

講座 応用微生物学

2.3.7 研究分野：発酵生理及び醸造学

| | | |
|------|-----------|----------------------|
| 構成員： | 教授 | 小川 順 |
| | 助教 | 櫻谷 英治 |
| | 特定教授 | 島 純（協力教員、2010.2～） |
| | 特定助教 | 安藤 晃規（協力教員、2009.11～） |
| | 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） | 2名 |
| | 研究員 | 4名 |

A. 研究活動（2010.4～2011.3）

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、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ソ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し、4-ヒドロキシイソロイシンの生産や、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と反応経路の解明、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の確立。また、乳酸菌を活用した、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。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

・岸野重信, 小川 順. 第7章 バイオプロダクトと新プラットフォーム形成 「9. 脂肪酸誘導体の合成」. 地球環境シリーズ エコバイオリファイナリー ―脱石油社会へ移行するための環境ものづくり戦略―、(植田充美、田丸 浩 監修), (株)シーエムシー出版, 213-219 (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「3. 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).

・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, 6, 3693-3706 (2010).

・Sakuradani, E. A. Ando, J. Ogawa S. Shimizu. Part2-2 Arachidonic Acid-Producing *Mortierella alpina* : Creation of Mutants, Isolation of the Related Enzyme Genes, and Molecular Breeding. Single Cell Oils -Microbial and Algal Oils 2nd Edition-, ed. Zvi Cohen, Colin Ratledge, AOCs Press, USA, 29-49 (2010).

• Shimizu, S., M. Kataoka. Aldehyde reductase. Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology (ed. by M.C. Flickinger) John Wiley & Sons, 1, 177-184 (2010).

• Shimizu, S., M. Kataoka. Lactonohydrolase. Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology (ed. by M.C. Flickinger) John Wiley & Sons, 5, 3116-3123 (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, 6, 3767-3774 (2010).

原著論文 (書評論文を含む)

• Kishino, S., J. Ogawa, A. Ando, K. Yokozeki, S. Shimizu. Microbial production of conjugated γ -linolenic acid from γ -linolenic acid by *Lactobacillus plantarum* AKU 1009a. J. Appl. Microbiol., 108 (6), 2012-2018 (2010).

• 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 (13), 2973-2980 (2010).

• Nakatani, M., M. Hibi, M. Minoda, J. Ogawa, K. Yokozeki, S. Shimizu. Two laccase isoenzymes and a peroxidase of a commercial laccase-producing basidiomycete, *Trametes* sp. Hal. N Biotechnol., 27 (4), 317-323 (2010).

• Ohto, C., M. Muramatsu, S. Obata, E. Sakuradani, S. Shimizu. Production of geranylgeraniol on overexpression of a prenyl diphosphate synthase fusion gene in *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 87 (4), 1327-1334 (2010).

・Sakuradani, E. Advances in the production of various polyunsaturated fatty acids through oleaginous fungus *Mortierella alpina* breeding. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 74 (5), 908-917 (2010).

・Sasaki, Y., M. Kataoka, N. Urano, J. Ogawa, A. Iwasaki, J. Hasegawa, K. Isobe, S. Shimizu. Cloning, sequencing and expression analysis of a gene encoding alcohol oxidase in *Paenibacillus* sp. AIU 311. *J. Biosci. Bioeng.*, 110 (2), 145-171 (2010).

・Smirnov, S.V., T. Kodera, N.N. Samsonova, V.A. Kotlyarova, N.Y. Rushkevich, A.D. Kivero, P. M. Sokolov, M. Hibi, J. Ogawa, S. Shimizu. Metabolic engineering of *Escherichia coli* to produce (2S, 3R, 4S)-4-hydroxyisoleucine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 88 (3), 719-726 (2010).

総説

・岸野重信, 小川 順. 特集 バイオマスからの有用物質生産プロセス最前線 脂肪酸誘導体の合成. *BIO INDUSTRY*, 27 (11), 32-37 (2010).

特許

・河島 洋、櫻谷英治、小川 順、清水 昌. 1種類の高度不飽和脂肪酸残基3個から成るトリグリセライドの製造方法、およびその利用 (特開2010-042037)

b) 学会発表

- 101st AOCs Annual Meeting & Expo : 4 件

- 19th International Symposium on Plant Lipids
第19回植物脂質国際シンポジウム : 1 件

- The Eleventh China-Japan-Korea Joint Symposium on Enzyme Engineering : 1 件

- The Eleventh China-Japan-Korea Joint Symposium on Enzyme Engineering : 1 件

- 6th International Symposium on Biocatalysis and Biotechnology
第6回生体触媒とバイオテクノロジー国際シンポジウム : 1 件

- Gordon Research Conferences
Plant Lipids: Structure, Metabolism & Function : 1 件

- JBA新資源生物変換研究会シンポジウム『2020年のバイオインダストリー』 : 1 件

- 第71回酵母研究会 : 1 件

- 発酵と代謝シンポジウム
発酵 - 日本の底力 - : 1 件

- 第21回微生物ワークショップ
「微生物によるものづくりの新展開」 : 1 件

- 第10回糸状菌分子生物学コンファレンス(2010)シンポジウム「産業界で活躍する糸状菌たち」 :

・日本油化学会第49回年会
日台ジョイントシンポジウム
「生体触媒と機能性脂質」：1件

・日本油化学会第49回年会：2件

・Bio Japan 2010 JBA 3 賞受賞者合同発表会：1件

・2010年度日本農芸化学会関西支部大会（第466回講演会）：3件

・第12回日本-スイスバイオテクノロジー・バイオプロセス会議：2件

・第10回糸状菌分子生物学コンファレンス(2010)：1件

・酵素工学会第64回講演会：1件

・”第62回日本生物工学会大会シンポジウム（産業酵母の育種技術の現状と展望：有用機能の向上）”

・”日本醸造学会第2回若手シンポジウム”：2件

・第62回日本生物工学会大会：8件

・酵素工学会第64回講演会：1件

- ・日本農芸化学会2011年度大会：18件

A-3. 国内における学会活動など①

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（学際的脂質創生研究部会代表幹事）、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）

A-3. 国内における学会活動など②

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
- ・挑戦的萌芽研究：小川 順：生活習慣病改善に有効な代謝調節機能を有する新規分岐鎖アミノ酸誘導体の創出
- ・基盤研究(B)：櫻谷 英治：質変換反応の探索と機能性脂質生産プロセスの開発

②その他の競争的資金

- ・ターゲットタンパク研究：小川 順：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
- ・生研センター：小川 順：脂質バランス栄養食品を創出する新規オメガ3脂肪酸素材の開発

- ・ NEDO受託研究：小川 順 ：微生物複合酵素系の産業触媒としての研究開発
- ・ NEDO受託研究：小川 順：非可食性植物由来ジカルボン酸製造プロセスのバイオ化基盤技術開発
- ・ JST受託研究：小川 順：ポリマー原料を生産する油脂蓄積微生物の創出
- ・ NEDO受託研究：岸野重信：微生物を用いた選択的な機能性脂質生産法の確立

A-4. 国際交流・海外活動①

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）

A-4. 国際交流・海外活動②

外国人研究者の受入

- ・ 研究員 1名 （韓国）
- ・ 受託研究員 1名 （韓国）

B. 教育活動 (2010. 4～2011. 3)

B-1. 学内活動

a) 開講授業科目 (担当教員)

・ 全学共通科目 : 応用生命科学(小川) 、 教職総合演習(小川)

・ 学部 : 応用生命科学入門Ⅱ(小川) 、 生化学Ⅰ(小川) 、 応用微生物学Ⅰ(小川) 、 応用微生物学Ⅱ(小川) 、 応用微生物学Ⅲ(小川) 、 応用微生物学Ⅳ(小川) 、 応用微生物学実験(櫻谷・安藤)

・ 大学院 : 発酵生理及び醸造学特論(小川、島) 、 発酵生理及び醸造学専攻演習(小川・櫻谷・島・安藤) 、 発酵生理及び醸造学専攻実験(小川・櫻谷・島・安藤)

B-3. 国際的教育活動①

留学生・外国人研修員の受入

・ 留学生 : 博士課程 1名 (中国)