

基質同一部位多段階酸化型シトクロム P450 酵素 RosC の反応制御を伴う変異体の構造解析

Structural study for a reaction-regulated mutant of a cytochrome P450 enzyme RosC 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

天然物の生合成に関与する一般的なシトクロム P450 酵素 (P450) は基質を 1 回のみ酸化修飾する。しかしながら、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)}。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。RosC が多段階の触媒反応を可能とするメカニズムを明らかにするために、これまでに野生型 RosC の立体構造を明らかにした。また、RosC が触媒する 3 段階の反応のうち、一段階目のみを触媒する変異体 (P107S/L176Q) を取得している³⁾。本研究では、この変異体の立体構造について検討した。

2 実験

大腸菌を用いて変異 (P107S/L176Q) を導入した RosC の N 末端 21 残基を除いた試料を発現させ、精製して結晶化を行った。24%PEG3350、0.1 M Bis-Tris pH 5.75 の沈殿剤を用いることで空間群 C22₁ に属する単結晶を得た。

得られた単結晶を用いて、分解能 2.45 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 を用い、決定済の野生型 RosC の結晶構造をモデルとして、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

RosC 変異体の構造は、野生型 RosC や他のシトクロム P450 酸化酵素と同様に三角プリズム型の構造であった。野生型において、FG loop は活性中心のへ

ムポケットを覆うような位置に存在していた。しかし、L176Q 変異体では、FG loop が disorder していた。このことから、変異体においては、FG loop のゆらぎが大きくなり、結合した基質の保持が不十分となる結果、多段階の触媒活性が生じないことが示唆された。現在、酸化反応の詳細を探るべく野生型 RosC と各基質との結晶化を進めている。

4 まとめ

変異 RosC の結晶構造を決定した。野生型との比較により、多段階の触媒活性を低下させる変異の構造的知見を得ることができた。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。

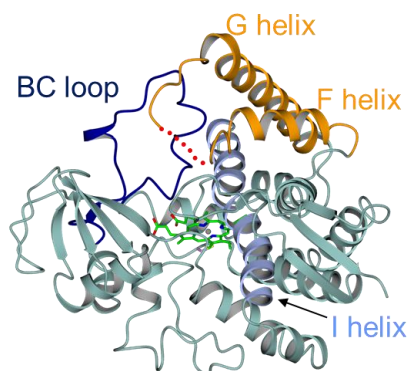


図 1 : 変異 RosC の結晶構造
Disorder 領域を赤点線で示した

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