The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Studies of roles of the amino acid residues in the vicinity of the active site in cytochrome P450cam
Author(s)	Sakurai, Keisuke
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/793
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【69】

氏　　名	櫻　井　啓　介（さくら　い　けい　すけ）
博士の専攻分野の名称	博　士（理　学）
学　位　記　番　号	第　２２７０３　号
学位授与年月日	平成21年３月24日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 理学研究科高分子科学専攻
学　位　論　文　名	Studies of roles of the amino acid residues in the vicinity of the active site in cytochrome P450cam （チトクロムP450camの活性部位近傍のアミノ酸残基の役割の研究）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　中川　敦史 （副査） 教　授　山本　　仁　　准教授　高橋　　聡　　准教授　鈴木　　守 名誉教授　月原　冨武

論　文　内　容　の　要　旨

チトクロム P450 は細菌から植物、動物まで生物種に広く分布する一原子酸素添加酵素で、補欠分子としてヘム *b* を持つ。ステロイドホルモンや脂肪酸、色素、香料、毒物、薬物などの代謝、合成と非常に幅広い基質をもつスーパーファミリーである。その中の一つ、チトクロム P450cam(以下 P450cam)は d-camphor 水酸化酵素である。その活性部位近傍にあるスレオニン 101 は、これまでの研究から基質非結合状態ではチロシン 96 と、水素結合を取ることが分かっている。しかしながら、基質非結合状態では、チロシン 96 に水素結合する構造とその回転体であるヘム *b* の 6 位プロピオン酸と水素結合する二通りの構造が報告されていた。真の基質結合構造を決めるため、基質結合割合が異なる２種類の基質部分結合型結晶を作成、その構造を温度因子と占有率の相関を用いて比較することにより、基質の結合がスレオニン 101 がチロシン 96 からヘム *b* の 6 位プロピオン酸へと構造を変化させることを定量的な測定で決定した。このスレオニン 101 の回転は、基質結合時に活性部位に占めていた水クラスターの排出と共に酸化還元電位の上昇を引き起こし、電子供与体に還元されて酵素反応を推し進める力になっているものと考えられる。

また、ヘム *b* はプロピオン酸を二つ持ち、それぞれが蛋白質と結合するためのアンカーとしての役割があるとされているが、P450cam では、触媒反応に於ける機能の一部も有しているのではないかと予測した。2 プロピオン酸の 1 つ、7 位のプロピオン酸は、P450cam が基質導入時に基質結合部位に存在する水分子を蛋白質外に排出する機構を有する可能性が、7 位プロピオン酸をメチル基に置換したヘムを導入した P450cam 再構成体によって示唆された。また、その結晶構造解析から、7 位プロピオン酸が水を排出する際には、7 位プロピオン酸と水素結合するアスパラギン酸 297 が鍵となっていることも示唆された。このことから、アスパラギン酸 297 と 7 位プロピオン酸の基質結合部位の水を排出する際の機構を探るため、アスパラギン酸 297 をアラニン、アスパラギン、ロイシンに置換した変異体を作成、それらの結晶構造解析を行った。また、これらの変異体で基質が導入された状態の構造解析を行うため、基質である camphor を結晶にソークしたものも構造解析を行った。

得られた結晶の分解能は、基質をソークしていないものはアラニン、アスパラギン、ロイシン変異体でそれぞれ 1.8、1.65、1.6Å、ソークしたものはそれぞれ 1.55、1.5、1.6Å であった。アスパラギン変異体では野生型と全く変わらない構造が、アラニン変異体から基質非結合状態に近い構造を得ることができ、ロイシン変異体の構

造はチトクロム P450cam はアスパラギン酸 297 を介した水排出機構を持っていることを強く示唆した。

論文審査の結果の要旨

チトクロム P450 は細菌から植物、動物まで生物種に広く分布する一原子酸素添加酵素で、補欠分子としてヘム *b* を持ち、ステロイドホルモンや脂肪酸、色素、香料、毒物、薬物などの代謝、合成と非常に幅広い基質をもつスーパーファミリーを構成している。チトクロム P450 スーパーファミリーに属する、d-camphor 水酸化酵素として働くチトクロム P450cam は、その活性部位が完全に分子内に埋もれた特殊な構造をとっている。

本研究では、X 線結晶構造解析によりチトクロム P450cam の詳細な原子構造を決定し、分子内の活性部位近傍の詳細な原子構造に基づいて、その触媒反応機構を明らかにした。

チトクロム P450cam の活性部位は分子内に完全に埋もれており、基質が結合していない時、活性部位にはクラスター状の水分子が存在している。基質結合に伴ってこの水クラスターの排出が起こり、同時に酸化還元電位の上昇を引き起こして、酵素反応を進める。本研究で決定したチトクロム P450cam の詳細な原子構造、特に、基質結合における構造変化により、基質結合に伴う側鎖の構造変化の様子を明らかにした。さらに、点変異体の構造解析により、基質結合の際に必要なクラスター状の水分子の排出が一つの経路を通って行われること、それがアスパラギン酸 297 の側鎖のコンフォメーション変化に基づいていることを明らかにした。

本研究により、詳細な原子構造に基づいて、チトクロム 450cam における触媒反応機構に関する新たな知見を得ることができた。

よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。