

嫌気性細菌における特異な脂肪酸代謝の解明と応用



京都大学大学院農学研究科 助教 岸野重信

はじめに

近年、肥満に伴う脂質代謝異常症やメタボリックシンドロームの増加にともない、脂質の分解・吸収の主な場となる腸管内における脂質代謝に関心が集まっている。また、腸内細菌がヒトの健康に与える影響への関心も高まってきており、腸内細菌の脂質代謝に関する情報の収集が急務となっている。

我々は、腸内細菌による脂質、特に不飽和脂肪酸の代謝について詳細に解析を行ってきた。これまで微生物学分野における脂肪酸代謝に関連する研究は主に好気性微生物に関する研究が多く、腸内細菌をはじめとする嫌気性細菌の脂肪酸代謝に関する研究はあまり行われていなかった。脂肪酸代謝能を有する嫌気性細菌の探索研究より我々は、腸内細菌の代表株である乳酸菌が食用油脂中に広く含まれているリノール酸(*cis*-9,*cis*-12-octadecadienoic acid (18:2))を機能性脂肪酸である共役リノール酸(CLA)へ変換することを見いだした。さらに、乳酸菌のリノール酸代謝を解析していく過程で、新規な不飽和脂肪酸飽和化代謝の全貌を明らかにすることに成功した。

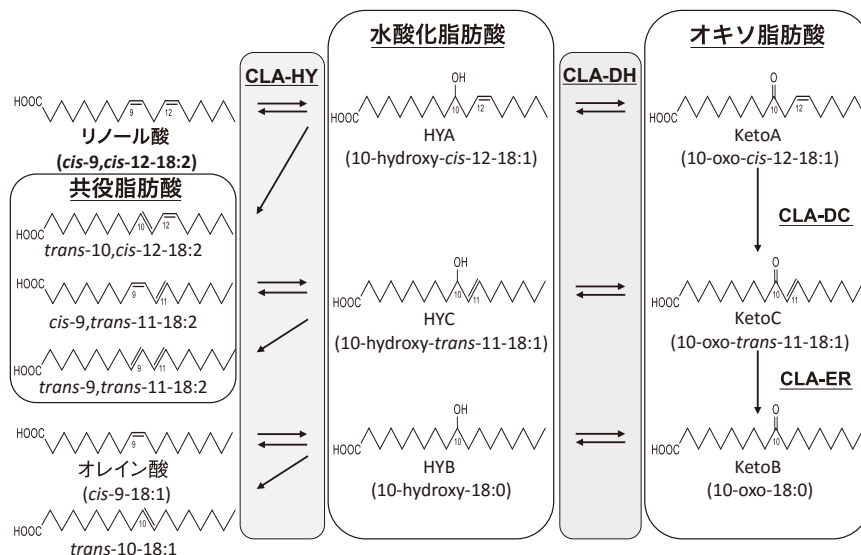
本講演では、嫌気性細菌より見いだされた新規な不飽和脂肪酸代謝についてリノール酸を例に紹介するとともに、見いだされた新規酵素群を活用することにより生産可能となった様々な修飾脂肪酸とその生理機能について紹介する。

1. 乳酸菌による脂肪酸代謝

1-1. 不飽和脂肪酸飽和化代謝

共役リノール酸(CLA)は、分子内に共役した二重結合を有するリノール酸の異性体であり、天然には反芻動物由来製品に微量含まれている。天然に主に存在するCLAは、*cis*-9,*trans*-11-18:2および*trans*-10,*cis*-12-18:2であり、抗がん作用、抗動脈硬化作用、体脂肪低減作用、抗アレルギー作用など様々な生理活性が報告されている。我々は、食経験豊かな乳酸菌を対象に、リノール酸をCLAへと変換する微生物を探索した結果、*Lactobacillus*属、*Enterococcus*属、*Pediococcus*属など様々な乳酸菌が、リノール酸をCLAへと変換することを見いだした。これらの乳酸菌が生産するCLAは、天然に存在する活性型CLAである*cis*-9,*trans*-11-18:2と*trans*-9,*trans*-11-18:2であった。そこでCLA生産能が最も高かった*Lactobacillus plantarum* AKU 1009aを選抜し、本菌におけるCLA生成酵素系の解明を試みた結果、3つのタンパク質(CLA-HY, CLA-DH, CLA-DC)が関与していることを見いだした。これらのタンパク質の機能を明らかにするために、これらのタンパク質をそれぞれ発現する形質転換大腸菌を作

製し、誘導発現させたタンパク質を精製した後、精製酵素を用いて詳細に解析した。その結果本代謝は、リノール酸の水酸化脂肪酸HYA (10-hydroxy-*cis*-12-octadecenoic acid (18:1))への水和、HYAのオキソ脂肪酸KetoA (10-oxo-*cis*-12-18:1)への酸化、KetoAの二重結合の転移によりエノン構造を有するKetoC (10-oxo-*trans*-11-18:1)の生成、それまでの反応を折り返すように進行するKetoCの水酸化脂肪酸HYC (10-hydroxy-*trans*-11-18:1)へのカルボニル還元、HYCの脱水により共役脂肪酸*cis*-9,*trans*-11-および*trans*-9,*trans*-11-18:2を生じる複雑な代謝により構成されることを明らかにした(図1)。さらにHYAは、CLA-HYが触媒する脱水反応により、天然に存在する活性型CLAの一つである*trans*-10,*cis*-12-18:2へと変換されることも見いだした(図1)。またCLA生成に必須である酵素として同定したタンパク質(CLA-DH, CLA-DC)をコードする遺伝子配列(*cla-dh*, *cla-dc*)が隣接して存在し、さらに別の遺伝子(*cla-er*)と共にオペロンを形成していた。そこで、*L. plantarum* AKU 1009aの*cla-er*遺伝子をクローニングし形質転換大腸菌を作製することにより、本タンパク質(CLA-ER)の機能解析を試みた結果、CLA-HY, CLA-DH, CLA-DC, CLA-ERの4つのタンパク質の共存下において、リノール酸がオレイン酸(*cis*-9-18:1)ならびに*trans*-10-18:1へと飽和化されることを見いだした。さらに詳細に解析した結果、CLA-ERが、KetoCの共役エノン構造中の炭素-炭素二重結合を飽和化しKetoB (10-oxo-octadecanoic acid (18:0))を生成することを明らかにした。その後、KetoBは、CLA-DHによりHYB (10-hydroxy-18:0)へとカルボニル還元され、CLA-DHによりオレイン酸および*trans*-10-18:1へと脱水されることを明らかにした(図1)。

図1 乳酸菌*Lactobacillus plantarum*による不飽和脂肪酸飽和化代謝

1-2. 不飽和脂肪酸水合代謝

我々は、上記の不飽和脂肪酸飽和化代謝以外のリノール酸代謝を、乳酸菌を用いて探索したところ、乳酸菌 *Pediococcus* sp. や *Lactobacillus acidophilus* が、リノール酸を CLA-HY 産物である HYA のみならず 13-hydroxy-*cis*-9-18:1 および 10,13-dihydroxy-18:0 へ変換することを見いだした。さらに、*L. acidophilus* NTV001 のゲノムより、リノール酸を 13-hydroxy-*cis*-9-18:1 へ変換する水和酵素 (FA-HY) をコードする遺伝子配列を特定し、FA-HY を発現する形質転換大腸菌の作成にも成功した。

2. 嫌気性細菌による不飽和脂肪酸代謝

脂肪酸代謝能を有する嫌気性細菌の探索研究より *Clostridium bifermentans* が、リノール酸のみならずアラキドン酸や魚油に含まれる EPA の二重結合を異性化し共役脂肪酸へと変換した後、さらに二重結合を飽和化することにより部分飽和脂肪酸へと変換することを見いだした。本菌は、脂肪酸の ω 6 位と ω 9 位 (メチル基末端側から数えて6番目と9番目の炭素原子) の二重結合を認識し、 ω 6 位の二重結合を ω 7 位へ異性化することにより ω 7, ω 9 共役脂肪酸が生産され、さらに ω 9 位の二重結合を飽和化することにより部分飽和脂肪酸が生産されることを明らかにした。本菌は、 ω 6 位と ω 9 位にシス型の二重結合をもつ遊離型脂肪酸を幅広く認識することから、本菌を活用することにより様々な共役脂肪酸、非メチレン型脂肪酸を生産することが可能となった。

3. 乳酸菌由来脂肪酸代謝関連酵素を活用した修飾脂肪酸生産

天然には、化合物内に水酸基を有している“水酸化脂肪酸”や、カルボニル基を有する“オキソ脂肪酸”、二重結合と二重結合の間にメチレン基をも含まない共役構造を有している“共役脂肪酸”、二重結合と二重結合の間に二つ以上のメチレン基を有する“非メチレン型不飽和脂肪酸”など、特異な分子構造を有する希少脂肪酸が存在しており、様々な生理機能を示すことから注目を集めている。しかし、十分な解析が成されるほどの供給源はない。

我々が明らかにした乳酸菌の不飽和脂肪酸代謝には、これらの希少脂肪酸が存在するため、本代謝関連酵素群は、これらの希少脂肪酸を供給するための良きツールとなると考えられた。さらに、乳酸菌のこれらの不飽和脂肪酸代謝は、リノール酸のみならず、炭素数18で、 Δ 9, Δ 12 位にシス型二重結合を有する脂肪酸、例えば、 α -リノレン酸、 γ -リノレン酸、ステア

リドン酸などにも適応可能であることを見いだした。そこで、これらの酵素群を活用し、様々な修飾脂肪酸の生産法ならびに精製法を確立することにより、多種多様な希少脂肪酸を生産することに成功した(図2)。

4. 乳酸菌による不飽和脂肪酸代謝産物の生理機能について

乳酸菌における新たな不飽和脂肪酸代謝の発見と関与する酵素群の機能解析に基づき生産可能となった脂肪酸代謝産物を用いて、腸管バリア機能制御、脂肪酸合成・脂質代謝制御、免疫制御、炎症抑制などの観点から生理機能評価を試みたところ、興味深い機能を見いだした。例えば、水酸化脂肪酸 HYA に腸管上皮バリアの損傷を回復する機能を、また、オキソ脂肪酸 KetoA に PPAR γ を介した脂質代謝制御の可能性を見いだしている。これらの結果は、乳酸菌の不飽和脂肪酸代謝に依存して腸管内に生成する脂肪酸分子種が、宿主であるヒトの健康に何らかの影響を与えている可能性を示唆している。

おわりに

近年、機能性脂肪酸が大変注目を集めているが、十分な解析がなされるほどの供給源がない。脂肪酸の微生物代謝研究を通じて取得した脂肪酸変換酵素は、幾何選択的、位置特異的な変換が可能で酵素であることから、社会ニーズ・産業ニーズに応じた多様な修飾脂肪酸合成の基盤技術となりうることを期待できる。

謝辞 本研究は、京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻発酵生理及び醸造学分野および産業微生物学講座で行われたものです。本研究のご指導、ご支援を賜りました清水昌名名誉教授、横関健三前客員教授、小川順教授に心より御礼申し上げます。また、様々な面からご支援いただいた同研究室の諸先生方、研究員、スタッフ、卒業生、在学生、大学・企業の共同研究者の方々に深く感謝いたします。最後に、本賞にご推薦いただきました日本農芸化学関西支部長・安達修二先生ならびにご支援を賜りました関西支部の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

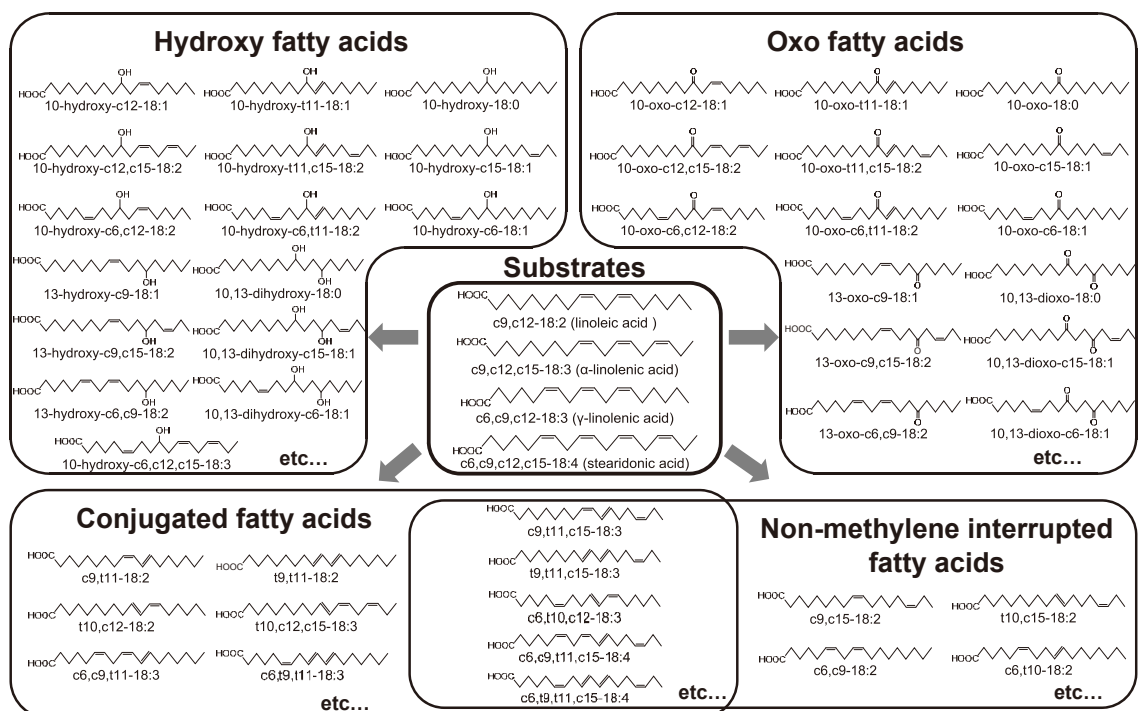


図2 脂肪酸代謝酵素を用いて生産可能な希少脂肪酸