

人工アミノ酸の部位特異的導入法を用いたチトクローム P450の酵素触媒機構の研究

Catalytic mechanism of cytochrome P450 enzyme studied by site-specific incorporation of unnatural amino acids

代表研究者 慶応義塾大学医学部助手 木股 洋子

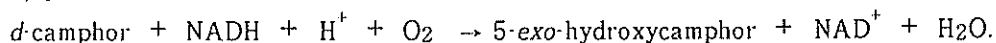
Research associate, Department of Biochemistry, School of Medicine,
Keio Univ. Yoko KIMATA

In the monooxygenation reaction catalyzed by cytochrome P450cam (P450cam), Thr252, a hydroxyl amino acid at the active site, is essential for the reductive cleavage of O-O bond of oxygen: hydroxyl (OH) group of the Thr has been proposed to serve as an acid catalyst for the O-O bond scission. In this study, four different unnatural amino acids were incorporated into 252-position to verify the role of the OH group. Catalytic activities of the mutant enzymes suggest that the OH group does not function as catalyst. Then, we propose that the OH group serves as an anchor of an acid catalyst and facilitates its catalytic action to cleave the O-O bond; water is possibly the catalyst.

研究目的

チトクロームP450 (P450) は、性ホルモンや水分及び鉱物代謝に関わるホルモン、神経伝達物質等の、生体の恒常性維持に重要な種々の生理活性物質を合成する一群の酵素である。P450 酵素群の働きは様々であるが、その反応中心の構造及びそれが行う化学反応の様式は共通であり、反応中心の構造因子（アミノ酸の官能基）がどのように反応を遂行するかという基礎研究は、P450 一般の機能の改変や制御をもたらすことが期待される。本研究は、P450 のモデルである微生物のP450camを題材として、人工アミノ酸導入法という従来の天然アミノ酸置換法より飛躍的に詳しい蛋白質の構造と機能の相関解析を可能にする、世界的にも新規な手法を用いて、P450 反応中心のアミノ酸官能基による触媒機構の解明を目指すものである。

P450 は、鉄複合体であるヘムを持つ一原子酸素添加酵素で、このうち微生物 *Pseudomonas putida* の P450cam は、以下のような樟腦 (camphor) の水酸化反応を行う。



この反応に於いて、分子状酸素の酸素原子間 (O-O) 結合が切断された後、一方の

酸素原子は *d*-camphor に取り込まれ、もう一方は H₂O に還元される。この O-O 結合の切断は、基質の一原子酸素添加を担う活性酸素種を生成するものであり、そのメカニズムは P450 の反応で最も問題とされる課題の一つである。この O-O 結合切断の過程では、二つのプロトンが必要となる。従来の天然アミノ酸置換法を用いた解析から、活性部位の252位スレオニンが、図のa に示すような水素結合のネットワークを介して、たんぱく質の外から内部の活性部位まで連なるプロトン供給系の末端を形成すると提唱されている。この系では、252位スレオニンの水酸基が、ヘムに結合した酸素分子へプロトンを供給して O-O 結合を切断する酸触媒として働くと提唱された。ところが、我々が人工アミノ酸置換により最初に得た、このスレオニンの水酸基をメチル基で保護した252位 O-methylThr 変異体は、比較的高い酵素活性を保った (BBRC 1995, 208, 96)。従って、上述の252位スレオニンのプロトン供与体としての役割は疑問視され、これに対して国内外から大きな反響を得た。そこで、このスレオニン水酸基の役割を更に詳しく検証するため、この水酸基を別の官能基に置き換えた3つの人工スレオニンアナログをP450_{cam}の252位へ導入し、得られた変異体の触媒活性を比較解析した。

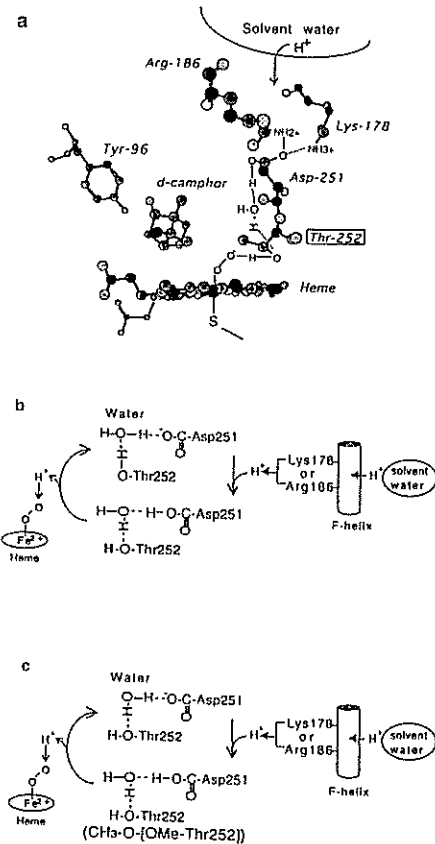


表 P450_{cam}の野生型と人工または天然アミノ酸導入変異体の触媒活性

P450 _{cam}	酵素消費あたりの5-exo-hydroxycamphor 生成割合 (%)	酵素消費速度 (μM/min/μM P450 _{cam})
252 Thr (野生型)	100	1304
※ 252 O-Me-Thr	100	410
252 Ser	85	830
※ 252 O-Me-Asp	76	140
252 Asn	57	420
252 Ile	44	277
252 Val	19	360
252 Leu	17	7
252 Cys	7	690
※ 252 S-Me-Cys	* < 5	102
※ 252 3-Amino-Ala	* < 5	73
252 Ala	5	1150
251 Asp (野生型)	100	1304
251 Ala	89	3

※ 人工アミノ酸導入変異体

* 検出限界以下

研究経過及び研究成果

今回作成した252位への人工アミノ酸導入変異体と、当研究室で251位または252位に天然アミノ酸置換した変異体との触媒活性を表にあらわした。252位置換体の特徴的な現象は、酸素消費と基質の水酸化が共役しない（アンカップリング）ために、反応産物（5-exo-hydroxycamphor）の生成効率が低いことである。例えば、252位スレオニンの水酸基を欠く252位アラニン変異体では、酸素消費速度は野生型と匹敵する程高いが、消費酸素あたりの産物生成量は、大きく減少した（カップリング割合5%）。一方、251位置換体は、表の251位アラニン変異体に例示したように、酸素消費速度は大きく減少するが、カップリング割合は比較的高く保たれた（約90%）。これらの知見から、我々は、以後252位スレオニンの主要な機能が維持されているか否かを、カップリング割合の高低によって判断することにした。

まず、人工アミノ酸 O-methyl-Thr (-OCH₃を持つ) と O-methyl-Asp (-COOCH₃を持つ) による252位置換体では、酸素消費速度は3分の1または9分の1に減少するが、カップリング割合は高く保たれた。どちらのアミノ酸も遊離水酸基を欠きプロトンを供給できないため、この結果からカップリング割合を高く保つために252位のプロトン供与体は必要でないと考えられた。更に、プロトンを供与しうる 3-amino-Ala (-NH₃⁺を持つ) による置換体で激しくアンカップリングする（カップリング割合5%以下）ことから、252位にプロトン供与体を有するだけでは機能を果たさないと考えられた。従って252位スレオニン水酸基が、図 a,b に示すような水素結合のネットワークより輸送されたプロトンを直接ヘム上に受け渡し、O-O 結合を切断する酸触媒として機能するという以前提唱された説は妥当でないと考えられた。そこで我々は最近、図 c に示すような、前説を修正したモデルを提唱した。ここでは、酸触媒として働くのはThr252とAsp251の間に存在する水分子で、Thr252の水酸基は、このスレオニンと水分子の間の水素結合の受容体としての役割を持つと考えた。そして、このようにしてスレオニンの側鎖が水分子を保持することが、上述のプロトン供給系において効率よくプロトンを運搬し、水分子の酸触媒としての機能を促進、あるいは、高いカップリング割合を保つために必要と考えた。表で、側鎖に酸素原子を持つアミノ酸（Thr, Ser, Asn, O-methyl-Thr, O-methyl-Asp）の置換体が高いカップリング割合を保っていることは、酸素原子が水素結合を受容しうることから説明できる。一方、3-amino-Ala 置換体で活性が減少するのは、おそらくタンパク質中でその側鎖であるアミノ基が・NH₃⁺として解離しており、水素結合の受容体として働いていないためと解釈している。

また、S-methyl-Cys や Cys 置換体ではカップリング割合が低く留まった。このことは、O-O 結合の解裂を行うのに、252位側鎖の硫黄原子は酸素原子に替わる役割を果たすことができないことを示唆している。硫黄原子の水素結合形成能は、酸素原子と比べ平衡常数にして百倍以上弱いことが知られている。従って、S-methyl-Cys や Cys 置換体では、上述のプロトン供給系における水分子を保持するのに充分強い水素結合能を持たないために、アンカップリングを引き起こしたと推測してい

る。同様に、Val や Leu による置換体のカップリング割合が低い原因も、炭素原子が水素結合を形成しないためと解釈している。しかし、これらと同様に炭化水素のみから成る側鎖を持つ Ile 置換体では、予想外にも比較的高い触媒活性を示した。この原因は現時点では不明だが、活性部位でこの残基の占める空間配置が、水素結合を形成しなくてもプロトンの輸送に適切な位置に水分子を保持しうるような環境を作っているのかもしれない。

今後の課題と発展

P450は、前述のように体内の様々な恒常性維持に重要な酵素である。本研究で用いたような手法により、その機能に必要とされる活性部位の微細構造を明らかにすることによって、P450 のアミノ酸レベルでの反応機構の解明に大きく貢献するとともに、本酵素の機能改変も可能にするであろう。

また、本研究に於いて、人工アミノ酸導入法を用いてP450の触媒機構に関する仮説を証明、或いは新たな説を提唱することにより、更に他の様々な酵素で、その作用機序の検証を促すことが期待される。又、当手法を多くの酵素へ応用することにより、特定の構造を持つアミノ酸残基が反応に関わる機序が、普遍的なものであるかタンパク質によって様々であるか検討し、系統的に整理することも目指している。人工アミノ酸導入法を適用した報告されている数例のうち2つの例 (nuclease, GTPase) で、今まで塩基触媒としての作用が提唱されていた活性部位アミノ酸残基の役割が否定され、それらはむしろ水素結合による基質の遷移状態の安定化に寄与すると予想される結果が得られている。我々が調べている P450_{cam} の252位スレオニンの場合でも、上述のようにその水酸基が直接の酸触媒として働く可能性は否定された。従って、更に他の酵素で触媒基と考えられている残基においても同様の傾向…即ち、直接的な触媒作用より寧ろ水素結合を介した間接的な作用を及ぼす…にある可能性が考えられ、この点に着目した解析も行っていきたい。

発表論文

Kimata Y, Shimada H, Hirose T and Ishimura Y : Substitutions of artificial amino acids, O-methyl-Thr, O-methyl-Asp, S-methyl-Cys and 3-amino-Ala, for Thr-252 of cytochrome P450_{cam}: probing the importance of the hydroxyl group of Thr-252 for oxygen activation. In: Ishimura Y, ed. Oxygen Homeostasis and Its Dynamics. Springer-Verlag, 印刷中 (1997)