バイオプロセスによるカルノシン生産法の開発

倉本 歩[1,3]*・木野 邦器[1,2]・佐藤 謙一郎[3]・岡田 行夫[3]

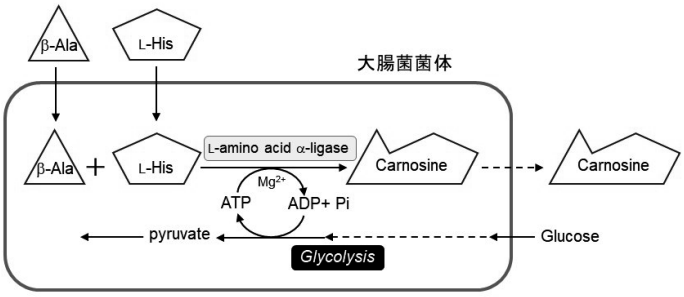
[1]早稲田大学理工学術院総合研究所，[2]早稲田大学先進理工学部 応用化学科，[3]東海物産株式会社

〒438-0012　静岡県袋井市国本 2391　東海物産株式会社　食品研究所

Tel: 0538-42-1410　Fax: 0538-44-3005

E-mail: kuramoto@tokaibsn.co.jp

L-アミノ酸 α-リガーゼ高発現大腸菌を触媒とするカルノシン生産



【酵素法に対する菌体反応法の優位性】
・カルノシンの合成反応に必要なATPの外部添加が不要
・精製酵素の調製が必要無いシンプルな工程で生産が可能
・菌体を触媒とするため分離・精製が容易
・製造コストの低減が可能

要旨

カルノシンはβ-アラニンと L-ヒスチジンが結合したジペプチドであり，抗酸化作用や抗疲労効果など多様な生理機能を有する有用化合物である．我々はこれまでに，L-アミノ酸リガーゼを高発現させた大腸菌を用いる菌体反応法により，ラボレベルでのカルノシンの高収率生産を達成している．本研究では，カルノシンの実機生産を目指し，培養，反応，精製の諸条件をリットルスケールで検討した．低コストを可能とする高収率生産プロセスを開発したので報告する．

背景

イミダゾールジペプチド（以下，IDPs）はアミノ酸のヒスチジンを構成成分とするジペプチドの総称であり，代表的なものとして，カルノシン，アンセリン，バレニン，ホモカルノシンが知られている．これらは抗酸化作用[1)]や抗疲労効果[2)]，認知症予防効果[3)]などの機能を有する機能性素材として注目され，サプリメントや機能性食品素材として広く流通している．哺乳類や鳥類､魚類の筋肉組織中に存在するこれら IDPs は，その動物種によって存在比率や含量が異なっている[4),5)]．国内外で使用される機能性食品のほとんどはカルノシンとアンセリンであり，それらの製造は専ら鶏や鮭などの天然資源からの抽出法に依存している．しかし，天然物からの抽出は，原料の供給や価格が不安定であり,養鶏時の二酸化炭素排出も課題となっている．我々はこれらの課題を解決するため，バイオプロセスによる生産技術の開発を鋭意検討している．

イミダゾールジペプチド合成活性が向上した改変型 L-アミノ酸 α-リガーゼの創製

L-アミノ酸 α-リガーゼ（以下，Lal）は，ATP の加水分解反応と共役して無保護の L-アミノ酸同士を結合し，ジペプチドを生成する酵素の総称である．Lal のうち *Bacillus subtilis* ATCC15245 が産生する YwfE は，β-アラニンと L-ヒスチジンの 2 種類のアミノ酸からカルノシンを合成する活性を有することが報告されていたが，その合成活性は工業生産に用いるには低かった．そこで我々は YwfE の結晶構造情報などをもとに，本酵素の基質認識部位近傍のアミノ酸残基に部位特異的変異導入を施すことで，カルノシン合成活性の向上した数種類の変異型酵素を取得することに成功した[6)]．また，本酵素はβ-アラニンとメチル-L-ヒスチジンを基質とすることで，他の IDPs であるアンセリン（β-アラニル-3-メチル-L-ヒスチジン)やバレニン(β-アラニル-1-メチル-L-ヒスチジン）を効率的に合成する触媒活性を有することも明らかにしている．

菌体法を用いた効率的カルノシン生産技術の開発

LaI による合成反応に必要となる ATP は高コストであり，LaI を使用する酵素法を工業生産に移行することは現実的ではない．そこで，LaI を高発現させた大腸菌を反応触媒とする菌体反応法の開発に取り組んだ．菌体反応法では，反応液へのグルコース添加によって菌体の糖代謝系と共役して ADP から ATP が再生されるため，酵素法のように当量の ATP を外部添加する必要がない．また，微生物はペプチダーゼ活性を有するため，菌体を用いるプロセスではペプチドを直接生産することは難しいが，大腸菌のカルノシン分解活性は幸いにも微弱であり，カルノシン生産において大腸菌を使用することに問題は無いと考えた．基質アミノ酸，グルコースおよび Mg^{2+}を含む反応液で菌体反応を行ったところ，効率的にカルノシンを合成することができた[7]（図 1）。

component	concn
β-Ala	12.5 mM
L-His	12.5 mM
D-Glucose	0 or 50.0 mM
$MgSO_4$	12.5 mM
LaI expressed whole cell	10.0 mg/mL
HEPES (pH8.0)	100 mM
30℃, 20 h	5 mL

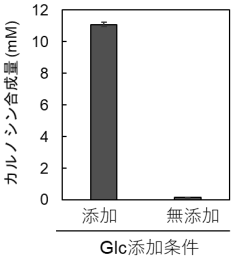


図 1．菌体反応法によるカルノシン合成

本カルノシン生産プロセスを実用化するため，培地コストの削減と 1 バッチ反応あたりの生産量向上に向けて検討した。反応条件の検討において，反応液の菌体濃度とカルノシン生産量の相関性を確認しており，生産量向上のためには培養で得られる菌体量を増加させることが必要と考えた．そこで，これまでラボ試験で大腸菌の培養に使用していた LB 培地から安価かつ食品利用可能な原料を主成分とする工業用の培地組成へ変更したところ，培養で得られる菌体量は増加したが，当該菌体にカルノシン合成活性は認められなかった．この原因として，LaI の発現においてラクトースを発現誘導剤とする pET システムを用いているため，炭素源のグルコースが培地中に含まれることにより CRP-cAMP 系転写制御やラクトースの取り込み阻害が起こり，目的酵素の発現が抑制されたと推察した[8]．この課題を解決するため，菌の生育に必要な炭素源をグルコースからグリセロールへと変更し，ラクトースをあらかじめ培地に添加して培養した結果，改良培地による菌体量増を維持しながらカルノシン合成活性を改善できた．本培養菌体を用いてβ-アラニン，L-ヒスチジン，グルコース，硫酸マグネシウムを含む反応液で 25 時間反応させたところ，LB 培地培養菌体を用いた時には 3.1 g/L だったカルノシン生産量は菌体量増の効果もあって 7.5 g/L に向上させることに成功した（図 2）．

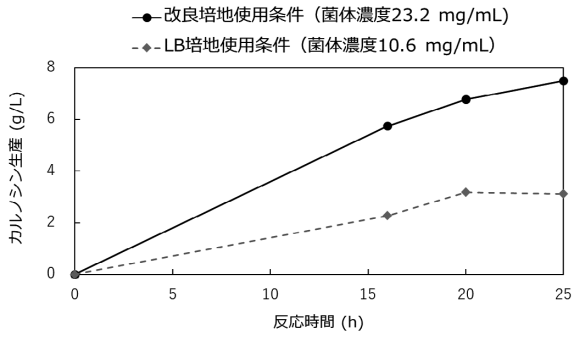


図 2．LB 培地および改良培地で得られた培養菌体を用いた時のカルノシン生産比較

カルノシン精製技術の開発

東海物産㈱では鶏肉や鮭の抽出液から高純度のカルノシンやアンセリンを得るために独自の分離精製技術を確立している（平成 30 年度文部科学大臣表彰 科学技術賞受賞）．本研究で得られたカルノシン合成後の反応液にこの分離精製技術を適用することで，98.3%の高純度カルノシン粉末の取得にも成功している．

最 後 に

我々は国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）の支援を受けて，菌体反応によるカルノシンやアンセリンの生産法の開発に取組んでいる．カルノシンについては，上述の通り，合成から精製まで一連の工程を確立した．またアンセリンについてはカルノシンをメチル化する菌体反応系を検討中である．今後は，ラボスケールから実機生産規模へのスケールアップを行ない，これら IDPs の商品化を達成し，健康長寿の実現に貢献していきたい．

文　　献

1) Boldyrev, A., A. *et al.*: *Physiol Rev.*, **93**(4), 1803-1845(2013).
2) Nordsborg, N. *et al.*: *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **285**(1), 143-148(2003).
3) Hisatsune, T. *et al.*: *J Alzheimers Dis.*, **50**(1), 149-159(2016).
4) Abe, H.: *Biochem. Physiol. B. Comp. Biochem.* **76**(1), 35-39(1983).
5) Sewell, D., A. *et al.*: *J. Physiol.*, **455**, 447-453(1992).
6) Kino, K. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **87**(4), 389-394(2023).
7) 駒林ら，日本生物工学会 2018 年度大会講演要旨集，p.283, 3Ma03
8) 森田鉄兵，饗場弘二，化学と生物： **43**(4),222-228(2005).