

真核微生物シトクロム P450 の機能ライブラリー

一瀬 博文・眞田 有規・割石 博之

九州大学大学院農学研究院 環境農学部門
サステイナブル資源科学講座 生物資源化学研究室

〒812-8581 福岡市東区箱崎 6 丁目 10-1

E-mail: ichinose@agr.kyushu-u.ac.jp

Home Page: <http://brc.wood.agr.kyushu-u.ac.jp/madlab/>

シトクロム P450 (P450) は生物界に幅広く分布するモノオキシゲナーゼであり、異物代謝や二次代謝産物の生合成など多岐に渡る生命現象を支えている。特に、真核微生物は極めて多様なシトクロム P450 分子種を有しているが、ほとんどの酵素はその機能が不明である。我々は真核微生物が持つ P450 の分子多様性に着目し、本酵素群の機能解明と高度利用を目指した研究を進めている。本研究では、麹菌 *Aspergillus oryzae*、白色腐朽担子菌 *Phanerochaete chrysosporium*、および褐色腐朽担子菌 *Postia placenta* に由来する合計 425 種の P450 をクローニングし、*Saccharomyces cerevisiae* に異種発現させて機能ライブラリーを構築した。P450 機能ライブラリーを用いることで、配列比較では困難なハイスループットな酵素機能を網羅的に探索することが可能となった。本発表では、P450 機能ライブラリーを用いた有用反応探索の例を示し、グリーンバイオプロセス構築へ向けた研究戦略について紹介する。

1. はじめに

シトクロム P450 (P450) は生物界で巨大なスーパーファミリーを構成する一原子酸素添加酵素であり、二次代謝産物の生合成や外来異物代謝など生物種に特徴的な生体反応を担っている。また、P450 が化学合成では困難な一原子酸素添加反応を行うことから、グリーンバイオプロセス構築へ向けた触媒ツールとしての有用性も高い。近年、様々な生物のゲノム情報が明らかとなり、多種多様な P450 遺伝子の存在が明らかとなった [1]。しかしながら、膨大な遺伝子配列情報と比較して酵素機能に関する知見は未だ少なく、生物機能の理解と高度利用へ向けた P450 機能の解明が求められる。

様々な真核微生物のゲノム配列が解読され、菌界における P450 分子種の多様性が明らかになった。真核微生物が複雑多岐に渡る二次代謝機構を P450 依存的に進化させたことを裏付けている。また、真核微生物は動物・植物・バクテリアと比較しても遙かに多様化した P450 分子種を有しており、グリーンプロセスの発展に繋がる有用反応の宝庫として興味を持たれる。我々は、麹菌・白色腐朽担子菌・褐色腐朽担子菌が有する P450 をゲノムワイドに探索し、酵母異種発現システムを活

用した P450 機能ライブラリーの構築を目指した [2-5]。機能ライブラリーを用いることで、配列比較では困難な P450 機能を迅速・網羅的に探索することが可能である。本研究では、機能ライブラリーを用いた網羅的機能探索の可能性を示し、グリーンバイオプロセス構築へ向けた研究戦略について紹介する。

2. 解析データおよび方法

(1) cDNA クローニングおよび異種発現

白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium*、褐色腐朽菌 *Postia placenta*、麹菌 *Aspergillus oryzae* のゲノムデータベースを精査し [2-5]、P450 保存配列を有する候補遺伝子を決定した。グルコース (1%) および酒石酸アンモニウム (1.2 mM) を生育栄養源とする人工培地で培養した菌体より total RNA を抽出し、予想配列に特異的な PCR プライマーを用いて RT-PCR により完全長 cDNA を増幅した。cDNA は酵母異種発現ベクターに連結して *Saccharomyces cerevisiae* に形質導入した。形質転換酵母を 96-well プレートで増殖させ (人工培地: 8% glucose, 2.68% yeast nitrogen base without amino acid, 160 mg/L L-histidine)、P450 機能ライブラリーを構築した。

(2) ライブラリーを用いた網羅的機能探索

5-アミノレブリン酸 (0.5 mM)、基質 (0.25 mM)、ツイーン 80 (2.0%) を加えた人工培地を 96-well プレートに分注し (0.5 mL/well)、形質転換酵母を植菌した後 2 日間振盪培養 (28°C, 1300 rpm) して変換反応を行った。所定時間培養後、菌体を含む培養液にメタノール/アセトン混合液 (1 : 1) を 0.5 mL 注加して反応を停止させた。遠心分離により細胞残渣を除去し、HPLC 分析に供して生成物の蓄積を追跡した。

3. 結果と考察

(1) cDNA 獲得と異種発現

種々の培養条件で生育させた菌体より RNA を抽出し、RT-PCR による遺伝子増幅を行った。一連の研究により、麹菌および担子菌に由来する 425 種の P450 遺伝子を完全長 cDNA として獲得することに成功した (*A. oryzae*, 121 種; *P. chrysosporium*, 120 種 ; *P. placenta*, 184 種)。

機能ライブラリーの構築を目指し、*S. cerevisiae* を用いた P450 異種発現を試みた。P450 に特徴的な一酸化炭素結合型スペクトルを解析したところ、多くの分子種が活性型酵素として高発現していることが示された。発現ベクターには P450 還元酵素も組み込まれており、酵母細胞内に P450 反応系が機能化されていると考えられた。

(2) 網羅的機能探索

P450 機能の網羅的なスクリーニングへ向け、425 種の形質導入酵母を 96 well プレートで培養して機能ライブラリーを作成した。本ライブラリーは保存・複製が容易であり、種々の化合物に対する微生物変換を迅速に追跡することが可能であった。

ゲニステインを基質として変換反応を追跡したところ、CYP57B3 を形質導入した酵母において 3 種類の生成物が蓄積した。P450 非発現酵母では基質の減少および生成物の蓄積が確認されなかったことから、本反応が CYP57B3 依存的に進行したことが示された。生成物を LC-MS 分析および NMR 分析に供することで、8 位、6 位、または 3' 位への水酸基導入が明らかになった。本結果より、CYP57B3 のゲニステイン水酸化活性が初めて示された。ゲニステインはマメ科植物に多く見いだされるイソフラボン誘導体である。イソフラボン類はエストロゲン活性・抗腫瘍活性・抗酸化活性など様々な生理活性を有しており、本研究で得られたヒドロキシゲニステインの有用活性についても興味を持たれる [6, 7]。また、ヒドロキシゲニステインは *A. oryzae* による大豆発酵過程で生成することが知られており、CYP57B3 が *in vivo* にけるゲニステイン水酸化反応に重

要な役割を果たすことも示唆された。

また、担子菌 P450 からイソフラボン誘導体・スチルベン誘導体・植物由来ジテルペンに高い活性を示す分子種が同定され、多種多様な生理活性物質の合成へ向けた有用酵素として期待された。さらに、白色腐朽菌が化学構造の大きく異なる化合物を変換可能な P450 (CYP5145A3, CYP5136A1, CYP5136A3, CYP5155A1) を有することが示された。これらの多機能性 P450 は、担子菌の優れた異物代謝能を支える鍵酵素として重要な役割を果たしていると考えられる。また、多機能性 P450 が種々の多環式芳香族化合物や環境汚染物質を変換したことから、バイオレメディエーション等への応用にも興味を持たれる。

4. 今後の展望

グリンプロセスの発展が求められる中、真核微生物の代謝多機能性に着目してバイオマス変換・バイオレメディエーション・ファインケミカル合成を目指す意義は大きい。今日では、様々な生物の遺伝子情報を手軽に知ることが可能となった。しかしながら、ゲノム配列情報だけから新規有用反応を獲得した例はバイオ関連全体を見渡しても未だない。すなわち、「膨大な配列情報を活用した迅速な機能探索」が生物機能の高度利用へ向けた鍵となる。

我々が構築した真核微生物 P450 の機能性ライブラリーを用いれば、網羅的・実験的・迅速な酵素機能探索が可能であり、バイオテクノロジーの発展に不可欠な「有用酵素の発掘」に繋がる可能性を秘めている。本ライブラリーを用いることで、様々な化合物を対象として迅速なスクリーニングを行うことが出来る。機能ライブラリーの可能性を多くの研究者に注目して頂き、活用して頂ける事を期待したい。

参考文献

- [1] <http://drnelson.uthsc.edu/CytochromeP450.html>
- [2] Hirose S, *et al.*: Biochem. Biophys. Res. Commun. 407, 118-123. (2011)
- [3] Ide M, *et al.*: Arch. Microbiol. 194, 243-253. (2012)
- [4] Nazir KHMNH *et al.*: Arch. Microbiol. 192, 395-408. (2010)
- [5] Nazir KHMNH *et al.*: Appl. Environ Microbiol., 77, 3147-3150 (2011).
- [6] Esaki H *et al.*: Biosci. Biotechnol. Biochem., 62, 740-746 (1998).
- [7] Isonishi, S. *et al.*: Oncol. Rep., 18, 195-201 (2007).