

略 歴

1983年 3月	名古屋大学農学部農芸化学科 卒業
1985年 3月	名古屋大学農学研究科 修士課程 修了
1985年 4月	協和発酵工業(株) 入社
1994年 4月	富山県立大学工学部 助手
1995年 10月	富山県立大学工学部 助教授(准教授)
2010年 4月	北海道大学大学院工学研究院 教授
	現在に至る

天然抗酸化剤～エルゴチオネイン～の高効率微生物生産

これまでに当研究室で、遺伝子組換え大腸菌を用いた発酵生産が検討され、*M. smegmatis* 由来 *egtBCDE* 遺伝子を大腸菌で個々に高発現させることにより、83 μ M (19mg/L) の ERG 生産性を得ている。その際、HER が高蓄積したため EgtB が律速反応であり、その原因として γ GC 供給不足が示唆された。そこで、チオ硫酸を培地に添加することによる L-Cys 供給強化を試みた結果、ERG 生産を 104 μ M (24mg/L) まで増加させることに成功した。しかし、依然 HER の高蓄積が認められたため、より高活性の EgtB を探索した。その結果、Egt1 同様に L-Cys を基質とする新規 EgtB を原核微生物に見出し、本酵素の高発現により、ERG 高生産 (224mg/L) を達成した。

Ergothioneine (ERG) は含硫アミノ酸であり、ビタミン C やビタミン E よりも高い抗酸化作用を示すことが報告されている。ヒトは ERG 合成能を持たないが、ERG 特異的なトランスポーターである OCTN1 を持つことから、生命活動に重要な役割を果たすと考えられている。近年、ERG に抗炎症効果や美白効果が確認され、サプリメントや化粧品への利用が期待されている。しかし、現在の主な供給源であるキノコの含量は 1mg/g-dry weight と低く、また精製も困難であるため、30 万円/g と高価であり、効率的で安価な供給法が望まれている。

キノコ類の他、*Cyanobacterium* 属、*Methylobacterium* 属、*Mycobacterium* 属、*Streptomyces* 属細菌も ERG を生産することが報告されている。しかし ERG 生合成遺伝子を含め、その生合成経路の詳細は長らく不明であった。しかし、2010 年に *Mycobacterium smegmatis* より ERG 生合成遺伝子 *egtABCDE* が同定され、ERG 生合成経路が明らかにされた (図 1)。すなわち S-adenosylmethionine (SAM) 依存性 methyltransferase である EgtD による L-His の 3 段階のメチル化、生成した hercynine (HER) への EgtB による γ -glutamylcysteine の付加、生成した hercynyl- γ -glutamylcysteine sulfoxide (HER- γ GC) からの EgtC による L-Glu の脱離、最後に pyridoxal phosphate (PLP) 依存性 C-S lyase である EgtE による ERG の生成からなる。

また、2014年には *Schizosaccharomyces pombe* 及び *Neurospora crassa* より ERG 生合成遺伝子 *egt1*、2 が同定され、先に述べた経路とは異なる新たな生合成経路が明らかにされた。Egt1 は EgtB と EgtD の 2 つの酵素が触媒する反応を行う二機能性酵素である。更に、EgtB は硫黄源として γ GC を用いるのに対し、Egt1 は L-Cys を基質とする点で異なる。従って Egt1 は L-His から HER-Cys を直接生成する反応を触媒し、次いで EgtE オーソログである Egt2 により ERG が生合成される (図1)。

これまでに当研究室で、遺伝子組換え大腸菌を用いた発酵生産が検討され、*M. smegmatis* 由来 *egtBCDE* 遺伝子が大腸菌で個々に高発現させることにより、83 μ M (19mg/L) の ERG 生産性を得ている¹⁾。その際、HER が高蓄積したため EgtB が律速反応であり、その原因として γ GC 供給不足が示唆された。そこで、チオ硫酸を培地に添加することによる L-Cys 供給強化を試みた結果、ERG 生産を 104 μ M (24mg/L) まで増加させることに成功している¹⁾。しかし、依然 HER の高蓄積が認められたため、本研究では、より高活性の EgtB を探索した。その結果、原核微生物に L-Cys を基質とする新規 EgtB を見出し、本酵素の高発現により、ERG 高生産を達成した。

研究の背景

ヒトを含む動物は、ERG を含む有機性硫黄化合物を合成できないため、食事から摂取する必要がある。ERG 高含有食品としてシイタケ、マイタケ、タモギタケなどのキノコ類や、味噌、醤油、ヨーグルト、チーズなどの発酵食品が知られている。興味深いことに、ERG を合成できない米、大豆、小麦等の穀物や葉物野菜にも ERG は含まれている。その理由は、土壤に存在する ERG 生産微生物からの供給と、その吸収と蓄積のためと推定されている。したがって、ERG は生物種間を超えて食物連鎖的に濃縮される珍しい含硫化合物といえる。

ヒトの病気の多くは、その発症や病状進行過程で、体内での過酸化脂質生成が関与していると考えられている。したがって、ビタミン C、ビタミン E、L-Cys などの抗酸化作用が着目されているが、過酸化脂質生成の原因であるヒドロキシラジカルを直接消去できるのは ERG のみであり、その食事摂取により多様な疾患の予防や改善に効果があると考えられる。しかし、ERG の抗酸化機能や効果効能については未だ科学的根拠に乏しい。その一つの原因として、in vitro、in vivo 評価に必要な高純度の ERG が大量に得られないことが挙げられる。例えば、比較的含有の多いタモギだけでも 1mg/g-dry weight と絶対量が少なく大量調製は容易ではない。一方、筆者らは遺伝子組換え技術を活用した大腸菌を用いた発現系で 24mg/L を達成しているが、商業生産には不十分である。その一つの原因として、生合成中間体である HER の高蓄積が挙げられることから、本研究では、高活性 EgtB の探索、利用による ERG 高生産を目的とした。

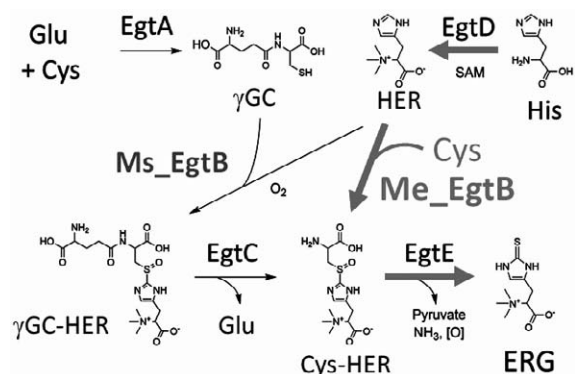


図 1 ERG 生合成経路

研究結果

(1) 新規EgtBの探索

より活性の高いEgtBを探索するため、*Mycobacterium* 由来EgtBのアミノ酸配列をクエリとしてBasic Local Alignment Search Tool (BLAST) 検索を行った。その結果、様々な細菌のゲノム中にEgtBと相同性を示すタンパク質を見出した。そこで購入可能な菌株よりゲノムDNAを調製後、*egtB* 遺伝子をPCRで増幅し、N末-His-tag融合発現ベクターにクローニング後、大腸菌で組換えタンパク質を発現、精製しin vitro解析に使用した。その結果、*Methylobacterium* 属細菌由来EgtBを用い γ GCを硫黄源に用いた場合、全く反応が進行しなかった。そこで、L-Cysを基質に用いた結果、反応が進行し、見出したEgtBは糸状菌タイプの新規EgtBであることが明らかとなった。また、 β -proteobacteria、 δ -proteobacteria、bacteroidetes属細菌に見出したEgtBについてもin vitroアッセイした結果、何れもL-Cysを基質に用いることがわかった。これらの相対活性を調べた結果、*Methylobacterium* 属由来EgtBが最も高い活性を示した。そこで本組換え酵素を用いて速度論解析を行った。その結果、Michaelis-Menten則を満たすことがわかり、Hanes-Woolf plotによりkinetic parameterを算出した。その結果、 K_m 値は 0.22 ± 0.03 mM、 k_{cat} 値は 46 ± 1.9 min⁻¹と算出された。これら値を他のEgtB (Egt1)と比較した結果、 γ GCを基質とする*Mycobacterium* 由来EgtBやL-Cysを基質とする*Microcystis* 由来EgtBと k_{cat} に大きな差はないものの K_m は高い値を示した(表1)。しかし、同じ2機能酵素である糸状菌由来*Neurospora* 由来Egt1よりは低い値を示した。

	K_m (Her) [mM]	K_m (γ GC or Cys) [mM]	k_{cat} [min ⁻¹]
<i>Mycobacterium</i> (actinobacterium)	0.043	0.079	72
<i>Microcystis</i> (cyanobacterium)	0.011	0.12	10.5
<i>Neurospora</i> (fungus)	0.44	0.60	136

表1 各微生物由来EgtB (Egt1)のkinetic parameters

(2) 新規EgtBを用いた発酵生産

最も高活性であった*Methylobacterium* 由来*egtB*を、以前当研究室で構築した*M. smegmatis* 由来*egtBCDE* 遺伝子発現カセット¹⁾の*egtB*と置換したプラスミドを構築後、大腸菌に導入しERG生産性を評価した。その結果、192時間で400mg/Lの生産性が得られ、*M. smegmatis* 由来*egtB*を用いた場合に比べ16倍に生産性が向上した²⁾。

(3) 今後の展望

Methylobacterium 由来*egtB*を用いて、ERG生産性の大幅な向上が見られたが、依然HERの高蓄積が認められることから、さらに高活性なEgtBが求められる。今回、多くの*egtB*相同遺伝子を見出したが、その一部しか評価していないことから、今後他の相同遺伝子を評価、利用することで、より高生産が期待できるかもしれない。

参考文献

- 1) R. Osawa, T. Kamide, Y. Satoh, Y. Kawano, I. Ohtsu, T. Dairi. Heterologous and high production of ergothioneine in *Escherichia coli*. *J. Agric. Food Chem.* **66**, 1191-1196 (2018). doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04924
- 2) T. Kamide, S. Takusagawa, N. Tanaka, Y. Ogasawara, Y. Kawano, I. Ohtsu, Y. Satoh, and T. Dairi. High Production of Ergothioneine in *Escherichia coli* Using the Sulfoxide Synthase from *Methylobacterium* Strains. *J. Agric. Food Chem.*, **68**, 6390-6394 (2020). doi: 10.1021/acs.jafc.0c01846.

実験方法

使用菌株

本研究で用いた菌株を以下に示す。プラスミド構築には *E. coli* XLI-Blue を用いた。タンパク質発現には *E. coli* BL21 (DE3) を用いた。

Strains	Description	Source
<i>E. coli</i> XLI-Blue	<i>hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, supE44, relA1, lac</i> [F', <i>proAB, lacI^qZΔM15, Tn10(Tc^R)</i>]	Nippon Gene
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F ⁻ , <i>ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm</i> (DE3)	Merck
<i>Methylobacterium brachiatum</i>	NBRC 103629	NBRC
<i>Methylobacterium pseudosasicola</i>	NBRC 105203	NBRC
<i>Labilithrix luteora</i>	NBRC 109946	NBRC
<i>Tenacibaculum maritimum</i>	NBRC 110778	NBRC
<i>Aquabacterium olei</i>	NBRC 110486	NBRC

使用したプラスミドの構築

M. brachiatum 由来 ERG 生合成遺伝子 *egtB* 発現プラスミドの構築

M. brachiatum のゲノム DNA および N-末に *Nde*I サイトと C-末に *Hind* III サイトを人工的に付加したプライマーを用いて *egtB* を増幅し、pQE1a の *Nde*I/*Hind* III サイトにクローニングした。

M. pseudosasicala 由来 ERG 生合成遺伝子 *egtB* 発現プラスミドの構築

M. pseudosasicola のゲノム DNA および *N*-末に *Nde*I サイトと *C*-末に *Hind*III サイトを人工的に付加したプライマーを用いて *egtB* を増幅し、pQE1a の *Nde*I/*Hind*III サイトにクローニングした。

L. luteora 由来 ERG 生合成遺伝子 *egtB* 発現プラスミドの構築

L. luteora のゲノム DNA および *N*-末に *Nde*I サイトと *C*-末に *Bam*HI サイトを人工的に付加したプライマーを用いて *egtB* を増幅し、pQE1a の *Nde*I/*Bam*HI サイトにクローニングした。

T. maritimum 由来 ERG 生合成遺伝子 *egtB* 発現プラスミドの構築

T. maritimum のゲノム DNA および *N*-末に *Nde*I サイトと *C*-末に *Bam*HI サイトを人工的に付加したプライマーを用いて *egtB* を増幅し、pQE1a の *Nde*I/*Bam*HI サイトにクローニングした。

A. olei 由来 ERG 生合成遺伝子 *egtB* 発現プラスミドの構築

A. olei のゲノム DNA および *N*-末に *Nde*I サイトと *C*-末に *Bam*HI サイトを人工的に付加したプライマーを用いて *egtB* を増幅し、pQE1a の *Nde*I/*Bam*HI サイトにクローニングした。

組換えタンパク質の発現、精製、kinetic 解析

pQE プラスミドのサブライヤーのプロトコールに従って、組換え酵素を発現・精製した。次いで以下の条件で *in vitro* 反応を行った。

反応液組成 (Her 基質)

HEPES	100 mM
NaCl	100 mM
TCEP	2 mM
Ascorbate	2 mM
HER	0.1~2 mM
L-Cys	0.5 mM
EgtB	0.5 μ M
Total 100 μ L	

Table 3-9 反応液組成 (L-Cys 基質)

HEPES	100 mM
NaCl	100 mM
TCEP	2 mM
Ascorbate	2 mM
HER	0.5 mM
L-Cys	0.05~0.5 mM
EgtB	0.5 μ M
Total 100 μ L	

分析条件

HPLCを用いて反応産物を分析した。分析条件は、参考文献¹⁾に記載と同様の方法で行った。

ERG発酵生産

大腸菌を宿主に用いたERGの発酵生産は参考文献¹⁾に記載と同様の方法で行った。