

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24688034

研究課題名(和文) 真核微生物P450の高機能化とタンパク質ライブラリの構築

研究課題名(英文) Protein library and functional engineering of fungal cytochromes P450

研究代表者

一瀬 博文 (Ichinose, Hirofumi)

九州大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00432948

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,700,000円

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に由来する304種類のシトクロムP450を用いて、大腸菌を宿主とする膜結合型P450の異種高発現技術を開発した。一連の研究において、P450の異種発現レベルを飛躍的に向上させるN末端配列が見出され、種々のP450をキメラ型酵素として高発現させることが可能になった。本研究において、60種類の真核微生物P450を大腸菌に高発現させたタンパク質ライブラリが完成した。また、麹菌に由来するP450を遺伝子工学的に機能強化して高いイソフラボン変換活性を実現し、生理活性物質生産に向けた有用P450の創出に成功した。

研究成果の概要(英文)：We performed extensive heterologous expression of fungal cytochrome P450s in *Escherichia coli* using 304 isoforms from white-rot and brown-rot basidiomycetes. Based upon a large-scale screening, we confirmed that at least 27 P450s could be expressed with/without simple sequence deletion at the 5' end of cDNAs, which encode the N-terminal hydrophobic domain of the enzyme. Moreover, we identified N-terminal amino acid sequences that can potentially be used to construct chimeric P450s, which could dramatically improve their expression levels even when the expression of the wild-type sequence was unpromising. So far, we constructed a protein library in which 60 fungal P450s were overexpressed in *E. coli*. In addition, catalytic potentials of *Aspergillus oryzae* P450s were improved by genetic engineering to show high activity against flavonoid compounds. The engineered P450s are potentially useful for production of bioactive compounds.

研究分野：生物工学

キーワード：シトクロムP450 真核微生物 タンパク質 異種発現

## 1. 研究開始当初の背景

シトクロム P450 (P450) は生物界に広く分布するモノオキシゲナーゼであり、ホルモン合成や異物代謝など多種多様な二次代謝機構に重要な役割を果たしている。P450 ファミリーほど多彩な機能を持つ酵素群は他になく、各々生物が独自の進化戦略で P450 機能を多様化させ、生物種に特徴的な代謝機構を獲得したと考えられる。とりわけ、真核微生物においては極めて多様な P450 ファミリーが存在しており、糸状菌類の優れた物質変換能力が P450 機能の多様性によって支えられていることを示唆している。また、P450 が有機合成反応では難しい位置・立体特異的な酸素添加反応を可能にすることから、産業界における有用触媒ツールとしての期待も大きく、P450 機能の解明を通じたバイオ産業の創成にも興味を持たれている。

近年、様々な生物の全ゲノム解析が進められており、今日までに 1 万 5 千種類を超える P450 遺伝子が発見されている。ゲノム解析から見出される P450 の機能を実験的に解明し、生物多様性の理解を目指すとともに、産業技術の発展を支える有用反応の発掘に興味を持たれる。また、P450 がタンパク質の基本構造を保存しながら、基質結合空間を微細に変化させて機能多様性を生み出すことに着目すれば、「配列-構造-機能」の統合的理解を通じた酵素機能デザインにも大きな期待が持たれる。

## 2. 研究の目的

P450 機能の多様性理解と高度利用には、酵素機能の諸特性を *in vitro* で決定し、生化学的知見を拡充することが肝要である。しかしながら、真核生物に由来する P450 の多くが膜結合型タンパク質であることから異種発現の難易度は高く、組換えタンパク質の獲得には未だ試行錯誤が求められている。特に大腸菌を用いた異種発現システムにおいては、目的タンパク質の大量獲得が期待されるものの、信頼性・普遍性・汎用性の高い実験技術は未だ開発されていない。

本研究では、白色腐朽担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* および褐色腐朽担子菌 *Postia placenta* に由来する 304 種類の P450 を対象に、異種発現の可否を網羅的に追跡し、異種発現におよぼすアミノ酸配列の諸特性を検討することで、大腸菌を宿主とする膜結合性 P450 の異種高発現技術の開発を目指した。さらに、既存の手法では困難な種々の真核微生物 P450 の大量発現を達成し、「配列-構造-機能」の統合的理解へ向けたタンパク質ライブラリの構築を目指した。また、先行研究で明らかにした担子菌や麹菌 *Aspergillus oryzae* に由来する P450 の有用機能を遺伝子工学的に強化するとともに、大腸菌における P450 電子伝達経路を活性化することで、大腸菌を宿主とする高効率物質変換システムの構築にも挑戦した。

## 3. 研究の方法

### (1) 大腸菌を宿主とする P450 の異種発現

白色腐朽菌 *P. chrysosporium* に由来する 119 分子種および褐色腐朽菌 *P. placenta* に由来する 185 分子種の P450 を供試遺伝子とし、タンパク質 N 末端領域に存在する膜貫通領域 (TMD) に部分欠損を施した cDNA を作製して大腸菌発現ベクター (pET22) のクローニングサイトに連結した。pET 発現ベクターは *E. coli* C41 (DE3) 株に形質転換し、発現誘導剤を加えた後、所定時間培養して異種発現の可否を網羅的に追跡した。大腸菌に蓄積する P450 は、無細胞抽出液の一酸化炭素結合型スペクトルを測定することで定量した。

### (2) N 末端キメラ酵素の創出

*P. chrysosporium* に由来する CYP5037E1v1, CYP5148A1, CYP5150E1v2 をモデル分子種に利用し、当該酵素の N 末端領域を 100 種類の異なる P450 の N 末端領域と置換することでキメラ型配列を作製した。キメラ型 P450 は pET22 に連結して発現ベクターを構築して異種発現実験に供した。

### (3) 有用 P450 の機能強化

*A. oryzae* に由来する種々の有用 P450 にランダムミューテーションを導入し、酵素活性を向上させた変異体の創出を試みた。また、担子菌 P450 を用いて確立した大腸菌異種発現技術を応用し、麹菌 P450 を大腸菌細胞内に異種発現させて酵素活性を追跡した。

### (4) P450 電子伝達機能の強化

紅色細菌 *Rhodobacter sphaeroides* に由来するアミノレブリン酸合成酵素 (ALAS) をコードする *hemA* 遺伝子を獲得し、pCDFDuet のクローニングサイトに連結して ALAS 発現ベクターを構築した。pET 発現ベクターを用いて構築したシトクロム *b5* (Cytb5) 発現ベクターと ALAS 発現ベクターを *E. coli* C41 (DE3) に形質転換し、Cyt-b5 と ALAS を共発現させることで P450 電子伝達経路の強化を図った。

## 4. 研究成果

### (1) 大腸菌を宿主とする P450 の異種発現

304 種類の担子菌 P450 を対象に、大腸菌における異種発現の可否を網羅的に追跡した。タンパク質 N 末端領域に存在する膜結合性配列を解析し、20~24 アミノ酸残基からなる TMD を決定した。TMD をコードする 10~12 アミノ酸残基を欠損させた cDNA を調製し、pET ベクターに連結して 304 種類の発現ベクターを得た。*E. coli* C41 (DE3) を宿主として担子菌 P450 の異種発現を試みたところ、27 種の担子菌 P450 を TMD 部分欠損型として過剰発現させることが可能であった (図 1)。また、大腸菌における担子菌 P450 の異種発現にはシャペロンタンパク質 (GroEL/ES) の共発現が有効であることが示された。さらに、野生型配列や TMD を全損させて異種発現を追跡したが、TMD 部分欠損型を上回る発現レベルは確認されなかった。以上の結果より、

担子菌 P450 の異種発現には TMD を部分欠損させることが重要であると考えられた。本研究により得られた知見は、動物や植物に由来する膜結合型 P450 の異種発現にも適応できると考えられる。

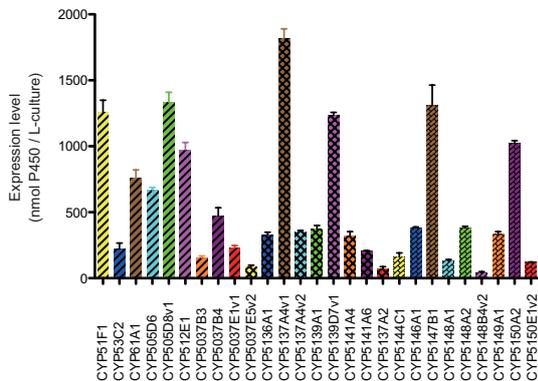


図1 大腸菌における TMD 欠損型 P450 の異種発現レベル

### (2) N 末端キメラ酵素の創出

CYP5037E1v1・CYP5148A1・CYP5150E1v2 をモデル分子種として、当該分子種の N 末端領域を、TMD 部分欠損型として異種発現させることに成功した 28 種の P450 の N 末端領域と置換してキメラ型酵素を作製した。キメラ型 P450 を *E. coli* C41 (DE3) に異種発現させたところ、発現レベルが著しく向上する配列の組み合わせが見出され、種々の担子菌 P450 の異種発現レベルを大きく改善しうることが示された (図2)。興味深いことに、発現レベルを大きく向上させる最適 N 末端配列は、3 種類のモデル分子種においてそれぞれ異なっていた。これらの結果は、P450 の異種高発現に効果的な N 末端領域は各々分子種で異なっており、種々のキメラ型配列を用いたスクリーニングから、既存技術では困難な異種発現も可能になると期待される。本研究においては、野生型または TMD 部分欠損型として異種発現させることが出来ない CYP5139D8 が、CYP5139D7v1 とのキメラ化によって異種発現可能になることを実証している。

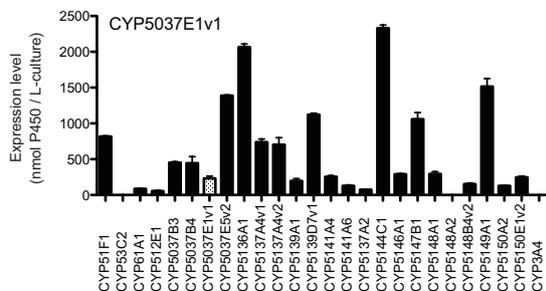


図2 キメラ型 CYP5037E1v1 の発現レベル

さらに、膜結合型 P450 の異種発現に効果的な N 末端配列の探索を目的として、CYP5037E1v1 を 100 種類の異なる P450 分子種に由来する N 末端配列に連結して異種発

現に与える影響を検討した。キメラ型 P450 の発現レベルを追跡したところ、少なくとも 64 種類の N 末端配列が CYP5037E1v1 の異種発現に利用可能であった (図3)。さらに、発現レベルを飛躍的に向上させる 5 種類の N 末端配列を決定することに成功し、M-A-I-S-L-A-V-F-L-R-W-L-K-A-D-S-H-L-R-L-P-P-G-P (CYP5348N1 由来)、M-A-S-F-F-R-L-S-S-A-L-P-P-G-P (CYP5348T3P 由来)、M-S-L-L-L-A-A-T-L-F-L-H-S-R-Q-K-R-Y-P-LP-P-G-P (CYP5144C1 由来)、M-A-V-L-A-A-L-L-C-Y-H-H-F-R-A-R-R-F-R-L-P-P-G-P (CYP5144C8 由来) または M-E-T-L-V-A-A-V-F-V-V-L-T-L-S-H-V-L-Y-T-R-W-D-R-A-Y-R-S-K-L-P-P-G-P (CYP5348L1v1 由来) からなるアミノ酸配列を N 末端キメラ化に利用することで種々の P450 の高発現が可能になると期待された。

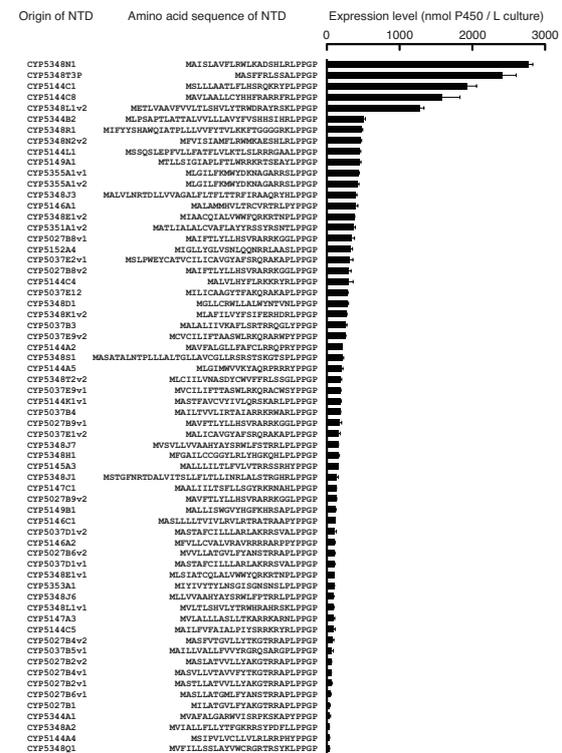


図3 キメラ型 CYP5037E1v1 の発現レベル

### (3) 有用 P450 の機能強化

麹菌 *A. oryzae* に由来する大豆イソフラボン水酸化 P450 にランダム変異を導入して 1000 種類の変異体を獲得し、酵母 *S. cerevisiae* に異種発現させて機能解析を行った。1000 種類の変異体を用いてゲニステイン水酸化活性を比較したところ、野生型の 2 倍の酵素活性を示す変異体の獲得に成功した。ゲニステイン水酸化体は種々の生理活性を示すことが知られており、麹菌 P450 を利用した高活性フラボノイドの生産を促進する機能強化が達成されたと考えられる。また、麹菌 P450 を担子菌 P450 の N 末端配列に連結することで大腸菌を宿主とする異種発現が可能となった。今後、麹菌 P450 と大腸菌を利用した高効率物質生産が可能になると考えられる。

#### (4) P450 電子伝達機能の強化

大腸菌におけるヘム合成経路の活性化を目的として、*R. sphaeroides* の ALAS をコードする *hemA* 遺伝子を PCR により獲得し、*E. coli* C41 (DE3) に異種発現させた。担子菌由来の Cyt-b5 と ALAS を共発現させたところ、Cyt-b5 の発現レベルが 2 倍に向上した。アミノレブリン酸の合成は、ヘム生合成の律速段階を担うことが知られており、ALAS の導入によってヘム含有電子伝達タンパク質である Cyt-b5 の異種発現レベルが向上したと考えられる。Cyt-b5 は担子菌 P450 の反応を促進することが知られており、大腸菌において P450 反応系の強化に繋がると期待される。

#### (5) 本研究成果のインパクトと展望

本研究により、大腸菌を宿主とする膜結合性 P450 の異種発現を飛躍的に向上させる基本技術の開発に成功し、60 種類の真核微生物 P450 を異種高発現するタンパク質ライブラリを構築した。本研究で開発したタンパク質ライブラリを用いれば、多種多様な P450 の結晶構造解析なども促進されると期待され、「配列-構造-機能」の統合的理解へ向けた基盤技術として活用されることを期待している。また、機能強化に成功した有用 P450 と大腸菌異種発現システムを組み合わせることで、新規バイオ産業の発展に繋がると期待される。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Ichinose H, Hatakeyama M, Yamauchi Y, “Sequence modifications and heterologous expression of eukaryotic cytochromes P450 in *Escherichia coli*”, *J Biosci Bioeng*, in press. (2015)  
DOI:10.1016/j.jbiosc.2015.01.019 (査読有)
2. Ichinose H, Wariishi H, “High-level heterologous expression of fungal cytochrome P450s in *Escherichia coli*”, *Biochem Biophys Res Commun*, 438, 289-294 (2013).  
DOI:10.1016/j.bbrc.2013.07.057 (査読有)
3. Ichinose H, “Cytochrome P450 of wood-rotting basidiomycetes and biotechnological applications”, *Biotechnol Appl Biochem*, 60, 71-81 (2013).  
DOI: 10.1002/bab.1061. (査読有)

[学会発表] (計 19 件)

1. 熊丸さち, 一瀬博文, 北岡卓也, “細菌におけるヘム合成経路の活性化と宿主利用”, 第 65 回日本木材学会大会研究発表, 2015.03.16. (東京)
2. Hatakeyama M, Yamauchi Y, Kitaoka T, Ichinose H, “Heterologous expression of cytochrome P450 from wood-rotting basidiomycetes in *Escherichia coli*”, International symposium on wood science

and technology 2015 (IAWPS2015), 2015.03.15. (Tokyo Japan)

3. Ichinose H, “A case study of heterologous expression of fungal P450s in *Escherichia coli* for the development of experimental protocols”, The 12th International symposium on cytochrome P450 biodiversity and biotechnology, 2014.09.24. (Kyoto Japan)
4. Yamauchi Y, Hatakeyama M, Ichinose H, “Modification of P450 N-terminal domains for high-yield heterologous expression in *Escherichia coli*”, The 12th International symposium on cytochrome P450 biodiversity and biotechnology, 2014.09.24. (Kyoto Japan)
5. Hatakeyama M, Ichinose H, Kitaoka T, “Chimerization for heterologous expression of fungal cytochromes P450 in *Escherichia coli*”, The 12th International symposium on cytochrome P450 biodiversity and biotechnology, 2014.09.24. (Kyoto Japan)
6. 畠山真由美, 一瀬博文, 北岡卓也, “大腸菌を用いた白色腐朽菌由来シトクロム P450 の高機能化”, 第 66 回日本生物工学会大会, 2014.09.09. (札幌)
7. Hatakeyama M, Ichinose H, Kitaoka T, “Overexpression of fungal cytochrome P450 in *Escherichia coli*”, The 10th International mycological congress, 2014.8.6 (Bangkok Thailand)
8. 畠山真由美, 一瀬博文, “真核微生物由来シトクロム P450 の大腸菌における過剰発現”, 第 14 回日本蛋白質科学会年会, 2014.06.25. (横浜)
9. Ichinose H, “Functional diversity and applications of fungal cytochromes P450”, Korea-Japan smart biodesign workshop: technology exchange for green biotechnology, 2014.01.20 (Sendai Japan).
10. 畠山真由美, 一瀬博文, 割石博之, “真核微生物由来シトクロム P450 の大腸菌における過剰発現”, 日本生物工学会 65 回大会, 2013.09.18. (広島)
11. Ichinose H, “A large-scale screening of heterologous expression of fungal cytochrome P450”, 18th International conference on cytochrome P450, biochemistry, biophysics and biotechnology, 2013.06.20. (Seattle USA)
12. Hatakeyama M, Ichinose H, Wariishi H, “Overexpression of multifunctional cytochrome P450s (CYP5136A1 & CYP5136A3) from white-rot fungi”, 18th International conference on cytochrome P450, biochemistry, biophysics and biotechnology, 2013.06.20. (Seattle USA)
13. 一瀬博文, “大腸菌を宿主とする真核微生物シトクロム P450 の異種発現”, 第 13 回日本蛋白質科学会年会, 2013.06.13. (鳥取)

14. 島山真由美, 一瀬博文, 割石博之, “生理活性フラボノイドの産生へ向けたシトクロム P450 機能の探索”, 日本生物工学会 64 回大会, 2012.10.24. (神戸)
15. 眞田有規, 一瀬博文, 割石博之, “真核微生物シトクロム P450 の機能ライブラリー”, 日本生物工学会 64 回大会, 2012.10.24. (神戸)
16. Ichinose H., “Molecular and functional diversity of fungal cytochrome P450”, 50th Anniversary symposium on cytochrome P450 in Fukuoka, 2012.12.02. (Fukuoka Japan)
17. Sanada Y, Ichinose H., Wariishi H, “Functional library of fungal cytochrome P450”, 50th Anniversary symposium on cytochrome P450 in Fukuoka, 2012.12.02. (Fukuoka Japan)
18. Hatakeyama M, Ichinose H., Wariishi H, “Functional screening of cytochrome P450s for production of bioactive flavonoids”, 50th Anniversary symposium on cytochrome P450 in Fukuoka, 2012.12.02. (Fukuoka Japan)
19. Ichinose H., “Catalytic potentials and applications of fungal cytochrome P450 for biotechnology”, The 11th International symposium on cytochrome P450 biodiversity and biotechnology, 2012.06.25. (Torino Italy)

[図書] (計 1 件)

1. Ichinose Hirofumi, Springer, Fifty Years of Cytochrome P450 Research, 2014, 409 (187-206).

[その他]

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

## 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・准教授

研究者番号 : 00432948