

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23248014

研究課題名(和文) バイオベースケミカルインダストリーを創出する有用微生物触媒の開発

研究課題名(英文) Development of useful microbial catalysts pioneering bio-based chemical industry

研究代表者

小川 順 (Ogawa, Jun)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：70281102

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 38,700,000円、(間接経費) 11,610,000円

研究成果の概要(和文)：バイオリファイナリーにより誘導される有機酸、アルコール、アミノ酸、糖、油脂などの化合物は、化学工業で用いられる化合物と構造を異にする。バイオマス由来の化合物は、酸化度の高い化合物であるのに対し、石油化学において汎用されるポリマー原料等は、還元度の高い化合物群である。本研究では、バイオマス由来の高酸化化合物を高還元化合物へと変換する技術、ならびに、それに必要なエネルギー・電子フローを効率化する微生物機能の開発に取り組んだ。具体的には、油脂ならびにアミノ酸からのジカルボン酸、ジオール、オレフィンの生産、ならびに、これらのプロセスへの補因子、エネルギー供給系の開発に取り組んだ。

研究成果の概要(英文)：Organic acids, alcohol, amino acids, sugars, and lipids generated by bio-refinery processes have different chemical structures from chemicals used in modern chemical industries. Chemicals used in petro based chemical industries, such as substrates for polymer synthesis, are highly reduced compounds; while biomass derived compounds are highly oxidized ones. In this research, bio-transformation technologies modifying biomass-derived oxidized compounds to highly reduced ones are investigated. The energy-supplying systems and electron flow systems supporting the reactions are also developed. For example, dicarboxylic acid, diol, olefin production from lipids were developed together with supporting cofactor regeneration systems and energy-providing systems.

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：酵素合成 微生物変換 ジオキシゲナーゼ アシルCoA NADH FAD 水酸化反応 飽和化反応

1. 研究開始当初の背景

バイオベースケミカルインダストリーの第一段階であるバイオマス変換過程(バイオリファイナリー)により生産される有機酸、アルコール、アミノ酸、糖、油脂などの一次化成品原料は、実際の化学工業で用いられる基幹合成原料と分子構造を異にする。化学工業における基幹合成原料は主にポリマー合成に有用なモノマー原料であり、還元度の高い炭化水素骨格に重合等の化学反応に必要な分子構造として不飽和結合、水酸基、カルボキシル基、アミノ基などを有する化合物群である。この化合物間のギャップを埋めることが、バイオマス由来の原料を現状の化学工業に誘導する鍵となると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、バイオリファイナリーと化学工業をうまく連結させるためのキーテクノロジーを開発すべく、バイオマスに由来の基幹化学合成原料に必要な分子構造を誘導しうる新規微生物触媒の探索・開発に取り組んだ。あわせて、これらの微生物反応の効率化に必要なプラットフォーム技術として、エネルギー・電子のフローを効率化する微生物機能の探索・開発に取り組んだ。

3. 研究の方法

バイオマスに由来の基幹合成原料に必要な分子構造を誘導しうる新規微生物触媒の開発として、(1)セバシン酸(ジカルボン酸)生産、(2)ジオール・ジアミン(アルコール、アミノアルコール)生産、(3)オレフィン生産、に取り組んだ。また、エネルギー・電子を橋渡しする微生物機能の開発として、(4)水和・脱水酵素との FAD・NADH 再生系のカップリング、(5)アシル CoA 合成系の開発、(6)水酸化反応に必要な電子伝達の効率化、に取り組んだ。

4. 研究成果

(1)セバシン酸(ジカルボン酸)生産

ジカルボン酸生産

ラッカーゼを用いた不飽和脂肪酸のジカルボン酸への変換反応について検討した。Trametes sp. Ha1 株由来のラッカーゼを触媒として用い、様々な二重結合位置や水酸基、カルボニル基などの置換基を有する炭素数 18 の不飽和脂肪酸を基質とし、メディエーターである 1-hydroxybenzotriazole と共に反応に供した。様々な不飽和脂肪酸基質を用いて反応を行った結果、生成物は酸化炭素-炭素結合開裂により生成するジカルボン酸(リノール酸基質の場合、炭素数 9 のジカルボン酸)であることがわかった。また、開裂

位置は二重結合位置や置換基の位置に影響を受けていることがわかった(図1)。

セバシン酸生産

(2)-にて述べる、乳酸菌脂質変換酵素によりリノール酸から誘導される 10-hydroxy-cis-12-オクタデセン酸(HYA)をジカルボン酸であるセバシン酸へと変換することを試みた。種々変換ルートを検討し、HYA を熱分解によって 10-オキソデカン酸に誘導し、10-オキソデカン酸を酸素酸化によってセバシン酸に誘導する化学変換ルート見出した。HYA の熱分解、10-オキソデカン酸の酸素酸化は、いずれも良好な収率で反応が進行し、操作は非常に簡便である。以上の検討により、HYA を 2 段階でセバシン酸に変換する低環境負荷の基本プロセスを構築することに成功した。

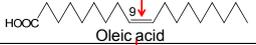
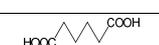
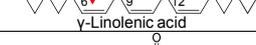
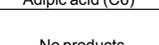
Substrate	Conversion rate	Product
	0.8%	
	6.6%	
	0.2%	
	-	No products
	1.6%	
	10.0%	

図1. ラッカーゼ触媒反応を活用する脂肪酸からのジカルボン酸生産

(2)ジオール・ジアミン生産

脂肪酸水酸化反応によるジオール生産

乳酸菌 *Pediococcus* sp. AKU 1080 によるリノール酸変換において、HYA のみならず 13-hydroxy-cis-9-オクタデセン酸および 10,13-dihydroxy-オクタデカン酸が生成することを見いだした(図2)

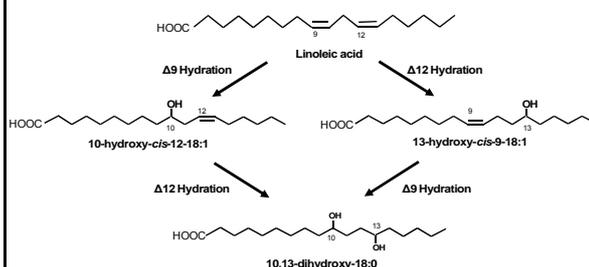


図2. *Pediococcus* sp. AKU 1080 における水酸化脂肪酸(ジオール)生産

脂肪酸水和酵素ならびに関連脂肪酸変換酵素の解析

上述のジオール生産に關与する、乳酸菌の不飽和脂肪酸飽和化酵素群の諸性質解明に取り組んだ。乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* におけるリノール酸飽和化代謝を対象とし解析した結果、本代謝反応はリノール酸を水和して 10-hydroxy-*cis*-12-オクタデセン酸 (18:1) を生成する反応を初発に、水酸基の酸化、二重結合の異性化、水酸基への還元、脱水と複数の反応を介して共役リノール酸へと変換することを明らかにした (図 3)。また、これらの反応を触媒する 3 種類の酵素 (CLA-HY, CLA-DH, CLA-DC) を同定し、さらに本酵素群をコードする遺伝子配列を決定した。

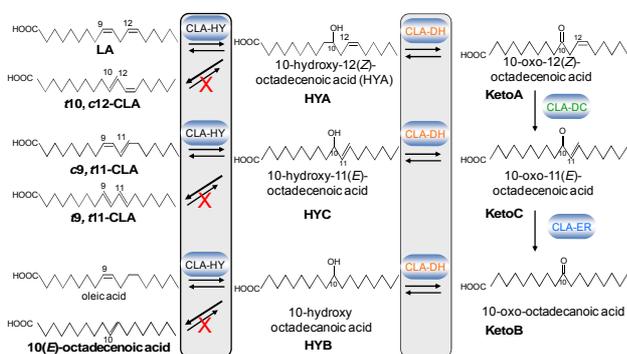


図 3 . *L. plantarum* AKU 1009a における不飽和脂肪酸飽和化代謝

水酸化脂肪酸生産への応用

不飽和脂肪酸飽和化代謝の初発反応を触媒する水和酵素のバルク化成品生産への応用を試みた。*L. plantarum* AKU 1009a 由来の水和酵素 (CLA-HY) を His-tag 融合タンパク質として大量発現する形質転換大腸菌を作成した。形質転換大腸菌を培養し、集菌・洗浄した菌体を触媒として用い、リノール酸や γ -リノレン酸を基質として反応を行った結果、それぞれ 10-hydroxy-*cis*-12-octadecenoic acid、10-hydroxy-*cis*-12-, *cis*-15-octadecadienoic acid を得ることができた。また、反応条件を最適化することにより、基質濃度約 30% (w/v) から 95% 以上の収率で生産物を得ることができ、さらに生成物の精製プロセスについても検討を行い、純度 99% 以上まで精製する系の確立に成功した。

ジアミン生産

アミノアルコールは、水酸基をカルボニル基へと酸化し、引き続きアミノ基転移反応にて、アミノ基を導入することにより、ジアミンへと誘導可能である。アミノ酸からアミノアルコールを生産すべく、アミノ酸水酸化酵素の開発を行った。

新規酵素として見いだしたイソロイシンジオキシゲナーゼ (IDO) の遺伝子配列をもとに、ゲノム情報を対象に選抜し、水酸化位置の異なる新規酵素群 (LdoA, SadA) の取得に成功した (図 4)。

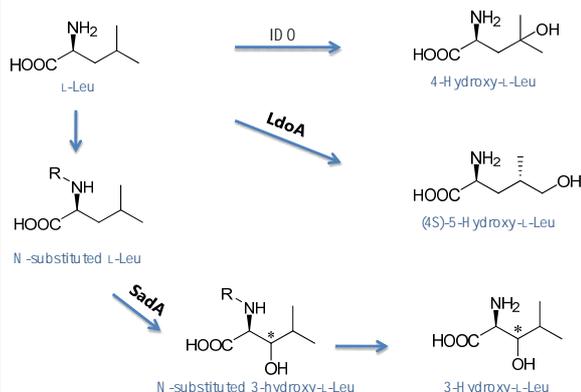


図 4 . 水酸化位置の異なる新規アミノ酸水酸化酵素群とその反応

(3) オレフィン生産

脂肪酸からのオレフィン生産に有用な脂肪酸のカルボキシ基の還元反応、ならびに、二重結合の飽和化反応 (エノン還元反応) の開発を行った。

カルボキシル基還元反応

研究例の少ないカルボキシル基の還元反応の探索を試みた。オクタン酸を添加した培地を用いて嫌気性細菌を培養し、オクタン酸の変換能を有する微生物の探索を行った結果、15 株において脂肪酸をアルコール (1-オクタノール) へ還元する活性を見いだした。最も高い脂肪酸還元能を示した *Eubacterium limosum* JCM 9976 において、炭素数 6 以上の飽和脂肪酸や炭素数 10 以上のジカルボン酸のほか、水酸化脂肪酸、芳香族脂肪酸、さらにアルデヒドをそれぞれ対応するアルコールへと還元することを明らかにした。また炭素数 4 以下の短鎖脂肪酸変換能を有する嫌気性微生物の探索をプロピオン酸を基質として行ったところ、土壌単離嫌気性細菌において炭素数 3~8 の飽和脂肪酸、不飽和脂肪酸および分枝脂肪酸を対応するアルコールに還元する活性を見いだした。また土壌分離菌 G49 株において中鎖脂肪酸の対応するアルコールへの還元能を見いだした。

エノン還元反応

L. plantarum AKU 1009a の不飽和脂肪酸飽和化反応に關与するエノン還元酵素の機能解明に取り組んだ。本菌のゲノム配列より、エノン還元酵素を推定される遺伝子配列 (cla-er) に注目し、CLA-ER を大量発現する形質転換大腸菌を作成した。作成した形質転換

大腸菌より調整した精製酵素 CLA-ER を用い、本酵素の機能解析を行ったところ、本酵素は乳酸菌における不飽和脂肪酸の飽和化反応の鍵酵素であることを明らかにした。本酵素は、飽和化代謝中間体の分子内エノン構造を認識し、二重結合を単結合へと飽和化する反応を触媒することを明らかにした。

(4) 水和・脱水酵素との FAD・NADH 再生系のカップリング

10-ヒドロキシ-cis-12-オクタデセン酸等の水酸化脂肪酸は、脂質代謝制御、腸管バリア機能強化など、特異な生理機能を有する機能性脂肪酸であるとともに、ポリマー原料等の化成品素材としても期待される化合物である。

乳酸菌 *L. plantarum* 由来の FAD 依存性水和酵素 (CLA-HY) を用いるリノール酸の 10-ヒドロキシ-cis-12-オクタデセン酸への変換につき、CLA-HY 高発現大腸菌を触媒とする反応を検討した。本反応には、還元型 FAD (FADH₂) の供給に NADH が要求されるため、大腸菌のグルコース代謝を内因性 NADH 再生系として活用する検討を行った。反応条件の最適化の結果、CLA-HY 高発現大腸菌を用い、グルコース (0.83 M) 存在下、NADH の非添加状態にて、1M のリノール酸から収率 98% にて 10-ヒドロキシ-cis-12-オクタデセン酸を生成する効率的生産法を確立した (図 5)。

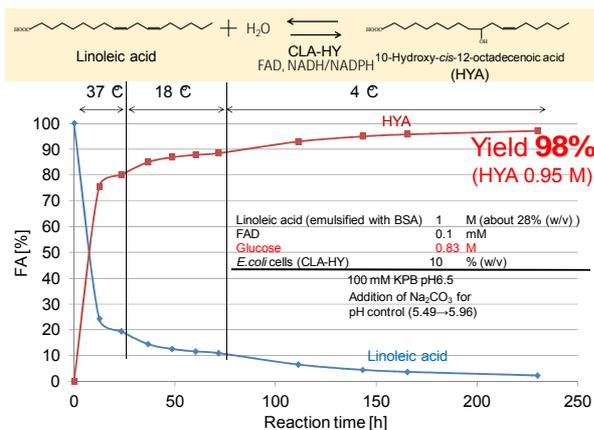


図 5 . 乳酸菌 *L. plantarum* 由来の FAD 依存性水和酵素 (CLA-HY) と NADH 再生系を共役させたリノール酸の 10-ヒドロキシ-cis-12-オクタデセン酸への変換反応

(5) アシル CoA 合成系の開発

、 -不飽和カルボン酸の立体選択的飽和化反応をモデルとしたアシル CoA リサイクリング系と FADH₂ 再生系の共役化、 -不飽和カルボン酸とアセチル CoA か

ら、 -不飽和アシル CoA と酢酸を生成する *Lactobacillus hamsteri*、、 -不飽和アシル CoA を、 -飽和アシル CoA へと還元する *Clostridium sporogenes*、、 -飽和アシル CoA と酢酸から、 -飽和カルボン酸とアセチル CoA を生成する *Atopobium fassor* を選抜した。これら 3 株を用いることにより、 -不飽和カルボン酸の立体選択的飽和化反応系を構築することができた。

また、*C. sporogenes* が触媒する飽和化反応の補酵素となる FADH₂ の再生系として、*L. plantarum* 由来の falvin:NADH reductase を導入し、NAD(P)H を還元力とする反応系を構築した。

アシル CoA 合成酵素群の拡張とその機能解明

糸状菌 *Mortierella alpina* 1S-4 は、炭素鎖長 20 の高度不飽和脂肪酸を生産するだけでなく、脂質蓄積能もきわめて高く、高活性なアシル CoA 合成系 (リサイクリング系) を有していると考えられる。そこで、本菌のアシル CoA 合成酵素 (acyl-CoA synthetase, ACS) の機能解析を試みた。

M. alpina 1S-4 には、12 個の ACS が存在することを見いだしており、本年度は、これら酵素遺伝子を酵母にて発現し、その基質特性を詳細に評価した。その結果、4 つの ACS (ACS8、ACS10、ACS11、ACS12) が、炭素数 14 ~ 20 の飽和脂肪酸、不飽和脂肪酸に対してアシル CoA 合成活性を示すことを明らかにした (図 6)。

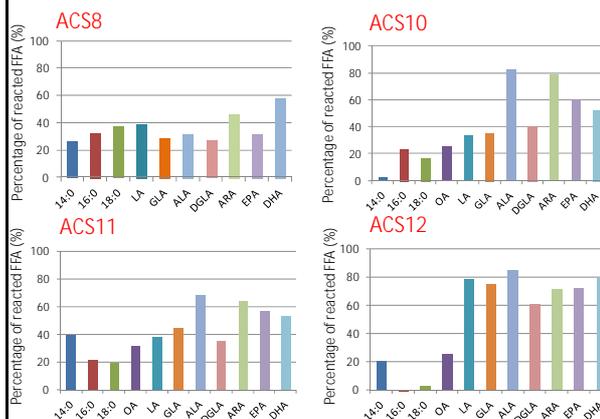


図 6 *M. alpina* 1S-4 由来 ACS (ACS8、ACS10、ACS11、ACS12) のアシル CoA 合成活性における基質特異性

(6) 水酸化反応に必要な電子伝達の効率化

精密酵素合成への応用が期待されている *Bacillus megaterium* 由来のシトクローム P450 モノオキシゲナーゼ BM-3 の実用化を志

向し、BM-3 触媒反応の効率化を検討してきた。その結果、BM-3 の活性化及び安定化因子としてスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) を同定し、その機能解明を行った。

SOD 発現大腸菌の BM-3 発現宿主としての機能評価を目的とし、大腸菌に存在する 3 種類の SOD 遺伝子、すなわち Mn 型 SOD 遺伝子 *sodA*、Fe 型 SOD 遺伝子 *sodB*、Cu-Zn 型 SOD 遺伝子 *sodC* を、BM-3 を発現する大腸菌に導入することにより、BM-3 と SOD の共発現大腸菌を構築した。構築した共発現大腸菌は、2-ベンジルオキシフェノールのパラ位特異的水酸化反応において、P450 単独発現株の約 2 倍の活性上昇を示した。

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 17 件)

- 1) Hibi, M., J. Ogawa. Characteristics and biotechnology applications of aliphatic amino acid hydroxylases belonging to the Fe(II)/ α -ketoglutarate-dependent dioxygenase superfamily. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **98** (9), 3869-3876 (2014). DOI: 10.1007/s00253-014-5620-z, 査読有
- 2) Takeuchi, M., S. Kishino, K. Tanabe, A. Hirata, S.B. Park, S. Shimizu, J. Ogawa. Hydroxy fatty acid production by *Pediococcus* sp. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **115** (4), 386-393 (2013). DOI: 10.1002/ejlt.201200414, 査読有
- 3) Smirnov, S.V., P.M. Sokolov, V.A. Kotlyarova, N.N. Samsonova, T. Kodera, M. Sugiyama, T. Torii, M. Hibi, S. Shimizu, K. Yokozeki, J. Ogawa. A novel L-isoleucine-4'-dioxygenase and L-isoleucine dihydroxylation cascade in *Pantoea ananatis*. *MicrobiologyOpen*, **2** (3), 471-481 (2013). DOI: 10.1002/mbo3.87, 査読有
- 4) Qin, H.M., T. Miyakawa, M.Z. Jia, A. Nakamura, J. Ohtsuka, Y.L. Xue, T. Kawashima, T. Kasahara, M. Hibi, J. Ogawa, M. Tanokura. Crystal Structure of a Novel N-Substituted L-Amino Acid Dioxygenase from *Burkholderia ambifaria* AMMD. *PLOS ONE*, **8** (5), e63996 (2013). DOI: 10.1371/journal.pone.0063996, 査読有
- 5) Kishino, S., M. Takeuchi, S.B. Park, A. Hirata, N. Kitamura, J. Kunisawa, H. Kiyono, R. Iwamoto, Y. Isobe, M. Arita, H. Arai, K. Ueda, J. Shima, S. Takahashi, K. Yokozeki, S. Shimizu, J. Ogawa. Polyunsaturated fatty acid saturation by gut lactic acid bacteria affecting host lipid composition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110** (44), 17808-17813 (2013). doi:10.1073/pnas.1312937110/-/DCSupplemental., 査読有
- 6) Kikukawa, H., E. Sakuradani, S. Kishino, S.B. Park, A. Ando, J. Shima, M. Ochiai, S. Shimizu, J. Ogawa. Characterization of a trifunctional fatty acid desaturase from oleaginous filamentous fungus *Mortierella alpina* 1S-4 using a yeast expression system. *J. Biosci. Bioeng.*, **116** (6), 672-676 (2013). DOI: 10.1016/j.jbiosc.2013.05.023, 査読有
- 7) Hibi, M., T. Kawashima, P.M. Sokolov, S.V. Smirnov, T. Kodera, M. Sugiyama, S. Shimizu, K. Yokozeki, J. Ogawa. L-Leucine 5-hydroxylase of *Nostoc punctiforme* is a novel type of Fe(II)/ α -ketoglutarate-dependent dioxygenase that is useful as a biocatalyst. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **97** (6), 2467-2472 (2013). DOI: 10.1007/s00253-012-4136-7, 査読有
- 8) Hibi, M., T. Kawashima, H. Yajima, S.V. Smirnov, T. Kodera, M. Sugiyama, S. Shimizu, K. Yokozeki, J. Ogawa. Enzymatic synthesis of chiral amino acid sulfoxides by Fe(II)/ α -ketoglutarate-dependent dioxygenase. *Tetrahedron: Asymmetry*, **24** (17), 990-994 (2013). DOI: 10.1016/j.tetasy.2013.07.017, 査読有
- 9) Ogawa, J., E. Sakuradani, S. Kishino, A. Ando, K. Yokozeki, S. Shimizu. Polyunsaturated fatty acid production and transformation by *Mortierella alpina* and anaerobic bacteria. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **114** (10), 1107-1113 (2012). DOI: 10.1002/ejlt.201200069, 査読有
- 10) Horinouchi, N., T. Sakai, T. Kawano, S. Matsumoto, M. Sasaki, M. Hibi, J. Shima, S. Shimizu, J. Ogawa. Construction of microbial platform for an energy-requiring bioprocess: practical 2'-deoxyribonucleoside production involving a C-C coupling reaction with high energy substrates. *Microbial Cell Factories*, **11** (82), (2012).

- doi:10.1186/1475-2859-11-82, 査読有
- 11) Horinouchi, N., C.L. Soon, S. Shimizu, J. Ogawa. Oxidative pyrimidine metabolism in *Rhodococcus erythropolis* useful for valuable nucleoside synthesis: Discovery of a novel amidohydrolase, ureidomalonase. *Biocat. Agri. Biotechnol.*, **1** (3), 264-266 (2012). DOI: 10.1016/j.bcab.2012.03.011, 査読有
 - 12) Hibi, M., T. Kawashima, T. Kasahara, P.M. Sokolov, S.V. Smirnov, T. Kodera, M. Sugiyama, S. Shimizu, K. Yokozeki, J. Ogawa. A novel Fe(II)/ α -ketoglutarate-dependent dioxygenase from *Burkholderia ambifaria* has α -hydroxylating activity of N-succinyl L-leucine. *Let. Appl. Microbiol.*, **55** (6), 414-419 (2012). DOI:10.1111/j.1472-765X.2012.03308.x, 査読有
 - 13) Hibi, M., S. Hatahira, M. Nakatani, K. Yokozeki, S. Shimizu, J. Ogawa. Extracellular oxidases of *Cerrena* sp. complementarily functioning in artificial dye decolorization including laccase, manganese peroxidase, and novel versatile peroxidases. *Biocat. Agri. Biotechnol.*, **1** (3), 220-225 (2012). DOI: 10.1016/j.bcab.2012.03.003, 査読有
 - 14) Hibi, M., J. Mano, T. Hagishita, J. Shima, S. Shimizu, J. Ogawa. α -Aryl- α -amino acid aminotransferase from *Variovorax* sp. JH2 is useful for enantioselective α -phenylalanine production. *Biocat. Agri. Biotechnol.*, **1** (3), 253-258 (2012). DOI: 10.1016/j.bcab.2012.04.001, 査読有
 - 15) 小川 順, 櫻谷英治, 岸野重信, 日比慎, 安藤晃規. バイオプラ最前線-バイオマスからのモノマー生産を支援するバイオリピッドプラットフォームの構築-, バイオプラジャーナル, 44, 13-19 (2012). 査読無
 - 16) Kishino, S., S.B. Park, M. Takeuchi, K. Yokozeki, S. Shimizu, J. Ogawa. Novel multi-component enzyme machinery in lactic acid bacteria catalyzing C=C double bond migration useful for conjugated fatty acid synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **416** (1-2), 188-193 (2011). DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.11.022, 査読有

- 17) 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). DOI:10.1271/bbb.100699 査読有

〔学会発表〕(計 11 件)

- 1) Ogawa, J. Microbial Oxygenases as Catalysts for Fine Chemical Synthesis. 103rd AOCs Annual Meeting & Expo. 2012年4月29日~2012年5月02日. Long Beach, CA, USA.
- 2) Ogawa, J. Application of microbial oxidizing enzymes for fine chemical synthesis and environmental Biotechnology. The 12th Japan-China-Korea Joint Symposium on Enzyme Engineering. 2012年5月28日~2012年5月31日. Kanazawa, Japan.
- 3) J. Ogawa. Development of Microbial Multi-component Enzyme Systems. IUMS 2011 X International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. 2011年9月7日. 札幌.

〔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

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

安藤 晃規 (ANDO, Akinori)

京都大学・生理化学研究ユニット・助教

研究者番号: 10537765