

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2019-15
(P2019-15A)

(43) 公開日 平成31年1月10日(2019.1.10)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 6 4
C 1 2 P 7/64 (2006.01)	C 1 2 P 7/64	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	

審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 21 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-116061 (P2017-116061)	(71) 出願人	504171134 国立大学法人 筑波大学 茨城県つくば市天王台一丁目1番1
(22) 出願日	平成29年6月13日 (2017.6.13)	(74) 代理人	100106909 弁理士 棚井 澄雄
		(74) 代理人	100188558 弁理士 飯田 雅人
		(74) 代理人	100169764 弁理士 清水 雄一郎
		(72) 発明者	鈴木 石根 茨城県つくば市天王台一丁目1番1 国立 大学法人筑波大学内
		(72) 発明者	町田 峻太郎 茨城県つくば市天王台一丁目1番1 国立 大学法人筑波大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 分岐鎖脂肪酸の製造方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 分岐鎖脂肪酸を製造する技術を提供する。

【解決手段】 特定の配列からなる塩基配列にコードされるタンパク質、又は特定の配列からなる塩基配列と70%以上の配列同一性を有する塩基配列にコードされ且つオレイン酸を10-メチレンステアリン酸に変化させる活性を有するタンパク質、及び、別の特定の配列からなる塩基配列にコードされるタンパク質、又は別の特定の配列からなる塩基配列と70%以上の配列同一性を有する塩基配列にコードされ且つ10-メチレンステアリン酸を10-メチルステアリン酸に変化させる活性を有するタンパク質、を発現させた宿主をインキュベートすることにより、不飽和脂肪酸の二重結合にメチル基が導入されて分岐鎖脂肪酸が合成される工程を備える、分岐鎖脂肪酸の製造方法。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記 (i - 1) 又は (i - 2) に記載のタンパク質、及び下記 (i i - 1) 又は (i i - 2) に記載のタンパク質を発現させた宿主をインキュベートすることにより、前記宿主中の不飽和脂肪酸の下記式 (1) で表される基にメチル基が導入されて下記式 (2) で表される基を有する分岐鎖脂肪酸が合成される工程を備える、下記式 (2) で表される基を有する分岐鎖脂肪酸の製造方法。

(i - 1) 配列番号 1 に記載の塩基配列にコードされるタンパク質

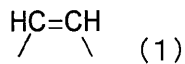
(i - 2) 配列番号 1 に記載の塩基配列と 70 % 以上の配列同一性を有する塩基配列にコードされ且つオレイン酸を 10 - メチレンステアリン酸に変化させる活性を有するタンパク質

10

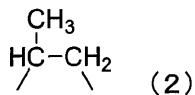
(i i - 1) 配列番号 2 に記載の塩基配列にコードされるタンパク質

(i i - 2) 配列番号 2 に記載の塩基配列と 70 % 以上の配列同一性を有する塩基配列にコードされ且つ 10 - メチレンステアリン酸を 10 - メチルステアリン酸に変化させる活性を有するタンパク質

【化 1】



【化 2】



20

【請求項 2】

前記不飽和脂肪酸がオレイン酸であり、前記分岐鎖脂肪酸が 10 - メチルステアリン酸である、請求項 1 に記載の製造方法。

【請求項 3】

不飽和脂肪酸に、下記 (i - 1) 又は (i - 2) に記載のタンパク質を反応させることにより、前記不飽和脂肪酸の下記式 (1) で表される基にメチレン基が導入されて下記式 (3) で表される基を有する脂肪酸が合成される工程と、

下記式 (3) で表される基を有する前記脂肪酸に、下記 (i i - 1) 又は (i i - 2) に記載のタンパク質を反応させることにより、下記式 (2) で表される基を有する分岐鎖脂肪酸が合成される工程と、

30

を備える、下記式 (2) で表される基を有する分岐鎖脂肪酸の製造方法。

(i - 1) 配列番号 1 に記載の塩基配列にコードされるタンパク質

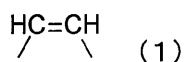
(i - 2) 配列番号 1 に記載の塩基配列と 70 % 以上の配列同一性を有する塩基配列にコードされ且つオレイン酸を 10 - メチレンステアリン酸に変化させる活性を有するタンパク質

(i i - 1) 配列番号 2 に記載の塩基配列にコードされるタンパク質

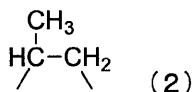
(i i - 2) 配列番号 2 に記載の塩基配列と 70 % 以上の配列同一性を有する塩基配列にコードされ且つ 10 - メチレンステアリン酸を 10 - メチルステアリン酸に変化させる活性を有するタンパク質

40

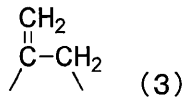
【化 3】



【化 4】



【化5】



【請求項4】

前記不飽和脂肪酸がオレイン酸であり、前記分岐鎖脂肪酸が10-メチルステアリン酸である、請求項3に記載の製造方法。

【請求項5】

下記(i-1)又は(i-2)に記載のタンパク質、及び下記(ii-1)又は(ii-2)に記載のタンパク質を備える、不飽和脂肪酸から下記式(2)で表される基を有する分岐鎖脂肪酸を製造するためのキット。

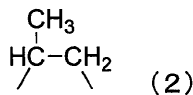
(i-1) 配列番号1に記載の塩基配列にコードされるタンパク質

(i-2) 配列番号1に記載の塩基配列と70%以上の配列同一性を有する塩基配列にコードされ且つオレイン酸を10-メチレンステアリン酸に変化させる活性を有するタンパク質

(ii-1) 配列番号2に記載の塩基配列にコードされるタンパク質

(ii-2) 配列番号2に記載の塩基配列と70%以上の配列同一性を有する塩基配列にコードされ且つ10-メチレンステアリン酸を10-メチルステアリン酸に変化させる活性を有するタンパク質

【化6】



【請求項6】

下記(iii-1)又は(iii-2)に記載の核酸、及び下記(iv-1)又は(iv-2)に記載の核酸を備える、不飽和脂肪酸から下記式(2)で表される基を有する分岐鎖脂肪酸を製造するためのキット。

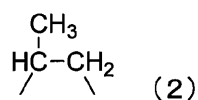
(iii-1) 配列番号1に記載の塩基配列からなる核酸

(iii-2) 配列番号1に記載の塩基配列と70%以上の配列同一性を有し且つオレイン酸を10-メチレンステアリン酸に変化させる活性を有するタンパク質をコードする核酸

(iv-1) 配列番号2に記載の塩基配列からなる核酸

(iv-2) 配列番号2に記載の塩基配列と70%以上の配列同一性を有し且つ10-メチレンステアリン酸を10-メチルステアリン酸に変化させる活性を有するタンパク質をコードする核酸

【化7】



【請求項7】

前記不飽和脂肪酸がオレイン酸であり、前記分岐鎖脂肪酸が10-メチルステアリン酸である、請求項5又は6に記載のキット。

【請求項8】

下記(i-1)又は(i-2)に記載のタンパク質の発現ベクター、及び下記(ii-1)又は(ii-2)に記載のタンパク質の発現ベクター、が導入された宿主。

(i-1) 配列番号1に記載の塩基配列にコードされるタンパク質

(i-2) 配列番号1に記載の塩基配列と70%以上の配列同一性を有する塩基配列にコードされ且つオレイン酸を10-メチレンステアリン酸に変化させる活性を有するタンパク質

(ii-1) 配列番号2に記載の塩基配列にコードされるタンパク質

10

20

30

40

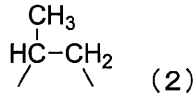
50

(i i - 2) 配列番号 2 に記載の塩基配列と 7 0 % 以上の配列同一性を有する塩基配列にコードされ且つ 1 0 - メチレンステアリン酸を 1 0 - メチルステアリン酸に変化させる活性を有するタンパク質

【請求項 9】

下記式 (2) で表される基を有する分岐鎖脂肪酸の製造用である、請求項 8 に記載の宿主。

【化 8】



10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、分岐鎖脂肪酸の製造方法に関する。より具体的には、分岐鎖脂肪酸の製造方法、不飽和脂肪酸から分岐鎖脂肪酸を製造するためのキット及び宿主に関する。

【背景技術】

【0002】

分岐鎖脂肪酸は、不飽和脂肪酸の特性である低い融点と、飽和脂肪酸の特性である酸化に対する高い耐性とを合わせ持つことから、その産業応用が期待されている。また、微生物における分岐鎖脂肪酸の合成機構の解析も進められている。

20

【0003】

例えば、非特許文献 1 には、マイコバクテリウム・ツベルクローシスの R v 0 4 6 9 (u m a A) 遺伝子にコードされる酵素 (U m a A) が、1 0 - メチルステアリン酸の合成に関与することが記載されている。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献 1】Meena L. S., et al., Biochemical characterization of an S-adenosyl-l-methionine-dependent methyltransferase (Rv0469) of Mycobacterium tuberculosis., Biol. Chem., 394 (7), 871-877, 2013.

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

しかしながら、実施例に後述するように、発明者らは、非特許文献 1 に記載されている U m a A タンパク質を大腸菌で発現させても、1 0 - メチルステアリン酸を合成することができないことを明らかにした。そこで、本発明は、微生物における分岐鎖脂肪酸の合成機構を解明し、分岐鎖脂肪酸を製造する技術を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明は以下の態様を含む。

40

[1] 下記 (i - 1) 又は (i - 2) に記載のタンパク質、及び下記 (i i - 1) 又は (i i - 2) に記載のタンパク質を発現させた宿主をインキュベートすることにより、前記宿主中の不飽和脂肪酸の下記式 (1) で表される基にメチル基が導入されて下記式 (2) で表される基を有する分岐鎖脂肪酸が合成される工程を備える、下記式 (2) で表される基を有する分岐鎖脂肪酸の製造方法。

(i - 1) 配列番号 1 に記載の塩基配列にコードされるタンパク質

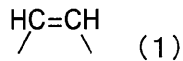
(i - 2) 配列番号 1 に記載の塩基配列と 7 0 % 以上の配列同一性を有する塩基配列にコードされ且つオレイン酸を 1 0 - メチレンステアリン酸に変化させる活性を有するタンパク質

(i i - 1) 配列番号 2 に記載の塩基配列にコードされるタンパク質

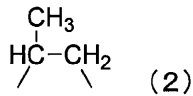
50

(i i - 2) 配列番号 2 に記載の塩基配列と 70 % 以上の配列同一性を有する塩基配列にコードされ且つ 10 - メチレンステアリン酸を 10 - メチルステアリン酸に変化させる活性を有するタンパク質

【化 1】



【化 2】

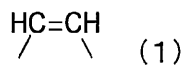


10

[2] 前記不飽和脂肪酸がオレイン酸であり、前記分岐鎖脂肪酸が 10 - メチルステアリン酸である、[1] に記載の製造方法。

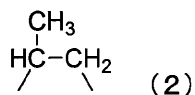
[3] 不飽和脂肪酸に、上記 (i - 1) 又は (i - 2) に記載のタンパク質を反応させることにより、前記不飽和脂肪酸の下記式 (1) で表される基にメチレン基が導入されて下記式 (3) で表される基を有する脂肪酸が合成される工程と、下記式 (3) で表される基を有する前記脂肪酸に、上記 (i i - 1) 又は (i i - 2) に記載のタンパク質を反応させることにより、下記式 (2) で表される基を有する分岐鎖脂肪酸が合成される工程と、を備える、下記式 (2) で表される基を有する分岐鎖脂肪酸の製造方法。

【化 3】

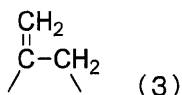


20

【化 4】



【化 5】



[4] 前記不飽和脂肪酸がオレイン酸であり、前記分岐鎖脂肪酸が 10 - メチルステアリン酸である、[3] に記載の製造方法。

30

[5] 上記 (i - 1) 又は (i - 2) に記載のタンパク質、及び上記 (i i - 1) 又は (i i - 2) に記載のタンパク質を備える、不飽和脂肪酸から上記式 (2) で表される基を有する分岐鎖脂肪酸を製造するためのキット。

[6] 下記 (i i i - 1) 又は (i i i - 2) に記載の核酸、及び下記 (i v - 1) 又は (i v - 2) に記載の核酸を備える、不飽和脂肪酸から上記式 (2) で表される基を有する分岐鎖脂肪酸を製造するためのキット。

(i i i - 1) 配列番号 1 に記載の塩基配列からなる核酸

(i i i - 2) 配列番号 1 に記載の塩基配列と 70 % 以上の配列同一性を有し且つオレイン酸を 10 - メチレンステアリン酸に変化させる活性を有するタンパク質をコードする核酸

40

(i v - 1) 配列番号 2 に記載の塩基配列からなる核酸

(i v - 2) 配列番号 2 に記載の塩基配列と 70 % 以上の配列同一性を有し且つ 10 - メチレンステアリン酸を 10 - メチルステアリン酸に変化させる活性を有するタンパク質をコードする核酸

[7] 前記不飽和脂肪酸がオレイン酸であり、前記分岐鎖脂肪酸が 10 - メチルステアリン酸である、[5] 又は [6] に記載のキット。

[8] 上記 (i - 1) 又は (i - 2) に記載のタンパク質の発現ベクター、及び上記 (i i - 1) 又は (i i - 2) に記載のタンパク質の発現ベクター、が導入された宿主。

[9] 上記式 (2) で表される基を有する分岐鎖脂肪酸の製造用である、[8] に記載の

50

宿主。

【発明の効果】

【0007】

本発明によれば、分岐鎖脂肪酸を製造する技術を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1】(a)及び(b)は、実験例2におけるガスクロマトグラフィーの結果を示すグラフである。

【図2】実験例3におけるガスクロマトグラフィーの結果を示すグラフである。

【図3】実験例4におけるSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)の結果を示す写真である。

10

【図4】実験例6におけるガスクロマトグラフィーの結果を示すグラフである。

【図5】実験例6におけるガスクロマトグラフィーの結果を示すグラフである。

【図6】実験例7の結果を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0009】

[分岐鎖脂肪酸の製造方法]

(第1実施形態)

1実施形態において、本発明は、下記(i-1)又は(i-2)に記載のタンパク質、及び下記(ii-1)又は(ii-2)に記載のタンパク質を発現させた宿主をインキュベートすることにより、前記宿主中の不飽和脂肪酸の下記式(1)で表される基にメチル基が導入されて下記式(2)で表される基を有する分岐鎖脂肪酸が合成される工程を備える、下記式(2)で表される基を有する分岐鎖脂肪酸の製造方法を提供する。

20

(i-1)配列番号1に記載の塩基配列にコードされるタンパク質

(i-2)配列番号1に記載の塩基配列と70%以上の配列同一性を有する塩基配列にコードされ且つオレイン酸を10-メチレンステアリン酸に変化させる活性を有するタンパク質

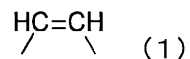
(ii-1)配列番号2に記載の塩基配列にコードされるタンパク質

(ii-2)配列番号2に記載の塩基配列と70%以上の配列同一性を有する塩基配列にコードされ且つ10-メチレンステアリン酸を10-メチルステアリン酸に変化させる活性を有するタンパク質

30

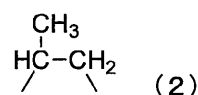
【0010】

【化6】



【0011】

【化7】



40

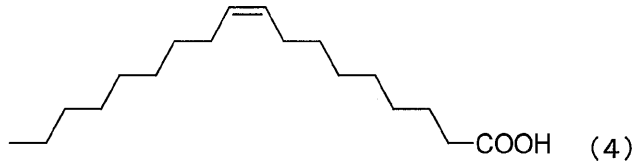
【0012】

ここで、10-メチレンステアリン酸は、オレイン酸の10位の炭素原子にメチレン基が結合した脂肪酸であり、10-メチレンオクタデカン酸とも呼ばれる。また、10-メチルステアリン酸は、オレイン酸の二重結合部分にメチル基が導入された分岐脂肪酸であり、10-メチルオクタデカン酸、ツベルクロステアリン酸とも呼ばれる。10-メチルステアリン酸は、結核菌であるマイコバクテリウム・ツベルクローシス等の細菌の膜リン脂質に大量に含まれていることが知られている。下記式(4)にオレイン酸の化学式を示し、下記式(5)に10-メチレンステアリン酸の化学式を示し、下記式(6)に10-メチルステアリン酸の化学式を示す。

【0013】

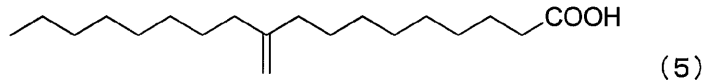
50

【化 8】



【0014】

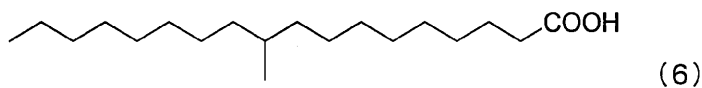
【化 9】



10

【0015】

【化 10】



【0016】

配列同一性とは、対象の塩基配列が、基準となる塩基配列（基準塩基配列）に対して一致している割合を示す値である。基準塩基配列に対する、対象塩基配列の配列同一性は、例えば次のようにして求めることができる。まず、基準塩基配列及び対象塩基配列をアラインメントする。ここで、各塩基配列には、配列同一性が最大となるようにギャップを含めてもよい。続いて、基準塩基配列及び対象塩基配列において、一致した塩基の塩基数を算出し、下記式（1）にしたがって、配列同一性を求めることができる。

20

$$\text{配列同一性 (\%)} = \frac{\text{一致した塩基数}}{\text{対象塩基配列の総塩基数}} \times 100 \quad (1)$$

【0017】

実施例において後述するように、配列番号 1 に記載の塩基配列にコードされるタンパク質は、S-アデノシルメチオニン (SAMM4) dependent methyl transferase の一種である（以下、「SAMM4 タンパク質」という場合がある。SAMM4 タンパク質の RefSeq アクセッション番号は WP_048472121 である。また、SAMM4 タンパク質をコードする遺伝子を「SAMM4 遺伝子」又は「BfaB 遺伝子」という場合がある。）。

30

【0018】

また、配列番号 2 に記載の塩基配列にコードされるタンパク質は、フラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) - linked oxidoreductase の一種である（以下、「FADO タンパク質」という場合がある。FADO タンパク質の RefSeq アクセッション番号は WP_048472120 である。また、FADO タンパク質をコードする遺伝子を「FADO 遺伝子」又は「BfaA 遺伝子」という場合がある。）。

40

【0019】

実施例において後述するように、発明者らは、大腸菌に SAMM4 タンパク質を発現させ、オレイン酸を与えても、オレイン酸から 10-メチルステアリン酸は合成されないことを明らかにした。更に、発明者らは、大腸菌に SAMM4 タンパク質及び FADO タンパク質を発現させ、オレイン酸を与えると、オレイン酸から 10-メチルステアリン酸が合成されることを明らかにした。

【0020】

すなわち、SAMM4 タンパク質及び FADO タンパク質の両者が存在する場合に、不飽和脂肪酸の上記式 (1) で表される基にメチル基が導入されて上記式 (2) で表される基を有する分岐鎖脂肪酸が合成される。

【0021】

50

不飽和脂肪酸から分岐鎖脂肪酸を合成するために、SAMM4タンパク質及びFADOタンパク質の双方が必要であることは、発明者らが今回初めて明らかにしたものである。本実施形態の製造方法により、分岐鎖脂肪酸を製造することができる。

【0022】

実施例において後述するように、ロドコッカス・エリスロポリス、ロドコッカス・ラバー、ノカルディア・ブラシリエンシスのSAMM4タンパク質及びFADOタンパク質も、本実施形態の製造方法に用いることができる。そして、実施例において後述するように、ロドコッカス・エリスロポリス、ロドコッカス・ラバー、ノカルディア・ブラシリエンシスのSAMM4遺伝子の塩基配列は、マイコバクテリウム・クロロフェノリカムのSAMM4遺伝子の塩基配列とそれぞれ76%、79%、79%の配列同一性を有していた。

10

【0023】

したがって、SAMM4タンパク質をコードする塩基配列は、オレイン酸を10-メチレンステアリン酸に変化させる活性を有するタンパク質をコードしている限り、配列番号1に記載の塩基配列と70%以上、例えば75%以上、例えば80%以上、例えば85%以上、例えば90%以上、例えば95%以上、例えば99%以上の配列同一性を有していれば、配列番号1の記載の塩基配列に対して変異を有していてもよいといえる。本明細書において、配列番号1に記載の塩基配列と70%以上の配列同一性を有し且つオレイン酸を10-メチレンステアリン酸に変化させる活性を有するタンパク質をSAMM4タンパク質の変異体という場合がある。

【0024】

また、実施例において後述するように、ロドコッカス・エリスロポリス、ロドコッカス・ラバー、ノカルディア・ブラシリエンシスのFADO遺伝子の塩基配列は、マイコバクテリウム・クロロフェノリカムのFADO遺伝子の塩基配列とそれぞれ75%、77%、77%の配列同一性を有していた。

20

【0025】

したがって、FADOタンパク質をコードする塩基配列は、10-メチレンステアリン酸を10-メチルステアリン酸に変化させる活性を有している限り、配列番号2に記載の塩基配列と70%以上、例えば75%以上、例えば80%以上、例えば85%以上、例えば90%以上、例えば95%以上、例えば99%以上の配列同一性を有していれば、配列番号2の記載の塩基配列に対して変異を有していてもよいといえる。本明細書において、配列番号2に記載の塩基配列と70%以上の配列同一性を有し且つ10-メチレンステアリン酸を10-メチルステアリン酸に変化させる活性を有するタンパク質をFADOタンパク質の変異体という場合がある。

30

【0026】

上記式(1)で表される基は、不飽和脂肪酸の二重結合部分を含む2個の基である。また、上記式(2)で表される基は、上記式(1)で表される基にメチル基が導入されて形成された基であり、脂肪酸の分岐鎖を含む。上記式(2)で表される基を有する脂肪酸は分岐鎖脂肪酸である。

【0027】

本実施形態の製造方法において、不飽和脂肪酸は、上記式(1)で表される基を有するものであれば特に限定されず、直鎖状であってもよく、分岐鎖状であってもよい。また、不飽和脂肪酸は二重結合を1個有する脂肪酸であってもよく2個以上有する脂肪酸であってもよいが、二重結合を1個有する脂肪酸であることが好ましい。

40

【0028】

本実施形態の製造方法において、不飽和脂肪酸及び分岐鎖脂肪酸は特に限定されず、例えば、不飽和脂肪酸がオレイン酸であり、目的生産物である分岐鎖脂肪酸が10-メチルステアリン酸であってもよい。

【0029】

本実施形態の製造方法において、不飽和脂肪酸は、遊離していてもよいし、リン脂質等を形成していてもよいし、脂肪酸の金属塩等を形成していてもよい。

50

【 0 0 3 0 】

第1実施形態の製造方法は、宿主内でS A M M 4タンパク質及びF A D Oタンパク質を発現させて分岐鎖脂肪酸を製造する方法である。ここで、宿主は、通常、上記式(2)で表される基を有する分岐鎖脂肪酸を製造しない宿主であってもよい。宿主としては、取り扱いが容易なものであれば特に限定されず、例えば、大腸菌、シアノバクテリア、カビ、ラビリンチュラ類、微細藻類等が挙げられる。

【 0 0 3 1 】

宿主は、製造目的の分岐鎖脂肪酸の材料となる不飽和脂肪酸を合成する生物であってもよいし、製造目的の分岐鎖脂肪酸の材料となる不飽和脂肪酸を合成しない生物であってもよい。

10

【 0 0 3 2 】

例えば、オレイン酸を材料として10-メチルステアリン酸を製造する場合、宿主としてはオレイン酸を合成しない大腸菌を用いてもよいし、オレイン酸を合成するシアノバクテリアを用いてもよい。

【 0 0 3 3 】

製造目的の分岐鎖脂肪酸の材料となる不飽和脂肪酸を合成しない生物を宿主とする場合には、宿主に不飽和脂肪酸を与えて分岐鎖脂肪酸を製造するとよい。したがって、第1実施形態の製造方法は、宿主に不飽和脂肪酸を与える工程を更に備えていてもよい。宿主に不飽和脂肪酸を与える方法としては、例えば、宿主の培地に不飽和脂肪酸を添加することが挙げられる。この場合、不飽和脂肪酸は、不飽和脂肪酸の金属塩の形態で培地に添加してもよい。

20

【 0 0 3 4 】

また、製造目的の分岐鎖脂肪酸の材料となる不飽和脂肪酸を合成する生物を宿主とする場合には、宿主に不飽和脂肪酸を与えなくても分岐鎖脂肪酸を製造することができる。また、製造目的の分岐鎖脂肪酸の材料となる不飽和脂肪酸を合成する生物を宿主とする場合であっても、宿主に不飽和脂肪酸を与えて分岐鎖脂肪酸を製造してもよい。

【 0 0 3 5 】

例えば、大腸菌を宿主として10-メチルステアリン酸を製造する場合、大腸菌の培地にオレイン酸を添加すればよい。また、シアノバクテリアを宿主として10-メチルステアリン酸を製造する場合、原料となるオレイン酸を添加しなくても10-メチルステアリン酸を製造することができる。

30

【 0 0 3 6 】

宿主をインキュベートする条件は、宿主の種類や製造目的の分岐鎖脂肪酸等に応じて適宜設定することができる。また、第1実施形態の製造方法は、宿主から上記式(2)で表される基を有する分岐鎖脂肪酸を回収する工程を更に備えていてもよい。

【 0 0 3 7 】

第1実施形態の製造方法は、一般的なバイオリクターを用いて実施することができる。バイオリクターは、宿主をインキュベートする容器を備えており、容器内で分岐鎖脂肪酸が製造される。ここで、宿主は培地中に浮遊した状態でインキュベートされてもよいし、樹脂、多糖類等から構成された担体に固定化された状態でインキュベートされてもよい。宿主が固定化されていると、宿主の取り扱いが容易になる、製造した分岐鎖脂肪酸の回収が容易になる等好ましい場合がある。バイオリクターを用いて分岐鎖脂肪酸を製造する場合、分岐鎖脂肪酸の製造はバッチ式で実施してもよいし、連続式で実施してもよい。

40

【 0 0 3 8 】

(第2実施形態)

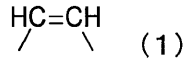
第2実施形態に係る分岐鎖脂肪酸の製造方法は、不飽和脂肪酸に、上記(i-1)又は(i-2)に記載のタンパク質を反応させることにより、前記不飽和脂肪酸の下記式(1)で表される基にメチレン基が導入されて下記式(3)で表される基を有する脂肪酸が合成される工程と、下記式(3)で表される基を有する前記脂肪酸に、上記(ii-1)又

50

は (i i - 2) に記載のタンパク質を反応させることにより、下記式 (2) で表される基を有する分岐鎖脂肪酸が合成される工程と、を備える。

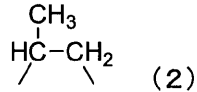
【 0 0 3 9 】

【 化 1 1 】



【 0 0 4 0 】

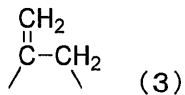
【 化 1 2 】



10

【 0 0 4 1 】

【 化 1 3 】



【 0 0 4 2 】

第 2 実施形態の製造方法は、インビトロで分岐鎖脂肪酸を製造する方法である。上述したように、上記 (i - 1) 又は (i - 2) に記載のタンパク質は、S A M M 4 タンパク質又はその変異体であり、上記 (i i - 1) 又は (i i - 2) に記載のタンパク質は、F A D O タンパク質又はその変異体である。

20

【 0 0 4 3 】

第 2 実施形態の製造方法では、まず、不飽和脂肪酸に S A M M 4 タンパク質又はその変異体を反応させて、上記式 (3) で表される基を有する脂肪酸を合成する。続いて、上記式 (3) で表される基を有する脂肪酸に F A D O タンパク質又はその変異体を反応させて、製造目的である上記式 (2) で表される基を有する分岐鎖脂肪酸を合成する。

【 0 0 4 4 】

第 2 実施形態の製造方法において、不飽和脂肪酸、分岐鎖脂肪酸、S A M M 4 タンパク質又はその変異体、F A D O タンパク質又はその変異体は、第 1 実施形態において上述したものと同様である。

30

【 0 0 4 5 】

第 2 実施形態の製造方法において、不飽和脂肪酸及び分岐鎖脂肪酸は特に限定されず、例えば、不飽和脂肪酸がオレイン酸であり、目的生産物である分岐鎖脂肪酸が 10 - メチルステアリン酸であってもよい。この場合、上記式 (3) で表される基を有する脂肪酸は、10 - メチレンステアリン酸である。

【 0 0 4 6 】

また、第 2 実施形態の製造方法は、反応系から上記式 (2) で表される基を有する分岐鎖脂肪酸を回収する工程を更に備えていてもよい。

【 0 0 4 7 】

第 2 実施形態の製造方法は、一般的なバイオリクターを用いて実施することができる。バイオリクターは、反応槽を備えており、反応槽で分岐鎖脂肪酸が製造される。S A M M 4 タンパク質又はその変異体、及び F A D O タンパク質又はその変異体は、それぞれ、樹脂、多糖類等から構成された担体に固定化された状態で用いると取り扱いが容易である。

40

【 0 0 4 8 】

また、不飽和脂肪酸の二重結合部分にメチレン基が導入される工程、及び、メチレン基が導入された前記脂肪酸が分岐鎖脂肪酸に変換される工程は、別々の反応槽で実施されてもよいし、同一の反応槽で実施されてもよい。また、第 2 実施形態の製造方法も、第 1 実施形態の製造方法と同様に、バッチ式で実施してもよいし、連続式で実施してもよい。

【 0 0 4 9 】

50

[不飽和脂肪酸から分岐鎖脂肪酸を製造するためのキット]

(第 1 実施形態)

1 実施形態において、本発明は、上記 (i - 1) 又は (i - 2) に記載のタンパク質、及び上記 (i i - 1) 又は (i i - 2) に記載のタンパク質を備える、不飽和脂肪酸から上記式 (2) で表される基を有する分岐鎖脂肪酸を製造するためのキットを提供する。

【 0 0 5 0 】

上述したように、上記 (i - 1) 又は (i - 2) に記載のタンパク質は、S A M M 4 タンパク質又はその変異体であり、上記 (i i - 1) 又は (i i - 2) に記載のタンパク質は、F A D O タンパク質又はその変異体である。

【 0 0 5 1 】

本実施形態のキットにおいて、不飽和脂肪酸、分岐鎖脂肪酸、S A M M 4 タンパク質又はその変異体、F A D O タンパク質又はその変異体は、分岐鎖脂肪酸の製造方法の実施形態において上述したものと同様である。本実施形態のキットは、上述した第 2 実施形態の製造方法に好適に用いることができる。

【 0 0 5 2 】

本実施形態の製造方法において、不飽和脂肪酸及び分岐鎖脂肪酸は特に限定されず、例えば、不飽和脂肪酸がオレイン酸であり、目的生産物である分岐鎖脂肪酸が 1 0 - メチルステアリン酸であってもよい。

【 0 0 5 3 】

(第 2 実施形態)

第 2 実施形態に係るキットは、下記 (i i i - 1) 又は (i i i - 2) に記載の核酸、及び下記 (i v - 1) 又は (i v - 2) に記載の核酸を備える、不飽和脂肪酸から上記式 (2) で表される基を有する分岐鎖脂肪酸を製造するためのものである。

(i i i - 1) 配列番号 1 に記載の塩基配列からなる核酸

(i i i - 2) 配列番号 1 に記載の塩基配列と 7 0 % 以上の配列同一性を有し且つオレイン酸を 1 0 - メチレンステアリン酸に変化させる活性を有するタンパク質をコードする核酸

(i v - 1) 配列番号 2 に記載の塩基配列からなる核酸

(i v - 2) 配列番号 2 に記載の塩基配列と 7 0 % 以上の配列同一性を有し且つ 1 0 - メチレンステアリン酸を 1 0 - メチルステアリン酸に変化させるタンパク質をコードする核酸

【 0 0 5 4 】

ここで、上記 (i i i - 1) 又は (i i i - 2) に記載の核酸は、S A M M 4 タンパク質又はその変異体をコードする核酸であり、上記 (i v - 1) 又は (i v - 2) に記載の核酸は、F A D O タンパク質又はその変異体をコードする核酸である。

【 0 0 5 5 】

本実施形態のキットにおいて、不飽和脂肪酸、分岐鎖脂肪酸、S A M M 4 タンパク質又はその変異体、F A D O タンパク質又はその変異体は、分岐鎖脂肪酸の製造方法の実施形態において上述したものと同様である。本実施形態のキットは、例えば、S A M M 4 タンパク質又はその変異体をコードする核酸、及び F A D O タンパク質又はその変異体をコードする核酸を、発現可能に宿主に導入することにより、上述した第 1 実施形態の製造方法に好適に用いることができる。

【 0 0 5 6 】

第 2 実施形態のキットにおいて、S A M M 4 タンパク質又はその変異体をコードする核酸は、ベクターに組み込まれていてもよい。また、F A D O タンパク質又はその変異体をコードする核酸は、ベクターに組み込まれていてもよい。

【 0 0 5 7 】

更に、S A M M 4 タンパク質又はその変異体をコードする核酸、及び F A D O タンパク質又はその変異体をコードする核酸は、それぞれ独立したベクターに組み込まれていてもよいし、1 個のベクターに組み込まれていてもよい。また、上記のベクターは発現ベクタ

10

20

30

40

50

ーであってもよい。発現ベクターのプロモーターは、使用する宿主内で機能可能なものを適宜選択して用いることができる。

【0058】

本実施形態の製造方法において、不飽和脂肪酸及び分岐鎖脂肪酸は特に限定されず、例えば、不飽和脂肪酸がオレイン酸であり、目的生産物である分岐鎖脂肪酸が10-メチルステアリン酸であってもよい。

【0059】

[宿主]

1実施形態において、本発明は、上記(i-1)又は(i-2)に記載のタンパク質の発現ベクター、及び上記(ii-1)又は(ii-2)に記載のタンパク質の発現ベクター、が導入された宿主を提供する。

10

【0060】

ここで、宿主としては、第1実施形態の製造方法において上述したものと同様であり、例えば、大腸菌、シアノバクテリア、カビ、ラビリンチュラ類、微細藻類等が挙げられる。

【0061】

本実施形態の宿主において、上記(i-1)又は(i-2)に記載のタンパク質は、SAMM4タンパク質又はその変異体であり、上記(ii-1)又は(ii-2)に記載のタンパク質は、FADOタンパク質又はその変異体である。また、SAMM4タンパク質又はその変異体、FADOタンパク質又はその変異体は、分岐鎖脂肪酸の製造方法の実施形態において上述したものと同様である。

20

【0062】

ここで、「発現ベクターが導入された宿主」とは、SAMM4タンパク質又はその変異体、及びFADOタンパク質又はその変異体を発現可能に構成された宿主であれば特に限定されない。

【0063】

例えば、SAMM4タンパク質又はその変異体の発現ベクター、及びFADOタンパク質又はその変異体の発現ベクターが宿主のゲノムに組み込まれた宿主であってもよい。あるいは、SAMM4タンパク質又はその変異体の発現ベクター、及びFADOタンパク質又はその変異体の発現ベクターが、宿主のゲノムには組み込まれておらず、エピソーマルに維持された宿主であってもよい。

30

【0064】

また、SAMM4タンパク質又はその変異体をコードする核酸、及びFADOタンパク質又はその変異体をコードする核酸は、それぞれ独立したベクターに組み込まれていてもよいし、1個のベクターに組み込まれていてもよい。

【0065】

本実施形態の宿主は、上述した第1実施形態の製造方法に好適に用いることができる。すなわち、本実施形態の宿主は、上記式(2)で表される基を有する分岐鎖脂肪酸の製造用であるということもできる。

【実施例】

40

【0066】

次に実施例を示して本発明を更に詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

【0067】

[実験例1]

(大腸菌におけるUmaAタンパク質の発現)

非特許文献1には、マイコバクテリウム・ツベルクローシスのumaA(Rv0469)遺伝子にコードされるUmaAタンパク質が、オレイン酸の二重結合にメチル基を導入する酵素であると記載されている。

【0068】

50

そこで、これが事実であるか否かを確認した。まず、*umaA* 遺伝子の発現ベクターを作製し、大腸菌 *rosetta2* 株に導入した。配列番号 3 に *umaA* 遺伝子の塩基配列を示す。また、大腸菌はオレイン酸を合成しないため、大腸菌の培地に終濃度 1 mM のオレイン酸ナトリウムを添加した。続いて、18 時間培養後、脂肪酸組成を解析した。

【0069】

《脂肪酸組成の解析》

まず、培地を遠心して大腸菌を回収した。続いて、大腸菌の沈殿を 2 mL のメタノールに懸濁し、懸濁液をガラス試験管に移した。続いて、遠心濃縮機（型式「CC-105」、トミー精工）で遠心しながら完全に乾燥させた。続いて、沈殿を 0.1 M 塩酸メタノール溶液に再懸濁した。

10

【0070】

続いて、チューブを強く閉め、100 で 1 時間インキュベートし、脂質中のアシル基をけん化して脂肪酸メチルエステルに変換した。続いて、得られた脂肪酸メチルエステルに *n*-ヘキサンを添加した。続いて、ヘキサン相を回収してヘキサンを蒸発させ、脂肪酸メチルエステルを含む残渣を 100 μ L の *n*-ヘキサンに溶解させた。続いて、1 μ L のヘキサン溶液をガスクロマトグラフ（型式「GC-2014」、島津製作所）に導入し、脂肪酸組成を解析した。

【0071】

その結果、10-メチルステアリン酸のピークは検出されないことが明らかとなった。この結果は、少なくとも *UmaA* タンパク質の発現のみでは、オレイン酸から 10-メチルステアリン酸を合成することができないことを示す。

20

【0072】

[実験例 2]

（大腸菌における *SAMM1* (WP__048471942)、*SAMM4* (WP__048472121)、*SAMM7* (WP__048471691) タンパク質の発現)

実験例 1 の結果から、既知の酵素ではオレイン酸から 10-メチルステアリン酸を合成することができないことが明らかとなった。そこで、オレイン酸から 10-メチルステアリン酸を合成する酵素の探索を行った。

【0073】

具体的には、まず、10-メチルステアリン酸の合成において、オレイン酸に導入されるメチル基の供与体は、*S*-アデノシルメチオニン (*SAM*) であると予測した。そして、*SAM* dependent methyl transferase であるとアノテーションされた様々な菌株のタンパク質のアミノ酸配列を公共データベースから抽出し、系統樹を作成した。

30

【0074】

続いて、*SAM* dependent methyl transferase を有する菌株のうち、分岐鎖脂肪酸を産生し、全ゲノムが解読されており、遺伝子を入手可能であり、P1 レベルで実験可能であること等から、*Mycobacterium chlorophenolicum* を実験対象として選択し、以降の実験を行った。

【0075】

Mycobacterium chlorophenolicum には、*SAM* dependent methyl transferase とアノテーションされた遺伝子が 7 つ存在した。そこで、これらを、それぞれ、*SAMM1* (RefSeq アクセッション番号: WP__048471942)、*SAMM2* (RefSeq アクセッション番号: WP__048473846)、*SAMM3* (RefSeq アクセッション番号: WP__048471080)、*SAMM4* (RefSeq アクセッション番号: WP__048472121)、*SAMM5* (RefSeq アクセッション番号: WP__048471690)、*SAMM6* (RefSeq アクセッション番号: WP__048473845)、*SAMM7* (RefSeq アクセッション番号: WP__048471691) と呼ぶことにした。

40

【0076】

50

続いて、S A M M 1 遺伝子、S A M M 4 遺伝子、S A M M 7 遺伝子の発現ベクターをそれぞれ作製し、大腸菌 *r o s e t t a 2* 株にそれぞれ導入した。配列番号 4 に S A M M 1 遺伝子の塩基配列を示し、配列番号 1 に S A M M 4 遺伝子の塩基配列を示し、配列番号 5 に S A M M 7 遺伝子の塩基配列を示す。

【 0 0 7 7 】

また、大腸菌はオレイン酸を合成しないため、大腸菌の培地に終濃度 1 m M のオレイン酸ナトリウムを添加した。続いて、1 8 時間培養後、実験例 1 と同様にして脂肪酸組成を解析した。

【 0 0 7 8 】

図 1 (a) 及び (b) は各大腸菌の脂肪酸組成を解析したガスクロマトグラフィーの結果を示すグラフである。図 1 (b) は、図 1 (a) の四角で囲んだ部分を拡大した図である。図 1 (a) 及び (b) 中、「 1 6 : 1⁷ 」は 7 - ヘキサデセン酸を表し、「 1 6 : 1⁹ 」はパルミトレイン酸を表し、「 1 6 : 0 」はヘキサデカン酸を表し、「 1 7 : 1 c y c l o⁹ 」はシス - 9 , 1 0 - メチレンヘキサデカン酸を表し、「 1 8 : 1⁹ 」はオレイン酸を表し、「 1 8 : 1¹¹ 」はバクセン酸を表し、「 1 8 : 0 」はステアリン酸を表し、「 1 9 : 0 M e 1 0 」は 1 0 - メチルステアリン酸を表し、「対照」は、S A M M 1、S A M M 4、S A M M 7 遺伝子を導入していない大腸菌 *r o s e t t a 2* 株の結果であることを表す。

10

【 0 0 7 9 】

その結果、S A M M 1、S A M M 4、S A M M 7 遺伝子を発現させた大腸菌のいずれにおいても 1 0 - メチルステアリン酸のピークが検出されないことが明らかとなった。この結果は、少なくとも S A M M 1、S A M M 4、S A M M 7 遺伝子の単独発現のみでは、オレイン酸から 1 0 - メチルステアリン酸を合成することができないことを示す。

20

【 0 0 8 0 】

[実験例 3]

(大腸菌における F A D O 及び S A M M 4 タンパク質の発現)

実験例 2 の結果を受け、発明者らは、オレイン酸から 1 0 - メチルステアリン酸を合成するために、S A M M 1 ~ S A M M 7 遺伝子以外に必要な遺伝子が存在すると予測した。そして、その遺伝子は、ゲノム上 S A M M 1 ~ S A M M 7 遺伝子の近くに存在すると予測した。そこで、S A M M 1 ~ S A M M 7 遺伝子の周辺遺伝子を調査した。

30

【 0 0 8 1 】

その結果、S A M M 4 遺伝子上流にフラビンアデニンジヌクレオチド (F A D) - l i n k e d o x i d o r e d u c t a s e とアノテーションされたタンパク質 (以下、「 F A D O 」という。) をコードする遺伝子が存在することを見出した。配列番号 2 に、F A D O 遺伝子の塩基配列を示す。

【 0 0 8 2 】

F A D O 遺伝子と S A M M 4 遺伝子の特徴的な関係として、F A D O 遺伝子の 3 ' 末端と S A M M 4 遺伝子の 5 ' 末端が 4 塩基分オーバーラップしていることを見出された。このことから、発明者らは、F A D O 及び S A M M 4 は常に同時に発現していると予測した。配列番号 6 に、マイコバクテリウム・クロロフェノリカムの F A D O 遺伝子の 3 ' 末端と S A M M 4 遺伝子の 5 ' 末端が 4 塩基分オーバーラップしている領域の塩基配列を示す。

40

【 0 0 8 3 】

なお、分岐鎖脂肪酸を合成するマイコバクテリウム・クロロフェノリカム以外の菌株のゲノムを調べたところ、ロドコッカス・エリスロポリス、ロドコッカス・ラバー、ノカルディア・ブラシリエンシス等の菌株においても、F A D O 遺伝子及び S A M M 4 遺伝子が 4 塩基分オーバーラップして存在していることが確認された。

【 0 0 8 4 】

そこで、まず、F A D O 遺伝子と S A M M 4 遺伝子が 4 塩基分オーバーラップしたものをそのまま発現ベクターにクローニングし、大腸菌 *r o s e t t a 2* 株に導入した。また

50

、大腸菌はオレイン酸を合成しないため、大腸菌の培地に終濃度 1 m M のオレイン酸ナトリウムを添加した。続いて、18 時間培養後、実験例 1 と同様にして脂肪酸組成を解析した。

【0085】

図 2 は大腸菌の脂肪酸組成を解析したガスクロマトグラフィーの結果を示すグラフである。図 2 中、「16 : 1⁹」はパルミトレイン酸を表し、「16 : 1⁷」は 7 - ヘキサデセン酸を表し、「16 : 0」はヘキサデカン酸を表し、「17 : 1 c y c l o⁹」はシス - 9 , 10 - メチレンヘキサデカン酸を表し、「18 : 1⁹」はオレイン酸を表し、「18 : 1¹¹」はパクセン酸を表し、「18 : 0」はステアリン酸を表し、「19 : 0 M e 1 0」は 10 - メチルステアリン酸を表し、「19 : 1 c y c l o⁹」はシス - 9 , 10 - メチレンオクタデカン酸を表し、「19 : 1 c y c l o¹¹」はシス - 11 , 12 - メチレンオクタデカン酸を表し、「F A D O - S A M M 4」は F A D O 遺伝子と S A M M 4 遺伝子が 4 塩基分オーバーラップしたものをそのまま大腸菌に導入した結果であることを表し、「対照」は遺伝子を導入していない大腸菌の結果であることを表し、「+」はイソプロピル - チオガラクトピラノシド (I P T G) の添加により発現誘導した結果であることを表し、「-」は発現誘導していない結果であることを表す。

10

【0086】

その結果、F A D O 遺伝子と S A M M 4 遺伝子が 4 塩基分オーバーラップしたものをそのまま発現させた大腸菌では 10 - メチルステアリン酸のピークが検出されないことが明らかとなった。

20

【0087】

[実験例 4]

(大腸菌における F A D O 及び S A M M 4 タンパク質の発現の検出)

実験例 3 の結果を受けて、F A D O 遺伝子と S A M M 4 遺伝子が 4 塩基分オーバーラップしたものをそのまま発現させた大腸菌における、F A D O タンパク質及び S A M M 4 タンパク質の発現を、S D S ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (S D S - P A G E) により確認した。また、比較のために、空のベクターを導入した大腸菌、及び S A M M 4 遺伝子のみを発現ベクターを導入した大腸菌についても同様の検討を行った。

【0088】

図 3 は、S D S - P A G E の結果を示す写真である。図 3 中、「+」は I P T G の添加により発現誘導した結果であることを表し、「-」は発現誘導していない結果であることを表し、「対照」は空のベクターを導入した大腸菌の結果であることを表し、「S A M M 4」は S A M M 4 遺伝子のみを発現ベクターを導入した大腸菌の結果であることを表し、「F A D O - S A M M 4」は F A D O 遺伝子と S A M M 4 遺伝子が 4 塩基分オーバーラップしたものをそのまま発現させた大腸菌の結果であることを表し、「M」は分子量マーカ-を表し、矢印は F A D O タンパク質及び S A M M 4 タンパク質を示す。

30

【0089】

その結果、F A D O 遺伝子と S A M M 4 遺伝子が 4 塩基分オーバーラップしたものをそのまま発現させた大腸菌では、プロモーターの直下に位置する F A D O タンパク質のみしか発現していないことが明らかとなった。

40

【0090】

[実験例 5]

(発現ベクターの改変)

実験例 4 の結果から、F A D O 遺伝子と S A M M 4 遺伝子が 4 塩基分オーバーラップしたものをそのまま大腸菌発現させても、F A D O タンパク質のみしか発現しないことが明らかとなった。この結果から、マイコバクテリウム・クロロフェノリカム由来の塩基配列では、大腸菌内で s e q u e n c e t o s t a r t t r a n s l a t i o n (シャイン・ダルガノ配列、Shine - Dalgarno sequence、SD 配列) が機能しないために、F A D O タンパク質のみしか発現しないことが考えられた。

【0091】

50

そこで、F A D O 遺伝子と S A M M 4 遺伝子が 4 塩基分オーバーラップした遺伝子の発現ベクターに対し、以下のストラテジー 1 及びストラテジー 2 の 2 種類の方法により改変を加え、大腸菌内で F A D O 遺伝子及び S A M M 4 遺伝子の双方を発現させることを試みた。

【 0 0 9 2 】

《ストラテジー 1》

S A M M 4 遺伝子上流の塩基配列を、コドンを変化させないように A G リッチにした塩基配列に改変した。配列番号 7 に、ストラテジー 1 により改変後の、F A D O 遺伝子の 3' 末端と S A M M 4 遺伝子の 5' 末端を含む領域の塩基配列を示す。

【 0 0 9 3 】

《ストラテジー 2》

S A M M 4 遺伝子上流に、大腸菌内で機能する新たな S D 配列を挿入した。配列番号 8 に、ストラテジー 2 により改変後の、F A D O 遺伝子の 3' 末端と S A M M 4 遺伝子の 5' 末端を含む領域の塩基配列を示す。

【 0 0 9 4 】

[実験例 6]

(オレイン酸の 10 - メチルステアリン酸への変換)

実験例 5 で改変した、ストラテジー 1 (s t 1) 及びストラテジー 2 (s t 2) の発現ベクターをそれぞれ大腸菌 r o s e t t a 2 株に導入した。また、比較のために空のベクターを導入した大腸菌も用意した。また、大腸菌はオレイン酸を合成しないため、大腸菌の培地に終濃度 1 m M のオレイン酸ナトリウムを添加した。また、比較のために、培地にオレイン酸ナトリウムを添加しなかったものも用意した。続いて、18 時間培養後、実験例 1 と同様にして脂肪酸組成を解析した。

【 0 0 9 5 】

図 4 及び図 5 は大腸菌の脂肪酸組成を解析したガスクロマトグラフィーの結果を示すグラフである。図 4 は培地にオレイン酸ナトリウムを添加しなかった場合の結果であり、図 5 は培地にオレイン酸ナトリウムを添加した場合の結果である。

【 0 0 9 6 】

図 4 及び図 5 中、「s t 1」は実験例 5 のストラテジー 1 により改変した発現ベクターを導入した結果であることを表し、「s t 2」は実験例 5 のストラテジー 2 により改変した発現ベクターを導入した結果であることを表し、「対照」は空のベクターを導入した結果であることを表し、「s t a n d a r d」は 10 - メチルステアリン酸の標品を表し、「18 : 1⁹」はオレイン酸を表し、「18 : 0」はステアリン酸を表し、「19 : 0 M e 1 0」は 10 - メチルステアリン酸を表す。

【 0 0 9 7 】

その結果、図 4 に示すように、培地にオレイン酸ナトリウムを添加しなかった場合には、s t 1 及び s t 2 の発現ベクターのいずれを導入した大腸菌においても、10 - メチルステアリン酸のピークが検出されないことが確認された。

【 0 0 9 8 】

一方、図 5 に示すように、培地にオレイン酸ナトリウムを添加した場合には、s t 1 及び s t 2 の発現ベクターのいずれを導入した大腸菌においても、10 - メチルステアリン酸のピークが検出された。

【 0 0 9 9 】

更に、s t 2 の発現ベクターを導入した大腸菌における 10 - メチルステアリン酸のピークをガスクロマトグラフィー質量分析 (G C - M S) により解析した結果、標品の 10 - メチルステアリン酸と同一のマススペクトルを示すことが確認された。また、データベース上にある 10 - メチルステアリン酸のマススペクトルとも一致することが確認された。

【 0 1 0 0 】

以上の結果は、大腸菌内で F A D O 遺伝子及び S A M M 4 遺伝子の双方を発現させるこ

10

20

30

40

50

とにより、オレイン酸から10-メチルステアリン酸を合成できることを示す。

【0101】

以上の結果から、SAMM4タンパク質の活性により、オレイン酸が10-メチレンステアリン酸に変換され、続いてFADOTANタンパク質の活性により、10-メチレンステアリン酸が10-メチルステアリン酸に変換されると考えられた。

【0102】

また、上述したように、FADOTAN遺伝子とSAMM4遺伝子が4塩基分オーバーラップしている、ロドコッカス・エリスロポリス、ロドコッカス・ラバー、ノカルディア・ブラシリエンシスは、マイコバクテリウム・クロロフェノリカムと同様に不飽和脂肪酸の二重結合にメチル基を導入して分岐鎖脂肪酸を製造すると考えられる。

10

【0103】

そして、マイコバクテリウム・クロロフェノリカムのFADOTAN遺伝子と、ロドコッカス・エリスロポリス、ロドコッカス・ラバー、ノカルディア・ブラシリエンシスのFADOTAN遺伝子との配列同一性を算出した結果、それぞれ75%、77%、77%であることが明らかとなった。

【0104】

また、マイコバクテリウム・クロロフェノリカムのSAMM4遺伝子と、ロドコッカス・エリスロポリス、ロドコッカス・ラバー、ノカルディア・ブラシリエンシスのFADOTAN遺伝子との配列同一性を算出した結果、それぞれ76%、79%、79%であることが明らかとなった。

20

【0105】

したがって、マイコバクテリウム・クロロフェノリカムのFADOTAN遺伝子と概ね70%以上の配列同一性を有する塩基配列にコードされ且つ10-メチレンステアリン酸を10-メチルステアリン酸に変化させる活性を有するタンパク質は、マイコバクテリウム・クロロフェノリカムのFADOTAN遺伝子と同様に機能するといえる。

【0106】

また、マイコバクテリウム・クロロフェノリカムのSAMM4遺伝子と概ね70%以上の配列同一性を有する塩基配列にコードされ且つオレイン酸を10-メチレンステアリン酸に変化させる活性を有するタンパク質は、マイコバクテリウム・クロロフェノリカムのSAMM4遺伝子と同様に機能するといえる。

30

【0107】

[実験例7]

(st2の発現ベクターを導入した大腸菌における10-メチルステアリン酸の割合)

実験例6において、st2の発現ベクターを導入した大腸菌における、各脂肪酸の全脂肪酸に対する存在割合を測定した。対照として、空のベクターを導入した大腸菌における各脂肪酸の全脂肪酸に対する存在割合を測定した。

【0108】

図6は、脂肪酸の存在割合を測定した結果を示すグラフである。図6中、「14:0」はテトラデカン酸を表し、「16:0」はヘキサデカン酸を表し、「16:1⁷」は7-ヘキサデセン酸を表し、「16:1⁹」はパルミトレイン酸を表し、「17:1cy⁹」はシス-9,10-メチレンヘキサデカン酸を表し、「18:0」はステアリン酸を表し、「18:1⁹」はオレイン酸を表し、「18:1¹¹」はバクセン酸を表し、「19:1cy⁹」はシス-9,10-メチレンオクタデカン酸を表し、「19:1cy¹¹」はシス-11,12-メチレンヘキサデカン酸を表し、「19:0Me10」は10-メチルステアリン酸を表す。

40

【0109】

その結果、st2の発現ベクターを導入した大腸菌では、全脂肪酸の約1モル%程度の10-メチルステアリン酸が合成されることが明らかとなった。

【産業上の利用可能性】

【0110】

50

本発明によれば、分岐鎖脂肪酸を製造する技術を提供することができる。

【配列表フリーテキスト】

【0111】

配列番号1はSAMM4遺伝子の塩基配列である。

配列番号2はFADO遺伝子の塩基配列である。

配列番号3はumaA遺伝子の塩基配列である。

配列番号4はSAMM1遺伝子の塩基配列である。

配列番号5はSAMM7遺伝子の塩基配列である。

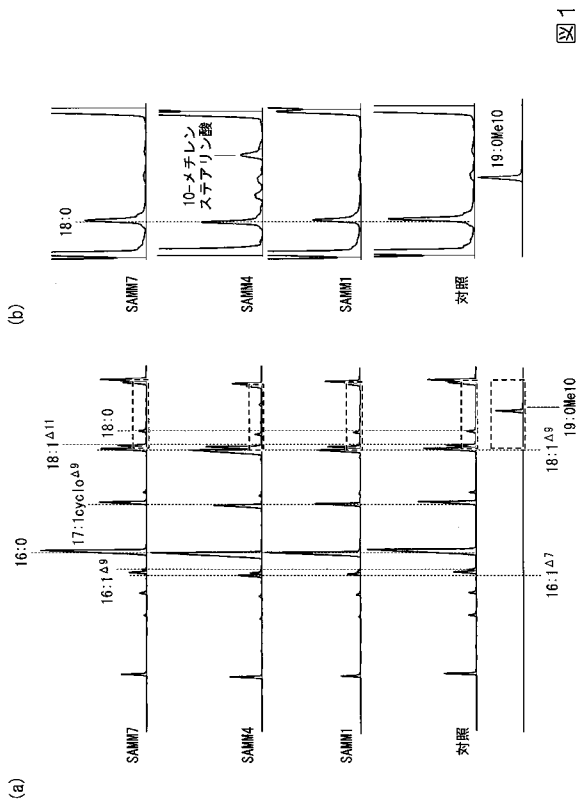
配列番号6は、マイコバクテリウム・クロロフェノリカムのFADO遺伝子の3'末端とSAMM4遺伝子の5'末端が4塩基分オーバーラップしている領域の塩基配列である

10

配列番号7は、実験例5のストラテジー1により改変後の、FADO遺伝子の3'末端とSAMM4遺伝子の5'末端を含む領域の塩基配列を示す。

配列番号8は、実験例5のストラテジー2により改変後の、FADO遺伝子の3'末端とSAMM4遺伝子の5'末端を含む領域の塩基配列を示す。

【図1】



【図2】

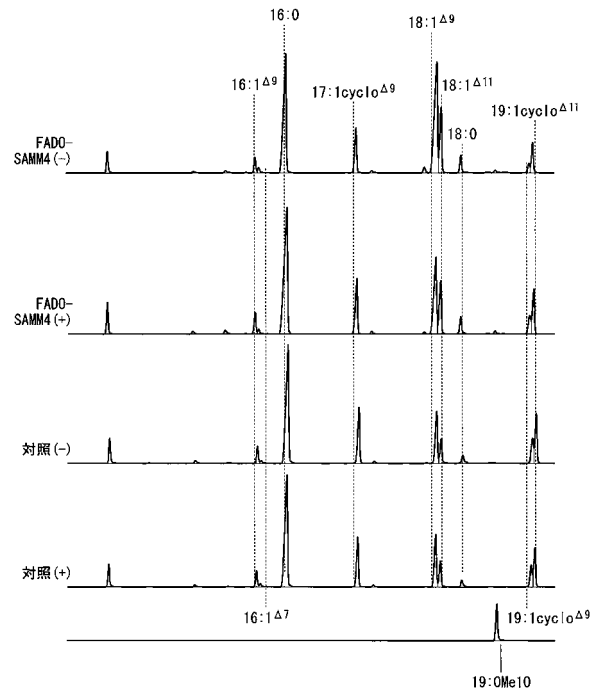


図2

【 图 3 】

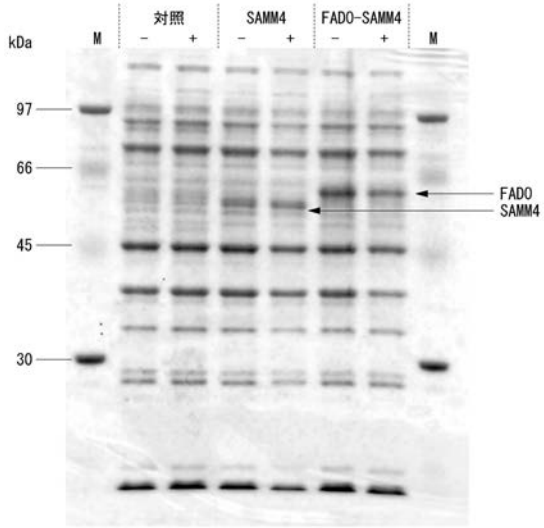


图 3

【 图 4 】

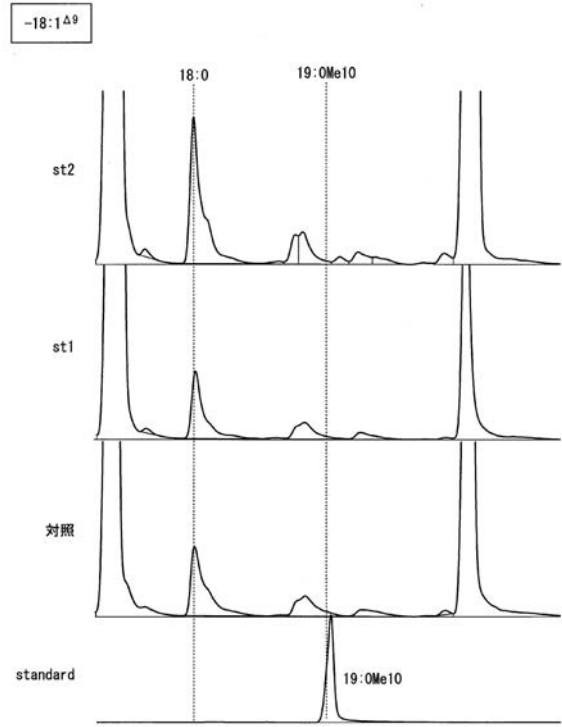


图 4

【 图 5 】

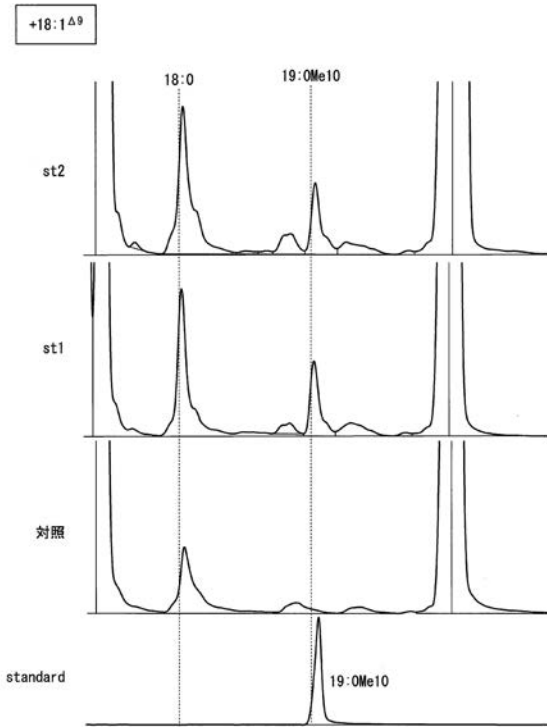


图 5

【 图 6 】

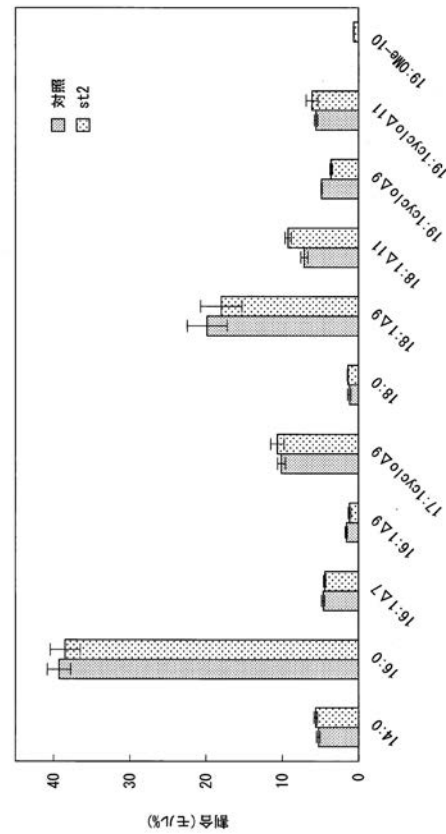


图 6

【配列表】

2019000015000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01) C 1 2 N 5/10

Fターム(参考) 4B064 AD02 AD87 CA02 CA19 CA21 CB16 CB30 CD07
4B065 AA01X AA26X AA36Y AB01 AC14 BA02 BB10 CA13 CA28 CA29