

〔生物工学会誌 第78巻 第3号 82-93. 2000〕

 総 説

大腸菌におけるホ乳類 Cytochrome P450 活性酵素 タンパク質の発現

香川 憲夫^{1*}・草野 一富^{1§}・堅中 泰樹^{2#}Vanderbilt University School of Medicine,¹ 大阪大学医学部保健学科²¹ Nashville, TN 37232-0146, USA² 〒565-0871 吹田市山田丘1-7

(平成11年10月8日受付 平成11年12月13日受理)

Heterologous Expression of Mammalian Cytochrome P450 as Active Forms in *Escherichia coli* —Review—

NORIO KAGAWA,^{1*} KAZUTOMI KUSANO,¹ YASUKI NONAKA² (*Department of Biochemistry, Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, TN 37232-0146, USA*¹; *School of Allied Health Science, Osaka University Faculty of Medicine, 1-7 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871*²) *Seibutsu-kogaku* **78**: 82-93, 2000.

Cytochrome P450 (P450) is involved in various biological pathways that are essential for the maintenance of life. Heterologous expression in *Escherichia coli* has become a powerful tool for obtaining large amounts of P450 for detailed enzymatic characterization and structural analyses. Although many P450 species have been expressed in *E. coli* during the last decade, overall the expression of P450 has been poorly investigated in a systematic manner. Therefore, some forms of P450 are still difficult to express at a useful level, and consequently remain unavailable for further study without improvement in their expression. In this review, we analyze previous reports to obtain a better understanding of the heterologous expression of P450 in *E. coli*, and propose empirical rules and troubleshooting procedures that may provide a better chance for successful expression of P450 species that have proved difficult to express.

[**Key words:** P450, amino-terminal sequence, alignment, conserved proline]

大腸菌を利用したタンパク質の発現は、酵母、昆虫細胞、ホ乳類の細胞系を用いる方法に比べ、維持管理が容易で、増殖が速く、かつ安価である。今日では、遺伝子操作技術の進歩によって、大腸菌内でタンパク質を発現することが容易になり、従来は困難であったヒト由来のタンパク質を大量に得ることも可能となった。しかし、生理活性、あるいは、酵素活性を有するタンパク質を発

現することは未だ容易ではなく、高レベルで発現しようとする、不活性なタンパク質の凝集体、すなわち、インクルージョンボディー (inclusion body) が生じてしまう場合が多い。インクルージョンボディーが形成された場合には、これを変成条件下で可溶化し、さまざまな条件下で再生してはじめて活性なタンパク質を得ることが出来る例もある。一方で、インクルージョンボディーの形成を防ぎつつ細胞質に可溶性タンパクとして活性を保ったまま発現しようとする試みがなされてきた。その結果、種々のタンパク質において成功例が報告され、構造解析、酵素活性の解析などに大きな貢献をしている。

* 連絡先, Corresponding author.

(E-mail: kagawan@ctrvax.vanderbilt.edu)

§ 現在, エーザイ 薬理安全衛生研究所 (〒300-2635 つくば市東光台5-1-3)

現在, 甲子園大学栄養学部 (〒665-0006 宝塚市紅葉が丘10-1)

P450 の大腸菌での発現は、その代表的な好例であり、P450 の発現に関する考察は、他の多くのタンパク質の大腸菌での発現にも寄与するものと期待される。

P450 はヘム鉄を含むタンパク質で、還元型 CO-複合体が 450 nm の波長に光吸収のピークを持つ一群の酸素添加酵素であり、細菌から高等動植物にまで存在する膨大な数の分子種を含むスーパーファミリーを形成している。動植物では、種々の薬物代謝、ステロイドホルモンの合成、ビタミン D₃ の合成、胆汁酸の合成など、生命維持に重要な数多くの代謝合成経路に関与している。これらの P450 を大腸菌発現系を用いて酵素活性を有する形で大量に発現することができれば、それまで困難であった個々の P450 酵素活性を詳細に検討することが可能となる。特に薬物代謝の研究においてはヒトと実験動物との差異が大きく、直接ヒトの薬物代謝系酵素の機能を解析することが重要である。しかし、動植物の P450 は、膜タンパク質に特有の高い疎水性のために、大腸菌で発現しようとするとならない不活性なインクルージョンボディとなりやすい。さらに、活性な酵素タンパク質が生成されるためには、フォールディングが正常に行われることに加え、補欠分子族であるヘムの導入が正しく行われる必要があり、大腸菌での発現はより複雑かつ困難なものであった。Barnes らは、1991年に初めてウシのステロイド 17 α 水酸化 P450 (P450c17) を活性な形で大腸菌内に発現することに成功した。³³⁾ この成功は、それまでできなかった P450 の大腸菌での発現に、試みるべき一つの指針を与えたことに大きな意味があり、その後、多くの P450 が Barnes らの方法を参考にして発現されてきた。

しかし、個々の P450 を発現するに際しては、前記の方法を適用しつつ、なお多くの試行錯誤が必要である。しかも、試行錯誤の結果、非常に低い発現しか得られない場合、あるいは発現できない場合に、これという解決法がなく、未だ容易に発現できるとはいえない。そこで本稿では、これまでに発現された多くの P450 の実例を比較し、我々の最近の知見と合わせることによって、これまであやふやな経験則と試行錯誤に依っていた大腸菌内での発現実験に対し、酵素活性を有する形で P450 の発現を試みる際に参考とすべき理論と標準的方法の提示を試みる。

1. アミノ末端の配列の選択と発現効率

これまで多くの P450 の大腸菌における発現例から、アミノ末端の改変が不可欠なことは明らかであるが、それ以外の領域の影響は未だ明らかでない。アミノ末端の

改変例として、ATG (メチオニン) の次に来る二番目のコドン、大腸菌で頻繁に使われる GCT コドン (アラニン) に置き換えること、二番目のコドン以降の配列はまちまちであるが、翻訳開始部位の RNA の二次構造を弱めるために、メチオニンから 6 番目のコドンまでをアミノ酸配列は変えず AT リッチとなるように変異を導入することが大腸菌での発現には必要であると考えられる。³³⁾ これらは、塩基配列の問題であり、二番目のアミノ酸がアラニンであれば良いのではなく、二番目のコドンが GCT であることに留意する必要がある。⁴²⁾

メチオニン、アラニンの次からのアミノ酸配列の改変の仕方は、次の 4 種の方法に分類できる。

A 法: 元のアミノ酸をそのまま使う。

B 法: アンカー部分に Barnes がウシ P450c17 の発現に用いたアミノ酸 6 残基分の塩基配列 (Barnes カセット, MALLLAVF) をそのまま用いる。

さらに元のアミノ酸配列を種々の程度に除去したうえで

C 法: MA にそのままつなぐ。

D 法: Barnes カセットをそのままつなぐ。

E 法: 発現が確認された他の P450 のアミノ末端の配列を挿入する。

いずれにせよ、アミノ末端の配列の選択がもっとも重要であると考えられるが、これまでのところ一定の法則は示されておらず、試行錯誤により数種の配列を試すこととなり、この段階がもっとも手間と時間のかかる作業である。しかも試行錯誤の結果、なお活性のある P450 が発現できなかった場合にどうすればよいのか、解決のための理論なり経験則とも云うべきものが示されていない。

しかし、すでに多くの P450 の大腸菌での発現の成功例が報告されており、これらを整理解析することによって、P450 を大腸菌で発現する際の基本的な考え方、問題を解決するための方向性を提示できるのではないかと考える。まず最初に、これまでに発現された P450 の個々の具体例を比較検討し、成功の可能性の高いアミノ末端の配列について考察する。

1.1 CYP2C ファミリー (Table 1 参照) CYP2C ファミリーは 3A ファミリーと共に、ヒトの肝臓での薬物代謝の主な部分を担う重要な P450 酵素群であり、⁴⁰⁾ ヒトの薬物代謝を研究するうえで、大腸菌での発現は非常に意味がある。

CYP2C ファミリーのアミノ末端の配列を比較すると、Fig. 1 に示すように、非常によく保存されており、小胞体膜に導入されるに必要な疎水性のアンカー領域

Table 1. Amino-terminal sequences of CYP2C family members expressed in *E. coli*.

	Amino-terminal sequence	Vector	<i>E. coli</i>	Expression (nmol/l)	Ref.
2C1 rabbit	MDPVVVLGLCLSCLLLLSLWKQSYGGGKLPPGP <u>MALLLAVFLGLSCLLLLLS...</u>	pCW	XL1Blue	200	(1)
2C2 rabbit	MDLVVVLGLCLSCLLLLSLWKQSHGGGKLPPGP <u>MALLLAVFLGLSCLLLLLS...</u>	pCW	XL1Blue	300	(1)
2C3 rabbit	MDLLIILGICLSCVVLSSLVKKTHGKGLPPGP <u>MALLLAVFLGLSCLLLLLS...</u> <u>MALLLAVFLGLSCLLLLLS...</u>	pCW	XL1Blue	500	(1)
		pCW	JM109	400	(3)
		pCW	XL1Blue	800–1200	(2)
2C4 rabbit	MDPVAGLVGLCCLLLLLSLWKQNSGRGKLPPGP <u>MALLLAVFLGLSCLLLLLS...</u>	pCW	XL1Blue	300	(1)
2C5 rabbit	MDPVVVLVLGLCCLLLLLSIWKQNSGRGKLPPGP <u>MALLLAVFLGLSCLLLLLS...</u>	pCW	XL1Blue	500	(1)
2C16 rabbit	MDPVVVLVLGLCCLLLLLSHWKQNSGRGKLPPGP <u>MALLLAVFLGLSCLLLLLS...</u>	pCW	XL1Blue	350	(1)
2C8 human	MEPFVVLVLCLSFMLLFSLWRQSCRRRKLP <u>MALLLAVFLGLSCLLLLLS...</u> (2E1-N') <u>MARQVHSSWNLP</u> ...	pCW	XL1Blue	1500	(1)
		pCW	DH5α	1600	(4)
2C9 human	MDSLVLVLCLSCLLLLSLWRQSSGRGKLPPGP <u>MALLLAVFLGLSCLLLLLS...</u> MARQSSGRGKLPPGP...	pCW	XL1Blue	500	(1)
		pCW	DH5α	1200	(4)
		pCW	DH5α	nd	(5)
		pCW	DH5α	10–20	(5)
(2C10)	<u>MALLLAVFLCLSCLLLLS...</u>				
(2C10)	MARQSSGRGKLPPGP...				
2C11 rat	MDPVLVLVLTSSLLLLSLWRQSFGRGKLPPGP MARQSFGRGKLPPGP...	pCW	DH5αF'	500–1500	(6)
2C18 human	MVPAVALVLCLSCFLLSLWRQSSGRGRLP <u>MALLLAVFLGLSCLLLLLS...</u>	pCW	XL1Blue	450	(1)
2C19 human	MDPFVVLVLCLSCLLLLSIWRQSSGRGKLPPGP <u>MALLLAVFLGLSCLLLLLS...</u> <u>MALLLAVFLCLS...</u>	pCW	XL1Blue	500	(1)
		pCW	DH5α	800	(4)

The amino-terminal sequences of wild-type and modified CYP2C family members are compared. Foreign amino acid sequences are underlined: for instance, the sequence MALLLAVF is derived from bovine CYP17, and MARQVHSSWN used for CYP2C8 is from the basic region in CYP2E1. The expression levels of P450 shown (nmol/l culture medium) are the values provided in the cited references.

nd, Not detectable.

(疎水性領域) (Membrane anchor region, A-Region), ファミリー内でよく一致する正電荷の存在する領域 (Basic region, B-Region), 保存されたプロリンの存在する領域 (Proline conserved region, P-Region) とその下流と考えることができる。まず, A-Region のアミノ末端からの配列をそのまま Barnes カセットに置き換える B 法によって, 多くの CYP2C に属する P450 が比較的高いレベルで発現された。これに対し, C 法として, A-Region を削除し, 最初の正電荷を持つアミノ酸の前に MetAla を付加した場合 (2C3, 2C9) にも, 安定して高い発現レベルを実現することができる。さらに E 法として, B-Region に他の P450 のアミノ酸配列を導入した場合 (Table 1. 2C8, 2E1 の B-Region を使用) もまた良い結

果を得ている。これらの疎水性領域を削除した P450 はその活性が臓器から精製したものと変わらないことが確認されている。^{3,4)} カルボキシン末端にヒスチジンを 4~6 残基加えることにより, 発現レベルおよび酵素活性を維持したままで, 精製を容易にすることにも成功している。

1.2 他の CYP2 ファミリー (Table 2 参照) Fig. 2 に示すように, CYP2 ファミリーに属する P450 のアミノ末端の配列は全体としてよく保存されており, P-Region は容易に決めることができる。B-Region の最初のアミノ酸の位置を決めることは個々の配列を見る限りかならずしも容易ではない。たとえば, 2A ファミリーの場合, 2A3 以外は適当な位置に塩基性アミノ酸が存在しない。したがって, B-Region に対する以下に示す再

2C6	rat	MDLVMLLVLTLTCLILLSIW-RQSSGRGKL-PPGPIPLP
2C7	rat	MDLVTFVLVLTLSLILLSIW-RQSSRRRKL-PPGPTPLP
2C11	rat	MDPVLVLVLTLSLILLSIW-RQSFGRGKL-PPGPTPLP
2C12	rat	MDPFVVLVLSLFLLLLYLW-RPSPGRGKL-PPGPTPLP
2C13	rat	MDPVVLLLSLFFLLFLSLW-RPSSGRGKL-PPGPTPLP
2C22	rat	MALFIFLGIWLSCLVFLFLW-NQHHVRRKL-PPGPTPLP
2C23	rat	MELLGFTTALVSVTCLSLLSVW-TKLRTGRKL-PPGPHPPS
2C24	rat	MDPVLVLVLTLSLILLSIW-RQSSGRGKL-PPGPTPLP
2C8	human	MEPFVVLVCLSFMLLFSW-RQSCRRRKL-PPGPTPLP
2C9	human	MDSLVLVCLSLILLSIW-RQSSGRGKL-PPGPTPLP
2C18	human	MVPAVALVCLSLFLLSLW-RQSSGRGKL-PPGPTPLP
2C19	human	MDPFVVLVCLSLILLSIW-RQSSGRGKL-PPGPTPLP
		A-Region B-Region P-Region

Fig. 1. Amino-terminal alignment of CYP2C family members. Based on the alignment of the amino-terminal sequences of CYP2C family members, the membrane anchor region (A-Region), basic region (B-Region), and proline conserved region (P-Region) are proposed. Hyphens are inserted between the regions.

定義が必要である. i) B-region は, P-Region の最初の Pro の上流 8 アミノ酸残基以上の長さとする. ii) サブファミリー (CYP2A, CYP2C など) 内では B-Region のアミノ酸数は同一とする. iii) A-Region に存在する連続した Leu の下流にあり, ファミリー (CYP1, CYP2 など), およびサブファミリー内で保存された位置にある塩基性残基を B-Region の最初のアミノ酸とする. iv)

個々の配列に適切な塩基性アミノ酸が存在しない場合には, これを含む他のメンバーの位置を採用する. v) Pro から 8 残基以上の距離に 2 個以上の保存された塩基性残基が存在する場合, 上流にある塩基性残基を B-Region の始まりの位置とする.

このように定義することにより, 2A の場合 (Fig. 2), 2A3 は P-Region の最初の Pro から 9 番目の位置に Lys

Table 2. Amino-terminal sequences of CYP2 family members expressed in *E. coli*.

		Amino-terminal sequence	Vector	<i>E. coli</i>	Expression (nmol/l)	Ref.
2A6	human	MLASGMLLVALLVCLTVMVLMVSWQQRKSKGKLPPGPTP (2E1-N') MARQVHSSWNLP... MARQVHSSWNLP...	pCW	DH5α	900	(4)
2E1	rabbit	MAVLGITVALLGWMAILLFISVWQKIHSSWNLP... MAALGVTV... MAALGVTV... MARQVHSS... MARQVHSS...	pKK233-2 pCW pCW pCW	DH5αMCR DH5α DH5α DH5α	*500-700 nd 40 1300	(7) (8) (8) (4)
2E1	human	MFALGVTVALLVWAAFLLLVSMWRQVHSSWNLP... MAALGVTV... MARQVHSS... MARQVHSS...	pCW pCW pCW	DH5α DH5α DH5α	nd 40 1300	(8) (8) (4)
2B1	rat	MEPSILLLLALLVGFLLLLVGRHHPKSRGNFP... MAPSILLLLA... MALLLAVLLA...	pKK233-2 pKK233-2	Topp3 Topp3	300-500 50	(9) (10)
2B11	dog	MELSVLLLLALLTGLLLLMARGHPKAYGHLPP... MALLLAVLLA...	pKK233-2	Topp3	100	(10)
2B5	rabbit	MEFSLLLLLAFLAGLLLLLRGHPKAHGRLP... MALLLAVLLA...	pKK233-2	Topp3	10	(10)
2F3	goat	MDSISTAILLLILALICLLLTSSKGKGRLP... MALLLAVFELLLI...	pCW	DH5α	25-50	(11)
2D6	human	MGLEALVPLAVIVAIFLLLVDMHRRQRWAARYPP... (N'-His) MRGSHHHHHHGSRRW... MARRQRWAARYPP... (2E1-N') MARQVHSSWNLP... (2E1-N') MARQVHSSWNLP...	pDS9 pCW pCW pCW	JM109 DH5α DH5α DH5α	15 nd 100 600	(12) (13) (13) (4)

The amino-terminal sequences and expression levels of CYP2 family members are shown as described in Table 1.

*The value of the expression level was estimated by the authors based on the data in the cited reference.

nd, Not detectable.

2A1	rat	MLDTGLLLVLASLSVMLLVSL-WQQKIRGRL-PPGPTPLPFIG
2A2	rat	MLDTGLLLVLASLSVMFLVSL-WQQKIRERL-PPGPTPLPFIG
2A3	rat	MLASGLLLVASVAFLSVLVLMSVW-QQRKLSGKL-PPGPTPLPFIG
2A6	human	MLASGMLLVALLVCLTVMVLMSVW-QQRKSKGKL-PPGPTPLPFIG
2A7	human	MLASGLLLVALACLTVMLVMSVW-QQRKSKGKL-PPGPTPLPFIG
2B1	rat	MEPSILLLLALLVGFLLLLV-RGHPKSRGNF-PPGPRPLPLL
2B2	rat	MEPSILLLLALLVGFLLLLV-RGHPKSRGNF-PPGPRPLPLL
2B3	rat	MDTSVLLLLAVLLSFLFLV-RGHAKVHGHL-PPGPRPLPLL
2B12	rat	MEFGVLLLLTLTVGFLFLVS-QSQPKTRGHL-PPGPRPLPFLG
2B15	rat	MELGVLLLLTFTVGFLLLLAS-QNRPKTHGHL-PPGPRPLPFLG
2B16P	rat	MEPSVLLLLAVLLSFLLLLV-RGHAKIHGRL-PPGPCPVPLL
2B6	human	MELSVLLFLALLTGLLLLV-QRHPNTHDRL-PPGPRPLPLL
2D1	rat	6-GTGLWSMAIFTVIFILLVDLMH-RRHRWTSRY-PPGPVWPVLG
2D2	rat	6-GDDLWAVVIFTAIFLLLVLDLVH-RHKFWTAHY-PPGPVPLPGLG
2D4	rat	6-GSELWPIAIFTIIFLLLVLDLMH-RRQRWTSRY-PPGPVWPVLG
2D5	rat	6-GTGLWPMAIFTVIFILLVDLMH-RHQRWTSRY-PPGPVWPVLG
2D6	human	MGLEALVPLAVIVAIFLLLVLDLMH-RRQRWAARY-PPGPLPLPGLG
2E1	rat	MAVLGITIALLVVWATLLVISIW-KQIYNSWNL-PPGPFPLPILG
2E1	human	MFALGVTVALLVWAAFLLLVSMW-RQVHSSWNL-PPGPFPLPIIG
2F1	human	MDSISTAILLLLLALVCLLLT-LSSRDKGKL-PPGPRPLPILG
2F2	mouse	MDGVSTAILLLLLAVISLSLT-FSSRGKGQL-PPGPKPLPILG
2G1	rat	MALGGAFSIFMTLCLSCLLILIAW-KRTSRGGKL-PPGPTPIPFLG
2H1	chicken	MDFLGLPTILLVCISCLLIAAW-RSTSQRGKE-PPGPTPIPIIG
2J1	rabbit	13-AGLHPKTLLLGAVAFLLFFAYF-LKTRRPKNY-PPGPWRLPFLG
2K1	trout	12-STVTLLGTVLFLVLVLRSSG-SSSEEQKE-PPGPRPLPLL
2M1	trout	6-ILQTNFVSIIGFVVIILLWMN-RGKQNSRL-PPGPAPIPLL
2Q1	X.laev.	MDTSWLWTLILLSLILYSTW-NKMYRKRL-PPGPTPIPLFG
		A-Region B-Region P-Region

Fig. 2. Amino-terminal alignment of CYP2 family members. CYP2 members are aligned based on conserved prolines and the proline conserved region (P-Region). The proposed basic regions (B-Region) and membrane anchor regions (A-Region) are indicated by the insertion of hyphens. Because of variations in the length of the anchor region, instead of the complete sequences, 2D1, 2D2, 2D4, and 2D5 are shown from Gly at 6, 2J1 from Ala at 13, 2K1 from Ser at 12, and 2M1 from Ile at 6. Although the P-Region is well conserved in each family, for instance, CYP2A1 does not have a basic amino acid as the first amino acid of the B-region, in some cases the B-Regions are proposed based on the alignment with other family members (e.g. 2A3 in the 2A family), with the result that the first amino acid of the B-Region of some family members is not a basic amino acid.

をもっており、これを B-Region の始まりとし、他の 2A は塩基性アミノ酸をこの位置にもたないが、2A3 に準じるものとした。このように考えると、CYP2C ファミリー同様に、A-Region、B-Region、P-Region に分けて考えることができ、削除可能な配列として A-Region を明らかにできる。この場合にも、A 法（ウサギおよびヒトの 2E1）、B 法（2B1, 2B11, 2B5, 2F3）、A-Region を除去した C 法（2E1）、E 法（2A6, 2D6; 2E1 の B-Region を使用）により活性を保持した P450 を発現することに成功している。CYP2C ファミリーとは異なり、A, B の方法では CYP2B5, ヒト CYP2E1, CYP2F3 に見られるように発現レベルが低いケースも見られる。しかし、C, E 法のように疎水領域を削除した場合には、おおむね高い発現が得られている。したがって、CYP2 ファミリーに関しては、目的にもよるが、B または A-Region を削除する C および E の方法により、高発現が得られると考えられる。

Table 2 の 2E1 および 2D6 に見られるように、まったく同じ発現ベクターを作り、同一の方法を用いているに

も関わらず、研究者により発現レベルに非常に大きな差が認められる場合もあるが、この点については後に考察する。

1.3 その他の薬物代謝系の P450 (Table 3 参照)

CYP2 ファミリーで示したようにアミノ末端の領域の分け方を拡張して考えると Fig. 3 および Fig. 4 に示すように、その他の P450 でも CYP2 ファミリーの考え方に当てはめることができる。A-Region の長さがファミリーにより異なるために、アミノ末端を一部削り、A-Region を Barnes カセットと比較し、Leu の連続配列が一致するように置き換えた D 法により CYP3A4, 3A5, 4A1, 79 などが発現されている。一方で、A-Region を除去する C および E の方法もまた有効であろうと思われるが、未だ試された例が報告されていない。

1.4 ステロイド合成系の P450 (Table 4 参照)

胆汁酸、ビタミン D₃、ステロイドホルモンなどの合成に関与する P450 は、小胞体膜に存在するミクロゾーム型 P450 とミトコンドリアに存在するミトコンドリア型 P450 とに分けられる。⁴¹⁾

Table 3. Amino-terminal sequences of other non-steroidogenic CYP family members expressed in *E. coli*.

		Amino-terminal sequence	Vector	<i>E. coli</i>	Expression (nmol/l)	Ref.
1A1	human	MLFPISMSATEFLLASVIFCLVFWVIRASRPQVPKGL MAFPISMSAT... MASRPQV... MAFPISMSAT...	pCW pCW pCW	DH5α DH5α DH5α	30 20 300	(14) (14) (4)
1A2	human	MALSQSVPFSAATELLLASAIFCLVFWVLKGLRPRVPK MALLLAVFSAATEL... MALLLAVFLFCLV... MALLLAVFLFCLV... MALLLAVFLFCLV...	pCW pCW pCW pCW	DH5α DH5α DH5α DH5α	nd 250 500 700	(15) (15) (4) (16)
3A4	human	MALIPDLAMETWLLLAVSLVLLYLYGTHSHGLFKKLG MALLLAVFLVLLY... MALLLAVFLVLLY... MALLLAVFLVLLY...	pCW pCW pCW	DH5α DH5α DH5α	100 200 400	(17) (18) (4)
3A5	human	MDLIPNLAVETWLLLAVSLVLLYLYGTRTHGLFKRLG MALLLAVFLVLLYLYGTHSHGLFKKL. MALLLAVFLVLLYLY...	pCW pCW	DH5α DH5α	300 200	(19) (18)
3A6	rabbit	MDLIFSLETWVLLAASLVLLYLYGTSTHGLFKKMGIP MALLLAVFLVLLYLYGT...	pKK233-2	Topp3	40–90	(20)
3A7	human	MDLIPNLAVETWLLLAVSLVLLYLYGTRTHGLFKKLG MALLLAVFLVLLYLY...	pCW	DH5α	50	(18)
3A12	dog	MDLIPSFSTETWLLLAIISLVLLYLYGTYTHGIFRKLG MALLLAVFLVLLY...	pKK233-2	Topp3	20–60	(20)
4A1	rat	MSVSALSSTRFTGSISGFLQVASVLGLLLLLVKAVQF (OR-FUSION) MALLLAVFLGLLLL...	pCW	DH5α	NA	(21)
4A4	rabbit	MSVSALSPTRLPGSLSGLLQVAALLGLLLLLLKAAQL MAVSALS...	pCW	JM109	10–20	(22)
4F4	rat	MPQLDLSWLGLRLETSLPWLLLLLIGASWLLVRLTQ MALLLAVESWL...	pCW	DH5α	40	(23)
4F5	rat	MPWLTVSGLDLGSVVTSTWHLLLLGAASWILARILAW MALLLAVFASW...	pCW	DH5α	40	(23)
6A1	<i>M. dom.</i>	MDFGSFLLYALGVLASLALYFVRWN MAFGSFLL...	pSE380 (trc)	NA	300	(24)
79	<i>S. bic.</i>	MATMEVEAAAATVLAAPLLSSSAILKLLLFFVVTLSYL MALLLAVFAAAATV... MALLLAVFAILK... MALLLAVFLS...	pSP19g10L	JM109	nd very low 200–500	(25) (25) (25)
2E1	human	ompA-CYP2E1 fusion	pCW	JM109	200	(26)
2A6	human	ompA-CYP2A6 fusion	pCW	JM109	200	(26)
3A4	human	ompA-CYP3A4 fusion	pCW	JM109	500	(26)
2A4	mouse	Pepti-native 2A4 fusion	pCW	DH5α	NA	(27)

The amino-terminal sequences and expression levels of other family members are shown as described in Table 1. 4A1 was expressed as a fusion protein with NADPH-dependent P450 reductase (OR-FUSION). 2E1, 2A6, and 3A4 were also expressed as fusion proteins with the leader sequence of *E. coli* outer membrane protein A (ompA), and 2A4 was as a fusion protein with an artificial amino-terminal sequence, peptitertgent (Pepti), as mentioned in the text. The expression of a plant P450, CYP79 from *S. bicolor*, and an insect P450, CYP6A1 from *M. domestica* (house fly), are included in this table.

nd, Not detectable.

NA, Not available.

1A1	rat	MPSVYGFPAFTSATELLLAVTTFCLGFVWV-RVTRTWVPKGLKS-PPGPWGLPFIGHV			
1A1	human	MLFPISMSATEFLLASVIFCLVFVWI-RASRPQVPKGLKN-PPGPWGWLIGHM			
1A2	rat	MAFSQYISLAPELLLATAIFCLVFVWL-RGTRTQVPKGLKS-PPGPWGLPFIGHM			
1A2	human	MALSQSVFPSATELLLASAIFCLVFVWL-KGLRPRVPKGLKS-PPEPWGWPPLGHV			
1B1	rat	9-SPQQLSSLSTQQTILLLLVSVLAIVHLGQ-WLLRQWRKWPSS-PPGFPFWPLIGNA			
1B1	human	9-DPWPLNPLSIQQTILLLLVSVLATVHVQG-RLLRQRRRQLRSA-PPGPFAPWPLIGNA			
3A1	rat	MDLLSALTLETWVLLAVVLVLLYFGT-RTHGLFKKQGI-PGPKPLPFFGTVL			
3A2	rat	MDLLSALTLETWVLLAVILVLLYRLGT-HRHGIFKKQGI-PGPKPLPFLGTVL			
3A9	rat	MDLIPNFSMETWLLLVISLVLLYLYGT-HSHGIFKKLGI-PGPKPLPFLGTIL			
3A18	rat	MEIIPNLSIETWVLLATSLMLFYIYGT-YSHGLFKKLGI-PGPKPVPLFGTIF			
3A3	human	MALIPDLAMETWLLLAASLVLLYLYGT-HSHGLFKKLGI-PGPTPLPFLGNIL			
3A4	human	MALIPDLAMETWLLLAASLVLLYLYGT-HSHGLFKKLGI-PGPTPLPFLGNIL			
3A5	human	MDLIPNLAVETWLLLAASLVLLYLYGT-RTHGLFKRLGI-PGPTPLPFLGNVL			
3A7	human	MDLIPNLAVETWLLLAASLILLYLYGT-RTHGLFKKLGI-PGPTPLPFLGNAL			
		<table border="1"> <tr> <td>A-Region</td><td>B-Region</td><td>P-Region</td></tr> </table>	A-Region	B-Region	P-Region
A-Region	B-Region	P-Region			

Fig. 3. Amino-terminal alignment of CYP1 and CYP3 members. The proposed A-Region, B-Region, and P-Region of CYP1 and CYP3 members are indicated based on the alignment as described in Fig. 2.

ミトコンドリア型 P450 として, CYP11A1 (P450_{sc}), CYP11B1 (P450_{11B}), CYP11B2 (P450_{aldo}), CYP27A (27-hydroxylase of C27 steroids and vitamin D₃), CYP27B (1 α -hydroxylase of 25-hydroxyvitamin D₃) がこれまでに発現されている。これらミトコンドリア型の P450 は, これまで述べてきたミクロゾーム型のような疎水領域は持たず, ミトコンドリアへの移送に必要なシグナルペプチド配列 (Mitochondrial transport signal, M-Signal), およびその切断部位からプロリン領域まで (B-Region) と, プロリン領域 (P-Region) とに分けて考えることができる (Fig. 5)。いずれの P450 もシグナルペプチドが切断されたあとの最初のアミノ酸を Ala (GCT) とし, アミノ末端の核酸配列を AT リッチとした mature type として発現された。CYP11A1 と CYP27A はこれにより 300-400

nmol/culture と比較的高い発現が可能であった。^{29,31)} しかし, CYP11B1 および CYP11B2 は同様の方法を用いても低い発現量 (10-50 nmol/l) しか得られていない。³²⁾

ミクロゾーム型の P450 としては, CYP7A1 (cholesterol 7 α -hydroxylase), CYP17 および CYP51 (lanosterol 14 α -demethylase) がこれまでに大腸菌で発現されている。これらもまた, 前記の P450 と同様にアミノ末端配列を考えることができる (Fig. 6)。Table 4 に示すように, CYP7A1 では, ラット, ヒト共に A-Region の削除 (C 法) により発現された。ウシの CYP17 は, アミノ末端の変更 (A 法) と, A-Region の削除 (C 法) の双方が試みられ, 後者の方が発現レベルは高くなっている。ヒトの CYP17 はアミノ末端を Barnes カセットに置き換える (B 法) ことで, 発現に成功している。CYP51 は A

4A1	rat	MSVSALSSTRFTGSI SGFLQVASVLGLLLLLLV-KAVQFYLRQWLLKAFQQF-PSPPFWHFFGHKQ			
4A2	rat	MGFSVFSPTSLDGVSGFFQGAFLLSLFLVLF-KAVQFYLRQWLLKALEKF-PSTPSHWLWGHNL			
4A3	rat	MGFSVFTPTSLDGVSGFFQGAFLLSLFLVLF-KAVQFYLRQWLLKALEKF-PSTPSHWLWGHDL			
4A8	rat	MSGALSFTIFPGSILGFLQIATVLTVLLLLL-KTAQFYLHRRWLLRATQQF-PSPPSHWFFGHKI			
4A11	human	MSVSVLSPSRLLGDVSGILQAASLLILLLLLLI-KAVQLYLHRQWLLKALQQF-PCPPSHWLFHQIQ			
4B1	human	MSGTATMVPSFLSLFSSSLGLWASGLILVLGFL-KLIHLLLRRLTAKAMDKF-PGPPTHWLFGHAL			
4B1	rat	MVLNFLSPSLRLGLWASVILMVIVL-KLFSLLLRRLKARAMDSF-PGPPTHWLFGHAL			
4D1	Dros.	MFLVIGAILASALFVGLLLYHL-KFKRLIDLISYM-PGPPVPLPVGHGH			
4F1	rat	MSQLSLSWLGLGPEVAFPWQTLTLFGASWILAQILTQIY-AAYRNFRRLRGF-PQPPKRNWLMGHV			
4F2	human	MSQLSLSWLGLWPVAASPWLLLLLVGASWLLAHVLAWTY-AFYDNCRRRLRCF-PQPPRRNWFVGHQ			
4F3	human	MPQLSLSSLGLWPMAASPWLLLLLVGASWLLA-RILAWTYTFYDNCRRRLRCF-PQPPKRNWFLGHL			
4F4	rat	MPQLDLWLGLRLLETSLPWLLLLLVGASWLLV-RVLTQTYIFYRTYQHLCDF-PQPPKRNWFLGHL			
4F5	rat	MPWLTVSGLDLGSVVTSTWHLLLLGAASWILA-RILAWTYSFCENCRRRLRCF-PQSPKRNWFLGHL			
4F6	rat	MLQLSLSLRGMGSLTASPWLLLLLVGASWILA-RILAWIYTFYDNCRRRLRCF-PQPPKPSWFWGHL			
5A1	human	MEALGFLKLEVNGPMVTVALSVALLALL-KWYSTSAFSRLFKLGLRH-PKPSPFIGNLTF			
5A1	rat	MEVLGLLKFEVSGTVVTVTLSVLLALL-KWYSTSAFSRLRKLGRH-PEPSPFVGNLMFF			
		<table border="1"> <tr> <td>A-Region</td><td>B-Region</td><td>P-Region</td></tr> </table>	A-Region	B-Region	P-Region
A-Region	B-Region	P-Region			

Fig. 4. Amino-terminal alignment of CYP4 and CYP5 members. The proposed A-Region, B-Region, and P-Region of CYP4 and CYP5 members are indicated as described in Fig. 2. Proline residues in the P-Region are surprisingly conserved within a CYP family.

Table 4. Amino-terminal sequences for the expression of steroidogenic P450 in *E. coli*.

	Amino-terminal sequence	Vector	<i>E. coli</i>	Expression (nmol/l)	Ref.
27A human	...KAAIPA-ALPSDKATGAPGAGPGVRRRQRSLEEI MALPSDKA....	pTrc99A	JM105 JM109	NA 400	(28) (29)
11A1 bovine	...TGEGAG-ISTKTPRPYSEIPSPGDNGWLNLYHFW MASTKTPRP...	pTrc99A	JM109	50 250	(30) (31)
11B1 rat	...HRTRAL-GTTAKVAPKTLKPFEAIPQYSRNKWLK MATTATLAPKT...	pTrc99A	JM109	20	(32)
11B2 rat	...HRTRAL-GTTATLAPKTLKPFEAIPQYSRNKWLK MATTATLAPKT...	pTrc99A	JM109	40	(32)
17 bovine	MWLLLAVFLLTLAYLFWPKTKHSGAKYPRSLPSLPLV MALLLAVF...	pCW	JM109	300-400	(33)
	MAKTKHS...	pCW	XL1Blue	600	(34)
17 human	MWELVALLLLTLAYLFWPKRRCPGAKYPKSLLSLPLV MALLLAVFLLTL...	pCW	DH5α	400	(35)
7A1 rat	MMTISLIWGI AVLVS CCIWFIVGIRRRKAGEPPLENG MAARRRKAGE...	pJL	MV1304	60	(36)
7A1 human	MMTISLIWGI AIAACCCLWLILGIRRRQTGEPPLENG MAARRRQTGE...	pJL	Topp3	50	(36)
21 human	MLLLGLLLLPLLAGARLLWNWKLRLSLHLPPLAPGFL MALLGLL...	pCW	JM109	nd	(37)
51 human	MLLLGLLQAGGSVLGQAMEKVTGGNLLSMLLIACFT MALLGLL...	pCW	Topp3	200	(38)

The amino-terminal sequences and expression levels of steroidogenic P450 members are shown as described in Table 1. In the wild-type sequences of mitochondrial P450 (27A, 11A1, 11B1, and 11B2), the cleavage sites (or putative cleavage sites) of the mitochondrial transport signals are indicated by hyphens.

nd, Not detectable.

NA, Not available.

法により発現された。CYP21 (P450c21) は A 法により発現が試みられ、酵素活性を検出することはできたが、スペクトルは確認できないほどに低発現であった。³⁷⁾ これまでの結果からすると、CYP21, CYP51, CYP19 (P450arom) など、B-Region の前に MetAla を付加する (C 法) ことで高発現が得られる可能性は高いと考えられる。

1.5 その他のアミノ末端を用いた発現 さらに、まったく異なるアミノ末端配列との融合タンパク質を形成することにより、活性な P450 の発現に成功した例が、ompA のリーダー配列を導入した場合と、peptitertgent との融合タンパク質で報告されている (Table 3)。ompA は大腸菌の主要な外膜タンパク質の一つであり、このリーダー配列との融合タンパク質として発現することにより、翻訳開始の際の問題をなくし、融合タンパク質を膜画分に発現することで精製を容易にする効用がある。²⁶⁾ 一方で、peptitertgent との融合タンパク質もまた、

翻訳開始を容易にし、この場合には、すべての融合タンパク質を細胞質に可溶性画分として発現し、その後の精製、構造解析を容易にすることを期待するものである。²⁷⁾ 両者ともにその意図は達成され、比較的高い発現レベルで活性を有する融合 P450 タンパク質を得ている。しかし融合タンパク質として発現した場合は、精製後、付加したアミノ末端部分の配列をプロテアーゼ処理により除き再度精製する必要がある、必ずしも有利とはいえない。一方で、これまで発現された多くの P450 は、そのカルボキシ末端にヒスチジン残基を 4~6 残基付加し、Ni-NTA カラムで精製が容易となるようにしても発現のレベル、酵素活性共に、影響が認められていない。しかし、同様のヒスチジン残基をアミノ末端に付加した場合、発現レベルが極度に低くなっている (Table 2, 2D6)。アミノ末端の配列が翻訳の効率を決めていると考え、連続したヒスチジン残基は、大腸菌発現において効率の良いアミノ末端配列ではないことを示唆し

11A1	bovine	...WGHHRVGTGEGAG-ISTKTTPRYPSEI-PSPGDNGWLNLY			
11A1	sheep	...WGHHRVGTGEGAG-ISTRTPRYPSEI-PSPGDNGWINLY			
11A1	human	...LGRLRVPTGEGAG-ISTRSPRPFNEI-PSPGDNGWLNLY			
11A1	rat	...QGPGLATGNGAG-ISSTNSPRSFNEI-PSPGDNGWINLY			
11A1	trout	...NSSMPVVRQALSP-DNSSTVQNFSEI-PGLWRNGLANLY			
11B1	rat	...WQCLHRTRAL-GTTAKVAPKTLK-PFEAIPQYSRNK			
11B2	rat	...WQCLHRTRAL-GTTATLAPKTLK-PFEAIPQYSRNK			
11B3	rat	...WQCLHRTRAL-GSTATQAPKTLK-PFEAIPQYSRNK			
11B1	bovine	...WLSLHEARLL-GTRGAAAPKAVL-PFEAMPRCPGNK			
11B1	human	...WLSLQRAQAL-GTRAARVPRTVL-PFEAMPRRPGNR			
11B2	human	...WLCLQRARAL-GTRAARAPRTVL-PFEAMPQHPGNR			
11B2	bullfrog	...RLSTAPLIHE-AREDGSLASQTL-PYEAIPPTGRSA			
27A	rabbit	...GARAKAAIPT-ALPADEAAQAPGAGPGDRRRRSLEEL-PRLGQLRFFYQA			
27A	rat	...GARAKAAIPA-ALRDHESTEGPGTGQ.DRPRLRSLAEL-PGPGLTLRFLFQL			
27A	human	...GARAKAAIPA-ALPSDKATGAPGAGPGVRRRQRSLEEI-PRLGQLRFFFQL			
24	rat	...LGQPPRSVTSKASAS-RAPKEVPLCPLMTDGETRNVTSL-PGPTNWPLLGS			
24	human	...PROPPRLVTSTAYTS-POPREVVCPLTAGGETQNAAL-PGPTSWPLLASL			
<table><tr><td>M-Signal</td><td>B-Region</td><td>P-Region</td></tr></table>			M-Signal	B-Region	P-Region
M-Signal	B-Region	P-Region			

Fig. 5. Mitochondrial CYP family members involved in steroid metabolisms. The putative mitochondrial transport signals (M-Signal), B-Region, and P-Region are divided by hyphens. Because the mitochondrial signal is cleaved off after transportation into mitochondria to form the mature P450, the complete sequences of signal peptides are not shown.

ている。

これらのアミノ末端のアミノ酸配列を比較整理すると、P450の大腸菌での発現は、アミノ末端の配列が一つの重要な要因であると考えられ、以下に示す一定の経験則を提示することができる。1) 膜画分に発現するためには、アミノ末端の配列を比較して、疎水領域に見いだされる連続したLeuの位置とBarnesカセットのLeuを合わせるようにアミノ酸配列を削除して、Barnesカ

セットに置き換える。2) 膜画分に発現する必要がない場合には、A-Regionを削除し、アミノ末端はMAK...またはMAR...とする。上記のA-RegionやB-Regionを決定するためには、アミノ末端付近に見いだされるP450全体で保存されているプロリンがよい指標となる。さらに、基本的にはA-Regionはあってもなくてもよい、B-Regionは必要と思われるが、他のP450のものと置換可能である、そして、これらの変更は活性に重要な影響

17 rat	MWELVGLLLLLILAYFFWV-KSKTPGAKL-PRSLPSLPLVGS			
17 bovine	MWLLLAVFLLTLAYLFWP-KTKHSGAKY-PRSLPSLPLVGS			
17 porcine	MWVLLVFLLTLTYLFWP-KTKGSGAKY-PRSLPVLVVGVS			
17 human	MWELVALLLTLAYLFWP-KRRCPGAKY-PKSLLSLPLVGS			
21 bovine	MVLAGLLLLLTLLAGAHLLWG-RWKLRLNHL-PPLVPGFLHLLQ			
21 sheep	MVLAGLLLLLTLLAGAHLLWG-RWKLRLNHL-PPLVPGFLHLLQ			
21 porcine	MVLVWLLLLTLKAGARLLWG-QWKLRLNHL-PPLVPGFLHLLQ			
21 human	MLLLGLLLLPLLAGARLLWN-WWKLRLNHL-PPLAPGFLHLLQ			
21 mouse	MLLPGLLLLLLLLAGTRWLWG-QWKLRLNHL-PRLAPGFLHFLQ			
51 <u>S. cerev.</u>	12-LEYVNIGLSHFLALPLAQRIISLIIPFIYNIVWQ-LLYS LRKDR-PPLVFYWI PWVG			
51 rat	10-GGSVLGQAMEQVTGGNLLSTLLIACAFTLSLVYLF-RLAVGHMVQ-LPAGAKSPPIY			
51 human	16-GGSVLGQAMEKVTGGNLLSMLLIACAFTLSLVYLI-RLAAGHLVQ-LPAGVKSPPIY			
51 <u>S. pombe</u>	MAFSLVSILLSIALAWYVGYIIN-QLTSRNSKR-PPIVFHWIPFVG			
19 human	MVLEMLNPIHYNITSIVPEAMPAATMSVLLLTGLFLLL-WNYEGTSSI-PGPGYCMGIGPL			
19 bovine	MLLEVLNPRHYNVTSMVSEVVPIASIAIILLTGFLLLV-WNYEDTSSI-PGPGSYFLGIGPL			
19 rat	MFLEMLNPMHYNVTIMVPETVPVSAMPLLLIMGLLLLI-RNCESSSSI-PGPGYCLGIGPL			
19 chicken	MIPETLNPLNYFTSLVPDMPVATVPPIILICFLFLI-WNHEETSSI-PGPGYCMGIGPL			
19 trout	23-DLLVSESRNATATRSEGISLATGSLLLLLCLLLAA-WRHTDNNSV-PGPFECFLGVGPL			
	<table><tr><td>A-Region</td><td>B-Region</td><td>P-Region</td></tr></table>	A-Region	B-Region	P-Region
A-Region	B-Region	P-Region		

Fig. 6. Microsomal CYP family members involved in steroid metabolisms. The putative A-Region, B-Region, and P-Region are proposed as described in Fig. 2.

を与えないと考えられる。このように、今までの発現実験の結果とホモロジー解析とを合わせて考えることにより、経験的に試みていた発現用のアミノ末端配列の構造に明確な指針を示すことができた。P450 の発現のレベル、あるいは成否がこれほどまでにアミノ末端の配列に依存していることは非常に興味深いことであり、大腸菌での翻訳調節機構について示唆するものと考えられるが、この詳細な機構の研究は今後の課題である。

なお、2E1 の B-Region の配列は、2A6, 2C8, 2D6 など用いられ高発現を得ている。したがって、この配列は CYP2 ファミリーの発現に共通のアミノ末端の配列として使える可能性が高く、あるいは Barnes カセットのように、より広い範囲での発現用のアミノ末端配列として利用できるかもしれない。これらの点を十分に考慮して、発現ベクターを作成することにより、大部分のミクロゾーム型 P450 の発現が可能であると考えられる。

2. その他の要因

大腸菌の mRNA の場合には、リボゾーム結合部位から翻訳開始点である Met コドン (ATG) までの距離が厳密に維持される必要がある。そのため、大腸菌用の発現ベクターはリボゾーム結合部位から一定の距離にメチオニンを再生するために、NdeI あるいは NcoI を利用して挿入するように設計されているものが多い。理由は不明であるが、ミトコンドリア型の P450 の場合には pTrc99A, ミクロゾーム型 P450 には pCWori+ が有効である。実際に、ミトコンドリア型のウシ P450_{sc} を pCW に組み込んでも発現されず、ミクロゾーム型のウシ P450_{c17} を pTrc に組み込んでも P450 の発現は見られなかった。pKK322 も使用されているが、このベクターを使用する場合には、リボゾーム結合部位から翻訳開始コドンまでの距離に注意する必要がある。pET ベクターは細菌の P450 の発現には有効であるが、動植物由来の P450 の発現には向かないようである。

大腸菌株は、これまでに JM109, DH5 α , MV1304, Topp3 などの菌種が用いられている。第一選択としては、JM109 か DH5 α 系の株がもっとも多く使われており、また我々の経験からも、多くの場合、双方ともに発現のレベルに差はあるものの、触媒活性を有する P450 としてある程度の発現量を得ることができる。

培養液としては、通常 Terrific Broth (TB) が用いられており、これにヘムの前駆体である δ -levulinic acid (ALA) を 1 mM 加えてヘム欠乏を防ぐ。また 1 mM の IPTG を加えることにより cDNA の転写を誘導する。

培養は通常、細胞数を一定に調節するために 37°C で一夜培養した後、100~500倍に希釈し、37°C でさらに培養する。OD₆₀₀ が 0.5-0.6 に達した時点で、IPTG, δ ALA などに加え、同時に温度を30度以下に下げて培養を続ける。この際の攪拌は、最大のエアレーションを与えるように振とう条件を定めるのが基本的な考え方であり、細胞の増殖速度が最大となるようダブリングタイムを測定しながら設定する必要がある。一方で、他の研究室では攪拌を最小限に押さえて成功している例もあり、攪拌条件の設定に関しては未だ議論の余地がある。いずれにせよ、至適な振とう条件は振とう器、培養フラスコの種類、大きさなどにより異なるため、培養の規模を増減する際には特に注意が必要である。

誘導の温度は、インクルージョンボディの形成を押さえるため 30°C 以下とする。恒温槽の種類により温度制御の精度が異なるため、まず 28°C で試してみるのが妥当であろう。また至適培養温度は P450 分子種によっても異なることがあり、P450 が検出されない場合には、さらに 2°C ずつ温度を上下してみる。先に述べた研究者間での発現レベルの極端な差は、恐らく使用している装置、培養容器などに起因する攪拌および温度調節による差であろうと考えられる。

発現のピークは、多くの P450 の場合には IPTG を添加した後、48時間前後である。しかし、中には12~24時間後に発現のピークがあり、48時間後には消失するケースもある。したがって、最初に試みる場合には12, 24, 48, 72時間での発現量の経時変化を追うことが望ましい。

最近、草野らはクロラムフェニコール (chloramphenicol) などのタンパク合成阻害剤として働く抗生物質をごく少量 (1 μ g/ml culture) 培養液に加えることで、大腸菌のストレス応答反応を誘導し、その結果、P450 に限らず、広範な異種タンパク質の大腸菌での発現を2~8倍促進できることを報告した。³⁹⁾ このようなストレス応答反応を利用した異種分子の発現は、新しい考え方に基づくものであり、今後、詳細な機構の研究と広範な応用が期待される。

3. 結 論

これまで述べてきたように、P450 を大腸菌で発現する際には、まずアミノ酸配列を比較し、A-Region, B-Region, P-Region を明らかにすることが重要である。次に発現ベクターのデザインを目的に応じて考える。アミノ末端に疎水性領域を残すか、B-Region からとするか、

さらに将来の精製のためにカルボキシ末端にヒスチジンタグを付加するかどうかを考慮する。これらの実験以前の計画の段階が非常に重要であり、慎重に調査選択をすることにより、ほとんどすべての P450 は酵素活性を保持したまま大腸菌において実用的なレベルで発現できるのではあるまいか。実際に筆者らは、このような操作により、他の P450 とはかなりアミノ末端の配列が異なり、発現が困難であった CYP4A ファミリー、CYP19 (P450arom) などの発現にも成功している (未発表)。

一般的に、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) 融合タンパク質、あるいは前述の ompA, peptidoglycan 融合タンパク質の系のように、アミノ末端にタグを付加して融合タンパク質として発現する方法は多くの例があり、高いレベルの発現を得るためにも有利なものである。これと、上述の P450 の例とを考え合わせると、アミノ末端の10残基前後のアミノ酸配列がタンパク質の発現のレベルに決定的な役割を果たしていると考えられる。このことからすると、P450 以外の一般的なタンパク質を大腸菌に発現する際にも、アミノ末端の配列は非常に重要なものであると考えられる。したがって、触媒活性を有するタンパク質を大腸菌で発現する際には、まず類似のタンパク質間のアミノ末端の配列を比較し、成功の可能性を探ることが重要な操作であろう。このような系統的なアミノ酸配列の検討により、翻訳に有利な GST などのタグをアミノ末端に付加し融合タンパクとして発現することなく、これまでは困難であったタンパク質が活性を有する形で大腸菌で発現できるようになるのではあるまいか。ゲノムプロジェクトの進展により、生理活性が未知の産物をコードした遺伝子が多く見つかり、これらのタンパク質の生理活性を研究するうえで、大腸菌での発現は今後ますます重要な手段になるであろう。それに伴い、大腸菌での転写翻訳のより詳細な機構の研究も今後の重要な課題であると考えられる。

要 約

大腸菌を利用した異種タンパク質の発現は広く様々な分野で利用されており、哺乳動物の生命の維持に必要な多くの cytochrome P450 (P450) が酵素活性を有するタンパク質としてすでに大腸菌内で発現されている。しかし、重要であるが発現の困難な、あるいは極度に低いレベルでしか発現できない P450 もあり、これらの P450 はこれといった発現の糸口さえもつかめないままに残されている。そこで本稿では、これまでの発現の例を比較し、我々の経験と併せて、酵素活性を有する P450 を大腸菌

内で発現する際の考え方を整理し、これまで発現が困難であった P450 を発現するための方法を提示する。

文 献

- 1) Richardson, T. H., Jung, F., Griffin, K. J., Wester, M., Raucy, J. L., Kemper, B., Bornheim, L. M., Hassett, C., Omiecinski, C. J., and Johnson, E. F.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **323**, 87-96 (1995).
- 2) von Wachenfeldt, C., Richardson, T. H., Cosme, J., and Johnson, E. F.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **339**, 107-114 (1997).
- 3) Richardson, T. H., Hsu, M. H., Kronbach, T., Barnes, H. J., Chan, G., Waterman, M. R., Kemper, B., and Johnson, E. F.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **300**, 510-516 (1993).
- 4) Iwata, H., Fujita, K., Kushida, H., Suzuki, A., Konno, Y., Nakamura, K., Fujino, A., and Kamataki, T.: *Biochem. Pharmacol.*, **55**, 1315-1325 (1998).
- 5) Sandhu, P., Baba, T., and Guengerich, F. P.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **306**, 443-450 (1993).
- 6) Licad-Coles, E., He, K., Yin, H., and Correia, M. A.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **338**, 35-42 (1997).
- 7) Winters, D. K. and Cederbaum, A. I.: *Biochim. Biophys. Acta.*, **1156**, 43-49 (1992).
- 8) Gillam, E. M., Guo, Z., and Guengerich, F. P.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **312**, 59-66 (1994).
- 9) He, Y. Q., He, Y. A., and Halpert, J. R.: *Chem. Res. Toxicol.*, **8**, 574-579 (1995).
- 10) John, G. H., Hasler, J. A., He, Y. A., and Halpert, J. R.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **314**, 367-375 (1994).
- 11) Wang, H., Lanza, D. L., and Yost, G. S.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **349**, 329-340 (1998).
- 12) Kempf, A. C., Zanger, U. M., and Meyer, U. A.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **321**, 277-288 (1995).
- 13) Gillam, E. M., Guo, Z., Martin, M. V., Jenkins, C. M., and Guengerich, F. P.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **319**, 540-550 (1995).
- 14) Guo, Z., Gillam, E. M., Ohmori, S., Tukey, R. H., and Guengerich, F. P.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **312**, 436-446 (1994).
- 15) Sandhu, P., Guo, Z., Baba, T., Martin, M. V., Tukey, R. H., and Guengerich, F. P.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **309**, 168-177 (1994).
- 16) Fisher, C. W., Caudle, D. L., Martin-Wixtrom, C., Quattrochi, L. C., Tukey, R. H., Waterman, M. R., and Estabrook, R. W.: *Faseb. J.*, **6**, 759-764 (1992).
- 17) Gillam, E. M., Baba, T., Kim, B. R., Ohmori, S., and Guengerich, F. P.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **305**, 123-131 (1993).
- 18) Gillam, E. M., Wunsch, R. M., Ueng, Y. F., Shimada, T., Reilly, P. E., Kamataki, T., and Guengerich, F. P.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **346**, 81-90 (1997).
- 19) Gillam, E. M., Guo, Z., Ueng, Y. F., Yamazaki, H., Cock, I., Reilly, P. E., Hooper, W. D., and Guengerich, F. P.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **346**, 81-90 (1997).

- F. P.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **317**, 374-384 (1995).
- 20) Born, S. L., Fraser, D. J., Harlow, G. R., and Halpert, J. R.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **278**, 957-963 (1996).
 - 21) Fisher, C. W., Shet, M. S., Caudle, D. L., Martin-Wixtrom, C. A., and Estabrook, R. W.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 10817-10821 (1992).
 - 22) Nishimoto, M., Clark, J. E., and Masters, B. S.: *Biochemistry*, **32**, 8863-8870 (1993).
 - 23) Kawashima, H., Kusunose, E., Thompson, C. M., and Strobel, H. W.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **347**, 148-154 (1997).
 - 24) Andersen, J. F., Utermohlen, J. G., and Feyereisen, R.: *Biochemistry*, **33**, 2171-2177 (1994).
 - 25) Halkier, B. A., Nielsen, H. L., Koch, B., and Moller, B. L.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **322**, 369-377 (1995).
 - 26) Pritchard, M. P., Ossetian, R., Li, D. N., Henderson, C. J., Burchell, B., Wolf, C. R., and Friedberg, T.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **345**, 342-354 (1997).
 - 27) Sueyoshi, T., Park, L. J., Moore, R., Juvonen, R. O., and Negishi, M.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **322**, 265-271 (1995).
 - 28) Axen, E., Postlind, H., Sjoberg, H., and Wikvall, K.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 10014-10018 (1994).
 - 29) Pikuleva, I. A., Bjorkhem, I., and Waterman, M. R.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **343**, 123-130 (1997).
 - 30) Wada, A., Mathew, P. A., Barnes, H. J., Sanders, D., Estabrook, R. W., and Waterman, M. R.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **290**, 376-380 (1991).
 - 31) Pikuleva, I. A., Mackman, R. L., Kagawa, N., Waterman, M. R., and Ortiz de Montellano, P. R.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **322**, 189-197 (1995).
 - 32) Nonaka, Y., Fujii, T., Kagawa, N., Waterman, M. R., Takemori, H., and Okamoto, M.: *Eur. J. Biochem.*, **258**, 869-878 (1998).
 - 33) Barnes, H. J., Arlotto, M. P., and Waterman, M. R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 5597-5601 (1991).
 - 34) Sagara, Y., Barnes, H. J., and Waterman, M. R.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **304**, 272-278 (1993).
 - 35) Imai, T., Globerman, H., Gertner, J. M., Kagawa, N., and Waterman, M. R.: *J. Biol. Chem.*, **268**, 19681-19689 (1993).
 - 36) Karam, W. G. and Chiang, J. Y.: *J. Lipid. Res.*, **35**, 1222-1231 (1994).
 - 37) Chung, B. C., Hu, M. C., Guzov, V. M., and Wu, D. A.: *Endocr. Res.*, **21**, 343-352 (1995).
 - 38) Stromstedt, M., Rozman, D., and Waterman, M. R.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **329**, 73-81 (1996).
 - 39) Kusano, K., Waterman, M. R., Sakaguchi, M., Omura, T., and Kagawa, N.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **367**, 129-136 (1999).
 - 40) Guengerich, F. P.: *Cytochrome P450; Structure, Mechanism, and Biochemistry* (Ortiz de Montellano, P. Ed.) p. 473-535, Plenum, New York (1995).
 - 41) Kagawa, N. and Waterman, M. R.: *Cytochrome P450; Structure, Mechanism, and Biochemistry* (Ortiz de Montellano, P. Ed.) p. 419-442, Plenum, New York (1995).
 - 42) Looman, A. C., Bodlaender, J., Comstock, L. J., Eaton, D., Jhurani, P., de Boer, H. A., and van Knippenberg, P. H.: *EMBO J.*, **6**, 2489-2492 (1987).