

ヒビ マコト
日比 慎

共同研究者

高橋 里美
(京都大学大学院農学研究科
産業微生物学講座 客員教授)

略 歴

平成 9年 3月 北海道大学理学部 卒業
平成11年 3月 北海道大学大学院
理学研究科生物学専攻
修士課程 修了
平成14年 9月 北海道大学大学院
理学研究科生物学専攻
博士後期課程単位取得退学
平成15年 4月 JBA 協和発酵分室
博士研究員
平成18年 4月 京都大学大学院
農学研究科産業微生物学講座
特定助教
平成28年 5月 京都大学大学院
農学研究科産業微生物学講座
特定准教授
平成29年 4月 富山県立大学
工学部生物工学科 准教授
現在に至る

植物に由来する希少含硫アミノ酸の酵素的生産法開発と 新規ファイトケミカルへの応用検討

近年食用植物に含まれる生理活性分子、すなわちファイトケミカルの同定と利用が進んでいる。植物に広く存在するファイトケミカルの一つとして、含硫アミノ酸であるS-アルキルシステインスルフォキシド(SACS)が知られている。例えばんにく中に多く含まれる(+)-アリイン(S-アリル体のSACS)は、多彩な機能性を持つことが相次いで報告されている。また植物体内には(+)-アリイン以外にも様々なS-アルキル鎖を持つSACSやその誘導体が多数存在しているが、これらは植物体内における含有量が微量であるため、ファイトケミカルとしての機能性が十分に評価されてこなかった。一方でこうした植物由来有機硫黄化合物はその食経験から安全性が保証されており、新規なファイトケミカル分子として魅力的な化合物である。

既に(+)-アリインなどの機能性を活用した商品が数多く販売されているが、原材料として植物体もしくはその抽出液を用いており、含有量の低さに起因する高生産コストや低純度、生産量の変動リスクなどが問題となる。植物体内におけるSACSの生合成経路は未だ解明されておらず、特定のSACSの生産量を増大させた組換え植物を作出することはできていない。またSACS分子は不斉点を含む光学活性化合物であるため、化学合成法を用いた効率的な生産は困難である。これに対して酵素法では、酵素触媒の持つ高度な立体選択性を活かすことで、光学活性SACSを選択的に生産可能となる。また酵素法を利用したバイオプロセスで生産されたSACSは安全面においても信頼性が高く、そのまま食品や医薬品などの分野へ適用できる。

本研究では、まずバイオプロセスによる (+) -アリンの効率的な生産法の開発を実施した。このバイオプロセスでは2種類の酵素触媒、S-アルキルシステイン合成酵素とスルフォキシド化酵素をタンデムに組み合わせる。スルフォキシド化酵素に関してはこれまでの研究において、*Bacillus thuringiensis* 由来のオキシゲナーゼ (IDO) がS-アルキルシステインと反応し、(+)-アリンを立体選択的に生成することを明らかにしている。そこで本バイオプロセスに利用可能なS-アルキルシステイン合成酵素を微生物スクリーニングにより探索した。この結果、*Escherichia coli* の保持するS-アルキルシステイン合成活性を持つ酵素を単離精製し、tryptophanase (TnaA) であると同定した。TnaA はアミノ酸の α, β -脱離反応を触媒する酵素として知られているが、本研究で初めて逆反応である合成反応を触媒しうることが示された。そこでIDOとTnaAを共発現する組換え菌体を生体触媒として用いたバイオプロセスを構築し、ピルビン酸、アンモニア、 α -ケトグルタル酸、アリルチオールを基質の用いた反応の最適化を行ったところ、最大で17.5mMの(+)-アリンを高光学純度で得ることに成功した。本バイオプロセスに特徴的な利点としては、安価で光学活性を含まない基質から2つの不斉点を持つ光学活性化合物を一気に生産できる事、また可逆的なS-アルキルシステイン合成反応を不可逆なスルフォキシド化反応で引っ張ることで全体としてSACSの合成側へと全体の反応を進行できる事、が挙げられる。本成果は、(+)-アリンの安全かつクリーンな効率的な生産法を開発できた初めてのケースであり、さらに実用化に向けた検討を行っている。

研究の背景

にんにくやキャベツに代表されるネギ属やアブラナ属の食用植物は、人類の有史以前から栽培されており、その長期間の食経験から、多岐にわたる健康上有用な生理活性を持つことが認識されてきた。近年、これらの植物体内に含まれる様々な有機硫黄化合物が生理活性機能を発揮する植物由来分子 (ファイトケミカル) であることが明らかになり、大きな脚光を浴びている。こうした有機硫黄化合物として、含硫アミノ酸であるS-アルキルシステインスルフォキシド (SACS) が知られている (図1)。例えばにんにく中に多く含まれる (+)-アリン (S-アリル体のSACS) は、抗糖尿病・抗高コレステロール血症・抗酸化・免疫調節作用など多彩な機能性を持ち、機能性食品や飼料添加物として広く利用されている。

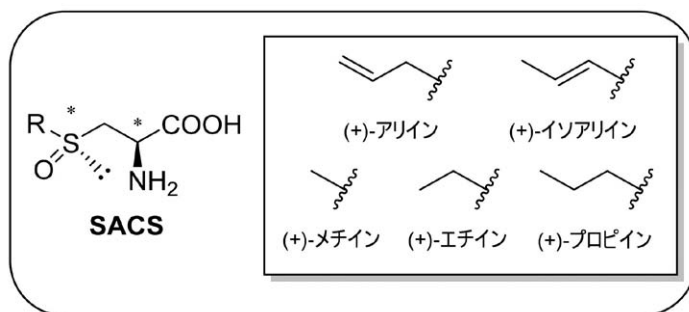


図1. SACSの化学構造

国内外においてSACSの機能性を活用した商品がサプリメントや健康補助食品などとして数多く販売されているが、これらは全て原材料として植物体もしくはその抽出液を用いているため、含有量の低さに起因する高い生産コストや低い純度、また天候や季節に左右される植物体の収穫量の変動リスク、などが問題である。さらに(+)-アリンの場合には、加工の過程で植物内在性のアリナーゼが接触することで容易に分解されてしまい、機能性を期待できる量を十分摂取することが難しい。さらにアリナーゼ反応の結果として生じるアリンなどの揮発性含硫化合物が悪臭の原因になる。以上の事から本研究の成果として得られるアリナーゼフリーの(+)-アリンは機能性素材として需要が大きいといえる。

(+)-アリン以外にも様々な有機硫黄化合物が植物体内から見出されているが、その含有量はごく微量であるため、ファイトケミカルとしての機能性が十分に評価されてこなかった。一方で、こうした微量有機硫黄化合物は豊富な食経験から安全性が保証されており、新規なファイトケミカルとして魅力的な化合物である。ファイトケミカルの機能解析を推進するには、効率的かつ安定的な供給法が必須であり、大量供給の達成が学術的・工業的に律速となっていた課題を解消しうものとなる。

SACSには2位の炭素原子(C)と硫黄原子(S)の2個の不斉点が存在しており、4種のジアステレオマー構造($S_C S_S$, $S_C R_S$, $R_C S_S$, $R_C R_S$)を取り得る。天然に存在するものは($R_C S_S$)-体のみであり、生合成において立体構造が厳密に制御されている。これまで植物体内におけるSACSの生合成経路に関する研究がなされており、グルタチオンを原料として生成すると想定されているが、その詳細な生合成経路や関連する生合成酵素に関しては殆ど未解明である。このため、特定のSACSの生産量を増大させた組換え植物を作出することは現状では困難な状況である。また化学合成法を用いて($R_C S_S$)-SACS分子だけを選択的に生成する研究は報告されているが、高価な触媒を必要とし、またキラル原料の使用もしくは光学分割処理などが必須となり、低コストで効率的な生産を行うことが困難である。また反応時に使用する重金属や有機溶媒などの製品への持ち込みが懸念され、食品や医薬品として利用する上での障壁となる。

我々はこれまでの基礎的な検討において、L-イソロイシン水酸化酵素(IDO)の酵素化学的な諸性質を解析し、本酵素が含硫アミノ酸のキラルスルフォキシド化反応を触媒することを明らかにした。含硫アミノ酸としてS-アシルシステインを用いた場合、(+)-アリンを選択的に生成することが可能である。そこで、我々はIDOなどの酵素触媒の持つ高度な立体選択性を活かすことで、(+)-アリンが選択的に生産可能となると着想した。酵素触媒を用いたバイオプロセスで生産されたSACSは安全面においても信頼性が高く、そのまま食品や医薬品などの分野へ適用できる利点もある。さらに、微生物におけるSACSの代謝変換は初の試みであるため、学術的に新たな知見を与え、植物代謝系には無いユニークな化合物への波及も期待できる。

研究結果

(1) (+)-アリン生産バイオプロセスのための基盤技術確立

本研究では、まずピルビン酸ナトリウム、硫酸アンモニウム、アシルチオールからS-アシルシステインを合成する活性を指標にした微生物スクリーニングを実施した。この結果、*Enterobacter aerogenes*、*Escherichia coli*、*Citrobacter freundii*をS-アシルシステイン合成活性保持菌株として見出した。

次に、これらの菌株よりS-アリルシステイン合成酵素の同定を進めたところ、これまでに*Enterobacter aerogenes* から cysteine desulfhydrase (CD) を、そして *Escherichia coli* から tryptophanase (TnaA) をそれぞれ取得することができた。これらのアミノ酸リアーゼ (CDと TnaA) をそれぞれ発現する組換え大腸菌株の構築を行い、両者とも活性型酵素として大量に発現させることに成功した。以上で得られた組換え大腸菌株を生体触媒とした (+) -アリン生産系の確立を目指した。

まず各生体触媒をタンデムに組み合わせた (+) -アリン生産バイオプロセスのための基盤技術確立を行った (図2)。このバイオプロセスは、① 安価な化合物からS-アリルシステインを合成する過程、② S-アリルシステインをスルフォキシド化して (+) -アリンに変換する過程、より構成されている。①の過程を触媒する酵素としては、上記で得られた2種類のアミノ酸リアーゼ、*E. aerogenes* 由来の CD、または *E. coli* 由来の TnaA を利用する。すなわち CD や TnaA の作用により、まずピルビン酸ナトリウム、硫酸アンモニウム、アリルチオールからS-アリルシステインが合成される。次に②の過程を触媒する酵素としては、*Bacillus thuringiensis* 由来の IDO を利用する。IDO は α -ケトグルタル酸依存的にS-アリルシステインを (+) -アリンに変換する。当該プロセスの特長は、安価で光学活性を持たない基質から2つの不斉点を持つ光学活性化化合物を一気に生産できる事、また可逆的なS-アリルシステイン合成反応①を不可逆なスルフォキシド化反応②で制御することで反応平衡を (+) -アリンの合成側へ誘導する事である。CD または TnaA を発現させた大腸菌と、IDO を発現させた大腸菌を菌体触媒として組み合わせ、反応条件 (pH、温度、触媒、基質濃度など) の最適化を行うことで、12.5mM (2.1g/L) の (+) -アリンを高光学純度で生成することに成功している。本成果は (+) -アリンの効率的生産法を確立した初のケースである。

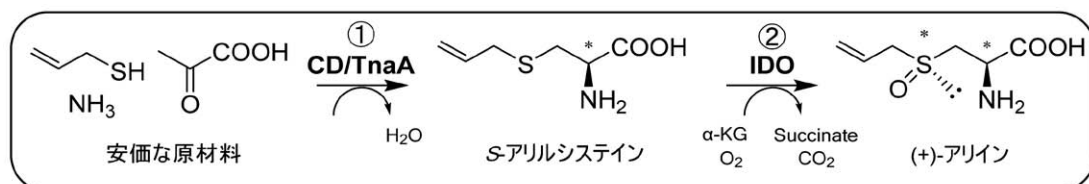


図2. (+) -アリン生産バイオプロセス

これまでにS-アルキルシステイン合成活性を持つ別種の酵素として、cysteine synthase や S-carboxymethylcysteine synthase などが報告されている。しかし、それぞれO-アセチルセリンや β -クロロアラニンなどの特殊で高価な基質を必要とするため、バイオプロセスのための触媒としては適していない。またアミノ酸リアーゼの逆反応を単独で利用したS-アルキルシステイン合成例は報告されているが、加水分解との競合のため収率は著しく低い。本研究では不可逆なスルフォキシド反応を共役させることでこの問題を解消している。またスルフォキシド化活性を持つ酵素に関しての報告も数例あるが、比活性や選択性など触媒機能の性能面において本研究で用いる IDO に優る酵素は知られていない。

(2) (+) -アリン生産バイオプロセスの高効率化

以上で構築できた (+) -アリン生産バイオプロセスを高効率化させるため、さらになる検討を進めた。まず CD と TnaA の詳細な機能解析を実施した結果、CD は (+) -アリンの分解活性も併せ持つことが明らかになったため、以降は TnaA を S-アルキルシステイン合成酵素触媒として使用することにした。

前述のバイオプロセスでは TnaA と IDO を個別に発現させた大腸菌を菌体触媒として使用していた。TnaA 反応 ① で生じた S-アルキルシステインを速やかに IDO 反応 ② で (+) -アリンに変換するためには、両酵素を同一の菌体内で協働させた方が触媒効率は高くなると考えた。そこで、TnaA-IDO 共発現大腸菌を作成し、菌体触媒として使用し、(+)-アリン生産収率の向上効果を検証した。この結果、TnaA-IDO 共発現大腸菌内で連続的な 2 種類の酵素反応を行った場合、1 日で 17.5mM (3g/L) の (+) -アリンを生産することができた (図 2)。今後はバイオプロセスを高度化することで、工業生産に向けた指標となる 10g/L の (+) -アリン生産を目指す。

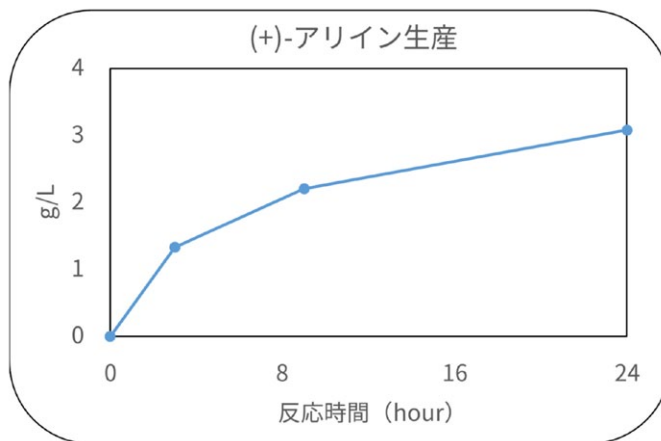


図 2. バイオプロセスによる (+) -アリンの効率的な生産

(3) 希少な SACS 分子種生産への拡張

(+) -アリン以外にも様々な S-アルキル鎖を持つ SACS が植物体内から多数見出されている。本研究で構築した (+) -アリン生産バイオプロセスにおいて、アリルチオール代わりに様々なチオールを使用することで、(+)-アリン以外の様々な希少 SACS 分子種の生産ができると考えた。

各過程を担う酵素触媒の反応性が重要であるため、まず TnaA による合成反応における各チオールに対する基質特異性、そして IDO によるスルフォキシド化反応における各 S-アルキルシステインに対する基質特異性を解析した (図 3)。TnaA はアリルチオールの他に、メタンチオール、エタンチオールを基質として受容し、それぞれ S-メチルシステイン、S-エチルシステインを生成する事を明らかにした。また IDO は S-アリルシステインの他に、S-メチルシステイン、S-エチルシステインと反応し、それぞれ (+)-メチン、(+)-エチンを生成する事を確認できた。この結果より、TnaA-IDO タンDEM 酵素反応による (+)-メチンと (+)-エチンのバイオプロセスの構築が可能であると考えられた。そこでピルビン酸ナトリウム、硫酸アンモニウム、 α -ケトグルタル酸、メタンチオールまたはエタンチオールを原料として、TnaA-IDO 共発現大腸菌を触媒に用いた反応を行った。しかし予想に反して、

生成物である (+) -メチンと (+) -エチンはごく微量しか生成されなかった。TnaA による合成反応の pH は 8.5 付近が最適であるのに対して、IDO の至適 pH は 6.0 付近である。現在この違いが生成量の低さの原因であると考えており、今後アルカリ性に至適を持つスルフォキシド化酵素の取得を新たに目指していく。

原材料	TnaA	IDO	TnaA/IDO
<chem>NC(=O)C=C</chem>	○	○	○
<chem>CCS</chem>	○	○	trace
<chem>CCCS</chem>	○	○	trace
<chem>CCCCS</chem>	×	-	×
<chem>CCCCCS</chem>	×	-	×
<chem>c1ccccc1CS</chem>	×	-	×

図3. バイオプロセスによる希少 SACS 分子種の生産検討

(4) 今後の展望

(+) -アリンは植物内で代謝され、多様な有機硫黄化合物に変換される (図4)。(+) -アリンからアリナーゼの作用により生成するアリシンには、強力な殺菌効果があり、機能的食品や感染症の

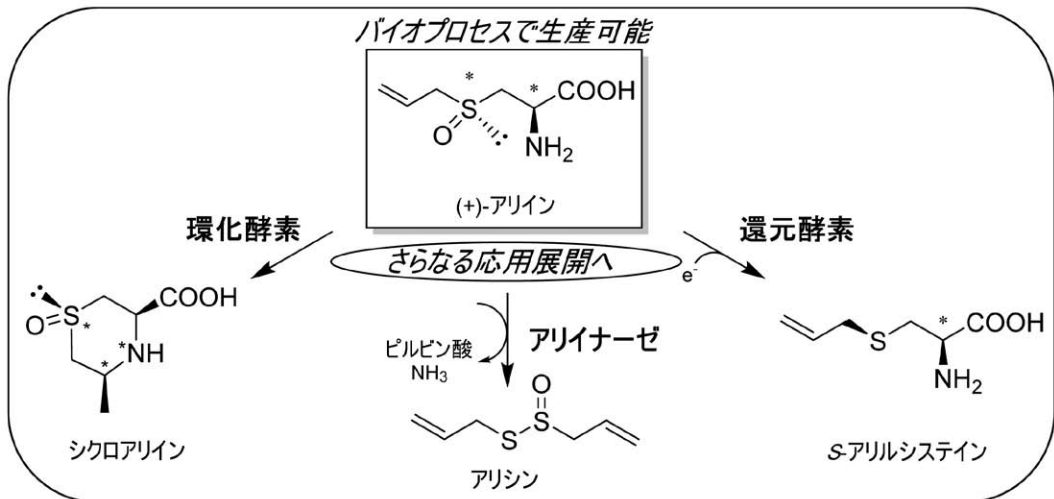


図4. (+) -アリンの代謝変換

治療薬としての開発が進んでいる。また (+) - アリインが分子内で環状化したシクロアリインは、血栓予防効果など (+) - アリインにはないユニークな生理活性を示す。シクロアリインの不斉点は3か所存在することから、(+)-アリインの環化には立体選択的な酵素反応が関与すると示唆されるが、これまでに植物の環化酵素は発見されていない。(+) - アリイン生産バイオプロセスの中間体である S- アリルシステインは、神経細胞保護作用が報告されており、アルツハイマー病の予防効果が期待されている。本研究の成果により生産可能とした (+) - アリインをさらに代謝酵素類で変換することで、これらの有用な分子種へと誘導する改良型バイオプロセスが可能となると考えられる。