

平成 21 年 5 月 21 日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18580334
 研究課題名（和文） 長鎖脂肪酸アルデヒドの脱カルボニル化酵素の探索と分離・精製
 研究課題名（英文） Screening, isolation and purification of fatty acid aldehyde decarboxylase from microorganisms.
 研究代表者
 細野 邦昭 (HOSONO KUNIAKI)
 日本大学・生物資源科学部・教授
 研究者番号：80339291

研究成果の概要：大量に廃棄される食用廃油の再資源化を目的に、油脂類に多く含まれる脂肪酸を化学的に還元した脂肪酸アルデヒドを脱カルボニル化し、石油代替品となる炭化水素に変換する微生物を探索した。土壌等より単離した微生物約 3000 株について、脂肪酸アルデヒドを炭化水素に変換する細菌 7 株を得ることができた。その中で最も有力な変換微生物として得られた株を、細菌 *Serratia marcescens* subsp. *marcescens* と同定した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,200,000	0	1,200,000
2007 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	630,000	3,930,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：環境農学

キーワード：応用微生物、酵素反応、廃棄物再資源化、バイオテクノロジー

1. 研究開始当初の背景

我が国における植物油の年間供給量（2004年）は、農林水産省によれば（「我が国の油脂事情」）約 260 万トンであり、公共施設、ホテル、食品加工場、スーパー等から出される食用廃油の量は年間約 100 万トンと推定されている。その一部は石鹼や飼料等に再利用されるものの、大部分は下水に廃棄されるか生ゴミとして焼却されている。しかし、食用廃油の処理には多額の費用がかかるため、川や海へ不法投棄されることから社会問題となり、油脂産業にとって食用廃油の再利用は大きな問題となっている。一方、これまで地球上に無限にあると考えられていた

石油には限界があり、石油鉱業連盟によれば（「世界の石油・天然ガス等の資源に関する 2000 年末評価」）、2000 年末の石油の確認埋蔵量は約 1 兆バレルで、今後、新しい油田の発見や技術改良が無いまま 2000 年の生産レベルを続ければ、79.1 年後には枯渇されると試算されている。

2. 研究の目的

地質学者の多くの考えは、石油は有史以前（古生代から中生代）の海洋生物や陸上植物の遺骸が高温と高圧により無機的に造られたという生物由来説をとっている。しかし、石油の主成分である炭化水素は微量ではあ

るが、植物、昆虫、水鳥等の体表に防水性を付与するために生合成され、体の表層部や羽の付け根等で見出されている。また、脊椎動物においては神経細胞の軸索を包むミエリン鞘に炭化水素の存在が報告されている。特に、微細藻類である緑藻 *Botryococcus* は細胞内に菌体重量の約30%もの炭化水素を蓄積することが報告されている。さらに、エンドウの葉の細胞内画分には、短鎖脂肪酸から炭素鎖を伸長して造られる長鎖脂肪酸をアルデヒドに変換した後、脱カルボニル化して炭化水素に変換する酵素系の存在が報告されている。この様な脂肪酸から炭化水素を合成する酵素系は、動物の細胞内画分にも存在することが示唆されている。Kolattukudy等は *Botryococcus* にもこれら動植物と同様な短鎖脂肪酸から長鎖脂肪酸のアルデヒドを経て炭化水素を合成する酵素系の存在を報告している(図1)。しかし、これら炭素鎖伸長酵素、脂肪酸のアルデヒドへの還元酵素、アルデヒドの脱カルボニル化酵素の存在が動植物に予測されるものの、未だ単離して酵素化学的に研究した報告はない。そこで、本研究では酵素系の最終ステップにある脂肪酸アルデヒドを脱カルボニル化して炭化水素に変換する酵素を微生物から探索し、分離・精製して酵素化学的性質を明らかにする。

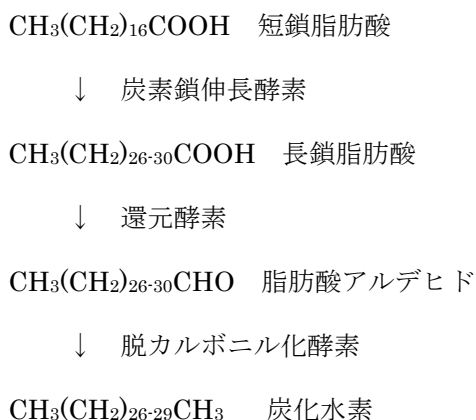


図1. 緑藻 *Botryococcus* における炭化水素合成系路 (推定)

3. 研究の方法

動植物系廃油には炭素数16および18の脂肪酸が多く含まれることから、炭素数18の脂肪酸の一級アルコールであるオクタデカノール($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{CH}_2\text{OH}$)を塩化クロム酸ピリジニウム(PCC)で酸化してオクタデカナル($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{CHO}$)を化学合成した。このオクタデカナルおよびこれを脱カルボニル化して得られるヘプタデカン($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3$)を各々唯一炭素源とする培地で微生物を培養し、オクタデカナルを脱カルボニル化してヘプタデカンに変換する

微生物、または逆にヘプタデカンをおクタデカナルに変換する微生物を探索した。スクリーニング法としては、単離した微生物を基質となるオクタデカナルあるいはヘプタデカンを含む培地で培養し、得られる培養液から基質およびその変換物質をベンゼンで抽出して薄層クロマトグラフィー(TLC)で分離し、基質のヘプタデカンまたはオクタデカナルへの変換の有無を判定した。TLCによる方法でヘプタデカンまたはオクタデカナルに変換されていると推定された試料については、さらにベンゼン抽出画分をガスクロマトグラフィー(GC)により分析し、目的とする変換物質であることを確認した。

4. 研究成果

1) スクリーニング結果

化学合成したオクタデカナルを炭素源とする合成培地(表1)に土壌等から単離した細菌2876株を接種し、28°C、7日間培養した。培養後、培養液にベンゼンを等量加えて脂溶性画分を抽出した後、ベンゼン抽出画分を濃縮して得られた画分をSilica gel 60 F₂₅₄プレートをを用いたTLCにより分離し(表2)、標準となるオクタデカナルおよびヘプタデカンと移動度(Rf値)を比較して変換株を選択した。

次に、TLCによりオクタデカナルあるいはヘプタデカンを生産していると推定される候補株のベンゼン抽出画分について、キャピラリーカラムを装備したGCにより分析した(表3)。標準となるオクタデカナルおよびヘプタデカンと溶出時間が同じ物質を生産している株を選択し、変換候補株として7株を得ることができた。その7株の中でオクタデカナルを最も効率よくヘプタデカンに変換しているNo.286株(図2)についてさらに検討した。

表1. 培地組成

KH ₂ PO ₄	0.2 %
(NH ₄) ₂ SO ₄	1 %
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 %
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01 %
酵母エキス	0.1 %
オクタデカナル	0.03 %
(またはヘプタデカン)	0.03 %
	pH 7.0

表2. TLC分析条件

薄層プレート: Silica gel 60 F₂₅₄
展開溶媒: トルエン: ヘキサン(7:3, v/v)

表3. GC分析条件

カラム: φ0.25 mm x 15 m
充填剤: 100% dimethylpolysioxane
検出: 水素イオン化検出器(FID)

温度設定条件

カラム：100℃
 注入部：250℃
 検出部：270℃
 昇温条件：100～250℃ (10℃/ min)

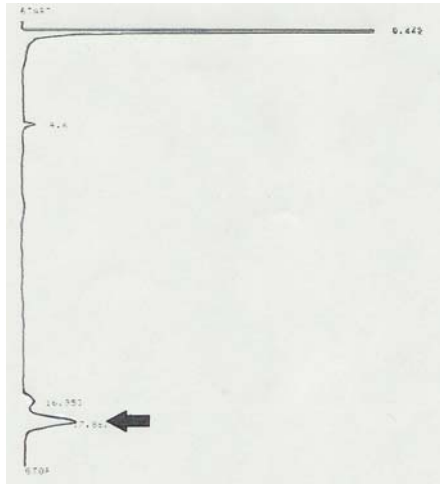


図 2. 細菌No.286 株のGC分析
 (矢印はヘプタデカンの存在を示す)

2) 高密度菌体によるヘプタデカンの生産
 スクリーニングに用いた培地は、オクタデカナルあるいはヘプタデカンの変換を目的に、これらを唯一炭素源として無機塩を加えたものであるため、細菌の増殖には適したものではなかった。特に、脱カルボニル化酵素は、微生物が本来持っている構成酵素ではなく基質に適応して合成される誘導酵素であるため、培地成分にオクタデカナルを含む誘導培地であることが必要であり、そのために炭素源および窒素源としてブドウ糖およびペプトン等を加えた培地では菌株の生育は良いが、オクタデカナルからヘプタデカンへの変換はほとんど見られなかった。また、ヘプタデカンと予想される変換物質は、GC の溶出時間から判定したが、生産量としては微量であった。そこで培養した多量の菌体に基質オクタデカナルを加えて反応させ、オクタデカナルからヘプタデカンへの変換を見た。反応時間が長くなるにつれ、ヘプタデカンの生産量が増加することから、細菌 No. 286 株による変換と推定した。

3) 細菌 No. 268 株の同定

次に、オクタデカナルからヘプタデカンへの変換菌を、16S rDNA の塩基配列および生理試験、生化学試験の結果から同定した。細菌 No. 286 株から得られた 16S rDNA の塩基配列をアポロン DB-BA 4.0 に対する相同検索から相同率を比較した結果、No.268 株

の 16S rDNA 塩基配列は *Serratia* 属細菌と高い相同性を示し、*S. marcescens* subsp. *sakuensis* KRED 株の 16S rDNA に対して 99.4%と最も高い相同性を示した(表 4)。また、国際塩基配列 DB (GenBank / DDBJ / EMBL) に対する相同検索からの相同率の比較においても、*Serratia* 属細菌の 16S rDNA に対して高い相同性を示した(表 5)。以上の結果、16S rDNA の塩基配列の相同率から No.268 株を *S. marcescens* に帰属する菌株とすることが妥当である判断した。

表 4. アポロン DB に対する相同率

菌株名	相同率
<i>S. marcescens</i> subsp. <i>sakuensis</i>	99.4%
<i>S. marcescens</i> subsp. <i>marcescens</i>	99.3%
<i>Serratia ureilitica</i>	98.3%
<i>Citrobacter murliniae</i>	97.5%
<i>Serratia odorifera</i>	97.6%
<i>Serratia entromophila</i>	97.7%
<i>Serratia ficaria</i>	97.6%
<i>Serratia rubidaea</i>	97.3%
<i>Citrobacter braakii</i>	97.1%
<i>Citrobacter freundii</i>	97.2%
<i>Enterobacter arogens</i>	97.3%
<i>Citrobacter werkmanii</i>	96.9%

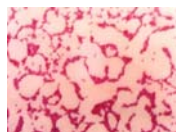
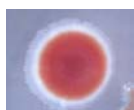
表 5. 国際塩基配列 DB に対する相同率

菌株名	相同率
uncultured bacterium(DQ068802)	99.5%
uncultured bacterium(DQ068828)	99.5%
bacterium enriched culture clone	99.4%
<i>Serratia</i> sp. TCR	99.4%
<i>Serratia</i> sp. KMR-3	99.4%
<i>Serratia marcescens</i>	99.5%
uncultured bacterium(DQ068896)	99.5%
uncultured bacterium(DQ068892)	99.5%
uncultured bacterium(DQ068825)	99.4%
uncultured bacterium(DQ068896)	99.5%
uncultured bacterium(DQ068895)	99.4%
uncultured bacterium(DQ068888)	99.4%

生産株の同定には 16S rDNA の塩基配列の相同検索だけでは不十分なため、細菌 No.286 株の形態観察および生理試験(表 6)、生化学試験(表 7)を行った。

表 6. 生理試験結果

試験項目	判定または特徴
培養温度	30℃
細胞形態	桿菌
グラム染色性	陰性
胞子の有無	無
運動性	有
コロニー形態 (LB 寒天培地、 培養時間 24hr)	直径：1.0-2.0 mm 色調：赤色 形：円形 隆起状態：レンズ状 周縁：全縁 表面の形状：スムーズ 透明度：不透明 粘稠度：バター様
生育温度試験 37℃	陽性
生育温度試験 45℃	陰性
カタラーゼ反応	陽性
オキシダーゼ反応	陰性
酸産生 (グルコース)	陽性
ガス産生 (グルコース)	陰性
酸化テスト	陽性
発酵テスト	陽性



No.268 株のコロニー グラム染色像

表 7. 生化学試験結果

試験項目	判定
β-カタラーゼ活性	+
アルギニンヒドロラーゼ活性	-
リシンデカルボキシラーゼ活性	+
オルニチンデカルボキシラーゼ活性	+
クエン酸の利用性	+
H ₂ Sの産生	-
ウレアーゼ活性	-
トリプトファンデアミナーゼ活性	-
インドール産生	-
アセトイン産生	+
ゼラチナーゼ活性	+
ブドウ糖発酵性	+
D-マンニトール	+
イノシトールの酸化	+
D-ソルビトールの酸化	+
L-ラムノースの酸化	-
D-メリビオースの酸化	-
D-アミダグリン	+
L-アラビノースの酸化	-

オキシダーゼ活性	-
NO ₂ の産生	+
N ₂ ガスへの還元	-
運動性	+
MacConkey 寒天培地での生育	+
OF 培地での酸化	+
OF 培地での発酵	+

生理試験および生化学試験の結果から得られた性状は、16S rDNA 塩基配列の解析結果から近縁性が示された *S. marcescens* の性状とほぼ一致した。一方、これらの性状は *S. marcescens* の亜種である *S. marcescens* subsp. *sakuensis* の性状にもほぼ一致したが、この菌は芽胞を形成する菌として提唱されている点で異なっていた。すなわち、生理試験によれば No. 268 株では芽胞の形成が認められないことから、*S. marcescens* subsp. *sakuensis* とは一致しないと判断した。

以上、16S rDNA 塩基配列および生理試験、生化学試験の結果から現段階では No. 268 株を *S. marcescens* subsp. *marcescens* に帰属する菌株であると同定した。

4) 今後の展望

細菌 No.268 は脂肪酸アルデヒドであるオクタデカノールを脱カルボニル化し、炭化水素であるペプタデカンに変換することが示唆された。しかし、ヘプタデカンである確認は GC 分析による標準物質との比較に基づくものであり、今後は、本物質を単離・精製して NMR および質量分析等の機器分析により目的とするヘプタデカンであることを確認する必要がある。その後、細菌 No. 268 株より脱カルボニル化酵素を分離・精製して酵素化学性質を明らかにする。

5. 主な研究発表等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

細野 邦昭 (HOSONO KUNIAKI)
 日本大学・生物資源科学部・教授
 研究者番号：80339291