



過酸化水素で駆動するシトクロム P450SP α の反応場設計

小野田 浩宜¹、荘司 長三¹、榊原 えりか¹、渡辺 芳人²

1 名大院理、2 名大物質科学国際センター

キーワード：タンパク質結晶構造解析，シトクロム P450，基質認識システム

1. 背景と研究目的

シトクロム P450 (CYP または P450) は多くの生物種が持つヘム酵素で、生体内の還元剤 (NAD(P)H) と酸素分子を用いて有機分子を酸化する。数千を超える CYP ファミリーの中で、CYP152 ファミリーに属する P450SP α (CYP152B1)は、過酸化水素を生体内で用いる特殊な P450 だと考えられている。P450SP α は脂肪酸を特異的に酸化すると知られているが、基質認識部位に変位導入を施した P450SP α は基質特異性を失うことが示された。本実験では基質特異性を失った P450SP α 変異体の結晶構造解析を行うことで、汎用性の高い触媒反応場の構造を解明する。

2. 実験内容

測定に用いた P450SP α の変異体は、大腸菌を用いて過剰発現を行い、各種カラムを用いて精製した。14 mg/mL の P450SP α 水溶液とリザーバー溶液 (0.1 M HEPES (pH 7.0)、37% (v/v) MPD) を 1:1 で混合し、シッティングドロップ蒸気拡散法を用いて結晶化を行った。結晶に 1.12 Å の X 線を 10 秒間照射し、検出器 ADSC Q315r を用いて 180 枚の回折像を測定した。得られた回折像は iMosflm と Aimless を用いて解析し、CCP4i を用いて P450SP α 野生型の構造 (PDB: 3AWM) を分子置換することで位相決定を行い、Phenix 及び COOT を用いて精密化を行った。

3. 結果および考察

変位導入を施したアミノ酸側鎖の位置を確認できる程度の分解能で、抗凍結処理を行わなかった P450SP α 結晶の X 線回折像が得られた。一方で、グリセロール濃度 30% まで上昇させるクライオプロテクトANT処理を施した結晶はいずれも低分解能であった。空間群や格子定数は野生型の値[1]と同等の値を示した (表 1)。野生型 P450SP α の結晶構造は大腸菌由来の脂肪酸が結合した状態で得られたが、基質認識部位に変位導入を施した P450SP α の結晶構造はカルボキシル基に由来する Y 字型の電子密度や長鎖アルキル基に由来する長い電子密度が確認できなかった。変位導入により B'-ヘリックスが活性中心近傍の I-ヘリックスとの相互作用部位を失い、B'-ヘリックスの位置に変化が見られた。

構造変化によって活性中心近傍の空間が拡大したことで、リザーバー溶液中の MPD 由来の電子密度が確認された。脂肪酸認識部位への変異導入によって、脂肪酸への特異性が低下したとともに、大きい分子が活性部位に侵入できるようになった可能性も示唆された。

表 1 Aimless 統計値

空間群	$P3_121$
格子定数 a, b, c (Å)	94.5, 94.5, 114.5
α, β, γ (°)	90, 90, 120
分解能 (Å)	81.8-2.20 (2.27-2.20)
I/ σ (I)	14.9 (2.0)
CC1/2	0.999 (0.673)
完全性	100 (100)
冗長性	10.6 (10.8)

4. 参考文献

1. T. Fujishiro *et al.* *J. Biol. Chem.* **2011**, 286, 29941-29950