

微生物による共役脂肪酸生産

小川 順*・岸野 重信・安藤 晃規・杉本 聡・清水 昌

近年、共役リノール酸 (CLA) に代表される共役脂肪酸のユニークな生理機能に注目が集まっている。CLA は分子内に共役二重結合を有するリノール酸異性体の総称であり、そのいくつかの異性体に発癌抑制作用、体脂肪低減作用、抗動脈硬化作用、インスリン感受性改善作用、免疫増強作用、骨代謝改善作用などが見いだされてきている。¹⁾これにともない、CLAの供給源・製造法に対する関心が高まっている。また、多種存在する CLA 異性体のうち限られたもののみが生理活性を示すため、それらを選択的に作り分ける技術も求められている。

現在米国にてボディビルダー用の補助食品として利用される CLA (年間 100 t 強) は、リノール酸を化学的に共役化することで製造されており、種々の異性体の混合物となっている。個々の異性体の機能に特化した医薬・機能性食品としての用途の拡大を想定すると、異性体選択性が高くかつ安全な生産法の開発が求められる。生物生産法の開発はこの問題を解決しようと考えられるが、既存の生物起源の CLA は反芻動物由来の食品に微量含まれるに限られていた (数 mg/g fat)。そこで我々は、より効率的な生物生産手段として微生物の利用を検討した。

リノール酸異性化反応による CLA 生産

1960年代半ば、Keplerらは、反芻胃内微生物が遊離不飽和脂肪酸による生育阻害を回避するためにリノール酸を飽和化する過程で、中間体としてCLAを産生することを報告していた。²⁾この知見に基づきさまざまな乳酸菌を対象にリノール酸をCLAへと変換する能力を探索した結果、*Lactobacillus acidophilus* や *L. plantarum* に属する乳酸菌に顕著な活性を見いだした。³⁾リノール酸の毒性ゆえに、生育菌体を用いるCLA発酵生産の効率は低かったものの、あらかじめ前培養しておいた菌体を触媒的に用いる微生物変換法を導入することにより、高基質濃度条件下での効率生産が達成された。触媒とする菌体の活性は、前培養培地にリノール酸を加えあらかじめCLA生産系酵素群を誘導しておくことや、微生物変換反応を嫌氣的に行うことにより向上した。各種機器分析により、生成するCLAは *cis*-9, *trans*-11-octadecadienoic acid (CLA1) および *trans*-9, *trans*-11-octadecadienoic

acid (CLA2) であることが判明した。⁴⁾このうちCLA1は発癌抑制作用などが報告されている活性型CLA異性体であった。

高いCLA生産能を示した *L. plantarum* AKU1009a の湿菌体を触媒として用い、リノール酸からのCLA生産の効率化を図った結果、CLAの生産量は約40 mg/mlに達した (モル転換率33%, CLA1 15 mg/ml, CLA2 25 mg/ml)。³⁾異性体生成比は基質濃度や反応時間などの反応条件により変動した。また、反応液にグルコース、L-セリン、NaClなどを添加することによりCLA2の生成を特異的に抑制できることも見いだされた。⁴⁾これらの反応条件を組み合わせることによりCLA1は最大80%, CLA2は97%以上の選択率で生産された。また、生産されるCLAのほとんどが遊離型として菌体内に (あるいは菌体に付着して) 回収された。*L. plantarum* は漬物などの植物性発酵食品に見いだされる食経験のある微生物であり、本方法により調製された乳酸菌菌体が、実用的な活性型CLA供給源となることが期待される。

乳酸菌におけるリノール酸からのCLA生成反応の解析

遊離型、エステル型、トリアシルグリセリド型のリノール酸を基質として用いるCLA生産を検討した結果、乳酸菌は、遊離型リノール酸のみを良好な基質とすることが判明した。

また、乳酸菌がリノール酸からCLAを生成する際、常にCLAの生成に先立って併産される未知脂肪酸の構造解析を行い、10-hydroxy-*trans*-12-octadecaenoic acid (HY1) および10-hydroxy-*cis*-12-octadecaenoic acid (HY2) の2種の水酸化脂肪酸 (HY) であると同定した。HYを単離精製し、これを基質とした反応を *L. acidophilus* AKU 1137の湿菌体を用いて行った結果、CLAの生成を確認した。このことより、HYを経由するCLA合成経路の存在が予想された。すなわち、CLAの生成には、リノール酸のHYへの水和反応と、HYの脱水にともなう二重結合の転移反応からなる複数の反応が関与していると考えられた (図1)。⁵⁾

リシノール酸水和反応によるCLA生産

HYがCLA合成中間体として想定されたことから、各

* 著者紹介 (代表) 京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻 (助手) 〒606-8502 京都市左京区北白川追分町
TEL. 075-753-6122 FAX. 075-753-6128 E-mail: ogawa@kais.kyoto-u.ac.jp

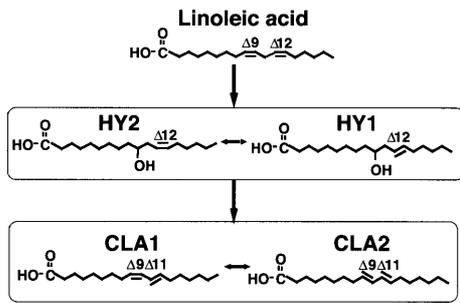


図1. 乳酸菌によるリノール酸のCLAへの変換

種水酸化脂肪酸を基質とする乳酸菌湿菌体による微生物変換反応を検討した結果、リシノール酸 (12-hydroxy-cis-9-octadecaenoic acid) がCLA (CLA1 および CLA2) へと変換されることを見いだした。⁶⁾ また、乳酸菌湿菌体におけるリシノール酸からのCLA生成活性は、前培養時にリノール酸や α -リノレン酸を添加することにより誘導されることを見いだした。*L. plantarum* JCM1551の湿菌体を触媒として反応を行った場合、3.4 mg/mlのリシノール酸から2.4 mg/mlのCLAが生成した(モル転換率70%, CLA1 0.8 mg/ml, CLA2 1.6 mg/ml)。⁷⁾

反応経路としては、リシノール酸が $\Delta 11$ 位において直接脱水反応を受けCLAが生成する経路と、 $\Delta 12$ 位において脱水反応を受けいったんリノール酸となり、これが上述のHYを経由する系にてCLAへと至る2つの経路の存在が予想された(図2)。

ヒマシ油からのCLA生産

リノール酸を基質とする反応と同様に、リシノール酸を用いる反応の直接の基質も遊離型のリシノール酸であ

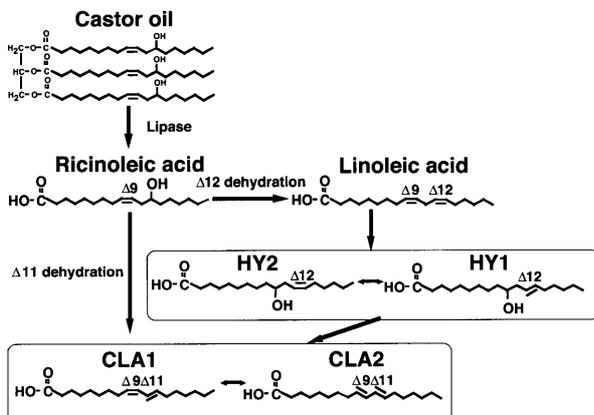


図2. 乳酸菌によるリシノール酸およびヒマシ油のCLAへの変換

り、エステル型やトリアシルグリセリド型は良好な基質とはならなかった。一方、リシノール酸の天然資源であり、リシノール酸を主構成脂肪酸(約85%)とするトリアシルグリセロールに富むヒマシ油の利用に興味を持たれた。種々検討を加えた結果、反応系にリパーゼを添加してヒマシ油から遊離リシノール酸を供給させながら反応を行うこと、ならびに、界面活性剤によりヒマシ油を反応系に効率的に分散させることにより、乳酸菌によるヒマシ油からのCLA生産が可能となった(図2)。⁶⁾ 最適なリパーゼ、界面活性剤として糸状菌 *Mucor javanicus* 由来リパーゼ (lipase M "Amano" 10, 天野エンザイム) および界面活性剤 Lubrol PX を用いる至適反応条件下では、30 mg/mlのヒマシ油から7.5 mg/mlのCLAが生成した(ヒマシ油に含まれるリシノール酸に対するモル転換率28%, CLA1 3.4 mg/ml, CLA2 4.1 mg/ml)。⁸⁾

trans-バクセン酸 $\Delta 9$ 不飽和化反応によるCLA生産

哺乳類生体内では、 $\Delta 9$ 不飽和化反応によりtrans-バクセン酸 (trans-11-octadecaenoic acid) がCLAへと変換されることが報告されている。同様の反応を幅広い基質特異性を示す $\Delta 9$ 不飽和化酵素を有する糸状菌 *Trichoderma* sp. 1-OH-2-3において検討したところ、trans-バクセン酸がCLA (CLA1 および CLA2) に変換されることが見いだされた(図3)。⁹⁾ この結果に基づき $\Delta 9$ 不飽和化酵素活性が報告されている酵母、糸状菌を対象に幅広くスクリーニングを行った結果、*Mortierella*, *Delacroixia*, *Rhizopus*, *Penicillium* 属糸状菌に高い活性を見いだした。生成するCLA異性体はいずれもCLA1 および CLA2 であったが、その生成比は菌株により異なっていた。

活性型CLAであるCLA1を選択的に生成した *Delacroixia coronata* IFO8586 株を選抜し、生産条件の至適化を行った。不飽和化反応はエネルギー要求性反応であるため、培地に添加したtrans-バクセン酸を菌体の生育と連動させてCLAに変換する方法が効率的であった。基質であるtrans-バクセン酸の形態を、遊離型とメチルエス

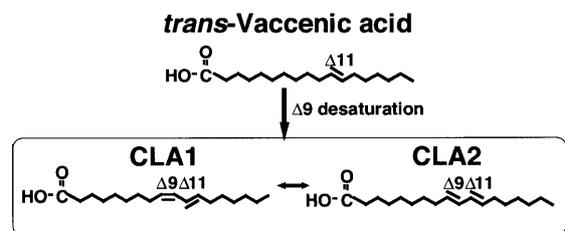


図3. 糸状菌によるtrans-バクセン酸のCLAへの変換

テルとで検討した結果, メチルエステルを基質とした際に CLA 生産量が増加した. そこで, *trans*-バクセン酸メチルエステルを基質として CLA1 選択の高生産条件の検討を行ったところ, 33.3 mg/ml の *trans*-バクセン酸メチルエステルを添加した栄養培地 (dextrin 5.0%, tryptone 2.0%, pH 9.0) にて *D. coronata* IFO 8586 を 28°C, 7 日間培養することにより, 10.5 mg/ml の CLA (モル転換率 32%, CLA1 10.3 mg/ml, CLA2 0.2 mg/ml) が生産された. この際の CLA1 選択率は 98% であった. また, 乳酸菌を用いた場合とは異なり, 生成した CLA の大部分 (約 70%) がトリアシルグリセリド型として回収された.

不飽和脂肪酸異性化反応による種々の共役脂肪酸生産

以上, CLA の微生物生産を中心に解説してきたが, これらの反応は, CLA 以外の多様な共役脂肪酸の生産にも適用できることが期待される. ここでは, 乳酸菌が触媒するリノール酸の異性化による CLA 生産に類似した反応を, 種々の高度不飽和脂肪酸を対象に検討した結果を述べる.

L. plantarum AKU1009a の湿菌体を種々の高度不飽和脂肪酸と反応させたところ, リノール酸以外に α -リノレン酸, γ -リノレン酸, ステアドリン酸を基質とした際にも新たな脂肪酸の蓄積が観察された. α -リノレン酸および γ -リノレン酸から生成した脂肪酸の構造解析を行った結果, 共役脂肪酸として α -リノレン酸より *cis*-9, *trans*-11, *cis*-15-octadecatrienoic acid (CALA1) および *trans*-9, *trans*-11, *cis*-15-octadecatrienoic acid (CALA2) が, γ -リノレン酸より *cis*-6, *cis*-9, *trans*-11-octadecatrienoic acid (CGLA1) と *cis*-6, *trans*-9, *trans*-11-octadecatrienoic acid (CGLA2) が生成していることを確認した (図4). この結果から, 乳酸菌により CLA 以外にもさまざまな共役脂肪酸が生産できる可能性が示された.^{9,10} また, α -リノレン酸からは *trans*-10, *cis*-15-octadecadienoic acid が, γ -リノレン酸からは *cis*-6, *trans*-10-octadecadienoic acid および *trans*-10-octadecadienoic acid が生成していたことから, これらの共役脂肪酸も飽和化反応の中間体として生

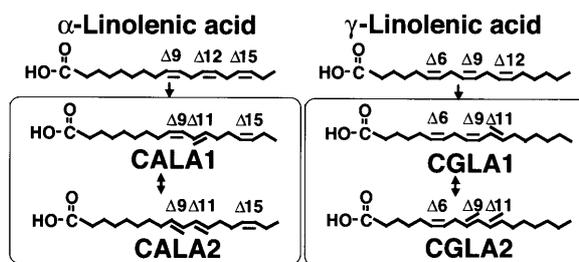


図4. 乳酸菌による α -リノレン酸および γ -リノレン酸の共役脂肪酸への変換

成している可能性が示唆された.

以上, 微生物による共役脂肪酸生産法のバリエーションを概説した.¹¹ 特に, 食経験豊富な乳酸菌による CLA の供給は, CLA の機能性食品としての利用や, 乳酸菌のプロバイオティクスとしての利用の展開を促すものと期待される. 筆者らはこれら以外にも, スエヒロタケの一種がリノール酸を共役トリエン酸 (9,11,13-octadecatrienoic acid) に変換することも見いだしており, 微生物には多様な共役脂肪酸生産系が潜んでいるように思われる. CLA を中心とした共役脂肪酸の生理機能研究は端緒に着いたばかりである. 微生物による共役脂肪酸の供給が一助となることを期待したい.

文 献

- 1) Pariza, M. W. *et al.*: *Prog. Lipid Res.*, **40**, 238 (2001).
- 2) Kepler, C. R. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **241**, 1350 (1966).
- 3) Kishino, S. *et al.*: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **79**, 159 (2002).
- 4) Kishino, S. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **67**, 179 (2003).
- 5) Ogawa, J. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 1246 (2002).
- 6) Kishino, S. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**, 2283 (2002).
- 7) Ando, A. *et al.*: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **80**, 889 (2003).
- 8) Ando, A. *et al.*: *Enzyme Microb. Technol.*, **35**, 40 (2004).
- 9) 小川 順ら: 科学と工業, **76**, 163 (2002).
- 10) Kishino, S. *et al.*: *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 572 (2003).
- 11) 小川 順ら: バイオサイエンスとインダストリー, **60**, 753 (2002).