

平成21年5月26日現在

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2006～2008

課題番号：18208009

研究課題名（和文） 微生物機能の多面的活用による新規機能性脂質の創製

研究課題名（英文） Production of novel functional lipids by manifold application of microbial capacity

研究代表者

清水 昌 (SHIMIZU SAKAYU)

京都大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：70093250

研究成果の概要：乳酸菌は機能性が注目されている共役リノール酸をつくる。ここでは、リノール酸から共役リノール酸への変換に関わる一連の酵素系を解明し、乳酸菌による共役リノール酸生産を確立した。さらに、油糧微生物の遺伝子操作や変異処理により、機能性が高い高度不飽和脂肪酸やステロール類の発酵生産技術を確立した。これら機能性脂質は、医薬・健康食品としての利用が多いに期待されるものである。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	16,100,000	4,830,000	20,930,000
2007年度	11,400,000	3,420,000	14,820,000
2008年度	9,200,000	2,760,000	11,960,000
年度			
年度			
総計	36,700,000	11,010,000	47,710,000

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：発酵生産、共役リノール酸、乳酸菌、高度不飽和脂肪酸、デスモステロール

1. 研究開始当初の背景

「脂肪酸発酵」と称する分野は比較的盛んに研究され、 γ -リノレン酸、アラキドン酸、共役リノール酸 (CLA) などの付加価値の高い有用脂肪酸の微生物生産法が開発されてきた。本研究では第一に、この技術を多様な希少脂肪酸生産へと発展させる。一方で、脂肪酸を構成単位とする様々な機能性脂質を微生物により創り出す「脂質発酵」の分野はほとんど進展していないのが現状である。その背景には、脂質合成経路や脂質蓄積機構が分子レベルで明確にされていないことが挙げられる。一方、近年の栄養学的研究成果か

ら、脂質の機能性を左右する構造要因として、脂肪酸構造のみならず脂質構造全体の影響がクローズアップされてきており、アシル基結合位置や脂肪酸分子種が特定されたアシルグリセロール (構造脂質)、リン脂質、糖脂質などが、通常の脂質では得られない様々な優れた生理特性を示すことが報告されている。例えば、トリグリセリドの2位の位置に高度不飽和脂肪酸 (PUFA) を1,3位に中鎖脂肪酸を配置する構造脂質や、2位に脂肪酸を持たないアシルグリセロールなどが高い消化吸収性を示し、燃焼型脂質として現代病である肥満の抑止に寄与することが報告さ

れている。また、多様な脂肪酸側鎖を有するステロール類の薬理効果にも注目が集まってきた。このような背景から、脂質構造を任意に制御する生産技術の開発が希求されており、特に、生物生産法は有機合成が不得手とする複雑な構造の機能性脂質の供給において有効な手段であると期待されている。しかしながら、現在の技術では、脂肪酸レベルでの生産制御は可能であるものの、脂質構造レベルでの生産制御は未開拓な領域であるといえる。そこで、本研究では、微生物による油脂生産を、脂質構造レベルで制御可能なものとする新たな技術的ブレークスルーに挑む。

2. 研究の目的

近年、高機能性脂質の食品・医薬品分野への利用、油糧植物の育種改良、高機能性構造脂質構築のための有用脂肪酸の供給が世界的に注目され、「脂質工学」という新しい技術分野が誕生し現在その領域を大きく広げつつある。申請者らは、「脂質工学」の先駆的立場から油脂の微生物生産研究を行ってきた。食品栄養学・医学分野における高機能性脂質の機能性評価研究と連携していく過程で、脂質工学のさらなる飛躍、新産業分野の開発、他分野との融合による新規研究テーマの探索のためには、油脂の機能や特性を決定する最も重要な構成単位である有用脂肪酸の分子種を拡充すること、すなわち、実用的な有用脂肪酸生産技術を確立し、供給可能な脂肪酸ライブラリーを多様化すること、ならびに、これらの脂肪酸をより機能性の高い脂質（トリアシルグリセロール、ジアシルグリセロール、リン脂質、糖脂質、ステロールエステル）に構築していく技術の開発が重要であるという認識に至った。本研究はこの提案に基づき、次世代型「脂質工学」の創出に向け、(I)微生物機能を利用した希少有用脂肪酸の実用的生産技術の開発、ならびに、(II)機能性脂質への構造化に有用な新規脂質合成能をもつ微生物の育種と微生物酵素の探索・開発を行うものである。

3. 研究の方法

(1) 乳酸菌における共役脂肪酸生成反応・飽和化反応の解析と応用：これまでに *Lactobacillus plantarum* がリノール酸あるいはリシノール酸を効率よく CLA へと変換する現象を見出している。また、この反応を解析していく過程で、二重結合への水和反応、脱水を伴う二重結合の転移反応、脂肪酸飽和化反応など多様な反応が関与していることを明らかにしている。そこで、これら一連の反応の反応機構の解明を行うとともに、応用的に有用な部分反応を抽出する。また、これらの反応を触媒する酵素（水和反応、脱水酵

素、転移酵素、飽和化酵素）の単離・精製および諸性質の解明を行い、さらにそれぞれの酵素反応の反応条件（嫌気条件、pH、温度、電子受容体・水素供与体・ビタミン・金属などの補欠因子の探索など）の最適化を行い、CLA 等の機能性脂質生産条件検討に役立てる。

(2) 腸内細菌における新規脂肪酸変換反応の探索・解析と応用：CLA 生成反応機構の解析から得られる情報や、酵素精製から得られる可溶性および安定化の情報、さらには、最適化された酵素反応条件、特に嫌気条件および補欠因子は、腸内細菌における脂肪酸変換反応探索系の条件設定に有意義な情報になりうる。そこで、これまでに蓄積してきた乳酸菌や腸内細菌に特異的な脂肪酸変換反応をフォローアップする諸条件（嫌気条件や補欠因子など）を参考にスクリーニング系を設定し、特に二重結合異性化反応、飽和化反応に着目した脂肪酸変換反応の探索を行い、反応の有効性の評価・応用へと展開させる。

(3) 糸状菌の分子育種による PUFA 生産性向上：これまでにアラキドン酸生産性糸状菌 *Mortierella alpina* 1S-4 とその誘導変異株が様々な PUFA をつくることを見出している。さらに、PUFA 生合成関連酵素（数種の脂肪酸不飽和化酵素と脂肪酸鎖長延長酵素）遺伝子の解明と本糸状菌の形質転換系の確立を達成した。これらの技術に基づき、野生株において脂肪酸鎖長延長酵素遺伝子の過剰発現によりアラキドン酸の生産性を向上させることに成功している。このような背景から、これまでに取得された各種 PUFA 生産変異株の形質転換系を開発し、PUFA 生合成・脂質蓄積に重要な鍵酵素遺伝子を代謝制御的に強化あるいは抑制することで PUFA 生産性を高めることを図る。

(4) ステロール生産性変異株の探索：これまでに、*Mortierella* 属糸状菌はステロール生産性が高く、天然では希少なデスモステロールを多く含むことを見いだしている。ステロールは機能性脂質として注目されているものの、微生物による発酵生産はあまり行われていないのが現状である。そこで、化学的変異剤処理により、デスモステロールの生産性が向上した変異株の探索を行った。

(5) *n*-アルカンをサブターミナル酸化で代謝する微生物の探索：これまでに微細藻 *Prototheca* sp. が *n*-アルカンをサブターミナル酸化経路によって代謝することを明らかにしてきた。*n*-アルカンを培地に添加し培養することで、サブターミナル酸化経路をもつ新たな微生物の探索を行う。

4. 研究成果

(1) 共役リノール酸生産の効率化をめざし、乳酸菌における共役脂肪酸生産酵素系の解析を行った。*Lactobacillus plantarum* AKU1009a はリノール酸を水和し、10-hydroxy-12-octadecenoic acid (HY) を生成した後、HY を脱水異性化することで共役リノール酸を生成する。*L. plantarum* AKU1009a より得た cell-free extract を超遠心し、膜画分と可溶性画分とに分画した結果、一連の変換反応に必要な蛋白質が両画分に分散していることを明らかにした。さらに、これらの蛋白質の精製を試みた結果、膜画分に存在する CLA-HY と可溶性画分に存在する CLA-DH, CLA-DC の3つのタンパク質が関与することを明らかにした。*L. plantarum* AKU1009a における本異性化反応の初発反応を触媒するリノール酸水和酵素 CLA-HY、ならびに、二重結合転移に関与する short-chain dehydrogenase 相同蛋白質 CLA-DH の機能解明を行った。その結果、CLA-HY が FAD を補酵素としリノール酸、オレイン酸、 α -リノレン酸、 γ -リノレン酸などを対応する 10-hydroxy-脂肪酸へと変換すること、CLA-DH が NAD⁺ 存在下にて 10-hydroxy-脂肪酸を対応する 10-keto-脂肪酸へと変換することを明らかにした。これらの知見は、嫌気性微生物における不飽和脂肪酸異性化過程の詳細を酵素反応レベルで初めて解明した先駆的な成果である。

(2) 共役高度不飽和脂肪酸生産に有用な微生物反応の探索を行った。*Clostridium bifermentans* がアラキドン酸やエイコサペンタエン酸 (EPA) といった炭素数 20 の高度不飽和脂肪酸を飽和化することを見いだした。アラキドン酸、EPA の飽和化産物はそれぞれ *cis*-5, *cis*-8, *trans*-13-20:3 ならびに *cis*-5, *cis*-8, *trans*-13, *cis*-17-20:4 であった。EPA を基質とする嫌氣的反応について本菌の無細胞抽出液を用いた検討を行った結果、飽和化産物とともに二つの未知脂肪酸の生成を確認した。これらを単離・精製し構造解析を行った結果、*cis*-5, *cis*-8, *cis*-11, *trans*-13, *cis*-17-20:5 ならびに *cis*-5, *cis*-8, *trans*-11, *trans*-13, *cis*-17-20:5 と同定した。これらの共役脂肪酸は EPA を飽和化する際の反応中間体であると推測された。

(3) アラキドン酸の工業生産糸状菌である *Mortierella alpina* 1S-4 の分子育種により PUFA の組成を大きく変えることに成功した。具体的には、RNAi 法により、*M. alpina* 1S-4 の脂肪酸鎖長延長酵素 (MAELO) 遺伝子の発現抑制を行ったところ、炭素鎖長 22 以上の飽和脂肪酸が検出されなかったことから、本酵素遺伝子は主に超長鎖飽和脂肪酸の生合

成に関与していることが示唆された。グルコースを炭素源とした培地で培養すると、MAELO-RNAi 形質転換株では超長鎖飽和脂肪酸が培養 14 日目でも検出されないことから、MAELO 遺伝子発現抑制により超長鎖脂肪酸を含まないアラキドン酸生産を示すことができた。また、アラキドン酸を EPA に変換する ω 3 脂肪酸不飽和化酵素遺伝子を本菌株で過剰発現させ、EPA の生産量を 4 倍増加させることに成功した。このようにある特定の遺伝子の過剰発現により、PUFA の生産性を向上できることを示した。さらに、アグロバクテリウムを用いた形質転換系を開発した。胞子 8×10^8 個から約 700 株の形質転換体を得ることに成功した。またそのうち 16 株中 15 株においてゲノム上に 1 コピーの挿入が確認でき、継体培養を繰り返しても安定してその形質が保持されることが明らかになった。よりマイルドな条件での形質転換が可能となり、宿主に応じた形質転換法の選択が可能となった。これらの研究成果は油糧微生物を用いた分子育種による有用脂質生産に関する先駆的な研究であり、実用生産への応用が大いに期待される。

(4) ステロール生産性 *Mortierella* 属糸状菌の形質転換系の構築とステロール高生産変異株の探索を行った。*Mortierella alpina* FA113 株は天然では希少なデスモステロールを多く蓄積することを見出している。デスモステロール高生産を目指し、パーティクルガン法を用いてウラシル要求性を指標とした形質転換系を構築した。さらに、ニトロソグアニジンによる変異処理により、本菌からステロール高生産株を 2 株単離することができた。ひとつは、総ステロール量が親株の 1.5 倍向上した変異株であり、もう一方は総ステロールに占めるデスモステロールの割合が 70% 以上に達する変異株であった。本研究成果は新たな機能性脂質として注目されるステロールの微生物生産の可能性を示した。

(5) これまでに、微細藻 *Prototheca* sp. が *n*-アルカンをサブターミナル酸化経路によって代謝することを明らかにしてきた。本研究ではさらに、放線菌 *Streptomyces californicus* や *S. griseus* が *n*-アルカンのサブターミナル酸化経路を有することを見いだした。*n*-ヘキサデカンを基質とした場合 4 位が、*n*-テトラデカンを基質とした場合 2 位が酸化された生成物が主に蓄積される。基質の鎖長によって酸化位置が異なることを初めて明らかにした。また、*n*-アルカン由来の生成物を同定したところ、*n*-アルカンはケトン誘導体、アルコール誘導体へと酸化された後、Baeyer-Villiger 反応によりエステル誘導体となり、その後、加水分解され対応す

る1級アルコールと脂肪酸へ分解されると推測された。本研究結果が、未解明なサブターミナル酸化に関連する酵素系の解明に貢献することが期待される。

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)

[雑誌論文] (計 10 件)

- ① 安藤晃規、小川順、杉本聡、岸野重信、櫻谷英治、横関健三、清水昌、Selective production of cis-9, trans-11 isomer of conjugated linoleic acid from trans-vaccenic acid methyl ester by *Delacroixia coronata*, J. Appl. Microbiol., 106(5), 1697-1704, 2009、査読有り
- ② 岸野重信、小川順、横関健三、清水昌、Metabolic diversity in biohydrogenation of polyunsaturated fatty acids by lactic acid bacteria involving conjugated fatty acid production, Appl. Microbiol. Biotechnol., 2009、査読有り
- ③ Masayoshi Muramatsu, Chikara Ohto, Shusei Obata, 櫻谷英治、清水昌、Accumulation of prenyl alcohols by terpenoid biosynthesis inhibitors in various microorganisms, Appl. Microbiol. Biotechnol., 80(4), 589-595, 2008、査読有り
- ④ 小川順、岸野重信、横関健三、清水昌、酵素法による共役脂肪酸の合成、フアインケミカル、37、18-27、2008、査読無し
- ⑤ 張朔、櫻谷英治、清水昌、Identification of a sterol $\Delta 7$ reductase gene involved in desmosterol biosynthesis in *Mortierella alpina* 1S-4, Appl. Environ. Microbiol., 73(6), 1736-1741, 2007、査読有り
- ⑥ 張朔、櫻谷英治、伊東久仁、清水昌、Identification of a novel bifunctional $\Delta 12/\Delta 15$ fatty acid desaturase from a basidiomycete, *Coprinus cinereus* TD#822-2, FEBS Lett., 581(2), 315-319, 2007、査読有り
- ⑦ 張朔、櫻谷英治、清水昌、Identification and production of n-8 odd-numbered polyunsaturated fatty acids by a $\Delta 12$ desaturation-defective mutant of *Mortierella alpina* 1S-4, Lipids, 41(6), 623-626, 2006、査読有り
- ⑧ 阿部孝宏、櫻谷英治、浅野貴弘、金丸博幸、清水昌、Functional characterization of $\Delta 9$ and $\omega 9$ desaturase genes in *Mortierella alpina*

1S-4 and its derivative mutants, Appl. Microbiol. Biotechnol., 70(6), 711-719, 2006、査読有り

- ⑨ Ren Chen, Keisuke Matsui, Miyuki Ogawa, Mieko Oe, 落合美佐、河島洋、櫻谷英治、清水昌、Masao Ishimoto, Makoto Hayashi, Yoshikatsu Murooka, Yoshikazu Tanaka, Expression of $\Delta 6$, $\Delta 5$ desaturase and GLELO elongase genes from *Mortierella alpina* for production of arachidonic acid in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] seeds, Plant Science, 170, 399-406, 2006、査読有り
- ⑩ 小川順、宋子良、岸野重信、李青山、堀之内伸行、清水昌、Screening and industrial application of unique microbial reactions involved in nucleic acid and lipid metabolisms, Biosci. Biotechnol. Biochem., 70(3), 574-582, 2006、査読有り

[学会発表] (計 3 件)

- ① 櫻谷英治、岸野重信、小川順、横関健三、清水昌、油糧微生物の代謝工学と機能性脂質生産への利用、第 60 回日本生物工学会大会、3S2a05、2008 年 8 月 29 日、宮城 (仙台)
- ② 小川順、岸野重信、横関健三、清水昌、Unique microbial reactions useful for conjugated fatty acid production, 2nd International Congress on Conjugated Linoleic Acid, 2007 年 9 月 21 日、イタリア (Cagliari)
- ③ 清水昌、微生物機能の探索・開発とバイオプロセス構築へのアプローチ、第 58 回日本生物工学会大会、1A-AM2、2006 年 9 月 11 日、大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 昌 (SHIMIZU SAKAYU)

京都大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：70093250

(2) 研究分担者

片岡 道彦 (KATAOKA MICHIIHIKO)

京都大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号：90252494

小川 順 (OGAWA JUN)

京都大学・微生物科学寄附研究部門・教授

研究者番号：70281102

櫻谷 英治 (SAKURADANI EIJI)

京都大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号：10362427

萩下 太郎 (HAGISHITA TAIRO)

京都大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号：20432346

日比 慎 (HIBI MAKOTO)

京都大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号：30432347

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