

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19175

研究課題名（和文）水和反応を活用した多種多様な水酸化脂肪酸生産のためのツールライブラリーの構築

研究課題名（英文）Construction of a tool library for the production of various kinds of hydroxyl fatty acids using hydration reaction

研究代表者

岸野 重信（Kishino, Shigenobu）

京都大学・農学研究科・准教授

研究者番号：40432348

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：機能性素材として幅広い分野で注目されている水酸化脂肪酸には多種多様な構造が存在し、さらに機能性は構造により異なる。しかしながら、化学合成法では特定の構造を有する水酸化脂肪酸の選択的合成は難しい。本研究では、脂肪酸水和酵素に注目し、水酸化脂肪酸をオンデマンド合成するための脂肪酸水和酵素のライブラリー化を試みた。

その結果、長鎖不飽和脂肪酸水和能を有する新規脂肪酸水和酵素の同定、および、タンパク質工学を用いて既知の脂肪酸水和酵素の基質特異性を改変することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

既報の脂肪酸水和酵素の殆どは、炭素数18のオレイン酸（C18:1 9Z）あるいはリノール酸（C18:2 9Z, 12Z）に高い親和性を示し、基質特異性の多様性が低いことが脂肪酸水和酵素の応用を妨げる一因となっている。本研究により、炭素鎖長20以上の不飽和脂肪酸に対して高い基質特異性を有する新規脂肪酸水和酵素の同定に成功し、さらに、タンパク質工学により水酸基の導入位置を改変可能であることが示された。本成果は脂肪酸水和酵素を用いた機能性脂肪酸の提供、および、産業利用への可能性を提供した。

研究成果の概要（英文）：Hydroxy fatty acids, which have been attracting attention as a functional material in a wide range of fields including food, pharmaceutical, and chemicals, have a wide variety of structures, and furthermore, their functionalities vary depending on the structure. However, it is difficult to selectively synthesize hydroxy fatty acids with a specific structure by chemical synthesis methods. In this study, we focused on fatty acid hydratases and attempted to create a library of fatty acid hydratases for on-demand synthesis of hydroxy fatty acids. We identified novel fatty acid hydratases with long-chain unsaturated fatty acid hydration activity and modified the substrate specificity of a known fatty acid hydratase by protein engineering.

研究分野：応用微生物学

キーワード：脂肪酸水和酵素 水酸化脂肪酸 微生物 タンパク質工学

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

水酸化脂肪酸は、食品・医薬品産業、ポリマー産業、化粧品産業など多分野において機能性素材としての様々な用途が期待され、大変注目を集めている。水酸化脂肪酸の機能性は、水酸基と二重結合の数と位置ならびに立体、さらに炭素数等により大きく異なる。すなわち、目的とする水酸化脂肪酸の選択的な合成が重要である。しかしながら、化学合成法は位置選択的な水酸基の導入が困難であり、目的とする水酸化脂肪酸を選択的に合成することが難しい。近年、化学合成法に変わる水酸化脂肪酸の合成方法として、微生物機能を活用した合成法が注目されており、特に、不飽和脂肪酸の酸化分解を防ぎつつ、水酸基を導入可能な水和反応の応用が期待されている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、申請者が世界に先駆け乳酸菌より見出し、報告した不飽和脂肪酸水和反応(図1)の知見を利用することで、革新的なオンデマンド水酸化脂肪酸生産を実現することである。具体的には、多種多様な水酸化脂肪酸生産を可能とする酵素ライブラリーの構築を目指し、これまでに報告が無い基質特異性を有する不飽和脂肪酸水和酵素の探索を行った。

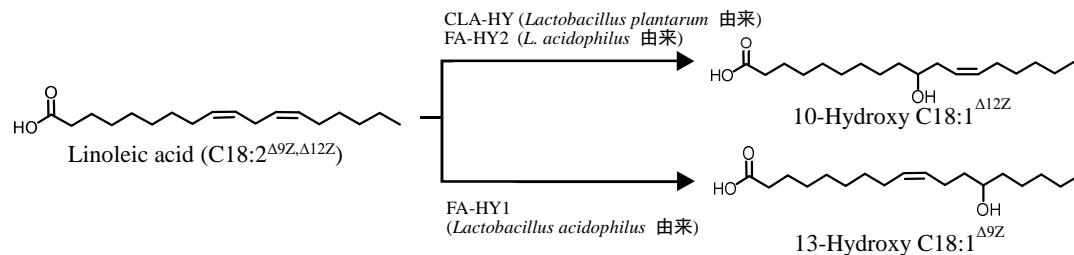


図1. 乳酸菌より見出した不飽和脂肪酸の水和反応

3. 研究の方法

(1) 新規水和酵素の精製と機能解析

既知の不飽和脂肪酸水和酵素の多くは炭素数 18 までの不飽和脂肪酸に対して水和能を示すが、18 以上の炭素数を有する長鎖不飽和脂肪酸に対して高い水和能を示す不飽和脂肪酸水和酵素は無い。そこで、長鎖不飽和脂肪酸を水和する細菌の探索を試みた。ドコサヘキサエン酸 (DHA, C22:6 $\Delta^{4,7,10,13,16,19}$) の変換能を指標にスクリーニングを行い、DHA を水和する活性を示す菌の取得を試みた。変換能はガスクロマトグラフィー (GC) を用いて評価した。取得した菌の粗酵素抽出物を調製し、疎水、イオン交換およびゲルろ過などの種々のカラムに供し、新規不飽和脂肪酸水和酵素を精製した。さらに、精製酵素の N 末端アミノ酸配列解析とゲノム解析を組み合わせることで新規不飽和脂肪酸水和酵素をコードする遺伝子を特定し、大腸菌において異種発現を行った。基質特異性は異種発現した大腸菌を用いた休止菌体反応にて、GC を用いて評価した。

(2) *in silico* による新規不飽和脂肪酸水和酵素候補遺伝子の探索と機能解析

in silico スクリーニングにより、CLA-HY および FA-HY1 のアミノ酸配列と相同性が低い (30% 未満) 不飽和脂肪酸水和酵素を選抜した。対象生物は細菌および真菌を選抜した。選抜した水和酵素候補遺伝子について、大腸菌において異種発現を行い、異種発現大腸菌を用いた休止菌体反応により、多様な脂肪酸と反応を行うことで基質特異性の詳細な評価を行った。

(3) タンパク質結晶構造解析による情報の収集・変異導入による機能改変と機能解析

L. acidophilus が有する 2 種の水和酵素 (FA-HY1 および FA-HY2, 図 1) をモデルタンパク質として用いた。*Elizabethkingia meningoseptica* 由来の脂肪酸水和酵素 (OhyA, リノール酸の 10 位に水酸基を導入) の結晶構造を用いて、基質特異性の決定に関わるアミノ酸残基を予測した。予測した残基に対して、ポイントミューテーションを導入し、作製した変異酵素を用いて水和反応を行い、水酸基の導入位置および基質特異性の変化を解析した。

4. 研究成果

(1) 新規水和酵素の精製と機能解析

嫌気性細菌を対象として、DHA を水和する活性を有する菌を探索し、2 種の菌の取得に成功した。このうちの 1 種より長鎖不飽和脂肪酸を水和する新規不飽和脂肪酸水和酵素の精製に成功した。さらに、精製酵素の N 末端アミノ酸配列解析とゲノム解析を組み合わせることで新規不飽和脂肪酸水和酵素をコードする遺伝子を特定し、大腸菌において異種発現系を構築した。取

得した酵素は既知の不飽和脂肪酸水和酵素 (CLA-HY、FA-HY1 および FA-HY2) との相同性が 40% 程度であった。取得した不飽和脂肪酸水和酵素の基質特異性を評価した結果、炭素数が 20 の ω -3 脂肪酸であるエイコサペンタエン酸 (EPA, C20:5 Δ 5Z,8Z,11Z,14Z,17Z) を最もよく水和し、また、DHA (炭素鎖長 22 の ω -3 脂肪酸) に対しても高い水和活性を示し、各基質よりそれぞれ 1 種のプロダクトが生成した。一方で、炭素数 18 の ω -3 脂肪酸であるステアリドン酸 (C18:4 Δ 6Z,9Z,12Z,15Z) に対しては水和活性を示さなかった。これらの結果は、本酵素が長鎖の不飽和脂肪酸に対して特異性が高いことを示している。すなわち、本酵素のユニークな基質特異性を応用することで、新規の水酸化脂肪酸が合成可能となると期待できる。これまでに、EPA や DHA が生体内において水酸化修飾を受け生理活性脂質として機能することが報告されている。しかしながら、EPA や DHA をはじめとする長鎖の多価不飽和脂肪酸は酸素存在下で容易に酸化するため取り扱いが難しく、水酸化体の調製が困難であった。しかし、本水和酵素により、長鎖の多価不飽和脂肪酸においても酸化分解を防ぎつつ、水酸化脂肪酸の合成が可能となり、産業および科学の両面において水酸化脂肪酸の詳細な理解と応用が可能になることが期待される。

(2) *in silico* による新規水和酵素候補遺伝子の探索と機能解析

既知の不飽和脂肪酸水和酵素と相同性が低い (アミノ酸配列の相同性が 30% 未満) 不飽和脂肪酸水和酵素を *in silico* で探索した。細菌から真菌まで計 9 種の不飽和脂肪酸水和酵素を取得し、各不飽和脂肪酸水和酵素を発現した大腸菌を調製し、休止菌体反応を用いて基質特異性を評価した。この結果、真菌より取得した不飽和脂肪酸水和酵素が DHA を水和し、2 種のプロダクトを生成した (図 2)。(1) で同定した新規不飽和脂肪酸水和酵素は DHA より 1 種のプロダクトを生成したことから、真菌由来不飽和脂肪酸水和酵素はユニークな基質特異性を有していることが示唆された。

(3) タンパク質結晶構造解析による情報の収集・変異導入による機能改変と機能解析

OhyA と FA-HY1 および FA-HY2 のアライメント解析を行い、OhyA の結晶構造から、FA-HY2 の基質特異性を決定していると予想される残基 (T391、H393 および I378) を選抜した。これらの残基に対して、変異を導入した結果、三重変異体 (T391S、H393S および I378P) が、リノール酸から主たるプロダクトとして、13OH-C18:1 Δ 9Z を生成した。本結果は、既知の不飽和脂肪酸水和酵素に対して、変異導入することで新規な基質特異性を付与できることを示している。

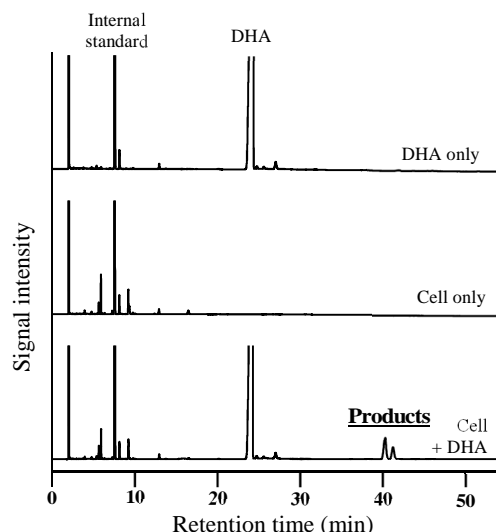


図 2. 真菌由来不飽和脂肪酸水和酵素発現大腸菌と DHA の反応液の GC クロマトグラム

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Eser Bekir Engin, Poborsky Michal, Dai Rongrong, Kishino Shigenobu, Ljubic Anita, Takeuchi Michiki, Jacobsen Charlotte, Ogawa Jun, Kristensen Peter, Guo Zheng	4. 巻 21
2. 論文標題 Rational Engineering of Hydratase from <i>Lactobacillus acidophilus</i> Reveals Critical Residues Directing Substrate Specificity and Regioselectivity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ChemBioChem	6. 最初と最後の頁 550 ~ 563
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cbic.201900389	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 該当する

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 5件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岸野重信
2. 発表標題 食事由来脂質と腸内細菌と機能性
3. 学会等名 日本油化学会東海支部油化学セミナー（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岸野重信
2. 発表標題 腸内細菌の脂質代謝と不飽和脂肪酸代謝産物に関する生理機能について
3. 学会等名 DHA・EPA協議会 第20回公開講演会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岸野重信
2. 発表標題 腸内細菌による食事由来油脂代謝と代謝物の生理機能
3. 学会等名 第26回植物油栄養懇話会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岸野重信
2. 発表標題 腸内細菌による油脂代謝と脂肪酸代謝産物の生理機能について
3. 学会等名 第9回機能油脂懇話会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岸野重信
2. 発表標題 腸内細菌に特異な代謝と代謝産物の生理機能
3. 学会等名 第33回さんわかセミナー（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤川真理子
2. 発表標題 リパーゼによる水酸化脂肪酸重合体の生産
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村川直美
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 2019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
研究 分担 者	竹内 道樹 (Takeuchi Michiki) (40766193)	京都大学・農学研究科・特定助教 (14301)	