

キタムラサキウニ消化管より分離したEPA産生菌の脂肪酸代謝について

誌名	日本水産學會誌
ISSN	00215392
著者	岩浪, 浩充 山口, 敏康 竹内, 昌昭
巻/号	61巻2号
掲載ページ	p. 205-210
発行年月	1995年3月

キタムラサキウニ消化管より分離した EPA 産生菌の脂肪酸代謝について

岩浪浩充, 山口敏康, 竹内昌昭

(1994年4月20日受付)

Fatty Acid Metabolism in Bacteria That Produce Eicosapentaenoic Acid Isolated from Sea Urchin *Strongylocentrotus nudus*Hiromitsu Iwanami,^{*1} Toshiyasu Yamaguchi,^{*1} and Masaaki Takeuchi^{*1}

The biosynthetic pathway of 5Z, 8Z, 11Z, 14Z, 18Z-eicosapentaenoic acid (EPA, C20:5 n-3) in *Vibrio* sp. isolated from sea urchin was studied. EPA was one of the major fatty acid constituents (17.5%) in the bacteria, while the other polyunsaturated fatty acids were trace elements (<1.0%). The radioactivity in the fatty acids was measured by a liquid scintillation counter after separating with argentic impregnated thin layer chromatography. The conversion from [1-¹⁴C]C18:1n-9 to C20:5n-3 was oxygen-dependent and cerulenin-sensitive. In the presence of cerulenin, the accumulation of radioactive trienoic fatty acid increased and tetra- and pentaenoic acids decreased. These results suggest that C18:1n-9 was aerobically desaturated and elongated to C20:5n-3 via C18:3. Since [1-¹⁴C] C20:4n-6 and [1-¹⁴C] C18:3n-3 were converted to C20:5n-3, the desaturation of n-6 to n-3 unsaturated fatty acids occur in both C18 and C20 chain length.

キーワード: エイコサペンタエン菌, 腸内細菌, EPA 産生菌, 脂肪酸代謝, キタムラサキウニ

水産動植物に含まれる脂肪酸は不飽和度が高く, これらの高度不飽和酸は生体膜構成成分としてだけでなく健康機能維持の上で重要な役割を担っている。

5Z, 8Z, 11Z, 14Z, 17Z, eicosapentaenoic acid (EPA^{*2}, 20:5 (n-3)^{*3}) には血小板凝集抑制作用, 血液中の中性脂質低下作用, 血液中の VLDL- および LDL- コレステロール低下作用 HDL- コレステロール増加作用, 血液粘度低下作用, 血圧低下作用, 抗炎症作用, 抗腫瘍作用などの生理活性作用が知られている。^{1,2)} このことから, 医学, 薬学方面からの研究が行われており, また, 機能性食品へ応用も期待されている。^{1,2)}

これまで EPA の高度不飽和脂肪酸は魚介類に広く分布するものとされてきたが, 近年高度不飽和脂肪酸を含む菌類が見いだされ, その産生条件について調べられている。^{3,9)}

一般に細菌は, 不飽和脂肪酸として一価不飽和脂肪酸を含有している。そのため細菌における不飽和脂肪酸に関する研究は, ほとんどが一価不飽和脂肪酸についてのものであり, その代謝について詳細に調べられている。¹⁰⁾

しかし, 近年まで高度不飽和脂肪酸を菌体脂肪の構成成分として含有する細菌の存在は知られていなかったため, その代謝についての研究は皆無に近い。報告されている EPA 産生菌においても高度不飽和脂肪酸として EPA のみが存在し, オレイン酸から EPA に至る中間代謝産物と考えられる脂肪酸をほとんど含有していないなどその脂肪酸組成も特徴的である。

そこで本研究では, キタムラサキウニ消化管から分離した EPA 産生菌を用い, 放射性標識脂肪酸を用いたトレーサー実験による脂肪酸代謝の解明, 特に不飽和脂肪酸の生成過程の解明を行うことを目的とした。

実験方法

材料 キタムラサキウニ消化管により探索した EPA 産生菌 *Vibrio* sp. を用いた。

試薬 [1-¹⁴C] オレイン酸 (1.786 pmol/3.7 kBq), [1-¹⁴C] α -リノレン酸 (1.923 pmol/3.7 kBq), [1-¹⁴C] アラキドン酸 (1.887 pmol/3.7 kBq) は, NEN から入手した。セルレニンおよび標準脂肪酸メチルエステルは SIGMA より購入した。

^{*1} 東北大学農学部水産化学研究室 (Laboratory of Marine Biochemistry, Faculty of Agriculture, Tohoku University, Tsutsumidori Amamiya, Sendai, Miyagi 981, Japan).

^{*2} IUPAC では icosapentaenoic acid (IPA) としているが, 本論文では一般に使われている EPA とする。

^{*3} 脂肪酸を炭素数 X, 二重結合の数 Y として X:Y で表すことにする。

培地の組成 イーストエキス 0.5%, 精製寒天末 2.5% (平板培地のみ加えた) を, 人工海水 (Jamarin S, ジャマリンラボラトリー): 蒸留水=1:1(v/v) に溶解し, pH 7.5 に調整したものを, 培地として用いた。

菌体の培養 平板培地から菌体を 2% ペプトン溶液 (蒸留水:人工海水=1:1, v/v に溶解) に接種し, 20°C で 1 日間静置培養した。この培養液を液体培地に接種し, 20°C で 24 時間振とう培養した。

菌体総脂質の脂肪酸組成の分析 培養液を遠心分離 (5,000 rpm, 10 min) して集菌した。この菌体を洗浄後, クロロホルム-メタノール混液 (2:1, v/v) で脂質を抽出し, 窒素気流下, 35°C で濃縮乾固し総脂質とした。この総脂質より塩酸-メタノールで, 脂肪酸メチルエステルを調製した。この脂肪酸メチルエステルをガスクロマトグラフィー (GLC) に供して脂肪酸組成を求めた。装置は日立 163 型を用い, カラムは CPSIL 88 (50 m×0.25 mm i. d.), カラムの温度は 100 から 200°C まで 4°C/min の速さで昇温した。

脂肪酸の *in vivo* における転換 菌体を, 50 mM Tris-HCl 緩衝液, pH7.5 (400 mM NaCl, 10 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 M グリセロール含有)¹¹⁾ に懸濁し, 10 分間予備加温した後, 10 μ l のエタノールに溶解した 3.7 kBq の放射性脂肪酸を加え 20°C で培養した。メタノールで反応を停止させた。

Table 1. Fatty acid composition of total lipid in *Vibrio* sp.

Fatty acid	Composition (%)
12:0	0.5
13:0	8.3
14:0	4.2
15:0 iso	10.7
15:0 anteiso	4.0
15:0	3.1
16:0	16.4
17:0	2.3
18:0	1.1
16:1n-7	13.2
17:1	3.8
18:1n-7	7.4
18:1n-9	1.1
20:1n-9	tr
18:2n-6	0.5
20:2	0.3
18:3n-3	tr
18:3n-6	0.1
20:3n-6	0.1
20:4n-3	0.7
20:4n-6	0.3
20:5n-3	17.5

tr: less than 0.1%.

18:1n-9 の *in vivo* における転換のセルレニン添加による影響 セルレニンを添加して鎖長延長を阻害した場合の基質脂肪酸の転換を調べた。¹²⁾ 菌体を含む緩衝液にセルレニン 500 μ g (10 μ l のエタノールに溶解) を添加し, 前項と同様に, 30 分間培養を行った。

***In vivo* における不飽和脂肪酸生成に対する酸素の影響** 不飽和脂肪酸の生成に及ぼす酸素の影響を調べるため脱酸素および酸素存在下で 18:1n-9 からの多価不飽和脂肪酸の生成を調べた。¹²⁾ 遠沈管に入れた菌体を含む緩衝液をハンディアスピレーターで 10 分間脱気後, 窒素気流下に 10 分間放置した。その後遠沈管の口をゴムシートで覆い, 脱酸素の状態では 18:1n-9 を用い前項と同様に 30 分間培養を行った。18:1n-9 はゴムシートを通し注射針で添加した。

硝酸銀薄層シートの作成¹³⁾ 5% 硝酸銀アセトニトリル溶液に薄層シート (Si Empore TLC シート, 3M, USA) を浸し, 20 分後に取り出し風乾した。その後 105°C で 30 分間活性化し, 硝酸銀薄層プレート (TLC) を作成した。以上の操作はすべて暗所で行った。

放射性脂肪酸の分析 反応停止後, 脂質を抽出し, 脂肪酸をメチルエステル化した。この脂肪酸メチルエステルの 1/10 量を硝酸銀 TLC にスポットし, その上に標品の脂肪酸メチルエステル (20:1, 20:2, 20:3, 20:4, および 20:5 をそれぞれ 20% 含有) 10 μ g をスポットし, ヘキサン-エーテル-酢酸混液 (60:40:1, v/v) で展開した。展開後ドラフト内で, 0.01% プリムリン溶液 (アセトン:水=4:1, v/v に溶解) を噴霧した後, 365 nm の紫外線のもとでスポットを確認した。このスポットの部分を取り取り, 液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定し, 基質の比放射能から次式により生成量を求めた。

生成量 (pmol/mg cell) = 基質の比放射能

×生成した脂肪酸の放射活性 (dpm) ÷ 菌体量 (mg)

アラキドン酸から EPA への変換の確認は硝酸銀 TLC プレートのラジオルミノグラフィーおよびラジオ高速液体クロマトグラフィー (ラジオ HPLC) により行った。展開後の TLC とイメージングプレートを 12 時間接触させ, パイオイメージングアナライザ (BAS2000, 富士写真フイルム) によって放射能を検出した。¹⁴⁾ ラジオ HPLC は, 以下の条件で測定した。カラム: Spherisorb ODS (4.6 mm×250 mm), 溶出溶媒: アセトニトリル 1.0 ml/min, 検出器: RAMONA 92 (エムエス機器), Ca-F シンチレーターセル, および UV (192nm)。¹⁵⁾

結 果

総脂質の脂肪酸組成 総脂質の脂肪酸組成を Table 1 に示した。主要な脂肪酸は炭素数 13 から 18 の飽和脂肪酸, 炭素数 16 から 18 の一価不飽和脂肪酸および EPA で

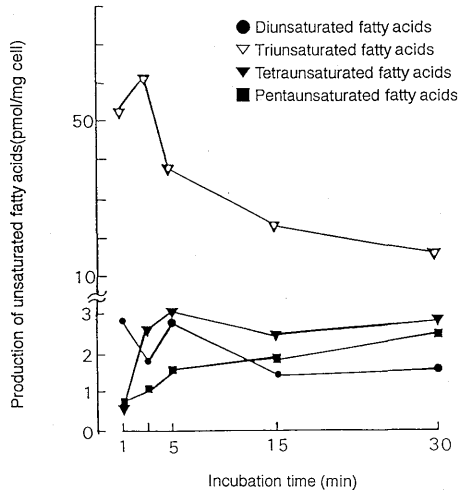


Fig. 1. Conversion of [$1-^{14}\text{C}$] 18:1n-9 to unsaturated fatty acids.

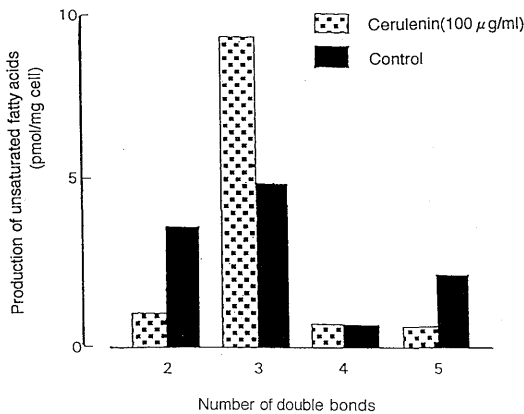


Fig. 2. Inhibition of elongation in [$1-^{14}\text{C}$] 18:1n-9.

あった。C18:2からC20:4に至る多価不飽和脂肪酸は、いずれも1%以下であった。

硝酸銀 TLCによる脂肪酸メチルエステルの分画 R_f 値0.74に一価不飽和脂肪酸および飽和脂肪酸, R_f 値0.63に二価不飽和脂肪酸, R_f 値0.50に三価不飽和脂肪酸, R_f 値0.29に四価不飽和脂肪酸, R_f 値0.10に五価不飽和脂肪酸がそれぞれ検出された。

C18:1n-9の転換の経時変化 [$1-^{14}\text{C}$]C18:1n-9を用いて、1分から30分間培養し、その間に生成した脂肪酸量をFig. 1に示した。二価不飽和脂肪酸は1分で最も高い値を示し2.84 pmol/mg cellであった。三価不飽和脂肪酸は、1分から2分にかけて増加し、2分では61.50 pmol/mg cellと最も高い値を示し、その後時間の経過とともに減少していった。四価不飽和脂肪酸は時間の経過とともに増加し、5分で最も高い値を示し3.04 pmol/mg cellとなり、その後15分では減少し、30分では再び増加

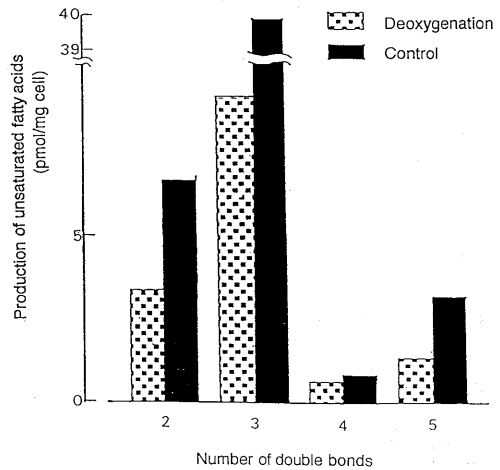


Fig. 3. Effect of oxygen in desaturation of [$1-^{14}\text{C}$] 18:1n-9.

した。五価不飽和脂肪酸(20:5n-3)は時間の経過とともに増加し、30分で2.42 pmol/mg cellと最も高い値を示した。

C18:1n-9脂肪酸の転換に対するセルレニンの影響 セルレニンを添加し培養した結果(Fig. 2), 三価不飽和脂肪酸の生成量は無添加の対照と比べ約2倍の9.28 pmol/mg cellであった。これに対し、四価以上の不飽和脂肪酸の生成量は対照以下であり、明らかに鎮長延長は阻害された。

C18:1n-9脂肪酸の転換におよぼす酸素の影響 脱酸素処理して培養した結果(Fig. 3), すべての不飽和脂肪酸の生成量は対照に比べ低い値を示し、五価不飽和脂肪酸(20:5n-3)は、対照と比べ約1/2の1.38 pmol/mg cellであった。

C18:3n-3脂肪酸の転換 [$1-^{14}\text{C}$]C18:3n-3の他の脂肪酸への転換(Table 2)は一部は飽和脂肪酸へ変換されたものの、大部分は四価不飽和脂肪酸となり、五価不飽和脂肪酸の生成量は四価不飽和脂肪酸のその1/18であった。

C20:4n-6脂肪酸の転換 [$1-^{14}\text{C}$]C20:4n-6から他の脂肪酸への転換を調べた結果(Table 3), 飽和脂肪酸、一価不飽和脂肪酸、および二価不飽和脂肪酸への転換は認められなかった。三価不飽和脂肪酸は、わずかに0.64 pmol/mg cell検出され、五価不飽和脂肪酸(C20:5n-3)は、32.01 pmol/mg cell検出された。ラジオルミノグラフィ(Fig. 4)により R_f 値でEPAに相当する画分(Fig. 4B)に放射能の存在が確認された。また、この部分より脂肪酸メチルエステルを溶出し標品(C20:1, C20:2, C20:3, C40:4, およびC20:5のメチルエステル, SIGMA)とともにおよびラジオHPLC(Fig. 5)により

Table 2. Conversion of [^{14}C] 18:3 n-3 to other fatty acids (pmol/mg cell)

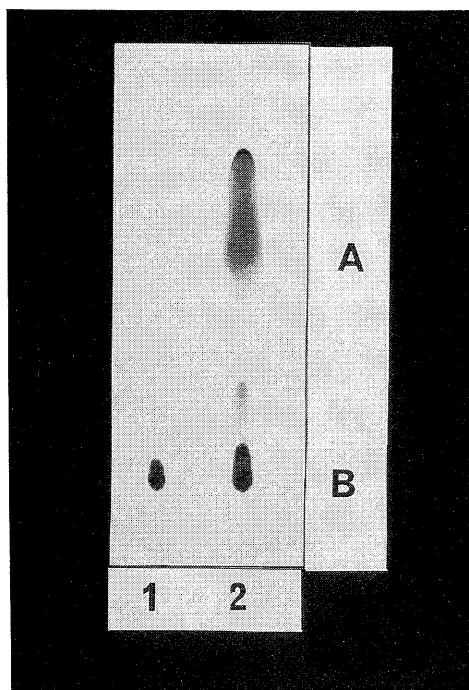
Number of double bonds	1*	2	4	5
Production of fatty acids	3.86	0.29	44.42	2.48

* Containing saturated fatty acids.

Table 3. Conversion of [^{14}C] 20:4n-6 to other fatty acids (pmol/mg cell)

Number of double bonds	1*	2	3	5
Production of fatty acids	0	0	0.64	32.01

* Containing saturated fatty acids.

**Fig. 4.** Autoradiographic image of fatty acid methyl ester isolated from *Vibrio* sp. incubated with [^{14}C] 20:4n-6.

TLC: AgNO₃ impregnated HPTLC plate silicagel 60. Solvent: Hexane-diethyl ether-acetic acid (60:40:1, v/v). 1: Fatty acid methyl ester (region B) purified from sample 2. 2: Fatty acid methyl esters from *Vibrio* sp.

分析し, EPA への放射能の取り込みを確認した。

考 察

本菌株の総脂質を構成する主要な脂肪酸は (Table 1), 炭素数 13 から 18 の飽和脂肪酸, 炭素数 16 から 18 の一価不飽和脂肪酸および C20:5n-3 であり, 矢沢らにより分離された EPA 産生菌の脂肪酸組成とほぼ同様であった。³⁻⁶⁾ また C20:5n-3 を除いた主要な脂肪酸の種類は, 一般のグラム陰性細菌のものと類似していた。^{11, 12, 16)} 総

脂質の脂肪酸組成では微量であった, 二価, 三価, および四価不飽和脂肪酸への C18:1n-9 の転換量の経時的変化から (Fig. 1), C18:1n-9 が順次不飽和化され, 五価不飽和脂肪酸 (C20:5n-3) を最終産物とすることが確認された。さらに, C18:1n-9 から C20:5n-3 への転換は, セルレニンの添加で鎖長延長が阻害され三価不飽和脂肪酸の生成量の増加が認められた (Fig. 2) ことから C18:1n-9 から C20:5n-3 への転換は C18:3 を経由することが確認された。また脱酸素条件下では C18:1n-9 の不飽和脂肪酸への転換は無処理の対照に比べ低くなっていた (Fig. 3)。すなわち C18:1n-9 から酸化的不飽和化と鎖長延長を経て, C20:5n-3 が生合成されることが明らかとなった。そこで C18:3n-3 の不飽和脂肪酸への取り込みを見たところ (Table 2), 四価不飽和脂肪酸 (C18:4n-3, C20:4n-3 と推察される) への高い割合の転換と, C20:5n-3 の転換を確認した。C18:1n-9 を用いた実験では四価飽和脂肪酸への高い割合の転換は認められず, その生成量は五価不飽和脂肪酸 (C20:5n-3) とほぼ同量から 2.4 倍程度であった。セルレニン添加により生成量が増大した三価不飽和脂肪酸が C18:3n-3 であれば, C18:1n-9 の転換においても四価不飽和脂肪酸への高い割合の転換が認められるはずであるが, そのようなことは起こらなかった。これらのことを考えあわせると, セルレニン添加で蓄積した三価不飽和脂肪酸の多くは, C18:3n-3 ではなく, C18:3n-6 と考えられる。さらに C20:4n-6 の大部分は C20:5n-3 へ転換することが確認できたことから (Table 3), C20:4n-6 が C20:5n-3 の前駆体として存在し, 本菌株が Δ 17 不飽和化酵素をもっているということが確認された。 Δ 17 不飽和化酵素は, 卵菌類 *Saprolegnia parasitica*¹⁷⁾ や糸状菌の *Mortirella* sp.^{8, 9)} で存在することが知られていたが, 細菌において Δ 17 不飽和化酵素の存在を確認したのは本研究が初めてである。以上のことから, 18:1n-9 から 20:5n-3 に至る生合成は, 18:3n-6 を経由するものと推定され, これより生成した 20:4n-6 を経由することを確認した。また 18:3n-3 が 20:5n-3 に転換したことから (Table 2), 高等動物に

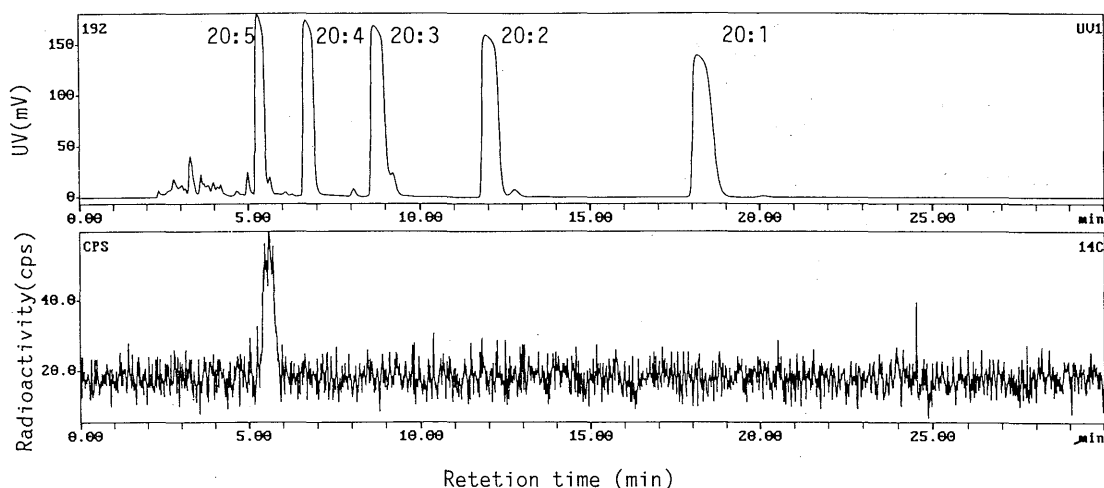


Fig. 5. Radiochromatogram of sample 1 eluted with authentic fatty acid methyl esters.

Column: Spherisorb ODS (4.6 mm×250 mm). Solvent: Acetonitrile (1 ml/min). Detector: Radio detector (Ramona 92). UV detector (192 nm).

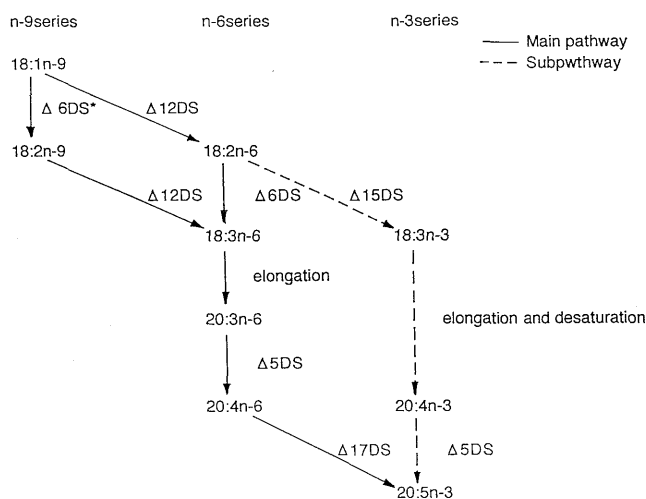


Fig. 6. Possible fatty acid biosynthetic pathway from 18:1n-9 to 20:5n-3. *Desaturase.

における 20:5n-3 の一般的生合成経路である n-3 高度不飽和脂肪酸を前駆体とする生合成経路も、本菌体が副経路として有していることを明らかにした。さらに 18:3n-3 が四価不飽和脂肪酸組成へ高い割合で転換するのに対し、菌体の脂肪酸組成では EPA の割合と比較し 20:4n-3 の割合が低い。これは 18:2n-6 から 18:3n-3 への転換が弱いことを示しているものと考えられる。以上のことから 18:1n-9 から 20:5n-3 に至る脂肪酸生合成経路は Fig. 6 のようにまとめられた。

文 献

- 1) 菅野道広, 池田郁男: 必須脂肪酸. 油化学, **40**, 831-837 (1991).
- 2) 鬼頭 誠: 高度不飽和脂肪酸の生理機能. 油化学, **40**, 838-844 (1991).
- 3) 矢沢一良: 海洋細菌による EPA の生産と利用. *Bio Industry*, **6**, 491-501 (1988).
- 4) 矢沢一良: 新種海洋細菌からの EPA 生産. 化学と工業, **41**, 1137-1139 (1988)
- 5) K. Yazawa, K. Araki, N. Okazaki, K. Watanabe, C. Ishikawa, A. Inoue, N. Numao, and K. Kondo: Production of eicosapentaenoic acid by marine bacteria. *J. Biochem.*, **103**, 5-7 (1988).
- 6) K. Yazawa, K. Araki, K. Watanabe, C. Ishikawa, A. Inoue, K. Kondo, S. Watanabe, and K. Hashimoto: Eicosapentaenoic acid productivity of the bacteria isolated from fish intestines. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **54**, 1835-1838 (1988).
- 7) Y. Shinmen, H. Yamada, and S. Shimizu: Production of arachidonic acid by *Mortierella elongata* IS-5. *Agric Biol. Chem.*, **51**, 785-790 (1987).

- 8) Y. Shinmen, H. Yamada, S. Shimizu, K. Akimoto, and H. Yamada: Production of eicosapentaenoic acid by *Mortierella fungi*. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **62**, 1455-1459(1988).
- 9) S. Shimizu, H. Kawashima, K. Akimoto, Y. Shinmen, and H. Yamada: Microbial conversion of an oil containing α -linoleic acid to an oil containing eicosapentaenoic acid. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **66**, 342-347 (1989).
- 10) A. J. Fulco: Fatty acid metabolism in bacteria. *Prog. Lipid Res.*, **22**, 133-160 (1983).
- 11) H. Okuyama, N. Okajima, S. Sasaki, S. Higashi, and N. Murata: The *cis/trans* isoamerization of the double bond of a fatty acid as a strategy for adaptation to changes in ambient temperature in the psychrophilic bacterium, *Vibrio* sp. strain ABE-1. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1084**, 13-20 (1991).
- 12) M. Wada, N. Fukunaga, and S. Sasaki: Effect of growth temperature on phospholipid and fatty acid composition in a psychrotrophic bacterium, *Pseudomonas* sp. strain E-3. *Plant Cell Physiol.*, **28**, 1209-1217 (1987).
- 13) 山田晃弘: 植物脂質の分析, 植物脂質代謝実験法, 生物化学実験法 24 (瓜谷郁三, 駒野 徹, 志村憲助, 中村道徳, 船津 勝編), 学会出版センター, 東京, 1989, pp. 36-37.
- 14) 森 啓司, 浜岡 勤: IP オートラジオグラフィ・システム (BAS). 蛋白質 核酸 酵素, **39**, 1877-1887 (1994).
- 15) M. I. Aveladano, M. VanRollins, and L. A. Horrocks: Separation and quantitation of free fatty acids and fatty acid methyl esters by reverse phase high pressure liquid chromatography. *J. Lipid Res.*, **24**, 83-93 (1983).
- 16) 矢野郁也: 細菌学領域における新しいクロマトグラフィー技術の応用. クロマトグラフィーにおける細菌の迅速同定—新しいクロマトグラフィー技術の応用 (矢野郁也・菱田真三郎編), 葉根出版, 東京, 1988, pp. 21-38.
- 17) J. L. Gellerman and H. Schlenk: Methyl-directed de saturation of arachidonic to eicosapentaenoic acid in the fungus, *Saprolegnia parasitica*. *Biochim. Biophys. Acta.*, **573**, 23-30 (1979).