

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15733

研究課題名（和文）細菌の  $\omega$ -3系高度不飽和脂肪酸の代謝に関わる新規タンパク質の探索と機能解明

研究課題名（英文）Exploration and Functional Elucidation of a Novel Protein Involved in the Metabolism of omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids in Bacteria

研究代表者

小川 拓哉 (Ogawa, Takuya)

京都大学・化学研究所・助教

研究者番号：40756318

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）： $\omega$ -3系高度不飽和脂肪酸（PUFA）の微生物生産系の開発に向けて、 $\omega$ -3 PUFA代謝の全容の理解が重要である。本研究ではShewanella属細菌の  $\omega$ -3 PUFA代謝能に注目し、本菌の新規PUFA代謝関連タンパク質の探索に取り組んだ。本研究の結果、 $\omega$ -酸化経路を介したドコサヘキサエン酸からエイコサペンタエン酸への変換機構を明らかにし、また、機能未知遺伝子が  $\omega$ -3 PUFAの代謝やその制御に関与する可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

微生物の  $\omega$ -3 PUFAに関する既往の研究では合成反応に主眼が置かれ、分解や変換といった他の代謝経路や代謝の制御に関する知見が乏しかった。これらを含めた  $\omega$ -3 PUFA代謝の全容の理解は基礎生物学的にも、微生物の応用開発のうえでも重要である。本研究で新たに得られた知見は、微生物によるPUFA代謝の基礎的理解を広げるとともに、微生物を用いた  $\omega$ -3 PUFAの合成・変換系の構築や生産性向上を考えるうえで応用可能な知見である。

研究成果の概要（英文）：Aiming at developing a microbe-based  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) production system, it is important to comprehensively understand  $\omega$ -3 PUFA metabolism. In this study, I focused on the ability of the bacterium belonging to the genus Shewanella to metabolize  $\omega$ -3 PUFA and tried to search for novel proteins that are related to PUFA metabolism. As a result, I revealed the mechanism of conversion from docosahexaenoic acid to eicosapentaenoic acid via a  $\omega$ -oxidation pathway and found the possible involvement of genes of unknown functions in the  $\omega$ -3 PUFA metabolism or its regulation.

研究分野：応用微生物

キーワード： $\omega$ -3系高度不飽和脂肪酸 脂質代謝 微生物変換 エイコサペンタエン酸 ドコサヘキサエン酸  $\omega$ -酸化

### 1. 研究開始当初の背景

(1) エイコサペンタエン酸 (EPA) やドコサヘキサエン酸 (DHA) に代表される  $\omega$ -3 系高度不飽和脂肪酸 (PUFA) は、人にとって必須の栄養素である (図 1)。人の健康を維持・増進する効果からサプリメントや医薬品として国内外で流通しており、世界的な市場規模は数兆円に上る。このような社会的ニーズを背景として、EPA/DHA 生産性の微生物の産業利用が注目を集めている。そのような微生物として、一部の海洋性細菌や真核微生物であるラビリンチュラ類等が知られている。既往の研究により、海洋性細菌においては EPA/DHA は一般的な脂肪酸と異なり、EPA/DHA の生合成に特化した Pfa 酵素群により合成されることや、細胞内で合成された EPA が細胞に酸化ストレス耐性を付与すること等が報告されている。当研究グループでも、南極海水から単離した EPA 生産性細菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 を用いて、EPA の代謝や生理機能の解明に取り組んできた。本菌は低温ストレスに応答して EPA を生産し、EPA 非生産性変異株 ( $\Delta$ EPA 株) は低温感受性を示す。近年では、Pfa 酵素群や、EPA を細胞膜リン脂質に導入する酵素 PlsC1 に焦点を当て、それらの特性解析や相互作用解析を行い、EPA および EPA 含有リン脂質の効率的な生合成機構を明らかにしてきた。

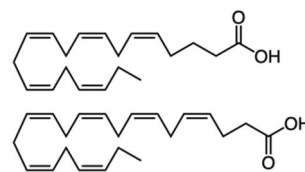


図 1. EPA (上) と DHA (下) の構造式

(2) 海洋性細菌の EPA/DHA の代謝に関する既往の研究では、上述の Pfa 酵素群による合成反応に主眼が置かれてきた [文献 1,2]。一方で、研究を開始する以前には、EPA/DHA の分解や変換といった他の代謝反応に関する知見はごくわずかであった。一例として、*S. livingstonensis* Ac10 の  $\Delta$ EPA 株は EPA の *de novo* 合成能を欠くが、外部添加した DHA 含有リン脂質から EPA をつくる変換経路を有している [文献 3]。しかし、この変換がどのような代謝反応を経て起こるのかは未解明であった。また、合成反応についても、Pfa 酵素の遺伝子発現調節や、Pfa 酵素のはたらきを補助するアクセサリタンパク質の有無など、制御機構の詳細は不明であった。

### 2. 研究の目的

海洋性細菌における EPA/DHA の代謝は、生合成反応を除き未解明な点が多い。そこで本研究では「*S. livingstonensis* Ac10 の  $\Delta$ EPA 株に見出された、DHA から EPA への変換反応の解明」および「ゲノム比較に解析により見出された、EPA/DHA 生産菌に特有な遺伝子の解析」に取り組み、EPA/DHA 代謝に関わる新規タンパク質の同定を目指した。これによって EPA/DHA 代謝の基礎的な理解を広げることが目的とした。このような取り組みは基礎生化学的に重要であり、なぜ海洋に棲む一部の細菌が EPA/DHA を必要とするのかといった問いを追求するうえで手掛かりになる可能性が期待された。応用面でも、代謝経路の包括的な理解は微生物・酵素を用いた EPA/DHA 生産方法の新規開発や増強に貢献できると考えた。

### 3. 研究の方法

(1) DHA から EPA への変換 (以降、DHA-EPA 変換) では 2 炭素ユニットと C=C 結合が 1 つ減少するため、 $\beta$  酸化、あるいは類似の代謝経路が想定された。そこで、まずは DHA の 4 位の C=C 結合の還元を担う 2,4-ジエノイル-CoA 還元酵素 (FadH) ホモログに注目して解析した。*S. livingstonensis* Ac10 のゲノムには FadH ホモログをコードする遺伝子が 6 つ存在する。そこで、各遺伝子の欠損株を作製し、DHA-EPA 変換能を調べるため、Bligh-Dyer 法により総脂質を抽出し、リン脂質組成をエレクトロスプレーイオン化質量分析 (ESI-MS) により分析した。一方で、リン脂質から脂肪酸メチルエステルを調製し、脂肪酸組成をガスクロマトグラフィー質量分析 (GC-MS) により分析した。また、FadH をコードする *sl\_1351* について、大腸菌 *Escherichia coli* を宿主とした組換え発現系を作製した。組換え酵素を精製し、想定される基質である DHA の 2,4-ジエノイル-CoA 体に対して反応性を示すか検討した。当該基質は酵素合成により調製し、また、反応生成物が後続の  $\beta$  酸化酵素である 2-エノイル-CoA 水和酵素/3-ヒドロキシアシル-CoA 脱水素酵素 (FadB) の基質になり得るかも検討した。

(2) DHA-EPA 変換の詳細なメカニズムを調べるため、 $\beta$  酸化経路の初発ステップを担う酵素であるアシル-CoA 脱水素酵素 (FadE) を解析した。*S. livingstonensis* Ac10 は FadE ホモログを 2 つ持つため (FadE1 および FadE2)、それらの遺伝子欠損株を作製し、リン脂質組成を ESI-MS により分析して DHA-EPA 変換能を調べた。また、各遺伝子の発現誘導特性を調べるため、EPA/DHA 存在下で本菌を培養し、特異抗体を用いたウェスタンブロットング解析により FadE1、FadE2 の発現を分析した。さらに、各 FadE ホモログの *E. coli* 発現系を作製し、組換え酵素を精製したのち、種々のアシル-CoA に対する反応性を検討した。

(3)  $\beta$  酸化酵素群による DHA-EPA 変換を検証するため、*S. livingstonensis* Ac10 の FadE1、FadH、FadB、および 3-ケトアシル-CoA チオラーゼ (FadA) の組換え酵素を調製し、*in vitro* で DHA-CoA

を基質として反応させ、生成物を ESI-MS により分析した。 *S. livingstonensis* Ac10 において EPA は主にリン脂質のアシル鎖として存在し、リン脂質アシル基転移酵素の一種である PlsC1 の働きによってリン脂質へと導入される。そこで、DHA-EPA 変換の分子機序に PlsC1 が関わる可能性を考え、これを調べるため *plsC1* 欠損株を作製し、リン脂質組成を ESI-MS により、また脂肪酸組成を GC-MS により分析した。

(4) Microbial Genome Database (<https://mbgd.nibb.ac.jp/>) を用いて既知の EPA/DHA 生産菌と非生産菌のゲノム比較を行い、EPA/DHA 生産菌に特有な遺伝子を探索した。それらの遺伝子が EPA/DHA 代謝やその制御に関わる可能性を考え、これを調べるため *S. livingstonensis* Ac10 の遺伝子欠損株を作製した。EPA 量を測定するため、4 度および 18 度で培養した遺伝子欠損株から脂質を抽出し、ESI-MS および GC-MS により脂質分析を行った。

#### 4. 研究成果

(1) FadH ホモログをコードする 6 つの遺伝子の欠損株について、ESI-MS によりリン脂質組成を分析した結果、親株や他の遺伝子欠損株と比べ、*sl\_1351* 欠損株では EPA 含有リン脂質が顕著に減少していた。同様に、脂肪酸組成を分析した結果、親株では DHA-EPA 変換率が約 9 割であったのに対し、*sl\_1351* 欠損株では 12% にまで低下していた (図 2)。他の 5 つの遺伝子欠損株の変換率は親株と同様であり、以上の結果から、*sl\_1351* が DHA-EPA 変換に重要であることが示唆された。次に、*sl\_1351* の組換え酵素を調製し酵素活性を検討した。*in vitro* アッセイの結果、本組換え酵素は DHA の 2,4-ジエノイル-CoA 体に対して脱水素活性を示し、また、その反応生成物を FadB が水和することが確認された。以上の結果から、*sl\_1351* が DHA から EPA への変換反応の 1 ステップを担うことが示された。また、*sl\_1351* は既知の *E. coli* FadH のオースログであることから、DHA が一般的な  $\beta$  酸化経路を経て EPA に変換されることが考えられた (図 3)。以上の成果をまとめ、Front. Microbiol. にて論文を発表した [文献 4]。

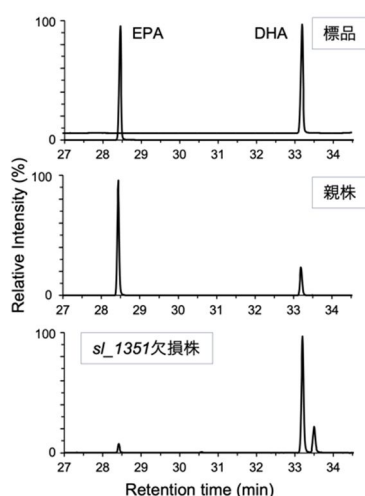


図 2. GC-MS による EPA/DHA 含量の分析

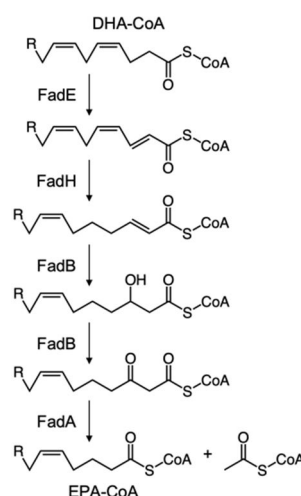
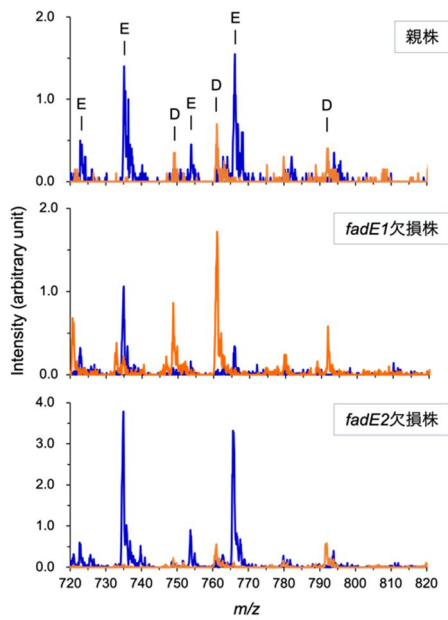


図 3. 推定される DHA-EPA 変換反応

(2) 一般的な  $\beta$  酸化では一連の酸化反応がくり返され、長鎖脂肪酸はアシル-CoA にまで分解されるが、DHA-EPA 変換では  $\beta$  酸化が 1 サイクルだけ進むことで選択的に EPA を生じることが考えられた。この機序に本菌が持つ 2 つの FadE ホモログの特性の違いや使い分けが関わることを考え、FadE1 と FadE2 の特性を解析した。遺伝子欠損株のリン脂質組成を調べた結果、*fadE2* 欠損株では EPA 含有リン脂質量が親株と同程度であったのに対し、*fadE1* 欠損株では顕著に減少していた (図 4)。また、*fadE2* の発現は EPA や DHA の存在下でも変化しなかったが、*fadE1* の発現は DHA の細胞添加によって誘導されることを発見した。これらの結果から、*in vivo* において *fadE1* が DHA-EPA 変換に関わることを示唆された。また、組換え酵素を用いた *in vitro* アッセイの結果、FadE1 が DHA-CoA や EPA-CoA に対して脱水素活性を示した。以上の結果から、2 つの FadE ホモログのうち FadE1 が DHA-EPA 変換の初発ステップを担うことがわかった (図 3)。以上の成果をまとめ、Biochem. Biophys. Res. Commun. にて論文を発表した [文献 5]。

(3) *S. livingstonensis* Ac10 の 4 種の  $\beta$  酸化酵素と DHA-CoA との反応生成物を分析した結果、EPA-CoA に加え、下流の  $\beta$  酸化代謝物の生成が確認された。上述したように FadE1 が EPA-CoA を基質したことも考え合わせると、DHA-EPA 変換では  $\beta$  酸化酵素のみの働きで EPA を選択的に生じるのではないことが考えられた。EPA を選択的に生じる別の要因として、EPA を細胞膜リン脂質に導入する PlsC1 に注目し、*plsC1* 欠損株の脂質分析を行った。その結果、親株と異なり *plsC1* 欠損株では EPA が細胞中に蓄積しないことがわかった。このことから、DHA-EPA 変換



◀ 図 4. ESI-MS による EPA 含有リン脂質 (E) と DHA 含有リン脂質 (D) の分析

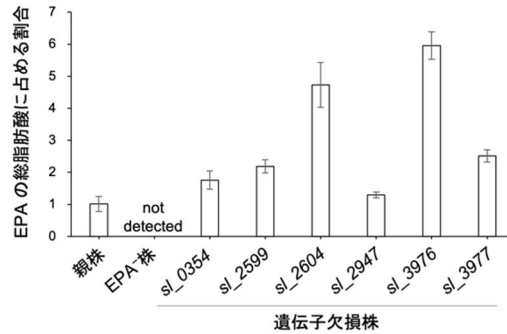


図 5. 各種遺伝子欠損株の EPA 量の分析

によって生じた EPA は PlsC1 によって素早く膜リン脂質に導入されることで、 $\beta$  酸化の次サイクルを免れることが考えられた。

以上の結果を総合すると、DHA は 1 サイクルの  $\beta$  酸化反応によって EPA に変換され、これがすばやく細胞膜へと取り込まれることで細胞内に蓄積する分子機序が考えられた。

(4) ゲノム比較解析の結果、EPA/DHA 生産菌に特有な遺伝子として 6 つの機能未知遺伝子に注目した。それらの遺伝子の欠損株を 4 度で培養し、細胞の脂質組成を分析したところ、EPA が最大で 6 倍にまで増大していることがわかった (図 5)。この結果は、EPA/DHA 生産性微生物の産業利用において、生産性向上の一手法として応用が期待できる。また、これらの遺伝子が EPA 生合成遺伝子の発現制御に関わる可能性を考え、本来 EPA を生産しない 18 度でも脂質分析を行った。結果として、当該遺伝子欠損株は野生株と同じく 18 度では EPA を生産せず、EPA 生産の温度依存的な制御には関わらないことがわかった。

#### < 引用文献 >

1. Yoshida K., et al. (2016) Mar. Drugs 14:94.
2. Moi I.M., et al. (2018) Appl. Microbiol. Biotechnol. 102:5811-26.
3. Sato S., et al. (2008) Extremophiles 12:753-61.
4. Ogawa T., et al. (2020) Front. Microbiol. 11:1104.
5. Yusuf Y. et al. (2020) Biochem. Biophys. Res. Commun. 528:453-8.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Takuya Ogawa, Kazuki Hirose, Yustina Yusuf, Jun Kawamoto, Tatsuo Kurihara	4. 巻 11
2. 論文標題 Bioconversion From Docosahexaenoic Acid to Eicosapentaenoic Acid in the Marine Bacterium <i>Shewanella livingstonensis</i> Ac10	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	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) 10.3389/fmicb.2020.01104	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 Yustina Yusuf, Takuya Ogawa, Jun Kawamoto, Tatsuo Kurihara	4. 巻 528
2. 論文標題 Role of acyl-CoA dehydrogenases from <i>Shewanella livingstonensis</i> Ac10 in docosahexaenoic acid conversion	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 453-458
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.05.185	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7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小川拓哉、廣瀬和樹、Yustina Yusuf、川本 純、栗原達夫
2. 発表標題 海洋性細菌による -3 高度不飽和脂肪酸の新奇代謝変換能
3. 学会等名 日本ビタミン学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小川拓哉、Yustina Yusuf、川本 純、栗原達夫
2. 発表標題 低温菌 <i>Shewanella livingstonensis</i> Ac10 における -3 系高度不飽和脂肪酸の代謝様式の解析
3. 学会等名 日本極限環境生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小川拓哉、廣瀬和樹、川本 純、栗原達夫
2. 発表標題 海洋性Shewanella属細菌による $\omega$ -3系高度不飽和脂肪酸の変換経路の解明
3. 学会等名 第66回日本生化学会近畿支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小川拓哉、廣瀬和樹、川本 純、栗原達夫
2. 発表標題 Shewanella属細菌における新規エイコサペンタエン酸生産経路の解析
3. 学会等名 酵素補酵素研究会2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yustina Yusuf、廣瀬和樹、小川拓哉、川本 純、栗原達夫
2. 発表標題 Polyunsaturated Fatty Acid Conversion in <i>Shewanella livingstonensis</i> Ac10
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yustina Yusuf、廣瀬和樹、小川拓哉、川本 純、栗原達夫
2. 発表標題 <i>Shewanella livingstonensis</i> Ac10の多価不飽和脂肪酸の変換におけるFadEの役割
3. 学会等名 極限環境生物学会2019年度（第20回）大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yustina Yusuf、廣瀬和樹、小川拓哉、川本 純、栗原達夫
2. 発表標題 In vitro and In vivo Analysis of FadH Protein from Shewanella livingstonensis Ac10 Involved in DHA Conversion
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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