



基質同一部位多段階酸化型シトクロム P450 酵素 RosC の結晶構造解析

鈴木浩典
東邦大学薬学部

キーワード：シトクロム P450 酸化酵素，合成生物学

1. 背景と研究目的

微生物由来のシトクロム P450 酵素 (P450) は 20 種類以上の酸化反応を触媒し，天然化合物の生合成に深く関与する。放線菌が生産するマクロライド系抗生物質 *rosamicin* の生合成に関与する RosC はラクトン環 C-20 位のヒドロキシ化，アルコール酸化，アルデヒド酸化の 3 段階の酸化反応を触媒する。一般的な P450 は基質を 1 回のみ酸化修飾するのに対し，RosC は基質同一部位の多段階の酸化修飾を可能とする。単一酵素でありながら酸化反応を複数回触媒する RosC のような酵素は，抗生物質をはじめとする天然物の構造と生物活性の多様性を生み出す魅力的な酵素であり，そのメカニズムの解明は生物学的な興味だけでなく，P450 を利用した合成生物学への応用も期待できる。本申請では，そのメカニズムを構造科学的に解明することを目指している。

2. 実験内容

大腸菌で発現させた RosC を精製し，結晶化スクリーニングを実施した。結晶化は，シッティングドロップ蒸気拡散法により行った。その結果，PEG3350 を沈殿化剤とする結晶化条件において，外形上良質な結晶を 2 種類 (A 型，B 型) 得ることができた。得られた結晶を抗凍結剤に浸漬し，急速凍結した後，結晶の質の評価および X 線回折強度データ収集を BL2S1 ($\lambda=1.1200 \text{ \AA}$) にて行った。

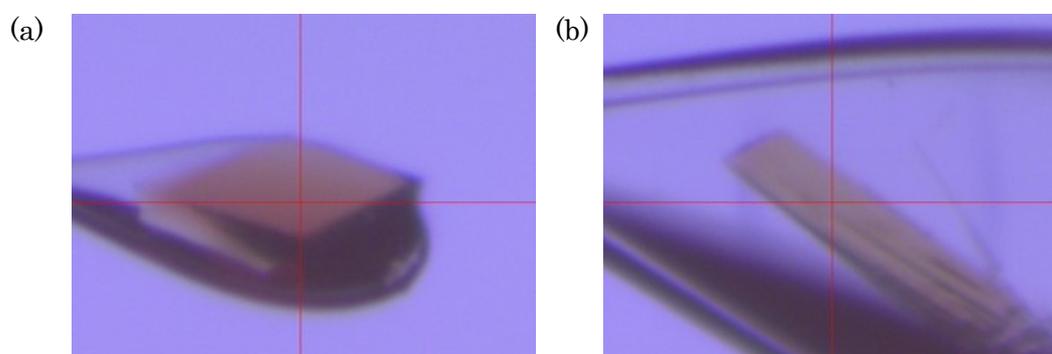


図 1. RosC 結晶 (a) A 型結晶，(b) B 型結晶

3. 結果および考察

X 線回折実験の結果，A 型結晶は 7–8 \AA 程度の分解能を与える結晶であった。B 型結晶は最高分解能として 2.7 \AA 程度の回折点が認められた。統計処理の結果，3.2 \AA のデータセットを得ることができた。今後は，各種プログラムを用いて立体構造解析を行う予定である。しかし，外形上は A 型または B 型と思われる結晶であっても，その多くが質に問題があることがわかり，回折像を得ることができなかった。得られたデータセットも求める分解能にはほど遠いため，結晶化条件の最適化，新たな結晶化条件の探索，結晶の持ち運び，クライオ条件の検討などを試みる。