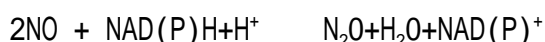


シトクロム P450nor の構造と機能

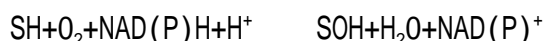
筑波大学応用生物化学系 祥雲弘文

変身名人 P450: シトクロム P450 (cytochrome P450、以下 P450) はプロトヘムを含有する分子量 5 万前後のタンパク質で、ヒトから細菌までの生物界に広く分布する。その生理機能は多岐にわたり、解毒、薬物代謝、ステロイドジェネシス、アラキドン酸カスケード、植物や微生物の二次代謝などにおいて様々な反応を触媒している酵素である。活性はモノオキシゲナーゼ反応が最も多いが、それ以外にも脱ハロゲン、脱水素、脱水、還元反応、C-C 結合切断、異性化反応など、20 種類を超えるタイプが知られている¹⁾。また近年植物でもゲノム解析が進み、植物一遺伝子 (Arabidopsis、シロイヌナズナの例) に約 300 もの P450 遺伝子の存在することが分かったが、このような例からも P450 は生物界全体で少なくとも 10 万のオーダーの分子種が存在すると予想される。一つの遺伝子から進化・分岐したタンパク質スーパーファミリーがこのような分子多様性を獲得した例は他にない。タンパク質が臨機応変に姿を変える機構として抗体がよく知られるが、P450 は抗体とは異なる機構で多彩な変身能力を獲得したと言える。このような著しい分子・機能分化にもかかわらず、全ての P450 はよく似た立体構造をとっていると考えられており、タンパク質の分子進化、分子設計、構造・機能相関などの研究分野での格好のモデルと言える。

P450nor の特異な反応機構: P450nor はカビ脱窒系に一酸化窒素 (NO) 還元酵素 (nitric oxide reductase) として関わり²⁾、以下の反応を触媒する。この反応は



NAD(P)H を電子供与体とすること以外、下記の通常モノオキシゲナーゼ P450 (水酸化反応が多い; SH は基質) とは異なる特異な機構を示す。



P450 モノオキシゲナーゼ反応の基質は有機物であり、また NAD(P)H からの 2 電子は還元酵素 (フラビンタンパク質) あるいはフェレドキシン経由で 2 回に分けて P450 に渡される。一方 P450nor は単独で上記反応を行い、還元酵素など他のタンパク質の助けを必要としない。この事実は P450nor が NAD(P)H から直接電子を受け取ることを意味する。ヘムに限らず、金属の酸化

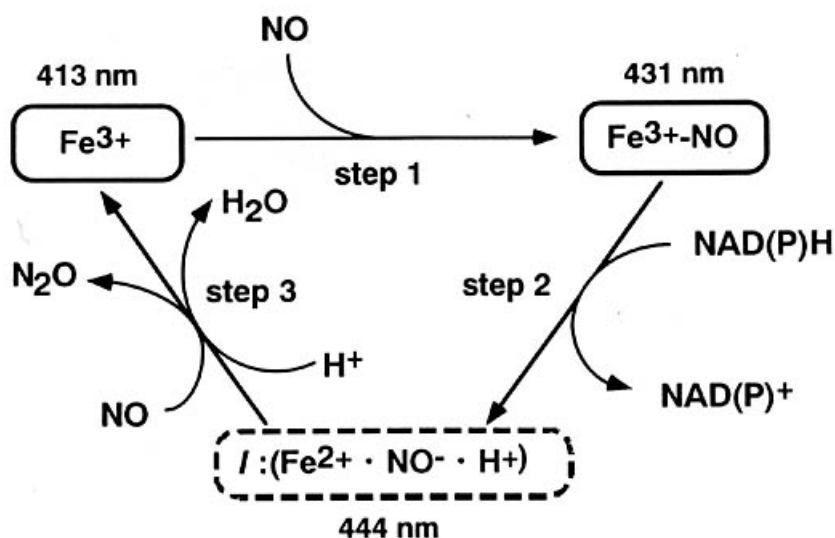


図1 P450norの反応サイクル。Fe³⁺などはヘム鉄の状態を表わす。各酵素種の数字はSoret吸収帯ピークの波長(図2参照)。Iはスペクトル中間体で括弧内はその推定構造。

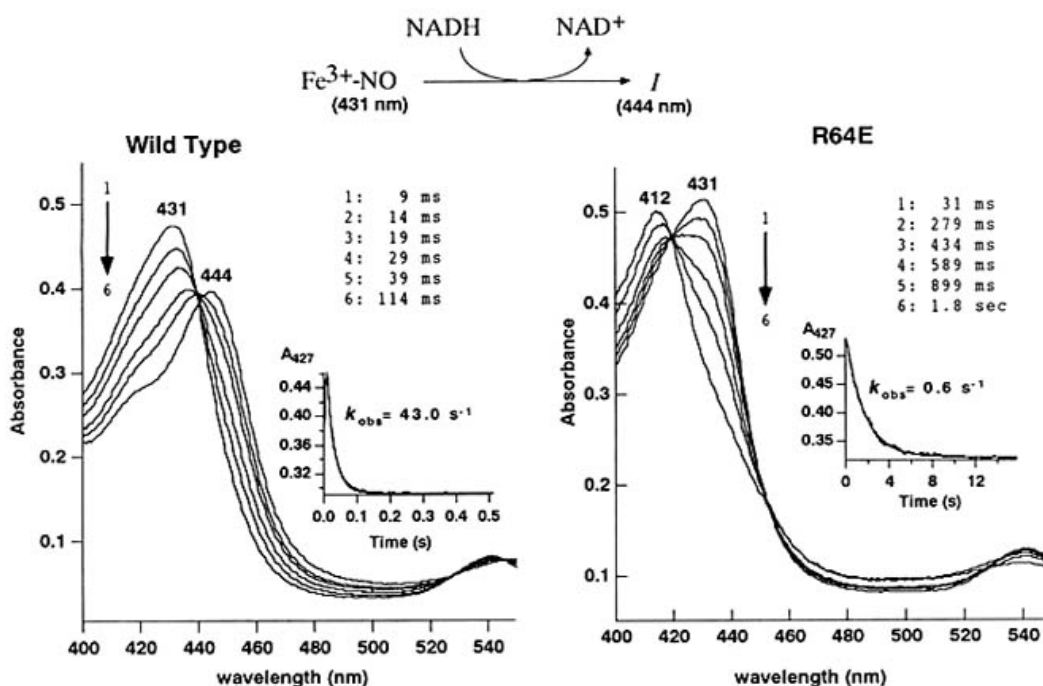


図2 第2ステップでの wild(左)と R64E 置換体(右)のスペクトル変化。上に反応式を示す6反応開始後の時間変化。P450norとNOを等モル、ラピッドスキャン装置のリザーバーで混合し、その溶液とNADH溶液を嫌氣的に混合するとIのスペクトルが準安定的に得られる。さらにIと反応する第二のNOがないため第3ステップの反応が進まず、酵素の大半がIの状態に留まる(図1参照)。Soretピークは:Fe³⁺、412nm;Fe³⁺·NO、431nm;I、444nm。挿入図は427nm(IとFe³⁺の等吸収点)における吸光度の時間変化で、k_{obs}が求まる。R64E置換体では還元速度(k_{obs})が遅すぎるため、生じたIが2個目のNO(Fe³⁺·NOから奪う)と反応したり、自然崩壊したりでIが蓄積しない。

還元中心に NAD(P)H の 2 電子が直接移る電子伝達形態は異例である。NAD(P)H からの電子伝達機構は P450_{nor} 反応の大きな興味の一つである。

P450_{nor} の反応機構として図 1 の 3 段階の過程よりなるサイクルが提唱されている³⁾。第一ステップは resting 酵素(Fe^{3+})と一分子の NO(基質)との結合過程で非常に速い反応である。フラッシュフォトリシスによる観測から、この過程は単純な二分子会合反応で説明可能である。第二ステップで酸化型酵素・NO 複合体($\text{Fe}^{3+} \cdot \text{NO}$)が NADH で還元されると、444nm に Soret 吸収帯極大をもつスペクトル中間体(*I*)が形成される(図 2)。I の実体に関してはラマン共鳴などにより、図 1 に示した構造が予想されている⁴⁾。P450_{nor} の反応サイクルはきわめて速く(室温で数万 min^{-1} 以上)、第二ステップは律速過程であるが、低温(5~10 度 C)でやっとならびッドスキャンで観測できる。第三ステップは I が二分子の NO と反応し、反応産物 N_2O を生じる過程であるが詳しい解析はなされていない。

P450_{nor} の結晶構造: resting、還元型・一酸化炭素複合体($\text{Fe}^{2+} \cdot \text{CO}$)、酸化型・NO 複合体などの結晶構造が解かれている^{5,6)}。P450_{nor} の立体構造は他の P450 と基本的に同じであり、ヘムを具にしたオムスピのような形をしている。P450_{nor} のような異端児ですら同一構造をとることは、すべての P450 は同じ様な立体構造をとると言う仮説を裏付ける。一方、各 P450 には個性も見られる。P450_{nor} の最も顕著な特徴は図 3 に示したように、ヘム遠位側ポケット(ヘモグロビンの例に習い、ヘム面を境に第 5 配位子システインのある側を近位 Proximal、反対側を遠位 distal と呼ぶ)が外に大きく口を開けていることである。このポケットから基質 NO と NADH が進入すると予想される。一方 NADH と P450_{nor} は複合体を形成すると予想しているが、resting 酵素と NADH を混合してもヘムは還元されない。すなわち NO が結合して($\text{Fe}^{3+} \cdot \text{NO}$)初めてヘムは NADH で還元される。しかし NADH との複合体の結晶は得られていない。複合体を形成するかどうかは、ステップ 2 の見かけの還元速度(k_{obs})が NADH 濃度に対して飽和するかどうかという速度論解析でも判別可能である。しかしラビッドスキャン装置の性能限界から、低い NADH 濃度範囲で k_{obs} が直線的に増加する範囲でしか信頼できる測定が得られていない。

プロトン供給系: resting(Fe^{3+})と $\text{Fe}^{3+} \cdot \text{NO}$ 型を比較すると、タンパク質の構造には大差無いが、ヘム近傍の水分子の配置と水分子を含む水素結合ネットワークに相違が見られた^{5,6)}。P450_{nor} 反応はモノオキシゲナーゼ P450 反応と同様に、電子とプロトン各 2 個の供給が必要である。モノオキシゲナーゼ P450 ではヘムに最も近い I ヘルックスの中程に、-Asp/Glu-Thr-、という P450 で高度に保存された配列があり、プロトン供給系として働くことが示され

ている^{7,8)}。P450_{nor}にもこのスレオニン残基は保存されているが(Thr243)、結晶構造からはプロトン供給への積極的関与は支持されていない。P450_{nor}のFe³⁺・NO型では水74がヘムに結合したNOの最も近くに存在し、ここからSer286、水33、Asp393を介してbu1k溶媒水へと水素結合ネットワークが形成されている。これらアミノ酸をバリンなどの不活性なアミノ酸残基に置換すると酵素活性は著しく減少し、その活性低下が第二ステップの還元過程

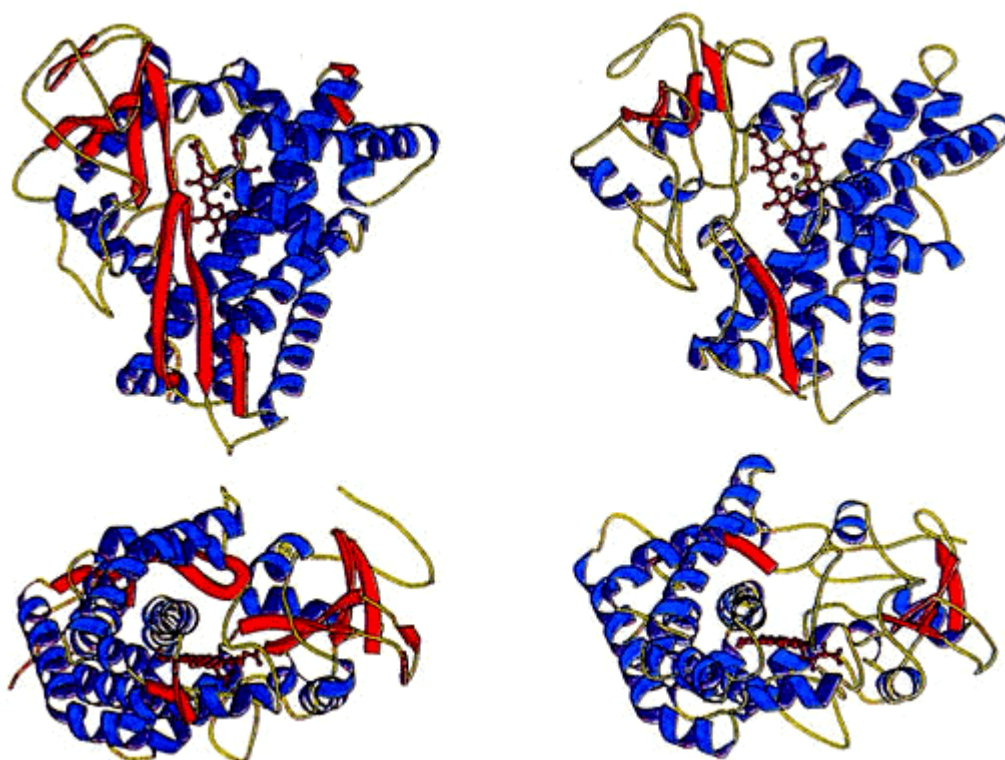


図3 P450_{cam}(左)とP450_{nor}(右)の結晶構造。(上)遠位側からヘム(赤の分子構造)面に垂直に見た;(下)上図の上方からヘム面に平行に見た。上図で右上から左下にヘムの上を横切るのがIヘリックス(P450_{nor}では真中でいったん途切れている)。下図右上がB'ヘリックス、左上がF(奥)およびG(手前)ヘリックス、ヘム面に接するように視線と同一方向に伸びているのがIヘリックス。

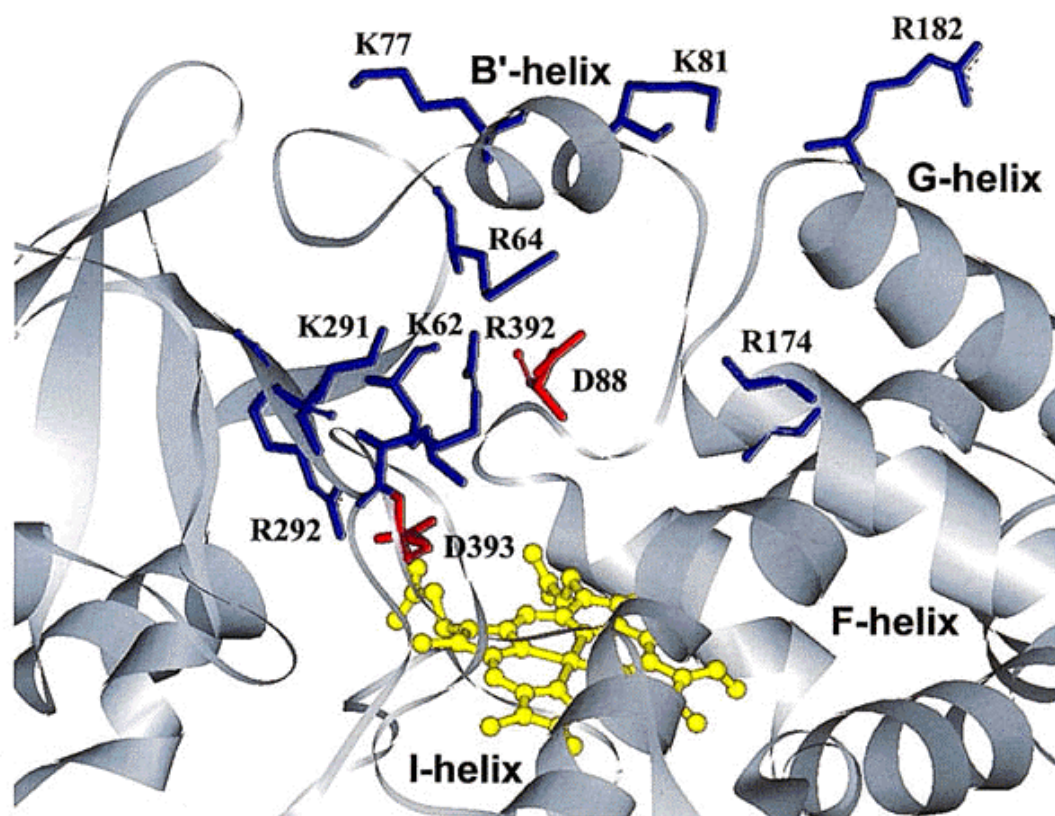


図4 ヘム(黄色)遠位ポケット。D393とR392は手前にある。R64、D88などは奥にある。Fe³⁺・NOにおける水素結合ネットワークはポケット手前の方にある。NADHはArg64,K62,K291のクラスター方向へ進入する。

(中間体形成過程)の阻害によることが示された。従って中間体(I)の形成には電子2個と共にプロトンの供給が必要であり、この水素結合ネットワークがプロトン供給系として働いていると考えられる。resting酵素がNADHで還元されず、NOとの複合体(Fe³⁺・NO)が還元される事実は、この水素結合ネットワークの形成がNADHからの電子伝達に必要であることを意味する。

遠位ポジティブチャージクラスター: P450スーパーファミリーは共通構造を保ちながらも、無数の基質に対応して基質結合部位を激しく変化させてきた。各P450間で保存性の低いこの基質認識領域(SRS; substrate recognition site)⁹⁾は一次構造上に6カ所存在するが、立体構造上は互いに接近しヘム遠位側に基質結合ポケットを形成する。P450norではSRSがNADHとの相互作用のために進化していると予想される。遠位ポケットとその周辺の構造を他のP450と比較すると、P450norではリジン、アルギニンなどポジティブチャージをもつアミノ酸の多いことに気付く(図4)。そこでこれら塩基・性アミノ酸を中性あるいは酸性アミノ酸へ置換した変異タンパク質を作成し、置換の酵

素活性への影響を見た(表 1)。その結果、Lys62, Arg64, Arg174, Lys291 などの置換はいずれも overall 活性を大きく減少させ、その減少は第 2 ステップの中間体 I 形成速度の低下に一致した。またこれら塩基性アミノ酸の置換は、中性よりも酸性アミノ酸への置換のほうが影響が大きかった。これらの結果は、これらポジティブチャージをもつアミノ酸残基がネガティブチャージをもつ NADH との相互作用に重要であることを強く支持する。なお、Arg292 は P 4 5 0 間で高度に保存され、ヘムのプロピオン酸側鎖と相互作用し、ヘムのタンパクへの結合に重要である。Arg292Glu 変異体はヘムを結合しなかった。

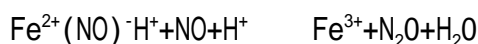
上記アミノ酸のうち Arg64, Lys62、および Lys291 の側鎖は遠位ポケット内部で、B'ヘリックスの真下からヘムプロピオン酸側鎖の方向に並んでいる。NADH 分子の先端はこのポジティブチャージルートに誘導されてヘムに接近すると考えられる。なおこのルートは上記 Ser286, Asp393 を含む水素結合ネットワークとはポケット内で離れている。また超低温結晶解析の結果、この水素結合ネットワークはヘム鉄近傍からさらに Thr243 を経由して外の溶媒にまで延びていることが判明した(図 4、手前側)。NADH はこの大きなネットワークがバリアーとなり、反対側のヘムプロピオン酸基の方向へ進入すると予想される。つまり水素結合ネットワークが NADH 進入ルートの一部を形成していると予想できる。事実、Asp393 の上方(ポケット入口方向)を覆う Arg392 の変異(Arg392Glu)は活性に影響しないという結果もこの推定を支持する。一方 Arg174 は、F、および G ヘリックス間のループ(遠位ポケットの入口で B'ヘリックスと向き合っている)の真下に位置し、ポケット上部で Arg64 と対峙している。これら二つのアルギニン残基は NADH のピロリン酸部分を両側からはさみ込むことが予想できる。

ポジティブチャージのキャンセル: wild type P 4 5 0 nor のヘムは常温で高スピン(5 配位型)と低スピン(6 配位型)の混合状態にある。上言己のアミノ酸置換は低スピン型の増加をもたらした(すなわち第 6 配位への水分子の結合が増えた)。一方、Cr などのハロゲンイオンは、P 4 5 0 nor に結合することにより低スピン型の増加をもたらす reverse type I リガンドであり、また同時に酵素反応(中間体形成反応)の阻害剤である。すなわち Arg64Glu などのアミノ酸置換はハロゲンイオン結合と同じ環境変化をヘムに与えたことになる。いずれの場合もポケット内部への負電荷の導入がポジティブチャージをキャンセルし、NADH の結合あるいは NADH からの電子伝達が阻害されたと解釈できる。なお、Br- は結晶解析から、R174 および K291 の近くに結合していることが判明した。何れも NADH との相互作用に重要な部位である。

以上のことから、ヘム遠位ポケット周辺や内部に存在するポジティブチャージクラスターは NADH がポケットへ進入する際のランドマークであり、さらに電

子がヘムに渡るためにも重要な働きをしていることは明らかである。

アスパラギン酸 88 :ヘム遠位ポケット内には二つの酸性アミノ酸側鎖が出ている。上記水素結合ネットワークに組み込まれる Asp393 と、それとはヘムを挟んで向かい合う Asp88 である。Asp88 の側鎖は R64 側鎖の下に埋もれ、そのネガティブチャージが NADH の進入を妨げないようになっている。この Asp88 の置換体には大変興味深い 1 性質が見られた。例えば Asp88Va1 置換体では, overa11 活性は wi1d 型の 30%程度に低下しているのに、中間体形成速度(第 2 ステップ)は逆に上昇した。上言己の塩基性アミノ酸の置換とは全く異なる結果である。NADH 進入ルート付近にあるネガティブチャージが除去されたため NADH の進入が容易になったと解釈され、Arg64, Lys62, Lys291 のクラスターが NADH の進入路であるという上記仮説が支持される。wi1d 型ではこの NADH による還元過程が律速であることから、Asp88Va1 置換体では第 3 ステップの速度が大幅に低下している筈である。事実 Asp88 の置換体では中間体 I が wi1d 型より安定であることが観察された。I が図 1 に示した構造をとるとすると、第 3 ステップの反応は次式となる。ここでもプロトン供給が必要であるが、そこに Asp88 が



関わっていることが期待される。これらの推測が正しければ、P450nor ではプロトン供給系が Asp393 を含むネットワークと、Asp88 が関与する系の二系列存在することになる。一方、反応に必要なプロトン 2 個がこれら二系列で供給されるとすると、NADH の水素は I に渡らないのだろうか、という疑問が残る。この点は今後の検討課題である。

B'ヘリックス:6 つある SRS の中でも B'ヘリックスを含む SRS1 は最も長く、P450分子間での変化に富んでおり、基質特異性決定に最も重要であることが判明している。P450nor は 2 種のカビから 3 種のアイソザイムが単離されている。これらは電子供与体に対して選択能をもつ。すなわち 2 種のアイソザイムは NADH に特異的であるが、残り 1 種は NADPH の方を好む。P450nor は両者の構造で 2'リン酸基の有無を分子内のどこかで見分けている筈である。3 種のアイソザイムの一次配列を比較して(3 種には 70~85%のアミノ酸配列相同性がある)NADH と NADPH の識別をしている部位を探した。NADH に特異的なアイソザイムの B'ヘリックスに 73S-A-75S-76G-K-という配列があり、二つの Ser 残基の側鎖はヘムポケット入口の方向を向いて入口を狭めている(図 5)。NADPH に特異的なアイソザイムでは 75 番目は G1y である。そこで前者の Ser75G1y 置換体を作成したところ NADPH による活'性が大幅に上昇し、overa11 活性の上昇

表1 P450 nor 各種変異体の性質

変異体	overall activity %	還元速度 (k_{obs}) (0.1 mM NADH) s^{-1}	high spin/low spin ^a high spin %	NO結合 k_{obs} $10^8 M^{-1} s^{-1}$
wild	100	43	54	1.09
K62A	36.4			
G76V	10.2			
R64Q	14.5	2.7	40	
R64E	4.5	0.6	38	0.92
R174Q	0	0.02	47	
R174E	0	0.01	40	1.00
K291E	9.6	1.8	30	0.73
K81E	100		54	
R392E	100		54	
R292E	inactive protein (unfolding)			

^ahigh spin/low spin の割合は、Soret 吸収帯のピーク位置で判別できる。high spin は 395nm 付近、low spin は 413nm 付近にピークをもつ。P450 nor の resting では両者の混在したスペクトルを示す。

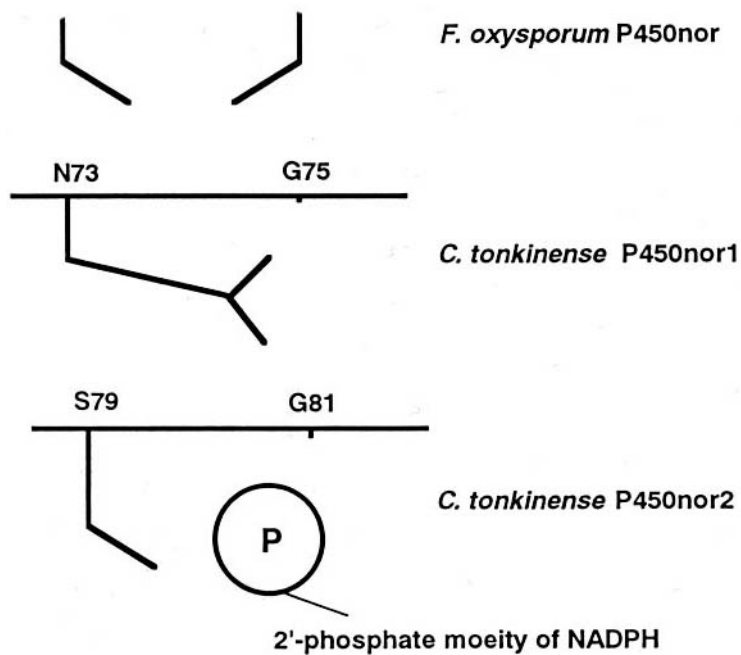


図5 三種のアイソザイムで、異なるアミノ酸が見られる B'ヘリックスにある配列。nor2 のみが NADPH の方に特異的である。

と第2ステップの還元速度の増加とが一致した。すなわち Ser75 側鎖は NADPH の侵入に対して立体障害となっていることが判明した。この結論は、隣接の

G1y76Va1 置換体の還元速度が大きく減少したことから支持される。従って P 4 5 0 nor の場合も、基質(電子供与体)特異性の決定に B'ヘリックスが重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

おわりに: P 4 5 0 nor の立体構造は紛れもなく P 4 5 0 スーパーファミリーのものであるが、その触媒機構は他のモノオキシゲナーゼ P 4 5 0 とはかなり異なることが明らかとなった。また構造上も、ヘム遠位ポケット内部および周辺に Lys/Arg のポジティブチャージの多いことが特徴である。これは NADH との直接相互作用に適応したためと思われる。モノオキシゲナーゼ P 4 5 0 と P 4 5 0 nor での電子供給路が逆であることが、タンパク質表面の荷電の違いに反映されている。モノオキシゲナーゼ P 4 5 0 では二原子酸素(O₂)の活性化、すなわち O-O 結合の不均衡開裂に相当のエネルギーが費やされているが、P 4 5 0 nor ではその必要がない。そのかわり NADH との直接相互作用に多大の努力の跡が感じられる。ここで検討した P 4 5 0 nor 中のアミノ酸残基(すなわち触媒に重要な残基)がすべて、何れかの SRS 領域に存在することは、P 4 5 0 nor が他の P 4 5 0 と同様に SRS 領域を変化させることでその機能を獲得したことを意味する。P 4 5 0 スーパーファミリーの変身力の逞しさに改めて驚嘆する。

謝辞: 自ら単離したタンパク質が構造解析に成功したのは初めての経験である。そして結晶構造解析の威力を改めて実感した。坂部プロジェクトに感謝申し上げたい。また、本研究では、X 線結晶解析やその他の物理化学的解析は、理化学研究所・生体物理化学研究室(城宜嗣主任研究員)で行われた。著者の研究室では、中原和彦博士、高谷直樹博士、張力博士らスタッフをはじめ、多くの大学院生が関わった。これらの方々に深謝する。

参考文献

1. Sono, M., Roac, M. P., Coulter, E. D., and Dawson, J. H. (1996) Chem. Rev. 96, 2841-2887
2. Nakahara, K., Tanimoto, T., Hatano, K., Usuda, K., and Shoun, H. (1993) J. Biol. Chem. 268(11), 8350-8355
3. Shiro, Y., Fujii, M., Iizuka, T., Adachi, S., Tsukamoto, K., Nakahara, K., and Shoun, H. (1995) J. Biol. Chem. 270 (4), 1617-1623
4. Obayashi, E., Takahashi, S., and Shiro, Y. (1998) J. Am. Chem. Soc. 120, 12964-12965
5. Park, S.-Y., Shimizu, H., Adachi, S., Nakagawa, A., Tanaka, I., Nakahara, K., Shoun, H., Obayashi, E., Nakamura, H., Iizuka, T., and Shiro, Y. (1997) Nature Str. Biol. 4 (10), 827-832

6. Shimizu, H., Obayashi, E., Gomi, Y., Arakawa, H., Park, S.-Y., Nakamura, H., Adachi, S., Shoun, H., and Shiro, Y. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 4816-4826
7. Kimata, Y., Shimada, H., Hirose, T., and Ishimura, Y. (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 208, 96-102
8. Schlichting, I., Berendzen, J., Chu, K., Stock, A. M., Maves, S. A., Benson, D. E., Sweet, R. M., Ringe, D., Petsko, G. A., and Sligar, S. G. (2000) *Science* 287, 1615-1622
9. Gotoh, O. (1992) *J. Biol. Chem.*, 267, 83-90.