

氏名	きしのぶ 岸野重信
学位(専攻分野)	博士(農学)
学位記番号	農博第1473号
学位授与の日付	平成17年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	農学研究科応用生命科学専攻
学位論文題目	Production of conjugated fatty acids by lactic acid bacteria (乳酸菌による共役脂肪酸生産)
論文調査委員	(主査) 教授 清水 昌 教授 加藤 暢夫 教授 植田 充美

論文内容の要旨

本論文は、乳酸菌の脂質代謝を解析する過程で見いだした様々な新規反応に関して、反応生成物の構造等の詳細を説明するとともに、機能性脂質の生産に応用した成果をまとめたものである。主な内容は次の通りである。

(1) 乳酸菌を対象にリノール酸を機能性脂質である共役リノール酸 (CLA) へと変換する活性を探索した結果、*Lactobacillus* 属乳酸菌の休止菌体に高い活性を認めた。また、高生産菌として選抜した *L. plantarum* AKU1009a が生産する CLA の化学構造を解析し、*cis*-9, *trans*-11-octadecadienoic acid (18:2) (CLA1) および *trans*-9, *trans*-11-18:2 (CLA2) であることを初めて明らかにした。このうち CLA1 は有効な生理機能が認められる活性型 CLA であった。本菌の休止菌体を用いる CLA 生産プロセスの効率化を試みた結果、培養時にリノール酸を添加することにより CLA 生産活性が賦活化されること、および活性の発現が対数増殖期後期において顕著であることを明らかにした。また、反応条件を検討した結果、嫌気的条件が CLA 生産に適していることを明らかにした。至適反応条件下における CLA 生産は 40mg/ml に達し、その際のリノール酸からの変換率は 33% であった。異性体生成比は反応条件により制御可能であり、L-セリン、グルコース、塩化ナトリウムなどを反応系に添加することにより CLA2 の生成が抑制され、CLA1 が選択的に生成した。また、低基質濃度条件にて長時間反応を行うことにより、CLA2 を選択的に生産することができた。

(2) 乳酸菌におけるリノール酸からの CLA 生成経路の解析を試みた結果、水酸化脂肪酸 10-hydroxy-12-octadecanoic acid を中間体とする代謝経路の存在を見いだした。また、リノール酸の CLA への変換反応が、水和および脱水を伴う二重結合の転位反応から成ることを初めて明らかにした。

(3) 水酸化脂肪酸であるリシノール酸からの CLA 生産を検討した結果、*L. plantarum* などの乳酸菌に高い CLA 生産活性を認めた。さらにリシノール酸のトリアシルグリセロールを主成分とする安価な植物性油脂ひまし油の利用を検討した結果、反応系にリパーゼを添加することにより、ひまし油が乳酸菌により CLA へと変換されることを見いだした。

(4) 乳酸菌を利用するリノール酸からの CLA 生産と同様の手法により、様々な不飽和脂肪酸からの新規な共役脂肪酸生産を検討した結果、 γ -リノレン酸、 α -リノレン酸、ステアリドン酸から新たな共役脂肪酸が生産されることを見いだした。そのうち、 γ -リノレン酸、 α -リノレン酸から得られる共役脂肪酸の構造解析を行なった結果、 γ -リノレン酸からは *cis*-6, *cis*-9, *trans*-11-octadecatrienoic acid (18:3) および *cis*-6, *trans*-9, *trans*-11-18:3 が、 α -リノレン酸からは *cis*-9, *trans*-11, *cis*-15-18:3 および *trans*-9, *trans*-11, *cis*-15-18:3 が生成することを確認した。また、さらなる飽和化生成物として α -リノレン酸からは *trans*-10, *cis*-15-18:2 が、 γ -リノレン酸からは *cis*-6, *trans*-10-18:2 が併産されていることも認めた。よって、共役化反応は脂肪酸飽和化反応の部分反応であることが明らかとなった。さらに α -リノレン酸および γ -リノレン酸からの対応する共役脂肪酸生産に関して、反応条件の至適化を試みた結果、それぞれ 25mg/ml および 8.8mg/ml の生産を達成した。

論文審査の結果の要旨

乳酸菌は古来より発酵食品製造に利用され、またヒトの腸内細菌であるものも多いことから、安全性の高い微生物と認知されている。このような背景から、プロバイオティクスに代表されるように、食品・医薬品の分野において乳酸菌の機能を活用する動きが盛んになりつつある。しかし、多様な乳酸菌機能の大半は、未解明である。本論文では乳酸菌の代謝機能を脂質代謝に関して解析し、様々な新規反応を見いだすとともに、それらを機能性脂質の生産へと応用した結果がまとめられている。以下に示す点が具体的な成果として評価できる。

- (1) 共役リノール酸 (CLA) は、栄養学や薬理学的見地から注目を集めている機能性脂質であり、特に *cis*-9, *trans*-11-octadecadienoic acid (18:2) および *trans*-10, *cis*-12-18:2 は、抗腫瘍活性、抗癌作用、抗動脈硬化作用、体脂肪減少作用など様々な生理活性を示すことが報告されている。現在これら活性型 CLA は、リノール酸の化学的異性化により供給されているが、安全性・選択性の面での問題が指摘されている。本論文では、微生物を用いる安全性・選択性の高い生産プロセスの開発が展開され、乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* AKU1009a を用いる新規な CLA 生産法が確立された。すなわち、乳酸菌によってリノール酸を効率的に CLA へと変換するための培養条件および反応条件の最適化が図られるとともに、反応生成物の詳細な構造解析から *cis*-9, *trans*-11-18:2 および *trans*-9, *trans*-11-18:2 が選択的に生成していることが明らかにされた。また、反応に影響を与える諸因子の詳細な解析に基づき、化学的異性化では困難であった異性体の選択的生産が達成された。
- (2) 乳酸菌におけるリノール酸からの CLA 生成経路は、水酸化脂肪酸 (10-hydroxy-12-octadecaenoic acid) を中間体とするものであり、一連の反応は、水和および脱水を伴う二重結合の転位反応から成り立っていることが初めて明らかにされた。本論文ではこの成果を利用し、水酸化脂肪酸であるリシノール酸やリシノール酸の天然資源であるひまし油からの活性型 CLA 生産法が確立された。
- (3) 自然界には CLA 以外にも多数の共役脂肪酸が存在しており、その生理活性にも注目が集められているが、適当な供給源を欠いているのが現状である。本論文では乳酸菌によるリノール酸からの CLA 生産法を、様々な不飽和脂肪酸の変換へと展開することにより、多様な新規共役脂肪酸生産法が確立されるに至っている。さらに反応経路の解析を行なうことにより、未解明であった乳酸菌の不飽和脂肪酸代謝を化合物レベルで確立した。すなわち、脂肪酸共役化反応が、脂肪酸飽和化反応の部分反応であるとする新知見を得ている。

以上のように、本論文は乳酸菌による共役脂肪酸生産について基礎・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、未解明であった乳酸菌の不飽和脂肪酸代謝を初めて明らかにしたのみならず、その成果をもとに新規な機能性脂質生産法を確立した点において、乳酸菌の産業的利用における新たな局面を提示しており、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17年1月13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。