

## 化粧品素材としての含硫化合物の生産に関する研究

木野 邦器、桐村 光太郎  
早稲田大学 理工学部

L-システイン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り、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。この生合成経路は複雑な制御を受けており、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 B6 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。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、 $\beta$  複合体としても存在しうる。また、 $\alpha$  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。また、TS 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。しかし、TS だけでは置換反応よりも脱離反応をより強く触媒するため、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。

### 【結果および考察】

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、興味深いことにその主分解産物として L-メチオニンを検出した。また、スルフィドとして加える Na<sub>2</sub>S は不安定な物質で、簡単に

H<sub>2</sub>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 Na<sub>2</sub>S が H<sub>2</sub>S になり気中に放出される。また、37 培養でこの傾向は増大する。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、Na<sub>2</sub>S の最適添加量を判断するのは難しい。

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-メチオニンの収率は L-セリンに対して 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。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。