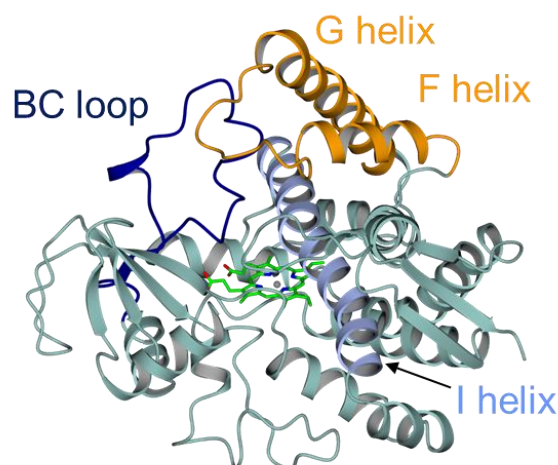


図 1 : RosC の結晶構造

参考文献

- [1] Y. Iizaka *et al.*, *Antimicrob Agents Chemother* 57, 1529-1531 (2013).
- [2] Y. Iizaka *et al.*, *FEMS Microbiol Lett.* 364, fnx110 (2017).
- [3] Y. Iizaka *et al.*, *Appl Microbiol Biotechnol* 105, 2647-2661 (2021).

* hironori.suzuki@phar.toho-u.ac.jp