論文要旨

総合論文 微生物によるカロテノイドの生産

秋 庸裕・小埜和久

広島大学大学院先端物質科学研究科 (〒739-8530 東広島市鏡山 1-3-1)

カロテノイド色素のなかでも、アスタキサンチンやカンタキサンチンなどのキサントフィル類は脂質過酸化や動脈硬化、炎症、がん化の抑制など抗酸化作用を基調とする高い生理活性が注目され、微細緑藻や酵母を用いた生産技術および用途の開発が進められている。最近見いだした海洋性微生物はキサントフィル類と高度不飽和脂肪酸を同時に顕著量生産することから、食品添加物や養殖魚類飼料を用途とした新たな供給源として有望である。

(連絡者：秋 庸裕) Vol.3, No.4, 175 (2003)

総合論文 糸状菌モルティエラ・アルピナの特異性

戸谷永生

神戸学院大学 栄養学部栄養生理学研究室
(〒651-2180 兵庫県神戸市西区伊川谷町有瀬 518)

Mortierella 属糸状菌は、 γ -リノレン酸をはじめとする多くの脂肪酸の高い生産性を有している。その中で *Mortierella alpina* は、n-6 系脂肪酸の代謝により細胞内脂質中に最終産物であるアラキドン酸 (AA) を特異的に多量に合成する菌株である。その成長には有機窒素とミネラル、糖からなる培養系が必要となり、液体培養では脂肪酸中の AA 組成比 71.2 %, AA 収率 11.1g/L, 固体培養ではそれぞれ 80.2 %, 13.1g/kg-培地に達した。これらの高い値は、培地当たりの菌体収率や菌体中の脂質含有率の高さによるものではなく、鎖長延長酵素と ($\Delta 9$, $\Delta 12$, $\Delta 6$, $\Delta 5$) 不飽和化酵素の活性が非常に高いことに起因していた。菌形態は、飢餓状態や高速攪拌下でバルブ状からペレット化し、菌が死滅しはじめる前まで AA 組成比が上昇した。また *M. alpina* は、プロスタグランジン (PG) 合成能もっており、培養液中に経日的に PGE_1 , PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$ を分泌する一方、培養液に添加した AA を変換することもできた。以上のように *M. alpina* は、顕著な AA/PG 合成能を有すると同時に、n-6 系脂肪酸の興味ある代謝モデルとしても特異性を示している。

(連絡者：戸谷永生) Vol.3, No.4, 183 (2003)

糸状菌モルティエレラ・アルピナの特異性

Specificity of Filamentous Fungus *Mortierella alpina*

戸谷 永生

神戸学院大学 栄養学部栄養生理学研究室

〒651-2180

兵庫県神戸市西区伊川谷町有瀬 518

Nagao TOTANI

Department of Nutritional Physiology, Faculty of Nutrition, Kobe-Gakuin University,

518 Arise, Ikawadani-cho, Nishi-ku, Kobe, JAPAN

651-2180

Abstract: Filamentous fungus, genus *Mortierella* has a high productivity of fatty acids, such as γ -linolenic acid. *Mortierella alpina* produces extraordinarily high percentages of arachidonic acid (AA), terminal metabolite of n-6 fatty acids, in intracellular lipids. The essential nutrients were organic nitrogen, minerals, and sugar. The highest AA contents and yields were 71.2% and 11.1g/L for liquid cultivation and 80.2% and 13.1g/kg-medium for solid cultivation, respectively. These results are attributed to neither high growth amounts nor high lipid contents of the fungus but to high activities in enzymes involved in chain elongation and ($\Delta 9$, $\Delta 12$, $\Delta 6$, $\Delta 5$) desaturases. Fungal form changed from pulp to pellets under starvation and high agitation with AA content increase until dying. In addition the fungus excreted prostaglandins (PGE_1 , PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$) over days in a liquid medium and also converted AA added in the medium to those prostaglandins. Thus, *M. alpina* shows the specificity of remarkable AA/PG productivities and is an interesting model for n-6 fatty acid metabolism.

Key words: *Mortierella alpina*, Arachidonic Acid, Prostaglandin, Pellet, Starvation

1 はじめに

1980年代に工業技術院の鈴木らの研究により、多くの微生物の中から、脂質生産性の高い糸状菌がスクリーニングされた¹⁾。特に高付加価値の高度不飽和脂肪酸である γ -リノレン酸 (GLA) の大量生産を期待できる株として見出された、*Mortierella isabellina* と *Mortierella ramanniana* var. *angulispora*^{2,3)} は、後の工業的生産に繋がっていったことは周知の通りである。またこの動きが日本における実践的なシングルセルオイル利用の始まりであったのではないと思われる。

一方、アラキドン酸 (AA) もプロスタグランジン (PG) の原料や必須脂肪酸の研究対象として興味ある高度不飽和脂肪酸であった。AAの微生物生産については、カナダの R.H. Ahern ら⁴⁾ がすでに (1964 年) *Mortierella renispora* の脂肪酸中に 26.7% のアラキドン酸が存在することを報告していた。しかしながらその後 *M. renispora* は、継代培養されず死滅したため存在していな

かった。D. Tyrrell⁵⁾ は、接合菌はえかび目の数種の糸状菌が同程度の AA 生産性を有することを見出した。日本国内でも、飯塚ら^{6~8)} はベニシリウム属、クラドスポリウム属、ムコール属、フザリウム属、ホルモデンドラム属、アスペルギルス属、ロードトルラ属に属する糸状菌を糖や炭化水素等を炭素源として培養し、AA 生産法を検討した。また育毛剤の有効成分として AA が着目され⁹⁾、*M. elongata* の液体培地での培養研究¹⁰⁾ が行われたが AA 蓄積量は 1 g/L 以下であった。いわし油からの AA 生産コストと比較した場合、微生物による油脂生産の企業的な採算をとることはかなり難しく、いわしの漁獲量の減少傾向、季節変動、AA 含有量の不安定性を考慮にいれても、AA の収率は 10 g/L 以上が望ましいと算出された。筆者は GLA の微生物生産が工業的に成立しつつある 1984 年に、AA の微生物による生産研究が数箇所の研究機関ですで行われていたにも関わらず、収率が向上しない点に着目した。GLA の代謝終点産物が AA であり、GLA の段階で代謝が止まらず AA を比較的多量に生産する糸状菌もある以上、AA の収率向上が可能ではないかとの考えのもとに、AA 生産菌のスク

連絡者：戸谷 永生

E-mail : totani@nutr.kobegakuin.ac.jp

リーニングと、その培養条件の検討に取り組んできた。その結果、*M. alpina* IFO 8568 をジャガイモ-デキストロース-寒天培地で培養したところ、その蓄積脂肪酸中の AA 組成比が 80.2% と極めて高い値を得ることができた^{11~17)}。その後の研究により、AA 収率は固体培地で 13.1 g/kg-培地¹⁸⁾、液体培地で 11.1 g/L^{19,20)} に到達することができた。その間、清水らは土壌から分離した *M. alpina* 1S-4 株が AA を 3.6 g/L で生産することを報告するとともに²¹⁾、その後各種の脂肪酸合成系変異株を報告してきた。このような経過のもと、現在では *M. alpina* が AA の工業生産あるいは脂肪酸合成経路の研究に多く使用されている²²⁾。

M. alpina の特異性は、高い AA 生産性に留まらない。AA を特異的に生合成することを見出した時点から、その存在が予言された通り、*M. alpina* は PG 合成能を有していた²³⁾。したがって *M. alpina* は、炭素源からまずパルミチン酸を生合成し、鎖長延長と不飽和化反応を繰り返し、アラキドン酸に代謝してから PG に変換するという一連の合成を単独でおこなっており、脂質代謝の研究に好適なモデル系であることもわかる。その合成の原動力の一つがエネルギーの需給バランスである。

本稿では *M. alpina* の特異性を脂肪酸不飽和化酵素の遺伝子、栄養要求性、AA 組成を上昇する要因、PG 合成能等の面から解説したい。

2 アラキドン酸生産菌のスクリーニング

菌の体系的な生産性スクリーニングには、液体合成培地が頻繁に用いられるが、対象となる菌の要求性を満たしているとは限らないため、自然界あるいは保存培地の条件に近い天然培地で培養することから着手した。そこで、手持ちの候補糸状菌を数通りの典型的な平板培地に接種し、培養後、脂質分析したところ短期間に良い結果に遭遇することができた^{11~20,24)}。*Mortierella* 属糸状菌 36 株を各々ジャガイモ-デキストロース-寒天培地、麦芽汁-寒天培地、コーンペプチド-寒天培地に接種し、室温で 2 週間培養したところ、ジャガイモ-デキストロース-寒天培地に菌糸が一番よく成長することを観察した。その成長した菌糸を採取し乾燥後、脂質抽出、エステル化して脂肪酸組成をガスクロマトグラフィーにより分析した。主要な脂肪酸の組成をまとめると Table 1 のようになった。

M. alpina IFO 8568, *M. elongata* IFO 8570, *M. exigua* IFO 8571, *M. hygrophila* IFO 5941, *M. bainieri* IFO 8569, *M. minutissima* IFO 8573, *M. verticillata* IFO 8575, *M. polycephala* IFO 6335 の計 8 株の生産する脂質の脂肪酸中には AA が含まれていた¹⁷⁾。とくに *M. alpina*

IFO 8568 の脂質では、AA 組成が 80% を超え、構成脂肪酸のすべてが AA であるグリセリドも多く存在することがわかる。

IFO 8568 以外の *M. alpina* の保存菌株もスクリーニングした結果、アメリカンタイプカルチャーコレクションの 3 菌株も同様に高い AA 生産性を示した^{19,20)}。しかし *M. alpina* に分類されていても全く AA を生産しない菌株も存在した^{19,20)}。培養経過と AA の菌体内への蓄積については、AA は培養日数とともに増加し、12~14 日後に最高値となったが、前駆脂肪酸のパルミチン酸- γ -リノレン酸は逆に減少した¹⁸⁾。ジホモ- γ -リノレン酸はほとんど存在しなかった。*M. alpina* においては Table 1 に掲げた AA 以外の脂肪酸の組成が少ないことから、パルミチン酸から AA にいたるまでに必要とされる鎖長延長酵素と ($\Delta 9$, $\Delta 12$, $\Delta 6$, $\Delta 5$) 不飽和化酵素の活性が非常に高いことも明らかである。*M. alpina* 以外の AA 生産菌ではステアリン酸と γ -リノレン酸が少なく、パルミチン酸とオレイン酸が多かった。Table 1 の結果は培養定常期終盤の値であるが、これらの菌は、鎖長延長酵素と $\Delta 6$, $\Delta 12$ 不飽和化酵素の活性が低いことが推測される。また、ジホモ- γ -リノレン酸の組成はほぼ 0 であったことより、 $\Delta 5$ 不飽和化酵素の活性は高いと考えられる。

一方、これら *Mortierella* 属菌のなかには、オレイン酸を 60% 以上含有する菌株や、リノール酸を約 50% 含有する菌株も存在した。これらはそれぞれ $\Delta 12$ や $\Delta 6$ 不飽和化酵素活性が低いためにオレイン酸やリノール酸が蓄積したと推察される。培地表面に増殖した菌体の肉眼所見としては、AA を生産する菌株はすべて白色脱脂綿様に菌糸が成長し、他はピンク~茶色のコロニーが大半であり、白色板状のものも一部存在した。

3 脂肪酸不飽和化酵素の遺伝子

M. alpina のもつ一連の不飽和化酵素の高い活性は、遺伝子操作の分野でも注目されている。シアノバクテリア^{25,26)}、植物^{27~29)} から単離した $\Delta 12$ -不飽和化酵素をコードしている cDNA クローンと、シアノバクテリア³⁰⁾、ルリヂシャ³¹⁾、線虫³²⁾ から単離した $\Delta 6$ 不飽和化酵素をコードしている cDNA クローンを比較すると、これらの不飽和化酵素のアミノ酸配列は非常によく似ており、特に鉄との結合に関与していると考えられている 3 箇所のヒスチジン-リッチな部位の相同性は高い。この部位の相同性は *M. alpina* の場合にもあてはまり^{32~34)}、不飽和化酵素のアミノ酸配列が検討された³⁵⁾。その結果 *M. alpina* の 5' 末端ランダムクローンから得られた $\Delta 12$ 不飽和化酵素 (399 アミノ酸残基) の cDNA 配列は、大豆 $\Delta 12$ 不飽和化酵素の cDNA 配列に類似しており²⁸⁾、

Table 1 Arachidonic Acid Producibility in Filaments of Genus *Mortierella* Grown on Potato-Dextrose-Agar Plates.

<i>Mortierella</i> \ Fatty acid (%)	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2 n-6	C18:3 n-6	C20:4 n-6	Color
<i>alpina</i> IFO 8568	7.1	3.4	1.1	2.1	2.7	80.2	White, filamentous
<i>elongata</i> IFO 8570	16.7	9.0	23.1	8.4	3.1	35.7	White, filamentous
<i>exigua</i> IFO 8571	17.4	2.7	22.6	10.5	4.8	32.4	White, filamentous
<i>hygrophila</i> IFO 5941	13.7	2.4	23.1	10.1	4.5	30.3	White, filamentous
<i>bainieri</i> IFO 8569	24.2	2.6	21.0	9.0	3.9	28.0	White, filamentous
<i>minutissima</i> IFO 8573	19.5	5.2	32.0	10.9	6.4	20.3	White, filamentous
<i>verticillata</i> IFO 8575	20.1	3.7	33.5	14.6	6.7	16.5	White, filamentous
<i>polycephala</i> IFO 6335	28.0	6.5	43.2	9.6	5.5	3.8	White, filamentous
<i>ramanniana</i> IFO 5426	16.7	4.3	62.1	8.7	7.1	0	Skin color
<i>isabellina</i> IFO 8572	10.9	2.4	58.1	13.6	13.6	0	Brown
<i>ramanniana</i> IFO 8186	18.0	4.5	57.7	16.5	1.6	0	Purple
<i>vinacea</i> IFO 7875	26.5	5.7	55.9	3.3	5.7	0	White
<i>nana</i> IFO 8190	21.1	4.3	54.4	11.1	6.7	0	White
<i>nana</i> IFO 8794	23.5	7.4	51.2	10.6	7.3	0	White
<i>humicola</i> IFO 8289	23.6	4.5	51.0	11.3	7.6	0	Pink
<i>isabellina</i> IFO 7884	19.1	4.3	50.3	10.2	13.5	0	Brown
<i>ramanniana</i> IFO 6744	20.1	4.7	49.0	12.9	11.9	0	Skin color
<i>humicola</i> IFO 8288	27.6	7.0	48.2	9.4	6.4	0	White
<i>humicola</i> IFO 8188	29.5	4.8	47.5	9.1	7.5	0	White
<i>ramanniana</i> IFO 8184	25.3	6.2	46.7	14.1	4.7	0	Pink
<i>ramanniana</i> IFO 7825	27.8	6.8	44.5	11.4	6.7	0	Pink
<i>isabellina</i> IFO 8309	26.2	5.6	44.5	10.4	9.7	0	Brown
<i>parvispora</i> IFO 8574	28.1	6.3	43.9	13.7	5.5	0	Gray
<i>isabellina</i> IFO 6336	16.7	3.7	43.6	14.4	18.1	0	Brown
<i>ramanniana</i> IFO 8185	24.4	4.2	43.3	19.9	6.0	0	Pink
<i>vinacea</i> IFO 6738	22.5	4.4	43.0	18.9	9.4	0	Pink
<i>isabellina</i> IFO 7824	25.2	5.6	42.7	11.1	11.2	0	Brown
<i>isabellina</i> IFO 8183	16.2	7.1	42.4	12.1	20.9	0	Brown
<i>ramanniana</i> IFO 8187	30.5	6.3	42.3	7.8	8.6	0	Pink
<i>isabellina</i> IFO 6739	15.3	7.5	42.1	15.7	17.9	0	Brown
<i>isabellina</i> IFO 8308	20.4	3.7	42.1	13.9	16.6	0	Brown
<i>isabellina</i> IFO 7873	20.2	11.1	42.0	9.0	16.2	0	Brown
<i>ramanniana</i> IFO 8287	24.1	4.6	39.7	22.6	6.4	0	White
<i>isabellina</i> IFO 7874	25.3	16.1	38.3	10.9	8.2	0	Brown
<i>isabellina</i> IFO 8286	21.0	6.5	38.2	10.5	19.2	0	Brown
<i>nana</i> IFO 8795	22.5	12.1	16.6	48.8	tr	0	Yellow

tr: trace

$\Delta 6$ 不飽和化酵素 (457 アミノ酸残基) の cDNA クローン
の配列は, シアノバクテリアである *Synechocystis* spp.,
Spirulina spp.³⁰⁾, ルリデシヤ³¹⁾ や線虫 *Caenorhabditis*
*elegans*³²⁾ の $\Delta 6$ 不飽和化酵素の cDNA 配列に類似して
いた。また *M. alpina* の $\Delta 5$ 不飽和化酵素のアミノ酸配
列は, 植物や動物の $\Delta 6$ 不飽和化酵素の配列よりもシア
ノバクテリアの $\Delta 6$ 不飽和化酵素の配列に類似していた

が, *C. elegans*³⁴⁾ のもつ $\Delta 5$ 不飽和化酵素と考えられる
酵素との相同性は低かった。

4 *M. alpina* の栄養要求性

先に述べたようにジャガイモ-デキストロース-寒天培
地で培養した *M. alpina* は, 高濃度の AA を含有する脂
質を蓄積することがわかり, ジャガイモ成分をさらに増

強した系としてジャガイモを蒸煮粉碎後ペーストにした¹⁸⁾。それをオートクレーブ滅菌したあと、デキストロース水溶液を添加し滅菌シャーレに注ぎ込んでジャガイモ-デキストロース平板を調製した。これに *M. alpina* を接種し 25℃ で 20 日間培養後、培養物全体をアミラーゼ水溶液に添加してジャガイモの大半を除去した。さらに水洗を繰り返し、脱水乾燥後、脂質抽出/分析を行ったところ、AA 収率は 13.1 g/kg-培地に到達した。

しかし従来の設備を利用した AA の工業的生産を目指した場合、ジャガイモの価格、培地調製の煩雑さ、培地面積の確保等が問題であった。そこで液体培養のための安価な窒素源を探索した。第 1 候補として (小麦フスマ + ペプトン) が選択され、フラスコスケールから 500 L の発酵槽まで検討して、最終的に脂肪酸中の AA 組成は 71.2%, 収率 11.1 g/L¹⁹⁾ に到達した。固体培養や液体培養における AA 収率の高さは、菌体収量や脂質含量の高さによるものではなく、脂質中の AA 組成比の高いことに起因していた (後述)。その後、小麦フスマも次第に大量入手が困難となったが、昨今ではジャガイモタンパク粉末が入手可能となり、全く遜色のない収率が期待できることとなった³⁶⁾。また大豆粉を用いた大量培養も行われ収率 10.9 g/L^{37,38)} が達成された。

他方、合成培地を用いた液体培養も検討された。窒素源として硝酸アンモニウムや硫酸アンモニウムを用いた場合、最適と考えられるミネラルミックス³⁹⁾を添加しても、菌体はほとんど成長しなかった。硝酸ナトリウムの場合、前二者の無機塩よりやや *M. alpina* の成長が良かった (6.5 g/L) が、GLA の工業生産にみられるような収率とは程遠かった。これより *M. alpina* は無機窒素を資化することはほとんどできないと判断した。

天然培地でよい成長がみられたことより、アミノ酸を用いた培地を次に検討した。ジャガイモ中のタンパク質を構成するアミノ酸の混合物を窒素源とし、19 種のミネラルミックスと共に培養すると、菌の成長もよく AA

の収率もジャガイモタンパク粉末を使用したときに匹敵した⁴⁰⁾。しかし、構成アミノ酸を個々に窒素源とした場合、アラニン、プロリン、アスパラギン、グリシン、チロシン、アルギニン等は良い成長をもたらしたが、メチオニン、フェニルアラニン、イソロイシン等はまったく栄養源とならなかった⁴¹⁾。

窒素源として尿素を試験してみたところ、浸透圧が低い 10 g/L の尿素濃度範囲までは、ジャガイモタンパク粉末を用いた液体培地と同様の良好な結果を得た⁴⁰⁾。AA のフラスコ培養の収率は、尿素濃度 2.14 g/L のとき最高値を示し、*M. alpina* の大量液体培養には尿素、ミネラルミックス、糖からなる合成培地を応用する道が開けた。

M. alpina のミネラル要求性は、構成アミノ酸組成が類似したコーンペプチドとジャガイモタンパク粉末を個々に窒素源として培養に用いた場合に顕著に現れる。後者はミネラルをまったく添加しなくても、菌体は順調に成長し、脂質も蓄積された。しかし、前者はミネラル添加なしではほとんど成長しなかった⁴¹⁾。ミネラルの添加効果の大きい順は、リン酸二水素カリウム > 硫酸マグネシウム > 硫酸亜鉛 > 硫酸鉄 (II) > 塩化マンガン > 硫酸銅 > 塩化カルシウム⁴²⁾であった。

5 γ -リノレン酸生産菌との比較

前項で、*M. alpina* の高い AA 生産性は、蓄積される脂肪酸中の AA 組成比が高いことに起因することを述べたが、*M. alpina* の液体培養による AA 生産¹⁹⁾を *M. ramanniana* var. *angulispora*⁴¹⁾による γ -リノレン酸の生産と 20 L 培養スケールで比較してみた (Table 2)。

M. ramanniana var. *angulispora* の至適糖濃度は 200 g/L と *M. alpina* の 2 倍であり、その結果培地当たりの菌体量、脂質量ともに高く、乾燥菌体量当たりの脂質量も高かった。*M. alpina* は AA 組成比のみが高いことにより AA 収率が上がったことがわかる。

Table 2 Fermentation of Arachidonic Acid (AA) by *Mortierella alpina* and γ -Linolenic Acid (GLA) by *Mortierella ramanniana* var. *angulispora* in a 20-L Scale.

<i>Mortierella</i>	Glucose concentration (g/L)	Dry cell weight (g/L)	Total lipid (g/L)	Lipid content (g/g DCW)	AA or GLA content in fatty acids(%)	AA or GLA yield (g/L)
<i>alpina</i>	100	41.4	14.0*	0.338	65.1	9.11
<i>ramanniana</i> var. <i>angulispora</i>	200	77.6	31.2	0.402	6.3**	2.0**

* as fatty acid methyl esters

** estimated from the graph (Fig.5-15) in literature⁴²⁾.

6 アラキドン酸組成の上昇する要因

6.1 培地形体

固体培地培養のほうが、液体培地培養より AA 組成の上昇が速かった。また、同じ培養時間でジャガイモ-デキストロース-寒天培地とジャガイモ-デキストロース平板での培養脂質を比較すると、寒天培地において AA 組成が高かった^{18,20)}。AA 組成比は菌への糖の供給量に反比例していた。寒天組織や平板に分散した糖が栄養菌糸にとりこまれ、分裂増殖して気中菌糸が伸びるため、栄養供給量の多い栄養菌糸のほうが当然多量に成長する。気中菌糸は栄養供給されにくいいため、時間経過と共に栄養菌糸よりも早く飢餓状態となり蓄積脂肪酸を異化してエネルギーを獲得し、分解しにくい AA が最終代謝産物として蓄積してくると思われる。したがって気中菌糸脂質中の AA 組成のほうが栄養菌糸のそれよりも高い値となった²⁰⁾。しかし気中菌糸は最終的には AA も消費して死滅する。液体培地であれば、固体培地よりも菌体全体への糖の供給が容易におこなわれるので飢餓状態も起こりにくい。

6.2 培地中の糖濃度

M. alpina の耐糖濃度は、固体培地では 9 g/L¹⁸⁾、液体培地では 20 g/L¹⁹⁾ 付近であった。糖濃度が低いと成長する菌体は少なく、AA 組成は高かった。反対に耐糖濃度以下で糖濃度が高いと菌体は多いが、AA 組成は低かった。それゆえ、AA の最高収率を得るためには、耐糖濃度付近で高速攪拌培養して最終的に飢餓状態にするか、低糖濃度で培養を進め、糖を培養中に追加してゆく方法⁴³⁾がある。また、後述するように液体培地中の糖濃度が高い場合は菌形態がパルプ状に留まりやすく、AA 組成が上昇しない一因にもなる。

6.3 培養温度

M. alpina をジャガイモ-デキストロース平板上に接種し 15℃から 28℃の各温度で培養後、成長した気中菌糸と栄養菌糸を併せた菌体の脂質分析をした。その結果、AA 組成が低温下では高く、高温下では低値に留まることがわかった。培地当たりの AA 収率は 20℃で最高値を示した²⁴⁾。

6.4 培養時間

20℃の液体培養¹⁹⁾では 17 日、固体培養²⁴⁾では培養 20 日の間、経時的に菌体量、AA 組成、AA 収率ともに上昇した。培地中に糖が存在するかぎり菌体量と脂質は増加するが、糖濃度が 1 g/L 程度に低下すると、それまでに蓄積した脂質を徐々に代謝・分解してエネルギーを獲得した。代謝が始まると、一番組成比の高いパルミチン酸が急激に減少するとともに、鎖長延長と不飽和化反応

を経て AA が増加した²⁰⁾。ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、 γ -リノレン酸も経時的に減少した¹⁹⁾。前述の液体培養で糖濃度を低く保つことによって、飢餓状態に近い状態で培養（適宜糖を追加）する場合は、菌体量の増加に制限がかかるが、短時間に AA 組成の上昇を促進することができた^{38,43)}。

6.5 物理的要因

M. alpina を液体培地中で攪拌培養する場合、初期に成長する菌体はフィラメントあるいはパルプ状であるが、その後攪拌速度により菌形態が異なってくる^{19,44~46)}。すなわち高速攪拌では米粒様のペレットに形態変化した。これは、単にパルプが物理的な力によって圧縮されたのではなく、中空でその表面は蒸煮した大豆の皮のように密で硬く、*M. alpina* の多形性を示している。このとき形態変化と同時に脂肪酸組成も大きく変化する。パルプ状菌体では培養日数が 20 日間で、AA 組成が 30% 程度にしか到達しないが、ペレット状菌体では 70% を越えた¹⁹⁾。高速攪拌（例えば 200 rpm/500 L 培養槽）により培地中に酸素が十分に供給されて、好気性の真菌の成長を促進する一方、糖が活発に消費されることにより早期に飢餓状態になり、酸素を必要とする脂肪酸の不飽和化反応⁴⁷⁾が進行しやすくなると考えられた。また、攪拌による剪断力が菌体をペレット化する要因も否定できない。坂口フラスコを用いた剪断力の小さい均一液体振盪培養では、通常パルプ状菌体が成長するが、窒素源を小麦フスマとするとペレットが生育しやすく（未発表データ）、固体のフスマが絶え間なく菌に衝突するためと考察した。さらに、ペレット化のためにエネルギーが一部消費される⁴⁸⁾ので、一層飢餓状態に近づき AA 組成が上昇した。また物理的要因が小さい場合、リン酸二水素カリウムと硫酸マグネシウムの添加比を調整することにより、菌体をペレット化することが可能であった⁴⁸⁾。

7 PG 合成能

M. alpina が高い AA 合成能を有していることから PG 合成能も期待できるのではないかと推測の下に、糸状菌 180 株、バクテリア 77 株、酵母 18 株、計 275 株の PG の発酵生産性が検討されている²³⁾。ニュートリエントアガーまたはブドウ糖ペプトン培地中 26℃で 1~10 日間微生物を振盪培養後、培養液から酢酸エチルをもちいて抽出し PG 粗画分を得た。これを HPLC により PGE₁、PGE₂、PGF_{2 α} 画分に分画/分取し、雄性ラットより摘出した胃底部組織切片の筋収縮によるバイオアッセイとプロスタグランジンラジオイムノアッセイキットにより定量分析を行った結果、糸状菌 8 株、バクテリア 3 株に 3 種の PG が発酵生産されていることが判明した。

Table 3 Fungal Production of Prostaglandins.

Fungi		Prostaglandins produced ($\mu\text{g/L}$)		
		PGE ₁	PGE ₂	PGF _{2α}
<i>Aspergillus candidus</i>	IFO 4389	0.21	0.68	0.06
<i>Aspergillus cellulosa</i>	IFO 4040	0.12	0.24	0.04
<i>Aspergillus niger</i>	IAM 3001	0.12	0.60	0.05
<i>Mortierella alpina</i>	ATCC 36965	0.29	2.55	0.93
<i>Mortierella alpina</i>	IFO 8568	0.59	5.45	2.70
<i>Mortierella elongata</i>	IFO 8570	2.52	5.55	5.10
<i>Mortierella humicola</i>	IFO 8289	0.2	0.26	0.02
<i>Hypocrea splendens</i>	IFO 7711	0.21	0.75	0.06

Revised from I. Nakajima, K. Suzaki and K. Oba, *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, 47, 867-871 (1998) by permission of Japan Oil Chemists' Society.

そのうち Table 3 には生産性の良好な糸状菌の結果のみを示した。*M. alpina* に強い PGE₂ 活性が認められたが、他の PG 生産菌もすべて（主に n-6 系）不飽和脂肪酸の生産菌であった。また、上記の培養系に AA を添加しても *A. niger*, *M. alpina* (IFO 8568), *M. elongata*, *M. humicola* は PG への変換能を示した。PG の安定性は極めて低いことが知られているが、数日間の培養中、徐々に PG 量が増加したことから、安定した性能が保持されていたことにも興味をもたれる。

8 おわりに

M. alpina の特異性をいくつかの面から説明した。本菌の特異性の根源は、一連の脂肪酸不飽和化酵素と鎖長延長酵素に基づく顕著に高い AA 生産性である。その成長には糖のほかに有機窒素と数種のミネラルが必須であり、ジャガイモや小麦フスマ、大豆が入手容易な供給源であった。ジャガイモタンパク粉末や（尿素＋ミネラル）でも代替可能であった。成長した菌体内に蓄積された脂肪酸は、培地中の糖の消費に伴い異化され、同時に代謝されて AA に変換される。このことより脂肪酸の β 酸化（NAD⁺ が必要）と不飽和化反応（NADH が必要）⁴⁷⁾ が NAD⁺ $\rightleftharpoons$ NADH+H⁺ の反応を介して連動しているのではないかと、すなわち *M. alpina* は飢餓状態に陥ると、エネルギー産生のために不飽和化反応が必然的に起こると推察している。*M. alpina* において、AA は代謝最終産物であるので脂肪酸中の AA 組成比が上がりやすいことも特徴である。GLA やジホモ- γ -リノレン酸、EPA のような脂肪酸は、それぞれの後続の合成反応酵素が存在する場合、その反応が進行して蓄積されないため組成比が上昇しない。

また、*M. alpina* は脂肪酸代謝系のモデルとしても興味はつきない。*M. alpina* にとって PG 生産の目的は何

であろうか？ 平滑筋収縮や胃酸分泌抑制といった効果では説明がつかないことは当然である。最後にアズキやタバコに *M. alpina* の脂肪酸合成酵素と鎖長延長酵素の遺伝子を導入してジホモ- γ -リノレン酸を生産できることが報告されている⁴⁹⁾。今後は栽培しやすい大豆を用いて形質転換技術を進展させ、脂肪酸組成を改変した品種の開発がめざされていくであろう。

文 献

- 1) 鈴木修, 山科孝雄, 横地俊弘, 油化学, 30, 854 (1981).
- 2) 鈴木修, 横地俊弘, 山科孝雄, 油化学, 30, 863 (1982).
- 3) 横地俊弘, 鈴木修, 油化学, 38, 1007 (1989).
- 4) R.H. Haskins, A.P. Tulloch & R.G. Micetich, *Can. J. Microbiol.*, 10, 187 (1964).
- 5) D. Tyrrell, *Can. J. Microbiol.*, 13, 755 (1967).
- 6) 飯塚 廣, 特開昭 52-64482 (1977).
- 7) 飯塚 廣, 特開昭 52-64483 (1977).
- 8) 飯塚 廣, 特開昭 52-64484 (1977).
- 9) 吉栖肇, 天地輝夫, 久住高章, 田中隆治, 石郷岡博, 特開昭 59-152307 (1984).
- 10) H. Yamada, S. Shimizu & Y. Shinmen, *Agric. Biol. Chem.*, 51, 785 (1987).
- 11) 戸谷永生, 砂崎和彦, 工藤俊博, 特願 1985-212168 (1985).
- 12) 戸谷永生, 砂崎和彦, 工藤俊博, 特願 1985-218558 (1985).
- 13) 戸谷永生, 砂崎和彦, 工藤俊博, 特願 1986-73450 (1986).
- 14) 戸谷永生, 砂崎和彦, 工藤俊博, 特願 1986-211267 (1986).
- 15) 戸谷永生, 砂崎和彦, 工藤俊博, ヨーロッパ特願 8611388.8 (1986).
- 16) 戸谷永生, 砂崎和彦, 工藤俊博, アメリカ特願 910, 605 (1986).
- 17) 戸谷永生, 砂崎和彦, 工藤俊博, 日本特許 2138405 (1998).
- 18) N. Totani, A. Watanabe & K. Oba, *J. Jpn. Oil Chem.*

- Soc.*, 36, 328 (1987).
- 19) N. Totani, K. Someya & K. Oba, *Industrial Application of Single Cell Oils*, Am. Oil Chem. Soc., pp.52-60 (1992).
 - 20) N. Totani & K. Oba, *Lipids*, 22, 1060 (1987).
 - 21) H. Yamada, S. Shimizu, Y. Shinmen, H. Kawashima & K. Akimoto, *World Conf. On Biotech. For the Fats and Oil Industry*, 173 (1988).
 - 22) T. Nakahara, オレオサイエンス, 1, 841 (2001).
 - 23) 中島一郎, 砂崎和彦, 大場健吉, 油化学, 47, 867 (1998).
 - 24) N. Totani & K. Oba, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 28, 135 (1988).
 - 25) T. Sakamoto, H. Wada, I. Nishida, M. Ohmori & N. Murata, *Plant Mol. Biol.*, 24, 643 (1994).
 - 26) N. Murata, P. Deshnum & Y. Tasaka, *Metabolism and Its Roles in Nutrition and Medicine* (Huang, Y.-S., and Milles, D.E., eds.) AOCS Press, Champaign, pp.22-32 (1996).
 - 27) J. Okuley, J. Lightner, K. Feldmann, N. Yadav, E. Lark & J. Browse, *Plant Cell*, 6, 147 (1994).
 - 28) E.P. Heppard, A.J. Kinney, K.L. Stecca & G.-H. Miao, *Plant Physiol.*, 110, 311 (1996).
 - 29) C. Kirsch, K. Hahlbrock & I.E. Somssich, *Plant Physiol.*, 115, 283 (1997).
 - 30) A.S. Reddy, M.L. Nuccio, L.M. Gross & T.L. Thomas, *Plant Mol. Biol.*, 27, 293 (1993).
 - 31) O. Sayanova, M.A. Smith, P. Lapinsk, A.K. Stobart, G. Dobson, W.W. Christie, P.R. Shewry & J.A. Napier, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 4211 (1997).
 - 32) J.A. Napier, S.J. Hey, D.J. Lacey & P.R. Shewry, *Biochem. J.*, 330, 611 (1998).
 - 33) D.S. Knutzon, J.M. Thurmond, Y.-S. Huang, S. Chaudhary, E.G. Bobik, Jr., G.M. Chan, S.J. Kirchner & P. Mukerji, *J. Biol. Chem.*, 273, 29360 (1998).
 - 34) L.V. Michaelson, C.M. Lazarus, G. Griffiths, J.A. Napier & A.K. Stobart, *J. Biol. Chem.*, 273, 19055 (1998).
 - 35) Y.-S. Huang, S. Chaudhary, J.M. Thurmond, E.G. Bobik, Jr., L. Yuan, G.M. Chan, S.J. Kirchner, P. Mukerji & D.S. Knutzon, *Lipids*, 34, 649 (1999).
 - 36) 戸谷永生, 兵頭佳代子, 山口彩子, 上田隆史, 日本油化学会誌, 49, 479 (2000).
 - 37) K. Higashiyama, T. Yaguchi, K. Akimoto, S. Fujikawa & S. Shimizu, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 75, 1501 (1998).
 - 38) K. Higashiyama, T. Yaguchi, K. Akimoto, S. Fujikawa & S. Shimizu, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 75, 1815 (1998).
 - 39) 戸谷永生, 三宅沢子, 山口彩子, 上田隆史, *JCBL*, 41, 256 (1999).
 - 40) 戸谷永生, 兵頭佳代子, 上田隆史, *JCBL*, 42, 250 (2000).
 - 41) 戸谷永生, 兵頭佳代子, 上田隆史, 日本油化学会誌, 49, 487 (2000).
 - 42) T. Nakahara, T. Yokochi, Y. Kamisaka & O. Suzuki, *Industrial Application of Single Cell Oils*, Am. Oil Chem. Soc., pp.61-97 (1992).
 - 43) N. Totani & K. Oba, *Abstract of ISF-JOCS World Congress 1988*, 8S01 (1988).
 - 44) 藤川茂昭, 東山堅一, 清水昌, バイオインダストリー, 57, 818 (1999).
 - 45) K. Higashiyama, S. Fujikawa, E. Park & M. Okabe, *J. Biosci. Bioeng.*, 87, 489 (1999).
 - 46) T. Hamanaka, K. Higashiyama, E. Fujikawa & E.Y. Park, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 56, 233 (2001).
 - 47) D. Voet & J. Voet, *Biochemistry*, John Wiley & Sons, Inc., pp. 589-590 (1995).
 - 48) N. Totani, A. Yamaguchi, M. Yawata & T. Ueda, *J. Oleo Sci.*, 51, 531 (2002).
 - 49) 化学工業日報, 2002年1月23日版(9).