

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05340

研究課題名（和文）生理活性脂肪酸の安定性と機能性向上を目的とした微生物由来アミド化触媒の探索

研究課題名（英文）Screening of microbial amide-bond forming enzyme for stabilization and functionalization of bioactive fatty acids

研究代表者

原 良太郎（Hara, Ryotaro）

京都大学・農学研究科・特定准教授

研究者番号：70553535

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：脂肪酸アミドは工業的にはプラスチックの製造において加工をしやすい可塑剤として有用である。近年では、医薬品としての有用性が注目されている。現行の化学合成法は、環境負荷が大きいことが問題である。本研究では、環境負荷の小さいバイオプロセスの構築を目指し、新たな微生物酵素の探索と解析を行った。その結果、Mycobacterium sp. AKU 2014株において脂肪酸アミドの一種であるオレアミドならびにエルカミド合成活性を見出した。当該活性を担う酵素を精製し、解析したところ、セリンペプチダーゼと同性を有していた。さらに、酵素遺伝子を大腸菌において発現させ、酵素的諸性質を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脂肪酸アミドは化粧品や医薬品として有用な化合物である。本研究では、脂肪酸アミドを環境負荷の少ない製法によって生産することを目指し、微生物酵素の探索を行った。見いだした酵素を用いることで、オレアミドやエルカミドのみならず、様々な種類の脂肪酸アミドも合成できた。本成果が起点となり、多様な脂肪酸アミドを低環境負荷条件下で製造することが期待される。

研究成果の概要（英文）：Fatty acid amides are compounds formed by the combination of fatty acids and amines, and they are useful as plasticizers in the manufacturing of plastics in the chemical industry. Recently, their potential as pharmaceuticals has attracted much attention. The current chemical synthesis methods include significant environmental issues. This study aimed to develop a bioprocess with lower environmental impact as an alternative to conventional manufacturing methods, and a novel microbial enzyme was screened and characterized. Consequently, oleamide- and erucamide-synthesizing activities were found in Mycobacterium sp. AKU 2014. Then, purification and identification of the enzyme responsible for this activity. Furthermore, the gene was expressed in Escherichia coli, and various enzymatic properties were uncovered.

研究分野：応用微生物学、酵素工学

キーワード：脂肪酸アミド アミド結合 セリンペプチダーゼ オレアミド エルカミド Mycobacterium スクリーニング

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脂肪酸アミドは脂肪酸とアミンがアミド結合で連結した物質であり、可塑剤や界面活性剤など幅広い化成品の原料として利用されている。近年では、睡眠導入や骨格筋減少の抑制に関わる脂質メディエーターとしても注目を集めている。また、空气中で酸化されやすい DHA や EPA などの高度不飽和脂肪酸をアミド化することで物性の安定化が見込まれることから、脂肪酸のアミド化は機能性脂肪酸をサプリメント等に加工する際に有用である。しかし、脂肪酸アミドは現在、高価な縮合剤や酸クロリドを用いた環境に負荷のかかる化学合成法によって生産されており、環境負荷の小さい酵素合成法の開発が求められている。

2. 研究の目的

本研究では脂肪酸アミドの効率的な生産に向け、現行の化学合成法の代替となる新規酵素合成法の開発を目指した。そこで、研究室保存菌株を中心に脂肪酸アミドを合成できる微生物の探索を通して酵素の取得に取り組んだ。

3. 研究の方法

3.1. 研究室保有菌株からの探索

脂肪酸アミドの中でも脂質メディエーターとして知られるオレアミドと可塑剤の原料であるエルカミドを合成する微生物の探索を行った。効率的にスクリーニングを行うため、研究室保有の乾燥菌体を用いて遊離脂肪酸のアミド化活性を評価した。1429 株を対象に、それぞれ 2 mM オレイン酸、2 mM エルカ酸、400 mM 硫酸アンモニウム、0.05 % (w/v) Tween 80、20 mM アデノシン 5'-リン酸、20 mM 硫酸マグネシウム・7水和物を含む反応液で 42 °C、6 h 反応させ、Bligh-Dyer 法で生成物を抽出後、オレアミドとエルカミドの合成をガスクロマトグラフィー (GC) で評価した。一次スクリーニングで活性を見出した 78 株について、単位菌体当たりのオレアミドとエルカミドの合成量を比較するため、湿菌体重量 50 mg/mL を用いて同様の反応系で休止菌体反応を行った。

3.2. 酵素精製

スクリーニングで見出した *Mycobacterium* sp. AKU 2014 に由来する脂肪酸アミド合成に関わる酵素を特定するために酵素精製を行った。ISP 2 培地 5 L で培養した菌体を超音波で破碎した後、無細胞抽出液を調製し、弱陰イオン交換、疎水、ゲルろ過、強陰イオン交換の順にカラムクロマトグラフィーを行った。

3.3. 脂肪酸アミド合成酵素の遺伝子クローニングと大腸菌における発現

同定したセリンペプチダーゼの特性解析を行うために、当該酵素遺伝子のクローニングを行った。*Mycobacterium* sp. AKU 2014 ゲノム中の対応する遺伝子を PCR で増幅し、pET-21a (+) または pET-28a (+) の NdeI/XhoI サイトに挿入した。構築したプラスミドを Rosetta2 (DE3) に導入し、組換え大腸菌を作製した。

3.4. 組換え酵素の精製と諸性質検討

抗生物質を含む LB 培地で培養した大腸菌 Rosetta2 (DE3) を超音波で破碎し、遠心分離後、無細胞抽出液を回収してニッケルカラムに通すことで精製酵素を取得した。最適反応条件は、2 mM オレイン酸、400 mM 硫酸アンモニウム、0.01 mg/mL 精製酵素を含む反応液において、温度 (15–60 °C) または pH (7–11) を変化させることで評価した。基質特異性は、脂肪酸の鎖長を変化させた様々な飽和脂肪酸、不飽和脂肪酸を検討した。

4. 研究成果

4.1. 研究室保有菌株からの探索

研究室保有菌株を用いてオレアミドならびにエルカミド合成活性を指標にスクリーニングを行った結果、オレアミドを合成する菌株を 78 株見出し、その中の 46 株についてはエルカミドの合成も認められた (図 1)。放線菌類については 46 株がオレアミドを合成し、そのうち 35 株はエルカミドも合成しており、見出した脂肪酸アミド合成菌の多くを放線菌類が占めた (表 1)。本スクリーニングでの脂肪酸アミド合成量の最大値はオレアミドが 0.21 mM、エルカミドが 0.07 mM であった。

続いて、より詳細な評価を行うために、休止菌体反応を検討した。その結果、0.15 mM 以上のオレアミドを合成した 21 株中 8 株が *Mycobacterium* 属、6 株が *Nocardia* 属であった。*Mycobacterium* sp. AKU 2014 においてはオレアミドとエルカミドを 0.2 mM 合成しており、こ

これは供試した菌株の中で最も多い合成量であった。

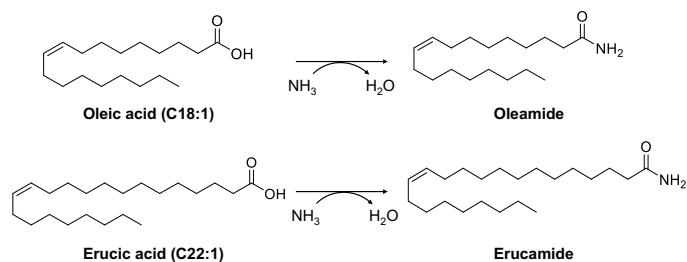


図 1. 酵素法によるオレアミド、エルカミドの合成.

表 1. 研究室保有菌株からの探索

グループ	評価数	活性あり	
		オレアミド	エルカミド
放線菌	110	46	35
酵母	184	12	5
バクテリア	96	10	6
冬虫夏草	67	3	0
担子菌	136	1	0
カビ	286	0	0
乳酸菌	188	0	0
その他	362	6	0
合計	1429	78	46

4.2. 脂肪酸アミド合成酵素の精製

脂肪酸アミドの合成活性が最も高かった AKU 2014 からの酵素精製を試みた。4 段階のクロマトグラフィーの結果、目的酵素は収量 0.21 %、精製倍率 595 倍で部分的に精製され (表 2)、SDS-PAGE 上の分子量 40,000 付近に酵素活性と相関するタンパク質バンドが認められた (図 2)。そこで当該バンドの切り出しを行い、プロテインシーケンサーによって当該タンパク質の N-末端アミノ酸配列を 19 残基までを決定した。得られたペプチドを BLAST で検索したところ、既知セリンペプチダーゼと 12 残基が一致した。

表 2. 脂肪酸アミドを合成酵素の精製

ステップ	総活性 (U*)	比活性 (U/mg)	収率 (%)	倍率 (fold)
無細胞抽出液	0.949	0.000724	100	1.0
HiPrep DEAE FF 16/10	0.452	0.00227	47	3.1
HiPrep Phenyl FF 16/10	0.0153	0.00240	1.6	3.3
Superdex 200 Increase 10/300	0.00285	0.0212	0.30	29
MonoQ 5/50	0.00202	0.431	0.21	595

*1 分間に 1 μ mol のオレアミドを合成する酵素量

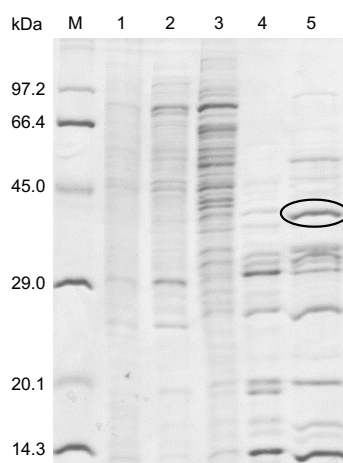


図 2. SDS-PAGE 分析.

レーン M, 分子量マーカー; レーン 1, 無細胞抽出液; レーン 2, HiPrep DEAE FF 16/10; レーン 3, HiPrep Phenyl FF 16/10; レーン 4, Superdex 200 Increase 10/300; レーン 5, MonoQ 5/50. 丸印が目的酵素を示す.

4.3. 脂肪酸アミド合成酵素遺伝子の異種発現

組換え酵素を大腸菌内で大量に生産させるために、セリンペプチダーゼ遺伝子のコドンが大腸菌型に同義置換し、各種発現プラスミドを構築した。精製を簡便化するためのヒスチジンタグの付加位置も検討した。その結果、コドンは大腸菌型、N-末端にヒスチジンタグを付加した組換え酵素が最も効率よく精製が可能であった。そこで、この条件を用いて酵素を大量に調製し、諸性質を解析した。

4.4. 最適反応条件と基質特異性

まず、組換え酵素がオレアミドとエルカミドの合成活性を有することを検証した。基本反応系を用いて、42°C、200 rpm、2 h の条件で反応させ、反応液を GC で分析した。その結果、元株 AKU 2014 株から精製した酵素と同様に、オレアミドとエルカミドの合成活性を示した。続いて、最適反応条件を検討した結果、最適温度は 35 °C、最適 pH は 9.0 であった。さらに、補因子による反応促進効果を期待し、様々な金属イオンを検討した結果、無添加条件と比較して有意な差は見られなかったことから、本酵素は金属イオン非依存性であることが明らかになった。

C6 から C22 の様々な飽和脂肪酸、不飽和脂肪酸を用いて基質特異性を検討した。その結果、C10 以上の脂肪酸において、対応する脂肪酸アミドの合成を確認した (表 3)。

表 3 脂肪酸に対する基質特異性

基質	生成物	生成量 (μM)
デカン酸	デカミド	6.2
ドデカン酸	ドデカミド	4.8
ミリスチン酸	ミリスタミド	107
パルミチン酸	パルミタミド	190
ステアリン酸	スタアラミド	163
オレイン酸	オレアミド	249
エルカ酸	エルカミド	195

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Ryotaro Hara, Tatsuo Fukao, Makoto Ueda, Jun Ogawa
2. 発表標題 Screening and Purification of Long-Chain Fatty Acid Amide-Forming Enzyme from Mycobacterium sp. AKU 2014
3. 学会等名 3rd Japan-Switzerland-Germany Workshop on Biocatalysis and Bioprocess Development (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 横尾 航平, 深尾 達夫, 原 良太郎, 上田 誠, 小川 順
2. 発表標題 Mycobacterium sp. AKU 2014 由来の脂肪酸アミド合成酵素の機能解析
3. 学会等名 第23回 生体触媒化学シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 横尾 航平, 深尾 達夫, 原 良太郎, 上田 誠, 小川 順
2. 発表標題 脂肪酸アミド合成に有用な微生物酵素の探索
3. 学会等名 第5回脂質駆動学術産業創生研究部会講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 深尾 達夫, 横尾 航平, 森 雅輝人, 原 良太郎, 上田 誠, 小川 順
2. 発表標題 脂肪酸アミド合成に有用な微生物酵素の探索および基質特異性の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2024年度大会
4. 発表年 2024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
---------	---------