

嫌気性微生物に特異な脂肪酸変換反応の解明及び共役脂肪酸生産への利用

岸野 重信

(京都大学大学院 農学研究科)

研究の目的

自然界に存在する一般的なジエン酸以上の不飽和脂肪酸は、二重結合と二重結合の間に一個のメチレン基を挟んだ構造を有するが、共役脂肪酸は二重結合と二重結合の間にメチレン基を挟まず単結合で結合した構造を有する。天然において共役脂肪酸は、反芻動物の肉や乳製品、ザクロやニガウリの種子、海藻などに微量ながら含まれており、有用な生理活性が報告されている¹⁻³⁾。特に乳製品などに含まれている共役リノール酸 (CLA; *cis*-9,*trans*-11-octadecadienoic acid (18:2)、*trans*-10,*cis*-12-18:2など)に関する研究が進んでおり、発癌抑制作用、体脂肪低減作用、抗動脈硬化作用、インスリン感受性改善作用、免疫増強作用、骨代謝改善作用などが見いだされてきている^{4,5)}。さらに海藻中に含まれる共役脂肪酸については、アラキドン酸やエイコサペンタエン酸などの高度不飽和脂肪酸由来の共役脂肪酸が数種存在し、これらの共役高度不飽和脂肪酸にも多くの生理活性が報告されている。そこでこれらの共役脂肪酸を含む油脂を用いた、機能性食品、飼料添加物や医薬品の開発が試みられているが、これらの共役脂肪酸は供給量が乏しく、化学合成法による合成も、構造が複雑なため困難とされている。

我々は嫌気性微生物の新規脂肪酸変換反応の探索を行ったところ、*Clostridium bifermentans*がリノール酸を活性型CLAへと位置選択的に変換することを見出した。さらに本菌は、天然有用脂肪酸であるアラキドン酸やエイコサペンタエン酸などを位置特異的かつ幾何選択的に共役脂肪酸へと変換することを明らかにした。そこで本研究では、本菌を用いた脂肪酸変換反応の解明と様々な共役脂肪酸生産への利用を試みた。

方法

嫌気性微生物による新規な脂肪酸変換反応の探索により選抜した *Clostridium bifermentans* の洗浄菌体を用いて各種脂肪酸と共に嫌氣的に反応を行った。反応終了後、脂肪酸を抽出しメチルエステル化した後ガスクロマトグラフィーにて脂肪酸分析に供した。得られた新規脂肪酸について、高速液体クロマトグラフィーにて分取・精製し、各種質量分析やNMR分析などにより生成物の化学構造を明らかにした。また、各反応における基質量と生成物量を経時的に解析することにより反応機構を解析した。

結果

*Clostridium bifermentans*の洗浄菌体を α -リノレン酸や γ -リノレン酸、コロンビン酸、ステアリドン酸などの炭素数18の脂肪酸や、エイコサジエン酸、エイコサトリエン酸、ジホモ- γ -リノレン酸、 ω 3アラキドン酸、アラキドン酸 (AA)、エイコサペンタエン酸 (EPA) などの炭素数20の高度不飽和脂肪酸と嫌氣的に反応に供したところ、未知ピークの出現を確認した。これら生成物の構造解析を行った結果、生成物はそれぞれ

Table 1. Production of conjugated fatty acids by *C. bifermentans*

C18 FAs	Substrate	Products
Linoleic acid	(9Z,12Z-18:2)	(9Z,11E-18:2, 9E,11E-18:2)
α -Linolenic acid	(9Z,12Z,15Z-18:3)	(9Z,11E,15Z-18:3, 9E,11E,15Z-18:3)
γ -Linolenic acid	(6Z,9Z,12Z-18:3)	(6Z,9Z,11E-18:3, 6Z,9E,11E-18:3)
Columbinic acid	(5E,9Z,12Z-18:3)	(5E,9Z,11E-18:3, 5E,9E,11E-18:3)
Stearidonic acid	(6Z,9Z,12Z,15Z-18:4)	(6Z,9Z,11E,15Z-18:4, 6Z,9E,11E,15Z-18:4)
C20 FAs	Substrate	Products
Eicosadienoic acid	(11Z,14Z-20:2)	(11Z,13E-20:2, 11E,13E-20:2)
Eicosatrienoic acid	(11Z,14Z,17Z-20:3)	(11Z,13E,17Z-20:3, 11E,13E,17Z-20:3)
Dihomo- γ -linolenic acid	(8Z,11Z,14Z-20:3)	(8Z,11Z,13E-20:3, 8Z,11E,13E-20:3)
ω -3 Arachidonic acid	(8Z,11Z,14Z,17Z-20:4)	(8Z,11Z,13E,17Z-20:4, 8Z,11E,13E,17Z-20:4)
Arachidonic acid	(5Z,8Z,11Z,14Z-20:4)	(5Z,8Z,11Z,13E-20:4, 5Z,8Z,11E,13E-20:4)
Eicaspentaenoic acid	(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z-20:4)	(5Z,8Z,11Z,13E,17Z-20:5, 5Z,8Z,11E,13E,17Z-20:5)

Z, cis configuration; E, trans configuration

れ対応する共役型脂肪酸であると同定した(Table 1)。

さらに反応時間を長くした場合に、ガスクロマトグラフィー分析において新たにピークが出現することを確認した。リノール酸、AA、EPA を、それぞれ基質として用いた反応について、このような新規ピークをもたらす生成脂肪酸の構造解析を行ったところ、リノール酸からの生成物は *trans*-11-octadecenoic acid、AA から生成物は *cis*-5,*cis*-8,*trans*-13-eicosatrienoic acid、EPA からの生成物は *cis*-5,*cis*-8,*trans*-13,*cis*-17-eicosatetraenoic acid であると同定された。これらの生成物はいずれも基質の二重結合が一つ飽和された脂肪酸である。EPA および AA を基質とした反応について、反応液中の脂肪酸の経時変化をモニターしたところ、基質の減少にともない共役型脂肪酸 (CEPAs、CAAs) が増え、さらに共役型脂肪酸の減少にともない二重結合が一つ飽和化した部分飽和脂肪酸 (Saturated EPA、Saturated AA) が増加することが明らかになった (Fig. 1)。これによりトリエン以上の脂肪酸では非メチレン型高度不飽和脂肪酸の生成が可能となった。非メチレン型高度不飽和脂肪酸については、高度不飽和脂肪酸の代替機能、抗癌剤標的酵素である DNA トポイソメラーゼに対する阻害活性など様々な機能が報告されてきており、

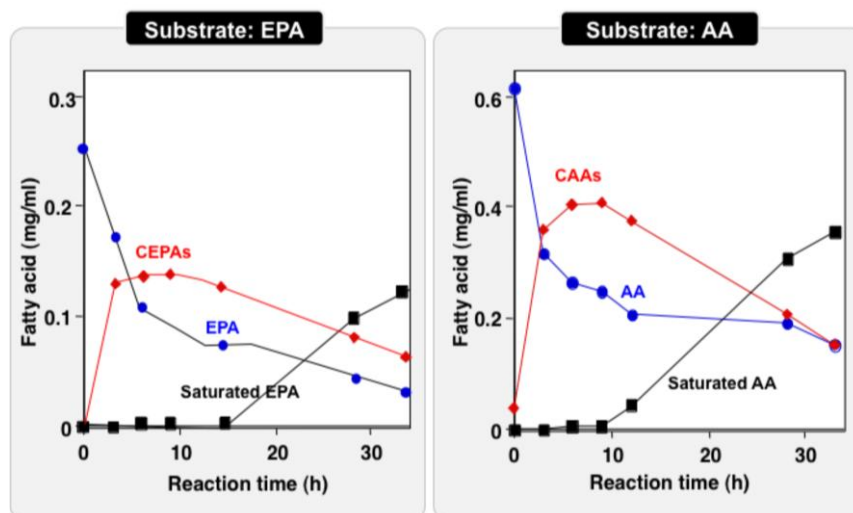
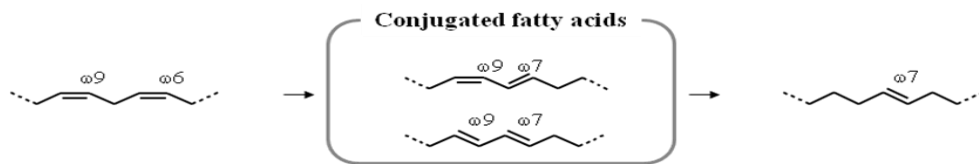


Fig. 1 Time course of EPA and AA transformation by *C. bifermentans*



Scheme 1 Putative pathway of polyunsaturated fatty acid transformation by *C. bifementans*

現在注目されている。

以上の結果より、本菌は、基質のメチル基末端側から数えて6位と9位 (ω 6位と ω 9位) の *cis* 型二重結合を認識し、基質の *cis*- ω 6,*cis*- ω 9 脂肪酸を *trans*- ω 7,*cis*- ω 9 および *trans*- ω 7,*trans*- ω 9 共役脂肪酸へと変換した後、*trans*- ω 7 脂肪酸へと飽和化することが明らかになった (Scheme1)。さらに本菌の無細胞抽出液を超遠心により分画し、各画分を反応に供したところ、可溶性画分に異性化活性が、膜画分に飽和化活性があることを見出した。

文献

- 1) Nagao, S. and Yanagita, T. (2005) Conjugated fatty acids in food and their health benefits. *J. Biosci. Bioeng.* **100**, 152–157.
- 2) Nagao, S. and Yanagita, T. (2008) Bioactive lipids in metabolic syndrome. *Prog. Lipid Res.* **47**, 127–146.
- 3) 岸野重信, (2008) 共役脂肪酸の生理活性. ビタミン, **82**, 655-657
- 4) Pariza, M.W., Park, Y. and Cook, M. E. (2001) The biological activity isomers of conjugated linoleic acid. *Prog. Lipid Res.* **40**, 283–298.
- 5) Toomey, S., McMonagle, J. and Roche, H. (2006) Conjugated linoleic acid: a functional nutrient in the different pathophysiological components of the metabolic syndrome? *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* **9**, 740–747.