

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23688011

研究課題名(和文)新規還元的脂肪酸代謝の探索と有用物質生産プロセスの開発

研究課題名(英文) Screening of novel fatty acid metabolism and development of the process for useful material production

研究代表者

岸野 重信 (Kishino, Shigenobu)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教

研究者番号：40432348

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,200,000円、(間接経費) 6,060,000円

研究成果の概要(和文)：チグリン酸(TGLA)の炭素炭素間二重結合を単結合へと飽和化し(S)-2-メチル酪酸(S-2MBA)へと変換する微生物を選抜した。さらに本反応は、3ステップの反応であることを明らかにし、各反応を触媒する微生物を選抜することによりS-2MBAの生産量向上に成功した。また、C14脂肪酸のカルボキシル基をアルコールへと還元する微生物を選抜し、本反応を詳細に解析することにより、C14脂肪酸のCoA体をアルデヒドへと変換する酵素を特定した。

研究成果の概要(英文)：I selected the microorganism which converted (E)-2-methyl-2-butenic acid (tiglic acid, TGLA) to (S)-2-methylbutyric acid (S-2MBA). This reaction was found to be consisted of three reactions. Therefore, I screened the microorganisms to catalyze these reactions each other. Using selected microorganisms, S-2MBA production was improved. I selected the microorganism which reduced the carboxyl group of C14 fatty acid to the corresponding alcohol, and from the more detailed analysis of this reaction, I was identified an enzyme that converted CoA form of C14 fatty acid to the corresponding aldehyde.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：応用微生物 脂質 酵素 発酵 バイオテクノロジー

1. 研究開始当初の背景

現在、多くの化成品は、その原料を化石資源に依存している。石油資源の枯渇が懸念される中、これらの化成品を持続的に生産・供給していくためには、石油由来原料を石油以外の原料へ転換・多様化していくことが必要である。そのためには、再生可能資源であるバイオマス、特に食料と競合しない非可食性植物資源から、有用な化合物を省エネルギー・高効率に製造するバイオリファイナリー技術の開発が急務となっている。具体的には、植物バイオマスであるデンプンやセルロース、ヘミセルロース、リグニン等から、主に微生物の機能を用いた発酵生産の手法により油脂類、有機酸類、アルコール類、アミノ酸類、糖類などを一次化成品原料として生産するプロセスの構築が盛んに試みられており、微生物により生産される機能性油脂であるアラキドン酸含有油脂や機能性素材であるバイオサーファクタントは実用化にいたっている。

申請者は、今までに植物バイオマスや発酵生産の手法により得られる一般的な脂肪酸を付加価値の高い脂肪酸へと変換する微生物の探索を行ってきた。例えば、ひまわり油などの主成分であるリノール酸をリノール酸の異性体であり共役二重結合を有する共役リノール酸へと変換する微生物の探索を行った。共役リノール酸とは、天然においては反芻動物の肉や乳製品に微量に含まれており、抗癌作用・抗動脈硬化作用・体脂肪減少作用・コレステロール比率の改善等の生理作用が報告されていることから、現在アメリカを始め世界各国で注目を集めている機能性脂質である。その結果、申請者は、世界に先駆けリノール酸を共役リノール酸へと触媒する乳酸菌を単離し、その反応機構を明らかにした。本反応は、嫌気条件下で起こる特異な反応であり、図1に示すような水合や脱水反応、酸化・還元反応、異性化反応など多段階の反応からなる新規な還元的不飽和脂肪酸代謝であることを明らかにした。

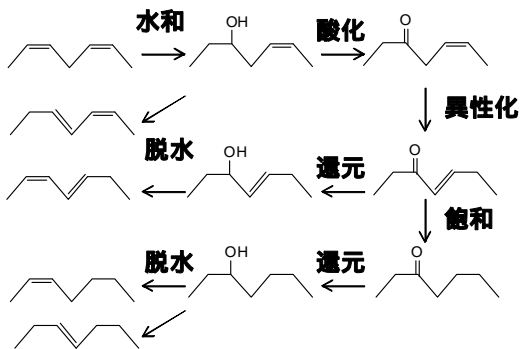


図1 嫌気性細菌に見出した新規な脂肪酸飽和化経路

さらに、本反応はリノール酸の飽和化反応の一部であることを明らかにした(図1)。現在、盛んに行われている微生物研究の脂肪

酸代謝は、好気条件下での代謝であり、酸化反応(不飽和化反応)が主であるのに対し、本反応は検討が十分になされていない嫌気条件下で起こる還元(飽和化)反応である(図2)。

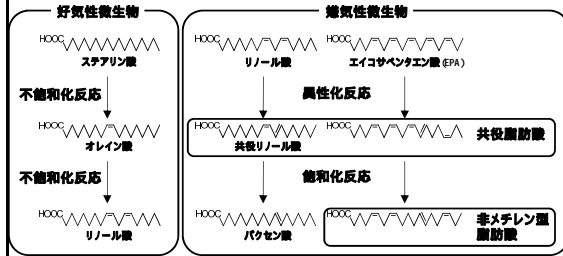


図2 好気性・嫌気性微生物が示す脂肪酸代謝経路

これは、嫌気環境下が微生物機能において基礎・応用両研究面で新たな潜在能力を有している事を暗示している。しかし、嫌気環境下での生物代謝・変換反応の研究は国内国外問わず、遅れているのが現状であった。

2. 研究の目的

現在幅広く研究が進んでいる微生物研究の脂肪酸代謝は、好気条件下での代謝であり酸化反応(不飽和化反応)が主である。それに対し、還元反応(飽和化反応)に関する知見はほとんどなく、工業的有機合成で行われる還元反応では、高温・高圧を必要とするだけでなく、位置特異性や位置選択性がほとんどなく、有機合成での位置選択的な還元反応は不可能である。本研究では申請者が既に見出している微生物を用いた様々な還元反応(飽和化反応)を機軸に、さらなる還元反応を探索し、その詳細を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

嫌気環境下での生物代謝・変換反応の研究は国内国外問わず遅れているが、その大きな要因は嫌気性条件を構築することが困難であることに起因する。

しかし、申請者は嫌気条件を作る独自の工夫を開発し、簡単に実用的な嫌気条件を設定できる系を確立している。この系を利用し、様々な微生物の代謝・反応を探索したところアラキドン酸やエイコサペンタエン酸(EPA)などの高度不飽和脂肪酸を部分的に飽和化する嫌気性細菌を取得した。またある種の嫌気性微生物が脂肪酸のカルボキシル基をアルコールへと還元することを見出した。微生物による脂肪酸のアルコールへの還元はほとんど報告がないことから、本菌を用いカルボキシル基を有する様々な基質(有機酸)を用いて反応を行ったところ、幅広い基質を認識し、それぞれ対応するアルコールへと還元することを明らかにした。アルコール類は、界面活性剤や医薬品、化粧品などニーズが多いにもかかわらず、工業的に製造できるアルコール類は限られている。

そこですでに取得してきたこれらの先駆的で独自性高い情報を活用し、さらに実績の

ある申請者が確立した嫌気環境条件を構築する系を用い、新たな脂肪酸、有機酸還元反応の探索を行った。具体的には、利用価値のある生成物を想定し、安価に入手容易な基質を培地に添加し、微生物とともに嫌気条件下にて培養を行い、得られた培養液を分析することにより生成物が出来ているかを評価した。さらに選抜した微生物を用い、反応に関わる補酵素の同定や、反応条件の最適化、さらに本反応に関わる酵素の特定などを行った。

さらに具体的には、1) 医薬中間体となる立体異性体が存在する分岐鎖飽和有機酸生産を目指し、分岐鎖不飽和有機酸の幾何選択的な還元(飽和化)反応を触媒する微生物の探索を行い、さらに本反応の詳細を明らかにすることにより幾何選択的な高生産法の構築を目指した。また、2) すでに取得している脂肪酸のカルボキシル基をアルコールへと還元する反応から得られた知見を活かし、炭素数 14 飽和脂肪酸であるテトラデカン酸を基質とし、テトラデカン酸を還元する能力の高い微生物の探索を行った。さらに3) 還元反応ライブラリー構築を目指し、リノレン酸や リノレン酸、エイコサペンタエン酸(EPA)を基質に還元的変換反応を触媒する微生物の探索を行った。

不飽和脂肪酸の還元的脂肪酸代謝に対する報告は皆無に等しいことから、参考文献等が存在しないが、申請者は既に乳酸菌を用いた不飽和脂肪酸の還元的脂肪酸代謝について明らかにしている。また、一般的に嫌気性微生物の酵素の中には酸素感受性の酵素が多く存在するが、申請者は乳酸菌の還元的脂肪酸代謝に関わる酵素を単離・精製する際に嫌気性微生物酵素を精製するための工夫を行い、還元的脂肪酸代謝に関連する酵素の同定に成功している。これらの独自性の高い情報や工夫を随所に活用し本研究を進めた。

4. 研究成果

1) Δ^2 -不飽和ケトンの炭素-炭素間二重結合を還元する反応は、一般的に old yellow enzyme が立体選択的に触媒することが知られている。しかし、一般的には old yellow enzyme は Δ^2 -不飽和カルボン酸を還元することはできない。本研究では、そのモデル反応としてチグリニン酸(TGLA, 2-メチル トランス 2-ブテン酸)を立体選択的に(S)-2MBA((S)-2-メチル酪酸)へと還元する微生物を探索し、嫌気性細菌 *Clostridium sporogenes* の洗浄菌体が本反応を触媒することを見いだした。本反応を触媒する酵素の取得を目指し、本菌の無細胞抽出液を作成して TGLA と反応に供したが、本菌の洗浄菌体では反応が進行するのに対し、無細胞抽出液では反応が進行しないことが明らかとなった。そこで、本反応液を詳細に解析したところ、TGLA の炭素-炭素間二重結合の飽和化反応(還元反応)の直接の基質は

TGLA の CoA エステル体(TGL-CoA)であることを見いだした。つまり本反応は、TGLA を TGL-CoA へと変換する反応、TGL-CoA を(S)-2MB-CoA へと還元する反応、(S)-2MB-CoA を(S)-2MBAへと変換する反応の3つの反応からなることを見いだした。そこで、各反応を触媒するのに適した嫌気性細菌を、それぞれの無細胞抽出液を用いて再度探索を行い、各反応に適した嫌気性細菌をそれぞれ選抜した。そこで、*Clostridium sporogenes* の洗浄菌体と、各反応を触媒するのに適した嫌気性細菌の無細胞抽出液を加え TGLA を基質に反応に供した結果、*Clostridium sporogenes* の洗浄菌体のみを用いて反応した時と比べ約 8.6 倍の(S)-2MBAを生産することが可能となった。

2) 脂肪酸のカルボキシル基の還元反応について、本研究では炭素数 14 の飽和脂肪酸であるテトラデカン酸を基質にカルボキシル基の還元反応に適した微生物の探索を行った。テトラデカン酸含有培地に微生物を植菌し嫌気的に培養を行い、得られた培養液を詳細に解析した結果、*Klebsiella pneumoniae* が効率よくテトラデカン酸を対応するアルコールである 1-テトラデカノールへと還元することを見いだした。そこで、本菌を選抜し、本菌の洗浄菌体を用いてテトラデカン酸の還元反応を試みたところ、本菌の洗浄菌体を用いた反応においてもテトラデカン酸の 1-テトラデカノールへの還元反応は観察できた。次に、本菌の無細胞抽出液を用い同様に反応に供した結果、無細胞抽出液を用いた反応ではテトラデカン酸の変換は観察できなかった。そこで、基質をテトラデカン酸から化学合成したテトラデカノイル CoA エステル体にしたところ、NADH, NADPH 存在下で 1-テトラデカノールの生産が確認できた。このことより本反応は、遊離型の脂肪酸が基質になるのではなく、CoA エステル体の脂肪酸が還元反応の基質になることが示唆された。そこで、テトラデカノイル CoA を化学合成し、作成したテトラデカノイル CoA を用い、本反応に関わる酵素の同定を試みた。その結果、CoA エステル体を対応するアルデヒドへと変換するフラクシオンと、CoA エステル体を対応するアルコールへと変換するフラクシオンが存在することが示唆された。そこで、あまり知見がない CoA エステル体をアルデヒドへと変換するフラクシオンについてさらなる精製を行い、本反応を触媒する酵素の特性に成功した。酵素の N 末端アミノ酸配列を解析し、データベース検索より対応するアミノ酸配列を特定し、類縁種のゲノム情報を活用してプライマーを作成後、本菌のゲノムをテンプレートに、本酵素をコードする遺伝子断片を増幅した。得られた増幅断片を *E. coli* 形質転換し、本蛋白質の発現系の構築に成功した。さらに、本形質転換体由来酵素を用い、諸性質の解明を行った。

3) 還元反応ライブラリーの構築を目指し、

反芻動物であるウシのルーメン液を採取し、ルーメン液を用いて還元的脂肪酸変換反応を行ったところ、申請者が既已取得している反応とは異なる挙動を示すルーメン液を取得することに成功した。そこでウシのルーメン液より様々な嫌気性細菌を単離し、得られた単離菌を用い、嫌氣的な反応による脂肪酸変換を試みた結果、 リノレン酸や リノレン酸、エイコサペンタエン酸(EPA)などの二重結合を異性化し、共役脂肪酸へと変換する微生物を取得した。今後、これらの代謝を詳細に解析することによりさらなる還元反応ライブラリーの拡充に繋がることが期待できる。

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)

[学会発表](計2件)

佐藤奈津子、岸野重信、中川拓哉、川端潤、小川 順

講演番号 1

「嫌気性細菌による 、 -不飽和脂肪酸の不斉水素化反応」

日本農芸化学会関西支部例会(第473回講演会) 2012.1.28、京都

中谷友樹、岸野重信、笠井 涉、石渡隆之、小川 順

講演番号 3B24a07

「カルボン酸還元能を有する嫌気性細菌の探索」

日本農芸化学会 2013 年度大会
2013.3.26、 仙台

6. 研究組織

(1)研究代表者

岸野 重信 (Kishino, Shigenobu)

京都大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号：40432348