

5-アミノレブリン酸の発酵生産と用途開発

田中 徹^{1*}・船田 茂行²・石塚 昌宏²

ALAとは

5-アミノレブリン酸 (ALA) は分子量 131 の δ 型アミノ酸で分子中央にカルボニルを有するが光学活性を持たず、比較的シンプルな分子構造を持つ。ALA はタンパク質を構成せず、エネルギー反応に重要なヘムやクロロフィル、ビタミン B₁₂ などのテトラピロール化合物の共通前駆体である。テトラピロール構造は 8 分子の ALA のみから構成され、環状中心に鉄が配位したものがヘム、マグネシウムが配位したものがクロロフィルである。ALA もテトラピロール化合物も原始地球の化学進化を検証するミラーの実験で見発見されていることから¹⁻³⁾、ALA は生命の根源物質の一つと考えられている。

ALA はすべての生物に存在し、動物では C4 経路によりグリシンとスクシニル CoA の縮合で合成され、植物では C5 経路によりグルタミン酸から 3 段階の酵素により合成される。生体中 ALA 由来の物質はかなりの量となるが、生産された ALA はすぐさま利用されるため生体内濃度は総じて低い。ワインや酒粕などの発酵食品や茶やスプラウト類には比較的高濃度の ALA が含まれている (図 1)⁴⁾。

ALA の発酵生産法の開発

ALA は生化学上重要な化合物であり、古くから多くの化学合成法が提案されてきたが多段を要し収率も低かった。著者らは発酵法による ALA 生産を目指し、広島国際学院大の佐々木らと光合成細菌 *Rhodobacter sphaeroides* を用いた ALA 高濃度蓄積に成功した⁵⁾。

しかしながら光合成細菌を用いた生産は光を ALA 生産のエネルギー源として要求したため、スケールアップが

困難であった。光照射の不要な従属栄養微好気培養での ALA 生産を目指して広島大学の永井、大阪大学の室岡の指導下、変異株の育種に取りかかり、光要求性の解除や ALAD を競合阻害するレブリン酸添加低減株、グリシン高利用株などの選抜基準で 7 代の垂直変異、合計 10 万株以上の選抜を経て ALA 生産に光を要求しない ALA 高蓄積変異株の育種に成功した⁶⁾。

得られた変異株はすでに光合成能を失い、色素構成も元株と大きく異なった。16 億年前に光合成細菌が *Proteobacteria* を経て真核細菌に寄生してミトコンドリアになり我々人間の ALA 合成を司っていることを考えると非常に興味深い。また、変異株の取得や培養条件の検討で ALA 合成に関する幾重もの調節系を知ったことは用途開発上も有益であった。本研究はスケールアップ、工業化に成功し 1999 年に本学会の技術賞を受賞した。

植物分野での用途開発

著者らが ALA の生産研究を開始した当時、ALA は低毒性の光要求型除草剤として注目されていた⁷⁾。著者らも発酵生産物で追試を行ったが、偶然にも希釈倍率を誤り、植物生長促進効果を発見した。その後、宇都宮大学の近内、竹内の下で研究を進め ALA が低濃度で植物の光合成を促進していることを見いだした。ALA がクロロフィルの前駆体であることから緑色や光合成の向上は理解しやすかった。実用化研究に関しては効果の安定性と高濃度時の光障害の回避に苦勞したが、(株)誠和との共同研究でマグネシウムや鉄などのミネラルの配合が有効であることを見いだした。ALA は液体肥料であるペンタキープに効果発現促進剤として添加が許可された⁸⁾。

ペンタキープは日本のみならず欧州を中心に世界展開を進めており、各国の研究者により次々と興味あるデータが出されつつある。宇都宮大学の倉持らが見いだした耐塩性向上効果は⁹⁾、実際に塩害に悩むサウジアラビアや中国黄土高原でその効果が追試されている (図 2)。

この劇的な耐塩性向上効果の機序について、著者らは光合成向上による糖濃度の上昇が植物体内の浸透圧を高めることで塩の進入を防ぐのではないかと考えているが¹⁰⁾、鳥取大学の西原らはヘム酵素の一種であるカタラーゼの上昇を観察しており、塩存在時に光合成で発生する活性酸素の消去が作用機序であると考察している¹¹⁻¹³⁾。

同様の効果は耐冷性向上効果でも示された。図 3 は

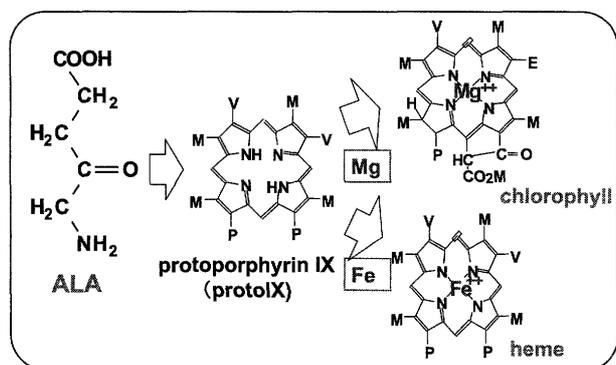


図 1. 5-アミノレブリン酸の代謝

* 著者紹介 ¹SBI アラプロモ株式会社 (取締役執行役員 CTO) E-mail: info_ala@sbigroup.co.jp <http://www.sbi-alapromo.co.jp>
²コスモ石油株式会社

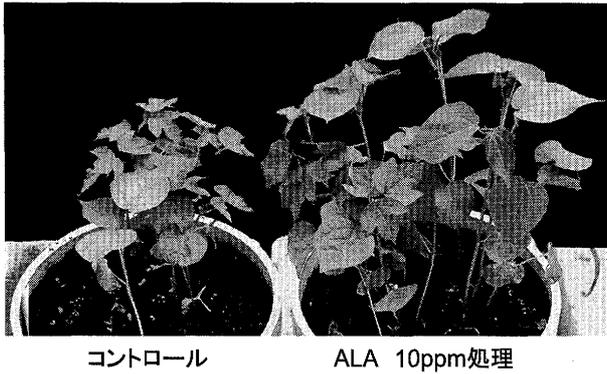


図2. ALA処理によるワタの耐塩性付与効果. (10 ppmのALA茎葉処理後にNaClを0.5%含む土壤に移植)

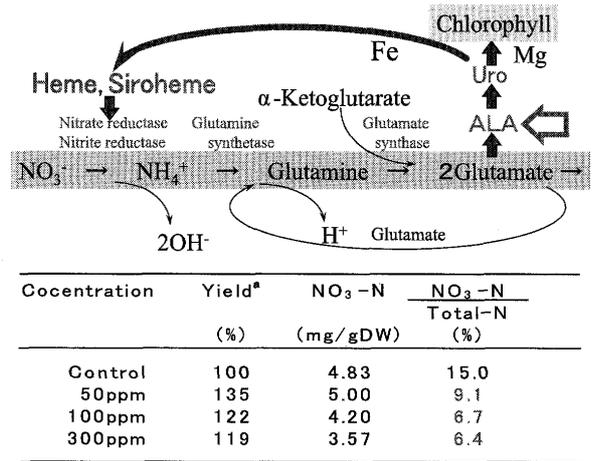


図4. ALAの窒素代謝に対する影響 (ハウレンソウ)



図3. ポインセチアに対する耐冷性向上効果

ALA 処理と無処理のポインセチアを -2°C の低温庫に一晚おいた場合の結果である。この実験は人為的に同じストレスを与えられるため、再現性も高い。明らかな低温耐性付与効果がみられ、ポインセチアの場合は 0°C では無処理でも冷害が出ず、 -3°C 以下では処理区にも冷害が出るため、約 2°C 耐冷性を向上させていると考えられた。耐冷性向上は冷害防止だけでなく、作物栽培の北限を高めたり、植林の冬越えを助けたりするものと期待される。また、温室栽培の燃料の削減により直接的に温暖化ガス削減に貢献する可能性も考えられる。耐冷性向上効果のその作用機構は耐塩性向上と同様に、浸透圧あるいは酸化ストレス軽減によるものと考えられている。

耐塩性向上や耐冷性向上は降雨量が少ないため、概して土壤の塩濃度が高く日中に比して夜温の低下が激しい沙漠地帯での植林に適していると考えた。沙漠地帯はアルカリ土壤も多いが、いろいろな沙漠地帯で検討を進めると、アルカリ土壤では土壤の塩濃度が高くなっても、非常に大きな効果が見いだされた。アルカリ土壤では鉄が水酸化鉄として不溶化し、植物が利用できなくなる。植物も鉄がないとヘムが作れないため生きていけない、ここにヘムの原料であるALAと鉄などのミネラルを含むペンタキープが与えられるため卓効を示すと考えられた。

植物というとクロロフィルばかりに注目していたが、植物でも肥料吸収の律速である硝酸、亜硝酸還元酵素はヘム酵素である。実際にALAの投与が硝酸、亜硝酸還元酵素を向上させることが報告されており¹⁴⁾、植物体全窒素中の硝酸の割合が低下することも報告されている¹⁵⁾。

このことはALAが光合成のみならず植物の窒素利用も促進していることを意味しており、施肥効率向上によるエネルギー節減や河川への窒素流亡による環境汚染防止にも役立つ可能性があることを示している (図4)。

ALAの効果は、引き続いて東欧での耐冷性向上効果、オランダでの植物工場での精緻な解析結果、アブダビやハンガリーでの水利用効率の向上のデータなど¹⁶⁾が見いだされつつあり、今世紀に予想される食糧不足に対抗しうる技術として注目される。また、収量だけでなく味や糖度、硝酸量、花の色にまで効果があり、家庭園芸でも人気を博している^{17,18)}。光合成促進は炭酸ガス固定能力の向上であり、増収はバイオマス燃料生産にも有用である。また、塩害防止や耐冷性向上などによる植林や沙漠の緑化に有用なALAはまさに「温室効果ガス25%削減国際公約に貢献するバイオ革新技術」の候補ではないかと自負している。

健康、美容分野での用途開発

植物での作用機序研究中に学生時代の生化学の教科書を開いて葉緑体での光合成について勉強し直してみると、光合成IIと光合成Iをつなぐ電子伝達系はヘムであり、ミトコンドリアの電子伝達系とそっくりなのに驚いた。ALAが光合成を促進するなら動物の電子伝達系にも効果が期待される「ALAと鉄は人にも効果があるのでは」と考え始めた。

細胞や動物を用いた試験でもALAと鉄との組み合わせは予想通り細胞代謝や動物の活動を活性化した。また、動物やボランティア試験でALAと鉄は貧血改善に有効で

特 集

あることも示された¹⁹⁾。先にも述べたように食品中にもALAは含まれていることから、酒粕から抽出したALAを配合した美容ドリンクを製造、販売し好評を頂いている。今後、発酵品との同等性試験を行った上で、発酵品の健康食品を用いた介入試験を実施していきたい。

美容分野では、必要な安全性試験を終え、肌に優しいALAのリン酸塩と特定の鉄との混合物を、米国化粧品工業会、日本化粧品工業連合会に化粧品原料登録し、本原料を配合した化粧品を開発、高い保水力や肌の弾力を保つとして市場で高い評価を頂いている^{20,21)}。ALAには育毛効果も報告されており²²⁾ 現在製品化に向けて開発中である。

動物の生体中で、ALAはミトコンドリア内でC4経路にて生合成される。生成されたALAはいったん細胞質に排出され順次コプロポルフィリノーゲンⅢにまで代謝された後、鉄により誘導されるABCトランスポーターでミトコンドリアに再度戻り、ヘムやシトクロムに代謝され電子伝達系で利用される。外生的に投与されたALAも自身が生産したALAと同様に細胞質で代謝されミトコンドリアに届くことは、ミトコンドリア内で働く他の重要な成分が輸送の問題で外生投与してもミトコンドリアに届けられず、効果を発揮できないことと対照的である。また、ミトコンドリアでのALAの生産性は加齢に伴い低下する²³⁾ことが知られており、ALA生産の低下は電子伝達系の活性を低下させることが予想されることから、ALAには基礎代謝を改善するいわゆる抗加齢素材として大きな可能性があると考えている。

医療分野での用途開発

植物でも大過剰のALAを外生的に投与することで、光要求型の除草剤として利用可能であるが、同様に人においても、ALAの単独大量投与でポルフィリンの前駆体であるプロトポルフィリンⅨ (PPIX)を一時的に蓄積させることができる。PPIXは光増感性を有するため、ALAは光動学的治療 (PDT) や診断 (PDD) に使用できる²⁴⁾。ALA投与時のPPIX蓄積は脳腫瘍、膀胱がん、咽頭がん、胃がんなど、さまざまながんの種類で確認されている。著者らは切除部位の厳密性が要求される脳腫瘍の術中診断の早期実用化を目指しているが、PDDについては、内視鏡術、ゆくゆくはすべてのがん手術時の取り残し確認に利用されるものと考えている。また、PDTについては、すでに欧米では皮膚がん治療に用いられているが、光反応はPPIXが蓄積するミトコンドリアで起こり、アポトーシス様の細胞死を誘導するため傷跡が残らないので、美容上の理由で注目されている。傷跡を残さない特徴は喉頭がんでの声帯を温存する治療や、妊娠に傷害のない子宮頸がんの治療などでも実用化が期待されている (図5)。

- ・SBIアラプロモ(株)(医療、健食、化粧品)
<http://www.sbi-alapromo.co.jp/>
- ・コスモ石油(株)(ALA原体、海外肥料、育毛剤)
<http://www.cosmo-oil.co.jp/ala/index.html>
- ・コスモ誠和アグリカルチャ(株)(家庭園芸用肥料)
<http://www.pentakkeep-world.com/index.html>
- ・(株)誠和(国内プロ用肥料)
<http://www.seiwa-ltd.jp/>
- ・サスティナブルクルー(化粧品:花蜜、はたらくて)
<http://www.hana-mitsu.com/>
- ・コスミック製薬(化粧品:アルサイエンスシリーズ)
<http://www.alscience.com/>
- ・alaサイエンスフォーラム(一般へのALA技術解説)
<http://www.ala-sf.net/web/blog/>
- ・ALA研究会(医療を中心としたALAの研究会)
<http://ala.umin.jp/>
- ・ポルフィリン研究会(ALAから導かれるヘムやポルフィリンの学術集会)
<http://www.appc.oita-u.ac.jp/inorgchem/amao/porphyrin/index.html>



図5. 参考 website

おわりに

以上、駆け足でALAの生産研究からその応用まで紹介してきたように、本学会で誕生したALA生産技術は農業から健康、美容さらには医療の世界で注目され、それぞれの分野の専門家との協力で実用化が始まっている。用途分野は日々進歩しているため、最後に関連する企業、学会のHPを紹介する (図5)。今後のALAの飛翔に注目されたい。

文 献

- 1) Miller, S. L.: *J. Amer. Chem. Soc.*, **77**, 2351 (1955).
- 2) Miller, S. L. et al.: *Science*, **130**, 245 (1959).
- 3) Szutka, A.: *Nature*, **212**, 401 (1966).
- 4) 笛木正一ら: ポルフィリン, **19**(1), in press.
- 5) Sasaki, K. et al.: *Appl. Microb. Biotechnol.*, **58**, 23 (2002).
- 6) 上山宏輝ら: 生物工学, **78**, 48 (2000).
- 7) Rebeiz, C. A. et al.: *Enzyme Microb. Technol.*, **6**, 390 (1984).
- 8) 田中 徹ら: 植物の生長調節, **40**(1), 22 (2005).
- 9) Watanabe, K. et al.: *Plant Growth Regul.*, **32**, 99 (2000).
- 10) 渡辺圭太郎ら: 日本農薬学会講演要旨集, **24**, 98 (2000).
- 11) Nishihara, E. et al.: *J. Plant Physiol.*, **160**, 1085 (2003).
- 12) Wongkantrakorn, N. et al.: *J. Pestic. Sci.*, **34**(2), 89 (2009).
- 13) Memon, S. A. et al.: *Acta Physiol. Plant*, **31**, 51 (2009).
- 14) 加藤一幾ら: 植物化学調節学会研究発表記録集, **42**, 36 (2007).
- 15) 葭田隆治ら: 植物化学調節学会研究発表記録集, **28**, 92 (1993).
- 16) Zsembeli, J. et al.: *Gumpensteiner Lysimetertagung*, p. 59 (2009).
- 17) <http://www.cosmo-oil.co.jp/>
- 18) <http://www.seiwa-ltd.jp/>
- 19) 押田敏雄ら: 家畜衛生研究会報, **27**(1), 27 (2001).
- 20) <http://www.hana-mitsu.com/>
- 21) <http://www.alscience.com/>
- 22) Morokuma, Y. et al.: *Int. J. Dermatol.*, **47**, 1298 (2008).
- 23) 近藤雅雄ら: 昭和51年度日米医学協力計画報告書 (1977).
- 24) Kaneko, S.: *JJSLSM*, **29** (2), 135 (2008).