

腸内細菌における特異な脂質代謝の解明と応用

岸野 重信 (京都大学大学院農学研究科)

kishino@kais.kyoto-u.ac.jp

1.はじめに

食品成分の代謝・変換には、ヒト自身の代謝のみならず、腸内細菌による代謝が少なからず関わっている。したがって、腸内細菌による食品成分の代謝を把握し、代謝産物が健康に与える影響を評価することが重要である。

演者は、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よる脂肪酸合成や β 酸化などを対象に行われてきたが、腸内細菌をはじめとする嫌気性細菌における脂肪酸代謝に関する研究は、あまり行われていなかった。その中で演者は、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*-12-18:2) 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、CLA 生産プロセス開発の観点から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詳細を明らかにすることに成功した。

本発表では、リノール酸を例に新規な不飽和脂肪酸代謝について解説するとともに、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を紹介する。

2. 共役リノール酸生産

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¹⁾⁻⁴⁾。演者は、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⁵⁾。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⁵⁾⁻⁷⁾。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^{8),9)}。そこで、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、精製酵素を用いてリノール酸から CLA への代謝経路について詳細に解析した。その結果、リノール酸の水酸化脂肪酸への水和、水酸化脂肪酸の酸化と引き続く二重結合の転移によるエノンの生成を経て、それまでの反応を折り返すように進行するカルボニル還元、脱水反応により CLA を生じる複雑な代謝を明らかにした (図1)。さらに HYA (10-hydroxy-*cis*-12-18:1) 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¹⁰⁾ (図1)。

3. 乳酸菌の不飽和脂肪酸代謝

3.1 不飽和脂肪酸飽和化代謝

ゲノム解読が終了している *L. plantarum* WCFS1 株のゲノム情報を精査したところ、リノール酸代謝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、さらに別のもう一つの遺伝子 (*cla-er*) が隣接してオペロンを形成していることを見いだした。そこで、*L. plantarum* AKU 1009a の *cla-er* 相同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。その結果、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、10-oxo-*trans*-11-18:1 の共役エノン構造中の炭素-炭素二重結合を飽和化し 10-oxo-18:0 を生成することを明らかにした。その後、10-oxo-18:0 は、CLA-DH により 10-hydroxy-18:0 へとカルボニル還元され、CLA-HY 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¹⁰⁾ (図1)。

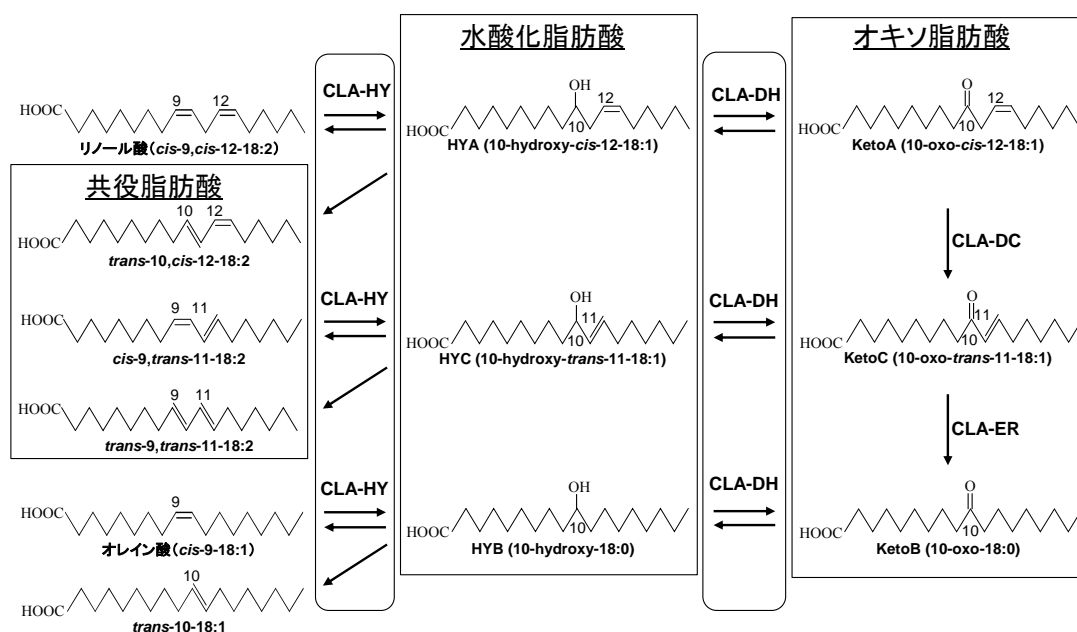


図1 *Lactobacillus plantarum* AKU 1009aにおける不飽和脂肪酸飽和化代謝

3.2 不飽和脂肪酸水和代謝

演者は、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^{11),12)}。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¹²⁾。

4. 乳酸菌の不飽和脂肪酸代謝関連酵素を用いた修飾脂肪酸生産

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一つ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。演者が明らかにした乳酸菌の不飽和脂肪酸飽和化代謝や水和代謝には、代謝産物として水酸化脂肪酸やオキソ脂肪酸、共役脂肪酸、部分飽和脂肪酸（非メチレン型不飽和脂肪酸）などが存在するため、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、 $\Delta 9$ 、 $\Delta 12$ 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を確立した(図 2)。

演者は、これら以外にも、炭素数 18 の食事由来脂肪酸（リノール酸、 α -リノレン酸、 γ -リノレン酸）や炭素数 20 の食事由来脂肪酸（アラキドン酸や EPA）に由来する共役脂肪酸、部分飽和脂肪酸の微生物生産法を開発している¹³⁾⁻¹⁶⁾。

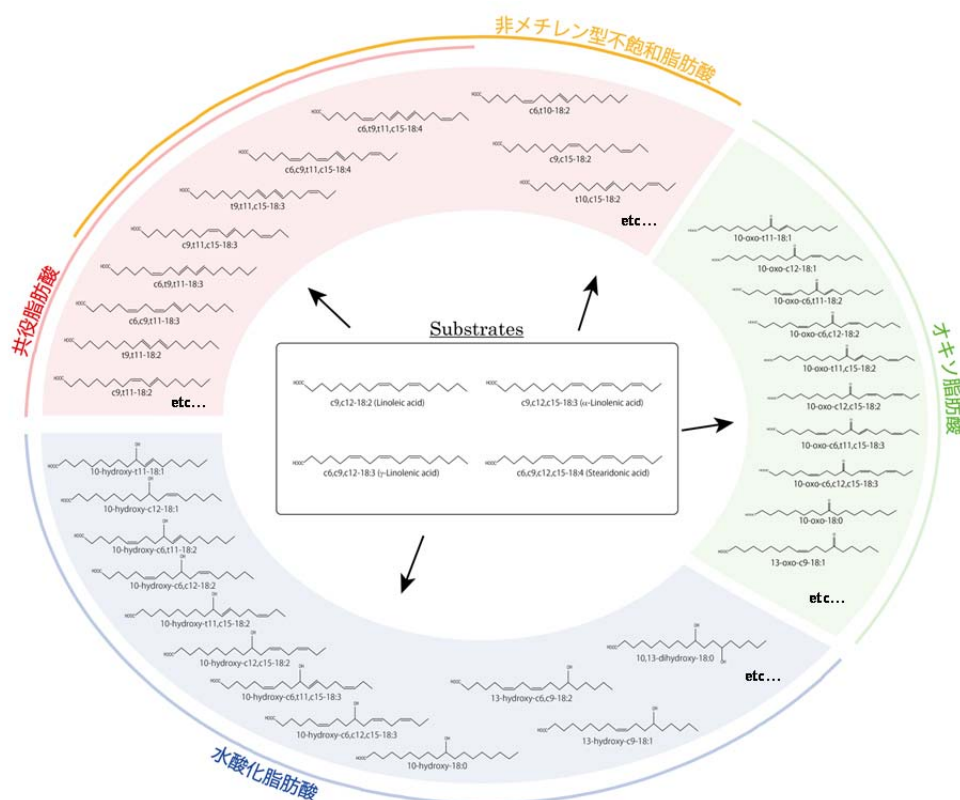


図2 乳酸菌由来の不飽和脂肪酸代謝系酵素を用いることにより生産可能な修飾脂肪酸

5. 脂肪酸代謝産物の生理機能

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¹⁷⁾、また、オキソ脂肪酸 KetoA (10-oxo-cis-12-18:1) 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¹⁸⁾。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。

6.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。脂肪酸の微生物変換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な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、卒業生、在学生、様々な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公益社団法人日本農芸化学会会長・植田和光先生に厚く御礼申し上げます。

引用文献

- 1) Lee K.N., *et al.*: Atherosclerosis, 108:19-25 (1994).
- 2) Park Y., *et al.*: Lipids, 32:853-858 (1997).
- 3) Gudbrandsen O.A., *et al.*: Br. J. Nutr., 102:803-815 (2009).
- 4) Pariza M.W. and Ha Y.L.: “Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms II” Plenum Press, 167 pp (1990).
- 5) Kishino S., *et al.*: J. Am. Oil Chem. Soc., 79:159-163 (2002).
- 6) Ogawa J., *et al.*: Appl. Environ. Microbiol., 67:1246-1252 (2001).
- 7) Kishino S., *et al.*: Biosci. Biotechnol. Biochem., 67:179-182 (2003).
- 8) Kishino S., *et al.*: Biosci. Biotechnol. Biochem., 75:318-322 (2011).
- 9) Kishino S., *et al.*: Biochem. Biophys. Res. Commun., 416:188-193 (2011).
- 10) Kishino S., *et al.*: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 110:17808-17813 (2013).
- 11) Takeuchi M., *et al.*: Eur. J. Lipid Sci. Technol., 115:386-393 (2013).
- 12) Hirata A., *et al.*: J. Lipid Res., 56:1340-1350 (2015).
- 13) Kishino S., *et al.*: Eur. J. Lipid Sci. Technol., 105:572-577 (2003).
- 14) Kishino S., *et al.*: J. Appl. Microbiol., 108:2012-2018 (2010).
- 15) Kishino S., *et al.*: Appl. Microbiol. Biotechnol., 84:87-97 (2009).
- 16) Sakurama H., *et al.*: J. Lipid Res., 55:1855-1863 (2014).
- 17) Miyamoto J., *et al.*: J. Biol. Chem., 290:2902-2918(2015).
- 18) Goto T., *et al.*: Biochem. Biophys. Res. Commun., 459:597-603 (2015).