

フェレドキシンとの相互作用能が向上したシトクロム P450 変異体の構造機能解析

Structural and functional analysis of cytochrome P450 mutant improved ferredoxin-binding affinity

西岡 大樹¹、山形 理紗²、井元 紀子³、安武 義晃⁴、田村 具博^{1,4}
(¹ 北大院・農、² 北海道ハイテク、³ 八戸大・人間健康、⁴ 産総研・生物プロセス)

シトクロム P450 はオキシゲナーゼの一種であり、2つの電子を使って還元的に酸素を活性化し、不活性な炭化水素鎖に一原子酸素添加反応を触媒するヘムタンパク質である。P450 は薬剤の解毒、ホルモンの生合成、脂肪酸代謝や複雑な抗生物質の生合成等、多岐にわたる生理機能を示す。自然界では基質特異性が異なっているP450が多数存在しており、基礎・応用の面から非常に興味深い分子の一つであり、現在までに多くのX線結晶構造解析が報告されている。

私達は、組換え *Rhodococcus* 属放線菌を用いた効率的な活性型ビタミン D₃ の生産を行う為に、ビタミン D₃ 水酸化酵素 (Vitamin D₃ hydroxylase; P450 Vdh) の発現系構築や進化工学による高活性 Vdh 変異体 (Vdh-K1) の取得を行なった。Vdh-K1 は高いビタミン D₃ 水酸化活性を示し、基質結合能も大きく上昇していた。しかしながら、Vdh-K1 は野生型に比べ分子の熱安定性及び細胞内タンパク質発現量が大きく低下していた。その為、高い活性を示し、なおかつ菌体内での発現が良い Vdh 変異体の取得が望まれていた。

本研究では、Vdh とそれにカップルするレドックスパートナー蛋白質との相互作用能の向上による高活性 Vdh 変異体の取得を目指した。これまでの研究から、Vdh へ最も効率よく電子伝達を行なう事がわかっている *Acinetobacter* sp. OC4 のレドックスパートナー蛋白質であるフェレドキシン (AciB) 及びフェレドキシン還元酵素 (AciC) を用いて実験を行い、AciB が結合すると予想される Vdh の分子表面に変異を導入し、より電子の受け渡しがスムーズに進むような変異体の取得を行った。構築した変異体のうち、特に Vdh-K1 とほぼ同等の高活性を示した T107A 変異体について、基質結合スペクトルアッセイ及び AciB との相互作用解析を行ったところ、基質との結合能は野生型とほとんど変わらずに AciB との相互作用能が向上している事がわかった。そこで、T107A 変異体の活性向上の構造的要因を探るべく、X 線結晶構造解析を行なったところ、進化工学によって取得された Vdh-K1 変異体とほぼ同様な大規模な構造変化が観察された。構造変化によって Vdh 分子表面の電荷分布が大きく変化する事から、この構造変化はレドックスパートナー蛋白質との相互作用能向上に寄与している事が示唆される。