
トピックス

胆汁酸合成の律速酵素 CYP7A1 の構造生物学的知見**Structural insight into CYP7A1, the rate-limiting enzyme for bile acid biosynthesis**

胆汁は、肝実質細胞で生成され、胆嚢で濃縮されて十二指腸内腔へ放出される¹⁾。胆汁の主成分である胆汁酸は、コレステロールの7 α -水酸化から始まる数段階の反応を経て生合成される。この反応を触媒する酵素は、cytochrome P450 family 7 subfamily A member 1 (CYP7A1)であり、胆汁酸合成の律速酵素でもある²⁾。肝実質細胞で生成された胆汁酸は一次胆汁酸と呼ばれ、一次胆汁酸が腸内細菌で分解されたものは二次胆汁酸と呼ばれる。これらの胆汁酸は、FXR³⁾やVDR⁴⁾をはじめとした核内受容体のリガンドとなり、胆汁酸トランスポーターなどの遺伝子発現を制御していることが知られている。十二指腸に放出された胆汁酸の90%以上は回腸で吸収され、門脈を経て肝臓に戻り、肝実質細胞に取り込まれる(腸肝循環)⁵⁾。腸肝循環に乗らなかった胆汁酸は、糞便として体外に排泄され、失われた分の胆汁酸が、肝実質細胞で新たに合成される。

CYP7A1が属するP450遺伝子スーパーファミリーは、原核生物から真核生物まで広く存在する⁶⁾。真核生物のP450は膜タンパク質であり、小胞体膜に局在するものと、ミトコンドリア内膜に局在するものが存在する⁷⁾。一方、原核生物のP450は可溶性タンパク質である。P450の立体構造は、1985年に原核生物型がまず報告され⁸⁾⁹⁾、引き続いて2000年に小胞体に局在するマイクロソーム型¹⁰⁾、さらに2010年にミトコンドリア型¹¹⁾が報告された。CYP7A1はマイクロソーム型のP450であり、その立体構造は2014年に報告された¹²⁾。これらのP450は、類似した基本構造を持つが、そこに個々の酵素に固有の構造的特徴が加わることで、多様な基質特異性を獲得したと考えられる。本稿では、CYP7A1の基質特異性を規定する構造的特徴を中心に紹介する。

CYP7A1の立体構造(図1A)は、CYP8A1の立体構造¹³⁾と類似していた。P450の基質は一般に、B'ヘリックスとF/Gループ(FヘリックスとGヘリックスをつなぐループ)を通り抜けて酵素内部に入り込み、基質結合部位に結合すると推定されている¹⁴⁾。CYP7A1で

は、B'ヘリックスがヘムに対して垂直に位置しており、B'ヘリックスとF/Gループ部分は閉じていた。CYP7A1とコレステロールの共結晶は得られなかったが、B'ヘリックスを構成する104番目のスレオニン残基を疎水性のアミノ酸であるロイシン残基に置換したところ(T104L)、基質cholest-4-en-3-one(図2)との共結晶が得られた(図1B)。基質cholest-4-en-3-oneは、ステロイド核の α 側をヘムに向け、ヘムと平行に向き合い、ヘムのピロール環ではなく、プロピオン酸側鎖の上方に位置していた。Iヘリックスを構成する284番目のトリプトファン残基(W284)と289番目のアスパラギン残基(N289)が活性部位に向かって突き出していることで、基質cholest-4-en-3-oneは、B'ヘリックス側に押し付けられていた。この結果、ステロイドB環C7位の炭素原子は、ヘムの鉄イオンから5Åの距離に位置していた。多くのP450では、Iヘリックスの中央部に保存されたスレオニン残基が存在し¹⁴⁾、(A/G)GxxTモチーフを形成しているが、CYP7A1では、このスレオニン残基がアスパラギン残基N289に置換しているため、(A/G)GxxTモチーフではなく、LWxxxxNTというCYP7ファミリーに特有のモチーフを形成していることが判明した。基質cholest-4-en-3-oneのケト基の酸素原子は、360番目のセリン(S360)、361番目のロイシン、485番目のグリシン(G485)などの近傍に位置していた。T104L変異が存在するB'ヘリックス周辺の構造は、3DAXと比べてあまり変化しておらず、A'ヘリックス周辺の構造が大きく変化していた。その結果、基質の進入経路は開いていた(図1B)。

CYP7A1特異的阻害剤である7-ケトコレステロールと、CYP7A1 T104L変異体の複合体の結晶構造も得られた。タンパク質部分は、リガンドが結合していない野生型CYP7A1と類似した構造を示し、基質の侵入経路も閉じていた。阻害剤7-ケトコレステロールは、基質cholest-4-en-3-oneとほとんど同じ位置を占めていた。7-ケトコレステロールの3 β -ヒドロキシ基は、G485のペプチド結合部分のカルボニル基、およびS360のヒ

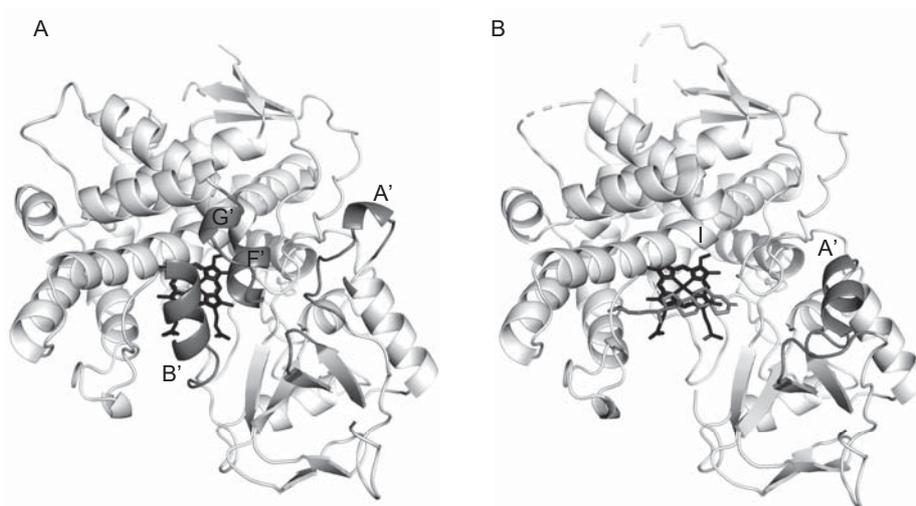


図1 ヒト CYP7A1 の立体構造

(A) 野生型ヒト CYP7A1 の立体構造 (PDB ID : 3DAX) を PyMOL で示した. タンパク質の主鎖を cartoon 表示で白く, ヘムを sticks 表示で黒く示した. また, 基質の基質結合部位への進入に関与すると考えられる領域を灰色で示し, α ヘリックスの名前を付した. F/G ループ領域には, F' ヘリックスと G' ヘリックスが存在する. (B) 基質 cholest-4-en-3-one 結合ヒト CYP7A1 T104L 変異体の立体構造 (PDB ID : 3SN5) を同様に示した. 基質結合部位を見やすくするため, B' ヘリックスと F/G ループを消去したが, この部分は 3DAX と比較して大きな構造変化はなく, A' ヘリックス周辺の構造が大きく変化していた. 基質 cholest-4-en-3-one を灰色の sticks 表示で示した.

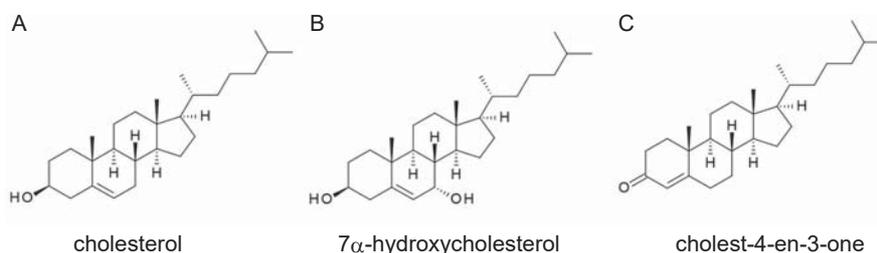


図2 CYP7A1 関連化合物

コレステロール (A), 7 α -ヒドロキシコレステロール (B), cholest-4-en-3-one (C) の構造を Symyx Draw で描画した.

ドロキシ基と水素結合を形成していた.

以上, CYP7A1 の基質認識の構造生物学的基盤について概説した. ほかの P450 との構造比較, また, ヒト以外の種由来の CYP7A1 の構造を明らかにしていくことで, CYP7A1 の基質認識機構や触媒機構の理解が深まっていくと期待される.

Key words :cytochrome P450, CYP7A1, cholesterol, bile acid, crystal structure, enterohepatic circulation

Department of Laboratory Medicine, The Jikei University
School of Medicine 3-25-8, Nishi-Shimbashi, Minato-ku,
Tokyo, 105-8461, Japan

Yoshihiro Mezaki

東京慈恵会医科大学臨床検査医学講座
目崎 喜弘

利益相反自己申告：申告すべきものなし

(2022.9.12 受付)

文 献

- 1) Ross MH, Pawlina W (2016) *Histology: a text and atlas with correlated cell and molecular biology*, 7th ed. Wolters Kluwer, Philadelphia, PA, USA
- 2) Chiang JYL, Ferrell JM (2020) Up to date on cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) in bile acid synthesis. *Liver Res* **4**, 47–63
- 3) Makishima M, Okamoto AY, Repa JJ, Tu H, Learned RM, Luk A, Hull MV, Lustig KD, Mangelsdorf DJ, Shan B (1999) Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science* **284**, 1362–1365
- 4) Makishima M, Lu TT, Xie W, Whitfield GK, Domoto H, Evans RM, Haussler MR, Mangelsdorf DJ (2002) Vitamin D receptor as an intestinal bile acid sensor. *Science* **296**, 1313–1316
- 5) 泉井亮, 妹尾春樹, 金田研司 (2012) カラー図解 人体の正常構造と機能 第4巻 肝・胆・膵 改訂第2版. 日本医事新報社, 東京
- 6) Omura T (2010) Structural diversity of cytochrome P450 enzyme system. *J Biochem* **147**, 297–306
- 7) 榊利之 (2019) ビタミンD代謝酵素の構造と機能に関する研究. *ビタミン* **93**, 469–477
- 8) Poulos TL, Finzel BC, Gunsalus IC, Wagner GC, Kraut J (1985) The 2.6-Å crystal structure of *Pseudomonas putida* cytochrome P-450. *J Biol Chem* **260**, 16122–16130
- 9) Graham-Lorence S, Peterson JA (1996) P450s: structural similarities and functional differences. *FASEB J* **10**, 206–214
- 10) Williams PA, Cosme J, Sridhar V, Johnson EF, McRee DE (2000) Mammalian microsomal cytochrome P450 monooxygenase: structural adaptations for membrane binding and functional diversity. *Mol Cell* **5**, 121–131
- 11) Annalora AJ, Goodin DB, Hong WX, Zhang Q, Johnson EF, Stout CD (2010) Crystal structure of CYP24A1, a mitochondrial cytochrome P450 involved in vitamin D metabolism. *J Mol Biol* **396**, 441–451
- 12) Tempel W, Grabovec I, MacKenzie F, Dichenko YV, Usanov SA, Gilep AA, Park HW, Strushkevich N (2014) Structural characterization of human cholesterol 7 α -hydroxylase. *J Lipid Res* **55**, 1925–1932
- 13) Chiang CW, Yeh HC, Wang LH, Chan NL (2006) Crystal structure of the human prostacyclin synthase. *J Mol Biol* **364**, 266–274
- 14) 城宜嗣, 祥雲弘文 (1998) P450 の立体構造: 普遍性と個別性. *化学と生物* **36**, 461–464