

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K05851

研究課題名(和文)多機能型チトクロームP450酵素MycGの反応制御に向けた研究

研究課題名(英文)Study for reaction control of multifunctional cytochrome P450 enzyme MycG

研究代表者

安齊 洋次郎 (Anzai, Yojiro)

東邦大学・薬学部・教授

研究者番号：20318299

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：Micromonospora griseorubida A11725が生産するマクロライド系抗生物質 mycinamicinの生合成における複数種類の酸化反応に関与する多機能型チトクロームP450酵素MycGの反応制御を試みた。生合成中間体であるmycinamicin- (M-) のエポキシ化が滞る3種類のMycG変異体をMycG変異体ライブラリーから取得した。MycG変異体V135G/E355Kをコードする遺伝子をmycG破壊株M. griseorubida TPMA0025へ導入したM. griseorubida TPMA0075は野生株やコントロール株よりもM- を10～40倍多く生産した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
複数種類の触媒反応を示す多機能型酵素の部分的な触媒反応の制御は、酵素反応や発酵における目的化合物や稀少化合物の効率的な取得や生産に繋がる。

研究成果の概要(英文)：We attempted to regulate the reaction of the multifunctional cytochrome P450 enzyme MycG, which is involved in several kinds of oxidation reactions in the biosynthesis of 16-membered ring macrolide antibiotic mycinamicin produced by Micromonospora griseorubida A11725. Three MycG mutants in which epoxidation of the biosynthetic intermediate M-V is retarded were obtained from the MycG random mutant library. M. griseorubida TPMA0075, in which the gene encoding the mycG mutant V135G/E355K was introduced into the mycG gene disruptant strain M. griseorubida TPMA0025, produced 10 to 40 times more amount of M-V than the wild strain M. griseorubida A11725 or the control strain M. griseorubida TPMA0047 (M. griseorubida TPMA0025 + mycG).

研究分野：微生物化学

キーワード：多機能型酵素 チトクロームP450酵素 マクロライド系抗生物質 生合成 反応制御

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

抗生物質の生合成経路においては、酸化、メチル化、アシル化、糖転移などの修飾反応が抗生物質の母核の形成とともに進められ、抗生物質の構造および生物活性の多様化に重要な役割を担っている。その重要な反応の一つである酸化反応を触媒するチトクロム P450 酵素 (P450 酵素) は水酸化、脱水素、エポキシ化、脱メチル化など多種多様な酸化反応を司る。多機能型 P450 酵素はこれら酸化反応を複数回触媒する酵素であり、その酸化反応の多彩さから、多様な化合物の生産に関与しうる魅力的な酵素であるが、一方、医薬品などの有用化合物の大量生産に応用する際は、この多様な酸化反応による副産物生産が問題となる可能性もある。

(1) 放線菌 *Micromonospora griseorubida* A11725 が生産する 16 員環マクロライド抗生物質 mycinamicin の生合成におけるラクトン環への C-14 水酸基と C-12,13 エポキシ環形成を触媒する多機能型 P450 酵素 MycG の機能解析が酵素レベル、生産菌レベルで解明された (図 1、引用文献)。また、共同研究者の米国シガン大学 DH Sherman 教授らは、X 線結晶構造解析により、MycG の本来の基質である mycinamicin (M-) は C-21 の mycinose 側が活性中心に向くが、その前駆体である mycinamicin (M-) では C-21 の javose 側が活性中心に向く従来の方向とは別に C-5 の desosamine 側が活性中心に向く可能性を見出した (引用文献)。また、NMR 法による分子間相互作用解析により、MycG と M- の結合様式を解明した (引用文献)。しかし、これらの詳細な機能解析において、C-14 水酸基と C-12,13 エポキシ環形成を制御する MycG のアミノ酸残基は同定されていなかった。

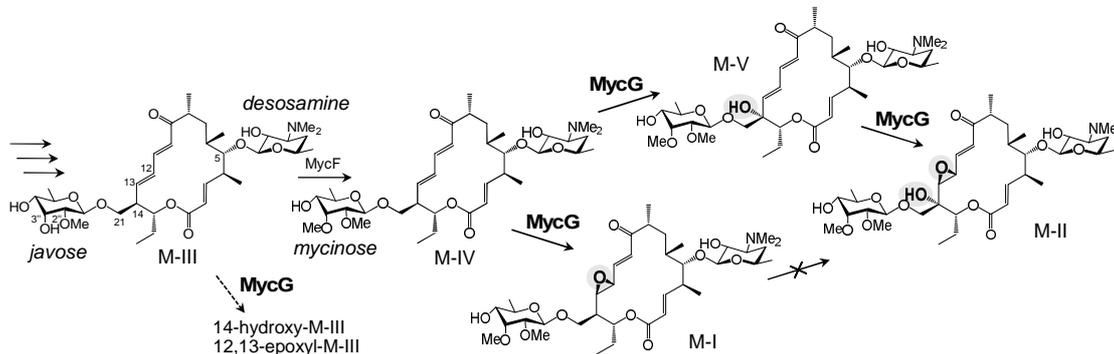


図1 *M. griseorubida* A11725のmycinamicin 生合成における多機能型 P450 MycG の機能

(2) DH Sherman 教授らの異種電子伝達タンパク質による研究では、P450 の反応には電子伝達タンパク質のフェレドキシン (Fd) とフェレドキシン NADP⁺ 酸化還元酵素 (FNR) が必要である。放線菌 *Rhodococcus* sp. NCIMB9784 がもつ P450 と Fd と FNR との融合型酵素 RhF の電子伝達タンパク質融合領域 (FNR-Fd) を電子伝達タンパク質として用いた MycG の *in vitro* 反応において、MycG の本来の基質ではない M- , mycinamicin (M-) , mycinamicin (M-) や最終産物 mycinamicin (M-) での C-5 の desosamine のアミノ基の脱メチル化を見出したが、MycG と FNR-Fd との融合型酵素では脱メチル化体を得られなかった (図 2、引用文献)。異種電子伝達タンパク質を用いた MycG の第 3 の触媒反応である脱メチル化反応は MycG の新たな興味深い反応であるが、それを制御するアミノ酸残基は同定されてなく、また、生産菌での脱メチル化反応も確認されていなかった。

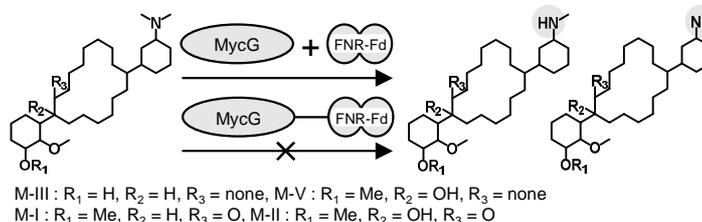


図2 異種電子伝達タンパク質との結合様式の違いによるMycGの反応

(3) 事前の実験により MycG-FNR-Fd 融合型酵素遺伝子の *mycG* 遺伝子破壊株 *M. griseorubida* TPMA0025 への導入による MycG 機能の回復は確認されたが、一方、*M. griseorubida* A11725 などへの異種 FNR-Fd の遺伝子を導入した菌株では *in vitro* 反応で見られた脱メチル化体の生産は確認されなかった。これは mycinamicin 生産株がもつ native な Fd と FNR が優先的に機能した結果と考えられ、生産株で P450 を利用する場合、生産株由来の Fd と FNR の影響が少ない融合型酵素が有効であることを示唆するものであった。

2. 研究の目的

(1) 16員環マクロライド抗生物質 mycinamicin の生合成に関与する多機能型 P450 酵素 MycG が触媒する C-14 水酸化、C-12,13 エポキシ環形成、C-5 の desosamine のアミノ基の脱メチル化に関与するアミノ酸残基の同定を行う。

(2) (1)の成果をもとに構築した MycG 変異体の酵素活性試験を行い、3種類の酸化反応のうちの一つあるいは2つが不活性となった人為的に各酸化反応が制御された変異型 MycG を取得する。そして、取得した変異型 MycG の遺伝子を *mycG* 遺伝子破壊株に導入し、mycinamicin 生産における変異型 MycG の効果を確認する。

(3) 野生型ならびに(2)で取得した変異型 MycG に *Rhodococcus* sp. NCIMB9784 の RhF の FNR-Fd などの利用可能な FNR-Fd との融合酵素を構築し、その有用性を検証する。また、FNR-Fd 内への変異の導入による MycG の3種類の酸化反応への影響を検証する。

3. 研究の方法

(1) 多機能型 P450 酵素 MycG を発現誘導した大腸菌菌株による微生物変換実験系を構築した。*M. griseorubida* A11725 がもつ P450 酵素遺伝子 *mycG* を P450 酵素発現ベクター-pCYPcamAB に挿入した pMCGcamAB を *E. coli* Rosseta 2 (DE3) へ導入した。微生物変換では IPTG、5-アミノレブリン酸により MycG を発現誘導した大腸菌菌株の菌液を用いた。

(2) MEGAWHOP 法を用いた P450 酵素遺伝子 *mycG* のランダム変異導入を行った。エラープロオン PCR でランダムに変異を導入した *mycG* 領域をもつ pMCGcamAB を *E. coli* Rosseta 2 (DE3) に導入し、*mycG* ランダム変異ライブラリーを構築した。これらライブラリーの菌株は M- を基質とした微生物変換試験にて評価した。反応性に変化が認められた *mycG* ランダム変異遺伝子の変異箇所を特定し、変異箇所の再構築により変異型 MycG 遺伝子を取得した。

(3) 変異型 MycG 遺伝子を *M. griseorubida* TPMA0025 に導入し、mycinamicin の生産性について評価した。大腸菌 - 放線菌接合用シャトルベクター-pSET152 に変異型 MycG 遺伝子を挿入したプラスミドを *M. griseorubida* TPMA0047 へ *E. coli* S17-1 からの接合伝達により導入した。取得した接合株の培養液中の mycinamicin の生産量は HPLC により測定した。

(4) *Rhodococcus* sp. NCIMB9784 の融合型 P450 酵素 RhF の FNR-Fd と MycG を結合させた融合型 P450 酵素である MycG+RhFRED の遺伝子をもつプラスミド pET28b-mycG-RhFRED の FNR-Fd に MEGAWHOP 法を用いてランダムに変異を導入し、得られたライブラリーを用いた mycinamicin を基質とした微生物変換試験を行った。反応性に変化が認められたランダム変異遺伝子の変異箇所を特定、変異箇所の再構築により変異型 MycG+RhFRED 遺伝子を取得した。*M. griseorubida* TPMA0047 へ変異型 MycG+RhFRED 遺伝子を導入し、取得した接合株の培養液中の mycinamicin の生産量は HPLC により測定した。

4. 研究成果

(1) *Pseudomonas putida* のレドックスパートナーである CamA,B と共に MycG が発現する pMCGcamAB をもつ *E. coli* Rosseta 2 (DE3) による mycinamicin 生合成中間体の微生物変換試験法を確立した。*mycG* がランダムに変異された pMCGcamAB を有する組換え大腸菌による M-IV の微生物変換試験の結果、最終産物である M- への変換率が顕著に低下した MycG 変異体 RM92, RM96, RM98 を取得した。各変異体における *mycG* 遺伝子の塩基配列の変異箇所のうちアミノ酸置換につながる変異は1~3か所であった。これら変異を1あるいは2か所もつ MycG 変異体における M-IV の微生物変換試験の結果、RM92 に由来する変異体 R111Q/V358L、RM96 の W44R はいずれも M- と M- の間の生合成中間体である M- の蓄積が確認され、RM98 に由来する変異体 V135G/E355K では M- の蓄積に加え M- の減少が確認された。(図3)

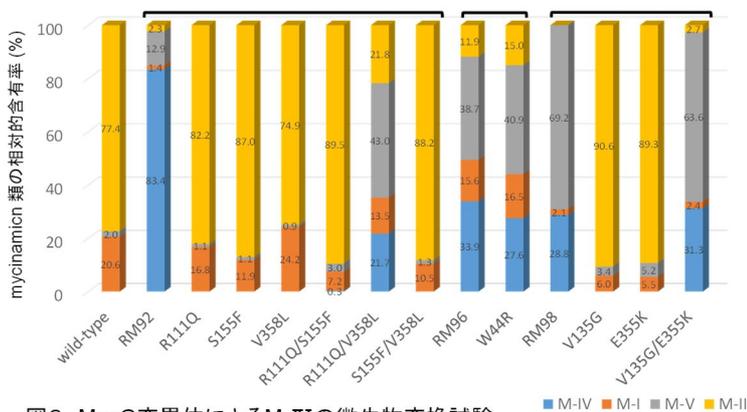


図3 MycG変異体によるM-IVの微生物変換試験

MycG 変異体 R111Q/V358L、V135G/E355K に変異箇所である 355 番と 358 番のアミノ酸残基であるグルタミン酸(E)とバリン(V)はヘム結合領域をもつ L ヘリックス内のアミノ酸残基であった。135 残基目のバリン(V)は E ヘリックス上のアミノ酸残基ではあるが、基質結合領域をもつ I ヘリックスに向かっていた。変異体 W44R の変異箇所である 44 番目のトリプトファン(W)は、基質結合領域の -シートに位置するアミノ酸残基であった(図4)。

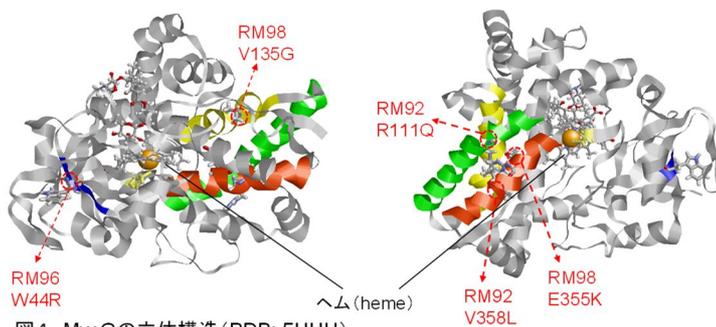


図4 MycGの立体構造(PDB: 5UHU)

(2) 微生物変換試験で M- の蓄積や M- の減少が確認された MycG 変異体 R111Q/V358L、W44R、V135G/E355K の遺伝子を *M. griseorubida* TPMA0025 に導入した菌株を mycinamicin 生産培地である FMM medium に 10 日間、振とう培養した。培養液中の mycinamicin を測定したところ、MycG 変異体 V135G/E355K の遺伝子を導入した *M. griseorubida* TPMA0075 の M- の生産量は $12.4 \pm 4.0 \mu\text{g/mL}$ であり、*M. griseorubida* A11725 や *M. griseorubida* TPMA0025 に野生型 MycG 遺伝子を導入した *M. griseorubida* TPMA0047 の M- の生産量より 10~40 倍高かった。一方、R111Q/V358L、W44R の変異体遺伝子を導入した *M. griseorubida* TPMA0073、TPMA0074 の M- の生産量は $0.6 \pm 0.5 \mu\text{g/mL}$ 、 $4.0 \pm 0.1 \mu\text{g/mL}$ であり、顕著な生産量の増加は確認されなかった(表1)。

表1 *M. griseorubida* 菌株の mycinamicin 生産量

| Strain | MycG | Mycinamicin 生産量 ($\mu\text{g/mL}$) | | | |
|----------|-------------|--------------------------------------|---------------|----------------|----------------|
| | | M-IV | M-I | M-V | M-II |
| A11725 | wild-type | 0.0 | 3.0 ± 0.4 | 0.3 ± 0.2 | 11.1 ± 0.3 |
| TPMA0047 | wild-type | 1.3 ± 0.7 | 3.4 ± 1.0 | 1.1 ± 0.8 | 7.7 ± 1.8 |
| TPMA0073 | R111Q/V358L | 0.4 ± 0.4 | 3.5 ± 2.1 | 0.6 ± 0.5 | 7.0 ± 4.0 |
| TPMA0074 | W44R | 9.5 ± 1.2 | 1.7 ± 0.6 | 4.0 ± 0.1 | 4.8 ± 0.4 |
| TPMA0075 | V135G/E355K | 5.7 ± 0.4 | 0.6 ± 0.1 | 12.4 ± 0.4 | 3.3 ± 1.0 |

(3) MycG の C 末端に *Rhodococcus* sp. NCIMB9784 の融合型 P450 酵素である RhFRED を結合させた融合型 P450 酵素である MycG+RhFRED の遺伝子をもつ pET28b-mycG-RhFRED の FNR-Fd に MEGAWHOP 法を用いてランダムに変異を導入した。M- を基質とした微生物変換試験の結果、最終産物である M- への変換率が顕著に低下した MycG+RhFRED 変異体 H47、H55、H56、H106 を取得した。各変異体における RhFRED 領域の遺伝子の塩基配列の変異のうちアミノ酸置換につながる変異は 1~4 か所であった。これら変異を 1 あるいは 2 か所もつ MycG 変異体を用いた M-IV の微生物変換試験では、いずれの変異体も M- への変換は確認されず、M-、M- の蓄積が確認された。一方、これら MycG+RhFRED 変異体の遺伝子を *M. griseorubida* TPMA0025 に導入した菌株の液体培養液には M- の生産が確認された。MycG+RhFRED では融合された Fd と FNR の機能が優先されると予想していたが、この結果は mycinamicin 生産株がもつ native な Fd と FNR が何らかの形で MycG に機能に影響を与えた可能性を示すものであり、更なる検証が必要である。

<引用文献>

- Yojiro Anzai, Shengying Li, Mani Raj Chaulagain, Kenji Kinoshita, Fumio Kato, John Montgomery, David H Sherman, Functional analysis of MycCl and MycG, cytochrome P450 enzymes involved in biosynthesis of mycinamicin macrolide antibiotics. *Chemistry and Biology*, vol. 15, 2008, 950-959
- Yojiro Anzai 1, Shu-ichi Tsukada, Ayami Sakai, Ryohei Masuda, Chie Harada, Ayaka Domeki, Shengying Li, Kenji Kinoshita, David H Sherman, Fumio Kato, Function of cytochrome P450 enzymes MycCl and MycG in *Micromonospora griseorubida*, a producer of the macrolide antibiotic mycinamicin, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 56, 2012, 3648-3656
- Shengying Li 1, Drew R Tietz, Florentine U Rutaganira, Petrea M Kells, Yojiro Anzai, Fumio Kato, Thomas C Pochapsky, David H Sherman, Larissa M Podust, Substrate recognition by the multifunctional cytochrome P450 MycG in mycinamicin hydroxylation and epoxidation reactions, *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 287, 2012, 37880-37890
- Drew R Tietz, Larissa M Podust, David H Sherman, Thomas C Pochapsky, Solution Conformations and Dynamics of Substrate-Bound Cytochrome P450 MycG, *Biochemistry*, vol. 56, 2017, 2701-2714
- Wei Zhang, Yi Liu, Jinyong Yan, Shaona Cao, Fali Bai, Ying Yang, Shaohua Huang,

Lishan Yao, Yojiro Anzai, Fumio Kato, Larissa M Podust, David H Sherman, New reactions and products resulting from alternative interactions between the P450 enzyme and redox partners, *Journal of the American Chemical Society*, vol. 136, 2014, 3640-46

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Iizaka, Y., Arai, R., Takahashi, A., Ito, M., Sakai, M., Fukumoto, A., Sherman, D. H., Anzai, Y. | 4. 巻 49 |
| 2. 論文標題 Engineering sequence and selectivity of late-stage C-H oxidation in the MycG iterative cytochrome P450 | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology | 6. 最初と最後の頁 kuab069 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jimb/kuab069 | 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 該当する |

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Iizaka Yohei, Sherman David H., Anzai Yojiro | 4. 巻 105 |
| 2. 論文標題 An overview of the cytochrome P450 enzymes that catalyze the same-site multistep oxidation reactions in biotechnologically relevant selected actinomycete strains | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Applied Microbiology and Biotechnology | 6. 最初と最後の頁 2647 ~ 2661 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00253-021-11216-y | 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 該当する |

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 飯坂 洋平、山田 茉莉、越野 翠麗、高橋 沙和、福本 敦、安齊 洋次郎 |
| 2. 発表標題 酸化酵素の異種発現によるハイブリッド型マクロライド系抗生物質生産系の構築 |
| 3. 学会等名 日本薬学会 第143年会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 飯坂洋平、山田茉莉、越野翠麗、福本敦、安齊洋次郎 |
| 2. 発表標題 酸化酵素MycGを応用したハイブリット型マクロライド系抗生物質の生産 |
| 3. 学会等名 第34回微生物シンポジウム |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Yojiro Anzai, Yohei Iizaka, Atsushi Fukumoto, Fumio Kato |
| 2. 発表標題 Functional analysis and application of multifunctional P450 enzyme MycG in biosynthetic pathway of 16-membered macrolide antibiotic mycinamicin. |
| 3. 学会等名 The First International Conference of Natural and Biological Resources Technologies. Ulaanbaatar, Mongolia (国際学会) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 飯坂洋平, 萩原瑠花, 重松優香, 福本敦, 安齊洋次郎 |
| 2. 発表標題 電子伝達機構を介した多機能型シトクロムP450酵素MycGの反応制御 |
| 3. 学会等名 日本薬学会 第142年会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 飯坂洋平, 伊藤みき乃, 酒井美穂, 澤井香奈子, 山田茉莉, 福本敦, 安齊洋次郎 |
| 2. 発表標題 シトクロムP450酵素MycGの反応制御に基づく希少な生合成中間体の効率的な生産 |
| 3. 学会等名 第33回微生物シンポジウム |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 飯坂洋平, 高橋あかり, 伊藤みき乃, 酒井美穂, 福本敦, 安齊洋次郎 |
| 2. 発表標題 多機能型シトクロムP450酵素MycGの多段階酸化反応に関与するアミノ酸残基の同定 |
| 3. 学会等名 日本薬学会 第141年会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 飯坂 洋平、荒井 瑠星、高橋 あかり、福本 敦、安齊 洋次郎 |
| 2. 発表標題 多機能型シトクロムP450酵素MycGの酸化反応制御に関する研究 |
| 3. 学会等名 日本薬学会第140年会 |
| 4. 発表年 2019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 |
|-------|--|--------------------------------|----|
| 研究分担者 | 福本 敦 (Fukumoto Atsushi) (50516391) | 東邦大学・薬学部・講師 (32661) | |
| 研究分担者 | 飯坂 洋平 (Iizaka Yohei) (40770425) | 東邦大学・薬学部・講師 (32661) | |

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 | | |
|---------|---------|--|--|
| 米国 | ミシガン大学 | | |