

26R-am09S

新規 P450 基質スクリーニング法を用いた P450BM3 変異体の基質特異性解析

○川又 綾乃¹, 鈴木 花奈¹, 高橋 裕介¹, 守谷 崇¹, 岩淵 好治¹, 叶 直樹¹ (東北大学院)

【背景・目的】シトクロム P450 は基質小分子に酸素原子を添加する酸化酵素である。基質や基質特異性が明らかになっていない P450 は数多く存在するため、迅速かつ網羅的な基質スクリーニング法が求められている。当研究室では P450 の酸化反応に伴い生じる NAD(P)⁺を 2-アセチルベンゾフランを用いて高感度に検出する方法 (2-ABF 法) を開発している (Moriya, T. *et al. Chem. Commun.* **2013**, 49, 11500)。これまでに本手法を組み込んだ P450 基質スクリーニング法を構築し、昨年度本大会にて報告した (日本薬学会第 136 年会 28S-pm07S)。今回、上記の P450 基質スクリーニング法を P450BM3 変異体の基質特異性解析に応用し、アミノ酸変異が基質特異性に及ぼす影響を評価した。

【方法・結果】研究室所蔵の合成化合物ライブラリーを用いて、M. T. Reetz らが開発した P450BM3 変異体の基質特異性を評価した。この変異体は脂肪酸酸化酵素である P450BM3 に 2 つのアミノ酸変異 (F87A/A330W) を導入することで testosterone の位置および立体選択的な酸化能を獲得した酵素である (Reetz, M. T. *et al. Nat. Chem.* **2011**, 3, 738)。これらの酵素に対し、2-ABF 法による 1 次スクリーニング、偽陽性化合物の除去を目的とする 2 次スクリーニング、P450 と基質の結合を検出する 3 次スクリーニング、および酸化成績体を検出する 4 次スクリーニングを行った。その結果天然型 P450BM3 では 4 種、F87A 変異体では 15 種、F87A/A330W では 4 種の化合物が基質として酸化された。これらの天然型酵素および変異体の基質に重複が少なかったことからアミノ酸変異を 1 つ導入するごとに基質特異性が劇的に変化したことがわかった。