

# ゲノム機能解析に基づくパスウェイデザインによる有用希少イノシトール類の生産

●吉田 健一

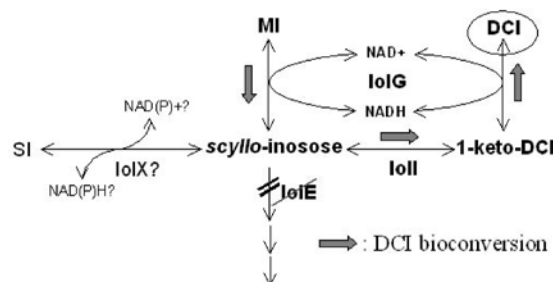
神戸大学 大学院農学研究科 生命機能科学専攻

## <研究の目的と進め方>

イノシトールとは1,2,3,4,5,6-シクロヘキサンヘキサオールの総称で、6個の水酸基の配座バリエーションによって9種の異性体が存在し、なかには特徴的な生理活性を示すものがある。本研究は、枯草菌ゲノム機能解析により解明されたイノシトール分解経路を応用して人為的に代謝経路(パスウェイ)をデザインし、疾病治療効果が期待される希少イノシトール異性体を簡便なバイオコンバージョンによって生産する独自の応用ゲノム研究である。既に、パスウェイデザインを施した枯草菌を作成して、糖尿病治療に有効であると期待される希少イノシトール D-*chiro*-inositol をバイオコンバージョンで生産するプロトタイプ研究に成功したが、人為的パスウェイデザインの実行は意外にもリン酸欠乏ストレスを引き起こして生産量の低下を招いており、本研究ではこのストレスの解明と解消を含めて生産性向上を目指す。加えて、上記の手法をさらに拡大活用して、アルツハイマー病治療への有効性が注目される別の希少イノシトール *scyllo*-inositol の生産にも取り組む計画である。本研究は、上記2種の有用希少イノシトールの生産という具体的目標のみならず、ゲノム機能解析に基づくパスウェイデザインによる有用物質生産の実践という学術的な目的を内包する。

## <2008年度の研究の当初計画>

枯草菌における MI 分解経路の本流は、下図の上から下へと流れる多段階反応である。MI は IolG によって脱水素されてケトン体 *scyllo*-inosose となり、次いで *scyllo*-inosose は IolE によってさらに脱水され、その後順次プロセスされて最終的に解糖系へと流入する(図では IolE 反応以降の詳細は省略した)。一方、DCI は MI 同様に IolG によって脱水素されて別のケトン体 1-keto-DCI を与えるが、これが IolI によって異性化され *scyllo*-inosose となる。すなわち、DCI も中間代謝産物 *scyllo*-inosose を介して MI 分解経路に流入する。MI と DCI を繋ぐ3段階反応はいずれも可逆反応であるので、IolE を不活性化して MI と DCI を相互変換でき得る新たなパスウェイを導入した枯草菌を MI を含む培地条件で培養すると、細胞内に *scyllo*-inosose が蓄積され、さらにそれが DCI へとバイオコンバージョンされて培地に蓄積した。しかし、現状の変換効率は6%程度と低い。人為的な DCI 生産パスウェイの実行がリン酸欠乏時と同様のストレスを引き起こし、変換効率を下げの一因となっていることが判明し、このストレスの本質の解明と解消が目標となっている。また、その他にも変換効率を上げる要因を2点想定し、初年度は以下の3点について研究を計画する。



### ① NAD<sup>+</sup>/NADH バランスの変動解析：

人為的な DCI 生産パスウェイに関与するリン酸含有化合物は NAD<sup>+</sup>/NADH だけである。予備的検討によると、NADH 脱水素酵素 II をコードする *yjID(ndh)* を破壊すると DCI の生産量が数 10% 増加する傾向が見られた。このことは、細胞内の NAD<sup>+</sup>/NADH バランスがリン酸欠乏シグナルと関連し、さらに変換効率に影響する可能性を示し、さらには有効利用できるリン酸量と細胞呼吸によるエネルギー生産の関連を暗示しており、非常に興味深い。そこで、*yjID(ndh)* 破壊やその他 NAD<sup>+</sup>/NADH バランスを変更する変異を導入してリン酸レギュロンの発現変動を解析する。

### ② DCI トランスポーターの解析：

DCI の細胞内外への輸送もバイオコンバージョン生産においては考慮すべきファクターである。申請者は2種の MI トランスポーター IolT と IolF を同定した。MI の場合 IolT が主たる取り込みを担うのだが、予備データによると DCI の場合はむしろ IolF に依存する傾向が示唆されている。放射性標識された DCI を入手できる目処があったので、これを利用して DCI の取り込み解析を行い、DCI 輸送とバイオコンバージョン効率との関連について研究を進める。

### ③ SI 代謝との関連：

DCI バイオコンバージョンにおいて、その変換効率が低い原因として IolE の不活性化によって蓄積する *scyllo*-inosose が別の経路に漏れている可能性が疑われる。想定される別経路は SI 分解系であり、申請者はこの分解系を想定するに足る枯草菌が SI を利用する事実を確認している。さらに、この分解系を担う未同定の IolX (図参照) が可逆的に *scyllo*-inosose を変換して SI を副産物として与えている可能性を示唆する予備的結果を得た。この確証を得るために MI と SI の分離が可能となる改良型 HPLC システムを用いる必要があり平成 20 年度の備品として申請する。枯草菌ゲノムには IolG のパラログが少なくとも 8 遺伝子あり、IolG 自体は SI と全く反応しない。IolX の候補が残るパラログのどれかであるという仮定を立て、それぞれの破壊株のうちで SI を利用できないものを探し、あるいは MI 資化と SI 資化の生育条件においてパラログの発現をアレイ解析して SI 資化との相関を

考慮することで IolX を同定する計画である。

### < 2008 年度の成果 >

#### ① NAD<sup>+</sup>/NADH バランスの変動解析：

NADH 脱水素酵素をコードする *yjID(ndh)* を破壊すると DCI の生産量が数 10% 増加する傾向が見られた。このことは、細胞内の NADH 濃度が NAD<sup>+</sup> に比して上昇することが DCI 変換の効率化に寄与する可能性を示唆した。しかし、*yjID(ndh)* を破壊しても、依然として DCI バイオコンバージョン時には *pho* レギュロン遺伝子群の誘導が低下することなく、すなわちリン酸欠乏シグナルは解消されなかった。従って、NADH 濃度が NAD<sup>+</sup> に比して上昇することは DCI バイオコンバージョンに功を奏するものの、リン酸欠乏シグナルの解消には影響しない可能性が濃厚になった。

一方、DCI バイオコンバージョンを行う細胞内において、*ndh* はむしろ誘導されており、つまりこのことから当初の推定とは逆に DCI バイオコンバージョン時において細胞は NADH 濃度を NAD<sup>+</sup> に比して低下させるべく反応していることが示唆された。

今年度の研究経過より、NAD<sup>+</sup>/NADH バランスがリン酸欠乏シグナルの発生と関係するのではないかという当初の推定はほぼ否定された。従って、今後は DCI コンバージョンとリン酸欠乏シグナルの発生をつなぐ手がかりを再度一から検証し直す。しかし、いずれにせよ NAD<sup>+</sup>/NADH バランスが DCI 変換効率に影響することは確かめられたので、今後はこのポイントについても解析を進める必要性が示された。

#### ② DCI トランスポーターの解析：

本研究立案時点で調査した際に放射活性標識された DCI をカタログに掲載していたメーカー数社に問い合わせたが、何れもその実は受注生産であり、かつあろうことか現在に至っては各社共に原料入手の目処が立たず実際には供給不可能であることが判明した。従って、本研究を遂行するためには、この標識化合物を自作することを余儀なくされたため、本年度はそのための準備を行うことに方針を転換した。具体的には、試験管内で IolG と IolI を MI に作用させれば DCI を 10% 程度の変換率で得ることができるので、<sup>14</sup>C(U) MI を原料に <sup>14</sup>C(U) DCI を酵素反応によって作成することにした。

ここで予想される問題点は、

- 1) <sup>14</sup>C(U) MI が高価の供給量も限られること
  - 2) MI/DCI の変換効率が低いこと
  - 3) MI と DCI の分離が悪いこと
- 以上の 3 点である。

1), 2) については、可能な限りの小容量で反応を組むことで対応する生成酵素またはそれを固定化したものを検討して高濃度の生成酵素を使用することにした。3) については TCL による分離と抽出が利用できることがわかり、適正条件をほぼ定めることができた。

#### ③ SI 代謝との関連：

*scyllo*-inosose と SI を相互に変換する酵素として推定していた IolX は実は 2 つの遺伝子 *yisS* と *yvaA* の産物、2 つの酵素であり、それぞれが独立してこの反応を触媒することが判明した。この成果は本年度最大の成果であり、*yisS* を *iolX*, *yvaA* を *iolW* と改名して論文発表の準備を進めている。

本年度予算で導入した改良型システムの立ち上げは見事に功を奏し、IolG パラログのうち IolX (YisS) は NAD<sup>+</sup> に依存して主として SI を *scyllo*-inosose に酸化する反応を担い、逆に IolW (YvaA)

が NADPH に依存して *scyllo*-inosose を SI に還元する反応を担うことが判明した。さらに、この知見を応用して MI/SI バイオコンバージョンが可能となることを予備実験で確かめ、新たな SI 製造の方法として特許出願することができた。この成果についても、独立して論文発表の準備に取り掛かったところである。

### < 国内外での成果の位置づけ >

本研究は国際的にもユニークなバクテリア型イノシトール代謝系の応用であり、その成果の含む独創性や生産物がもたらす社会的な意義など大いに注目されている。特に、DCI と SI のバイオコンバージョン生産は、代表者が本応用ゲノム特定領域研究とは別途参画している科学技術振興調整費・先端融合領域イノベーション創出拠点の形成「バイオプロダクション次世代農工連携拠点」プロジェクトとの関連から、プロジェクト参画の工学系研究者や協働企業との連携によって早期の実用化が望まれている。

### < 達成できなかったこと、予想外の困難、その理由 >

前述の通り、DCI バイオコンバージョンに伴うリン酸欠乏シグナルの発生源が NAD<sup>+</sup>/NADH バランスの変動で説明できないことは推定に反していた。この点は再度アイデアの見直しからやり直すほかない。本年度着手できなかったメタボローム解析を含めて来年度の課題とする。

一方、当初入手が可能と考えられた標識 DCI の供給が途絶えていたことは大きな痛手となった。しかし、本年度の検討によってすでに当該化合物の自作はほぼ目途が立っており、来年度は予定していたトランスポーターの解析に着手できるものと期待している。

### < 今後の課題 >

本年度の研究成果より、DCI バイオコンバージョンの効率化に、細胞内の NADH 濃度を NAD<sup>+</sup> に比して上昇させることが効を奏することが示唆されており、この点に重点的な検討を加える。さらに、新たに判明した IolX, IolW の制御を加味して SI バイオコンバージョンの洗練を目指す。

一方、DCI バイオコンバージョンに伴うリン酸欠乏シグナルの発生源の特定については、一からの再出発となるが、メタボローム解析や上述の SI 代謝との関連を視野に入れて新展開を試みる。

イノシトール異性体の細胞内取り込みの解明については、まず標識 DCI の作成を一里塚として実際の解析着手を急ぐ。また、可能であれば標識 SI の作成にも挑戦し、同様の解析への糸口を探る。

以上最終的には得られた知見をすべて統合して、効率的に DCI および SI を生産する方法論の確立を目指す。

### < 成果公表リスト >

#### 1) 論文/プロシーディング

Yoshida, K., Yamaguchi, M., Morinaga, T., Kinehara, M., Ikeuchi, M., Ashida, H., and Fujita, Y. (2008) *myo*-Inositol catabolism in *Bacillus subtilis*. J. Biol. Chem. 283(16), 10415-10424. (0806161124)