



## CYP102A1 モノオキシゲナーゼの基質誤認識機構解明

小野田 浩宜<sup>1</sup>, 米村 開<sup>1</sup>, 荘司 長三<sup>1</sup>, 渡辺 芳人<sup>2</sup>  
 1 名大院理, 2 名大物国センター

キーワード：タンパク質結晶構造解析, シトクロム P450, 基質誤認識システム

### 1. 背景と研究目的

生物は目的の分子を効率的に生合成するために酵素を用い、酵素の反応場は効率的な触媒反応を引き起こす為に高度に設計されている。シトクロム P450 (CYP) は多くの生物種が持つヘム酵素で、生体内の還元剤と酸素分子を用いて有機分子を酸化する。数千種存在する CYP ファミリーの中で、CYP102 ファミリーに属する P450BM3(CYP102A1)は、最も高い一原子酸素添加能を示す。CYP102A1 は脂肪酸を特異的に酸化すると知られているが、脂肪酸疑似分子を加えた CYP102A1 は基質特異性を失った。本実験では CYP102A1 の酸化反応触媒中心であるヘムドメイン (CYP102A1H) と基質疑似分子の共結晶構造解析を行うことで、基質疑似分子の結合様式を調べた。

### 2. 実験内容

測定に用いた CYP102A1H は大腸菌を用いて過剰発現を行い、陰イオン交換カラムとサイズ排除カラムを用いて精製した。各種基質疑似分子 (No. 70、119、120) を溶解した CYP102A1H 水溶液 (50 mM Tris-HCl (pH 7.4)) とリザーバー溶液 (MgSO<sub>4</sub>、PEG8000 を含む 0.1 M Tris-HCl (pH 7.4)) をマイクロチューブ内で混合し、シーディングバッチ法を用いて結晶化を行った。高速凍結処理を行った CYP102A1H の結晶に対して、1.12Å の X 線を 1°当たり 8 秒から 30 秒照射し、検出器 ADSC Q315r を用いて、180°以上回転させながら X 線回折像を測定した。得られた回折像は iMosflm と Aimless を用いて解析し、CCP4i を用いて CYP102A1H の構造 (PDB:3WSP) を分子置換することで位相決定を行い、Refmac5、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。添加した基質疑似分子によって、結晶の大きさや形状は異なったが、空間群と格子定数に大きな変化は見られなかった。分子置換法によって位相を決定した電子密度において、CYP102A1H の活性部位中に、対応する基質疑似分子の電子密度を確認できた。

表 1 Aimless 統計値

化合物 No.	70	119	120
空間群	<i>P</i> 2 <sub>1</sub>	<i>P</i> 2 <sub>1</sub>	<i>P</i> 2 <sub>1</sub>
格子定数 a, b, c (Å)	58.7, 145.6, 63.3	58.6, 147.8, 63.6	58.5, 147.1, 64.4
$\alpha, \beta, \gamma$ (°)	90.0, 96.9, 90.0	90, 98.2, 90	90, 99.9, 90
分解能 (Å)	47.58-2.05 (2.10-2.05)	73.8-2.10 (2.15-2.10)	73.55-2.55 (2.66-2.55)
I/ $\sigma$ (I)	10.7 (1.7)	6.7 (2.7)	5.5 (1.6)
cc <sub>1/2</sub>	0.997 (0.604)	0.985 (0.826)	0.974 (0.530)
完全性	98.9 (97.8)	95.1 (80.9)	99.9 (100)
冗長性	3.4 (3.3)	3.0 (2.6)	4.2 (4.0)