

皮膚菌叢をコントロールする有用脂質の生産工場ビフィズス菌の開発

北海道大学 大学院工学研究院応用化学部門

菊川 寛史

1. はじめに

近年、報告者は *Bifidobacterium* sp. JCM 7042 に希少脂肪酸の蓄積を発見し、この希少脂肪酸の構造が *7cis*-hexadecenoic acid (*7cis*-C16:1)であることを明らかにした。さらに、*7cis*-C16:1 の標準試料、およびこの *7cis*-C16:1 を含有するビフィズス菌から抽出した総脂肪酸が、敗血症やアトピー性皮膚炎を惹起する黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* に強い抗菌性を示す一方で、有益ブドウ球菌である *Staphylococcus epidermidis* 等に抗菌性を示さないという選択抗菌性を示すことを初めて発見した¹⁾。しかし、本技術の実用化には、本ビフィズス菌における *7cis*-C16:1 生産量の改善が必要である。*7cis*-C16:1 は主として、ビフィズス菌の生体膜リン脂質として存在しており、生産量が菌体増殖数に依存するうえ生成物阻害が生じると考えられる。本研究は、本来ビフィズス菌が形成しない脂質形態であるトリアシルグリセロールの生合成能力をビフィズス菌に付与して脂肪酸の集積場を設定することで、*7cis*-C16:1 の生産上限と阻害の解除を同時に達成できるのではないかと着想した。さらに、変異育種による脂肪酸生合成亢進株の獲得による生産改善も目指す。ビフィズス菌脂質あるいは生産した *7cis*-C16:1 を、塗布剤や化粧品として皮膚塗布すれば、日常生活でスキンケアするなかで、黄色ブドウ球菌の制御とアトピー性皮膚炎の治癒・予防が期待できる。

2. 産業化への課題

7cis-C16:1 の実用化に向けて、以下の問題点が挙げられる。

1. ビフィズス菌だけでなく細菌は一般的に、トリアシルグリセロールの生合成系を保持していない。そのため、脂質および脂肪酸の貯蔵場所は生体膜としてか、生体膜に介在する形態および遊離型脂肪酸として一部細胞質に存在するのみであると考えられる。そのため、*7cis*-C16:1 の高生産には、生産した *7cis*-C16:1 の蓄積手法・蓄積形態を検討する必要がある。
2. ビフィズス菌を含めて細菌は、元来脂質の生産性がそれほど高くない。そのため、*7cis*-C16:1 の生産量を上げるためには、脂肪酸の生合成が向上した株の作出が必要となると考えられる。

以上より、*7cis*-C16:1 を利用した抗菌性スキンケアの社会実装を実現するためには、ビフィズス菌における *7cis*-C16:1 をはじめ脂肪酸群の生産性の向上と蓄積性の向上の両方を達成する必要があると考えられる。

3. 研究計画

本研究では、以下の研究計画を立案した。

- ① . ビフィズス菌においてトリアシルグリセロール生合成関連酵素群を発現させ、7*cis*-C16:1 含有トリアシルグリセロールを初めて作出することを試みる。また、トリアシルグリセロールに脂肪酸を蓄積することによる 7*cis*-C16:1 生産量の増加を試みる。
- ② . 脂肪酸合成酵素に特異的な変異剤を用いて、温和な変異処理をかける。これにより、トリアシルグリセロール生産株を親株にして脂肪酸生合成亢進株を育種し、7*cis*-C16:1 生産量の増加を目指す。
- ③ . トリアシルグリセロール、その生合成の基質となるジアシルグリセロール、及びアシル CoA の同時定量法を確立する。トリアシルグリセロールおよび 7*cis*-C16:1 生産量の高生産に向けて対処必要な律速段階を解明する。

本報告では、研究期間や人員の制限もあり、各項目のうち、①ビフィズス菌の宿主ベクター系の導入とモデルビフィズス菌株における酵素遺伝子の発現、②変異処理によって脂肪酸生産量が増加するか、化学変異導入剤によるランダム変異導入による高生産化の確認、を検討した。

4. ビフィズス菌の宿主ベクター系の導入

はじめに、ビフィズス菌の宿主ベクター系を導入し、当研究室における形質転換株の構築を検討した。ビフィズス菌のモデル株として、*Bifidobacterium longum* subsp. *longum* 105-A 株の分譲とビフィズス菌用シャトルベクター数種類²⁾の譲渡を受けた。まずはこの宿主ベクター系を用いて形質転換を試行し、十分にコロニーが出現する形質転換法（エレクトロポレーション法における過電圧・抵抗値、菌体濃度など）を調整した（図1）。

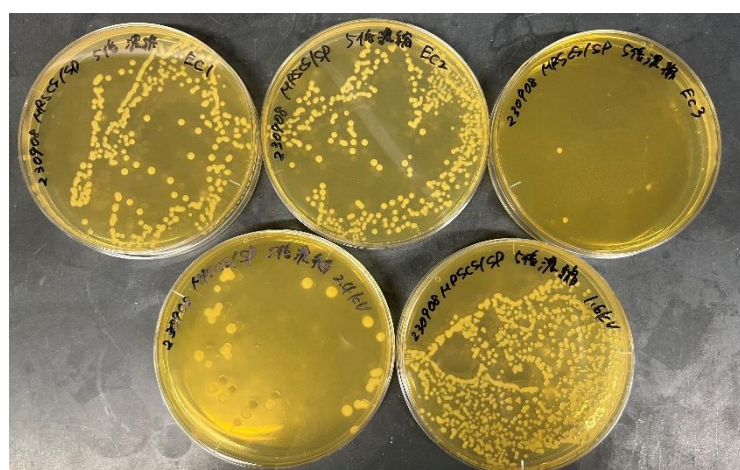


図1. エレクトロポレーション法の検討

5. トリアシルグリセロール生合成関連酵素発現株の作製

続いて、トリアシルグリセロール生合成酵素遺伝子をビフィズス菌のコードン使用頻度に合わせて遺伝子配列に再設計し、遺伝子合成サービスから合成遺伝子を得た。この合成遺伝子をベクターに組み込み、上記エレクトロポレーション法にて、まずはモデル株である 105-A 株に導入した。薬剤耐性マーカーにより薬剤クロラムフェニコールに耐性を示して生育したコロニーをピックアップし、再度薬剤を含む平板培地上に植菌することで、安定的にベクターを保持して、ベクターを保持することにより発現するクロラムフェニコールの薬剤耐性を示した株を選抜した（図 2）。

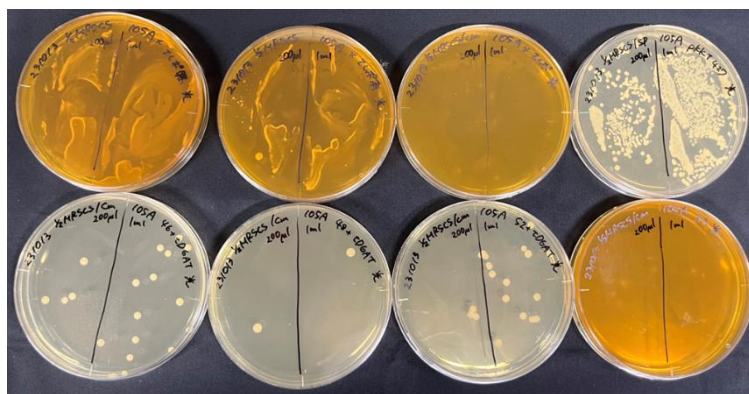


図 2. 上段：クロラムフェニコール無し、下段：クロラムフェニコール有り。左 3 つが形質転換株を植菌した培地を示している。

コロニーを直接 PCR のテンプレートに用いた PCR により、遺伝子導入が成功していることを確認した。

さらに、遺伝子発現を確認するために、形質転換株の菌体を破碎して、導入遺伝子の転写・翻訳レベルを確認することとした。まず、ビフィズス菌を溶菌させ、RNA を抽出した。抽出した RNA 溶液をテンプレートとして逆転写反応を行い、逆転写された cDNA をテンプレートとしてトリアシルグリセロール生合成酵素遺伝子の存在を PCR で確認したところ、トリアシルグリセロール生合成酵素遺伝子の転写を確認した。次いで、トリアシルグリセロール生合成酵素遺伝子がタンパク質レベルまで発現しているか確認した。ビフィズス菌は細胞壁が固く破碎が容易ではないため、まずは菌体破碎方法を検討し、破碎バッファーおよび破碎方法の検討を行った。検討により得られた菌体破碎液を SDS-PAGE に供した結果、トリアシルグリセロール生合成酵素と推定されるバンドサイズに過剰なタンパク質発現は見られなかった。しかし、酵素タンパク質が合成されていないのか、あるいはバンドとして明確に判断できる発現量が見られなかったのか決定できなかった（図 3）。今後、トリアシルグリセロール生合成酵素のウエスタンブロッティング法の確立が必要である。

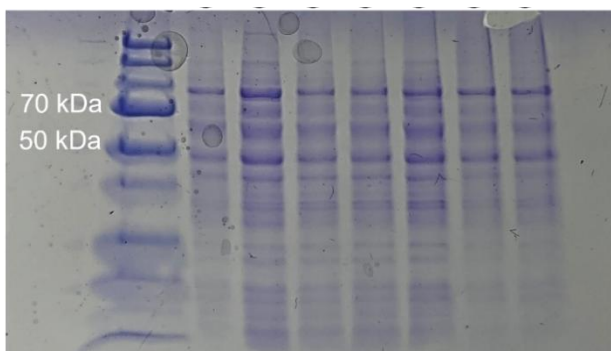


図 3. SDS-PAGE による発現確認（51.7 kDa）

6. 顕微鏡観察、および TLC 上での脂質分画

形質転換体を脂質染色試薬 Nile red により染色し、蛍光顕微鏡にて観察した。結果、トリアシルグリセロール生合成酵素発現株に置いて、宿主株や空ベクター株には見られなかったスポットが出現した（図 4）。

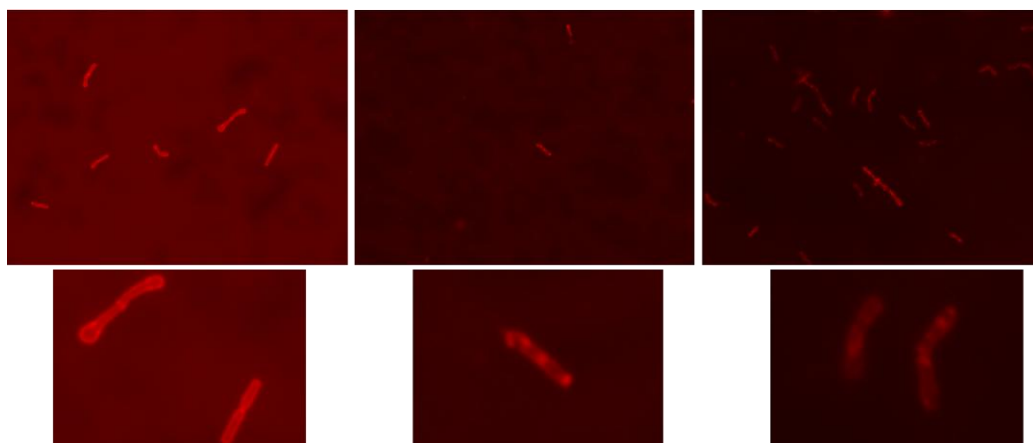


図 4. 蛍光顕微鏡による脂質蓄積観察。

左：宿主株、中：酵素遺伝子発現株、右：空ベクター導入株

形質転換株の総脂質を Bligh & Dyer 法にて抽出し、TLC 上にて各種脂質画分に分画した。分画した TLC プレートにプリムリン試薬を噴霧し、各種脂質の検出を行った（図 4）。結果、トリアシルグリセロールと考えられるスポットは観察できなかった。

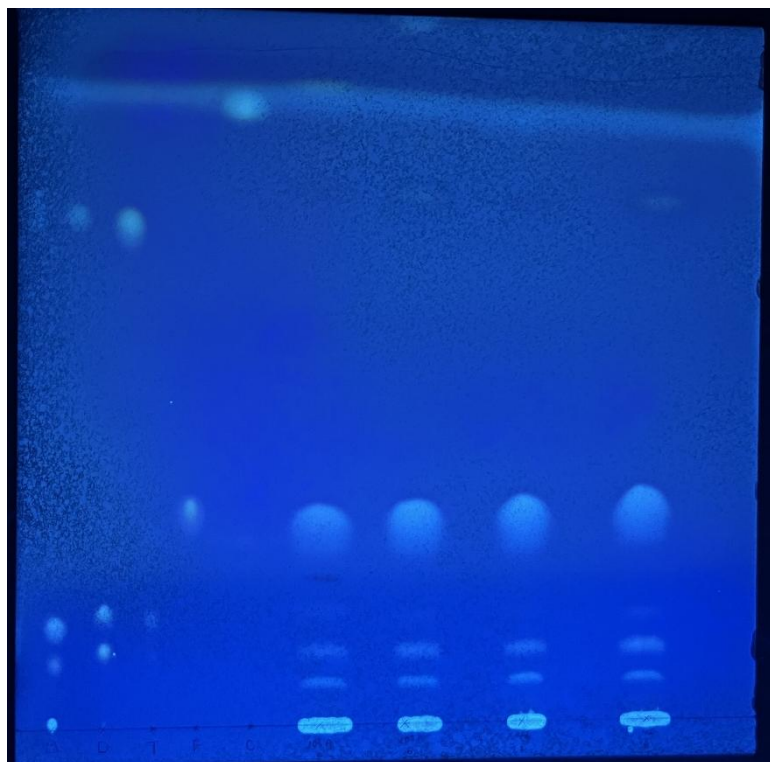


図 5. TLC 上での脂質分画。上部にあるスポット列が、トリアシルグリセロールの分画位置を示す。

7. 化学変異導入剤によるランダム変異株の 7*cis*-C16:1 生産

ここでは、比較的ダメージの少ない化学変異導入剤であるメタンスルホン酸エチルを用いて、*Bifidobacterium* sp. JCM 7042 の変異株を取得し、変異株群から 7*cis*-C16:1 生産量の向上した株を選抜した。結果、親株よりも 7*cis*-C16:1 生産量が 2 倍程度に増加した株が得られた（図 6）。このことから、変異導入によるビフィズス菌の脂肪酸生産の亢進が可能であると推測される。今後、目的である脂肪酸合成系を標的とした変異育種を行っていく予定である。

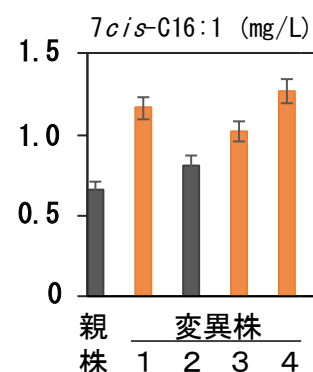


図 6. ランダム変異育種株の 7*cis*-C16:1 生産量

8. まとめ

本研究では、黄色ブドウ球菌選択的な画期的な抗菌性化合物の実利用を目指して、ビフィズス菌における希少抗菌性脂肪酸 7*cis*-C16:1 の高生産を目指した。一つ目の方策として、トリアシルグリセロールの蓄積化を目指して、トリアシルグリセロール生合成酵素遺伝子の発現を試みた。まず、ビフィズス菌の宿主ベクター系を当研究室に置いて確立した。次いで、遺伝子導入株を作製し、酵素遺伝子の転写を確認した。また、蛍光顕微鏡および TLC にてトリアシルグリセロールの出現を解析した。蛍光顕微鏡観察の結果、遺伝子導入株にのみ、スポットが出現した。一方、TLC 分画においては、トリアシルグリセロールの出現は確認できなかった。今後、GCMS, LCMS などの質量分析装置を用いた微量分析により、トリアシルグリセロールの検出を目指す。また、発現遺伝子の構築内容を見直して、SDS-PAGE で確認できるような発現株を構築できないか、検討する。

7*cis*-C16:1 生産株の変異育種においては、予備検討としてランダム変異育種を行い、7*cis*-C16:1 生産量の増加を確認した。今後、脂肪酸合成系を標的とした変異育種法を構築して、直接的育種による 7*cis*-C16:1 高生産株の育種を目指す。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、北海道大学工学部応用理工系学科応用化学コースの当時 4 年生の光信伶美氏に協力いただき、北海道大学大学院工学研究院応用化学専攻・生物合成化学研究室 教授・松本謙一郎先生と助教・蜂須賀真一先生から多大なご助言を頂きました。

最後に、公益財団法人天野工業技術研究所から多大なご支援を頂きました。ここに記して謝意を示します。

参考文献

- 1) Kikukawa H., Nagao T., Ota M., Takashima S., Kitaguchi K., Yanase E., Maeda S., Hara K.Y.,

“Production of a selective antibacterial fatty acid against *Staphylococcus aureus* by *Bifidobacterium* strains.” *Microbiome Research Reports* 2(1):4 (2023).

- 2) Sakanaka M., Tamai S., Hirayama Y., Onodera A., Koguchi H., Kano Y., Yokota A., Fukiya S.,
“Functional analysis of bifidobacterial promoters in *Bifidobacterium longum* and *Escherichia coli*
using the α -galactosidase gene as a reporter” *Journal of Bioscience and Bioengineering* 118(5):489-
495 (2014).