

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12737

研究課題名(和文)糸状菌由来チトクロームP450の収束型ライブラリーの構築と新機能の探索

研究課題名(英文)Construction of convergent library for fungal cytochrome P450s and its application to exploring novel functions

研究代表者

及川 英秋(Oikawa, Hideaki)

北海道大学・理学研究院・教授

研究者番号：00185175

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：麹菌を宿主として、低分子化合物のCH結合を活性化して酸素官能基を導入するチトクロームP450多重遺伝子を形質転換した株を調製した。合計45種以上のユニークなP450を用いて、ライブラリーの構築に成功した。ハイスループット化を目指して、このライブラリーを用いて、反応スケールを検討したところ、操作上の容易さから目標に合致するスケールダウンに成功した。市販品のほか生合成研究で入手できたユニークな骨格を持つ基質を用いた微生物変換も試した。その結果多くの変換物が得られたものの、変換効率が予想以上に悪く、どの酵素遺伝子が変換するかの特定に労力がかかることがわかった。

研究成果の概要(英文)：Heterologous expression of cytochrome P450 for fungal natural product biosynthesis has been employed. We succeeded to prepare library of multiple P450-expressed transformants. Using this unique library, we performed the screening the transformants and found various conversion to generate a number of new metabolites although their productions were relatively low.

研究分野：生物有機化学

キーワード：チトクロームP450 酸化酵素 天然物 生合成

## 1. 研究開始当初の背景

糸状菌が生産する代表的な天然物の生合成経路を俯瞰すると、経路特異的な骨格構築酵素と経路非特異的な修飾酵素の組み合わせによって天然物特有の構造多様性が創出されていることがわかる。この内、後者に分類されるチトクローム P450(略称:P450)が触媒する分子変換反応には、1)不活性な C-H 結合のラジカル開裂に起因する酸化及び骨格変換反応、2)同一分子内で化学的環境が異なる複数の部位に対する段階的な酸化反応など、有機化学的にも興味深い反応が数多く知られている(Chem. Rev. 1996, 96, 2841)。また、三共によるコレステロール低下剤・プラバスタチンの合成(Eur. J. Biochem. 1989, 184, 707)、大正製薬による活性型ビタミン D3 の合成( Appl. Microbiol. Biotechnol. 1992, 38, 152.)に P450 が利用されていることからわかるように、その特異な反応性を利用した製造プロセスも開発されている。一方、近年のゲノム解析から糸状菌は 1 菌株当たり 100 種類程度の P450 を有していることが明らかにされているが、その多くは機能が明らかにされていない(BMC Genet. 2008, 9, 402)。こうした背景の下、P450 の有する機能の網羅的な解析や P450 がもつ潜在的な機能を開発して物質変換へと応用することは学術的・産業的にも重要な研究課題であると考えられている。

## 2. 研究の目的

チトクローム P450 は、C-H 結合のラジカル開裂を起点として有機化学的にも興味深い分子変換反応を触媒する。その特異な反応性と選択性に対しては学術的にも興味もたれているばかりでなく、医薬品などの製造プロセスでの利用も期待されている。さらに、ゲノム解析から推定される P450 の数は指数関数的に増加しており、その潜在的な可能性(新機能など)にも大きな注目が集められている。そこで本研究課題では、糸状菌由来の P450 を解析するための汎用性の高い新手法を確立するとともに、P450 のもつ未開拓機能の発掘と物質変換への応用可能性を検証することを目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究では、“ 麹菌異種発現系を利用した P450 発現ライブラリー ” の概念を具体化し、基質特異性が寛容であるために多段階反応を触媒する P450 の中から新機能を有する P450 を発掘する。具体的には、1) 迅速なプラスミド構築法と麹菌への多数(8~12 種) 遺伝子同時導入法の確立、2) 48 種の P450 からなる発現ライブラリーの構築、3) 微生物変換で生成した新たな化合物の単離・構造決定、4) 前項で見いだした反応を触媒する P450 の同

定から、本研究課題で提案した手法の妥当性を評価する。また、将来的なハイスループット化を想定し、微生物変換のスケールダウンも検討する。

### (1) 発現ライブラリー構築方法の確立～多数遺伝子同時導入法の確立～

提案した概念を実現するには、発現ライブラリーを迅速に構築する必要がある。そこで、我々が開発した“ 4 遺伝子同時導入法 (ChemBioChem 2014, 15, 2076.) ” と “ ギブソン・アッセンブリー ” を応用して 8 個以上の P450 遺伝子の同時導入を検討する。

後述する P450 遺伝子の中から 12 種類を選び、2 種類ずつ発現用ベクターに導入する。具体的には、1) 2 種類の P450 遺伝子に加えてリンカー部を PCR で増幅する、2) ギブソン・アッセンブリー法を使って 3 つの断片とベクター (pUARA2 もしくは pUSA2) を一度に連結することで、合計 6 種類の発現用プラスミドを迅速に構築する。次いで、構築した 4 種及び全てのプラスミドを使った 8 遺伝子以上の同時導入を検討する。検討する項目としては、形質転換の際に使用するプラスミドの濃度・絶対量及びプロトプラストの濃度などを想定している。導入された遺伝子の確認は、PCR で行う。所期の形質転換体を得られる手法を確立できたら、ライブラリーの構築へと研究を進める。

### (2) P450 発現ライブラリーの構築

短期間で P450 のもつ未開拓機能を発掘するには、研究対象とする P450 ライブラリーの質が重要となる。そこで本研究では、基質特異性が寛容であることが期待される多段階反応を触媒する P450 に焦点をあてる。具体的には、我々が着目してきた天然物(ポリケチド : betaenone など、テルペン : aphidicolin など、メロテルペノイド : paxilline など)の生合成の中で多段階反応を触媒する P450 に加え、機能が明らかにされている P450 も研究対象とする。以下に示すライブラリーの構築を考慮し、標的遺伝子の総数は 48 種類を想定している。

上述した実験で確立した手法を用いて、P450 発現ライブラリーを構築する。具体的には、まず始めに 2 種類の P450 を導入した発現用プラスミドを 24 種類構築する。次いで、構築したプラスミド(4 種類)を同時に使った形質転換により 8 つの P450 を導入した形質転換体(A-I; 合計 9 種類)を構築する。このライブラリーは、酸化反応を触媒した P450 を 4 つにまで絞り込めるように設計したものである。

### (3) P450 の有する新機能の発掘

本研究課題で標的とした P450 は、1) デカリン骨格を修飾する P450、2) インドールジテルペンを修飾する P450、3) テルペン骨格を修飾する P450、4) その他の 4 種類に大別される。そこで、これらの構造的特徴を兼備した 3 タイプの化合物群と構造的特徴が異なる

る2タイプの化合物群を使った微生物変換を検討する。後者の化合物群としては、生理活性天然物や P450 の機能解析で頻りに用いられている coumarin などを想定している。

将来的なハイスループット化を想定し、変換反応に用いる基質の絶対量と反応ボリュームのスケールダウンを検討する。具体的な目標値として、基質の絶対量(数~数十 μg スケール)と反応ボリューム(数百 μL スケール)を設定する。次いで、市販及び研究室で保有する候補基質を使った微生物変換反応を行う。反応生成物の解析は、使用した基質の化学構造に応じて LC-MS、GC-MS、HPLC を使い分ける。分析によって基質の消費と新たな生成物の増加を確認できた場合、大量スケールで反応を行った後、各種分光学的手法を用いて生成物の構造を決める。

(4) 特異な機能を有する P450 遺伝子の同定  
上記ライブラリーの中に特異な反応を触媒する P450 遺伝子が存在した場合、該当する P450 遺伝子を特定する。これにより、提案した手法の妥当性を検証する。反応を触媒する P450 が数種類あった場合には、生成物の化学構造を基に優先順位を決める。

上述したように、ライブラリーを使った微生物変換により候補遺伝子を(1反応につき)4種類にまで絞り込める。そこで、各 P450 を別々に形質転換して反応を触媒する P450 を特定する。具体的な実験手法は、上述した実験で確立した手法を用いる。

合計 48 種の P450 遺伝子を研究対象にすることを考えると、プラスミドの構築だけでも 3~4 ヶ月程度を要すると考えられる。また、これまでに成功例のない 8 個以上の遺伝子導入法を確立するには、種々の検討と確認作業を含めて 6~8 ヶ月程度を見込んでいる。その後の機能解析には 1 年程度かかると考え、述べ 2 年間の研究期間を設定した。

#### 4. 研究成果

計画通り 3 種のベクター(pUARA2, pUSA2, pAdeA2)を用いて、麹菌 *Aspergillus oryzae* NSAR1 株を宿主として、P450 発現ライブラリーの調製を行った。Penitrem 生合成系で見出された水酸化(PtmJ)、エポキシ化(PtmL)、環拡大(PtmK)を触媒する酵素遺伝子を一つのベクターに組込んだ。同様に aflatrem 生合成に関与する、メチル基の酸化的脱離およびアリル位酸化の 5 段階を触媒する AtmP および二箇所の縮環位の酸化を行う AtmQ 導入ベクターなど、「Bet2 (betaenone), PbP450-1/PbP450-2 (aphidicolin), CntC (cinatrin), Sol6 (solanapyrone), CcsD (cytochalasin)」合計 12 個の遺伝子を組込んだ形質転換株ライブラリーを作成した。新規変換反応を検討するためのライブラリー構築と並行して、ophiobolin の水酸化反応を検討した。Ophiobolin の生産が確認され

た菌株 *Bipolaris maydes*, *Emericella varicolor* 由来のチトクローム P450 水酸化酵素 Ob1B-Bm/Ob1B-Ev の場合、トランスポーターOb1D-Ac 存在下でのみ、4 段階の酸化生成物である ophiobolin C を生産するのを見出した。これに対し ophiobolin の非生産株と言われてながら、ophiobolin の生合成遺伝子クラスターを持つ *Aspergillus clavatus* 由来の相同性の高い P450 Ob1B-Ac の場合、トランスポーターOb1D-Ac 非存在下で前駆体を投与することにより、4 種の異常生成物を与えた。このように相同性の高い酵素間で酸化する位置が異なるのは、大変興味深い結果である。

今回 P450 ライブラリーを充実させるため、ポリケチド系天然物に作用する P450 として alt1, alt2, alt3 (alternapyrone), ポリペプチドとのハイブリッド型天然物に作用する AsolA/AsolB (didymellamide), HirJ (hirsutellone), セスタテルペン生合成に関与する tpcB, tpcC (terpestacin), Nf-P450 (sesterfisherol), btcB, btcC (新規セスタテルペン)のほか、インドールテルペンで利用される SpdJ (sespandol), JanP/JanQ (shearinine), 糸状菌では稀なりボースム型ペプチド UstC (ustiloxin) の機能解析を終え、これらを導入した新たな麹菌株ライブラリーを構築した。

これと並行して植物ホルモンである abscisic acid の生合成に関与する機能未知の P450 である BcABA1, BcABA2 を麹菌異種発現させた。有機合成的に調製したイオニリデンエタン関連化合物 4 種の微生物変換を行った。ハイスループット化を目指して、反応スケールを検討したところ、操作上の容易さから 500 μL の培地に数十 μg の化合物を投与し、二日間程度培養する条件で再現性良く、分析できることを確認した。

さらにキノコ由来の P450 は分解系に使用されることから、市販動物用の抗生物質 Pleuromutilin の生合成に関与する P450 である Ple1, Ple6, Ple7 導入した麹菌株を新たに調製し、先に調製したライブラリーとともに、上述の条件で微生物変換を検討した。ポジコンとして本来の基質での変換能を試したほか、市販品 5 種および生合成研究で入手できた 8 種のユニークな骨格を持つ基質も試した。その結果多くの変換物が得られたものの、変換効率が悪く、どの酵素遺伝子が変換するかの特異も労力がかかることがわかった。現在比較的収量の良い化合物についてその構造決定を行っている。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

K. Narita, R. Chiba, A. Minami, M.

Kodama, I. Fujii, K. Gomi, H. Oikawa, Multiple Oxidative Modifications in the Ophiobolin Biosynthesis: P450 Oxidations Found in Genome Mining, *Org. Lett.*, 査読の有, Vol. 18, 2016, 1980-1983

〔学会発表〕(計 4 件)

小崎拓登, 南篤志, 五味勝也, 及川英秋, 麹菌異種発現系を用いた Abscisic Acid の生合成研究 (3)、日本農芸化学会大会、2017 年 3 月 18 日、京都女子大学 (京都府、京都市)

山根桃華, 南篤志, 劉成偉, 尾崎太郎, 塚越多映, 常盤野哲生, 五味勝也, 及川英秋, 抗生物質プロイロムチリンの生合成研究 (3)、日本化学会 第 97 春季年会、2017 年 3 月 17 日、慶應義塾大学 日吉キャンパス (神奈川県、横浜市)

Koji Narita, Ryota Chiba, Atsushi Minami, Hideaki Oikawa, Total biosynthetic study of antitumor antibiotic ophiobolins using by *Aspergillus oryzae* heterologous expression system, *Pacificchem2015*, 2015 年 12 月 18 日, Hawaii, USA

成田興司、千葉諒太、南篤志、藤井勲、及川英秋、麹菌発現系を利用した抗腫瘍性物質 ophiobolin 類の全生合成研究、日本化学会北海道支部 2015 年夏季研究発表会、2015 年 7 月 18 日、北海道教育大学函館校 (北海道、函館市)

〔その他〕

ホームページ等

<http://wwwchem.sci.hokudai.ac.jp/~yuhan/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

及川 英秋 (OIKAWA, Hideaki)

北海道大学・大学院理学研究院・教授

研究者番号：00185175

(3) 連携研究者

南 篤志 (MINAMI, Atsushi)

北海道大学・大学院理学研究院・助教

研究者番号：40507191