

1P-248 *Lactobacillus acidophilus*由来新規リノール酸 Δ 12水和酵素の同定と機能解析○平田 晶子¹, 竹内 道樹¹, 内堀 良重^{1,2}, 米島 靖記², 岸野 重信¹, 小川 順¹⁽¹⁾京大院・農・応用生命, ⁽²⁾日東薬品工業)
ogawa@kais.kyoto-u.ac.jp

【目的】水酸化脂肪酸は、医薬中間体から界面活性剤まで多分野で幅広く利用されている。また近年、その腸管バリア保護、脂質代謝改善といった生理機能についても注目が集まり研究が進められている。これまでに本研究室では、*Lactobacillus plantarum* AKU 1009a に、リノール酸の Δ 9位の二重結合を水和しC10位に水酸基を導入する水和酵素(CLA-HY)を見いだすとともに、*Pediococcus* sp. AKU 1080 に10,13-dihydroxy-octadecanoic acidを生成する活性を見いだしている。本研究では、新たにリノール酸の Δ 12位の二重結合を水和しC13位に水酸基を導入する*L. acidophilus*を選抜し、本活性を担う酵素の諸性質解明を試みた。

【方法・結果】リノール酸を基質に、13-hydroxy-*cis*-9-octadecenoic acidを生成する*L. acidophilus* NTV001(NITE BP-1788)を選抜した。また、CLA-HY遺伝子とのホモロジー検索により本反応を触媒する酵素の遺伝子を本菌のゲノムよりクローニングし、形質転換大腸菌を作製した。得られた形質転換体の洗浄菌体を触媒として炭素数18の様々な脂肪酸に対する水和反応を検討した結果、リノール酸から13-hydroxy-*cis*-9-octadecenoic acid、 α -リノレン酸から13-hydroxy-*cis*-9-*cis*-15-octadecadienoic acid、 γ -リノレン酸から13-hydroxy-*cis*-6-*cis*-9-octadecadienoic acidが生成することを確認した。また、His-tag融合タンパク質として本酵素を精製し、諸性質の解明を行った。

Cloning and functional analysis of linoleic acid Δ 12 hydratase from *Lactobacillus acidophilus*○Akiko Hirata¹, Michiki Takeuchi¹, Yoshie Uchibori^{1,2}, Yasunori Yonejima², Shigenobu Kishino¹, Jun Ogawa¹⁽¹⁾Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., ⁽²⁾Nitto Pharm.)**Key words** lactic acid bacteria, hydroxy fatty acid, hydratase**1P-250** *Lactobacillus plantarum* AKU 1009a 由来水酸化脂肪酸脱水酵素の機能解析○竹内 道樹¹, 朴 時範², 北村 苗穂子¹, 岸野 重信^{1,2}, 小川 順^{1,3}⁽¹⁾京大院・農・応用生命, ⁽²⁾京大院・農・産業微生物, ⁽³⁾京大・生理化学ユニット)
ogawa@kais.kyoto-u.ac.jp

【目的】近年、特異な構造を有する脂肪酸の生理機能に注目が集まっている。トマトに含まれる13-オキソオクタデカジエン酸が生理活性(脂質代謝改善機能)を有することから、類似した構造を有するオキソ脂肪酸にも注目が集まっている。当研究室では、乳酸菌*Lactobacillus plantarum* AKU 1009a によるリノール酸飽和化代謝を明らかにしており、本代謝中間体としてオキソ脂肪酸を同定している。本研究にてオキソ脂肪酸の誘導に機能する酵素、水酸化脂肪酸脱水酵素(CLA-DH)の諸性質解明を試みた。本酵素は、10-hydroxy-*cis*-12-octadecenoic acid (HYA) から10-oxo-*cis*-12-octadecenoic acid (KetoA) への可逆的変換反応を触媒する酸化還元酵素である。

【方法・結果】IPTG添加によりCLA-DHを誘導発現する形質転換大腸菌の無細胞抽出液から各種クロマトグラフィーにより、CLA-DHを精製した。精製酵素によるHYAの酸化反応およびKetoAの還元反応について、ガスクロマトグラフィーを用いて生成物を定量分析することで機能解析を行った。本酵素の酸化・還元反応における補酵素はそれぞれNAD⁺・NADHであった。また、補酵素濃度、反応温度・pHの影響や、酵素の温度・pH安定性等を検討した。さらに、還元反応により生成するHYAの水酸基の立体構造についても検討した。

Functional analysis of hydroxy-fatty-acid dehydrogenase from *Lactobacillus plantarum* AKU 1009a○Michiki Takeuchi¹, Si-Bum Park², Nahoko Kitamura¹, Shigenobu Kishino^{1,2}, Jun Ogawa^{1,3}⁽¹⁾Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., ⁽²⁾Lab. Ind. Microbiol., Kyoto Univ., ⁽³⁾Res. Unit Physiol. Chem., Kyoto Univ.)**Key words** lactic acid bacteria, oxo fatty acid, hydroxy fatty acid, dehydrogenase**1P-249** Analyses of 10-hydroxy-*cis*-12-octadecenoic acid production by lactic acid bacteria with potentials as probiotics○Nu Anh Thu Le¹, Shigenobu Kishino¹, Yoshie Uchibori^{1,2}, Yasunori Yonejima², Jun Ogawa¹⁽¹⁾Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., ⁽²⁾Nitto Pharm.)
ogawa@kais.kyoto-u.ac.jp

[Introduction] The recent studies reported that the disruption of gut microbial community has been linked to pathological intestinal conditions such as obesity, diabetes, and inflammatory bowel disease. Therefore, the contribution of beneficial components such as probiotics and prebiotics to gut microbiome aiming to prevent the dysbiosis has become the focus of ever more attention. In our previous studies, we found that 10-hydroxy-*cis*-12-octadecenoic acid (HYA), which was produced from linoleic acid (LA) by *Lactobacillus plantarum* AKU 1009a, had ability to recover the intestinal epithelial barrier impairment in Caco-2 cells. Such evidences highlight screening for HYA producer in lactic acid bacteria with potentials as probiotics.

[Methods and results] Strain AKU 1232 which was identified as *L. curvatus* or *L. sakei* subsp. *sakei* was selected as a potential strain for HYA production. Analyses of cultivation conditions for obtaining the probiotics cells with high HYA-producing activity, the strain AKU 1232 cells in the stationary growth phase without inducer were found to show the significant activity of HYA-production from LA. In addition, NAD⁺ considerably stimulated the HYA production by strain AKU 1232 cells. From these results, niacin was found to be a good candidate for prebiotics.

Analyses of 10-hydroxy-*cis*-12-octadecenoic acid production by lactic acid bacteria with potentials as probiotics○Nu Anh Thu Le¹, Shigenobu Kishino¹, Yoshie Uchibori^{1,2}, Yasunori Yonejima², Jun Ogawa¹⁽¹⁾Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., ⁽²⁾Nitto Pharm.)**Key words** lactic acid bacteria, 10-hydroxy-*cis*-12-octadecenoic acid, *Lactobacillus plantarum*, probiotics**1P-251** 低温菌シンプル酵素変換技術によるフマル酸からのアスパラギン酸の生成○浜田 麻衣, 田島 晋久, 中島 豊, 加藤 純一
(広島大院・先端物質)

hamad-ma1@softbank.ne.jp

【目的】微生物を利用した物質変換において、宿主由来の代謝酵素による副産物の生成が目的産物の収率を低下させる大きな要因である。不要な代謝関連遺伝子の破壊株や精製酵素を用いた反応が収率の改善策として想定されるが、破壊株の構築や酵素の精製にコストと手間を生じてしまう。そこで我々は中温菌由来の酵素を発見させた低温菌株を中温で熱処理したシンプル酵素触媒による変換技術の開発を行っている。本触媒では熱処理により低温菌由来の代謝酵素が失活し、目的産物を生成する中温菌由来の酵素のみが機能するため、基質を目的産物に完全に変換させることが期待できる。本研究ではフマル酸からアスパラギン酸に効率的に変換させるシンプル酵素触媒を構築することを目的とした。

【方法及び結果】*E. coli*由来のアスパルターゼをコードしたaspAを低温菌*Shewanella livingstonesis* Ac10株に導入し、培養後に熱処理することでシンプル酵素触媒を構築した。これを用い、フマル酸を基質として37℃で反応させ、*E. coli*由来のアスパルターゼによりアスパラギン酸の生成反応を行った。Ac10由来の代謝酵素活性を抑制するために熱処理温度の検討を行った。50℃で熱処理をした細胞では、低温菌由来のフマルターゼの失活によりリンゴ酸の生成がほとんど見られず高収率でアスパラギン酸に変換することができた。その一方、55℃で熱処理した細胞ではアスパルターゼの失活が確認され、アスパラギン酸生成能が低下した。したがって、50℃の熱処理でアスパラギン酸生成量が最も高いと考えられる。

Costruction of phychrophile-based simple biocatalyst for efficient bio-conversion of fumaric acid to aspartic acid○Mai Hamada, Takahisa Tajima, Yutaka Nakashimada, Junichi Kato
(Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)**Key words** aspartic acid, fumaric acid, *Shewanella livingstonesis* Ac10