

微生物を宿主としたシトクロム P450による

微生物変換に関する研究

学位論文内容の要旨

骨粗しょう症治療薬として使用される calcitriol (CT: $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{VD}_3$) は vitamin D_3 (VD_3) を基質として *Pseudonocardia autotrophica* による微生物変換により生産されている。より高力価の CT 生産系を構築が望まれており、まず VD_3 から CT への反応を触媒する酵素遺伝子のクローニングを試みた。これまでに分子生物学的手法により本遺伝子のクローニングが試みられてきたが成功していなかった背景があり、酵素精製により *P. autotrophica* NBRC 12743 株より触媒酵素の単離を試みた。6ステップのカラムクロマトグラフィーを経て、産業上非常に重要な本酵素の精製に成功した。Vdh (vitamin D_3 hydroxylase) と名付けた本酵素は *in vitro* の反応系再構成に塩の添加を要求する。この性質を見出したことで酵素精製が可能となった。精製酵素のアミノ酸配列を元に *vdh* 遺伝子のクローニングを行い、Vdh は 403 アミノ酸からなる CYP107 ファミリーに属する P450 であることが明らかとなった。微生物由来の P450 で塩を要求するものはこれまでに報告されておらず、塩要求性は本酵素に特徴的な性質であると考えられたが、なぜ塩を要求するかその理由は不明である。Vdh は高い VD_3 25-hydroxylase 活性と $25(\text{OH})\text{VD}_3$ 1α -hydroxylase 活性を示し、 VD_3 から CT 生産に適した酵素であることが示された。 VD_3 と類似の構造を持つ VD_2 や 7-dehydrocholesterol の 25 位も水酸化する活性も示した。*vdh* 遺伝子の同定により、*Escherichia coli* や *Rhodococcus erythropolis* を宿主とした VD_3 水酸化反応系の構築が可能となった。*vdh* 遺伝子にランダム変異を導入し、*E. coli* を宿主として高活性クローンのスクリーニングを行なった。1000 クローンからのスクリーニングの結果、高活性化に寄与する 8 箇所のアミノ酸置換部位を同定した。これらの内、機能が異なると推測された 4 箇所のアミノ酸置換を多重化し、 VD_3 25-hydroxylase 活性が 21.6 倍上昇した変異体 Vdh-K1 (T70R/V156L/E216M/E384R) の作製に成功した。Vdh-K1 を用いることにより、これまで野生型 Vdh では解析できなかった VD_3 と $25(\text{OH})\text{VD}_3$ 基質結合型の結晶構造解析も成功した。

新規 *P. autotrophica* の宿主-ベクター系 (pTAOR4-Rev) を構築した。これまでに、*Pseudonocardia* 属放線菌由来のプラスミドについて報告は無かったため、我々は独自に *P. autotrophica* DSM 43082 株よりプラスミドを単離し、複製必須領域を同定した。単離したプラスミド pPA43082 は rolling-circle type の複製様式であることが示唆された。また、発現系に用いる acetone 誘導プロモーターを *P. autotrophica* NBRC 12743 株のゲノム中より同定した。複製必須領域と acetone 誘導プロモーターと共に、他の

ベクター構築に必須なエレメントを合わせて、acetone 誘導型の発現ベクターの構築 (pTAOR4-Rev) に成功した。

構築した発現ベクターを用いて Vdh と BoxA の発現試験を行った。BoxAB は compactin (CP) から pravastatin へ変換する *Streptomyces* sp. TM-7 株よりクローニングされた compactin 6 β -hydroxylase である P450 とその遺伝子の下流に存在する Fdx である。CO スペクトル解析の結果、*P. autotrophica* 中で Vdh と BoxA が活性型として発現していることが示された。また、その発現は acetone によって誘導されていることが示された。BoxAB 発現する *P. autotrophica*/pTAOR4-Rev-boxAB 株による CP から PV の微生物変換試験を行った。休止菌体反応では、acetone の誘導により PV 生成活性が 3.3 倍上昇することが示された。

バッチ培養した *P. autotrophica*/pTAOR4-Rev-boxAB 株による PV 生産試験を行なった。acetone 誘導を行なった培養液に CP を添加して変換を開始し、PV 生産に伴って減少した CP を加えながら変換を続けた。その結果、100 時間の変換試験で、14.3 g/l の PV を蓄積した。これまで放線菌を中心とする微生物で CP を基質とした PV 生産が報告されていたが、それらの変換活性と比較して顕著に高い蓄積量を示した。また、boxAB 由来株である、*Streptomyces* sp. TM-7 株 (PV 蓄積量: 4.6 g/l/160 hr) や BoxAB 発現 *E. coli* 株 (1.7 g/l/24 hr) と比較しても *P. autotrophica*/pTAOR4-Rev-boxAB 株は高い PV 蓄積量を示した。本結果より、*P. autotrophica* における新規 acetone 誘導型発現ベクターが機能的に働いていることとともに、*P. autotrophica* には P450 の触媒反応に必要な電子伝達系が細胞内に備わっており、微生物変換を志向した P450 の発現宿主として適していることが推測された。今後、Vdh-K1 発現 *P. autotrophica* での VD₃ 変換試験や *P. autotrophica*/pTAOR4-Rev-boxAB による PV 生産の実用化が望まれる。また、他の P450 の産業応用に本宿主-ベクター系が応用されることを期待する。

本研究結果から、これまで低活性のため産業への応用が限られた P450 において、有用 P450 の同定とその性質解明および高活性化、遺伝子組み換えツールを用いた高力価生産への道筋を示すことができた。

学位論文審査の要旨

主 査 客員教授 田 村 具 博
副 査 教 授 横 田 篤
副 査 客員教授 鎌 形 洋 一
副 査 客員准教授 湯 本 勳

学 位 論 文 題 名

微生物を宿主としたシトクロム P450による

微生物変換に関する研究

これまでP450の触媒反応を利用した微生物変換は、基質に対する位置・立体選択的な水酸化反応が可能であり、化学合成法に見受けられる多段階反応による低収率やコスト高という問題点を解決できる可能性がある。本研究は、放線菌を宿主としたP450による微生物変換技術において、新たな物質生産系を構築・展開する上で非常に有益である。

骨粗しょう症治療薬として使用されるcalcitriol (CT: $1\alpha, 25(\text{OH})_2 \text{VD}_3$)は、化学合成法に加えvitamin D_3 (VD_3)を基質として放線菌*Pseudonocardia autotrophica*による微生物変換により生産されている。高力価のCT生産系を構築には、反応を触媒する酵素の単離・同定が必要となるが、過去、複数の研究グループによる分子生物学的手法を用いた探索は失敗に終わっていた。そこで本研究では、生化学的手法による酵素の同定を試みた。その結果、6段階の精製ステップを経て酵素の精製に世界で初めて成功した。更に、遺伝子クローニングと共に組換えタンパク質の発現・精製にも成功し、同酵素の各種機能解析を可能とした点は高く評価される。

Vdh(vitamin D_3 hydroxylase)と名付けられた精製酵素は、403アミノ酸からなるCYP107ファミリーに属するP450で、他の微生物由来P450とは異なり酵素活性に塩を要求する特徴をもつ。この触媒活性に対する塩要求性の機構は不明だが、この性質がこれまで同酵素の同定を困難にしていた可能性について考察している。Vdhは高い VD_3 25-hydroxylase活性と25(OH) VD_3 1α -hydroxylase活性を示し、その酵素学的解析から VD_3 からCT生産に適した酵素であることを示した。また、 VD_3 と類似の構造を持つ VD_2 や7-dehydrocholesterolの25位を水酸化する能力を示すことも見出した。

vdh 遺伝子発現系を導入した組換え大腸菌による VD_3 水酸化反応系を用いて、*vdh* 遺伝子にランダム変異を導入したライブラリーから、高活性変異体のスクリーニングを行なった。変異体1000クローンを解析した結果、高活性化に寄与する8箇所のアミノ酸置換部位を同定した。更に、これらの内、機能が異なると推測された4箇所のアミノ酸置換を多重化し、 VD_3 25-hydroxylase活性が21.6倍上昇した変異体Vdh-K1 (T70R/V156L/E216M/E384R)の作製に成功した。進化工学的手法による、酵素の高活性化は、他のP450分子にも応用が可能であり解析手法と共に得られた成果は評価に値す

る。また、Vdh-K1 の取得により、これまで野生型Vdhでは解析できなかったVD₃と25(OH)VD₃基質結合型の結晶構造解析も成功しており、VD₃水酸化における原子レベルでの反応機構の解析を可能にした。

Vdhの機能解析・改変に加えて、同遺伝子を利用した微生物変換への高度利用を目指し、*P. autotrophica*用の新規発現ベクター (pTAOR4-Rev) 構築に関する研究を展開した。過去、*Pseudonocardia*属放線菌に対する発現ベクターの報告は無かったため、*P. autotrophica* 25株から内在性プラスミドを探索し、DSM 43082株より内在性プラスミドpPA43082を単離した。次に、発現ベクターに導入するプロモーターを取得するため、アセトン添加により誘導されるタンパク質を同定し、同タンパク質をコードする遺伝子クローニングを行った。同遺伝子上流領域とともに複製必須領域などベクター構築に必要なDNA断片を組み合わせ、新規アセトン誘導型発現ベクター (pTAOR4-Rev) の構築に成功している。

この構築した発現ベクターにVdhとBoxAをコードする遺伝子を導入し、それらタンパク質の発現株による検討が行われた。BoxAB はcompactin (CP)から抗高脂血症薬として知られるpravastatin (PV)へ変換する*Streptomyces* sp. TM-7 株よりクローニングされたP450(compactin 6β-hydroxylase) (BoxA)とその遺伝子の下流に存在するフェレドキシシン(BoxB)である。*P. autotrophica* 中で発現した各P450 (VdhとBoxA)は、活性型酵素として存在していることをCOスペクトル解析より示した。また、その発現は予想通りアセトンにより誘導されることを確認した。BoxABを発現する*P. autotrophica*株によるCP からPVの微生物変換試験を行うと、休止菌体反応では、アセトンによる発現誘導によってPV生成活性が3.3倍上昇することを見出した。

更に、バッチ培養した上記*P. autotrophica*によるPV生産試験を行なった結果、100時間の変換試験で、14.3g/LのPV蓄積を確認した。これまで微生物によるCPを基質としたPV生産が報告されていたが、それらと比較して顕著に高い蓄積量を達成した。また、boxAB由来株である、*Streptomyces* sp. TM-7 株 (PV蓄積量: 4.6 g/L/160 hr)やBoxAB発現*E. coli*株 (1.7 g/L/24 hr)と比較しても高いPV蓄積量を示した。このことから、新規アセトン誘導型発現ベクターが*P. autotrophica*内で機能的に働いていることを示すと共に、P450を介した微生物変換に対する同菌の有用性について議論している。

このように、放線菌*Pseudonocardia autotrophica*の内在性P450VdhによるVD₃変換に関する基礎的研究並びに応用研究、ならびに同放線菌に対する発現ベクターの開発とBoxA発現によるPV生産に関する応用研究は、同菌を利用した微生物変換技術の基礎と応用技術を検討・確立する上で非常に有用であり、更なる応用展開が期待できることから高く評価される。

よって、審査員一同は、藤井良和が博士(農学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。