

令和 7 年 5 月 30 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2024

課題番号：21K05364

研究課題名（和文）酸化経路の再考に基づく ω -3高度不飽和脂肪酸の代謝変換の研究

研究課題名（英文）Study on the metabolic conversion of omega-3 polyunsaturated fatty acids through a reconsideration of beta-oxidation pathway

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）：(1) *Shewanella livingstonensis* Ac10におけるドコサヘキサエン酸からエイコサペンタエン酸への新奇物質変換能に着目し、これを担う分子基盤を研究した。その結果、この変換が ω -酸化経路を経て起こることを明らかにし、またリン脂質合成との共役が重要である可能性を見出した。(2) 同菌の近縁種 *Shewanella vesiculosa* HM13を用いて、有用脂質の生産と膜小胞への積み込みを検証した。現在までにそれらの脂質の生産には至っていないが、生産系の改善に向けた知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

当該の脂肪酸は ω -3高度不飽和脂肪酸に分類され、人の健康維持・増進に深く結びついていることから食事やサプリメントからの摂取が推奨されるが、その供給源の1つとして微生物が注目されている。本研究成果は ω -3高度不飽和脂肪酸の微生物生産に取り入れることで生産能を拡張できることが期待される。また、人などの哺乳動物や真核微生物でも ω -3高度不飽和脂肪酸の代謝変換が確認されているがその分子機構は不明である。本研究成果は生物による ω -3高度不飽和脂肪酸の代謝を追求するうえで基礎的に重要な発見であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：(1) I focused on the novel bacterial ability to convert docosahexaenoic acid to eicosapentaenoic acid in *Shewanella livingstonensis* Ac10 and studied on the underlying molecular mechanism. As a result, I found that this conversion occurs via ω -oxidation pathway and possibly requires the coupling with phospholipid synthesis. (2) I attempted to produce valuable lipids and load them to membrane vesicles using *Shewanella vesiculosa* HM13. Although the attempts have not succeeded yet, I gained some idea to improve the production system.

研究分野：応用微生物学

キーワード： ω -3高度不飽和脂肪酸 エイコサペンタエン酸 ドコサヘキサエン酸 ω -酸化酵素 微生物物質変換膜小胞 微生物物質生産

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

エイコサペンタエン酸 (EPA) やドコサヘキサエン酸 (DHA) は ω -3 高度不飽和脂肪酸 (PUFA) の一種であり (図 1)、人の健康維持・増進に欠かせない栄養素であるが、人は PUFA を *de novo* 合成できないため食事やサプリメントから補う必要がある。これらの ω -3 PUFA の供給源の 1 つとして、EPA や DHA を生産する海洋性細菌が注目されている。これらの細菌は ω -3 PUFA の *de novo* 合成が可能であり、1996 年に EPA の生合成を担う *pfa* 遺伝子 (*pfaA-pfaE*) が同定されて以降、異種の細菌を用いた EPA/DHA の生産系の構築や、各種 PUFA を作り分ける酵素反応機構の解明が精力的に進められてきた。一方で、これらの細菌における分解や変換といった生合成以外の代謝反応に関しては知見が乏しく、EPA/DHA の産業利用に資する微生物および遺伝子資源の新規探索・開拓に取り組むことを考えた。

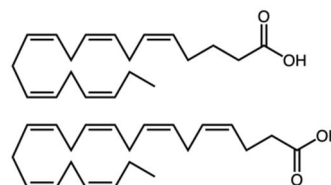


図 1 . EPA (上) と DHA (下) の化学構造

2. 研究の目的

本研究では次の 2 つのテーマに取り組んだ。

(1) 申請者らの研究グループはこれまでに、EPA 生産能を有する低温適応性細菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 を用いて EPA の代謝や低温適応における働きを分析してきた。その中で、EPA の *de novo* 合成能を欠いた変異株 (Δ EPA 株) を培養する際、培地に DHA、あるいは DHA をアシル基に持つリン脂質を添加すると、EPA を合成できることを見出した [*Extremophiles* (2008) 12:753-61]。このことから、本菌が培地中の DHA を取り込み EPA に変換する新奇の物質変換能を持つことが予測され、本研究ではその分子基盤を明らかにすることを目的とした。

(2) 申請者らの研究グループでは *S. livingstonensis* Ac10 の近縁種で、細胞外膜小胞 (EMV) を多量に分泌する *Shewanella vesiculosa* HM13 を単離している。EMV は脂質二重層で覆われた直径 20-250 nm の粒子であり、細胞表面の生体膜からの出芽等により生じ、小胞の内側にタンパク質や核酸といった生体分子を内包する。本研究では、本菌に EPA 等の有用な脂質分子を高生産させた際に EMV に積み込まれないかと考え、この可能性を検証することを目的とした。微生物を用いた物質生産において細胞外への分泌は生産性を高めるための手段の一つであり、これに EMV を利用した新規微生物物質生産システムの構築を目指した。

3. 研究の方法

(1) DHA から EPA への変換を担う分子基盤の解明

申請者の先行研究により、DHA から EPA への変換に β -酸化酵素であるアシル-CoA デヒドロゲナーゼ (FadE) と 2,4-ジエノイル-CoA レダクターゼ (FadH) が関わることを見出している [*Front. Microbiol.* (2020) 11:1104; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2020) 528:453-8]。そこで本研究では、 β 酸化の残りのステップを担うエノイル-CoA ヒドラターゼ/3-ヒドロキシアシル-CoA デヒドロゲナーゼ (FadB、FadJ)、および 3-ケトアシル-CoA チオラーゼ (FadA、FadI) の関与を検討した (図 2)。このため、 Δ EPA 株を親株として *fadB*、*fadA*、*fadJ*、*fadI* の各遺伝子を相同組換えにより破壊した単独遺伝子欠損株、また、*fadB* と *fadJ*、および *fadA* と *fadI* の 2 つを破壊した二重遺伝子欠損株 (Δ EPA/ Δ *fadB*/ Δ *fadJ* 株、 Δ EPA/ Δ *fadA*/ Δ *fadI* 株) を作製した。親株とこれらの変異株を DHA 存在下で培養したのち、細胞から Bligh-Dyer 法により総脂質を抽出し、質量分析計 API3000 を用いてリン脂質を分析した。さらに、リン脂質の脂肪酸アシル基をメチルエステル体に変換し、ガスクロマトグラフ質量分析計 Clarus SQ8 GC/MS を用いて分析した。また、広域宿主シャトルベクター pJRD-Cm^R に各 *fad* 遺伝子をクローニングして相補プラスミドを作製し、二重遺伝子欠損株に導入して培養したのち同様に脂質を分析した。

一般的に、 β -酸化は一連の酸化反応のくり返しによって脂肪酸をアセチル-CoA へと分解する異化経路である。 β -酸化によって DHA から EPA を生じるにはこれらの反応をくり返さず 1

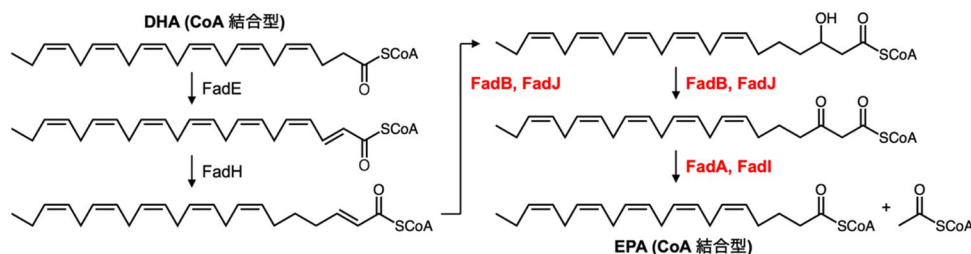


図 2 . 推定される DHA から EPA への変換反応

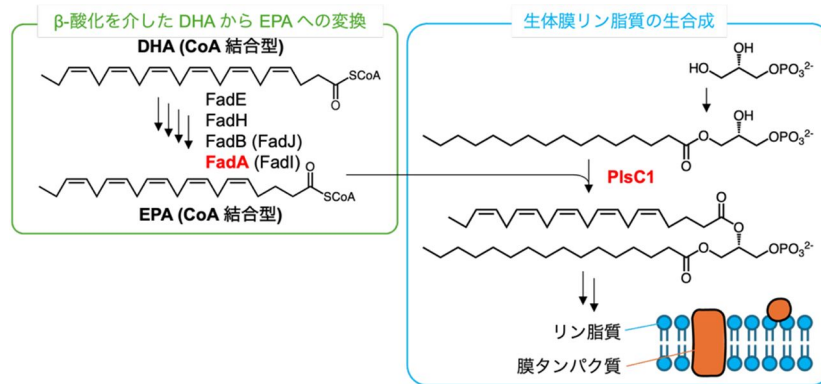


図3. 予想される DHA から EPA への変換反応とリン脂質合成反応の共役

サイクルで止める必要があるが、その分子基盤は不明である。仮説として、本変換反応がリン脂質の合成反応と共役しており、DHA からの変換で生じた EPA がさらなる β -酸化を受ける前にリン脂質にアシル鎖として取り込まれることを考えた (図3)。この可能性を検証するため、 β -酸化反応の最終ステップを担う FadA と、本菌において EPA をリン脂質に導入することが知られているリゾホスファチジン酸アシル基転移酵素 PlsC1 [*Trace Nutr. Res.* (2012) 29:92-9] との相互作用を分析した。このため、HA タグをコードする塩基配列を Δ EPA 株のゲノム中の *fadA* に、また、His6 タグをコードする塩基配列を *plsC1* に融合した変異株 (Δ EPA/*fadA*^{HA}/*plsC1*^{His6} 株) を作製した。この変異株を DHA 存在下で培養したのち、脂質を抽出して質量分析に供した。次に、同様に調製した細胞を破砕してタンパク質を粗抽出し、抗 HA 抗体と Dynabeads Protein G を用いた免疫沈降実験に供した。その過程で得られた各画分を SDS-PAGE とウェスタンブロットング分析に供し、FadA^{HA} とともに PlsC1^{His6} が共沈するか分析した。

(2) *S. vesiculosa* HM13 を用いた有用脂質の生産と EMV への積込み

他の *Shewanella* 属細菌と同じく、*S. vesiculosa* HM13 は EPA の生合成を担う *pfa* 遺伝子を有するが、EPA の生産量は少ない。そこで、EPA 生産能を増強するため、*pfa* 遺伝子のプロモーターの置換を試みた。下流の遺伝子の発現を強力に促進する P49 プロモーター (P_{P49}) を相同組換えにより *pfaA* の上流に導入し、変異株 (P_{P49} -*pfa* 株) を得た。親株とこの変異株を培養したのち総脂質を抽出し、リン脂質およびその脂肪酸組成を API3000 と Clarus SQ8 GC/MS を用いて分析した。

EPA 以外の有用脂質として遊離脂肪酸、フラン脂肪酸 (FuFA)、カロテノイドの一種であるリコピンの生産を試みた。広域宿主シャトルベクター pJRD-Cm^R にプロモーター (P_{P49} と P_{BAD}) と生合成遺伝子 (遊離脂肪酸, 変異型 *tesA*; リコピン, *crtEIB*) をクローニングした発現プラスミドを作製し、*S. vesiculosa* HM13 に導入して各脂質の生産性を検討した。FuFA については、本菌は生合成遺伝子 *ufaMDO* を有するもののほぼ生産しないため、生産量を向上させるため初発酵素であるメチル基転移酵素 UfaM、また UfaM のホモログであるシクロプロパン脂肪酸合成酵素 Cfa に種々のアミノ酸置換を導入し機能改変を試みた。これらの酵素を大腸菌 *Escherichia coli* で異種発現させ、その脂質を抽出・分析した。また、この発現宿主にさらに *ufaD* または *ufaDO* を導入し FuFA の生産を検討した。

4. 研究成果

(1) DHA から EPA への変換を担う分子基盤の解明

PCR 法と DNA シーケンシングにより遺伝子の欠損を確認した。親株と 4 種の単独遺伝子欠損株の脂質を分析した結果、いずれの変異株も親株と同等の EPA を生産しており、依然として DHA から EPA への変換が起きることがわかった。図2に示す通り、FadB と FadJ、および FadA と FadI は互いに機能が重複するため、どちらか一方の存在が本変換に十分である、またはこれらの β -酸化酵素は本変換と無関係であることが考えられた。そこで次に、これらの機能重複する遺伝子の両方を欠損した二重遺伝子欠損株を作製した。その脂質を抽出し分析した結果、これらの変異株では EPA 量が減少しており、DHA から

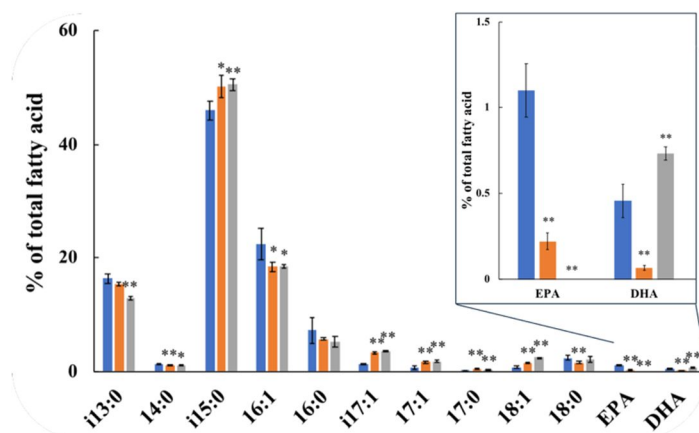


図4. 二重遺伝子欠損株における DHA から EPA への変換能の低下。青, Δ EPA; 橙, Δ EPA/ Δ *fadB*/ Δ *fadJ*; グレー, Δ EPA/ Δ *fadA*/ Δ *fadI*. n=3.

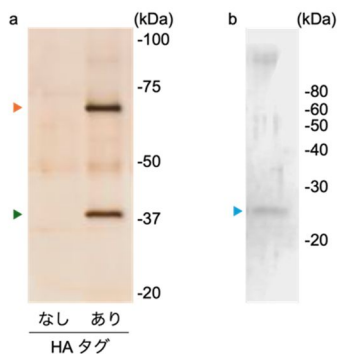


図5．免疫沈降サンプルの SDS-PAGE 分析。a, 銀染色; b, 抗 His6 抗体を用いたウェスタンブロットティング。分子質量: FadA (▼), 41 kDa; FadB (▶), 77 kDa; PlsC1 (▶), 27 kDa。

EPA への変換の低下が認められた (図 4)。また、各 *fad* 遺伝子を相補することで本変換能が回復した。以上のことから、FadB、FadJ、FadA、FadI のいずれもが本変換に関与することがわかり、DHA が β -酸化経路全体を介して EPA に変換されることが明らかになった。

PCR 法と DNA シーケンシングにより、ペプチドタグをコードする塩基配列がゲノムに挿入されたことを確認した。培養および脂質分析の結果、 Δ EPA/*fadA*^{HA}/*plsC1*^{His6} 株は親株である Δ EPA 株と同等の生育を示し、依然として EPA を生産することがわかった。このことから、タグ付加が FadA や PlsC1 の酵素機能を損なわないことを確認した。そこで次に、同変異株を利用して免疫沈降実験を実施した。分析の結果、FadA^{HA} とともに FadB が共沈すること (FadA と FadB はヘテロテトラマーを形成することが知られる) が示唆され、免疫沈降が機能していることが確認された (図 5 a)。同様のサンプルをウェスタンブロットティング分析に供した結果、PlsC1^{His6} のバンドが認められ (図 5 b)、FadA と PlsC1 が相互作用することが示唆された。より確かな証明のため、 Δ EPA/*plsC1*^{His6} 株をコントロールとした対照実験を交えて検証する予定である。

(2) *S. vesiculosa* HM13 を用いた有用脂質の生産と EMV への積込み

PCR 法と DNA シーケンシングにより、*P*₄₉ が *pfaA* の上流に導入されたことが確認された。脂質分析の結果、*P*₄₉-*pfa* 株の EPA 生産量は親株と同等であり、プロモーター置換による生産量の増強は認められなかった。今後は、転写量を増やす以外のアプローチが必要である。

pJRD をベクターとした変異型 *tesA* の発現プラスミドを作製した。これを *S. vesiculosa* HM13 に導入して培養したのち遊離脂肪酸を分析した。その結果、変異型 *tesA* 発現株とベクターコントロールとで、また誘導剤の有無で遊離脂肪酸の量に変化はなかった。原因として本菌では *E. coli* 由来の *P*_{BAD} プロモーターが効果的に働かないことや誘導剤の取込みが弱いことが考えられた。また、pJRD をベクターとした *crtEIB* の発現プラスミドの作製を試みたが、実験をくり返したもののプラスミドは得られなかった。原因として、*P*₄₉ を用いたリコピンの大量生産が宿主細胞に阻害的に働くことが考えられた。今後は他のプロモーターの利用や遺伝子発現の条件の最適化を検討する。

FuFA の生産では、機能改変のため *S. vesiculosa* HM13 由来の UfaM に変異を導入したが、変異型 UfaM は野生型と同一の生成物を与えた。一方で、野生型 Cfa はシクロプロパン脂肪酸を生じるが、変異型 Cfa は 2 種のメチル化脂肪酸を生成した (図 6)。これらは FuFA 生産の中間体およびその類縁体と考えられ、FuFA の生産性増強に利用可能であることが期待された。そこで次に、*ufaD* および *ufaDO* を導入し、当該のメチル化脂肪酸が FuFA まで変換されるかを検証した。脂質分析の結果、UfaD の生成物であるジエン型の脂肪酸の生成が示唆されたが、最終生成物である FuFA の生成は認められなかった。今後は UfaO への変異導入による機能改変や培養条件の最適化を検討する。

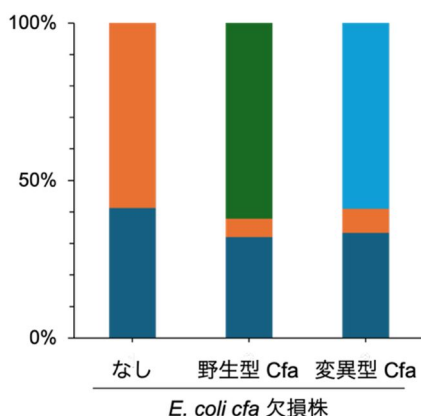


図6．Cfa 発現株における脂肪酸クラスの割合。紺, 飽和脂肪酸; 橙, 不飽和脂肪酸; 緑, シクロプロパン脂肪酸; 水色, メチル化脂肪酸。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 正木翼加、小川拓哉、川本 純、栗原達夫
2. 発表標題 低温菌 <i>Shewanella livingstonensis</i> Ac10における 酸化酵素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の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023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
---------	---------