

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月15日現在

機関番号：23303

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21380062

研究課題名（和文） 微生物の芳香族アミノ酸脱炭酸酵素に関する研究

研究課題名（英文） Studies on microbial aromatic L-amino acid decarboxylase

研究代表者

熊谷 英彦（KUMAGAI HIDEHIKO）

石川県立大学・生物資源環境学部・特任教授

研究者番号：70027192

研究成果の概要（和文）：

芳香族アミノ酸脱炭酸酵素は、様々な生理活性アミンおよびその誘導体の生成に関わる重要酵素である。本研究では、様々な細菌から該酵素遺伝子群を取得し、酵素学的な基礎性状解析を行ったほか、大腸菌細胞を用いた植物アルカロイド合成プラットフォームの構築に本酵素を利用することに成功した。また、本酵素を保持する乳酸菌群の消長を追うため、次世代シーケンシング法を用いた発酵食品の菌叢解析も遂行した。

研究成果の概要（英文）：

Aromatic amino acid decarboxylase is a key enzyme for synthesis of various biogenic amines and their derivatives. In this study, we isolated the genes encoding the enzyme from various bacteria, and carried out enzymatic analyses for their products. We also succeeded in constructing a bacterial platform for synthesis of the plant alkaloid using a recombinant *E. coli* strain. In addition, fermented food microbiota was investigated by using pyrosequencing technique to evaluate the existing ratio of lactic acid bacteria with abilities to produce biogenic amines.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
2010 年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2011 年度	3,000,000	900,000	3,900,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：応用微生物学

科研費の分科・細目：

キーワード：芳香族アミン、芳香族アミノ酸脱炭酸酵素、ビタミン B<sub>6</sub> 酵素、発酵生産、発酵食品、菌叢解析、次世代シーケンシング法

## 1. 研究開始当初の背景

芳香族アミノ酸脱炭酸酵素（AADC, EC 4.1.1.28）は、芳香族アミノ酸の $\alpha$ 位のカルボキシル基を脱離し、芳香族アミンおよび二酸化炭素を生じる反応を触媒するピリドキサル 5'-リン酸依存性酵素である。AADC

は高等生物から微生物にいたるまで広く保持され、哺乳類においてはセロトニンやドーパミン、さらにドーパミンから生じるアドレナリンおよびノルアドレナリンといった神経伝達物質およびホルモンの合成に関与し、植物においてはベンジルイソキノリンアル

カロイドおよびインドールアルカロイドなどの二次代謝産物の合成において役割を果たす。AADC の機能喪失および欠損は、パーキンソン氏病および AADC 欠損症といった重篤な中枢神経系疾患を引き起こすため、その重要性から医療分野においても注目されている。ブタ腎臓、ラット肝臓、およびヒト胎盤由来酵素については多くの報告がなされており一部結晶構造解析も終了しているが、これまで微生物由来 AADC については詳しい研究報告が殆どなかった。

## 2. 研究の目的

1. に述べた背景から、本研究では将来の医療・薬学分野における AADC の重要性を見据え、微生物由来 AADC の酵素学的特性の解明とその応用利用を目指した以下の研究を展開した。

(1) 複数のバクテリアから AADC のホモログ遺伝子を単離し大腸菌内にて発現させて組換え体を得、基質特異性等の酵素性状の解明を行った。

(2) 3,4-ジヒドロキシフェニル-L-アラニン (L-DOPA) に特異性の高い AADC を探索し、その酵素機能を微量で極めて強い生理活性を持ち医薬として期待される植物アルカロイドの微生物生産に応用した。

(3) 乳酸菌において古くから存在が報告されている L-チロシンに対して特異性の高い AADC を単離し、酵素機能を調べるとともに、発酵食品中の乳酸菌叢を解析することによってチラミン生成型乳酸菌群の消長をつかんだ。

## 3. 研究の方法

### (1) AADC ホモログ遺伝子の探索、クローニング、および組換え酵素の精製

細菌ゲノムシーケンスデータベース中においてブタ腎臓由来 AADC のホモログ遺伝子を探索し、細菌 2 株 (*Pseudomonas putida* KT2440 および *Microscilla marina* ATCC23134) において、相同性約 40 % の該当 ORF を見出した。また、乳酸菌 5 株 (*Enterococcus faecalis*, *Enterococcus hirae*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus brevis*, および *Lactobacillus curvatus*) のゲノム DNA より PCR 法にて AADC ホモログ遺伝子群の全長を増幅した。上記の遺伝子群を pET-16b (Merck) ベクター上の T7 プロモーター下流に導入し、大腸菌内において N 末端ヒスチジンタグ融合体として発現させた。精製には、Ni-NTA resin (Qiagen)、Mono-Q HR 5/50 (GE Healthcare)、および Superdex-200 HR 10/300 (GE Healthcare) を用いた。

### (2) 酵素性状解析および発酵産物解析

精製後 SDS-PAGE 上で単一バンドを示し

た酵素サンプルについて、至適 pH、至適温度、pH 安定性、および熱安定性を評価し、また基質特異性を評価した。至適 pH および pH 安定性の評価の際はクエン酸リン酸カリウム (pH 4.5-6.0)、リン酸カリウム (pH 5.5-8.5)、および  $\text{NH}_4\text{OH-NH}_4\text{Cl}$  (pH 8.0-11.0) 緩衝液を使用し、基質として

5-hydroxy-L-tryptophan (L-5-HTP) を用いた。基質特異性評価の際は、L-DOPA, L-5-HTP, L-phenylalanine (L-Phe), L-tyrosine (L-Tyr), L-tryptophan (L-Trp),

3-methoxy-L-tyrosine (MeO-L-Tyr),  $\alpha$ -methyl-L-DOPA, および各アミノ酸の D 体を用いた。生成した各芳香族アミン群は、HPLC にて 280 nm の吸光度により検出した。該波長域に吸収を持たない物質群については AccQ-tag (Waters) によるアミノ基標識法を使用し、蛍光検出を行った。 $\alpha$ -methyl-L-DOPA の反応生成物を評価する際、および大腸菌培養上清中における植物アルカロイド (レチクリン) 産生を評価する際は、LC/MS による検出を行った。

### (3) 発酵食品の乳酸菌叢解析

発酵食品サンプル 3 種 (かぶらずし、なれずし、山廃酒母) から、FastPure DNA kit (タカラバイオ) を用いて DNA 抽出・精製を行い、PCR により細菌 16S rDNA V1-V2 可変領域の増幅を行った。増幅サンプルの精製を行った後、Genome Sequencer FLX system (Roche) を用いた各サンプル約 20,000 リードの次世代シーケンス解析を行い、RDP Classifier および BLAST を用いて分類・同定に供した。

## 4. 研究成果

### (1) *Pseudomonas putida* KT2440 株由来 AADC の機能解析

大腸菌において発現させた各 AADC 組換え体の中から、哺乳類・植物・昆虫由来酵素との相同性が高い *P. putida* KT2440 由来酵素について、詳細な酵素性状の解析を行った。その結果、本酵素の至適 pH は 8.0、至適温度は 55°C であり、pH 6.0~11.0、45 °C 以下において安定であった。本酵素は L-DOPA に対して極めて特異性が高く、L-5-HTP に対しても高い活性を持つブタ・ラット・ヒト・ショウジョウバエ由来酵素と明確に区別された ( $k_{\text{cat}}/K_m$  において L-DOPA:L-5-HTP=140:1、ブタ腎臓由来酵素においては 5:1 程度)。また、ブタ由来酵素において報告されていた  $\alpha$ -methyl-L-DOPA に対する oxidative deaminase 活性 (酸素存在下において、通常脱炭酸反応を経て酸化的脱アミノ反応までが進行する) も確認され、両酵素間において類似した反応機構が予想された。また、D 体に対する活性は示さなかったことも以前に報告された脱炭酸酵素群と共通していた。

## (2) *Enterococcus faecium* 由来 AADC (TYDC) の機能解析

乳酸菌においては、古くから L-Tyr に特異性の高い脱炭酸酵素の存在が報告されており、発酵食品中（チーズ、ワイン等）において多量摂取時に頭痛・血圧上昇等の原因となるチラミンの高含有に關与する危害要因として認識されてきた。本研究では、*E. faecium* 由来 AADC (L-Tyr 脱炭酸酵素、TYDC) の大腸菌組換え体の性状解析を行った。その結果、*P. putida* 由来酵素と異なり、至適 pH が若干酸性側の 5.5-6.0 付近に存在することが明らかになり、安定 pH 域も 5.0-7.0 付近と比較的狭い範囲にあることが判明した。*E. hirae*, *E. faecalis*, および *L. brevis* 由来酵素においても至適 pH は同様に弱酸性域にあったことから、乳酸菌 TYDC に共通する性質であることが強く示唆された。

## (3) AADC の植物アルカロイド発酵生産への応用

AADC の機能を有用物質生産に繋げることをめざし、植物において L-Tyr および L-DOPA を出発物質として合成されるベンジルイソキノリンアルカロイド (BIA) を発酵生産ターゲットとした組換え大腸菌を作製した。本株は L-Tyr 合成系の代謝フローを増強した菌株であり (変異型 *aroG*, *tyrA* の発現、*ppsA*, *tktA* の発現、および *tyrR* 欠損)、さらに L-Tyr からベンジルイソキノリン骨格を生じるために必要な中間原料 [3,4-ジヒドロキシフェニルアセトアルデヒド (3,4-DHPAA) および 3,4-ジヒドロキシフェニルエチルアミン (Dopamine)] を供給するための人工代謝経路 [チロシナーゼ、AADC (*P. putida* 由来)、およびモノアミンオキシダーゼ] を導入している。加えて、モルヒネをはじめとする BIA の重要中間体であるレチクリンの生合成に關わる植物由来遺伝子群 (ノルコクラウリン合成酵素、ノルコクラウリン-6-*O*-メチル基転移酵素、コクラウリン-*N*-メチル基転移酵素、および 3'-ヒドロキシ-*N*-メチルコクラウリン-4'-*O*-メチル基転移酵素) も導入しており、グルコースおよびグリセロールといった単純な炭素源から植物アルカロイドを合成するために必要な遺伝子群を全て擁した菌株である。本株をグリセロールを炭素源として培養したところ、培養液 1 L あたり 40 mg を超えるレチクリンを生成することに成功した。本代謝経路においては L-DOPA 特異的に脱炭酸が起こることが求められるため、*P. putida* 由来 AADC の特性が十二分に活かされたことが成功に繋がったと考えられる。本

研究例は AADC の酵素機能を活用し医薬候補物質として多くの可能性を持つアルカロイドの微生物生産を達成した注目すべき成果であり、次世代の微生物生産技術における AADC の高い利用性を示すことができたと考えられる。

## (4) 発酵食品中の菌叢解析によるチラミン生成乳酸菌の消長解析

本研究では、乳酸菌 TYDC の機能解析と併せて、発酵食品中における乳酸菌の消長も解析した。塩漬け・酢漬けした魚および米飯から製造され 1~2 か月の発酵を行う石川県能登地方の“なれずし”、塩漬けした魚、カブ、および米麴を用いて製造され 4~10 日間の発酵を行う石川県加賀地方の“かぶらずし”、および日本酒の山麴仕込みのモトである“山麴酒母”について、仕込み期間中に経時的にサンプルを採取し、細菌 16S rRNA 遺伝子を増幅し次世代シーケンス法を用いた菌種同定に供した。その結果、かぶらずしおよび山麴酒母においては *Lactobacillus sakei* が発酵期間中において次第に優勢となったが、なれずしにおいては *L. plantarum* およびチラミンの主要生成菌種として知られる *L. brevis* を優勢とする菌叢の推移がみられた (図 1)。上記の主要乳酸菌種を MRS 培地を用いて単離したところ、なれずしから単離・培養した *L. brevis* のみからチラミン生成活性が確認された。なれずし中のチラミン濃度を評価したところ、健常人においては摂取に問題ない濃度であるものの、チラミンが顕著に検出されたことから、TYDC 保持型 *L. brevis* により産生された可能性が高いと考えられた。

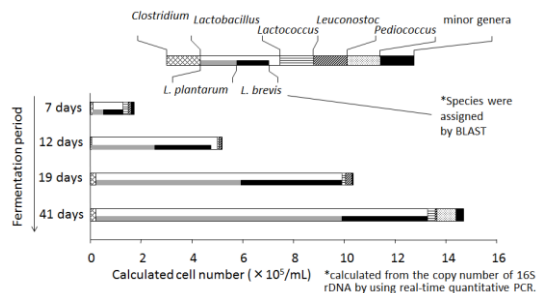


図 1 次世代シーケンス法によるなれずし中の菌叢解析結果

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

①中川明, 南博道, 金柱成, 小柳喬, 片山高嶺, 佐藤文彦, 熊谷英彦, Bench-top fermentative production of plant benzylisoquinoline alkaloids using a

bacterial platform. Bioengineered Bugs, 査読有, 3 巻, 2012, 49-53.

②清原正志, 小柳喬, 松井裕, 山本恵子, 武春美, 勝山陽子, 辻篤志, 宮前博人, 近藤哲史, 中村静夫, 片山高嶺, 熊谷英彦. Changes in microbiota population during fermentation of Narezushi, as revealed by pyrosequencing analysis. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 査読有, 76 巻, 2012, 48-52.

③中川明, 南博道, 金柱成, 小柳喬, 片山高嶺, 佐藤文彦, 熊谷英彦. A bacterial platform for fermentative production of plant alkaloids. Nature Communications, 査読有, 2 巻, 2011, 326.

④小柳喬, 清原正志, 松井裕, 山本恵子, 近藤哲史, 片山高嶺, 熊谷英彦. Pyrosequencing survey of the microbial diversity of “narezushi”, an archetype of modern Japanese sushi. Letters in Applied Microbiology, 査読有, 53 巻, 2011, 635-640.

〔学会発表〕(計 12 件)

①小柳喬, 中川明, 桜間晴子, 山本恵子, 桜井直文, 高木幸信, 南博道, 片山高嶺, 熊谷英彦. Characterization of 3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine (L-DOPA) decarboxylase from *Pseudomonas putida* KT2440. 第 12 回 日中韓酵素工学会議. 2012. (金沢).

②中川明, 松村栄太郎, 小柳喬, 松田元規, 南博道, 片山高嶺, 佐藤文彦, 熊谷英彦, 山本憲二. 改良型ベンジルイソキノリンアルカロイド生合成系を用いた大腸菌でのレチクリン生産. 日本農芸化学会大会 2012 年度大会 (京都).

③中川明, 南博道, 松村栄太郎, 松田元規, 小柳喬, 片山高嶺, 佐藤文彦, 熊谷英彦. 大腸菌を用いた植物アルカロイドの発酵生産. 日本分子生物学会 2011 年度大会 (横浜).

④小柳喬, 清原正志, 松井裕, 山本恵子, バルラ・フローリン, 武春美, 勝山陽子, 辻篤志, 宮前博人, 近藤哲史, 中村静夫, 榎本俊樹, 片山高嶺, 熊谷英彦. 能登のなれずしの微生物フローラ～ピロシーケンス法による優勢菌種の解明～. 日本農芸化学会大会 2012 年度大会 (京都).

⑤中川明, 南博道, 金柱成, 小柳喬, 片山高嶺, 佐藤文彦, 熊谷英彦. Bacterial platform for fermentative production of plant alkaloids. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (札幌).

⑥小柳喬, 清原正志, 松井裕, 山本恵子, バルラ・フローリン, 四十万谷正久, 榎本俊樹,

片山高嶺, 熊谷英彦. 金沢産発酵食品「かぶらずし」の微生物フローラ～次世代シーケンサーを用いた経時的菌叢変化の追跡～. 日本乳酸菌学会 2011 年度大会 (大阪).

⑦小柳喬, 清原正志, 松井裕, 山本恵子, バルラ・フローリン, 四十万谷正久, 榎本俊樹, 片山高嶺, 熊谷英彦. Pyrosequencing analysis of the bacterial flora of “kaburazushi”, a traditional lactic acid-fermented pickle in Japan. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (札幌).

⑧中川明, 小柳喬, 南博道, 片山高嶺, 佐藤文彦, 熊谷英彦. 大腸菌を用いたベンジルイソキノリンアルカロイド直接発酵系の構築. 日本農芸化学会 2011 年度大会 (京都).

⑨小柳喬, 清原正志, 松井裕, 山本恵子, バルラ・フローリン, 四十万谷正久, 榎本俊樹, 片山高嶺, 熊谷英彦. ピロシーケンサーを用いた石川県産発酵食品「かぶらずし」の菌叢解析. 日本農芸化学会 2011 年度大会 (京都).

⑩中川明, 南博道, 小柳喬, 眞志喜桜, 片山高嶺, 佐藤文彦, 熊谷英彦. 大腸菌を用いたベンジルイソキノリンアルカロイド生合成系の構築. 日本農芸化学会 2010 年度大会 (東京).

⑪小柳喬, 桜井直文, 吉村恵子, 中川明, 高木幸信, 南博道, 片山高嶺, 熊谷英彦. バクテリア由来芳香族アミノ酸脱炭酸酵素の機能解析. 日本農芸化学会 2010 年度大会 (東京).

⑫小柳喬, 松井裕, 南博道, 片山高嶺, 熊谷英彦. 乳酸菌由来チロシンデカルボキシラーゼの遺伝子クローニングおよび性状解析. 日本農芸化学会 2009 年度大会 (福岡).

〔図書〕(計 1 件)

熊谷英彦, 小柳喬, 松井裕, 片山高嶺, 石川県伝統発酵食品の菌叢解析と機能性食品開発. 食品と開発 (UBM メディア (株)), 6 巻, 2012, 77-80.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 3 件)

名称: 乳酸発酵におけるアミン生成制御法

発明者: 小柳喬, 片山高嶺, 熊谷英彦

権利者: 石川県立大学

種類: 特許

番号: 特願 2012-072660

出願年月日: 24 年 3 月 28 日

国内外の別: 国内

名称: 芳香族アミンの製造方法

発明者: 小柳喬, 南博道, 片山高嶺, 熊谷英彦

権利者：味の素株式会社  
種類：特許  
番号：特開 2011-130744  
出願年月日：21年12月25日  
国内外の別：国内

名称：植物ベンジルイソキノリンアルカロイドの生産方法  
発明者：中川 明、南 博道、片山高嶺、熊谷 英彦  
権利者：石川県  
特許出願番号：2010-212261(2010年9月22日国内出願)  
国際出願番号 PCT/JP2011/71520(2011年9月21日出願)

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

熊谷 英彦 (KUMAGAI HIDEHIKO)  
石川県立大学・生物資源環境学部・特任教授  
研究者番号：70027192

### (2) 研究分担者

片山 高嶺 (KATAYAMA TAKANE)  
石川県立大学・生物資源工学研究所・准教授  
研究者番号：70346104

小柳 喬 (KOYANAGI TAKASHI)  
石川県立大学・食品科学科・助教  
研究者番号：20535041

松井 裕 (MATSUI HIROSHI)  
研究者番号：40336730

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：