(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第6104361号
(P6104361)

(45)発行日　平成29年4月5日(2017.4.5)　(24)登録日　平成29年3月10日(2017.3.10)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA
C12N 1/15	(2006.01)	C12N	1/15	
C12N 1/19	(2006.01)	C12N	1/19	
C12N 1/21	(2006.01)	C12N	1/21	
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	5/10	

請求項の数 14　(全 20 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2015-504505 (P2015-504505)
(86)(22)出願日　平成25年4月5日(2013.4.5)
(65)公表番号　特表2015-517808 (P2015-517808A)
(43)公表日　平成27年6月25日(2015.6.25)
(86)国際出願番号　PCT/KR2013/002885
(87)国際公開番号　WO2013/151393
(87)国際公開日　平成25年10月10日(2013.10.10)
審査請求日　平成26年10月29日(2014.10.29)
(31)優先権主張番号　10-2012-0036372
(32)優先日　平成24年4月6日(2012.4.6)
(33)優先権主張国　韓国(KR)
(31)優先権主張番号　10-2012-0056029
(32)優先日　平成24年5月25日(2012.5.25)
(33)優先権主張国　韓国(KR)

(73)特許権者　514252784
イファ　ユニバーシティ－インダストリー　コラボレーション　ファウンデーション
大韓民国　１２０－７５０　ソウル　ソデムン－グ　イファヨデ－ギル　５２
(74)代理人　110000176
一色国際特許業務法人
(72)発明者　パク，チン　ピョン
大韓民国　１５０－９１８　ソウル　ヨンドゥンポ－グ　ヨイド－ドン　ヨイド　クシー　アパートメント　１０１－２４０３
(72)発明者　ソン，チ　ウォン
大韓民国　１５０－７９５　ソウル　ヨンドゥンポ－グ　ヨイド－ドン　ミソン　アパートメント　Ｃ－３０６

最終頁に続く

(54)【発明の名称】生物変換により長鎖脂肪酸から中鎖ω－ヒドロキシ脂肪酸、α，ω－ジカルボン酸、ω－アミノ脂肪酸を生産する方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

加水酵素をコードする遺伝子、アルコール脱水素酵素をコードする遺伝子、ＢＶＭＯをコードする遺伝子、及びエステル加水分解酵素をコードする遺伝子が導入された形質転換体であって、長鎖脂肪酸から中鎖ω－ヒドロキシ脂肪酸（ω－ｈｙｄｒｏｘｙ　ｆａｔｔｙ　ａｃｉｄ）、又はα，ω－ジカルボン酸（α，ω－ｄｉｃａｒｂｏｘｙｌｉｃ　ａｃｉｄ）を生成する形質転換体。

【請求項２】

前記長鎖脂肪酸としてオレイン酸（ｏｌｅｉｃ　ａｃｉｄ（Ｃ１８））を用いた場合、中鎖ω－ヒドロキシ脂肪酸としてω－ヒドロキシノナン酸（ω－ｈｙｄｒｏｘｙｎｏｎａｎｏｉｃ　ａｃｉｄ（Ｃ９））が生成される請求項１に記載の形質転換体。

【請求項３】

前記長鎖脂肪酸としてオレイン酸を用いた場合、α，ω－ジカルボン酸としてα，ω－デカン二酸（α，ω－ｄｅｃａｎｅｄｉｏｉｃ　ａｃｉｄ（Ｃ１０））が生成され、アルコールとしてオクタノール（Ｃ８）が生成される請求項１に記載の形質転換体。

【請求項４】

アルコール脱水素酵素をコードする遺伝子、ＢＶＭＯをコードする遺伝子、及びエステル加水分解酵素をコードする遺伝子が導入された形質転換体であって、ヒドロキシ長鎖脂肪酸から中鎖ω－ヒドロキシ脂肪酸を生成する形質転換体。

【請求項５】

前記ヒドロキシ長鎖脂肪酸としてリシノール酸（Ｃ１８）を用いた場合、中鎖ω－ヒドロキシ脂肪酸としてω－ヒドロキシウンデク－９－エン酸（ω－ｈｙｄｒｏｘｙｕｎｄｅｃ－９－ｅｎｏｉｃ ａｃｉｄ（Ｃ１１））が生成される請求項４に記載の形質転換体。

【請求項６】

前記ヒドロキシ長鎖脂肪酸としてレスクエロール酸（ｌｅｓｑｕｅｒｏｌｉｃ ａｃｉｄ（Ｃ２０））を用いた場合、中鎖ω－ヒドロキシ脂肪酸としてω－ヒドロキシトリデク－１１－エン酸（ω－ｈｙｄｒｏｘｙｔｒｉｄｅｃ－１１－ｅｎｏｉｃ ａｃｉｄ（Ｃ１３））が生成される請求項４に記載の形質転換体。

【請求項７】

アルコール脱水素酵素をコードする遺伝子がさらに導入され、前記長鎖脂肪酸としてオレイン酸（Ｃ１８）を用いた場合、α，ω－ジカルボン酸としてα，ω－ノナンニ酸（α，ω－ｎｏｎａｎｅｄｉｏｉｃ ａｃｉｄ（Ｃ９））が生成される請求項１に記載の形質転換体。

【請求項８】

加水酵素をコードする遺伝子、アルコール脱水素酵素をコードする遺伝子、ＢＶＭＯをコードする遺伝子、エステル加水分解酵素をコードする遺伝子、及びアミノ基転移酵素をコードする遺伝子が導入され、長鎖脂肪酸からω－アミノ脂肪酸を生成する形質転換体。

【請求項９】

前記長鎖脂肪酸としてオレイン酸（Ｃ１８）を用いた場合、ω－アミノ脂肪酸としてω－アミノノンナン酸（ω－ａｍｉｎｏｎｏｎａｎｏｉｃ ａｃｉｄ（Ｃ９））が生成される請求項８に記載の形質転換体。

【請求項１０】

（ａ）請求項１～９のいずれかの形質転換体と長鎖脂肪酸を反応させて反応物を得るステップと、

（ｂ）前記反応物から分解産物を回収するステップとを含む、長鎖脂肪酸から分解産物を生産する方法。

【請求項１１】

前記長鎖脂肪酸は、オレイン酸、リシノール酸（ｒｉｃｉｎｏｌｅｉｃ ａｃｉｄ）、１２－ヒドロキシステアリン酸（１２－ｈｙｄｒｏｘｙｓｔｅａｒｉｃ ａｃｉｄ）、リノレン酸（ｌｉｎｏｌｅｉｃ ａｃｉｄ）、パルミトレイン酸（ｐａｌｍｉｔｏｌｅｉｃ ａｃｉｄ）、レスクエロール酸又はそれらの組み合わせである請求項１０に記載の方法。

【請求項１２】

前記分解産物は、中鎖ω－ヒドロキシ脂肪酸、α，ω－ジカルボン酸、ω－アミノ脂肪酸、アルコール又はそれらの組み合わせである請求項１０に記載の方法。

【請求項１３】

前記分解産物は、炭素数５～１４の中鎖ω－ヒドロキシ脂肪酸、α，ω－ジカルボン酸、ω－アミノ脂肪酸、炭素数２～１４のノルマルアルコール又はそれらの組み合わせである請求項１０に記載の方法。

【請求項１４】

前記分解産物は、 ω－ヒドロキシノナン酸、ω－ヒドロキシウンデク－９－エン酸、ω－ヒドロキシトリデク－１１－エン酸、α，ω－ノナンニ酸（ａｚｅｌａｉｃ ａｃｉｄ）、α，ω－デカン二酸（ｓｅｂａｃｉｃ ａｃｉｄ）、 ω－アミノノンナン酸、ヘプタン酸（ｈｅｐｔａｎｏｉｃ ａｃｉｄ）、ノナン酸（ｎｏｎａｎｏｉｃ ａｃｉｄ）、ω－ヒドロキシウンデカン酸（ω－ｈｙｄｒｏｘｙｕｎｄｅｃａｎｏｉｃ ａｃｉｄ）、ω－ヒドロキシトリデカン酸（ω－ｈｙｄｒｏｘｙｔｒｉｄｅｃａｎｏｉｃ ａｃｉｄ）、α，ω－ウンデク－２－エンニ酸（α，ω－ｕｎｄｅｃ－２－ｅｎｅｄｉｏｉｃ ａｃｉｄ（ｃｉｓ－２－ｕｎｄｅｃｅｎｅ－１，１１－ｄｉｏｉｃ ａｃｉｄ））、ノルマルオクタノール又はそれらの組み合わせである請求項１２に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】
【０００１】
本発明は、生物変換により長鎖脂肪酸から中鎖ω－ヒドロキシ脂肪酸、α，ω－ジカルボン酸、ω－アミノ脂肪酸を生産する方法に関するものであり、より具体的には、ＢＶＭＯを発現するように形質転換された形質転換体、前記形質転換体を用いた生物変換により炭素数１６～２０の長鎖脂肪酸から炭素数５～１４の中鎖ω－ヒドロキシ脂肪酸、α，ω－ジカルボン酸、ω－アミノ脂肪酸又はアルコールを生産する方法、前記ＢＶＭＯを用いてケト脂肪酸から鎖内にエステル基が導入された脂肪酸誘導体を生産する方法、及び前記方法で作製された新規ω－ヒドロキシ脂肪酸に関するものである。
【背景技術】
【０００２】
ω－ヒドロキシ脂肪酸は、脂肪酸の末端に１個のヒドロキシ基（水酸化基）を有する脂肪酸の一種であり（ＨＯＣＨ$_2$（ＣＨ$_2$）ｎＣＯＯＨ）、ポリエチレン系プラスチックの製造時にモノマーとして用いられており、乳化剤、接着剤、コーティング剤の生産、化粧品や医薬品の製造に広く用いられている。また、ポリアミド、ポリエステル系プラスチックの製造、化粧品や日用品の製造に広範囲に用いられている長鎖ジカルボン酸合成の前駆体としても用いられる。
【０００３】
中鎖α，ω－ジカルボン酸（ＨＯＯＣ（ＣＨ$_2$）ｎＣＯＯＨ）とω－アミノ脂肪酸（Ｈ$_2$ＮＣＨ$_2$（ＣＨ$_2$）ｎＣＯＯＨ）は、ポリアミド、ポリエステルなどのプラスチック製造時にモノマーとして用いられており、乳化剤、凍結防止剤、ペイント、コーティング剤の生産にも用いられている。また、抗菌活性などの様々な生理活性があるので、化粧品、食品、日用品の生産にも広く用いられている。例えば、炭素数１０の中鎖ジカルボン酸であるセバシン酸（（ＨＯＯＣ）（ＣＨ$_2$）$_8$（ＣＯＯＨ））は、年間５０，０００ＭＴ以上生産されており、プラスチック、ろうそく、化粧品、乳化剤、凍結防止剤、腐食防止剤の生産に用いられている。また、抗菌活性を有するので、にきび治療剤、化粧品、日用品の製造にも用いられている。
【先行技術文献】
【特許文献】
【０００４】
【特許文献１】米国特許第５９５２５１７号明細書
【特許文献２】米国特許第６３９２０７４号明細書
【特許文献３】米国特許第５４２０３１６号明細書
【特許文献４】米国特許出願公開第２０１１／０１０５７７４号明細書
【非特許文献】
【０００５】
【非特許文献１】Biotechnol. Lett., 29: 1393-1398, 2007
【非特許文献２】J. Biotechnol., 158: 17-23, 2012
【非特許文献３】Appl. Microbiol. Biotechnol. 73: 1065-1072, 2007
【非特許文献４】Agric Biol. Chem., 54: 2039-2045, 1990
【非特許文献５】J. Biotechnol. 262: 17712-17718, 1987
【非特許文献６】ChemCatChem, 5: 154-157, 2013
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００６】
これら中鎖ω－ヒドロキシ脂肪酸、α，ω－ジカルボン酸、ω－アミノ脂肪酸は、自然界にほとんど存在しないため、主に化学合成法により産業的に生産されているが、化学合成法は高温・高圧、強酸及び／又は環境に深刻な問題を引き起こす毒性酸化物を要するという問題がある（特許文献１，２，３，４）。例えば、セバシン酸は、リシノール酸を化学的に分解することにより作製されている（特許文献１，２）。しかし、リシノール酸を

化学的に分解するためには２００～３００℃以上の高温工程が必要であり、硫酸などの強酸や、重金属イオン触媒、有機溶媒などの毒性物質を用いるので作製過程が危険なだけでなく、作製後に環境汚染物質を多量に排出するなどの問題がある。

【０００７】

炭素数９の中鎖ジカルボン酸であるアゼライン酸は、オレイン酸のオゾン分解（ozonolysis）により生産されている（特許文献３）。しかし、上記技術によりアゼライン酸を生産する際には、強酸化剤であるオゾンを多量に用い、それにより様々な副産物が生成され、生成される副産物を除去するために重金属触媒を用いる分離精製工程を必ず行わなければならないという問題がある。このように、複雑な分離精製工程、環境汚染、エネルギー過剰使用などの様々な問題があるので、これらを改善する研究の必要性が高まっている。そこで、環境にやさしく、単純化された工程による作製方法が盛んに研究されており、生体触媒反応を用いた工程を開発しようとする研究が盛んに行われている。例えば、酵素を用いた長鎖脂肪酸から長鎖ω－ヒドロキシ脂肪酸を生産する方法、石油化合物である炭化水素から中鎖ジカルボン酸を作製する方法などは開発されているが、酵素を用いた再生可能な長鎖脂肪酸から中鎖ω－ヒドロキシ脂肪酸、α，ω－ジカルボン酸、ω－アミノ脂肪酸、アルコールなどを作製する方法はいまだ開発されていない。

【０００８】

本発明者らは、ＢＶＭＯが、炭素数１６～２０の長鎖脂肪酸由来のケト脂肪酸を、エステル加水分解酵素により切断される鎖内にエステル基が導入された脂肪酸誘導体の形態に変換することを見出し、前記ＢＶＭＯ遺伝子が導入された形質転換微生物を用いると、前記長鎖脂肪酸から中鎖ω－ヒドロキシ脂肪酸、α，ω－ジカルボン酸、ω－アミノ脂肪酸、アルコールなどを作製できることを確認し、本発明を完成するに至った。

【課題を解決するための手段】

【０００９】

本発明は、ＢＶＭＯを発現する形質転換体を提供することを目的とする。

【００１０】

また、本発明は、前記形質転換体を用いた生物変換により長鎖脂肪酸から様々な分解産物を生産する方法を提供することを目的とする。

【００１１】

さらに、本発明は、前述した方法で作製されて化学式１で表されるω－ヒドロキシ脂肪酸を提供することを目的とする。

【発明の効果】

【００１２】

本発明のＢＶＭＯを発現する形質転換体を用いた生物変換反応により、培地に含まれる炭素数１６～２０の長鎖脂肪酸を分解して炭素数５～１４のω－ヒドロキシ脂肪酸、α，ω－ジカルボン酸、ω－アミノ脂肪酸、アルコールなどの分解産物を大量に生成することができるので、ω－ヒドロキシ脂肪酸、α，ω－ジカルボン酸、ω－アミノ脂肪酸又はアルコールのより安全かつ経済的な生産に広く活用することができる。

【図面の簡単な説明】

【００１３】

【図１ａ】加水酵素、アルコール脱水素酵素、ＢＶＭＯ及びエステル加水分解酵素を用いて長鎖脂肪酸（炭素数１８のオレイン酸）から中鎖ω－ヒドロキシ脂肪酸（炭素数９のω－ヒドロキシノナン酸）を生成する反応を順に示す概略図である。

【図１ｂ】アルコール脱水素酵素、ＢＶＭＯ及びエステル加水分解酵素を用いて長鎖脂肪酸（炭素数１８のリシノール酸）から中鎖ω－ヒドロキシ脂肪酸（炭素数１１のω－ヒドロキシウンデク－９－エン酸）を生成する反応を順に示す概略図である。

【図１ｃ】アルコール脱水素酵素、ＢＶＭＯ及びエステル加水分解酵素を用いて長鎖脂肪酸（炭素数２０のレスクエロール酸）からω－ヒドロキシ脂肪酸（炭素数１３のω－ヒドロキシトリデク－１１－エン酸）を生成する反応を順に示す概略図である。

【図１ｄ】加水酵素、アルコール脱水素酵素、ＢＶＭＯ及びエステル加水分解酵素を用い

て長鎖脂肪酸（炭素数１８のオレイン酸）からα，ω－ジカルボン酸（炭素数１０のα，ω－デカンニ酸）とオクタノールを生成する反応を順に示す概略図である。
【図１ｅ】加水酵素、ミクロコッカス・ルテウス由来のアルコール脱水素酵素、ＢＶＭＯ、エステル加水分解酵素、シュードモナス・プチダ由来のアルコール脱水素酵素を用いて長鎖脂肪酸（炭素数１８のオレイン酸）からα，ω－ジカルボン酸（炭素数９のα，ω－ノナンニ酸）を生成する反応を順に示す概略図である。
【図１ｆ】加水酵素、ミクロコッカス・ルテウス由来のアルコール脱水素酵素、ＢＶＭＯ、エステル加水分解酵素、シュードモナス・プチダ由来のアルコール脱水素酵素、アミノ基転移酵素を用いて長鎖脂肪酸（炭素数１８のオレイン酸）からω－アミノ脂肪酸（炭素数９のω－アミノノンナン酸）を生成する反応を順に示す概略図である。
【図２ａ】本発明のオレイン酸加水酵素、アルコール脱水素酵素及びＢＶＭＯを発現する形質転換体を用いてオレイン酸から生産された、鎖内にエステル基が導入された脂肪酸の時間の経過による生産量の変化を示すグラフである。
【図２ｂ】本発明のオレイン酸加水酵素、アルコール脱水素酵素及びＢＶＭＯを発現する形質転換体を用いてオレイン酸から鎖内にエステル基が導入された脂肪酸を生産し、それをエステル加水分解酵素で反応させた反応産物のＧＣ／ＭＳ分析結果を示すグラフである。
【図３ａ】本発明のアルコール脱水素酵素及びＢＶＭＯを発現する形質転換体を用いてリシノール酸から生産された、鎖内にエステル基が導入された脂肪酸の時間の経過による生産量の変化を示すグラフである。
【図３ｂ】本発明のアルコール脱水素酵素及びＢＶＭＯを発現する形質転換体を用いてリシノール酸から鎖内にエステル基が導入された脂肪酸を生産し、それをエステル加水分解酵素で反応させた反応産物のＧＣ／ＭＳ分析結果を示すグラフである。
【図４】本発明のアルコール脱水素酵素及びＢＶＭＯを発現する形質転換体を用いてレスクエロール酸から鎖内にエステル基が導入された脂肪酸を生産し、それをエステル加水分解酵素で反応させた反応産物のＧＣ／ＭＳ分析結果を示すグラフである。
【図５ａ】本発明のオレイン酸加水酵素、アルコール脱水素酵素及びＢＶＭＯを発現する形質転換体を用いてオレイン酸から生産された、鎖内にエステル基が導入された脂肪酸の時間の経過による生産量の変化を示すグラフである。
【図５ｂ】本発明のオレイン酸加水酵素、アルコール脱水素酵素及びＢＶＭＯを発現する形質転換体を用いてオレイン酸から鎖内にエステル基が導入された脂肪酸を生産し、それをエステル加水分解酵素で反応させた反応産物（セバシン酸）のＧＣ／ＭＳ分析結果を示すグラフである。
【図６】本発明のオレイン酸加水酵素、ミクロコッカス・ルテウス由来のアルコール脱水素酵素及びＢＶＭＯを発現する形質転換体を用いてオレイン酸から鎖内にエステル基が導入された脂肪酸を生産し、それにエステル加水分解酵素とシュードモナス・プチダ由来のアルコール脱水素酵素を発現する形質転換体を投入して反応させ、得られた反応産物の時間の経過に伴う生産量を示すグラフである。
【図７】オレイン酸加水酵素、ミクロコッカス・ルテウス由来のアルコール脱水素酵素、ＢＶＭＯ及びエステル加水分解酵素、シュードモナス・プチダ由来のアルコール脱水素酵素を発現する形質転換体を用いてリシノール酸から生産されたα，ω－ウンデク－２－エンニ酸（ｃｉｓ－２－ｕｎｄｅｃｅｎｅ－１，１１－ｄｉｏｉｃ ａｃｉｄ）の時間の経過による生産量の変化を示すグラフである。
【図８】本発明のオレイン酸加水酵素、ミクロコッカス・ルテウス由来のアルコール脱水素酵素及びＢＶＭＯを発現する形質転換体を用いてオレイン酸から鎖内にエステル基が導入された脂肪酸を生産し、それにエステル加水分解酵素、シュードモナス・プチダ由来のアルコール脱水素酵素、アミノ基転移酵素を発現する形質転換体を投入して反応させ、得られた反応産物の時間の経過に伴う生産量を示すグラフである。
【発明を実施するための形態】
【００１４】

上記目的を達成するために、本発明の一実施形態は、ＢＶＭＯ遺伝子が導入された形質転換体を提供する。

【００１５】

本発明における「ＢＶＭＯ（Baeyer-Villiger monooxygenase）」とは、ケトンを酸化させてラクトンやエステル化合物を生成するＢａｅｙｅｒ－Ｖｉｌｌｉｇｅｒ酸化反応を含む様々な酸化反応を触媒する酵素であるｍｏｎｏｏｘｙｇｅｎａｓｅの一種を意味する。本発明の目的上、形質転換体で発現してケト脂肪酸から鎖内にエステル基が導入された脂肪酸誘導体（例えば、１０－ケトステアリン酸（１０－ｋｅｔｏｓｔｅａｒｉｃ ａｃｉｄ）から１０－オクチルオキシ（ｏｃｔｙｌｏｘｙ）－１０－オキソデカン酸（ｏｘｏ ｄｅｃａｎｏｉｃ ａｃｉｄ））を生産する反応を触媒する活性を示すものであれば、前記ＢＶＭＯは特にこれらに限定されるものではないが、シュードモナス属菌株（Pseudomonas sp.）、ロドコッカス属菌株（Rhodococcus sp.）、ブレビバクテリウム属菌株（Brevibacterium sp.）、コマモナス属菌株（Comamonas sp.）、アシネトバクター属菌株（Acinetobacter sp.）、アルスロバクター属菌株（Arthrobacter sp.）、ブラキモナス属菌株（Brachymonas sp.）などの微生物由来のＢＶＭＯであることが好ましく、シュードモナス・プチダ（Pseudomonas putida）、シュードモナス・フルオレッセンス（Pseudomonas fluorescens）、シュードモナス・ベロニイ（Pseudomonas veronii）、ロドコッカス・ジョスティ（Rhodococcus jostii）又はシュードモナス属菌株ＨＩ－７０（Pseudomonas sp. strain HI-70）由来のＢＶＭＯであることがより好ましく、シュードモナス・プチダ由来のＢＶＭＯであることが最も好ましい。前記ＢＶＭＯをコードする遺伝子の塩基配列は、ＮＣＢＩのＧｅｎＢａｎｋなどの公知のデータベースから得られるが、その例としては、ＧｅｎＢａｎｋ Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ Ｎｏ． ＣＡＦＫ０１０００００１０で表される遺伝子、ＢＶＭＯ遺伝子を発現するように作製された発現ベクターｐＪＯＥ－ＫＴ２４４０ＢＶＭＯ（非特許文献１）などから得られる遺伝子などが挙げられ、配列番号９のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列などであることが好ましい。

【００１６】

また、前記ＢＶＭＯは、ケト脂肪酸から鎖内にエステル基が導入された脂肪酸誘導体を生産する反応を触媒する活性を示すＢＶＭＯを形質転換体として発現できる限り、ＢＶＭＯを構成するアミノ酸配列の少なくとも１つの位置で１個又は複数（タンパク質のアミノ酸残基の立体構造における位置や種類によって異なるが、具体的には２～２０個、好ましくは２～１０個、より好ましくは２～５個）のアミノ酸が置換、欠失、挿入、付加又は逆位されたアミノ酸配列を含んでもよく、前記ＢＶＭＯの活性を保持又は強化できる限り、前記ＢＶＭＯのアミノ酸配列に対して８０％以上、好ましくは９０％以上、より好ましくは９５％以上、特に好ましくは９７％以上の相同性を有するアミノ酸配列を含んでもよく、微生物の種又は菌株によって前記ポリペプチドが有する活性を示す酵素のアミノ酸配列が異なることがあるので、特にこれらに限定されるものではなく、前記アミノ酸の置換、欠失、挿入、付加又は逆位などには、前記ＢＶＭＯの活性を有する微生物の個体又は種の違いに基づく場合など、天然に生じる突然変異配列又は人為的な変異配列を含んでもよい。

【００１７】

本発明における「相同性」とは、互いに異なる２つのアミノ酸配列又は塩基配列間の同一性を意味し、スコア（score）、同一性（identity）、類似性（similarity）などのパラメーター（parameter）を計算するＢＬＡＳＴ ２．０を用いる、当業者に周知の方法により決定されるが、特にこれに限定されるものではない。

【００１８】

本発明における「形質転換体」とは、標的タンパク質をコードするポリヌクレオチドをベクターにより宿主内に導入し、その後前記標的タンパク質を発現するように変異させた細胞又は微生物を意味する。ここで、前記宿主細胞に導入されるポリヌクレオチドは、宿主細胞内に導入されて発現するものであれば、いかなる形態であってもよい。

【００１９】

本発明が提供する前記形質転換体は、公知のＢＶＭＯをコードするポリヌクレオチド配列が導入された発現ベクター又は公知の発現ベクターｐＪＯＥ－ＫＴ２４４０ＢＶＭＯ（非特許文献１）などを宿主細胞に導入することにより作製することができる。ここで、用いることのできる宿主細胞としては、本発明のＢＶＭＯをコードするポリヌクレオチド配列が導入されＢＶＭＯを発現する宿主細胞であれば、特に限定されるものではないが、生物変換工程への適用に適した培養可能な単細胞の原核生物又は真核生物の細胞を用いることが好ましく、大腸菌、酵母などを用いることがより好ましく、大腸菌ＢＬ２１（ＤＥ３）細胞を用いることが最も好ましい。

【００２０】

本発明の形質転換体は、培地に含まれる炭素数１６～２０の長鎖脂肪酸を分解して炭素数５～１４の中鎖ω－ヒドロキシ脂肪酸、α，ω－ジカルボン酸、ω－アミノ脂肪酸を生産するのに用いることができ、このために、前記ＢＶＭＯをコードする遺伝子以外に、加水酵素（hydratase）やリポキシゲナーゼ（lipoxygenase）をコードする遺伝子、アルコール脱水素酵素（alcohol dehydrogenase）をコードする遺伝子、エステル加水分解酵素（esterase）をコードする遺伝子、アミノ基転移酵素（aminotransferase）をコードする遺伝子などがさらに導入される。

【００２１】

本発明における「加水酵素（hydratase）」とは、炭素二重結合に水を加えてヒドロキシ化合物を可逆的に生成する酵素を意味するが、逆反応によりヒドロキシ化合物から水を除去することができるので「脱水酵素（dehydratase）」ともいえる。前記加水酵素は、ステノトロホモナス・マルトフィリア（Stenotrophomonas maltophilia）、リシニバシラス・フシフォルミス（Lysinibacillus fusiformis）、マクロコッカス・カセオリティカス（Macrococcus caseolyticus）、プロピオニバクテリウム・アクネス（Propionibacterium acnes）などの菌株由来のものを用いることが好ましいが、特にこれらに限定されるものではない。本発明の目的上、前記加水酵素は、炭素数１６～２０の長鎖脂肪酸にヒドロキシ基を加えてヒドロキシ脂肪酸を生成するために用いられる。

【００２２】

本発明における「リポキシゲナーゼ（lipoxygenase）」とは、不飽和脂肪酸に分子状酸素を添加する酸素添加酵素であり、不飽和脂肪酸のｃｉｓ，ｃｉｓ－１，４－ペンタジエン構造を認識してメチレンの水素原子を立体特異的に抽出し、反対側（antarafacial）で酸素を添加してヒドロペルオキシドを生成する反応を触媒する酵素を意味する。本発明の目的上、前記リポキシゲナーゼは、前述した加水酵素と同様に、炭素数１６～２０の長鎖脂肪酸にヒドロキシ基を加えてヒドロキシ脂肪酸を生成するために用いられる。

【００２３】

本発明における「アルコール脱水素酵素（alcohol dehydrogenase）」とは、アルコールから水素を除去してアルデヒド、ケトン又はカルボン酸を生成する反応を触媒する酵素を意味する。前記アルコール脱水素酵素は、ミクロコッカス・ルテウス、シュードモナス属菌株由来のものを用いることが好ましいが、特にこれらに限定されるものではない。本発明の目的上、前記アルコール脱水素酵素は、前記加水酵素又はリポキシゲナーゼにより生成されたヒドロキシ脂肪酸から水素を除去してケト脂肪酸を生成するか、エステル加水分解酵素により生産されたω－ヒドロキシ脂肪酸をω－オキソ脂肪酸（ω-oxofatty acid）又はα，ω－ジカルボン酸を生産するために用いられる。

【００２４】

本発明における「エステル加水分解酵素（esterase）」とは、エステル化合物のエステル結合を加水分解する酵素を意味する。本発明の目的上、前記エステル加水分解酵素は、ＢＶＭＯにより生成された、鎖内にエステル基が導入された脂肪酸誘導体のエステル基を分解するために用いられる。

【００２５】

本発明における「アミノ基転移酵素（aminotransferase）」とは、ω－オキソ脂肪酸のオキソ基をアミノ基に変換する酵素を意味する。前記アミノ基転移酵素は、微生物由来の

ものを用いることができ、特にこれに限定されるものではないが、クロモバクテリウム・ビオラセウム（Chromobacterium violaceum）、シリシバクター・ポメロイ（Silicibacter pomeroyi）、ロドコッカス・スフェロイデス（Rhodococcus sphaeroides）、メソリゾビウム・ロティＭＡＦＦ（Mesorhizobium lotimaff）、シリシバクター（Silicibacter sp.）などの菌株由来のものを用いることが好ましい。本発明の目的上、前記アミノ基転移酵素は、アルコール脱水素酵素により生成されたω－オキソ脂肪酸からω－アミノ脂肪酸を生産するために用いられ、Ｃ９、Ｃ１１、Ｃ１２及びＣ１３のω－オキソ脂肪酸からω－アミノ脂肪酸を生産するために用いられることが好ましい。

【００２６】

本発明の一実施例においては、ステノトロフォモナス・マルトフィリア（Stenotrophomonas maltophilia）由来のオレイン酸加水酵素遺伝子及びミクロコッカス・ルテウス（Micrococcus luteus）由来のアルコール脱水素酵素遺伝子を含むｐＡＣＹＣ／オレイン酸加水酵素／アルコール脱水素酵素発現ベクターを大腸菌Ｅ．ｃｏｌｉ ＢＬ２１（ＤＥ３）菌株に導入して加水酵素及びアルコール脱水素酵素を発現する１次形質転換体を作製し、前記１次形質転換体にシュードモナス・プチダ由来のＢＶＭＯ遺伝子発現ベクターｐＪＯＥ－ＫＴ２４４０ＢＶＭＯを導入してオレイン酸加水酵素、アルコール脱水素酵素及びＢＶＭＯを同時に発現する２次形質転換体を作製した（実施例１）。

【００２７】

上記目的を達成するために、本発明の他の実施形態として、前記形質転換体を用いた生物変換により長鎖脂肪酸から様々な分解産物を生産する方法を提供する。

【００２８】

具体的には、本発明の長鎖脂肪酸から分解産物を生産する方法は、（ａ）ＢＶＭＯをコードする遺伝子が導入された形質転換体と長鎖脂肪酸を反応させて反応物を得るステップと、（ｂ）前記反応物から分解産物を回収するステップとを含む。ここで、前記分解産物は、中鎖ω－ヒドロキシ脂肪酸、α，ω－ジカルボン酸、ω－アミノ脂肪酸又はアルコールであってもよい。前記分解産物は、炭素数５～１４の中鎖ω－ヒドロキシ脂肪酸、α，ω－ジカルボン酸、ω－アミノ脂肪酸、又は炭素数２～１４のノルマルアルコールであってもよく、ω－ヒドロキシノナン酸、ω－ヒドロキシウンデク－９－エン酸、ω－ヒドロキシトリデク－１１－エン酸、α，ω－ノナンニ酸（ａｚｅｌａｉｃ ａｃｉｄ）、α，ω－デカン二酸（ｓｅｂａｃｉｃ ａｃｉｄ）、ω－アミノノンナン酸、ヘプタン酸、ノナン酸、ω－ヒドロキシウンデカン酸、ω－ヒドロキシトリデカン酸、α，ω－ウンデク－２－エンニ酸（ｃｉｓ－２－ｕｎｄｅｃｅｎｅ－１，１１－ｄｉｏｉｃ ａｃｉｄ）、ω－アミノウンデク－９－エン酸（ω－ａｍｉｎｏｕｎｄｅｃ－９－ｅｎｏｉｃ ａｃｉｄ）、α，ω－トリデク－２－エンニ酸（α，ω－ｔｒｉｄｅｃ－２－ｅｎｅｄｉｏｉｃ ａｃｉｄ）、ノルマルオクタノールなどであることがより好ましい。

【００２９】

ここで、前記長鎖脂肪酸は、特にこれらに限定されるものではないが、炭素数１６～２０の直鎖型脂肪酸であることが好ましく、オレイン酸、リシノール酸、１２－ヒドロキシステアリン酸、リノレン酸、パルミトレイン酸、レスクエロール酸などであることがより好ましい。

【００３０】

また、前記反応とは、基質として用いられる長鎖脂肪酸に前記形質転換体から生産される加水酵素、リポキシゲナーゼ、アルコール脱水素酵素、エステル加水分解酵素、アミノ基転移酵素などの様々な酵素を反応させて前記長鎖脂肪酸の切断、分解又はアミノ基の転移を触媒する酵素反応を意味するが、前記形質転換体から生産される一連の酵素は形質転換体の内部で生産され、生産された酵素が形質転換体の外部に分泌されるので、前記反応は形質転換体の内部で行われてもよく、外部で行われてもよい。例えば、炭素源を含む培地で前記形質転換体を培養しながら、培地に含まれる炭素源が所定量消費されたら長鎖脂肪酸を培地に加え、前記形質転換体から生産された前記酵素により長鎖脂肪酸を切断、分解又はアミノ基を転移させることにより様々な分解産物を生産する方式を用いることもで

き、長鎖脂肪酸を含む反応緩衝液に前記形質転換体を入れ、長鎖脂肪酸を切断、分解又はアミノ基を転移させることにより様々な分解産物を生産する方式を用いることもでき、前記各酵素を形質転換体から分離し、分離した酵素を各担体に固定化してから長鎖脂肪酸が含まれる反応緩衝液を加え、前記固定化した酵素で長鎖脂肪酸を切断又は分解することにより様々な分解産物を生産する方式を用いることもできる。ここで、培地又は反応緩衝液に含まれる長鎖脂肪酸の含有量は、特にこれに限定されるものではないが、０．１～１００ｇ／Ｌの最終濃度となるように加えることが好ましい。

【００３１】

本発明における「培養」とは、微生物を人工的に調節した好適な環境条件で生育させることを意味する。本発明において、前記形質転換体を培養する方法は、当業界で周知の方法を用いることができる。具体的には、前記培養は、バッチプロセス又は流加もしくは反復流加プロセス（fed batch or repeated fed batch process）で連続して培養することができるが、これらに限定されるものではない。

【００３２】

培養に用いられる培地は、適当な炭素源、窒素源、アミノ酸、ビタミンなどを含有する通常の培地内において、好気性条件下で温度、ｐＨなどを調節しながら適切な方式で特定菌株の要件を満たすものでなければならない。用いることのできる炭素源としては、グルコース、スクロース、ラクトースなどの糖、脂肪、脂肪酸、グリセリンが挙げられる。これらの物質は、単独で用いることもでき、混合物として用いることもできる。用いることのできる窒素源としては、アンモニア、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウムなどの無機窒素源と、グルタミン酸などのアミノ酸及びペプトン、肉類抽出物、酵母抽出物、麦芽抽出物、トウモロコシ浸漬液、カゼイン加水分解物などの有機窒素源とを用いることができる。これら窒素源は、単独で用いることもでき、組み合わせて用いることもできる。好気状態を維持するために、培養物内に酸素又は酸素含有気体（例えば、空気）を注入する。培養物の温度は通常１５℃～３７℃、好ましくは２０℃～３０℃であり、前記培養は１０～１００時間行われる。

【００３３】

また、反応液から中鎖ω－ヒドロキシ脂肪酸、α，ω－ジカルボン酸、ω－アミノ脂肪酸、アルコールなどの分解産物を回収するステップは、透析、遠心分離、濾過、溶媒抽出、クロマトグラフィー、結晶化などの当業界で公知の方法により行うことができる。例えば、前記反応液を遠心分離した後、形質転換体を除去し得られた上清を溶媒抽出法に適用することにより目的とする分解産物を回収する方法を用いることができるが、それ以外にも、前記各分解産物の特性に合わせて公知の実験方法を組み合わせて前記分解産物を回収する方法であれば、特に限定されるものではない。

【００３４】

本発明において、提供する加水酵素をコードする遺伝子、アルコール脱水素酵素をコードする遺伝子、ＢＶＭＯをコードする遺伝子、エステル加水分解酵素をコードする遺伝子、及びアミノ基転移酵素をコードする遺伝子を異なる組み合わせで宿主細胞に導入すると、異なる機能を有する様々な形質転換体を作製することができ、前記作製した各形質転換体は、培地や反応液に存在する炭素数１６～２０の長鎖脂肪酸（オレイン酸、リシノール酸、リノール酸、レスクエロール酸など）から炭素数５～１４の中鎖ω－ヒドロキシ脂肪酸、α，ω－ジカルボン酸、ω－アミノ脂肪酸又はアルコールを生成することができる。

【００３５】

例えば、大腸菌にアルコール脱水素酵素をコードする遺伝子、及びＢＶＭＯをコードする遺伝子を導入することにより作製された形質転換体は、長鎖脂肪酸を鎖内にエステル基が導入された長鎖脂肪酸に変換することができ、前記形質転換体がエステル加水分解酵素、アルコール脱水素酵素又はアミノ基転移酵素を単独で又は組み合わせてさらに含む場合、前記変換された、鎖内にエステル基が導入された長鎖脂肪酸は、様々な形態の中鎖ω－ヒドロキシ脂肪酸、α，ω－ジカルボン酸、ω－アミノ脂肪酸又はアルコールに変換することができる。

【００３６】
本発明の一実施例として、加水酵素、アルコール脱水素酵素、ＢＶＭＯ及びエステル加水分解酵素を発現する形質転換体は、オレイン酸（Ｃ１８）などの長鎖脂肪酸からω－ヒドロキシノナン酸（Ｃ９）などの中鎖ω－ヒドロキシ脂肪酸を生成することができるが、加水酵素は長鎖脂肪酸をヒドロキシ脂肪酸に変換させ、アルコール脱水素酵素は前記変換されたヒドロキシ脂肪酸から水素を除去してケト脂肪酸を生成し、ＢＶＭＯは前記生成されたケト脂肪酸を酸化させて鎖内にエステル基が導入された長鎖脂肪酸を生成し、エステル加水分解酵素は前記生成された、鎖内にエステル基が導入された長鎖脂肪酸のエステル結合を加水分解して中鎖ω－ヒドロキシ脂肪酸を生成する（図１ａ）。
【００３７】
本発明の他の実施例として、アルコール脱水素酵素、ＢＶＭＯ及びエステル加水分解酵素を発現する形質転換体は、リシノール酸（Ｃ１８）などのヒドロキシ長鎖脂肪酸からω－ヒドロキシウンデク－９－エン酸（Ｃ１１）などの中鎖ω－ヒドロキシ脂肪酸を生成することができるが、アルコール脱水素酵素は前記ヒドロキシ長鎖脂肪酸から水素を除去してケト脂肪酸を生成し、ＢＶＭＯは前記生成されたケト脂肪酸を酸化させて鎖内にエステル基が導入された長鎖脂肪酸を生成し、エステル加水分解酵素は前記生成された、鎖内にエステル基が導入された長鎖脂肪酸のエステル結合を加水分解して中鎖ω－ヒドロキシ脂肪酸を生成する（図１ｂ）。
【００３８】
本発明のさらに他の実施例として、アルコール脱水素酵素、ＢＶＭＯ及びエステル加水分解酵素を発現する形質転換体は、レスクエロール酸（Ｃ２０）などのヒドロキシ長鎖脂肪酸から ω－ヒドロキシトリデク－１１－エン酸（Ｃ１３）などの中鎖ω－ヒドロキシ脂肪酸を生成することができるが、アルコール脱水素酵素は前記ヒドロキシ長鎖脂肪酸から水素を除去してケト脂肪酸を生成し、ＢＶＭＯは前記生成されたケト脂肪酸を酸化させて鎖内にエステル基が導入された長鎖脂肪酸を生成し、エステル加水分解酵素は前記生成された、鎖内にエステル基が導入された長鎖脂肪酸のエステル結合を加水分解して中鎖ω－ヒドロキシ脂肪酸を生成する（図１ｃ）。
【００３９】
本発明のさらに他の実施例として、加水酵素、アルコール脱水素酵素、ＢＶＭＯ及びエステル加水分解酵素を発現する形質転換体は、オレイン酸（Ｃ１８）などの長鎖脂肪酸からα， ω－デカンニ酸（Ｃ１０）などのα，ω－ジカルボン酸とオクタノール（Ｃ８）を生成することができるが、加水酵素は長鎖脂肪酸をヒドロキシ脂肪酸に変換させ、アルコール脱水素酵素は前記変換されたヒドロキシ脂肪酸から水素を除去してケト脂肪酸を生成し、ＢＶＭＯは前記生成されたケト脂肪酸を酸化させて鎖内にエステル基が導入された長鎖脂肪酸を生成し、エステル加水分解酵素は前記生成された、鎖内にエステル基が導入された長鎖脂肪酸のエステル結合を加水分解してα，ω－ジカルボン酸とアルコールを生成する（図１ｄ）。
【００４０】
本発明のさらに他の実施例として、加水酵素、ミクロコッカス・ルテウス由来のアルコール脱水素酵素、ＢＶＭＯ、エステル加水分解酵素及びシュードモナス・プチダ由来のアルコール脱水素酵素を発現する形質転換体は、オレイン酸（Ｃ１８）などの長鎖脂肪酸からα，ω－ノナン二酸（Ｃ９）などのα，ω－ジカルボン酸を生成することができるが、加水酵素は長鎖脂肪酸をヒドロキシ脂肪酸に変換させ、ミクロコッカス・ルテウス由来のアルコール脱水素酵素は前記変換されたヒドロキシ脂肪酸から水素を除去してケト脂肪酸を生成し、ＢＶＭＯは前記生成されたケト脂肪酸を酸化させて鎖内にエステル基が導入された長鎖脂肪酸を生成し、エステル加水分解酵素は前記生成された、鎖内にエステル基が導入された長鎖脂肪酸のエステル結合を加水分解してω－ヒドロキシ脂肪酸を生成し、シュードモナス・プチダ由来のアルコール脱水素酵素は前記ω－ヒドロキシ脂肪酸から水素を除去してα，ω－ジカルボン酸を生成する（図１ｅ）。
【００４１】

本発明のさらに他の実施例として、加水酵素、ミクロコッカス・ルテウス由来のアルコール脱水素酵素、ＢＶＭＯ、エステル加水分解酵素、シュードモナス・プチダ由来のアルコール脱水素酵素及びアミノ基転移酵素を発現する形質転換体は、オレイン酸（Ｃ１８）などの長鎖脂肪酸からω－アミノノナンニ酸（Ｃ９）などのω－アミノ脂肪酸を生成することができるが、加水酵素は長鎖脂肪酸をヒドロキシ脂肪酸に変換し、ミクロコッカス・ルテウス由来のアルコール脱水素酵素は前記変換されたヒドロキシ脂肪酸から水素を除去してケト脂肪酸を生成し、ＢＶＭＯは前記生成されたケト脂肪酸を酸化させて鎖内にエステル基が導入された長鎖脂肪酸を生成し、エステル加水分解酵素は前記生成された、鎖内にエステル基が導入された長鎖脂肪酸のエステル結合を加水分解してω－ヒドロキシ脂肪酸を生成し、シュードモナス・プチダ由来のアルコール脱水素酵素は前記ω－ヒドロキシ脂肪酸から水素を除去してω－ケト脂肪酸を生成し、アミノ基転移酵素は前記生成されたω－ケト脂肪酸にアミノ基を転移させてω－アミノ脂肪酸を生成する（図１ｆ）。

【００４２】

一方、長鎖脂肪酸から生産されたω－ヒドロキシ脂肪酸は、シュードモナス・プチダ由来のアルコール脱水素酵素によりα，ω－ジカルボン酸に変換されるか（実施例５及び６）、アミノ基転移酵素との連続反応によりω－アミノ脂肪酸に変換される（実施例７）。

【００４３】

前記形質転換体により生成された炭素数５～１４のω－ヒドロキシ脂肪酸、α，ω－ジカルボン酸、ω－アミノ脂肪酸及びアルコールは、前記形質転換体から培地又は反応緩衝液に分泌されるので、前記形質転換体を固定化担体に固定するか、前記形質転換体を流加又は連続培養すると、炭素数５～１４のω－ヒドロキシ脂肪酸、α，ω－ジカルボン酸、ω－アミノ脂肪酸及びアルコールを大量に生産することができる。

【００４４】

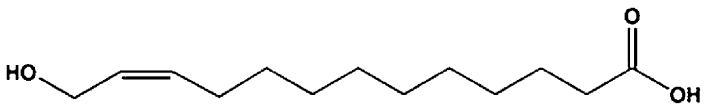
本発明の一実施例によれば、ステノトロフォモナス・マルトフィリア由来のオレイン酸加水酵素遺伝子、ミクロコッカス・ルテウス由来のアルコール脱水素酵素遺伝子を大腸菌ＢＬ２１（ＤＥ３）菌株に導入して加水酵素及びアルコール脱水素酵素を発現する形質転換体を作製し、前記形質転換体にシュードモナス・フルオレッセンス由来のＢＶＭＯ遺伝子を導入して加水酵素、アルコール脱水素酵素及びＢＶＭＯを発現する形質転換体を作製した（実施例４）。また、加水酵素、アルコール脱水素酵素、ＢＶＭＯを発現する形質転換体を培養してオレイン酸と反応させた結果、１０－ヒドロキシステアリン酸、１０－ケトステアリン酸、鎖内にエステル基が導入された脂肪酸が生産され（図５）、それにシュードモナス・フルオレッセンス由来のエステル加水分解酵素を投入して反応させることにより、α，ω－デカンニ酸とオクタノールを生産することができた。

【００４５】

上記目的を達成するために、本発明のさらに他の実施形態として、前述した方法で作製され、下記化学式１で表される新規ω－ヒドロキシ脂肪酸を提供する。

【００４６】

【化１】



【００４７】

前記化合物は、前述した方法により作製することができる。例えば、オレイン酸加水酵素、アルコール脱水素酵素及びＢＶＭＯを発現する形質転換体を培養してレスクエロール酸と反応させることにより、鎖内にエステル基が導入された脂肪酸を生産することができ、前記生産された、鎖内にエステル基が導入された脂肪酸にシュードモナス・フルオレッセンス由来のエステル加水分解酵素を投入して反応させることにより、前記化学式１の新規ω－ヒドロキシ脂肪酸を生産することができる。前記生産された新規ω－ヒドロキシ脂

肪酸は、ＧＣ／ＭＳ分析により構造を確認することができる。

【００４８】

上記目的を達成するために、本発明のさらに他の実施形態として、前記ＢＶＭＯを用いてケト脂肪酸から鎖内にエステル基が導入された脂肪酸誘導体を生産する方法を提供する。

【００４９】

以下、実施例を挙げて本発明をより詳細に説明する。しかし、これらの実施例は本発明を例示的に説明するためのものであり、本発明の範囲がこれらの実施例に限定されるものではない。

【実施例１】

【００５０】

多段階の酵素合成を用いたω－ヒドロキシノナン酸の生産

１）遺伝子クローニング

オレイン酸加水酵素とアルコール脱水素酵素遺伝子とを含む組換え発現ベクターを作製するために、ステノトロフォモナス・マルトフィリア由来のオレイン酸加水酵素遺伝子とミクロコッカス・ルテウス由来のアルコール脱水素酵素遺伝子のクローニングを行った。

【００５１】

まず、オレイン酸加水酵素遺伝子は、プラスミドベクターｐＥＴ２８（＋）ａ／オレイン酸加水酵素（非特許文献２）を鋳型とし、制限酵素であるＰｖｕＩとＸｈｏＩの切断部位を含むように作製されたプライマー（配列番号１及び２）を用いたＰＣＲを行って増幅した。

正方向プライマー：５’－ｇｃｔａｇｃａｔｇｔａｔｔａｃａｇｔａａｔｇｇｔａａｃｔａｔｇａａ－３’（配列番号１）

逆方向プライマー：５’－ｇｇｃｔｃｇａｇｃｔａｔａｔｔａｇｔｔｔａｃｔｔｔｃｔｔｔｃａ－３’（配列番号２）

【００５２】

前記増幅したＰＣＲ産物を制限酵素であるＰｖｕＩとＸｈｏＩで切断し、プラスミドベクターｐＡＣＹＣ（Novagen社製）に挿入してｐＡＣＹＣ／オレイン酸加水酵素発現ベクターを作製した。

【００５３】

また、アルコール脱水素酵素は、ミクロコッカス・ルテウス由来のアルコール脱水素酵素のＤＮＡ塩基配列（Genebank Accession No.ZP_07049769）を鋳型とし、制限酵素であるＥｃｏＲＩとＨｉｎｄＩＩＩの切断部位を含むように作製されたプライマー（配列番号３及び４）を用いたＰＣＲを行って増幅した。

正方向プライマー：５’－ａｔｃｇａａｔｔｃｇｔｃｃｇａｇｔｔｃａｃｃｃｇｔｔｔｃｇａ－３’（配列番号３）

逆方向プライマー：５’－ａｔａｔｃａａｇｃｔｔｃａｇｃｃｇａｇｃｇｇｇｇｔｇｔｃｃｔ－３’（配列番号４）

【００５４】

前記増幅したＰＣＲ産物を制限酵素であるＥｃｏＲＩとＨｉｎｄＩＩＩで切断し、前記作製されたｐＡＣＹＣ／オレイン酸加水酵素発現ベクターに挿入し、ｐＡＣＹＣ／オレイン酸加水酵素／アルコール脱水素酵素発現ベクターを作製した。

【００５５】

２）宿主細胞の培養

大腸菌Ｅ．ｃｏｌｉ ＢＬ２１（ＤＥ３）は、プラスミド保持のために１０ｇ／ｌグルコース及び適切な抗生剤が含まれるリーゼンバーグ（Riesenberg）培地で培養した。ここで、リーゼンバーグ培地は、４ｇ／ｌのＮ（NH_4）$_2$$HPO_4$、１３．５ｇ／ｌの$KH_2PO_4$、１．７ｇ／ｌのｃｉｔｒｉｃ ａｃｉｄ、１．４ｇ／ｌの$MgSO_4$、及び１０ｍｌ／ｌのｔｒａｃｅ ｍｅｔａｌ ｓｏｌｕｔｉｏｎ（１０ｇ／ｌの$FeSO_4$、２．２５ｇ／ｌの$ZnSO_4$、１．０ｇ／ｌの$CuSO_4$、０．５ｇ／ｌの$MnSO_4$、０．２３ｇ／

ｌの$Na_2B_4O_7$、２．０ｇ／ｌの$CaCl_2$、及び０．１ｇ／ｌの$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$）が含まれており、ミクロコッカス・ルテウスはＬＢ培地で培養した。

【００５６】

３）形質転換体を用いたω－ヒドロキシノナン酸の生産

まず、実施例１－１）のステノトロフォモナス・マルトフィリア由来のオレイン酸加水酵素遺伝子とミクロコッカス・ルテウス由来のアルコール脱水素酵素遺伝子が挿入されたｐＡＣＹＣ／オレイン酸加水酵素／アルコール脱水素酵素発現ベクターを実施例１－２）で培養した大腸菌ＢＬ２１（ＤＥ３）菌株に導入することにより１次形質転換体を作製した。

【００５７】

次に、前記１次形質転換体にシュードモナス・プチダ由来のＢＶＭＯ遺伝子を発現するように作製された発現ベクターｐＪＯＥ－ＫＴ２４４０ＢＶＭＯ（非特許文献１）を導入することにより、オレイン酸加水酵素、アルコール脱水素酵素及びＢＶＭＯを発現する２次形質転換体を作製した。

【００５８】

次に、前記２次形質転換体をリーゼンバーグミネラル培地で３０℃及び２００ｒｐｍの条件で培養しながら、ＩＰＴＧとラムノースを処理してオレイン酸加水酵素、アルコール脱水素酵素及びＢＶＭＯを発現させ、そこに１ｍＭのオレイン酸と反応させることにより、ω－ヒドロキシノナン酸を生産した（図２）。図２ａは前記２次形質転換体を用いて生産された、鎖内にエステル基が導入された脂肪酸の時間の経過に伴う生産量の変化を示すグラフであり、（●）はオレイン酸の濃度を示し、（△）は１０－ヒドロキシステアリン酸の濃度を示し、（▽）は１０－ケトステアリン酸の濃度を示し、（■）は鎖内にエステル基が導入された脂肪酸の濃度を示し、（▲）はω－ヒドロキシノナン酸の濃度を示す。図２ｂは反応終了後にエステル加水分解酵素で処理して反応産物をＧＣ／ＭＳで分析した結果を示す図である。オレイン酸から生産された、鎖内にエステル基が導入された脂肪酸は、ほとんどｎ－ノナン酸とω－ヒドロキシノナン酸に変換された。

【実施例２】

【００５９】

リシノール酸からのω－ヒドロキシウンデク－９－エン酸の生産

実施例１で作製した形質転換体を用いて、基質であるリシノール酸からω－ヒドロキシウンデク－９－エン酸を生産した。

【００６０】

すなわち、オレイン酸の代わりに１ｍＭのリシノール酸を加えることを除いては、実施例１－３）と同様の方法でω－ヒドロキシウンデク－９－エン酸を生産した（図３）。図３ａは前記形質転換体を用いてリシノール酸から生産された、鎖内にエステル基が導入された脂肪酸の時間の経過に伴う生産量の変化を示すグラフであり、（△）はリシノール酸の濃度を示し、（▽）は１２－ケトオレイン酸の濃度を示し、（■）は鎖内にエステル基が導入された脂肪酸の濃度を示し、（▲）はω－ヒドロキシウンデク－９－エン酸の濃度を示す。図３ｂは反応終了後にエステル加水分解酵素で処理して反応産物をＧＣ／ＭＳで分析した結果を示す図である。リシノール酸から生産された、鎖内にエステル基が導入された脂肪酸は、ほとんどｎ－ヘプタン酸とω－ヒドロキシウンデク－９－エン酸に変換された。

【実施例３】

【００６１】

レスクエロール酸からのω－ヒドロキシトリデク－１１－エン酸の生産

実施例１で作製した形質転換体を用いて、基質であるレスクエロール酸からω－ヒドロキシトリデク－１１－エン酸を生産した。

【００６２】

すなわち、オレイン酸の代わりに１ｍＭのレスクエロール酸を加えることを除いては、実施例１－３）と同様の方法でω－ヒドロキシトリデク－１１－エン酸を生産した（図４

）。図４は前記形質転換体とエステル加水分解酵素を用いてレスクエロール酸からω－ヒドロキシトリデク－１１－エン酸を生産し、その反応産物をＧＣ／ＭＳで分析した結果を示す図である。レスクエロール酸は、ほとんどヘプタン酸とω－ヒドロキシトリデク－１１－エン酸に変換された。

【実施例４】

【００６３】

オレイン酸からのα，ω－デカンニ酸の生産

実施例１で作製したｐＡＣＹＣ／オレイン酸加水酵素／アルコール脱水素酵素発現ベクターとシュードモナス・フルオレッセンス由来のＢＶＭＯ遺伝子発現ベクター（非特許文献３）を大腸菌ＢＬ２１（ＤＥ３）菌株に導入して形質転換体を作製し、それを用いて基質であるオレイン酸からα，ω－デカンニ酸（セバシン酸）を生産した（図５）。図５ａは前記形質転換体を用いて生産された、鎖内にエステル基が導入された脂肪酸の時間の経過に伴う生産量の変化を示すグラフであり、（●）はオレイン酸の濃度を示し、（△）は１０－ヒドロキシステアリン酸の濃度を示し、（▽）は１０－ケトステアリン酸の濃度を示し、（■）は鎖内にエステル基が導入された脂肪酸の濃度を示す。図５ｂは反応終了後にエステル加水分解酵素で処理して反応産物をＧＣ／ＭＳで分析した結果を示す図である。オレイン酸から生産された、鎖内にエステル基が導入された脂肪酸は、ほとんどセバシン酸とノルマルオクタノールに変換された。

【実施例５】

【００６４】

オレイン酸からのα，ω－ノナンニ酸の生産

１）遺伝子クローニング

エステル加水分解酵素とアルコール脱水素酵素遺伝子とを含む組換え発現ベクターを作製するために、シュードモナス・フルオレッセンス由来のエステル加水分解酵素遺伝子とシュードモナス・プチダ由来のアルコール脱水素酵素遺伝子をクローニングした。

【００６５】

まず、エステル加水分解酵素遺伝子は、プラスミドベクターｐＧＡＳＴＯＮ／エステル加水分解酵素（非特許文献４）を鋳型とし、制限酵素であるＮｄｅＩとＸｈｏＩの切断部位を含むように作製されたプライマー（配列番号５及び６）を用いたＰＣＲを行って増幅した。

正方向プライマー：５’－ｇｃｇｃｃａｔａｔｇａｔｇａｇｃａｃａｔｔｔｇｔｔｇｃａａａａ－３’（配列番号５）

逆方向プライマー：５’－ｇｃｇｃｃｔｃｇａｇｔｃａｇｔｇｇｔｇａｔｇｇｔｇａｔｇａｔｇａｃｔｃｃｇｃｃｇｃｃａｃｔｔｔ－３’（配列番号６）

【００６６】

前記増幅したＰＣＲ産物を制限酵素であるＮｄｅＩとＸｈｏＩで切断し、プラスミドベクターｐＣＯＬＡｄｕｅｔ－１（Novagen社製）に挿入してｐＣＯＬＡｄｕｅｔ－１／エステル加水分解酵素発現ベクターを作製した。

【００６７】

また、アルコール脱水素酵素は、シュードモナス・プチダ由来のアルコール脱水素酵素のＤＮＡ塩基配列（非特許文献５）を鋳型とし、制限酵素であるＢａｍＨＩとＮｏｔＩの切断部位を含むように作製されたプライマー（配列番号７及び８）を用いたＰＣＲを行って増幅した。

正方向プライマー：５’－ｇｃｇｃｇｇａｔｃｃｇａｔｇｔａｃｇａｃｔａｔａａｔｃｇｔｔ－３’（配列番号７）

逆方向プライマー：５’－ｇｃｇｃｇｃｇｇｃｃｇｃｔｔａｇｔｇｇｔｇａｔｇｇｔｇａｔｇａｔｇｃａｔｇｃａｇａｃａｇｃｔａｔ－３’（配列番号８）

【００６８】

前記増幅したＰＣＲ産物を制限酵素であるＢａｍＩとＮｏｔＩで切断し、前記作製されたｐＣＯＬＡｄｕｅｔ－１／エステル加水分解酵素発現ベクターに挿入し、ｐＣＯＬＡｄ

ｕｅｔ－１／エステル加水分解酵素／アルコール脱水素酵素発現ベクターを作製した。

【００６９】

２）形質転換体を用いたα，ω－ノナンニ酸の生産

まず、実施例５－１）のシュードモナス・フルオレッセンス由来のエステル加水分解酵素とシュードモナス・プチダ由来のアルコール脱水素酵素遺伝子が挿入されたｐＣＯＬＡｄｕｅｔ－１／エステル加水分解酵素／アルコール脱水素酵素発現ベクターを実施例１－２）で培養した大腸菌ＢＬ２１（ＤＥ３）菌株に導入することにより形質転換体を作製した。

【００７０】

実施例１で作製した形質転換体と実施例５－１）で作製した形質転換体を用いて、基質であるオレイン酸からα，ω－ノナンニ酸（アゼライン酸）を生産した。実施例１で作製した形質転換体を用いて、オレイン酸から鎖内にエステル基が導入された脂肪酸を生産し、実施例５－１）で作製した形質転換体を用いて、鎖内にエステル基が導入された脂肪酸からアゼライン酸を生産した（図６）。図６は生産されたアゼライン酸の時間の経過に伴う生産量の変化を示すグラフであり、（■）は鎖内にエステル基が導入された脂肪酸の濃度を示し、（▲）はω－ヒドロキシノナン酸の濃度を示し、（◇）は９－オキソノナン酸の濃度を示し、（◆）はアゼライン酸の濃度を示す。

【実施例６】

【００７１】

リシノール酸からのα，ω－ウンデク－２－エンニ酸の生産

実施例１で作製したｐＡＣＹＣ／オレイン酸加水酵素／アルコール脱水素酵素発現ベクター、シュードモナス・プチダ由来のＢＶＭＯ遺伝子発現ベクター、及び実施例５－１）で作製したｐＣＯＬＡｄｕｅｔ－１／エステル加水分解酵素／アルコール脱水素酵素発現ベクターを大腸菌ＢＬ２１（ＤＥ３）菌株に導入して形質転換体を作製した。

【００７２】

前記形質転換体を用いて、リシノール酸（$C_{18}H_{34}O_3$）からα，ω－ウンデク－２－エンニ酸を生産した（図７）。図７は前記形質転換体を用いてリシノール酸から生産されたα，ω－ウンデク－２－エンニ酸の時間の経過に伴う生産量の変化を示すグラフであり、（△）はリシノール酸の濃度を示し、（▽）は１２－ケトオレイン酸の濃度を示し、（■）は鎖内にエステル基が導入された脂肪酸の濃度を示し、（▲）はω－ヒドロキシウンデク－９－エン酸の濃度を示し、（◇）は９－オキソウンデク－９－エン酸の濃度を示し、（◆）はα，ω－ウンデク－２－エンニ酸の濃度を示す。

【００７３】

なお、前記形質転換体を用いることにより、レスクエロール酸からヘプタン酸とα，ω－トリデク－２－エンニ酸を生産することができた。

【実施例７】

【００７４】

オレイン酸からのα－アミノエンニ酸の生産

１）形質転換体の作製

まず、実施例５－１）のシュードモナス・フルオレッセンス由来のエステル加水分解酵素とシュードモナス・プチダ由来のアルコール脱水素酵素遺伝子が挿入されたｐＣＯＬＡｄｕｅｔ－１／エステル加水分解酵素／アルコール脱水素酵素発現ベクターを大腸菌に導入して１次形質転換体を作製した。

【００７５】

次に、前記１次形質転換体にシリシバクター由来のアミノ基転移酵素を発現するベクター（非特許文献６）を導入することにより、エステル加水分解酵素、アルコール脱水素酵素及びアミノ基転移酵素を発現する２次形質転換体を作製した。

【００７６】

２）形質転換体を用いたα－アミノエンニ酸の生産

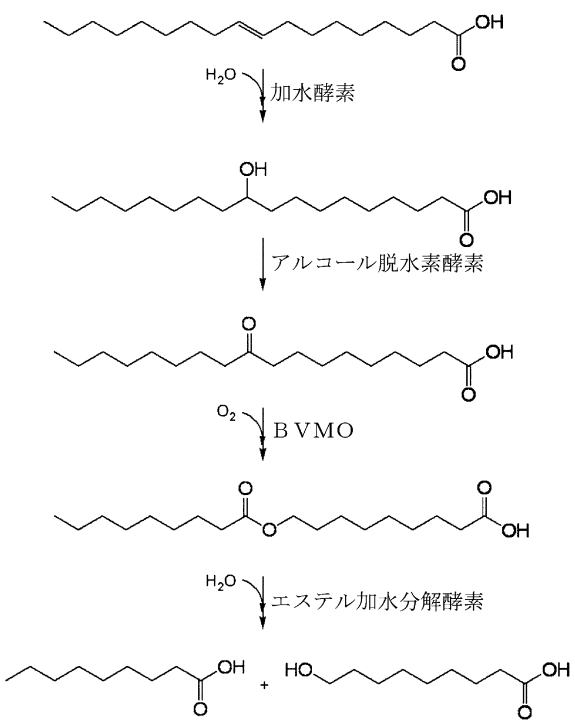
実施例１で作製した形質転換体と実施例６－１）で作製した２次形質転換体を用いて、

基質であるオレイン酸からα－アミノエンニ酸を生産した。実施例１で作製した形質転換体を用いて、オレイン酸から鎖内にエステル基が導入された脂肪酸を生産し、実施例６－１）で作製した形質転換体を用いて、鎖内にエステル基が導入された脂肪酸からα－アミノエンニ酸を生産した（図８）。図８は生産されたα－アミノエンニ酸の時間の経過に伴う生産量の変化を示すグラフであり、（■）は鎖内にエステル基が導入された脂肪酸の濃度を示し、（▲）はω－ヒドロキシノナン酸の濃度を示し、（◇）は９－オキソノナン酸の濃度を示し、（◆）はα－アミノエンニ酸の濃度を示す。

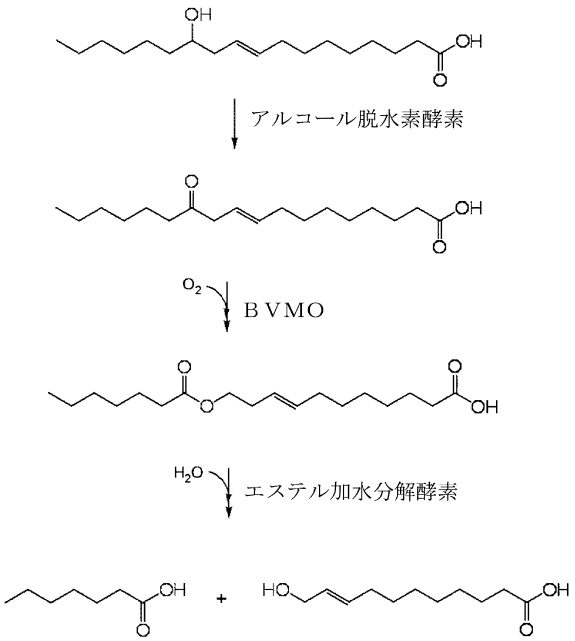
【００７７】

なお、前記形質転換体を用いることにより、リシノール酸からヘプタン酸とα－アミノウンデク－９－エン酸を生産することができた。

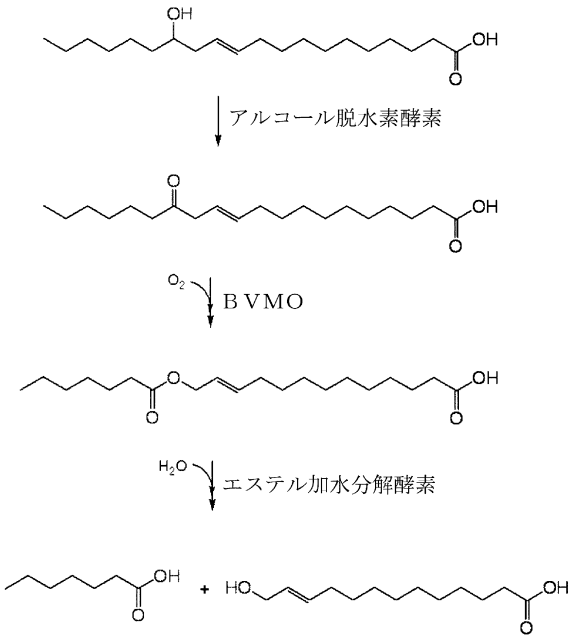
【図１ａ】



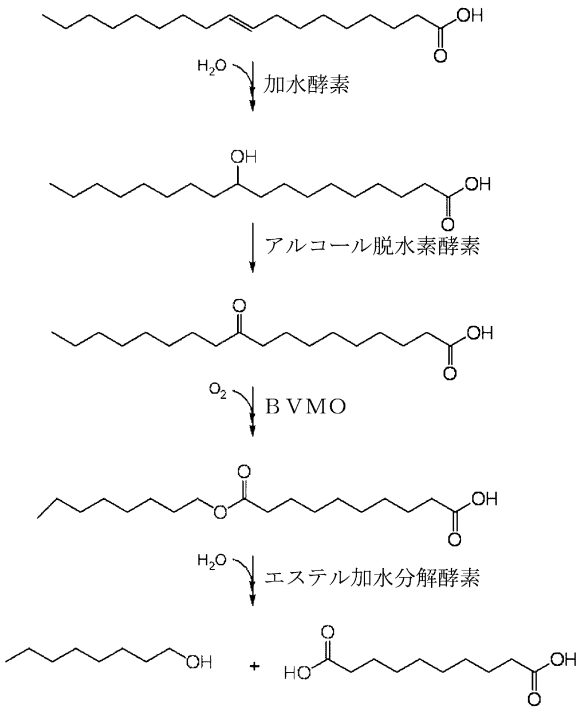
【図１ｂ】



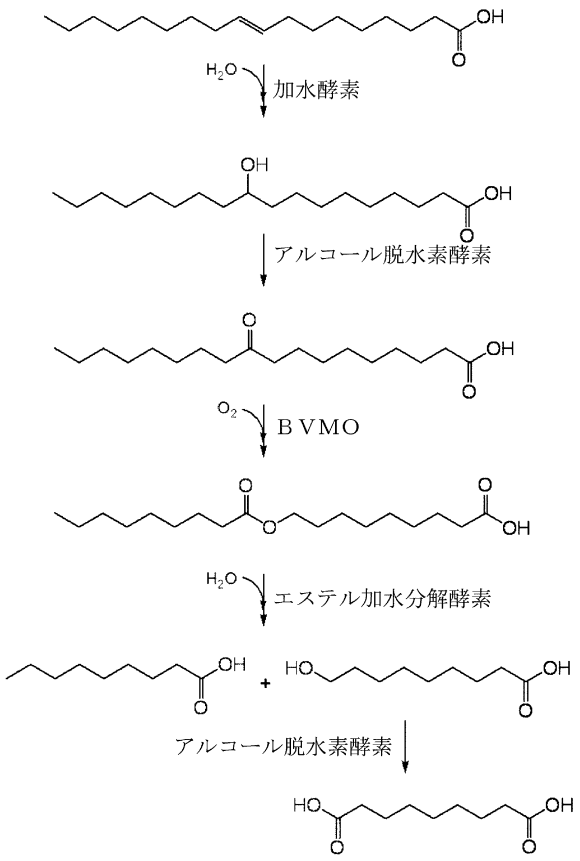
【図１ｃ】



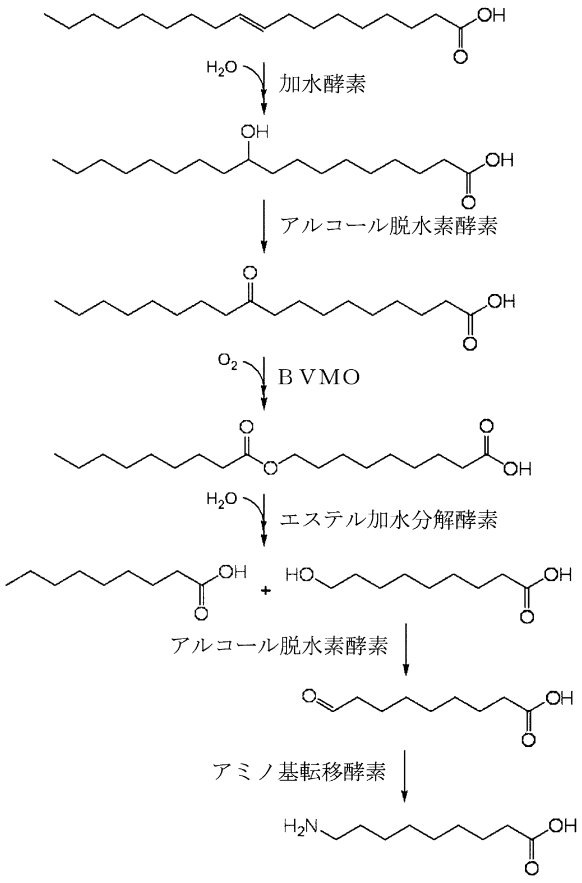
【図１ｄ】



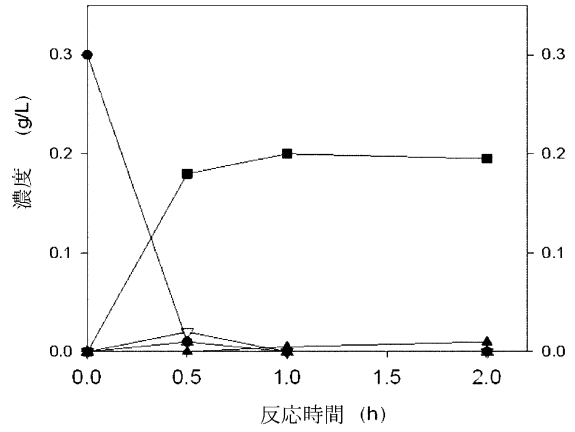
【図１ｅ】



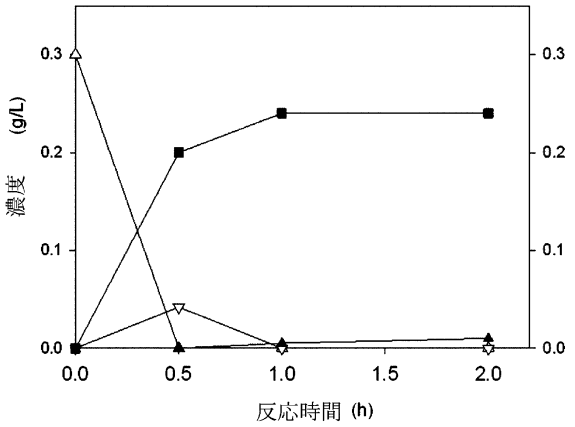
【図１ｆ】



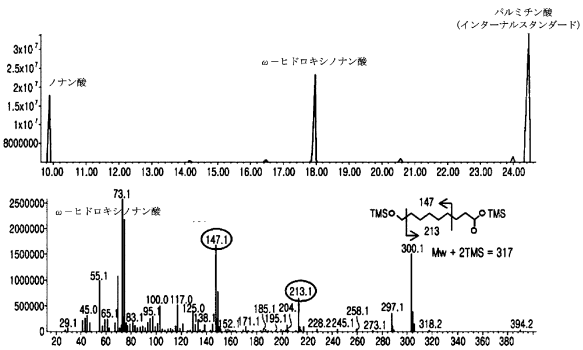
【図２ａ】



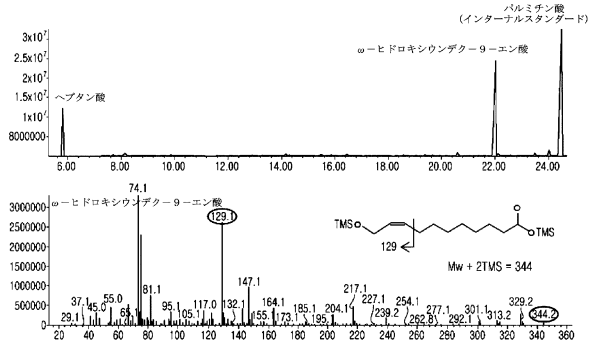
【図３ａ】



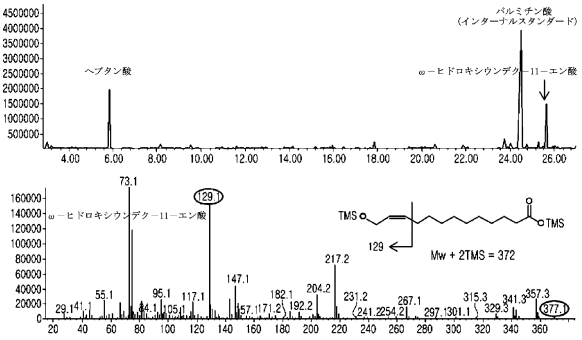
【図２ｂ】



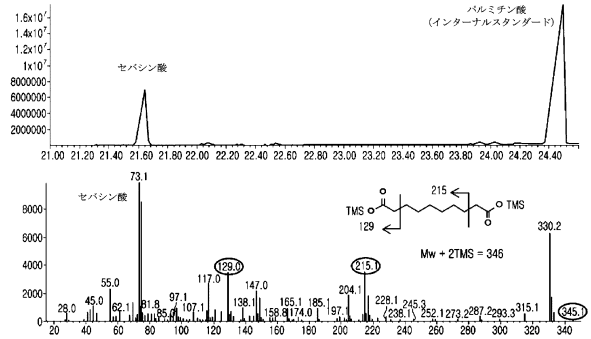
【図３ｂ】



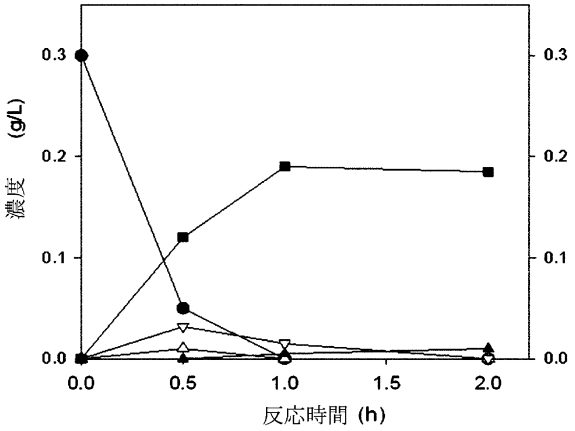
【図４】



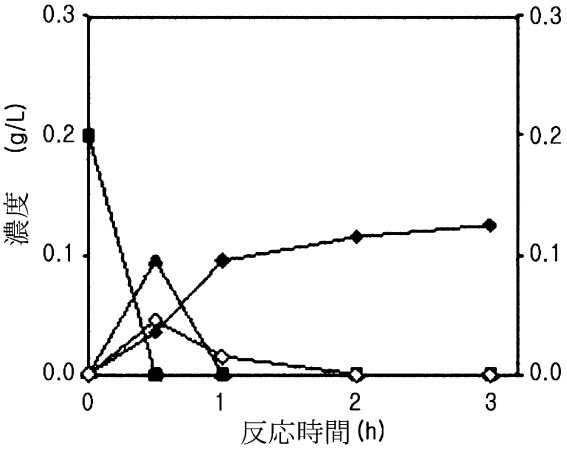
【図５ｂ】



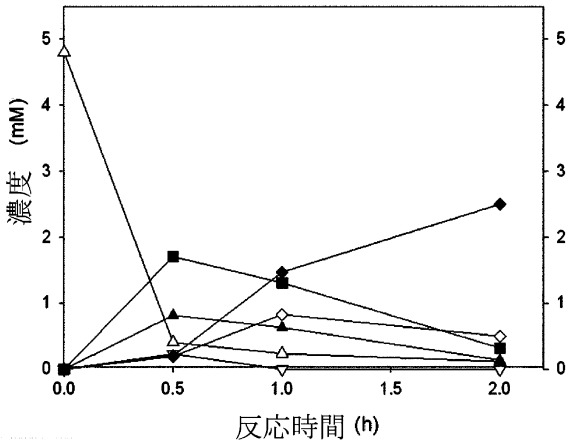
【図５ａ】



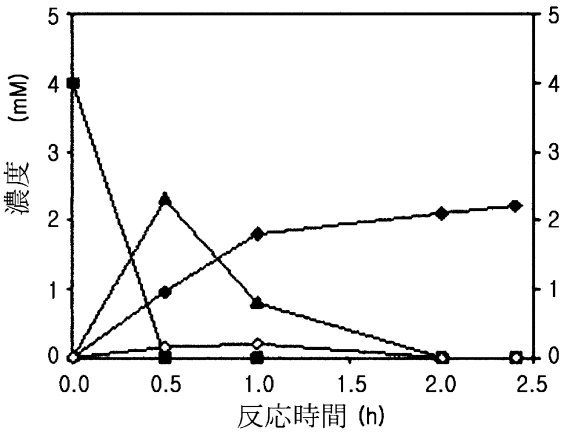
【図６】



【図７】



【図８】



【配列表】

0006104361000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI	
C12P	*7/04*	*(2006.01)*	C12P	7/04
C12P	*7/42*	*(2006.01)*	C12P	7/42
C12P	*7/44*	*(2006.01)*	C12P	7/44
C12P	*7/64*	*(2006.01)*	C12P	7/64

(31)優先権主張番号 10-2013-0005814
(32)優先日 平成25年1月18日(2013.1.18)
(33)優先権主張国 韓国(KR)

前置審査

(72)発明者 ジョン, ウン ヨン
大韓民国 ５７０－７７３ チョルラブッート イクサンーシ プソンードン プヨン ５ーチャ アパートメント ５０５－８０１

審査官 川合 理恵

(56)参考文献 Appl. Microbiol. Biotechnol., 2007, Vol. 75, pp. 1095-1101
J. Chem. Soc., 1963, pp. 5889-5893
Eur. J. Org. Chem., 2002, pp. 3711-3730
Biochem. Lett., 2007, Vol. 29, pp. 1393-1398
Appl. Microbiol. Biotechnol., 2007, Vol. 73, pp. 1065-1072
Appl. Environ. Microbiol., 2009, Vol. 75, No. 10, pp. 3106-3114

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ １５／００－１５／９０
Ｃ１２Ｐ １／００－４１／００
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＲＥＧＩＳＴＲＹ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ／ＷＰＩＤＳ（ＳＴＮ）
ＰｕｂＭｅｄ