

有用希少イノシトールのバイオアベイラビリティと バイオコンバージョン生産

吉田 健一^{1*}・蓮沼 誠久²

ミオ-イノシトールはイノシトール類の中で天然に最も豊富に見いだされるものであり、枯草菌などのバクテリアはこれを炭素源として効率よく利用する。枯草菌のミオ-イノシトール代謝経路は、D-キロ-イノシトールならびにシロ-イノシトールという他のイノシトール異性体を代謝する分岐経路と連絡している。そして、これらの連絡反応を触媒する複数の酵素とその遺伝子を同定し、さらにそれらを合目的に制御することによって、代謝経路の人為改変を施した枯草菌が作り出された。こうして生まれた“パスウェイデザイン”枯草菌はミオ-イノシトールをD-キロ-イノシトールに、あるいはシロ-イノシトールへと選択的にバイオコンバージョンできる。後述のとおり、D-キロ-イノシトールならびにシロ-イノシトールは、特異な生理活性を持つ有用化合物であるが、天然には希少であり微生物によるバイオコンバージョンで生産が可能となることは、これらの利用促進のために有効かつユニークな技術として期待されている。

しかし、現状の技術ではいまだ変換効率が低く、さらなる改良の余地があることも事実である。したがって、これからは変換効率の向上に繋がるさまざまな培養条件の検討、および更なる遺伝子改変の可能性を探る必要があり、このためにはイノシトール類を正確に定量評価すること、多検体処理に対応することなど、正確かつ迅速な分析モニタリング技術を整備する必要がある。そこで、GC-TOFMS分析法の適応を検討した結果、ミオ-イノシトールとシロ-イノシトールの分離が不十分で正確な定量ができないという従来の問題が解消されただけでなく、多量検体処理に加えて、細胞内の代謝産物の定量分析も可能となった。さらに、GC-TOFMS分析法はイノシトール類を投与したマウスの血清の分析にも適応できることがわかった。この成果は、有用イノシトール類のバイオアベイラビリティ（生物学的利用能：服用した薬物が全身循環に到達する割合）の検出が可能となったことを意味しており、イノシトール類の体内動態の理解

を含めて今後の薬理的な利用開発を進める上の突破口を開いたと期待される。

以下本稿では、有用希少イノシトールを微生物利用によってバイオコンバージョンで生産すること、ならびにそれらのバイオアベイラビリティを検定すること、という二つの試みに関し新規分析技術の導入がいかに威力を発揮しうるかという視点から話題を提供したい。

イノシトール異性体と生理活性

イノシトールとは1,2,3,4,5,6-シクロヘキサンヘキサールの総称で、6個の水酸基の配座バリエーションによって9種の異性体が存在する。なかでも自然界に最も多く存在するのはミオ-イノシトール (*myo*-inositol, 図1) であり、植物種子のリン酸貯蔵物質であるフィチン酸 (ミオ-イノシトール-1,2,3,4,5,6-リン酸) のリン酸を切り出すことでコメ (ぬか) やムギ (ふすま)などを原料として安価に供給されている。

イノシトール異性体のなかには、特徴的かつ有用な生理活性を示すものがあるが、ミオ-イノシトール以外は希少であり、かつ高価でもある。たとえば、D-キロ-イノシトール (*D-chiro*-inositol, 図1) は、糖尿病治療や多嚢胞卵巣症に有効であると期待される。この生理活性はD-キロ-イノシトールがインスリン様の機能を発揮して血糖値を低下させる、あるいは小胞体から細胞膜への小嚢移動を促進させることに由来すると考えられるが詳細はいまだ研究の途上にある¹⁾。一方、シロ-イノシトール (*scyllo*-inositol, 図1) はアルツハイマー病治療への

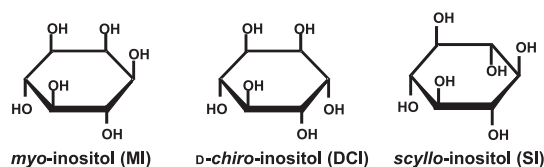


図1. 3種のイノシトール異性体の構造

*著者紹介 ¹神戸大学大学院農学研究科生命機能科学専攻（教授） E-mail: ken-yoshi@kobe-u.ac.jp

²神戸大学自然科学系先端融合研究環

有効性が注目される。この異性体の効能発揮のメカニズムについても研究が進展中である。これまでに少なくとも、アルツハイマー病の典型的症状である β アミロイドの重合・蓄積を抑制し、アルツハイマー病モデル動物（マウス）の認知症状を緩和し正常な寿命をまっとうさせることが示されている²⁾。

枯草菌のイノシトール代謝経路

枯草菌におけるミオ-イノシトール分解経路の本流は、図2に示す多段階反応であり、この経路に必要となる一連の酵素は基本的に*iolABCDEFGHIJ*からなる遺伝子クラスター*iol*オペロンにコードされている³⁾。細胞に取り込まれたミオ-イノシトール(MI, 図2)はIolGによって触媒される初発反応で脱水素されてケトン体2-ケト-ミオ-イノシトール(2KMI, 図2)となり、次いで2KMIはIolEによって脱水され⁴⁾、その後は加水分解による環構造の開裂(IolD反応)、異性化とリン酸化(IolBとIolC反応)、IolJアルドラーゼ反応など順次プロセスされて最終的に解糖系へと流入する⁵⁾。また、ミオ-イノ

シトールの細胞内への取り込みにはIolTとIolFという2つのトランスポーターがそれぞれ独立に関与していることが判明している⁶⁾。一方、D-キロ-イノシトール(DCI, 図2)もミオ-イノシトール同様にIolGによって脱水素されて別のケトン体1-ケト-D-キロ-イノシトール(1KDCI, 図2)を与えることがわかり、さらにこれがIolIによって異性化され2-ケト-ミオ-イノシトールとなる。すなわち、D-キロ-イノシトールも中間代謝産物2-ケト-ミオ-イノシトールを介してミオ-イノシトール分解経路に流入して、以降同様にして分解されるのである⁷⁾。シロ-イノシトール(SI, 図2)はIolXとIolWという2種のSI脱水素酵素の基質となり2-ケト-ミオ-イノシトールに変換される。前者酵素は NAD^+ 依存型であり、シロ-イノシトールで誘導されてシロ-イノシトールの酸化分解のために機能する。一方、後者は構成的に発現する NADP^+ 依存型酵素であり、2-ケト-ミオ-イノシトールをシロ-イノシトールへと還元する逆反応に適しているがその生理的意義はいまだ不明である⁸⁾。

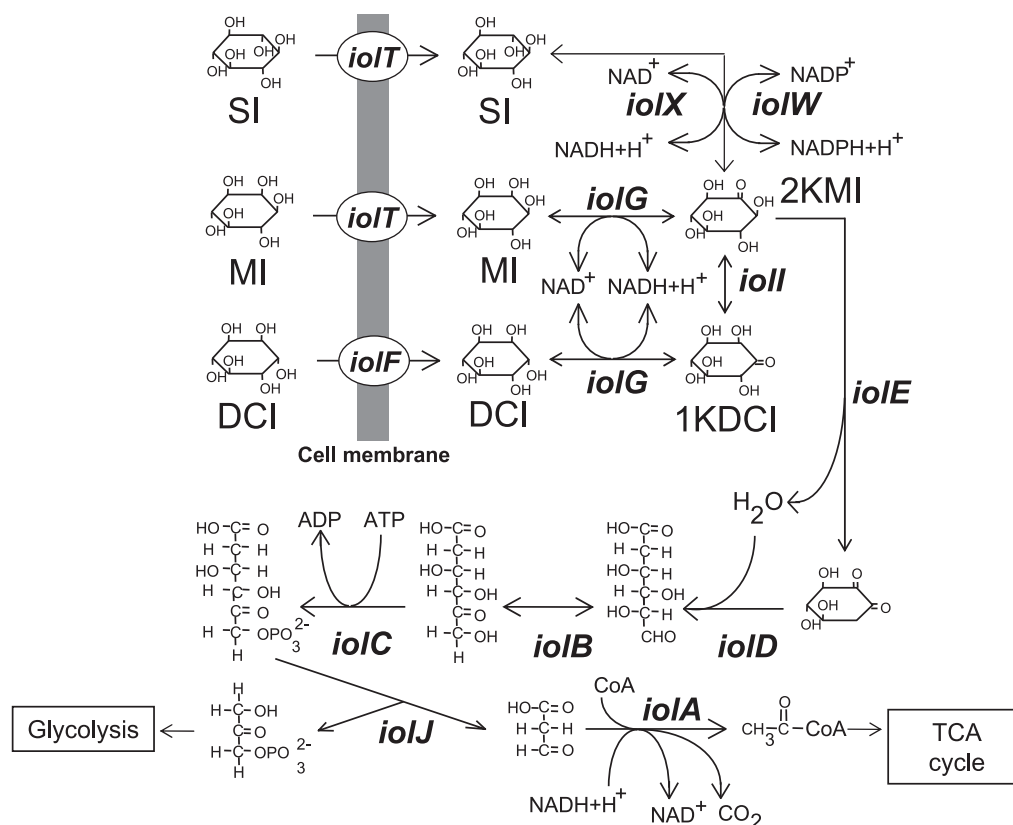


図2. 枯草菌におけるイノシトール代謝の全体像⁸⁾

イノシトールのバイオコンバージョン

筆者らは、IolIの機能を発見した際に、IolEを不活性化するとミオ-イノシトールとD-キロ-イノシトールを短絡して相互変換でき得るパスウェイを形成できると考え、このようなパスウェイによるD-キロ-イノシトールのバイオコンバージョン生産を想起した。そして、実際にそのようなパスウェイが構成的に機能するように枯草菌の遺伝子を改変しミオ-イノシトールを多量に含む培地中で培養すると、細胞内に2-ケト-ミオ-イノシトールが蓄積され、さらにそれがD-キロ-イノシトールへと変換されて培地に蓄積することを実証した⁷⁾。しかし後になって、この際にはIolXとIolWも機能するので、少なからずシロ-イノシトールが副産物として発生していたことが発覚した(YF256, 図3) (むしろシロ-イノシトールの方が量的には多い)。実は、従来法であるHPLC分析ではミオ-イノシトールとシロ-イノシトールの分離が難しかったため、この現象は見逃されており、IolXとIolWの発見の後にGC-TOFMS分析法⁹⁾の導入をもって初めて定量的に確認することができた。現在では、IolGによってミオ-イノシトールを2-ケト-ミオ-イノシトールへと変換した上で、各々の目的に応じてIolIのみ、あるいはIolWのみを作用させて、D-キロ-イノシトール(TM033, 図3)とシロ-イノシトール(TM039, 図3)をそれぞれ選択的にバイオコンバージョン生産することが可能となった(未発表)。現在はこの正確な定量分析を応用して、更なる変換率の向上を目指している。

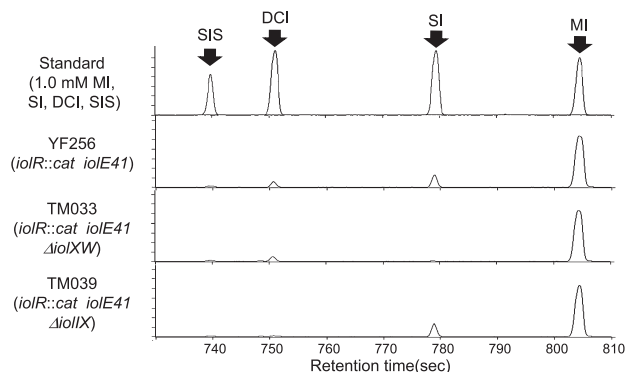


図3. 枯草菌変異株によるイノシトールバイオコンバージョンのGC-TOFMS分析. 図左に示した遺伝子改変を有する変異株(YF256, TM033, およびTM039)を1%ミオ-イノシトールを含む変換用培地で一晚培養した培養液をGC-TOFMS分析した。

納豆のピニトールとそのバイオアベイラビリティ

D-キロ-イノシトールの3位メトキシ体はマメ科ならびにマツ科の植物に含まれるイノシトール誘導体である。特に、ダイズはピニトール含量に富むことが知られている。その構造的類似性からも了解しやすいが、ピニトールにもD-キロ-イノシトールと同じ生理活性が認められ、糖尿病治療や多嚢胞卵巣症に有効であると期待される。しかし、その分離精製が困難であるため現実的にはほとんど利用されていない。

筆者らは、納豆菌にも枯草菌とほぼ同様のミオ-イノシトール分解系があり、またそれがピニトールの分解に関与していることを見いだした。したがって、ダイズを納豆菌に発酵させた食品である納豆はピニトールを含有することが望まれるが、納豆菌は発酵の過程でこれを消費してしまう。そこで、納豆菌のミオ-イノシトール分解系を不活性化すれば元々ダイズに含まれているピニトールを損なうことなく納豆に保持することができるというアイデアを得て、ピニトール含有納豆の製造方法を提案した¹⁰⁾。

ピニトール含有納豆が実用化されれば、イノシトール誘導体の食品への初の適応例となると期待されるが、冷静に現状を鑑みると食品として摂取したイノシトールの体内動態についてはいまだ報告がない。ミオ-イノシトールについてはリン脂質であるホスファチジルイノシトールに取り込まれることが容易に予見され、また血液中でもそのまま循環している可能性が高い。しかし、ピニトールについては吸収率も不明である上、体内変換の可能性もある。一般に、血清は組成が複雑な上に物性的にも扱いにくい面があるため化学分析が難しく、特にイノシトール類の分離定量は前例が乏しい。そこで、これらの体内動態を探るために、前述の微生物培養の分析で威力を発揮したGC-TOFMSの応用を試みた。

その結果、ミオ-イノシトール(MI, 図4)のみならずピニトール(PI, 図4)も、それぞれを摂取させたマウスの血清中に1 mM以上というかなりの高濃度で検出された。この濃度は、試験管内で筋肉細胞にピニトールを作用させた場合にグルコースを取り込む能力が40%も上昇することが示されている条件に匹敵する¹¹⁾。すなわち、試験管内で観察されたこの現象が実際に体内でも起こりうることを支持する事実である(未発表)。さ

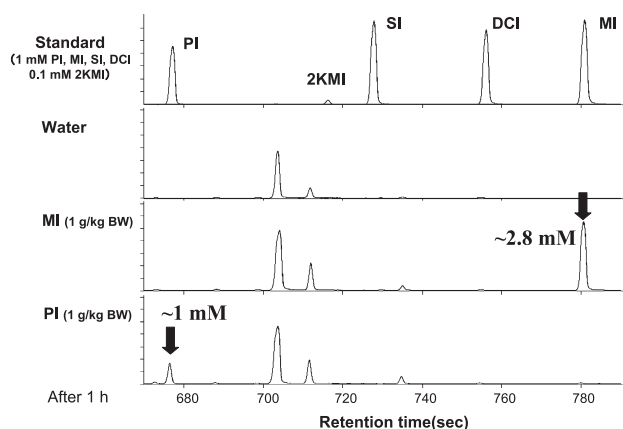


図4. マウス血清のGC-TOFMS分析結果. ミオ-イノシトールまたはピニトールを体重kgあたり1gの割合で摂取させたマウスから1時間後に採血して血清をGC-TOFMSで分析した.

らに、この結果を見る限り、ピニトールがD-キロ-イノシトールをはじめとするその他のイノシトール異性体に変換されることはほとんどないようである。

有用希少イノシトールの社会的インパクト

有用希少イノシトールのバイオコンバージョン生産法に用いる原料のミオ-イノシトールは、コメ（ぬか）やムギ（ふすま）などの大量に供給可能な未利用植物資源に含まれるフィチン酸のリン酸を切り出すことで安価に供給される。また、ダイズ（納豆）に含まれるピニトールも、未利用資源として有望である。したがって、これ

らが実用化され効率的生産手段が確立されれば、もはやこれら有用イノシトールは希少でも高価でもなくなり、その利用機会を拡大し一般への普及を図ることが可能となるだろう。これら有用イノシトールは人畜無害で、口に甘く（あるいはほとんど無味）食品への適応が可能である。変換効率を高めることや異性体の分離技術の確立など、いまだ課題が残されているが、簡便なバイオコンバージョンによって有用希少イノシトールを選択的に生産するコンセプトを具体化することに成功した意義は大きい。ピニトールの場合は、摂取したものがそのまま速やかに吸収されて体内をめぐることが確かめられた。今後の高齢化社会を鑑みるに、糖尿病やアルツハイマー病の治療および予防に役立つ機能性食品素材には大きな社会的ニーズが予見される。

文 献

- 1) Lerner, J.: *Int. J. Exp. Diabetes Res.*, **3**, 47 (2002).
- 2) McLaurin, J. *et al.*: *Nat. Med.*, **12**, 80 (2006).
- 3) Yoshida, K. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **179**, 4591 (1997).
- 4) Yoshida, K. *et al.*: *Microbiology*, **150**, 571 (2004).
- 5) Yoshida, K. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **283**, 10415 (2008).
- 6) Yoshida, K. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **184**, 983 (2002).
- 7) Yoshida, K. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 1310 (2006).
- 8) Morinaga, T. *et al.*: *Microbiology*, **156**, 1538 (2010).
- 9) Hasunuma, T. *et al.*: *Microb. Cell Fact.*, **10**, 2 (2011).
- 10) Morinaga, T. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**, 1913 (2006).
- 11) Yap, A. *et al.*: *Cytotechnology*, **55**, 103 (2007).