

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23658075

研究課題名(和文) 脂質変換を活性化する補因子再生系の開発

研究課題名(英文) Development of recycling system of coenzyme for lipid transformation

研究代表者

岸野 重信 (Kishino, Shigenobu)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教

研究者番号：40432348

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、水素供与体として利用できるFADH₂を効率よく供給できる形質転換大腸菌の作成に成功した。今後、本形質転換大腸菌あるいは、導入した配列を用い、FADH₂を要求する反応に応用することにより実用化を図る。また、様々な脂肪酸・有機酸反応で欠かせないCoAについて、モデル反応を設定し、CoA再利用化の系を構築した。今後、CoAを利用する反応に応用することにより実用化を図る。

研究成果の概要(英文)：In this research, I was succeeded to construct the transformant which produce FADH₂ efficiently. FADH₂ is used as the hydrogen-donor. At next stage, I would like to use this transformant for practical application. Furthermore, I set the model reaction for recycling the CoA, and I was succeeded to recycle the CoA. Therefore, I would like to use this system for practical application.

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：CoA FADH₂

1. 研究開始当初の背景

生理活性を示す脂質の機能性は、脂肪酸の鎖長、不飽和度、*cis/trans*、特異な構造（例えば共役二重結合や非メチレン型不飽和脂肪酸など）等に基づくことが最近の研究で示されている。また、天然に存在する生理活性を示す機能性脂質は、希少なものが多く供給法が確立されていないものが多く存在する。よってこれらの希少脂肪酸供給法の未確立が、希少脂肪酸に関する研究の発展を障害するものとなっている。そこで化学的異性化法を利用した合成法が試行されているが、化学合成・有機合成では、*cis/trans* 異性体、光学異性体などの幾何異性体や位置特異的な作り分けが難しく、化学合成・有機合成を利用した変換反応では生理活性の不明な様々な異性体の混合物となり、特定の化合物のみを得るにはさらなる分取・精製が必要となる。これに対して、微生物や酵素を利用した反応では特定の異性体を選択的に生成するため、製造工程の効率化や安全性の向上が可能となり、食品・医薬品への供給拡充に繋がることが期待される。

そこで申請者は、化学合成では困難な位置特異的・幾何選択的な脂質変換反応を可能とする微生物の探索を行ってきた。その結果、水和・脱水反応や酸化・還元反応、二重結合の異性化反応、二重結合の飽和化反応、カルボキシル基のアルコールへの還元反応など数多くの新規な位置特異的・幾何選択的な脂質変換反応を取得した（図1）。

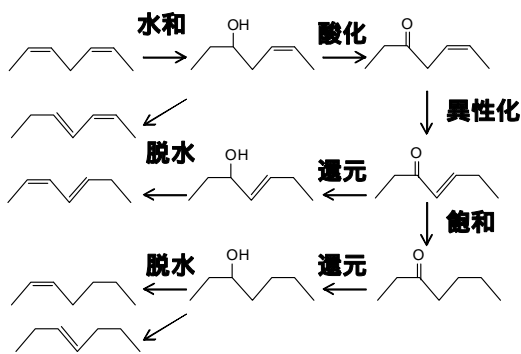


図1 嫌気性細菌に見出した新規な脂肪酸飽和化経路

申請者が獲得してきたこれらの様々な脂質変換反応を詳細に解析した結果、脂質変換反応にはエネルギーや補因子が必要なものが少なくないことを明らかにした。教科書をもて微生物による脂肪酸・有機酸代謝について数多く報告されているが、これらの反応・代謝は、基質が CoA エステル体であり、様々なエネルギー（NAD(P)(H)など）要求性反応であるものが数多く存在する。エネルギー要求性反応の場合、エネルギーの添加や微生物の成育と連動させた脂質の変換反応を行うことが余儀なくされる。しかし、微生物の成育と連動した変換反応は、産業的な利用を考慮すると非効率的でありコストのかか

る反応となる。現在、遺伝子工学分野の急速な発展により、活性を保持した状態での酵素の大量発現系を容易に構築することが可能となってきたことから、微生物機能を利用した脂肪酸・有機酸変換反応を触媒する酵素の大量発現などが簡単に構築できる。しかし、エネルギー再生系として、グルコース脱水素酵素やギ酸脱水素酵素による NAD(P)H 再生系や、申請者らのグループにより、酵母の解糖系を活用した ATP の供給系が構築されているだけであり、それら以外の供給系は考案されていなかった。

2. 研究の目的

現在、遺伝子工学が発展しており、反応の中核となる酵素の大量発現系の構築は安易になってきている。これにエネルギー・補因子の再生系や供給系をカップリングすることにより、微生物の成育と連動した変換反応が、酵素とエネルギー・補因子再生系・供給系とで実現できるようになる。つまり、教科書に載っているような、現在数多く知られているエネルギー・補因子要求性の脂肪酸・有機酸変換反応が全て酵素とエネルギー・補因子再生系・供給系のカップリングで可能となる。対象となるエネルギーや補因子には、NAD(P)H や FAD などの酸化還元補因子や ATP や CoA などの高エネルギー補因子などが挙げられる。そこで本研究ではこれらのエネルギー・補因子の再生系の構築を目的とする。

3. 研究の方法

申請者は、未解明であった乳酸菌の脂肪酸代謝についてリノール酸を基質に詳細に検討した結果、乳酸菌の脂肪酸代謝は、水和・脱水反応、酸化・還元反応、異性化反応、飽和化反応など多種多様な新規反応が関与する複雑な反応機構であることを明らかにしている（図1）。また、本反応を触媒するたんぱく質の大量発現系を構築し、酵素の大量発現に成功している。さらに各反応を詳細に検討した結果、水和・脱水反応は FAD・NADH 要求性反応、酸化・還元反応と飽和化反応は NADH 要求性反応であることを明らかにした。

また、申請者は、嫌気性微生物を用いた有機酸の変換反応を検討したところ、有機酸のカルボキシル基をアルコールへと変換する反応や、二重結合を還元する反応を数種見出しており、詳細な検討よりこれらの反応は、CoA エステル体が基質となり変換していると推測している。そこで、申請者が既に獲得している上記のエネルギー・補因子要求性反応についてさらに詳細な検討を行い、エネルギー・補因子再生系の構築を試みた。また、得られたエネルギー・補因子の再生系や、供給系等を利用し、今まで得てきたエネルギー・補因子要求性反応に応用した。

具体的には、1) FAD・NADH 再生系カップリングによる FADH₂ 供給系の構築、2) アシル CoA 再生系の構築、を行った。

4. 研究成果

1) FAD・NADH 再生系カップリングによる FADH₂ 供給系の構築。

申請者が見出したリノール酸水和酵素 CLA-HY は、補酵素に FAD および NADH を必要とする酵素である。そこで、CLA-HY と NADH 再生系として利用できるグルコース脱水素酵素 (GDH) を同時に発現する形質転換体を作成し、本形質転換体を用いてリノール酸水和活性を評価した。しかし、GDH を発現した事により、添加する NADH の量を抑えることは出来たが、大幅な活性の上昇は確認できなかった。次に、本反応に必要な補酵素が FAD および NADH であることから、FAD および NADH から生成する FADH₂ が本反応に関与している可能性が示唆された。そこで、FAD と NADH から FADH₂ を生成する酵素の取得を試みた。CLA-HY を見いだした乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* のゲノム配列を詳細に解析し、FAD と NADH から FADH₂ を生成する可能性が示唆される、ある遺伝子配列に注目した。そこで、本遺伝子配列を *Lactobacillus plantarum* のゲノムを鋳型に PCR にて増幅し、得られた増幅断片を組込んだベクターを大腸菌に形質転換することにより形質転換大腸菌を作成した。今後作成した形質転換大腸菌を用い、本反応の活性上昇を評価する。さらに NADH 再生系とのカップリングによる活性上昇の評価を合わせて行う。

2) アシル CoA 再生系の構築。

まず初めに、モデル反応 (化合物 1 (不飽和有機酸) 化合物 1-CoA エステル体 (水素付加反応) 化合物 2-CoA エステル体 化合物 2 (飽和有機酸)) を設定し、各化合物を評価できる分析系をガスクロマトグラフィーおよび高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて確立したのち、確立した本分析系を用いてモデル反応を触媒する微生物の探索を行った。その結果、ある微生物が、基質 (化合物 1) を化合物 2 へと変換する事を明らかにした。しかし、選抜した微生物について詳細に解析した結果、本菌は、化合物 1 を CoA エステル化する際に ATP を必要とする反応 (アシル CoA シンセターゼ様反応) であり、また化合物 2-CoA エステル体を化合物 2 と CoA へと加水分解反応 (チオエステラーゼ様反応) することが示唆された。本経路を用いて CoA 再生系を構築する場合、ATP が必要となるため、ATP の供給を考慮する必要が生じる。そこでより効率的な CoA 再生系を目指し、アシル CoA 転移酵素の取得を、新たに探索した。方法は、栄養培地を用いて培養した微生物を洗浄したのち、ビーズを用いたビーズ破砕により無細胞抽出液を取得し、得られた無細胞抽出液と、化合物 1 とアセチル

-CoA あるいは化学合成した化合物 2-CoA エステル体と酢酸を含むリン酸カリウム緩衝液 (pH7.5) 内にて反応を行った。反応後、酢酸エチルを用いて抽出を行い、酢酸エチル層はガスクロマトグラフィーを用いて、水層は HPLC によって評価した。その結果、化合物 1 とアセチル CoA から化合物 1-CoA エステル体および酢酸を生成する微生物、および化合物 2-CoA エステル体と酢酸から化合物 2 とアセチル CoA を生成する微生物の取得に成功した。そこで新たに取得したこれらの微生物の無細胞抽出液と、化合物 1 を化合物 2 へと変換する微生物、アセチル CoA、基質 (化合物 1) を合わせて反応に供することにより、CoA トランスフェラーゼを用いた CoA 再利用化を評価したところ、化合物 1 から化合物 2 への生産性が向上したことを確認した。

さらに、本モデル反応における二重結合の飽和化に関わる水素供与体について、化合物 1 を化合物 2 へと変換する微生物を用いて検討した。方法は、上記と同様に、栄養培地を用いて培養して得た菌体を洗浄したのち、ビーズを用いたビーズ破砕により無細胞抽出液を取得した。得られた無細胞抽出液と、化合物 1-CoA エステル体、NADH や NADPH などの水素供与体になりうるものとともにリン酸カリウム緩衝液 (pH7.5) 内にて反応を行った。水素供与体となりうる候補を緻密に精査した所、乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* のゲノム配列から取得した FAD および NADH から FADH₂ を生成すると予想されるタンパク質をコードする遺伝子配列を組込んだ形質転換体の無細胞抽出液を加えることにより、本モデル反応が効率よく進行することを見いだした。具体的には、本遺伝子を、His-タグ融合タンパク質として大量発現させた形質転換大腸菌を超音波破砕し、得られた無細胞抽出液を超遠心分離することで可溶性画分を調整し、得られた可溶性画分と化合物 1 を化合物 2 へと変換する微生物の無細胞抽出液、化学的に合成した化合物 1-CoA エステル体、FAD、NADH、NADPH を含むリン酸カリウム緩衝液で嫌氣的に反応を行った結果、形質転換大腸菌の無細胞抽出液を添加しない場合には確認できない化合物 2 の生産が確認できた。以上のことより、化合物 1-CoA エステル体から化合物 2-CoA エステル体への水素供与体は FADH₂ であることが示唆された。これらの結果を利用し、さらに CoA の再利用化ならびに NADH 再生系を導入することによりモデル反応の効率化が期待できる。

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)

[学会発表](計 1 件)

佐藤奈津子、岸野重信、中川拓哉、川端潤、小川 順

講演番号 1

「嫌気性細菌による， -不飽和脂肪
酸の不斉水素化反応」

日本農芸化学会関西支部例会（第 473 回
講演会） 2012.1.28、京都

6 . 研究組織

(1)研究代表者

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

(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