



第6回 油脂生産性糸状菌 *Mortierella alpina* による 機能性脂質生産

小川 順^{1)*}, 櫻谷英治¹⁾, 安藤晃規²⁾, 清水 昌^{1,3)}

¹⁾ 京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻 〒606-8502 京都市左京区北白川追分町

²⁾ 京都大学微生物科学寄付研究部門 〒606-8502 京都市左京区北白川追分町

³⁾ 京都学園大学バイオ環境学部 〒621-8555 京都府亀岡市曾我部町南条大谷 1-1

Functional lipid production by an oil-accumulating fungus *Mortierella alpina*

Jun Ogawa^{1)*}, Eiji Sakuradani¹⁾, Akinori Ando²⁾ and Sakayu Shimizu^{1,3)}

¹⁾Division of Applied Life Sciences, Graduate School of Agriculture, Kyoto University

Kitashirakawa-oiwakecho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8502 Japan

²⁾Research Division of Microbial Sciences, Kyoto University

Kitashirakawa-oiwakecho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8502 Japan

³⁾Faculty of Bio-environmental Sciences, Kyoto Gakuen University

1-1 Nanzyo-otani, Sogabe-cho, Kameoka, Kyoto 621-8555, Japan

1. はじめに

1980年頃までは、微生物が大量に生成・蓄積することができる脂肪酸は、炭素数が18以下で不飽和結合数が1か2のものしか知られておらず、特徴的な脂肪酸を生産するとは認識されていなかった。その後、*Mucor*属や*Mortierella*属糸状菌がγ-リノレン酸(18:3n-6)やアラキドン酸(20:4n-6)を著量含有する油脂の生産菌株として見いだされた。これを契機に、微生物を用いて油糧植物や動物油脂からは得がたいユニークな機能性脂質を生産する試みが多方面からなされるようになり、いわゆる「発酵油脂 (Single Cell Oils)」の実用生産への道が拓かれた。以来、発酵油脂の研究を筆頭に、機能性脂質生産に微生物機能を活用する研究が最近の脂質工学研究における主要な分野となっており、新規な高機能性脂質を供給する手段として食品・医薬品分野から高い注目を集めている(小川ら, 2008)。

本稿では、我々が取り組んでいる微生物機能を活用する機能性脂質生産研究の中から、アラキドン酸生産

性糸状菌 *Mortierella alpina* を用いる様々な高度不飽和脂肪酸 (PUFA) 含有油脂の生産研究を紹介する。

2. *Mortierella alpina* による高度不飽和脂肪酸含有油脂の生産 (Sakuradani *et al.*, 2009; 櫻谷ら, 2009; Sakuradani & Shimizu, 2009)

アラキドン酸 (20:4n-6)、エイコサペンタエン酸 (EPA; 20:5n-3) などの高度不飽和脂肪酸 (PUFA) は、それ自体がユニークな生物活性を有すること、あるいはプロスタグランジン類の前駆体であることからその機能に注目が集まっている。筆者らは PUFA 含有油脂の新しい供給源を微生物に求め、糸状菌 *Mortierella alpina* 1S-4 株が脂質含量が高くアラキドン酸生産菌として優れた特性を有することを見いだした。現在、*M. alpina* 1S-4 を用い高密度培養することにより、高いアラキドン酸含量の油脂(トリアシルグリセロール)の工業的発酵生産が行われている。また、本菌から誘導した各種脂肪酸不飽和化酵素変異欠損株を用い PUFA 生合成の経路を分断あるいは変更することで、新しい生合成経路を作りだす試みも展開されており、n-9, n-6, n-3 系列の炭素数 20 の PUFA をはじめ、様々な PUFA を選択的に著量生産する技術が確立されて

*Corresponding author

E-mail: ogawa@kais.kyoto-u.ac.jp

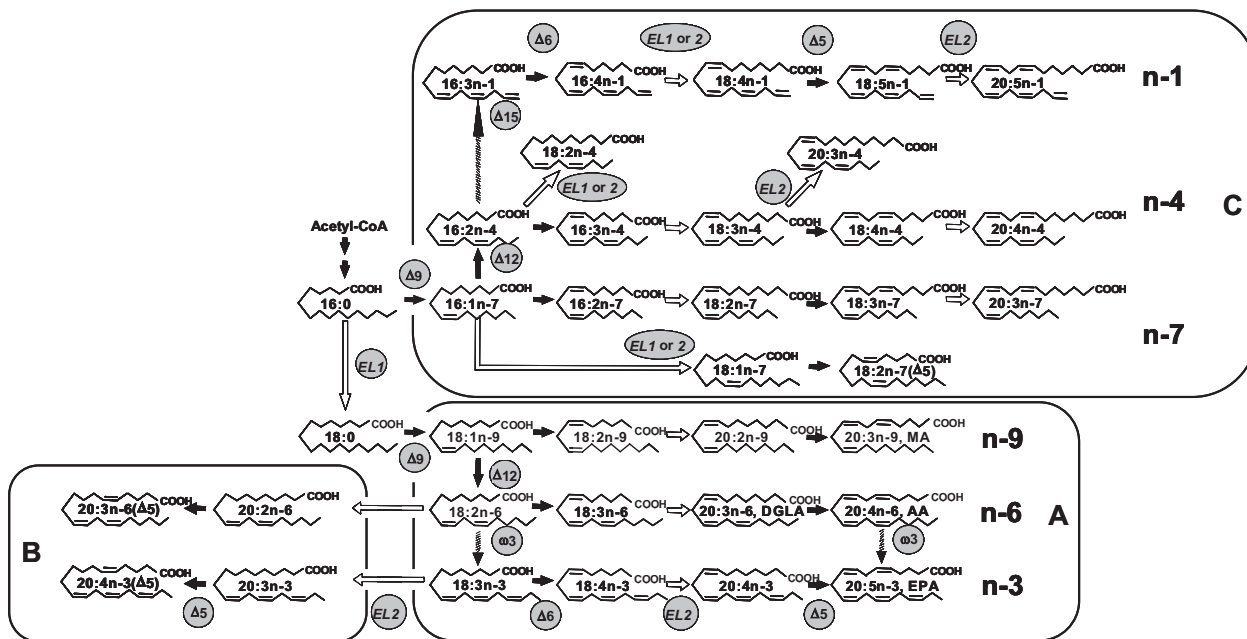


図1 糸状菌 *M. alpina* 1S-4 およびその変異株における PUFA の生合成経路

図中の $\Delta 9$, $\omega 3$ などは脂肪酸のそれぞれの番号の位置に二重結合を挿入する不飽和化酵素 (DS) を, EL は鎖長延長酵素を表す. AA; アラキドン酸, DGLA; ジホモ- γ -リノレン酸, MA; ミード酸

いる.

1) n-6 系 PUFA 含有油脂

M. alpina 1S-4 はグルコースを含む単純な培地によく生育しアラキドン酸を含むトリアシルグリセロールを菌体内に著量蓄積する. 最適条件下でのアラキドン酸生産量は 15-20 g/l に達し, 得られた菌体のトリアシルグリセロール含量は 500-600 mg/g 乾燥菌体, 油脂の全脂肪酸中のアラキドン酸量は 30-70% に達する. アラキドン酸はプロスタグランジンなどの前駆体として重要であるだけでなく, 乳児の発育に必須であることも注目されている.

アラキドン酸の生合成の前駆体であるジホモ- γ -リノレン酸 (DGLA; 20:3n-6) の生産は, 本菌の培地にゴマの抽出物を添加することで可能となる (図 1 A). これは胡麻種子中に含まれるセサミンが DGLA からアラキドン酸への変換に関与する $\Delta 5$ 不飽和化酵素を特異的に阻害するためである. 後に, *M. alpina* 1S-4 の胞子を変異処理することで得られた $\Delta 5$ 不飽和化酵素欠損変異株を用いる方法が開発され, 総脂肪酸中の DGLA 含量が 20-50% で, ほとんどアラキドン酸を含まない (1% 以下) DGLA 油脂の生産が可能となっている. ジホモ- γ -リノレン酸はアトピー性皮膚炎に有効であることが報告され注目されている.

2) n-9 系 PUFA 含有油脂

n-9 系 PUFA の生合成経路 (図 1 A) の最終生産物であるミード酸 (20:3n-9) は, 軟骨組織, 胎盤, 実験的に作製された必須脂肪酸欠乏動物などに微量存在する脂肪酸である. *M. alpina* 1S-4 から得た $\Delta 12$ 不飽和化酵素欠損変異株では, 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. このような変異株では, n-6 経路は機能せず, 本来ほとんど機能しないはずの n-9 経路が優勢となる. よって, 蓄積した 18:1n-9 は徐々にミード酸に変換される. 得られた油脂の構成脂肪酸は少量の飽和脂肪酸と 18:1n-9 以降の n-9 脂肪酸であり, ミード酸の含量は 33% に達する. これにより, これまで天然には存在しなかった n-9 系脂肪酸で構成されるユニークな油脂の生産が可能となった. ミード酸は関節炎に有効であることが報告され注目されている. また, $\Delta 12$ 不飽和化酵素欠損変異株より誘導した $\Delta 12$, $\Delta 5$ 不飽和化酵素 2 重欠損変異株を用いるとミード酸生合成の前駆体である *cis*-8, *cis*-11-エイコサジエン酸 (20:2n-9) の生産が可能である.

3) n-3 系 PUFA 含有油脂

M. alpina 1S-4 を 20°C 以下の低温で生育させると $\omega 3$ 不飽和化酵素が誘導生成する. 従って, n-6 経路を経

て生成蓄積したアラキドン酸は、本酵素反応によってさらに変換を受け EPA となる。この現象を利用すると、アラキドン酸と EPA を含む油脂の生産が可能となる。また、親株に代えて $\Delta 5$ 不飽和化酵素欠損株を用いると、DGLA から *cis*-8, *cis*-11, *cis*-14, *cis*-17-エイコサテトラエン酸 (20:4n-3) への変換も可能である。

M. alpina 1S-4 のユニークな性質として、炭素数 14, 16, 18 などの脂肪酸の効率良い取り込み能と炭素数 20 の PUFA への変換能がある。例えば、n-3 経路の親脂肪酸である α -リノレン酸 (18:3n-3) を培地に加えると、容易に EPA へ変換される。微生物変換の例とも言えるが、 α -リノレン酸源として安価で α -リノレン酸含量の高い (全脂肪酸の約 60%) アマニ油を含んだ培地で $\Delta 12$ 不飽和化酵素欠損変異株を培養すると、生成する油脂中の n-3 系 PUFA の割合は 47% (EPA, 20%; 18:3n-3, 20%; その他, 7%) となる (この場合、n-3 経路は n-9 経路に優先して機能する)。一方、アマニ油中のリノール酸に由来する n-6 系 PUFA の割合は 10-20% である。同様にアマニ油を含む培地で上記の $\Delta 12$, $\Delta 5$ 不飽和化酵素 2 重欠損変異株を培養すると、EPA の前駆体である 20:4n-3 が著量蓄積する。

4) メチレン非挿入型 PUFA 含有油脂

$\Delta 6$ 不飽和化酵素が欠損すると n-6 経路は $\Delta 6$ 不飽和化反応を省略して進行する (図 1 B)。すなわち、親脂肪酸である 18:2n-6 は鎖長延長酵素 (EL2) により直接鎖長延長され炭素数 20 の PUFA となり、さらに $\Delta 5$ 不飽和化酵素により不飽和化され、 $\Delta 8$ 位の 2 重結合が欠落した炭素数 20 の PUFA が生成する (18:2n-6 \rightarrow 20:2n-6 \rightarrow 20:3n-6 ($\Delta 5$))。同様のことは 18:3n-3 を親脂肪酸として n-3 経路でも起こる (18:3n-3 \rightarrow 20:3n-3 \rightarrow 20:4n-3 ($\Delta 5$))。

5) n-7, n-4, n-1 系 PUFA 含有油脂

炭素数 16 から 18 への鎖長延長反応に関与する酵素 (EL1) が部分的に欠失した変異株は 16:0 を著量蓄積する。本変異株の脂肪酸組成は複雑で、親株 (1S-4) が生成する脂肪酸以外に少なくとも 12 種の脂肪酸が検出される。これらの脂肪酸を炭素鎖長と 2 重結合の割合を指標に生合成順に並べたものを図 1 C に示した。本変異株で最初に起こる反応は、 $\Delta 9$ 不飽和化酵素による 16:0 から 16:1n-7 への変換である。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、 $\Delta 12$ 不飽和化酵素によって 16:2n-4 へと変換され n-4 経路の親脂肪酸として使用される。n-7 および n-4 経路において 16:1n-7, 16:2n-4 は $\Delta 6$ 不飽和化酵素によってそれぞれ 16:2n-7, 16:3n-4 へと変換される。また、16:2n-7, 16:3n-4 は鎖長延長酵素 (EL1 もしくは EL2), $\Delta 5$ 不飽和化酵素, 鎖長延長酵素 (EL2) によってさらに変換を受け、それぞれの経路の最終脂肪酸である 20:3n-7, 20:4n-4 へと変換される。従って、16:1n-7 は図 1 A の 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 経路に対応させることができる。これらの経路が機能する原因は、各経路の親脂肪酸 (16:1n-7, 16:2n-4) が $\Delta 6$ 不飽和化酵素の基質として同程度の親和性を有するからであろう。同様に図 1 C の n-1 経路は、図 1 A の n-3 経路に対応するとみなせる。この経路は本変異株では通常の培養条件下では機能しないが、この経路の親脂肪酸となる 16:3n-1 を培地に添加し微生物変換を行うことで 20:5n-1 の生産が可能となる。

6) 油脂の菌体外生産

培養液中にトリアシルグリセロールを総脂質の 10 ~ 40% 漏出する変異株を取得し、連続培養による総生産量の向上や脂質精製の簡便さにつながることを期待できる菌体外脂質生産の可能性を示した。様々な不飽和化酵素活性欠損変異株から脂質漏出変異株を誘導し、アラキドン酸だけでなくジホモ- γ -リノレン酸やミード酸の菌体外生産も可能とした。また、漏出脂質が培養液中に均一に分散することに寄与していると考えられる膜構成成分として、セレプロシドを同定した。脂質の菌体外漏出機構解明が今後の課題である。

3. PUFA 生合成に関与する酵素遺伝子の構造と機能の解明

図 1 で示した PUFA 生合成経路を分子レベルで解明するために、*M. alpina* 1S-4 の脂肪酸不飽和化反応に必要な電子伝達に関与するタンパク質および図 1 に示したすべての不飽和化酵素 (DS) と鎖長延長酵素 (EL) をコードする遺伝子の構造と機能を網羅的に解明した。具体的には、 $\Delta 9$ DS, $\Delta 12$ DS, $\Delta 6$ DS, ω 3DS, EL1, 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るとともに、 $\Delta 5$ DS, EL2 をクローニングした。すなわち、16:0 からの PUFA 生合成経路に関わる 2 種の EL (EL1, EL2) と 5 種の DS をコードする遺伝子すべてが解明されている。この他にも、24:0 あるいは 26:0 をそれぞれ 24:1n-9, 26:1n-9 に不飽

和化する ω 9DS 遺伝子や, 18:0 を 26:0 (18:0 → 20:0 → 22:0 → 24:0 → 26:0) まで鎖長延長する MAELO 遺伝子もクローニングされている.

M. alpina やその他の生物から得られた DS 遺伝子の情報を総合すると, Δ 4DS と Δ 5DS, Δ 6DS, Δ 8DS は N 末端に, 微生物由来の Δ 9DS と ω 9DS は C 末端にシトクロム b_5 様のモチーフが存在し, 一般のミクロソーム電子伝達系とは少し異なり, DS 自体が電子伝達にも関与していると考えられている. 一方, Δ 12DS と ω 3DS にはこのようなモチーフは存在せず, 電子伝達の仕組みも前者とは異なると考えられる. これらの特徴は, アミノ酸配列の相同性とも相関しており, Δ 4DS と Δ 5, Δ 6, Δ 8DS, Δ 9DS と ω 9DS, Δ 12DS と ω 3DS は互いに相同性が高いことが分かっている.

M. alpina 1S-4 には2つの Δ 9DS (Δ 9I と Δ 9II) と2つの Δ 6DS (Δ 6I と Δ 6II) が存在する. Δ 9DS あるいは Δ 6DS 活性低下変異株においては, それぞれ2

つのアイソザイムのうち Δ 9I と Δ 6I 遺伝子にのみ変異部位が存在する. 親株ではそれぞれのアイソザイムのうち Δ 9I, Δ 6I が主に機能し, 他方は発現せず休眠状態にある. 転写された方の遺伝子の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ことが判明している.

4. 宿主ベクター系の開発と分子育種株による PUFA 生産

薬剤耐性とウラシル要求性を指標とし, *M. alpina* 1S-4 の胞子に対してパーティクルガン法やアグロバクテリウム法により遺伝子を導入する形質転換系を確立した. この技術を用いて, 表1で示すように不飽和化酵素や鎖長延長酵素の過剰発現, あるいは RNAi により, 様々な C20 PUFA の生産性を向上させることに成功した. さらに, これまでに取得した有用変異株の形質転換系も構築し, 変異株がもつ特性を利用した分子育種による PUFA 生産を可能とした. すなわち,

表1 *M. alpina* の分子育種による PUFA 生産

PUFA	宿主	ターゲット遺伝子	方法	生産技術の特徴
アラキドン酸	JT-180 (Δ 12DS 欠損株)	Δ 12DS	過剰発現	JT-180 は Δ 12DS 活性が欠損し, Δ 5DS と Δ 6DS 活性が高まった変異株である. Δ 12DS 活性を復帰させることでアラキドン酸生産性が高くなる.
アラキドン酸	野生株	EL2	過剰発現	アラキドン酸生合成の律速と考えられている EL2 活性を高めることでアラキドン酸生産性が高くなる (4.4 g/l).
20:3n-6 (Δ 5), 20:2n-6	野生株	Δ 6DS	RNAi	Δ 6DS 活性低下により 20:3n-6 (Δ 5), 20:2n-6 が蓄積する.
EPA	野生株	ω 3DS	過剰発現	EPA の生産性が高くなる (0.8 g/l, 30%).
20:4n-3	S14 (Δ 5DS 欠損株)	ω 3DS	過剰発現	20:4n-3 の生産性が高くなる (1.8 g/l, 35%).
ミード酸	野生株	Δ 12DS	RNAi	Δ 12DS 活性低下により 20:3n-6 (Δ 5), 20:2n-6 が蓄積する.
16:0, 16:1n-7	野生株	EL1	RNAi	EL1 活性低下により 16:0 が蓄積し, さらに Δ 9DS により 16:1n-7 が蓄積する.
n-4/n-7 PUFA	M1 (EL1 活性低下株)	MAELO	RNAi	アラキドン酸などの n-6 PUFA の割合が減少し, n-4/n-7 PUFA の生産性が高くなる.
n-7 PUFA	M1	Δ 12DS	RNAi	n-4 PUFA の割合が減少し, n-7 PUFA の生産性が高くなる.
18:0, PUFA	野生株	MAELO	RNAi	22:0, 24:0 が生合成されなくなり, 18:0 とそれに続く PUFA の生産性が高くなる.
22:4n-6, 22:5n-3	野生株	<i>PavELO</i> , ω 3DS	過剰発現	C20 PUFA を C22 PUFA へ変換する微細藻類 <i>Pavlova</i> sp. の elongase (<i>PavELO</i>) と <i>M. alpina</i> の ω 3DS 遺伝子の共発現により, 22:4n-6 と 22:5n-3 が生合成される.

アラキドン酸, ジホモ- γ -リノレン酸, ミード酸だけでなくエイコサペンタエン酸 (EPA; 20:5n-3) やエイコサテトラエン酸 (20:4n-3) といった n-3 PUFA の生産性向上に成功した。

5. まとめ

以上, 本稿では油脂生産性糸状菌 *M. alpina* 1S-4 における代謝工学的取り組み, ならびに変異株育種と分子育種を通して, これまで適当な供給源が知られていなかった種々の PUFA 含有油脂の生産が可能となってきたことを概説した。詳細については, 下記に挙げた総説論文の内容を参考にされたい (小川ら, 2008; Sakuradani *et al.*, 2009; 櫻谷ら, 2009; Sakuradani & Shimizu, 2009)。アラキドン酸, ジホモ- γ -リノレン酸, ならびにミード酸は, 大量供給が可能となったことで新たな機能が解明されてきたといえる。既に, アラキドン酸含有油脂は乳児用ミルクの添加物として, あるいは種々の乳製品の品質を高めるための素材として世界的に使用されている。今後, 様々な PUFA 含有油脂について, 栄養補助食品素材, 医薬品素材などへの用途開発に向けた需要の拡大が期待されるため, 本研究で開発した育種技術を駆使して, さらなる PUFA 含有油脂の安定供給を目指す必要がある。また, より多様な PUFA 分子種の提供を目指して, 腸内細菌を用いて PUFA を様々な機能性油脂 (共役脂肪酸, 部分飽和脂肪酸, 水酸化脂肪酸) へと変換する研究も活発化してきている (岸野・小川, 2010; Kishino *et al.*,

2009)。今後の展開に注目したい。

文献

- 岸野重信, 小川 順 2010. 脂肪酸誘導体の合成. BIO INDUSTRY 27: 32-37.
- Kishino, S., Ogawa, J., Yokozeki, K. & Shimizu, S. 2009. Microbial production of conjugated fatty acids. Lipid Technology 21: 177-181.
- 小川 順, 岸野重信, 櫻谷英治, 清水 昌 2008. 高度不飽和脂肪酸・共役脂肪酸含有油脂の微生物生産, 植田充美 (監修), 微生物によるものづくり—化学法に代わるホワイトバイオテクノロジーのすべて—, p. 85-91, シーエムシー出版, 東京.
- Sakuradani, E., Ando, A., Ogawa, J. & Shimizu, S. 2009. Improved production of various polyunsaturated fatty acids through filamentous fungus *Mortierella alpina* breeding. Appl. Microbiol. Biotechnol. 84: 1-10.
- 櫻谷英治, 安藤晃規, 小川 順, 清水 昌 2009. 機能性脂質の微生物による生産—アラキドン酸に関連する油脂の発酵生産を中心として—。蛋白質 核酸 酵素 54: 725-734.
- Sakuradani, E. & Shimizu, S. 2009. Single cell oil production by *Mortierella alpina*. J. Biotechnol. 144: 31-36.

(担当編集委員: 高木 忍)