細菌のチトクローム P-450†

安河内孝徳, 古賀秀雄, 相良康弘, 堀内忠郎

(九州大学薬学部)

チトクローム P-450 (以下 P-450 と略す) は、バクテリアから昆虫、植物、哺乳動物に至るまで自然界に広く分布している。現在までに報告されている細菌の P-450 はすべて可溶性タンパク質であり、これらの細菌はいずれも P-450 の水酸化基質を菌生育炭素源とする場合が多い。ここでは最もよく研究が進んでいる *Pseudomonas putida* のカンファー水酸化チトクローム P-450_{cam} を中心に紹介する。P-450 生産菌に関する報告は動物の P-450 についての報告に比べてそれほど多いものではなく、表 1 に示すようにいくつか知られていない。しかも、現在までは P-450_{cam} 以外、あまり研究が進んでいない状況である。以下に細菌の P-450 について概説しよう。

1. テルペン化合物水酸化チトクローム P-450

このグループでは、現在カンファー (環状テルペン)、リナロール (直鎖状テルペン) を分解する *Pseudomonas putida* 菌の P-450 が知られている。そのうち、カンファーを水酸化する P-450_{cam} の系が、その生化学・酵素化学・遺伝子構造などについて古くから最もよく研究されている⁽¹⁾。Gunsalus ら⁽²⁾は 1959 年、カンファーを唯一の炭素源として生育できる *Pseudomonas putida* PpG 1 (ATCC 17453) を単離し、その酸化分解経路を部分的ではあるが明らかにした (図 1)。分解第 1 段階は、5-エキソ水酸化酵素 (後にこれに P-450_{cam} が関与していることがわかった) による 5-エキソ-ヒドロキサンファー (化合物 F) の生成に始まる。その後、数段階を経て 3 分子の酢酸とイソ酪酸にまで分解される。片桐ら⁽³⁾は PpG 1 株によるカンファーの水酸化に P-450 が関与していることを見出したが、この P-450_{cam} (*cam* C 遺伝

子生産物) はその後、単一にまで生成され、その分光学的および生化学的諸性質は、それまでに高等動物のミトコンドリアおよびミクロソームの P-450 について報告された結果と驚くべき一致を示した。カンファーの水酸化反応も 1 原子酸素添加酵素の基準に当てはまるものであり、これには 3 つの酵素が関与している。この系では、FAD-タンパク質 (ブチダレドキシニン還元酵素; *cam* A 遺伝子産物) が NADH から電子を受け取り (FAD が還元される)、次に鉄・硫黄タンパク質 (ブチダレドキシニン; *cam* B 遺伝子産物) の鉄が還元され、ついでカンファーと結合した P-450_{cam}, すなわちカンファー・P-450_{cam} 複合体のヘム鉄へ電子が渡される。この複合体は分子状酵素とただちに結合し、さらに 2 個目の電子をブチダレドキシニンから受け取り、元の酸化型 P-450_{cam} と水酸化されたカンファーを生じる。これらの *cam* A, B, C 遺伝子は、5-エキソカンファー脱脱水素酵素 (*cam* D 遺伝子産物) とともに *cam* オペロン (*cam* DCAB の順) を形成し、Cam リプレッサー (*cam* R 遺伝子産物) により制御を受けている。また、これらの遺伝子群は CAM プラスミドと呼ばれる伝達性の巨大プラスミド (約 240 kb) 上に存在している。P-450_{cam} の構成系は電子供与体が NADH であることを除いて、副腎皮質ミトコンドリアのステロイド水酸化酵素系 (アドレノドキシニン還元酵素, アドレノドキシニンおよび 2 種の P-450, P-450_{11β} と P-450_{9α} からなり、電子供与体は NADPH である) と、きわめて類似している。われわれは、*cam* オペロンのほかアドレノドキシニン還元酵素, アドレノドキシニンについても遺伝子構造を解析してきた⁽⁴⁻⁶⁾が、現在これらの酵素およびその変異体を大腸菌で発現させ、細菌の系と高等動物の系を比較しつつ、これらの反応メカニズム解析に取り組んでいる。また最近 Cam リプレッサーの精製にも成功した (荒牧ら、未発表)。Poulos ら⁽⁷⁾は X 線結晶解析法を用い、チトクローム P-450_{cam} の立体構造を解明した。これによると、へ

† Bacterial Cytochrome P-450.

Takanori YASUKOCHI, Hideo KOGA, Yasuhiro SAGARA and Tadao HORIUCHI (Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, Fukuoka 812)

表 1 細菌チトクローム P-450

細菌	チトクローム P-450 の機能	基 質
<i>Pseudomonas putida</i> PpG1 (ATCC 17453)	5-ケト水酸化	カンファー
<i>Pseudomonas putida</i>	8-メチル水酸化	リナロール
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> (ATCC 19067)	アルカン水酸化	<i>n</i> -オクタン
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	アルカン水酸化	<i>n</i> -ヘキサデカン
<i>Bacillus megaterium</i> (ATCC 13368)	15 β 水酸化	3-オキソ- Δ^4 ステロイド
<i>Bacillus megaterium</i> (ATCC 14581)	ω -1, ω -2, ω -3 水酸化	脂肪酸
<i>Pseudomonas putida</i>	7-メチル水酸化	<i>p</i> -シメン
<i>Moraxella</i>	<i>o</i> -脱メチル化	グアヤコール
<i>Nocardia</i>	<i>o</i> -脱アルキル化	未定
<i>Rhizobium japonicum</i>	未定	未定
<i>Corynebacterium</i>	未定	コレステロール

図 1 カンファーの分解経路 (*Pseudomonas putida* PpG1)

ムは L- と I-ヘリックスにはさまれるように分子内に入り込んでおり、Cys-357 はヘム鉄とチオレートリガンドを形成している。ヘムの上部（遠位）には酸素が結合すると考えられるポケットがあり、ここには疎水性の残基の間に Thr-252 が存在する。この基は、ほとんどすべての P-450 に保有されるが、この基を部位特異的変異法によって Ala, Val などに変えると、カンファーに酸素添加がゆかなくなり H_2O_2 ができる^(8,9)。Ser, Asn に置換した変異体では酸素添加反応が進むから、水酸基またはアミド基が必要と思われる⁽¹⁰⁾。この変異体ではオキシゲナーゼがオキシダーゼに変換したことになる。これ以外にランダム変異法を用いて、プチダレドキシンの結合部位や基質結合部位に関しても実験が進行中である。

リナロールを炭素源として生育できる *Pseudomonas putida* が Madhyastha ら⁽¹¹⁾により単離され、その後 Gunsalus らによりこの系はチトクローム P-450_{Lin} によるリナロールの 8-メチル水酸化であることが証明された。P-450_{Lin} は分子量 45,000 で、純品にまで精製されている。この菌には、リナロールの 10 位メチル基を水酸化するもう 1 つの P-450 が見出されている。

2. *n*-アルカン水酸化チトクローム P-450

Rhodococcus rhodochrous ATCC 19067 の *n*-オクタン水酸化チトクローム P-450 は、*n*-オクタンによって

産生誘導され⁽¹²⁾、この水酸化酵素系は、高等動物のミクロソームの P-450 系に類似している。

n-ヘキサデカンを炭素源として生育しうる *Acinetobacter calcoaceticus* strain EB 104 もまた P-450 によって *n*-ヘキサデカンを ω -水酸化する⁽¹³⁾。この水酸化酵素系には、NADH-フェレドキシン還元酵素、フェレドキシンおよび P-450 が存在している。面白いことにこの系では、基質と無縁な芳香族炭化水素化合物のビフェニルやフェナントレンにより P-450 の生産が誘導される。

3. ステロイド水酸化チトクローム P-450

Bacillus megaterium ATCC 13368 株のチトクローム P-450_{meg} は 3-オキソ- Δ^4 ステロイド体の 15 β 水酸化を行う。この P-450_{meg} は分子量 52,000 であり、純品にまで精製されている。Berg ら⁽¹⁴⁾が行った置換再構成実験では、このステロイド水酸化電子伝達系のフラボタンパク質および鉄・硫黄タンパク質の P-450 に対する特異性は低い。また、*B. megaterium* の系を用いた再構成実験で、このステロイド化合物は生育炭素源にはならないので、この菌にとって本来の生理的代謝物質ではないと考えられる。

4. 脂肪酸水酸化チトクローム P-450

上記と異なった *Bacillus megaterium* ATCC 14581 株から得られる P-450 は長鎖飽和脂肪酸の水酸化反応に

関与する⁽¹⁵⁾。この菌は3種類のP-450を生産する。最も量の多いP-450_{BM-3}は分子量119,000の単一ペプチドであり、このペプチド自体で脂肪酸のモノオキシゲナーゼ活性を持つ。単一ペプチドによりNADPHからの電子伝達および基質への酸素添加反応が行われる例はこれが初めてであり、この酵素は酵素化学上および進化的にみて興味深い。トリプシンによる限定加水分解では2本のポリペプチドが得られ、そのC末部分はFADおよびFMNを含んでいる。N末部分はヘムを含み、脂肪酸結合能を有し、CO結合還元型は特有のP-450スペクトルを示す。この部分は結晶化され、今後の発展に期待が持たれている⁽¹⁶⁾。次に量の多いP-450_{BM-1}は、分子量47,000であり、アミノ酸配列はP-450_{cam}に似ている⁽¹⁷⁾。最も量の少ないP-450_{BM-2}(分子量:46,000)は精製されている⁽¹⁷⁾が、その性質についてはまだほとんど知られていない。

5. 芳香族炭化水素・水酸化チトクローム P-450

これには β -シメンとグアヤコール水酸化チトクロームP-450が知られている。前者は β -シメンを炭素源として生育できる*P. putida* JT 101 菌から単離され、P-450_{cym}と呼ばれる⁽¹⁸⁾。その分子量は45,000であるが、まだ精製されていない。ただし、カンファー水酸化系に関与するフラボタンパク質およびレドキシニンにP-450_{cym}を組み合わせた再構成系では、 β -シメンの7位メチル基が効率よく水酸化される。

またグアヤコールの o -メチル基を脱メチル化するP-450が*Moraxella* 菌より見出された⁽¹⁹⁾。この菌は、グアヤコールを炭素源として生育できる。しかし、このP-450の精製に関する報告はまだない。

Cartwright and Broadbent⁽²⁰⁾は、*Nocardia* strain NH 1 よりP-450依存 o -脱アルキル酵素を単離、精製した。このP-450_{npd}は、分子量45,000である。

6. 窒素固定菌からのチトクローム P-450

Appleby⁽²¹⁾は、*Rhizobium japonicum* strain CC 705 より6種のP-450(a, b, c1~c4)を同定し、このうち、P-450 a, b および c1 を精製した。精製された3つのP-450はいずれも分子量45,000を示した。P-450 c1のアミノ酸分析より、このP-450はCys残基を2個しか持っておらず、ミクロソーム型P-450に類似している。しかし、これらのP-450の機能については、まだはっきりしない。

7. 他の細菌のチトクローム P-450

コレステロールを唯一炭素源として生育できる*Corynebacterium* sp. からチトクロームP-450_{cb}が得られている⁽²²⁾。このP-450は、分子量が50,000であること以外、詳しい報告はされていない。

本稿では、チトクロームP-450を生産する細菌をできるだけとりあげてみたが、以上の情報より明らかなように、今後細菌のP-450も種々の基質に対する宝庫としてますます重要性を増すことであろう。そしてそれらの機能分化と構造変化の関連などきわめて興味ある事実の見出されることが期待される。

- (1) I. C. Gunsalus, J. R. Meeks, J. D. Lipscomb, P. Debrunner and E. Munck: "Molecular Mechanisms of Oxygen Activation," Academic Press, 1974, p. 559—613.
- (2) W. H. Bradshaw, H. E. Conrad, E. J. Corey, I. C. Gunsalus and D. Lednicer: *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 5007 (1959).
- (3) M. Katagiri, B. N. Ganguli and I. C. Gunsalus: *J. Biol. Chem.*, **243**, 3543—3546 (1968).
- (4) H. Koga, H. Aramaki, E. Yamaguchi, K. Takeuchi, T. Horiuchi and I. C. Gunsalus: *J. Bacteriol.*, **166**, 1089—1095 (1986).
- (5) Y. Sagara, H. Sawae, A. Kimura, Y. Sagara-Nakano, K.-I. Morohashi, K.-I. Miyoshi and T. Horiuchi: *J. Biochem.*, **107**, 77—88(1990).
- (6) Y. Sagara, Y. Takata, H. Sawae, A. Kimura and T. Horiuchi: in *Drug Metabolizing Enzymes: Genetics, Regulation and Toxicology*, ed. by M. Ingelman-Sundberg, J.-A. Gustafsson and S. Orrenius, Proceedings of the VIIIth International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations, Stockholm, Karolinska Institutet, 1990, p. 50.
- (7) T. L. Poulos, B. C. Finzel, I. C. Gunsalus, G. C. Wagner and J. Kraut: *J. Biol. Chem.*, **260**, 16122—16130 (1985).
- (8) M. Imai, H. Shimada, Y. Watanabe, Y. Matsushima-Hibiya, R. Makino, H. Koga, T. Horiuchi and Y. Ishimura: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **86**, 7823—7827 (1989).
- (9) S. A. Martinis, W. M. Atkins, P. S. Stayton and S. G. Sligar: *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 9252—9253 (1989).
- (10) H. Shimada, Y. Watanabe, M. Imai, R. Makino, H. Koga, T. Horiuchi and Y. Ishimura: "Dioxygen Activation and Homogeneous Catalytic Oxidation," Elsevier Science Publishers, 1991, p. 313—319.

- (11) K. M. Madhyastha, P. K. Bhattacharyya and C. S. Vaidyanathan : *Can. J. Microbiol.*, **23**, 230—239 (1977).
 - (12) G. Cardini and P. Jurtshvk : *J. Biol. Chem.*, **245**, 2789—2796 (1970).
 - (13) O. Asperger, B. Stüwer and H.-P. Kleber : *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **21**, 309—312 (1985).
 - (14) A. Berg, M. Ingelman-Sundberg and J.-A. Gustafsson : *J. Biol. Chem.*, **254**, 5264—5271 (1979).
 - (15) Y. Miura and A. J. Fulco : *Biochim. Biophys. Acta*, **388**, 305—317 (1975).
 - (16) R. T. Ruettinger, L.-P. Wen and A. J. Fulco : *J. Biol. Chem.*, **264**, 10987—10995 (1989).
 - (17) H. Schwalb, L. O. Narhi and A. J. Fulco : *Biochim. Biophys. Acta*, **838**, 302—311 (1985).
 - (18) J. J. DeFrank and D. W. Ribbons : *J. Bacteriol.*, **129**, 1356—1364 (1977).
 - (19) A. Dardas, D. Gal, M. Barrelle, G. Sauret-Ignazi, R. Sterjiades and J. Pelmont : *Arch. Biochem. Biophys.*, **236**, 585—592 (1985).
 - (20) N. J. Cartwright and D. A. Broadbent : *Microbios*, **10**, 87—96 (1974).
 - (21) C. A. Appleby : *Biochim. Biophys. Acta*, **147**, 399—402 (1967).
 - (22) 山本明広, 武森重樹, 片桐正之 : 生化学, **46**, 534 (1974).
-