

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)			
論文調査委員	主査	九州大学	准教授	一瀬博文
	副査	九州大学	教授	北岡卓也
	副査	九州大学	教授	堤 祐司
	副査	九州大学	教授	角田佳充

論文審査の結果の要旨

本論文は、白色腐朽担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* から見出された多機能性シトクロム P450 モノオキシゲナーゼ (CYP5136A1, CYP5136A3) の高度利用を指向し、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ものである。さらに、麹菌 *Aspergillus oryzae* 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ている。

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、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 の創出に成功している。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可能であることを見出している。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、本酵素が P450 還元酵素非依存的な電子伝達経路を通じて活性化されることを明らかにし、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を証明している。

つづいて、抗 HIV 活性や強い抗酸化作用を持つ 3'-ヒドロキシゲニスチンの高生産を指向し、麹菌由来の CYP57B3 にランダム変異を導入して当該酵素のゲニスチン変換活性向上を図っている。酵母異種発現系を利用して 2000 種超の CYP57B3 変異体ライブラリを作製し、ゲニスチン変換活性を網羅的に追跡することで、野生型と比較して 14 倍の生成物を蓄積させる変異体を獲得することに成功している。また、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行うことで、変異型のゲニスチンに対するミカエリス定数が野生型の約 1×10^3 倍に減少し、ゲニスチンに対する親和性が著しく向上していることを証明している。さらに、ランダム変異導入により置換を受けた 3 か所の部位を様々なアミノ酸残基で置換し、個々の変異体の反応特性を解析することで CYP57B3 のゲニスチン水酸化活性に重要な役割を果たすアミノ酸残基を同定している。

以上要するに、本論文は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に成功し、反応動力学的解析を通じて P450 酵素の触媒機能発現メカニズムを解明することで、P450 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るものである。また、麹菌由来 CYP57B3 のゲニスチン水酸化活性の飛躍的な向上を達成することで、P450 を利用した有用フラボノイド産生への可能性を飛躍的に拡大している。一連の研究成果は、生物工学および生物資源化学の発展に寄与する価値ある業績と認める。よって、本研究者は博士（農学）の学位を得る資格を有するものと認める。