

新規代謝反応の探索を基盤とした微生物機能の応用開発

小川 順 (京都大学大学院農学研究科)

ogawa@kais.kyoto-u.ac.jp

環境調和型社会を実現すべく、生物反応を利用した産業技術に期待が集まっている。これに関し、微生物の多彩な物質代謝は、生物反応の探索研究における格好のターゲットである。本稿では、ユニークな物質代謝を示す微生物の探索を端緒に、新たに見いだされた代謝反応や関与する酵素の機能解明を行い、その成果を機能性脂質生産、有用物質生産、環境制御技術などに応用した例を紹介する。

はじめに

省エネルギーで環境負荷の少ない様々な技術の開発が求められるなか、生物機能を利用したり模倣したりする試みが数多くなされている。生物の物質変換能を物質生産に導入したバイオプロセスの開発や、生物反応の特異性を活用した食品加工技術、精密合成、分析技術、医療技術の開発などがその例と言える。このように、様々な産業分野において生物反応の導入が検討されるに伴い、利用可能な生物反応ライブラリーの拡充が求められている。これに関し、自然界に無数存在する微生物の多彩な物質代謝は、生物反応の探索研究における格好のターゲットである。本稿では、ユニークな脂質代謝、核酸代謝、フェノール性化合物の分解代謝を示す微生物の探索を端緒に、新たに見いだされた代謝反応や関与する酵素の機能解明を行い、その成果を機能性脂質生産、有用物質生産、環境制御技術などに応用した例を紹介する。

微生物における新規脂肪酸代謝の解析と機能性脂質生産への応用

近年、ジアシルグリセロール、中鎖脂肪酸含有トリアシルグリセロールなど様々な機能性脂質が食品・医薬品の分野で注目を集めており、今までにない多様な機能を発揮しうる脂質の創製に期待がよせられている。脂質の機能や特性を左右する重要な構成単位の一つは脂肪酸であり、産業的に供給可能な脂肪酸の分子種(脂肪酸ライブラリー)を拡充することが、新規機能性脂質の創出には不可欠である。筆者らはこの認識に基づき、新規機能性脂質の創製に向け、微生物機能を利用した様々な脂肪酸の生産法を開発を行った。ターゲットとしては、ダイエット効果、抗腫瘍活性、抗炎症活性などにおいて注目を集めている共役リノール酸(CLA)に代表される共役脂肪酸を取り上げ、植物油脂、動物油脂、微生物油脂を原料とした微生物変換による生産プロセスの開発を試みた。筆者らは、反芻胃内微生物が不飽和脂肪酸を飽和化する過程で共役脂肪酸を中間体として生成することに着目し、様々な消化管内微生物(主に乳酸菌)を対象にリノール酸をCLAへと変換する能力を探索した。その結果、*Lactobacillus acidophilus* や *L. plantarum* に属する乳酸菌に顕著な活性を見いだした。生成するCLAは *cis*-9,*trans*-11-octadecadienoic acid (18:2) および *trans*-9,*trans*-11-18:2 であり、*L. plantarum* の湿菌体を触媒的に用いるとリノール酸からのCLA生産は約40 mg/mlに達し、主に遊離型脂肪酸として回収された(図1)。この反応は ω -リノレン酸、 ω -リノレン酸の共役化にも有効であった。乳酸菌によるCLA生成反応は、リノール酸の水和によるヒドロキシ脂肪酸(10-hydroxy-12-octadecaenoic acid)の生成と、その脱水ともなう二重結合転移の二段階からなると推定された。これに基づき、各種ヒドロキシ脂肪酸の乳酸菌による変換反応を検討した結果、リシノール酸(12-hydroxy-*cis*-9-octadecaenoic acid)がCLA(*cis*-9,*trans*-18:2、および *trans*-9,*trans*-11-18:2)へと変換されることが判明した(図1)。反応は遊離型リシノール酸に特異的であったが、リパーゼを用いることにより、リシノール酸のトリアシルグリセリドに富むひまし油がCLA生産の原料となりうることも示された(図1)。

乳酸菌に見いだされたこれらの活性は、炭素数 18 で 9、12 位に *cis* 型非共役二重結合を有する脂肪酸に限定されていた。そこで、さらに多様な脂肪酸に対する変換活性を嫌気性微生物に探索した結果、*Clostridium* 属細菌が炭素数 20 の脂肪酸（アラキドン酸や EPA など）における 6、9 位の *cis* 型非共役二重結合を飽和化し、7 位に *trans* 型の二重結合を形成することを見いだした。また、この反応を詳細に検討した結果、7、9 位に共役二重結合を有する共役脂肪酸が中間体として生成していることを明らかにした。一方、糸状菌の脂肪酸不飽和化反応の機能解析を行い、9 不飽和化酵素 (*Mortierella*, *Trichoderma*, *Delacroixia* 属) の幅広い基質特異性を明らかにし、この特性を利用した *trans*-バクセン酸からの共役リノール酸生産法を開発した (図 1)。本反応では、*cis*-9,*trans*-11-18:2 が高い選択率で生成し、主にトリアシルグリセリドとして回収された。これらの研究により、共役脂肪酸を中心とした機能性脂質の微生物生産における新たなバリエーションを提示することができた。特に、食経験豊富な乳酸菌による CLA の供給は、CLA の機能性食品としての利用や、乳酸菌のプロバイオティクスとしての利用を促すものと期待される。CLA を中心とした共役脂肪酸の生理機能研究が盛んになってきているなか、微生物変換による供給がその一助となることを期待したい。

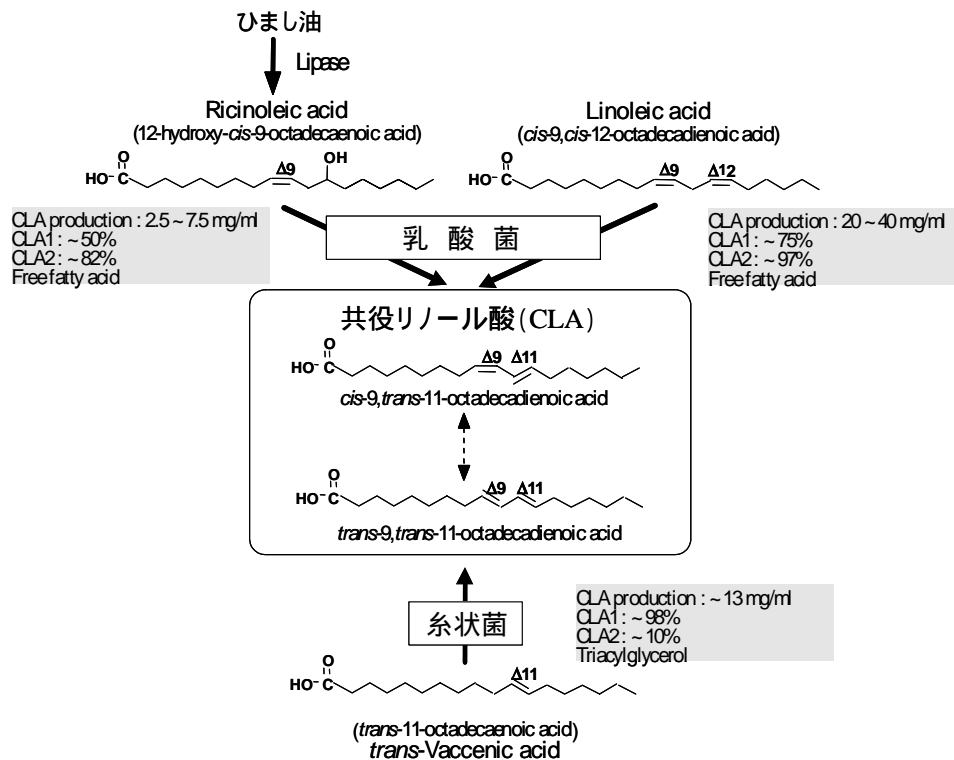


図 1 . 微生物による共役リノール酸 (CLA) 生産

微生物における核酸代謝の解析と有用物質生産への応用

アンチセンス DNA や RNAi を応用した遺伝子治療のツールとして合成 DNA が医薬としての脚光を浴び始めたこと、また、DNA チップなどを用いる遺伝子診断法の開発などを背景に、マテリアルとしての DNA やその合成骨格となる 2'-デオキシリボヌクレオシド (dNS) ならびにデオキシリボースの需要拡大が予想されている。筆者らは、dNS の微生物生産プロセスとして核酸代謝における可逆的ヌクレオシド分解経路の逆反応に注目し、グルコース、アセトアルデヒド、核酸塩基を原料とする新たな微生物生産プロセスを開発した。本プロセスでは、グルコースを解糖系によりフルクトース 1,6-2-リン酸 (FDP) に変換し、これを、デオキシリポアルドラーゼ (DERA) によりアセトアルデヒド存在下にて 2-デオキシリボース 5-リン

酸(DR5P)へと誘導した後、ホスホペントムターゼ(PPMase)によるリン酸転移、ヌクレオシドホスホリラーゼ(NPase)による核酸塩基付加を経て dNS を得ることができる(図2)。触媒としては、パン酵母解糖系、DERA および PPMase 共発現大腸菌ならびに精製 NPase を用いた。プロセスの至適化により、約 75 mM の dNS が 600 mM のグルコース、250 mM のアセトアルデヒド、90 mM の核酸塩基から生産された。この結果は、鍵中間体であるリン酸化糖 DR5P の合成に必要なエネルギー(ATP)を解糖系から効率よく獲得できたこと、反応平衡を分解側に向けてしまうリン酸の生成を ATP 再生に活用する工夫がうまく機能したことを示していた。また、この成果に基づき、本プロセスの部分反応を用いるグルコース、アセトアルデヒドからの DR5P ならびにデオキシリボースの効率生産を試みた。トルエン処理したパン酵母菌体を用い、触媒量の AMP 添加のもと高濃度リン酸緩衝液中にて約 1.1 M のグルコースを基質とした反応を行うことにより、約 350 mM の FDP を生産することができた。この FDP を DERA 高発現大腸菌の触媒する DR5P 合成反応の基質として用い、対グルコース収率 22%にて約 250 mM の DR5P を生産することができた。また、DERA 高発現大腸菌を用いる反応を高温下(47°C)にて行うことにより内在性ホスファターゼ活性が顕在化し、デオキシリボースとして高蓄積させることが可能となった。最近、DNA の安定性や、特殊な繰り返し構造、ポリマーとしての特性を電子素材や、化学素材に応用する動きもでてきており、DNA ならびに dNS の利用がバイオ領域に留まらず幅広く展開される気運もある。遺伝子技術の基幹素材とも言える 2'-デオキシリボヌクレオシドならびに DNA の経済的な供給法の開発により、ライフサイエンス全般の発展に大きく拍車がかかることを期待したい。

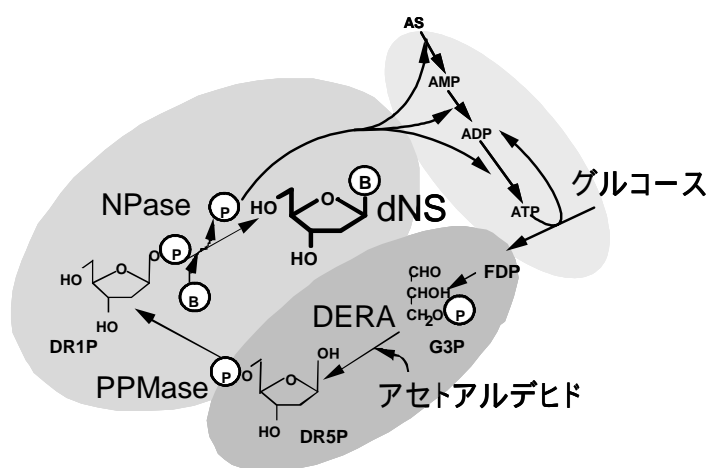


図2 . 微生物の解糖系ならびヌクレオシド分解系の逆反応を利用した 2'-デオキシリボヌクレオシド (dNS) 生産
 B; アデニン、AS; アデノシン、FDP; フルクトース 1,6-2-リン酸、G3P; D-グリセルアルデヒド 3-リン酸、DR5P; 2'-デオキシリボース 5-リン酸、DR1P; 2'-デオキシリボース 1-リン酸、dNS; 2'-デオキシリボヌクレオシド、DERA; デオキシリボアルドラーゼ、PPMase; ホスホペントムターゼ、NPase; ヌクレオシドホスホリラーゼ

微生物のフェノール性化合物分解酵素の環境制御技術への利用

従来、人々は十分な食料を確保するために、農作物に感染する植物病害を化学農薬によって抑制してきた。しかし、これらの化学農薬のみに依存することは生態系・環境保全の観点から限界があり、新たな植物病害抑制技術の開発が望まれている。筆者らは、微生物によるフェノール性化合物分解に関与する酸化酵素ラッカーゼが示す殺菌作用を植物病原菌の駆除に利用すべく、その機能を賦活する低分子有機化合物(メディエーター)との併用によるラッカーゼ・メディエーターシステムを化学農薬に代わるバイオ農薬として開発することを試みた。*Trametes* 属担子菌由来ラッカーゼならびにメディエーターとしてオイゲノールを用いてイチゴ炭疽病菌(*Glomerella cingulata*)、そうか病菌(*Streptomyces scabies*)、青枯病菌(*Pseudomonas solanacearum*)、トマト根腐萎凋病菌(*Fusarium oxysporum*)を対象に殺菌効果を検討した結果、いずれの菌に対してもラッカーゼとオイゲノールの共存下にて顕著な殺菌効果を認めた。一方、ラジカル消去剤の添加

により、殺菌効果が減少したことから、ラジカル様中間体の殺菌作用への関与が推測された。さらに、オイゲノールに代わるメディエーターを食品添加物群に探索した結果、オイゲノールに構造が類似するフェノール性化合物に活性を認めた。以上の研究により、ラッカーゼ・メディエーターシステムを用いるバイオ農薬の基礎を確立することができた。今後、実際的な処理方法の開発ならびに安全なメディエーターの開発により、微生物ラッカーゼを用いる新たなバイオ農薬の実用化が期待される。

結言ならびに謝辞

生物反応の探索研究は、微生物機能の多様性に立脚している。様々な微生物代謝の解明により生物反応ライブラリーが拡充され多方面の産業に利用されることを期待したい。本研究は京都大学農学研究科応用生命科学専攻発酵生理及び醸造学分野にて行われたものであり、応用を目指した微生物機能探索研究を終始ご指導いただいた京都大学教授・清水昌先生に心より御礼申し上げます。さらに、様々な面からご支援いただいた同研究室の諸先生方、卒業生、在学生、様々な企業の共同研究者の方々に深く感謝いたします。

業績リスト

- 1) J. Ogawa, CL. Soong, S. Kishino, QS. Li, N. Horinouchi, and S. Shimizu (2006) Screening and industrial application of unique microbial reactions involved in nucleic acid and lipid metabolisms. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70:574-582.
- 2) N. Horinouchi, J. Ogawa, T. Kawano, T. Sakai, K. Saito, S. Matsumoto, M. Sasaki, Y. Mikami, and S. Shimizu (2006) Biochemical retrosynthesis of 2'-deoxyribonucleosides from glucose, acetaldehyde, and a nucleobase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 71:615-621.
- 3) N. Horinouchi, J. Ogawa, T. Kawano, T. Sakai, K. Saito, S. Matsumoto, M. Sasaki, Y. Mikami, and S. Shimizu (2006) Efficient production of 2-deoxyribose 5-phosphate from glucose and acetaldehyde by coupling of the alcoholic fermentation system of baker's yeast and deoxyriboaldolase-expressing *Escherichia coli*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70:1371-1378.
- 4) N. Horinouchi, J. Ogawa, T. Kawano, T. Sakai, K. Saito, S. Matsumoto, M. Sasaki, Y. Mikami, and S. Shimizu. (2006) One-pot microbial synthesis of 2'-deoxyribonucleoside from glucose, acetaldehyde, and a nucleobase. *Biotechnol. Lett.*, 28:877-881.
- 5) J. Ogawa, S. Kishino, A. Ando, S. Sugimoto, K. Mihara, and S. Shimizu (2005) Production of conjugated fatty acids by lactic acid bacteria. *J. Biosci. Bioeng.*, 100:355-364.
- 6) W. T. Sulistyningdyah, J. Ogawa, H. Tanaka, C. Maeda, and S. Shimizu (2004) Characterization of alkaliphilic laccase activity in the culture supernatant of *Myrothecium verrucaria* 24G-4 in comparison with bilirubin oxidase. *FEMS Microbiol. Lett.*, 230: 209-214.
- 7) S. Kishino, J. Ogawa, Y. Omura, K. Matsumura, and S. Shimizu (2002) Conjugated linoleic acid production from linoleic acid by lactic acid bacteria. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 79:159-163.
- 8) J. Ogawa, K. Matsumura, S. Kishino, Y. Omura, and S. Shimizu (2001) Conjugated linoleic acid (CLA) accumulation via 10-hydroxy-12-octadecaenoic acid during microaerobic transformation of linoleic acid by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67:1246-1252.

Screening and Application of Novel Microbial Metabolisms and Involved Reactions

Jun Ogawa (Graduate School of Agriculture, Kyoto University)

ogawa@kais.kyoto-u.ac.jp