

令和元年6月12日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19237

研究課題名(和文)細胞内コンビナトリアル・エンザイモロジーによるイノシトール異性体の生産

研究課題名(英文)Production of inositol isomers by intracellular combinatorial enzymology

研究代表者

吉田 健一(Yoshida, Ken-ichi)

神戸大学・科学技術イノベーション研究科・教授

研究者番号：20230732

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：複数のイノシトール代謝酵素を組み合わせる枯草菌細胞内コンビナトリアル・エンザイモロジーを実施し、初年度に2種類のイノシトール脱水素酵素を組み合わせる15通りのコンビナトリアル株を揃えた。そして2年度目に、上記の15株それぞれに枯草菌と *G. kaustophilus* に由来するイノソース異性化酵素を加えて30株の追加菌株を揃えた。その結果、SIおよびDCIへの変換が複数の菌株において観察された。他の異性体の生産は見られなかったため、現在も引き続き *G. kaustophilus* に由来する酵素の活性が顕在化する高温、SIやDCIを基質に用いた場合に、他の異性体が生産される可能性を検討している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

微生物細胞内で性質の異なる複数のアイソザイムを組み合わせるコンビナトリアル・エンザイモロジーの着想自体に前例のない斬新さがある。イノシトールの異性体は多くが希少で高価であるが、本研究の成果如何によっては安価にそれらが生産でき、それらが将来的に“希少”ではなくなる可能性がある。このようにして“希少”なイノシトール異性体の生産が可能になれば、それらに秘められた機能や用途の開発が可能となる。特に、希少イノシトールには特異な生理活性が認められるものがあり(例えばSIはアルツハイマー病、DCIは糖尿病への適応がある)、この観点から新たな生理活性分子が発見される波及効果が見込まれる。

研究成果の概要(英文)：We conducted an intracellular combinatorial enzymology in *Bacillus subtilis* involving multiple inositol metabolic enzymes, and in the first year, we prepared 15 combinatorial strains that combine two inositol dehydrogenases. Then, in the second year, 30 additional strains were prepared by adding inosorase enzymes derived from *Bacillus subtilis* and *G. kaustophilus* into each of the 15 strains described above. As the results, conversion of myo-inositol into scyllo-inositol and D-chiro-inositol was observed in some strains. Since the production of other inositol stereoisomers was not observed, we are currently testing other conditions using SI or DCI as a substrate as well as at higher temperatures at which the activity of the enzyme derived from *G. kaustophilus* is enhanced.

研究分野：応用微生物学

キーワード：イノシトール 枯草菌 *Geobacillus kaustophilus* combinatorial enzymology metabolic engineering synthetic biology

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

イノシトールとはシクロヘキサンの6つの炭素原子それぞれに水酸基が結合した化合物であり、各水酸基がアキシャルまたはエクアトリアル方向の何れかに位置することで9種の異性体が存在する。自然界のイノシトールは、ほとんどがmyo-inositol (MI) であり(水酸基の一つだけがアキシャル方向に位置し、他は全てエクアトリアル方向)その他の異性体は非常に希少で高価であるため研究例も限られている。

微生物のイノシトール脱水素酵素は1か所の水酸基を脱水素してイノソースを生じるが、立体特異性がある。例えば、枯草菌のイノシトール脱水素酵素アイソザイムの一つ IolG は、MI のアキシャル水酸基にのみ NAD⁺/NADH, H⁺依存性かつ可逆的に反応する。一方、もう一つのアイソザイム IolW は MI とは反応せず、全ての水酸基がエクアトリアル方向にある scyllo-inositol (SI) にのみ NADP⁺/NADPH, H⁺依存性かつ可逆的に反応する。さらに、イノソース異性化酵素 IolI は、イノソースのカルボニル基を隣の炭素の位置へ移動させる異性化を触媒する。

上記の反応を枯草菌細胞内でカップリングして、MI を SI へと異性体変換する方法論を確立した実績より、イノシトール脱水素酵素アイソザイムやイノソース異性化酵素を組み合わせたコンビナトリアル・エンザイモロジーを細胞内で実施し、現在有効な生産方法がない希少イノシトールの生産を試みる本研究の着想を得た。9種類のイノシトール異性体の内、MI, SI, そして D-chiro-inositol (DCI) 以外の異性体は、現在のところ効率的な生産方法がない。前述の通り、枯草菌の IolG と IolW は、それぞれ MI のアキシャル水酸基、そして SI のエクアトリアル水酸基のみを基質とする特異性があり、これらを同時に MI に作用させると SI への変換が可能となる。一方、IolG と IolI を MI に作用させると DCI が生成する。これらの酵素を枯草菌の細胞内で同時発現させて作用させると、変換後の産物は細胞外に排出され、自ずから培地中に蓄積される。また我々は、*Geobacillus kaustophilus* から3種の新たなイノシトール脱水素酵素を分離しており、それらはいずれも MI と反応し、少なくとも2種はアキシャルおよびエクアトリアル方向の水酸基どちらでも基質にできると考えられる。

従って、これらの酵素を様々に組み合わせる枯草菌内で発現させ、これまで製造方法が無かった希少異性体6種を生成できる可能性がある。自然界のイノシトールは、ほとんど全て MI であると言ってよい程であり、その他の異性体は非常に希少で高価であるが、安価にそれらが生産できるようになれば、それらが将来的に“希少”ではなくなる可能性がある。このようにして“希少”なイノシトール異性体の生産が可能になれば、それらに秘められた機能や用途の開発が可能となる。特に、希少イノシトールには特異な生理活性が認められるものがあり(例えば SI はアルツハイマー病、DCI は糖尿病への適応がある)この観点から新たな生理活性分子が発見される波及効果にも期待を寄せる価値がある。

2. 研究の目的

イノシトールはシクロヘキサンの6価アルコールであり、水酸基の結合方向の組み合わせが異なる9種類の異性体がある。微生物のイノシトール代謝の初発反応はイノシトール脱水素酵素による水酸基1か所の脱水素反応であり、この酵素には基質特異性の異なる複数のアイソザイムが存在する。申請者は、2種のイノシトール脱水素酵素アイソザイムを同時にミオ-イノシトールに作用させ、アルツハイマー病治療に役立つシロ-イノシトールへと異性体変換することに成功した実績がある。本研究は、枯草菌と *Geobacillus kaustophilus* に由来する計6種類のイノシトール脱水素酵素アイソザイムを2つずつ組み合わせる細胞内コンビナトリアル・エンザイモロジーを実施し、異性体変換によって様々な希少イノシトールを生産する可能性を探る挑戦である。

3. 研究の方法

我々は、枯草菌と *G. kaustophilus* のそれぞれから3種のイノシトール脱水素酵素アイソザイムの遺伝子を取得している(計6種)。本研究では、これらを2つずつ組み合わせ、予めイノシトールの分解能力を削除した枯草菌細胞内で共発現させ(計 $6 \times 5 / 2 = 15$ 通り)この細胞を MI に作用させて、細胞内での2つのアイソザイムのカップリングによって発生するイノシトール異性体を検出同定する細胞内コンビナトリアル・エンザイモロジーを実施する。さらに、それぞれの組み合わせに枯草菌と *G. kaustophilus* のイノソース異性化酵素 IolI の発現を追加して、新たな異性体が発生するかどうかも検討する(従って、組み合わせ総計 $15 + 15 \times 2 = 45$ 通り)。本研究は、現在有効な生産方法がない希少イノシトール異性体を生産する新たな方

法論を見出すことを目的とする探索研究である。

(1) 平成 29 年度の研究計画

コンビナトリアル・エンザイモロジーのシャーシ菌株の作成

細胞内コンビナトリアル・エンザイモロジーを行う基本細胞は、イノシトールを分解せず、尚且つ MI を恒常的に細胞内へ取り込むことができるものである必要があるため、その条件を満たす“シャーシ菌株”を作成する。そこで、枯草菌標準菌株の染色体よりイノシトール分解系 *ioI* 遺伝子群を完全に削除する。但し、MI の取り込みを担う *ioIT* については温存しておく(*ioIR* リプレッサー遺伝子が削除されることによって、この遺伝子の発現は自ずから恒常的になる)。この際の遺伝子操作は既開発の pop-in pop-out 法を用い、染色体上に抗生物質耐性遺伝子等の痕跡が残らないようにデザインする。

コンビナトリアル・エンザイモロジーの準備(シャーシ株へのイノシトール脱水素酵素の導入)

枯草菌においては 6 種類の抗生物質に対する薬剤耐性遺伝子が利用可能である(具体的には、クロラムフェニコール、カナマイシン、エリスロマイシン、テトラサイクリン、スペクチノマイシン、フレオマイシン)。また、申請者は枯草菌と *G. kaustophilus* から反応特性が異なる合計 6 種類のイノシトール脱水素酵素アイソザイムの遺伝子を取得している。

そこで、これらのアイソザイム遺伝子と薬剤耐性遺伝子を一対一にして枯草菌の染色体へインテグレートさせるコンビナトリアル・エレメントのデザインが可能となる。各アイソザイム遺伝子と薬剤耐性遺伝子を組み換え PCR で連結し、さらにその両腕に染色体の特定ローカス(例えば *amyE*, *aprE*, *hutM* 座など)への 2 回交雑によるインテグレーションを可能にする相同領域を PCR で連結する。枯草菌は、この PCR 断片を取り込んで染色体と組み換えを起こし、これによって各アイソザイムそれぞれがシャーシ細胞で発現するように組み込まれる。各アイソザイム遺伝子は強力な構成的プロモーターで発現させる。

コンビナトリアル・エンザイモロジーの実施(第 1 期)

上記で作成されるイノシトール脱水素酵素アイソザイムの内一つをそれぞれ導入したシャーシ細胞から染色体を調製し、その DNA を用いて別のイノシトール脱水素酵素を発現する細胞を適切な薬剤耐性マーカーを指標として形質転換することにより、2 種類の異なるアイソザイムを発現する組み合わせ 15 通りのコンビナトリアル株を揃える。作成された 15 種類のコンビナトリアル株について、それぞれ MI を 1% 程度含むイノシトール異性体変換用ソイトン培地(先行研究により既に設定済み)にて培養し、培地中に放出蓄積されるイノシトール異性体を、これも既に稼働している HPLC 分析により分離同定する。

(2) 平成 30 年度の研究計画

コンビナトリアル・エンザイモロジーの実施(第 2 期)

前年度に作成された 15 種類のコンビナトリアル株それぞれに *ioII* 遺伝子を導入し、さらに 15 株のコンビナトリアル株を作成する。この際の方法は、先述のイノシトール脱水素酵素アイソザイム遺伝子の導入に用いた方法に類似したものを想定している。具体的には、各アイソザイム遺伝子を導入した際に利用したものと重複しない第 7 の遺伝子ローカスへのインテグレーションを設定する。また、前述の薬剤耐性遺伝子 6 種類の内で任意の 3 種類を選び *ioII* 遺伝子を導入するための組み換え PCR 断片を 3 種類用意し、コンビナトリアル株に既に導入されているマーカーとの重複が起こらないようにする(3 種類の薬剤耐性遺伝子があれば、少なくとも 1 種類はアイソザイム遺伝子を導入したものと重複しない)。こうして新たに作成される 15 種類のコンビナトリアル株について、前年度同様にそれぞれ MI を 1% 程度含むイノシトール変換用培地にて培養し、培地中に現れるイノシトール異性体を分離同定する。

コンビナトリアル・エンザイモロジーの実施(第 3 期)

上述の段階で 30 株に増えたコンビナトリアル株について、イノシトール異性体変換を行う原

料として、MI 以外にも供給可能な SI や DCI を用いる第 3 期の培養実験を実施する。一方、*G. kaustophilus* は好熱菌であり、この微生物に由来するイノシトール脱水素酵素も高温域で触媒活性を高める傾向を示す[前項記載の文献 3]。枯草菌は 50 程度までは耐えることができるので、培養温度を高めることで *G. kaustophilus* 由来の酵素の働きを強めつつ、逆に枯草菌由来のものを弱めて、生成するイノシトール異性体の量や種類に変化が起きるか否か検討を加える。

4. 研究成果

これまで培った従来の研究を発展させて、複数のイノシトール脱水素酵素を組み合わせる細胞内 コンビナトリアル・エンザイモロジーを実施し、様々な希少イノシトールを生産する新たな手法開発の可能性に挑戦した。

初年度は、第 1 期コンビナトリアル・エンザイモロジーの実施として、2 種類の異なるイノシトール脱水素酵素を発現する組み合わせ 15 通りのコンビナトリアル株を揃えた。作成された 15 種類のコンビナトリアル株について、それぞれ MI を 1%程度含むイノシトール異性体変換用ソイトン培地にて培養し、培地中に放出蓄積されるイノシトール異性体を分離同定した。結果的に幾つかの組み合わせにおいて MI から SI への変換が認められた。

そして 2 年度目には、上記の 15 株それぞれに枯草菌または *G. kaustophilus* に由来するイノソース異性化酵素を加えて、計 30 株のあらたなコンビナトリアル株を揃えた。その結果、SI のみならず DCI への変換が複数の菌株において観察された。但し、通常の枯草菌が生育する温度では、他の異性体の生産は見られなかったため、現在も引き続き *G. kaustophilus* に由来する酵素の活性が顕在化する高温培養にて検討を加えている。また、SI や DCI を基質に用いた場合に、他の異性体が生産される可能性も検討する予定である。

5. 主な発表論文等

上述の通り、当初の実施期間内に本研究を完成するには至らなかったため、本研究直接の成果の発表は完了できない現状にある。従って、現在検討を進めている継続研究の成果を待つて詳細を報告するための論文発表を予定しており、現状では本研究の直接的な成果として記載すべき論文や学会発表等に該当はない。但し、敢えて本研究から派生的に関連する論文や学会発表をあげるならば以下の通りである。

[雑誌論文] (計 1 件)

Sibponkrung, S., Kondo, T., Tanaka, K., Tittabutr, P., Boonkerd, N., Teaumroong, N., Yoshida, K. Genome Sequence of *Bacillus velezensis* S141, a New Strain of Plant GrowthPromoting Rhizobacterium Isolated from Soybean Rhizosphere. *Genome Announc* 5(48): e01312-17. 2017 (査読あり)

[学会発表] (計 4 件)

Yoshida, K., Tanaka, K. and Ishikawa, S. *Bacillus subtilis* cell factory converting phytic acid into scyllo-inositol, a therapeutic agent for Alzheimer's disease. *Enzyme Engineering XXIV*. 2017. (国際会議)

Michon, C., Tanaka, K., Ishikawa, S., and Yoshida, K. Production of myo-inositol from glucose in *Bacillus subtilis*. 19th International Conference on Bacilli & Gram-Positive Bacteria. 2017. (国際会議)

Michon, C., Kang, CM., Ishikawa, S., and Yoshida, K. *Bacillus Subtilis* Cell Factories for Production of Two Inositol-Stereoisomers from Glucose. *Metabolic engineering* 12. 2018. (国際会議)

Michon, C., Kawabata, H., Kang, CM., Ishikawa, S., and Yoshida, K. Controlling Redox State of NADP⁺/NADPH to Improve Enzyme Performance in *Bacillus Subtilis*. *Metabolic engineering* 12. 2018. (国際会議)