

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658069

研究課題名(和文)パラコッカス属細菌のイノシトール代謝を用いたシロイノシトール生産系の開発

研究課題名(英文)scyllo-inositol production using inositol catabolic pathway in Paracoccus sp. 43P.

研究代表者

中村 顕 (NAKAMURA, Akira)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：10207863

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、Paracoccus sp. 43P株のinositol代謝経路を用いて、安価なmyo-inositol (MI)を、アルツハイマー病の治療薬として期待されるscyllo-inositol (SI)へと変換する生産系の確立を目指した。まずSIへの変換に関与する2種の酵素(IoIG, LgdA)を精製し、試験管内での反応を行ったところ、最大で35%の変換効率でSIが生産された。このことから予定したSI生産系の確立が可能であることが示された。次に43P株のioIE破壊株を用いてSI生産を検討したところ、約20%の変換効率でSI生産が可能であった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to develop a scyllo-inositol (SI) production system from myo-inositol (MI), using MI dehydrogenase (IoIG) and scyllo-inosose reductase (LgdA) of Paracoccus sp. 43P. In vitro reaction with both the enzymes produced 17.8 mM SI from 50 mM MI after 10 h reaction, showing that at these enzymes can be used for SI production, with relatively high conversion rate (35%).

The ioIE deletion mutant of strain 43P, which blocks downstream catabolism of scyllo-inosose, was constructed and used for bioconversion of MI to SI. This strain achieved about 20% conversion to SI after 96 h cultivation in a minimal medium with galactose as a carbon source.

研究分野：微生物分子生物学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：scyllo-inositol myo-inositol Paracoccus sp. 43P bioconversion

1. 研究開始当初の背景

Inositol は、シクロヘキサン環の各炭素原子に水酸基が付加した構造を取っており、水酸基の立体配座により合計 9 種類の立体異性体が存在する。立体異性体の中では、*myo*-inositol (MI) が自然界で最も大量に存在し、特にそのリン酸化体(フィチン酸)は、植物種子のリン酸の貯蔵形態として多量に含まれていることが知られている。

Inositol 類の中には人に対して生理活性を有するものが知られている。例えば、MI はパニック障害や強迫性障害、あるいはうつ病の症状緩和に効果があるとされている。また *D-chiro*-inositol (DCI) は、糖尿病や多嚢胞卵巣症の治療に有効であると報告されている。同様に、*scyllo*-inositol (SI) は、作用機構は未解明なものの、アミロイドβタンパク質の凝集を抑制することから、アルツハイマー病の治療薬として期待されている。しかしながら SI は自然界での存在量が少なく、実用化には至っていないのが現状である。Yamaoka ら (*Microb. Cell Fact.*, **10**, 69, 2011) は、枯草菌の inositol 代謝経路を改変し、MI dehydrogenase (IolG) 及び SI dehydrogenase の逆反応 (*scyllo*-inosose (SIS) reductase) を利用することにより、安価な MI を SI へと変換するバイオコンバージョン系の構築を報告している。この系では、変換効率約 50% と報告されているが、さらなる変更効率の向上が望まれている。

2. 研究の目的

我々は以前の研究で、土壌より *L*-グルコース資化菌 *Paracoccus* sp. 43P 株を分離し、その *L*-グルコース代謝機構について明らかにした。その過程で代謝の初発反応を司る酵素 *L*-glucose dehydrogenase (LgdA) をコードする遺伝子が、推定 inositol 代謝経路を構成する遺伝子群とクラスターを形成しており、さらに LgdA が *L*-glucose dehydrogenase 活性に加えて SI dehydrogenase 活性及びその逆反応の SIS reductase 活性を示すことを見出した。このクラスター中には *iolG* と推定される遺伝子も存在していたので、43P 株を用いて SI 生産系の開発が可能であると考えた。特に LgdA の SIS reductase 活性は、枯草菌酵素の該当する活性よりも強いいため、より効率の良い変換が可能ではないかと考えた。

以上より本研究では、43P 株の *iolG* 及び LgdA を用いて、MI を SI へと変換するバイオコンバージョン系を構築し、枯草菌系の変換効率を上回る変換を達成することを目指した。本研究のコンセプトを Fig. 1 に示す。

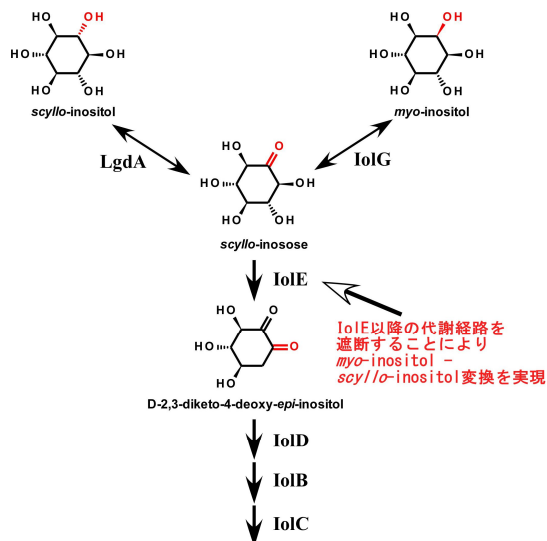


Fig. 1. 本研究のコンセプト

3. 研究の方法

(1) 推定 *iolG* の機能解析

43P 株ゲノムより推定 *iolG* 遺伝子を PCR により単離し、大腸菌を宿主に発現・該当酵素を精製し、所定の酵素活性 (MI dehydrogenase) を有しているかどうかを検討した。同時に精製 LgdA とのカップリング反応により、試験管内で MI を SI へと変換する反応が可能かどうかを検討した。

(2) 43P 株の *iolE* 欠損株の作製

pBBR1MCS2 由来の *mob* 遺伝子領域を pUC19 に含む自殺プラスミド pUC19*mob* に、*iolE* ORF を導入し、さらに同 ORF 内に Km 耐性カセットを挿入したプラスミドを作製した。このプラスミドを、*tra* 遺伝子を保持する大腸菌 S17-1 株に導入し、接合伝達により 43P 株に導入した。形質転換体を Km 耐性で選択した後、PCR により *iolE* 破壊を確認した。

(3) *iolE* 破壊株を用いた SI 生産の検討

作製した *iolE* 破壊株を MI 存在下で培養し、経時的に培養上清中の MI、SI 量を HPLC により定量した。

4. 研究成果

(1) 推定 *iolG* の機能解析

43P 株の *iolG* 遺伝子を、大腸菌 pET system を用いて発現し、N 末端に付加した His-tag を利用して酵素を精製した。精製酵素は予想通り MI dehydrogenase 活性を示し、その比活性は 0.19 U/mg protein であった。

次に精製した *iolG* と LgdA を用いて試験管内で反応させることにより、実際に MI の SI 変換が可能かどうかを検討した。pH 7.0 で反応させた場合には、SI 生産は認められなかつ

たが、両酵素の至適 pH が LgdA は pH 6.0、IolG は pH 9.0 と大きく離れていたためであることが判明した。そこで、両酵素がある程度の活性を示す pH 7.5 で反応を行ったところ、45 分以降に SI が検出されるようになった。最終的に 10 時間の反応後に、17.8 mM の SI の生産が認められた (Fig. 2)。これは基質として添加した MI の量 (50 mM) に対して、変換効率約 35% に相当する。

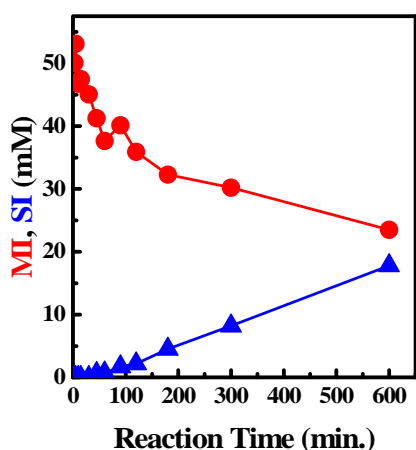


Fig. 2. IolG-LgdA coupling 反応を用いた SI 生産

以上の結果から、43P 株の IolG、LgdA を用いて SI へのバイオコンバージョンが可能であることが判明するとともに、試験管内の反応でもある程度の高い効率で SI の生産が可能であることが明らかになった。

(2) 43P 株の *iolE* 破壊株の作製

43P 株を用いてバイオコンバージョン系を構築するには、同株の SIS 以降の inositol 代謝経路をブロックする必要がある。そこで、inosose dehydratase をコードすると推定される *iolE* 遺伝子の破壊株の作製を行った。43P 株への遺伝子導入は、現在までのところ接合伝達でのみ可能なので、*mob* 遺伝子を含み 43P 株内では複製ができない自殺プラスミド pUC19mob を用いることとした。

pUC19mob に *iolE* ORF をクローン化し、さらに同 ORF 内に pBBR1MCS2 由来の Km 耐性遺伝子を挿入した。このプラスミドを大腸菌 S17-1 株に導入し、さらに 43P 株との接合伝達により 43P 株に導入し、Km 耐性株を取得した。Km 耐性株より PCR を用いて、ゲノム上の *iolE* 遺伝子に相同組換えにより Km 耐性遺伝子が挿入された株を選択した。この株が MI 資化能を失っていたことから、inositol 代謝経路が遮断されていることを確認した。

(3) *iolE* 破壊株を用いた SI 生産の検討

得られた *iolE* 破壊株を 50 mM MI 存在下で

培養し、SI 生産について検討した。D-glucose を炭素源として含む最少培地で培養したところ、培養 96 時間後に 6.6 mM の SI の生産が確認された。さらに炭素源を D-galactose に変更したところ、生産量は 10.1 mM となった (変換効率約 20%)。同時に DCI も 4.4 mM 検出された (Fig. 3)。培養条件、特に培地中の窒素源について検討したが、tryptone 及び yeast extract を添加してより rich な培地条件にすると、SI 生産量の減少が認められた。また、炭素源についても検討したが、D-galactose を用いた場合が最も生産量が高かった。

DCI が生産されていたことより、43P 株中の IolI (inosose isomerase) が作用していることが推察されたので、*iolE-iolI* 同時破壊株の作製を試みたが、取得には至らなかった。

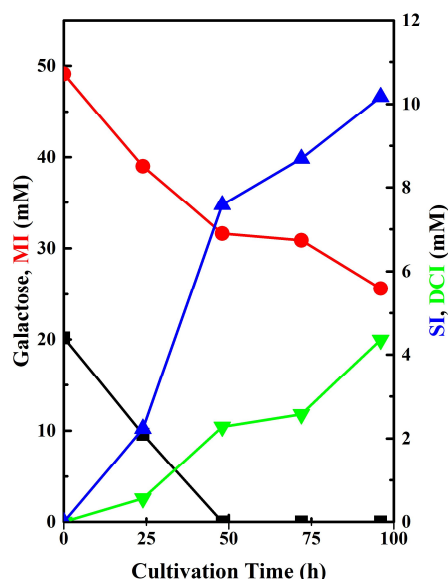


Fig. 3. *ΔiolE* 株による SI 生産。培養液中の各物質の濃度を HPLC により定量した。

以上のように本研究では、43P 株の inositol 代謝経路を利用して、MI を SI へ変換するバイオコンバージョン系の構築に成功したが、SI への変換効率は枯草菌の系よりも低いものであった。今後は *iolI* 破壊の導入や培養条件のさらなる検討、さらに 43P 株を宿主とした高発現系の構築とその利用などにより、変換効率の向上が望まれる。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

中村 顕 (NAKAMURA Akira)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：10207863