

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H05025

研究課題名（和文）腸内細菌におけるプラズマローゲン生合成機構の解明と応用展開

研究課題名（英文）Elucidation and application of the biosynthetic pathway of plasmalogens in gut microbes

研究代表者

安藤 晃規 (Ando, Akinori)

京都大学・農学研究科・助教

研究者番号：10537765

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 19,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では腸内細菌における生合成機構の解明に取り組んだ。腸内細菌におけるプラズマローゲンは、エタノールアミン型プラズマローゲン（PlsEtn）であること、そのうち上位10種の分子種が全PlsEtnの約90%を占めていること、sn-2位に多価不飽和脂肪酸が結合したPlsEtnは見られないことを明らかにした。

また、いずれの株でも 1'-desaturaseホモログ遺伝子は見い出せず、ジオレオイル型ホスファチジルエタノールアミン添加時にも、プラズマローゲン組成の変化は見られないこと、菌体内PEとPlsEtnの分子種の分布に相関性が低いことなど生合成経路がヒトとは異なることが強く示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

プラズマローゲンは、生体内では希少なリン脂質ではなくむしろありふれた脂質であるにもかかわらず、いまだ具体的な生理的機能は明らかにされていない。本研究では、生体への供給源となりうる腸内細菌群のプラズマローゲンに着目し、その分布、形態、組成を精査し、さらに生合成経路の解明に取り組んだ。研究成果として得られる機能性微生物・脂質は食品素材・医薬品としての機能が期待されるものであり、それら業界を刺激するものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we conducted to elucidate the plasmalogen biosynthetic mechanism in gut microbes. We revealed that most of plasmalogens were ethanolamine-type plasmalogens (PlsEtn), the top 10 molecular species accounted for about 90% of the total PlsEtn, and no PlsEtn with a polyunsaturated fatty acid bound at the sn-2 position, like human type plasmaloges.

No 1'-desaturase homolog gene was found in these strains which accumulated some plasmalogens. The addition of dioleoylphosphatidylethanolamine to the medium did not change the plasmalogen composition. In addition, low correlation between the distribution of molecular species of PE and PlsEtn in these bacteria. These results strongly suggested that the plasmalogen biosynthetic pathway in gut microbes is different from that in humans.

研究分野：応用微生物学

キーワード：腸内細菌 plasmalogens

1. 研究開始当初の背景

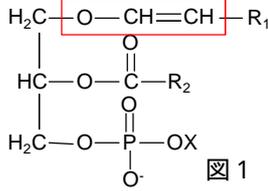


図1

プラズマローゲンは、sn-1 位にビニルエーテル構造 (図 1 枠内) をもつアルケニル基を有したリン脂質である。ヒトではプラズマローゲンがリン脂質全体の約 20% を占め、主にエタノールアミン型とコリン型として存在する¹⁾。近年、生体内プラズマローゲンが正常な発育に極めて重要な働きをすること^{1, 2, 3)}、アルツハイマー病をはじめとする種々の病態においてプラズマローゲンが減少すること^{4, 5, 6)}などが報告され、これら病態との関係性に注目が集まっており、その体内動態や具体的な生理機能の解明が強く望まれている。

プラズマローゲンの生合成経路は、好気性の動物において、ジヒドロキシアセトンリン酸を初発とする *de novo* 生合成経路と、アルキルあるいはアルケニルグリセロールから生合成経路に入るサルベージ経路の存在が確認されている (図 2)。2 つの生合成経路の調節メカニズムについては不明であるが、*de novo* 合成系の初期反応酵素が欠損した変異細胞にアルキルもしくはアルケニルグリセロールを添加することで細胞内プラズマローゲン量が回復すること⁷⁾、また、若年ラットへのアルキルグリセロールの給餌により、組織中の給餌由来のアルケニルエーテルを有するプラズマローゲン分子種が顕著に増加することが報告されている⁸⁾。

これらの報告から、申請者は動物ではプラズマローゲンの取り込みが生体内の恒常性に影響を与えている可能性があるとの着想を得て、食餌や腸内細菌由来のプラズマローゲンが重要な供給源になるとの考えに至った。しかしながら、腸内細菌群のプラズマローゲンの分布、脂質形態、組成、加えて、生合成経路も動物と嫌気性微生物では大きく異なることが報告されているのみであり⁹⁾、その全体像は明らかにされていない (図 3)。

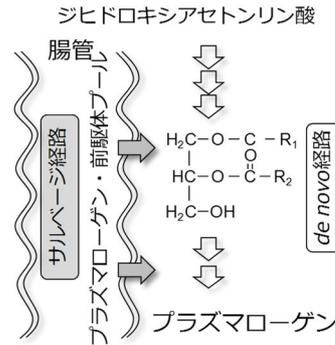


図2 好気性動物のプラズマローゲン生合成推定経路

2. 研究の目的

エタノールアミン型プラズマローゲン

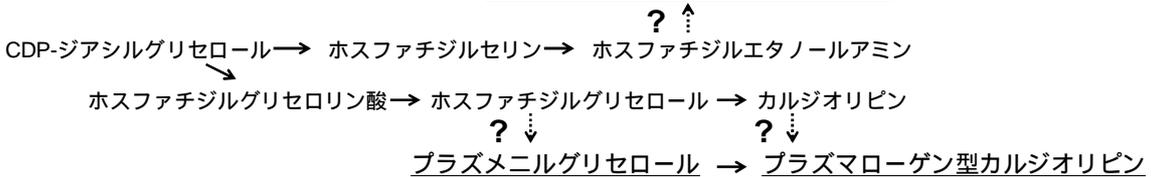


図3 嫌気性菌における推定プラズマローゲン生合成経路

本申請では、プラズマローゲンの体内動態解析や機能解析を見据え、まず(1) 代表的なヒト腸内細菌群のプラズマローゲンの分布、形態、組成を明らかにし、特に顕著なプラズマローゲン蓄積を示す腸内細菌を対象に、蓄積条件を精査、さらに(2) プラズマローゲン生合成機構の解明に取り組んだ。

3. 研究の方法

(1) 腸内細菌群のプラズマローゲンの分布、形態、組成の解析

既に報告されている腸内細菌構成種の情報をもとに、培養可能な菌を収集し、ヒト腸内において供給される種々の菌のプラズマローゲンの分布と量、また分子種を調査した。具体的には、培養後、全脂質を抽出し、脂質クラス解析 (LC/MS) を行い、さらに脂質を酸性条件下にてメチル化し脂肪酸組成の解析 (GC/MS) を行った。この際、ビニルエーテル構造に由来するアルデヒドがジメチルアセタール (DMA) として検出できることを利用し (図 4)、プラズマローゲン蓄積能を簡易的に評価した。続いて、プラズマローゲンを LC/MS/MS にて定量するとともに、LTQ Orbitrap により sn-1 と sn-2 位の詳細な分子種を明らかにした。

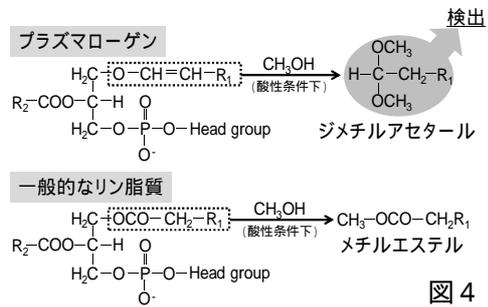


図4

(2) プラズマローゲン生合成機構の解明

(1)の検討にて見いだした菌のうちゲノムが公開されているものを選抜し、そのゲノム情報をもとに、生合成経路を推定するとともに、生合成に関与する遺伝子群、酵素群の推定を行った。

嫌気性微生物において推定されている図3の経路に基づき、プラズマローゲンの基質となると考えられているアルキルエーテル型脂質を添加し培養を行い、推定生合成経路の検証を行った。

4. 研究成果

(1) 腸内細菌群のプラズマローゲンの分布、形態、組成の解析

プラズマローゲン生産菌の探索に先立ち、菌体脂質中のプラズマローゲンを簡便に検出できる分析系の確立を試みた。菌体中の総脂質に対して酸性条件下でメタノールを反応させると、プラズマローゲンからはビニルエーテル構造由来のジメチルアセタール(DMA)が生じる(図4)ことを利用した。菌体からの脂質抽出およびメタノール処理の各ステップについて条件検討を行なった結果、まず菌体を凍結乾燥破砕し、Bligh-Dyer法にて総脂質を抽出した後、10%塩酸-メタノール溶液を作用させることにより、試料中のプラズマローゲンを効率的にDMA化できることを明らかにした。さらに、GC-MS分析条件を最適化し、DMAの高感度検出を可能にした。以上により、DMA検出を指標にプラズマローゲンの存在を簡便に確認できる系を確立した。

上記手法を用いて、プラズマローゲン生産菌の探索を行なった。研究室保存菌867株(真菌154株、担子菌54株、嫌気性菌および乳酸菌660株)および自然界からの新規単離細菌187株の合計1055株についてGC-MS分析を行なったところ、236株(真菌類5株、嫌気性細菌161株、新規単離細菌70株)からDMAが検出された。この236株のうち、特に高いDMA値を示した60株をLC-MS分析に供したところ、*Clostridium*属、*Megasphaera*属、*Bifidobacterium*属をはじめとする嫌気性細菌25株において、エタノールアミン型プラズマローゲン(PlsEtn)が検出された(図5)。

一方で、DMAが検出されたにもかかわらずプラズマローゲンが確認できなかった菌も存在した。メタノール処理前の脂質分析結果から、そのような菌ではアルデヒド類が生産されていることが明らかとなり、アルデヒド由来のDMAが検出されたものと考えられた。

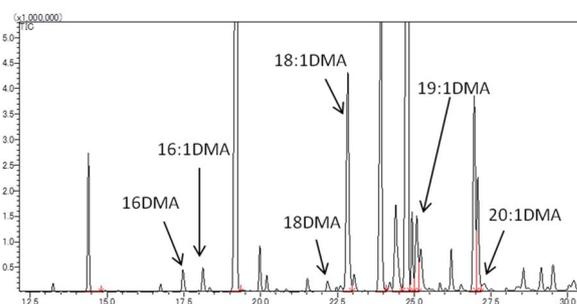


図5 単離されたプラズマローゲン生産菌中の脂質(メチル化処理後)の一例(DMA以外のピークは単純脂質由来の脂肪酸メチルエステル)

見いだされた25株をLTQ Orbitrapに供し、生産されるPlsEtnの分子種について詳細な分析を行なった。その結果、sn-1位、sn-2位ともに、主に炭素数16~20の飽和脂肪酸または一価不飽和脂肪酸から構成されていることを明らかにした。これは先述のGC-MSによるDMA分析結果(図5)とも合致した。この結果は、GC-MSによる簡便なDMA分析のみによってPlsEtnの構成分子種をある程度推測できることを示唆しており、分析の効率化に繋がる。

続いて、三連四重極型LC/MS/MSによる多重反応モニタリング(MRM)プログラムを用いて、上記プラズマローゲン生産菌を対象に、プラズマローゲンの定量分析を試みた。その結果、見いだされたプラズマローゲンは全てエタノールアミン型プラズマローゲン(PlsEtn)であり、コリン型などのプラズマローゲンは検出されなかった。さらに、sn-1、sn-2位それぞれのアシル基の炭素鎖長12~30、不飽和度0~5の組み合わせからなるPlsEtn約3000種について測定したところ、PlsEtn32:0(16:0/16:0)やPlsEtn34:1(16:0/18:1)など、上位10種のPlsEtnが全PlsEtnの約90%を占めていることが明らかとなった。この結果は、上述のOrbitrap-LC/MSによる分析結果とも合致している。一方で、ヒト体内に含まれるようなsn-2位に多価不飽和脂肪酸が結合したPlsEtnは、これら微生物においては見られないことがわかった。

なお、MRMによる測定では、一度に検出できる分子種の数に限りがあるため、効率的な分析のためには測定対象となる分子種を絞る必要がある。そこで、上記の結果をもとに、存在比率の高いPlsEtnを対象とするMRMプログラムを構築し、微生物PlsEtnのLC/MS/MSによる効率的な半定量定性分析を可能にした。

(2) 微生物におけるプラズマローゲン生合成経路の解明

哺乳類など高等生物では、プラズマローゲンの特徴であるビニルエーテル結合は生合成経路の一番最後に Δ^1 -不飽和化酵素によって生成されると推測されている(図6)。上記で取得したプラズマローゲン生産微生物のうち、既に全ゲノムが解読されている数株についてホモログ検索を行ったところ、いずれの株のゲノムでも Δ^1 -desaturaseホモログは見い出せなかった。このことから、これら微生物では、哺乳類などの生合成経路とは異なる経路でプラズマローゲンが生合成されている可能性が示唆された。

微生物におけるプラズマローゲン生合成経路についてはほとんど解明されていないが、嫌気性微生物においてジアシル型リン脂質のグリセロール骨格がプラズマローゲン合成に利用されている可能性があるとする報告があり、図3に示す経路が可能性のひとつとして推測されている。これを検証するため、プラズマローゲン生産菌に対してジオレオイル型ホスファチジルエタノールアミン (PE18:1/18:1) を添加し培養を行ったが、非添加時と比較してプラズマローゲン組成に変化は見られなかった。このことから、これら微生物における PlsEtn 生合成経路は PE を経由しないことが示唆された。プラズマローゲン生産菌における菌体内 PE と PlsEtn の分子種の分布に相関性が低いことから、図3とは異なる経路で PlsEtn が生合成されている可能性が考えられた。

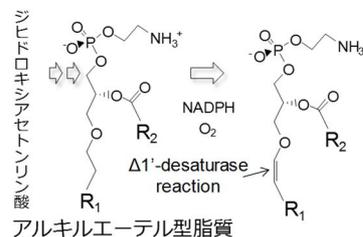


図6 動物細胞における推定プラズマローゲン生合成経路

- 1, Braverman et al. Biochim. Biophys. Acta, 1822, 1442-1452, 2012
- 2, Rodemer et al. Hum. Mol. Genet., 12, 1881-1895, 2003,
- 3, Komljenovic et al. Cell Tissue Res., 337, 281-299, 2009
- 4, Kanzawa et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 106, 17711-17716, 2009
- 5, Goodnote et al. J. Lipid Res. 48, 2485-98, 2007
- 6, Maeba et al. J AtherosclerThromb., 14, 12-18, 2007
- 7, Zoller et al. Biochem. J., 338, 769-76, 1999
- 8, Das et al. FEBS Lett., 227, 7097-103, 1988
- 9, Howard :Prog. Lipid Res., 49, 493-498, 2010

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Farida Asras Mohd Fazli, Shimada Yoshimi, Nagano Hideaki, Munesato Kei, Takeuchi Michiki, Takemura Miho, Ando Akinori, Ogawa Jun	4. 巻 83
2. 論文標題 Production of prostaglandin F2 by molecular breeding of an oleaginous fungus <i>Mortierella alpina</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1~7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/09168451.2018.1562880	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 Tsuda Kentaro, Nagano Hideaki, Ando Akinori, Shima Jun, Ogawa Jun	4. 巻 101
2. 論文標題 Modulation of fatty acid composition and growth in <i>Sporosarcina</i> species in response to temperatures and exogenous branched-chain amino acids	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Applied Microbiology and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 5071~5080
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00253-017-8227-3	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 Sakamoto Takaiku, Sakuradani Eiji, Okuda Tomoyo, Kikukawa Hiroshi, Ando Akinori, Kishino Shigenobu, Izumi Yoshihiro, Bamba Takeshi, Shima Jun, Ogawa Jun	4. 巻 245
2. 論文標題 Metabolic engineering of oleaginous fungus <i>Mortierella alpina</i> for high production of oleic and linoleic acids	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Bioresource Technology	6. 最初と最後の頁 1610~1615
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.biortech.2017.06.089	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24件（うち招待講演 10件/うち国際学会 10件）

1. 発表者名 Yudai Miyoshi, Tomoyo Okuda, Yoshimi Shimada, Akinori Ando, Shigenobu Kishino, Jun Ogawa
2. 発表標題 Introducing hydration enzyme genes (CLA-HY, FA-HY1) into <i>Mortierella alpina</i> for the production of hydroxy fatty acids
3. 学会等名 Kyoto University Kasetsart University (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yudai Miyoshi、Tomoyo Okuda、Yoshimi Shimada、Akinori Ando、Shigenobu Kishino、Jun Ogawa
2. 発表標題 Introducing hydration enzyme genes (CLA-HY, FA-HY1) into <i>Mortierella alpina</i> for the production of hydroxy fatty acids
3. 学会等名 JSBBA KANSAI Student Committee
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mohd Fazli Farida Asras宗里 啓永野 秀昭島田 良美竹村 美保岸野 重信安藤 晃規小川 順
2. 発表標題 油糧微生物 <i>Mortierella alpina</i> 1S-4 における紅藻 <i>Gracilaria vermiculophylla</i> 由来シクロオキシゲナーゼの発現によるプロスタグランジンF2 の生産
3. 学会等名 酵素工学研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Jun Ogawa、Shigenobu Kishino、Akinori Ando、Michiki Takeuchi、Ryotaro Hara、Makoto Hibi
2. 発表標題 Bioprocess development using microbial metabolisms
3. 学会等名 International Society of Biocatalysis and Agricultural Biotechnology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 塘 由惟友永奈美川上祥子安藤晃規小川 順真鍋祐樹菅原達也
2. 発表標題 13C ラベル化したスフィンゴ脂質の消化管吸収の評価
3. 学会等名 公益社団法人 日本油化学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Jun Ogawa、Shigenobu Kishino、Akinori Ando、Michiki Takeuchi、Ryotaro Hara、Makoto Hibi
2. 発表標題 Microbial metabolisms pioneering novel enzymatic and microbial bioprocesses
3. 学会等名 浙江大学 天野エンザイム株式会社（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Jun Ogawa、Shigenobu Kishino、Akinori Ando、Michiki Takeuchi、Ryotaro Hara、Makoto Hibi
2. 発表標題 Microbial metabolisms pioneering novel bioprocesses
3. 学会等名 Japanese Society of Enzyme Engineering（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroshi Kikukawa、Eiji Sakuradani、Akinori Ando、Sakayu Shimizu、Jun Ogawa
2. 発表標題 Metabolic Engineering for Rare PUFA Production by an Oil-producing Fungus <i>Mortierella alpina</i>
3. 学会等名 AOCS (American Oil Chemists' Society)（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akinori Ando、Yuki Takemoto、Ryohei Nakatsuji、Shigeru Hiramoto、Eiji Sakuradani、Jun Ogawa
2. 発表標題 Practical Eicosapentaenoic Acid (EPA) Production by <i>Mortierella alpina</i> Molecular Breeding under Ordinary Temperature
3. 学会等名 AOCS (American Oil Chemists' Society)（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Eiji Sakuradani、Akinori Ando、Sakayu Shimizu、Jun Ogawa
2. 発表標題 Production of Various PUFAs by filamentous fungus <i>Mortierella alpina</i>
3. 学会等名 AOCS (American Oil Chemists' Society) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Jun Ogawa、Mohd Fazli Farida Asras、Hideaki Nagano、Yoshimi Shimada、Miho Takemura、Shigenobu Kishino、Akinori Ando
2. 発表標題 Expression of Cyclooxygenase in <i>Mortierella alpina</i> 1S-4 for the production of a prostaglandin, PGF2
3. 学会等名 AOCS (American Oil Chemists' Society) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 波多野文美、安藤晃規、奥田知生、菊川寛史、松山恵介、小川 順
2. 発表標題 ラビリンチュラ類による 3ドコサペンタエン酸 (DPA) 生産
3. 学会等名 第9回学際的脂質創生研究部会講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 島田良美、岸野重信、油屋駿介、青木 航、植田充美、馬場健史、安藤晃規、小川 順、櫻谷英治
2. 発表標題 油糧糸状菌 <i>Mortierella alpina</i> の漏出脂質プロテオーム解析と漏出株の創製
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 村川直美, 上野このみ, 阪本鷹行, 安藤晃規, 岸野重信, 相馬悠希, 和泉自泰, 馬場健史, 小川 順, 櫻谷英治
2. 発表標題 糸状菌由来オレイン酸水和酵素遺伝子の機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 安藤 晃規
2. 発表標題 糸状菌による有用脂質生産
3. 学会等名 第29回夏期油脂・コレステロール研究会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Akinori Ando
2. 発表標題 Future visions of applied microbiology and food nutrition
3. 学会等名 2017 AOCs Annual Meeting（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 安藤 晃規
2. 発表標題 平成29年度 農芸化学奨励賞受賞講演 油糧糸状菌の分子育種基盤の構築と有用油脂生産への展開
3. 学会等名 日本農芸化学会関西支部例会（第499回講演会）（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 奥田 知生、安藤 晃規、櫻谷 英治、鎌田 望、落合 美佐、小川 順
2. 発表標題 糸状菌Mortierella alpina 1S-4 株における誘導発現プロモーターの探索と評価
3. 学会等名 日本農芸化学会 関西・中四国・西日本支部 2017年度合同大阪大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Akinori Ando, Tomoyo Okuda, Hiroshi Kikukawa, Eiji Sakuradani "Jun Ogawa"
2. 発表標題 Production of omega-3 fatty acids by an oleaginous fungus Mortierella alpina breeding
3. 学会等名 the 13th International Symposium on Biocatalysis and Agricultural Biotechnology (13th ISBAB) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小川 順、竹内 道樹、安藤 晃規、岸野 重信
2. 発表標題 食と腸内細菌が維ぐ健康
3. 学会等名 日本歯周病学会60周年記念京都大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 安藤 晃規
2. 発表標題 食料生産・健康のために微生物に期待すること
3. 学会等名 「微生物サステナビリティ研究拠点」シンポジウム 応用微生物学だからできる異分野連携による新たな研究の潮流
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 島田 良美、安藤 晃規、岸野 重信、櫻谷 英治、小川 順
2. 発表標題 油糧糸状菌Mortierella alpinaの分子育種による遊離脂肪酸生産に関する検討
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 村川 直美、加納 みずほ、阪本 鷹行、安藤 晃規、岸野 重信、相馬 悠希、和泉 自泰、馬場 健史、小川 順、櫻谷 英治
2. 発表標題 腐グリセロール資化性糸状菌が生産する脂肪酸代謝産物
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 横山 晋太郎、浅井 大貴、Brian King Himm Mo、安藤晃規、小川 順
2. 発表標題 糸状菌Plectospira myriandraによるC14脂肪酸高含有油脂の生産
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 北本勝ひこ、春田伸、丸山潤一、後藤慶一、尾花望、斉藤勝晴	4. 発行年 2017年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 512
3. 書名 食と微生物の事典	

〔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
研究協力者	惠 淑萍 (HUI SHU-PING)		