総 説

微生物による高度不飽和脂肪酸を含む
新規な機能性油脂の生産と利用

清 水 昌

京都大学農学部 (〒606-01 京都市左京区北白川)

Production and Application of Single Cell Oils
Containing C₂₀ Polyunsaturated Fatty Acids

Sakayu SHIMIZU

Department of Agricultural Chemistry, Kyoto University

(Sakyo-ku, Kyoto-shi, 〒606)

Mycelia of a fungus *Mortierella alpina* 1S-4 and the mutants derived from it are new and rich sources of C₂₀ polyunsaturated fatty acids (PUFAs) of pharmacologically and dietary importance. *M. alpina* 1S-4 produces a unique triacylglycerol with high *n*-6 PUFA content. The mycelial content of arachidonic acid reaches 274 mg/g dry mycelia (4.3 g/L) on cultivation of the fungus in a medium containing glucose and yeast extract. The value accounts nearly 70 % of the total fatty acids in the extracted oil. Mutants defective in $\Delta 5$ desaturase are potent producers of dihomo- γ -linolenic acid (4.1 g/L). A $\Delta 12$ desaturase-defective-mutant produces an oil containing only *n*-9 PUFAs. The mycelial Mead acid content is 141 mg/g dry mycelia (1.9 g/L). An oil rich in *n*-3 PUFAs can be produced by the same mutant when grown in a medium containing linseed oil. The content of total *n*-3 PUFAs (*i.e.*, α -linolenic acid+8,11,14,17-*cis*-icosatetraenoic acid+5,8,11,14,17-*cis*-icosapentaenoic acid) is nearly 50 % in total mycelial fatty acid. The enzyme systems for the biosynthesis of PUFAs in the *Mortierella* fungi is also discussed.

1 はじめに

最近の脂質工学の主要な成果の一つに、微生物による油脂類の生産に関するものがある。すなわち、油糧植物からは得にくい *n*-6, *n*-3 および *n*-9 系高度不飽和脂肪酸 (PUFA), あるいはこれらを含有する油脂類の生産と利用に関するものである。最近では、このような微生物によってつくられるユニークな油脂は、従来の動物や植物由来の油脂と区別して, “Single Cell Oil” という呼び名が与えられている。

炭素数が18のリノール酸 (18:2 *n*-6) や α -リノレン酸 (18:3 *n*-3) は植物油脂の主要成分として広く自然界に存在するので、日常の食生活の中でもなじみの深い PUFA である。動物はリノール酸や α -リノレン酸を生合成する能力がなく、これらの PUFA は植物性食品から摂取され、さらに不飽和化と炭素鎖の延長が繰り返されて、 γ -リノレン酸 (GLA; 18:3 *n*-6), ジホモ- γ -リノレン酸 (DGLA; 20:3 *n*-6), アラキドン酸

(AA; 20:4 *n*-6), イコサペンタエン酸 (EPA; 20:5 *n*-3) など、より不飽和度の高い炭素数 20 および 22 の PUFA に変換される (Fig.-1)。これらの PUFA は細胞膜の主要構成成分として膜の流動性の調節に関与したり、体内の代謝で様々な機能を示す一方、プロスタグランジン類の直接の前駆体としても重要な役割を果たす。従って、リノール酸や α -リノレン酸に富む食品を摂取すれば、*n*-6 および *n*-3 経路 (Fig.-1) によって、これらの PUFA が合成され、それぞれの機能を発揮する。しかし、成人病患者やその予備軍、乳児、老人では生合成の不飽和化反応に関与する $\Delta 6$ および $\Delta 5$ 不飽和化酵素の働きが低下することが多く、これらの PUFA は不足しがちになる。最近の栄養学では世界的に、飽和脂肪の過剰摂取を改めるとともに、*n*-3 PUFA と *n*-6 PUFA をバランスよく摂取すること、できれば *n*-3=EPA, *n*-6=リノール酸ではなく、両系列のすべての PUFA のバランスのとれたものを摂取することを提唱している。従って、これらの PUFA あるいはこれを含

Shaded PUFAs are produced by *Mortierella alpina* 1S-4 and its mutants. $\Delta 9$, $\Delta 12$, $\Delta 15$, $\Delta 6$, and $\Delta 5$ indicate desaturases for the corresponding positions, respectively. EL, elongase.

Fig.-1 The $n-6$, $n-3$ and $n-9$ routes for the biosynthesis of PUFAs.

有する油脂を機能性食品、飼料、医薬品などとして利用するための研究開発も世界的規模で進められている¹⁾。

一方、これら油脂の供給源に目を向けると、 $n-6$ および $n-3$ 系列の出発脂肪酸となるリノール酸と α -リノレン酸は植物においてオレイン酸(18:1 $n-9$)の不飽和化反応によって生成する。ほとんどの植物でこれらの脂肪酸は最終生産物であり、豊富に存在する。これらのPUFAから導かれるいわゆる動物性のPUFAは、EPAやドコサヘキサエン酸(DHA; 22:6 $n-3$)が魚油に比較的多く含まれる(主に海洋性藻類やプランクトンに由来する)以外には、PUFAを豊富に含むものは少ない。すなわち、月見草種子(GLA)、動物臓器(AA)などあまり実用的でないものが知られているのみで、生産性の高い資源生物は知られていない。また、これらの供給源は気象条件によって供給量やPUFA含量が変動すること、環境汚染による油脂資源自体の汚染なども問題となりつつある。著者らは、生産スペース、生産条件の制御、長期安定供給などの面から有利と思われる微生物にこれら油脂の新しい供給源を求め探索を行い、アラキドン酸生産性糸状菌 *Mortierella alpina* 1S-4 を得た。現在、本菌あるいは本菌から誘導したアラキドン酸合成の不飽和化酵素が欠損した種々の変異株を用いることで様々なPUFA含有油脂の発酵生産が可能となっている(Table-1)^{2)~11)}。本稿では、著者らの成果を中心に Single Cell Oil の生産と利用について概説する。

2 微生物における PUFA の生合成

PUFA 生産菌として報告されている微生物は、菌体脂質の構成脂肪酸パターンに基づいて、 C_{18} PUFA し

か生産できないものと C_{20} PUFA も生産できるものに大別できる。 C_{18} PUFA 生産菌は、*Mucor* 属などの糸状菌にみられる $n-6$ PUFA を生産するもの(γ -リノレン酸生産菌)と酵母などにみられる $n-3$ PUFA を生産するもの(α -リノレン酸生産菌)がある。 C_{20} PUFA 生産菌は、 $n-6$ PUFA を生産するもの(アラキドン酸生産菌)、 $n-6$ と $n-3$ PUFA を同時に生産するもの、 $n-3$ PUFA のみを生産するもの(EPA 生産菌)に分けられる。

菌体脂質の構成脂肪酸として微量のアラキドン酸を含む微生物が存在することは古くから知られていたが、微生物による生産の可能性が示されたのは、著者らが土壌から分離した *Mortierella alpina*, *M. elongata* などの糸状菌によるものが最初である。著者らの探索の結果では、高いアラキドン酸含量の菌株は、分類学的にはすべて *Mortierella* 属 *Mortierella* 亜属に属することが明らかにされている。菌体から抽出される全脂肪酸中に占めるアラキドン酸の割合は15%以上、中には約70%に達するものも存在する。中でも、*M. alpina* 1S-4 はアラキドン酸生産能が高いこと、グルコースなどの糖質以外にも、種々の脂質、アルカン、アルケンなどを効率よく菌体内に取り込んで生育の炭素源としてあるいはPUFA 合成の前駆物質として利用できること、生育が旺盛で菌株の安定性も高いことなど工業化に適した菌株であることが示されている^{12)~14)}。

Fig.-1 にステアリン酸からの $n-9$, $n-6$ および $n-3$ PUFA への生合成経路を示した。*M. alpina* 1S-4 によるアラキドン酸の生成は $\Delta 9$, $\Delta 12$, $\Delta 6$ および $\Delta 5$ の4つの不飽和化酵素と炭素数を18から20にするための鎖

Table-1 PUFA production by *Mortierella alpina* 1S-4 and its mutants.

PUFA	Major source in food	Biological function cellular distribution, use, etc.	Producer	Lipid content		PUFA productivity		Other remarks
				Total FA (mg/g dry mycelia)	% PUFA content in total FA	PUFA content (mg/g dry mycelia)	PUFA yield (g/L)	
<i>n</i> -6 PUFA Dihomo- γ -linolenic acid (20 : 3, DGLA)	not known [mother's milk (0.3 %)]	Precursor of PG 1	Wild strain	463	23.1	107	2.17	Inhibition of Δ 5 DS by sesamin
			Mutant Mut 44	488	42	205	4.1	Accumulation by Δ 5 DS mutant
Arachidonic acid (20 : 4, AA)	Animal meat (2~3 %)	Major component of membrane phospholipids, precursor of PG 2	Wild strain	400~550	30~70	100~200	3~5	High AA content oil
<i>n</i> -9 PUFA Icosadienoic acid (20 : 2)	not known	not known	Mutant 226-9	304	22	62	0.7	Conversion of OA through <i>n</i> -9 route by Δ 12 DS and Δ 5 DS double mutant
Mead acid (20 : 3, MA)	not known	Precursor of LT 3	Mutant Mut 48	427	33	141	1.9	Conversion of OA through <i>n</i> -9 route by Δ 12 DS mutant
<i>n</i> -3 PUFA Icosatetraenoic acid (20 : 4)	not known	Precursor of 17, 18-dehydro-PGE 1	Mutant S 14	574	12	67	1.7	Conversion of ALA through <i>n</i> -3 route by Δ 5 DS mutant
Icosapentaenoic acid (20 : 5, EPA)	Fish, shellfish, algae sardine oil (10 %), cod liver oil (10 %)	Precursor of PG 3, pharmaceuticals, food additive,	Wild strain	243	10.9	27	0.5	Conversion of AA by <i>n</i> -3 DS at low growth temperature
				585	7.1	42	1.35	Conversion of ALA through <i>n</i> -3 route at normal growth temperature
				585	12	67	1.88	Conversion of ALA and AA through <i>n</i> -3 and <i>n</i> -6 route, respectively, at low growth temperature
			Mutant Mut 48	320	20	64	1.0	Conversion of ALA at normal growth temperature by Δ 12 DS mutant. Low <i>n</i> -6 PUFA

FA, fatty acid : DS, desaturase : OA, oleic acid : ALA, α -linolenic acid.

長延長酵素の関与のもと、 $n-6$ 経路に従って進行することが中間体であるリノール酸、 γ -リノレン酸、ジホモ- γ -リノレン酸を同定することで確認されている。生成したアラキドン酸の70~90%は、トリアシルグリセリンとして菌糸中に蓄積する。本菌では、 $n-6$ 経路のPUFA 生合成に関与する $\Delta 9$, $\Delta 12$, $\Delta 6$, $\Delta 5$ 不飽和化酵素および鎖長延長酵素は $n-9$ および $n-3$ 経路の対応するPUFA にも作用する。したがって、 $n-9$ および $n-3$ 経路の適当な中間体を培地に加えて *M. alpina* 1 S-4 を培養すると、中間体は菌糸内に取り込まれて、それぞれの経路の末端 PUFA であるミード酸および EPA に変換され、アラキドン酸の場合と同様にトリアシルグリセリンの形で蓄積する。一方、リノール酸を α -リノレン酸に変換する $\Delta 15$ 不飽和化酵素〔または $n-6$ PUFA (アラキドン酸) の $n-3$ 位へ二重結合を導入して $n-3$ PUFA (EPA) とする $n-3$ 不飽和化酵素〕の活性は温度に依存的であり、低温条件(20℃以下)でのみ活性を示し、本菌の生理的な生育温度であると考えられる20~30℃では不活性である。したがって、中間体の添加によることなく $n-3$ 経路のPUFA (特にEPA) を生成蓄積させるには、培養温度を低温(6~20℃)にする必要がある。この場合、培養温度が低いほど菌体の

全脂肪酸中に占める EPA の割合が高くなり、6℃では約15%に達する。*M. alpina* 1S-4では生成したEPAの約70%はリン脂質、特にホスファチジルコリン、の構成脂肪酸として存在する。これは、28℃で生成するアラキドン酸の大部分がトリアシルグリセリンに含まれることと対照的であり、EPAが低温条件下における細胞膜の流動性の調節に深く関与していることが示唆される。PUFA 生合成に関する上記の事実は、*M. alpina* 1S-4のみならず *Mortierella* 亜属の他の菌株についても認められることから、この亜属における普遍的な特性とみなすことができる^{15), 16)}。

$n-6$ 経路の酵素あるいは酵素系に関する知見は動植物、微生物いずれについてもまだ未解明な部分が多い。動物ではアシル-CoA が不飽和化酵素の直接の基質となるようであるが、植物ではリン脂質タイプのものが基質となっているようである。*Mortierella* 属糸状菌でも、状況は同じで、ラベルしたPUFAとATP, CoA (あるいはラベルしたアシル-CoA) をミクロソーム画分と反応させると酵素活性が追跡できる程度のことしかわかっていない。著者らは最近、不飽和化酵素と共役するミクロソーム電子伝達系についていくつかの知見を得ている。Fig.-2は、ミクロソーム懸濁液中のシトクロム

Fig.-2 Shift down of the NADH-supported steady state reduction level of cytochrome b_5 by acyl-CoA in microsomes from *Mortierella hygrophila*. See ref. 17 for details.

b_5 の酸化還元レベルを測定することで電子伝達系における電子の流れを調べたものである。この図からは、シトクロム b_5 の還元には NADPH より NADH の方が有効であること、不飽和度の低いアシル-CoA を不飽和化酵素の基質として加えると、不飽和化酵素への速やかな電子の流れが観察されるが、不飽和度の高いアシル-CoA 基質でははゆるやかな電子の流れしか観察されないこと、などがわかる。特に、不飽和度の高い基質で起こるゆるやかな電子の流れは、不飽和度の高いアシル-CoA が不飽和化酵素の基質としては適していないことを示唆するものであり、例えば、アシル基がリン脂質に組み込まれてから反応が進行するなどの可能性が考えられる。さらに、著者らは、シトクロム b_5 を *M. hygrophila* から精製・単離し、以下のことを明らかにしている。すなわち、①本菌では分子量の異なる2つのシトクロム b_5 (b_{5I} (分子量 16,000) と b_{5II} (分子量 19,000)) が存在すること、②両者のN末端はブロック

されていること、③アミノ酸組成を比較すると、 b_{5I} 、 b_{5II} とも全体としては動物の b_5 と似ているが、個々のアミノ酸に注目すると、グリシンやアラニン、ロイシン、リシンは b_{5II} で少なめであること (Fig.-3)、④ b_{5I} をリジルエンドペプチダーゼで消化して得た内部ペプチド断片のうちいくつかのもののアミノ酸配列は動物のものとは比較的高い相同性を示す (Fig.-4) がほとんど相同性のない部分もあること、⑤ b_{5II} はプロテアーゼによる切断に高い抵抗性を持っており、 b_{5I} とはかなり異なった三次元構造をとっていると考えられること、などである¹⁷⁾。

3 *M. alpina* 1S-4 より誘導された不飽和化酵素欠損変異株

著者らは、*M. alpina* 1S-4 を親株としてアラキドン酸の生成に関与する各種不飽和化酵素の欠損あるいは劣

Relative content indicates percentage of each amino acid in total amino acid residues.
Fig.-3 Comparison of the amino acid compositions of cytochrome b_5 s from *Mortierella hygrophila* and from mammalian sources.

		35		40		45		50		55															
K-10		V	Y	D	L	S	G	F	I	D	E	H	P	G	G	E	E	V	L	L	D	E	A	G	K
(a)		V	Y	D	L	T	K	F	L	E	E	H	P	G	G	E	E	V	L	R	E	Q	A	G	G
(b)		V	Y	D	L	T	K	F	L	E	E	H	P	G	G	E	E	V	L	R	E	Q	A	G	G
(c)		I	Y	D	I	T	K	F	L	D	E	H	P	G	G	E	E	V	L	R	E	Q	A	G	G
(d)		V	Y	D	I	T	R	F	L	S	E	H	P	G	G	E	E	V	L	L	E	G	A	G	A

		60		65		70		75													
K-6		D	A	T	E	S	F	E	D	V	G	H	S	D	E	A	R	D	I	M	K
(a)		D	A	T	E	N	F	E	D	V	G	H	S	T	D	A	R	G	L	S	K
(b)		D	A	T	E	N	F	E	D	I	G	H	S	T	D	A	R	G	L	S	K
(c)		D	A	T	E	N	F	E	D	V	G	H	S	T	D	A	R	A	L	S	E
(d)		D	A	T	E	S	F	E	D	V	G	H	S	P	D	A	R	E	M	L	K

(a) Man, monkey, rat, rabbit, pig or calf ; (b) horse ; (c) chicken ; (d) rat OM-b₅.

Fig.-4 Comparison of the amino acid sequences of peptides, K-10 (upper) and K-6 (lower), derived from cytochrome b₅L of *Mortierella hygrophila*, and partial amino acid-sequences of cytochrome b₅S from animals.

化した変異株の誘導に成功している¹⁸⁾。いずれの変異株も親株の胞子をニトロソグアニジンなどの薬剤で変異処理し、寒天平板上で発芽したコロニーから得られた菌体の脂肪酸組成をガスクロマトグラフィーで調べることににより、得られたものである。それらのうち代表的変異株を Fig.-5 に示した。Mut 44 と S14 はジホモ-γ-リノレン酸の割合が高く（それぞれ 32.8 % と 48.8 %）、アラキドン酸の割合は低く（11.7 % と 0.9 %）になっており、親株のそれ（DGLA=6.5 %, AA=44.4 %）とは完全に逆転していることが最も特徴的である。また、ジホモ-γ-リノレン酸の前駆体である γ-リノレン酸の割合もやや高くなっている。よって、Mut 44 では Δ5 不飽和化酵素の活性がきわめて低下しているものと考えられ、S14 ではほぼ完全に欠損していると考えられる。また、これらの変異株を低温条件あるいは α-リノレン酸を含む油脂の存在下で培養すると EPA の前駆体である 8,11,14,17-*cis*-イコサテトラエン酸 (20:4 n-3) が著量蓄積する。このことも上記の結論を支持するものである^{19),20)}。

K 1 は Mut 44 から誘導された変異株であり、Δ5 不飽和化酵素活性の低下とともに n-3 不飽和化酵素が欠損した二重変異株である。従って、本変異株は低温条件下で培養しても n-3 系列の PUFA を生成することはない²¹⁾。

Mut 48 ではオレイン酸の割合が異常に高い (49.3 %) こと、n-6 経路の PUFA が全く検出されず、それに代わって親株では検出されることのない n-9 系列の 6,9-*cis*-オクタデカジエン酸 (18:2 n-9)、8,11-*cis*-イ

Fig.-5 List of mutants derived from an arachidonic acid-producing-fungus *Mortierella alpina* 1S-4

コサジエン酸 (20:2 n-9)、ミード酸 (MA ; 5,8,11-*cis*-イコサトリエン酸 ; 20:3 n-9) が検出される。よって、Mut 48 は Δ12 不飽和化酵素が欠損しているものと考えられる。Mut 48 において n-9 経路の PUFA が検出されるのは、Δ12 不飽和化酵素の欠損によって行き場を失ったオレイン酸が Δ6, Δ5 不飽和化酵素および鎖延長酵素の作用を受けて n-9 経路へ流れるためと考えら

れる。動物の必須脂肪酸欠乏において見られるミード酸の生成と同様な状況が作り出されているものと思われる²²⁾。

226-9 は Mut 48 から誘導された変異株であり, 6,9-*cis*-オクタデカジエン酸を蓄積する。よって, $\Delta 12$ と $\Delta 5$ 不飽和化酵素を同時に欠損していると考えられる。

T 4 は菌体脂肪酸が飽和脂肪酸のみで構成される $\Delta 9$ 不飽和化酵素欠損変異株であり, 蓄積したステアリン酸 (18:0) のほとんどは遊離脂肪酸として存在する。

Mut 49 ではリノール酸の割合が高く (31.8%), *n*-6 PUFA は微量しか検出されない。よって本変異株では $\Delta 6$ 不飽和化酵素が欠損していると考えられる。また, $\Delta 8$ 位に不飽和結合を持たない珍しい C_{20} PUFA である 11,14-*cis*-イコサジエン酸 (20:2 *n*-6) および 5,11,14-*cis*-イコサトリエン酸 (20:3 $\Delta 5$) が検出される。これらの PUFA は蓄積したリノール酸の一部が直接鎖延長酵素と $\Delta 5$ 不飽和化酵素の作用を受けて生成するものと思われる。すなわち, *n*-6 経路のバイパスともいえる $\Delta 6$ 不飽和化反応をスキップした新しい経路が誘導される (Fig.-6 a)。同様のことは, *n*-3 経路についても起こる。この経路の親脂肪酸である α -リノレン酸を培地に加えると, 11,14,17-*cis*-イコサトリエン酸 (20:3 *n*-3) を経て 5,11,14,17-*cis*-イコサテトラエン酸 (20:4 $\Delta 5$) へと流れるバイパスが誘導される (Fig.-6 b)²³⁾。

N 15 は奇数鎖 PUFA 特に C_{19} PUFA を蓄積する変異株であるが変異点は明らかでない。

いずれの変異株の特性も継代培養などで変化せず安定して保持されているので, 実用的な観点からもこれらの変異株は注目される。実際, これら変異株を用いて, 以下に述べるような様々なユニークな PUFA 含有油脂の生産法が確立されている (Table-1 参照)¹⁰⁾。

4 PUFA 含有油脂の発酵生産と期待される用途

4.1 アラキドン酸

M. alpina 1 S-4 は, 単純な培地で旺盛な生育と安定

で高いアラキドン酸生産能を示すことから工業化に適した株として検討が加えられている。培地のグルコース濃度を 2~4 % に保ちながら本菌を培養すると, 4~6 d の培養で, 3~5 g/L のアラキドン酸が生産できる。菌体中の油脂含量が高いこと (約 600 mg/g 乾燥菌体; 脂質の約 90 % はトリアシルグリセリンで占められる), トリアシルグリセリン中のアラキドン酸含量が高いこと (30~70 %) が特徴的である (Table-1, Fig.-7 a)¹³⁾。

現在, 明らかにされているアラキドン酸あるいはアラキドン酸含有油脂の作用として, 胃粘膜保護作用, 皮膚の乾せん(癬)治療効果, 脂肪肝予防に代表される肝臓保護効果, がん(癌)細胞に対する殺細胞効果, 肝硬変における脂質代謝異常改善, 胎児の身体や脳の発育における重要性などが報告されている。また, アラキドン酸は DHA と同じく母乳に含まれており, 乳児の発育に役立っているとの報告もあり, アラキドン酸を含む乳児用粉ミルクも市販されている²⁴⁾。

4.2 ジホモ- γ -リノレン酸

Fig.-1 の生合成経路からもわかるように, アラキドン酸はジホモ- γ -リノレン酸の $\Delta 5$ 位が不飽和化されることによって生成する。従って, この変換反応 ($\Delta 5$ 不飽和化反応) を抑制することができれば, アラキドン酸生産菌によるジホモ- γ -リノレン酸生産が可能となるはずである。このような考えに基づいて, *M. alpina* 1 S-4 を様々な物質の存在下で培養し, 菌体脂肪酸組成に変化をもたらすものの探索が行われた。その結果, ごま油またはごま油の搾りかすを培地に加えると, アラキドン酸に代わって, ジホモ- γ -リノレン酸が優先的に蓄積することが判明した。例えば, アラキドン酸生産用の培地にごま油のアセトン抽出物を 0.03~0.06 % (ごま油 1.5~3 % に相当) 添加した培地あるいはごま油の搾りかすを加えたものを生産培地として *M. alpina* 1 S-4 を培養すると, ジホモ- γ -リノレン酸とアラキドン酸の生産量はそれぞれ 2.2 g/L (107 mg/g 乾燥菌体) および 1.1 g/L となる。得られた油脂中の総脂肪酸に占めるジホモ- γ -リノレン酸の割合は 20~30 % に達する

Fig.-6 Routes to novel PUFAs, 5,11,14-*cis*-icosatrienoic acid (a) and 5,11,14,17-*cis*-icosatetraenoic acid (b) from linoleic acid and α -linolenic acid, respectively.

(a) *n*-6 PUFA oil (high AA) by *M. alpina* 1S-4, (b) *n*-6 PUFA oil (high DGLA) by *M. alpina* 1S-4 in the presence of sesamin, (c) *n*-6 PUFA oil (high DGLA) by S 14, (d) *n*-9 PUFA oil by Mut 48, (e) *n*-3 PUFA oil by Mut 48.

Fig.-7 Typical fatty acid compositions of the fungal oil produced by *M. alpina* 1S-4 and its mutants.

(Table-1, Fig.-7 b)。その後の検討で、ごま種子またはごま油中にはΔ5不飽和化反応を特異的に抑制する微量因子が含まれること、この微量因子は、セサミンを中心とする数種類のリグナン化合物であることが明らかとなっている^{25)~27)}。

実際の生産ではΔ5不飽和化酵素欠損変異株を生産株として用いるので、上記のような阻害剤を添加する必要はない。変異株 (Mut 44 と S 14) のジホモ-γ-リノレン酸生産量は2~4 g/Lと高く、油脂中の含量は油脂総脂肪酸の20~50%となる。また、S14では菌体総脂肪酸中のアラキドン酸の割合は1%以下となり、ほとんどアラキドン酸を含まないジホモ-γ-リノレン酸油脂の生産が可能である (Table-1, Fig.-7 c)。現在、天然の供給源が知られていないジホモ-γ-リノレン酸に関しても、このように微生物による生産が可能になったことは特筆すべきことといえる^{19), 20)}。

ジホモ-γ-リノレン酸は、細胞膜の構成成分であると同時に1シリーズプロスタグランジンなどのイコサノイドの前駆物質でもある。これまでジホモ-γ-リノレン酸の供給源として適当なものがなかったことから、その生理作用については今後の展開を待つ部分も多いが、抗血栓作用、血圧降下作用などの報告がある。また、ジホモ-γ-リノレン酸の前駆体であるγ-リノレン酸の数々の生

理作用がジホモ-γ-リノレン酸を経由した1シリーズプロスタグランジンの効果で説明できるため、γ-リノレン酸と同様の効果が予想されている²⁴⁾。

4.3 ミード酸などの*n*-9 PUFA

Δ12不飽和化酵素欠損株 Mut 48を親株がアラキドン酸を大量蓄積する条件下で培養すると、*n*-6 PUFAを全く含まず*n*-9 PUFAのみで構成されるユニークな油脂が得られる。*n*-9経路の最終生産物であるミード酸の生産量は1.9 g/L (141 mg/g 乾燥菌体；菌体総脂肪酸中に占める割合、33%)となる (Table-1, Fig.-7 d)²²⁾。

ミード酸は、必須脂肪酸 (リノール酸) 欠乏症の動物や胎盤に見いだされる。高等動物では、最終的にロイコトリエン3に変換され、アラキドン酸から誘導されるロイコトリエン4の生成を抑制し様々な生理作用を示すとされているが詳細な検討はされていない。*n*-6 PUFAを含まないこの種のPUFA油脂は、*n*-9 PUFAの機能を明らかにする上で興味深い素材といえ、今後の展開が期待される。同様に、Δ12不飽和化酵素欠損変異株 Mut 48から誘導したΔ5不飽和化酵素欠損株 226-9を用いるとミード酸の前駆体である8,11-*cis*-イコサジエン酸の生産が可能である (Table-1)。

4.4 EPA などの $n-3$ PUFA

M. alpina 1S-4 が EPA を生成する条件は、本菌の $n-3$ 不飽和化酵素の作用温度域である低温 (6~20℃) で本菌を培養することと、あるいは $n-3$ 経路の前駆体 (α -リノレン酸など) を培地に添加して EPA への転換系を作動させることであることはすでに述べた。従って、条件さえ整えれば、本菌による $n-3$ PUFA の大量蓄積も可能と思われる。特に α -リノレン酸からの変換系は実用的にも興味深い。例えば、*M. alpina* 1S-4 は安価な α -リノレン酸源としてのあまに油 (脂肪酸組成比で約 60 % 含む) とともに培養すると、あまに油を取り込んで速やかに生育し、グルコース単独添加培地では生産の認められなかった通常の培養温度 (20~30℃) で EPA を含むトリアシルグリセリンを生産する (生産量, 1.35 g/L)。また、あまに油添加のもとで低温培養すると EPA の生産量はさらに増大し約 2 g/L に達する。しかし、いずれの場合も得られる油脂中には、アラキドン酸をはじめとして $n-6$ PUFA が多量に含まれる^{28), 29)}。

この結果を $\Delta 12$ 不飽和化酵素欠損変異株 Mut 48 に適用すると、 $n-3$ PUFA のみから成る興味深い油脂が得られる。その理由は、以下のように説明できる。Mut 48 はグルコース単独添加培地ではオレイン酸から $n-9$ PUFA をつくることは先に述べたが、ここに $n-3$ 経路の親脂肪酸である α -リノレン酸が共存すると両者が $\Delta 6$ 不飽和化酵素の基質として競合するが、後者の方がよく反応するので結果的に $n-3$ 経路が優先し $n-9$ 経路の PUFA の生成は抑制される。親株である *M. alpina* 1S-4 と同様のアマニ油添加培養条件で本変異株を培養すると、EPA の生成量は約 1.0 g/L、菌体の全脂肪酸中に占める $n-3$ PUFA の割合は約 55 % となる (EPA, 20 % ; α -リノレン酸, 20 % ; その他, 15 %)。一方、 $n-6$ PUFA と飽和およびモノ不飽和脂肪酸の割合はそれぞれ 17 % と 33 % である (この場合の $n-6$ PUFA はあまに油中のリノール酸に由来する) (Table-1, Fig.-7e)。

同様にあまに油を含む培地で $\Delta 5$ DS 活性微弱化変異株 S 14 を培養すると、EPA の前駆体である 8,11,14,17-*cis*-イコサテトラエン酸 (20 : 4 $n-3$) が著量蓄積する (1.7 g/L ; 菌体総脂肪酸の 12 %) ³¹⁾。また、先に述べた $\Delta 12$, $\Delta 5$ 不飽和化酵素二重欠損変異株 226-9 株を用いるとさらに高い生産が可能となる (Table-1)。この PUFA は 17,18-デヒドロプロスタグランジン E₁ の前駆体であり、生理作用などの検討が期待される。

M. alpina 1S-4 およびその変異株以外にも微生物による EPA の生産が最近報告されている。中でも、サバの腸内から単離された海洋細菌によるものは、海洋における EPA の食物連鎖を考える上で興味深い。生産性は低い、菌体の総脂肪酸中の EPA の割合 (約 40 %)

が高く、EPA 以外の PUFA が存在しないなど注目すべき性質もある。藻類も古くから EPA 生産の対象として検討されており、ハワイやイスラエルでは解放型の水槽や池を利用した生産が行われている。

EPA の生理作用の研究は、海獣類、魚類を多食するグリーンランドエスキモーに心筋こうそく (梗塞) などの血栓性疾患が少ないという疫学調査に端を発して、また魚油という豊富な供給源が存在することから、多岐にわたって展開され、血小板凝集抑制作用、血清脂質改善作用、抗炎症作用などが明らかに成っている。また、DHA とともに栽培漁業用の飼料添加物としての用途もある²⁴⁾。

C₂₂PUFA である DHA は、EPA とともに魚油の主要脂肪酸であり、最近、その特異な生理作用が注目されている。これまで DHA の生産能力の高い微生物の報告はないが、海洋性の藻類やカビが DHA を生産することは古くから知られており、これらを用いた培養条件の検討や高生産菌を海洋から得ようとする試みが活発になりつつある。

微生物による EPA や DHA の生産が、これら PUFA の最大の供給源である魚油にコスト的に対抗するにはまだ時間を要すると思われるが、微生物由来の EPA や DHA には魚油臭がほとんどないこと、魚油に含まれ、心臓疾患の原因とされるエルカ酸の含量が低いことなど利点も多く、海洋汚染問題なども考え合わせると、将来実用化できる要素は充分にある。

4.5 その他のユニークな PUFA を含む油脂の生産

M. alpina 1S-4 の $\Delta 6$ 不飽和化酵素欠損変異株 Mut 49 を用いると、蓄積したリノール酸の一部は直接鎖長延長酵素と $\Delta 5$ DS の作用を受けて $\Delta 8$ 位に不飽和結合を持たない珍しい C₂₀PUFA (5,11,14-*cis*-イコサトリエン酸に変換されること、同様のことは $n-3$ 経路についても起こり、培地に添加した α -リノレン酸は、5,11,14,17-*cis*-イコサテトラエン酸に変換されることはすでに述べた。

その他、*M. alpina* 1S-4 による $n-6$ あるいは $n-3$ PUFA に対応する奇数鎖 PUFA (17 : 2, 17 : 3, 19 : 3, 19 : 4 など)、 $n-1$ PUFA の生産も可能である^{33), 34)}。

以上、C₂₀PUFA を含むユニークな Single Cell Oil の生産について要約した。 γ -リノレン酸やアラキドン酸含有油脂の微生物生産が成功したのを機に、この分野の焦点は、ジホモ- γ -リノレン酸、ミード酸、EPA、DHA、変異株による新規な油脂などの新しいターゲットを対象とした菌株の探索や生産技術の開発に向かいつつあり、今後の展開が期待される。

本稿で引用した著者らの研究は京都大学農学部農芸化学科、九州大学農学部食糧化学工学科、サントリー (株) リサーチセンターの方々による共同研究であり、ご指導

とご協力をいただいた方々に感謝いたします。

〔平成7年(1995年)5月16日受理〕

文 献

- 1) D.J. Kyle, C. Ratledge (eds), "*Industrial Applications of Single Cell Oils*", American Oil Chemists' Society, Illinois (1992)
- 2) H. Yamada, S. Shimizu, Y. Shinmen, H. Kawashima, K. Akimoto, "*World Conference on Biotechnology for the Fats and Oils Industry*" (T.H. Applewhite, ed.) American Oil Chemists' Society, Illinois, (1988) p. 173; *J. Dispersion Sci. Technol.*, 10, 561 (1989)
- 3) S. Shimizu, H. Yamada, "*Biotechnology of Vitamins, Pigments and Growth Factors*" (E.J. Vandamme, ed.) Elsevier Applied Science, London, (1989) p. 105; "*15th Scandinavian Symposium on Lipids*" (V.K. S. Shukla, G. Holmer, eds.) Scandinavian Forum for Lipid Research and Technology, Denmark, (1989) p. 230; *Comments Agric. Food Chem.*, 2, 211 (1990)
- 4) 清水 昌, 山田秀明, 油脂, 42 (12), 224 (1989); 月刊フードケミカル, (1) 71 (1991); 日本醸造協会誌, 87, 36 (1991)
- 5) 清水 昌, 新免芳史, 秋元健吾, 天知輝夫, 山田秀明, *BIO INDUSTRY*, 7, 438 (1990)
- 6) 清水 昌, 新免芳史, 秋元健吾, 菅野道廣, 山田秀明, ビタミン, 66, 289 (1992)
- 7) 清水 昌, 天野 典英, 山田秀明, バイオサイエンスとインダストリー, 50, 755 (1992)
- 8) 清水 昌, 河島 洋, チャルーンキットモンコンセーリー, 油化学, 42, 254 (1993)
- 9) 清水 昌, 化学と生物, 31, 312 (1993); 農化, 69, 711 (1995)
- 10) チャルーンキットモンコン セーリー, 清水 昌, バイオサイエンスとインダストリー, 52, 571 (1994)
- 11) S. Shimizu, S. Jareonkitmongkol, "*Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 33: Medical Aromatic Plants VIII" (Y.P.S. Bajaj, ed.) Springer, Berlin, p. 308
- 12) H. Yamada, S. Shimizu, Y. Shinmen, *Agric. Biol. Chem.*, 51, 785 (1987)
- 13) Y. Shinmen, S. Shimizu, K. Akimoto, H. Kawashima, H. Yamada, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 31, 11 (1989)
- 14) N. Amano, Y. Shinmen, K. Akimoto, H. Kawashima, T. Amachi, S. Shimizu, H. Yamada, *Mycotaxon.*, 4, 257 (1992)
- 15) S. Shimizu, H. Kawashima, Y. Shinmen, K. Akimoto, H. Yamada, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 65, 1455 (1988)
- 16) S. Shimizu, Y. Shinmen, H. Kawashima, K. Akimoto, H. Yamada, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 150, 335 (1988)
- 17) N. Kouzaki, H. Kawashima, M.C. M. Chung, S. Shimizu, *Biochim. Biophys. Acta*, 1256, 319 (1995)
- 18) S. Jareonkitmongkol, S. Shimizu, H. Yamada, *J. Gen. Microbiol.*, 138, 997 (1992)
- 19) S. Jareonkitmongkol, H. Kawashima, N. Shirasaka, S. Shimizu, H. Yamada, *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 2196 (1992)
- 20) S. Jareonkitmongkol, E. Sakuradani, S. Shimizu, *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 4300 (1993)
- 21) S. Jareonkitmongkol, E. Sakuradani, S. Shimizu, *Arch. Microbiol.*, 161, 316 (1994)
- 22) S. Jareonkitmongkol, H. Kawashima, S. Shimizu, H. Yamada, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 69, 939 (1992)
- 23) S. Jareonkitmongkol, H. Kawashima, S. Shimizu, H. Yamada, *Biochim. Biophys. Acta*, 1167, 137 (1993)
- 24) 秋元健吾, 農化, 69, 729 (1995)
- 25) S. Shimizu, K. Akimoto, H. Kawashima, Y. Shinmen, H. Yamada, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 66, 237 (1989)
- 26) 清水 昌, 山田秀明, バイオサイエンスとインダストリー, 48, 1183 (1990)
- 27) S. Shimizu, K. Akimoto, Y. Shinmen, H. Kawashima, M. Sugano, H. Yamada, *Lipids*, 26, 512 (1991)
- 28) S. Shimizu, H. Kawashima, K. Akimoto, Y. Shinmen, H. Yamada, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 66, 342 (1989)
- 29) S. Shimizu, H. Kawashima, K. Akimoto, Y. Shinmen, H. Yamada, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 32, 1 (1989)
- 30) S. Jareonkitmongkol, S. Shimizu, H. Yamada, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 70, 119 (1993)
- 31) チャルーンキットモンコン セーリー, 鎌田 望, 櫻谷 英治, 清水 昌, 農化, 68, 462 (1994)
- 32) S. Shimizu, H. Kawashima, K. Akimoto, Y. Shinmen, H. Yamada, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 68, 254 (1991)
- 33) S. Shimizu, S. Jareonkitmongkol, H. Kawashima, K. Akimoto, H. Yamada, *Arch. Microbiol.*, 156, 163 (1991)