

基質同一部位多段階酸化型シトクロム P450 酵素 RosC とその基質との複合体
構造解析Structural analysis a cytochrome P450 enzyme RosC, that catalyzed multistep
oxidation reactions, in complexed with its substrates

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 (RS) 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。さらに, RosC が触媒する 3 段階の反応のうち, 第 1 段階のみを触媒する変異体(P107S/L176Q)を取得し³⁾, その立体構造も明らかにした。本研究では, 野生型 RosC と, 3 段階の酸化反応の各基質である RS, 20-dihydrosamicin (RS-A), 20-deoxo-20-dihydrosamicin (RS-B)との複合体の立体構造を決定した。

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、精製した。これに最終濃度 0.5 mM で各基質を加え、それぞれ結晶化を行った。60%Tacsimate, pH 7.0 を沈殿剤として用いることで単結晶を得た。各結晶はいずれも空間群 C2 に属し、互いに同型であった。

得られた各結晶を用いて、いずれも分解能 2.30 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 Molrep を用い、野生型 RosC をサーチ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

3 段階酸化反応の第 1 の基質である RS-B は, デンソサミン部分がアグリコン面に対して垂直に配向し, RosC の基質結合 cavity 内に収容されるように結合していた (図 1)。基質結合 cavity の入り口に相当する FG ループにある Leu176 のカルボニル基が, デンソサミン糖の C2'位ヒドロキシル基と水素結合を形成していた (図 2a 中の青線)。Leu176 のカルボニル基は, 中性下でプロトン化して存在するデンソサミンの C3'位ジメチルアミノ基との静電相互作用にも関与していると考えられる⁴⁾ (図 2a 中の赤線)。マクロラクトン環は, BC ループおよび FG ループ, I ヘルックス上にあるアミノ酸残基と疎水性相互作用していた。また, ヒドロキシ修飾を受ける C-20 位はヘム鉄に向かって配向していた。

RosC と, 3 段階酸化反応の第 2, 第 3 の基質である RS-A と RS との結合様式は, RS-B とほぼ同様であった (図 2b, c)。その修飾部位である C-20 位のヒドロキシル基とアルデヒド基が Ser248 と水素結合を形成するとともに, ヘム鉄に向かって配向していた。

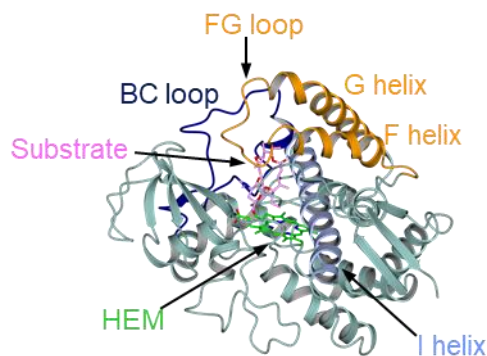
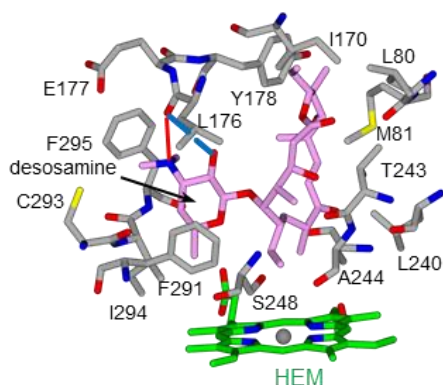
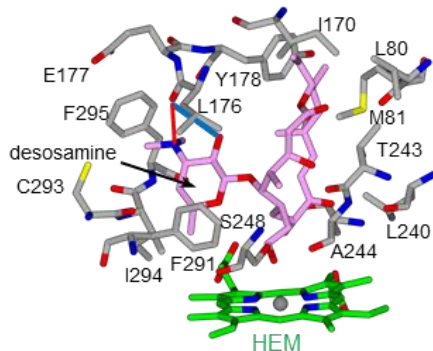


図 1. RosC と RS-B の複合体の全体構造

(a) RS-B



(b) RS-A



(c) RS

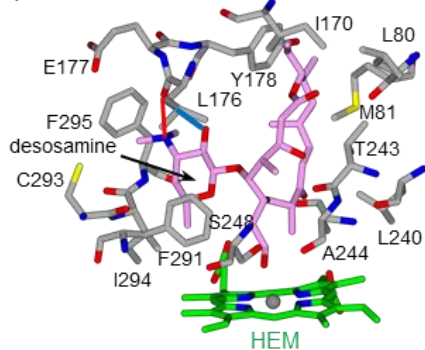


図 2. 各基質の RosC の活性部位への結合。

(a) RS-B, (b) RS-A, (c) RS. 各基質の炭素原子をピンク、基質との相互作用に関与する RosC のアミノ酸残基の炭素原子を灰色、ヘム鉄の炭素原子を緑で示した。

4. まとめ

RosC と、多段階酸化反応の各基質との複合体の結晶構造を決定した。これまでに決定したりガンドフリーの野生型および機能欠損した変異体との構造比較および、複合体間の構造比較により、単一酵素による多段階酸化反応の構造的知見を得ることができた。

参考文献

1. Y. Iizaka *et al.*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 57, 15291531 (2013).
2. Y. Iizaka *et al.*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 364, fnx110 (2017).
3. Y. Iizaka *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 105, 2647–2661 (2021).
4. D.H. Sherman *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 281, 2628947–26297 (2006).

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