

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	Juo-Ying Chen
論文題目	Functional characterization of the enzymes involved in conjugated fatty acid metabolism in <i>Paraclostridium bifermentans</i> JCM 1386 ^T (<i>Paraclostridium bifermentans</i> JCM 1386 ^T における共役脂肪酸代謝に関与する酵素群の機能解析)		
(論文内容の要旨)			
腸内細菌は、その代謝活性により生じる代謝物を介して、ヒトにとって様々な有益な効果をもたらすと報告されている。例えば、腸内細菌代謝によりリノール酸（18:2 LA）から生じる代謝物である水酸化脂肪酸が抗肥満作用や腸管上皮バリア障害の改善効果を示すこと、また、共役脂肪酸構造を有するLA由来の代謝物である共役リノール酸の一種 <i>cis</i>-9,<i>trans</i>-11-octadecadienoic acid（<i>cis</i>-9,<i>trans</i>-11-18:2; CLA1）が抗炎症効果や抗動脈硬化作用を示すことなど、人にとって有益な脂肪酸代謝物の産生が報告されている。 本論文では、共役脂肪酸に注目した。共役脂肪酸は天然にはごく微量しか存在せず、生産法としてはアルカリ異性化法が開発されているが、本方法では複数の異性体の混合物が生じる。このように、共役脂肪酸を異性体選択的に生産するための技術が不十分であったため、共役脂肪酸に対する生理機能の解析は限定されたものとなっていた。 これまでに、<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>が反芻動物の第一胃においてLAを<i>trans</i>-バクセン酸へと飽和化し、代謝中間体としてCLA1を産生することが報告されている。本論文の先行研究においては、不飽和脂肪酸を飽和化する菌株として<i>Paraclostridium bifermentans</i> JCM 1386^Tが選抜され、本菌が炭素数18（C18）脂肪酸だけでなく、炭素数20（C20）脂肪酸であるエイコサペンタエン酸（EPA; 20:5）やアラキドン酸（AA; 20:4）を飽和化することが見いだされている。そのため、本菌のC20脂肪酸飽和化代謝においても、<i>B. fibrisolvens</i>のように、共役脂肪酸が代謝中間体となっていることが想定された。そこで、本論文では、<i>P. bifermentans</i> JCM 1386^TにおけるC18及びC20の高度不飽和脂肪酸（PUFA）の飽和化代謝の解明、共役脂肪酸生産に関与する酵素群の機能解析、ならびに、それらの応用を目的とした研究を展開した。			
第1章では、<i>P. bifermentans</i> JCM 1386^TにおけるPUFA飽和化代謝の解析を試みた。<i>P. bifermentans</i> JCM 1386^Tを用いてEPAを基質とした休止菌体反応を行ったところ、未知化合物であるUK1とUK2の生成が確認された。それぞれの化合物を単離精製し、質量分析、核磁気共鳴などの各種分析に供することにより、UK1ならびにUK2を<i>cis</i>-5,<i>cis</i>-8,<i>cis</i>-11,<i>trans</i>-13,<i>cis</i>-17-20:5（CEPA1）ならびに<i>cis</i>-5,<i>cis</i>-8,<i>trans</i>-11,<i>trans</i>-13,<i>cis</i>-17-20:5（CEPA2）と同定した。さらに、飽和化代謝が顕在化する培養条件で得た菌体を用い、休止菌体反応の経時変化を観察した結果、CEPA1ならびにCEPA2が、EPA飽和化代謝における中間体であることを見いだした。加えて、CEPA1を基質とした反応においてCEPA2の生産を確認したことから、CEPA2がCEPA1から生成していることを明らかにした。 また、多様な共役脂肪酸の生産に向け、本菌の無細胞抽出液を用いた基質特異性の検討を行った結果、AAが<i>cis</i>-5,<i>cis</i>-8,<i>cis</i>-11,<i>trans</i>-13-20:4（CAA1）および<i>cis</i>-5,<i>cis</i>-8,<i>trans</i>-11,<i>trans</i>-13-20:4（CAA2）に異性化されること、また、<i>cis</i>-ω6,<i>cis</i>-ω9二重結合を有するその他のC18やC20 PUFAが、対応する<i>trans</i>-ω7,<i>cis</i>-ω9および<i>trans</i>-ω7,<i>trans</i>-ω9の二重結合を有する共役脂肪酸に異性化されることを明らかにした。			
第2章では、PUFAの非共役二重結合を共役二重結合へと異性化する<i>P. bifermentans</i> JCM 1386^T由来の新規脂肪酸イソメラーゼの機能解析を試みた。			

近年、*Bifidobacterium breve* CCFM683においてLAをCLA1へ異性化するリノール酸イソメラーゼ（BBI）が報告され、 α -リノレン酸や γ -リノレン酸もそれぞれ対応する共役脂肪酸へと異性化されることが確認されている。そこで本章では、BBIのアミノ酸配列情報を活用して、*P. bifermentans* JCM 1386^T由来の脂肪酸イソメラーゼを同定することを試みた。

飽和化代謝の初発反応である異性化を触媒する脂肪酸イソメラーゼ（PBI）を、*P. bifermentans* JCM 1386^Tより同定し、その機能を解明した。その結果、PBIが*cis*- ω 6,*cis*- ω 9二重結合を有するPUFAを*trans*- ω 7,*cis*- ω 9を有する共役脂肪酸へと異性化することを明らかにした。加えて、共役脂肪酸の高生産に向けた反応条件の検討を行った。PBIをコードする遺伝子を導入した形質転換大腸菌60 mgを含む1 mL反応系においては、0.77 mgの基質LAから0.73 mgのCLA1を異性体選択的に生産することができた。また、0.78 mgの基質AAからは、0.19 mgのCAA1を生産することができた。

第3章では、共役脂肪酸における二重結合の*cis-trans*異性化を触媒する*P. bifermentans* JCM 1386^T由来の新規脂肪酸イソメラーゼの機能解析を試みた。

P. bifermentans JCM 1386^Tの休止菌体を用いた反応においては、CEPA1のCEPA2への異性化に加えて、CLA1の*trans*-9,*trans*-11-octadecadienoic acid（*trans*-9,*trans*-11-18:2; CLA2）への異性化が確認された。そこで、共役脂肪酸における二重結合の*cis-trans*異性化を触媒するイソメラーゼの同定を目的として、CLA1のCLA2への異性化を指標に酵素精製を行った。

菌体を超音波破碎後、遠心分離により無細胞抽出液を調製した。さらに、超遠心分離により膜画分を除き、高速タンパク質液体クロマトグラフィー（FPLC）を用いて可溶性画分からタンパク質精製を行った。5段階の精製を経て、精製酵素を得たのち、そのN末端アミノ酸配列の解析を行った。得られた配列を本菌のゲノム配列に検索した結果、PBctI-1とPBctI-2をイソメラーゼ候補として選抜し、それぞれをコードする遺伝子を導入した形質転換株を構築した。作製した形質転換株を用いてHis-tagに親和性を示すアフィニティカラムで精製を行い、得られた精製酵素を用いてCLA1を基質とする反応を行った。その結果、PBctI-1とPBctI-2においてCLA1をCLA2へと異性化する活性が見いだされた。さらに、共役脂肪酸生産ツールとしての応用を目的に、基質特異性を調べたところ、*trans*- ω 7,*cis*- ω 9共役脂肪酸を*trans*- ω 7,*trans*- ω 9共役脂肪酸へと異性化することに加え、*trans*-10,*cis*-12-18:2を*trans*-10,*trans*-12-18:2へと異性化することが見いだされた。

本論文で同定した酵素群の遺伝子配列を用いて腸内細菌メタゲノム情報を解析することで、個人ごとの腸内細菌叢における共役脂肪酸生産の潜在的な可能性を推定することが可能となると考えられる。さらに、本論文で最適化した反応条件を用いて、微生物変換による共役脂肪酸の生産が可能になると考えられる。

以上のように、本論文は、*P. bifermentans* JCM 1386^TにおけるPUFA飽和化代謝の理解を深め、PUFAの異性化による共役脂肪酸生産法の開発に有用な情報を提供するものである。

注)論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(論文審査の結果の要旨)

食事成分の腸内細菌による代謝の理解は、健康維持に資する情報を提供する。例えば、代謝系に関与する酵素の遺伝子情報と腸管メタゲノム情報の活用により、個々人の腸内細菌叢における代謝物産生能の有無、ひいては、食事成分の潜在機能の享受の程度が理解される。また、腸内細菌の代謝活性、あるいは関与する酵素を用いることにより、機能性代謝物を合成することが可能となる。本論文では、食事由来する高度不飽和脂肪酸 (PUFA) の腸内細菌による飽和化代謝を解析し、詳細な代謝経路を解明するとともに、関連する酵素の機能解析、ならびに、機能性代謝物生産への応用を展開した。評価すべき点として以下の3点が挙げられる。

1. *Paraclostridium bifermentans* JCM 1386^Tにおける不飽和脂肪酸の飽和化代謝に関して、*cis*- ω 6,*cis*- ω 9二重結合を持つC18およびC20のPUFAが、*trans*- ω 7,*cis*- ω 9または*trans*- ω 7,*trans*- ω 9構造を持つ共役脂肪酸に異性化され、さらに ω 9位の飽和化を経て*trans*- ω 7構造を有する脂肪酸に変換されることを明らかにした。
2. *Bifidobacterium breve* CCFM683由来の脂肪酸イソメラーゼのアミノ酸配列に基づき、PUFAの非共役二重結合を共役二重結合へ異性化する*P. bifermentans* JCM 1386^T由来の脂肪酸イソメラーゼ (PBI) を同定した。また、共役脂肪酸生産に向けた反応条件の検討を行い、PBIを高発現する形質転換大腸菌の休止菌体を用いるLAのCLA1への効率的変換法を構築した。
3. *P. bifermentans* JCM 1386^Tから、共役脂肪酸における二重結合の*cis*-*trans*異性化を触媒するイソメラーゼを酵素精製により同定した。精製酵素により、*trans*- ω 7,*cis*- ω 9共役脂肪酸が*trans*- ω 7,*trans*- ω 9共役脂肪酸へと異性化されることを確認した。加えて、*trans*-10,*cis*-12-octadecadienoic acidを基質とした反応において、*trans*-10,*trans*-12異性体への異性化を確認した。

以上のように、本論文は、食事由来するPUFAの腸内細菌による飽和化代謝を解析し、機能性化合物である共役脂肪酸が代謝中間体となっていることを明らかにしたとともに、その代謝に関与する種々の異性化酵素の同定、機能解明、さらには、それらの酵素を用いる機能性共役脂肪酸合成法の確立を達成したものであり、その成果は、発酵生理学、分子微生物科学、応用微生物学の発展に寄与するところが大い。

よって、本論文は博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、令和7年10月29日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士 (農学) の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

また、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降 (学位授与日から3ヶ月以内)