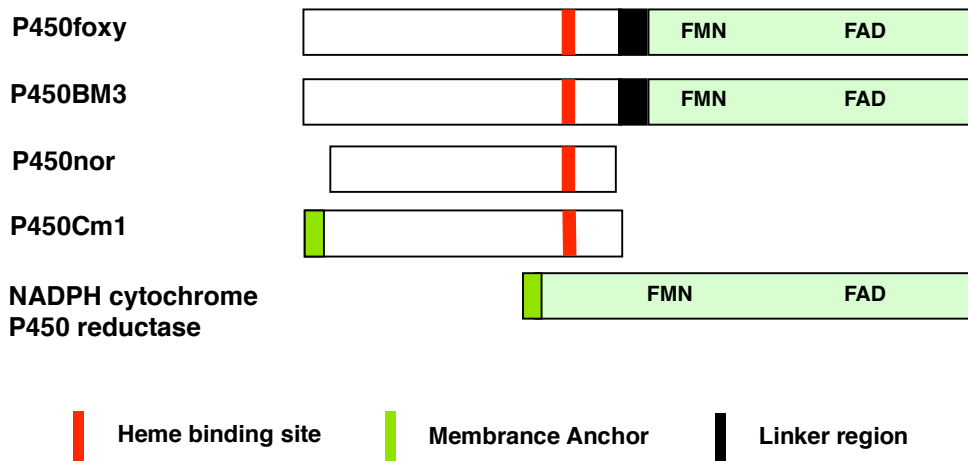


カビのユニークな P450 の工業的利用のための基礎研究

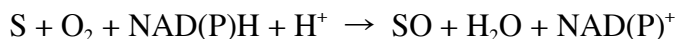
東京大学大学院農学生命科学研究科 祥雲弘文

我々はカビ *Fusarium oxysporum* から 2 種のシトクロム P450 (P450)、P450nor と P450foxy を単離した。P450nor はカビの脱窒にかかわり、一酸化窒素 (NO) 還元酵素として働く。カビ脱窒も我々オリジナルの発見であるが、P450nor も P450 として画期的機能を示し、その発見とその後の解析は当該分野で高い評価を得ている。一方 P450foxy は脂肪酸亜末端 (ω -1 $\sim\omega$ -3) 水酸化活性を示すが、P450 とその還元酵素が天然に融合したタンパク質である点、非常にユニークである。本研究はこの 2 種の P450 について基礎的解析を加え、工業的にも魅力的な P450 反応の、有用物質生産などへの基礎知見を提供することを目的とする。

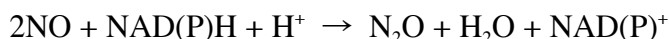
図1 P450 の
レドックスパート
ナーと構造模式



P450 は通常、モノオキシゲナーゼ反応を触媒する (下式)。P450 のへムは NAD(P)H



の 2 電子を直接には受取れないため、フラビントタンパク質などの他のタンパク質 (レドックスパートナー) が電子を P450 に運ぶ。真核生物の P450 の多くは小胞体膜に結合しているが、NADPH-シトクロム P450 還元酵素 (以下、P450 還元酵素) がレドックスパートナーである。P450 還元酵素は N 末から FMN、FAD、および NADPH の結合ドメインより構成される。電子の流れは、NADPH $\rightarrow$ FAD $\rightarrow$ FMN $\rightarrow$ P450、である。真核生物の一個体は通常多数の P450 種を持つが、P450 還元酵素は一種類しか持たない (植物には 2 種類見つかっている)。従って P450 還元酵素は一種類で数十、場合によっては数百の P450 種に電子を供給していることになる。P450 と P450 還元酵素は通常別のタンパク質であるが、両者が融合して一つのタンパク質になったものも見つかっている。P450foxy は真核生物で初めて発見された、そのような融合タンパク質である。一方、P450nor はモノオキシゲナーゼではなく、一酸化窒素 (NO) 還元酵素 (Nor) として以下の反応を触媒する。驚くべき



ことに、P450nor はレドックスパートナーを必要とせず、NAD(P)H から直接電子を受取ることで唯一の P450 である。P450 反応はその反応や基質の多様性などから、工業的利用への期待が高まっている。しかし一般に P450 反応は多成分系のため活性の再構成が難

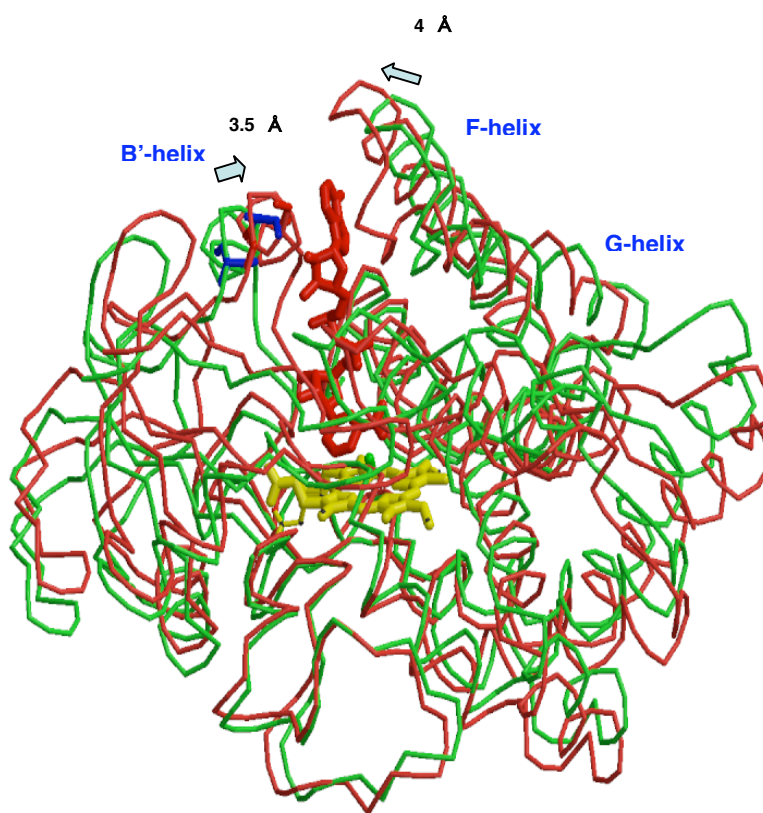
しく、またそれができても反応速度が低く、応用に際しての高い障壁となっている。P450foxy や P450BM3 などの P450 は融合タンパク質であるため、再現される活性は通常の P450 より遥かに高速である。また P450nor 反応は酵素反応として超高速の部類に入り、 10^6 min^{-1} 程度の分子活性が予想される。これら、無数に存在する P450 反応の中で例外的に高速反応を実現させる P450nor、P450foxy の反応機構に関しての基礎的解明は、P450 の工業的利用を考える上でも重要であり、本研究課題の主旨である。

P450nor-NADH アナログ (NAAD) 複合体の結晶構造解析

P450nor は NADH (または NADPH) を生理的電子供与体としてそれから直接電子を受取る唯一のヘムタンパク質 (さらには金属タンパク質) である。通常あり得ない NADH から P450 への直接電子伝達の証明には、両者の複合体の結晶構造を提供することがもっとも直接的である。

図2 P450nor の結晶構造

P450nor-NO 複合体 (グリーン) と P450nor-NAAD (ニコチン酸アデニンジヌクレオチド) 複合体 (赤) の、ヘム (黄) を中心とした重ねあわせ。NAAD 結合により B'-ヘリックスと F,G-ループはそれぞれ 3.5, 4.0 Å 移動している。NAAD 分子は赤の太線。



これまで P450nor のレスティング (Fe^{3+})、CO 型 ($\text{Fe}^{2+}\text{-CO}$)、NO 結合型 ($\text{Fe}^{3+}\text{-NO}$) などの X 線結晶構造が解かれていたが、NADH (アナログ) との複合体に関しては結晶が得られていなかった。今年度、NADH アナログである NAAD (ニコチン酸アデニンジヌクレオチド) との複合体 ($\text{Fe}^{3+}\text{-NAAD}$) の結晶化に成功し、その立体構造を決定することができた。その結果、数々の興味深いタンパク質-リガンドの相互作用が明らかとなった。

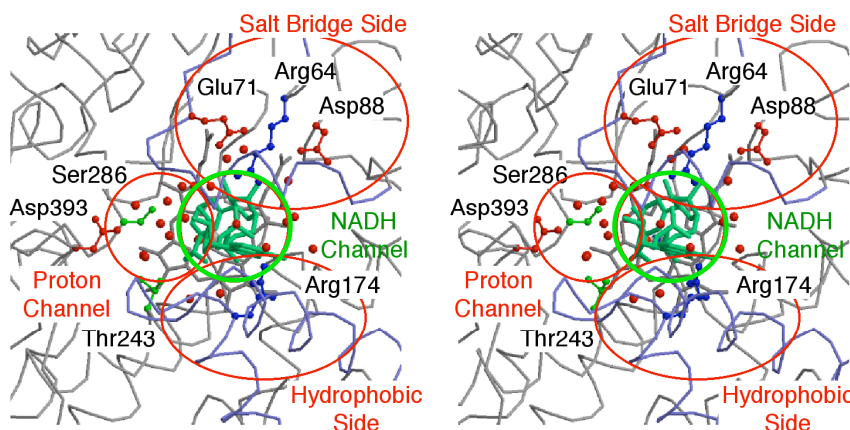
(1) 全体構造：図2に示されるように、NAAD の結合による大きなタンパク質構造変化が観察された。ヘム遠位ポケットの入口を形成する B'-ヘリックスおよび F-, G-ヘリックスは互いに近づくように大きく動き、その結果ポケット入口が閉じるように変化していた。一方ヘム近傍に存在する最長の I-ヘリックスはヘムから遠ざかるように動いた。全体の構造変化は誘導適合 (induced fit) と言える。

(2) NADH 結合部位：ヘムポケット内部は3つの側面より構成される（図3の細線円）。B'-ヘリックス下部には親水性アミノ酸が集中している（親水性側面）。一方 F-, G-ヘリックスおよび F,G-ループの下方は疎水的である（疎水性側面）。これらの二つの側面が NADH チャンネルを形成している。NAAD はこれら側面の性質に呼応して、分子内の親水性および疎水性部分をそれぞれの側面に向けていた。3番目の側面にはプロトンチャンネルが

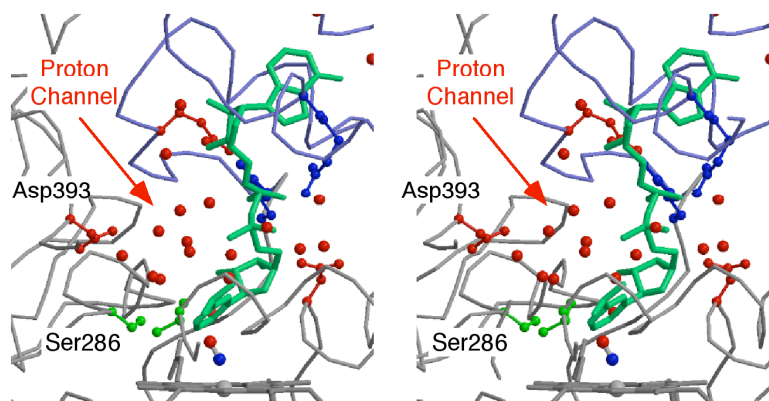
図3 NADH チャンネル（中央太い緑の円）とプロトンチャンネル（隣接の赤小円）。

A、ヘム 遠位ポケット上方から。B、ヘム（最下部）に平行面から。赤小球は水。Arg、Glu および Asp、Ser および Thr の側鎖はそれぞれ青、赤、および緑で描かれている。

A



B



形成されている。疎水性側面には唯一の親水性残基である Arg174 が存在する。一方親水性側面には Glu71, Arg64, Asp88, Lys291, Lys62, Arg292 などの荷電アミノ酸が集中している。Arg174 と Arg64 は予想通り NAAD のピロリン酸部分を両側から挟み込み、補酵素結合に中心的役割を果たしていた。ヘム近傍の I-ヘリックスに存在する Thr243（全ての P450 に保存される Thr に相当する）はニコチン酸環の側鎖と結合し、環結合の立体特異性を決めている。B'-ヘリックスに存在する Ser73 と Ser75 は予想通り、アデニン環の 2'-OH 基の近傍に位置し、電子供与体（NADH, NADPH）の特異性決定に主要な働きをしている。Arg292 も P450 間で保存されるアミノ酸残基であるが、ヘムのプロピオン酸基の一つと相互作用している。NAAD 結合に伴い、Arg292 は上方（ポケット入口方向）へ大きく移動し、それとともにヘムプロピオン酸基の一つが上方へ大きく動いていた。ヘムが片足を上げた格好である。このプロピオン酸基もニコチン酸環結合の立体特異性に重要な役割を演じている。

(3) 活性中心：ニコチン酸環の C4 炭素はヘムに結合した NO のごく近傍に位置し、proR

面をヘム (NO) 側に向けていた。この立体特異的結合には Thr243 と上記プロピオン酸基が重要な役割を果たしていた。この結合構造は従来の NADH 水素の同位体効果などの結果とも一致し、NADH からヘム (NO) へのヒドリドイオン (H⁻) 伝達が強く支持された。NADH チャンネルにほぼ平行に、Asp393, Ser286 および多数の水分子からなるプロトンチャンネルが形成されているが、これは H⁻に引続くプロトン供給に重要であると予想される。

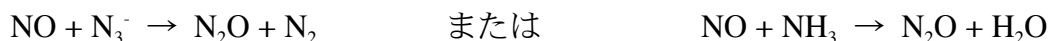
(4) 塩橋ネットワーク：NAAD 非結合型構造では Glu71-Arg64-Asp88 の3残基が塩橋ネットワークを形成している。NAAD 結合により Glu71 と Arg64 は NAAD の方向へ大きく移動するが、Asp88 はそれ程動かない。すなわち、Arg64-Asp88 間の塩橋が切断する。塩橋ネットワークはタンパク質構造を安定化し、NAAD の結合はエネルギー的に不利であると思われる。この塩橋ネットワークの切断は、電子伝達後の NAD⁺解離に有利に働く (k_{off} 上昇)。すなわち、NAD への親和性を犠牲にして反応速度を高める巧妙な仕組みが明らかとなった。

多機能酵素としての P450nor：

P450nor は NADH と過酸化水素の存在下で NADH ペルオキシダーゼ活性を示す (下式)。



今年度新たに、共脱窒反応を触媒することが発見された (下式)。



すなわち P450nor は、NADH の代りに還元度の高い窒素供与体 (アザイド、アンモニアなど) が存在すると N₂O を生成するという、非常に興味深い反応を行うことが発見された。

P450foxy のタンパク質工学： P450foxy の構造解析を目指して結晶化を試みているが、未だ成功していない。P450foxy は細菌由来の P450BM3 によく似ている。両者の顕著な違いは、P450foxy のみに基質阻害が見られる点である。P450BM3 は結晶構造解析が解かれている。その結果によると、ヘムポケット入口に存在する Phe42, Arg47, および Tyr51 の残基が基質の結合に重要な働きをしている。アミノ酸配列のアラインメントから、これら残基に相当するアミノ酸は P450foxy では Leu43, Lys48, Phe52 である。このような重要なアミノ酸が両者で全て置き換わっていることは、大変興味深い。P450foxy のこれらアミノ酸を置換した変異体を作成し、性質を調べた。その結果これら残基は基質の結合に重要であるだけでなく、基質阻害や基質特異性に深く関わることが判明した。

研究成果

1. Su, F., Takaya, N., and Shoun, H. Nitrous oxide-forming codenitrification catalyzed by cytochrome P450nor. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68** (2), 473-475 (2004)
2. Su, F., Fushinobu, S., Takaya, N., and Shoun, H. Involvement of a Glu71-Arg64 couple in the access channel for NADH in cytochrome P450nor. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68** (5), 1156-1159 (2004)
3. Umemura, M., Su, F., Takaya, N., Shiro, Y., and Shoun, H. D88A mutant of cytochrome P450nor provides kinetic evidence for direct complex formation with electron donor NADH. *Eur. J. Biochem.* **271** (14), 2887-2894 (2004)
4. Oshima, R., Fushinobu, S., Su, F., Zhang, L., Takaya, N., and Shoun, H. Structural evidence for direct hydride transfer from NADH to cytochrome P450nor. *J. Mol. Biol.*, in press (2004)