

放線菌を用いた微生物変換に影響を及ぼす細胞内因子の探索とその機能解析

生命分子化学講座 基礎環境微生物学分野
西山 東希

【背景と目的】 医薬品として使用される活性型ビタミン D₃ は、化学合成法による生産のみならず *Pseudonocardia* 属放線菌を用いた発酵法でも生産されている。我々はこれまでに、*Pseudonocardia autotrophica* よりビタミン D₃ (VD₃) を不活性型から活性型に変換するシトクロム P450(Vdh)を同定し、*Rhodococcus* 属放線菌を宿主とした同酵素の異種発現系でも VD₃ 水酸化が可能であることを確認している。本研究では、高効率な活性型 VD₃ 生産系構築を目的とし、*Rhodococcus erythropolis* を宿主として、VD₃ 水酸化反応に影響を及ぼす細胞内因子の探索を行った。

【方法および結果】 Vdh の発現ベクターを形質転換した *R. erythropolis* JCM3201 株に対し、トランスポゾンライブラリーを作製し、変異株と two-hybrid 系による活性型 VD₃ 検出を可能としたレポーター酵母との共培養を行い、不活性型 VD₃ から活性型 VD₃ (25(OH)VD₃) への水酸化が不能となる変異株をスクリーニングした。トランスポゾン変異体約 25,000 株に対し 96 ウェルプレートを利用したスクリーニングの結果、約 40 株の VD₃ 水酸化不能株を取得した。さらに、最適化した条件下でこれら候補株における VD₃ 水酸化能を HPLC で測定したところ、VD₃ 水酸化率が著しく低下した株が 3 株得られた。これら 3 株に加え、共同研究者により取得された 21 株の VD₃ 水酸化能低下株に対し、遺伝子解析を行った結果、機能未知タンパク質や転写調節因子などをコードする 9 つの遺伝子にトランスポゾンが挿入されていることが確認された。同定した変異遺伝子の発現系を上記変異株に導入して VD₃ 水酸化能の回復実験を行ったところ、フェリチン様ドメインを有する機能未知タンパク質やアンチシグマ因子を発現させた場合のみ水酸化能が回復した。更に、野生株に Vdh およびそのレドックスパートナー TheCD を共発現した株にてこれら 2 つの遺伝子を過剰発現させたところ、前者のタンパク質発現株で水酸化率が著しく上昇した。また、VD₃ の基質透過性と排出系の関連性を確かめるため、*R. erythropolis* PR4 株由来の Efflux protein (EP) (49 種) を Vdh-TheCD 発現株にて発現させたところ、VD₃ 水酸化率に大きく変化をもたらす分子が認められ、その多くは水酸化効率を低下させることが判明した。

【考察および結論】 VD₃ 水酸化能低下株より同定された 9 遺伝子の内、残りの 7 遺伝子に関しては、更なる解析・検討が必要である。また、フェリチン様ドメインを有する機能未知タンパク質の VD₃ 水酸化率向上についても、今後詳細な解析が必要であるが、Vdh のへムや TheC の鉄-硫黄クラスターへの Fe 供給と関連している可能性が考えられる。また、*R. erythropolis* PR4 株由来 EP の発現による VD₃ 水酸化率の低下は、VD₃ が細胞内に拡散・侵入しても Vdh による反応前に速やかに排出されたことで引き起こされた可能性がある。EP のもつ広い基質特異性や排出能を活用することで、細胞に対する毒性物質が含まれる変換系、または反応により毒性が付与された物質等が混在する変換系への応用が可能になるかもしれない。