

博士論文

カビのヘム-チオレート含有酸化酵素の研究

東京大学農学生命科学研究科
応用生命工学専攻 酵素学研究室
平成 18 年度入学 小川 徳之
指導教員 祥雲 弘文

目次

発表要旨.....	4
略語.....	8
序論.....	9
第一章 麹菌 <i>Aspergillus oryzae</i> ゲノム中の有用酸化酵素の探索.....	38
第一節 <i>A. oryzae</i> ゲノム上の標的酵素の探索・選定.....	38
1-1 方法.....	38
1-2 結果および考察.....	38
第二節 AOPE 及び推定還元酵素融合型 P450 の発現条件の検討.....	59
2-1 試料.....	59
2-2 方法.....	59
第三節 AOPE の大腸菌発現系の構築.....	70
3-1 方法.....	70
3-2 結果および考察.....	74
第四節 AOPE の <i>P. pastoris</i> 発現系による発現検討.....	76
4-1 方法.....	76
4-2 結果及び考察.....	80
第五節 <i>A. oryzae</i> AOPE 過剰発現株の作製.....	81
5-1 方法.....	81
5-2 結果及び考察.....	84
第六節 <i>A. oryzae</i> AOPE 過剰発現株の発現培養及び精製.....	85
6-1 方法.....	85
6-2 結果及び考察.....	87
第七節 AOPE の粗精製試料での活性測定.....	93
7-1 方法.....	93
7-2 結果及び考察.....	95
第八節 <i>A. oryzae</i> 融合型 P450s (CYP505A3、A13) の大腸菌発現系の構築.....	99
8-1 方法.....	99
8-2 結果及び考察.....	102
第九節 第一章の総括.....	109
第二章 カビ <i>Fusarium oxysporum</i> 由来の還元酵素融合型 P450foxy のタンパク質工学的手法による機能改変.....	111
第十節 大腸菌発現系による野生型 P450foxy の発現・精製.....	111
10-1 方法.....	111
10-2 結果及び考察.....	112
第十一節 His tag 付全長 P450foxy 発現系の構築.....	115

11-1 方法.....	115
11-2 結果及び考察.....	120
第十二節 His tag 付 P450、還元酵素ドメインの発現.....	122
12-1 方法.....	122
12-2 結果及び考察.....	123
第十三節 His tag の有無が P450foxy の反応性に与える影響.....	130
13-1 方法.....	130
13-2 結果及び考察.....	131
第十四節 QuikChange 法による P450foxy F88 変異体の作製.....	143
14-1 方法.....	143
5-2 結果及び考察.....	145
第十五節 部位特異的変異導入(Saturation Mutagenesis)による変異体作製.....	159
15-1 方法.....	159
15-2 結果及び考察.....	161
第十六節 Error prone PCR による高色素能形成変異体の作製.....	165
16-1 方法.....	165
16-2 結果及び考察.....	167
第十七節 AL 変異体の <i>in vitro</i> における挙動.....	172
17-1 方法.....	172
17-2 結果及び考察.....	173
第十八節 Cytochrome P450foxy の結晶化.....	182
18-1 試料.....	182
18-2 方法.....	182
18-3 結果及び考察.....	183
第十九節 第二章の総括.....	187
第三章 結論.....	189
引用論文.....	191
謝辞.....	202

発表要旨

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成 18 年度博士課程 入学
氏名 小川 徳之
指導教員名 祥雲 弘文

論文題目 カビのヘム-チオレート含有酸化酵素の研究

第一章 序論

化成品の原料は炭化水素である石油であるが、そこに付加価値をつけるためには酸素の導入が重要なステップとなる。不活性な炭化水素を酸化するため、現在は重金属をはじめとした化学触媒による酸化反応が用いられているが、環境に負荷をかけることが多く、環境にやさしい酸化反応が求められている (Green sustainable chemistry)。その方法のひとつとして酵素反応が期待されている。シトクロム P450 (以下 P450)は、その多彩な酵素機能からそのような工業的利用において魅力的である。しかし実際の応用に際しては困難な障壁も存在する。一方 P450 において酸素 (O_2) や NADPH に依存せず、過酸化水素 (H_2O_2) などの過酸化由来の酸素原子を用いて基質を酸化するペルオキシド・シヤント反応が古くより知られていたが、 H_2O_2 を利用する場合、とくにペルオキシゲナーゼ (Pox) 反応と呼ばれる。Pox 反応は、P450 の工業的利用に際しての欠点を克服することが期待され、また近年、Pox を生理反応とする P450 も発見されている。すべての P450 の中で工業的利用にもっとも期待されているものは P450BM3 である。P450BM3 は P450 と還元酵素が融合しているため self-sufficient であり、また turn-over が速い(モノオキシゲナーゼ P450 で最速)。P450BM3 に Pox 活性を付与する指定進化 (directed evolution) など、その工業的利用を目指した研究が盛んに行われている。一方、カビ *Cardariomyces fumago* 由来の Chloroperoxidase(以下 CPO)は H_2O_2 を用いて有機基質を塩素化する変った反応を触媒するが、加えてさまざまな有機物を基質とする Pox 活性を示すことで注目される。CPO は CO 型 Soret 帯を 450 nm 付近に持つヘムタンパク質であるが、そのアミノ酸一次配列は P450 に相同性を示さず、従って P450 スーパーファミリーには属さない。CPO のようにヘム第 5 配位子が P450 と同様にシステインのチオレートアニオンであるが P450 スーパーファミリーには属さないものを、ヘム-チオレートタンパク質と総称する。CPO 以外の例として NO 合成酵素 (NOS)、CooA などのセンサータンパク質がある。

当研究室ではカビ *Fusarium oxysporum* より P450BM3 によく似た融合タンパク質である P450foxy が発見され、遺伝子のクローニングもなされている。本研究では上記のような工業的応用を念頭に置いて P450foxy の改変を試み、またカビ遺伝子情報より有用酵素（とくに CPO）の探索を行い、クローニング、機能解析を行うことを目的とした。さらに結晶構造がまだ解明されていない P450foxy の結晶化検討も行った。

第二章 *Asperigillus oryzae* ゲノムからの Chloroperoxidase 様酵素のクローニング

A. oryzae のゲノム解読は 2005 年に完了しており、他の *Asperigillus* 属のカビと比較して 2 割ほど大きなゲノムサイズであり、代謝に関する酵素群が多く存在していることが明らかになっている。*A. oryzae* のゲノムに対して、CPO のアミノ酸配列を用いて Blast search したところ、第五配位子ヘム-チオレート構造およびヘム結合領域周辺が保存された配列 AOPE (*Asperigillus oryzae* peroxidase : AO0902000344)を見出した(Fig.1)。CPO と比較して AOPE の予想分子量は 10 kDa 以上小さく、アライメントした結果ではギャップも多かった。現在までに Haloperoxidase 以外にヘム-チオレート構造を持つ酵素の研究例はなく、サイズの小さな類似配列の存在は興味深い考え、AOPE の機能解明を目的としてクローニングを試みた。(Table.1)。

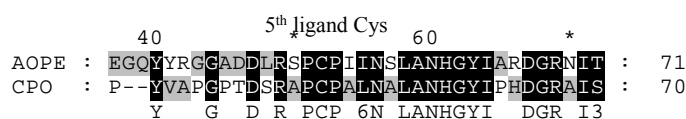


Fig. 1 Alignment of CPO heme region and putative heme binding region of AOPE.

Table. 1 Comparison of AOPE and Chloroperoxidase characters.

	AOPE (AO0902000344)	Chloroperoxidase (CAC16733.1)
Organism	<i>A. oryzae</i>	<i>Cardariomyces fumago</i>
Amino acids	272	373
M.W.	30.1 kDa	42 kDa
Feature	Heme-thiolate enzyme Internal protein	Heme-thiolate enzyme Secretion enzyme Glycoprotein

RT-PCR による発現条件の検討を行った結果、AOPE は恒常的に発現している酵素であることが明らかになった。また、RACE 法による配列解析により、AOPE は配列中にイントロンを含まないことがわかった。AOPE のクローニングは、大腸菌発現系、酵母発現系では達成できなかったため、*A. oryzae* の AOPE の過剰発現株作製を試みた。*A. oryzae* cDNA ライブラリーより、PCR により C 末端に 6His tag を導入した AOPE 遺伝子を増幅し、発現プロモータとして P-glaA142 を含む pNGA142 ベクターに導入し、発現ベクターを構築した。*A. oryzae* Δ niaD 株にプロトプラスト法による形質転換を行い、AOPE 過剰発現株を作製した。RT-PCR により、組換え AOPE の mRNA レベルでの発現を確認した。過剰発現株を DPY 液体培地で培養し、得られた菌体を液体窒素を用いて破碎し、Ni²⁺キレートカラムに供したところ、SDS-PAGE 上で予想分子量に相当するタンパク質を部分精製することができた(Fig.2)。CO 差スペクトル測定を行ったところ、ヘム-チオレート構造を持つ酵素の特徴である 450 nm 付近の吸収極大を確認することができた。粗精製試料を用いた活性測定を行ったところ、ABTS(2'2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid)に対してペルオキシダーゼ反応を示すことが見出された(Fig.3)。

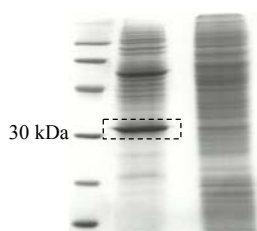


Fig. 2 SDS-PAGE of AOPE after HisTrap column.

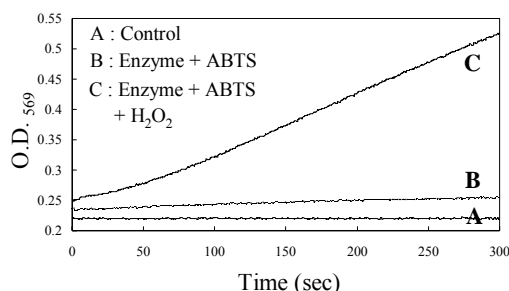


Fig. 3 Activity assay of AOPE using ABTS as a substrate.

AOPE の反応回転は 94.7 min^{-1} であり、ペルオキシダーゼ反応としてはかなり遅いことがわかった。CPO の基質に対する反応性は見出されず、CPO と同条件でのハロゲン導入反応も現在のところ確認されていない。CPO は遠位に酸塩基触媒として機能する Glu が存在するが、AOPE では保存されておらず、この点が低い活性に関係している可能性も考えられた。研究を進める上での問題点として AOPE の発現量はかなり少なく、不安定な酵素であったため、発現量の増加検討および性状解明を進めている。本研究は P450、haloperoxidase 以外のヘム-チオレート含有酵素のクローニングに成功し、ペルオキシダーゼ反応を持つことを確認した初めての例であり、菌体内酵素であるのも特筆すべき点であった。

第三章 P450foxy の変異導入による機能改変

還元酵素融合型 P450foxy は、脂肪酸水酸化反応を 3000 min^{-1} という高速で進行させるため、産業応用に期待が持たれる。さらにこの特性を維持したまま基質特異性を改変させることができれば産業的価値を大幅に高めることができる。本研究では、大腸菌発現系において QuickChange 法による変異体酵素を作出し、機能改変を行うと同時に P450foxy の基質認識に関するアミノ酸残基についての知見を得ることを目的とした。高い相同性を持つ P450BM3 の結晶構造解析の結果から、F87 は脂肪酸の末端炭素と相互作用することが明らかになっており、ヘムの真上に位置することから基質が活性部位に侵入する障害になりうることが予想されている。P450foxy においても F88 として保存されており、第一の標的として F88 の変異を試みた。脂肪酸水酸化活性は F88V、I 変異体を除いて著しく低下したが、トリデカン酸に対する K_d の変化は小さいことから F88 は脂肪酸結合に対する寄与は小さく、活性部位内部で脂肪酸鎖を固定することでヘム上に配位しやすくしていると考えられた。F88W 変異体はトリデカン酸に対する結合能を完全に消失しており、F88 の立体が基質侵入に大きな影響を与えることが確認された。F88G、A、V、I の変異体酵素の発現培養を行うと、培地中に青色の色素の蓄積が見られた。スペクトル比較より、色素をインディゴ色素であると同定し、変異体酵素がインドール酸化能を得たことが示唆された。F88A で最も多い色素の蓄積が認められたことから、活性部位内の立体が基質認識に影響していると考え、インディゴ色素の蓄積量を指標として部位特異的変異導入によるインドール酸化能の向上を試みた。V83、V75、L264、L43 についての Saturation mutagenesis の結果、F88A 変異体の 8.3 倍の色素生成能を持つ F88A V83L 変異体を取得した。

さらなる活性上昇および基質認識に関与する残基を調べるため、F88A 変異体を鋳型とした Error prone PCR による変異体スクリーニングを行った。2500 コロニーのスクリーニングにより、14 種の色素生成能を持った変異体を選出し配列を確認したところ、V83 または V75 が置換された変異体が多く見出され、P450foxy の基質認識においてこの二箇所のアミノ酸の影響が大きいことを再確認した。また P450 の活性に関与するとされる I ヘリックス領域にも変異が散見された。インドールに対する K_d 測定の結果、F88A 変異体で TypeI シフトが観察されるようになり、結合親和性が上昇していることが明らかになった。F88A V83L 変異体は精製時にすでに TypeI スペクトル変化が起こっており、インドール添加によるスペクトル変化は観察されなかった。このことから、F88A V83L の高色素生産能はインドールにたいする強力な結合能に由来すると推測している。精製酵素をもちいた *in vitro* 活性試験ではインドール酸化活性を再現することができず、培養中の色素蓄積は大腸菌内の他の酵素の寄与が予想される。P450foxy 全長の結晶を得ることはできていないが、P450、還元酵素各ドメインの結晶化条件を見出すことができた。十分な反射が得られていないため、結晶化条件の最適化を行っている。

第四章 総括

本研究において、*A. oryzae* ゲノム上に CPO 様ヘム-チオレート含有タンパク質 AOPE の存在を見出し、クローニングを試みた。*A. oryzae* 過剰発現株を作成することでリコンビナント AOPE の発現に成功し、部分精製酵素においてペルオキシダーゼ反応を示すことを見出した。現在までに知られている haloperoxidase は全て菌体外分泌酵素であり、菌体内に同じくペルオキシダーゼ反応を示す類似酵素が機能しているという報告例はなく、その生理的意義に興味を持たれる。さらなる性状解明に向けて発現条件および効率的精製方法の検討を進めている。

P450foxy の変異体作製により、F88 一残基の置換によって基質特異性大きく変化するという興味深い現象がみられた。F88 によりかさ高い基質の侵入が妨げられていることが示唆され、F88 を小さなアミノ酸残基に置換することで脂肪酸水酸化活性を消失する代わりに、インドール酸化反応を付与することができた。部位特異的変異導入により P450foxy の V83、V75 のアミノ酸が基質認識に影響が大きいことが示された。融合 P450 のアライメント結果から、F88 周辺は保存度が高いのに対し、V83、V75 に相当する残基は置換されていることが多く、生理的な基質の違いを示唆する可能性があると考えられる。十分な反射は得られていないものの、P450foxy のドメイン毎の結晶化条件を見出すことができた。今後、条件の精密化によって結晶構造を解明し、P450foxy の反応機構に関する知見を得ることを期待している。

略語

AaP	: <i>Agaricus aegerita</i> peroxidase
AOPE	: <i>Aspergillus oryzae</i> peroxidase
ALA	: 5-aminolevulinic acid
CPO	: Chloroperoxidase
Cyt.c	: cytochrome <i>c</i>
DTT	: Dithiothreitol
EDTA	: Ethylene diamine tetra acetic acid
FAD	: Flavin adenine dinucleotide
FPLC	: Fast protein liquid chromatography
FMN	: Flavin mononucleotide
NADH	: β -Nicotinamideadenine dinucleotide
NADPH	: β -Nicotinamideadenine dinucleotidephosphate
PMSF	: Phenyl methyl sulfonyl fluoride
P450	: Cytochrome P450
IPTG	: Isopropyl-b-thiogalactoside
LB	: Luria- Bertani
TB	: Terrific Broth
PDB	: Protein data bank
PEG	: Polyethyleneglycol
SDS-PAGE	: Sodium dodecyl sulfate -poly acryl amide gel electrophoreis
SRS	: Substrate recognition sites

序論

1.Green sustainable chemistry

現在、様々な化成品は石油由来の炭化水素を利用して合成される。高い付加価値を与えるために様々な化学反応が行われるが、特に酸化反応が重要なステップとなっている。酸化反応の現在の主流は、重金属触媒を用いた化学反応であり、その反応過程において生じる重金属廃棄物は環境汚染に直結するものである。さらに一般的に化学反応の進行には、高温、高圧といった厳しい反応条件が求められることが多く、エネルギー的にも環境に大きな負荷を強いている現状がある。この代替として酵素的な反応の応用が期待されている。酵素的な酸化反応の特長である高い特異性(立体、位置)、温和な反応条件は、工業応用において非常に有用である。バクテリア、酵母、カビを始めとした微生物由来の酵素の機能解析は古くから行われているが、現在それら酵素の産業利用に注目が集まっており、Green sustainable chemistry(環境負荷が小さく、持続可能な化学合成)の名の元、実用を目指した多くの基礎研究が進行している。特にヘム-チオレートを含有した酸化酵素であるシトクロム P450 は非常に優れた酸化反応性を持ち、工業応用が期待されている。

2.麹菌 *Aspergillus oryzae* のゲノムプロジェクト

A. oryzae (Fig. I-1)は、日本において伝統的に、発酵産業(酒、味噌、醤油等)に用いられてきた糸状菌である。*Aspergillus* 属の糸状菌のうち、*A. fumigatus*、*A. flavus*、*A. niger* など一部のものがヒトにアスペルギルス症と呼ばれる病原性を示すのに対し[1]、*A. oryzae* は米国食品医薬品局(FDA)によって GRAS(Generally recognized as safe)と指定されるなど、病原性がなく、高い安全性をもつ微生物としても知られている。糸状菌によって生産される強力な発ガン物質であるアフラトキシンの生合成遺伝子が、*A. oryzae* において大きく欠損していることが理由のひとつとして考えられている[2-4]。*A. oryzae* は、日本の食文化と密接な関連性があるだけでなく、世界的にも安全性や酵素の高い生産能から注目されている微生物である。特に近年では、*A. oryzae* の持つ高いタンパク質分泌生産能力が注目されており、国内外でバイオテクノロジーによる酵素生産への応用研究が行われている。



Fig.I-1 麹菌 *Aspergillus oryzae*

A. oryzae のゲノムに関する研究は、1996年に町田らによって EST 解析が開始され、1998 年からは、国内の大学、研究所、企業が連携することで 2000 年までに約 17000 の EST 解析が完了している (<http://nrif2.nrif.go.jp/EST2/>)[5]。この解析では、固体培養を含む様々な条件で生育させた *A. oryzae* から cDNA ライブラリーが作成され、発酵産業に用いられている条件など、遺伝子の発現プロファイルが比較された。ゲノム解析は、製品評価技術基盤機構(NITE)を中心とし、産学官連携コンソーシアム(産業技術総合研究所、酒類総合研究所、食品総合研究所、東京大学、東京農工大学、東北大学、名古屋大学、日本醸造協会、アクシオヘリックス、天野エンザイム、インテック W&G、大関、キッコーマン、協和発酵工業、月桂冠、ヒゲタ醤油)によって、2001 年から開始され、2005 年に完了している。ゲノム解析は、ホールゲノムショットガン法によって行われ、約 37 Mb の塩基配列上に 12000 の遺伝子が予測された。DNA、遺伝子データベースもウェブ上で公開されている。(<http://www.bio.nite.go.jp/dogan/Top.>) *A. oryzae* のゲノムの特徴として、同時期にゲノム解析が行われた *A. fumigatus*、*A. nidulans* と比較して約 30%大きく、それに比例して、遺伝子数も増加していることがわかった。特に *A. oryzae* は、タンパク質や糖質の分解に関わる多数の加水分解酵素を多量に分泌することが知られているが、これらの遺伝子が 3-5 割程多く存在している。この結果は、*A. oryzae* において特異的に発現する新規酵素の存在する可能性を示唆する[6, 7]。

A. oryzae のゲノム上には、様々な機能を持ったシトクロム P450 と推定される遺伝子が 149 存在していることが明らかになっている (Table.1-1)。これは同属の *A. nidulans*(102)、*A. fumigatus*(65)と比較しても多いといえる。このうち、還元酵素融合型シトクロム P450 とアノテーションされている *cyp505* ファミリーは 4 つ存在しており、これは他二種の二倍である[6]。

Table.1-1 *Aspergillus* 属のゲノム上に存在する P450 遺伝子数の比較

Family	Function	<i>A. oryzae</i>	<i>A. nidulans</i>	<i>A. fumigatus</i>
<i>cyp57</i>	Pisatin demethylases	12	8	3
<i>cyp58</i>	Trichodiene oxygenases	11	9	2
<i>cyp53</i>	Benzoate monooxygenases	10	5	6
<i>cyp64</i>	P450 oxidoreductases	10	4	4
<i>cyp65</i>	Trichothecene hydroxylases	9	3	1
<i>cyp52</i>	Alkane hydroxylases	8	6	8
<i>cyp65</i>	Isotrichodermin hydroxylases	5	3	1
<i>cyp505</i>	Fatty acid hydroxylases	4	2	2
<i>cyp51</i>	Sterol demethylases	3	2	2
<i>cyp509</i>	Fum15 homologues	3	2	2
<i>cyp61</i>	Sterol desaturases	2	1	1
<i>cyp55</i>	P450 nitric oxide reductase	1	-	-
<i>cyp58,59,60,62,68,53,503,512</i>	P450 monooxygenases	22	20	7
Unknown cytochrome P450s		49	37	25
Total cytochrome P450s		149	102	65

3. シトクロム P450

シトクロム P450(以下 P450)は微生物から植物、動物まで生物界に広く分布する一群のヘムタンパク質で(Table.I-2)、還元型で一酸化炭素と結合して約 450 nm に極大をもつ特徴的な吸収スペクトルを示すことにその名が由来している(Fig.I-2)。P450の大きな特徴のひとつに、触媒する反応の耐用性、基質特異性が分子によって多様に異なり、幅広い点がある。主とするのはモノオキシゲナーゼ反応であり、基質に対して水酸化、エポキシ化、N,O,S-脱アルキル化、N,S-酸化反応を触媒するものも知られる(Fig.I-3)。これらの反応は各生物内の生理的機能に重要な役割を担っている。すなわち、哺乳類におけるステロイド合成、脂肪酸代謝、ゼノバイオティクスの代謝、植物における二次代謝産物の生産、真核生物においてはステロール合成、放線菌などバクテリアにおける抗生物質の生産である。さらに、種々の化学物質の代謝活性化による化学発癌への関与、環境汚染物質の代謝などにも P450 が関連することが明らかになっており、重要な問題とされている。以上のように極めて分化した反応多様性、生物分布を持つが、P450 はタンパク質の一次構造と高次構造の比較から一つの共通祖先遺伝子から生物進化の過程で分化し、多様化した遺伝子スーパーファミリーであると考えられている。P450 の分類は、アミノ酸配列が 40%以上一致すれば同一ファミリー、55%以上一致すれば同一サブファミリーに分類されることとなっている。

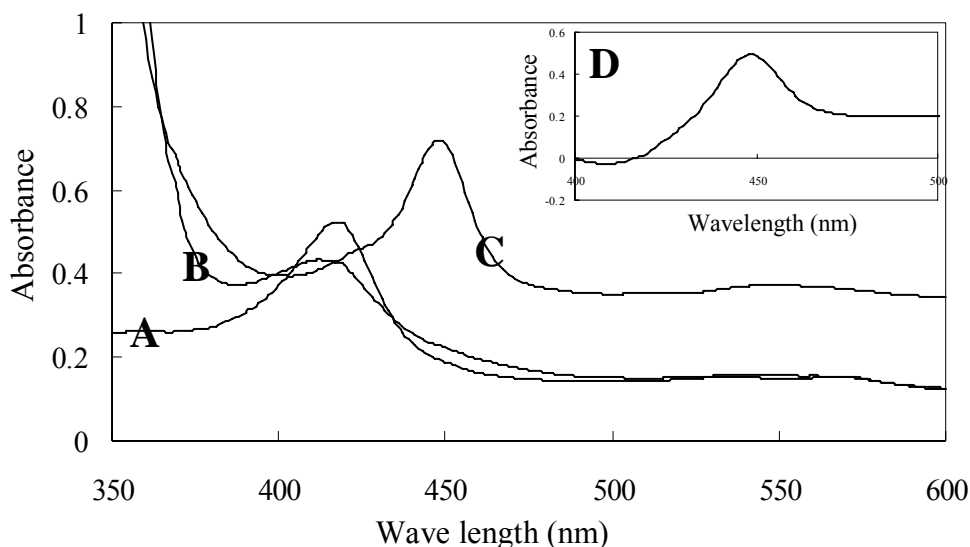


Fig.I-2 P450の典型的なスペクトル変化

A: 酸化状態(resting state) B: ジチオナイト還元状態 C: CO付加状態
D: CO差スペクトル

Table.I-2 様々な生物の持つP450遺伝子数

Species	P450s
<i>Escherichia coli</i>	0
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	20
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	150
<i>Arabidopsis thaliana</i>	249
<i>Oryza Sativa</i>	458
<i>Drosophila melanogaster</i>	87
<i>Fugu rubripes</i>	49
<i>Homo sapiens</i>	57

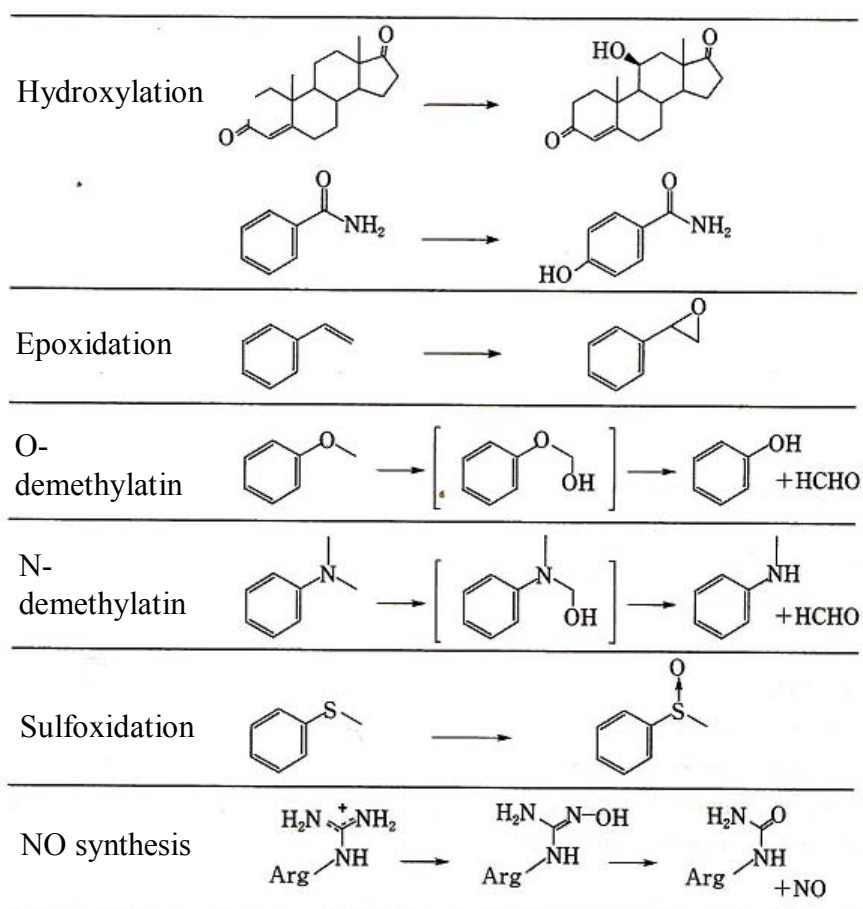


Fig.I-3 P450による代表的な酸化反応

『P450の分子生物学 講談社 2003』より引用

4. P450 の分子的性質

P450 の特徴である一酸化炭素結合状態の 450 nm 付近の吸収極大は、プロトヘムの第五配位子としてタンパク質のシステインのチオール基がイオン化したチオレートアニオン(-S⁻)が配位していることに由来する(Fig.I-4)。このシステインの前後のアミノ酸配列は、全ての P450 において非常に保存度が高く、ヘム結合領域と呼ばれる。ゲノム上の塩基配列から推定されるアミノ酸配列にこの配列が見つかり、その塩基配列は P450 遺伝子をコードしている可能性が高いと考えられる。

真核生物の P450 は、細胞内で小胞体またはミトコンドリアに結合した膜タンパク質として存在するのに対し、原核生物の P450 は可溶性タンパク質であり、細胞質に存在している。マイクロソーム型 P450 は一般に 500 程度のアミノ酸からなり、N 末端の 20-30 残基からなる疎水性領域が膜へのアンカーとなっている。ミトコンドリア型 P450 は、内膜のマトリクス側に結合しているが、膜結合に関与する配列は不明なままである。バクテリアの P450 は分子量が小さく、約 400 のアミノ酸からなることが多い。しかし真核生物、原核生物に関わらず数箇所の保存アミノ酸配列が存在し、立体構造も類似しており、共通祖先遺伝子から分化したという説が支持される。

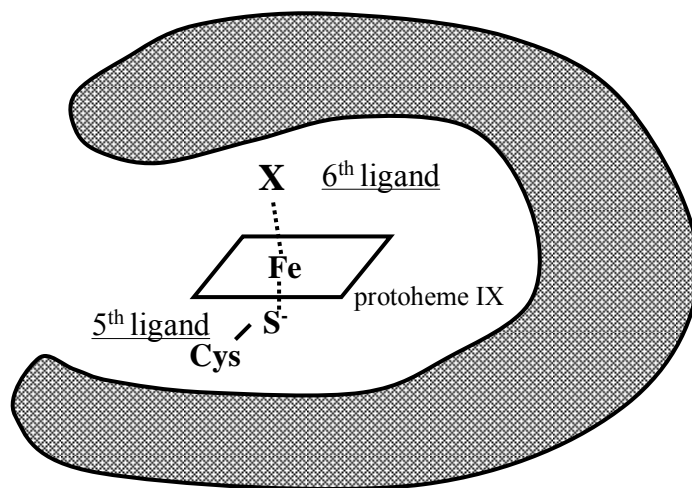
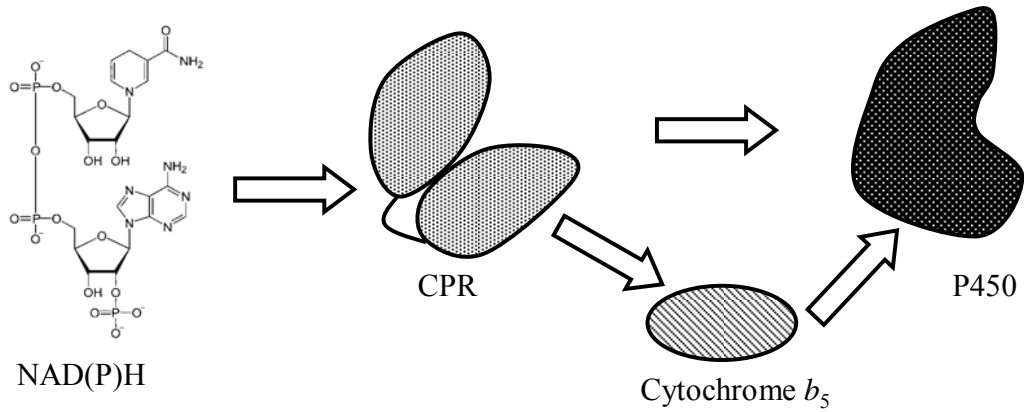


Fig.I-4 P450のヘムと軸配位子モデル

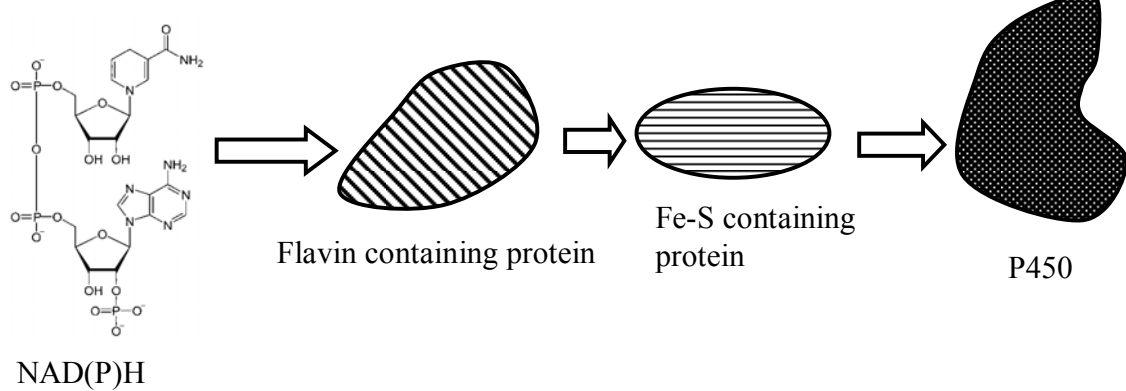
5.P450 の電子伝達系

P450 は主としてモノオキシゲナーゼ反応を触媒し、この反応には分子状酸素と共に、結合した酸素を活性化するための還元力の供給が必要となる。還元力は一般に NADPH(NADH)から電子伝達酵素を通じて P450 に受け渡される。原核生物、ミトコンドリアに存在する P450 では FAD を含む NADPH-ferredoxin 還元酵素と、Fe-S 含有タンパク質であるフェレドキシンが NADPH から受け取った二分子の電子を一分子ずつ P450 へ伝達する(Class I)。ミクロソーム型の P450 では、FAD,FMN を含む NADPH-P450 還元酵素(CPR)が、NADPH から受け取った二分子の電子を一分子ずつ P450 に渡す(Class II)。また、ミクロソーム型 P450 では、NADPH からシトクロム b_5 を経由して電子伝達が起こる経路も存在している。上記のように、電子伝達経路により古典的に真核生物型 P450 は Class II、原核生物は Class I と分類されていた。融合型 P450 である P450BM3 では、モノオキシゲナーゼ反応を触媒する P450 ドメインと還元酵素ドメインが一本のポリペプチド鎖に存在するという特徴的な構造を持つ。バクテリア由来でありながら P450BM3 の還元酵素ドメインは FAD、FMN を含み、真核生物の CPR と相同性が高い。P450BM3 の発見は P450 電子伝達経路の多様性を示す存在となり、その電子伝達系は、真核生物における Class II の電子伝達経路のモデルとして用いられている。介在するタンパク質は異なるが、二分子の電子が一分子ずつ、二回に分けて P450 へ伝達されるのが P450 反応における電子伝達系の特徴である[8]。

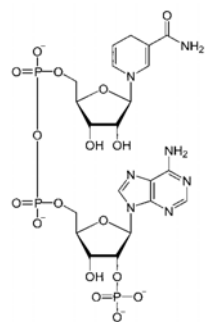
Microsome type P450 enzymatic system (Class II)



Mitochondrial, bacterial P450 enzymatic system (Class I)



Fused type P450



Intramolecular electron transfer

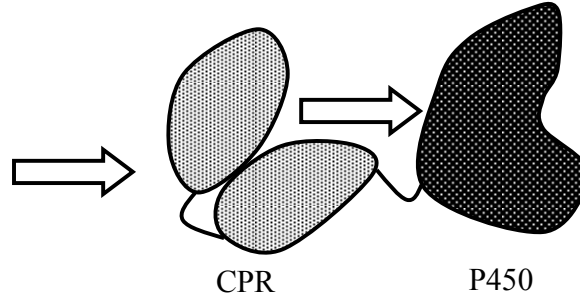


Fig.I-5 P450の電子伝達系

6.P450 の反応サイクル

P450 によるモノオキシゲナーゼ反応は、不活性な炭化水素、芳香族化合物に水酸基を導入するというものであり、化学工業的に行うためには、上述の通り困難な工程必要となる。P450 は二分子の電子を受け取り、結合した酸素を活性化することで酸化反応を触媒する[9]。典型的な反応スキームは以下に示すとおりである。

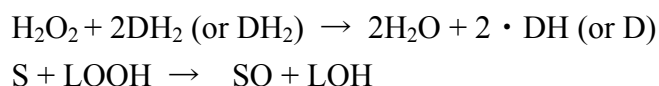


P450 のモノオキシゲナーゼ反応機構は、Estabrook らによって Cyclic reaction mechanism として 1971 年に提案されている(Fig.I-6)[10]。反応におけるステップは以下に示す。①酸化型 P450 に基質が結合する。基質結合により P450 の酸化還元電位が上昇し、電子を受け取りやすくなる。②還元酵素より一分子の電子が供給され、ヘムが還元される。③ヘムに酸素分子が結合する。④二分子目の電子が導入され、酸素分子が活性化する。⑤プロトンが活性化した酸素分子に結合する。(Compound 0) ⑥もう一分子のプロトンが付加し、水分子として脱離し、P450 活性分子種 Compound I (Oxo ferryl π -cation radical intermediate)が生成する。⑦Compound I により基質の酸素添加反応が進行する。⑧反応生成物が脱離し、酸化型 P450 が還元する。電子伝達が基質の反応に反映されないアンカップリング現象(⑨-⑪)は、適切なタイミングで電子、プロトンが伝達されない場合に起こる。活性分子種としての Compound I の存在は古くから提案されていたが、実際にスペクトル的に捉えられたのは 2002 年に CYP119 について行われた研究においてである[11]。

7.P450 のペルオキシドシャント反応

P450 のペルオキシドシャント反応は、クメンペルオキシド、過酸化水素などを酸素供与体として基質を酸化する経路である。過酸化水素依存的に酸素を基質に導入し酸化する反応は特にペルオキシゲナーゼ反応と呼ばれる。この反応は発見当初、生理的反応とは考えられていなかったが、後に本反応を主として触媒するヘムタンパク質(ペルオキシダーゼ)がエンドウマメ種子中に存在することが明らかになった[12, 13]。さらに後述のクロロペルオキシダーゼや、*Sphingomonas* 属細菌 *Sphingomonas paucimobilis* に見出された Fatty acid α -Hydroxylase、*Bacillus subtilis* 由来の P450BSb において生理的な P450 ペルオキシドシャント反応が発見されている[14]。この二種の P450 は、P450 ペルオキシゲナーゼと呼ばれ、いずれも過酸化水素依存的に飽和脂肪酸の α 、 β 位の水酸化反応を触媒する。一般的な P450 は、ヘム近位側表面に負電荷が集中しており、還元酵素の表面の正電荷と相互作用する。一方、P450 ペルオキシゲナーゼの近位側の表面には負電荷の集中は見られない。さらに、P450 ペルオキシゲナーゼは、活性部位内部にアルギニンを持ち、脂肪酸のカルボン

酸と相互作用する機能を持つ。これら二点において、P450 ペルオキシゲナーゼは一般的な P450 と異なり、過酸化水素依存的な反応に特化しているといえる。P450 及びクロロペルオキシダーゼは反応サイクルで、過酸化水素から酸素 1 原子を受け取り、NADPH を用いた反応時と同じ活性分子種 Compound I を生成する(Fig.I-7)。



通常の P450 も過酸化水素依存的に酸化反応を進行させることが可能であるが、一般的に NADPH-還元酵素系と比較して反応回転がとて低いことが多い。この原因として、反応中間体 Compound I の安定性に関係していると考えられている。ペルオキシダーゼは、P450 と比較して安定な Compound I を形成することが知られており、これはペルオキシダーゼの遠位側の親水的環境が中間体を安定化する。P450 の疎水的遠位環境とは明確に異なる。また、酵素の過酸化水素に対する安定性も反応性に関係しているのかもしれない。

P450 のペルオキシドシャント反応は、NADPH を電子供与体として用いる反応と同様の反応を安価な過酸化水素によって達成することができ、反応に伴って生成するのは水のみである。この反応は P450 の工業応用において非常に価値が高く、注目を浴びている。

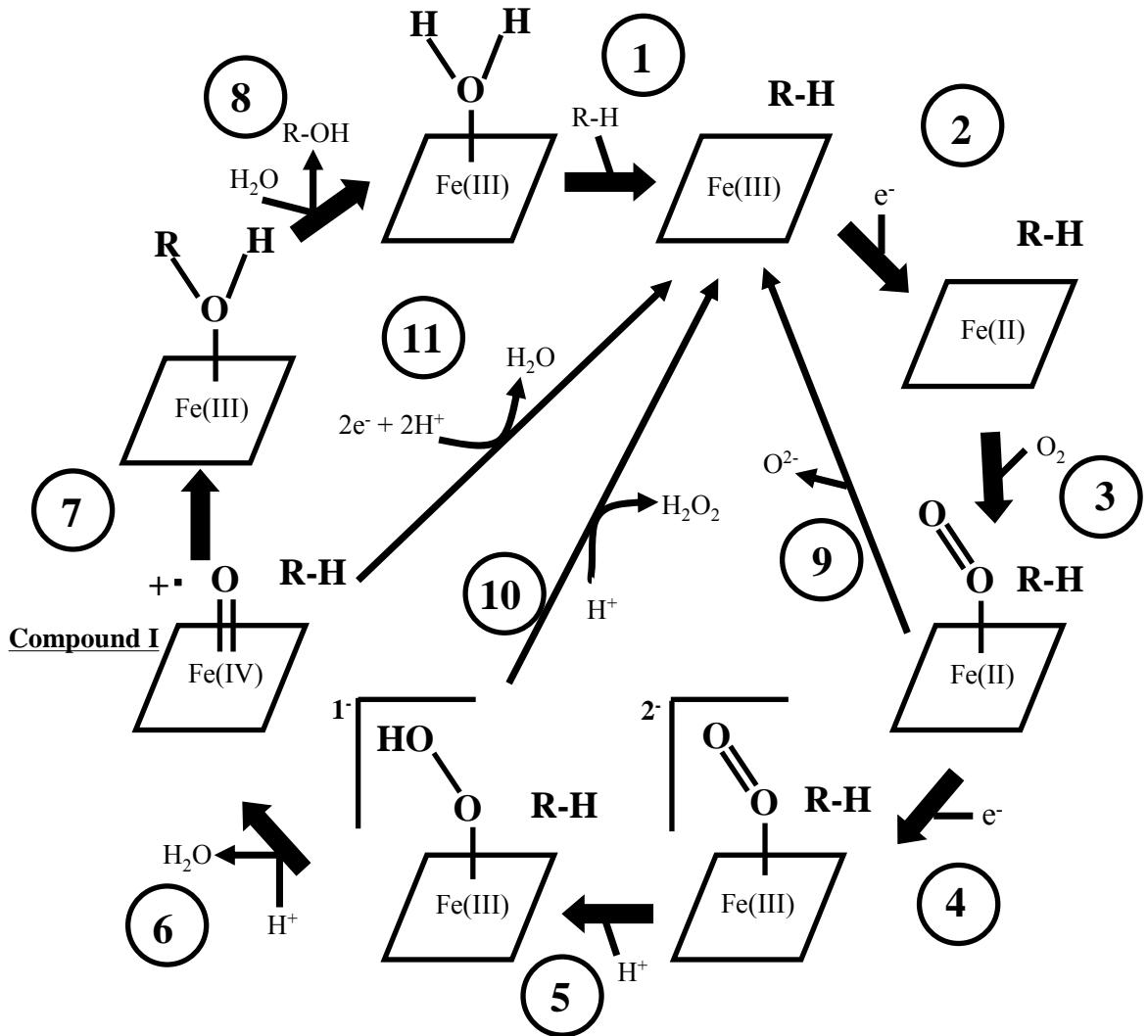


Fig.I-6 450の反応サイクル

R-H : 反応基質 番号は本文における説明に対応する。

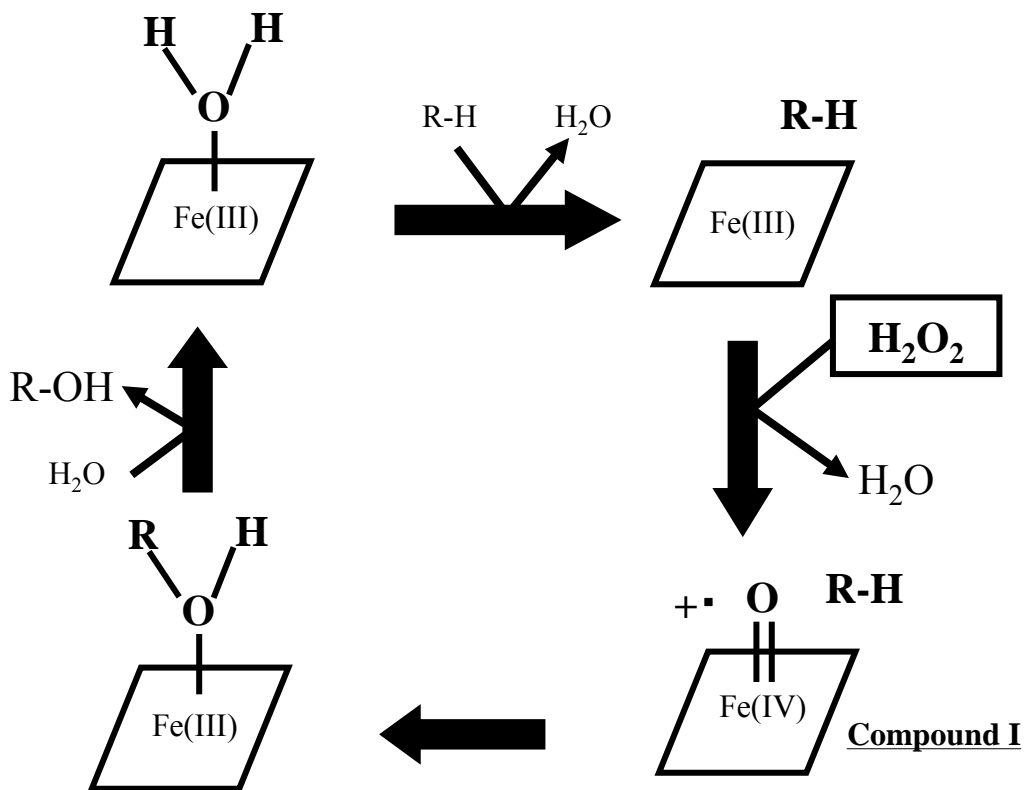


Fig.I-6 P450におけるペルオキシドシヤント
R-H: 反応基質

8.P450 の基質誘導スペクトル変化(Fig.I-8)

P450 の活性部位ポケットは厳密に疎水性に保たれている。基質は疎水性の高い化合物であり、反応を受けるに際して酸素が結合する第六配位子側(遠位側)に、酸素が導入されるべき構造部分をへム鉄に向けて適切な方向・距離(一般的に 5 Å程度)に配置される。酸化状態 P450 では、第六配位子側に水が配位しているが、基質が侵入してくることで押しのけられて動く。このことによりへム鉄のスピンの状態が変化し、吸収スペクトル上の変化が観察される。すなわち、P450 への基質結合により水分子の O-配位を示す低スピン型スペクトルから、五配位型の高スピン型スペクトルへの変化が起こる。ソーレー帯における P450 の吸収は、へム鉄の電子状態を反映しており、一般的には酸化型における 420 nm 付近の吸収極大が、390 nm 付近へシフトする。このスペクトル変化は基質結合に伴う Type I スペクトル変化と

呼ばれ、差スペクトルでは、390 nm 付近に山、420 nm 付近に谷が生じる。通常、P450 の基質は Type I スペクトル変化を誘導する。Type II スペクトル変化では 420 nm の吸収極大が 425-430 nm にシフトが起こる。Type II スペクトルは、へム鉄への N 原子配位を示しており、阻害剤として機能する。Type II リガンドの特徴として構造中に N 原子を含み、4-フェニルイミダゾールなどが用いられる(Fig.I-9)。

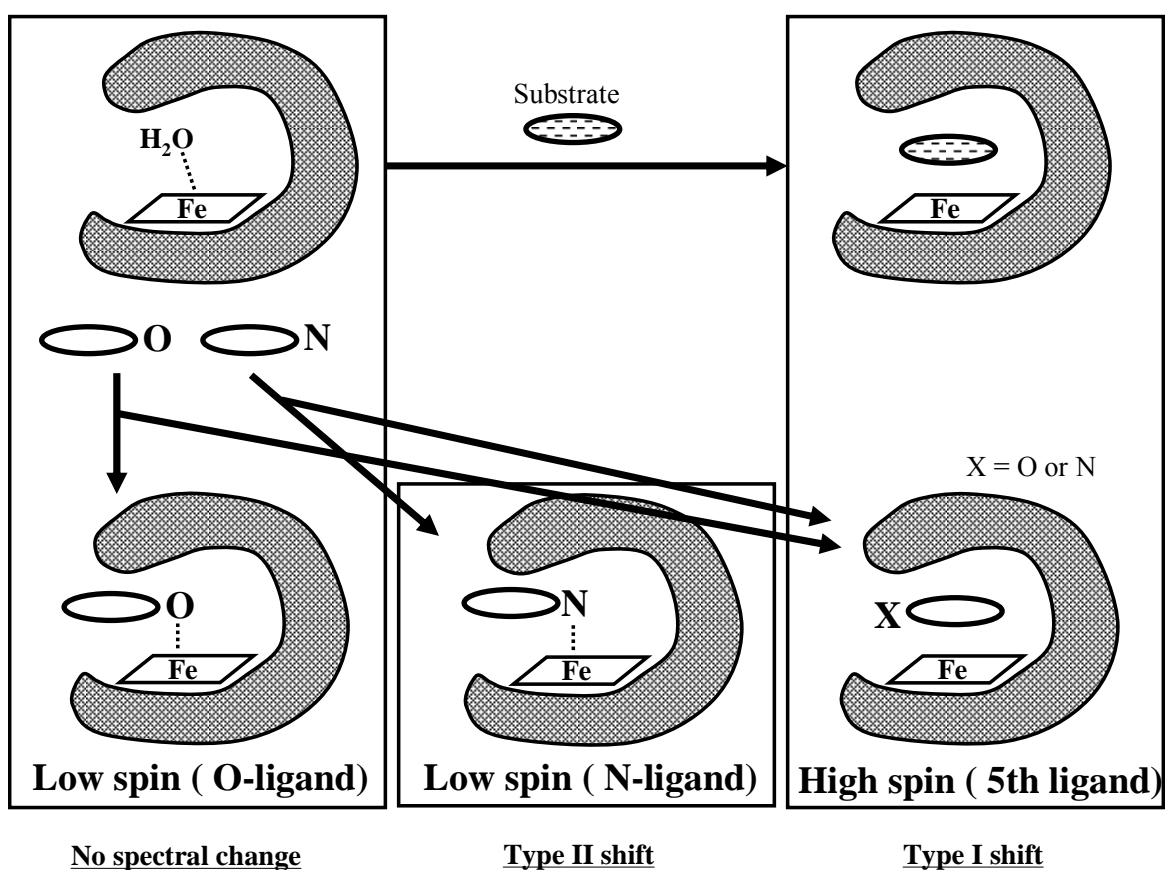


Fig.I-8 基質誘導スペクトル変化モデル

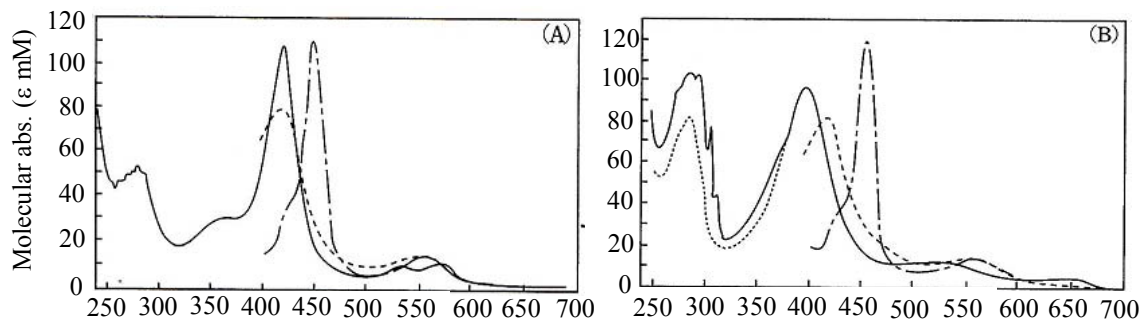


Fig.I-9 P450の典型的な低スピン型と高スピン型のスペクトル

A : CYP2B4 (典型的な低スピン型) B : CYP1A2 (典型的な高スピン型)

実線及び点線 : 酸化型、破線 : 還元型、鎖線 : CO結合型

『P450の分子生物学 講談社 2003』より引用

9.カビのシトクロム P450

カビは、真核生物として必要最低限の P450 しか持たないと考えられている酵母 (*Saccharomyces cerevisiae* : 3 種、*Schizosaccharomyces pombe* : 2 種)と比較しても圧倒的に多くの P450 遺伝子を持つことが明らかになっている(アカパンカビ *Neurospora crassa* : 38 種、白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* : 150 種以上)。 *A. oryzae* の P450 遺伝子のアノテーション結果によると、推定されている 149 の P450 には、主要な反応であるモノオキシゲナーゼ反応を触媒するものの他、カビの病原性に関与するとされる Pisatin demethylase (cyp57)、カビの脱窒発見の鍵となった P450nor (Nitric oxide reductase : cyp55)などが存在しており、カビにおいて P450 が極めて多様な反応を担っている可能性が示唆される[6]。また、カビ *Fusarium oxysporum* から初めて単離された還元酵素融合型 P450(cyp505)は[15]、バクテリア *Bacillus megaterium* 由来の P450BM3 と最も高い相同性を持ち[16]、バクテリア・カビの間での系統的な関連性が指摘されており、P450 の進化的観点からも興味深い酵素である。 *P. chrysosporium* のゲノム上には、前述の通り、150 という P450 の存在が示唆されているが、これらのうち多くがダイオキシンのようなゼノバイオティクスやリグニン分解、その結果生じる芳香族化合物の分解に関与することが予想されている[17, 18]。また、カビの一種には穀物等に生え、その際にアフラトキシンやステリグマトシステンに代表される強力な毒性、変異原性、発がん性を持つ二次代謝産物ポリケタイドを生産するものがあり、これらの二次代謝産物の合成に P450 が関与している可能性も示唆されている[19]。

10.融合型 P450

融合型 P450 は、*B. megaterium* の P450BM3 (CYP102A1)が初めての例であり、P450 と P450 還元酵素が融合して一本のポリペプチド鎖として存在する構造を持ち (Fig.I-10)、脂肪酸垂末端 (ω -1 -3)水酸化反応を触媒する[20]。ゲノム解析の結果、*Bacillus subtilis* は2種の本ホモログ(CYP102A2,3)を持ち[21, 22]、さらに他の *Bacillus* 属も同様の融合型 P450 を持つことが明らかになり、クローニング、性状比較が行われている[23-25]。*Fusarium* 属に見出された P450foxy は同様の融合タンパク質であり、ミクロソーム膜画分に回収される点を除くと酵素学的諸性質は P450BM3 に酷似し[15]、P450foxy も脂肪酸の垂末端酸化反応を触媒するが[26]、生理的機能は必ずしも同一ではないことが指摘されている。P450BM3 の還元酵素ドメインはバクテリア由来の酵素でありながら、真核生物の P450 還元酵素(CPR)と相同性が高いという特徴を持ち、P450 における電子伝達系 Class II のモデルとされていることは前述の通りである。融合型 P450 の最大の特徴として、酵素反応速度が極めて速いことがあげられる。P450BM3 では反応回転は 10000 min^{-1} にも至るという報告があり、P450 による反応としては異例と言える速さである。この要因として、タンパク質の融合により分子内電子伝達となった有利性があげられている。P450BM3 は、古くから研究例が多く、タンパク質工学的的手法による機能改変が試みられ、工業応用が最も期待されている酵素の一つである。バクテリアの持つ P450BM3 以外の融合型 P450 の研究も近年進展を見せている一方で、糸状菌の持つ融合型 P450 の酵素学的性質についての研究例は極めて限られる。*P. chrysosporium* ゲノム上には7種、*A. oryzae* も4種の融合型 P450 がアノテーションされており、その生理的機能および反応性に興味を持たれる。

11.P450foxy の分子的特徴

カビ *F. oxysporum* 由来のシトクロム P450foxy は、P450 ドメイン(54 kDa)と P450 還元酵素(65 kDa)が融合して一本のポリペプチド鎖として存在するユニークな構造を持った全長 119 kDa の融合型 P450 である。一般に真核生物由来の P450 は膜結合型であることが知られているが、P450foxy も例に漏れず、膜画分より単離された[16]。さらに *F. oxysporum* のゲノム上より P450foxy の遺伝子が単離され、クローニングが行われた。当初、酵母発現系における研究例が報告され[27]、後に大腸菌大量発現系が確立されて大量の酵素が調整できるようになり酵素学的な研究が進んだ[28]。奇妙なことに、大腸菌発現系で P450foxy は可溶性画分に回収することができた。通常膜結合型 P450 は、N 末端に膜結合領域(非電荷アミノ酸 10-20 残基の後に塩基性アミノ酸残基)を持つことが知られているが、P450foxy はそれに相当する配列は見出されておらず、カビ菌体内においては、P450foxy は、翻訳後修飾を受けることによって膜にアンカーされると考えられている[16]。

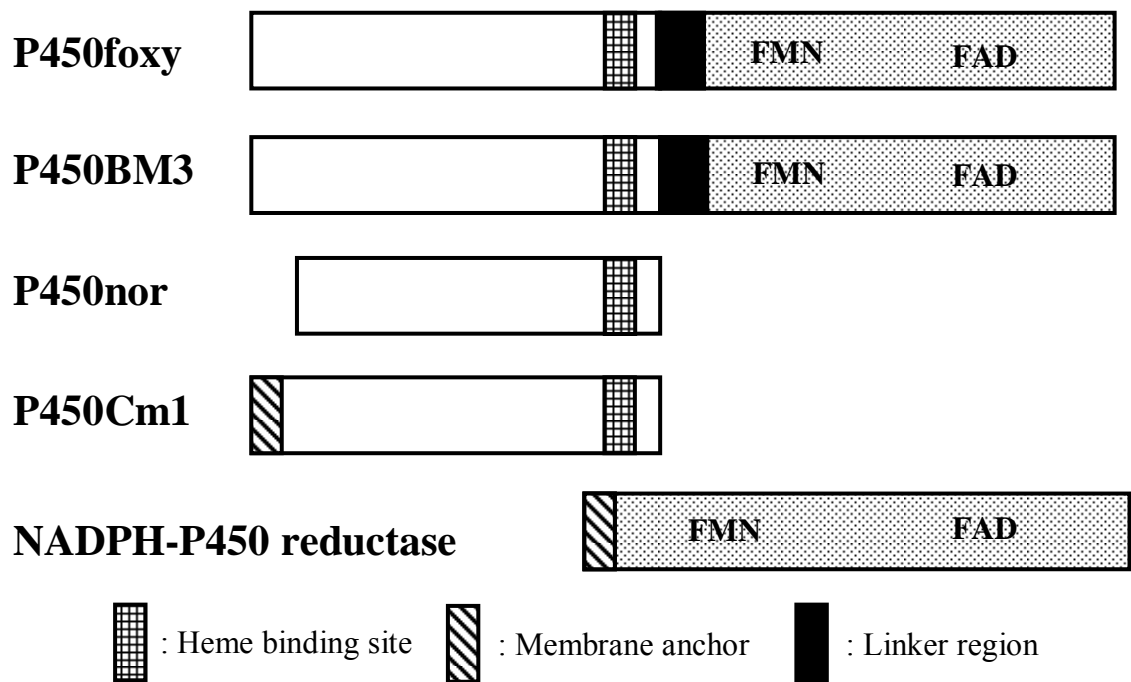


Fig.I-10 P450のレドックスパートナーと構造

12.P450foxy の酵素学的特徴

P450foxy による脂肪酸水酸化反応は、飽和脂肪酸 C9-18 の亜末端において進行し、最適鎖長は C12-13 である。水酸基の付加は ω -1 -3 で起こり、位置特異性は ω -1 が最も高い(Fig.I-11)[29]。P450foxy による酸化反応サイクルは極めて速く、最も効率よく反応の進行する C13(トリデカン酸)においては、1分あたり 3000 回転にも及ぶ。この数値は他の P450 と比較しても圧倒的に速く、その要因として還元酵素の融合が挙げられている。また P450foxy の還元酵素の活性が、基質となる脂肪酸を添加することで大幅に上昇するという現象が報告されているが、その詳細な機構は明らかになっていない。一般に P450 は基質が結合することで酸化還元電位が上昇し、還元酵素からの電子供給が進みやすくなることが知られており、これは有害な過酸化水素の生成を抑制するための機構であると考えられている。P450BM3 基質複合体の結晶構造解析の結果より、活性部位内部に脂肪酸が結合することで、分子全体の大きな構造変化が誘導されることが明らかになっている。P450foxy も同様に、基質となる脂肪酸が活性部位に侵入することで、還元酵素も含めた構造変化が起こり、電子伝達効率が劇的に上昇するものと考えられる。

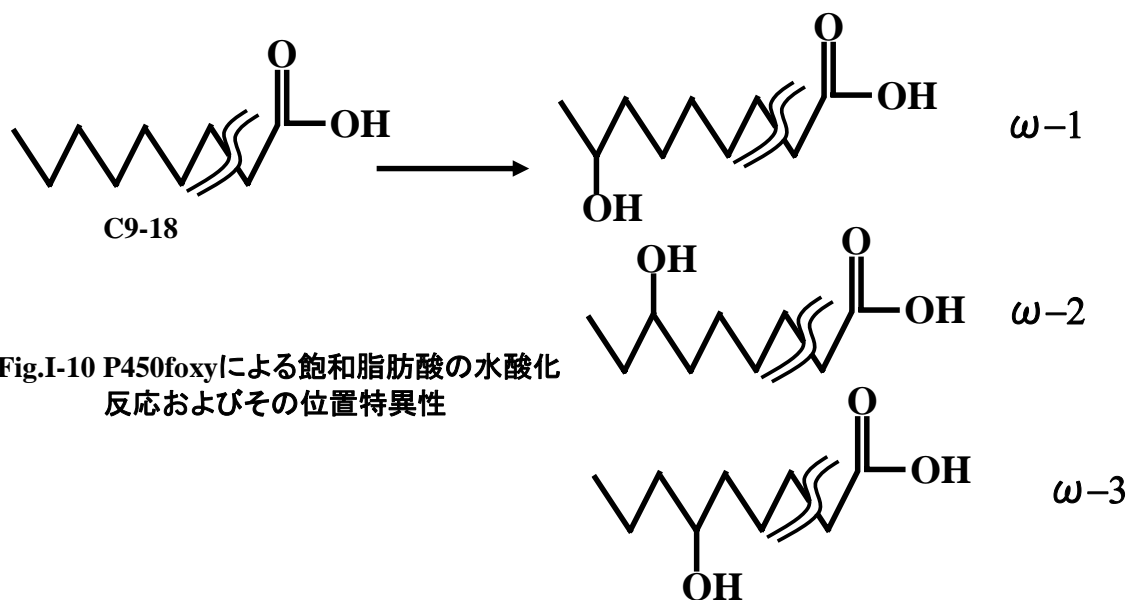


Fig.I-10 P450foxyによる飽和脂肪酸の水酸化反応およびその位置特異性

13.P450foxy と P450BM3 の酵素学的、構造的類似点と相違点

P450foxy と P450BM3 は還元酵素融合型 P450 である。P450BM3 は *B. megaterium* 由来の脂肪酸水酸化酵素であり、他の構成成分を必要としない self-sufficient であること、可溶性酵素であること、真核生物由来 P450 と同様の電子伝達系を持つという理由から P450 のモデルとして古くから極めて多くの研究例がある。P450foxy と P450BM3 は、アミノ酸配列的に P450 ドメインだけでなく、還元酵素ドメインにおいても互いに最も近い系統関係にあり(P450 ドメイン: 40.6%、還元酵素ドメイン: 35.3%)、酵素学的性質も酷似している[30]。P450foxy は真核生物であるカビ由来であるのにも関わらず、バクテリア由来の P450 と最も近いことから、P450foxy は、P450BM3 の真核生物における counterpart であると呼ばれ P450 の進化的観点からも興味深い。生理的な存在意義は明確にされていないが、P450BM3 はバクテリアに毒性を示す脂肪酸を環境中から速やかに排除する機能を担うと考えられている[31]。また、最近の研究では、クオラムセンシングにおいてオートインデューサーとして働くことが知られるアシルホモセリンラクトン(AHSL)を基質として認識する可能性も報告されている[32]。カビの還元酵素融合型 P450 では、P450foxy のホモログ(CYP505B)が他のカビにおいて見出されており、二次代謝産物生産への関与が示唆されている。P450BM3 は、バクテリア内でフェノバルビタールの添加によって発現が誘導される現象が知られており[33-35]、遺伝子上流に応答配列が含まれることが確認されている[36]。P450foxy ではそのような誘導は起こらず、応答配列も存在しない。

両者とも脂肪酸水酸化活性を持つことが知られているが、酵素学的性質を比較すると、注目すべき相違がいくつか存在している。まず、基質として認識する脂肪酸の炭素鎖長が異なっており、P450foxy は、C9-18 の飽和脂肪酸を、P450BM3 では、C12-20 の飽和及び不飽和脂肪酸を基質として認識する[37]。次に P450foxy において観察される長鎖脂肪酸に対する基質阻害があげられる。P450foxy は、ある一定の基質濃度において、C13 に最も高い基質特異性を示し、炭素鎖長が長くなるにしたがって酵素活性が低下する傾向が見られる。そして C14 以上の炭素鎖長以上で、高い基質濃度のとき、基質阻害が見られるという報告がなされている。P450BM3 では、C15(ペンタデカン酸)で最も高い酵素活性を示すが、P450foxy ほど高い基質特異性ではなく、それ以上の長鎖脂肪酸においても基質阻害は見られない。さらに P450BM3 は、長鎖不飽和脂肪酸に対しても反応を示すという特徴がある。現段階では、P450foxy の構造情報は得られていないが、アライメント比較から、P450BM3 と脂肪酸との相互作用は類似していると考えられ、酵素学的相違につながると予想されるアミノ酸残基がいくつか提示されている。

P450foxy と P450BM3 活性部位入口に存在するアミノ酸の相違に着目した実験が前任者によって行われた。P450BM3 の結晶構造解析と変異体による実験より、基質

である脂肪酸の結合に Phe42、Arg47、Tyr51 のアミノ酸が重要な役割を果たすことが示唆されている[38, 39]。それに対応するアミノ酸は P450foxy では、Leu43、Lys48、Phe52 となっており、P450BM3 に対応する P450foxy 変異体を作成して、脂肪酸への反応性を調べた。結果、これらの三つのアミノ酸が P450foxy においても基質結合に大きく関与していることが示唆され、基質特異性の変化、基質阻害の緩和等に顕著な効果が見られた。また、P450foxy と P450BM3 の活性部位内部を疎水性に保つアミノ酸残基(Leu75、Phe87、Leu181、Ile263、Leu437)の保存度が高いことと比較して、活性部位入口のアミノ酸が性質は似通っているものの、保存されていないことは、注目に値する(Fig.I-12)。

Table.I-3 P450foxyとP450BM3の比較

	P450foxy	P450BM3
Organism	<i>F. oxysporum</i> (Eukaryote)	<i>B. megaterium</i> (Prokaryote)
Localization	Membrane	Cytosol
Molecular weight	119 kDa	119 kDa
Shape	Fusion type P450	
Substrates	Saturated Fatty acid (C9-C18)	Saturated Fatty acid (C10-C19) Un-saturated Fatty acid
Homology P450domain: 40.6% Reductase domain : 35.3%		

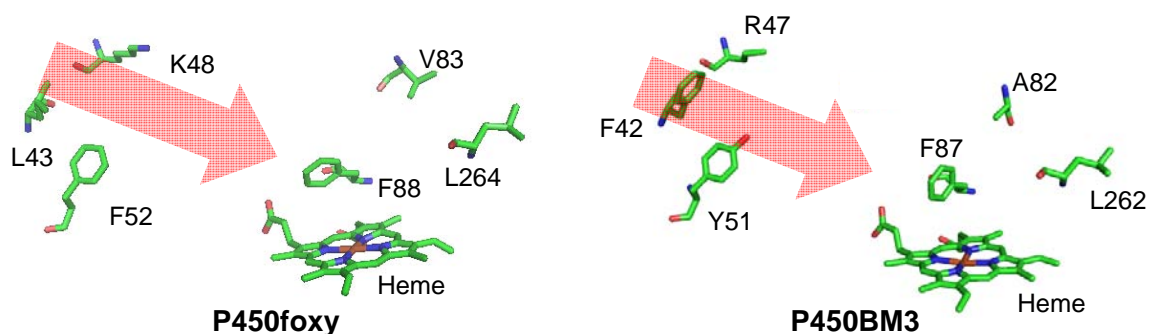


Fig.I-12 P450foxyとP450BM3の活性部位入口のアミノ酸配置の比較

14.P450BM3 のタンパク質工学的手法による機能改変

P450BM3 工業応用にむけた研究が最も進んでいる P450 であり、その酵素学的特長を生かすため、タンパク質工学的手法による機能改変を行った報告例が非常に多い。一例を以下に示す。より付加価値の高い短鎖炭素鎖の水酸化を可能にするための Saturation mutagenesis、部位特異的突然変異による機能改変[40, 41] 中鎖脂肪酸特異的変異体[42] 複素環の酸化能の付加[43, 44] アルカン水酸化活性[45] 過酸化水素依存的反応の付与[46] 活性部位に他の P450 の配列を導入したキメラ酵素の作出[47, 48] 担体固定化して Fine Chemical Synthesis に応用、ヘム周辺に変異を導入し、ヘムと相互作用させることで酵素の安定化を図る[49-51]など枚挙に暇がない。

15.還元酵素融合型 P450 の結晶構造解析

還元酵素と P450 が融合しているという、その特異な構造的特徴と、酵素反応速度との相関関係を明らかにするため、P450BM3 の結晶構造解析は古くから行われており、P450 ドメインのみを発現したものについては、基質、阻害剤の有無での様々な結晶構造が解かれ[42, 52, 53]、構造情報がウェブ上で公開されている。さらに P450 ドメインと還元酵素ドメインのうち、FMN-結合ドメインまでのコンストラクトについても結晶構造が報告され[54]、P450BM3 における電子伝達系の一端が明らかになっているが、全長酵素の構造解析の成功例は報告されていない。P450foxy についても大腸菌発現系が構築されてから、結晶構造解析が試みられているが、現在まで得られている構造情報は皆無である。P450BM3 との構造比較のため、P450foxy の結晶構造解析も急がれる。

16.ハロゲン添加酵素 クロロペルオキシダーゼ (Chloroperoxidase:CPO)

過酸化水素依存的にハロゲンを添加する反応を触媒する酵素はハロペルオキシダーゼと呼称される。この一群の酵素には、バナジウム(V)もしくはプロトヘムが補酵素として含まれる。バナジウム含有ブロモペルオキシダーゼは、最初に褐藻類 *Ascophyllum nodosum* に見出され[55]、同様に塩素化、臭素化反応を触媒する酵素が緑藻類、グラム陰性バクテリア[56, 57]、放線菌にも見出されている[58]。これらの生物においてハロゲン化二次代謝産物の生合成への関与が示されている。構造的には Acid phosphatase に類縁が見出されている[59]。

カビ *Caldariomyces fumago* によって生産されるクロロペルオキシダーゼ(CPO : Fig. I-12) はプロトヘム含有型ハロペルオキシダーゼであり、カビ由来の P450 として古くから知られており[60-62]、研究例も多い。ペルオキシダーゼ反応のみではなく (Fig.I-13)、ハロゲン存在下で基質にハロゲン原子を導入するという珍しい反応を触媒することが知られている (Fig.I-14)。生理的には *C. fumago* の二次代謝産物カルダリオマイシンの過酸化水素依存的塩素付加反応を触媒している[60]。

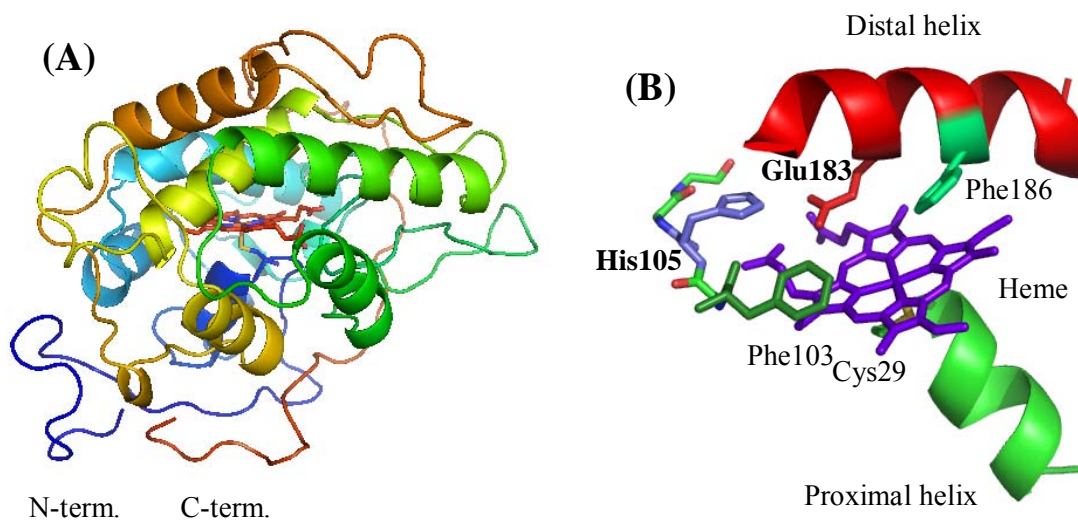
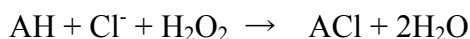


Fig.I-13 CPOの結晶構造 (PDB : 1CPO)

(A) : CPOの全体構造、糖鎖は省略されている。

(B) : CPOのヘム周辺構造 活性に重要な残基は太字で示した。

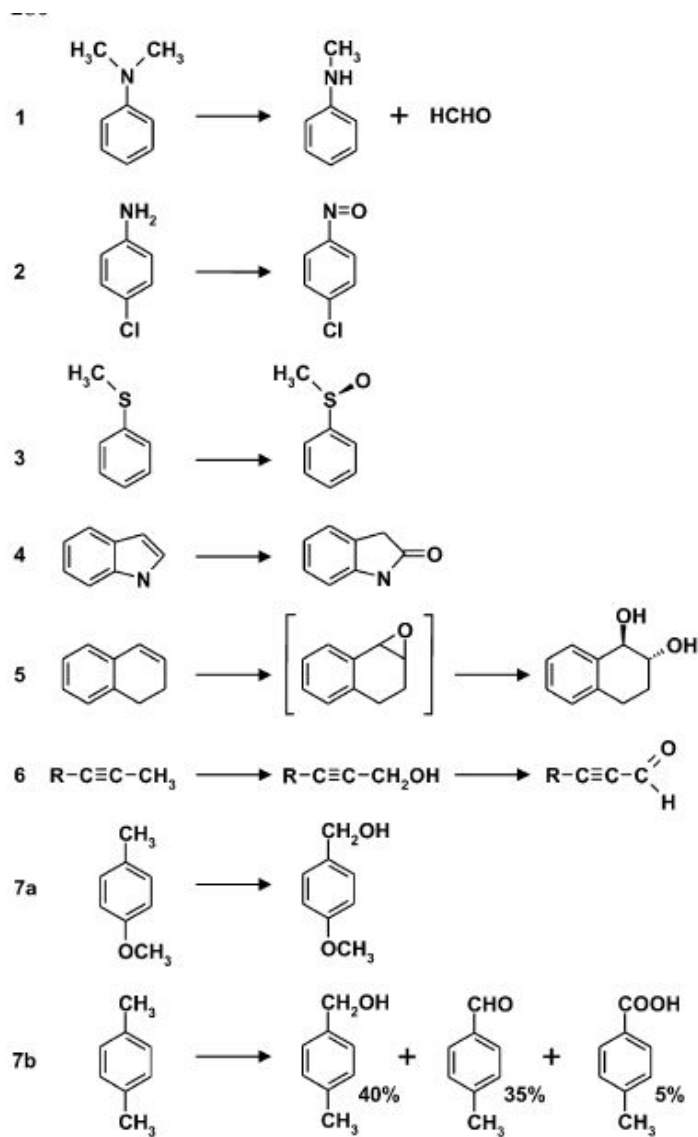


Fig.I-14 CPOによるPeroxidase反応

1 : N-dealkylation 2 : Oxidation of the amino group 3 : Enantioselective sulfoxidation
 4 : Indole oxidation 5 : Epoxidation 6 : Propargylic hydroxylation 7a : Benzylic hydroxylation 7b : Selective hydroxylation

[62] Hofrichter et al (2006)より引用

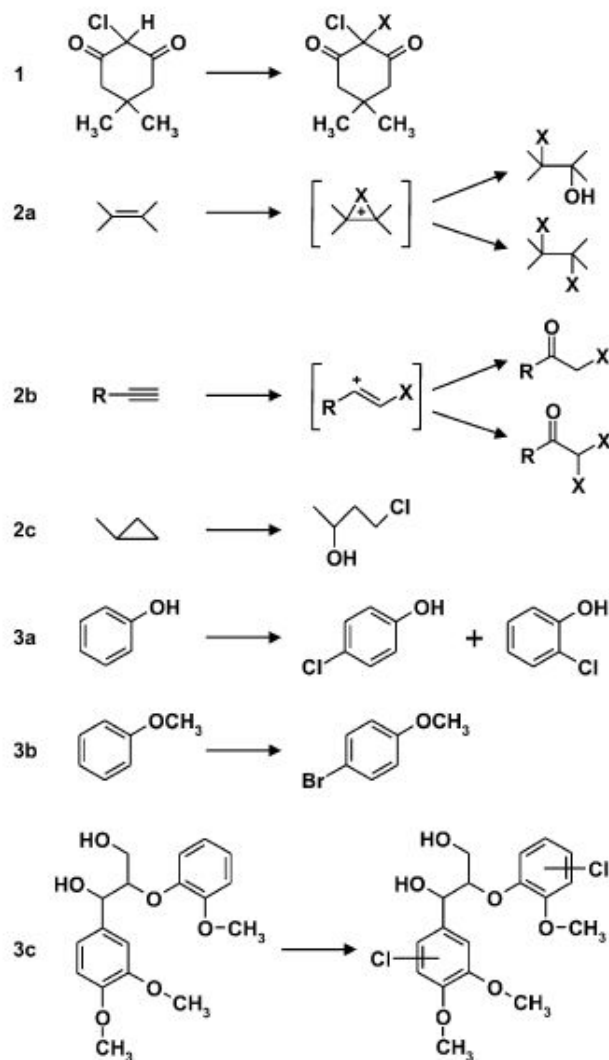


Fig.I-15 CPOによるHalogenation反応

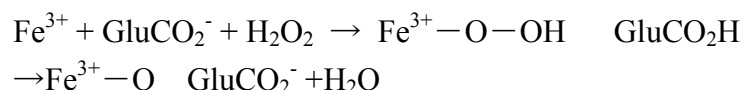
1 : Chlorination and bromination of diketones 2a : Halogenation of alkenes
 2b : Halogenation of alkynes 2c : Chlorination and bromination of
 cycloalkanes 3a : Chlorination of phenol 3b : Bromination of anisole 3c :
 Chlorination of a non-phenolic lignin model compound

[62] Hofrichter et al (2006)より引用

CPO は、ヘム鉄第五配位子がシステインであり、チオレートアニオンとして配位している点は P450 と一致する[63, 64]。しかし、分子全体のアミノ酸配列は P450 に相同性を示さず、菌体外酵素である点、糖タンパク質である点など[65]、P450 フェ

ミリーとは一線を画す性質が多く、スーパーファミリーには属していない。

P450 や西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) の酵素反応では、反応過程で活性型の Compound I の生成が示されている[66]。この中間体生成のためにはヘム鉄に結合した酸素(または過酸化水素)の不均等開裂が必要である[67]。HRP(ヘム鉄第五配位子: His)ではヘム近位側の負荷電アミノ酸がヘム鉄方向へ電子を押し出し、遠位側の正荷電アミノ酸がヘム鉄の反対側から電子を引っ張るプッシュ・プル機構が提案されている[68, 69](Fig. I-16)。一方 P450 では遠位側の正荷電アミノ酸は存在せず、近位側の負荷電している第五配位子チオレートアニオンが直接電子を押し出すことが重要とされている[67]。CPO の第五配位子 Cys を His に変えた変異体で活性があまり変化しないという報告があり[70]、このことは CPO において第五配位子 Cys が P450 の場合ほど重要な機能を持たないことを示す[71]。また CPO の遠位には負荷電 Glu183 など極性アミノ酸残基が存在しており、その重要性が指摘されている[72, 73]。負電荷を持った Glu183 は、一般酸塩基触媒として機能すると考えられ、侵入してきた過酸化水素からプロトンを引き抜き、Compound I の生成を助けると予想される。また、弱酸は Glu183 の静電的反発によって活性部位内に侵入することができない。低 pH では、Glu183 がプロトンされ、塩素イオンが侵入しやすくなる。CPO が酸性でのみ高い塩素化活性を示すのは、この残基の影響が大きく、酵素的な性質を大きく左右する残基である。Glu183 は、おそらく一般ペルオキシダーゼにおける一般酸塩基触媒として機能するヒスチジンと同様の機能を持つと推測される。



$\text{Fe}^{3+}-\text{O}$ は酸化され、Compound I を生成する。活性部位内部に存在する Glu183 側鎖のプロトン化、脱プロトン化の状態により環境は大きく変化し、HRP など他のペルオキシダーゼには見られない構造的特徴である。

これらの結果は、CPO は P450 と HRP に代表されるヘムペルオキシダーゼのハイブリッド、もしくは中間に位置する性質を持つ可能性を示唆する[74, 75]。CPO によるハロゲン付加反応の機構にはいくつかの研究例があるが、酵素反応で生じる次亜塩素酸によって間接的に基質にハロゲン原子が導入される機構が提唱されている[76](Fig. I-15)。

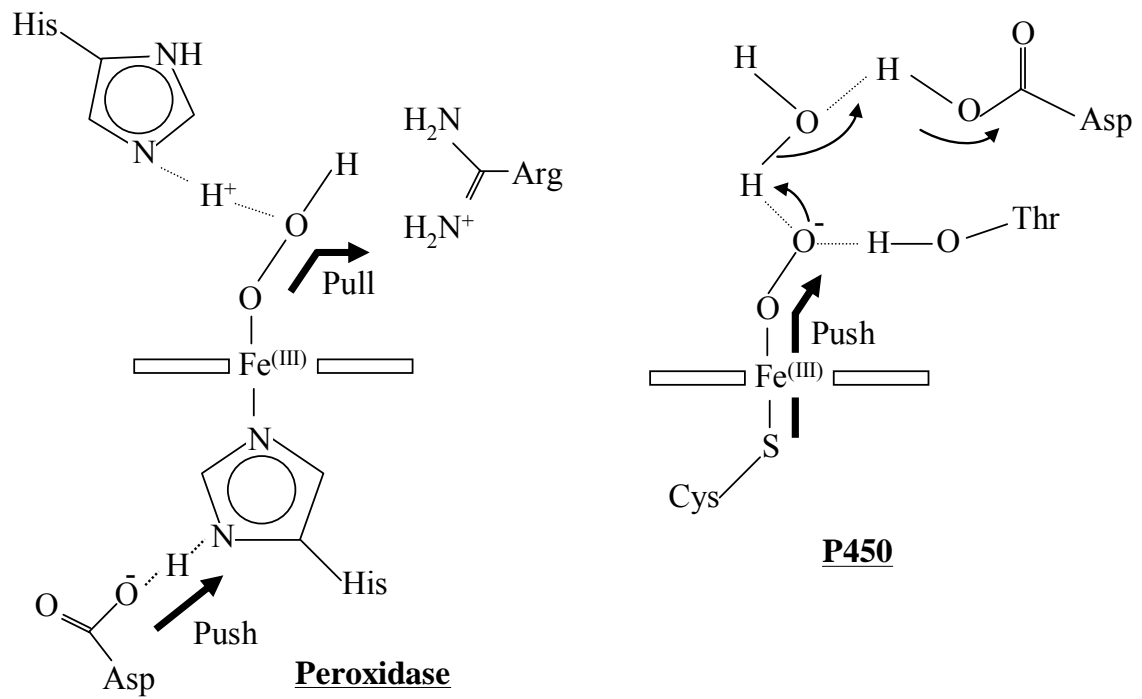


Fig.I-16 ペルオキシダーゼにおけるpush-pull機構

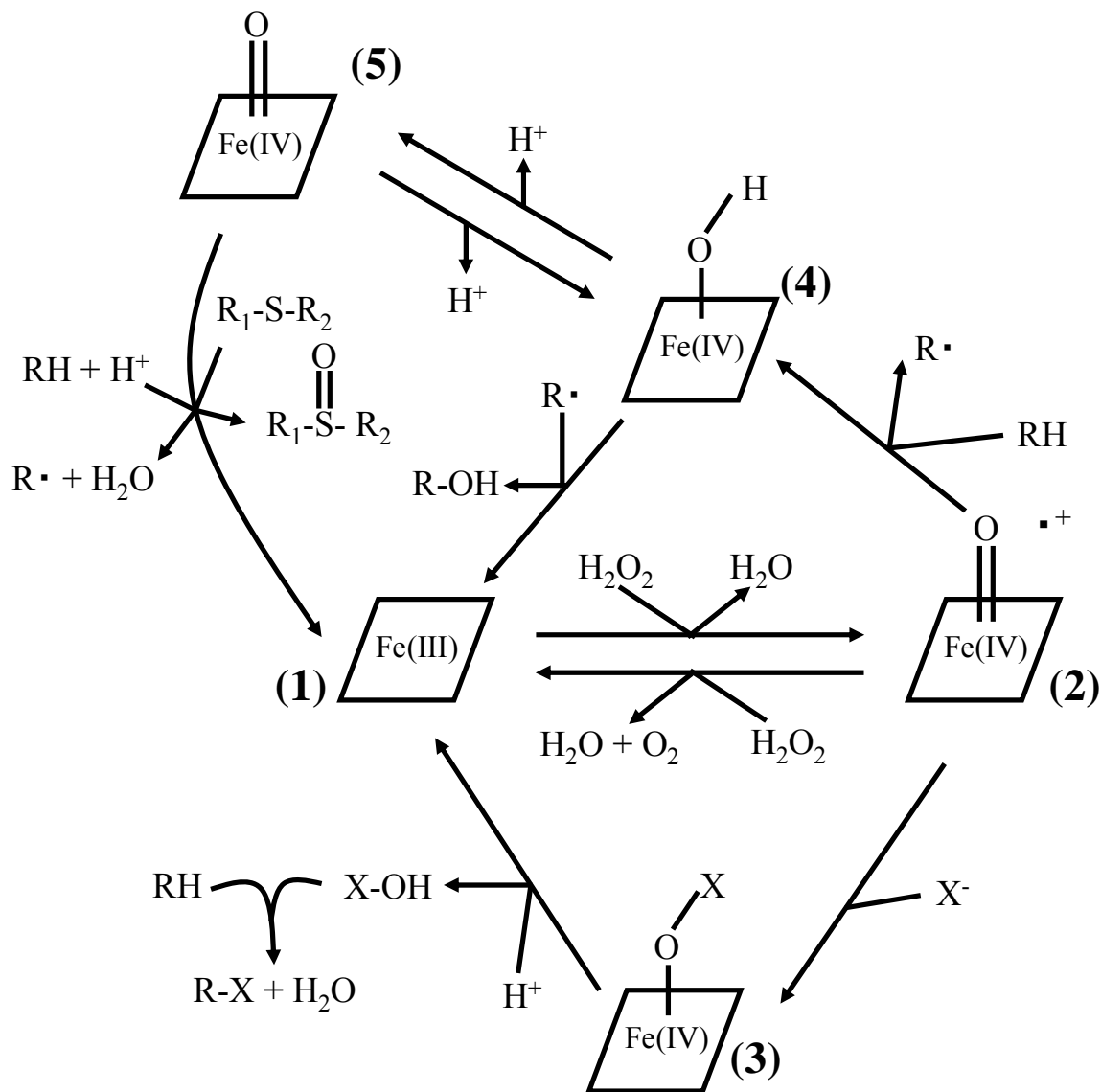


Fig.I-17 ヘム-チオレート型ハロペルオキシダーゼによる触媒サイクル

(1) Resting ferric enzyme (2) Compound I (3) Compound X that releases hypohalous acid (HOX) (4) Protonated compound II (5) Compound II

Classic peroxidase reaction : (2) → (4) → (5) → (1)

Halogenation : (3) → (1) Hydroxylation : (4) → (1)

Oxygenation : (5) → (1)

ハロゲン添加酵素として、古くから CPO が知られ、研究が進められてきたが、最近カビや食用キノコも同様の酵素を生産していることが明らかになっており (Fig.1-7)、性状が調べられ、塩素、臭素、ヨウ素の付加反応を触媒することが明らかになった。酵素によって付加することのできるハロゲン原子への嗜好性は異なっており、基質となる化合物にも違いが見られる[77-79]。ハロペルオキシダーゼの生理的な存在意義は、これらの酵素が分泌酵素である点から、難分解性リグニンの分解に寄与する、もしくは CPO と同様二次代謝産物合成に関わっている可能性が考えられる。この酵素的なハロゲン添加反応は、他の酵素においては見出されておらず、極めて稀有であるといえ、工業的応用にも期待されている[80-82]。

CPO のクローニング研究例は多く報告されているが、大腸菌発現系、酵母発現系 (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastries*) においては達成できず[83]、系統の近い *Aspergillus niger* 発現系においてのみ菌体外分泌発現させることに成功しており、反応性、スペクトルの性質が野生酵素と一致することが確かめられている[84]。ヘムペルオキシダーゼの他、*P. chrysosporium* のリグニンペルオキシダーゼ、マンガンペルオキシダーゼも工業的応用を視野に入れてクローニングが行われた研究例が報告されているが[85, 86]、こちらも大腸菌発現系では達成できていない。通常の P450 とは異なり、ペルオキシダーゼの大量発現系の構築は困難であることが多いが、この原因として、翻訳後修飾が活性の発現のために不可欠である、発現したペルオキシダーゼが宿主にとって有毒である、単純にフォールディングが困難でありカビ特有の介在タンパク質が必要、などが考えられるが、結論には至っていない[65]。

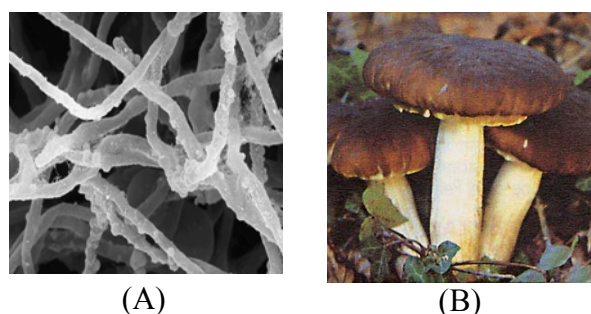


Fig.I-18 既知のハロペルオキシダーゼを産出する糸状菌
(A) : *P. chrysosporium* (B) : *A. aegerita*

17.既存のヘム-チオレート含有タンパク質(Table.I-4)

ヘムタンパク質のうち、第五配位子がシステイン由来のチオレートであるタンパク質はいくつか報告されている。前述の通り、P450 は広い生物界に存在しており、モノオキシゲナーゼ反応を触媒する。カビ由来 CPO は、HRP と同様にペルオキシダ

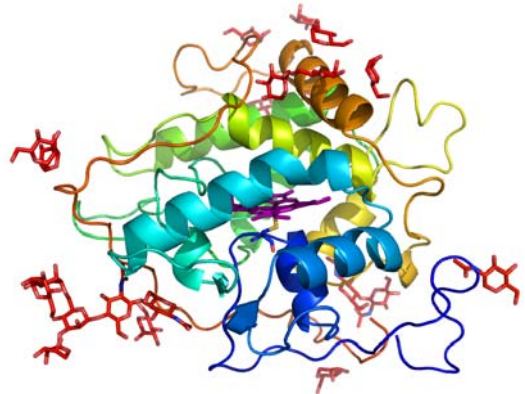
ーゼ反応を触媒するが、同時に酸素を基質に導入するペルオキシゲナーゼ反応を触媒することができる。また、特筆すべき点として、CPOは菌体外に分泌される分泌タンパク質である。高等生物の持つ、一酸化窒素(NO)合成酵素(Nitric oxide synthase :NOS)もヘム-チオレート含有酵素であり、モノオキシゲナーゼ反応によりアルギニンを基質としてNOを合成する。NOSは融合型P450と同じく、オキシゲナーゼドメインと、還元酵素ドメインが融合した構造を持つ。CooAは、プロテオバクテリア *Rhodospirillum rubrum* の持つセンサータンパク質である。このバクテリアは、一酸化窒素を炭素源として資化することができ、COの存在をCooAが知覚し関連したタンパク質群の転写を促進する。通常時、CooAの第五配位子はヒスチジンであるが、COが結合することによる構造変化から、システインに変化する。この構造変化がシグナルとなり、転写促進が起こる。以上のタンパク質は、ヘム-チオレート含有タンパク質ではあるが、その局在、活性とも異なっており、立体構造、サイズについても関連性は見られない(Fig.I-19)。

Table. I-4 既知のヘム-チオレート含有酸化酵素の性状の比較

	Cytochrome P450	CPO (Chlorperoxidase)	NOS (Nitric oxide synthase)	CooA
Origin	Various organisms	<i>C. fumago</i>	Various organisms	<i>Rhodospirillum rubrum</i>
M.W.	40-50 kDa	42 kDa	133 kDa	24.5 kDa
Localization	Intracellular	Secretory enzyme	Intracellular	Intracellular
Activity	Monooxygenase	Peroxygenation	Monooxygenase	CO sensing transcription enhancer



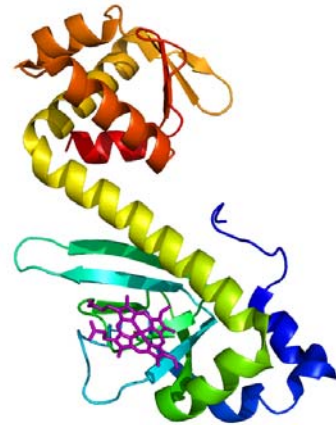
(A) P450BM3 P450 domain



(B) Chloroperoxidase



(C) NOS oxidase domain



(D) CooA

Fig.I-19 ヘム-チオレート含有酵素の立体構造

PDB I.D. ;P450BM3, 1BVY ; Chloroperoxidase, 1CPO ; NOS,1lzx ;
CooA, ;2fmy

ヘムは紫色で示した。

18.P450 関連酵素の工業的応用及び問題点

P450 は、ヒトの薬剤代謝に主要に関与する酵素であることから、医薬方面での研究例が多いが、P450 の工業的応用を目的とした研究例も多い。P450 は、温和な条件下で安定な C-H 結合の間に酸素原子を導入することで、化合物を活性化させることができるため、有用性が注目されている。しかし、その一方で、いくつかの問題点が存在している。まず、1) P450 反応は一般的に多成分系であり、電子を P450 に受

け渡すための還元酵素が必要であり、*in vitro* において再構成が非常に困難である。2) 次に酵素的な安定性も高いとはいえ、活性中心であるヘムが脱落しやすい。実験室レベルではグリセロール添加による安定化が一般的に行われているが、工業応用を大規模スケールでは困難である。3) 電子供給源となる NADH、NADPH が非常に高価である。4) 一部の P450 を除いて反応のアンカップリング率が高い。(P450 から基質への酸素原子の受け渡し効率が悪い。) 5) 反応速度がとても遅い。など現段階での壁は高いといえる。CPO や新たに発見されたペルオキシゲナーゼ活性を持つ P450 は上記の問題点を解決する上、環境への環境への付加の小さい Green Sustainable Chemistry の観点から見ても理にかなっており、光明となりうる酵素として期待されている。融合型 P450BM3 は最も工業応用に向けて研究が進んでいる酵素の一つであり融合型 P450 の持つ高い反応性は非常に魅力的である。バクテリアのみならず、糸状菌、放線菌といった様々な生物種にも同様な酵素の存在が明らかになっており[62]、それらの基礎的な研究は工業応用に直結する重要な知見を提供すると考えられる。

19.本研究の目的

P450 反応は基礎研究分野だけでなく、工業的応用面でも魅力的であるが、いまだ克服できない問題点がいくつか存在している。しかし本項で触れた還元酵素融合型 P450 や、ヘム-チオレートペルオキシダーゼ(CPO etc.)、P450 ペルオキシゲナーゼはその問題点のうち、いくつかをすでに解消している。還元酵素融合型 P450 は、最大の欠点であるレドックスパートナーとの再構成を解決しているし、ヘム-チオレートペルオキシダーゼ、P450 ペルオキシゲナーゼは過酸化剤依存的に反応を進めることができるため、再構成問題、高価な NADPH という問題を解消する。さらに反応で生じる物質は目的産物とクリーンな水のみである。還元酵素融合型 P450 や、ペルオキシゲナーゼ活性を付与した P450 は工業的利用価値が極めて高いと考えられる。本研究の目的は、新たにゲノム配列が明らかになり、ウェブ公開されている *A. oryzae* ゲノム上から工業的利用価値の高いと考えられる酵素の探索・クローニング・性状解明することを目的としている。

融合型 P450 であり、工業応用に向けて高いポテンシャルを持つと期待されるにも関わらず、詳細な研究が行われていない P450foxy をタンパク質工学的手法によって機能改変を行い、新規反応性を付与することを目指し、同時に融合型 P450 の基質結合とアミノ酸配置について検討した。また、立体構造が明らかになっていない P450foxy の結晶化構造解析も目的とした。

第一章 麹菌 *Aspergillus oryzae* ゲノム中の有用酸化酵素の探索

第一節 *A. oryzae* ゲノム上の標的酵素の探索・選定

1-1 方法

(1) NCBI 遺伝子情報データベースより、カビ *Cardariomyces fumago* 由来 Chloroperoxidase(CAC16733.1 chloroperoxidase from *Leptoxyphium fumago*)及びカビ *Fusarium oxysporum* 由来 P450foxy (cyp505、fatty acid omega-hydroxylase: BAA82526) のアミノ酸配列を取得し、NITE によりウェブ公開されている *A. oryzae* ゲノム情報 (http://www.bio.nite.go.jp/dogan/MicroTop?GENOME_ID=ao)に対して blast search することで、CPO 関連酵素及び融合型 P450 の探索を行った。

(2) NCBI データベースにおける blast search 及び cytochrome P450 home page (<http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html>)での直接配列比較により、CPO 様配列及び、予想融合 P450 の探索を行った。得られた配列を clustalW(<http://align.genome.jp/>)で解析し、配列的相同性および系統解析を行った。

1-2 結果および考察

麹菌 *A. oryzae* のゲノムに対する Blast search の結果、CPO に相同性のある 2 種のタンパク質(Table.1-1) 及び配列から融合型 P450 と推測される 3 種の遺伝子を見出した。

Table.1-1 *A. oryzae*ゲノム上に存在するCPOと相同性を持つ配列

Annotation	I.D.	A.A.	M.W.	Identity
Chloroperoxidase : query	CAC16733.1	373	42 kDa	-
Putative chloroperoxidase	AO0090102000344	275	30578	32%(55/170)
Putative chloroperoxidase	AO0090026000063	242	26982	26%(58/215)
Putative protein	AO0090010000307	205	22866	23%(46/194)
Putative protein	AO0090026000757	177	20869	57%(20/37)

CPO を query として用いて返された結果のうち、二つの配列において Putative chloroperoxidase とアノテーションがなされていた。最も高い相同性を示した AO090102000344 のタンパク質(以下、AOPE と呼称する。) は、chromosome 4 に存在しており、塩基数 828 のイントロンを含まない配列と予測されていた (Fig.1-1)。Chloroperoxidase と比較してタンパク質のアミノ酸数が約 100 少なく、予測分子量も約 12000 小さかった。糸状菌の二次代謝産物生合成に関する遺伝子はクラスターを形成することが報告されているが[87]、chromosome 上の前後の遺伝子は predicted

protein (Lipid transport and metabolism)、Na⁺/K⁺ transporter とアノテーションされており、特に関連性は認められなかった(Fig.1-2)。CPO と AOPE とのアライメントの結果から、ヘム-チオレートタンパク質の特徴であるシステイン(Cys29)及びその前後のアミノ酸の保存度が高いことがわかった。一般的に P450 においてヘムと結合する第五配位子システインはタンパク質の後半に位置するのに対し、CPO、AOPE は前半にシステインが存在するという共通点が見られた[88](Fig.1-3)。さらにシステイン前後のアミノ酸残基がプロリンである点も P450 では見られない構造的特徴である[88]。Fig.1-4 に、CPO の近位側を形成するアミノ酸を示す。CPO において、ヘム配位 Cys は Pro にはさまれ、突出したヘアピン状構造の頂点部分に存在していることがわかる。AOPE においても Asp、Asn をはじめとした残基が保存され、同様の立体構造を形成する可能性が高いことが示唆される。また、CPO において重要な機能を担うと考えられているアミノ酸残基を比較すると(Table.1-2)、第五配位子と予想されるシステインの他、遠位側では、His105 が AOPE に保存されていた。CPO において酸・塩基触媒残基として重要であると考えられる Glu183 は AOPE には保存されていなかったが、前後に 5 つの Glu が存在しており、このうちのどれかが代わりに機能している可能性も考えられる。また、CPO の疎水性ポケットを形成しているアミノ酸はあまり保存されておらず、基質特異性が変動している可能性を示唆する。CPO は、分泌タンパク質であり、成熟の際に切断される N 末端 20 残基のシグナル配列が存在することが知られている。AOPE の N 末端の配列は CPO との保存度はあまり高くなく、シグナル配列としての特徴も保存していなかったため、分泌タンパク質ではないと予想した(Fig.1-5)。CPO の特徴として糖タンパク質であることが挙げられ、N 結合型糖鎖が 3 箇所、O 結合型糖鎖が 10 箇所存在し、高度に糖鎖修飾を受けたタンパク質である[72, 89]。AOPE の配列中には糖鎖結合モチーフが 2 箇所存在していた。前述の通り、AOPE は CPO と比較してかなりサイズが小さいことが予測され、大きなギャップも存在していた。Fig.1-6 に CPO とのアライメントから予測された AOPE のギャップ部分を CPO 全体構造(緑)に対して赤色で示す。CPO における H-helix が AOPE で欠失しており、C 末端および一部のループが短縮している。構造中心部を形成する helix は維持されていることから、構造的な大きな変化は少ないと予想した。ヘム第五配位子および活性に関与する一部アミノ酸が保存されていることから、CPO に類似した活性を持つことが期待された。AO090026000063 と CPO とのアライメントの結果、こちらも第五配位子と予想されるシステインが保存されており、ヘム-チオレートタンパク質であることが考えられたが、それ以外機能的に重要なアミノ酸はほとんど保存されていなかった。Putative protein とアノテーションされた 2 種類のタンパク質においてはシステインも保存されていなかった。現在までに研究が進んでいる haloperoxidase である CPO、AaP はそれぞれ 42、46 kDa の分子量を持つのに対し、AOPE の予想分子量は約 30 kDa であった。*P. chrysosporium*、*A.*

nidulans、Basidiomycete *Agaricus aegerita* などのカビにおいて、同様に 30%程度の配列相同性をもつ Putative chloroperoxidase の存在が報告されているが、それらに関する研究は進んでおらず[90]、生理的な機能に関して興味もたれる。また、P450 のぞいたヘム-チオレート含有酵素は NOS(Nitric oxide synthase)が知られているが、そのアミノ酸配列とは相同性を示さないことから、新規ヘム-チオレート酵素である可能性が考えられる。以上より AOPE (AO090102000344)をクローニング対象として選択することとした。

```
atctagaacgattccttagatgtctgatcatgcttactggtttggtataactgtattccctctgtatgta
cataaacgcggttagcctgtgaggaaccagggttgagcgggttaataaagccaaatgcccataagcaaagat
gcacgtttacctcccagtagcggcatggaaagctgacaacagggttggaatgtgaccaaccattcagccgcaga
catcatctgcattgaacacgagctccaatcaaacaccctgcatatgaaccagcgcgtatataaacatcagcc
taagaacc
```

```
ATGAAATCCATAATTTGGTTTTCTTTTTACCGCCGCTTTTTCTATTACAAACCCTCACTTACCACAACATT
CCAACATGTCGAGCGAAAACGACACCCTTTGAGAAGGGCAATACTACCGAGGGGGAGCAGACGACCTGCGCTC
CCCATGCCAATCATCAACTCCCTCGCAAACCACGGCTACATCGCTCGCGACGGCCGTAACATCACGGGGATC
CAACTGAAGGCAGCGCTAGAACACATCGGACTCGGCTTCGACACGGCAGGAGGCCCTCGTCAAGATCGCGTTCC
AAGACCAGTCGACCCACCCGAAGGCACCCACGCACAACAGCCAACCTCGGTCTGCGCGACGCCGGCCAAGT
CAACGAAGACGGAGACCCCGTGCTAAACCTCGATCAACTCGGCCGTCACACGCCATCGAGCATGACGTCTCC
GTTACGCGACAAGACCGCGCGTTGGGCGATTACATCCATCTCAATCCCGACCTGTACCAGCAACTTCTCGCGT
CTTCTAGCAATGGGACGTCATTTTCTATCTCGGATATCGGAAACCTGCGTAAGAAACGGTTCGAGCAGTCGAA
GAGGGATAACCCGGAGCTGGATTTGGACAAGAGGATGCATTATATCGCTTGCCTGAGGTTGGGGGTATCATG
GGCGTATTTGGGAAGGGGCTCTACCATGTTCCGAAGGAGTATATAGAGGCGATCTTTGGTGAGGAGCGGTTAC
CGTTTGACGAGGGATGGCGGCCAAGATGGACGAAGTTGATTTGCCCGAGGCTGGGGCGGTGACTTTGGCTAT
TTCGCATTATGCGTGGCCGTTTTAG
```

```
gtggttttgtcatgattgagtttttgatattttatcaatctgtggcgctctggagcaacagttggatagat
tgagaaattgtttttogaagtttggcgacaagggtcatagatatgcttctgcaggaataattatgacgggat
gatataaacctaaactaggacatgcaagtggaatggatcttcactcttggttactggcatagatacatatag
cacaggcgaagtctcacatttatataatataaatcccgatatacattttcttacgaaaccagtatgtaaccag
tatgtatc
```

Fig.1-1 AOPE (AO090102000344) の塩基配列（+前後 300 bp）

AOPEは828 bpの塩基からなり、イントロンを含まないと予測されている。

Table.1-2 CPOにおける機能的に重要なアミノ酸残基

Residue	Sequence	Function
Cys29	RAPCPAL	Heme 5th ligand
Glu183	QNVESGF	General acid base catalyst
His105	AFEHDHS	At distal side, bind with Glu183
Leu70	VIELALT	Form hydrophobic pocket
Phe103	PHAFEHD	
Val182	IQNVESG	
Phe186	ESGFIFA	
Ala267	GAEAVPL	

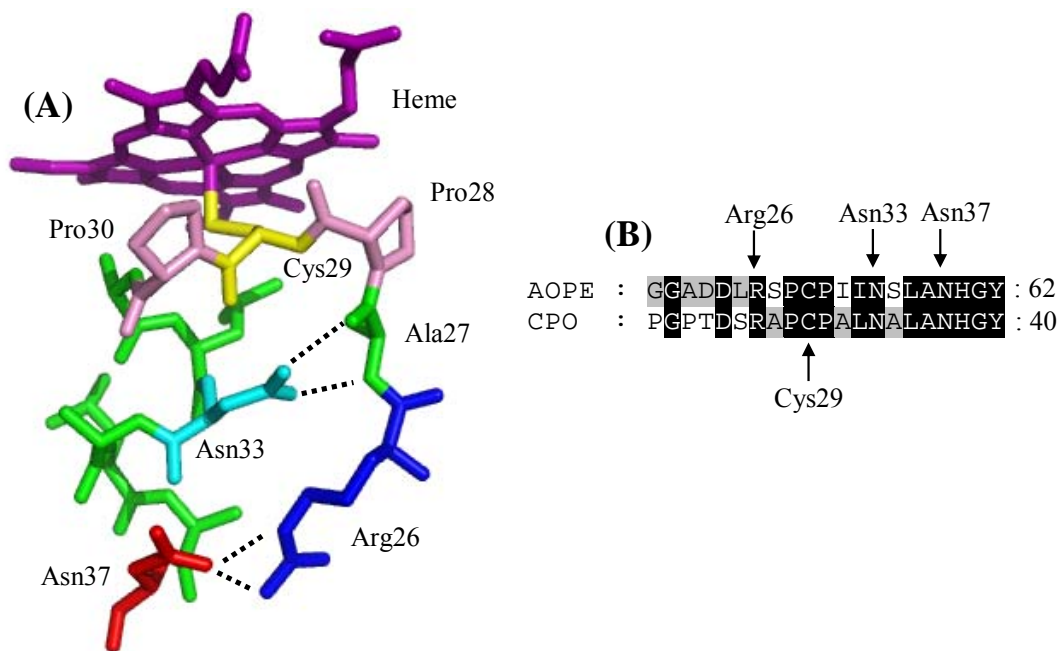


Fig.1-4 CPOの近位側立体構造

(A) CPOの近位側(Proximal side) 立体構造 破線は残基間の相互作用を示す。

(B) CPO、AOPEの近位側配列のアライメント

立体構造維持に関わる相互作用を持つアミノ酸は全て保存されている。

AOPE : -MKSTIWFETAAFSITNPHLEQHS : 22
 CPO : MFSKVLFFVAALPHSVRQEFGS- : 22



Fig.1-5 AOPEおよびCPOのN末端のアミノ酸配列アライメント
 分泌シグナルペプチドは疎水性の核が塩基性アミノ酸残基にはさまれ、Glu、Aspの隣で切断される。▲はCPOにおける切断部位を示す

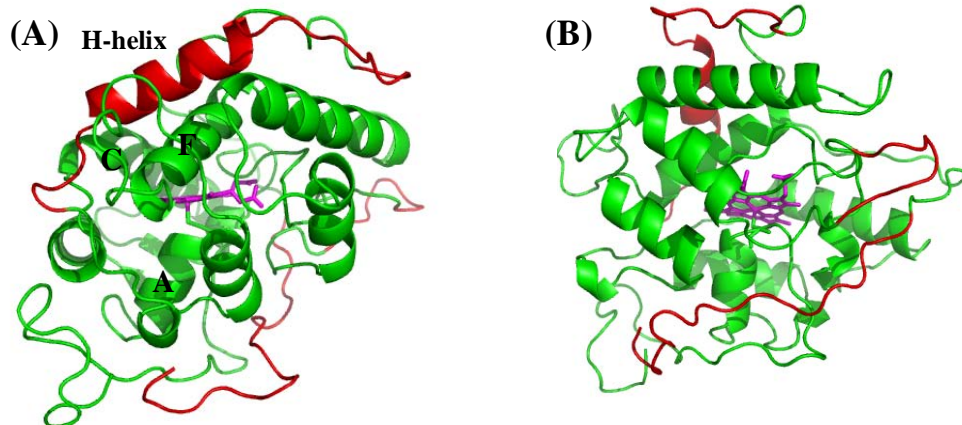


Fig.1-6 CPO構造におけるAOPEのギャップ部分
 (A) : ヘムを真横から見た図 (B) : ヘムを真下から見た図
 ヘムは紫、AOPEにおいて欠失している配列を赤で示す。

P450foxy を query として用いた際に返された結果を Table.1-3 に示す。結果には様々な種類の P450 が含まれていたが、アミノ酸残基数を比較することで 3 種の予想還元酵素融合型 P450 を見出した。3 種とも P450foxy と全長において 40%以上の高い相同性を示したが、AO090005001313 は、Sulfite reductase とアノテーションされていた。以降、AO09001000445 : CYP505A3、AO090005001313 : CYP505C3、AO090020000369 : CYP505A13 と呼称する(Fig.1-7,8,9)。P450foxy と選択された予想配列のヘムドメインのアライメントを Fig.1-10 に示す。P450 の特徴であるヘム結合領域(A)および、活性ポケット内部(B,D)の保存度が高いことがわかる。しかし活性ポケットを形成するいくつかの残基、P450foxy における V75、V83 が置換されていることは、基質特異性に何らかの影響を与えうる可能性が考えられる。C の前後は、活性ポケット入口に相当する領域であり、P450foxy において L43、K48、F52 の変異が基質となる脂肪酸の炭素鎖特異性に大きく影響することが前任者の研究で明らかになっている(Fig.1-11)。特に K48 は、脂肪酸のカルボキシル基の負電荷と相互作用すると考えられる残基である。今回見出された 3 種において、全て正電荷を持つアミノ酸が保存されていないのは特筆に価すると考えられ、脂肪酸を基質としない可能性も示唆する(Table. 1-4)。得られた 3 種の推定還元酵素融合型 P450 の塩基配列情報を元に発現条件検索及びクローニングを行うこととした。

Table.1-3 *A. oryzae*ゲノム上の推定融合型P450

Annotation	I.D.	A.A.	M.W.	Identity
P450foxy : query	BAA82526	1066	119 kDa	-
Cytochrome P450	AO090010000445	1103	122397	48%(534/1103)
Sulfite reductase	AO090005001313	1110	124234	47%(523/1110)
Cytochrome P450	AO090020000369	1054	117950	44%(466/1054)

ATGAGCAGCCCAAGGCAGAACCCGTTCCCATCCCGGGGCCGGGGTGTGCCTCTGATGGGAAACATCCTCGATATTGAGAGCGAAATCCC
 TCTAAGAAGCTTGAAATGATGGCAGATACTTATGGTATGAACAATGGCGATAATCCTGTTTTGAGAATATACATTGATTTTTTTTACAGG
 TCCTATCTATCGGTTAACGACCTTTGGATTCTCACGTTGCATGATCAGCTCCACGAGCTGGCAGCTGAGGTGTTGATGAGGAGCGTTTTA
 CCAAAAAGATCATGGCAGGCCTCAGTGAGCTTCGCCACGGTATCCACGATGGTTTATTCACGGCCATATGGGCGAGGAGAATTGGGAGATT
 GCACATCGCGTTTTGATGCCCGCCTTTGGGCCCTCAACATCCAAAATATGTTGATGGTACATCCTGCGTTGAGCTTGAGAGTGGTATGGA
AGTGCGACAGCGCTAACGTAGAGTATAGAAATGCACGACATTGCAACACAGTTGGTATGAAGTGGGCTCGACAAGGGCCTAAGCAGAAAA
 TCATGGTCACAGATGATTTACCCCGCTTACATTGGATACCATCGCCCTATGTGCCATGGGCACCCGATTCAATTCTTTCTATAGCGAAGAG
 ATGCATCCCTTTGTGGACGCAATGGTTGGGATGTTGAAGACTGCGGGCGACCGCTCCCGTCGCCAGGCTTGGTCAACAACCTGCCTACTAC
 TGAACAACAAGTATTGGGAGGATATCGACTACCTCCGCAACCTTTGCAAGGAGCTTGTGATACCCGCAAAAAAATCCTACGGACAAGA
 AAGATTTGCTCAATGCTCTAATCAATGGCCGTGACCCGAAGACCGGCAAGGGCATGTATGACTCCATCATTGATAATATGATCACTTTC
 CTGATTGCTGGTGAGTATACATCTGTGAAAAAAGTGGTTTGTAAACACCGGATAGGACATGAAACCACCTCTGGTTCGCTTTCGTTGCG
 CTTCTACAACATGCTCAAGAACCCCGAGGCATATCAGAAAGCTCAGGAGGAAGTGGACAGAGTCAATTGGACGCCGAGGATTACCGTCGAGG
 ACCTGCAAAAAGCTGCCTTACATTACTGCTGTATGCGTGAACCTTACGACTACCCCTACTGCACCCGCTATTGCAGTCGGCCCTCACCCG
 ACCAAGAACCAGAGGACCCCGTCACTCTTGGTAAACGGAATAATGTTCTTGGCAAAGACGAGCCATGTGCTCTTGTGGGCAAGATTCA
 GCGTGATCCCAAGGTGTACGGCCCGATGCAGAGGAATCAAGCAGAGCGGATGCTGGATGAGCATTCAACAAGCTGCCTAAGCAGCGGT
 GGAACCTTTGCGAAACGGAATGCGAGCATGTATCGGTGCGCCGTTTGCCTGGCAGGAAGCGCTCCTCGTATTGCGATGTTGTTGCAAAAC
 TTCAACTCCAGATGGATGATCCGTCTACAACATCAACTCAAGCAGACGCTCACCATCAAGCCCAATCATTTCTATATGAGAGCTGCTCT
 TCGCGAGGGCTTGGACGCTGTGCACCTAGGATCAGCATTGAGCGCTAGCAGCAGCGAGCATGCGGATCACGCTGCCGGCCATGGTAAGGCAG
 GCGCCGCTAAGAAGGGTCCGATTTGAAGCCTATGCATGTATACTACGGTAGCAACACTGGAACCTGTGAGGCCCTTGAAGACGCGCTCGCC
 GATGATGCCACTAGCTATGGCTACTCGGCTGAGGTTGAATCGTAGATTTCGGCAAAGATAGCATCCCAAGAATGGGCCGTTGTTTTCAT
 CACCGCGTCTATGAAGGACAGCCCGAGATAATGCCGCCATTTCTTCCGATGGCTCAGCGCTTGAAGGGCGCAAAACCTTGGACGGCG
 TTAATTATGCTGTGTTGCGCTGTGGACATCGTAAGTGCATTCATTCCTCATTTTGCAGGTAACCCCTCTAACAAGGACGAATTTAGACGA
 TTGGCAGACAACCTTCTACCGCATTCCTAAGGAAGTTAACCGCCTTGTGGCGAGAATGGCGCAATAGGCTCTGCGAGATCGGTCTGGCCG
 ACACAGCCAACGCTGATATCGTCACGGATTTGATACCTGGGGTGAACCTTCGTTTTGGCCAGCAGTTGCCGCTAAATTCGGTCAAACACC
 CAGGGCTCCAGAAAGTCACTCCACTCCGCTGTAGAGTCACTCGGTCACAGAGCAACTACCCTCGGTCTCAACTGCAAGAAGGTCTTGT
 CGTGGAGAACACGCTCCTCACTCAGGCTGGCGTGCTGCCAAGCGGACTATTGCTTCAAGCTCCCTACTGATACGCAGTACAAGTGGCGT
 ACTACCTGGCCATCCTTCCAGTGAACCCAGCACTGTAGTCCGCAAAGTCAAGAGCGGTTTCGATCTTCCCTGGGACGCCGTACTCCGCATC
 GAGAAGGCATCTCCCTCATCTCGAAACACATTTCCATCCCAATGGATACCCAAGTCTCCGCTACGACCTGTTCCGACCTACGTCGAACT
 CTCGCAGCCCGCATCGAAGCGTGACCTAGCAGTCTCGCCGACGAGCGGATAGACCCGAAACCCAAGCCGAACACAGGCGATCGCCT
 CCGACCCAGCCGGTTCGCGGAGATCTCCAGAAAGCGCATCAGCGTACTGGACCTACTGCTTCAATACCCTCCATCAACCTCGGATCGGA
 GACTTCGTAGCCATGCTCCCTCCATGCGTGTCCGCCAGTACTCCATCTCTCCTCCCTTACTGACACCCACCGAATGCTCCATCACCTT
 CTCGCTCCTGAAAGCCCATCCCTCGCCGCTCACCAAGAAGACGAATACCTCGGCGTTGCATCAACCTACCTTTCCGAACTCCGCTCCG
 GCGAACGCGTCCAACTCTCCGTCCGCCCTCGCACACTGGCTTCAAGCCCCCACCAGAACTCAGTACCCCAATGATCATGGCCTGCGCCGGC
 AGCGCCCTCGCCCTTCCGCGGCTTCGTGATGGACGCGCGGAGAAAATCCGCGGCGTGCAGCTCCGCTCCATGCCGAACAACCCGC
 TAAAGCGATCCTCTACGCGGCTGCCGACCCAAAGGCAAGGACGACATCCACGCCGACGAGCTGGCCGAATGGGAGAAGATCGGTGCCGTGG
 AAGTCAGACGGGCTACAGCCGTCCAGCGACGGGTGCAAGGGCACACAGTGCAGGATCTCATGATGGAAGATAAGAAGGAGCTCATTGAT
 CTCTTTGAGAGCGGGCTAGGATCTATGTCTGTGGTACGCCGGCGTTGGTAAATGCCGTCCGGGATTCGATTAAGAGTATGTTCTCGAGAA
 CGGAGGAGATTGCTGCAATTGCGAAGGAGAAGGGCGAGCCTGTTTCGGACGATGATGAGGAGACGGCGTTTGAGAAGTCTTAGATGACAT
 GAAGACTAAGGAGCGGTATACTACGGATATTTTTGCTTAA

Fig.1-7 CYP505A3 (AO090001000445)の塩基配列

4箇所のイントロンの存在 (下線) が予想されている。

Intron I : 128-183 Intron II : 427-489 Intron III : 931-978

Intron IV : 1963-2020

ATGCGACAAAATGACAACGAAAAGCAAATATGTCCAATCCCAGGACCTCAAGGTTAGCGAGCATCCTTATCATTGAGAAAAGTCTAA
TGAGTGTCCAGGCTACCATTCTCGGGAATATCCTGGACATCGATCTAGACAATGGTACCATGTCCAGGCTGAAGATCGCGAAAACCTA
CTGTGCGTGTCTGTGCAAGAAGTAGATCATAACACAGAAGTGGTAACATTCGGCCCTGTTCAAAGACCCTATTTTTAAGTTCACCTTCGC
GGGAGAGACATCCATTGTATAAATAGCGTGGCCCTGCTTTCTGAACTCTGCGATGAAACCCGATTCCACAAGCATGTCTCCTTTGGCCTC
GAGCTACTCCGCTCCGGTACACATGATGGGTTATTTACTGCGTACGATCATGAAAAGAACTGGGAGCTTGCCCATCGGCTGCTAGTGCCAG
CGTTTGGTCCATTACGAATCCGTGAGATGTTCCACAGATGCATGATATCGCGCAGCAACTATGTCTCAAATGGTAGGGCACCCCTATAAC
AGCCTCTCAGATGCTTTGGCTGAGGAGTCTTGATTGTTAGGCAGCGCTATGGTCCAAGGAGGCCCTTGAATCTGGTTGACGATTTCACTC
GCACTACTCTTGATACCATCGCGTTATGTGCGATGGGCTACCGATTCAACAGCTTCTATTCGGAAGGTGACTTTCATCCCTCATCAAGAG
CATGGTCAGATTCCTGAAAGAGGCGGAAACACAGGCAACTCTGCCTTCAATTTATCAGCAACCTTCGTGTTGCGGAAAGAGGAGGACTCAA
TTAGATATTGATCTTATGCGCACCGTGTGTCGCGAAATTGTTACTGAGCGCCGAGCAACCTTGATCACAAGAATGACCTACTTGACA
CAATGCTGACCTCTCGAGACAGCTTATCTGGGATGCGTTAAGCGACGAATCGATCATCGATAACATCCTGACATTTTTAGTGCCTGGCCA
CGAGACTACTTCAGGGCTCCTGTGTTGCGGTGACTACCTTTTGACAACGCGCTGATGCCATGGCCAAGGCAGCTCATGAGGTAGACGAT
GTGCTGGGCGACCAAGAGCTCACGATTGAGCACCTCTCAATGCTGAAATACCTCAATGCTATTCTTCGTGAGACTTTACGATTAATGCCCA
CCGCACCTGGGTTAGCGTCACGCCCTATAAACCAGGATCATTGGGGGCAAATACGAAGTCAAACCAGGAGACTCACTAGATGTGTTCTCCT
CGCGCTGTGCATCGAGATCCTGCCGTATACGGTCTGACGCAGATGAGTTTCGCCCGGAAAGGATGTCAGATGAACACTTCCAAAAGCTC
CCGGCAACTCGTGAAAACCTTCGGTAATGGTAAAAGGAGTTGCATTGGCGGGCTTTTGCCTGGCAGGAGGCCCTGATGGTTAGTCCGT
TCTGTATTGCTGTTCCCTTGACGGCCATGTCTACCAGCCGCTCGTATACTAAGGCAACTATGTGCAACATACAGATCCTGGCCTTGATT
CTGCAGAGCTTTAGTCTCAATTTGGTTGACAGGGGTATACCTTAAACTCAAAGAGTCGCTCACTATAAAACAGATAACCTGTGGGCT
ATGCAACACCACGACCCGGCCGAAACGTGCTCCACACCCGATTAGCGCTCAAACAACAGTACACACCCTGAGGGCCTAATGTCCTTAA
GCATGAGACGGTAGAATCCAACCAGCAACCTCCTTTATGGCTCGAACAGCGGAACTTTCGAGGGCCCTGGCCATCGATTGGCCATCGAA
ATGAGCAGCAAGGGCCGATTGCTATGCAAGGTACAACCTATGGACGCAATCGAGCACCCGACTTCCCGAGGCCAACCCGGTATAATTA
TCACTGGATCATACGATGGAAGGCCGCTGAAAACGCACGGCATTGTTGCAAGTGGCTCCAGTCCCTAAAGGGGAATGACCTGGAAGGGAT
TCAGTACGCCGCTTCGGATGCGGTAGACTCATCACCTCTGCTCATATAATGGTAATGACTGACAGGTTTCCAGGACATCACGACTGGT
CGACCACCTTCTATAAAAATCCACCCCTCATAGATACTATAATGGCGGAACATGGTGGAGCTCGTCTAGCCCGCGAGGGTCGGCGGATAC
TGCAGAAGATGACCCTTCGCGGAATTAGAGTCATGTCGGAAGAGGCGCTGCGCTGGTCTTGAGGCTGCCTTCGATCTTGTCGCCAT
AACTCATCGGATGGGACTGGAAGAGCACCAGGATAACCTTCGATCACCTACACGTTGCGCGCTGCTCACGAAACAGCTGTCGTTCATC
AAGTTCGCGTGTGACATCCGCGGAAACCACTAAGAAAGTCCATGTTGAGCTGGCCCTGCCAGATAAATCAACTACCGTCTCGGTGATCA
TCTAGCCATTTGCCCTTAACCTCTCGCAGAGTGTGCAGCGGACTTTCACTTTTCAAATCGGTTAGATACCATTTTGTATATGACT
TCTAGCAGTGCCACCTCCTTCCGACAGATACCCCTATATCTGCCACGACCTGTTGAGCGGCTATGTGGAATGAATCAAGTGGCTACGC
CCACTGTACGTGTATCTAGGGCCCTGCACATTACTGATATAATGGACTGACCTTCTTCAACAGAGCTTGAGATCGTTGGCTGCGAAAAGCC
ACCGATGAGAAAACCTGCAGAGTATCTTGAAGCCCTCGCCACAGATCGATACACAACGGAAGTCCGGGGAAACCATTTGTCCCTATTGGACA
TATTAGAAAGCTATTCCGTACCCTCGATTGAAATTCAGCATTATATCCAGATGTTGCCTCTCCTTCGGCCCGCCAATACACCATTTCTC
ATCTCCGCGATTGAACCGTGGCCAGGCTTCATTGACTGTTTCTGTTATGGAGAGAGCAGACGTTGGCGGGCTAGAAACTGTGCTGGGGTA
GCATCAAACCTACCTAGCGAGCTGCACACCCGGTTCGATCCTCCGAGTGTCTGCGGCAGGCAAATCCTGACTTCAGACTCCAGATGAGT
CGTGCTCTACCCCATAAATCATGGTTGCCGCTGGATCAGGCATTGCACCTTCCGCGCATTTGTCCAGGAAAGATCCGTCCGACAGAAGGA
AGGAATCATCTTACCCCGGCCCTCCTGTTTTTGGTTGCAGGAGAGCTGACTTGGATGATCTCTATCCGAGGAGTGGATGCTTTGGAG
GAACAAGGGGTGGTAAACGCTCTTTAGAGCTTTAGCAGAGCTCAGAGCGAGCCATGGCTGCAAATACGTCCAAGATTTGCTATGGATGG
AAAGAGTGAGGGTGAAAACGCTTTGGGACAAGATGCTAAGGTCTTCGCTGCGGCAGCGTTAGAATGAATGAAGGGGTGAAGGCGATAAT
TTCAAAGATTGTTTCTCCTACA CCGACGGAAGAACTCGCGCGGATATATAGCTGAGACTTTTATATGA

Fig.1-8 CYP505A13 (AO090020000369) の予想塩基配列

6箇所のイントロンの存在 (下線) が予想されている。

Intron I :53-103 Intron II : 185-248 Intron III : 529-587 Intron
IV : 1447-1532 Intron V : 2026-2069 Intron VI : 2645-2703

ATGGAAGAGACGAAGCTCATTCCAATTCCAGAGCCCCGAGGCCTTCTCTGTTGGAAACATTCTGGATGTTGATTTCAGAGGCACCGGAGAAA
AGCTTTCAGCGGCTGGCGGAAACATATGGTATATCCCAACAAGCACGCATTCTACTGCTTTGGTTGCCGTAGCTCTGTTTCAGTCCCATTATAC
CAAGCATATCTTTTGGCACCGCTAATTATACGCATTATAAGGTCCAATCTTTGCGCTGAACCTCGCGGAGCCTCAAGAGTGTTTCATAAGCAC
TTACGAACCTCGTCGACGAAATTTGCGATGAGGAACGATTACCAAGGTTGTGACCGCTGGATTGAGAGAGATTGAAACCGCGTTCAAGATGG
TCTGTTTACTGCAGATTATCCTGGAGAGGATAACTGGGCAATTGCACATCGCGCTCCTGGTTCTGCTTTTGGACCGTTGATGATTTCAGCTAT
GTATGAAGGTGTTTTTCCACTGTGCCAAACACTACCTGATAATCGGAAGCTTGACAACATATAGACATGTACGACATTGCAAGCCAGCTTG
CTCTTAAATGGGCACGGCAGGGTCTTCTGCGACCATAATGGCCAATGATGACTTCACTCGCTTAAAGCTGGACACTATCGCGCTCTGTTCCA
TGGAACTAGGTTCAATCTTTTACAGTGAAGATTTGCATCCTTTTCAAGGCAGTGGTACGTTGCTACAGGGATCCTCAGATAGGACTT
TCCGTTTCGACACTTCTTAAACAACCTGCCTACGAGGAAAATAAAAAACTGGAGTGATATCAGTCTTCTCGCAACGTTGCTCAGGAGCTAG
TCGATGCACGGAGAAACAATCCAATAGACAAGAAGGACCTTCTAATGCCCTTATCCTTGGTCAAGACCTCCAGACTGGCCAGCATCTCAGCG
ACGACTCAATCATCAACAATATGATAACATTCCTTGTGCGAGGTAAGGGGTTATGTGTGGGTTTGTACCCTAATTACTGACCTTTCGCATAG
GACATGAGACGACATCTGCCACACTGACATTCCTTTTCTACTATTTGCTTAAAGAACCCGCATGCATACCAGAGACACAGGAAGAAGTCGACA
CGGTAGTCGGTCAACGAAAGATTATAGTGGAGGATTTGTCAAATGCCCTACATTGCAGCCTCACTGAGAGAGACACTGCGGCTTCAGGCTC
CAGTTCCTTAAATCGCTTTTTCATCCCACCTACTAAAAACCTGAAGATCCAGTAACTTTAGGGAAGGGCAAGTATGCTTTAAACAACGATG
AGCCTGTGGTCTTATCATGGGAAAGGTACATCGGGATCCGAAGGCTTTTGGTGTATGATGCAGAGGAGTTCAAGCCAGAGAGAATGCTGGATA
AAAACCTTGAAGACCTCCCTAAGAATGCGTGGAAAGCATTGGGAACGGTATGAGAGGATGCATCGGCCGCCCATTTGCTTGGCAAGAGATGT
TGCTTGTGGTGGCCATGTTGCTGCAAATCTCAATTTGAGATGGAGAATCCAGCTATGATCTTGAATCAAGCAGTCACTATCAATCAAGC
CTGACGGCTTCAAATGAAGGCAACGCTTGAAGAGGCTAGATGCAGCCAAGCTAGCGAGCGTCTTGAACAGCGGTGGCGATCTTTTGTCTC
ATGCTCCTCAGATACTCAATGGGGAGTATAAACCTAACACAGATTTACGTTTTTCAATTTGAGGCCTATGCATATATCTTTGGTAGTAATACTG
GTACCTGTGAAGCTCTGGCTCGAAGGCTAGCTAAGGACTCTATGGGATACGGTTTTGCAACCAGAGTCGAAAGTCTGAACTCAGCCATGGAGA
ACATTTCCAGAGACAACCTGTCTATCTTATTACCGCAACGTACGAGGGGACGCTCCTGATAACGCTGCCATTTCTTGAATGGCTGAACG
GGCTAAAGAAAGCTGAGCTGGATGGAGTAAATATTGTGTATTGGGATGTGGCCATCGTGAGCTATCCTTCTCCGCTTGATAGTTGTGATGCA
GTTGCTCTTGACTGTGATTTGCTAATGAGCCGGGACTATCAGATGACTGGTCAGCCACGTTTCTACGTATTCGCAAGCTACCAATGATCTT
ATAGAGAAGCACGGCGGAACCCGCTTATGTGACATGGGTATGGCCGATGCAGCCAATTCAGACATGTTCTCTGATTTGATACCTGGAGCGAG
CTCATTCTCTGGCCGGCCATCAATTTGAAGTTTGGCCGTGCATCATCCGAGGGAGACGTACAATCCAAGTCTGCCTTACATGTTGACGTTAGT
TCGAGCATCGGAGCTTTCACATTTGGCCCTCAGTTGCAGGAAGGATACGTGCTGAAAAACAACACTACTCACAACACCCGACGTGCCCCGCAAG
AGAATGCTACGATTCAAACCTACCACCAGATACAACCTACCAATGTGGAGATTATCTCATCGTACTACCTGTAAACCCAGCTCATGTTGTCTGC
CGCGCAATCGTCTGTTTTAACATATCGTGGGACTCTATGCTTACAGTCAGGAAGCCGTCGCATGCTTCAGATGGCATCAGAACATGCCCTA
GAGACCCCATCTCCGCTTCGAGCTTTTTCAACATACGTGGAGCTATCCCAACCAGCATCAAACGAGACCTAATCACCCCTCGCAGACGCA
GCTACCACAGATACAGACGCTCAAGCAGAGCTACAGTCACTCGCTCCAGCCCTAACCGCTTCACTGAAGAAGTCAACAACCCGCTAAGC
CCCCTCGACATTCTCATACGCCATCCTTCATCAACCTACCCTGAGCACTTCTCGAAATGCTACCCCTTTCGAGCGCGCAACTACTCA
ATCTCATCATCCCCTAGCCAGCCGATCCGACTGCACTATCACATTCTCAGTCTAAACTCACCCACCTATCAACAGAAAACAAACGATTC
GTAGGAGTGCATCCACATACCTCTCCGAACCTCAAGCGGGAGACCGGTTCAAATTTCCATCCGCGCCTCGAACAACAAGGCTTCAAACCC
CCCTTGAAGAGGAAACACCGATGATAATGGCATGCGCAGGAAGCGGTCTAGCCCCTTTCGCGGGTTTCATCATGGATCGCGGGAAAGGATC
CGCGGACGAGGCACCGAACTTTCCGACGATGACCATCCCGAGATAGGTAACCAGCAAGAGCTATATTATACATCGGCTGCCGCACAAAG
GGCAAAGATGATATTTCATGCGAGTGAAGTACGCAATGGACTCGCCAGGGTCTGTTGATGTCGATGGGCGTATAGTCGGCCGACTGATAGA
TCGACGGGACGTCATGTTGAGGATTTGCTGTTGAGGATCGTAACGAGTACTTGAGTTGATTGACCAGGGAGCACGCATCTATGTGTGTTGGC
GGAATGAGTGTGCGGACGGGTATCCGCCAGGTATCAAAGATATGTTCAATGAGAGATGTCGCGAGGTGCTGGAGAATGGCTCCGATGGGAC
GAGGACGTGGCTGCTGAGGAGTATTTGGATAGTTGAAGACTGAGGAGAGGTTATGCGACGGATGTA TTTACGTTAG

Fig.1-9 CYP505C3 (AO090005001313) の予想塩基配列

4箇所のイントロン (下線) の存在が予想されている。

Intron I :122-227 Intron II : 474-531 Intron III : 991-1023

Intron IV : 2011-2089

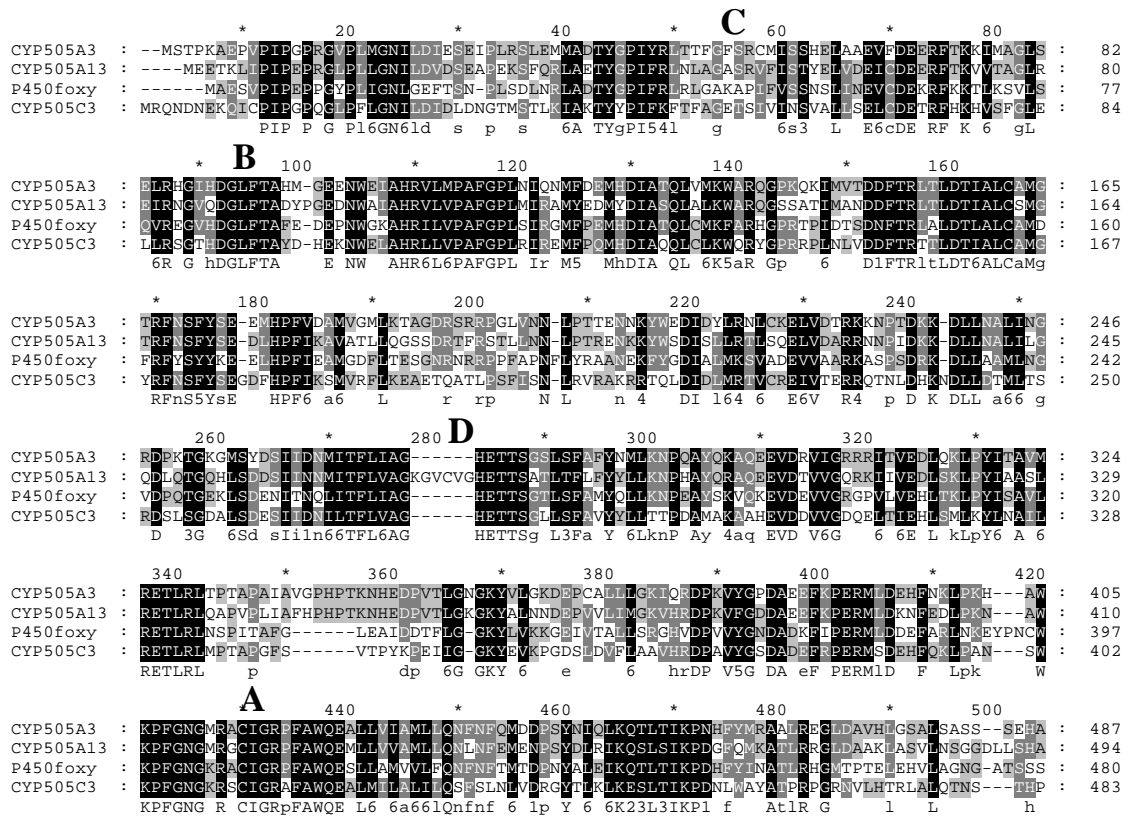


Fig.1-10 *A. oryzae* 由来推定融合型P450およびP450foxyのP450ドメインのアミノ酸配列アライメント
A : ヘム結合領域 B : 活性部位内のP450foxyのF88 C : 活性部位入口 D : CYP505A13にのみ見られる挿入配列

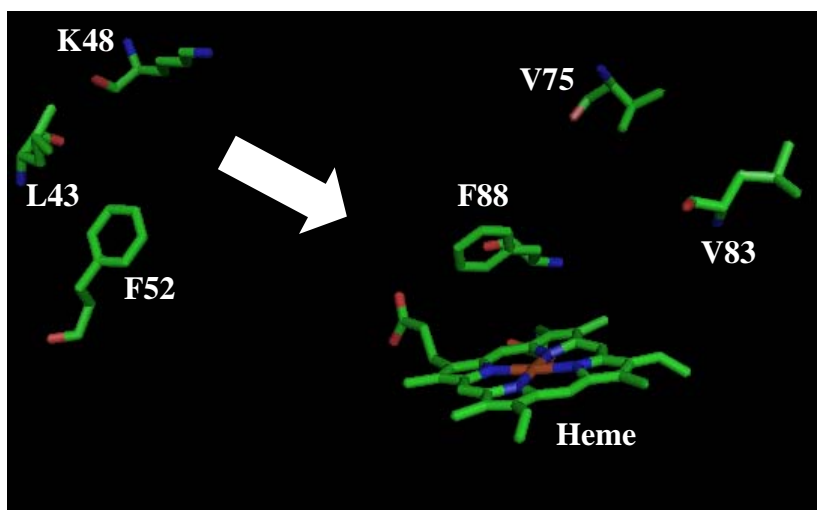


Fig.1-11 P450foxy活性部位の構造モデル

矢印は、活性部位入口からの基質の侵入方向を示す。

Table.1-4 P450foxyの基質認識に関わると考えられる残基と推定融合型P450の対応する残基

Enzyme.	Amino acids					
P450foxy	F88	V83	V75	L43	K48	F52
CYP505A3	F93	I88	G80	L53	F58	M62
CYP505A13	F91	V86	V78	L51	A56	F60
CYP505C3	F95	T90	G82	F55	E60	V64

P450foxyと保存されている残基は灰色で示した。

CPOのアミノ酸配列を Query として Blast search を行ったところ、糸状菌の予想タンパク質が 100 以上ヒットした。関連性の高い上位 20 種について Table.1-5 にまとめた。ほぼ全ての配列は 250-300 のアミノ酸からなり、CPO との相同性は 30%前後であった。アノテーションは hypothetical protein、putative peroxidase、conserved protein とされており、糸状菌内に広く分布しているにもかかわらずほとんど性状が明らかになっていないことが裏付けられた。一種の糸状菌内にはそれぞれ 2 種程度の CPO 類似タンパク質が存在しているようであった。CPO のアミノ酸数 373 に近いタンパク質は検出されなかった。N 末端およびヘム結合領域のアライメントを Fig.1-12 に示す。CPO は、N 末端に分泌シグナルを持つことが知られているが、今回見出した糸状菌の CPO 様タンパク質の N 末端は全く保存されておらず、この一群のタンパク質が分泌シグナルを含まないことが予想される。ヘム結合領域は、すべてのタンパク質で高度に保存されており、CPO 同様のヘム結合領域の構造を持っていた。その他の領域も保存された残基が点在しており、機能的類似が示唆される。Fig.1-13 にアライメント結果に基づいて作製した系統樹を示す。偶然にも、AOPE は系統的に CPO と近接していたが、相同性から判断しても全てのタンパク質において同様の機能であると考えられる。上述のとおり、一種の糸状菌内には複数の CPO 様タンパク質が存在しているが、それらの間での関連は系統樹からは判断できなかった。

以上の結果は、AOPE を始めとした CPO 類似酵素が糸状菌内で実際に機能している可能性を強く支持する結果であるといえる。タンパク質の見出された件数から考えると、CPO がむしろ特殊に分化したヘム-チオレート酸化酵素であると思われる。このようなタンパク質の研究例は全く報告がないが、性状を明らかにすることで、糸状菌の生活環におけるヘム-チオレート酵素の新しい関与が提示されるかもしれない。

Table.1-5 CPO queryに対してBlast searchで得られたCPO様タンパク質

#	locus	organism	Annotation	A.A.	Identity(%)
1	XP_001795607	<i>Phaeosphaeria nodorum</i>	hypothetical protein SNOG_05198	258	28
2	XP_001212699	<i>Aspergillus terreus</i> NIH2624	conserved hypothetical protein	242	31
3	XP_001933801	<i>Pyrenophora tritici-repentis Pt-1C-BFP</i>	conserved hypothetical protein	258	30
4	XP_382517	<i>Gebberella zeae</i> PH-1	hypothetical protein FG02341.1	266	28
5	XP_367663	<i>Magnaporthe grisea</i> 70-15	hypothetical protein MGG_07574	257	27
6	XP_001402490	<i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88	hypothetical protein An10g01000	258	26
7	XP_001217937	<i>Aspergillus terreus</i> NIH2624	conserved hypothetical protein	725	30
8	XP_001911526	<i>Podospora anserina</i>	unnamed protein product	268	29
9	XP_001390900	<i>Aspergillus niger</i>	hypothetical protein An0600720	265	31
10	XP_001822538	<i>Aspergillus oryzae</i>	hypothetical protein	275	28
11	XP_001791651	<i>Phaeosphaeria nodorum</i> SNI15	hypothetical protein SNOG_00990	268	28
12	XP_681664	<i>Aspergillus nidulans</i> FGSC A4	hypothetical protein AN8395.2	268	29
13	XP_001226389	<i>Chaetomium globosum</i> CBS 148.51	hypothetical protein CHGG_08462	271	27
14	XP_664061	<i>Aspergillus nidulans</i> FGSC A4	hypothetical protein AN6457.2	264	29
15	XP_660182	<i>Aspergillus nidulans</i> FGSC A4	hypothetical protein AN2578.2	271	29
16	EED21063	<i>Talaromyces stipitatus</i> ATCC 10500	peroxidase, putative	309	28
17	XP_001931318	<i>Pyrenophora tritici-repentis</i> Pt-1C-BFP	conserved hypothetical protein	254	28
18	EEB93417	<i>Moniliophthora perniciosa</i> FA553	hypothetical protein MPER_07927	281	26
19	CAP99340	<i>Penicillium chrysogenum Wisconsin</i> 54-1255 Pc22g20520	hypothetical protein	264	25
20	XP_001225194	<i>Chaetomium globosum</i> CBS 148.51	hypothetical protein CHGG_07538	283	25
21	CAC03461	<i>Agaricus bisporus</i>	putative chloroperoxidase	284	-

Identity : vs CPO

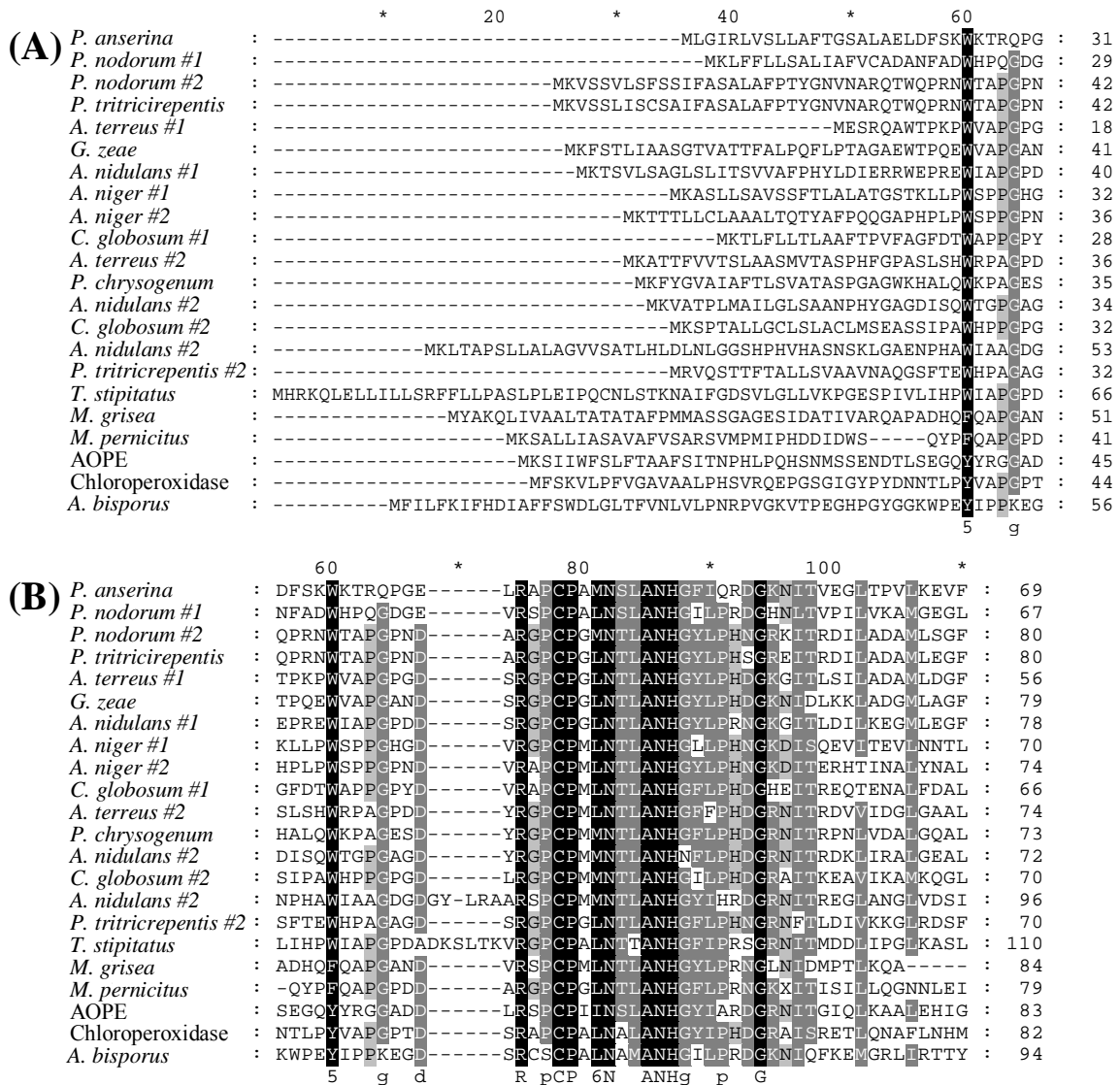


Fig.1-12 糸状菌のCPO様タンパク質のアライメント

(A) N末端領域 (B) ヘム結合領域

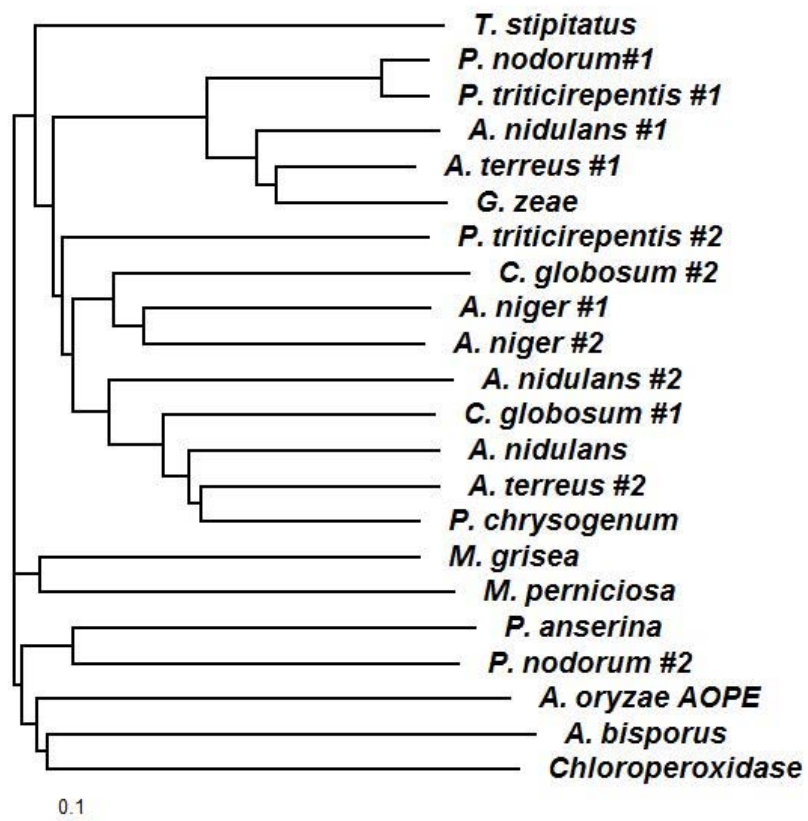


Fig.1-13 糸状菌内のCPO様タンパク質の系統樹

QueryとしてP450foxyのアミノ酸配列を用いたblast searchおよび配列比較から見出された融合型P450をTable.1-6に示す。融合型P450はバクテリア、糸状菌において広く分布していることが明らかになった。P450BM3が見出された*B. megaterium*の他、様々な*Bacillus*属バクテリアが1個ないし二個の融合型P450を保持していることが明らかになった。これらのうちいくつかはすでにクローニング、酵素的性質が研究されていることはすでに述べたとおりである。*Bacillus*属以外にも、グラム陰性バクテリア、放線菌にも分布していた。糸状菌の融合型P450ではP450foxyが知られているが、本研究によるとバクテリア以上の多様性が糸状菌において認められた。Fig.1-14に活性部位内部に存在するアミノ酸配列のアライメントを示す。序論にて述べたように、P450foxyにおけるF88は、ヘム上部に存在し、基質である脂肪酸と結合すると考えられている。バクテリアにおけるこの領域のアライメントでは、この領域の保存度はかなり高く、特に*Bacillus*属由来で顕著であった。糸状菌由来の酵素では、保存されたアミノ酸残基が数残基少なく、保存度が高いアミノ酸残基においても置換が起こっている酵素も見られた。後の実験結果にも関連するが、P450foxyにおいて活性部位内部に存在するV83、V75は、*Bacillus*属の酵素では保存度が高いといえたが、それと比較して糸状菌由来の酵素ではより様々な残基に置換されていた。F88以降のアミノ酸配列がバクテリアでは保存されているのに対し、糸状菌では全く保存性がないのも特徴的であった。

Fig.1-15に、活性部位入口に相当する配列のアライメントを示す。活性内部と同様、糸状菌において、アミノ酸残基の多様化が見られた。Fig.1-15に示したアミノ酸残基は、P450foxy、P450BM3で類似した、基質認識に関与すると考えられるものである。バクテリア、糸状菌両者において、前後の配列と比較して43-52の配列の保存度が低くなっており、特にバクテリアにおいて顕著であった。これは、活性部位への基質侵入に大きく影響する可能性があり、非常に興味深い結果といえる。K48は、P450foxyにおいて、脂肪酸のカルボン酸と相互作用すると考えられる重要な機能残基であるが、バクテリアにおいてこの塩基性残基が保存されているのはむしろ少数であり、逆に糸状菌での保存度が高かった。*Bacillus*属由来の酵素は全てある程度の脂肪酸に対する反応性が認められているため、この位置の残基の保存度が脂肪酸への反応性に直接反映しているわけではないのかもしれない。しかし、以上の結果は活性部位内部および入口の構造の違いを示し、ひいては認識する基質の多様性を反映している可能性も与える。Fig.1-16に全長アミノ酸配列のアライメントに基づいた系統樹を示す。バクテリア由来の酵素は、系統樹において一群のクラスターを形成しており、放線菌由来の酵素も含まれていた。糸状菌由来の酵素は、それと比較してかなり広い多様性を持つことが明らかになった。*A. oryzae*、*A. niger*、*A. terreus*の持つ酵素は、系統的に近く、それぞれ同じ機能をもった複数種の酵素がそれぞれの糸状菌に存在していると考えられる。これは*Aspergillus*属における進化

系統的にも一致している[91]。P450foxy は系統的には *Aspergillus* 属の持つ融合型 P450 と離れており、*N. crassa*、*G. zeae* 由来の酵素と関連性が高いようである。*M. grisea* 由来の 4 種の融合型 P450 は、系統樹をまたいで広く分布しており、生理機能に興味を持たれる。系統樹において *P. chrysosporium* 由来の酵素が、それらのみで一群のクラスターを形成していた点は特筆に価する。*P. chrysosporium* は、ゲノム上に 150 を超える P450 が存在することが明らかになっており、ゼノバイオティクス(薬物の分解、代謝等)に関与することが示唆されている。7 種の酵素全てが CYP505D ファミリーにアノテーションされており、他の糸状菌とは一線を画す性質を持つことが考えられる。系統的に近い酵素が複数種存在していることから、融合型 P450 が *P. chrysosporium* で独自の機能を持つように分化し、遺伝子重複によって複数の融合型 P450 を持つに至ったと考えられる[92, 93]。

以上の結果より、バクテリア、糸状菌において広く融合型 P450 は分布しており、糸状菌においてはバクテリア以上に広い多様性を獲得していることが明らかになった。現在、融合型 P450 の研究は P450BM3 を始めとしてバクテリア由来の酵素が扱われることが多いが、その原因として、真核生物である糸状菌の酵素は分離、クローニングが困難であることが挙げられる。しかし、多様化した糸状菌の融合型 P450 は工業応用に関して極めて有用性が高い研究対象であると思われる。

Table.1-6 Blast search及び、遺伝子比較によって見出された融合型P450

Bacteria	Organism	No.	Annotation	A.A.
	<i>B. megaterium</i>	1	CYP102A1 (P450BM3)	1049
	<i>B. subtilis</i>	2	CYP102A2	1061
			CYP102A3	1065
	<i>B. anthracis</i>	1	P-450:NADPH-P450 reductase	1065
	<i>B. cereus</i>	2	NADPH-cytochrome P450 reductase	1065
			P-450:NADPH-P450 reductase	1065
	<i>B. licheniformis</i>	1	Putative fused P450	1074
	<i>B. thuringinensis</i>	1	NADPH-cytochrome P450 reductase	1065
	<i>Ralstonia eutropha</i>	1	NADPH-cytochrome P450 reductase	1095
	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	1	Blr2882 protein	1095
	<i>Actinosynnema pretiosum</i>	1	Cytochrome P450	1005
	<i>Streptomyces avermitilis</i>	1	putative cytochrome P450	1073

Fungi	Organism	No.	Annotation	A.A.
	<i>F. oxysporum</i>	1	CYP505A1 (P450foxy)	1066
	<i>A. oryzae</i>	3	CYP505A3	1103
			CYP505A13	1110
			CYP505C3	1054
	<i>A. fumigatus</i>	1	CYP505A8	1083
	<i>A. nidulans</i>	1	Purative uncharacterized protein	1083
	<i>A. niger</i>	3	ASPNG Contig An16c0100	1104
			ASPNG Contig An06c0110	1091
			the <i>F. oxysporum</i> homolog CYP505	1064
	<i>A. terreus</i>	2	Predicted protein	1050
			Putative uncharacterized protein	1033
	<i>P. chrysosporium</i>	7	CYP505D1	1059
			CYP505D2	1054
			CYP505D3	1064
			CYP505D4	1110
			CYP505D5	1059
			CYP505D6	1057
			CYP505D7	624
	<i>Phaeosphaeria nodorum</i>	1	Putative uncharacterized protein	1073
	<i>Neurospora crassa</i>	1	CYP505A2	1108
	<i>Magnaporthe grisea</i>	4	CYP505A5	1120
			CYP505A4	1116
			CYP505C1	1218
			CYP505A6	1083
	<i>Gibberella zeae</i>	2	CYP505A7	1069
			CYP505C3	1066

Bacteria

		V75	V83	F88	
	*	100	*	120	
<i>B. subtilis</i> #1	:	AEVCDEKRFDKNLG-KGLQK	VREFGGDGLFTSWTHEPNWQKAH	:	102
<i>B. licheniformis</i>	:	KEVSEESRFDKNMG-KGLLKVREFSGDGLFTSWTEEPNWRKAH	:	102	
<i>B. anthracis</i>	:	AEVCDETRFDKSIE-GALAKVRAFAGDGLFTSETQEPNWQKAH	:	103	
<i>B. ghuringi</i>	:	AEVCDETRFDKSIE-GALAKVRAFAGDGLFTSETDEPNWKKAH	:	103	
<i>B. cereus</i> #1	:	AEVCDETRFDKSIE-GALAKVRAFAGDGLFTSETQEPNWKKAH	:	103	
<i>B. cereus</i> #2	:	AEVCDETRFDKSIE-GALAKVRAFAGDGLFTSETHEPNWKKAH	:	103	
<i>B. subtilis</i> #2	:	KEVCDEERFDKSIE-GALEKVRAFSGDGLFTSWTHEPNWRKAH	:	102	
P450BM3	:	KEACDESRFDKNLS-QALKFVRDFAGDGLFTSWTHEKNWKKAH	:	101	
<i>B. japonicum</i>	:	DELSDEKRFDKTVR-GALRRVRAVGGDGLFTADTREPNNWSKAH	:	105	
<i>S. avermitilis</i>	:	AEVCDETRFFKQIDKTPLAHVVDYAGACLFATAHQHEEEWGMMAH	:	109	
<i>R. eutropha</i>	:	SELCDAAQFRKYIG-PPVSYLRGMAGDGLFTARSDEANWQKAH	:	128	
		E cde rFdK 6	6 6R	GdGLFT	E nW kAH

Fungi

		V75	V83	F88	
	*	100	*	140	
<i>A. niger</i> #1	:	Q---ALVDELCDSESRFHKA	VASGLLENLRMLAHDGLFTAYHGER-GWGI	:	128
<i>A. terreus</i>	:	Q---ALVDELCDSESRFHKA	VMGGLKLRMLASDGLFTAYHGER-GWGI	:	101
<i>A. oryzae</i> #1	:	V---ALLSELCDSETRFHKH	VSFGLLELRSGTHDGLFTAYDHEK-NWEL	:	106
<i>A. niger</i> #2	:	R---RIAEELCDSETRFCKL	VAGGLEKMKPVVGDGLFTAQSDDP-KWAI	:	102
<i>G. zeae</i> #1	:	R---DLLDELCDSETRFHKI	VTGGVDKLRPLAGDGLFTAQHGHN-DWGI	:	106
<i>M. grisea</i> #1	:	R---ELAHEVCDETRWHKLV	TSGVSTLRQVVQDALFTAHHGSR-QWGI	:	133
<i>A. oryzae</i> #2	:	H---ELAAEVFDEERFTTKI	MAGLSELRHGIHDGLFTAHMGEENWEI	:	104
<i>A. niger</i> #3	:	Q---ELVDEVCNEERFAKSV	DGGGLGQLRNLLHDGLFTARYPGEENWAL	:	103
<i>A. oryzae</i> #3	:	Y---ELVDEICDEERFTKVI	TAGLREIRNGVQDGLFTADYPGEDNWA	:	103
<i>A. terreus</i>	:	Y---ELANEIR-----	NCVHDGLFTANYPGEENREI	:	85
P450foxy	:	S--NSLINEVCDEKRFKKT	TKSVLSQVREGVHDGLFTAFEDENWVGK	:	99
<i>G. zeae</i> #2	:	S--NAFINEVCDEKRFKKT	TKSVLSVREGVHDGLFTAFEDENWVGK	:	99
<i>P. nodorum</i>	:	S--QALMNEVCDEERFSKI	VAAALEQVRNGIHDGLFTAYGEHERNWGI	:	104
<i>N. crassa</i>	:	S--QALVHELCDSETRFQKT	VNSALHEIRHGIHDGLFTARNDEPNWGI	:	105
<i>A. fumigatus</i>	:	T--HALVNETCDEKRFKRS	VNSALAHVREGVHDGLFTAKMGEV-NWEI	:	97
<i>A. nidulans</i>	:	T--HALVNETCDEKRFKRS	VNSALAHVREGVHDGLFTAKMGEV-NWEI	:	97
<i>M. grisea</i> #2	:	T--QALVNEVCDEKRFYKS	INPTLKEVRGGTHDGLFTAYPDEE-NWGI	:	104
<i>M. grisea</i> #3	:	T--HALVNEVCDEKRFKKS	VAAALGLREAIHDGLFTAHNDEPNWGI	:	140
<i>M. grisea</i> #4	:	D--WDLVHEVCDDSRFKKS	IKGDEELRNAVHDGLFTSSGEDEENWGI	:	140
<i>P. chrysosporium</i> #1	:	Q---ELVHEVSDDKRFRK	SPKGGLELRPLIGDSLITADYPREENWGI	:	99
<i>P. chrysosporium</i> #2	:	Y---ELVHEASNDKLF	FRKSVGGPLAELRSSVGDGLVTANVPGEENWGI	:	99
<i>P. chrysosporium</i> #3	:	Q---ELVHEVSDDKRFRK	TVQGPLGEVRAVAGDGLFTADVPGEENWDI	:	99
<i>P. chrysosporium</i> #4	:	S--QELLHEVSDKRFKRS	IPRSALQVRNAVGDGLFTANGD-DPNWHL	:	99
<i>P. chrysosporium</i> #5	:	S--QELLHEVSDKRFKRS	VPSSALDQVGNAAGEGLFTAAGD-NPNWHL	:	97
<i>P. chrysosporium</i> #6	:	INTQELLHEVSDKRFKRS	IVSGGLENEVRNAAGDGLFTAHADKEQNWA	:	102
<i>P. chrysosporium</i> #7	:	A---KLMSDVSDDKKFK	YNMSPGLMQRNAVGDGLFTAYGE-EPNWGI	:	98
<i>A. pretiosum</i>	:	H---ELVARMCSDP	SWGKAVHPALEQVRDFAGDGLFTARGDEPNWVGK	:	104
		e	k	dgLrTa	w

Fig.1-14 融合型P450の活性部位内部配列のアライメント

赤枠は、活性部位内部で保存度が高いPhe残基を示す。

数字は、P450foxyの活性部位内部に存在するアミノ酸残基の位置を示す。

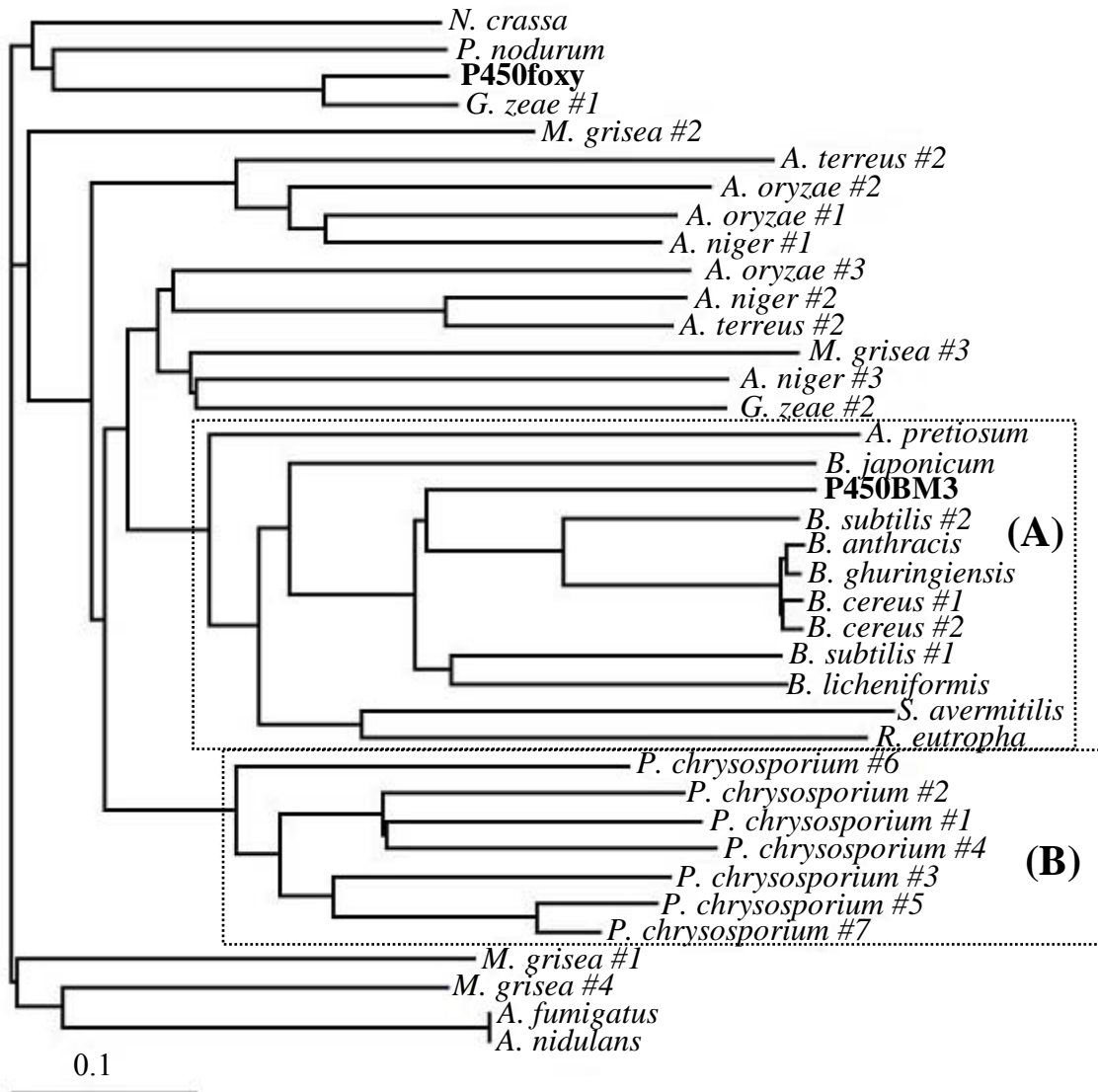


Fig.1-16 融合型P450のアミノ酸配列に基づいたアライメント

(A) : バクテリア由来融合型P450 (B) : *P. chrysosporium* 由来融合型P450

第二節 AOPE 及び推定還元酵素融合型 P450 の発現条件の検討

真核生物由来タンパク質のクローニングのためのテンプレートとなる cDNA ライブラリー取得のために目的酵素の発現条件を検討すると同時に、対象の生理的機能に対する示唆を得ることを目的とした。

2-1 試料

麹菌 *A. oryzae* 野生株(RIB40)を、同研究室の周より分与されたものを用いた。使用まで Potato dextrose agar plate 培地に 30°C で培養することで生育させ、4°C で保存した。

Potato Dextrose Agar (PDA) medium.	
Potato Dextrose Broth (Difco : 254920)	24 g
INA AGAR (伊那食品 : BA-10)	15 g
D.W.	1000 mL
	pH 5.1- 5.2

2-2 方法

培養方法

麹菌の培養は DPY、CD 液体培地[94]及びふすま固体培地[95]を用いて行った。DPY 液体培養は DPY 培地 200 mL を 500 mL 羽付きフラスコに入れ、通気可能なゴム栓を用いた。白金耳を用いて plate 培地から少量かきとって植菌し、30°C、150 rpm の条件で 48hrs 振とう培養を行った。48hrs 培養後、粒状に生育した菌体をオートクレーブ滅菌した Mira cloth (CALIBIOCHEM Cat# 475855) を用いて濾集し、滅菌水で菌体を洗浄し、滅菌したスパーテルで十分に水分を除いた後、2 mL マイクロチューブに回収して液体窒素で瞬間凍結した。使用するまで -80°C で保存した。CD 培地は *Aspergillus* 属の最小培地であり、誘導条件を検討する際に用いた。上記の通り DPY 培地で 48hrs 培養し、濾集、滅菌水洗浄した菌体を、検討する成分を含む CD 培地に移し 8 hrs、30°C、150 rpm の条件で振とう培養した。ふすま固体培養は、市販のふすま 10 g と滅菌水 5 mL を混合して 50 mL 三角フラスコに入れ、121°C、20 min オートクレーブ滅菌したものを培地として用いた。4 mL の滅菌水に懸濁した *A. oryzae* 胞子液を培地に添加し、30°C、72 hrs 静置培養した。培地表面に生育した白色の菌体を滅菌したスパーテルでかきとり、2 mL マイクロチューブに入れ、使用するまで -80°C で保存した。

Dextrin Polypepton Yeast Extract (DPY) medium.

Dextrin (KOKUSAN : 254920)	20 g
Polypepton (Wako : 394-00115)	10 g
Yeast Extract (Difco : 212750)	5 g
KH ₂ PO ₄ (Wako : 169-04245)	5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O (Wako : 131-00405)	0.5 g
D.W.	1000 mL
	pH 5.5

CD (*Aspergillus minimal*) medium.

NaNO ₃ (Wako : 254920)	3 g
KCl (Wako : 163-03545)	2 g
KH ₂ PO ₄ (Wako : 169-04245)	1 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O (Wako : 131-00405)	1 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O (Wako : 098-01085)	35 mg
Glucose (Wako : 041-00595)	20 g
D.W.	1000 mL

Adjusted by 5 M KOH to pH 5.5

誘導条件

液体培養における誘導条件は、AOPE、融合型 P450 について以下の通りである (Table.2-1)。 *C. fumago* 由来 CPO は、培養時にフルクトースにより発現が誘導されるという報告があるため[96]、AOPE においても CD 培地の炭素源を変化させることで発現に与える影響を検討した。融合型 P450 については、解毒酵素の遺伝子発現誘導作用が強いことが知られているフェノバルビタール(Sigma : P5178)[97]、P450foxy の遺伝子が単離された際に培地に添加されていた大豆油(Wako : 190-03776)の添加による影響を検討した[98]。

Table.2-1 AOPEおよび融合型P450発現条件検討

For AOPE	For CYP505A3、A13、C3
Carbon source was replaced in CD liquid medium.	Wheat bran solid medium
Glucose	DPY liquid medium + 5% Soybean oil
Fructose	DPY liquid medium + 5 mM Na Phenobarbital
Glycerol	
Pyruvate	For CYP505C3 (Anaerobic culture)
Maltose	CD liquid medium + 5 mM Na nitrate
None	CD liquid medium + 5 mM Na nitrite
	CD liquid medium + 5 mM Na sulfate
	CD liquid medium + 5 mM Na sulfite

ゲノム DNA の抽出

DPY 液体培地で培養、集菌したものを試料として用いた。Wizard® Genomic DNA purification Kit (Promega #218878)を用い、マニュアルの”Isolating Genomic DNA from Plant Tissue”に従った。試料を小型乳鉢に入れ、液体窒素で完全に磨砕し、約 40 mg を滅菌した 1.5 mL マイクロチューブに分取した。600 µL Nuclei Lysis Solution を添加し、ボルテックス(Kika® works) し、65°C、15 min インキュベートし、さらに 3 uL RNase を添加して 37°C、15 min インキュベートした。5 min 室温静置後、200 µL Protein Precipitation Solution を添加し、20sec 激しくボルテックスし 15000 xg、3 min、室温の条件で遠心分離し、上清を分取した。600 µL イソプロパノールを添加し、15000 xg、1min、室温で遠心分離した。上清を除去し、得られた沈殿を 600 µL 70% エタノールを添加、15000 xg、1 min、遠心分離することでリンスしたエタノールを除去し、マイクロチューブの蓋を開けて 15 min 放置して風乾させ、100 µL Rehydration Solution を添加し 65°C、1h インキュベートすることで溶解させた。得られた溶液は Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies)によって濃度を測定後、使用まで-20°C冷凍保存した。

Total RNA の抽出

各誘導条件で培養した菌体から目的遺伝子の発現の確認、cDNA 作成のため、Total RNA の抽出を行った。本実験において、すべての器具は 121°C、60 分オートクレーブ滅菌したものを、水は diethylpyrocarbonate 処理することで RNase を失活させたもの (DEPC 水) を使用した。実験操作における器具は RNase-OFF RNase Decontamination Solution (TaKaRa : 9037) で処理し、サニメント手袋(アズワン : 14280601)を着用した。TRIzol® Reagent (Invitrogen : 15596-026)を用い、マニュアルにしたがって操作を行った。試料を乳鉢に入れ、液体窒素を添加して完全に磨砕した。約 100 mg を 1.5 mL マイクロチューブに分取し、1 mL TRIzol Reagent を添加し、攪拌後室温で 5 min インキュベートした。200 µL クロロホルムを添加し 15 sec 十分に攪拌し、室温で 3 min 静置した後、12000 xg、15 min、4°C の条件で遠心分離し、上層の水相を別のマイクロチューブに分取した。500 µL イソプロパノールを混和させ、室温で 10 min 静置後、12000 xg、15 min、4°C の条件で遠心分離した。上清を除去して得られた沈殿を 1 mL 75% エタノールを添加してボルテックスし、7500 xg、5 min、4°C の条件で遠心分離することでリンスした。上清を除去し、沈殿を 10 min 風乾した後、適量の DEPC 水に溶解させ、55°C、10 min インキュベートした。得られた溶液は Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer によって濃度を測定後、使用まで-80°C冷凍保存した。得られた Total RNA は、変性 agar gel 電気泳動に供することで分解せずに調製されたことを確認した。

RT-PCR

得られた Total RNA 1 μg を RT-PCR に供した。反応には ReverTra Ace - α - First Strand cDNA Synthesis Kit (TOYOBO : FSK-101) を用い、マニュアルに従って操作を進めた。反応系、反応サイクルは以下に示すとおりである。本論文での PCR 反応は、Thermal Cycler Dice Gradient (TaKaRa : TP600) または Thermal Cycler PERSONAL (TaKaRa : TP240) を用いている。

R.T. reaction mix.	(μL)	R.T. reaction cycle	
RNase Free H ₂ O	11 - X	42°C	10 min
5 X RT Buffer	4	99°C	5 min
10 mM dNTP	2	4 °C	5 min
RNase Inhibitor	1		
Primer (Oligo dT20 : 10 pmol / μL)	1		
Revertra Ace	1		
RNA sample (1 μg)	X		

R.T.反応で得られた反応液 1 μL を鋳型とし用い、配列に合わせて設計した特異的プライマーを用いた PCR 反応に供した。反応 Control として R.T.反応を行っていない Total RNA を鋳型とした反応を行った。本反応では Easy-ATM High-Fidelity PCR Cloning Enzyme (STRATAGENE® : #600400) を用いた。反応液、反応サイクルは以下の通りである。

PCR mix. for Easy A enzyme.	(μL)	PCR cycles	
Distilled water	37.1	95°C	2 min
10 X Reaction Buffer	5	95°C	40 sec
2.5 mM dNTP	4	55°C	30 sec
DNA template or RNA control	1	72°C	1 min
Primers (10 μM)	1 each		
Enzyme	0.5	72°C	7 min

各対象に対して、Blast search によって得られた遺伝子配列を参考にしてプライマーを設計 (Table.1-6) し、PCR 反応に使用した。それぞれのプライマーには、大腸菌発現系に導入することを考え、pET vector 用の制限酵素サイトを導入してある。また融合型 P450 のリバースプライマーは C 末端に 4His tag に相当する塩基配列を含んでいる。PCR 反応後、0.8% アガロースゲル電気泳動に供し、増幅を確認した。

Table.2-2 AOPEおよび推定融合型 P450のクローニングプライマー

For CPO like proteins		Restriction Site.	
AOPE	F	<i>Nhe</i> I	ACGGCTAGCATGAAATCCATAATTGG
	R	<i>Xho</i> I	ACTCGAGCTAAAACGGCCACGCATAATG
For Putative fused P450s.			
CYP505A3	F	<i>Kpn</i> I	ACGGGGTACC GATGAGCACGCCCAAGGCA
	R	<i>Spe</i> I	AGGACTAGT TTAGTGGTGGTGGTGAGCAAAAATATCCGTAG TATACCGCTCC
CYP505A13	F	<i>Eco</i> R I	ACCGGAATTCATGGAAGAGACGAAGCTCATTCC
	R	<i>Xho</i> I	ACCGCTCGAGCTAGTGGTGGTGGTGCGTAAATACATCCGT CGCATACCTCTCTCT
CYP505C3	F	<i>Hind</i> III	ACCC AAGCTT GATGCGACAAAACGAAAAGCAAATATGT
	R	<i>Spe</i> I	AGGACTAGTTCAGTGGTGGTGGTGTATAAAAGTCTCAGCT ATATATCGCCG

下線は導入した制限酵素サイトを示す。

アガロース電気泳動

DNA 断片の確認は、アガロースゲル電気泳動によって行った。泳動に用いるゲルは、確認を行う断片のサイズによってアガロースゲル 2%(-1.5 kbp)、0.8%(1-10 kbp)を使い分けた。500 mL 三角フラスコにアガロース(Solana :10150)、200 mL TAE 緩衝液(Tris-base : 242 g、Na₂EDTA : 37.2 g、Acetic Acid : 57.1 mL、D.W. : 1L)をいれ、電子レンジで加熱することで完全に溶解させた。固化しない程度に冷えた段階で 20 μL エチジウムブロマイド(Wako : 315-90051)を添加し、型に流し込んで 4 hrs 静置することで固化させた。作成したゲルは使用まで TAE 緩衝液中で保存した。泳動は、Mupid α ((株)アドバンス)を用いて 100 V の電圧で行った。泳動後のバンドの確認は FAS-III システム (Toyobo)によって行った。分子量マーカは LoadingQuick λ/Sty I (Toyobo : DNA-126)、100bp DNA Ladder(Toyobo : DNA-030X)を用いた。

サブクローニング(Fig.2-1)

RT-PCR の結果、増幅が認められたものを LaboPass™ Gel Extraction Kit (北海道システムサイエンス: CMG0112)を用いてゲルから切り出した。NanoDrop を用いて濃度を測定し、pT7-Blue2 vector (Novagen : 69080-3)とライゲーションを行った。ベクターの使用量は 15 ng とし、ライゲーションの際のベクターとインサートのモル比は 1 : 4 を基準とした。ライゲーション試薬は、Ligation high (Toyobo : LGK-101)を用いた。ベクターとインサート溶液を混合し、等量のライゲーション試薬を添加し、サーマルサイクラーによって 16°C、1 hr 以上インキュベーションした。反応液全量を用いて大腸菌 DH5α株にトランスフォーメーションした。-80°C保存してあった DH5αコンピテントセルを氷上で解凍し、試料を静かに添加し、30 min 氷上保持した。42°C、45 sec ヒートショックし、さらに 2 min 氷上で保持し、400 μL SOC 培地 (Difco :

244310)を添加し、37°C、20 min インキュベートした。引き続き 37°C、40 min 激しく振とう培養した。培養した菌体を、20 μ L 0.1 M IPTG (Wako : 099-05013)、50 μ L 15 mg/mL X-gal (Wako : 027-07854)を塗布した LB agar plate 培地(Difco : 244620) 100 μ g/mL Ampicillin (Wako : 018-10372)に植菌した。37°C、12hrs 以上静置培養し、出現した白コロニーを選択しコロニーPCR によってインサートの有無を確認した。コロニーPCR には LA-Taq (Takara : RR002A)を用いた。1 試料毎に 5 μ L の反応液を分注し、滅菌した爪楊枝を用いてコロニーを添加した。コロニーPCR では、ベクターのプロモータ領域及びターミネータ領域に相当するプライマーを用いた(Table.2-3)。PCR 反応後、アガロース電気泳動に供し、目的のサイズに相当するバンドが出現したコロニーを選択した。

Table.2-3 コロニーPCRに用いたプライマー

T7 Promoter. TAATACGACTCACTATAGGG
T7 Terminator ATGCTAGTTATTGCTCAGCGG

大腸菌発現系におけるT7 Promoter、Terminator配列に合わせて設計した。

PCR mix. for LA-Taq. ColonyPCR (μ L)	PCR cycles
Distilled water	15.5
2 X GC Buffer I	25
2.5 mM dNTP	8
Primers (10 μ M)	1
Enzyme	0.5
	96°C 2 min
	96°C 30 sec
	55°C 30 sec
	72°C 1 min
	72°C 7 min

} 25 cycles

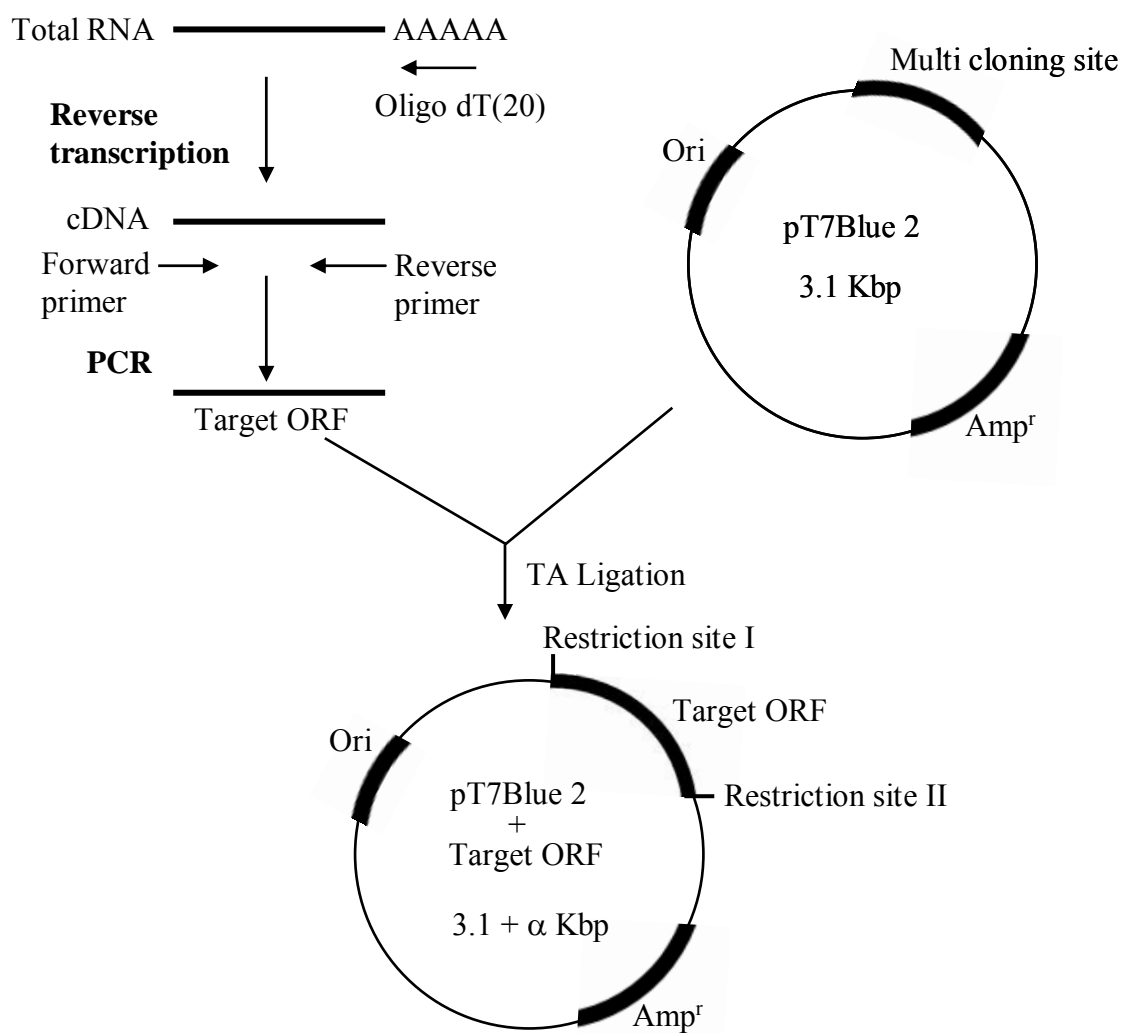


Fig.2-1 TAクローニングによる目的ORFのサブクローニング

Sequence check

コロニーPCR の結果得られたポジティブコロニーを 3 mL LB medium. (100 µg/mL) に植菌し、37°C、150 rpm の条件で振とう培養した。培養菌体から LaboPass™ Mini Plasmid DNA Purification Kit (北海道システムサイエンス : CMP01129)を用いてプラスミド DNA を調製した。GenomeLab™ DTCS – Quick Start Kit (BECKMAN COULTER : 608120) を用いて Sequence PCR を行った。75 fmol に相当する DNA に滅菌水を添加して 10 µL に fill up し、96°C、1 min の条件でサーマルサイクラーを用いて Pre-heat した。氷上で冷ました後、8 µL Quick Start Mix、さらに 2 µL 1.6 µM プライマーを添加し、以下の条件で PCR 反応させた。反応液を 2 µL 250 mM EDTA、2 µL 3 M NaOAc、1 µL グリコーゲンと混和させた後、60 µL の 95%氷冷エタノールを添加し、速やかに 15100 xg、4°C、15 min の条件で冷却遠心した。沈殿を失わないようにエタノールを除去し、200 µL 70% エタノールを添加し 15100 xg、4°C、2 min の条件で冷却遠心することで洗浄した。この操作を二回行った後、20 min 室温静置することで風乾し、40 µL SLS に溶解して測定試料とした。CEQ™ 2000XL DNA Analysis System (Beckman Coulter)によって測定を行った。用いた分析パラメータは LFR-1 である。得られた測定結果は Genetyx (Genetyx Corp®)を用いて解析した。

Table.2-4 AOPEおよび融合型P450の配列確認用プライマー

AOPE	Sequence
500-	ACTTCTCGCGTCTTCTAGCA
-560	ACGCAGGTTTCCGATATCCGA
CYP505A3	Sequence
420-	GCCTAAGCAGAAATCATGGTCAC
820-	CCACCTCTGGTTCGCTTTCGTT
1320-	GGATGATCCGTCCTACAACATTC
1720-	CTTCGAGTGGCTCAGCGCTTT
2120-	CGGACTATTCGCTTCAAGCTC
2520-	CAACCTCGCGATCGGAGACTT
2920-	CCGGCTGCCGCACCCAAGG
CYP505A13	Sequence
450-	CTCGCTTAACGCTGGACACTAT
850-	CTGACATTCCTTTTCTACTATTTGC
1250-	GAGAGGATGCATCGGCCGC
1700-	GTACGAGGGGCAGCCTCCTGAT
2100-	CAGGAAGGATACGTGCTCG
2500-	CCTTCCATCAACCTACCACTG
2800-	CCGCGGGTTCATCATGGATCG

RACE 法による AOPE の全長の確認

精製した *A. oryzae* の Total RNA を鋳型とし、RACE 法による AOPE の全長配列の確認を行った。逆転写反応時に Adaptor 配列を付加した oligo dT(20)プライマーを使用した。逆転写産物を鋳型とし、AOPE 5' Forward 特異的プライマー及び、Adaptor 配列と complementary な配列を持つ Reverse プライマー(3' RACE primer)を用いて PCR を行った。さらに反応産物を鋳型として用いた nested PCR に供し、電気泳動により増幅を確認した。ゲルからバンドを切り出し pT7Blue2 ベクターにサブクローニングし、3'RACE プライマーを用いて sequence を確認した。

2-3 結果および考察

炭素源の異なる条件で培養した *A. oryzae* より調製した Total RNA を RT-PCR に供し、AOPE の発現条件の検討を行った。AOPE は、全ての条件で同等に発現していることが明らかになり、恒常的に機能している可能性が示唆された(Fig.2-2)。また、CPO に見られるような特定の炭素源によって発現が誘導される現象は見られなかった。データベース情報によると AOPE はイントロンを含まない配列であると予想されているが、CPO と比較して 10 kDa ほど予想分子量が小さいため、アノテーションが誤っている可能性を考え、3'RACE 法による全長配列の確認を行った。AOPE 遺伝子下流に 18 塩基の polyA 鎖が存在し、確認した配列は完全にデータベース上の配列と一致し、AOPE はイントロンを含まないことが明らかになった。また、開始コドン ATG に対し、配列中に終始コドン TAG は 7 箇所存在したが、フレームシフトを起こさずに開始コドンに対応するのは、データベース上で指定された場所のみであった(Fig.2-3)。

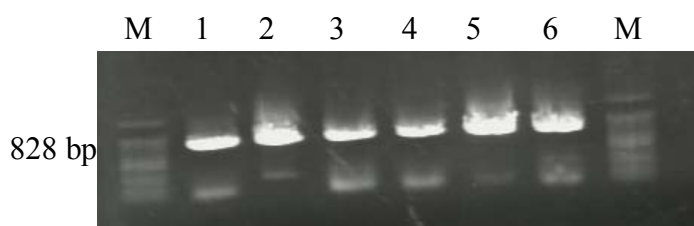


Fig.2-2 異なる炭素源存在下におけるAOPEの発現

1 : Glucose, 2 : Glycerol, 3 : Pyruvate, 4 : Maltose, 5 : Fructose,
6 : None.

ATGAAATCCATAATTTGGTTTTCTCTTTTACCCGCGCTTTTTCTATTACAAACCTCACTTACCAC
 AACATTCCAACATGTCCAGCGAAAACGACACCCTTT**CAGAAGGGCAATACTACCGAGGCGGAGCAGA**
 CGACCTGCGCTCCCCATGCCAATCATCAACTCCCTCGAAACCACGGCTACATCGCTCGGACGGC
 CGTAACATCACCGGGATCCA**ACTGAAGGCAGCGCTAGAACACATCGGACTCGGCTTCGACACGGCAG**
 GAGGCTCGTCAAGATCGCGTTC**CAAGACCACGTGACCCACCCGAAGGCACCCACGCACAACAGC**
 CAACTTCGGTCTGCGCGACGCGGCAAGTCAACGAAGACGGAGACCCCGTGCTAAACCTCGATCAA
 CTGCGCCGTCACACGGCATCGAGCATGACGTCTCGGTTACGCGACAAGACCGCGCGTTGGGCGATT
 ACATCCATCTCAATCCCGACCTGTACCAGCAACTTCTCGCGTCTTCTAGCAATGGGACGTCA**TTTTC**
 TATCTCGGATATCGGAAACCTGCGTAAGAAACGGTTCGAGCAGTCAAGAGGGATAACCCGGAGCTG
 GATTTGGACAAGAGGATGCATTATATCGCTTGGCGTGAGGTTGGGGGTATCATGGGCGTATTTGGGA
 AGGGGCTCTACCATGTTCCGAAGGAGTATATAGAGGCGATCTTTGGTGAGGAGCGGTTACCGTTTGA
 CGAGGGATGGCGCCAAGATGGACGAAGTTGTATTTGCCGAGGCTGGGGCGGTGACTTTGGCTATT
 TCGCATTATGCGTGGCCGTTTTAGGTGGTTTTGTATGATTGAGTTTTGATATTATTTATCAATCT
 GTGGCGCTCTGGAGCAACAGTTGGATAGATTGAGAAATTGTTTTCGAAGTTTGGCGACAAGGGTCA
 TAGATATGCTTCTGAGGGAATAATTATGACGGTATGATATAAACCTAAACTAGGACATGCAAGTGGAA
 ATGGATCTTCACTCTTGT**AAAAAAAAAAAAAAAAAA**CACTGTCATGCCGTTACGTAGCATCGGAA
 TTCTATAGGTGACC

Fig. 2-3 RACE法によって決定したAOPEの遺伝子配列

配列中に存在する開始、終始コдонは灰色で、決定されたものを太字で示した。ポリA鎖は下線で示す。

推定融合型 P450(CYP505A3、A13、C3)の発現条件検討は、DPY 液体培地、小麦ふすま固体培地、DPY 液体培地に大豆油、5 mM フェノバルビタールナトリウム添加条件において行った(Fig.2-4)。CYP505A3 はいずれの条件においても発現が見られたが、小麦ふすま固体培地において発現量が増加しているようであった。逆にCYP505A13 は、固体培地においてはほとんど発現が見られず、液体培地において添加物質の有無に関わらずほぼ同程度に発現が見られた。バンド強度より判断すると、CYP505A3 の発現強度と比較すると、CYP505A13 の発現量はかなり少なかった。CYP505C3 は、いずれの条件でも発現が見られなかった。P450BM3 は、フェノバルビタールによって大幅に発現が上昇することが古くから知られており、遺伝子配列の上流に応答配列が存在していることが明らかになっている。今回用いた試料ではそのような発現上昇は見られず、フェノバルビタールに対する応答性はないことがわかった。配列データベース上で、sulfite reductase とアノテーションされていることから、嫌気条件における CYP505C3 の発現条件検討を行った。培地に硫酸 Na、亜硫酸 Na、硝酸 Na、亜硝酸 Na を 5 mM で添加し、脱気した嫌気培養を行ったが、CYP505C3 の発現を見出すことはできなかった(結果は示さず)。

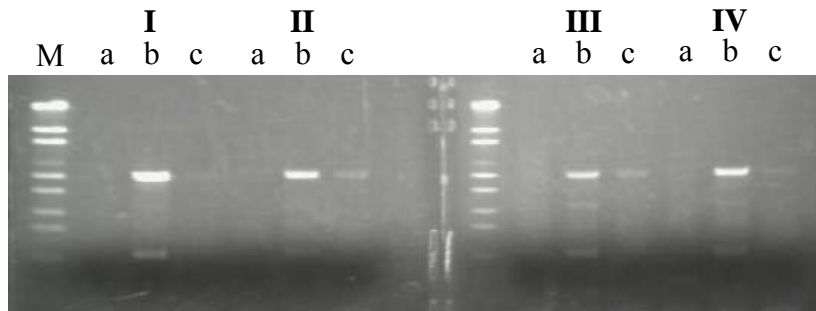


Fig.2-4 推定融合型P450の各誘導条件での発現

I : Wheat bran solid medium.

II: DPY 5% soybean oil medium

III : DPY 5 mM Na-Phenobarbital.

IV : DPY liquid medium.

a : CYP505C3

b : CYP505A3

c : CYP505A13

CYP505A3 は小麦ふすま培地由来の、CYP505A13 は 5% 大豆油添加 DPY 液体培地由来の cDNA ライブラリーを鋳型とし、それぞれの特異的プライマーを用いて PCR によって増幅し、pT7Blue2 ベクターに導入した。Sequencing の結果、CYP505A3 の配列は、イントロンを含まずデータベース上の配列と完全に一致し、遺伝子の単離に成功した。CYP505A13 の配列はほぼデータベース上の配列と一致したが、Fig.1-17-D の挿入配列に相当する塩基配列が存在していなかった。このことにより P450foxy、他の推定融合型 P450 とのギャップがなくなるため、データベース上の配列が誤っていると考え、CYP505A13 の遺伝子の単離に成功したと判断した。その他の配列、イントロンの位置はデータベースの情報に完全に一致していた。明確な発現条件を決定することはできなかったが、CYP505A3、A13 の発現は条件によって差がみられ機能的にも異なっている可能性も考えられた。

第三節 AOPE の大腸菌発現系の構築

3-1 方法

発現培養

pT7blue-AOPE を予め導入してある *Nhe* I (Roche : 885843)、*Xho* I (Roche :703770) で処理し、電気泳動で分離し、ゲルから抽出することで AOPE インサートを調製した。同じく *Nhe* I、*Xho* I で処理した発現ベクターとライゲーションし、大腸菌発現系発現ベクターを作成した(Fig.3-1)。検討を行ったベクター及び大腸菌ホストは Table.3-1 に示す。

Restriction reaction mix.		Treated under 37°C for 1hr<
10 X reaction buffer.	1	
Sample	3	
Restriction enzyme #1	0.5	
Restriction enzyme #2	0.5	
Distilized water	5	

Table.3-1 AOPEの発現検討を行った大腸菌発現系.

pET vectors	Character	Host
pET-21a	C terminus 6His	BL21 Codon plus (DE3) C43 (DE3) HMS(DE3)
pET-28b	N、C terminus 6His	
Cold shock vectors		
pCold I	C terminus 6His	BL21
pCold IV	No His tag.	JM109
pCold TF	N terminus Trigger Factor and 6His	DH5α

今回の大腸菌発現系では pET vector system (Novagen)、pCold vector system (TaKaRa) の二種類について検討を行った。各 system における発現方法を以下に示す。pET vector を用いた発現系では、構築した発現ベクターを BL21 Codon plus(DE3)、C43(DE3)、HMS174(DE3)各株にリトランスフォーメーションした。出現したコロニーを 3 mL LB 液体培地 (選択マーカとして、pET-21b : 100 µg / mL Amp.、pET-28b : 50 µg / mL Kanamycin、Wako : 113-00343)に植菌し、37°C、150 rpm、12 hrs 前培養を行った。培養液を 500 mL 羽付きフラスコに入れた 200 mL TB 液体培地に 1%植菌を行い 37°C、150 rpm で O.D.₆₀₀=0.6-7 に至るまで約 2 hrs 培養した。O.D₆₀₀ の測定は NanoDrop を使用した。誘導は、終濃度 1 mM となるように 0.1 M IPTG、大腸菌においてヘムの前駆体となる 5-Aminolevlinic acid hydrochloride (コスモ・バイオ:

AL-00-2)を 0.5 mM となるように添加し、さらに 24 hrs、150 rpm の条件で培養を行った。培養温度は 25、30°C について検討した。

pCold vector は、大腸菌コールドショック遺伝子 *cspA* のプロモータ配列と 5'非翻訳領域を利用したタンパク質発現システムである。*cspA* プロモータの下流には発現を厳密に制御するための *lac operator* が挿入されている。本ベクターを用いて低温で発現誘導することにより、宿主大腸菌由来タンパク質の合成が抑制され、目的タンパク質のみを高効率で得ることができる。pCold TF DNA は、大腸菌シャペロン的一种であるトリガーファクター (Trigger Factor ; TF、M.W. : 48 kDa) を可溶化タグとする融合型のコールドショック発現ベクターである。従来の大腸菌発現系と比較して発現量や可溶性度の向上が期待できる。pCold vector についても pET vector と同様に発現ベクターを構築し、BL21、JM109、DH5 α 株にそれぞれリトランスフォーメーションした。出現したコロニーを 3 mL LB 液体培地 100 μ g / mL Amp. に植菌し、37°C、150 rpm、12hrs 前培養を行った。培養液を 500 mL 羽付きフラスコに入れた 200 mL TB 液体培地に 1%植菌を行い 37°C、150 rpm で O.D.₆₀₀=0.6-7 に至るまで約 2 hrs 培養した。O.D.₆₀₀ の測定は NanoDrop を使用した。誘導は、終濃度 1 mM となるように 0.1 M IPTG、0.5 mM となるように 5-aminolevulinic acid を添加し、さらに 24 hrs、150 rpm、16°C の条件で培養を行った。低温での培養には BIO-SHAKER BR-40LF (TAITEC)、または低温恒温槽付回転式振とう培養機を使用した。

TB liquid (Terrific Broth) medium.

Tryptone (Difco : 211705)	12 g
Yeast Extract	24 g
Glycerol (Wako : 075-00611)	4 g
KH ₂ PO ₄	2.3 g
K ₂ HPO ₄ (Wako : 164-04295)	1.3 g
D.W.	1000 mL
	Neutral pH

培養終了後、6500 xg、4°C の条件で High-speed Refrigerated Centrifuge (himac : CR206) を用いて集菌した。

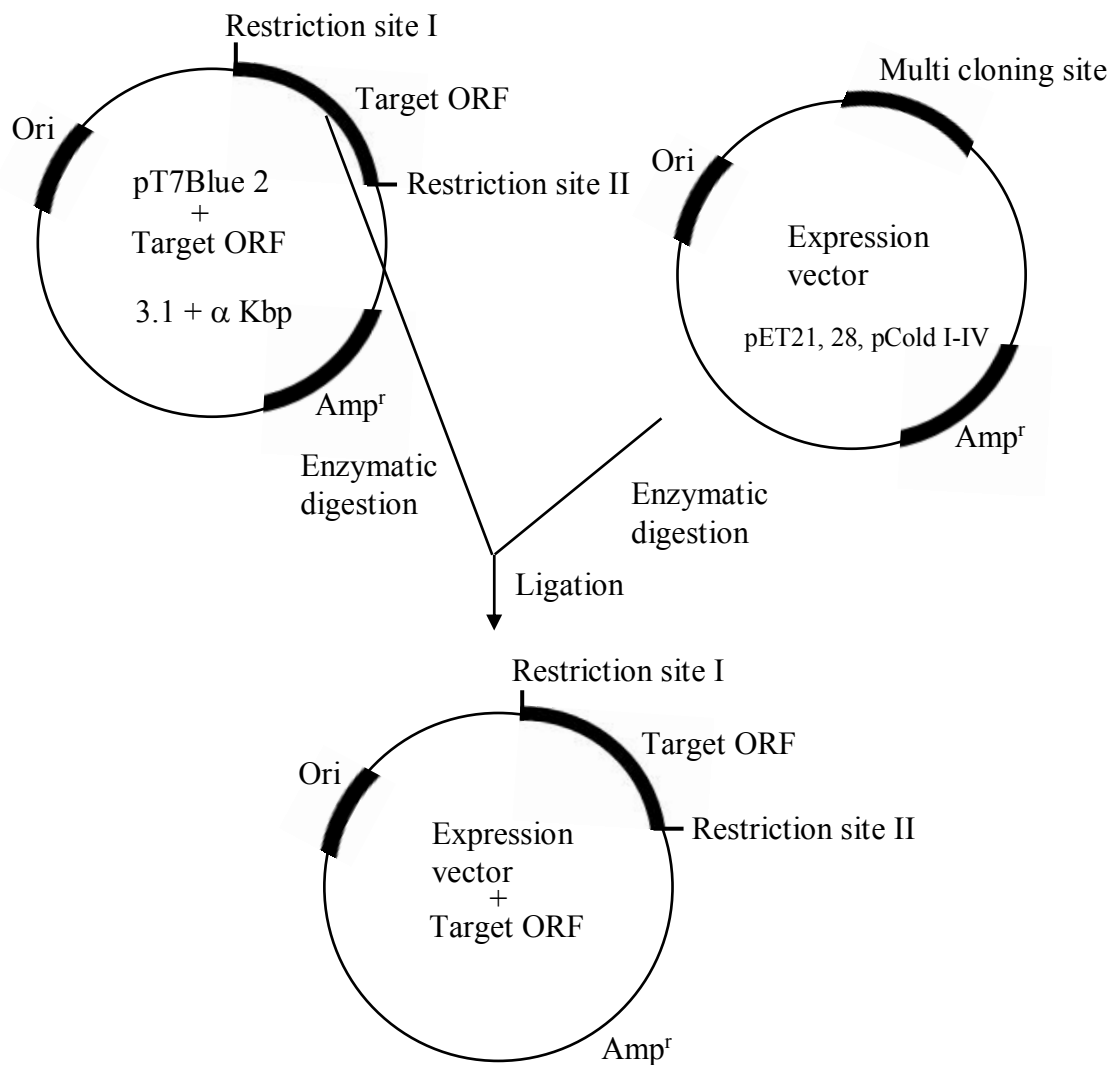


Fig.3-1 大腸菌発現系発現ベクターの構築

発現確認

得られた菌体を、適当量の 50 mM Mops (pH7.4)(Wako : 343-01805)、10% グリセロール、0.1 mM DTT (Wako : 041-08976)、PMSF(Wako : 162-12182)に懸濁し、超音波破碎機 SONIFIER 250D (BRANSON)を用いて氷水中で攪拌しながら破碎した。条件は PROCES : 5 min、PULSE : 5sec、DUTY : 60%、STEMP : 25°C、OUTPUT CONTROL : 6で行った。破碎した菌液を 25000 xg、4°C、20 min の条件で冷却遠心分離し、上清を Cell free extract として分取した。Cell free extract を SDS-PAGE 及び CO 差スペクトル測定を行うことで発現の確認を行った。SDS-PAGE は以下の方法で行った。タンパク質の目的サイズによってアクリルアミド濃度を変動させた。Cell free extract のタンパク質濃度を NanoDrop により測定し、約 120 µg に相当する量を 200 µL PCR チューブに取り、等量の Loading buffer (5 mL 0.5 M Tris HCl (pH6.8)、10 mL 10%SDS、50% Glycerol、1 mg BPB、3.5 mL β-mercaptoethanol)と混合し、96°C、5 min の条件で加熱処理した。処理後、氷中保持することで冷却し、SDS-PAGE に供する試料とした。分子量マーカーは、LMW Marker Kit (GE ヘルスケア : 17-0446-01、Phosphorylase b : 97 kDa、Albumin : 66 kDa、Ovalbumin : 45 kDa、Carbonic anhydrase : 30 kDa、Trypsin inhibitor : 20.1 kDa、α-Lactalbumin : 14.4 kDa)を用い、泳動は Linear Power ELECTROPHORESIS (ATTO : AE-3105)によって行った。下表において 30% Acrylamide (Wako : 016-15915)、LGB (=Lower gel buffer : 1.5 M Tris HCl (pH8.8) 0.4%SDS)、UGB(=Upper gel buffer : 0.5 M Tris-HCl (pH6.8) 0.4%SDS)、10 X Running buffer (Tris 15.1 g、Glycine 72.1 g、SDS 5g、500 mL)である。泳動終了後、ゲルを QuickCBB (Wako : 299-50101)で染色してバンドを検出した。また、大腸菌発現系において、不適切なフォールディングを受けたタンパク質が不溶性画分に蓄積することがあるため、Cell free extract を調製後の沈殿も同様に SDS-PAGE に供した (Table.3-2)。

Table.3-2 SDS-PAGE ゲル組成

Lower gel			Upper gel
%	10	15	
30% Acrylamide	5.3	8	0.96
L,UGB		4	2
D.W.	6.7	4	5
TEMED		15 µL	8
10% APS		0.2	0.1
Range (kDa)	25-150	10-80	

P450 は、還元条件下で CO を付加することで 450 nm 付近に強い吸収を示す。このことから CO 差 (還元状態で CO 付加したものから、還元状態のスペクトルの値を差し引いたもの) スペクトルを観察することで、P450 酵素の発現を確認することができる。測定には UV/Vis Spectrophotometer (JASCO : V-550)を使用した。Cell free extract を酸化状態 resting state、マイクロスパーテルで極少量の Sodium Hydrosulfite (Sodium Dithionite Wako : 190-02115)を添加したものを還元状態 reduced state とした。還元した試料に CO ガス(ジーエルサイエンス: CQB02530) を purge して測定し、reduced state のスペクトルを差し引いたものを Difference spectra(差スペクトル)とした。差スペクトルにおいて 450 nm 付近に吸収が確認された場合は、 $\text{absorbance}_{448-490}$ の値とモル吸光係数($\epsilon = 91 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)より P450 量を算出した。

3-2 結果および考察

検討結果を Table.3-3 に示す。pET vector では、いずれの大腸菌株、温度においても可溶性、沈殿共に発現を確認することができなかった。pCold I を使用した発現系でも同様に発現を確認することはできなかったが、pCold IV を使用した場合は、全ての大腸菌ホストの沈殿の約 30 kDa 付近に発現が見られた。これは AOPE の推定分子量約 30 kDa に一致した。しかし可溶性画分にはそれに相当するバンドを観察することはできず、また CO 差スペクトルでも 450 nm 付近の吸収が見られなかったことから、タンパク質として発現したが、すべてが適切にフォールディングできず、沈殿となってしまっていると判断した。pET vector においては温度因子を検討することで発現タンパク質の可溶化を促進させることが知られているが、pCold では温度を 16°C で固定する必要があるため、これ以上の可溶化検討を行うことはできなかった。pCold TF を使用した発現系では、可溶性画分に約 80 kDa に大量の発現が確認された。これは AOPE + TF の予想分子量約 78 kDa に一致した。しかし P450 を大量発現した大腸菌で見られる菌体の赤変および CO 差スペクトルを観察することができず、pCold IV と同様、適切なフォールディングがなされていないことが予想された。さらに、pCold TF vector では、N 末端に 6His tag が付加されるため、Ni²⁺キレートイオン交換カラム HisTrapTM FF (GE ヘルスケア : 17-5286-01)を用いて精製を行った。(詳細な方法は後述する。) 発現タンパク質は、カラムに吸着することができ、正常に溶出することができたが、溶出した試料においても P450 に特徴的な褐色はまったく見られず、CO 差スペクトルも得ることができなかった。類似する構造を持つと予想される CPO においても初期に大腸菌を用いた大量発現系の構築が行われたが、結果失敗に終わっており、その原因として CPO の酵素として成熟するためにいくつかの翻訳後修飾が必要であることが提案されていた[65]。CPO の大腸菌発現系においても不溶性発現が見られており、リフォールディング実験が行われたが、適切にフォールディングすることができたのは極わずかであったと報告されている[83]。以上のこ

とから、AOPE も CPO と同様酵素として正確にフォールディングされるためには、何らかの翻訳後修飾が必要であり、それらが起こらない大腸菌発現系においては、翻訳が進んでも最終的に活性型酵素にまで至らず、沈殿化してしまうものと推測した。また、本項に記載はしていないが、不溶性発現が見られたものについて、難発現タンパク質の可溶化発現に有効であるとされるシャペロンプラスミド共発現系 (pT-GroE、pGroE)、Hot shock (20% EtOH)、Cold shock (0.01% Chloramphenicol (Wako : 036-10571)、Tetracycline (Wako : 594-11581))の検討も行ったが、顕著な改善は見られなかった。よって次の方法として翻訳後修飾が行われる酵母 *Pichia Pastoris* 発現系の構築を試みることにした。

Table.3-3 AOPEの大腸菌発現系での発現検討結果

Vector.	Result.
pET21a, 28b	No expression
pCold I	No expression
pCold IV	Expressed in precipitation
pCold TF	Expressed in soluble as T.F. fused form

第四節 AOPE の *P. pastoris* 発現系による発現検討

本項における実験手法は主に、Easy Select Pichia Expression Kit manual (Invitrogen) に従った。真核生物である *P. pastoris* は、外来タンパク質の processing、フォールディング、翻訳後修飾という面において有利であり、扱いも容易である。同じく酵母発現系である *Saccharomyces cerevisiae* と比較しても異種タンパク質の発現レベルが 10-100 倍に及ぶこともある。*P. pastoris* はメタノール資化性酵母であり、単独の炭素源としてメタノールを資化することができる。メタノール代謝における第一段階は、Alcohol oxidase によるメタノールのホルムアルデヒドへの酸化である。この反応では、同時に過酸化水素が生成されるが、この毒性の影響を避けるため、メタノールの代謝は、ペルオキシソームと呼ばれる特殊な細胞内小器官で行われる。*P. pastoris* は二種の Alcohol oxidase 遺伝子 (AOX1、AOX2) を持ち、主として AOX1 の貢献度が高いとされている。AOX1 遺伝子の発現は厳密に制御されており、またメタノールの添加により非常に高いレベルで誘導され、総発現タンパク質のうち、30%以上にも達する。AOX1 promoter 配列は単離され、異種タンパク質発現用のベクターに導入されて利用されている。

4-1 方法

発現プラスミドの構築(Fig. 4-1)

酵母発現ベクター pPICZA α 、pPICZB に AOPE 遺伝子を導入した。pPICZA α には、*P. pastoris* の細胞外分泌シグナルである α -factor が含まれており、細胞外発現を可能にすることで精製が有利となる。pPICZB は通常の細胞内発現を行う。また、C 末端に 6His tag が付加されている。プラスミドマップより、5'末端に *EcoR* I、3'末端に *Xba* I の各制限酵素サイトを導入した一組のプライマーを設計した(Table.4-1)。このプライマーを用いて、pT7Blue2-AOPE を鋳型として、Easy-A high fidelity enzyme による PCR を行い、AOPE 断片を調製した。pPICZ ベクターは、大腸菌、酵母のシャトルベクターであるため、大腸菌ホストに保持させてあったグリセロールストックからミニプレップすることで調製した。AOPE 断片及び pPICZ を *EcoR* I (Roche : 703737)、*Xba* I (Roche : 674257)を用いて消化し、アガロース電気泳動で分離・切り出し後、ライゲーションした。ライゲーションした試料を大腸菌 DH5 α 株にトランスフォーメーションし、LB agar plate 培地 25 μ g/mL ZeocinTM (invitrogen : 45-0430) 上に植菌、コロニーPCR によってポジティブコロニーを選択した。配列は、前述の方法によって確認した。

Table.4-1 *P. pastoris* 発現系において用いたクローニングプライマー

AOPE-S for Pichia	<u>AGAATTCATGAAATCCATAATTTGG</u>
AOPE-AS for Pichia	<u>ATCTAGAAACGGCCACGCATAATGCGA</u>

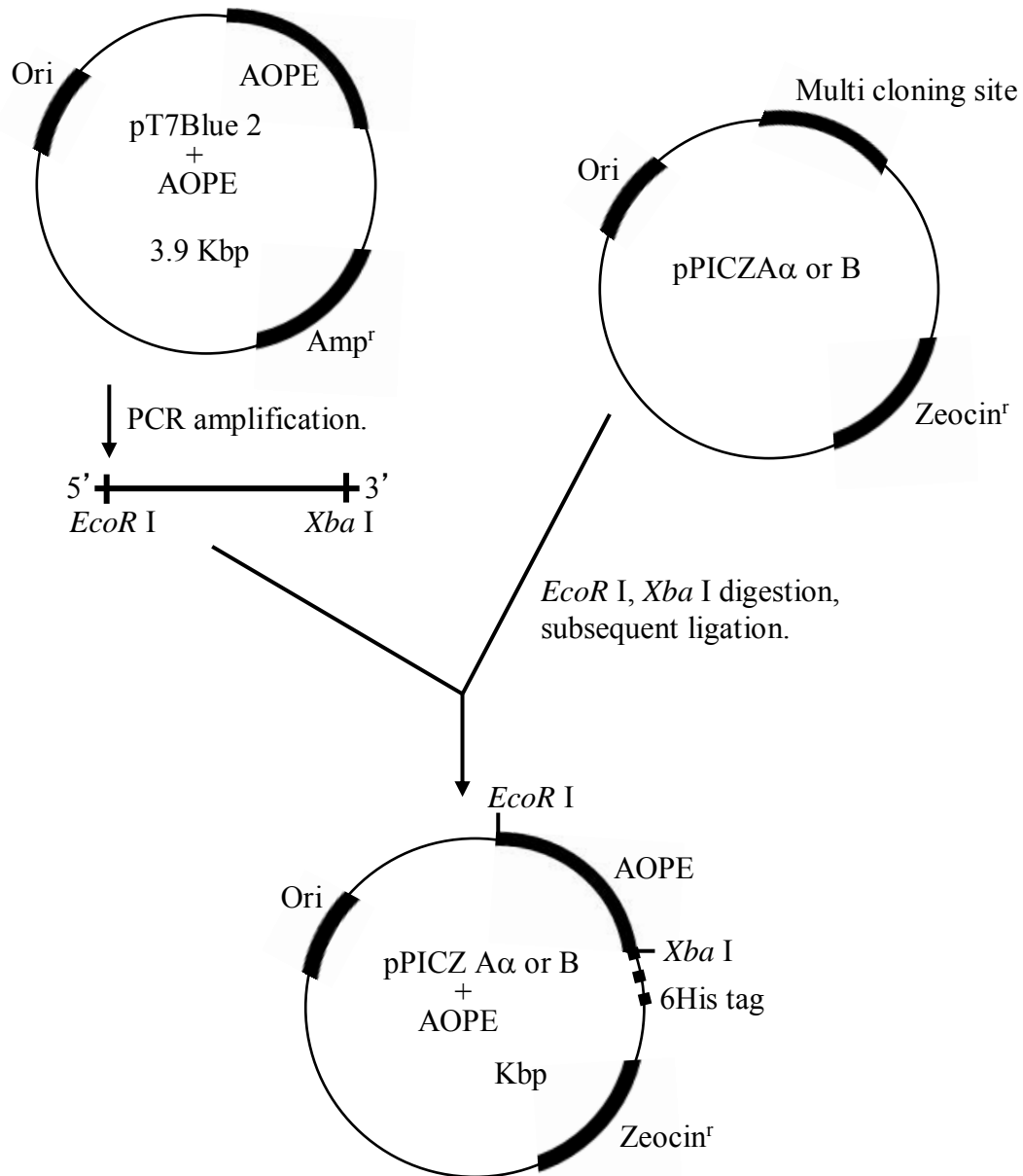


Fig. 4-1 *P. pastoris* 発現系発現ベクターの構築

エレクトロポレーションによる形質転換

P. pastoris へのトランスフォーメーションは、エレクトロポレーションによって行った。細胞内に取り込まれたプラスミド DNA は、非相同的にゲノム DNA に導入される。大量精製したプラスミド DNA を *Sac* I (Roche : 669792) によって消化しリニアにした。切断後、エタノール沈殿、LaboPass™ PCR Purification Kit (北海道システムサイエンス : CMR0112) によって精製し、10 μ L 滅菌水に溶解した。これはエレクトロポレーション効率および DNA への導入効率を高めることを目的としている。発現宿主として -80°C でグリセロールストックとして保存してあった KM71H 株を用いた。エレクトロポレーション用コンピテントセルの作成法は以下の通りである。グリセロールストックより DPY agar plate 培地にストリークし、30°C で培養することでコロニーを生育させた。5 mL DPY 培地に植菌し、30°C、24 hrs 前培養を行った。3 L 三角フラスコに入れた 500 mL DPY 培地に全量を植菌し、O.D₆₀₀=1.5 に至るまで 30°C で振とう培養した。培養菌体を 1500 xg、5 min、4°C の条件で集菌し、20 mL 滅菌水に懸濁して 2 回洗浄を行った。さらに 20 mL 1M ソルビトール (Wako : 194-03752) で同様に 2 回洗浄し、最終的に 1M ソルビトール 500 μ L に懸濁してコンピテントセルとした。エレクトロポレーションは、Gene Pulser®II Electroporation System (Bio-Rad : 339BR4764) を用いた。設定はマニュアルに従った (C=25 μ F、PC=200 Ω 、V=1.5 kV)。キュベットは、Gene Pulser® Cuvette 0.2 cm electrode gap (Bio-Rad : 165-2086) を用いた。プラスミド溶液 (1-5 μ g DNA) をコンピテントセル 50 μ L に添加し、10 min 氷上静置した。試料をキュベットにいれ、electroporation 処理を行った。滅菌したパスツールピペットで 1 mL 1M ソルビトールを添加、懸濁して試料を 1.5 mL マイクロチューブに回収し、30°C、1 hr インキュベーションした。1500 xg、4°C、1 min の条件で遠心分離し、900 μ L の上清を除去し、100 μ L に再懸濁して YPD agar plate 培地 25 μ g/mL Zeocin™ に植菌した。30°C でコロニーが出現するまで培養を行った。出現したコロニーは、表面観察及び顕微鏡観察で酵母であることを確認した。目的遺伝子の導入は、コロニー PCR によって行った。コロニーを爪楊枝で 5 μ L 滅菌水に懸濁し、5 μ L Lyticase (5 U/ μ L Sigma : L2524) を添加して 30°C、10 min インキュベートした。液体窒素で 1 min 凍結、融解処理を行い、得られた試料を PCR の鋳型として用いた。PCR 反応は LA-Taq を用い、AOPE 特異的プライマーを使用した。コントロールとして、トランスフォーメーションを行っていない菌体を鋳型とした反応も同時に行った。

発現培養

コロニー PCR により目的遺伝子の導入を確認したコロニーを用いて、発現検討を行った。プレートのコロニーを、爪楊枝を用いて 15 mL ファルコンチューブに入れた 5 mL MGYH 液体培地 (Minimal Glycerol Medium Histidine) に植菌し、30°C、120 rpm

の条件で O.D₆₀₀=2-6 に至るまで振とう培養した。培養後 1500 xg、4°C、5 min の条件で集菌し、20 mL BMMH 液体培地(Buffered Minimal Methanol Medium)に再懸濁後同条件で遠心分離によって集菌するという操作を 2 回行って菌体洗浄を行った。この操作は、炭素源としてのグリセロールが残っていると、メタノールによる発現誘導が厳密に行われなくなるために行っている。洗浄した菌体を O.D₆₀₀=0.7-0.9 となるように BMMH 液体培地に懸濁し、200 mL サカグチフラスコに入れて 30°C、120 rpm の条件で振とう培養した。24 hrs 毎に培養液量の 1/200 量の 100% メタノールを添加した。培養は 4 日間行い、一日毎に 1 mL ずつサンプリングを行い、破碎菌体抽出液、沈殿、および培地を SDS-PAGE に供し、目的タンパク質の発現を確認した。回収した菌体は 1.5 mL マイクロチューブに入れ、1500 xg、4°C、5 min の条件で集菌した。上清培地は別のマイクロチューブに分取した。菌体は 200 µL 50 mM Mops (pH7.4) 10% グリセロール 0.1 mM DTT、PMSF に懸濁し、適量の Glass beads、acid washed (Sigma : G8772)を添加して振とう破碎機 DISRUPTOR GENIE™ (Scientific Industries)を用いて 10 min 破碎を行った。処理後 15000 xg、4°C、20 min の条件で遠心し、上清を可溶性画分として分取した。沈殿は、適量の同緩衝液に再懸濁し、膜画分した。以上の培地画分、可溶性画分、膜画分を SDS-PAGE に供し、発現の有無を確認した。また溶液画分(可溶性画分、培地画分)については、CO 差スペクトルの測定も行った。

MGYH liquid medium for *P. pastoris* culture.

Yeast Nitrogen Base (Difco : 291940)	13.4 g
Glycerol	10 g
Biotin	0.4 mg
Histidine (Nacalai tesque : 181-165G)	4 mg
D.W.	1000 mL

BMMH liquid medium for *P. pastoris* culture.

100 mM Postassium phosphate (pH6)	
Yeast Nitrogen Base	13.4 g
Biotin	0.4 mg
Histidine	4 mg
Methanol	10 mL
D.W.	1000 mL

4-2 結果及び考察

KM71H 株に発現ベクター pPICZA α -AOPE、pPICZB-AOPE ベクターをエレクトロポレーション法によってトランスフォーメーションを行った。出現したコロニーをコロニーPCR に供したところ、目的遺伝子に相当するサイズのバンド増幅を確認し、AOPE 遺伝子の導入を確認できたため、定法に従い発現検討を行った。*Pichia* 発現系においては、培地中にも分泌発現されることがあったため、培地成分および菌体破碎抽出液を SDS-PAGE に供したが、目的タンパク質の発現を見出すことができなかった。

Pichia 発現系においては、コロニー間に発現量の差が生じることがあることがあることを考慮し、出現したコロニー全てについて発現検討を行ったが、いずれのベクターを用いたコロニーにおいても発現を確認することはできなかった。

真核生物である酵母 *P. pastoris*、*S. cerevisiae* を用いた発現系は、特に翻訳後修飾が必要であるとされるタンパク質の発現においてよく用いられる。実際にマンガンペルオキシダーゼなど、カビ由来の酵素の発現例は多い[99]。しかし CPO は、糖鎖修飾をはじめ、多くの翻訳後修飾が必要であると考えられ、*P. pastoris*、*S. cerevisiae* の発現系の構築例はいくつか報告されているが、成功例はない。同じくヘム-チオレート酵素である P450 の発現は可能であるため、ヘム-チオレート含有型のペルオキシダーゼの発現に対しては何らかの障壁があるのかもしれない。

第五節 *A. oryzae* AOPE 過剰発現株の作製

カビ *C. fumago* 由来の CPO は、大腸菌、酵母発現系において大量発現が試みられたが失敗に終わっており、同じくカビ *A. niger* 発現系において細胞外分泌発現により成功例が報告されている[100]。真核生物である酵母では、タンパク質の翻訳後修飾が起こることが期待されたが、活性型 CPO の発現は得られておらず、やはり近縁であるカビにおいてのみ起こる修飾が必須であることが予想される。AOPE の発現も酵母発現系では達成できなかつたため、本来の宿主である *A. oryzae* の AOPE 過剰発現株を作成することを目指した。

5-1 方法

発現ベクターの構築

使用した株及びプラスミドを Table.5-1 に示す。全てのベクターは *A. fumigatus* の β -Amylase のプロモータである P-glaA142、T-agdA を転写制御因子として含み、培地に含まれる Dextrin によって強力に転写が促進される[101]。pPTR I、II は *Aspergillus* 属形質転換用のベクターであり、選択マーカとして *A. oryzae* の Pyriithiamine 耐性遺伝子 *ptrA* (Pyriithiamine : Sigma : P0256 : thiamine の代謝拮抗性アナログ) を含む。pNGA142 は、同化型亜硝酸還元酵素 *niaD* 遺伝子を含む。*A. oryzae* Δ niaD300 株は、酒類総合研究所より供与された。本株は同化型亜硝酸還元酵素を持たないため、*A. oryzae* 最小培地である CD 培地で生育することができない。pNGA142 ベクターで形質転換し、外部的に *nia D* 遺伝子を補うことで生育可能となり、選択マーカとして利用できる[102]。

pT7blue-AOPE プラスミドより、新規に設計したクローニングプライマーを用いてインサートを調製した(Table.5-2)。Forward には、*Hind* III サイト、Reverse には *Nde* I (Roche : 11040219) の各制限酵素サイトが導入してある。また、Reverse には目的配列末端に 6His tag を導入してあり、発現時に精製を容易にすると同時に、元の宿主で発現していると予想される AOPE と区別することを目的としている。PCR によって調製した AOPE 断片及びベクターを *Hind* III、*Nde* I で処理し、ライゲーションを行い、発現ベクターを構築した(Fig.5-1)。

Table.5-1 形質転換に使用した *A. oryzae* 株及びベクター

Hosts	Vectors	Character
<i>A. oryzae</i> RIB40 (WT)	pPTR I	Pyriithiamine resistant, inserted by anti-homologous recombination
	pPTR II	Pyriithiamine resistant, preserved as the plasmid in the cell
<i>A. oryzae</i> Δ niaD400	pNGA142	Including Assimilatory Nitrate reductase gene

Table.5-2 *A. oryzae*の発現ベクター構築に用いたプライマー

AOPE-S for <i>A. oryzae</i>	AAGCTTCCACCATGAAATCCATAATTTGG
AOPE-AS for <i>A. oryzae</i> 6His	ACATATGCTAATGATGATGATGATGATGAAA CGGCCACGCATAATG

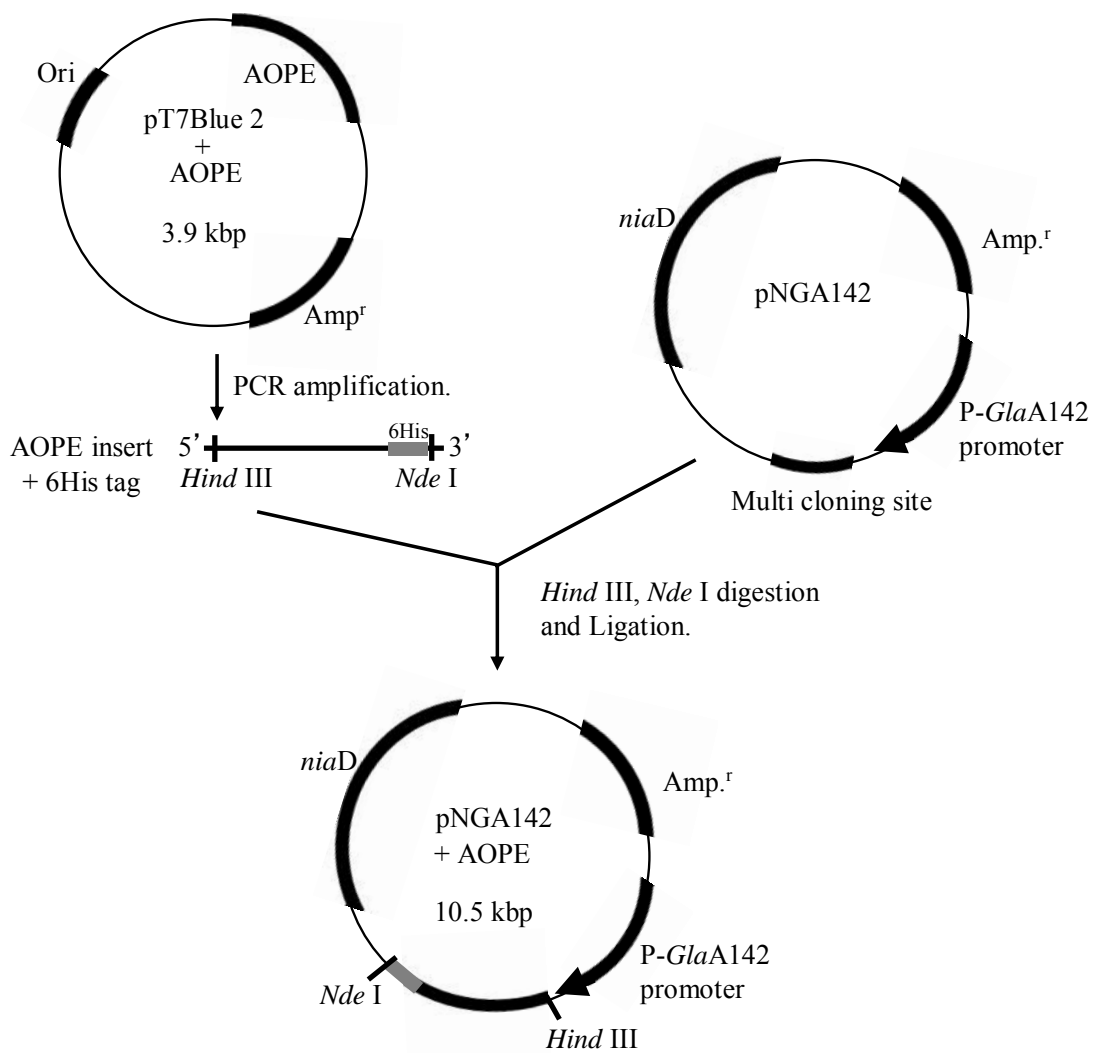


Fig. 5-1 *A. oryzae* 過剰発現株作製用ベクターの構築

プロトプラストの作成、形質転換

今回の実験では、プロトプラスト法による目的遺伝子導入を行った。500 mL 羽付フラスコに入れた 100 mL DPY 培地に、白金耳を用いて植菌し、30°C、120 rpm の条件で約 24hrs 振とう培養した。滅菌した Millacroth を用いて生育した菌体を回収し、滅菌水で洗浄した。適量の菌体を、50 mL ファルコンチューブにいれ、10 mL の Sol I を添加して 30°C、3 hrs、50 rpm の条件で振とうした(Table.5-3)。処理液を Millacroth で濾過することで残渣を除去し、通過液を分取した。等量の Sol. II をゆっくり混合し 750 xg、4°C、8 min の条件で遠心分離した。このとき、Brake off の設定とした。沈殿を Sol II に、懸濁・遠心分離する操作を二回行うことで洗浄を行い、最終的に 2.5×10^8 個/mL となるように Sol. II に懸濁し、プロトプラスト懸濁液とした。プロトプラスト数の計数には、トーマ血球計算盤 (サンリード硝子有限会社 : A106) を用いた。

15 mL ファルコンチューブに入れた 200 μ L プロトプラスト懸濁液に 5-10 μ g/10 μ L プラスミド溶液を添加し、30 min 氷上静置した。250、250、850 μ L と段階的に Sol III を添加していき、やさしく混合し、20 min 室温静置した。10 mL Sol. II を添加し、750 xg、4°C、8 min の条件で遠心分離した。沈殿を 500 μ L Sol. II に懸濁した。全量を予め 15 mL ファルコンチューブに分注し、50°C で保温しておいた 5 mL Top Agar (CD 培地+ 1.2 M ソルビトール、0.8% Agar) にプロトプラスト懸濁液全てを混合し、下層培地(CD 培地+ 1.2 M ソルビトール、1.5% Agar) に重層した。pPTR ベクターを使用する場合は、この培地に 10 μ L の pyrithiamine を添加した。十分に固化させた後、30°C で静置培養した。コロニー形成後、同じ選択培地に 3 回植えつぎ、形質を安定させた。

Table.5-3 *A. oryzae* の形質転換に用いた試薬

Sol. I	Sol. II
1% Yatalase (TaKaRa : T017)	1.2 M Sorbitol
0.6 M (NH ₄) ₂ SO ₄ (Wako : 019-03435)	50 mM CaCl ₂ (Wako : 038-07385)
50 mM Maleate buffer (pH5.5)	35 mM NaCl (Wako : 191-01665)
	10 mM Tris-HCl (pH7.5)
<hr/>	
Sol. III	
60% PEG4000 (Wako : 162-09115)	
50 mM CaCl ₂	
10 mM Tris-HCl (pH7.5)	

mRNA レベルでの発現の確認

選択培地において選択されたコロニーについて、前述の方法に従って mRNA を調整、AOPE 特異的プライマーを用いた RT-PCR を行うことによって mRNA レベルでの発現の確認を行った。AOPE 特異的プライマーの C 末端には 6His tag をコードする塩基配列が含まれており、*A. oryzae* 本来が本来持つ AOPE とは区別される。コントロールとして形質転換を行っていない株由来の Total RNA を鋳型とした RT-PCR も行った。

5-2 結果及び考察

pPTR I、II ベクターを用いて形質転換を行ったが、pyrithiamine 含有 CD plate 培地上で選択することができなかった。手技に問題があった可能性は否めないが、pPTR ベクターとは異なる選択ベクターである pNGA142 を用いてリコンビナント AOPE 遺伝子の導入を試みたところ、CD plate 培地上で生育可能な二つのコロニーの選択に成功した。二つのコロニー(#1,2)を分離し、DPY 液体培地にて培養した菌体から Total RNA を抽出し、Table.5-2 のプライマーを用いて RT-PCR を行うことで遺伝子の導入を確認した。結果を Fig.5-2 に示す。AOPE 遺伝子は野生型 *A. oryzae* 中でも恒常的に発現していることを前節で確認しているが、用いたプライマーには 6His tag に相当する配列を含むため、コントロールとして用いた形質転換を行っていない株において増幅は見られていない。この結果より、6His tag を含めた AOPE 遺伝子の導入に成功し、少なくとも mRNA レベルまでの発現は誘導されていることを確認した。また RT-PCR だけであるので定量性はないが、#1,2 株それぞれで同程度の mRNA 発現が起こっていることが判断できた。

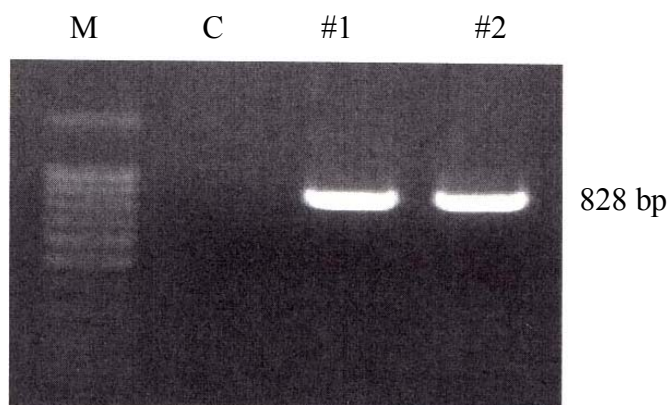


Fig.5-2 RT-PCRによるリコンビナントAOPE遺伝子の発現の確認

M: マーカ C: コントロール #1,2: 過剰発現株

第六節 *A. oryzae* AOPE 過剰発現株の発現培養及び精製

6-1 方法

AOPE の発現培養

AOPE を導入した *Ania D 400 A. oryzae* 株を用いて発現培養を行った。取得した株を CD Agar plate 培地に線引きし、30°C で十分に培養した。5 mL 孢子懸濁液(0.1% Tween80、0.8% NaCl)を用いて培地懸濁液を調製し、滅菌した Millacloth を通過させることで菌糸などの成分を除去した。1500 xg、7 min の条件で遠心し、上清を除去した。5 mL 滅菌水を添加懸濁し、同条件で遠心した。この操作を二回行って孢子を洗浄した。最終的に適量の滅菌水に懸濁し、孢子懸濁液とした。孢子懸濁液をトーマ血球計算盤を用いて計数し、100 mL の DPY 培地に 200000 個の孢子が含まれるように植菌した。30°C、150 rpm の条件で振とう培養を 48 hrs 行い、Millacloth を通過させることで集菌し、使用するまで -20°C で冷凍保存した。

AOPE の精製

(1) Ni²⁺キレートカラムによる精製

冷凍保存してあった培養菌体を自然解凍して乳鉢にいれ、少量の緩衝液(20 mM Mops (pH7.4)、10%グリセロール、0.1 mM PMSF、20 mM イミダゾール (Wako : 102033))及び石英砂 (Wako : 172-00015)を添加し、温度が上がりすぎないように注意しながら、乳棒を用いて十分に破碎した。破碎した菌体を 10000 xg、4°C、20 min の条件で冷却遠心し、上清を分取した。シリンジフィルター Minisart 5、1.2 µm (Sartorius stedim biotech : 17594、17593)を通過させることで不溶成分を除去し、Cell free extract とした。

カラムは、HisTrapTM FF crude 5 mL (GE healthcare : 17-5286-01)を用いた。これは、下部フィルター孔が約 20 µm であるため、不溶成分の多い *A. oryzae* の Cell free extract にも使用しやすいと考えて選択した。同カラムを 10 カラム体積の Buffer A で十分に平衡化した (Table.6-1)。送液には Econopump (Bio-Rad : 700B1210860) または PERISTA PUMP (ATTO : SJ-1211)を使用し、流速は 3 mL/min とした。

Cell free extract を同条件でカラムに供し吸着させた。通過液は別に分取した。サンプルの吸着後、50 mL Buffer A (10 カラム体積)によって洗浄した。洗浄後、カラムを □CTA FPLC 生体分子精製システム (Amersham Biosciences : 7601-51) に装着した。タンパク質の溶出は UV280 nm で検出した。Buffer A で 280 nm の吸収がベースラインに戻るまで洗浄し、さらに 5% Buffer B で洗浄した。吸収がベースラインまで戻った後、Buffer B 5%-100%、20 min の条件でグラジエント溶出した。タンパク質の溶出にしたがって 1.5 mL ずつ分取した。分取したフラクションを SDS-PAGE および CO 差スペクトル測定に供した。

Table.6-1 Ni²⁺キレートリングカラムに用いた緩衝液

Buffer A : Binding buffer
20 mM Mops (pH7.4) 10% Glycerol 20 mM Imidazole.
Buffer B : Elution buffer
20 mM Mops (pH7.4) 10% Glycerol 500 mM Imidazole.

(2)ゲル濾過カラムによる精製

HisTrap カラムで得られた画分を、Amicon Ultra-15 10 k (Millipore : UFC901024)に入れ、3000 xg、4°Cの条件で冷却遠心することで 2 mL にまで濃縮した。カラムは、Hiload™ 16/60 Superdex™200 Prep grade (Amersham Biosciences : 17-1069-01) を用いた。分離前に 3 カラム体積の BufferC (20 mM Mops (pH7.4) 5% グリセロール 0.1 mM DTT) で平衡化した。試料を 2 mL シリンジを用いてカラムに負荷し、同緩衝液で 1.5 mL/min の条件で溶出した。タンパク質の溶出は UV280 nm で検出した。また、溶出体積からタンパク質分子量の算出には GEL FILTRATION MOLECULAR WEIGHT MARKERS (Sigma : MW-GF-1000、Tyroglobulin : 669 kDa、Apoferritin : 443 kDa、Alcohol dehydrogenase : 150 kDa、BSA : 66 kDa、Carbonic Anhydrase 29 kDa) を同条件で分離し、溶出体積に対して log (M.W.) をプロットすることで検量線を作成した。タンパク質の溶出は、ピーク分取、または 1.5 mL のフラクション分けを行った。得られたフラクションは、SDS-PAGE、CO 差スペクトル測定に供した。

(3)粗精製 AOPE のスペクトル挙動の観察

Ni²⁺キレートリングカラム精製後の粗精製試料を用いて、スペクトル挙動の観察を試みた。試料を限外濾過により 20 mM Mops (pH7.4) 10%グリセロールで溶液置換後、適当濃度まで濃縮した。無処理における測定結果を酸化状態、極少量のジチオナイトを添加した状態での測定結果を還元状態、さらに CO ガスを付加させた後の測定結果を CO 付加状態とし、スペクトル挙動を P450 及び既存のハロペルオキシダーゼと比較した。

AOPE 発現量増加のための検討

AOPE の菌体内発現量の増加を目的とした検討を行った。5-Aminolevulinic acid hydrochloride は、ヘムの前駆体となる化合物であり、大腸菌発現系においてヘムタンパク質の発現を行う際に添加している。Hemin chloride (MP Biomedicals. LLC :194025) は、ヘムの供給が、AOPE の発現時の律速となっている可能性を考えて、外部的に 1 mM となるように添加した。CPO でのリフォールディング実験にお

いて外部的な hemin の添加によって、活性型の CPO 回収が可能であることが報告されている[83]。3X DPY 培地は、Dextrin、Polypeptone、Yeast extract の成分のみを通常の三倍の濃度としたものである。今回使用した p-GlaA プロモータは Dextrin によって強力に発現が誘導されるが、その培地成分を増加させることによってより強力に誘導かけ、さらに長期間培養を可能にすることを目的とした。Florisil® 60-100 mesh (Sigma : 22,074-4)は、培地に添加することで、菌体の凝集を防ぐことを目的としている。DPY 培地において *A. oryzae* を培養すると菌糸が絡み合い、球状に生育する。この球状に生育した内部では、菌体が不活性化しており、目的タンパク質の生産量の低下の可能性も考えられた。同じくカビである *C. fumago* (CPO 生産菌)を用いた実験で、微粒子を液体培地に添加することで菌体の分散した形での培養が可能になり、結果として菌体収量および生産酵素である CPO 量も増加したという報告がある [103]。

6-2 結果及び考察

取得したコロニーを DPY 液体培地に植菌し、30°C、48 hrs の条件で培養を行った。同研究室の周の実験結果により、*A. oryzae* のフラボヘモグロビンの過剰発現株は、発現培養により菌体がピンク色になるということが観察されていたが、AOPE 過剰発現株については外見的な変化は特に観察されず、培養時の菌体のフェノタイプにも影響は見られなかった。培養菌体約 200 g を液体窒素を用いて凍結破碎し、Cell free extract を Ni²⁺キレートリングカラムに供した。一般に P450 の大腸菌発現系では、カラムが赤変するほどの発現量が見られるため、AOPE の発現をカラムへの吸着で見極めようとしたが、色の変化は見られず、発現量が非常に少ないことが予測された。試料のカラムへの吸着、洗浄後、イミダゾールのグラジエント溶出を行うと、タンパク質の溶出が見られた(Fig. 6-1)。ピーク分取した後、画分を濃縮し SDS-PAGE、CO 差スペクトル測定(Fig.6-2)に供した。濃縮した時点において、試料はヘムタンパク質に特徴的な赤褐色を呈した。CO 差スペクトルを測定したところ、447 nm に吸収極大を持つピークを確認したことから、ヘム-チオレート含有酵素が示された。さらに SDS-PAGE では、AOPE の予想分子量約 30 kDa に相当するバンドを確認することができ、目的タンパク質 AOPE の発現が達成されたと判断した。しかし約 60 kDa の夾雑タンパク質(以下 AO60k)をはじめとして非特異的に吸着したタンパク質が多く、精製度は十分ではなかった。この原因として、*A. oryzae* は大腸菌と比較して圧倒的に多くの ORF (Open Reading Frame)を持つため、カラムへの非特異的吸着が多くなってしまったためであると考えられる。さらに精製度を高めるため、ゲル濾過カラムに供したところ、複雑な溶出パターンを示した(Fig.6-3)。溶出した I – IV のピークを分取し、それぞれ濃縮、SDS-PAGE に供した(Fig.6-4)。ゲル濾過カラムにおける溶出体積および SDS-PAGE の結果よりピーク IV が目的酵素であると考え

し、精製に成功したが、濃縮しても赤褐色は呈さず、CO 差スペクトルも極めて僅かにしか確認されなかった。この結果は、AOPE がゲル濾過カラムでの精製過程で失活したことを意味する。原因として、分子のサイズで分離するゲル濾過カラムで、タンパク質と補酵素であるヘムが分離されてしまったこと、Ni²⁺カラムからイオン強度が急激に変化したことによる影響、中性 pH に対する安定性が低いなどが考えられた。CPO、AaP といった分泌型ヘム-チオレート含有酵素は、pH2 から pH7 という広い pH 範囲において活性を示すことが知られている。AOPE は、N 末端に分泌シグナルが存在していないことから、細胞内で機能する酵素であると予想しているが、このことが pH を含めた環境の変化に不安定であることに関係している可能性もある。

粗精製試料のスペクトル変化を Fig.6-5 に示す。AOPE は酸化状態において 426 nm にソーレー極大を示した。P450 は、ヘムにリガンドの窒素が配位することで Type II シフトが起こり、425 nm 付近へ吸収が変化する。AOPE の 426 nm 付近の吸収は、Ni²⁺キレートカラムによる精製の際に用いたイミダゾールが配位している可能性も考えられる。前述の通り、CO 付加状態において 446 nm の吸収極大をしめした。P450、ハロペルオキシダーゼと挙動を比較した結果を Table.6-2 に示す。AOPE の挙動は、P450、CPO とは酸化状態の吸収において明確に異なっており、還元状態、CO 付加状態においては、*Coprinus radians* 由来の CrP に類似しているといえた。

本実験により、*A. oryzae* AOPE 過剰発現株において、リコンビナント AOPE の発現を見出すことができ、部分精製を行うことができた。しかし、最大の問題点として 200 g の菌体から、Ni²⁺キレートカラム後の時点で 0.5 mg 未満という低収率であった。AOPE 生産性を高めるため、上記の条件で検討を行った。形質転換を行っていない菌体の Cell free extract においては CO 差スペクトルが観察されないのに対し、AOPE 過剰発現株において弱いながらも CO 差スペクトルを観察することができた。よって CO 差スペクトル及び SDS-PAGE の変化から発現向上条件の検討を行った。結果として SDS-PAGE、CO 差スペクトルいずれにおいても顕著に発現が増加する条件を見出すことはできなかった。Hemin、5-aminolevulinic acid を添加しても変化が見られず、また同じくヘムタンパク質であるフラボヘモグロビンの過剰発現が可能であることから、ヘムの供給が律速となっているわけではないようである。また、培養温度を 30 から 25℃へと変化させたことによる影響も見られなかった。今回の CO 差スペクトルから有効条件の検討を行ったが、*A. oryzae* は、P450、シトクロム c オキシダーゼなど、ソーレー帯に吸収を持つタンパク質が多く存在しているため、検討方法として適切ではなかった可能性が考えられる。Frorisil を培養時に 10 g/L で添加し、さらに植菌する胞子の量をコントロールすることで、再現性のよい培養を行うことができ、菌体を増加させることができた。AOPE の性状研究のため、発現増加を第一命題とし、Real Time PCR など定量的な手法を用いること

で、さらなる発現条件検討を進めている。また、菌体を除いた培養液も同様に Ni^{2+} キレーティングカラムに供したが、吸着は全く見られなかった。

Ni^{2+} キレーティングカラムにおいて AOPE と同時に溶出された約 60 kDa の夾雑タンパク質 AO60k は、数度行った精製において再現よく出現した。*A. oryzae* が本来持つタンパク質ならば、 Ni^{2+} カラムによって濃縮されることはないと考えられるため、AO60k は AOPE と複合体を形成するなど、挙動を共にしている可能性が考えられた。ゲル濾過カラムによって分離した試料を用いて N 末端配列解析に供し、タンパク質の同定を試みた。得られた配列を *A. oryzae* データベースに対して Blast search を行った結果、AO60k は、Chromosome 6 上に存在する AO090038000558 と一致し、UDP-glucose pyrophosphorylase(予想分子量：59174 Da)とアノテーションされていたが、AOPE との関連性を見出すことはできなかった。これが、C 末端に His tag が付加されていることに起因する Artificial な挙動であるか否かも不明である。

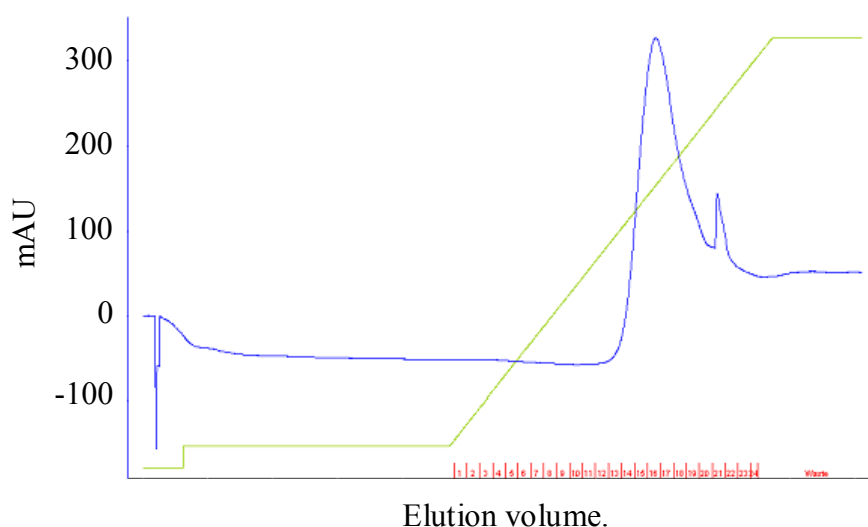


Fig. 6-1 AOPEの Ni^{2+} キレーティングカラムにおける溶出パターン
緑のラインはイミダゾール濃度のグラジエントを示す。

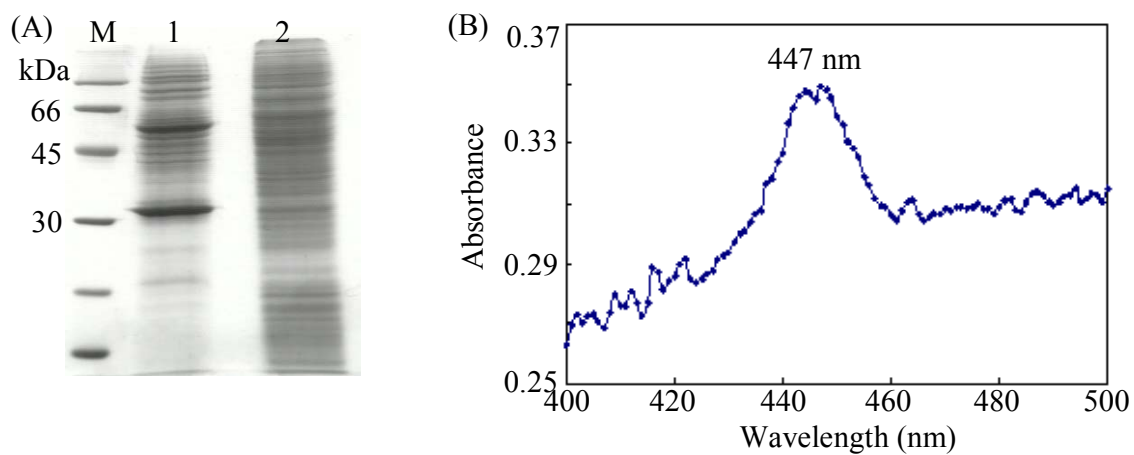


Fig. 6-2 Ni²⁺キレートリングカラム後の粗精製 AOPEの(A)SDS-PAGE、(B)CO差スペクトル

(A) M: マーカ 1: AOPE粗精製画分 2: Cell free extract

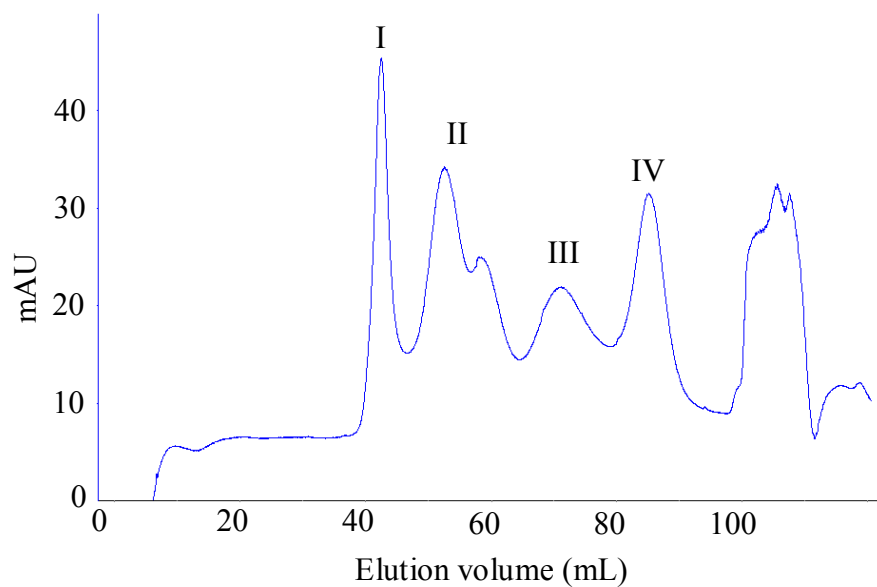


Fig.6-3 ゲル濾過カラムにおけるAOPEの溶出パターン I - IVの溶出をピーク分取した。

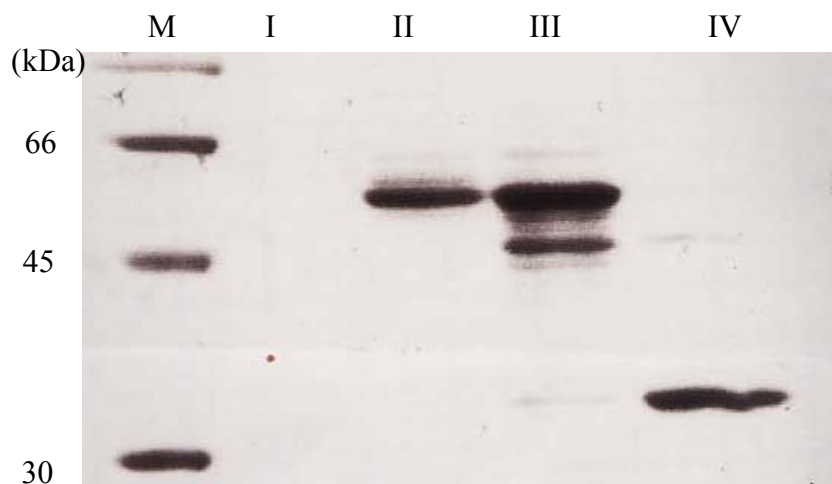


Fig. 6-4 ゲル濾過カラム各ピークのSDS-PAGE
 M : マーカー I-IV : Fig.6-3の対応するピーク

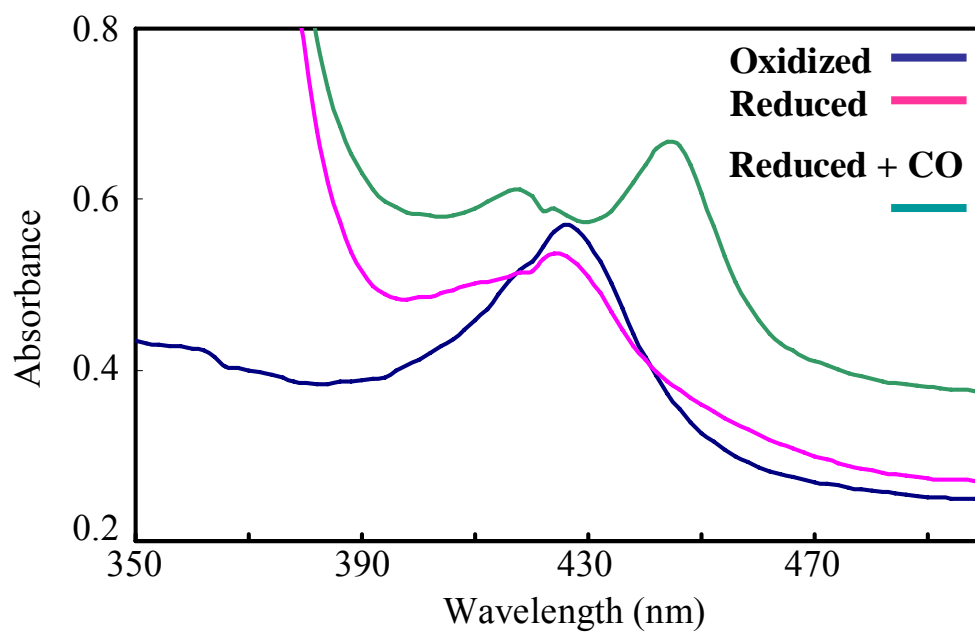


Fig.6-5 粗精製AOPEのスペクトル挙動

**Table.6-2 AOPE及び既存のヘム-チオレート含有酵素の
スペクトル挙動の比較**

	Solet max. (nm)		
	Oxidized	Reduced	Reduced + CO
AOPE	426	424	446
CPO	401	409	443
AaP	420	413	445
CrP	422	426	446
P450foxy	418	412	447

第七節 AOPE の粗精製試料での活性測定

A. oryzae の AOPE 過剰発現株を作製し、Ni²⁺キレートリングカラムによる精製を行い、SDS-PAGE 上で目的分子量 30 kDa に相当するバンドを見出し、CO 差スペクトルにおける 450 nm の吸収も見出した。さらに精製度の向上を目指してゲル濾過カラムに供したが、非常に不安定であり、変性してしまった。よって Ni²⁺キレートリングカラムによって精製を行った粗精製段階においてペルオキシダーゼ活性測定を試みた。

7-1 方法

(a)AOPE の使用可能な電子供与体及び触媒反応の検討

Ni²⁺キレートリングカラムによって精製を行い、SDS-PAGE 上でバンドが確認できるようになった段階の粗精製試料を用いて活性測定を行った(Fig.6-2)。活性測定は、ペルオキシダーゼ反応による基質の吸光の変化によって行った。ペルオキシダーゼ活性測定、ハロペルオキシダーゼ活性測定における反応液組成はそれぞれ Table.7-1,2 に示す。使用した基質は Table.7-3, Fig.7-1 に示す。使用した基質は CPO、AaP (*Agrocybe aegerita* peroxidase)の実験において使用されていたものを用いている。全て芳香族性の化合物であるのは、CPO、AaP がリグニンの成分である難分解性芳香族化合物の分解に寄与していると予想されているためである。ハロゲン付加反応の試験に用いた MCD (2-Chloro-5,5-dimethyl-1,3-cyclohexanedione)は、*C. fumago* が塩素化反応の生来の基質である。

Table.7-1 AOPE peroxidase assay 反応液組成

Components	Vol. (μL)	Final conc.
100 mM Potassium phosphate buffer (pH7) or 100 mM Acetate buffer (pH5)	375	
10 mM Substrate	5	100 μM
Sample	20	-
18 mM H ₂ O ₂	100	3.6 mM

Table.7-2 AOPE halogenation assay 反応液組成

Components	Vol. (μL)	Final conc.
100 mM Potassium Citrate (pH2.75) 20 mM KCl	375	-
10 mM Substrate		100 μM
Sample	20	-
10 mM H ₂ O ₂	100	2 mM

Table.7-3 AOPEの活性測定に用いた反応基質及び反応条件

Reaction	Substrate	pH	wave length (nm)
Oxidation	Veratryl alcohol (Wako : 042-21152)	7	310
	Benzyl alcohol (Wako : 027-01276)	7	280
	2,6-Dimethoxyphenol (Wako : 048-24861)	7	569
	ABTS (Sigma : A1888)	5	420
Halogenation	2-Chloro-5,5-dimethyl-1,3-cyclohexanedione (Sigma : M4632)	2.75	278

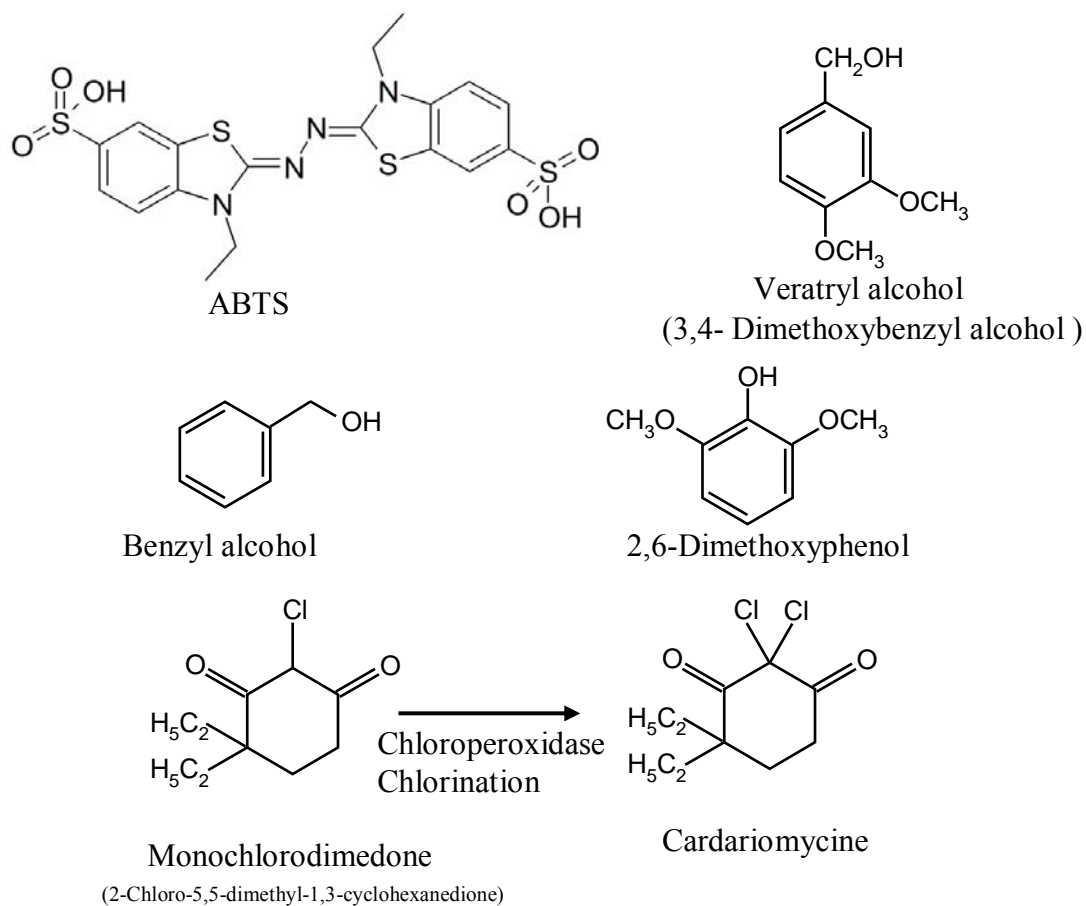


Fig.7-1 AOPE の活性試験に用いた基質の構造

(b)電子供与体として ABTS を用いた AOPE の速度論的パラメータ及び pH 特異性

ABTS はペルオキシダーゼ反応における電子供与体として働き、反応中間体 Compound I に電子を供与することで、濃緑色の 420 nm に特徴的な吸収を持つ ABTS カチオンラジカルを生成する。(a)Table.7-1 に示した反応系において、ABTS 及び過酸化水素濃度を段階的に変化させ、反応回転を算出した。また、反応緩衝液の pH を 2-9 まで変化させ、それぞれの pH における反応回転を算出した。使用した緩衝液は Fig.7-4 に結果と合わせて示した。コントロールとして反応系より酵素液を除いた試料を測定した。

7-2 結果及び考察

Ni²⁺キレートキヤラムによる精製後の粗精製試料を用いて、ペルオキシダーゼ活性測定に供した。正確な酵素量、活性の強度が不明であったため 500 µL の反応系に対し、20 µL の酵素液を用いた。Table.7-3 に示した基質を用いた活性試験の結果を Table.7-4 に示す。今回用いた基質の中では ABTS を用いた場合のみ活性を見出すことができた。Fig. 7-2 に示すように、酵素を含まない control では変化が起こらないのに対し、酵素を添加すると顕著な吸光度の上昇を観察することができた。また、H₂O₂ の代わりに緩衝液を添加した測定では、僅かな吸光度の変化のみ観察されたことから、本反応が H₂O₂ 依存的に進行していることが明らかになった。CO 差スペクトルの測定値から、試料中の AOPE 量を計算し、ABTS のモル吸光係数を基にして一分あたりの反応回転数を計算した。AOPE の pH5 条件下での ABTS に対する Turnover は 96.4 min⁻¹であった。一般にペルオキシダーゼ反応は反応回転が極めて速いことが特徴である。ハロペルオキシダーゼである AaP の同条件下での反応回転は 16000 min⁻¹であり、AOPE の活性はその 100 分の 1 にも満たなかった。

粗精製 AOPE を用い、ABTS、H₂O₂ に対する K_m、V_{max} の算出を試みた(Fig.7-3)。ABTS に対する K_m は、11.2 µM であった。H₂O₂ に対する K_m は、13.3 mM であり、V_{max} は、3500 min⁻¹ まで上昇した。Table.7-5 に、既知のハロペルオキシダーゼ AaP、CrP と AOPE との K_m を比較した結果を示す。ABTS に対しては、ほぼ同レベルの値を示した。一方、H₂O₂ に対する K_m、13.3 mM は、他二種の酵素と比較して 10 倍以上高い値であった。本実験において、AOPE の反応回転が低いことが示されているが、その原因として H₂O₂ 濃度が不十分であったためであると考えられた。一般的なペルオキシダーゼは、生体内に発生した有害な H₂O₂ のスカベンジャーとして機能するのに対し、AOPE の H₂O₂ に対する K_m は有意に高いと考えられ、一般的なペルオキシダーゼと異なる生理機能を持つことが予想される。

Fig.7-4 に AOPE の ABTS に対するペルオキシダーゼ反応の pH 特異性の検討を行った結果を示す。pH6 において最も高い活性を示し、pH4 までの酸性領域において

ほぼ同程度の活性を維持した。逆に pH7 以上の中性、アルカリ性領域では急激に活性が低下した。この挙動は AaP、CrP と一致している。ハロペルオキシダーゼは、ペルオキシゲナーゼ反応の基質により至適 pH が異なる傾向があるようであるため、AOPE の生理的 pH は必ずしも pH6 付近ではない可能性も考えられる。

CPO、AaP は菌体外酵素であり、リグニンに類する芳香族化合物に対して反応性を示すのに対し、AOPE はおそらく菌体内で機能しているため、芳香族化合物に対して反応性を示さないことは理論上正しいといえる。AOPE の基質となる物質は *A. oryzae* 菌体内に存在すると考えられ、同じペルオキシダーゼ活性を検出することができたものの、AOPE の生理的な機能、目的は CPO、AaP とは異なることを示唆する結果を得られたと考えられる。今回の活性測定において低い活性しか得られなかった理由として、以下が考えられる。まず、前節で検討したように、AOPE はかなり安定性が低い酵素である可能性がある。次に反応条件が適切でなかったことが考えられる。菌体内で機能にしている酵素であれば、外部的な pH の変化に sensitive であるのかもしれない。さらに基質に関して、上述のように芳香族性化合物は AOPE の本来の基質でないと考えられる。

序論で述べたように、CPO では第五配位子 Cys は電子を押し出す機能を担っていないことが変異体実験により明らかになっており、その代わり遠位側の Glu183 が活性に寄与すると考えられている。AOPE ではアライメントからは Glu183 に相当する残基が保存されておらず、CPO 型のヘム結合モチーフをもちながら、Cys が電子を押し出す機能をもつ、P450 型の機構を持つ可能性も考えられる。また、一般的なペルオキシダーゼにおけるように His105 が触媒残基となることも考えられるだろう。

ABTS を基質として、Cell free extract を用いて活性測定も行っているが、形質転換の有無に関わらず活性は検出されなかった。本研究の特徴として、ゲノムに対して Blast search を行い、クローニング対象を選定したという点がある。一般的には Cell free extract における活性を検出し、活性を指標に野生型の酵素を精製するという流れをとることが多い。しかし、AOPE は Cell free extract では活性が検出されないため、活性を指標とした方法ではおそらく見出すことはできなかったと思われる。

AOPE の性状解明研究を進めるにあたり、発現量増加検討に加え、活性測定に用いることができる適切な基質を見極める必要もある。MCD に対するハロゲン付加反応は見出されていないが、こちらも反応条件、基質の検討を行う必要がある。

本実験において、CPO に類似した構造を持つ菌体内酵素 AOPE が同様にペルオキシダーゼ反応を持つことが確認された。特にヘム-チオレート含有酵素が菌体内でペルオキシダーゼ活性を示すことは、本研究において初めて見出すことに成功した。今後、AOPE の反応性に関する研究も発現量増加検討と平行して進行させる予定である。

Table.7-4 AOPEの反応性試験結果

Reaction	Substrate	Reactivity (turnover min ⁻¹)
Oxidation	Veratryl alcohol	n.d.
	Benzyl alcohol	n.d.
	2,6-Dimethoxyphenol	n.d.
	ABTS	96.4
Halogenation	MCD	n.d.

n.d. : not detected.

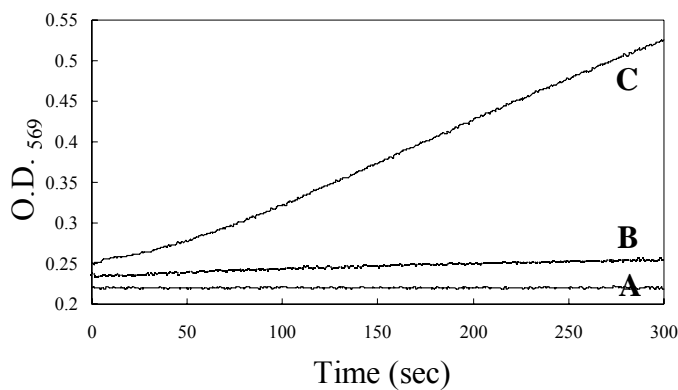


Fig.7-2 AOPE によるABTSの反応に伴う吸光度の変化

A : Control (酵素含まない) B : - H₂O₂ C : + H₂O₂

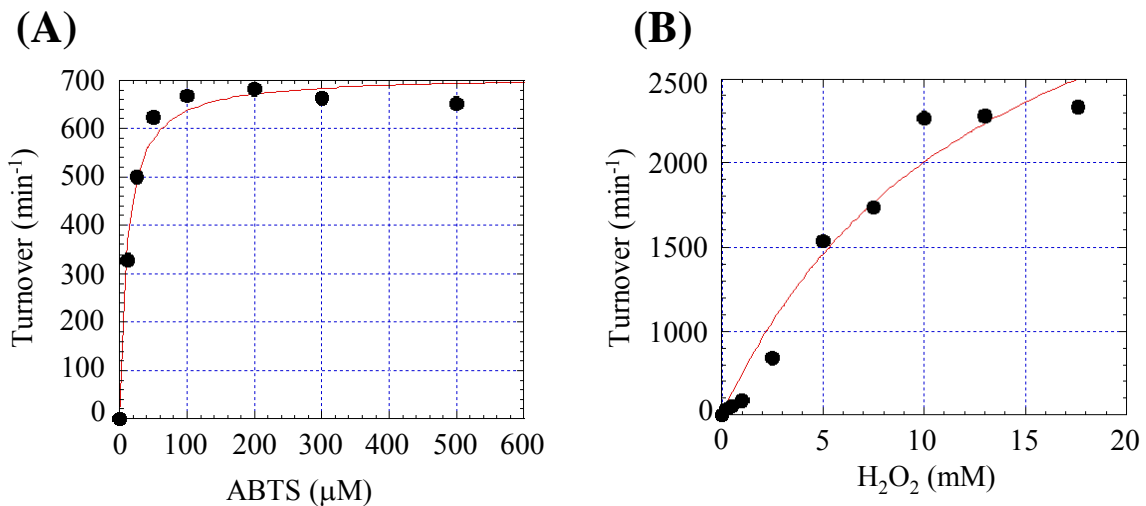


Fig.7-3 AOPEのABTS及びH₂O₂に対する速度論的パラメータの測定

(A) ABTSに対する K_m 測定 (B) H₂O₂に対する K_m 測定

$$K_m(\text{ABTS}) = 11.2 \pm 2.0 \mu\text{M} \quad V_{\max} = 3500 \pm 800 \text{ min}^{-1}$$

$$K_m(\text{H}_2\text{O}_2) = 13.3 \pm 5.3 \text{ mM}$$

Table.7-5 AOPEと既知のハロペルオキシダーゼの K_m の比較

	AOPE	AaP	CrP
K_m (ABTS) (μ M)	11.2	37	49
K_m (H_2O_2) (mM)	13.3	1.3	1.2

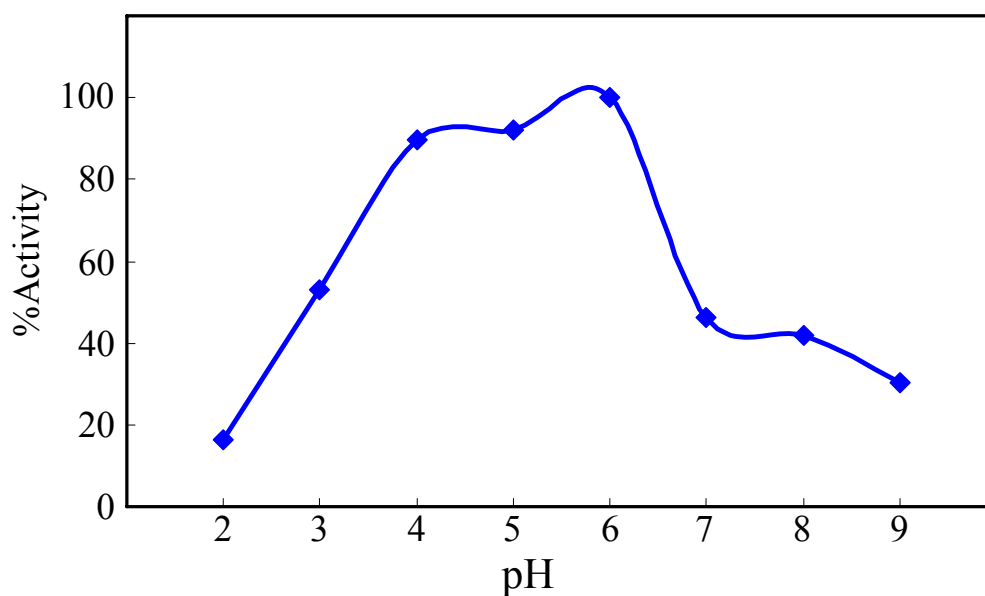


Fig.7-4 AOPEのABTSペルオキシダーゼ活性のpH特異性

pH2-3, Glycine-HCl ; pH4-5, Acetate-KOH ; pH6, Maleate -KOH ;
pH7, KPB ; pH8-9, Tris HCl

第八節 *A. oryzae* 融合型 P450s (CYP505A3、A13)の大腸菌発現系の構築

前節の発現条件検討において発現を見出すことができた CYP505A3、A13 について、発現・性状解明することを目的とした。また、比較のため、*F. oxysporum* 由来の融合型 P450foxy (pCWfoxy)、当研究室の猪狩が構築した放線菌 *Streptomyces avermitilis* 由来の融合 P450、CYP102D1(Fig.8-1)[104]も発現し、用いることとした (pET17b-CYP102D1)。

8-1 方法

発現系構築

融合型 P450 は、発現が困難であることが予想されたため、全長酵素および P450 ドメインのみの二種類のコンストラクトを作製することとした。前節で構築した pT7blue-CYP505A3、pT7blue-CYP505A13 および CYP102D1 発現ベクター (pET17b-CYP102D1)を鋳型とした。前述のプライマー及び、P450 ドメイン末端に設計し、4His tag を導入したプライマーを用い(Table.8-1)、PrimeSTAR[®] HS DNA Polymerase (TaKaRa : R010A)によって DNA 断片を増幅した。構築スキームは Fig. 3-1 と同様に操作した。

Table.8-1 各酵素のP450ドメインのクローニングプライマー

CYP102D1 P450 5' <i>Nde</i> I	GAGATAATACATATGACCACAACAGCCCGAGAC
CYP102D1 P450 3' <i>Spe</i> I 4His	TGTGACTAGTTCAGTGGTGGCCGAACACGGTCC GCTCGTGCTCCTGA
CYP505A3 P450 3' <i>Spe</i> I 4His	AGGACTAGTTTAATGATGATGATGAGCGCTCAAT GCTGATCCTAGGTGC
CYP505A13 3' <i>Spe</i> I 4His	ACCGCTCGAGCTAATGATGATGATGGCCACCGCT TCAAGACGCTCGC

PCR mix. for PrimeSTAR.	(μ L)	PCR cycles	
Distilled water	32.5	96°C	2 min
5 X Reaction Buffer	10	96°C	10 sec
2.5 mM dNTP	4	55°C	5 sec
DNA template	1	72°C	2 min
Primers (10 μ M)	1 each		} 30 cycles
Enzyme	0.5	72°C	

増幅した各 DNA 断片及び pET17-b ベクターを、各プライマーに導入した制限酵素で処理し、電気泳動で分離・切り出しすることで精製した。断片と切断したベクターをライゲーションし、大腸菌 DH5 α 株にトランスフォーメーションした。出現したコロニーについて、各特異的プライマーを用いてコロニーPCR を行い、ポジティブコロニーを選択した。プラスミドを調製して配列を確認した。プラスミドを発現宿主として大腸菌 C43(DE3) (Lucigen : 60446-1)にリトランスフォーメーションした。各株を 3 mL LB 培地(100 μ g/mL Amp.)に植菌し、37 $^{\circ}$ C、150 rpm、10 hrs 振とう培養し、培養液に 8%の濃度となるようにグリセロールを添加し、液体窒素で凍結させ、グリセロールストックとして-80 $^{\circ}$ C保存した。P450foxy の発現系の構築については別項にて記載する。

発現培養

グリセロールストックより、3 mL LB 培地(100 μ g/mL Amp.)に植菌し、37 $^{\circ}$ C、150 rpm で 12hrs 前培養した。500 mL 容羽付フラスコに入れた 200 mL TB 培地に 1%植菌し、37 $^{\circ}$ C、150 rpm で O.D.₆₀₀=0.6-0.7 に至るまで培養した。最終濃度 0.5 mM となるように 0.1 M IPTG、5-aminolevulinic acid hydrochloride を添加して発現を誘導した。引き続き 25 $^{\circ}$ C、150 rpm、24 hrs 培養後を行い、3000 xg、4 $^{\circ}$ Cの条件で遠心分離して集菌した。菌体は使用するまで-20 $^{\circ}$ Cで冷凍保存した。

発現確認・精製

取得した菌体を自然解凍し、適当量の Buffer A に懸濁した。前述の方法で cell free extract を調製し、SDS-PAGE 及び CO 差スペクトルの測定を行った。

発現が確認されたものについては、引き続き精製に供した。前述の方法に従って Ni²⁺キレートカラムに供し、ピークを分取した。Amicon Ultra を用いて試料を 2 mL まで濃縮し、ゲル濾過カラムに供した。精製した試料は、透析用セルロースチューブ 24/32 (三光純薬 : UC24-32-100)にいれ、20 mM Mops (pH7.4) 10% グリセロールに対して透析した。透析液は、基本的に試料体積の 100 倍量とし、2 hrs 後に液を交換し、その後 12 hrs 以上 4 $^{\circ}$ Cで静置した。各精製段階におけるタンパク質量定量は、BCATM Protein assay Kit (PIERCE : #23227)をマニュアルに従って使用した。

精製試料のスペクトル測定及び脂肪酸、阻害剤添加によるスペクトル変化

精製した試料を、前述の方法でスペクトル測定に供した。全ての測定には石英セル(光路長 : 1 cm)を用いており、測定条件は 25 $^{\circ}$ Cで行った。CO 差スペクトルから、P450 量を算出し、3-4 μ M となるように希釈した。各 500 μ L の試料をセルに入れ、基質と予想される脂肪酸 Tridecanoic acid (Sigma: T0502)および P450 の一般的な阻害剤として知られる 4-フェニルイミダゾール (Wako : 161-12711)の Dimethyl Sulfoxide

(DMSO : Wako :043-07216)溶液を用いて 0.5 μ L ずつ滴定し、それに伴うスペクトル変化を測定した。対照として 20 mM Mops(pH7.4) 10% グリセロールを用いた。

MTTQPETDLRPIRSPRGVPLFGHTPQIPSTNPVEYFGKLSKQFPEGLYGMEIAGIEQVFVWDPDLVAEVC
DETRFFKQIDKTPLAHVRDYAGAGLFTAHQHEEWEWMAHRVLLPVFSQRAMKGYFGQMLEIAQNLVGKWE
RKEGQPVNITDDYTRLTLDIALSGFGYRFDSFAKEDLHPFLNALLQALVESLRRSQELPVMTKMRKADD
KKYRENIRLMRDLVENVIKERREGKGTGEDDLLGLMLEATDPETGKGLDDDNVRDQVVTFIAGHETTSG
LLSFATYSLMRNPHILAQAYAEVDRLLPGDTPDYDTIMQMDVIPRILEETLRLWAPIPMIGKSPLEDTV
IGGCYGLKKGARVNILEGPLHHPKAWERPEEFDINRWLPENRVNHHHPHAYKPFNGVVRACIGRQFALTE
ARLALALVLQKFKFADTDDYKMDVKEALTRKPGGFELNVRARQEHERTVFGAADLQTDDTQAQAAVSGVG
VNLTVAYGSSLGSCEDLARTADRGERSGFGTTLVGLDELGDNLPT EGLLVVVASSYNGKAPDNAQRFD
LLAAGLPEGSLSNVRFALLGAGNTQWVATYQGFPKRIEAGLLAAGATRVERGIDAAGDFDGMATRWMD
TLWTTLAEYYAADTSETTGPRFEVQLLTEAEVRPAIVSEQAYPLTVVANEELVSDATGLWDFSIEPPRPA
AKSITIELPDGVTYDTGNHLAVFAKNPVLVNRALARLGVDRDQVLRDQPGGGRTHLPVGTPTTGLLF
TEFVELQDVATRSQIQELAEHTQCPWTRPQLQAYTADTAEAEERYQKEILGKRVSVLNLLERFPAVELPL
AVFLEMMGPIRPRFYSISSPLANPRHVRLTVGLLEGPALSGDGRYRGTCSYIAGLESGDVFGYGYVRVP
SPTFAPPADPATPLLLIGPGTGIAPLRGFLEERAHQHAHGTQVGLSQVFGCRHPEHDYFYRQEMQDWEQ
AGIAQVHTAFSAVTGHPARFVQDAIVGAADTVWQAIQDGAYVYVCGDGRRMAPAVREALAAIYRKHTGSD
DEAAQQWLAQLEADERYQQDVFA

Fig.8-1 CYP102D1 のアミノ酸配列

(SAV575 cyp2 putative cytochrome P450 / NADPH-ferrihemoprotein reductase)

P450ドメインを下線で示した。以降は還元酵素ドメインを示す。

8-2 結果及び考察

本実験において、CYP505A3、CYP505A13、CYP102D1 それぞれの全長及び P450 ドメインに C 末端に 4His tag を pET17-b ベクターに導入した発現ベクターを構築し、大腸菌株にトランスフォーメーションした。さらに別節で構築した P450foxy の P450 ドメインの発現系も比較のため用いた。結果として、CYP505A3、CYP102D1、P450foxy それぞれの P450 ドメインのみ適切にフォールディングされた形で可溶化発現させることができた。CYP505A3、CYP102D1、P450foxy の全長発現系は、可溶性画分に発現が見られたが CO 差スペクトルを観察することができず、適切にフォールディングされていないことが予想された。*Bacillus* 属のバクテリアに見出された数種の CYP102 は、同じく C 末端に 4His tag を導入し pET ベクターを用いた発現が可能であった[21, 22]。P450foxy は、pCWori+ベクターを用いた全長発現系の構築が可能であるが、発現時の局在が異なることからカビ体内においては翻訳後修飾が起こっていることが予想されている。CYP505A3、A13 も *A. oryzae* 菌体内において酵素として成熟するために何らかの修飾が必要であることが原因で、大腸菌内発現ができない可能性も考えられる。P450foxy とバクテリア由来の P450BM3 は全長においてアミノ酸相同性が 30%を超えているが、やはり真核生物、原核生物間において酵素発現段階において差が見られるようであった。CYP102D1 全長の発現系は前任者の猪狩が構築しているが、同じグリセロールストックを用いても適切にフォールディングさせることができず、発現が不安定であった。また発現系に用いた大腸菌株間における差異は見られなかったため、菌体量が多く、成長の速い C43(DE3)を用いることとした。発現可能であった CYP505A3、CYP102D1 の P450 ドメイン発現大腸菌を大量培養し、Ni²⁺キレートカラムによる精製を行った。一段階で SDS-PAGE 上で単一バンドにまで精製することができた(Fig.8-2)。本試料を用いてスペクトル測定に供した。200 mL TB 培地を用いた培養で十分な試料を調製することができた。

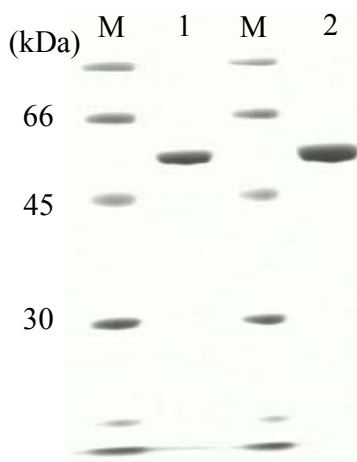


Fig.8-2 CYP102D1、CYP505A3各P450ドメインのNi²⁺カラム精製後のSDS-PAGE

M : マーカ 1 : CYP102D1 P450ドメイン 2 : CYP505A3 P450ドメイン

P450foxy、CYP505A3、CYP102D1 の P450 ドメインのスペクトル変化を Fig.8-3 に示す。P450foxy、CYP505A3 は、CO 差スペクトルにおいて 450 nm 付近に吸収極大を持つ典型的な P450 のスペクトルを示した。CYP102D1 についても同様に 450 nm 付近に吸収極大が見られたが、変性したタンパク質に由来する 420 nm 付近の吸収が顕著に観察された。前任者の猪狩が全長酵素のスペクトルを測定した際にも同様な変性が見られた。還元酵素 C 末端に 4His tag が付加したことにより、酵素全体のフォールディングが緩くなってしまっていると考察しているが、P450 ドメインのみの場合でも同様な現象が見られたことから、CYP102D1 は本質的に不安定であり、P420 となりやすいことが示唆された。P450foxy の反応基質である脂肪酸 Tridecanoic acid (C13)を各 P450 ドメインに添加した際スペクトル変化を Fig.8-4 に示す。P450foxy P450 ドメインに C13 を添加すると、全長酵素と同様な典型的な基質結合に伴う Type I スペクトル変化を示す(420 nm → 390 nm 付近の吸収増大)。P450foxy に対する C13 の結合定数 $K_d=2.6 \mu\text{M}$ であった。それに対し CYP505A3、CYP102D1 は 500 μM という濃度を添加してもスペクトル変化はほとんど観察されなかった。P450 において、Type I シフトの有無は反応性の有無に必ずしも一致しないことが報告されているが、CYP505A3、CYP102D1 は少なくとも P450foxy の基質となる脂肪酸とは結合しにくく、反応性がない可能性を示唆する。前任者の猪狩が全長 CYP102D1 を用いた飽和脂肪酸水酸化活性試験を行っているが、活性は見出されず、今回の結果と一致する。また、Fig.1-9、Table.1-4 に示す P450 ドメインのアライメントによると、*A. oryzae* に見出された融合型 P450 はいずれも活性部位入口の塩基性アミノ酸が保存されていない。前述の通り、このアミノ酸が脂肪酸のカルボキシル基と静電的に相互作用することで、活性部位内部への侵入につながるものが P450BM3 の脂肪酸複合体結晶構造から推測されている。バクテリアに見出されている融合型 P450 は炭素鎖、位置特異性に差異は見られるものの、脂肪酸を認識することが報告されているが[22, 105, 106]、放線菌 *S. avermitilis* 由来の CYP102D1、*A. oryzae* 由来の CYP505A3、13 が脂肪酸に対して反応性を示さない可能性がここまでの結果から示された。各酵素の基質が不明であったため、さらに P450 の阻害剤として用いられる 4-フェニルイミダゾール(以下 4-PI、Fig.8-5)に対する結合能をスペクトル的に解析した。結果を Fig.8-6 に示す。4-PI は分子中の窒素原子がへムに直接配位し、典型的な Type II スペクトル変化(420 nm → 435 nm)を示す。各酵素とも典型的な TypeII スペクトル変化を観察された。P450foxy、CYP102D1 の 4-PI に対する K_d はそれぞれ 240 μM 、217.5 μM とほぼ同程度であったのに対し、CYP505A3 は、5.2 μM という強い親和性を持つことが明らかになった。4-PI はイミダゾールとフェニル基が結合した構造を持つことから、4-PI の K_d の違いは活性部位内部へのかさ高い分子の侵入しやすさを反映していると考えられる。Table.1-4 に活性部位内部に存在するアミノ酸残基の P450foxy に対する置換を示してあるが、CYP505A3 では I88、G80(P450foxy では V83、V75)と

なっており、活性部位内部の構造が変化していることがわかる。また、活性部位入口の残基のうち P450foxy における F52 が、M62 に置換されていることによる侵入しやすさに与える影響も考えられる。アライメントの結果によると、活性部位入口に相当する 40-55 の領域は、保存度があまり高くなくこの事実も基質認識の違いを示唆する。一方、P450foxy における F88 がすべての融合型 P450 において保存されていたことは興味深い点といえた。P450BM3 において、脂肪酸の末端炭素がこの残基と相互作用することで水酸化反応進行を可能にしていると推測されているが (Fig.8-7)、CYP102D1、CYP505A3 の脂肪酸を認識しないことが示唆される酵素においても保存されていた。この結果から、F88 が存在する本来の意味は、脂肪酸認識というより、活性部位内部の環境維持に関わっていると考えることもできる。実際 F88 は、活性部位入口からみて真下に位置しており、F88 が存在することで侵入してきた溶媒を反応が進行するへム上に近づけないための機能を十分に果たすことができると思われる。

今回構築した発現系では、P450 ドメインのみしか可溶化発現することができなかつたため、全長酵素を用いた活性測定を行うことで基質となりうる化合物の検討を行う必要がある。既知の融合型 P450 と異なる挙動を示す酵素を見出すことができたため、融合型 P450 の特長である極めて速い反応回転を維持したまま異なる化合物との反応性を持つことができれば、工業的応用につながるし、活性部位入口・内部のアミノ酸残基の影響に関する知見を得ることもできる。今後、全長酵素の発現系構築を目指すことを目的としたいと考えている。

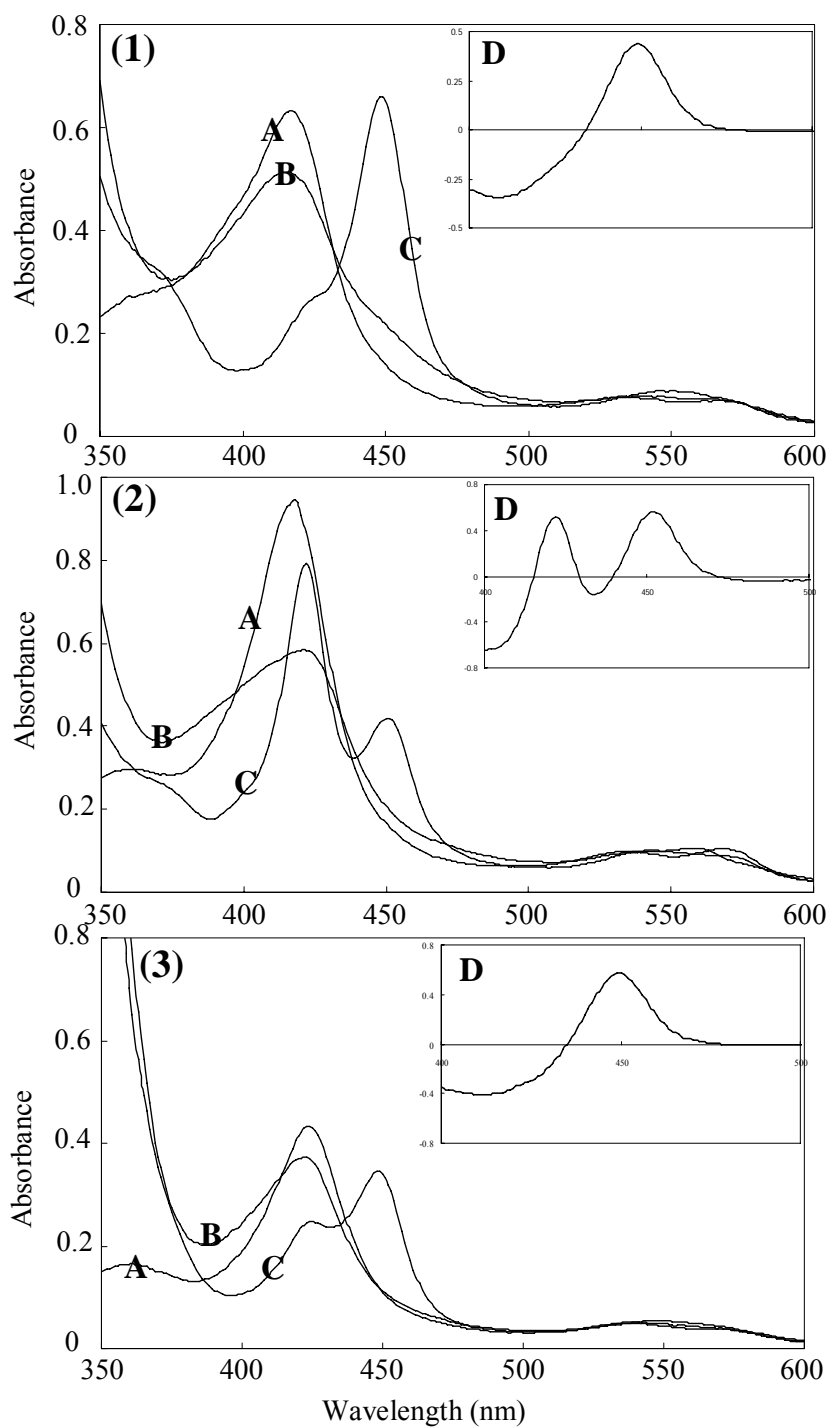


Fig.8-3 融合型P450 P450ドメインのスペクトル変化

(1) : P450foxy (2) : CYP102D1 (3) : CYP505A3

A: 酸化状態 B: ジチオナイト還元状態 C: 還元状態 + CO

D: CO差スペクトル

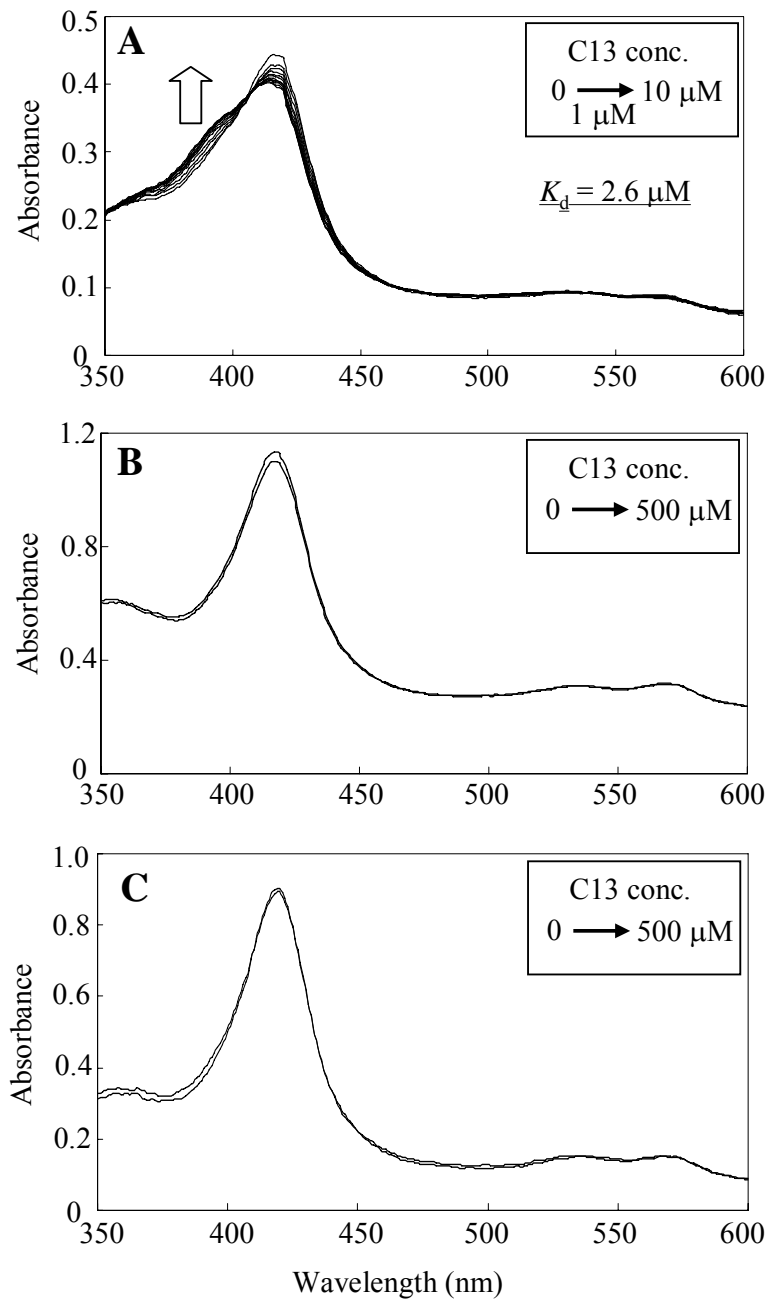


Fig.8-4 トリデカン酸添加によって誘導されるスペクトル変化

A : P450foxy P450ドメイン B: CYP102D1 P450ドメイン

C: CYP505A3 P450ドメイン

AはC13DMSO溶液を用いて1 μMづつ滴定した。

B、CはC13DMSO溶液を用いて250 μMづつ滴定し、0、500 μMの時点のスペクトルを比較した。

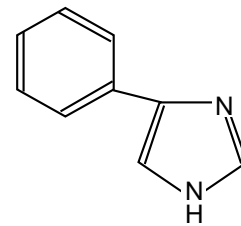
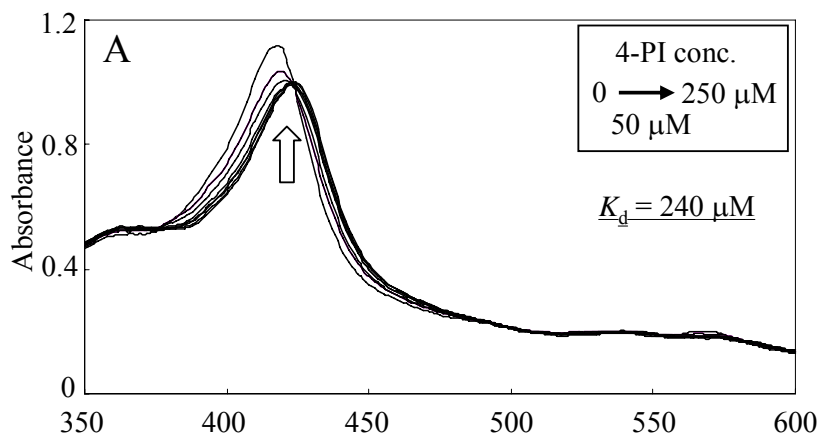


Fig.8-5 4-Phenylimidazolの立体構造

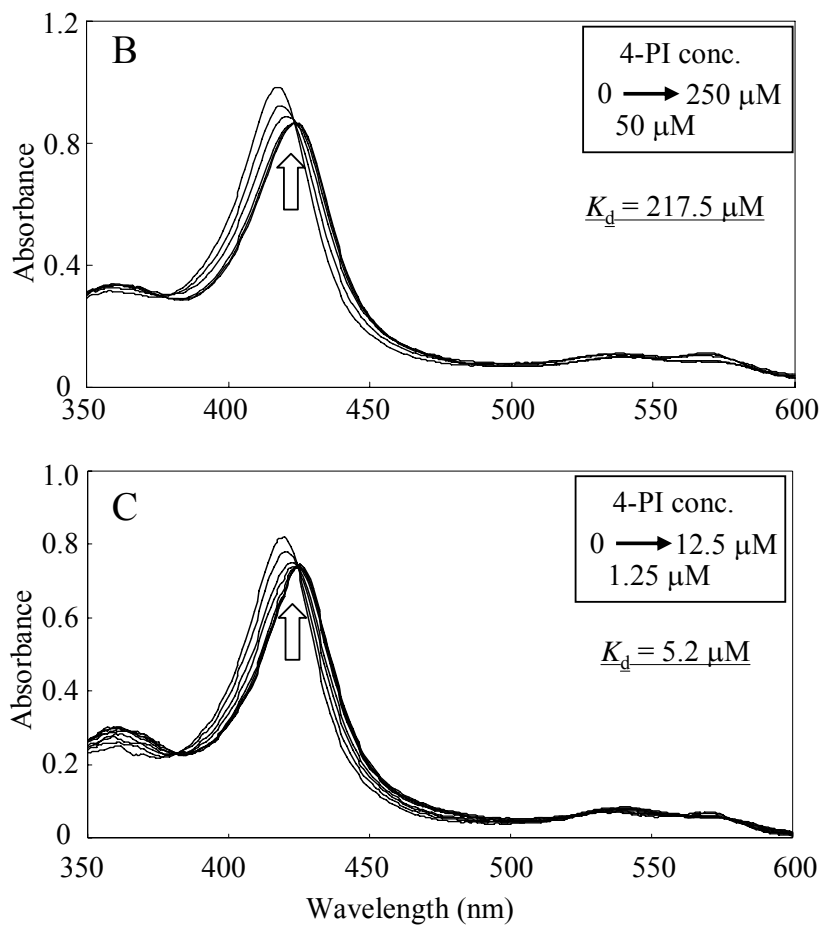


Fig.8-6 4-Phenylimidazolによって誘導されるスペクトル変化

A : P450foxy P450ドメイン B: CYP102D1 P450ドメイン

C: CYP505A3 P450ドメイン

A、Bは4-PI DMSO溶液を用いて50 μMづつ滴定した。

Cは1.25 μMづつ滴定を行った。

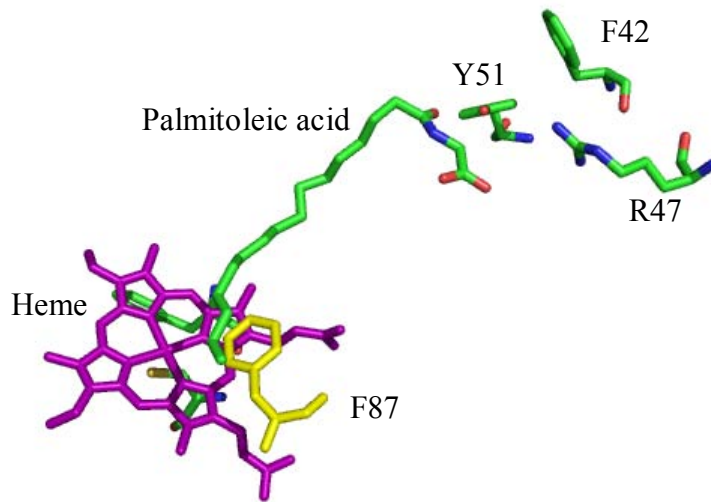


Fig.8-7 P450BM3の基質複合体の活性部位内部の結晶構造

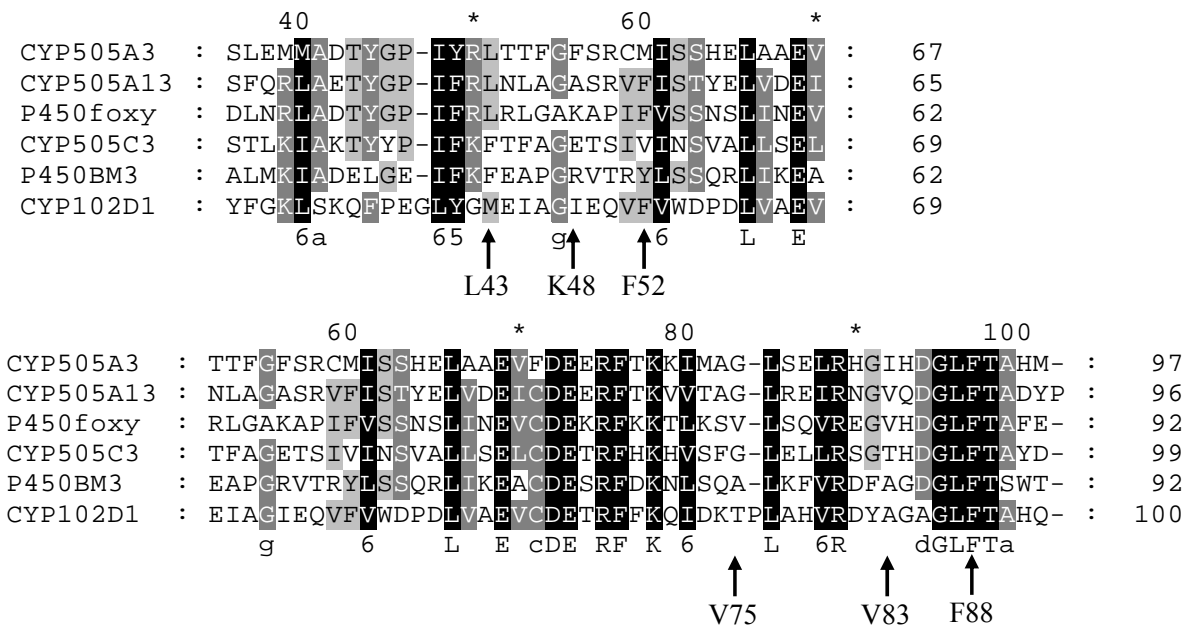


Fig.8-8 融合P450の活性部位入口及び内部のアミノ酸配列アライメント

矢印で示した数字はP450foxyのアミノ酸残基番号を示す。

第九節 第一章の総括

第一章では、CPO、P450foxy のアミノ酸配列を *A. oryzae* のゲノム情報に対して Blast search を行い、工業的応用を視野にいた有用酵素の探索を行った。CPO の配列を Query として用いた結果から、CPO とヘム結合領域が高度に保存された推定ヘム-チオレート含有酵素 AOPE の存在を見出した。RT-PCR による発現条件探索の結果、AOPE は恒常的に発現・機能しているタンパク質であることが示された。AOPE のクローニングを試み、大腸菌、酵母発現系では発現が見られなかったため、*A. oryzae* AOPE 過剰発現株を作製した。RT-PCR により C 末端に 6His tag を付与したリコンビナント AOPE の mRNA レベルでの発現を確認した。さらに過剰発現株菌体を破碎し、Ni²⁺キレートカラムに供したところ、発現量が少ないものの、タンパク質レベルでの発現も確認し、ヘム-チオレート含有酵素に特徴的な 450 nm の吸収極大を CO 差スペクトルにおいて観察した。ゲル濾過カラムによりさらなる精製を試みたが大部分が失活し、AOPE が不安定な酵素であることが示唆された。Ni²⁺キレートカラム後の粗精製試料を用いて活性測定を行った結果、ABTS に対してペルオキシダーゼ活性を示すことが明らかになったが、反応回転は 96.4 min⁻¹ とペルオキシダーゼ反応としては遅いことがわかった。CPO においては遠位側の Glu183 が触媒反応に重要な働きを示すことが報告されているが、AOPE では保存していない。このことは、活性部位内部の構造が大きく異なっている、もしくは CPO、HRP とは全く異なる新規な反応機構を持つ可能性も示唆する。ハロペルオキシダーゼ活性は見出されていない。CPO、AaP は菌体外分泌酵素であるのに対し、AOPE は菌体内で機能していることが示された。細胞内で機能するヘム-チオレート含有酵素ではシトクロム P450、NOS、CooA が現在知られているが、AOPE はそのどれとも相同性を示さない。よって AOPE は菌体内で機能し、ヘム-チオレート含有酵素がペルオキシダーゼ活性を持つということを示した初めての報告となる。ペルオキシダーゼとしての反応はまだ見出していないが、より広い基質を用いて検討を進めていきたいと考えている。さらに興味深い点として、AOPE の分子量は CPO 42 kDa と比較して約 30 kDa と、10 kDa 以上小さいことがあげられる。AOPE と同じく、CPO と類似した小さな推定ヘム-チオレート含有酵素の存在は、数種の糸状菌において見出されているが、その性状について言及した報告はいまだない。リコンビナント AOPE の発現に成功した本研究結果は、それら酵素の生理的機能解明、ひいては工業的応用研究への端緒となったといえ、非常に意義深いといえる。発現量が少ないため詳細な性状解明研究は進行中であるが、培養条件検討を行うことで発現量向上を目指しており、今後さらに興味深い結果が得られると期待している。

P450foxy を Query として用いた Blast search の結果、CYP505 ファミリーに属する推定融合型 P450 三種(CYP505A3、A13、C3)を見出した。発現条件検討を行った結果、CYP505A3 はほぼ恒常的に発現しており、CYP505A13 は、大豆油添加条件で僅

かに発現が上昇することを見出した。RT-PCRにより、CYP505A3、A13 両遺伝子の単離、サブクローニングに成功した。P450foxy、CYP505A3、放線菌由来の融合型 P450、CYP102D1 の各 P450 ドメインを大腸菌発現系で大量発現させ、精製試料のスペクトル挙動を比較した。P450foxy の反応基質である飽和脂肪酸トリデカン酸添加によるスペクトル変化を観察したところ、CYP505A3、CYP102D1 においては基質結合を意味する Type I スペクトル変化が見られず、両酵素が脂肪酸を基質として認識しない可能性を示唆した。アミノ酸配列アライメントの結果によると、脂肪酸結合に重要であると考えられる K48 が保存されておらず、上述の可能性を支持した。P450 の阻害剤である 4-PI に対する K_d は、CYP505A3 において他の二種の酵素と比較して顕著に低い値を示し(高い親和性)、立体的に大きな化合物が侵入しやすい構造を持つことを示唆した。活性部位内部アミノ酸の比較より、V83、V75 が置換されていることが分かり、これらアミノ酸が融合型 P450 の基質認識、反応性に影響を与えることが示された。この結果は、融合型 P450 の基質を変異導入によって大きく改変できる可能性を提示し、タンパク質工学的機能改変に応用可能な有用な知見であると考えられる。また、現在知られている *Bacillus* 属バクテリア由来融合型 P450 が脂肪酸に反応性を示すのに対し、今回見出した糸状菌、放線菌由来融合型 P450 が脂肪酸と結合しないという事実は、真核生物、原核生物において、融合型 P450 の生理的意義が異なる可能性を示し、真核生物において融合型 P450 が多様な機能を担っていることを予想させた。新規融合型 P450 の活性測定には至っていないが、脂肪酸以外の基質を認識する可能性が高く、なおかつ高い反応回転を示すことが確認できれば、工業的応用に関して非常に有望であるといえる。糸状菌由来の融合型 P450 の大腸菌系での大量発現は、おそらく翻訳後修飾といった理由で困難であったが、構造比較によって基質認識に関する知見を得ることができた。各酵素の遺伝子の単離は成功しているため、今後は、各酵素全長の安定発現系の構築、活性測定を目的とした研究を進めていく予定である。系統解析の結果、糸状菌における融合型 P450 は、バクテリアのそれを上回る多様性を持つことが明らかになった。これら酵素の性状解明することで、融合型 P450 の工業応用研究がかなり進展する可能性があるだろう。

第二章 カビ *Fusarium oxysporum* 由来の還元酵素融合型 P450foxy のタンパク質工学的的手法による機能改変

本研究では、P450foxy の高い反応を活かし、タンパク質工学的的手法によって変異させることで、新規機能を持った酵素の作出を目的とした。P450BM3 においても機能改変を目的とした実験例が数多く報告されているが、本研究を通じて P450BM3 で得られない機能を得ること、明らかになっていない両者の生理的機能の違いに関する示唆をえることを目指した。また、いまだ明らかになっていない P450foxy の結晶構造を解明することも目的としている。

第十節 大腸菌発現系による野生型 P450foxy の発現・精製

本節は前任者の小林の考案した発現・精製方法に則って進めており、発現株 (DH5 α 、pCWfoxy) は、グリセロールストックの状態で供与されたものである。

10-1 方法

発現培養・Cell free extract の調製

50 mL フェルコンチューブに入れた 20 mL LB 培地(100 μ g/mL)に、グリセロールストックから植菌し、12-16 hrs 前培養した後、5L 羽付三角フラスコに入れた 2L TB 培地に植菌し(1%植菌)、30 $^{\circ}$ C、150 rpm の条件で O.D₆₀₀=0.4-0.5 に至るまで振とう培養した。最終濃度 1 mM IPTG、0.5 mM 5-Aminoluvulinic acid、1 μ g/mL Chloramphenicol (Wako : 036-10571)として発現を誘導した。引き続き 30 $^{\circ}$ C、150 rpm の条件で振とう培養し、24-36hrs 後に 3000 rpm、4 $^{\circ}$ Cの条件で遠心分離することで集菌した。

得られた菌体を適量の Buffer D (50 mM Mops(pH7.4)、0.1 mM EDTA、0.1 mM DTT、0.1 mM PMSF、10%グリセロール)に懸濁し、前述の方法で超音波破砕機を用いて水中破砕を行った。破砕後、20000 xg、4 $^{\circ}$ C、20 min の条件で冷却遠心分離し、上清を分取した。0.45 μ m シリンジフィルターを通過させることで不溶性物質を除去し、Cell free extract とした。

DEAE sepharose 弱陰イオン交換カラムによる精製

XK16/20 column (GE ヘルスケア : 18-8773-01) に 20 mL DEAE sepharose Fast Flow (GE ヘルスケア : 17-0709-01)を充填したものをを用いた。カラムを \square CTA FPLC 生体分子精製システムに取り付け、Buffer D を 3 mL/min の流速で 5 倍カラム体積流すことで平衡化した。試料は Econopump を用いてカラムに吸着させた。UV280 nm でモニターしながら、Buffer D を用いて流速 3 mL/min で非吸着物質が出てこなくなるま

で洗浄を行った。再平衡化後、Buffer D と Buffer E (50 mM Mops(pH7.4)、0.1 mM EDTA、0.1 mM DTT、1 M KCl 10%グリセロール)により、30 min、50%のリニアグラジエント(0→0.5 M KCl)をかけて溶出を行った。タンパク質の溶出に合わせて 10 mL ずつ分画を行った。P450 に特徴的な赤褐色を目安に、O.D.₄₂₀/O.D.₂₈₀ の値が大きい画分を選択し、次の精製に用いた。

Table.10-1 P450foxyのDEAE sepharoseカラムによる精製で用いた緩衝液

Buffer D : Binding buffer
50 mM Mops (pH7.4) 10% Glycerol 0.1 mM EDTA, DTT.
Buffer E : Elution buffer
50 mM Mops (pH7.4) 10% Glycerol 0.1 mM EDTA, DTT 1M KCl

2'5'ADP Sepharose affinity カラムによる精製

2'5'ADP Sepharose affinity 4B (GE ヘルスケア : 17-0700-01)は、アガロースに NADP、NAD のアナログである 2'5'ADP が固定化されており、これらを基質として用いる酵素を特異的に精製することができる。10 mL のレジンをエコノカラム(内径 2.5 cm、長さ 5 cm Bio-Rad : 737-2507)に充填した。エコノカラムは □CTA FPLC 生体分子精製システムに接続することができないため、自然落下によりカラムの平衡化、溶出を行った。5 カラム体積の Buffer F (50 mM Mops.(pH7.4)、0.1 mM DTT、0.1 mM EDTA、10%グリセロール)で平衡化した後、DEAE カラムで分取した画分をそのまま負荷した。さらに 10 カラム体積の Buffer F で洗浄した後、Buffer G (Buffer F + 3 mM β-NADPH (オリエンタル酵母 : 44330000)で溶出した。β-NADPH の吸収により、280 nm でモニターすることができないため、P450 に特徴的な赤褐色を目安に分画を行った。

ゲル濾過カラムによる精製

ADP-sepharose で得られた画分を Amicon Ultra を用いて 2 mL に濃縮した。以後の操作は前述の通りである。得られた画分を SDS-PAGE に供し、夾雑タンパク質が極力含まれない画分を選択した。さらに 20 mM Mops(pH7.4) 10% グリセロールに対して透析を行い、結晶化、活性測定に供した。

10-2 結果及び考察

前任者である小林の考案した精製スキームに従って操作を行った。各精製段階における SDS-PAGE および精製テーブルを Fig.10-1、Table.10-2 に示す。本結果は 1 L TB 培地から得られた菌体を元に精製を行った物である。pCWfoxy 発現ベクターを用いた発現系では酵素発現量はかなり多く、2 L TB 培地で 30°C、48 hrs 培養して得

られた菌体約 20 g から 50 mg 程度の酵素を調製することが可能であった。誘導時に添加したクロラムフェニコールはコールドショックにより酵素の可溶化効果があり、その添加の有無で回収できる酵素量に顕著な差が見られた。200 mL TB 培地を用いた発現系では 48 hrs の培養を行うと、酵素収量が劇的に減少してしまったため、小スケールでは 24-30 hrs の培養時間が適切であった。培養容器である羽付フラスコの羽部分が短いほうが良く、振とう速度も 120-150 程度で最も良い結果が得られた。P450foxy は融合タンパク質であるためフォールディングが難しく、一般的なタンパク質の発現と比較して緩やかな誘導条件が適切であるためであると考えられる。DEAE-sepharose による精製では、夾雑タンパク質の除去という観点からはあまり有効であるとはいえなかったが、大腸菌由来の脂質・核酸等の非タンパク質性の夾雑物質の除去のために用いた。アフィニティーカラム ADP-sepharose は、精製効果はかなり高く、この一段階で SDS-PAGE 上でほぼ単一バンドにすることができた。活性測定、スペクトル測定では、この段階の試料を透析して用いることができた。結晶化を目的とした精製時には、さらにゲル濾過カラムに供した(Fig.10-2)。ゲル濾過カラムにおける溶出体積からの分子量見積もりは別節にて言及する。

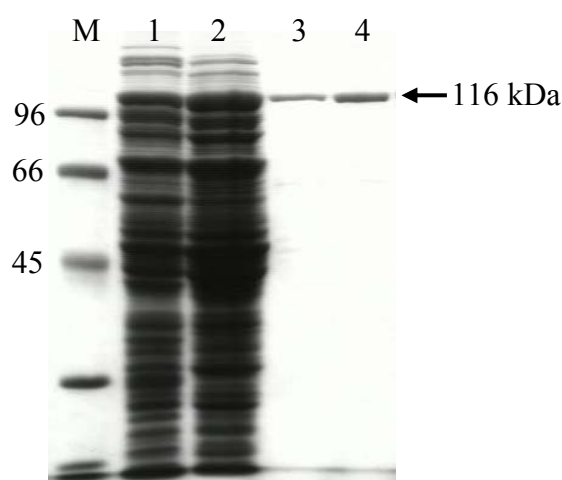


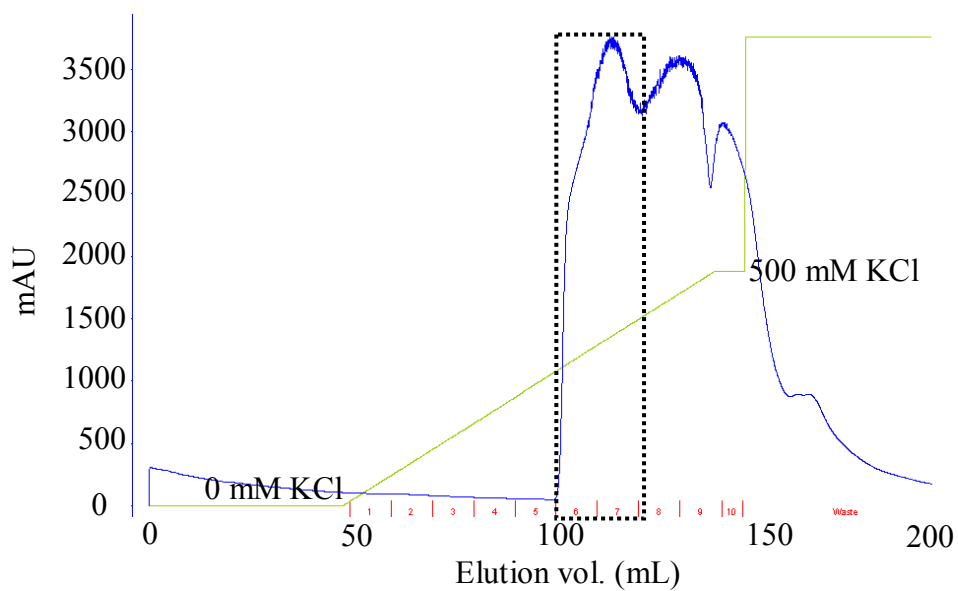
Fig.10-1 P450foxy WT 精製段階におけるSDS-PAGE

1 : Cell free extract 2 : DEAE-sepharose 3 : ADP-sepharose 4 : ゲル濾過

Table.10-2 リコンビナントP450foxyの精製テーブル

Step	vol. mL	Total protein mg	Specific content ($\mu\text{mol P450}$)
Cell free extract	100	1542	0.217
DEAE sepharose	40	476	0.179
ADP sepharose	22.5	30	0.074
Superdex 200pg	10	11	0.073

(A) DEAE-sepharose



(B) Superdex 200 prep grade

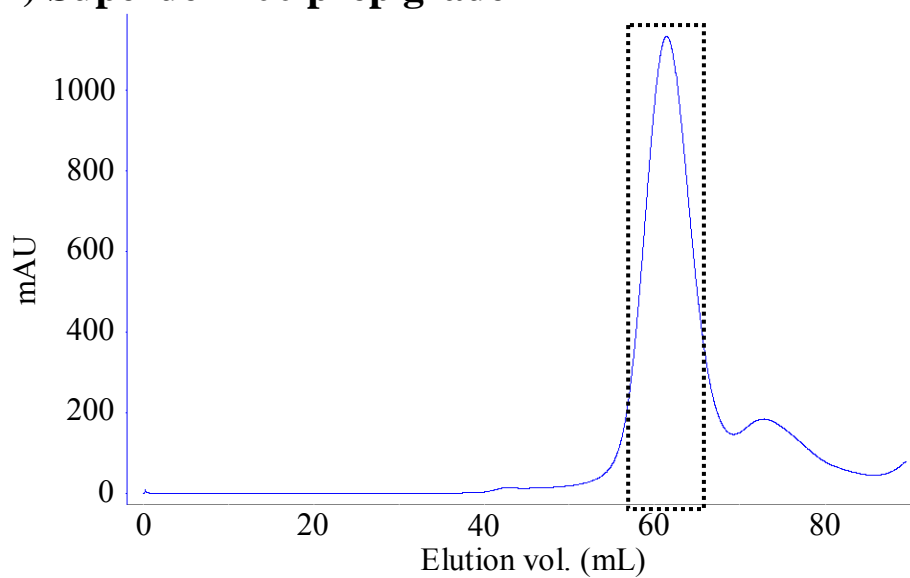


Fig.10-2 リコンビナントP450foxyの精製における溶出パターン

第十一節 His tag 付全長 P450foxy 発現系の構築

前任者の精製方法は、ADP-sepharose が精製のキーステップとなっていた。しかし、このカラムは短命で高価な上、溶出に使用する β -NADPH も高価であり、結晶化のための大量精製や、さまざまな変異体を調製するためには適していないと考えられた。本項では、P450foxy の N 末端および C 末端に His tag を導入したコンストラクトを作製し、より簡便な精製を可能にすることを目的とした。

11-1 方法

QuikChange 法による制限酵素サイトの破壊

P450foxy His tag 付コンストラクト pET ベクター発現系の構築を試みたが、可溶性画分に発現が見られるものの適切にフォールディングさせることはできなかった。そのため、本来 P450foxy 遺伝子が導入されていた pCWori+ベクターを用いて His tag 付コンストラクトの作製を試みた。pCWori+ベクターは P450 の発現においてしばしば用いられている古典的ベクターであり、Double Ptac promoter によって発現が開始され、Lac repressor を含むため、IPTG によって転写を制御することができる[107, 108]。

P450foxy 遺伝子は、*Nde* I、*Hind* III サイトによって pCWori+ベクターに導入されているが、P450foxy の遺伝子中に二ヶ所の *Nde* I サイト(108、2295)を含むため、QuikChange 法を用いた silent mutation によって *Nde* I サイトを破壊した(Table.11-1 , Fig.11-1)。

QuikChange 法は Quik change manual (Strata Gene)を一部改変して行った(Fig.11-2)。P450foxy の塩基配列を参考に、*Nde* I サイトを(catatg→cataCg)としたプライマーを設計した。PCR は PrimeSTAR HS Polymerase を用い、鋳型として野生型 pCWfoxy を 200 ng 以上用いた。PCR 後、一部の反応液を電気泳動に供し、増幅を確認した。0.5 μ L/50 μ L Dpn I (Roche : 70190122)を添加し、37°C、3hrs 以上インキュベーションすることで鋳型のプラスミドを分解した。反応液全量を電気泳動に供し、増幅バンドを切り出し、DNA 断片を抽出した。DNA 断片を大腸菌 DH5 α に 10 μ L トランスフォーメーションし、LB agar plate 培地(100 μ g/mL)に植菌し、12 hrs、37°Cで培養した。出現したコロニーをコロニーPCR に供し、増幅サイズが正常なものを選択し、プラスミドを調製して配列を確認した。以上の操作を二回行い、二ヶ所の *Nde* I サイトを破壊した。完成したプラスミドを調製し、全長の配列が野生型と同一であることを確認した。

Table.11-1 P450foxy配列中の*Nde* I破壊のために用いたQuikChangeプライマー

108 <i>Nde</i> I break -F	CGTTTAGCGGATACATACGGCCCCATTTTCAGA
108 <i>Nde</i> I break -R	TCTGAAAATGGGGCCGTATGTATCCGCTAAACG
2295 <i>Nde</i> I break -F	TGTATTTAGCGCATACGTTGAATTATCACAACC
2295 <i>Nde</i> I break -R	GGTTGTGATAATTCAACGTATGCGCTAAATACA

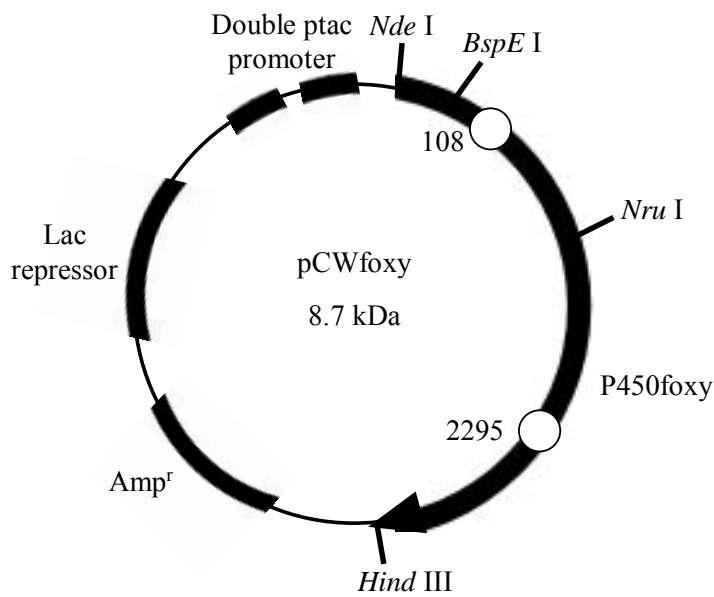


Fig.11-1 pCWfoxyベクター

白丸はP450foxy遺伝子中に存在する*Nde* Iサイトを示す。

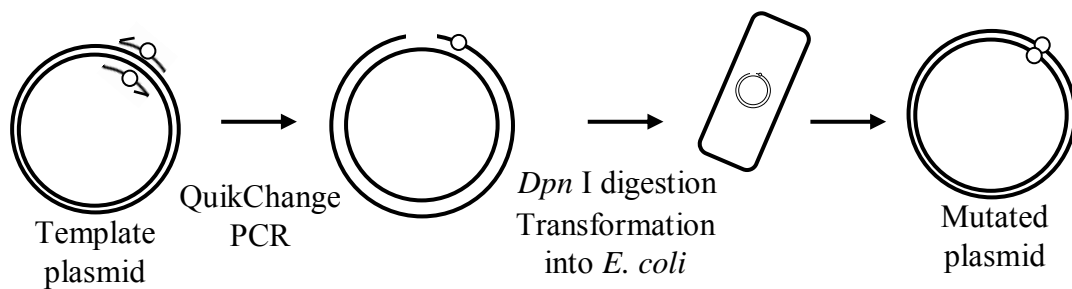


Fig.11-2 QuickChange法による変異導入プラスミドの作製

PCR mix. for PrimeSTAR.	(μL)	PCR cycles	
Distilled water	32.5	96°C	2 min
5 X Reaction Buffer	10	96°C	10 sec
2.5 mM dNTP	4	55°C	5 sec
DNA template (200 ng plasmid DNA)	1	72°C	9.2 min
Primers (10 μM)	1 each	72°C	10 min
Enzyme	0.5		

His tag 付 P450foxy 発現プラスミドの構築 (Fig.11-3)

得られた *Nde* I 破壊プラスミドを鋳型とし、PrimeSTAR HS polymerase を用いて P450foxy 遺伝子のクローニングを行った。N、C 末端それぞれに 4His tag を導入することを考え、プライマーにそれぞれ 4His をコードする塩基配列を含めた。5' 末端には、*Nde* I、3' 末端には *Sac* I サイトを導入した (Table.11-2)。電気泳動で断片の増幅を確認し、Purification Kit で精製後、*Nde* I、*Sac* I で制限酵素処理した。同酵素で処理した pCWori+ベクターにライゲーションし、DH5 α にトランスフォーメーションした。LB agar plate 培地 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Amp.) に植菌し、37°C、12 hrs 以上培養した。出現したコロニーを、コロニー PCR に供し、ポジティブコロニーについて発現検討を行った。

Table.11-2 P450foxy 全長の大腸菌発現系のためのプライマー (His tag の有無).

P450foxy -F	AGGAATTCCATATGGCTGAATCTGTTCCGATTCCGG
P450foxy -R	TACCGAGCTCCTAATCGAAAACATCAGTAGCAAACCGCTC
P450foxy N-4His F	AGGAATTCCATATGCATCATCATCATGCTGAATCTGTTCC GGAACCG
P450foxy C-4His R	TACCGAGCTCCTAATGATGATGATGATCGAAAACATCAGTA AACCGCTC

小スケール (試験管レベル) における P450foxy の発現検討

本実験では、数種類の変異体を作成したため、試験管レベルでの発現検討法を考案した。1 mL LB 培地 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Amp.) を入れた試験管に、爪楊枝で植菌し 37°C、12 hrs 振とう培養した。培養液を、3 mL TB 培地 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Amp.) を入れた試験管に 1% 植菌し、O.D₆₀₀=0.4-0.5 に至るまで 37°C、150 rpm の条件で振とう培養し、1 mM IPTG、0.5 mM 5-Aminolevulinic acid、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Clm. となるように添加することで発現を誘導した。30°C、150 rpm、24 hrs 振とう培養を行った。培養液を 2 mL マイクロチューブに入れ、遠心分離することで集菌し、50 mM Mops (pH7.4) 10% グリセロ

ールに懸濁した。懸濁液を 15 mL スピッツ管に入れ、密閉式超音波細胞破碎装置 BIORUPTOR (COSMO BIO co, ltd : UCW-201)によって破碎した。破碎液を 1.5 mL マイクロチューブに入れ、20000 xg、4℃、20 min の条件で冷却遠心し、上清を Cell free extract として分取した。SDS-PAGE に供し、発現の有無を確認した。

His Tag 付 P450foxy の大量発現及び精製

通常の P450foxy と同様に発現培養した。得られた菌体を Buffer A (20 mM Mops(pH7.4) 10%グリセロール 0.1 mM PMSF)に懸濁、破碎して Cell free extract を調製した。Ni²⁺キレートリングカラム HisTrap crude FF、ゲル濾過カラム Superdex 200 に順次供し、精製を行った。HisTrap カラムにおいて溶出に用いるイミダゾールは、P450 に結合するため、ゲル濾過後の精製試料を 50 mM Mops (pH7.4) 10%グリセロールに対して透析を行った。

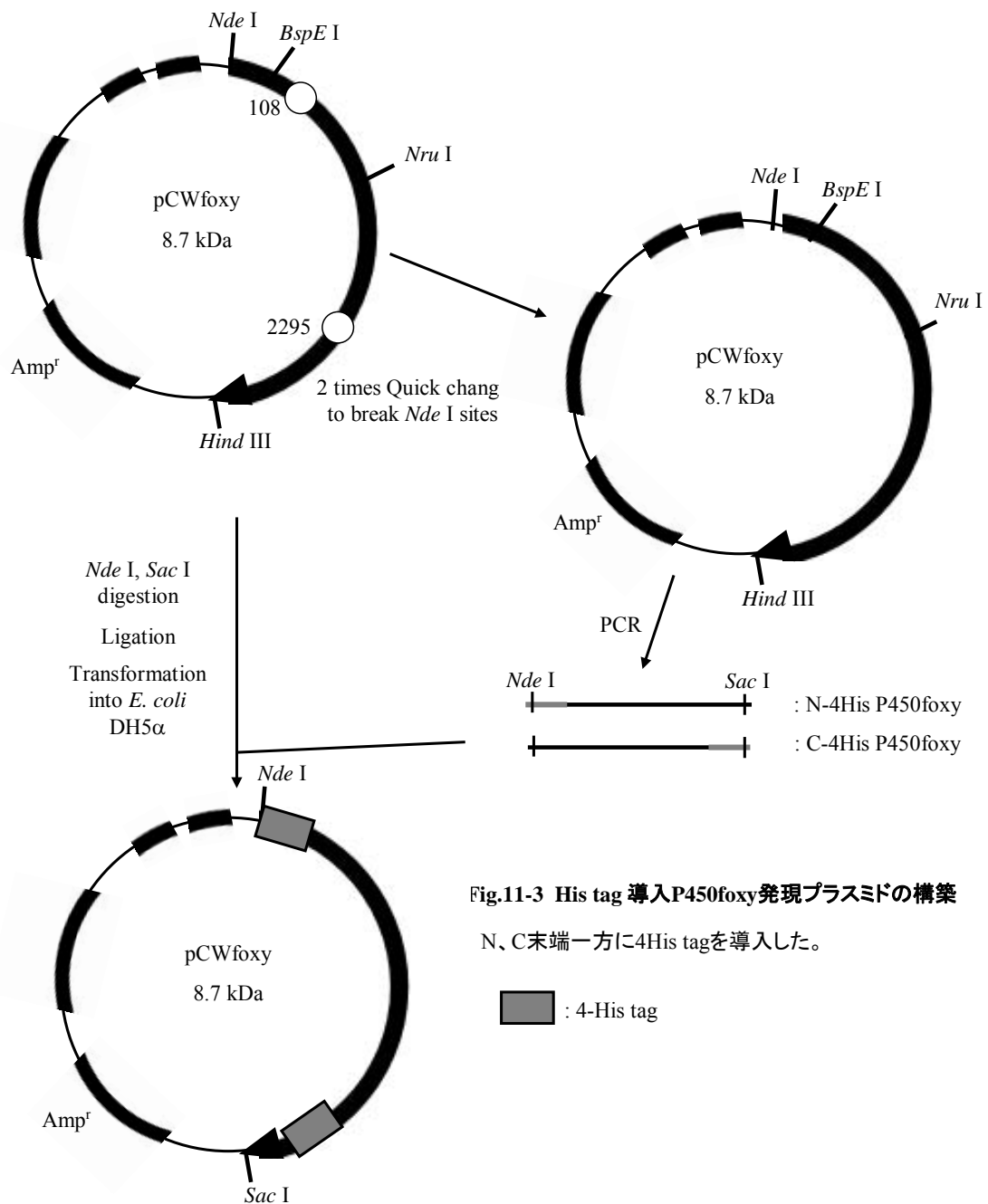


Fig.11-3 His tag 導入P450foxy発現プラスミドの構築

N、C末端一方に4His tagを導入した。

■ : 4-His tag

11-2 結果及び考察

供与された pCWfoxy を保持する DH5 α 株よりミニプレップし、pCWfoxy プラスミドを取得した。His tag を付加することによる影響が不明であったため、N、C 各末端に 4His tag を付加したコンストラクトの構築を試みた。P450foxy の配列中の二箇所の *Nde* I サイトを QuickChange 法によって破壊した。pCWfoxy は、8.7 kbp と比較的サイズが大きかったため、通常の QuickChange 法では達成できず反応方法を改変した。定法では KOD-plus(Toyobo)、pfu turbo polymerase を使用していたが、本実験では増幅が確認できず、PrimeStar HS polymerase を用いた場合にのみ増幅させることができた。使用する鋳型を指定の 50 ng から、200 ng 以上とし、反応サイクルを 16 から 25 サイクルとした。PCR 産物を *Dpn* I 処理後、電気泳動に供してバンドを切り出す操作を加えたことで、DNA 断片の精製・濃縮と同時に、鋳型を完全に分離することができた。これにより、大腸菌の形質転換の効率を大幅に上昇させ、誤って野生型のプラスミドを選択する可能性を完全になくすことができた。改変した pCWfoxy ベクターを鋳型とし、PCR により His tag を付加した P450foxy DNA 断片を調製し、pCWori+ベクターに再度導入することで目的ベクターを構築することに成功した。野生型 pCWfoxy と同様の培養・誘導方法で発現を確認することができた。(以下、no-His foxy、N-His foxy、C-His foxy とそれぞれ略称する。) N-His foxy は、C-His foxy と比較して顕著に発現量が多かった。この原因として、コドン使用頻度が高い His の塩基配列を開始コドン直後に導入したことで転写効率が向上した可能性が考えられた。培養菌体を 6-1 に示した方法に従い、Ni²⁺キレートリングカラム、ゲル濾過カラムによる精製に供した。各過程における SDS-PAGE を Fig.11-4 に示す。両者とも全く同一な精製挙動を示した。Ni²⁺キレートリングカラム後に既にスペクトル測定、活性測定に十分な精製度であることが分かり、精製にかかる時間、コストを大幅に削減することができた。また、発現量も両者とも no-His foxy と遜色なく、200 mL TB 培地から得られる菌体で十分な試料の調製が可能であった。

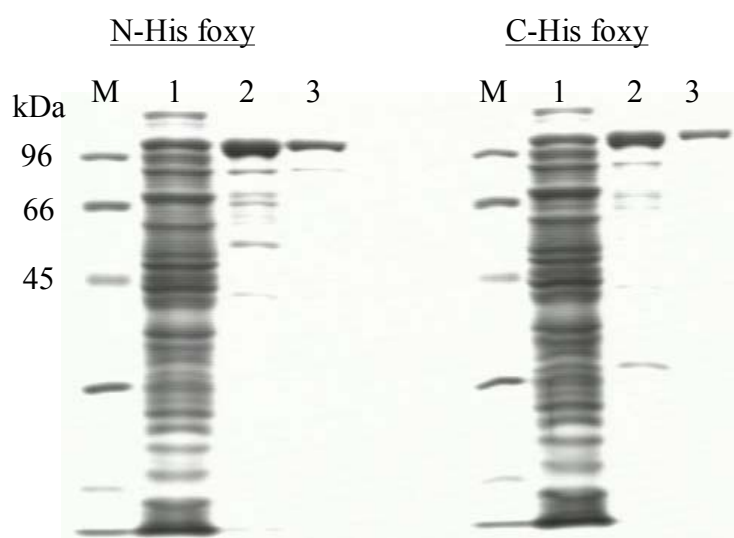


Fig.12-4 His tagを付加したP450foxyの精製過程におけるSDS-PAGE

M : マーカー 1 : Cell free extract 2 : Ni²⁺カラム 3 : ゲル濾過カラム

第十二節 His tag 付 P450、還元酵素ドメインの発現

P450foxy は、大別して P450 ドメイン、還元酵素ドメインの二つの機能ドメインから成り立っている。各ドメインの機能解析のため、分離したコンストラクトをそれぞれ作製することを試みた。また、還元酵素融合型 P450BM3 の結晶構造解析において、全長の結晶化は極めて困難であることが報告されており、P450foxy においても各ドメインの結晶化に供することも目的とした。

12-1 方法

発現系の構築

pET17-b を用いた発現系構築を試みた。pCWfoxy を鋳型とし、PrimeStar HS polymerase を用いてクローニングした。P450BM3 とのアライメントの結果から、P450 ドメインの 3'末端(リンカーは含めない)および還元酵素 5'末端についてプライマーを新たに設計した(Table.12-1)。クローニングプライマーの 5'末端には *Kpn* I、3'末端には *Spe* I 制限酵素サイトを含めた。また、C 末端にそれぞれ 4His tag に対応する塩基配列を導入してある。前述の方法と同様に pET17-b ベクターに P450 ドメイン、還元酵素ドメインを導入し、発現ベクターを構築した。発現ベクターを大腸菌 C43(DE3)株にリトランスフォーメーションした。

Table.12-1 P450foxyのP450、還元酵素ドメインのクローニングプライマー。

P450domain -F	ACGGGGTACCATGGCTGAATCTGTTCCGATTCCGGAACCGC CGGGTTATCCGCTT
P450domain -R	AGGACTAGTCTAGTGGTGGTGGTGTCCATTTTCCTGCTAGGA CATGCTCTAA
Reductase domain -F	ACGCGGGTACCAGTGGGAAGCCTATGGCTATTTTC
Reductase domain -R	AGGACTAGTCTAGTGGTGGTGGTGTCCATTTTCCTGCTAGGAC ATGCTCTAA

発現培養・精製

P450foxy 全長を発現する場合と同様に行った。誘導時の O.D.₆₀₀ を 0.6-0.7 とし、0.5 mM IPTG を添加した。P450 ドメインについては 0.5 mM 5-Aminolevulinic acid を添加した。引き続き 25°C、24 hrs、150 rpm の条件で振とう培養後、冷却遠心分離によって集菌した。精製は、前述の方法に従い HisTrap、Superdex200 に順次供することで行った。

還元酵素ドメインの活性測定[109]

反応系は下表に示す。Cytochrome *c* は、酸化状態とジチオナイトで還元した還元状態との差スペクトルを測定し、 $\epsilon_{550}=21$ より濃度を算出した。NADPH を除く組成

を混合し、30°C、10 min インキュベーションした。試料をセルに入れ、すばやく 50 μL 1.25 mM NADPH を混合した。Cytochrome *c* の還元に伴う 550 nm の吸収増大を 30°C、1 min 観察した。反応において用いられる NADPH、NADH、cytochrome *c* を濃度を変えて測定することで、それぞれの K_m を算出した。

Table.12-2 還元酵素活性測定反応液の組成

Components	Vol.	Final conc.
50 mM KPB (pH7.5) 10% Glycerol	410.5 μL	-
2.1 mM Cytochrome <i>c</i>	9.5 μL	40 μM
1 mM FAD	5 μL	10 μM
1 mM FMN	5 μL	10 μM
Enzyme (1 μg)	10 μL	-
1.25 mM NADPH	50 μL	125 μM

P450、還元酵素ドメインを用いた再構成による脂肪酸水酸化活性測定

精製した P450、還元酵素ドメイン比率(0:1、1:1、2:1、4:1)を変えて混合し、Tridecanoic acid に対する水酸化活性を測定した。詳細な実験方法は次節に示すとおりである。

12-2 結果及び考察

pCWfoxy を鋳型として用いた PCR により、C 末端に 4His を導入した DNA 断片を増幅し、pET17-b に導入することで発現ベクターを構築した。大腸菌ホストは、株に関わらず発現を確認できたため、菌体収量が多く成長の速い C43(DE3)株を用いた。培養菌体から cell free extract を調製し、 Ni^{2+} キレートリングカラム、ゲル濾過カラムに供することで SDS-PAGE 上単一にまで精製を行うことができ、推定分子量に一致した(Fig.12-1)。各ドメインとも発現量は多く、200 mL TB 培地から得られた菌体から、30 mg 以上の酵素を調製することができた。培養菌体は、P450、還元酵素ドメインの補酵素、ヘム及びフラビンに由来する赤褐色、黄色を呈した。本実験および第八節の結果から、融合型 P450 を pET ベクターにより発現することは困難であるが、ドメイン毎であれば容易にかつ大量に発現させることが可能であるようだ。次に、精製した還元酵素ドメインの cytochrome *c* 還元活性の測定を行った(Fig.12-2)。活性測定に先立って補酵素 FAD、FMN を添加してインキュベートを行わない試料では、還元活性が見られなかった。これは精製過程において FAD、FMN の大部分が脱落してしまっていることを示す。本精製では、 Ni^{2+} キレートリングカラムカラムを用いているが、イオン強度が大きく変化するイオン交換カラムなどでは補酵素

が脱落しやすいことが報告されており、本実験においてもその傾向が見られた。Fig.12-3 に P450BM3 における FMN 結合領域の立体構造を示す。FMN は、イソアロキサジン環と W574 のスタッキング作用によりタンパク質に結合しており、G570、Y536 が電子伝達に関係していることが変異体実験により明らかになっている[110]。P450foxy においてもこれらの残基は G589、W593、Y555 として保存されており、同様の FMN 結合形式、電子伝達機能をもつことが予想される。FAD の結合領域は、マウス由来 P450 還元酵素の立体構造より、C 末端の Trp が同様にスタッキングしていることが明らかになっている[111]。P450BM3、P450foxy においても同様にそれぞれ Trp1046、Phe1065 が保存されている(Fig.13-7)。補酵素と直接相互作用する残基が少ないことがこれらの脱離のしやすさに関係している。NADPH を添加しない試料では還元活性が検出されないことから、還元酵素ドメインが NADPH から電子を供給されていることが示される。Fig.12-4 に NADPH、NADH、cytochrome *c* に対する K_m 測定の結果を示す。P450foxy の還元酵素ドメインは、NADPH に対して NADH の 200 倍以上の嗜好性を示し、P450BM3 と一致した[112]。 V_{max} はほぼ同程度であった。Table.12-3 に再構成実験の結果を示す。還元酵素ドメインに対する P450 ドメインの比率を増やしても、NADPH の減少はあまり変化せず、融合酵素における高い反応回転を再現することはできなかった。この原因として、融合型 P450 の還元酵素の持つ構造的な特徴が関係していると考えられる。Fig.12-5 に、融合型 P450 還元酵素ドメイン及び哺乳類の P450 還元酵素の、FMN、FAD 結合ドメイン間のリンカー領域のアライメントを示す。融合型 P450 ではリンカーがかなり短縮しており、これにより分子内での効率的な電子伝達が可能になると考えられている[113]。しかし、ドメインが分離されている状態では逆に電子伝達の効率が低下する結果となると思われ、すなわち、融合 P450 では還元酵素も特殊化されており、融合していることが電子伝達のためには必須である。別々に存在する P450 および還元酵素を人工的に融合させる試みにおいて、一定の活性向上は認められているが、生来の融合型 P450 ほどの活性は見出されておらず[114, 115]、このことも融合型 P450 の特殊な構造を示すと考えられる。P450BM3 において、P450 ドメインと FMN 結合ドメインまで結合したコンストラクトと、FAD 結合ドメインを用いた再構築系が試みられ、脂肪酸水酸化活性が検出されている[116]。このことから、P450 ドメインと FMN 結合ドメイン間が構造的に接近していることが反応に不可欠であると考えられた(Fig.12-6)。Cytochrome *c* に対する電子伝達は適切に行われるが、この理由として P450 と Cytochrome *c* の結合サイトが異なっているためであることが、P450BM3 における研究で明らかになっている[117]。

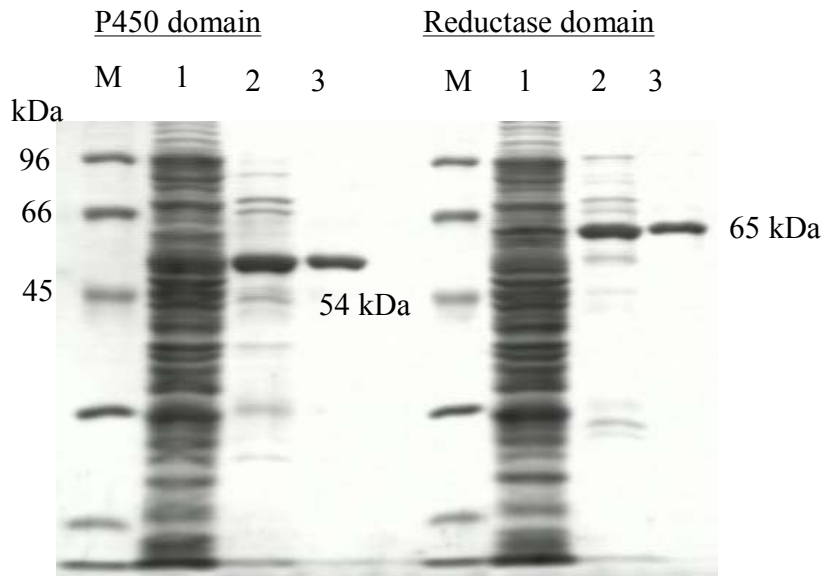


Fig.12-1 P450foxyのP450、還元酵素ドメインの精製過程におけるSDS-PAGE

M : マーカー 1 : Cell free extract 2 : Ni²⁺カラム 3 : ゲル濾過カラム

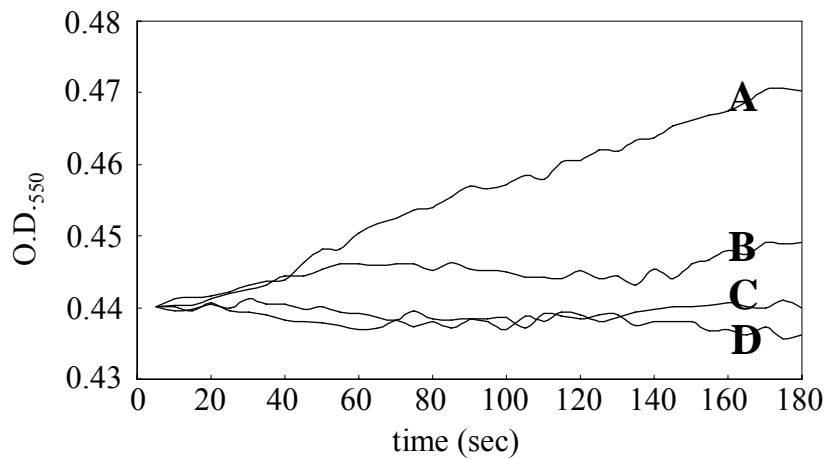


Fig.12-2 還元酵素ドメインのcytochrom cに対する還元挙動

A : 通常測定条件 B : - FMN C : -FAD D : -NADPH

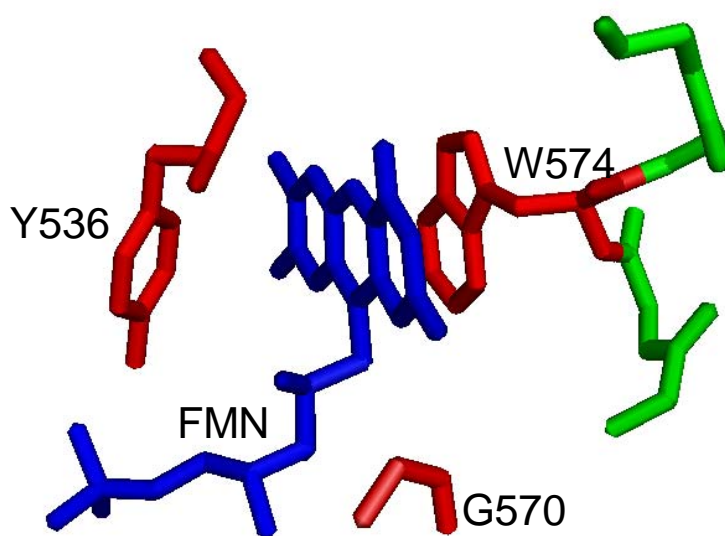
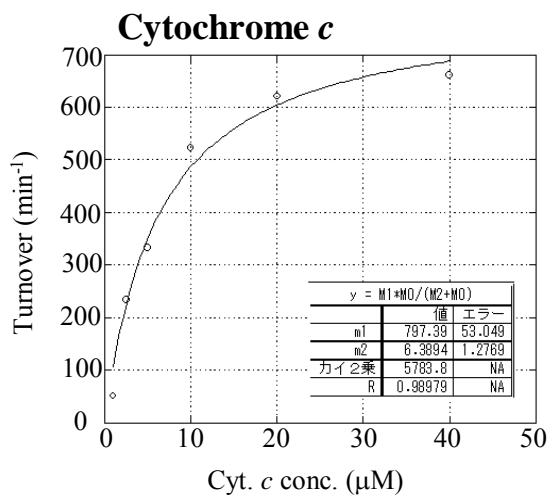
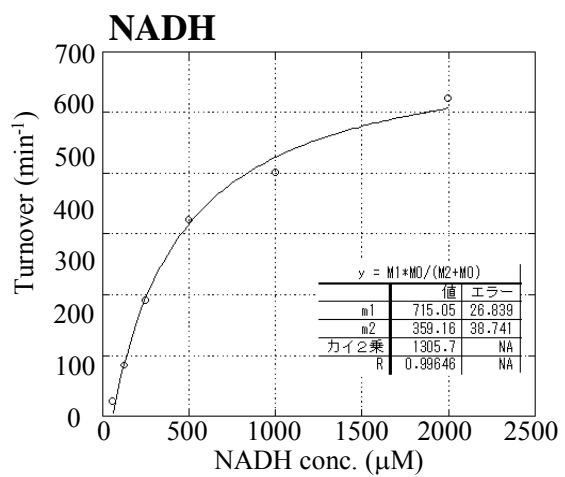
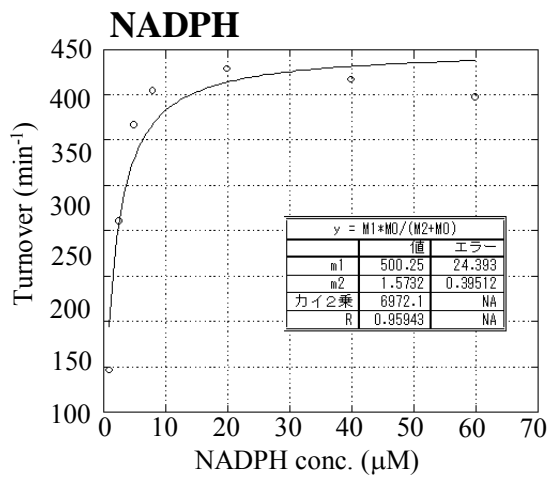


Fig.12-3 P450BM3のFMN結合残基

FMNは青、結合及び電子伝達に重要と考えられる残基は赤で示す。



	K_m	V_{max}
NADPH	1.6 ± 0.4	500.3 ± 24
NADH	359 ± 38	715.1 ± 27
Cytochrome c	6.4 ± 6.4	797.4 ± 53

Fig.12-4 還元酵素ドメインの K_m および V_{max} 測定
他成分を固定し、測定成分のみ濃度を変化させた。

Table.12-3 P450、還元酵素ドメインの比率を変えた再構成実験におけるNADPHの減少量の比較

P450/Red. ratio	mol NADPH	mol Red. ⁻¹ min ⁻¹
0 : 1		0.105 ± 0.02
1 : 1		0.107 ± 0.01
2 : 1		0.118 ± 0.02
4 : 1		0.114 ± 0.01
.....		
Fused (1 : 1)		20.5 ± 1.7

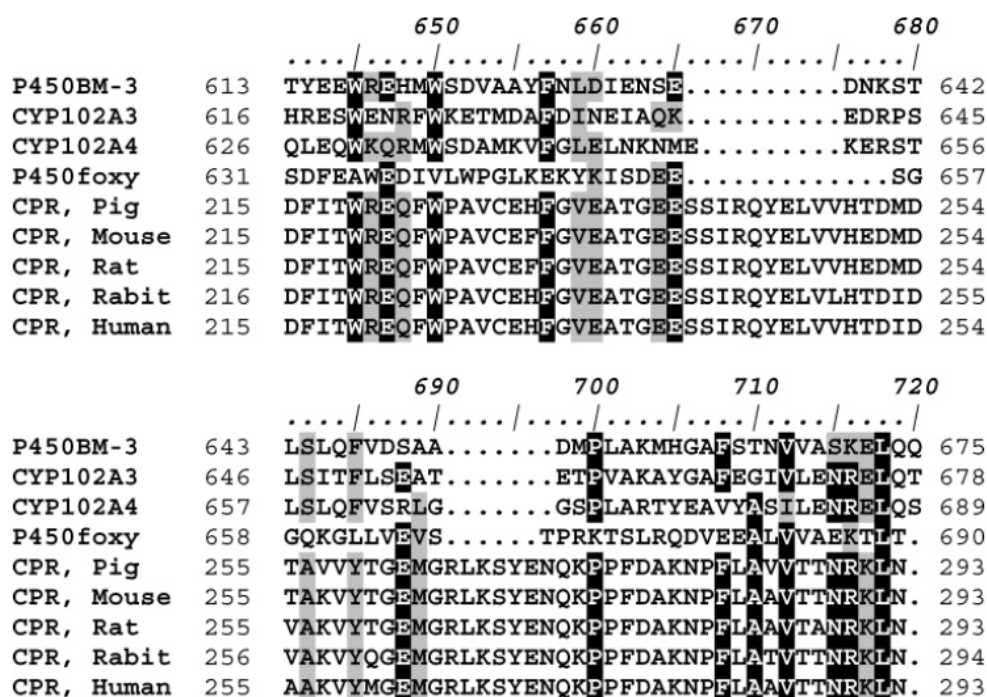


Fig.12-5 融合型P450還元酵素ドメインおよび哺乳類由来P450還元酵素のFMN,FADリンカードメインのアライメント

Kitazume et al (2007) より引用

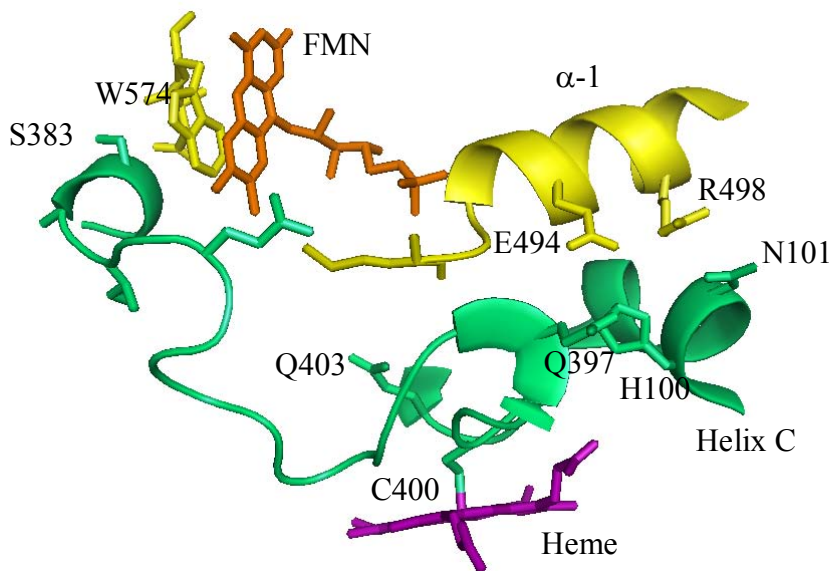


Fig.12-6 P450BM3のP450ドメインとFMN結合ドメインの相互作用

緑はP450ドメイン、黄色はFMN結合ドメインの構造を示す。

FMNはオレンジで示す。

FMN結合ドメインは、ヘムの近位側の正電荷と相互作用をもつ。

第十三節 His tag の有無が P450foxy の反応性に与える影響

前項で作製に成功した N 末端、C 末端 His tag 付 P450foxy および、P450、還元酵素各ドメインの酵素的性状を比較し、His tag が付加されたこと、ドメインが分離されたことによる影響を見極めることを目的とした。

13-1 方法

ゲル濾過カラムにおける溶出体積からの分子量予測

ゲル濾過カラムにおける各試料の溶出体積を、ゲル濾過マーカ MW-GF-1000Kit(Tyroglobulin : 669 kDa, Apoferritin : 443 kDa, Alcohol dehydrogenase : 150 kDa, BSA : 66 kDa, Carbonic Anhydrase : 29 kDa)を同条件で分離し、作製した検量線に当てはめることで分子量を概算し、溶液中で各酵素がどのような状態を取っているか推測した。

スペクトル比較

本実験では、全長 P450foxy(no-His、N-His、C-His)、P450 ドメイン(C 末 His tag)を用いた。

(A) 精製酵素を 3-4 μM となるように希釈し、UV-VIS Spectrophotometer により 350-600 nm の波長範囲におけるスペクトルを測定した。通常の状態を酸化状態(resting state)、ジチオナイトを少量添加したものを還元状態(reduced state)、CO ガスを purge したものを CO 付加状態(reduced + CO state)とし、スペクトル挙動を比較した。

(B) P450foxy の基質である tridecanoic acid (C13)の添加によるスペクトル変化を観察した。500 μL の測定試料(3-4 μM P450)を石英セルにいれ、350-600 nm の範囲におけるスペクトルを測定した。0.5 μL ずつ 1 mM C13 を添加していき、それに伴うスペクトル変化を観察した。基質濃度にたいして O.D₄₂₀₋₃₉₀ (Type I スペクトル変化)の値をプロットし、C13 に対する K_d を算出した。

脂肪酸に対する活性の比較

本実験では、全長 P450foxy(no-His foxy、N-His foxy、C-His foxy)を使用し、反応性を比較した。CO 差スペクトルから算出した酵素 1 μg (P450foxy : 119 kDa, 0.86 μM)を用いて活性試験に供した。反応系は Table.13-1 に示す。基質として飽和脂肪酸(C9-17)を 125 μM の濃度で使用した。NADPH を除く組成を混合し、1.5 mL マイクロチューブに入れて 30°C、10 min インキュベートした。試料を石英セルに入れ、450 nm の反応液に対し、50 μL 1.25 mM NADPH をすばやく混合し、30°C で 340 nm の吸光の減少を 1 min 測定した。吸光度減少の傾きと、NADPH のモル吸光係数 $\epsilon_{340}=6.22$

の値から、一分あたりの反応回転(turnover)を算出した。

Table.13-1 P450foxyの脂肪酸水酸化活性の反応組成

Components	Vol.	Final conc.
50 mM Mes(pH6.5) 10% Glycerol	420 μ L	-
1 mM FAD	5 μ L	10 μ M
1 mM FMN	5 μ L	10 μ M
Enzyme (1 μ g)	10 μ L	-
6.25 mM Substrate	10 μ L	125 μ M
1.25 mM NADPH	50 μ L	125 μ M

還元酵素活性の比較

本実験では、全長 P450foxy(no、N 末、C 末 His tag)、P450 ドメイン(C 末 His tag) による、電子受容体として Cytochrome *c* (Sigma : C2037)を用いた還元酵素活性の測定を行った。酵素 1 μ g(全長酵素 0.86 μ M、還元酵素ドメイン 1.54 μ M)を用いた。P450BM3 および P450foxy の還元酵素活性は、基質である脂肪酸を添加することで飛躍的に上昇することが知られており[118]、本実験においても dodecanoic acid (C12) を 125 μ M の濃度で添加することによる挙動の変化を観察した。

13-2 結果及び考察

三種の全長 P450foxy(no-His、N-His、C-His) のゲル濾過カラムでの溶出パターンを Fig.13-1 に示す。His tag の有無に関わらず挙動は完全に一致しており、対称な単一ピークとして検出された。標準タンパク質から作製した検量線に溶出体積を当てはめると、204-212 kDa と算出された(Table.13-2)。P450foxy の分子量は 119 kDa であるので、溶液中に存在する分子は全て二量体で存在していることが明らかになった。P450 ドメイン及び還元酵素ドメインのゲル濾過カラムにおける溶出パターンを Fig.13-2 に示す。同様に対称な単一ピークとして検出された。P450 ドメインの分子量は 54 kDa、還元酵素ドメインの分子量は 65 kDa であることから、P450 ドメインは単量体、還元酵素ドメインは二量体として存在していると判断した。以上の結果より、P450foxy は溶液中では還元酵素ドメイン間の相互作用により、二量体で存在しているといえる。全長 P450foxy および P450 ドメインのスペクトル比較を行ったところ、全長 P450 のスペクトルは、His tag の有無によらず完全に一致し CO 差スペクトルも同様に観察された(データは示さず)。P450 ドメインについても同様に CO 差スペクトルを観察することができたが、異なる点として酸化状態において、350-400 nm の吸収が若干上昇していることが観察された。P450 における吸収の特徴である α , β 帯(それぞれ吸収極大 561、531 nm)を比較すると、 β 帯の吸収が α 帯の吸収より大きいことが分かる(Fig.13-3)。一般に P450 は酸化状態においては α 帯の吸収が

β 帯より大きい、基質もしくは阻害剤が結合することで β 帯の吸収が増大する。P450foxy の脂肪酸への K_d は数 μ M であるため、還元酵素ドメインが存在しないことで反応が進まなかった大腸菌由来の脂肪酸が活性部位に結合したまま精製されたと予想される[51]。

Fig.13-4 に、トリデカン酸(C13)を添加によるスペクトル変化及び K_d 測定値を示す。N-His foxy、C-His foxy、C-His P450 ドメインにおいて同様に Type I スペクトル変化を示し、 K_d の値もほぼ等しかった。この結果は His tag および還元酵素ドメインの有無は、基質結合に影響を及ぼさないことを示す。no-His foxy、N-His foxy、C-His foxy を用いて飽和脂肪酸に対する反応性を測定した(Fig.13-5)。no-His foxy、N-His foxy においては、炭素鎖 12 に対して最も高い特異性を示し、turnover もほぼ同程度であった。しかし C-His foxy では turnover は 1/2 程度に低下しており、炭素鎖 12 付近に特異性を示す傾向が見られたが、明確な特異性が失われた。上述の実験より、His tag の有無は脂肪酸の結合性に影響を及ぼさないことが明らかになっているため、C-His foxy では、水酸化反応が進行する過程、すなわち還元酵素ドメインから P450 ドメインへの電子の伝達する段階で阻害を受けていることが示唆される。

Fig.13-6 に、各コンストラクトの還元酵素活性を測定した結果を示す。No-His foxy、N-His foxy の通常条件での turnover は約 1000 min^{-1} であるのに対し、C-His foxy、C-His 還元酵素ドメインでは 500 min^{-1} であり、その活性は 1/2 に低下していた。この活性低下は、脂肪酸水酸化活性における活性低下率に一致しており、C 末端に His tag が付加されることにより還元酵素ドメインの活性が低下し、脂肪酸水酸化活性の turnover が低下することが推測された。また、融合型 P450 は基質である脂肪酸を添加することで、還元酵素活性が上昇するという特徴が報告されているため[118]、 $125 \mu\text{M}$ ドデカン酸を添加した際の還元酵素活性を比較した。No-His、N-His foxy では turnover が $2500\text{-}3000 \text{ min}^{-1}$ となり、約 2.6 倍に上昇し報告が再現された。C-His foxy では turnover が約 2500 min^{-1} となり、その活性上昇率は 5.6 倍にも達した。本実験において最も興味深い結果が、C-His 還元酵素ドメインにおいても脂肪酸を添加することで還元酵素活性の上昇が観察されたことである。脂肪酸を添加することで turnover は約 3000 min^{-1} にも至り、活性上昇率は 6.4 倍であった。通常条件の活性測定では、C-His の存在により活性が半分低下したが、脂肪酸添加によって誘導される活性上昇率は no-His、N-His を大きく上回り、ほぼ同程度に至った。P450 還元酵素の立体構造は、C 末端が酵素内部に巻き込まれる形でフォールディングしているという報告がある[111]。Fig.13-7 にマウス由来の P450 還元酵素の C 末端の立体構造を示す。補酵素 FAD は C 末端から二番目の Trp の側鎖とスタッキングにより結合している。P450BM3、P450foxy においてそれぞれ Trp1046、Phe1065 が同位置に存在しており、His tag が付加することで構造が変化し、FAD の保持能力が低下することが活性低下の理由であると考えられる。脂肪酸を添加することで活性の復帰が起こる

が、構造変化が C 末端付近に影響している可能性を示す。

P450 の反応サイクルにおいて、活性部位に基質が結合することで酸化還元電位が上昇し、還元酵素より電子の受け取りが可能になる。P450BM3 における研究で、基質が活性部位内部に結合することで還元酵素ドメインを含めた大きな立体構造変化がおこり、その結果還元酵素活性が上昇するという予測がある[119]。さらに最近 P450BM3 は、電子の伝達に際して二量体構造をとり、互いの還元酵素ドメインから、P450 ドメインへ電子を受け取るモデルが提唱されている。P450BM3 の反応には二量体構造が必須であり[120]、その単量体・二量体の平衡は溶液中の塩濃度および、脂肪酸の有無によって影響を受けると報告されている(Fig.13-8)[121]。この報告は、融合型 P450 における基質添加による還元酵素活性の上昇を説明しうる結果であると思われたが、P450foxy はゲル濾過カラムの結果から、常に二量体構造をとっていることが推測されている。還元酵素ドメインもまた、常に二量体構造をとっているようである。還元酵素ドメインを、500 mM KCl 条件、125 μ M C12 条件で 30 min インキュベートしたのち、native PAGE に供して挙動を比較したが、無処理のものと比較して変化はなかった。さらに、125 μ M C12 を含んだ緩衝液を用いてゲル濾過カラムで還元酵素ドメインを分離したが、C12 の有無で溶出体積に差はなかった(上記の実験結果は示さず)。これらの結果は、P450foxy が常に二量体構造をとっており、脂肪酸の添加によって四次構造が変化しているわけではないことを示す。

次に C-His 還元酵素ドメインを用いて、活性上昇を誘導する脂肪酸炭素鎖長の特異性の有無を調べ、脂肪酸水酸化活性における炭素鎖長特異性と比較した(Fig.13-8)。還元活性上昇に関して明確な炭素鎖長特異性があり、驚くべきことに脂肪酸水酸化活性における特異性と完全に一致した。さらに C12 濃度を変化させて還元酵素活性の上昇を測定したところ、一定濃度で飽和が見られ、C-His 還元酵素ドメインは C12 に対して $K_m = 21.8 \mu\text{M}$ であった(Fig.13-9)。以上の結果から、脂肪酸が P450 ドメインだけでなく、還元酵素ドメインにも結合し、作用していることが示唆された。

P450BM3 においても還元酵素ドメインに脂肪酸を添加した結晶構造解析は試みられた例はないため、脂肪酸がどこに、どのように作用しているかは不明である。補酵素として FAD、FMN が含まれており、還元酵素ドメインのスペクトルではそれらに由来した 380、450 nm 付近の特徴的な吸収が見られる。この吸収は結合部位周辺が疎水性環境になる、すなわち脂肪酸が結合することで吸収が変化することが報告されている[122]。これを利用して還元酵素ドメインに C12 を滴定することでスペクトル変化の有無を観察した(Fig.13-11)。前実験で測定した $K_m = 21.8 \mu\text{M}$ を大幅に超える濃度を添加してもスペクトル変化は観察されず、すくなくとも脂肪酸は補酵素の周辺に結合しているわけではないことが推測された。

P450 ではないが、還元酵素との融合酵素として NO 合成酵素(NOS)が知られている。この酵素も酸化酵素ドメインと還元酵素ドメインよりなり、反応に必須な電子

は還元酵素ドメインからヘムに導入される。その際の電子移動には、カルモジュリンとテトラヒドロビオプテリンの結合および、ホモ二量体の形成が必要であることが示されている(Fig.13-12)[123]。融合型 P450 においてはこのような制御因子の存在は報告されておらず、P450 ドメインに基質が結合することがシグナルとなって、分子全体に構造変化が起こり高い反応回転が誘導されると推測されている。しかし本実験から、今まで基質として考えられてきた脂肪酸が還元酵素ドメインに結合することが明らかになり、P450foxy における電子伝達のエフェクターとして機能している可能性が示唆された。また、還元酵素活性上昇に効果のある脂肪酸炭素鎖と脂肪酸水酸化活性における特異性が一致するという可能性も示唆的であるといえる。P450foxy の生理的機能は未だ不明であるが、前任者はポリケタイドを始めとした二次代謝産物の生合成に関与する可能性を提案していた。P450foxy は脂肪酸を水酸化する活性を持つことが知られているが、エフェクター分子としての脂肪酸が偶然活性部位に結合することができるためではないか、と推測している。Table.1-4 に示すように、P450foxy の活性部位入口に存在する K48 は、他の糸状菌・放線菌由来の融合型 P450 では保存されていないことが多く、実際にそれらは脂肪酸に対する結合能を有していなかった(Fig.8-4)。この結果も上述の推測を支持すると考えられた。

現段階では、状況証拠のみしか得られていないが、詳細は、同蛍光分析および脂肪酸添加条件での還元酵素ドメインの結晶構造解析によって明らかになると期待している。

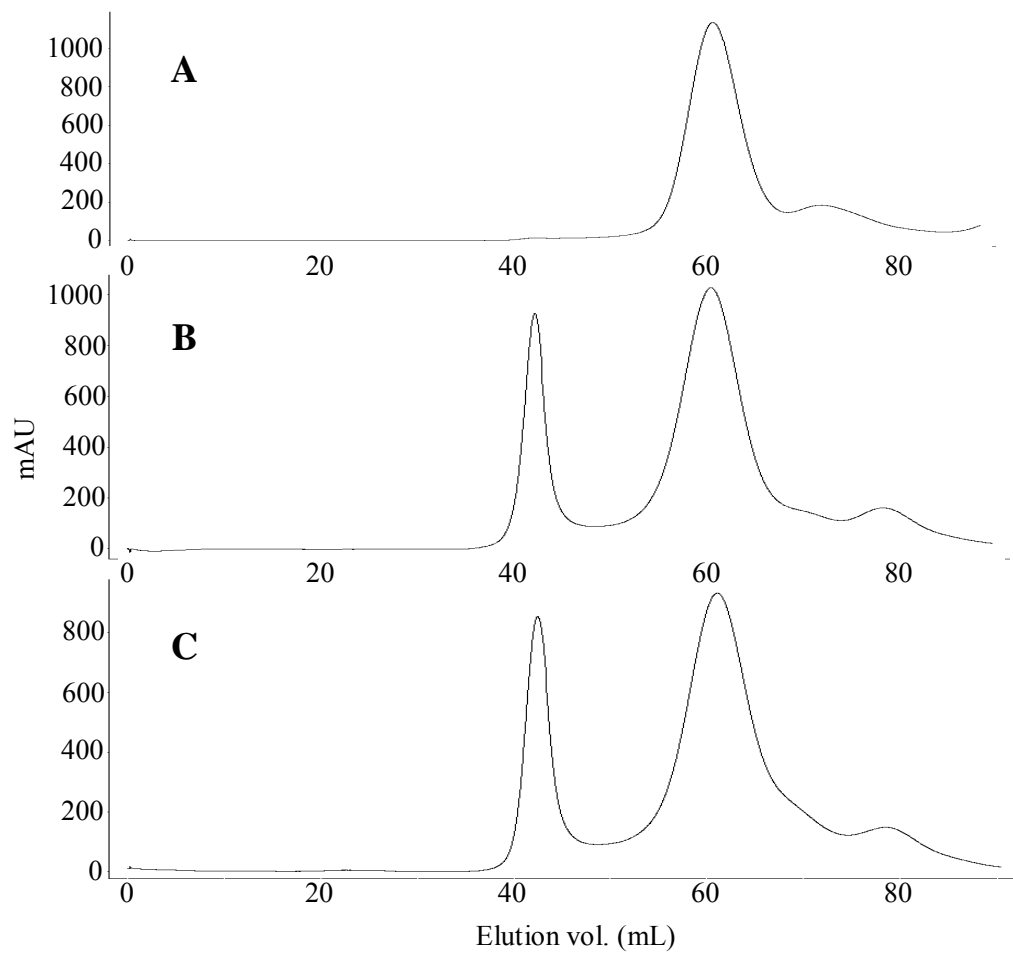


Fig.13-1 全長P450foxy(no-His, N-His, C-His)のゲル濾過カラムにおける溶出挙動の比較
 A : no-His foxy B : N-His foxy C : C-His foxy

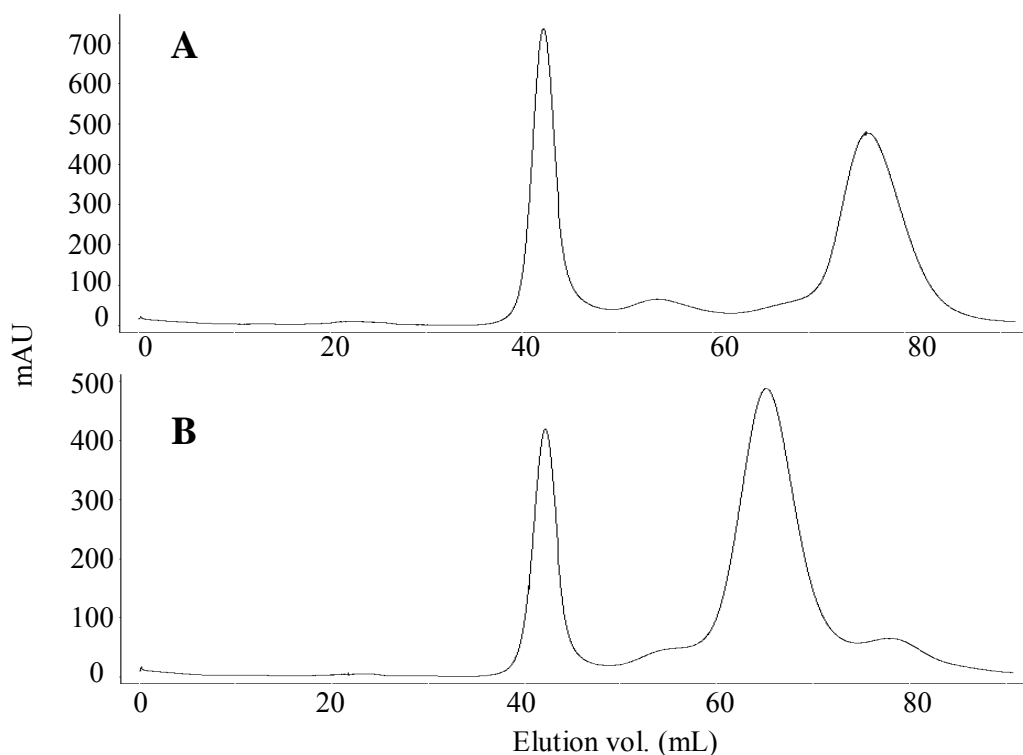


Fig.13-2 P450foxyのP450、還元酵素ドメインのゲル濾過カラムにおける溶出挙動の比較

A : P450ドメイン B : 還元酵素ドメイン

Table.13-2 ゲル濾過カラム溶出体積からの分子量の見積もり

Protein	M.W.	log(M.W.)	Elution vol. (mL)
Thyroglobulin	669000	5.825	47.2
Apoferritin	443000	5.646	54.1
Alcohol dehydrogenase	150000	5.176	62.8
BSA	66000	4.820	74.1
Carbonic Anhydrase	29000	4.462	86.1
no-His foxy	203926	5.309	61.48
N-His foxy	208208	5.318	61.23
C-His foxy	212050	5.326	61.01
C-His foxy P450 domain	59990	4.778	76.2
C-His foxy Red. domain	150935	5.179	65.1
P450foxy	119000		
P450 domain	54000	<u>Theoretical M.W</u>	
Reductase domain	65000		

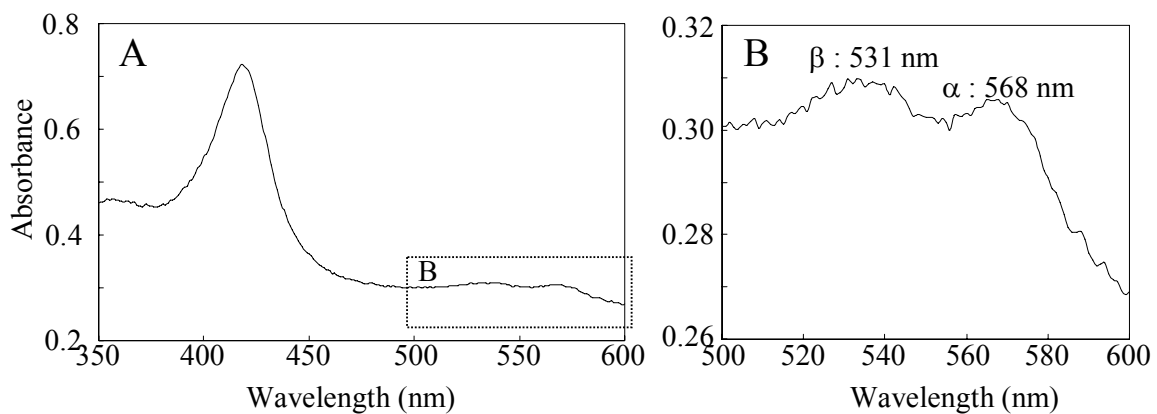


Fig.13-3 P450foxy、P450ドメインの酸化状態スペクトル

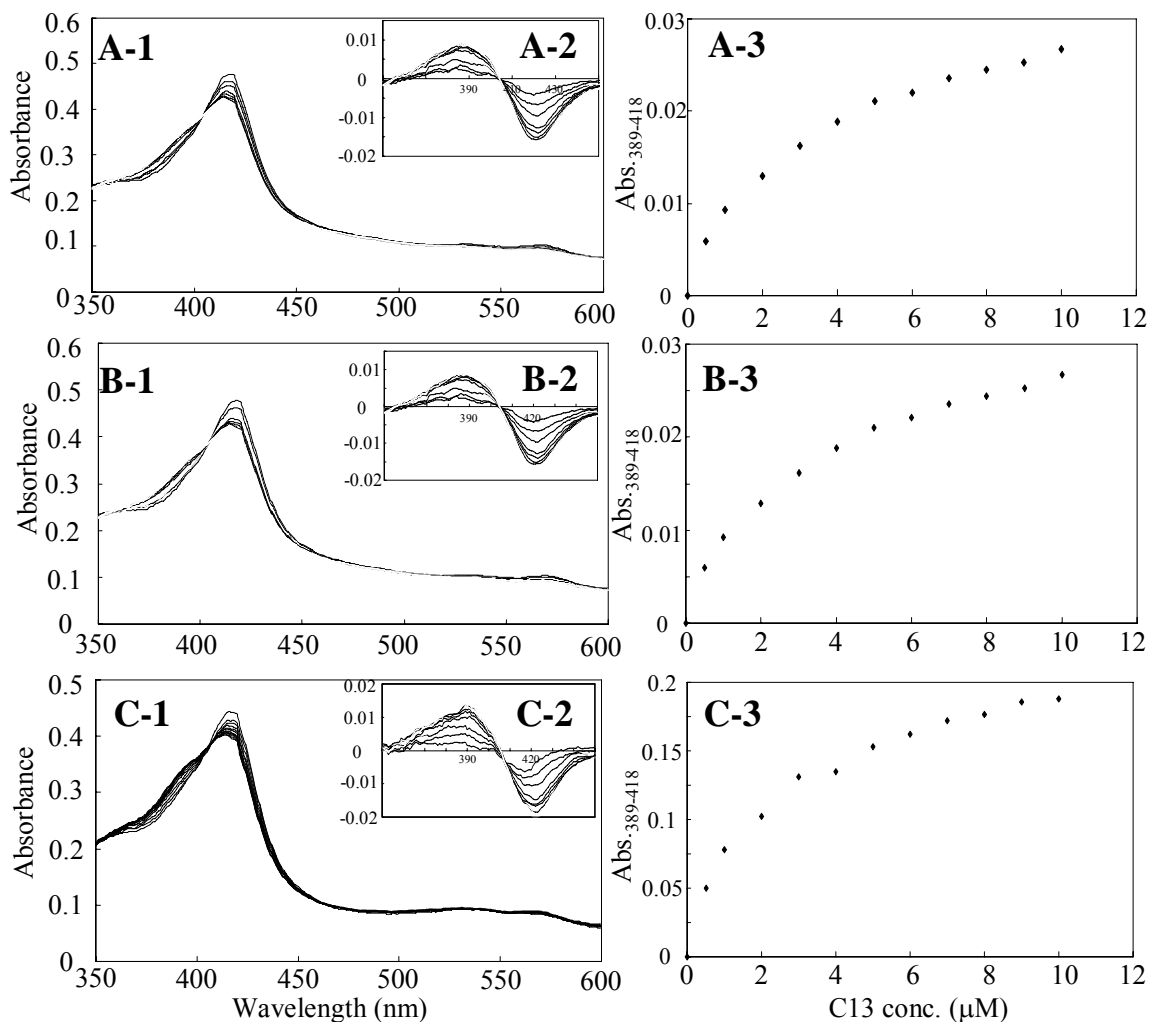


Fig.13-4 Tridecanoic acid 添加によって誘導されるスペクトル変化及び K_d 値

A : N-His foxy B : C- His foxy C : C-His P450ドメイン
 1 : スペクトル変化 2 : 差スペクトル 3: O.D.₃₈₉₋₄₁₈ vs C13 conc.
 0.5 μ M C13 DMSO溶液による滴定

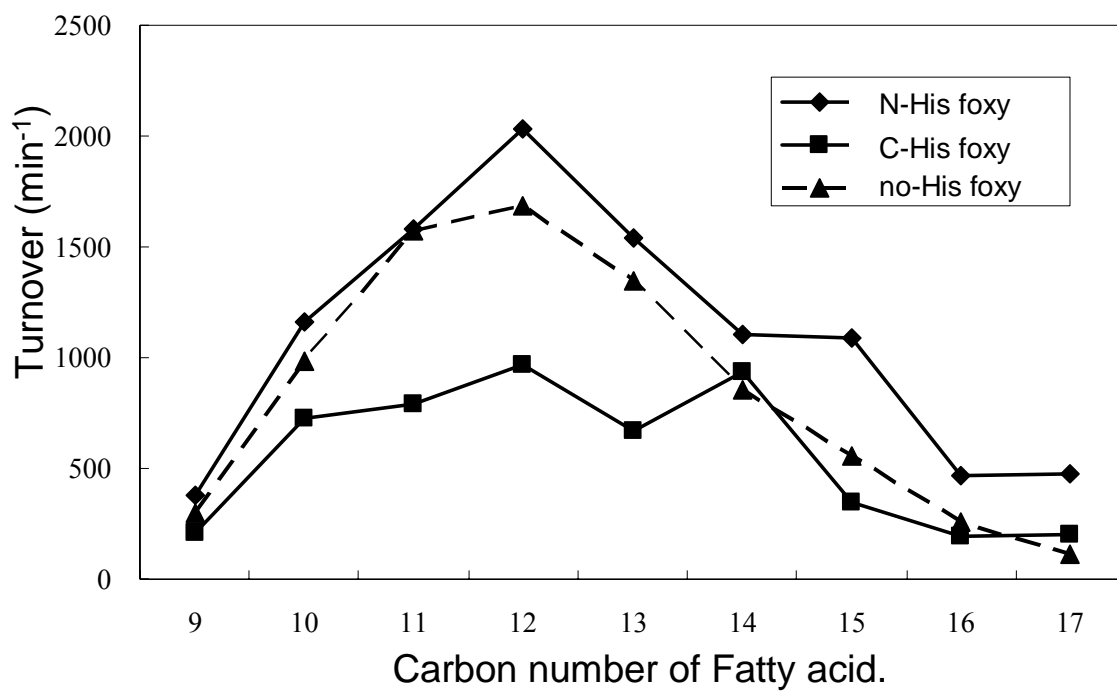


Fig.13-5 His tagの有無がP450foxyの脂肪酸水酸化活性に与える影響
各試料は三連で測定を行った。

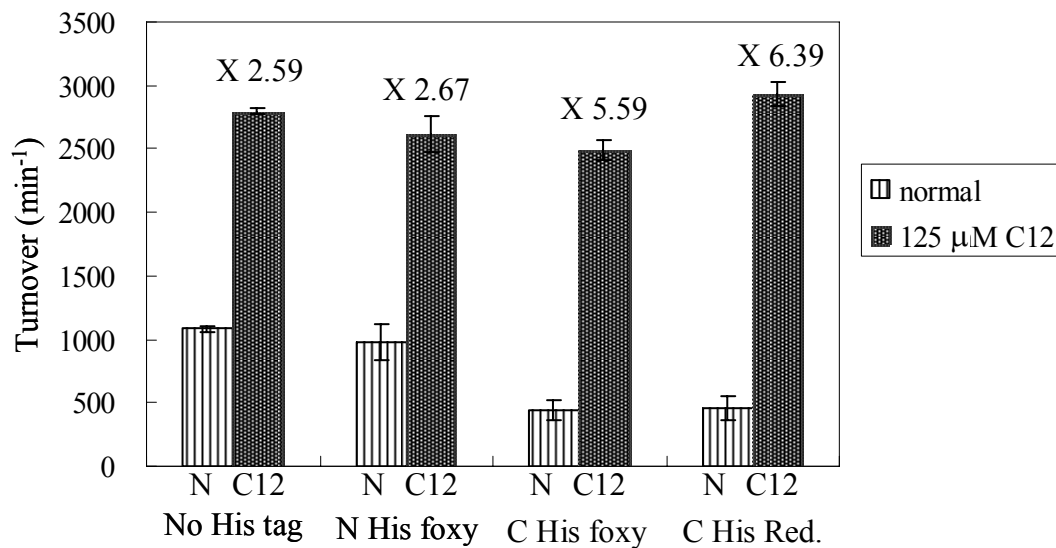


Fig.13-6 His tagの有無がP450foxyの還元酵素活性に与える影響

N : 通常の試験条件

C12 : 125 μM ドデカン酸添加.

バーの上の数値は、dodecanoic acidを添加した際の活性上昇の割合を示す。測定はそれぞれ三連で行った。

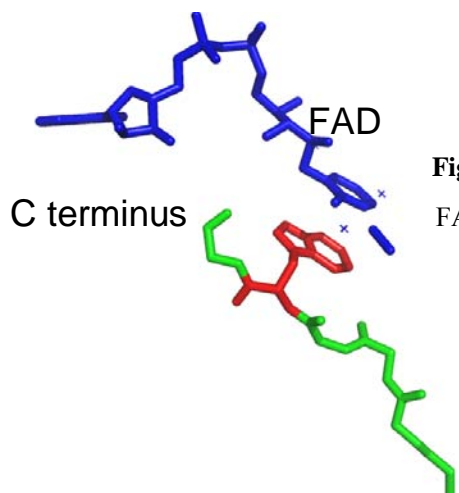


Fig.13-7 マウスP450還元酵素のC末端配列及びFADの結合

FADと相互作用するTrpを赤、FADを青で示す。

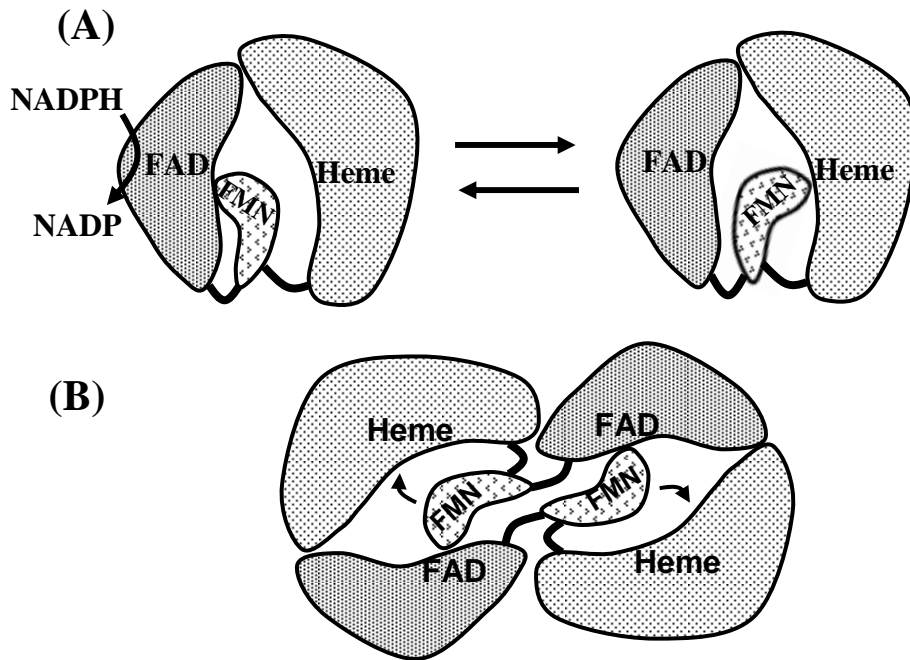


Fig.13-8 P450BM3のドメイン間電子伝達モデル

(A) 単量体での電子伝達(分子内伝達) (B) 二量体での電子伝達(分子間伝達)

様々な実験報告から、二量体電子伝達が支持されている。

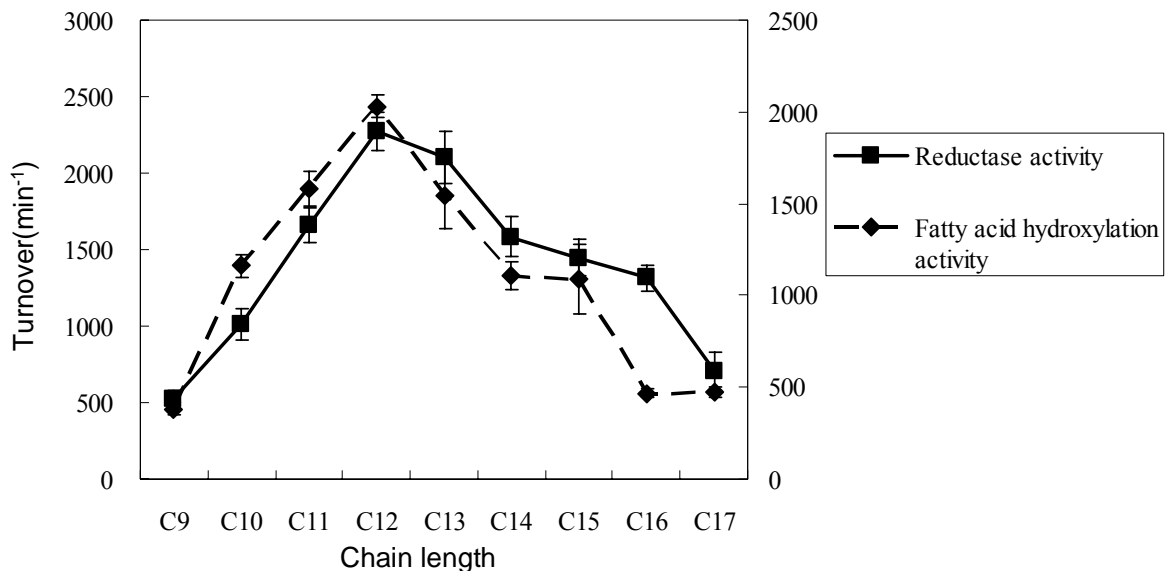


Fig.13-9 還元酵素ドメインの活性上昇に寄与する脂肪酸の炭素鎖特異性および、全長酵素の脂肪酸水酸化活性の炭素鎖特異性の比較

還元酵素ドメインの活性測定はシトクロム *c* の還元に伴う 550 nm の吸収増大により行った。

脂肪酸水酸化活性は、no-His foxy を用い、反応進行に伴って減少する NADPH の 340 nm の吸収減少を観察した。

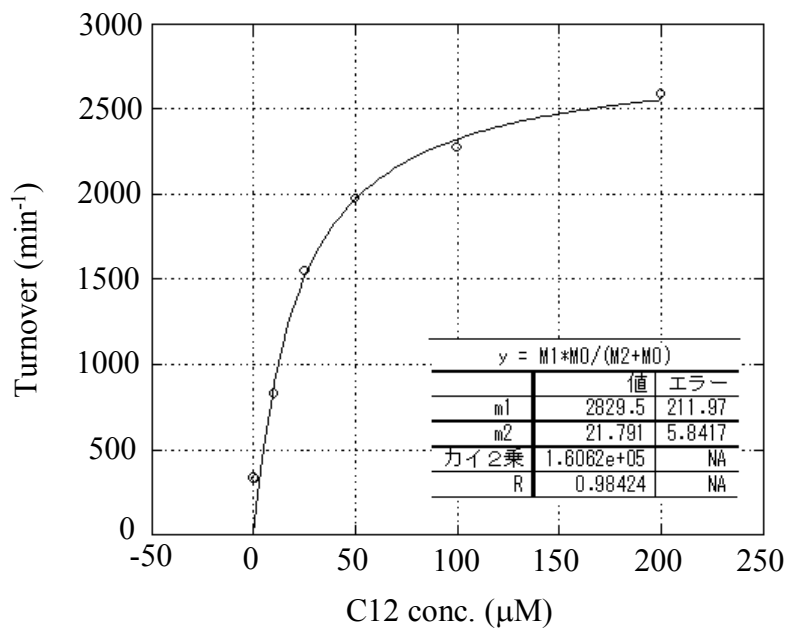


Fig.13-10 C-His 還元酵素ドメインのC12に対する K_m の測定

$$K_m = 21.8 \pm 5.8 \mu\text{M} \quad V_{\text{max}} = 2830 \pm 212 \text{ min}^{-1}$$

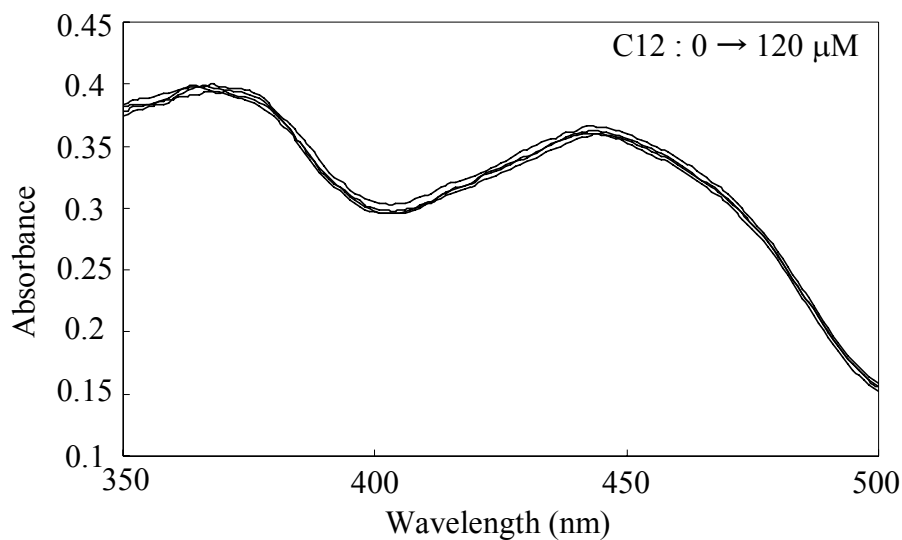


Fig.13-11 還元酵素ドメインにdodecanoic acidを添加した際のスペクトル変化

20 mM dodecanoic acid DMSO溶液を用い、20 μM刻みで滴定してスペクトル変化を観察した。

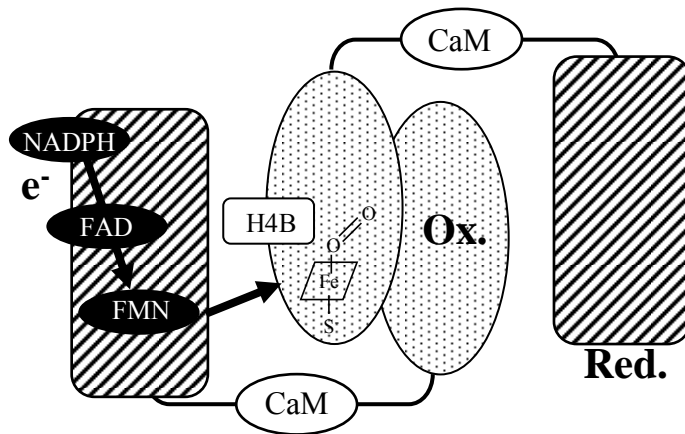


Fig.13-12 NOS の電子伝達における二量体構造

Ox. : 酸化酵素ドメイン Red. : 還元酵素ドメイン

H4B : テトラヒドロbioプテリン CaM : カルモジュリン

第十四節 QuikChange 法による P450foxy F88 変異体の作製

P450BM3 において、活性ポケット内部のヘム上部に存在する Phe87(F87)は、基質である脂肪酸の末端炭素と相互作用することが結晶構造解析の結果から明らかになっている[53, 124]。また、活性ポケット入口から見て真下に位置する残基でもあるため、外部から溶媒の侵入を防ぐ作用を持つ可能性も示唆されている。P450BM3 の変異体実験において F87V 変異体は、脂肪酸水酸化反応の位置特異性が変化し、 ω 末端にも水酸化反応が進行すること[125]、長鎖不飽和脂肪酸のエポキシ化反応を触媒するようになることが明らかになっており[126, 127]、F87 が P450BM3 において重要な機能を持つことが示唆される。P450foxy においても、相当する F88 および周辺の配列は保存されており、変異を導入することで反応性を変化させることができると予想した。

14-1 方法

QuikChange 法による F88 変異体の作製(Fig.14-1)

F88 の Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Trp 変異体を QuikChange 法によって作製した。Table.14-1 に示すプライマーを設計し、pCWfoxy を鋳型として用い、前述の PrimeSTAR HS polymerase を用いた方法で QuikChange PCR を行い、変異プラスミドを作製した。配列を読み、変異の導入を確認した。変異プラスミドを *BspE* I、*Nru* I で処理し、電気泳動で分離することで変異が導入された DNA 断片を得た。同酵素で処理した pCW N-his foxy ベクターにライゲーションし、大腸菌 DH5 α にリトランスフォーメーションし発現株とした。

Table.14-1 F88変異体作製用Quickchangeプライマー

F88G	F	gtgcacgatggcctcGGCacagcattcgagg
	R	cctcgaatgctgtGCCgaggccatcgtgcac
F88A	F	gtgcacgatggcctcGCgacagcattcgagg
	R	cctcgaatgctgtCGCgaggccatcgtgcac
F88V	F	gtgcacgatggcctcGTGacagcattcgagg
	R	cctcgaatgctgtCACgaggccatcgtgcac
F88L	F	gtgcacgatggcctcCTGacagcattcgagg
	R	cctcgaatgctgtCAGgaggccatcgtgcac
F88I	F	gtgcacgatggcctcATTacagcattcgagg
	R	cctcgaatgctgAATgaggccatcgtgcac
F88W	F	gtgcacgatggcctcTGGacagcattcgagg
	R	cctcgaatgctgtCCAgaggccatcgtgcac

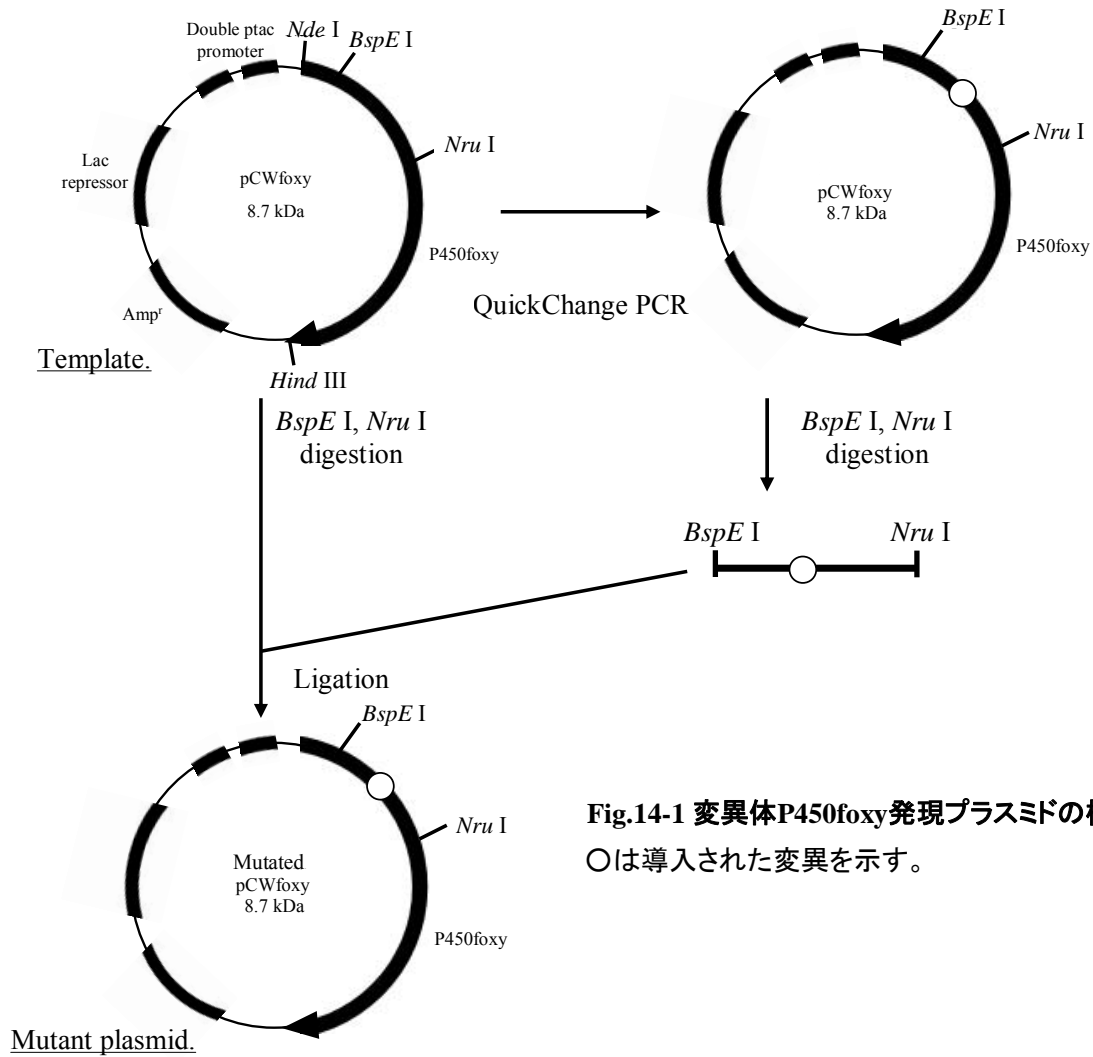


Fig.14-1 変異体P450foxy発現プラスミドの構築
○は導入された変異を示す。

F88 変異体の発現及び精製

前述の P450foxy 野生型の発現と同様に発現、HisTrap カラム、Superdex200 カラムによって精製を行った。精製後の試料を SDS-PAGE に供し、精製度を確認した。

変異体の UV-vis スペクトルおよび基質結合により誘導されるスペクトル変化

変異体 P450foxy の UV-vis スペクトルは、前述の方法に従って行った。

脂肪酸水酸化活性測定および炭素鎖数特異性に与える影響

前述の方法で、各変異体について脂肪酸水酸化活性測定を行った。

F88 変異体による色素形成能の評価

いくつかの F88 変異体の発現培養において培地中に、水に不溶性の青色色素の蓄積が見られた。前述の試験管レベルの発現培養を行い、色素形成能の評価を試みた。

(A)生成色素の同定を行った。色素を生成した培養菌体を 1.5 mL マイクロチューブにいれ、9000 xg、2 min の条件で遠心分離することで集菌した。適当量の DMSO を添加して再懸濁し、15000 xg、5 min、室温の条件で再度遠心分離し、上清を分取した。350-700 nm の範囲で UV-Vis スペクトルを測定した。

(B) 変異体のグリセロールストックから、1 mL LB 培地(100 µg/ mL Amp.)を入れた試験管に植菌し、37°C、150 rpm の条件で 12 hrs 以上振とう培養した。3 mL TB 培地(100 µg/ mL Amp.)に 1%植菌し、37°C、150 rpm、2 hrs 振とう培養した。1 mM IPTG、0.5 mM 5-aminoluvulinic acid、1 µg/mL Clm.として発現を誘導し、引き続き 30°C、150 rpm、48 hrs の条件で培養した。培養後、試験管を十分にボルテックスし、培養液 500 µL を 1.5 mL マイクロチューブに分取し、9000 xg、1 min 遠心分離することで菌体を回収した。培地を十分に除去し、500 µL DMSO を添加して再懸濁することで生成した色素を可溶化させた。15000 xg、5 min、室温の条件で遠心分離し、上清を分取した。300 µL の試料を 96 穴マイクロプレート(IWAKI : 3860-096)にいれ、670 nm の吸光度をマルチウェルプレートリーダー Benchmark Plus (Bio-Rad)によって測定した。以上の操作は三連で行った。また、残りの培養菌体を破碎し、SDS-PAGE に供して目的タンパク質が発現していることを確認した。

5-2 結果及び考察

pCWfoxy を鋳型にした QuikChangePCR により、6 種類の変異体(F88G、F88A、F88V、F88L、F88I、F88W)を作製した。QuikChangePCR は困難であったが、前述の方法を用いることで比較的高効率で変異体を得ることができた。また、PCR 産物にプライマーがいくつも連結して導入されてしまうという原因不明の障害がしばしば発生したが、プライマーの塩基数を 35 以上、PCR におけるアニーリング温度を T_m に関わ

らず 70°C と高めから検討することで解消することができた。作製した変異体発現プラスミドを大腸菌 DH5 α に導入し、発現培養を行った。全てのプラスミドにおいて野生型と同様に発現させることができた。また発現培養中に一部の変異体 F88G、F88A、F88V、F88I において、培地中に青色の色素が蓄積する現象が見られた(Fig.14-2)。得られた菌体から cell free extract を調製し、前述の方法に従い Ni²⁺キレートカラム、ゲル濾過カラムに供して精製を行った。精製過程における挙動は野生型と同様であり、二段階の精製で SDS-PAGE 上ほぼ単一バンドにまで精製することができた(Fig.14-3)。この試料を用い、スペクトル測定を行った。全てにおいて CO 差スペクトルにおいて 450 nm 付近の吸収極大が観察された。しかし F88G、F88A、F88V 変異体において 420 nm 付近に変性酵素 P420 に相当する吸収が見られ、アミノ酸側鎖が小さいほど吸収が大きくなる傾向があった。また、F88G の酸化状態におけるスペクトルは 350-400 nm 付近にかけて吸収が増大したブロードした形状であった(Fig.14-4)。F88I、L では野生型と同一な挙動を示したが、F88W の酸化型スペクトルは野生型と一致しているが、CO 差スペクトルでは顕著な P420 の吸収が見られた。単一まで精製した酵素を、BCA 法及び CO 差スペクトルの吸収からの P450 濃度測定に供し、適切にフォールディングしている酵素の割合を算出した(Table.14-2)。野生型が 79%、F88V、F88L、F88I ではほぼ 100%の酵素が適切なフォールディングがなされていたが、F88A では 56%、F88G、F88W に至ってはそれぞれ 34%、37%と適切にフォールディングされた酵素の割合が低下しており、スペクトル測定の結果と一致した。これらの結果より、F88 は P450foxy のフォールディングに関係があり、適切なサイズのアミノ酸残基が存在する必要があると考えられる。P450 の活性部位内部は疎水性に保たれている必要があるが、F88G、F88A では側鎖が小さすぎて外部からの溶媒、基質の侵入を容易にしてしまう。また逆に F88W では、トリプトファン側鎖が大きすぎるため、ヘム及び周辺残基に直接干渉する。F88V、I、L 変異体では、その側鎖のサイズが F88 の代替として許容範囲にあるのだろう。

各変異体酵素にトリデカン酸を添加した際のスペクトル変化を示す(Fig.14-6)。F88G、F88W においては 500 μ M まで濃度を上げて Type I スペクトル変化は観察されなかった。F88G ではすでに Type I スペクトル変化に類する 350-400 nm 付近の吸収増大が起こっているためこれ以上変化しない、もしくは 88 位の疎水性アミノ酸がなくなったことにより活性部位内の環境が疎水性に保たれていないことが理由として考えられる。これは、Type I スペクトル変化は酸化状態時にヘム上に配位した水分子が基質侵入によって除去されることに由来するためである。F88W は、トリプトファン側鎖により物理的に基質の侵入及びヘムへの配位が阻害されているためであると思われる。また、F88V、F88L では野生型より大きなスペクトル変化が起こった。これも上述の理由により、88 位のアミノ酸が活性部位内部の環境を左右するという推論を支持する。Table.14-3 に基質結合スペクトルにおけるピークのシフト

及び K_d の値を示す。 K_d は、スペクトル変化が見られた変異体で全て同レベルであった。このことから、脂肪酸の結合に関して F88 の寄与は小さく、活性部位入口の塩基性アミノ酸 K48 が主となっていると思われる。また、F88G が脂肪酸添加によってスペクトル変化が誘導されないことから、88 位には単純に疎水性アミノ酸残基が存在していることが必要であるのかもしれない。

Fig.14-7 に各変異体の脂肪酸水酸化活性および炭素鎖長特異性を調べた結果を示す。全ての変異体において活性は大幅に低下しており、最も活性が維持されていた F88V においても野生型の 25% 程度の活性であり、F88I では 15% 程度であった。また炭素鎖特異性は、変異体ごとに変動が見られた。F88V は C11-13 にほぼ同程度の活性を示し、野生型と同じ特異性を持つといえた。活性は微弱ながらも F88A は C11、F88I は C13 に対して至適であった。F88G、W は C12 までの比較的短い炭素鎖長において微弱な活性を示したが、長鎖脂肪酸には反応性を示さなかった。実験に先立ち、F88 をより小さなアミノ酸に置換することで、長鎖脂肪酸に至適炭素鎖長がシフトすると予測したが、本実験ではその傾向は見られなかった。F88V、I という分岐鎖アミノ酸において活性が維持される傾向があることから、88 位のサイズより脂肪酸の炭素鎖との相互作用のしやすさが活性維持および特異性に関係していると予想される。

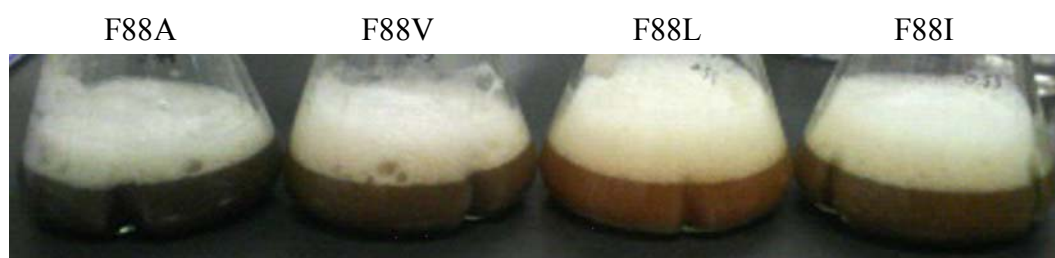


Fig.14-2 P450foxy F88変異体発現培養において培地中に蓄積する青色色素

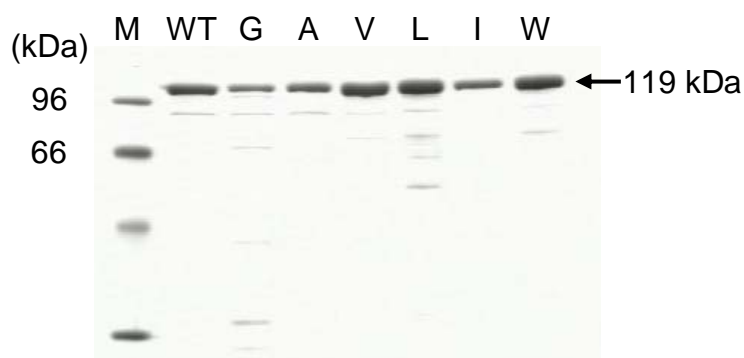


Fig.14-3 精製F88 変異体のSDS-PAGE

1 : WT 2 : F88G 3 : F88A 4 : F88V 5 : F88L 6 : F88I 7 : F88W

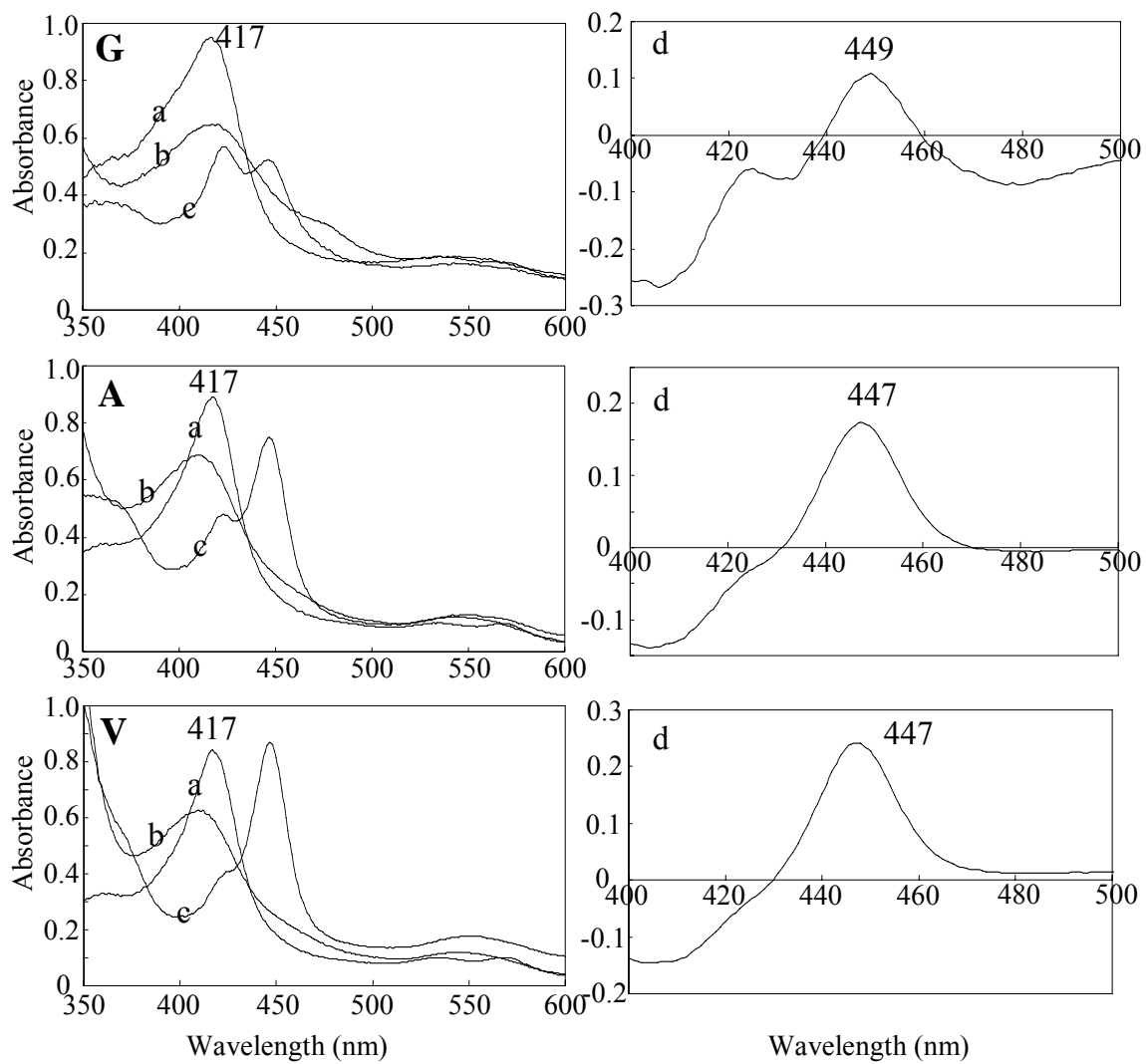


Fig.14-4 F88変異体のスペクトル変化 #1 (F88G、F88A、F88V)

グラフの左上に各変異残基を示した。ピーク上の数字は吸収極大波長を示す。

a : 酸化状態 b : ジチオナイト還元状態 c : 還元状態+CO d : CO差スペクトル

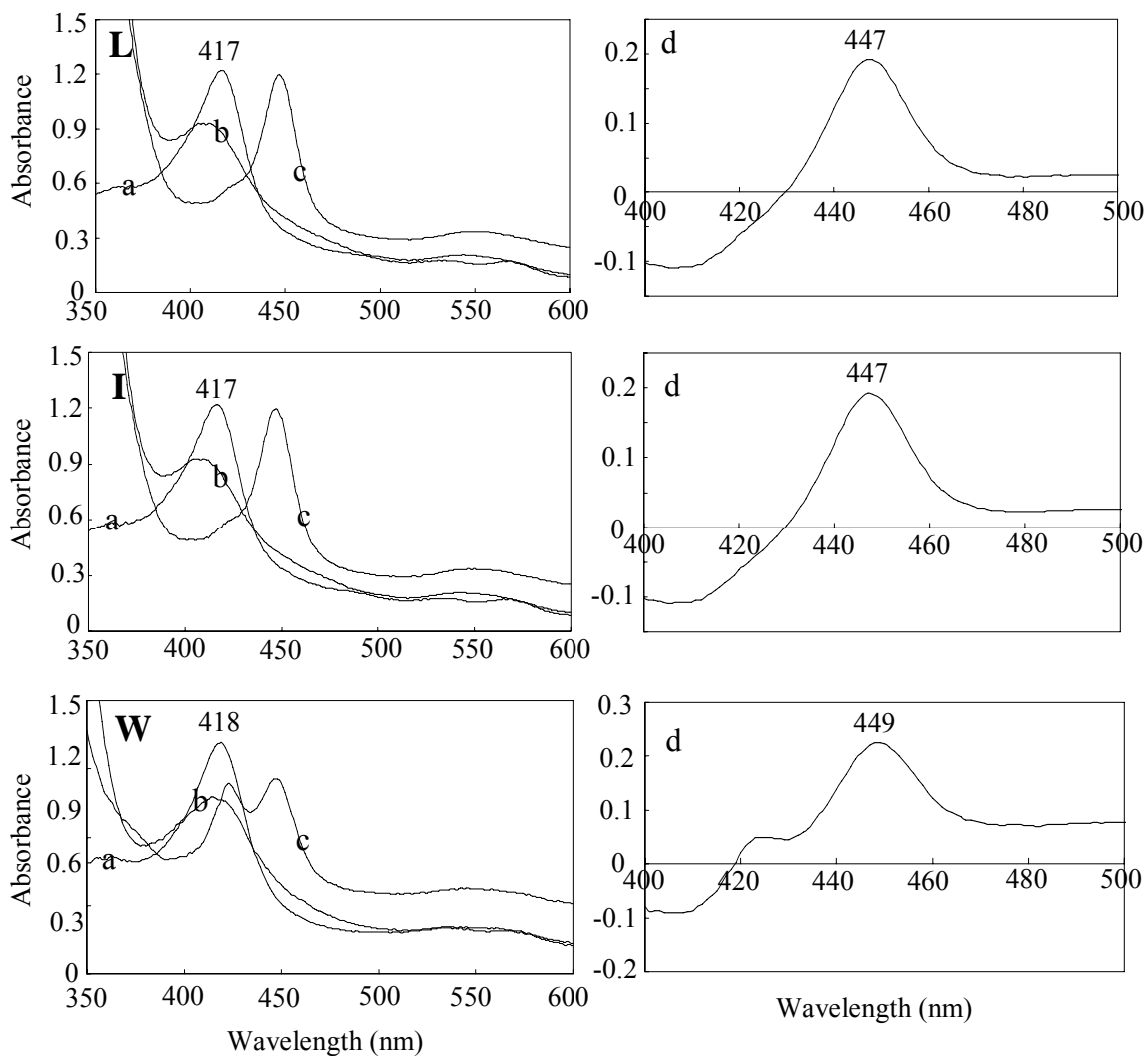


Fig.14-5 F88変異体のスペクトル変化 #2 (F88L、F88I、F88W)

a: 酸化状態 b: ジチオナイト還元状態 c: 還元状態+CO d: CO差スペクトル

Table.14-2 精製F88変異体の正しくフォールディングされたP450の割合

Sample	P450foxy conc. (μM)		Correctly folded P450 %
	BCA assay	CO difference spectra	
WT	9.3	7.4	79
F88G	9.8	3.3	34
F88A	12.2	6.8	56
F88V	11.4	14.4	126
F88L	11.0	14.8	135
F88I	11.5	11.3	98
F88W	10.9	4.0	37

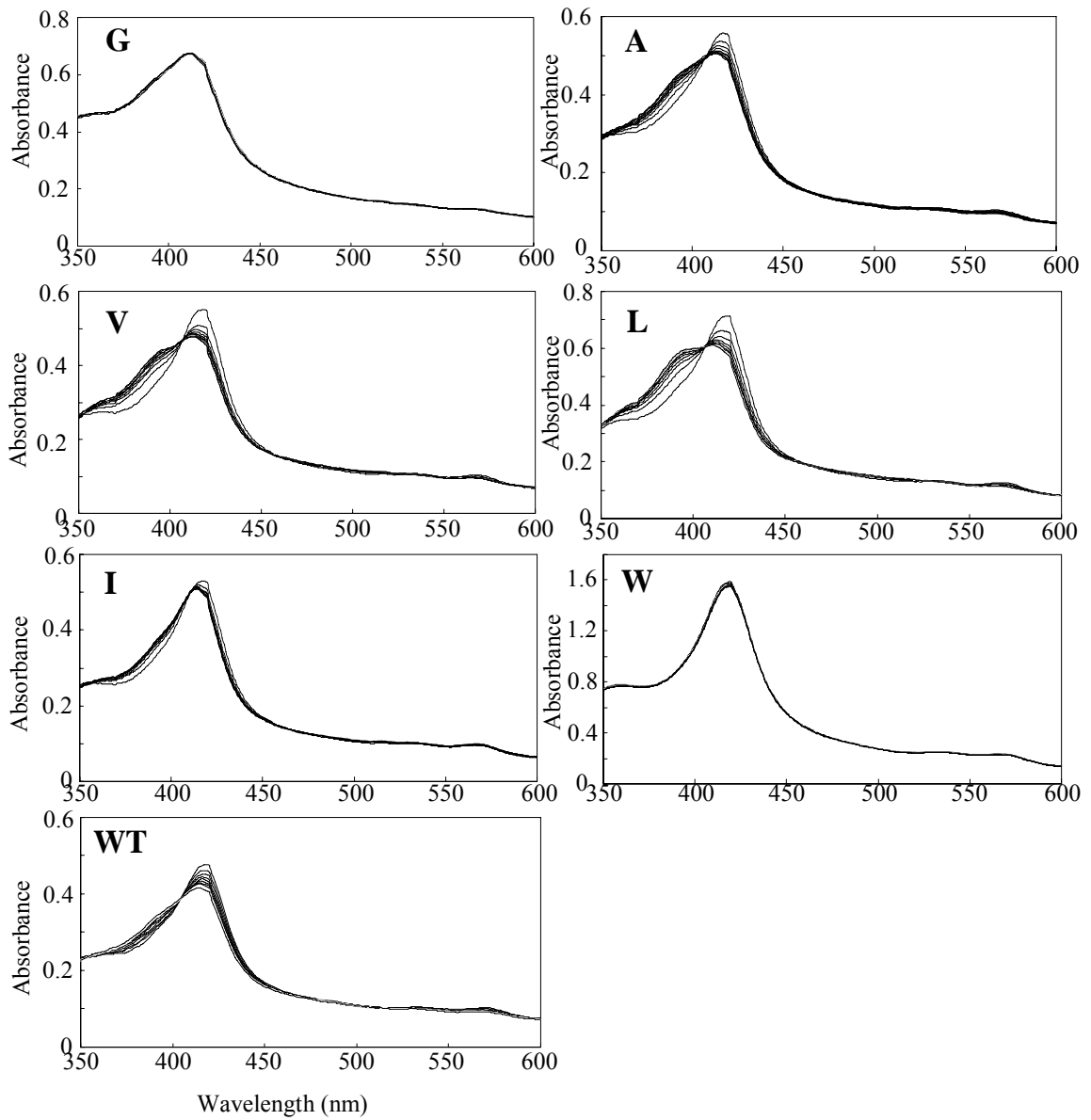


Fig.14-6 F88変異体のtridecanoic acid添加によって誘導されるスペクトル変化
 0.5 μ M C13 DMSO溶液を用いて0 \rightarrow 10 μ Mまで滴定を行った。顕著な変化が見られなかったF88G、F88Wについてはさらに500 μ Mまで測定を行っている。

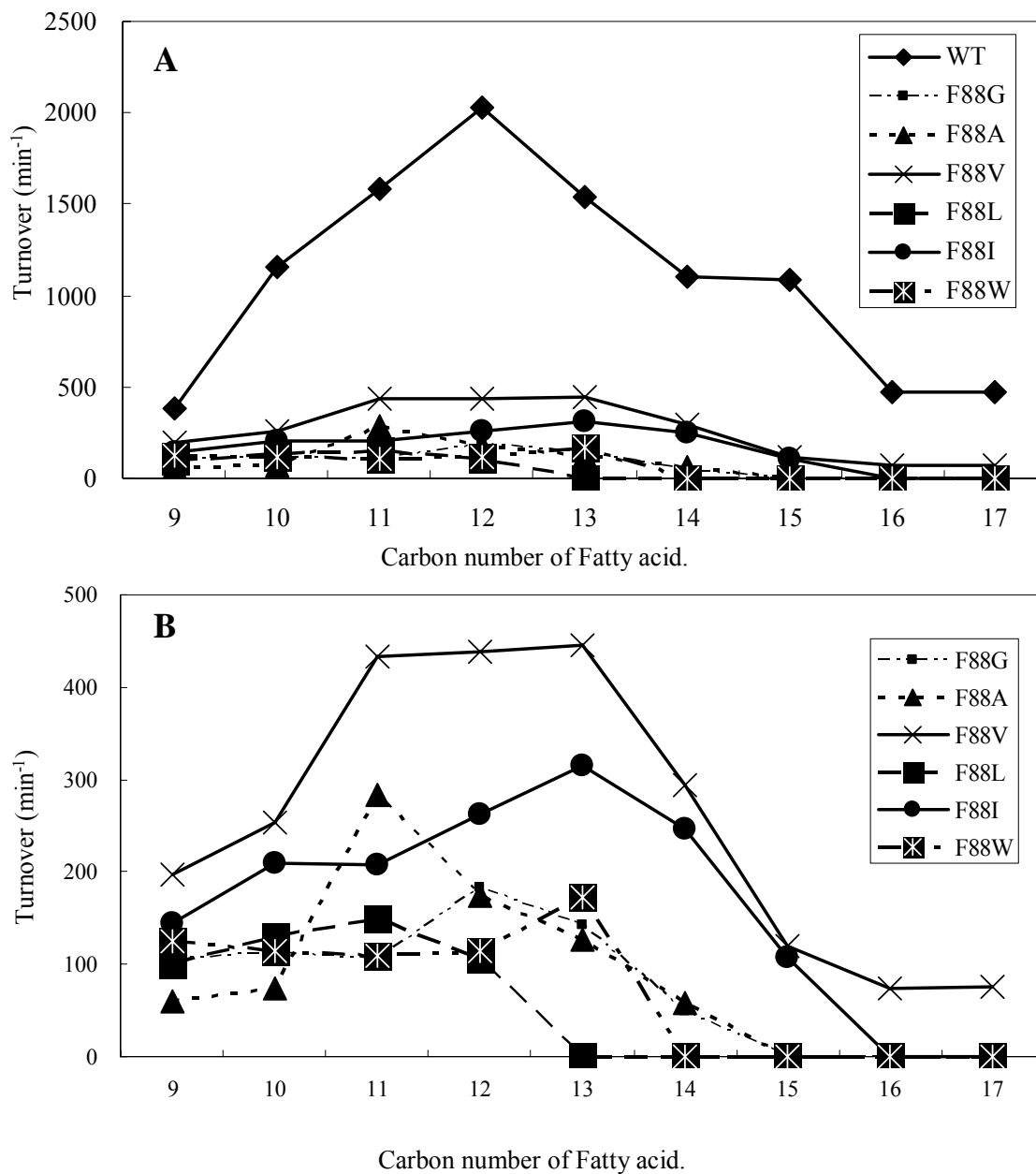


Fig.14-7 F88変異体の脂肪酸水酸化活性および炭素鎖長特異性

A: 野生型と各変異体との比較 B: 変異体だけの拡大図

それぞれ三連で測定を行っている。

Table.14-3 野生型及び各変異体のC13に対する K_d の比較

Sample	Oxidized	Type I shift	K_d	Error
no His foxy	418	389	2.75	0.18
N His foxy	418	389	3.05	0.24
C His foxy	418	389	2.58	0.15
C His P450 domain	415	389	2.18	0.22
F88G	412	n.c.	-	-
F88A	417	389	2.2	0.08
F88V	418	387	1.42	0.06
F88L	418	388	1.82	0.07
F88I	418	391	1.16	0.07
F88W	419	n.c.	-	-

n.c. : spectra was not changed

F88 変異体の発現培養において、特徴的な青色色素が蓄積される。変異体発現培養液から、水に不溶性の青色色素を DMSO により抽出し、市販のインディゴ色素 DMSO 溶液とスペクトルを比較したところ、620 nm 付近に吸収極大を持つ特徴的なスペクトルが一致した(Fig.14-8)。特徴的な青色とスペクトル的一致より、培地中に蓄積した青色色素はインディゴ色素であると同定した。P450 およびジオキシングナーゼの大腸菌発現系において同様の色素が蓄積する現象が報告されており[128, 129]、P450BM3 の変異体においてもすでに報告例があった。インディゴ生成機構は完全には明らかにされていないが、Fig.14-9 の反応経路が推定されている[41]。インディゴ色素の前駆体となるインドールは、培地に含まれるトリプトファンに由来する[130]。酵素反応によりインドールが水酸化され、2-hydroxy indole、3-hydroxy indole が生成する。これらが培養における振トウで空気酸化を受けて二量体化し、インディゴ色素となる。この推定反応機構では、最初のインドールの水酸化にのみ酵素が関わっているが、二量体化にも酵素が関与するとしている機構も提案されている[131]。

変異体酵素の色素生成能を比較するために、試験管レベルの発現培養を行った。各変異体によって生産された色素量を Fig.14-10 のグラフに示す。F88A において最も多くの色素生成が確認され、F88G、F88V、F88I がそれに続いた。色素の生成量は 88 位アミノ酸が小さいほど多くなる傾向が見られ、野生型、F88L、F88W では全く観察されなかった。各測定変異体の SDS-PAGE を Fig.14-11 に示す。野生型及び全ての変異体と同程度に発現していることが分かる。Fig.14-12 に野生型及び変異体にインドールを添加することで誘導されるスペクトル変化を示す。野生型、F88G、F88W はインドールによる Type I スペクトル変化が起こらなかったが、F88A、F88V、F88L、F88I では明確な Type I スペクトル変化を観察した。さらに 4-PI によるスペク

トル変化も検討したところ、全ての酵素において Type II スペクトル変化が起こることを確認した(スペクトルは示さない)。以上のスペクトル測定値より、インドール、4-PI に対する K_d を算出した(Table.14-4)。予想通り色素形成能を持った変異体においてインドールへの結合能を示す Type I スペクトル変化がみられ、色素の量に比例して K_d が低下する傾向が見られた。F88A ではスペクトル変化が小さすぎて正確な K_d 測定が困難であったが、グラフより 20 μM 以下であると予想される。同じく色素生成がみられる F88G はインドールによるスペクトル変化は誘導されなかったが、酸化状態において吸収極大が 412 nm とシフトしていることからすでにシフトが起こっているものと推測した。Type I シフトの大きさは、色素生産能に関しては無関係のようであった。また、10 mM 以上という高いインドール濃度において Type I シフトからさらに引き続いて Type II シフトに変化することが観察された(Fig.14-13)。これは二分子目のインドールが活性部位内に侵入したことを示し、活性部位内部でのインドール二量体化反応の可能性が考えられた。しかし Type II シフトの起こるインドール濃度が 88 位置換によって影響を受けず、また生理的条件下でインドールが 10 mM を超える濃度に至ることは考えにくい。よってこの Type II スペクトル変化は、色素形成には関係ない挙動であると結論した。Type II スペクトルの K_d は、インドールの難溶性から決定できなかった。阻害剤 4-PI によって誘導される Type II スペクトル変化は全ての酵素でみられ、こちらの K_d も色素形成能に比例して低下する傾向が見られた(Fig.14-14)。以上の結果より、88 位アミノ酸残基の立体的サイズを小さくしたことでインドール、4-PI といった芳香族化合物の活性部位への侵入、ヘム上への配位が容易になることが明らかになった。また、インドールと同様の構造を持つナフタレンを添加することでも Type I シフトが観察されたことから、他の二環性の芳香族化合物に対する反応性を有する可能性も示唆された。精製酵素を用いたインドールに対する活性測定は後述する。

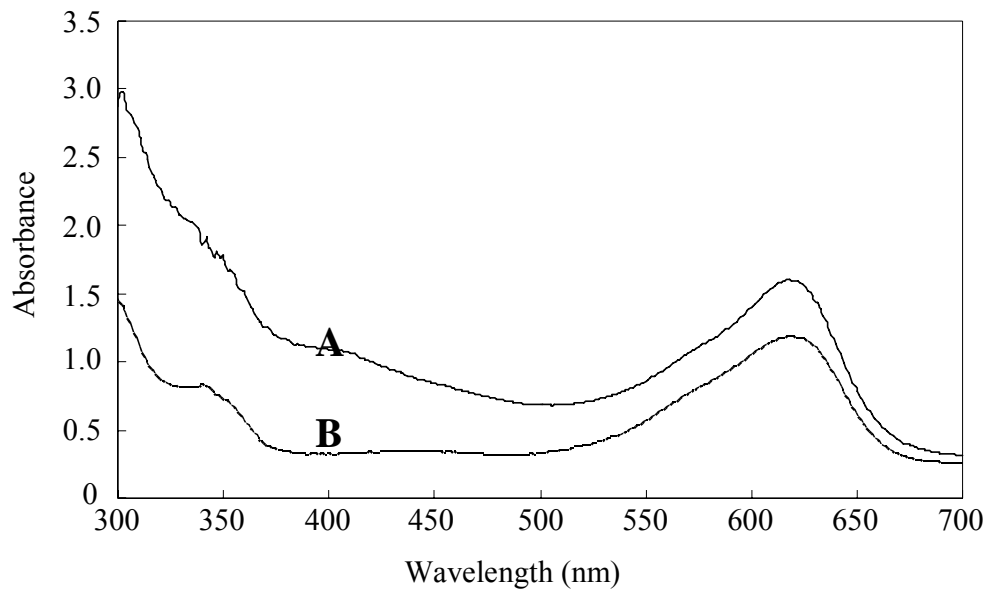


Fig.14-8 変異体発現培養において蓄積する青色色素とインディゴ色素のスペクトル比較

A : F88A変異体培地からDMSOによって抽出した色素

B : 50 μM インディゴ色素 DMSO溶液

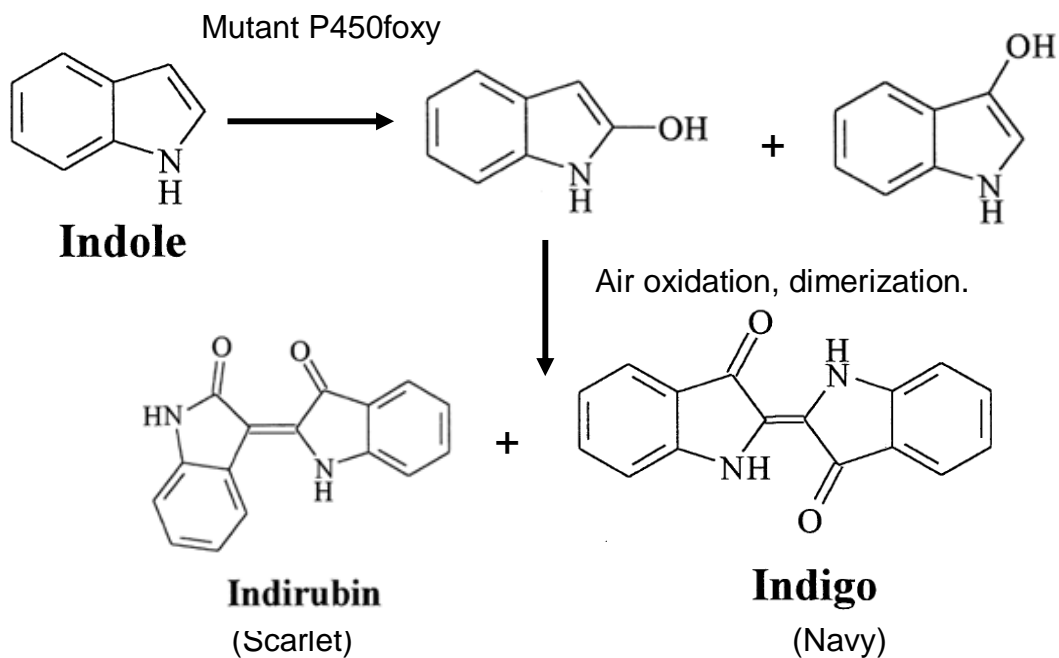


Fig.14-9 インディゴ色素形成の推定反応

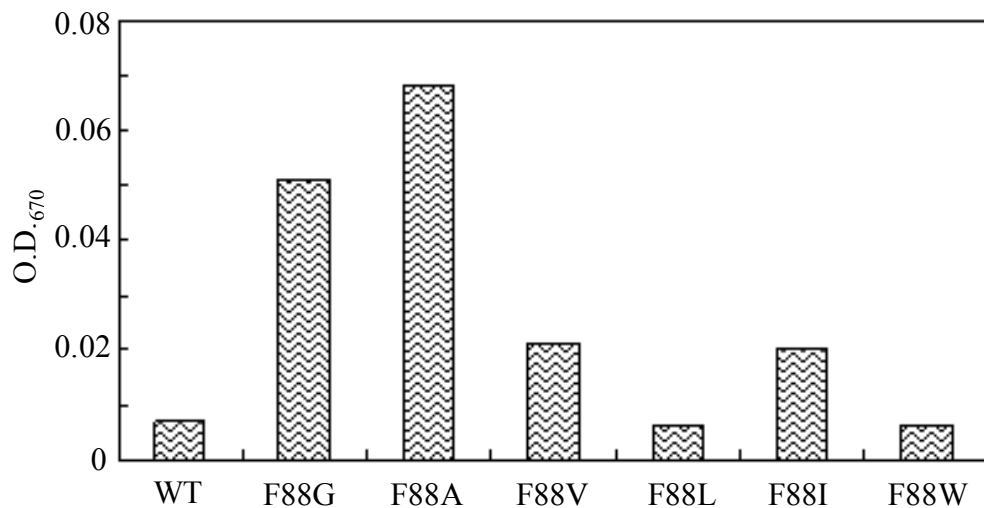


Fig.14-10 変異体が蓄積する色素量の比較

試験管スケールで、誘導後48 hrs培養後に色素の抽出を行った各三連で試験を行い、平均値を示した。



Fig.14-11 試験管レベルで培養したP450foxy野生型及び変異体のCell free extractのSDS-PAGE

P : 精製したP450foxy

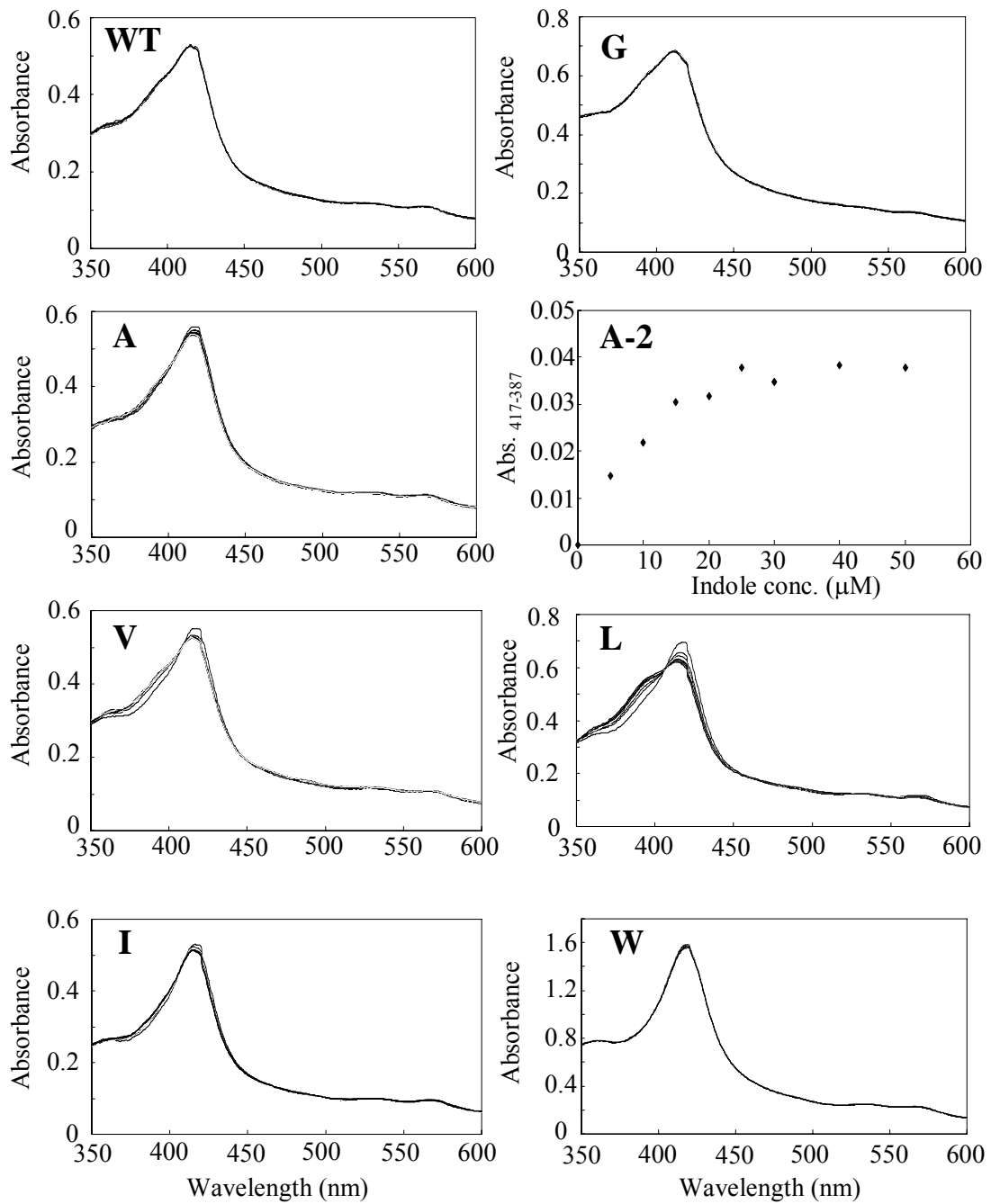


Fig.14-12 各変異体のインドール添加によるスペクトル変化

WT、F88G、F88V、F88L、F88I、F88Wは、50 mM インドールDMSO溶液を用いて500 μMまで滴定した。

F88Aは、2.5 mM インドールDMSO溶液を用いて25 μMまで滴定した。

A-2は、インドール濃度に対してAbs.₄₁₇₋₃₈₇の値をプロットしたグラフを示す。

Table.14-4 野生型及び変異体P450foxyへのインドール、4-PIの結合

Indole

	Oxidized	Type I shift	K_d (μM)	Error
WT	418	-	n. b.	n. b.
F88G	412	-	n. b.	n. b.
F88A	417	387	<20	*1
F88V	418	386	30.1	3.2
F88L	418	388	146.3	11.1
F88I	418	385	84.1	14.6
F88W	419	-	n. b.	n. b.

n.b. : not binded *1 : 誤差が大きく決定できなかった。

4-PI

	Oxidized	Type II shift	K_d	Error
WT	418	433	95.9	2.7
F88G	412	432	147.8	24.8
F88A	417	432	13.3	0.6
F88V	418	433	17.4	0.5
F88L	418	433	30	1.2
F88I	418	433	13.1	0.5
F88W	419	432	188.4	16.3

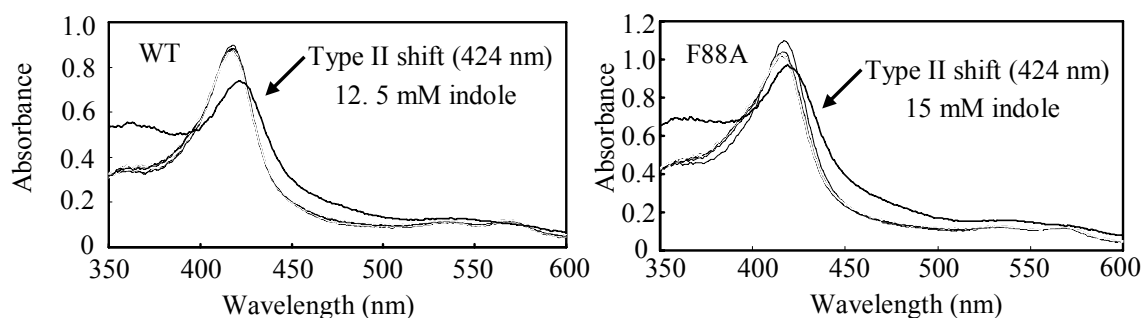


Fig.14-13 高濃度インドールにより誘導されるType II スペクトル変化

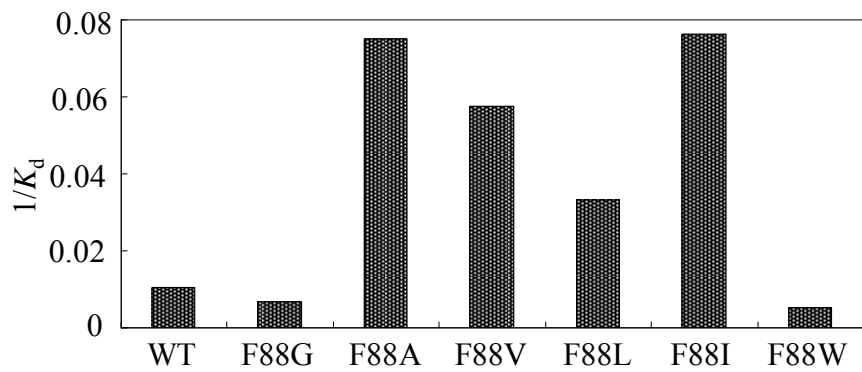


Fig.14-14 野生型及び変異体酵素の4-PIに対する K_d の比較

第十五節 部位特異的変異導入(Saturation Mutagenesis)による変異体作製

前節において、F88 変異体のうち、F88G、A 変異体が特に強い色素生成能を持つことが明らかになり、活性ポケットの立体的な影響が大きいことを示唆する結果を得た。本節では、P450BM3 と P450foxy のアライメント結果より、活性ポケット内部の立体的に変化している残基に着目した部位特異的変異を行い、インディゴ色素生成能の向上を試みた。

15-1 方法

Saturation Mutagenesis による変異体ライブラリーの作製

V83、V75、L43、L264 について saturation Mutagenesis による変異体ライブラリーを作製した。各残基について、塩基を指定しない NNN としたランダムプライマーを作製し(Table.15-1)、F88A プラスミドを鋳型として用いた QuikChange 法による変異体作製を行った。大腸菌株 DH5 α にトランスフォーメーションし、LB agar plate 培地(100 μ g/ mL Amp.) にコロニーを出現させた。

Table.15-1 部位特異的変異において用いたランダムプライマー

V83 random	F	cagccaagtctcgagagggtNNNcacgatggcctc
	R	gaggccatcgtgNNNaccctctcgaacttggtg
V75 random	F	gaccctaaagtcgNNNctcagccaagtctcgagagg;
	R	ccctctcgaacttggtgagNNNcgacttagggtc
L43 random	F	catatggccccattttcagaNNNcgtcttgagcc
	R	ggctccaagacgNNNtctgaaaatggggccatag
L264 random	F	cagctcatcacattcNNNattgccggccacgaaac
	R	gttctgtggccggcaatNNNgaatgtgatgagctg

色素高生産能コロニーのスクリーニング

プレートから、50 コロニーを選択した。試験管レベルのスクリーニングを、発現誘導まで前述の方法に従い、引き続きの発現誘導は 30°C、150 rpm、24 hrs の条件で行った。選択したコロニーは LB agar plate 培地にコピーして保存した。色素の生成が見られた培養菌体から前述の方法に従って色素を可溶化させ、マイクロプレートリーダーにより O.D.₆₇₀ を測定した。また、残りの菌体からタンパク質を抽出し、SDS-PAGE により P450foxy 変異体の発現を確認した。顕著な色素の生成を確認した変異体について、プラスミドを調製し、Sequencing によってアミノ酸変異を確認した(Fig.15-1)。

一箇所の変異によって得られた変異体プラスミドを鋳型として、さらに別のアミノ酸に対する Saturation Mutagenesis を行うことで、活性の向上を試みた。

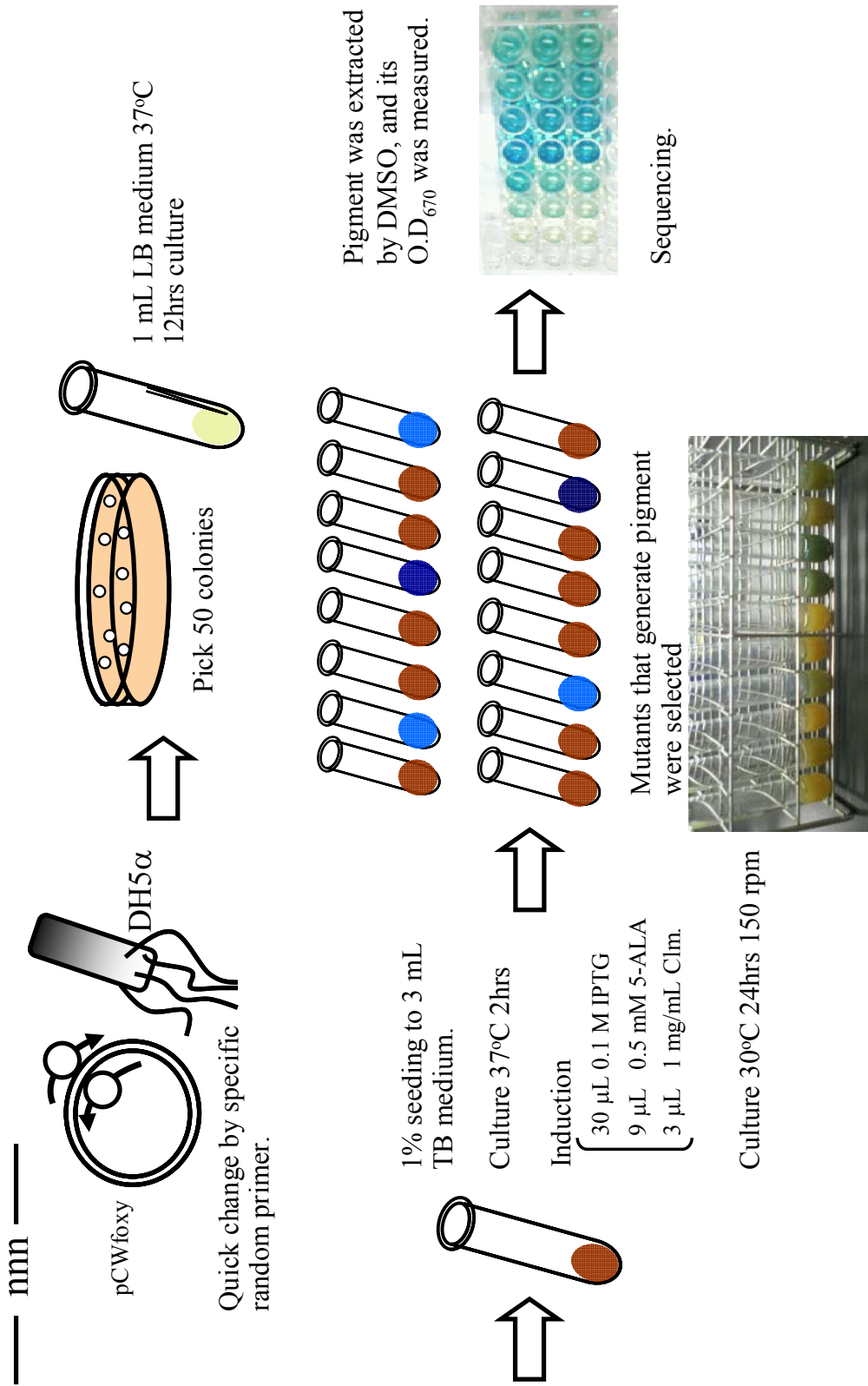


Fig.15-1 部位特異的ランダム変異における色素生産株のスクリーニング

15-2 結果及び考察

予備試験より、QuikChange PCR でアニーリング温度を 70°C に設定することでほぼ全てが正確に増幅され、また 50 個のコロニーをスクリーニングすることで確率的に 20 種全てのアミノ酸を網羅できることを確認した。P450BM3、P450foxy のアライメントで、活性部位内部に位置するアミノ酸のうち保存されておらず、立体的に影響を与えうると予想した残基、すなわち V83、V75、L264 および活性部位内部に位置し、外部的な分子の活性部位内部への侵入を制御すると予想される L43 を選択した(Fig.15-2)。初期鑄型として F88A 及び野生型発現プラスミドを用い、Fig.15-3 に示した流れでスクリーニングを行い、10 種の変異体を取得した。各スクリーニングにおける結果は Table.15-2 に示す。大腸菌発現系では色素の生成に個体差が見られるため、取得した 10 種の変異体を各三連で 24 hrs 培養し色素精製量を平均値で評価した(Fig.15-4)。WT における O.D.₆₇₀ の値を 1 とすると、F88A では 3.3、最も高い値を示した F88A V83L (以後 AL 変異体) では 23 倍もの色素生産能を有していることが分かった。野生型では視認できる色素生成は見られない。さらに変異を重ねたが、AL 変異体を超えるものは得られていない。各変異体の cell free extract を SDS-PAGE に供した結果、全て野生型と同様に可溶化発現していることを確認した(Fig.15-5)。実験に先立ち、F88 変異体の結果を踏まえてそれぞれのアミノ酸側鎖が小さくなる変異体を取得されることを予測していた。しかし予想に反し、V83 変異の結果では側鎖がより大きくなった変異体(Trp、Leu)で色素生成能が向上した。V75 変異では Asp が選択されたが、同時に Asn も見出されたことからこちらもやはり Asp、Asn の立体構造が適切であったためであると考えられた。また V83、L265 の変異において Thr 導入によって活性向上が見られるという結果が得られ、他の位置でも Thr が選択されることがあった。Thr の水酸基がインドールと相互作用するのか、立体的な問題であるのかは不明である。基質の活性部位侵入に影響する可能性を考えて L43 の変異を行ったが、Ala 変異体では逆に生成能が低下していた。これは基質結合以前に、酵素の安定性が低下するためであると考えられる。今回の変異導入実験の結果から、活性部位内部のアミノ酸をより大きな残基に置換し空間的に占めることでインドールに対する反応性が向上することが示唆された。つまりヘム周辺への接近、配位は F88 によって規制されているが、活性部位内部の空間は基質としての脂肪酸が結合するだけでは余りあると考えられる。F88A だけではインドールは活性部位内部で十分に固定されず、反応が進行しにくい。Fig.14-12 において、F88A はインドールによって誘導される Type I スペクトルが小さいのもそれを反映しているといえる。P450BM3 においても error prone PCR 等の手法を用いた機能改変が行われているが、やはり同様に空間を狭めることで反応性が向上することが報告されている [132]。本実験において、23 倍の色素生成能を持つ AL 変異体を取得した。

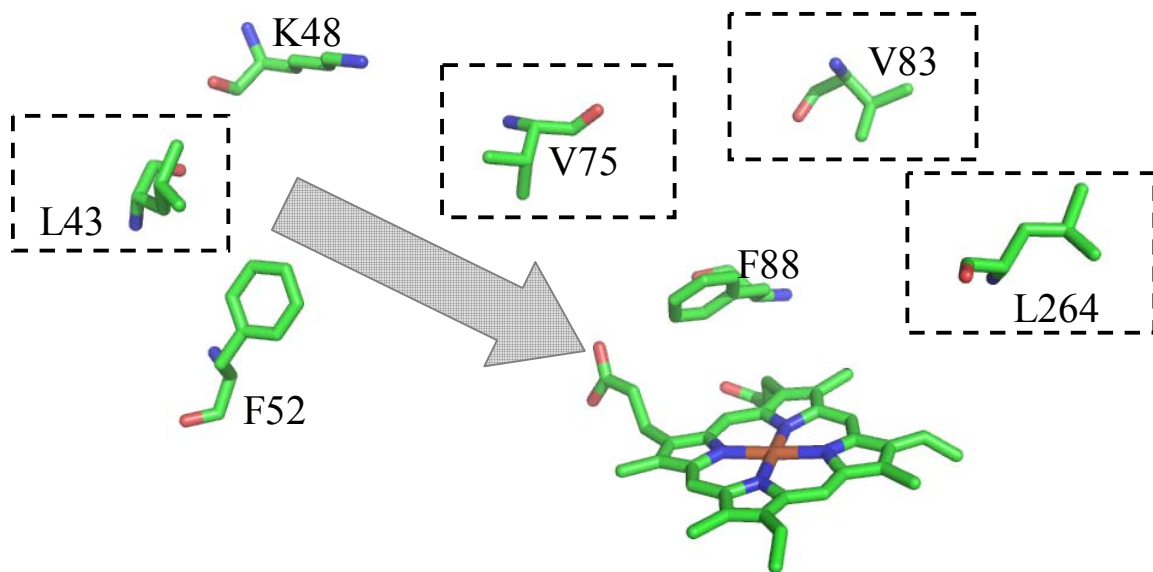


Fig.15-2 部位特異的ランダム変異において選択したアミノ酸残基

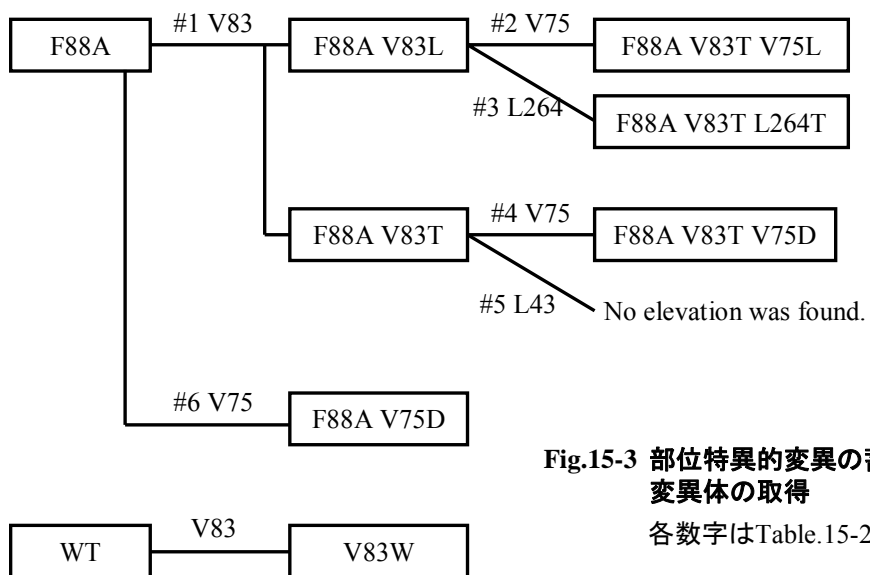


Fig.15-3 部位特異的変異の蓄積による変異体の取得
各数字はTable.15-2の結果に対応する。

Table.15-2 ランダム変異において選択されたコロニーおよび置換アミノ酸

#1 F88A-V83 random			#2 F88A V83L-V75random		
No.	O.D.670	A.A.	No.	O.D.670	A.A.
F88A	0.059	-	F88A V83L	0.169	-
4	0.124	Cys	5	0.14	Leu
7	0.122	Leu	6	0.154	Thr
16	0.147	Leu	7	0.136	Ala
17	0.097	Cys	9	0.144	Val
26	0.192	Thr	17	0.148	Leu
27	0.193	Leu	18	0.137	Leu
30	0.147	Ile	20	0.148	Leu
33	0.153	Leu	21	0.169	Leu
37	0.115	Thr			
40	0.155	Leu	#4 F88A V83T-V75random		
46	0.103	Ala	No.	O.D.670	A.A.
#3 F88A V83L-L264 random			F88A V83T	0.151	-
No.	O.D.670	A.A.	5	0.093	Trp
F88A V83L	0.169	-	7	0.152	Trp
13	0.145	Thr	21	0.175	Asp
15	0.071	Val	23	0.08	Thr
31	0.058	Gly	25	0.128	Gly
35	0.051	Ala	28	0.073	Gly
36	0.114	Leu	41	0.081	Trp
45	0.091	Phe	#6 F88A-V75 random		
#5 F88A V83T-L43 random			No.	O.D.670	A.A.
No.	O.D.670	A.A.	F88A	0.059	-
F88A V83T	0.151	-	5	0.096	Asn
48	0.131	Ala	9	0.111	Asn
50	0.094	Phe	22	0.134	Asp
			26	0.066	Ser
			27	0.065	Cys
			49	0.085	Glu

灰色は、選択したコロニーを示す。タイトルの数字はFig.15-3に対応する。

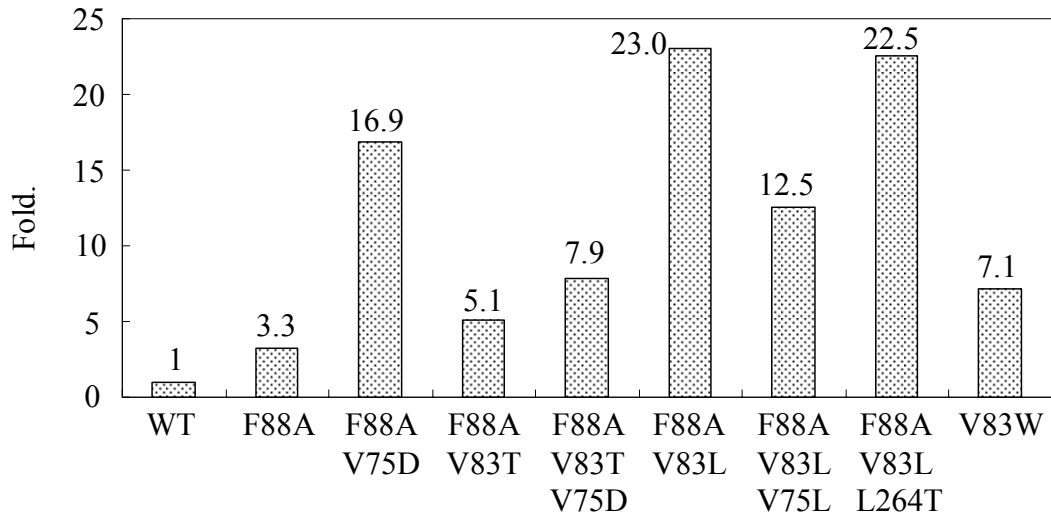


Fig.15-4 選択された変異体の色素生成能の比較

バーの上の数字は野生型を1としたときのO.D.₆₇₀の値の倍率を示す。

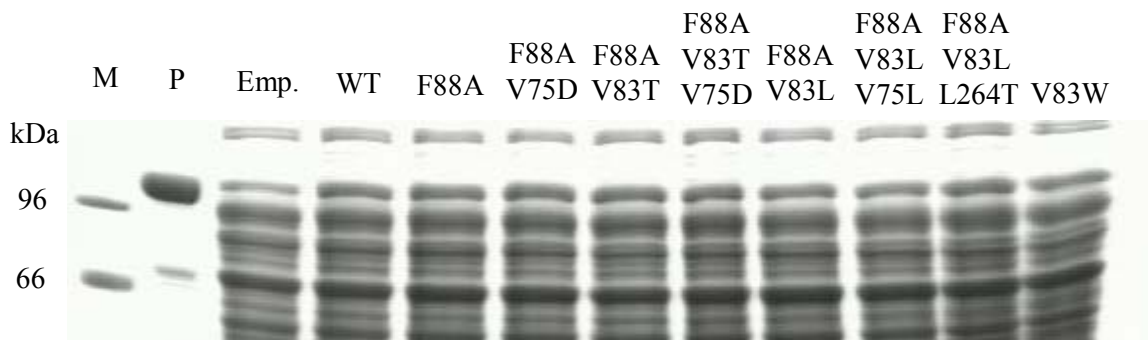


Fig.15-5 部位特異的変異により取得した変異体のCell free extractのSDS-PAGE

P : 精製した野生型P450foxy Emp. : pCWori+を導入したDH5α

第十六節 Error prone PCR による高色素能形成変異体の作製

活性ポケット内部に焦点をあてた部位特異的変異(Saturation Mutagenesis)により、鋳型としてもちいた F88A 変異体と比較して、飛躍的に高い色素形成能をもった変異体の作出に成功した。しかし、選択した各アミノ酸残基の変異間で相乗的に活性を向上させる効果は見出されなかった。よって、活性ポケットだけに限らず、P450 ドメイン全体に error prone PCR によって変異を導入し、活性向上に効果のある位置を探索した。

16-1 方法

Error prone PCR 反応条件の検討

Error prone PCR(Fig.16-1)は、polymerase による DNA 増幅において一定の割合で入る error を利用して変異体を作製する方法である。PCR は、 $MnCl_2$ の共存により正確度が低下する。 $MgCl_2$ に $MnCl_2$ を様々な割合で添加し、適切な割合(0.5%)の変異が導入される条件の検討を行った。本実験では、スクリーニング効率を上げるため、error の導入を P450 ドメインに絞ることとし、鋳型として F88A 変異体プラスミドを使用した。P450foxy 5'-S および、*Nru* I サイト後に新たに設計したプライマー(Foxy-r1675)を用い、LA-Taq による増幅を行った。このとき、通常の 25 mM MgCl を 5 μ L(終濃度 2.5 mM)添加するのに対し、25 mM $MnCl_2$ を 5:0、4:1、2.5:2.5、1:4、0:5 の割合で添加した。増幅産物を精製し、*Bsp*E I、*Nru* I で制限酵素処理し、同酵素で処理した pCWfoxy プラスミドとライゲーションした。大腸菌 DH5 α 株にトランスフォーメーションした。コロニーPCR によって正しくライゲーションされているものを各 8 選択し、プラスミドを調製した。Sequencing によって error の導入される割合を確認した。

P450foxy-R 1675 CTGTCCTTCGTATGATGCAGTGAC

Error Prone PCR による変異体ライブラリーの作製

下表の条件で error prone PCR を行い、Fig.16-1 に示す方法で変異体プラスミドを構築、トランスフォーメーションした大腸菌コロニーを LB agar plate 培地に生育させ、スクリーニング対象とした。

PCR mix. for Error prone PCR by LA-Taq. (μL)		PCR cycles	
Distilled water	31.5	95°C	2 min
10 X Buffer (Mg^{2+} free)	5	95°C	40 sec
2.5 mM dNTP	4	55°C	30 sec
25 mM MgCl_2	4.5	72°C	1.5 min
25 mM MnCl_2	0.5	} 30 cycles	
DNA template (20 ng/ μL)	1		72°C
Primers (10 μM)	1 each		
Enzyme	0.5		

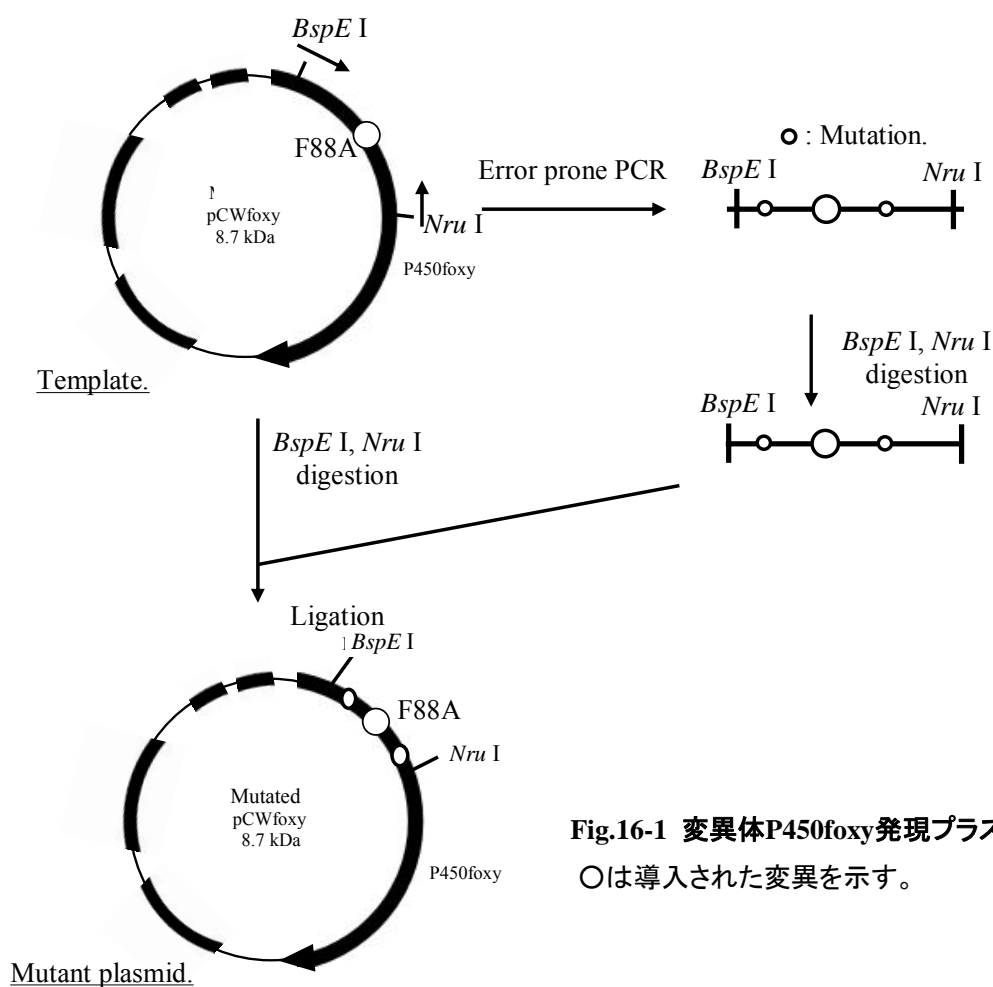


Fig.16-1 変異体P450foxy発現プラスミドの構築
○は導入された変異を示す。

Deep well plate を用いた小スケールスクリーニング

Error prone PCR では、多数のコロニーをスクリーニングする必要があるため、deep well plate 1 mL Blocks (Matrix : 4212)を用いたスクリーニング系を構築した。96 穴マルチウェルプレートに LB 培地(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Amp.)を連続分注器 Nichimate Stepper (NICHIRYO : 81-NSTP)を用いて 75 μL ずつ分注した。滅菌した爪楊枝を用いてコロニーから植菌し、シールし BioShaker (TAITEC : M.BR-022UP)によって 37°C、800 rpm の条件で 12hrs 振とう培養した。100 μL TB 培地(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Amp.) 1 mM Indole を入れた Deep well plate に、8 連ピペッターをもちいて 1 μL 培養液を植菌し(1%)、シールして 37°C、800 rpm、2hrs 振とう培養した。前培養したプレートは冷蔵保存した。培養後、50 μM IPTG、0.5 mM 5-aminolevulinic acid、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Clm.となるように連続分注器を用いて添加することで発現を誘導した。引き続き 30°C、800 rpm、24 hrs の条件で振とう培養し、色素の生成を観察した。顕著な色素形成が見られたコロニーについて(Fig.16-2)、冷蔵保存してあったプレートから LB 培地に植菌してプラスミドを調製し、sequencing によって変異導入部位を確認した。また、試験管レベルでの発現も行い、ここまでに得られていた変異体と色素生成能を比較した。

16-2 結果及び考察

実験に先立ち、error prone PCR の条件検討を行った。MgCl₂/MnCl₂ の比率を変えて PCR を行い、発現プラスミドを構築しランダムに選択したプラスミドの配列を確認することで変異の導入される割合を算出した。MnCl₂ が 50%までの条件で変異導入は比例的に増加し、10%の MnCl₂ を添加することで約 0.5% (1000 塩基に対して 5 の変異)が導入されることを確認し、上記の反応条件を設定した。より多くのコロニーをスクリーニングするため、Deep well plate を用いた assay 系を構築した。インディゴ色素生成には空気酸化の過程が含まれると予想されるため、1 mL のウェルに 100 μL TB 培地を添加し、通気性のシールを用いた。さらに 1 mM インドールを添加することで色素の生成量が増加することを見出した。原因は不明であるが、誘導時に添加する IPTG は 50 μM とかなり低い濃度を用いると最も良い結果が得られた。振とう条件は速すぎると、おそらく P450foxy のフォールディングが困難になるため、色素の生成は見られなかった。Deep well plate 振とう機で 800 rpm が適切であると判断した。実験に先立って行った予備実験から、プラスミド構築におけるライゲーションの成功効率は約 90%、タンパク質として可溶化発現する確率は 54.5%であった。また、上記の条件で培養した場合、F88A による色素生成量は非常に少なかった。現在までに 2500 個のコロニーのスクリーニングを行い、14 個のコロニーを選択・配列確認を行った。エラーの割合は、サイレントミューテーションを含めて全て 0.5-1% の範囲にあった。選択したコロニーおよび導入されていた変異を Table.16-1 に示す。14 個中 6 個の変異体に、部位特異的変異によって検討したアミノ酸変異がみられ、

AL 変異体も選択したコロニーに含まれていた。他の変異は 200-300 の範囲に変異が散見され、この領域には P450 の活性に重要である I-helix が含まれる。変異導入は配列の中心付近に多く、N、C 両末端付近にはあまり変異は見られなかった。得られた変異体を試験管レベルでの発現培養に供し、今までに得ている変異体と色素生成能の比較を行った(Fig.16-3、4)。48 hrs 時点の測定値では多くの変異体で 10 倍以上の生成量認められた。24 hrs 時点での測定値は変異体間に顕著な差が見られ、これは各変異体のインドールに対する反応速度を反映していると考えられる。V83L 変異が導入されることで 24 hrs 時点での色素量はかなり増加し、新規に見出された変異体 F88A A195、F88A D94E E204G F322L、F88A Q59N V222I も反応速度の向上に寄与している可能性が高いと考えられる。立体構造における位置を Fig.16-5 に示す。前節にも述べたように、V83、V75 の変異は、活性部位内部の構造を直接的に変異させることが明白であるが、新たに見出された変異は活性部位から離れた場所に存在しており、どのように影響を与えているか判断できなかった。Fig.16-3、4 より、error prone PCR では、AL 変異体を上回る変異体を得ることはできなかった。しかし新たに見出されたアミノ酸について部位特異的変異を行うことで有用な結果が得られることが期待される。

P450BM3 において行われた部位特異的変異および error prone PCR により得られたインドール水酸化活性の付与されたもののうち、最も高い活性を持つ変異体は、A74G、F87V、L188 変異体であると報告されている[41]。88 位の変異が必須であることは共通しているが、P450BM3 においては必ずしも側鎖が小さければよい、ということではないようである。75 位の変異により色素生成能が向上することも共通しているが、P450foxy では V75L,T、P450BM3 では A74G と、明らかに置換効果が異なることが示唆される。P450foxy では、V83L が最も高い効果が見られたが、P450BM3 における A82 変異効果は報告されていない。以上の結果は P450BM3、P450foxy の活性部位内部の構造的差異を反映すると考えられる。

アライメントから判断した V83、V75 変異が本実験においても複数見出されたことは非常に示唆的であり、やはりインドールへの反応性の向上のためには活性部位内部のアミノ酸に直接変異を導入することが有効であることが再確認された。Error pronePCR において、最も重視されるポイントはスクリーニングの簡便さである。本実験で構築した assay 系は、発現培養を行うのみで色覚的にポジティブクローンを選択することができる。大腸菌の cell free extract を調製する必要もなく、極めて効率よくスクリーニングを行うことが可能であった。また 8 連マイクロピペッター、連続分注器は非常に有用であった。

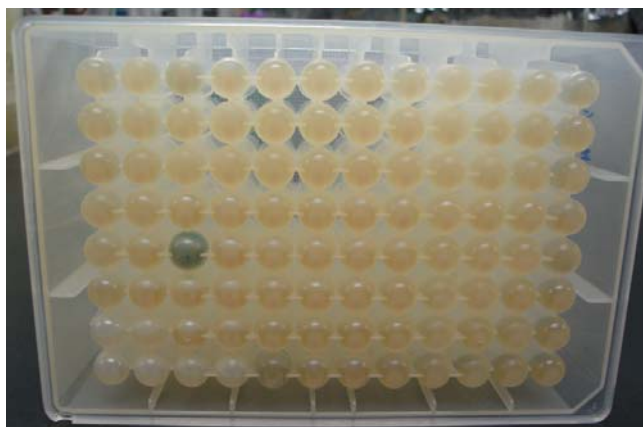


Fig.16-2 ErrorProne PCRスクリーニング培養における色素の生成

Table.16-1 ErrorPronePCRで選択されたコロニーに導入されていた変異

#	Mutation	#	Mutation
#5	E169V K233R K291E	#37	V83I
#19	D219E I256T S290G	#41	V83L
#28	V83L V75L	#43	A195V
#31	D253N K300N	#46	I261V K250E
#32	P26L M180V	#47	D94E E204G F322L
#35	V83T V75G	#48	V75A S358P
#36	V83I	#49	Q59N V222I

この変異に加えて、全てにF88A変異が導入されている。
前節で検討を行った残基は灰色で示した。

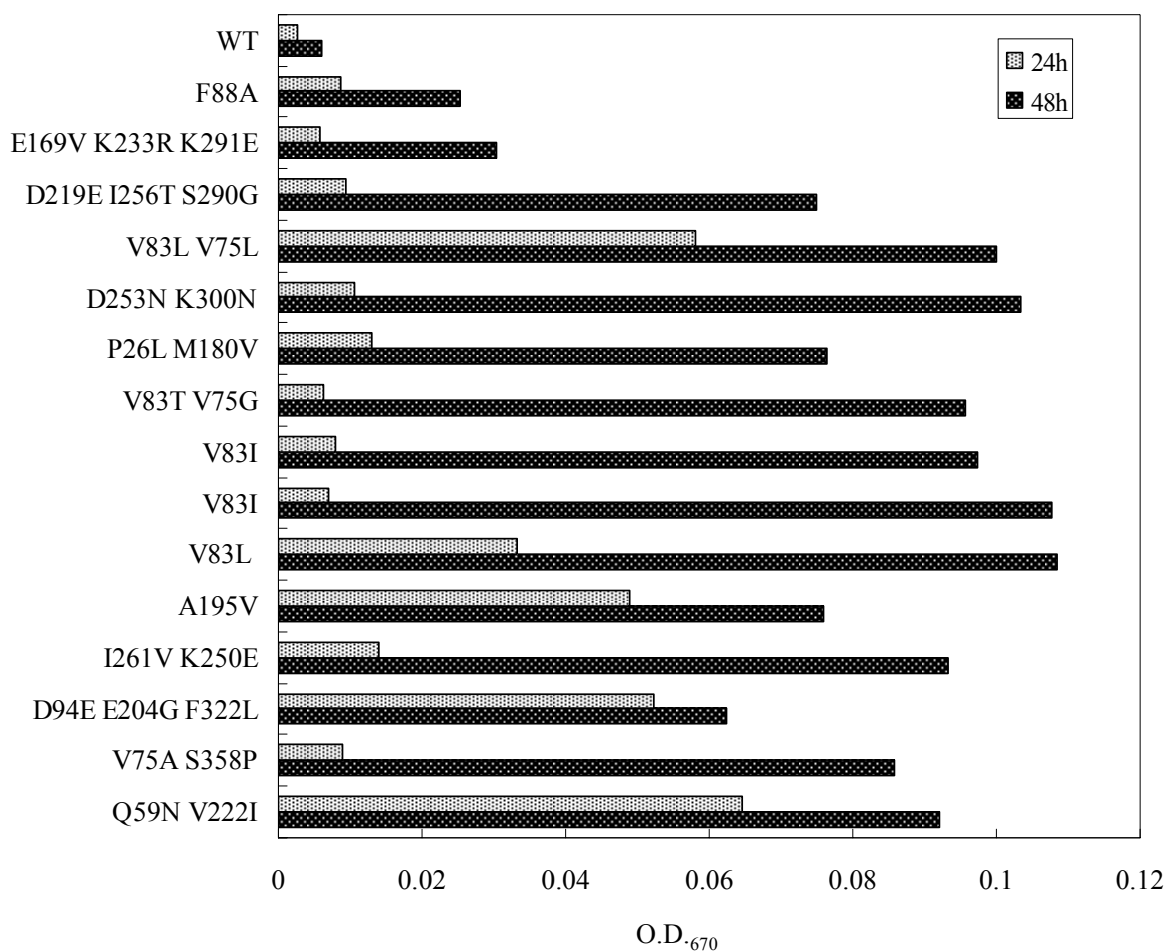


Fig.16-3 ErrorPronePCRで見出された変異体の色素生成能の評価

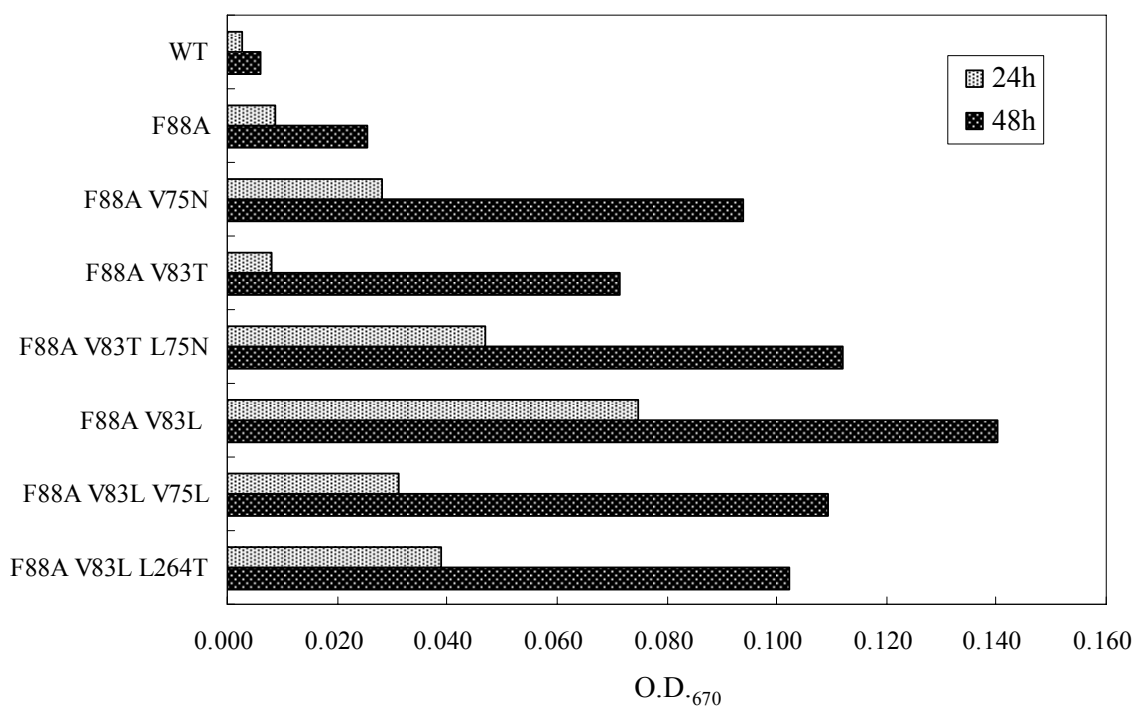


Fig.16-4 部位特異的変異で作出した変異体の色素生成能の評価

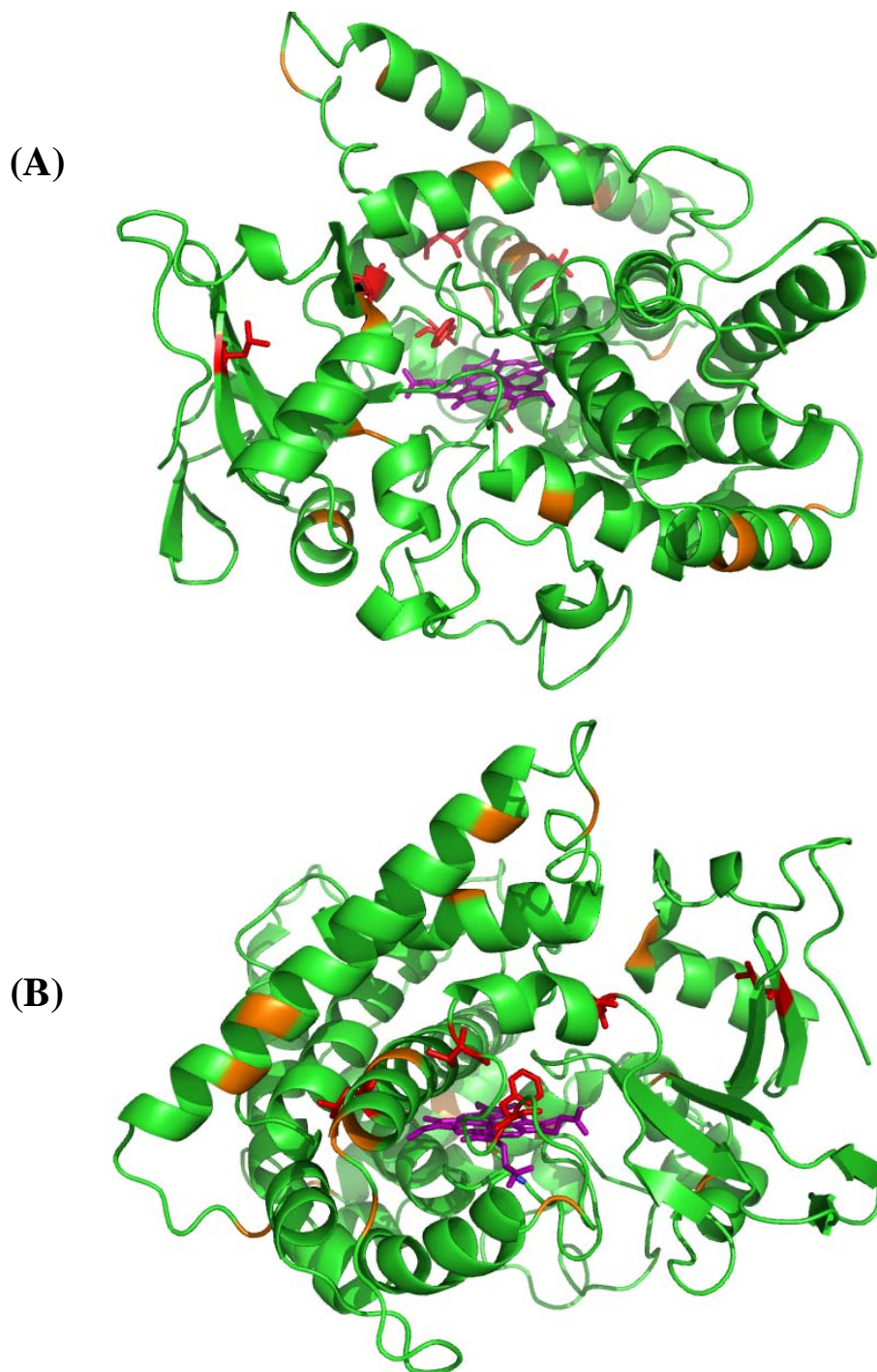


Fig.16-5 部位特異的変異及びerror prone PCRで選択された変異の立体的配置

紫：ヘム 赤：部位特異的変異で選択した残基
 オレンジ：ErrorPronePCRで新規に選択された残基

第十七節 AL 変異体の *in vitro* における挙動

部位特異的変異導入、error pronePCR の結果より、*in vivo* において AL 変異体が最も効率よく多量の色素を生成することが明らかになった。本節では、AL 変異体の精製を行い、*in vitro* において性状を調べることで色素高生産能の要因を明らかにすることを目的とした。

17-1 方法

本実験では同時に野生型 P450foxy、F88A も調製し、比較のために用いた。

AL 変異体の発現培養・精製

野生型 P450foxy と同様に操作したが、培養容器は羽がついていない通常の三角フラスコに 200 mL TB 培地をいれた。誘導条件等は同一である。培養菌体から cell free extract を調製し、Ni²⁺キレートカラム、ゲル濾過カラムに供した。精製後、20 mM Mops(pH7.4) 10%グリセロールに対して透析を行った。SDS-PAGE で精製度を確認した。

スペクトル測定

精製した AL 変異体を用いてスペクトル測定(CO 差、インドール、4-PI 添加によるスペクトル変化、K_d測定)を行った。CO 差スペクトルから、P450 濃度を算出し 3-4 μM とした。

インドールを基質とした水酸化活性測定

P450BM3 での実験例を参考に[41]Table.17-1 の条件で活性測定を行った。基本的な操作は脂肪酸水酸化活性試験と同様である。反応は 30°Cで行い、NADPH の消費に伴う 340 nm の吸収の減少を 10 min 観察した。反応後、50 μL 0.1 M KOH を添加し、5 min 室温静置した後、O.D.₆₇₀ の測定を行った。

Table.17-1 変異体P450foxyによるインドール水酸化活性反応液組成

Components	Vol. (μL)	Final conc. (μM)
50 mM Tris-HCl(pH8.2) 10% Glycerol	420	-
1 mM FAD	5	10
1 mM FMN	5	10
Enzyme (5 μg)	10	-
25 mM Indole	10	500
1.25 mM NADPH	50	125

還元酵素活性測定

前述の方法に従う(13-1)。通常条件、125 μM dodecanoic acid 添加による挙動の変化を比較した。

17-2 結果及び考察

AL 変異体の発現培養は、長い羽付フラスコでは色素の蓄積は見られるものの、発現量はかなり低レベルであった。普通の三角フラスコを用いると、菌体収量は低下するものの菌体は赤みを帯び、P450 の発現量が上昇したことが分かり、SDS-PAGE でもそれを確認することができた。変異を蓄積したことにより、通常の発現培養条件ではフォールディングしにくくなったと考えられる。同様の挙動は、前任者の変異体実験においても報告されている。Ni²⁺キレートカラム、ゲル濾過カラムにおける挙動は野生型 P450foxy と一致した。上記の発現培養条件で 400 mL 分の TB 培地から十分な試料を得ることができた。精製された AL 変異体は、黒味がかかったオレンジ色を呈しており、野生型、F88A とは明らかに異なった色をしていた (Fig.17-1)。AL 変異体の cell free extract には大量のインディゴ色素が含まれていたため、精製後にも残留していることを考えたが、十分な透析を行っても色調は戻らず、酵素自身のもつ呈色であると判断した。AL 変異体の SDS-PAGE 上の挙動は野生型、F88A と同一である (Fig.17-2)。AL 変異体のスペクトル変化を Fig.17-3 に示す。酸化状態におけるソーレー帯の吸収極大は 419 nm であり、野生型とほぼ同一であったが、350-390 nm の吸収がそれらより強い点が特徴的であった。この吸収は、P450foxy における Type I スペクトル変化において見られる特徴である。脂肪酸を P450foxy に添加していくと黒味がかかった色調に変化していく。これらより、AL 変異体は精製過程・透析によっても分離されないほどの親和性で何らかの化合物が活性部位に存在しているものと考えられ、その化合物はインドールであると推測した。データは示さないが、C13 を添加しても AL 変異体はスペクトル変化を示さず、すでに活性部位が占められていることを示唆する。Fig.17-4 にインドールを添加により誘導されるスペクトル変化を示す。スペクトル上での変化はほとんど見られなかったが、差スペクトルより Type I スペクトル変化が誘導されていることが明らかになった。K_d の値は変化が小さすぎて正確に算出することができなかったが、Fig.17-4-b より、<10 μM であると思われる。立体的な影響を考察するために 4-PI を添加によるスペクトル変化を観察、K_d を算出した (Fig.17-5)。野生型、F88A、AL 変異体のインドール、4-PI に対する K_d をまとめて Table.17-2 に示す。AL 変異体の各 K_d は F88A よりさらに小さくなっており、親和性が向上していることが明らかになった。この K_d 値の変化も色素生成能向上の一因となっていると考えられる。理論的には大きな化合物が活性部位に侵入するためには、空間的に広くすることが有効であると考えられるが、

本測定ではその逆の傾向が見られた。この結果は、第十五、十六節での考察と一致している。

AL 変異体のインドールに対する水酸化活性測定を行った(Fig.17-6)。本試験では、活性があまり高くないことを考慮し 500 μ L の反応系に 5 μ g の酵素を使用した。全ての酵素において、基質を添加しない状態においても NADPH の弱い減少が観察された。これは還元酵素ドメインから伝達された電子が酸素に供与され、過酸化水素が生成するオキシダーゼ反応が進行しているものと推測した[133]。WT と比較して F88A、AL 変異体の control での NADPH の減少が低下していることから、変異体酵素では、P450 ドメインへの電子伝達効率が低下していると考えられる。予想に反して、基質としてインドールを添加すると、逆に NADPH の減少量が低下するという減少が見られた。Fig.17-7 に、還元酵素ドメインにインドールを添加することによる cytochrome c 還元活性の変化を示した。500 μ M インドール共存時において、反応回転が 10%程度に低下しており、機構は不明であるが還元酵素ドメイン内における電子伝達に対して阻害効果が見られた。反応終了後に KOH を添加してアルカリ条件にしたが、670 nm の吸収は全ての酵素において違いは見られなかった。酵素反応で hydroxyindole が生成していればアルカリ条件におくことで二量体化が進行し、インディゴ色素が生成するはずである。よって本試験では NADPH の消費による 340 nm の減少が酵素反応に反映されていない、すなわちアンカップリングしていると推測される。また、NADPH の減少量もかなり低いため、検出可能な量が生成されていない可能性も考えられる。

AL 変異体のインドール反応性が見られない原因を究明するため、還元酵素活性の測定を行った(Fig.17-8)。野生型と F88A の通常条件での活性はほぼ同値であったが、AL 変異体ではそれらの 30%程度の活性しか持たなかった。Dodecanoic acid を添加した条件での還元酵素活性の上昇はすべての変異体で見られたが、それでも AL 変異体は野生型の 50%にも満たなかった。F88A と AL 変異体の構造的違いは V83 が Leu に置換されている点だけである。また、AL 変異体の活性部位内部にはおそらくインドール分子が結合していることが示唆されている。これらが電子伝達に伴っておきると考えられる構造変化の障害になっているのかもしれない。P450BM3 に結合した脂肪酸の末端は、F87 と相互作用しながらも A82 の方向を向き、立体的に近くなる。V83L はこの残基がさらに大きくなっているため、立体的な影響も十分に考えられる(Fig.17-8)。もしこの推論が正しければ、活性部位内部の構造変化はかなり大きく、基質結合の親和性が上昇しても反応に必要な電子伝達効率が悪影響をうけることになる。F88A では電子伝達効率およびドデカン酸添加に対する挙動は、野生型と同一であった。一方、P450BM3 の電子伝達を可能にする構造変化は、脂肪酸の末端炭素鎖が F87 に結合することで開始されるという機構が予測されているが、野生型と F88A 変異体の還元酵素活性を比較すると少なくとも P450foxy においては 88 位のア

ミノ酸との相互作用の寄与はそれほど大きくないと考えられる。

F88A、AL 変異体は P450 ドメインへの電子伝達効率が低下しており、さらに Fig.17-6 においてインドールへの親和性が高い変異体になるにつれて NADPH の減少が低下していることから、インドールが活性部位内部に結合することで酸素への電子伝達は起こりにくくなっているといえる。しかし基質の酸化反応に NADPH の減少が反映されておらず、極めてカップリング効率が悪いといえ、他の何らかの分子へ電子がわたってしまっていると考えられる。

P450BM3 における報告によると、F87V 変異によりインドール水酸化能を獲得し、さらに L188Q、A74G と変異を蓄積することで K_{cat} の上昇は小さいものの、 K_m が低下していくことが分かっている[41]。 K_m が低下していることから、P450foxy の V83L と同様にインドールへの親和性を向上させる意味合いがあると思われる。P450foxyF88A 変異体と AL 変異体は、培養時には明らかに色素生成能の違いがみられた。前述の通り、培養時における色素の前駆体インドールは培地成分に由来しているため、濃度的にかなり低いレベルであることが予想される。よって F88A と AL 変異体の違いは、インドールへの親和性の差が反映されているといえるかもしれない。

同様の目的で P450BM3 の変異体を作製した報告では活性が検出されているが[134]、大腸菌 cell free extract を添加することでその効率が向上するという報告があり[135]、電子伝達のアンカップリングの結果生じる活性酸素分子種を大腸菌の SOD (Super oxide dismutase) が分解できるためであると考察されている。Fig.I-6 の P450 における反応サイクルによると、適切なタイミングで電子が供給されないと反応中間体が崩壊し、過酸化水素やスーパーオキシドアニオンラジカル(O_2^-)が生成することが示されている。AL 変異体において、還元酵素活性が低下していることが明らかになったが、このことにより、電子伝達が潤滑に進行しにくくなっている可能性も考えられる。また、活性酸素の生成は酵素の不安定化、失活にもつながる。P450foxy 変異体培養時の色素生産も、大腸菌由来の他の酵素の介在が必要であるのかもしれない。外来タンパク質を発現する大腸菌を bio catalyst として使用する研究例が P450foxy、P450BM3 においても報告されており[40, 136, 137]、そのような方法では今回取得した変異体発現株は十分有用である。AL 変異体はナフタレンに対する結合能をもつことも確認しているため、変異の導入次第でさまざまな芳香族化合物を酸化させることができるかもしれない。しかし AL 変異体によるインドール酸化を直接的に証明するために *in vitro* での活性再現を目指し、その障害要因究明を行って行く必要がある。本実験により、P450foxy において P450BM3 で行われているのと同様に機能改変が可能であるということが示された。さらに色素生成能向上に効果があるアミノ酸が P450BM3 と異なることが明らかになったことから、P450BM3 で達成されていない反応を進行させる変異体を作製することができる可能性も示された。

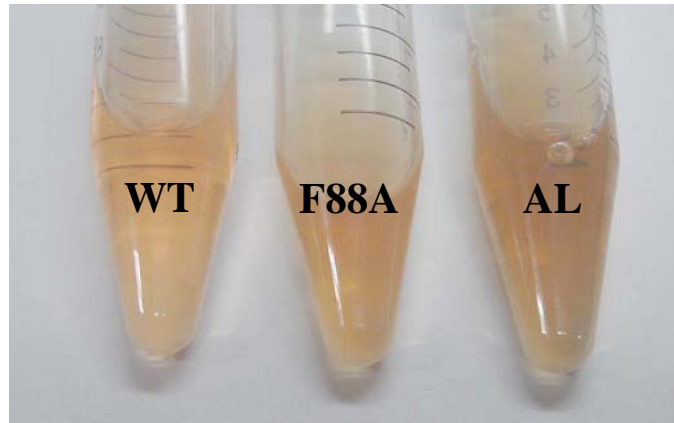


Fig.17-1 野生型、F88A、AL変異体の精製後の色調の違い
AL変異体のみ、黒味がかったオレンジ色を呈した。

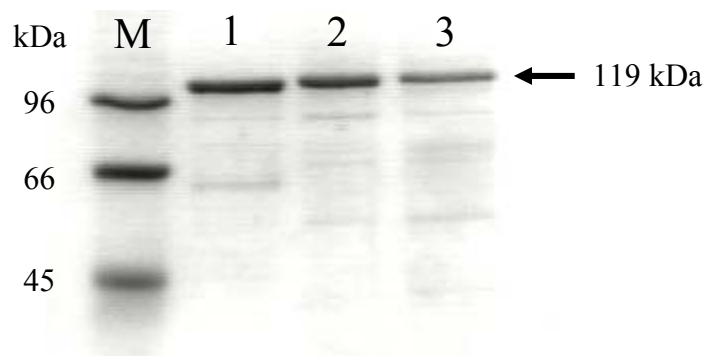


Fig.17-2 野生型、F88A、AL変異体のSDS-PAGE
1 : 野生型 2 : F88A 3 : AL変異体

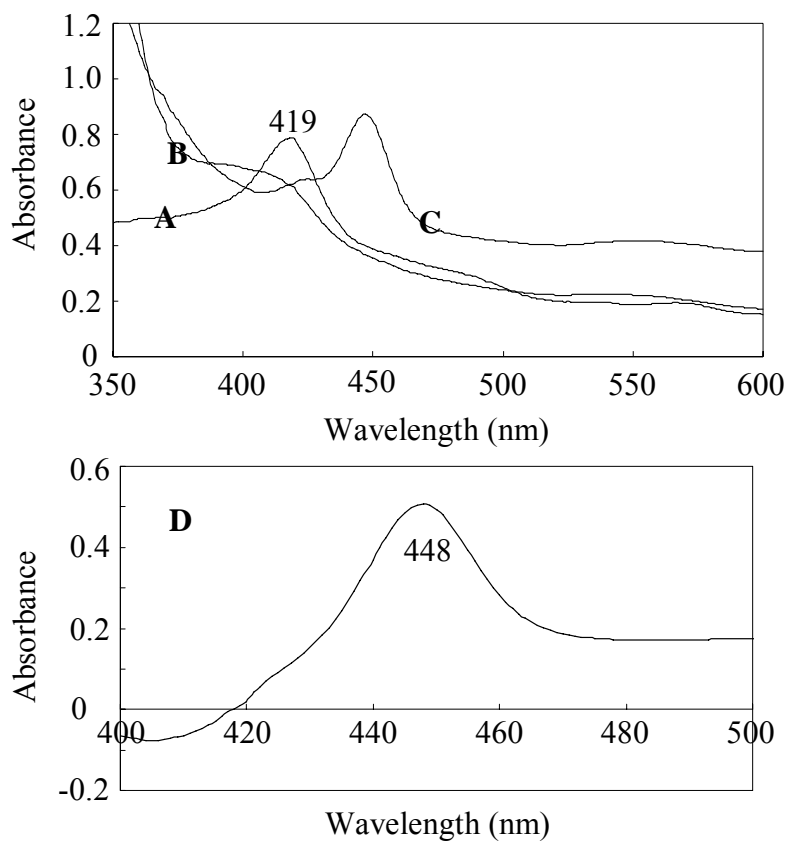


Fig.17-3 AL変異体のスペクトル変化

A : 酸化状態 B:ジチオナイト還元状態 C :還元状態+CO D : CO差スペクトル

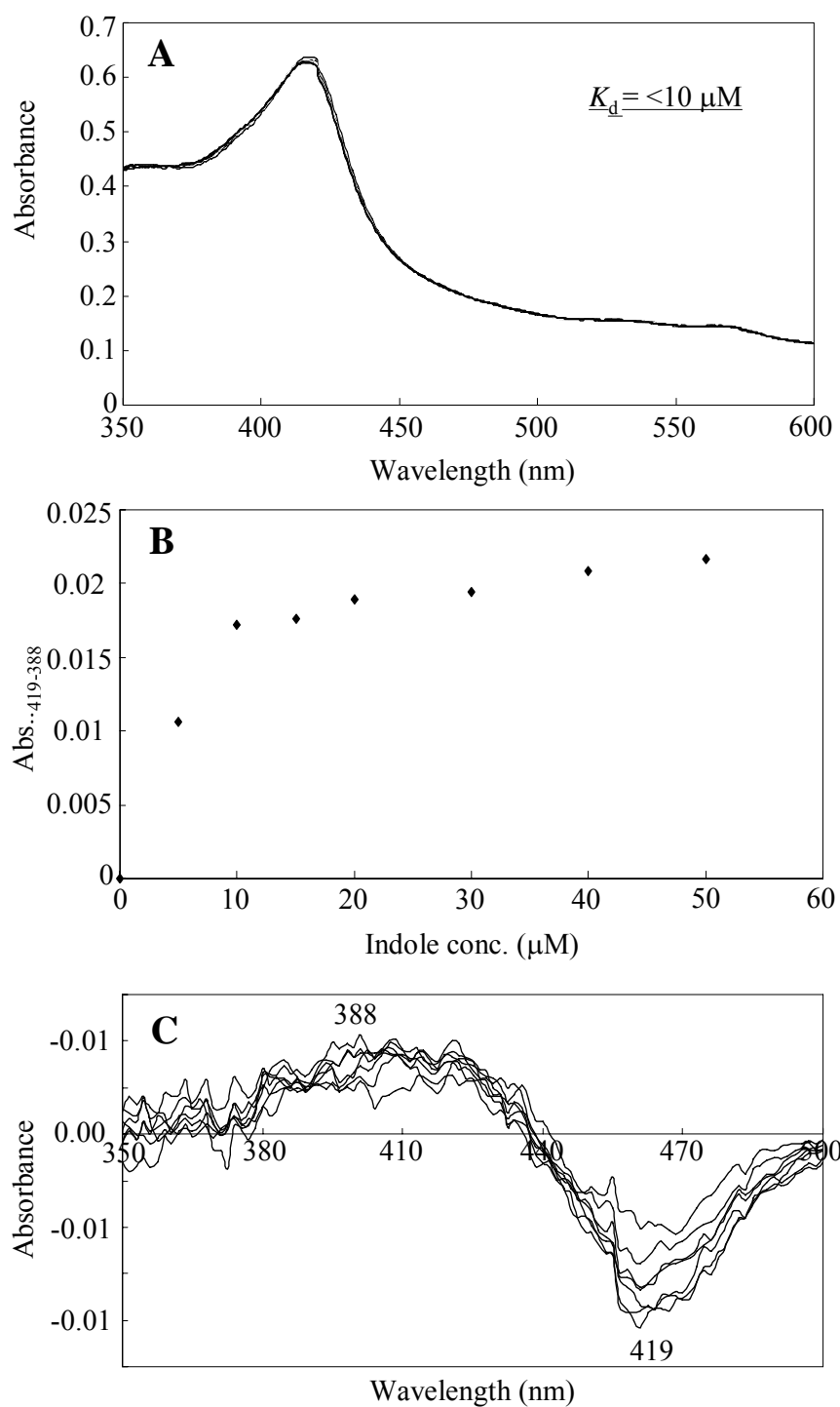
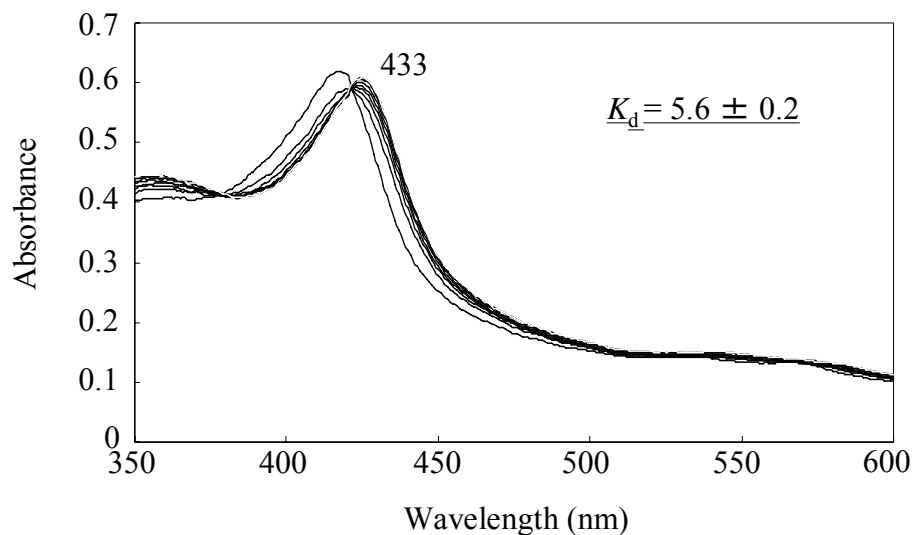


Fig.17-4 AL変異体のインドール添加によるスペクトル変化
 A : スペクトル変化 B : インドール濃度 vs Abs.419-388 C : 差スペクトル
 5 mM インドールDMSO溶液を用いて滴定した。



5 mM 4-PI DMSO溶液を用いて滴定した。

Table.17-2 インドール、4-PIに対する K_d の比較

Sample	K_d for Indole (μM)	K_d for 4-PI (μM)
WT	n.b.	95.9 ± 2.7
F88A	<20*	13.3 ± 0.6
AL mutant	<10*	5.6 ± 0.2

n.b. : not binded *スペクトル変化が小さく決定できなかった。

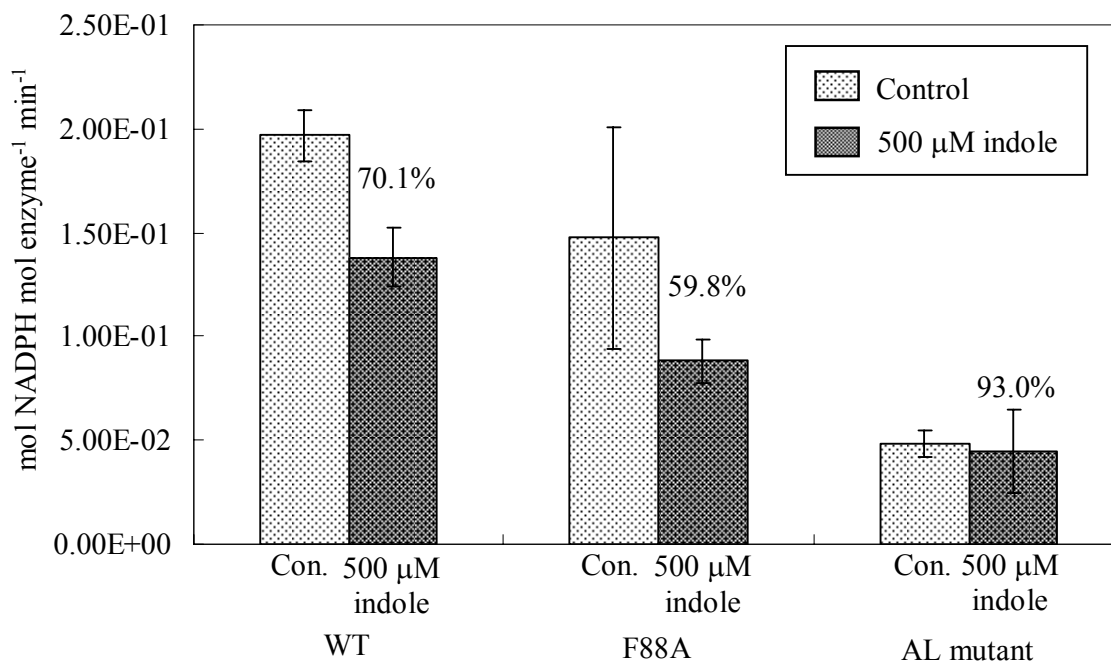


Fig.17-6 AL変異体によるインドール水酸化反応試験におけるNADPHの減少

Controlは基質の代わりにDMSOを等量添加した。

バーの上の数字は、controlに対するインドール添加時のNADPHの減少率を示す。

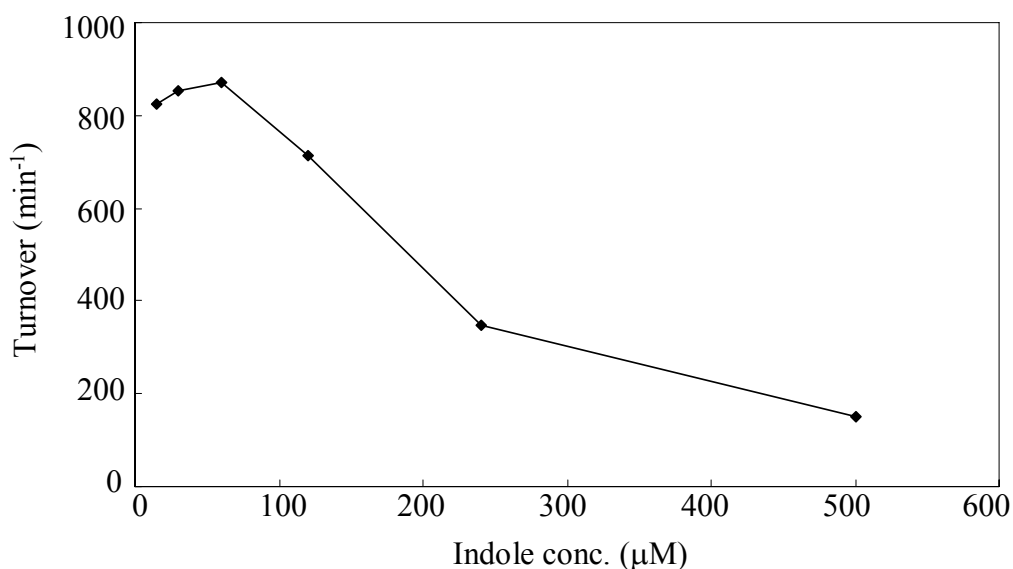


Fig.17-7 インドールによる還元酵素ドメインのCyt. c還元活性の阻害

C-His還元酵素ドメインを使用し、様々なインドール濃度におけるCyt.c還元酵素活性を測定した。

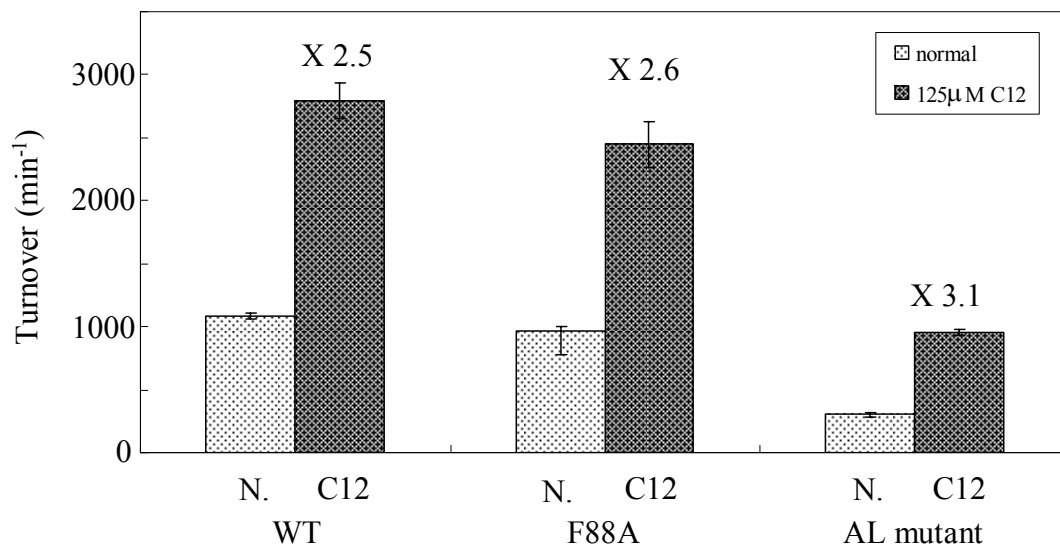


Fig.17-8 野生型および各変異体の還元酵素活性比較
 バーの上の数字はドデカン酸添加による活性上昇率を示す。

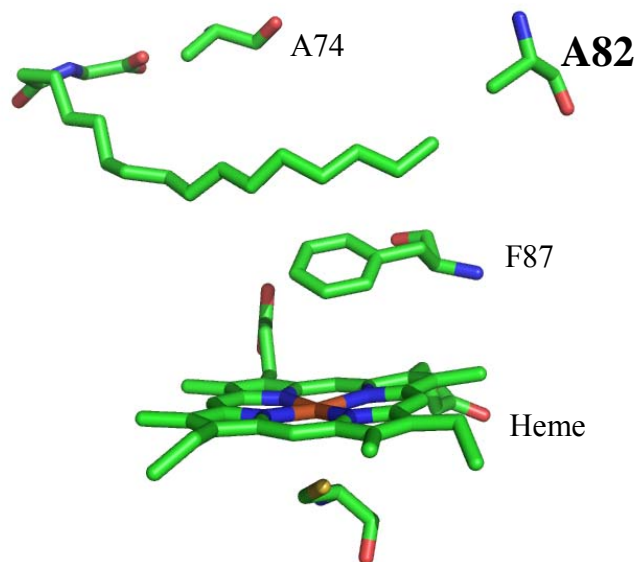


Fig.17-9 P450BM3の基質結合におけるA82の位置

第十八節 Cytochrome P450foxy の結晶化

P450foxy の全長構造および P450 ドメイン、還元酵素ドメインの X 線結晶構造解析を目的とした。融合型 P450 の特性として反応回転が 3000 min^{-1} と極めて高く、P450 ドメインと還元酵素間の効率的な電子伝達に強い関心が集まっている。*B. megaterium* 由来の P450BM3 の結晶構造解析を行った報告例は多く、様々な変異体、基質複合体の構造が解析されている。しかし、全長での構造が解明された例は未だ報告されていない。P450foxy の結晶化はこれまでも行われてきたが、完全長を持つ物はもちろん、ドメイン毎の結晶構造解析も成功していない。

18-1 試料

P450foxy 全長、C 末端 His tag 付 P450 ドメイン、還元酵素ドメインを試料とした。

18-2 方法

試料の調製

各項目で述べた方法で精製を行い、5 mM Mops (pH7.4) に対して透析を行った。透析後、Amicon Ultra によって 15-20 mg/mL まで濃縮した。さらに Ultrafree-MC 0.22 μm (Millipore : UFC30GV00) に入れ、5000 xg、4°C で遠心することで限外濾過し、微小な不純物を除いた。タンパク質濃度を BCA 法によって測定した。基質を添加する場合は、濃縮前に 200 μM となるように添加し、4°C、30 min 静置した後に処理を行った。

結晶化スクリーニング

結晶化条件のスクリーニングは小スケールで行うため、COC-CRYSTALQUICK PLATTE (greiner bio-one : 609820) を用いたシッティングドロップ法で行った。結晶化条件は、5、25°C とし、タンパク質濃度は 15-20 mg/mL とした。Table.18-1 に示す結晶化スクリーニングキットを用いた。P450foxy 全長、P450 ドメインについては、基質である 200 μM C13 を添加したもの、還元酵素ドメインについては、補酵素 FAD、FMN を各 100 μM となるように添加した試料も検討した。

Plate に 8 連ピペッターを用いてリザーバ溶液 80 μL を入れた。ウェル中で試料 1 μL と等量のリザーバ溶液を混合した。クリアテープでシールし、各温度のインキュベータ内に静置し、数日毎に観察した。

Table.18-1 P450foxyの結晶化条件検討に用いたスクリーニングキット

Crystal Screen I,II (Hampton Research)
Crystal Screen Lite (Hampton Research)
PEG/Ion Screen (Hampton Research)
Wizard I, II, III (Emerald Biosystem)
Salt RX (Hampton Research)
Cryo I, II (Hampton Research)
Ammonium Sulfate Grid Screen (Hampton Research)
Additive Screen (Hampton Research)

結晶化条件の精密化

スクリーニングにおいて結晶が観察された条件を初期条件とし、より質の良い結晶を得るため、沈殿剤、塩濃度、pH、buffer の種類などについて条件の精密化を行った。シッティングドロップ法で行った。

X 線回折データ測定

回折強度データの収集は、高エネルギー加速器研究機構(KEK)の放射光実験施設(PF)の実験ステーション BL6A で行った。結晶をドロップより、マイクロピペッターを用いて回収し、クライオプロテクトANTとして段階的にグリセロールを含む同リザーバ溶液に移した。顕微鏡で観察しながら Raxid IV⁺⁺クライオループを用いて結晶をすくいとり、100 K のクライオストリームにおいて瞬間的に冷却して測定した。

18-3 結果及び考察

P450 ドメイン及び還元酵素ドメインの結晶化条件を見出すことができ、X 線回折に供した。P450 ドメインは約 8 Å、還元酵素ドメインは 3.3 Å までの反射を確認したがデータ測定には至っていない。以降の結晶は Fig.18-1 にまとめて示す。P450 ドメインをシッティングドロップ法により初期スクリーニングを行った結果、(a)の微小な結晶が確認された。同条件で再現性を確認したところ、しばしば(b)のようなゼリー状の凝集が起こった。硫酸濃度を 0.02 M 刻みに変化させ検討を行ったところ、1.12 M 硫酸の条件で(c)の単一結晶が得られた。この結晶を X 線回折に供したところ、8 Å 程度の反射が見られたが、スポットが流れてしまっていた(Fig.18-2-A)。この結晶はおそらく薄い板状の結晶が何枚も重なってできていた。さらに(c)の条件に Additive Screening を添加し検討を行うと DMSO(d)、0.1 M Proline(e)の添加により結晶の質が向上した。これらを X 線回折に供したところ、分解能は前回とほぼ同程度

であったが、スポットが安定した(Fig.18-2-B)。得られた結晶が薄すぎたため、分解能が十分ではなかったと考えられ、現在さらに厚い結晶が得られる条件を検討している。以上の硫酸を用いた結晶作製は比較的再現性が良く、温度は 5°C、タンパク質濃度は 15 mg/mL 程度でよい結果が得られるようである。硫酸ナトリウムなど他の硫酸塩では結晶は得られなかった。pH の条件検討では 6.5 付近で結晶が成長することが多く、中性以上では(b)のような凝集が起こりやすかった。リガンドとしてドデカン酸を添加し、スクリーニングを行ったところ、リガンドを含まない試料とは異なる条件で、異なる形状の結晶が得られた(f)。しかしこの結晶では反射は得られず、再現性にも乏しかった。

還元酵素ドメインの結晶化において、初期スクリーニングの段階で二種類の条件で結晶が成長した(g, h)。精製過程において補酵素 FAD、FMN が脱離しやすいことが報告されているため、結晶化に際してそれぞれ 50 μ M 添加したところ、結晶が成長しやすかった。これらの結晶を X 線回析に供したところ、(g)において 3.3 Å までの反射が見られた。詳細な構造解析には 3 Å 以上の分解能が必要であるため、データ収集には至らなかったが、同条件で結晶を作出し、さらに強いビームラインで X 線回析を行えば十分な反射が得られる可能性が高い。現在は上記の結晶化条件の再現性確認および条件の精密化を行っている。特に本研究において、脂肪酸が還元酵素ドメイン自体に相互作用するという興味深い可能性が示されているため、脂肪酸を添加した条件での結晶化条件検討も行っていきたいと考えている。

全長 P450foxy についても同様に条件検討を行ったが、沈殿してしまうことが多く、特に沈殿剤として Polyethyleneglycol(PEG)を含む条件とは相性が悪いようであった。検討温度を 25°C から 5°C に下げることで沈殿する割合を少なくすることができたが、今現在有望な結晶は得られていない。

タンパク質の結晶化において、分子の均一性が最も成功率を左右するといわれている。Table.14-2 に示すように、P450foxy は野生型においても約 20% のヘムが適切に配置されていない、もしくは脱落してしまっている。このことは試料の不均一性につながる。また、本研究で作製した F88 変異体のうち、F88V、L、I はヘムの保持率がほぼ 100% に向上していることが示されているため、これら変異体を結晶化に供することで異なる結果が得られるかもしれない。同様に、還元酵素ドメインの FAD、FMN も精製時に脱落しやすいが、結晶化検討時に 50 μ M FAD、FMN を添加することで結晶性が向上したことは、分子の均一性が向上したことに由来すると考えられる。P450foxy、P450BM3 は両者とも全長構造の結晶構造は解かれていないが、この原因として、P450、還元酵素という異種酵素の融合であることだけでなく、ヘム、フラビン補酵素の保持率が一定ではなく、試料の均一性を保つことが困難であることも考えられる。

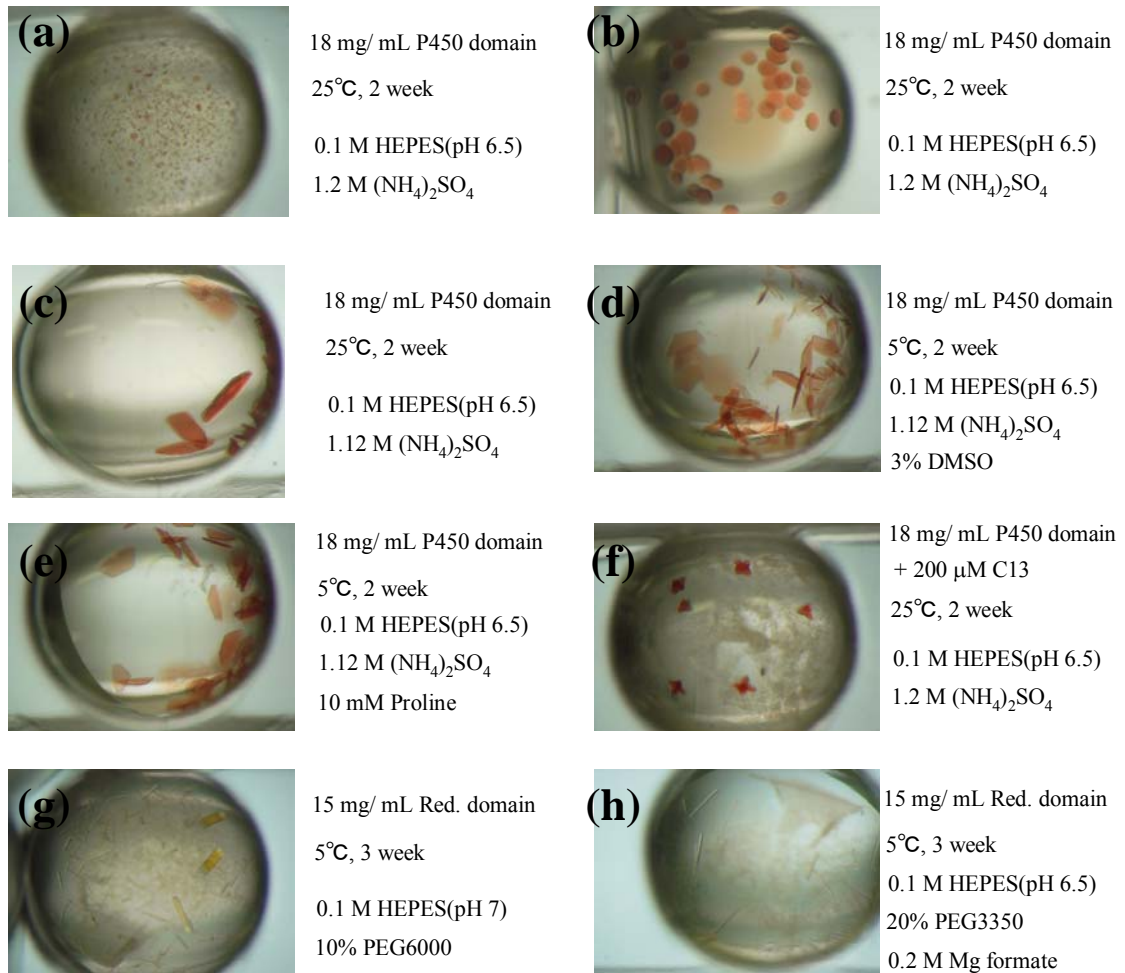
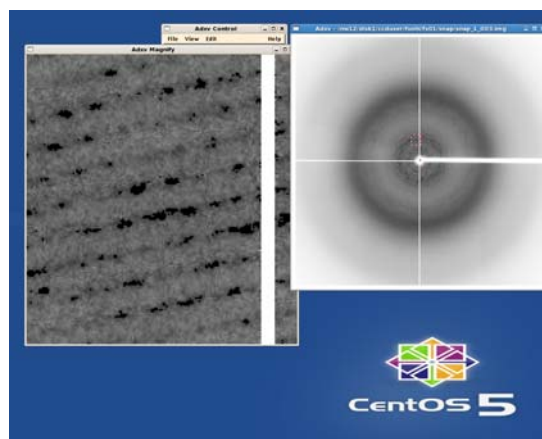
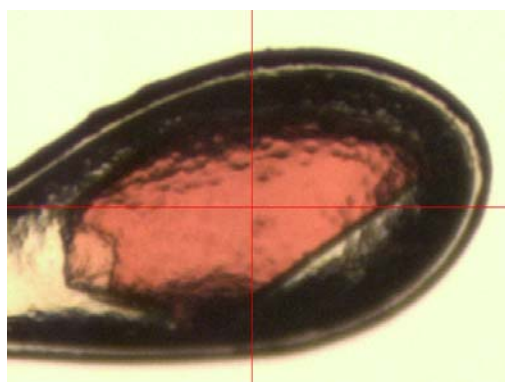


Fig.18-1 P450foxyの結晶化スクリーニングで見出された結晶

(A)



(B)

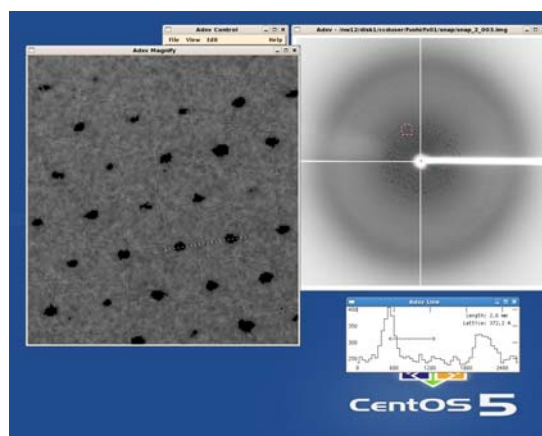
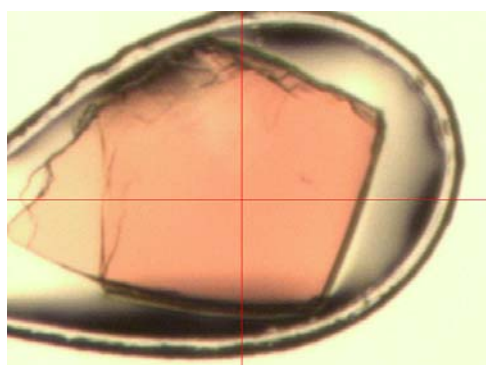


Fig.18-1 P450foxy P450ドメインのX線反射

(A) 0.1 M HEPES (pH6.5) 1.12 M (NH₄)₂SO₄

(B) 0.1 M HEPES (pH6.5) 1.12 M (NH₄)₂SO₄ 3% DMSO

第十九節 第二章の総括

P450foxy は、カビ *F. oxysporum* より単離された融合型 P450 であり、バクテリア由来の P450BM3 と最も近い性質を持つ。融合型 P450 は P450 ドメインと還元酵素ドメインが融合しており、極めて高い反応回転を示すことが知られている。P450BM3 はその特性により工業応用に向けた研究例が非常に多い。一方で P450foxy の研究例は圧倒的に少なく、その性状・生理的意義に関しても不明な点が多い。本研究は、P450foxy をタンパク質工学的手法によって機能改変を試みた初めての報告例である。

P450foxy の大腸菌発現系を前任者から供与され、実験に用いた。カビ菌体内で膜結合酵素であると考えられている P450foxy が、大腸菌発現系では可溶性発現されるのは有利な点であった。精製方法もすでに前任者によって確立されているが、本実験に先立ち His tag を付加したコンストラクトを構築し、さらに迅速かつ簡便な試料調製法を確立した。His tag が P450foxy の酵素活性に与える影響を調べた結果、C 末端 His tag を付加すると脂肪酸水酸化活性が約半分に低下し、それは C 末端側に存在する還元酵素ドメインのフォールディングが変化し、還元酵素活性が低下することに由来していることが明らかになった。この結果は C 末端に His tag を付加したコンストラクトで研究が行われることが多いバクテリア由来の融合型 P450 とは異なっていた。P450 ドメインと還元酵素ドメインを分離した大腸菌発現系を構築した。ゲル濾過カラムにおける溶出体積比較より、P450foxy は常に二量体として存在しており、それは還元酵素ドメイン間の相互作用によることが明らかになった。

分離された P450 ドメインは、全長酵素とスペクトルの性質、脂肪酸結合能において一致した。融合型 P450 において脂肪酸を添加すると還元酵素活性が上昇するという報告があり、それは P450 ドメインの活性部位に脂肪酸が結合することで誘導される構造変化が理由であるとされている。P450foxy においてもこの挙動は見られ、驚くべきことに還元酵素ドメインのみに脂肪酸を添加することでも還元酵素活性の上昇が見られた。さらに活性上昇を誘導する脂肪酸と P450foxy の脂肪酸水酸化反応の炭素鎖長は完全に一致し、ドデカン酸において至適であった。この結果から、P450foxy において脂肪酸は P450 ドメインだけでなく、還元酵素ドメインにも何らかの相互作用を持ち、電子伝達を活性化させるエフェクターとしての機能を持つ可能性が示唆される。また P450foxy の脂肪酸炭素鎖特異性は、この作用に影響されているといえるかもしれない。P450 ではないが、同じく酸化酵素、還元酵素ドメインの融合酵素である NOS(Nitric oxide synthase)において、電子伝達及び二量体化が外部因子カルモジュリンによって制御されていることが知られている[138, 139]。融合型 P450 でこのような性質は報告されておらず、脂肪酸が還元酵素ドメインに結合、制御因子として機能していることが構造解析的に証明することができれば、融合型 P450 の新たな電子伝達機構モデルを提案することにつながる。

活性部位内部に存在するアミノ酸のうち F88 を置換した 6 種の変異体(G, A, V, L, I,

W)を作製し、反応性を比較した。より小さい残基を導入した変異体ほど、適切にフォールディングされる割合が減少したことから、88位のアミノ酸残基が外部からの溶媒侵入を遮断し、活性部位内の環境を整える機能を持つことを予想させる。各変異体の脂肪酸に対する反応性は、全変異体で著しく低下し、炭素鎖特異性に変動が見られたが側鎖のサイズとの間に関連性は見られなかった。F88は、P450BM3の結晶構造解析の結果より、脂肪酸の末端炭素鎖と相互作用すると考えられるため、この残基が置換されることで末端炭素が固定されず反応が進みにくいという説明が可能である。トリデカン酸に対する K_d を比較したところ変動はあまり見られず、88位アミノ酸の脂肪酸結合能に対する寄与は小さいと考えられた。F88G、Wは脂肪酸結合能を失っており、F88Gは活性部位内部の環境が疎水性に保たれていない、F88Wは物理的に脂肪酸の侵入を阻害していることが原因と考えられた。

いくつかの F88 変異体酵素は、培地中にインディゴ色素を生産した。トリプトファン由来のインドールが変異体酵素により酸化されることが予想された。色素生産能を比較すると F88A が最も多くの色素を生産したことから、F88 の立体的障害がなくなったことでインドールのような大きな基質の侵入が可能になったことが明らかになった。さらに色素生産能を指標として、活性部位内部の部位特異的変異導入を行い、23 倍の色素生産能を持つ F88A V83L(AL 変異体)を取得した。Deep well plate を用いた error prone PCR スクリーニングを行い 14 種の変異体を取得した。配列を確認すると、V83、V75 に変異が導入されているものも多く見出され、活性部位内部の立体がインドールへの反応性に影響が大きいことを示した。これは第一章での *A. oryzae* 由来融合型 P450 に関する検討を強く支持する結果である。

F88A、AL 変異体を精製して性状を調べたところ色素生成能に比例してインドール、4-PI に対する親和性が向上しており、これは活性部位内部の構造を変異導入によって調製したことによる効果であり、色素生成能に反映されていると考えられた。*In vitro* におけるインドール水酸化活性測定を行ったが、活性を再現することは現在できていない。AL 変異体の還元酵素活性が野生型と比較して 30%程度に低下しているのも一因であるかもしれない。現在 AL 変異体によるインドール酸化能の再現のための検討を行っている。

P450foxy の結晶化検討で、P450、還元酵素各ドメインの結晶化条件を見出し、反射が起こることを確認した。データ収集には至っていないが、引き続き再現性確認・条件精密化を続けていく予定である。特に還元酵素ドメインは、本研究で興味深い示唆が得られたため、重点的に検討を行いたいと考えている。

第三章 結論

A. *oryzae* のゲノムに対する blast search の結果、CPO と 28% のアミノ酸相同性および保存されたヘム結合領域を持つタンパク質 AOPE を見出し、AOPE 過剰発現株を作成することでクローニングに成功した。粗抽出酵素においてペルオキシダーゼ反応および、CO 差スペクトルにおける 450 nm 付近の吸収極大を観察した。さらなる blast search の結果、CPO 類似タンパク質は糸状菌に広く分布しており、なんらかの生理的意義をもつことが示唆された。本研究は菌体内において、ペルオキシダーゼ反応を触媒するヘム-チオレート含有酵素が存在することを示した初めての報告例である。発現量が少ないことにより、詳細な性状研究は進行中であるが、現在発現量の増加検討を行い、その酵素的性状の解明を目指している。CPO は広い pH 範囲で反応性を示すが、pH2-3 という低 pH で最も高い活性を持つ。この性質は工業応用において障害となりうる。反応至適 pH のことなるペルオキシダーゼ取得は応用に関して有用である。

P450foxy および P450BM3 の配列を用いた blast search により、糸状菌およびバクテリアの持つ融合型 P450 の配列情報を取得した。アミノ酸アライメントに基づいた系統分析により、糸状菌の融合型 P450 は、バクテリアと比較して広い配列多様性および生理的な機能をもつことを明らかにした。

P450foxy の還元酵素ドメインに、基質である脂肪酸が直接相互作用し、還元酵素活性が上昇するという興味深い現象を見出した。NOS に見られるような外部因子の関与が電子伝達および立体構造に影響を与えるという報告は融合型 P450 ではなされておらず、融合型 P450 の電子伝達に関する新規な知見であった。

P450foxy の F88 変異により、脂肪酸水酸化活性を失う代わりにインドール酸化能を得たことが示唆された。アミノ酸一残基の置換により基質特異性を大きく変化させることができた。88 位の疎水性残基は基質認識だけでなく P450foxy の活性部位内部環境への寄与が大きいことが示された。

部位特異的変異および error prone PCR により、培地中に蓄積する色素量を指標としてインディゴ色素高生産変異体のスクリーニングを行った。P450foxy の活性部位内部の V83、V75 変異が活性向上の効果が大きいことが明らかになった。これらの残基は他の融合型 P450 では保存度が低く、基質認識が異なることを示す知見であった。最も多くの色素を生産する AL 変異体においても、精製酵素をもちいた *in vitro* における試験で活性を再現することは現在できていない。この理由として還元酵素からの電子伝達効率が低下していること、アンカップリングの割合が高いことが示唆された。また、大腸菌由来の酵素の関与も考えられた。有効なアミノ酸変異が P450BM3 とことなり、活性部位内部の構造の差、反応性の差が見出された。

P450、還元酵素ドメインにおいて結晶化条件を見出すことができ、条件の精密化により構造解明が近い将来可能になると期待する。

工業的応用が期待される融合型 P450 のうち、糸状菌由来 P450foxy でタンパク質工学的手法による機能改変を行った初めての報告であり、活性部位内部のアミノ酸側鎖を変異させることで、様々な化合物を認識させることができる可能性が示された。

引用論文

- [1] M. T. Hedayati, A. C. Pasqualotto, P. A. Warn, P. Bowyer, and D. W. Denning, *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer, *Microbiology-Sgm* 153 (2007) 1677-1692.
- [2] J. W. Cary, and K. C. Ehrlich, Aflatoxigenicity in *Aspergillus*: molecular genetics, phylogenetic relationships and evolutionary implications, *Mycopathologia* 162 (2006) 167-177.
- [3] K. C. Ehrlich, J. Yu, and P. J. Cotty, Aflatoxin biosynthesis gene clusters and flanking regions, *J Appl Microbiol* 99 (2005) 518-527.
- [4] Y. H. Lee, M. Tominaga, R. Hayashi, K. Sakamoto, O. Yamada, and O. Akita, *Aspergillus oryzae* strains with a large deletion of the aflatoxin biosynthetic homologous gene cluster differentiated by chromosomal breakage, *Appl Microbiol Biotechnol* 72 (2006) 339-345.
- [5] T. Akao, M. Sano, O. Yamada, T. Akeno, K. Fujii, K. Goto, S. Ohasi-Kunihiro, K. Takase, M. Yasukawa-Watanabe, K. Yamaguchi, Y. Kurihara, J. I. Maruyama, P. R. Juvvadi, A. Tanaka, Y. Hata, Y. Koyama, S. Yamaguchi, N. Kitamoto, K. Gomi, K. Abe, M. Takeuchi, T. Kobayashi, H. Horiuchi, K. Kitamoto, Y. Kashiwagi, M. Machida, and O. Akita, Analysis of expressed sequence tags from the fungus *Aspergillus oryzae* cultured under different conditions, *DNA Research* 14 (2007) 47-57.
- [6] M. Machida, K. Asai, M. Sano, T. Tanaka, T. Kumagai, G. Terai, K. I. Kusumoto, T. Arima, O. Akita, Y. Kashiwagi, K. Abe, K. Gomi, H. Horiuchi, K. Kitamoto, T. Kobayashi, M. Takeuchi, D. W. Denning, J. E. Galagan, W. C. Nierman, J. J. Yu, D. B. Archer, J. W. Bennett, D. Bhatnagar, T. E. Cleveland, N. D. Fedorova, O. Gotoh, H. Horikawa, A. Hosoyama, M. Ichinomiya, R. Igarashi, K. Iwashita, P. R. Juvvadi, M. Kato, Y. Kato, T. Kin, A. Kokubun, H. Maeda, N. Maeyama, J. Maruyama, H. Nagasaki, T. Nakajima, K. Oda, K. Okada, I. Paulsen, K. Sakamoto, T. Sawano, M. Takahashi, K. Takase, Y. Terabayashi, J. R. Wortman, O. Yamada, Y. Yamagata, H. Anazawa, Y. Hata, Y. Koide, T. Komori, Y. Koyama, T. Minetoki, S. Suharnan, A. Tanaka, K. Isono, S. Kuhara, N. Ogasawara, and H. Kikuchi, Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*, *Nature* 438 (2005) 1157-1161.
- [7] J. E. Galagan, S. E. Calvo, C. Cuomo, L. J. Ma, J. R. Wortman, S. Batzoglou, S. I. Lee, M. Basturkmen, C. C. Spevak, J. Clutterbuck, V. Kapitonov, J. Jurka, C. Scacciochio, M. Farman, J. Butler, S. Purcell, S. Harris, G. H. Braus, O. Draht, S. Busch, C. D'Enfert, C. Bouchier, G. H. Goldman, D. Bell-Pedersen, S. Griffiths-Jones, J. H. Doonan, J. Yu, K. Vienken, A. Pain, M. Freitag, E. U. Selker, D. B. Archer, M. A. Penalva, B. R. Oakley, M. Momany, T. Tanaka, T. Kumagai, K. Asai, M. Machida, W. C. Nierman, D. W. Denning, M. Caddick, M. Hynes, M. Paoletti, R. Fischer, B. Miller, P. Dyer, M. S. Sachs, S. A. Osmani, and B. W. Birren, Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A-fumigatus* and *A-oryzae*, *Nature* 438 (2005) 1105-1115.
- [8] K. J. McLean, M. Sabri, K. R. Marshall, R. J. Lawson, D. G. Lewis, D. Clift, P. R. Balding, A. J. Dunford, A. J. Warman, J. P. McVey, A. M. Quinn, M. J. Sutcliffe, N. S. Scrutton, and A. W. Munro, Biodiversity of cytochrome P450 redox systems, *Biochem Soc Trans* 33 (2005) 796-801.
- [9] D. Hamdane, H. Zhang, and P. Hollenberg, Oxygen activation by cytochrome P450 monooxygenase,

Photosynth Res 98 (2008) 657-666.

[10] Estabroo.Rw, Hildebra.Ag, J. Baron, K. J. Netter, and K. Leibman, New Spectral Intermediate Associated with Cytochrome-P-450 Function in Liver Microsomes, Biochemical and Biophysical Research Communications 42 (1971) 132-&.

[11] D. G. Kellner, S. C. Hung, K. E. Weiss, and S. G. Sligar, Kinetic characterization of compound I formation in the thermostable cytochrome P450 CYP119, J Biol Chem 277 (2002) 9641-9644.

[12] A. Ishimaru, and I. Yamazaki, Hydroperoxide-Dependent Hydroxylation Involving H₂O₂-Reducible Hemoprotein in Microsomes of Pea Seeds - New Type Enzyme Acting on Hydroperoxide and a Physiological-Role of Seed Lipoxygenase, Journal of Biological Chemistry 252 (1977) 6118-6124.

[13] A. Ishimaru, and I. Yamazaki, Carbon Monoxide-Binding Hemoprotein Reducible by Hydrogen-Peroxide in Microsomal Fractions of Pea Seeds, Journal of Biological Chemistry 252 (1977) 199-204.

[14] I. Matsunaga, N. Yokotani, O. Gotoh, E. Kusunose, M. Yamada, and K. Ichihara, Molecular cloning and expression of fatty acid alpha-hydroxylase from *Sphingomonas paucimobilis*, Journal of Biological Chemistry 272 (1997) 23592-23596.

[15] N. Nakayama, A. Takemae, and H. Shoun, Cytochrome P450foxy, a catalytically self-sufficient fatty acid hydroxylase of the fungus *Fusarium oxysporum*, Journal of Biochemistry 119 (1996) 435-440.

[16] T. Kitazume, N. Takaya, N. Nakayama, and H. Shoun, *Fusarium oxysporum* fatty-acid subterminal hydroxylase (CYP505) is a membrane-bound eukaryotic: Counterpart of *Bacillus megaterium* cytochrome P450BM3, Journal of Biological Chemistry 275 (2000) 39734-39740.

[17] H. Doddapaneni, R. Chakraborty, and J. S. Yadav, Genome-wide structural and evolutionary analysis of the P450 monooxygenase genes (P450ome) in the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: Evidence for gene duplications and extensive gene clustering, BMC Genomics 6 (2005) -.

[18] J. S. Yadav, H. Doddapaneni, and V. Subramanian, P450ome of the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: structure, evolution and regulation of expression of genomic P450 clusters, Biochemical Society Transactions 34 (2006) 1165-1169.

[19] J. A. Seo, R. H. Proctor, and R. D. Plattner, Characterization of four clustered and coregulated genes associated with fumonisin biosynthesis in *Fusarium verticillioides*, Fungal Genet Biol 34 (2001) 155-165.

[20] L. O. Narhi, and A. J. Fulco, Phenobarbital Induction of a Soluble Cytochrome P-450-Dependent Fatty-Acid Mono-Oxygenase in *Bacillus-Megaterium*, Journal of Biological Chemistry 257 (1982) 2147-2150.

[21] M. C. U. Gustafsson, O. Roitel, K. R. Marshall, M. A. Noble, S. K. Chapman, A. Pessegueiro, A. J. Fulco, M. R. Cheesman, C. von Wachenfeldt, and A. W. Munro, Expression, purification, and characterization of *Bacillus subtilis* cytochromes P450CYP102A2 and CYP102A3: Flavocytochrome homologues of P450BM3 from *Bacillus megaterium*, Biochemistry 43 (2004) 5474-5487.

[22] O. Lentz, V. Urlacher, and R. D. Schmid, Substrate specificity of native and mutated cytochrome P450 (CYP102A3) from *Bacillus subtilis*, Journal of Biotechnology 108 (2004) 41-49.

- [23] M. Budde, S. C. Maurer, R. D. Schmid, and V. B. Urlacher, Cloning, expression and characterisation of CYP102A2, a self-sufficient P450 monooxygenase from *Bacillus subtilis*, *Applied Microbiology and Biotechnology* 66 (2004) 180-186.
- [24] P. K. Chowdhary, M. Alemseghed, and D. C. Haines, Cloning, expression and characterization of a fast self-sufficient P450: CYP102A5 from *Bacillus cereus*, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 468 (2007) 32-43.
- [25] M. Dietrich, S. Eiben, C. Asta, T. A. Do, J. Pleiss, and V. B. Urlacher, Cloning, expression and characterisation of CYP102A7, a self-sufficient P450 monooxygenase from *Bacillus licheniformis*, *Applied Microbiology and Biotechnology* 79 (2008) 931-940.
- [26] H. Shoun, Y. Sudo, and T. Beppu, Subterminal Hydroxylation of Fatty-Acids by a Cytochrome-P-450-Dependent Enzyme-System from a Fungus, *Fusarium-Oxysporum*, *Journal of Biochemistry* 97 (1985) 755-763.
- [27] T. Kitazume, N. Takaya, N. Nakayama, and H. Shoun, *Fusarium oxysporum* fatty-acid subterminal hydroxylase (CYP505) is a membrane-bound eukaryotic counterpart of *Bacillus megaterium* cytochrome P450BM3, *J Biol Chem* 275 (2000) 39734-39740.
- [28] T. Kitazume, A. Tanaka, N. Takaya, A. Nakamura, S. Matsuyama, T. Suzuki, and H. Shoun, Kinetic analysis of hydroxylation of saturated fatty acids by recombinant P450foxy produced by an *Escherichia coli* expression system, *European Journal of Biochemistry* 269 (2002) 2075-2082.
- [29] H. Shoun, Y. Sudo, and T. Beppu, Subterminal hydroxylation of fatty acids by a cytochrome P-450-dependent enzyme system from a fungus, *Fusarium oxysporum*, *J Biochem* 97 (1985) 755-763.
- [30] T. Kitazume, A. Tanaka, N. Takaya, A. Nakamura, S. Matsuyama, T. Suzuki, and H. Shoun, Kinetic analysis of hydroxylation of saturated fatty acids by recombinant P450foxy produced by an *Escherichia coli* expression system, *Eur J Biochem* 269 (2002) 2075-2082.
- [31] N. English, C. N. Palmer, W. L. Alworth, L. Kang, V. Hughes, and C. R. Wolf, Fatty acid signals in *Bacillus megaterium* are attenuated by cytochrome P-450-mediated hydroxylation, *Biochem J* 327 (Pt 2) (1997) 363-368.
- [32] P. K. Chowdhary, N. Keshavan, H. Q. Nguyen, J. A. Peterson, J. E. Gonzalez, and D. C. Haines, *Bacillus megaterium* CYP102A1 oxidation of acyl homoserine lactones and acyl homoserines, *Biochemistry* 46 (2007) 14429-14437.
- [33] G. C. Shaw, and A. J. Fulco, Barbiturate-mediated regulation of expression of the cytochrome P450BM-3 gene of *Bacillus megaterium* by Bm3R1 protein, *J Biol Chem* 267 (1992) 5515-5526.
- [34] B. H. Kim, and A. J. Fulco, Induction by barbiturates of a cytochrome P-450-dependent fatty acid monooxygenase in *Bacillus megaterium*: relationship between barbiturate structure and inducer activity, *Biochem Biophys Res Commun* 116 (1983) 843-850.
- [35] L. O. Narhi, and A. J. Fulco, Phenobarbital induction of a soluble cytochrome P-450-dependent fatty acid monooxygenase in *Bacillus megaterium*, *J Biol Chem* 257 (1982) 2147-2150.

- [36] R. T. Ruettinger, L. P. Wen, and A. J. Fulco, Coding nucleotide, 5' regulatory, and deduced amino acid sequences of P-450BM-3, a single peptide cytochrome P-450:NADPH-P-450 reductase from *Bacillus megaterium*, *J Biol Chem* 264 (1989) 10987-10995.
- [37] H. Y. Li, K. Darwish, and T. L. Poulos, Characterization of recombinant *Bacillus megaterium* cytochrome P-450 BM-3 and its two functional domains, *J Biol Chem* 266 (1991) 11909-11914.
- [38] H. Li, and T. L. Poulos, The structure of the cytochrome p450BM-3 haem domain complexed with the fatty acid substrate, palmitoleic acid, *Nat Struct Biol* 4 (1997) 140-146.
- [39] M. A. Noble, C. S. Miles, S. K. Chapman, D. A. Lysek, A. C. MacKay, G. A. Reid, R. P. Hanzlik, and A. W. Munro, Roles of key active-site residues in flavocytochrome P450 BM3, *Biochem J* 339 (Pt 2) (1999) 371-379.
- [40] Y. Lu, and L. H. Mei, Co-expression of P450BM3 and glucose dehydrogenase by recombinant *Escherichia coli* and its application in an NADPH-dependent indigo production system, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 34 (2007) 247-253.
- [41] Q. S. Li, U. Schwaneberg, P. Fischer, and R. D. Schmid, Directed evolution of the fatty-acid hydroxylase P450 BM-3 into an indole-hydroxylating catalyst, *Chemistry* 6 (2000) 1531-1536.
- [42] Q. S. Li, U. Schwaneberg, M. Fischer, J. Schmitt, J. Pleiss, S. Lutz-Wahl, and R. D. Schmid, Rational evolution of a medium chain-specific cytochrome P-450 BM-3 variant, *Biochim Biophys Acta* 1545 (2001) 114-121.
- [43] A. B. Carmichael, and L. L. Wong, Protein engineering of *Bacillus megaterium* CYP102. The oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Eur J Biochem* 268 (2001) 3117-3125.
- [44] Q. S. Li, J. Ogawa, R. D. Schmid, and S. Shimizu, Engineering cytochrome P450 BM-3 for oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Appl Environ Microbiol* 67 (2001) 5735-5739.
- [45] A. Glieder, E. T. Farinas, and F. H. Arnold, Laboratory evolution of a soluble, self-sufficient, highly active alkane hydroxylase, *Nat Biotechnol* 20 (2002) 1135-1139.
- [46] Q. S. Li, J. Ogawa, R. D. Schmid, and S. Shimizu, Residue size at position 87 of cytochrome P450 BM-3 determines its stereoselectivity in propylbenzene and 3-chlorostyrene oxidation, *FEBS Lett* 508 (2001) 249-252.
- [47] S. Fuziwara, I. Sagami, E. Rozhkova, D. Craig, M. A. Noble, A. W. Munro, S. K. Chapman, and T. Shimizu, Catalytically functional flavocytochrome chimeras of P450 BM3 and nitric oxide synthase, *J Inorg Biochem* 91 (2002) 515-526.
- [48] C. K. Chen, T. Shokhireva, R. E. Berry, H. Zhang, and F. A. Walker, The effect of mutation of F87 on the properties of CYP102A1-CYP4C7 chimeras: altered regiospecificity and substrate selectivity, *J Biol Inorg Chem* 13 (2008) 813-824.
- [49] M. G. Joyce, H. M. Girvan, A. W. Munro, and D. Leys, A single mutation in cytochrome P450 BM3 induces the conformational rearrangement seen upon substrate binding in the wild-type enzyme, *J Biol Chem* 279 (2004) 23287-23293.

- [50] H. M. Girvan, K. R. Marshall, R. J. Lawson, D. Leys, M. G. Joyce, J. Clarkson, W. E. Smith, M. R. Cheesman, and A. W. Munro, Flavocytochrome P450 BM3 mutant A264E undergoes substrate-dependent formation of a novel heme iron ligand set, *J Biol Chem* 279 (2004) 23274-23286.
- [51] H. M. Girvan, H. S. Toogood, R. E. Littleford, H. E. Seward, W. E. Smith, I. S. Ekanem, D. Leys, M. R. Cheesman, and A. W. Munro, Novel haem co-ordination variants of flavocytochrome P450BM3, *Biochem J* 417 (2009) 65-76.
- [52] H. Y. Li, and T. L. Poulos, The structure of the cytochrome p450BM-3 haem domain complexed with the fatty acid substrate, palmitoleic acid, *Nature Structural Biology* 4 (1997) 140-146.
- [53] K. G. Ravichandran, S. S. Boddupalli, C. A. Hasemann, J. A. Peterson, and J. Deisenhofer, Crystal-Structure of Hemoprotein Domain of P450Bm-3, a Prototype for Microsomal P450S, *Science* 261 (1993) 731-736.
- [54] I. F. Sevrioukova, H. Y. Li, H. Zhang, J. A. Peterson, and T. L. Poulos, Structure of a cytochrome P450-redox partner electron-transfer complex, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (1999) 1863-1868.
- [55] H. Vilter, Peroxidases from Phaeophyceae.3. Catalysis of Halogenation by Peroxidases from *Ascophyllum-Nodosum* (L) Le-Jol, *Botanica Marina* 26 (1983) 429-435.
- [56] M. Almeida, S. Filipe, M. Humanes, M. F. Maia, R. Melo, N. Severino, J. A. da Silva, J. J. Frausto da Silva, and R. Wever, Vanadium haloperoxidases from brown algae of the Laminariaceae family, *Phytochemistry* 57 (2001) 633-642.
- [57] M. G. Almeida, M. Humanes, R. Melo, J. A. Silva, J. J. da Silva, and R. Wever, Purification and characterisation of vanadium haloperoxidases from the brown alga *Pelvetia canaliculata*, *Phytochemistry* 54 (2000) 5-11.
- [58] K. H. van Pee, G. Sury, and F. Lingens, Purification and properties of a nonheme bromoperoxidase from *Streptomyces aureofaciens*, *Biol Chem Hoppe Seyler* 368 (1987) 1225-1232.
- [59] J. Littlechild, E. Garcia-Rodriguez, A. Dalby, and M. Isupov, Structural and functional comparisons between vanadium haloperoxidase and acid phosphatase enzymes, *J Mol Recognit* 15 (2002) 291-296.
- [60] L. P. Hager, D. R. Morris, F. S. Brown, and H. Eberwein, Chloroperoxidase.2. Utilization of Halogen Anions, *Journal of Biological Chemistry* 241 (1966) 1769-&.
- [61] D. R. Morris, and L. P. Hager, Chloroperoxidase.I. Isolation and Properties of Crystalline Glycoprotein, *Journal of Biological Chemistry* 241 (1966) 1763-&.
- [62] M. Hofrichter, and R. Ullrich, Heme-thiolate haloperoxidases: versatile biocatalysts with biotechnological and environmental significance, *Applied Microbiology and Biotechnology* 71 (2006) 276-288.
- [63] S. R. Blanke, and L. P. Hager, Identification of the 5Th Axial Heme Ligand of Chloroperoxidase, *Journal of Biological Chemistry* 263 (1988) 18739-18743.
- [64] S. R. Blanke, and L. P. Hager, Cysteine-29 Is the 5Th Axial Ligand in Chloroperoxidase, *Faseb Journal* 2

(1988) A586-a586.

- [65] P. Kenigsberg, G. H. Fang, and L. P. Hager, Posttranslational Modifications of Chloroperoxidase from *Caldariomyces-Fumago*, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 254 (1987) 409-415.
- [66] I. Schlichting, J. Berendzen, K. Chu, A. M. Stock, S. A. Maves, D. E. Benson, B. M. Sweet, D. Ringe, G. A. Petsko, and S. G. Sligar, The catalytic pathway of cytochrome P450cam at atomic resolution, *Science* 287 (2000) 1615-1622.
- [67] M. Sono, M. P. Roach, E. D. Coulter, and J. H. Dawson, Heme-containing oxygenases, *Chemical Reviews* 96 (1996) 2841-2887.
- [68] S. Nagano, M. Tanaka, K. Ishimori, Y. Watanabe, and I. Morishima, Catalytic roles of the distal site asparagine-histidine couple in peroxidases, *Biochemistry* 35 (1996) 14251-14258.
- [69] R. Wang, and S. P. de Visser, How does the push/pull effect of the axial ligand influence the catalytic properties of Compound I of catalase and cytochrome P450? *Journal of Inorganic Biochemistry* 101 (2007) 1464-1472.
- [70] X. W. Yi, M. Mroczko, K. M. Manoj, X. T. Wang, and L. P. Hager, Replacement of the proximal heme thiolate ligand in chloroperoxidase with a histidine residue, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (1999) 12412-12417.
- [71] S. Adachi, S. Nagano, K. Ishimori, Y. Watanabe, I. Morishima, T. Egawa, T. Kitagawa, and R. Makino, Roles of Proximal Ligand in Heme-Proteins - Replacement of Proximal Histidine of Human Myoglobin with Cysteine and Tyrosine by Site-Directed Mutagenesis as Models for P-450, Chloroperoxidase, and Catalase, *Biochemistry* 32 (1993) 241-252.
- [72] M. Sundaramoorthy, J. Turner, and T. L. Poulos, The crystal structure of chloroperoxidase: A heme peroxidase-cytochrome P450 functional hybrid, *Structure* 3 (1995) 1367-1377.
- [73] M. Sono, J. H. Dawson, K. Hall, and L. P. Hager, Ligand and Halide Binding-Properties of Chloroperoxidase - Peroxidase-Type Active-Site Heme Environment with Cytochrome-P-450 Type Endogenous Axial Ligand and Spectroscopic Properties, *Biochemistry* 25 (1986) 347-356.
- [74] Hollenbe.Pf, and L. P. Hager, P-450 Nature of Carbon-Monoxide Complex of Ferrous Chloroperoxidase, *Journal of Biological Chemistry* 248 (1973) 2630-2633.
- [75] O. Bangcharoenpaupong, P. M. Champion, K. S. Hall, and L. P. Hager, Resonance Raman Studies of Isotopically Labeled Chloroperoxidase, *Biochemistry* 25 (1986) 2374-2378.
- [76] K. M. Manoj, Chlorinations catalyzed by chloroperoxidase occur via diffusible intermediate(s) and the reaction components play multiple roles in the overall process, *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics* 1764 (2006) 1325-1339.
- [77] D. H. Anh, R. Ullrich, D. Benndorf, A. Svatos, A. Muck, and M. Hofrichter, The coprophilous mushroom *Coprinus radians* secretes a haloperoxidase that catalyzes aromatic peroxygenation, *Applied and Environmental Microbiology* 73 (2007) 5477-5485.
- [78] R. Ullrich, and M. Hofrichter, The haloperoxidase of the agaric fungus *Agrocybe aegerita* hydroxylates

- toluene and naphthalene, *Febs Letters* 579 (2005) 6247-6250.
- [79] R. Ulrich, J. Nuske, K. Scheibner, J. Spantzel, and M. Hofrichter, Novel haloperoxidase from the agaric basidiomycete *Agrocybe aegerita* oxidizes aryl alcohols and aldehydes, *Applied and Environmental Microbiology* 70 (2004) 4575-4581.
- [80] C. E. Grey, F. Rundback, and P. Adlercreutz, Improved operational stability of chloroperoxidase through use of antioxidants, *Journal of Biotechnology* 135 (2008) 196-201.
- [81] A. Longoria, R. Tinoco, and R. Vazquez-Duhalt, Chloroperoxidase-mediated transformation of highly halogenated monoaromatic compounds, *Chemosphere* 72 (2008) 485-490.
- [82] C. D. Murphy, Fluorophenol oxidation by a fungal chloroperoxidase, *Biotechnology Letters* 29 (2007) 45-49.
- [83] Q. Zong, P. A. Osmulski, and L. P. Hager, High-Pressure-Assisted Reconstitution of Recombinant Chloroperoxidase, *Biochemistry* 34 (1995) 12420-12425.
- [84] A. Conesa, F. van de Velde, F. van Rantwijk, R. A. Sheldon, C. A. M. J. J. van den Hondel, and P. J. Punt, Expression of the *Caldariomyces fumago* chloroperoxidase in *Aspergillus niger* and characterization of the recombinant enzyme, *Journal of Biological Chemistry* 276 (2001) 17635-17640.
- [85] A. Conesa, C. A. M. J. J. van den Hondel, and P. J. Punt, Studies on the production of fungal peroxidases in *Aspergillus niger*, *Applied and Environmental Microbiology* 66 (2000) 3016-3023.
- [86] P. Stewart, R. E. Whitwam, P. J. Kersten, D. Cullen, and M. Tien, Efficient expression of a *Phanerochaete chrysosporium* manganese peroxidase gene in *Aspergillus oryzae*, *Applied and Environmental Microbiology* 62 (1996) 860-864.
- [87] D. W. Brown, J. H. Yu, H. S. Kelkar, M. Fernandes, T. C. Nesbitt, N. P. Keller, T. H. Adams, and T. J. Leonard, Twenty-five coregulated transcripts define a sterigmatocystin gene cluster in *Aspergillus nidulans*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (1996) 1418-1422.
- [88] T. L. Poulos, The role of the proximal ligand in heme enzymes, *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 1 (1996) 356-359.
- [89] M. Sundaramoorthy, J. M. Mauro, A. M. Sullivan, J. Ternner, and T. L. Poulos, Preliminary Crystallographic Analysis of Chloroperoxidase from *Caldariomyces-Fumago*, *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* 51 (1995) 842-844.
- [90] K. H. van Pee, Microbial biosynthesis of halometabolites, *Archives of Microbiology* 175 (2001) 250-258.
- [91] A. Goffeau, Genomics: multiple moulds, *Nature* 438 (2005) 1092-1093.
- [92] H. Doddapaneni, R. Chakraborty, and J. S. Yadav, Genome-wide structural and evolutionary analysis of the P450 monooxygenase genes (P450ome) in the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: evidence for gene duplications and extensive gene clustering, *BMC Genomics* 6 (2005) 92.
- [93] J. S. Yadav, H. Doddapaneni, and V. Subramanian, P450ome of the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: structure, evolution and regulation of expression of genomic P450 clusters, *Biochem Soc Trans* 34 (2006) 1165-1169.

- [94] K. Nakajima, S. Kunihiro, M. Sano, Y. Zhang, S. Eto, Y. C. Chang, T. Suzuki, Y. Jigami, and M. Machida, Comprehensive cloning and expression analysis of glycolytic genes from the filamentous fungus, *Aspergillus oryzae*, *Current Genetics* 37 (2000) 322-327.
- [95] K. Oda, D. Kakizono, O. Yamada, H. Iefuji, O. Akita, and K. Iwashita, Proteomic analysis of extracellular proteins from *Aspergillus oryzae* grown under submerged and solid-state culture conditions, *Applied and Environmental Microbiology* 72 (2006) 3448-3457.
- [96] M. J. Axley, P. Kenigsberg, and L. P. Hager, Fructose Induces and Glucose Represses Chloroperoxidase Messenger-Rna Levels, *Journal of Biological Chemistry* 261 (1986) 5058-5061.
- [97] L. O. Narhi, and A. J. Fulco, Identification and Characterization of 2 Functional Domains in Cytochrome-P-450Bm-3, a Catalytically Self-Sufficient Monooxygenase Induced by Barbiturates in *Bacillus-Megaterium*, *Journal of Biological Chemistry* 262 (1987) 6683-6690.
- [98] M. C. U. Gustafsson, C. N. A. Palmer, C. R. Wolf, and C. von Wachenfeldt, Fatty-acid-displaced transcriptional repressor, a conserved regulator of cytochrome P450 102 transcription in *Bacillus* species, *Archives of Microbiology* 176 (2001) 459-464.
- [99] X. Zhong, L. Peng, S. Zheng, Z. Sun, Y. Ren, M. Dong, and A. Xu, Secretion, purification, and characterization of a recombinant *Aspergillus oryzae* tannase in *Pichia pastoris*, *Protein Expr Purif* 36 (2004) 165-169.
- [100] A. Conesa, C. A. van den Hondel, and P. J. Punt, Studies on the production of fungal peroxidases in *Aspergillus niger*, *Appl Environ Microbiol* 66 (2000) 3016-3023.
- [101] P. J. Punt, N. D. Zegers, M. Busscher, P. H. Pouwels, and C. A. van den Hondel, Intracellular and extracellular production of proteins in *Aspergillus* under the control of expression signals of the highly expressed *Aspergillus nidulans* *gpdA* gene, *J Biotechnol* 17 (1991) 19-33.
- [102] H. Uchida, S. Arakida, T. Sakamoto, and H. Kawasaki, Expression of *Aspergillus oryzae* phytase gene in *Aspergillus oryzae* RIB40 *niaD*(-), *J Biosci Bioeng* 102 (2006) 564-567.
- [103] B. A. Kaup, K. Ehrich, M. Pescheck, and J. Schrader, Microparticle-enhanced cultivation of filamentous microorganisms: increased chloroperoxidase formation by *Caldariomyces fumago* as an example, *Biotechnol Bioeng* 99 (2008) 491-498.
- [104] H. Ikeda, J. Ishikawa, A. Hanamoto, M. Shinose, H. Kikuchi, T. Shiba, Y. Sakaki, M. Hattori, and S. Omura, Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*, *Nature Biotechnology* 21 (2003) 526-531.
- [105] P. K. Chowdhary, M. Alemseghed, and D. C. Haines, Cloning, expression and characterization of a fast self-sufficient P450: CYP102A5 from *Bacillus cereus*, *Arch Biochem Biophys* 468 (2007) 32-43.
- [106] M. Dietrich, S. Eiben, C. Asta, T. A. Do, J. Pleiss, and V. B. Urlacher, Cloning, expression and characterisation of CYP102A7, a self-sufficient P450 monooxygenase from *Bacillus licheniformis*, *Appl Microbiol Biotechnol* 79 (2008) 931-940.
- [107] A. M. Wu, and T. Platt, Transcription Termination - Nucleotide-Sequence at 3' End of Tryptophan

- Operon in *Escherichia-Coli*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75 (1978) 5442-5446.
- [108] H. A. Deboer, L. J. Comstock, and M. Vasser, The Tac Promoter - a Functional Hybrid Derived from the Trp and Lac Promoters, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* 80 (1983) 21-25.
- [109] N. Nakayama, and H. Shoun, Fatty-Acid Hydroxylase of the Fungus *Fusarium-Oxysporum* Is Possibly a Fused Protein of Cytochrome-P-450 and Its Reductase, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 202 (1994) 586-590.
- [110] M. L. Klein, and A. J. Fulco, Critical Residues Involved in Fmn Binding and Catalytic Activity in Cytochrome-P450(Bm-3), *Journal of Biological Chemistry* 268 (1993) 7553-7561.
- [111] M. Wang, D. L. Roberts, R. Paschke, T. M. Shea, B. S. S. Masters, and J. J. P. Kim, Three-dimensional structure of NADPH-cytochrome P450 reductase: Prototype for FMN- and FAD-containing enzymes, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (1997) 8411-8416.
- [112] R. Neeli, O. Roitel, N. S. Scrutton, and A. W. Munro, Switching pyridine nucleotide specificity in P450 BM3: mechanistic analysis of the W1046H and W1046A enzymes, *J Biol Chem* 280 (2005) 17634-17644.
- [113] S. Govindaraj, and T. L. Poulos, Role of the Linker Region Connecting the Reductase and Heme Domains in Cytochrome P450(Bm-3), *Biochemistry* 34 (1995) 11221-11226.
- [114] H. Murakami, Y. Yabusaki, T. Sakaki, M. Shibata, and H. Ohkawa, A genetically engineered P450 monooxygenase: construction of the functional fused enzyme between rat cytochrome P450c and NADPH-cytochrome P450 reductase, *Dna* 6 (1987) 189-197.
- [115] C. W. Fisher, M. S. Shet, D. L. Caudle, C. A. Martin-Wixtrom, and R. W. Estabrook, High-level expression in *Escherichia coli* of enzymatically active fusion proteins containing the domains of mammalian cytochromes P450 and NADPH-P450 reductase flavoprotein, *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (1992) 10817-10821.
- [116] J. A. Peterson, I. Sevrioukova, G. Truan, and S. E. Graham-Lorence, P450BM-3: A tale of two domains - Or is it three? *Steroids* 62 (1997) 117-123.
- [117] M. L. Klein, and A. J. Fulco, The Interaction of Cytochrome-C and the Heme Domain of Cytochrome P-450(Bm-3) with the Reductase Domain of Cytochrome P-450(Bm-3), *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* 1201 (1994) 245-250.
- [118] M. B. Murataliev, and R. Feyereisen, Functional interactions in cytochrome P450BM3. Fatty acid substrate binding alters electron-transfer properties of the flavoprotein domain, *Biochemistry* 35 (1996) 15029-15037.
- [119] H. Y. Li, and T. L. Poulos, Fatty acid metabolism, conformational change, and electron transfer in cytochrome P-450(BM-3), *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1441 (1999) 141-149.
- [120] R. Neeli, H. M. Girvan, A. Lawrence, M. J. Warren, D. Leys, N. S. Scrutton, and A. W. Munro, The

dimeric form of flavocytochrome P450BM3 is catalytically functional as a fatty acid hydroxylase, *Febs Letters* 579 (2005) 5582-5588.

[121] I. Sevrioukova, G. Truan, and J. A. Peterson, The flavoprotein domain of P450BM-3: Expression, purification, and properties of the flavin adenine dinucleotide- and flavin mononucleotide-binding subdomains, *Biochemistry* 35 (1996) 7528-7535.

[122] H. Shoun, T. Beppu, and K. Arima, On the stable enzyme-substrate complex of p-hydroxybenzoate hydroxylase. Evidences for the proton uptake from the substrate, *J Biol Chem* 254 (1979) 899-904.

[123] D. H. Craig, S. K. Chapman, and S. Daff, Calmodulin activates electron transfer through neuronal nitric-oxide synthase reductase domain by releasing an NADPH-dependent conformational lock, *Journal of Biological Chemistry* 277 (2002) 33987-33994.

[124] C. F. Oliver, S. Modi, M. J. Sutcliffe, W. U. Primrose, L. Y. Lian, and G. C. Roberts, A single mutation in cytochrome P450 BM3 changes substrate orientation in a catalytic intermediate and the regioselectivity of hydroxylation, *Biochemistry* 36 (1997) 1567-1572.

[125] C. F. Oliver, S. Modi, M. J. Sutcliffe, W. U. Primrose, L. Y. Lian, and G. C. K. Roberts, A single mutation in cytochrome P450 BM3 changes substrate orientation in a catalytic intermediate and the regioselectivity of hydroxylation, *Biochemistry* 36 (1997) 1567-1572.

[126] S. GrahamLorence, G. Truan, J. A. Peterson, J. R. Falck, S. Z. Wei, C. Helvig, and J. H. Capdevila, An active site substitution, F87V, converts cytochrome p450 BM-3 into a regio- and stereoselective (14S,15R)-arachidonic acid epoxygenase, *Journal of Biological Chemistry* 272 (1997) 1127-1135.

[127] R. T. Ruettinger, and A. J. Fulco, Epoxidation of Unsaturated Fatty-Acids by a Soluble Cytochrome-P-450-Dependent System from *Bacillus-Megaterium*, *Journal of Biological Chemistry* 256 (1981) 5728-5734.

[128] B. D. Ensley, B. J. Ratzkin, T. D. Osslund, M. J. Simon, L. P. Wackett, and D. T. Gibson, Expression of Naphthalene Oxidation Genes in *Escherichia-Coli* Results in the Biosynthesis of Indigo, *Science* 222 (1983) 167-169.

[129] B. D. Smith, J. L. Sanders, P. R. Porubsky, G. H. Lushington, C. D. Stout, and E. E. Scott, Structure of the human lung cytochrome P450 2A13, *J Biol Chem* 282 (2007) 17306-17313.

[130] C. C. Hyde, and E. W. Miles, The Tryptophan Synthase Multienzyme Complex - Exploring Structure-Function-Relationships with X-Ray Crystallography and Mutagenesis, *Bio-Technology* 8 (1990) 27-32.

[131] E. M. Gillam, L. M. Notley, H. Cai, J. J. De Voss, and F. P. Guengerich, Oxidation of indole by cytochrome P450 enzymes, *Biochemistry* 39 (2000) 13817-13824.

[132] W. C. Huang, A. C. G. Westlake, J. D. M. M. Gordon Joyce, P. C. E. Moody, and G. C. K. Roberts, Filling a hole in cytochrome p450 BM3 improves substrate binding and catalytic efficiency, *Journal of Molecular Biology* 373 (2007) 633-651.

[133] K. P. Vatsis, H. M. Peng, and M. J. Coon, Replacement of active-site cysteine-436 by serine converts

cytochrome P4502B4 into an NADPH oxidase with negligible monooxygenase activity, *Journal of Inorganic Biochemistry* 91 (2002) 542-553.

[134] H. M. Li, L. H. Mei, V. B. Urlacher, and R. D. Schmid, Cytochrome P450 BM-3 evolved by random and saturation mutagenesis as an effective indole-hydroxylating catalyst, *Appl Biochem Biotechnol* 144 (2008) 27-36.

[135] Q. S. Li, J. Ogawa, R. D. Schmid, and S. Shimizu, Indole hydroxylation by bacterial cytochrome P450 BM-3 and modulation of activity by cumene hydroperoxide, *Biosci Biotechnol Biochem* 69 (2005) 293-300.

[136] T. Kitazume, Y. Yamazaki, S. Matsuyama, H. Shoun, and N. Takaya, Production of hydroxy-fatty acid derivatives from waste oil by *Escherichia coli* cells producing fungal cytochrome P450foxy, *Applied Microbiology and Biotechnology* 79 (2008) 981-988.

[137] S. Schneider, M. G. Wubbolts, G. Oesterhelt, D. Sanglard, and B. Witholt, Controlled regioselectivity of fatty acid oxidation by whole cells producing cytochrome P450BM-3 monooxygenase under varied dissolved oxygen concentrations, *Biotechnol Bioeng* 64 (1999) 333-341.

[138] D. K. Ghosh, M. A. Holliday, C. Thomas, J. B. Weinberg, S. M. Smith, and J. C. Salerno, Nitric-oxide synthase output state. Design and properties of nitric-oxide synthase oxygenase/FMN domain constructs, *J Biol Chem* 281 (2006) 14173-14183.

[139] C. Feng, G. Tollin, M. A. Holliday, C. Thomas, J. C. Salerno, J. H. Enemark, and D. K. Ghosh, Intraprotein electron transfer in a two-domain construct of neuronal nitric oxide synthase: the output state in nitric oxide formation, *Biochemistry* 45 (2006) 6354-6362.

謝辞

本研究を行うにあたりまして、終始懇切丁寧なご指導を下さりました、東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻 祥雲弘文教授に心からお礼申し上げます。博士課程より研究室に所属することになった私に、難しくも非常に興味深い研究テーマを与えて下さり、研究が思うように進まないときには様々なご指摘をしていただきました。論文執筆の際には、励ましていただくと同時に暖かく見守って下さり、大変感謝しております。

ゼミにおいて実験に関する有益なご助言を多く賜りました同専攻 若木高善准教授に心からお礼申し上げます。

とても熱心にディスカッションに応じていただきました、同専攻 伏信進矢助教に心からお礼申し上げます。特に結晶化に関していただきました多くの助言に感謝しております。

研究室の事務を担当していただき、書類手続きなどで大いに助けていただきました、酵素学研究室秘書 藤本海音氏に感謝します。作ってきていただいたパンやケーキはとてもおいしかったです。

研究室の諸先輩方に深く感謝します。本来私がやらなければならない研究室の雑務を引き受けてくださり、実験に関する話し合いも行っていただいた、宮原盛雄氏に感謝しております。実験方法について厳しくも丁寧にご指導していただきました金尚完氏に感謝します。一緒に野球中継を見たのは良い思い出です。良い兄貴分として遊びに、実験に楽しませてくださった鈴木龍一郎氏に感謝します。

同期の周勝敏氏にお礼申し上げます。研究室に入ったばかりで右も左も分からない時に様々な実験方法を教えていただきました。また、実験で行き詰まったときには様々なご助言、討論をしていただき、うまくいかず悩んでいるときには相談にのっていただき、大変感謝しています。おそらく周さんがいなかったら卒業できなかったでしょう。同じく同期の許蓮花氏に感謝いたします。P450の研究仲間として様々なご助言を下さりとても助かりました。そして、許さんがいなかったら、ニースから帰ってこられなかったかもしれません。

猪狩朋子氏、高木恒輝氏、黒瀬太造氏、相原良一氏、平林謙氏、中屋智氏、林アンドレッサ真奈美氏、松岡正剛氏ら、後輩に感謝します。とても楽しく研究生活を過ごさせていただきました。

東北大学から今に至るまで良い友人である小平晃久氏、海老根真琴氏、杉本俊輔氏に感謝します。いつも応援してくれる吉村弥生氏に感謝します。苦しいときにとっても励みになっていました。

これまで、私を経済面において支えてくれた両親に深く感謝します。とてもご心配おかけしたと思います。私の今後についてとても心配してくれた叔父に感謝します。以上の方々、誰がいなくても現在の私は無いと思っています。