

氏 名	かわ しま ひろし 河 島 洋
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	論 農 博 第 2130 号
学位授与の日付	平 成 9 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学 位 論 文 題 目	MICROBIAL METABOLISM AND PRODUCTION OF C -20 POLYUNSATURATED FATTY ACIDS (微生物の C-20 高度不飽和脂肪酸の代謝と生産)
論文調査委員	(主 査) 教 授 清 水 昌 教 授 岩 村 倏 教 授 熊 谷 英 彦

論 文 内 容 の 要 旨

C-20 高度不飽和脂肪酸は、エイコサノイドの前駆体として、またそれ自体多様な生理作用を示すため、機能性食品や医薬品への応用が期待されている。中でも、ミード酸や 8,11,14,17-エイコサテトラエン酸は、実的な供給源が知られておらず、その生産法の確立が待たれていた。本研究において著者は、C-20 高度不飽和脂肪酸含有油脂の発酵生産を目的とし、アラキドン酸生産菌 *Mortierella* 属糸状菌から種々の突然変異株を取得するとともに、代謝工学的な手法を用いて、上記脂肪酸含有油脂の大量生産法を確立した。また、微生物における高度不飽和脂肪酸合成機構の解明を目的とし、*Mortierella* 属糸状菌から不飽和化酵素に電子を伝達するシトクロム b_5 を精製した。さらに、不飽和化酵素の阻害剤を広く探索し、4 種類の阻害剤を見出した。阻害活性に必要な化学構造の解明や阻害機構の解析により、ほとんど性質のわかっていなかった不飽和化酵素の諸性質の一部を明らかにした。その主な内容は、以下のとおりである。

1) $\Delta 12$ 不飽和化活性の欠損した *Mortierella alpina* から、 $\Delta 6$ 不飽和化活性が上昇し、よって、ミード酸生産性の向上した突然変異株を取得した。本変異株の培養条件を最適化し、従来の 2 倍以上のミード酸生産が可能であることを示した。また、 $\Delta 5$ 不飽和化活性欠損株を用い、 α -リノレン酸を多く含むアマニ油を培地に添加することで、8,11,14,17-エイコサテトラエン酸の大量生産を可能にした。さらに、 $\Delta 5$ および $\Delta 12$ 不飽和化性の両方が欠損した突然変異株を用いると、構造の類似する他の C-20 高度不飽和脂肪酸の含量が顕著に低下した 8,11,14,17-エイコサテトラエン酸含有油脂の生産が可能なのも示した。また、 ^{13}C でラベルしたグルコースや脂肪酸を含む培地で *Mortierella alpina* を培養することにより種々のタイプの ^{13}C 標識高度不飽和脂肪酸が高収量で得られることを明らかにした。

2) *Mortierella hygrophila* からシトクロム b_5 が存在することを示し、アミノ酸配列の一部の決定により、動物由来のチトクロム b_5 と一部相同性を持つことを見出した。また、シトクロム b_5 が実際に電子伝達に関わっていることを示した。*Mortierella* 属糸状菌においても、シトクロム b_5 が不飽和化反応に関与していることを示唆した。

3) 不飽和化酵素の阻害剤を探索し、4種類の阻害剤を見出した。1つは、漢方薬の細辛に含まれるアサリニンなどのリグナン類で、ラット肝臓ミクロソームの $\Delta 5$ 不飽和化酵素を非拮抗的に阻害することを示した。2つ目は抗酸化剤として知られる没食子酸アルキルエステルで、 $\Delta 5$ および $\Delta 6$ 不飽和化酵素を非拮抗的に阻害することや、阻害活性を持つためには、カルボン酸のエステル化と3位水酸基の存在が必須であることを示した。3つ目は、香辛料ターメリックに含まれるクルクミンで、 $\Delta 5$ および $\Delta 6$ 不飽和化酵素を非拮抗的に阻害し、阻害活性を持つためには、二重結合と共役した芳香環、4位水酸基、3位メトキシ基が必要なことを示した。4つ目は、ジヒドロピリジン系カルシウム拮抗薬であるニカルジピンとニフェジピンで、それぞれ $\Delta 5$ または $\Delta 6$ 不飽和化酵素を特異的に阻害することや、いずれの場合も阻害機構は拮抗阻害であることを示した。上記の結果に基づき、不飽和化酵素にはこれら阻害剤を特異的に結合する部位が存在すると考えられることを示唆した。

論文審査の結果の要旨

C-20 高度不飽和脂肪酸あるいは、これらを含有する油脂は、機能性食品や医薬品の素材としての利用が期待されている生理活性脂質である。特に、ミード酸や8,11,14,17-エイコサテトラエン酸は、特異な生理作用を持ちながら、その供給源は知られておらず、実際的な生産法の確立が待たれていた。また、従来、高度不飽和脂肪酸の生合成機構についても解明が待たれる課題であった。本論文は、微生物を用いた上記脂肪酸などのC-20 高度不飽和脂肪酸含有油脂の大量生産法の確立と、高度不飽和脂肪酸の生合成機構の解明を目的として行った研究成果をまとめたものであり、評価すべき点は以下のとおりである。

1) *Mortierella alpina* のミード酸高生酸突然変異株を取得し、ミード酸の大量生産法を確立した。また、生産性の向上が $\Delta 6$ 不飽和活性の上昇に起因することを示唆した。

2) *Mortierella alpina* の $\Delta 5$ 不飽和化活性欠損株を用い、生合成前駆体としての α -リノレン酸に富むアマニ油を培地に加えることによって、8,11,14,17-エイコサテトラエン酸の大量生産ができることを示した。

3) *Mortierella alpina* の $\Delta 5$ および $\Delta 12$ 不飽和化活性の両方が欠損した突然変異株を取得し、8,11,14,17-エイコサテトラエン酸の大量生産法を確立した。また、得られた油脂中の8,11,14,17-エイコサテトラエン酸含量は高く、構造の類似した他のC-20 高度不飽和脂肪酸の含量は逆に著しく低いため、8,11,14,17-エイコサテトラエン酸の高度精製が容易であることを示した。

4) ^{13}C でラベルしたグルコースや脂肪酸を含む培地で *Mortierella alpina* を培養することにより、種々のタイプの ^{13}C 標識高度不飽和脂肪酸が高収量で得られることを示した。

5) *Mortierella hygrophila* からシトクロム b_5 を精製し、分子量の異なる2種類のシトクロム b_5 が存在することを示した。また、そのアミノ酸配列の一部を決定することにより、動物由来のシトクロム b_5 と一部相同性を持つことを見出した。さらに、シトクロム b_5 が実際に不飽和化反応に関与していることを示唆した。

6) 4種類の不飽和化酵素阻害剤を見出し、それぞれの阻害機構、阻害定数、さらに阻害活性に必要な化学構造などを明らかにすることによって、これまでにわかっていなかった不飽和化酵素の性質の一

部を明らかにした。

以上のように、本論文は、代謝工学的手法を用いて、従来得ることのできなかった付加価値の高い高度不飽和脂肪酸含有油脂を、実用的な規模で発酵生産する方法を確立するとともに、高度不飽和脂肪酸の生合成機構の解明に重要な手掛かりを与えたものであり、応用微生物学並びに発酵生理学の進展に貢献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9年1月16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。