

## 論文の内容の要旨

応用生命工学専攻  
平成 18 年度博士課程 進学  
氏名 許 蓮花  
指導教員 祥雲 弘文

論文題目 放線菌 *Streptomyces avermitilis* 由来 P450 の構造機能解析

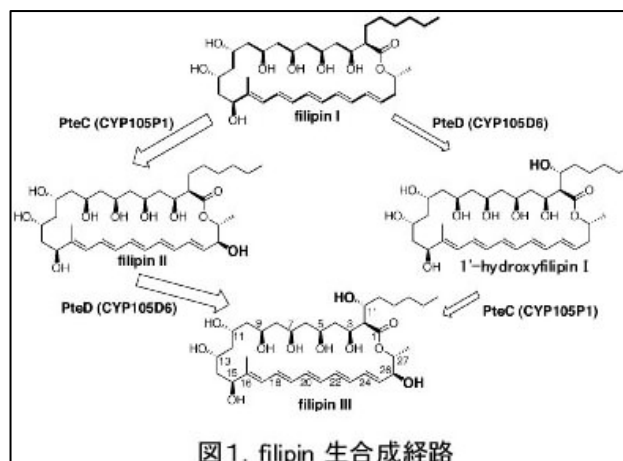
シトクロム P450 (P450) は生命科学の広範な分野に登場する一群のヘムタンパク質の総称で、原核生物から高等動植物にいたる生命に普遍的に存在し、また多彩な生理反応に関わっている。

放線菌は数多くの二次代謝産物を生産するが、実際医療に使われている抗生物質の 3 分の 2 は放線菌の産物である。*Streptomyces* は放線菌の代表的な属で、抗細菌剤、抗真菌剤、抗癌剤、免疫抑制剤など生理活性物質を生産することでよく知られている。近年 *Streptomyces coelicolor*A3(2)、*Streptomyces avermitilis*、*Streptomyces griseus* のゲノム解析が終了し、それぞれ 18、33、27 個の P450 遺伝子が見いだされた。そのうち、*S. avermitilis* の P450 の一部は avermectin, filipin, geosmin, pentalenolactone 生合成または未知の二次代謝経路に関わると予想されるが、ほとんどの P450 の機能に関しては未解明のままである。本研究では *S. avermitilis* の P450 のうち、filipin の生合成に関わる CYP105P1、CYP105D6、及び応用面で注目されている CYP105D7 に着目し、それらの遺伝子のクローニングと発現、精製、機能解析、構造解析を行った。

## 1. CYP105P1 と CYP105D6 の触媒活性

*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* 生合成遺伝子群を作っている。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用いられ、type C Niemann-Pick 病の有名な診断手段としても広く使われている。CYP105P1 と CYP105D6 をコードする遺伝子の変異体の解析から、これらの P450 はそれぞれ C26 位と C1' 位の水酸化反応を触媒することが明らかになっている (H. Ikeda et al., 未報告データ)。

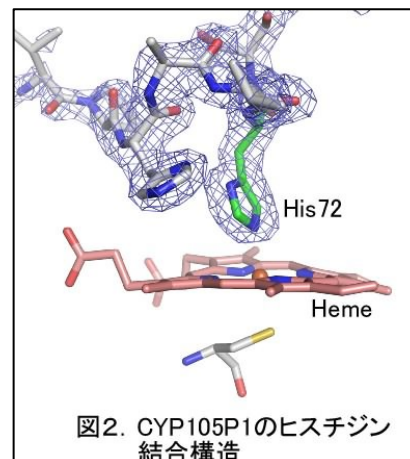
本研究では、精製した CYP105P1 と CYP105D6 酵素を用いて初めて *in vitro* で *filipin* 水酸化触媒活性を確認した。CYP105P1 は *filipin* I の 26 位を水酸化して *filipin* II を生産し、CYP105D6 は *filipin* I の 1' 位を水酸化して 1'-hydroxyfilipin I を生産した。この結果から、CYP105P1、CYP105D6 はともに *filipin* I に対して触媒活性を持つが、それぞれの異なる部位を水酸化することが明らかになった。さらに、CYP105P1 と CYP105D6 の両方を作用させた場合、*filipin* II と 1'-hydroxyfilipin I に加え、*filipin* III (26 位と 1' 位の水酸化物) が検出された。この結果は図 1 のような *filipin* 生合成経路を示唆している。



## 2. CYP105P1 の結晶構造

CYP105P1 の基質フリー (WT-free)、および Type II リガンドである 4-phenylimidazole の結合型 (WT-4PI) の構造決定に成功した。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高い B-factor を示した。特に、BC ループは WT-free 構造と WT-4PI 構造でそれぞれ 4 残基、11 残基 disorder していた。

WT-free 構造の BC ループ部位は特徴的な構造をしていた。N 末端側 (Ala70-His72) は一つの短い  $3_{10}$ -ヘリックスを形成し、His72 の imidazole 側鎖部分はヘムの鉄と結合していた (図 2)。そこで、His72 をアラニンに変えた変異体を作製し、UV-可視吸収スペクトル測定法と EPR 法を用いて、野生型と比



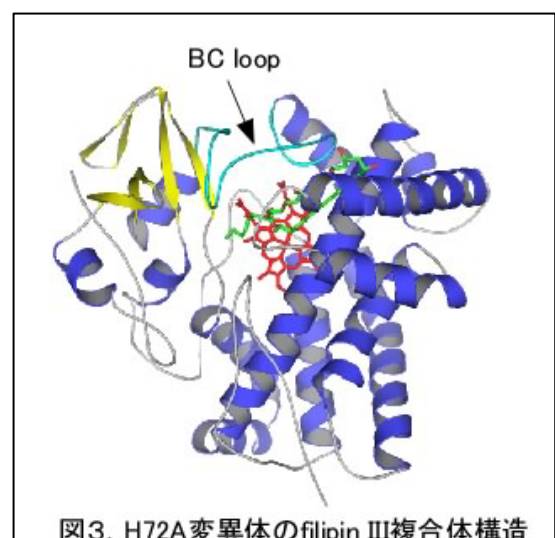
較を行った。その結果、野生型と変異体においてほぼ同様のスペクトルが得られ、CYP105P1のヒスチジン結合状態は溶液中では支配的ではないことが示唆された。更に、H72A 変異体の基質フリーの構造 (H72A-free) を決定し、WT-free 構造と比較を行った。H72A-free 構造では BC ループ部分が分子の外側の方に大きく移動し、遠位側ヘムポケットの入り口が広く開いていた。Ala72 はヘム鉄から 17 Å 離れており、ヘム鉄には水分子が結合していた。この観測結果は、CYP105P1 の大部分は低スピン状態であるという分光学的結果と一致している。ここで述べた CYP105P1 のリガンドフリーの構造と小さい阻害剤 (4PI) の結合構造で、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。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が必要であると考えられた。野生型と H72A 変異体を用いて、生理基質 filipin I 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、基質の結合がもっと容易になったからであると考えられる。

### 3. CYP105P1 の filipin 複合体構造

CYP105P1 の野生型と H72A 変異体に生産物である filipin III を添加し、その結合を吸収スペクトル測定法で確認した。その結果、予想外に H72A 変異体でのみ filipin III の結合による Type I スペクトル変化が確認できた。そこで、filipin III と H72A 変異体を用いて複合体の結晶化を試みたところ、それらの複合体構造を決定することができた (図 3)。

P450 の構造では BC loop 部位と FG ヘリックス部位は基質結合ポケットの入り口を形成しており、基質認識及び結合に関わっている。BC ループ部位には通常 B'ヘリックスと呼ばれる短いヘリックスがある。Filipin III 複合体構造では BC ループ部位に B'ヘリックスを作らず、ループだけの構造を取っていた。このような BC ループの構造は初めて見られた特徴的な構造で、巨大な基質である filipin III を包むために必要であると考えられる。

Filipin III の C26 位の水酸基はヘム鉄から 4.7 Å 離れていて、生理基質である filipin I は類似した場所に配位すると考えられた。一方、C1' 水酸基は Ala72 と 6.1 Å 離れていて、野生型では His72 が C1' 位水酸基と立体障害を起こし、filipin III の結



合は不可能であることが複合体構造から示唆された。これは吸収スペクトル測定の結果と一致する結果であった。

#### 4. CYP105D6 の結晶構造

CYP105D6 の基質フリーの構造を 2.3 Å 分解能で決定した。BC ループと FG ループ部位ではそれぞれ 9 残基、6 残基 disorder していた。このような BC ループと FG ループ部位の柔軟性は、CYP105P1 と同様に filipin という巨大な基質を包むために必要であると考えられる。

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 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 H72A 変異体の filipin III 複合体の構造では、β 1-5 シートの前のループ部分とヘムの上に広くて深いスペースがあり、そこには filipin III の C1' 側の tail が入るようになっていた。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。このような違いによって、CYP105D6 の β 1-5 シート前のループ部分とヘムの上のスペースは CYP105P1 より狭くなり、filipin の tail とは立体障害を起し、C26 位がヘムに近づくのを防ぐと考えられた。

#### 5. CYP105D7

*S. avermitilis* 由来 CYP105D7 は CYP105D6 と 56.6% の高いアミノ酸配列相同性を持つ。CYP105D6 は filipin の C1' 位のみを水酸化し、基質特異性が非常に狭い。一方、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が近年明らかになった。しかし、CYP105D7 の *S. avermitilis* 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 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、さまざまな応用が期待できる。

本研究では 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。