

遺伝子組換え体が生産するチトクロームP-450を利用した ステロイド生産システムの開発と課題

青木 央, 宮崎 俊一, 澤谷 拓治

What Problem Do We Face on the Development of Steroid Production System by Using Cytochrome P-450 Protein from the Recombinant DNA Microorganism?

Hiroshi Aoki, Syunichi Miyazaki, Takuji Sawaya

要 旨

遺伝子組換え技術によって生産したチトクロームP-450を利用してステロイドホルモンを生産するための基礎的な技術開発をおこなった。用いたチトクロームP-450は酸性フォスファターゼのプロモータを利用してパン酵母の中で発現させたチトクロームP-450dである。工業利用としての目的のため、大量培養、抽出、固定化酵素、脂溶性基質との反応系の構築、そしてコスト計算について検討した。大量培養や抽出は、ジャーファーメンターや遠心分離技術の利用で実験室レベルから生産レベルの移行は可能と思われたが、酵素の固定化や脂溶性基質との反応系を構築するには課題が残された。また、コスト計算からは酵素の寿命を伸ばすことが指摘された。

今後の研究の方向としては、タンパク質工学による酵素の設計技術などを駆使することによって上記の問題が解決されるものと考え、遺伝子組換え技術で目的にあった酵素を生産するなどの研究をするのが望ましいという結論になった。

1. 緒 言

北海道は農水産物が豊富であることから食糧を中心とした一次産品の供給基地としての役割を果たしてきたが、水産資源の減少、国際的な200海里規制、円高不況、そして輸入自由化等によって厳しい経済状況にある。函館地域には食品加工業、ファインケミカル、そして医薬品関連の企業群があるが、何れも中小企業であることから、テクノポリス函館の中核研究機関である当工業技術センターが支援すべき技術開発がある。

本開発研究は、バイオテクノロジーを積極的に二次産業に活用し、地域企業に新技術を導入して技術を高度化することを目的にすすめられた。即ち、遺伝子組換え技術を用いて形質転換した微生物を創造し、この微生物の大量培養や、微生物が

生産するタンパク質（酵素）によって高付加価値物質を生産する技術開発を進めようとした。

生体内において、コレステロールから各種のステロイドホルモン合成におけるキー・ステップにチトクロームP-450タンパク質¹⁾が関与している。このタンパク質の遺伝情報をコードしているチトクロームP-450遺伝子を利用することによって、コレステロールからステロイドホルモン製造の原料となる医薬品素材を高収率かつ高純度で生産する技術を開発しようと計画した。この技術が開発されることによって地元企業に対して以下の波及効果が期待された。

(1)高付加価値物質であるステロイドホルモン中間体を低コスト、かつ高純度で生産することが可能となる。

- (2)函館地域のみならず北海道にはなかった新しい産業の芽生えとなる。
- (3)バイオテクノロジーの最先端技術である遺伝子組換え技術の地元企業への普及や導入が容易になり、技術力や生産性の向上に結びつく。
- (4)微生物の大量培養技術は、発酵食品の製造など医薬品以外の産業分野への応用も可能であり、大きく貢献できる。
- (5)バイオテクノロジーを総合的に組合せて発展させることによって、将来的にはプロテインエンジニアリング(タンパク質工学)としての大きな飛躍が期待される。

1.1 ステロイドホルモンと医薬品産業

生物が生存するためには、生物の個体、器官そして細胞がそれぞれ適切な条件のもとで調節を受けて初めて可能であり、このための支配因子の1つに化学的な司令がある。特定の細胞で生体内外の情報に応じて生産・分泌され、体液を介してその情報を他の細胞へ伝達する物質の代表がホルモンである。ホルモン情報は機能発現、恒常性(ホメオスタシス)の維持など生物の正常な生活を保証する重要な要因である。下垂体ホルモン、甲状腺ホルモン、成長ホルモン、アドレナリン、インシュリンなどの他にステロイドホルモンも代表的なホルモンの1つである。ステロイドホルモンは、ステロイド骨格をもつホルモンの総称で、雄性動物のアンドロゲン(テストステロンなど)、雌性動物のエストロゲン(エストラジオールなど)およびプロゲステロン、両性を通じてのコレステロール(コレチゾール、コレチコステロンなど)に大別される。多くの哺乳類のステロイドホルモンの原料はコレステロールである。各ステロイドホルモンは特定の臓器でコレステロールから生合成される。最初にステロイドホルモン産生臓器だけに存在する側鎖切断酵素によってプレグネノロンとなる。さらにこう丸ではアンドロゲンが生成され、ついで卵胞や胎盤でエストロゲンが作られる。このようなステロイドホルモンを作り上げていく過程は基質特異性の高い酵素によって触媒されている。

コレステロールの側鎖のC₂₀とC₂₂の間の炭素鎖結合が切断されてプレグネノロンが作られる反応は、ステロイドホルモン生合成経路の第1段階である。このコレステロール側鎖切断酵素はチトク

ロームP-450の一種で、P-450scc (side-chain cleavage of cholesterolの意)と略称されている。

ステロイドホルモンの医薬品としての売上げ高は、全世界で5000億円をはるかに超えており、国内では1000億円以上の売上げであり、全医薬品の約3%を占める大きな分野となっている。ステロイドホルモン原体の従来の製造方法は、11 α 水酸化などの発酵がコレチコイドの製造工程の一部に組み込まれているにすぎず、その主体は有機合成反応であった。しかし三菱化成(株)では、魚油や羊毛脂から抽出されるコレステロール、あるいは、大豆油やtall油から抽出される β -sitosterolやcampesterolなどのsterol類のC₁₇とC₂₀との間で側鎖を切断し、ステロイドホルモン合成に適切な中間体を微生物によって多量かつ安価に生産する発酵技術を確立した²⁾。しかしながら、ステロイドホルモン生合成の最初のステップであるC₂₀とC₂₂との間の結合を容易に、かつ効率よく切断する方法が未だ確立されていないため、C₂₁ステロイドの合成は従来法で行われている。

我々は、最近急速に進歩し、その一部が企業化にも成功した遺伝子組換え技術を用いてコレステロールのC₂₀とC₂₂との間の結合を効率よく切断する方法の開発を計画した。即ち、この反応を触媒するタンパク質を形質転換した微生物の大量培養で生成し、この作用によってコレステロールからプレグネノロンを生産しようとするものである(図1)。

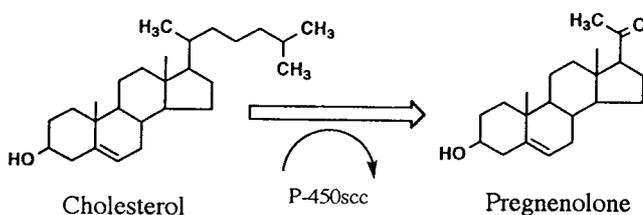


図1 P-450_{scc}によるコレステロール側鎖の切断

このプレグネノロンを医薬品素材とし、従来法の化学反応や微生物を利用した方法を用いることによってステロイドホルモン合成の工程が大きく改善されるものと考えられる。しかし、その目的を達成するためには表1のようなハードルがあり、一つ一つ解決していかななくてはならないと考える。

表1 遺伝子組換え体が生産する
酵素利用技術の開発課題

培養	大量培養への転換
抽出	失活の少ない経済的な抽出
反応	脂溶性基質との反応
電子伝達系	酸化還元反応系の再構成
プラント	固定化酵素による生産計画

1.2 チトクロームP-450遺伝子の組換えと発現の現状

遺伝子構造やその発現機構の解明、そして遺伝子のもっている情報にもとづいて生産されるタンパク質の一次構造の解明といったような基礎科学の分野は工業化学に多大な貢献をした。人工的に組換えた遺伝子を大腸菌などのバクテリア、酵母、更には動植物細胞に導入し、これを培養することによってタンパク質の生産が可能になったことから、最近、ヒト成長ホルモン、インシュリン、インターフェロンなどの医薬品が遺伝子操作技術を駆使して製造され、産業への応用が注目されている。大腸菌は遺伝学的解析が最も進んでおり、遺伝子の発現機構もよくわかっている。又、菌の取り扱いが容易で、増殖も速く、外来遺伝子の発現には非常に適した宿主である。大川らは、ラットP-450cの大腸菌での発現を、*lac* プロモーターや *tac* プロモーターなどを用いて検討したが、何れの場合もP-450cの発現量は低かった³⁾。酵母は大腸菌に次いで遺伝学的研究が進んでおり、多くの変異株が取得されている。培養も容易で、外来遺伝子導入のための形質転換法も確立されている。更に、酵母は真核生物で動物細胞と類似したオルガネラをもつので、動物などの外来遺伝子から合成されたタンパク質が本来の細胞と同じ挙動をとり、機能を発揮できる可能性がある。大川らは、酵母のアルコールデヒドロゲナーゼのプロモーターとターミネーターをもつ発現ベクターpAAH5を用いてラットP-450cの発現プラスミドを構築し、これを酵母 *Saccharomyces cerevisiae* AH22株へ導入した。この結果、種々の実験結果よりP-450タンパク質の発現を確認した⁴⁾。清水らは、ラットP-450dを酸性ホスファターゼのプロモーター

に接続し、同様に酵母での発現を確認した⁵⁾。

以上述べた結果は、主に薬物代謝にかかわっているP-450遺伝子に関するものである。一方、ステロイドホルモンの生合成にかかわっているP-450遺伝子の微生物での発現については、大川らが17 α や21水酸化酵素について報告している⁶⁾。我々が開発しようとしていたP-450sccはこの研究を始めたころには行われていなかったが、後、Watermanらのグループが成功した。⁷⁾

一方、東北大の藤井教授や清水助教授のご協力によりP-450sccと類縁のP-450dの発現プラスミドP-450d/pAAH5を導入した酵母AH22/P-450d/pAAH5株 (*S. cerevisiae* AH22) を御供与していただき、実験に使用した。P-450dタンパク質は、女性ホルモンである17 β -エストラジオールの2位水酸化活性を有している。発現プラスミドP-450d/pAAH5は、P-450scc/pAAH5と遺伝子の構造や、ステロイド化合物の代謝活性を有しているなど類似点が多く、なおかつ、発現ベクターが同じであることから酵母での発現に関する基本技術を確立する上で最適であると考えた。すなわち、P-450sccの発現の実験をすすめる一方でP-450dを用いたステロイド工業生産システムの検討を同時に進めようと計画した。この報告は工業生産のシステムを構築する場合にどのような問題点が生じ、どのように解決しようとしたかを示す。

2. 形質転換した酵母の大量培養

チトクロームP-450遺伝子の酵母での発現は、何れの場合も研究室レベルでの実験であるため、フラスコを使用して行われている。しかしながら、工業化を目的とする場合は、大量培養が可能で、なおかつ培養液の諸条件をコントロールすることが可能なジャーフェーマンター（連続攪はん培養器）を使用する⁸⁾のが良いと考える。そこで、ジャーフェーマンターを使用して、酵母AH22/P-450d/pAAH5の大量培養について検討した。東北大の清水氏は遺伝子組換え酵母AH22/P-450d/pAAH5をリン酸濃度をひきさげることにより発現誘導し、振盪培養をつづけることで活性のあるP-450dを得ているが、我々は、同じスケール比でジャーフェーマンターを前培養に取り入れることが可能と考え、実験をした。

2.1 ジャーファーマンターを利用したチトロームP-450dの生産

基本的な培養法はジャーファーマンターを使用する事以外は清水氏らの振とう培養法と同じようにおこなった。基本は高リン酸培地で培養後、低リン酸培地に移し替えてP-450dを発現させる方法である。1.5ℓの高リン酸バークホルダー培地を入れた容積3ℓ小型ジャーファーマンター（高杉製作所、東京、TS.NC-3型）に発現酵母の30%グリセリンストック0.2~0.3mlを加えて、30℃で培養する。この時の攪はん回転数は100rpm、空気流量は

0.5ℓ/minとした。pHスタットは使用せず、溶存酸素(DO)、pHを常時モニターし記録した。培養液を適当な時期にサンプリングして吸光度(650nm)をUVKON860（コントロン社、スイス）のエンドオン検出器で測定した。さらに適当な時期に集菌後、2ℓの低リン酸バークホルダー培地を入れた3ℓ三角フラスコ3本に均等に接種、ひき続き大型回転振とう培養器（高崎科学器械、埼玉、TXY-60T）で培養する。

2.1.1 結果と考察

モニターの経時変化は図2のようになった。

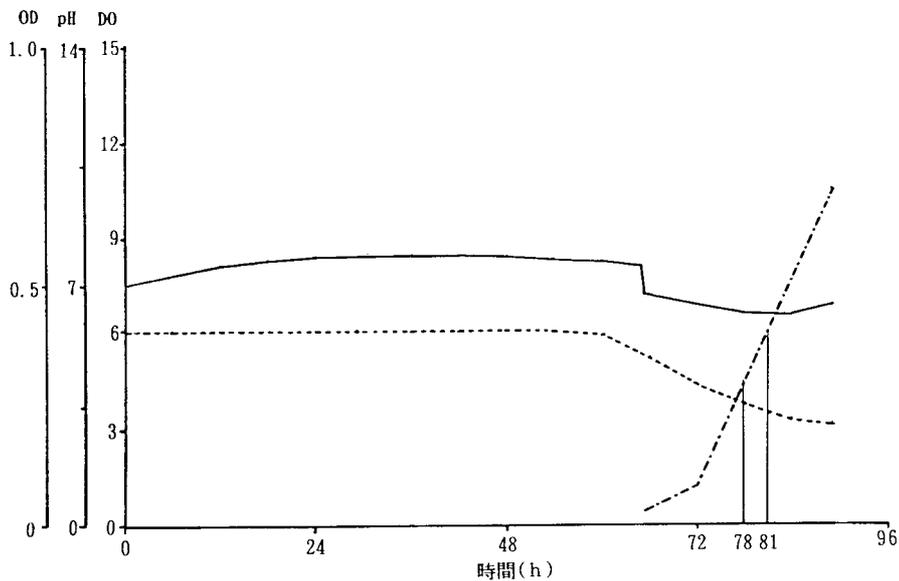


図2 ジャーファーマンターによる高リン酸バークホルダー培地での酵母AH22株の培養状態
 培養容積1.5ℓ、培養温度30℃、攪拌回転数100rpm、空気流量0.5ℓ/min、
 ———— : DO (溶存酸素量 ppm), - - - - - : pH,
 - · - · - · : OD (エンドオンフォトマル方式, 測定波長650nm)

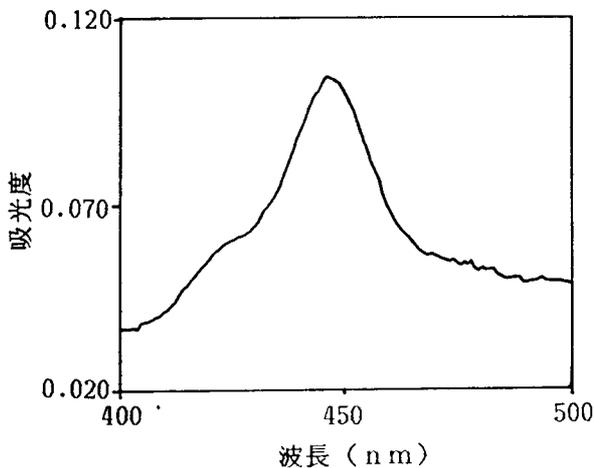


図3 P-450dのCO還元差スペクトル

培養液50mlを約10倍濃縮してCO還元スペクトルを測定したところ図3に示すようなスペクトルを得ることができた。P-450dの発現量は450nmと490nmの吸光度の差より1000/91(nmol/ml/cm)の係数で計算が可能である。この発現株はリン酸培地の交換時期と交換後の培養時間により発現量が大きく異なった。図4に示したように培地交換してから48時間培養したときに発現量は最も高くなり、それ以上培養しても発現量は低下する。培養培地移し替え時の吸光度が0.7程度で移し替えた場合は同じく低リン酸培地で48時間培養しても発現量は0.46で移し替えた場合の半分程度になった。

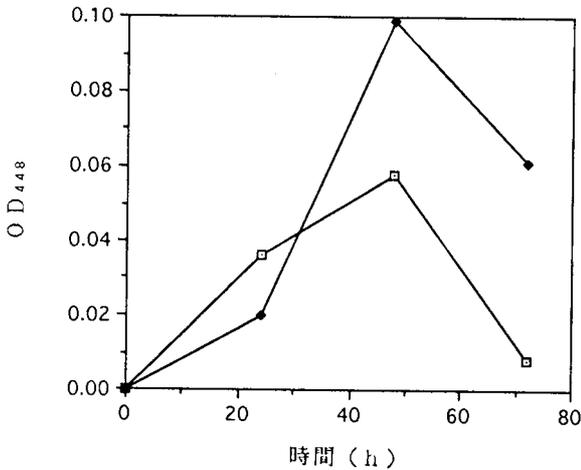


図4 CO還元差スペクトルの最大値と培養時間の関係

—□— : 移し替え時 OD_{650nm} = 0.703
 —◆— : 移し替え時 OD_{650nm} = 0.460
 培養液を10倍濃縮後、測定

振とう培養の場合、吸光度が0.3~0.4になったところで低リン酸培地に移し替えをおこなうと発現量が高いこと、2日目に発現量が多いことが清水氏により知られているので、ほぼ一致した結果となった。図2の実験結果から培養時間は78~81時間でその時のpHは3.5前後になると予測できた。その後、実験の繰り返しにより培養時間は約87~89時間を要し、培地交換時期の判断に吸光度をサンプリングしなくても培地のpHを経時的に測定し、3.3~3.2になった時に培地交換を行えば良いこともわかった。しかし、酵母の生育が良くなるなどの大きなメリットはなく、振とう培養と相違が無いと判断された。結局、ジャーフェメンターを利用する最大のメリットとして培地交換の時期の正確な予測ができることが注目された。逆に振とう培養しておいてから、本培養にジャーフェメンターを利用しても発現がおこなわれることを確認しており、全ての培養に攪はん培養を採用できると考えられた。

3. 大量培養されたチトクロームP-450dの抽出

我々は工業利用という目的で技術開発を進めており、いわゆる研究目的で行っているカラムクロマトグラフィーを用いてチトクロームタンパク質を精製することは採算面で不向きであると考えた。そこで目標にしたのがマイクロソーム⁹⁾として分画するレベルである。しかも、マイクロソームを可能なかぎり短時間で調製することは工業利用を

考える上で重要である。他の方法と比較して良好な結果を得たのがガラスビーズ破碎を用いる方法と、希薄なセシウム塩溶液中でのショ糖密度勾配遠心法を組み合わせる用いるマイクロソームの迅速な調製法である。マイクロソームは細胞内の小胞体からなり、酵母のマイクロソームの主成分はタンパク質合成の場として働くりボソームである。この実験でいわゆる滑面マイクロソーム画分と言われるところにP-450dの活性の高い部分が分画できることがわかり、以後の実験に使用した。発現酵母はリン酸培地6ℓ (2ℓ×3本)の培養液から湿重量で約14~15g集菌できて、滑面マイクロソーム画分に抽出できたP-450dは200~230nmolとなった。培養液1ℓから1.3~1.5mgの収量であった。この時の滑面マイクロソーム画分のエトキシクマリンに対する水酸化活性は0.4~0.6nmol/min/nmolP-450であった¹⁰⁾。

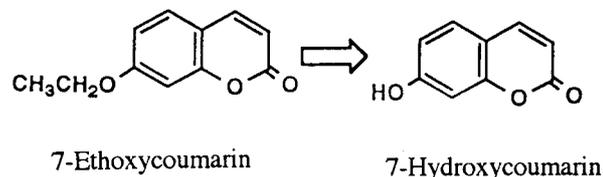


図5 チトクロームP450dによるクマリンの水酸化

4. チトクロームP-450の固定化

タンパク質の固定化法にはたくさんの種類があり、特に共有結合による固定化に使用できる場所は12種類ほどあると考えられている¹¹⁾。今回、固定化法の選択としてP-450dとP-450sccに共通性のある固定化を考えなくてはならない。P-450dはアミノ酸が513残基あり、P-450sccでは520残基あって、アミノ酸の1次構造のホモロジーはMicroGene (Beckman社, USA) による解析では全アミノ酸残基に対して約21%~22%であった。このホモロジーの高いところで固定化に利用できるアミノ酸残基が見つかるとういが、少なくともタンパク質のC末端やN末端の固定化については共通するので、N末端の固定化としてCNBr活性化担体を用いた固定化を試みた。

4.1 チトクロームP-450dの固定化の実験方法

6ℓ培養したP-450d発現酵母AH22株からエトキシクマリンに対する活性を有する滑面マイクロソーム

ム画分をショ糖密度勾配遠心分画した。これをCNBr担体であるCNBr活性化アガロース (CNBr-セファロース4B) と4°Cで16時間反応させる。固定化担体は活性化のため乾燥ゲルを1mM塩酸溶液で適宜膨潤させ、乾燥ゲル1gあたり200ml以上の1mM塩酸で洗い、ガラスフィルタ (WhatmanGF/C) を通したゲルを再び、カップリングバッファー (0.1MNaHCO₃ (pH8.3), 0.5MNaCl) に再懸濁したものをを用いる。担体乾燥重量3.0gを15mlのカップリング溶液で懸濁し、ガラスビーズホモジナイザー破碎懸濁液5ml相当分の滑面マイクロソーム画分をカップリングさせた。テフロンスターラーは使用しない。つぎに0.1MTris・HCl (pH8.0) を少量加えて2時間室温で静置、固定化を停止した後、0.1M酢酸緩衝液 (pH4.0), 0.5MNaClで担体を洗い、次に0.1MTris・HCl (pH8.0), 0.5MNaCl再び室温で2時間静置する、この操作を繰り返した後、固定化P-450を得る。乾燥担体3.0gは260mg~630mgのキモトリプシノーゼンを固定化する容量があるので、ほぼ全てのタンパク質が固定化されることになる。

固定化P-450dの活性の測定には基質としてエトキシマリンを使用した。溶液組成は0.5mMエトキシマリン, 0.5mM NADPH, 5mM MgCl₂, 50mMリン酸カリウム緩衝液 (pH7.4), NADPH再生系は加えず全量が2mlとなるようにして蛍光強度を測定 (EX350nm, EM460nm) する。さらに固定化する前の滑面マイクロソーム画分を固定化P-450dのアッセイ系に追加して200μl添加した場合も蛍光強度の変化を測定した。

4.1.1 結果と考察

測定の結果図6のようになった。固定化前の滑面マイクロソームには活性があったが、固定化P-450dには活性はなかった。固定化P-450dにマイクロソーム懸濁液をさらに添加した場合は活性があった。すなわち、固定化あるいは固定化の操作中にP-450dは完全に失活してしまったことを意味している。CNBrによる固定化はマイクロソームからのP-450dが他の夾雑するタンパク質と比較してどの程度固定化されているかわからないが、CNBrはリジンなどのすべてのアミノ基に作用する可能性があること、カップリング工程に時間を要すること、pHジャンプが大きいため耐久性に劣るP-450が物理化学的ショックを受けたことにより失活してしま

ったものとする。

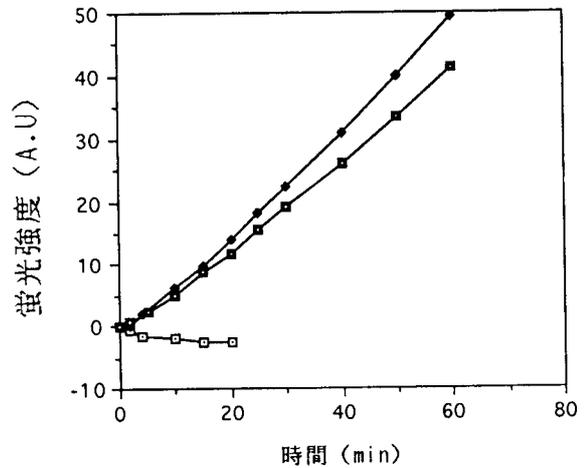


図6 固定化P-450dのエトキシマリンに対する水酸化活性

- 固定前のマイクロソーム画分
- ◆— セファロース4B固定化P-450d + ミクロソーム画分
- セファロース4B固定化P-450d

一方、C末端を固定化する方法をP-450に適用する場合、グルタミン酸のカルボキシル基は活性中心に近いアルギニンのグアニジン基と相互作用している可能性が高いようなので全てのカルボキシル基に作用するような固定化は成功する確率が低いと考えた。

P-450dに大きな物理化学的ショックを与えないで特異的に固定化できる可能性として考えられる一つの方法はアスパラギン酸のカルボキシル基を合成酵素を用いて部位特異的に固定化する方法である。しかし、アスパラギンシンターゼを使用し試みたが良好な結果を得るには至っていない。

さて、マイクロソームの中のP-450dの固定化は、後に述べる電子伝達系などを含めてのオルガネラの固定化ということになると大変都合がよいのであるが、多くの困難をとまなうことが予測される。このような困難も遺伝子組換え技術とタンパク質工学といわれる分子設計の技術の進歩により解決されるものと信じている。

5. 脂溶性基質との反応の場をどうつくるか

チトクロームP-450sccの基質となるステロイドは脂溶性の物質であって水には溶けにくい性質がある。そして、P-450タンパク質は生体内では脂質二重膜に一部分が埋め込まれた状態で反応の場が

設定されている。また、P-450はエマルゲンなどの界面活性剤により活性が安定化することが知られており、反応の場を再構成するために界面活性剤が用いられていることは意義あることである。そこで、P-450発現酵母であるAH22株のリン脂質組成を調べた上、同様のリン脂質組成にてステロイド基質をリポソームに埋胞しマイクロソーム画分として得られたP-450と膜融合することにより反応の場をつくること(図7)を試みた。

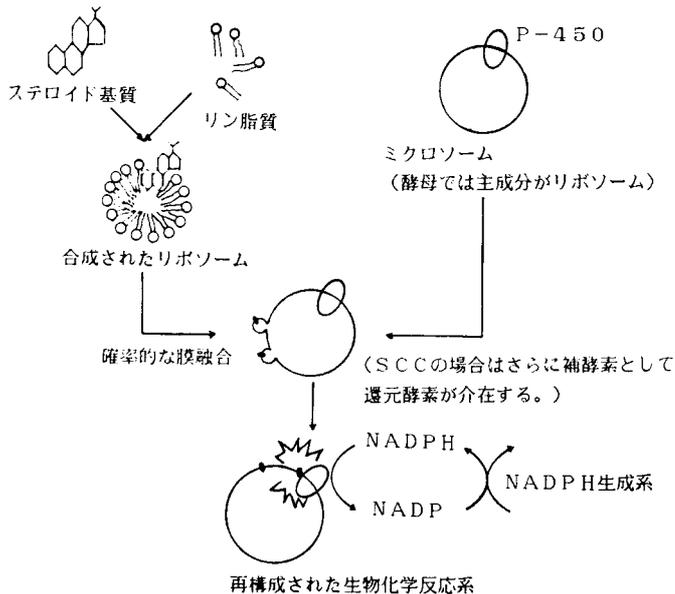


図7 ミクロソームとリポソームを利用した反応系の再構成

5.1 P-450 d 発現酵母の脂質のTLCによる分析

クロロホルム：メタノール(2：1)混合溶媒30mlと凍結乾燥したP-450d発現酵母を1.5gを混合し、ホモゲナイズする。ガラスフィルターで濾過後、残渣を0.2倍量のクロロホルム・メタノール混液で洗い、0.05M塩化ナトリウム溶液を加え、クロロホルム：メタノール：塩化ナトリウムの溶液が8：4：3となるようにする。2000×gで遠心分離し上層を捨てる。クロロホルム：メタノール：蒸留水=3：48：47混液でクロロホルム層を洗い、窒素ガス気流下で乾燥させる。次に試料をシリカゲル60の2次元薄層クロマトグラフィーにかける。第1次展開溶液としてクロロホルム：メタノール：アンモニア水=65：35：5、第2次展開溶媒としてクロロホルム：メタノール：アセトン：酢酸：蒸留水=10：2：4：2：1、標準品としてはPI(ホスファチジルイノシトール)を用いた。発色剤はVaskovskyとKostevskyの方法(水銀-モリブデン硫酸)によった。

分析結果は図8のようになり、含有量はつぎのようになった。

フォスファチジルコリン(PC) > フォスファチジルエタノールアミン(PE) >> リゾフォスファチジルエタノールアミン(LPE) > スフィンゴミエリン(SPH) > フォスファタイトドアシッド(PA)

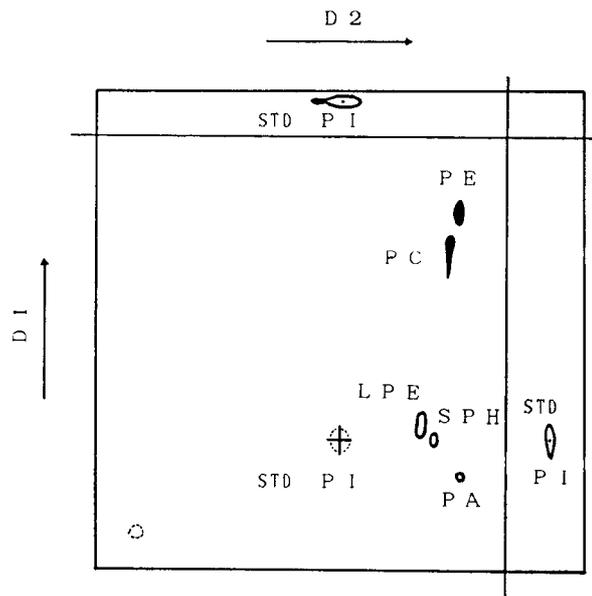


図8 パン酵母AH22株のリン脂質のTLC分析の例

5.2 リポソームを用いたステロイド基質の埋胞

リポソームは脂質人工膜の一種である。機械的な振動により作製されるリポソームは脂質膜が同心円上の多重構造(MLV)となり、これに超音波処理などを施すと単一膜構造のリポソーム(SLV)が得られる。

先の酵母脂質の分析結果を踏まえた上で、次のようにしてリポソームを作製した。PC(鶏卵)100mg, PE1mg, エストラジオール40mgをクロロホルム：メタノール(2：1)5mlに溶解し250mlのナスフラスコに加える。ロータリーエバポレータで30℃に保ちながら乾固し、0.5gのガラスビーズと5mlの緩衝液(10mMTris・HCl(pH7.5), 0.1mMDTT, 0.65Mソルビトール)を加え、フィルター(ミリポアFG50)を通した窒素ガス雰囲気下、回転攪はんさせる。30分後、リポソームに埋胞されたエストラジオール懸濁溶液を得ることができた。ここで得られたリポソームはMLVである。この実験よりエストラジオール濃度は8mg/mlとなり基質濃度は約2000倍も高めることが出来た。(ステロイドの溶解性の例として水溶液100mlに含まれる飽和量は

17 α -エストラジオールの場合0.39mg, エストロンの場合0.08mgである。)

5.3 確率的な膜融合による反応の場の再構成

このようにして調製したリポソームを用いエストラジオールに対するマイクロソームP-450dの活性について調べてみた。(図9)

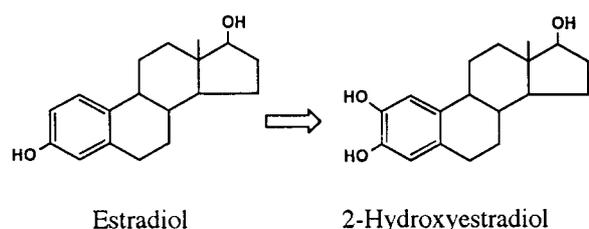


図9 チトクロームP450dによるエストラジオールの水酸化

共栓付きの試験管に調製したマイクロソーム画分溶液5mlと0.5MTris・HCl(pH7.4)を200 μ l, リポソーム埋胞エストラジオール懸濁液を100 μ l, そしてNADPHを5mg加え, 最後に蒸留水で全量を10mlとし, ガラスビーズを適量に加えてよくハンドシェイクする。室温に1~4時間放置後, サンプルングした9mlに100%(W/V)TCA (SIGMA, USA)を1ml加え反応を停止する。その後2mlのジクロロメタンで2回抽出し, HPLCで生成物を分析する。分析条件はカラム TOSO ODS-80TM→YMC 312A(ODS-120)の2段連結カラム, 溶離液 アセトニトリル:蒸留水:酢酸=50:50:1, 流速 0.7ml/min, 検出UV240nm。この結果, 図10に示すように2-ヒドロキエストラジオールと同じ位置にピークが検出された。

6. 酸化還元酵素をどのように手にいれるのか

チトクロームP-450sccとP-450dはP-450ファミリーの中の一つであるが, P-450dはマイクロソーム型であるのに対してP-450sccはミトコンドリア型である点が大きく異なる。P-450sccがコレステロールの側鎖切断反応をおこなうためには, 電子伝達系としてNADPHアドレノドキシン還元酵素-アドレノドキシン系が必要であるのに対し, ここで用いているP-450dは, ラットの肝臓由来のP-450d遺伝子を酸性フォスファターゼプロモーターを有するベクターpAM82に組み込み, パン酵母

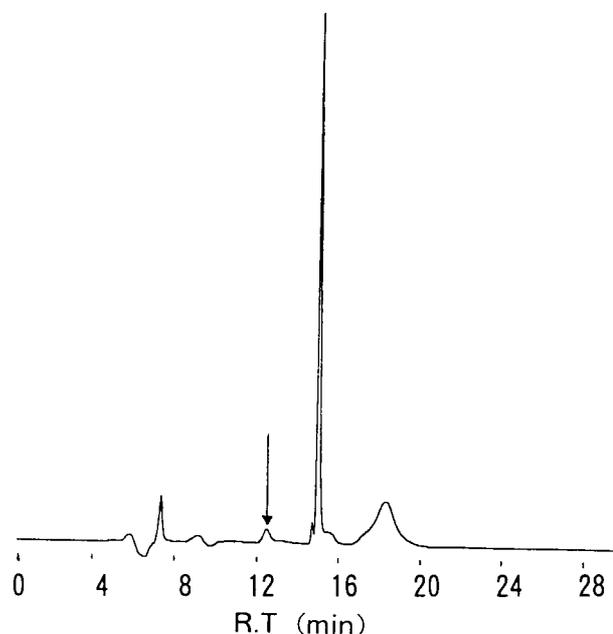


図10 リポソームエストラジオールを基質としたチトクロームP-450dの生成物の分析
中央のピークはエストラジオール
手前→で示したピークは生成物とみられるピーク

(*S. Serevisiae*) AH22株での発現を確立した系であり, マイクロソーム画分として分画した成分には基本的にNADPHを補うだけで活性を示す。

このP-450sccの特徴である酸化還元系をどのように提供するかという問題は実用化に向けての大きな課題となる。実験室レベルでは須原らが単離抽出に成功して¹²⁾その精製品を用いているが, 最近は同一遺伝子上に組み込んで融合酵素とし発現系を作製した例¹³⁾が報告されている。なお, この反応系に必要なNADPHは次にあげるような系で再生できる。ひとつは80mM グルコース-6-リン酸, 10units/ml グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ, 8mM NADPHであり, もう一つは7.5mM DL-イソクエン酸Na, 0.5unit/ml イソクエン酸デヒドロゲナーゼ, 5mM MgSO₄, 0.5mM NADPHである。しかし, 電子伝達系が関係するので反応系は複雑となる。

7. 採算性からみる今後の目標と課題

遺伝子組換えチトクロームP-450を用いたステロイドホルモンの製造について, 問題点と今後の指針を検討するために, コストの試算を行った。基本的な生産フローは培養, 抽出, 分画, 酵素固定化, ステロイド原料加工, 反応, 分離, 抽出である。モデルケースとして次のような仕様を前提とした。

- (1) ステロイドの生産システムとしてP-450は遺伝子組換え技術で形質転換した酵母により生産

できるものとし、抽出された酵素は固定化した状態で250時間の寿命が保証され、基質となるステロイドは リポソームの場で反応するものとした。NADPHは再生しないものとし、反応形式はマイクロソーム型とした。基本的にはバッチ生産であるとする。

(2) コスト計算にあたっては原材料費と光熱費を中心に計算し、人件費や減価償却費を含まないこと。

さらにモデル試算の具体的な技術条件として、培養時間は前培養が90時間、本培養が48時間とすること。前培養にはジャーファーメンターを使用すること。固定化できる酵素溶液は培養6ℓあたり200nmol生産でき、酵素溶液の活性は0.6 nmol/min/nmolP-450であること。固定化担体はCNBr-アガースを使用し全ての酵素が固定化できること。基質濃度は8mg/mlとして反応に投与できたとすること。以上の条件を設定した。

表2 ステロイド粗製品生産工程別コスト見積一覧

生産工程	概算原料コスト
培養	347.18円/ℓ
抽出	25.23円/ℓ
分画	21.74円/ℓ
酵素固定化	1859.64円/回
反応	9216.24円/基質1mmol
ステロイド原料加工	4416.73円/基質1g
分離抽出	96.00円
ステロイド粗製品コスト	34287円/g/6ℓ

7.1 結論

それぞれの工程においてかかる計算コストは表2に示した。最大生産可能なステロイドは6ℓスケールにおいて0.6nmol/min/nmol×200nmol×60×250h=1.8mmol(cholesterolにして0.7g:MW387)であるので、結局1gのプレグレノロンを生産するのにかかるコストは3.4万円程度(計算:(347.18+25.23+21.74)×6+1859.64+9216.24×1.8+4416.73×0.7+96.0=24001.48, 24001.48/0.7=34287.83円/g)と見積られた。一方、固定化酵素寿命を2500時間、活性を組換え技術で10倍に改善した場合の生産コストは1gあたり1万円程度となる。((347.18+25.23+21.74)×6+1859.64+9216.24×180+4416.73×180×387/1000+96.0=1970913.15, 1970913.15/180=10949.52円/g) このことは、酵素の寿命がコスト

に影響することを示している。しかし、他の要因のコストに占める割合は研究の進めるべき方向を提供する興味ある事例となっていることがわかる。

(1) NADPHを安価に手に入れること。

基本的にコストの占有率が高いのはNADPHであり、69.1%を占めている。酵素を改善してコストダウンを図ると占有率は84.2%に増加する。こちらが問題として大きいかもしれないが再生系の使用により見積が変わる。

(2) リポソームを用いない安価な反応系を捜すこと。

酵素を改善した分だけ培養、抽出、分画のコストが9.9%から0.1%に減少するのに対して、リポソームのコスト占有率が12.9%から15.6%に上昇する。

(3) 必要な還元酵素を安価に手に入れること。

これはマイクロソーム型ではなくミトコンドリア型を用いた場合避けられない大きな課題となる。

7.2 コスト計算の基本資料

[培養]前培養培地: 1.5ℓ×48.5円=72.7円, 電力: 0.5kw×90h×21円=945.0円, 滅菌: 15min/60×2kw×21円=10.5円, 本培養培地: 2ℓ×3本で96.128×3=288.4円, 電力: 0.75kw×48h×21円=756.0円, 滅菌: 15min/60×2kw×21円=10.5円, 小計2083.10円(347.18円/ℓ)

[抽出]破碎: 0.946kw×2/60×21=0.662円, ビーズ: 5360円/kg×20g=107.2円, 遠心分離: 6kw×20/60×21円=42円, 緩衝液: 76.6円/ℓ×20ml=1.532円, 小計151.39円(25.23円/ℓ)

[分画]分画用0.6Mショ糖液: 5ml×4本×448.08円/ℓ=8.96円, 分画用1.3Mショ糖液: 10ml×4本×675.51円/ℓ=27.02円, 遠心分離: 6kw×21円×1.5h×0.5=94.5円, 小計130.48円(21.74円/ℓ)

[酵素固定化]乾燥担体1gは体積3.5mlとなる25mg/ml×3.5ml=87.5mgの固定化能力があり乾燥担体1gあれば培養液6ℓの抽出液固定化は十分で1,848円×1g=1,848円, 酢酸緩衝液: 52.79円/ℓ×30ml=1.58円, トリス緩衝液: 318.78円/ℓ×30ml=9.56円, 炭酸水素溶液: 50.22円/ℓ×10ml=0.50円, 小計1859.64円, 0.1M 酢酸緩衝液 17.69円 0.5M NaCl 35.10円/ℓ 小計 52.79円/ℓ, 0.1M TrisHCl 283.68円/ℓ 0.5M NaCl 35.10円/ℓ

小計 318.78円/ℓ 0.1M NaHCO₃ 15.12円/ℓ 0.5M NaCl 35.10円/ℓ 小計 50.22円/ℓ

[反応]0.5mM NADPH: 4592.40円/ℓ, 5mM MgCl₂: 1.42円/ℓ, 50mM 緩衝液14.30円/ℓ, 小計 4608.12円 (9216.24円/mmol)

[ステロイド原料加工]PC: 288円/g×100mg/8mg=3.6円/mg, PE: 680円/g×1mg/8mg=0.085円/mg, クロメタ混液: 3350円/3ℓ×5mℓ/8mg=0.698円/mg, 3685円/g+698円/g=4383円/g基質 10mM TrisHCl 28.368円/ℓ, 0.1mM DDT 28.370円/ℓ, 0.65M Sorbitol 213.137円/ℓ 小計269.875円/ℓ, 8mg/mlから基質1gに対して 33.73円/g (合計4416.73円/g基質)

[抽出]ジクロロメタンにて液々分配抽出, 30mℓあ

れば充分。30mℓエタノールと水混合液で低温晶析とする。36円+60円=96円, 小計96円/回

[価格明細]高リン酸バークホルダー培地 48.50円/ℓ 低リン酸バークホルダー培地 48.06円/ℓ TrisHCl 500g 9000円 saccharose 10kg 9500円 CsCl 1kg 80000円 NaHCO₃ 500g 950円 NaCl 500g 600円 CNBr-agar 250g 462000円 CH₃COONa・3H₂O 500g 650円 NADPH Na salt 1g 12000円 MgCl₂ 500g 700円 KH₂CO₃ 500g 950円 K₂HCO₃ 500g900円 CHCl₃ 3ℓ 3950円 Methanol 3ℓ 2150円 CH₂Cl₂ 3ℓ 3600円 Ethanol 3ℓ 6000円 PC 25g 7200円 PE 25g 17000円 DTT 25g 46000円 sorbitol 500g 900円 電力1kwh 21円

表3 P-450の工業利用のための問題点と解決策

課題	従来の実験レベル	有力な実用化技術	技術転換のめど
培養	振とう培養	ジャーファーマンター	○
抽出	界面活性剤 カラムクロマト	ガラスビーズ破砕法 シヨ糖密度勾配法	○
反応	ハイドロキシ コレステロール	コレステロール 膜融合法	△
電子伝達系	再構成法	宿主由来	X
プラント	-----	固定化酵素法	X

X: 未知

8. ま と め

医薬品としてのステロイドホルモンの生産や利用法についての調査の結果, 副腎皮質ホルモン, 黄体ホルモン, 男性ホルモン, そして女性ホルモンに至る一連の各種ステロイドホルモン原料の簡易で安価, なおかつ総合的な生産体制を確立することが求められていることはまちがいない。一方, エイズの影響から避妊薬としてのステロイドホルモンの需要は大きく見込めない可能性もある。本研究では, そうした背景のもとチトクロームP-450遺伝子の組換え技術や有用微生物の大量培養技術を利用したステロイドホルモン等の医薬品素材生産技術の開発を目標として行ってきた。その結果は次の表3に示すようにまとめられると考えられる。まだまだ検討すべき課題が多いとい

うのが率直な気持ちである。ただし, 困難な中でも今後の研究の方向としてどんな課題に取り組むべきか多くのヒントを与える研究であったことは特筆すべきことと思っている。なかでもタンパク質の設計技術から遺伝子に工夫をして要求される仕様の酵素を生産する技術開発は間違いなくよい結果をもたらすだろうと考えられた。

謝 辞

チトクロームP-450dの発現酵母AH22株を提供してくださいました東北大学反応化学研究所の清水透助教授および東北大学理学部藤井義明教授に感謝申し上げます。

参考文献

- 1) 武森重樹, 小南思郎; チトクロームP-450 (東京大学出版会), (1990).
- 2) 今田幸男, 石川八郎, 西川大吉郎; 農化, 55, 8 (1981), P713
- 3) 中村啓子, 大江田憲治, 村上裕子, 大川秀郎; 生化学, 56, (1984), P1093.
- 4) K. Oeda, T. Sakaki and H. Ohkawa; DNA, 4, (1984), P203.
- 5) T. Shimizu, K. Sogawa, Y. Fujii-Kuriyama, M. Takahashi, Y. Ogoma, and M. Hatano; FEBS Lett., 207, 2(1986), P217.
- 6) 大川秀郎ら; 第61回日本生化学会大会抄録(於東京), (1988), P931.
- 7) A. Wada, P. A. Mathew, H. J. Barnes, D. Sanders, R. W. Estabrook and M. R. Waterman; Arch. Biochem. Biophys., 290, 2(1991), P376.
- 8) 合葉修一, A. ハンフリー, N. ミス; 生物化学工学第2版 (東京大学出版会), (1976), P139.
- 9) 毛利秀雄, 香川靖雄編; 実験生物学講座. 第6巻細胞分画法 (丸善), (1984), P52.
- 10) 青木央, 宮崎俊一, 澤谷拓治; 北海道立工業技術センター研究報告, 第二号(1992), P75.
- 11) 福井三郎; バイオリアクター (講談社), (1985), P13.
- 12) K. Suhara, S. Takemori, and M. Katagiri; Biochem. Biophys. Acta, 263, (1972), P272.
- 13) 大川秀郎, 薮崎義康; 「遺伝子組換えを駆使した蛋白質デザイン」(高分子学会バイオ・高分子研究会編, 学会出版センター), (1987), P71.