

マクロライド生合成に関与するシトクロム P450 酵素 RosD の構造解析 Structural analysis of RosD, a cytochrome P450 enzyme involved in macrolide biosynthesis

鈴木浩典*, 飯坂洋平, 野口修治, 安齊洋次郎
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

シトクロム P450 酵素 (P450) は、天然物生合成において多様な酸化反応を触媒し、構造と生物活性の多様化を担っている。その優れた触媒能から生体触媒としての利用が期待され、反応性と基質特異性の制御機構の解明が重要な課題となっている。16 員環マクロライド系抗生物質 *rosamicin* の生合成には、P450 RosC と RosD が関与する^{1,2)}。RosC はこれまでに基質との複合体の結晶構造が解析され、基質同一部位の多段階酸化反応機構が明らかにとなっている³⁾。RosD は C-12/13 位のエポキシ化を触媒し、複数の生合成中間体を受容する高い基質寛容性を示す。一方、*mycinamicin* 生合成酵素 MycG は、C-12/13 位のエポキシ化と C-14 位の水酸化を触媒する多機能型 P450 として機能する。これまでに、*mycinose* が付加した *rosamicin* 生合成中間体に対し、MycG は *mycinose* を介して基質認識するのに対し、RosD では *mycinose* が基質認識を阻害することが明らかとなっている⁴⁾。両酵素は同一部位のエポキシ化を触媒するが、その基質認識機構や多機能性発現機構には相違がある。本研究では、RosD の基質認識機構の解明を目的として、その立体構造解析を行った。

2. 実験

大腸菌発現系により RosD 全長を発現・精製し、結晶化条件をスクリーニングした。25% Polyethylene glycol 3,350、0.1 M HEPES、0.2 M NaCl、pH 7.5 を沈殿剤として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 Molrep を用い、相同タンパク質である RosC の結晶構造 (PDB ID: 9VGM) 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 RosD の全体構造は、P450 に特徴的な三角プリズム型で、分子全体を貫く I helix と基質認識に関与する BC loop と FG loop 構造を確認できた (図 1)。P450 では、基質結合時の BC loop と FG loop の動的構造変化が基質寛容性と反応選択性の制御に重要な役割を果たすと考えられている。本研究で得られた RosD の単体構造は、今後の基質複合体との比較解析を行う上で重要な情報となる。現在、生合成中間体との結晶化を進めている。

4. まとめ

RosD の単体結晶の立体構造情報は、RosD の高い基質寛容性と反応制御機構の解明に向けた重要な知見を提供すると考えられるものである。

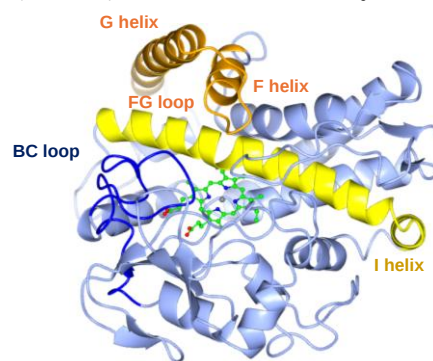


図 1. RosD の結晶構造

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* 109, 264 (2025).
4. Y. Iizaka *et al.*, *FEMS Microbiol Lett* 371, Fnae080 (2024).

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