

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24658078

研究課題名(和文) 長鎖アルカンの合成と分解に関わる酵素群の探索と脂質変換反応への応用

研究課題名(英文) Screening of enzymes involved in synthesis and degradation of long-chain alkanes and application of their enzymes for lipid conversion

研究代表者

櫻谷 英治 (Sakuradani, Eiji)

徳島大学・ソシオテクノサイエンス研究部・教授

研究者番号：10362427

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：プロトテカ属微細藻が直鎖アルカンのサブターミナル酸化経路を持つことを発見した。そこで、*P. zopfii* JCM9400を用いて、サブターミナル酸化反応に関わると考えられる第二級アルコールをケトンへ酸化する二級アルコールデヒドロゲナーゼの精製及び遺伝子クローニングを試みた。得られ遺伝子を大腸菌で発現し、諸性質を解明したところ2-dodecanolを2-dodecanoneに変換することを見い出した。さらに、ドラフトゲノム解析により、GC含量は極めて高く、ORFで約60%、非翻訳領域では70%以上のGC含量を示すことを見いだした。さらに、パーティクルガン法により遺伝子を導入することに成功した。

研究成果の概要(英文)：We found sub-terminal oxidation pathways of n-alkanes in micro-alga *Prototheca* sp. by screening microorganisms based on degradation of n-alkanes. We tried purification of a secondary alcohol dehydrogenase (SADH) involved in oxidation of a secondary alcohol to the corresponding ketone from *P. zopfii* JCM9400, and cloning of the encoding gene. Expression of the gene in *Escherichia coli* revealed that the SADH converted 2-dodecanol to 2-dodecanone. Determination of draft genome sequences in *P. zopfii* JCM9400 disclosed high GC contents, more than 60% of GC contents in open reading frames, and more than 70% of GC contents in non-coding regions. We succeeded the development of transformation system of *P. zopfii* JCM9400 by means of particle bombardment.

研究分野：応用微生物学

キーワード：プロトテカ アルカン 微細藻 サブターミナル酸化

1. 研究開始当初の背景

長鎖 *n*-アルカンの末端酸化(図1 経路 A)に関わる酵素やその遺伝子の諸性質は多くの生物種で解明されてきた。一方、*n*-アルカンのサブターミナル酸化(図1 経路 B)は古くから数種のバクテリアや糸状菌で報告されているものの、その反応に関わる酵素や遺伝子は同定されていない。1970 年代に石油分解菌として注目された微細藻 *Prototheca* sp. は *n*-アルカンを効率的に分解することができるが(JD Walker et al. 1975. Appl. Microbiol. 30(1): 79-81.) 一方でその代謝経路は明らかにされていなかった。代表者らは一部の *Prototheca* sp. がサブターミナル酸化経路で長鎖アルカンの 5 位を酸化し、2 級アルコールからケトン体へと酸化することを見いだした。さらに、バクテリア、放線菌、糸状菌、担子菌からも酸化位置が異なるサブターミナル酸化経路を有することを明らかにした。また、これまでに脂肪酸からアルカンへの変換(図1 経路 C)に関する知見は少なく、高等植物 *Arabidopsis thaliana* にもその代謝経路はあるものの関連酵素は同定されていない。工業的には、高温・白金/炭素触媒下で脱炭酸を伴ったアルカン合成が可能であるが、エネルギー消費が高い(J Fu et al. 2011 ChemSusChem. 4 481-486)。代表者らは、アルカンの分解だけでなく合成に関わる反応の探索も目指した。

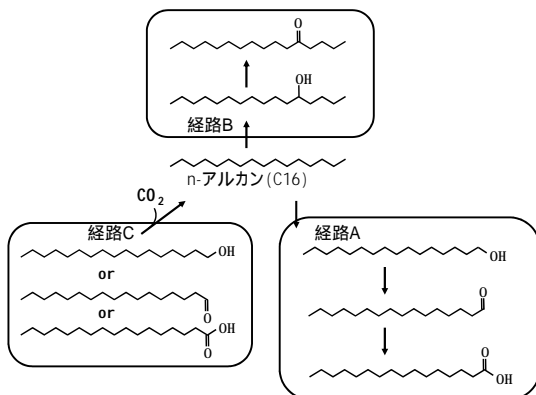


図1. *n*-アルカン代謝経路

2. 研究の目的

代表者らが見いだした *n*-アルカンのサブターミナル酸化能をもつ微生物群はアルカンの鎖長、酸化位置、酸化能力に違いを示すことがわかっている。これら酵素(遺伝子)が同定されれば、難分解性物質の分解による環境浄化、2 級アルコールやケトン体の生産、さらに、新たな物質変換の可能性に繋がることが期待される。さらに脂肪酸から脱炭酸をとまうアルカン合成反応が解明されれば、燃料供給問題に大きく寄与すると考えられる。

これまで生物による *n*-アルカンのサブターミナル酸化経路に関してはほとんど研究が進んでいない。その理由として、サブターミナル反応を有する生物種の報告例が少な

ったこと、関連酵素が膜結合型であり精製が困難であったこと、電子伝達系とリンクした酵素の活性測定法が確立していなかったことなどが考えられた。代表者らは、石油分解性微細藻 *Prototheca zopfii* が効率よく *n*-アルカンの 5 位を酸化するサブターミナル酸化経路を有することを初めて見いだした(櫻谷ら、微細藻プロトテカによる *n*-アルカン代謝経路の解明, 日本農芸化学会 2007 年度大会, 講演番号 2A11p19)。そこで、代表者らは、これまでに取得した様々な微生物種からサブターミナル酸化反応に関わる酵素群をタンパク質レベルあるいは遺伝子レベルで単離・同定することを試みた。

本研究による長鎖 *n*-アルカンの合成と分解に関わる酵素群が解明されれば、新たな酸化酵素群の発見につながることを期待される。さらにこれら酵素群を利用し、反応性に乏しい長鎖 *n*-アルカンの変換利用、逆反応を利用した酸化物からのアルカン生成、さらには、燃料資源として期待される長鎖 *n*-アルカン生産が可能と考えられた。

3. 研究の方法

(1) 2-dodecanol を酸化しケトンへと変換する酵素の精製を試みた。最終的に得られた酵素の N 末端配列を決定し、常法に従い遺伝子のクローニングを試みた。得られた遺伝子のアミノ酸配列をデータベース上で検索し酵素の特性を推定した。

(2) 上記で得られた酵素遺伝子を大腸菌で発現させることを試みた。組換え体をさまざまな鎖長の二級アルコールと反応させることで酵素の諸性質を解明した。

(3) *P. zopfii* JCM9400 のドラフトゲノムを解析した。ゲノムの GC 含量が極めて高いために断片化がおり、十分なデータ量を得ることができなかった。

(4) *P. zopfii* JCM9400 は代表者らがこれまでに得た微生物の中で最も効率的にアルカンをサブターミナル酸化経路で代謝することができる。アルカンの分解能力の高さだけでなく、細胞表面の高い新油性も影響していると考えられる。そこで、遺伝子工学的アプローチでこれらメカニズムを解明するために、*P. zopfii* JCM9400 の形質転換系の構築を試みる。まずは、選択マーカーの探索のために、これまで実績のある薬剤耐性を試験する。同時に、栄養要求性(ウラシル、トリプトファン、メチオニンなど)株の取得も試みた。微細藻 *Prototheca* が光合成能をもたないクロレラ様細胞であるため、クロレラ形質転換系で用いられる遺伝子銃法により遺伝子の導入を試みた。

4. 研究成果

(1) アルカン資化を指標としてスクリーニ

ングを行い、一部の *Prototheca* 属微細藻が直鎖アルカンのサブターミナル酸化経路を持つことを発見した。そこで、*Prototheca zopfii* JCM9400 を用いて、サブターミナル酸化反応に関わると考えられる第二級アルコールをケトンへ酸化する secondary alcohol dehydrogenase (SADH) の精製及び遺伝子クローニングを試みた。*P. zopfii* の無細胞抽出液を可溶性及び不溶性画分に分画し、2-dodecanol を基質、NAD(P)⁺ を補酵素として SADH 活性を測定した結果、両画分に活性がみられた。可溶性画分より硫酸分画、各種カラムクロマトグラフィーを用いて SADH を精製した。SDS-PAGE により推定される本酵素の分子量は約 35kDa であった。さらに精製酵素を用いて様々なアルコールに対する活性を調べたところ、第二級アルコールに対する活性はあるが第一級アルコールに対する活性が確認できなかったことから、この酵素がサブターミナル酸化経路に参与している可能性が示唆された。精製タンパク質から部分アミノ酸配列を決定し、この配列を基に 3,117 bp から成る塩基配列を得た。この塩基配列から推定されたアミノ酸配列をタンパク質データベースで相同性検索した結果、acetoin reductase と高い相同性を示す 822bp の断片を得た。cDNA より対応する遺伝子を取得した結果、推定アミノ酸配列が精製した酵素のアミノ酸配列と一致したので、目的の酵素をコードする遺伝子が得られたと考えられる。この cDNA 由来の塩基配列からの推定アミノ酸配列を相同性検索した結果、acetoin reductase や short chain dehydrogenase との相同性を示した。

(2) この単離した遺伝子が大腸菌で発現し、基質特異性を評価した。形質転換大腸菌を LB 培地で培養し、IPTG で誘導した後、菌体を回収し休止菌体反応に用いた。基質とした各種 2 級アルコールを 0.2%、NAD⁺ を補酵素として反応に用いた。C10 から C20 の 2 級アルコールを基質としたところ、2 位に水酸基を有する 2 級アルコールを対応するケトン体へと変換する活性が高いことがわかった。5-ヒドロキシウンデカノールには活性を示すが、ヘキサデカノンの主要な中間代謝物である 5-ヒドロキシヘキサデカノールにはほとんど活性を示さなかった。また、長鎖ケトンを経験とした場合の逆反応(還元反応)を評価したところ、反応は進行するものの酸化反応よりも活性は低いこともわかった。さらに精製酵素を用いて様々なアルコールに対する活性を調べたところ、第二級アルコールに対する活性はあるが第一級アルコールに対する活性が確認できなかったことから、この酵素がサブターミナル酸化経路に参与している可能性が示唆された。

(3) 微細藻 *P. zopfii* JCM9400 のドラフトゲノム解析を評価することを試みた。GC 含量

は極めて高く、ORF で約 60%、非翻訳領域では 70%以上示した。GC 含量が極めて高いためにゲノム情報のコンティグ数が多くなり遺伝子のアノテーションを行うことが難しかった。これまでに解析を行った SADH のホモログ遺伝子の探索を試みたが、遺伝子の断片化のため同定することはできなかった。また、これまでにバクテリアなどで報告されているバイヤビリガーマノオキシゲナーゼと類似の配列を見出すことができなかった。

(4) *P. zopfii* は我々がこれまでに得た微生物の中で最も効率的にアルカンをサブターミナル酸化経路で代謝することができる。アルカンの分解能力の高さだけでなく、細胞表面の高い親油性も影響していると考えられる。そこで、遺伝子工学的アプローチでこれらメカニズムを解明するために、*P. zopfii* の形質転換系の構築を試みた。まずは、選択マーカーの探索のために、これまで実績のある薬剤耐性を試験した結果、カナマイシン、テトラサイクリン、ゼオシンなどの薬剤が比較的低濃度で有効であることがわかった。ここではゼオシン耐性マーカーを利用し、パーティクルガン法による形質転換を試みた。その結果、得られた形質転換体のゲノム上に導入したベクター遺伝子が PCR により確認することができた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3件)

櫻谷英治、微生物による長鎖 *n*-アルカンの新規サブターミナル酸化経路、化学と生物、in press、査読有、2015

Y. Takimura, E. Sakuradani, Y. Natsume, T. Miyake, J. Ogawa, S. Shimizu, Achlorophyllous alga *Prototheca zopfii* oxidizes *n*-alkanes with different carbon-chain lengths through a unique subterminal oxidation pathway. *J. Biosci. Bioeng.*, 117 (3), 275-277 (2014) 査読有. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2013.09.004

E. Sakuradani, Y. Natsume, Y. Takimura, J. Ogawa, S. Shimizu, Subterminal oxidation of *n*-alkanes in achlorophyllous alga *Prototheca* sp. *J. Biosci. Bioeng.*, 116 (4), 472-474 (2013) 査読有. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2013.04.019

[学会発表](計 1件)

三宅貴士、櫻谷英治、小川順、微細藻 *Prototheca zopfii* のアルコールデヒドロゲナーゼに関する研究、第5回日本醸造学会若手シンポジウム、2013年10月17日、北とび

あ（東京都北区）

6．研究組織

(1)研究代表者

櫻谷 英治（SAKURADANI EIJI）
徳島大学・大学院ソシオテクノサイエンス
研究部・教授
研究者番号：10362427

(2)研究分担者

安藤 晃規（ANDO AKINORI）
京都大学・学際融合教育研究推進センター
生理化学研究ユニット・助教
研究者番号：10537765
平成26年8月6日削除