

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：23803

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15729

研究課題名（和文）アトピー性皮膚炎の原因となる皮膚菌叢を健常化する希少脂肪酸の微生物生産

研究課題名（英文）Microbial production of rare fatty acid curing atopic dermatitis by normalizing skin bacterial flora

研究代表者

菊川 寛史（Kikukawa, Hiroshi）

静岡県立大学・食品栄養科学部・助教

研究者番号：80758805

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：アトピー性皮膚炎を惹起する黄色ブドウ球菌の選択的な抗菌剤の開発・生産を目指して、希少脂肪酸の生産微生物の探索と生産性改善を試みた。これまでに、生産微生物の探索、高生産株の選抜、高生産培養条件の設定、有用添加物の発見、炭酸ガス通気による生産法の更なる改善、など種々の評価を行ってきた。研究成果として、ビフィズス菌に抗菌性を持つ希少脂肪酸16:1 7の生産を見出した。また、ビフィズス菌の生育だけでなく脂肪酸生産においても、L-システイン及び炭酸ガスの有効性を示した。また、化学変異導入による高生産変異株を取得した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ビフィズス菌において、脂質・脂肪酸に関する研究例はほとんどないため、基礎学術的意義の高い研究成果である。一方で、ヨーグルトなど食品として利用され、健康効果についても良く知られるビフィズス菌において抗菌性脂肪酸の蓄積を見出したことは、将来的な抗菌性脂肪酸の実用化や社会実装に向けた研究開発の第一歩となるものと期待される。

研究成果の概要（英文）：With the aim of developing and producing a selective antibacterial agent for *Staphylococcus aureus* that causes atopic dermatitis, we surveyed for microorganisms that produce rare fatty acids and attempted to improve their productivity. So far, various evaluations have been carried out, such as searching for producing microorganisms, selecting high-producing strains, setting high-producing culture conditions, discovering useful additives, and further improving the production method by aerating carbon dioxide gas. As a research result, we found the production of a rare fatty acid 16:1 7, which has antibacterial properties against bifidobacteria. In addition, the effectiveness of L-cysteine and carbon dioxide was shown not only in the growth of bifidobacteria but also in the production of fatty acids. In addition, a high-production mutant strain was obtained by introducing a chemical mutation.

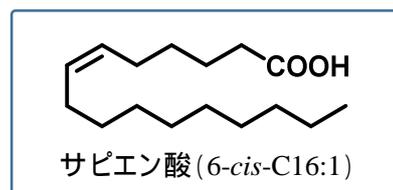
研究分野：応用微生物学

キーワード：ビフィズス菌 C16モノエン酸 アトピー性皮膚炎 黄色ブドウ球菌 表皮ブドウ球菌

## 1. 研究開始当初の背景

サピエン酸 (6-*cis*-C16:1) は、ヒトの皮下組織にある皮脂腺で特異的に生合成され、皮脂脂肪酸の4%を占める一価不飽和脂肪酸である。サピエン酸はヒト以外の動物には存在しないが、ヒトに特異的である理由も未解明である。サピエン酸やその異性体 (9-*cis*-C16:1) は、アトピー性皮膚炎 (atopic dermatitis, AD) を引き起こす皮膚常在性黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* に対する抗菌活性をもつ (文献1: Nagao, T. et al., 106th AOCs 年会講演要旨集, p4, 2015)。近年、*S. aureus* の弱毒性変異株が生じることにより AD が重症化すると明らかになったが、サピエン酸は、この *S. aureus* 弱毒株に対しても強い抗菌性を保持している (文献2: Okino, N. et al., IUMS2017, OR030, 2017)。

一方、近縁種である表皮ブドウ球菌 *S. epidermidis* は、皮膚保湿や菌叢正常化により、AD やニキビを抑制することから美肌菌として注目されるが、サピエン酸は美肌菌に抗菌性を示さない選択的抗菌性を有する。つまり、サピエン酸を含有する全く新しい機能性食品・塗布剤により、異常皮膚細菌叢の正常化による AD の治癒・予防が可能となる。



しかし、サピエン酸は、ヒトに特異的に存在するため、サピエン酸の有用な供給源は存在しない。また、化学合成法で位置選択的に二重結合を導入してサピエン酸を合成するのは困難である一方、その発酵生産例もない。そこで、サピエン酸の発酵微生物の発見を志向した。サピエン酸の摂取・塗布を可能にするには、食用に相応しい安全な微生物基盤が不可欠である。そこで、食経験が豊富なビフィズス菌によるサピエン酸の発酵生産法の確立と、機能性食品・塗布剤の開発を着想した。

## 2. 研究の目的

- 1) サピエン酸を高生産するビフィズス菌の探索
- 2) ビフィズス菌がもつサピエン酸生合成メカニズムの解明
- 3) 培養・代謝工学によるサピエン酸生産の最適化

## 3. 研究の方法

自然界及び保有する微生物保存株を培養して、各菌体内の総脂肪酸を抽出・誘導體化してガスクロマトグラフィー及び質量分析装置に供した。また、高生産株を選抜し、選抜株において種々の培養条件・温度・培地組成で蓄積性を評価するとともに、GCMS、LCMS など質量分析装置による脂肪酸の構造解析を行った。さらに、同属菌株のうち、高生産株と非生産株のゲノムを比較することで高生産の鍵となり得る遺伝子の探索を行った。一方、高生産の育種として、突然変異導入による高生産変異株の作出を目指した。

## 4. 研究成果

### (1) サピエン酸生産微生物のスクリーニングと培養条件の検討

自然界より収集した微生物株 50 株、糸状菌 5 株とビフィズス菌 28 株を培養し、培養菌体から抽出・誘導體化した総脂肪酸をガスクロマトグラフィーで分析したところ、ビフィズス菌においてサピエン酸と溶出時間を同じくするピークを検出した (表1)。このうち、*Bifidobacterium adolescentis* JCM 7042 株と *B. boum* JCM 1211 株において、比較的高い脂肪酸生産とサピエン酸と思われるピークを検出した。

また、これら 2 株に着目して、サピエン酸の生産性を指標とした基礎的な培養条件を検討し、最適な培地組成 (図1) および培養条件 (表2) を検討した。また、様々な培地成分の添加により生産性への影響を評価した結果、L-システインの添加により、16:1 脂肪酸について、7042 株では、生産性 (mg/L) 及び含有率 (%) がそれぞれ 2 倍、1211 株でも生産性が 2 倍に増加することを見出した。

表1. ビフィズス菌群の脂肪酸生産性

strain	Dried cell weight (mg)	Total fatty acid (mg/L)	C16:1 (%)
Bifidobacterium bifidum	16.8	24.7	0.0
B. adolescentis JCM 1275	37.9	43.4	0.0
B. adolescentis 12451	25.8	55.8	1.8
B. adolescentis 3-117	27.9	54.4	0.5
B. adolescentis 12-114	21.8	39.4	0.9
B. adolescentis 12-111	35.7	106.0	2.3
B. adolescentis 7042	36.6	106.6	2.3
B. adolescentis 4-2	27.2	57.4	0.0
B. adolescentis 4-16	9.2	19.6	0.0
B. adolescentis 4-58	24.0	39.0	0.6
B. adolescentis 9-124	20.8	33.4	0.3
B. animalis subsp. animalis JCM 1190	21.9	44.7	0.0
B. animalis subsp. lactis JCM 10602	25.3	35.2	0.6
B. boum 1211	31.5	77.5	2.7
B. breve	22.3	67.8	0.5
B. catenulatum	16.7	36.6	0.0
B. dentium JCM 1192	21.6	44.4	0.6
B. gallinarum JCM 16291	11.8	20.2	0.7
B. indicum JCM 1302	9.9	23.4	0.0
B. longum 105A wild	25.8	65.4	0.0
B. longum infantis ATCC 15697	20.7	38.6	0.0
B. longum infantis JCM 1222	40.1	56.0	0.0
B. longum NCC 2705	35.4	93.5	0.0
B. pseudocatenulatum	48.2	40.9	0.0
B. ruminantium JCM 8222	30.6	74.9	0.7
B. thermophilum JCM 1207	24.0	68.1	0.8

表2. 基礎的な培養条件検討

	<i>Bifidobacterium</i> sp. JCM 7042	<i>B. boum</i> JCM 1211
Temp. ( )	24	37
Time (h)	48	48
pH	6.5	7.0
16:1Δ6 in culture medium (mg/L)	2.8	2.1
16:1Δ6 in total FA (%)	3.4	2.7

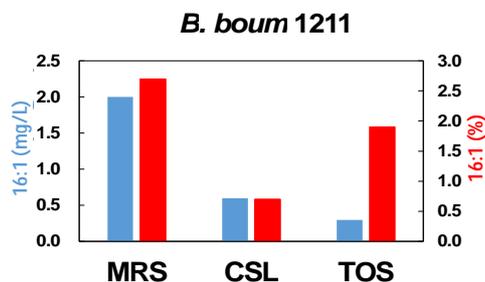
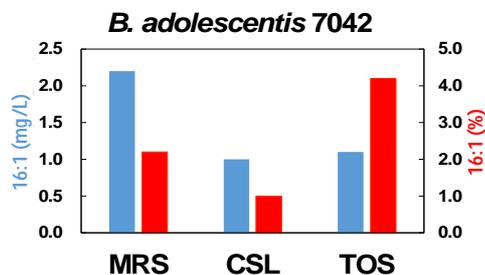


図1. 最適な培地組成の検討

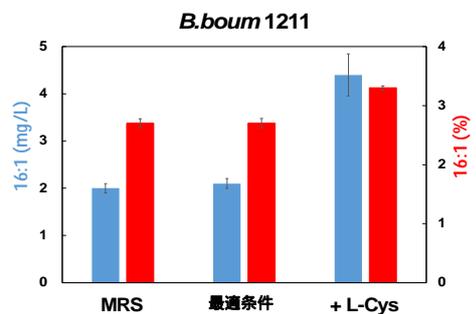
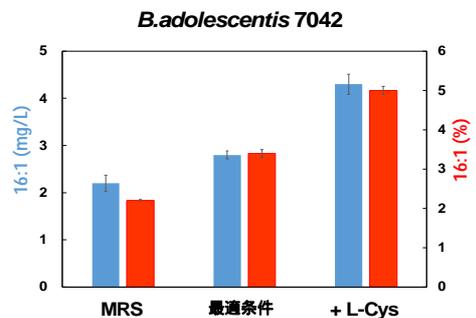


図2. L-システインの添加効果

## (2) 選抜したビフィズス菌が生産する16:1の構造決定

選抜した7042株の生産する16:1の詳細な構造を決定するために、7042株由来脂肪酸サンプルをGCMSおよびLCMSMSにて解析した。GCMS分析においては、脂肪酸サンプルを4,4-dimethylloxazoline (DMOX) 誘導体化して、GCMSに供した。各種16:1脂肪酸標品と溶出時間を比較したところ、サピエン酸(16:1 6)ではなく、16:1 7であると示唆された(図3)。MSフラグメントからも16:1 6ではないと示唆された。さらに、LCMSMSでより詳細に分離・構造解析した結果、フラグメントパターンより16:1 7であると明らかになった。サピエン酸ではなかったものの、16:1 7はサピエン酸と二重結合位置の違いのみであり、黄色ブドウ球菌および表皮ブドウ球菌に対する選択的抗菌活性もサピエン酸と同等であることが報告されている。

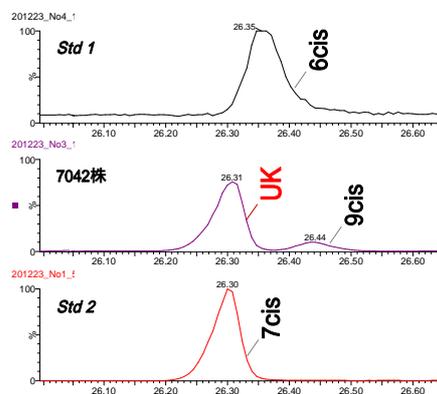
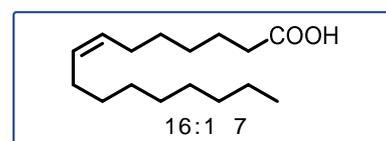


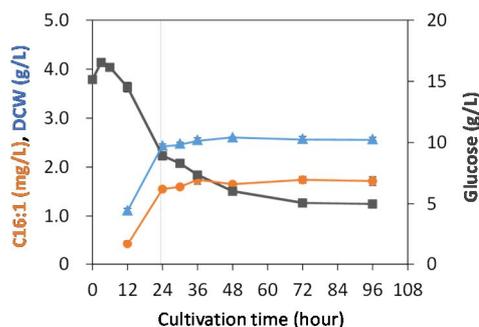
図3. GCMSにおける溶出時間



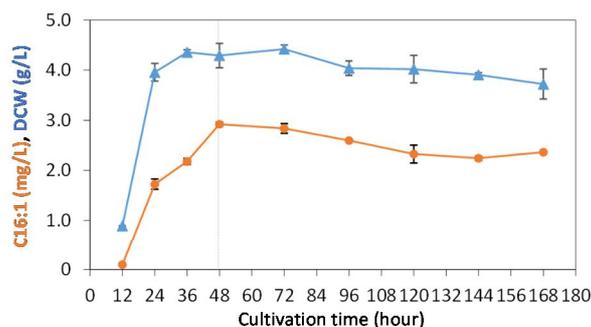
## (3) 7042株の培養スケールアップと炭酸ガス通気の影響

7042株のMRS培地での培養をスケールアップし、簡易的なジャーフェーメンテーション装置により、炭酸ガス通気による影響評価を行った。ビフィズス菌は、炭酸ガスの利用が可能で、アスパラギン酸や核酸合成に要求されることが報告されている。通気のコントロール条件として、窒素ガスを用いた(図4)。窒素ガス条件下と比較して、炭酸ガス条件下では、生育、16:1 7生産性ともに、大幅に改善した。また、L-システインと炭酸ガス通気の両方により、最終的な生育・生産性に影響はなかったものの、システイン添加によって生育速度、生産速度が向上した。

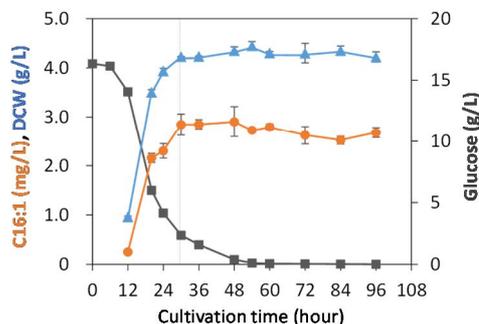
### ● MRS with N<sub>2</sub>



### ● MRS with CO<sub>2</sub>



### ● MRS with L-cys & CO<sub>2</sub>



- CO<sub>2</sub>曝気によって、*B. adolescentis*の生育とC16:1生産性が改善した。
- CO<sub>2</sub>曝気+ L-cys添加により生産速度が約1日短縮した。
- MRS培地+ CO<sub>2</sub>曝気条件下で総脂肪酸のうちC16:1比率は、約2.3%だった。

図4. 炭酸ガス通気の影響

#### (4) 化学変異導入による高生産株の取得

高生産株の取得を目指して、脂肪酸高生産変異株の効率的な取得方法を確立し、16:1 7の高生産変異株の取得を目指した。化学変異導入剤としてメタンサルホン酸エチルを用い、培地に塗布したナイルレッド(脂質画分に取り込まれることで赤色に呈色する)を指示試薬とした変異処理法を考案した。この変異処理法において、より赤く、より早く赤色を呈したコロニーをピックアップすることで、高生産化したと思われる変異株を取得した。一次スクリーニング、二次スクリーニングを経て、野生株の2倍程度の生産性を示す変異株を数株選抜した。

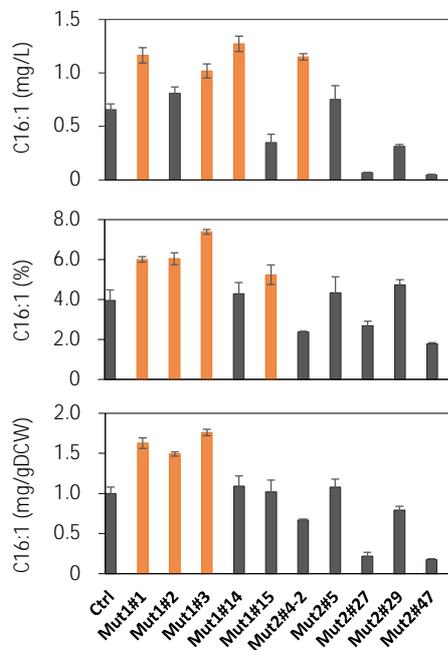


図5. 変異株のスクリーニング

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Mo Brian K H, Ando Akinori, Nakatsuji Ryohei, Okuda Tomoyo, Takemoto Yuki, Ikemoto Hiroyuki, Kikukawa Hiroshi, Sakamoto Takaiku, Sakuradani Eiji, Ogawa Jun	4. 巻 85
2. 論文標題 Characterization of 3 fatty acid desaturases from oomycetes and their application toward eicosapentaenoic acid production in <i>Mortierella alpina</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1252 ~ 1265
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbaa123	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hara Kiyotaka Y., Kageyama Yuya, Tanzawa Nanami, Hirono-Hara Yoko, Kikukawa Hiroshi, Wakabayashi Keiji	4. 巻 28
2. 論文標題 Development of astaxanthin production from citrus peel extract using <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Environmental Science and Pollution Research	6. 最初と最後の頁 12640 ~ 12647
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11356-020-11163-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kikukawa H, Shimizu S, Ota N, Yasohara Y, Ito N, Mitsukura K, Yoshida T	4. 巻 19
2. 論文標題 Screening and characterization of microorganisms catalyzing (S)-selective oxidation of , - disubstituted propanediols	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biocatalysis and Agricultural Biotechnology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bcab.2019.101108	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 1.Hara KY, Saito M, Kato H, Morikawa K, Kikukawa H, Nomura H, Fujimoto T, Hirono-Hara Y, Watanabe S, Kanamaru K, Kondo A	4. 巻 18
2. 論文標題 5-Aminolevulinic acid fermentation using engineered <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbial Cell Factories	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12934-019-1242-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 小川 順・奥田知生・菊川寛史・安藤晃規	4. 巻 20 (3)
2. 論文標題 Mortierella alpina 1S-4の分子育種株による高度不飽和脂肪酸高含有油脂の発酵生産	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 オレオサイエンス	6. 最初と最後の頁 103-109
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5650/oleoscience.20.103	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 安藤晃規・奥田知生・波多野文美・菊川寛史・松山恵介・小川 順	4. 巻 20 (3)
2. 論文標題 ラビランチュラ類Aurantiochytrium sp. T7株による 3-docosapentaenoic acid ( 3-DPA) の生産	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 オレオサイエンス	6. 最初と最後の頁 111-117
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5650/oleoscience.20.111	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Wu Chang-Yu, Okuda Tomoyo, Ando Akinori, Hatano Ayami, Kikukawa Hiroshi, Ogawa Jun	4. 巻 133
2. 論文標題 Isolation and characterization of the 3-docosapentaenoic acid-producing microorganism Aurantiochytrium sp. T7	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 229 ~ 234
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2021.10.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hirono-Hara Yoko, Kato Airi, Mizutani Yurika, Kikukawa Hiroshi, Hara Kiyotaka Y.	4. 巻 17
2. 論文標題 Effect of spent coffee grounds extract on astaxanthin production by Xanthophyllomyces dendrorhous	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioresource Technology Reports	6. 最初と最後の頁 100953 ~ 100953
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bi.teb.2022.100953	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kikukawa Hiroshi、Shimizu Chisato、Hirono Hara Yoko、Hara Kiyotaka Y.	4. 巻 132
2. 論文標題 Effect of ethanol on astaxanthin and fatty acid production in the red yeast <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Applied Microbiology	6. 最初と最後の頁 2034 ~ 2041
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jam.15335	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kikukawa Hiroshi、Shimizu Chisato、Hirono-Hara Yoko、Hara Kiyotaka Y.	4. 巻 35
2. 論文標題 Screening of plant oils promoting growth of the red yeast <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> with astaxanthin and fatty acid production	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biocatalysis and Agricultural Biotechnology	6. 最初と最後の頁 102101 ~ 102101
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bcab.2021.102101	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kikukawa Hiroshi、Okaya Takuma、Maoka Takashi、Miyazaki Masayuki、Murofushi Keita、Kato Takanari、Hirono-Hara Yoko、Katsumata Masahiro、Miyahara Shoichi、Hara Kiyotaka Y.	4. 巻 19
2. 論文標題 Carotenoid Nostoxanthin Production by <i>Sphingomonas</i> sp. SG73 Isolated from Deep Sea Sediment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Marine Drugs	6. 最初と最後の頁 274 ~ 274
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/md19050274	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 水谷友梨香, 加藤愛理, 関川貴寛, 菊川寛史, 原 清敬
2. 発表標題 酵母を用いたコーヒー抽出残渣からの高付加価値品の生産
3. 学会等名 日本農芸化学会大会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 菊川寛史, 景山裕也, 弘埜陽子, 原清敬
2. 発表標題 Improvement of Astaxanthin Production in Xanthophyllomyces dendrorhous by Resource and Metabolic Engineering
3. 学会等名 Virtual 2020 AOCS Annual Meeting & Expo (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 水谷友梨香, 加藤愛理, 関川貴寛, 菊川寛史, 原 清敬
2. 発表標題 コーヒー抽出残渣の発酵資源化
3. 学会等名 日本醸造学会第12回若手シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 景山裕也, 若林敬二, 菊川寛史, 原清敬
2. 発表標題 赤色酵母によるアスタキサンチン発酵生産への柑橘果皮抽出液の利用
3. 学会等名 日本醸造学会第12回若手シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 塩澤優稀, 弘埜陽子, 菊川寛史, 原清敬
2. 発表標題 デルタロドプシンによるATP再生を伴うグルタチオン生産性の向上
3. 学会等名 日本醸造学会第12回若手シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ando A, Hatano A, Okuda T, Kikukawa H, Matsuyama K, Ogawa J
2. 発表標題 Production of 3-docosapentaenoic acid (DPA) by <i>Aurantiochytrium</i> sp. T7 strain
3. 学会等名 American Oil Chemists' Society Annual Meeting 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kikukawa H, Koyasu R, Yasohara Y, Ito N, Mitsukura K, Yoshida T
2. 発表標題 Asymmetric oxidation of 1,3-propanediols to chiral hydroxyalkanoic acids
3. 学会等名 14th International Symposium on Biocatalysis and Biotransformations (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ando A, Hatano A, Okuda T, Kikukawa H, Matsuyama K, Ogawa J
2. 発表標題 A rare 3-PUFA, 3-docosapentaenoic acid, production by <i>Aurantiochytrium</i> sp. T7 strain
3. 学会等名 Marine Biotechnology Conference 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 弘埜陽子, 塩澤優稀, 戸谷吉博, 石井 純, 柘植謙爾, 松田史生, 菊川寛史, 原 清敬
2. 発表標題 光駆動ATP 再生系による出芽酵母型Vmax細胞の創製
3. 学会等名 第52回酵母遺伝学フォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水谷友梨香, 加藤愛理, 関川貴寛, 菊川寛史, 原 清敬
2. 発表標題 コーヒー抽出残渣の発酵資源化
3. 学会等名 第71回日本生物工学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水谷友梨香, 加藤愛理, 関川貴寛, 菊川寛史, 原 清敬
2. 発表標題 コーヒー抽出残渣の発酵資源化
3. 学会等名 第8回食品薬学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kikukawa Hiroshi, Okaya Takuma, Maoka Takashi, Miyazaki Masayuki, Murofushi Keita, Kato Takanari, Hirono-Hara Yoko, Katsumata Masahiro, Miyahara Shoichi, Hara Kiyotaka Y.
2. 発表標題 カロテノイドNostoxanthinを高純度で生産する深海微生物
3. 学会等名 第21回マリンバイオテクノロジー学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

静岡県立大学 環境工学研究室  
<https://web.u-shizuoka-ken.ac.jp/~env-bioeng/>  
 静岡県立大学教員データベース  
<https://db.u-shizuoka-ken.ac.jp/show/f-kikukawahiroshi.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------