◆ 解 説 ◆

部位特異的変異体を用いたシトクロム P450反応機構の解析

姫路工業大学理学部 牧 野 龍
慶応義塾大学医学部 島 田 秀 夫

Recent advances in genetic engineering techniques have enabled the determination of complete amino acid sequences of cytochrome P450's. Alignment of the known sequences revealed the presence of several homologous regions in the sequence. These data together with results for the crystallographic structure suggested that highly conserved residues in the oxygen binding pocket, Asp and Thr residues play a key role in the oxygen activation of this enzyme. In this paper, we summarized the function of these residues in the oxygen activation, based on findings obtained by site-directed mutagenesis.

Cytochrome P450/Hemoprotein/Oxygen activation/Site-directed Mutagenesis/Proton relay network

シトクロム P450は、システイン残基のチオレイトアニオン (S⁻) を第五配位子とするヘムタンパク質の総称であり、その分子量は50kDa 前後である。P450という奇妙な名称は、ヘム鉄に一酸化炭素が結合すると他のヘムタンパク質とは異なり450nm にソーレー帯の吸収極大をあたえることに由来する。この特異な性質は、S⁻ の配位による。現在では、動植物、細菌から数百種にもおよぶ P450 分子種が見出されている。その機能は、薬毒物などの外来性物質の代謝やステロイドホルモンの合成等多岐にわたるが、反応の基本は酸素分子を活性化してその一原子酸素を有機基質に添加する反応、一原子酸素添加反応である。

1982年に肝臓由来の P450 の一次構造が決定されて以来、現在までに100種以上の分子種の一次構造が判明している。これらの一次構造の相互の比較から、高度に保存されている数種のアミノ酸残基がみいだされ、それらの残基の機能の重要性が指摘された。ほぼ時を同じくしたカンファーを代謝する *Pseudomonas putida* 由来の P450 (P450cam; 一般に添え字を付して特定の分子種を表す) の結晶構造の解明、ならびに遺伝子

工学の進歩は、保存されたアミノ酸残基の機能の解析を可能にした。本稿では、部位特異的変異法により解析した P450cam の酸素活性化機構を概説する。

1. P450による酸素活性化 (一原子酸素添加反応)

P450 により触媒される有機基質への酸素添加の overall 反応を次式に示す。

この式は、酸素は活性化されて開裂し、一原子の酸素が有機基質 (SH) に導入されるとともに他の酸素原子は水にまで還元されることを意味する。酸素の還元のみを眺めてみると、次式に示すように

となり、O-O 結合の開裂はその結合の強さを考慮すると H₂O₂ 生成以後におきると考えられる。事実、ペルオキシダーゼという H₂O₂ を分解するヘム酸素反応では、H₂O₂ の O-O 結合の開裂が起き、Por⁺Fe⁴⁺=O 分子種 (Por⁺ は、ボルフィリン核が一電子酸化された陽イオンラジカルであることを示す) が生成する。このように H₂O₂ の 2 当量の酸化当量は、鉄とボルフィリンに 1 当量ずつ保存される。この開裂反応は、酵素分子中の His 残基により触媒される。すなわち、His 残基はプロトン受容体となり H₂O₂ より 1 個の H⁺

Analyses of Cytochrome P450-catalyzed Oxygenase Reaction by Using Site-directed Mutants

Ryu MAKINO, *Hideo SHIMADA

Faculty of Science, Himeji Institute of Technology

* Department of Biochemistry, School of Medicine, Keio University

図1. A)にP450camの研究に基づいて想定された酸素活性化機構を示した。図中のSHは基質カンファーを、SOHは酸素添加された産物であるヒドロキシカンファーを、また e^- は電子を示す。この反応サイクルの1回転ごとに、2等量の電子が消費される。B)に、基質カンファーとその代謝産物の構造を示した。

を引抜き、プロトン化されたHis残基が次に H^+ 供与体となりO-O結合の開裂を触媒する機構が結晶構造解析に基づいて提唱されている。つまり、O-O結合の開裂にはプロトン供与が絶対的に必要とされる。この反応およびP450のモデル錯体の結果に基づいて想定したP450の反応機構を図1に示す。反応は、(1)酸化型酵素(ヘム鉄は Fe^{3+} 状態)への基質(SH)の結合ではじまり、(2)1個目の電子導入による還元型酵素(Fe^{2+})の生成を経て、(3) Fe^{2+} 型ヘム鉄に酸素が結合した酸素化型反応中間体が生成する。この段階までは実験的に証明されており、還元型ヘム鉄と酸素との

複合体である酸素化型の生成はP450に限ったことではなく他のヘムタンパク質にも見られる。この後の酸素化型への2個目の電子導入に伴う反応がP450反応の特徴である。

酸素化型中間体は2個目の電子により還元され、その過程で一原子酸素添加がおこるが、その反応経路としていくつかの可能性が考えられている^{1),2)}。そのうち、hydroperoxy種の生成を経て前述のporphyrin π -cation radical種が生成する可能性がもっとも高い。これらの中間体の生成には H^+ の供給が必須であり、 H^+ 供与機構を結晶構造より推測し、それを担うアミノ酸残基の変異体を用いて解析した酸素活性化機構を次に述べる。

2. 高度に保存されているアミノ酸残基

50をこえるP450分子種の一次構造の比較から、ヘムに配位するCys残基以外に、いくつかのアミノ酸残基が高度に保存されていることが判明した。そのうち、Gly残基とThr残基(P450camのnumberingでGly248とThr252)が、真核、原核生物を問わず極めて高度に保存されている³⁾(表1)。また面白いことに、Thr残基の一つ手前の251番目にはほぼ例外なく酸性アミノ酸であるAspあるいはGluが位置しており、それらの構造上、機能上の重要性をうかがわせる。それではこれらのGly, Thr, Asp残基は立体構造上どこに位置しているのか、X線結晶構造の判明しているP450camを例としてみよう。

3. P450camの結晶構造

ヘム周辺の構造の概要をのべると、ヘムは二つの長いHelix IとHelix Lにはさまれて存在しており、タンパク質内部に埋もれている³⁾。ヘム酵素の機能に重要なdistal側(遠位側、酸素などの外来性配位子が結合する側)の残基の多くはHelix Iに含まれており、その一部分の概略を図2に示した。保存されている

表1 Helix Iのアミノ酸配列

<i>P. putida</i> P450cam	GLLLVGGLDT ²⁵² VVNFLSP
<i>B. megaterium</i> P450BM3	ITFLIAGHET ²⁶⁶ TSGLLSF
Rat P450b	LSLFFAGTET ³⁰² SSTTLRY
Rabbit P450LM2	LSLFFAGTET ³⁰² TSTTLRY
Rat P450c	FDLFGAGFDT ³²⁵ ITTAISW
Rat P450d	NDIFGAGFET ³¹⁹ VTTAIFW
Rabbit P450 ω -1	SDVFMAGTET ³⁰¹ TSTTLRY
Bovine P450sc	TEMLAGGVNT ³²⁹ TSMTLQW
Bovine P45011 β	IDLTAGSVDT ³¹⁸ TAFPLLM

図 2. P450cam のヘム近傍の概念図. 248から252までのアミノ酸残基は Helix I に含まれ, 178と186のアミノ酸残基は Helix F に含まれる. 代表的なヘム蛋白質であるミオグロビンやペルオキシダーゼと異なり, P450ではヘム鉄の真上に distal アミノ酸残基が存在していない.

Gly248, Asp251, Thr252残基はいずれも Helix I を構成している残基であり, またヘム近傍に位置している.

Gly248と Thr252の水素結合は, 通常の水素結合と異なり Gly248のペプチドカルボニルと Thr252の側鎖水酸基との間の水素結合であり, その結果として隙間が生じる. この隙間が酸素などの外来性配位子の結合のポケットになる. さらにこの空間は, Asp251残基と Helix F に含まれる Lys178, Arg186残基とのイオン結合により安定化される. なお, Lys178, Arg186残基は分子表面に位置している残基であり, 一次構造上の保存性が高い. このようにヘム近傍には, 保存性の高い残基が集中しており, これらの残基が P450の機能である酸素添加反応と密接に関わっていることは疑いない.

一方, 基質カンファーは, 主に Tyr96との水素結合によりヘムの真上に固定されている.

4. 部位特異的変異法による P450cam の酸素活性化の解析

i) Thr252の変異

ヘム近傍に位置し, 保存性が高く, H^+ 供与性の側鎖を持つアミノ酸残基である Thr252 の変異体 (Thr252→Ala, Gly, Val, Pro, Asn, Ser) を大腸菌を用いて発現した⁴⁾. これらの変異酵素の吸収スペクトルは, 酸化型, 還元型, 一酸化炭素結合型, 酸素化型いずれの場合も天然型酵素のそれらとよく似て

表 2 P450cam 変異酵素の酸素消費活性と酸素添加能

変異酵素	酸素消費速度 ($\mu\text{mol}/\text{min}/\mu\text{mol of P450cam}$)	消費された酸素当りの 反応産物の生成量 (%) H_2O_2	ROH
Thr252 (native)	1348	3	97
Thr252Ala	1148	89	5
Thr252Gly	1094	88	3
Thr252Ser	831	15	85
Thr252Asn	417	12	57
Asp251Ala	3	11	90
Asp251Gly	21	2	99

酸素消費活性はヘム当りの回転数で表示した. 酸素消費ならびに H_2O_2 産生量は酸素電極で測定し, カンファーの代謝物である ROH (5-hydroxycamphor) はガスクロマトグラフで定量した.

おり, アミノ酸変異がヘムの周辺の構造に大きな変化を与えるようには思えない. 作製した変異体の代表的な例について, 酵素活性 (酸素消費速度) と生成した酸素代謝物の分析結果を表 2 にまとめた^{4)~6)}. Ala, Gly 変異により酸素消費速度には大きな変化がみられないにもかかわらず, 消費された酸素の大部分は基質に取り込まれることなく H_2O_2 として放出される. Val, Pro 変異体でも同様である. この H_2O_2 放出反応 (Uncoupling 反応) は単純な反応ではあるが, このような機能をもつヘム酵素は未だ知られていない.

水酸基をもつ Ser 残基あるいはアミド基をもつ Asn 残基の導入により, 酸素添加反応は大きく回復する. 次の段階として, H_2O_2 が P450 反応サイクル (図 1) のどの過程から放出されてくるのか問題になる. 可能性としては, (1) 酸素化型酵素の分解に伴い生じる O_2^- の不均化反応による経路, (2) 酸素化型酵素に 2 個目の電子が導入された後, のどちらかである. 解析結果は, 2 個目の電子導入後に H_2O_2 が生成されることを示していた.

これらの結果は, (1) Thr252残基が Gly248残基との水素結合形成という構造的な面よりもむしろ酸素活性化に関与していること, (2) 252残基の側鎖の OH あるいは NH_2 のような H^+ 供与性基は文字どおりの H^+ 供与体として機能しているか, あるいは H^+ 供与体として機能する H_2O 分子をつなぎとめるアンカーとして機能していること, (3) 酸素化型酵素が一電子還元されると hydroperoxo 型反応中間体が生成し, それが分解して H_2O_2 が放出されることを示唆する. それでは, Thr252Ala 変異体ではヘム近傍に H^+ 供与性のアミノ酸残基が存在しないにもかかわらず, 何故 H_2O_2 が生

成するのでしょうか？ この一見つじつまのあわない現象の答えは、Ala 変異体の結晶構造解析により与えられた⁷⁾。意外なことに、Thr の OH 基の占めていた位置に新たに H₂O 分子が見出されたのである。したがって、H₂O₂ 生成に必要な H⁺ は、新たに見出された H₂O 分子により供給されたものと考えざるを得ない。逆に言えば、酸素添加 (O-O 結合の開裂) が起こるのかあるいは H₂O₂ 放出反応が起こるのかは、プロトン供与体の厳密な位置、配向により制御されていることを強く示唆する。

このように、hydroperoxo 種の生成はほぼ確かなこととおもわれるが、真の活性中間体である π -cation 種の生成についてはいまだに不明のまま残されている。

ii) Asp251 残基の変異

Asp251 残基の変異体 (Asp251→Ala, Gly, Asn) の酸素消費速度は劇的に減少するが、意外なことに酸素添加能は完全といってよい程高く保たれている^{6), 8)} (表 2)。図 1 の個々の反応段階を解析してみると、1 個目の電子伝達速度ならびに酸素化型の生成速度は変異によりほとんど影響をうけないが、驚いたことに酸素化型酵素への 2 個目の電子伝達速度が著しく遅くなる。これが酵素活性低下の見かけ上の原因である。

この非常に異なる電子伝達速度を説明するのに、1 個目と 2 個目の電子伝達経路が異なるものと考えれば話は簡単であるが、これは極めて考えにくい。なぜならば、電子伝達タンパク質は P450cam あたり一分子しか結合せず、また電子伝達タンパク質の結合部位に存在するアミノ酸の変異体では 1 個目の電子伝達が遅くなると 2 個目の伝達も遅くなるからである。

1 個目と 2 個目の電子伝達を比べてみると、前者は電子のみでいいが後者は電子にくわえて H⁺ が必要とされる。この点を考慮すると、2 個目の電子伝達は H⁺ 供与と共奏的におこり、したがって、Asp251 残基はプロトン伝達経路の一員であるようにみえる。実際、Asp251 残基とイオン結合している Lys178, Arg186 残基は外部の水と接触しているので、外部から Asp251 残基を経てプロトンを提供する系の存在が予想される。

iii) プロトン供給系

Thr252 残基が O-O 結合の開裂において直接の H⁺ 供与体あるいは H₂O のアンカーとして機能しているものと考え、タンパク質外部からこれらにプロトンを提供する経路がなければならない。結晶構造から可能性の高い経路として、(1)上に述べた Asp251 残基を含む経路と、(2)Helix I を貫く 3 分子の水を介して Glu366 残基と Thr252 残基を結び付けている経路が考

えられた。後者の可能性は、Glu366 の変異体を用いて反応を解析したところ、酸素添加能に影響を与えないことから、除外することができる。

(1)の経路の存在をどのようにして証明したらよいのか？ Asp251 残基が関与しているとする、pH の変化によりヘム鉄の酸化還元電位が影響をうける可能性が予想された。この方法は古典的であるが、ヘム近傍の解離基の存在を検出するには優れた手段である。測定結果をまとめると、(a)天然型酵素では、pH の低下に伴い電位は上昇し、その pH-電位曲線の解析から還元型で pK=6.3、酸化型で pK=5.7 の解離基の存在が確認された、(b)Thr252Ala 変異体のみならず Asp251Ala, Asp251Asn 変異体の電位は pH 依存性を示さず、上述の解離基は検出されない、(c)天然型酵素で Asp251 残基のカルボキシル基と強く水素結合する 2-phenyl imidazole 存在下においても解離基は検出されない^{9), 10)}。この解離基は、pK 値ならびに(c)の結果から判断して Asp251 残基のカルボキシル基であると予想される。この pK 値はカルボキシル基としては高く、他のアミノ酸残基の側鎖との間に水素結合等の相互作用があることをうかがわせる。この考察ならびに Thr252Ala の変異体で解離基が見出せないという実験結果は、Thr252 と Asp251 残基の間に相互作用が存在することを強く示唆する。

Sligar とも、Asp251Ala 変異体の活性低下を認め、Asp251 残基と Thr252 残基が直接相互作用しているモデルを提唱している⁸⁾。結晶構造をみるかぎり、両残基が直接相互作用する可能性は低く、それゆえ、それらの残基の間に H₂O 分子が橋渡しするモデルを考えてみた。

この H₂O 分子は X 線結晶構造解析では見出されていないが、分子モデリング計算結果では、結晶構造解析で見出されている H₂O 分子以外に Thr252 と Asp251 残基の間に H₂O 分子が存在するという¹¹⁾。更に、この H₂O 分子の存在をうらづける結果が P450BM3 のヘムタンパク質メインの X 線結晶構造解析から得られている¹²⁾。

P450BM3 の X 線結晶構造解析は、P450 としては二番目の例である。P450BM3 は P450cam とは全く基質特異性をことにしていることに加えて一次構造上の相同性も 20% 以下と低いが、その全体の骨組みは驚くほど P450cam のそれと類似している。P450cam における Asp251, Thr252 残基に対応する残基は P450BM3 では Glu267, Thr268 残基であり (表 1)、両残基の間に

Glu267---H₂O---Thr268のように一分子のH₂Oが結合している。P450BM3ではP450camと異なりHelix Fとの間にイオン結合する残基は見出されず、Glu267残基が直接外部の水分子と接触している。このように二種の酵素のあいだに差異は存在するが、P450のプロトン供給系としてThr---H₂O---Asp (又はGlu)の基本構造を想定することが可能である(図3)。

それでは、酸素添加反応のkey残基であるThr残基は、直接プロトン供与体あるいはH₂O分子のアンカーのどちらであろうか?これに対する答えを得るために、水素結合の受容体としての性質をもつがプロトン供与体としての機能を欠く人工アミノ酸であるO-メチルスレオニンでThr252を置換した変異体を作製した¹³⁾。この変異体は、高い酸素添加能を保持していた。この結果は、Thr252残基がH₂O分子のアンカーとして機能すること、H₂O分子が直接のプロトン供与体であることを強く示唆するものである。

5. おわりに

紙面の都合で、ヘム鉄に結合した配位子におよぼすアミノ酸変異の効果についてくわしく述べることができなかった。ここで、簡単にふれておきたい。

一酸化炭素複合体(Fe²⁺-CO)のdistal側の構造変化を鋭敏に反映するFe-CO伸縮振動^{14), 15)}を共鳴ラマン散乱法で測定すると、252番目の置換アミノ酸残基の側鎖の容積の減少とともにFe-CO伸縮振動の低波数シフトがみられた。この結果は、側鎖容積の減少とともに、COがよりヘム面傾いて結合することを意味する。一方、酸素化型のO-O伸縮振動は、一原子酸素添加能の高い252ならびに251残基の変異体では天然型とほぼ同じであるが、酸素添加能の低いThr252Ala変異体では有意に低波数シフトする。この結果は、結合酸素の配向と酸素活性化能の間に相関があることをさらに予想させる。

Asp251残基と[Lys178, Arg186残基]との間のイ

図3. 結晶構造が判明している2種類のP450のプロトン供給系のモデル

オン結合をアミノ酸置換により切断してもFe-CO伸縮振動に大きな変化はみられず、結晶構造解析から指摘されたこのイオン結合の構造的な重要性(配位子結合ポケットの安定化)には疑問を持たざるを得ない。この結果のようにまたGly248-Thr252間の水素結合による配位子結合ポケットの形成等に関しても、結晶構造により提唱されたこれらのアミノ酸残基の役割は非結晶状態すなわち動的状態ではどの程度の寄与をなすのであろうか。古くはChanceが結晶状態のヘモグロビンに対するある種の配位子の結合速度定数と溶液のそれとの間に大きな差異を見出したように、静的状態と動的状態には時によりかなりの差があるのであろう。我々のような結晶構造解析に対する批判力、判断力に欠ける酵素化学者は、頭を悩ます。

以上、部位特異的変異法によるP450の酸素活性化機構の解析を概略したが、この解析は安定なP450camにおいて特にすすんでおり、また、そのなかでも我々とSligarのグループが先んじている。このような理由でP450camに主眼をおいて紹介したことをご理解いただきたい。

部位特異的変異法による解析をはじめた当時、この手法により未知の反応中間体を捕捉できるのではないかと期待していたが、現実はそのようにあまいものではなかった。今後、より直接的な手段により、真の反応中間体の構造解析が進むことを切望する。なお電子伝達タンパク質とP450との相互作用あるいは基質特異性の解析を目指した部位特異的変異法による結果については、清水¹⁶⁾、今井と吉田¹⁷⁾の総説を参考にさせていただきたい。

最後にあたり、共鳴ラマンの測定は、横浜市大総合理学部 西村善文教授との共同研究であり、忙しいなか測定におつきあいいただいたこと、また、研究全般にわたる慶大医学部 石村巽教授と九大薬学部 堀内忠郎教授(現創価大工学部)のご指導を深謝する。

文 献

- 1) White, R. E., Coon, M. J. (1980) *Ann. Rev. Biochem.*, **49**, 315-356
- 2) 牧野龍, 石村巽 (1982) 代謝, **19**, 27-35
- 3) Poulos, T. L., Finzel, B. C., Howard, A. J. (1987) *J. Mol. Biol.*, **192**, 687-700
- 4) Imai, M., Shimada, H., Watanabe, Y., Matsushima-Hibiya, Y., Makino, R., Koga, H., Horiuchi, T., Ishimura, Y. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 7823-7827
- 5) Martinis, S. A., Atokins, W. M., Stayton, P. S., Sligar,

- S. G. (1989) *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 9252-9253
- 6) Makino, R., Shimada, H. (1993) Cytochrome P-450 (Omura, T., Ishimura, Y., Fujii-Kuriyama, Y., eds) 17-30, Kodansya Ltd., Tokyo (Japan)
- 7) Raag, R., Martinis, S. A., Sligar, S. G., Poulos, T. L. (1991) *Biochemistry*, **30**, 11420-11429
- 8) Gerber, N. C., Sligar, S. G. (1992) *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 8742-8743
- 9) 牧野龍, 島田秀夫, 岡田有紀子, 石村巽, 堀内忠郎 (1991) 生化学, **63**, 80
- 10) Shimada, H., Makino, R., Unno, M., Horiuchi, T., Ishimura, Y. (1994) Cytochrome P450 (Lechner, M. C., ed) 299-306, John Libbey Eurotext, Paris.
- 11) Wade, R. C. (1990) *J. Comput. Aided Mol. Des.*, **4**, 199-204
- 12) Ravichandran, K. G., Boddupalli, S. S., Hasemann, C. A., Peterson J. A., Deisenhofer, J. (1993) *Science*, **261**, 731-736
- 13) Kimata, Y., Shimada, H., Hirose, T., Ishimura, Y. (1995) *Boichem. Biophys. Res. Commun.*, in press
- 14) Uno, T., Nishimura, Y., Makino, R., Iizuka, T., Ishimura, Y., Tsuboi, M. (1985) *J. Biol. Chem.*, **260**, 2023-2026
- 15) Tsubaki, M., Ichikawa, Y. (1986) *Biochemistry*, **25**, 3563-3569
- 16) 清水透 (1992) 生化学, **64**, 397-401
- 17) 今井嘉郎, 吉田雄三 (1994) 蛋白質 核酸 酵素 (5月号増刊, 蛋白質の時代), **39**, 1133-1140

まきの りゅう

略歴 1974年北海道大学理学部理学研究科化学課程修了。イリノイ大学研究員, 慶応大学医学部助手, 講師を経て1991年より姫路工業大学理学部助教授。現在, 一酸化窒素の細胞内レセプターであるグアニル酸シクラーゼの研究を行っている。

連絡先 〒678-12 兵庫県赤穂郡上郡町金出地1479-1

姫路工業大学理学部 生命科学科 生体物質化学 I

TEL 07915-8-0207 or 0208 FAX 07915-8-0132

しまだ ひでお

略歴 1977年大阪大学大学院理学研究科生物化学博士課程を中途退学。同年慶應義塾大学医学部助手。1979年に理学博士 (大阪大学) を取得, そして同年から1981年までアメリカ合衆国コロラド州立大学生化学教室に留学。1981年に慶應義塾大学医学部に戻り, 1989年同大学講師。約10年ほど前からアミノ酸の部位特異的置換法を使った解析でチトクロム P450反応機構を解明する努力を続けている。しかし天然型アミノ酸同志の置換では, 導入可能なアミノ酸残基に構造上および機能上制限があり, 従っていわゆる痒いところに手が届かない実験に終わってしまう。そこでそれを克服するために, 現在は人工アミノ酸の部位特異的置換法も用い, それが軌道に乗った処である。

趣味 ジョギング, テニス。

連絡先 〒160 東京都新宿区信濃町35

慶應義塾大学医学部医化学教室

TEL 03-3353-1211 ex. 2642 FAX 03-3358-8138