

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19580080
 研究課題名（和文） ポリヒドロキシアルカン酸合成酵素遺伝子の導入による多価不飽和脂肪酸分解過程の解明
 研究課題名（英文） Elucidation of degrading processes of polyunsaturated fatty acids by introducing a gene encoding polyhydroxyalkanoate synthase
 研究代表者
 前田 勇（ISAMU MAEDA）
 宇都宮大学・農学部・准教授
 研究者番号：10252701

研究成果の概要（和文）：多価不飽和脂肪酸の12位のシス二重結合が存在する場合に、ジエノイル-CoA レダクターゼ活性がその不飽和脂肪酸の β -酸化において重要な働きを担うことが明らかになっている。リノール酸と α -リノレン酸は9位と12位のシス二重結合を有する点で共通することから、 α -リノレン酸の β -酸化活性の阻害と代謝におけるジエノイル-CoA レダクターゼ活性の必要性の高さは15位の二重結合の存在に由来することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：When a polyunsaturated fatty acid contains the 12-*cis* double bond, dienoyl-CoA reductase activity has been shown to play an important role in β -oxidation of the fatty acid. As both linoleic acid and α -linolenic acid contain the 9-*cis* and 12-*cis* double bonds, it was suggested in α -linolenic acid that its inhibitory effect on β -oxidation and the higher necessity of dienoyl-CoA reductase activity in its metabolism might be due to the existence of 15-*cis* double bond.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2008年度	400,000	120,000	520,000
2009年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
総計	3,900,000	1,170,000	5,070,000

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：不飽和脂肪酸、ポリヒドロキシアルカン酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸、酵母、*Saccharomyces cerevisiae*、 β -酸化

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、分子内にシス型不飽和結合を有する多価不飽和脂肪酸の生理学的な重要性が提唱されている。

(2) ポリヒドロキシアルカン酸合成酵素遺伝子 *phaC* を酵母細胞に導入する手法は、*phaC*

の異種発現により合成された *PhaC* が脂肪酸中間代謝物をポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) ポリマー中へと取り込むことにより中間代謝物がポリエステル内に固定化され、以後の代謝や輸送を受けないという原理を基礎とする。したがって、*PhaC* 活性がペルオキシソームで発現するように組換えられた

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* では、培養後の細胞から抽出した PHA の各モノマー脂肪酸の含量によりペルオキシソームで生成した脂肪酸の中間代謝物濃度の相対的比較が可能となる。これにより、 β -酸化活性の相対的な比較が可能になる。

2. 研究の目的

(1) 様々な生理活性が注目されている多価不飽和脂肪酸の代謝速度とその経路、さらには β -酸化の調節メカニズムについて解明する。

(2) PHA 合成酵素遺伝子 *phaC* にペルオキシソームへのターゲティング・シグナルを付加し *S. cerevisiae* 株で発現させることで、多価不飽和脂肪酸のペルオキシソームにおける β -酸化への影響について明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 実験材料

出芽酵母 *S. cerevisiae* BY4742 株とその遺伝子破壊株を用いた。遺伝子破壊株を含む酵母菌株は EUROSCARF (<http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/>) より入手した。脂肪酸はステアリン酸 (C18:0)、オレイン酸 (C18:1 $^{cis-9}$)、リノール酸 (C18:2 $^{all cis-9,12}$)、 α -リノレン酸 (C18:3 $^{all cis-9,12,15}$) (Sigma 社) を用いた。

(2) 増殖能の評価

酵母株の培養はグルコースを含まない最少培地を用い、0.1% (w/v) の脂肪酸を添加して炭素源とした。脂肪酸の培地への溶解性を高めるために界面活性剤として Pluronic F-127 (Sigma 社) を 2% (w/v) の濃度で添加した。菌体濃度はトーマ血球計算盤を用いて測定した。

(3) プラスミドの構築

緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* の PHA 合成酵素遺伝子 *phaC* の 3' 末端に *S. cerevisiae* のペルオキシソーム・ターゲティング・シグナル 1 の塩基配列を付加した発現ユニットを酵母用遺伝子発現ベクター p415GPD に挿入することで、*phaC* 発現プラスミドを作成した。また緑色蛍光タンパク質 (GFP) をコードする遺伝子 *gfp* の 3' 末端にペルオキシソーム・ターゲティング・シグナル 1 の塩基配列を付加した発現ユニットを酵母用遺伝子発現ベクター p415GPD に挿入することで、ペルオキシソーム蛍光標識用プラスミドを作成した。

(4) β -酸化活性の評価

phaC 発現プラスミドにより形質転換した酵母株を 0.1% (w/v) のトリデカン酸 (C13:0)

と 0.01% (w/v) のオレイン酸、リノール酸、または α -リノレン酸を添加し培養を行った。培養の後、菌体を回収し凍結乾燥により乾燥させ重量を測定した。メタノールで乾燥菌体を洗浄した後に、クロロホルム、メタノール、濃硫酸が 10:10:0.3 (v/v/v) の割合で含まれるトランスエステルフィケーション混液を 20 ml の培養液から回収した乾燥菌体に対して 1 ml の割合で加え 96°C で 4 時間反応させた。これにより、菌体内に合成・蓄積された PHA の抽出・加水分解と、それにより生成されるモノマーのメチルエステル化を同時に行った。反応液に 0.9% (w/v) の塩化ナトリウム水溶液を加えて攪拌した後に遠心分離により分離させたクロロホルム層を回収した。クロロホルム中の脂肪酸メチルエステルの定量は HP-5MS カラム (30 m、アジレント・テクノロジー社) を装着した GC-MS (Focus GC-DSQII、サーモフィッシャー・サイエンティフィック社) により行った。 β -酸化活性の評価は、トリデカン酸由来の奇数鎖長アシル基を有するメチル 3-ヒドロキシアルカン酸を定量することにより行った。

(5) ペルオキシソーム形成の誘導効率評価

ペルオキシソーム蛍光標識用プラスミドにより形質転換した酵母株を 0.1% (w/v) のグルコース、オレイン酸、リノール酸、または α -リノレン酸を添加し培養を行った。遠心分離により回収した菌体をパラホルムアルデヒドにより固定化し、リン酸緩衝生理食塩水に再懸濁させた。落射微分干渉観察と落射蛍光観察は、60 倍油浸対物レンズを装着した共焦点レーザー走査型顕微鏡 (FV1000-D、オリンパス社) を用いて同時に行った。

4. 研究成果

(1) 酵母株の多価不飽和脂肪酸資化性

グルコースを炭素源として増殖した BY4742 株を、脂肪酸を炭素源とする培地に植菌した場合、ステアリン酸、オレイン酸、またはリノール酸では増殖が認められたが、 α -リノレン酸では 14 日間の培養で増殖が確認されなかった。このことから、 α -リノレン酸は資化されないことが判明した。一方、前培養においてオレイン酸で増殖した細胞を同様に植菌した場合、試験に用いた全ての脂肪酸で増殖が認められた (図 1)。この結果から、グルコースで増殖した細胞が α -リノレン酸を資化できなかった理由として、 α -リノレン酸では脂肪酸代謝酵素の誘導が顕著でないことが推察された。

次に、 α -リノレン酸によるペルオキシソームの形成誘導について調べた (図 2)。用いた組換え酵母株においては、脂肪酸 β -酸化の場合であるペルオキシソームが存在する場合は

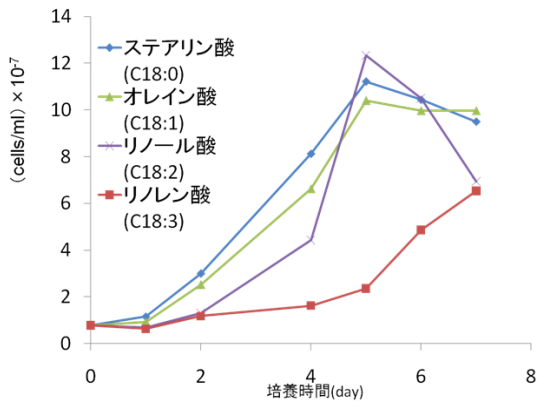


図1 オレイン酸で順化した酵母株を用いた増殖試験

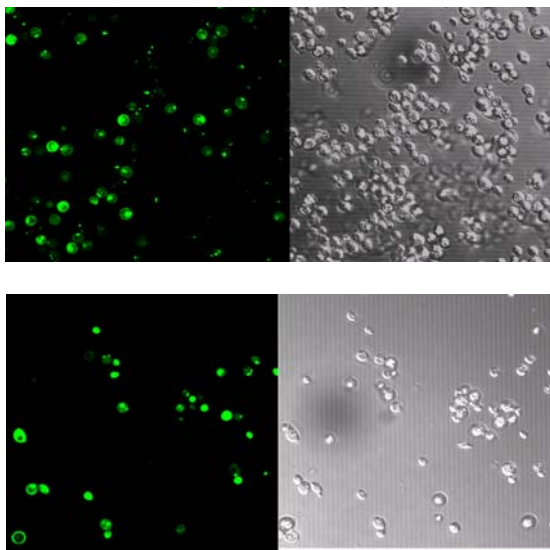


図2 オレイン酸(上)または α -リノレン酸(下)で増殖した酵母細胞におけるペルオキシソームの形成. 左, 落射蛍光観察; 右, 落射微分干渉観察.

GFP の蛍光がペルオキシソームに局在し細胞内に点在して観察される。ペルオキシソーム形成を誘導することが知られているオレイン酸では、細胞全体が光っているものに対して細胞内の点として光っている数が多く、この結果によりオレイン酸によるペルオキシソーム形成の誘導が確認された。一方、 α -リノレン酸では細胞の多くが全体的に光っており、ペルオキシソームへの GFP の局在が少ないことが判る。

これらの結果から、 α -リノレン酸ではペルオキシソーム形成の誘導が行われなかったために、 α -リノレン酸代謝に必要な酵素活性が誘導されないことが推察された。

(2) α -リノレン酸による β -酸化活性阻害

トリデカン酸の β -酸化に由来する奇数鎖メチル 3-ヒドロキシアルカン酸の乾燥菌体

重量当たりの量を測定した(図3)。その結果、オレイン酸に対して、リノール酸では各メチルエステル量はほとんど減少が見られないのに対し、 α -リノレン酸では全てのメチルエステル量が著しく減少した。このことから、ペルオキシソーム形成が誘導されない場合は、 α -リノレン酸は β -酸化活性を阻害することが明らかとなった。

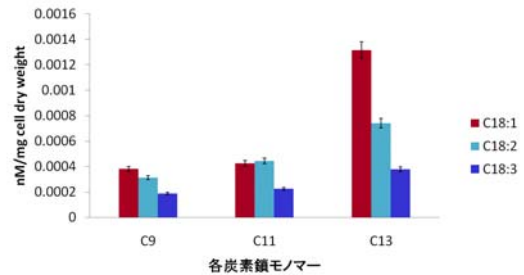


図3 オレイン酸、リノール酸、 α -リノレン酸の β -酸化活性への影響

(3) 多価不飽和脂肪酸の β -酸化に関する遺伝子の役割

本研究において注目した遺伝子は、4種であり、その中の3種は働きが明らかにされている。*ECII*は、エノイル-CoA イソメラーゼをコードする遺伝子であり、3-*cis*二重結合を2-*trans*二重結合に変換する。偶数位、奇数位に関係なく9, 12, 15-*cis*の全ての二重結合を代謝する上で重要とされる。*SPS19*は、ジエノイル-CoA リダクターゼをコードする遺伝子であり、2-*trans*と4-*cis*の二つの二重結合を3-*cis*の一つの二重結合に変換する上で重要とされる。特に偶数位の12-*cis*の二重結合を代謝する上で重要とされる。*PTE1*は、ペルオキシソーム局在型アシル-CoA チオエステラーゼをコードする遺伝子であり、CoA エステルとして β -酸化で代謝される脂肪酸をCoAと遊離脂肪酸に分解し、 β -酸化に必要なCoAを再生させる。*DCII*は、機能が明らかになっていない遺伝子であるが、エノイル-CoA イソメラーゼと同等の働きを有する酵素をコードしている可能性が考えられている。

グルコース、オレイン酸、リノール酸、あるいは α -リノレン酸を炭素源とした各遺伝子破壊株の増殖を調べた(図4)。細胞は、前培養においてオレイン酸で増殖させたものを調製した。その結果、全ての菌株においてグルコースとオレイン酸では速やかな増殖が認められた。一方、リノール酸では*SPS19*破壊株において増殖が著しく低下した。 α -リノレン酸では*ECII*破壊株あるいは*PTE1*破壊株において増殖が著しく低下し、*SPS19*破壊株において増殖が認められなかった。

オレイン酸、リノール酸、そして α -リノレン酸の二重結合の代謝に必須であるとされ

る *ECI1* 破壊株において各脂肪酸を炭素源として増殖が認められたことから、エノイル-CoA イソメラーゼの欠失を相補する活性を持つ酵素が存在することが示唆された。

また、リノール酸も α -リノレン酸も 9-*cis* と 12-*cis* の二重結合を有する点で共通するにもかかわらず、二重結合が二つのリノール酸よりも二重結合が三つの α -リノレン酸の方が、12-*cis* の代謝に必須とされる *SPS19* の破壊の、増殖における負の影響が強く現れた。このことから、 α -リノレン酸の 15-*cis* の二重結合の存在が β -酸化における *SPS19* (ジエノイル-CoA レダクターゼ遺伝子) の必要性を高めていることが示唆された。また、*PTE1* あるいは *ECI1* の破壊の負の影響がリノール酸よりも α -リノレン酸で大きく現れたことから、15-*cis* の二重結合の代謝にはこれらの遺伝子の機能も深く関わっていることが示唆された。

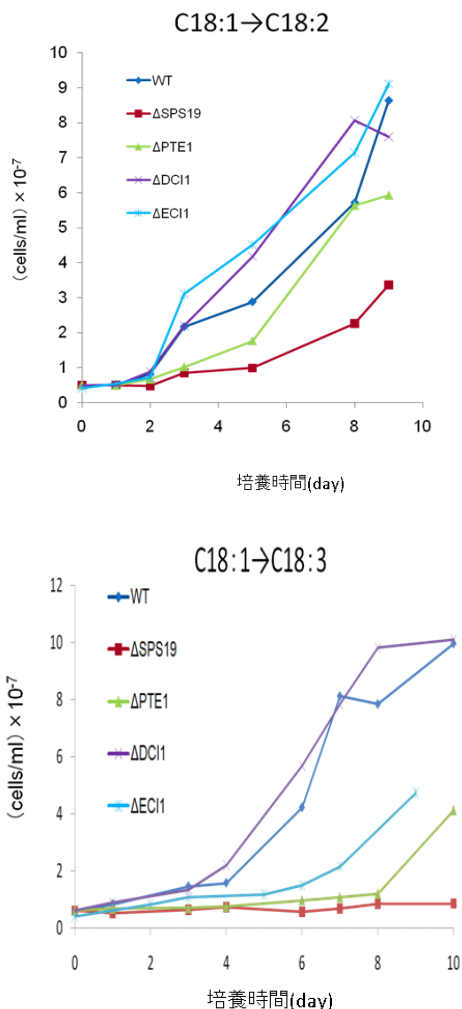


図 4 オレイン酸で順化した遺伝子欠損株を用いた増殖試験

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 1 件)

- ① Yoshiaki Seto, Junkyu Kang, Li Ming, Naoto Habu, Ken-ichi Nihei, Shunsaku Ueda, Isamu Maeda, Genetic replacement of *tesB* with *PTE1* affects chain-length proportions of 3-hydroxyalkanoic acids produced through β -oxidation of oleic acid in *Escherichia coli*. Journal of Bioscience and Bioengineering, in press (2010) 査読有

〔学会発表〕(計 3 件)

- ① 高浜 由実、上田 俊策、前田 勇、出芽酵母を用いた多価不飽和脂肪酸 β -酸化過程の解明、日本農芸化学会関東支部 2009 年度大会、平成 21 年 10 月 31 日、東京都町田市 玉川大学視聴覚センター
- ② 瀬戸 慶彬、長谷川 晴子、上田 俊策、前田 勇、アシル-CoAチオエステラーゼ II (TesB) ファミリー酵素の β -酸化中間体に対する基質特異性の解析、日本農芸化学会関東支部 2007 年度大会、平成 19 年 11 月 10 日、宇都宮市 宇都宮大学学生会館多目的ホール
- ③ 瀬戸 慶彬、長谷川 晴子、上田 俊策、前田 勇、acyl-CoA thioesterase II (TesB) family 酵素の β -酸化中間体に対する基質特異性の解析、第 59 回日本生物工学会大会、平成 19 年 9 月 26 日、東広島市 広島大学東広島キャンパス

〔その他〕

ホームページ等

<http://agri.mine.utsunomiya-u.ac.jp/hpj/deptj/chemj/jmicrobio/microb-eng.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田 勇 (MAEDA ISAMU)

宇都宮大学・農学部・准教授

研究者番号：10252701