



過酸化水素駆動型シトクロム P450 の基質認識

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 はヘム上方のアルギニン残基が脂肪酸のカルボキシル基を認識し、脂肪酸を特異的に酸化すると知られている。本研究では、P450BM3 (CYP102A1) のヘム上方にアルギニンを導入した変異体の過酸化水素駆動機構を解明する為に、結晶構造解析に取り組んだ。

2. 実験内容

測定に用いた P450BM3 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。P450BM3 水溶液 (50 mM Tris-HCl (pH 7.4)) とリザーバー溶液 (MgSO₄, PEG800 を含む 0.1 M Tris HCl (pH 7.4)) 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。高凍結処理を行った結晶に対して 1.12 Å の X 線を 2 秒間照射し、検出器 ADSC Q315r を用いて 360 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 P450BM3 野生型の構造 (PDB: 1BU7) 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

35% のグリセロールを含むリザーバー溶液を用いて抗凍結処理を行ったサンプルは、アイスリングを含まない X 線回折像を示した。変異体結晶の空間群や格子定数は野生型と異なる値を示した。パルミチン酸の添加により分解能が向上したが、活性部位にパルミチン酸の結合は観測されなかった。アミノ酸側鎖の位置を決定するのに十分な分解能が得られたにもかかわらず、変異導入したアルギニンの位置を一義的に決定できなかった。Spring-8 で測定した高分解能の結晶構造では、アルギニン周辺に円状の電子密度が観測された。以上の結果から、変異導入したアルギニンは活性部位内で揺らいでおり、脂肪酸を固定化することが出来ないため、アルギニンの導入位置の再検討が必要であると判明した。

表 1 Aimless 統計値	AichiSR BL2S1	AichiSR BL2S1	SPring-8 BL26B1
	パルミチン酸非添加	パルミチン酸添加	パルミチン酸添加
空間群	$P2_1 2_1 2_1$	$P2_1 2_1 2_1$	$P2_1 2_1 2_1$
格子定数 a, b, c (Å)	58.5, 128.9, 147.7	58.3, 127.3, 147.7	58.7, 125.5, 146.7
α, β, γ (°)	90, 90, 90	90, 90, 90	90, 90, 90
分解能 (Å)	73.3-2.60 (2.72-2.60)	73.8-1.90 (1.93-1.90)	45.6-1.45 (1.47-1.45)
I/ σ (I)	6.9 (1.2)	10.2 (1.2)	13.9 (1.7)
cc _{1/2}	0.984 (0.555)	0.998 (0.614)	0.999 (0.663)
完全性	94.2 (86.5)	100 (99.5)	99.7 (94.7)
冗長性	6.8 (4.5)	11.9 (10.6)	14.1 (9.8)