

枯草菌を活用する生理活性イノシトールの開発

吉田 健一^{1*}・田中 耕生²

イノシトールとは、シクロヘキサンの各炭素上の水素原子が一つずつヒドロキシ基に置き換わった構造を持つシクリトールの総称で、ヒドロキシ基の配置の組合せにより9種の異性体が存在する。これら異性体の違いは些細なことと考えられがちであるが、目を転ずればアルドースやケトースの場合にわずか1か所のヒドロキシ基の配座が異なるだけでまったく別の物質として区別されることから（たとえば、D-グルコースとD-ガラクトースの違いを思い起こしていただきたい）、実は化学的にも、また生物学的にも決して軽視はできない。

自然界にもっとも多く存在するものはミオ-イノシトール（図1. MI）である。ミオ-イノシトールは、生体内である程度は生合成されること、またさまざまな食品中にも広く含有されることから通常の栄養状態であれば欠乏症の発生は稀である。ただし、実験的に欠乏状態を作り出すと、発育不全や脱毛などの障害がみられるので、ビタミンBの一種と考えられ、脂肪肝や高脂血症の治療に用いられる場合もある。工業的には植物種子のリン酸貯蔵物質であるフィチン酸のリン酸を切出す方法で生産され、米ぬかなどを原料として比較的安価に供給される。

その他の異性体の中には、特筆すべき有用な生理活性を示すものがある。たとえば、D-キロ-イノシトール（図1. DCI）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¹⁾。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4型グルコース輸送担体の小胞体から細胞膜への移動を促進させることに由来すると考えられる

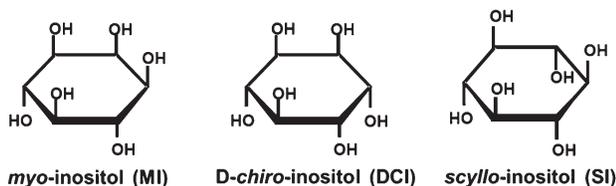


図1. 3種のイノシトール異性体の構造。イノシトールには、6個のヒドロキシ基の立体配置の組み合わせの違いによって9種類の立体異性体が存在し、図にはそのうちの3種類を示す。ミオ-イノシトール（MI）に比して、D-キロ-イノシトール（DCI）、シロ-イノシトール（SI）はそれぞれ異なる位置のヒドロキシ基が1か所だけ反転している。

が、その詳細はいまだ研究の途上にある。一方、シロ-イノシトール（図1. SI）はアルツハイマー病治療への有効性が注目され、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²⁾。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の認知症を緩和し正常な寿命を全うさせることが示されている。

ところが、これらの有用異性体は希少であり、それゆえ高価でもある。上記のように非常に興味深い生理活性を有しながら、一般に知名度が低く、また実用例が少ないイノシトール希少異性体の活用を普及させて健康増進に役立てるためには、これらの効率的な生産方法を確立することが必要となる。筆者は枯草菌のゲノム解析を通じて、イノシトールの代謝系の詳細を解明するに至り、それを応用して希少イノシトール異性体を生産する発想を得た。すでに、その方法論の開発については、ある程度の具体的な成果があがっているので、本稿では現在に至る取組みの概要を紹介したい。

枯草菌のイノシトール代謝

微生物のなかにはイノシトールを炭素源として効率的に分解利用するものがあり、枯草菌はその代表として知られる^{3,4)}。

枯草菌におけるミオ-イノシトール分解経路の多段階酵素反応の要約を図2に示す。この経路で機能する一連の酵素群は基本的に*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。ミオ-イノシトールは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（図2. 2KMI）となり、次いで2KMIはIolEによって脱水され、その後はIolDが担う加水分解による環構造の開裂、IolBによる異性化とIolCによるリン酸化、そしてIolJアルドラーゼ反応による分断など複数のプロセスを経て、最終的に生成するジヒドロキシアセトンリン酸が解糖系へ、あるいはマロニックセミアルデヒドが酸化的脱炭酸を受けて生じるアセチルCoAがTCA回路へと流入する。

D-キロ-イノシトールを代謝する場合、D-キロ-イノシトールはミオ-イノシトール同様にIolGの基質

* 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

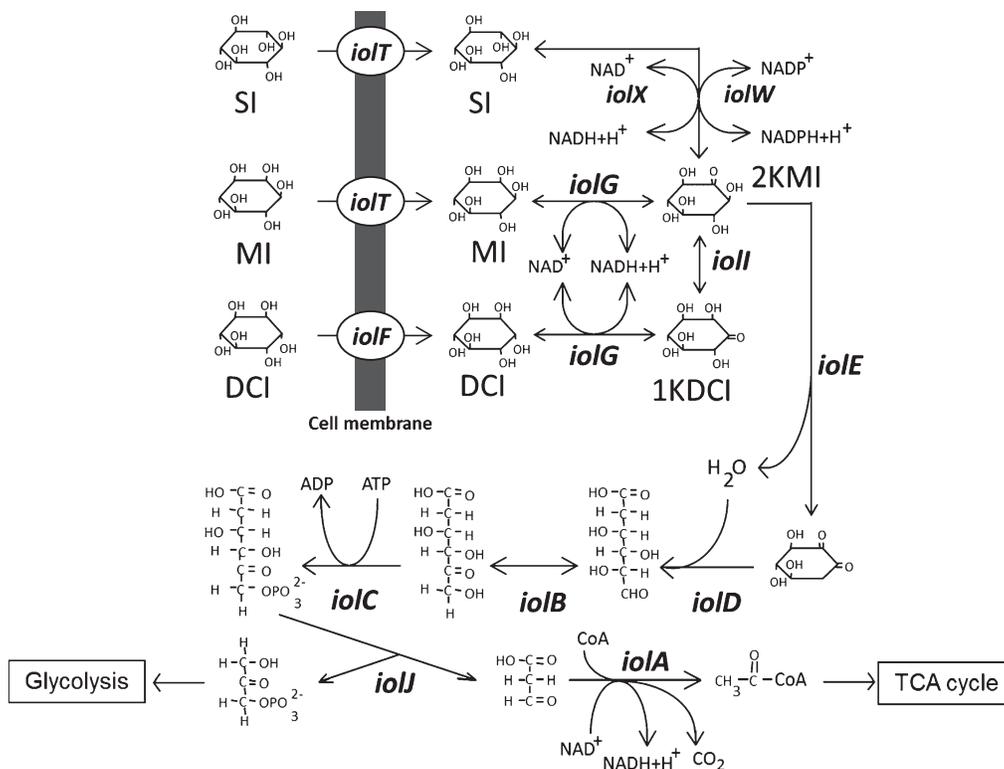


図2. 枯草菌におけるイノシトール代謝の全体像^{3,4)}. 枯草菌はミオ-イノシトール (MI), D-キロ-イノシトール (DCI), シロ-イノシトール (SI) を炭素源として分解利用することができる. この分解系に関与しているのが*iol*遺伝子群である.

となるが、脱水素されると別のケトン体1-ケト-D-キロ-イノシトール (図2. 1KDCI) となり、さらにこれがIolIによって異性化されて2-ケト-ミオ-イノシトールとなる⁵⁾. 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、以降は同様にして分解されるのである.

シロ-イノシトールはIolXとIolWという2種酵素の基質となり2-ケト-ミオ-イノシトールに変換されることが判明した⁵⁾. 前者酵素はNAD⁺依存型でシロ-イノシトールの存在によって誘導され、またシロ-イノシトールの酸化分解のために機能する. 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を優先させることが示されている.

イノシトール異性体のバイオコンバージョン

上述の通りの枯草菌のイノシトール分解経路において注目すべきは、ミオ-イノシトールとD-キロ-イノシトールおよびシロ-イノシトールから2-ケト-ミオ-イノシトール (2KMI) へと至る反応経路が、いずれも可逆反応であることである. すなわち、ミオ-イノシト-

ールを十分に供給しながら、2-ケト-ミオ-イノシトールの脱水分解を担うIolEを不活性化すると、論理的には2-ケト-ミオ-イノシトールをハブとして、この可逆的な反応経路を経て、3種のイノシトール異性体を相互変換できるはずである. このことから、筆者らは比較的安価なミオ-イノシトールを原料として、有用希少なD-キロ-イノシトールやシロ-イノシトールをバイオコンバージョンで生産する方法の開発を想起するに至った.

ミオ-イノシトールからD-キロ-イノシトールを生産するためには、まずIolGによってミオ-イノシトールを2-ケト-ミオ-イノシトールへと導いた上で、IolEとIolX, IolWの3者をすべて不活性化して以降の分解を堰き止めるとともにシロ-イノシトールへの転換経路を完全に遮断する戦略が考えられる. 逆に、シロ-イノシトールを生産するためには、IolEに加えてD-キロ-イノシトールへの経路に関わるIolIを不活性化し、それに加えてシロ-イノシトールの酸化を行うIolXも排除してIolWのみの活性を残すとよい.

そこで、実際に上記の通りに選択的な遺伝子破壊変異をそれぞれ施した枯草菌を用いて検討が行われた結果、前者D-キロ-イノシトール生産の場合、理論通りに生産を確認することができたもののIolI酵素による2-ケ

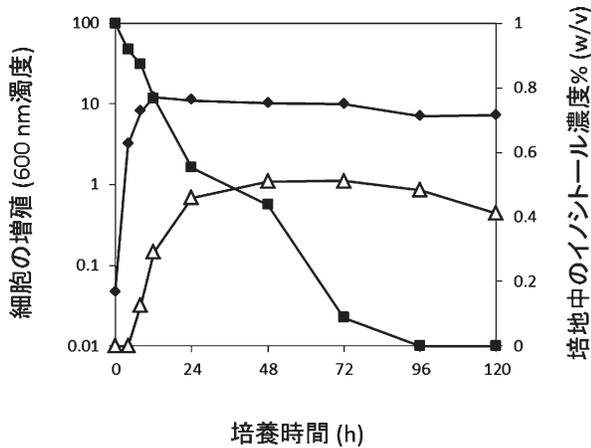


図3. 選択的な遺伝子破壊変異を施した枯草菌によるイノシトール異性体変換⁶⁾. 選択的な遺伝子破壊変異を施した枯草菌細胞をバイオコンバージョン用培地にて培養し、細胞の増殖(◆)と培地中のミオ-イノシトール(■)とシロ-イノシトール(△)の濃度を継時的に測定した⁶⁾.

ト-ミオ-イノシトールから1-ケト-D-キロ-イノシトールへの異性化が律速となるためか、残念ながら生産効率があまり上がらないことが示されている⁴⁾.

一方、後者のシロ-イノシトール生産については、理論通りの遺伝子操作を加えた菌株を用いて、天然に豊富なミオ-イノシトールをバイオコンバージョンしてシロ-イノシトールを生産する細胞工場の実現に迫る技術が確立されつつあり、以下にその到達点をまとめる。

図3に、培地中のミオ-イノシトールをシロ-イノシトールへと変換するバイオコンバージョンを実施した代表的な結果を示す。細胞の増殖度を600 nmの濁度で、培地中のミオ-イノシトールの消費量、合わせてシロ-イノシトールの生産蓄積量を継時的に計測したものである。バイオコンバージョン用の培地には元々1%のミオ-イノシトールが添加されており、それは培養の開始からほぼ一定速度で減少し、培養開始後96時間に至るまでにすべてが消費されている。シロ-イノシトールは増殖の遷移期ごろから培地へと分泌されて蓄積しはじめ、それは定常期に入ってから48時間目まで増加し続けて、およそ0.5%に達している。したがって、ミオ-イノシトールからシロ-イノシトールへの変換効率はおおよそ50%である。そしてこの際、96時間後の培地に含まれるイノシトールはシロ-イノシトールだけである。すなわち、このバイオコンバージョンを用いる付加的な利点として、比較的困難なミオ-イノシトールとシロ-イノシトールの分離精製ステップを簡略できる可能性も示された。

しかし一方で、添加したミオ-イノシトールの半量が

消失してしまったことは明らかに資源の損失である。この原因は、IoIEの不活性化に点変異を用いたためであると推定された。そこで筆者らは、昨今利用できるようになった最新の染色体操作技術によって当該遺伝子を完全に削除して、このミオ-イノシトールの損失が完全に食い止められることを確認している。さらに、これに加えて*iolG*と*iolW*を過剰に強制発現させると、培地に添加したミオ-イノシトールのすべてがシロ-イノシトールに変換されることも見いだしている⁷⁾。すなわち、枯草菌を活用するバイオコンバージョン法によるシロ-イノシトール生産の技術開発は、遂に実用可能なレベルに到達したと言えよう。今後は、培養工学やスケールアップなど、実生産を見据えた研究を進める予定である。

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)などの未利用植物資源(農業残渣)に含まれるフィチン酸であり、これら穀類の消費にともなって自ずと大量供給が可能である。フィチン酸はミオ-イノシトールの6価リン酸エステルであり、リン酸を切り出すことでミオ-イノシトールは比較的安価に供給される。しかし、フィチン酸は難溶性の塩(フィチン)を形成するために取り扱いが難しい。また、現実的なリン酸切り出しについては、酸加水分解などの化学的プロセスが一般に用いられており、そのため一旦は化学的にミオ-イノシトールを精製する手順が必須となっている。そこで、筆者らはフィチンからリン酸の切り出すフィターゼという酵素を導入して、一貫したバイオプロセスを組むことができないか検討を始めている⁸⁾。特に、枯草菌の持つ旺盛な酵素タンパク質の分泌能力に着目し、上述のバイオコンバージョン細胞からフィターゼを大量に分泌させ、フィチンに直接的に作用させることができないかという可能性に重点を置いており、これが首尾よく調べれば、コメぬかやムギふすまそのものを原料とする直接的なバイオプロセスを構築することが可能になると期待される。

有用イノシトールは上述のほかにもあり、たとえばダイズなどのマメ科植物に含まれるピニトール(D-キロ-イノシトールの3-O-メトキシ体)も有望である。ピニトールはダイズ植物体重量の少なくとも約0.5%程度を占める。しかし、他の糖質など多数の夾雑物を含む植物体からの分離精製は非常に困難であり、現状は顧みられぬまま廃棄されている。そこで、筆者らは産学連携プロジェクトを立ち上げて、この未利用資源ピニトールを

効率的に抽出精製する技術開発にも取り組んでおり、これらが実用化されればピニトール一般への普及を図ることが可能となると期待されている。

ここまで述べてきた有用イノシトールは何れも人畜無害と考えられており、また口に甘く(あるいはほとんど無味)、機能性食品素材としても適応が可能である。摂取したイノシトール類は比較的ゆっくりと代謝されるためか、大部分がそのまま体内をめぐることが示唆されており⁹⁾、アメリカ食品医薬品局(FDA)からも一般的安全性(GRAS)が認定されている。したがって、上述のように簡便なバイオコンバージョンによって有用イノシトール異性体を生産するコンセプトを具体化した筆者らの成果は、これまで希少であったものを一般普及させる可能性を切り開いたものとして意義深い。

特に、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。特筆すべきは、シロイノシトールが、FDAにより早期開発のターゲッ

トとして指定され、そのアルツハイマー病の治療や予防への有効性を評価する臨床試験がすでに米国で進行している事実である。この試験の結果如何によっては、今後ますますこの化合物の利活用が加速的に進展するものと期待される。

文 献

- 1) Larne, 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. Biol. Chem.*, **283**, 10415 (2008).
- 4) Morinaga, T. *et al.*: *Microbiology*, **156**, 1538 (2010).
- 5) Yoshida, K. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 1310 (2006).
- 6) Yamaoka, M. *et al.*: *Microb. Cell Fact.*, **10**, 69 (2011).
- 7) 吉田健一ら：日本生物工学会大会講演要旨集, 2P-122 (2013).
- 8) 辻 祥吾ら：日本生物工学会大会講演要旨集, 3P-159 (2013).
- 9) Yamashita, Y. *et al.*: *J. Agric. Food Chem.*, **61**, 4850 (2013).