



# 岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

ホスホリパーゼDによるリン脂質の酵素的変換とその  
応用に関する研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2014-04-01 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 新保, 喜久雄 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12099/2355">http://hdl.handle.net/20.500.12099/2355</a>

氏名（本籍）	新保喜久雄（静岡県）
学位の種類	博士（農学）
学位記番号	農博甲第14号
学位授与年月日	平成6年3月14日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻
研究指導を受けた大学	静岡大学
学位論文題目	ホスホリパーゼDによるリン脂質の酵素的変換とその応用に関する研究
審査委員	主査 静岡大学教授 伊奈和夫 副査 静岡大学教授 坂田完三 副査 信州大学教授 茅原 紘 副査 岐阜大学教授 柘植 治人 副査 静岡大学教授 衛藤 英男

### 論文の内容の要旨

本論文はレシチンの有効利用に関するものである。

大豆レシチン（大豆リン脂質混合物）は潜在的生産可能量が大きいにもかかわらず実際の需要は少なく、未利用資源の一つである。その有効活用には、種々の加工を施して新たな機能を付加して高付加価値化することが必要である。そのための方法として phospholipase D (PLD) によるホスファチジル基転移反応が有力である。なぜなら、リン脂質の親水性基を種々の化合物に変換することで、天然物としては存在しない新規なリン脂質誘導体とし、もとのリン脂質とは別の機能を付与できる可能性があるからである。本研究は、リン脂質の酵素変換に使用し得るような高いホスファチジル基転移活性を有する PLD を探索し、新規な機能を持つリン脂質誘導体の合成を試みたものである。

PLD によるリン脂質の酵素変換の研究を行うに際して、探索研究に使用する酵素の給源として土壌微生物を考え、スクリーニングを行った。すなわち大豆レシチンを炭

素源とする制限培地を用いて、各地の土壤から 831株の微生物を得た。これらの中から、PLD の加水分解活性とホスファチジル基転移活性を指標として、29株菌が選別された。そのうちの2菌株の培養液は高いホスファチジル基転移活性を示し、かつ PLD 生産菌としては未報告であると思われた。菌学的諸性質を検討した結果、2種の微生物は Streptomyces lydicus および Streptomyces antibioticus であると同定された。この 2つの放線菌の培養液から、各種のクロマトグラフィー等の手段により PLD の精製を行った。それぞれの酵素を電気泳動的に単一なまでに精製し、分子量、等電点を測定した。さらに至適 pH、至適温度および種々の物質が活性に与える影響を検討した。次に精製された酵素について、ホスファチジル基転移反応に関するいくつかの性質を調べた。続いてホスファチジル基転移反応の良いアクセプターであることが確かめられた化合物について反応を行い、その性質を検討した。糖や ethyleneglycol 類のホスファチジル化物は高い両親媒性を持つことが予想されたので、その乳化特性をその他のリン脂質と比較した。合成したものは、phosphatidylethyleneglycol, phosphatidyldiethyleneglycol, phosphatidyltriethyleneglycol, phosphatidylglucose, phosphatidyletanolamine, phosphatidylglycerol および phosphatidylserine である。各種溶媒に対する溶解性は、全試料ともクロロホルムに可溶、水および大豆白絞油に不溶であった。ケロシンには phosphatidylethanolamine, phosphatidylserine, phosphatidylglucose が不溶であった。各試料のエマルジョンの乳化型は、phosphatidylserine 1.0%濃度のとき W/O 型であったが、他はすべて O/W 型であった。静置法によるエマルジョンの安定性は phosphatidylethyleneglycol, phosphatidyldiethyleneglycol, phosphatidyltriethyleneglycol, および phosphatidylserine のエマルジョンが、天然物である phosphatidylcholine の場合に比較して分離率、分離速度ともに小さく、安定であった。遠心分離法によるエマルジョンの安定性は、phosphatidylserine の場合を除きリン脂質誘導体濃度の影響を受けにくかった。また phosphatidylethyleneglycol, phosphatidyltriethyleneglycol, および phosphatidylglucose の油層分離率が低く、安定であった。界面張力は各試料とも時間の経過に従い徐々に低下し、phosphatidylethyleneglycol, phosphatidyltriethyleneglycol が比較的低い値を示した。

酵素阻害など生理活性を持つ化合物のホスファチジル化の例として、kojic acid をアクセプターとする反応を行った。合成した phosphatidylated koji acid はミトコンドリア膜を膨潤させ、生体膜に親和性を持つことが示された。そこで phosphatidyl-

tidylated kojic acid の抗菌試験を行った。Escherichia coli に対して kojic acid よりも強い抗菌性を示した。また kojic acid は tyrosinase を阻害するが、phosphatidylated kojic acid も阻害活性を保持していた。kojic acid の tyrosinase 阻害は、酵素活性部位の銅とのキレーションによるものとされることから、phosphatidylated kojic acid は油脂の酸化を促進する微量金属に対して不活化する作用を持つと考え、酸化試験を行ったところ、長鎖脂肪酸のホスファチジル基を持つ phosphatidylated kojic acid が油脂中で抗酸化性を示した。

以上のように、PLD のホスファチジル基転移反応により、新規な機能を持つリン脂質誘導体の合成が可能になり、大豆レシチンの有効利用の可能性の一つが示された。

### 審 査 結 果 の 要 旨

本論文はレシチンの有効利用に関するものである。

大豆レシチンは未利用資源の一つであり、その有効活用は高付加価値化することが必要である。そのための方法として phospholipase D (PLD) によるホスファチジル基転移反応が有力である。本研究は、リン脂質のホスファチジル基転移活性を有する PLD を探索し、それを用いた新規な機能を持つリン脂質誘導体の合成を試みたものである。

PLD によるリン脂質の酵素変換は、先ず各地の土壤から微生物を分離した。これらの中から PLD の加水分解活性とホスファチジル基転移活性の高い 2 菌株を選択した。これら 2 種の菌は Streptomyces lydicus および Streptomyces antibioticus であると同定した。2 種の放線菌培養液から PLD の精製を行い、それぞれの酵素の諸性質を検討した。次に精製された酵素について、ホスファチジル基転移反応に関するいくつかの性質を検討した。ethyleneglycol および糖類のホスファチジル化物は高い両親媒性を持ち乳化特性を持つことが予測され、この性質についてリン脂質と比較した。

合成品 phosphatidylethyleneglycol, phosphatidyl-

diethyleneglycol, phosphatidyltriethyleneglycol, phosphatidylglucose, phosphatidylethanolamine, phosphatidylglycerol および phosphatidylserine のエマルジョンの乳化型は, phosphatidylserine 1.0%濃度のとき W/O 型であったが, 他はすべて O/W 型であった. 静置法によるエマルジョンの安定性は ethanol-amine を除く他のものは天然物と分離率, 分離速度ともに小さく安定であった. 遠心分離法によるエマルジョンの安定性は, serine を除き他のものは油層分離率が低く, 安定であった.

生理活性をもつ化合物のホスファチジル化物 phosphatidylated kojic acid はミトコンドリア膜を膨潤させ, 生体膜に親和性をもつことが示され, 抗菌試験に於いて Escherichia coli に対して強い抗菌性を示した. また, 油脂の酸化に対して抗酸化性を示した.

以上のように, PLD により新規な機能をもつリン脂質誘導体の合成が可能になり, 大豆レシチンの有効利用の一つが明らかにされたものと考えられる.