

遺伝子発現変動解析による

Cytochrome P450 およびレドックスパートナー遺伝子の同定に関する研究

2022年 1月

大久保 真哉

遺伝子発現変動解析による
Cytochrome P450 およびレドックスパートナー遺伝子の同定に関する研究

筑波大学大学院
生命環境科学研究科
生物機能科学専攻
博士（生物工学）学位論文

大久保 真哉

目次

緒論	1
【第 1 章】 CPD-1 水酸化反応に関与する候補遺伝子の選抜	11
【1】 序言	11
【2】 実験試料と実験方法	12
【3】 結果と考察.....	15
【第 2 章】 <i>Streptomyces avermitilis</i> 異種発現系を用いた水酸化機能の検証	21
【1】 序言	21
【2】 実験試料と実験方法	23
【3】 結果と考察.....	28
結論	36
参考文献	39
謝辞	45

緒論

酵素反応の有用性

微生物あるいは微生物が保有する酵素を用いた生体触媒反応は食品、化学、ライフサイエンス分野で幅広く活用されている重要な産業ツールである。本技術は温和な条件下で化合物の不活性結合部位を位置および立体選択的に修飾可能なため、有機合成技術と相補的な化学反応ツールとして本日まで発展してきた。特に製薬業界においては新規合成経路の開発に貢献しており、医薬品候補化合物の探索、医薬品原料の製造、あるいは医薬品の薬物代謝物研究に利用されている。また 2000 年から 2010 年にかけて、不斉点を持つ医薬品は全体の 35%から 70%まで増加しており、これらの合成には高度な立体制御を可能とする化学反応が不可欠である。この点からも製薬業界における酵素反応の重要性はより増していくと考えられる。さらに酵素反応は官能基の保護・脱保護処理を行うことなく目的とする化学反応を達成できるため、異性化反応が生じてしまう有機合成反応の回避や合成ステップ数の削減などに貢献可能である。これは医薬品原料の製造コスト低下に寄与し、結果として人々が医薬品にアクセスする機会を向上させる効果も期待できる。

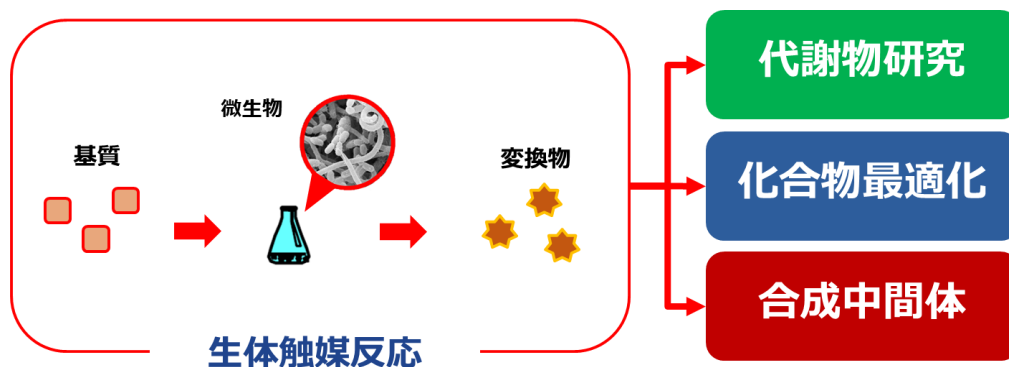


Fig. 1-1 Examples of bio-catalysis use in the pharmaceutical industry

さらに酵素反応の積極的活用は 2015 年に国際連合で定められた持続可能な開発目標 (以下、SDGs とする) の指針とも合致する。グリーンケミストリーの代表的技術である酵素反応技術は人体および環境への負荷を軽減するツールとして有用である。有機合成では希少金属を用いた触媒反応が広く普及しているが、これらは資源が限られており、その廃棄物は環

境への影響も考慮すると適切に処する必要がある。代表的な例を挙げると、白金族金属触媒である四酸化オスミウムはアルケン類をジオールへ変換する重要な酸化ツールであるが、希少金属を用いていること、また生物に悪影響があることから、安全に廃棄物を処理するといった配慮が求められる。さらに取り扱える製造施設も限られてくることに加え、オスミウム廃液の処理には多大な費用がかかる。こうした金属触媒を生体触媒、つまり酵素反応に置き換えていくことはSDGsへの貢献に寄与し、これを積極的に導入する研究機関、企業の長期的な成長にも繋がる。

Table 1-1 Contribution of bio-catalysis to the 12 principles of green chemistry

The 12 principles of Green Chemistry	Bio-catalysis (Enzyme/Microorganism)
Waste prevention	Can reduce waste
Atom economy	Can reduce rare metal catalyst
Less hazardous syntheses	Low toxicity for environment
Safer solvents and auxiliaries	Often used in water
Energy efficiently	Mild condition
Reduced derivatization	Can avoid protection/deprotection step
Catalysis	Bio-catalysis
Design for degradation	Not applicable
Real-time analysis	Can analyze the reaction process
Inherently safer processes	Mild condition

一方、酵素反応に関わる周辺技術の進歩も目覚ましい。次世代シーケンサーの普及や遺伝子合成技術の進展は酵素反応技術の革新に大きな影響を与えている。例えば酵素を含む微生物の遺伝子情報は日々蓄積され続けており、アメリカ国立生物工学情報センター (GenBank)、国立遺伝学研究所 (DDBJ)、欧州バイオインフォマティクス研究所 (ENA) の3研究機関ではこれらのデータの相互交換を行うなど、国際的な塩基配列データベース構築が進んでいる。現在では、これらのデータベースから目的とする酵素を検索・抽出し、遺伝子合成によって迅速に入手することができる。また遺伝子合成なら網羅的なアミノ酸変異を導入することも容易であり、酵素の最適化研究にも有用である。さらに大腸菌、酵母などの各種異種発現ツールも充実しており、目的の酵素を用途に合わせて即座に検証することも可

能となっている。

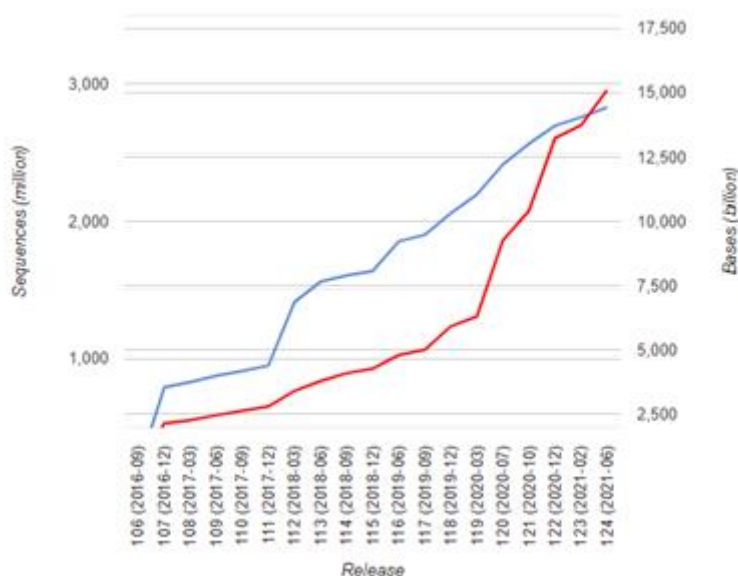


Fig. 1-2 INSDC (DDBJ/ENA/GenBank) database growth

Number of sequences (Blue line), number of bases (Red line), this statistical graphic is referenced from DDBJ website (<https://www.ddbj.nig.ac.jp/statistics/index-e.html>)

一方で、新規かつ有用な酵素を発見するためには多くの労力を要するため、新たな酵素を探索し、最適化していくための効果的なアプローチが求められている。その1つとして、土壌、水圏、生体試料などから得られたメタゲノムを有用酵素の探索源として利用する試みが報告されている^{8, 15}。本法は培養困難な微生物由来の酵素であっても探索対象となること、遺伝子情報を起点とするために新規酵素を獲得できる機会が増加するなどの強みがある。しかしながら、今日利用されている産業酵素の多くは、実際に環境試料から分離され、培養可能な微生物由来のものである。これらの微生物は酵素活性を指標としたスクリーニングによって選抜されているため、本法は新たな酵素を探索する上でいまだ有用な手法だと言える。

しかし、見出した有用な微生物から目的の酵素をコードする遺伝子を特定するためには、ゲノムウォーキング法などを活用し、地道に微生物ゲノムから探索していかなければならない。ただしゲノムウォーキング法は対象の遺伝子情報がなければ適用できないという短所もあるため、新規性の高い酵素の遺伝子を同定するためには、ショットガンクローニングやそれに類する技術を用いる必要がある。またショットガンクローニングの場合は、微生物ゲノム中の各遺伝子を網羅的に評価する方法を合わせて構築することも重要である。さらに酵素によっては、その機能を発現するために各種補酵素および補欠分子族が要求される場合もあ

るため、機能性の評価方法が煩雑になり、多大な労力が発生する可能性がある。つまり、ゲノムウォーキング法やショットガンクローニング法に代わる微生物のゲノムから目的の酵素をコードする遺伝子を効率的に同定できるアプローチがあれば、微生物酵素の産業利用をさらに加速させることに繋がるはずである。

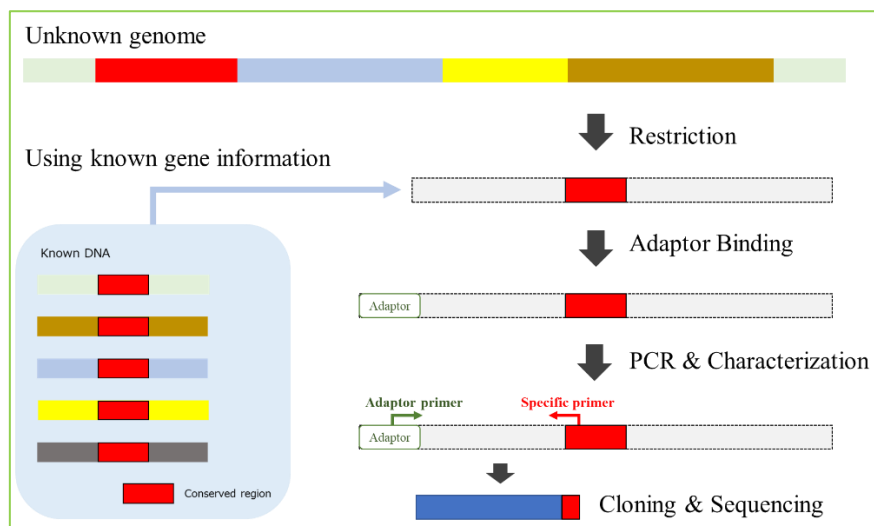


Fig. 1-3 Genome walking method for identification of novel enzyme

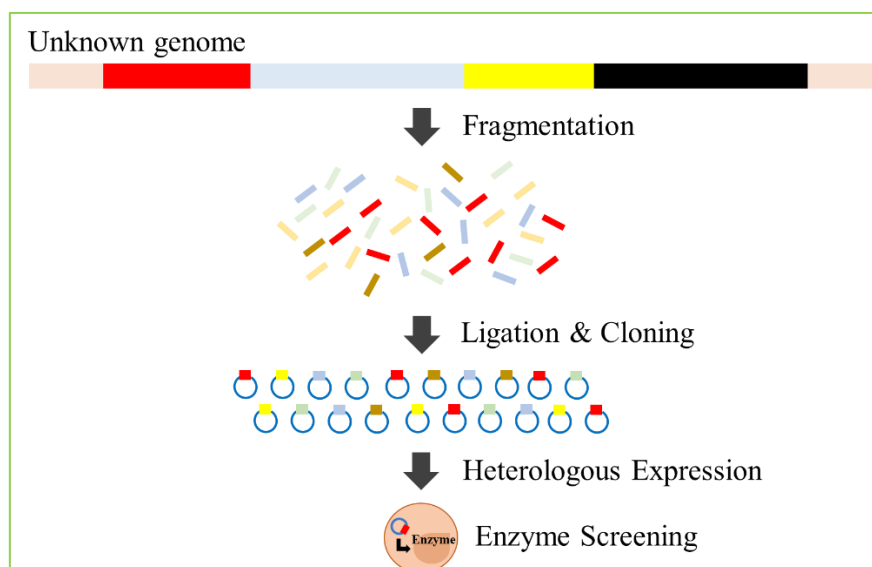


Fig. 1-4 Shotgun cloning method for identification of novel enzyme

放線菌の産業利用

放線菌はグラム陽性細菌に属する一群であり、菌糸状に生育してその先端に様々な形状胞子や胞子嚢を形成する糸状菌に類似した微生物である。高度に発達した形態分化を行うこと、多様な培養的性状を示すことから、一般的に他の細菌と区別して取り扱われてきた。微生物分類学上、*Actinomycetales* 目のうち、結核菌が属する *Mycobacteriaceae* 属を除外した菌群が放線菌と定義されている。また 16S rRNA/DNA 解析に基づく系統解析において、*Corynebacterium* や *Microbacterium* などのいわゆるアクチノバクテリアは球・桿菌であるが、放射状に発達する菌糸を形成する *Streptomyces* 属放線菌と近縁な位置にあることが分かっている。すなわち、放射状の菌糸を形成するかどうかで放線菌と定義することは不可能であり、最近では *Actinobacteria* 綱に属する菌群すべてを放線菌とする場合もある。

また放線菌は発酵に係る産業分野において極めて重要な菌群である。放線菌の二次代謝産物としてストレプトマイシンに代表される抗生物質をはじめ、抗寄生虫物質（エバーメクチン）、抗腫瘍物質（ドキソルビシン）、免疫抑制剤（FK506）などの医薬品の他、酵素阻害剤、ビタミン、農薬、動物薬など、多くの生理活性物質が実用化に至っている。また生産する化合物の構造多様性も広く、生産物質としてアミノグリコシド、 β -ラクタム、マクロライド、ペプチド、テルペン、ヌクレオチドなどを網羅しており、それら生合成経路の保有数も考慮すると、二次代謝産物の生産能力は他の微生物と比べて特に優れた菌群であると言える。

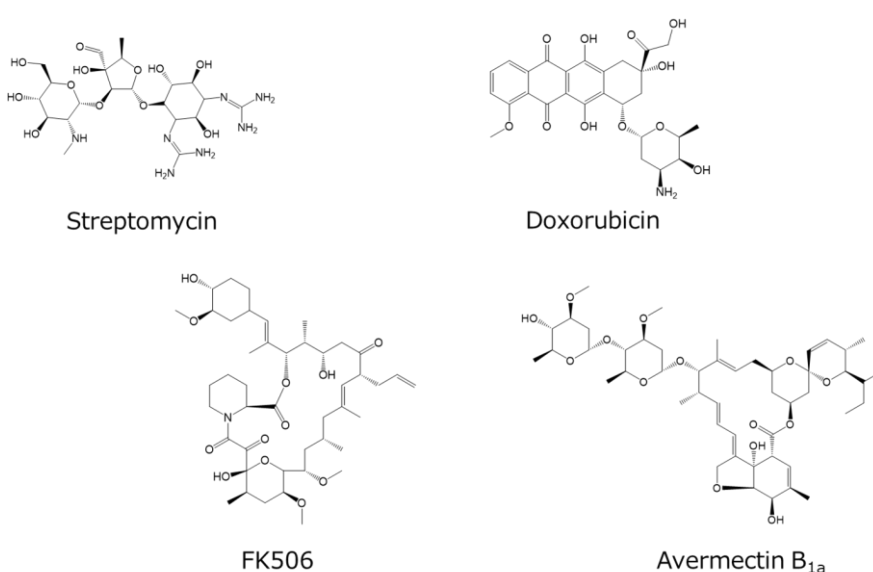


Fig. 1-5 Secondary metabolites of actinomycetes

一方、本菌群は生態系において、その底辺に位置する分解者としても重要な役割を担っている。樹木植物の主要な構成成分であるリグニンや土壌および植物堆積物の腐植質の構成成分であるフミン酸など、ポリフェノール構造を有する難分解性物質の分解活性に関する研究が数多く報告されている¹⁹。これには放線菌のセルラーゼ、キシラーゼ、ペルオキシダーゼなどの酵素群が関与しているとされており、土壌中の真菌類と協調して難分解性物質の分解・資化を行っているものと考えられている。また食品分野では *Streptomyces* 属放線菌由来のβ-グルカナーゼを用いたオリゴ糖の製造や、グルコースイソメラーゼを用いたフルクトースの製造が実用化に至っている。さらに製薬業界では *Streptomyces* 属放線菌由来のシトクロム P450 を用いたプラバスタチンの製造や *Rhodococcus* 属放線菌由来のニトリルヒドラーゼを用いたニコチンアミドの製造など、医薬品原料の供給にも活用されている。このように本菌群は生理活性物質の重要な生産者という役割の他、各種酵素の探索源としても有望である。

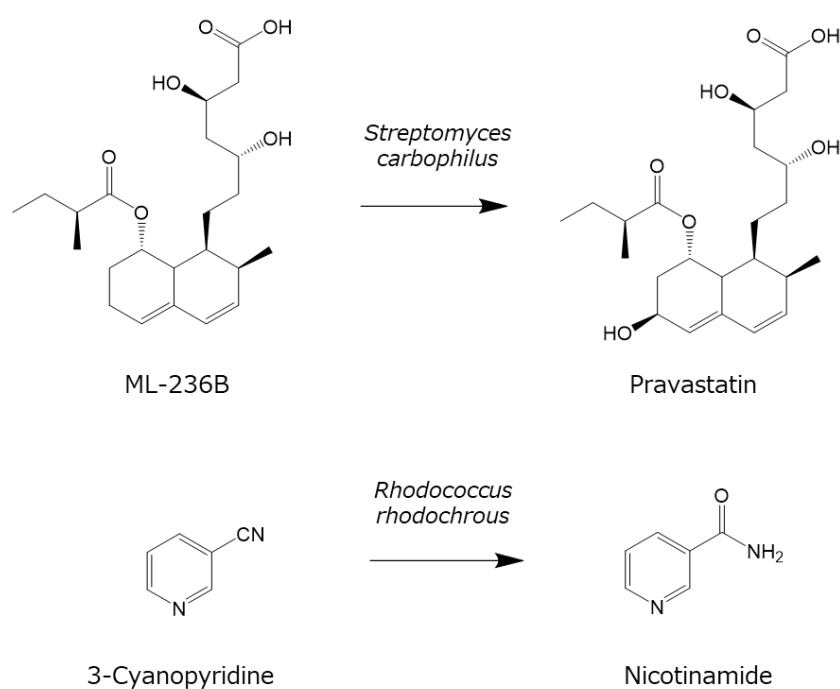


Fig. 1-6 Example of use of actinomycete-derived enzymes

シトクロム P450

シトクロム P450 は酸化還元酵素ファミリーの 1 種であり、微生物、植物、哺乳動物などの生物が保有する酵素である（ただし、大腸菌は本酵素を保有しない）。約 500 アミノ酸残基から構成され、活性部位にヘム鉄を有する。このヘムの鉄分子にシステイン残基と水分子がリガンドとして配位している。シトクロム P450 のヘム鉄は還元状態で一酸化炭素と結合することにより、450 nm 付近で光吸収極大を示す。ゆえに Pigment 450 nm、450 nm の吸収極大を示す色素という意味でシトクロム P450 (CYP) と命名された。一般的な真正細菌では可溶性酵素として菌体内に分布しているが、真核生物では主に小胞体膜上に発現し、一部ミトコンドリアにも分布している。これまでに 700 種を超える分子種が報告されており、遺伝子スーパーファミリーを形成している³¹。

本酵素の代表的な生体内機能は体内に侵入した異物の代謝である。CYP の基質は主に脂溶性が高く、生体内で蓄積されていくと毒性を示すものが多い。ヒトの薬物代謝においても第 1 相反応として機能し、水酸化、脱アルキル化、エポキシ化反応を行うことで、薬物の極性を高め、生体外に放出されやすい性質へ変化させる機能を持つ。一方、コレステロールなどの生体内分子の生合成に関わる CYP も存在し、微生物の二次代謝産物の生合成に修飾酵素として関与する他、その機能は多種多様である。一般的に代謝に関わる CYP の基質特異性は低く、一方で生体内分子や二次代謝産物の生合成に関与する CYP は高い基質特異性を有する傾向がある。

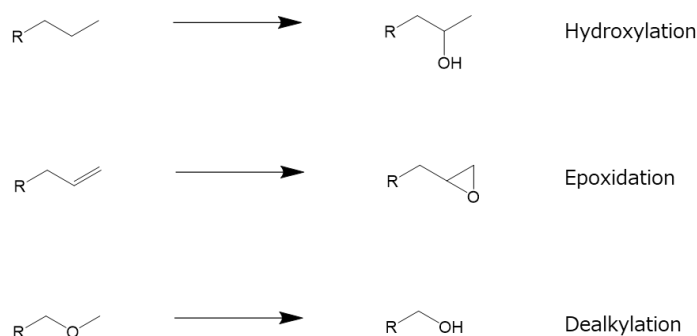


Fig. 1-7 Examples of chemical reactions catalyzed by CYP

真正細菌が保有する CYP は、NADH および NADPH から還元エネルギーを伝達するフェレドキシン (Fdx) およびフェレドキシンレダクターゼ (Fpr) をレドックスパートナーとして要求することが多い。Fdx は非ヘム鉄と硫黄原子のクラスターを内包するタンパク質の 1 種である。Fpr により還元エネルギーを伝達された Fdx は CYP のヘム鉄を還元型に変化させ、そこに酸素原子が結合することにより、CYP の酸化反応機能を発現することが可能となる。酸素が活性部位に結合し、反応活性型となった CYP は基質に酸化付加反応を行うと休止状態へと戻る。真正細菌由来 CYP の多くはこの反応サイクルが求められるため、CYP 単独では十分な酵素活性を示すことができず、Fdx や Fpr などのレドックスパートナーが共存している必要がある。

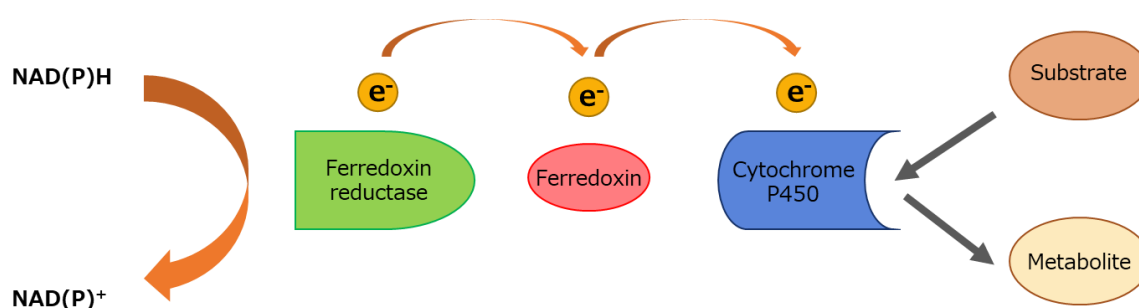


Fig. 1-8 Catalytic cycle of cytochrome P450

また化学反応における CYP の価値は高い。有機合成的手法で化合物の部位特異的な酸化反応を実施する際は、化合物分子内の他の官能基の保護が求められる他、立体選択的に酸素を導入することが困難な場合もある。例えば、製薬業界では薬物代謝研究において、医薬品の薬効を維持し、安全性を確保するために代謝クリアランスを予測することが不可欠である。この予測にはヒト代謝物の各種標品をそれぞれ合成し、それらを用いてヒトの体内における各代謝物の生成量を定量することが求められる。代謝物標品を合成する際、微生物 CYP を用いることは理にかなっており、ヒト CYP と同様の位置・立体選択的な反応を再現するケースも多い。また有望な化合物に対して水酸基を導入し、それを起点に各種誘導体へと展開するなど、新たな医薬品候補化合物の探索においても有用である。

本研究の目的と意義

本研究では、代謝型グルタミン酸受容体 5 (mGluR5) の選択的ポジティブアロステリックモジュレーターである CPD-1 に対し、位置・立体選択的に水酸基を導入する放線菌 *Streptomyces* sp. EAS-AB2608 から、この水酸化反応を触媒する CYP を同定し、基質特異性などの機能の一端を把握することを目的とする。

グルタミン酸受容体の 1 つである mGluR5 は G タンパク質共役受容体 (GPCR) のファミリー C に属している。一方、*N*-メチル-D-アスパラギン (NMDA) 受容体のシグナル伝達の機能低下はアルツハイマー型認知症などの神経変性疾患に関与していると考えられている。作用機序として、mGluR5 の活性化を通じて NMDA 受容体のシグナル伝達を増強ないし正常化することにより、これら神経変性疾患の治療効果が期待できる。CPD-1 はこの mGluR5 を活性化するポジティブアロステリックモジュレーターとして同定された化合物であり、*in vitro* 評価において効果を示した化合物である。そして CPD-1 の C4 (R) 位水酸化体である CPD-2 は薬物の代謝物研究および構造活性相関の把握や周辺化合物の探索の起点となる有用な化合物である。

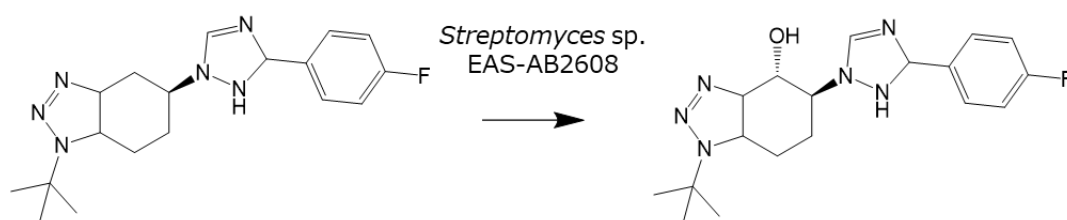


Fig. 1-9 Bioconversion of CPD-1 using *Streptomyces* sp. EAS-AB2608

Streptomyces sp. EAS-AB2608 は日本の土壌から分離された放線菌であり、100 株ほどの放線菌から酵素活性スクリーニングによって選抜された株である。そして本株は CPD-1 を CPD-2 へ効率的に水酸化する機能を有する。一般的に *Streptomyces* 属放線菌は 20 から 40 種ほどの CYP 遺伝子を保有しており、本微生物のゲノムから目的の CYP をコードする遺伝子を特定するには多くの労力を要すると考えられた。一方、プレグナン X レセプターなどを介した外来物質によるヒト CYP の誘導メカニズムがすでに報告されており、真正細菌由来の CYP 遺伝子も異物の存在下で発現量に変化が起きるのではないかと仮説を立

てた⁴⁶。本研究では、各遺伝子の発現量の変化を RNA シークエンシング (RNA-Seq) を用いた発現量変動解析により把握し、*Streptomyces* sp. EAS-AB2608 が保有する 8333 coding sequences (CDS) から、CPD-1 の水酸化に関与する遺伝子の候補を選抜、それらを別種である *Streptomyces avermitilis* を用いた異種発現系によって実際の水酸化活性を調査した。

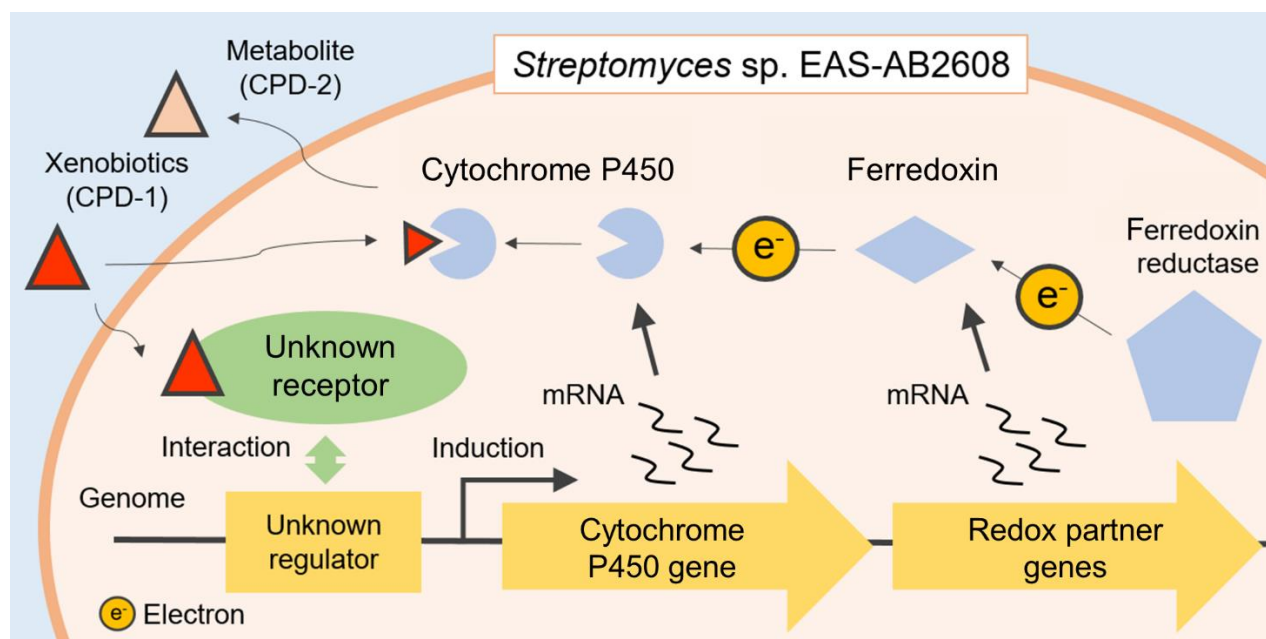


Fig. 1-10 Schematic diagram of expression mechanism of cytochrome P450 and the redox partner genes in *Streptomyces* sp. EAS-AB2608

【第 1 章】 CPD-1 水酸化反応に関与する候補遺伝子の選抜

【1】 序言

本章では CPD-1 水酸化反応に関与する遺伝子を *Streptomyces* sp. EAS-AB2608 のゲノムから選抜することを目的に、リファレンスとなる本株のドラフトゲノム解析および RNA-seq を用いた遺伝子発現変動解析を実施した。

一般的な *Streptomyces* 属放線菌は線状ゲノムを有し、ゲノムサイズは約 8 Mbp、その遺伝子数は 7000~8000 ほどとされている。例えば大腸菌や同じグラム陽性菌であるバチルス属のゲノムサイズは約 4 Mbp ほどであり、真正細菌の中でも突出して大きいと言える。また一部では出芽酵母に匹敵するゲノムサイズ（12 Mbp）を有する場合もある。

本研究で使用する RNA-seq 法はマイクロアレイなどの他の遺伝子発現変動解析方法と比べ、ダイナミックレンジが広く、サンプル間の網羅的な遺伝子発現レベルを比較することが可能である。またマイクロアレイ解析とは異なり、新規微生物（新規ゲノム）を解析する際に特異的プローブの設計が不要なことも利点として挙げられる。

本章の概略を以下に示す。まず RNA-seq 解析を行う前段階として、*Streptomyces* sp. EAS-AB2608 のゲノム情報が必要となるため、本菌株のゲノムを 2 種の次世代シーケンサーで解析し、高質なリファレンスゲノムを取得した。その後、水酸化反応の基質である CPD-1 を *Streptomyces* sp. EAS-AB2608 の増殖菌体に添加し、これによって生じた遺伝子の発現量変動を解析する際に RNA-seq 法を採用した。これらの実験を通じ、コントロール群（DMSO 添加群）と比較して優位に遺伝子変動が見られた遺伝子の選抜を行った。

【2】 実験試料と実験方法

実験試料

本章で使用した *Streptomyces* sp. EAS-AB2608 は、日本で採取した土壌より分離した。本菌株は製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター (NBRC) に NBRC 114648 として寄託・保管した。その他の試薬および実験機器については、各実験方法に記載した。

***Streptomyces* sp. EAS-AB2608 のゲノム DNA の調製**

Streptomyces sp. EAS-AB2608 の凍結菌体ストック溶液 100 μ L を、滅菌済みのトリプティックソイ培地 (Difco、TSB 培地) 10 mL に接種した。その後、レシプロシェーカーを用いて 28 $^{\circ}$ C、200 rpm の条件で 18 時間の振盪培養を行った。培養後、遠心分離機を用いて菌体を回収した。回収した菌体をリゾチーム (Sigma) 処理した後、プロティナーゼ K (富士フィルム和光) および SDS (ドデシル硫酸ナトリウム) を用いてゲノム DNA を遊離した。これをフェノール・クロロホルム混液で精製し、ゲノムシーケンズ解析用のゲノム DNA 試料とした。本ゲノム DNA 調製法は Komatsu らの手法を参考にしている。

全ゲノムシーケンシングと *de novo* アセンブル

調製したゲノム DNA 試料を共同研究者である新家らに移譲し、illumina 社の Miseq および Pacific Biosciences 社の PacBio RS II の機器を用いてゲノムシーケンシングを実施していただいた。さらに Newbler (Roche 社) を用いた *de novo* アセンブルの実施、アセンブルデータをご提供いただいた。GeneAnnotator を用いて行った各 CDS のアノテーションのデータと上記のシーケンズデータを遺伝子発現変動解析のリファレンスゲノムとした。

***Streptomyces* sp. EAS-AB2608 の messenger RNA 試料の調製**

Streptomyces sp. EAS-AB2608 の凍結菌体ストック溶液 100 μ L を、滅菌済みの TSB 培地 10 mL に接種した（容器は試験管を使用した）。その後、レシプロシェーカーを用いて 28°C、200 rpm の条件で 3 日間の振盪培養を行った。この培養液 100 μ L を新しい TSB 培地 10 mL に接種した。これについて、さらにレシプロシェーカーを用いて 28°C、200 rpm の条件で振盪培養を行った。培養 18 時間後、DMSO に溶解した CPD-1（エーザイ）を終濃度 100 mg/L となるように培地に添加した。これを基質添加群とした。またネガティブコントロールとして同量の DMSO（dimethyl sulfoxide）を加えたサンプルも用意し、これをコントロール群とした。それぞれ 2 サンプルずつ準備し、mRNA の調製は Oliver らの方法を参考にして行った³⁴。CPD-1 あるいは DMSO を添加してから 3 時間後、各サンプルから菌液を回収し、RNeasy Protect Bacteria Kit (Qiagen) を用いて Total RNA (tRNA) を抽出した。抽出した tRNA 画分から、MICROBExpress Bacterial mRNA Enrichment Kit (ThermoFisher Scientific) を用いて messenger RNA (mRNA) の濃縮を行った。

RNA-seq

得られた mRNA から TruSeq RNA Library Prep Kit v2 (illumina) を用いて cDNA ライブラリーを調製した。各 cDNA ライブラリーのクオリティチェックには TapeStation (Agilent) を使用した。各 cDNA ライブラリーの濃度は Kapa Library Quantification Kit (Kapa Biosystems) を用いて定量した。定量後、4 nM まで各ライブラリーを希釈し、これを等量合一し、cDNA ライブラリーミックスとした。最終的に cDNA ライブラリーミックスを 1.5 pM まで希釈し、NextSeq500 (illumina) を用いてシーケンシングを行った。シーケンシングにより得られた各サンプルのデータは FASTQ フォーマットとして保存し、これを遺伝子発現変動解析に用いた。

遺伝子発現変動解析方法

Streptomyces sp. EAS-AB2608 のリファレンスゲノムおよび FASTQ フォーマットと

して保存した各サンプルの RNA-seq データを遺伝子発現変動解析に用いた。具体的には各シーケンスリードをリファレンスゲノムへとアライメントし、各遺伝子に対するリードカウントデータを算出した。これを Transcripts per kilobase million (TPM) 法で補正し、サンプル間の発現量の正規化を行った。TPM 法は各 CDS の遺伝子長でリードカウントを補正し、続けて補正後の各 CDS のカウント数が 100 万となるように補正する正規化方法である。正規化後のデータを用い、基質添加群とコントロール群の遺伝子発現量の差を解析した。遺伝子発現変動解析については Strand NGS v3.1 (Strand Life Sciences) を使用した。

【3】 結果と考察

Streptomyces sp. EAS-AB2608 のドラフトゲノム解析

取得した *Streptomyces* sp. EAS-AB2608 のゲノム長は 9,320,785 bp (9.3 Mbp) であり、GC 含量は 72.7%、使用したアノテーションソフトのアルゴリズムでは 8,333 CDS が存在していることが判明した。今回、水酸化反応に関与する CYP およびレドックスパートナーをコードする遺伝子に着目するため、8,333 CDS から CYP、Fdx および Fpr と定義された遺伝子をそれぞれピックアップした (Table 2-1、2-2、2-3)。CYP と判別された遺伝子は 45 種、Fdx および Fpr と判別された遺伝子はそれぞれ 8 種ずつ存在した。このゲノム情報については DDBJ を通じ、ENA、GenBank、それぞれのデータベースに Accession 番号 AP024135 として登録した。

Table 2-1 Ferredoxin genes in *Streptomyces* sp. EAS-AB2608

Gene ID	Start	End	Strand	Control TPM	Control SD	Substrate TPM	Substrate SD	P-value ^a	Regulation	Fold_change
<i>easab2608_00799</i>	940112	940312	-	196.7	1.2	1655.9	439.3	0.0804	up	8.42
<i>easab2608_01929</i>	2115189	2115422	-	11.2	7.1	10.4	9.4	0.8195	down	-1.07
<i>easab2608_03384</i>	3732035	3732235	-	46.3	6.3	82.3	4.2	0.1980	up	1.78
<i>easab2608_06607</i>	7345059	7345355	-	335.7	35.4	450.6	6.8	0.2438	up	1.34
<i>easab2608_06876</i>	7633503	7633826	+	16.3	1.8	19.3	2.7	0.6304	up	1.18
<i>easab2608_07014</i>	7790423	7790653	-	1.0	0.0	2.4	1.4	0.5000	up	2.44
<i>easab2608_08093</i>	9026276	9026467	-	5.6	4.6	5.3	2.5	0.8578	up	0.95
<i>easab2608_08219</i>	9211466	9211660	-	3.1	2.1	7.6	4.8	0.6556	up	2.42

^aThis statistical analysis was performed by paired t-tests.

Table 2-2 Ferredoxin reductase genes in *Streptomyces* sp. EAS-AB2608

Gene ID	Start	End	Strand	Control TPM	Control SD	Substrate TPM	Substrate SD	P-value ^a	Regulation	Fold_change
<i>easab2608_01650</i>	1826064	1827296	-	45.9	9.0	47.9	8.7	0.1925	up	1.04
<i>easab2608_02088</i>	2291343	2292608	-	126.8	12.3	131.4	25.5	0.9539	up	1.04
<i>easab2608_04113</i>	4494581	4495642	-	789.2	40.0	882.1	21.1	0.1491	up	1.12
<i>easab2608_04114</i>	4495635	4497563	-	613.7	17.7	759.0	49.4	0.1087	up	1.24
<i>easab2608_06877</i>	7633933	7635138	+	88.3	8.3	90.2	3.8	0.7148	up	1.02
<i>easab2608_07013</i>	7789042	7790433	-	1.6	0.6	4.4	2.5	0.5254	up	2.84
<i>easab2608_07227</i>	8022474	8023808	-	6.6	2.4	18.2	0.5	0.1958	up	2.75
<i>easab2608_08218</i>	9210204	9211469	-	5.3	0.1	4.7	3.3	0.6851	down	-1.12

^aThis statistical analysis was performed by paired t-tests.

Table 2-3 Cytochrome P450 genes in *Streptomyces* sp. EAS-AB2608

Gene ID	Start	End	Strand	Control TPM	Control SD	Substrate TPM	Substrate SD	P-value ^a	Regulation	Fold_change
<i>easab2608_00262</i>	289204	290472	-	3.3	0.6	5.0	0.4	0.3471	up	1.50
<i>easab2608_00265</i>	291469	292710	-	5.2	0.5	8.0	4.1	0.6614	up	1.54
<i>easab2608_00272</i>	303097	304326	-	1.8	0.8	3.0	1.3	0.0533	up	1.64
<i>easab2608_00277</i>	310996	312192	-	4.1	0.9	5.2	0.7	0.2088	up	1.25
<i>easab2608_00287</i>	324655	326109	-	1.9	0.9	2.8	1.3	0.7725	up	1.47
<i>easab2608_00331</i>	371915	373099	-	28.4	0.9	46.9	10.6	0.3191	up	1.65
<i>easab2608_00359</i>	402425	403681	+	1.3	0.3	4.0	2.3	0.4687	up	3.15
<i>easab2608_00486</i>	547260	548456	+	3.9	1.9	3.6	1.5	0.9794	down	-1.07
<i>easab2608_00519</i>	577201	578247	-	7.3	2.0	10.7	2.2	0.1162	up	1.47
<i>easab2608_00634</i>	704664	705875	+	8.7	2.2	3.1	1.3	0.1056	down	-2.82
<i>easab2608_00635</i>	705981	707207	+	14.4	4.0	17.4	0.4	0.5427	up	1.21
<i>easab2608_00653</i>	726580	727872	+	1.3	0.3	5.7	2.4	0.2723	up	4.56
<i>easab2608_00667</i>	742067	743353	+	5.1	0.4	7.6	2.8	0.6114	up	1.49
<i>easab2608_00754</i>	885959	887167	-	27.0	13.2	36.4	7.0	0.6697	up	1.35
<i>easab2608_00800</i>	940325	941554	-	199.5	4.6	1589.3	461.5	0.0859	up	7.97
<i>easab2608_00832</i>	968047	971226	-	4.1	1.5	4.5	1.5	0.9015	up	1.11
<i>easab2608_00841</i>	978517	980067	+	4.2	1.7	7.2	4.5	0.4152	up	1.71
<i>easab2608_00895</i>	1027639	1028853	+	9.2	0.4	15.0	0.8	0.0124	up	1.63
<i>easab2608_01137</i>	1267646	1269034	+	4.0	3.0	5.5	0.1	0.5980	up	1.37
<i>easab2608_01888</i>	2066037	2067272	-	5.1	0.5	5.8	2.7	0.9893	up	1.14
<i>easab2608_01889</i>	2067313	2068506	-	8.0	2.5	7.2	2.3	0.8971	down	-1.11
<i>easab2608_01947</i>	2130738	2131973	-	7.9	1.8	7.9	0.8	0.8741	up	1.00
<i>easab2608_02716</i>	3023115	3024545	-	15.4	0.4	13.6	2.8	0.6479	down	-1.13
<i>easab2608_03136</i>	3467550	3468770	-	22.2	3.4	14.4	2.2	0.0028	down	-1.54
<i>easab2608_03992</i>	4374733	4375920	+	7.9	0.3	8.6	3.2	0.9783	up	1.09
<i>easab2608_04710</i>	5127153	5128541	+	55.0	8.3	68.0	4.1	0.4860	up	1.24
<i>easab2608_05119</i>	5587842	5589362	+	2.5	0.0	3.4	1.3	0.6753	up	1.36
<i>easab2608_05383</i>	5919488	5923927	+	4.0	0.7	3.7	1.2	0.8788	down	-1.06
<i>easab2608_05574</i>	6180959	6182224	-	27.6	3.4	12.3	0.9	0.0378	down	-2.25
<i>easab2608_05760</i>	6397755	6398945	+	90.4	9.8	212.7	78.0	0.3554	up	2.35
<i>easab2608_06451</i>	7128539	7129732	+	8.4	1.0	10.2	1.4	0.5937	up	1.22
<i>easab2608_06630</i>	7368374	7369879	+	8.7	1.1	7.9	1.0	0.0059	down	-1.09
<i>easab2608_07012</i>	7787764	7789002	-	3.5	0.5	4.9	1.5	0.6249	up	1.40
<i>easab2608_07086</i>	7856567	7857784	-	5.5	1.7	8.2	2.6	0.6472	up	1.49
<i>easab2608_07300</i>	8092281	8093627	+	28.6	2.2	16.7	5.1	0.3773	down	-1.72
<i>easab2608_07301</i>	8093732	8094994	+	46.1	14.0	51.8	12.4	0.8487	up	1.12
<i>easab2608_07377</i>	8174112	8175329	-	5.1	1.1	8.5	1.2	0.3680	up	1.68
<i>easab2608_07494</i>	8312279	8313532	+	628.6	13.8	191.4	47.9	0.1204	down	-3.28
<i>easab2608_07538</i>	8367050	8368291	-	17.4	0.7	19.8	2.4	0.5790	up	1.14
<i>easab2608_07638</i>	8540761	8541873	+	3.0	0.9	1.7	0.7	0.5679	down	-1.75
<i>easab2608_07879</i>	8788457	8789689	-	20.8	0.3	26.7	8.9	0.6677	up	1.29
<i>easab2608_07892</i>	8800464	8801675	+	5.1	0.3	7.2	1.5	0.2786	up	1.41
<i>easab2608_08094</i>	9026494	9027777	-	4.2	1.1	1.8	0.1	0.1653	down	-2.35
<i>easab2608_08095</i>	9027774	9029006	-	1.2	0.2	3.2	1.5	0.2253	up	2.66
<i>easab2608_08220</i>	9211699	9212922	-	3.9	2.4	6.8	0.3	0.4887	up	1.74

^aThis statistical analysis was performed by paired t-tests.

遺伝子の発現変動解析

水酸化反応に関与する各酵素をコードする遺伝子を選抜するにあたり、以下のような基準を設けた。まず注目するものを、1) CPD-1 を添加した群の発現量がコントロール群に比

べ、優位に上昇している遺伝子（発現誘導型）、2）CPD-1 を添加した群とコントロール群の発現量は同程度だが、他の遺伝子に比べて発現量が高い遺伝子（定常発現型）と定めた。また今回の解析結果においては、TPM 値 500 を閾値とし、これを超える発現量を示す遺伝子を選抜対象とした。また本実験で得られた RNA-seq 解析の生データについては DDBJ の Sequence Read Archive (SRA) に Accession 番号 DRA011062 として登録した。

1) CYP 遺伝子の発現変動解析

ピックアップした 45 種の CYP 遺伝子について、発現変動解析結果を **Fig. 2-1** に示した。発現誘導型として注目された遺伝子 *easab2608_00800* (*cyp*) のコントロール群の TPM は 199.5 (± 4.6) であった。一方、CPD-1 添加群の TPM は 1589.3 (± 461.5) であった。即ち、CPD-1 を添加することで、本遺伝子の発現量は 8 倍程度上昇した。TPM 値 500 を超える遺伝子として、*easab2608_07494* (*cyp*) にも注目したが、本遺伝子は CPD-1 を添加することによって発現量が低下していたため、CPD-1 の水酸化反応に関与していないと判断し、選抜対象から除外した。

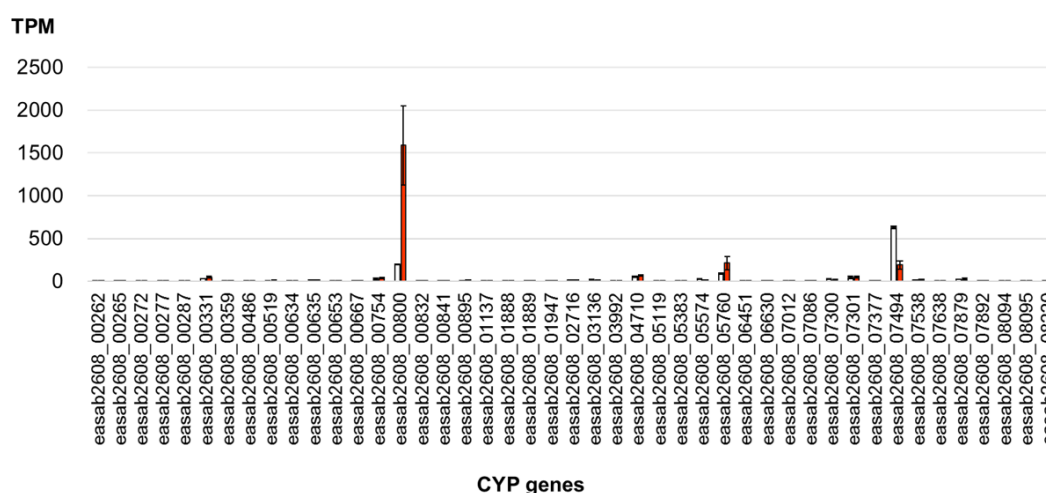


Fig. 2-1 Expression levels of cytochrome P450 genes

Bars denote the mean value obtained from duplicate samples. Error bars indicate standard deviation. Control TPM (white bars), expression level in each sample group treated with DMSO (dimethyl sulfoxide), normalized by transcripts per million. Substrate TPM (red bars), expression level in each sample group treated with CPD-1, normalized by transcripts per million. CYP, cytochrome P450.

2) Fdx 遺伝子の発現変動解析

ピックアップした8種のFdx遺伝子について、発現変動解析結果をFig. 2-2に示した。発現誘導型として注目された遺伝子 *easab2608_00799* (*fdx*) のコントロール群のTPMは196.7 (± 1.2)であった。一方、CPD-1添加群のTPMは1665.9 (± 439.3)であった。本遺伝子も *easab2608_00800* (*cyp*) と同様に、CPD-1を添加することで発現量は8倍程度上昇した。他の遺伝子については上述の基準により、選抜対象から除外した。

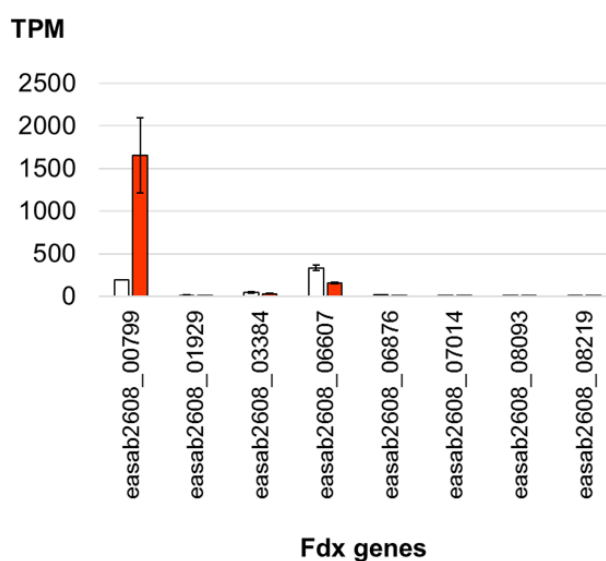


Fig. 2-2 Expression levels of ferredoxin genes

Bars denote the mean value obtained from duplicate samples. Error bars indicate standard deviation. Control TPM (white bars), expression level in each sample group treated with DMSO (dimethyl sulfoxide), normalized by transcripts per million. Substrate TPM (red bars), expression level in each sample group treated with CPD-1, normalized by transcripts per million. Fdx, Ferredoxin.

3) Fpr 遺伝子の発現変動解析

ピックアップした8種のFpr遺伝子について、発現変動解析結果をFig. 2-3に示した。発現量が相対的に高い2種の遺伝子 (*easab2608_04113*, *easab2608_04114*) が認められたが、上述の基準により、選抜対象から除外した。

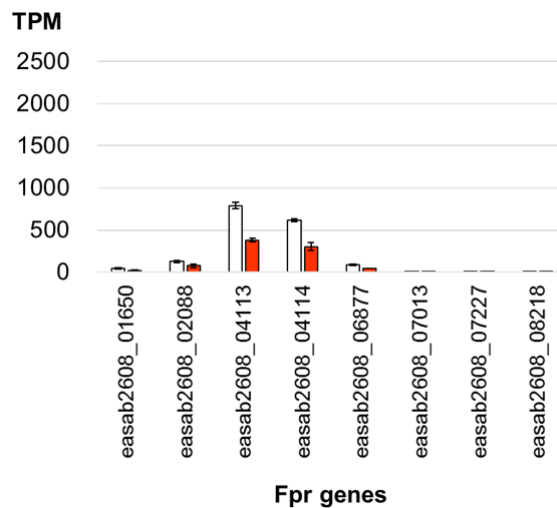


Fig. 2-3 Expression levels of ferredoxin reductase genes

Bars denote the mean value obtained from duplicate samples. Error bars indicate standard deviation. Control TPM (white bars), expression level in each sample group treated with DMSO (dimethyl sulfoxide), normalized by transcripts per million. Substrate TPM (red bars), expression level in each sample group treated with CPD-1, normalized by transcripts per million. Fpr, Ferredoxin reductase.

考察

上述の結果から、*Streptomyces avermitilis* 異種発現系を用いた水酸化機能の検証ステップに進める遺伝子として、*easab2608_00800* (*cyp*) および *easab2608_00799* (*fdx*) の2種を選抜した。

本研究で選抜した2種の遺伝子間の距離は *easab2608_00800* の終止コドンから *easab2608_00799* の開始コドンまで 13 bp と隣接している。CPD-1 添加によって遺伝子発現量が上昇し、さらにその発現レベルも同程度であることから、これらの遺伝子は同一オペロンによって発現制御されていると考えられた。一方、今回の解析ではレドックスパートナーである Fpr 遺伝子のみ選抜することができなかった。この理由として、選抜された *easab2608_00799* の遺伝子産物 EASAB2608_00799 が菌体内の複数の Fpr によって還元エネルギーを伝達されるため、特定の Fpr を必要としない可能性が想定された。

今回、*Streptomyces* sp. EAS-AB2608 が保有する CYP およびレドックスパートナーを

コードする遺伝子の中には、*easab2608_00800* (*cyp*) と *easab2608_00799* (*fdx*) のように遺伝子が隣接している組み合わせがいくつか存在している。*cyp/fdx* の組み合わせとして、*easab2608_08094* (*cyp*)、*easab2608_08093* (*fdx*) が、さらに *cyp/fdx/fpr* の組み合わせとして *easab2608_07012* (*cyp*)、*easab2608_07013* (*fpr*)、*easab2608_07014* (*fdx*) および *easab2608_08220* (*cyp*)、*easab2608_08218* (*fpr*)、*easab2608_08219* (*fdx*) を認めた。今回の解析ではいずれの遺伝子も発現レベルが低く、これらが同一オペロンで制御されているか判断することは困難である。これを実証するためには、基質として使用した CPD-1 を添加する以外のアプローチで解明する必要があると考えられた。

【第 2 章】 *Streptomyces avermitilis* 異種発現系を用いた水酸化機能の検証

【1】 序言

本章では、RNA-seq を用いた遺伝子発現変動解析が責任酵素の特定に有用かどうか検証することを目的に、*easab2608_00800* (*cyp*) と *easab2608_00799* (*fdx*) の 2 種の遺伝子の各種発現株を用い、CPD-1 を含む 6 化合物の変換試験を実施した。試験の評価には LC-PDA-MS を使用し、各生成物を解析することで、*easab2608_00800* の遺伝子産物の変換効率およびその基質特異性を調査した。

本研究では、(二次代謝産物の各生合成遺伝子を大規模に欠失させた) *Streptomyces avermitilis* MA-4680 株の SUKA シリーズを異種発現ホストとして用いることにした。その中で、*S. avermitilis* SUKA24 Δ *saverm3882* Δ *saverm7426* は線状プラスミド SAP1 が除かれ、さらに相対的に活性を持っている 2 種の CYP を Cre-loxP による部位特異的組換え反応で欠失させた株である。即ち、本菌株は二次代謝産物などの夾雑物が生じにくく、内在性 CYP の影響を抑制したホストとして利用することが可能である。また *Streptomyces avermitilis* SUKA24 Δ *saverm3882* Δ *saverm7426* のゲノム上にはアクチノファーージ溶原サイト *attB* が保持されており、これを起点に pKU565 プラスミドに挿入した各遺伝子をゲノム上に組み込むことで発現株を構築することが可能となる。さらに使用したプラスミド pKU565*bla-tsr::Psav2794-fld-fpr-ter* にはコドンを最適化した Flavodoxin (WP_001018618、*fld*) および Ferredoxin reductase (WP_000796332、*fpr*) があらかじめ組み込まれている。即ち、新たに挿入する遺伝子と *fld* と *fpr* が同一オペロンで制御される構成であり、検討する CYP が単独でも酸素付加反応が実行できる発現系となっている。本異種発現系は共同研究者である池田らによって開発された^{15, 16, 23, 25}。

微生物を用いた化合物の変換反応に用いられる主な方法として、増殖菌体を用いる場合と、増殖を停止させた静止菌体を用いる場合の 2 種類が存在する。前者は菌体が増殖中の培地に直接基質を添加して変換反応を行う手法である。本手法の操作は簡便であるものの、目的物の単離精製時に培地成分などの夾雑物が混入しやすく、その後の作業が複雑化するなどのデメリットも存在する。後者は菌体を適当なバッファーで洗浄することによって増殖を停止させ、菌体を酵素が充填されたキャリアとして利用する方法である。目的物の単離精製作業は効率化するが、タンパク質合成に必要な栄養素が徐々に枯渇していくため、本手法の変換

活性は発現する遺伝子産物の安定性に依存すると考えられる。本章で実施した変換試験では後者の静止菌体を用いる方法を採用した。

本章の概略を以下に示す。まず RNA-seq を用いた遺伝子発現変動解析によって選抜した *easab2608_00800* (*cyp*) と *easab2608_00799* (*fdx*) の単独あるいは共発現株を用い、CPD-1 の水酸化活性を測定した。反応後、CPD-1 の C4 (R) 水酸化体である CPD-2 を単離精製し、NMR 解析によって構造に矛盾がないことを調べた。さらに選抜した遺伝子産物である EASAB2608_00800 の基質特異性を把握するため、各種 CYP の基質として報告されている 5 化合物に対する反応性および各生成物への変換効率を解析した。

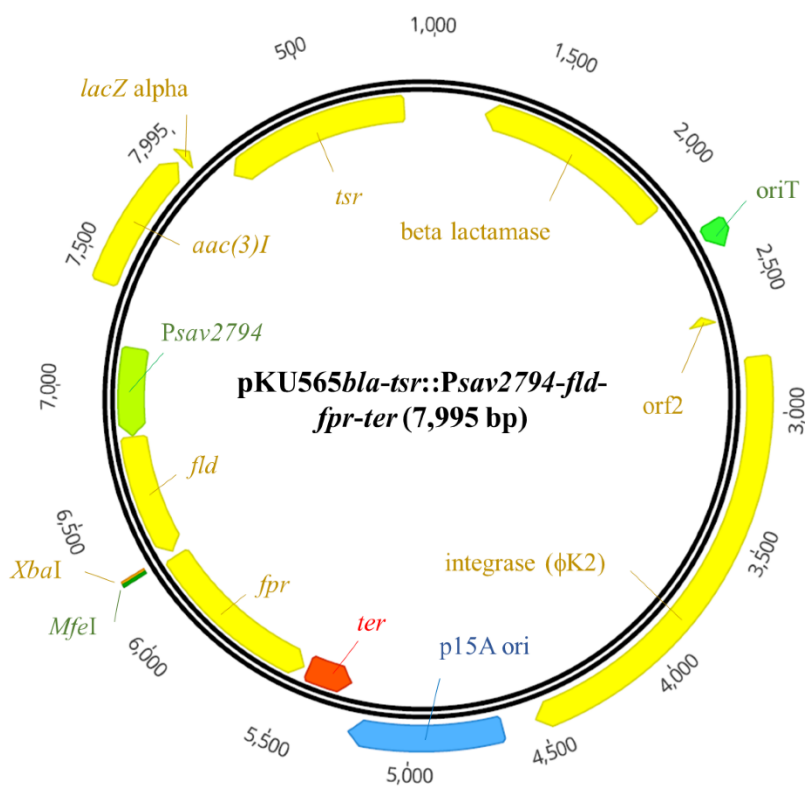


Fig. 3-1 Restriction map of *pKU565bla-tsr::Psav2794-fld-fpr-ter*

【2】 実験試料と実験方法

実験試料

本章で使用した *S. avermitilis* SUKA24 Δ saverm3882 Δ saverm7426 および pKU565 プラスミドは共同研究者である池田らに提供いただいた。その他の試薬および実験機器については、各実験方法に記載した。

プラスミドおよび発現株の構築

RNA-seq を用いた遺伝子発現変動解析によって選抜した *easab2608_00800* (*cyp*) と *easab2608_00799* (*fdx*) の2種の遺伝子は *Streptomyces* sp. EAS-AB2608 のゲノム DNA を鋳型に PCR によって得た。使用したプライマーを **Table 3-1** に示す。各 DNA 断片は pKU565*bla*-*tsr*::*Psav2794*-*fld*-*fpr*-*ter* の制限酵素サイト *Xba*I/*Mfe*I に挿入した (各 DNA 断片は pKU565*bla*-*tsr*::*Psav2794*-*fld*-*fpr*-*ter* の *fld* と *fpr* の間に挿入された)。構築した組換えプラスミドは kim らが報告している *Escherichia coli*/*Streptomyces* 接合法によって *S. avermitilis* SUKA24 Δ saverm3882 Δ saverm7426 に導入した²³。構築した発現株は共同研究者である新家らに提供いただいた。

Table 3-1 PCR primer pairs used in this study

easab2608_00800 gene primer pair

AB2608_800_1F 5'-GCTCTAGATAGGTGCCTGGGGCATCTAATGAAGATCGG-3'

AB2608_800_1R 5'-CTCGAGCAATTGTTACCAGGTCACAGGGAGTTCCAGC-3'

easab2608_00800 and *easab2608_00799* gene primer pair

AB2608_800_1F 5'-GCTCTAGATAGGTGCCTGGGGCATCTAATGAAGATCGG-3'

AB2608_799_1R 5'-CTCGAGCAATTGTTACCAGGTCACAGGGAGTTCCAGC-3'

発現株を用いた変換反応

試験で使用した各菌株の概要を **Table 3-2** に示す。各株の凍結ストック溶液 100 μ L を、滅菌済みの SY-32 培地 10 mL に接種した (容器はエルレンマイヤーフラスコを使用した)。SY-32 培地の組成を **Table 3-3** に示す。その後、ロータリーシェーカーを用いて 28 $^{\circ}$ C、200 rpm の条件で 3 日間の振盪培養を行った。培養後、新しい SY-32 培地に 1% (v/v) の比率で増殖した菌体を接種した (容器はエルレンマイヤーフラスコを使用した)。その後、ロータリーシェーカーを用いて 28 $^{\circ}$ C、200 rpm の条件で 2 日間の振盪培養を行った。培養後、遠心分離機を用いて菌体を回収した。回収した菌体は 22 mM リン酸緩衝液 (pH7.0) で洗浄し、さらに **Table 3-4** に示す反応液に置換した。変化試験で使用する菌体濃度は濁度法によって均一化し、これを変換試験に使用した。また試験で使用した化合物は DMSO で溶解し、最終濃度が 0.1 mM となるように各反応液へ添加した。これを 28 $^{\circ}$ C、200 rpm、24 時間の条件でロータリーシェーカーを用いて反応させた。

Table 3-2 Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain	Plasmid	Strain ID
<i>Streptomyces</i> sp. EAS-AB2608	None	EAS-AB2608
<i>S. avermitilis</i> SUKA24 Δ <i>saverm3882</i> Δ <i>saverm7426</i>	None	SUKA24 Δ <i>saverm3882</i> Δ <i>saverm7426</i>
<i>S. avermitilis</i> SUKA24 Δ <i>saverm3882</i> Δ <i>saverm7426</i>	pKU565 <i>bla-tsr::P_{sav2794}-fld-fpr-ter::easab2608_00800</i>	ES_SUKA_62
<i>S. avermitilis</i> SUKA24 Δ <i>saverm3882</i> Δ <i>saverm7426</i>	pKU565 <i>bla-tsr::P_{sav2794}-fld-fpr-ter::easab2608_00800-easab2608_00799</i>	ES_SUKA_63
<i>S. avermitilis</i> SUKA24 Δ <i>saverm3882</i> Δ <i>saverm7426</i>	pKU565 <i>bla-tsr::P_{sav2794}-fld-fpr-pld_ter</i>	ES_SUKA_70

Table 3-3 SY-32 medium

D-glucose	(富士フィルム和光純薬)	10 g
Soluble starch	(富士フィルム和光純薬)	10 g
Bacto soytone	(Difco)	5 g
Yeast extract	(オリエンタル酵母)	5 g
Ammonium sulfate	(富士フィルム和光純薬)	2 g
NaCl	(富士フィルム和光純薬)	2 g
TES	(同仁化学)	23 g
Distilled water		1 L

pH 8

Table 3-4 Reaction solution for bioconversion

D-glucose-6-phosphate	(オリエンタル酵母)	1.3 g
β -NADPH	(オリエンタル酵母)	0.38 g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	(富士フィルム和光純薬)	1 g
D-glucose-6-phosphate dehydrogenase	(オリエンタル酵母)	1000 U
Phosphate buffer (20X concentrate)	(LSIメディエンス)	50 mL
Distilled water		950 mL

pH 7

化合物の変換スクリーニング

上述の方法を用い、各化合物の変換スクリーニングを実施した。スクリーニングで使用した化合物を **Fig. 3-2** に示す。CPD-1 の他、検証する遺伝子産物の基質特異性を把握するため、インドメタシン（非ステロイド性消炎・鎮痛剤）、ロシグリタゾン（抗糖尿病薬）、ラバコール（ノウゼンカズラ科植物由来キノン系天然物）、カルバマゼピン（抗てんかん薬）そ

してゲニステイン（マメ科植物由来イソフラボン）を本試験に使用した。これらはヒトおよび微生物の CYP の基質として報告されている化合物であり、本スクリーニングの目的に合致していると考えられた^{3, 38, 43, 46}。反応後、各反応液を等量のアセトニトリルと混合し、14,000 g、室温、2 分の条件で遠心分離を行い、上清を回収した。回収した上清は遠心濃縮器 DD-4X (Genevac) を用いて溶媒を留去した。乾固物に上清の 10 分の 1 量の DMSO を加えて溶解し、うち 10 μ L を LC-PDA-MS を用いて分析した。各サンプルに含まれる基質由来のピークについては ESI-MS によって分子量を推定し、光極大吸収 254 nm のピークエリアをもとに変換率を算出した。

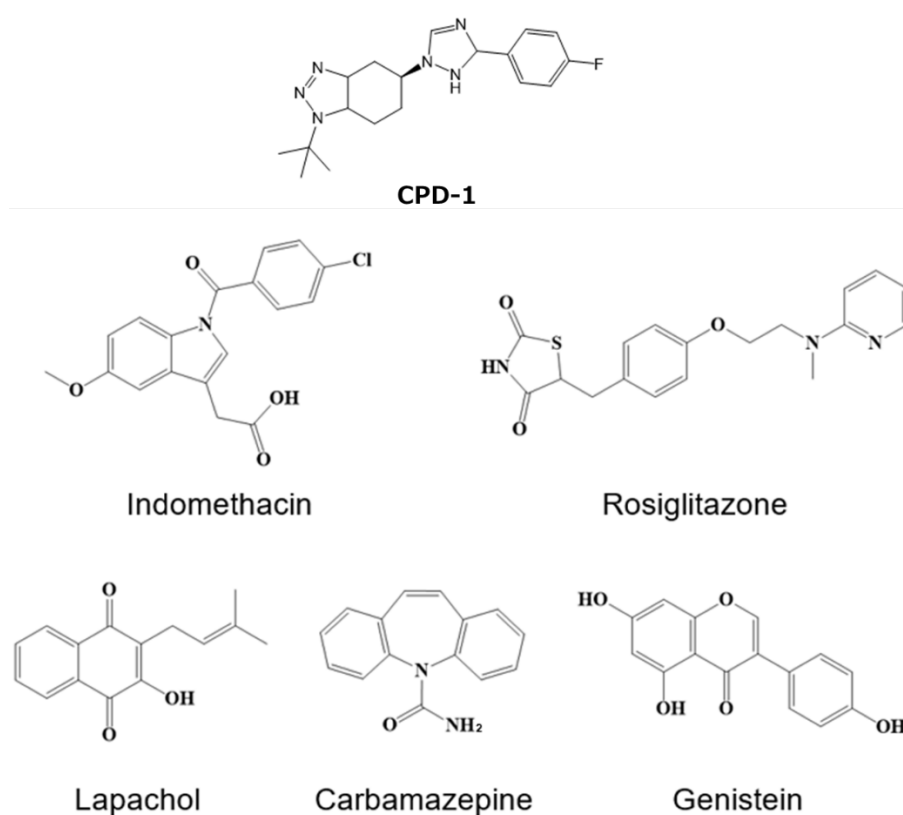


Fig. 3-2 Structure of compounds used in this study

CPD-2 の単離精製

変換反応を行った 100 mL の反応液に対し、等量の酢酸エチルを用いた液液分配法により CPD-2 の回収を行った。本操作を 2 回繰り返して有機層を回収して減圧濃縮により CPD-

2 を含む乾固物を得た。次に逆相 HPLC を用いてこの乾固物から CPD-2 を精製した。カラムは内径 20 mm、長さ 250 mm の Unison US-C18 (Imtakt) を使用した。移動相には水およびアセトニトリルを使用した。これを流速毎分 5 mL、130 分間でアセトニトリル濃度を 20% から 80% まで上昇させるグラジエント条件で HPLC 分取を行った。分取後、CPD-2 を含むフラクションを合一し、減圧濃縮によりアセトニトリルを留去した。フラクションを 25 mL の水で希釈し、酢酸エチルを用いた液液分配法により水層から CPD-2 を抽出した。この有機層に無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、減圧濃縮によって CPD-2 を得た。CPD-2 の構造解析は LC-PDA-MS と ^1H および ^{13}C NMR を用いて実施した。

LC-PDA-MS 解析

LC-PDA-MS 解析には Agilent 社の HPLC システム 1200 シリーズを用いた。本システムには検出器として Photo Diode Array (DAD、G1315D) および四重極 LC/MS (6130) が装備されている。LC/MS のネブライザーガスには N_2 ガスを使用し、スプレーチャンバーのキャピラリー電圧はポジティブ・ネガティブモードともに 4 kv を維持した。カラムは内径 4.6 mm、長さ 50 mm の Unison UK-C18 (Imtakt) を使用した。さらにカラムオープンの温度を 28°C で維持した。移動相には 0.1% (v/v) のギ酸を添加した水およびアセトニトリルを使用した。これを流速毎分 2 mL、6 分間でアセトニトリル濃度を 1% から 99% まで上昇させるグラジエント条件で HPLC 分析を行った。

NMR 解析

各 NMR スペクトルは Bruker Advance spectrometer (Bruker) を用いて取得した。データ取得時の温度は 30°C を維持した。DCH (dual carbon/proton) クライオプローブを使用して、 ^1H NMR は 600.13 MHz、 ^{13}C NMR は 150.90 MHz でスペクトルデータを取得した。測定するサンプル (CPD-1 および CPD-2) をメタノール- d_4 で溶解した。ケミカルシフトは δ_{H} 3.30 (CHD₂OD) および δ_{C} 49.0 (CD₃OD) のピークを基準とした。 ^1H NMR では COSY、NOESY、さらに ^{13}C NMR では HSQC、HMBC (カップリングシグナルは 8 Hz) のスペクトルデータを取得した。

【3】 結果と考察

CPD-1 水酸化に関与する遺伝子産物の特定

Streptomyces sp. EAS-AB2608、ES_SUKA_62、ES_SUKA_63、ES_SUKA_70 の4株 (Table 3-2 を参照のこと) を用い、24 時間後の各 CPD-1 反応液の分析結果を Fig. 3-3 に示す。まずネガティブコントロールとして用いた ES_SUKA_70 の反応液では CPD-2 の生成は確認できなかった。そのためホストである *S. avermitilis* SUKA24 Δ saverm3882 Δ saverm7426 に CPD-1 の水酸化活性はなく、ホスト内在性由来の CYP が本検証に影響しないことが分かった。また easab2608_00800 (cyp) のみ発現させた ES_SUKA_62 は CPD-1 を CPD-2 に変換するものの、生成物は ESI-MS スペクトルでしか検出できず、変換効率は1%以下だった。対して、easab2608_00800(cyp) および easab2608_00799(fdx) を共発現させた ES_SUKA_63 は ES_SUKA_62 と比べて CPD-1 から CPD-2 への変換効率は大きく向上し (40.0%)、この2種の遺伝子の保有株である *Streptomyces* sp. EAS-AB2608 と同等の変換効率を示した (42.2%)。そのため、easab2608_00799 (fdx) は easab2608_00800 (cyp) の CPD-1 水酸化活性の増強に関与していると考えられた。以上の結果から、easab2608_00800 (cyp) は *Streptomyces* sp. EAS-AB2608 の CPD-1 水酸化に関与する責任酵素遺伝子の1つであることを確認した。また CPD-1 の生成時に生じる副生成物 (-177 Da) も *Streptomyces* sp. EAS-AB2608 および ES_SUKA_63 を使用した場合に検出できたため、この生成にも easab2608_00800 (cyp) が関与していると考えられた。

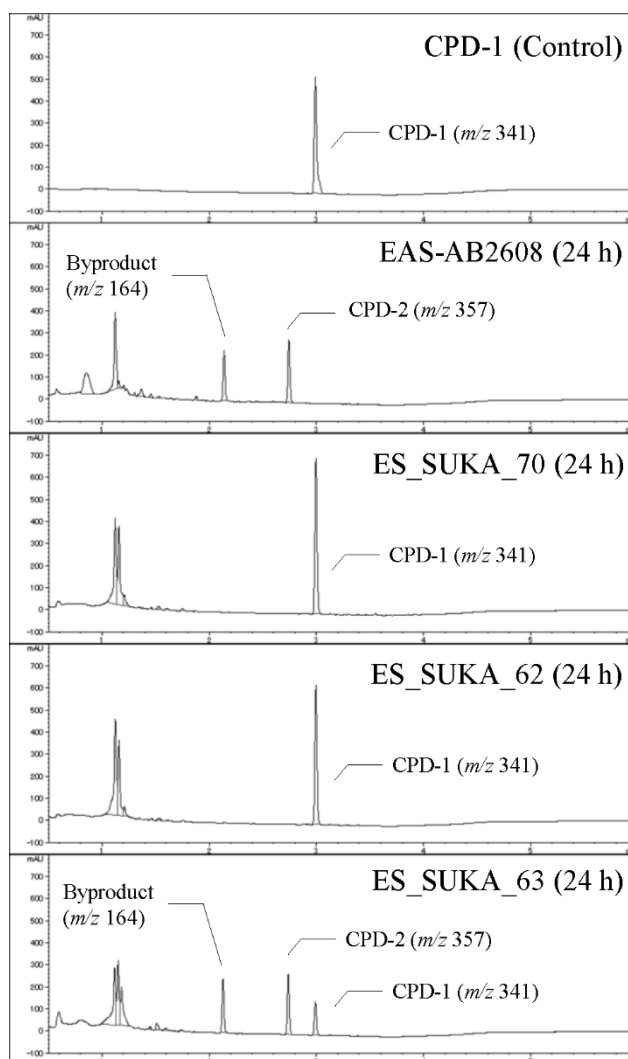


Fig. 3-3 Liquid chromatography profiles after 24 h of bioconversion of CPD-1 using each strain

As a control, DMSO (dimethyl sulfoxide) solution of CPD-1 (0.5 mM, 10 μ L injection) was analyzed.

***easab2608_00800 (cyp)* 遺伝子産物の基質特異性**

Streptomyces sp. EAS-AB2608、ES_SUKA_62、ES_SUKA_63、ES_SUKA_70 の4株を用いて、CPD-1 を含む6化合物の代謝プロファイルをそれぞれ解析した(**Table 3-5**)。その結果、ES_SUKA_62 および ES_SUKA_70 ではいずれの化合物においても10%を超える生成物が検出できなかった。ES_SUKA_63 ではインドメタシン、ロシグリタゾンにおいて脱メチル体と推定されるピークが生成され、ラパコールでは水酸化体と推定されるピーク

クが生成された。これらはネガティブコントロールとして用いた ES_SUKA_70 では検出できなかったことから、*easab2608_00800* (cyp) がこの生成に関与していると考えられた。つまり、*easab2608_00800* (cyp) の遺伝子産物は CPD-1 以外の化合物も基質として酸化活性を示すことが分かった。対して、ES_SUKA_63 はゲニステインやカルバマゼピンには活性を示さなかった。一方、*easab2608_00800* (cyp) および *easab2608_00799* (fdx) の保有株である *Streptomyces* sp. EAS-AB2608 は ES_SUKA_63 と異なるプロファイルを示した。具体的にはインドメタシンおよびゲニステインにおいてグリコシル付加体 (+178 Da、+176 Da) と推定されるピークが生成されており、さらにロシグリタゾンおよびラパコールでは様々な誘導体の生成が確認された (いずれも 10% 以上の変換効率はない)。ゆえに *Streptomyces* sp. EAS-AB2608 は外来物質の代謝において、本研究で特定した CYP 以外にグリコシルトランスフェラーゼなどの酵素が関与していると考えられた。

Table 3-5 Bioconversion screening results of six compounds using *Streptomyces* sp. EAS-AB2608 and heterologous expression strains ES_SUKA_70, ES_SUKA_62, and ES_SUKA_63

Peaks ^a	Conversion ratio (% of control) ^b			
	EAS-AB2608	ES_SUKA_70	ES_SUKA_62	ES_SUKA_63
CPD-1	0	110.4	96.5	23.4
CPD-2	42.2	0	0	40.0
-177 Da	32.7	0	0	34.1
Indomethacin	0.9	103	90.1	78.3
-14 Da	0	0	0	17.6
+178 Da	40.2	0	0	0
Rosiglitazone	0	102.9	83.3	5.3
-14 Da	0	0	0	16.8
Lapachol	3.6	88.9	76	55.6
+16 Da	0.0	0	0	17.9
Carbamazepine	88.1	111.1	106.8	112.1
Genistein	0	71.3	67.7	74.9
+176 Da	72.7	0	0	0

^aMetabolites with peaks of more than 10% are shown in this table.

^bThe conversion ratio of each peak was calculated using the area of the UV (ultraviolet) absorption peak (at 254 nm).

CPD-2 の構造解析

CPD-1 は *Streptomyces* sp. EAS-AB2608 および ES_SUKA_63 の 24 時間後の反応液から、回収率約 40%、鏡像異性体過剰率 (ee) 99%以上、純度 99%以上で取得することができる。CPD-1 および CPD-2 の化学構造は MS および NMR データから解析を行った。ESI-MS (ポジティブモード) 解析において、CPD-1 は MS スペクトル $[M+H]^+$ および $[2M+Na]^+$ として m/z 341 および 703 が検出された。一方、CPD-2 は MS スペクトル $[M+H]^+$ および $[2M+Na]^+$ として m/z 357 および 735 が検出された。これは CPD-1 と比べて CPD-2 が 16 Da 増加していることを示している。さらに NMR データは CPD-2 として図 X の構造式を支持した。HSQC スペクトルは CPD-1 の C4 位がメチレンシグナル (δ_H 3.31–3.38 ppm/ δ_C 29.36 ppm) であるのに対し、CPD-2 では C4 位がメチンシグナル (δ_H 5.19 ppm/ δ_C 67.88 ppm) に変化している。このダウンフィールドシフトを伴うメチレン基からメチン基への変化は CPD-2 のテトラヒドロベンゾトリアゾール環の C4 位が水酸化されていることを示している。さらに CPD-2 の 1H NMR スペクトルを見ると、H4 (δ_H 5.19 ppm) と H5 (δ_H 4.53 ppm) のカップリング定数が 7.9 Hz であり、これは H4 および H5 が axial/axial の関係にあることを示している。さらに NOESY スペクトルは図 X に示すテトラヒドロベンゾトリアゾール環の立体を支持した。以上のデータは、CPD-2 が CPD-1 の C4 (R) 位の水酸化体の構造であることを支持している。

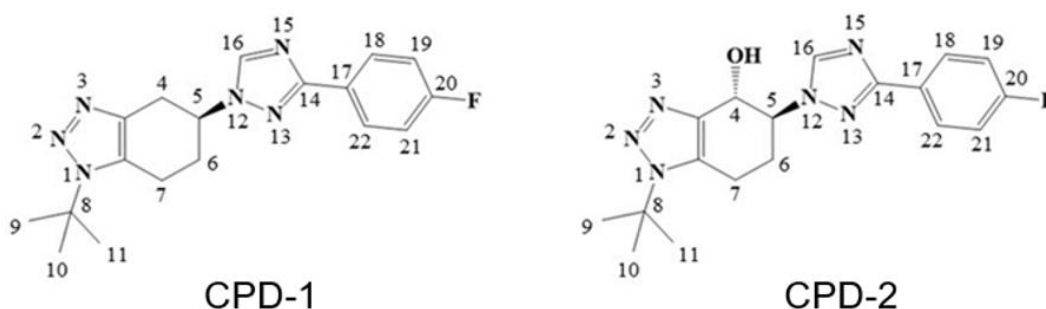


Fig. 3-4 Structures of CPD-1 and CPD-2

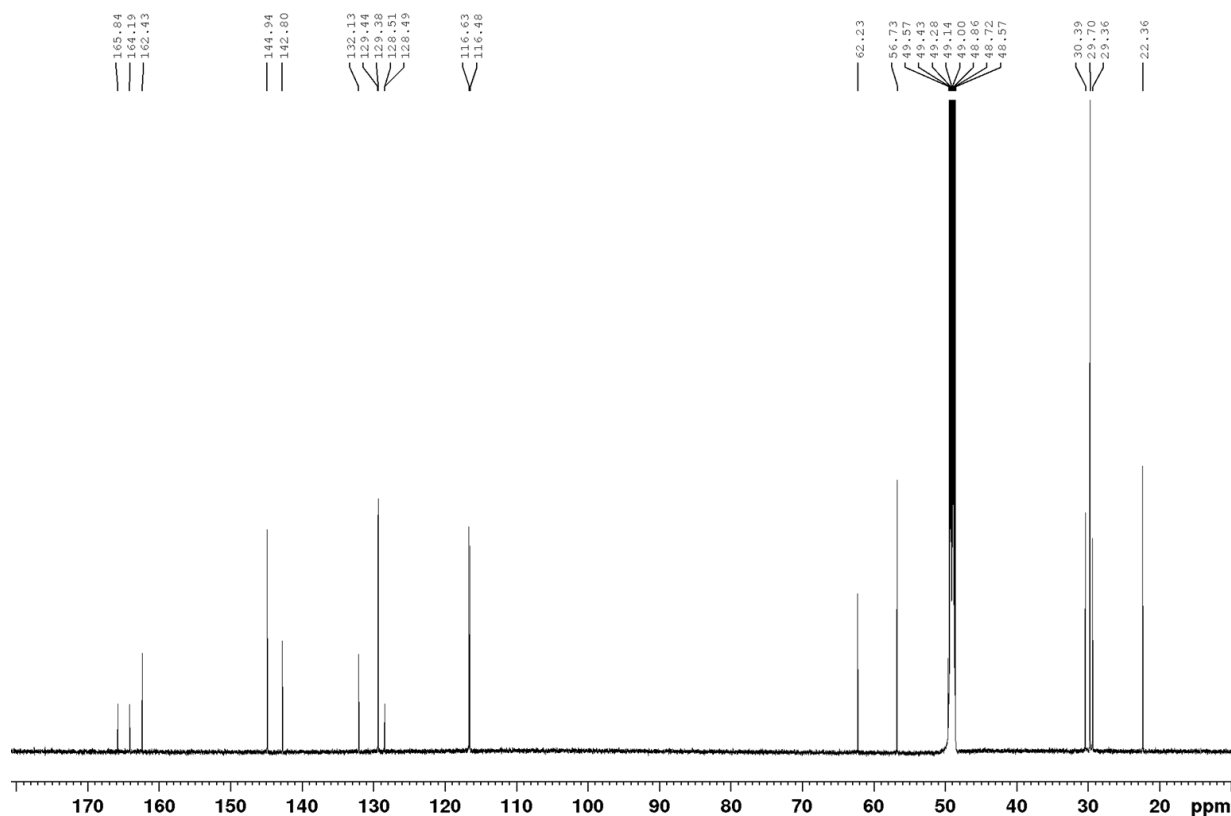


Fig. 3-6 CPD-1 ^{13}C NMR spectrum

2) CPD-2 の解析情報

The molecular formula is $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{FN}_6\text{O}$. ^1H NMR (600 MHz, methanol- d_4): δ ppm 1.71 (s, 9H), 2.40 (dddd, $J = 13.7, 5.4, 3.2, 2.8$ Hz, 1H), 2.55–2.63 (m, 1H), 3.13 (dddd, $J = 16.6, 10.5, 5.6, 1.0$ Hz, 1H), 3.20 (ddd, $J = 16.6, 5.7, 3.2$ Hz, 1H), 4.53 (ddd, $J = 11.3, 8.0, 3.1$ Hz, 1H), 5.19 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.17 (br t, $J = 8.8$ Hz, 2H), 8.05 (br dd, $J = 8.8, 5.4$ Hz, 2H), 8.53 (s, 1H). ^{13}C NMR (151 MHz, methanol- d_4): δ ppm 22.55, 28.83, 29.73, 62.32, 64.48, 67.88, 116.55 (d, $2J_{\text{C-F}} = 22.1$ Hz), 128.57 (d, $4J_{\text{C-F}} = 3.2$ Hz), 129.43 (d, $3J_{\text{C-F}} = 8.5$ Hz), 133.20, 146.33, 146.38, 162.68, 165.00 (d, $1J_{\text{C-F}} = 247.3$ Hz).

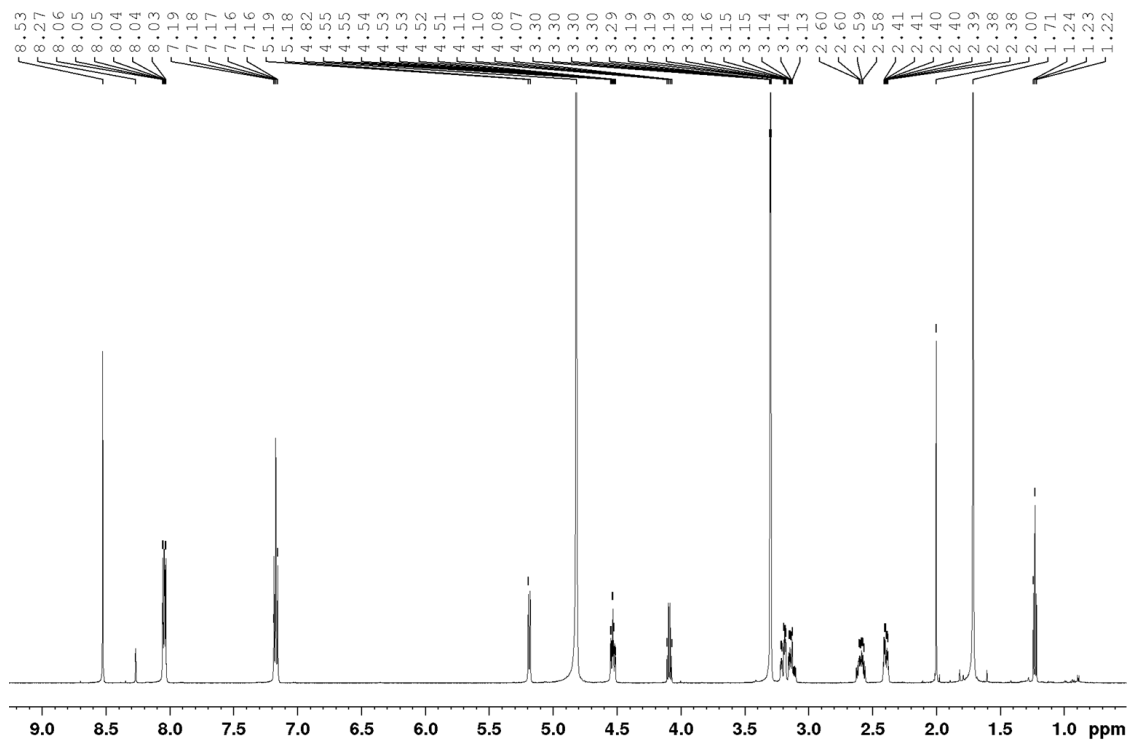


Fig. 3-7 CPD-2 ¹H NMR spectrum

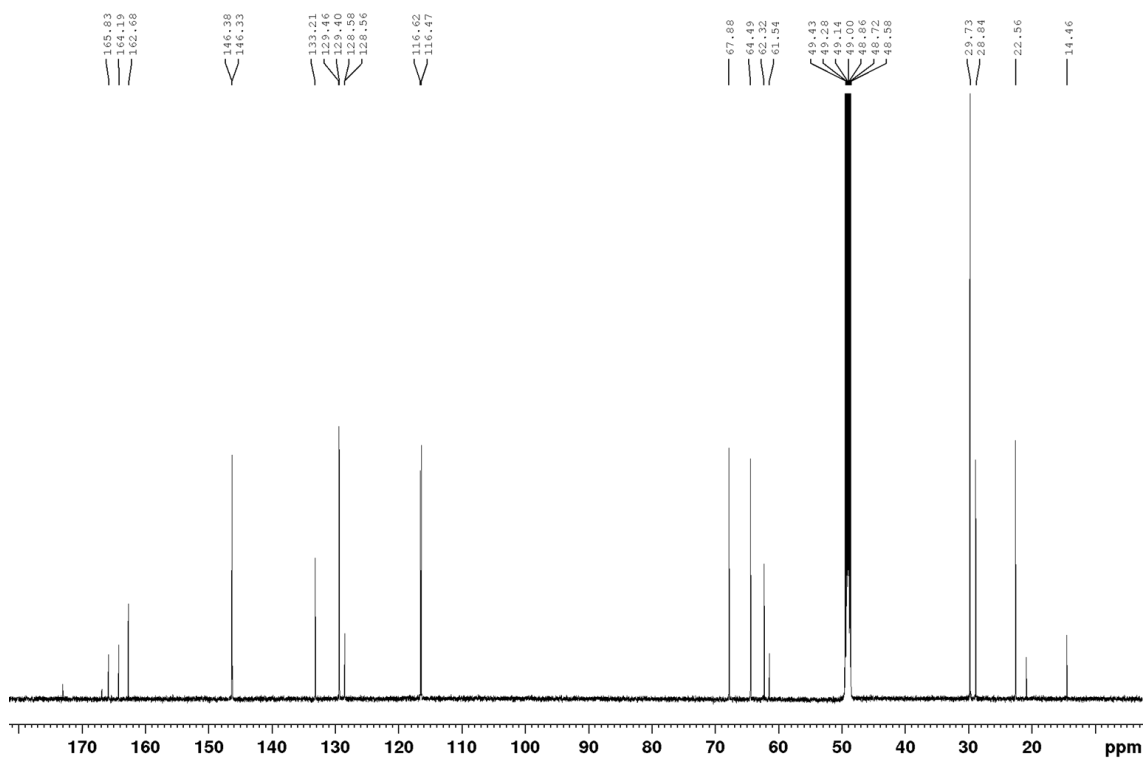


Fig. 3-8 CPD-2 ¹³C NMR spectrum

考察

上述の結果から、*Streptomyces* sp. EAS-AB2608 の CPD-1 水酸化活性に関与する遺伝子産物の 1 つとして、EASAB2608_00800 (CYP) を特定した。さらにその活性を増強する遺伝子産物として EASAB2608_00799 (Fdx) を見出した。

本研究で構築した発現株はプラスミドに挿入した遺伝子産物の他、Fid および Fpr を産生していた。また ES_SUKA_62 は RNA-seq を用いた遺伝子発現変動解析によって選抜された遺伝子のうち、*easab2608_00800* (*cyp*) のみを発現している株であった。この発現株の水酸化活性が、*easab2608_00800* (*cyp*) および *easab2608_00799* (*fdx*) を共発現させている ES_SUKA_63 よりも大きく減弱していた。これは EASAB2608_00800 (CYP) が *S. avermitilis* SUKA24 Δ *saverm3882* Δ *saverm7426* の内在性 Fdx や同時に発現している Fid を認識せず、レドックスパートナーとして EASAB2608_00799 (Fdx) を選択的に認識していると想定している。

また *Streptomyces* sp. EAS-AB2608 および ES_SUKA_63 の 6 化合物に対する代謝プロファイルには大きな差があった。特に *Streptomyces* sp. EAS-AB2608 ではグリコシル付加体がインドメタシンやゲニステインで検出されたが、ES_SUKA_63 ではそれらの生成は検出できなかった。これは *S. avermitilis* SUKA24 Δ *saverm3882* Δ *saverm7426* および pKU565*bla*-*tsr*::*Psav2794*-*fld*-*fpr*-*ter* を用いた異種発現系が、選択的酸化反応を行うためのツール、また CYP およびそのレドックスパートナーの機能を理解するためのツールとして有用であることを示している。

結論

RNA-Seq を用いた遺伝子発現変動解析はダイナミックレンジが広く、サンプル間の遺伝子発現レベルの網羅的な比較を可能とする。本研究と類似した用途として、微生物による化合物の代謝および分解経路を理解するために使用された報告もある^{22, 52}。さらに RNA-Seq を用いて、真核生物のゲノムから機能的な CYP をコードする遺伝子を探索する試みがすでに報告されている^{8, 14}。本研究では、化合物の水酸化反応に関与する遺伝子産物を放線菌のゲノムから特定するために適した手法として RNA-Seq 解析を採用した。

Streptomyces sp. EAS-AB2608 は CPD-1 を水酸化体 (CPD-2) に変換する機能を持つ菌株として同定された。RNA-Seq を用いた遺伝子発現変動解析により、本菌株が保有する 45 種の CYP の中から、CPD-1 の水酸化に関与する CYP (EASAB2608_00800) を効率的に選択することができた。同様に EASAB2608_00799 (Fdx) は EASAB2608_00800 (CYP) のレドックスパートナーとして選抜されており、これらが CPD-1 の水酸化反応に関与することを *Streptomyces avermitilis* 異種発現系を用いて明らかにした。Pandey らは本研究と同様に、CYP105D7 の最適なレドックスパートナー遺伝子を特定するため、定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (qPCR) 法を用いることで、Fdx と Fpr の遺伝子発現変動解析を行っている³⁵。彼らはダイゼイン (マメ科植物由来イソフラボン) によって *sav7470* (*fdx*) および *sav5675* (*fpr*) の発現量が誘導されることを明らかにし、*S. avermitilis* MA-4680 が保有する内因性レドックスパートナー酵素の中から適切な組み合わせを選抜した。このように機能的な CYP を探索する際には、CYP と共にその最適なレドックスパートナーを選択することが重要である。そのため、RNA-Seq による遺伝子発現変動解析は微生物を用いた化合物変換に関与する各種酵素、特に CYP とその最適なレドックスパートナー酵素を選抜するのに有用であると考えられた。

Streptomyces 属放線菌は、遺伝子発現において高度な制御ネットワークを持っている。本菌群は特定の DNA 配列に結合することによって応答する因子やシグマ因子など、多くの転写調節因子を保有している。一次代謝のみならず、天然物などの二次代謝産物の生合成、抗生物質耐性に関与する転写調節因子などを合わせると、20 種ほどの遺伝子ファミリーを保有していることになり、真正細菌の中でも特に多様性に富んでいると言える。しかし、外来物質の代謝に関与する CYP などの代謝酵素の転写調節因子はよく分かっていない。本研

究で特定された EASAB2608_00800 および EASAB2608_00799 をコードする遺伝子の転写調節メカニズムも不明のままである。これについてはさらなる調査が必要である。

放線菌を使用した異種発現系は、これまでもいくつか報告されており、特に CYP の異種発現のためのツールとして使用されているものがある。Imoto らは *Rhodococcus erythropolis* 異種発現系を用いて、ビタミン D3 から 25-ヒドロキシビタミン D3 への変換を行った¹⁷。この異種発現系で宿主として用いた菌体は、抗菌ペプチドであるナイシンで処理することにより、微生物の膜に微細孔を形成させ、膜透過性を向上させることができる。即ち、膜透過性に課題がある化合物に対してもこの異種発現系では評価することが可能である。また Felpeto-Santero らは *Corynebacterium glutamicum* 異種発現系を用いて、真核生物に由来する膜結合 CYP の発現に成功している¹³。筆者らは真菌 *Cochliobolus lunatus* 由来の膜結合 CYP を用いて、実際にコルテキソロン（抗アンドロゲン薬）の水酸化活性を評価している。一般的に真正細菌で真核生物の膜タンパクを発現させることは困難であるため、筆者らの異種発現系は真菌などの CYP の機能性を検証するツールとして有用である。本研究で用いた、*S. avermitilis* SUKA24 Δ saverm3882 Δ saverm7426 および発現ベクター-pKU565bla-tsr :: Psav2794-fl-d-fpr-ter は、選択的酸化反応を行うツールとして、医薬品候補化合物の探索、医薬品原料の製造、あるいは医薬品の薬物代謝物研究などにおいて有用であると考えられる。本異種発現系は、上述した既存のものと相補的に運用することで、新たな酵素の探索やその機能解明に貢献できる。

我々は本研究を含め、これまでに放線菌 6 株に対して RNA-seq を用いた遺伝子発現変動解析を適用してきた。RNA-Seq による候補遺伝子の選抜基準は菌株によって異なるが、6 菌株のうち 5 菌株で機能的な CYP とそのレドックスパートナーをコードする遺伝子を特定することに成功している。特定できなかった 1 例については、対象の菌株の反応選択性が低く、基質を複数の酸化的代謝物に変換していた。そのため、本研究の実験条件のみでは、候補となる遺伝子産物を選抜することが困難な場合もある。即ち、RNA-seq による遺伝子選抜の確度をあげるためには、mRNA の調製法を事例ごとに最適化する必要があると考えられた。現在、本アプローチを CYP 以外の代謝酵素の遺伝子産物の選抜に適用できるかどうか解析中で、今後、適用範囲を拡大できればと考えている。

本研究を通じて、伝統的な酵素活性スクリーニングにより選抜された微生物から有用酵素が効率的に同定されるようになれば、それらの酵素活性や安定性などの機能性把握が進み、

構造生物学的な解析を通じて戦略的に酵素の機能改変を行うなど、最新の酵素最適化技術の適用が加速し得る。ひいては酵素反応の産業的利用が促進され、各分野における新たな機能分子の開発や SDGs への貢献にも繋がると考えている。

参考文献

- 1) Adams JP, Brown MJ, Diaz-Rodriguez A, Lloyd RC, Roiban GD (2019) Biocatalysis: A pharma perspective. *Adv Synth Catal* 361:2421-2432.
- 2) Arai M, Naito A, Okazaki T, Serizawa N, and Iwado S (1990) Application of actinomycetes in the production of pravastatin, a novel cholesterol-lowering agent (in Japanese with English abstract). *Actinomycetologica* 4:95-102.
- 3) Baldwin SJ, Clarke SE, Chenery RJ (1999) Characterization of the cytochrome P450 enzymes involved in the in vitro metabolism of rosiglitazone. *Br J Clin Pharmacol* 48:424-432.
- 4) Barka EA, Vatsa P, Sanchez L, Gaveau-Vaillant N, Jacquard C, Klenk HP, Clément C, Ouhdouch Y, van Wezel GP (2016) Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 80:1-43.
- 5) Barka EA, Vatsa P, Sanchez L, Gaveau-Vaillant N, Jacquard C, Klenk HP, Clément C, Ouhdouch Y, van Wezel GP (2016) Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 80:1-43.
- 6) Burg RW, Miller BM, Baker EE, Birnbaum J, Currie SA, Hartman R, Kong Y, Monaghan RL, Olson G, Putter I, Tunac JB, Wallick H, Stapley EO, Oiwa R, Ōmura S (1979) Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: Producing organism and fermentation. *Antimicrob Agents Chemother* 15:361-367.
- 7) Chapman J, Ismail AE, Dinu CZ (2018) Industrial applications of enzymes: Recent advances, techniques, and outlooks. *Catalysts* 8:238.
- 8) Chen C, Wang C, Liu Y, Shi X, Gao X (2018) Transcriptome analysis and identification of P450 genes relevant to imidacloprid detoxification in *Bradysia odoriphaga*. *Sci Rep* 8:1-9.

- 9) Choi JM, Han SS, Kim HS (2015) Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. *Biotechnol Adv* 33:1443-1454.
- 10) Colin PY, Kintses B, Gielen F, Miton CM, Fischer G, Mohamed MF, Hyvönen M, Morgavi DP, Janssen DB, Hollfelder F (2015) Ultrahigh-throughput discovery of promiscuous enzymes by picodroplet functional metagenomics. *Nat Commun* 6:1-12.
- 11) Douka A, Vouyiouka S, Papaspyridi LM, Papaspyrides CD (2018) A review on enzymatic polymerization to produce polycondensation polymers: the case of aliphatic polyesters, polyamides and polyesteramides. *Prog Polym Sci* 79:1-25.
- 12) Ellard JM, Madin A, Philips O, Hopkin M, Henderson S, Birch L, O'Connor D, Arai T, Takase K, Morgan L, Reynolds D, Talma S, Howley E, Powney B, Payne AH, Hall A, Gartlon JE, Dawson LA, Castro L, Atkinson PJ (2015) Identification and optimisation of a series of tetrahydrobenzotriazoles as metabotropic glutamate receptor 5-selective positive allosteric modulators that improve performance in a preclinical model of cognition. *Bioorganic Med Chem Lett* 25:5792-5796.
- 13) Felpeto-Santero C, Galán B, Luengo JM, Fernández-Cañón JM, Del Cerro C, Medrano FJ, García JL (2019) Identification and expression of the 11 β -steroid hydroxylase from *Cochliobolus lunatus* in *Corynebacterium glutamicum*. *Microb Biotechnol* 12:856-868.
- 14) Hori K, Yamada Y, Purwanto R, Minakuchi Y, Toyoda A, Hirakawa H, Sato F (2018) Mining of the uncharacterized cytochrome P450 genes involved in alkaloid biosynthesis in California poppy using a draft genome sequence. *Plant Cell Physiol* 59:222-233.
- 15) Ikeda H, Ishikawa J, Hanamoto A, Shinose M, Kikuchi H, Shiba T, Sakaki Y, Hattori M, Omura S (2003) Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nat Biotechnol* 21:526-531.
- 16) Ikeda H, Shin-ya K, Omura S (2014) Genome mining of the *Streptomyces avermitilis* genome and development of genome-minimized hosts for heterologous expression of biosynthetic gene clusters. *J Ind Microbiol Biotechnol* 41:233-250.

- 17) Imoto N, Nishioka T, Tamura T (2011) Permeabilization induced by lipid II-targeting lantibiotic nisin and its effect on the bioconversion of vitamin D3 to 25-hydroxyvitamin D3 by *Rhodococcus erythropolis*. *Biochem Biophys Res Commun* 405:393-398.
- 18) Jenkins CM, Waterman MR (1994) Flavodoxin and NADPH-flavodoxin reductase from *Escherichia coli* support bovine cytochrome P450c17 hydroxylase activities. *J Biol Chem* 269:27401-27408.
- 19) Kasuga K, Kojima I (2016) Isolation of novel lignocellulose-degrading actinomycete strains. *Akita Prefectural University Web journal B (in Japanese)* 3:51-57.
- 20) Kelly SL, Kelly DE (2013) Microbial cytochromes P450: biodiversity and biotechnology. Where do cytochromes P450 come from, what do they do and what can they do for us?. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 368:20120476.
- 21) Kelly SL, Kelly DE, Jackson CJ, Warrilow AG, Lamb DC (2005) The diversity and importance of microbial cytochromes P450. In: Paul R. Ortiz de Montellano (ed) *Cytochrome P450*. Springer, Boston, MA, pp 585-617.
- 22) Kim D, Park HJ, Sul WJ, Park H (2018a) Transcriptome analysis of *Pseudomonas* sp. from subarctic tundra soil: Pathway description and gene discovery for humic acids degradation. *Folia Microbiol (Praha)* 63:315-323.
- 23) Kim JH, Komatsu M, Shin-Ya K, Omura S, Ikeda H (2018b) Distribution and functional analysis of the phosphopantetheinyl transferase superfamily in Actinomycetales microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115:6828-6833.
- 24) Kino T, Hatanaka H, Miyata S, Inamura N, Nishiyama M, Yajima T, Goto T, Okuhara M, Kohsaka M, Aoki H, Ochiai T (1987) FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. *J Antibiot* 40:1256-1265.
- 25) Komatsu M, Uchiyama T, Ōmura S, Cane DE, Ikeda H (2010) Genome-minimized *Streptomyces* host for the heterologous expression of secondary metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:2646-2651.

- 26) Komatsu M, Komatsu K, Koiwai H, Yamada Y, Kozone I, Izumikawa M, Hashimoto J, Takagi M, Omura S, Shin-ya K, Cane DE, Ikeda H (2013) Engineered *Streptomyces avermitilis* host for heterologous expression of biosynthetic gene cluster for secondary metabolites. *ACS Synth Biol* 2:384-396.
- 27) Kumar A, Dhull DK, Mishra PS (2015) Therapeutic potential of mGluR5 targeting in Alzheimer's disease. *Front Neurosci* 9:215.
- 28) Lam KS (2009) Application of whole-cell biotransformation in the pharmaceutical industry. In: Tao J (eds) *Biocatalysis for the pharmaceutical industry: Discovery, development, and manufacturing*. John Wiley & Sons (Asia), Singapore, pp 213-227
- 29) Leis B, Angelov A, Mientus M, Li H, Pham VT, Lauinger B, Bongen P, Pietruszka J, Goncalves LG, Santos H, Liebl W (2015) Identification of novel esterase-active enzymes from hot environments by use of the host bacterium *Thermus thermophilus*. *Front Microbiol* 6:275.
- 30) Liu X, Kokare C (2017) Microbial enzymes of use in industry. In: Brahmachari G (ed) *Biotechnology of microbial enzymes: Production, biocatalysis and industrial applications*. Academic Press, Cambridge, MA, pp 267-298.
- 31) Nelson DR (2018) Cytochrome P450 diversity in the tree of life. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom* 1866:141-154.
- 32) Norjannah B, Ong HC, Masjuki HH, Juan JC, Chong WT (2016) Enzymatic transesterification for biodiesel production: A comprehensive review. *RSC Adv* 6:60034-60055.
- 33) Okubo S, Shibuguchi T, Ishihara Y, Shin K, Ena E, Okuda A (2018) Application of microbial C-H bond activation to chemical synthesis for drug discovery [Poster session]. The 36th Medicinal Chemistry Symposium, Kyoto, Japan (November 28-30)
- 34) Oliver HF, Orsi RH, Ponnala L, Keich U, Wang W, Sun Q, Cartinhour SW, Filiatrault MJ, Wiedmann M, Boor KJ (2009) Deep RNA sequencing of *L. monocytogenes* reveals overlapping and extensive stationary phase and sigma B-dependent transcriptomes,

including multiple highly transcribed noncoding RNAs. BMC Genom 10:641.

- 35) Pandey BP, Lee N, Choi KY, Kim JN, Kim EJ, Kim BG (2014) Identification of the specific electron transfer proteins, ferredoxin, and ferredoxin reductase, for CYP105D7 in *Streptomyces avermitilis* MA4680. Appl Microbiol Biotechnol 98:5009-5017.
- 36) Park ST, Kim J (2016) Trends in next-generation sequencing and a new era for whole genome sequencing. Int Neurourol J 20:S76.
- 37) Quaderer R, Omura S, Ikeda H, Cane DE (2006) Pentalenolactone biosynthesis. Molecular cloning and assignment of biochemical function to PtlI, a cytochrome P450 of *Streptomyces avermitilis*. J Am Chem Soc 128:13036-13037.
- 38) Raveendran S, Parameswaran B, Beevi Ummalyima S, Abraham A, Kuruvilla Mathew A, Madhavan A, Rebello S, Pandey A (2018) Applications of microbial enzymes in food industry. Food Technol Biotechnol 56:16-30.
- 39) Roh C, Seo SH, Choi KY, Cha M, Pandey BP, Kim JH, Park JS, Kim DH, Chang IS, Kim BG (2009) Regioselective hydroxylation of isoflavones by *Streptomyces avermitilis* MA-4680. J Biosci Bioeng 108:41-46.
- 40) Romero-Rodríguez A, Robledo-Casados I, Sánchez S (2015) An overview on transcriptional regulators in *Streptomyces*. Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech, 1849:1017-1039.
- 41) Rosenthal K, Lütz S (2018) Recent developments and challenges of biocatalytic processes in the pharmaceutical industry. Curr Opin Green Sustain Chem 11:58-64.
- 42) Shaw NM, Robins KT, Kiener A (2003) Lonza: 20 years of biotransformations. Adv Synth Catal 345:425-435.
- 43) Sheldon RA, Woodley JM (2018) Role of biocatalysis in sustainable chemistry. Chem Rev 118:801-838.

- 44) Silva EO, Ruano-Gonzalez A, Dos Santos RA, Sanchez-Maestre R, Furtado NA, Collado IG, Aleu J (2016) Antifungal and cytotoxic assessment of lapachol derivatives produced by fungal biotransformation. *Nat Prod Commun* 11:95-98.
- 45) Spasic J, Mandic M, Djokic L, Nikodinovic-Runic J (2018) *Streptomyces* spp. in the biocatalysis toolbox. *Appl Microbiol Biotechnol* 102:3513-3536.
- 46) Tompkins LM, Wallace AD (2007) Mechanisms of cytochrome P450 induction. *J Biochem Mol Toxicol* 21:176-181.
- 47) Venkatakrisnan K, von Moltke LL, Greenblatt DJ (2001) Human drug metabolism and the cytochromes P450: Application and relevance of in vitro models. *J Clin Pharmacol* 41:1149-1179.
- 48) Waksman SA, Reilly HC, Johnstone DB (1946) Isolation of streptomycin-producing strains of *Streptomyces griseus*. *J Bacteriol* 52:393.
- 49) Wang Z, Gerstein M, Snyder M (2009) RNA-Seq: A revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet* 10:57-63.
- 50) Walsh MK (2007) Immobilized enzyme technology for food applications. In novel enzyme technology for food applications. Robert Rastall (ed). Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England, pp 60-84.
- 51) Yang W, Cao H, Xu L, Zhang H, Yan Y (2015) A novel eurythermic and thermostable lipase LipM from *Pseudomonas moraviensis* M9 and its application in the partial hydrolysis of algal oil. *BMC Biotechnol* 15:94.
- 52) Zhang W, Zhang T, Jiang B, Mu W (2017) Enzymatic approaches to rare sugar production. *Biotechnol Adv* 35:267-274.
- 53) Zhang C, Hao Q, Zhang S, Zhang Z, Zhang X, Sun P, Pan H, Zhang H, Sun F (2019) Transcriptomic analysis of chlorimuron-ethyl degrading bacterial strain *Klebsiella jilinsis* 2N3. *Ecotoxicol Environ Saf* 183:109581.

謝辞

小林達彦教授には大学院に入学してから現在まで、研究、論文執筆について貴重なアドバイス、丁寧なご指導を賜りました。また研究以外でも多くのサポートをいただいたこと、心より感謝申し上げます。

北里大学大村智記念研究所の池田治生教授からは本研究で活用した SUKA 株ならびに発現ベクターを提供いただきました。その他、本研究について多くのアドバイスをいただきました。改めて御礼申し上げます。

次世代天然物化学技術研究組合のプロジェクトリーダーである新家一男先生らにはゲノムシーケンスの実施、発現株を提供いただき、多大なご尽力をいただきました。この場を借りて深く御礼申し上げます。

最後に、エーザイ筑波研究所の共同研究者の方々には各種データの取得、日々のディスカッションを通じて適切なお助言をいただき、本研究を大きく支えていただきました。心から御礼申し上げます。