

学位論文題名

ロドコッカス属細菌を宿主としたシトクロム P450を
介するビタミン D₃水酸化体生産に関する研究

学位論文内容の要旨

微生物を宿主細胞として用いたファインケミカルや汎用化学品など有用物質の生産は、現在では数多く実用化されている。一例として、世界で初めて工業化された微生物触媒による汎用化学品(アクリルアミド)の製造は、*Rhodococcus* 属放線菌を宿主として確立されている。*Rhodococcus* 属放線菌は高 GC 含量グラム陽性菌で有機溶媒耐性を示すほか、脂肪族をはじめ芳香族や複素環式化合物などを変換する生体触媒活性も強く、種によっては広範囲な温度領域(4~35℃)での増殖も可能な既存の汎用型宿主とは異なる表現型を有する細菌である。私が所属する研究室では、*Rhodococcus erythropolis* 細菌を多目的用途に使用可能な物質生産のプラットフォームとするため、組換えタンパク質を発現させるための各種発現ベクターの開発や、同属細菌の機能解析を行うためのトランスポゾンベクターなど、宿主-ベクター系の開発を行っている。

ビタミン D₃ (VD₃) と各種誘導体は、骨粗鬆症や乾癬等の治療薬として使用されているが、化学合成法による活性型 VD₃ 製造の場合、コレステロールを原料に製造工程が約 20 工程あり、収量も著しく低い(1%)。一方、微生物による変換は不活性型 VD₃ を原料に 1 工程で済む。このことより微生物を利用した高効率な VD₃ 水酸化系の技術開発が求められている。最近、活性型ビタミン D₃ の実生産に用いられている *Pseudonocardia autotrophica* より、不活性型 VD₃ を活性型 (25(OH)VD₃ および 1 α ,25(OH)₂VD₃) に変換するシトクロム P450 Vdh (vitamin D hydroxylase) が同定された。この Vdh は哺乳類における VD₃ の 2 段階水酸化反応(肝臓での CYP27A1 による 25 位酸素添加と腎臓での CYP27B1 による 1 α 位酸素添加)の両反応を触媒する分子量 44,368 の可溶性酵素で、一次構造の相同性から CYP107 フェミリーに属する P450 であることが判明した。この Vdh と *R. erythropolis* NI86/21 由来の電子伝達系タンパク質 ThcC, ThcD を *R. erythropolis* 細菌に共発現した組換え体を構築することにより、VD₃ から 25(OH)VD₃ への生産が可能であることが確認されている。

そこで本研究では、*R. erythropolis* JCM3201 株をモデル宿主とした高効率なビタミン D₃ 水酸化体生産系の構築を目指した。

(1) *R. erythropolis* JCM3201 株を宿主としたビタミン D₃ 水酸化体生産に影響を及ぼす細胞内因子の探索

VD₃ 水酸化に影響を及ぼす細胞内因子を探索するために、トランスポゾンベクター-pTNR を用いて Vdh と同分子に共役するレドックスパートナー分子、ThcC, ThcD(*R. erythropolis* NI86/21 由来)の共発現ベクターを導入した *R. erythropolis* JCM3201 株を宿主としたトランスポゾン変異ライブラリーを作製した。一方、VD₃ 水酸化体の検出が視覚的に可能な two-hybrid 系を利用したレポーター酵母との共培養系を構築し、変異体ライブラリーに対してスクリーニングを行った。構築した共培養系システムは、Vdh, ThcC, ThcD 共発現株による VD₃ 変換反応、レポーター酵母による VD₃ 水酸化体検出までの一連の反応を一つの 96 ウェルプレート上で行なうことが可能であるため、ハイスループットなスクリーニングに適している。この系を用いてトランスポゾン変異体約 40,800 株に対する 1 次スクリーニングを行ない、約 70 個の VD₃ 水酸化体検出不能株を取得した。さらに、HPLC にて VD₃ 水酸化活性を個別に測定する 2 次スクリーニングを行った結果、活

性が著しく低下した 12 個の陽性株を得た。各変異体におけるトランスポゾン挿入部位を解析したところ、機能不明のタンパク質や、膜タンパク質、転写調節因子、電子伝達タンパク質などの遺伝子への挿入が確認された。同定された膜タンパク質は薬剤排出型のものであると推定されたが、過剰発現により細胞の生育阻害が起こるため、発現レベルを制御した系の構築が必要であると考えられた。一方、電子伝達タンパク質([2Fe-2S]フェレドキシン)は、Vdh と [2Fe-2S]フェレドキシンおよび ThcD との共発現ベクターを導入した組換え体を使用した *in vivo* 実験より ThcC と同様に Vdh への電子伝達が可能であることが確認された。

(2) Vdh と *R. erythropolis* JCM3201 株由来の電子伝達タンパク質の共発現によるビタミン D₃ 水酸化体生産効率

Rhodococcus 属細菌は同属同種であっても株間で内在性プラスミドに多様性があることが確認されている。また、*Rhodococcus* 属細菌のゲノム解析や機能解析が十分でないことから、*R. erythropolis* JCM3201 株のゲノム解析を次世代シーケンサーにて行い、927 contig からなる総塩基数約 6.0 Mb のゲノム配列情報を得た。この DNA 配列情報をもとに P450 と共役するレドックスパートナー分子を検索すると、前述 (1) のスクリーニングにより同定された [2Fe-2S]フェレドキシンの他に、3 種の [3Fe-4S]フェレドキシンおよび 2 種の [7Fe-4S]フェレドキシンがゲノム上にコードされていることが判明した。[2Fe-2S]フェレドキシンをコードする遺伝子には、その下流に P450 を挟んでフェレドキシンレダクターゼがコードされていることも明らかとなった。これらの遺伝子情報を基に、Vdh と各種フェレドキシンとフェレドキシンレダクターゼの共発現ベクターを導入した組換え体を作製し VD₃ 水酸化体生産活性比較検討した。その結果、[2Fe-2S]フェレドキシンおよび 3 種の [3Fe-4S]フェレドキシンは、Vdh と ThcD との共発現において ThcC と同様に Vdh への電子伝達が可能であることが確認できた。中でも 2 種の [3Fe-4S]フェレドキシンにおいては他のフェレドキシンと比較して VD₃ 水酸化体生産活性が若干高くなる傾向が確認された。フェレドキシンレダクターゼ (Fdr) は、ThcD と同様に各種フェレドキシンへの電子伝達が可能であることが確認できた。

(3) 標的細胞膜に孔を形成して抗菌活性を示す Nisin を利用した新たな VD₃ 水酸化体生産系の構築

上述した一連の研究結果から、VD₃ の水酸化体生産効率は Vdh やレドックスパートナー分子の細胞内発現量と比例しないことから、同効率の上昇には宿主細胞の VD₃ 膜透過性の改善が重要であることが示唆された。VD₃ は水に難溶なため、シクロデキストリン(CD)に包接した状態で反応を行う。よって標的細胞の細胞膜に孔を形成し抗菌活性を示す Nisin を利用して、*R. erythropolis* JCM3201 株に Nisin 孔を形成させ、細胞内への VD₃-CD 複合体透過量を亢進させることで VD₃ の水酸化効率上昇が期待される。Vdh とレドックスパートナーの共発現ベクター導入株に対し、Nisin 存在下/非存在下の VD₃ 水酸化活性を測定した。Nisin 添加により細胞膜上に孔が形成された細胞は 99% 致死するが、溶菌することなく、基質 (シクロデキストリンに包接された VD₃) の透過性が著しく上昇していることが予想された。また Nisin 処理した細胞を 16hr を 1 サイクルとした繰返し反応を行うと、1 回毎の VD₃ 水酸化率は最大 90% 近くまで向上することが明らかとなった。更に、4 サイクル反応後に Nisin 未処理細胞と比較すると、VD₃ 水酸化体総収量を約 6 倍と著しく上昇させることが可能であった。

本研究成果から、微生物における物質変換系においてその変換効率を高める要因探索と解決法として、上記開発したレポーター酵母との共培養系によるスクリーニング技術や、Nisin を利用した VD₃ の膜透過向上による水酸化体生産系は、他の脂溶性ホルモン様物質の変換系構築や宿主細胞にとって有毒な物質の微生物変換への応用が大いに期待できる。

学位論文審査の要旨

主 査 客員教授 田 村 具 博
副 査 教 授 横 田 篤
副 査 客員教授 鎌 形 洋 一
副 査 客員准教授 湯 本 勳

学位論文題名

ロドコッカス属細菌を宿主としたシトクロム P450 を 介するビタミン D₃水酸化体生産に関する研究

ビタミン D₃(VD₃)の水酸化体である活性型 VD₃(25(OH)VD₃ および 1 α ,25(OH)₂VD₃)とその誘導体は、骨粗鬆症や乾癬等の治療薬として使用されている。活性型 VD₃ の製造法としては化学合成法と(コレステロールを原料に約 20 の製造工程あり低収量(1%))、微生物変換による製造法(不活性型 VD₃を原料に 1 工程)が知られている。微生物変換による製造は、反応工程も少なく環境にやさしいという特徴を持つが、生産効率の向上や副反応産物生成の抑制など改善すべき問題がある。最近、活性型ビタミン D₃ の実生産に用いられている放線菌 *Pseudonocardia autotrophica* より、不活性型 VD₃ を活性型に変換するシトクロム P450 Vdh (vitamin D hydroxylase) が同定され、VD₃ 水酸化体製造に関する分子・細胞レベルでの機能解析が可能になってきた。本研究は、放線菌 *Rhodococcus erythropolis* をモデル宿主とし、微生物変換によるビタミン D₃ 水酸化体の生産効率化を展開する上で非常に有益な知見が得られている。

まず *R. erythropolis* JCM3201 株を宿主とした、ビタミン D₃ 水酸化体生産に影響を及ぼす細胞内因子の探索技術に関する研究を行った。VD₃ 水酸化体は、HPLC による検出が一般的であり、多検体のスクリーニングには適さない。よってハイスループットな検出系を構築するため、two-hybrid 系を利用したレポーター酵母と *R. erythropolis* との共培養系による活性型 VD₃ の新規検出システムを構築した。本系は、組換え *R. erythropolis* で生成された 25(OH) VD₃ が、レポーター酵母内の VD₃ レセプターに結合した後、発現するレポーター遺伝子の酵素活性を検出する方法である。この検出系確立により、96-well プレートを使用した多検体同時解析が可能にした。また、本系が既存のステロイドホルモン検出用レポーター酵母にも応用可能であることも示され評価に値する。

本システムを用いて、トランスポゾン変異体約 40,800 株より、約 70 個の VD₃ 水酸化体検出不能株を取得した。さらに、HPLC にて再度 VD₃ 水酸化活性を測定し、最終的に 12 個の陽性株を得ている。各変異体におけるトランスポゾン挿入部位を解析したところ、機能未知のタンパク質や、膜タンパク質、転写調節因子、電子伝達タンパク質などの遺伝子への挿入が確認された。同定した電子伝達タンパク質([2Fe-2S]フェレドキシン)については、組換えタンパク質を用

いた *in vivo* 実験より Vdh への電子伝達が可能であることを示した。

次に、Vdh と *R. erythropolis* JCM3201 株由来の電子伝達タンパク質の共発現によるビタミン D₃ 水酸化体生産効率を検討した。*Rhodococcus* 属細菌は同属同種であっても遺伝子構造が多様なため、使用した *R. erythropolis* JCM3201 株のゲノム解析を行い、927 contig からなる総塩基数約 6.0 Mb の DNA 配列情報を得ている。この情報をもとに P450 と共役するレドックスパートナー分子を検索し、上述のスクリーニングにより同定された [2Fe-2S]フェレドキシン(Fdx)の他に、3種の [3Fe-4S]Fdx および 2種の [7Fe-4S]Fdx を同定した。また、[2Fe-2S]Fdx をコードする遺伝子下流には、P450 を挟んでフェレドキシンレダクターゼ(Fdr)がコードされていることを見出した。これらの遺伝子情報を基に、Vdh と各種 Fdx と Fdx の共発現株を作製し VD₃ 水酸化体生産能を比較検討した結果、[2Fe-2S]Fdx および 3種の [3Fe-4S]Fdx は、Vdh への電子伝達が可能であることを示した。また同定した Fdr は、各種フェレドキシンへの電子伝達が可能であることも示した。ただし、分子間により電子伝達効率が違うことから、Vdh による VD₃ 水酸化反応の効率化には、電子伝達効率を念頭に置いたレドックスパートナー分子の組み合わせが重要であることを明らかにした。

また一連の研究から、VD₃ の水酸化体生産効率は Vdh やレドックスパートナー分子の細胞内発現量と比例しないことを見出し、同効率の上昇には宿主細胞の VD₃ 膜透過の改善が重要であることを示唆した。VD₃ は水に難溶性を示すため、シクロデキストリン(CD)に包接した状態で反応を行う。そこで標的細胞(*R. erythropolis* JCM3201 株)の細胞膜に抗菌物質 nisin により膜孔を形成させ、その孔から VD₃-CD 複合体を細胞内へ移行させることで VD₃ 水酸化効率の上昇を期待し研究が展開されている。

細胞に nisin を添加すると細胞膜上に孔が形成され 99%以上の細胞は致死するが、溶菌や細胞内タンパク質の漏出が無いことを見出した。更に、過酸化物によって発光する緑色化学発光 γ -シクロデキストリン (Green Chemi-luminescence CD, GCCD) をモデル基質として同 CD の細胞内取り込みを調べると、nisin の濃度と処理時間に依存して高くなり、nisin 孔が CD の通り道として利用できることを確認した。そこで、実際 VD₃ を包接させた CD 複合体を基質として nisin 処理細胞での水酸化反応を調べると、nisin 未処理細胞に比べて数倍高い水酸化効率が得られることを見出した。更に、nisin 処理した細胞を用いて、16hr を 1 サイクルとした繰返し反応を行うと、1 回毎の VD₃ 水酸化率を最大 90%近くまで向上させること、そして、4 サイクル反応後に nisin 未処理細胞に対して VD₃ 水酸化体総収量を約 6 倍上昇させることを見出し、生細胞を利用して得られる結果より遙かに高効率な水酸化生産系の構築に成功した。本結果は、難溶性物質を利用した微生物変換系としては極めて有用な技術情報であり、また新規性も含め高く評価される。

本研究では、微生物における物質変換効率を高める細胞内因子探索法として、レポーター酵母との共培養系によるスクリーニング技術や、nisin により形成された膜孔を利用した基質の変換反応向上に関する研究が展開されてきた。本研究により、VD₃ 水酸化研究の発展性のみならず、他の P450 を介した変換反応や脂溶性物質に対する変換反応への広い応用性についても評価に値する。

よって、審査員一同は、井元紀子が博士(農学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。