

氏名	安藤晃規
----	------

(論文内容の要旨)

本論文は機能性脂質の微生物生産に関して、実用生産に向けた応用研究ならびに、それを支援するための分子育種に有用なツールの充実を図ることを目的としたものである。特に、共役リノール酸の効率的生産ならびに、高度不飽和脂肪酸の生産制御のための新規形質転換系の開発を遂行した研究成果がまとめられている。以下にその概要を記す。

(1) 共役リノール酸 (CLA) の効率的生産を目的とし、水酸化脂肪酸であるリシノール酸 (RA) あるいは、RA を多量に含有する安価な植物油脂ヒマシ油を CLA へと変換しうる能力を乳酸菌に探索した。結果、種々の乳酸菌が効率的に CLA を生産することを認めた。*Lactobacillus plantarum* JCM 1551 を用いる反応では、至適条件下 24 時間の休止菌体反応により、30 mg/ml の RA から最大収量となる 4.2 mg/ml の CLA を、48 時間の反応により 3.4 mg/ml の RA から最大収率 70%にて 2.5 mg/ml の CLA を生産することができた。また、ヒマシ油を原料とした際には、反応系にリパーゼを添加することにより CLA 生産が可能となることを見いだした。Lipase M “Amano” 10 を用いる至適条件下、ヒマシ油 (30 mg/ml) と湿菌体 (12%) を 170 時間嫌氣的に反応させることで、7.5 mg/ml の CLA を生産することができた。

(2) 糸状菌 *Trichoderma* sp. 1-OH-2-3 株に関し、種々の脂肪酸を基質とした脂肪酸変換反応を検討することで、本菌の脂肪酸不飽和化酵素、鎖長延長酵素の基質特異性を精査した。本菌を 18:2n-9、トランスバクセン酸 (*trans*-18:1n-7)、17:0、15:0、あるいは 13:0 を 0.8% 添加した液体培地にて培養後、菌体の脂肪酸組成をガスクロマトグラフにより分析した。その結果、18:2n-9 の添加で γ -リノレン酸 (18:3n-6) が、17:0、15:0、13:0 の添加で 17:1n-5、17:2n-3 が、トランスバクセン酸の添加で 2 種の 9,11-octadecadienoic acid 異性体が生成することが認められた。この結果より、本菌の $\Delta 9$ 不飽和化酵素が幅広い基質に作用することが示された。また、トランスバクセン酸から生成する異性体の一方を単離精製し各種機器分析による構造解析に供したところ、*cis*-9,*trans*-11-octadecadienoic acid (CLA1) であると同定され、有用な生理活性が報告されている、CLA 異性体の一つであることが判明した。ま

た、もう一方の異性体は *trans-9,trans-11-octadecadienoic acid* (CLA2) であると予想された。

(3) 乳酸菌による CLA 生産では CLA1 と CLA2 が生産されるが、有用な生理活性を示す活性型 CLA は主に CLA1 である。糸状菌の $\Delta 9$ 不飽和化酵素の働きにより CLA1 の生産が可能であることが示されたので、真菌を利用したトランスバクセン酸からの CLA 生産を検討した。その結果、数種のカビに CLA1 を異性体選択的に生成する高い活性が認められ、*Delacroixia coronata* IFO 8586 を CLA1 高生産菌として選抜した。トランスバクセン酸メチルエステル (*t*-VAME) を基質とする至適条件下、33.3 mg/ml の *t*-VAME から 10.5 mg/ml の CLA (CLA1, 10.3 mg/ml; CLA2, 0.15 mg/ml) を生産することができた。この際の CLA1 の異性体純度は 98% に達した。また生成した CLA の 69% がトリアシルグリセロールとして回収された。

(4) 高度不飽和脂肪酸生産性糸状菌 *Mortierella alpina* 1S-4 株の脂肪酸生産制御、ならびに、共役脂肪酸生産への展開を目指し、本菌の実用的な形質転換系を開発すべく、新たな選択薬剤の探索、およびマーカー遺伝子の評価を行った。結果、担子菌に特異性の高い薬剤カルボキシンを 100 $\mu\text{g/ml}$ の濃度にて培地に添加した際に、本菌の菌糸の成長並びに胞子の発芽を阻害できることを明らかにした。さらにカルボキシンのターゲットであるコハク酸脱水素酵素複合体の Ip サブユニット (*sdhB*) 遺伝子を本菌より単離し、耐性機構に関与する 1 塩基変異を挿入した変異導入遺伝子を構築した。本変異遺伝子を *M. alpina* 1S-4 において過剰発現させたところ、形質転換株はカルボキシリン 100 $\mu\text{g/ml}$ 添加培地上で生育可能であったことから、組換え体選抜のためのマーカー遺伝子として有用であることが明らかとなった。

(5) *M. alpina* 1S-4 を対象に、新たに *Agrobacterium tumefaciens* を介した遺伝子導入法を試みた。宿主としてウラシル要求性変異株を用い、バイナリーベクターの T-DNA 領域に野生株由来の *ura5* 遺伝子発現用カセットを挿入し、胞子を受容体として栄養要求性を指標に形質転換を試みた。結果、*A. tumefaciens* と胞子の共培養の至適条件下、胞子 10^8 個中、約 700 株の形質転換体を得た。また、そのうち 60-80% の形質転換体が安定して形質を保持し、形質転換効率および安定性の改善が認められた。またサザンブロット解析から、16 株中 15 株 (約 94%) において染色体上に単コピーで挿入された T-DNA 領域が確認できた。

	氏名	安藤 晃規
--	----	-------

(論文審査の結果の要旨)

近年、有機合成化学では困難な精密合成を要する物質を、生体触媒、特に微生物機能を活用して生産する試みが積極的になされている。一方、多様な生理活性を示すことから注目を集めている機能性脂質には、複雑な構造を有するものが多い。本論文では、機能性脂質として共役リノール酸 (CLA) ならびに高度不飽和脂肪酸に焦点をあて、それらの微生物生産プロセスを開発するための生化学的解析、並びに、生産に用いる微生物の分子育種法の開発に関する研究結果がまとめられている。以下に示す点が成果として評価できる。

(1) 乳酸菌によるリノール酸からの CLA 生産において、反応中間体として水酸化脂肪酸が関与していることが明らかになっていた。その知見を端緒として、乳酸菌を用い、水酸化脂肪酸の一種であるリシノール酸からの CLA 生産を検討した。高活性菌を探索した結果、種々の乳酸菌にリシノール酸を CLA へと変換する能力を見いだした。さらには、リシノール酸をトリアシルグリセロールの形態で多量に含有する、安価な植物油脂であるヒマシ油を原料とした際にも、リパーゼを反応系に共存させることで乳酸菌による CLA 生産が可能となることを示した。安価な原料を用い CLA 生産を実現できたことは、実用生産への足がかりとなる成果である。

(2) 糸状菌 *Trichoderma* sp. 1-OH-2-3 株の脂肪酸生合成を検討することで、本菌の脂肪酸不飽和化酵素並びに鎖長延長酵素が広い基質特異性を有することを明らかにした。さらには、本菌の $\Delta 9$ 不飽和化活性を利用することにより、トランスバクセン酸からの CLA 生産が可能であることを示した。糸状菌による CLA 生産は初めての報告であり、微生物による CLA 生産に関して、新たな応用展開を示すものである。

(3) 真菌類の $\Delta 9$ 不飽和化活性を活用した CLA 生産を目的としたスクリーニングにより、活性型の CLA の一つである *cis-9,trans-11-octadecadienoic acid* (CLA1) を異性体選択的に生産しうる糸状菌 *Delacroixia coronata* IFO 8586 を見いだした。至適条件下、総生産 CLA

中、98%が CLA1 となる選択的かつ効率的生産を実現した。本プロセスの構築は、今まで高純度異性体の供給が困難であった CLA1 の生理機能解析を支援するものである。

(4) 高度不飽和脂肪酸生産性糸状菌 *Mortierella alpina* 1S-4 株を対象に、本菌の実用的な形質転換系の構築を模索した。その結果、カルボキシンを選択薬剤に、コハク酸脱水素酵素 Ip サブユニットの変異導入遺伝子をマーカー遺伝子とする形質転換株の新たな選抜法を確立した。これは従来の栄養要求性を指標とした形質転換系を代替しうる、産業株に応用可能な形質転換法である。

(5) *M. alpina* 1S-4 を対象として、新たに *Agrobacterium tumefaciens* を介した遺伝子導入法を開発した。従来の遺伝子銃法にくらべ形質転換効率、遺伝子の安定性の向上を達成した。また、90%以上の形質転換株において染色体上に単コピーで挿入された T-DNA 領域が認められたことから、今後の *M. alpina* 1S-4 における変異解析に有用であることが示された。

以上のように本論文は微生物による機能性脂質生産について、基礎・応用両面にわたって検討を加えたものである。得られた結果は、機能性脂質の実用生産を押し進めるにとどまらず、脂肪酸生合成機構の解明を支援するとともに、新たな産業利用への可能性を提示しており、応用微生物学に寄与するところが大きい。

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、平成20年3月7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。