

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：24302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K05898

研究課題名(和文) リン脂質(レシチン)の改変・加工に用いる新規耐熱性ホスホリパーゼの性質と応用

研究課題名(英文) Characteristics and applications of a novel thermostable phospholipase for modification and processing of phospholipids (Lecithin)

研究代表者

辻本 善之(Tsujimoto, Yoshiyuki)

京都府立大学・生命環境科学研究科・講師

研究者番号：20315930

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：好熱性細菌B157T株のホスホリパーゼA(PlaA)は不活性型(PlaA-Cpro)として分泌され、細胞外で活性型となることが示唆されている。本研究では、PlaA-Cproを大腸菌で発現し、*in vitro*プロセッシングによってPlaAの大量調製に成功した。本酵素は広い範囲のpH・温度で安定であり、中性脂質には作用せず、リン脂質のsn-1位に高い選択性を持つPLA1であった。また、本酵素は基質を含む混合ミセルを認識することを明らかにした。さらに、本酵素を用いて、リン脂質とメタノールから脂肪酸メチルエステルを合成したり、リン脂質の脂肪酸を中性脂質の脂肪酸と交換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

好熱性細菌B157T株が生産するホスホリパーゼ(PlaA)が広範囲のpHや温度で安定であり、sn-1位に高い選択性を持つPLA1であったため、市販酵素の代替酵素として十分対応できる酵素であると考えられる。また、本酵素は、脂肪酸メチルエステルの合成やリン脂質の脂肪酸を中性脂質の脂肪酸に交換するのに利用できることを明らかにした。本酵素は、相同性の高いタンパク質が報告されていない新規酵素であるため、脂質関連酵素の基質認識の理解や脂質関連酵素の特性解明に大きな貢献が期待されるだけでなく、環境負荷の少ないリン脂質の改変や加工において産業利用の可能性を示している。

研究成果の概要(英文)：The characteristics of phospholipase A (PlaA) from *Caenibacillus caldisaponilyticus* B157T strain were studied. It is suggested that PlaA is initially secreted as an inactive form with a C-terminal pro-sequence (PlaA-Cpro) and becomes active through extracellular processing. Recombinant PlaA-Cpro was expressed in *Escherichia coli* and processed *in vitro* to obtain active recombinant PlaA (rPlaA). rPlaA showed strong and stable enzymatic activity across various pH and temperature conditions. It preferred the sn-1 position of phospholipids but had little hydrolytic activity on neutral lipids. Furthermore, rPlaA could recognize the assembly state of substrates and surfactants. It was also found that rPlaA facilitated the synthesis of fatty acid methyl esters from phospholipids and methanol, as well as the exchange of fatty acids between phospholipids and neutral lipids.

研究分野：発酵生理学、応用微生物学、脂質生化学

キーワード：ホスホリパーゼ リン脂質 レシチン リン脂質改変 脂肪酸メチルエステル

1. 研究開始当初の背景

産業に用いられる酵素製剤は、安全性・安定性に優れ、低コストで生産可能であることが必須条件である。近年、市場の拡大・国際化により、宗教上の条件も加わってきた。現在、ブタ膵臓 PLA が広く用いられているが、イスラム教徒やユダヤ教徒の評価基準であるハラールやコーシャには、ブタ由来であるために認証されない。従って、多くの企業がその代替酵素を求めており、麹菌などのホスホリパーゼ A (PLA) もこれまでに上市されているが、それらには高い生産コストや狭い反応条件などという問題点もある。

リン脂質の1つであるレシチンは、本来、ホスファチジルコリン (PC) のことを示すが、PC を多く含む製剤のこともレシチンと呼ばれ、様々な分野で利用されている。現在、PLA は油脂精製、リゾレシチン (酵素処理レシチン) 製造および食品加工などに使用されている。リン脂質とその誘導体の日本での市場規模は年間約 50 億円程度だと言われ、その需要の増加が見込まれている。さらに、機能性脂肪酸 (ドコサヘキサエン酸やエイコサペンタエン酸など) を含む機能性リン脂質の需要はさらに拡大すると考えられている。

我々は、リン脂質の改変・加工に利用できる新規 PLA (PlAa) を産生する好熱性細菌をスクリーニングした。その結果、新規好熱性細菌 *Caenibacillus caldisaponilyticus* B157^T 株 (新属新種) を単離し、さらに、そのゲノム遺伝子の配列を決定した (1,2)。PlAa は C 末端側に pro 配列を持つ不活性型 (PlAa-Cpro) として分泌され、細胞外で活性型 (PlAa) へとプロセッシングされることが示唆されている。一般的に PLA がリン脂質から成る細胞膜を破壊するため、微生物による大量生産は困難であるが、我々は、本酵素遺伝子のクローニングと本酵素の大腸菌発現系と大量調製法を確立した。また、予備実験的ではあるが、本酵素は、PLA 活性に加え、トランスアシラーゼ活性も有することも分かり、リン脂質の改変・加工に利用できる可能性が示唆されていた。

2. 研究の目的

本酵素遺伝子のホモロジー検索の結果、本酵素の相同性の高いタンパク質はほとんど報告がなく、新規酵素であることが判った。そこで、本酵素の特徴を明らかにし、産業利用可能かどうか評価することとした。

一般的に、PLA は細胞膜成分であるリン脂質を加水分解し、細胞膜を破壊するため、異種発現を含めた微生物生産による大量生産は不向きである。このことが、市販酵素に限られていることや、酵素学的研究や応用例が意外に少ない大きな要因の一つである。本酵素は、不活性型のプロ酵素として大量に発現できるという大きな利点がある。また、PLA で不活性型のプロ酵素が存在する例はこれまで全く報告されておらず、本酵素の成熟メカニズムの解明は、学術的にも興味深い。上記のように、PLA の研究例が少ないため、その応用例もほとんど報告が少ない現状である。そこで、本研究では、本酵素の諸性質を明らかにし、産業利用可能かを検討することを目的とした。

3. 研究の方法

組換え PlAa-Cpro (rPlAa-Cpro) を大腸菌で発現し、*in vitro* プロセッシングにより活性型組換え PlAa (rPlAa) を得た。本酵素は、加水分解活性だけではなく、トランスアシラーゼ活性 (アシル CoA 非依存的アシル基転位活性) を持つ可能性がある。本研究では、rPlAa の諸性質解析を行い、産業応用を目標に、リン脂質改変に応用するための反応条件を検討した。大腸菌で発現させた rPlAa-Cpro を Proteinase K で処理後、疎水性カラム等を用いて rPlAa を精製した。酵素活性測定は、基質に卵黄 phosphatidylcholine (PC)、界面活性剤にタウロコール酸ナトリウムを用い、60、pH 7 で行った。脂肪酸メチルエステル (FAME) 合成反応は、メタノール存在下で行なった。脂肪酸置換反応は、卵黄 PC の加水分解後に水分を除去し、種々の中性脂質を加えて反応させた。

4. 研究成果

rPlAa は、広域の pH・温度で安定 (pH 3.0-12.0, 0-65) かつ高活性 (pH 6.0-11.0, 60-70) であり (図 1) 至適条件下で、~200 U/mg の比活性を示した。このように本酵素は、安定に優れており産業利用しやすい酵素であると考えられる。

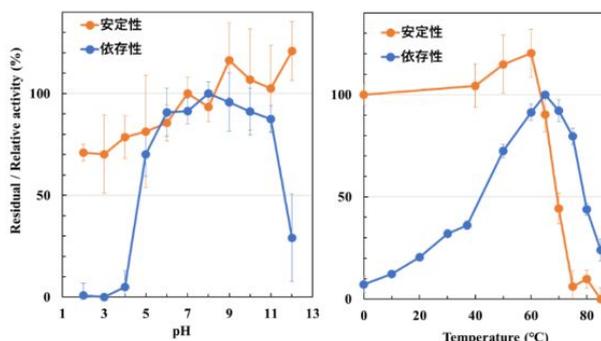


図1 rPLAのpHと温度に対する依存性と安定性

また、卵黄 PC を基質とした加水分解反応では、生成物 FFA に *sn*-1 位に多く存在する飽和脂肪酸が 98%含まれていた。この結果からは、位置ではなくて、飽和脂肪酸選択性の可能性も考えられた。そこで、2つの合成基質、1-palmitoyl-2-stearoyl-sn-glycerol-3-phosphocholine と 1-stearoyl-2-palmitoyl-sn-glycerol-3-phosphocholine を用いて加水分解で生じた遊離脂肪酸を分析した結果、約 80%が *sn*-1 位の脂肪酸であった。従って、本酵素は *sn*-1 位への位置選択性が非常に高い PLA₁ であった。さらに、種々の基質を用いて加水分解活性を調査した結果、本酵素はリン脂質を認識するが中性脂質を認識にないことが明らかとなった(図2)。乳化剤として種々用いたが、中性脂質の加水分解活性は低かった。また、エステル結合型界面活性剤である tween20 と tween80 や、脂肪酸側鎖の異なる *p*-nitro-esters は tritonX-100 との混合ミセル条件下で有意な活性を示した。

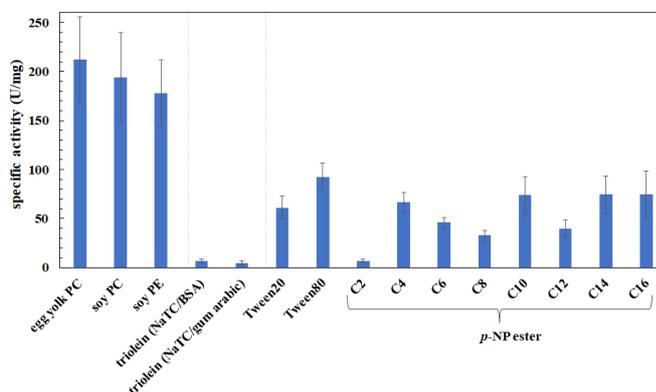


図2 rPLAの基質特異性

次に、rPLAは基質や界面活性剤の会合状態(ミセル)の認識機構を調査した。基質として単独ではミセル形成がない *p*-nitrophenyl palmitate を用いた。この結果、曇点が 64 である triton X-100 では、60でも高い加水分解活性を示したが、曇点が 23 である triton X-114 では、60での活性は低かった(図3)。また、ミセルを形成しない乳化剤であるアラビアガムでは活性は低かった(図3)。これらの結果は、本酵素が基質そのものではなくて、基質を含む混合ミセルを認識していることを示している。

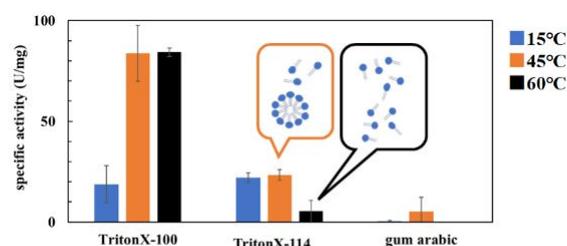


図3 rPLAの基質構造の影響

また、長時間の加水分解反応の結果、リゾホスファチジルコリンの生成量は反応 2 h 以降一定となった。この要因は、酵素の失活ではなく、反応産物である FFA による阻害であることが示唆された。従って、酵素反応でリゾリン脂質からグリセロホスホコリンにまで加水分解することなく、乳化性の優れたリゾリン脂質製造に用いることが可能であることが示された。

バイオディーゼルとして知られている脂肪酸メチルエステル(FAME)の合成活性は、基質が卵黄 PC、10%メタノール存在下で比活性は ~20 U/mg であった。図4は、中性脂質として食用油である、オリーブ油、ココナツ油、アマニ油を用いた場合を示している。反応後の PC の飽和脂肪酸が減少し、中性脂質由来の不飽和脂肪酸含量が増加することが明らかとなった。

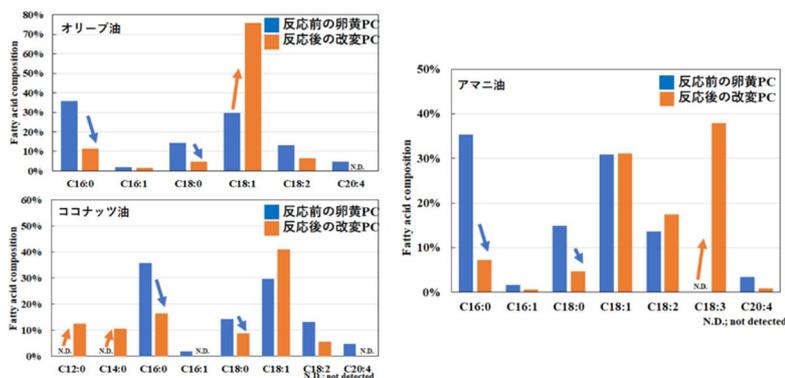


図4 卵黄PCの脂肪酸側鎖の食用油を用いた交換

これらの結果より、rPLAは大量調製が可能であり、温度安定性に優れてるだけでなく、幅広い pH で活性を示すため、既存酵素に比べて産業利用しやすい性質を持っていることが明らかとなった。また、リゾリン脂質や FAME の製造、さらには、リン脂質の脂肪酸置換による高付加価値リン脂質の製造にも産業利用の可能性が示された。

<引用文献>

- (1) Tsujimoto, Y. *et al.* (2016). *Caenibacillus caldisaponilyticus* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, spore-forming and phospholipid-degrading bacterium isolated from acidulocompost. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **66**(7), 2684-2690.
- (2) Tsujimoto, Y. *et al.* (2017). Draft Genome Sequence of *Caenibacillus caldisaponilyticus* B157^T, a Thermophilic and Phospholipase-Producing Bacterium Isolated from Acidulocompost *Genome Announcements*, **5**(13), e00089-17.

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 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tsujimoto Yoshiyuki, Watanabe Kunihiko	4. 巻 ?
2. 論文標題 Caenibacillus	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria	6. 最初と最後の頁 1~5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/9781118960608.gbm01623	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 ○森 千波、田中 秀典、齋藤 遼、辻本 善之、渡部 邦彦
2. 発表標題 リン脂質改質を目指した好熱性細菌B157T株由来活性型ホスホリパーゼA1組換え体の調製と性質決定
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 ○木村風香、辻本善之、渡部邦彦
2. 発表標題 Caenibacillus caldisaponilyticus B157T株由来の組換えホスホリパーゼA1 (rPlaA) の諸性質解析と基質認識機構の解明
3. 学会等名 日本農芸化学会関西支部
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 ○木村風香、辻本善之、渡部邦彦
2. 発表標題 Caenibacillus caldisaponilyticus B157T 株由来の組換えホスホリパーゼA1 (rPlaA) の諸性質解析と触媒残基の同定
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2022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
---------	---------