

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：84431

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26450113

研究課題名(和文) アトピー性皮膚炎増悪化予防に資する脂肪酸素材の微生物変換法と酵素法による生産

研究課題名(英文) Production and purification of fatty acid contributing to prevention of atopic dermatitis through microbial conversion and enzymatic process.

研究代表者

永尾 寿浩 (Nagao, Toshihiro)

地方独立行政法人大阪産業技術研究所・森之宮センター・研究室長

研究者番号：30416309

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：皮膚の微生物は健康と疾病に相関することから、アトピー性皮膚炎の炎症悪化に関与する黄色ブドウ球菌と、健康に寄与する表皮ブドウ球菌に注目した。

*Aeromonas hydrophila*は9cis-C18:1含有植物油を基質とした時、7cis-C16:1と5cis-C14:1を生産する。7cis-C16:1は黄色ブドウ球菌の生育を抑制し表皮ブドウ球菌の生育を抑制しない選択的抗菌活性があることから、この脂肪酸の精製を試みた。酵素法による精製は困難であったが、ODSカラムを用いれば7cis-C16:1を86%まで精製することができ、選択的抗菌活性が確認された。

研究成果の概要(英文)：Skin microbiota is concerned in several diseases and healthy condition, we thus focus on *Staphylococcus aureus* and *S. epidermidis*.

Aeromonas hydrophila converted 9cis-C18:1 to 7cis-C16:1 and 5cis-C14:1. 7cis-C16:1 showed selective anti-bacterial activity which suppressed growth of *S. aureus* and did not suppress growth of *S. epidermidis*. So, we attempted purification of 7cis-C16:1. Purification of 7cis-C16:1 was not succeeded through enzymatic process, but ODS column was effective for purification of 7cis-C16:1 (86% purity).

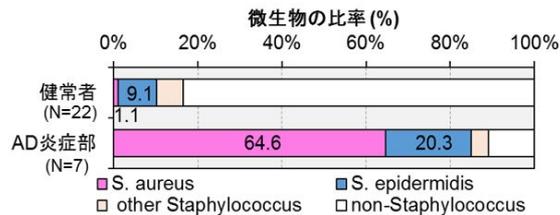
研究分野：応用微生物学、脂質工学、酵素工学

キーワード：Staphylococcus aureus, S. epidermidis, アトピー性皮膚炎, パルミトレイン酸, 皮脂, 抗菌活性, 菌叢, スキンマイクロバイオーーム

1. 研究開始当初の背景

ヒトの皮膚に常在する微生物・皮膚菌叢 (skin microbiota) は、ヒトの健康と疾病の相関関係に深く関与している。そこで本研究では、アトピー性皮膚炎 (Atopic dermatitis, AD) などの皮膚疾患と皮膚菌叢の相関関係に注目した。

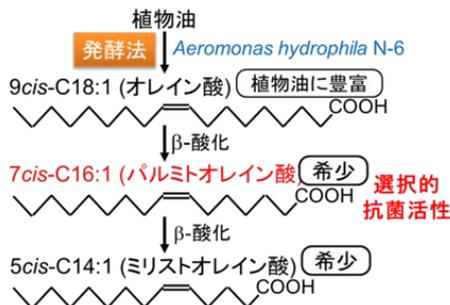
皮膚菌叢のうち、これまで *Staphylococcus aureus* (Au) と *Staphylococcus epidermidis* (Ep) に関する研究が以前から行われてきた。健康者では Au よりも Ep が優勢に存在するが、AD 患者の炎症部では Au が劇的に増加し、AD の炎症悪化に関与する(1)。



また、米国の研究グループの研究では、手洗いが多くにより皮脂が減少して手荒れになりやすい病院の ICU の労働者の手では、Au が高頻度で検出されており、院内感染が危惧される(2)。一方、Ep は Au の生育抑制に関与する複数の物質を分泌している。また最近、化粧品業界では、Ep を美肌菌としてもはやすようになっている。そこで、Au の生育を抑制し Ep の生育を抑制しない選択的抗菌活性をもつ素材の開発が求められている。

2. 研究の目的

大阪城の土壌から単離した細菌 *Aeromonas hydrophila* N-6 (N6 株) は、植物油を基質とした時、原料油を構成する脂肪酸の炭素数をβ-酸化により2または4個減少させ、ワックス (脂肪酸と脂肪族アルコールのモノエステル体) として菌体内に蓄積する(3,4)。9cis-C18:1 (オレイン酸) を豊富に含む向日葵油 (9cis-C18:1 含量, 81%) を基質として本菌を培養したとき、7cis-C16:1 (パルミトレン酸異性体) と 5cis-C14:1 (ミリストレン酸) の混合物が生産された。



7cis-C16:1 は、皮脂に由来から存在し Au の生育を抑制している 6cis-C16:1 (サピエン酸) と同等の活性、つまり Au の生育を抑制し、Ep の生育を抑制しない選択的抗菌活性

を保持することから、7cis-C16:1 は AD で顕著に増加する Au の生育を選択的に抑制し、皮膚菌叢を健全化する素材として非常に有用である。皮脂に存在するサピエン酸は天然油脂からの入手が困難であることから、その代わりとなる素材の開発が求められている。そこで本研究では、植物油を基質とした N6 株の培養により得られた 7cis-C16:1 と 5cis-C14:1 の脂肪酸混合物から、酵素法などにより、7cis-C16:1 を精製し、選択的抗菌活性で皮膚菌叢を健全化して AD の増悪化を予防する素材の開発を目的とした。

3. 研究の方法

抗菌活性は、微量液体希釈法により最少生育阻止濃度 (minimum inhibitory concentration, MIC) で評価した。供試試料である各脂肪酸は、10,000 μg/mL となるように DMSO に溶解した。*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* NBRC13276 または *Staphylococcus epidermidis* NBRC100911 (Type strain) を 3 mL の N.B. 培地 (0.5 wt% 鰹肉エキス, 1 wt% ハイポリペプトン, 0.5% NaCl, pH7.0) に 1 白金耳植菌し、振とうしながら 37 °C で一晩前々培養した。この前々培養液を、植菌量が 10 wt% となるように新しい NB 培地 3.6 mL に植菌し、振とうしながら 37 °C で 3 時間前培養した。660 nm における濁度から、生菌数が 2.0 × 10⁴ cfu/mL となるように N.B. 培地 (pH6.0) で希釈し、試験菌株懸濁液を調製した。

234 μL の試験菌株懸濁液を 96 穴丸底マイクロプレートの 2 列目に分注し、3~11 列目には 130 μL ずつ分注した。次いで、26 μL の供試試料 (10,000 μg/mL) をマイクロプレートの 2 列目に添加し、ピペティングにより十分懸濁し、10 倍に希釈した。次に、この懸濁液 130 μL をマイクロプレートの 3 列目に添加して懸濁し、順次 2 倍ずつ段階的に希釈した。

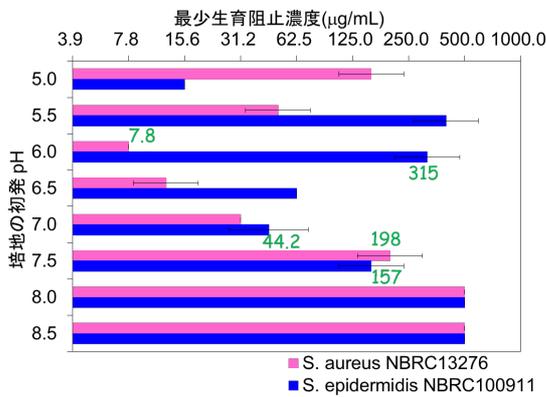
マイクロプレートを 37 °C にて 2 日間静置培養した後、試験菌株の生育を、沈殿した菌体の有無を目視により確認して判定し、試験菌株の生育が見られなくなる供試試料の最小濃度を MIC とした。

4. 研究成果

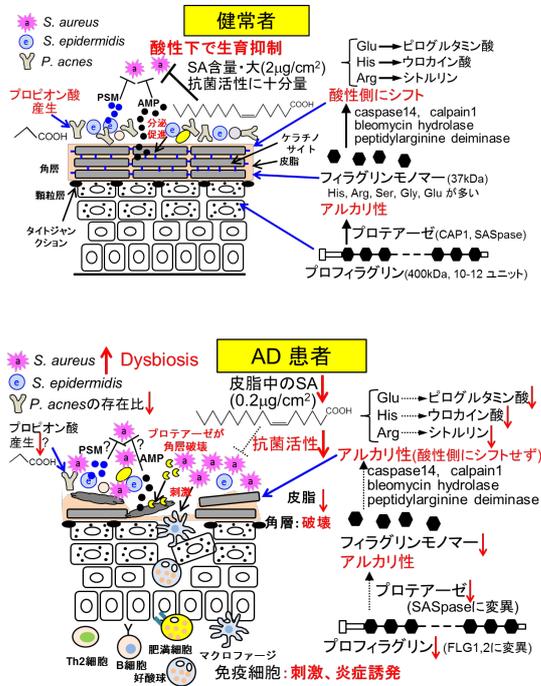
(1) ヒトの皮脂中に存在する 6cis-C16:1 の異性体で、限定的な植物油に存在し、試薬として入手が容易な 9cis-C16:1 (パルミトレン酸) の、Au と Ep に対する抗菌活性に及ぼす培地の初発 pH の影響を調べた。

pH を 5.0~8.5 の範囲とし、MIC を測定した結果、MIC に pH 依存性が認められ、Au に対する抗菌活性が最も強い pH は 6.0、Ep に対するそれは 7.0 であり、中~アルカリ性領域では両菌株に対する抗菌活性が同等であったが、弱酸性領域では選択的抗菌活性を

示す、つまり Au の生育を抑制し Ep の生育を抑制しないことが分かった。



これらの結果より、AD と健常者の皮膚表面 pH と 6cis-C16:1 含量、AD で Au が増える現象との相関関係が、下図のように説明可能である。

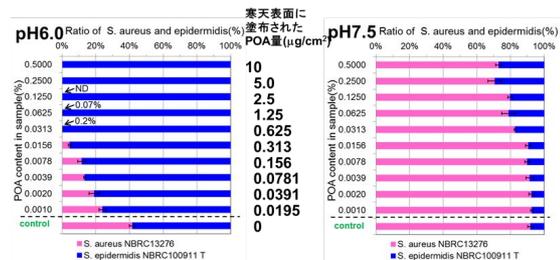


(2) 従来の活性評価法は、液体培地を用いた単一微生物に対する MIC である。本研究の最終目的は、複数微生物が混在する皮膚へ塗布する医薬部外品・化粧品素材であり、前記の評価法は実情に合致しない。そこで、Ep だけが生育してくる素材開発を目的とし、皮膚塗布モデル系として、Au と Ep が共存する寒天培地を用いて、どちらの微生物が優先化するかを調べる新規抗菌活性評価法を開発した。

両菌株を塗布した寒天プレートに、培地に 9cis-C16:1 を懸濁したモデル化粧品を、現実的な塗布量に近い 2 µg/cm² で寒天表面に塗布し、その共培養プレートを 37 °C で培養した。生育してきた菌を回収し、両菌の違いの判別が可能卵黄添加マンニット食塩寒天培地

に塗布後、生育してきた両菌株の相対比を求めた。

その結果、皮膚表面が弱アルカリ性であるアトピー性皮膚炎を模した pH7.5 の寒天培地の時、C16:1 が 0.5% (5000 µg/mL) の試料懸濁液を塗布しても Au が全く抑制されず、両菌株が生育した。一方、健常者の皮膚を模した pH6.0 の寒天培地を用いた時、C16:1 が 0.0313% (31.3 µg/mL) の以上の試料懸濁液を塗布したとき、Au が完全に抑制され、Ep が優先化する選択的抗菌活性が認められた。



(3) 9cis-C18:1 を 81% 含む向日葵油を基質としたとき、*Aeromonas hydrophila* N-6 が生産する 7cis-C16:1 と 5cis-C14:1 の混合物 (N6 脂肪酸、未変換の 9cis-C18:1 も残存している) からの 7cis-C16:1 の精製を行った。

N6 脂肪酸とラウリルアルコールをリパーゼ (*Rhizopus japonicus* または *Candida rugosa* 由来) でエステル化後、エステル画分と未反応脂肪酸画分の脂肪酸組成を調べた。その結果、いずれのリパーゼを用いても、9cis-C18:1 は除去できたが、5cis-C14:1 が除去されず、7cis-C16:1 を精製できなかった。これは、両リパーゼは、カルボン酸と、カルボン酸側から最初に来る二重結合の距離が重要であり、9cis-C18:1 に良く作用するが、7cis-C16:1 と 5cis-C14:1 には作用性が低く、しかも両脂肪酸間での作用性に差がないためである。従って、リパーゼによる 7cis-C16:1 と 5cis-C14:1 の分画は困難と判断した。

この事について更に調べたところ、9cis-C18:1 と 9cis-C16:1 が等量混合しているシーベリーという果実由来の植物油を用いて前記と同じ反応をさせたところ、9cis-C18:1 よりも 9cis-C16:1 の方が反応速度が早いことが分かった。つまり、反応性の順番は、9cis-C16:1 > 9cis-C18:1 > 7cis-C16:1, 5cis-C14:1 であり、*C. rugosa* リパーゼは、9位に cis のある脂肪酸に最も良く作用する事、同じ 9 位に cis がある場合は炭素数 18 個よりも 16 個の方が反応速度が速いことが分かった。

次に、工業スケールに適用可能な ODS オープンカラムを用いた精製を試みた。ODS を充填したカラムに N6 脂肪酸をアプライし、メタノール : 水 : トリフルオロ酢酸 = 95:5:0.05 (vol/vol/vol) で溶出させたところ、7cis-C16:1 と 5cis-C14:1 が分画され、7cis-C16:1 含量が 86% になった。これの抗菌活性を調べたところ、Au を抑制し Ep を抑制

しない選択的抗菌活性が認められ、当初の目標を達成することができた。

<引用文献>

- 1) H.H. Kong, et al., Genome Research, 22, 8505(2012)
- 2) M. Rosenthal, et al, Pathogens, 3, 1-13(2014)
- 3) T. Nagao, et al., Microbial conversion of vegetable oil to rare unsaturated fatty acids and fatty alcohols by an *Aeromonas hydrophila* isolate., J. Am. Oil Chem. Soc., 86, 1189-1197 (2009).
- 4) T. Nagao, Y. Shimada, Microbial production of rare unsaturated fatty acids and fatty alcohols., Lipid Technology, 22, 250-252(2010).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

- 1) 永尾寿浩, 第1回大阪産業技術研究所との産官技術交流会「バイオ技術を活用した環境と人にやさしいものづくり - 食品・化粧品等の開発に役立つ新素材 -」講演ノート, 酵素法による機能性脂質の製造および皮膚の微生物を健全化する脂質, 生産と技術, 70, 9-11 (2018).
- 2) 永尾寿浩, 田中重光, リパーゼのユニークな反応機構を利用した機能性脂質の製造, 科学と工業, 90, 85-92 (2016).
- 3) 永尾寿浩, 希少な不飽和脂肪酸と高度不飽和脂肪酸アルコールの微生物生産 皮膚菌叢の健全化を通じた健康維持への応用, 化学と生物, 54, 448 (2016).
- 4) 永尾寿浩, 岸本憲明, 脂肪酸の選択的抗菌活性による皮膚菌叢の健全化とアトピー性皮膚炎増悪化予防の可能性, アレルギーの臨床, 36, 372 (2016).
- 5) 永尾寿浩, リパーゼのユニークな反応機構を利用した機能性脂質の製造, バイオサイエンスインダストリー, 72, 218-220 (2014).

〔学会発表〕(計10件)

- 1) 宇山彩香, 杉野哲造, 田中重光, 永尾寿浩, ニキビ患者群に多いアクネ菌株に対して選択的抗菌活性を示す脂肪酸のスクリーニング, 日本農芸化学会 2018 年度大会.
- 2) A. Uyama, T. Sugino, S. Tanaka, T. Nagao, Screening of fatty acids showing selective antibacterial activity against acne-associated *Propionibacterium acnes*., 2018 AOCS Annual Meeting.
- 3) 大西耕平, 畑中優佳, 藤川真理子, 安井夕貴, 倉田淳志, 永尾寿浩, 岸本憲明, *Staphylococcus aureus* と *S. epidermidis* に対するパルミトレイン酸の抗菌活性メカニズムの検討, 日本農芸化学会 2017 年度大会.

- 4) 永尾寿浩 他, 皮膚菌叢の健全化を目指した *Staphylococcus aureus* と *S. epidermidis* の共培養によるパルミトレイン酸の選択的抗菌活性の評価, 日本農芸化学会 2017 年度大会.
- 5) T. Nagao, S. Tanaka, A. Kurata, N. Kishimoto, Evaluation of selective antibacterial activity of palmitoleic acid with co-cultivation of *Staphylococcus aureus* and *S. epidermidis*., 2017 AOCS Annual Meeting.
- 6) 永尾寿浩 他, 選択的抗菌活性による皮膚菌叢の健全化と皮膚疾患予防を目指した植物油からのパルミトオレイン酸異性体への微生物変換, 日本農芸化学会 2016 年度大会.
- 7) T. Nagao, S. Tanaka, A. Kurata, H. Nakano, N. Kishimoto, Selective antibacterial activity of palmitoleic acid useful for possible prevention of atopic dermatitis., 106th AOCS meeting (2015).
- 8) T. Nagao, S. Tanaka, A. Kurata, N. Kishimoto, Selective antibacterial activity of palmitoleic acid useful for possible prevention of atopic dermatitis., 11th ISBAB meeting (2015).
- 9) 永尾寿浩 他, アトピー性皮膚炎の増悪化予防に寄与する北海道産果実由来脂肪酸の微生物選択的抗菌活性, 日本農芸化学会 2014 年度大会.
- 10) 永尾寿浩 他, 皮膚菌叢の健全化とアトピー性皮膚炎増悪化予防が期待される北海道産シーベリー油の選択的抗菌活性, 第 66 回日本生物工学会大会 (2014).

〔図書〕(計1件)

Enzymatic Purification and Enrichment of Polyunsaturated Fatty Acids and Conjugated Linoleic Acid Isomers., Y. Shimada, T. Nagao, Food Lipid (Chapter 13), p.383-404, (2017)

〔産業財産権〕

出願状況 (計2件)

名称: 脂肪酸組成物およびその製造方法、ならびに該脂肪酸組成物を含有する皮膚外用剤、医薬部外品および化粧品
発明者: 永尾寿浩, 田中重光 (他4名, 2番目)
権利者: 大阪市立工業研究所(現: 大阪産業技術研究所)、産業技術総合研究所、ヤエガキ醗酵技研
種類: 特許権
番号: 特願 2017-034097
出願年月日:
国内外の別: 国内

名称: アクネ菌株選択的抗菌剤
発明者: 永尾寿浩, 田中重光 (他2名, 1番目)
権利者: 大阪市立工業研究所(現: 大阪産業技術研究所)、桃谷順天館

種類：特許権
番号：PCT/JP2017/039144, 特願
2016-214239,
出願年月日：2016年11月1日
国内外の別：国内、海外

〔その他〕
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永尾 寿浩 (NAGAO Toshihiro)
地方独立行政法人大阪産業技術研究所・森
之宮センター・研究室長
研究者番号：30416309

(2) 研究分担者

田中 重光 (TANAKA Shigemotsu)
地方独立行政法人大阪市立工業研究所・森
之宮センター・生物・生活材料研究部・研
究員
研究者番号：20509822

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

岸本 憲明 (KISHIMOTO Noriaki)
近畿大学農学研究院応用生物科学科・教授

倉田 淳志 (KURATA Atsushi)
近畿大学農学研究院応用生物科学科・准教
授