

微生物による高度不飽和脂肪酸の生産

清水 昌 (京都大学農学部農芸化学科教授)

1. はじめに

動物は一般にリノール酸や α -リノレン酸を合成する能力がないので、これらの高度不飽和脂肪酸 (PUFA) は植物性食品を摂取することでまかなわれる。摂取されたリノール酸、 α -リノレン酸は Fig. 1 に示した生合成経路に従って、不飽和化と炭素鎖の延長を繰り返して、 γ -リノレン酸、ジホモ- γ -リノレン酸、アラキドン酸あるいはエイコサペンタエン酸 (EPA) などさらに不飽和度の高い PUFA に変換される。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、血圧、ホルモン分泌系、免疫系などの調節などで様々な機能を有する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脂肪酸である。

健康人では、リノール酸や α -リノレン酸に富

む食品を摂取すれば、Fig. 1 に示した経路に従って、これらの PUFA が合成され、それぞれの機能を発揮するが、糖尿病、高血圧やがんの成人病患者やその予備軍、乳児、老人では生合成系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ため、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、 $n-3$ 系 PUFA と $n-6$ 系 PUFA をバランスよく摂取すること、できれば $n-3 = \text{EPA}$ 、 $n-6 = \text{リノール酸}$ 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 あるいはこれを含有する油脂を医薬品、機能性食品、飼料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。

一方、これらの油脂の供給源に目を向けると、EPA 源としての魚油以外には、PUFA を豊富に

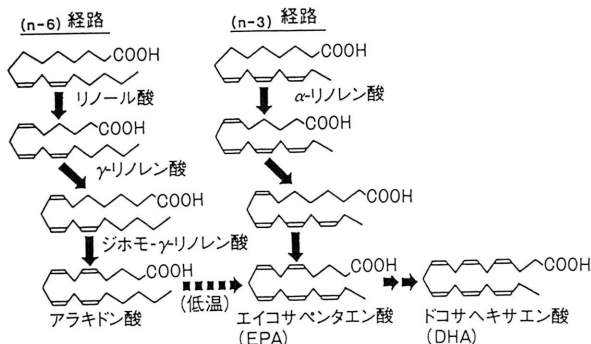


Fig. 1 The n-6 and n-3 route for the biosynthesis of polyunsaturated fatty acids.

含むものは乏しく、種子 (γ -リノレン酸)、動物臓器 (アラキドン酸) などあまり実用的とはいえないものが知られているにすぎない。又、これらの供給源も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。従って、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て活発な研究が行われるようになった。

ここでは、われわれが京都の土壌から分離したアラキドン酸生産性の糸状菌 *Mortierella alpina* 1S-4 株を用いて行った炭素数20の PUFA 生産に関する研究について、浦上食品・食文化振興財団からの助成によって得られた成果を含め、これまでに得られた成果の概略を記す。

2. アラキドン酸の生産^{1,2)}

アラキドン酸を菌体の構成脂肪酸として含む微生物が存在することは知られていたが、生産性を含めて微生物による生産の可能性が示されたのは、

土壌から分離された *Mortierella* 属 *Mortierella* 亜属の糸状菌によるものが最初である。われわれは、これらの分離菌の中で、アラキドン酸生産能力が高く、菌株の安定性など大量生産に適した株として *M. alpina* 1S-4 株を選んで、生産条件を検討した。*Mortierella* 亜属は γ -リノレン酸生産菌である *Micromucor* 亜属 (この亜属の菌株はジホモ- γ -リノレン酸、アラキドン酸などの炭素鎖が20の PUFA を生合成できない) と比べると、高グルコース濃度に対する耐性が弱い、2~4%濃度を保ちながら培養するとよく生育し、4~6日間の培養で3~4 g/lのアラキドン酸生産が可能となった (菌体収量30 g/l; 脂質含量420 g/g 乾燥菌体; アラキドン酸含量147mg/g 乾燥菌体)。本菌は、アラキドン酸含量が高いことが特徴的であり、菌体中の全脂肪酸中のアラキドン酸含量は30~70%に達する (Table 1)。培養後の菌体は熱乾燥することで、長期間、酸化に対して安定であり、よってアラキドン酸含量の高い微生物油脂の大量生産が可能となった。

Table 1 Fatty acid compositions of the oil produced by *Mortierella alpina* 1S-4.

Fatty acid	Composition (weight %)		
	DGLA oil	ARA oil	
		type 1	type 2
Myristic acid (14:0)	1.9	0.7	0.3
Palmitic acid (16:0)	24.1	17.0	7.0
Palmitoleic acid (16:1)	0.4	0.3	0.4
Stearic acid (18:0)	7.0	8.8	2.8
Oleic acid (18:1)	20.1	22.1	6.6
Linoleic acid (18:2)	6.6	9.8	5.9
γ -Linolenic acid (18:3 γ)	4.1	3.1	3.9
Eicosenoic acid (20:1)	0.3	0.8	0.7
Eicosadienoic acid (20:2)	0.5	0.7	1.1
Dihomo- γ -linolenic acid (20:3)	23.1	7.9	3.9
Arachidonic acid (20:4)	11.2	29.8	67.4
Total fatty acid content	790-810 g/kg oil		

ARA=arachidonic acid. DGLA=dihomo- γ -linolenic acid.

3. ジホモ- γ -リノレン酸の生産^{3,4)}

Fig.1 に示したように、ジホモ- γ -リノレン酸がさらに不飽和化を受けるとアラキドン酸となる(Δ5 不飽和化反応)。したがって、この反応を抑制すればジホモ- γ -リノレン酸が多量に蓄積するはずである。われわれは、Δ5 不飽和化反応の阻害剤の探索を行った。その結果、ゴマ油を培地に加えて *M. alpina* 1S-4 を培養すると、アラキドン酸とジホモ- γ -リノレン酸の生成割合が逆転し、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。たとえば、3%のゴマ油とともに培養すると、ジホモ- γ -リノレン酸の生産量は2.2 g/l に上昇し、アラキドン酸の生産量は0.7 g/l に減少した。両 PUFA の生産量の和は、ゴマ油を加えないで培養したときの生産量と大差がないこと、同じ現象が他のアラキドン酸生産菌でも観察されること、また、この現象がゴマ油の脂肪酸組成とは無関係に起こることなどから、ゴマ油中に Δ5 不飽和化酵素を特異的に抑制する微量因子が含まれているものと推測した。

実際の生産では、アラキドン酸生産用の培地にゴマ油のアセトン抽出物を0.03~0.06% (ゴマ油1.5~3%に相当) 添加した培地あるいはゴマの搾り糟を添加したものを生産培地として用いる。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 (107mg/g 乾燥菌体)、1.1 g/l である。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(Table 1)。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。

4. EPA の生産⁵⁻⁸⁾

EPA はクロレラなどの微小藻類や卵菌類にわずかに存在することが報告されているだけで、最

近まで微生物生産に関する報告は全くなかった。

Fig.1 に示すように、EPA は α -リノレン酸を前駆体としてn-3経路によって生成することが動物などで知られている。*Mortierella* 属のカビは動物と同じく α -リノレン酸を自ら生成する能力がなく、したがって、グルコースからn-3経路を経てEPAを生成することはできない。われわれは、(1)n-6経路を経て生成したジホモ- γ -リノレン酸あるいはアラキドン酸をEPAに変換できないか、(2)n-3経路の適当前駆体PUFAを培地に加えてこれをEPAに変換できないか、について検討した。

(1)については、培養温度を低温(6~12℃)にすることでEPAが新たに生成蓄積することを発見した。これは、*M. alpina* 1S-4の菌体中にアラキドン酸のメチル基末端側へ2重結合を導入してEPAとする不飽和化酵素が存在すること、この酵素は低温、高温(20~30℃)どちらの培養条件でも生産されるが、酵素活性は低温条件下でのみ発現することに基づくことが明らかとなった。この現象は、アラキドン酸を生産できる菌株ならほとんど例外なく観察されること、温度が低くなるほど菌体中の総脂肪酸中に占めるEPAの割合が高くなること(*M. alpina* 1S-4では6℃で約15%)も判明した。*M. alpina* 1S-4の場合、生成したEPAの約70%はリン脂質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グリセリド中に含まれることと対照的であり、EPAが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。

(2)については、 α -リノレン酸を含む培地で*M. alpina* 1S-4を培養すると微量のEPAが生成することから、この菌にもn-3経路が存在することを認めた。そこで、安価な α -リノレン酸源としてのアマニ油(脂肪酸組成で約60%含む)に着目し、これをEPA含有脂へと変換させることを

試みた。*M. alpina* 1S-4 はアマニ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高温条件下でも 1.35 g/l の EPA を生産した。通常の培養温度 (20~30℃) における EPA 生産の可能性が示されたことは、低温培養が菌の生育速度や冷却エネルギーコストの点で問題があるため、実用的にはきわめて意義深にことと言える。また、(1)と(2)の条件を組み合わせると EPA の生産量はさらに増大し約 2 g/l に達する。

5. ゴマ油から単離された $\Delta 5$ 不飽和化酵素阻害剤⁹⁾

先に述べたようにゴマ油には $\Delta 5$ 不飽和化酵素を特異的に抑制する因子が存在すると考えられる。*M. alpina* 1S-4 のジホモ- γ -リノレン酸とアラキドン酸の生成比の変化を指標にしてゴマ油から活性物質の単離を行い、セサミン、エピセサミン、セサミノール、などの 3, 7-ジオキサビシクロ [3, 3, 0] オクタン環を有する数種の化合物を得た (Fig. 2)。ジホモ- γ -リノレン酸の生産を促進す

る活性は、セサミン>セサミノール>エピセサミンの順に強く、セサモリンは菌による分解を受けて活性を示さなかった。一方、*M. alpina* 1S-4 の無細胞抽出液を用い酵素活性を指標にすると、いずれの化合物も $\Delta 5$ 不飽和化酵素のみを強く阻害し、炭素数18の脂肪酸の不飽和化反応 (すなわち、ステアリン酸→オレイン酸、オレイン酸→リノール酸、リノール酸→ γ -リノレン酸への変換) に関与する $\Delta 9$, $\Delta 12$ および $\Delta 6$ 不飽和化酵素は全く影響を受けないことが判明した (Fig. 3)。同様の実験をラット肝ミクロソームを用いて行うと、やはり $\Delta 5$ 不飽和化酵素のみが特異的に阻害され、セサミンが微生物のみならず動物においても有効な阻害剤であることが確認された。いずれの化合物も非拮抗的に $\Delta 5$ 不飽和化酵素を阻害することから、酵素が基質の結合部位とは異なるセサミンに特異的な結合部位を有するものと思われる。

6. おわりに

以上、*M. alpina* 1S-4 による炭素数20の PUFA の生産について、われわれが得た成果を要約

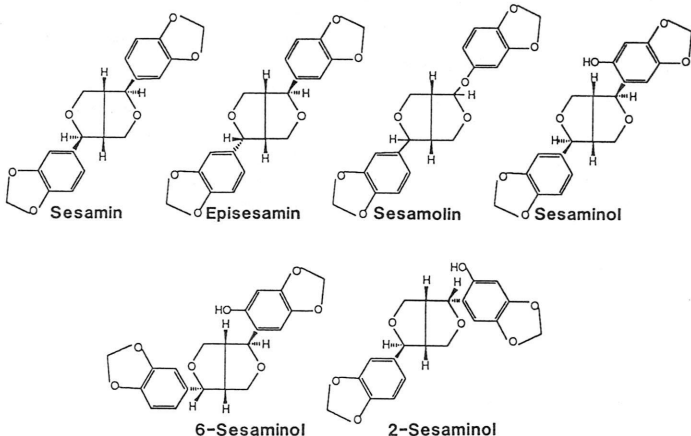


Fig. 2 $\Delta 5$ Desaturase inhibitors isolated from sesame seeds or oil.

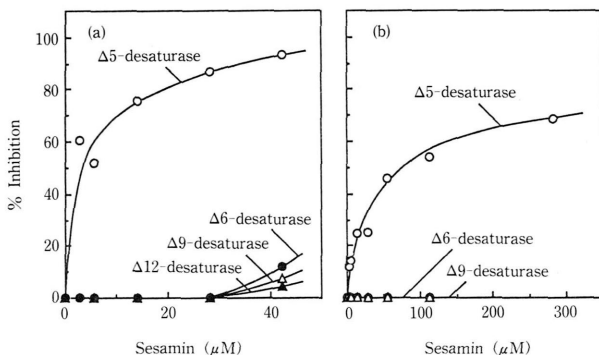


Fig. 3 Specific inhibition of $\Delta 5$ desaturase of *Mortierella alpina* (a) and rat liver (b) by sesamin.

した。また、これらの研究の中からゴマ油に含まれるセサミンのユニークな作用が発見された。セサミンは天然の $\Delta 5$ 不飽和化酵素阻害剤としては、世界で初めて見いだされたものであり、動物の系でも $\Delta 5$ 不飽和化酵素を特異的に阻害すること、セサミンを飼料に加えたラットやマウスでは肝臓のジホモ- γ -リノレン酸とアラキドン酸の比率が変化することなども明らかとなっている。従って、それぞれのPUFAに由来するプロスタグランジンの濃度も変動することも十分予想できる。これらのことは、古来からの健康食品としてのゴマあるいはゴマ油の作用点を考える上でも興味深いことである。

文 献

- 1) H. Yamada, S. Shimizu and Y. Shinmen, *Agric. Biol. Chem.*, 51 785 (1987).
- 2) Y. Shinmen, S. Shimizu, K. Akimoto, H. Kawashima and H. Yamada *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 31 11., (1989).
- 3) S. Shimizu, K. Akimoto, H. Kawashima, Y. Shinmen and H. Yamada, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 66 237 (1989).
- 4) S. Shimizu, K. Akimoto, H. Kawashima, Y. Shinmen, S. Jareonkitmongkol and H. Yamada, *Agric. Biol. Chem.*, 53 1437 (1989).
- 5) S. Shimizu, Y. Shinmen, H. Kawashima, K. Akimoto and H. Yamada, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 150 335 (1988).
- 6) S. Shimizu, H. Kawashima, Y. Shinmen, K. Akimoto and H. Yamada, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 65 1455 (1988).
- 7) S. Shimizu, H. Kawashima, Y. Shinmen, K. Akimoto and H. Yamada, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 66 341 (1989).
- 8) S. Shimizu, H. Kawashima, K. Akimoto, Y. Shinmen and H. Yamada, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 32 1 (1989).
- 9) S. Shimizu, K. Akimoto, Y. Shinmen, H. Kawashima, M. Sugano and H. Yamada *Lipids*, 26 512 (1991).

Production of Polyunsaturated Fatty Acids by Microorganisms

Sakayu Shimizu (Department of Agricultural Chemistry, Kyoto University)

There are many advantages of using microorganisms as practical sources of long chain polyunsaturated fatty acids (PUFAs). After searching a wide variety of microorganisms, fungal mycelia were found to be new and rich sources of C-20 PUFAs of dietary and pharmacologically importance. A soil isolate, *Morhiarella alpina* 1S-4, produced 4.3g/l (274mg/g dry mycelia) of arachidonic acid (Ara) on cultivation in a conventional carbohydrate medium. The value accounted for more than 65% of the total fatty acids in the extracted lipids from the mycelia. Eicosapentaenoic acid (EPA) was also produced, when *M. alpina* was grown at lower temperature (i. e., 12°C). This temperature-dependent formation of EPA was found to be due to the activation of the enzyme, which catalyzes desaturation at the n-3 position of Ara, by low temperature. The fungus converted oils containing α -linolenic acid, such as linseed oil and perilla oil, to an oil containing EPA (yield, 1.88g/l). This conversion was independent of the growth temperature. When grown in the presence of sesame oil, the same fungus produced dihomogamma-linolenic acid (2.17g/l) with an accompanying marked decrease in Ara production. This was found to be due to specific inhibition of $\Delta 5$ desaturase by sesamin and related lignan compounds present in the oil. Rat liver microsomal $\Delta 5$ desaturase was also specifically inhibited by sesamin.