

令和 4 年 5 月 19 日現在

機関番号：23201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05794

研究課題名(和文) タンデム酵素反応による(+)-アリイン生産バイオプロセスの実用化検討と応用展開

研究課題名(英文) Production of (+)-alliin by tandem enzymatic reactions

研究代表者

日比 慎(Hibi, Makoto)

富山県立大学・工学部・准教授

研究者番号：30432347

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では複数の酵素を組み合わせることで、安価な原料から(+)-アリインや他のS-アリルシステインスルフォキシドを生産できるバイオプロセスの開発に成功した。(+)-アリイン生産法の確立では、100 mMの基質から最大60 mMの(+)-アリインを生産した。またS-アリルシステインスルフォキシド生産への応用展開では、アリルチオール代わりに様々なチオールを使用し、これまで確認されていた(+)-メチンや(+)-エチンの他に、プロピイン、ブチン、および芳香環、ヒドロキシ基、分岐鎖を含むキラルスルフォキシドなど、多様な分子種が生成可能であることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

(+)-アリインは疲労回復や抗酸化作用などの効能を持ち、機能性表示食品や医薬品として市販されている。(+)-アリインの様な有機硫黄化合物は他にも植物体内に含有するが、ごく微量であるためその機能性は十分に評価されていない。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。本研究の成果により、植物が作る希少なファイトケミカルを著量生産できるバイオプロセスの基盤技術が開発された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we succeeded in developing a bioprocess that produces (+)-alliin and other S-allylcysteine sulfoxides from inexpensive raw materials by combining multiple enzymes. In establishing the (+)-alliin production method, up to 60 mM (+)-alliin was produced from a 100 mM substrate. In addition, in the application development to S-allylcysteine sulfoxide production, various thiols are used instead of allyl thiols, and in addition to the previously confirmed (+)-methiin and (+)-ethiin, it was revealed that various molecular species such as propiin, butiin and chiral sulphoxides containing aromatic rings, hydroxy groups and branched chains were produced.

研究分野：応用微生物学

キーワード：ファイトケミカル バイオプロセス

1. 研究開始当初の背景

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は様々な有機硫黄化合物が含まれており、これらこそ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。例えばにんにく中に多く含まれる(+)-アリイン(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。(+)アリイ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、本研究が学術的・工業的に律速となっていた課題を解消しうるものとなる。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。

これまでに申請者らは、酵素触媒を組み合わせた(+)-アリイン生産バイオプロセスの基盤技術を確認している。このバイオプロセスは、安価な化合物から S-アリルシステインを合成する過程、S-アリルシステインをスルフォキシド化して(+)-アリインに変換する過程、より構成されている。この過程を触媒する酵素としては、2種類のアミノ酸リアーゼ、*Enterobacter aerogenes* 由来の cysteine desulfhydrase (CD) または *Escherichia coli* 由来の tryptophanase (TnaA) が利用できる。すなわち CD や TnaA は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-アリルシステインを合成する活性を示す。次にこの過程を触媒する酵素としては、申請者が発見した *Bacillus thuringiensis* 由来のオキシゲナーゼ (IDO) が利用できる。IDO は α -ケトグルタル酸依存的に S-アリルシステインを(+)-アリインに変換する。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を不可逆なスルフォキシド化反応で制御することで反応平衡を(+)-アリインの合成側へ誘導する事である。本成果は(+)-アリインの効率的生産法を実証した初のケースであり、既に最大 2.1 g/L の(+)-アリインを高光学純度で生成することに成功している。本研究において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 10 g/L の(+)-アリイン生産を目指した。

2. 研究の目的

本研究では既知または新規な微生物酵素の持つ触媒活性を活用し、植物が作る希少なファイトケミカルを著量生産できるバイオプロセスの開発を目的とする。具体的には、申請者らの開発した(+)-アリイン生産バイオプロセスを基盤とし、A. (+)-アリイン生産の高効率化、B. 希少なSACS分子種生産への拡張、C. (+)-アリインを起点とした分子種展開、の検討を行っていく。本研究を実施する過程で、学術的に独自性が高い酵素の発見および、申請者ら実績を踏まえた独自の視点で考案した酵素触媒の新規利用法が成果として得られる。

A. (+)-アリイン生産の高効率化

上記の(+)-アリイン生産バイオプロセスを高効率化させるため、以下の3つを検討する。

【A-1】現在のバイオプロセスでは CD/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る。CD/TnaA 反応で生じた S-アリルシステインを速やかに IDO 反応で(+)-アリイ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られる。そこで、CD-IDO および TnaA-IDO 共発現大腸菌を作成し、菌体触媒として使用し、(+)-アリイン生産収率の向上効果を検証する。

【A-2】CD/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 付近であり、同一反応場においてそれぞれの酵素の活性を十分に引き出せていないことが(+)-アリイン生産における課題と考えている。一般的にアミノ酸リアーゼの逆反応を利用したアミノ酸合成反応は、アルカリ条件下で進行する。そこで、微生物スクリーニングにより、強アルカリ pH で機能するスルフォキシド化酵素の取得を目指す。

【A-3】CD/TnaA による合成反応は本来の加水分解反応の逆反応であり、水溶液中では分解側に平衡が片寄る。そこで、S-アリルシステイン合成活性を持つ別のタイプの酵素反応を探索する。例えば、 β -cyanoalanine synthase にはチオール基交換活性が報告されており、システインとアリルチオールを原料とした S-アリルシステイン生成反応が有望なターゲットである。また tryptophan

synthase はセリンとチオールの縮合活性が報告されている。

B. 希少な SACS 分子種生産への拡張

(+)-アリイン以外にも様々な 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。本項では、アリルチオールの代わりに様々なチオールを使用し、(+)-アリイン以外の様々な希少 SACS 分子種の生産を検討する。ここでは各過程を担う酵素触媒の反応性が重要であるため、CD/TnaA の各チオールに対する基質特異性と比活性、IDO の各 S-アルキルシステインに対する基質特異性と比活性を明らかにする。期待した活性が得られない場合には、類縁酵素のスクリーニングを実施する。

C. (+)-アリインを起点とした分子種展開

(+)-アリイ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。本項では既にバイオプロセスで生産可能とした(+)-アリインをさらに代謝酵素類で変換することで、有用な分子種へと誘導する改良型バイオプロセスを構築する。(+) -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。そこで、微生物スクリーニングにより、(+)-アリイン還元酵素の新規取得を目指す。

3. 研究の方法

A. (+)-アリイン生産の高効率化

【A-1】CD と IDO、および TnaA と IDO を共発現できる組換え大腸菌株の構築を行う。共発現に適したベクターと宿主の組み合わせ、培養条件などを検討し、各酵素が大量発現した菌体を得る。この菌体を生体触媒として反応を行い、まず各酵素の比活性を測定する。目的とする酵素の比活性が十分確認された菌体を用いたバイオプロセスを行い、共発現による(+)-アリイン生産収率の向上効果を検証する。

また本菌の発酵生産菌としての利用を試みる。反応に必要なピルビン酸と α -ケトグルタル酸は大腸菌の代謝経路を利用することでグルコースから供給する。ここでは申請者らの実績である α -ケトグルタル酸高蓄積株を宿主に利用する。ジャーファーメンターで共発現菌を培養し、アリルチオールをフィードしながら(+)-アリインを発酵生産する。

【A-2】微生物スクリーニングにより新規酵素の探索を行う。菌体触媒を用いた S-アリルシステインの(+)-アリインへの変換反応を行い、pH 8.5 以上の強アルカリ条件下で機能するスルフォキシド化酵素を探索する。これまで IDO 以外のオキシゲナーゼにおいて含硫アミノ酸のスルフォキシド化活性が報告されており、既知酵素の特性情報を活用する。活性を持つ菌体から酵素精製を行い、組換え大腸菌株を作製して触媒として用いる。

【A-3】 β -cyanoalanine synthase は主に植物酵素であるが、ゲオバチルス属細菌などからも見つかっている。そこで、微生物由来酵素の組換え大腸菌の菌体触媒を用いて、システインとアリルチオールから S-アリルシステインを生成する活性を測定する。また tryptophan synthase によるセリンとアリルチオールの反応も試みる。

以上の結果を踏まえ、高収率な(+)-アリイン生産に最適なバイオプロセスの開発を行う。

B. 希少な SACS 分子種生産への拡張

CD や TnaA に関しては様々なチオール類（メタンチオール、エタンチオール、プロパンチオール、ブタンチオールなど）を、また IDO に関してはこれまで活性が確認できていない S-アルキルシステイン類を用いて、基質特異性と比活性を測定する。また微生物スクリーニングも平行し、スルフォキシド化酵素を取得する。各原材料に最適な酵素触媒を利用したバイオプロセスを構築し、希少な SACS 生産へ向けた反応条件検討を行う。

C. (+)-アリインを起点とした分子種展開

腸内細菌を対象とした微生物スクリーニングにより、(+)-アリインのスルフォキシド還元反応により S-アリルシステインを生成する酵素などを探索する。

4. 研究成果

A. (+)-アリイン生産の高効率化

研究開始当初、(+)-アリインの前駆体である S-アリルシステインの生成酵素として大腸菌由来 tryptophanase (TnaA)を見出していた。当該酵素と *Bacillus thuringiensis* 由来オキシゲナーゼ (IDO) をタンデムに組み合わせることで、アリルチオール、ピルビン酸、アンモニア、 α -ケトグルタル酸から一気通貫で(+)-アリインを生成できると予想した。タンデム反応の特徴として、1 段階目の TnaA 反応は加水分解の逆反応を利用するため TnaA 単独では可逆的であるが、2 段階目の IDO 反応が不可逆なため、反応平衡を(+)-アリイン生成側に傾けることが可能となる。さらに、アキ

ラルな原料からキラルな化合物を生成する点でも利用価値が高い。そこで、本プロセスの有効性を実証するために、単一大腸菌で *tnaA* および *ido* 遺伝子を共発現させ、(+)-アリイン生成反応系の構築を図った。しかし、両遺伝子は個別の大腸菌に発現させたときは良好に発現したが、単一大腸菌内で共発現させると *tnaA* 遺伝子が発現しなくなり、機能しなくなる問題が生じた。そこで、代替酵素を探索した。

SAC 生成活性を指標に TnaA の代替酵素を種々検討したところ、大腸菌由来 tryptophan synthase (TrpAB) が有効であった。そこで、TrpAB と IDO を組み合わせ、L-セリン、アリルチオール、 α -ケトグルタル酸からワンポットで(+)-アリインを生成するバイオプロセスの構築を試みた (Fig. 1)。大腸菌 Rosetta 2(DE3)に *trpAB* と *ido* を共発現させたところ、両遺伝子とも良好に発現した。当該菌体の休止菌体と各基質を pH 7.0 の条件で反応させたところ、(+)-アリイン生成が認められた。これにより、単一菌体での(+)-アリイン生成モデルが構築できた。このとき、反応液中にアンモニアが蓄積していたことから、宿主大腸菌による中間体または生成物の分解が考えられた。そこで、TnaA による SAC 分解活性に着目し、本酵素が(+)-アリイン生成収率の低下の原因であると予想した。ゲノム情報を利用し、宿主大腸菌の *tnaA* 遺伝子を破壊したところ、(+)-アリイン生成収率が顕著に増加した。さらに、反応条件 (菌体量や基質濃度など) を最適化することで、3 時間の反応で 100 mM の基質から最大 60 mM の(+)-アリインを生産した。この生産性は、既報の中で最も高いものであった。今後は、構築したプロセスの通気、攪拌条件、基質の添加方法を検討し、スケールアップを行うことで、実用的に(+)-alliin の生産が可能となり、効率的な供給体制の構築に貢献できる。

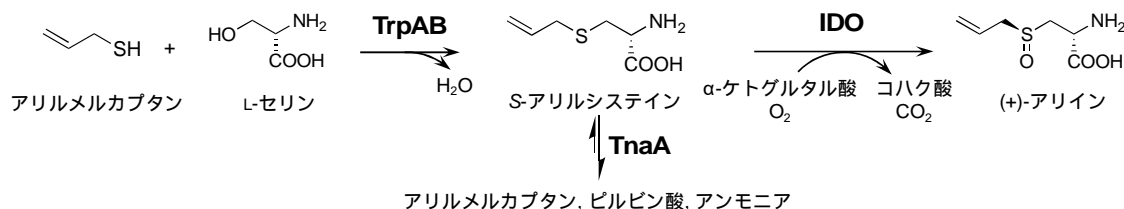


Fig. 1. 本研究で構築した TrpAB-IDO による(+)-アリイン生成バイオプロセス.

B. 希少な SACS 分子種生産への拡張

TnaA は逆反応を利用することで SAC 生成するが、生成可能な S-置換システインの種類に関しては未検討であった。そこで、アリルチオールの代わりに多様なチオール類を用いて S-置換システイン類の生成を検討した。その結果、メタンチオール、エタンチオール、プロパンチオール、ブタンチオール、芳香族チオールなどをチオール源として利用することで、対応する S-置換システインの生成が可能であった。これらは自然界では希少な SACS の前駆体となりうる。さらに、IDO による立体選択的スルフォキシド化により SACS の生成も可能と考えられる。

一方、項目 A で構築した *trpAB-ido* 共発現大腸菌 Rosetta 2(DE3)を用いて、同様に様々なチオール類を検討した。その結果、これまで IDO による生成が確認されていた(+)-メチンや(+)-エチンの他に、プロピン、ブチン、および芳香環、ヒドロキシ基、分岐鎖を含むキラルスルホキシドなど、TnaA との組み合わせ以上に多様な SACS が生成可能であることが明らかになった (Fig. 2)。これらの中には、有用な生理活性のある天然物に加え、非天然型の新規化合物も含まれていた。今後、プロセスをさらに高度化することで、新たな生理活性が期待できる希少 SACS の開発につなげていく。

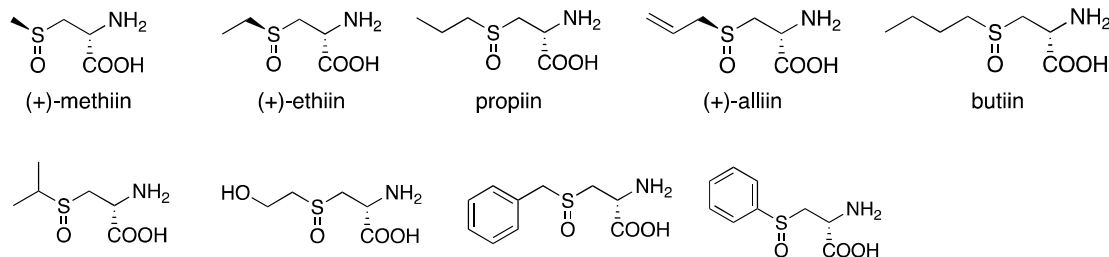


Fig. 2. TrpAB · IDO プロセスで生成した SACS 分子種.

C. (+)-アリインを起点とした分子種展開

近年、腸内細菌の代謝物が宿主の腸内環境を健全にし、健康維持に寄与することが多数報告されている。そこで、(+)-アリインを腸内細菌に代謝させることで、宿主に望ましい効果を発揮す

ることを期待し、腸内環境に近い嫌気条件下で(+)-アリインを変換する菌株、特に腸内細菌を中心に探索を行った。その結果、ヒトおよびニワトリ由来腸内細菌において特異な代謝産物を検出した。当該化合物は、PLP 酵素阻害剤により生成しなくなり、LC-MS 分析により得た分子量情報などから構造を推定した。

さらに、いくつかの腸内細菌科の株において、(+)-アリインを還元して SAC を生成する興味深い活性を見出した（未発表）。そこで、最も高活性を示したモデル株を用いて種々の機能解析を行った。当該活性は、特異的条件での培養、ならびに嫌気条件下での反応により顕在化すること、また、(+)-アリイン以外の幅広いスルフォキシドに対しても還元活性を示すことを明らかにした。本活性の担う酵素をデータベースや文献情報などから可能な限り推定し、各遺伝子の破壊株を検討したが、いずれの株においてもスルフォキシド還元活性は消失しなかった。このことから、本還元活性は新規酵素によるものと示唆された。近年、S-アリルシステインなどは、スルフォキシド体には無い生理活性を示すことが報告されている。これは、従来知られている(+)-アリインに加え、その還元体にもユニークな代謝や活性があると予想する。今後、還元反応を担う酵素系を明らかにすることで、微生物における新たな還元代謝系の発見のみならず、希少な化合物の生成に貢献すると予想する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Mizutani Taku, Hara Ryotaro, Takeuchi Michiki, Yamagishi Kazuo, Hirao Yoshinori, Mori Kenichi, Hibi Makoto, Ueda Makoto, Ogawa Jun	4. 巻 in press
2. 論文標題 L-Tryptophan-starved cultivation enhances S-allyl-L-cysteine synthesis in various food-related microorganisms	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bbb/zbac044	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 水谷 拓、飯星貴幸、原 良太郎、竹内道樹、日比 慎、高橋里美、小川 順
2. 発表標題 微生物酵素を利用した(+)-alliin 生産法の構築及び腸内細菌による代謝経路の検討
3. 学会等名 第22回生体触媒化学シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Makoto Hibi, Michiki Takeuchi, Ryotaro Hara, Jun Ogawa
2. 発表標題 Tandem enzymatic reactions for the production of a phytochemical L-(+)-alliin
3. 学会等名 1st Japan-Germany-Switzerland Workshop for Enzyme Technology and Bioprocess Development (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水谷拓, 原良太郎, 竹内道樹, 日比慎, 上田誠, 小川順
2. 発表標題 微生物酵素を利用したS-置換システインスルフォキシドの立体選択的合成
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 水谷拓, 飯星貴幸, 竹内道樹, 原良太郎, 日比慎, 高橋里美, 小川順
2. 発表標題 (+)-alliinのタンデム酵素反応による生産及び腸内細菌における代謝産物の解析
3. 学会等名 酵素工学研究会第82回講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水谷拓, 飯星貴幸, 竹内道樹, 原良太郎, 日比慎, 高橋里美, 小川順
2. 発表標題 有用含硫アミノ酸の微生物由来酵素による生産及び腸内細菌代謝に関する研究
3. 学会等名 公益財団法人発酵研究所寄附講座 糸状菌・環境インターフェイス工学講座開設記念式典・シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水谷拓, 原良太郎, 竹内道樹, 日比慎, 上田誠, 小川順
2. 発表標題 有用S-置換システインスルフォキシドの合成に向けた複合酵素系の構築
3. 学会等名 酵素工学研究会第87回講演会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	竹内 道樹 (Takeuchi Michiki) (40766193)	京都大学・農学研究科・特定助教 (14301)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	原 良太郎 (Hara Ryotaro) (70553535)	京都大学・農学研究科・特定准教授 (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関