ミニレビュー

[Nippon Nōgeikagaku Kaishi Vol.69, No.6, pp.716~718, 1995]

海洋微生物による有用脂質の生産

矢澤一良

(相模中央化学研究所)

はじめに

有用脂質として、水産性機能性脂質である $n-3$ 系高度不飽和脂肪酸を挙げることができる。即ち、エイコサペンタエン酸 (EPA) は、「閉塞性動脈硬化症」に伴う潰瘍、疼痛および冷感の改善を適応症とする医薬品として 1990 年に市販され、またドコサヘキサエン酸 (DHA) は近年機能性健康食品素材や医薬品素材として急速な研究・開発の進展がみられており、共に興味ある生理活性を有する。(これらの化学構造を図 1 に示す) これらの高度不飽和脂肪酸は化学合成の困難な化合物であるため、もっぱら魚油等を天然素材として抽出・精製により工業化されて来た。一方近年 Single Cell Oil の有用性が注目される様になり、EPA や DHA 等の生理活性脂肪酸の微生物生産に関する研究・開発が進展した。

筆者らの研究室において、1987 年に新しい EPA 生産源として EPA 産生海洋細菌を見だし、その後本菌を用いて種々の検討を行った^(1,2)。本稿ではそれらについて概説する。

EPA 産生海洋細菌の検索と発見

これまで EPA の起源としては、藻類・植物プランクトン⇒動物プランクトン⇒小魚⇒魚類や海産動物と繋がる一連の『食物連鎖』で説明されてきており、藻類や植物プランクトンが、EPA の第一次生産者であるとされてきた。しかしながら、筆者らは、このような『食物連鎖』だけではなく、EPA を豊富に持つ青背の魚の腸内に棲息する共生微生物には EPA を産出するものがあるのではないかと考え、検索を開始した結果、1987 年 EPA 産出海洋細菌を発見することができた。

即ち、種々の海産魚や海産動物の腸内より約 50,000 株の微生物を分離し、単菌にて培養した後、一つ一つ

EPA の抽出・分析を行った。その結果、EPA 含量の多い青背の魚に比較的高頻度で EPA 産生菌が分離され、また分離頻度だけではなくそのなかでも特に高い EPA 産生能を有する株もカツオ、アジ、サバ、トビウオ、イワシより分離できた。またこれら青背魚と言われているものの他により高頻度にマボヤやドンコ、ソコグラより EPA 産生菌が分離されたが、分析の結果マボヤはその体内に EPA が多量に蓄積されており、また後者のドンコ、ソコグラは深海魚の一種であり、低温・高圧下の環境に棲息していることから EPA の機能を考えると、その EPA 産生菌も多く検出されたのではないかと考えている。EPA 産生菌は、約 60 項目の生理的・生化学的試験と電子顕微鏡による形態学的試験により分類・同定を試みた。その結果、ほとんどの EPA 産生菌は好気性菌であり、更にそのうちの大部分は *Shewanella* (*She.*) *putrefaciens* であると同定した。またこの群の中には比較的 EPA 産生能の高い菌株が集中していた。また *She. putrefaciens* に類縁の新種の海洋細菌と同定されたものがあり、その中にはこれまでで EPA 産生能の最も高い SCRC-2738 (豊後水道のアジ腸内より分離) が含まれている。(SCRC-2738 の透過型電子顕微鏡写真を図 2 に示した)。

EPA 産生菌の菌体内脂質

SCRC-2738 の菌体脂肪酸組成は極めて特徴的で、高度不飽和脂肪酸は唯一 EPA のみであり、特に EPA と拮抗作用を示すアラキドン酸を全く含まなかった。(図 3 に GLC チャートを示す) また本菌 SCRC-2738 の総脂肪酸に対する EPA の占める割合は、培養条件により異なり、25~40% に達した⁽³⁾。本菌の EPA の生合成経路としては、 $C_{18:1} \Rightarrow C_{20:1} \Rightarrow C_{20:2} \Rightarrow C_{20:3} \Rightarrow C_{20:4} \Rightarrow C_{20:5}$ (EPA) という経路が強く示唆される結果が得られているが、いずれにせよ $C_{20:1}$ から $C_{20:4}$ に至る菌体内脂肪酸がほとんど検出できず、おそらく EPA に至るまでの生合成酵素の活性が高いこと、EPA から先への変換

† Production of Marine Single Cell Oil
Kazunaga YAZAWA (Sagami Chemical Research Center)

図 1 EPA 及び DHA の化学構造

酵素は活性が低いことによると考えられる。本菌の脂肪酸組成に影響を及ぼす主な因子として培養温度と塩濃度を挙げることができる。本菌の培養温度を上昇させると、EPA 生産能が低下し、30℃培養では全く EPA を生産しなくなるが、この事実は、アシル転移酵素の活性低下や基質特異性の変化によるものではなく、EPA 合成活性の低下の可能性が強いことを示唆している⁽⁴⁾。一方、本菌は塩分を含まない培地では全く生育せず、海洋由来のものである証拠を与えるが、6.5%以上でも生育できない。至適濃度は塩 1.6%~3.2%程度と思われる。一方 EPA の脂質分子種を調べた。その結果、本菌の EPA の脂質分子種は、約 90~95%がリン脂質の形態であり、残りの 5~10%が遊離脂肪酸として存在していた⁽⁵⁾。この事は、EPA 産生菌中おもな EPA は主として細胞膜成分として機能していることが予測される。またリン脂質の中ではホスファチジルエタノールアミン (PE) とホスファチジルグリセロール (PG) にほぼ 50%ずつ存在するものと思われる。また常法により

図 2 SCRC-2738 の透過型電子顕微鏡写真

図 3 SCRC-2738 株の菌体脂肪酸組成の GLC 分析

sn-1 (α) 位および sn-2 (β) 位の脂肪酸分析を行った結果、EPA は PE, PG 共に SN-2 位に特異的にエステル結合している事が分かった (表 1)。

EPA 産生菌の遺伝子工学的応用

EPA 産生菌の有用性を検討する目的で、培地成分の検討⁽⁶⁻⁸⁾、ジャーファーマンターを用いた大量培養の検討⁽⁹⁾、ラットを用いた EPA リン脂質の生理活性の検討^(10,11)、栽培漁業における生物餌料への応用⁽¹²⁾等の検討を行った。

さらに観点をかえて、EPA 産生菌の EPA 生合成関連遺伝子のクローニングを試みた。その結果約 37 Kbp

表 1 リン脂質分子内脂肪酸組成

脂 肪 酸	脂肪酸組成 (モル%)			
	ホスファチジルエタノールアミン		ホスファチジルグリセロール	
	sn-1(α)	sn-2(β)	sn-1(α)	sn-2(β)
14:0	3.2	0.8	1.1	0.4
i-15:0 ¹⁾	11.5	7.2	4.5	2.1
15:0	0.5	0.3	3.4	0.4
16:0	12.1	0.6	10.7	1.6
16:1	6.8	20.9	8.0	11.5
i-17:0	0.6	0	0.9	0
17:0	1.8	0	2.7	0.3
17:1 ²⁾	4.0	6.4	5.7	6.1
17:1 ³⁾	1.6	0	2.2	0.3
18:0	0.4	0.1	0.6	0.3
18:1(n-9)	1.1	1.0	1.5	1.2
18:1(n-11)	6.1	0.7	7.8	1.1
20:5	0.1	11.8	1.0	24.7

1) イソ型脂肪酸

2,3) 二重結合の位置異性体

のDNA断片をベクターにいれることができ、本来EPA産生能のない大腸菌にEPA産生能を賦与することに成功した。また全塩基配列の決定及び8つのOpen Reading Frame (ORF) の存在を確認している⁽¹³⁾。今後より高度な遺伝子工学的手段を用いる事により、他種生物細胞、特に、脂質含量の多い酵母や植物でのEPA産生能の発現ができるようになる可能性が示唆されたことになる。マリンバイオジェンテクノロジーと言う新しい分野の発展に少しでも寄与できれば幸せに思う。

- (1) K. Yazawa., K. Araki., N. Okazaki., K. Watanabe., C. Ishikawa., A. Inoue., N. Numano., and K. Kondo : *J. Biochem.* **103**, 5—7 (1988)
- (2) K. Yazawa., K. Araki., K. Watanabe., C. Ishikawa., A. Inoue., K. Kondo., S. Watanabe., and K. Hashimoto : *Nippon Suisan Gakkaishi*, **54**, 1835—1838 (1988)
- (3) 矢澤一良, 石川千夏子, 渡部和郎, 荒木恵子, 井上 玲, 沼尾長徳, 近藤 聖: 脂質生化学研究, **30**, 219—222 (1988)
- (4) 渡部和郎, 矢澤一良: 油化学, **42** (4), 278—285 (1993)
- (5) 渡部和郎, 石川千夏子, 赤堀結花里, 矢澤一良, 近藤 聖, 川口昭彦: 脂質生化学研究, **31**, 247 (1989)
- (6) N. Suzuki., K. Yazawa., K. Watanabe., C. Ishikawa., S. Yano., N. Fukutsuka., T. Nakama., and N. Koto : *Nippon Suisan Gakkaishi*, **59**, 571 (1993)
- (7) N. Suzuki., A. Inoue., M. Shikano., K. Yazawa and K. Kondo : *Nippon Suisan Gakkaishi*, **57**, 1407 (1991)
- (8) M. Akimoto., T. Ishii., K. Yamagaki., K. Ohtaguchi., K. Koide and K. Yazawa : *JAOCs* **68**, 504—508 (1991)
- (9) 鈴木信雄, 矢澤一良, 渡部和郎, 赤堀結花里, 石川千夏子, 近藤 聖, 高田清克: 日本水産学会誌, **58**, 323—328 (1992)
- (10) 矢澤一良, 渡部和郎, 石川千夏子, 増沢康男, 山口宏二, 近藤 聖, 江 孟 繁, 木村 修一: 脂質生化学研究, **32**, 291—294 (1990)
- (11) 矢澤一良, 増沢康男: 油化学, **40**, 845—857 (1991)
- (12) K. Watanabe., K. Sezaki., K. Yazawa and A. Hino : *Nippon Suisan Gakkaishi*, **58**, 271—276 (1992)
- (13) 山田章子, 渡部和郎, 矢澤一良, 加藤誠志, 近藤 聖: 脂質生化学研究, **36**, 417—420 (1994)