

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月24日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2009～2011

課題番号：21688013

研究課題名（和文）木材腐朽担子菌が有するシトクロムP450の網羅的機能探索と高度利用

研究課題名（英文）Comprehensive functional screening and application of cytochrome P450 from basidiomycetes

研究代表者

一瀬 博文（ICHINOSE HIROFUMI）

九州大学・大学院農学研究院・助教

研究者番号：00432948

研究成果の概要（和文）：白色腐朽担子菌および褐色腐朽担子菌が有するシトクロム P450 をゲノムワイドに探索し、304 種類の完全長遺伝子をクローニングすることに成功した。獲得した cDNA を酵母に形質導入し、P450 酵素を異種発現させて機能スクリーニングシステムを構築した。本研究により担子菌 P450 が潜在的に備える有用機能を網羅的かつ実験的に探索することが可能となり、生理活性物質・医薬中間体・ファインケミカルなどの生産を可能とする種々の有用機能が発掘された。

研究成果の概要（英文）： We explored the molecular diversity of basidiomycetous cytochrome P450 and isolated 304 genes encoding full-length cDNA. The isolated P450 genes were transformed into *Saccharomyces cerevisiae* to construct a functional library. Using the functional library, the catalytic potentials of P450s against a wide variety of compounds were elucidated. A functionomic survey allowed the discovery of novel catalytic potentials. An increased compilation of P450 functions will facilitate a thorough understanding of metabolic diversity in basidiomycetes and provide new insights that could also expedite practical applications in the biotechnology sector.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	10,000,000	3,000,000	13,000,000
2010年度	7,200,000	2,160,000	9,360,000
2011年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
総計	21,800,000	6,540,000	28,340,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林学・木質科学

キーワード：木材腐朽担子菌・シトクロム P450・リグニン

1. 研究開始当初の背景

木材腐朽担子菌は複雑多岐にわたる変換反応を通じて木質バイオマスを完全分解する微生物であり、他生物にない優れた物質変換能力を有している。担子菌の代謝多機能性を活用してバイオマス変換・バイオレメディエーション・ファインケミカル合成を達成することにも興味を持たれており、担子菌の高度利用を目指した応用研究が国内外で盛んに行

われている。近時、様々な担子菌ゲノム全塩基配列の解読も進められており、ゲノムワイドな遺伝子探索も可能になった。しかしながら、ゲノム配列情報だけから新規有用反応を獲得した例はバイオ関連全体を見渡しても未だない。すなわち、「膨大な配列情報を活用した迅速な機能探索」が担子菌の高度利用へ向けた鍵となる。

2. 研究の目的

シトクロム P450 (P450) は巨大なスーパーファミリーを構成するモノオキシゲナーゼであり、本酵素群ほど生物界で多様化した生体機能分子はない。P450 の生理機能は多岐にわたり、生物固有の二次代謝機構を支えている。また、P450 がケミカルプロセスでは困難な位置・立体選択的な酸化反応を可能にすることから、産業界における触媒ツールとしての有用性は極めて高い。本研究では、ゲノム配列が公開された白色腐朽担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* および褐色腐朽担子菌 *Postia placenta* が有する P450 機能の網羅的理解と高度利用を目的として、迅速かつ実験的な機能探索システムの構築を目指した。また、多種多様な化合物を用いた網羅的機能探索を通じて有用酵素を発掘し、生化学的解析を加えることで詳細な反応メカニズムの解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子探索およびクローニング

P. placenta ゲノムデータベースを精査し、P450 保存配列を持つ遺伝子をゲノムワイドに決定した。ゲノム配列から予測された P450 遺伝子に対して特異的プライマーを設計し、RT-PCR の手法を用いて完全長 cDNA を増幅した。獲得した cDNA はプラスミドベクターに連結し、DNA シークエンサーを用いて塩基配列を確認した。

(2) 機能ライブラリーの構築と網羅的機能探索

獲得した完全長 cDNA を酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 発現ベクターに連結して形質転換酵母を作成した。各 P450 を発現する形質転換酵母を 96 ウェルプレート中で独立に培養し、機能ライブラリーとした。担子菌 P450 を発現する形質転換酵母に種々の化合物を添加して生成物の蓄積を追跡した。生成物は種々の分析機器を用いて化学構造を決定した。

(3) 有用酵素の機能解析

機能探索より明らかになった有用酵素を大腸菌発現ベクターに連結し、*Escherichia coli* C41(DE3) 株を宿主として異種発現させた。高度に精製した酵素を用いて反応動力学的解析を加え、反応諸特性を明らかにした。

4. 研究成果

(1) 褐色腐朽担子菌 P450 遺伝子の獲得

褐色腐朽担子菌 (*P. placenta*) のゲノムデータベースを精査して 381 種類の P450 遺伝子候補を決定した。このうち遺伝子断片を除く 250 種の候補遺伝子を標的として PCR プライマーを設計し、RT-PCR による cDNA 獲得を試みた。検討の結果、種々の P450 遺伝子が発現する培養条件の決定に至った。最適条件下で培養した菌体より全 RNA を抽出し、RT-PCR による cDNA 増幅を試みたところ、216 種の P450 が実際に転写されることが明らかになった。また、184 種の完全長

cDNA を獲得することに成功した。既にライブラリー化を終了していた *P. chrysosporium* 由来 P450 遺伝子と合計して、304 種類の担子菌 P450 の完全長 cDNA ライブラリーが完成した。

(2) 機能ライブラリーの構築と網羅的機能探索

304 種類の担子菌 P450 完全長 cDNA を酵母用発現ベクターに連結し、*S. cerevisiae* に形質導入してリコンビナント酵素の発現を行った。P450 に特徴的な吸収スペクトルを分光学的に解析したところ、80%以上の担子菌 P450 が効率的に異種発現していることが示された。また、酵母生育培地にアミノレブリン酸を添加することで異種発現効率が向上した。各々の形質転換酵母を 96 ウェルプレートで培養し、迅速かつ網羅的な機能探索を可能とする機能性ライブラリーを作成した(図1)。



図1 担子菌 P450 の機能スクリーニングシステム
各々P450 を 96-well プレートで発現させ、基質を加えて微生物変換を行う。変換産物を HPLC や GC-MS を用いて分析する。

担子菌 P450 を異種発現する酵母に種々の化合物を添加して微生物変換を追跡し、50 種類の新規反応を明らかにした。また、化学構造が異なる種々の化合物を変換可能な担子菌 P450 も発掘され、本酵素群が担子菌の優れた異物代謝能を支える鍵酵素であることが示唆された。さらに、イソフラボン誘導体・スチルベン誘導体・植物由来ジテルペンに高い活性を示す分子種の発掘にも成功し(図2)、多種多様な生理活性物質の合成へ向けた知見が得られた。

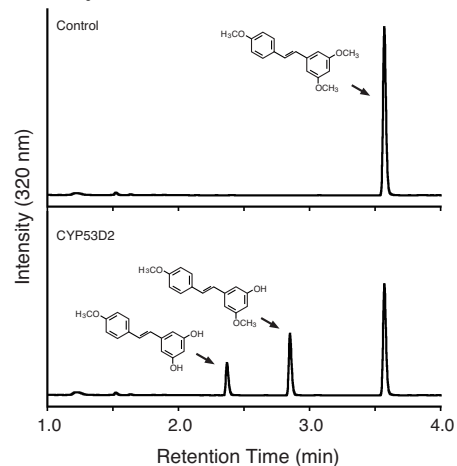


図2 CYP53D2 によるスチルベン類の変換生成物の HPLC 分析

(3) 有用酵素の機能解析

酵素機能が明らかになった担子菌 P450 の詳細な反応機構解明を試みた。白色腐朽担子菌由来 CYP5150A2 遺伝子を大腸菌発現ベクターに連結して *E. coli* C41(DE3) 株に形質転換したところ、シャペロンタンパク質を共発現させることで CYP5150A2 の大量発現が可能であった。また、アフィニティーおよびイオン交換クロマトグラフィーにより高純度の酵素を獲得することに成功した。精製酵素を用いて反応特性について検討したところ、本酵素が脂肪酸や安息香酸誘導体に極めて高い活性を示すことが明らかとなり (図 3)、CYP5150A2 を利用した液晶原料や化成品の合成に興味を持たれた。また、本酵素がシトクロム *b5* 依存的に活性を発現することが明らかになった。シトクロム *b5* と CYP5150A2 を共発現する大腸菌が高い P450 活性を有していたことから、バイオプロセスでの利用に期待が持たれた。

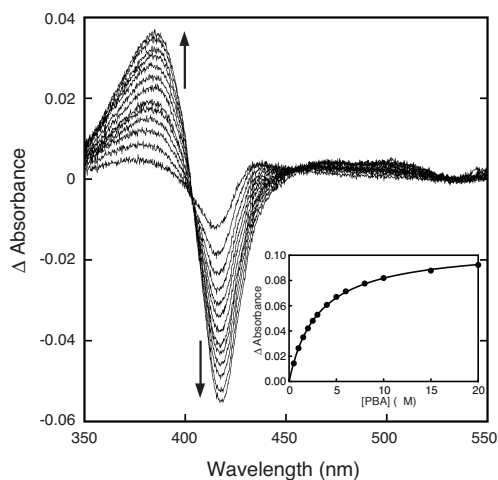


図 3 CYP5150A2 の基質結合スペクトル
精製酵素とペンチル安息香酸の結合スペクトル

(4) 研究成果のインパクトと展望

本研究で構築した P450 機能ライブラリーを用いることで、多種多様な酵素機能が明らかになった。一連の研究を通じて、有用化合物の合成を可能とする P450 も発掘され、有用 P450 の機能強化・機能改変を達成することでバイオプロセスの構築が促進されると期待している。

また、迅速・網羅的・実験的な機能探索が可能な「担子菌 P450 機能ライブラリー」は複製・保存が可能であり、種々の応用研究に利用することが出来る。これまで機能推定すら困難であった状況において、本研究成果のインパクトは大きく、様々な分野の研究を発展させる基盤技術として活用されることを期待している。

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 10 件)

1. Molecular and functional diversity of fungal cytochrome P450s. Ichinose H. *Biol. Pharm. Bull.* in press. (査読有)
2. Molecular identification and functional characterization of cytochrome P450 monooxygenases from the brown-rot basidiomycete *Postia placenta*. Ide M, Ichinose H., Wariishi H. *Arch Microbiol.* 2012 Apr;194(4):243-53. (査読有)
3. Heterologous expression and mechanistic investigation of a fungal cytochrome P450 (CYP5150A2): Involvement of alternative redox partners. Ichinose H., Wariishi H. *Arch Biochem Biophys.* 2012 Feb;518(1):8-15. (査読有)
4. Construction and application of a functional library of cytochrome P450 monooxygenases from the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. Nazir KHMNH, Ichinose H., Wariishi H. *Appl Environ Microbiol.* 2011 May;77(9):3147-50. (査読有)
5. Insight into functional diversity of cytochrome P450 in the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: Involvement of versatile monooxygenase. Hirosue S, Tazaki M, Hiratsuka N, Yanai S, Kabumoto H, Shinkyō R, Arisawa A, Sakaki T, Tsunekawa H, Johdo O, Ichinose H., Wariishi H. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011 Apr 1;407(1):118-23. Epub 2011 Mar 21. (査読有)
6. Cytochrome P450 monooxygenases involved in anthracene metabolism by the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Chigu NL, Hirosue S, Nakamura C, Teramoto H, Ichinose H., Wariishi H. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2010 Aug;87(5):1907-16. (査読有)
7. Molecular characterization and isolation of cytochrome P450 genes from the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. Nazir KHMNH, Ichinose H., Wariishi H. *Arch Microbiol.* 2010 May;192(5):395-408. (査読有)
8. Metabolism of mono- and dichloro-dibenzo-p-dioxins by *Phanerochaete chrysosporium* cytochromes P450. Kasai N, Ikushiro S, Shinkyō R, Yasuda K, Hirosue S, Arisawa A, Ichinose H., Wariishi H, Sakaki T. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2010 Mar;86(2):773-80. (査読有)
9. Atypical kinetics of cytochromes P450 catalysing 3'-hydroxylation of flavone from the white-rot fungus *Phanerochaete*

- chryso sporium*. Kasai N, Ikushiro S, Hiro sue S, Arisawa A, Ichinose H., Uchida Y, Wariishi H, Ohta M, Sakaki T. *J Biochem.* 2010 Jan;147(1):117-25. (査読有)
10. Enzymatic properties of cytochrome P450 catalyzing 3'-hydroxylation of naringenin from the white-rot fungus *Phanerochaete chryso sporium*. Kasai N, Ikushiro S, Hiro sue S, Arisawa A, Ichinose H., Wariishi H, Ohta M, Sakaki T. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 Sep 11;387(1):103-8. (査読有)

[学会発表] (計 17 件)

1. 真核微生物が有するシトクロム P450 の機能スクリーニング, 眞田 有規, 一瀬 博文, 割石 博之, 第 62 回日本木材学会大会, 2011.3.15, (札幌)
2. Molecular diversity and functional application of cytochrome P450 from basidiomycetes, Ichinose H., The 6th International Medicinal Mushrooms Conference, 2011.9.27, (Zagreb, Croatia)
3. 真核微生物が有するシトクロム P450: 機能解明と高度利用, 一瀬 博文, 第 84 回日本生化学会大会(シンポジウム), 2011.9.24, (京都)
4. Functionomic survey and catalytic application of cytochrome P450 monooxygenases from fungi, Ichinose H., Wariishi H., 17th International Conference on Cytochrome P450 Biochemistry, Biophysics and Structure, 2011.6.26, (Manchester, UK)
5. Functional application of fungal cytochrome P450 for bioindustry, Ichinose H., 33rd Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, 2011.5.2, (Seattle USA)
6. 担子菌が有するシトクロム P450 機能の解明と利用, 井手正迪, 一瀬 博文, 割石 博之, 第 61 回日本木材学会大会, 2011.3.19, (京都)
7. Functional characterization of cytochromes P450 from the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*, Nazir KHMN., Ichinose H., Wariishi H. The 10th International Symposium on Cytochrome P450 Biodiversity and Biotechnology, 2010.20.3, (Boston USA)
8. Molecular identification and functional characterization of cytochromes P450 from wood-rotting fungi, Ide M., Ichinose H., Wariishi H. The 10th International Symposium on Cytochrome P450 Biodiversity and Biotechnology, 2010.20.3, (Boston USA)
9. Molecular and functional characterization of cytochromes P450 from the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*, Nazir KHMNH., Ichinose H., Wariishi H. IMC9 The Biology of Fungi 2010.8.1, (Edinburgh UK)
10. Molecular diversity of cytochromes P450 from wood-rotting basidiomycetes, Ide M., Ichinose H., Wariishi H., IMC9 The Biology of Fungi 2010.8.1, (Edinburgh UK)
11. 褐色腐朽担子菌シトクロム P450 のクローニングおよび異種発現, 井手正迪, 一瀬 博文, 割石 博之, 第 60 回日本木材学会大会, 2010.3.17, (宮崎)
12. *Phanerochaete chryso sporium* が有するクロロペルオキシダーゼ遺伝子の単離および同定, 嶋岡隆行, 一瀬 博文, 割石 博之, 第 60 回日本木材学会大会, 2010.3.17, (宮崎)
13. Functional diversity and enzymatic application of cytochrome P450 from wood-rotting basidiomycetes, Ichinose H., Hiro sue H., Tazaki M., Arisawa A., Jodo O., Wariishi H. Asia pacific biochemical engineering conference, 2009.11.25, (Kobe Japan)
14. 木材腐朽担子菌におけるシトクロム P450 分子種の多様性, 井手正迪, 一瀬 博文, 割石 博之, 第 54 回リグニン討論会, 2009.10.29, (静岡)
15. Molecular characterization and isolation of cytochrome P450 genes from *Aspergillus oryzae*, Nazir KHMN.H., Ichinose H., Wariishi H. 16th International Conference on Cytochrome P450, 2009.6.21, (Okinawa Japan)
16. Gene expression profiling and enzymatic function of *Phanerochaete chryso sporium* cytochrome P450 involved in xenobiotic metabolism of aromatic compounds, Chigu N.L., Ichinose H., Wariishi H. 16th International Conference on Cytochrome P450, 2009.6.21, (Okinawa Japan)
17. Functional characterization of cytochrome P450 from the white-rot fungus *Phanerochaete chryso sporium*, Ichinose H., Hiro sue H., Tazaki H., Arisawa H., Jodo H., Wariishi H., 16th International Conference on Cytochrome P450, 2009.6.21, (Okinawa Japan)

[その他]

ホームページ等

<http://brc.wood.agr.kyushu-u.ac.jp/madlab/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

一瀬 博文 (ICHINOSE HIROFUMI)

九州大学・大学院農学研究院・助教

研究者番号：00432948