有用物質生産のための微生物プロセスの 開発に関する基盤的研究

(2003 年度日本農芸化学会賞受賞)

清 水 昌

(京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻)

Key words: lactonase; carbonyl reductase; 2'-deoxyribonucleoside; arachidonic acid; conjugated fatty acid

はじめに

微生物が示す多様でユニークな機能はさまざまな分野で応用され、役立てられている。筆者は、スクリーニングを基盤とする微生物の新機能の探索および代謝や生合成の研究を通じて、新しい多種多様な微生物反応を見だし、反応に関与する酵素の特性と機能を究明するとともに、それらを利用して機能性脂質、光学活性化合物、ビタミン類、汎用化成品などの新規な合成・変換法の開発へと研究を展開してきた^{1)~7)}。ここでは、幾つかの研究成果について概略を述べる。

1. キラル化合物の合成と変換に有用な微生物反応の探索と開発

酵素は、生体のさまざまな反応を触媒し、生命維持にかかわっている。生合成・代謝の円滑な進行は各酵素の示す厳密な特異性（基質特異性、立体選択性、位置選択性など）に立脚している。このような高い選択性をもつ酵素（生体触媒）を精密な選択性が要求されるキラル化合物合成の場で触媒として用いることは大きなメリットがある。最近では、既存の有機化学的合成プロセスを凌駕し、実用に供されるものも少なくない。この項では、微生物酵素を用いたキラル化合物生産について、有用反応の探索・発見から機能開発に至る実際を述べる。

(1) キラルテクノロジーの新兵器 “ラクトナーゼ”^{8)~11)}

アルドン酸ラクトンや芳香族ラクトンなど分子内エステル結合を有する化合物に特異的に作用しこれを立体選択的に開環加水分解する従来報告のなかったタイプの一群の酵素が微生物に存在することを発見した（表 1）。これらを “lactonohydrolase” と命名し、キラル化合物の合成・変換用触媒としての有用性を示した。

***Fusarium* ラクトナーゼの発見とパントラクトンの工業的光学分割法（ラクトナーゼ法）の開発：**D-パントテン酸およびその誘導体は、医薬品、飼料添加物などとして幅広い用途がある。これらはいずれも D-パント酸 (D-PA) に由来する不斉中心を有し、工業的合成法は、DL-パントラクトン (DL-PL) の合成、DL-PL の光学分割、D-PL と β -アラニン（およびその誘導体）のアミド縮合からなる。本合成法でキラルビルディングユニットとなる D-PL の調製はこれまでジアステレオマー塩形成による光学分割によっていた。これは分割剤であるキラルアミンの合成も含め煩雑であり、抜本的な改良が期待されていた。筆者らは、立体選択的なラクトナーゼ反応による光学分割法を想定し、DL-PL に対する不斉加水分解能を有する微生物を探索した。その結果、*Fusarium* 属および分類学的に近縁の糸状菌に D-PL に特異的な加水分解活性が、L-PL に選択的な反応は細菌や酵母に見いだされた（表 1）。実用的には、D 体選択的な反応が有用で、この場合、基質の加水分解率とは無関係に、開環した D-PL すなわち D-PA を回収すれば理論的には D-PA の光学純度を 100% に保つことができる。一方、L-PL の開環では、反応液中に残った L-PL を含む基質から D-PL を回収せねばならず、L-PL を完全に加水分解しない限り高い光学純度の D-PL が得られない。D 体選択的な高活性菌 *F. oxysporum* AKU3702 より目的酵素を単離し、諸性質を解明した（表 1）。本酵素にはサブユニット当たり約 1 原子のカルシウムが含まれ、分子量約 2000 の高マン

Microbial processes for the production of chemically and biologically useful compounds
Sakayu SHIMIZU (Division of Applied Life Sciences, Graduate School of Agriculture, Kyoto University)

表1 微生物ラクトナーゼの多様性

	<i>F. oxysporum</i>	<i>A. tumefaciens</i>	<i>Ac. calcoaceticus</i>	<i>Acinetobacter</i> sp. NCIMB9871
Native M_r (Subunit M_r)	12,500 (63,000)	62,000 (26,500)	55,000 (30,000)	49,000 (34,000)
Substrate specificity (K_m [mM]/ V_{max} [$\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$])
D-Pantolactone	123/653	No activity	No activity	ND
L-Pantolactone	No activity	3.59/13.7	No activity	ND
D-Galactono- γ -lactone	23/1800	No activity	No activity	ND
3,4-Dihydrocoumarin	6.3/2800	$2560/7.74 \times 10^4$	0.801/4760	ND
ϵ -Caprolactone	ND	ND	No activity	0.752/1260
Optimum pH	7-7.5	8.5	7.0	9.5-10
Optimum temperature	50°C	45°C	30°C	40°C
pH stability (30°C, 30 min)	5.0-10	>5.0	>5.0	>7.0
Thermal stability	<50°C (pH 7.4, 20 min)	<50°C (pH 7.4, 20 min)	<75°C (pH 7.0, 30 min)	<25°C (pH 7.0, 30 min)

ND: Not determined

図1 DL-パントラクトンの光学分割における従来法（ジアステレオマー塩形成法）と酵素法（ラクトナーゼ法）の比較

ノース型糖鎖がサブユニットの4カ所のAsp残基に結合している。カルシウムは活性発現に必須だけでなく、酵素の安定性にも寄与している。本酵素はD-PL以外に種々のアルドン酸ラクトン（D-ガラクトノラクトン、L-マンノラクトン、D-グルノラクトンなど）を可逆的に加水分解する。基質となるラクトンは、いずれもHaworthの投影式で表した場合、2位のOH基が下向きになるという共通点をもっている。また3,4-ジヒドロクマリンなどの芳香族ラクトンは不可逆的に加水分解される。

上記の結果に基づき、筆者らは*F. oxysporum*の菌体を触媒とした実生産レベルでのDL-PLの光学分割法の開発に取り組んだ。*F. oxysporum*の洗浄菌体を触媒とし、DL-PLの不斉加水分解反応を行うと、70% DL-PL水溶液がほ

ぼ定量的に分割できる。実際の光学分割は、アルギン酸カルシウムゲルで包括固定化した菌体を用い、30～35% DL-PL水溶液を基質として行う。D-PAの生成に伴うpHの低下は、アルカリ添加により自動調整する。10～21時間後には、95%以上のD-PLが加水分解され、高い光学純度(98%e.e.)のD-PAが得られる。反応後の固定化菌体をろ過回収し、再度同様の反応に供すると、高い加水分解率と生成物の光学純度を保ったまま180回(180日)以上にわたる使用が可能である。この方法は、反応効率のみならず、エネルギー消費(CO₂換算で約30%削減)、廃液や廃棄物の削減の面でも効果が大きく、従来の分割剤による方法に代わって1999年より3000 t/y規模のD-パントテン酸生産プロセスに導入され、実用に使われている(図1)。

図2 ジヒドロクマリンヒドロラーゼ (DHase) によるモノクロロジメドンのハロゲン化反応

Agrobacterium ラクトナーゼ: *Fusarium* ラクトナーゼとは逆の立体選択性を示す新規酵素は, *A. tumefaciens* AKU316 より精製・単離された. 本酵素は L-PL のほか, 3,4-ジヒドロクマリンや 2-クマラノンなどの芳香族ラクトンに対しても高い加水分解活性を示す. 一方, D-PL をはじめ, *Fusarium* ラクトナーゼの良い基質となったアルドン酸ラクトン類に対してはその立体配置にかかわらず活性を示さない (表 1). 本酵素遺伝子の推定アミノ酸配列は, *Streptomyces* 属のポリケタイドサイクラゼと高い相同性を示す. ポリケタイドサイクラゼは, 芳香属性抗生物質などの 2 次代謝産物合成への関与が示されており, *Agrobacterium* ラクトナーゼについても同様の機能が示唆される. しかし, これに相当する 2 次代謝産物の確認を含め本酵素の *in vivo* での役割は未解明である.

Acinetobacter ラクトナーゼ (ジヒドロクマリンヒドロラーゼ): ジヒドロクマリンヒドロラーゼ (DHase) は, 芳香族ラクトンに特異的な新規ラクトナーゼの獲得を目的とした探索により得られた. 3,4-ジヒドロクマリンに対して高い活性を示すほか, 2-クマラノン, ホモゲンチジン酸ラクトンなどの芳香属ラクトンも水解する. 一方, D-PL, アルドン酸ラクトンに対する活性は認められない (表 1). DHase は高温, 高アルカリ性条件下で優れた安定性を示す. DHase 遺伝子の推定アミノ酸配列は *Pseudomonas* 属細菌などのセリンエステラーゼと高い相同性を示す. また, 細菌由来のノンヘムハロペルオキシダーゼとも相同性がある. DHase をはじめ, これらの酵素にはいずれも活性中心にセリンエステラーゼファミリーに特徴的な Gly-X-Ser-X-Gly モチーフからなる活性 Ser 残基とこれとともに活性中心を形成する Asp, His 残基が共通して保存されて

おり, DHase もまた本ファミリーに属すると考えられる. さらに, DHase は過酸化水素と臭素イオン存在下でモノクロロジメドンの臭素付加反応を触媒し, ラクトナーゼ活性に加え, ハロペルオキシダーゼ活性を併せ持つ多機能酵素である. 一見, 別の二つの反応が同一の酵素によって触媒される機構を矛盾なく説明するものとして次の機構が提唱されている (図 2). 本ハロゲン化反応には酢酸などの有機酸が必須であり, ①反応液中の有機酸が酵素の活性 Ser 残基に求核攻撃し, アシル中間体を形成する. ②エステル交換反応に似た要領でアシル中間体が過酸化水素による攻撃を受け, 過酸化有機酸が生じる. ③生じた過酸化有機酸は酸化剤として働き, ハロゲンイオンが次亜ハロゲン酸へと変換され, これがさまざまな有機化合物を攻撃することでハロゲン化が起こる. DHase によるハロゲン化反応ではジヒドロクマリンが加水分解されて生じるヒドロキシフェニルプロピオン酸が酢酸などに対応する有機酸として機能する. また, 本酵素は, 生体内では過酸の無毒化に関与することも証明されている.

これらの特性に加え, DHase は幾つかの直鎖状エステルに対して立体選択的かつ位置選択的な加水分解活性を示す. 直鎖状エステルに対する DHase の基質特異性は厳密で, ①メチルエステルに特異的である, ②2 位の立体配座を認識する, ③ジエステルの一方のみを加水分解し, モノエステルを生成する, などの特徴が挙げられる. このような特徴を活かし, DHase 遺伝子を大量発現させた大腸菌の菌体を触媒として用いると, DL-β-アセチルチオイソ酪酸メチルの D 体選択的加水分解, および分子内に二つのエステル結合をもつメチルセトラキサートの末端エステル結合の位置選択的加水分解が効率よく行える (図 3). このよう

図3 ジヒドロクマリンヒドロラーゼによる直鎖状エステルの立体選択的および位置選択的加水分解反応

図4 微生物細胞によるカルボニル化合物の不斉還元
原理 (a) と宿主細胞を用いた汎用型不斉還元システム (b)

に DHase の高い選択性と触媒能は *Fusarium* ラクトナーゼ同様、有用物質生産のための新たな触媒として期待できる。

(2) 補酵素再生と供役した汎用型カルボニル不斉還元システムの開発^{12)~17)}

パン酵母をプロキラルなカルボニル化合物およびグルコース（エネルギー源）と混合すると、カルボニル化合物が還元され、キラルアルコールが生成するという知見は数多く報告されてきた（図 4a）。中身はブラックボックスでパン酵母は入手が容易であり、反応としては混ぜるだけでよい。現在でもさまざまな研究が行われている。しかし、実用レベルに達した成果は得られていない。原因は、反応効率が悪いこと、生成物の光学純度が十分高くないことに集約される。問題解決には、①還元のためのエネルギーの供給系と還元系の効率よい共役、②同一の細胞に混在する同じ基質に反応する種々のカルボニル還元酵素の中から目的の反応に適した酵素を選択しこれを増強すること、が必要である。還元反応の触媒はカルボニル基の還元または水酸基の酸化に関与するレダクターゼやデヒドロゲナー

ゼであり、これらは NAD(P)H などの補酵素を要求する。補酵素の再生に関与する適当な酵素と還元に関与する酵素を組み合わせれば、基質の還元と補酵素の供給は共役させることができるはずである。例えば、還元酵素と補酵素再生のための酵素を大量に同一の細胞中で発現させれば、簡単にキラルアルコールの製造のための生体触媒として機能すると考えられる（図 4b）。また、このようなシステムは、基質特異性や立体選択性が異なる還元酵素を取りそろえてライブラリー化すれば、汎用型の還元システムとして機能するはずである。ここでは、汎用型不斉還元システムの開発を目指して行った研究成果について述べる。

カルボニル還元酵素ライブラリーの構築：グルコース共存下でケトパントラクトン、4-クロロ-3-オキソブタン酸エチル (COBE) などさまざまなケトン類を基質として、種々の微生物の不斉還元能を検索した。その結果、転換率や光学純度のプロファイルはさまざまで、テストした微生物のみならず、用いた基質により変動し、高い光学純度で片方の対掌体を与えるもの、逆の立体選択性を示すものなど微生物の還元能力は多様であった。このような探索を通して多

反応	生成物		
	モル収率	光学純度	収量
>99%	>99% ee	400 g/l
>99%	>99% ee	100 g/l
90%	>99% ee	100 g/l
95%	>99% ee	300 g/l
>99%	>99% ee	350 g/l
90%	>99% ee	70 g/l

図5 ライブラリー化された還元酵素によるキラルアルコールの生産

種多様な還元酵素が見いだされ、20種からなる還元酵素のライブラリーが構築された。いずれの酵素も精製・単離され、諸性質の解明を通してNAD(P)H依存性のレダクターゼ/デヒドロゲナーゼファミリーに属することが示されている。補酵素の再生にはギ酸脱水素酵素やグルコース脱水素酵素の使用が考えられるが、これについてもライブラリーが作られている。

汎用型不斉還元システムによるキラルアルコール類の生産：上記の結果に基づいて、補酵素の再生系とライブラリー化された基質特異性が異なり、安定性など特性的にも優れたカルボニル還元酵素のそれぞれをペアにしたモジュールを宿主微生物（大腸菌など）に遺伝子導入し、高発現させることでさまざまなプロキラルなカルボニル化合物を対応するキラルアルコールに容易に変換できるシステムが確立された（図4b）。

例えば、COBEから*R*(-)-4-クロロ-3-ヒドロキシブタン酸エチル(*R*-CHBE)を生成する反応では、*Sporobolomyces salmonicolor*のアルデヒド還元酵素(AR1)を用いると、300 g/LのCOBEが16時間後には定量的に*R*-CHBEに変換される。また、還元酵素モジュールを*Candida magnoliae*のカルボニル還元酵素(S1)に代えると、350 g/LのCOBEを定量的に*S*-CHBEに変換できる。この還元システムは、医薬品製造の中間原料として重要な幾つかのキラルアルコール生産プロセスに導入され実用に供されている。

図5に幾つかの還元酵素モジュールによる反応例を示

したが、モジュールを替えることで、さまざまな高純度キラルアルコールが高濃度、高立転換率で生産可能であり、システムの汎用性が証明されている。なかでも、*Rhodococcus erythropolis*のアミノプロパノール脱水素酵素(APDH)による*l*-1-フェニル-1-オキソ-2-アミノメチルプロパン(*l*-MAK)から*d*-ψ-エフェドリンへの変換は二つの不斉点(2位および1位)を同時認識するユニークな反応である。実際には、合成が容易な*dl*-MAKを基質とし、MAKが自動ラセミ化を受ける微アルカリ性条件下で反応を行う。したがって、通常の還元では4種の異性体が生じるが、この場合はラセミ体基質のすべてが一つの異性体に収斂する。

カロチノイド系色素のキラルビルディングブロックとして有用な4*R*,6*R*-アクチノールの生産も検討が進んでいる。この場合、反応は2段階で、C=C結合への水素添加とカルボニル還元という機能の異なる2種の還元モジュール(*Candida macedoniensis*の旧黄色酵素(OYE)と*Corynebacterium acuatium*のLVN還元酵素(LVR))が使用される。これは、本還元システムがカルボニルの還元のみならず、他の還元反応にも利用できることを示しており、この意味でも汎用型である。補酵素依存性の還元酵素が光学活性化化合物の実用的合成に使用された例はこれまではほとんど報告がなかった。これらの結果は、還元酵素が光学活性化化合物の工業的製造に利用できることを示した最初の例と思われる。

表2 酵素法による核酸関連化合物の生産

化合物	酵素 (微生物)	方法
コエンチーム A	複合酵素系 (<i>Brevibacterium ammoniagenes</i>)	パントテン酸, L-システイン, AMP を基質として <i>B. ammoniagenes</i> (親株または変異株) の解糖系およびコエンチーム A 生合成酵素系を共役的に作用させ変換する.
FAD	FAD 合成酵素 (<i>Arthrobacter oxydans</i>)	化学的に合成したフラビンモノヌクレオチドを酵素的に ATP とピロリン酸縮合させる.
S-アデノシルメチオニン	S-アデノシルメチオニン合成酵素 (<i>Saccharomyces sake</i>)	L-メチオニンを <i>S. sake</i> 変異株の生育培地に添加して変換させ菌体内に蓄積させる.
S-アデノシルホモシステイン	S-アデノシルホモシステインヒドロラーゼ (<i>Alcaligenes faecalis</i>)	アデノシンとホモシステインを縮合させる.
2'-デオキシリボヌクレオシド	複合酵素系 (組換え大腸菌およびパン酵母)	解糖系によってグルコースから変換した D-グリセルアルデヒド 3-リン酸とアセトアルデヒドの縮合で得た 2-デオキシリボースをヌクレオシドの分解反応系の逆反応によって核酸塩基を結合させる.

図6 グルコース、アセトアルデヒド、核酸塩基を原料とする 2'-デオキシリボヌクレオシドの生産

2. 核酸関連化合物の生産

筆者らは、コエンチーム A、アデノシルメチオニン、アデノシルホモシステインなどの核酸関連化合物の生産についても研究を行い (表 2)^{18)~21)}、核酸塩基類の新規代謝酵素系の探索と開発へと研究展開した^{22)~26)}。この項では、最近の成果の一つである 2'-デオキシリボヌクレオシド (dNS) の生産について述べる。

(1) 酵素法と代謝工学的手法を組み合わせた 2'-デオキシリボヌクレオシドの生産^{27), 28)}

dNS は、PCR の普及、アンチセンス DNA を用いた遺伝子治療、核酸系抗ウィルス剤を用いた新しい感染症治療技術の開発に伴い、需要の拡大が期待されている。筆者らは、dNS の生産プロセスとしてヌクレオシドの可逆的な分解

経路に注目し、関与する酵素、デオキシリボアルドラーゼ (DERA)、ホスホペンタムターゼ (PPMase)、ヌクレオシドホスホリラーゼ (NPase) の活性菌を用いる合成法を検討した。経路的には、ヌクレオシドの分解代謝経路を逆向けにたどるものであり、リン酸化三単糖、アセトアルデヒド、核酸塩基が原料となる。また、リン酸化三単糖を解糖系などの糖代謝経路を利用して糖質から誘導し、共役させることで、安価な原料からの dNS の供給が可能と思われる (図 6)。

DERA 活性菌による 2-デオキシリボース 5-リン酸の生産: dNS 生産において鍵となるのは、2-デオキシリボース骨格の合成である。まず、DERA 反応によりグリセルアルデヒド 3-リン酸 (G3P) とアセトアルデヒドから 2-デオキシリボース 5-リン酸 (DR5P) の生成を検討した。DERA 高

活性菌 *Klebsiella pneumoniae* の菌体を触媒的に用いると、高 pH、高アセトアルデヒド濃度の条件下、100 mM G3P から収率 70% で DR5P が生成した。本菌は、解糖系酵素アルドラーゼおよびトリオースイソメラーゼ活性も強力で、ジヒドロキシアセトンリン酸とアセトアルデヒドからも効率よく R5P を生成した。

DERA 活性菌および PPMase, NPase 活性菌を用いた dNS 生産: DR5P は PPMase, NPase によるリン酸基転位、塩基付加を受け dNS となる。PPMase, NPase 高活性菌として得た *Bacillus coagulans* 菌体を触媒的に用いると、50 mM DR5P と 50 mM 塩基から収率 30% で dNS が生成した。また、*K. pneumoniae* を用いた DR5P 合成反応液を DR5P 源としても効率よく dNS が生成し、リン酸化三単糖、アセトアルデヒド、核酸塩基を原料とした dNS 生産の可能性が示された。

グルコース、アセトアルデヒド、核酸塩基を原料とした dNS 生産プロセスの開発: *K. pneumoniae* の DERA を大腸菌に導入し、大腸菌の活発な解糖系によりグルコースから誘導されるリン酸化三単糖を DR5P へ変換する代謝工学的検討を行った。各種解糖系中間体とアセトアルデヒドからの DR5P 生産を検討した結果、フルクトース 1,6-リン酸 (FDP)、グルコース 6-リン酸 (G6P) から高転換率で DR5P が生成した。また、グルコースからの DR5P 生成も認めた。さらに、解糖系を回転させるため、本条件下に ATP を加えると、効率よく DR5P が生成した。生成した DR5P は、*B. coagulans* (PPMase, NPase) により dNS へ変換された。

酵母の解糖経路と共役した dNS 生産: 上記の結果は、解糖経路の中間体である FDP や G6P が効率よく供給できれば、安価な糖質、アセトアルデヒド、核酸塩基からの効率よい dNS 合成が可能であることを示している。解糖経路中間体の供給に、1970 年代に栃倉らによって開発された酵母の発酵エネルギー生成系の利用を試みた。すなわち、グルコースとリン酸塩を高濃度で含む反応液に発酵性の酵母菌体とともに AMP (またはアデノシン) を反応させると、高エネルギーリン酸化合物として FDP や ATP が蓄積するというものであり、この系で供給される FDP から G3P が得られる。トルエン処理パン酵母菌体を用いると、触媒量の AMP 添加のもと、1.2 M グルコース、0.75 M リン酸緩衝液から約 600 mM の FAD が生成し、これにアセトアルデヒドと DERA 菌体を加えると、200 mM の DR5P が生成した。

結局、全体の反応は、①酵母によるグルコースからの FDP の生成、②DERA 高発現大腸菌による FDP、アセトアルデヒドからの G3P を経る DR5P の合成、③PPMase

および NPase によるリン酸基転移を伴う DR5P と核酸塩基からの dNS 合成の 3 ステップからなる。各ステップはそれぞれを分割してもよく、ワンポットで連続的に行ってもよい。後者の場合、グルコース、アセトアルデヒド、核酸塩基から約 20 mM の dNS が生成する。今後、DERA, PPMase, NPase を共発現する大腸菌の開発などにより、より経済的なプロセスの構築が期待される。

3. 油糧微生物の探索と開発^{29)~35)}

アラキドン酸 (AA; 20:4n-6) などの高度不飽和脂肪酸 (PUFA) を著量生産する微生物の発見により、微生物がユニークな脂質の供給源として高い可能性をもつことが示された。以来、油糧植物や動物油脂からは得がたい脂質を生産できる一連の微生物は、「油糧微生物」として注目されるようになり、微生物による機能性脂質生産の試みが多方面からなされるようになった。その結果、いわゆる「発酵油脂 (Single Cell Oil)」の実用生産への道が拓かれた。この項では、筆者らが展開してきた AA 生産性 *Mortierella* 属糸状菌による種々の PUFA 含有油脂の生産研究とこの過程で見いだされたゴマの微量成分セサミンの機能開発、新たな機能性脂質として注目を集めている共役脂肪酸の生産について簡単に紹介する。詳細は最近の総説^{36), 37)}を参照されたい。

(1) 代謝工学的手法による高度不飽和脂肪酸を含む新規発酵油脂の生産

AA 含有油脂の工業生産: *Mortierella alpina* 1S-4 が AA を主たる構成脂肪酸とするトリアシルグリセロール (TG) を著量生成蓄積することを世界に先駆けて見いだした。*M. alpina* 1S-4 (親株) はグルコースなど安価な炭素源を含む単純な培地によく成育し、菌体内に AA に富む TG を蓄積する (TG 含量, 500~600 mg/g dry cells; TG 中の全脂肪酸に対する AA の割合, 30~70%; 培地当たりの AA 生産量, 13~20 g/L)。現在、本菌が生産する AA 高含有 TG は、乳児用ミルクの栄養強化素材として世界的に使用されている。

不飽和化酵素 (DS) 欠損変異株によるさまざまな PUFA 含有油脂の生産: 種々の DS 欠損 (または活性低下) 変異株が得られ、これらを用いると、n-9, n-6, n-3 経路 (図 7a) のすべての C20PUFA が生産できる。例えば、 $\Delta 5DS$ 欠損変異株では AA 生合成の直接の前駆体であるジホモ- γ -リノレン酸 (DGLA; 20:3n-6) が蓄積する。得られた油脂の AA 含量は 1% 以下であり、DGLA 含量は 40~50% に達する。 $\Delta 6DS$ 欠損変異株では、 $\Delta 6$ 不飽和化反応が省略され、蓄積したリノール酸 (18:2n-6) は、鎖長延長酵素 (EL) によって $\Delta 8$ 位に二重結合をもたない C20PUFA が生成

図7 *Mortierella alpina* 1S-4 および変異株で認められる PUFA の生合成経路

する(図7b). $\Delta 12DS$ 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。蓄積した18:1n-9は18:2n-6に代わって本来機能しないn-9経路に導かれ、ミード酸(MA; 20:3n-9)が蓄積する。得られた油脂の構成脂肪酸は少量の飽和脂肪酸とn-9脂肪酸であり、MAの含量は33%に達する。このようにして、従来適当な供給源がなかったDGLA, MAなどを含むユニークな機能性油脂の工業生産が可能となった。

鎖長延長酵素欠損変異株による新しいPUFA生合成経路の創製: パルミチン酸(16:0)からAAへの変換にはC16→C18およびC18→C20の2種のEL(EL1, EL2)が関与する。前者の反応に関与するEL1が部分的に欠失した変異株は、16:0を著量蓄積する。本変異株で最初に起こる反応は、 $\Delta 9DS$ による16:0→16:1n-7の変換である。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、 $\Delta 12DS$ によって16:2n-4へ変換されn-4経路の親脂肪酸として使用される。両経路において16:1n-7, 16:2n-4は $\Delta 6DS$ によってそれぞれ16:2n-7, 16:3n-4へ変換される。また、16:2n-7, 16:3n-4はEL1もしくはEL2, $\Delta 5DS$, EL2によりさらに変換され、各経路の最終脂肪酸である20:3n-7, 20:4n-4に至る。したがって、16:1n-7は通常のn-9, n-6, n-3経路の出発脂肪酸である18:1n-9に相当する脂肪酸とみなせる。また、n-7, n-4経路はそれぞれn-9, n-6経路に対応する。同様に16:3n-1を培地に加えると、n-3経路に対応するn-1経路が機能し、20:5n-1が生成する。このようにして、一つの変異に基づいて、さまざまな新しい生合成経路の誘導が可能なが示された(図7c)。

油脂の菌体外漏出: TG漏出性変異株の油脂生産性、油脂の脂肪酸組成は基本的に親株と同等であるが、生成した油脂は菌体から漏出し培地に蓄積する。油脂の漏出量は生産された全油脂の10~40%に達する。漏出油脂は培地中で水と分離して2層化せず、直径1~2 μm 程度の粒子として均一に分散するので、粒子は界面活性を有する膜で覆われていると推測される。

遺伝子組換えによる生合成経路変更の試み: C20PUFA生合成に関与する酵素遺伝子のうち、 $\Delta 9DS$, $\Delta 12DS$, $\Delta 6DS$, シトクロム b_5 , シトクロム b_5 還元酵素の各遺伝子を得ている。 $\Delta 9DS$ 遺伝子は2種存在し、一方は発現せず休眠状態にある。転写された方の遺伝子が変異により不活性化されると、休眠状態の遺伝子が転写される。同様に $\Delta 6DS$ にも2種の遺伝子が存在するが、これらは、どちらも同程度に転写されている。さらに $\Delta 9DS$, $\Delta 12DS$, $\Delta 6DS$ 遺伝子をそれぞれ麹菌に導入すると、各遺伝子が発現し機能する。しかし、宿主の油脂生産性は低い。*M. alpina*の形質転換系確立が今後の課題である。

(2) 脂肪酸不飽和化酵素の特異的阻害剤の発見

筆者らは、上記の研究の過程で、ゴマ種子に含まれるセサミンなどのリグナン化合物が、DGLAからAAへの変換に関与する $\Delta 5DS$ の特異的阻害剤であることを発見し、その阻害機構を解明した。これは、不飽和化酵素の特異的阻害剤としては最初の例となった。また、ウコンの主成分であるクルクミンが $\Delta 5DS$ および $\Delta 6DS$ 共通の阻害剤であることも併せて見いだした。動物の系でもこれらの化合物は同様の阻害作用を示し、特に、セサミン添加食餌で飼育したラットでは、肝臓および血清のDGLA濃度の上昇

と AA 濃度の減少がもたらされること, アルコール過剰摂取によって誘起される肝機能の低下が著しく改善されることなどを明らかにした。

(3) 共役リノール酸の生産

乳酸菌などに 18:2n-6 の二重結合を異性化し対応する生理活性共役脂肪酸 (CLA) へと変換する活性が広く分布していることを認めた。 *Lactobacillus plantarum* AKU 1009a の菌体と 18:2n-6 を反応させると, 9c,11t-18:2 が効率よく生成する。また, 本変換反応が 10-ヒドロキシ脂肪酸を中間体とする二重結合への水和と脱水によって進むことを示した。これにより, 不明であった CLA の生合成経路が解明された。

謝 辞

本研究は, 京都大学大学院農学研究科発酵生理および醸造学研究室において行われた。ご指導, ご鞭撻をいただいた故緒方浩一先生, 山田秀明先生, 谷吉樹先生に心より感謝いたします。また, 一緒に研究をしていただいた研究室および企業の多くの方々に御礼申し上げます。

- 1) H. Yamada and S. Shimizu: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **27**, 622-642 (1988).
- 2) S. Shimizu, J. Ogawa, M. Kataoka, and M. Kobayashi: *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, **58**, 45-87 (1997).
- 3) J. Ogawa and S. Shimizu: *Trends Biotechnol.*, **17**, 13-21 (1999).
- 4) 清水 昌: 触媒, **43**, 190-195 (2001).
- 5) 本田孝祐, 片岡道彦, 清水 昌: ケミカル・エンジニアリング, 345-351 (2002).
- 6) J. Ogawa and S. Shimizu: *Current Opinion Biotechnol.*, **13**, 367-375 (2002).
- 7) 清水 昌: ビタミン, **77**, 131-145 (2003).
- 8) S. Shimizu and M. Kataoka: in "Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation," ed. by M.C. Flickinger and S. W. Drew, John Wiley & Sons, New York, 1999, pp. 1571-1577, 1923-1934.
- 9) S. Shimizu, M. Kataoka, K. Honda, and K. Sakamoto: *J. Biotechnol.*, **92**, 187-194 (2001).
- 10) 清水 昌, 森川忠則, 新田一誠, 坂本恵司, 和田浩一: 日本化学会誌, **2001**, 1-9.
- 11) 本田孝祐, 片岡道彦, 清水 昌: バイオサイエンスとインダストリー, **60**, 163-166 (2002).
- 12) S. Shimizu and M. Kataoka: *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, **63**, 109-123 (1999).
- 13) S. Shimizu and M. Kataoka: in "Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation," ed. by M.C. Flickinger and S.W. Drew, John Wiley & Sons, New York, 1999, pp. 63-69.
- 14) K. Kita, M. Kataoka and S. Shimizu: *J. Biosci. Bioeng.*, **88**, 591-598 (1999).
- 15) 片岡道彦, 喜多恵子, 清水 昌: 化学と生物, **38**, 313-318 (2000).
- 16) 八十原良彦, 長谷川淳三, 清水 昌: バイオサイエンスとインダストリー, **60**, 604-605 (2002).
- 17) M. Kataoka, K. Kita, M. Wada, Y. Yasohara, J. Hasegawa, and S. Shimizu: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **62**, 437-445 (2003).
- 18) S. Shimizu and H. Yamada: *Trends Biotechnol.*, **2**, 137-141 (1984).
- 19) S. Shimizu and H. Yamada: in "Biotechnology of Vitamins, Pigments and Growth Factors," ed. by E. J. Vandamme, Elsevier Applied Science, London, 1989, pp. 199-219, 351-372, and 373-381.
- 20) S. Shimizu and M. Kataoka: in "Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation," ed. by M. C. Flickinger and S. W. Drew, John Wiley & Sons, New York, 1999, pp. 1923-1934.
- 21) S. Shimizu: in "Biotechnology," 2nd Ed., Vol. 10, ed. by H.-J. Rehm and G. Reed, Wiley-VCH, Weinheim, 2001, pp. 320-340.
- 22) J. Ogawa and S. Shimizu: *J. Molec. Catal. B: Enzymatic*, **1**, 167-176 (1997).
- 23) J. Ogawa and S. Shimizu: in "Stereoselective Biocatalysis," ed. by R. Patel, Marcel Dekker, New York, 2001, pp. 1-21.
- 24) 小川 順, 宋 子良, 清水 昌: 化学と生物, **39**, 333-339.
- 25) C.-L. Soong, J. Ogawa, and S. Shimizu: *J. Molec. Catal. B: Enzymatic*, **12**, 71-75 (2001).
- 26) J. Ogawa and S. Shimizu: in "Handabook of Industrial Biocatalysis," ed. by C.-T. Hou, Marcel Dekker, New York, in press.
- 27) J. Ogawa, K. Saito, T. Sakai, N. Horinouchi, T. Kawano, S. Matsumoto, M. Sasaki, Y. Mikami, and S. Shimizu: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **67**, 933-936 (2003).
- 28) N. Horinouchi, J. Ogawa, T. Sakai, T. Kawano, S. Matsumoto, M. Sasaki, Y. Mikami, and S. Shimizu: *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 3791-3797 (2003).
- 29) 清水 昌: 化学と生物, **33**, 528-537 (1995).
- 30) M. Certik, E. Sakuradani, and S. Shimizu: *Trends Biotechnol.*, **16**, 500-505 (1998).
- 31) M. Certik and S. Shimizu: *J. Biosci. Bioeng.*, **87**, 1-14 (1999).
- 32) J. Ogawa, E. Sakuradani, and S. Shimizu: in "Lipid Biotechnology," ed. by T.-M. Kuo, Marcel Dekker, New York, 2002, pp. 563-574.
- 33) 清水 昌, 小川 順, 櫻谷英治: バイオサイエンスとインダストリー, **59**, 451-454 (2001).
- 34) 小川 順, 櫻谷英治, 清水 昌: 科学と工業, **76**, 163-170 (2002).
- 35) 小川 順, 岸野重信, 清水 昌: バイオサイエンスとインダストリー, **60**, 753-754 (2002).
- 36) 清水 昌, 櫻谷英治, 小川 順: オレオサイエンス, **3**, 129-139 (2003).
- 37) 清水 昌: バイオサイエンスとインダストリー, **62**, 11-16 (2004).

プロフィール

清水 昌 しみず・さかゆ

京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻

昭和 20 年 6 月 2 日生まれ

〈略歴〉 昭和 43 年京都大学農学部農芸化学科卒業

昭和 48 年同大学大学院農学研究科博士課程修了

同年同農学部助手

平成元年同助教授

平成 4 年同教授, 現在に至る.

〈研究テーマと抱負〉 スクリーニングを通しての微生物機能の開発およびその応用. 特に有用物質生産に取り組んでいる.

〈趣味〉 レコードのコレクション, 木工, 釣り