

学位論文要旨

Study on long-chain alcohol utilization pathways in the glycolipid-producing yeast *Starmerella bombicola*

(糖脂質生産菌 *Starmerella bombicola* における長鎖アルコール資化経路に関する研究)

広島大学大学院理学研究科 数理分子生命理学専攻
氏名 高橋 史員

1. 研究の背景と目的

アルキルポリグリコシド (APGs) は、高い起泡性と肌への非侵襲性を併せ持つ安心・安全な優れた洗浄剤であり、各種の洗剤等に配合されている。APGsの工業的生産は、主に糖とアルコールを原料とした化学合成により行われているが、原料アルコールを多量に必要とし、高温・高圧下での反応を行うために原料グルコースが変性してしまう等の問題がある。このような実情から、より効率のよい生産方法を開発するため、微生物を用いた常温、常圧でのAPGsの製造技術が検討されている。例えば、バイオサーファクタントとして有用なソホロリピッドの生産酵母である *Starmerella bombicola* を、糖と2級アルコールを含有する培地で培養すると、生産物としてAPGsの一種であるアルキルソホロシドを生成することが知られている。

しかしながら、安価な1級アルコールを原料とした場合、生産物収率が著しく減少するという課題が存在した。そこで本研究では、微生物による常温・常圧下での高収率なAPGs製造法を構築するため、これまでに不明であった本菌のアルコール資化経路の解明を行った。

2. *S. bombicola* における1級アルコール資化経路の解明と、長鎖アルコール酸化酵素FAO1遺伝子破壊株による、新奇アルキルポリグリコシドの生成と物性解析

微生物における長鎖アルコール代謝経路は NAD(P)⁺ を電子受容体とするアルコールデヒドロゲナーゼ系、もしくは酸素を受容体とする脂肪族アルコールオキシダーゼ (fatty alcohol oxidase: FAO) 経路が知られている。*S. bombicola* の1級アルコール資化経路として、ペリプラズムにFAO活性を有することが知られているが、配列情報や酵素の特性解析は報告されていない。私は *S. bombicola* のゲノム解析を行い、既知のFAOである *Candida tropicalis* FAO2 と低い相同性 (35%) を示す新規なFAO1遺伝子を見出した。大腸菌にてFAO1遺伝子を異種発現し、機能解析を行った結果、鎖長4から16までの1級アルコールに対し酸化活性を示し、FAO活性を有することが明らかとなった。

次に *S. bombicola* における栄養要求性株の選抜、形質転換系を構築し、FAO1遺伝子の破壊を行った。その結果、 Δ FAO1株は1級アルコールに対する資化能、及び増殖能を失うことが明らかとなった。これらの結果から、本菌における1級アルコールの主た

る代謝経路は、FAO1 による酸化であることが示唆された。

△FAO1 株を用いてグルコースと 1-テトラデカノールを反応させた結果、1-テトラデカノール骨格から成るソホロリピッド生産能の向上と、未知化合物が得られた。該化合物を精製後、LC-MS 及び加水分解後の GC-MS によってアルキル基の構造を解析した。未知化合物を構成するアルキル基は 1, 13-テトラデカンジオールもしくは 1, 14-テトラデカンジオールであり、これらジオールに糖鎖が 4 つ付加した新規な糖脂質であることが示唆された。両末端ジオールの配糖体化合物は報告例がほとんど認められず、新規性が高い。△FAO1 株により生産されたアルキルソホロシド混合物は、野生株が生産するソホロリピッドと比較し水溶性の向上、発泡性の顕著な向上が認められ、工業上有用な性質を有していた。

3. *S. bombicola* における 1 級アルコール酸化酵素 FAO1 の 2 級アルコール資化経路での役割の解明

第 2 章では、2 級アルコールの代謝資化経路の解明を行った。FAO1 遺伝子欠損株は 2 級アルコールを資化できないため、FAO1 は 2 級アルコール代謝経路においても主たる酸化反応として寄与すると考えられる。しかしながら FAO1 は 2 級アルコールを基質としてほとんど認識しないため、アルコール分解における初発酸化段階は、2 級アルコール基の酸化ではないと考えられた。そこで、FAO1 遺伝子欠損株にて 2 級アルコール、グルコースを基質として培養したところ、 ω 末端、 ω 末端が水酸化されたジオール型の糖脂質が得られた。また、ソホロリピッド合成に寄与する糖転移酵素である UGTA1 を欠損させると、上記糖脂質は消失し、 ω 末端、 ω 末端ジオールの蓄積が認められた。これらの結果から、*S. bombicola* における 2 級アルコールは、 ω 末端の水酸化を受けた後、FAO1 により酸化され β 酸化経路へと入り資化されると考えられた。

まとめ

本研究では、糖脂質生産菌である *S. bombicola* において 1 級アルコール酸化酵素 FAO1 を同定した。FAO1 は本菌において長鎖アルコール代謝経路に大きな寄与を示すことを証明し、FAO1 遺伝子破壊株では投入されたアルコールを効率よく配糖体として変換できることが示された。本研究はアルコール代謝経路を解明した基盤的な成果だけではなく、新たな配糖体、糖脂質、両末端ジオールの合成法として有用であると考えられる。