

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15436

研究課題名（和文）ポリマー生産を目的とした糸状菌嫌気的脂質代謝機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of anaerobic lipid metabolism mechanism of filamentous fungi for polymer production

研究代表者

阪本 鷹行（SAKAMOTO, Takaiku）

徳島大学・大学院社会産業理工学研究部（生物資源産業学域）・講師

研究者番号：90740332

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：水酸化脂肪酸（HFA）は石油代替ポリマーの原料として注目されているが、自然界では希少であるため、効率的なHFA生産法が希求されている。本研究では、糸状菌Fusarium属について、真菌で初めて嫌気的な脂質代謝反応によるHFA合成機構を見出した。また、HFA合成に関与する脂肪酸水和酵素を特定し、そのユニークな基質特異性を明らかにした。さらに、生産後のHFA代謝経路について、一般的な脂質酸化を受けた後に香気成分であるラクトンへと変換されることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

石油代替資源として注目される水酸化脂肪酸（HFA）は総じて細胞毒性が高く、これまで微生物による発酵生産は困難であった。しかし、本研究で見出したFusarium属糸状菌はHFA耐性および蓄積能に優れており、HFA発酵生産における有用な育種対象であることが示された。また、Fusarium内在性のHFA合成酵素を特定したこととHFA代謝経路を推定したことで、今後の育種標的としてHFA高生産株構築が期待できる。さらに、真菌における嫌気的な脂質代謝メカニズムの報告は初めてであり、学術的な貢献度も高いと考えられる。

研究成果の概要（英文）：The aim of this project is to elucidate the production and metabolic mechanism of hydroxy fatty acids (HFAs), a raw material for petroleum substitute polymers, in the filamentous fungus Fusarium. Our study on the mechanism of HFAs synthesis by anaerobic lipid metabolic reactions in Fusarium was the first report in fungi. The fatty acid hydratase involved in HFAs synthesis in Fusarium was identified and its unique substrate specificity was revealed. Furthermore, it is suggested that HFAs in Fusarium is converted to the aroma component, lactone, via lipid  $\beta$ -oxidation and cyclization pathways.

研究分野：応用微生物学

キーワード：水酸化脂肪酸 Fusarium 脂肪酸水和酵素 脂質代謝

## 1. 研究開始当初の背景

乳酸菌やルーメン細菌などの嫌気性細菌が生産する 10-ヒドロキシオクタデセン酸 (HYA) は、反応性に優れた長鎖の炭素骨格を有するため、現行するポリマーの代替原料として利用可能である。現在、石油に依存している世界のナイロン市場の 5% を HYA に代替することで、年間数十万トンの CO<sub>2</sub> 排出量削減が見込まれる。したがって、HYA 高生産プロセスの開発が希求される。

HYA 生合成については脂肪酸水和酵素が単離・解析されている (Kishino et al. 2013, etc.)。HYA 高生産株の育種には HYA 生産経路を強化、あるいは HYA 代謝経路を遮断することが定石である。しかし、嫌気性細菌は脂質をほとんど蓄積しないだけでなく、培養や観察が困難であるため、水和酵素反応以外の HYA 代謝に関する基礎研究は進んでいない。

申請者は真菌で初めて HYA を生産する糸状菌 *Fusarium* 属菌 D2 株を見出した。また、本菌株が細菌と同様の嫌氣的代謝によって菌体外の遊離リノール酸を HYA へと変換することを明らかにした。真菌における嫌氣的な脂肪酸代謝のアプローチは他に類が無く、生化学的にもユニークな反応であるといえる。さらに本菌株は、HYA 生産能を有する、遊離脂肪酸耐性が高いといった面で非常にユニークな生物資源である。本研究では、*Fusarium* 属菌 D2 株において『嫌氣的脂質代謝はどのように制御され、生産された HYA はどのように代謝されるか?』を解明し、HYA 高生産株の育種へとつなげることを目的とした。この代謝機構は嫌気性細菌においてもブラックボックスであるため、得られた結果は生化学的に新規の発見となる。

## 2. 研究の目的

本研究は *Fusarium* 属菌 D2 株について、HYA 合成関連遺伝子の機能解析、および代謝脂質解析によって、どのような条件・機構で HYA が生合成され、代謝されるのか、一連の代謝経路を解明し、HYA 高生産株育種の基盤を確立することを目的とした。

## 3. 研究の方法

*Fusarium* 属菌 D2 株の脂肪酸水和酵素 (D2Ohy) をクローニングし、*in silico* による配列および系統分類を行った。また、大腸菌による異種発現によって酵素タンパク質を精製し、補酵素因子と至適活性条件を検討した。さらに、酵素の基質と成り得る多価不飽和脂肪酸を選定し、D2Ohy の基質特異性を精査した。

*Fusarium* 属菌 D2 株に外因性の遊離脂肪酸を与えて嫌氣的に HYA を生産させた後、新たに窒素源を加えて好気条件下に移すことで、HYA の代謝を誘導した。得られた培養液について脂質分析および香気成分の官能評価を行い HYA 代謝機構を推定した。

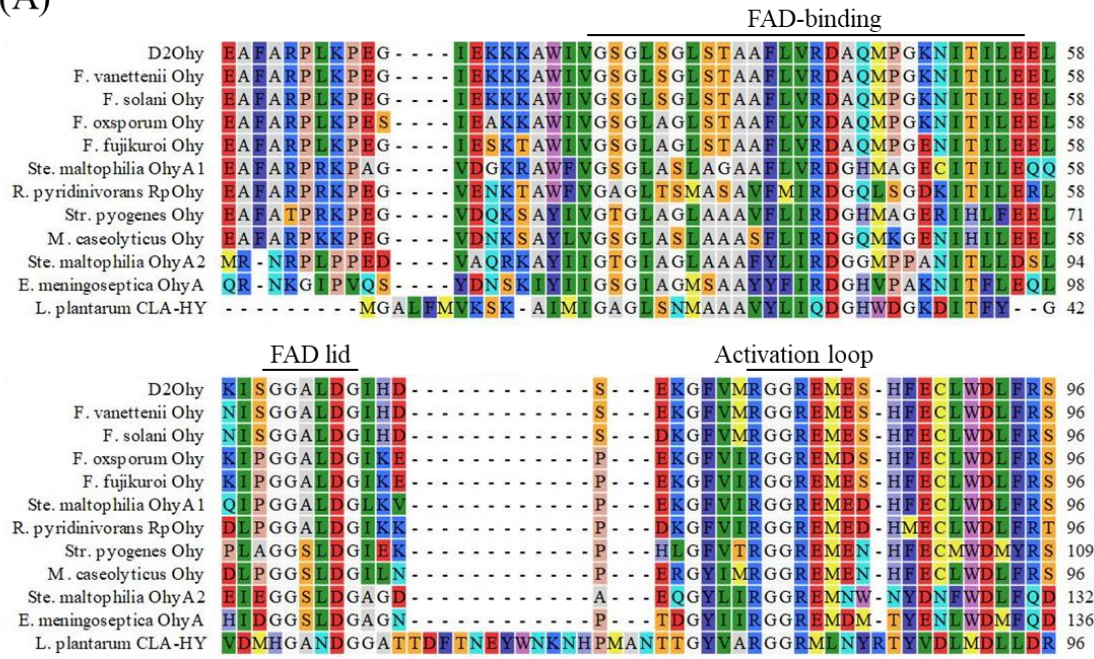
## 4. 研究成果

*Fusarium* 属菌 D2 株の脂肪酸水和酵素 D2Ohy について *in silico* 解析を行った結果、バクテリア由来の既知 Ohy と同様の活性ドメインと補酵素 FAD の結合モチーフを有することが示された (図 1)。一方、D2Ohy および他の *Fusarium* 属菌ゲノムデータから推定される Ohy 群は、バクテリアの Ohy とは明確に異なるクレードに分類された。さらに、D2Ohy 遺伝子を導入した油糧真菌株において、*Fusarium* 属と同条件での HYA 生産が確認され、D2Ohy は真菌で応用可能であることが示唆された (データ未公開)。

D2Ohy における至適活性条件を検討した結果、既報の細菌由来水和酵素に比べて低い pH (pH 5.5)、および高い温度 (55°C) で高活性を示す、ユニークな酵素であることを明らかにした (表 1)。さらに、基質特異性について、既知 Ohy と比較して  $\gamma$ -リノレン酸やリノール酸にユニークな活性を示した (表 2)。これらの結果から、反応熱による温度上昇に耐性がある D2Ohy は酵素法によるリアクター開発にアドバンテージがあり、かつ広範囲の水酸化脂肪酸生産に応用可能であることが示唆された。

*Fusarium* 属菌 D2 株において HYA の  $\beta$  酸化を誘導したところ、HYA を含むすべての貯蔵脂質が減少したが HYA の  $\beta$  酸化中間体は検出されなかった。興味深いことに、 $\beta$  酸化誘導によって培養液は白濁化し、官能試験において甘くミルクィな香気が認められた (データ未公開)。これらのことは、HYA が他の脂肪酸と同様に貯蔵エネルギーとして速やかに代謝され、その途中で水酸基とカルボキシル基の環化によってラクトン様の香気成分へと変換されることを示唆した。今後、想定されるラクトンなどを解析し、代謝経路の追及を試みる必要がある。また、脂肪酸蓄積および  $\beta$  酸化に関連する遺伝子を標的とした分子育種による HYA 高生産株育種が課題として挙げられる。

(A)



(B)

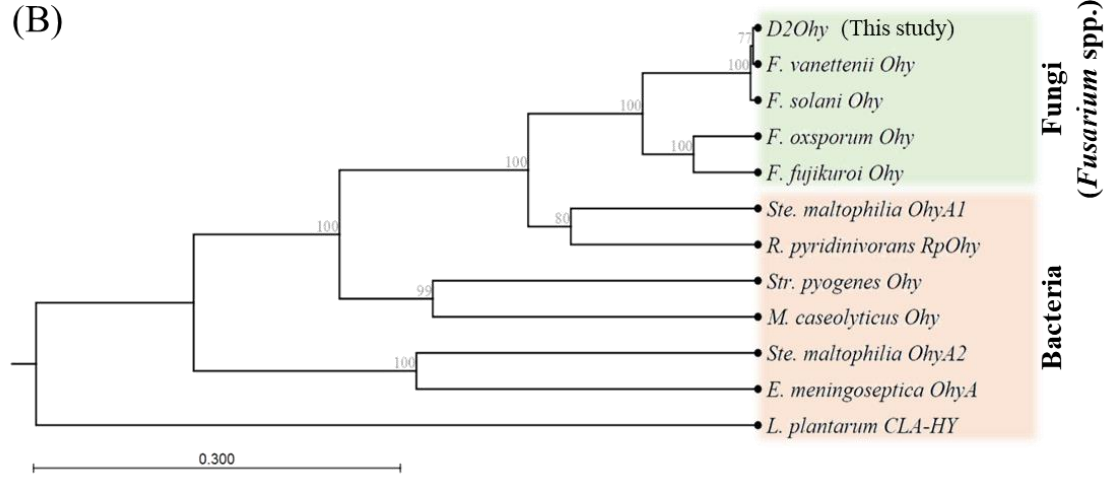


図 1. D2Ohy と *Fusarium* 属菌の推定 Ohy、および既知バクテリア Ohy 群との FAD 結合モチーフ、FAD リッド、活性化ループの配列保存 (A)、および系統樹 (B)

表 1. D2Ohy および既知 Ohy における至適条件比較

Enzymes	Origin	Optimal temperature	Optimal pH	References
OhyMc	<i>Macrococcus caseolyticus</i>	25°C	6.5	Joo <i>et al.</i> 2012.
OhyA1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	35°C	6.0	Kang <i>et al.</i> 2017.
OhyA	<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	25°C	6.0	Engleder <i>et al.</i> 2015.
OhyRe	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	28°C	7.2	Lorenzen <i>et al.</i> 2018
CLA-HY	<i>Lactobacillus plantarum</i>	37°C	5.5	Takeuchi <i>et al.</i> 2015
D2Ohy	<i>Fusarium</i> sp. D2	45°C	5.0	This study

表 2. D2Ohy の基質特異性

Substrate	Product	Relative activity (%)		
		D2Ohy2	CLA-HY <sup>a</sup>	OhyA1 <sup>b</sup>
<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12-Octadecadienoic acid (Linoleic acid)	10-Hydroxy- <i>cis</i> -12-octadecenoic acid	100 <sup>c</sup>	100 <sup>d</sup>	100 <sup>e</sup>
<i>cis</i> -9-Hexadecenoic acid (C16) (Palmitoleic acid)	10-Hydroxyhexadecanoic acid	148	44	120
<i>cis</i> -9-Octadecenoic acid (C18) (Oleic acid)	10-Hydroxyoctadecanoic acid	573	335	316
12-Hydroxy- <i>cis</i> -9-octadecenoic acid (Ricinoleic acid)	10, 12-Dihydroxyoctadecanoic acid	45	0.5	n.r. <sup>f</sup>
<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12, <i>cis</i> -15-Octadecatrienoic acid ( $\alpha$ -Linolenic acid)	10-Hydroxy- <i>cis</i> -12, <i>cis</i> -15-octadecadienoic acid	55	29	31
<i>cis</i> -6, <i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12-Octadecatrienoic acid ( $\gamma$ -Linolenic acid)	10-Hydroxy- <i>cis</i> -6, <i>cis</i> -12-octadecadienoic acid	124	43	44
Methyl <i>cis</i> -9-Octadecenoate (Methyl oleate)	Methyl 10-Hydroxyoctadecanoate	4	n.r.	n.r.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Murakawa Naomi, Sakamoto Takaiku, Kanoh Mizuho, Park Si-Bum, Kishino Shigenobu, Ogawa Jun, Sakuradani Eiji	4. 巻 39
2. 論文標題 Microbial production of hydroxy fatty acids utilizing crude glycerol	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biocatalysis and Agricultural Biotechnology	6. 最初と最後の頁 102286 ~ 102286
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bcab.2022.102286	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sakamoto Takaiku, Kamegawa Yuichi, Kurita Chinami, Kanoh Mizuho, Murakawa Naomi, Sakuradani Eiji	4. 巻 16
2. 論文標題 Efficient production of biolipids by crude glycerol-assimilating fungi	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioresource Technology Reports	6. 最初と最後の頁 100861 ~ 100861
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biteb.2021.100861	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Eiji Sakuradani, Yoshida Kai, Murakawa Naomi and Takaiku Sakamoto
2. 発表標題 Studies on filamentous fungus <i>Fusarium</i> sp. accumulating hydroxy fatty acids
3. 学会等名 2022 AOCs Annual Meeting & Expo (Web会議) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 霞田 快, 村川 直美, 阪本 鷹行, 櫻谷 英治
2. 発表標題 水酸化脂肪酸生産性糸状菌 <i>Fusarium solani</i> D2株の形質転換条件の検討
3. 学会等名 2021年度 第3回脂質駆動学術産業創生研究部会講演会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------