

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06893

研究課題名(和文) 酸化阻害条件下で脂質を好氣的に代謝する微生物の探索と酸化脂質ライブラリーの構築

研究課題名(英文) Screening of microorganisms metabolizing lipids aerobically under inhibition of β -ta oxidation and construction of oxidized lipid library

研究代表者

竹内 道樹 (TAKEUCHI, MICHIKI)

京都大学・農学研究科・特定助教

研究者番号：40766193

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：生体内の好氣的脂質代謝物に様々な生理機能が報告されていることから、好氣的な脂質代謝産物は新規な機能性脂質として期待されている。「リポキシゲナーゼ(LOX)やP450等の酸化酵素による独自に入手可能な脂肪酸の変換」、「酸化阻害条件下で脂質を好氣的に変換する微生物の探索と機能解析」の2つの方法により脂質ライブラリーの拡張を試みた。その結果、新規なヒドロキシ脂肪酸を生産する微生物の取得に成功した。また、乳酸菌由来の水酸化脂肪酸やオキソ脂肪酸は、P450 BM-3により新規なエポキシ脂肪酸へ変換されることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Oxidative lipid metabolites are expected to have physiological functions. Expansion of lipid library was tried by two methods, 'conversion of original fatty acids by lipoxygenase and P450' and 'screening of microorganisms converting fatty acid oxidatively under inhibition of beta-oxidation. As a result of screening, the microorganism producing novel hydroxy fatty acid was obtained. In addition, it was revealed that hydroxy and oxo fatty acids from lactic acid bacteria were converted to novel epoxy fatty acids by P450 BM-3.

研究分野：応用微生物学

キーワード：酸化脂質

1. 研究開始当初の背景

脂質の酸化的な代謝産物は生体内で重要な生理活性を示すことから、注目を集めている。アラキドン酸由来のロイコトリエン等は古くから研究されており、炎症性メディエーターとして働くことが知られている。また最近では、EPA や DHA 由来のレゾルピンやプロテクチンが抗炎症性メディエーターとして働くことが明らかにされている。また、プロテクチンのウイルスの増殖抑制活性や、トマト由来オキソオクタデカジエン酸の PPAR 活性化といった新規な生理機能が報告されており、好気的な脂質代謝産物は新規な機能性脂質として期待されている。

これまでに乳酸菌の不飽和脂肪酸の飽和化代謝について研究を行ってきた。乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* AKU1009a が水酸化脂肪酸やオキソ脂肪酸を経由し、不飽和脂肪酸を飽和化していることを明らかにした(図1)。また、本代謝経路に關与する4つの酵素(水和酵素、脱水素酵素、異性化酵素、エノン還元酵素)を用いることで、様々な水酸化脂肪酸やオキソ脂肪酸を生産することに成功している。さらに、本代謝経路の中間体である10-ヒドロキシ-*cis*-12-オクタデカジエン酸や10-オキソ-*cis*-12-オクタデカジエン酸が腸管バリア保護作用や PPAR を介した体脂肪低減作用を有することも明らかにしている。しかし、これらの乳酸菌の生産する水酸化脂肪酸やオキソ脂肪酸のライブラリーは嫌気的な代謝産物に限られていたことから、好気的な脂質代謝産物を含めたライブラリーに拡張することで、新規な機能性脂質をさらに獲得できると期待できる。

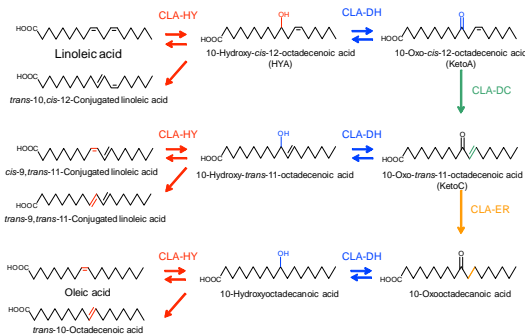


図1 乳酸菌の不飽和脂肪酸飽和化代謝

2. 研究の目的

微生物においては、好気的な脂質変換の報告例は少なく、新規な脂質酸化酵素群は近年見つかっていない。その理由として、普遍的な好気的脂質代謝経路である酸化経路により脂質が代謝されることが原因の一つと予想された。そこで、本研究では、「酸化阻害条件下で脂質を好気的に変換する微生物の探索と機能解析」および「リポキシゲナーゼや P450 等の酸化酵素による独自に入手可能な脂肪酸の変換」の2つの方法により脂質ライブラリーの拡張を行い、新規な機能性脂質の創出することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 酸化阻害条件下で脂質を好気的に代謝する微生物を取得するための探索方法の確立および、確立した探索方法を用いた微生物探索を行った。阻害条件下で、研究室保存の乾燥菌体約1000株を対象に、37、300 rpmの好気条件下で脂質、特に独自に入手可能な脂肪酸を好気的に変換する菌株のスクリーニングを行った。さらに、得られた微生物より脂質代謝に關与する酵素を推定し、組換え大腸菌による発現を試みた。

未知ピークが確認された場合は、LC-MSにより分子量を推定し、GC-MSにより官能基の位置を解析した。さらに、HPLCにより分取した未知化合物をNMRに供することで、未知化合物の構造を決定した。

(2) 独自に入手可能な脂肪酸(乳酸菌の生産する水酸化脂肪酸・オキソ脂肪酸など)を基質として用い、好気的な脂質代謝に關与する酵素による変換を試みた。好気的な脂質代謝に關与する酵素としては、リポキシゲナーゼや P450 等があげられる。大豆リポキシゲナーゼはリノール酸の13位をヒドロペルオキシ化するだけでなく、アラキドン酸・EPA・DHAのそれぞれ15・18・20位もヒドロペルオキシ化できる基質特異性の広い酵素である。また、安定して活性を発揮できる P450 として知られているのが、*Bacillus megaterium* 由来の P450 BM3 である。P450 BM3 により EPA が17,18 エポキシ EPA へと変換されることが報告されている。大豆リポキシゲナーゼと P450 BM-3 を用いて、脂質ライブラリーの拡張を行った。

4. 研究成果

(1) 様々な酸化阻害条件を探索したところ、微生物を乾燥菌体とすることにより、酸化を阻害できることを明らかにした。乾燥菌体を対象に、脂質を好気的に代謝する微生物を探索した結果、*Micrococcus luteus* が水酸化脂肪酸を効率的にオキソ脂肪酸へ変換することを明らかにした(図2)。

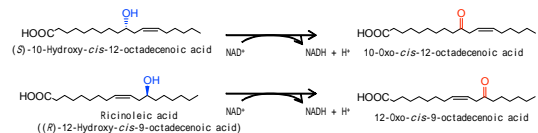


図2 *Micrococcus luteus* による水酸化脂肪酸からオキソ脂肪酸への変換

また、本菌の水酸化脂肪酸脱水素酵素に His-tag を付与し、アフィニティーカラムにより精製した酵素を用いて基質特異性を検討したところ、本酵素は10-ヒドロキシ脂肪酸や12-ヒドロキシ脂肪酸などの様々な水酸化脂肪酸を脱水素できたことから、本酵素は基質特異性の広い酵素であることを明らかにした。また、本酵素は NAD+ を補酵素として要求することを明らかにした。本酵素を発現

する形質転換大腸菌を触媒として用い、NAD+再生条件下でオキソ脂肪酸生産を試みたところ、高効率でオキソ脂肪酸が生産できることを明らかにした。

(2) 好氣的に α -リノレン酸 (*cis*-9, *cis*-12, *cis*-15-octadecatrienoic acid) を代謝する菌として、*Cellulomonas* sp. と *Rhodotorula* sp. を見だし (図3) これらの菌による脂質代謝産物の同定を GC-MS, LC-MS, NMR を用いて行った。

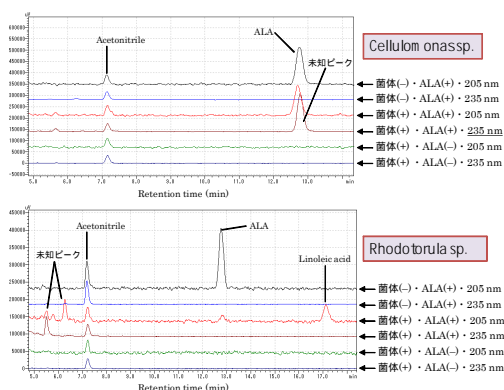


図3 *Cellulomonas* sp. と *Rhodotorula* sp. による α -リノレン酸変換物のクロマトグラム

その結果、*Cellulomonas* sp. による生成物は、共役 α -リノレン酸 ((9*Z*, 11*E*, 15*Z*)-octadecatrienoic acid) であることを明らかにした (図4)。*Cellulomonas* 属はグラム陽性の通性嫌気性細菌であり、セルラーゼを産生するセルロース分解菌で、反芻動物のルーメン内に存在している。*Cellulomonas* 属は、ルーメン内でセルロースを分解するとともに、共役脂肪酸の生産に寄与している可能性が示唆された。また、共役 α -リノレン酸を生産する微生物としては、乳酸菌などの嫌気性微生物が知られているが、本菌は好気条件下で共役 α -リノレン酸を生産することから、本菌は新規な α -リノレン酸イソメラーゼを有している可能性が示唆された。

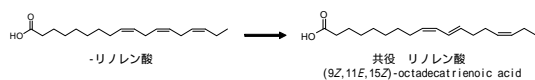


図4 *Cellulomonas* sp. による α -リノレン酸の変換

Rhodotorula sp. による α -リノレン酸変換物を、GC-MS, LC-MS, NMR を用いて構造決定したところ、生成物は、ヒドロキシ- α -リノレン酸と新規なジヒドロキシ- α -リノレン酸であることを明らかにした。反応に関与する酵素を推定し、本酵素を発現する形質転換大腸菌を作成しており、新規酸化脂質の生産プロセスの構築を試みている。

(3) 乳酸菌由来の水和酵素や脱水素酵素を用い、リノール酸、 α -リノレン酸、 α -リノレン酸から生産される 10-ヒドロキシ脂肪酸

や 10-オキソ脂肪酸を基質として用いた。大豆由来リポキシゲナーゼや P450 BM-3 により変換を試みた。その結果、これらの脂肪酸に対してリポキシゲナーゼは作用しなかったが、P450 BM-3 は二重結合を有する 10-ヒドロキシ脂肪酸や 10-オキソ脂肪酸に対して作用し、効率よく二重結合をエポキシ化することを見出した (図5)。生成物の構造は、GC-MSおよびLC-MSを用いて同定した。また、反応生成物は新規な化合物であることを明らかにした。

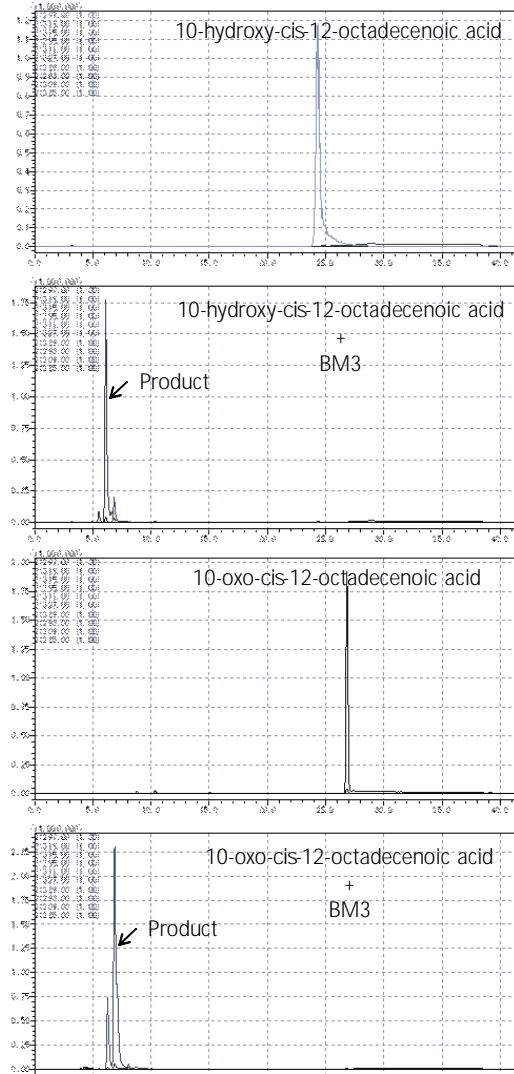


図5 P450 BM-3 による 10-ヒドロキシ脂肪酸と 10-オキソ脂肪酸の変換物のクロマトグラム

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 0 件)

〔学会発表〕(計 8 件)

(1) 国際会議

○Michiki Takeuchi, Si-Bum Park, Nahoko Kitamura, Shigenobu Kishino, Jun Ogawa, Enzymatic characterization of hydroxy fatty acid dehydrogenase from

Lactobacillus plantarum AKU 1009a, The 14th China-Japan-Korea Joint Symposium on Enzyme Engineering (2016)

○Michiki Takeuchi, Shigenobu Kishino, Si-Bum Park, Nahoko Kitamura, Jun Ogawa, Metabolism of food derived polyunsaturated fatty acids by gut microorganisms generating bioactive fatty acids, Wageningen University-Kyoto University International Exchange Program (2016)

○Michiki Takeuchi, Shigenobu Kishino, Si-Bum Park, Nahoko Kitamura, Makoto Hibi, Jun Ogawa, Production of dicarboxylic acids from biomass derived fatty acids by laccase-mediator system, ICC05-AEM2016 (2016)

○Michiki Takeuchi, Shigenobu Kishino, Si-Bum Park, Nahoko Kitamura, Jun Ogawa, Production of hydroxy fatty acids with health promoting activity using linoleic acid hydratase involved in polyunsaturated fatty acid saturation metabolism in lactic acid bacteria, 107th AOCS annual meeting (2016)

○Michiki Takeuchi, Chihiro Ishikawa, Kazuki Saito, Shigenobu Kishino, Satomi Takahashi, Jun Ogawa, Eicosapentaenoic acid conversion by cytochrome P450 BM-3 and its mutants to bio-active epoxide derivatives, Enzyme Engineering XXIV (2017)

○Michiki Takeuchi, Chihiro Ishikawa, Kazuki Saito, Shigenobu Kishino, Satomi Takahashi, Jun Ogawa, Production of bio-active epoxidized eicosapentaenoic acid with cytochrome P450 BM-3 and its mutants, The 19th Japanese-German Workshop (2017)

(2) 国内学会

齊藤一輝、○大地健介、竹内道樹、永野秀昭、岸野重信、小川順、*Bacillus megaterium* F13 株による EPA 酸化代謝物 (17,18-EpETE) の生産条件の検討、日本農芸化学 2017 年度大会 (2017)

木村隆利、○竹内道樹、日比慎、小川順、*Curvularia lunata* 由来新規ステロイド 11-ヒドロキシラーゼの同定、2016 年度 第 7 回学際的脂質創生研究部会講演会 (2017)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹内道樹 (Takeuchi, Michiki)
京都大学・大学院農学研究科・特定助教
研究者番号: 4 0 7 6 6 1 9 3

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

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: 4 0 4 3 2 3 4 8