

進化工学適用前後でのビタミン D₃ 水酸化酵素の 立体構造と活性上昇の構造基盤

安武 義晃¹, 藤井 良和^{2,3}, 千 宇光¹, 西村 賢治²,
株本浩樹², 有澤 章², 田村 具博^{1,3}
(¹産総研・ゲノム, ²メルシャン・生物資源, ³北大院・農)

シトクロム P450 は、生物界に普遍的に見られるヘムタンパク質の一群であり、多くの P450 が基質化合物に対してモノオキシゲナーゼ活性を示すことが知られる。しかしながら基質となる物質は P450 分子種によって多岐に渡っており、そのため P450 の生物学的な機能は、ホルモン生合成、脂肪酸代謝、抗生物質の合成、解毒分解、薬剤代謝等、非常に広範囲に渡る。このような機能的多様性を秘めた P450 酵素は基礎・応用研究の両面から非常に興味深く、現在も様々な P450 分子種の立体構造が報告されている。

放線菌 *Pseudonocardia autotrophica* は、培地中のビタミン D₃ を水酸化ビタミン D₃ (1 α ,25(OH)₂VD₃) に変換する能力を持つ。水酸化ビタミン D₃ は骨粗鬆症等に有効な薬剤であり、現在 *P. autotrophica* によるバイオプロセスによってその生産が実際に行われている。この生体触媒を可能にしている *P. autotrophica* 由来ビタミン D₃ 水酸化酵素 (Vdh) は、ビタミン D₃ を水酸化ビタミン D₃ に変換する部位選択的連続水酸化反応を触媒することができるシトクロム P450 であるが、本酵素の *P. autotrophica* 細胞内での生理的機能は不明である。私たちはさらなる高効率バイオプロセス実現のため、進化工学的手法を用いた高活性型 Vdh 変異体 (Vdh-K1) の取得を行うと共に、野生型 Vdh および Vdh-K1 の結晶構造解析を行い、活性向上の構造的要因および基質認識メカニズムの理解を目指した。飛躍的に活性が向上した Vdh-K1 は四重変異体であり、これら全ての変異箇所は活性部位には存在しない。構造解析の結果から、これら分子全体に散らばった変異が分子の大規模な構造変化を誘導し、それによって安定な基質複合体の形成が可能になることが示唆された。