

研究課題 (テーマ)		植物由来シトクロム P450 の大腸菌発現に最適な N 末端配列の探索	
研究者	所属学科等	職	氏名
代表者	生物工学科	助教	山口拓也
分担者			
研究結果の概要			
<p>本研究の目的は、植物由来シトクロム P450 (P450) の大腸菌発現に最適な N 末端配列を見出し、植物 P450 の異種生産を容易にすることである。P450 は植物特化代謝物や植物ホルモンの生合成、分解に関与する重要酵素である。また、化学合成では困難な一酸素原子添加反応を温和な条件で触媒する。そのため、植物 P450 は基礎・応用の両面から盛んに研究がされている。しかし、異種タンパク質生産宿主として汎用されている大腸菌において生産が困難なことが多く、大量生産系の構築が P450 研究・利用のボトルネックとなっている。大腸菌での生産が困難な理由は、植物 P450 は N 末端に疎水性の膜貫通領域を有しており、植物と大腸菌で膜移行メカニズムが異なるため、凝集してしまうからである。大腸菌で P450 を生産するため、N 末端の膜貫通領域を削除する方法が取られるが、それでも成功率は低い。そこでさらに、膜貫通領域の C 末端側にあるベーシックリージョンを大腸菌で高生産可能な P450 のベーシックリージョンと置換する方法が利用されている。ラット由来 CYP2C3 ベーシックリージョンとの置換が一般に利用されており、植物 P450 のベーシックリージョンと置換することで劇的に生産量が増加する例がある。しかし、CYP2C3 との置換により、全ての植物由来 P450 を生産できるわけではなく、生産量も不十分なことが多い。これまでラット由来 CYP2C3 の配列が一般的に利用されてきたが、哺乳動物由来 P450 よりも、植物由来ベーシックリージョンの利用が、植物 P450 の高生産に適している可能性がある。そこで本研究では、大腸菌で高生産可能な植物 P450 を選抜し、大腸菌生産に適したベーシックリージョンを探索した。</p> <p>55 種の植物由来 P450 を大腸菌で発現し、その生産量を評価した。その結果、生産が確認できたのは 14 種であり、このうち培地 1L あたり 10 mg 以上の生産量を得られた P450 はわずか 2 種であった。高発現した植物 P450 と大腸菌で発現しないもののベーシックリージョンを置換し、大腸菌における生産量を比較した。その結果、いくつかの P450 において、明確に大腸菌における生産用が増加した。その生産量は CYP2C3 置換体と比較してわずかに高かった。以上のことから、植物由来ベーシックリージョンを利用することで、大腸菌で生産困難であった植物 P450 を生産できるようになった。</p>			
今後の展開			
<p>次世代シークエンサーの普及により、明らかにされた植物 P450 の配列は 17 万種以上である。今後、より多くの植物 P450 の大腸菌における生産量を評価していくことで、より大腸菌発現向上高価の高いベーシックリージョンを獲得できると考えられる。また、植物 P450 の大腸菌生産系を構築、発展させていくことで、多様な反応を触媒する P450 ライブラリーとしての利用にもつながると考えられる。</p>			