

新属新種の好熱性細菌が作る耐熱性ホスホリパーゼ A を用いた 機能性リン脂質とバイオディーゼルの高効率生産法の開発

京都府立大学大学院 生命環境科学研究科 渡部 邦彦

【緒言】ホスホリパーゼはリン脂質を加水分解する酵素であり、油脂の精製、乳化性に優れたリゾリン脂質（アシル基が1本しかないリン脂質）の製造、食品・化粧品の乳化や薬物送達システム（DDS）などの用途に適したリン脂質への改質などに広く産業利用されている。ホスホリパーゼ A（PLA）はリン脂質に作用し、リゾリン脂質と遊離脂肪酸（FFA）を生成する酵素であり、その世界的需要は増加している。しかし、最も利用されているブタ膵臓 PLA には感染症や宗教上の問題があり、これを凌ぐ微生物酵素が求められている。そこで我々は新規 PLA を得る目的で、菌源として斬新なアシドロコンポストから耐熱性 PLA を生産する新規好熱性細菌 *Caenibacillus caldisaponilyticus* B157^T 株を単離・同定し¹⁾、そのゲノム配列を明らかにした²⁾。本酵素遺伝子の同定と酵素化学的解析から、B157^T 株が細胞外に生産する PLA は既知酵素と配列相同性がほとんどなく、リン脂質の *sn*-1 位に選択性の高い耐熱性ホスホリパーゼ A₁ (PLA₁) であることが分かった。PLA は細胞膜成分であるリン脂質を分解するため、大腸菌での組換え体の大量発現は困難であり、PLA に関して詳細な研究報告例は世界的にも少ない。そこで本研究では、本酵素の大量調製法を確立し、本酵素の機能解析を通じて機能性リン脂質と脂肪酸メチルエステル（バイオディーゼル）の高効率生産法を開発することを目的とした。

【方法と結果】種々の解析より、B157^T 株 PLA₁ は細胞内でN末端にシグナル配列を持つプレプロ酵素として発現し、分泌時にシグナル配列が切断され、C末端側に pro domain (23.6 kDa) を持つ活性のほとんどないプロ型酵素 (PlaA-Cpro, 52.5 kDa) として分泌された後、細胞外プロテアーゼによりプロセシングされ、成熟型酵素 (PlaA, 28.9 kDa) へと活性化されることが示唆された。

そこで、PlaA を直接大腸菌で発現することを試みたが、高活性体を得られなかった。従って、組換え PlaA-Cpro (r PlaA-Cpro) の *in vitro* プロセシングにより組換え PlaA (rPlaA) を調製することとした。rPlaA-Cpro を得るために発現ベクター pET-11a と発現宿主 *Escherichia coli* Rosetta (DE3) を用いた。熱処理などにより部分精製した rPlaA-Cpro に対して各種プロテアーゼを反応させた結果、B157^T 株培養上清と Proteinase K で処理した時のみ、ホスホリパーゼの活性染色で移動度の同じ強い活性バンドを得た。そこで、rPlaA-Cpro を Proteinase K で処理した後、rPlaA を調製・精製した。ホスホリパーゼ活性の測定には、基質として卵黄ホスファチジルコリン (PC) を用いて 60°C, pH 7.0 で反応を標準条件として酵素反応を行い、生成される脂肪酸量を定量し評価した。

rPlaA は、広範囲な pH 範囲 (pH 4-11、0°C、3 h) で安定性を示し、pH 10 で最大活性を示し、pH 6-11 で最大活性の 50%以上の活性を示した。また、rPlaA は耐熱性に優れ、30 min 保持で 70°C (pH 7) まで安定であり、卵黄 PC を基質とした時 70°C で最大活性を示した。最大の関心事として、10-50%(v/v) メタノール存在下で 3 h 酵素反応を行うと、リゾホスファチジルコリン (LPC) と FFA に加えて脂肪酸メチルエステル (バイオディーゼル) の生成が薄層クロマトグラフィーで確認された。このことから、本酵素が高いメタノール耐性とエステル交換活性を有することが示された。

次に、rPlaA を用いた PC 改質を試みた。卵黄 PC は *sn*-1 位に飽和脂肪酸が、*sn*-2 位に不飽和脂肪酸が多く結合していることが知られている。そこで、*sn*-1 位への選択性が高い本酵素を利用して、*sn*-1 位の飽和脂肪酸を不飽和脂肪酸へと交換 (アシル基転移) できるかを検討した。基質に卵黄 PC を用いて 16 h の酵素反応後にオリーブオイル (オレイン酸などの不飽和脂肪酸に富むトリアシルグリセロール) を添加し、さらに酵素反応を続けた。その結果、オリーブオイル添加前にはほとんどなかった PC が顕著に増加していた。また、反応産物である PC の脂肪酸組成をガスクロマトグラフィーによって調べた結果、不飽和脂肪酸含量が有意に増加していた。しかし、オリーブオイルではなくオレイン酸のみを添加した時には PC は生じなかった。このことから、PC の加水分解と不飽和脂肪酸との間の逆反応ではなく、PC と不飽和脂肪酸に富むトリアシルグリセロールとの間のエステル交換反応が起こり、オリーブオイル由来不飽和脂肪酸が LPC またはグリセロホスホコリンへアシル基転移して不飽和脂肪酸の多い PC が生じたと考えられる。

リン脂質は、脂肪酸組成の違いにより物理化学的性質だけでなく栄養機能性も違うことが知られている。その一方、リン脂質は油脂精製やバイオディーゼル生産では除去すべき対象でもある。本研究では、報告例がほとんどない耐熱性 PLA の大量調製法を確立し、B157^T 株由来 PLA がリゾリン脂質と脂肪酸メチルエステル (バイオディーゼル) の生産やリン脂質の改質に利用できることを明らかにした。これらの結果は、PLA の食品・化粧品・健康産業・環境産業など様々な分野・産業への利用展開を図る上で重要な知見となる。

- 1) Tsujimoto Y, Saito R, Furuya H, Ishihara D, Sahara T, Kimura N, Nishino T, Tsuruoka N, Shigeri Y, **Watanabe K.** *Caenibacillus caldisaponilyticus* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, spore-forming and phospholipid-degrading bacterium isolated from acidulocompost., *Int J Syst Evol Microbiol.* **66**:2684-2690 (2016)
- 2) Tsujimoto Y, Saito R, Sahara T, Kimura N, Tsuruoka N, Shigeri Y, **Watanabe K.** Draft genome sequence of *Caenibacillus caldisaponilyticus* B157^T, a thermophilic and phospholipase-producing bacterium isolated from acidulocompost., *Genome Announc.* **5**, e00089-17 (2017)