

博士論文

放線菌 *Streptomyces avermitilis* 由来 P450 の 構造機能解析

東京大学大学院農学生命科学研究科

応用生命工学専攻 酵素学研究室

平成 18 年度博士課程進学 許蓮花

指導教員 祥雲弘文

目次

略語表	
序章 シトクロム P450	1
本文	2
図表	12
参考文献	26
第一章 <i>Streptomyces avermitilis</i> 由来 CYP105P1 の機能構造解析： 構造的柔軟性及びヒスチジン結合型	29
序	30
材料と方法	30
結果	42
考察	51
図表	54
参考文献	76
第二章 <i>Streptomyces avermitilis</i> 由来 CYP105P1 の構造機能解析： 複合体の構造	79
序	80
材料と方法	81
結果と考察	85
図表	92
参考文献	111
第三章 <i>Streptomyces avermitilis</i> 由来 CYP105D6 の機能構造解析	113
序	114
材料と方法	114
結果と考察	120
図表	125
参考文献	136
第四章 <i>Streptomyces avermitilis</i> 由来 CYP105D7 の機能解析	137
序	138
材料と方法	138
結果と考察	144
図表	150
謝辞	162

略語表

FAD	flavin adenine dinucleotide
FMN	flavin mononucleotide
SRS	substrate recognition site
SAV	<i>Streptomyces avermitilis</i>
PDB	Protein Data Bank
P450nor	cytochrome P450 NO reductase
PCR	Polymerase Chain Reaction
DMSO	dimethyl sulfoxide
LB	Luria-Bertani
IPTG	isopropyl 1-thio- β -D-galactoside
OD	optical density
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
Tris	tris (hydroxymethyl) aminomethane
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatograph
BCA	bicinchoninic acid
BSA	bovine serum albumin
CBB	coomassie brilliant blue
SDS-PAGE	SDS ポリアクリルアミド電気泳動
TLC	Thin-Layer Chromatography
HPLC	High performance liquid chromatography
KEK	高エネルギー加速器研究機構
PF	シンクロトロン放射光実験施設
MAD	multiple wavelength anomalous dispersion (多波長異常分散)
MIR	multi- heavy atom isomorphous replacement (多重重原子同型置換)
CCD	charge-coupled device
EPR	Electron Paramagnetic Resonance
WT	wild type
RMSD	Root Mean Square Distance
MES	2- (N-morpholino) ethanesulfonic acid
PEG	Polyethylene Glycol
PEGMME	Polyethylene Glycol Monomethyl Ether

序章 シトクロム P450

シトクロム P450 とは

シトクロム P450 (以下 P450) は細菌から高等生物に至る生命に普遍的に存在する一群のヘムタンパク質の総称である。P450 スーパーファミリーは一つの祖先型遺伝子が無数に分岐進化し、著しい機能分化とそれに伴う分子多様性を獲得して形成された。P450 はその還元型ヘムに一酸化炭素 (CO) が結合した形でソーレー (soret) 吸収帯 (ヘムタンパク質に特徴的で強い吸収をもつ) ピークを 450 nm にもつ (Pigment 450) (図 1)。P450 という名称は、この極大吸収の吸収波長に由来して、名付けられた。P450 は一原子酸素添加酵素 (モノオキシゲナーゼ) として働くことが多いが、触媒する反応の種類は驚くほど多彩であり、水酸化反応、エポキシ化反応、脱メチル反応など、そのタイプは 30 近くにのぼる (図 2)。P450 の生理機能も多彩で、薬物 (毒物) 代謝、ステロイドホルモン・胆汁酸合成、二次代謝などはよく知られる。

P450 の分子的性質

P450 の特徴である一酸化炭素結合物の 450 nm の吸収スペクトルはプロトヘムの第五配位座に P450 タンパク質のシステイン残基の-SH 基がイオン化したチオレートアニオン ($-S^-$) が配位していることによる (図 3)。このシステイン残基の前後のアミノ酸配列はすべての P450 についてよく保存されており“ヘム結合領域”と呼ばれている。塩基配列から推定されるアミノ酸配列にこの配列が見つかり、その DNA は P450 をコードしている遺伝子と見なされる。

動物、植物、酵母などの真核生物の P450 は細胞内で小胞体またはミトコンドリアに存在する膜タンパク質であるが、原核生物である細菌の P450 は水溶性で細胞質に存在する。ミクロソーム型およびミトコンドリア型の P450 は 500 前後 (490~520 程度) のアミノ酸からなり、ミクロソーム型ではアミノ末端の 20~30 のアミノ酸残基からなる疎水性領域が膜への結合に関与している。ミトコン

ドリリア型 P450 は内膜のマトリックス側に結合しているが、P450 分子の膜結合部分はまだ明らかになっていない。細菌の水溶性 P450 は一般に真核生物の P450 よりも分子量がかなり小さく 400 前後のアミノ酸からなる。しかし、すべての P450 について数ヶ所の共通した保存アミノ酸配列が存在しタンパク質の立体構造も極めて類似しているため、真核生物の P450 も原核生物の P450 も同一の共通祖先遺伝子に由来すると考えられている。

P450 の分類・命名

P450 はこれまでに、自然界において 4500 以上もの分子種が発見されており、大きな酵素ファミリー (E.C.1.14.-) を形成している (<http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html>)。

公認されたこの分類法において、P450 スーパーファミリーに属する遺伝子は共通の接頭辞 CYP ではじまり、それに続くファミリー番号、サブファミリー記号、遺伝子番号によって区別される。例えば *CYP105P1* では、105 がファミリー番号、P がサブファミリー記号、1 が遺伝子番号である。アミノ酸配列が 40% 以上一致すれば同一ファミリーに、55% 以上一致すれば同一サブファミリーに分類されるのが規則である。ただし、生理活性が明らかになっている P450 については触媒する反応や基質を示す慣用名も常用されている。例えば、一酸化窒素 (NO) を亜酸化窒素 (N₂O) に還元する反応を触媒する P450 の遺伝子は *CYP55A1*、タンパク質は CYP55A1 と書かれるが、慣用的には P450_{nor} と呼ばれる。

シトクロム P450 の電子伝達系構成成分

P450 は主にモノオキシゲナーゼとして機能するが、この反応には分子状酸素の存在とともに、へムに結合した酸素分子を活性化するための還元力の供給が必要である。還元力は一般に、NADPH から電子伝達酵素を通して P450 に供給

される[1] [2] (図 4)。その際、ミクロソーム型の P450 (真核生物の小胞体に存在) では FAD と FMN を含む NADPH-P450 還元酵素が、NADPH から受け取った二電子を、一電子ずつに分け、P450 に電子を渡す。一方、原核生物、ミトコンドリアに存在する P450 では FAD を含む NADPH-フェレドキシン還元酵素と、鉄-硫黄タンパク質であるフェレドキシンが NADPH から受け取った二電子を一電子ずつに分け、P450 への電子伝達を行う。ミクロソーム型の P450 においては NADH あるいは NADPH からシトクロム b5 を経由して P450 に電子が伝達される経路もある。いずれの場合も、NAD(P)H からの 2 電子は還元酵素あるいはフェレドキシン経由で 2 回に分けて P450 に渡される。

P450 の基質誘導スペクトル変化

P450 の基質は一般的に疎水性に富み、酵素反応に際して、酸素が結合する第六配位子側に、酸素が挿入されるべき疎水性部分をへム鉄に向けて適切な距離に配置されなければならない。そのため P450 (酸化型) に基質が結合すると、第六配位座にある水分子は“押しのけられて”動くことが多く、それを吸収スペクトルで見るとスピン状態の変化として観察される。即ち、P450 に基質が結合すると、低スピン型 (O-配位型) スペクトルから高スピン型 (五配位型) スペクトルへの変化がみられる (図 5)。基質の添加により生じるこのようなスペクトル変化を「基質誘導スペクトル変化」と呼ぶ。

酸化型 P450 の吸収スペクトルは、①418 nm 付近に鋭いソーレー帯の極大を持つ場合と、②393 nm 付近に幅の広いソーレー帯の極大を持つ場合を典型とするが、③両者の中間を示すものもかなり多い。①を低スピン型、②を高スピン型、③を混合スピン型と呼び、へム鉄の電子状態を意味している (図 1)。P450 のへム鉄に対する軸配位子は、第五配位子は必ず近位のシステインが提供する S-(チオレートアニオン) になっており、もう一方 (遠位側) は空である場合 (五配

位型) と多くの場合である水の酸素原子が第六配位子になっている場合 (O-配位型) が典型であり、P450 のスピン型を配位子の状態から見ると、大まかには五配位型が高スピン型、O-配位型が低スピン型にあたる (図 3、図 5)。

五配位型 (基質結合型) への変化を差スペクトルとして観察すると、390 nm 付近の山と 420 nm 付近の谷になる Type I スペクトル変化、山と谷が逆になる Reverse Type I スペクトル変化、425 nm 付近が山になり、400 nm 前後に谷が出る Type II スペクトル変化がある (図 6)。いずれのタイプになるかは、加える化合物と添加前の状態による。P450 に対し Type I スペクトル変化を与えるリガンドを Type I リガンドと呼び、Type II スペクトル変化を与えるリガンドを Type II リガンドと呼ぶ。たいていの P450 の基質は Type I リガンドである。本研究で対象とした CYP105P1 と CYP105D6 の基質である filipin I も Type I リガンドである。Type II リガンドの特徴は、その化合物内に N 原子を持ち、ヘムに対して、孤立電子対を配位させることにある。イミダゾール類など、P450 の阻害剤となるものが、Type II リガンドとなる。

P450 の触媒反応サイクル

P450 は、代表的反応である水酸化反応以外にも図 2 で示すようなさまざまな酸化反応を触媒する。酸素添加反応を触媒する機構については 1971 年に Estabrook らによって、“cyclic reaction mechanism”が提案され[3]、今まで発展してきた。提唱されている P450 の触媒サイクルを図 6 で示す[4]。

1. 基質が活性中心に結合すると、第六配位座にある水分子は押しよけられて、低スピン型 (O-配位型) スペクトルから高スピン型 (五配位型) スペクトルへの変化が見られる。つまり、上で述べた Type I スペクトル変化が確認できる (図 6 の挿入図)。
2. 基質結合によって、P450 の酸化還元電位が上昇して還元されやすくなり、

シトクロム P450 還元酵素を介して NAD(P)H から電子 (e^-) 一個を受け取って、基質の複合体を生ずる。それに伴いヘム鉄 Fe^{III} から Fe^{II} になる。

3. ヘム鉄 Fe^{II} が生成すると、直ちに酸素分子がヘム鉄 Fe^{II} に結合し、オキシ付加体 ($Fe^{III}-O-O\cdot$) が形成される。
4. オキシ付加体は比較的安定な化学種であるが、時間とともに配位しているスーパーオキシド ($O-O\cdot$) が脱離して Fe^{III} 状態のヘムが生成する自己酸化が起こる。シトクロム P450 の反応サイクルでは、自動酸化が進行する前に 2 回目の一電子還元反応が進行する。この 2 つめの電子の供給により、配位しているスーパーオキシドがペルオキシド (O_2^-) になる。
5. 酸素がプロトンと相互作用して $Fe^{III}-O_2^-\cdots H^+$ の状態になるが、水溶液系では $Fe^{III}-O_2^-\cdots H^+$ の段階で反応が止まらずに、 $Fe^{III}-O-O-H$ (compound 0) を経て O-O 結合が不均等開裂を起こし、酸化活性種であるポルフィリン π -カチオンラジカル $Fe^{IV}=O$ (compound I) が生成すると考えられている[5]。
6. Compound I はペルオキシダーゼやカタラーゼなどで観測されている反応活性種である。この反応活性種が基質に酸素添加反応を行い、休止状態へと戻る。

P450 の分子構造

1. 全体構造

Pseudomonas putida の P450cam は最初に構造解析がなされ、1985 年初めて結晶構造が報告された[6]。以来 20 年の間に、数十種類の P450 の結晶構造が報告された。

すべての P450 の全体構造は、比較的 β シートの多い領域と α ヘリックスの多い領域よりなり、1 辺 60 Å、厚さ 30 Å の三角形おむすび型をしている (図 7)。酵素反応の活性中心であるヘムは、分子全体のほぼ中央、三角形の面に平行に

位置しており、溶媒領域とは直接接触していない。ヘム鉄には、2.2~2.3 Å の結合距離で第五配位子の Cys チオレート (S⁻) が配位している。ヘム面に対して第五配位子の反対側の部位は鉄の第六配位座であり、ここには水 (H₂O) や酸素 (O₂) などの分子が外部配位子として結合する部位である。第六配位座の斜め上、分子全体を右上から左下に貫くように長い I ヘリックスが存在している。その I ヘリックスにかぶさるように V 字型をした F、G ヘリックスが存在する。以上の構造上の特徴は、今まで報告されたすべての P450 に見られ、“P450-fold”とも命名されている。

2. 基質及び配位子結合部位

全体構造は基本的に類似であるが、今まで報告されているすべての P450 の結晶構造を重ね合わせてみると、B' (B ヘリックスと C ヘリックスの間にあるヘリックス)、F、G ヘリックスの構造に大きな相違が観測される。さらに、B' ヘリックス、ならびに F、G ヘリックスをつなぐループ部分 (FG ループ) は温度因子が高く、分子構造上でゆらぎの大きい部位である。以上のことから、これらの部分は、P450 による基質認識や、基質および配位子の結合の際の P450 の動的構造と関連していると考えられている。すなわち、これらの部位の構造多様性が、P450 の機能多様性と密接に関連している。

ヘムポケットに入った基質は P450 に認識され結合するが、その基質認識部位 (SRS) は一次構造比較より特定されている。SRS は三次構造上では、①BC ループ部位 (B'ヘリックスとその周辺)、②F ヘリックスの C 末端側、③G ヘリックスの N 末端側、④I ヘリックスの N 末端側半分程度、⑤β1-4、⑥β4-1 と β4-2 の間のターン部分に対応する (図 8)。今まで、P450cam [7]、P450eryF [8]、P450BM3 [9]、P450nor [10]などの基質結合型の構造が解かれているが、確かにこれらの部分の多くは基質と接触している。これらの部位は、P450 間でもっとも構造多様性が見られる

部位とほぼ一致しており、P450 の反応多様性を決めている大きな構造要因の一つである[11] [12]。SRS の二つの多様性の高い部位、BC ループ (SRS-1) 部位と FG ヘリックス (SRS-2、SRS-3) 部位は基質結合ポケットの入り口を形成していて、基質認識及び結合にもっとも関わっていると考えられている (図 7)。

放線菌 (Actinomycetes) の P450

放線菌とは形態 (菌糸と放線状のコロニーを形成) から命名された微生物群であるが、その名 (ray fungi) のように初めはカビ (菌はカビを意味する) の一種であると思われていた。典型的な放線菌は *Streptomyces* 属であるが、遺伝子配列に基づく現代の分類では結核菌やジフテリア菌など、典型的な形態をとらない細菌も数多く放線菌の仲間となっている。放線菌はゲノムサイズが大きく、*Streptomyces* 属放線菌では、染色体が線状でテロメア構造をもつ (真核生物の特徴) など、原核生物の中ではもっとも高等な生き物であるとされる。二次代謝とは、エネルギー代謝やアミノ酸・核酸合成などのように普遍的な、生存に必須の一次代謝に対比される物質合成代謝である。二次代謝の多くは種特異的であり、植物と微生物で見られ、そこには無数の P450 が関与する。二次代謝の意義は生存競争を勝ち抜くことにある。その典型的な例が“植物と動物の戦争”に見られる。植物は動物からの補食を逃れるため毒を合成し (合成酵素 P450)、動物はその毒で死なないように解毒酵素 P450 を発展させた。進化の歴史において両者は P450 を共通の武器にして戦ってきた。放線菌には抗生物質などの毒の合成 (CYP107 など) と解毒 (CYP105 など) の両方に使われる P450 が見られる。このことは土壌など放線菌の生存環境における生存競争の厳しさを反映しているのかも知れない。放線菌の P450 としては除草剤を代謝する P450SU1 (CYP105A1) および P450SU2 (CYP105B1)、大豆粉で誘導される P450soy

(CYP105D)、抗生物質エリスロマイシン生合成に関わる P450eryF (CYP107)、高コレステロール血症治療薬プラバスタチンの変換にかかわる P450sca、等が古くから知られている。

近年のゲノム解析の成果は放線菌の P450 研究分野に新局面をもたらした。細菌 1 個体のもつ P450 は真核生物に比べて少ないことが予想されたが、近年多くの放線菌のゲノム解析が終了し、*S. avermitilis* (33 種) [13]、*S. griseus* (27 種) [14]、*Saccharopolyspora erythraea* (36 種) [15]、結核菌 (放線菌の仲間) *Mycobacterium tuberculosis* (20 種) [16]、などは多くの P450 遺伝子をもつことが明らかになった (表 1)。このように、放線菌は多数の P450 を有しているが、まだそのほとんどに関して機能解析が成されていないのが現状である。

P450 による酵素反応は実に多彩で、モノオキシゲナーゼ反応以外にもさまざまな活性が見出されている[17]。基質の分子内架橋や二量体化などを伴う酸化的カップリング反応もその一つで、古くは植物や酵母 (胞子成分であるジチロシンの合成) で知られていた。放線菌の二次代謝ではそのような反応がよく見られる。*Amycolatopsis orientalis* の vancomycin 合成に関わる P450 である OxyA, OxyB [18]、および OxyC [19]、色素生産に関わる *S. coelicolor* の CYP158A2[17] [20]、抗がん剤に用いられるインドロカルバズール骨格形成に関わる CYP245A1 (P450StaP) [21]などがその例である。これらの酸化的カップリング反応機構は不明なことが多いが、おそらくはモノオキシゲナーゼ反応ではなく、ペルオキシダーゼ様反応あるいはカチオン機構が考えられている。X 線結晶構造が解かれた放線菌 P450 としては、上記の P450 以外に P450MoxA [22]、P450PikC [23]、CYP105A (P450SU1) [24]などがある。

CYP105 ファミリー

CYP105 ファミリーの酵素は放線菌で頻繁に発見され[25]、カビの P450nor

(CYP55A1) に系統的に最も近いことから、カビは P450_{nor} を細菌から水平遺伝子伝達により獲得したと予測している。P450_{nor} はもともと特殊な P450 の一つで、カビの脱窒で NADH から直接電子を受け取り、一酸化窒素 (NO) を一酸化二窒素 (N₂O) に還元する反応を触媒する[26] [10]。今まで、二つの CYP105 ファミリーの酵素の結晶構造、P450 MoxA と P450 SU-1 (CYP105A1)の構造が報告された[24] [22]が、それらの生理学的役割は未だに不明なままである。一方、CYP105 ファミリー酵素の多種多様な合成物に対する水酸化能力はいろいろな応用にかんがりの関心を引きつけている。

***S. avermitilis* の P450**

抗寄生虫薬 Avermectin の生産菌として有名な放線菌 *S. avermitilis* は 2003 年ゲノム解析が完了し、33 個の P450 遺伝子を持つことが明らかになった (表 2、図 9) [27]。そのうち 11 個の P450 (CYP105D6、CYP105P1、CYP171A1、CYP178A1、CYP180A1、CYP107Y1、CYP181A1、CYP107W1、CYP183A1、CYP158A3、CYP05R1) に関してはそれらの遺伝子の配置から二次代謝産物の生合成に関わる[28]と予測される。CYP105D6 と CYP105P1 はフィリピンの生合成遺伝子群、CYP171A1 はエバーメクチンの生合成遺伝子群、CYP180A1 はジオスミンの生合成遺伝子群、CYP107W1 はオリゴマイシンの生合成遺伝子群、CYP183A1 はペントレノラクトン生合成遺伝子群に位置していて、それぞれ相応する抗生物質の生合成に関わっていると予想される。この中でペントレノラクトン生合成に関わる遺伝子の研究が最近進んでおり、CYP183A1 の機能解析が行われ、ペントレノラクトンの酸化反応を触媒することが明らかにされている[29]。一方、CYP183A1 以外の P450 遺伝子に関しては、それらの生理的役割や触媒反応機構はまだほとんど明らかになっていない。

S. avermitilis のゲノム中で、CYP105P1 (*PteC*、SAV413) と CYP105D6 (*PteD*、

SAV412) をコードする遺伝子はポリケチドシンターゼ (*pteA1-pteA5*)、ferredoxin (*fdxI, pteE*)、推定亜鉛結合デヒドロゲナーゼ (*pteB*) 遺伝子とともに filipin 生合成遺伝子群含まれている[30](図10)。近年、共同研究者の池田らによって、CYP105P1とCYP105D6は、応用面で重要な色素である filipin のC26位とC1'位の水酸化反応を触媒することが *in vivo* で明らかにされた (図11) (未発表データ)。CYP105D7はDiclofenac (非ステロイド性抗炎症薬)、Tolbutamide (糖尿病治療薬)、Lauric acid (飽和脂肪酸)、Testosterone (ステロイドホルモン)、Carbazole (複素環式化合物)、Compactin (コレステロール降下薬)、Milbemycin (心臓疾患治療薬) など、さまざまな化合物の水酸化、脱メチル化反応を触媒し、基質特異性が非常に低いことも近年明らかになった (H. Ikeda et al., 未発表データ) (図12)。しかし、CYP105D7の *in vivo* における機能はまだ不明で、その機能解析はとても困難である。一方、基質特異性の異なるCYP105D6とCYP105D7 (56.6%のアミノ酸相同性) の構造比較は大変興味深く、その成果は、ドラッグデザインや有用酵素への改変など、工業利用への応用が期待できる。

本研究の目的

本研究では *S. avermitilis* 由来 P450 のうち、filipin 生合成にかかわる CYP105P1、CYP105D6、及び工業利用への応用が期待できる CYP105D7 に着目し、それらの遺伝子のクローニングと発現、精製を行い、*in vitro* での基質結合および触媒活性を確認し、さらに、結晶化と構造解析を行い、基質認識機構と基質特異性の解明を目指した。

表 1 放線菌ゲノム上の P450 遺伝子数

放線菌名	ゲノムサイズ(MB)	発表年	P450 遺伝子数
<i>Streptomyces griseus</i> IFO 13350	8.5	2008 ^[14]	27
<i>Streptomyces peucetius</i>	8.7	2004 ^[31]	19
<i>Streptomyces avermitilis</i> MA-4680	9.0	2003^[30]	33
<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	8.7	2002 ^[32]	18
<i>Saccharopolyspora erythraea</i> NRRL 2338	8.2	2007 ^[15]	36
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	4.4	1998 ^[16]	20
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	2.5	2003 ^[33]	—
<i>Noardia farcinica</i> IFM 10152	6.3	2004 ^[34]	26
<i>Rhodococcus jostii</i> RHA1	9.7	2006 ^[35]	25

本研究の研究対象は太字で示す。

表 2 *S. avermitilis* 由来の P450

ID	Start	End	Gene	Note
SAV109	125995	127230	<i>cyp1</i>	CYP154A2
SAV412	495737	494487	<i>pteD</i>	CYP105D6, filipin gene cluster
SAV413	497482	496283	<i>pteC</i>	CYP105P1, filipin gene cluster
SAV575	729997	726776	<i>cyp2</i>	CYP102D1
SAV584	737312	738511	<i>cyp3</i>	CYP147B1
SAV838	992719	991484	<i>cyp4</i>	CYP178A1
SAV941	1171000	1169630	<i>aveE</i>	CYP171A1, avermectin gene cluster
SAV1171	1461257	1460052	<i>cyp5</i>	CYP107F2
SAV1308	1618128	1616797	<i>cyp6</i>	CYP154D1
SAV1611	1978527	1977286	<i>cyp7</i>	CYP105Q1
SAV1987	2426744	2425563	<i>cyp8</i>	CYP107L2
SAV2061	2511890	2510664	<i>cyp9</i>	CYP179A1
SAV2165	2638738	2640003	<i>geoC</i>	CYP180A1, geosmin gene cluster
SAV2377	2902815	2901616	<i>cyp10</i>	CYP107Y1
SAV2385	2910356	2911516	<i>cyp11</i>	CYP181A1
SAV2806	3448770	3447322	<i>cyp12</i>	CYP182A1
SAV2894	3554746	3555960	<i>olmB</i>	CYP107W1, oligomycin gene cluster
SAV2999	3755792	3757141	<i>cyp13</i>	CYP183A1, pentalenolactone gene cluster
SAV3031	3790131	3788761	<i>cyp14</i>	CYP170A2
SAV3519	4355043	4353631	<i>cyp15</i>	CYP107V1
SAV3536	4376290	4377663	<i>cyp16</i>	CYP107U2
SAV3704	4584481	4583057	<i>cyp17</i>	CYP154B2
SAV3881	4795018	4796253	<i>cyp18</i>	CYP157A2
SAV3882	4796250	4797452	<i>cyp19</i>	CYP154C2
SAV4539	5543376	5544593	<i>cyp20</i>	CYP107P2
SAV5111	6206060	6207481	<i>cyp21</i>	CYP184A1
SAV5841	7049112	7047868	<i>cyp22</i>	CYP125A2
SAV6249	7508111	7509277	<i>cyp23</i>	CYP107X1
SAV6706	8020473	8021933	<i>cyp24</i>	CYP157C2
SAV7130	8491421	8490207	<i>cyp25</i>	CYP158A3
SAV7186	8561604	8560411	<i>cyp26</i>	CYP105R1
SAV7426	8859127	8857613	<i>cyp27</i>	CYP102B2
SAV7469	8895853	8897103	<i>cyp28</i>	CYP105D7

本研究の研究対象は太字で示す。

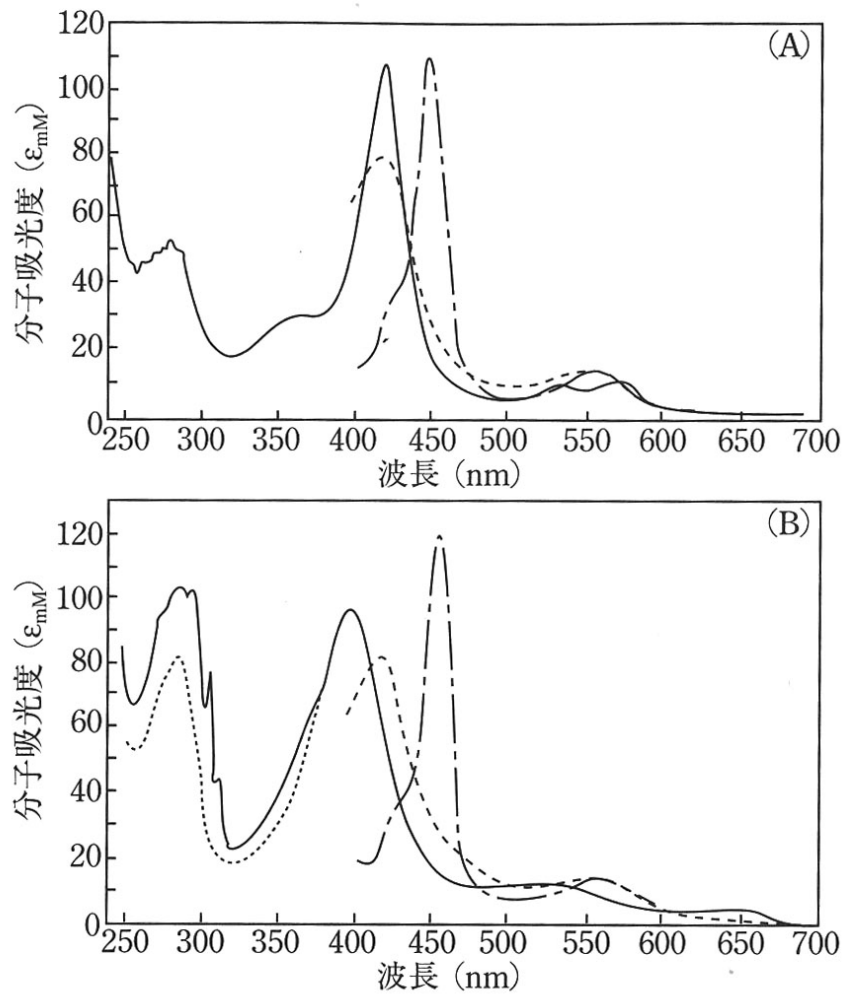


図1 P450の典型的な低スピン型と高スピン型のスペクトル

A : CYP2B4 (典型的な低スピン型)、B : CYP1A2 (典型的な高スピン型)

実線及び点線 : 酸化型、破線 : 還元型、鎖線 : CO 結合物

『P450の分子生物学 講談社 p26』より引用。

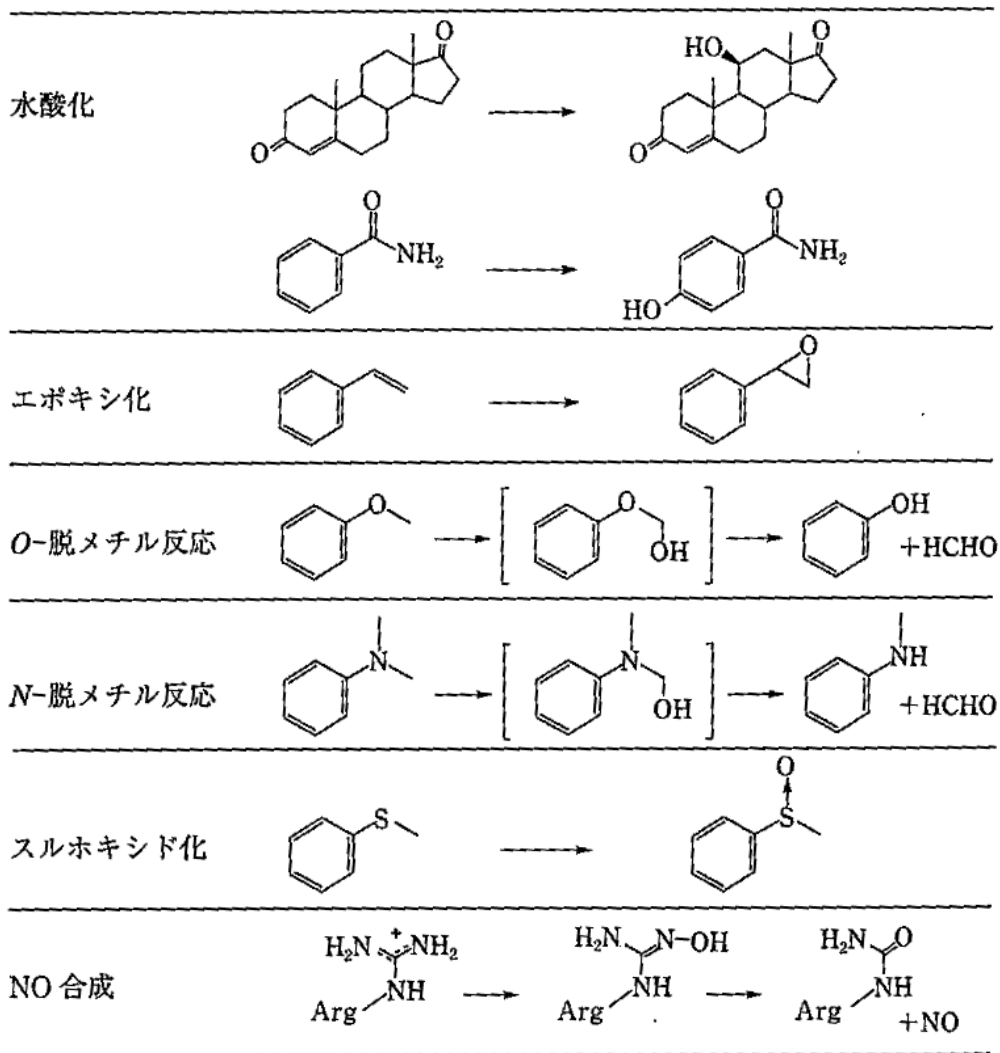


図 2 P450 による代表的酸化反応

『P450 の分子生物学 講談社 p58』より引用。

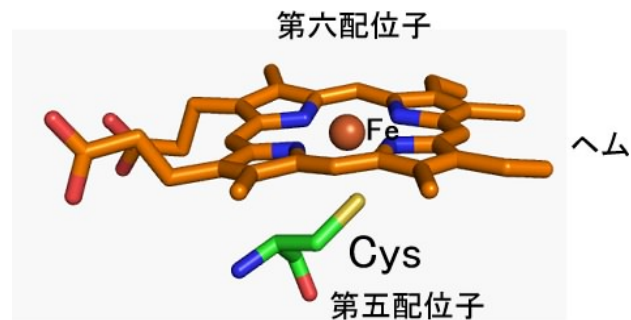
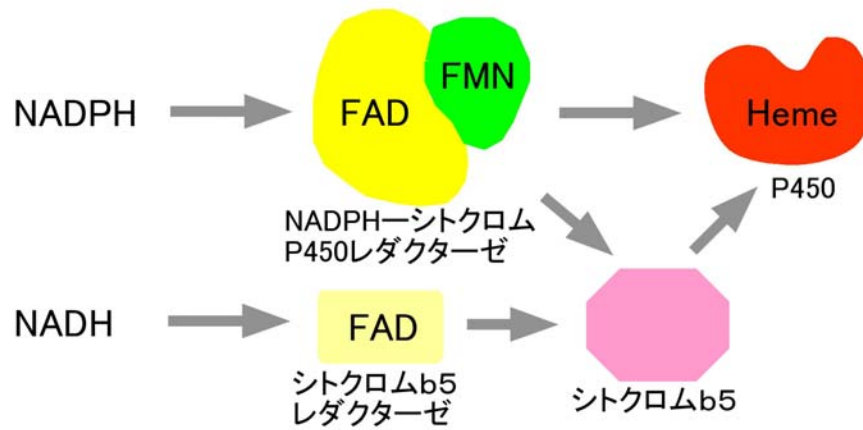


図3 P450 のへムと軸配位子（第五配位子と第六配位子）

すべての P450 分子において、へムの第五配位座にチオレートアニオン($-S^-$)が配位しており、これが還元型 CO 結合物の 450 nm の吸収の原因である。静止状態(酸化型:鉄二価)では、第六配位子が酸素(水に由来)のとき(低スピン状態)と空位の状態(高スピン状態)があり、静止状態では通常、両者が混合した状態にある。

ミクロソームのP450



バクテリア・ミトコンドリアのP450

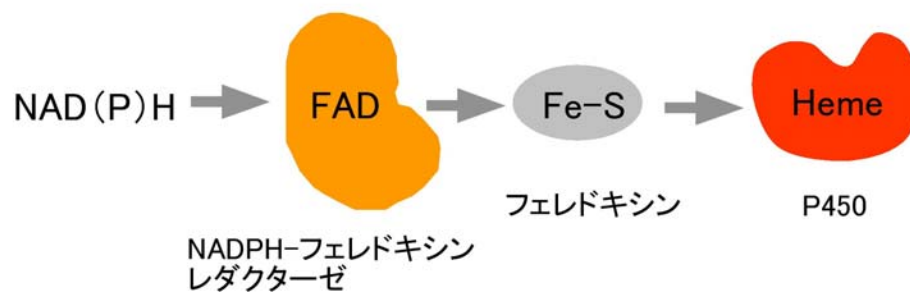


図4 P450の電子伝達経路

本研究の研究対象である CYP105P1、CYP105D6、CYP105D7 はバクテリア型電子伝達を行うと予想される。

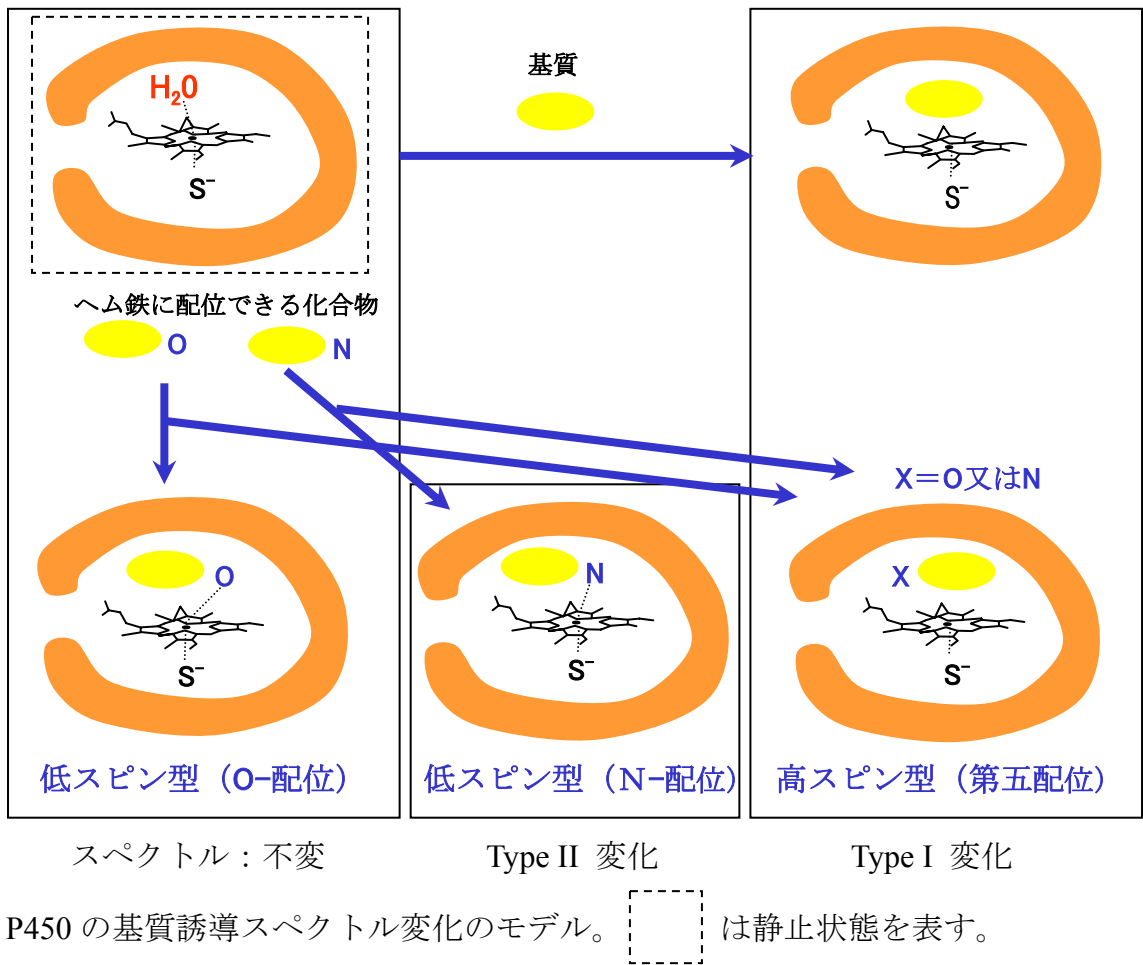


図5 基質誘導スペクトル変化のモデル

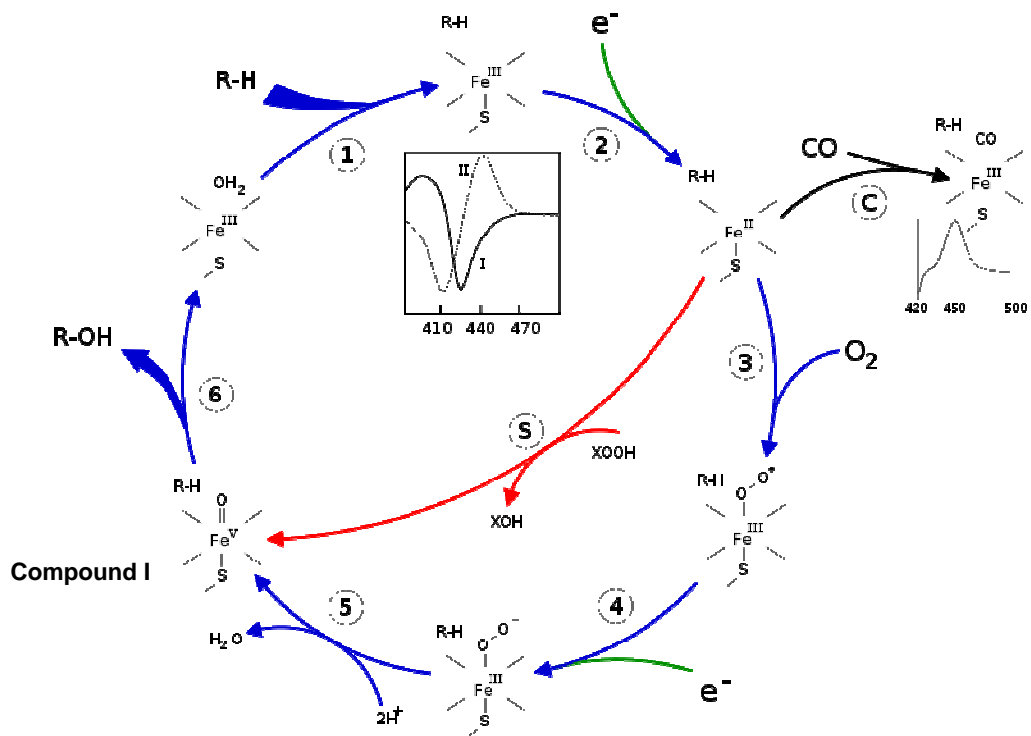


図6 P450の触媒サイクル

Fe^{III}:酸化型 P450 中のへム鉄 (三価鉄)、Fe^{II}:還元型 P450 中のへム鉄 (二価鉄)、

R-H: 基質、R-OH: 水酸化された基質 (反応産物)

挿入図: Type I (I) スペクトル変化と Type II (II) スペクトル変化

S: 中央を横切るショートカットがパーオキシサイドシヤント。XOOH は仮説パーオキシサイド。

C: 還元された P450 に一酸化炭素 (CO) が結合すると、触媒サイクルは中断される。その反応を CO 差スペクトルで確認すると、450 nm に極大吸収が見られる。

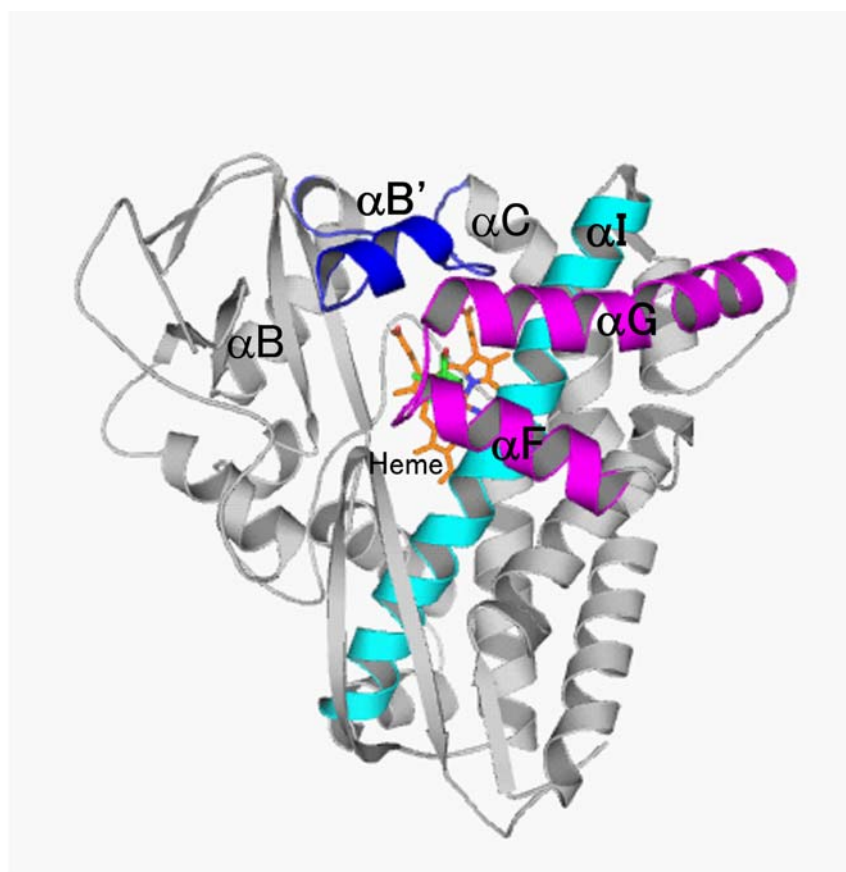


図7 P450の全体構造 (P450cam[7])

Iヘリックスはシアン色、FGヘリックスはマゼンタ色、B'ヘリックスは青色で示す。リガンド (camphor) は緑色のスティックで、ヘムはオレンジ色のスティックで示す。

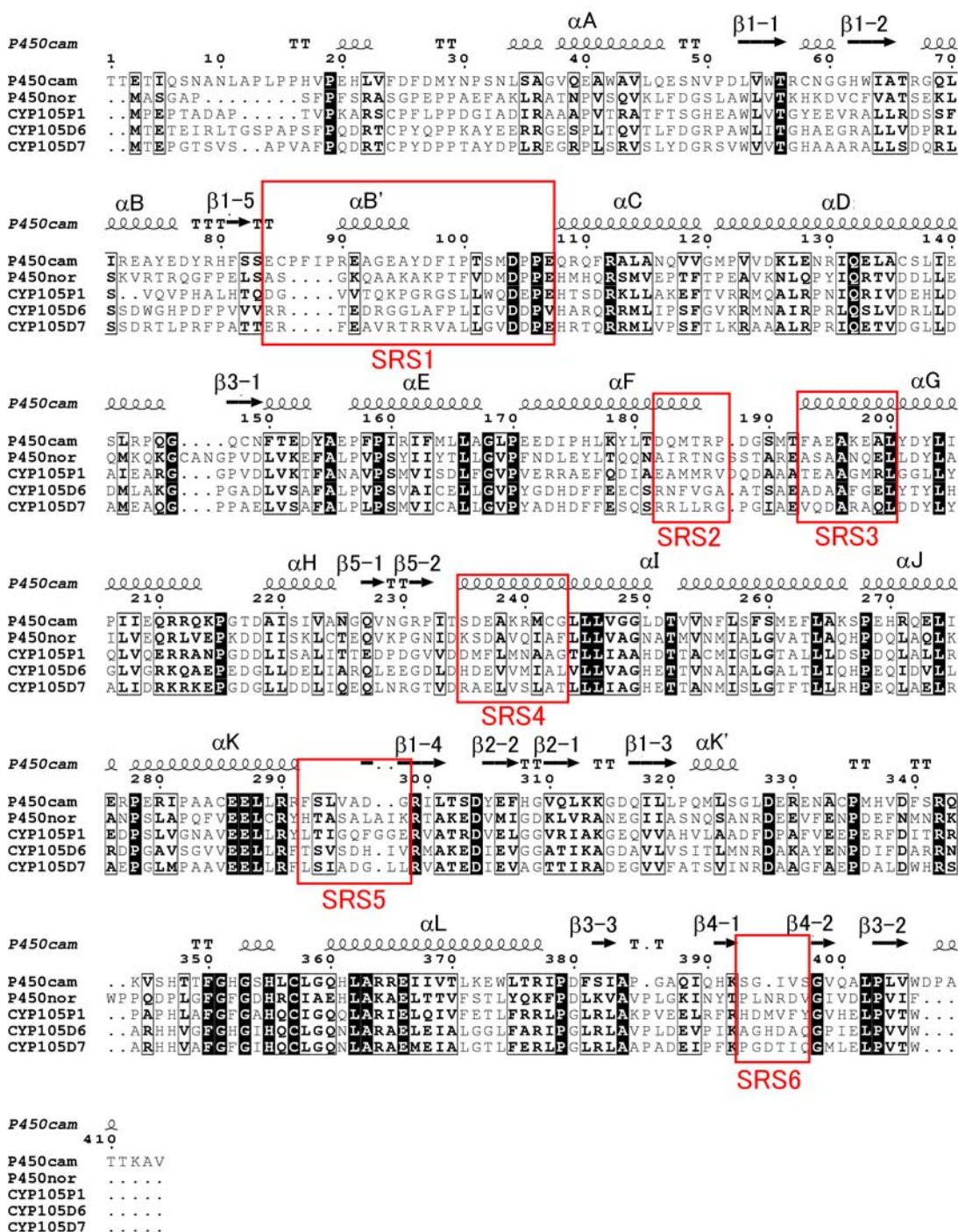


図8 P450の基質認識部位 (SRS)

P450cam (PDB コード : 2CPP)、P450nor、CYP105P1、CYP105D6、CYP105D7の二次配列を示す。基質認識部位は赤色の□で囲んで示す。

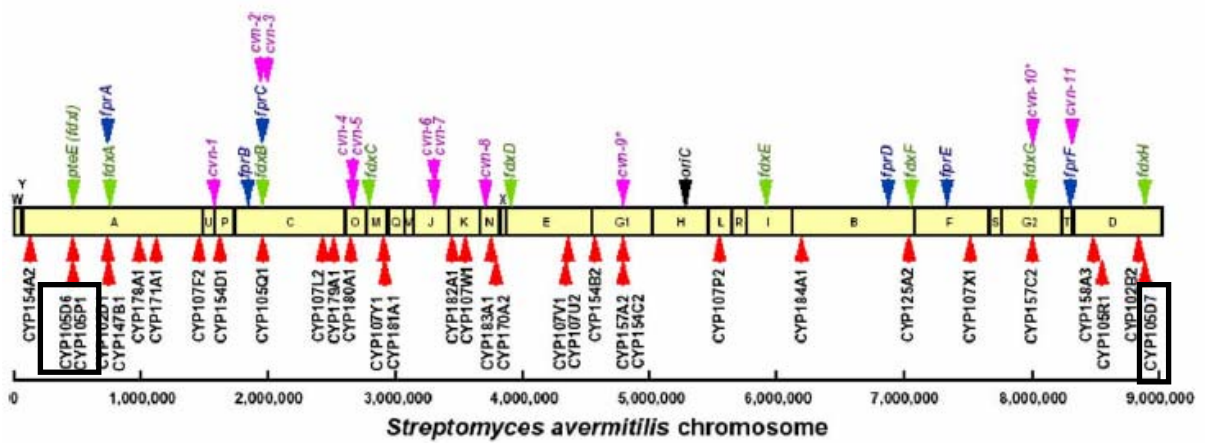


図9 *S. avermitilis* のゲノム染色体地図[13]

S. avermitilis は 33 個の P450 遺伝子 (CYP、赤色の矢印)、6 個のフェレドキシソレダクターゼ遺伝子 (*fpr*、青色の矢印)、9 個のフェレドキシソレダクターゼ遺伝子 (*fdx*、緑色の矢印) を持っている。*oriC* : 複製開始点、*cvn* : 保存されているオペロン

□で囲んでいるのは CYP105P1、CYP105D6、CYP105D7

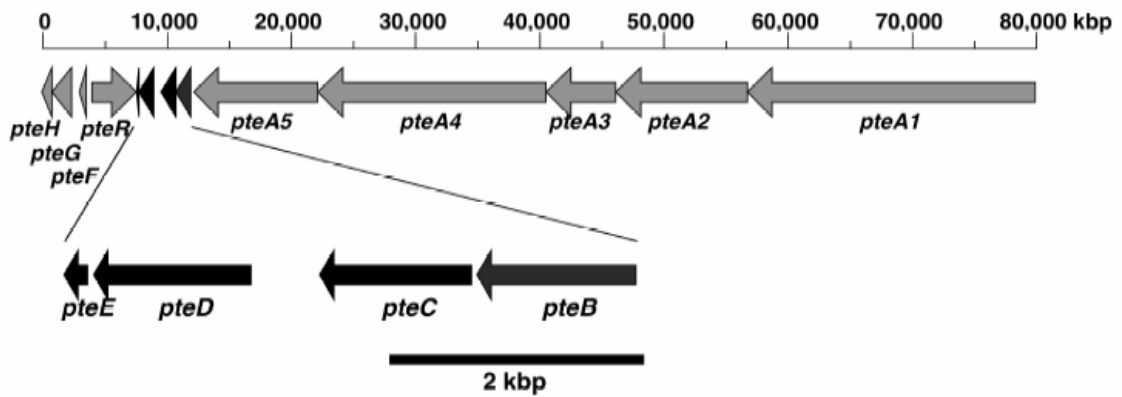


図 10 *Streptomyces avermitilis* ゲノム中の filipin 生合成遺伝子群

矢印は転写方向と予想するORFのサイズを示す。黒い矢印はそれぞれ *pteB*、*pteC* (CYP105P1)、*pteD* (CYP105D6)、*pteE* (ferredoxin) 遺伝子を示す。

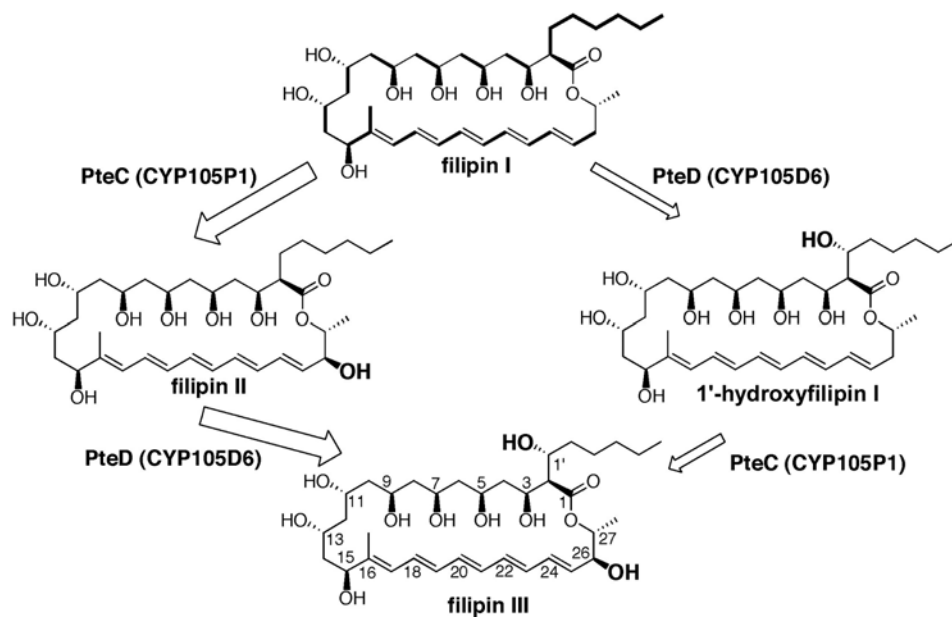


圖 11 filipin 生合成經路

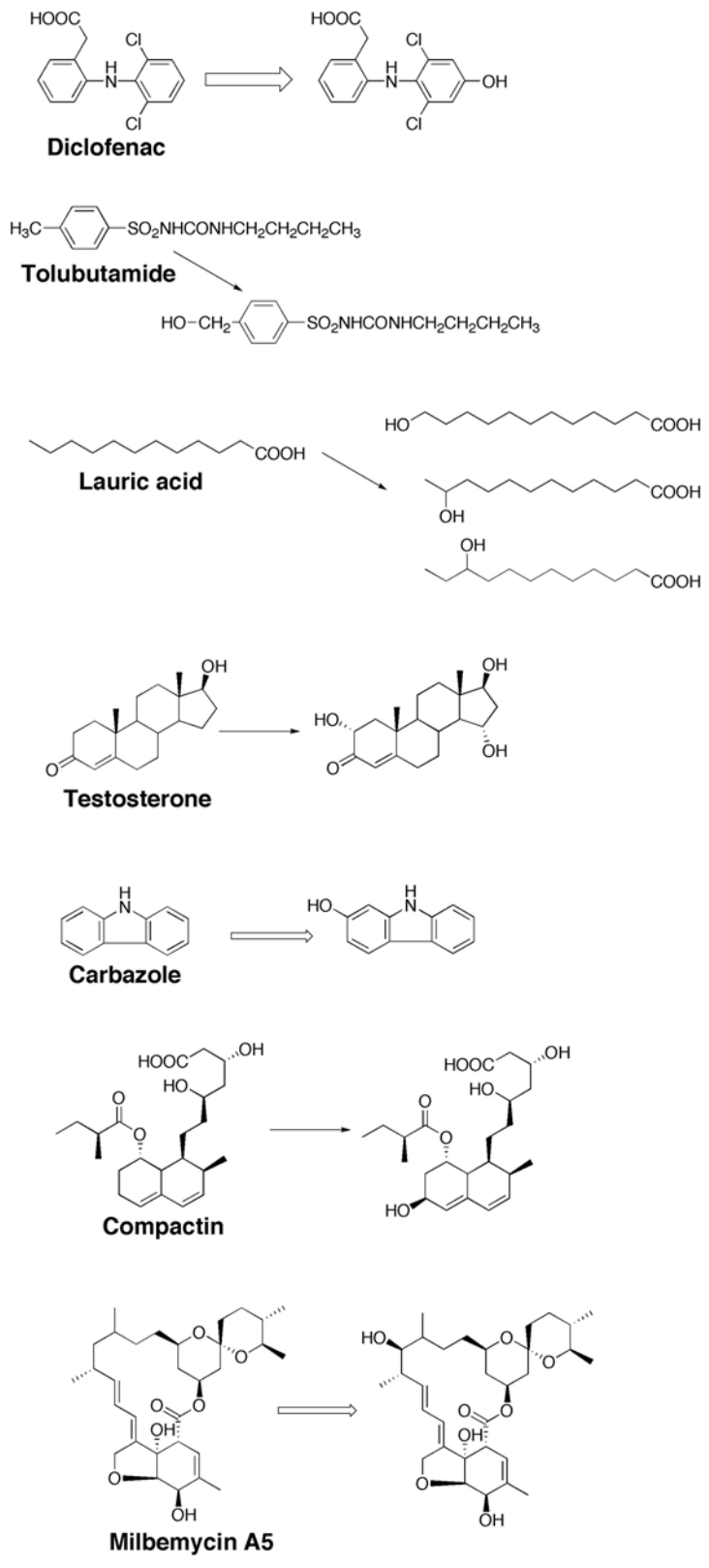


図12 CYP105D7が触媒する基質

参考文献

1. Guengerich, F.P., *Reactions and significance of cytochrome P-450 enzymes*. J Biol Chem, 1991. **266**(16): p. 10019-22.
2. Porter, T.D. and M.J. Coon, *Cytochrome P-450. Multiplicity of isoforms, substrates, and catalytic and regulatory mechanisms*. J Biol Chem, 1991. **266**(21): p. 13469-72.
3. Estabrook, R.W., J. Baron, and A. Hildebrandt, *A new spectral species associated with cytochrome P-450 in liver microsomes*. Chem Biol Interact, 1971. **3**(4): p. 260-1.
4. Meunier, B., S.P. de Visser, and S. Shaik, *Mechanism of Oxidation Reactions Catalyzed by Cytochrome P450 Enzymes*. Chemical Reviews, 2004. **104**(9): p. 3947-3980.
5. Kellner, D.G., et al., *Kinetic Characterization of Compound I Formation in the Thermostable Cytochrome P450 CYP119*. J. Biol. Chem., 2002. **277**(12): p. 9641-9644.
6. Poulos, T.L., et al., *The 2.6-Å crystal structure of Pseudomonas putida cytochrome P-450*. J Biol Chem, 1985. **260**(30): p. 16122-30.
7. Poulos, T.L., B.C. Finzel, and A.J. Howard, *High-resolution crystal structure of cytochrome P450cam*. Journal of Molecular Biology, 1987. **195**(3): p. 687.
8. Cupp-Vickery, J.R. and T.L. Poulos, *Structure of cytochrome P450eryF involved in erythromycin biosynthesis*. Nat Struct Biol, 1995. **2**(2): p. 144-53.
9. Haines, D.C., et al., *Pivotal Role of Water in the Mechanism of P450BM-3*. Biochemistry, 2001. **40**(45): p. 13456-13465.
10. Oshima, R., et al., *Structural evidence for direct hydride transfer from NADH to cytochrome P450nor*. J Mol Biol, 2004. **342**(1): p. 207-17.
11. Gotoh, O., *Substrate recognition sites in cytochrome P450 family 2 (CYP2) proteins inferred from comparative analyses of amino acid and coding nucleotide sequences*. J Biol Chem, 1992. **267**(1): p. 83-90.
12. Stout, C.D., *Cytochrome p450 conformational diversity*. Structure, 2004. **12**(11): p. 1921-2.
13. Lamb, D.C., et al., *Cytochrome p450 complement (CYPome) of the avermectin-producer Streptomyces avermitilis and comparison to that of Streptomyces coelicolor A3(2)*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **307**(3): p. 610-9.

14. Ohnishi, Y., et al., *Genome Sequence of the Streptomycin-Producing Microorganism Streptomyces griseus IFO 13350*. J. Bacteriol., 2008. **190**(11): p. 4050-4060.
15. Oliynyk, M., et al., *Complete genome sequence of the erythromycin-producing bacterium Saccharopolyspora erythraea NRRL23338*. Nat Biotech, 2007. **25**(4): p. 447.
16. Cole, S.T., et al., *Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence*. Nature, 1998. **393**(6685): p. 537.
17. Guengerich, F.P., *Common and Uncommon Cytochrome P450 Reactions Related to Metabolism and Chemical Toxicity*. Chemical Research in Toxicology, 2001. **14**(6): p. 611-650.
18. Zerbe, K., et al., *Crystal Structure of OxyB, a Cytochrome P450 Implicated in an Oxidative Phenol Coupling Reaction during Vancomycin Biosynthesis*. J. Biol. Chem., 2002. **277**(49): p. 47476-47485.
19. Pylypenko, O., et al., *Crystal Structure of OxyC, a Cytochrome P450 Implicated in an Oxidative C-C Coupling Reaction during Vancomycin Biosynthesis*. J. Biol. Chem., 2003. **278**(47): p. 46727-46733.
20. Zhao, B., et al., *Binding of two flavin substrate molecules, oxidative coupling, and crystal structure of Streptomyces coelicolor A3(2) cytochrome P450 158A2*. J Biol Chem, 2005. **280**(12): p. 11599-607.
21. Makino, M., et al., *Crystal structures and catalytic mechanism of cytochrome P450 StaP that produces the indolocarbazole skeleton*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007. **104**(28): p. 11591-11596.
22. Yasutake, Y., et al., *Crystal structure of cytochrome P450 MoxA from Nonomuraea recticatena (CYP105)*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **361**(4): p. 876-82.
23. Sherman, D.H., et al., *The structural basis for substrate anchoring, active site selectivity, and product formation by P450 PikC from Streptomyces venezuelae*. J Biol Chem, 2006. **281**(36): p. 26289-97.
24. Sugimoto, H., et al., *Crystal structure of CYP105A1 (P450SU-1) in complex with 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3*. Biochemistry, 2008. **47**(13): p. 4017-27.
25. O'Keefe, D.P. and P.A. Harder, *Occurrence and biological function of cytochrome P450 monooxygenases in the actinomycetes*. Mol Microbiol, 1991. **5**(9): p. 2099-105.
26. Nakahara, K., et al., *Cytochrome P-450 55A1 (P-450dNIR) acts as nitric oxide reductase employing NADH as the direct electron donor*. J Biol Chem, 1993. **268**(11): p. 8350-5.

27. Ikeda, H., et al., *Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism Streptomyces avermitilis*. Nature Biotechnology, 2003. **21**(5): p. 526-531.
28. Lamb, D.C., et al., *Cytochrome P450 complement (CYPome) of the avermectin-producer Streptomyces avermitilis and comparison to that of Streptomyces coelicolor A3(2)*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2003. **307**(3): p. 610.
29. Quaderer, R., et al., *Pentalenolactone Biosynthesis. Molecular Cloning and Assignment of Biochemical Function to PtlI, a Cytochrome P450 of Streptomyces avermitilis*. J. Am. Chem. Soc., 2006. **128**(40): p. 13036-13037.
30. Ikeda, H., et al., *Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism Streptomyces avermitilis*. Nat Biotechnol, 2003. **21**(5): p. 526-31.
31. Parajuli, N., et al., *Genome analyses of Streptomyces peucetius ATCC 27952 for the identification and comparison of cytochrome P450 complement with other Streptomyces*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2004. **425**(2): p. 233.
32. Bentley, S.D., et al., *Complete genome sequence of the model actinomycete Streptomyces coelicolor A3(2)*. Nature, 2002. **417**(6885): p. 141.
33. Cerdeno-Tarraga, A.M., et al., *The complete genome sequence and analysis of Corynebacterium diphtheriae NCTC13129*. Nucl. Acids Res., 2003. **31**(22): p. 6516-6523.
34. Ishikawa, J., et al., *The complete genomic sequence of Nocardia farcinica IFM 10152*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004. **101**(41): p. 14925-14930.
35. McLeod, M.P., et al., *The complete genome of Rhodococcus sp. RHA1 provides insights into a catabolic powerhouse*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2006. **103**(42): p. 15582-15587.

第一章 *Streptomyces avermitilis* 由来 CYP105P1 の機能構造解析：

構造的柔軟性及びヒスチジン結合型

序

本章では、*S. avermitilis* 由来 CYP105P1 の触媒活性を *in vitro* で確認し、三つの異なる状態、野生型のリガンドフリー (WT-free)、野生型と 4-phenylimidazole (4PI) との複合体 (WT-4PI)、H72A 変異体のリガンドフリー (H72A-free) の結晶構造解析を行った。そして、部位特異的変異体を作製し、野生型との比較を行った。

材料と方法

材料

本研究に用いた試薬は、特に記さない限り、和光純薬工業株式会社または SIGMA の特級試薬を用いた。*S. avermitilis* Δ *pteCpteD* (CYP105P1、CYP105D6 欠失株) は共同研究者の池田らにより作製されたものを提供していただいた。

S. avermitilis のゲノム DNA の調製

菌株は *S. avermitilis* MA-4680 を用いた。培地は肉エキス培地を用いた。酵母エキス (Difco) 0.5 g、肉エキス (Kyokuto) 10 g、グリセロール 30 mL を 1000 mL のイオン交換水に溶解し、水酸化ナトリウムで pH 7.2 に調整後、滅菌した。

試験管に肉エキス培地 10 mL を入れシリコ栓をし、培養したプレートより 1 白金耳植菌後、30°C、120 rpm で 7 日間培養した後、集菌し、Wizard Genomic DNA Purification Kit を用いゲノム DNA を精製し、PCR 用のテンプレートとした。

発現系の構築

大腸菌における発現系プラスミドを図 1-1 のように構築した。発現ベクターは

pET17b (Novagen) を使用した。 *S. avermitilis* データベース (<http://avermitilis.ls.kitasato-u.ac.jp/>) に掲載されている P450 の遺伝子配列を元にプライマーを表 1-1 のように設計した。プライマーは北海道システムサイエンス (HSS) に注文し、入手した。また、PCR により、N 末端開始コドン部位に制限酵素サイト *Nde* I サイトを導入し、C 末端には *Spe* I サイトを導入し、遺伝子 C 末端部位には四つの His 残基よりなる His-tag を付加した。

PCR のポリメラーゼはフィデリティーの高い Easy A polymerase (Stratagene) を用いた。Template 1 μ L、Easy A polymerase 0.2 μ L、Easy A buffer 5 μ L、2.5 mM dNTP Mixture 5 μ L、primer-N (10 μ M) 1.5 μ L、primer-C (10 μ M) 1.5 μ L、DMSO 5 μ L、滅菌水 30.8 μ L を混合し、以下の反応を行った。まず 96°C で 2 分、96°C で 30 秒、65°C で 30 秒、72°C で 1 分のサイクルを 30 回繰り返した後、72°C で 5 分を行った。

PCR 後、0.8%アガロースゲルで泳動し、増幅を確認した。目的の断片を切り出し、QIA-quick Gel Extraction Kit (Qiagen) で精製を行った。

PCR 産物を用いて TA クローニングを行った。4.5 μ L PCR 産物と 0.5 μ L pT7Blue ベクター (Novagen)、5 μ L の Ligation high (Toyobo) を混合し、室温で 1 時間ライゲーション反応を行った。10 μ L 反応液を大腸菌の JM109 もしくは XL10-Gold (Stratagene) コンピテント細胞に入れ、氷の上で 30 分、42°C で熱ショックを 1 分、SOC 培地を 150 μ L 添加後、氷の上で 2 分、37°C で一時間培養の順で処理を行った。最後の培養液に 20 mg/mL x-gal 50 μ L、0.1 M IPTG 20 μ L を入れ、アンピシリン入りの LB プレートにまいて、一晩培養した。白いコロニーのいくつかを選んで、LB 培地 (100 μ g/mL Ampicilin) で一晩培養し、plasmid Miniprep kit (Qiagen) により精製しプラスミドを得た。プラスミドはシーケンス用プライマーを用いて、DNA シーケンサー CEQ 2000XL DNA analysis System (Beckman Coulter) で塩基配列を確認した。TA クローニングで得られたプラス

ミドは pT7Blue-CYP105P1 とした。

発現プラスミド pET17b と TA クローニングで得られたプラスミド pT7Blue-CYP105P1 について *Nde* I と *Spe* I で制限酵素処理を行った。インサートとベクター量の比を 9 : 1 にし、Ligation high を用い 15°C で 1 時間ライゲーション反応を行った。反応液を大腸菌 JM109 もしくは XL10-Gold (Stratagene) にトランスフォームした。LB プレートに出てきたコロニーのうちの 1 個を取って 5 ml の LB 培地で培養した。plasmid Miniprep kit により精製し、得られたプラスミドをアガロース電気泳動することにより、インサートが挿入されているか確認した。得られたプラスミドは pET17b-CYP105P1 とした。

発現

プラスミド pET17b-CYP105P1 で形質転換した *E.coli* BL21 CodonPlus (DE3) (Stratagene) を 20 mL の LB 培地 (Difco) (100 µg/mL Ampicillin、25 µg/mL Chloramphenicol) を用いて、37°C で 12 時間前培養を行ったのち、2 L の改変 TB 培地 (表 1-2、表 1-3) に前培養液を全て加え (1% seeding)、5 L の羽根突きフラスコを用いて 37°C で本培養を開始した。2 時間ほど培養した後、 $OD_{600} \doteq 0.6 \sim 0.8$ に達したところで、IPTG による誘導を行わずに 25°C でさらに 20 時間培養後、5000 rpm で 10 分間遠心して菌体を回収した。

精製

1) 得られた菌体を、300 mL のバッファー [50 mM potassium phosphate (pH 7.5)、0.5 M NaCl、10 mM imidazole、0.1 mM DTT、10% (v/v) glycerol] に懸濁し、冷却しながら、超音波破砕機 SONIFER 2500 (BRANSON) により破砕を 10 分間行った。破砕後、遠心 (18,000 rpm、30 min) して上清を得た。この上清を Minisart 0.45 µm Filter (Sartorius stedim) に通した後のサンプルを粗酵素抽出液とした。

2) 粗酵素抽出液をバッファー [50 mM potassium phosphate (pH 7.5)、0.5 M NaCl、10 mM imidazole、0.1 mM DTT、10% (v/v) glycerol] で平衡化した HiTrap Chelating HP (5 mL) カラム (GE Healthcare) に吸着させた。平衡化バッファーで非吸着画分を溶出した後、10-500 mM imidazole の濃度直線勾配を用いて流速 2.5 mL/min でタンパク質を溶出した。赤色の溶出液約 10 mL を分取し、SDS-PAGE で溶出物を確認した。

3) His-tag アフィニティーカラムで精製した目的酵素を含む画分を集め、Amicon Ultra-15 10K (Millipore) を用いて濃縮し、バッファー [20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、0.1 mM EDTA、0.1 mM DTT、10% (v/v) glycerol] に置換した。Minisart 0.45 µm Filter に通した後、バッファー [20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、0.1 mM EDTA、0.1 mM DTT、10% glycerol] で平衡化した Resource Q カラム (GE Healthcare) に吸着させた。平衡化バッファーで非吸着画分を溶出した後、0-0.5 M NaCl の濃度直線勾配を用いて、流速 1 mL/min でタンパク質を溶出した。赤色の溶出液は約 1 mL ずつ分取し、SDS-PAGE でそれぞれの画分の溶出物を確認した。

4) Resource Q カラムで精製した目的酵素を含む画分を集め、Amicon Ultra-15 10K を用いて濃縮し、Minisart 0.45 µm Filter に通した後、バッファー [10 mM potassium phosphate (pH 7.5)、0.15 M NaCl、0.1 mM EDTA、0.1 mM DTT、10% (v/v) glycerol] で平衡化した Hiload 16/60 Superdex 200 (GE Healthcare) に load した。流速 1 mL/min でタンパク質を溶出し、赤色の溶出液は約 1 mL ずつ分取した。SDS-PAGE でそれぞれの画分の溶出物を確認し、目的酵素を含む画分を集め、Amicon Ultra-15 10K を用いて濃縮し、Minisart 0.45 µm Filter に通した。

精製は全部 4°C で AKTA FPLC (GE healthcare) を用いて行った。

SDS-PAGE

SDS-PAGE は、Laemmli の方法に従った。ゲル濃度は 10%とし、電気泳動後のタンパク質の検出には Quick CBB により染色を行った。分子量マーカーは LMW-SDS Marker Kit (GE healthcare) を用いた。

タンパク質の定量

タンパク質の定量は、BCA 法により算出した。BCA working reagent (PIERCE) とサンプルを混合し、37°Cで 30 分間 incubate した後、562 nm の吸光を測定した。標準タンパク質として γ -グロブリンまたは BSA を用い、0 mg/mL、0.2 mg/mL、0.4 mg/mL、0.6 mg/mL、0.8 mg/mL、1 mg/mL の濃度で検量線を作成した。

filipin Iの単離精製

1) 種培養と生産培養

種培地：グルコース1 g、脱脂大豆粉3 g、酵母エキス (Difco) 1 gを200 mLのイオン交換水に溶解し、2 M水酸化カリウムでpH 7.5に調整後、高圧蒸気滅菌した。

生産培地：デキストリン20 g、グルコース2 g、脱脂大豆粉15 g、酵母エキス3 g、炭酸カルシウム3 gをイオン交換水1 Lに溶解し、2 M水酸化カリウムでpH 7.0に調整後、高圧蒸気滅菌した。

種培地を10 mLずつスプリングコイル入り大試験管3本に分注し、CYP105P1、CYP105D6欠失株の孢子懸濁液を接種した。これを、30°Cで2日間培養したものを種培養液とした。3本の種培地を1本の大試験管にまとめ、よく混合した。500 mLの三角フラスコに入れた200 mLのfilipin生産培地15本 (計3 L) 種培地を2 mLずつ接種し、30°Cで5日間培養した。

2) 菌体からの培養物質の抽出

ヌッチェを用いて培養液3 Lより菌体を回収し、アセトン1200 mLで30分間攪拌して菌体内蓄積物を抽出した。ヌッチェでアセトン層を吸引濾過し、再度アセトン600 mLで同じ操作を繰り返した。次にアセトン層をエバポレーターで減圧濃縮し、得られた水層を分液漏斗に移し酢酸エチルを加えて混和した。エマルジョンを形成した場合は、適量の水と塩化ナトリウムを加えて酢酸エチル層と水層を分離させ、酢酸エチル層を回収した。再度残った水層を酢酸エチル抽出を行った後、酢酸エチル層に無水硫酸ナトリウムを加え脱水し、濃縮乾固した。

3) シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる分離精製

欠失株の抽出物はシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製を行った。アセトン抽出物の重量のおよそ50倍量のシリカゲルをクロロホルムで膨張させ、カラム管 (60Φ×400) に充填した。少量のクロロホルムに溶解したアセトン抽出物をシリカゲルに重層し、カラム体積の倍量のクロロホルム、続いてクロロホルム：メタノール=10:1、さらに4:1で溶出した。溶出液は約15 mLずつ分取し、シリカゲルTLCでそれぞれの画分の溶出物を確認した。

4) 分取HPLCによる分離精製

シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した目的の物質を含む画分を集め濃縮乾固したものを0.2 μmのフィルターに通した後、少量のメタノールに溶解し、HPLCで下記に示した条件で単離精製を行った。

カラム：PEGASIL-ODS (20Φ×250 mm)

流速：9 mL/min

検出波長：340 nm

溶媒：アセトニトリル：メタノール：水=55：20：25

分離液をエバポレーターで濃縮乾燥後、分液漏斗に移し酢酸エチルを約3分の1量加え分離を行った。エマルジョンを形成した場合は遠心して、酢酸エチル層と水層を分離させ、酢酸エチル層を回収した。再度酢酸エチル抽出を行った後、酢酸エチル層に無水硫酸ナトリウムを加え脱水し、濾紙で濾過した後、エバポレーターで濃縮乾固した。さらにデシケーター中で減圧乾燥させ、重さを測定した。

活性測定

精製後の酵素を200 μM に調製したものをを用いた。filipin I溶液は分解しやすいため、毎回新しく調製したものを使用した。P450は、電子伝達系としてferredoxinとferredoxin-NADP⁺ reductaseを必要とするが、CYP105P1の*S. avermitilis*における電子伝達系は明らかとなっていないので、spinach（ほうれん草）由来の電子伝達系を用い反応を行った。

酵素反応溶液の組成は次のようにした。50 mM potassium phosphate (pH 7.5)、0.1 mM EDTA、0.1 mM DTT、10% (v/v) glycerol、0.2 μM P450、0.2 Units spinach ferredoxin:NADP⁺ reductase、0.12 mg spinach ferredoxin、0.4 mM filipin I、1 mM NADPHを含む1 mLの反応液を作製した。反応はNADPHの添加により開始させた。

作製した反応溶液を用いて、室温でインキュベートし、1分間隔でそれぞれ200 μL ずつ取り、300 μL 酢酸エチルにより反応を終了させた。よく攪拌した後、10,000 rpmで1分間遠心して、酢酸エチル層を回収した。酢酸エチル画分は遠心エバポレーターで濃縮乾固し、100 μL のメタノールに溶解し、HPLCで分析した。HPLCの条件は下記の通りである。

カラム：PEGASIL-ODS (4.6Φ×250 mm)

流速：0.8 mL/min

検出波長：342 nm

溶媒：アセトニトリル：メタノール：水=55：20：25

filipin I、filipin II、1'-hydroxyfilipin I、filipin III のピーク位置は池田らにより同定された条件を参照した。

結晶化

結晶化条件の初期スクリーニングは、Crystal Screen (Hampton Research)、Crystal Screen 2 (Hampton Research)、Crystal Screen Lite (Hampton Research)、Index (Hampton Research)、Wizard Screen III (Emerald Biostructures)、Structure Screen 1 (Molecular Dimensions)、Structure Screen 2 (Molecular Dimensions)、Crystal Screen CRYO (Hampton Research)、Precipitant Synergy 33%、66%、100% (Emerald Biostructures) を用いて、シッティングドロップ蒸気拡散法により行った。結晶化は、Greiner 96 well Crystallization Plate (Greiner) を用いて、1 μl のタンパク質溶液 [10 mg/mL CYP105P 1、10 mM Tris-HCl (pH7.5)、0.1 mM EDTA、500 mM NaCl] と 1 μl のリザーバー溶液を混合し、25°Cで静置することにより行った。初期スクリーニングの結果に基づいて、タンパク質濃度、沈殿剤、塩、バッファー、リガンドなどの条件を最適化した。シッティングドロップ蒸気拡散法に加えて、VDX Plate (Hampton) を用いたハンギングドロップ蒸気拡散法による結晶化も試みた。

X線回折データ収集

X線回折データは高エネルギー加速器研究機構 (KEK；茨城県つくば市) の放射光施設 Photon Factory (PF) 実験ステーション BL6A、NW12A で CCD 検出

器を用いて収集した。結晶は抗凍結剤なしで直接クライオループ (Hampton Research) にマウントし、100 K の N₂ ストリーム中で Flash Freezing により瞬間冷却した。波長は 1.0000 Å で行った。回折データはプログラム HKL2000 を用いて処理した[1]。

構造決定と精密化

通常、タンパク質の X 線結晶構造解析を行うには、位相情報を求める必要がある。そのタンパク質と似たアミノ酸配列を持つタンパク質 (通常アミノ酸配列の相同性が 30%以上) で構造が明らかになっている場合には、その構造をモデルとして用いて分子置換法という方法で位相情報を求めることができる。しかし、似た既知構造がない場合には、重原子を用いた MAD 法か、MIR 法により位相情報を求める必要が生じる。

本研究では、MOLREP を用いた分子置換法により構造を決定した[2]。初期構造モデルは ARP/wARP を用いて構築した[3]。手動でのモデル構築と精密化はそれぞれ Coot[4]と Refmac5[5]を用いて行った。Refmac5 を用いた精密化の最終段階では bulk solvent correction と TLSMD サーバーによって規定されたグループより TLS 精密化を行った。TLS とは、分子を擬似剛体に分割し、それぞれの Translation、Liberation、Screw rotation をパラメータ化した精密化法である。データ収集と精密化の統計値を表 1-4 に示す。タンパク質の立体構造の図は PyMOL (version 0.99; DeLano Scientific LLC, Palo Alto, CA, USA [<http://www.pymol.org>]) を用いて作成した。

部位特異的変異体の調製

部位特異的変異体は、TA クローニングで得られたプラスミド pT7Blue-CYP105P1 を鋳型として、QuikChange 法 (Stratagene) を用いて作製し

た。使用したプライマーを表 1-5 に示す。これらプライマーを北海道システムサイエンス (HSS) に注文し、入手した。

ポリメラーゼはフィデリティの高い PrimeSTARTMHS DNA Polymerase (Takara) を用いた。PrimeSTARTMHS buffer 10 μ L、dNTP Mixture 4 μ L、primer-1 (10 μ M) 1 μ L、primer-2 (10 μ M) 1 μ L、Template 0.5 μ L、PrimeSTARTMHS DNA Polymerase 0.5 μ L を混合し、滅菌水 33 μ L を混合し、以下の反応を行った。98°C で 10 秒、50°C で 5 秒、72°C で 6 分を 20 回繰り返した。

反応後、制限酵素 *DpnI* で 37°C、1 時間処理した。反応液で大腸菌 XL10-Gold (Stratagene) を形質転換した。コロニーを 1 個選んで、LB 培地で一晚培養し、プラスミド抽出 (Qiagen Plasmid Miniprep Kit) を行った。目的の変異が投入されていることを DNA シークエンシングにより確認した。変異体酵素は、野生型と同様の方法で発現させて単一になるまで精製した。

吸収スペクトル測定

分光光度計は V-550 (JASCO) を使い、25°C で測定を行った。セルは光路長 1 cm の石英セルを用いた。野生型と変異体酵素はそれぞれバッファー[50 mM potassium phosphate (pH 7.5)、0.1 mM EDTA、0.1 mM DTT、10% (v/v) glycerol] を用いて一定濃度に希釈したタンパク質溶液を作製した。

タンパク質溶液 400 μ L を石英セルに入れ、測定波長 300~600 nm で吸収スペクトルを測定した。これを「酸化型」もしくは「静止型」のスペクトルとした。この溶液にジチオナイトを最終濃度が 10 mM になるように加え還元状態にし、吸収スペクトルを測定した。これを「ジチオナイト還元型」スペクトルとした。また、CO を吹き込んだ溶液にジチオナイトを加えて測定した吸収スペクトルを「CO 結合型」スペクトルとした。その後、CO 結合型と還元型のスペクトルの差を計算し「CO 差スペクトル」とした[6]。CO 差スペクトルの 490 nm におけ

る吸光度と 450 nm 付近の最大ピークにおける吸光度の差を取り、モル吸光係数 $\epsilon=91.0 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ を用いて、P450 の濃度を計算し、発現確認を行った。以下の章では、CO 差スペクトルの測定はここに書いた方法で行ったものとする。

解離定数 K_d 測定

CYP105P1 の野生型と H72A 変異体酵素を用いて、阻害剤である 4-phenylimidazol (4PI) との解離定数 K_d を測定した。分光光度計は V-550 (JASCO) を用い、25°C で測定を行った。セルは光路長 1 cm の石英セルを用いた。CYP105P1 の野生型と H72A 変異体酵素をバッファー [50 mM potassium phosphate (pH 7.5)、0.1 mM EDTA、0.1 mM DTT、10% (v/v) glycerol] を用いて最終濃度が約 5 μM になるように希釈した。4PI をメタノールに溶解し、高濃度溶液を作製した。

1 mL のタンパク質溶液を測定波長 300 nm~600 nm について吸収スペクトルを測定した。これをリガンド濃度が 0 μM の際のスペクトルとした。次に 4PI 高濃度溶液を 0.5 μL 、1 μL 、2 μL とスペクトルの変化を観察しながら滴定を行った。その都度攪拌してパラフィルムで蓋をし、3 分間放置した後、スペクトルを測定した。スペクトルの変化が起こらなくなったら滴定を終了する。各リガンド濃度のスペクトルについてそれぞれリガンド濃度 0 μM のスペクトルと差を算出し差スペクトルとした。差スペクトルで約 438 nm 付近の最も高い吸収 ($\Delta\text{Absorbance}$) と約 416 nm 付近の最も低い吸収 ($\Delta\text{Absorbance}$) の差を Y 軸に、それぞれのリガンド濃度を X 軸にプロットし、 K_d を算出した。

EPR 測定

EPR スペクトルは ES-CT470 液体ヘリウム低温保持装置を装備した JOEL 分光計 JES-FA100 に ES-CT470 を用いて測定した。その際の温度は Model 9650 Cryogenic Temperature Controller でモニターした。スペクトルの測定には野生型

と H72A 変異体それぞれ 495 μM 、280 μM に濃縮したタンパク質溶液を使用した。バッファーは 50 mM potassium phosphate (pH 7.5)、0.1 mM dithiothreitol、0.1 mM EDTA、10% (v/v) glycerol を使用した。4PI 結合スペクトルを測定時は、4PI 最終濃度が 0.5 mM になるように添加した。

結果

発現と精製

大腸菌で大量発現させる際、事前に、発現用大腸菌株の条件検討（C43 (DE3) 株、BL21 (DE3) Codonplus 株）、IPTG 終濃度（0, 0.5 mM）、培養時間（15～25 時間）を振っての発現条件検討を行った。結果、発現菌株は大腸菌 BL21 CodonPlus (DE3) 株、IPTG 終濃度は 0 mM、培養時間は 20 時間で最も多くの目的タンパク質が得られた。

大腸菌で大量発現させた CYP105P1 を 3 段階のカラムクロマトグラフィーにより単一になるまで精製した（図 1-2）。SDS-PAGE 上での分子量は約 49 kD と見積もられた。一方、アミノ酸配列から計算される分子量は、44 kD である。2 L の培養液から約 10 mg の精製 CYP105P1 が得られた。

filipin I の単離精製

S. avermitilis Δ pteCpteD 欠損株を 3 L の生産培地で培養して得た菌体から、アセトン抽出、シリカゲルカラムクロマトグラフィーおよび分取 HPLC による精製によって 99%まで純粋な filipin I を 7.45 mg 取得した。filipin I は淡黄色を呈しており、波長 331 nm、347 nm、368 nm で、ペンタエンに特徴的な吸収を示した。filipin I は空気と光により分解しやすく、溶液状態で保存すると六日間で半分以上が分解することが、HPLC の分析より分かった。filipin I を使う時は毎回新しく調製したものを使用した。

活性測定

精製した CYP105P1 を用いて in vitro で filipin 水酸化触媒活性を確認した。CYP105P1 は filipin I の 26 位を水酸化して filipin II を生産した（図 1-3）。

結晶化

WT-free と WT-4PI の二つの異なる状態で結晶化を行った。

10 mg/mL のタンパク質溶液を用いて WT-free の結晶化条件の初期スクリーニングを行ったところ、以下の条件を含む複数の条件で結晶を得られた。

- Index #24 : 2.8 M Sodium acetate pH 7.0
- Index #25 : 3.5 M Sodium formate pH 7.0

初期条件の内 3.5 M Sodium formate pH 7.0 の条件で得られた結晶を用いて X線回折を試したところ 2.5 Å 分解能まで回折した。初期条件を参考に最適化を行った。タンパク濃度、沈殿剤濃度、バッファー、pH、温度などを変えて、細かく条件検討した。その結果、4°C でシットティングドロップ蒸気拡散法により、1 µL のタンパク質溶液[9 mg/mL、10 mM Tris-HCl (pH7.5)、0.5 M NaCl、0.1 mM EDTA] と 1 µL のリザーバー溶液[3.7 M sodium formate]を混合することにより、大きな結晶を得ることができた (図 1-4A)。この結晶は空間群 $P4_32_12$ に属し、1.95 Å 分解能まで回折した。

タンパク質溶液 (10 mg/mL 酵素、2.5 mM 4PI) を用いて WT-4PI の結晶化条件の初期スクリーニングを行ったところ、以下の条件を含む複数の条件で結晶を得られた。

- Crystal Screen #4 : 2.0 M Ammonium sulfate、0.1 M Tris-HCl pH 8.5
- Crystal Screen #33 : 4.0 M Sodium formate
- Precipitant synergy 67% #10: 13.4% (v/v) glycerol、1.675 M K_2H phosphate/ NaH_2 phosphate pH 7.5
- Index #29 : 60% (v/v) Tacsimate pH 7.0

初期条件を参考に最適化を行った。タンパク濃度、沈殿剤濃度、バッファー、pH、温度などを変えて、細かく条件検討した。その結果、25°C でシットティング

ドロップ蒸気拡散法により、1 μL のタンパク質溶液[10 mg/mL、10 mM Tris-HCl (pH7.5)、0.5 M NaCl、0.1 mM EDTA]と1 μL のリザーバー溶液[3.8 M sodium formate]を混合することにより、良質の結晶を得ることができた (図 1-4B)。この結晶は空間群 $P3_121$ に属し、2.6 \AA 分解能まで回折した。

構造決定

1) WT-free の構造はホモロジーモデリングサーバー3D-JIGSAW を用いて OxyB[7]を元にしたサーチモデルを作成した。MOLREP を用いた分子置換法により 1.95 \AA 分解能で決定した。 R 因子=19.0% (R_{free} =21.1%) まで精密化した。非対称単位には、一つの CYP105P1 分子が含まれ、高い Matthews coefficient (4.27 $\text{\AA}^3/\text{Da}$) と溶媒含量 (71.2%) を示した。最終モデルは、7-78、83-400 のアミノ酸残基、一つのヘム分子、487 個の水分子が含まれる。最終モデルのアミノ酸残基には、C 末端の残基 Trp399 に付いた四つのヒスチジンタグの最初の一つ His400 が含まれる。BC ループにおいては Thr79 から Pro82 の四つの残基は disorder のためモデルに入れなかった。

2) WT-4PI の構造は精密化した WT-free の構造をサーチモデルとして、分子置換法により 2.6 \AA 分解能で決定し、 R 因子=17.6% (R_{free} =23.6%) まで精密化した。WT-4PI の結晶は WT-free の結晶と同形ではないが、非対称単位には、一つの CYP105P1 分子が含まれ、WT-free と同様に高い Matthews coefficient (4.76 $\text{\AA}^3/\text{Da}$) と溶媒含量 (74.2%) を示した。最終モデルは、9-69、81-401 のアミノ酸残基、一つのヘム分子、一つの 4PI 分子、127 個の水分子が含まれる。最終モデルのアミノ酸残基には、C 末端の四つのヒスチジンタグの中の二つが含まれる。

野生型リガンドフリー (WT-free) の全体構造

CYP105P1 の WT-free の構造は 13 個の α ヘリックス (A-L) と β -rich 領域を持っていて、典型的な P450 構造を示した (図 1-5)。

DALI サーバー[8]を用いた類似構造検索により、CYP105 ファミリーを含む P450 スーパーファミリーのメンバーと構造類似性を持つことが分かった。CYP105P1 と最も類似していたのは *Nonomuraea recticatena* 由来 MoxA (CYP105) [PDB コード 2Z36、chain A、Z スコア= 47.1、対応する 371 残基の C α 原子に対する RMSD = 1.9 Å][9] (図 1-6B)、*Streptomyces venezuelae* 由来 P450 PikC のリガンドフリーの open 構造[PDB コード 2BVJ、chain B、Z スコア= 45.6、対応する 373 残基の C α 原子に対する RMSD = 2.4 Å][10] (図 1-6C)、カビの *Fusarium oxysporum* 由来 P450nor のリガンドフリーの構造[PDB コード 1ROM、Z スコア= 44.4、対応する 373 残基の C α 原子に対する RMSD = 2.1 Å] [11] (図 1-6D) である。これらの P450 の構造は他の P450 の構造と比べた場合、比較的に開いた FG ヘリックスを持っている。*Streptomyces griseolus* 由来 P450 SU-1 (CYP105A1) は CYP105P1 とアミノ酸配列の相同性が近いにもかかわらず構造的には閉じた FG ヘリックスを持つなど、比較的に低い構造相同性[PDB コード 2ZBX、Z スコア= 42.7、対応する 372 残基の C α 原子に対する RMSD = 2.6 Å] を示す[12] (図 1-6E)。

他の P450 と同様に、CYP105P1 の WT-free 構造の BC ループと FG ループ部位は比較的に高い B-factor を示した。特に、BC ループ部位は一部 (Thr79-Pro82) が disorder していた。今まで P450 PikC のリガンドフリーの open 構造[10]、P450 StaP (CYP245A1) [13]、CYP231A2 の基質フリーの構造[14]など複数の構造において、BC ループが disorder していると報告されている。

MoxA、P450 SU-1、P450nor を含むほとんどの P450 は BC ループ部位に α ヘリックス (通常 B'ヘリックス) を持っているが、CYP105P1 の WT-free の構造には含まれていなかった (図 1-5、図 1-6A、図 1-7A)。CYP105P1 の WT-free の構造

の BC ループ部位は特徴的な構造をしていた。BC ループの N 末端側 (Ala70–His72) は一つの短い 3_{10} ヘリックスを作っていて、His72 の imidazole 側鎖部分はヘムの鉄と結合していた (2.2 Å) (図 1-5B)。この部分の電子密度マップは明瞭に確認できる (図 1-8A)。この局所的な構造は His72 と His69 の二つの Nδ1 原子の間の水素結合 (2.9 Å) と、その他の、いくつかの水分子を含む水素結合により安定化されている (図 1-9A)。この構造で、B ヘリックスの後ろにある Phe63–Val67 はβシート (β1-6) を作っている (図 1-7A)。

野生型 4PI 結合 (WT-4PI) の全体構造

WT-4PI の構造では BC ループの disorder した部分 (Ala70–Gln80) が WT-free より長く、His72 を含む短い 3_{10} ヘリックスも確認できない。WT-4PI と WT-free の構造は、BC ループ部分以外はほとんど類似している (対応する $C\alpha$ 原子に対する RMSD = 0.75 Å) (図 1-7B)。この disorder した部分の両側の領域は、分子の外側に向いていて (図 1-7B、図 1-10)、B ヘリックスの後に続く β1-6 strand は作っていない。結合した 4PI 分子の $F_{obs} - F_{calc}$ omit マップは図 1-8B に示した。4PI の imidazole 環は WT-free の His72 側鎖と同じ位置を占めていた。imidazole の一つの窒素原子はヘムと直接結合し、もう一つの imidazole 窒素原子は Thr241 と水素結合 (2.9 Å) をしていた (図 1-9B)。4PI のフェニル環は四つの疎水性残基、Leu88、Trp89、Ile236、Phe286 により囲まれていた。これらの相互作用は他の 4PI 結合の P450 構造と類似していた[15] [16] [17] [18] [19]。

部位特異的変異体

WT-free の構造で His72 の imidazole 側鎖はヘム鉄に直接結合している。His72 の重要性を調べるために His72 を Ala、Lys、Glu、Cys、Met に置換した変異体と His72 と His69、両方を Ala に置換した二重変異体を作製し、野生型と同様の

方法で発現させて、SDS-PAGE で単一になるまで精製した。これらの変異体を用いて吸収スペクトル測定を行った結果、全部の変異体でスペクトルのソーレー帯の極大は 421 nm だった。本章では主に H72A 変異体を用いて実験と考察を行った。H72A 変異体の精製後の SDS-PAGE は図 1-2E で示す。

吸収スペクトル測定

精製後の野生型 CYP105P1 の吸収スペクトルを測定した。酸化型は 420 nm に鋭いソーレー帯の極大を持ち、540 nm に β 帯、571 nm に α 帯の山を持つ、典型的な低スピン型スペクトルを示した。ジチオナイト還元型は 418 nm に吸収が減少したソーレー帯の極大を持ち、CO 結合型は 447 nm と 548 nm に山を持つスペクトルが得られた (図 1-11A)。精製後の H72A 変異体の酸化型は 421 nm にソーレー帯の極大を持ち、還元型と CO 結合型の特徴は野生型 CYP105P1 とほぼ同様であった (図 1-11B)。

P450 の Type II スペクトル変化はヘムの第六配位子が窒素性配位子 (通常窒素を含む芳香族複素環化合物) によって置換されることによって起こり、酸化型でソーレー帯が長波長側へ移行する。CYP105P1 の WT-free の結晶構造で His72 の imidazole 側鎖部分がヘムに結合していたことから、野生型の吸収スペクトルは Type II スペクトル変化後に相当する約 425 nm にソーレー帯極大が存在すると予想された。しかし、予想外に野生型と H72A 変異体は酸化型でそれぞれ 420 nm、421 nm のほぼ同様なソーレー帯極大を示し、さらに、次に示すように、どちらも典型的な Type II スペクトル変化を示したため、CYP105P1 のヒスチジン結合構造は溶液中では支配的ではないことが示唆された。

解離定数 K_d 測定

P450 の Type II スペクトル変化は酸化型でソーレー帯が長波長側へ移行し、そ

の差スペクトルは 425–435 nm の山と 390–413 nm の谷[20] [21] [22]を持つ。図 1-12 では野生型と H72A 変異体の 4PI で滴定を行った結果を示した。両方において典型的な Type II スペクトル変化を示し、ほぼ同様な結果が得られた。野生型と H72A 変異体の解離定数 K_d 値はそれぞれ $12.5 \pm 0.4 \mu\text{M}$ 、 $15.2 \pm 1.0 \mu\text{M}$ であった。

EPR 測定

EPR は電子スピン共鳴と呼ばれる。電子は、電荷共に、スピン角運動量を持つため磁気双極子を伴うことになる。従って、自由な電子を磁場中におくと、その磁気双極子が磁場に平行か反平行かで電子の持つエネルギーが違ってくる。このエネルギーの差に相当するエネルギーを持つ電磁波を照射すると、電子が電磁波を吸収して、共鳴現象が観測される。この時、電子が回りの微視的な環境の影響を受けて、共鳴の条件が変わってくる。従って共鳴吸収が起きるときの、磁場の強さ・電磁波の周波数・共鳴の大きさ・幅を調べることで、電子の回りの微視的な環境について知ることができる。

野生型と H72A 変異体を用いて、 $g \sim 2$ 付近の低スピン領域で、4PI なしとありの条件下で EPR スペクトル測定を行った（図 1-13）。

4PI なしの条件で野生型と H72A 変異体は再び実質的に同様な結果 ($g_z = 2.42$ 、 $g_y = 2.25$ 、 $g_x = 1.91$) を示した。この結果は、吸収スペクトル結果と同様に、CYP105P1 のヒスチジン結合構造は溶液中では支配的ではないことが示唆された。

4PI 存在下ではそれぞれピークの増加 ($g = 2.50$ and 1.87) が見られたが、野生型と変異体で大きな差は見られなかった。

ヒスチジン結合状態の検出

上記の結果を踏まえ、UV-可視吸収スペクトル測定法を用いて、溶液中でのヒスチジン結合状態の検出を試みた。はるかに低い濃度のたんぱく質 (~3 μM) を用いて、結晶化条件と類似した条件、0–4.8 M sodium formate (pH 8.0)、0–3.6 M sodium acetate (pH 8.0)、20 mM MOPS-NaOH (pH 7.4) の中の 0–3.0 M potassium chloride に変えて測定を行った。しかし、試みたすべての条件においてソーレー帯極大は 419–422 nm から移行することはなく (データは示さない)、溶液中でのヒスチジン結合状態を検出することはできなかった。

H72A 変異体の結晶化

H72A-free は WT-free の結晶化条件を参考にした。沈殿剤は sodium formate を用い、タンパク質の濃度と pH を変えて最適化を行った。その結果、4°C でシッピングドロップ蒸気拡散法により、1 μL のタンパク質溶液[10 mg/mL、10 mM Tris-HCl (pH7.5)、0.5 M NaCl、0.1 mM EDTA]と 1 μL のリザーバー溶液[4.2 M sodium formate、pH 8.2]を混合することにより、良質の結晶を得ることができた (図 1-4C)。この結晶は空間群 $P4_32_12$ に属し、2.4 Å 分解能まで回折した。

H72A 変異体リガンドフリーの (H72A-free) の全体構造

H72A-free の構造は精密化した WT-free の構造をサーチモデルとして、分子置換法により 2.4 Å 分解能で決定し、 R 因子=18.4% (R_{free} =23.5%) まで精密化した。非対称単位には、一つの CYP105P1 分子が含まれる。最終モデルは、7-400 のアミノ酸残基、一つのヘム分子、225 個の水分子が含まれる。

H72A-free の構造は WT-free (対応する 340 残基の $\text{C}\alpha$ 原子に対する RMSD = 0.61 Å) と WT-4PI (対応する 350 残基の $\text{C}\alpha$ 原子に対する RMSD = 0.62 Å) 構造と基本的に同様であった。この構造では全部の BC ループ部分がモデル構築された。H72A-free 構造では BC ループ部分が上の方に大きく移動し、遠位側ヘムが

ケットの入り口が広く開くようになっている (図 1-7C)。BC ループは明瞭な二次構造を作っていない。BC ループの N 末端部分 (His69–Gly76) と β 1-2– β 1-3 ループ (Thr40–His43) 部分の相互作用は BC ループの open コンフォメーションを安定化させている (図 1-7C)。Ala72 はヘム鉄から 17 Å 離れていた。BC ループの中心部分にある二つの残基 (Glu80、Lys81 を図 1-10 ではマゼンタ色で示している。) は比較的に弱い電子密度と高い B-factor を示している。BC ループの C 末端側部分 (Gly83–Gly92) のコンフォメーションは WT-free と WT-4PI 構造と類似している (図 1-10)。BC ループ部分と対比的に、三つの構造の FG ヘリックス部分はほとんど重なっている。H72A-free 構造のヘム鉄の第六配位子は水分子になっていて、Asp237 の主鎖カルボニル酸素との水素結合により安定化されていた (図 1-9C)。この観測結果は先に示した、CYP105P1 のヒスチジン結合状態は支配的ではないという分光学的結果と一致している。

活性比較

H72A 変異体は CYP105P1 の野生型と同様に filipin I に対して活性を示した (図 1-14)。野生型と H72A 変異体の触媒活性を比較したところ、H72A 変異体の活性は野生型より約 20% 上昇した。その理由としては、野生型では一部存在したヒスチジンとヘムの結合が変異体では無くなり、基質の結合が容易になったからであると考えられる。

考察

図 1-15 は三つの CYP105P1 構造と二つの構造類似性の高い P450 である、MoxA、P450nor のリガンドフリーの構造を分子表面図で示している。P450nor のリガンドフリーの構造は open コンフォメーションをとり、ヘムは広い NADH 結合チャンネルを通して見えている (図 1-15E)。MoxA は活性中心に結晶化バッファー中に存在していた 2- (N-morpholino) ethanesulfonic acid (MES) が結合しているが、基本的に open コンフォメーションをとっている (図 1-15D)。CYP105P1 の WT-free 構造も FG ヘリックスが開いた状態であるために、基本的に open コンフォメーションではあるが、BC ループがヘムの方に陥没し、ヘムの遠位側ヘムポケットを完全に覆うようになっている (図 1-15A)。一方、WT-4PI と H72A-free 構造は開いた BC ループを持ち、分子の外からヘムにアクセス可能になっている (図 1-15B と図 1-15C)。これらの事実は MoxA と P450nor と異なる CYP105P1 の BC ループの著しい柔軟性を示唆している。CYP105P1 に類似したバクテリアの P450、OxyB (CYP165B3)、P450 PikC、P450 SU-1 のリガンドフリーの構造は 3 から 7 残基が disorder した BC ループを持っている[10] [12] [23]。対照的に、リガンドなしとリガンド結合の構造で FG ヘリックスが動く例はいくつもある。例えば、*Sulfolobus solfataricus* 由来の CYP119[24]、P450nor[25]、そして CYP158A2[26]などである。膜結合 P450 が脂溶性の基質を取り入れる仕組みは可溶性 P450 とは異なっている。哺乳類の CYP2B4 の場合、可溶性 P450 のチャンネルとは垂直な向きに、広いチャンネルが存在している。そのチャンネルは、B ヘリックスと C ヘリックスの間にあり、ヘム面の上にある[27] [28]。チャンネルの開口には BC ループと C ヘリックスの大幅な動きが直接関わっていて、リン脂質二重層からの基質はこのチャンネルを通過して活性部位にアクセスすると考えられる[29]。*Mycobacterium tuberculosis* 由来ステロール 14 α デメチラーゼも同様な

場所に基質アクセスチャネルを持っていて、それは BC ループと C ヘリックスの disorder によって開くようになる[27]。

今まで、ヒスチジン結合 P450 の結晶構造の例は二つある。一つは、哺乳類の CYP2B4 のリガンドフリーの構造である[28]。大きく開いたコンフォメーションの CYP2B4 の左右対称のホモ二量体構造では、一つの分子の FG ヘリックスがもう一つの分子の cleft を満たすようになっている。FG ヘリックスの先端にある His226 残基はヘム鉄に第六配位子として結合し、分子間の配位結合を作っている (図 1-16A)。この独特なホモ二量体は UV-可視分光法 (ソーレー帯の極大が 424 nm に移動) により、溶液中でも確認できた。もう一つの例は P450 BM3 の遺伝子操作された A264H 変異体である[30] (図 1-16B)。Ala264 は I ヘリックスのヘム鉄から近い場所に位置していて、その変異体 (例えば、グルタミン酸、リジン、ヒスチジン) は第六配位子としてヘムと結合する。結合状態は溶液中でも安定で、UV-可視吸収スペクトル測定法 (427 nm にソーレー帯極大を持つ)、EPR 法 ($g = 2.50, 2.26, 1.89$)、磁気円二色性 (MCD) 法を含む分光学的な方法でも確認されている。

ここで述べた CYP105P1 のリガンドフリーの構造と小さい阻害剤 (4PI) 結合構造で、三つの異なる BC ループのコンフォメーションが確認できた。そして、WT-free と H72A-free 構造のいずれにおいても、野生型のヒスチジン結合コンフォメーションは crystal packing によるものではないことが確認できる (図 1-17)。従って、理由は不明だが、ヒスチジン結合コンフォメーションは野生型の結晶中だけで安定化している可能性が考えられる。これらの結果からは CYP105P1 の BC ループが溶液中で高い柔軟性をもつことが強く示唆される。可溶性 P450 が大きいマクロライド系基質をヘムポケットに受け入れる場合、入り口部分の構造的柔軟性は必要である。

図 1-18 では *S. avermitilis* ゲノム中の CYP105 ファミリーと高い相同性を持ち、

構造が解明された P450 の BC ループ部分のアミノ酸配列のアライメントを示した。CYP105P1 には保存された FP/WP モチーフが欠けている。さらに、CYP105P1 と CYP105D6 にはこの部分にいくつかのグリシン残基が含まれている。このような配列の特徴は *filipin* 水酸化酵素の BC ループ部分に柔軟性をもたらしていると考えられる。

表 1-1 CYP105P1 の PCR 用プライマー

CYP105P1-1F 5'-CCCATATGCCCGAGCCCACCGCCGACGC-3'

CYP105P1-2R 5'-GCACTAGTTCAGTGGTGGTGGTGCCAGGTGACGGGCAGCTCGTGCACG-3'

付加したヒスチジンコドン¹を太字で示し、*Nde* I、*Spe* I 制限酵素部位を下線で示す。

表 1-2 改変 TB 培地 1 L の組成

12 g	Bacto tryptone
24 g	Bacto yeast extract
2 g	Bacto peptone
2.31 g	KH_2PO_4
12.54 g	K_2HPO_4) pH7.4
337.2 mg	thiamine hydrochloride
128.4 mg	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
83.8 mg	δ -ALA
250 μ L	Trace element (組成は表 1-2)
100 mg	ampicilin

表 1-3 P450 発現用 Trace element の組成

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	5.4 g
$\text{CoCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	400 mg
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	400 mg
ZnCl_2	200 mg
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	200 mg
CuCl_2	200 mg
H_3BO_3	100 mg
conc.HCl	20 mL
D.W.	q.s
Total	200 mL

0.45 μm のフィルターで濾過滅菌後、4°Cで保存

表 1-4 データ収集と精密化の統計値

Data set	WT-free	WT-4PI	H72A-free
Data collection statistics			
Beam line	PF-AR NW12A	PF-AR NW12A	PF-BL6A
Wavelength (Å)	1.000	1.000	1.000
Space group	$P4_32_12$	$P3_121$	$P4_32_12$
Unit cell (Å)	$a = b = 88.401$ $c = 193.885$	$a = b = 143.725$ $c = 70.943$	$a = b = 88.635$ $c = 191.473$
Resolution (Å) ^a	50.00-1.95 (2.02-1.95)	50.00-2.60 (2.69-2.60)	50.00-2.40 (2.49-2.40)
Total reflections	812,705	294,967	407,345
Unique reflections	57,002	26,300	30,777
Completeness (%) ^a	99.8 (100.0)	100.0 (100.0)	99.8 (100.0)
Redundancy ^a	14.3 (14.1)	11.2 (11.1)	13.3 (12.7)
Mean $I/\sigma(I)$ ^a	65.3 (5.3)	38.7 (4.3)	48.3 (5.3)
R_{merge} (%) ^a	5.1 (40.9)	6.9 (42.9)	6.0 (47.2)
Refinement statistics			
PDB code	3E5J	3E5K	3E5L
Resolution range (Å)	38.75-1.95	34.52-2.60	40.23-2.40
No. of reflections	53,921	24,928	29,066
R -factor / R_{free} (%)	19.0 / 21.1	17.6 / 23.6	18.4 / 23.5
No. of TLS groups	6	3	7
Average B-factor (Å ²)			
Protein	29.5	39.6	40.2
Heme	30.8	35.9	38.3
4PI	-	45.0	-
Water	53.5	50.3	54.2
RMSD from ideal values			
Bond lengths (Å)	0.016	0.017	0.023
Bond angles (degrees)	1.604	3.549	2.186
Ramachandran Plot (%) ^b			
Favored	95.5	93.9	96.9
Allowed	2.9	4.5	2.1
Outlier	1.6	1.6	1.0

^a Values in parentheses are for the highest resolution shell.

^b Determined by RAMPAGE server (21).

表 1-5 部位特異的変異の導入に用いたオリゴヌクレオチド

H72A	5'-GTGCCC <u>ACGCGT</u> TGG CC ACCCAGGACGGCGTC-3'
H72K	5'-GTGCCC <u>ACGCGT</u> TGA AG ACCCAGGACGGCGTC-3'
H72E	5'-GTGCCC <u>ACGCGT</u> TGG AG ACCCAGGACGGCGTC-3'
H72C	5'-GTGCCC <u>ACGCGT</u> TGT GG ACCCAGGACGGCGTC-3'
H72M	5'-GTGCCC <u>ACGCGT</u> TGAT G ACCCAGGACGGCGTC-3'
H69A H72A	5'-GCGTCCAGGTGCCC GCC GCACT GG CCACCCAG-3'

作製した変異のコドン_{を太字で示し、変異導入を確認するための制限酵素 *Mlu* I}
部位を下線で示す。

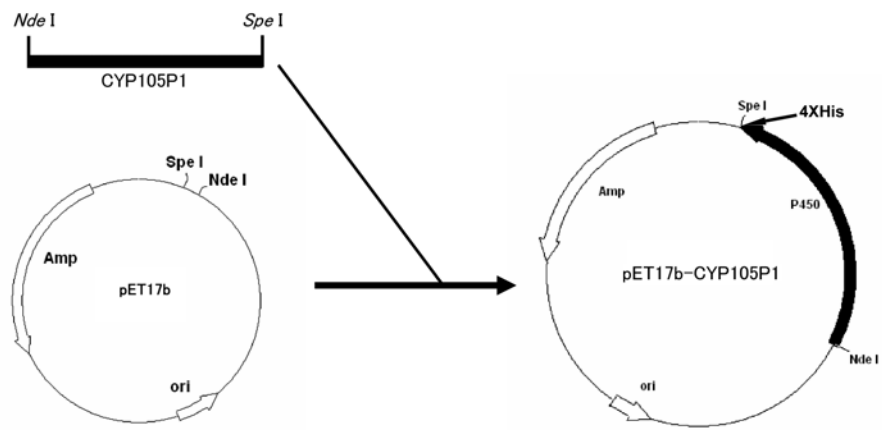


図 1-1 CYP105P1 の発現系構築

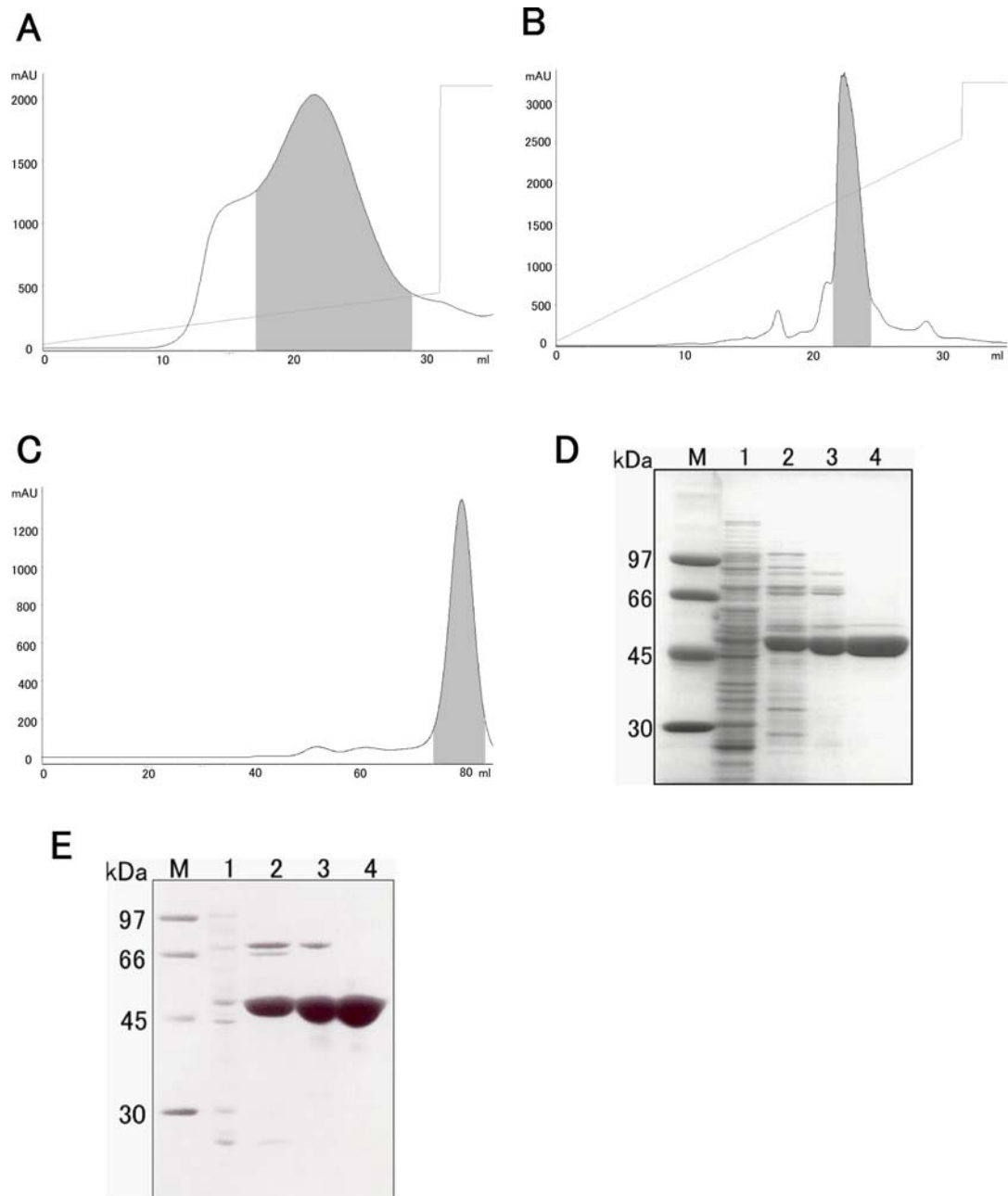


図 1-2 CYP105P1 の精製

(A-C) カラムクロマトグラフィーの溶出パターン：(A) HiTrap Chelating HP (B) Resource Q (C) Hiload 16/60 Superdex 200。CYP105P1 が含まれる画分を網かけで示す。(D、E) 野生型 (D) と H72A 変異体 (E) の SDS-PAGE：M、マーカー；1、菌体抽出液；2、HiTrap Chelating HP；3、Resource Q；4、Hiload 16/60 Superdex 200。

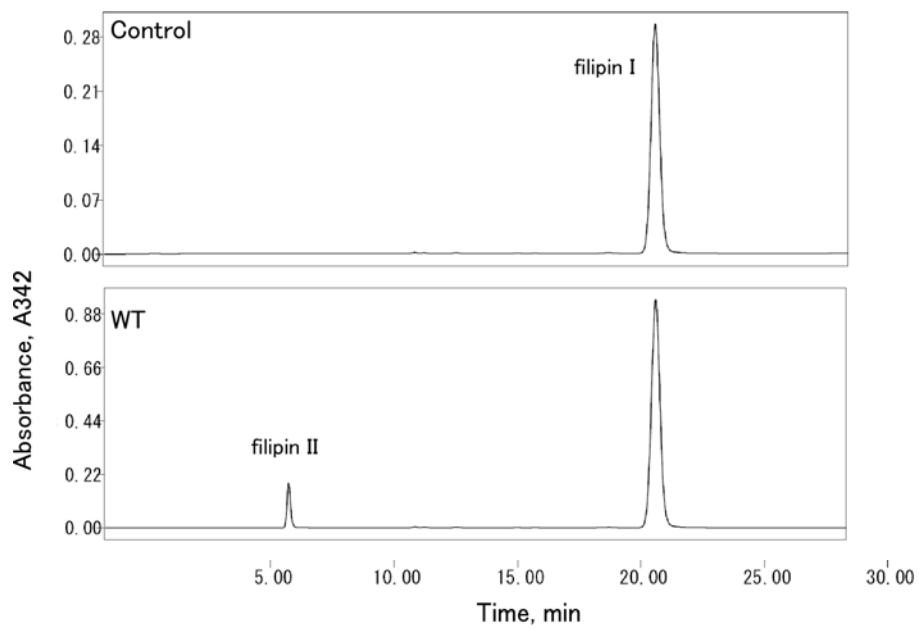


図 1-3 CYP105P1 の触媒活性

反応条件と HPLC による測定条件は本文中に示す。

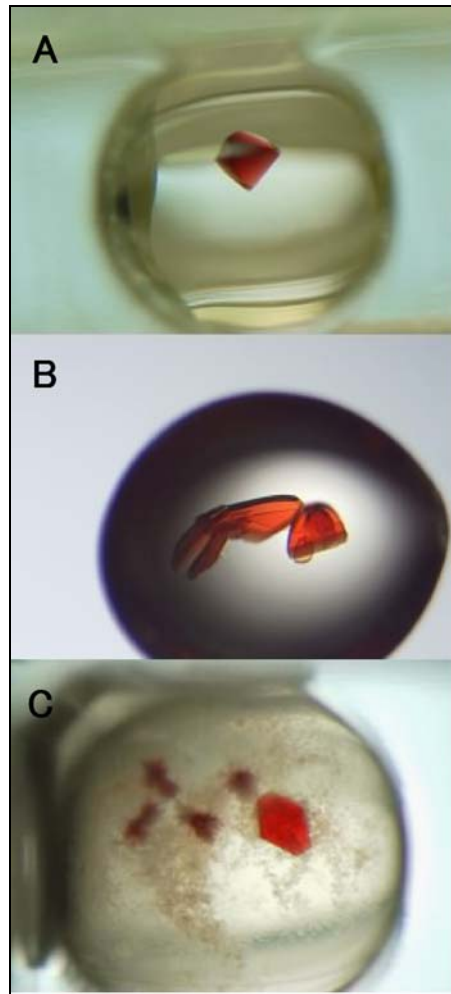


図 1-4 CYP105P1 の結晶

(A) WT-free の結晶、(B) WT-4PI の結晶、(C) H72A-free の結晶。

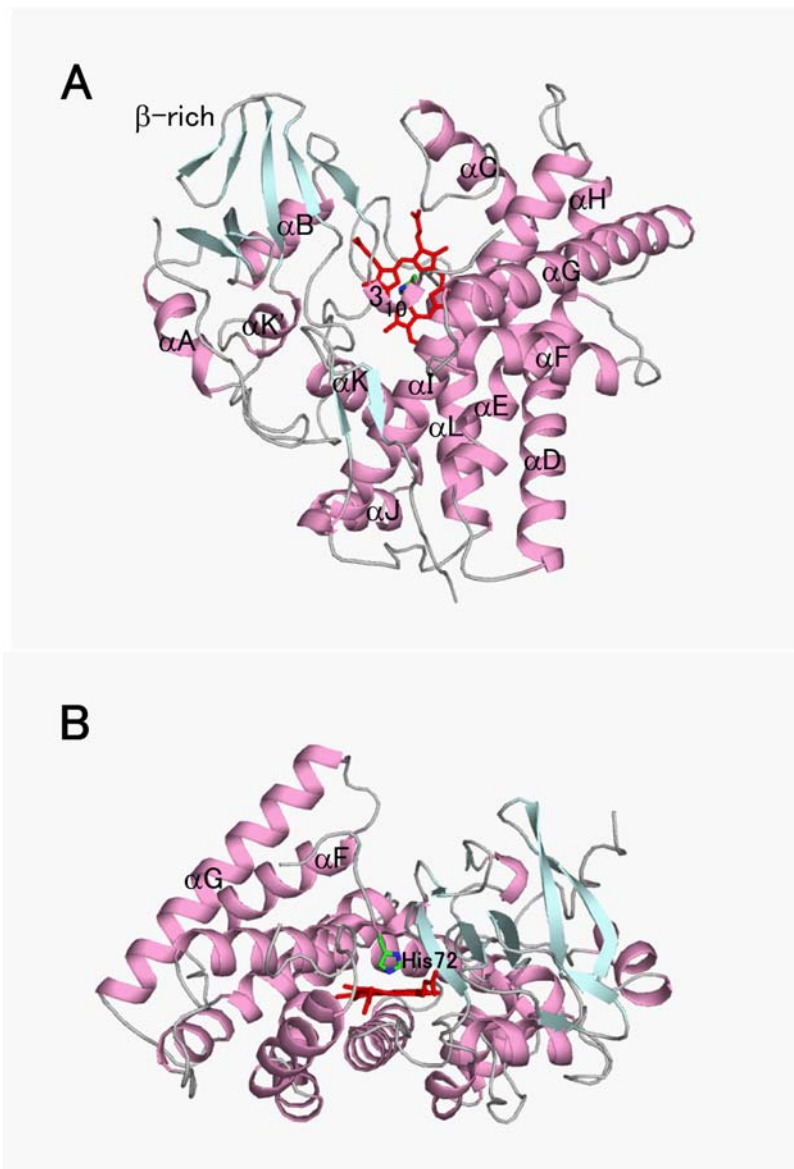


図 1-5 WT-free の全体構造

(A) Top view、(B) Side view、(A-B) において、重要なヘリックスをピンク色で示す。ヘムはスティックと球で、His72 はスティック表示で示す。

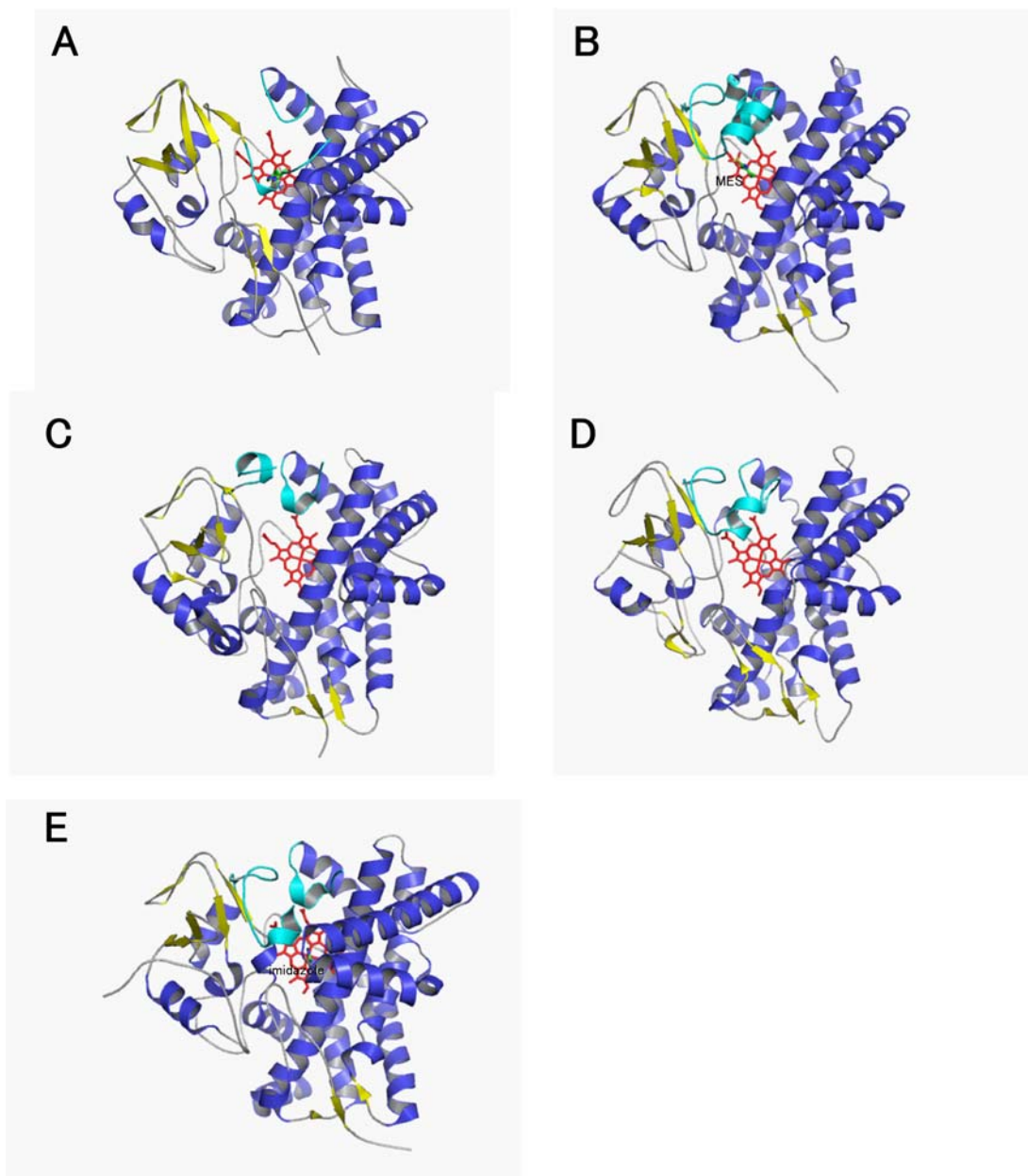


図 1-6 WT-free の構造と構造類似タンパク質の比較

(A) WT-free の構造、(B) *N.recticatena* 由来 P450moxA (CYP105) の構造、(C) *S.venezuelae* 由来 P450 PikC のリガンドフリーの open 構造、(D) カビの *F.oxysporum* 由来 P450nor のリガンドフリーの構造、(E) *S.griseolus* 由来 P450 SU-1 (CYP105A1) と imidazole 結合構造、(A-E) において、 α ヘリックスと β シートをそれぞれブルーと黄色で示す。BC ループ領域はシアン色で示す。ヘムは赤色のスティックで、リガンドは緑色のスティックで示す。

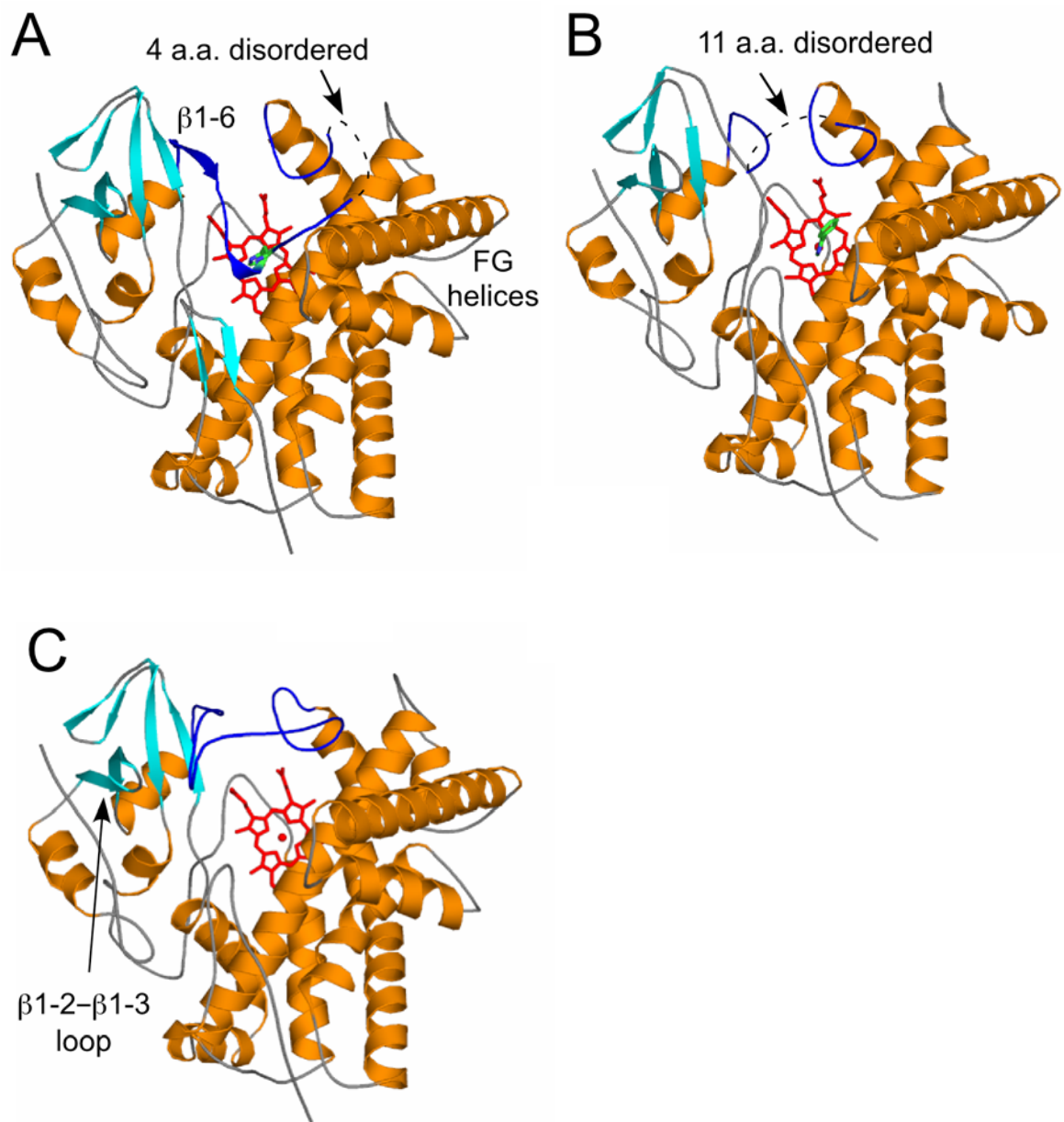


図 1-7 CYP105P1 の三つの状態の構造

(A) WT-free、(B) WT-4PI、(C) H72A-free、(A-E) において、 α ヘリックスと β シートをそれぞれオレンジ色とシアン色で示す。BC ループ領域はブルー色で示す。ヘムは赤色のスティックで、リガンドは緑色のスティックで示す。

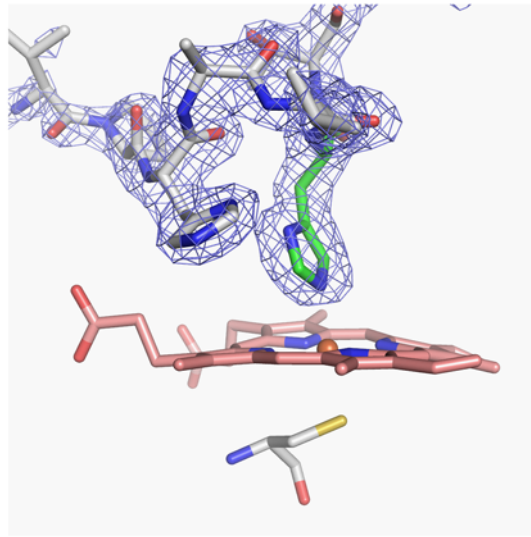
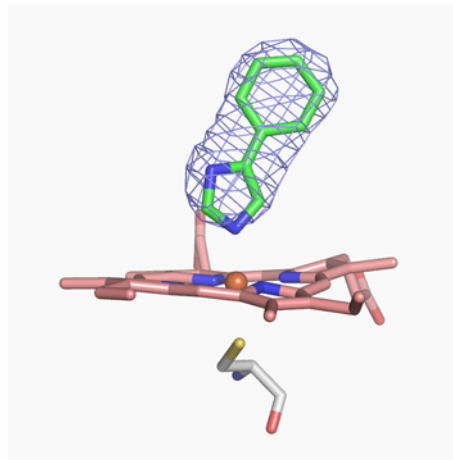
A**B**

図 1-8 $F_{\text{obs}} - F_{\text{calc omit}}$ 電子密度マップ

(A) WT-free 構造で His72 結合。contour level = 2.0 σ 。(B) WT-4PI 構造で 4PI 結合。contour level = 3.0 σ 。(A-B) において、電子密度マップは青色で示す。リガンドは緑色のスティックで、他の残基は白色スティックで示す。ヘムはスティック表示で示す。

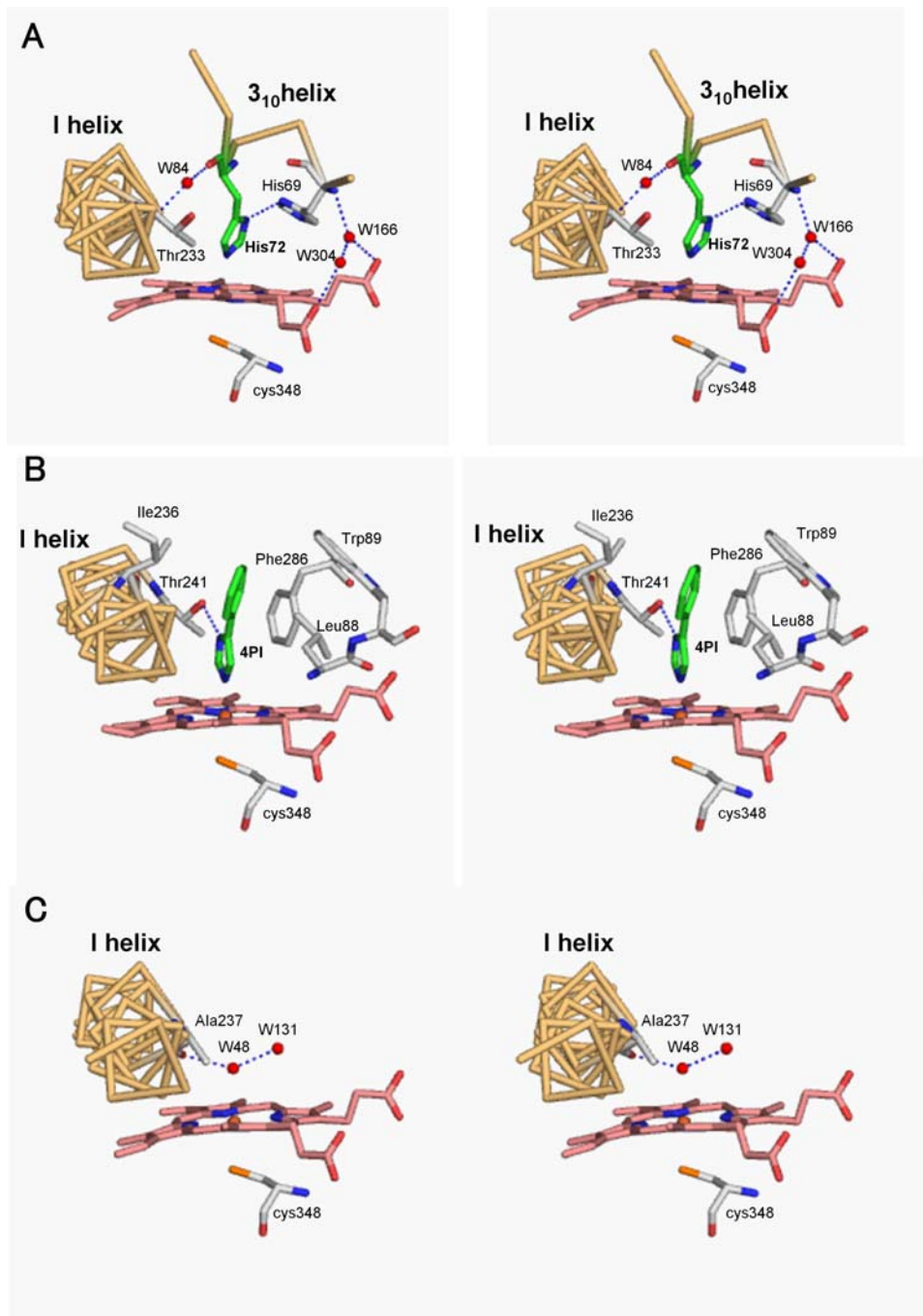


図 1-9 CYP105P1 のへム遠位側の相互作用 (ステレオ図)

(A) WT-free、(B) WT-4PI、(C) H72A-free、(A-C) において、Iヘリックスと 3_{10} ヘリックスはリボンで、へムはスティックで示す。リガンドは緑色のスティックで示し、活性部位の残基は白色のスティックで示す。水分子は赤色の球で示す。水素結合は青色の点線で示す。

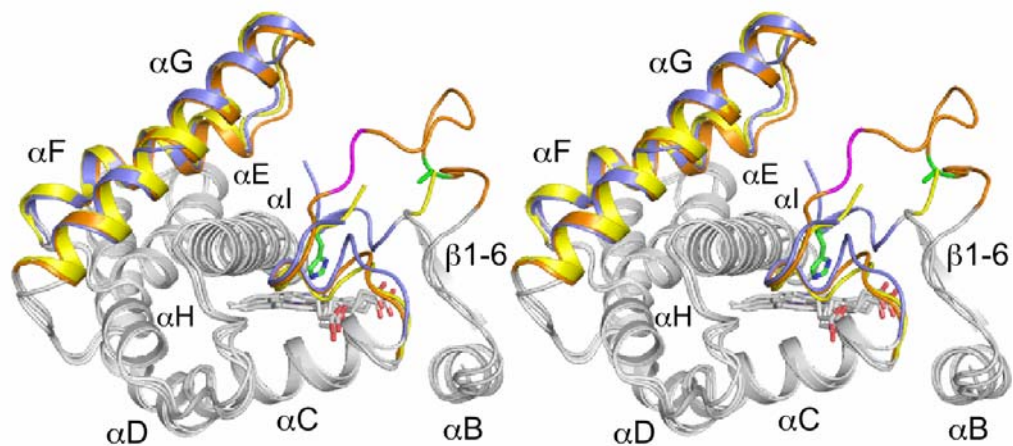


図 1-10 CYP105P1 の三つの状態の構造の重ね合わせ (ステレオ)

B ヘルックスから I ヘルックスまでの部分をリボンモデルで示す。WT-free、WT-4PI、H72A-free の構造の FG ヘルックス部位と BC ループ部位はそれぞれ青色、黄色、オレンジ色で示す。H72A-free 構造の BC ループ上の二つの残基 (Gly80 と Lys81 はマゼンタ色で示す) は比較的弱い電子密度を示した。WT-free 構造の His72 と H72A-free の Ala72 は緑色のスティックで示す。

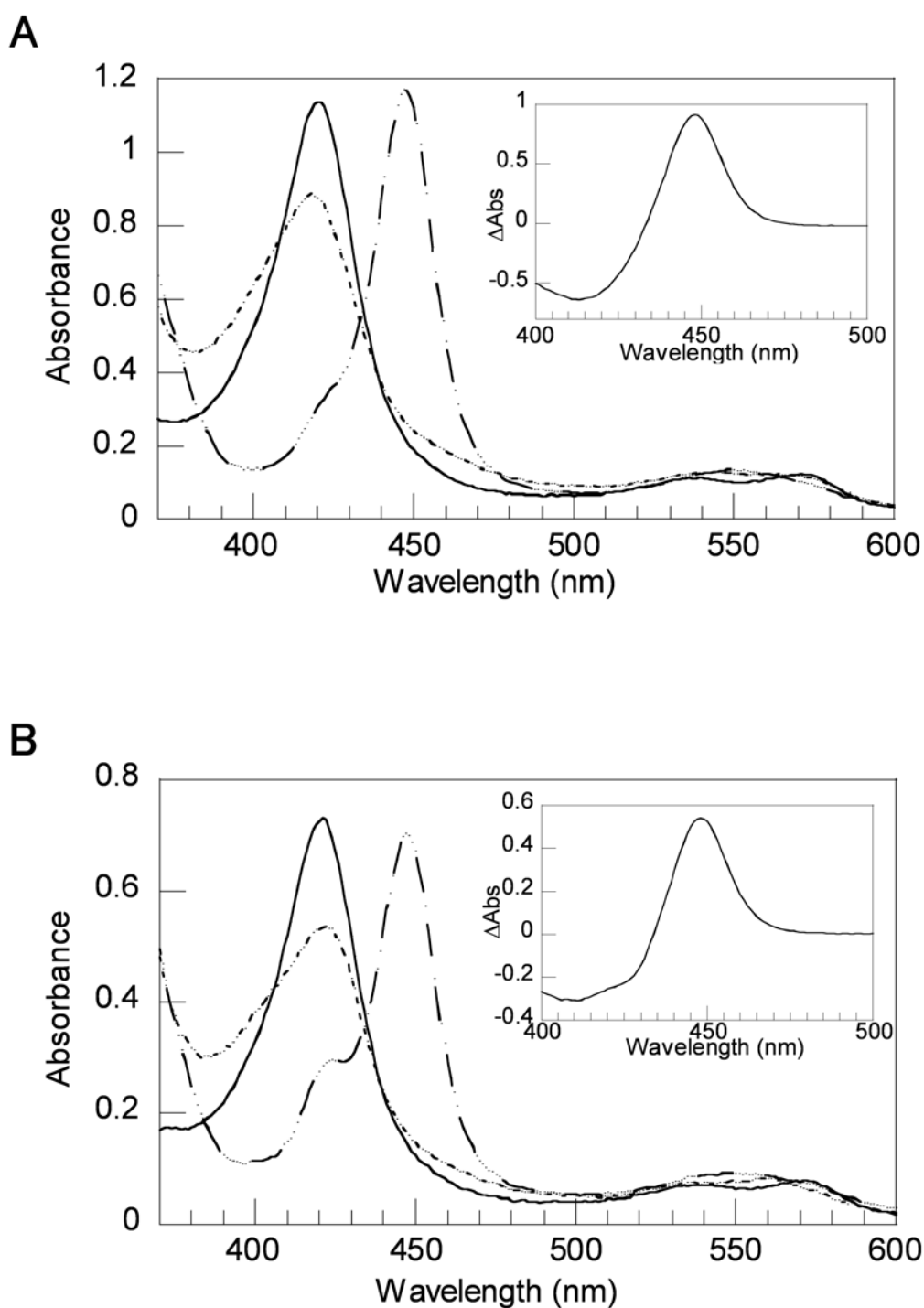


図 1-11 精製後の CYP105P1 の UV-可視吸収スペクトル

(A) 野生型 CYP105P1、(B) H72A 変異体、(A-B) において、静止型 (——)、ジチオナイト還元型 (- - -)、CO 結合理型 (- · - ·)。挿入図 : CO 差スペクトル (CO 結合理型とジチオナイト還元型のスペクトルの差)

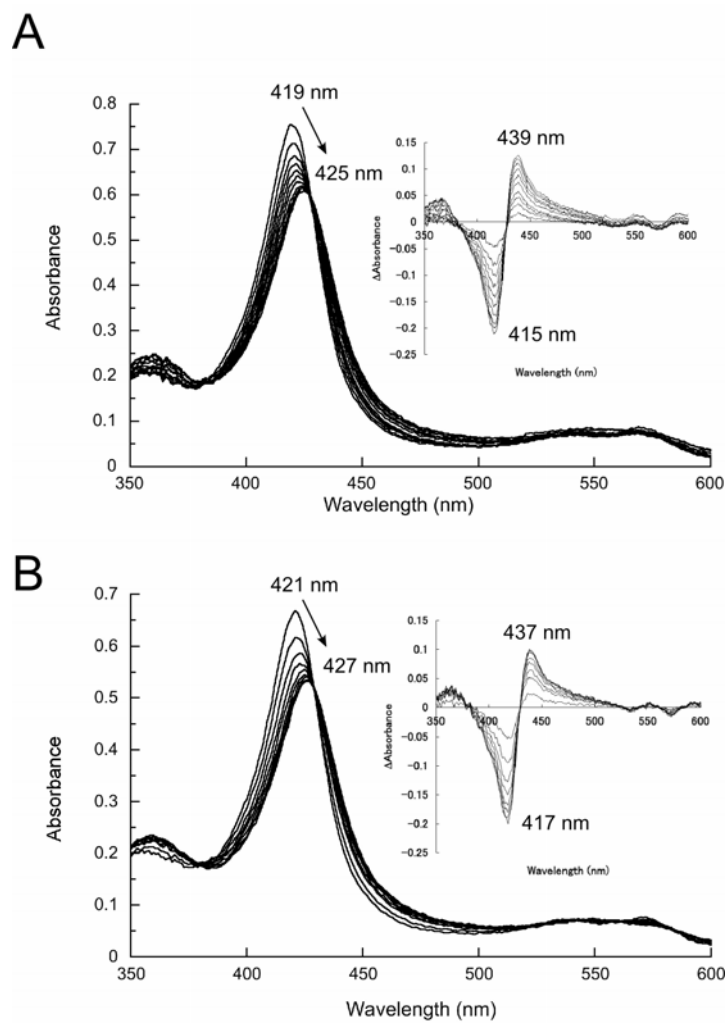


図 1-12 4PI の滴定によるの Type II スペクトル（酸化型）変化

(A) 野生型、(B) H72A 変異体、(A-B) において、挿入図は差スペクトルを示す。実験方法を参考。

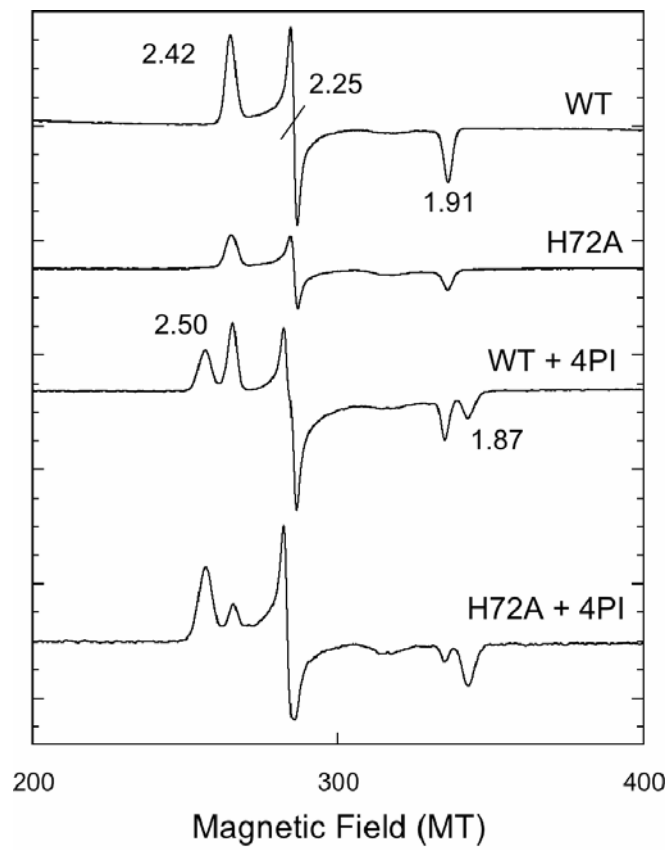


図 1-13 4PI の有無での X バンド EPR スペクトル

(A) 野生型、(B) H72A 変異体。

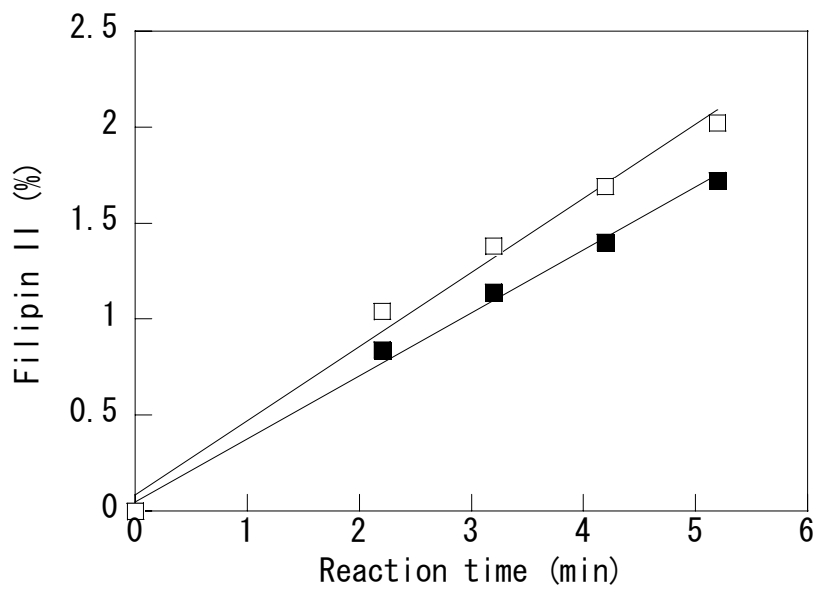


図 1-14 野生型と H72A 変異体の活性

野生型は■で、H72A 変異体は□で示す。

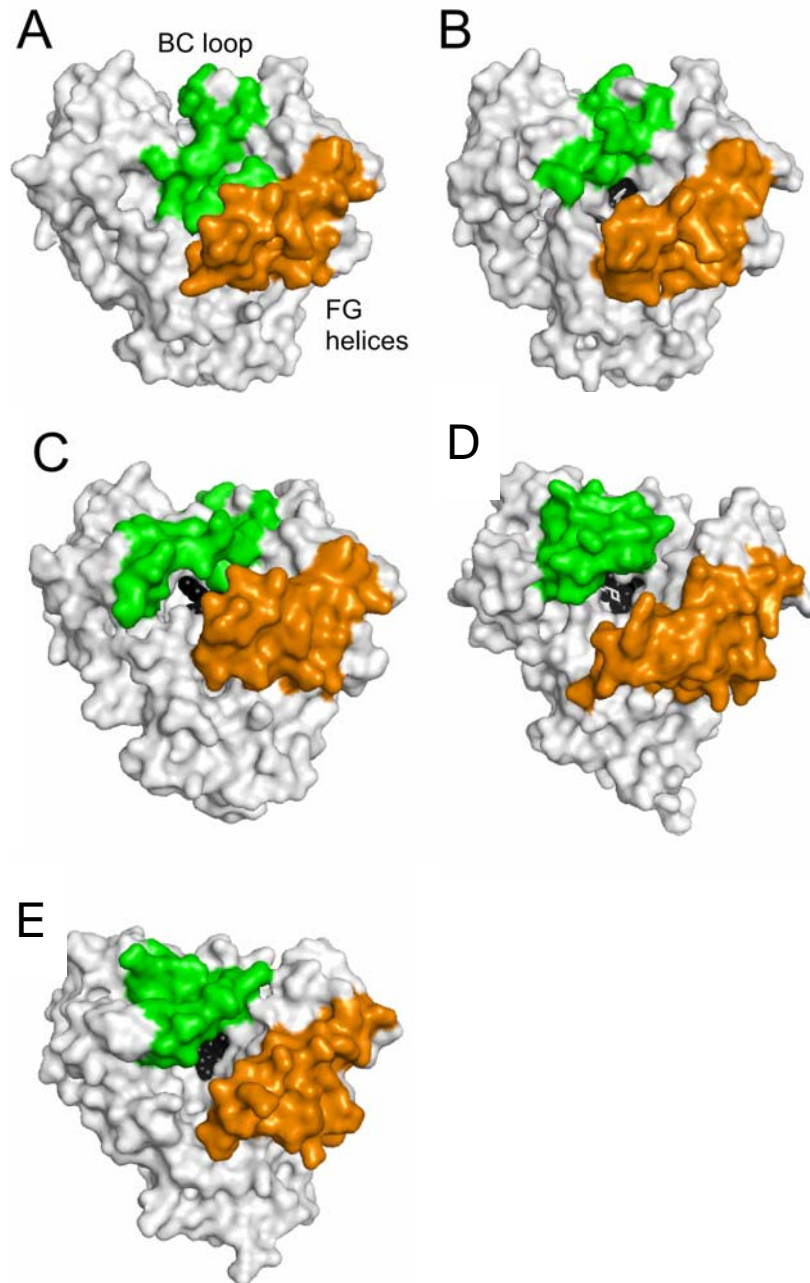


図 1-15 CYP105P1 と関連 P450 の分子表面図

(A) WT-free、(B) WT-4PI、(C) H72A-free、(D) MoxA (PDB コード : 2Z36)、
 (E) P450nor のリガンドフリー (PDB コード : 1ROM)。FG ヘリックス部位と
 BC ループ部位はそれぞれオレンジ色と緑色で示す。ヘムは黒色の球で、リガ
 ンド (4PI と MES) は白色のスティックで示す。

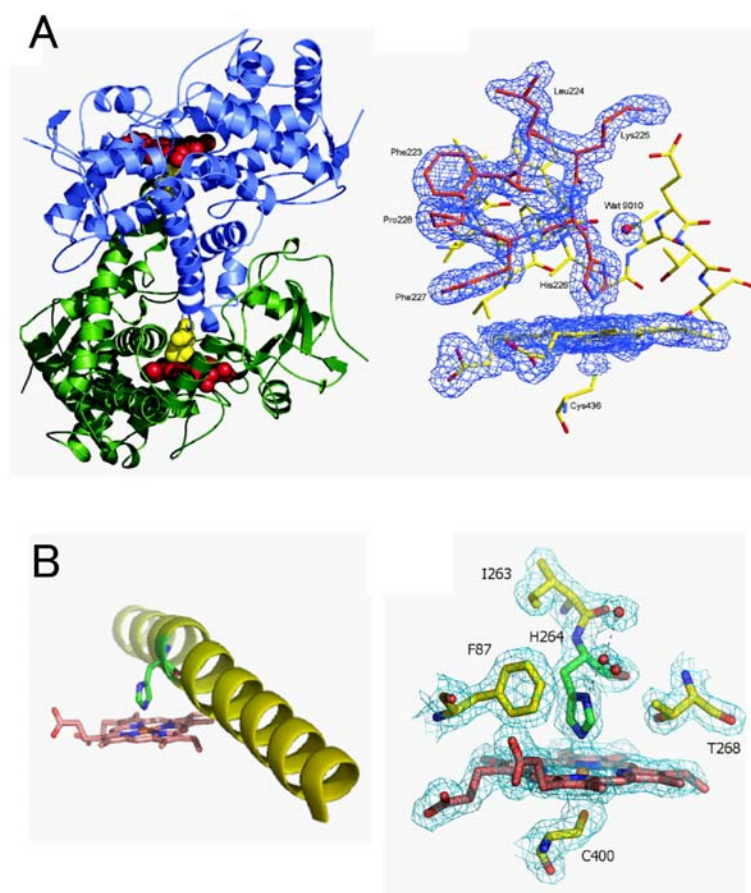


図 1-16 ヒスチジンリガンド構造

(A) 哺乳類の CYP2B4 のリガンドフリー構造におけるヒスチジンリガンド構造。左：全体構造。右：ヘム付近の拡大図。非対称単位中の隣の分子の FG ヘリックスがポケットに入り込み、その先のヒスチジンがヘムにリガンドしている。(B) P450BM3 の A264H 変異体。左：I ヘリックス上の His264 とヘム。右：ヘム付近の拡大図。

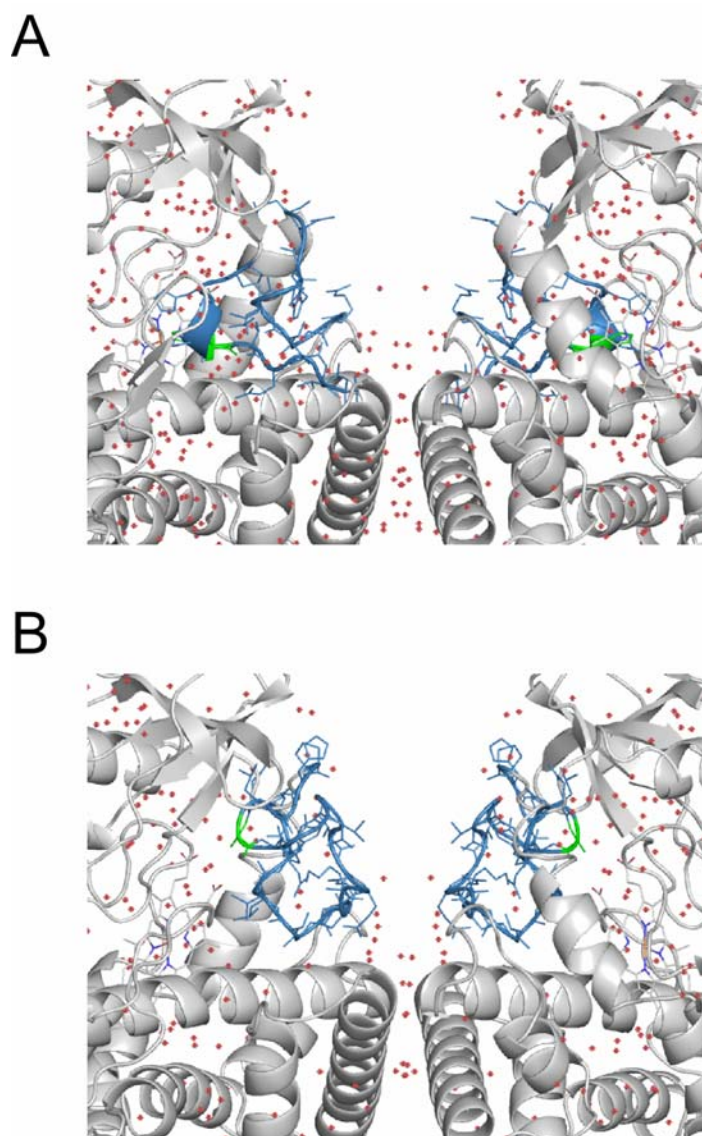


図 1-17 crystal packing 構造

(A) WT-free、(B) H72A-free、(A-B)において、BC ループは青色で示す。His72、もしくは Ala72 残基は緑色で示す。水分子は赤色の星で示す。

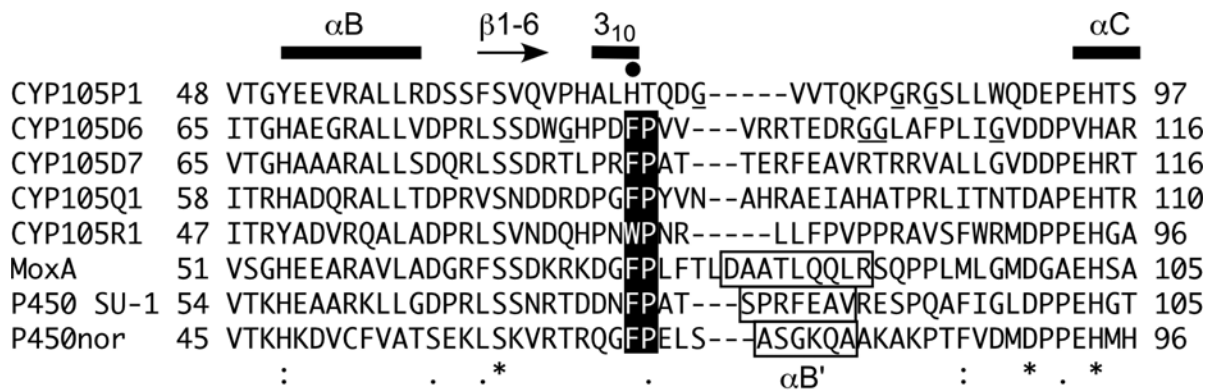


図 1-18 ゲノム *S. avermitilis* 由来の CYP105 ファミリーと MoxA (CYP105)、P450SU-1 (CYP105A1)、P450nor (CYP55A1) の BC ループとその隣接領域のアミノ酸配列のアライメント

CYP105P1 WT-free の二次構造と His72 残基を配列の上に示す。アライメントの下のシンボルは保存程度を示す。構造決定されている P450 の B'ヘリックス領域は箱で、保存された FP/WP モチーフは白黒逆の文字で、CYP105P1 の BC ループ中のグリシン残基は下線で示す。

参考文献

1. Otwinowski, Z. and W. Minor, *Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode*. Methods Enzymol., 1997. **276**: p. 307-326.
2. Vagin, A. and A. Teplyakov, *MOLREP: an automated program for molecular replacement*. J. Appl. Cryst., 1997. **30**(6): p. 1022-1025.
3. Perrakis, A., R. Morris, and V.S. Lamzin, *Automated protein model building combined with iterative structure refinement*. Nature Structural Biology, 1999. **6**(5): p. 458-463.
4. Emsley, P. and K. Cowtan, *Coot: model-building tools for molecular graphics*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2004. **60**(Pt 12 Pt 1): p. 2126-32.
5. Murshudov, G.N., A.A. Vagin, and E.J. Dodson, *Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 1997. **53**(Pt 3): p. 240-55.
6. Omura, T. and R. Sato, *The Carbon Monoxide-Binding Pigment of Liver Microsomes. I. Evidence for Its Hemoprotein Nature*. J Biol Chem, 1964. **239**: p. 2370-8.
7. Bates, P.A., et al., *Enhancement of protein modeling by human intervention in applying the automatic programs 3D-JIGSAW and 3D-PSSM*. Proteins, 2001. **Suppl 5**: p. 39-46.
8. Holm, L. and C. Sander, *Dali: a network tool for protein structure comparison*. Trends Biochem Sci, 1995. **20**(11): p. 478-80.
9. Yasutake, Y., et al., *Crystal structure of cytochrome P450 MoxA from Nonomuraea recticatena (CYP105)*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **361**(4): p. 876-82.
10. Sherman, D.H., et al., *The structural basis for substrate anchoring, active site selectivity, and product formation by P450 PikC from Streptomyces venezuelae*. J Biol Chem, 2006. **281**(36): p. 26289-97.
11. Park, S.Y., et al., *Crystal structure of nitric oxide reductase from denitrifying fungus Fusarium oxysporum*. Nat Struct Biol, 1997. **4**(10): p. 827-32.
12. Sugimoto, H., et al., *Crystal structure of CYP105A1 (P450SU-1) in complex with 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3*. Biochemistry, 2008. **47**(13): p. 4017-27.
13. Makino, M., et al., *Crystal structures and catalytic mechanism of cytochrome P450 StaP that produces the indolocarbazole skeleton*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007. **104**(28): p. 11591-11596.
14. Ho, W.W., et al., *Crystal Structure and Properties of CYP231A2 from the*

- Thermoacidophilic Archaeon Picrophilus torridus* † ‡. Biochemistry, 2008. **47**(7): p. 2071-2079.
15. Ho, W.W., et al., *Crystal structure and properties of CYP231A2 from the thermoacidophilic archaeon Picrophilus torridus*. Biochemistry, 2008. **47**(7): p. 2071-9.
 16. Podust, L.M., et al., *Comparison of the 1.85 Å structure of CYP154A1 from Streptomyces coelicolor A3(2) with the closely related CYP154C1 and CYPs from antibiotic biosynthetic pathways*. Protein Sci, 2004. **13**(1): p. 255-68.
 17. Podust, L.M., T.L. Poulos, and M.R. Waterman, *Crystal structure of cytochrome P450 14 α -sterol demethylase (CYP51) from Mycobacterium tuberculosis in complex with azole inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(6): p. 3068-73.
 18. Poulos, T.L. and A.J. Howard, *Crystal structures of metyrapone- and phenylimidazole-inhibited complexes of cytochrome P-450cam*. Biochemistry, 1987. **26**(25): p. 8165-74.
 19. Yano, J.K., et al., *Crystal structure of a thermophilic cytochrome P450 from the archaeon Sulfolobus solfataricus*. J Biol Chem, 2000. **275**(40): p. 31086-92.
 20. Ahlstrom, M.M. and I. Zamora, *Characterization of type II ligands in CYP2C9 and CYP3A4*. J Med Chem, 2008. **51**(6): p. 1755-63.
 21. Kumaki, K., et al., *Correlation of type I, type II, and reverse type I difference spectra with absolute changes in spin state of hepatic microsomal cytochrome P-450 iron from five mammalian species*. J Biol Chem, 1978. **253**(4): p. 1048-58.
 22. Schenkman, J.B., H. Remmer, and R.W. Estabrook, *Spectral studies of drug interaction with hepatic microsomal cytochrome*. Mol Pharmacol, 1967. **3**(2): p. 113-23.
 23. Zerbe, K., et al., *Crystal structure of OxyB, a cytochrome P450 implicated in an oxidative phenol coupling reaction during vancomycin biosynthesis*. J Biol Chem, 2002. **277**(49): p. 47476-85.
 24. Park, S.Y., et al., *Thermophilic cytochrome P450 (CYP119) from Sulfolobus solfataricus: high resolution structure and functional properties*. J Inorg Biochem, 2002. **91**(4): p. 491-501.
 25. Oshima, R., et al., *Structural evidence for direct hydride transfer from NADH to cytochrome P450nor*. J Mol Biol, 2004. **342**(1): p. 207-17.
 26. Zhao, B., et al., *Binding of two flavin substrate molecules, oxidative coupling, and crystal structure of Streptomyces coelicolor A3(2) cytochrome P450 158A2*. J Biol Chem, 2005. **280**(12): p. 11599-607.

27. Podust, L.M., et al., *Estriol bound and ligand-free structures of sterol 14alpha-demethylase*. *Structure*, 2004. **12**(11): p. 1937-45.
28. Scott, E.E., et al., *Structure of mammalian cytochrome P450 2B4 complexed with 4-(4-chlorophenyl)imidazole at 1.9-A resolution: insight into the range of P450 conformations and the coordination of redox partner binding*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(26): p. 27294-301.
29. Zhao, Y., et al., *Structure of microsomal cytochrome P450 2B4 complexed with the antifungal drug bifonazole: insight into P450 conformational plasticity and membrane interaction*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(9): p. 5973-81.
30. Girvan, H.M., et al., *Structural and spectroscopic characterization of P450 BM3 mutants with unprecedented P450 heme iron ligand sets. New heme ligation states influence conformational equilibria in P450 BM3*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(1): p. 564-72.

第二章 *Streptomyces avermitilis* 由来 CYP105P1 の構造機能解析：

複合体の構造

序

28 員環のポリエンマクロライド抗生物質 filipin は生体膜中のコレステロールのプロープとして[1] [2]、そして、type C Niemann-Pick 病の有名な診断手段として広く使われている[3] [4]。NMR 研究で、filipin III は 18 Å の長さ、7-8 Å の幅、3-4 Å 厚さの桿菌状分子であることが分かった[5] (表 2-1)。この大きな 28 員環は rigid で、*syn* 1,3-ポリオール分子内水素結合と共役したペンタエン部分により安定化されているが、外側のアルキル鎖は非常に柔軟である。

マクロライド水酸化酵素として初めて構造が明らかになったのは erythromycin の生合成に関わっている P450eryF (CYP107A1) である[6]。近年、epothilone 生合成でエポキシ化反応を触媒する P450epoK (CYP107B1) の基質フリーと基質結合型の結晶構造が決定された[7]。そして、narbomycin、pikromycin など数多いマクロライド系抗生物質の生産に関わっている P450 PikC (CYP107L1) の結晶構造が報告された[8]。

本章では、CYP105P1 の野生型と生理基質である filipin I の複合体構造 (WT-filipin I)、H72A 変異体と最終産物である filipin III の複合体構造 (H72A-filipin III) を解析し、基質特異性の構造基盤の解明を試みた。

材料と方法

材料

本研究に用いた試薬は、特に記さない限り、和光純薬工業株式会社または SIGMA の特級試薬を用いた。

発現と精製

第一章で記述した方法で行った。

filipin Iの単離精製

第一章で記述した方法で行った。

解離定数 K_d 測定

分光光度計は V-550 (JASCO)を用い、25°Cで測定を行った。セルは光路長 1-cm の石英セルを用いた。測定波長は 300 nm~600 nm について吸収スペクトルを測定した。CYP105P1 をバッファー[50 mM potassium phosphate (pH 7.5)、0.1 mM EDTA、0.1 mM DTT、10% (v/v) glycerol]を用いて最終濃度が約 5~10 μM になるように希釈した。filipin I と filipin III は DMSO に溶解し、高濃度溶液を作製した。

- 1) 1 mL のバッファーと 1 mL のタンパク質溶液が入った二つのセルを用意し、それぞれ吸収スペクトルを測定した。これを基質濃度が 0 μM のスペクトルとした。
- 2) 次に基質高濃度溶液 1 μL (任意) を両セルにそれぞれ添加し、よく攪拌してパラフィルムで蓋をし、2 分間放置した後、スペクトルを測定した。
- 3) 次に再度基質高濃度溶液 1 μL (任意) を両セルに添加し、よく攪拌してパラフィルムで蓋をし、2 分間放置した後、スペクトルを測定した。スペク

トルの変化を観察しながら、基質の添加量を調節した。

- 4) スペクトル変化を観察しながら滴定を行い、スペクトルを測定した。
- 5) スペクトルの変化が起こらなくなるまで滴定を行った。
- 6) 酵素溶液のスペクトルからバッファー溶液のスペクトルをそれぞれ引いて、酵素のスペクトルとした。
- 7) 各基質濃度のスペクトルについてそれぞれ基質濃度 0 μM のスペクトルと差を算出し、差スペクトルとした。差スペクトルで約 380 nm 付近の最も高い吸収 ($\Delta\text{Absorbance}$) と約 420 nm 付近の最も低い吸収 ($\Delta\text{Absorbance}$) の差を Y 軸に、それぞれの基質濃度を X 軸にプロットした。

結晶化

CYP105P1 (野生型、変異体) と filipin (filipiin I, filipin III) を用いた複合体結晶化を試みた。filipin III は Sigma から購入した filipin mixture を使用した。filipin mixture は *S. filipinensis* により生産され、C1' と C26 位の水酸基の有無の違いによる四つのマクロライド filipin I, filipin II, filipin III, filipin IV (filipin III の異性体) の混合物である[9] [10]。この中で filipin III が 80%以上占めている。filipin I は市販がないため、研究室で単離精製したものを使用した。結晶化は以下の方法で行った (図 2-1)。

- I. 溶媒は DMSO を用いて、高濃度 filipin 溶液を作製した。
- II. 濃縮酵素に高濃度 filipin 溶液 2 μL 添加し、ULTRAFREEE-0.5 Centrifugal Filter Device (Millipore) を用いて遠心濃縮した。
- III. その中に 400 μL の結晶化バッファーを添加し、もう一度高濃度 filipin 溶液 2 μL 添加し、ULTRAFREEE-0.5 Centrifugal Filter Device を用いて遠心濃縮した。
- IV. これを二、三回繰り返す、酵素と基質を十分結合させた。
- V. 次に 400 μL のバッファーだけを添加し、濃縮することで余計な化合物

を排除した。

VI. この洗浄ステップも二、三回繰り返す、最後に Minisart 0.45 μm Filter を通し、結晶化に使用した。

結晶化条件の初期スクリーニングは、Crystal Screen (Hampton Research)、Crystal Screen 2 (Hampton Research)、Index (Hampton Research)、Wizard Screen I (Emerald Biostructures)、Wizard Screen II (Emerald Biostructures)、Salt RX (Hampton Research)、Grid Screens (Hampton Research)、Quick Screen (Hampton Research) を用いて、シッティングドロップ蒸気拡散法により行った。結晶化は、Greiner 96 well Crystallization Plate (Greiner) を用いて、1 μL のタンパク質溶液 [10 mg/mL 酵素溶液 (基質添加後)、10 mM Tris-HCl (pH7.5)、0.1 mM EDTA、500 mM NaCl] と 1 μL のリザーバー溶液を混合し、25°Cで静置することにより行った。

X線回折データ収集

X 線回折データは高エネルギー加速器研究機構 (KEK ; 茨城県つくば市) の放射光施設 Photon Factory (PF) 実験ステーション NW12A、BL5A で CCD 検出器を用いて収集した。結晶は、20% glycerol を添加したリザーバー溶液を用いて抗凍結した。クライオループ (Hampton Research) にマウントし、100 K の N_2 ストリーム中で Flash Freezing により瞬間冷却した。波長は 1.0000 \AA で行った。回折データはプログラム HKL2000 を用いて処理した。

構造決定と精密化

本研究では、MOLREP を用いた分子置換法により構造を決定した。初期構造モデルは ARP/wARP を用いて構築した。手動でのモデル構築と精密化はそれぞれ Coot と Refmac5 を用いて行った。Refmac5 を用いた精密化の最終段階では bulk solvent correction と TLSMD サーバーによって規定されたグループより TLS 精密

化を行った。データ収集と精密化の統計値を表 2-3 に示す。タンパク質の立体構造の図は PyMOL (version 0.99; DeLano Scientific LLC, Palo Alto, CA, USA [<http://www.pymol.org>]) を用いて作製した。

結果と考察

解離定数測定

1) 生理基質 filipin I との結合

CYP105P1 の野生体と H72A 変異体を用いて生理基質 filipin I との結合を確認した。両方で 420 nm 付近のピークが 390 nm 付近に完全にシフトし、典型的な Type I スペクトル変化を示した (図 2-2、図 2-3)。331 nm、347 nm、368 nm 付近に存在する三つのピークは filipin I の吸収である。この結果から、野生型と H72A 変異体両方とも filipin I と結合することが確認できた。解離定数 K_d は非常に小さいため、正確な値は得られなかった。

2) 生産物 filipin III との結合

CYP105P1 の野生型と H72A 変異体を用いて filipin III との解離定数を測定した。野生型酵素に filipin III を添加した際、スペクトル変化は起こらなかった (図 2-4A)。一方、H72A 変異体に filipin III を添加すると 420 nm 付近のピークが減少し、390 nm 付近の増大が見られ、Type I スペクトル変化であることが示唆された (図 2-4B)。図 2-B で、filipin III の吸収により、320 nm から 370 nm 付近に幅広い山が現れ、390 nm 付近の増大の確認が困難であるが、差スペクトルからわずかに確認することができた。この結果から、H72A 変異体酵素は filipin III と結合すると考えられた。H72A 変異体と filipin III の解離定数 K_d は約 4.0 μM で、非常に小さい値を示した。

結晶化

1) 10 mg/ml の filipin I を添加した野生型酵素溶液を用いて結晶化条件の初期スクリーニングを行ったところ、以下の条件で結晶を得られた。

- Salt RX #19: 0.1 M Bis-Tris propane pH 7.0、0.7 M tri-sodium citrate dihydrate
- Wizard I #33 : 2.0 M Ammonium Sulfate、CAPS pH 10.5、Lithium sulfate

初期条件 Salt RX #19 と Wizard I #33 で得られた結晶を用いて X 線回折を試したところそれぞれ 2.0 Å と 1.8 Å の高分解能まで回折した。Wizard I #33 で得られた結晶を図 2-5A に示す。これらの結晶は同様に空間群 $P4_12_12$ に属していた。

2) 10 mg/ml の filipin III を添加した H72A 変異体酵素を用いて結晶化条件の初期スクリーニングを行ったところ、以下の条件で結晶を得られた。

- Salt RX #20 : 0.1 M Tris pH 8.5、0.7 M tri-Sodium citrate dihydrate
- Salt RX #96 : 0.1 M Bis-Tris propane pH 7.0、60% v/v Tacsimate

初期条件の内 0.1 M Bis-Tris propane pH 7.0、60% v/v Tacsimate の条件で得られた結晶は小さく、周囲はほとんど沈殿に囲まれた状態だったが (図 2-5B)、X 線回折を試したところ、空間群 $P4_12_12$ に属し、2.7 Å 分解能まで回折した。

構造決定

1) 下記の精密化した H72A-filipin III の構造をサーチモデルとして、分子置換法により 1.8 Å 分解能で決定し、 R 因子=20.4% ($R_{\text{free}}=26.3\%$) まで精密化した。非対称単位には、一つの CYP105P1 分子が含まれる。最終モデルは、Glu7 から His403 のアミノ酸残基、一つのヘム分子、一つの filipin I 分子、585 個の水分子が含まれる。

2) 精密化した WT-free の構造をサーチモデルとして、分子置換法により 2.7 Å 分解能で決定し、 R 因子=19.1% ($R_{\text{free}}=23.6\%$) まで精密化した。非対称単位には、一つの CYP105P1 分子が含まれ、高い Matthews coefficient ($3.97\text{\AA}^3/\text{Da}$) と溶媒含量 (69.0%) を示した。最終モデルは、Ala6 から His400 のアミノ酸残基、

一つのヘム分子、一つの filipin III 分子、26 個の水分子が含まれる。

野生型と filipin I 複合体構造 (WT-filipin I)

1) 全体構造

WT-filipin I 複合体の全体構造を図 2-6AB に示した。ヘムポケットに、filipin I に対応する明瞭な電子密度が確認できる (図 2-6C)。

DALI サーバー[11]を用いた類似構造検索結果を表 2-3 に示した。最も類似していたのは *Saccharopolyspora erythraea* 由来 erythromycin 生合成に関わっている P450eryF (CYP107A1 [6])、*Streptomyces griseolus* 由来 P450 SU-1 (CYP105A1) [12]、カビの *Fusarium oxysporum* 由来 P450nor[13]である。

ほとんどの P450 と同様に、CYP105P1 の FG ヘリックス部位は基質結合によって closed 型コンフォメーションを取っている。一方、BC ループ部位は 33 残基の安定した長いループでできていて、B'ヘリックスは作っていない。このように B'ヘリックスを含まない BC ループは β 1-2— β 1-3 ループ (Ser41) 部分と相互作用し、さらに、F ヘリックス (Ala179) とも相互作用している。これらの二つの相互作用は BC ループを安定化させていると考えられる。今まで *Rhodospseudomonas palustris* 由来 CYP199A2 の基質フリーの構造[14]と *Citrobacter braakii* 由来 P450cin (CYP176A1) の 1,8-Cineole 結合構造[15]で B'ヘリックスを作らない安定な BC ループ構造が報告された (図 2-7)。CYP199A2 と P450cin は、それぞれ 33 残基と 29 残基でできた BC ループをもっていて、両方とも対応する FG ヘリックス部位と相互作用し、ループ構造を安定化している。興味深いことに、P450cin は P450cam の基質である camphor に似た 1,8-Cineole を基質としていて、その基質結合ポケットは P450cam よりも狭く、構造既知 P450 では最小であるのに対し、CYP105P1 の基質である filipin I は今まで構造既知 P450 の基質としてはもっとも大きく、基質結合ポケットも比較的広い。以上の考察か

ら、B'ヘリックスを作らないBCループは基質の大きさとは関係なく構成され、主に相応するFGヘリックスとの相互作用によって安定化していると考えられる。

2) filipin Iの結合による構造変化

野生型の基質フリーの構造 (WT-free) は第一章で記述した。WT-free構造とWT-filipin I構造を重ね合わせたところ、C α に対するRMSD値は2.0 Åで、構造の比較的大きな変化が示唆された (図2-8A)。最も大きく変化した部分はBCループ部分で、Gly76残基のC α は分子の外側に14.2 Å動いていた。P450の基質結合による構造変化は通常、ヘム遠位側の入り口部分にあたるFG部位、及びBCループがそれぞれ内側に閉じ、closedコンフォメーションをとる。WT-filipin I構造でBCループは逆に分子の外側を向いて移動するように見えるが、それはWT-free構造でのヒスチジン結合が原因である。第一章で述べたように、WT-free構造のヒスチジン結合は溶液中では支配的ではない。WT-free構造とH72A-free構造はBCループ部分以外基本的に同様 (対応する340残基のC α 原子に対するRMSD = 0.61 Å) であることから、ここではH72A-free構造を用いて構造変化を調べた。

図2-8BC、図2-9に示すように、filipin Iの結合により分子全体 (主にFG部位) がゆがみ、ヘムの遠位側のポケットは内側に閉じていた。つまり、closedコンフォメーションをとっていた。FGループのAsp176残基及びBCループのAsp75残基のC α はそれぞれ内側に8.7 Åと2.6 Å移動していた。これらの部位はP450では一般的にフレキシブルで、基質結合により動くと考えられている。もう一箇所の構造変化はC末端側で確認できた (図2-8C)。C末端側のAsp386とVal388はそれぞれFGループのVal175、Met173と水素結合をし、Asp386周辺のループは3.4 Å動いていた。

3) 活性部位

P450で基質はへム面に垂直に結合するのが一般だが、filipin IはC26位がへム鉄に向くように、全体がへム面に約60° 斜めに傾き、BCループとGヘリックスの間から頭を出す形で結合していた。filipin IのC26位とへム鉄の距離は5.0 Åで、触媒を受ける妥当な位置であった。

基質結合ポケットはへム、BCループ、FGループ部位、Iヘリックス、およびC末端側のループにより作られている。WT-filipin I構造では基質結合チャンネルがはっきり確認できる(図2-9B)。基質結合ポケットを作っているアミノ酸残基は、BCループのThr79、Gln80、Lys81、Pro82、Ser86、Leu87、Leu88、Trp89；FGループのMet172、Met173；GヘリックスのThr182、Glu183、Gly186、Met187、Leu189、Gly190；IヘリックスのMet228、Asn229、Gly232、Thr233、Ile236、Ala237、Ala238；C末端側のVal388、Phe389である。このうち、Gln80とPro82のみfilipin Iと直接相互作用している(図2-10A)。図2-10Aで示すように、filipin Iを真ん中に挟んで、左側はPro82、Leu88、Trp89、右側はMet172、Met173、Val388、Phe389がfilipin Iと疎水相互作用をし、filipin Iの向きを決めている。これらの残基は基質認識に重要であると考えられる。filipin IのC1位の酸素は水を介してへムと水素結合している。filipin Iのポリオール側は多数の水で充填され、これらの水を介してFGループとGヘリックス、およびBCループと相互作用し、安定化すると考えられる(図2-10B)。一方、filipin Iの疎水性のペンタエン部分はIヘリックスと疎水性相互作用を行う。

もう一つ、基質認識に重要な部位はKヘリックスとβ 1-5シートの間のループ部分である。このループとへムの間には広くて深いスペースがあり、そこにはfilipin IのC1'側のtail(アルキル鎖)が入るようになっている(図2-11)。このようなスペースを作るために重要な残基はGly284、Gly287、Gly288である。さ

らに、ループのGln285、Phe286、Gly287はそれぞれ水を介してfilipin IのC3位の水酸基と水素結合をし、filipin Iの安定にも寄与している。

H72A変異体とfilipin III複合体構造 (H72A-filipin III)

解離定数の測定で、H72A 変異体は filipin III と結合できるという結果が得られたが、変異体を用いた結晶化でも一致した結果が得られ、filipin III の結合が確認できた。H72A-filipin III の全体構造を図 2-12AB に示し、filipin III の電子密度マップを図 2-12C に示した。このマップで、C1'位側の tail 部分 (アルキル鎖) に異なる向きをした二つの電子密度が確認できる。これは、C₆ 脂肪鎖で作られたアルキル鎖の柔軟性によると考えられる。

H72A-filipin III 構造と WT-filipin I 構造はほぼ同様であった (対応する 394 残基の C α 原子に対する RMSD = 0.50 Å) (図 2-13A)。BC ループは変異体構造のほうがわずかに (Gln74 の C α は 1.4 Å) 内側に動いていた (図 2-13B)。His72 と Ala72 はほぼ同じ位置に存在した。filipin I と filipin III はほぼ完全に重なり、基質と最終産物として妥当な位置配置をしていた。WT-filipin I 構造で filipin I の C26 からへム鉄まで 5.0 Å、H72A-filipin III 構造で filipin III の C26 位の水酸基からへム鉄まで 4.7 Å 離れていた。一方、WT-filipin I の構造で、C1' と His72 は 6-7 Å 離れていて、H72A-filipin III の構造で、Ala72 と filipin III の C1'位水酸基は 6.1 Å 離れていた。

基質結合ポケット

filipinは今まで構造が解明されたP450の基質としては最大であるため、基質結合ポケットも広いだらうと予測した。そこで、P450cam [16]、P450SU-1 [17]、P450nor [13]、CYP2B4 [18]、P450eryF [6]、P450 PikC [8]、P450epoK [7]の基質結合構造の基質結合ポケットの体積をCASTpプログラムで計算し、CYP105P1と比

較を行ったが、予想外の結果が得られた（表2-3、図2-14）。CYP105P1の基質結合ポケットの体積はP450cam、P450SU-1、CYP2B4、P450eryF、P450 PikCよりは大きい値を示したものの、P450norよりは小さい値を示した。P450norの基質結合ポケットはプロトンチャンネルを作っている水分子で満たしているため、構造既知のP450の中でもっとも広い基質結合ポケットを作っている。CYP105P1の生理基質である filipin Iは今まで構造既知のP450の基質では最大級であるのに対して、その基質ポケットの体積は思うほど広くはなかった。その原因としては、filipinの細長い形と基質結合ポケットの疎水性部分によると考えられた。

His72

解離定数測定実験で野生型とH72A変異体はともに filipin Iと結合するが、最終産物である filipin IIIとの結合はH72A変異体のみで起こることが分かった。この結果から、His72はC1'位の認識になんらかの関与が示唆され、His72の役割は反応最終産物である filipin IIIの結合を妨げることが考えられた。

表2-1 filipinの物理学的、生化学的性質

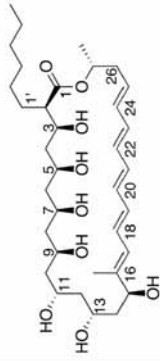
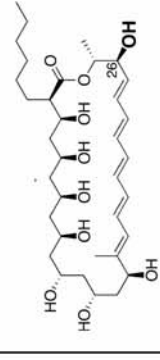
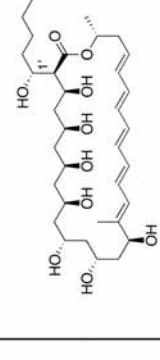
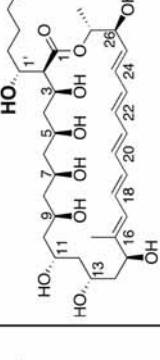
	filipin I	filipin II	1'-hydroxyfilipin I	filipin III
構造				
分子式	$C_{35}H_{58}O_9$	$C_{35}H_{58}O_{10}$	$C_{35}H_{58}O_{10}$	$C_{35}H_{58}O_{11}$
UV (nm)	323, 339, 357	326, 341, 360	323, 339, 357	326, 341, 360
色	淡黄色	黄色	淡黄色	黄色

表 2-2 データ収集と精密化の統計値

Data set	WT-filipin I	H72A -filipin III
Data collection statistics		
X-ray source	PF-BL5A	PF-AR NW12A
Wavelength (Å)	1.000	1.000
Space group	<i>P</i> 4 ₁ 2 ₁ 2	<i>P</i> 4 ₁ 2 ₁ 2
Unit cell (Å)	<i>a</i> = <i>b</i> = 91.368 <i>c</i> = 151.239	<i>a</i> = <i>b</i> = 85.724 <i>c</i> = 194.424
Resolution (Å) ^a	50.00-1.80 (1.86-1.80)	50.00-2.70 (2.80-2.70)
Total reflections	829,838	294,474
Unique reflections	60,018	20,784
Completeness (%) ^a	99.9 (100.0)	100.0 (100.0)
Redundancy ^a	13.8 (13.9)	14.2 (13.4)
Mean <i>I</i> / σ (<i>I</i>) ^a	38.7 (3.2)	46.9 (5.6)
<i>R</i> merge (%) ^a	8.8 (46.5)	6.8 (47.1)
Refinement statistics		
Resolution range (Å)	44.15-1.80	42.30-2.70
No. of reflections	55,868	19,640
<i>R</i> -factor / <i>R</i> _{free} (%)	20.4 / 26.3	19.1 / 23.6
No. of atoms	-	3159
No. of TLS groups	-	6
Average B-factor (Å ²)		
protein	-	34.4
Heme	-	36.0
filipin III	-	66.3
water	-	47.1
Rmsd from ideal values		
Bond lengths (Å)	-	0.030
Bond angles (degrees)	-	2.777
Ramachandran Plot (%)		
Favored	-	91.8
Allowed	-	6.9
Disallowed	-	1.3

^a Values in parentheses are for the highest resolution shell.

^b Determined by RAMPAGE server (21).

表2-3 DALIサーチの結果

	PDBコード	Zスコア	Rmsd (Å)	対応残基	総残基	配列同一性 (%)	タンパク質	由来
1	1OXA	50.6	1.9	383	403	38	P450eryF (CYP107A1)	<i>Saccharopolyspora erythraea</i>
2	3CV9	50.5	2.0	388	403	42	P450SU-1 (CYP105A1)	<i>Streptomyces griseolus</i>
3	1XQD	47.8	2.2	388	399	34	P450nor (CYP55A1)	<i>Fusarium oxysporum</i>
4	2Z36	47.6	2.3	383	403	44	P450moxA (CYP105)	<i>Nonomuraea recitcatena</i>
5	2D09	47.4	2.2	385	404	29	CYP158A2	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)
6	3EJE-D	46.1	1.6	361	385	35	P450BioI (CYP107HI)	<i>Bacillus subtilis</i>
7	3BDZ-B	45.2	2.1	376	397	23	P450cin (CYP176A1)	<i>Citrobacter braakii</i>
8	2C6H	45.1	2.3	376	393	38	P450PikC (CYP107L1)	<i>Streptomyces venezuelae</i>
9	1N40	45.1	2.4	377	394	28	CYP121	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
10	1GWI-B	44.9	2.4	382	400	30	CYP154C1	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)

表 2-4 P450 の基質結合ポケット体積の比較

P450	Species	PDB Code	Substrate	Substrate binding pocket volume (Å ³)
P450cam	<i>Pseudomonas putida</i>	1DZ4	Camphor	69.4
P450SU-1	<i>Streptomyces griseolus</i>	2ZBZ	1a,25(OH)2D3	420.5
P450nor	<i>Fusarium oxysporum</i>	1XQD	Nicotinic acid adenine dinucleotide (NAAD)	1541.7
CYP2B4	<i>Rab1t</i>	1SUO	4-chlorophenylimidazole	77.3
P450eryF	<i>Saccharopolyspora erythraea</i>	1JIO	6-DEB	366.5
P450 PikC	<i>Streptomyces venezuelae</i>	2C7X	Narbomycin	487.4
CYPepoK	<i>Sorangium cellulosum</i>	1Q5D	Epothilone B	587.8
CYP105P1	<i>Streptomyces avermitilis</i>		Filipin I	641.2
			Filipin III	526.1

a 基質結合ポケットの体積計算は CASTp プログラムを用いた。

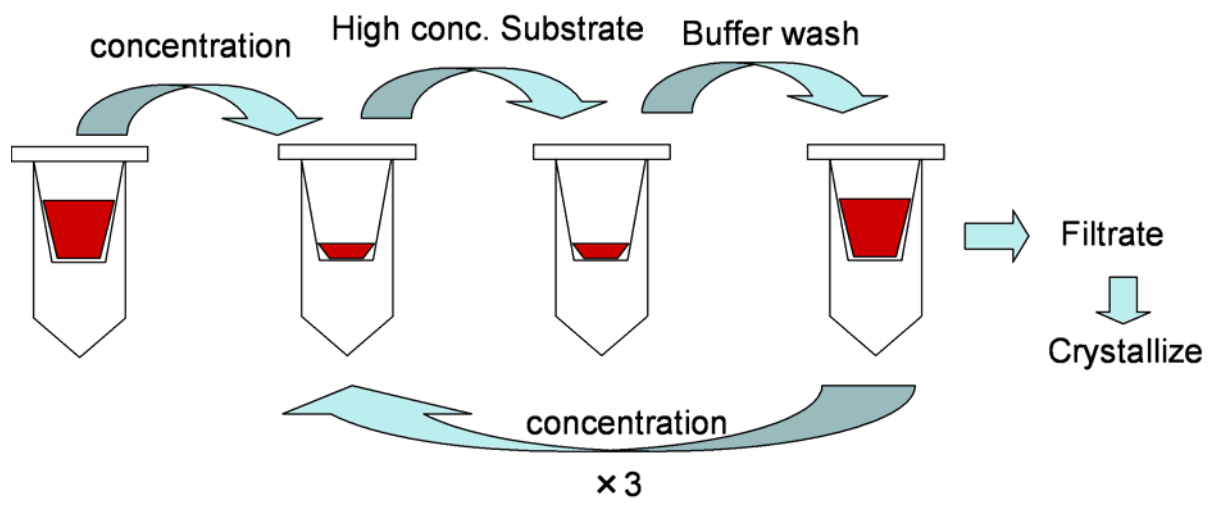


図 2-1 CYP105P1 と filipin を用いた結晶化

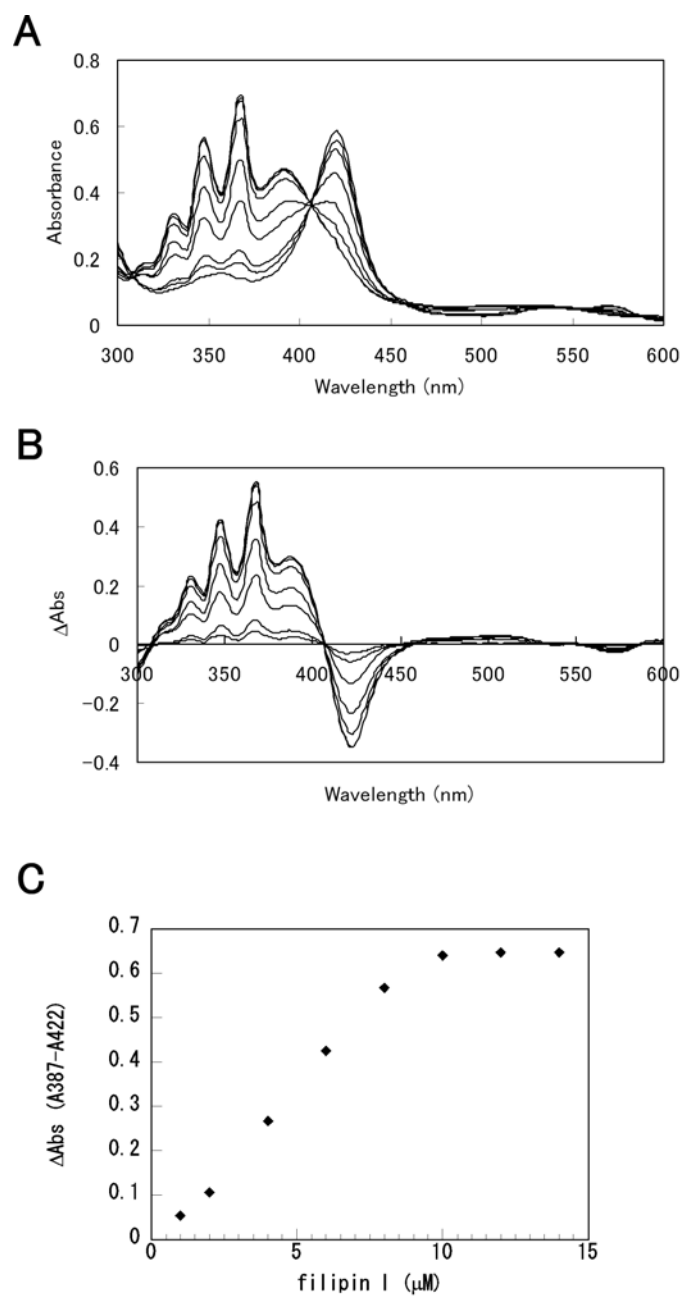


図 2-2 野生型と filipin I の結合

(A) 滴定スペクトル、(B) 滴定差スペクトル、(C) 結合様式。

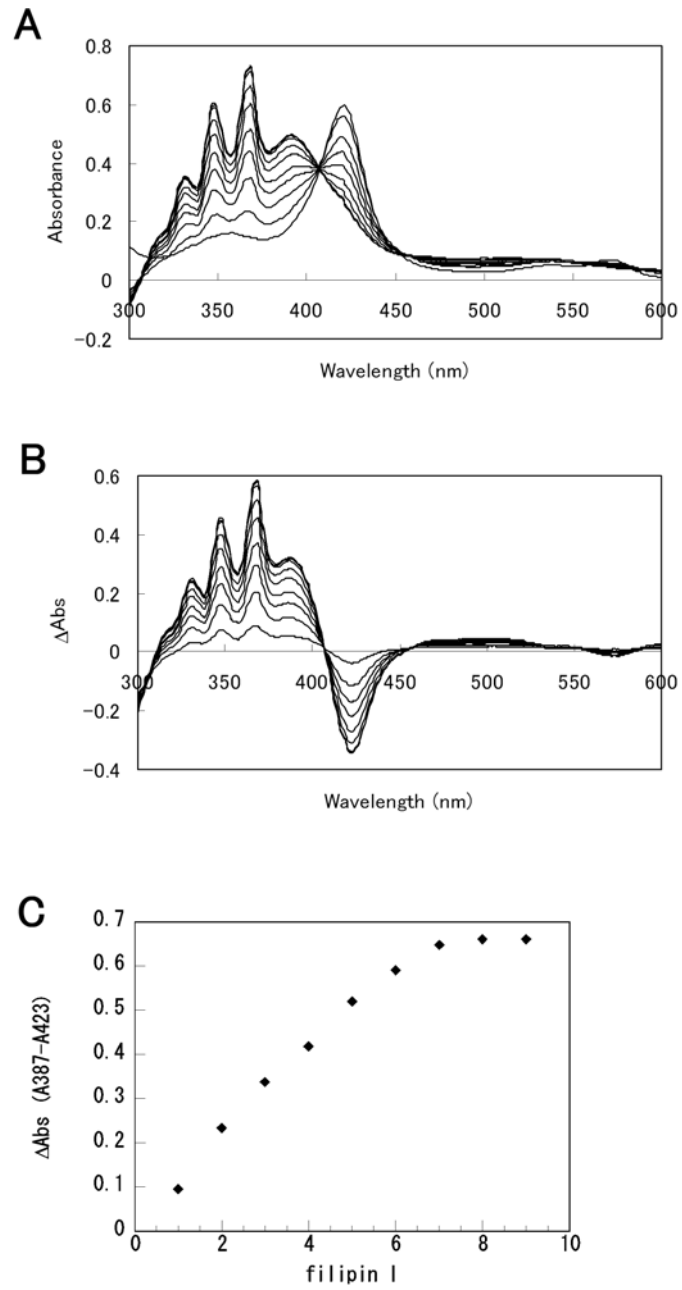


図 2-3 H72A 変異体と filipin I の結合

(A) 滴定スペクトル、(B) 滴定差スペクトル、(C) 結合様式。

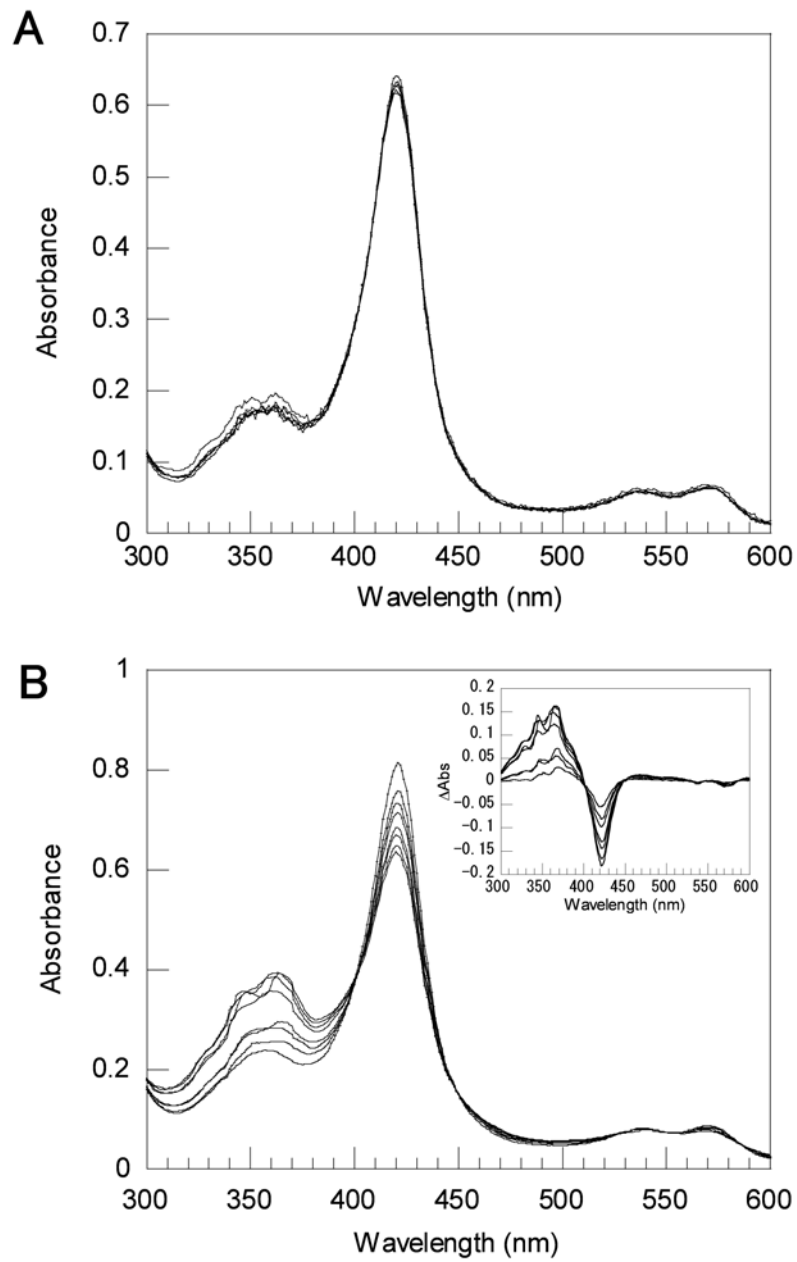


図 2-4 filipin III の結合

(A) 野生型、(B) H72A 変異体、(A-B) において、filipin III 滴定スペクトルを示した。B の挿入図は滴定差スペクトルを示す。

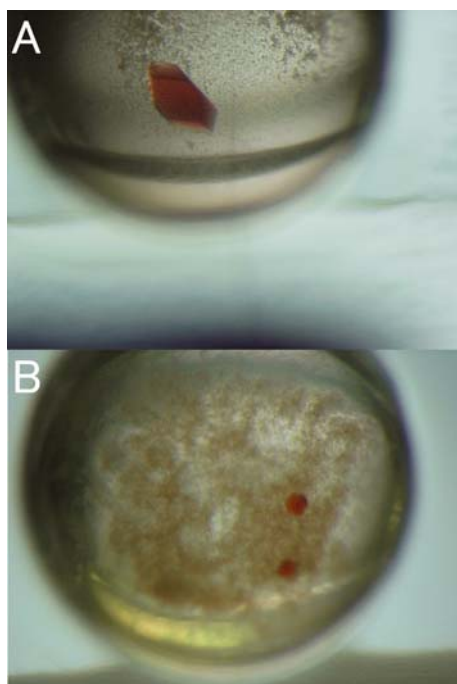


図 2-5 CYP105P1 と filipin の複合体の結晶
(A)WT-filipin I、 (B) H72A-filipin III。

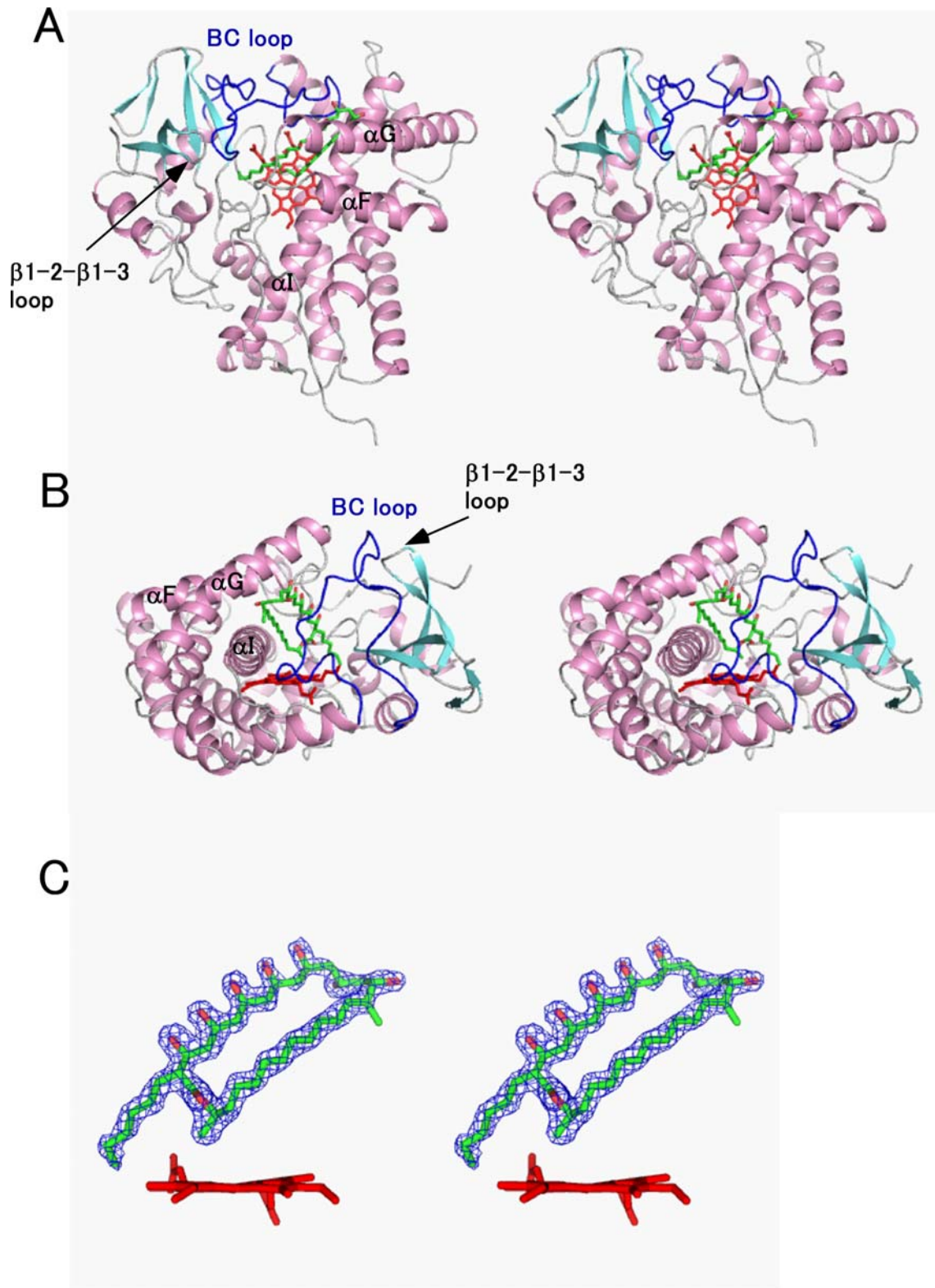


図 2-6 野生型と filipin I の複合体の構造 (ステレオ)

(A) Top view、(B) Side view、(C) filipin I の $F_{obs} - F_{calc}$ omit 電子密度マップ、
 (A-C) において、ヘリックス、 β シートをそれぞれピンク色とシアン色で示す。

へムは赤色のスティックで、filipin I は緑色のスティックで示す。(C) で contour level = 4.0 σ

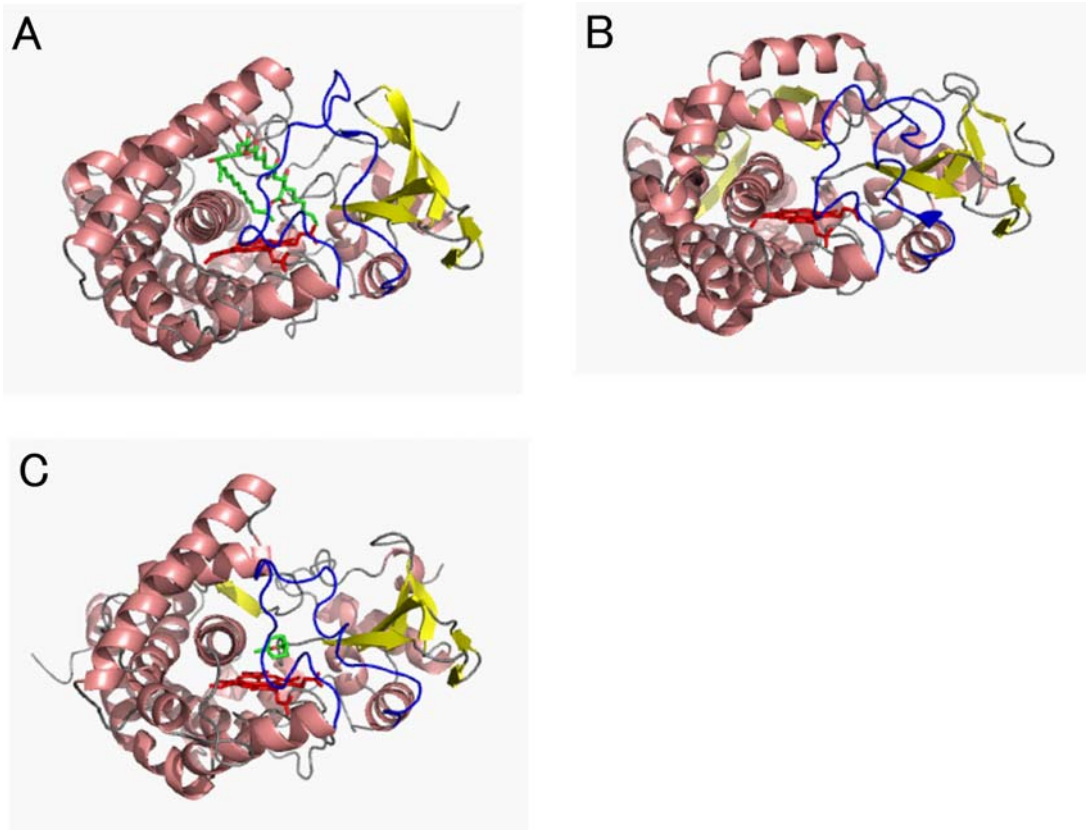


図 2-7 CYP105P1 と既知構造比較

(A) CYP105P1、(B) CYP199A2、(C) P450cin、(A-C) において、ヘリックスと β シートをそれぞれピンク色と黄色で示す。BC ループは青色で示す。ヘムは赤色スティックで、基質は緑色スティックで示す。

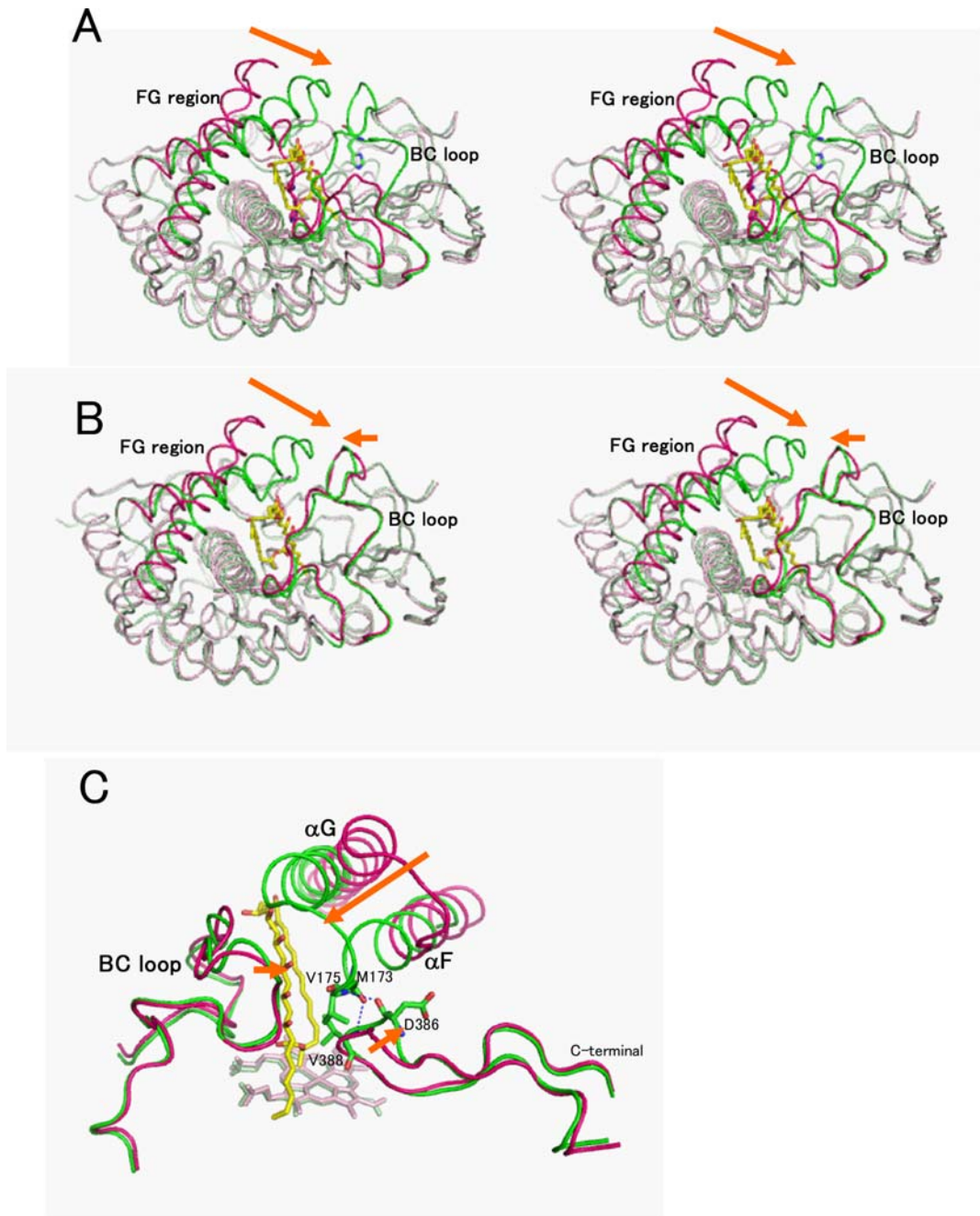


図 2-8 filipin I 結合による構造変化

(A) WT-free と WT-filipin I の比較、(B) H72A-free と WT-filipin I の比較、(C) H72A-free と WT-filipin I 比較(拡大図)、(A-C)において、フリーの構造(WT-free、H72A-free) はピンク色で、WT-filipin I 構造は緑色で示す。ヘムと基質はスティックで示す。構造変化の方向はオレンジ色の矢印で示す。相互作用している残基はスティックで示す。

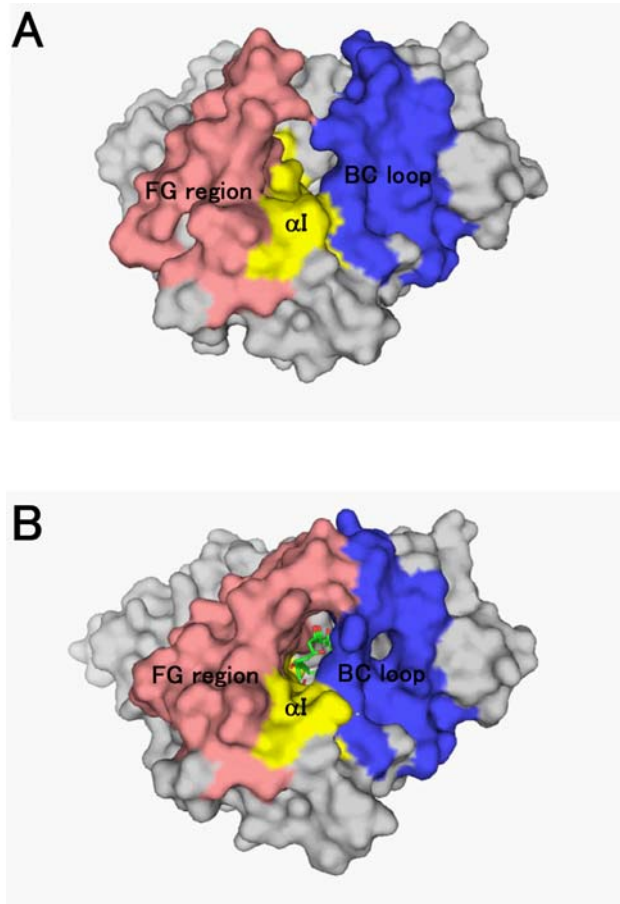


図 2-9 CYP105P1 の分子表面図

(A) H72A-free、(B) WT-filipin I、(A-B) おいて、BC ループは青色で、FG 部位はピンク色で、I ヘルックスは黄色で示す。基質とヘムはそれぞれ緑色と赤色のスティックで示す。

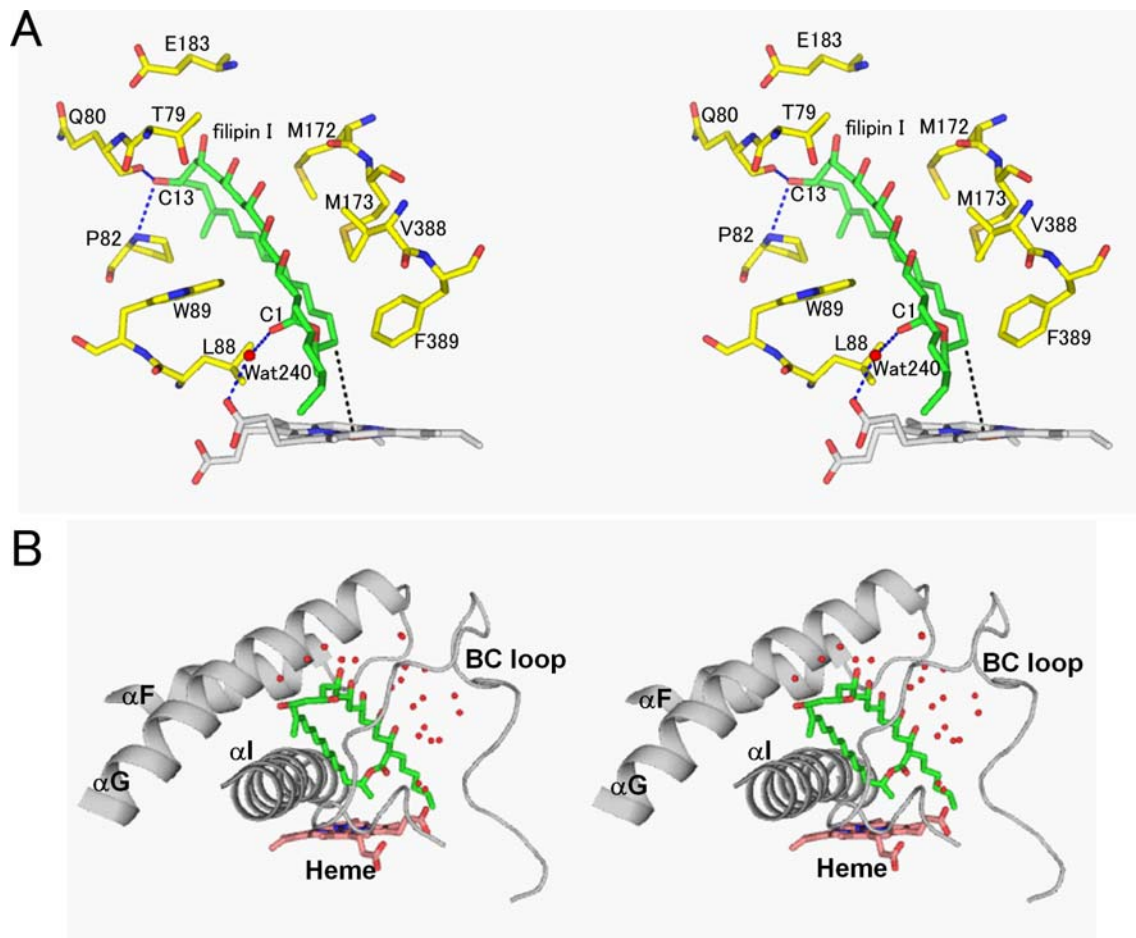


図 2-10 野生型と filipin I 複合体の活性部位

(A) 活性部位の相互作用、(B) 基質結合ポケット内の水分子、(A-B) において、基質とヘム、重要残基はスティックで示す。水分子は赤い球で示す。

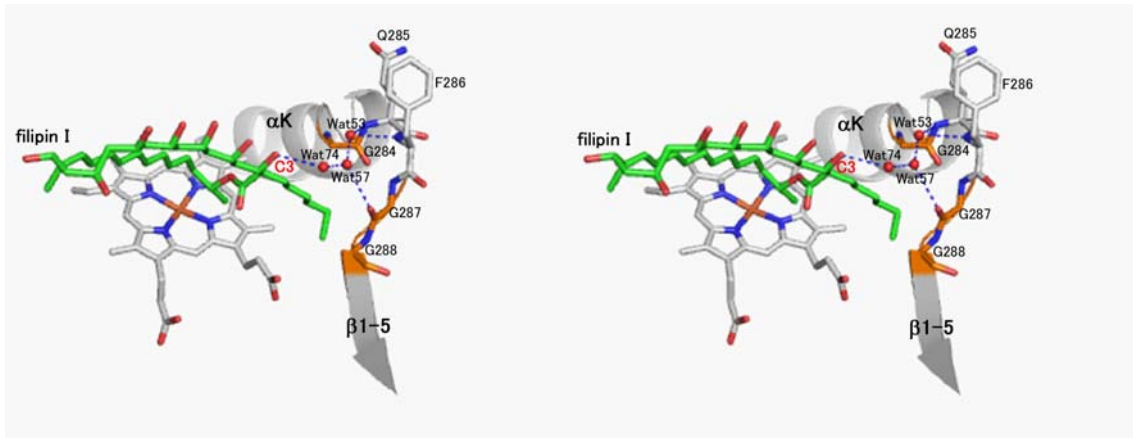


図 2-11 filipin I の tail (アルキル鎖) 認識

基質、ヘム、重要残基はスティックで示す。水分子は赤色の球で示す。G284、G287、G288 はオレンジ色で示す。

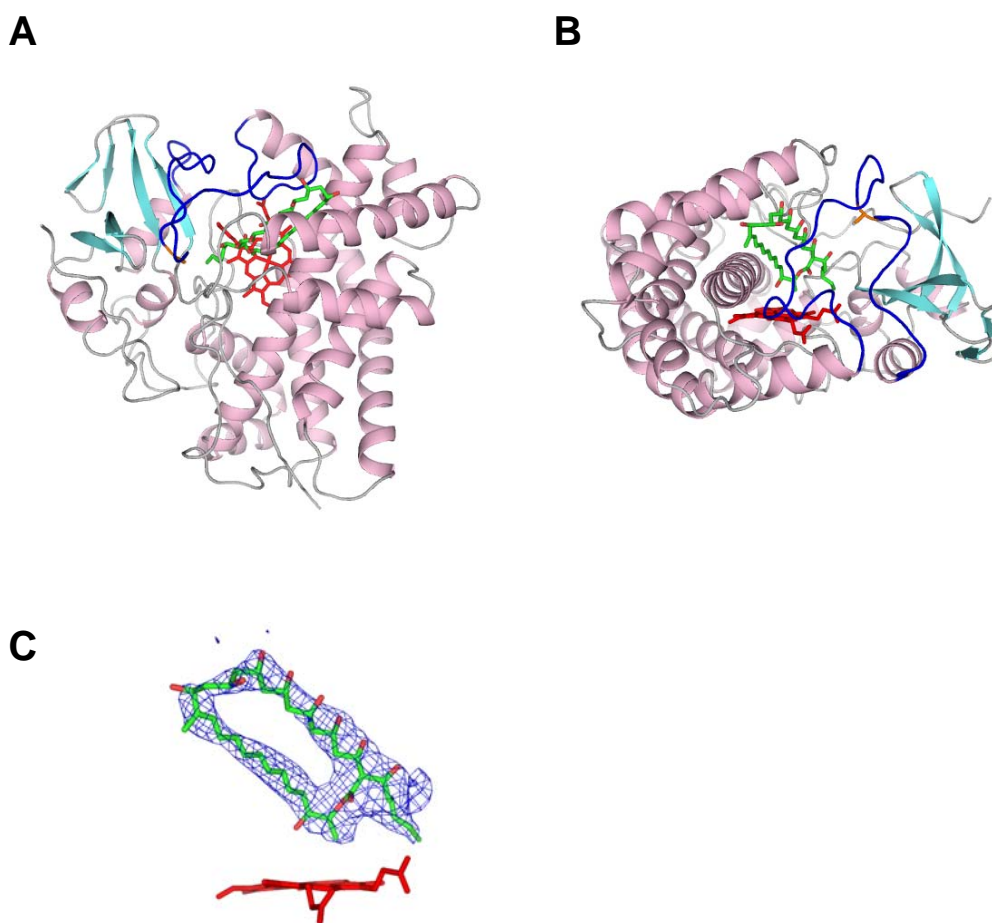


図 2-12 H72A 変異体と filipin III の複合体の構造

(A) Top view、(B) Side view、(C) $F_{\text{obs}} - F_{\text{calc omit}}$ 電子密度マップ、
 contour level = 2.0 σ 。(A-C) において、ヘリックス、 β シートをそれぞれピンク
 色とシアン色で示す。ヘムトリガンドはスティックで示す。BC-loop部分は青色
 で示す。Ala72はオレンジ色のスティックで示す。

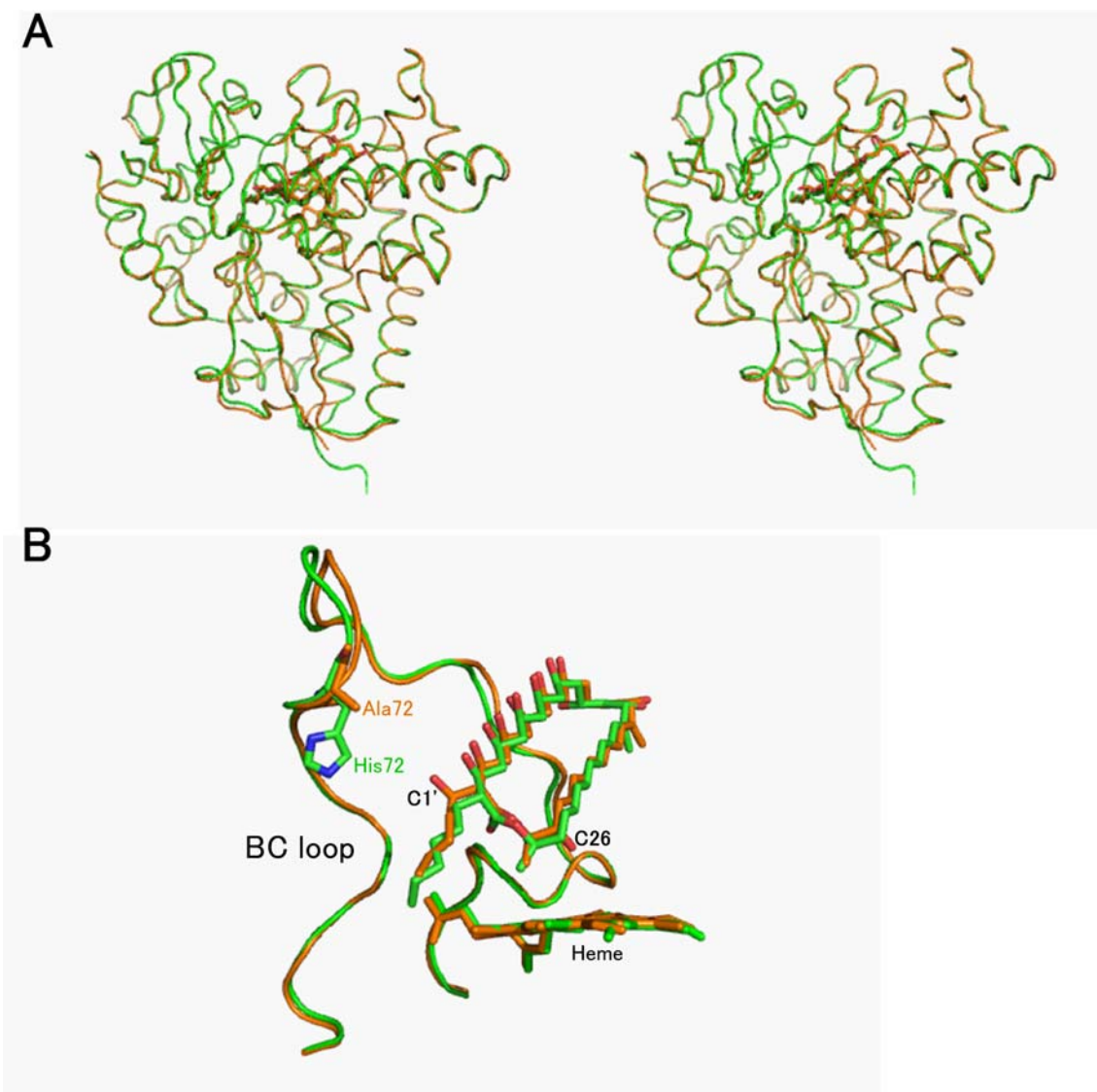


図 2-13 WT-filipin I と H72A-filipin III の構造比較

(A) 全体構造、(B) 活性部位、(A-B)において、WT-filipin I は緑色、H72A-filipin III はオレンジ色で示す。ヘム、リガンド、His72、Ala72 はスティックで示す。

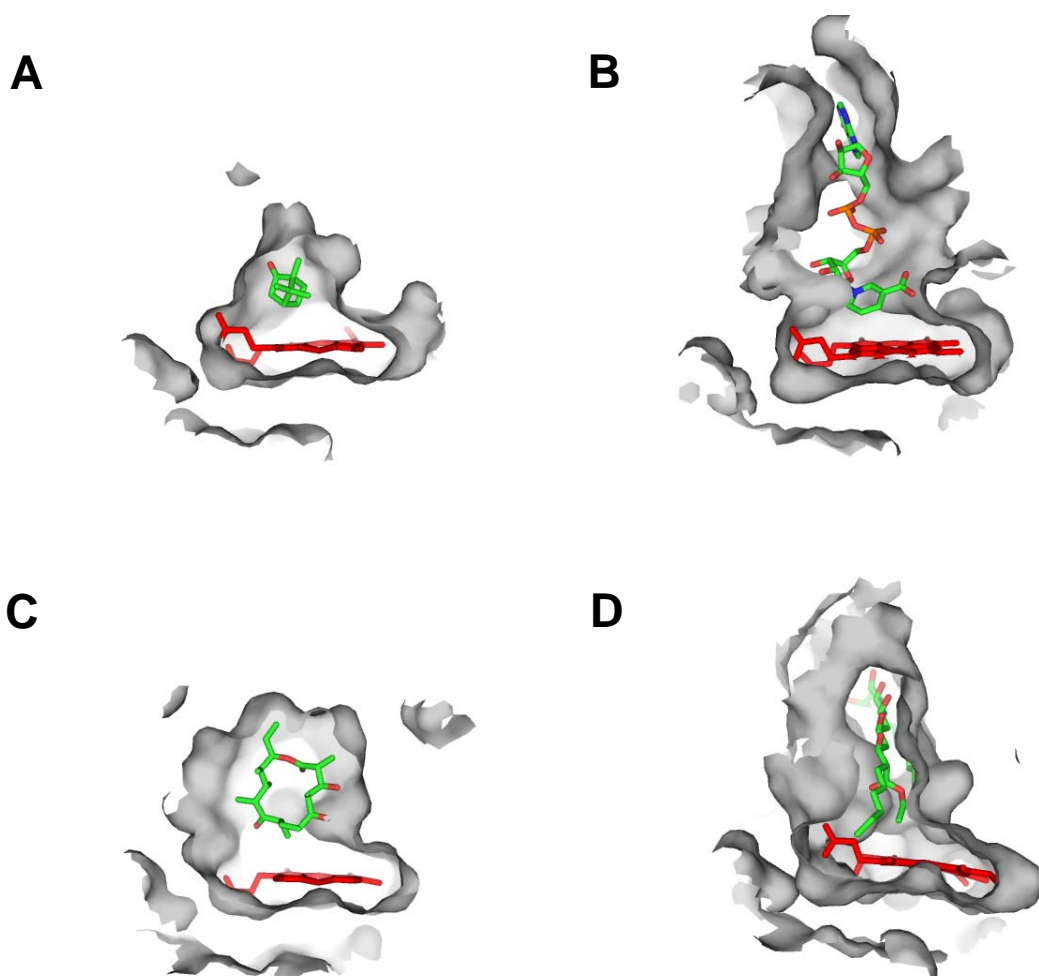


図 2-14 P450 の基質結合ポケットの比較

(A) P450cam、(B) P450nor、(C) P450eryF、(D) CYP105P1、(A-D) において、基質結合ポケットの断面図を示す。基質は緑色のスティックで、ヘムは赤色のスティックで示す。(表 2-3 を参照)

参考文献

1. Gimpl, G. and K. Gehrig-Burger, *Cholesterol reporter molecules*. Biosci Rep, 2007. **27**(6): p. 335-58.
2. Wachtler, V. and M.K. Balasubramanian, *Yeast lipid rafts?--an emerging view*. Trends Cell Biol, 2006. **16**(1): p. 1-4.
3. Butler, J.D., et al., *Progesterone blocks cholesterol translocation from lysosomes*. J Biol Chem, 1992. **267**(33): p. 23797-805.
4. Butler, J.D., et al., *Niemann-pick variant disorders: comparison of errors of cellular cholesterol homeostasis in group D and group C fibroblasts*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(2): p. 556-60.
5. Volpon, L. and J. Lancelin, *Solution NMR structures of the polyene macrolide antibiotic filipin III*. FEBS Lett, 2000. **478**(1-2): p. 137-40.
6. Cupp-Vickery, J.R. and T.L. Poulos, *Structure of cytochrome P450eryF involved in erythromycin biosynthesis*. Nat Struct Biol, 1995. **2**(2): p. 144-53.
7. Nagano, S., et al., *Crystal structures of epothilone D-bound, epothilone B-bound, and substrate-free forms of cytochrome P450epoK*. J Biol Chem, 2003. **278**(45): p. 44886-93.
8. Sherman, D.H., et al., *The structural basis for substrate anchoring, active site selectivity, and product formation by P450 PikC from Streptomyces venezuelae*. J Biol Chem, 2006. **281**(36): p. 26289-97.
9. Bergy, M.E. and T.E. Eble, *The filipin complex*. Biochemistry, 1968. **7**(2): p. 653-9.
10. Pandey, R.C. and K.L. Rinehart, Jr., *Polyene antibiotics. V. Characterization of components of the filipin complex by mass spectrometry*. J Antibiot (Tokyo), 1970. **23**(8): p. 414-7.
11. Holm, L. and C. Sander, *Dali: a network tool for protein structure comparison*. Trends Biochem Sci, 1995. **20**(11): p. 478-80.
12. Hayashi, K., et al., *Structure-Based Design of a Highly Active Vitamin D Hydroxylase from Streptomyces griseolus CYP105A1*. Biochemistry, 2008. **47**(46): p. 11964-11972.
13. Oshima, R., et al., *Structural evidence for direct hydride transfer from NADH to cytochrome P450nor*. J Mol Biol, 2004. **342**(1): p. 207-17.
14. Bell, S.G., et al., *Crystal Structure of CYP199A2, a Para-Substituted Benzoic Acid Oxidizing Cytochrome P450 from Rhodospseudomonas palustris*. Journal of Molecular Biology, 2008. **383**(3): p. 561.

15. Mehareenna, Y.T., et al., *Crystal Structure of P450cin in a Complex with Its Substrate, 1,8-Cineole, a Close Structural Homologue to d-Camphor, the Substrate for P450cam*. *Biochemistry*, 2004. **43**(29): p. 9487-9494.
16. Schlichting, I., et al., *The Catalytic Pathway of Cytochrome P450cam at Atomic Resolution*. *Science*, 2000. **287**(5458): p. 1615-1622.
17. Sugimoto, H., et al., *Crystal structure of CYP105A1 (P450SU-1) in complex with 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃*. *Biochemistry*, 2008. **47**(13): p. 4017-27.
18. Scott, E.E., et al., *Structure of mammalian cytochrome P450 2B4 complexed with 4-(4-chlorophenyl)imidazole at 1.9-Å resolution: insight into the range of P450 conformations and the coordination of redox partner binding*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(26): p. 27294-301.

第三章 *Streptomyces avermitilis* 由来 CYP105D6 の機能構造解析

序

CYP105D6 は CYP105P1 と同様に立体構造は決定されておらず、基質認識機構や反応機構は不明である。

本章では、*S. avermitilis* 由来の CYP105D6 の精製を行い、阻害剤との結合を確認し、CYP105D6 と CYP105P1 の活性を *in vitro* で確認した。さらに、CYP105D6 の基質フリーの構造を解明し、CYP105P1 との構造比較により、基質特異性の解明を行った。

材料と方法

材料

本研究に用いた試薬は、特に記さない限り、和光純薬工業株式会社または SIGMA の特級試薬を用いた。

発現系の構築

大腸菌における発現系プラスミドを図 3-1 のように構築した。用いたプラスミドは表 3-1 に示す。プラスミド作製方法は第一章で記述したのとほぼ同様である。得られたプラスミドは pET17b-CYP105D6 とした。

発現条件検討

プラスミド pET17b-CYP105D6 で大腸菌 BL21(DE3)、BL21 CodonPlus (DE3)、BL21 (DE3) pLysS、C43 (DE3)、HMS174 (DE3) を形質転換した。それぞれ前培養を行ったのち、200 mL の LB 培地に 1% seeding し、30°C で培養した。OD₆₀₀ が 0.2~0.8 に達したところで、濃度がそれぞれ 0 mM、0.1 mM、0.5 mM になるよ

うに IPTG を加え、25°C で培養した。培養時間が 20 時間になったところで、それぞれ 10 mL ずつ集菌し、1.5 mL のバッファー[10 mM Tris-HCl (pH 7.5)、0.1 mM EDTA、0.1 mM DTT、10% (v/v) glycerol] に懸濁し、超音波処理した後、18,000 rpm、4°C で 20 分間遠心を行い、不溶性沈殿画分と可溶性画分に分離した。得られた上清画分を無細胞抽出液とした。発現確認は無細胞抽出液を用いて SDS-PAGE を行い、差スペクトルを測定した。

大量発現

20 mL の LB 培地 (Difco) (100 µg/mL Ampicillin) にグリセロールストックから植菌し、37°C で 12 時間前培養を行った。2 L の改変 TB 培地に前培養液を全て加え (1% seeding)、5 L の羽根突きフラスコを用いて 37°C で本培養を開始した。OD₆₀₀ ≒ 0.6~0.8 に達したところで、最終濃度が 0.5 mM になるように 1 M の IPTG を加え、さらに 25°C で 24 時間培養後、5000 rpm で 10 分間遠心して菌体を回収した。2 L の培養で約 30 g の菌体を得た。

精製

1) 得られた菌体を 300 mL のバッファー[20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、0.5 M NaCl、10 mM imidazole、0.1 mM DTT、10% (v/v) glycerol] に懸濁し、冷却しながら、超音波破砕機 SONIFER 2500 (BRANSON) により破砕を 10 分間行った。破砕後、遠心 (18,000 rpm、4°C、40 min) して上清を得た。この上清を Minisart 0.45 µm Filter (Sartorius stedim) に通した後のサンプルを粗酵素抽出液とした。

2) 粗酵素抽出液をバッファー[20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、0.5 M NaCl、10 mM imidazole、0.1 mM DTT、10% (v/v) glycerol] で平衡化した HiTrap Chelating HP (5 mL) カラム (GE Healthcare) に吸着させた。平衡化バッファーで非吸着画

分を溶出した後、10-500 mM imidazole の濃度直線勾配を用いて流速 2.5 mL/min でタンパク質を溶出した。赤色の溶出液約 10 mL ずつ分取し、SDS-PAGE で溶出物を確認した。

3) His-tag アフィニティーカラムで精製した目的酵素を含む画分を集め、Amicon Ultra-15 10K (Millipore) を用いて濃縮し、バッファー[20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、0.1 mM EDTA、0.1 mM DTT、10% (v/v) glycerol]に置換した。Minisart 0.45 µm Filter に通した後、バッファー[20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、0.1 mM EDTA、0.1 mM DTT、10% Glycerol]で平衡化した Resource Q カラム (GE Healthcare) に吸着させた。平衡化バッファーで非吸着画分を溶出した後、0-0.5 M NaCl の濃度直線勾配を用いて、流速 1 mL/min でタンパク質を溶出した。赤色の溶出液は約 1 mL ずつ分取し、SDS-PAGE でそれぞれの画分の溶出物を確認した。

4) Resource Q カラムで精製した目的酵素を含む画分を集め、Amicon Ultra-15 10K (Millipore) を用いて濃縮し、Minisart 0.45 µm Filter に通した後、バッファー [10 mM Tris-HCl (pH 7.5)、0.15 M NaCl、0.1 mM EDTA、0.1 mM DTT、10% (v/v) glycerol] で平衡化した Hiload 16/60 Superdex 200 (GE Healthcare) に load した。流速 1 mL/min でタンパク質を溶出し、赤色の溶出液は約 1 mL ずつ分取した。SDS-PAGE でそれぞれの画分の溶出物を確認し、目的酵素を含む画分を集め、Amicon Ultra-15 10K (Millipore) を用いて濃縮し、Minisart 0.45 µm Filter (Sartorius stedim) に通した。

精製は全部 4°C で AKTA FPLC (GE healthcare) を用いて行った。

SDS-PAGE

第一章で記述した方法で行った。

タンパク質の定量

第一章で記述した方法で行った。

吸収スペクトル測定

第一章で記述した方法で行った。

解離定数 K_d 測定

分光光度計は V-550 (JASCO) を使い、25°C で測定を行った。セルは光路長 1 cm の石英セルを用いた。測定波長は 300 nm~600 nm について吸収スペクトルを測定した。CYP105D6 をバッファー[50 mM potassium phosphate (pH 7.5)、0.1 mM EDTA、0.1 mM DTT、10% (v/v) glycerol]を用いて最終濃度が約 5~10 μM になるように希釈した。阻害剤はメタノールに溶解し、高濃度溶液を作製した。

- 1) 1 mL のバッファーと 1 mL のタンパク質溶液が入った二つのセルを用意し、それぞれ吸収スペクトルを測定した。これをリガンド濃度が 0 μM のスペクトルとした。
- 2) 次に基質高濃度溶液 1 μL (任意) を両セルにそれぞれ添加し、よく攪拌してパラフィルムで蓋をし、2 分間放置した後、スペクトルを測定した。
- 3) 次に再度阻害剤高濃度溶液 1 μL (任意) を両セルに添加し、よく攪拌してパラフィルムで蓋をし、2 分間放置した後、スペクトルを測定した。スペクトルの変化を観察しながら、基質の添加量を調節した。
- 4) スペクトルの変化が起こらなくなるまで滴定を行う。
- 5) 酵素溶液のスペクトルから相応するバッファー溶液のスペクトルをそれぞれ引いて、酵素の real スペクトル値とした。
- 6) 各基質濃度のスペクトルについてそれぞれ基質濃度 0 μM のスペクトル

と差を算出し、差スペクトルとした。差スペクトルで約 435 nm 付近の最も高い吸収 (Δ Absorbance) と約 410 nm 付近の最も低い吸収 (Δ Absorbance) の差を Y 軸に、それぞれの基質濃度を X 軸にプロットし、 K_d を算出した。

活性測定

第一章で記述した方法で行った。

結晶化

CYP105D6 と filipin III の複合体の結晶化を試みた。filipin III は Sigma から購入した filipin mixture を使用した。filipin mixture は *S. filipinensis* により生産され、C1' と C26 位の水酸基の有無の違いによる四つのマクロライド filipin I、filipin II、filipin III、filipin IV (filipin III の異性体) の混合物である[1] [2]。この中で filipin III が 80% 以上占めている。

結晶化条件の初期スクリーニングは、Crystal Screen (Hampton Research)、Crystal Screen 2 (Hampton Research)、Index (Hampton Research)、Wizard Screen I (Emerald Biostructures)、Wizard Screen II (Emerald Biostructures)、Wizard Screen III (Emerald Biostructures)、Structure Screen 1 (Molecular Dimensions)、Structure Screen 2 (Molecular Dimensions)、CRYO I (Emerald Biostructures)、CRYO II (Emerald Biostructures) を用いて、シッティングドロップ蒸気拡散法により行った。結晶化は、Greiner 96 well Crystallization Plate (Greiner) を用いて、1 μ L のタンパク質溶液 [8 mg/mL CYP105D6、0.3 mM filipin、10 mM Tris-HCl (pH7.5)、0.1 mM EDTA、500 mM NaCl、] と 1 μ L のリザーバー溶液を混合し、25°C で静置することにより行った。

X線回折データ収集

X 線回折データは高エネルギー加速器研究機構（KEK；茨城県つくば市）の放射光施設 Photon Factory（PF）実験ステーション NW12A で CCD 検出器を用いて収集した。結晶は、20% glycerol を添加したリザーバー溶液を用いて抗凍結した。クライオループ（Hampton Research）にマウントし、100 K の N₂ ストリーム中で Flash Freezing により瞬間冷却した。波長は 1.0000 Å で行った。回折データはプログラム HKL2000 を用いて処理した。

構造決定と精密化

本研究では、MOLREP を用いた分子置換法により構造を決定した。初期構造モデルは ARP/wARP を用いて構築した。手動でのモデル構築と精密化はそれぞれ Coot と Refmac5 を用いて行った。Refmac5 を用いた精密化の最終段階では bulk solvent correction と TLSMD サーバーによって規定されたグループより TLS 精密化を行った。データ収集と精密化の統計値を表 3-2 に示す。タンパク質の立体構造の図は PyMOL（version 0.99; DeLano Scientific LLC, Palo Alto, CA, USA [<http://www.pymol.org>]) を用いて作製した。

結果と考察

発現と精製

発現条件検討を行った結果、発現菌株は大腸菌C43 (DE3) 株、IPTG終濃度は0.5 mMで最も多くのCYP105D6が得られることが分かった。

大腸菌で大量発現させたCYP105P1を3段階のカラムクロマトグラフィーにより精製した(図3-2)。SDS-PAGE上での分子量は約44 kDと見積もられた。一方、アミノ酸配列から計算される分子量は、44 kDである。SDS-PAGE上で高分子量のタンパク質は最後まで除けることができなかったが、その原因は不明である。2 Lの培養液から約25 mgの精製CYP105D6が得られた。

吸収スペクトル測定

精製後の野生型CYP105D6の吸収スペクトルを測定した。酸化型は419 nmに鋭いソーレー帯の極大を持ち、534 nmにβ帯、569 nmにα帯の山を持つ、典型的な低スピン型スペクトルを示した。ジチオナイト還元型は409 nmに吸収が減少したソーレー帯の極大を持ち、CO結合型は447 nmと548 nmに山を持つスペクトルが得られた。CO差スペクトルでは447 nmに一つの山を示し、P450であることが確認でき、CYP105D6は発現していると判断した(図3-3)。

解離定数 K_d の測定

精製後の CYP105D6 を用いて、阻害剤 imidazole、2-phenylimidazole、4-phenylimidazole を適定時のスペクトル変化の仕方及び解離定数 K_d の測定を行った。スペクトル変化と差スペクトルを図 3-4 に示した。三つの阻害剤を用いたスペクトルは全部 Type II スペクトル変化を示し、 K_d 値はそれぞれ 13.3 mM、1.56 mM、0.51 mM であった。三つの阻害剤のうち、4-phenylimidazole の K_d 値がもっ

とも小さく、比較的結合しやすいことが示唆された。2-phenylimidazole、4-phenylimidazole の K_d 値が imidazole より小さいのは、疎水性の phenyl 基が疎水性の基質ポケットと相互作用するため、結合しやすくなったと考えられる。

活性測定

CYP105P1、CYP105D6を用いて filipin Iを反応させた産物をHPLCで同定した。結果、CYP105P1は filipin Iの26位を水酸化して filipin IIを生産し、CYP105D6は1'位を水酸化して1'-hydroxyfilipin Iを生産した(図3-5)。この結果から、CYP105P1、CYP105D6はともに filipin IIに対して水酸化活性を持ち、それぞれ filipin Iの異なる部位を水酸化することが明らかになった。さらに、CYP105P1とCYP105D6の両方を一緒に反応させると、filipin IIと1'-hydroxyfilipin Iに加え、filipin IIIが検出された。これらの結果でin vitroで初めてCYP105P1とCYP105D6の酵素活性を確認し、共同研究者の池田治生教授らがin vivoの実験から提案した序章の図11のような反応経路は成立することが証明された。

結晶化

タンパク質溶液 (8 mg/mL 酵素、0.3 mM filipin) を用いて結晶化条件の初期スクリーニングを行ったところ、以下の条件で微結晶を得られた。

- Crystal Screen #33 : 4.0 M Sodium formate
- Structure Screen 1 #45 : 4.0 M Sodium formate

初期条件を参考に最適化を行った。タンパク濃度、沈殿剤濃度、バッファー、温度などを変えて、細かく条件検討したが、結晶は再現しなかった。Crystal Screen #33 の条件で得られた結晶 (図 3-6) を用いて X 線回折を試したところ 2.3 Å 分解能まで回折した (表 3-2)。この結晶は空間群 $P3_121$ に属していた。

興味深いことに、CYP105D6 の結晶化条件は CYP105P1 と 4PI 結合時の結晶化

条件とほぼ一致していた。さらに、結晶の空間群も同様に $P3_121$ に属し、構造が類似していることが示唆された。

構造決定

CYP105D6の構造はホモロジーモデリングサーバー3D-JIGSAWを用いてサーチモデルを検索した。Vancomycin 生合成に関わるP450、OxyC [3]を元にしたモデルが構築され、MOLREPを用いた分子置換法により2.3 Å分解能で構造を決定した。 R 因子=16.2% ($R_{\text{free}}=22.5\%$)まで精密化した。非対称単位には、一つのCYP105D6分子が含まれ、高いMatthews coefficient ($2.66 \text{ \AA}^3/\text{Da}$)と溶媒含量(53.9%)を示した。最終構造には、Ser11-His408アミノ酸残基、一つのヘム分子、280個の水分子が含まれる。最終モデルのアミノ酸残基には、C末端の残基Trp404に付いた四つのヒスチジンからなるHis-tagが含まれる。しかし、disorderにより、BCループ部分ではArg82からLeu90までの9個の残基、FGループ部分ではGly181からAla186までの6個の残基が含まれなかった。

本来CYP105D6とfilipin mixtureを用いた複合体結晶化を試みたが、決定された構造ではfilipinの結合が確認できなかった。

CYP105D6基質フリーの結晶構造

CYP105D6基質フリーの構造は典型的なP450の構造を示した(図3-7)。P450の基質フリーの構造で、BCループとFGループ部位は比較的にB-factorが高く、柔軟性が高い部分である。今までP450 PikCのリガンドフリーのopen構造[4]、P450 StaP (CYP245A1) [5]、CYP231A2の基質フリーの構造[6]など複数の構造において、BCループのdisorderに関して報告された。CYP105D6の基質フリーの構造ではBCループとFGループ部位両方で、それぞれ9残基、6残基disorderしていた。このように、BCループとFGループの広い範囲でdisorderしたP450構造は初めて

で、filipinという大きいマクロライド基質をへムポケットに受け入れる場合、入り口部分の構造的柔軟性が示唆された。さらに、CYP105P1の野生型基質フリーの構造ではBCループにおいて四つのアミノ酸残基がdisorderしたのに対して、CYP105D6ではBCループとFGループ合わせて15の残基がdisorderしたことは特徴的である。

CYP105D6 と CYP105P1 の構造比較

CYP105D6 と CYP105P1 の野生型基質フリーの構造の比較を DaliLite サーバーを用いて行ったところ、高い構造類似性[Z スコア= 43.7、対応する 367 残基の C α 原子に対する RMSD = 2.2 Å]を示した (図 3-9A)。興味深いことに、CYP105D6 は CYP105P1 の H72A 変異体の基質フリーの構造ともっと高い構造類似性[Z スコア= 47.6、対応する 373 残基の C α 原子に対する RMSD = 2.0 Å]を示した。その原因は、CYP105P1 の野生型基質フリーの構造では His72 がへムと結合し、BCループ全体がへム側に陥没するなど、ユニークな構造を取るためであると考えられる。一方、CYP105P1 の H72A 変異体の基質フリーの構造では His72 とへムの結合が無くなり、ほかの P450 と同様に BC ループ全体が分子の外側に存在する。

基質特異性の構造基盤

CYP105D6 と CYP105P1 は非常に類似した構造を取りながら、filipin の C26 位と C1' 位それぞれを特異的に認識している。その基質結合において filipin 分子の tail (アルキル鎖) 部分の位置は基質特異性に非常に重要であると考えた。

CYP105P1 の WT-filipin I 構造では、K ヘリックスと β 1-5 シートまでの部分とへムの上に広くて深いスペースがあり、そこには filipin I の C1' 側の tail (アルキル鎖) が入るようになっていた (図 3-9B)。このようなスペースを作るために

重要な残基は Gly284、Gly287、Gly288 である。CYP105D6 の基質フリーの構造と比較したところ、CYP105D6 では Gly287 に相応する残基がないうえに、Gly284 と Gly288 に相応する残基はそれぞれセリンとイソロイシンに変わっていた（図 3-8、図 3-9C）。このような違いによって、CYP105D6 の K ヘリックスと β 1-5 シートまで部分とヘム間のスペースは CYP105P1 より狭くなり、filipin の tail とは立体障害を起こし、C26 位がヘムに近づくのを防ぐと考えられた。

表 3-1 CYP105D6 の PCR 用プライマー

CYP105D6-1F 5'-CCCATATGACTGAGACCGAAATCCGCCTC-3'

CYP105D6-2R 5'-GGACTAGTTCAGTGGTGGTGGTGCCAGACGACGGGGAGCTCGATC-3'

付加したヒスチジンコドン^{*}を太字で示し、*Nde* I、*Spe* I 制限酵素部位を下線で示す。

表 3-2 データ収集と精密化の統計値

Data set	CYP105D6 WT-free
Data collection statistics	
X-ray source	PF-AR NW12A
Wavelength (Å)	1.000
Space group	$P3_121$
Unit cell (Å)	$a = b = 67.533$ $c = 182.089$
Resolution (Å) ^a	50.00-2.30 (2.38-2.30)
Total reflections	238,132
Unique reflections	22,289
Completeness (%) ^a	100.0 (100.0)
Redundancy ^a	10.7 (9.8)
Mean $I/\sigma(I)$ ^a	25.3 (4.1)
R merge (%) ^a	9.8 (46.0)
Refinement statistics	
Resolution range (Å)	33.77-2.30
No. of reflections	21,082
R -factor / R_{free} (%)	16.2 / 22.5
No. of atoms	3277
No. of TLS groups	3
Average B-factor (Å ²)	
protein	22.9
Heme	17.1
water	38.3
Rmsd from ideal values	
Bond lengths (Å)	0.020
Bond angles (degrees)	1.928
Ramachandran Plot (%)	
Favored	96.8
Allowed	2.9
Disallowed	0.3

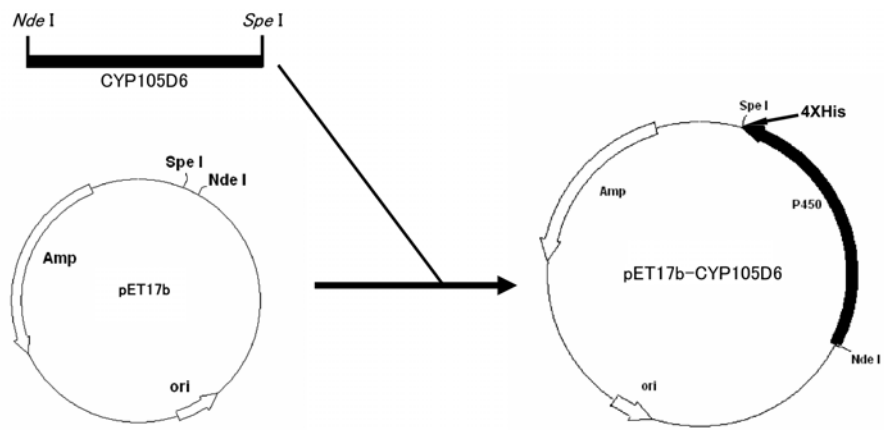


図3-1 CYP105D6の発現系構築

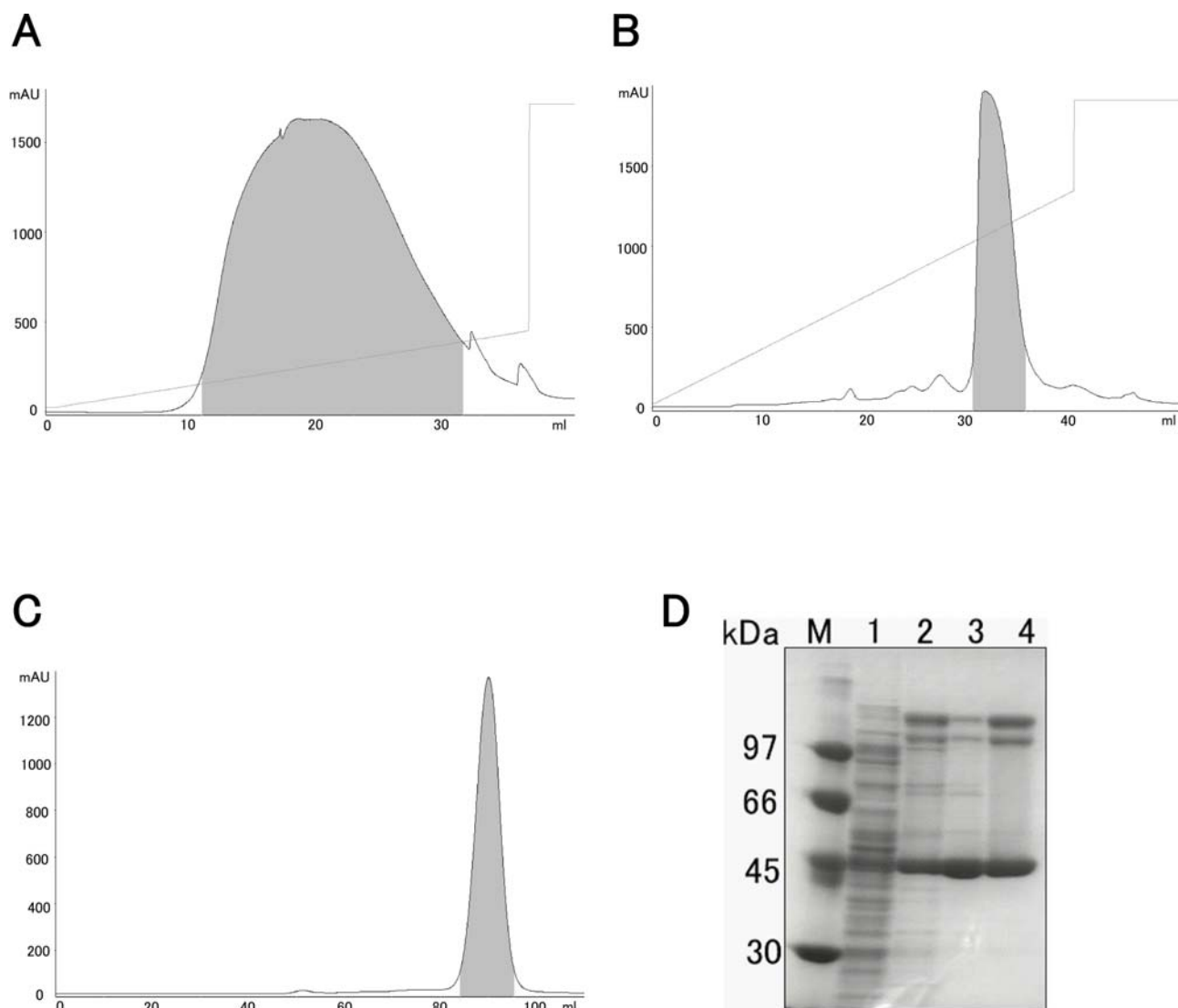


図3-2 CYP105D6の精製

(A-C) カラムクロマトグラフィーの溶出パターン：(A) HiTrap Chelating HP
 (B) Resource Q (C) Hiload 16/60 Superdex 200。CYP105D6が含まれる画分を網
 かけで示す。(D) SDS-PAGE：M、マーカー；1、菌体抽出液；2、HiTrap Chelating
 HP；3、Resource Q；4、Hiload 16/60 Superdex 200。

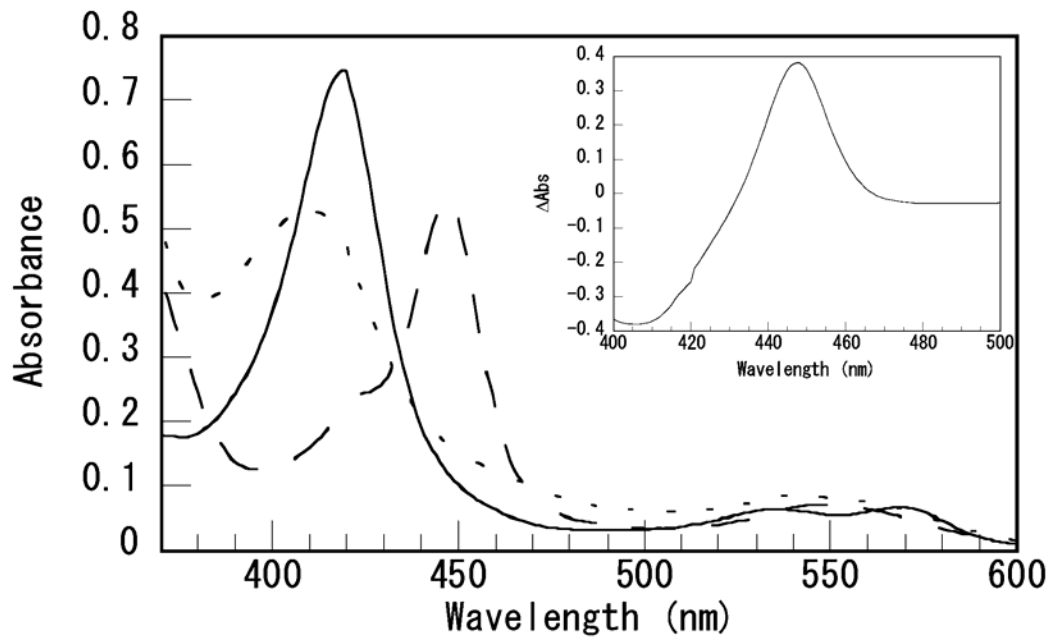


図 3-3 精製後の CYP105D7 の UV-可視吸収スペクトル

静止型 (——)、ジチオナイト還元型 (- - -)、CO 結句型 (- · - ·)。挿入図：CO 差スペクトル (CO 結句型とジチオナイト還元型のスペクトルの差)

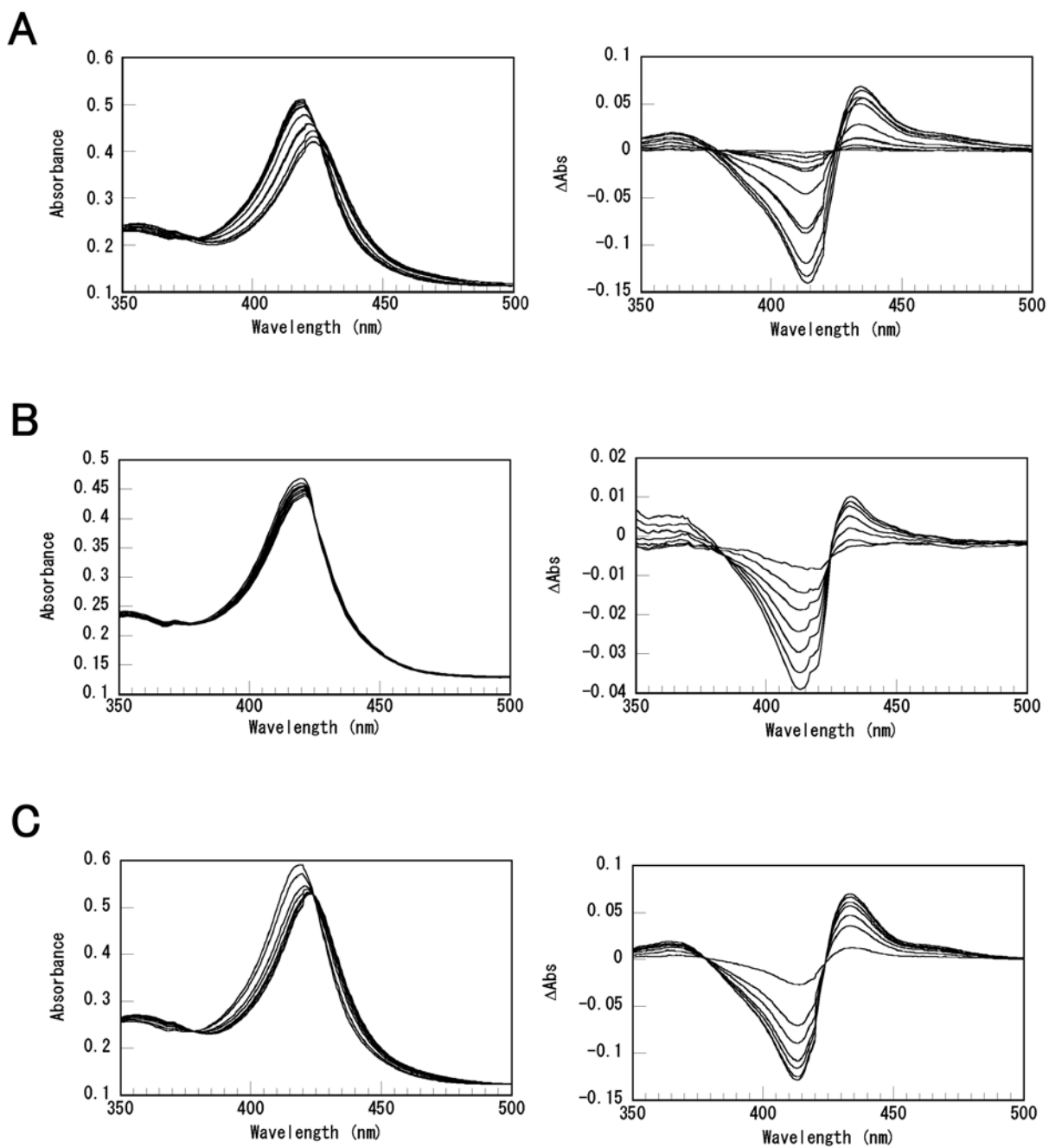


図3-4 CYP105D6と阻害剤結合

(A) imidazole結合、(B) 2-phenylimidazole結合、(C) 4-phenylimidazole結合、(A-C) において、それぞれ滴定スペクトルと滴定差スペクトルを示した。

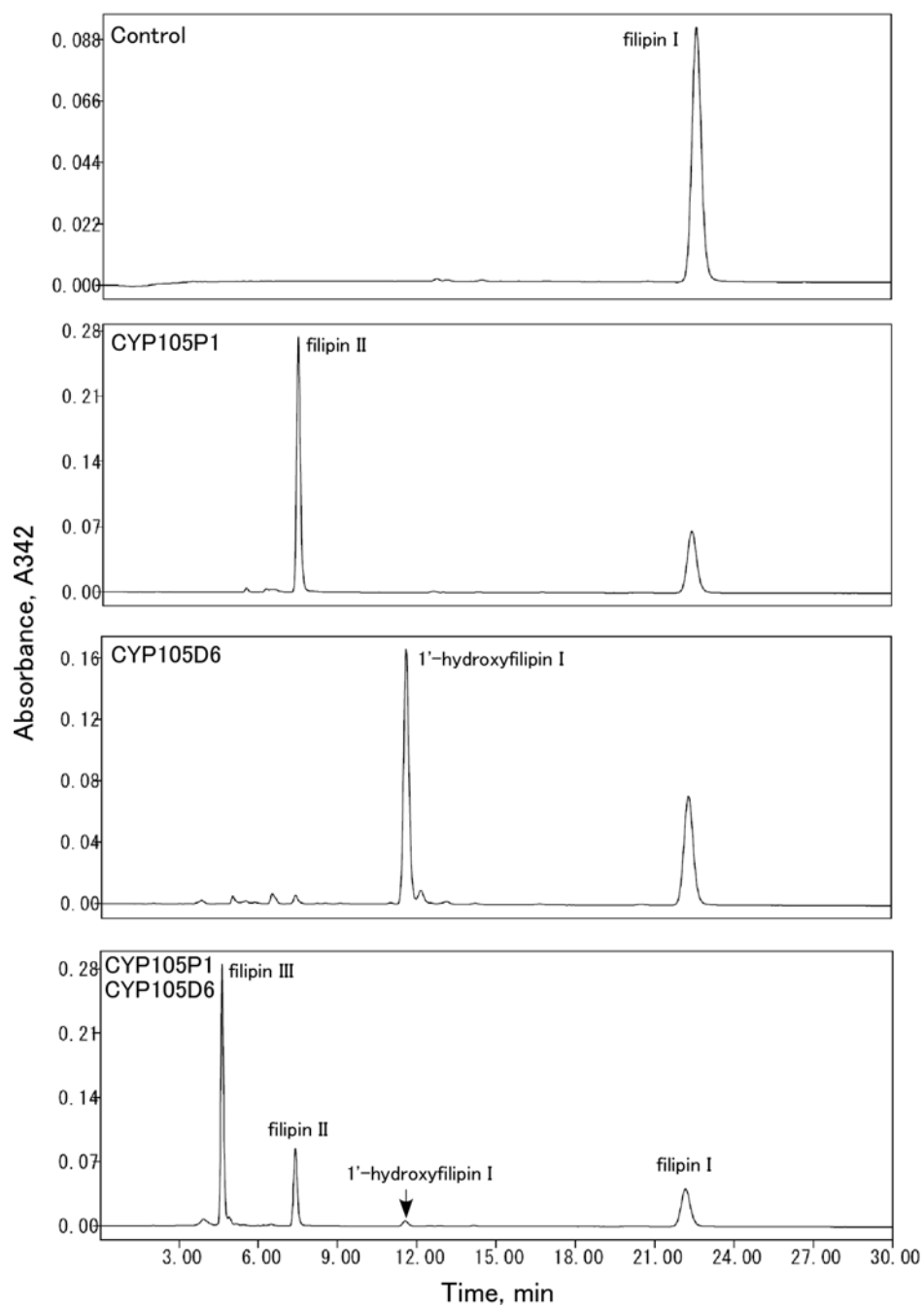


図3-5 CYP105D6とCYP105P1の触媒活性

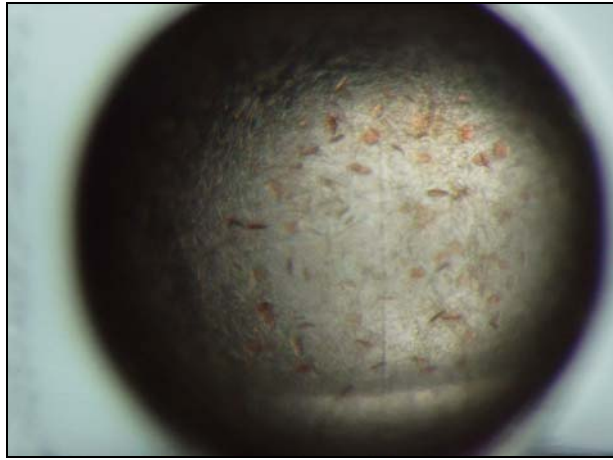


図 3-6 CYP105D6 基質フリーの結晶

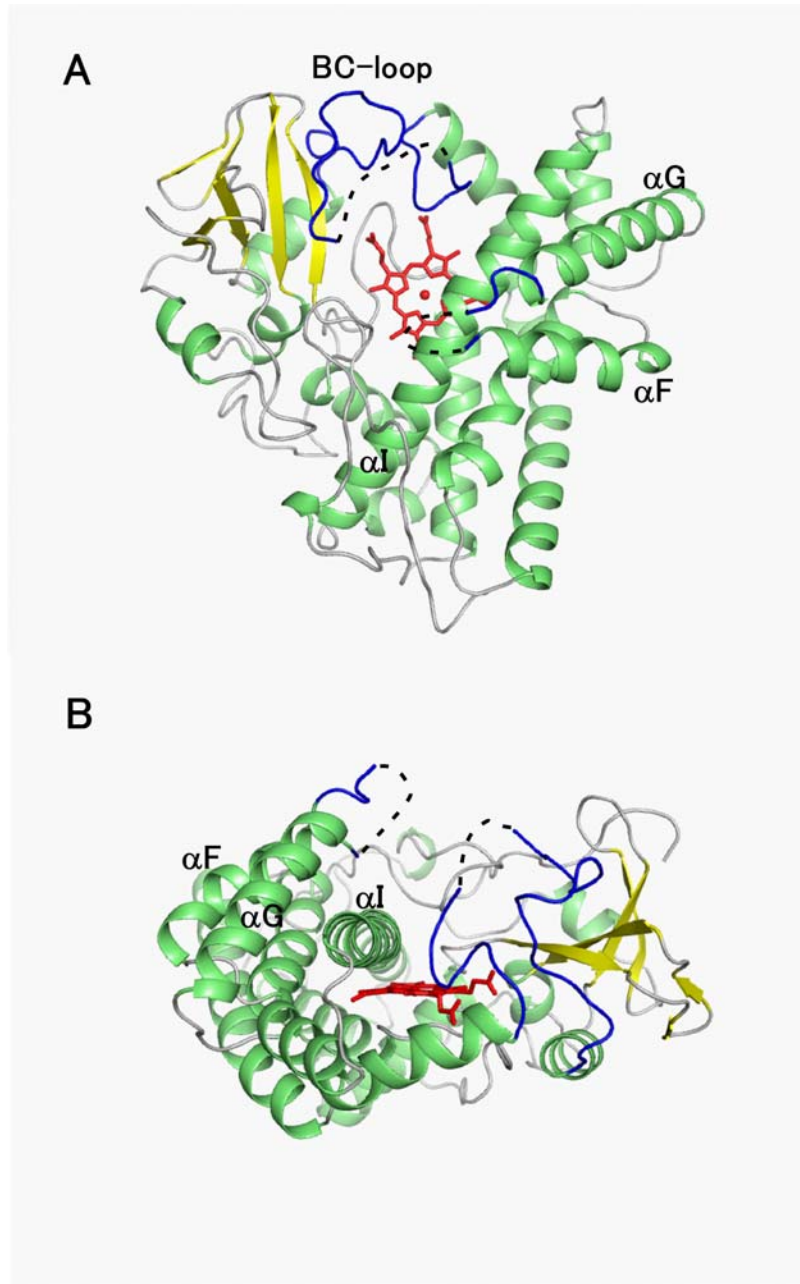


図3-7 CYP105D6の基質フリーの全体構造

(A) Top view、(B) Side view、(A-B)において、ヘリックス、 β シートをそれぞれグリーン色と黄色で示す。ヘムはスティックで示す。BC-loopとFG-loop部分は青色で示す。disorder部分は点線で示す。

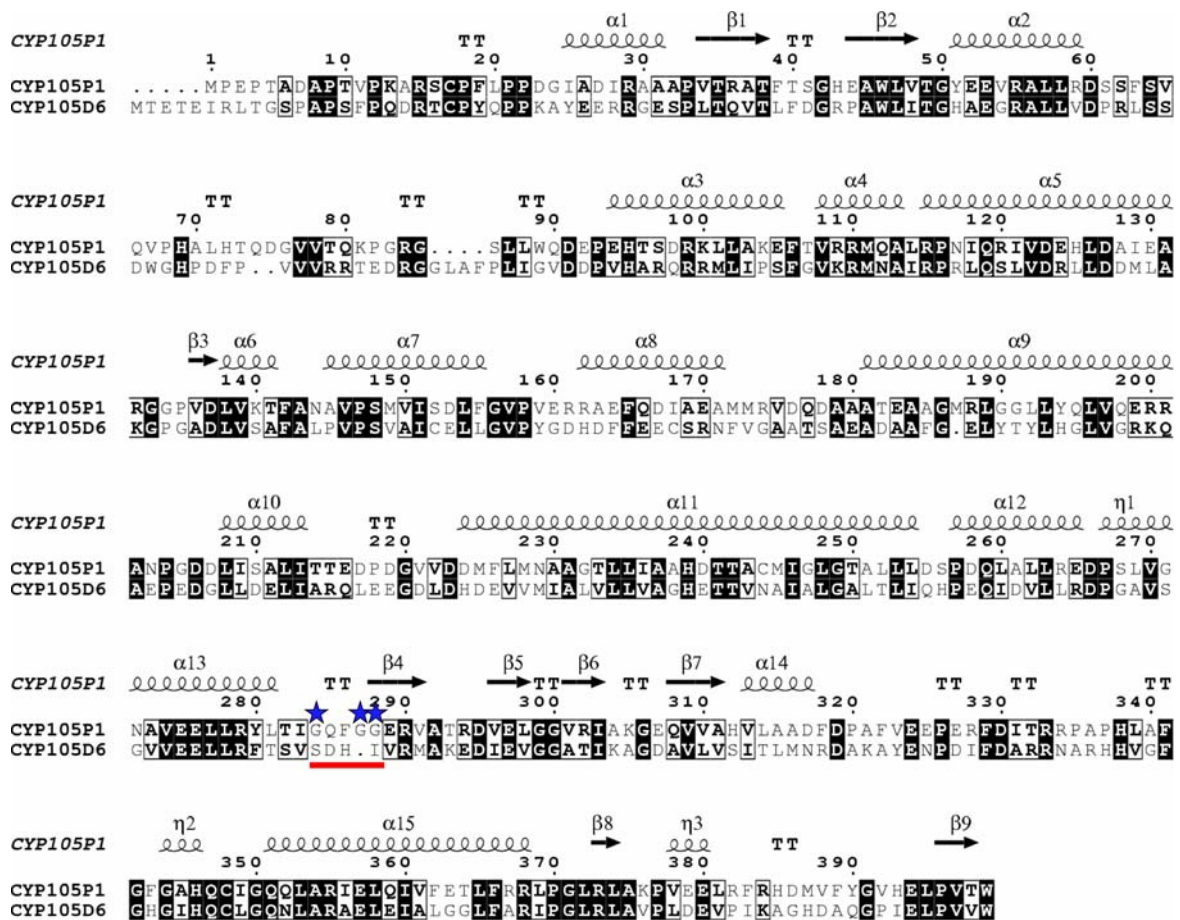


図3-8 CYP105D6とCYP105P1のアミノ酸配列のアライメント

完全に保存されているアミノ酸残基を黒色の背景で示す。CYP105P1の二次構造を配列の上に示す。基質特異性に関わる部位は赤い下線で示し、基質特異性に関わる残基は青い星で示す。

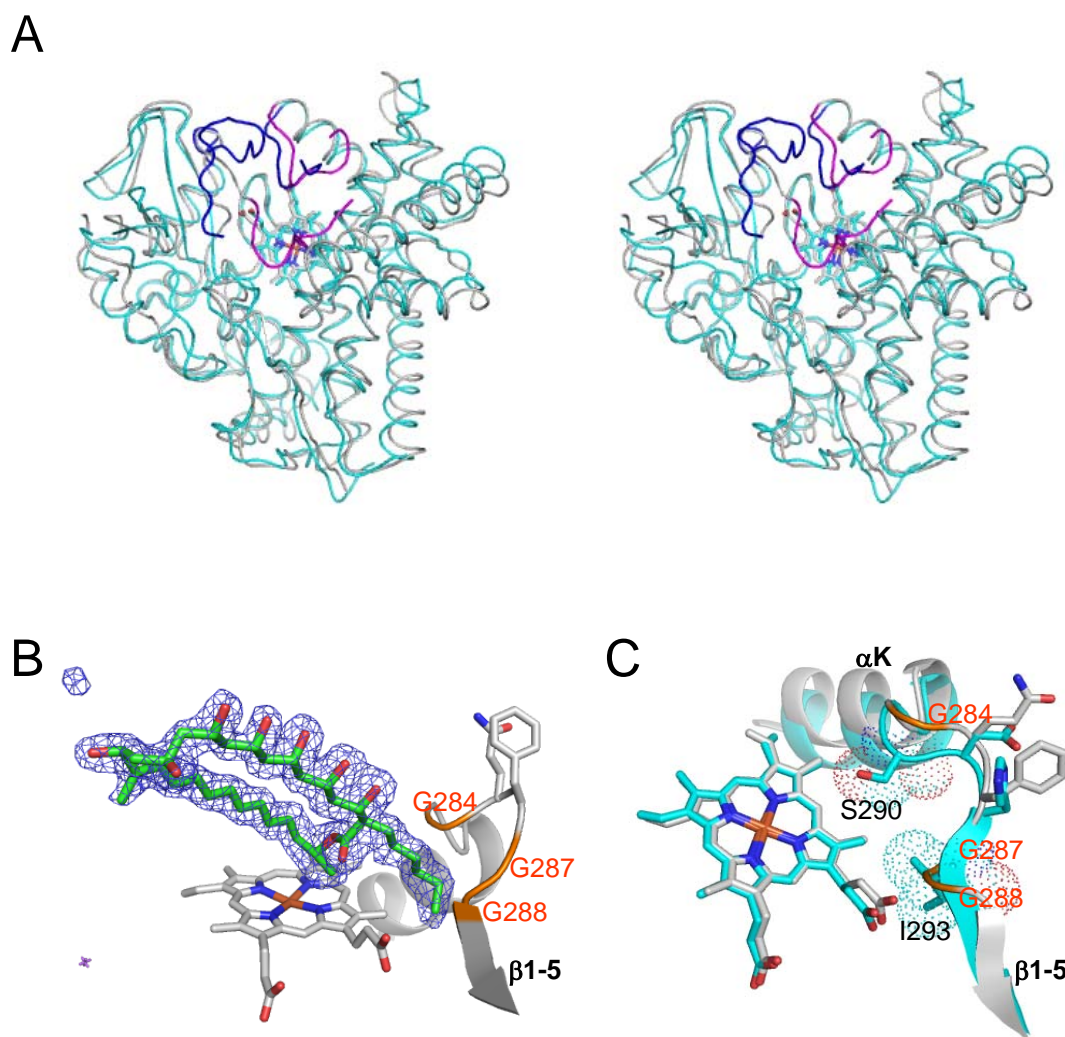


図3-9 CYP105D6とCYP105P1の比較

(A) 基質フリーの全体構造の重ね合わせ（ステレオ）、(B) CYP105P1の野生型と filipin I の結合構造、(C) 基質フリーの構造比較。β1-5シートとKヘリックスの間のループ部分は基質特異性に関わる、(A-C)において、CYP105D6はシアン色で、CYP105P1はグレー色で示す。CYP105D6とCYP105P1のBCループはそれぞれ、青色とマゼンタ色で示す。filipin Iは緑色のスティックで、基質特異性に関わる残基をスティックで示す。CYP105P1のGly284、Gly287、Gly288はオレンジ色で示す。

参考文献

1. Bergy, M.E. and T.E. Eble, *The filipin complex*. Biochemistry, 1968. **7**(2): p. 653-9.
2. Pandey, R.C. and K.L. Rinehart, Jr., *Polyene antibiotics. V. Characterization of components of the filipin complex by mass spectrometry*. J Antibiot (Tokyo), 1970. **23**(8): p. 414-7.
3. Pylypenko, O., et al., *Crystal Structure of OxyC, a Cytochrome P450 Implicated in an Oxidative C-C Coupling Reaction during Vancomycin Biosynthesis*. J. Biol. Chem., 2003. **278**(47): p. 46727-46733.
4. Sherman, D.H., et al., *The structural basis for substrate anchoring, active site selectivity, and product formation by P450 PikC from Streptomyces venezuelae*. J Biol Chem, 2006. **281**(36): p. 26289-97.
5. Makino, M., et al., *Crystal structures and catalytic mechanism of cytochrome P450 StaP that produces the indolocarbazole skeleton*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007. **104**(28): p. 11591-11596.
6. Ho, W.W., et al., *Crystal Structure and Properties of CYP231A2 from the Thermoacidophilic Archaeon *Picrophilus torridus**. Biochemistry, 2008. **47**(7): p. 2071-2079.

第四章 *Streptomyces avermitilis* 由来 CYP105D7 の機能解析

序

本章では CYP105D7 の発現精製を行い、さまざまな基質との解離定数を測定し、結晶化を試みた。

材料と方法

材料

本研究に用いた試薬は、特に記さない限り、和光純薬工業株式会社または SIGMA の特級試薬を用いた。

発現系の構築

大腸菌における発現系プラスミドを図 4-1 のように構築した。用いたプラスミドは表 4-1 に示す。プラスミド作製方法は第一章で記述したのとほぼ同様である。得られたプラスミドは pET17b-CYP105D7 (4His 付加) とした。

発現条件検討

プラスミド pET17b-CYP105D7 (4His 付加) で大腸菌 BL21 CodonPlus (DE3)、C43 (DE3) を形質転換した。それぞれ前培養を行ったのち、200 mL の LB 培地に 1% seeding し、30°C で培養した。OD₆₀₀ が 0.2~0.8 に達したところで、濃度がそれぞれ 0 mM、0.1 mM、0.5 mM になるように IPTG を加え、25°C で培養した。培養時間が 20 時間になったところで、それぞれ 10 mL ずつ集菌し、1.5 mL のバッファー[10 mM Tris-HCl (pH 7.5)、0.1 mM EDTA、0.1 mM DTT、10% (v/v) glycerol]に懸濁し、超音波処理した後、18,000 rpm、4°C で 20 分間遠心を行い、不溶性沈殿画分と可溶性画分に分離した。得られた上清画分を無細胞抽出液と

した。発現確認は無細胞抽出液を用いて SDS-PAGE を行い、差スペクトルを測定した。

大量発現

20 mL の LB 培地 (Difco) (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ampicillin 、 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Chloramphenicol) にグリセロールストックから植菌し、37°C で 12 時間前培養を行ったのち、2 L の改変 TB 培地に前培養液を全て加え (1% seeding)、5 L の羽根突きフラスコを用いて 37°C で本培養を開始した。2 時間ほど培養した後、 $\text{OD}_{600} \doteq 0.6\sim 0.8$ に達したところで、IPTG による誘導を行わずに 25°C でさらに 20 時間培養後、5000 rpm で 10 分間遠心して菌体を回収した。

精製

精製は第三章で記述した方法で行った。

SDS-PAGE

第一章で記述した方法で行った。

タンパク質の定量

第一章で記述した方法で行った。

吸収スペクトル測定

第一章で記述した方法で行った。

解離定数 K_d 測定

第二章で記述した方法で行った。

結晶化

CYP105D7 の基質フリーと基質結合の結晶化を試みた。

結晶化条件の初期スクリーニングは、Crystal Screen (Hampton Research)、Crystal Screen 2 (Hampton Research)、Index (Hampton Research)、Wizard Screen I (Emerald Biostructures)、Wizard Screen II (Emerald Biostructures)、Wizard Screen III (Emerald Biostructures)、Structure Screen 1 (Molecular Dimensions)、Structure Screen 2 (Molecular Dimensions)、CRYO I (Emerald Biostructures)、CRYO II (Emerald Biostructures)、Crystal Screen CRYO (Hampton Research)、Precipitant Synergy 33%、66%、100% (Emerald Biostructures) を用いて、シッティングドロップ蒸気拡散法により行った。結晶化は、Greiner 96 well Crystallization Plate (Greiner) を用いて、1 μ L のタンパク質溶液 [10 mg/mL CYP105D7、10 mM Tris-HCl (pH7.5)、0.1 mM EDTA、500 mM NaCl] と 1 μ L のリザーバー溶液を混合し、25°C で静置することにより行った。

His-tagなしのCYP105D7の発現系の構築

北里大学池田治生教授らによって作製されたCYP105D7とP450還元酵素を投入したプラスミドをテンプレートとし、CYP105D7のみの発現系を新しく構築した。発現ベクターはpET17b (Novagen) を使用した。テンプレートプラスミドとpET17bベクターを*Nde* Iと*Spe* Iで切断し、DNA断片をアガロースゲル電気泳動で分離した。目的のDNA断片を切り出し、Gel Extraction Kit (Qiagen) を用いて精製した。Ligation High (Toyobo) を用いて目的のDNA断片のライゲーションを行い、発現プラスミドpET17b-CYP105D7 (4Hisなし) を構築した。DNAシーケンサーCEQ 2000XL DNA Analysis System (Beckman Coulter) を用いて、インサートの塩基配列を確認した。

His-tagなしのCYP105D7の発現と精製

1) プラスミド pET17b-CYP105D7 (4His なし) で形質転換した *E.coli* BL21 CodonPlus (DE3) (Stratagene) を 100 µg/mL ampicillin と 25 µg/mL Chloramphenicol を含む 20 mL の LB 培地を用いて、37°C で 12 時間前培養を行ったのち、2 L の LB 培地 (100 µg/mL Ampicillin、25 µg/mL Chloramphenicol、0.475 mM 塩化第二鉄・6 水和物、0.5 mM アミノレブリン酸) に前培養液を全て加え (1% seeding)、5 L の羽根突きフラスコを用いて 37°C で本培養を開始した。2 時間ほど培養した後、OD₆₀₀ ≒ 0.6~0.8 に達したところで、IPTG による誘導を行わずに 25°C でさらに 20 時間培養後、5000 rpm で 10 分間遠心して菌体を回収した。得られた湿重量 10 g の菌体を、100 mL のバッファー [50 mM Tris-HCl (pH 7.4)、0.1 mM EDTA、0.1 mM DTT、10% (v/v) glycerol] に懸濁し、冷却しながら、超音波破碎機 SONIFER 2500 (BRANSON) により破碎を 10 分間行った。破碎後、遠心 (18,000 rpm、30 min) して上清を得た。この上清を Minisart 0.45 µm Filter (Sartorius stedim) に通した後のサンプルを粗酵素抽出液とした。

2) 粗酵素抽出液をバッファー [50 mM Tris-HCl (pH 7.4)、0.1 mM EDTA、0.1 mM DTT、10% (v/v) glycerol] で平衡化した Q-Sepharose Fast Flow カラム (GE Healthcare) (ベッド体積: 100 mL) に吸着させた。平衡化バッファーで非吸着画分を溶出した後、0-1M NaCl の濃度直線勾配を用いて流速 10 mL/min でタンパク質を溶出した。赤色の溶出液は約 10 mL ずつ分取し、SDS-PAGE でそれぞれの画分の溶出物を確認した。

3) Q-Sepharose Fast Flow カラムで精製した目的酵素を含む画分を集め、Amicon Ultra-15 10K (Millipore) を用いて濃縮し、バッファー [10 mM potassium phosphate

(pH 7.4)、0.1 mM EDTA、0.1 mM DTT、10% (v/v) glycerol] に置換した。Minisart 0.45 μ m Filter に通した後、バッファー [10 mM potassium phosphate (pH 7.4)、0.1 mM EDTA、0.1 mM DTT、10% (v/v) glycerol] で平衡化した Hydroxyapatite カラム (ベッド体積: 30 mL) にアプライし、Flow through 画分を全部収集した。

4) Hydroxyapatite 精製で、収集した目的酵素を Amicon Ultra-15 10K (Millipore) を用いて濃縮し、バッファー [50 mM Tris-HCl (pH 7.4)、0.1 mM EDTA、0.1 mM DTT、10% (v/v) glycerol] に置換した。Minisart 0.45 μ m Filter に通した後、バッファー [50 mM Tris-HCl (pH 7.4)、0.1 mM EDTA、0.1 mM DTT、10% glycerol] で平衡化した Resource Q カラムに吸着させた。平衡化バッファーで非吸着画分を溶出した後、0-1 M NaCl の濃度直線勾配を用いて、流速 2 mL/min でタンパク質を溶出した。赤色の溶出液は約 1 mL ずつ分取し、SDS-PAGE でそれぞれの画分の溶出物を確認した。

5) Resource Q カラムで精製した目的酵素を含む画分を集め、Amicon Ultra-15 10K を用いて 2 mL 程度まで濃縮し、Minisart 0.45 μ m Filter に通した後、バッファー [20 mM Tris-HCl (pH 7.4)、0.1 mM EDTA、0.1 mM DTT、0.15 M NaCl、10% (v/v) glycerol] で平衡化した Hiload 16/60 Superdex 200 (GE Healthcare) に load した。流速 1 mL/min でタンパク質を溶出し、赤色の溶出液は約 1 mL ずつ分取した。SDS-PAGE でそれぞれの画分の溶出物を確認し、目的酵素を含む画分を集め、Amicon Ultra-15 10K を用いて濃縮し、Minisart 0.45 μ m Filter に通した。

精製は全部 4°C で AKTA FPLC (GE healthcare) を用いて行った。

His-tagなしのCYP105D7の結晶化

結晶化条件の初期スクリーニングは、Crystal Screen (Hampton Research)、Crystal

Screen 2 (Hampton Research)、Index (Hampton Research)、Wizard Screen I (Emerald Biostructures)、Wizard Screen II (Emerald Biostructures)、Precipitant Synergy 33%、66%、100% (Emerald Biostructures)、PEG/ion Screen (Hampton Research)、Additive Screen (Molecular Dimensions) を用いて、シッティングドロップ蒸気拡散法により行った。結晶化は、Greiner 96 well Crystallization Plate (Greiner) を用いて、1 μ L のタンパク質溶液 [CYP105D7、10 mM Tris-HCl (pH 7.4)、0.1 mM EDTA、0.1 mM DTT、200 mM NaCl、10% glycerol] と 1 μ L のリザーバー溶液を混合し、25 $^{\circ}$ C で静置することにより行った。タンパク質溶液の濃度は、10 mg/mL、15 mg/mL、20 mg/mL の条件で行った。

X線回折データ収集

X線回折データは高エネルギー加速器研究機構 (KEK ; 茨城県つくば市) の放射光施設 Photon Factory (PF) 実験ステーション BL5A、BL6A、NW12A で CCD 検出器を用いて収集した。結晶は抗凍結剤なしで直接クライオループ (Hampton Research) にマウントし、100 K の N₂ ストリーム中で Flash Freezing により瞬間冷却した。波長は 1.0000 Å で行った。回折データはプログラム HKL2000 を用いて処理した。

結果と考察

発現と精製

His-tag つき酵素の発現条件検討を行った結果、発現菌株は大腸菌 BL21 CodonPlus (DE3) 株、IPTG 終濃度は 0 mM、培養時間は約 20 時間でもっとも多くの目的タンパク質が得られた。

大腸菌で大量発現させた CYP105D7 を 3 段階のカラムクロマトグラフィーにより単一になるまで精製した (図 4-2)。アミノ酸配列から計算される分子量 (44 kDa) と一致して、精製した CYP105D7 は SDS-PAGE 上で分子量 45 kDa の位置に泳動した。2 L の培養液から約 15 mg の精製 CYP105D7 が得られた。

吸収スペクトル測定

精製後の野生型CYP105D7の吸収スペクトルを測定した (図4-3)。酸化型は418 nmに鋭いソーレー帯の極大を持ち、534 nmにβ帯、568 nmにα帯の山を持つ、典型的な低スピン型スペクトルを示した。ジチオナイト還元型は414 nmに吸収が減少したソーレー帯の極大を持ち、CO結合型は414 nm、447 nmと545 nmに山を持つスペクトルが得られた。414 nmの山はCO結合が不十分である可能性が高いが、CO差スペクトルでは447 nmに一つの山をもつことからCYP105D7は正しくfoldingをしていることが確認できた。

解離定数 K_d 測定

精製後のCYP105D7を用いて、Diclofenac、Lauric acid、Testosterone、Compactin、Milbemycinの解離定数 K_d を測定した。そのうち、Diclofenac、Lauric acidは低スピン型から高スピン型に明確に移行する典型的なP450のType Iスペクトル変化を示した。これらの基質はCYP105D7の第六配位座にある水分子を完全に押し分け、

酵素と完全に結合することが示唆される (図4-4、図4-5)。Compactinを添加した時のスペクトル変化では、低スピン型から高スピン型への移行が確認でき、Type Iスペクトル変化であることが分かった。しかし、スペクトル変化は40%程度で終了し、Compactinとの結合が不完全であることが示唆された (図4-7)。基質Milbemycinは非常に不溶であったために、タンパク質溶液が不透明になりやすく正確なスペクトルを測定するのはとても困難であった。しかし、差スペクトルから基質溶液の濃度をX軸にプロットを行った時、きれいな飽和曲線を描き、酵素との結合が確認できた (図4-8)。Testosteroneとのスペクトルでは、低スピン型から高スピン型への移行がわずかに確認でき、Type Iスペクトル変化であることが分かった。この結果からは、TestosteroneはCYP105D7とわずかに結合することが示唆される (図4-6)。

以上五つの基質との解離定数 K_d の値は表4-2に示した。それぞれの基質の K_d の値は μM 単位で比較的小さい値を示していたが、脂肪酸のLauric acid以外は水に溶けにくいため、比較的誤差が大きいと考えられる。従って、 K_d は基質結合の目安と考えた。

結晶化

タンパク質溶液を用いて、基質Diclofenac、Lauric acid、Testosterone、Compactin、Milbemycinとの複合体の結晶化を試みた。さまざまな条件で初期スクリーニングを行ったが、ほとんどの条件で沈殿が見られ、結晶は得ることができなかった。原因としては、酵素の揺らぎによる不安定、基質の不完全結合による酵素の不安定、His-tagの影響などが考えられる。

His-tagなしのCYP105D7の発現と精製

大腸菌で大量発現させる際、事前に、BL21 CodonPlus (DE3) 株を用いて、IPTG

終濃度 (0、0.1 mM、0.5 mM)、培養時間 (5~20 時間) を振っての発現条件検討を行った。結果、IPTG 終濃度は 0 mM、培養時間は 17 時間で最も多くの目的タンパク質が得られた。

大腸菌で大量発現させた His-tag なし CYP105D7 を 4 段階のカラムクロマトグラフィにより単一になるまで精製した (図 4-9)。精製過程の検討中、二本目のカラムとして Hydroxyapatite を用いたが、目的タンパク質が flow through に出してしまうことが分かった。しかし、SDS-PAGE の結果から、Hydroxyapatite の flow through を得るだけでも精製効果が十分あることが確認できたので、flow through を全部採集し、次のカラムに使用した。三本目のカラムとして疎水カラムである Butyl-Toyopearl と Phenyl-Toyopearl、陰イオン交換カラムである MonoQ カラムを試した。しかし、疎水カラムを用いた場合、目的タンパク質がカラムと結合したまま溶出しないことが分かった。更に、Mono Q カラムを試したところ、タンパク質溶液の CO 差スペクトルで P450 の一部変性が見られた。その原因として、Mono Q が強イオン交換体であるため変性を起こしたと考えられる。Mono Q よりは少し弱い陰イオンカラムである Resource Q カラムを用いると、タンパク質の変性は起こらず、効率よく分離ができた。

アミノ酸配列から計算される分子量 (44 kDa) と一致して、精製した CYP105D7 は SDS-PAGE 上で分子量 45 kDa の位置に泳動した (図 4-9E)。2 L の培養液から約 7.4 mg の精製 CYP105D7 が得られた。

His-tagなしのCYP105D7の結晶化

1) 10 mg/mL、20 mg/mL のタンパク質溶液を用いて基質フリーの結晶化条件の初期スクリーニングを行ったところ、以下の複数の条件で結晶が得られた。

・ Crystal Screen #6 : 30% PEG 4000、0.1 M Tris-HCl (pH 8.5)、0.2 M Magnesium Chloride

- Crystal Screen #17 : 30% PEG 4000、0.1 M Tris-HCl (pH 8.5)、0.2 M Lithium Sulfate
- Crystal Screen #18 : 20% PEG 8000、0.1 M Na Cacodylate (pH 6.5)、0.2 M Magnesium Acetate
- Crystal Screen #22 : 30% PEG 4000、0.1 M Tris-HCl (pH 8.5)、0.2 M Sodium Acetate
- Crystal Screen #37 : 8% PEG 4000、0.1 M Na Acetate (pH 4.6)
- Crystal Screen #41 : 10% iso-Propanol、0.1 M Na Hepes (pH 7.5)、20% PEG 4000
- Crystal Screen #46 : 18% PEG 8000、0.1 M Na Cacodylate (pH 6.5)、0.2 M Calcium Acetate
- Crystal Screen 2 #22 : 12% PEG 20,000、0.1 M MES (pH 6.5)
- Crystal Screen 2 #26 : 30% PEGMME5000、0.1 M MES (pH 6.5)、0.2 M Ammonium Sulfate
- Wizard I #37 : 2.5 M NaCl、0.1 M imidazole (pH 8)
- Wizard II #24 : 30% PEG 8000、0.1 M imidazole (pH 8)、0.2 M NaCl
- PEG/ion #33 : 20% PEG 3350、0.2 M Sodium Sulfate

初期条件の結果から沈殿剤として PEG は有効であることが分かった。以上の初期条件を参考に、タンパク質濃度、沈殿剤濃度、バッファー、pH などを変えて、細かく条件検討を行った。その結果、複数の条件で針、板状の一見良質な結晶が得られた。これらの結晶を用いて放射光施設 Photon Factory (PF) 実験ステーション NW12A で X 線回折実験を行ったところ、ほとんどの結晶において分解能が低く、データ収集までは至らなかった。そのうち、35% PEG MME5000、0.1 M MES pH 6.5、0.2 M Ammonium Sulfate の条件で得られた結晶が最高 3 Å 分解能まで回折した (図 4-10A)。

2) タンパク質溶液を用いて基質 Diclofenac との複合体の結晶化条件の初期スク

リーニングを行ったところ、以下の条件で結晶を得られた。

- Crystal Screen #15 : 30% PEG8000、0.1 M Na Cacodylate (pH 6.5) 、0.2 M

Ammounium Sulfate

- Crystal Screen 2 #26 : 30% PEGMME5000、0.1 M MES (pH 6.5) 、0.2 M Ammounium Sulfate

- Precipitant synergy 100% #39 : 40% PEG400 、 15% PEG1000 、 0.15M K₂Hphosphate/NaH₂phosphate (pH 6.5)

以上の初期条件を参考に、タンパク質濃度、沈殿剤濃度、バッファー、pH などを変えて、細かく条件検討を行った。更に、Additive Screen を行った結果、38% PEG400、14% PEG1000、0.1 M K₂H phosphate/NaH₂ phosphate (pH 6.5)、1.0 M Glycine の条件で良質の結晶を得られた (図 4-10 B)。放射光施設 Photon Factory (PF) 実験ステーション BL5A、BL6A で X 線回折実験を行ったが、7 Å 分解能までしか回折せず、データ収集は行わなかった。

3) タンパク質溶液を用いて基質 Tolbutamide との複合体の結晶化条件の初期スクリーニングを行ったところ、以下の条件で結晶を得られた。

- Crystal Screen #18 : 20% PEG 8000、0.1 M Na Cacodylate (pH 6.5) 、0.2 M

Magnesium Acetate

- Precipitant synergy 100% #39 : 40% PEG400 、 15% PEG1000 、 0.15M K₂Hphosphate/NaH₂phosphate (pH6.5)

以上の初期条件を参考に、条件検討を行ったところ、基質が Diclofenac である場合と類似した条件で結晶を得られた。38% PEG400、14% PEG1000、0.1 M K₂H phosphate/NaH₂ phosphate (pH 6.5)、0.3 M Glycyl-glycyl-glycin の条件で得られた一見良質な結晶を放射光施設 Photon Factory (PF) 実験ステーション BL5A、BL6A で X 線回折実験を行った (図 4-10 C)。結果、3.75 Å 分解能まで回折し、データ

収集を行ったが、構造決定までは至らなかった。

His-tag あり、なしの結晶化の比較

His-tag のありとなしの二つの発現系の条件で行った結晶化で、His-tag なしの条件だけで複数の結晶が得られ、His-tag ありの条件では結晶は一つも得られなかった。以上の結果から、CYP105D7 において C 末端側の四つの Histidine はタンパク質の folding、あるいは、構造に影響を与えていると考えられた。

一方、His-tag なしでは、基質フリー、基質結合両方で、さまざまな結晶化条件において、数多い良質な結晶が得られたにも関わらず、3~10 Å 分解能までしか回折しなかった。この回折結果から、CYP105D7 の構造の揺らぎにより、分子間並びが乱れてしまった可能性が示唆された。このような構造の揺らぎはさまざまな基質と結合するために必要であると考えられた。

表 4-1 CYP105D7 の PCR 用プライマー

CYP105D7-1F 5'-CATATGACAGAGCCCGGTACGTCCGTGTC-3'

CYP105D7-2R 5'-GGACTAGTTCAGTGGTGGTGGTGCCAGGTCACGGGGAGTTCAGCATC-3'

付加したヒスチジンコドン¹を太字で示し、*Nde* I、*Spe* I 制限酵素部位を下線で示す。

表 4-2 CYP105D7 と基質の K_d

Substrate	K_d (μM)
Diclofenac	84.9 ± 4.8
Lauric acid	18.8 ± 0.7
Compactin	27.4 ± 0.8
Milbemycin	18.6 ± 1.3
Testosterone	68.2 ± 21.7

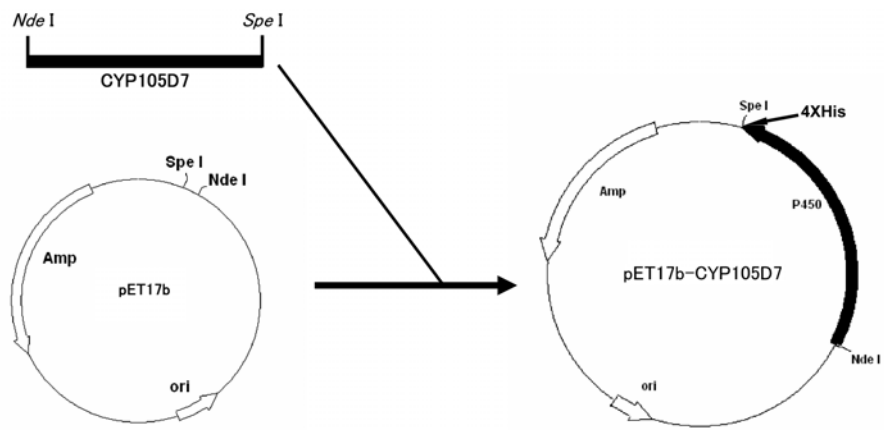


図4-1 CYP105D7の発現系構築 (His-tagあり)

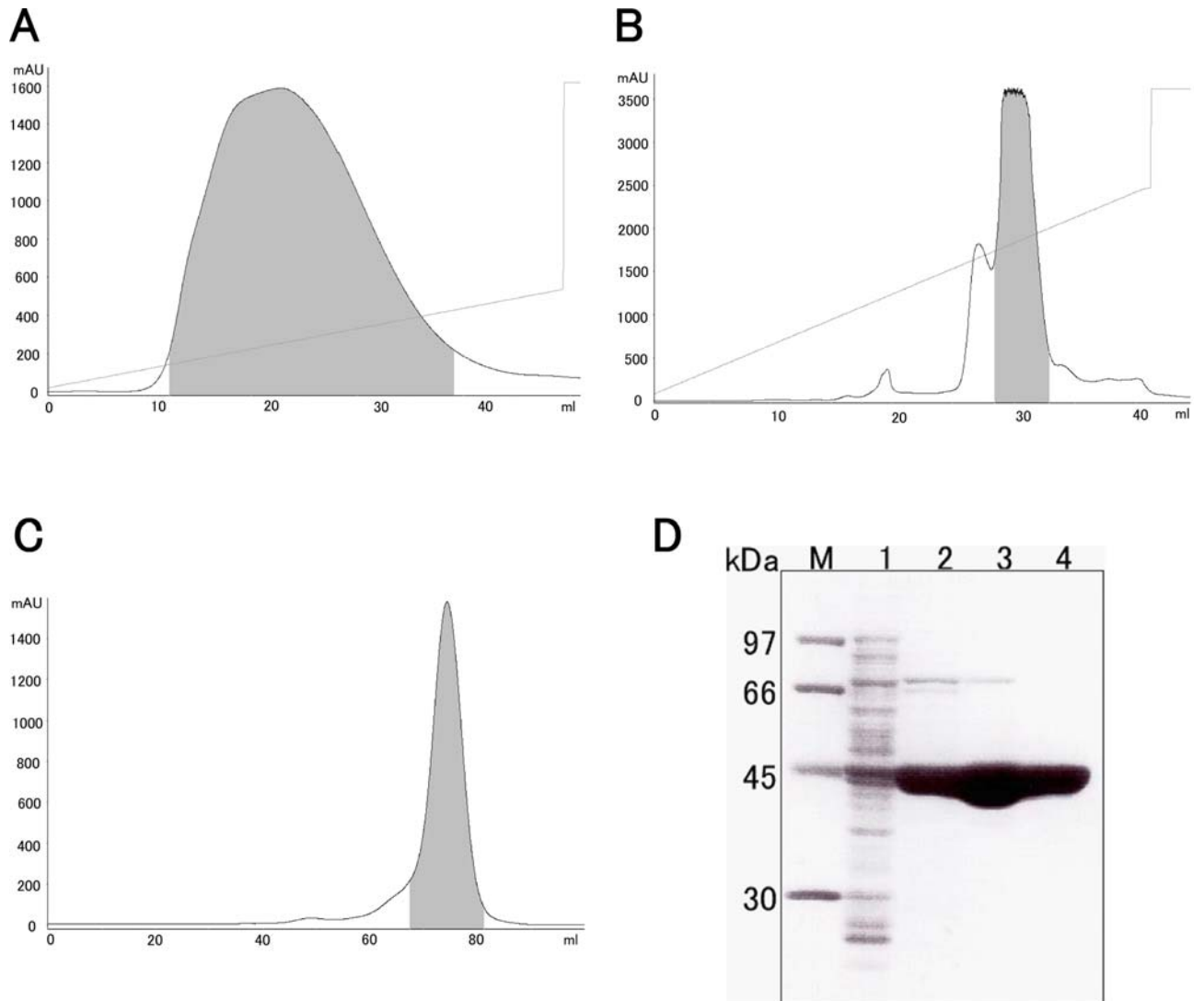


図4-2 CYP105D7の精製 (His-tag あり)

(A-C) カラムクロマトグラフィーの溶出パターン：(A) HiTrap Chelating HP
 (B) Resource Q (C) Hiload 16/60 Superdex 200。CYP105D7が含まれる画分を網
 かけで示す。(D) SDS-PAGE：M、マーカ；1、菌体抽出液；2、HiTrap Chelating
 HP；3、Resource Q；4、Hiload 16/60 Superdex 200。

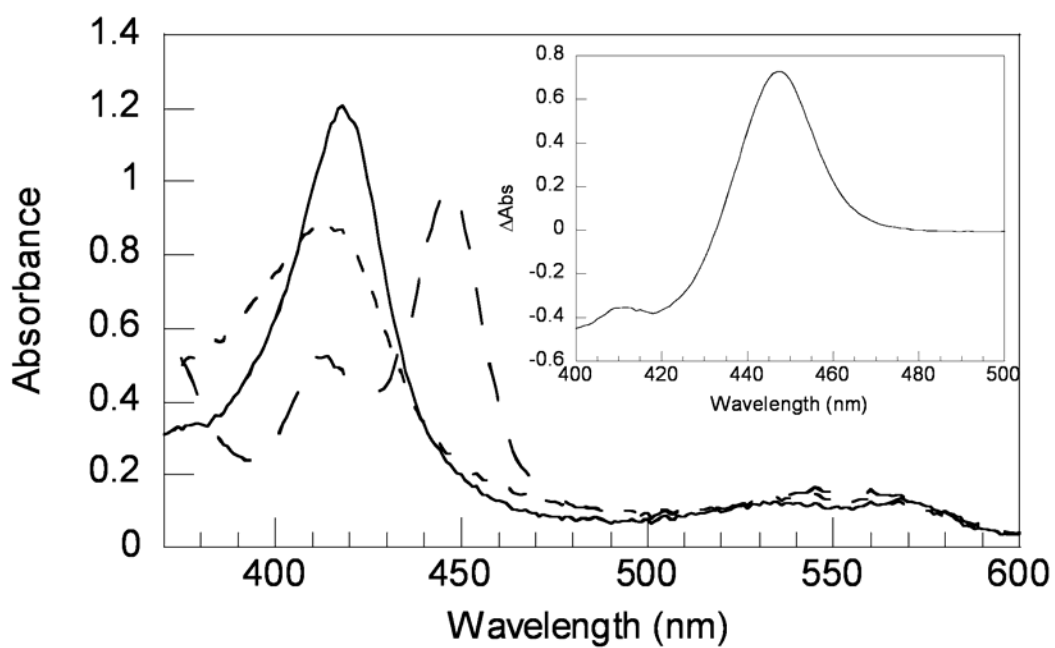


図 4-3 精製後の CYP105D7 の UV-可視吸収スペクトル

静止型 (——)、ジチオナイト還元型 (- - -)、CO 結合型 (- · -)。挿入図 : CO 差スペクトル (CO 結合型とジチオナイト還元型のスペクトルの差)

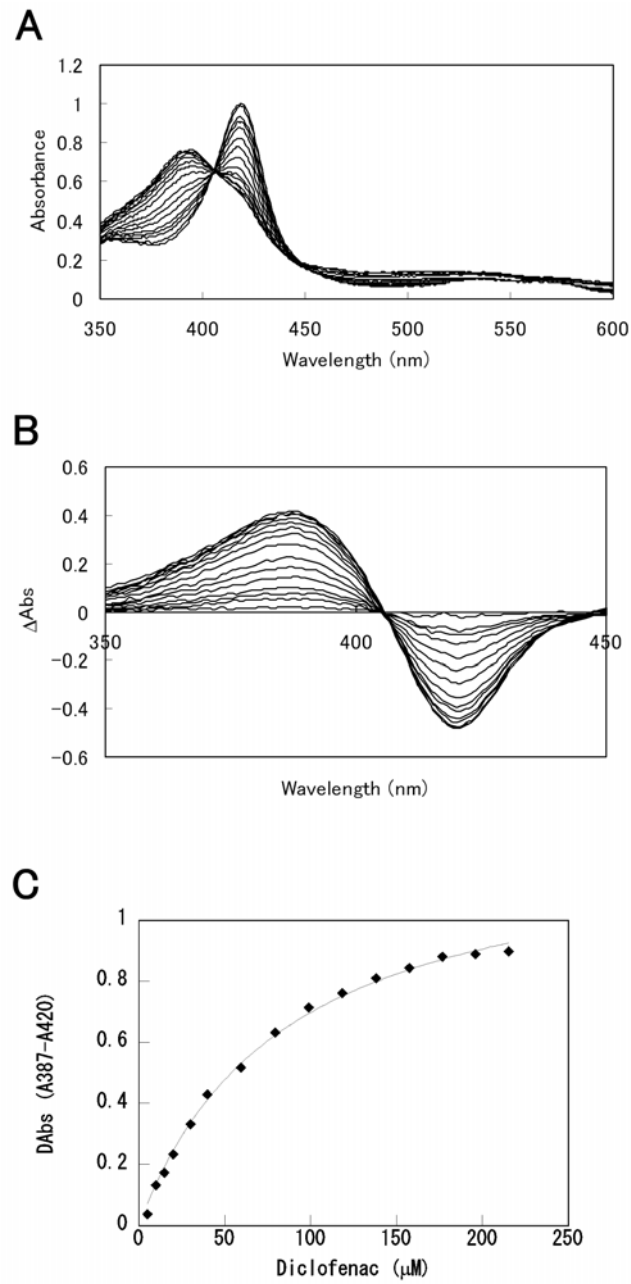


図4-4 CYP105D7とDiclofenacの結合

(A) Diclofenac滴定スペクトル、(B) Diclofenac滴定差スペクトル、(C) Diclofenac結合様式。

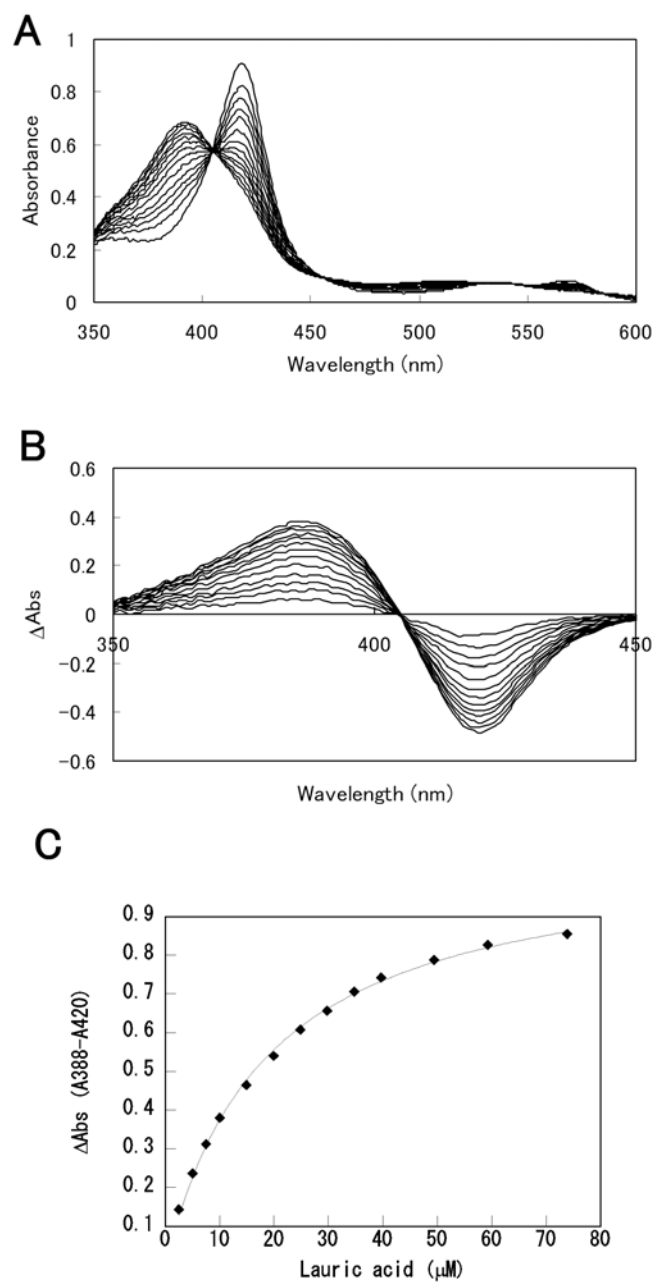


図4-5 CYP105D7とLauric acidの結合

(A) Lauric acid滴定スペクトル、(B) Lauric acid滴定差スペクトル、(C) Lauric acid結合様式。

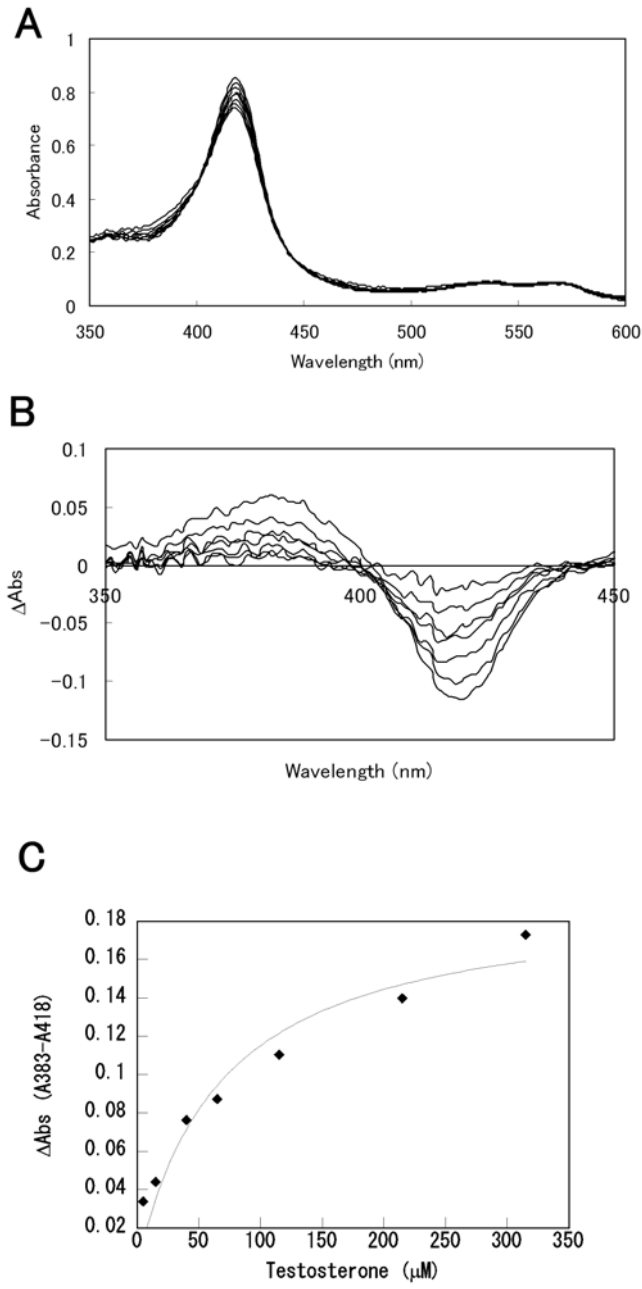


図4-6 CYP105D7とTestosteroneの結合

(A) Testosterone滴定スペクトル、(B) Testosterone滴定差スペクトル、(C) Testosterone結合様式。

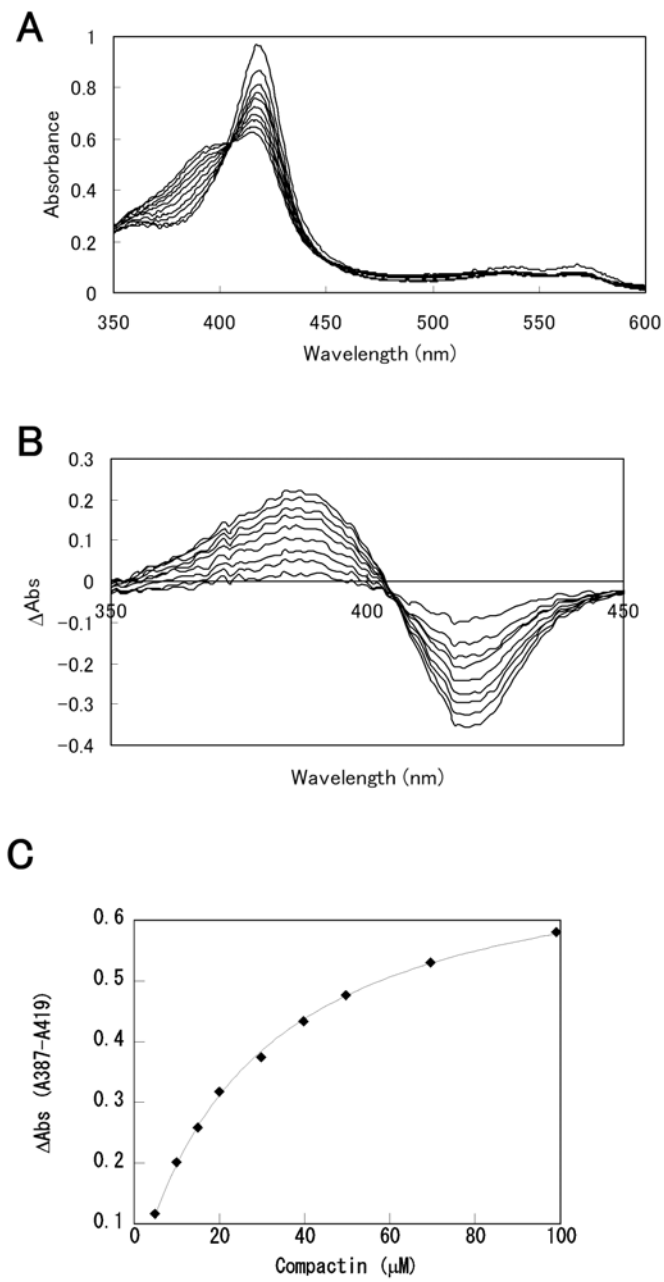


図4-7 CYP105D7とCompactinの結合

(A) Compactin滴定スペクトル、(B) Compactin滴定差スペクトル、(C) Compactin結合様式。

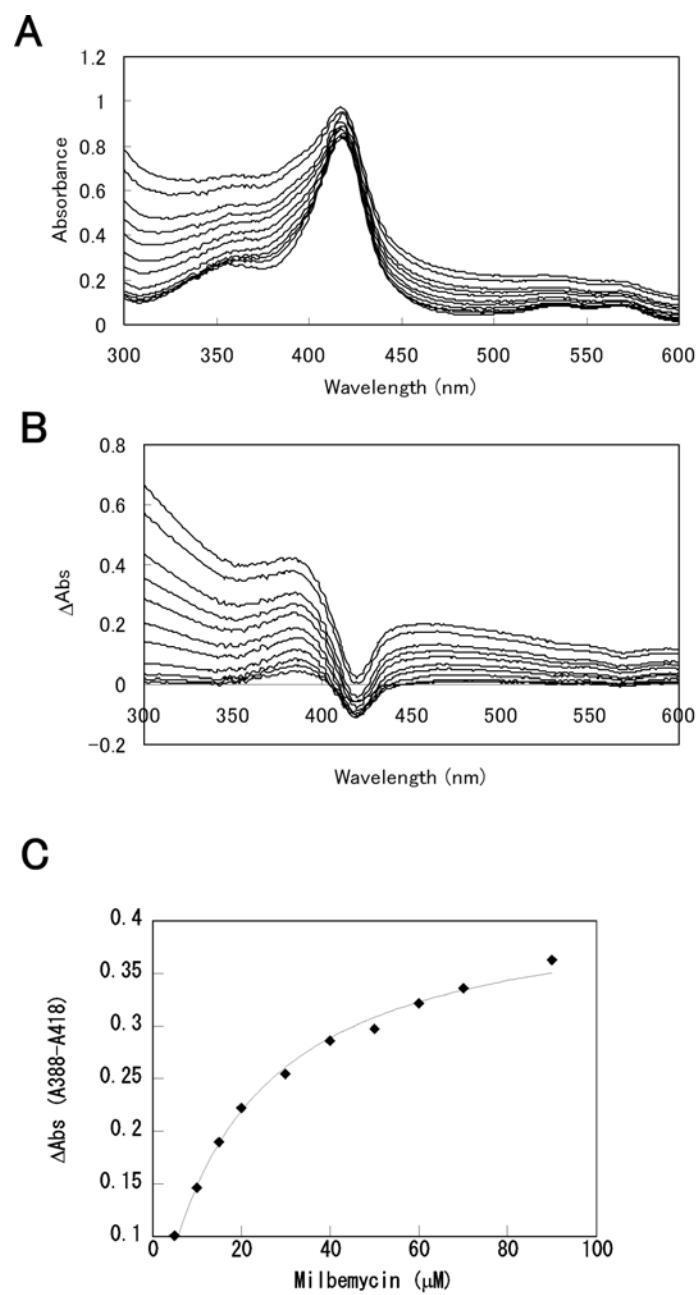


図4-8 CYP105D7とMilbemycinの結合

(A) Milbemycin滴定スペクトル、(B) Milbemycin滴定差スペクトル、(C) Milbemycin結合様式

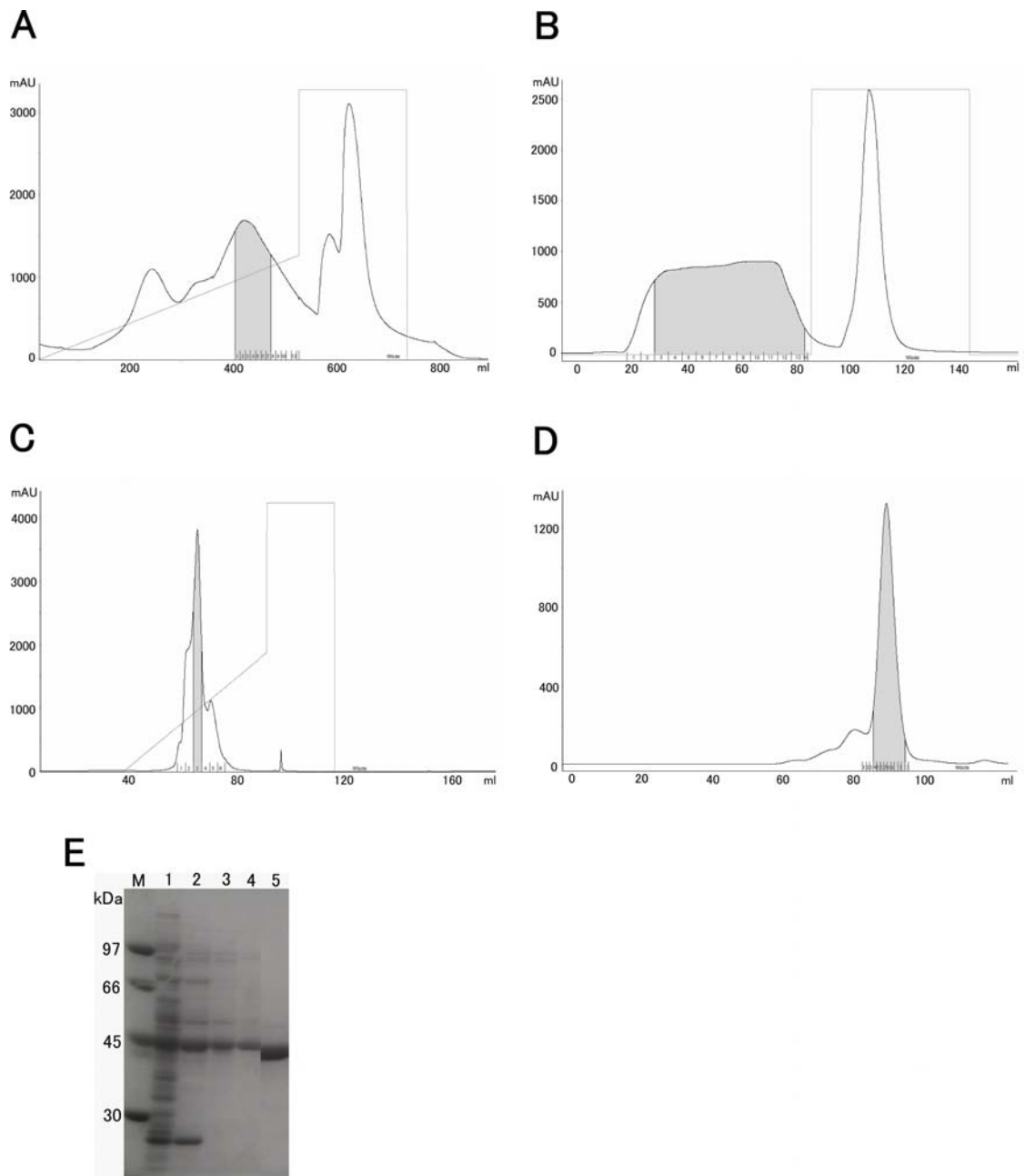


図4-9 CYP105D7の精製 (His-tagなし)

(A-D) カラムクロマトグラフィーの溶出パターン： (A) Q-Sepharose (B) Hydroxyapatite (C) Resource Q (D) Hiload 16/60 Superdex 200。CYP105D7が含まれる画分を網かけで示す。(E) SDS-PAGE：M、マーカー；1、菌体抽出液；2、Q-Sepharose；3、Hydroxyapatite；4、Resource Q；5、Hiload 16/60 Superdex 200。

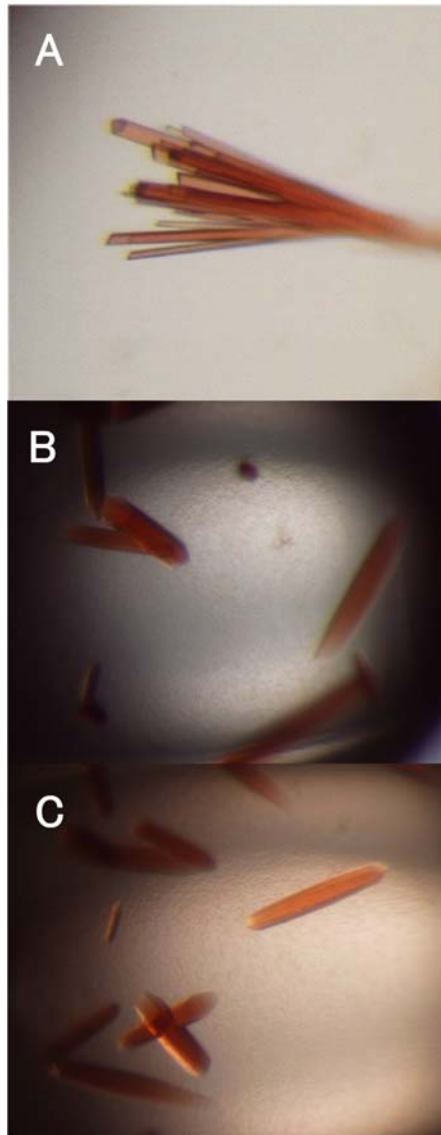


図4-10 CYP105D7の結晶

(A) 基質フリー、(B) 基質 Diclofenac との複合体、(C) 基質 Tolbutamide との複合体。

謝辞

祥雲弘文教授には研究生として入学してから現在に至るまで、研究の指針や実験の進め方について多くのご指導を賜りました。生活面では奨学金の配慮もくださり、心より感謝申し上げます。若木高善準教授には、長い間EPRなど実験に関する助言とご指導を賜り、心より感謝申し上げます。伏信進矢助教にはX線結晶解析の基礎から、実験方法、論文の書き方まで丁寧なご指導を賜り、心より感謝申し上げます。秘書である藤本海音さんには、入学してから長い間生活面で多くのサポートをいただきました。この場を借りてお礼を申し上げます。

北里大学微生物制御工学研究室の池田治生教授からは、研究対象であるP450の遺伝子情報や基質、欠損株、filipin Iの精製方法などを提供していただきました。この場を借りてお礼を申し上げます。

当研究室の先輩である日高將文博士、金尚完博士、宮永顕正博士、西増弘志博士をはじめとした本研究室の先輩、同期、後輩からは、研究に関する多くのアドバイスやサポートをいただきました。皆様のおかげで充実した研究生活を送ることができました。心より感謝いたします。

最後に、私の長い学生生活を支え、研究に集中する環境を与えてくれた家族に感謝いたします。そして、研究を理解し、そばでサポートしてくれた夫劉海江博士に感謝いたします。