

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成 21 年度博士課程 入学
氏名 牧野 拓也
指導教員名 大西 康夫

論文題目

放線菌 *Streptomyces griseus* 由来 P450 の網羅的機能解析

シトクローム P450 モノオキシゲナーゼ (P450) は、低分子化合物の炭素原子に立体・位置選択的に水酸基を導入する反応を触媒するが、同様の反応を化学合成で行うとすると多工程が必要であり、大変困難であることが多い。そのため P450 は医薬品や化成品原料の微生物変換製造プロセスに有用な酵素として注目されている。P450 を利用した微生物変換技術の実用化には、目的の反応を触媒する P450 の探索が重要である。この際、大腸菌を宿主にした遺伝子発現系が有用であるが、異種生物由来 P450 を高い活性をもつ形で発現させる系を構築することも非常に重要である。

抗生物質をはじめとする多種多様な生理活性物質の生産菌として知られる放線菌は、他の細菌と比べて多くの P450 遺伝子を有している。本研究の対象であるストレプトマイシン生産放線菌 *Streptomyces griseus* ゲノムには 27 個の P450 遺伝子がコードされているが、これらの遺伝子産物の触媒機能は 1,4,6,7,9,12-hexahydroxy-perylene-3,10-quinone (HPQ)-melanin の生合成に関与する P450_{mel} を除き不明である。本研究の第一の目的は、*S. griseus* 由来 P450 の網羅的機能解析により、新たな基質特異性・反応特異性をもつ P450 を見出すことである。

放線菌由来の P450 が機能を発揮するためには、P450 へ電子を渡す電子伝達タンパク質 (フェレドキシン [Fdx] あるいはフラボドキシン [Fldx]) と NAD(P)H 由来の電子を電子伝達タンパク質へ渡す電子伝達タンパク質還元酵素 (フェレドキシン還元酵素 [FdR] あるいはチオレドキシン

ン還元酵素 [TdR]) が必要である。*S. griseus* のゲノムには、6 種類の電子伝達タンパク質と 5 種類の電子伝達タンパク質還元酵素がコードされている (図 1)。*S. griseus* 由来の複数の P450 に対して、電子伝達タンパク質と電子伝達タンパク質還元酵素がどのような組み合わせで利用され得るかを調べ、これらのタンパク質を用いて高い基質変換率を達成する P450 異種発現系を新たに構築することが本研究の第二の目的である。

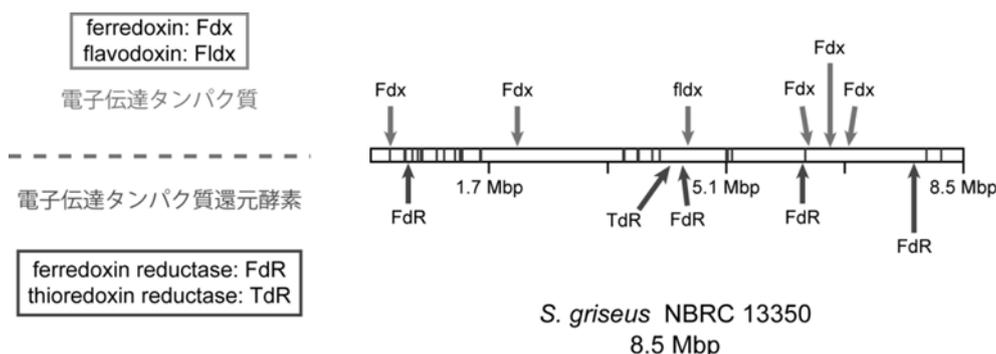


図1. *S. griseus* の P450 電子伝達システム候補遺伝子

カラムの中の線はゲノム上の P450 の位置を示している。

1. pRED システムを利用した基質スクリーニング

pRED システムは大腸菌を宿主として P450 を P450 還元酵素ドメイン (*Rhodococcus sp.* 由来) との融合タンパク質として発現させ、休止菌体を基質化合物のバイオコンバージョンに利用する系である。*S. griseus* 由来の 27 種の P450 遺伝子を pRED ベクターにクローニングし、組換え大腸菌によるバイオコンバージョン系を用いて、57 種類の基質候補化合物に対してスクリーニングを行った。その結果、3 つの P450 (CYP105D2、CYP107CA1、CYP154C3) の基質候補を見出した。

CYP154C3 は基質候補化合物のうち、testosterone、 β -estradiol、progesterone の 3 種類の steroid 化合物を変換した (変換率はそれぞれ 81.2%、4.3%、73.7%)。testosterone と progesterone の変換産物を大量調製し、NMR、高分解能 MS によって構造解析した結果、いずれも steroid 骨格 D 環の 16 α 位が立体・位置選択的に水酸化されていることが明らかになった。

CYP105D2 は非ステロイド性抗炎症薬の一種である diclofenac sodium (DFNa) を基質としてただ 1 つの変換産物を生成した (変換率 7.5%)。紫外可視光吸収スペクトルが大きく変化したことから、変換産物では共役系に水酸基が導入されていることが示唆された。基質変換効率が低いことから、pRED システムによる変換物の詳細な構造解析は行わなかったが、希少放線菌 *Nonomuraea recticatena* 由来の CYP105 (P450_{maxA}) が DFNa の 4' 位に水酸基を導入することが報告されているため、CYP105D2 による DFNa の変換も同様である可能性が高いと考えた (第 5 章でこれを確認した)。

CYP107CA1 は indole を基質として変換効率 14.3% で変換産物を生成した。紫外可視光吸収スペクトルがそれほど変化しないことから、ピロール環に水酸基が導入されていると考えられた。CYP107CA サブファミリーの触媒反応に関しては、これまで全く知見がない。

2. CYP154C3 の酵素諸性質の解析

CYP154C3 の詳細な基質特異性を解析するため、26 種類の steroid 化合物を用いた二次スクリーニングを行ったところ、17 種類の steroid に対して変換産物が検出された。特に高い変換効率 (99.9%~76.6%) を示した 6 種類の steroid に対する変換産物の構造解析を行い、全ての変換産物が steroid 骨格の D 環 16 α 位に水酸基が導入されたものであることを明らかにした。変換率が高い値 (99.9%~82.1%) を示した化合物では、D 環 17 位がカルボニル基であると同時に D 環 16 位に置換基がないという共通点が見いだされた。一方、provitamin D3、(+)-4-cholesten-3-one、cholesterol benzoate のような steroid 骨格 D 環の 17 位に C₂ 以上の置換基を有する化合物は変換されなかった。なお、構造決定した 8 種類の変換産物のうち、4 種類は化学合成困難な新規化合物であった。また、*Nocardia farcinica* 由来の CYP154 が 0.1 mM の testosterone を 50% 程度変換した例が報告されているが、CYP154C3 は 1 mM の testosterone を 80% 程度変換できたことから、本 P450 を用いた変換系は、*N. farcinica* 由来の酵素を用いた系より変換率が 10 倍以上も高く、工業生産レベルでの利用に適したものであった。

次に、CYP154C3 の酵素活性が P450 還元酵素と融合させた状態での特異な活性でないことを示すため、CYP154C3 を融合タンパク質ではなく、単独の酵素として大腸菌で生産し、精製酵素を用いて *in vitro* 基質変換試験および酵素反応速度論解析を行った。ハウレンソウ由来の P450 還元酵素を用いた *in vitro* 基質変換試験を行い、精製酵素を用いた場合も pRED システムと同様の変換産物を生産することを確認した。次に Δ^4 -androstene-3,17-dione を基質として酵素反応速度論解析を行い、 K_m 値 (10.2 μM)、 k_{cat} 値 (17.9 sec^{-1})、 k_{cat}/K_m (1.7 $\mu\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$) を算出した。CYP154C3 の k_{cat}/K_m 値を、同様にハウレンソウ由来の P450 還元酵素を用いて測定した他の *Streptomyces* 属由来 P450 のものと比較すると、*S. platensis* 由来の P450_{ref}(CYP107L) の 8.1 倍、*S. avermitilis* 由来の CYP105D7 の 175.8 倍であり、CYP154C3 の触媒活性が大変高いことが示された。

3. 宿主由来の P450 電子伝達タンパク質／電子伝達タンパク質還元酵素を用いた変換系

第三章において基質が判明した各 P450 について、*S. griseus* が保有する 6 種の電子伝達タンパク質と 5 種の電子伝達タンパク質還元酵素を全 30 通りの組み合わせで共発現させた大腸菌を作製し、バイオコンバージョン実験に供した。その結果、各 P450 に対して、図 2 に示した電子伝達タンパク質と電子伝達タンパク質還元酵素の効果的な組み合わせを確認できた。

		電子伝達タンパク質還元酵素					
		Fdx1	Fdx2	Fdx3	Fdx4	Fdx5	Fldx
電子伝達タンパク質	FdR1	CYP105D2(35.1%)		CYP154C3(88.2%)	CYP105D2(32.4%)	CYP154C3(76.1%)	CYP154C3(84.4%)
	FdR2						
	FdR3	CYP107CA1(73.9%)				CYP154C3(66.4%)	CYP154C3(71.9%)
	FdR4						
	TdR	CYP105D2(29.8%) / CYP154C3(71.3%)	CYP154C3(80.7%)	CYP154C3(79.9%)			CYP107CA1(70.9%)

図2. 宿主由来のP450電子伝達タンパク質／電子伝達タンパク質還元酵素を用いた変換系

各 P450 について、最も効果的な組み合わせを見てみると、CYP154C3 に対しては Fdx3-FdR1 (変換率 88.2%)、CYP107CA1 については Fdx1-FdR3 (変換率 73.9%) と、CYP105D2 に対しては Fdx1-FdR1 (変換率 31.5%) であり、pRED システムと比較して変換率がそれぞれ、1.07 倍、5.2 倍、4.7 倍に向上した。この結果は、放線菌由来の電子伝達タンパク質および電子伝達タンパク質還元酵素を用いる本システムの有用性を示すものである。

さらに、各 P450 に共通した 4 つの新たな知見を得た。

第 1 に CYP154C3、CYP105D2、CYP107CA1 を単独で発現させた場合においても高い基質変換率を示した (変換率はそれぞれ 62.4%、5.9%、53.0%)。過去の研究において大腸菌内在性の Fldx とフラボドキシニン還元酵素 (FldR) が P450 へ電子を供給することは知られていたが、このように高い変換率を示した事例は無かった。

第 2 に P450 と電子伝達タンパク質還元酵素のみを発現させると P450 単独で発現させた場合と比較して活性が落ちた。この結果は 2 種類の遺伝子が発現させた事による P450 の発現量の低下したことが考えられた。

第 3 に P450 と電子伝達タンパク質のみを発現させると変換率が向上する場合がある。電子伝達タンパク質を発現させることで P450 の発現量は落ちているはずだが、それにもかかわらず変換率が上昇した理由は *S. griseus* 由来の電子伝達タンパク質と P450 の相性が良いことが原因であると推測した。つまり、大腸菌由来 FldR を経由して *S. griseus* 由来の電子伝達タンパク質から P450 への電子の受け渡しが行われたことが推測された。

第 4 に P450 に加え *S. griseus* 由来の電子伝達タンパク質と電子伝達タンパク質還元酵素を発現させると、P450 の発現量は落ちているにもかかわらず基質変換率を上昇させる組合せがあった。この結果から P450 と相性の良い電子伝達タンパク質と電子伝達タンパク質に相性の良い電子伝達タンパク質還元酵素の組合せが示唆された。

4. CYP105D2 による diclofenac sodium 変換産物の構造決定

CYP105D2-Fdx1-FdR1 共発現系を用いて、培養液 1 L 当たり 25.9 mg の DFNa 変換産物を精製し、4'位が水酸化された構造であると決定した。