

## 多機能型シトクロムP450モノオキシゲナーゼGfsFの構造機能研究

東京工業大学大学院理工学研究科化学専攻 宮永顕正

### 研究の目的

微生物が生産する天然化合物は多様な構造を示し、その中には有用な生理活性を示すものも多く存在する。酸化還元反応など天然化合物の基本骨格を修飾する反応は化合物の構造多様性や生理活性に与える影響が大きいが、非常にバラエティに富んでいるために未開拓の部分が依然として多い。シトクロムP450モノオキシゲナーゼ(P450)は微生物から植物や動物まで幅広く分布する酵素である。生物進化の過程で、P450は様々な基質に対して多様な反応を触媒することができるように機能的に分化してきた。微生物の天然化合物の生合成系には多数のP450遺伝子が存在し、天然化合物に水酸基やカルボニル基などを位置選択的及び立体選択的に導入する反応を触媒し、天然化合物の構造多様性に大きく貢献していると考えられる。しかし、現状では、配列情報のみではP450がどのような反応を触媒するかを予測することが困難である。このため、修飾反応の人為的制御や有用な活性を持つ天然化合物類縁体創出を目指すためには、P450の配列と機能の相関に関する知見を蓄積していく必要がある。

放線菌 *Streptomyces graminofaciens* A-8890株が生産する16員環マクロライド抗生物質FD-891はヒト白血病細胞に対して顕著な細胞毒性を示す。興味深い生物活性の為、化学生物学的研究が精力的に行われてきた。これまでに、FD-891生合成遺伝子クラスターがクローニングされ、図1に示す生合成経路が明らかになった。遺伝子破壊株を用いた実験や休止菌体を用いた投与実験などにより、興味深いことに、生合成最終段階において、P450であるGfsFが、ポリケチド骨格のC8,9位のエポキシ化を行った後に、C10位を水酸化するという二段階の酸化反応を触媒するこ

とが分かっている。このような順序で段階的酸化反応を触媒するP450はGfsFが初めての例である。エポキシ化と水酸化の順序は厳密に制御されていると考えられるが、*in vitro*における酵素反応解析は行われておらず、その基質認識機構については不明である。そこで、本研究では、GfsFのユニークな段階的反応の基質認識機構の詳細を解明することを目的として、GfsFの*in vitro*での酵素反応解析と結晶構造解析を行った。

### 経過と結果

まず、GfsFの大腸菌発現系を構築した後、組み換えタンパク質を発現させ、Niアフィニティカラムを用いて精製GfsF酵素を得た。スペクトル解析を行ったところ、典型的な低スピン型の吸収スペクトルを示した。この精製GfsF酵素が活性を有しているかを確認するため、*in vitro*反応を行うこととした。一般的にP450は反応系に電子供与体を必要とする。そこで、本研究では、プチダレドキシン、プチダレドキシ還元酵素の組み換えタンパク質をそれぞれ調製し、これらを電子供与体として用いて、*in vitro*反応を行った。その結果、25-O-methyl-FD-892を基



図2 GfsFΔN15の結晶構造

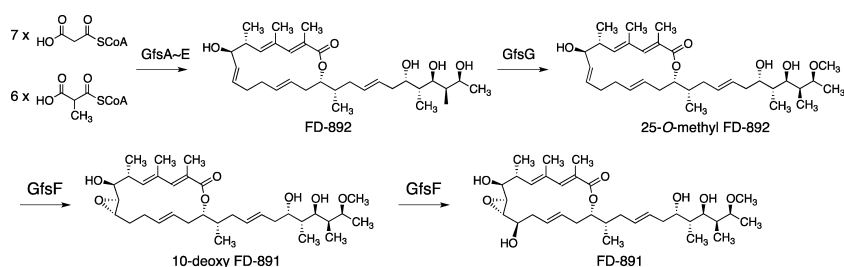


図1 FD-891の生合成経路

質として用いた時に反応の進行が確認できた。反応の経時変化を調べた結果、エポキシ化された中間体である 10-de-oxy-FD-891 は速やかに生成したものの、最終生成物である FD-891 の生成速度は比較的遅いことが明らかになった。このことから、C10 位の水酸化に比べ、C8, 9 位のエポキシ化が起きやすく、このことが反応の順序に影響を与えていると考えられた。

次に、GfsF の結晶化を行った。まず、GfsF の全長を用いて、結晶化を試みたが、X 線回折に適した結晶は得られなかった。種々検討の結果、N 末端部分の 15 残基を含まない GfsF (GfsF $\Delta$ N15) を発現させ、結晶化に用いたところ、良質な結晶を得ることに成功した。高エネルギー加速器研究機構にて、X 線回折データを収集し、分子置換法による位相決定、モデル構築を行い、分解能 1.95 Å にて立体構造を決定することに成功した。決定した GfsF $\Delta$ N15 の構造は P450 に共通してみられるフォールドをとっていた

(図 2)。リガンドが結合していない他の P450 構造と同様に、開いた構造を取っていた。DALI サーバーを用いて類似構造を検索したところ、CYP105 ファミリーに属する P450 と構造類似性を示すことが明らかになった。GfsF $\Delta$ N15 は比較的大きな基質結合ポケットを持っていた。Ile85, Phe89, Ala248, Met252, Ile403 などの疎水的な残基が基質結合ポケットを形成していたことから、これらの残基が疎水的な基質の認識に関わっていると考えられる。現在、詳細な基質認識機構を明らかにするため、25-*O*-methyl-FD-892 などとの共結晶化を行っている。

## 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、ご理解を頂き、研究奨励金を賜りました農芸化学研究奨励会に深く感謝申し上げます。