

放線菌の filipin 生合成に関わるシトクロム P450 の結晶構造解析

○許蓮花¹、伏信進矢¹、池田治生²、若木高善¹、祥雲弘文¹

¹東大・院農・応生工、²北里大・生命研

放線菌は抗生物質生産菌として重要であるが、近年、多くの抗生物質生合成への P450 の関与が明らかとなっている。*Streptomyces avermitilis* のゲノム中には 33 個のシトクロム P450 (CYP) 遺伝子が存在する。その一部は Avermectin、Filipin、Geosmin、Pentalenolactone 生合成または未知の二次代謝経路に関わると予想されるが、ほとんどの P450 の機能に関しては未解明のままである。*S. avermitilis* の CYP105P1 はコレステロールに特異的に結合する色素である Filipin の C26 位の水酸化反応を触媒する。我々は *S. avermitilis* の P450 のうち、filipin の生合成に関わる CYP105P1 に着目し、立体構造を X 線構造解析などにより明らかにすることを研究目的とした。

S. avermitilis のゲノムから CYP105P1 をクローニングし、発現、精製、結晶化を行った。結果、CYP105P1 の基質フリー (WT-free)、および Type II リガンドである 4-phenylimidazole の結合型 (WT-4PI) の構造決定に成功した。他の P450 と同様に、CYP105P1 の WT-free 構造の BC ループと FG ループ部位は比較的高い B-factor を示した。特に、BC ループは WT-free 構造と WT-4PI 構造でそれぞれ 4 残基、11 残基 disorder していた。

WT-free 構造の BC ループ部位は特徴的な構造をしていた。N 末端側 (Ala70–His72) は一つの短い 3_{10} ヘリックスを形成し、His72 の imidazole 側鎖部分はヘムの鉄と結合していた。そこで、His72 をアラニンに変えた変異体を作製し、UV-可視吸収スペクトル測定法と EPR 法を用いて、野生型と比較を行った。その結果、野生型と変異体においてほぼ同様のスペクトルが得られ、CYP105P1 のヒスチジン結合状態は溶液中では支配的ではないことが示唆された。更に、H72A 変異体の基質フリーの構造 (H72A-free) を決定し、WT-free 構造と比較を行った。H72A-free 構造では BC ループ部分が分子の外側の方に大きく移動し、遠位側ヘムポケットの入り口が広く開いていた。Ala72 はヘム鉄から 17 Å 離れており、ヘム鉄には水分子が結合していた。この観測結果は、CYP105P1 の分光学的結果と一致している。ここで述べた CYP105P1 のリガンドフリーの構造と小さい阻害剤 (4PI) の結合構造で、三つの異なる BC ループのコンフォメーションが確認できた。これらの結果からは CYP105P1 の BC ループが溶液中で高い柔軟性をもつことが強く示唆される。可溶性 P450 が大きいマクロライド系基質をヘムポケットに受け入れる場合、入り口部分の構造的柔軟性が必要であると考えられた。