

# 微生物変換による活性型ビタミン D<sub>3</sub> の効率的生産

## — 分子の改良から細胞膜改変までの包括的アプローチ —

安武 義晃、田村 具博\*

生体触媒を用いた物質変換プロセスは、一般に反応特異性が高く、効率的な物質生産を行う上で極めて重要な技術である。加えて、生体触媒は有害物質の排出が少なく、環境汚染のリスクが少なく、生産過程におけるエネルギー消費量が少ないという利点がある。この論文では、放線菌ロドコッカスエリスロポリス細胞を用いた生体触媒変換系による活性型ビタミンD<sub>3</sub>の生産に関して記述する。この微生物変換の触媒反応を担う酵素の性能向上は、進化学および立体構造を基にした手法の組み合わせにより達成した。これにより、活性型ビタミンD<sub>3</sub>の実生産効率を高めることに成功した。さらに、抗菌物質であるナイシンを用いて細胞を処理することにより、ビタミンD<sub>3</sub>の細胞膜透過効率を飛躍的に向上させることに成功し、新たなビタミンD<sub>3</sub>水酸化反応プロセスの基盤開発に成功した。

キーワード: シトクロム P450、ビタミン D<sub>3</sub>、微生物変換、ナイシン、構造生物学、タンパク質工学

## Efficient production of active form of vitamin D<sub>3</sub> by microbial conversion

### – Comprehensive approach from the molecular to the cellular level –

Yoshiaki YASUTAKE and Tomohiro TAMURA\*

Conversion processes of organic compounds using biocatalyst generally have high regio- and stereo-selectivity, and are becoming increasingly important for efficient production of chemicals. In addition, biocatalysis is less hazardous, less polluting and less energy-consuming than the conventional chemical method. We report the highly efficient bioconversion system using actinomycete *Rhodococcus erythropolis* to produce active form of vitamin D<sub>3</sub> currently used as a pharmaceutical. The improvement of performance of the enzyme used for the bioconversion has been achieved by the combination of evolutionary engineering and structure-based methods. Accordingly, the practical production efficiency of active form of vitamin D<sub>3</sub> has been substantially increased. In addition, we have succeeded in significant improvement of cellular permeability of vitamin D<sub>3</sub> by using nisin-treated cells, and have developed a new platform for vitamin D<sub>3</sub> hydroxylation process.

Keywords: Cytochrome P450, vitamin D<sub>3</sub>, bioconversion, nisin, structural biology, protein engineering

### 1 はじめに

ビタミン D<sub>3</sub> (VD<sub>3</sub>) は脂溶性ビタミンの一種であり、人間の体内においてさまざまな生理機能を担う極めて重要な物質である<sup>[1]</sup>。人間は VD<sub>3</sub> のほとんどを食物から摂取し、摂取された VD<sub>3</sub> は肝臓および腎臓において活性型 VD<sub>3</sub> へと変換される。この活性型 VD<sub>3</sub> はステロイド炭素骨格の 25 位が水酸化された 25-ヒドロキシ VD<sub>3</sub> (25(OH)VD<sub>3</sub>)、さらに 1 $\alpha$ 位が水酸化された 1 $\alpha$ ,25-ジヒドロキシビタミン D<sub>3</sub> (1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>VD<sub>3</sub>) であり、人の体内においてカルシウムやリン酸の恒常性維持、細胞の増殖・分化、免疫調節等に深く関与する。遺伝的もしくは環境的要因による活性型 VD<sub>3</sub> の欠乏は、骨粗鬆症・くる病・乾癬・副甲状腺機能亢進症等の病気を引き起こすことが知られており、実際にこれらの病気の治療薬として活性型 VD<sub>3</sub> が使用されている<sup>[1]</sup>。

現在、主に薬剤として使用されている 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>VD<sub>3</sub> は

有機化学合成の手法によって製造されており、コレステロールを出発物質として約 20 の反応ステップを経て合成することが可能であるが (図 1A)、その収率はわずか 1 %程度にとどまる<sup>[2]</sup>。このような生産効率でも事業化されているのは、活性型 VD<sub>3</sub> が極微量の投与 (0.5 ~ 数  $\mu$ g/日以下) でその薬理効果を示すからであり、その価格はとても高価である (一般試薬として販売されている VD<sub>3</sub> の値段は 1 mg 当たり約 7 円であるのに対し、1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>VD<sub>3</sub> は 1 mg 当たり約 13 万円となる (S 社カタログより))。このようなファインケミカルを大量に生産するためには、上記化学合成方法では低い反応効率のため精製方法が複雑となり、薬剤として使用するための高純度精製品を製造するためには高いコストを支払わなくてはならない。また、化学合成法ではステロイド骨格に対する部位選択的水酸化反応を行うことが困難であるため、薬効を示す可能性のある多様な活性型 VD<sub>3</sub> 誘導体を製造するには不向きな手法でもある。

産業技術総合研究所 生物プロセス研究部門 〒062-8517 札幌市豊平区月寒東 2 条 17-2-1  
Bioproduction Research Institute, AIST 2-17-2-1 Tsukisamu-Higashi, Toyohira, Sapporo 062-8517, Japan \* E-mail: t-tamura@aist.go.jp

Original manuscript received September 7, 2011, Revisions received October 31, 2011, Accepted November 7, 2011

一方、この化学合成法に代わる手法として、微生物がもつ変換能力を利用した活性型 VD<sub>3</sub> の製造が実用化されている<sup>[3][4]</sup>。この微生物変換反応を担う *Pseudonocardia autotrophica* という放線菌は、培地中に添加した VD<sub>3</sub> を活性型 VD<sub>3</sub> へと変換する能力をもつ。さらには、この微生物変換の過程で生まれる反応中間体 (25(OH)VD<sub>3</sub>) は、医薬中間体としての利用価値があると共に 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>VD<sub>3</sub> 同様の薬理効果があり、この 25(OH)VD<sub>3</sub> の取得も同一のプロセスにおいて可能である（一般試薬として販売されている 25(OH)VD<sub>3</sub> の値段は 1 mg 当たり約 4 万円である（S 社カタログ））（図 1B）。

生物が所持する酵素を利用した生体触媒変換は、一般に高い部位選択性・立体選択性を示すことから、化学物質合成において大きなインパクトをもつ。加えて、これまでの有機合成法に比べて安全であり、汚染物質の排出量が少なく、かつ穏やかな反応条件（常温・常圧）であることからエネルギー消費量も低い。このような特徴を併せもつ生体触媒変換技術に対しては「グリーンケミストリー」という言葉が使われるように、環境調和型の物質合成手法として広く知られている。*P. autotrophica* による活性型 VD<sub>3</sub> の生産は、このような特徴をすべて兼ね備えた環境調和型の物質生産法である。しかし、後述するようなさまざまな問題点が存在しているため、その生産性は最大化されていない。この論文では、まず現在実用化されている微生物変換における問題点と開発目標を示し、その上でそれを解決するために適用した研究手法とその組み合わせ方、またどのような着眼点が有効であったかを示しながら、高効率・高性能な組換え微生物変換系の構築に至るまでを記述する。

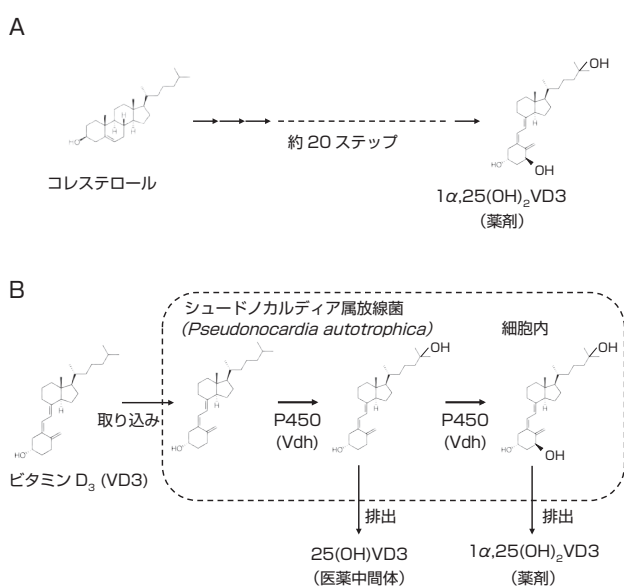


図 1 活性型ビタミン D<sub>3</sub> の生産法  
有機合成法 (A) および *P. autotrophica* による微生物変換による方法 (B)。

なおこの論文では、企業が事業実施している VD<sub>3</sub> 水酸化体生産に関する情報をオープンにできないため、記述した開発内容がどれだけ実生産の効率化に寄与できるか数値で示すことができない点を了承いただきたい。

## 2 克服すべき問題点と開発目標

微生物変換による活性型 VD<sub>3</sub> の生産技術の利点は上述のとおりであり、現在、企業では VD<sub>3</sub> 水酸化能の高い *P. autotrophica* 育種株を培養し、培養液に VD<sub>3</sub> と VD<sub>3</sub> の溶解度を高める目的でシクロデキストリン (CD) を添加し、微生物を増殖させながら VD<sub>3</sub> 水酸化体を培地に蓄積させていく手法が採られている (図 1B)。研究初期は *P. autotrophica* 野生株を用いて検討が進められ、菌培養 2 日後に VD<sub>3</sub> を添加し (200  $\mu$ g/ml)、翌培養 3 日目に 45  $\mu$ g/ml の 25(OH)VD<sub>3</sub> の蓄積が確認されている<sup>[4]</sup>。現在は育種株を使用した生産が行われており、その生産効率はかなり高くなっていると考えられる。

しかし、この手法には改良を施すべき問題点も存在しており、それらを解決することによって、飛躍的に性能が向上した微生物変換が可能になると考えられる。以下に、それら問題点、推定される原因を分析し、解決の指針をまとめる。

- ① 変換効率・・・現在実施されている微生物変換では、培地中に添加した VD<sub>3</sub> がすべて変換されず、未反応基質が残留している。実験室レベルでの解析では 30 % 以上の未反応物が確認される。変換可能量は細胞内の酵素の絶対量に大きく依存すると考えられるため、大量の酵素を細胞内に安定に発現・蓄積させる技術が必要である。これにより、添加した VD<sub>3</sub> の大部分を活性型に変換する変換系の構築が期待される。
- ② 変換速度・・・現在実施されている微生物変換では、1 回あたりの変換反応には 100 時間以上を必要としている。これは、微生物の生育速度が遅いことと、酵素の天然基質 (未特定) ではない VD<sub>3</sub> を基質として使用しているため酵素反応速度が遅いことが主な原因であると考えられる。反応速度を向上させた変異体酵素を創成し、増殖が速い微生物細胞中で反応を行うことにより、より短い期間で同一量の活性型 VD<sub>3</sub> を得ることが可能になると考えられる。
- ③ 副反応産物の存在・・・この微生物変換における最大の問題は、26 位炭素が水酸化された副反応産物が生じることである。この 26 位水酸化体は、高速液体クロマトグラフィーにより 25 位水酸化体と近接あるいは重なったピークとして溶出される。このため、医薬品としての 25 位水酸化体生産には、26 位水酸化体を完全に除去する必要がある。

り、25位水酸化体収率を下げる要因となっている。これは酵素反応の部位選択性が低いことが原因であるため、部位選択性の向上した変異体酵素を作製し、26位水酸化反応を抑制することが求められる。

- ④ 細胞膜透過の問題・・・VD3は脂溶性ビタミンであり、難水溶性の性質を示す。したがって、上述したように変換培地中にはVD3と共にシクロデキストリン (CD) を添加し、CDの環状構造中にVD3をトラップ (包接) させた状態で溶解させている。相対的に分子量の大きいCD-Vd3複合体は細胞膜を透過できないため、CDから解離したVD3が単独で効率良く膜を透過するか、もしくはCDごと膜透過させるような工夫が必要である。細胞膜透過効率は、この微生物変換反応の律速になっており、膜透過の問題が改良されれば、反応効率 (①) および見かけの反応速度 (②) の向上も同時に期待される。

解決されるべき上記問題点のうち、①から③に関しては、変換反応を実際に担っている酵素の性能が主な原因として挙げられる。そこで、まずは酵素の特徴付けと変異導入による改良、および酵素の細胞内での大量蓄積技術が必要となる。また後述するとおり、この酵素はシトクロム P450 と呼ばれる酵素群の一員である。シトクロム P450 とは、分子内にヘムをもち、外部から電子が供給されることでさまざまな物質の炭化水素鎖に水酸基を挿入する能力をもつ酵素群の名称であり、活性を発揮するために適切な電子供与タンパク質を必要とする。そこでこの酵素に効率良く電子を伝達できるようなレドックスパートナー遺伝子を探索し、この酵素と共に共発現させる必要がある。④に関しては細胞膜自体の構造、あるいは物質を膜透過させるトランスポータータンパク質の機能の問題に関係するため、そのような情報を取得できる細胞であることが望まれる。

以上の問題を解決するためには、VD3 水酸化能を有さず、組換え大量発現が可能で、培養が容易で増殖も速く、かつゲノム情報が利用できる微生物を変換ホストとして利用して情報収集を行い、*P. autotrophica* の系へフィードバックすることが望ましいと考えた。これらの条件を満たす生物種として、*P. autotrophica* と同じ放線菌に属する *Rhodococcus erythropolis* 宿主ベクター系<sup>[5]</sup>を利用して研究を進めることとした (図 2)。

### 3 成果への道筋

#### 3.1 酵素の単離と遺伝子の同定

希少放線菌である *P. autotrophica* に VD3 を活性型 VD3 に変換する能力があることが発見されたのは今から約 20 年前のことである。ステロイド骨格への水酸化反応を触媒するという特徴から、この反応を触媒する酵

素はシトクロム P450 の一種であると予想されたが、酵素の同定には長い間成功していなかった。そこで私達はまずこの酵素をコードする遺伝子の探索から着手した。*P. autotrophica* のゲノム配列解読はなされていなかったため、VD3 水酸化活性を指標に *P. autotrophica* 細胞抽出液から直接酵素の精製を試みた。VD3 水酸化活性は、一般に P450 が活性を発揮するために必要とする電子伝達タンパク質を共存させることで検出されたため、目的酵素は予想どおり P450 の一種であると確認されたが、精製途中で VD3 水酸化活性が検出できなくなる現象が障壁となり精製は難航した。試行錯誤の結果、この酵素が活性を示すために反応溶液中に塩 (NaCl 等) が存在しなければならないことを見出し、精製の最終ステップまで活性を追跡することが可能となった<sup>[6]</sup>。得られた精製酵素より部分アミノ酸配列の決定を行った後、この酵素をコードする遺伝子のクローニングに成功した。

#### 3.2 試験管内でVD3水酸化反応を再現

上述の方法により同定に成功した VD3 水酸化活性を示す酵素は、大腸菌を用いた一般的な大量発現系を利用して生産することが可能であった。ただし P450 酵素はヘムタンパク質であるため、ヘムを内包した活性型酵素を取得するためには、培地中にヘム前駆体である 5-アミノレブリン酸を添加する必要がある。これは大腸菌を利用して P450 酵素を大量生産する際に頻繁に用いられる手法である。一方、この酵素は *R. erythropolis* を利用した組換え大量発現も同様に可能であったが、その際培地に 5-アミノレブリン酸を添加することなく酵素の取得が可能であった。これは、放線菌がそもそも多くの P450 遺伝子をもつことから、ヘム生合成経路が安定に機能し、細胞内のヘムが枯渇することなく維持できているからだと考えている。5-アミノレブリン酸は高価な試薬であるため、組換え発現を行う場合、*R. erythropolis* を利用した微生物変換はこの点で有利である。

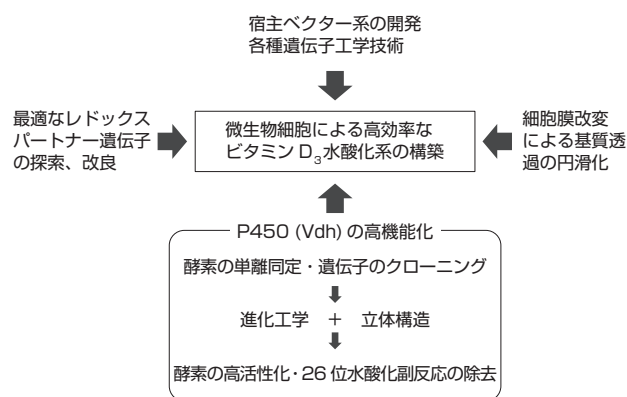


図 2 研究開発のアウトライン

次に、大量発現により取得された酵素の試験管内における活性測定を行い、酵素の機能を詳細に解析した。P450 は水酸化反応の1代謝回転を行うために2個の電子が必要であり、電子を供給するレドックスパートナータンパク質をアッセイ系に加える必要がある。ここでは、さまざまなP450のアッセイに対して汎用的に用いられている市販のハウレンソウ由来レドックスパートナータンパク質を利用した。その結果、この酵素がVD<sub>3</sub>から25(OH)VD<sub>3</sub>、および25(OH)VD<sub>3</sub>から1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>VD<sub>3</sub>への二段階の水酸化反応を連続的に触媒することが明らかになった。1 $\alpha$ (OH)VD<sub>3</sub>が検出されないことから、この酵素は必ずVD<sub>3</sub>の25位炭素を最初に水酸化し、続いて25(OH)VD<sub>3</sub>に対して1位炭素の水酸化を行うことが分かった。また、少量の26位水酸化体も検出され、これらの結果はすべて*P. autotrophica*細胞によるVD<sub>3</sub>変換時に検出されるものと一致した。私達はこのP450酵素がこの微生物変換を実際に担っている酵素であると断定し、ビタミンD<sub>3</sub>水酸化酵素(vitamin D<sub>3</sub> hydroxylase (Vdh))と名付けた。以下、このP450酵素をVdhと記すことにする。

### 3.3 組換え発現を用いた細胞内変換

次に、*R. erythropolis*の組換え細胞を用いてVD<sub>3</sub>の水酸化を行う微生物変換系の構築を行った。Vdhの単独発現ではVD<sub>3</sub>水酸化活性はとて低く、何らかのレドックスパートナータンパク質を共発現させる必要があった。そこで、抗生物質チオストレプトンによって発現が誘導される誘導型ベクターに、Vdhおよび*R. erythropolis*由来のレドックスパートナータンパク質(フェレドキシンおよびフェレドキシン還元酵素)をコードする3種の遺伝子を挿入し、*R. erythropolis*細胞内でこれらを共発現させ、培地にVD<sub>3</sub>を添加してVD<sub>3</sub>の変換試験を行った。結果、*R. erythropolis*細胞を用いた場合にも、活性型VD<sub>3</sub>が生産されることを確認した。P450への電子供給を最も効率良く行うことができるパートナーは、必ずしもそのP450が本来の由来生物細胞内でカップルするタンパク質であるとは限らないことが報告されている<sup>[7]</sup>。これは遺伝子の細胞内発現レベルや細胞内環境のわずかな差異によって電子伝達効率が著しく左右されるためと考えられている。そこで私達は、上記の共発現ベクターにさまざまな電子伝達タンパク質遺伝子を挿入して変換テストを行い、それらの中から高いVD<sub>3</sub>水酸化活性を示すレドックスパートナーを探索した。その結果、*Acinetobacter*由来のAciB、AciCというタンパク質がVdhに対して最も相性のいいパートナーであった。

### 3.4 酵素改良への異なる二つのアプローチ

一般に生物が作り出す酵素というものは、ある基質を特

異的に認識し、特異的な反応を行うことに特化した触媒体である。しかし、*P. autotrophica*が生息する土壤中にVD<sub>3</sub>は見出されないため、VdhはVD<sub>3</sub>を水酸化し代謝するために進化した(特化した)酵素ではないと考えられる。事実、単離精製した酵素のVD<sub>3</sub>水酸化活性は、何らかの物質の生合成に関与するような特異的機能をもつP450の活性よりもかなり低い。したがって、VdhのVD<sub>3</sub>水酸化活性は酵素として全く最適化されておらず、まだまだ向上させることが可能だろうと考えられる。

酵素を改良するための変異導入を行う場合、全く異なる二つのアプローチがある。一つは、タンパク質の立体構造を解析し、その構造情報に基づいて変異を導入する論理的戦略(rational design)である。構造機能相関が明確である場合には強力な手法である一方で、タンパク質の立体構造は無数のパラメータから成る複雑系であるため、時にアミノ酸残基と機能との間に単純な相関関係がないことも多い。もう一つのアプローチは、ランダム変異を導入した遺伝子変異ライブラリーを作製し、性能の向上した変異体をスクリーニングする進化工学的アプローチである。こちらはライブラリーの作製とそれらすべてをアッセイして検証する必要があるため大変な労力が必要となる一方で、活性部位近傍に限らず、配列上のいかなる場所からも酵素の機能向上に貢献する変異が抽出されてくる可能性がある。当該研究では、これら二つのアプローチをどちらかに限定することなく、両方の手法を用いて酵素の改良を行った(図2)。結果的に、進化工学および構造に基づいた変異導入の両方の戦略において、それぞれの手法の長所が引き出され、有用な変異体を生み出すことに成功した。

#### 3.4.1 酵素の高活性化

VD<sub>3</sub>水酸化活性が著しく向上した変異体は、ランダム変異によるスクリーニングの後、活性が向上したクローンの変異か所を組み合わせることによって取得された。最も活性が向上した4重変異体(Vdh-K1)は、野生型Vdh(Vdh-WT)と比較して25位水酸化活性が約12倍、1位水酸化活性が約25倍、それぞれ向上していることが確認された<sup>[6][8]</sup>。興味深いことに、これら4カ所の変異はすべて活性部位から遠く離れた場所に位置しており、このような変異をrational designによって見出すことは困難である。Vdh-K1の取得は、構造情報にとらわれない進化工学の利点が最大に生かされた結果となった。一方、立体構造解析を行うことで、なぜこれらの変異が大きな活性向上を生み出したのかを推察することができた。Vdh-WTとVdh-K1の間には大きな構造変化が観察され、変異4カ所のうち3カ所はその構造変化を誘発させるような変異であった。すなわちVdhの活性向上は、基質結合ポケットの基質の形状に

対する最適化ではなく、分子構造全体がとりうる二つのコンフォメーション (open form と closed form) の平衡を調節することで可能になった<sup>[8]</sup> (図 3)。P450 は自然界において、二次代謝産物の生合成系あるいはさまざまな物質の解毒分解にかかわる酵素であり、広い基質特異性を示す分子種も多い。当該研究で観察された変異導入による構造変化の平衡移動は、自然界において新たな環境や物質に出会った時、これら P450 がわずかに数カ所の変異で迅速に適應するメカニズムなのかもしれない。この成果によって、VD<sub>3</sub> 水酸化体生産効率を著しく向上させられる可能性が生まれた。しかしながら後述する基質の膜透過性の問題により、酵素の性能アップだけでは VD<sub>3</sub> 水酸化体生産効率の大幅な向上には至っていない。

### 3.4.2 酵素副反応を完全に消去する

*P. autotrophica* による活性型 VD<sub>3</sub> 生産においては、約 10 % の割合で 26 位炭素が水酸化された副反応産物が生じる。これは明らかに酵素の基質認識に問題があり、より厳密に VD<sub>3</sub> を認識する酵素を作製するか、基質結合ポケット内での基質の結合方位を微調整する必要があると思われる。そこで、構造情報に基づいた基質結合ポケットへの変異導入を行うため、Vdh と VD<sub>3</sub> の複合体結晶構造解析を試みた。Vdh-WT は基質結合親和性が低く、基質複合体結晶を得ることができなかったが、一方で高活性変異体 Vdh-K1 は VD<sub>3</sub> との複合体の状態での結晶化に成功し、酵素がどのように VD<sub>3</sub> を認識するのかを明らかにすることができた<sup>[8]</sup> (図 4)。基質結合ポケットを形成するアミノ酸残基のうち、VD<sub>3</sub> の 24 位から 27 位炭素の近傍に位置す

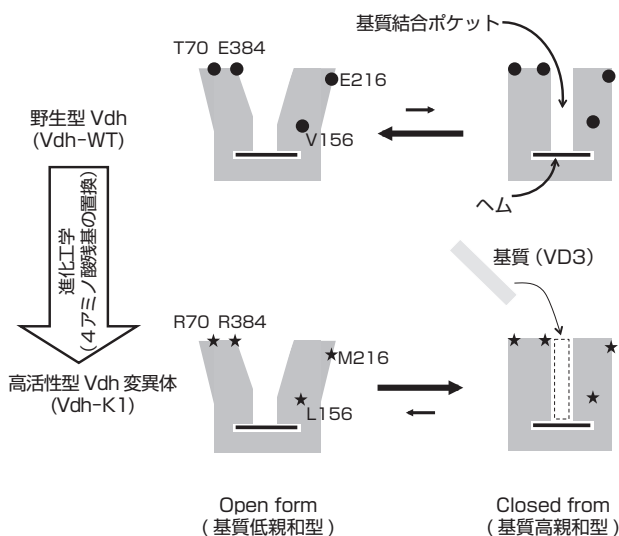


図 3 P450 Vdh の高活性化メカニズム

一般に P450 はオープン構造とクローズ構造の平衡にあり、基質はクローズ構造と結合しやすい。進化工学によって選ばれた変異によってこの構造間の平衡が大きく移動し、クローズ構造をとる分子の総数が増え、高活性化が達成された。

るアミノ酸残基に着目し、それらに対してアミノ酸総置換を行うことで副反応比率が低下した変異体 (I88V) を取得した<sup>[9]</sup>。Vdh-K1 + I88V の 5 重変異体は、*P. autotrophica* による生体変換試験において、副反応比率が 1 % 程度にまで低下し、また単独 I88V 変異体の場合は、26 位水酸化体は検出限界以下にまで低下した。この成果は、立体構造情報に基づいてはいるが、完全な rational design ではない。どのアミノ酸残基のどのような変異が副反応を低減させられるのかを、論理的に推定することはとても難しい。したがって、変異を導入すべき場所 (アミノ酸残基) のみを立体構造を基に選定し、選定したアミノ酸残基に対してはランダム総置換の戦略をとることで、副反応低減を実現する変異を選び出すことに成功した。この研究成果により、25(OH)VD<sub>3</sub> の生産効率を高めることに成功し、現在実用化に向けた開発が進められている。

### 3.5 細胞を加工する

Vdh を組換え発現させた *R. erythropolis* により活性型 VD<sub>3</sub> を生産するにあたり、最後の大きな問題となる事象が物質の細胞膜透過効率である。これは *R. erythropolis* に特有の問題ではなく、*P. autotrophica* においても同様の問題が観察されていた。*R. erythropolis* においては、細胞内 Vdh 発現量を変動させても、細胞内酵素量と VD<sub>3</sub> 水酸化体の変換率に相関は認められず、ある一定の変換効率で固定される<sup>[10]</sup>。また *P. autotrophica* では、試験管内での再構成系を用いたアッセイ結果では飛躍的な高活性化が確認された Vdh-K1 (3.4.1 参照) であっても、*P. autotrophica* 細胞内変換を行うと野生型と大きな差が生まれないのである。これは細胞内で酵素の性能が生かされていない状況を意味しており、基質である VD<sub>3</sub> の細胞膜透過が律速になっていると推測された。VD<sub>3</sub> は脂溶性のステロイドであり水への溶解度は極めて低い。そのため現在の微生物

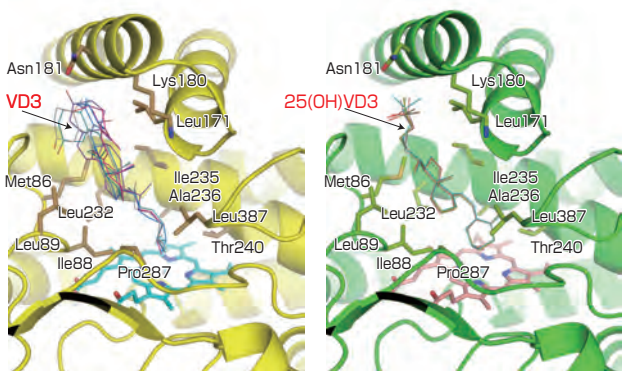


図 4 P450 Vdh による上下反転した異なる基質認識メカニズム。VD<sub>3</sub> (左) と 25(OH)VD<sub>3</sub> (右) はそれぞれ互いに反転した方位で酵素に結合することができ、それによって活性型 VD<sub>3</sub> への連続水酸化が可能となる。基質結合サイトの詳細情報から、副反応を除去するための変位候補のアミノ酸を選定した。

変換においては、CD を培地に添加し、CD の環状構造内に VD<sub>3</sub> を包接させて溶解度を向上させている。実際に *in vivo*、*in vitro* 共に、溶液中への CD の添加によって Vdh の VD<sub>3</sub> 水酸化活性は劇的に向上する。しかし、分子量の大きい CD-VD<sub>3</sub> 複合体が細胞膜を透過することは難しいと考えられ、VD<sub>3</sub> は CD から解離した後に拡散的に細胞内へと入ると考えられるが、実際の VD<sub>3</sub> 細胞内取り込み機構は全く不明である（図 5）。そこでまず、何らかの膜タンパク質（トランスポーター）によって VD<sub>3</sub> が運搬されている可能性を考慮し、トランスポゾンを用いたランダム遺伝子破壊実験および *R. erythropolis* ゲノム情報を利用し、VD<sub>3</sub> の変換活性を向上させるようなトランスポーターホモログ遺伝子の同定を試みた。しかし、現在までにそのような遺伝子を見出すことはできていない。

そこで着想を大きく転換し、細胞に物理的に穴を開ける

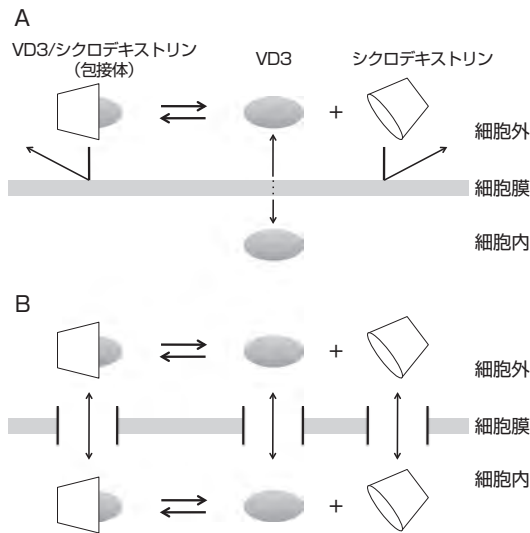


図 5 細胞膜の物質透過の概念図

通常の状態の細胞膜 (A) では、VD<sub>3</sub> のみが自然拡散的に膜を透過できると考えられる。ナイシン処理により孔が生じた細胞膜 (B) では、シクロデキストリンを含め低分子量物質は自由に移動できるようになる。

ことで CD-VD<sub>3</sub> 複合体を細胞内の酵素に直接的に送り届けることはできないか検討を行い、ナイシンという抗菌物質に着目した<sup>[11]</sup>。ナイシンは *Lactococcus lactis* 由来の 34 アミノ酸から成る抗菌ペプチドであり、食品添加物としても認可されている。ナイシンの作用機序はよく研究されており、主にグラム陽性菌の膜に直径 2-2.5 nm 程度の孔 (pore) を生じさせ、細胞内低分子物質が細胞外に漏出することで抗菌活性を示す<sup>[12]</sup>。過剰のナイシン添加は溶菌作用を示すが、*R. erythropolis* 細胞は他の細菌と比較して溶菌しにくい性質をもっている。そのため、ナイシンの添加量を調節することにより、孔は形成されながら一方で細胞構造は維持され溶菌しないというユニークな状態を作り出すことが可能となる。この状態の細胞は、理論上フェレドキシンや P450 等のタンパク質は細胞外に出られず、酵素が高濃度にパックされた反応容器として利用できる。この孔を通して CD や VD<sub>3</sub> が細胞内に自由に出入りすることができるかどうかを実験的に調べるために、ナイシン処理を施した細胞に対し、緑色化学発光  $\gamma$ -シクロデキストリン (Green Chemi-luminescence CD) を添加し、その細胞内取り込みを調べた。その結果、ナイシンの濃度、および処理時間に依存して細胞からの発光レベルが高くなり、孔が CD の通り道として利用可能であることを確認した。

次に、実際にナイシン処理した細胞を用い VD<sub>3</sub> 水酸化反応の実験をさまざまな条件下で行ったところ、ナイシン処理した細胞は未処理の生細胞とは異なり、細胞内に存在する酵素量に依存して水酸化能が上昇することを見出した。さらに、反応系に NADH 再生系を要求すること、そして細胞内に安定なレドックスパートナーを発現させておくことが重要であるということが判明した<sup>[10]</sup>。NADH 再生系にはグルコース脱水素酵素 (GDH) を用い、また安定性の高いレドックスパートナーとして *Acinetobacter* 由来の

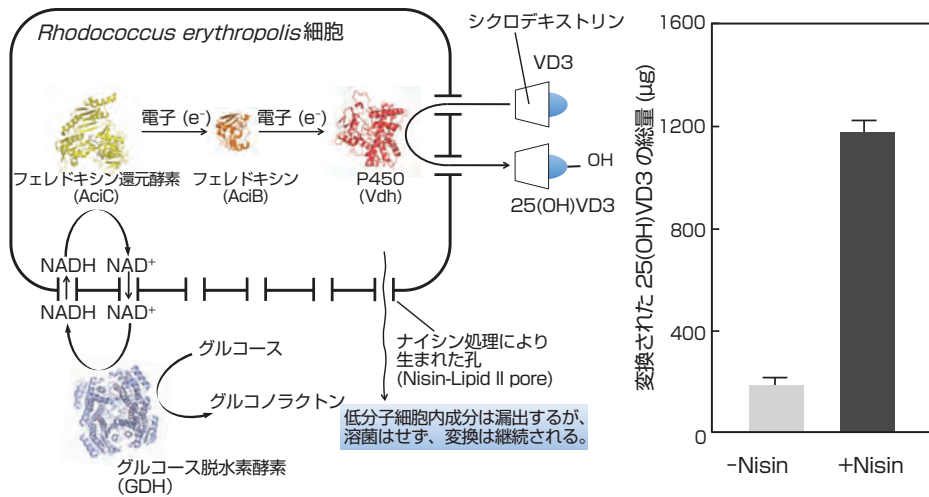


図 6 ナイシン処理を行った *R. erythropolis* 細胞による水酸化 VD<sub>3</sub> 生産の概念図

AciB, AciC を発現させて野生型 Vdh を利用した反応系を構築し (図 6)、この系を用いてナイシン処理細胞の VD<sub>3</sub> 水酸化体生産性を検討した。その結果、ナイシン処理細胞は同未処理細胞に比べて数倍高い水酸化効率を得られることが確認された。さらに、ナイシン処理細胞を 16 時間の反応を 1 サイクルとして繰り返し反応を行うと、1 回ごとの VD<sub>3</sub> の水酸化率は最大 90 % 近くまで向上し (ナイシン未処理細胞では 50 % 未満)、また 4 サイクル反応後の VD<sub>3</sub> 水酸化体総収量は、ナイシン未処理細胞に対し約 6 倍高くなることを見出した<sup>[10]</sup>。このナイシンを使用した変換反応系は、短時間で VD<sub>3</sub> を 90 % 変換することが可能であり、VD<sub>3</sub> 水酸化体の生産効率を著しく向上させた。さらに、ナイシン処理細胞は反応液としてバッファー系を利用するので培養液中での反応とは異なり夾雑物を少なくできるほか、細胞を回収し再利用できるので、溶解度の低い基質を用いて反応数を増やして生産性を上げる場合において有効な手法であると考えられる。当該技術を *P. autotrophica* に反映することができれば、高活性型酵素 Vdh-K1 を最大限活用した生産系が可能になると考えられる。

#### 4 今後の展開と課題

この研究開発は、活性型 VD<sub>3</sub> の生産を微生物変換によって効率的に行うことを目指し、とりわけ現在企業において実施されている野生型菌株による変換の問題点を克服し、効率・コストにおいてそれより優れた変換系の構築を目指して行った。この研究において構築されたナイシン処理を行った *R. erythropolis* 細胞による変換系は、現在実際に企業で事業化されている *P. autotrophica* による系をはるかに超えた生産効率を実現していると思われる。現在は、レドックスパートナーと P450 間の電子伝達のさらなる効率化が可能であるか検討を行っている。構築した高活性型酵素は、変異導入により酵素の構造安定性が低下しているため、酵素の安定性をそのままに活性を促進させる系の構築が必要と考えられるからである。P450 における電子伝達効率の向上を達成し、活性向上につなげた研究成果はすでにいくつか報告されており<sup>[13]</sup>、電子伝達部位の加工がさらなる変換性能アップにつながることは十分に期待できる。一方、ナイシン処理による細胞孔の形成と CD を組み合わせた物質変換技術は、疎水性の高い難溶性物質や、CD をキャリアとして用いることが可能な物質の変換系において広く適用が可能である。一般に、脂溶性物質の微生物変換は高効率を実現することがとても難しく、そのような用途に対して高い利用価値があるものと考えている。今後、他の微生物変換系において、ナイシンおよび CD の利用価値を評価していきたいと考えている。

#### 謝辞

当該研究は、メルシャン株式会社医薬化学品事業部 (現日本マイクロバイオファーマ株式会社) との共同研究により、また NEDO プロジェクト「微生物機能を活用した高度製造基盤技術開発」からの研究資金のサポートを受けて行われた。ここに謝意を表したい。

#### 参考文献

- [1] G. Jones, S. A. Strugnell and H. F. DeLuka: Current understanding of the molecular actions of vitamin D, *Physiol. Rev.*, 78 (4), 1193-1231 (1998).
- [2] G. D. Zhu and W. H. Okamura: Synthesis of vitamin D (calciferol), *Chem. Rev.*, 95 (6), 1877-1952 (1995).
- [3] J. Sasaki, A. Miyazaki, M. Saito, T. Adachi, K. Mizoue, K. Hanada and S. Omura: Transformation of vitamin D<sub>3</sub> to 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> via 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> using *Amycolata* sp. strains, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 38 (2), 152-157 (1992).
- [4] K. Takeda, T. Asou, A. Matsuda, K. Kimura, K. Okamura, R. Okamoto, J. Sasaki, T. Adachi and S. Omura: Application of cyclodextrin to microbial transformation of vitamin D<sub>3</sub> to 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> and 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>, *J. Ferment. Bioeng.*, 78 (5), 380-382 (1994).
- [5] T. Nakashima and T. Tamura: A novel system for expressing recombinant proteins over a wide temperature range from 4 to 35 °C, *Biotechnol. Bioeng.*, 86 (2), 136-148 (2004).
- [6] Y. Fujii, H. Kabumoto, K. Nishimura, T. Fujii, S. Yanai, K. Takeda, N. Tamura, A. Arisawa and T. Tamura: Purification, characterization, and directed evolution study of vitamin D<sub>3</sub> hydroxylase from *Pseudonocardia autotrophica*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 385 (2), 170-175 (2009).
- [7] Y. Khatri, M. Girhard, A. Romankiewicz, M. Ringle, F. Hannemann, V. B. Urlacher, M. C. Hutter and R. Bernhardt: Regioselective hydroxylation of norisoprenoids by CYP109D1 from *Sorangium cellulosum* So ce56, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 88 (2), 485-495 (2010).
- [8] Y. Yasutake, Y. Fujii, W.-K. Cheon, A. Arisawa and T. Tamura: Structural evidence for enhancement of sequential vitamin D<sub>3</sub> hydroxylation activities by directed evolution of cytochrome P450 vitamin D<sub>3</sub> hydroxylase, *J. Biol. Chem.*, 285 (41), 31193-31201 (2010).
- [9] K. Nishimura, Y. Fujii, A. Arisawa, T. Tamura and Y. Yasutake: Improvement of vitamin D hydroxylase, *Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 2011-115078* (June 16, 2011).
- [10] N. Imoto, T. Nishioka and T. Tamura: Permeabilization induced by lipid II-targeting lantibiotic nisin and its effect on the bioconversion of vitamin D<sub>3</sub> to 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> by *Rhodococcus erythropolis*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 405 (3), 393-398 (2010).
- [11] W. Liu and J. N. Hansen: Some chemical and physical properties of nisin, a small protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 56 (8), 2551-2558 (1990).
- [12] H. E. Hasper, B. Kruijff and E. Breukink: Assembly and stability of nisin-lipid II pores, *Biochemistry* 43 (36), 11567-11575 (2004).
- [13] L. S. Koo, C. E. Immoos, M. S. Cohen, P. J. Farmer and P. R. Ortiz de Montellano: Enhanced electron transfer and lauric acid hydroxylation by site-directed mutagenesis of CYP119, *J. Am. Chem. Soc.* 124 (20), 5684-5691 (2002).

**執筆者略歴**

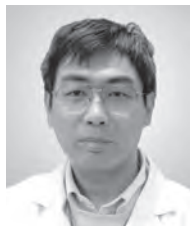
安武 義晃（やすたけ よしあき）

2004年北海道大学大学院理学研究科博士後期課程修了。北海道大学大学院理学研究科産学官連携研究員を経て、2005年4月より産業技術総合研究所ゲノムファクトリー研究部門研究員。2010年4月より、生物プロセス研究部門研究員。博士（理学）。現在、この論文で記載したVD<sub>3</sub>水酸化反応系の他、新規抗生物質の生合成酵素や医療診断酵素等有用機能タンパク質の構造機能解析と高機能化に向けた研究に取り組んでいる。この論文では、微生物変換を担うタンパク質全般の構造学的研究および機能解析、機能改変を担当した。



田村 具博（たむら ともひろ）

1993年徳島大学医学研究科生理学系専攻修了。学術振興会特別研究員を経て同海外特別研究員として1994年よりマックスプランク生化学研究所構造生物学部門にてポストドク。2000年工業技術院北海道工業技術研究所（現産業技術総合研究所）入所。2002年北海道大学大学院農学研究科教授併任。2011年産業技術総合研究所生物プロセス研究部門遺伝子発現工学研究グループ長。北海道大学大学院農学院客員教授。博士（医学）。現在、ロドコッカス属放線菌を多目的用途に使用可能な発現プラットフォームの開発を行なっている。この論文では、VD<sub>3</sub>水酸化反応全般における研究立案と総括を行った。

**査読者との議論****議論1 全体的なコメント**

コメント（中村 和憲：産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門）  
論文全体として、具体的な反応系が明示されていないと思います。また、これまでの手法の効率やコストの具体的な数値も明示されていないため、この研究によってどの程度の生産性のアップやコスト削減が可能になったのか定量的な判断が困難です。

回答（安武 義晃、田村 具博）

ご指摘いただいた反応系に関する説明をこの論文へ追記いたしました。しかし、この反応系は現在実生産されている技術であり、企業の秘密情報となっております。よって生産効率等の具体的な情報はいかなるものも開示することができません。現時点で記載できる範囲での追記・修正を行いました。

**議論2 具体的な生産方法の明示**

コメント（中村 和憲）

変換速度に関する記述の中で、これまでの手法では、微生物の生育速度と酵素の反応速度が遅いことが問題点として挙げられていますが、具体的な生産法が記載されていないため、どの段階がどの程度問題なのか理解することが困難です。たとえば、微生物を培養した後に静止菌体を使って変換するのか、微生物を増殖させながら変換反応を行うのか等、具体的な生産方法をもう少し詳しく記述して下さい。

回答（安武 義晃、田村 具博）

議論1でも述べたように、現在の活性型VD<sub>3</sub>生産系に関する諸情報は非公開であるため、直接数値を用いた比較について記載することが困難であることをご了承いただければ幸いです。記載できる範囲での修正・追記を致しました。

**議論3 実用化における今後の課題**

質問（赤松 幹之：産業技術総合研究所ヒューマンライフテクノロジー研究部門）

この研究によって、非常に生産効率が高い生産方法を開発したとありますが、「4.今後の展開と課題」において、電子伝達のさらなる効率化を目指す書かれています。さらなる効率化が必要なのはどのような理由によるのでしょうか？また、これに関連して、この研究は日本マイクロバイオファーマ（株）との共同研究ということですが、実際の製品の生産に使われる道筋ができていないのか、製品製造にはさらなる研究開発が必要なのでしょうか。これのバリアになっているのが電子伝達効率なのでしょうか。それ以外にも障壁があるのでしたら、記載していただくと、成果の位置付けが明確になるとと思います。

回答（安武 義晃、田村 具博）

この研究開発は、既に実用化されている*P. autotrophica*を用いた物質生産法をさらに洗練された効率的なものにしようという取り組みです。進化学および立体構造に基づく酵素の改良、および生物種の変更によってその生産性は大きく向上しました。しかし、変異を導入することで活性が向上した酵素の熱安定性は低下しており、細胞内に大量に蓄積させることができないという問題も明らかになっています。そこで、酵素の安定性を維持したまま活性を高めるための方法として、P450に対する電子伝達の効率化が必要だと考えており、VdhとAciB、Cの系において改良する余地があると推察しています。電子伝達効率の高度化が達成されることで、現在の生産効率をさらに超えることが可能になると考えられます。一方、私たちが開発した*R. erythropolis*による反応系を実生産に用いる場合の障壁は、生産効率の問題ではなく、むしろ組換え微生物を用いる点だと考えられます。企業では現在、育種した菌株を用いており、組換え微生物による生産は行っておりません。使用する菌の種類を変更し、かつ組換え微生物による生産系を立ち上げるには、安全試験をはじめとする各種手続きが必要になりますし、またそのようなプラントを導入するための設備投資が必要になります。活性型VD<sub>3</sub>の市場はさらに拡大することが見込まれており、近い将来私達が開発した技術を用いた生産が可能になることを期待しています。コメントに対してこの論文を修正いたしました。

**議論4 生産プロセスにおける酵素高活性化の意義**

コメント（中村 和憲）

酵素の高活性化において酵素そのものの活性の増加が記載されていますが、この活性の増加が実際の生産プロセスにおいてどの程度有効であるのか、ある程度の説明が必要だと思います。最終的にコストをどの程度下げることにつながるのか等イメージできるとよいです。

回答（安武 義晃、田村 具博）

実験室レベルでの解析では、酵素の高活性化あるいは酵素の細胞内蓄積量の増加が達成されても、活性型VD<sub>3</sub>の生産量が劇的に改善するには至っていません。それは、VD<sub>3</sub>が脂溶性物質であるが故に、水溶性分子に比べ細胞内外の移動が大幅に制限されるためと考えられます。これまで、VD<sub>3</sub>をシクロデキストリンに包接させ、溶解度を向上させることで変換効率は著しく改善されましたが、細胞内酵素の蓄積量に依存した活性の向上は確認できていませんでした。この論文に示したように、抗菌物質ナイシンによってVD<sub>3</sub>の細胞膜透過に対する障壁を取り払い、変換活性を高めるといった成果が得られましたが、このナイシン処理細胞を使用した場合には、細胞内酵素の蓄積量に依存して、VD<sub>3</sub>水酸化体の生産量が上昇するという結果を得ています。高活性型酵素を使用した場合にも同様の効果が得られると予想しています。近い将来、ナイシンを利用して膜透過効率を改善した系を実生産に利用することができれば、高活性型酵素はそのポテンシャルを十分に発揮することができるのではないかと考えています。