



基質結合が引き起こすシトクロム P450BM3 の構造変化

小野田 浩宜¹、荘司 長三¹、中川 洋²、元川 竜平²、渡辺 芳人³

1 名大院理、2 日本原子力研究開発機構、3 名大物質科学国際センター

キーワード : 構造解析, X-線小角散乱, シトクロム P450, 基質認識システム

1. 背景と研究目的

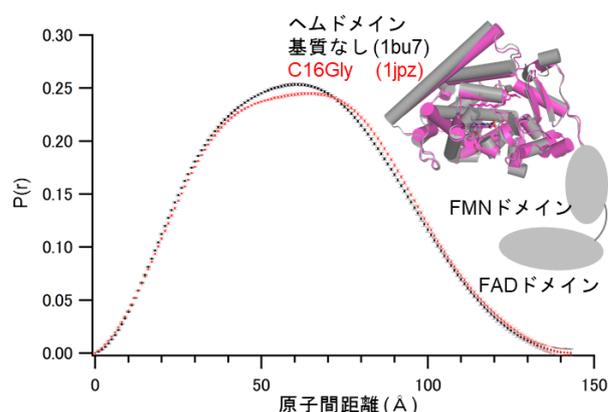
シトクロム P450BM3 は長鎖脂肪酸誘導体を効率的に水酸化するヘム酵素である。P450BM3 は P450 モノオキシダーゼ (ヘムドメイン) と P450 レダクターゼ (FMN ドメイン、FAD ドメイン) の融合タンパク質で、単結晶 X-線構造解析によって各ドメインの結晶構造が解析されている。しかし、融合タンパク質の結晶構造解析は報告されていない。私たちは酵素機能の向上を目指し、P450BM3 水溶液の X-線小角散乱測定を用いて構造解析し、基質の結合による構造変化を観測した。

2. 実験内容

測定に用いた P450BM3 は、大腸菌を用いて過剰発現を行い、Ni-アフィニティーカラム、陰イオン交換カラム、ゲルろ過カラムを用いて精製し、SDS-PAGE と DLS を用いて P450BM3 二量体の単離を確認した。単離した P450BM3 を 100 μM の基質 (*N*-パルミトイルグリシン、C16Gly) を含む水溶液で透析し、1, 2, 3, 5 mg/mL の P450BM3 を含む透析内液と P450BM3 を含まない透析外液の X 線小角散乱を測定した (測定波長: 0.92 \AA 、検出器 Pilatus 10K、検出器距離 4.0, 1.2 m、測定時間: 1 分)。P450BM3 の X-線小角散乱プロファイルは SAngler と ATSAS を用いて導出した。

3. 結果および考察

AichiSR (BL8S3) で測定した基質非結合型 P450BM3 の X-線散乱プロファイルは SPring-8 で測定した SEC-SAXS の測定結果と相似であった。1-5 mg/mL の濃度域において、P450BM3 の散乱強度は濃度に比例し、粒子間効果が見られなかったため、最も散乱強度が強い 5 mg/mL の散乱プロファイルを解析に用いた。 $q = 0.1 \text{ \AA}^{-1}$ の散乱角付近で、C16Gly の結合により P450BM3 の散乱プロファイルが変化した。ATSAS の GNOM を用いて原子間距離分布関数 $P(r)$ を求めると、最長の原子間距離 (D_{Max}) は変化しないが、一部の原子間距離と慣性半径 (R_g) の伸長は観測された (図 1)。ヘムドメインの結晶構造解析では、基質の結合により構造が変化する事が知られている¹。水溶液中の P450BM3 二量体の構造も C16Gly の結合によって変化した。DAMMIN 及び GASBOR を用いて *ab initio* モデリングを行い、 $\chi^2 = 1.3$ 程度のビーズモデルが得られた。現在、散乱プロファイルによる構造評価を採用した ClusPro サーバーのタンパク質タンパク質ドッキングシミュレーションと SREFLEX、MD シミュレーションを複合的に用い、高分解能な構造解析に取り組んでいる。



	R_g (\AA)	$I(0)$	D_{Max}
基質なし	47.8	240	143
100 μM C16Gly	48.4	243	143

図 1 基質添加による原子間分布関数の変化

4. 参考文献

1. K. Suzuki *et al. Catal. Sci. Technol.* **2017**, *7*, 3332-3338