

# 麴菌が有するシトクロム P450 の網羅的機能探索

一瀬 博文

(九州大学大学院 農学研究院)

## 研究の目的

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る。本酵素群は生体ホルモンの生合成や異物代謝など、様々な二次代謝機構に関与して生物機能の多様性を支えている<sup>1)</sup>。また、P450 が化学合成では困難な一原子酸素添加反応を行うことから、グリーンバイオプロセス構築へ向けた触媒ツールとしての有用性も高い。近年、様々な生物のゲノム情報が明らかとなり、多種多様な P450 遺伝子の存在が明らかとなった。しかしながら、膨大な遺伝子配列情報の蓄積と比較して酵素機能に関する知見は未だ少なく、生物機能の高度理解と利用へ向けた P450 の機能解明が求められる。

麴菌 *Aspergillus oryzae* は古来より食品分野で利用されてきた真核微生物であり、本菌の優れた物質生産能を活用した新規バイオプロセスの創成に興味を持たれる。近年、*A. oryzae* のゲノム全塩基配列が決定され<sup>2)</sup>、本菌が多くの *A. oryzae* P450 (AoCYP) を有することが明らかになった。麴菌が多様な AoCYP 機能を発現して本菌特徴的な物質変換および物質生産能を可能にすると考えられ、AoCYP 機能の高度理解と利用に興味を持たれた。本研究では、麴菌の代謝多様性解明と新規バイオプロセス創出を目指し、AoCYP 機能ライブラリーを構築して網羅的機能探索と有用酵素発掘に挑戦した。

## 方法

**AoCYP 遺伝子の獲得：** *A. oryzae* ゲノムデータベースを精査し<sup>3)</sup>、P450 保存配列 (F-x-x-G-x-x-C-x-G) を有する候補遺伝子を決定した。予想配列に特異的な PCR プライマーを作成し、RT-PCR による遺伝子増幅を行った。グルコース (1%) および酒石酸アンモニウム (1.2 mM) を生育栄養源とする人工培地で培養した菌体より total RNA を抽出し、RT-PCR を行って完全長 cDNA を増幅した<sup>4,5)</sup>。増幅産物は pUC18 ベクターにクローニングして塩基配列を決定した。

**AoCYP の異種発現および機能探索：** AoCYP の完全長 cDNA を酵母発現ベクター (pGYR) のグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) プロモーター下流に連結し、*Saccharomyces cerevisiae* AH22 株に形質導入して AoCYP 発現酵母を得た<sup>6)</sup>。SD 培地 (8% glucose, 2.68% yeast nitrogen base without amino acid, 160 mg/L L-histidine) にて培養した形質転換酵母を回収し、CO 差スペクトル測定に供してリコンビナント酵素の発現を追跡した<sup>6,7)</sup>。種々の AoCYP 遺伝子を導入した形質転換酵母を 96-well プレートで培養し、リコンビナント酵素を発現する種母を調製した。基質 (0.5mM) を添加した SD 培地に種母を植菌し、28°C にて 2 日間振とう培養を行った。所定時間培養後、細胞を含む培養液にメタノールを注加して反応を停止し、細胞残渣を除去した後 HPLC 分析により基質および生成物の消長を追跡した。

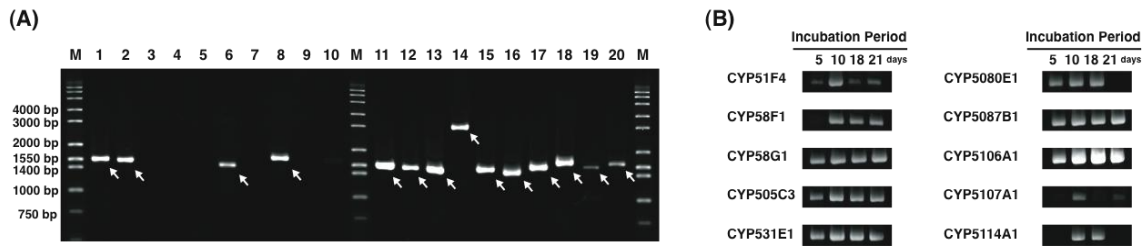


図1 *A. oryzae* 第6染色体にコードされたP450の転写挙動  
 (A) YPD培地および人工培地で培養した菌体におけるAoCYP遺伝子の発現をRT-PCRにより追跡した。Lane 1-10: YPD培地にて5日間培養した菌体, Lane 11-20:人工培地にて10日間培養した菌体, CYP51F4 (1 and 11), CYP58F1 (2 and 12), CYP58G1 (3 and 13), CYP505C3 (4 and 14), CYP531E1 (5 and 15), CYP5080E1 (6 and 16), CYP5087B1 (7 and 17), CYP5106A1 (8 and 18), CYP5107A1 (9 and 19), CYP5114A1 (10 and 20)  
 (B) 人工培地におけるAoCYP遺伝子発現の経時変化

## 結果

### 遺伝子配列の決定とcDNAの獲得

*A. oryzae* のゲノムデータベースを精査し、P450保存配列を有する155種の候補遺伝子を決定した。このうち13種は偽遺伝子化していることが強く示唆されたため、成熟タンパク質を与える142種のAoCYPを標的として完全長cDNAの獲得を試みた。種々の培養条件下で生育する*A. oryzae* より total RNA を調製してAoCYPの転写挙動を追跡したところ、グルコースおよび酒石酸アンモニウムを生育栄養源とする人工培地中で多くのAoCYP遺伝子が発現した(図1)。一連の研究において142種の遺伝子増幅を行い、少なくとも133種のAoCYPが実際に転写されることを明らかにした。また、本研究において121種の完全長cDNAを獲得することに成功した。

### AoCYPの網羅的機能探索

獲得した121種の完全長cDNAを酵母発現ベクターに連結し、*S. cerevisiae* に形質導入した。所定時間培養した形質転換酵母を分光学的解析に供してAoCYPの異種発現を追跡したところ、P450に特徴的な450nm付近のCO差スペクトルが得られた<sup>7)</sup>。本結果は、リコンビナントAoCYPが高発現したことを示している。現在までに、少なくとも70種のAoCYPが*S. cerevisiae* を宿主として異種発現することを明らかにしている。

AoCYPを形質導入した121種の*S. cerevisiae* を96-wellプレート中で培養し、AoCYPの機能ライブラリーを作成した。機能ライブラリーに種々の基質を添加して微生物変換を追跡し、AoCYPが有する酵素機能の網羅的探索を行った。ゲニステインを基質として変換反応を追跡したところ、CYP57B3を形質導入した酵母において3種類の生成物が蓄積した。AoCYP非発現酵母では基質の減少および生成物の蓄積が確認されなかったことから、本反応がCYP57B3依存的に進行したことが示された。生成物をLC-MS分析およびNMR分析に供することで、8位、6位、または3'位への水酸基導入が明らかになった(図2)。本結果より、CYP57B3のゲニステイン水酸化活性が初めて示された(図3)。

ゲニステインはマメ科植物に多く見いだされるイソフラボン誘導体である。イソフラボ

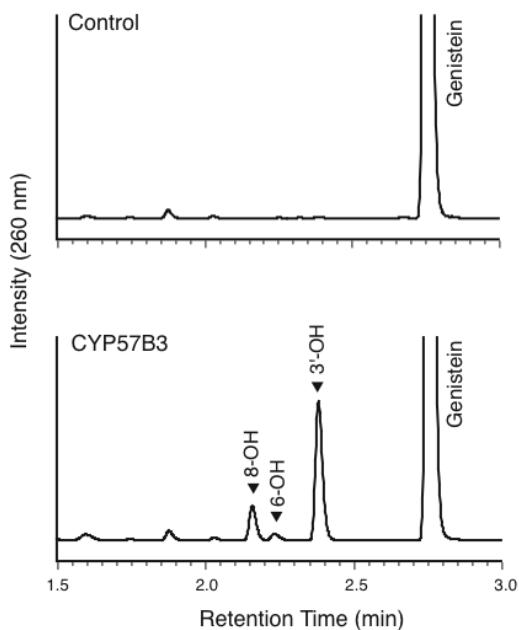


図2 ゲニステイン変換反応の HPLC 分析  
AoCYP 非発現株 (コントロール) および  
AoCYP 発現株 (CYP75B3) にゲニステインを  
添加して反応を開始し、2 日間後の生成物を  
HPLC により分析した。8-OH, 6-OH, 3'-OH  
は8-ヒドロキシゲニステイン, 6-ヒドロキシゲ  
ニステイン, 3'-ヒドロキシゲニステインを示  
す。



図3 CYP57B3 によるゲニステインの変換

ン類はエストロゲン活性・抗腫瘍活性・抗酸化活性など様々な生理活性を有しており、本研究で得られたヒドロキシゲニステインの有用活性についても興味を持たれる。また、ヒドロキシゲニステインは *A. oryzae* による大豆発酵過程で生成することが知られており<sup>8)</sup>、CYP57B3 が *in vivo* にけるゲニステイン水酸化反応に重要な役割を果たすことも示唆された。現在、詳細な機能解析および機能強化を加えて、CYP57B3 機能を活用したヒドロキシゲニステイン大量生産系の開発を目指している。

本研究では、フラボノイド・テルペノイド・ステロイドなど様々な化合物を用いたスクリーニングを行い、これまで未知であった AoCYP の酵素機能を決定することに成功した (表 1)。現在、生成物の同定を急ぐと共に機能情報の蓄積を進めている。

表1 AoCYP が活性を示す化合物

Substrate	AoCYP
7-Ethoxycoumarin	CYP57B3, CYP5061B5, CYP5075A1, CYP5078A5, CYP531E1, CYP620H9, CYP5080B2,
Genistein	CYP57B3
Daizein	CYP57B3
Naringenin	CYP57B3, CYP62C2
Testosterone	CYP5061B5, CYP5068A2, CYP62A1, CYP65AC2, CYP630A3

## 結論

本研究を通じて AoCYP 機能を網羅的かつ実験的に探索することが可能になった。反応スクリーニングシステムを用いることで、AoCYP が潜在的に備える物質変換能を簡便に探索することが出来る。現在、種々の化合物を基質に用いた機能探索を進めており、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指向した検討を加えている。また、AoCYP の酵素機能情報をさらに蓄積することで、麹菌が有するユニークな代謝機構の高度理解にも貢献していきたい。

## 文献

1. Ortiz de Montellano, P. R. (ed.) (2005) Cytochrome P-450: structure, mechanism, and biochemistry 3<sup>rd</sup> ed. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
2. Machida, M., Asai, K., Sano, M., *et al* (2005) Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. Nature 438: 1157-1161.
3. <http://www.bio.nite.go.jp/dogan/Top>
4. Kirk, T. K., Schultz, E., Connors, W. J., Lorenz, L. F., and Zeikus, J. G. (1978) Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*. Arch. Microbiol. 117: 277-285.
5. Nazir, K. H. M. N. H., Ichinose, H., and Wariishi, H. (2010) Molecular characterization and isolation of cytochrome P450 genes from the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. Arch. Microbiol. 192: 395-408.
6. Sakaki, T., Shinkyō, R., Takita, T., Ohta, M., and Inouye, K. (2002) Biodegradation of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins by recombinant yeast expressing rat CYP1A subfamily. Arch. Biochem. Biophys. 410: 91-98.
7. Omura, T., and Sato, R. (1964) The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes, II. Solubilization, purification, and properties. J. Biol Chem. 239: 2379-2385.
8. Esaki, H., Kawakishi, S., Morimitsu, Y., and Osawa, T., (1999) New potent antioxidative *o*-dihydroxyisoflavones in fermented japanese soybean products. Biosci. Biotechnol. Biochem. 63: 1637-1639.