

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20380050

研究課題名（和文） 微生物における還元的脂肪酸・有機酸変換機能の探索と開発

研究課題名（英文） Screening and development of reductive fatty acid- and organic acid-transforming activities in microorganisms

研究代表者

小川 順 (OGAWA JUN)

京都大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：70281102

研究成果の概要（和文）：

還元的物質変換反応は、バイオマスの有効利用ならびにバイオマスからの石油系原料化合物生産に有効であると考えられている。そこで、微生物を対象に、ユニークな還元的脂肪酸・有機酸代謝を探索し、見いだされた代謝系を、反応・酵素・遺伝子の観点から解析した。また、見いだされた反応を、様々な機能性脂質（共役脂肪酸、水酸化脂肪酸、部分飽和脂肪酸）や、脂肪族アルコール類などの生産へと応用した。

研究成果の概要（英文）：

Reductive chemical reactions are useful for biomass utilization and biomass transformation to petro-chemical compounds. Reductive metabolisms of fatty acids and organic acids were screened in microorganisms and the reactions, enzymes, and genes involved in the metabolisms were analyzed. Furthermore, the reactions were applied to functional lipid (conjugated fatty acids, hydroxyl fatty acids, and partially saturated fatty acids) production and fatty alcohol production.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2009年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2010年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
年度			
年度			
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

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：還元反応、脂肪酸、有機酸、嫌気反応、共役化反応、飽和化反応、嫌気性微生物

1. 研究開始当初の背景

還元的物質変換機能がバイオマスの有効利用ならびにバイオマスからの石油系原料化合物生産に重要であることは、例えば、米国において DuPont 社が開発したグルコース

からの 1,3-プロパンジオール生産の例にも明らかである。この場合鍵となる反応は、グリセロールの 3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを経る 1,3-プロパンジオールへの変換であり、この過程ではジオールをアルデヒドへ

と脱水する酵素ならびにアルデヒドをアルコールへと還元する酵素が機能している。いずれも、*Clostridium*、*Citrobacter*、*Enterobacter*、*Klebsiella*、*Lactobacillus*などの嫌気性細菌にその活性が見いだされている還元的物質変換活性である。

一方、石油の主成分である飽和アルカン類をバイオマスから生産する場合、植物ならびに微生物により生産可能な不飽和脂肪酸類を原料とした還元的プロセスを設計することができる。この際、鍵となる反応は、不飽和脂肪酸の飽和化、飽和脂肪酸の脱炭酸、もしくは、アルデヒド・アルコールを経る還元反応となる。飽和化活性は、嫌気性ルーメン細菌や乳酸菌に、脱炭酸活性は藻類に、アルデヒド・アルコールを経る還元活性は *Vibrio* 属の嫌気性細菌に報告例があるが、詳細な検討はなされていない。

また、*Clostridium* 属細菌において酪酸がブタノールへと還元されることが知られているが、同様のカルボキシル基のアルコールへの還元反応がジカルボン酸の変換に適応できれば、汎用性のポリマー原料となるジオールを発酵生産可能なコハク酸などのジカルボン酸を原料として誘導するプロセスの構築が期待できる。

以上のように、植物バイオマスである糖質・油脂、ならびに微生物により発酵生産可能な脂肪酸・ジカルボン酸などから、現在の化学工業で利用されている石油系原料化合物の誘導を想定する場合、還元的脂肪酸・有機酸変換機能が重要となってくる。しかし、これらの機能が微生物において産業利用の観点から網羅的に探索され、詳細に解析・検討された例は少ない。

2. 研究の目的

筆者らは脂質の微生物変換研究を展開するなかで、嫌気性細菌に新規な還元的不飽和脂肪酸代謝を見だし、不飽和脂肪酸の水和・脱水を伴う共役脂肪酸への異性化、二重結合の飽和化などの興味深い反応の関与を明らかにするとともに、これらの反応を共役脂肪酸などの新規機能性脂質の生産へと応用してきた。本研究ではこれらの実績に基づき、嫌気性細菌における還元的脂肪酸代謝研究を酵素・遺伝子・反応機構レベルへと深化させ基礎的知見を得るとともに、その成果を様々な機能性脂質、脂肪酸アルコール類、飽和アルカン類などの生産へと応用することを目的とする。

3. 研究の方法

第一の課題として、脂肪酸分子内に存在する炭素-炭素二重結合を還元的に飽和化する反応の解析と応用に取り組んだ。具体的には、リノール酸の共役リノール酸への異性化

に関して高活性を示す乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* AKU1009a における不飽和脂肪酸飽和化代謝系を解明した。

第二の課題として、脂肪酸分子内のカルボキシル基をアルコールへと還元する反応の解析と応用に取り組んだ。脂肪酸のアルデヒド・アルコールを経る還元反応が *Vibrio* 属などの嫌気性細菌に報告されているが、詳細な検討はなされていない。筆者らは、嫌気性細菌における不飽和脂肪酸飽和化反応の研究過程で、*Eubacterium* 属細菌が、脂肪酸を脂肪酸アルコール類へと変換することを見だし、その詳細を解析した。

4. 研究成果

(1) 不飽和脂肪酸飽和化反応の解析、高活性菌の探索と新規機能性脂質生産への応用

これまでに *Butyrivibrio fibrisolvens* などの嫌気性細菌が不飽和脂肪酸を共役脂肪酸を中間体とする経路にて飽和化することが知られていた。筆者らは、リノール酸を共役リノール酸へと変換する活性が高い *Lactobacillus plantarum* AKU1009a における脂肪酸飽和化反応経路を解析した結果、図 1 に示す新規な不飽和脂肪酸飽和化経路を見いだした。本経路においては、リノール酸はまず水和され 10-hydroxy-12-octadecenoic acid (HY) となり、HY が脱水異性化されることで共役リノール酸 (c9, t11-CLA; *cis*-9, *trans*-11-octadecadienoic acid 及び t9, t11-CLA; *trans*-9, *trans*-11-octadecadienoic acid) が生成し、これが *trans*-10-octadecenoic acid を経てステアリン酸へと飽和化される。

まず、リノール酸を共役リノール酸へと変換する酵素系の解析を行った結果、膜画分に一つ、可溶性画分に二つ、本反応に関与する蛋白質が存在することを明らかにし、膜画分に存在するタンパク質を CLA-HY、可溶性画分に存在するタンパク質を CLA-DH と CLA-DC とした。これらの3つの蛋白質、CLA-HY、CLA-DH、CLA-DC を用いて反応の詳細を解析した結果、リノール酸の共役化反応はこれら3つ全ての蛋白質が存在したときのみ進行することが明らかとなった。続いて、リノール酸共役化に関与する上記3つの酵素をコードする遺伝子をそれぞれ *L. plantarum* AKU1009a からクローニングし、発現ベクターを構築した。形質転換により大量発現大腸菌を作製し、酵素の精製及び諸性質の検討を行った。

精製 CLA-HY の吸収スペクトルを測定した結果、450 nm 付近に極大吸収を確認したことから、CLA-HY はフラビン酵素であることが判明した。精製酵素を FAD、リノール酸と共に反応に供した結果、10-hydroxy-*cis*-12-octadecenoic acid (HYA) の生成が観察された。

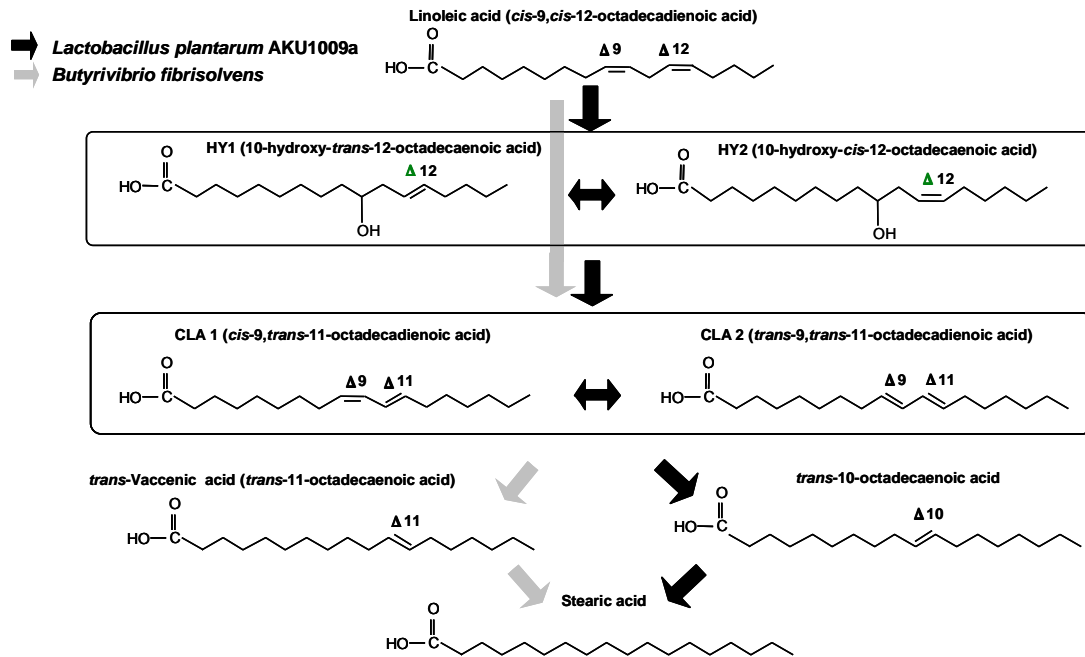


図1. 嫌気性細菌における不飽和脂肪酸飽和化経路。

また CLA-HY は炭素数 18 で 9 位に *cis* 型の二重結合を有するオレイン酸、 α -リノレン酸、 γ -リノレン酸をそれぞれ対応する 10-ヒドロキシ脂肪酸へと変換した。精製 CLA-DH は CLA-HY、CLA-DC の存在下においてリノール酸を CLA1 及び CLA2 へと変換することを確認した。また CLA-DH は short-chain dehydrogenase/oxidoreductase と相同性が高く、 NAD^+ 存在下で HYA を 10-oxo-*cis*-12-octadecenoic acid へと変換した。精製 CLA-DC の機能については明らかになっていないが、acetoacetate decarboxylase と相同性を示す蛋白質であり、リノール酸から CLA-HY、CLA-DH の作用により生成する 10-oxo-*cis*-12-octadecenoic acid を 10-oxo-*trans*-11-octadecenoic acid に変換すると考えられた。

また、CLA-HY、CLA-DH、CLA-DC の遺伝子情報を、*L. plantarum* のゲノム情報に照らし合わせた結果、CLA-DH、CLA-DC と隣接して存在し、nitroreductase と相同性を示す遺伝子 CLA-ER を見いだした。本酵素を *L. plantarum* AKU1009a からクローニングし、発現ベクターを構築後、形質転換により大量発現大腸菌を作製し、酵素の精製及び諸性質の検討を行った。その結果、CLA-ER が 10-oxo-*trans*-11-octadecenoic acid を 10-oxo-octadecanoic acid へと飽和化する活性を示すことが明らかとなった。これにより、CLA-HY、CLA-DH、CLA-DC、CLA-ER により触媒される不飽和脂肪酸飽和化反応の全体像が明らかとなった。

すなわち、CLA-HY により触媒される不飽和脂肪酸の水酸化脂肪酸への水和、CLA-DH により触媒される水酸化脂肪酸の酸化と、引き続き CLA-DC により触媒される二重結合の転移によるエノンの生成、さらには、CLA-ER により触媒されるエノンの還元を経て、それまでの反応を折り返すように進行する CLA-DH の逆反応である還元、CLA-HY の逆反応である脱水反応により飽和化を完結する一連の不飽和脂肪酸飽和化系路が明らかとなった。

また、この不飽和脂肪酸飽和化系路に関与する 4 つの酵素 CLA-HY、CLA-DH、CLA-DC ならびに CLA-ER について、有用物質生産への応用を検討した。その結果、CLA-HY に関して、ポリマー原料、潤滑剤、界面活性剤等に利用される水酸化脂肪酸の生産に有用であることを見いだした。具体的な生産例としては、オレイン酸を基質とした際に、収率約 90%にて 30 g/L の 10-ヒドロキシステアリン酸の生産を達成した。さらに、CLA-HY、CLA-DH、CLA-DC の 3 種の蛋白質から構成される複合酵素系を共発現する大腸菌を用い、 α -リノレン酸、 γ -リノレン酸、ステアリドン酸を基質とし対応する共役高度不飽和脂肪酸を生産するプロセスを構築した。

(2) 脂肪酸のアルデヒド・アルコールを経る還元的代謝の解析、高活性菌の探索と石油系化合物生産への応用

脂肪酸のアルデヒド・アルコールを経る還元反応が *Vibrio* 属などの嫌気性細菌に報告

されているが、詳細な検討はなされていない。著者らは、嫌気性細菌における不飽和脂肪酸飽和化反応の研究過程で、*Eubacterium* 属細菌が、脂肪酸を脂肪族アルコール類へと変換することを見だし、その詳細を解析した。パルミチン酸を添加した GAM 培地を用いて、*Eubacterium* 属細菌を培養し、培養液上清をガスクロマトグラフィーにて分析したところ 1-ヘキサデカノールの生成を確認した。よって *Eubacterium* 属細菌は、脂肪酸を対応するアルコールへと還元することが明らかとなった。本還元反応の基質特異性を検討した結果、炭素数 3 から 24 の飽和脂肪酸、炭素数 10 から 16 のジカルボン酸、芳香族カルボン酸などをそれぞれ対応するアルコールへと変換することが判明した。

コハク酸をプロピオン酸へと脱炭酸する菌株、及びプロピオン酸を 1-プロパノールへと還元する菌株の探索を行った。その結果、コハク酸からプロピオン酸を生産する *Selenomonas ruminantium* JCM 6582 及び、プロピオン酸から 1-プロパノールを生産する *Clostridium sporogenes* JCM 1410 を取得した。各反応に対する最適条件の検討を行い、これら 2 株の混合培養による 1-プロパノール生産を試みた。その結果、コハク酸を原料としプロピオン酸を経由する 1-プロパノール生産に成功した。

以上、新たに見いだされた還元的脂肪酸代謝に関わる酵素反応・微生物変換反応は、様々な生理活性が期待される機能性脂質の生産、ならびにバイオ燃料・ポリマー素材として期待される脂肪族アルコール類の新たな生産法を提供しうると考えられる。

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 12 件)

- ① Kishino S., J. Ogawa, K. Yokozeki, S. Shimizu. Linoleic acid isomerase in *Lactobacillus plantarum* AKU1009a proved to be a multi-component enzyme system requiring oxidoreduction cofactors. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 75(2), 318-322 (2011). 査読有
- ② Kishino, S., J. Ogawa, A. Ando, K. Yokozeki, S. Shimizu. Microbial production of conjugated γ -linolenic acid from γ -linolenic acid by *Lactobacillus plantarum* AKU 1009a. *J. Appl. Microbiol.*, 108 (6), 2012-2018 (2010). 査読有
- ③ 岸野重信, 小川 順. 特集 バイオマスからの有用物質生産プロセス最前線 脂肪酸誘導体の合成. *BIO INDUSTRY*, 27 (11), 32-37 (2010). 査読無
- ④ Kishino, S., J. Ogawa, K. Yokozeki, S. Shimizu. Metabolic diversity in biohydrogenation of polyunsaturated fatty acids by lactic acid bacteria involving conjugated fatty acid production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 84 (1), 87-97 (2009). 査読有
- ⑤ Kishino, S., J. Ogawa, K. Yokozeki, S. Shimizu. Microbial production of conjugated fatty acids. *Lipid Technology*, 21 (8-9), 177-181 (2009). 査読有
- ⑥ Ando, A., J. Ogawa, S. Sugimoto, S. Kishino, E. Sakuradani, K. Yokozeki, S. Shimizu. 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
- ⑦ 小川 順, 清水 昌. 微生物酵素の産業利用-その最前線を探る-. *化学と生物*, 47 (6), 412-418 (2009). 査読有
- ⑧ 櫻谷英治, 安藤晃規, 小川 順, 清水 昌. 機能性脂質の微生物による生産 -アラキドン酸に関連する油脂の発酵生産を中心として-. *蛋白質 核酸 酵素*, 54 (6), 725-734 (2009). 査読有
- ⑨ von Canstein, H., J. Ogawa, S. Shimizu, J.R. Lloyd. Secretion of flavins by *Shewanella* species and their role in extracellular electron transfer. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74 (3), 615-623 (2008). 査読有
- ⑩ Fernandez, A., J. Ogawa, S. Penaud, S. Boudebouze, D. Ehrlich, M. van de Guchte E. Maguin. Rerouting of pyruvate metabolism during acid adaptation in *Lactobacillus bulgaricus*. *Proteomics*, 8, 3154-3163 (2008). 査読有

⑪ 小川 順, 岸野重信, 清水 昌. 新春特集 微生物機能による反応と物質生産 序論-ユニークな微生物機能の探索・開発と物質生産への利用. 月刊 ファインケミカル, 37 (1), 5-7 (2008). 査読無

⑫ 岸野重信, 小川 順, 横関健三, 清水 昌. 乳酸菌による共役脂肪酸生産. バイオサイエンスとインダストリー, 66 (2), 54-59 (2008). 査読無

[学会発表] (計 10 件)

① S. Kishino et al., Linoleic acid isomerase in *Lactobacillus plantarum* AKU1009a is a multi-component enzyme system requiring oxidoreduction cofactors. 101st AOCS Annual Meeting & Expo. 2010. 5. 17. Phoenix, USA

② 小川 順ら, 代謝的視点からの機能探索に基づく微生物酵素開発. 2010 年度日本農芸化学会大会. 2010 年 3 月 30 日. 東京大学 (東京都)

③ J. Ogawa et al. Metabolic, enzymatic, and genetic studies on biohydrogenation of polyunsaturated fatty acids by anaerobic bacteria involving conjugated fatty acid production. 5th International Symposium on Biocatalysis and Biotechnology. 2009 年 11 月 19 日. Taichung, Taiwan.

④ 小川 順ら, 脂肪酸分子種の多様性を創出する微生物機能. 第 14 回水産油脂技術懇話会. 2009 年 11 月 10 日. 日本水産油脂協会 (東京都)

⑤ J. Ogawa et al. A multi-component enzyme system for linoleic acid transformation to conjugated linoleic acid (CLA) in lactic acid bacteria. 15th German-Japanese Workshop on Enzyme Technology. 2009 年 9 月 26 日. Rostock, Germany

⑥ J. Ogawa et al. A multi-component enzyme system for linoleic acid transformation to conjugated linoleic acid (CLA) in lactic acid bacteria. Enzyme Engineering XX. 2009 年 9 月 24 日. Groningen, Holland.

⑦ J. Ogawa, et al. Potentials of

Microorganisms for Functional Food Production and Probiotics

Workshop Argentina-Japan "Bioscience and Biotechnology for the Promotion of Agriculture and Food Production". 2009 年 8 月 4 日. Buenos Aires, Argentina.

⑧ 小川 順ら, 微生物機能を活用した様々な機能性脂質素材の生産. "2009 年油脂産業技術部会セミナー -有用油脂の高度利用「油脂と健康」-". 2009 年 5 月 18 日. 油脂工業会館 (東京都)

⑨ J. Ogawa, et al. Potentials of lactic acid bacteria for functional lipid production and anti-hyperuricemia probiotics. The 11th Swiss-Japanese Joint Meeting on Biotechnology and Bioprocess Development. 2008 年 10 月 28 日. Minusio, Switzerland.

⑩ J. Ogawa, et al. Unique fatty acid transformation catalyzed by anaerobic bacteria and its application for conjugated fatty acid production. The 2008 Annual Meeting of The Society for Industrial Microbiology. 2008 年 8 月 11 日. San Diego, USA.

[図書] (計 5 件)

① Sakuradani, E., J. Ogawa, S. Kishino, A. Ando, K. Yokozeki, S. Shimizu. Oils, Microbial Production. Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology (ed. by M.C. Flickinger) John Wiley & Sons, 6, 3693-3706 (2010).

② 小川 順, 櫻谷英治, 岸野重信, 安藤晃規, 清水 昌. 第 5 編-第 1 章-第 5 節 「3. 有用脂肪酸の生産」. 酵素利用技術大系 (小宮山真監修), エヌ・ティー・エス, 430-433 (2010).

③ 岸野重信, 小川 順. 第 7 章 バイオプロダクトと新プラットフォーム形成 「9. 脂肪酸誘導体の合成」. 地球環境シリーズ エコバイオリファイナリー -脱石油社会へ移行するための環境ものづくり戦略- (植田充美、田丸 浩 監修), 株式会社シーエムシー出版, 213-219 (2010).

④ 小川 順, 岸野重信, 櫻谷英治, 清水 昌. 高度不飽和脂肪酸・共役脂肪酸含有油脂の微生物生産. バイオテクノロジーシリーズ 微生物によるものづくり -化学法に代わるホワイトバイオテクノロジー

一のすべて-, 植田充美監修, シーエム
シー出版, 東京, pp. 85-91 (2008).

- ⑤ 小川 順, 岸野重信, 櫻谷英治, 横関健
三, 清水 昌. 微生物機能を活用した食
品機能の創出. 栄養学研究の最前線, 日
本栄養食糧学会監修, 建帛社, pp.
151-165 (2008).

[その他]

ホームページ等

<http://www.hakko.kais.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小川 順 (OGAWA JUN)

京都大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号: 70281102

(2) 研究分担者

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
(H20、H21 より辞退)

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

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

(3) 連携研究者