

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K04846

研究課題名（和文）細菌由来シトクロムP450の触媒活性に必要な電子伝達システムの探索

研究課題名（英文）Discovery of specific redox systems for bacterial cytochrome P450s

研究代表者

平川 秀彦（Hirakawa, Hidehiko）

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：90451799

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：シトクロムP450が触媒活性に必要な電子伝達タンパク質およびその還元酵素を特定するための技術を開発した。ヘテロ三量体タンパク質のサブユニットを連結ユニットとして利用した選択的な近接化により、細胞抽出液を用いた、電子伝達タンパク質を還元可能な還元酵素の特定を実現した。さらに、シトクロムP450、電子伝達タンパク質、還元酵素の選択的な近接化により、遊離状態では起こらないようなシトクロムP450と還元酵素の電子伝達タンパク質に対する相互作用の競合現象を利用することで、シトクロムP450のパートナーとなる電子伝達タンパク質と還元酵素を特定できることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

医農薬品及びその代謝物などの合成用触媒としての利用が期待されているシトクロムP450は、触媒活性に2つの補助タンパク質（電子伝達タンパク質、還元酵素）を必要とする。ゲノム解析により、シトクロムP450は生物界に広く存在していることが明らかになっているものの、パートナーとなる補助タンパク質の特定が容易ではないため、その利用は進んでいない。本研究では、選択的な近接化により、シトクロムP450の触媒反応を評価せずにパートナーとなる補助タンパク質を特定する方法論を確立しており、今後のシトクロムP450の利用および研究を大きく発展させるものと期待される。

研究成果の概要（英文）：A method to identify electron transfer proteins and their reductases required for cytochrome P450s has been developed. Selective protein assembly using subunits of a heterotrimeric proteins as concatenating units enabled to identify reductases that can reduce target electron transfer protein using cell lysates. Furthermore, the selective assembly of the three proteins enabled to identify the redox partner proteins by utilizing the competition between the interaction of electron transfer proteins with cytochrome P450s and that with reductases, which are not detected in free protein solution,

研究分野：酵素工学

キーワード：シトクロムP450 電子伝達システム スクリーニング

1. 研究開始当初の背景

シトクロム P450 モノオキシゲナーゼ(P450)は位置選択的・立体選択的な水酸化、エポキシ化、脱アルキル化などを触媒し、抗生物質、フラボノイド、ステロイドなどの生合成に関与しており、医農薬品及びその代謝物などの合成用触媒としての利用が期待されている。P450 は生物界に広く存在し、300 以上のファミリーが存在することが知られている。中でも、細菌由来 P450 は高い比活性を有し、水溶性タンパク質として大腸菌などの汎用宿主により発現できるため、その利用が期待されている (*Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2014)。

しかし、細菌由来 P450 の産業利用は進んでいない。一部の例外を除き、細菌由来 P450 は、フェレドキシンなどの電子伝達タンパク質(ET)を介して、補酵素 NAD(P)H により還元されたフラビン含有還元酵素(RD)から電子を受け取り、活性種を生成する(図1)。すなわち、この二つの補助タンパク質(ET および RD)の存在下でのみ細菌由来 P450 は触媒活性を発揮する。補助タンパク質遺伝子は P450 遺伝子とオペロンを形成するとは限らないため、ゲノム情報を元にして特定することはできない。また、ET の P450 や RD に対する相互作用は特異的であるものの弱いため、結合力を利用した方法では特定できない。そのため、RD による ET の還元反応および ET から P450 への電子伝達反応を評価することにより、パートナーとなる ET および RD を特定せざるを得ないが、そのためには高濃度の ET が必要となる。

P450 は基質と結合した後に電子を受け取る(図1)ため、ET から P450 への電子伝達の評価においては、予め基質が特定されている必要がある。しかし、基質を特定するためには、P450 による変換反応を評価する必要があり、そのためには補助タンパク質が予め特定されている必要がある。このようなジレンマがあるため、ET と基質をコンビナトリアルに組み合わせた反応評価を用いて、ET と基質を同時に特定しなければならず、多大な労力・時間・コストが必要となる。さらに、反応溶液が適切な補助タンパク質や基質を含まない場合、反応に利用されなかった還元力は自動酸化により活性酸素種を生成し、非酵素的な反応を起こす可能性があるため、この方法は信頼性も低い。すなわち、RD - P450 間を往復して電子を運ぶという ET の役割自体が補助タンパク質の特定を極めて困難にしている。実際、補助タンパク質が特定されている細菌由来 P450 は 10 種類にも満たず、多くの細菌由来 P450 の機能は未解明である。

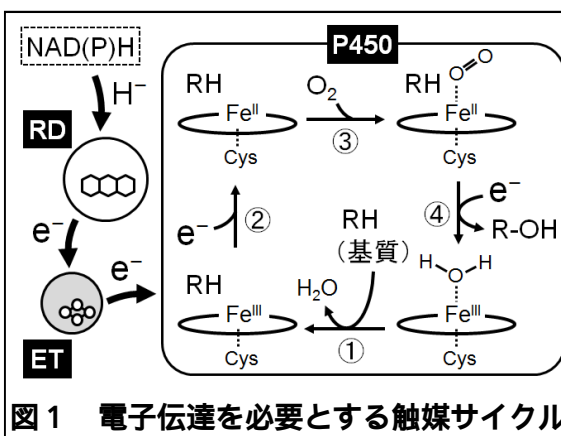


図1 電子伝達を必要とする触媒サイクル

2. 研究の目的

本研究では、人為的な近接化を利用した、電子伝達タンパク質(ET) - 還元酵素(RD)間相互作用、および ET - P450 間相互作用を検出する技術を開発し、基質非存在下においてターゲットの P450 を活性化可能な ET と RD を取得するため方法論を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

電子伝達タンパク質(ET)の還元酵素(RD)と P450 に対する相互作用は弱いため、希薄溶液中で、ET - RD 複合体および ET - P450 複合体は、遊離の ET、RD、P450 と比

べて無視できる程度でしか存在しない。しかし、ET、RD、P450 を人為的に 1 : 1 : 1 で近接させ、互いに拡散できない状況を作り出せば、ET に対する RD および P450 の局所濃度は極めて高くなる上に、ET と RD が相互作用している時は遊離の ET と RD は存在せず、ET と P450 が相互作用している時は遊離の ET と P450 は存在しないため、ET - RD 複合体および ET - P450 複合体の存在割合は無視できると予想される。そこで、ヘテロ三量体タンパク質であるクレン古細菌由来核内増殖抗原 (PCNA) を構成する 3 つのサブユニットを ET、RD、P450 を選択的に近接させるための連結ユニットとして用いることにより、電子伝達可能な RD を ET に近接させた時のみ ET が還元され、ET を還元可能な RD を簡便に特定できることを明らかにした上で、ET、RD、P450 を人為的に近接させた場合に、ET - RD 複合体および ET - P450 複合体の存在割合が遊離の ET、RD、P450 と比べて無視できなくなることを確認し、さらに、人為的に近接化させた場合においても、ET - RD 複合体の形成および ET - P450 複合体の形成は、遊離の ET - RD 間相互作用および ET - P450 間相互作用の強さを反映したものであり、ET - RD 複合体の形成と ET - P450 複合体の形成の競合においても反映されることを明らかにし、実際にライブラリの中から、電子伝達可能な ET を選択できることを示す、という流れで研究を進めた。

4 . 研究成果

Sulfolobus solfataricus 由来 PCNA を構成する 3 つのサブユニット SsoPCNA1、SsoPCNA2、SsoPCNA3 のうち、SsoPCNA1、SsoPCNA2 に対して細菌由来シトクロム P450 システムの構成要素であるフェレドキシン還元酵素 (FdR)、フェレドキシン (FdX) を融合したタンパク質を構築した。SsoPCNA1-FdR 融合タンパク質にはアフィニティタグを導入することにより、SsoPCNA2-FdX 融合タンパク質をマルチウェルプレートに固定し、SsoPCNA1-FdR 融合タンパク質を含む細胞抽出液を用いて、複数の細菌由来 FdR と FdX の間でコンビナトリアルに近接させたところ、同じ細菌由来の FdR - FdX 間で高効率に電子伝達されることをシトクロム c の還元反応を指標として明らかにした。すなわち、FdX を還元可能な FdR をタンパク質精製することなく、細胞抽出液を用いて特定可能であることが明らかとなった。また、由来が異なる FdR - FdX 間でも電子伝達が生じたことから、FdR による FdX の認識は厳密ではないことも明らかとなった。

各 PCNA サブユニットは N 末端と C 末端の 2 か所のタンパク質の融合箇所を持つため、最大で 6 分子を近接させることができる。SsoPCNA1、SsoPCNA2、SsoPCNA3 との融合により、1 分子の *Pseudomonas putida* 由来シトクロム P450 (P450cam) に対して、その酸化還元系を構成する PdX と PdR の数を変えて近接させたところ、近接させた状況においては P450cam - PdX 間相互作用と P450cam - PdR 間相互作用は競合することが明らかとなり、その競合を説明する速度論モデルを提案した (*Biotechnol. J.* 2018)。

P450cam との相互作用に影響を及ぼす PdX 上のアミノ酸残基は既往の研究により明らかにされている。そこで、アミノ酸置換により P450cam との相互作用の強さを変えた変異体を作成し、P450cam との相互作用の強さが PdR による PdX の還元反応に対する影響を調べた。相互作用の強さと還元反応の低下度合いとの間には正の相関があることを見出した。さらに、*S. solfataricus* 由来 PCNA よりも安定なヘテロ三量体を形成する *Metallosphaera sedula* 由来 PCNA を構成するサブユニット MsePCNA1、MsePCNA2、MsePCNA3 と PdR、PdX、P450cam を連結した融合タンパク質を構築し、これらを用いても同様の結果が得られることを確認した。

*P. putida*以外の細菌由来 P450 に対して、PCNA を用いて FdX と FdR を近接させたところ、同じ細菌由来 FdR による FdX の還元反応速度を低下させたものの、PdR による PdX の還元反応は低下させなかった。また、同じ細菌が有する別のフェレドキシンに対する還元反応速度も低下させなかった一方で、別株由来の FdR による FdX の還元反応速度を低下させた。実際に、基質存在下で、その P450 の反応を評価したところ、P450 が反応速度を低下させた FdR と FdX の組合せでのみ、反応が進行した。このことから、複数の電子伝達タンパク質を有する細菌において、特定の電子伝達タンパク質が P450 に電子伝達可能であり、配列情報からパートナーとなる電子伝達タンパク質を特定するのが困難であることが明らかとなった。さらに、異なる株が持つ酸化還元系を電子伝達に利用できる可能性があることも明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|---|---------------------------------|
| 1. 著者名 Haga Tomoaki, Hirakawa Hidehiko, Nagamune Teruyuki | 4. 巻 13 |
| 2. 論文標題 Artificial Self Sufficient Cytochrome P450 Containing Multiple Auxiliary Proteins Demonstrates Improved Monooxygenase Activity | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Biotechnology Journal | 6. 最初と最後の頁 1800088 ~ 1800088 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/biot.201800088 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 齋藤 航汰、平川 秀彦、市川 創作 |
| 2. 発表標題 人為的な近接化を利用したシトクロムP450cam-プテグレドキシシン間相互作用の検出 |
| 3. 学会等名 酵素工学研究会第82回講演会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 平川秀彦 |
| 2. 発表標題 複数の酸化還元ドメインを有する人工自己充足型シトクロムP450における電子伝達プロセスの解析 |
| 3. 学会等名 第31回生物無機化学夏季セミナー |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Hidehiko Hirakawa |
| 2. 発表標題 What is happening in an artificial self-sufficient cytochrome P450? |
| 3. 学会等名 The 15th Japan-China-Korea Joint Symposium on Enzyme Engineering (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 渡邊 千晶、平川 秀彦、市川 創作 |
| 2. 発表標題 Metallosphaera sedula由来核内増殖抗原を利用したシトクロムP450システムの不溶化 |
| 3. 学会等名 酵素工学研究会第82回講演会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 齋藤 航汰、平川 秀彦、市川 創作 |
| 2. 発表標題 人為的な近接化を利用したシトクロムP450cam-ブチダレドキシシン間相互作用の検出 |
| 3. 学会等名 酵素工学研究会第82回講演会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Hidehiko Hirakawa |
| 2. 発表標題 Artificial proximity of electron transfer protein to cytochrome P450 opens a treasure chest |
| 3. 学会等名 Pacifichem 2021 (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2021年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
| | | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|