

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名

許 蓮花

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。近年 *Streptomyces avermitilis* のゲノム解析が終了し、33 個の P450 遺伝子が見いだされた。*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、構造学的な研究は全く進んでいなかった。本研究では *S. avermitilis* のゲノム中で filipin 生合成遺伝子群に配置している CYP105P1 と CYP105D6、および、基質特異性が非常に広い CYP105D7 を研究対象にして、その機能解析と立体構造解析を行うことで、反応機構や基質認識機構を明らかにすることを目的にしたものである。

第一章で CYP105P1 のクローニング、発現、精製、結晶化、構造解析について述べた。この章では基質フリー (WT-free)、および Type II リガンドである 4-phenylimidazole の結合型 (WT-4PI) の構造を決定した。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。このような構造はネイティブでの分子内ヒスチジン結合としては最初の例であり、非常に興味深い。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、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た。このような BC ループの柔軟性は今までの構造既知 P450 では例のないもので、filipin という巨大基質の認識に必要であると考えられる。

第二章で CYP105P1 の野生型と生理基質である filipin I 結合を吸収スペクトル測定法で確認し、複合体構造を 1.8 Å の高分解能で決定した。filipin I は今まで構造既知の P450 の基質では最大級であり、その基質認識範囲は広く、特徴的であった。filipin I の親水性ポリオール側は多数の水分子で充填され、一方、filipin I の疎水性のペンタエン側は I ヘリックスと疎水性相互作用を行っていた。このような親水性および疎水性相互作用によって巨大 filipin I は安定化していると考えられた。

次に、CYP105P1 の野生型と H72A 変異体で酵素反応産物である filipin III との結合を調べた。結果、CYP105P1 の野生型では filipin III との結合が確認できなかったが、H72A 変異体酵素では filipin III との結合が確認できた。更に、H72A 変異体酵素と filipin III の複合体構

造を明らかにし、His72の役割は反応産物である filipin III の結合を妨げることが示唆された。

第三章で 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。この結果から、CYP105P1、CYP105D6 はともに filipin I 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た。

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 していて、CYP105P1 同様に filipin という巨大基質を包むために必要であると考えられた。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 分子のアルキル鎖部分は基質特異性に非常に重要であると考えた。CYP105P1 の野生型-filipin I 構造では、K ヘリックスとその先のグリシンリッチな loop により、ヘムとの間に広くて深いスペースを作り、そこには filipin I のアルキル鎖が入るようになっていた。一方、CYP105D6 の構造ではループ部分が一残基短くなっている。また、アルキル鎖に相当する位置に Ser290 と I293 の側鎖が見られ、結果として、ポケット部分が狭くなっている。このため、アルキル鎖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。以上の結果で、CYP105P1 と CYP105D6 の基質特異性を解明することに成功した。

第四章では 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。CYP105D7 は Diclofenac、Tolbutamide、lauric acid、testosterone、carbazole、Compactin、Milbemycin など、さまざまな化合物と結合し、その基質特異性の広さから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。

以上、本論文では、放線菌の 3 種の P450、CYP105P1、CYP105D6、CYP105D7 について検討し、CYP105P1 および CYP105D6 の *in vitro* 酵素活性を初めて確認した。さらに両 P450 について X 線解析による 3 次元構造を解明した。両 P450 の基質は、これまで 3 次元構造の解明された P450 の中で最大である。とくに CYP105P1 では 5 種の構造の比較からこれまでに類を見ない基質結合による誘導適合の構造変化が明らかとなり、高く評価される。以上の結果は、学術上並びに応用上貢献するところ大である。よって審査委員一同は本論文が博士（農学）の学術論文として価値あるものと認めた。