

京都大学教育研究振興財団助成事業
成 果 報 告 書

令和5年 4月 28日

公益財団法人京都大学教育研究振興財団

会 長 藤 洋 作 様

所 属 部 局 農学研究科

職 名 助教

氏 名 滝田 禎亮

助 成 の 種 類	令和4年度 ・ 研究活動推進助成			
申請時の科研費 研究 課 題 名	高度な静的・動的構造解析に基づく高機能シトクロムP450の創製と産業応用			
上記以外で助成金 を 充 当 した 研 究 内 容	該当なし			
助成金充当に関 わる共同研究者	該当なし			
発表学会文献等	引き続き研究を行っており、その結果が出次第、論文として投稿する予定である。			
成 果 の 概 要	研究内容・研究成果・今後の見通しなどについて、簡略に、A4版・和文で作成し、添付して下さい。(タイトルは「成果の概要／報告者名」)			
会 計 報 告	交付を受けた助成金額	1,000,000	円	
	使用した助成金額	1,000,000	円	
	返納すべき助成金額	0	円	
	助成金の使途内訳	費 目	金 額	
		酵素精製試薬等	264,900	
		遺伝子試薬等	315,363	
DNA配列解析		62,490		
備品	357,247			
当財団の助成に つ い て	本助成金は研究を継続する上で大変に助かりました。心より感謝申し上げます。引き続き予算を獲得できるように研究を進めてまいります。			

成果の概要／滝田禎亮

<研究の内容>

放線菌由来水溶性P450であるCYP105A1がビタミンD3の25位および1 α 位を次々と水酸化し、活性型ビタミンD3（1 α , 25-ジヒドロキシビタミンD3）に変換することを見出したが、活性がきわめて低く実用化にはほど遠いものであった。そこで、X線結晶構造解析によりCYP105A1の立体構造を明らかにし、部位特異的変異導入による活性上昇を試みた。基質結合部位に存在するArg73とArg84をAlaに置換することにより飛躍的な活性上昇に成功した。また、CYP105A1およびその変異体はジクロフェナクなど多くの非ステロイド系抗炎症剤や高脂血症治療薬であるスタチン系化合物にも高い活性を示し、CYP105A1の創薬への応用が期待される。本研究では第一段階として、CYP105A1のR84Aに新たな変異を導入し、メバスタチンへの高い結合性を有する変異体を得る。さらに、この変異体を解析することで、基質のcatch and releaseに関する知見を得る。

<研究成果>

CYP105A1のR84A変異体を用い、そのAsn72からIle96の25残基をランダム変異導入領域とした。Agilent Technologiesの方法に従い、ランダム変異導入ライブラリーを作製した。さらに、CYP105A1のR84A変異体酵素、スクリーニングに必要なハウレンソウ由来フェレドキシン（FDX）とフェレドキシン還元酵素（FDR）を精製した。FDXとFDRともSDS-PAGEで単一バンドを示した。吸収スペクトルを測定したところ、それぞれに特有のピークが観察された。ジクロフェナクを基質として用いて、精製したFDXとFDRはCYP105A1に電子伝達機能を有することを確認した。R84A変異体酵素、R84A可溶性画分（菌体破碎後の遠心上清）、およびランダム変異ライブラリーから得たクローン20種の可溶性画分を用い、メバスタチンと反応させ、HPLCにより解析した。R84A変異体酵素とR84A可溶性画分は類似の代謝物を示したが、後者は変換率が極めて低かった。クローン20種の可溶性画分の中にはR84A可溶性画分と異なるパターンを示すと思われるものが見られた。

今後の見通し

スクリーニングを確実なものにするために、可溶性画分の調製法および酵素反応条件の検討を行う。さらに、スクリーニングに簡易精製した酵素を用いることも検討する。また、精製に時間の要するFDRの発現系を構築する。その後、スクリーニングを再開し、有用と思われるものについては変異部位を特定しX線結晶構造解析を行う。