

## XB119

## 微生物を利用した水酸化変換技術の開発と応用

(メルシャン 生物資源研究所) ○有澤 章\*

## 【はじめに】

微生物の培養菌体を触媒として用いる微生物変換は操作性に優れ、酸化還元反応などの細胞内在コファクター要求性の反応にも適用できることから、位置・立体選択的反応や複雑な構造をもつ天然物の修飾などで医薬・化学品の製造に有利なプロセスを提供してきた。これまでに様々な微生物変換系の産業利用が検討される中で、多様な化合物を水酸化する機能をもつシトクロム P450 モノオキシゲナーゼ (P450) に着目した。本発表では微生物変換資源としての P450 の探索基盤の確立と有用水酸化化合物製造への応用について紹介する。

## 【探索基盤の確立】

独自に取得した細菌由来 P450 遺伝子のほか、遺伝子データベースなどから取得した配列を基に PCR で、起源菌 (または近縁の菌) の P450 遺伝子を増幅した。250 種以上の P450 遺伝子を収集した後、それらを順次レドックスパートナー遺伝子 (*Pseudomonas putida* 由来 *camAB*) とともに発現ベクターに組み込み、大腸菌で発現させることで、全細胞触媒として 96 穴プレートで水酸化変換反応が可能な程度まで小スケール化して探索プラットフォーム (P450 反応アレイ) を確立した。

## 【検証試験による評価】

前記 P450 - レドックスパートナー共発現系に基づく全細胞触媒を用いて、ヒト P450 の代表的基質として知られているテストステロン等の薬物を使って検証試験を実施し、この探索プラットフォームが機能することを確認した。この時、ヒト P450 による薬物代謝にかかわる主要な反応が個々の反応ベースで細菌由来 P450 によっても代替できることが分かった<sup>1)</sup>。このことは、代謝活性化を期待する水酸化薬物の探索や調製に、本探索プラットフォームが利用できることを示唆する。

## 【改良と応用】

大腸菌での機能的発現においては *camAB* のほか、*Acinetobacter* 属細菌由来の *aciBC* 遺伝子にコードされるレドックスパートナー<sup>2)</sup>が

様々な細菌由来 P450 に電子伝達可能であった。また、多剤排出ポンプ遺伝子 *tolC* を破壊した大腸菌宿主を用いることで変換率の向上が認められた<sup>3)</sup>。さらに、トリテルペン等の細胞透過が困難な化合物のためには無細胞系反応系で変換を容易にすることができた<sup>4)</sup>。

本探索プラットフォームは所望の水酸化酵素の探索に利用できるほか、選択された P450 候補の進化工学的機能改変にも適用可能であった。実際、ビタミン D<sub>3</sub> 水酸化酵素の機能改変においては比活性で 20 倍の向上を達成した<sup>5)</sup>。微生物 P450 はヒト P450 を包括する機能多様性を潜在的に備えていることに加えバイオプロセスへ導入しやすい利点がある。今後、このような取り組みが医薬候補誘導体の探索や製造に有利な方法を提供できるものと期待される。

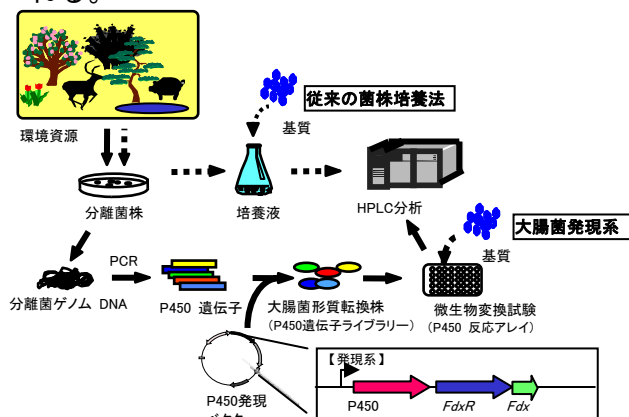


図. P450 による水酸化変換系探索基盤

## 【参考文献】

- 1) Agematu H., *et al.*, Biosci. Biotechnol. Biochem., 70, 307-311, 2006
- 2) Fujii T., *et al.*, Biosci. Biotechnol. Biochem., 70, 1379-1385, 2006
- 3) Fujii T., *et al.*, Biosci. Biotechnol. Biochem., 73, 805-810, 2009
- 4) Fujii Y., *et al.*, Biosci. Biotechnol. Biochem., 70, 2299-2302, 2006
- 5) Fujii Y., *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 385, 170-175, 2009

\* 連絡先 E-mail: arisawa-a@mercian.co.jp