

平成 21 年 6 月 8 日現在

研究種目：若手研究 (A)

研究期間：2006～2008

課題番号：18686067

研究課題名 (和文) 組換え大腸菌を利用するシトクロム P450 システムの機能強化

研究課題名 (英文) A recombinant *Escherichia coli* whole-cell biocatalyst with a new P450 system for efficient biocatalytic oxidation

研究代表者

神谷 典穂 (KAMIYA NORIHO)

九州大学・大学院工学研究院・准教授

研究者番号：50302766

研究成果の概要：近年、生体触媒の酸化反応プロセスへの応用が注目されている。酸化反応には一般に高温・高圧が要求され、反応の制御が困難であると同時に爆発性を伴うため、これを常温・常圧で効率よく行うことが可能なバイオプロセスに変換する意義は極めて大きい。本研究では、特に脂溶性の基質の酸化反応を、常温・常圧で効率よく行うことが可能な新規生体触媒の創製を目指し、遺伝子工学的手法と有機化学的手法を組み合わせ、補酵素 NADH/NADPH 再生系が導入された大腸菌 P450 細胞触媒の機能強化について検討した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	12,000,000	3,600,000	15,600,000
2007 年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
2008 年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
年度			
年度			
総計	23,300,000	6,990,000	30,290,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：生体触媒、バイオ酸化プロセス、P450、組換え大腸菌、補酵素再生系

1. 研究開始当初の背景

近年、生体触媒の酸化反応プロセスへの応用が注目されている。酸化反応には一般に高温・高圧が要求され、反応の制御が困難であると同時に爆発性を伴うため、これを常温・常圧で効率よく行うことが可能なバイオプロセスに変換する意義は極めて大きい。生体内では、多種多様な酵素が基質の酸化反応を効率よく触媒しているが、中でも P450 システムと呼ばれる酸化還元酵素は、分子状酸素を基質の炭素-炭素結合に導入可能であり、脂溶性の基質の変換も可能なため、その実用化に特に注目が集まっている。しかしながら、P450 システムには一般に還元力 (NADH or NADPH) が必要とされ、これらの補酵素が極

めて高価なことから、バイオ酸化プロセスの実現における大きな障害となっている。一方、近年の遺伝子工学の進展により、大腸菌を始めとする微生物宿主内に、様々なタンパク質/酵素を発現することが可能になり、細胞内での補酵素再生系の構築と、これを直接的に利用する酸化還元酵素系 (デヒドロゲナーゼ) に関する研究が盛んに検討されている。

2. 研究の目的

本研究では、NADH あるいは NADPH を補酵素として利用する新たな P450 システムを大腸菌内で構築することを目的とした。特に、大きく以下の 2 つの目標を掲げた。

Pseudomonas putida 由来の 3 つの可溶性タ

ンパク質からなる P450 システム（以下、P450cam システム）をモデルとして、大腸菌を細胞触媒として用いる超高効率なバイオ酸化プロセスの構築を目指した（図1）。まず、酵素触媒的な補酵素 NADH 再生系の導入について検討した。次に、3つのタンパク質（プチダレドキシシン還元酵素：PdR、プチダレドキシシン：Pdx、ヘム酵素：P450cam）間での電子伝達過程の律速段階となるステップを担う2つのタンパク質を融合することで、基質変換速度の向上を試みた。

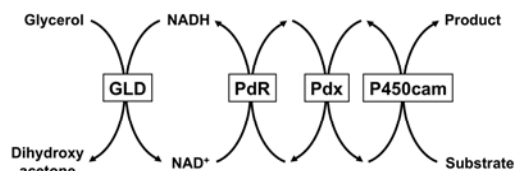


図1 P450cam システムの概略図

P450 システムに必要な3つのタンパク質が融合した天然の P450 システム（以下、P450-BM3 システム）につき、NADH から NADP⁺への電子伝達を加速することにより、犠牲試薬としてのグリセロールからの2段階補酵素再生を経た基質酸化反応プロセスの構築（図2）について検討した。

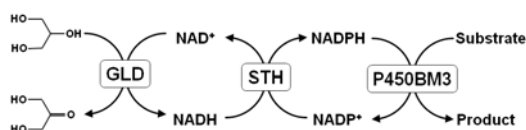


図2 2段階補酵素再生系を介した P450-BM3 システムの概略図

3. 研究の方法

(1) P450cam システムの構築

触媒反応プロセスに必須の3つのタンパク質成分ならびに大腸菌由来グリセロールデヒドロゲナーゼ（GLD）遺伝子を遺伝子工学的手法によりクローニング、発現、精製を行った。各タンパク質への部位特異的変異導入は、定法に従って行った。細胞触媒としての利用に際しては、P450cam システムと GLD の4つのタンパク質を大腸菌内に同時に発現させ、これを休止菌体として用いた。

(2) P450-BM3 システムの構築

Bacillus megaterium 由来の P450-BM3 についても遺伝子クローニング、大腸菌を宿主としたタンパク質発現を行った。また、可溶性トランスヒドロゲナーゼ（STH）についても発現系を構築した。

(3) 酸化活性の測定

P450cam システムの酵素活性は、天然基質である camphor の酸化反応を GC-MS により追跡した。P450-BM3 の活性測定用の発色基質は、既報に従って合成した。

(4) 細胞内タンパク質連結系の構築

タンパク質の連結を触媒する酵素として、グラム陽性菌の外膜タンパク質の連結を触媒する Sortase（ソルターゼ）と呼ばれる酵素を発現する遺伝子ベクターを調製した。また、ソルターゼの基質配列となるペプチドを、P450cam システムを構築するタンパク質にペプチドタグとして付加し、これらと同時にソルターゼを共発現させ、大腸菌内におけるタンパク質連結を試みた。

4. 研究成果

(1) P450cam システムの機能強化

構成成分の安定化による活性強化

P450cam システムの触媒反応プロセスに必須の3つのタンパク質成分のうち、補酵素 NADH から供給される電子を媒介する Pdx をタンパク質工学的手法で安定化した。これにより、GLD による補酵素（NADH）再生系と共役させた P450cam システムの触媒効率が向上し、安定化前に比べ約2倍の基質変換効率を達成した（図3）。このことから、複数のタンパク質間相互作用が必要な酵素触媒プロセスにおいて、鍵となるタンパク質間相互作用の強化により、細胞触媒全体の触媒効率を向上可能なことを明らかにした。

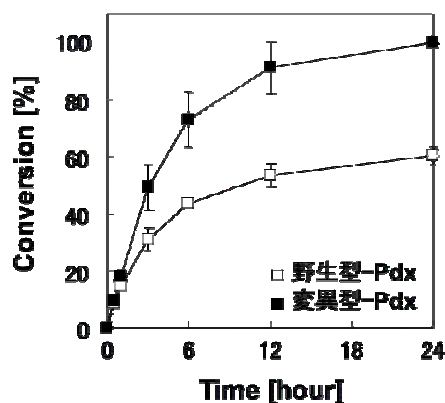


図3 触媒過程に関するタンパク質成分の安定化による細胞触媒の機能強化

P450cam-Pdx の融合による活性強化

補酵素 NADH から供給される電子を媒介するプチダレドキシシン（Pdx）と酵素部位である P450cam を遺伝子工学的手法により融合化することにより P450cam システムの触媒効率の向上を試みた。その結果、大幅な触媒効率の向上には至らなかったが、融合タンパク質が宿主内で部分的にプロテアーゼ分解を受けながらも酸化反応は進行することが明らかとなった。

生体内タンパク質融合系の構築

上記の例では、Pdx と P450cam が遺伝子レベルで連結された融合タンパク質を利用した。一方、最近、ソルターゼと呼ばれるタンパク質連結酵素が、大腸菌内でも機能するこ

とが明らかとなっている。そこで、本酵素を用いた生体内 (*in vivo*) の Pdx-P450 融合タンパク質の調製を試みた。その結果、Western blotting により融合タンパク質の存在は確認できたが、十分な活性を得るに至らなかった。これは、本来、生体膜上で 2 次元拡散しながら反応を触媒するソルターゼを、可溶性タンパク質として細胞内で発現したことにより反応性が低下したためと考えられた。

一方、非共有結合的相互作用に基づく機能強化について、自己組織化能を有するタンパク質と P450cam システムを構成する各タンパク質成分を融合した人工タンパク質を調製し、これらの自己組織的な会合により触媒活性が向上する系の構築についても検討を行ったが、活性向上には至らなかった。

P450 基質特異性改変による機能強化

P450cam 酵素活性部位のアミノ酸の部位特異的変異により、基質特異性が変化することが報告されている。このことは、本システムの最終触媒プロセスを担う酵素成分の活性部位置換により、様々な基質へと対応可能なプロセスへと変換可能なことを示している。そこで、既報に基づき、塩素系化合物の脱塩素化反応を触媒する P450cam 変異体を調製したところ、GLD とこの変異体を共発現させた大腸菌は青い色を呈し、色素(インディゴ)を高収率で生産可能なことが明らかとなった(図 4)。

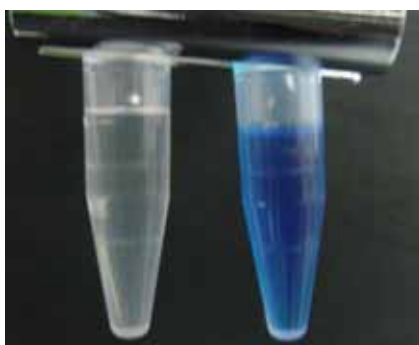


図 4 GLD と P450cam 変異体を共発現した組換え大腸菌による色素生産 (左)通常の大腸菌; (右)組換え大腸菌

(2) P450-BM3 システムの機能強化

P450-BM3 システムは、触媒反応プロセスに必要な酸化還元部位を同一タンパク質中に有する巨大タンパク質複合体である。従って、P450cam システムの様にタンパク質成分を個別に調製する必要がないが、天然型の P450-BM3 は高価な NADPH を補酵素として必要とする。そこで上述の GLD による NADH 再生系と、NADH の還元力を NADPH に転移する反応を触媒する STH を共役させる 2 段階補酵素再生系(図 2)を、生体外にて構築することを試みた。

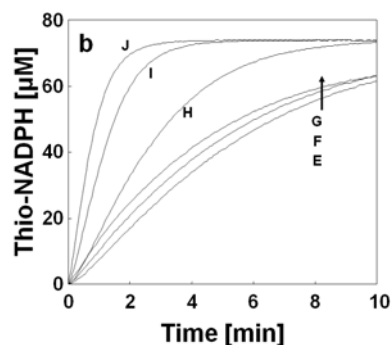


図 5 2 段階補酵素再生系を介した P450-BM3 触媒による基質酸化の例 (Unit 比: STH/GLD = 1:1 (E); 1:2 (F); 1:5 (G); = 2:2 (H); 5:2 (I); 10:2 (J).)

合成発色基質を用いた詳細な分光学的解析の結果、GLD により再生された NADH が STH に認識され、その還元力を NADPH へと受け渡す共役系の構築に成功した。また、GLD と STH の比を変えた検討から、複数のタンパク質を介して進行する本系において、STH が NADPH へ電子を受け渡す過程が律速となることを明らかにした(図 5)。

(3) プロセス工学による機能強化

脂溶性基質の変換を目的としたバイオプロセス構築においては、水 有機溶媒二相系がよく利用される。そこで、(1) の細胞触媒系に対して、脂溶性基質を有機相に添加し、水相側に分配した基質が変換される系を構築したところ、ここでも補酵素再生系を導入した細胞触媒においてのみ十分な酸化活性が見られた。また、近年、水、有機溶媒に続く第 3 の溶媒として、イオン液体が注目を集めている。そこで、イオン液体・水二相系の構築に向け、水と混和しない疎水性イオン液体を合成し、上述の細胞触媒による基質酸化反応を試みたが、十分な活性の発現には至らなかった。

以上をまとめると、まず、3 つの可溶性タンパク質からなる *Pseudomonas putida* 由来 P450cam システムをモデルとして、補酵素 NADH 再生系の導入による大腸菌細胞触媒の機能強化に成功した。興味深いことに、グリセロールを犠牲的な還元試薬として用いた変異型 P450cam システムにおいて、組換え大腸菌の培養に伴い菌体内に高濃度のインディゴが蓄積することが明らかとなった。次に、補酵素 NADPH を要求する天然のタンパク質融合型 P450 システムである P450-BM3 システムに着目した。本システムに、NADH から NADP⁺への電子伝達を触媒する酵素を共存させることにより、グリセロールから NADPH までの一連の電子伝達システム(2

段階補酵素再生系)を構築することで、少量のNADH/NADPHを再生しながら脂溶性基質の酸化反応を促進する新たなバイオ酸化プロセスの構築に成功した。

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3件)

T. Mouri, N. Kamiya, M. Goto, 'Increasing the catalytic performance of a whole cell biocatalyst harboring a cytochrome P450cam system by stabilization of an electron transfer component', *Biotechnol. Lett.*, vol. 28, 1509-1513 (2006), 査読有

T. Mouri, T. Shimizu, N. Kamiya, M. Goto, 'Design of a cytochrome P450BM3 reaction system linked by two-step cofactor regeneration catalyzed by a soluble transhydrogenase and glycerol dehydrogenase', *Biotechnol. Prog.*, in press. (2009), 査読有
N. Kamiya, H. Abe, M. Goto, Y. Tsuji, H. Jikuya, 'Fluorescent substrates for covalent protein labeling catalyzed by microbial transglutaminase', *Org. Biomol. Chem.*, in press. (2009), 査読有

[学会発表](計10件)

毛利 剛, 神谷 典穂, 後藤 雅宏, 'P450cam 変異体が導入された高効率インディゴ生産菌の創製', 化学工学会第39回秋季大会, 2007年9月14日, 北海道大学.

毛利 剛, 神谷 典穂, 後藤 雅宏, 'P450cam 変異体とグリセロールデヒドロゲナーゼを共発現した組換え大腸菌の構築とインジゴ生産への応用', 第59回日本生物工学会大会, 2007年9月26日, 広島大学.

T. Mouri, N. Kamiya, M. Goto, 'Co-expression of P450cam mutant and glycerol dehydrogenase in recombinant *Escherichia coli* and its application to indigo production', The 20th International Symposium on Chemical Engineering, December 1, 2007, Deajeon, Korea.

神谷 典穂, 毛利 剛, 後藤 雅宏, '大腸菌を細胞触媒として利用する色素生産', 第3回産業用酵素シンポジウム, 2008年3月7日, 九州大学.

志水 豪, 毛利 剛, 神谷 典穂, 後藤 雅宏, '反応速度向上を目的とした半自給自足型 Cytochrome P450cam—Putidaredoxin 融合タンパク質の構築', 第45回化学関連支部合同九州大会, 2008年7月5日, 北九州国際会議場。(優秀ポスター賞受賞)

神谷典穂, 安倍弘喜, 後藤 雅宏, '酵素反

応による生体分子ラベル化に適した新規蛍光基質のデザイン', 化学工学沖縄大会, 2008年8月8日, 沖縄産業支援センター.

毛利 剛, 神谷 典穂, 後藤 雅宏, '二段階補酵素再生系と連動した Cytochrome P450BM3 反応系の構築', 第60回日本生物工学会大会, 2008年8月28日, 東北学院大学.

志水 豪, 毛利 剛, 神谷 典穂, 後藤 雅宏, '大腸菌を利用するシトクロム P450cam 細胞触媒システムの改良へ向けた戦略', 第60回日本生物工学会大会, 2008年8月28日, 東北学院大学.

毛利 剛, 神谷 典穂, 後藤 雅宏, 'STH をメディエーターとして利用する NADPH の再生と P450 酸化反応への利用', 酵素工学研究会30周年記念シンポジウム, 2008年11月13日, かずさアガミホール.

志水 豪, 毛利 剛, 神谷 典穂, 後藤 雅宏, '構成タンパク質の融合がシトクロム P450cam 細胞触媒の機能に与える影響', 酵素工学研究会30周年記念シンポジウム, 2008年11月13日, かずさアガミホール.

[図書](計0件)

なし

[産業財産権]

出願状況(計1件)

名称: タンパク質蛍光ラベル化用酵素基質

発明者: 神谷典穂, 後藤雅宏, 安倍弘喜

権利者: 国立大学法人 九州大学

種類: 出願

番号: 特願 2008-176104

出願年月日: 2008/7/4

国内外の別: 国内

取得状況(計0件)

なし

[その他]

ホームページ等

<http://www.bioeng.cstm.kyushu-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神谷 典穂 (KAMIYA NORIHO)

九州大学・大学院工学研究院・准教授

研究者番号: 50302766

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし