

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06515

研究課題名(和文) シトクロムP450-還元酵素複合体の立体構造解析による電子移動機構解明

研究課題名(英文) Structural study of cytochrome P450-reductase complex to elucidate electron transfer mechanism

研究代表者

杉島 正一 (Sugishima, Masakazu)

久留米大学・医学部・准教授

研究者番号：30379292

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：脂質代謝や薬物代謝において重要なシトクロムP450へNADPH-シトクロムP450還元酵素(CPR)からどのように還元力が供給されるのかを明らかにするために、本研究では天然のCPRとP450の融合タンパク質であるP450BM-3に着目し、立体構造決定を目指した。P450BM-3の野生型や変異体についてX線小角散乱測定および多角度光散乱測定を行った結果、P450BM-3は二量体であり、その形成にCPRドメインが寄与することが示唆された。また、クライオ透過電子顕微鏡による単粒子解析を試みたが、2次元分類した際の分子の見え方が限られていることなどから、3次元マップは得られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

P450BM-3のP450ドメインはその酵素活性の高さから産業的応用が期待されている酵素である。これまでに部分構造は明らかとなっているが、全長構造が明らかとなれば、その応用はより発展することが期待される。また、CPRとP450はステロイドホルモンの合成に関与しており、その機能不全による遺伝病が知られている。CPRからP450への電子移動機構が明らかになることによって、その遺伝病の治療法解明に寄与することが期待される。本研究結果ではX線小角散乱測定による低分解能構造しか得られなかったが、今後の研究進展によって、原子分解能の構造が得られれば、上記の目的が達成されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Cytochrome P450 is involved in lipid and xenobiotic metabolisms. In order to proceed enzymatic reaction of P450, electron transfer from NADPH-cytochrome P450 reductase (CPR) or other redox partner is indispensable. To elucidate electron transfer mechanism between them, we tried to prepare the complex of cytochrome P450 and CPR. However, the redox complex of P450 and CPR is unstable, thus we tried to determine the tertiary structure of P450BM-3 which is a natural fusion protein of P450 and CPR from bacteria.

Based on the small-angle X-ray scattering and multi-angle light scattering results, we concluded that P450BM-3 is a homo-dimer and CPR domain is involved in dimer formation. We also tried to determine the tertiary structure of P450BM-3 by cryo-electron microscopy although it was failed due to the uniformity of the particle orientation.

研究分野：生化学、構造生物学

キーワード：X線小角散乱 電子伝達複合体 クライオ電子顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

シトクロム P450 は様々な脂溶性分子の水酸化反応を触媒する脂質や薬物の代謝において非常に重要な酵素である。様々な脂質に対応するために、基質特異性の異なる数多くの P450 が知られており、ヒトの場合 50 種以上の P450 が知られている。P450 は小胞体膜やミトコンドリア膜に結合したヘム酵素であり、その酵素反応過程においてヘム鉄に結合した酸素分子を活性化させる。P450 が酵素反応に必要な酸素分子を活性化するためには、鉄硫黄クラスターを補因子とするアドレノドキシニン(Adx)やフラビン酵素である CPR からの還元力が必要であり、この電子移動経路の詳細を明らかにするためには、酸化還元複合体の立体構造が必要である。Adx-P450 複合体については、バクテリアホモログにおいて、すでに構造解析例がある(Tripathi S. et al. (2013) Science 340, 1227-30, Hiruma Y. et al. (2013) J. Mol. Biol. 425, 4353-65)が、CPR-P450 複合体に関しては、いまだに実験的な構造解析例がない。CPR は P450 以外にヘム代謝における主要酵素であるヘムオキシゲナーゼ(HO)に還元力を供給することが知られている。HO は小胞体膜に結合した酵素で、基質としてヘムを結合する。HO も P450 と同様にヘム鉄に結合した酸素分子を活性化させるために還元力が必要である。これまでに我々は HO の酵素反応機構に関する生化学・構造生物学的研究を進めており、その中で、CPR-HO 複合体の結晶構造解析に成功している(図1)。

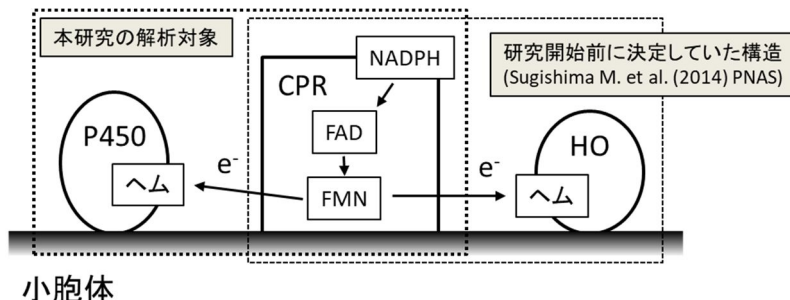


図1 CPR からヘム蛋白質への還元力受け渡し

2. 研究の目的

そこで、本研究では CPR-P450 複合体の構造決定を目指し、CPR から P450 への電子移動機構を明らかにすることを目的とした。本研究では天然の CPR と P450 の融合タンパク質である P450BM-3(CYP102A1)に着目した。P450BM-3 は *Bacillus megaterium* 由来の P450 (N 末端側) と CPR (C 末端側) が融合した酵素で、飽和脂肪酸の水酸化を触媒する。P450 ドメインはその酵素活性の高さから精力的に研究が進められており、基質特異性や触媒反応の人工的改変なども研究されていて、産業応用も期待されている酵素である。P450BM-3 は研究開始段階で、P450 ドメインおよび CPR ドメインの部分構造が報告されていたが (Sevrioukova IF et al. (1999) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 96, 1863-8, Joyce MG et al. (2012) FEBS J. 279, 1694-706)、全長の構造決定はされておらず、P450 ドメインと CPR ドメインがどのように相互作用して、分子内電子移動を行うのかは不明である。本研究では P450BM-3 の X 線結晶構造解析および X 線小角散乱法やクライオ TEM (透過型電子顕微鏡) を使った単粒子解析による溶液構造の解析を計画した。本研究の解析結果を使った応用として、P450BM-3 は産業応用が期待されている酵素なので、例えば、合理的に他の P450 と P450 ドメインを繋ぎ変えた設計が可能になるなど、全長の立体構造決定後は応用研究がより一層進展することが期待される。また、CPR に関する遺伝病として、Antley-Bixler 症候群という病気(指定難病の一つ)が知られている。この病気は CPR の機能不全により、ステロイドホルモン合成にかかわる P450 が機能不全に陥り、その結果として、性器異常、二次性徴の異常、骨合併症などを呈する難病である。P450BM-3 の構造解析により、CPR から P450 への電子移動機構が明らかになることによって、本疾患の遺伝的背景と作用機序について理解が深まり、疾患克服への糸口がつかめることも期待される。

3. 研究の方法

P450BM-3 の大腸菌における発現プラスミドを名古屋大学の荘司長三博士、イリノイ大学の Stephan Sligar 博士から供与いただき、大腸菌を用いた発現/精製系を構築した。野生型に加えて、CPR-HO 複合体の構造解析時に導入した CPR ドメインへの変異の導入などを行った変異型 (del16; CPR ドメイン内の FMN 結合ドメインと FAD 結合ドメインの間のヒンジ領域 6 残基を欠損したもの、TGEE; CPR ドメインを rat CPR TGEE 変異体(CPR-HO 複合体の構造解析で用いた変異体)と置き換えたもの)の発現/精製系も構築した。これらの野生型および変異型 P450BM-3 について、創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム(BINDS)の支援のもと、高エネルギー加速器研究機構 フォトンファクトリーの放射光を利用した SEC(サイズ排除クロマトグラフィー)-SAXS 測定(図2)とビームライン近傍にある装置を活用した SEC-MALS(多角度光散乱検出器)測定を行った。結晶化も試みたが、現在まで良好な結晶は得られていない。野生型 P450BM-3 はホモダイマーを形成しており、分子量が約 20 万 Da とクライオ TEM の解析対象として十分な大きさを持っていると考えられることから、BINDS の支援の元、高エネルギー加速器研究機構に設置されたクライオ

TEM を用いて、タンパク質濃度を変化させながら野生型 P450BM-3 の撮影を行った。

4. 研究成果

(1) SEC-MALS, SEC-SAXS による P450BM-3 の溶液構造の解析

SEC-MALS による解析から野生型 P450BM-3 と del6 変異体の分子量はそれぞれ 218 kDa, 213 kDa と推定され、いずれも二量体を形成していると推定された。また TGEE 変異体の分子量は 126 kDa と推定され、単量体と推定された。一方で SEC-SAXS の Guinier 解析および Pr 関数の解析結果からは野生型 P450BM-3、del6 変異体、TGEE 変異体の回転半径はいずれも 48-51Å と推定され、変異による違いはほとんど見られなかった。この結果からは、TGEE は細長く伸びた棒状の分子であることが推定され、野生型 P450BM-3 と del6 変異体は棒状の分子が 2 分子、長軸方向を接合面として結合していることが示唆させる。図 2 にプログラム DAMMIF を用いた分子形状の推定結果を示した。上記の結論は DAMMIF による形状の推定結果とも一致すると考えられる。

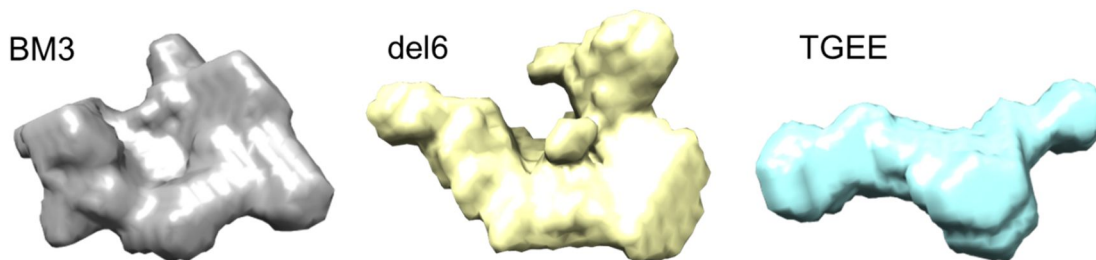


図 2 DAMMIF による P450BM-3 の外形の推定

また、CPR ドメインを大きく変更している TGEE 変異体において会合様式が変化していることから、P450BM-3 は CPR ドメインを会合面として二量体を形成することが示唆された。

(2) クライオ TEM による P450BM-3 の溶液構造の解析

タンパク質濃度をある程度最適化した野生型 P450BM-3 について、3321 枚のクライオ TEM 画像を取得し、プログラム relion を用いた単粒子解析を行った。目視確認によって拾い上げた 4000 粒子ほどの画像を鋳型として、250 万粒子程度をプログラムによって自動的に拾い上げた。そのうちの一部を使って二次元分類を行った。その結果の例を図 3 に示す。

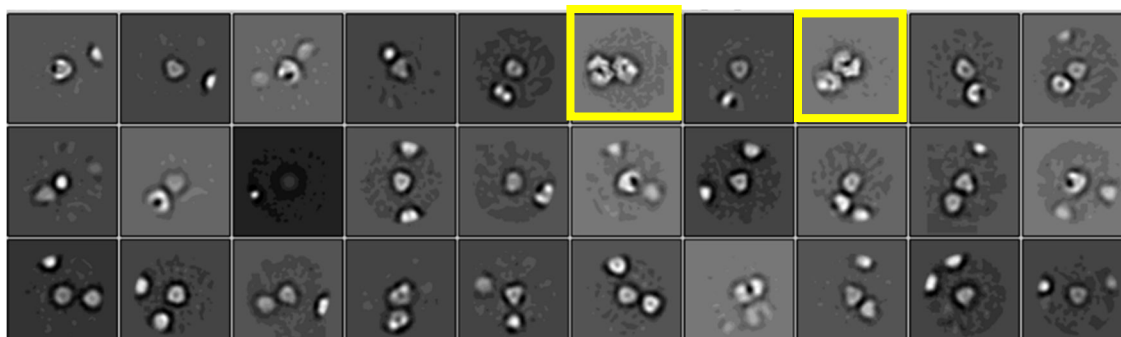


図 3 クライオ TEM 画像の 2 次元分類 (マスク直径は 200Å)

図 3 の黄色で囲った 2 次元平均画像はホモダイマーを形成している粒子と推定される。しかし、その割合は少なく、粒子の見える方向が一方向であることから、3 次元マップの再構成には至らなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Sato Hideaki, Sugishima Masakazu, Tsukaguchi Mai, Masuko Takahiro, Iijima Mikuru, Takano Mitsunori, Omata Yoshiaki, Hirabayashi Kei, Wada Kei, Hisaeda Yoshio, Yamamoto Ken | 4. 巻 478 |
| 2. 論文標題 Crystal structures of hydroxymethylbilane synthase complexed with a substrate analog: a single substrate-binding site for four consecutive condensation steps | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Biochemical Journal | 6. 最初と最後の頁 1023 ~ 1042 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1042/BCJ20200996 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Sugishima Masakazu, Taira Junichi, Sagara Tatsuya, Nakao Ryota, Sato Hideaki, Noguchi Masato, Fukuyama Keiichi, Yamamoto Ken, Yasunaga Takuo, Sakamoto Hiroshi | 4. 巻 9 |
| 2. 論文標題 Conformational Equilibrium of NADPH-Cytochrome P450 Oxidoreductase Is Essential for Heme Oxygenase Reaction | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Antioxidants | 6. 最初と最後の頁 673 ~ 673 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antiox9080673 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Sugishima Masakazu, Wada Kei, Fukuyama Keiichi | 4. 巻 27 |
| 2. 論文標題 Recent Advances in the Understanding of the Reaction Chemistries of the Heme Catabolizing Enzymes HO and BVR Based on High Resolution Protein Structures | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Current Medicinal Chemistry | 6. 最初と最後の頁 3499 ~ 3518 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2174/0929867326666181217142715 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Miyake Keita, Fushimi Keiji, Kashimoto Tomonori, Maeda Kaisei, Ni Ni Win, Kimura Hiroyuki, Sugishima Masakazu, Ikeuchi Masahiko, Narikawa Rei | 4. 巻 287 |
| 2. 論文標題 Functional diversification of two bilin reductases for light perception and harvesting in unique cyanobacterium <i>Acaryochloris marina</i> MBIC 11017 | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 The FEBS Journal | 6. 最初と最後の頁 4016 ~ 4031 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.15230 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 Iijima Mikuru, Ohnuki Jun, Sato Takato, Sugishima Masakazu, Takano Mitsunori | 4. 巻 9 |
| 2. 論文標題 Coupling of Redox and Structural States in Cytochrome P450 Reductase Studied by Molecular Dynamics Simulation | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-45690-2 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Sugishima Masakazu, Wada Kei, Fukuyama Keiichi, Yamamoto Ken | 4. 巻 295 |
| 2. 論文標題 Crystal structure of phytychromobilin synthase in complex with biliverdin IX _a , a key enzyme in the biosynthesis of phytyochrome | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry | 6. 最初と最後の頁 771 ~ 782 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.011431 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Sugishima Masakazu, Wada Kei, Unno Masaki, Fukuyama Keiichi | 4. 巻 59 |
| 2. 論文標題 Bilin-metabolizing enzymes: site-specific reductions catalyzed by two different type of enzymes | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Current Opinion in Structural Biology | 6. 最初と最後の頁 73 ~ 80 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.sbi.2019.03.005 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 Masaki Unno, Keisuke Igarashi, Yoshinori Hagiwara, Masakazu Sugishima, Kei Wada, Keiichi Fukuyama, Atsushi Ikeda, Katsuhiko Kusaka, Naomine Yano, Tatsuya Joutsuka, Andreas Ostermann |
| 2. 発表標題 Relationship between the protonation state of the substrate and the absorption spectrum in a mutant of the enzyme that synthesizes a photosynthetic pigment |
| 3. 学会等名 MLZ Conference 2021 (国際学会) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Masakazu Sugishima, Kei Wada, Natsuki Saito, Masaki Unno, Keiichi Fukuyama, Ken Yamamoto |
| 2. 発表標題 Structural and functional analysis of tomato HY2 which synthesizes the chromophore for plant phytochrome |
| 3. 学会等名 第21回日本蛋白質科学会年会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Masakazu Sugishima, Junichi Taira, Mikuru Iijima, Hideaki Sato, Kei Wada, Masato Noguchi, Keiichi Fukuyama, Mitsunori Takano, Hiroshi Sakamoto, Ken Yamamoto |
| 2. 発表標題 Domain movements of NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase (CPR) are required for the smooth electron transfer from CPR to heme-heme oxygenase-1 (HO-1) complex |
| 3. 学会等名 25th Congress of the International Union of Crystallography (国際学会) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 杉島正一、和田 啓、齋藤夏希、海野昌喜、福山恵一、山本 健 |
| 2. 発表標題 フィトクロム発色団合成酵素HY2の結晶大型化に向けて |
| 3. 学会等名 日本結晶学会2020年度年会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|-----------------------------------|
| 1. 発表者名 杉島正一、和田 啓、福山恵一、山本 健 |
| 2. 発表標題 光応答タンパク質フィトクロムの発色団合成機構 |
| 3. 学会等名 第93回日本生化学会大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|-----------------------------------|
| 1. 発表者名 杉島正一、和田 啓、山本 健 |
| 2. 発表標題 フィトクロム発色団合成酵素のX線結晶構造解析 |
| 3. 学会等名 2019年度日本生化学会九州支部例会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 杉島正一、和田 啓、山本健 |
| 2. 発表標題 フィトクロモビリン合成酵素の酵素反応と立体構造 |
| 3. 学会等名 第43回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 佐藤秀明、杉島正一、塚口舞、増子隆博、小俣義明、和田啓、久枝良雄、山本健 |
| 2. 発表標題 基質誘導体を結合したヒドロキシメチルピランシターゼ反応中間体の構造解析 |
| 3. 学会等名 第43回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 杉島正一、和田啓、福山恵一、山本健 |
| 2. 発表標題 赤色光受容体フィトクロムの光受容色素合成に必須な酵素の立体構造と機能 |
| 3. 学会等名 2019年度日本結晶学会年会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名 杉島正一 |
| 2. 発表標題 ヘム分解酵素H0-1によるCOとO2の厳密な識別機構 |
| 3. 学会等名 第92回日本生化学会大会（招待講演） |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

| |
|---|
| <p>個人のホームページ https://sites.google.com/view/msugishima76</p> |
|---|

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|---|--------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 佐藤 秀明 (Sato Hideaki) (60271996) | 久留米大学・医学部・准教授 (37104) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| | |
|---------|---------|
| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|