

26PB-am006

ステロール 14-脱メチル化酵素の真菌特有領域の機能に関する解析

三木 正史¹, 柳澤 有記¹, 吉田 雄三³, ○青山 由利^{2,1} (¹創価大院工学, ²創価大理工,
³武庫川女大薬)

ステロール 14-脱メチル化酵素(CYP51)は、ステロールを合成する真核生物すべてに存在する P450(CYP)分子種であり、生物界を通して機能が保存された CYP である。CYP51 は 500~600 のアミノ酸残基で構成されているが、生物界ごとの一次構造の相同性は 30-40%と低い。これらの CYP51 をアライメントすると、保存された基質結合領域および CYP51 ごとでアミノ酸残基数と配列が異なる N 末側膜結合領域が見られるが、それ以外に真菌類 CYP51 には他にない長めのアミノ酸配列が存在した。今回この領域の役割に着目し、この領域を欠失させて解析を行った。

酵母 CYP51 の 437-452 番目のアミノ酸残基を欠失させた *CYP51* 遺伝子を pCWori+ベクターに導入し、大腸菌発現ベクターを構築した。大腸菌膜画分に発現させた欠失酵母 CYP51 は、野生型酵母 CYP51 と同様、可溶化後 EAH-Sepharose 4B および Bio-Gel HT カラムクロマトグラフィーで精製した。

欠失酵母 CYP51 の精製では、EAH-Sepharose 4B での溶出が 2 つに分かれ、野生型と同じ位置に溶出した標品は還元型 C₀ 結合物の差スペクトルで急速に変性物 420nm への変換を示したが、カラムから遅れて溶出した標品は安定していた。安定したスペクトルを有する欠失酵母 CYP51 の精製標品を用いて、酵母 P450 還元酵素との再構成でラノステロール 14-脱メチル化活性を測定したところ、野生型に比べ活性は 15%まで低下していた。欠失させた領域は、最近明らかになった X 線結晶構造によると還元酵素からの電子伝達で影響を受ける可能性が推定され、酵母 CYP51 のこの周辺の構造は欠失させると動物 CYP51 と類似した。そこでラット P450 還元酵素との再構成で活性測定を行ったところ、欠失酵母 CYP51 の活性は野生型に比べ 32%となり、酵母の還元酵素を用いた場合より活性の低下が少なく興味深かった。