

博士論文

ヒト皮脂脂肪酸の微生物生産と化粧品素材への応用

令和6年7月

荒木 裕行

表題

(和文) ヒト皮脂脂肪酸の微生物生産と化粧品素材への応用

(英文) Bacterial production of a human sebaceous fatty acid and its application to cosmetics

論文の区分

課程外博士

著者名

荒木 裕行

現所属

花王株式会社 技術開発センター 品質技術 G (品質基幹技術)

申請日

2024年07月16日

紹介教授

所属 広島大学大学院統合生命科学研究科

職名 教授

氏名 三本木至宏

所属 近畿大学工学部化学生命工学科システム工学研究科

職名 教授

氏名 仲宗根薫

目次

略記.....	1
本論.....	2
第1章：序論.....	2
背景と目的.....	2
第2章：cis-6-ヘキサデセン酸の発酵生産体制の構築.....	8
第1節：諸言.....	8
第2節：実験方法.....	8
第3節：実験結果.....	10
第4節：考察.....	18
第5節：小括.....	21
第3章：Desaturase 様遺伝子の取得.....	22
第1節：諸言.....	22
第2節：実験方法.....	23
第3節：実験結果.....	27
第4節：考察.....	40
第5節：小括.....	43
第4章：cis-6-ヘキサデセン酸の抗菌特性および液状口紅への応用検討.....	44
第1節：諸言.....	44
第2節：実験方法.....	45
第3節：実験結果および考察.....	49
第4節：小括.....	63
第5章：総括.....	64
第6章：引用文献.....	67
主要論文.....	74
謝辞.....	75

略記

AD : Atopic dermatitis__アトピー性皮膚炎

Aw : Water activity__水分活性

C16:1 Δ 6 : *cis*-6-hexadecenoic acid__ヘキサデセン酸

C18:1 Δ 9 : *cis*-9-oleic acid__オレイン酸

GC : Gas chromatography__ガスクロマトグラフィー

IPH : Isopropyl hexadecanoic acid__イソプロピルヘキサデカン酸

IP Δ H : Isopropyl hexadecenoic acid__イソプロピルヘキサデセン酸

MS : Mass spectrometry__マススペクトロメトリー

MSG : Glutamic acid monosodium salt__グルタミン酸モノナトリウム塩

SCD : Soybean casein digest__ソイビーンカゼインダイジェスト

本論

第1章

序論

背景と目的

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 と呼ばれている(Fig. 1-1(A))。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 (全脂肪酸の約85%) されていることが知られているが、その局在性、存在意義、および機能については不明な点が多い。

C16:1Δ6 はカルボキシル末端より数えて6番目と7番目の炭素間に二重結合を1つ有する16個の炭素にて構成される不飽和脂肪酸 (Fig. 1-1(B))であり、ヒトの皮膚、毛髪にてその存在が明らかとなっており、とくにヒト皮脂を構成する脂肪酸の主要な成分として見出されている[1-6]。ヒト皮脂脂肪酸は皮膚最外層のバリア機能を担っており、外来菌の防御に重要な役割を果たしていることが報告されている。その脂肪酸の有する抗菌性により皮膚上の微生物叢の均衡が維持されているとも推察されている[6-11]。

(A)



(B)

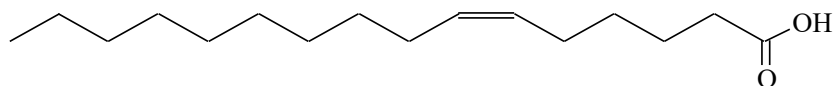
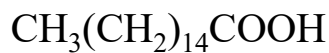


Fig. 1-1. Appearance of *Thunbergia alata* and chemical structure of *cis*-6-hexadecenoic acid (C16:1Δ6).

(A); *T. alata*, (B); C16:1Δ6

ヒト皮膚上の多種多様な微生物群、すなわちヒト・マイクロバイームに関しては、昨今の次世代シーケンサーを利用したメタゲノム解析手法の適用により、これら微生物叢の詳細が明らかとなりつつある[12]。このような研究から、ヒトの皮膚常在菌や生活環境から付着した外来微生物の作用によって、体臭や皮膚の状態が変化することも徐々に明らかとなっている。中でもニキビや肌荒れ、フケといった症状やアトピー性皮膚炎 (AD)などの疾患は、皮膚に棲息する微生物のバランスが崩れた際に皮膚の状態の悪化原因となっていることも多く、皮膚に常在する微生物の良好かつ安定な恒常性維持がスキンケアの重要な要素の1つとしても考えられている。そのため、皮脂脂肪酸のコントロール、とりわけその主要な構成成分である C16:1Δ6 のコントロールは極めて重要であり、皮膚性状を決定付ける因子として非常に特異な脂肪酸と考えられる。

C16:1Δ6 の工業的生産方法についての報告は極めて少なく、先述した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、製薬企業によって 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複数段階の工程を経て製造する化学合成法が特許化されているのみである[13, 14]。これら製法は非常に複雑、且つ多段階を要するため、汎用的な利用を踏まえた工業的規模での物質生産方法としては課題が残る。

機能性を有した脂肪酸の微生物による工業的規模での製造法に関しては、日本鉱業 (現 ENEOS 株式会社)にて開発された、トリデカンを基質とし *Candida tropicalis* による酸化反応を利用したブラシル酸 (1, 13-トリデカンジカルボン酸)の発酵生産が非常に有名である。ブラシル酸はエチレングリコールとの縮合反応を経て、合成ムスクであるエチレンブラシレートとして様々な香粧品に香料素材として利用され、1998 年には 500 ton/年の生産量との報告がなされている[15]。また、糸状菌である *Mortierella* 属による γ -リノレン酸[16-18]やアラキドン酸[19-21]といった多価不飽和脂肪酸の発酵生産検討は精力的に行われており、中でもアラキドン酸に関しては *Mortierella alpina* 1S-4 株による高含有油脂の工業的規模での安定した発酵による供給体制が確立されており、年間 10 ton 以上の生産量 (2016 年時点)を達成している。アラキドン酸は乳児用ミルクの添加物や種々の乳製品の品質を高めるための素材として世界的に注目、利用されているとともに、さらなる高付加価値化として栄養補助食品や医薬品等の素材としての応用検討も進められている[19-22]。この様な脂肪酸、不飽和脂肪酸の微生物生産に関しては生産される物質が微生物の菌体内に蓄積されるため、後処理工程の煩雑さが課題として上げられる。

不飽和脂肪酸の生理学的な効果については幾つか興味深い報告がなされている。例えば、リノール酸はコレステロールのレベルを低下させることが示されており[23-25]、AD の症状を改善するとの報告もなされている[26-30]。アラキドン酸に関しては胚発生にとって重要な役割を担っており、とくに脳の発育には重要な物質として知られているとともに[31-33]、ガン細胞の死を誘導するとの報告もなされている[34]。不飽和脂肪酸の機能として報告されている抗菌特性に関しては、オレイン酸 (C18:1Δ9)をはじめとしてこれまでに数多くの検討

がなされているが[35, 36]、とくに C16:1Δ6 の抗菌特性に関しては、先に記述した特許にてカンジダ症の原因菌である *Candida* 属菌、黄色ブドウ球菌、連鎖球菌、大腸菌、といった限定された病原性菌に対する抗菌効果の報告がなされているものの、詳細はこれまで明らかとなっていない状況であった[14]。

一方、一般的な消費者が日常生活にて使用する各種消費財の中身（製剤）には、使用期間中に混入した微生物による汚染を防止するために防腐剤を初めとした各種抗菌性物質が配合されている。消費財に使用する抗菌性物質はヒトが直接接触する可能性を踏まえて、また、環境中に放出される可能性を踏まえて、安全性の高い剤を安全性が確保される安全率を踏まえた濃度にて処方されている状況がある。しかしながら昨今、とくに抗菌性物質の中でも防腐剤として認められている物質に対する規制強化の動きが激しい状況にある[37, 38]。例えば、代表的な防腐剤であり化粧品等のパーソナルケア製品に汎用的に使用されている物質であるパラベン類が、内分泌攪乱物質として懸念物質リストに上げられ、分岐パラベン類の配合禁止、さらには長鎖パラベン類の規制濃度上限低減に至った[39]。また、各種消費財は消費者による使用後に生活排水、廃棄物等の様々な形で環境中に排出されることとなるため、SDGs (Sustainable Development Goals)/ESG (Environmental Social Governance)視点からも消費財に使用される成分への関心は年々増している。このようなヒトや環境への影響を踏まえた規制強化の流れは欧州を中心に非常に速い速度で変化しており、本流れが ASEAN 地域を初めとして世界各地に伝播して行く現状がある。このように、各種化学物質への制限、とりわけ製剤の微生物学的品質を維持する上で重要な防腐剤への制限が年々強化されている状況を受けて、欧州、米国、日本といった地域にて防腐剤を守る活動：Preservative Defense 活動、が活発化している。とくに米国では、防腐剤を守る活動に加えて、新規な抗菌効果を有する物質の探索、開発に対する活動を積極的に推進するプロジェクトが設置され、様々な団体、企業の積極的な参加を募り、それら参画機関より資金提供を受けて本課題に対する研究を後押ししている状況がある。

このような世の中の動向も鑑み、C16:1Δ6 の非常に特徴的な局在性およびその興味深い抗菌特性を応用した製剤開発にて社会へ貢献することを目的として、本研究では 2 つの大きな課題、すなわち本物質の安定した簡便で安価な工業生産体制の確立と各種製品に適用可能な素材としての応用に取組んできた。

これまでに進めてきた工業生産体制検討として、土壌より分離したアルカン資化性菌の中から、*Rhodococcus* 属細菌 KSM-B-3M の 2 次変異株である KSM-MT66 株が各種のアルキル化合物（アルカン、クロロアルカン、脂肪酸エステル）を不飽和化し[40]、菌体外に不飽和化合物を生産することを見出している (Fig. 1-2)。中でもイソプロピルヘキサデカン酸 (IPH) を基質として利用した際に、その第 6 位に *cis* 二重結合を導入しイソプロピルヘキサデセン酸 (IPΔH) を生成することを見出し (Fig. 1-3)、C16:1Δ6 が IPΔH を加水分解して容易に取得できることから、本変換反応に着目した工業化生産検討を進めてきた。本菌を利用した休止菌体反応による生産体制として、本菌の休止菌体を 5% (wet w/v) となるように IPH 20%

(w/v)、0.25 M リン酸緩衝液 (pH 7.0)、グルタミン酸 Na (MSG) 1.0% (w/v)、thiamine 2 mM、MgSO₄ 2 mM を含有する液に対して添加し、2.6 l の bioreactor を利用した 1 l の仕込み量にて 26°C での通気攪拌反応系での C16:1Δ6 生産体制を構築している。本反応系は、水、油、菌体から構成されており、反応後の O/W type の乳化溶液を静置し、分離した水相を廃棄、油相に基質を再添加することで W/O type に相転移させ、疎水性の hollow fiber にて生産物である C16:1Δ6 を回収する新規な後処理工程も構築している。本休止菌体反応系にて IPΔH として 50 g/l/3 days の生産性を得ており、基質濃度の最適化による繰返し反応系 (13 cycle、約 300 時間) では 0.8 g/l/h の生産効率を達成している。尿素アダクト法、エバポレーション、シリカカラムによる精製工程を経て、高純度 (97%以上) に精製する後処理工程の開発にも成功し[41-43]、これら製造法に関する特許を取得している[44-46]。しかしながら本生産体制の課題として、植物からの抽出法や化学合成法よりは簡略化され高い生産性を安定的に確保できる製造法ではあるものの、多段階かつ複雑な工程を経るため、より簡便でより安価な工業的な生産体制の確立が所望されている。

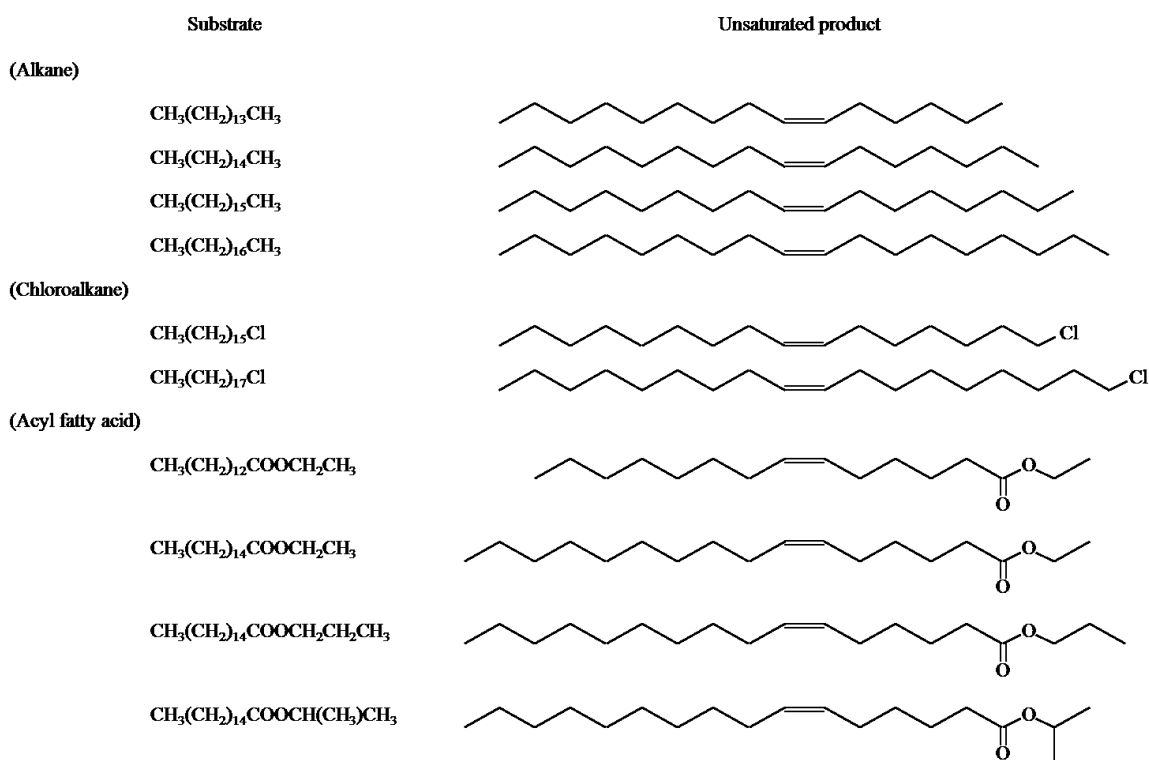


Fig. 1-2. The pattern of regiospecific desaturation of aliphatic substrates by *Rhodococcus* sp. strain cells [40].

The figure illustrates typical examples of the desaturation reactions catalyzed by the rhodococcal cells.

また、各種製品素材としての応用研究として、AD 患者 9 名および健常者 10 名を対象と

した検討にて、上腕から採取した皮脂中に含まれる C16:1Δ6 の存在量が健常人と比較して AD 患者においては低下している傾向にあり、AD 患者の患部においては、黄色ブドウ球菌の検出数と C16:1Δ6 の存在量に負の相関を認めている[47, 48]。臨床的な pilot test として、AD 患者の患部に対し従来の治療薬に替えて C16:1Δ6 含有 lotion の塗布を実施し、AD 患者患部の 75%で黄色ブドウ球菌数の減少を確認するとともに皮膚性状改善効果を確認している[47, 48]。さらに、脇臭に関与するアポリポプロテイン D の分解を抑制することで不快臭の低減、すなわち脇臭といった体臭抑制効果を示すことを確認し、菌に対する直接的な効果ばかりでなく反応を阻害する因子としての症状改善効果も確認されている[49]。ヒト以外への展開として、イヌやネコといった小動物で発症する膿皮症の原因菌である *Staphylococcus intermedius* に対する抗菌効果を見出し、膿皮症を患ったビーグル犬での効果も確認している[50]。このような検討結果から、ヒトばかりでなく現代のライフスタイルとして家族同様の存在となっているペットにも優しいケア剤への応用も含めて、本物質へのさらなる展開への期待が持たれている。

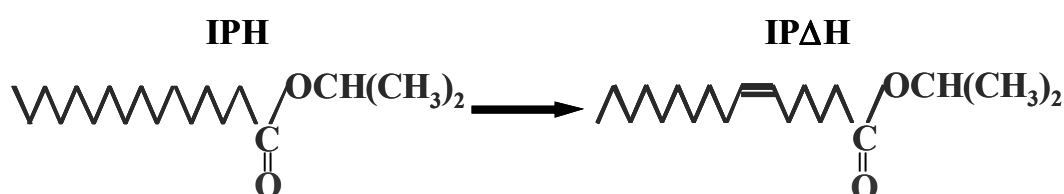


Fig. 1-3. Conversion of IPH by *Rhodococcus* sp. strain KSM-MT66 [40, 51].

本論文では、本物質のさらなる安定生産体制の確立として、これまでに確立した休止菌体反応による C16:1Δ6 の生産体制よりもさらに簡易的な工業的生産体制、すなわち増殖連動型による発酵生産体制の確立について記述した[51]。また、遺伝子工学的手法による本物質の安定かつ高生産体制の構築に向け、本物質生産に関与する可能性のある遺伝子として分子内の 6 位に *cis*-2 重結合を導入する酵素である desaturase (EC1.14.19.3)を標的とし、当該物質生産菌である *Rhodococcus* 属細菌から初めてΔ6-desaturase 様遺伝子の cloning を実施、その機能確認を実施した結果について記述した[52]。さらに、確立した増殖連動型発酵生産体制にて製造された本物質を用いて、各種製品素材としての応用展開を図るべく、幅広い菌種に対する抗菌特性を精査した。その特性、その存在様式を活かした製剤系の一例として、微

生物による変臭課題を有し、刺激を感じ易く安全性上も特段の留意を図ることが求められるヒト粘膜への適用製剤である液状 lip gloss への応用展開について記述した[53]。これら検討結果から、C16:1Δ6 が各種製剤系にて微生物学的品質維持に重要な新規抗菌成分として非常に有望な物質であること、さらに幅広い製品への抗菌素材としての応用の可能性について記述した。

第2章

C16:1Δ6 の発酵生産体制の構築

第1節：諸言

C16:1Δ6 の *Rhodococcus* 属細菌による生産体制として、これまでに構築した休止菌体反応には大きく4つの煩雑な工程、即ち、(1)菌体の増殖、(2)菌体の回収、(3)基質と菌体との接触、(4)疎水性 hollow fiber を利用した生産物の相転移による回収、を経る必要があった。これら工程をさらに簡略化し、より簡便でより安価なさらなる工業化を指向した生産体制を確立すべく検討を実施した。

本章では各種基質に対して2重結合を導入する能力を獲得した *Rhodococcus* 属細菌 KSM-MT66 株から誘導した esterase 活性低下変異株である KSM-T64 株の取得とその変異株を利用した IPΔH のより簡略化された生産法、すなわち、増殖連動型の発酵生産法、その培養条件の最適化、ならびに本変異株を利用した工業的な増殖連動型の発酵生産法の確立について記述する。また、構築した増殖連動型の発酵生産体制を基本とした工業的規模での生産体制による本物質の生産費用の検討結果についても記述する。

第2節：実験方法

微生物

本実験では KSM-MT66 株とその esterase 活性低下株である KSM-T64 株 (FERM P-18182 in NITE) を使用した。KSM-MT66 株は土壌より分離されたアルカン資化性菌である *Rhodococcus* 属細菌 KSM-B-3 株 (FERM BP-1531 in NITE) の2次変異株であり [54]、MT66 株

からさらに esterase 活性を低減させた変異株が T64 株である。

培地および培養条件

20 ml の種培養培地 (0.5% グルタミン酸モノナトリウム塩 (MSG)、4 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.3% yeast extract [Difco, Detroit, MI, USA]、2 μM $\text{MnSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、50 μM $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、5 μM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、30 μM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、10 mM K_2HPO_4 、および 1.0% glucose)を含む 500 ml フラスコに MT66 株を植菌した。30°C にて 1 日間振とう培養し菌体を増殖させた。本種培養液 0.2 ml を 20 ml の主培養培地 (1.0% MSG、2 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.3% yeast extract [Difco]、2 μM $\text{MnSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、50 μM $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、5 μM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、30 μM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.25 M リン酸緩衝液 (pH 7.0)、および 18% (v/v) IPH を含む 500 ml フラスコに移植し、26°C にて振とう培養を行った。

変異株の育種と選択

変異株の取得に当たっては既報の方法[41]により MT66 株を UV 照射することにより行った。Esterase 活性低下変異株を優先化させるためにアンピシリン濃縮法を適用し、SCD 寒天培地 (Nihon Pharmaceutical, Tokyo, Japan)にて生育させた。数日間培養後、形成された集落 (colony)を SCD 寒天培地および最小寒天培地 (75 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、15 mM KH_2PO_4 、1 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、70 μM $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.1 mM $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、1 mM CaCl_2 、0.1 mM thiamine、0.5% IPH、および 1.5% 寒天)の両培地に採取した。最小寒天培地にて微弱な生育を示した colony に相当する SCD 寒天培地上の colony を採取した。採取した colony を先述した培地および培養条件にて培養し、IPA Δ H の生産能力をガスクロマトグラフィー (GC)にて評価した。

Esterase 活性低下変異株の選別は esterase 活性の簡便測定法により実施した。まず、各株を 5 ml SCD 培地にて個々に 30°C、数日間振とう培養した後、遠心分離により細胞を回収した。回収した細胞は 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0)にて洗浄し、同緩衝液に再懸濁した。そ

の細胞懸濁液を BIOMC 7500 Sonicator (Seiko I & E/Sonics & Materials, Tokyo)にて 10 分間氷上にて破碎した後、遠心分離にて細胞の残渣を回収し、その上清 50 μ l を 5 μ l の酪酸 p-ニトロフェニルを含む 950 μ l の同緩衝液へ添加した。30°C にて 3 分間恒温後、反応液中に遊離された p-ニトロフェノールを吸光度計 (400 nm)にて定量した。

分析方法

培養液中の生産物と残存基質は 2 倍容の酢酸エチルにて抽出し、DB-1 カラム (0.25 mm thick \times 0.2 mm internal diameter \times 30 m long; J & W Scientific, Folsom, CA, USA)と FID 検出器を付属した GC モデル 5890 シリーズ II (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA)にて測定を実施した。流速 29 cm/sec のヘリウムをキャリアーガスとして使用した。スプリット比 75:1、カラムオープン温度を 220°C、注入口および検出器温度を 250°C と設定した。

試薬

IPH は東京化成工業 (Tokyo, Japan)、酪酸 p-ニトロフェニルは Sigma (Saint Louis, MO, USA) よりそれぞれ購入した。Yeast extract は Difco およびアサヒビール (Tokyo, Japan)より購入した。他の物質に関しては分析グレードのものを和光純薬 (Osaka, Japan)より購入した。

第 3 節：実験結果

KSM-MT66 株による IP Δ H の増殖連動型発酵生産

以前の検討結果にて MT66 株の至適条件下における休止菌体反応により 3 日間で約 50 g/l の IP Δ H の生産性を確認している[54]。本生産条件では、休止菌体 1 g (湿潤重量)、1.0% MSG、

2 mM thiamine、および 2 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ を含有した 0.25 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 15 ml に対して 5 ml の IPH を基質として添加していた。

本検討では、IPAH のより簡便で工業的な発酵生産体制の確立を主眼としたため、先ず MT66 株を利用した培養条件の最適化により基礎となる発酵生産条件を設定した。本基礎培地条件では 3 日間の培養にて 18 g/l の IPAH の生産を確認した。MSG が休止菌体反応時に IPAH の生産性を向上させた知見[41]から、IPAH の生産における基礎培地への MSG の添加効果について検討した。その結果、MSG 濃度 1.0% を 2 倍量の 2.0% 添加した系にて IPAH が 26 g/l に向上することが明らかとなった。

IPAH の生産における金属イオンの影響

基礎培地から金属イオンを削除した場合、MT66 株による IPAH の生産性は 3 日間で 3 g/l と顕著に低下することが見出された (データ非掲載)。Koike らの検討[41]では休止菌体反応による IPAH の生産において数種の金属イオンが MSG の消費速度を向上させることが報告されていた。Fig. 2-1 に示すように増殖連動型生産において、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MnSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、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、それぞれの至適濃度が 2 mM、2 μM 、60 μM 、5 μM であることが判明した。とくに Mg^{2+} および Fe^{2+} の添加は顕著な効果を示すことが見出され、両金属イオンが Mn^{2+} および Cu^{2+} とともに最適な濃度条件で添加された場合に IPAH の生産性が 3 日間の培養にて約 50 g/l に向上することが明らかとなった。また、金属イオンの添加効果を検証する中で ZnSO_4 が生産性に対して阻害的に働くことが判明した。 Zn^{2+} は NADH オキシダーゼ[55]やチトクローム P-450[56]、鉄還元酵素[57]といった酵素の活性を阻害することも知られていたため、本物質を培地成分から削除することとした。

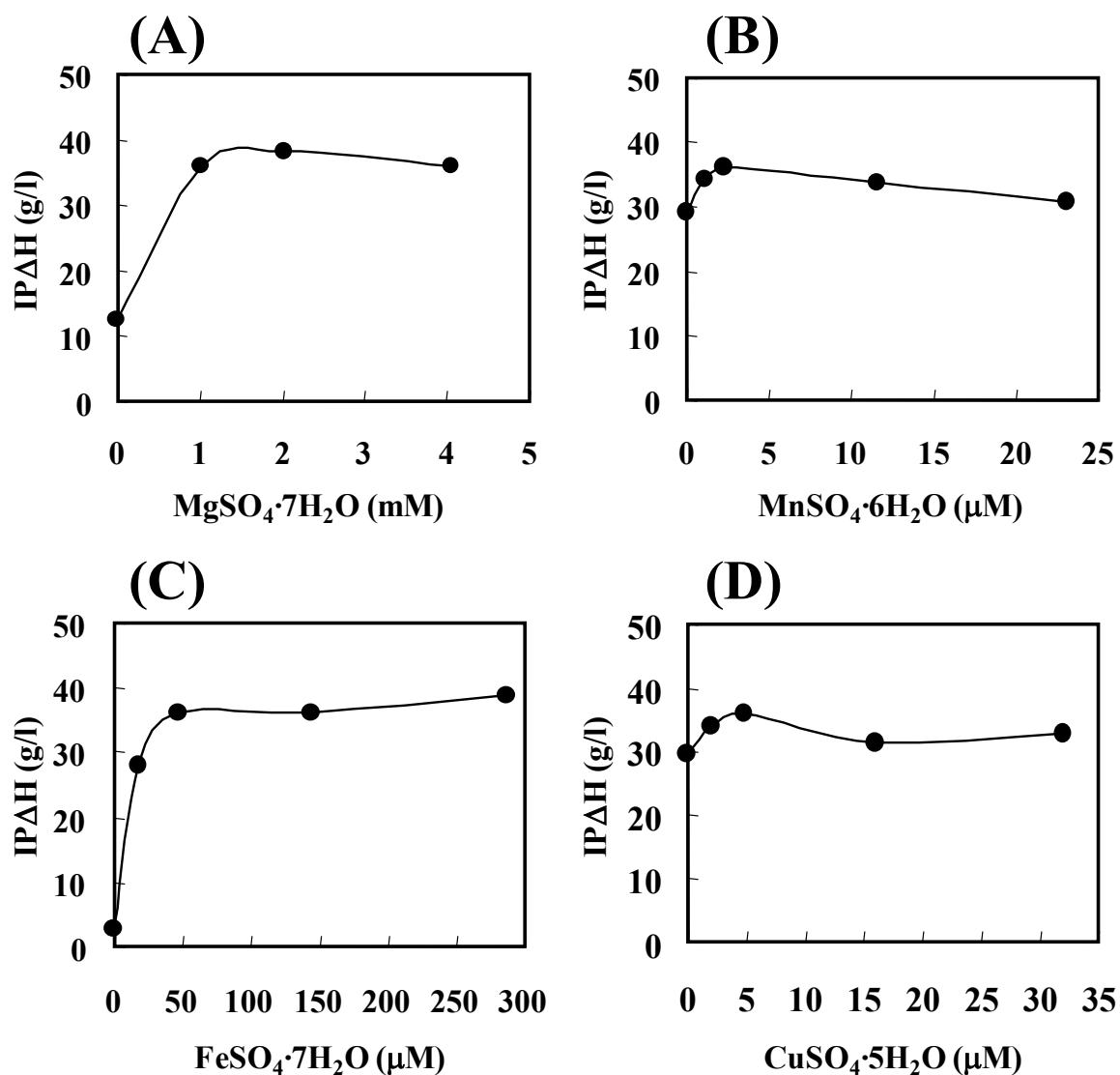


Fig. 2-1. Effects of metal ions on IPΔH production by KSM-MT66 [51].

Cells were incubated with shaking at 26°C for 3 d in the presence of MgSO₄·7H₂O (A), MnSO₄·6H₂O (B), FeSO₄·7H₂O (C), or CuSO₄·5H₂O (D). The basal medium contained 2.0% MSG, 0.3% yeast extract (Difco), 0.25 M potassium phosphate buffer (pH 7.0), and 18% IPH.

Esterase 活性低下変異株のスクリーニング

MT66 株は IPH から菌体外に IPΔH を生産するばかりでなく、その生産物である IPΔH を分解することが見出されており、IPΔH エステルの分解酵素である carboxyl esterase を生産していることが推察された。そのため、IPΔH の高生産化には MT66 株の carboxyl esterase 活性を低減させ、生産後の IPΔH を分解させることなく回収する系を構築する必要があると考え、UV 処理による変異株のスクリーニングを試みた。アンピシリン濃縮後の SCD 寒天培地上に出現した大凡 13,000 colony の中から、112 colony を SCD 寒天培地および IPH を唯一の炭素源とする最小寒天培地の両培地に移植した。112 colony の中から、MT66 株と比較して carboxyl esterase 活性の低減に由来すると考えられる最小寒天培地上での微弱な生育を示した 53 株を選択した。親株である MT66 株を対照として選択した 53 の変異株による IPΔH の生産性を検証した。

それら変異株の中で T64 株と命名した菌株は、親株である MT66 株よりも IPΔH の生産性が 6%向上していることが判明した (Fig. 2-2)。また、T64 株は親株である MT66 株に比較して 40%の esterase 活性しか有していないことが判明した (Fig. 2-3)。T64 変異株は親株である MT66 株に比較して、先に記述した培養条件下で IPΔH を 1.2 倍以上となる 60 g/l の生産性にて菌体外に再現良く生産することが確認できた。

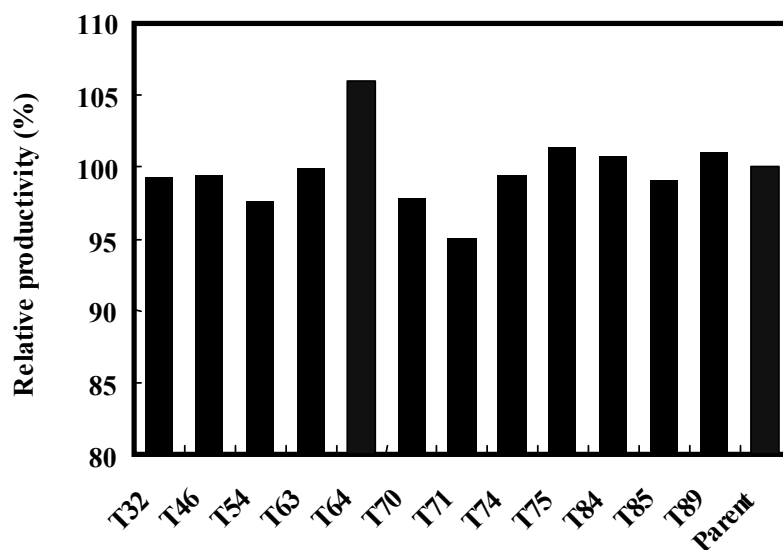


Fig. 2-2. IPΔH production by mutants and parental KSM-MT66 [51].

Cells were cultivated with shaking at 26°C for 3 d in the presence of 18% IPH. Black bars indicate the production of IPΔH (g/l) by mutants, showing percentages with KSM-MT66 taken as 100%.

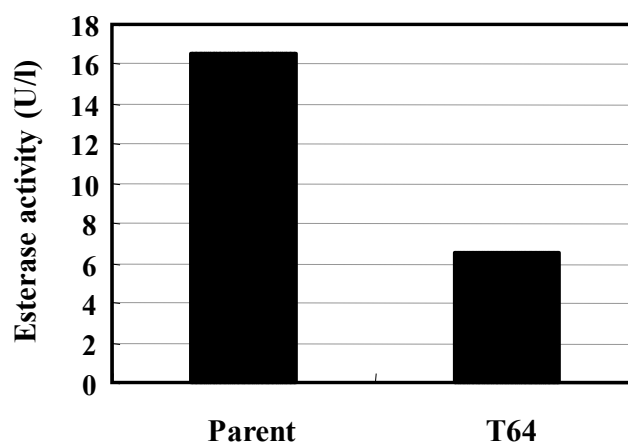


Fig. 2-3. Esterase activity of parental KSM-MT66 and mutant strain KSM-T64 [51].

PNP-butyl was used as a substrate. Reaction was performed in 0.1M phosphate buffer (pH7.0) at 30°C.

基質濃度の効果

T64 株による IPΔH 生産をより経済的に実施するため、試薬グレードである Difco 社製 yeast extract を、より安価な工業グレードのアサヒビール社製 yeast extract P-21 (0.3%)にて置換した。本置換により 4 日間培養による IPΔH の生産性は著しく低下した (46 g/l)。費用対効果を念頭におきつつ、工業的視点での培地の最適化を図るため、P-21 の濃度を 0.3%から 0.8%へ、リン酸緩衝液濃度を 0.25 M から 0.35 M へ、その pH を 7.0 から 7.3 へ変更した。本変更により、4 日間の培養により 55 g/l の生産性を確保することが確認できた。T64 株の培養条件の最適化を進め、最終的には Table 2-1 に示すように 22% IPH を基質として使用し、4 日間の培養によって 61 g/l の最も高い生産性を達成することができた。残存基質は先に報告している方法[43]にて再利用が可能であり、さらに IPΔH はアルカリ条件下の加水分解反応により容易に C16:1Δ6 に変換可能である。これら条件の最適化により工業化に向けた増殖連動型発酵生産体制を確立することができた[58]。

Table 2-1. Production of IPΔH by KSM-MT66 and T64 [51].

Reaction conditions		KSM- MT66	KSM-T64
Reaction process		Resting	Growing
Reaction ingredient	MSG	1%	2%
	Metal		
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	2 mM	2 mM
	MnSO ₄ ·6H ₂ O	-*	2 μM
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	-	60 μM
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	-	5 μM
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	-	-
	Thiamine	2 mM	-
	Yeast extract (P-21)	-	0.8%
	Phosphate buffer	250 mM	350 mM
		pH 7	pH 7.3
	IPH	20%	22%
IPΔH productivity		50 g/l	61 g/l

* Not added.

30 l jar fermentor による IPΔH の生産

構築した至適培養条件にて 30 l jar fermentor による IPΔH の生産を試みた。30 l jar fermentor への生産規模拡張に際して、種培養の容量を 200 ml の培地を含有する 2 l フラスコへ変更し、その全量を 15 l の至適化された主培養培地を含む 30 l jar fermentor に添加した。培養温度を 26°C、攪拌速度 350 rpm、通気量 0.3 vvm、通気圧 0.02 MPa として 培養を実施したところ、4 日間の培養により 43 g/l の生産性を達成することができた (Fig. 2-4)。

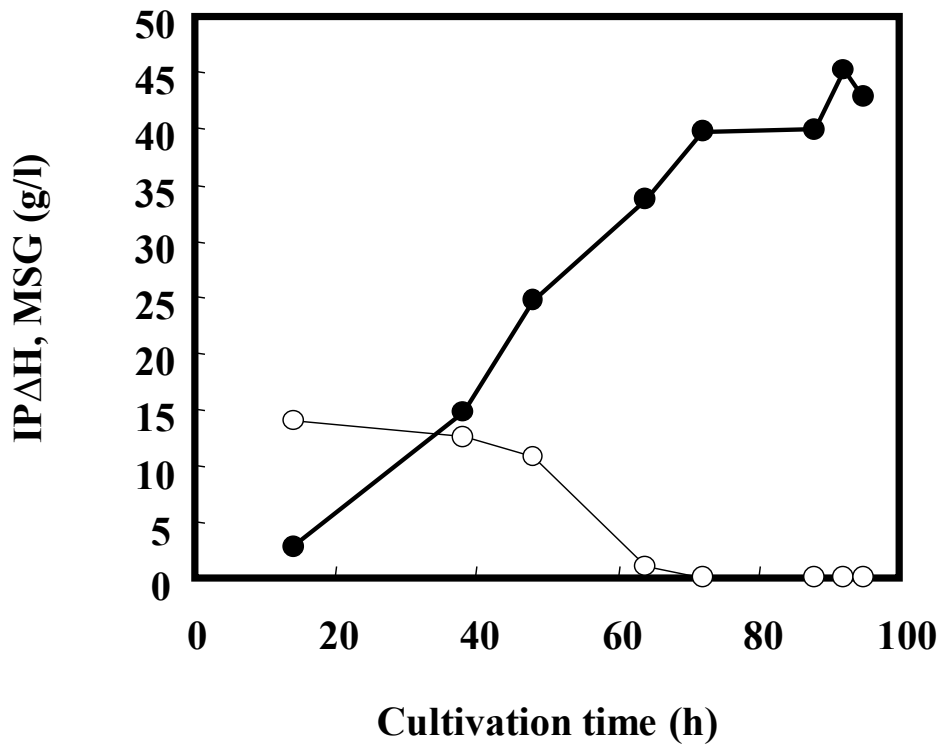


Fig. 2-4. Production of IPΔH with 30 l jar fermentor under optimized conditions by KSM-T64 [51]. Cultivation was performed at 26°C, with agitation at 350 rpm, aeration at 0.3 vvm and pressure at 0.02 MPa, and other conditions were described in the text. Closed circles show the productivity of IPΔH (g/l). Open circles show glutamate consumption (g/l).

第4節：考察

本研究では KSM-MT66 株から派生した変異株 T64 株による IPΔH の工業化を指向した増殖連動型発酵生産体制の確立、30 l jar fermentor によるその有効性検証結果について記述した。本システムはこれまでに構築した休止菌体反応による生産体制に比較して、希少な不飽和脂肪酸をより簡便でより高い生産性にて生産可能なプロセスを提供するものである。今回の生産体制に合わせた後処理工程の簡略化にも検討を加えている。培養液を乳酸による酸性化後、溶剤（ヘキサン）による抽出、遠心分離（固相／液相→液相（水相）／液相（油相））、アルカリ加水分解、中和・水洗、薄膜式蒸留、といった工業的規模の汎用工程を組み合わせ、C16:1Δ6 比率 90% の高純度精製法も確立した (Fig. 2-5)。

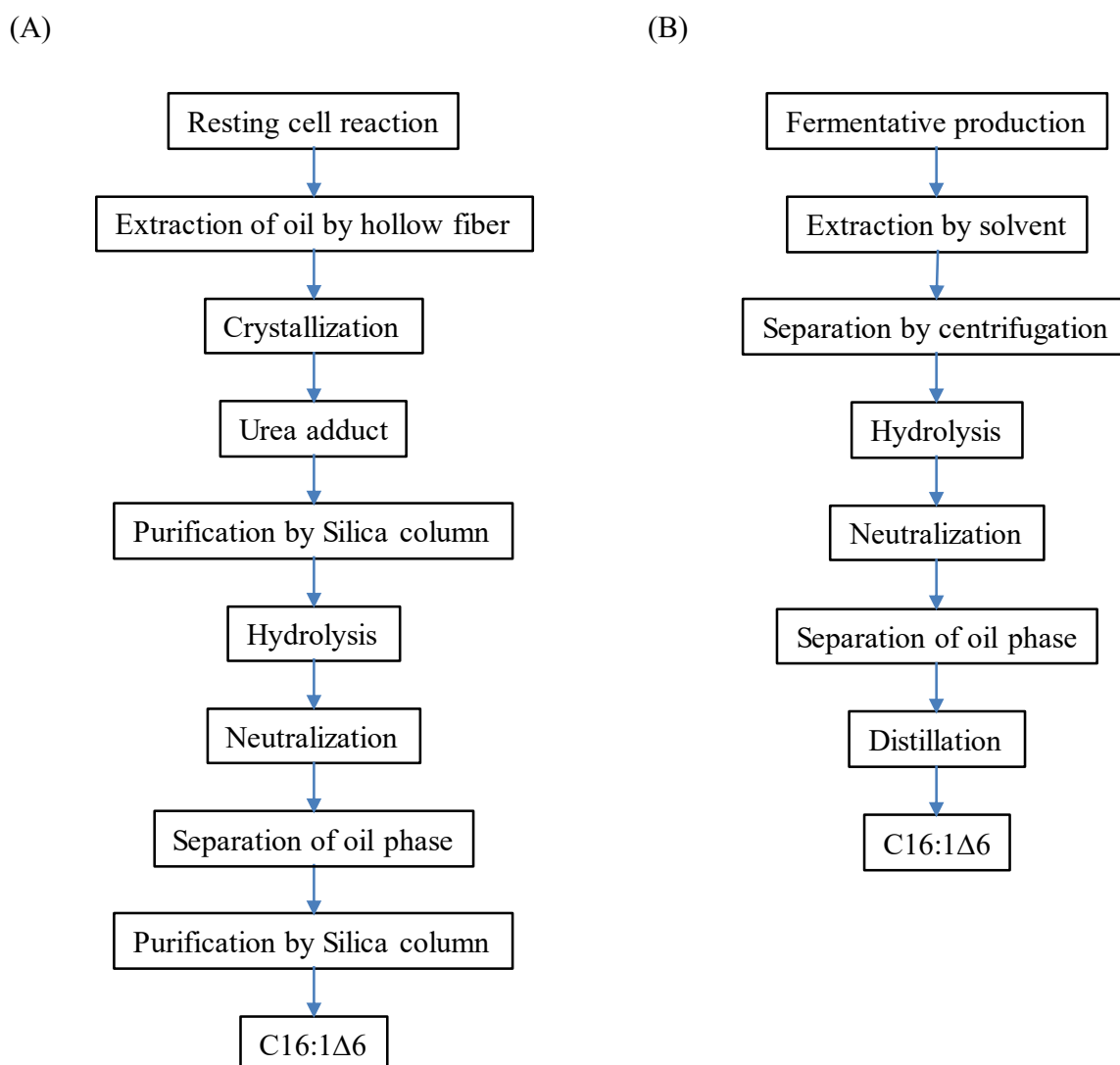


Fig. 2-5. Manufacturing and Purification process of C16:1Δ6.

(A); Resting cell reaction process, (B); Fermentative production process

今回構築した生産体制をベースとした増殖連動型の培養工程と上記の後処理工程にて、弊社 1m³ または 10m³ の既存設備を転用して製造した際の費用試算では、変動費、固定費を含めた全部原価として 1 m³ 設備を稼働させ 1 ton/year の生産量とした場合には¥61,500/kg、10 m³ 設備を稼働させ 7.7 ton/year とした場合には¥13,500/kg と試算している (※弊社でのパラベンエステル使用量の凡そ半量を C16:1Δ6 で置換することを仮定し、4 ton/year の必要量として試算した。Fig. 2-6)。現在試薬として販売されている本物質の価格は 5 mg 当たり¥1~5 万円 (¥20 万円~¥100 万円/kg)、ヤハズカズラの種子として¥10 万円/kg 以上であることを踏まえると、非常に安価で簡便な C16:1Δ6 の工業的生産体制を構築できたものと考えている。また、先述した工業規模でのアラキドン酸のサントリーによる販売価格¥3~5 万円/kg (※アラキドン酸組成比率 40%)[59]、本販売価格の利益を 50%と仮定したとしても、今回構築した C16:1Δ6 の増殖連動型発酵生産体制は純度および価格においても工業化に十分耐えうるものと考えられる。

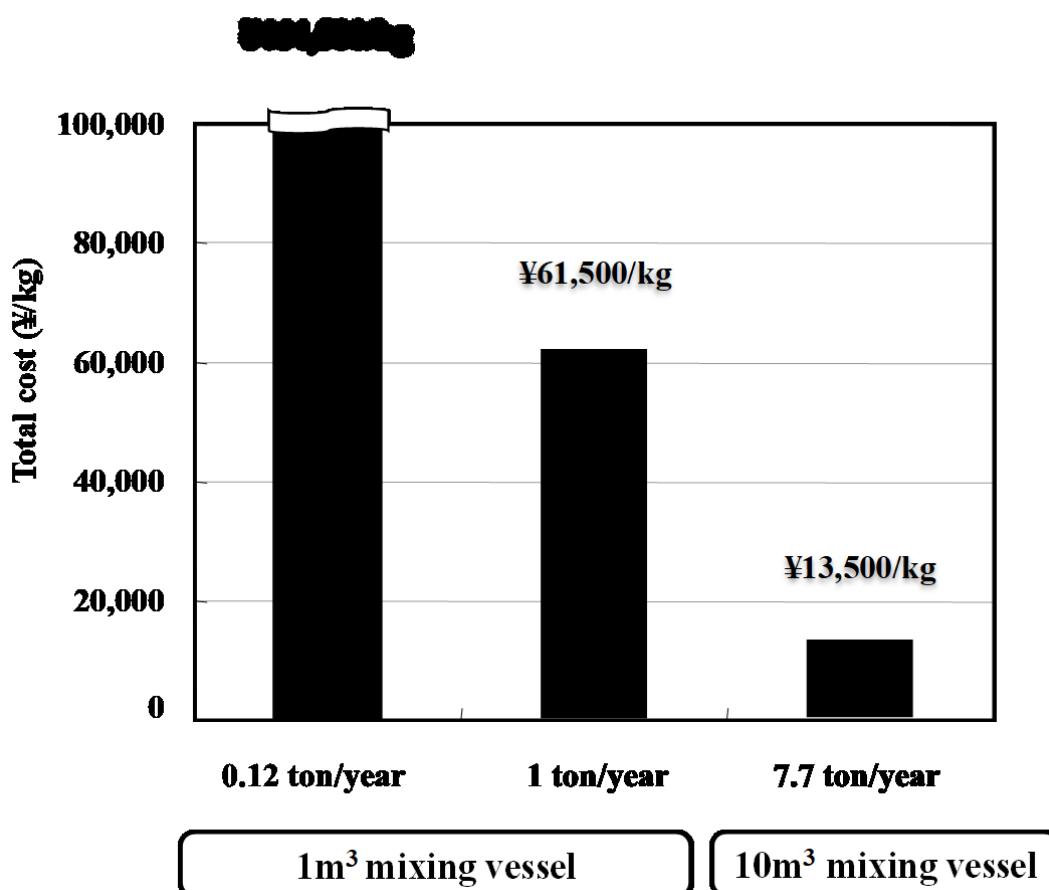


Fig. 2-6. Manufacturing cost estimation of C16:1Δ6.

一般的に不飽和脂肪酸の生産は利用される微生物の菌体内に蓄積される[16]。そのため、本検討の対象である *Rhodococcus* 属細菌による IPΔH の菌体外への生産はこれまでに報告されている他の不飽和脂肪酸の生産とは異なった機構によって生産されていることが伺える。MSG、酸素、脂肪酸エステルとアルカンへの不飽和化反応特性[40, 54]、*esterase* 活性低減変異株による不飽和脂肪酸の生産性向上、といった点を踏まえると、本反応系に関与する酵素システムはこれまでに多数報告されている CoA 型とは相違した CoA 非依存性である可能性も示唆される。MSG は、アラキドン酸の生産性向上と脂肪酸の不飽和化反応に必要な補酵素である NAD(P)H の提供[41, 60]を触媒する、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼの活性向上に関与している可能性[60]が考えられていることから、MSG の添加効果はグルタミン酸のペントースリン酸経路の活性化の可能性が考えられる。また、Fig. 2-1 に示すように、本検討で使用した金属イオンの中で Mg^{2+} と Fe^{2+} が IPΔH の生産性を顕著に向上させたことから、脂質の不飽和化に関与する鉄含有酸化還元酵素[61-63]が IPΔH の生産に関与している可能性も示唆される。今回取得されたこれらの結果を踏まえても、*Rhodococcus* 属細菌による IPΔH の生産機構は極めて珍しく未解明な点も多い。親株と変異株の相違をゲノムレベルで比較することで IPΔH の生産に関与する因子の解明やさらなる高生産化に向けたヒントが得られる可能性がある。本物質のさらに発展した工業化検討にはこれら本機構に関わる詳細の解明が望まれる。

ヒトでは Δ6-desaturase がある特定の条件下にてヘキサデカン酸を基質として利用し、C16:1Δ6 を合成しているとの報告がなされている[3]。そのため、*Rhodococcus* 属細菌による菌体外への特異な本物質の生産に関与すると考えられる酵素である *desaturase*、それを構成する遺伝子の探索研究へとまずは展開し、遺伝子工学的手法による、より安価で簡便な C16:1Δ6 の工業生産体制の確立に繋げて行く。

第5節：小括

C16:1Δ6 は *Rhodococcus* 属細菌 KSM-MT66 株の休止菌体反応によって IPH から IPΔH への変換反応、IPΔH の加水分解反応によって製造が可能である。本特異な不飽和脂肪酸の工業的規模でのより簡便で経済的な生産プロセスを構築するために、*Rhodococcus* 属細菌の増殖に連動した発酵型生産体制の確立を目指し培養条件の最適化検討を実施した。至適条件として金属イオンである Mg^{2+} と Fe^{2+} イオンが IPΔH の効率的な生産には必要不可欠であること、 Zn^{2+} が阻害的に働くことを見出した。さらなる IPΔH の生産性の向上を目指し、培養後半に認められる IPΔH の分解を抑制するために、親株である MT66 株に UV による変異処理を施し、*esterase* 活性低減変異株として T64 株を取得するに至った。本変異株の培養条件の最適化により、親株である MT66 株の生産性 (52 g/l) を上回る生産性である 60 g/l 以上の IPΔH を 4 日間で達成できる系を構築することができた。また、本至適培養条件の 30 l jar fermentor での有効性も確認することができた。本生産体制をベースとしたコスト試算として、10 m³ 既存設備の転用、7.7 ton/year の製造量と仮定した場合に、変動費、固定費を含めた全部原価が¥13,500/kg となり、これまでに報告されている工業規模での不飽和脂肪酸の生産価格に匹敵する簡便かつ安価な微生物による C16:1Δ6 の発酵生産体制を世界で初めて確立することができた。

第3章

Desaturase 様遺伝子の取得

第1節：諸言

カルボキシル末端より数えて 6 番目と 7 番目の炭素間に二重結合を導入する酵素は $\Delta 6$ -desaturase と呼ばれ、リノール酸からリノレン酸の生成に関わる $\Delta 6$ -acyl CoA desaturase (EC 1.14.19.3)がよく知られており、C16:1 $\Delta 6$ 合成に関与する酵素もその触媒特性から本酵素に類似した desaturase と考えられる。これまでに多くの研究者によって動物、植物、糸状菌、細菌から $\Delta 6$ -desaturase の単離が試みられている[64-67]。数種の動物および細菌から単離された $\Delta 6$ -desaturase は acyl CoA または acyl 脂質を基質として認識し、可溶化した形態では無く膜に結合した膜結合型酵素として存在している。そしてこれまでに報告されている全ての微生物由来の $\Delta 6$ -desaturase は唯一リノール酸のような不飽和脂肪酸を基質としてさらに不飽和化することが知られている。多くの研究者はとくに *Mortierella alpina*[16]や *Mortierella cincinelloides*[17]といった糸状菌に注目し、不飽和脂肪酸の工業的生産研究を進めている。これら糸状菌からは2種の $\Delta 6$ -desaturase をコードする遺伝子がそれぞれ単離されており、その配列および機能が解析されている[69-71]。一方、ヒトまたはラットの *FAD2* 遺伝子がコードする $\Delta 6$ -desaturase が飽和脂肪酸を基質として認識し、ある特定の条件下において C16:1 $\Delta 6$ レベルを向上させるといった報告がなされている[3, 68]。

Koike ら[43, 54, 72]は *Rhodococcus* 属細菌の変異株が各種の acyl 脂肪酸、alkane、haloalkane を基質とした際にその中央の位置に二重結合を導入することを見出しているが、C16:1 $\Delta 6$ 生産菌である *Rhodococcus* 属の不飽和化に関与する遺伝子に対する研究アプローチはこれまで行われていなかった。C16:1 $\Delta 6$ 生産に関与する遺伝子が取得できれば、これまでに培ってきたセルラーゼやプロテアーゼといった洗剤用酵素の工業的生産のように、遺伝子工学的手法を利用した対象脂肪酸の大量生産、基質特異性の改変による各種脂肪酸種の取得を自由に実施できるテーラーメイドな脂肪酸生産体制の可能性が考えられる。また、本遺伝子の明確化により C16:1 $\Delta 6$ 製造に関する幅広い製造方法を確立することができるものと考えられる。

一方、*Rhodococcus* 属細菌の膜脂肪酸組成として C16:1 $\Delta 6$ の存在を示す報告がなされており[73]、*Rhodococcus* 属細菌から C16:1 $\Delta 6$ 生産に関与する遺伝子研究、さらには本遺伝子を利用した C16:1 $\Delta 6$ 生産体制検討へと進んで行く可能性も考えられた。この様な状況を鑑み、C16:1 $\Delta 6$ の生産体制および知的財産権をより強固にして行く観点でも C16:1 $\Delta 6$ 生産に関与する遺伝子の取得を早急に実施する必要性が生じていた。

本章では増殖連動型発酵生産体制に使用している *Rhodococcus* 属細菌 KSM-T64 株より $\Delta 6$ -desaturase 遺伝子の取得を試みた結果、すなわち、放線菌である *Rhodococcus* 属細菌から

初めて新規な 2 種の $\Delta 6$ -desaturase 様遺伝子の cloning を実施した結果、およびその遺伝子の発現産物による本遺伝子の機能解析結果について報告する。

第 2 節：実験方法

微生物およびベクター

本研究では alkane 資化性菌として単離された *Rhodococcus* 属細菌 KSM-B-3 株 (FERM BP-1531 in NITE) から派生した esterase 活性低減変異株である KSM-T64 株 (FERM P-18182 in NITE) を使用した [72]。一般的な cloning のための宿主大腸菌として HB101 および JM109 (TaKaRa, Shiga, Japan)、発現用の宿主大腸菌としては BL21 (DE3) (Novagen [Current Merck], Darmstadt, Germany) を使用した。Cloning 用のベクターとしては pUC109 (TaKaRa) を使用し、とくに TA cloning には pT7 Blue-T vectors (Novagen) を使用した。発現用ベクターとしては pET-15b (Novagen) を使用した。

$\Delta 6$ -desaturase の保存配列である histidine motif (Histidine box) に基づいた PCR

Degenerated PCR および Nested PCR を実施するために desaturase 遺伝子にて高度に保存されている領域である Histidine Box [3, 64, 71, 74] に符合する遺伝子を利用した (Fig. 3-1)。Primer としては下記に示す配列 1、2、3、4 を使用した。

配列 1: 5'-YTGGTGGAAGGRYAABCAYAA-3'

配列 2: 5'-RGGGA AVARRTGGTG-3'

配列 3: 5'-CAYAAYNMDCAYCA-3'

配列 4: 5'-GTGGTGCTCRATCTGGWARTT-3'

(*) Y、R、B、N、M、D、V、W はそれぞれ混合塩基を示す。Y: C/T、R: A/G、B: C/T/G、N: A/C/G/T、M: A/C、D: A/G、V: A/C/G、W: A/T

Primer 1 および 3 は Histidine box 2 (WWXXXHXXHH) を、primer 2 および 4 は Histidine box 3 (XXQIEHHLFP) を対象として設計した。染色体 DNA を 50 ng、primer を 0.5 μ M、TaKaRa Ex Taq polymerase (Takara) を含む混合溶液にて PCR を実施した (25 μ l)。特異性を高めるために以下に示す Touch Down PCR 条件を適用した。

Touch Down PCR: 94 °C x 1 分 → { 94 °C x 1 分、64 °C x 1 分、72 °C x 1 分 → 94 °C x 1 分、62 °C x 1 分、72 °C x 1 分 → 94 °C x 1 分、60 °C x 1 分、72 °C x 1 分 } x 2 サイクル

本サイクル後、以下の条件にて PCR を実施した。

PCR: { 94 °C x 1 分、58 °C x 1 分、72 °C x 1 分 } x 30 サイクル → 72 °C x 10 分 → 4 °C

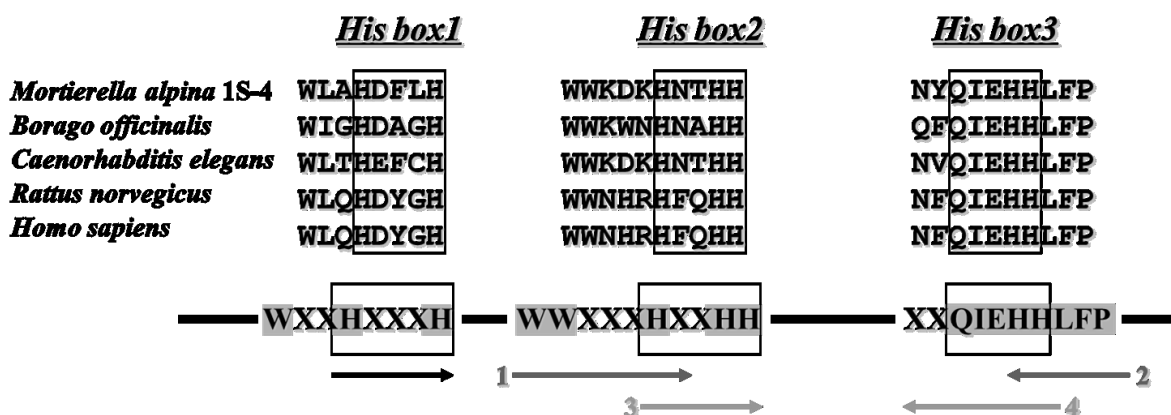


Fig. 3-1. Construction of the primers on the basis of the histidine motifs conserved among known $\Delta 6$ -desaturases [52].

Primers 1, 2, 3, and 4 were 5'-YTGGTGGGAAGGRYAABCAYAA-3', 5'-RGGGAAVARRTGGTG-3', 5'-CAYAAYNMDCAYCA-3', and 5'-GTGGTGCTCRATCTGGWARTT-3', respectively.

取得された PCR 産物を High pure PCR purification kit (Roche, Basel, Switzerland)にて精製した後、一端乾燥させ、再度滅菌イオン交換水 20 μ l に溶解させた。TA cloning を行うべく、その内の 4 μ l を使用して pT7 Blue-T vector (Novagen) 50 ng と 16 $^{\circ}$ C にて一昼夜 Ligation 反応を行った。反応後、エタノール沈殿による精製を行い、滅菌イオン交換水 5 μ l に溶解し、その内の 1 μ l を使用して JM109 に形質転換した。

Inverse PCR は以下の条件にて実施した。染色体約 2 μ g を *Bam*HI または *Sph*I を用いて 37 $^{\circ}$ C にて一昼夜完全に消化した。High Pure PCR Product Purification Kit (Roche)にて精製した後、1/10 倍量の DNA (約 200 ng)を用い DNA Ligation Kit ver.1 (Takara)にて自己環化反応を行った。エタノール沈殿によって精製した後、15 μ l の滅菌イオン交換水に溶解し、その内の 0.5 μ l を Inverse PCR の鋳型として使用した。Inverse PCR は 2 段階にて実施し、1 段階目の PCR 産物に対して 2 段階目の PCR として Nested PCR を適用した。1 段階目の PCR には C 末端側に相補する sense primer として 5'-CCGACTGCCGAACAATGCGATACG-3'、N 末端側に相補する anti sense primer として 5'-GCGAACTTCAATTCGGCAAGCTC-3'を使用し、2 段階目の PCR には sense primer として 5'-GCCGAGCTCCAACGCCCGCTGGAC-3'、anti sense primer として 5'-GGACTCATGAGCGGCAATCTGAAA-3'を使用して TaKaRa Ex Taq polymerase (Takara)にて増幅した (各 primer 濃度は 0.5 μ M)。PCR 条件は 94 $^{\circ}$ C x 0.5 分 \rightarrow 55 $^{\circ}$ C x 0.5 分 \rightarrow 72 $^{\circ}$ C x 4 分を 1 サイクルとして 30 サイクル実施した。

Rdes1 および *Rdes2* 発現プラスミドの構築と発現

大腸菌内で取得遺伝子の発現を行いその機能を確認するべく、各 open reading frame (ORF) に対して大腸菌用発現プラスミドの構築を行った。

Rdes1 ORF は発現用ベクターである pET-15b ベクターの *XbaI* サイトおよび *XhoI* サイトに、また *Rdes2* ORF は *NcoI* サイトおよび *Bpu1102I* サイトに導入した(Fig. 3-2)。

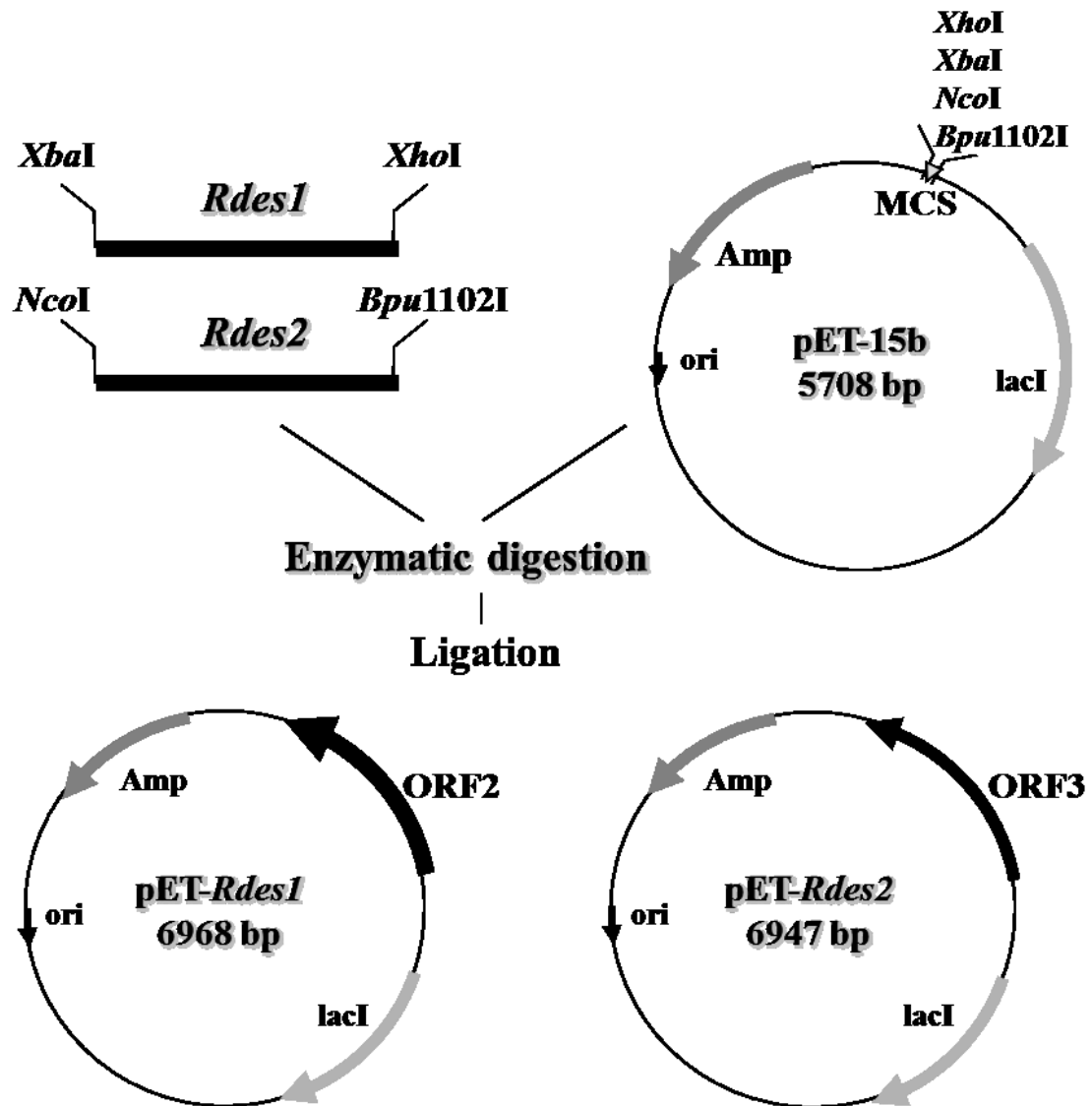


Fig. 3-2. Scheme for construction of the *Rdes1* and *Rdes2* expression plasmids [52].

The *Rdes1* ORF was introduced between the *XbaI* and *XhoI* sites in the pET-15b expression vector, and the *Rdes2* ORF between *NcoI* and *Bpu1102I* sites in pET-15b.

Rdes1 ORF の増幅には以下の primer set を使用した。

Sense primer: 5'-

ATTATCTAGAATAAGGAGATATACCGTGGCCATCACCGATATCAAAGAGTT-3'

(*本配列には *XbaI* site、ribosome binding site を含む。

Antisense primer: 5'-ATTACTCGAGTTATCACTTCCGGCGCTTCGGCAT-3'

(*本配列には *XhoI* site を含む。

Rdes2 ORF の増幅には以下の primer set を使用した。

Sense Primer: 5'-ATTACCATGGCGATTGCAGATGTCAAGGAA-3'

(*本配列には *NcoI* site を含む。

Antisense Primer: 5'-ATTTGCTCAGCGCAGGCCGAGGAGGCT-3'

(*本配列には *Bpu1102I* site を含む。

PCR には Pyrobest DNA polymerase (Takara) を使用し、100 μ l の反応系にて染色体 DNA 0.5-50 ng、各 primer 0.5 μ M にて PCR 反応を実施した。*Rdes1* および *Rdes2* の各 ORF に関しては以下の反応条件を適用した。

Rdes1 ORF: 95 °C x 1 分 → 66 °C x 1 分 → 72 °C x 1.5 分を 1 サイクルとして 30 サイクル

Rdes2 ORF: 95 °C x 1 分 → 64 °C x 1 分 → 72 °C x 2 分を 1 サイクルとして 35 サイクル

取得された PCR 産物を High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) にて精製した後、その内の 10 μ l を使用して、上記制限酵素 10~50 Units により 37 °C にて 7 h~一昼夜消化した。消化後 High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) にて精製し、同酵素にて消化した pET-15b vector 100 ng と DNA Ligation Kit ver.2 (Takara) にて Ligation 反応を行った。エタノール沈殿にて精製、乾燥後、滅菌イオン交換水 5 μ l に溶解し、その内の 1 μ l を使用して HB101 へ形質転換した。

発現プラスミドの取得には大腸菌 BL21 (DE3) (Novagen) を使用した。上記にて構築した発現プラスミドを BL21 (DE3) に形質転換した。取得された形質転換体は 50 μ g/ml のアンピシリンを含有する LB 培地に接種し、一昼夜 37 °C にて培養した。培養液の一部を同 50 μ g/ml のアンピシリンを含有する LB 培地に接種し、1 時間培養を継続した。発現させるタンパクの誘導のため、イソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド (1 mM) を培養液に添加し、3 時間培養を継続した。培養液の 10 μ l を SDS-PAGE に供した。

脂肪酸の抽出と GC および GC/MS による解析

形質転換された大腸菌 BL21 (DE3) を 22,400 g、4 °C にて 10 分間遠心分離し、細胞を回収した。回収した細胞を滅菌生理食塩水にて 2 回遠心・洗浄した後、25% (v/v) メタノールに 15% (w/v) となるように水酸化カリウムを溶解した溶液を湿菌体重量 1 g 当たり 20 ml 添加した。本細胞懸濁液を 70 °C、6 時間攪拌しながら保温した後、硫酸にて酸性化、この溶液を 2 倍量のヘキサンにて 4 回抽出して脂質を抽出した。本サンプルを 5% (v/v) 塩酸メタノ

ール溶液にてエステル化し、Ulbon HR-SS-10 column (50 m x 0.25 mm i.d., Shinwakako, Kyoto, Japan)を付帯した GC およびガスクロマトグラフィー/マススペクトロメトリー (GC/MS) 分析 (GC-17A CLASS GC-10, Shimadzu, Kyoto, Japan) に供した。カラム温度条件としては、100°Cにて2 分間恒温した後、昇温速度 6°C/分にて 210°C まで昇温させ、その後 25 分間同温度にて恒温した。注入温度と検出器温度はそれぞれ 250°C、270°C とし、split ratio を 1:25 とした。

配列情報検索

相同性検索には DDBJ (http://blast.ddbj.nig.ac.jp/report#T5HYE5_1) (2020.01.12 時点)の blastn または blastp を、疎水性度の検索には SOSUI (<http://harrier.nagahama-i-bio.ac.jp/sosui/>) を利用した。Domain 検索には NCBI Conserved Domains (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) (2020.01.12 時点)を利用した。タンパクの 2 次構造予測には Jpred 4 (http://www.compbio.dundee.ac.uk/jpred4/index_up.html) (2020.01.12 時点)、または GENETYX version 6.15 を利用した。

遺伝子登録番号

本研究にて同定された遺伝子はジーンバンクに寄託し、ORF1 (*Rred1*)に関しては AB847089、ORF2 (*Rdes1*)に関しては AB847087、ORF3 (*Rdes2*)に関しては AB847088 として登録した。

第3節：実験結果

Δ6-desaturase の保存領域である histidine motif に基づいた *Rhodococcus* 属細菌からの desaturase 様遺伝子の単離と発現

Degenerated および Nested PCR により agarose gel 電気泳動にて約 560-bp の PCR 断片を取得した。本 560-bp の遺伝子断片には *Mycobacterium* 属の有する Linoleoyl-CoA desaturase と相同性が認められる配列が存在していたため、本遺伝子断片の配列情報から Inverse PCR を実施し、ゲノム DNA の *SphI* および *BamHI* 消化物から 3.3-kbp および 3.5-kbp を増幅した。本 Inverse PCR 産物の Direct sequencing により 5.7-kbp の遺伝子情報を取得 (Fig. 3-3)、この 5.7-kbp の領域内に 3 つの ORF を同定した。一つ目の ORF1 (*Rred1*)は推定される開始コドンから 1,134 塩基 (bp)、378 アミノ酸 (aa) より構成され、GC 含量は 64.1%であった (Fig. 3-4)。二つ目の ORF2 (*Rdes1*)と三つ目の ORF3 (*Rdes2*)はそれぞれ 1,260 bp および 1,239 bp、420

aa および 413 aa よりそれぞれ構成され、GC 含量はそれぞれ 59.9%、63.3%であった (Fig. 3-5, Fig. 3-6)。 *Rhodococcus* 細菌の GC 含量が一般的に 60~70%前後であることを踏まえると、取得した ORF は対象とした *Rhodococcus* 属由来のものとして妥当な値を示していると考えられた。とくに *Rdes1* と *Rdes2* は光合成細菌の desaturase (360 aa をコード)[75]よりも両者大きく、線虫、糸状菌、およびヒトから単離されている N 末端領域にチロクローム b5 ドメインを有する front-end desaturase よりも小さいものであった。また、*Rdes1* および *Rdes2* には Fig. 3-7 に示すように全ての膜結合型 desaturase に存在する 3 つの histidine motif[63]が存在することが判明した。これらのことから *Rdes1* および *Rdes2* は本 *Rhodococcus* 属細菌ゲノム内に tandem に存在する desaturase 様遺伝子であることが判明した。取得された *Rdes1* および *Rdes2* の ORF を大腸菌 BL21 (DE3)にて個々に発現させた際、抽出タンパクの SDS gel 電気泳動にて一つの特徴的な 45 kDa の分子量を有するバンドが検出された (Fig. 3-8)。

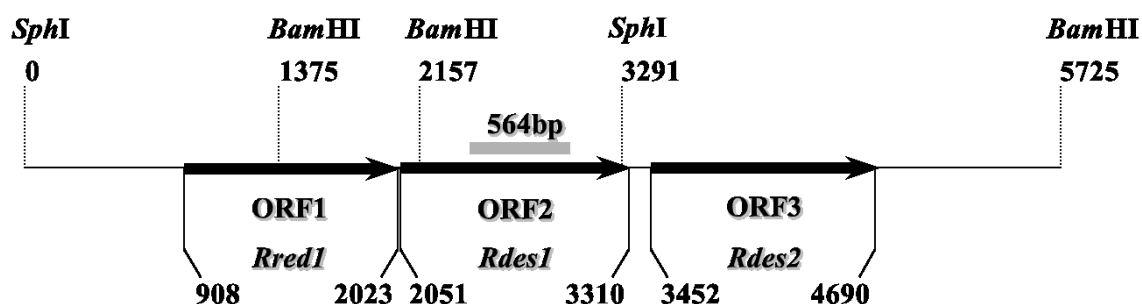


Fig. 3-3. Schematic diagram of the genomic region isolated by inverse PCR [52].

Gray bar indicates the region amplified in the first PCR series involving nesting and degenerate primers.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90
GTGAGAGGTGGAGTCTGATGGGTCTGAAGGACTGGATCGAGGACCACGGCAGCGTCGGTAGTTCGGGCAGCGGGTGAAGCTCAATCTG
V R G G G L M G L K D W I E A P A A S V V P A A R S K L N L

      100     110     120     130     140     150     160     170     180
CTTCGGGTGCGGGCGGCTCGGCTGACCACACCATTTGCTTCCCAGACTATCTGCACCTCGCGAATCCGTTGTGGTCTGCCGCGAGCTG
L R G A A A R L T T P L L P D D Y L H L A N P L W S A R E L

      190     200     210     220     230     240     250     260     270
CGCGGCCAGATCGTCAAGTCCGGCCCGAGACCACGGACTCGGCGACCATCGTCATCAAGCCGGGTGGGGATTGACTTCAACTACCAG
R G Q I V E V R P E T T D S A T I V I K P G W G F D F N Y Q

      280     290     300     310     320     330     340     350     360
CCGGGGCAGTACATCGGCATCGGTCTGCATATCGACGGCCGTTGGCATTGGCGGTCTACTCACTTACCTCGCTCCCAACTGGGAGAAC
P G Q Y I G I G L H I D G R W H W R S Y S L T S P P N W E N

      370     380     390     400     410     420     430     440     450
AAGCGATTTCCATCGCGGTCAAGGCCATGCCCAGGGCTTTCTCTCGAGCCACCTCGTCAGCGGGGCCGTGCCGTCGGGAACCATCGTT
K R I S I A V K A M P E G F L S S H L V S G A V P S G T I V

      460     470     480     490     500     510     520     530     540
CGACTGGCCACGCTTCCGGCAACTTCCGTTGCCGGATCCGCGCCGGAGAGATCCTGTTTCATCACCGCCGGCAGTGGCATCACTCCG
R L A T P S G N F A L P D P P P E K I L F I T A G S G I T P

      550     560     570     580     590     600     610     620     630
GTCATGGGCATGTTGCGGACGATGAACCGGCGGGTCAATTGCCCGACGTTCATGCACATCCACTCGGCTCCGACGGAATCCGACGTGATG
V M G M L R T M N R R G Q L P D V M H I H S A P T E S D V M

      640     650     660     670     680     690     700     710     720
TTCGCCGACGAACACAGCACTGCACGCCGAGCAGGACTTTCGTGAGCCACGTGCAACTCACGCGACGTGACGGAAAGTTCAAACCT
F A D E L T A L H A E H E D F V S H V Q L T R R D G K F K L

      730     740     750     760     770     780     790     800     810
AGTTCTCTGACACGGTCTGCCCGACTGGCGCGAGGCCACACCTGGGCGTGGGACCCCTCCCGTTGCTCGACGAGCTCGAAGACGTC
S S L D T V C P D W R E R H T W A C G P L P L L D E L E D V

      820     830     840     850     860     870     880     890     900
TGGAAGGCGGAACGCATCGAGGATCGACTCCACATGGAGCGGTTTCGCGTATCGCGCATCGATGCTTCGGCCGACGGTGGCACGGTCCAG
W K A E R I E D R L H M E R F A V S R I D A S A D G G T V T

      910     920     930     940     950     960     970     980     990
TTCGAGAAGTCGGTAAGACGATCACCGTCGACGGTGCACGACGCTTCTGGAGGCGGGCAGCAGTCCGGTGCCTTGATGCCGTTCCGGT
F E K S G K T I T V D G A T T L L E A G E Q S G A L M P F G

     1000     1010     1020     1030     1040     1050     1060     1070     1080
TGCCGCATGGGCATCTGCCAGACGTGTGTCGTACCTCTCGTTGCCGGCCACGCGATCGATCTACGCTCGGGGAAACAGCACGGGAGGGC
C R M G I C Q T C V V P L V A G H A I D L R S G K Q H A E G

     1090     1100     1110     1120     1130     1140
GAGCGCATCCAGACGTGCATCTCCGCCCGCCGGCGACTGTACGCTGGACGCA
E R I Q T C I S A A A G D C T L D A

```

Fig. 3-4. Nucleotide and deduced amino acid sequence encoded by *Rred1* [52].

Translation of nucleotides into amino acids was performed with GENETYX-WIN (ver. 6.1; Soft Wear Development).


```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90
GTGGCCATCACCGATATCAAAGAGTTTTTCGCACCTCACCGAGGCCGATGTCGAAGCTCTCGGACGTGAACTCGATCAGATTCGACTCGAC
V A I T D I K E F S H L T E A D V E A L G R E L D Q I R L D

      100     110     120     130     140     150     160     170     180
ATCGAAGACTCTCGTGGGATCCGGGACGCCCGCTACATTCGTGCGTCAATTCGCGTCCAGCGGGCGTTGGAGCTCGGCGGGCGTATCGCA
I E D S R G I R D A R Y I R R V I R V Q R A L E L G G R I A

      190     200     210     220     230     240     250     260     270
TTGTTCGGCAGTCGGTACCGACCCGGCATGGTTGGTTCGGCAGCACCCCTGCTGAGCCTGTCGAAGATCATCGAGAACATGGAGCTCGGGCAT
L F G S R Y R P A W L V G T T L L S L S K I I E N M E L G H

      280     290     300     310     320     330     340     350     360
AACGTCATGCACGGGCAATGGGACTGGATGAACGATCCCGAGATTCCTCCGTCCTCGTGGGAGTGGGATCAGACCCGTCCTCCGAGCAT
N V M H G Q W D W M N D P E I H S V S W E W D Q T G P S E H

      370     380     390     400     410     420     430     440     450
TGGAAGCGCGCCCAACTACCAGCACACACGTACACCAATGTCGTGCGTATGGACGAGGATCTCGGTTTCGGGATTCGCGTATGACT
W K R A H N Y Q H H T Y T N V V G M D E D L G F G I L R M T

      460     470     480     490     500     510     520     530     540
CGTGACGAGCCGTGGAAGCCGATCAACCTCTTCCAGCCGATCGCCAACGTGATCTTGGCGGCCACGTTTCGAGTGGGGCATCGCGTGCAC
R D E P W K P I N L F Q P I A N V I L A A T F E W G I A L H

      550     560     570     580     590     600     610     620     630
GACCTCACGCGCGACCCGAGTTGGAGGGCGCGAAAAGGGGAGCTGAACCTCGCAGCGAACAAAGACTTCGCGGCAAGATCTTTCGT
D L T A A A E L E G A E K G Q L N S Q A N K D F A R K I F R

      640     650     660     670     680     690     700     710     720
CAGGTGGGCAAGGACTTCATCTTGTTCCTCCGGCGCTGACGGGGCCGGCGTGAAGTCGACCATGTCGGCCAATGCGACCCGCAACCTCGTG
Q V G K D F I L F P A L T G P A W K S T M S A N A T A N L V

      730     740     750     760     770     780     790     800     810
CGCAACCTGTGGGCGTACGTCGTATCTTCTGTGGCCACTTCCCGACCGGTGCCGAGAAGTTCACGGTTGCCGAATTCGAGCAGGAGACT
R N L W A Y V V I F C G H F P D G A E K F T V A E F E Q E T

      820     830     840     850     860     870     880     890     900
CGTCACGAGTGGTACCTGCGCCAGATGCTCGGTAGTGCGAACCTCAATTCCGGCAAGCTCATGGGACTCATGAGCGGCAATCTGAGCTAC
R H E W Y L R Q M L G S A N F N S G K L M G L M S G N L S Y

      910     920     930     940     950     960     970     980     990
CAGATCGAGCACCAGTGTTCCTCCGATCTGCCGAGCAACCGCTATCCCGAAATCGCTGTGAAGATGCGTGCATTGTGCGAGAAGTTCGAT
Q I E H H V F P D L P S N R Y P E I A V K M R A L C E K F D

     1000     1010     1020     1030     1040     1050     1060     1070     1080
CTCCCGTACACCACCGGTTTCGCTCTTCAAGCAGTATCTTCTGGCTCTGCGCACCATCCACAAGTTGGCTTTGCCGGACAAGTGGCTGACC
L P Y T T G S L F K Q Y L L A L R T I H K L A L P D K W L T

     1090     1100     1110     1120     1130     1140     1150     1160     1170
GCAACCTCGGACAATGCTCCGGAACGCTTTCGGAACGCGGTTCCGCGACTCGGGATTCCGGGACGAGCCATGGCGATGGTGGAGGAC
A T S D N A P E T S S E L R F R D S G F R D A A M A M V E D

     1180     1190     1200     1210     1220     1230     1240     1250     1260
CTTGTACCGATCCGATCACCGGTAAGCGTCTCGGTTTGTGACCGCACTCAAGTCGAGGCCCGTCCCGCATGCCGAAGCGCCGGAAG
L R T D P I T G K R L G L L T A L K S Q A R S R M P K R R K

```

Fig. 3-5. Nucleotide and deduced amino acid sequence encoded by *Rdes1* [52].

Translation of nucleotides into amino acids was performed with GENETYX-WIN (ver. 6.1; Soft Wear Development).

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90
ATGGCGATTGCAGATGTCAAGGAATACGCACATCTCACGGACGCCACATCGAGGCGCTCGGCGCGAACTCGACGCGATTTCGTCGCGAC
M A I A D V K E Y A H L T D A D I E A L G R E L D A I R R D

100     110     120     130     140     150     160     170     180
ATCGAGGAGTCGGCGGGGAGAAGGATGCGCGATACGTGCGCAACGTCAATTCGTCTGCAGCGTTTCGCTCGAAATCGGCGGGCCGCGCAGTG
I E E S R G E K D A R Y V R N V I R L Q R S L E I G G R A V

190     200     210     220     230     240     250     260     270
CTTTTCGCCAGCCGTCGTCTCCGGCGTGGCTCGCGGAGTTGGCCTGCTGACGCTCTCGAAGATCATCGAGAACATGGAACCTCGGGCAC
L F A S R R R P A W L A G V G L L T L S K I I E N M E L G H

280     290     300     310     320     330     340     350     360
AACGTGATGCACGGGCGAGTGGGACTGGATGAACGACCCGGAGATCCACTCCACCTCGTGGGAGTGGGACGTACCCGGCCCGCTCGCGCAC
N V M H G Q W D W M N D P E I H S T S W E W D V T G P S A H

370     380     390     400     410     420     430     440     450
TGAAGCAGACCCACAACACTACCTGCATCACAAGTACACCAACGTCCTCGGAATGGACGACGACGTCGGATACGAGACTCCTCCGCGTACC
W K Q T H N Y L H H K Y T N V L G M D D D V G Y G L L R V T

460     470     480     490     500     510     520     530     540
CGCGATCAGCGCTGGAAGCCCTTCAACGCCGCAACCTGGTCTACAACACGCTGCTCGCGCTGTTCTTCGAGTACGGCATCGCCGCGACAG
R D Q R W K P F N A G N L V Y N T L L A L F F E Y G I A A Q

550     560     570     580     590     600     610     620     630
CACCTCGAGCTCGGCAAGTGGCCAAGGGCCGCGCCACAAGGAAGAGACGCGCAAGCTCCGTGAGGTGCGCGAGAAGATCGGCAAG
H L E L G K V A K G R A D K E E T Q R K L R E V G E K I G K

640     650     660     670     680     690     700     710     720
CAGGTCTCGCGACTACGTCATCTACCCGGCCATCACCGGCCGGCGTGAAGAGACGTTGTGCGCAACTTCACCGCCAACACTCTG
Q V L R D Y V I Y P A I T G P A W K S T L S A N F T A N T L

730     740     750     760     770     780     790     800     810
CGGAACGTGTGGACCAACGCGGTATCTTCTGCGGCCACTTCCCGGACGGTGGCAGAAAGTTCACCAAGGAAGACATCGACAAGGAAACG
R N V W T N A V I F C G H F P D G A E K F T K E D I D K E T

820     830     840     850     860     870     880     890     900
CAGGCTCAGTGGTACCTGCGTCAGATGCTCGGCAGCGCAACATCGAGGGCAGCGCTCATGGACTTCATGACGGGCAACCTGAGCTAC
Q A Q W Y L R Q M L G S A N I E G S A L M D F M T G N L S Y

910     920     930     940     950     960     970     980     990
CAGATCGAGCACCACCTGTCCCGGATCTGCCAGCAACCGCTACAAGGACATCGCGGTACGCGTTCAGGTGCGTACGTCGCGGACAAGTACGAC
Q I E H H L F P D L P S N R Y K D I A V T V R Q L A D K Y D

1000    1010    1020    1030    1040    1050    1060    1070    1080
TTGCCGTACACGACGGGCCGCTTGCCGTGCGAGTACGCCAAGTCTGGCGCACCATCGCCAAGCTGTCGCTGCCCAACAAGTACCTCAAG
L P Y T T G P L A V Q Y A K S W R T I A K L S L P N K Y L K

1090    1100    1110    1120    1130    1140    1150    1160    1170
GACACCGTCGACAATGCGCCGAGACGGCGTCGGAGCGGATGTTTCGACGGCGAACTGACCTCGACTGTCGATCCCGTGACCGGGCGTCCG
D T V D N A P E T A S E R M F D G E L T S T V D P V T G R R

1180    1190    1200    1210    1220    1230    1240
AGTGGCCTCAAGAGCGCCATCGCACGTAAGCGCAAGAGCGGAAAGCTGCGCAGCCTCCTCGGCCTGCGC
S G L K S A I A R K R K S G K L R S L L G L R

```

Fig. 3-6. Nucleotide and deduced amino acid sequence encoded by *Rdes2* [52].

Translation of Nucleotides into Amino Acids was performed with GENETYX-WIN (ver. 6.1; Soft Wear Development).

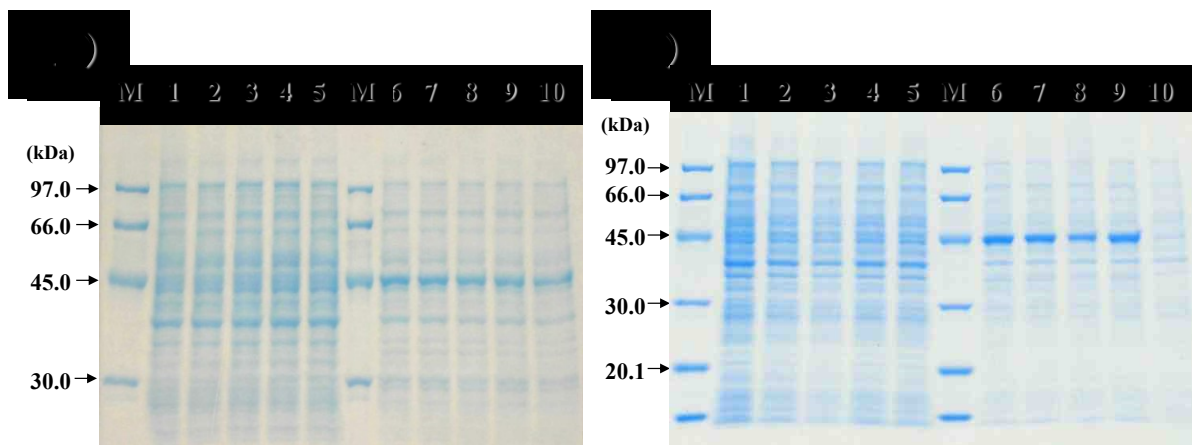


Fig. 3-8. Expression of *Rdes1* and *Rdes2* in *E. coli* BL21 (DE3) [52].

Panel A; expression of *Rdes1*-encoded protein, lane 1-5; protein bands produced by five transformants before IPTG induction, lane 6-10; protein bands produced by same five transformants after IPTG induction, M; Marker. Panel B; expression of *Rdes2*-encoded protein, Lane 1-5; protein bands produced by five transformants before IPTG induction, lane 6-10; protein bands produced by same five transformants after IPTG induction, M; Marker, lane 5 and 10; protein bands produced by transformants carrying only the **pET-15b** vector (control lane). Each gel used in these experiments comprised a 4% stacking gel and a 10% resolving gel. Bio safe CBB-250 (Bio-Rad) was used to stain protein bands.

組換え大腸菌の脂肪酸組成比較による発現 *desaturase* 活性の評価

In vitro での発現タンパクの活性を確認するため、形質転換された大腸菌 BL21 (DE3)の細胞を超音波にて破碎して IPH を基質とした IPΔH への変換反応を試みた。しかしながら本反応系では IPΔH の生成は確認出来なかった。この理由として発現タンパクの大腸菌内での不安定性、大腸菌と *Rhodococcus* との膜構造の相違による基質との相互作用の相違から単純な緩衝液系では進行しなかったものと推察した。それ故、ベクターのみを有する形質転換体を対照として、対象とする遺伝子の組換え大腸菌との脂肪酸組成を比較することで発現タンパクの活性を評価することとした。全ての評価にて飽和脂肪酸としてはヘキサデカン酸、不飽和脂肪酸としては *cis*-9-ヘキサデセン酸および *cis*-11-ヘキサデセン酸が最も優位に検出された脂肪酸であり、C16:1Δ6 はマイナーな成分であった (Fig. 3-9 および 3-10)。ベクターのみを導入した対照では本不飽和脂肪酸は 0.4%であったが、*Rdes1* を導入した場合には 0.7% (対照と比較して 2.0 倍)、*Rdes2* を導入した場合には 1.1% (対照と比較して 3.0 倍)であった (Table 3-1)。C12 および C14 の不飽和脂肪酸に顕著な増減は認められず、加えて *cis*-6-オクタデセン酸も非検出であったことから、*Rdes1* または *Rdes2* の両形質転換体では C16:1Δ6 が

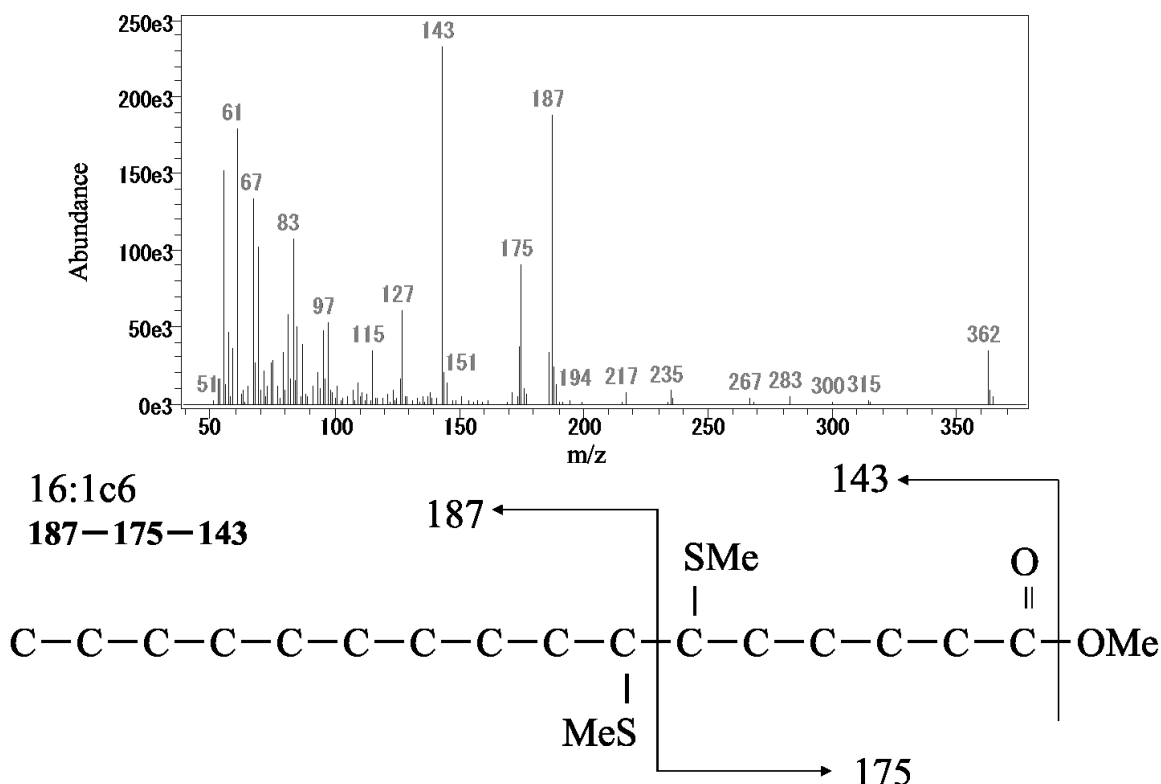


Fig. 3-10. Mass spectrum of *cis*-6-hexadecenoic acid (C16:1Δ6) by GC/MS [52].
Analysis conditions of GC/MS were described in the Materials and methods.

配列の相同性

Rred1 は *Rdes1* または *Rdes2* とは相同性が認められず、*Rdes1* と *Rdes2* は遺伝子ベースで 65%の相同性を有し、それら両遺伝子がコードするタンパクレベルでは 59%の相同性を有していた (Fig. 3-7)。*Rred1* は *Rhodococcus erythropolis* 由来の NADPH Oxidoreductase (AP008957) とアミノ酸レベルで 99%一致していた。*Rdes1* はゲノム解析から明らかとなっている新規な海洋性細菌 *Rhodococcus* sp. NJ-530 由来の Acyl-CoA desaturase (A0A3G8ZW99)、*Rhodococcus erythropolis* SK121 由来の Stearoyl-CoA 9-desaturase (C3JG47)、*Rhodococcus enclensis* 由来の Fatty acid desaturase (A0A1C4BPE2) とアミノ酸レベルで 99%の相同性を示した。*Rdes2* はゲノム解析から明らかとなっている *Rhodococcus* sp. KBW08 由来の Fatty acid desaturase (A0A3N7D6T0)、*Rhodococcus* sp. NJ-530 由来の Fatty acid desaturase (A0A3G8ZW91)、*Rhodococcus erythropolis* SK121 由来の Stearoyl-CoA 9-desaturase (C3JG46)、*Rhodococcus qingshengii* 由来の Acyl-CoA desaturase (A0A069JER6) とアミノ酸レベルで 100%の相同性を示した。今回取得した両 *Rdes* タンパクは疎水性が低く、これまでに知られている膜結合型

desaturase で認められる 2 つの明確な膜貫通領域が認められなかった (Fig. 3-11)。また、SOSUI による解析結果から、Rdes1 タンパクの平均疎水度は-0.364047、Rdes2 タンパクの平均疎水度は-0.495641 となり、両者が可溶性タンパクの可能性が高いことが明らかとなった。そのため、これら取得された 2 つの desaturase 様タンパクは *Rhodococcus* 属細菌内にて膜に強固に結合することなく可溶化した形態にて存在している可能性が示唆された。これらの結果から、Rdes1 と Rdes2 の両者はゲノムアノテーションの結果からみると Acyl-CoA desaturase、Fatty acid desaturase、または Stearoyl-CoA 9-desaturase と推定されるタンパクと同様の触媒活性を有しているものの、これまでに報告されている desaturase とは局在性を異にする全く新規な酵素である可能性が示唆された。

Table 3-1. Comparison of the cellular fatty acid compositions among transformed *E. coli* cells [52].

	Concentration (%)			Ratio	
	Rdes1	Rdes2	Vector	Rdes1/Vector	Rdes2/Vector
C12:0	3.4	1.5	4.7	0.7	0.3
C14:0	10.0	5.2	9.3	1.3	0.6
C16:0	37.5	32.1	35.5	1.1	0.9
C18:0	0.7	1.5	1.4	0.5	1.1
C16:1(c-6)	0.7	1.1	0.4	2.0	3.0
C16:1(c-9)	13.3	5.9	7.9	1.7	0.8
C18:1(c-9)	0.2	0.2	0.6	0.4	0.4
C18:1(c-11)	17.6	23.7	20.1	0.9	1.2

a Extraction of fatty acids was performed as described in the Materials and Methods. The average values of two-independent analysis results are shown as percentages of all fatty acids isolated.

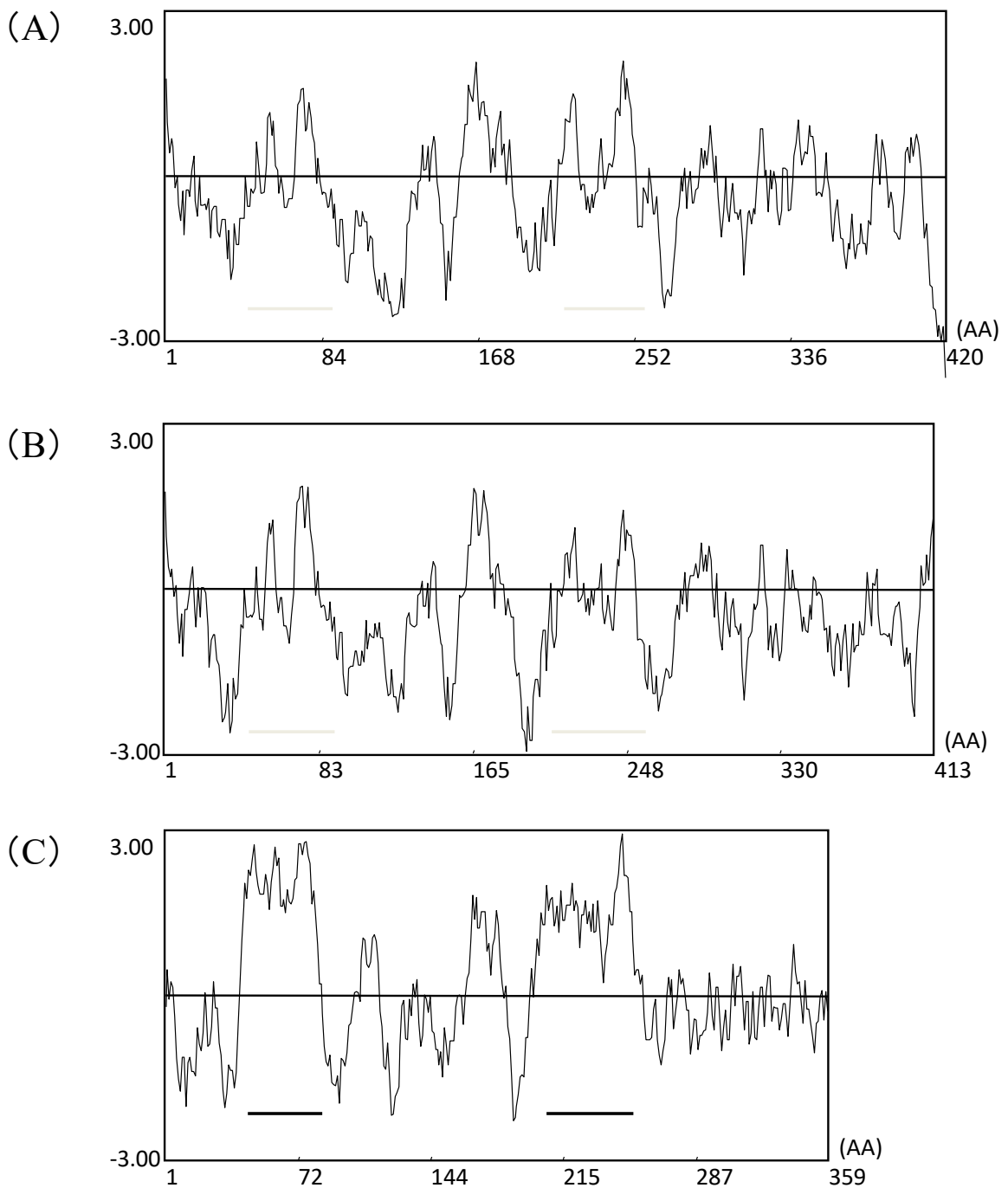


Fig. 3-11. Hydrophobic profiles of proteins encoded of Rdes1 and Rdes2.

(A); Rdes1, (B); Rdes2, (C); Δ 6-desaturase from *Synechocystis* sp. strain PCC6803

GENETYX version 6.15 whose method was Kyte and Doolittle was used for the prediction of hydrophobicity profile of proteins. Average span was set at 8.

Solid bars: Putative membrane spanning regions.

$\Delta 6$ -desaturase の系統樹

Rdes1 と Rdes2 の両者は Acyl-CoA desaturase、Fatty acid desaturase、または Stearoyl-CoA 9-desaturase と推定されるタンパクと同様の触媒活性を有している可能性が伺えたが、これら相同性の高いタンパクの機能は明確に同定されていないことから、これまでに機能の知られている $\Delta 6$ -desaturase と今回取得された 2 つの desaturase 様タンパクとの系統樹を作成した。Fig. 3-12 に示すように、Rdes1 と Rdes2 はこれまでに報告されている他の膜結合型 $\Delta 6$ -desaturase と異なったクラスターを形成することが明確となった。Rdes1 と Rdes2 はこれまでに報告されている $\Delta 6$ -desaturase と比較した場合、Rdes1 は *Mus musculus*、*Rattus norvegicus*、*Homo sapiens*、*Synechocystis* sp.、*Arthrospira platensis* の有する $\Delta 6$ -desaturase とそれぞれ 29%、31%、28%、23%、23%、Rdes2 はそれぞれ 36%、25%、36%、24%、19%のアミノ酸レベルでの低い相同性を示すに留まった。



Fig. 3-12. Phylogenetic tree of functionally identified Δ 6-desaturase proteins from various organisms [52].

GENETYX-WIN and Basic local alignment tool (BLAST) were each used to generate nucleotide or amino acid sequence alignments. To construct phylogenetic trees, Clustal W (ver. 1.83) software and the neighbor-joining method were used; sites involving gaps were excluded from all analysis during tree construction and nucleotide substitution rates (K nuc values) were calculated. Bootstrap trials were set at 1000. Scale bar indicates the K nuc values calculated from the nucleotide sequences.

第4節：考察

Rhodococcus 属細菌 KSM-T64 株から新規な 2 つの $\Delta 6$ -desaturase 様遺伝子を同定し、その特性解析を実施した。*Rdes1* および *Rdes2* と命名したこれら 2 種の遺伝子はゲノム内にて tandem に存在していた。それらの想定されるアミノ酸配列からこれまでに機能が報告されている $\Delta 6$ -desaturase と低い相同性しか示さないことから非常に特異な新規配列であり、既知の Acyl-CoA desaturase や Fatty acid desaturase とは全く異なる desaturase 様タンパクをコードしていることが判明した。既知の $\Delta 6$ -desaturase との系統解析の結果にて異なったクラスターを形成していることから取得した遺伝子の特異性が明らかとなった。

本検討では組換え大腸菌における *Rdes1* および *Rdes2* の 2 種の遺伝子の発現により、特異な脂肪酸である C16:1 $\Delta 6$ 量がそれぞれ 2.0 倍、3.0 倍といった増加に留まっていた。その理由を以下のように考えている。脂肪酸の代謝は非常に厳密に制御されており、本不飽和脂肪酸の導入とその顕著な発現は組換え菌株の中で致命的な影響を及ぼし生体機能を維持することができないものと想定された。とくに C16:1 $\Delta 6$ のような不飽和脂肪酸は膜の流動性に関与するため、直接的に細胞の生命活動に影響する可能性が考えられた。また、*Rhodococcus* 内にて膜近傍に可溶化した状態で存在する可能性のある酵素を pET-15b vector にて大腸菌内で発現させたことにより、本酵素の不適切な局在性や不溶化といった状況を生み出し、大腸菌内にて活性を維持した酵素が少なかった可能性が考えられた。これら理由により、今回適用した試験条件下では、この特異な不飽和脂肪酸の顕著な増加が抑制されたものと考えられた。加えて、今回の試験条件では補酵素の供給も制限されていたため、本因子も少なからず影響していた可能性が考えられ、2.0 倍、3.0 倍の本特異な不飽和脂肪酸の増加は今回の様々な因子が制限された試験条件下では良好な発現であったとも考えられた。

今回の実験にて明らかとなった *Rdes1* と *Rdes2* タンパクが形質転換された大腸菌内にて、飽和脂肪酸であるヘキサデカン酸を有した前駆体を高い選択性を持って基質として 2 重結合を導入している可能性が高いことが伺えたことは、これまでに報告されている不飽和脂肪酸をさらに不飽和化するといった反応を鑑みても非常に興味深い知見となった。このような点からも今回取得された結果は、*Rdes1* および *Rdes2* タンパクがこれまでの desaturase とは異なった非常に新規性の高い酵素であることが本結果からも示唆された。今回の検討では in vitro での従来活性測定にてその活性を検出することができなかったため、*Rdes1* および *Rdes2* の両酵素が acyl 脂質、acyl CoA、acyl ACP、またはフリーの脂肪酸を基質として利用しているのかは判明していない。遺伝子工学的手法による C16:1 $\Delta 6$ の生産を踏まえると、これを今後明確化することが必要である。

本検討にて取得された両 desaturase 様タンパクには、これまでに報告されている $\Delta 6$ -desaturase に特異的なチトクローム b の結合領域である HPGG motif がコードされていない

ことが配列情報から明らかとなった。今回新規に両 $\Delta 6$ -desaturase 様タンパクの 5'末端に Rred1 というタンパクが存在していることが明らかとなったが、その機能については現時点では不明である。本 Rred1 タンパクの domain search 結果から、Rred1 には2つのドメイン、すなわち、FAD および NAD(P)への結合領域を有した Iron-sulfur binding ferredoxin reductase (FNR)様 domain と 2Fe-2S 鉄硫黄 cluster 結合 domain をコードしていることが判明している (Fig. 3-13)。それ故、Rred1 は今回取得されたタンパクの共役タンパクとして不飽和化反応に関与している可能性が考えられる。もし今回取得されたタンパクと本 Rred1 タンパクを共発現させれば、さらなる C16:1 $\Delta 6$ の増加も期待できる。

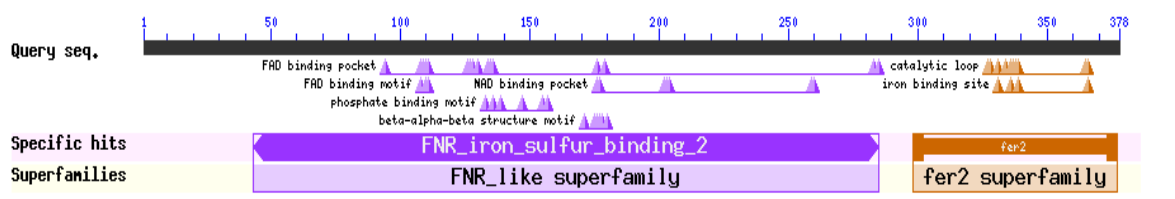


Fig. 3-13. Domain search result of Rred1.

NCBI conserved domain search was used.

FNR_iron_sulfur_binding_2; Iron-sulfur binding ferredoxin reductase (FNR) proteins combine the FAD and NAD(P) binding regions of FNR with an iron-sulfur binding cluster domain.

fer2; 2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain.

また、これまでに報告されている同一菌株からの2種類の $\Delta 6$ -desaturase 遺伝子をみると、*M. alpina* 1S-4株から単離された2種の $\Delta 6$ -desaturase 遺伝子は92%という高い相同性を示し、2種の遺伝子は起源が同一であり一方の遺伝子の複製によって生じた産物と考えられている[71]。*M. cincinelloides* から単離された2種の $\Delta 6$ -desaturase 遺伝子に関しては23%という非常に低い相同性であり、各々の遺伝子は独立して発生したものと推察されている[70]。Rdes1 と Rdes2 タンパクの相同性は約60%であり、上記の *M. alpina* と *M. cincinelloides* の両者の間に位置している。また、両タンパクの想定される機能、疎水プロット、二次構造 (Fig. 3-14)などの非常に類似したデータを踏まえると、Rdes2 は Rdes1 のイソ酵素 (Isozyme) ではないかと推論される。今回単離した *Rhodococcus* 属細菌からの2種の desaturase 様遺伝子のさらなる発現プロファイルの解析により、これら遺伝子の進化の起源も明らかになる可能性がある。

第5節：小括

Rhodococcus sp. KSM-T64 株より、IPH から IPΔH への変換に関与すると考えられる酵素であるΔ6-desaturase 遺伝子の cloning を行った。本酵素がこれまでに単離されていないため、既知のΔ6-acyl CoA desaturase (EC 1.14.19.3)の保存領域を参考にして PCR 法による cloning を試みた。取得された断片の中から、*Mycobacterium* 属の有する Linoleoyl-CoA desaturase と相同性の認められた断片を見出し、その上流領域および下流領域の解析を行った。その結果、取得された遺伝子領域内にタンパクをコードすると考えられる ORF が3つ存在し、この内の ORF2 (*Rdes1*: 1260 bp、420 aa)と ORF3 (*Rdes2*: 1239 bp、413 aa)はともに *Rhodococcus* 属の acyl-CoA desaturase や fatty acid desaturase と 99-100%の相同性を有する desaturase 様配列であることが判明した。この *Rdes1* および *Rdes2* の両者は tandem に存在しており、この両遺伝子を大腸菌内で発現させたところ、*Rdes1* の発現によって分子量約 45,000、*Rdes2* の発現によって分子量約 43,000 のタンパクバンドがそれぞれ顕著に増加していることが SDS PAGE により明らかとなった。さらにこの両遺伝子を発現させた大腸菌の脂肪酸組成を解析したところ、C16:1Δ6 がベクターのみを有する対照となる形質転換体に比較してそれぞれ 2.0、3.0 倍に増加していた。また、これら両タンパクと機能既知のΔ6-desaturase との系統解析から、これら両タンパクは既知の酵素と相違したクラスターを形成していることが判明し、取得した両遺伝子はΔ6-desaturase 様活性を有する新規なタンパクをコードしていることが明らかとなった。これらの結果から遺伝子組換え技術を活用した C16:1Δ6、各種不飽和脂肪酸の新たな生産体制の基盤を構築できたものと考えられた。

第4章

C16:1Δ6の抗菌特性および液状口紅への応用検討

第1節：諸言

化粧品を初めとする各種消費材はその使用期間中に各種微生物を保有する使用者であるヒトや無菌環境では無い使用環境から絶えず微生物の混入リスクと対峙する必要がある。このような混入微生物により製剤が腐敗、変敗といった現象を引き起こすことを防止するために、中身となる製剤には防腐剤等の抗菌性物質を配合し、微生物の増殖を抑制または死滅させ、使用期間中においても一定の微生物学的品質を維持する対策が講じられている。製剤の中でもとくにヒトに直接触れる化粧品等の製剤は、ヒトが有する多種多様な微生物を製剤に直接持込むリスクが極めて高い製剤と考えられ、製剤開発者、とくに防腐処方設計者は、製剤の使用者であるヒトへの影響、さらにはその製剤が環境中に放出（洗い流しや廃棄）された際の環境への影響も踏まえて、より安全性が高く、ヒトおよび環境への影響を極力低減させた防腐処方設計を日々模索している[37]。

化粧品の中でもとくにヒトの粘膜に使用する製剤では防腐性を担保する上で使用する抗菌性物質による刺激への懸念があり、剤と濃度の設定には特段の注意が払われている。ヒトの粘膜に使用する代表的な製剤として口唇化粧品が上げられる。本製剤系では唇上および口腔内の微生物が製剤使用時に直接混入する可能性が極めて高く、微生物とともに唾液や皮膚、口腔粘膜、さらには飲食時の残渣といった様々な因子の持込みも容易に想定されるため、微生物の増殖に有利な状況が生み出される。固形製剤に比較して液状の油性製剤系ではこれらの混入因子が製剤中で水滴状に留まる可能性が高く、微生物の生育因子として重要な水分活性 (Water Activity; Aw)が高い状態で維持される可能性がある。このような高Awの状態では防腐性が適切に構築されていない場合に、混入微生物の増殖による変臭といった品質の変化、劣化が起こり易くなることが知られている[77]。このような状況からヒト粘膜に使用しても刺激感が無く、さらに各種微生物に対して効果的な抗菌性物質が所望されている。

本章では、ヒトに対して常在性、一過性の各種微生物に対する C16:1Δ6 の抗菌特性を幅広く検証し、ヒトの皮膚上での本物質の防御機能としての関与を明確化することとした。また、本物質のヒトでの特異な局在性を応用し、化粧品素材として本物質を利用することで、化学合成的に製造されている防腐剤であり化粧品および食品等の各種製剤に汎用されているパラベンエステルを C16:1Δ6 にて置換することによる、新たな防腐処方設計の実現可能性を検証した結果について記述した。

第2節：実験方法

C16:1Δ6 の調製

本検討ではアルカン資化性菌であり土壌より単離された *Rhodococcus* 属細菌 KSM-B3 株 (FERM BP-1531 in NITE)[41]から派生した esterase 低減変異株である KSM-T64 株 (FERM P-18182 in NITE)を使用した[51]。KSM-T64 株の培養は 2.0% MSG, 2 mM MgSO₄·7H₂O、2 μM MnSO₄·6H₂O、60 μM FeSO₄·7H₂O、5 μM CuSO₄·5H₂O、0.8% yeast extract (Asahi Beer, Tokyo, Japan)、0.35 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.3)、22% IPH (Tokyo Chemical Industry, Tokyo, Japan)を含有する培地を使用し、26°C の振とう培養条件による発酵法により生産させた[51]。培養液から溶剤抽出した IPΔH をアルカリ条件下、80°C にて 3 時間加水分解した。取得された C16:1Δ6 を薄膜蒸留にて精製 (140–160°C、3Pa)し、不純物としてパルミチン酸を含有する純度約 95%品として以降の実験に供した。

使用菌株

C16:1Δ6 の抗菌特性を調べるために以下の菌株を使用した。ヒト皮膚上に認められる代表的な細菌種として、*Staphylococcus epidermidis* JCM2414、*Staphylococcus saprophyticus* JCM2427、*Staphylococcus aureus* ATCC12600、*Micrococcus luteus* JCM1464、*Micrococcus varians* IFO15358、*Corynebacterium xerosis* JCM1971、*Propionibacterium acnes* ATCC6919、口腔内で認められる代表的な細菌種として、*Streptococcus mutans* JCM5705、*Streptococcus salivarius* JCM5707、*Streptococcus sanguis* JCM5708、*Actinomyces viscosus* ATCC15987、*Actinomyces naeslundii* ATCC12104、腸内にて認められる代表的な細菌種として、*Clostridium perfringens* JCM1290、*Clostridium butyricum* JCM1391、*Escherichia coli* ATCC11775、*Enterococcus cloacae* JCM1232、広く環境から検出される芽胞形成細菌種 (栄養細胞)として、*Bacillus subtilis* IFO13719、*Bacillus cereus* JCM2152、水場のような一般的な環境で認められる代表的な細菌種として、*Pseudomonas aeruginosa* IFO12689、*Pseudomonas putida* ATCC14164、*Pseudomonas cepacia* JCM5964、*Pseudomonas fluorescens* JCM5963、酵母として、*Candida albicans* JCM1542、*Saccharomyces cerevisiae* JCM7255、*Cryptococcus laurentii* IFO0609 を選択して使用した。

また、製剤への応用検討として、液状口唇化粧品の実使用テストにて分離された未同定のグラム陽性球菌 2 菌種 (*Staphylococcus* sp. strain 030411-1-1 株、*Streptococcus* sp. strain 030411-1-2 株)、未同定のグラム陽性桿菌 1 菌種 (*Bacillus* sp. strain 030411-1-3 株)の 3 菌株を使用した。

使用培地

細菌の培養には、SCD 寒天培地 (Nihon Pharmaceutical, Tokyo, Japan)および SCDLP 寒天培地 (Nihon Pharmaceutical)を使用した。*P. acnes* の培養には、改良 GAM 寒天培地 (Nissui Pharmaceutical, Tokyo, Japan)。また、酵母の培養には、GP 寒天培地 (Nihon Pharmaceutical)および GPLP 寒天培地 (Nihon Pharmaceutical)を使用した。

試薬

Rhodococcus sp. strain KSM-T64 株の培地には分析用グレードのものを使用した (Wako Pure Chemical, Osaka, Japan)。抗菌活性を調査する際に使用したオレイン酸 (C18:1Δ9)は分析用グレードのものを使用した (Sigma, St. Louis, MO, USA)。化粧品製剤設計に際して使用した他の原料に関しては化粧品グレードのものを使用した。

C16:1Δ6 の各種微生物に対する抗菌効果

SCD 寒天培地にて 30°C、2-3 日培養 (リフレッシュ培養)した各種菌体を 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0)に懸濁し、十分に攪拌した (溶液中の菌体濃度 : 10⁶ CFU/ml)。C16:1Δ6 の 10% (v/v)エタノール溶液を調製し、終濃度 25 mg/l または 50 mg/l となるように各種菌体懸濁液に添加した。30°C にて 1 時間恒温した後、一定量をサンプリングした。サンプリングは、LP 希釈液「ダイゴ」 (Nihon Pharmaceutical)にて C16:1Δ6 の抗菌性を不活化した後、適宜同希釈液にて段階希釈後、LP 希釈液「ダイゴ」含有寒天培地に一定量を塗抹した。塗抹後の培地を 30°C にて 2-3 日培養後 (*P. acnes* の場合には 37°C にて 3-5 日培養)、培地上の菌数を測定し、細胞濃度を算出した。嫌気性菌の場合にはアネロパックガスパック嫌気ジャー (Mitsubishi Gas Chemical, Tokyo, Japan)を使用し、培養を実施した。C16:1Δ6 非添加系を対照とし、初発菌数を 100%、1 時間後の残存菌数を相対値として算出した。

C16:1Δ6 を作用させた際の菌体内容物の溶出

C16:1Δ6 の抗菌性を詳細に検討するために以下の実験条件にて検証実験を実施した。SCD 寒天培地にて 30°C、2-3 日培養 (リフレッシュ培養)した各種菌株 (*S. aureus*、*S. epidermidis*) を 0.85% NaCl 含有 50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.0)に懸濁した (初発菌体濃度 10⁷⁻⁸ CFU/ml)。C16:1Δ6 の 10% (v/v)エタノール溶液を調整し、所定濃度 (25 mg/l または 50 mg/l) となるように添加した。所定時間 (0、1、4 時間)、30°C にて恒温した後、一定量をサンプリングした。サンプリングした液は遠心分離 (13,800g、15 min) にて上清の吸光度を測定 (200-300 nm のスペクトル分析) すると共に、LP 希釈液にて段階希釈後、SCDLP 寒天培地に塗抹した。30 °C にて 2-3 日培養後の菌数を測定し、抗菌特性を評価した。

走査型電子顕微鏡による C16:1Δ6 処理菌体の観察

C16:1Δ6 の微生物に与える影響を確認するために C16:1Δ6 の抗菌性実験によって得られた *S. aureus* を集菌し、LP 希釈液および生理食塩水にて数回洗浄した菌体を走査型電子顕微鏡観察 (SEM) に供した。SEM には以下に示す処理法にて調製した試料を供した。洗浄菌体を 2.5% グルタルアルデヒド溶液にて前固定 (22 時間) し、0.1 M Milloning リン酸緩衝液 (pH 7.4) にて室温、1 時間攪拌しながら洗浄した (途中緩衝液を 2 回交換)。その後、1% オスミウム酸溶液にて 4 °C、1 時間固定した後、イオン交換水にて室温、1 時間攪拌しながら洗浄した。洗浄後、エタノール上昇系列にて室温にて攪拌しながら脱水 (50、70、80、90、95% にて各 10 分、さらに 100% エタノールにて 15 分処理を 3 回繰り返す) した。その後、*t*-ブチルアルコールにて室温、1 時間置換後 (途中 3 回溶液交換)、凍結乾燥を行なった。イオンスパッターにて白金パラジウムコーティング (W.D. 30 mm、放電電流 20 mA、放電時間 80 秒) した後、SEM 用試料とし、15 kV、50000 倍にて観察した。

プロトプラスト化菌体への C16:1Δ6 の作用

C16:1Δ6 の細胞膜への効果を明らかにするために、以下の実験条件にて調製したプロトプラスト化菌体への効果を検証した[78]。SCD 寒天培地にて 30°C、2-3 日培養 (リフレッシュ培養) した各種菌体 (*S. aureus*、*S. epidermidis*) を Staphylococci の細胞壁溶解酵素であるリゾスタフィン (100 U/ml, Sigma, St. Louis, MO, USA) 含有 50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) に懸濁し、30°C、2 時間処理した (初発菌体濃度 10⁶ CFU/ml)。C16:1Δ6 の 10% (v/v) エタノール溶液を調整し、所定濃度 (12.5 mg/ml、25 mg/l または 50 mg/l) となるように 0.85% NaCl 含有 50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.0) に添加した。リゾスタフィン処理菌体を C16:1Δ6 含有緩衝液に接種し、所定時間 (0、1、4 時間)、30°C にて恒温した後、一定量をサンプリングした。サンプリングした液は LP 希釈液にて段階希釈後、SCDLP 寒天培地に塗抹した。30°C にて 2-3 日培養後の菌数を測定し、抗菌特性を評価した。

C16:1Δ6 と C18:1Δ9 の抗菌性の比較

SCD 寒天培地にて 30°C、2-3 日培養 (リフレッシュ培養) した菌体を生理食塩水に懸濁し 10⁷ CFU/ml 濃度となるように調整した。本菌体懸濁液を 50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.0) に 1% 接種した。C16:1Δ6 と 18:1Δ9 は 10% (v/v) エタノール溶液として調製し、終濃度 10 mg/ml、25 mg/l または 50 mg/l となるように各種菌体懸濁液に添加した。30°C にて恒温し、短時間での抗菌効果を検証するために 1、4、および 24 時間目にサンプリングを実施した。各時間のサンプルは上記のように LP 希釈液にて希釈、寒天培地に塗抹後、所定の時間培養し、菌数測定を実施した。菌数の振れ幅は ISO11930[79]にて記述されている 0.5 log を採用し、抗

菌性の差を評価した。

保存効力試験と実使用テスト

先述したように液状 lip gloss のような化粧品製剤は塗布用ブラシが容器に付属した形態となっており、粘調な液性状であることもあり使用時には皮膚由来の物質とともに微生物がブラシを介して容器に混入することが想定される。混入した微生物の増殖を抑止するためには何かしらの対策が講じられなければならない。このような使用状況下での C16:1Δ6 の抗菌効果を検証するために、異なった防腐系を有するモデル液状 lip gloss を作成し、製剤の一般的な試験法である保存効力試験[79]と実使用テストにて評価した。

保存効力試験は以下の実験条件にて実施した。60% heavy fluid isoparaffin、8% ceresin、0.5% stearyl glyceryl sebacate、2% red No. 202、2% oxidized titanium、7% mica coated with oxidized titanium、0.5% hyaluronic acid、squalene (バランス)、にて口唇粘膜用製剤である液状 lip gloss を調製した (対照: 処方 1)。本対照製剤に C16:1Δ6 を 0.1% (w/w) 添加した製剤 (処方 2) と化粧品製剤の汎用防腐成分であるエチルパラベンおよびプロピルパラベンをそれぞれ 0.05% (w/w) 添加した製剤 (処方 3) を調製した (Table 4-1)。

Table 4-1. Preservative system of model liquid-type lip gloss for preservative efficacy and home-use tests [53].

Ingredient (% (w/v))	Preservative system for preservative efficacy test			Preservative system for home-use test		
	1	2	3	4	5	6
C16:1Δ6	-	0.1	-	0.5	-	-
Oleic acid	-	-	-	-	-	0.5
Ethylparaben	-	-	0.05	-	0.1	0.1
Propylparaben	-	-	0.05	0.1	0.1	0.1

過去に実施した液状 lip gloss の実使用試験での分離株 3 株 (strain 030411-1-1、strain 030411-1-2、strain 030411-1-3) を SCD 寒天培地にて 30°C、2-3 日培養した。それぞれの株を生理食塩水に懸濁 (10⁸ CFU/ml) 後、等量混合することで菌体混合懸濁液を調製した。調製した口唇化粧品料に対して菌体混合懸濁液を 1% (v/w) 接種し、十分に攪拌した。菌体接種後、30°C にて

恒温し、短期間で防腐系の有効性を検証するために1、2、3、5日目にサンプリングを実施した。採取したサンプルはLP希釈液にて不活化処理をするとともに段階希釈後、SCDLP寒天培地に塗抹した。30°Cにて2-3日培養後の菌数を測定し、菌数減少速度を確認した。菌数の振れ幅はISO11930にて記述されている0.5 logを採用し、保存効力の差を評価した。

また、実使用試験は以下の実験条件にて実施した。実使用試験に際しては保存効力試験に適用した液状 lip gloss を調製し、これに0.1% (w/w) プロピルパラベンに0.5% (w/w) C16:1Δ6を配合した製剤(処方4)、0.1% (w/w) エチルパラベンおよびプロピルパラベンを配合した製剤(処方5)、本処方5に化粧品原料として汎用されている不飽和脂肪酸であるC18:1Δ9を0.5% (w/w)配合した製剤(処方6)を作成した。事前に Informed consent が得られた女性パネラー20名に1日2回本製剤を塗布し、2週間継続使用して頂いた。同グループに対して2週間の Interval を空けた後、別な製剤を同様の使用法にて使用頂いた。2週間使用期間中に刺激の増強等の異常を感じた場合にはその時点で試験を中止することとし、2週間後に刺激感の増強等の違和感を感じたパネラーの人数を測定するとともに、回収したサンプルの変臭の有無を官能検査により評価した。また、各パネラーの唇の製剤使用前後の水分蒸散量を測定した。測定には30°C、30%湿度条件にて水晶湿度センサー quartz crystal (Skicon-200, IBS Co. Ltd, Shizuoka, Japan)を利用して、製剤使用後の水分蒸散量に関しては製剤0.05 gを唇上に塗布した後の水分蒸散量を測定した。水分蒸散量の抑制効果は下記計算式(1)によって算出した。

(1): 水分蒸散抑制率 (%) = $(1 - (\text{Lip gloss を塗布した後の水分蒸散量} / \text{Lip gloss を塗布する前の水分蒸散量})) * 100$

変臭サンプルの統計学的処理に関してはχ²乗法を適用し、p値<0.05として算出した。

第3節：実験結果と考察

C16:1Δ6の各種微生物に対する抗菌性

常在性および一過性のヒト菌叢として知られる25菌種に対するC16:1Δ6の抗菌性を幅広く評価した。C16:1Δ6は高濃度のエタノールとの相乗効果が報告[80]されていることから、エタノール自身およびエタノールとの相乗効果を抑制するため、C16:1Δ6のエタノール溶液を添加する液量を極力低減し、25 mg/ml と 50 mg/ml の2点の濃度にて評価した。その結果、C16:1Δ6はグラム陰性菌に対しての効果は低く、これまでに報告されているようにグラム陽性菌に対して高い効果が各種微生物を用いた実験においてもあらためて確認できた[10, 11, 47]。このような選択的な抗菌活性は実施した2つの濃度にて確認されたため、Table 4-2として50 mg/mlの結果を収載した。

Table 4-2. Antimicrobial efficacy of C16:1Δ6 against various microorganisms [53].

	No.	Test strain	Ratio (%) ^a
Skin microbe	1	<i>Staphylococcus epidermidis</i> JCM 2414	16.7
	2	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> JCM 2427	18.9
	3	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12600	1.90
	4	<i>Micrococcus luteus</i> JCM 1464	<0.100
	5	<i>Micrococcus varians</i> IFO 15358	<0.100
	6	<i>Corynebacterium xerosis</i> JCM 1971	<0.100
	7	<i>Propionibacterium acnes</i> ATCC 6919	<0.100
Oral microbe	8	<i>Streptococcus mutans</i> JCM 5705	<0.100
	9	<i>Streptococcus salivarius</i> JCM 5707	<0.100
	10	<i>Streptococcus sanguis</i> JCM 5708	<0.100
	11	<i>Actinomyces viscosus</i> ATCC 15987	<0.100
	12	<i>Actinomyces naesulundii</i> ATCC 12104	<0.100
Intestinal microbe	13	<i>Clostridium perfringens</i> JCM 1290	<0.100
	14	<i>Clostridium butyricum</i> JCM 1391	42.2
	15	<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775	16.4
	16	<i>Enterobacter cloacae</i> JCM 1232	26.7
Spore-forming microbe	17	<i>Bacillus subtilis</i> IFO 13719	<0.100
	18	<i>Bacillus cereus</i> JCM 2152	<0.100
Environmental microbe	19	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IFO 12689	32.5
	20	<i>Pseudomonas putida</i> ATCC 14164	37.3
	21	<i>Pseudomonas cepacia</i> JCM 5964	4.10
	22	<i>Pseudomonas fluorescens</i> JCM 5963	10.0
Yeast	23	<i>Candida albicans</i> JCM 1542	2.20
	24	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> JCM 7255	<0.100
	25	<i>Cryptococcus laurentii</i> IFO 0609	<0.100

^a Value shows ratio of surviving microorganisms.

Reaction was performed at 30°C for 1 h at the final concentration of 50 mg/l (pH 7.0); initial inoculum was 10⁶ cfu/ml.

C16:1Δ6 の作用による微生物に与える変化をより詳細に捉えるため、C16:1Δ6 を *S. aureus* と *S. epidermidis* の両菌体に作用させた場合の両菌体からの菌体内溶出物質量を吸光度計 (200-300 nm) にて経時的に測定した。その結果、*S. epidermidis* に比較して *S. aureus* では約 260~280nm の吸光度が経時的に顕著に増加する傾向が観察された (Fig. 4-1)。本結果から、C16:1Δ6 の作用により *S. aureus* から核酸、タンパク等の細胞内物質の溶出が起こっている可能性が強く示唆された。C16:1Δ6 により処理した *S. aureus* の状態を確認するため、C16:1Δ6 処理を施した *S. aureus* を SEM にて観察した結果、肥大した細胞、内部に窪みを有する細胞、内容物が漏出した状態の細胞が多数確認でき、*S. aureus* の膜への影響を裏付ける結果を確認することができた (Fig. 4-2)。また、C16:1Δ6 の *S. aureus* への作用部位を明らかにするため、Staphylococci の細胞壁溶解酵素であるリゾスタフィンを使用した *S. aureus* と *S. epidermidis* のプロトプラスト化菌体への影響を検証した結果、両プロトプラスト化菌体への C16:1Δ6 の抗菌性はリゾスタフィン未処理菌体への抗菌性の傾向と殆んど変化は無く、プロトプラスト化した *S. aureus* に対しては高い効果を示し、プロトプラスト化した *S. epidermidis* に対しては効果が低いといった選択性を残していることが明らかとなった (Fig. 4-3)。本結果から、C16:1Δ6 の作用点は細胞壁では無く、細胞膜である可能性が高いことが示唆された。

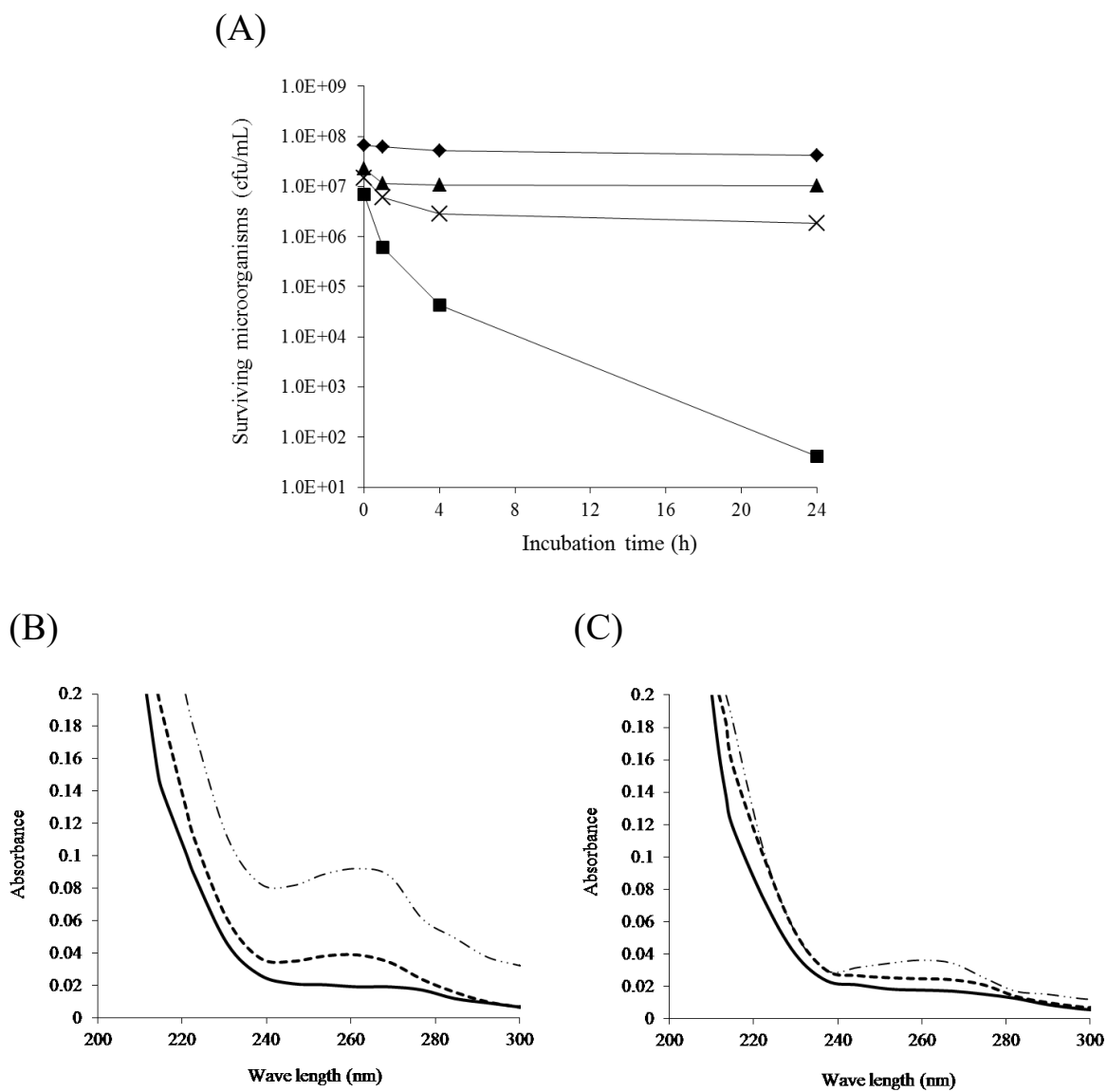


Fig. 4-1. Confirmation of activity of C16:1Δ6 against *S. aureus* and *S. epidermidis*.

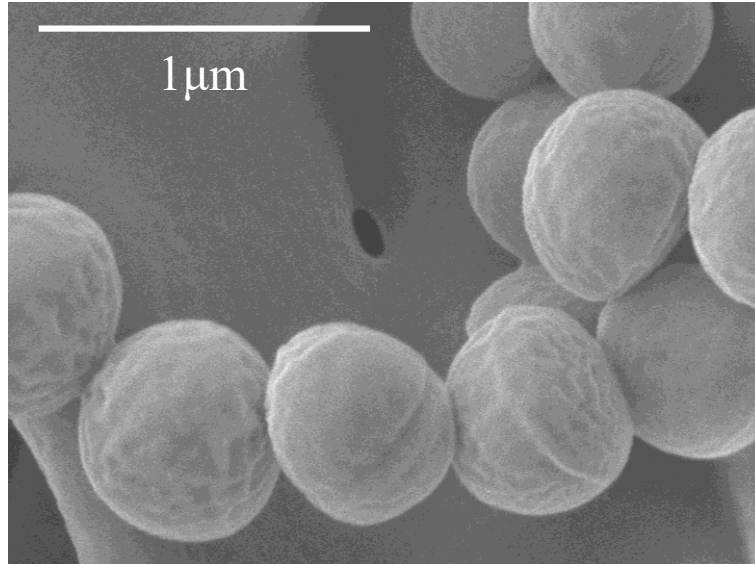
(A) Change in ratio of surviving microorganisms, (B) Change of absorbance in *S. aureus* suspension,

(C) Change of absorbance in *S. epidermidis* suspension

◆: Control *S. aureus*, ■: *S. aureus* + 50 mg/l C16:1 Δ6, ▲: Control *S. epidermidis*, ×: *S. epidermidis* + 50 mg/l C16:1Δ6

(B) (C) —: Initial absorbance, - - -: Absorbance after 1 hour, - · - · -: Absorbance after 4 hours

(A)



(B)

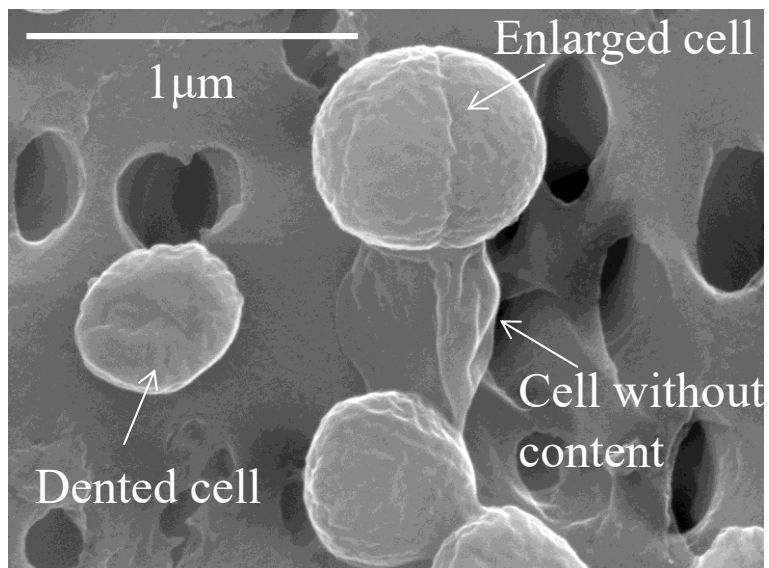
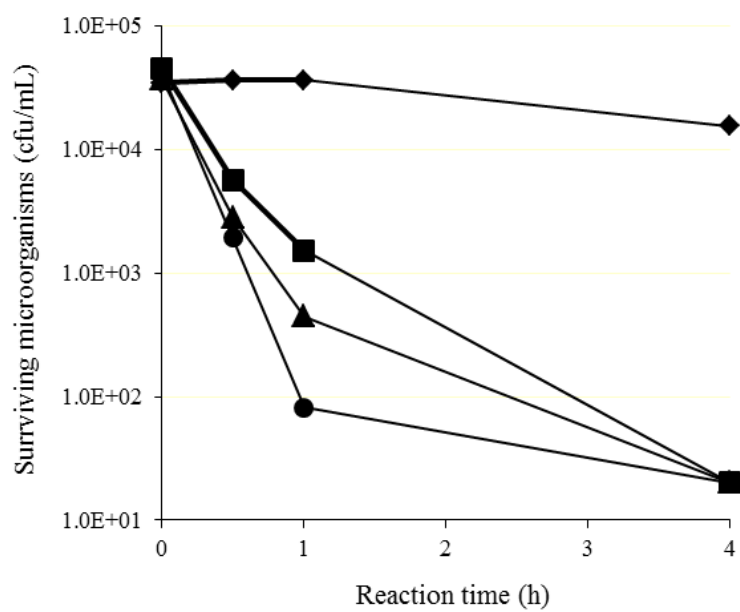


Fig. 4-2. SEM observation of *S. aureus* exposed to C16:1Δ6.

(A)Control: Cells not treated with C16:1Δ6, (B) Cells treated with C16:1Δ6

(A)



(B)

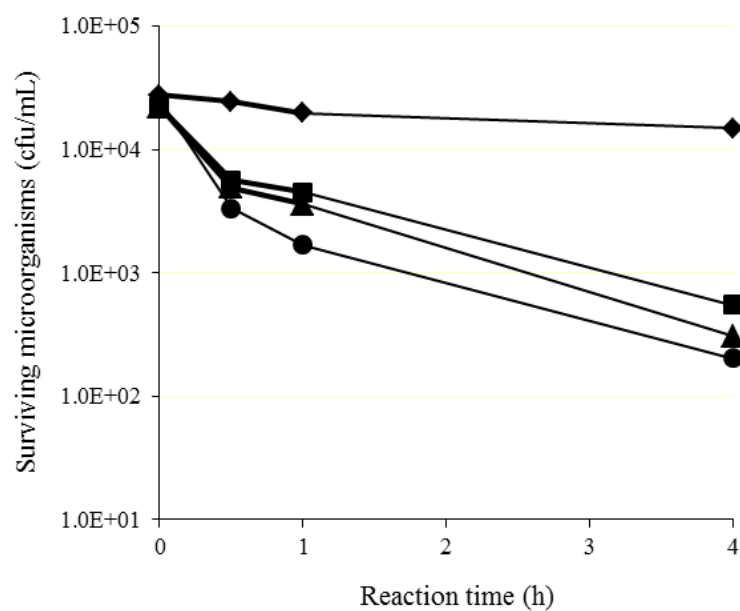


Fig. 4-3. Antimicrobial efficacy of C16:1 Δ 6 against protoplasts of *S. aureus* and *S. epidermidis*.

(A) *S. aureus*, (B) *S. epidermidis*

◆: Control (without reagent), ■: 12.5 mg/l C16:1 Δ 6, ▲: 25 mg/l C16:1 Δ 6, ●: 50 mg/l C16:1 Δ 6

これまでの検討結果から得られた興味深い知見として、本物質の抗菌特性解析の中で、種選択的な抗菌活性、すなわち、同属の異種に対する相違した抗菌活性は、Takigawa らが報告しているようにグラム陽性細菌である *S. epidermidis* および *S. aureus* に加えて[47]、*C. perfringens* および *C. butyricum* に対しても認められることが今回の検討にて初めて明らかとなった[53]。今回の検討にて見出された *Clostridium* 属への異種間での選択殺菌性に関して、腸内細菌であり食中毒の原因菌である *C. perfringens* に対しては高い抗菌性を示し、整腸剤にも利用されている *C. butyricum*[81]には抗菌性を示さないといった「選択殺菌性」を利用することで、腸内細菌叢の健全化にも有効な知見を提示することができたと考えている。腸内のマイクロバイオーームと皮膚上のマイクロバイオーームの関係も近年の検討成果として報告[82]されていることから、これら腸内細菌叢への選択殺菌性を活用した皮膚性状の正常化への新たな展開にも繋がる非常に興味深い知見として考えている。

薬剤の種選択性に関しては、白癬菌として知られる *Tricophyton* 属に対する抗真菌薬においても認められている現象であり、例えばイミダゾール系抗真菌薬の代表的な薬剤である硝酸ミコナゾールでは、*Tricophyton mentagrophytes* に対しては低濃度で有効な殺菌活性を示すものの、*Tricophyton rubrum* に対しては効果が小さいといった特徴を有している[83]。このような選択性の差は構成脂質の不飽和度やステロールの種類による細胞膜脂質に対する親和性の相違と考えられており[84]、抗菌機構としてはプラズマメンブレンに直接作用し、ステロールの合成阻害による膜破壊とそれに続く代謝の不均衡の誘発と考えられている[84]。このような抗真菌薬での種選択的な殺菌性の相違、さらには想定されている殺菌機構は、今回の検討結果にて見出された「選択殺菌性」の機構を考察する上で非常に興味深い知見である。

また、今回の検討にて C16:1Δ6 は、上記以外にも皮脂分泌の増加等によってもたらされるニキビの原因菌である *P. acnes* やカンジダ症の原因菌である *C. albicans*、口腔内に存在する各種虫歯の原因菌といったヒトに対して様々な病状を引き起こす可能性のある菌に対しても高い効果を有することが明らかとなった。C16:1Δ6 塗布試験によって AD 患者の皮膚上の黄色ブドウ球菌を減少できたように[47]、皮膚疾患の原因の一つとして捉えられている外来菌を減少させ、ヒトの微生物叢を正常化できる可能性が確認できたため、今後、これら様々な疾患に起因する外来菌への皮膚上、口腔内における効果も塗布試験、接種試験で確認したいと考えている。

これまでの文献情報を踏まえて本結果を考察すると、C16:1Δ6 は皮膚表層の構成脂肪酸として水分の保持を促進し、マイルドな抗菌効果による防御機能を通して皮膚の性状維持に寄与していると想定された。本想定機構はスフィンゴシンおよび関連するセラミド脂質類縁物質の機構に類似している。すなわち、皮膚や口腔内の様々な微生物に対して抗菌効果を示すことで皮膚をはじめとしたマイクロバイオーームの正常化に関与している[85]。現に皮膚上のスフィンゴシンレベルは健康者に比較して AD 患者にて減少していることが C16:1Δ6

と同様に示されており、本減少により *S. aureus* のような病原性微生物の局在化を誘導することが示されている[86]。このようなヒト皮脂による防御機能は皮膚の恒常性を維持する上で非常に興味深い。先述したように C16:1Δ6 は皮膚や毛髪に特異に存在する物質であり、その有する選択的な抗菌活性から、他の不飽和脂肪酸よりも優位性を示せる剤として大いに期待している。

C16:1Δ6 と化粧品素材として汎用されている C18:1Δ9 の抗菌活性の比較

C16:1Δ6 の *S. aureus* と *S. epidermidis* に対する抗菌特性を化粧品等の製剤にて汎用的に利用されている C18:1Δ9 と比較するため、各剤の 0, 25, および 50 mg/ml の濃度でそれぞれの抗菌活性を評価した。その結果、C16:1Δ6 は 1 および 4 時間の反応にて C18:1Δ9 に比較して有意に高い抗菌性を示した。一方、両不飽和脂肪酸は *S. epidermidis* に比較して *S. aureus* にて高い抗菌性を示すことが判明した。この様な種選択的な抗菌性が実験にて使用した各濃度にて確認できたため、Fig. 4-3 として 50 mg/ml 濃度での結果を記述した。本結果から、ヒトに生来存在している C16:1Δ6 は汎用素材である C18:1Δ9 に比較して高い種選択的な抗菌性を示すことを初めて明らかにした。

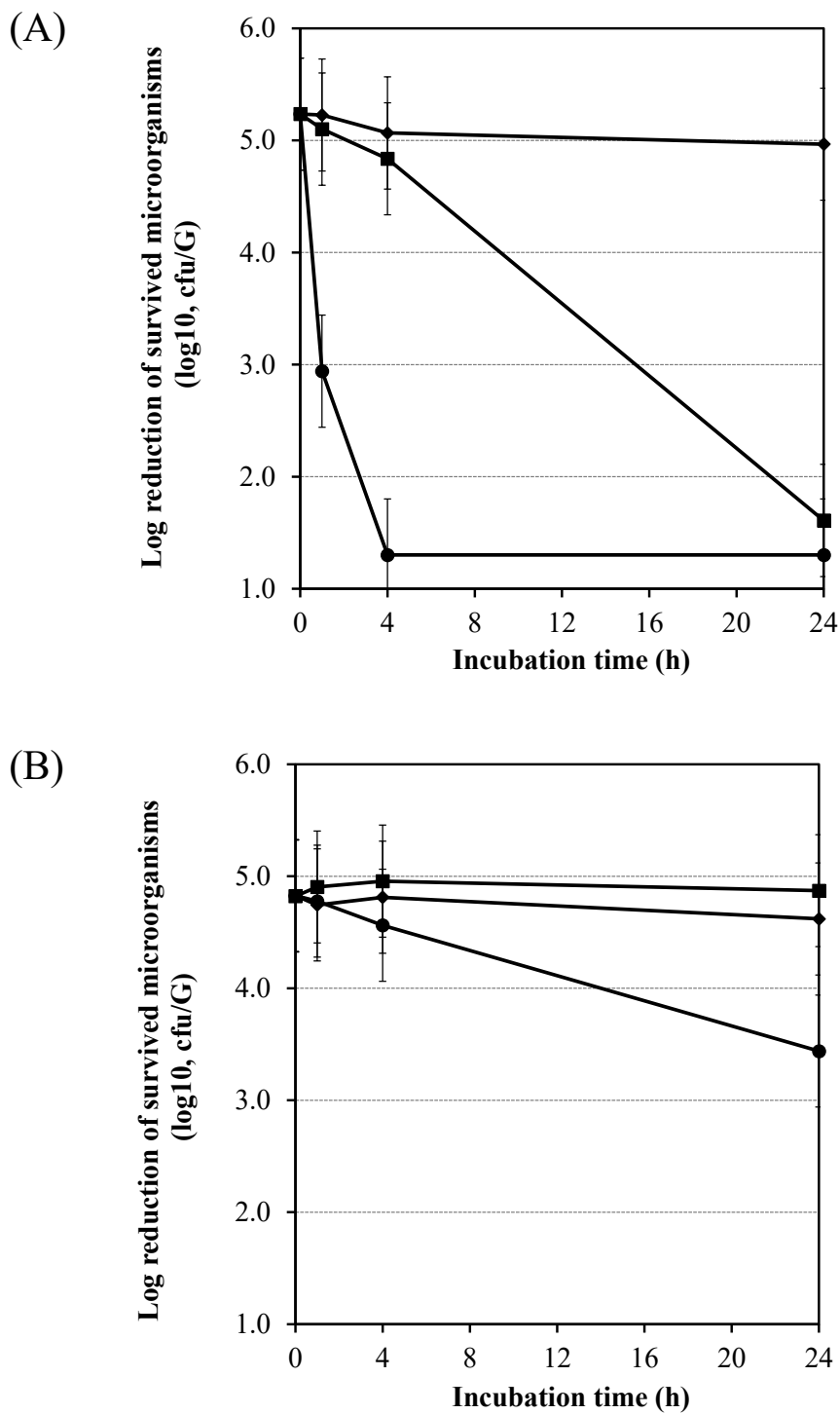


Fig. 4-4. Antimicrobial efficacy of *cis*-6-hexadecenoic acid (C16:1Δ6) and oleic acid (C18:1Δ9) against *S. aureus* (A) and *S. epidermidis* (B) [53].

◆, Control (without fatty acid); ●, 50 mg/l C16:1Δ6; ■, 50 mg/l C18:1Δ9. Error bar shows an acceptable range of deviation of 0.5 log which was mentioned in ISO 11930.

C18:1Δ9 の抗菌性に関する知見は幾つか報告されている。口腔微生物[35]やメチシリン耐性 *S. aureus* (MRSA)[87]に対して高い抗菌性を示すことが報告されており、本効果の機構として対象微生物の細胞壁への攻撃と破壊が上げられている。一方、*S. aureus* に対する不飽和脂肪酸の抗菌活性に関しては幾つかの報告がある。これらの報告の中では、不飽和脂肪酸が細胞膜の破壊によって細胞内のエネルギー生産を阻害すること、これら不飽和脂肪酸への *S. aureus* の馴化が細胞表層の疎水性の減少と相関していること、が報告されている[88]。他の報告では *cis*-9-ヘキサデセン酸の *S. aureus* に対する抗菌性が細胞膜の分極による低分子タンパクの漏洩によってもたらされることが報告されている[89]。また、脂肪酸の抗菌活性に対する防御として細胞壁中のテイコ酸量の変化が関与していることも示唆されている。

先述した種選択的な殺菌性の相違に関する検討結果とこのような報告例を基にし、C16:1Δ6 の抗菌機構解明に向けた取組みとして、本実験系にて使用した *S. aureus* と *S. epidermidis* の脂肪酸組成を解析している。その結果、*S. epidermidis* に比較して *S. aureus* では直鎖脂肪酸 (C14, C16, C17, C18, C19, C20)の割合が *S. epidermidis* の約 35%に対して約 45%と高く、*iso* 体 (C14-C19)および *anteiso* 体 (C15, C17, C19)を包含する分岐鎖脂肪酸の割合は、*S. aureus* と *S. epidermidis* にてそれぞれ約 22%と約 24%、約 31%と約 39%、と *S. aureus* にて低いことが明らかとなった。本結果は O'Donnell らによる *Staphylococcus* 属における脂肪酸種の *profile* 結果と傾向が類似している[90]。脂肪酸は細胞膜の主要な構成成分であり、抗生物質のような抗菌ストレスに対応して変化することが示されていることから、*S. epidermidis* における分岐鎖脂肪酸、とくに *anteiso* 体の高い比率が *S. aureus* に比較して C16:1Δ6 に対する低い感受性に関与していると想定している。加えて、*S. aureus* において膜の分岐鎖脂肪酸量の低減により各種ストレスに対する感受性を高めることも報告されていることから[91]、*Staphylococcus* 属における脂肪酸組成の相違、とくに細胞膜の脂肪酸組成の相違が C16:1Δ6 に対する感受性の相違に繋がっている可能性が考えられる。

多くの抗菌性物質は様々な部位と作用し、その部位の特性に応じたその後引き起こされる様々な現象によって細胞の生存が脅かされると考えられているが、今回の検討結果から C16:1Δ6 の抗菌性は細胞膜への作用によって主に引き起こされ、その抗菌活性が *Staphylococcus* 属の細胞膜における分岐鎖脂肪酸種の割合に負の相関性を示す可能性が示唆された。

先述した *C. butyricum/perfringens* への C16:1Δ6 の影響の相違、種特異的な選択性に関しても、膜脂肪酸組成解析 (飽和/不飽和度、分岐脂肪酸種、脂質種、等) やプロトプラストへの殺菌性の相違、膜の流動性解析といった *S. epidermidis/aureus* に対して実施した検討内容に加えたより詳細な機構解明検討を実施し、「選択殺菌性」の本質を見極めて行きたいと考えている。

C16:1Δ6 の口唇粘膜適用化粧品への応用

一般的に、水を含有しない非水系の製剤は低 A_w (<0.75) であり、そのような製剤中では微生物は増殖することができず、防腐剤等の抗菌性物質が配合されていない製剤においてすら混入した微生物の数は徐々に減少して行く[92]。しかしながら、時折そのような製剤においても口唇の成分や唾液が混入することで、高い湿度環境が形成され、微生物の増殖、それに伴う変臭生成といった製品の品質劣化が起こる。そのようなケースでは、グラム陰性菌はグラム陽性菌に比較して低 A_w 条件下での生存性が悪いため、グラム陰性菌よりもグラム陽性菌の方がその原因微生物の主体となることが多い。液状の口唇化粧品である lip gloss は、粘性の高い製剤のために混入した異物を固形製剤に比較して巻き込み易く、上記のように混入した異物とともにグラム陽性菌の混入による影響を受け易いと考えられる。そのため、C16:1Δ6 を含有したモデル液状 lip gloss の保存効力評価をグラム陽性菌であり過去の実使用テストでの分離菌を利用して実施した。

グラム陽性の3種の分離菌株 (030411-1-1 株、030411-1-2 株、030411-1-3 株) を使用した保存効力試験にて、C16:1Δ6 を 0.1% (w/w) 配合した処方 2 は防腐剤を含有しない対照処方 1 と比較して接種菌の死滅速度が速いことが明らかとなった (Fig. 4-4)。同様の防腐性はエチルおよびプロピルパラベンを各 0.05% (w/w) 配合した処方 3 でも観察された (Fig. 4-4)。しかしながら、本 vitro の実験系において処方 1 と 2、処方 1 と 3、処方 2 と 3、との比較では C16:1Δ6 が製剤系において再現性良くその安定した抗菌性を示すものの、ISO11930[79]にて記述されている 0.5 log の菌数減少率の許容値を踏まえた有意差のある相違は確認できなかった。一方、本実験系にて使用した製剤は、保存効力試験にて一般的に使用される *Escherichia coli* や *P. aeruginosa* のような標準的な指標菌であるグラム陰性細菌[79]に対しても素早い減少速度を示し、適切な防腐力を有することが確認できた (データ非掲載)。

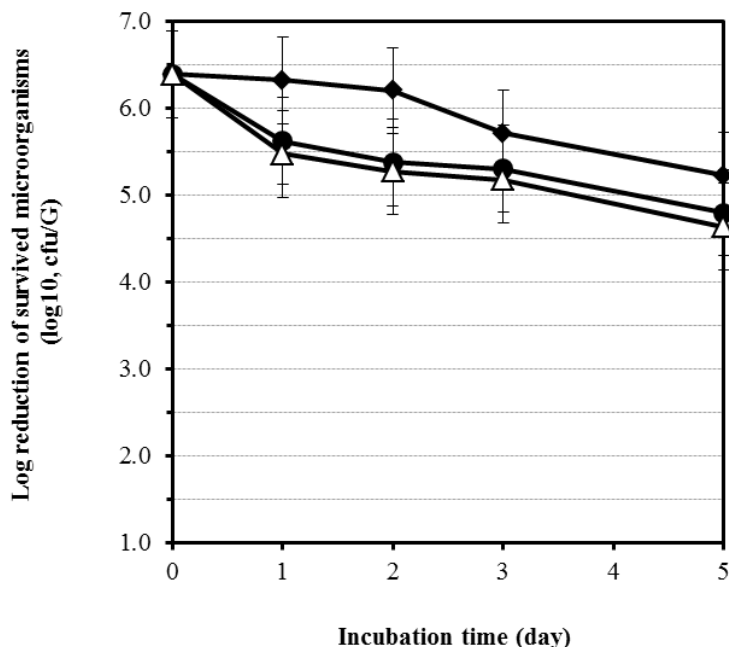


Fig. 4-5. Preservative efficacy of liquid-type lip gloss products formulated with *cis*-6-hexadecenoic acid (C16:1Δ6 [53]).

Three distinct Gram-positive environmental isolates (strains 030411-1-1, 030411-1-2, and 030411-1-3) were tested. ◆, Control formulation 1 without preservatives; ●, formulation 2 with 0.1% (w/w) C16:1Δ6; △, formulation 3 with 0.05% (w/w) ethyl paraben + 0.05% (w/w) propyl paraben. Error bar shows an acceptable range of deviation of 0.5 log which was mentioned in ISO 11930.

次に、以下に示す 3 つの相違した防腐系を有する製剤を使用した実使用試験にてそれらの製剤の使用期間中における保存効力を検証した。各製剤の防腐系は、処方 4 : 0.5% (w/w) C16:1Δ6 および 0.1% (w/w) プロピルパラベン、処方 5 : 0.1% (w/w) エチルパラベンおよび 0.1% (w/w) プロピルパラベン、処方 6 : 0.1% (w/w) エチルパラベン、0.1% (w/w) プロピルパラベンおよび 0.5% (w/w) C18:1Δ9、であった。C16:1Δ6 を含有した処方 4 では 2 週間の実使用テストにおいて変臭を示したサンプルは無く、パラベン単独 (処方 5)、パラベンと C18:1Δ9 の混合系 (処方 6) を使用した 2 種類の製剤ではそれぞれ、20 件中 7 件および 4 件の変臭を確認した。χ² 検定にてこれら製剤における変臭生成の有意差を確認したところ p 値 < 0.05 にてその有意差が確認できた。さらに、C16:1Δ6 を添加した処方 4 では一日 2 回、2 週間の連用にて刺激を感じたパネラーもいなかった (Table 4-3)。C16:1Δ6 を配合した処方 4 では C18:1Δ9 を配合した処方 6 に比較して実使用テストにてより高い防腐性を示す

ことが確認でき、ヒト皮脂脂肪酸である C16:1Δ6 が使用者にとってマイルドな防腐効果を提供しつつ実際の使用場面においても効果的に機能していることが確認できた。

Table 4-3. Result of home-use testing with 3 model formulations [53].

	Formulation for home-use test		
	4	5	6
Number of malodorous samples ^a	0 of 20	7 of 20	4 of 20
(Ratio of malodorous samples)	(0%)	(35%)	(20%)
Number of people felt irritation	0 of 20	0 of 20	0 of 20

^a Significant differences between experimental values for the number of malodorous samples were determined using chi-square test for goodness of fit, with $p < 0.05$ considered significance. In this experiment, chi-square test for goodness of fit was 6.73 and the p-value was 0.03.

さらに、防腐系として C16:1Δ6 とパラベンエステルを組み合わせた製剤 (処方 4) では、パラベンエステルのみ配合した製剤 (処方 5) およびパラベンエステルと C18:1Δ9 を組み合わせた製剤 (処方 6) よりも、水分蒸散抑制効果も高いことを確認することができ (処方 4 は 52%、処方 5 は 45%、処方 6 は 38%)、皮膚の潤いを保持できる有効な防腐系を構築することができたものと考えられた。本検討により、この特異な新規不飽和脂肪酸を抗菌性物質として配合した製剤開発に明るい光を見出すことができた。

口唇化粧品の中でもとくに液状口唇化粧品を長期に使用した場合、先述したように唾液、唇由来成分、皮膚上および口腔内の微生物が本製剤に取り込まれ、製品の形態 (容器構造、製剤の水分の抱え込み易さ、使用方法、等) によっては変臭といった微生物による製品品質への影響が認められる可能性がある。変臭を抑制するためには防腐剤を配合するといった対策が有効であるが、唇といった非常に敏感な粘膜では防腐剤の過剰配合による刺激感の増強とともに唇の荒れを誘発する可能性が否定できず、防腐剤の過剰添加は避けられるべきである。そこで、C16:1Δ6 のヒト皮膚上に存在し、且つ、抗菌性を有するといった他の脂肪酸には無い優位性を応用し、C16:1Δ6 を添加した製剤での防腐性向上効果を油性液体口唇化粧品にて評価した背景がある。口唇部も皮膚上の常在菌である *Staphylococcus* 属や口腔内の常在菌である *Streptococcus* 属を主体としたグラム陽性菌が多く存在する可能性を考えると、C16:1Δ6 の添加はその抗菌特性からも非常に有効な方法と考えられ、実際にその効果を本検討にて検証することができた。C16:1Δ6 は分子内に 2 重結合を有するが故にその分子の安定性が懸念され、製剤への適用には制限が掛かる可能性も否定できない。しかしながら、

今回適用した複雑な組成で構成される油性口唇化粧品製剤中では安定に存在できることをGC分析にて確認しているとともに、**dibutylhydroxytoluene (BHT)**といった酸化防止剤の添加により単純な系でも安定に維持できることも確認している (データ非掲載)。

本検討における本脂肪酸の抗菌特性の明確化、さらには製剤系での刺激感の増強を伴わない防腐性向上効果の確認により、様々な使用者に対応した幅広い各種製剤系への応用にさらに期待が持たれる。

第4節：小括

ヒト皮脂に存在する非常に興味深い特異な脂肪酸である C16:1Δ6 がグラム陰性菌よりもグラム陽性菌に対して高い効果を示すことが幅広い菌種に対する抗菌特性から明らかとなり、*Staphylococcus* 属細菌のみならず *Clostridium* 属細菌に対しても種特異的な「選択殺菌性」という非常に興味深い性質を示すことを見出すことができた。また、ヒトへの危害の可能性のある菌種として知られる *C. albicans* やニキビの起因菌である *P. acnes*、虫歯の起因菌として知られる *S. mutans* をはじめとする各種の口腔細菌に対する高い抗菌性を見出すことができた。C16:1Δ6 の *Staphylococcus* 属への抗菌性は化粧品にて汎用素材として利用されている C18:1Δ9 と比較して高く、種選択性も高いことが明らかとなった。本物質の抗菌機構としては、細胞膜への作用が推察され、*S. aureus* および *S. epidermidis* への選択性の相違は構成脂肪酸組成の相違、中でも分岐脂肪酸の量比による障害、疎水性度の相違に起因する可能性が示唆された。C16:1Δ6 がヒトの皮膚上に存在する内在的な代謝成分といった特徴を利用し、ヒトに対して穏やかな製品開発への応用、すなわち、刺激感が少なく使用時における品質課題である変臭抑制を目指し、刺激を感じ易い粘膜に適用する液状口唇化粧品である液状 lip gloss への応用を検討した。その結果、化学合成的に製造され各種製剤型にて汎用されている防腐剤であるパラベンエステルを、本物質にて置換した処方 of 2 週間の実使用試験において、唾液、唇由来成分、皮膚上および口腔内の微生物によって引き起こされる可能性のある変臭といった品質劣化が抑制されるとともに、刺激も誘発せず、水分蒸散量の抑制も達成できる安定した防腐系を提案することができた。本検討結果に基づき、本抗菌性素材が消費者向け製品にてヒトのみならず環境安全性の観点からも優しい安定した物質として適用可能であることを見出した。

第5章 総括

C16:1Δ6 はヤハズカズラの種子やヒトの皮膚および毛髪に特異的に存在し、その機能解明が進んでいない炭素数 16 個、分子内に一つの *cis*-6 二重結合を有する不飽和脂肪酸である。AD 患者ではその存在率が減少することも報告されている極めて珍しい脂肪酸である。

本不飽和脂肪酸の製造法として、これまでに確立されていた休止菌体反応および相転移膜型 reactor を利用した生産体制よりもさらに簡易的で安価な工業的生產体制、すなわち、増殖連動型発酵生産方法の確立について記述した。

本論文にて C16:1Δ6 高生産変異株の取得、本菌株を使用した培養条件の最適化による増殖連動型発酵生産方法により、休止菌体反応の生産性 (52 g/l) を上回る IPΔH を 4 日間にて 60 g/l 生産できる系を構築することができ、さらに 30 l jar fermentor にてその工業化に向けた有効性を確認した。本生産体制と本生産体制に合わせた後処理工程を基軸として、10 m³ の既存設備を転用した実機生産体制による費用試算 (生産量 7.7 ton/year にて計算) では、全部原価として ¥13,500/kg (販売されている試薬価格: ¥20~100 万円/kg) と試算され、現状の生産価格よりも非常に安価で簡便に製造できるプロセスを構築することができた。本製造価格は現在販売されている不飽和脂肪酸の代表例であるアラキドン酸の販売価格 (¥3~5 万円/kg) と比較しても遜色ないレベルであり、実製造に十分耐えうる生産条件であることが確認できた。

また、本物質生産に関与する可能性のある遺伝子として分子内に 2 重結合を導入する酵素である *desaturase* を標的として当該物質生産菌である *Rhodococcus* 属細菌から初めてその遺伝子の *cloning* を実施した。取得した遺伝子領域内に 2 つの新規 *desaturase* 様遺伝子が *tandem* に存在していること、本遺伝子を発現させた組換え大腸菌の脂肪酸組成解析の結果にて C16:1Δ6 が顕著に増加すること、系統解析の結果から発現タンパクが既報の Δ6-*desaturase* とは相違した新規なクラスターを形成することを見出し、*Rhodococcus* 属細菌の有する新規遺伝子源と遺伝子組換え技術を活用した C16:1Δ6 を含めた各種不飽和脂肪酸の新たな生産体制の可能性への検証結果について記述した。

さらに、確立した増殖連動型発酵生産体制にて製造された本物質を用いて、各種製品への応用展開を図るべく、ヒトの常在菌および一過性の菌を標的とした幅広い菌種に対する抗菌特性を精査し、ヒトの各種疾患に関与するグラム陽性菌に対する優れた効果を確認するとともに *Staphylococcus* 属および *Clostridium* 属において種特異的な選択性を有する殺菌性、すなわち、“選択殺菌性”を見出すことができた。その殺菌性は細胞膜への影響、その構成脂肪酸組成の疎水性度の相違が起因する可能性が示唆された。本物質の特性を活かした製剤開発の一例として刺激を感じ易いヒト粘膜への適用製剤である液状 lip gloss へ本物質を配合し、*vitro* での保存効力試験および実使用試験にてこれまで汎用されてきた防腐成分であ

るパラベンエステルや抗菌性を有する基剤である C18:1Δ9 に比較して同等以上の防腐性能を確認した。実使用テストでは本物質の抗菌特性による変臭抑制効果を確認するとともに優れた水分蒸散抑制効果も確認した。これら検討結果から、C16:1Δ6 が各種製剤系にて微生物学的品質維持に重要な新規防腐成分として機能する非常に有望な物質であることを記述した。

本研究成果を踏まえた将来展望として以下の内容を考えている。C16:1Δ6 の製造法としては、休止菌体反応生産体制から増殖連動型の安価で簡便な生産性の高い発酵生産体制の岩盤が築け、さらに組換え *E. coli* を使用した発酵生産体制、その先には組換え *Rodococcus* 属細菌を使用した基質となる有機溶剤種に影響を受け難い工業生産体制が視野に入ってきた。C16:1Δ6 の組換え生産が可能となれば、遺伝子改変による生産性の向上、さらには特異性の改変への道も拓ける。遺伝子改変による特異性改変によって製造される脂肪酸種のバリエーションを整備できれば、各種脂肪酸のテーラーメイドな高生産体制を構築することも考えられる。C16:1Δ6 の機能活用としては、医薬品、医薬部外品、化粧品をはじめとしたスキンケア製品、ヘアケア製品からより安価な原料種への要望が高いパーソナルケア製品、とくに本物質の抗菌特性を踏まえたオーラルケア製品や浴用剤への応用が考えられる。また、ヒトが直接触れる可能性からマイルドな製剤型が要望される食器用洗剤のような雑貨品への展開、本物質の選択殺菌性を踏まえた食品、飲料、サプリメントといった機能性製剤への活用も見込める。新規抗菌成分としてのハードルの高さはあるが、中でも AD 治療薬、カンジダ症治療薬、褥瘡治療薬（寝たきりの患者の褥瘡部に黄色ブドウ球菌が多く検出される症例より）、といった医薬品への展開には大いに期待できる。先述した改変脂肪酸の製剤系への応用を図ることで C16:1Δ6 には無い別な機能付与も考えられることから、皮膚性状や腸内環境の正常化によるマイクロバイオーームコントロール技術を手にも可能となる。今回の検討結果を基盤とした脂肪酸研究のさらなる進化と深化により、微生物が関与する様々な疾患の改善、ペット、環境も含めた清潔で安全なヒトの生活の基盤を支える優しい製品開発に向けた明るい未来を創出する研究に繋がるものと考えている。この様な大きな視点に立てば、化学合成との融合による新たな脂肪酸研究の展開にも道が拓け、我々が推進してきたヒト皮脂脂肪酸研究が様々な可能性を提示できるまでに発展していると実感する。さらなる脂肪酸研究の発展により、豊かな生活文化の実現に向けた真価の提供に貢献できることを一研究者として切に期待している (Fig. 5)。

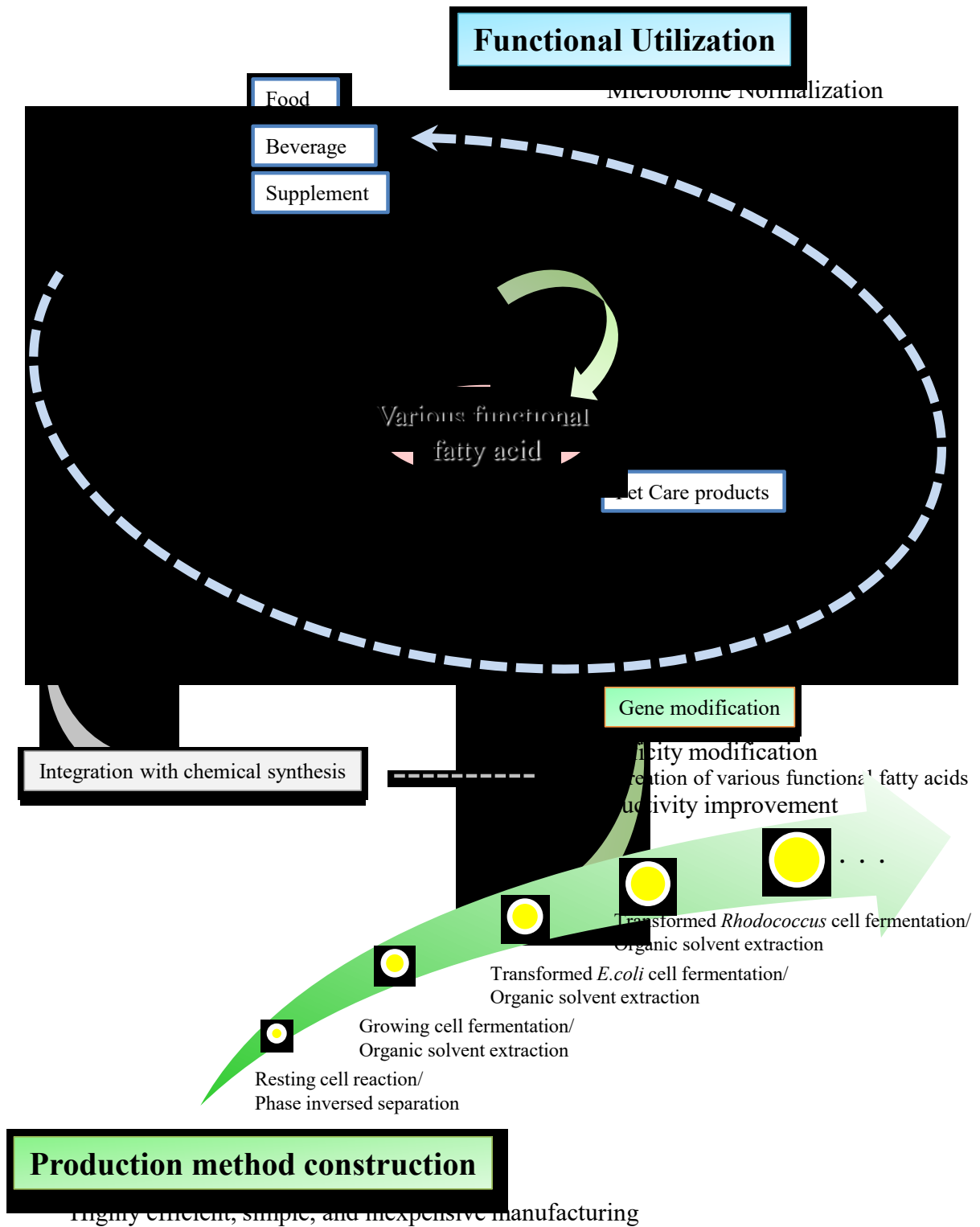


Fig. 5. Future scope of C16:1Δ6.

第6章

引用文献

1. Downing, D., T. and Strauss, J., S.: Synthesis and composition of surface lipids of human skin, *J. Invest. Dermatol.*, **62**, 228-244 (1974). <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12676793>
2. Carol, L., F., Derek, R., B., and Kim, A., B.: The roles of cutaneous lipids in host defense, *Biochim. Biophys. Acta*, **1841**, 319-322 (2014).
3. Lan, G., Joel, S., G., Charleen, H., Kurt, S., and Stephen, M., P.: Identification of the Δ -6 desaturase of human sebaceous glands: Expression and enzyme activity, *J. Invest. Dermatol.*, **120**, 707-714 (2003).
4. Morello, A., M. and Downing, D., T.: trans-Unsaturated fatty acids in human skin surface lipids, *J. Invest. Dermatol.*, **67**, 270-272 (1976).
5. Yamamoto, A., Serizawa, S., Ito, M., and Sato, Y.: Effect of aging on sebaceous gland activity and on the fatty acid composition of wax esters, *J. Invest. Dermatol.*, **89**, 507-512 (1987).
6. Wille, J., J., Drake, D., and Wertz, P., W.: Identification of cis-palmitoleic acid as the active antimicrobial in human skin sebum, *J. Invest. Dermatol.*, **108**, 677 (1997).
7. Burtenshaw, J., M., L.: The mechanism of self-disinfection of the human skin and its appendages, *J. Hyg.*, **42**, 184-210 (1942).
8. Bergsson, G., Arnfinnsson, J., Steingrímsson, O., and Thormar, H.: Killing of gram-positive cocci by fatty acids and monoglycerides, *APMIS.*, **109**, 670-678 (2001).
9. Chamberlain, N., R., Mehrtens, B., G., Xiong, Z., Kapral, F., A., Boardman, J., L., and Rearick, J., I.: Correlation of carotenoid production, decreased membrane fluidity, and resistance to oleic acid killing in *Staphylococcus aureus* 18Z, *Infect. Immun.*, **59**, 4332-4337 (1991).
10. Wille, J., J. and Kydonieus, A.: Palmitoleic acid isomer (C16:1 Δ 6) in human skin sebum is effective against gram-positive bacteria, *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.*, **16**, 176-187 (2003).
11. Sumrell, G., Mod, R., R., Magne, F., C., and Novak, A., F.: Antimicrobial activity of some fatty acid derivatives, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **55**, 395-397 (1978).
12. 富田秀太.: HMP から 10 年-皮膚細菌叢研究のトピックス, *Frag. J.*, **12**, 12-16 (2018).
13. Daniela, K., Hansgeorg, E., and Jurgen, K.: Process for the preparation of cis-6-hexadecenoic acid. WO98/16104 (2002).
14. Ernst, H., Klein, D., and Koppenhofer, J.: Method for producing cis-6-hexadecenoic acid, JP2002-241340 (2002).
15. 井上重治.: 微生物と香り-ミクロ世界のアロマの力. *Frag. J.*, 78-79 (2002).
16. Certik, M. and Shimizu, S.: Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production, *J. Biosci. Bioeng.*, **87**, 1-14 (1999).

17. Suzuki, O.: Production of γ -linoleic acid by fungi and its industrialization, Proceedings of world conference on biotechnology for the fats and oils industry. *AOCS.*, 110-116 (1987).
18. Yamada, H., Shimizu, S., and Shinmen, Y.: Production of arachidonic acid by *Mortierella elongata* 1S-5, *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 785-790 (1987).
19. Certik, M. and Shimizu, S.: Production and application of single cell oils, *Agro. Food Ind. Hi-Tech.*, **10**, 26-32 (1999).
20. Shinmen, Y., Shimizu, S., Akimoto, K., Kawashima, H., and Yamada, H.: Production of arachidonic acid by *Mortierella* fungi, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **31**, 11-16 (1989).
21. Yamada, H.: Production of arachidonic acid and eicosapentaenoic acid by microorganisms, p. 173-177. In Applewhite, T. H. (ed.), Proceedings of World Conference on Biotechnology for the Fats and Oils Industry, Hamburg, Germany, 1987. American Oil Chemists' Society, Champaign (1988).
22. 小川順.: 油脂発酵クロニクル. *生物工学*, **90**, 723-727 (2012).
23. Ide, T., Sugano, M., Ishida, T., Niwa, M., Arima, M., and Morita, A.: Effects of gamma-linolenic acid on fatty acid profiles and eicosanoid production of the hamster, *Nutr. Res.*, **7**, 1085-1092 (1987).
24. Lee, J., H. and Sugano, M.: Effects of linoleic and gamma-linolenic acid on 7,12-dimethylbenz (a) anthracene-induced rat mammary tumors, *Nutr. Rep. Int.*, **34**, 1041-1049 (1986).
25. Sugano, M., Ishida, T., Yoshida, K., Tanaka, K., Niwa, M., Arima, M., and Morita, A.: Effects of mold oil containing γ -linolenic acid on the blood cholesterol and eicosanoid levels in rats, *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 2483-2491 (1986).
26. Hebborn, P., Jablonska, S., Beutner, E., H., Langner, A., and Wolska, H.: Action of topically applied arachidonic acid on the skin of patients with psoriasis, *Arch. Dermatol.*, **124**, 387-391 (1988).
27. Lovell, C., R., Burton, J., L., and Horrobin, D., F.: Treatment of atopic eczema with evening primrose oil, *Lancet*, **19**, 278 (1981).
28. Nissen, H., P. and Biltz, H.: Borage oil, *Cosmet. Toilet. Mag.*, **110**, 71-77 (1995).
29. Schalin-Karrila, M., Mattila, L., Jansen, C., T., and Uotila, P.: Evening primrose oil in the treatment of atopic eczema: effect on clinical status, plasma phospholipid fatty acids and circulating blood prostaglandins, *Br. J. Dermatol.*, **117**, 11-19 (1987).
30. Tolleson, A. and Frithz, A.: Transepidermal water loss and water content in the stratum corneum in infantile seborrheic dermatitis, *Acta Derm. Venereol.*, **73**, 18-20 (1993).
31. Carlson, S., E., Werkman, S., H., Peeples, J., M., Cooke, R., J., and Tolley, E., A.: Arachidonic acid status correlates with first year growth in preterm infants, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 1073-1077 (1993).
32. Lanting, C., I., Fidler, V., Huisman, M., Touwen, B., C., and Boersma, E., R.: Neurological

- differences between 9-year-old children fed breast-milk or formula-milk as babies, *Lancet*, **344**, 1319-1322 (1994).
33. Makrides, M., Simmer, K., Goggin, M., and Gibson, R., A.: Erythrocyte docosahexaenoic acid correlates with the visual response of healthy, term infants, *Pediatr. Res.*, **33**, 425-427 (1993).
 34. Canuto, R., A., Muzio, G., Biocca, M., E., and Dianzani, M., U.: Lipid peroxidation in rat Ah-130 hepatoma cells enriched in vitro with arachidonic acid, *Cancer Res.*, **51**, 4603-4608 (1991).
 35. Huang, C., B., George, B., and Ebersole, J., L.: Antimicrobial activity of n-6, n-7 and n-9 fatty acids and their esters for oral microorganisms, *Arch. Oral Biol.*, **55**, 555-560 (2010).
 36. Chen, C., H., Wang, Y., Nakatsuji, T., Liu, Y., T., Zouboulis, C., Gallo, R., Zhang, L., Hsieh, M., F., and Huang, C., M.: An innate bactericidal oleic acid effective against skin infection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A therapy concordant with evolutionary medicine, *J. Microbiol. Biotechnol.*, **21**, 391-399 (2011).
 37. Araki, H., Hamada, S., Toshima, Y., Kawazoe, Y., Otani, M., Suzuki, R., Usukura, J., and Ookawa, M.: An offensive defense: Minimizing preservatives, maximizing protection and resources, *Cosmet. Toilet. Mag.*, Mar., 64-78 (2018).
 38. 荒木裕行, 都島康彦, 川添良江, 大谷正彦, 鈴木留佳, 白倉淳, 大河正樹.: Offensive な防腐剤 Defense 戦略-防腐剤を最小限に抑え防腐力を最大限に発揮させる技術, *Frag. J.*, **11**, 70-77 (2018).
 39. Commission regulation (EU) No 1004/2014 of 18 September 2014 amending Annex V to Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council on cosmetic products.
 40. Koike, K., Ara, K., Adachi, S., Takigawa, H., Mori, H., Inoue, S., Kimura, Y., and Ito, S.: Regiospecific internal desaturation of aliphatic compounds by a mutant *Rhodococcus* strain, *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 5636-5638 (1999).
 41. Koike, K., Takaiwa, M., Ara, K., Inoue, S., Kimura, Y., and Ito, S.: Production of isopropyl cis-6-hexadecenoate by regiospecific desaturation of isopropyl palmitate by a double mutant of a *Rhodococcus* strain, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**, 399-404 (2000).
 42. Koike, K., Takeuchi, K., Mino, H., Takaiwa, M., Tohoh, T., Tadokoro, T., Tsutoh, K., and Ito, S.: A repeat-batch membrane bioreactor with a phase inversion for desaturation of isopropyl palmitate by a mutant *Rhodococcus* strain, *J. Biotechnol.*, **80**, 101-107 (2000).
 43. Takeuchi, K., Koike, K., and Ito, S.: Production of cis-unsaturated hydrocarbons by a strain of *Rhodococcus* in repeated batch culture with a phase-inversion, hollow-fiber system, *J. Biotechnol.*, **14**, 179-186 (1990).
 44. 特公平 2-6516 号公報 (特許 1577661)
 45. 特公平 4-12718 号公報 (特許 1699930)
 46. 特公平 2-6515 号公報 (特許 1577660)

47. Takigawa H., Nakagawa, H., Kuzukawa, M., Mori, H., and Imokawa, G.: Deficient production of hexadecenoic acid in the skin is associated in part with the vulnerability of atopic dermatitis patients to colonization by *Staphylococcus aureus*, *Dermatology*, **211**, 240-248 (2005).
48. Araki, H., Sugai, Y., and Takigawa, H.: Improvement of atopic dermatitis by human sebaceous fatty acids and related lipids (Chap. 19), In “Atopic dermatitis - disease etiology and clinical management”, Jorge Esparza-Gordillo and Itaru Dekio, IntechOpen, London, UK, pp. 309-324 (2012).
49. 特開 2005-154365 (P2005-154365A)
50. 特開 2003-113079 (P2003-113079A)
51. Araki, H., Hagihara, H., Takigawa, H., Kotani, N., Tsujino, Y., Koike, K., Kawai, S., Ozaki, K., and Ito, S.: Hyperproduction of sebaceous *cis*-6-hexadecenoic acid by esterase-reduced mutant of *Rhodococcus* sp. Strain, *J. Biosci. Bioeng.*, **104**, 300-303 (2007).
52. Araki, H., Hagihara, H., Takigawa, H., Tsujino, Y., and Ozaki, K.: Novel genes encoding hexadecanoic acid Δ 6-desaturase activity in a *Rhodococcus* sp., *Curr. Microbiol.*, **73**, 646-651 (2016).
53. Araki, H., Mori, H., Tamura, E., Hagihara, H., and Takigawa, H.: Human sebaceous *cis*-6-hexadecenoic acid: Possible application of an innate antimicrobial substance to cosmetic products for mucous membrane, *J. Cosmet. Dermatol. Sci. Appl.*, **7**, 133-147 (2017).
54. Koike, K., Takaiwa, M., Kimura, Y., Inoue, S., and Ito, S.: Substrate specificity of regiospecific desaturation of aliphatic compounds by a mutant *Rhodococcus* strain, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**, 1064-1066 (2000).
55. Beard, S., J., Hughes, M., N., and Poole, R., K.: Inhibition of cytochrome bd-terminated NADH oxidase system in *Escherichia coli* K-12 by divalent metal cations, *FEMS Microbiol. Lett.*, **131**, 205-210 (1995).
56. Jeffery, E., H.: The effect of zinc on NADPH oxidation and monooxygenase activity in rat hepatic microsomes, *Mol. Pharmacol.*, **23**, 467-473 (1983).
57. Huyer, M. and Page, W., J.: Ferric reductase activity in *Azotobacter vinelandii* and its inhibition by Zn^{2+} , *J. Bacteriol.*, **171**, 4031-4037 (1989).
58. 特開 2002-262895 (特許 4179760)
59. Bio Products, *Bio Industry*, **34**, 64-66 (2017).
60. Lan, W., Z., Qin, W., M., and Yu, L., J.: Effect of glutamate on arachidonic acid production from *Mortierella alpina*, *Lett. Appl. Microbiol.*, **35**, 357-360 (2002).
61. Fox, B., G., Shanklin, J., Somerville, C., and Munck, E.: Stearoyl-acyl carrier protein delta 9 desaturase from *Ricinus communis* is a diiron-oxo protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 2486-2490 (1993).
62. Nagai, J. and Bloch, K.: Enzymatic desaturation of stearyl acyl carrier protein, *J. Biol. Chem.*,

- 243, 4626-4633 (1968).
63. Shanklin, J., Whittle, E., and Fox, B., G.: Eight histidine residues are catalytically essential in a membrane-associated iron enzyme, stearoyl-CoA desaturase, and are conserved in alkane hydroxylase and xylene monooxygenase, *Biochemistry*, **33**, 12787-12794 (1994).
 64. Aki, T., Shimada, Y., Inagaki, K., Higashimoto, H., Kawamoto, S., Shigeta, S., Ono, K., and Suzuki, O.: Molecular cloning and functional characterization of rat Δ -6 fatty acid desaturase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **255**, 575-579 (1999).
 65. Cahoon, E., B., Cranmer, A., M., Shanklin, J., and Ohlrogge, J., B.: Δ 6 Hexadecenoic acid is synthesized by activity of a soluble Δ 6 palmitoyl-acyl carrier protein desaturase in *Thunbergia alata* endosperm, *J. Biol. Chem.*, **269**, 27519-27526 (1994).
 66. Cho, H., P., Nakamura, M., T., and Clarke, S., D.: Cloning, expression, and nutritional regulation of the mammalian Δ 6 desaturase, *J. Biol. Chem.*, **274**, 471-477 (1999).
 67. Laoteng, K., Mannontarat, R., Tanticharoen, M., and Cheevadhanarak, S.: Δ 6-desaturase of *Mucor rouxii* with high similarity to plant Δ 6-desaturase and its heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **279**, 17-22 (2000).
 68. Guillou, H., Rioux, V., Catheline, D., Thibault, J., N., Bouriel, M., Jan, S., D'Andrea, S., and Legrand, P.: Conversion of hexadecanoic acid to hexadecenoic acid by rat Δ 6-desaturase, *J. Lipid Res.*, **44**, 450-454 (2003).
 69. Inagaki, K., Aki, T., Shiota, T., Kawamoto, S., Shigeta, S., Suzuki, O., and Ono, K.: Evidence of isozymes for Δ 6 fatty acid desaturase in rat hepatocytes, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **67**, 451-454 (2003).
 70. Michinaka, Y., Aki, T., Shimauchi, T., Nakajima, T., Kawamoto, S., Shingo, S., Suzuki, O., and Ono, K.: Differential response to low temperature of two Δ 6 fatty acid desaturases from *Mucor circinelloides*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **62**, 362-368 (2003).
 71. Sakuradani, E. and Shimizu, S.: Gene cloning and functional analysis of a second Δ 6-fatty acid desaturase from an arachidonic acid-producing *Mortierella* fungus, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **67**, 704-711 (2003).
 72. Koike, K., Takaiwa, M., Kimura, Y., and Ito, S.: Production of isopropyl *cis*-hexadecenoate by regiospecific desaturation of isopropyl palmitate by a double mutant of a *Rhodococcus* strain, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**, 399-404 (2000).
 73. Gutierrez, J., A., Nichols, P., and Couperwhite, I.: Changes in whole cell-derived fatty acids induced by benzene and occurrence of the unusual 16:1 ω 6c in *Rhodococcus* sp. 33, *FEMS Microbiol. Lett.*, **176**, 213-218 (1999).
 74. Sayanova, O., Smith, M., A., Lapinskas, P., Stobart, A., K., Dobson, G., Christie, W., W., Shewry, P., R., and Napier, J., A.: Expression of a borage desaturase cDNA containing an N-terminal cytochrome b5 domain results in the accumulation of high levels of Δ 6-desaturated fatty acids in

- transgenic tobacco, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 4211-4216 (1997).
75. Reddy, A., S. and Thomas, T., L.: Expression of a cyanobacterial $\Delta 6$ -desaturase gene results in γ -linolenic acid production in transgenic plants, *Nat. Biotechnol.*, **14**, 639-642 (1996).
 76. Hashimoto, Y., Nishiyama, M., Yu, F., Watanabe, I., Horinouchi, S., and Beppu, T.: Development of a host-vector system in a *Rhodococcus* strain and its use for expression of the cloned nitrile hydratase gene cluster, *J. Gen. Microbiol.*, **138**, 1003-1010 (1992).
 77. 特開 2005-247776 (P2005-247776A)
 78. Schuhardt V.T., Huber T.W., Pope L.M.: Electron microscopy and viability of lysostaphin-induced staphylococcal spheroplasts, protoplast-like bodies, and protoplasts. *J. Bacteriol.*, **97**, 396-401 (1969).
 79. ISO11930:2012 Cosmetics-Microbiology-Evaluation of the antimicrobial protection of a cosmetic product.
 80. Drake, D., R., Brogden, K., A., Dawson, D., V., and Wertz, P., W.: Thematic review series: Skin lipids. Antimicrobial lipids at the skin surface, *J. Lipid Res.*, **49**, 4-11 (2008).
 81. Kanauchi, O., Matsumoto, Y., Matsumura, M., Fukuoka, M., and Bamba, T.: The beneficial effects of microflora, especially obligate anaerobes, and their products on the colonic environment in inflammatory bowel disease, *Curr. Pharm. Des.*, **11**, 1047-1053 (2005).
 82. Balato, A., Cacciapuoti, S., Di, Caprio, R., Marasca, C., Masarà, A., Raimondo, A., and Fabbrocini, G.: Human microbiome: Composition and role in inflammatory skin diseases, *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, **67**, 1-18 (2019).
 83. Yamasaki, Y., Funai, K., Ueshima, M., and Shingu, H.: Antimycotic activity of econazole nitrate and its related compounds, *Nippon Saikingaku Zasshi*, **69**, 813-825 (1979).
 84. Fromtling, R., A.: Overview of medically important antifungal azole derivatives, *Clin. Microbiol. Rev.*, **1**, 187-217 (1988).
 85. Fischer, C., L., Drake, D., R., Dawson, D., V., Blanchette, D., R., Brogden, K., A., and Wertz, P., W.: Antibacterial activity of sphingoid bases and fatty acids against gram-positive and gram-negative bacteria, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **56**, 1157-1161 (2012).
 86. Arikawa, J., Ishibashi, M., Kawashima, M., Takagi, Y., Ichikawa, Y., and Imokawa, G.: Decreased levels of sphingosine, a natural antimicrobial agent, may be associated with vulnerability of the stratum corneum from patients with atopic dermatitis to colonization by *Staphylococcus aureus*, *J. Invest. Dermatol.*, **119**, 433-439 (2002).
 87. Chen, C., H., Wang, Y., Nakatsuji, T., Liu, Y., T., Zouboulis, C., Gallo, R., Zhang, L., Hsieh, M., F., and Huang, C., M.: An innate bactericidal oleic acid effective against skin infection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A therapy concordant with evolutionary medicine, *J. Microbiol. Biotechnol.*, **21**, 391-399 (2011).
 88. Kenny, J., G., Ward, D., Josefsson, E., Jonsson, I., M., Hinds, J., Rees, H., H., Lindsay, J., A., Tar-

- kowski, A., and Horsburgh, M., J.: The *Staphylococcus aureus* response to unsaturated long chain free fatty acids: Survival mechanisms and virulence implications, *PLoS One*, **4**, e4344 (2009).
89. Parsons, J., B., Yao, J., Frank, M., W., Jackson, P., and Rock, C., O.: Membrane disruption by antimicrobial fatty acids releases low-molecular-weight proteins from *Staphylococcus aureus*, *J. Bacteriol.*, **194**, 5294-5304 (2012).
 90. O'Donnell, A., G., Nahaie, M., R., Goodfellow, M., Minnikin, D., E., and Hájek, V.: Numerical analysis of fatty acid profiles in the identification of staphylococci, *J. Gen. Microbiol.*, **131**, 2023-33 (1985).
 91. Singh, V., K., Hattangady, D., S., Giotis, E., S., Singh, A., K., Chamberlain, N., R., Stuart, M., K., and Wilkinson, B., J.: Insertional inactivation of branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase in *Staphylococcus aureus* leads to decreased branched-chain membrane fatty acid content and increased susceptibility to certain stresses, *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 5882-5890 (2008).
 92. ISO29621:2010 Cosmetics-Microbiology-Guidelines for the risk assessment and identification of microbiologically low-risk products.

主要論文

1. Hyperproduction of sebaceous cis-6-hexadecenoic acid by esterase-reduced mutant of *Rhodococcus* sp. strain.
J. Biosci. Bioeng., **104**, 300-303 (2007).
Araki, H., Hagihara, H., Takigawa, H., Kotani, N., Tsujino, Y., Koike, K., Kawai, S., Ozaki, K., and Ito, S.
DOI: 10.1263/jbb.104.300
2. Novel genes encoding hexadecanoic acid Δ 6-desaturase activity in a *Rhodococcus* sp..
Curr. Microbiol., **73**, 646-651 (2016).
Araki, H., Hagihara, H., Takigawa, H., Tsujino, Y., and Ozaki, K.
DOI: 10.1007/s00284-016-1106-9
3. Human sebaceous cis-6-hexadecenoic acid: Possible application of an innate antimicrobial substance to cosmetic products for mucous membrane.
J. Cosmet. Dermatol. Sci. Appl., **7**, 133-147 (2017).
Araki, H., Hajime, M., Tamura, E., Hagihara, H., and Takigawa, H.
DOI: 10.4236/jcdsa.2017.72012
4. Improvement of atopic dermatitis by human sebaceous fatty acids and related lipids (Chap. 19), In “Atopic dermatitis - disease etiology and clinical management”.
Jorge Esparza-Gordillo and Itaru Dekio, IntechOpen, London, UK, pp. 309-324 (2012).
Araki, H., Sugai, Y., and Takigawa, H.
DOI: 10.5772/26861

謝辞

本論文の作成に当たり、終始懇切なるご指導、ご鞭撻を賜りました広島大学大学院統合生命科学研究科 三本木至宏教授、近畿大学工学部化学生命工学科システム工学研究科 仲宗根薫教授に深く感謝し御礼申し上げます。また、博士論文を審査いただき、ご助言を賜りました広島大学大学院統合生命科学研究科 島本整教授、西村慎一教授、船戸耕一准教授に心より感謝申し上げます。

本研究は1980年代の国家プロジェクトである通産省次世代産業基盤技術研究開発制度にて推進された研究をベースとして長い年月を掛けて醸成させてきたテーマであり、花王株式会社の数多くの諸先輩方に支えられ推進してきたテーマであります。諸先輩方のC16:1Δ6に対する深い愛情無くしては本テーマの継続は難しかったものと考えております。この場を借りて本テーマに携わって来られた諸先輩方に深く厚く御礼申し上げます。

本研究を実施する機会、また、本研究を取り纏める機会を与えて下さいました長谷部佳宏現社長、生産部門に所属している身でありながら本研究の取り纏めをご承認下さいました吉田靖氏（現技術開発センター 品質技術グループ長）、瀧村靖氏（現生物科学研究所長）、当時研究主幹として非常に有用なアドバイスを下さり親身に実験に関する相談に乗って下さった伊藤進氏（北海道大学創成科学共同研究機構）、本研究テーマ推進時の室長であり本テーマを温かく支えて下さった川合修次氏（前宇都宮大学地域共生研究開発センター）、後任室長であり技術的面からもご指導下さった尾崎克也氏（現人財戦略部門／一般財団法人バイオインダストリー協会）、当時のグループリーダーとして本テーマの有効利用を真摯に進めて下さり、困難な状況も一緒に乗り越えて下さった滝川博文氏、萩原浩氏、に厚く御礼申し上げます。また、本研究テーマを立上げ当時から携わってこられ、本研究の外部発表時に非常に有用なアドバイスを下さった小池謙三氏、荒勝俊氏（現早稲田大学理工学術院総合研究所）に厚く御礼申し上げます。本研究テーマと一緒に進めて下さった森啓氏、高岩美喜雄氏、吉松正氏、小谷伸始氏、辻野幸晴氏、上村隆明氏、故秋葉俊一氏、田村英子氏、菅井由也氏に厚く御礼を申し上げます。

また、C16:1Δ6の抗菌機構解明研究として遺伝子組み換え大腸菌、*Staphylococcus* 属細菌の脂肪酸組成解析にご協力、ご助言を下さった山本公平氏（前一般社団法人日本油糧検定協会）に厚く御礼を申し上げます。

なお、本論文の一部の図表に関しましては、Springer Nature、Elsevier、IntechOpen、Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications (JCDSA)、各社の許可を得て転載しております。本許可に関しまして、各社にこの場を借りて厚く御礼を申し上げます。

最後にこの年齢になってまでも博士号取得に向けて私を絶えず励まし、信じ、応援し続けてくれた家族、親族一同に深く感謝申し上げます。