

平成 21 年 4 月 10 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18780056

研究課題名 (和文) 触媒微生物内における酸化酵素反応の局所的速度論解析

研究課題名 (英文) Intracellular kinetic analysis of oxygenases in whole-cell catalysts

研究代表者

本田 孝祐 (HONDA KOUSUKE)

大阪大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：90403162

研究成果の概要：

酸化酵素反応において宿主微生物由来の因子が目的酵素の反応速度に及ぼす影響を明らかにすることを目的に、大腸菌 1 遺伝子破壊株を宿主とした網羅的スクリーニングを実施し、欠損により、酸化酵素反応速度を増長しうる 3 種類の遺伝子を同定した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,400,000	0	1,400,000
2007 年度	1,100,000	0	1,100,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	210,000	3,410,000

研究分野：応用微生物学

科研費の分科・細目：農芸化学・微生物利用学

キーワード：生体機能利用、応用微生物、酵素反応、反応場制御

## 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) に代表される酸化酵素群は多様な化合物に対する位置・立体選択的な水酸化反応を触媒可能であるため化学品生産業における触媒としても利用価値が高い。一方、これらの酵素は目的酵素のほかに補酵素や電子伝達のためのレドックスパートナーを必要とするため、実際の利用にあたっては、目的酵素を内包する微生物細胞そのものを触媒として用いる必要がある。すなわち、これらの酵素反応は宿主細胞由来の因子の影響を多分に受けると予想される。研究開始当時、進化工学的手法などによる目的酵素自身の

改良については複数の報告が散見されたが、宿主を改良し、反応効率を高めるといった観点からのアプローチはほとんど見られなかった。

本実施課題では、酵素反応に対し、これを内包する宿主由来の因子 (遺伝子) が及ぼす影響を網羅的かつ定量的に評価するためのツールとして大腸菌 1 遺伝子破壊株ライブラリー (Keio collection) を使用した。すなわち、本ライブラリーは、汎用宿主細菌である大腸菌において、これが有する約 4000 の遺伝子のうち、生育に必須なものを除いた約 3800 のそれぞれを個別にノックアウトした変異株ライブラリーである。Keio collection

を用いた研究報告例は数多く見られるが、これらはいずれも大腸菌の栄養要求性やコロニー形態、走化性といった比較的アッセイしやすい表現系に対して、遺伝子の影響を網羅的に調査したものである。約 3800 にのぼる変異株のすべてに対して産業用酵素遺伝子ベクターを導入し、その活性をアッセイするというチャレンジングな取り組みは、研究開始当初から現在に至るまで、本研究課題を除いて実施された例は見られない。

## 2. 研究の目的

産業上重要な酸化酵素に対し、これを内包する微生物宿主由来の因子（遺伝子）が目的酵素に及ぼす影響を定量化するとともに、有効な変異導入により触媒微生物の反応効率を向上させることを目的とした。

## 3. 研究の方法

Keio collection を構成する各遺伝子破壊株に対し、*Streptomyces* 属細菌由来のシクロム P450 モノオキシゲナーゼ（CYP154A1）発現ベクターを導入し、各遺伝子破壊株における酵素活性を定量、野生株を宿主としたものと比較した。マルチウェルプレート上での培養および反応による高スループットスクリーニング、ならびに試験管スケールでの 2 次スクリーニングにより野生株に比して有意な活性上昇を示した変異株を選抜した。高活性株の得られた高活性株について、CYP154A1 活性の向上が当該遺伝子の不活化によるものであること、すなわちゲノム上の他の突然変異の結果でないことを確認するため、野生株から再度当該遺伝子を除去したものを調製し、これを宿主とした活性測定を実施した。さらにここで高活性を示した株について、削除した遺伝子を相補プラスミドベクターにより再導入し、CYP154A1 活性の再低減を確認した。

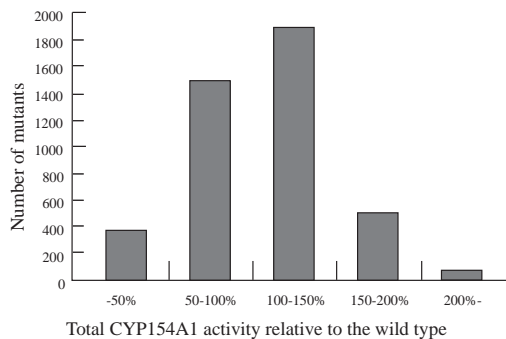


図 1 1 次スクリーニングにおける CYP154A1 活性の分布

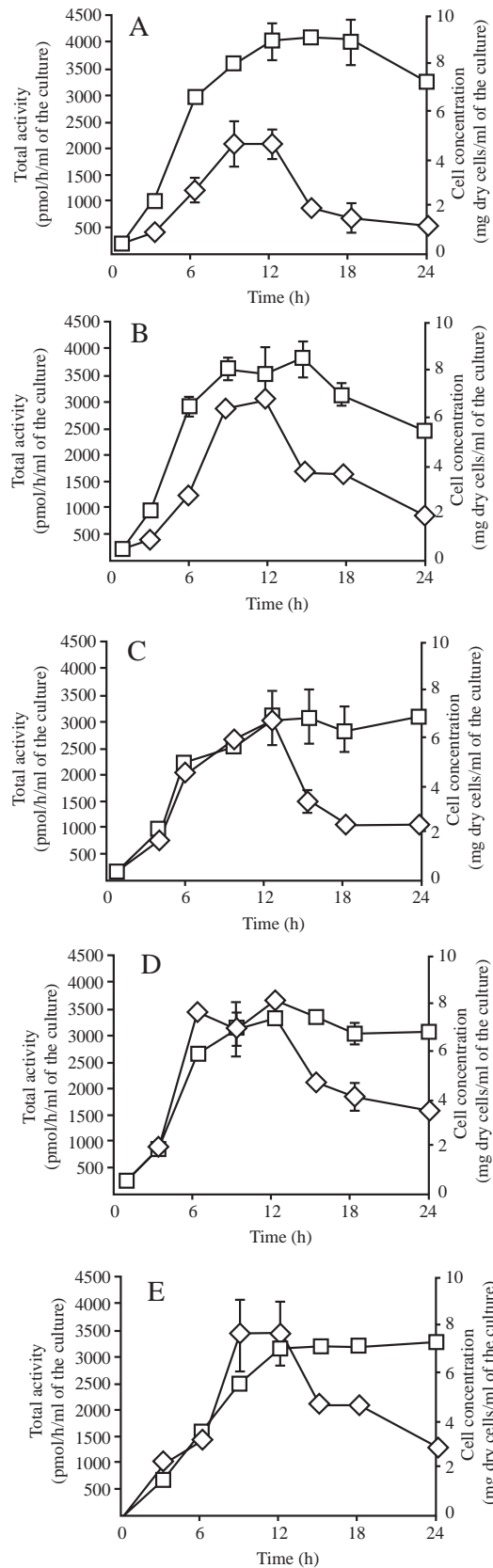


図 2 野生株 (A)、 $\Delta$ cpxA (A)、 $\Delta$ gcvR (A)、 $\Delta$ glnL (A)、および  $\Delta$ uk 株における生育曲線 (□) と CYP154A1 活性の経時変化 (◇)

#### 4. 研究成果

Keio collection 由来の約 3800 の遺伝子破壊株に対する形質転換と CYP154A1 活性を指標としたスクリーニングの結果、4 株の遺伝子破壊株において、野生株に対して 1.4~1.7 倍程度の活性の向上が見いだした (図 1)。

野生株より当該遺伝子の再破壊と再破壊株における活性評価を行った結果、このうち 3 株 ( $\Delta cpxA$ ,  $\Delta gcvR$ ,  $\Delta glnL$ ) においてスクリーニング時と同様の高活性が得られた (図 2)。再破壊株において活性の向上が認められなかった株 ( $\Delta uk$ ) については、Keio collection 中の同株のゲノム上に存在した突然変異により CYP154A1 活性が向上していたものと考えられる。

Keio collection における遺伝子破壊は、対象とする遺伝子を抗生物質 (カナマイシン) 耐性遺伝子と置換することによって行われている。このため、破壊株では対象遺伝子の下流にコードされる別の遺伝子の転写量への影響が無視できない。上記 3 株における活性向上が対象遺伝子の不活化によるものであるか否かを確認するため、各遺伝子に対し、下流遺伝子への転写量変化が低減できる in frame deletion 法による破壊を実施した。この結果得られた遺伝子破壊株は Keio collection 由来のそれらと同等の活性を示し、上記 3 つの遺伝子を不活化することにより CYP154A1 活性が向上していることが強く示唆された。さらなる確認のため、各 in frame deletion 株に対し、対象遺伝子をプラスミドベクターにより相補した株を構築し、これらを宿主とした CYP154A1 活性を測定したところ、いずれも野生株と同様、あるいはそれ以下の活性値を示した (表 1)。

以上のように本研究を通じて、産業上重要とされる P450 反応において、これを内包する触媒微生物の活性を向上させる複数の遺伝子欠損を明らかにすることができた。大腸菌一遺伝子破壊株ライブラリーは微生物の表現型・遺伝子型の相関を明らかにする手

表 1 得られた遺伝子破壊株ならびにこれらの in frame deletion 株と相補株の CYP154A1 活性。活性は野生株に対する相対活性 (%) で記した。

菌株	破壊遺伝子			
	$\Delta cpxA$	$\Delta gcvR$	$\Delta glnL$	$\Delta uk$
Keio collection 株	147	172	142	161
再破壊株	162	163	131	61.9
In-frame deletion 株	141	162	139	n.d.
In-frame deletion 株+コントロールベクター	141	75.7	140	n.d.
In-frame deletion 株+相補ベクター	99.1	37.7	105	n.d.

立てとして広く認知されつつあるが、これまでに見られている研究は、大腸菌の形体や運動性など比較的アッセイしやすい表現系についてのみである。本研究は約 4000 からなるライブラリーに形質転換、酵素活性測定を行い有用な変異を網羅的に見出した初めての実施例である。

今後、P450 に限定せず様々な産業用酵素の活性発現に今回見出された遺伝子欠損の影響を調査することにより、本研究成果の有用性をさらに押し広げていくことが期待される。

#### 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 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

- 1) Zhou, Y., Minami, T., Nishino, T., Nugroho, D.A., Honda, K., Omasa, T., Ohtake, H “Screening of *Escherichia coli* single-gene knockout mutant which could enhance a P450 activity” 日本農芸化学会 2008 年度大会、2008 年 3 月 名古屋
- 2) Zhou, Y., Honda, K., Omasa, T., Ohtake, H “Screening of *Escherichia coli* single-gene knockout mutants which are able to enhance the deethylation of 7-ethoxycoumarin catalyzed by CYP154A1” BioMicroWorld2007, Dec. 2007, Seville, Spain.
- 3) 西野琢磨、Zhou Ying, Darmawan Ari Nugroho、本田孝祐、大政健史、大竹久夫「シトクロムP450 モノオキシゲナーゼ活性に影響を及ぼす細胞構成因子の探索」生物工学会 2007 年度大会 2007 年 6 月 広島

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

本田 孝祐 (HONDA KOUSUKE)

大阪大学・大学院工学研究科・助教  
研究者番号：90403162

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者