

# 化粧品素材としての含硫化合物の生産に関する研究

早稲田大学 理工学部

木野 邦器、桐村 光太郎

In generally microorganisms, L-cysteine is synthesized from sulfide and O-acetyl-L-serine (OAS) by O-acetylserine sulphydrylase (OASS). On the other hand, tryptophan synthase (TS) consist of  $\alpha$ -subunit and  $\beta$ -subunit forming  $\alpha_2\beta_2$  complex. An  $\alpha$ -subunit and  $\beta$ -subunit can exist as  $\alpha$  monomer and  $\beta_2$  homodimer in cell, respectively. It is known three-dimensional structure of TS $\beta$  is similar to that of OASS-A which is an isozyme of OASS, although nucleotide sequences are identified only 20%. And TS $\beta$  can recognize not only OAS but also L-serine as substrate and synthesize L-cysteine from L-serine and sulfide.  $\beta_2$  complex has the activity of  $\beta$ -replacement and  $\beta$ -elimination reaction, and it catalyzes  $\beta$ -elimination reaction more than the other one. However  $\alpha_2\beta_2$  complex catalyzes  $\beta$ -replacement reaction more.

We attempt to synthesize L-cysteine from L-serine and sulfide by using the enzyme reaction of TS overexpression organism. At first trpB and trpA gene were cloned into an expression vector pTrc99A and the constructed plasmid designated pTTS. We identified that L-cysteine was synthesized from L-serine and sulfide by enzyme reaction of cell-free extract of Escherichia coli JM109 carrying plasmid pTTS. And L-methionine was detected in this reaction mixture.

## 1. 緒言

含硫化合物は生体において重要な機能を持つことが多く、化粧品・医薬品・食品などの原料として広く用いられている。特にL-システインは化粧品原料として用いられているが、その製法は専ら毛髪等タンパク質からの抽出法に依存しており、発酵法による工業的製法が確立されていないアミノ酸の一つである。また、最近はその需要増や環境問題から従来の主製法である抽出法からの脱却も望まれている。

一般的な微生物においてL-システインは、硫酸還元経路の最終産物のスルフィドとO-アセチルセリン（以下OAS）からO-アセチルセリンスルフィドヒドラーゼ（以下OASS）の触媒する反応によって合成される<sup>1)</sup>。この生合成経路は複雑な制御を受けており<sup>2)</sup>、またL-システインは多くの含硫化合物の生合成中間体であるため代謝されやすく、高収率の発酵生産プロセスを構築することは極めて難しい。このような背景を踏まえ、我々はビタミンB<sub>6</sub>依存性酵素トリプトファンシンターゼ（以下TS）の特性に着目した<sup>3)</sup>。TSは $\alpha$ サブユニットと $\beta$ サブユニットの2種類から成り、 $\alpha_2\beta_2$ 複合体としてL-トリプトファン生合成の最終段階を触媒する多機能酵素であり、それぞれ $\alpha$ 単体、 $\beta_2$ 複合体としても存在する。また、 $\beta$ サブユニットの遺伝子配列は、OASSのアイソザイムで主活性体であるOASS-A

の遺伝子配列と20%程度しか一致していないにも関わらず、お互いの立体構造は酷似している<sup>4,5)</sup>。また、TS $\beta$ はOASだけでなく、L-セリンも基質とすることが報告されている<sup>6)</sup>。しかし、TS $\beta$ だけでは $\beta$ 置換反応よりも $\beta$ 脱離反応をより強く触媒するため、 $\beta$ 置換反応を必要とするL-システイン合成を行うには、TSは $\alpha_2\beta_2$ 四量体の状態で用いることが望ましいと考えられる。

本研究では、TSの $\beta$ 置換反応によってL-セリンとスルフィドからL-システインを合成する効率的な生産系の確立を目的とした。そこでTS $\alpha$ 、TS $\beta$ をコードする大腸菌由来の遺伝子 trpA と trpB を高発現プラスミドにクローニングしてプラスミド pTTS を構築した。まず、トリプトファン要求性 (trpBA 欠損変異) 大腸菌を pTTS で形質転換した時のL-トリプトファン要求性相補の可否を確認し、次にL-システイン要求性 (cysE 欠損変異) 大腸菌を当該プラスミドで形質転換した時、L-システインの代わりにL-セリンとスルフィドを添加した培地で生育するかどうかを確認した。さらに、pTTS で形質転換した大腸菌の粗酵素抽出液を用いてL-セリンとNa<sub>2</sub>SからのL-システイン合成を試みた。

## 2. 実験

### 2.1 試薬

本研究で使用した制限酵素は全て日本ジーン社製であり、プラスミド pTrc99A はアマシャムファルマシアバイオテク社製である。Polymerase Chain Reaction (PCR) で用いた DNA Polymerase には TaKaRa 社製 Ex Taq を用い、その他の試薬は全て関東化学社製のものを使用した。

### 2.2 使用菌株

本研究では、DNA 供試菌および宿主として *Escherichia coli* JM109 を用いた。L-トリプトファン要求性大腸菌は



Development of Novel Process for Producing Sulfur-containing Compound as Cosmetics Material  
Kuniki Kino, Kohtaro Kirimura

\*  
School of Science and Engineering Waseda University

*E. coli* CAG12202 (*trpB::Tn10Kan, thi-1, relA1*) を、L-システイン要求性大腸菌は *E. coli* KY14182 を用いた。なお、CAG12202 株は国立遺伝学研究所より分譲され、KY14182 は協和発酵工業株式会社より分譲された株である。

## 2.3 実験方法

### 2.3.1 *trpA*、*trpB* のクローニング

*trpA*、*trpB* のクローニングは PCR 法にて実施した。既に報告されている大腸菌由来の *trpA*、*trpB* の塩基配列から、2 種のオリゴヌクレオチドプライマー、5'-CGCCATGGAAGGAAAGGAACAATGAC-3' と 5'-GGCTGCAGTTAACTGCGCGTCGCCGC-3' を設計した。*E. coli* JM109 の染色体 DNA を鋳型として PCR 法にて *trpA*、*trpB* を含む DNA 断片を増幅した。PCR の条件は、95°C 60 秒 (1 サイクル)、95°C 60 秒、56°C 60 秒、72°C 120 秒 (30 サイクル)、72°C 300 秒 (1 サイクル) で行った。その後、得られた DNA 断片 (約 2.1kb) とプラスミドベクター pTrc99A を *NcoI* と *PstI* で制限消化し、両者を連結してプラスミド pTTS を構築した。

### 2.3.2 形質転換

形質転換はバイオラッド社製ジーンバルサーを用いたエレクトロポレーション法 (初期電圧 25V、抵抗 400Ω、キャパシタンス 25FD) にて実施した。

### 2.3.3 菌体の培養

菌体の培養は、500mL 容三角フラスコに LB 培地 (バクトトリプトン 10 g/L、イーストエキストラクト 5 g/L、NaCl 10 g/L) を 200mL 入れたものに接種し、37°C で 18 時間液体振とう培養した。

### 2.3.4 組換え TS の活性確認

pTTS を導入した L-トリプトファン要求性大腸菌 *E. coli* CAG12202 を最少平板培地に接種し、その生育の可否で pTTS による L-トリプトファン要求性の相補を確認した。

また、組換えトリプトファンシンターゼを用いて L-トリプトファン合成を検討した。pTTS を導入した *E. coli* JM109 を 200mL の LB 培地で 18 時間培養し、集菌した菌体に 50mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) 20mL を加え、さらに L-セリン 50 mM、インドール 10mM、ピリドキサルリン酸 0.1 mM になるように添加した溶液で、37°C、24 時間反応を実施した。分析は薄層クロマトグラフィー (TLC) を用いて行い、展開溶媒は 99.5% エタノール:H<sub>2</sub>O = 63:37 とした。

### 2.3.5 組換え TS による L-システインの合成

最少培地に L-システイン合成における基質となる L-セリン 50mM、Na<sub>2</sub>S 30mM を含み、さらに補酵素である

ピリドキサルリン酸 0.1 mM、誘導物質であるイソプロピルチオガラクトシド (IPTG) 0.1mM を含んだ平板培地上に、pTTS を導入した L-システイン要求性大腸菌 *E. coli* KY14182 を接種し、L-システイン要求性の回復をその生育の可否で判断した。

また、pTTS を導入した *E. coli* JM109 を 200mL の LB 培地で 18 時間培養し、集菌した菌体を 50 mM リン酸緩衝液 (pH7.0) 20mL で懸濁し、ホモジナイザーにより細胞膜を破碎、その後遠心分離により細胞膜を除去して粗酵素抽出液を調製した。L-セリン 50 mM、Na<sub>2</sub>S 30 mM、ピリドキサルリン酸 0.1 mM、さらに L-システインの収率が上がると報告されている SDS を 1 g/L になるように添加した溶液を用い、37°C、24 時間反応を行った。分析は TLC により実施した。展開溶媒は前述と同様である。

## 3. 結果

### 3.1 *trpBA* のクローニング

*E. coli* JM109 の染色体 DNA から単離、増幅した *trpBA* (2.1 kb) を高発現ベクター pTrc99A (4.6 kb) の *NcoI*-*PstI* サイトにクローニングし、目的プラスミド pTTS (6.7 kb) を得た (Fig. 1)。

### 3.2 SDS-PAGE による TS $\alpha$ 、TS $\beta$ の発現の確認

pTTS を導入した *E. coli* JM109 において、pTTS の持つ *trpA* と *trpB* の発現の程度を調べるため、*E. coli* JM109/pTTS の粗酵素抽出液に対して SDS-PAGE を行った。29kDa の TS $\alpha$  の大きさ一致する強いバンドが 30 kDa 付近に、45kDa の TS $\beta$  の大きさと一致する強いバンドが 45 kDa 付近に認められ、TS $\alpha$ 、TS $\beta$  両遺伝子の高発現が各々確認できた (Fig. 2)。

### 3.3 TS の活性確認

組換え TS が活性を保持しているか確認するために、pTTS を導入した TS 欠損株 *E. coli* CAG12202 (CAG12202 / pTTS) を L-トリプトファンを含まない最少平板培地に接種し、その生育の可否により L-トリプトファン要求性の相補を観察した。期待通り宿主の L-トリプトファン

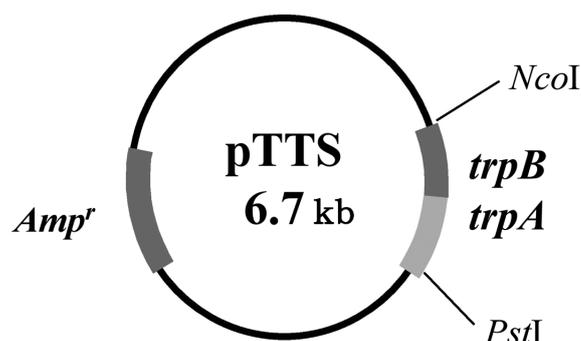


Fig.1 Physical map of constructed plasmid pTTS carrying *trpB* and *trpA* gene.

要求性は相補され、*E.coli* CAG12202 / pTTS は生育した。

さらに、休止菌体反応による L-トリプトファン合成の活性も検討した。その結果、収率は低いものの L-トリプトファンの合成が TLC により確認でき (Fig. 3)、組換え TS が活性を保持していることが示された。

### 3.4 L-システイン要求性の相補

pTTS のコードする TS が活性を維持していることを確認したので、続いてこれを用いて L-システインの合成を試みた。pTTS を導入した L-システイン要求性大腸菌 *E.coli* KY14182 (KY14182 / pTTS) を、L-セリン、Na<sub>2</sub>S、ピリドキサルリン酸、IPTG を添加した L-システインを含まない最少平板培地に接種した。その結果、*E.coli* KY14182 / pTTS は生育し、L-セリンと Na<sub>2</sub>S から L-システインが合成されていることが示された。また、そのコロニーの大きさは L-システインを含んだ最少平板培地に接種した宿主が形成するコロニーと同程度かそれ以上の大きさであった。

### 3.5 粗酵素抽出液による L-システインの合成

L-トリプトファン合成反応は休止菌体反応で行ったが、L-システイン合成反応は粗酵素抽出液により実施した。この理由は 2 点あり、1 点目は L-システインが酸化により容易に二量体 (L-シスチン) となり沈殿を生じるため、あらかじめ細胞膜を除去し反応後に遠心分離することで簡便に L-シスチンの回収が可能であると考えたからである。2 点目は大腸菌の細胞膜には粘着性があり、休止菌体反応では菌体同士の接着により収率が低下する可能性があり、それを回避するためである。そこで粗酵素抽出液を用い、基質となる L-セリンと Na<sub>2</sub>S の最適条件を検討した。

Na<sub>2</sub>S は高濃度では酵素活性を阻害する。検討の結果、酵素活性を保持することができる上限はおよそ 30mM であることがわかった。そこで、L-セリン 50mM、Na<sub>2</sub>S 30mM、ピリドキサルリン酸 0.1mM、SDS 1 g/L を粗酵素抽出液を用いる場合の最適条件とし、L-システイン合成反応を実施した。反応液の TLC 分析では、収率が低いものの L-システイン生成を確認できた。ところが、他にも生成物が検出され、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による分析の結果、L-メチオニンの位置にピークが見られた。再度 TLC により検討したところ、L-システインと L-メチオニンの位置にスポットが確認でき (Fig. 4)、L-システインと L-メチオニンが上記反応系において生成していることが明らかになった。

## 4. 考察

TS を用いた L-セリンと Na<sub>2</sub>S からの L-システインの合成が確認できた。しかし、収率は低かった。これは、反応条件の最適化がなされていないことと、含硫アミノ酸の

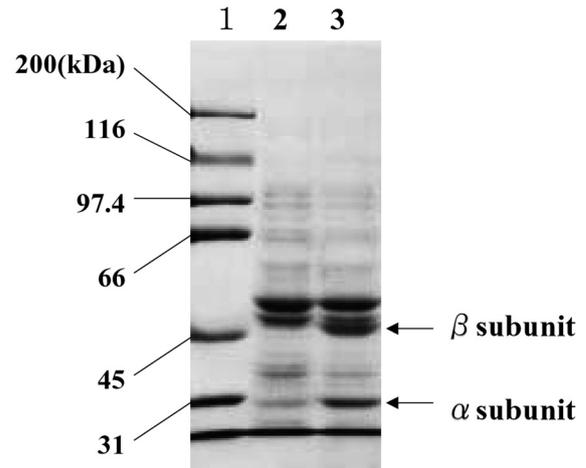


Fig.2 SDS-PAGE analysis of the cell-free extracts of each strain.

Lane1, Protein size marker ; lane2, cell extract of *E.coli* JM109; lane3, cell extract of *E.coli* CAG12202/pTTS.

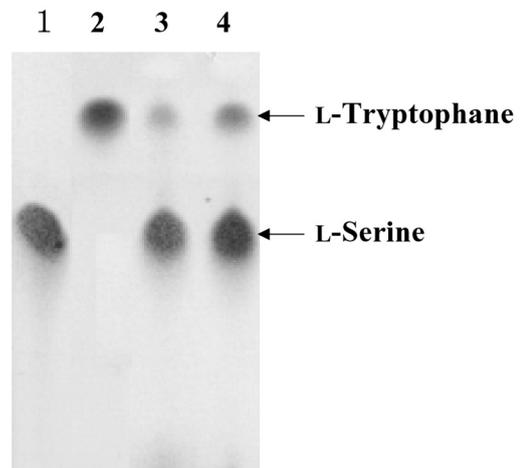


Fig.3 Thin-layer chromatogram of L-tryptophan synthesis reaction products using TS.

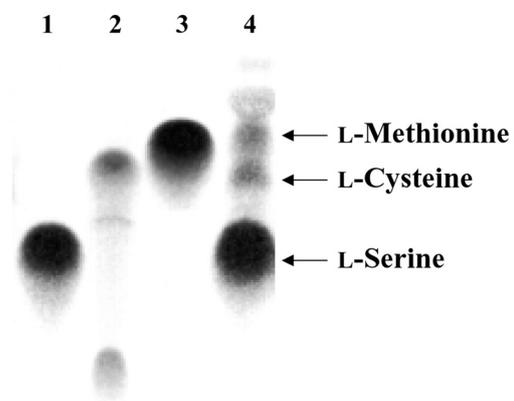


Fig.4 Thin-layer chromatogram of L-tryptophan synthesis reaction products using TS.

Lane1, L-serine ; lane2, L-cysteine ; lane3, L-methionine ; lane4, reaction product by enzyme reaction of cell-free extract of *E.coli* JM109/pTTS.

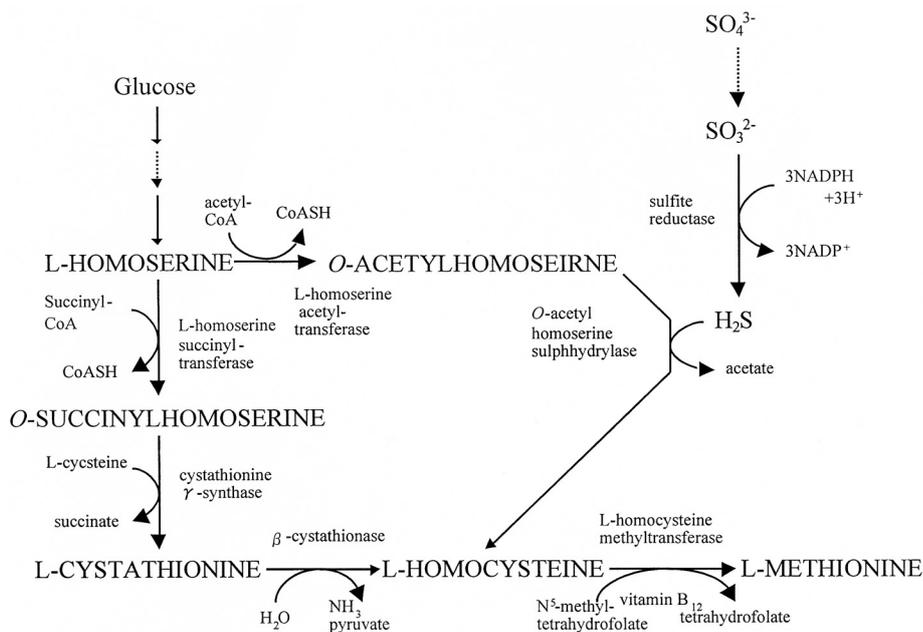


Fig.5. Biosynthesis pathway of L-methionine

代謝中間体である L-システインは分解代謝されやすく、安定に保持されなかったからではないかと考えられる。この場合、L-システインから分解代謝系を抑える必要があるが、その主分解産物として L-メチオニンを検出したことは極めて興味深い。

また、スルフィドとして加える  $\text{Na}_2\text{S}$  は不安定な物質で、簡単に  $\text{H}_2\text{S}$  になり気中に放出されてしまう。例えば反応溶液の pH を調整するときはこの傾向が激しく、かなりの量の  $\text{Na}_2\text{S}$  が  $\text{H}_2\text{S}$  になり気中に放出される。また、培養中は  $37^\circ\text{C}$  と比較的高温状態であるのでこの傾向は益々増大する。したがって反応溶液内ではスルフィド量が律速となり、十分な反応を行なうためにはその不足分を逐次補う必要があると考えられる。しかし、反応溶液中の残存硫黄イオン濃度を計測することはできないので、 $\text{Na}_2\text{S}$  の最適添加量を判断するのは難しい。

L-メチオニンは微生物では Fig. 5 に示す経路により合成されている。今回の研究では、L-セリンに対する L-メチオニンの収率は約 20 ~ 30% であった。仮に L-メチオニンへの代謝経路を遮断した菌体で L-システインの合成反応を行うと、40 ~ 50% 以上の高収率で L-システインを得ることができると期待される。L-メチオニンはもっぱら化学合成法から得られるメチオニンラセミ体からの分割法で生産されているが、安価な L-メチオニン供給の可能な発酵生産プロセスは未だ確立されていない。今回、L-システインだけでなく L-メチオニンの生成も確認することができた。L-セリンからの L-メチオニン合成に関する

報告は従来なく、L-メチオニンの新たな酵素合成法を提示するものとして今後詳細に検討する価値があると考えられる。

#### (引用文献)

- 1) Kredich N.M. : Biosynthesis of cysteine, In :Neidhardt FC, Ingraham JL, Magasanik B. (eds) : Escherichia coli and Salmonella typhimurium, : Cellular and Molecular Biology, 1, American Society for Microbiology, 1987, 419-428.
- 2) Kredich N.M. : Regulation of cysteine biosynthesis in Escherichia coli and Salmonella typhimurium, 115-132. In K.M.Herrmann, R.L.Somerville (eds), Amino Acids: Biosynthesis and Genetic Regulation. Addison-Wesley Publishing Company, 1983
- 3) Miles E.W. : Tryptophan synthase : Structure, function, and subunit interaction, Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol., 49, 127-186, 1979.
- 4) Hyde C.C., Ahmed S.A., and Davies D.R., : Three-dimensional structure of the tryptophan synthase  $\alpha_2\beta_2$  multienzyme complex from Salmonella typhimurium, J. Biol. Chem., 263, 17857-17871, 1988.
- 5) Burkhard P., Rao G.S., and Hohenester E. : Three-dimensional structure of O-acetylserine sulfhydrylase from Salmonella typhimurium, J. Mol. Biol., 283, 121-133, 1998.
- 6) 嶋田正雄, 中村武史, 石渡健一, ほか 1 名, : 特開昭 61-242589