

# 学 位 論 文 の 要 旨

論文題目 ヒト皮脂脂肪酸の微生物生産と化粧品素材への応用

氏 名 荒 木 裕 行

## 論文の要旨

ヤハズカズラ (*Thunbergia alata*) はキツネノマゴ科ヤハズカズラ属の植物であり、Black-eyed Susan vine とも呼ばれている。熱帯地方から亜熱帯に自生する本植物の種子には cis-6-ヘキサデセン酸 (サピエン酸、C16:1Δ6) が非常に多く含有 (約 85%) されていることが知られているが、その存在意義、有する機能については不明な点が多い。C16:1Δ6 は、炭素数 16 個で分子内 (C6 位) に二重結合を 1 つ有する不飽和脂肪酸であり、ヒト皮脂脂肪酸の主要成分としても見出されている。とくにヒトの皮膚、毛髪にてその存在が明らかとなっており、それらの恒常性維持に寄与していると考えられているが、その特異な局在性と未解明な生理作用から、非常に稀有な脂肪酸と考えられる。この特異な C16:1Δ6 の従来の製法はヤハズカズラ種子からの抽出をベースとした多段階の精製法、または 1-クロロ-4-ブロモブタンをウンデシンと反応させた後に数工程を要する有機合成による方法が知られており、安価かつ大量の需要に応えることは困難といった課題があることから、簡便かつ安価な製法の確立が望まれている。

一方、化粧品、スキンケア製品、ヘアケア製品といった日用品の多くには、防腐剤などの各種抗菌性化合物が配合されている。直近の世界の潮流として、代表的な汎用防腐剤であるパラオキシ安息香酸エステル (パラベン類) が内分泌かく乱物質として懸念物質リストに掲載され、分岐パラベンは配合禁止、長鎖パラベン使用への規制も強化されるといった課題が浮上している。その様な動向からヒトへの安全性が高い抗菌性化合物を防腐剤代替化合物として活用することに期待が高まっている。

申請者は、本研究において上記課題へ対応すべく微生物機能を利用した C16:1Δ6 の新たな発酵生産体制の確立、生産効率向上に向けた関与遺伝子の解明、さらには C16:1Δ6 の工業的利用先としての化粧品製剤への応用を目的とした研究を展開した。

本論文は、5 章より構成されている。

第 1 章では、本研究の背景と目的について記述した。有用化合物の微生物生産として本研究の背景に繋がる脂肪酸、とくに不飽和脂肪酸の発酵生産体制に関する事例を総括した。さらに、C16:1Δ6 の従来の工業的製法の概要を示し、改善が求められる工程などを指摘した。また、C16:1Δ6 の性質や生理活性を総括した。とくに抗菌性などの有用性ととともに、これまでの研究成果として得られているアトピー性皮膚炎患者に対する皮膚性状改善効果について記述することで、さらなる C16:1Δ6 の応用展開への期待について記述した。以上を踏まえ本研究の意義と目的を明確に記述した。

第 2 章では、本研究の目的の一つである C16:1Δ6 の発酵生産体制の構築について記述した。微生物による工業レベルの簡便な生産体制の確立に向けて、これまでの検討にて構築してきた *Rhodococcus* 属細菌による休止菌体反応での反応条件をベースに増殖連動型による発酵生産培養条件を検討した。当該物質生産菌によって生産された C16:1Δ6 エステルが培養後半にて分解される現象が確認されたことから、分解を抑制することでさらなる生産性向上を図るべく、エステラーゼ活性低減変異株の取得を行った結果について記述した。13,000 株から選抜したエステラーゼ

活性 40%低下変異株を利用しての培養条件の最適化検討にて、重要な因子として見出した金属イオンの生産性に及ぼす効果の検証結果を記述した。金属イオンとして  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MnSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、および  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  の個々の添加効果を検討し、各々の至適濃度が 2 mM、2  $\mu\text{M}$ 、60  $\mu\text{M}$ 、5  $\mu\text{M}$ 、かつ、 $\text{ZnSO}_4$  を削除した最適化培養条件を設定した。本条件を踏まえて増殖連動型発酵生産体制、すなわち、工業生産に向けたさらなる培地改良検討として、工業グレードの酵母エキスの利用、リン酸緩衝液濃度 (0.25~0.35M)、基質濃度 (イソプロピルヘキサデカン酸 : 20~22%)、pH (7.0~7.3) の最適化を経て、簡便な増殖連動型工業生産体制による 61 g/l/4 日の生産性を確立した結果について記述した。10 m<sup>3</sup> の既存設備を転用し、今回構築した増殖連動型の生産体制をベースとする製造方法にて、変動費、固定費を合わせた全部原価として ¥13,500/kg を達成した。ヤハズカズラの種子として 10 万円以上/kg、試薬として 20~100 万円/kg といった販売価格状況から、約 1/7~1/70 の売価に相当する安価かつ大量生産体制を世界で初めて確立することができた。

第 3 章では、C16:1 $\Delta$ 6 の生産に関わると考えられる酵素 desaturase 遺伝子の取得について記述した。C16:1 $\Delta$ 6 は cis-6 位に二重結合を 1 つ有する脂肪酸であり、 $\Delta$ 6-desaturase (EC 1.14.19.3) の関与が考えられたため、 $\Delta$ 6-desaturase 遺伝子に焦点を絞り、*Rhodococcus* 属細菌からの本遺伝子の取得を試みた。*Rhodococcus* 属細菌からの  $\Delta$ 6-desaturase 遺伝子の取得に関する報告が皆無であったため、これまでに報告されていた数種の  $\Delta$ 6-desaturase 遺伝子の共通配列 (Histidine box 配列) からプライマーを合成し、PCR による増幅、本取得配列から Inverse PCR による  $\Delta$ 6-desaturase 遺伝子全長配列の取得について記述した。取得された約 5.7 kbp の遺伝子内には  $\Delta$ 6-desaturase 様遺伝子である 2 つの遺伝子 *Rdes1* (1260 bp) および *Rdes2* (1239 bp) がタンデムに連結していることを明らかにした。*Rdes1* は 420 アミノ酸残基 (aa) から成る 45 kDa、*Rdes2* は 413 aa から成る 43 kDa のタンパクをコードしていることが判明した。*Rdes1* と *Rdes2* のアミノ酸レベルでの相同性は 59% であった。*Rdes1* と *Rdes2* の個々の機能を確認するため、各遺伝子を pET-15b ベクターのマルチクローニングサイト内 T7 プロモーター下流に配置し、個々に大腸菌に導入、発現させた。その形質転換体の脂肪酸組成として 2.0 倍および 3.0 倍の C16:1 $\Delta$ 6 の増加を確認した。取得遺伝子によって構成される酵素はこれまでに報告されている  $\Delta$ 6-desaturase とは異なるクラスターを形成する新規な酵素であることが明らかとなった。両遺伝子の取得により遺伝子組換え技術を活用した工業的な C16:1 $\Delta$ 6 生産への途を拓いた。

第 4 章では、C16:1 $\Delta$ 6 の抗菌性に関する検討およびその抗菌特性を利用した化粧品素材としての応用について記述した。本物質の抗菌特性として、様々な製剤型への応用を踏まえ、ヒト、環境に主に存在すると報告のある各種微生物に対する抗菌性を幅広く検討した。本結果から、グラム陽性菌に対する優れた抗菌性を確認すると共に、とくに *Staphylococcus* 属 (*S. aureus* および *S. epidermidis*) および *Clostridium* 属 (*C. perfringens* および *C. butyricum*) 細菌の中で種特異的な選択殺菌性という非常に興味深い抗菌特性を有することを明らかにした。とくに皮膚常在菌である *S. epidermidis* (表皮ブドウ球菌) に比較して外来菌であり病原性菌、特定菌としても分類されている *S. aureus* (黄色ブドウ球菌) に対する高い選択的な抗菌特性を有効活用するため、製剤開発に着手した結果について記述した。C16:1 $\Delta$ 6 の元来ヒト皮膚に存在するという特異的な局在性から、刺激を感じ易い部位への適用、また、製剤の使用中に微生物の混入、増殖による変臭といった品質課題への対応、として C16:1 $\Delta$ 6 が有する抗菌特性を利用した口唇粘膜への適用製剤である液状口紅への応用検討について記述した。化学合成法によって製造され各種製剤にて汎用的に利用されている防腐剤であるパラベン類、ならびに化粧品の汎用素材であり抗菌効果を有するオレイン酸を本物質に置換することで、ヒトへの刺激が少なく、変臭抑制効果が確認された結果について記述した。本結果から C16:1 $\Delta$ 6 の化粧品やパーソナルケア製品といった幅広い製品、さらなる幅広い製品形態への抗菌素材としての応用展開の可能性について記述した。

第 5 章では、本研究を総括した。本研究では、C16:1 $\Delta$ 6 の増殖連動型による発酵培養生産体制、C16:1 $\Delta$ 6 エステルの分解抑制を志向したエステラーゼ活性低減変異株の創生、最適培養条件による工業生産化体制、の各段階を確立することによって、ヒト健康に特異的な作用を有する C16:1 $\Delta$ 6 の工業的生産体制の確立に成功した。また、 $\Delta$ 6-desaturase 様の新規な 2 つの遺伝子の取得、そ

の大腸菌内での発現、大腸菌構成脂肪酸としての C16:1 $\Delta$ 6 濃度の向上を確認した。本研究の波及効果として、本研究で初めて取得された $\Delta$ 6-desaturase 様遺伝子の生物学的意義や新規な活用法としての遺伝子組み換え微生物による高効率微生物生産体制の可能性を示した。さらに、極めて高価格であった C16:1 $\Delta$ 6 を従来価格の 1/7~1/70 で供給可能な体制を構築したことによって、各種製品の防腐剤代替素材としての応用を図るべく、各種微生物に対する抗菌性の明確化、その抗菌特性を活用した液状口紅での効果を確認した。ヒトに優しい抗菌性物質としての化粧品素材への応用展開を皮切りに、新たな応用展開への可能性を提示した。

以上より、本研究成果を基盤として医薬品、医薬部外品、化粧品をはじめとしたスキンケア、ヘアケア製品、より安価な原料が要望される家庭用製品、本物質の特性を活用した食品などへの展開によって、ヒトの健康が岩盤となる豊かな生活文化の実現に貢献できる道が拓けたと考えている。