(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2020年10月8日(08.10.2020)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2020/203751 A1

(51) 国際特許分類:
C12P 7/64 (2006.01) *C12N 1/20* (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01) *C12N 1/21* (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01) *C12N 15/60* (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01) *C12N 9/88* (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2020/013983

(22) 国際出願日： 2020年3月27日(27.03.2020)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

(30) 優先権データ：
特願 2019-067966 2019年3月29日(29.03.2019) JP

(71) 出願人: 国立大学法人京都大学 (**KYOTO UNIVERSITY**) [JP/JP]; 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町３６番地１ Kyoto (JP). 日東薬品工業株式会社 (**NITTO PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD.**) [JP/JP]; 〒6170006 京都府向日市上植野町南開３５－３ Kyoto (JP).

(72) 発明者: 小川 順 (**OGAWA, Jun**); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町３６番地１ 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 岸野 重信 (**KISHINO, Shigenobu**); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町３６番地１ 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 北尾 浩平 (**KITAO, Kohey**); 〒6170006 京都府向日市上植野町南開３５－３ 日東薬品工業株式会社内 Kyoto (JP).

(74) 代理人: 高島 一 (**TAKASHIMA, Hajime**); 〒5410044 大阪府大阪市中央区伏見町四丁目１番１号 明治安田生命大阪御堂筋ビル Osaka (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：
— 国際調査報告（条約第21条(3)）
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則5.2(a)）

WO 2020/203751 A1

(54) **Title:** PRODUCTION METHOD FOR RARE FATTY ACID USING NOVEL ENZYME, AND NOVEL RARE FATTY ACID

(54) 発明の名称： 新規酵素を用いた希少脂肪酸の製造法ならびに新規希少脂肪酸

(57) **Abstract:** The present invention provides production methods for a hydroxylated fatty acid by a hydration reaction using a novel enzyme derived from a soil bacterium of the genus *Clostridium*, by using a fatty acid as a substrate. The present invention also provides a novel useful rare fatty acid that is obtained by these production methods.

(57) 要約：本発明は、脂肪酸を基質とした、土壌のクロストリジウム属に由来する新規酵素を用いた水和反応による水酸化脂肪酸の製造方法を提供する。また、これら製造法により得られる利用価値のある新規の希少脂肪酸も提供する。

明　細　書

発明の名称 ：

新規酵素を用いた希少脂肪酸の製造法ならびに新規希少脂肪酸

技術分野

[0001] 本発明は、脂肪酸の製造法に関する。詳細には、不飽和脂肪酸を原料とした、新規酵素による水和反応を特徴とした水酸化脂肪酸の製造に関する。また、これら製造法により得られる新規の希少脂肪酸に関する。

背景技術

[0002] 共役リノール酸（conjugated linoleic acid, CLA）に代表される共役脂肪酸は、脂質代謝改善作用、抗動脈硬化作用、体脂肪減少作用等、様々な生理活性を有することが報告されており（非特許文献１－３）、医薬・機能性食品等を始めとして様々な分野への利用に注目されている機能性脂質である（特許文献１、２）。CLAは、反芻動物の胃に存在する微生物により生成されるため乳製品や肉製品に含まれることや植物油にわずかに存在することが知られているが、その生成の詳細なメカニズムについては知られていない。

[0003] 本発明者らは、ラクトバチルス・プランタルム（Lactobacillus plantarum）の菌体内に存在する酵素（CLA-HY,CLA-DC,CLA-DH）が、リノール酸を共役リノール酸へ変換する反応に必須であることを報告した（特許文献１）。これらの酵素反応における具体的な一連の反応メカニズムや中間体等の存在を報告した（特許文献４）。これらの酵素反応はリノール酸等の炭素数18の不飽和脂肪酸の10位に水酸基、カルボニル基を有する希少脂肪酸の製造に有効であった。更にラクトバチルス・アシドフィルスの菌体内に存在する酵素の存在を報告した（特許文献５）。この酵素は、リノール酸等の炭素数18の不飽和脂肪酸の13位に水酸基、カルボニル基を有する希少脂肪酸の製造に有効であり、また、炭素数20の不飽和脂肪酸の12位と15位、炭素数16の不飽和脂肪酸の10位、炭素数22の不飽和脂肪酸の水酸化基、カルボニル基を有する希少脂肪酸や、パルミトレイン酸等の炭素数16の不飽和脂肪酸の10位に水酸基

、カルボニル基を有する希少脂肪酸の製造にも有用であった。ラクトバチルス・アシドフィルスの水和酵素は、炭素数22のドコサヘキサエン酸の14位を水酸化することにも有効であったが、ドコサヘキサエン酸、ドコサペンタエン酸の11位に水酸基を付与する効果はなく、これら脂肪酸の製造法は知られていなかった。また、ラクトバチルス・アシドフィルスの酵素はエイコサペンタエン酸の12位を水酸化するのに有効ではなく、エイコサペンタエン酸を水和して12位を水酸化する技術は知られていなかった。

[0004] 加えて、近年トマトに含有される９－オキソ－オクタデカジエン酸や１３－オキソ－オクタデカジエン酸等のオキソ脂肪酸に、脂質代謝改善等の生活習慣病を改善する活性が報告されている（特許文献３、非特許文献４、５）。さらに、発明者らは10位、13位に水酸基やオキソ基を有する炭素数18の水酸化脂肪酸やオキソ脂肪酸に、代謝改善、脂質代謝改善等の生活習慣病を改善する活性や、腸管バリア機能を改善させる活性、抗炎症作用を有することを報告しており（特許文献６、７、８、９）、水酸化脂肪酸、オキソ脂肪酸に対する関心が高まっている。しかし、水酸化脂肪酸やオキソ脂肪酸は、不飽和脂肪酸の分子内に複数存在する二重結合を識別し、特定の位置に水酸基、カルボニル基を導入する必要があるため、不飽和脂肪酸から機能性水酸化脂肪酸、機能性オキソ脂肪酸を合成することは困難となっている。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特開２００７－２５９７１２号公報

特許文献2：特開２００７－２５２３３３号公報

特許文献3：特開２０１１－１８４４１１号公報

特許文献4：WO2013/168310

特許文献5：WO2015/111699

特許文献6：WO2014/069227

特許文献7：WO2014/129384

特許文献8：WO2015/111700

特許文献9：WO2015/111701

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Ha YL, (1987), Carcinogenesis, vol.8, no.12, p.1881-1887

非特許文献2：Clement Ip, (1991), Cancer Res., vol.51, p.6118-6124

非特許文献3：Kisun NL, (1994), Atherosclerosis, vol.108, p.19-25

非特許文献4：Kim Y-I,(2011), Mol. Nutr. Food Res., vol.55, p.585-593

非特許文献5：Kim Y-I,(2012),PLoS ONE, vol.7, no.2, e31317

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明の目的は、不飽和脂肪酸を原料とし、新規酵素を用いて、酸素を要さずに水酸化脂肪酸を製造する方法を提供することである。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、土壌由来クロストリジウム属の微生物が炭素数22の不飽和脂肪酸であるドコサヘキサエン酸の11位を水酸化する反応を明らかにし、これらの生成に関与する新規酵素（FA-HYcx1）を同定した。

[0009] 本発明者らは、新規酵素（FA-HYcx1）を用い炭素数20位の不飽和脂肪酸を水酸化脂肪酸とする方法を見出し、さらに生成した物質の水酸基を化学反応によりオキソ化する方法を見出した。

[0010] 本発明者らは、新規酵素（FA-HYcx1）を用いた新たな希少脂肪酸の製造方法により、これまで発見されていない構造の水酸化脂肪酸及びオキソ脂肪酸を生成し、それらに核内受容体PPARα、PPARγおよびPPARδのアゴニストとしての活性があることを見出した。

[0011] 具体的には、本発明者らは、新規酵素（FA-HYcx1）を用いて、ドコサヘキサエン酸（DHA）から11-ヒドロキシ-シス-4，シス-7，シス-13，シス-16，シス-19-ドコサペンタエン酸が生成されることを見出し、さらに、11-ヒドロキシ-シス-4，シス-7，シス-13，シス-16，シス-19-ドコサペンタエン酸を、クロム酸を用いる化学的酸化法を導入して11-オキソ-シス-4，シス-7，シス-13

，シス-16，シス-19-ドコサペンタエン酸が生成されることを見出した。

[0012] さらに検討した結果、本発明者らは、新規酵素（FA-HYcx1）を用いて、ドコサペンタエン酸（DPA）から11-ヒドロキシ-シス-7，シス-13，シス-16，シス-19-ドコサテトラエン酸が生成されることを発見し、10位にシス二重結合を有する炭素数22の不飽和脂肪酸を基質とし、11位が水酸化された脂肪酸が生成されることを見出した。

[0013] また、本発明者らは、新規酵素（FA-HYcx1）を用いて、9位にシス型二重結合を有する炭素数18の不飽和脂肪酸（リノール酸、γ-リノレン酸、α-リノレン酸、オレイン酸等）、11位にシス型二重結合を有する炭素数20の不飽和脂肪酸（エイコサペンタエン酸、ジホモ-γ-リノレン酸、ミード酸、アラキドン酸等）を基質とし、それぞれ、10位、12位が水酸化された脂肪酸が生成されることを見出した。特許文献５における水和酵素（FA-HY）はエイコサペンタエン酸の11位のシス二重結合を水和しないが、新規酵素（FA-HYcx1）は11位のシス二重結合を水和し、12位が水酸化された脂肪酸の12-ヒドロキシ-シス-5，シス-8，シス-14，シス-17-エイコサテトラエン酸が生成されることを見出した。

[0014] 本発明者らは、本発明により得られた生成物の水酸化脂肪酸の中には、これまでに見出されていない構造を持つ脂肪酸、即ち新規の物質が含まれていることを見出した。また、本発明者らは、新規脂肪酸を含むこれら水酸化脂肪酸には、核内受容体PPARα、PPARγ及びPPARδのアゴニストとしての活性があることを発見した。従って、前記水酸化脂肪酸は、代謝改善剤等に利用できる。

[0015] また、本発明者らは、かかる水酸化脂肪酸を原料とし、クロム酸を用いる化学的酸化法を導入することで、オキソ脂肪酸を生成できることを見出した。これら生成物のオキソ脂肪酸もまた、これまでに知られていない構造を持つ新規の物質であった。新規脂肪酸を含むこれらオキソ脂肪酸にも、核内受容体PPARα、PPARγ及びPPARδのアゴニストとしての活性があることと考えられることから、前記オキソ脂肪酸もまた、代謝改善剤等に利用できる。以

上の知見に基づき、本発明が完成された。

[0016] 即ち、本発明は下記のとおりである：

［１］以下の（ａ）～（ｃ）のいずれかの酵素タンパク質。

（ａ）配列番号２に示されるアミノ酸配列からなる酵素タンパク質、

（ｂ）配列番号２に示されるアミノ酸配列において、１又は複数個のアミノ酸が欠失及び／又は置換及び／又は挿入及び／又は付加されたアミノ酸配列を含み、かつ水和反応を触媒する酵素活性を有するタンパク質、

（ｃ）配列番号１に示される塩基配列の相補鎖配列からなる核酸と、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列によってコードされ、かつ水和反応を触媒する酵素活性を有するタンパク質；

［２］［１］に記載の酵素タンパク質を含む、クロストリジウム属の菌体または菌体破砕物；

［３］［１］に記載の酵素タンパク質をコードする核酸；

［４］［３］に記載の核酸を含むベクター；

［５］［４］に記載のベクターで形質転換された宿主細胞；

［６］［５］に記載の宿主細胞を培養し、該培養物から［１］に記載の酵素タンパク質を回収することを含む、該酵素の製造方法；

［７］10位にシス型二重結合を有する炭素数22の不飽和脂肪酸から、［１］に記載の酵素タンパク質を用いた水和反応により、11位に水酸基を有する炭素数22の水酸化脂肪酸を製造する方法；

［８］10位にシス型二重結合を有する炭素数22の不飽和脂肪酸から、［１］に記載の酵素タンパク質を用いた水和反応により、11位に水酸基を有する炭素数22の水酸化脂肪酸を誘導し、該水酸化脂肪酸から、脱水素反応又は化学的酸化により、11位にカルボニル基を有する炭素数22のオキソ脂肪酸を製造する方法；

［９］11位にシス型二重結合を有する炭素数20の不飽和脂肪酸から、［１］に記載の酵素タンパク質を用いた水和反応により、12位に水酸基を有する炭素数20の水酸化脂肪酸を製造する方法；

［１０］11位にシス型二重結合を有する炭素数20の不飽和脂肪酸から、［１］に記載の酵素タンパク質を用いた水和反応により、12位に水酸基を有する炭素数20の水酸化脂肪酸を誘導し、該水酸化脂肪酸から、脱水素反応又は化学的酸化により、12位にカルボニル基を有する炭素数20のオキソ脂肪酸を製造する方法；

［１１］9位にシス型二重結合を有する炭素数18の不飽和脂肪酸から、［１］に記載の酵素タンパク質を用いた水和反応により、10位に水酸基を有する炭素数18の水酸化脂肪酸を製造する方法；

［１２］9位にシス型二重結合を有する炭素数18の不飽和脂肪酸から、［１］に記載の酵素タンパク質を用いた水和反応により、10位に水酸基を有する炭素数18の水酸化脂肪酸を誘導し、該水酸化脂肪酸から、脱水素反応又は化学的酸化により、10位にカルボニル基を有する炭素数18のオキソ脂肪酸を製造する方法；

［１３］10位にシス型二重結合を有する炭素数22の不飽和脂肪酸が、ドコサヘキサエン酸またはドコサペンタエン酸である［７］または［８］に記載の方法；

［１４］11位にシス型二重結合を有する炭素数20の不飽和脂肪酸が、エイコサペンタエン酸、ジホモ-γ-リノレン酸、ミード酸、エイコサテトラエン酸、エイコサトリエン酸またはアラキドン酸である［９］または［１０］に記載の方法；

［１５］9位にシス型二重結合を有する炭素数18の不飽和脂肪酸が、リノール酸、αリノレン酸、γリノレン酸またはオレイン酸である［１１］または［１２］に記載の方法；

［１６］［７］の方法によって製造される、11-ヒドロキシ-シス-4, シス-7, シス-13, シス-16, シス-19-ドコサペンタエン酸または11-ヒドロキシ-シス-7, シス-13, シス-16, シス-19-ドコサテトラエン酸；

［１７］［９］の方法によって製造される、12-ヒドロキシ-シス-5, シス-8, シス-14, シス-17-エイコサテトラエン酸；

［１８］［８］の方法によって製造される、11-オキソ-シス-4, シス-7, シス-13, シス-16, シス-19-ドコサペンタエン酸または11-オキソ-シス-7, シス-13, シス-16, シス-19-ドコサテトラエン酸；

［１９］［１０］の方法によって製造される、12-オキソ-シス-5, シス-8, シス-14, シス-17-エイコサテトラエン酸；

［２０］［１６］－［１９］のいずれか１つに記載の水酸化脂肪酸またはオキソ脂肪酸を含む脂肪酸含有物；

［２１］医薬組成物である［２０］に記載の脂肪酸含有物；

［２２］食品または食品添加物である［２０］に記載の脂肪酸含有物；

［２３］化粧品または化粧品添加物である［２０］に記載の脂肪酸含有物；

［２４］飼料は飼料添加物である［２０］に記載の脂肪酸含有物；

［２５］［１６］－［１９］のいずれか１つに記載の水酸化脂肪酸またはオキソ脂肪酸を生産するための、［１］に記載の酵素タンパク質を含む、クロストリジウム属菌体または菌体破砕物の使用。

発明の効果

[0017] 本発明者らは、従来知られていなかった脂肪酸水和酵素（FA-HYcx1）を見出し、炭素数２２、２０、１８の不飽和脂肪酸を水酸化脂肪酸とする方法を見出し、さらに生成した物質の水酸基を化学反応によりオキソ化する方法を見出した。かかる方法により製造される希少脂肪酸等は、医薬組成物・食品・化粧品等の様々な分野で使用される点でも、極めて有用である。また、新規酵素による製造により新規希少脂肪酸が製造できるようになり、該新規希少脂肪酸も核内受容体PPARα、PPARγ及びPPARδのアゴニストとしての活性があることから、該新規希少脂肪酸は、医薬組成物・食品・化粧品等の様々な分野で有用な物質となる。

図面の簡単な説明

[0018] [図1]DHA由来、EPA由来の希少脂肪酸のPPARα、PPARγおよびPPARδアゴニスト活性の結果を示す。縦軸は、相対的なルシフェラーゼ活性を示す。

発明を実施するための形態

[0019] 以下、本発明の詳細を説明する。

[0020] 本発明は、新規脂肪酸水和酵素「FA-HYcx1」を提供する。

具体的には、本発明の新規酵素「FA-HYcx1」は、

（ａ）配列番号２に示されるアミノ酸配列からなる酵素タンパク質、

（ｂ）配列番号２に示されるアミノ酸配列において、１又は複数個のアミノ酸が欠失及び／又は置換及び／又は挿入及び／又は付加されたアミノ酸配列を含み、かつ配列番号２に示されるアミノ酸配列からなる酵素タンパク質が有する酵素活性を有するタンパク質、あるいは

（ｃ）配列番号１に示される塩基配列の相補鎖配列からなる核酸と、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列によってコードされ、かつ配列番号２に示されるアミノ酸配列からなる酵素タンパク質が有する酵素活性を有するタンパク質である。

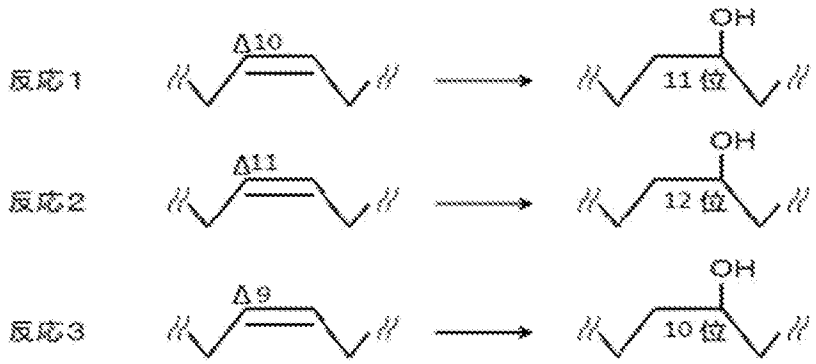
[0021] 上記（ｂ）に関し、より具体的には、（ｉ）配列番号２に示されるアミノ酸配列中の1～20個、好ましくは1～10個、より好ましくは1～数（5、4、3もしくは2）個のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、（ｉｉ）配列番号２に示されるアミノ酸配列に1～20個、好ましくは1～10個、より好ましくは1～数（5、4、3もしくは2）個のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、（ｉｉｉ）配列番号２に示されるアミノ酸配列に1～20個、好ましくは1～10個、より好ましくは1～数（5、4、3もしくは2）個のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、（ｉｖ）配列番号２に示されるアミノ酸配列中の1～20個、好ましくは1～10個、より好ましくは1～数（5、4、3もしくは2）個のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、又は（ｖ）それらを組み合わせたアミノ酸配列を含むタンパク質が挙げられる。性質の似たアミノ酸（例えば、グリシンとアラニン、バリンとロイシンとイソロイシン、セリンとトレオニン、アスパラギン酸とグルタミン酸、アスパラギンとグルタミン、リシンとアルギニン、システインとメチオニン、フェニルアラニンとチロシン等）同士の置換等であれば、さらに多くの個数の置換等がありうる。

上記のようにアミノ酸が欠失、置換又は挿入されている場合、その欠失、

置換、挿入の位置は、上記酵素活性が保持される限り、特に限定されない。

[0022] 上記（ｃ）において「ストリンジェントな条件」とは、同一性が高いヌクレオチド配列同士、例えば70、80、90、95又は99％以上の同一性を有するヌクレオチド配列同士がハイブリダイズし、それより同一性が低いヌクレオチド配列同士がハイブリダイズしない条件、具体的には通常のサザンハイブリダイゼーションの洗浄条件である60℃、1xSSC、0.1％SDS、好ましくは、0.1xSSC、0.1％SDS、さらに好ましくは、68℃、0.1xSSC、0.1％SDSに相当する塩濃度及び温度で、1回、より好ましくは2～3回洗浄する条件等が挙げられる。特に、68℃、0.1xSSC、0.1%SDSで3回洗浄する条件以上の過酷な条件を、ハイストレンジェントな条件ともいう。

[0023] [化1]



[0024] 上記（ｂ）または（ｃ）に関し、配列番号２に示されるアミノ酸配列からなる酵素タンパク質が有する酵素活性としては、（１）10位にシス型二重結合を有する炭素数22の不飽和脂肪酸（以下、「cis-10不飽和脂肪酸」と略記する場合がある）を基質として利用し、11位に水酸基を有する炭素数22の水酸化脂肪酸（以下、「11-hydroxy脂肪酸」と略記する場合がある）に変換し得る酵素活性（反応１）、（２）11位にシス型二重結合を有する炭素数20の不飽和脂肪酸（以下、「cis-11不飽和脂肪酸」と略記する場合がある）を基質として利用し、12位に水酸基を有する炭素数20の水酸化脂肪酸（以下、「12-hydroxy脂肪酸」と略記する場合がある）に変換し得る酵素活性（反応２）、（３）9位にシス型二重結合を有する炭素数18の不飽和脂肪酸（以下、「ci

s-9不飽和脂肪酸」と略記する場合がある）を基質として利用し、10位に水酸基を有する炭素数18の水酸化脂肪酸（以下、「10-hydroxy脂肪酸」と略記する場合がある）に変換し得る酵素活性（反応３）の少なくとも１つ、好ましくは全てを有していれば特に制限はない。

上記の「cis-10不飽和脂肪酸」、「cis-11不飽和脂肪酸」、「cis-9不飽和脂肪酸」としては、それぞれ、10位にシス型二重結合を有する炭素数22の不飽和脂肪酸、11位にシス型二重結合を有する炭素数20の不飽和脂肪酸、9位にシス型二重結合を有する炭素数18の不飽和脂肪酸であれば特に制限されず、例えば一価不飽和脂肪酸、二価不飽和脂肪酸、三価不飽和脂肪酸、四価不飽和脂肪酸、五価不飽和脂肪酸などが挙げられる。尚、本明細書において「脂肪酸」という場合、遊離の酸のみならず、エステル体、塩基性化合物との塩等をも包含する。

[0025] 本発明のFA-HYcx1は、FA-HYcx1をコードする配列番号１の遺伝子を合成し、適当なベクターにサブクローニングし、大腸菌などの適当な宿主に導入して培養し、配列番号２の組換えタンパク質として製造することができる。FA-HYcx1は精製されたものであっても、粗精製されたものであってもよい。あるいは、大腸菌等の菌体に発現させ、その菌体自体を用いても、培養液を用いてもよい。さらには、該酵素は遊離型のものでもよく、各種担体によって固定化されたものでもよい。

[0026] 配列番号１の遺伝子は、化学的にDNA鎖を合成するか、もしくは合成した一部オーバーラップするオリゴDNA短鎖を、PCR法（オーバーラップPCR法）やGibson Assembly法を利用して接続することにより、その全長をコードするDNAを構築することも可能である。化学合成又はPCR法もしくはGibson Assembly法との組み合わせで全長DNAを構築することの利点は、該DNAを導入する宿主に合わせて使用コドンをCDS全長にわたり設計できる点にある。異種DNAの発現に際し、そのDNA配列を宿主生物において使用頻度の高いコドンに変換することで、タンパク質発現量の増大が期待できる。使用する宿主におけるコドン使用頻度のデータは、例えば（公財）かずさDNA研究所のホームページに公

開されている遺伝暗号使用頻度データベース（http://www.kazusa.or.jp/codon/index.html）を用いることができ、又は各宿主におけるコドン使用頻度を記した文献を参照してもよい。入手したデータと導入しようとするDNA配列を参照し、該DNA配列に用いられているコドンの中で宿主において使用頻度の低いものを、同一のアミノ酸をコードし使用頻度の高いコドンに変換すればよい。例えば、宿主細胞が大腸菌である場合、大腸菌や微生物一般のコドン使用に最適化されたFA-HYcx1をコードする遺伝子を使用することができる。

[0027] 本発明のFA-HYcx1をコードする核酸を含むベクターは、目的（例えば、タンパク質の発現）に応じて、ベクターを導入する宿主細胞に適したものを適宜選択し、使用することができる。発現ベクターである場合、適切なプロモーターに機能可能に連結された本発明の核酸を含み、好ましくは本発明の核酸の下流に転写終結シグナル、すなわちターミネーター領域を含む。さらに、形質転換体を選択するための選択マーカー遺伝子（薬剤耐性遺伝子、栄養要求性変異を相補する遺伝子等）も含むこともできる。また、発現したタンパク質の分離・精製に有用なタグ配列をコードする配列等を含んでもよい。また、ベクターは、対象宿主細胞のゲノムに組み込まれるものであってもよい。そして、本発明のベクターは、コンピテント細胞法、プロトプラスト法、リン酸カルシウム共沈法等、自体公知の形質転換法で、対象宿主細胞内に導入することができる。

[0028] 本発明において「宿主細胞」は、本発明のFA-HYcx1をコードする核酸を含むベクターを発現できれば任意の細胞でよく、細菌、酵母、真菌及び高等真核細胞等が挙げられる。細菌の例としては、バチルス又はストレプトマイセス等のグラム陽性菌又は大腸菌等のグラム陰性菌が挙げられる。FA-HYcx1をコードする核酸を含むベクターが導入された組換え細胞は、宿主細胞に適した自体公知の方法により培養することができる。

[0029] 本発明のFA-HYcx1の「精製」は、自体公知の方法、例えば、遠心分離等で集菌した菌体を、超音波又はガラスビーズ等で摩砕した後、遠心分離等により細胞片等の固形物を除き、粗酵素液を調製し、さらに、硫安、硫酸ナトリ

ウム等による塩析法、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、アフィニテイクロマトグラフィー等のクロマトグラフ法、ゲル電気泳動法等を用いることができる。

[0030] 本発明のFA-HYcx1は、上記の通り、cis-10不飽和脂肪酸、cis-11不飽和脂肪酸、cis-9不飽和脂肪酸を基質として利用し、前記の各不飽和脂肪酸を、11-hydroxy脂肪酸、12-hydroxy脂肪酸、10-hydroxy脂肪酸にそれぞれ変換し得る酵素活性を有する。従って、本発明はまた、［１］cis-10不飽和脂肪酸から、本発明のFA-HYcx1を用いた水和反応により、11-hydroxy脂肪酸を製造する方法（製法１）、［２］cis-11不飽和脂肪酸から、本発明のFA-HYcx1を用いた水和反応により、12-hydroxy脂肪酸を製造する方法（製法２）、［３］cis-9不飽和脂肪酸から、本発明のFA-HYcx1を用いた水和反応により、10-hydroxy脂肪酸を製造する方法（製法３）をそれぞれ提供する。

本発明の製法１の「cis-10不飽和脂肪酸」としては、例えば、ドコサヘキサエン酸、ドコサペンタエン酸等が挙げられる。

本発明の製法１によって製造される「11-hydroxy脂肪酸」としては、例えば、ドコサヘキサエン酸から誘導される11-ヒドロキシ-シス-4,シス-7,シス-13,シス-16,シス-19-ドコサペンタエン酸、ドコサペンタエン酸から誘導される11-ヒドロキシ-シス-7,シス-13,シス-16,シス-19-ドコサテトラエン酸等が挙げられる。

本発明の製法２の「cis-11不飽和脂肪酸」としては、例えば、エイコサペンタエン酸、ジホモ-γ-リノレン酸、ミード酸、エイコサテトラエン酸、エイコサトリエン酸、アラキドン酸等が挙げられる。

本発明の製法２によって製造される「12-hydroxy脂肪酸」としては、例えば、エイコサペンタエン酸から誘導される12-ヒドロキシ-シス-5,シス-8,シス-14,シス-17-エイコサテトラエン酸、ジホモ-γ-リノレン酸から誘導される12-ヒドロキシ-シス-8,シス-14-エイコサジエン酸、ミード酸から誘導される12-ヒドロキシ-シス-5,シス-8-エイコサジエン酸、エイコサテトラエン酸から誘導される12-ヒドロキシ-シス-8,シス-14,シス-17-エイコサトリエン酸

、エイコサトリエン酸から誘導される12-ヒドロキシ-シス-14,シス-17-エイコサジエン酸、アラキドン酸から誘導される12-ヒドロキシ-シス-5,シス-8,シス-14-エイコサトリエン酸等が挙げられる。

本発明の製法３の「cis-9不飽和脂肪酸」としては、例えば、リノール酸、αリノレン酸、γリノレン酸、オレイン酸等が挙げられる。

本発明の製法３によって製造される「10-hydroxy脂肪酸」としては、例えば、リノール酸から誘導される10-ヒドロキシ-シス-12-オクタデセン酸、αリノレン酸から誘導される10-ヒドロキシ-シス-12,シス-15-オクタデカジエン酸、γリノレン酸から誘導される10-ヒドロキシ-シス-6,シス-12-オクタデカジエン酸、オレイン酸から誘導される10-ヒドロキシオクタデカン酸等が挙げられる。

[0031] 水和反応は、例えば、cis-10不飽和脂肪酸、cis-11不飽和脂肪酸又はcis-9不飽和脂肪酸と、本発明のFA-HYcx1とを接触することにより行うことができ、具体的には、適当な緩衝液（例えば、リン酸緩衝液、トリス緩衝液、ホウ酸緩衝液等）中で、基質である不飽和脂肪酸と本発明のFA-HYcx1とを適当な濃度で混合し、インキュベートすることにより行われ得る。基質濃度は、例えば1～1000g/L、好ましくは10～500g/L、より好ましくは20～250g/Lである。前記のFA-HYの添加量は、例えば、0.001～10mg/m L、好ましくは0.1～5mg/mL、より好ましくは0.2～2mg/m Lである。

[0032] 水和反応（反応１～３）には「補因子」を用いてよく、例えば、FAD等を用いることができる。その添加濃度は水和反応が効率良く進む濃度であればよい。好ましくは0.001～20mM、より好ましくは0.01～10mMである。

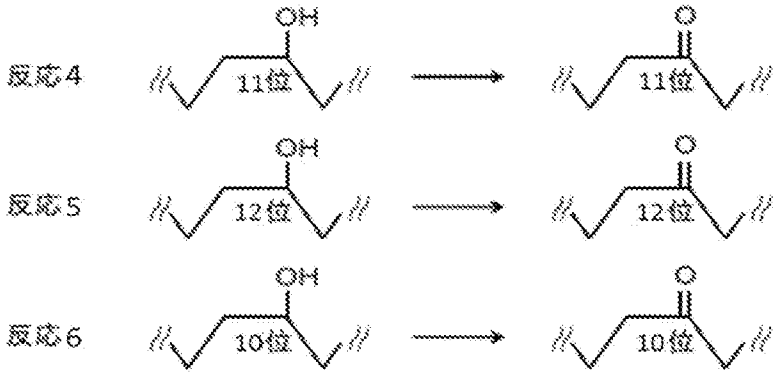
さらに、水和反応に「活性化剤」を用いてよく、例えば、NADH、NADPHからなる群から選ばれる１又は２の化合物が挙げられる。その添加濃度は水和反応が効率良く進む濃度であればよい。好ましくは0.1～20mM、より好ましくは1～10mMである。

[0033] 水和反応は、本発明のFA-HYcx1の好適温度、好適ｐＨの範囲内で行うことが望ましい。例えば、反応温度は５～５０℃、好ましくは２０～４５℃であ

る。また、反応液のｐＨとしては、例えば、ｐＨ４～１０、好ましくはｐＨ５～９である。反応時間も特に制限はないが、例えば１０分～７２時間、好ましくは３０分～３６時間である。

[0034] 本発明の好ましい一実施態様においては、本発明のFA-HYcx1は、それをコードする核酸を含む発現ベクターが導入された組換え細胞（例えば、大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞等）の形態で反応系に提供される。この場合、当該細胞の培養に適した液体培地に、基質及び必要に応じて補因子や活性化剤を添加して、当該細胞を培養することにより、水和反応を行うこともできる。

[0035] [化2]



[0036] 更に、クロム酸を用いた化学的酸化により、本発明の製法１～３で得られた11-hydroxy脂肪酸から11位にカルボニル基を有する炭素数22のオキソ脂肪酸（以下、「11-oxo脂肪酸」と略記することがある）（反応４）、12-hydroxy脂肪酸から12位にカルボニル基を有する炭素数20のオキソ脂肪酸（以下、「12-oxo脂肪酸」と略記する場合がある）（反応５）、10-hydroxy脂肪酸から10位にカルボニル基を有する炭素数18のオキソ脂肪酸（以下、「10-oxo脂肪酸」と略記する場合がある）（反応６）がそれぞれ生成される。

[0037] 従って、本発明はまた、［４］cis-10不飽和脂肪酸から、本発明のFA-HYcx1を用いた水和反応により、11-hydroxy脂肪酸を誘導し、該11-hydroxy脂肪酸から、化学的酸化により、11-oxo脂肪酸を製造する方法（製法４）、［５］cis-11不飽和脂肪酸から、本発明のFA-HYcx1を用いた水和反応により、12-hydroxy脂肪酸を誘導し、該12-hydroxy脂肪酸から、化学的酸化により、12-oxo

脂肪酸を製造する方法（製法５）、［６］cis-9不飽和脂肪酸から、本発明のFA-HYcx1を用いた水和反応により、10-hydroxy脂肪酸を誘導し、該10-hydroxy脂肪酸から、化学的酸化により、10-oxo脂肪酸を製造する方法（製法６）をそれぞれ提供する。

本発明の製法４～６の「cis-10不飽和脂肪酸」、「cis-11不飽和脂肪酸」、「cis-9不飽和脂肪酸」としては、上記の製法１～３に記載の基質と同様である。

本発明の製法４によって製造される「11-oxo脂肪酸」としては、例えば、ドコサヘキサエン酸から誘導される11-オキソ-シス-4,シス-7,シス-13,シス-16,シス-19-ドコサペンタエン酸、ドコサペンタエン酸から誘導される11-オキソ-シス-7,シス-13,シス-16,シス-19-ドコサテトラエン酸等が挙げられる。

本発明の製法５によって製造される「12-oxo脂肪酸」としては、例えば、エイコサペンタエン酸から誘導される12-オキソ-シス-5,シス-8,シス-14,シス-17-エイコサテトラエン酸、ジホモ-γ-リノレン酸から誘導される12-オキソ-シス-8,シス-14-エイコサジエン酸、ミード酸から誘導される12-オキソ-シス-5,シス-8-エイコサジエン酸、エイコサテトラエン酸から誘導される12-オキソ-シス-8,シス-14,シス-17-エイコサトリエン酸、エイコサトリエン酸から誘導される12-オキソ-シス-14,シス-17-エイコサジエン酸、アラキドン酸から誘導される12-オキソ-シス-5,シス-8,シス-14-エイコサトリエン酸等が挙げられる。

本発明の製法６によって製造される「10-oxo脂肪酸」としては、例えば、リノール酸から誘導される10-オキソ-シス-12-オクタデセン酸、αリノレン酸から誘導される10-オキソ-シス-12,シス-15-オクタデカジエン酸、γリノレン酸から誘導される10-オキソ-シス-6,シス-12-オクタデカジエン酸、オレイン酸から誘導される10-オキソオクタデカン酸等が挙げられる。

[0038] 本発明の製法４～６については、クロム酸を用いた化学的酸化により、化学的にオキソ脂肪酸を得ることができ、例えば、11-hydroxy脂肪酸、12-hydr

oxy脂肪酸または10-hydroxy脂肪酸と、酸化剤（例：下述のクロム酸等）とを接触させることにより行うことができる。

[0039] 具体的には、化学的酸化としては、自体公知の方法、例えばクロム酸酸化、好ましくはジョーンズ酸化等が挙げられる。クロム酸としては、無水クロム酸CrO_3、クロム酸H_2CrO_4、二クロム酸$H_2Cr_2O_7$といった化合物の塩や錯体を使用することができる。

具体的には、無水クロム酸2.67 gに硫酸 2.3 ml、水7.7 mlを加えた物を、アセトンを90 ml加えてクロム酸溶液を作成する。三角フラスコに、2 gの水酸化脂肪酸と、40 mlのアセトンを加え、氷上にてスターラーで撹拌しながら上記のクロム酸溶液を１滴ずつ加える。溶液が青色から抹茶色になったらクロム酸溶液の滴下をやめ、イソプロピルアルコールを用いて反応を停止する。析出した沈殿をろ紙を用いてろ過し、分液ロートに入れさらにジエチルエーテルを150 ml及びミリQ水300 mlを加えてよく振り、ジエチルエーテル層を数回ミリQ水で洗浄する。洗浄後のジエチルエーテル層に硫酸ナトリウム（無水）を適量加えて撹拌し残存水分を除去する。添加した無水硫酸ナトリウムをろ紙を用いてろ過し、得られたジエチルエーテル層をロータリーエバポレーターにて濃縮し、反応産物(オキソ脂肪酸)及び未反応の基質を抽出する。

[0040] 無水クロム酸による酸化反応により得られた抽出物(基質と生成物（オキソ脂肪酸）を含む混合物）を中圧クロマトグラフィーに供し、カラムから出てきた溶液をフラクションに分けて回収する。回収した各フラクションをLC/MS及びガスクロマトグラフィーにより分析し、オキソ脂肪酸のみが含まれたフラクションを集めてロータリーエバポレーターにて濃縮する。得られた最終生成物の一部を用いてメチルエステル化した後に、ガスクロマトグラフィーにてオキソ脂肪酸の純度を評価し、純度98%以上のオキソ脂肪酸を得ることができる。

[0041] 本発明の製法４～６の酸化反応は、脱水素酵素による酵素反応を利用してもよく、11-hydroxy脂肪酸、12-hydroxy脂肪酸、10-hydroxy脂肪酸を基質として利用し、11-oxo脂肪酸、12-oxo脂肪酸、10-oxo脂肪酸にそれぞれ変換し

得る酵素であれば特に制限はないが、例えば、乳酸菌由来の水酸化脂肪酸デヒドロゲナーゼが好ましい。脱水素酵素は精製されたものであっても、粗精製されたものであってもよい。あるいは、大腸菌等の菌体に発現させ、その菌体自体を用いても、培養液を用いてもよい。さらには、該酵素は遊離型のものでもよく、各種担体によって固定化されたものでもよい。

[0042] 脱水素反応は、例えば、11-hydroxy脂肪酸、12-hydroxy脂肪酸または10-hydroxy脂肪酸と、前記脱水素酵素とを接触させることにより行うことができ、具体的には、適当な緩衝液（例えば、リン酸緩衝液、トリス緩衝液、ホウ酸緩衝液等）中で、基質である11-hydroxy脂肪酸、12-hydroxy脂肪酸、10-hydroxy脂肪酸と脱水素酵素とを適当な濃度で混合し、インキュベートすることにより行われ得る。基質濃度は、例えば0.01～100g/L、好ましくは0.05～50g/L、より好ましくは0.1～5g/Lである。脱水素酵素の添加量は、例えば、0.001～10mg/mL、好ましくは0.005～1mg/mL、より好ましくは0.05～0.2mg/mLである。

[0043] 脱水素反応には「補因子」を用いてよく、例えば、NADやNADP等を用いることができる。その添加濃度は酸化反応が効率良く進む濃度であればよい。好ましくは0.001～20mM、より好ましくは0.01～10mMである。

[0044] 脱水素反応は、脱水素酵素の好適温度、好適ｐＨの範囲内で行うことが望ましい。例えば、反応温度は５～５０℃、好ましくは２０～４５℃である。また、反応液のｐＨとしては、例えば、ｐＨ４～１０、好ましくはｐＨ５～９である。反応時間も特に制限はないが、例えば１０分～７２時間、好ましくは３０分～３６時間である。

[0045] 本発明の一実施態様においては、脱水素酵素は、それをコードする核酸を含む発現ベクターが導入された組換え細胞（例えば、大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞等）の形態で反応系に提供される。この場合、当該細胞の培養に適した液体培地に、基質及び必要に応じて補因子や活性化剤を添加して、当該細胞を培養することにより、酸化反応を行うこともできる。

[0046] 本発明の製法１～６により得られる以下の水酸化脂肪酸はこれまでに知ら

れていない構造をもつ新規の脂肪酸である。

＜水酸化脂肪酸＞

11-ヒドロキシ-シス-4, シス-7, シス-13, シス-16, シス-19-ドコサペンタエン酸

11-ヒドロキシ-シス-7, シス-13, シス-16, シス-19-ドコサテトラエン酸

12-ヒドロキシ-シス-5, シス-8, シス-14, シス-17-エイコサテトラエン酸

＜オキソ脂肪酸＞

11-オキソ-シス-4, シス-7, シス-13, シス-16, シス-19-ドコサペンタエン酸

11-オキソ-シス-7, シス-13, シス-16, シス-19-ドコサテトラエン酸

12-オキソ-シス-5, シス-8, シス-14, シス-17-エイコサテトラエン酸

[0047] 本発明により得られる新規の水酸化脂肪酸は、核内受容体PPARα、PPARγ及びPPARδのアゴニストとしての活性があり、オキソ脂肪酸も同様の活性があると考えられることから、これらの脂肪酸は、代謝改善剤等に利用できる。

[0048] 本発明で得られる水酸化脂肪酸及びオキソ脂肪酸は、従来公知の生理活性に基づいて、例えば、医薬組成物、食品、化粧品に配合して使用され得る。従って、本発明の別の態様において、本発明で得られる水酸化脂肪酸および／またはオキソ脂肪酸を含む、脂肪酸含有物（例：脂肪酸含有組成物）が提供される。前記脂肪酸含有物としては、例えば、前記の医薬組成物、食品、化粧品、飼料や、これらの添加物などが挙げられる。

水酸化脂肪酸、オキソ脂肪酸を含有する医薬組成物の剤型としては、散在、顆粒剤、丸剤、ソフトカプセル、ハードカプセル、錠剤、チュアブル錠、速崩錠、シロップ、液剤、懸濁剤、座剤、軟膏、クリーム剤、ゲル剤、粘付剤、吸入剤、注射剤等が挙げられる。水に難溶な場合は、植物性油、動物性油等の非親水性有機溶媒に溶解するか又は、乳化剤、分散剤もしくは界面活性剤等とともに、ホモジナイザー（高圧ホモジナイザー）を用いて水溶液中に分散、乳化させて用いる。

[0049] 製剤化のために用いることができる添加剤には、例えば大豆油、サフラー

油、オリーブ油、胚芽油、ひまわり油、牛脂、いわし油等の動植物性油、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、グリセリン、ソルビトール等の多価アルコール、ソルビタン脂肪酸エステル、ショ糖脂肪酸エステル、グリセリン脂肪酸エステル、ポリグリセリン脂肪酸エステル等の界面活性剤、精製水、乳糖、デンプン、結晶セルロース、Ｄ－マンニトール、レシチン、アラビアガム、ソルビトール液、糖液等の賦形剤、甘味料、着色料、ｐＨ調整剤、香料等を挙げることができる。なお、液体製剤は、服用時に水又は他の適当な媒体に溶解又は懸濁する形であってもよい。また、錠剤、顆粒剤は周知の方法でコーティングしても良い。

[0050] 注射剤の形で投与する場合には、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、経皮、関節内、滑液嚢内、胞膜内、骨膜内、舌下、口腔内等に投与することが好ましく、特に静脈内投与又は腹腔内投与が好ましい。静脈内投与は、点滴投与、ボーラス投与のいずれであってもよい。

[0051] 本発明で得られる水酸化脂肪酸、オキソ脂肪酸を含有する「食品」の形態としては、例えば、サプリメント（散在、顆粒剤、ソフトカプセル、ハードカプセル、錠剤、チュアブル錠、速崩錠、シロップ、液剤等）、飲料（お茶、炭酸飲料、乳酸飲料、スポーツ飲料等）、菓子（グミ、ゼリー、ガム、チョコレート、クッキー、キャンデー等）、油、油脂食品（マヨネーズ、ドレッシング、バター、クリーム、マーガリン等）等が挙げられる。

[0052] 上記食品には、必要に応じて各種栄養素、各種ビタミン類（ビタミンＡ、ビタミンＢ１、ビタミンＢ２、ビタミンＢ６、ビタミンＣ、ビタミンＤ、ビタミンＥ、ビタミンＫ等）、各種ミネラル類（マグネシウム、亜鉛、鉄、ナトリウム、カリウム、セレン等）、食物繊維、分散剤、乳化剤等の安定剤、甘味料、呈味成分（クエン酸、リンゴ酸等）、フレーバー、ローヤルゼリー、プロポリス、アガリクス等を配合することができる。

[0053] 本発明で得られる水酸化脂肪酸、オキソ脂肪酸を含有する「化粧品」としては、クリーム、乳液、ローション、マイクロエマルジョンエッセンス、入浴剤などが挙げられ、香料等を混合してもよい。

[0054] 以下の実施例により本発明をより具体的に説明するが、実施例は本発明の単なる例示にすぎず、本発明の範囲を何ら限定するものではない。

実施例 1

[0055] FA-HYcx1の大腸菌での発現

大腸菌発現用ベクターpET21b (Novagen)とロゼッタ2(DE3)株からなる宿主ベクター系を用いた。配列番号１のFA-HYcx1遺伝子断片をpET21bに挿入し、発現ベクター(pFA-HYcx1)を構築した。pFA-HYcx1をロゼッタ2(DE3)株に形質転換し、形質転換株ロゼッタ/pFA-HYcx1株を得た。得られたロゼッタ/pFA-HYcx1株を0.1 gアンピシリン、0.034 gクロラムフェニコールを含む1 l LB培地（1%バクトトリプトン(Difco)、0.5%酵母エキス、1%塩化ナトリウムを含む培地(pH 7.0)）にて37℃、110 rpmで好気的に培養し、OD600 nmが0.5になった時点で1 M IPTGを500 μl添加し、さらに18℃にて21.5時間培養した。培養後8,500 rpmにて10分間遠心分離し、ロゼッタ/pFA-HYcx1株の湿菌体を得た。

実施例 2

[0056] FA-HYcx1を発現させた形質転換大腸菌を用いた不飽和脂肪酸から水酸化脂肪酸の生成

脂肪酸水和酵素（FA-HYcx1）誘導形質転換大腸菌を用いた、各種不飽和脂肪酸から水酸化脂肪酸の生成試験を行った。反応液は、脂肪酸水和酵素誘導形質転換大腸菌（湿菌体重量 0.3 g/ml）、NADH (5 mM)、FAD (0.1 mM)、不飽和脂肪酸 (10 mM)、BSA(0.3 mg)を含む100 mM リン酸カリウムバッファー(pH 6.5)で全量を1 mlとした。反応は、37℃にて、酸素吸着剤アネロパック（三菱化学）存在下で嫌気的に16～60時間、120 rpmで振とうしながら行った。反応後、反応液(1 ml)に対して、2 mlのクロロホルム、2 mlのメタノール、1 mlの1.5%KClを加え撹拌し、クロロホルム層を回収した。回収したクロロホルム層を遠心エバポレーターにて濃縮し、反応産物及び未反応の基質を抽出した。抽出物の一部を用いてメチルエステル化した後にガスクロマトグラフィーにて反応産物を評価した。

実施例 3

[0057] 実施例２より得られた抽出物(基質と生成物(水酸化脂肪酸)を含む混合物)から生成物の精製

実施例２より得られた抽出物(基質と生成物（水酸化脂肪酸）を含む混合物)を中圧クロマトグラフィーに供し、カラムから出てきた溶液をフラクションに分けて回収した。回収した各フラクションをLC/MS及びガスクロマトグラフィーにより分析し、生成物（水酸化脂肪酸）のみが含まれたフラクションを集めてロータリーエバポレーターにて濃縮した。得られた最終生成物（水酸化脂肪酸）の一部を用いてメチルエステル化した後に、ガスクロマトグラフィーにて生成物の純度を評価した。その結果、各基質からそれぞれ純度98%以上の生成物を得た。生成物は、NMRや二次元NMR、GC-MS分析などを用いて化学構造を決定した。その結果、ドコサヘキサエン酸からは純度98%以上で11-ヒドロキシ-シス-4,シス-7,シス-13,シス-16,シス-19-ドコサペンタエン酸を得ることができた。ドコサペンタエン酸からは純度98%以上で11-ヒドロキシ-シス-7,シス-13,シス-16,シス-19-ドコサテトラエン酸を得ることができた。エイコサペンタエン酸からは純度98%以上で12-ヒドロキシ-シス-5,シス-8,シス-14,シス-17-エイコサテトラエン酸を得ることができた。ジホモ-γ-リノレン酸からは純度98%以上で12-ヒドロキシ-シス-8,シス-14-エイコサジエン酸を得ることができた。ミード酸からは純度98%以上で12-ヒドロキシ-シス-5,シス-8-エイコサジエン酸を得ることができた。エイコサテトラエン酸からは純度98%以上で12-ヒドロキシ-シス-8,シス-14,シス-17-エイコサトリエン酸を得ることができた。エイコサトリエン酸からは純度98%以上で12-ヒドロキシ-シス-14,シス-17-エイコサジエン酸を得ることができた。リノール酸からは純度98%以上で10-ヒドロキシ-シス-12-オクタデセン酸を得ることができた。αリノレン酸からは純度98%以上で10-ヒドロキシ-シス-12,シス-15-オクタデカジエン酸を得ることができた。γリノレン酸からは純度98%以上で10-ヒドロキシ-シス-6,シス-12-オクタデカジエン酸を得ることができた。オレイン酸からは純度98%以上で10-ヒドロキシオクタデカン酸を得ることができた。アラキドン酸からは純度98%以上で12-ヒドロキシ-シス-5,シス-8

,シス-14-エイコサトリエン酸を得ることができた。

実施例 4

[0058] 無水クロム酸(CrO_3)を用いた水酸化脂肪酸からオキソ脂肪酸の生成

無水クロム酸2.67 gに硫酸 2.3 ml、水 7.7 mlを加えた物を、アセトンを90 ml加えてクロム酸溶液を作成した。三角フラスコに、2 gの水酸化脂肪酸と、40 mlのアセトンを加え、氷上にてスターラーで撹拌しながら上記のクロム酸溶液を１滴ずつ加えた。溶液が青色から抹茶色になったらクロム酸溶液の滴下をやめ、イソプロピルアルコールを用いて反応を停止した。析出した沈殿をろ紙を用いてろ過し、分液ロートに入れさらにジエチルエーテルを150 ml及びミリQ水300 mlを加えてよく振り、ジエチルエーテル層を数回ミリQ水で洗浄した。洗浄後のジエチルエーテル層に硫酸ナトリウム（無水）を適量加えて撹拌し残存水分を除去した。添加した無水硫酸ナトリウムをろ紙を用いてろ過し、得られたジエチルエーテル層をロータリーエバポレーターにて濃縮し、反応産物(オキソ脂肪酸)及び未反応の基質を抽出した。

実施例 5

[0059] 実施例４より得られた抽出物(基質と生成物（オキソ脂肪酸）を含む混合物)から生成物の精製

実施例４より得られた抽出物(基質と生成物（オキソ脂肪酸）を含む混合物)を中圧クロマトグラフィーに供し、カラムから出てきた溶液をフラクションに分けて回収した。回収した各フラクションをLC/MS及びガスクロマトグラフィーにより分析し、オキソ脂肪酸のみが含まれたフラクションを集めてロータリーエバポレーターにて濃縮した。得られた最終生成物の一部を用いてメチルエステル化した後に、ガスクロマトグラフィーにてオキソ脂肪酸の純度を評価した。その結果、各基質から純度98%以上のオキソ脂肪酸を得ることができる。生成物は、NMRや二次元NMR、GC-MS分析などを用いて化学構造を決定した。その結果、11-ヒドロキシ-シス-4,シス-7,シス-13,シス-16,シス-19-ドコサペンタエン酸からは純度98%以上で11-オキソ-シス-4,シス-7,シス-13,シス-16,シス-19-ドコサペンタエン酸を得ることができた。11-ヒドロキシ-

シス-7,シス-13,シス-16,シス-19-ドコサテトラエン酸からは純度98%以上で11-オキソ-シス-7,シス-13,シス-16,シス-19-ドコサテトラエン酸を得ることができた。12-ヒドロキシ-シス-5,シス-8,シス-14,シス-17-エイコサテトラエン酸からは純度98%以上で12-オキソ-シス-5,シス-8,シス-14,シス-17-エイコサテトラエン酸を得ることができた。12-ヒドロキシ-シス-8,シス-14-エイコサジエン酸からは純度98%以上で12-オキソ-シス-8,シス-14-エイコサジエン酸を得ることができた。12-ヒドロキシ-シス-5,シス-8-エイコサジエン酸からは純度98%以上で12-オキソ-シス-5,シス-8-エイコサジエン酸を得ることができた。12-ヒドロキシ-シス-8,シス-14,シス-17-エイコサトリエン酸からは純度98%以上で12-オキソ-シス-8,シス-14,シス-17-エイコサトリエン酸を得ることができた。12-ヒドロキシ-シス-14,シス-17-エイコサジエン酸からは純度98%以上で12-オキソ-シス-14,シス-17-エイコサジエン酸を得ることができた。10-ヒドロキシ-シス-12-オクタデセン酸からは純度98%以上で10-オキソ-シス-12-オクタデセン酸を得ることができた。10-ヒドロキシ-シス-12,シス-15-オクタデカジエン酸からは純度98%以上で10-オキソ-シス-12,シス-15-オクタデカジエン酸を得ることができた。10-ヒドロキシ-シス-6,シス-12-オクタデカジエン酸からは純度98%以上で10-オキソ-シス-6,シス-12-オクタデカジエン酸を得ることができた。10-ヒドロキシオクタデカン酸からは純度98%以上で10-オキソオクタデカン酸を得ることができた。12-ヒドロキシ-シス-5,シス-8,シス-14-エイコサトリエン酸からは純度98%以上で12-オキソ-シス-5,シス-8,シス-14-エイコサトリエン酸を得ることができた。

実施例 6

[0060] 核内受容体PPARα、PPARγ及びPPARδのアゴニストとしての活性の測定

本発明のPPARリガンド剤のPPARα、γ、δの活性化能の測定は、Nobuyuki Takahashiら、FEBS Letters 514 (2002) p315-322、「Dual action of isoprenols from herbal medicines on both PPARgamma and PPARalpha in 3T3-L1 adipocytes and HepG2 hepatocytes.」のMaterial and methods Reporter p

lasmids and luciferase assaysの欄を参照して行った。詳細には、PPARα、γ、δリガンド活性は、PPARリガンド結合領域とGAL4 DNA結合領域との融合タンパクに対する結合および標的遺伝子活性化をルシフェラーゼの発現で評価するレポーター・アッセイにより測定した。具体的には、CV-1細胞に、PPARα、γ、δリガンド結合領域とGAL4 DNA結合領域の融合タンパク質をコードするDNAを含むプラスミドと、GAL4結合DNA配列にルシフェラーゼをつないだレポータープラスミドを導入し、この細胞に、以下に記載のリガンドを添加して、インキュベートした後にルシフェラーゼ活性の検出を行った。

サンプルはエタノールを用いて濃度調整を行った。陰性コントロールにはエタノール（0.1%）を用いた。脂肪酸は各10μMとなるように添加した。

水酸化脂肪酸の本発明の水酸化脂肪酸の代表として、11-ヒドロキシ-シス-4,シス-7,シス-13,シス-16,シス-19-ドコサペンタエン酸（「11(OH)DHA」と示す）、12-ヒドロキシ-シス-5,シス-8,シス-14,シス-17-エイコサテトラエン酸（「12(OH)EPA」と示す）、また、その他の脂肪酸の比較としてドコサヘキサエン酸（「DHA」と示す）、14-ヒドロキシ-シス-4,シス-7,シス-10,シス-16,シス-19-ドコサペンタエン酸（「14(OH)DHA」と示す）、エイコサペンタエン酸（「EPA」と示す）のPPARα、γ、δリガンド活性のデータを図１に示す。このうち、「11(OH)DHA」及び「12(OH)EPA」の希少脂肪酸は新規脂肪酸である。本実施例で「DHA」及び「EPA」は試薬購入したものを使用し、「14(OH)DHA」はWO2015/111699に記載の方法にて作成した。

[0061] 本発明を好ましい態様を強調して説明してきたが、好ましい態様が変更され得ることは当業者にとって自明である。

ここで述べられた特許及び特許出願明細書を含む全ての刊行物に記載された内容は、ここに引用されたことによって、その全てが明示されたと同程度に本明細書に組み込まれるものである。

産業上の利用可能性

[0062] 本発明の方法によれば、様々な水酸化脂肪酸、オキソ脂肪酸を製造することができるため、当該水酸化脂肪酸、オキソ脂肪酸の医薬・食品等様々な分

野への適用が可能となる。また、本発明の方法によれば、新規の希少脂肪酸の製造が可能となる点でも極めて有用である。

[0063] 本出願は、日本で出願された特願２０１９－０６７９６６（出願日：２０１９年３月２９日）を基礎としており、その内容はすべて本明細書に包含されるものとする。

請求の範囲

[請求項1] 以下の（ａ）～（ｃ）のいずれかの酵素タンパク質。

（ａ）配列番号２に示されるアミノ酸配列からなる酵素タンパク質、

（ｂ）配列番号２に示されるアミノ酸配列において、１又は複数個のアミノ酸が欠失及び／又は置換及び／又は挿入及び／又は付加されたアミノ酸配列を含み、かつ水和反応を触媒する酵素活性を有するタンパク質、

（ｃ）配列番号１に示される塩基配列の相補鎖配列からなる核酸と、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列によってコードされ、かつ水和反応を触媒する酵素活性を有するタンパク質

[請求項2] 請求項１に記載の酵素タンパク質を含む、クロストリジウム属の菌体または菌体破砕物。

[請求項3] 請求項１に記載の酵素タンパク質をコードする核酸。

[請求項4] 請求項３に記載の核酸を含むベクター。

[請求項5] 請求項４に記載のベクターで形質転換された宿主細胞。

[請求項6] 請求項５に記載の宿主細胞を培養し、該培養物から請求項１に記載の酵素タンパク質を回収することを含む、該酵素の製造方法。

[請求項7] 10位にシス型二重結合を有する炭素数22の不飽和脂肪酸から、請求項１に記載の酵素タンパク質を用いた水和反応により、11位に水酸基を有する炭素数22の水酸化脂肪酸を製造する方法。

[請求項8] 10位にシス型二重結合を有する炭素数22の不飽和脂肪酸から、請求項１に記載の酵素タンパク質を用いた水和反応により、11位に水酸基を有する炭素数22の水酸化脂肪酸を誘導し、該水酸化脂肪酸から、脱水素反応又は化学的酸化により、11位にカルボニル基を有する炭素数22のオキソ脂肪酸を製造する方法。

[請求項9] 11位にシス型二重結合を有する炭素数20の不飽和脂肪酸から、請求項１に記載の酵素タンパク質を用いた水和反応により、12位に水酸基

を有する炭素数20の水酸化脂肪酸を製造する方法。

[請求項10] 11位にシス型二重結合を有する炭素数20の不飽和脂肪酸から、請求項１に記載の酵素タンパク質を用いた水和反応により、12位に水酸基を有する炭素数20の水酸化脂肪酸を誘導し、該水酸化脂肪酸から、脱水素反応又は化学的酸化により、12位にカルボニル基を有する炭素数20のオキソ脂肪酸を製造する方法。

[請求項11] 9位にシス型二重結合を有する炭素数18の不飽和脂肪酸から、請求項１に記載の酵素タンパク質を用いた水和反応により、10位に水酸基を有する炭素数18の水酸化脂肪酸を製造する方法。

[請求項12] 9位にシス型二重結合を有する炭素数18の不飽和脂肪酸から、請求項１に記載の酵素タンパク質を用いた水和反応により、10位に水酸基を有する炭素数18の水酸化脂肪酸を誘導し、該水酸化脂肪酸から、脱水素反応又は化学的酸化により、10位にカルボニル基を有する炭素数18のオキソ脂肪酸を製造する方法。

[請求項13] 10位にシス型二重結合を有する炭素数22の不飽和脂肪酸が、ドコサヘキサエン酸またはドコサペンタエン酸である請求項７または請求項８に記載の方法。

[請求項14] 11位にシス型二重結合を有する炭素数20の不飽和脂肪酸が、エイコサペンタエン酸、ジホモ-γ-リノレン酸、ミード酸、エイコサテトラエン酸、エイコサトリエン酸またはアラキドン酸である請求項９または請求項１０に記載の方法。

[請求項15] 9位にシス型二重結合を有する炭素数18の不飽和脂肪酸が、リノール酸、αリノレン酸、γリノレン酸またはオレイン酸である請求項１１または請求項１２に記載の方法。

[請求項16] 請求項７の方法によって製造される、11-ヒドロキシ-シス-4, シス-7, シス-13, シス-16, シス-19-ドコサペンタエン酸または11-ヒドロキシ-シス-7, シス-13, シス-16, シス-19-ドコサテトラエン酸。

[請求項17] 請求項９の方法によって製造される、12-ヒドロキシ-シス-5, シス-

8, シス-14, シス-17-エイコサテトラエン酸。

[請求項18] 請求項８の方法によって製造される、11-オキソ-シス-4, シス-7, シス-13, シス-16, シス-19-ドコサペンタエン酸または11-オキソ-シス-7, シス-13, シス-16, シス-19-ドコサテトラエン酸。

[請求項19] 請求項１０の方法によって製造される、12-オキソ-シス-5, シス-8, シス-14, シス-17-エイコサテトラエン酸。

[請求項20] 請求項１６～請求項１９のいずれか１項に記載の水酸化脂肪酸またはオキソ脂肪酸を含む脂肪酸含有物。

[請求項21] 医薬組成物である請求項２０に記載の脂肪酸含有物。

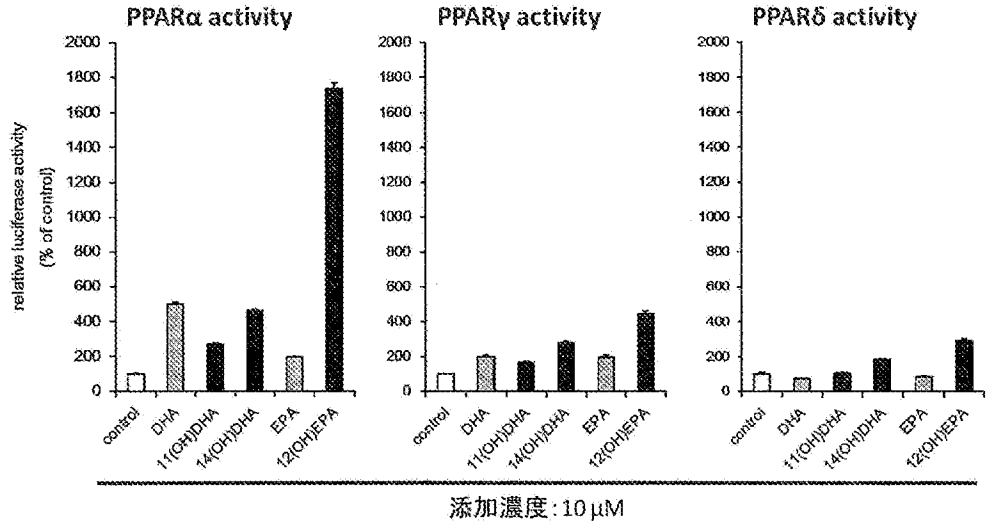
[請求項22] 食品または食品添加物である請求項２０に記載の脂肪酸含有物。

[請求項23] 化粧品または化粧品添加物である請求項２０に記載の脂肪酸含有物。

[請求項24] 飼料は飼料添加物である請求項２０に記載の脂肪酸含有物。

[請求項25] 請求項１６～請求項１９のいずれか１項に記載の水酸化脂肪酸またはオキソ脂肪酸を生産するための、請求項１に記載の酵素タンパク質を含む、クロストリジウム属菌体または菌体破砕物の使用。

[図1]


PPARα activity
PPARγ activity
PPARδ activity
relative luciferase activity
(% of control)
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
control
DHA
11(OH)DHA
14(OH)DHA
EPA
12(OH)EPA
添加濃度：10 μM

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2020/013983

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl. C12P7/64(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/20(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N15/60(2006.01)i, C12N9/88(2006.01)i
FI: C12N15/60ZNA, C12N1/15, C12N1/21, C12N1/19, C12N5/10, C12P7/64, C12N1/20A, C12N9/88
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl. C12P7/64, C12N5/10, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/20, C12N1/21, C12N15/60, C12N9/88

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2020
Registered utility model specifications of Japan 1996-2020
Published registered utility model applications of Japan 1994-2020

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN), UniProt/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2013/168310 A1 (KYOTO UNIVERSITY) 14.11.2013 (2013-11-14), entire text	1-25
A	WO 2015/111699 A1 (KYOTO UNIVERSITY) 30.07.2015 (2015-07-30), entire text	1-25
A	SAKURAMA, H. et al., Biohydrogenation of C20 polyunsaturated fatty acids by anaerobic bacteria, J. Lipid Res., 2014, vol. 55, pp. 1855-1863, entire text	1-25
A	岸野重信，腸内細菌の脂質代謝と不飽和脂肪酸代謝産物に関する生理機能について，食品と開発，2019, vol. 54, no. 2, pp. 8-11, entire text, (KISHINO, Shigenobu, Lipid metabolisms of intestinal bacteria and physiological functions on fatty acid metabolites, Food Processing and Ingredients)	1-25

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.
☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
17.04.2020	28.04.2020
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2020/013983

WO 2013/168310 A1	14.11.2013	US 2015/0125911 A1	
WO 2015/111699 A1	30.07.2015	US 2017/0022526 A1	
		EP 3098313 A1	
		CN 107075502 A	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2020/013983

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

C12P 7/64(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; C12N 1/15(2006.01)i; C12N 1/19(2006.01)i; C12N 1/20(2006.01)i; C12N 1/21(2006.01)i; C12N 15/60(2006.01)i; C12N 9/88(2006.01)i
FI: C12N15/60 ZNA; C12N1/15; C12N1/21; C12N1/19; C12N5/10; C12P7/64; C12N1/20 A; C12N9/88

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

C12P7/64; C12N5/10; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/20; C12N1/21; C12N15/60; C12N9/88

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０２０年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２０年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２０年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN); UniProt/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
A	WO 2013/168310 A1 (国立大学法人京都大学) 14.11.2013 (2013-11-14) 全文	1-25
A	WO 2015/111699 A1 (国立大学法人京都大学) 30.07.2015 (2015-07-30) 全文	1-25
A	SAKURAMA, H., et al., Biohydrogenation of C20 polyunsaturated fatty acids by anaerobic bacteria, J. Lipid Res., 2014, Vol. 55, pp. 1855-1863 全文	1-25
A	岸野重信，腸内細菌の脂質代謝と不飽和脂肪酸代謝産物に関する生理機能について，食品と開発，2019年，第54巻，第2号，第8-11頁 全文	1-25

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☑ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
“&” 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
17.04.2020	28.04.2020

名称及びあて先
日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

権限のある職員（特許庁審査官）
川合　理恵 4B 4046

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2020/013983

第Ⅰ欄　　ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第１ページの１．ｃの続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

a. ☑ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
　☑ 附属書C/ST.25テキストファイル形式
　☐ 紙形式又はイメージファイル形式

b. ☐ 国際出願とともに、ＰＣＴ規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表

c. ☐ 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
　☐ 附属書C/ST.25テキストファイル形式(ＰＣＴ規則13の3.1(a))
　☐ 紙形式又はイメージファイル形式（ＰＣＴ規則13の3.1(b)及びＰＣＴ実施細則第713号）

2. ☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見:

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2020/013983

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO 2013/168310 A1	14.11.2013	US 2015/0125911 A1	
WO 2015/111699 A1	30.07.2015	US 2017/0022526 A1	
		EP 3098313 A1	
		CN 107075502 A	