

2.3.7 研究分野：発酵生理及び醸造学

構成員：	教授	小川 順
	准教授	片岡 道彦
	助教	櫻谷 英治
	大学院博士後期課程	1 名
	大学院修士課程	20 名
	専攻 4 回生	5 名
	博士研究員 (PD)	4 名
	研究員	4 名

A. 研究活動 (2009. 4～2010. 3)

A-1. 研究概要

a) 微生物による有用油脂類生産の代謝工学

アラキドン酸、エイコサペンタエン酸 (EPA) などの高度不飽和脂肪酸を、医薬品や機能性食品として利用する動きが最近活発化しているが、これまでその豊富な供給源は知られていなかった。そこで、微生物界にその供給源を求め探索した結果、農学部キャンパスの土から分離した *Mortierella* 属カビが、アラキドン酸を著量生産することを見出した。さらに、培養条件の制御や変異株の育種および代謝工学的手法や分子生物学的手法を駆使して、ジホモ- γ -リノレン酸や EPA、ミード酸など様々な高度不飽和脂肪酸の選択的な生産も達成した。これらは 50,000 リットル培養装置で実用レベルの生産実験を行っている。また、高度不飽和脂肪酸生合成に関与する酵素および遺伝子の解析、ならびに *Mortierella* 属カビの新規形質転換系の開発にも取り組んでいる。さらに、新たな機能性油脂の生産を目指し、様々な微生物の油脂変換能力を検討した結果、乳酸菌に新規機能性脂肪酸である共役脂肪酸を生産する能力を見いだし、共役リノール酸生産を軸とした開発を進めている。

b) 微生物によるキラル化合物の生産法の開発と分子生物学的解析

微生物酵素のもつ極めて優れた特徴のひとつである立体選択性を利用した、有用光学活性化合物 (アミノ酸・ビタミン類等) 生産法の開発を行っている。例として、酸化還元酵素によるカルボニル基の不斉還元反応を用いる、様々なキラルビルディングブロックの生産に成功している。これは、2000 年より実用に供されている。また、ラクトン環を立体選択的に加水分解する酵素をカビに発見し、この酵素反応によるパン

トテン酸の合成中間原料であるパントラクトンの光学分割法を開発し、1999 年より工業生産（年間 2,000 トン）に導入されている。さらに、これらの反応を触媒する酵素についても精製・単離を行い、立体選択的反応機構等の酵素化学的研究・タンパク質化学的研究も行っている。

c) 微生物由来の新規酵素の探索・機能解析および応用

核酸関連化合物の微生物代謝の解明とそれに関わる酵素の機能解析および応用を行っている。例えば、核酸塩基分解酵素ジヒドロピリミジナーゼの 5-置換ヒダントイン類に対する立体選択性を利用した D-アミノ酸生産プロセスの開発、グルコースとアセトアルデヒドを出発原料とする 2'-デオキシリボヌクレオシド合成法の開発、クレアチニン代謝系酵素を利用した腎機能評価のための臨床診断用酵素の開発などを行っている。また、様々な特徴を有するペルオキシダーゼ、ラッカーゼなどのオキシダーゼ類を微生物界に広く検索するとともに、その用途開発を行っている。例えば、キノコ（ヒトヨタケ）由来のペルオキシダーゼの洗剤用酵素としての開発、臨床診断用酵素としての開発、ラッカーゼの環境浄化用酵素としての開発、染色・脱色用酵素としての開発などを行っている。

d) 微生物によるニトリル化合物の代謝研究とその応用

ニトリル化合物の微生物による分解代謝の解明およびニトリル分解酵素と有機化学合成とを組み合わせた新しい有用物質生産プロセス（ハイブリッドプロセス）の開発を目的として、ニトリルを直接カルボン酸とアンモニアに加水分解する酵素「ニトリラーゼ」と、ニトリルを水和してアミドへ変換する酵素「ニトリルヒドラターゼ」についてタンパク質・遺伝子レベルから検討している。本研究の応用面での成果の一部として、細菌 *Rhodococcus rhodochrous* J1 のニトリルヒドラターゼを用いたアクリロニトリルからアクリルアミドの工業生産（年間 3 万トン）が 1991 年より稼働している。これは、酵素法による大量生産型化成品生産の初めての例として、また、環境調和型のグリーンケミストリーの成功例として世界的な注目を集めている。また、同じ反応により 1998 年より 3-シアノピリジンからのニコチンアミドの工業生産も行われている。

e) 全学寄附研究部門・微生物科学寄附研究部門との共同研究

微生物機能の探索研究を支援すべく様々な微生物の収集を行うとともに、微生物における物質代謝の詳細な解析を基盤に、有用物質生産のためのバイオプロセス、エネルギー生産、環境浄化、機能性食品生産、プロバイオティクス開発などに有用な微生物機能・微生物酵素の開発を行っている。例えば、*Bacillus* 属細菌に見いだした新たな脂肪族アミノ酸代謝経路とその経路上にて機能する新規ジオキシゲナーゼを用いた水酸化脂肪族アミノ酸生産技術の開発を行い、抗糖尿病活性・抗肥満活性が期待される 4-ヒドロキシイソロイシンの効率生産を実現した。また、嫌気性細菌における脂肪酸飽和化経路について、関与する酵素群を特定するとともに複雑な反応経路の実態

をはじめて明らかにした。また、本酵素系にて機能する脂肪酸異性化酵素を活用した機能性脂質・共役脂肪酸の生産技術を確立した。一方、乳酸菌における核酸代謝の解析に基づき、乳酸菌プロバイオティクスによるプリン体腸管吸収抑制を介する高尿酸血症予防の可能性を見いだした。さらには、バイオ電池モジュールとしての微生物ラッカーゼの探索・機能開発研究、油脂生産性糸状菌における油脂の分泌生産に関する研究に取り組んでいる。

A-2. 研究業績（国内・国外含む）

a) 成果刊行

著 書

- ・片岡道彦, 浦野信行, 清水 昌. 新規人工生合成経路構築によるバイオプロパノールの発酵生産. 第二世代のバイオ燃料の開発と応用展開 (植田充美, 福崎英一郎, 吉田和哉監修), シーエムシー出版, 東京, 189-195 (2009).
- ・片岡道彦, 清水 昌. 第5編-第1章-第5節「1. 酵素法によるキラルアルコールの生産1」. 酵素利用技術大系 (小宮山眞監修), エヌ・ティー・エス, 418-422 (2010).
- ・小川 順, 櫻谷英治, 岸野重信, 安藤晃規, 清水 昌. 第5編-第1章-第5節「2. 有用脂肪酸の生産」. 酵素利用技術大系 (小宮山眞監修), エヌ・ティー・エス, 430-433 (2010).
- ・Shimizu, S., M. Kataoka. Aldehyde reductase (Carbonyl reductase). Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology (ed. by M.C. Flickinger) John Wiley & Sons, in press (2010).
- ・Shimizu, S., M. Kataoka. Lactonohydrolase (Lactonase). Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology (ed. by M.C. Flickinger) John Wiley & Sons, in press (2010).
- ・Sakuradani, E., J. Ogawa, S. Kishino, A. Ando, K. Yokozeki, S. Shimizu. Oils, Microbial Production. Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology (ed. by M.C. Flickinger) John Wiley & Sons, in press (2010).
- ・Shimizu, S., M. Kataoka. Pantothenic Acid and Related Compounds. Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology (ed. by M.C. Flickinger) John Wiley & Sons, in press (2010).

• Ogawa, J., N. Horinouchi, S. Shimizu. Retrosynthetic production of 2'-deoxyribonucleoside from glucose, acetaldehyde, and nucleobase through multistep enzyme reactions. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* (ed. by C.T. Hou, J.-F. Shaw) CRC Press, 269-278 (2009).

原著論文（査読付）

• Ando, A., J. Ogawa, S. Kishino, T. Ito, N. Shirasaka, E. Sakuradani, K. Yokozeki, S. Shimizu. Fatty acid desaturation and elongation reactions of *Trichoderma* sp. 1-OH-2-3. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 86, 227-233 (2009).

• Ando, A., J. Ogawa, S. Sugimoto, S. Kishino, E. Sakuradani, K. Yokozeki, S. Shimizu. Selective production of cis-9, trans-11 isomer of conjugated linoleic acid from trans-vaccenic acid methyl ester by *Delacroixia coronata*. *J. Appl. Microbiol.*, 106, 1697-1704 (2009).

• Ando, A., E. Sakuradani, K. Horinaka, J. Ogawa, S. Shimizu. Transformation of an oleaginous zygomycete *Mortierella alpina* 1S-4 with the carboxin resistance gene conferred by mutation of the iron-sulfur subunit of succinate dehydrogenase. *Curr. Genet.*, 55 (3), 349-356 (2009).

• Ando, A., Y. Sumida, H. Negoro, D.A. Suroto, J. Ogawa, E. Sakuradani, S. Shimizu. Establishment of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of an oleaginous fungus, *Mortierella alpina* 1S-4, and its application for eicosapentaenoic acid producer breeding. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75 (17), 5529-5535 (2009).

• Horinouchi, N., T. Kawano, T. Sakai, S. Matsumoto, M. Sasaki, Y. Mikami, J. Ogawa, S. Shimizu. Screening and characterization of a phosphopentomutase useful for enzymatic production of 2'-deoxyribonucleoside. *N. Biotechnol.*, 26(1-2), 75-82 (2009).

• Isobe, K., T. Takahashi, J. Ogawa, M. Kataoka, S. Shimizu. Production and characterization of alcohol oxidase from *Penicillium purpurescens* AIU 063. *J. Biosci. Bioeng.*, 107 (2), 108-112 (2009).

• Kishino, S., J. Ogawa, K. Yokozeki, S. Shimizu. Metabolic diversity in biohydrogenation of polyunsaturated fatty acids by lactic acid bacteria involving conjugated fatty acid production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 84, 87-97 (2009).

• Kishino, S., J. Ogawa, K. Yokozeki, S. Shimizu. Microbial production of conjugated fatty acids. *Lipid Technology*, 21(8-9), 177-181 (2009).

- Kodera, T., SV. Smirnov, NN. Samsonova, YI. Kozlov, R. Koyama, M. Hibi, J. Ogawa, K. Yokozeki, S. Shimizu. A novel l-isoleucine hydroxylating enzyme, l-isoleucine dioxygenase from *Bacillus thuringiensis*, produces (2S,3R,4S)-4-hydroxyisoleucine.. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 390(3), 506-510 (2009).
- Matsushita, N., M. Miyashita, Y. Ichiki, T. Ogura, E. Sakuradani, Y. Nakagawa, S. Shimizu, H. Miyagawa. Purification and cDNA cloning of LaIT2, a novel insecticidal toxin from venom of the scorpion *Liocheles australasiae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 73(12), 2769-2772 (2009).
- Muramatsu, M., C. Ohto, S. Obata, E. Sakuradani, S. Shimizu. Alkaline pH enhances farnesol production by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biosci. Bioeng.*, 108 (1), 52-55 (2009).
- Ogawa, J., J. Mano, T. Hagishita, S. Shimizu. Enantioselective ester hydrolase from *Sphingobacterium* sp. 238C5 useful for chiral resolution of β -phenylalanine and for its β -peptide synthesis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 60(3-4), 138-144 (2009).
- Ohto, C., M. Muramatsu, S. Obata, E. Sakuradani, S. Shimizu. Overexpression of the gene encoding HMG-CoA reductase in *Saccharomyces cerevisiae* for production of prenyl alcohols. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 82, 837-845 (2009).
- Ohto, C., M. Muramatsu, S. Obata, E. Sakuradani, S. Shimizu. Prenyl alcohol production by expression of exogenous isopentenyl diphosphate isomerase and farnesyl diphosphate synthase genes in *Escherichia coli*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 73 (1), 186-188 (2009).
- Sakuradani, E., T. Abe, S. Shimizu. Identification of mutation sites on w3 desaturase genes from *Mortierella alpina* 1S-4 mutants. *J. Biosci. Bioeng.*, 107 (1), 7-9 (2009).
- Sakuradani, E., M. Nojiri, H. Suzuki, S. Shimizu. Identification of a novel fatty acid elongase with a wide substrate specificity from arachidonic acid-producing fungus *Mortierella alpina* 1S-4. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 84(4), 709-716 (2009).
- Takeshita, D., M. Kataoka, T. Miyakawa, K. Miyazono, A. Uzura, K. Nagata, S. Shimizu, M. Tanokura. Crystallization and preliminary X-ray analysis of the NADPH-dependent 3-quinuclidinone reductase from *Rhodotorula rubra*. *Acta Cryst.*, F65, 645-647 (2009).

- ・Tokuhira, K., M. Muramatsu, C. Ohto, T. Kawaguchi, S. Obata, N. Muramoto, M. Hirai, H. Takahashi, A. Kondo, E. Sakuradani, S. Shimizu. Overproduction of geranylgeraniol by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75 (17), 5536-5543 (2009).
- ・Uzura, A., F. Nomoto, A. Sakoda, Y. Nishimoto, M. Kataoka, S. Shimizu. Stereoselective synthesis of (R)-3-quinuclidinol through asymmetric reduction of 3-quinuclidinone with NADPH-dependent 3-quinuclidinone reductase from *Rhodotorula rubra*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 83 (4), 617-626 (2009).
- ・Yamamura, A., S. Maruoka, J. Ohtsuka, T. Miyakawa, K. Nagata, M. Kataoka, N. Kitamura, S. Shimizu, M. Tanokura. Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of conjugated polyketone reductase C2 (CPR-C2) from *Candida parapsilosis* IFO 0708. *Acta Cryst.*, F65, 1145-1148 (2009).
- ・Murai, M., T. Yamashita, M. Senoh, Y. Mashimo, M. Kataoka, H. Kosaka, A. Matsuno-Yagi, T. Yagi, H. Miyoshi. Characterization of the ubiquinone binding site in alternative NADH-quinone oxidoreductase of *Saccharomyces cerevisiae* by photoaffinity labeling. *Biochemistry.*, 49, 2973-2980 (2010).

総説

- ・Sakuradani, E., A. Ando, J. Ogawa, S. Shimizu. Improved production of various polyunsaturated fatty acids through filamentous fungus *Mortierella alpina* breeding. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 84, 1-10 (2009).
- ・櫻谷英治, 安藤晃規, 小川 順, 清水 昌. 機能性脂質の微生物による生産 -アラキドン酸に関連する油脂の発酵生産を中心として-. 蛋白質 核酸 酵素, 54 (6), 725-734 (2009).
- ・Sakuradani, E., S. Shimizu. Single cell oil production by *Mortierella alpina*. *J. Biotechnol.*, 144(1), 31-36 (2009).

報告書等

- ・片山高嶺, 小川 順. the 11th Swiss-Japanese Joint Meeting on Biotechnology and Bioprocess Development. バイオサイエンスとインダストリー, 67(2), 86-87 (2009).
- ・小川 順, 清水 昌. 微生物酵素の産業利用-その最前線を探る-. 化学と生物, 47 (6), 412-418 (2009).

b) 学会発表

- ・日本農芸化学会 2009 年度大会 : 18 件

- ・第9回日本蛋白質科学会大会：2件
- ・日本ビタミン学会第61回大会：1件
- ・ターゲットタンパク研究プログラム第3回研究交流会：1件
- ・第18回日本バイオイメージング学会学術講演会：1件
- ・第61回日本生物工学会大会：1件
- ・Enzyme Engineering XX：3件
- ・第82回日本生化学会大会：1件
- ・日本農芸化学会2009年度支部合同大会シンポジウム：9件
- ・日本農芸化学会北日本支部第144回大会：1件
- ・酵素工学会第62回講演会：1件
- ・日本農芸化学会中部支部第157回例会若手シンポジウム：1件
- ・BioMicroWorld2009：1件
- ・第13回生体触媒科学シンポジウム：1件
- ・第32回分子生物学会大会：1件
- ・平成21年度ターゲットタンパク研究プログラムシンポジウム「ターゲットタンパク研究プログラムから見える未来3」：1件
- ・第8回脂質工学研究部会講演会：4件
- ・2009 bioactive lipid molecules and transporters：2件
- ・e-バイオ研究会 公開セミナー 「e-バイオ (Electron-oriented Biotechnology) の幕開け-Downhill バイオから Uphill バイオへ」：1件
- ・第11回CLA懇話会：2件
- ・第5回武田科学振興財団薬科学シンポジウム：1件
- ・2009年油脂産業技術部会セミナー-有用油脂の高度利用「油脂と健康」-：1件
- ・第14回水産油脂技術懇話会：1件
- ・5th International Symposium on Biocatalysis and Biotechnology：1件
- ・Italy-Japan Symposium, New Trends in Enzyme Science and technology：1件
- ・15th German-Japanese Workshop on Enzyme Technology：1件
- ・Workshop Argentina-Japan “Bioscience and Biotechnology for the Promotion of Agriculture and Food Production：1件
- ・Biotrans09 (9th International Symposium on Biocatalysis)：1件

A-3. 国内における学会活動など

所属学会等（役割）

- ・小川 順：日本農芸化学会（産学官若手交流会メンバー・関西支部評議員）、日本生物工学会（脂質工学研究部会代表幹事）、日本醸造学会（若手の会運営委員）、大阪工研協会（ニューフロンティア材料部会幹事）、日本バイオインダストリー協会（発酵と代謝研究会幹事）
- ・片岡道彦：酵素工学研究会（幹事）、日本ビタミン学会（「ビタミン誌」トピックス等担当委員）

競争的資金等獲得状況

①科学研究費補助金

- ・基盤研究(B)：小川 順：微生物における還元的脂肪酸・有機酸変換機能の探索と開発
- ・基盤研究(B)：片岡道彦：バイオ還元システムを基盤とする有用物質生産プロセスの開発
- ・若手研究(A)：櫻谷英治：油糧微生物の分子育種と微生物の特異な脂質代謝機能を活用した有用物質生産

②その他の競争的資金

- ・ターゲットタンパク研究プログラム：片岡道彦：キラル化合物の産業生産に有用な酵素の触媒反応機構の解明と高機能化
- ・NEDO 受託研究：小川 順：微生物複合酵素系の産業用触媒としての研究開発

A-4. 国際交流・海外活動

所属学会等（役割）

- ・小川 順：Applied Microbiology and Biotechnology（編集委員）、International Society of Biocatalysis and Biotechnology（編集委員）
- ・片岡道彦：Journal of Bioscience and Bioengineering（編集委員）、Recent Patents on Biotechnology（編集委員）

国際会議・研究集会等（国、役割）

- ・小川 順：15th German-Japanese Workshop on Enzyme Technology（組織委員）、5th International Symposium on Biocatalysis and Biotechnology（組織委員）

外国人研究者の受入

- ・研究員 2名（韓国）

B. 教育活動（2009. 4～2010. 3）

B-1. 学内活動

a) 開講授業科目（担当教員）

- ・学部： 生化学Ⅰ（片岡）、応用微生物学Ⅲ（小川・片岡）、応用微生物学実験（片岡・櫻谷・安藤）
- ・大学院： 発酵生理及び醸造学専攻演習（小川・片岡・櫻谷・安藤）、発酵生理及び醸造学専攻実験（小川・片岡・櫻谷・安藤）

B-2. 学外における教育活動

学外非常勤講師

- ・小川 順：東京農工大学農学部（応用生物化学特別講義）、東京大学大学院農学生命科学研究科（微生物機能開発学）
- ・片岡道彦：岐阜大学工学部（生命工学特論Ⅲ）

B-3. 国際的教育活動

留学生・外国人研修員の受入

- ・留学生： 博士課程 1名（中国）

C. その他

- ・小川 順：NEDO 平成 21 年度生物機能活用技術分野技術戦略マップ改訂調査個別委員会「生産（ものづくり）」（委員）