

機能性脂質の微生物生産

小川 順*・櫻谷 英治・清水 昌

近年、植物・動物油脂には見られない脂肪酸組成を持った油脂を自然条件に左右されことなく生産する「微生物発酵油脂 (single cell oils)」の開発が精力的に展開されている。その結果、さまざまな機能性脂質を生産する微生物が見いだされ、医薬・食品分野から高い注目を集めている。ここでは、*Mortierella* 属糸状菌による高度不飽和脂肪酸 (PUFA) の発酵生産、微生物による共役脂肪酸生産を例に、機能性脂質の微生物生産を概説する。

***Mortierella* 属糸状菌による PUFA の生産¹⁻⁶⁾**

我々はアラキドン酸 (AA; 20:4n-6) を高生産する糸状菌 *Mortierella alpina* 1S-4 を見だし、その高い油脂生産性、特徴的脂肪酸組成 (飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸の両方を含む) をさまざまな角度から検証することにより、AA 発酵生産の基礎を確立した。最近では、種々の変異株の育種により多様な C18 および C20 の PUFA の工業生産を可能としている。以下に代表的な PUFA 生産の例を述べる。また、図 1 に *M. alpina* 1S-4 およびその変異株に見いだされた PUFA の *de novo* 生合成系を示す。

n-6 系 PUFA 含有油脂 アラキドン酸: *M. alpina* 1S-4 はグルコースを含む単純な培地によく生育し AA を含む

トリアシルグリセロールを菌体内に著量蓄積する。主窒素源を大豆タンパクとする培地でグルコースの間歇フィードのもとに溶存酸素濃度を 10–15 ppm 程度に保って通気攪拌培養し、菌形態を小型ペレット状に制御すると、高い AA 含量を保ったまま高密度培養が可能となる。最適条件下での AA 生産量は 13–20 g/l に達し、得られた菌体のトリアシルグリセロール含量は 500–600 mg/g 乾燥菌体、全脂肪酸中の AA 量は 30–70% に達する。

ジホモ- γ -リノレン酸: AA 生合成 (図 1a) の前駆体であるジホモ- γ -リノレン酸 (DGLA; 20:3n-6) の生産は、*M. alpina* 1S-4 の培地にゴマの抽出物を添加することで可能となる。これはゴマ種子中に含まれるセサミンが DGLA から AA への変換に関与する $\Delta 5$ 不飽和化酵素 (DS) を特異的に阻害するためである。後に、*M. alpina* 1S-4 の胞子を変異処理することで得られた $\Delta 5$ DS 欠損変異株を用いる方法が開発され、総脂肪酸中の DGLA 含量が 20–40% で、ほとんど AA を含まない (1% 以下) DGLA 含有油脂の生産が可能となっている。

n-3 系 PUFA 含有油脂 *M. alpina* 1S-4 を 20°C 以下の低温で生育させると $\omega 3$ ($\Delta 17$) DS が誘導生成され、n-6 経路を経て生成した AA が EPA へと変換される (図 1a)。また、n-3 経路の前駆体 (α -リノレン酸など) を培地に

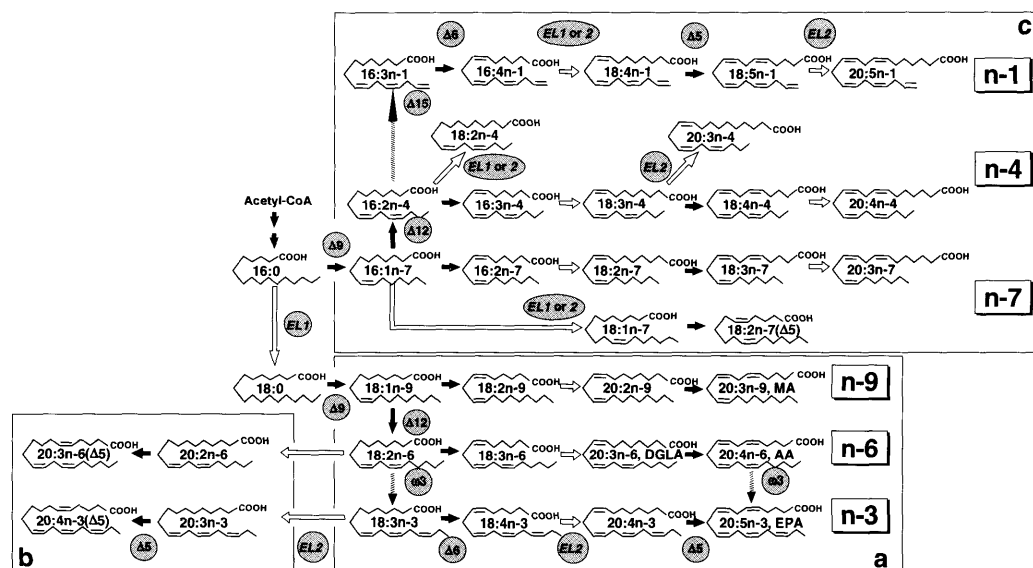


図1. *M. alpina* 1S-4 およびその変異株における PUFA の生合成経路。図中の $\Delta 9$, $\omega 3$ などは脂肪酸のそれぞれの番号の位置に二重結合を挿入する不飽和化酵素 (DS) を、EL は鎖長延長酵素を表す。

* 著者紹介 京都大学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

添加して EPA への変換系を作動させることも可能である。

エイコサテトラエン酸: *M. alpina* 1S-4由来の $\Delta 5$ DS欠損株を20°C以下の低温で生育させると, $\omega 3$ ($\Delta 17$) DSが誘導生成することにより, n-6 経路を経て生成したDGLAが*cis*-8, *cis*-11, *cis*-14, *cis*-17-エイコサテトラエン酸(20:4n-3)へと変換される(図1a)。

n-9系PUFA含有油脂 ミード酸: *M. alpina* 1S-4から得た $\Delta 12$ DS欠損変異株は, オレイン酸(18:1n-9)をn-6経路の親脂肪酸である18:2n-6に変換できない。このような変異株ではn-6経路は機能せず, 本来ほとんど機能しないはずのn-9経路が優勢となる。よって, 蓄積した18:1n-9は徐々にミード酸(MA; 20:3n-9)に変換される(図1a)。得られた油脂の構成脂肪酸は少量の飽和脂肪酸と18:1n-9以降のn-9脂肪酸(総脂肪酸の80%以上)であり, MAの含量は33%に達する。

エイコサジエン酸: *M. alpina* 1S-4由来の $\Delta 12$, $\Delta 5$ DS二重欠損変異株を用いるとMA生合成の前駆体である*cis*-8, *cis*-11-エイコサジエン酸(20:2n-9)の生産が可能である(図1a)。

n-7, n-4, n-1系PUFA含有油脂 C16→C18の鎖長延長反応に関与する酵素(EL1)が部分的に欠失した*M. alpina* 1S-4由来の変異株においては16:0が著量蓄積し, $\Delta 9$ DSにより16:1n-7へ変換される。生成した16:1n-7はそのままn-7経路の親脂肪酸として使用されるか, $\Delta 12$ DSによって16:2n-4へと変換されn-4経路の親脂肪酸として使用され, それぞれの経路の最終脂肪酸である20:3n-7, 20:4n-4へと変換される。n-1経路は16:3n-1を培地に添加すると機能し, 20:5n-1が生成する(図1c)。

PUFAの菌体外生産 生成した油脂を菌体外に漏出する変異株が*M. alpina* 1S-4より誘導されている。生産される油脂は親株と同様, AAに富む。油脂の漏出量は全生

産脂質の10~40%に達し, 漏出脂質は培地中に一様に分散する直径数 μm の脂肪球として存在した。この脂肪球膜上にあつて界面活性を担うと考えられる分子種として, セレブロシド, ステロール配糖体を同定している。

微生物による共役脂肪酸の生産⁴⁻⁸⁾

共役リノール酸(CLA)に代表される共役脂肪酸の生理機能(発癌抑制作用, 体脂肪低減作用, 抗動脈硬化作用など)に注目が集まっている。現在, CLAはリノール酸の化学的共役化により製造されており, 種々の異性体の混合物となっているが, 生理活性を有する異性体は一部のもののみである。医薬・機能性食品としての用途を想定すると, 異性体選択性が高く安全な生産手段の開発が求められる。そこで我々は, 微生物を用いるCLA生産を検討した。

リノール酸異性化反応によるCLA生産 リノール酸をCLAへと変換する能力を微生物に探索した結果, *Lactobacillus acidophilus* や *L. plantarum* に属する乳酸菌に顕著な活性を見だし, 洗浄菌体を触媒的に用いる微生物変換法を確立した。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CLA生産系酵素群を誘導しておくことや, 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。このうちCLA1には発癌抑制作用が報告されている。高いCLA生産能を示した*L. plantarum* AKU1009aの湿菌体を用いる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)。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, CLA1は最大80%, CLA2は97%以上の異性体純度で生産された。また, 生

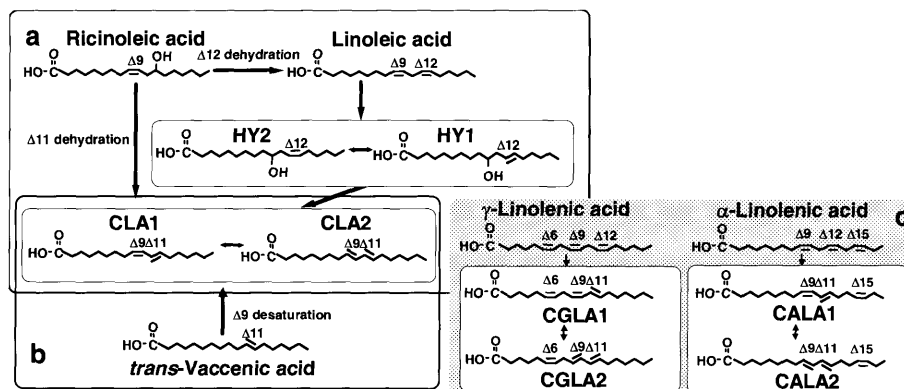


図2. 微生物において見いだされた共役脂肪酸生成反応

産されるCLAは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。この乳酸菌によるCLA生産の過程で常に併産される未知脂肪酸の構造解析を行い、水酸化脂肪酸10-hydroxy-12-octadecenoic acid (HY) であると同定した。また、単離精製したHYを基質とした反応を行い、CLAの生成を確認した。これらの結果より、HYを経由するCLA合成経路の存在が予想された（図2a）。

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、各種水酸化脂肪酸の乳酸菌による変換を検討した結果、リシノール酸（12-hydroxy-*cis*-9-octadecenoic acid）がCLA（CLA1およびCLA2）へと変換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）。反応経路としては、 $\Delta 11$ 脱水反応による直接変換と、 $\Delta 12$ 脱水反応を起点としリノール酸を経る系路が予想された（図2a）。直接の基質となるのは遊離型リシノール酸のみであったが、リシノール酸の天然資源であるヒマシ油（トリアシルグリセロール型）の利用を検討した結果、反応系にリパーゼおよび界面活性剤を添加することでCLA生産が可能となった。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（モル転換率28%，CLA1, 3.4 mg/ml, CLA2, 4.1 mg/ml）。

***trans*-バクセン酸 $\Delta 9$ 不飽和化反応によるCLA生産**
trans-バクセン酸 (*trans*-11-octadecenoic acid) を $\Delta 9$ 不飽和化によりCLAへと変換する活性（図2b）をさまざまな系状菌に見いだした。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結果、33.3 mg/mlの*trans*-バクセン酸メチルエステルを含む栄養培地（dextrin 5.0%, tryptone 2.0%, pH 9.0）を用い、28°Cにて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異性体純度は98%であった。生成したCLAの70%がトリアシルグリセロールとして回収された。

乳酸菌による種々の共役脂肪酸生産 *L. plantarum* AKU1009aの湿菌体を種々のPUFA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が生成した。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-および*trans*-9, *trans*-11, *cis*-15-octadecatrienoic acid (CALA1およびCALA2) が、 γ -リノレン酸より*cis*-6, *cis*-9, *trans*-11-および*cis*-6, *trans*-9, *trans*-11-octadecatrienoic acid (CGLA1およびCGLA2) が生成していることを確認した（図2c）。

おわりに

微生物を用いるさまざまな油脂生産プロセスの開発により、従来適当な供給源がなかったユニークな脂肪酸組成を有する油脂の供給が可能となった。すでに、AA含有油脂は乳児用ミルクの添加物として使用されている。今後、栄養補助食品素材、医薬品素材などへの用途開発が期待される。また、乳酸菌により共役脂肪酸が効率的に生産される可能性も示された。脂質代謝に関わる新たなプロバイオティクス機能の開発が期待される。

文 献

- 1) Certik, M. *et al.*: *Trends Biotechnol.*, **16**, 500 (1998).
- 2) 藤川茂昭ら：バイオサイエンスとインダストリー, **57**, 818 (1999).
- 3) Sakuradani, E. *et al.*: *Single Cell Oils*, (Cohen, Z. and Ratledge, C.), p.21, AOCS Press (2005).
- 4) 清水 昌ら：オレオサイエンス, **3**, 129 (2003).
- 5) 清水 昌ら：バイオサイエンスとインダストリー, **62**, 11 (2004).
- 6) 小川 順ら：科学と工学, **76**, 163 (2002).
- 7) 小川 順ら：バイオサイエンスとインダストリー, **60**, 753 (2002).
- 8) 小川 順ら：生物工学, **82**, 285 (2004).