

学 位 論 文 題 名

Verification of the anti-oxidative function of
eicosapentaenoic acid in bacteria

（細菌でのエイコサペンタエン酸の抗酸化機能の検証）

学位論文内容の要旨

（目的）

脂質二重層からなる細胞膜の機能の一つは、疎水性マトリクスとして酵素や物質を保持し、化学反応の場を提供することである。従って、細胞膜の物理特性、特に膜の流動性は細胞膜機能に大きな影響を及ぼす。細胞膜の流動性は外的な環境要因の影響を大きく受け、特に低温による膜流動性の低下は著しい。変温生物では、膜流動性を至適な状態に維持するために脂肪酸組成を変化させるが、中でも脂肪酸の不飽和度を上げることが最も一般的である。

ドコサヘキサエン酸(DHA)やエイコサペンタエン酸(EPA)などの長鎖多価不飽和脂肪酸(LC-PUFA)は、細菌から動物まで広く分布することが知られており、その機能の一つは、他の不飽和脂肪酸と同様に、細胞膜の流動性の維持にあると考えられている。しかし、熱帯性の微細藻類の中にも DHA や EPA を高レベルで持つものがあることや、EPA 産生細菌の EPA 欠損変異株が必ずしも低温感受性にならないことなどの知見から、LC-PUFA の機能は膜流動性の維持のだけではないと予想される。

LC-PUFA は、ビスアリル水素を多数もつ最も酸化されやすい生体物質の一つである。酸化された脂肪酸はラジカルを形成し、他の生体物質の酸化を促進すると考えられる。しかし、実際には、動物の網膜など酸化ストレスにさらされやすい部位に多くの DHA が蓄積されており、さらに、動物やその培養細胞では、DHA はむしろ抗酸化的に機能することが明らかになっている。加えて、DHA や EPA をもつリン脂質からなるリポソームやミセルでは、DHA、EPA とも活性酸素分子種に対して安定であるだけでなく、他のアシル鎖の酸化をも抑制することが報告されている。本研究では、細菌の系を用いて、LC-PUFA はより普遍的な機能として抗酸化性をもつという仮説の検証を試みた。

（方法）

大腸菌 DH5 α 株および大腸菌のカタラーゼ欠損変異株 UM2 株に EPA 合成遺伝子群を導入して、EPA 合成能を付与した。本来 EPA を生合成するイカ腸内細菌 *Shewanella mariniteistna* IK-1 株 (IK-1 株) の EPA 合成遺伝子の一部に変異を導入した EPA 欠損変異株を作成した。EPA をもつ大腸菌形質転換株および IK-1 株と EPA を持たないそれぞれの対照株を H₂O₂ で処理し、その生育への影響、タンパク質の酸化(カルボニル化)、脂質の過酸化への影響を比較した。また、H₂O₂ 処理後の細胞内外の H₂O₂ 濃度を測定した。

(結果および考察)

全脂肪酸の約 10% の EPA をもつ大腸菌 DH5 α 株の形質転換株 (DH5 α EPA+) とその対照株 (DH5 α EPA-) を 3 mM H₂O₂ で処理すると、DH5 α EPA- 株ではコロニー形成能が未処理のものの 15% まで減少したが、DH5 α EPA+ 株のコロニー形成能は影響を受けなかった。この結果は、EPA が H₂O₂ による細胞の生育阻害を抑制することを示している。形質転換と 3 mM H₂O₂ 処理のいずれも、カタラーゼ活性に大きな影響をもたらさなかった。また、3 mM H₂O₂ 処理に伴うカルボニル化タンパク質の量は DH5 α EPA- 株では上昇したが、DH5 α EPA+ 株では変化しなかった。さらに、3 mM H₂O₂ 処理は DH5 α EPA+ 株と DH5 α EPA- 株の脂肪酸組成に全く影響を及ぼさなかったが、脂肪酸の量からみた細胞の回収量は、DH5 α EPA- 株では処理前のものに比べ約 8% 減少したのに対し、DH5 α EPA+ 株では変わらなかった。以上の結果から、EPA はカタラーゼの存在とは独立して H₂O₂ による細胞内物質の酸化を抑え、さらに細胞の崩壊を抑制していることが示唆される。

次に、カタラーゼの影響を完全に排除するために、大腸菌のカタラーゼ欠損変異株 UM2 株の EPA 合成能をもつ形質転換株を用いた。加えて、細胞内で生成する H₂O₂ や細胞が細胞外に放出する抗酸化物質などの影響を除くために、UM2 形質転換株の細胞は、洗浄後、緩衝液に再懸濁し、一定時間静置したもの (休止細胞) を使用した。H₂O₂ 処理濃度は 0.3 mM とした。その結果、EPA をもつ UM2 形質転換株においても、大腸菌 DH5 α の場合と同様に、EPA は H₂O₂ 処理による生育阻害、タンパク質の酸化、細胞の破壊を抑制した。また、EPA を合成しない対照株の H₂O₂ 処理後の細胞内 H₂O₂ 濃度は、EPA を生合成する株よりも高く、H₂O₂ の細胞内への透過速度は約 3.5 倍であった。以上の結果から、大腸菌における EPA の抗酸化機能は、EPA をもつリン脂質からなる細胞膜による、H₂O₂ の細胞内への透過抑制に起因することが示唆された。

全脂肪酸の約 20% が EPA である *S. maritima* IK-1 とその EPA 欠損変異株 IK-1 Δ 8 株の細胞を 0.01~1 mM H₂O₂ を含む緩衝液に懸濁し、30 分静置した後のコロニー形成能は、いずれの H₂O₂ 濃度でも、IK-1 株が IK-1 Δ 8 株に比べて高かった。この結果は、寒天培地の中心に H₂O₂ を染込ませたる紙を置いた生育阻害実験において、IK-1 の生育阻止円が IK-1 Δ 8 株に比べて大きいことから裏付けられた。以上の結果は、本来 EPA を持つ細菌においても、EPA は細胞外 H₂O₂ に対して抗酸化的に働くことを示している。

本研究の結果、EPA が細菌細胞において抗酸化的に機能することが明らかとなった。その機構については不明である。しかし、EPA をもつ細胞を H₂O₂ で処理しても、脂肪酸組成は影響を受けず、EPA の過酸化化物であるマロンデアルデヒドの生成は無視できるほどであることから、EPA の抗酸化機能は、EPA またはその誘導体が細胞の抗酸化システムを活性化させるという代謝的・生理的なものではなく、EPA の構造的な特徴に起因するものであると予想される。文献の NMR や X 線回折などによる解析によって、1) DHA や EPA をもつ脂質二重膜は他の PUFA を持つものよりもコンパクトな構造をとりうること、2) LC-PUFA とパルミチン酸などの中鎖飽和脂肪酸が結合したリン脂質によって形成される脂質二重膜では、脂質二重層の疎水界面により疎水度の高い層が形成されること、が明らかにされている。これらの報告と本研究結果を考え合わせると、EPA の抗酸化機能は、EPA をアシル成分としてもつ細胞膜による親水性分子である H₂O₂ の遮蔽効果である、と結論づけられる。この LC-PUFA の効果は、低温環境に限らず、細菌を含む微生物の外部環境に由来する活性酸素分子種に対する防御機構として機能していると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査	助教授	奥 山 英登志
副 査	教 授	森 川 正 章
副 査	教 授	福 井 学
副 査	助教授	山 崎 健 一
副 査	主任研究員	森 田 直 樹

((独) 産業技術総合研究所)

学 位 論 文 題 名

Verification of the anti-oxidative function of eicosapentaenoic acid in bacteria

(細菌でのエイコサペンタエン酸の抗酸化機能の検証)

ドコサヘキサエン酸 (DHA) やエイコサペンタエン酸 (EPA) などの長鎖多価不飽和脂肪酸 (LC-PUFA) の機能は、他の不飽和脂肪酸と同様、細胞膜の流動性の維持にあると考えられる。しかしながら、EPA 産生細菌の EPA 欠損変異株が必ずしも低温感受性にならないことなどから、膜流動性に関わらない LC-PUFA の機能があると予想される。

一般的に多価不飽和脂肪酸は極めて酸化され易い生体物質であるが、DHA や EPA をもつリン脂質からなるリポソームやミセルでは、DHA や EPA は活性酸素分子種に対して安定であるだけでなく、他のアシル鎖の酸化をも抑制することが報告されている。加えて、DHA は動物やその培養細胞で抗酸化効果を示すことが報告されている。これらの知見をふまえ、申請者は LC-PUFA はより普遍的な機能として抗酸化性を持つのではないかと考えるに到り、本研究でその検証を試みた。

申請者は先ず大腸菌に *Shewanella pneumatophori* SCRC-2738 株由来の EPA 合成遺伝子群を導入することによって、EPA を合成する大腸菌形質転換株 (EPA+株) とその対照株 (EPA-株) を調製し、これらの形質転換株を用いて過酸化水素 (H_2O_2) 処理に対する応答の違いを比較した。 H_2O_2 処理により EPA-株は生育が顕著に阻害されたのに対して、EPA+株ではその生育阻害が完全に抑制された。 H_2O_2 処理は EPA-株のタンパク質の酸化および細胞の部分的破壊をもたらしたが、EPA+株では影響がなかった。以上の結果は、EPA が H_2O_2 処理による酸化ス

トレスに対して抑制効果を持つことを示している。

申請者は大腸菌形質転換株（EPA+株）に見られる酸化ストレス抑制効果が、EPA が細胞膜のリン脂質の成分として存在することで、 H_2O_2 の膜透過を妨げるためではないかと推定した。この仮説を実証するために、 H_2O_2 で処理した EPA+株および EPA-株の細胞内 H_2O_2 濃度の測定を行った。その際、申請者は宿主として大腸菌のカタラーゼ活性欠損変異株 UM2 株を用いること、EPA+株および EPA-株の細胞を栄養と酸素の供給を制限した非増殖条件下におき、内在性 H_2O_2 の生成を抑制することなど、十分な配慮の元の実験を行っている。 H_2O_2 濃度の測定の結果、EPA-株は H_2O_2 の流入速度、細胞内濃度とも、EPA+株に比べて高い値を示した。この結果は、EPA が H_2O_2 の細胞内への流入を抑制することを示すものであり、大腸菌形質転換株での EPA の抗酸化機能が H_2O_2 の細胞内への透過を妨げることによるとする仮説を裏付けるものであった。EPA の同様の抗酸化機能は、本来 EPA を合成する *Shewanella mariniteistna* IK-1 株とその EPA 欠損変異株 IK-1Δ8 株を用いた実験でも確認された。

申請者は本研究を次のようにまとめている。1) EPA を持つ大腸菌形質転換株および本来 EPA を持つ細菌において、EPA は H_2O_2 による酸化ストレスに対する抑制効果を持つ。2) その効果は EPA により H_2O_2 の細胞内への流入が抑制されることによる。EPA が H_2O_2 の細胞膜透過を抑制する機構については不明だが、申請者は LC-PUFA と中鎖飽和脂肪酸からなるリン脂質が脂質二重膜を形成する際に、脂質二重膜の中央（界面）により疎水性の強い飽和アシル鎖の層が形成されるとの文献上の知見を引用し、EPA がもたらすこのような特異的構造が細菌細胞膜にも形成され、親水性分子（ H_2O_2 ）の遮蔽に寄与しているのではないかと考察している。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士（地球環境科学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判断した。