

平成21年 5月25日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19780056

研究課題名 (和文) 嫌気性微生物に特異な新規脂肪酸変換反応の探索と解明

研究課題名 (英文) Screening for unique fatty acid transformation catalyzed by anaerobic bacteria

研究代表者

岸野 重信 (KISHINO SHIGENOBU)

京都大学大学院・農学研究科・助教

研究者番号：40432348

研究成果の概要：現在プロバイオティクスとしても多く利用されている乳酸菌の脂質代謝や脂肪酸代謝はほとんど明らかにされていなかった。申請者は、乳酸菌を用いた共役リノール酸生産法の開発を行っており、その詳細な生化学的解析を通じて乳酸菌の脂肪酸代謝の一端を明らかにした。また、多くの研究が行われている好気条件下では得られなかった新規な脂肪酸変換反応を、嫌気性微生物を用いて探索した結果、産業用途のある、あるいは医薬品の原料となりうる脂肪酸の水酸化反応を見出した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	0	2,100,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	390,000	3,790,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：発酵生産

1. 研究開始当初の背景

近年、栄養学的見地から、脂質の機能性に注目が集められている。この脂質の機能性は、脂肪酸の鎖長、不飽和度、*cis/trans* 等に基づくことが最近の研究で示されている。様々なバリエーションのある脂質より、有用な脂質を供給するためには位置特異的かつ幾何選択的な生産もしくは混合物からの分離・精製が必要となる。例えば、最近注目を集めている機能性脂質の一つである共役リノール酸 (CLA) は、抗癌作用・抗動脈硬化作用・

体脂肪減少作用・コレステロール比率の改善等の生理作用が報告されているが、これら生理活性を示す活性型 CLA は *cis-9, trans-11* 異性体及び *trans-10, cis-12* 異性体のみとされている。活性型 CLA は、天然において反芻動物由来製品に微量に含まれているだけであり、現在大量供給法としてリノール酸からの化学的異性化法が試行されている。しかし、異性化法により合成される CLA は様々な異性体の混合物となり、活性型 CLA を得るにはさらに分離・精製が必要となる。また、食品や医薬品での利用を考慮すると、より安全性の

高い生産プロセスで位置特異的かつ幾何選択的な生産技術の開発が急務となる。そこで申請者は、反芻動物由来製品に微量に含まれている CLA が、反芻動物の胃内に存在するルーメンバクテリアにより生産されているという報告に基づき、嫌気性微生物特に乳酸菌を対象に CLA 生成経路の解明と CLA 高生産菌の探索・育種を試みた。その結果、種々の乳酸菌においてリノール酸がステアリン酸へと飽和化される際の間体として位置特異的かつ幾何選択的に CLA が生成・蓄積することを見いだした。現在まで幅広く研究がなされている好気条件下での脂肪酸代謝は、酸化（不飽和化）反応が主であるのに対し、本反応は検討が十分になされていない嫌気条件下で起こる還元（飽和化）反応である。これは、嫌気性微生物が脂肪酸代謝において基礎・応用両研究面で新たな潜在能力を有している事を暗示している。嫌気環境下での生物代謝・変換反応の研究は国内国外問わず、遅れているのが現状であるが、申請者は嫌気条件を作る独自の工夫を開発し、簡単に実用的な嫌気条件を設定できる系を確立している。この系を利用し、本反応を詳細に検討したところ、本反応は嫌気条件下において乳酸菌の菌体を触媒として用いる休止菌体反応のみならず、乳酸菌無細胞抽出液においても進行する事より、嫌気性微生物の持つユニークな酵素系の関与が期待できる。また、これらの酵素系を用いる事により今まで好気条件下では生産が困難であった新規脂肪酸生産への応用も期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、あまり検討が進んでいない嫌気条件下での微生物反応に着目し、好気条件下では不可能なユニークな脂肪酸変換反応を見出し、機能性脂質生産に適用することで様々な有用脂質生産のための新しいプロセス開発の基盤をつくることを目的としている。

3. 研究の方法

申請者は現在までに嫌気条件下において種々の乳酸菌がリノール酸を飽和化する過程でリノール酸の共役異性体である CLA や水和産物である 10-ヒドロキシ-12-オクタデセン酸を生成・蓄積することを示してきた。嫌気条件下での新規脂肪酸代謝経路の解明を目指すにあたり、上記の水和および脱水と共役化の 2 反応を中心に上げ、本代謝経路・反応系の解明を目指す。また、乳酸菌を対象とした CLA 生産菌体の探索を行った際に、

好気条件下での脂肪酸代謝では見られない、未知脂肪酸を生産する反応を数種見いだしており、これらの情報を整理するとともに、さらなる探索により新規脂肪酸生産反応の発見につとめる。

4. 研究成果

申請者は、乳酸菌が触媒するリノール酸異性化反応を活用した共役リノール酸 (CLA) 生産プロセスの確立に成功している。また、この反応を利用し、 α -リノレン酸や γ -リノレン酸、ステアリドン酸由来の共役トリエン酸、共役テトラエン酸生産にも成功している。さらに、リノール酸異性化反応は、リノール酸の Δ 9 位二重結合の水和による水酸化脂肪酸 (10-hydroxy-12-octadecenoic acid) の生成と、脱水を伴う二重結合の転移という複数のステップから成り立ち、これらの反応には、少なくとも 3 つのタンパク質が関与していることを明らかにしている。そこで、*Lactobacillus plantarum* AKU 1009a における本異性化反応の初発反応を触媒するリノール酸水和酵素 (CLA-HY) の諸性質について検討した。

その結果、*L. plantarum* AKU 1009a の CLA-HY は、膜画分に存在するタンパク質であった。本菌のゲノムから候補遺伝子を選抜し、プライマーを作成し PCR により増幅後、His-tag 融合タンパク質として形質転換大腸菌に大量発現させた。形質転換大腸菌の可溶性画分に発現した CLA-HY を精製し、得られた精製酵素を用いて諸性質を解析した。その結果、本酵素は FAD を補酵素とし、リノール酸のみならず、オレイン酸や α -リノレン酸、 γ -リノレン酸などを対応する 10-hydroxy-脂肪酸へと変換した。

また、嫌気性微生物の中でも乳酸菌を対象としてリノール酸をユニークな脂肪酸へと変換する新たな脂肪酸変換反応の探索を行った結果、乳酸菌 *Pediococcus* sp. LBK454 がリノール酸をユニークなヒドロキシ脂肪酸へと変換することを見出した。*Pediococcus* sp. LBK454 をリノール酸とともに反応に供したところ三種類のヒドロキシ脂肪酸が生成した。得られたヒドロキシ脂肪酸を、高速液体クロマトグラフィーを用いて精製し MS-MS, NMR, 二次元 NMR 等に供した結果、10-hydroxy-*cis*-12-octadecaenoic acid, 13-hydroxy-*cis*-9-octadecaenoic acid, 及び 10, 13-dihydroxy-octadecanoic acid であると同定した。また、本反応は本菌の休止菌体や、本菌を超音波破碎により得られる無細胞抽出液を触媒とする反応においても進行することを明らかにした。さらに、本反応を詳細に検討したところリノール酸の Δ 9 位の

二重結合を水和する酵素と $\Delta 12$ 位の二重結合を水和する酵素は異なることを明らかにした。水酸化脂肪酸は、樹脂やワックス、ナイロン、プラスチック、防腐剤、化粧品など工業的にも利用範囲が広く価値のある脂肪酸であり、また CLA 生産の中間体としても関与していることから、本菌の水和活性は、さらなる用途に期待がもてる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

1、S. Kishino, J. Ogawa, K. Yokozeki, S. Shimizu: Metabolic diversity in biohydrogenation of polyunsaturated fatty acids by lactic acid bacteria involving conjugated fatty acid production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, (査読有)(2009) in press

2、岸野重信、清水昌：乳酸菌のさらなる可能性、温故知新 (査読無) (2008) 45 : 24-39

3、岸野重信、小川順、横関健三、清水昌：乳酸菌による共役脂肪酸生産、バイオサイエンスとインダストリー (査読無) (2008) 66 : 54-59

4、小川順、岸野重信、清水昌：酵素法による共役脂肪酸類の合成 (査読無) (2008) 37 : 18-27

[学会発表] (計 2 2 件)

1、乳酸菌の共役リノール酸 (CLA) 生産系にて機能するリノール酸水和酵素の諸性質
岸野重信、朴時範、小川順、横関健三、清水昌
日本農芸化学会 2009 年度大会 (福岡) (2009 年 3 月 28 日)

2、乳酸菌の共役リノール酸 (CLA) 生産系にて機能する short-chain dehydrogenase ホモログタンパク質の諸性質
岸野重信、朴時範、小川順、横関健三、清水昌
日本農芸化学会 2009 年度大会 (福岡) (2009 年 3 月 28 日)

3、乳酸菌の共役リノール酸 (CLA) 生産に関わるリノール酸水和酵素の諸性質
岸野重信、朴時範、小川順、横関健三、清水昌
第 7 回脂質工学研究部会講演会 (大阪) (2009 年 3 月 13 日)

4、Microbial Mass Production of Conjugated Linoleic Acid

岸野重信 (招待講演)

The International Health Food Symposium (韓国) (2008 年 9 月 19 日)

5、微生物による共役脂肪酸生産

小川順、岸野重信、横関健三、清水昌
第 10 回 CLA 懇話会 (東京) (2008 年 10 月 4 日)

6、嫌気性細菌による新規共役脂肪酸

岸野重信、朴時範、河合正昭、小川順、横関健三、清水昌
第 60 回日本生物工学会大会 (仙台) (2008 年 8 月 28 日)

7、Unique fatty acid transformation catalyzed by anaerobic bacteria and its application for conjugated fatty acid production

小川順、岸野重信、横関健三、清水昌
Society for Industrial Microbiology Annual Meeting Program (San Diego) (2008 年 8 月 11 日)

8、乳酸菌による共役リノール酸生産とその生化学的解析

小川順、岸野重信、横関健三、清水昌
日本乳酸菌学会 2008 年度大会 (京都) (2008 年 7 月 15 日)

9、ヒドロキシ脂肪酸生産に関わる乳酸菌酵素系の機能解析

岸野重信、田辺香緒里、小川順、横関健三、清水昌
日本農芸化学会 2008 年度大会 (愛知) (2008 年 3 月 28 日)

10、嫌気性細菌による共役 EPA 及び共役アラキドン酸の生産

岸野重信、朴時範、河合正昭、三原皓典、小川順、横関健三、清水昌
日本農芸化学会 2008 年度大会 (愛知) (2008 年 3 月 28 日)

11、嫌気性細菌による共役高度不飽和脂肪酸生産

河合正昭、朴時範、三原皓典、岸野重信、小川順、横関健三、清水昌
第 6 回脂質工学研究部会講演会 (京都) (2008 年 2 月 29 日)

12、乳酸菌由来遺伝子を導入した形質転換大腸菌による共役脂肪酸生産

岸野重信、河合正昭、小川順、横関健三、清

水昌
第9回CLA懇話会(大阪)(2007年10月20月)

13、乳酸菌遺伝子を導入した形質転換大腸菌による共役脂肪酸生産

河合正昭、**岸野重信**、横関健三、清水昌
第59回日本生物工学会大会(広島)(2007年9月27日)

14、Practical production of conjugated linoleic acid by lactic acid bacteria and analysis of the reactions and enzymes involved

岸野重信、安藤晃規、杉本聡、三原皓典、田辺香緒里、河合正昭、村上明紀、小川順、清水昌

II International Congress on Conjugated Linoleic Acid (CLA): From experimental models to human application (イタリア)
(2007年9月22日)

15、Unique microbial reactions useful for conjugated fatty acid production

小川順、**岸野重信**、安藤晃規、杉本聡、三原皓典、田辺香緒里、河合正昭、村上明紀、清水昌

II International Congress on Conjugated Linoleic Acid (CLA): From experimental models to human application (イタリア)
(2007年9月21日)

16、Bacterial production of useful conjugated fatty acids

岸野重信、小川順、横関健三、清水昌
98th AOCS Annual Meeting & Expo (アメリカ)
(2007年5月15日)

17、Introduction of Hydroxyl Groups into Fatty Acids by Microbial Reactions and Engineering of the Enzymes Involved

小川順、**岸野重信**、田辺香織、V. Urlacher, R. D. Schmid, 清水昌

98th AOCS Annual Meeting & Expo (アメリカ)
(2007年5月14日)

[図書](計 2件)

1、小川順、**岸野重信**、櫻谷英治、横関健三、清水昌・栄養学研究の最前線 第14章 微生物機能を活用した食品機能の創出

日本栄養・食糧学会監修 建帛社出版、pp.151-165 (2008年出版)

2、小川順、**岸野重信**、櫻谷英治、清水昌・微生物によるものづくり-化学法に代わるホワイトバイオテクノロジーの全て-

第2章食品素材の生産 6 高度不飽和脂肪酸・共役脂肪酸含有油脂の微生物生産

植田充美監修 シーエムシー出版、pp.85-91
(2008年出版)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岸野 重信 (KISHINO SHIGENOBU)
京都大学大学院・農学研究科・助教
研究者番号: 40432348

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし