

新規な微生物酵素を用いた脂肪酸変換技術の構築

京都大学大学院農学研究科 岸野 重信



はじめに

我々は、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、応用が期待される複数の微生物反応を取得している。また、脂肪酸のカルボキシル基をアルデヒド経由でアルコールへと還元する活性も見いだしている。本シンポジウムでは、微生物酵素や微生物を用いた様々な脂肪酸変換技術について紹介する。

共役化反応

共役脂肪酸は、分子内に共役した二重結合を含む脂肪酸の総称であり様々な生理活性が報告されている。特に乳製品などに含まれている共役リノール酸(CLA; *cis-9,trans-11-18:2*, *trans-10,cis-12-18:2* など)に関する研究が進んでおり、発癌抑制作用、体脂肪低減作用、抗動脈硬化作用などが見いだされてきている。これらのCLAは、腸内細菌で観察される不飽和脂肪酸(リノール酸; *cis-9,cis-12-18:2*)の飽和化過程の中間体であると考えられていたがその詳細は不明であった。そこで我々は、様々な乳酸菌を対象にリノール酸をCLAへと共役化する活性を探索した結果、乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* AKU1009a が効率よくリノール酸を *cis-9,trans-11* 異性体および *trans-9,trans-11* 異性体へと変換することを見出した。そこで本菌におけるリノール酸からのCLA生成反応を詳細に解析した結果、リノール酸の水和により生成する水酸化脂肪酸(HY; 10-hydroxy-*cis-12-18:1*)が中間体として機能しており、水酸化脂肪酸の脱水をともなう二重結合の転移によりCLAが生成することを明らかにした(図1A)。さらに本菌の洗浄菌体を種々の高度不飽和脂肪酸と反応させたところ、リノール酸以外にも α -リノレン酸(*cis-9,cis-12,cis-15-18:3*)、 γ -リノレン酸(*cis-6,cis-9,cis-12-18:3*)、ステアリドン酸(*cis-6,cis-9,cis-12,cis-15-18:4*)を基質とした際に、基質の *cis-9,cis-12* が *cis-9,trans-11* と *trans-9,trans-11* へ共役化した共役脂肪酸を蓄積することを明らかにした。以上のことより、本菌は *cis-9,cis-12* を有する炭素数18の脂肪酸を基質として認識し、10-hydroxy脂肪酸への水和と脱水をともなう二重結合の転移により *cis-9,trans-11* および *trans-9,trans-11* 共役脂肪酸を生産することを明らかにした。

一方、アラキドン酸(*cis-5,cis-8,cis-11,cis-14-20:4*)及びEPA(*cis-5,cis-8,cis-11,cis-14,cis-17-20:5*)を変換する微生物の探索を行ったところ、*Clostridium bifermentans* の洗浄菌体がそれぞれ基質の *cis- ω 6,cis- ω 9* を *trans- ω 7,cis- ω 9* および *trans- ω 7,trans- ω 9* へと共役化することを明らかにした(図1B)。

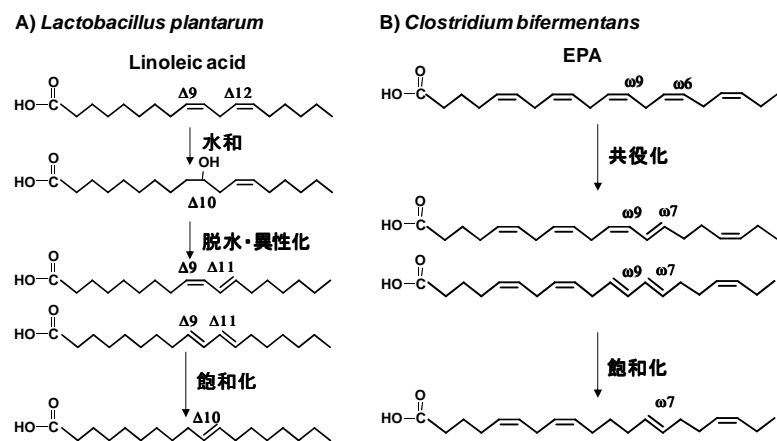


図1. 微生物による不飽和脂肪酸代謝

飽和化反応

リノール酸を効率よくCLAへと変換する *L. plantarum* AKU1009a の洗浄菌体を用いてリノール酸

や α -リノレン酸、 γ -リノレン酸の共役化反応を行った際に、それぞれ対応する共役脂肪酸の他に、二重結合の数が基質より一つ少ない脂肪酸の生成を確認した。これらの脂肪酸の構造解析を行った結果、*L. plantarum* AKU1009a は、*cis*-9,*cis*-12 脂肪酸を *cis*-9,*trans*-11 および *trans*-9,*trans*-11 共役脂肪酸へと変換した後、*trans*-10 脂肪酸へと飽和化することを明らかにした (図 1 A)。

一方、*C. bifermentans* の洗浄菌体をリノール酸やアラキドン酸、EPA を基質とする反応に供したところ、対応する共役脂肪酸の他に、乳酸菌と同様、基質よりも二重結合の数が一つ少ない脂肪酸の生成を確認した。これらの脂肪酸の構造解析を行った結果、*C. bifermentans* は、*cis*- ω 6,*cis*- ω 9 脂肪酸を *trans*- ω 7,*cis*- ω 9 および *trans*- ω 7,*trans*- ω 9 共役脂肪酸へと変換した後、*trans*- ω 7 脂肪酸へと飽和化することを明らかにした (図 1 B)。よってこれらの反応を利用することにより機能性脂質として注目を集めている非メチレン型不飽和脂肪酸生産が可能となった。

水和・脱水反応

脂肪酸分子中の二重結合への水和反応による水酸基の導入は、樹脂、ワックス、ナイロン、プラスチック、防蝕剤、化粧品、コーティング剤、潤滑油など工業的にも利用価値の高い水酸化脂肪酸の生産に有用である。乳酸菌 *L. plantarum* AKU1009a による CLA 生産においては、リノール酸の $\Delta 9$ 位の *cis* 型二重結合に水分子が結合する水和反応が初発反応である。本反応に関わる水和酵素を用いた水和反応は、リノール酸のみならずオレイン酸や α -リノレン酸、 γ -リノレン酸など炭素数 18 で $\Delta 9$ 位に *cis* 型二重結合を持つ脂肪酸を基質とした際に観察され、対応する 10-hydroxy 脂肪酸が生成する。さらに本酵素により得られる水酸基の光学純度は 99%以上で S 体を特異的に生成し、その変換率は 90%を超えることから産業利用への応用が期待できる (図 2)。また、さらなる探索により、リノール酸の 13 位に水酸基を導入する乳酸菌の取得にも成功している。

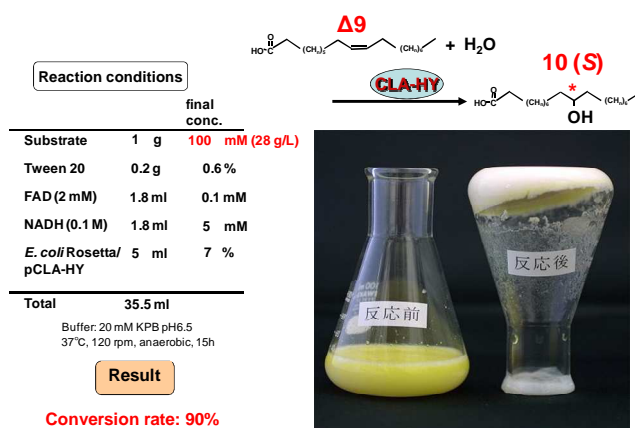


図2 乳酸菌由来水和酵素による反応

カルボキシ基のアルコールへの還元反応

アルコール類は、界面活性剤や医薬品、化粧品などニーズが多いにもかかわらず、工業的に製造できるアルコール類は限られている。また、天然に存在する脂肪族アルコール類は、どれも存在量が微量であり大量供給は不可能である。そこで炭素数 8 のオクタン酸を含有する培地を用いて、脂肪酸を脂肪族アルコールへと変換する微生物の探索を行った結果、*Clostridium* 属や *Eubacterium* 属細菌の培養において、オクタノールの蓄積を認め、カルボン酸がアルコールへと還元されていることを確認した。特に還元活性の高かった *Clostridium sporogenes* を用いて様々なカルボン酸を培地に添加して変換を行ったところ、飽和脂肪酸や、水酸化脂肪酸、ジカルボン酸、芳香族環カルボン酸など、幅広いカルボン酸が基質として認識され、それぞれ対応するアルコールへと還元されることを明らかにした。また、本菌はアルデヒドも対応するアルコールへと還元したことから、本菌によるカルボン酸のアルコールへの還元は、アルデヒドを経由して進行することが示唆された。

おわりに

以上のように、脂質の微生物変換研究を通じて脂肪酸代謝に関わる様々な諸反応 (共役化、飽和化、水和、カルボン酸還元など) が見いだされた。これらの諸反応を単独、あるいは組み合わせて用いることにより、社会ニーズ・産業ニーズに応じた様々な脂肪酸誘導体の合成が期待できる。