

特集：タンパク質の化学構造から生物機能に迫る

シトクロム P450nor の生理機能・反応機構・構造

祥雲弘文, 伏信進矢

カビの脱窒に関わるシトクロム P450nor は、通常モノオキシゲナーゼとして働く P450 スーパーファミリーにありながら、NO 還元という特異な反応を行う。さらに通常はフラビントタンパク質の介在なくしては不可能な NADH からの還元力の受取りを独力で行う。1 電子酸化還元中心しかもたないヘムタンパク質に NADH の 2 電子が直接伝達するという、前例のない電子伝達の機構に興味もたれている。これまでにさまざまな角度から解析が加えられ、その特異な反応機構が明らかにされつつある。とくに P450nor と NAD⁺ アナログとの複合体の X 線結晶構造解析の成功により、H⁻ トランスファー (hydride transfer) やプロトン搬送系の機構が明らかとなった。一方近年のゲノム解析の成果は P450nor のカビにおける普遍的分布や、強力な温室効果ガス N₂O の大気中濃度上昇への寄与を示唆する。

1. はじめに

シトクロム P450 (以下 P450) は細菌から高等生物に至る生命に普遍的に存在する一群のヘムタンパク質の総称である¹⁾。P450 スーパーファミリーは一つの祖先型遺伝子が無数に分岐進化し、著しい機能分化とそれに伴う分子多様性を獲得して形成された。P450 はその還元型ヘムに一酸化炭素 (CO) が結合した形でソーレー (Soret) 吸収帯 (ヘムタンパク質に特徴的で強い吸収をもつ) ピークを 450nm にもつ (Pigment 450)。P450 は大村・佐藤によりその性質が明らかにされ、命名された。P450 は一原子酸素添加酵素 (モノオキシゲナーゼ) として働くことが多いが、触媒する反応の種類は驚くほど多彩であり、還元反応、異性化反応、脱水反応、C-C 結合開裂など、そのタイプは 30 近くにのぼる。P450 の生理機能も多彩で、薬物 (毒物) 代謝、ステロイドホルモン・胆汁酸合成、二次代謝などはよく知られる。P450 生理機能に関わる “動物と植物の戦争”

は面白い。すなわち植物は動物の補食から逃れるため毒の作成 (二次代謝の一種) に P450 を発展させ、動物はその毒で死なないように P450 を解毒酵素として発展させてきた。

シトクロム P450nor (P450nor) は一酸化窒素 (NO) を亜酸化窒素 (N₂O) に還元する反応を触媒する NO 還元酵素 (Nor) としての生理機能をもつ (下式)²⁾。



この機能は多彩な P450 の中でも極端に分化したものの一つである。この P450nor 反応の顕著な特徴として、P450nor がこの反応を単独で行えることが挙げられる。NADH の 2 電子は通常ヒドリドイオン (H⁻) として同時に伝達される。従ってヘムのような 1 電子の酸化還元中心は NADH から直接電子を受取ることはできない。フラビントタンパク質などから成る電子伝達系の助けが必要である。ところが P450nor は NAD(P)H から直接電子を受取る²⁾。この異例の電子伝達機構のために、P450nor は生物無機化学分野を中心に大きな関心を集めることとなった。

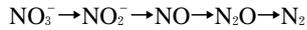
P450nor の Nor 反応はカビの脱窒に関わる。脱窒とは硝酸イオンなどの固定窒素が還元され、窒素ガス (N₂) や N₂O などの気体となって大気中に放出される現象で³⁾、地上での主要な物質循環の一つとして重要な役割を果たしている。窒素サイクル (窒素固定、硝化、および脱窒) に関わる生命は従来、原核生物 (細菌) のみであると考えられて

東京大学大学院農学生命科学研究科 (〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1)

Physiological function, reaction mechanism, and structure of cytochrome P450nor

Hirofumi Shoun and Shinya Fushinobu (Department of Biotechnology, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan)

いた。筆者らは20年近く前に真核生物であるカビに明瞭な脱窒活性を発見することができた⁴⁾。脱窒は嫌気呼吸(O_2 以外の物質、硝酸、硫酸、フマル酸、その他を最終電子受容体とする呼吸)としての生理的意義をもち、細菌の完全な脱窒は4段階よりなる(下式)³⁾。



各還元ステップはそれぞれ固有の末端酸化酵素(異化型の硝酸還元酵素(dNar)、亜硝酸還元酵素(dNir)、Nor、および亜酸化窒素還元酵素(Nos))により行われ、呼吸鎖電子伝達系より電子が供給される。カビ脱窒系はNosを欠くようで、脱窒産物は N_2O である。 N_2O は炭酸ガスの300倍の温室効果を発揮し、近年炭酸ガスやメタンなどの温室効果ガスとともに大気中の濃度を増している。カビの脱窒がその一翼を担っていると予想される⁵⁾。

2. P450nor 遺伝子の構造と多機能性解毒酵素 P450nor

P450nor 遺伝子はまず、初めてカビ脱窒活性が確認された *Fusarium oxysporum* より単離され、CYP 55 の系統名が与えられた⁶⁾。ORFの開始コドンは2カ所存在し、両者の間には23残基アミノ酸からなるミトコンドリア移送シグナルが存在する。一方、菌体からP450norタンパク質を精製すると2種のアイソフォーム(norA, norB)が得られる。これらのN末端のアミノ酸はnorAでは二つ目のMetの一つ前(N末側)のThrであり、norBでは一つ後ろ(C末側)のAlaで、しかもアセチル化されていた。これら結果をまとめると、CYP 55A1は一つの遺伝子で局在の異なる2種のP450norアイソフォームを作る。norA(404アミノ酸残基)は最初の開始コドンから翻訳され、ミトコンドリアの可溶性画分に移送されてシグナルは切断を受ける。norB(402アミノ酸残基)は2番目の開始コドンから翻訳され、サイトゾルに局在し、翻訳後修飾・アセチル化を受ける^{7,8)}。一方、別の脱窒真菌 *Cylindrocarpus tonkinense* にはP450nor遺伝子が二つあり(CYP 55A2, CYP 55A3)、一方(nor1)はミトコンドリア移送シグナルをもち、他方(nor2)はもたない。またnor2はnor1や*F. oxysporum*のP450norとは異なり、NADHよりNADPHを好む^{9,10)}。このようにミトコンドリアとサイトゾルの両方にP450norが配置されていることは、危険分子NOの解毒が細胞全体で重要であることを意味する。これら2種のカビとは系統的に離れた担子菌系酵母 *Trichosporon cutaneum* からもP450nor遺伝子が単離された¹¹⁾。このP450norはミトコンドリアに局在し、非脱窒条件(好気、硝酸・亜硝酸なし)でも発現する。またnor2と同様にNADPHにも高い反応性を示す。近年のゲノム解析の成果によりかなり高い確率でカビにおけるP450norの存在が明らかとなり、その普遍性が証明されつつある。

真核生物のP450は小胞体あるいはミトコンドリアに局

在し、いずれも膜結合性であり、そのN末端に膜結合領域をもつ。一方P450norはその局在によらず可溶性で、そのような膜結合領域をもたない。すなわち真核生物で初めての、そして現在でも唯一の可溶性P450である。またP450norはそのアミノ酸配列から真核生物より原核生物のP450に系統分類され、放線菌由来のCYP105ファミリーにもっとも高い相同性(35~40%)を示す⁶⁾。CYP105ファミリーは通常モノオキシゲナーゼであり、Nor活性をもつものは発見されていない。これらのことからカビはP450norのもとになる遺伝子を放線菌から獲得し、その機能を作り替えたものと予想される。

P450norがカビ脱窒(N_2O 生成)に必須であることは、遺伝子破壊の結果から証明されている¹²⁾。*F. oxysporum*などのカビ脱窒系の誘導条件は細菌とよく似ていて、それは通気抑制と脱窒基質(硝酸または亜硝酸)の存在である。しかし転写調節に関わる因子は、カビでは真核生物型である。P450nor遺伝子の5'-上流域には転写因子NirAおよびRox-1の結合部位に相同の領域が見出される。NirAは硝酸同化のための調節因子であり、Rox-1は酵母のアルコール発酵などで働く嫌気応答因子である。これら領域はP450nor発現の際、脱窒基質および酸素制限条件への応答にそれぞれ必須であることが示されている¹³⁾。

カビ脱窒系はミトコンドリアに局在し、嫌気呼吸として機能する¹⁴⁾。この我々の発見は、真核生物の好氣的呼吸器官と教科書的にも長い間定義されてきたミトコンドリアに嫌気呼吸の存在を示した、数少ない例の一つとなった。*F. oxysporum*のdNarは細菌の膜結合型dNar(NarGHI)によく似ていると思われる¹⁵⁾。また、銅含有タイプのdNir(NirK)も精製されている¹⁶⁾。ミトコンドリアは内部共生で誕生し、ミトコンドリアの元となった共生細菌(原ミトコンドリア)は現在の α -プロテオバクテリアにもっとも近縁であると考えられている。カビのdNar, dNirが細菌脱窒系のもと同一起源であるとする、カビミトコンドリアは原ミトコンドリアの時代からこれら遺伝子を保持してきた可能性が考えられる(投稿中)。一方、細菌のNorはシトクロムcbタイプで、カビのP450norとは異なる。すなわち、カビ脱窒系は嫌気呼吸によるATP生成に貢献する成分としてdNar, dNirを残し、元のNor, Nosは捨て去ったと思われる。この嫌気呼吸系での最終産物はNOである。NOは大変危険な分子であるので、他所から貰ったP450遺伝子をNorに作り替え、解毒酵素P450norとして用いている、と推測している。

*F. oxysporum*は微好気条件下で酸素呼吸と硝酸呼吸(脱窒)を平行して行っていると思われる¹⁷⁾。そのような混成呼吸(hybrid respiration)¹⁷⁾を行うミトコンドリアでは2種の危険分子 O_2 とNOが同時に発生し、遭遇する可能性が高い。これらが反応するとさらに危険な分子、過酸化亜硝

酸 (ONOO^-) が生成する. P450nor はこの危険分子をも解毒することが示唆されている¹⁸⁾. さらに P450nor は NADH-ペルオキシダーゼ活性 (H_2O_2 の水への還元) (未発表) や共脱窒活性 (NO やアザイドの消去) も示す¹⁹⁾. このように P450nor は多機能酵素として, さまざまな危険分子の消去に機能していると思われる.

3. 反応機構

P450nor の Nor 反応は非常に速く, 装置や方法の限界から速度定数を正確に得ることは難しい. 低温 (10°C) で見かけの $k_{\text{cat}} = 1,200\text{s}^{-1}$ が得られているが²⁰⁾, かなり低い NADH 濃度 (0.16mM) で得られた値であり, 真の k_{cat} は常温 (25°C) であれば 100万 min^{-1} 前後であろうと推測される. P450nor 反応は図 1A のように 3 段階に分けることができる (ステップ①~③)²⁰⁾. まず①で 1 個目の基質 NO が休止状態 (resting) 酵素 (Fe^{3+}) に結合し, Fe^{3+} -NO 複合体を形成する. この反応は非常に速く, 10°C で見かけの二次反応速度定数 $2.6 \times 10^7\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ を得ている. 次に②でこの NO 複合体は NADH により還元され, 444nm にソーレ吸収帯ピークをもつ中間体 *I* を形成する. 最後に 2 個目の基質 NO が *I* と反応し, 反応産物 N_2O と H_2O を遊離する (ステップ③). 中間体 *I* の形成過程 (還元過程) (ステップ②) はラピッドスキャン装置により観察される (図 1B). P450nor とそれより僅かに過剰の NO を混合してお

き (Fe^{3+} -NO 複合体; 431nm スペクトル種), 嫌気条件下で NADH 溶液と混合すると, *I* (444nm スペクトル種) が準安定状態で蓄積する. この観察では NO 濃度を P450nor 濃度と同程度にすることがみそで, 2 個目の NO が供給されないため反応が先に進まず, *I* が蓄積する.

P450nor 反応が余りにも速いため当初は, 本当に酵素反応か? の疑いもあり得た. NAD 関与の酵素反応でこのような高速は他に知られていない. 酵素反応ではなく化学反応的に起こっている疑いもあり得た. またそれまで知られた P450 を考えると, P450 に NADH の結合部位が存在するとは考えにくかった. これらのことを判定する一つの手段として速度論的解析がある. すなわち還元過程の見かけの速度定数 (k_{obs} ; 図 1B) が NADH 濃度に対して飽和するかどうか, を見る. 飽和すれば酵素反応, 飽和しなければ化学反応である. しかしこの過程も速すぎて低い NADH 濃度でしか測定できず, そのような解析は不可能であった. この *I* 形成過程が飽和キネティクスに従う酵素反応である (つまり NADH 結合部位をもつ) ことは, 後に P450nor 変異体 (D88A) を用いて立証された²¹⁾. 還元過程で NO 過剰にするとターンオーバーが起こり, 431nm 種が蓄積する. このことはこの還元過程が全体の律速であることを意味する.

中間体 *I* の化学的実体がどのようなものであるか, は最大の関心事の一つである. また, NADH の 2 電子はどの

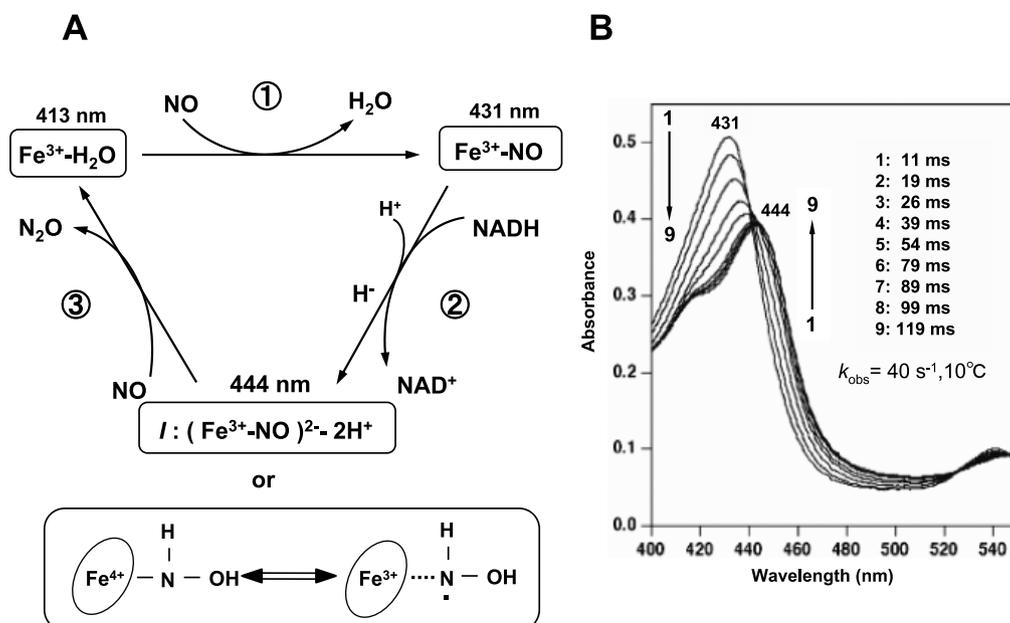


図 1 P450nor の反応サイクル (A) と, 還元過程で観察されるスペクトル変化 (B)

Fe^{3+} などは酵素に結合したヘム鉄の荷電状態を示す. A の下図は中間体 *I* の推定構造 (Fe^{3+} -ヒドロキシルアミンラジカル複合体と等価); (B), 還元過程 (ステップ②; *I* の形成過程) で観察されるスペクトル変化. ラピッドスキャン装置による. Fe^{3+} -NO 複合体 (431nm スペクトル種) と NADH 溶液を嫌気的に混合した後の, 各時間におけるスペクトルを記録. 低温 (10°C), 低 NADH 濃度 ($20\ \mu\text{M}$) にも関わらず *I* 形成過程は非常に速い.

ような形で渡されるか、2個目の水素原子（プロトン）はどちらのステップ（②か③か）で供給されるか、なども *I* の実体と関連し、興味深い課題である。これまでの観察から、もっとも可能性の高い *I* の構造は図 1A に示したように、 Fe^{3+} -NO 複合体が2電子還元され、さらに2個のプロトンが供給された形である²²⁾。還元過程において NADH の2電子はヒドリドイオン (H^-) の形で供給され、さらにプロトン供給ネットワーク（後述）からプロトン1個が供給され、*I* が形成される。この *I* の構造は鉄3価 (Fe^{3+}) とヒドロキシルアミンラジカルとの複合体と等価である（図 1A 下右図）。 H^- 伝達は、 Fe^{3+} -NO 複合体を H^- 供与体である水素化ホウ素ナトリウム (sodium boron hydride; NaBH_4) と反応させると 444nm スペクトル種が形成することからも支持される²²⁾。また、パルス放射線分解でヒドロキシルアミンラジカルを生成させる系に休止型 (Fe^{3+}) を置くとやはり 444nm 種が形成することから、やはりこの構造が支持される²²⁾。NADH のニコチンアミド環 C4 には二つの水素が結合し、これらはプロキラルの関係にある。電子伝達に際し、これら水素の何れかが H^- として伝達される（酵素により特異性がある）。これら水素を重水素で置換した NADH を作成し、P450nor の overall 反応あるいは還元過程への影響を見たところ、プロ-R の水素にのみ有意の同位体効果が観察された²²⁾。この結果も H^- トランスファーを支持する。

P450nor の反応機構は物理化学系研究者の興味も惹くようであり、その分野からの解析結果を報ずる論文も散見される。最近 Lehnert らはコンピューターを用いた電子軌道計算 (density functional calculations) の結果から P450nor の反応サイクルを推定している（図 2）²³⁾。それによると、 Fe^{3+} -NO が H^- を受取った直後の生成物は Fe^{2+} -HNO に相当する（中間体③）。この種はエネルギー的に安定で、そのエネルギー準位をゼロとして以下の中間体への遷移における自由エネルギー変化を計算してある。③はすぐにプロトン化して④（中間体 *I*）になる。④ (*I*) は Fe^{4+} -NHOH $^-$ に相当する。④に2個目の NO が反応する際、まず1電子が NO からフェリル基 (Fe^{4+}) にわたり、生じた NO^+ は鉄に配位した N の孤立電子対を攻撃して N-N 結合を形成し（⑤）、同時にプロトンが N から O に移り⑥を生じる。この機構によりスピン禁制を免れ、安定なリガンド (-NHOH) とラジカル (NO) が高速で反応できる理由となっている。⑤はリガンドが外れ易いが、速やかに⑥になることにより安定化される。⑦はエネルギー準位が高く、遷移状態にあると思われる。この計算結果は、*I* の化学的実体に関する我々の提案（図 1A）を完全に支持している。

P450 の第5配位子が電子に富んだチオレートアニオン (S^-) である理由について、モノオキシゲナーゼにおいては O_2 の O-O 結合を不均等開裂するためのプッシュプル機構が提案されている。P450nor に関しての提案もあるが¹⁸⁾,

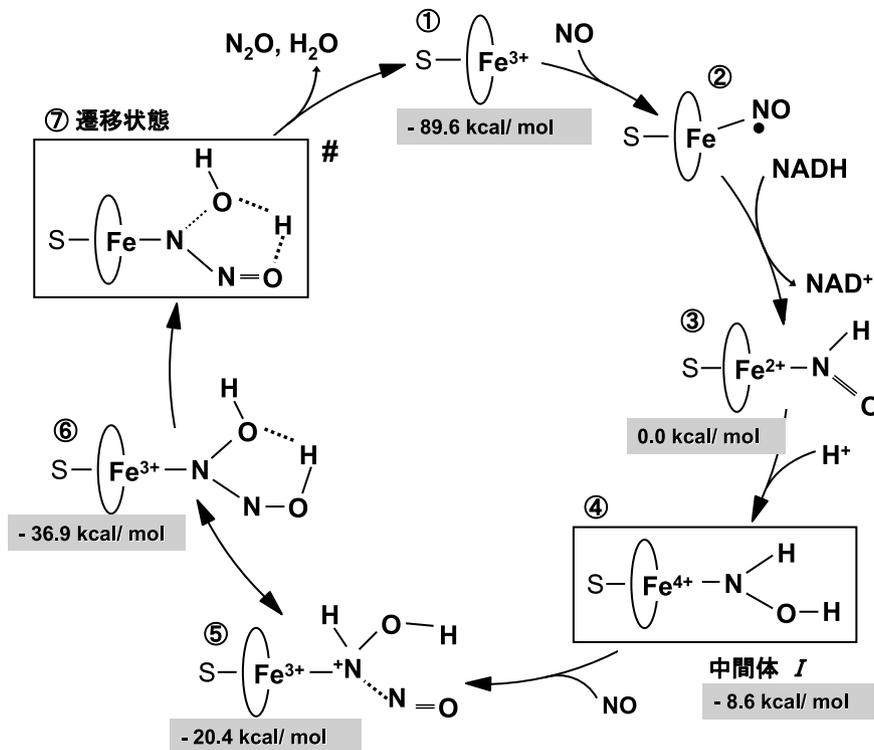


図 2 P450nor の推定反応サイクル
Lehnert ら（文献 23）を改変。

ここでは触れない。

4. X線結晶構造解析

・全体構造：すべてのP450は互いによく似た立体構造をとっていると考えられている。P450はヘムを具にしたおにぎりのような形をしている。大まかには似ていても、それぞれのP450には個性も見受けられる。P450norでは休止型²⁴⁾、CO結合型²⁴⁾、NO結合型²⁵⁾、NADHアナログ結合型²⁶⁾などのX線結晶構造解析に成功し、詳細な構造が明らかとなっている。P450norもその特異な機能に対応するように特徴的な構造をもつ。P450分子はヘム面を中心として遠位側 (distal side) と近位側 (proximal side) に分けられる。この呼び方はヘモグロビンやミオグロビンにおける proximal histidine, distal histidine に起源を發する。通常のP450では、近位側は電子供与タンパク質 (フラビンタンパク質またはフェレドキシン) から電子を受取る側であり、またヘム鉄第5配位子のシステイン残基が存在する側でもある。一方遠位側は基質や酸素が結合し、触媒作用の行われる側であり、基質結合のための空間が存在する (ヘム遠位ポケット)。電子供与タンパク質は分子表面に負荷電の多い側でP450に結合するため、P450近位側表面は正荷電を帯びている。ところがP450norの荷電分布は逆で、遠位側に正荷電が多く、近位側は負荷電が多い。この荷電分布はNADHが遠位側からP450norに結合することと一致する。もう一つのP450nor構造の特徴は、大きな遠位ポケットの存在とそのポケットの環境が親水的であることである。通常のP450は基質が疎水性であるため、遠位ポケットは疎水的である。

・正荷電クラスター：P450nor遠位側に分布する正荷電アミノ酸としては、Lys62, Arg64, Lys77, Lys81, Arg174, Arg182, Lys291, Arg392などが挙げられる。部位指定変異の結果から、これら正荷電アミノ酸残基の中でArg174とArg64がNADHの結合にとくに重要であることが明らかとなっている²⁷⁾。

・電子供与体特異性決定部位：これまで数種類のカビからP450norタンパク質が精製されている。それらの電子供与体特異性は、NADHのみを好むものと、NADHとNADPHのどちらでもよいもの (あるいはどちらかというとならNADPHを好むもの) とに大別される。これらP450norのアミノ酸配列の比較とすでに解かれていた休止型P450norの立体構造を元に、この電子供与体特異性を決定している部位を検索した。ヘムポケット入口に存在するB'-ヘリックスは異なるP450分子間でもっとも激しく変化する部分であり、その構造は基質特異性を反映しているとされる。*F. oxysporum* のP450norはNADHのみを好む。B'-ヘリックスに存在するSer73とSer75は側鎖をカニの両ハサミのようにポケットの内側に向けている。これら二つのSer残

基をそれぞれGlyに置換した変異体 (Ser75Gly; SG mutant, およびSer73Gly/Ser75Gly; GG mutant) ではNADPHによる活性が大幅に改善された²⁸⁾。これらSer残基の側鎖はNADPの2'-リン酸基の立体障害となっており、変異体ではその障害が取り除かれたためNADPHによる活性が改善されたと解釈される。とくにSer75Gly変異の効果が大きかった。NADPHを好むP450norはこの部位が、-S-G-, であり、NADHのみを好むものは、-S-S-または-N-G-, であった。NADHとNADPHに対する特異性が僅か1カ所ないし2カ所のアミノ酸で決定されていた。ここでもB'-ヘリックスの基質特異性決定における重要性が示された。

・プロトン搬送系：NO-結合型の結晶構造から、Ser286, Asp393, および水数分子からなる水素結合ネットワークの存在が明らかとなった²⁵⁾ (図4c)。このネットワークはNADH結合によりリアレンジを受けるが、還元過程でのプロトン供給 (図1A) を担っている。

・保存Thr残基：最長のヘリックスI-ヘリックスの中程に、すべてのP450で高度に保存されたThr残基が存在する。このThr残基はモノオキシゲナーゼP450において隣接のAsp残基と共同して酸素分子 (O₂) を活性化すると考えられている。P450norにもこのThr残基は保存されているが、隣接のAspはAlaに置き換わっている。このThr243を他のアミノ酸に置換すると活性が著しく損なわれることからその重要性が示唆されていたが²⁹⁾、モノオキシゲナーゼP450とは機能の異なることは明らかである。その役割は長い間不明であったが、NADアナログ結合型の構造が解かれて判明した²⁶⁾ (後述)。

・アニオンホール：ハロゲンイオンはP450nor反応を阻害し、その機構はNADHに拮抗的である。ブロムイオン (Br⁻) 結合部位が2カ所見つかっている²⁷⁾。その一つはヘム近傍にあり、Ser286, Ala289, Asn315などの側鎖で囲まれ、また主鎖がヘムから遠ざかるように湾曲しているためスペースができています。Ser286は上記プロトン搬送系にあつてヘムに最近接の位置にあり、中間体I形成に重要な働きをしている。Asn315の側鎖はSer286の主鎖カルボニルと水素結合し、Ser286側鎖の向きを支えている。Asn315Asp変異体はI形成過程が著しく損なわれることから、アニオンホールはNADHからの電子伝達に重要な役割を果たしていると思われる。

5. ニコチン酸アデニンジヌクレオチド (NAAD) との複合体

・NAAD結合による構造変化：P450norにNADH結合部位の存在することは、いくつかのNADアナログとの相互作用により示唆されていた。すなわちNAD⁺などのアナログはリガンド結合で誘起される特徴的なスペクトル変化 (タイプIあるいはリパースタイプI) を引き起こし、そこ

から K_d も測定されていた。上記 GG mutant はこれら NAD アナログとの結合力も高めていたが、この変異体を用いて NAD アナログである NAAD との複合体の結晶化に成功した²⁶⁾。

GG mutant のリガンドフリーの休止型の結晶構造は、野生型でこれまで決定された構造（休止型、CO 型、NO 結合型）と大差なかった。一方、NAAD 結合型では低分子リガンド（CO、NO）の結合では見られない大きな構造変化が誘起されていた。ヘム遠位ポケット入口を形成する F/G-ヘリックスと B'-ヘリックスは入口を塞ぐように互いに接近し、NAAD 分子を包み込んでいた（図 3a）。誘導適合のよい例である。一方ヘム近位側には顕著な変化は見られなかった。

・ヘム遠位ポケット B'-ヘリックス側荷電アミノ酸残基の集団移動：P450nor の大きなヘム遠位ポケットは親水的であると述べたが、荷電アミノ酸の分布には際立った偏りがある。ポケット内部の B'-ヘリックス側はとくに親水性が高く、Lys62, Arg64, Glu71, Asp88, Lys291, Arg292 など荷電アミノ酸が多く存在する。一方 F-および G-ヘリックス側はより疎水的で、荷電アミノ酸は Arg174 のみである（図 3b, 図 4a）。これら B'-ヘリックス側アミノ酸残基のほとんどが NAAD 結合により集団で大きく移動していた。これとは対照的に Arg174 は興味深い動きをする。F/G-ヘリックス側も NAAD 結合により全体に大きく動き、Arg174 の主鎖部分も同様であるが、その側鎖先端はほとんど動かない。Arg174 は反対側に位置する Arg64 とともに NAAD 分子のピロリン酸部分を両側から押さえ込んでいる。Arg64 には補助者（Lys291）がいるが、Arg174 は F/G-ヘリックスサイドで孤高の正荷電アミノ酸である。この Arg174 は NADH の結合にもっとも重要で、NADH 結合のランドマークとなっていると思われる。

・塩橋ネットワーク：遠位ポケット中の荷電アミノ酸のうち Glu71, Arg64, Asp88 は休止型において塩橋ネットワークを形成している。NAAD 結合に伴う上記荷電アミノ酸残基集団移動において Asp88 だけが動きが少なく、置いてけぼりをくう。その結果 Arg64-Asp88 間の塩橋が切れる（図 3b）。Asp88Ala あるいは Asp88Val 変異体では overall 活性はかなり落ちるが、還元（中間体 I 形成）速度は変わらない、あるいはむしろ促進されたりする²¹⁾。このことはこれら Asp88 変異体では I 形成以降のステップが阻害されていることを意味する。具体的には電子を渡した後の NAD (NAD⁺) の遊離が阻害されたと考えている (NAD⁺ に対する親和性の増加)。

これらの結果から塩橋ネットワーク Glu71-Arg64-Asp88 の意義は以下のように解釈できる。ネットワーク形成はタンパク質構造の安定化に寄与しているが、NADH 結合により塩橋の一部が切断され、その分タンパク質構造が不安

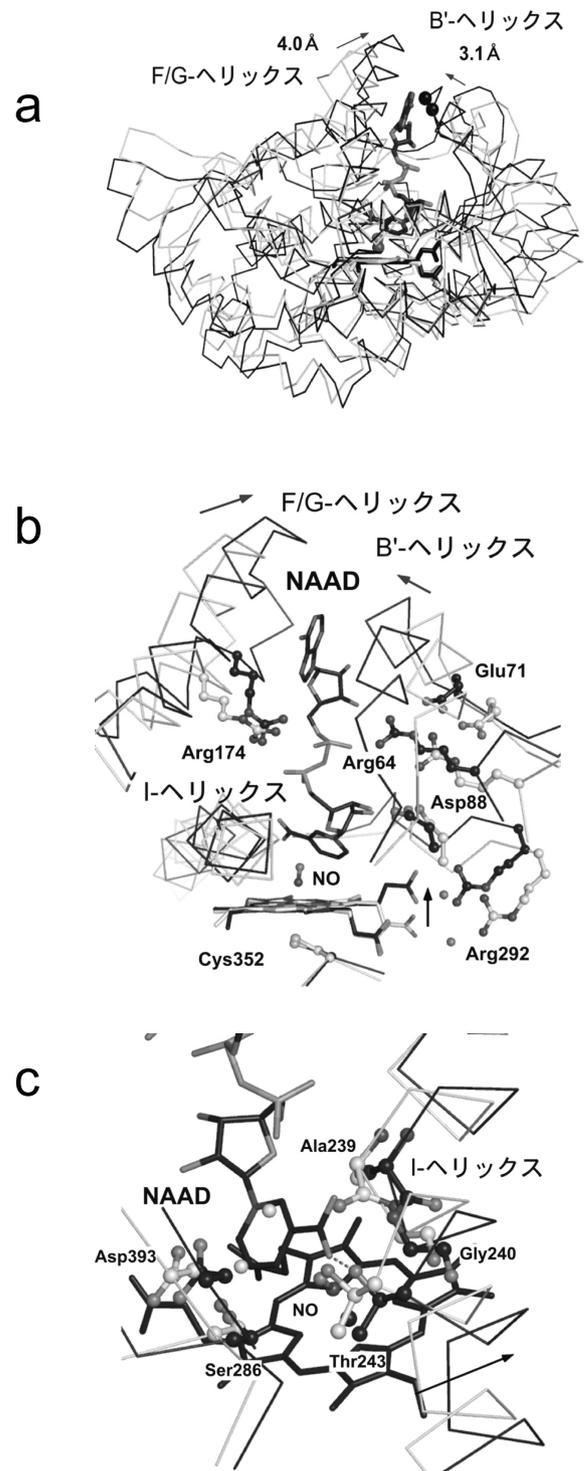


図 3 NAAD 複合体(濃灰色)と NO 型(淡灰色)との重ねあわせ (a) 全体構造、B'-ヘリックス側の 2 個の黒玉は GG 変異体変異部位 (S73, S75) を示す；(b)、ヘム遠位ポケット。塩橋ネットワーク (Glu71-Arg64-Asp88)、NADH の結合に最重要な Arg174、ヘムのタンパク質への結合に重要な Arg292、片足 (プロピオン酸基) を上げたヘム、など。一番下にヘムと第 5 配位子 Cys352、第 6 配位子 NO が見える；(c)、ヘム近傍：NAAD (左上から) のニコチン酸環 C4 炭素 (環の先端) はプロ R 面をヘム鉄-NO の方へ向けている。複合体形成に伴い I-ヘリックスはヘムからやや遠ざかり、Ala239 は主鎖をフリップさせている。Thr243 はニコチン酸側鎖カルボキシレート酸素の一つと水素結合している (点線)。

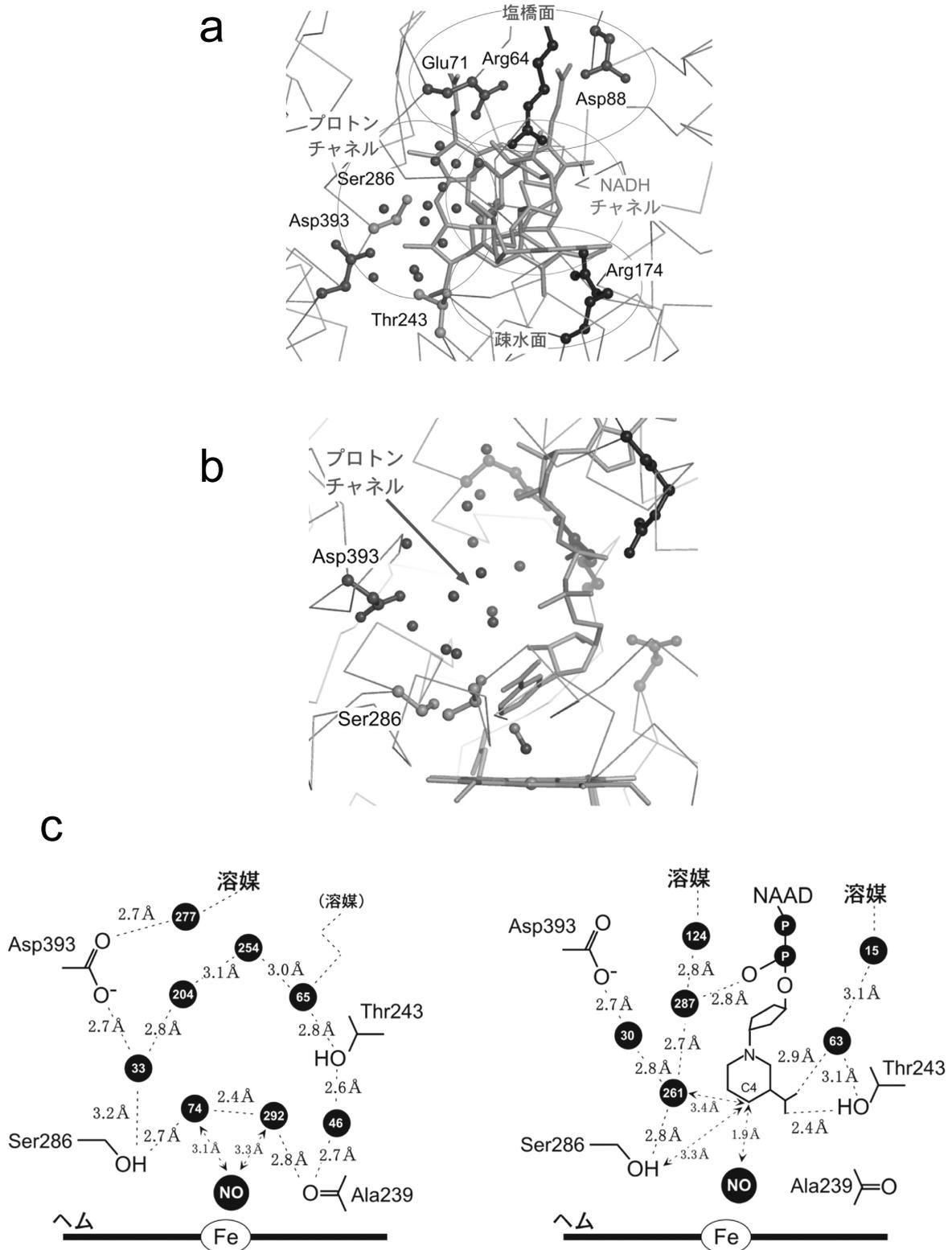


図4 (a), ヘムポケット上方から見たNADHチャンネルとプロトンチャンネル (Ser286, Asp393, および水数分子) ; (b), 横から見た図;ヘム-NOにNAADのニコチン酸環が最接近している; (c), NAAD結合による水素結合ネットワークのリアレンジ;左, NO型;右, NAAD結合型. NAAD結合により水素結合ネットワークは大幅に組替えが起こり, 最短距離で溶媒にまで伸びている. NAADもその幹線形成に関わっている. Ala239の反転も組替えに一役買っている.

定化する。安定な構造（塩橋ネットワーク形成）に戻ろうとする力はI形成後のNAD⁺を早く追出そうとする（NAD⁺に対する低い親和性）。Asp88変異体ではこのような力が失われ、NAD⁺の解離速度（ k_{off} ）が減少し、NAD⁺に対する結合力が増す（ $K_d = k_{off}/k_{on}$ の減少）。この仮定は、P450nor反応の速度論的性質と一致する。すなわちP450norは基質（NO, NADH）に対する親和性を下げ（犠牲にして）超高速を実現している。

・活性中心：NADHニコチンアミド環のアナログであるNAADのニコチン酸環はC4のプロR側をヘム鉄-NO複合体の方へ向けていた（図3c）。すなわち上記、NADHのC4水素の同位体効果の結果とよく一致する。この結果はNADHからのH⁺トランスファーを支持する有力な成果となった。上述のように、I-ヘリックスに存在する高度に保存されたThr残基（Thr243）の役割は不明であったが、結晶構造ではThr243はニコチン酸環の側鎖と水素結合し、環を固定するために重要であることが判明した（図3c）。Ser286, Asp393を含むプロトン搬送系はNAAD結合により再アレンジされ、溶媒からヘム近傍までの水素結合ネットワークが最短距離をとるように変わっていた（図4b, c）。ここで注目すべきは、NAAD分子自身がネットワーク形成に関与していることである。このことは、プロトン搬送系によるプロトン供給がNADH（あるいはNAD⁺）の結合している間に行われることを意味している。すなわち2個目のプロトンも1個目（実際はH⁺として供給されるが）と同様に、還元過程（図1Aステップ②）において供給されることが支持される。

アニオンホールを挟んでSer286の反対側にはヘムの二つあるプロピオン酸基の片方が足を伸ばしている。この側鎖はArg292（すべてのP450で保存されている）と相互作用しているが、NAAD結合でArg292が集団移動することに伴い上方（近位側とは逆向き）へ移動していた。すなわちヘムは片足を上へもち上げた格好になっている（図3a, b）。その結果NAADニコチン酸環の回転（動き）は制約を受ける。以上の結果から、Thr243とヘムの一方のプロピオン酸基がNADHのニコチンアミド環を固定し、C4炭素のプロR面をヘム鉄-NO複合体の方向に向け、プロキラル特異性を生じしめている、と結論される。

以上のP450nor-NADHアナログ複合体の結果は、NADHからヘムへの直接の電子伝達という異例の形態が、H⁺を介して行われることを強く支持する。また当初、化学反応的ではないか、と疑われたP450norの高速反応も、ちゃんとした酵素反応であることが最終的に証明された。

6. おわりに

初めは疑われることも多かったP450nor反応であるが、NADアナログとの複合体のX線結晶構造解析に成功した

おかげで、研究のひとまずの区切りができた。機能や分子の多様性（diversity）の面で、P450は免疫抗体を除く生体タンパク質の中でチャンピオンであろう。P450norの機能は分岐多様化したP450の中でも極端な例の一つである。P450分子の柔軟性、適応性の高さに驚かされる。P450norのようなものは意図して発見できるものではない。それとの遭遇は典型的なセレンディピティーである。その経緯は他で述べた³⁰⁾。ご参考になれば幸いです。

以上の結果は筑波大学、理化学研究所、コンスタンツ大学などとの共同研究の成果であり、ともに携わった多くの研究者・学生の方々に深謝申し上げる。

文 献

- 1) P450の分子生物学（2003）（大村、石村、藤井編）、講談社サイエンティフィク、東京。
- 2) Nakahara, K., Tanimoto, T., Hatano, K., Usuda, K., & Shoun, H. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 8350–8355.
- 3) Zumft, W.G. (1997) *Mol. Biol. Rev.*, **61**, 533–616.
- 4) Shoun, H. & Tanimoto, T. (1991) *J. Biol. Chem.*, **266**, 11078–11082.
- 5) Laughlin, R.J. & Stevens, R.J. (2002) *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **66**, 1540–1548.
- 6) Kizawa, H., Tomura, D., Oda, M., Fukamizu, A., Hoshino, T., Gotoh, O., Yasui, T., & Shoun, H. (1991) *J. Biol. Chem.*, **266**, 10632–10637.
- 7) Nakahara, K. & Shoun, H. (1996) *J. Biochem.*, **120**, 1082–1087.
- 8) Takaya, N., Suzuki, S., Kuwazaki, S., Shoun, H., Maruo, F., Yamaguchi, M., & Takeo, K. (1999) *Arch. Biochem. Biophys.*, **372**, 340–346.
- 9) Usuda, K., Toritsuka, N., Matsuo, N., Kim, D.-H., & Shoun, H. (1995) *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 883–889.
- 10) Kudo, T., Tomura, D., Liu, D., Dai, X., & Shoun, H. (1996) *Biochimie*, **78**, 792–799.
- 11) Zhang, L., Takaya, N., Kitazume, T., Kondo, T., & Shoun, H. (2001) *Eur. J. Biochem.*, **268**, 3198–3204.
- 12) Takaya, N. & Shoun, H. (2000) *Mol. Gen. Genet.*, **263**, 342–348.
- 13) Takaya, N., Uchimura, H., Lai, Y., & Shoun, H. (2002) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**, 1039–1045.
- 14) Kobayashi, M., Matsuo, Y., Takimoto, A., Suzuki, S., Maruo, F., & Shoun, H. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 16263–16267.
- 15) Uchimura, H., Enjoji, H., Seki, T., Taguchi, A., Takaya, N., & Shoun, H. (2002) *J. Biochem.*, **131**, 579–586.
- 16) Kobayashi, M. & Shoun, H. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 4146–4151.
- 17) Takaya, N., Kuwazaki, S., Adachi, Y., Suzuki, S., Kikuchi, T., Nakamura, H., Shiro, Y., & Shoun, H. (2003) *J. Biochem.*, **133**, 461–465.
- 18) Daiber, A., Shoun, H., & Ullrich, V. (2008) in *The Smallest Biomolecules: Diatomics and their Interactions with Heme Proteins* (Ghosh, A. ed.), pp. 354–377, Elsevier.
- 19) Su, F., Takaya, N., & Shoun, H. (2004) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**, 473–475.
- 20) Shiro, Y., Fujii, M., Iizuka, T., Adachi, S., Tsukamoto, K., Nakahara, K., & Shoun, H. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 1617–

- 1623.
- 21) Umemura, M., Su, F., Takaya, N., Shiro, Y., & Shoun, H. (2004) *Eur. J. Biochem.*, **271**, 2887–2894.
 - 22) Daiber, A., Nauser, T., Takaya, N., Kudo, T., Weber, P., Hultschig, C., Shoun, H., & Ullrich, V. (2002) *J. Inorg. Biochem.*, **88**, 343–352.
 - 23) Lehnert, N., Praneeth, V.K.K., & Paulat, F. (2006) *J. Comput. Chem.*, **27**, 1338–1351.
 - 24) Park, S.-Y., Shimizu, H., Adachi, S., Nakagawa, A., Tanaka, I., Nakahara, K., Shoun, H., Obayashi, E., Nakamura, H., Iizuka, T., & Shiro, Y. (1997) *Nat. Struct. Biol.*, **4**, 827–832.
 - 25) Shimizu, H., Obayashi, E., Gomi, Y., Arakawa, H., Park, S.-Y., Nakamura, H., Adachi, S., Shoun, H., & Shiro, Y. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 4816–4826.
 - 26) Oshima, R., Fushinobu, S., Su, F., Zhang, L., Takaya, N., & Shoun, H. (2004) *J. Mol. Biol.*, **342**, 207–217.
 - 27) Kudo, T., Takaya, N., Park, S.-Y., Shiro, Y., & Shoun, H. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 5020–5026.
 - 28) Zhang, L., Kudo, T., Takaya, N., & Shoun, H. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 33842–33847.
 - 29) Okamoto, N., Imai, Y., Shoun, H., & Shiro, Y. (1998) *Biochemistry*, **37**, 8839–8847.
 - 30) 祥雲弘文 (2004) 日本農芸化学会誌, **78**, 724–729.
-