

様式3

神戸大学バイオシグナル総合研究センター共同利用研究報告書

平成 30 年 4 月 30 日

神戸大学バイオシグナル総合研究センター長 殿

所 属 機 関・部 局 名 産業技術総合研究所・健康工学研究部門
職 名 総括研究主幹
研 究 代 表 者 名 茂里康

下記のとおり平成29年度の共同利用研究成果を報告します。

記

(課題番号:281011)

1. 共同利用研究 課題名	薬物代謝酵素を用いた有用化合物の生物生産と精密蛋白質定量に関する研究			
2. 共同利用研究 目的	化成品の多くは石油精製品を出発物質として化学合成により生産されている。本研究では、有限資源である石油を使用しない生物生産系の確立を目的として、植物抽出化合物に対して薬物代謝酵素の CYP53A15 を反応させることで、有用な化合物の合成を行う為の反応系の確立を目指すと共に、薬物代謝酵素量定量の標準化を推進する。			
3. 共同利用研究 期間	平成 29 年 4 月 1 日 ～ 平成 30 年 3 月 31 日			
4. 共同利用研究組織				
氏 名	所属部局等	職名等	役 割 分 担	
(研究代表者) 茂里 康	健康工学研究部門	総括研究主幹	研究総括・質量分析	
(分担研究者) 達 吉郎	健康工学研究部門	部門長	蛋白質同定・定量的解析法確立	
5. センター内受入研究者	研究部門・ 分野名	シグナル分子応答・環境 物質応答	氏 名	今石 浩正

※ 次の6, 7, 8の項目は、枠幅を自由に変更できます。但し、6, 7, 8の項目全体では1頁に収めて下さい。

(課題番号:281011)

6. 共同利用研究計画

①安息香酸のパラ位水酸化が明らかとなっている P450 分子種、CYP53A15cDNA を、大腸菌発現用 tac プロモーター下流に連結させた発現用プラスミドを作製し、酵素の発現量を還元型 CO 差スペクトルにより評価する。

②CYP53A15 発現大腸菌へと、安息香酸を直接添加し、HPLC および質量分析によりパラ水酸化安息香酸の生成を確認する。また、温度、反応時間を連続的に変化させることで、反応条件の最適化を行う。

③CYP53A15 発現大腸菌から、超遠心分画およびカラムクロマトを行うことで CYP53A15 酵素蛋白質を精製する。次に、本精製酵素の蛋白質同定をマスマスペクトル解析することで、精製酵素量を正確に算出する。この結果を用い、本生物変換系に用いた P450 分子種の酵素比活性を正確に求める手法を開発する。

7. 共同利用研究の成果

①CYP53A15 をコードする cDNA の N 末端配列を改変させることにより、還元型 CO 差スペクトルを示す組換え大腸菌を作製する事に成功した。

②一昨年度に作製した CYP53A15 発現用プラスミドを大腸菌 JM109 株へと導入し、安息香酸を直接添加後に HPLC 分析を行った。その結果、少量のパラ水酸化安息香酸の生成が確認できた。次に、本酵素反応の最適化を試みた結果、25 度の培養条件で最大量の代謝産物が得られることが判明した。

③昨年度に引き続き 4℃の氷冷下に CYP53A15 発現大腸菌を静置した後、超音波破碎法を用いて破碎処理を行った。超音波破碎処理は 20W で 3 回行った。次に、破碎処理が完成していることを確認するために、還元型 CO 差スペクトルを用いて総 P450 酵素量を評価した。その結果、破碎処理が成功したことが確認出来た。超遠心分画により CYP53A15 酵素蛋白質画分を含む大腸菌膜画分を粗精製する事には成功したが、現在の所均一生成には成功しておらず今後の研究課題が明らかとなった。

8. 共同利用研究成果の学会発表・研究論文発表状況

論文発表:

Tamaki S.,Yagi M., Nishihata, Y., Yamaji, H., Shigeri, Y., Uno, T., Imaishi, H. (2018) Modification of N-terminal amino acids of fungal benzoate hydroxylase (CYP53A15) for the production of p-hydroxybenzoate and optimization of bioproduction conditions in Escherichia coli, J. Microbiol. Biotech. 28(3), 439-447

学会発表:

玉木峻、今石浩正、「大腸菌における安息香酸水酸化酵素の異種発現と生物生産システムへの応用」
2017 年度生命科学系学会合同年次大会(第 40 回日本分子生物学会) 神戸国際展示場

玉木峻、今石浩正、「CYP53A15 発現大腸菌を用いた p-ヒドロキシ安息香酸生産性の向上」第69回日本生物工学会大会 早稲田大学

9. 共同利用研究に関連した受賞, 博士学位論文の取得, 大型研究プロジェクトや競争的資金の獲得等がありましたらご記入ください。