多様な微生物代謝の発見と解析ならびにその統合的応用に関する基盤研究

京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻　小　川　　順

はじめに

物質変換に代表される微生物機能は，食品，医薬品，化学工業などの様々な産業に利用されてきた．今後も，持続可能な循環型社会の構築に向け，多様な産業への微生物機能の導入を可能とするツールの拡充が求められている．筆者らは，従来の方法論に加え，複合的な酵素機能を顕在化させる補酵素再生系やエネルギー供給系を考慮した探索手法，腸管や根圏などの生物間相互作用の場で発揮される機能を濃縮する環境制御手法の構築を通して，様々な新規微生物代謝，複合微生物系の探索，解析，応用に取り組んできた．ここでは，筆者らが蓄積してきた新規微生物機能に関する基礎的知見とその応用を紹介する．

1.　微生物の物質変換能を活用する有用物質生産

1-1.　核酸関連化合物代謝の解析と応用

一連の研究（図1）は，博士課程のテーマから派生している．ピリミジン塩基の還元的代謝酵素などを，構造が類似する5-置換ヒダントインの立体選択的変換に応用し，D-, L-体アミノ酸の立体選択的合成プロセスを開発した．D-アミノ酸生産法は，抗生物質側鎖の工業生産に活用されている．また，ピリミジン塩基の酸化的分解代謝を初めて解明し，塩基交換反応の反応平衡制御ツールとして開発した．プリン塩基代謝酵素を，プロキラルなイミド化合物の立体選択的変換によるGABAアナログの合成や高尿酸血症予防法の開発に応用した．2'-置換ヌクレオシド代謝系酵素を初めて見いだし，核酸医薬用の2'-*O*-メチルヌクレオシドの合成に応用した．デオキシリボヌクレオチド代謝系の逆反応を，未確立であったグルコースからのデオキシリボヌクレオシド（dNS）生産に応用した．本研究は，生命分子のRNA起源説と絡んだ基礎的にも興味深い展開を見せている．

1-2.　水酸化が関与する新規アミノ酸代謝の解析と応用

核酸代謝研究がアミノ酸生産への応用に展開したことを契機に，アミノ酸代謝の研究に取り組んだ．報告例がなかった遊離脂肪族アミノ酸の水酸化反応を微生物に見いだし，本反応への二価鉄/α-ケトグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼの関与を示した．本酵素遺伝子の相同遺伝子をゲノム情報に探索し，多様な類縁酵素を見いだした（図2）．これらを用いて医薬品中間体などを合成しキラル合成基質ライブラリとして製品化した．

地球外アミノ酸としても知られるα,α-2置換α-アミノ酸（2-アミノイソ酪酸）の酸化的代謝を初めて見いだし，その初発酵素として加水分解酵素と配列相同性を示す新規な非ヘム二核鉄依存モノオキシゲナーゼを発見し，医薬品中間体D-メチルセリンの立体選択的合成に応用した．

1-3.　油脂発酵・脂肪酸変換の新展開

核酸，アミノ酸代謝と並行し，油脂関連研究も展開した．

【EPA発酵】アラキドン酸生産菌*Mortierella alpina* 1S-4のEPA生産株への分子育種に取り組んだ．低温で活性化する本菌のω3不飽和化酵素（DS）の遺伝子を本菌の恒常発現プロモーターに連結し*Agrobacterium*法にて染色体上に導入，過剰発現させ，EPA生産を4倍向上させた．新たに見いだした常温にて機能する*Plectospira myriandra*由来Δ17DS遺伝子ならびに*Coprinus cinereus*由来Δ12DS遺伝子を共に高発現プロモーターPP3pにて制御し，Δ12DS欠損変異株*M. alpina* JT180株に発現させた．本株は26℃，10日の培養にて，EPA高含有油脂を著量生産した（総脂質28 g/L，EPA含量52%（14 g/L））．

【ω3-DPA発酵】母乳に含まれるω3-DPAは，その誘導体がアレルギー疾患を抑制することから，新規供給源が求められている．ω3脂肪酸生産性微生物の探索過程で，長期培養によりω3-DPAを蓄積する*Aurantiochytrium* sp. T7株を見いだし，グルコースの枯渇がω3-DPAの蓄積を誘導することを示した．

【魚油代替発酵DHA】養殖飼料は魚油DHAを使用し，資源循環に課題がある．魚油代替発酵DHAを開発すべく，植物資源を用いる発酵生産系の開発に取り組んだ．*Aurantiochytrium* sp. 6-2株が米麹にて発酵処理した発酵脱脂大豆を利用し，効率的にDHA高含有油脂を発酵生産しうることを見いだした．本発酵DHAは飼料中の魚油DHAの50%を代替可能であった．

【プロスタグランジン発酵】オゴノリ由来新規シクロオキシゲナーゼをアラキドン酸生産菌*M. alpina* 1S-4株に発現させた．本菌は菌体外に6 mg/LのPGF$_{2\alpha}$を蓄積した．

【抗炎症性EPA代謝物生産】新規抗炎症性EPA代謝物17,18-エポキシエイコサテトラエン酸（17,18-EpETE）はヒト体内で

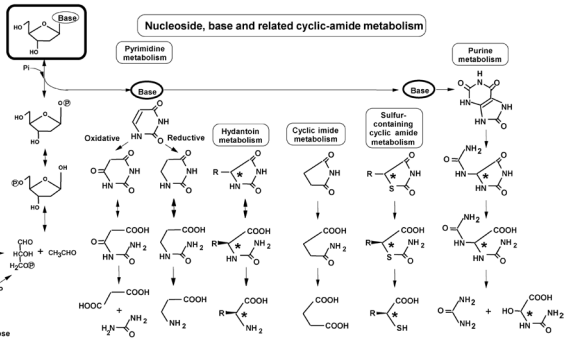

図1.　研究対象とした核酸関連化合物代謝

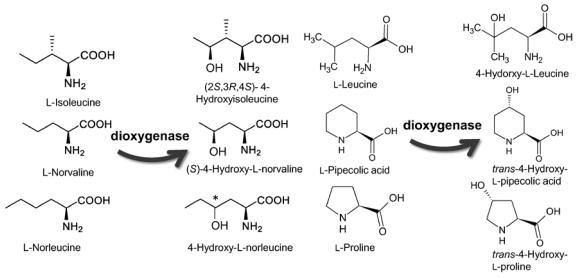

図2.　微生物に見いだした新規アミノ酸水酸化反応

P450モノオキシゲナーゼ（P450）により生成するが，代謝活性の個人差のため抗炎症作用を享受できない場合がある．枯草菌P450の解析過程で，納豆菌に17,18-EpETE生成活性を見いだし，魚油と納豆を用いた抗炎症食品の開発に応用した．

1-4.　様々な微生物酸化酵素の探索，解析と応用

上記のアミノ酸・脂肪酸代謝の応用において有用であった酸化酵素に関する研究を多面的に展開した．特に，P450，ペルオキシダーゼ，ラッカーゼを対象に新たな機能の開拓に取り組んだ．ラッカーゼについて，中性pHで機能する新規ラッカーゼを見いだいし，酵素バイオ電池の開発に活用いただいた．また，ラッカーゼのラジカル生成能に起因する殺菌機能の開発研究が，後述する有機水耕栽培に関する共同研究の契機となった．

2.　食と微生物の相互作用の理解に基づく健康増進

2-1.　腸内細菌における脂肪酸代謝の解析と代謝物の生理機能解析ならびにその応用

微生物における脂肪酸代謝研究を拡張し，腸内細菌叢における食事由来脂肪酸代謝の解析に取り組み，生理機能発現代謝物を同定するとともに，腸内細菌食事成分代謝物（ポストバイオティクス）を新たな概念に基づく健康増進ツールとして開発した．遊離脂肪酸の腸内細菌による飽和化代謝を酵素レベルで解明し（図3），水和反応を起点に生じる代謝物群（水酸化・オキソ・エノン脂肪酸）が，宿主移行していることを見いだした．

代謝物を酵素合成し，多くの先生方との共同研究にて生理機能を評価した結果，代謝変換によりω3脂肪酸の健康機能が強化されること，ω6脂肪酸代謝物がω3脂肪酸様の健康機能を示すことを見いだいした．例えば，リノール酸の水和代謝物（HYA；10-ヒドロキシ-*cis*-12-オクタデセン酸）が血糖値上昇抑制，耐糖能改善，抗肥満，腸管上皮バリア保護，抗炎症などの機能を有するとともに，生活習慣病予防につながる腸内細菌叢を誘導することを見いだした．このほかにも，水酸化・オキソ脂肪酸にPPAR，LXR，TRPV1を介した脂質代謝・エネルギー代謝制御機能を，エノン脂肪酸に抗酸化作用を，共役脂肪酸に抗炎症活性を見だしている．HYAについては，ヒトに対する効果・安全性の検証，乳酸菌代謝を利用した植物油脂からの効率生産技術の開発を経て，機能性表示食品として市販された．

2-2.　腸内細菌における植物機能性分子代謝の解析と応用

腸内細菌による食品成分代謝を植物機能性分子を中心に展開し，関与する新規酵素系を特定，解析し応用した．

アブラナ科植物に含まれる*S*-グリコシド結合型配糖体グルコシノレートは，腸内細菌によりイソチオシアネートに変換され，抗がん，抗酸化，抗炎症などの生理機能を示すが，関与する酵素系は不明であった．比較プロテオーム解析を適用し，

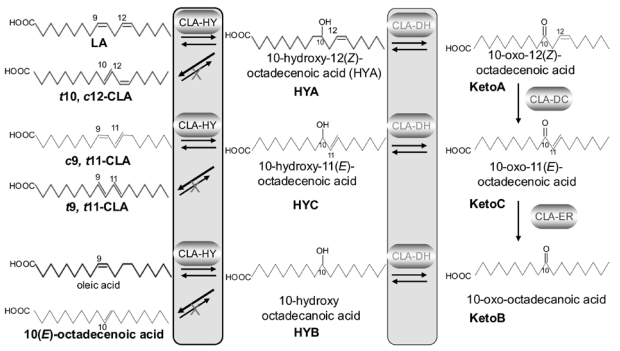

図3.　遊離脂肪酸の腸内細菌による飽和化代謝

PTS糖輸送体，アリル-ホスホ-β-D-グルコシダーゼが関与する新規なグルコシノレート分解酵素系を見いだした．

ザクロに含まれるエラグ酸は腸内細菌により抗酸化・抗炎症，オートファジー制御などの生理活性を示すウロリチン類に変換されるが，この代謝の脱水酸化過程に関与する酵素系は不明であった．比較プロテオーム解析を適用した結果，初発酵素エラグ酸ラクトナーゼ，ならびに，ウロリチン構造上の多様な水酸基に位置選択的に作用する脱水酸化酵素群を特定した．これらの酵素系の理解は代謝物の酵素合成を介し製品化を支援した．一連の酵素遺伝子情報は腸内細菌メタゲノム解析を介して食品機能享受の個人差を理解する精密栄養学を支援しうる．

3.　複合微生物系の物質循環機能を活用する環境制御技術

根圏や水圏環境において物質循環を担っている難分離・培養微生物の機能解析を，モデル系の確立により実現し，関与する微生物を同定・解析・応用した．この研究の端緒となったのは，ラッカーゼの殺菌機能を水耕栽培系に応用する試みであったが，研究は，水耕栽培系の複合微生物系を有効活用する有機水耕栽培技術の共同研究に展開した．具体的には，複合微生物系である植物根圏において窒素代謝を担う難培養硝化菌を水系で濃縮・優先化させる環境制御技術の構築，機能解析の実現，硝化を担う微生物の単離同定を経て，選抜微生物による硝化複合微生物系のモデル構築に成功した．この複合微生物系を活用する新規な水耕栽培技術は，プロバイオポニックスとして新たにJAS規格を取得し作物生産の現場に導入されるとともに，人工土壌創出技術，環境電子伝達を考慮した脱窒と組み合せた水質保全技術として，実用化に向け展開されている．

おわりに

以上の成果は，バイオものづくり技術の拡充を介したCO_2削減，新たな健康増進手法の確立と機能性食品素材・医薬品シーズの提供，複合微生物系機能の活用による持続的循環型社会の構築を支援し，プラネタリーヘルスの実現に貢献する農芸化学領域の将来研究に学術基盤を提供するものと期待している．

これらの研究開発を支援したオミクス技術・ハイスループット技術の登場は，ビッグデータの集積・活用を介して，微生物機能研究に革新をもたらした．一方，現時点では理解が不十分な情報があまた存在し，そこに未知機能が潜んでいることも浮き彫りとなった．ここで述べた，機能レベルでの代謝解析を通した未知との対話が，複合的な物質変換システム，生物間相互作用システムなどの複雑系を理解する端緒となり，見いだされる新規機能の多方面への統合的応用が，農芸化学が先導的に開拓しうる新たな産業を創生することを期待し，これからも「微生物機能の探・観・拓」に尽力したい．

謝　辞　本研究は，京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻発酵生理及び醸造学分野，ならびに，産業微生物学講座を中心に展開された．微生物機能研究おける精神性をご教授いただいた山田秀明先生，清水昌先生，産業応用の実際を説いてくださった横関健三先生，髙橋里美先生，上田誠先生に深く感謝いたします．また，直接研究を共にした現教員の岸野重信氏，安藤晃規氏，原良太郎氏，旧教員の片岡道彦氏，櫻谷英治氏，日比慎氏，竹内道樹氏をはじめとする研究室スタッフ，学生，企業共同研究者の皆さまに厚く御礼申し上げます．また応用の具現化を導いた異分野との融合や現場での生の取り組みをご指導・協働いただいた多くの方々に心より感謝申し上げます．