

オフタルミン酸の発酵生産法の確立

伊藤 智和

名古屋大学大学院 生命農学研究科

研究の目的

オフタルミン酸 (γ -Gluamyl-2-aminobutyryl-glycine, Fig. 1) は、水晶体レンズや、急性肝障害時の血中に高濃度見いだされる内因性のトリペプチドである。その生理機能は不明ながら、オフタルミン酸は、カルシウム感知受容体 (CaSR) のアゴニストとしてkokumeiペプチドとしても機能することや、血中濃度が肝障害・酸化ストレスのバイオマーカーとして利用できることなどが報告されている。オフタルミン酸の供給は現在のところ高価な化学合成品のみが知られているが、我々は最近、*E. coli* の機能未知ピリドキサーリン酸結合タンパク質 YggS の欠損株がオフタルミン酸を高濃度蓄積する初めての例であることを見出した¹⁾。本研究では、*yggS* 欠損株を用いたオフタルミン酸の新規な発酵生産法の開発を目指した。

方法

2-アミノ酪酸 (2-AB) 合成に関与するトレオニンデヒドラターゼ (IlvA)、アラニン-バリンアミノトランスフェラーゼ (AvtA)、これに加えて γ -グルタミルシステイン合成酵素 (GshA)、およびグルタチオン合成酵素 (GshB) を *yggS* 欠損株 ($\Delta yggS$) に過剰発現させ、オフタルミン酸蓄積量に対する影響を検証した。また、 γ -グルタミルトランスフェラーゼ (GGT) の欠損株 ($\Delta yggS \Delta ggt$) を作製し、その影響を検証した。GshA および GshB 双方を過剰発現させる発現ベクターや、この GshA に生成物阻害脱感作変異 (S495F 変異) を導入したベクターを作製し、これを $\Delta yggS \Delta ggt$ へ導入することで、オフタルミン酸高生産株の構築を検討した。また、グルタチオンインポーター (YliABCD 複合体) の欠損株を作製し、その効果を検証した。

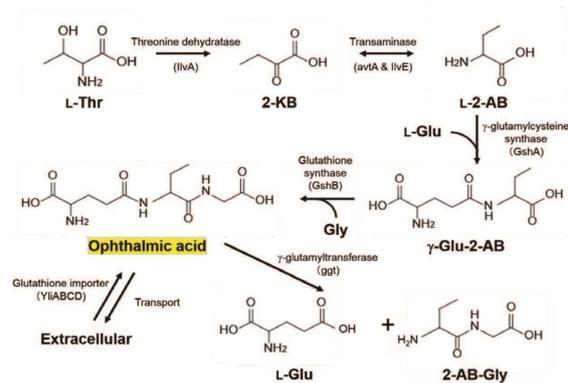


Fig. 1 推定オフタルミン酸代謝経路

結果

① オフタルミン酸生合成フラックスの増強

オフタルミン酸は、グルタチオン中システインが2-アミノブチル酸(L-2-AB)に置換さ

れた構造を有するトリペプチドであり、L-Glu、L-2-AB、Gly よりグルタチオン合成酵素 (GshA および GshB) によって生合成されると示唆される (Fig. 1)。また、L-2-AB は 2-ケト酪酸からのアミノ基転移反応によって生合成され、この供給量がオフタルミン酸合成量を規定すると予想された。L-2-AB の生合成に関与すると予想された IlvA および AvtA、GshA、GshB を過剰発現させ、菌体内のオフタルミン酸含量を定量したところ、特に GshA と GshB の過剰発現がオフタルミン酸生産量の向上に効果的であることが示された (Fig. 3)。

② オフタルミン酸分解系の減弱

$\Delta yggS$ において、培養液中 (菌体および培地中) オフタルミン酸量は定常期初期に最大となり、その後減少したため、何らかのオフタルミン酸異化酵素の存在が示唆された。オフタルミン酸を含めた γ -グルタミルペプチドの異化は GGT が主要な役割を担うことが予想された。そこで、*ggt* 欠損株を作製し、その影響を観察した。*yggS* と *ggt* の二重欠損株では、 $\Delta yggS$ で見られた定常期におけるオフタルミン酸蓄積量の減少が観察されなかった (Fig. 2)。従って、GGT がオフタルミン酸の主要な異化酵素であることが確認された。*ggt* 欠損は、オフタルミン酸の定常期以降の培養系内での保持に有効であることが示された。

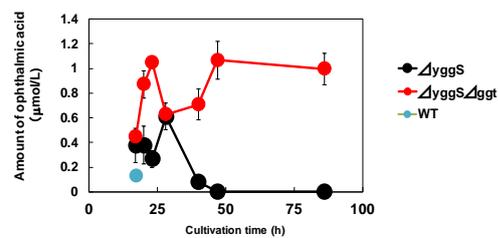


Fig. 2 *ggt* 変異がオフタルミン酸生産性に与える影響

③ GshA、GshB 共発現ベクターの構築と培養条件の検証

先に示したように GshA および GshB の過剰発現はそれぞれ、オフタルミン酸の高蓄積に効果的であった。そこで、GshA・GshB 共発現がオフタルミン酸生産性に与える影響を検証した。しかしながら、GshA・GshB 共発現はオフタルミン酸生産性に顕著な影響を与えなかった。GshA はグルタチオンによる生成物阻害を受けることが知られていた。このため、この脱感作を目的とした点変異 (S495F 変異) を GshA に導入し (GshA*)、この影響を検証した。 $\Delta yggS \Delta ggt$ 株に GshA* および GshB を共発現させ、1 mM のオフタルミン酸構成アミノ酸を含む M9 最少培地で培養したところ、212 $\mu\text{mol/L}$ (73 mg/L) のオフタルミン酸の生産が可能となった (Fig.3)。

④ グルタチオンインポーター (YliABCD 複合体) 欠損の影響

大腸菌において、オフタルミン酸のアナログであるグルタチオンは、対数増殖期に菌体外に排出され、その後菌体内へと取り込まれる。菌体外へ排出されたオフタルミン酸の菌体内への再取り込みを抑制する目的で、グルタチオンインポーターとして知られる YliABCD 複合体の欠損株 ($\Delta yggS \Delta ggt \Delta yliAB$) を作製し、その影響を検証した。同三重変異株は、1 mM のオフタルミン酸構成アミノ酸を含む M9 最少培地において 246

μmol/L (85 mg/L)を生産し、オフタルミン酸蓄積量は親株 ($\Delta yggS\Delta ggt$) と比較して 16% 増大した(Fig.3)。

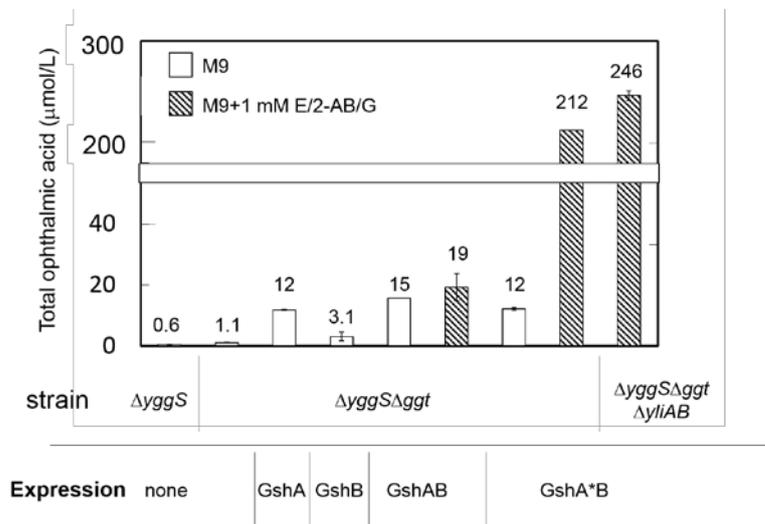


Fig. 3 オフタルミン酸の発酵生産法の確立 (まとめ)

結論

本研究では、ピリドキサルリン酸結合タンパク質 YggS の欠損株が示す、オフタルミン酸高蓄積能に着目し、この欠損株を用いた新規なオフタルミン酸発酵生産法の開発を目指した。*yggS*・*ggt*・*yliAB* 三重欠損株に変異型 GshA および GshB を過剰発現させることで、1 mM のオフタルミン酸構成アミノ酸を含む最少培地中で、85 mg/L のオフタルミン酸を生産することが可能となり、新規のオフタルミン酸発酵生産法の確立への道を開いた。

文献

- 1) Ito T., Yamauchi A., Hemmi H., Yoshimura T. (2016) Ophthalmic acid accumulation in an *Escherichia coli* mutant lacking the conserved pyridoxal 5'-phosphate-binding protein YggS. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 122. 689-693