

Enzyme engineering of fungal cytochrome P450 monooxygenases for biotechnological applications

畠山, 真由美

<https://doi.org/10.15017/1866352>

出版情報 : 九州大学, 2017, 博士 (農学), 課程博士
バージョン :
権利関係 :

氏 名 : 畠山 真由美

論文題名 : Enzyme engineering of fungal cytochrome P450 monooxygenases for
biotechnological applications
(真核微生物シトクロム P450 の高度利用に向けた酵素工学的研究)

区 分 : 甲

論 文 内 容 の 要 旨

持続可能で低環境負荷なモノづくりの実現に向け、酵素触媒を利用した物質生産技術の構築が求められている。シトクロム P450 モノオキシゲナーゼ (P450) は、有機合成反応では難しい位置・立体特異的な酸素添加反応を可能にすることから、医薬品やファインケミカル合成などへの応用が期待される。しかしながら、異種発現技術の改良や酵素活性の向上など実用的な利用に向けた課題も多い。本研究では、白色腐朽担子菌から見出された多機能性 P450 (CYP5136A1, CYP5136A3) の高度利用を志向し、大腸菌を利用した異種高発現技術を開発するとともに、当該酵素のユニークな触媒特性を反応動力学的に解明した。さらに、麴菌由来の CYP57B3 に遺伝子工学的改変を加えて有用フラボノイドの高効率産生を可能にした。

はじめに、CYP5136A1 と CYP5136A3 のタンパク質 N 末端側に存在する膜結合性配列を改変した種々のキメラ型 P450 を作出して大腸菌による異種発現の可否を追跡した。野生型配列と比較して、発現量を大きく向上させるキメラ型 CYP5136A1 の創出に成功した。また、野生型配列では発現困難な CYP5136A3 においても、N 末端配列を改変することで異種発現させることが可能であった。さらに、大腸菌に異種発現させた CYP5136A1 を高度に精製して反応機構の諸特性を解析したところ、本酵素が P450 還元酵素 (CPR) 非依存的な電子伝達経路を通じて活性化されることが明らかとなり、一連の反応においてシトクロム b_5 が重要な役割を果たすことが示された。

つづいて、麴菌由来の CYP57B3 にランダム変異を導入して酵素活性の向上を図った。CYP57B3 は、フラボノイドに分類されるゲニステインを基質として、抗 HIV 活性や強い抗酸化作用を持つ 3'-ヒドロキシゲニステインを与えることが知られている。酵母異種発現系を利用して 2000 種超の変異体ライブラリを作製し、ゲニステインへの酵素活性を追跡した。網羅的なスクリーニングの結果、野生型と比較して 14 倍の生成物を蓄積させる変異体を得られた。変異導入部位を決定したところ、3 か所のアミノ酸置換が生じた (V138I, S243N, V463F) ことが明らかになった。CYP57B3 を発現する酵母のミクロソーム画分を調製して反応動力学的解析を加えたところ、変異型のゲニステインに対するミカエリス定数 (K_m 値) は野生型の約 1×10^{-3} 倍に減少しており、ゲニステインに対する親和性が著しく向上していることが明らかとなった。また、種々のアミノ酸置換を導入した変異体作出して反応特性を解析することで、CYP57B3 の活性を支配する重要なアミノ酸残基を同定することにも成功した。

一連の研究を通じて、担子菌に由来する多機能性 P450 を大腸菌で異種高発現させることが可能となった。さらに、CYP5136A1 がシトクロム b_5 の存在下で CPR 非依存的に酵素活性を示すことが初めて証明され、本酵素を利用したバイオプロセス構築を促進する重要な知見を与えた。また、麴菌由来 CYP57B3 のゲニステイン水酸化活性の飛躍的な向上を達成した。本成果により、P450 を利用した有用フラボノイド産生が可能になると期待される。