

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658079

研究課題名(和文)反芻動物由来食品中のトランス脂肪酸低減に向けた嫌気性微生物脂質代謝の解析と応用

研究課題名(英文) Analysis and application of lipid metabolisms in anaerobic bacteria for reducing trans fatty acid in foods derived from ruminant animals

研究代表者

小川 順(Ogawa, Jun)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：70281102

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：食品中に含まれるトランス脂肪酸には、健康に対する悪影響が報告されてきている。トランス脂肪酸は、牛、羊などの反芻動物の肉や乳、その加工品に含まれており、その低減が求められている。本研究では、反芻胃に存在する嫌気性細菌におけるトランス脂肪酸生成反応に関して、脂肪酸飽和化反応の初発反応を触媒する水和脱水酵素がトランス脂肪酸生成に関与することをはじめて明らかにするとともに、本酵素活性の制御によりcis/trans比を操作できる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Trans fatty acids in foods are reported to have bad effects on health. Trans fatty acids are found in foods derived from ruminant animals such as cow and sheep. Low trans fatty acid is recommended for health. In this research, it was found that hydratase catalyzing the first step of the polyunsaturated fatty acid saturation metabolism is involved in trans fatty acid generating systems. The ratio of cis/trans fatty acid was influenced by the activity control of the hydratase.

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：トランス脂肪酸 嫌気性微生物 飽和化 反芻動物 FAD NADH オレイン酸 乳酸菌

1. 研究開始当初の背景

食品中には、不飽和脂肪酸中のシス型炭素-炭素二重結合の一部がトランス型二重結合に変化したトランス脂肪酸が含まれる。最近、このトランス脂肪酸に関して、血液中の LDL コレステロール濃度を上昇させる一方、HDL コレステロール濃度を減少させるため、結果として冠動脈性心疾患のリスクを高めるなど、健康に対する悪影響が報告されてきている。そのため、食品製造過程でのトランス脂肪酸生成抑制や、トランス脂肪酸摂取量の低減を促すための含量表示等の試みがなされている。

トランス脂肪酸は、油脂の加工過程において生成し、マーガリンやファットスプレッド、ショートニングなどの硬化処理された油脂とそれらを原材料に含む食品に含まれている。ところが、これらの加工油脂由来のトランス脂肪酸だけではなく、天然材料由来のトランス脂肪酸も存在する。それらは主に、牛、羊、山羊などの反芻動物由来の肉や乳、その加工品に存在している。これらの反芻動物由来の食品にトランス脂肪酸が存在する理由として、反芻胃に存在する嫌気性細菌の脂質代謝の関与が報告されている。

嫌気性細菌の脂質代謝を詳細に検討し、トランス脂肪酸生成機構を解明することは、天然材料由来トランス酸の低減に役立つ技術の開発に繋がると期待される。

2. 研究の目的

嫌気性細菌に対し不飽和脂肪酸は生育阻害を示すが、この毒性を低減すべく、嫌気性細菌は不飽和脂肪酸を毒性が低い飽和脂肪酸へと飽和化する。申請者らは、この嫌気性細菌における脂肪酸飽和化代謝の詳細を世界に先駆けて明らかにし、その過程にてトランス脂肪酸生成に参与する酵素反応を特定するに至った。

本研究では、嫌気性細菌におけるトランス脂肪酸生成に参与する酵素反応を詳細に解析することを通して、トランス脂肪酸生成抑制に機能する様々な化合物因子、環境因子を特定することを目的とする。これらの因子の特定は、不明であった反芻胃における脂質代謝の理解に役立つのみならず、反芻動物由来の食品中におけるトランス脂肪酸含量を低減し、より安全性の高い食品を提供することに貢献しうる。

3. 研究の方法

乳酸菌の不飽和脂肪酸飽和化代謝系酵素として見いだした脂肪酸水和脱水酵素 (CLA-HY) の詳細な解析を軸に研究を展開した。

CLA-HY により触媒される脱水反応の詳細な解析に必要な CLA-HY 蛋白質、ならび

に、酵素反応基質 (10-ヒドロキシステアリン酸) の大量調整を行うとともに、大腸菌無細胞抽出液中に見いだした幾何選択性制御因子の特定を試みた。

また、形質転換大腸菌の不飽和脂肪酸飽和化代謝系をモデルに、酸化還元状態や、見いだした幾何選択性制御因子 (化合物因子、環境因子) の影響を評価し、トランス脂肪酸生成抑制効果のある因子の抽出を試みた。

4. 研究成果

(1) CLA-HY 蛋白質の大量調整

N 末端側に His-Tag を付加した CLA-HY 蛋白質を高発現しうる大腸菌用発現ベクターを構築した (図 1)。本ベクターを大腸菌内で発現させ、CLA-HY 蛋白質を大腸菌内で高発現させた。続いて、His-Tag 付加 CLA-HY 蛋白質を Ni-カラムクロマトグラフィー等により簡易精製する方法を確立した (図 2)。

精製酵素の吸収スペクトルを測定した結果、450 nm 付近に極大吸収を示したことから、本酵素はフラビン酵素であることが示唆された。また、本酵素の活性が NADH の添加により増加することが判明した。本酵素は、9 位にシス型二重結合を有する炭素数 18 の脂肪酸を基質とした。また、本酵素が触媒する反応は、基質の 9 位の二重結合の水和反応であり、10 位選択的に水酸基を導入することを明らかにした。

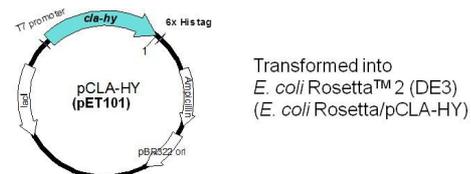


図 1. CLA-HY 発現ベクター

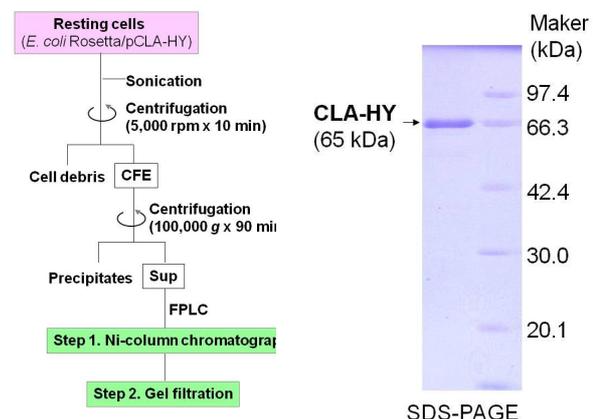


図 2. CLA-HY の大腸菌での発現ならびに精製

(2) 酵素反応基質 (10-ヒドロキシステアリン酸) の大量調整

乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* 由来の FAD 依存性水和酵素 (CLA-HY) を用いるオレイン酸の 10-ヒドロキシステアリン酸への変換につき、CLA-HY 高発現大腸菌を触媒とする反応を検討した。本反応には、還元型 FAD (FADH₂) の供給に NADH が要求されるため、反応系中の FAD ならびに NADH 濃度を最適化する検討を行った。反応条件の最適化の結果、CLA-HY 高発現大腸菌を用い、FAD、NADH の添加条件下にて、0.1M のオレイン酸から収率 90%にて 10-ヒドロキシステアリン酸を生成する効率的生産法を確立した (図 3)。

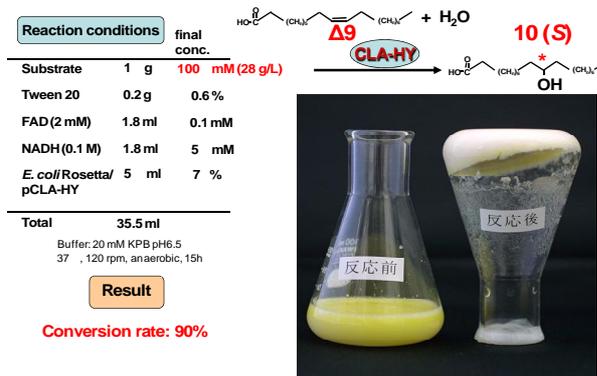


図 3 . CLA-HY を用いる 10-ヒドロキシステアリン酸の生産

(3) 大腸菌無細胞抽出液中の幾何選択性制御因子の特定

CLA-HY は、10-ヒドロキシステアリン酸をオレイン酸及び *trans*-10-オクタデセン酸へと脱水する反応を触媒する酵素である。精製した His-tag 融合 CLA-HY を触媒として反応する際に、形質転換大腸菌を作成する際に用いた宿主大腸菌の無細胞抽出液 (CFE) を加えると脱水活性が大幅に上昇することを見いだした。そこで、脱水反応により得られる不飽和脂肪酸の *cis/trans* に着目しつつ、大腸菌 CFE による CLA-HY の活性上昇について調べた。

まず、CFE 及び CLA-HY の量を変えて検討を行った。CFE を添加しない時、*trans*-10-オクタデセン酸やオレイン酸は約 0.01 mg/ml 程度しか生成しないのに対し、CFE を 50 μ l 添加することにより、*trans*-10-オクタデセン酸が 0.07 mg/ml、オレイン酸が 0.02 mg/ml 生成した。さらに CFE を添加していくと、CFE 量 300 μ l までは *trans*-10-オクタデセン酸生成量がわずかに増加し、それ以上に CFE を添加すると減少する傾向にあった。一方、オレイン酸生成量は、CFE の添加により上昇した。

続いて、CFE 量を 100 μ l に固定し CLA-HY の添加量を変化させると、添加する CLA-HY 量が増加するに従い、オレイン酸生成量は変化しないが、*trans*-10-オクタデセン酸生成

量は増加した。これらの結果より、CFE 及び CLA-HY 量が、CLA-HY の触媒する脱水反応において、*cis/trans* 制御に関わっていることが示唆された。

また、熱処理した CFE を添加した結果、熱処理の上清及び沈殿物ともに活性上昇が確認できた (図 4)。

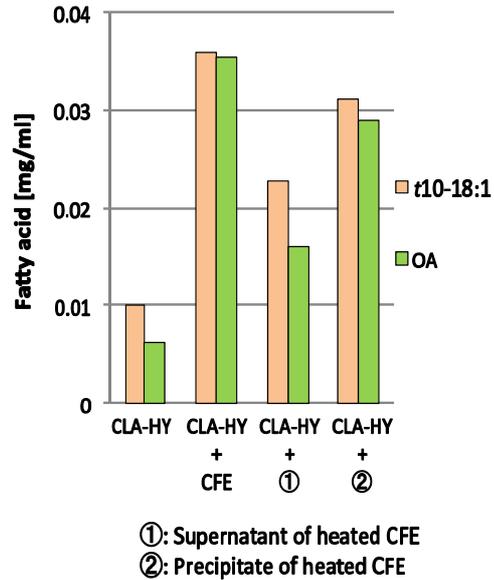


図 4 . 大腸菌 CFE 熱処理物が CLA-HY の 10-ヒドロキシステアリン酸脱水反応に及ぼす影響。10-ヒドロキシステアリン酸; t10-18:1 オレイン酸; OA

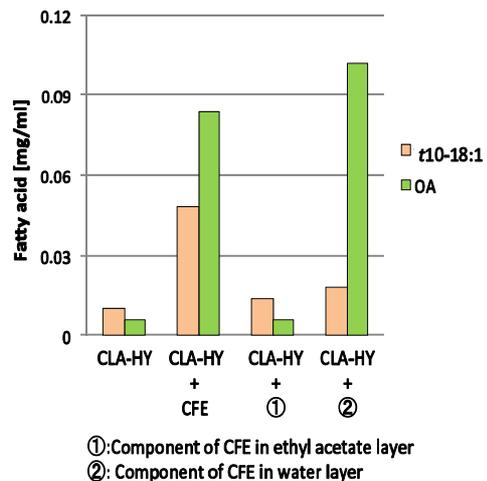


図 5 . 大腸菌 CFE の脂溶性ならびに水溶性画分が CLA-HY の 10-ヒドロキシステアリン酸脱水反応に及ぼす影響。10-ヒドロキシステアリン酸; t10-18:1 オレイン酸; OA

また、CFE を溶媒抽出した結果、酢酸エチル層では、CLA-HY の活性上昇が確認できず、水層画分で活性上昇が確認できた (図 5)。これらの結果より、CLA-HY の活性上昇に関する CFE の成分は、水溶性物質であるが、熱処理により影響を受けない物質であること

が示唆された。

(4) まとめ

食品中に含まれるトランス脂肪酸には、冠動脈性心疾患のリスクを高めるなど、健康に対する悪影響が報告されてきている。トランス脂肪酸は、牛、羊などの反芻動物の肉や乳、その加工品に含まれており、その低減が求められている。本研究では、反芻胃に存在する嫌気性細菌におけるトランス脂肪酸生成酵素反応として、脂肪酸飽和化反応の初発反応を触媒する水和脱水酵素が、トランス脂肪酸生成に関与することをはじめて明らかにするとともに、本酵素活性の制御により *cis/trans* 比を操作できる可能性を示した。

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7件)

- 1) Takeuchi, M., S. Kishino, K. Tanabe, A. Hirata, S.B. Park, S. Shimizu, J. Ogawa. Hydroxy fatty acid production by *Pediococcus* sp. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **115** (4), 386-393 (2013). DOI: 10.1002/ejlt.201200414, 査読有
- 2) Kishino, S., M. Takeuchi, S.B. Park, A. Hirata, N. Kitamura, J. Kunisawa, H. Kiyono, R. Iwamoto, Y. Isobe, M. Arita, H. Arai, K. Ueda, J. Shima, S. Takahashi, K. Yokozeki, S. Shimizu, J. Ogawa. Polyunsaturated fatty acid saturation by gut lactic acid bacteria affecting host lipid composition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110** (44), 17808-17813 (2013). doi:10.1073/pnas.1312937110/-/DCSupplemental., 査読有
- 3) 岸野重信, 小川 順. 乳酸菌の新たな脂肪酸代謝 機能性脂肪酸生産と腸内脂質代謝制御への展開 - . 化学と生物, 51 (11), 738-744 (2013). 査読無
- 4) 岸野重信, 小川 順. 乳酸菌における不飽和脂肪酸の飽和化反応に関わる新規酵素群の機能解析. バイオサイエンスとインダストリー, 71 (2), 134-137 (2013). 査読無
- 5) 小川 順, 岸野重信. 「特集: 美味しい健康生活は微生物が作る ~作物生産、食品素材開発、健康支援~」 乳酸菌代謝と美味しい健康生活. 生物工学会誌, 91 (11), 637-640 (2013). 査読無
- 6) 小川 順. 腸内細菌に特異な脂質代謝「脂肪酸飽和化反応」に関与する新規酵素系の機能解析と応用. 日本応用酵素協会誌, 48, 47-48 (2013). 査読無

- 7) Ogawa, J., E. Sakuradani, S. Kishino, A. Ando, K. Yokozeki, S. Shimizu. Polyunsaturated fatty acid production and transformation by *Mortierella alpina* and anaerobic bacteria. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **114** (10), 1107-1113 (2012). DOI: 10.1002/ejlt.201200069, 査読有

[学会発表](計4件)

- 1) Ogawa, J., S. Kishino, M. Hibi, N. Horinouchi, K. Yokozeki, S. Takahashi, S. Shimizu. Development of platform technologies and screening of module enzymes for multi-component enzyme systems requiring energy supply. Enzyme Engineering XXII. 2013年9月22日~2013年9月26日, Toyama, Japan.
- 2) Ogawa, J., M. Hibi, S. Kishino, S. Shimizu. Enzymatic chiral alcohol synthesis using oxygenases and hydratases. 17th German-Japanese Workshop on Enzyme Technology. 2013年7月26日~2013年7月27日, Hamburg, Germany.
- 3) Ogawa, J., M. Hibi, S. Kishino, N. Horinouchi, A. Ando, E. Sakuradani, S. Shimizu. Development of multi-component enzyme systems for future chemical industry. 2013 KSBB Spring Meeting and International Symposium. 2013年4月10日~2013年4月12日, Gwangju, Korea.
- 4) 竹内道樹, 田辺香緒里, 平田晶子, 朴時範, 岸野重信, 小川 順. *Lactobacillus plantarum* AKU 1009a 由来リノール酸水和酵素の諸性質解明, 日本農芸化学会2013年度大会, 2013年3月24日~2013年3月28日, 仙台

[その他]

ホームページ等
<http://www.hakko.kais.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小川 順 (OGAWA, Jun)
京都大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号: 70281102

(2) 研究分担者

安藤 晃規 (ANDO, Akinori)
京都大学・生理化学研究ユニット・助教
研究者番号: 10537765

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