

令和元年5月22日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K06864

研究課題名(和文) S-アデノシルメチオニン依存酵素を活用した有用物質生産プラットフォームの開発

研究課題名(英文) Development of a platform for bio-production of useful compounds using S-adenosylmethionine-dependent enzymes

研究代表者

佐藤 康治 (Sato, Yasuharu)

北海道大学・工学研究院・助教

研究者番号：30360928

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：近年、合成生物学的手法を代謝工学へ応用することで、微生物により生産可能な化合物種が飛躍的に拡大されている。生産可能な化合物種のさらなる拡張にはS-アデノシルメチオニン依存酵素の利用は重要である。そこで本研究では、それら酵素を活用するためのプラットフォーム開発を目的とした。その検証にフェニルエタノールアミン-N-メチル基転移酵素が、副産物S-アデノシルホモシステインによる反応阻害の回避に大腸菌のもつ分解経路が利用できることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

S-アデノシルメチオニン依存メチル基転移酵素を用いた有用物質生産はすでに報告されているが(鎮痛剤モルヒネ等)、その生産量は数十 $\mu$ Mと非常に低く、内在性SAMで十分賄えるレベルであった。しかし生産量が増えた場合、SAM供給不足だけでなく反応によって生じる副産物S-アデノシルホモシステインによる反応阻害も無視できない。したがって、供給系と分解系を強化したプラットフォームは今後のバイオプロセス開発において解決すべき重要な課題といえる。

研究成果の概要(英文)：Microbial production of various useful compounds has been reported using synthetic biology and metabolic engineering methods. To further expand the products, application of S-adenosylmethionine-dependent enzymes are important. Therefore, this study aimed to develop a platform for utilizing these enzymes. As the results, it was confirmed that phenylethanolamine-N-methyltransferase was useful for the verification. To avoid inhibition by the by-product S-adenosylhomocysteine, the degradation pathway of Escherichia coli could be used.

研究分野：生物化学工学

キーワード：S-アデノシルメチオニン メチル基転移酵素 補酵素 葉酸 代謝工学

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

### 1. 研究開始当初の背景

人類は植物や微生物から医薬品や香料等として利用可能な多くの化合物を見出し、使用してきた。それらの中には蓄積量が低い、製造コストが高い、乱獲による動植物資源の枯渇が懸念される等の理由により、その使用が制限される化合物もあり、新たな製造プロセス開発に興味もたれる。バイオテクノロジーは、その一端を担う技術として注目され、各国で様々な研究開発が展開されており、特に近年では、合成生物学的手法を利用した微生物による有用物質生産技術が注目され、その進展は著しく、多種多様な化合物を生産可能とする微生物が創出されている。微生物によって生産可能な化合物種をさらに拡張するには、物質生産に応用可能な酵素種の拡張が重要である。酵素の中には、反応に補酵素を要求するものがあり、その利用が鍵となる。

### 2. 研究の目的

研究代表者は、これまでに補酵素であるコエンザイム A やテトラヒドロプテリンを利用した有用物質生産バイオプロセスの開発に成功している (*J. Biosci. Bioeng.* **122**, 660 (2016), *A. Microbiol. Biotechnol.* **94**, 365 (2012), *Metab. Eng.* **14**, 603 (2012) 他)。そこで本研究では、新たなターゲットとして「S-アデノシルメチオニン (SAM)」に着目した。

有用化合物の多くは化学修飾を受け、本来の機能が発揮されるものが多数存在する。修飾酵素の中でも SAM 依存酵素は多種多様な反応を触媒することが知られており (Struck, AWS ら, *ChemBioChem* **13**, 2642 (2012), Broderick, JB ら, *Chem. Rev.* **114**, 4229 (2014))、その物質生産への応用は今後ますます重要になると考えられる。SAM 依存酵素の多くは、メチル基転移反応を触媒し、鎮痛剤モルヒネ、神経伝達物質アドレナリンや香料バニリンなどの合成に用いられている。これまで SAM の発酵生産に関する試みは報告があるが、SAM を利用した物質生産法の効率化については報告がなかった。そこで本研究では SAM 依存酵素利用のための大腸菌を宿主としたプラットフォームの構築を目的とした。

### 3. 研究の方法

S-アデノシルホモシステイナーゼ (SAHase) 遺伝子は *Gulbenkiania* sp. SG4523 株より、SAHヌクレオシダーゼ (Mtn) と S-リボシルホモシステイナーゼ (LuxS) 遺伝子は *E. coli* より PCR 法にて増幅し取得した。遺伝子はそれぞれ pCF1s-Red ベクター (図 1 左) の tac プロモーター下流にクローニングした。SAM 依存メチル基転移酵素遺伝子はすべて大腸菌コドンに最適化した人工遺伝子を合成し、それぞれ pQE1a-Red ベクター (図 1 右) の tac プロモーター下流にクローニングした。

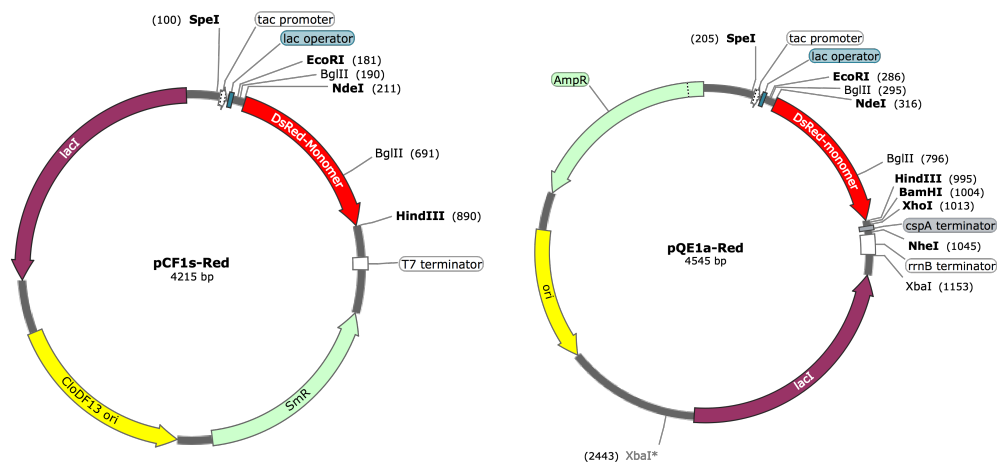


図 1. 使用したベクターのマップ

構築したプラスミドで大腸菌 BW25113 株を形質転換し、組換え株を作製した。組換え株は LB 培地、培養温度 30 °C で培養後、IPTG でタンパク質発現を誘導し集菌した。その後、超音波破碎し粗酵素液を調製、*in vitro* 反応を行い、反応液を HPLC で解析した。

大腸菌を用いたシネフリン合成は以下のように行った。まずは組換え株を M9 最少培地で一晚培養した。その培養液を新しい M9 最少培地に植菌し培養温度 30 °C で培養した。OD が 0.5 に達した時点で IPTG を添加し、さらに 5 時間培養した。集菌後、等量のオクトパミン含有 M9 最少培地に植菌し、30 °C で培養した。適時サンプリングし、その遠心分離後の上清を HPLC で解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) SAH 分解経路の構築

SAM 依存メチル基転移酵素は、SAM をメチル基供与体とする生体内メチル化反応を触媒し、反応副産物として S-アデノシルホモシステイン (SAH) を生じる (図 2)。生成した SAH は SAM 依存

メチル基転移酵素の阻害剤として機能し、生体内メチル化反応を低下させ、タンパク質合成や細胞機能に重大な障害となるため、速やかに分解される必要がある。ヒトをはじめとしたある種の生物は、S-アデノシルホモシステイナーゼ (SAHase) をもち、その分解を行う。他方、SAHase をもたない生物も知られ、SAH ヌクレオシダーゼ (Mtn) と S-リボシルホモシステイナーゼ (LuxS) による分解経路をもつ。SAH 分解によって生じるホモシステインは、タンパク質アミノ酸であるメチオニンとなり、SAM 合成にリサイクルされる。したがって、SAM を利用した物質生産法の高効率化には SAH 分解経路が重要となるため、それについて検討した。

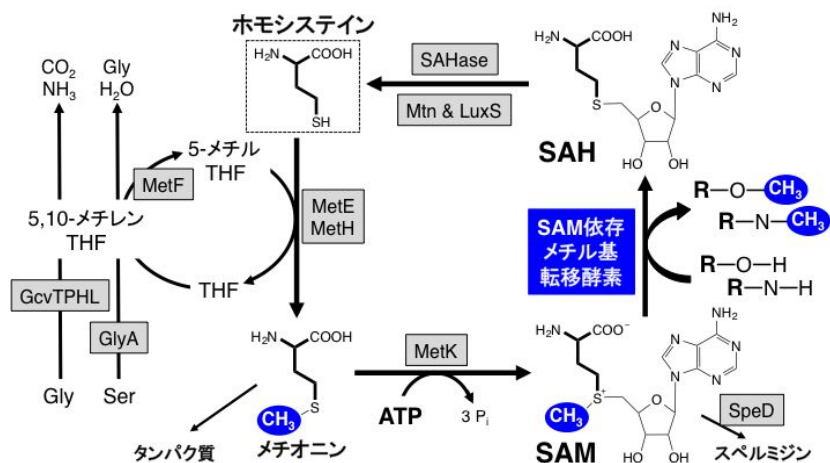


図 2. SAM 依存メチル基転移酵素の利用のためのプラットフォーム

SAHase に関しては、研究代表者が以前に単離した *Gulbenkiania* sp. SG4523 株より遺伝子をクローニングした。本遺伝子を発現した大腸菌の粗酵素液を用い、SAH を基質に *in vitro* 解析を行ったが活性を確認できなかった。

本研究で宿主とする大腸菌は Mtn と LuxS をもつため、その利用を検討した。大腸菌の粗酵素液を調製し、SAH を基質に *in vitro* 反応を行い、反応液を HPLC で解析した。しかし活性を確認できなかった。この結果より、通常の生育条件下では、その活性は低く抑えられていると考えられた。そこで、まずは Mtn 遺伝子をタンパク質発現ベクターへクローニングし高発現させ、上述と同様に解析したところ、反応 15 分で SAH のピークが完全に消失し、反応産物であるアデノシンが検出された。ホモシステイン生成の確認はチオール基検出試薬 DTNB を用い行ったが、検出されなかった。続いて LusS も高発現させ解析した結果、ホモシステインを検出でき、SAH をホモシステインまで分解できることがわかった。しかし、その反応は Mtn と比較し非常に遅かった。

## (2) SAM 依存メチル基転移酵素の選抜

SAM 依存メチル基転移酵素として、これまでに機能解析の報告のある 3 種の酵素、ラットおよび粘液細菌 *Myxococcus xanthus* 由来カテコール-0-メチル基転移酵素 (COMT と SafC) およびヒト由来フェニルエタノールアミン-N-メチル基転移酵素 (PNMT) を用いた。すべての遺伝子は大腸菌コドンに最適化した人工合成遺伝子として取得、大腸菌タンパク質発現ベクターへクローニングし使用した。

カテコール-0-メチル基転移酵素 (図 3) については、プロトカテク酸を基質に大腸菌粗酵素液を用いた *in vitro* 反応を行い、HPLC で解析した。その結果、SafC はバニリン酸を、一方 COMT は主産物としてバニリン酸、副産物としてイソバニリン酸を生成した。このように各酵素について活性を確認できた。しかし、反応後、すべての反応液が褐色に変色していた。この原因として、基質の酸化が予想された。この変質は今後の定量解析に支障をきたすため、本研究への使用を断念した。

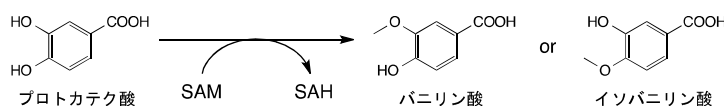


図 3. カテコール-0-メチル基転移酵素の反応

フェニルエタノールアミン-N-メチル基転移酵素 PNMT (図 4) についてはノルアドレナリンを基質に、上記と同様の方法で解析した。その結果、生成物であるアドレナリンが検出され、目的の酵素活性を確認できた。しかし、この場合においても反応液が褐色に変色し、基質や生産物の酸化が予想された。そこで、より安定な化合物の使用を検討した。シネフリンはアドレナリンの 3 位水酸基を欠如した化学構造をもち、陳皮 (チンピ)、枳実 (キジツ)、呉茱萸 (ゴシュユ) などミカン科植物を基原とする生薬に含まれるアルカロイドとして知られている。シ

ネフリンは、その構造からオクトパミンを基質に PNMT による N-メチル化反応により合成されると予想された (図 4)。そこで、オクトパミンを基質として上述と同様の解析を行った結果、目的生成物を検出した。よって、ヒト由来 PNMT はオクトパミンをシネフリンへと変換可能と判明した。この際、反応液の変色は認められず、HPLC で定量解析可能であり、基質・生成物いずれも安定であった。次に、大腸菌を用いたシネフリン合成について検討した。オクトパミン含有 M9 最少培地に先の PNMT 発現大腸菌を植菌し、その培養液を HPLC で解析した。その結果、シネフリンの合成が確認され、また、大腸菌はそれらを代謝せず定量解析に適していることがわかった。

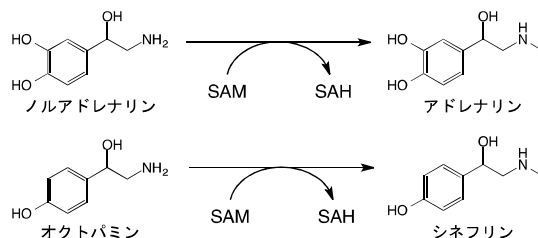


図 4. フェニルエタノールアミン-N-メチル基転移酵素の反応

現在、ヒト由来 PNMT と SAH 分解系との共発現条件の最適化を進めている。さらに SAM 供給系の強化も行い、SAM 依存酵素活用のためのプラットフォームを完成させる。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

Feng, R., Satoh, Y., Morita, H., Ogasawara, Y., Dairi T., Amino acid residues recognizing isomeric glutamate substrates in UDP-N-acetylmuramic acid-L-alanine-glutamate synthetases, *ACS Chemical Biology*, 査読有, in press.

DOI: 10.1021/acscchembio.9b00159

Tanaka, N., Kawano, Y., Satoh, Y., Dairi, T., Ohtsu, I., Gram-scale fermentative production of ergothioneine driven by overproduction of cysteine in *Escherichia coli*, *Scientific Reports*, 査読有, Vol.9, Article number 1895 (2019).

DOI: 10.1038/s41598-018-38382-w

Takusagawa, S., Satoh, Y., Ohtsu, I., Dairi, T., Ergothioneine production with *Aspergillus oryzae*, *Bioscience, Biotechnology & Biochemistry*, 査読有, Vol.83, pp.181-184 (2019).

DOI: 10.1080/09168451.2018.1527210

Osawa, R., Kamide, T., Satoh, Y., Kawano, Y., Ohtsu, I., Dairi, T. Heterologous and high production of ergothioneine in *Escherichia coli*, *Journal Agricultural & Food Chemistry*, 査読有, Vol.66, pp.1191-1196 (2018).

DOI: 10.1021/acs.jafc.7b04924

佐藤康治, 河野祐介, 大津徹生, 大利徹, 抗酸化物質エルゴチオネインの発酵生産, *バイオサイエンスとインダストリー*, 査読無, Vol.76(5), pp. 402-403 (2018).

<https://www.jba.or.jp/library/bi/>

大津徹生, 河野祐介, 佐藤康治, 大利徹, 抗酸化機能を有するエルゴチオネインのシステイン生産大腸菌による発酵生産, *FRAGRANCE JOURNAL*, 査読無, Vol.46(7), pp.65-69 (2018).

<https://www.fragrance-j.co.jp/magazine/fragrance-journal/>

佐藤康治, 馮若茵, 大利徹, 細菌ペプチドグリカンの新規生合成機構, *バイオサイエンスとインダストリー*, 査読無, Vol.75(5), pp.422-423, (2017).

<https://www.jba.or.jp/library/bi/>

Feng, R., Satoh, Y., Ogasawara, Y., Yoshimura, T., Dairi T., An unprecedented glycopeptidyl-glutamate epimerase for bacterial peptidoglycan biosynthesis, *Journal of the American Chemical Society*, 査読有, Vol.139, pp. 4243-4245 (2017).

DOI: 10.1021/jacs.7b01221

[学会発表] (計 1 1 件)

Feng, R., Satoh, Y., Ogasawara, Y., Yoshimura, T., Dairi T., A glycopeptidyl-glutamate epimerase for bacterial peptidoglycan biosynthesis, 2<sup>nd</sup> China-Japan Joint Symposium on Natural Product Biosynthesis, Guangzhou, China, 2019

田草川隼, 佐藤康治, 大津徹生, 大利徹, *Aspergillus oryzae* を用いた ergothioneine 生産, 平成 30 年度日本農芸化学会 北海道支部第 2 回講演会, 札幌, 2018 年

馮若茵, 佐藤康治, 小笠原泰志, 森田洋行, 吉村徹, 大利徹, 微生物に見出したペプチドグリカン新規生合成酵素の解析, 第 60 回天然有機化合物討論会, 久留米, 2018 年

田草川隼、佐藤康治、大津巖生、大川徹、*Aspergillus oryzae* を用いた ergothioneine 生産、2018 年度日本生物工学会北日本支部札幌シンポジウム、札幌、2018 年  
大澤怜、上出倫敬、佐藤康治、河野祐介、大津巖生、大川徹、大腸菌を宿主とした Ergothioneine の発酵生産、日本農芸化学会 2018 年度大会、名古屋、2018  
河野祐介、田中尚志、城山真恵加、大城聡、佐藤康治、大川徹、大津巖生、システイン生産大腸菌によるエルゴチオネインの発酵生産、日本農芸化学会 2018 年度大会、名古屋、2018  
佐藤康治、放線菌におけるエルゴチオネイン生産とその役割、環境微生物系合同大会 2017 シンポジウム「硫黄循環に寄与する微生物と硫黄化合物が持つ新規な機能」、仙台、2017  
大澤怜、上出倫敬、佐藤康治、河野祐介、大津巖生、大川徹、大腸菌による Ergothioneine の発酵生産、第 69 回日本生物工学会大会、東京、2017  
馮若茵、佐藤康治、小笠原泰志、吉村徹、大川徹、An unprecedented glutamate epimerase for bacterial peptidoglycan biosynthesis、2017 年度日本放線菌学会大会、長野、2017  
馮若茵、佐藤康治、小笠原泰志、吉村徹、大川徹、細菌のペプチドグリカン合成に関する新規酵素、平成 29 年度日本農芸化学会 北海道支部第 1 回講演会、帯広、2017  
馮若茵、佐藤康治、小笠原泰志、吉村徹、大川徹、An unprecedented glutamate epimerase for bacterial peptidoglycan biosynthesis、日本農芸化学会 2017 年度大会、京都、2017

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：エルゴチオネイン合成微生物、及びエルゴチオネインの製造方法

発明者：大津巖生、河野裕介、田中尚志、大川徹、佐藤康治

権利者：筑波大学、北海道大学

種類：特許

番号：特願 2018-038057 号

出願年：2018 年

国内外の別：国内

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

アウトリーチ活動

北海道立函館中部高等学校生を対象とした講演会、函館、2016 年 11 月

北海道大学 オープンユニバーシティ体験入学、札幌、2016 年 8 月

## 6. 研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。