

人間の体内で生理活性物質^(注1)へと変換されることから、近年注目を集め、サプリメントとしての販売や粉ミルク等にも添加されているアラキドン酸^(注2)や今後、医薬品、健康食品等への応用が期待されるジホモ-γ-リノレン酸、ミード酸などの有用脂肪酸 これら有用脂肪酸をつくるカビ^(注3)の遺伝子操作系を構築し、生産性向上を達成。

アラキドン酸を生産する油脂蓄積糸状菌 *Mortierella alpina* 1S-4 (野生株) から変異処理 (ある種の化学薬品で菌体を処理し、遺伝子の改変を行うこと) によって生み出された実用的有用変異株をさらに遺伝子操作し、アラキドン酸、ジホモ-γ-リノレン酸、ミード酸など特定の多価不飽和脂肪酸 (PUFA: polyunsaturated fatty acid) の効率的生産プロセスを開発し、安定供給をめざします。

- アラキドン酸は母乳に含まれる成分であり、実際に粉ミルクにも添加されています。また、年齢とともにその生合成能は低下するため、老化予防の健康食品として販売されています。
- アラキドン酸以外にこのカビがつくるジホモ-γ-リノレン酸、ミード酸、8,11,14,17-エイコサテトラエン酸などは、医薬品、食品、健康食品への応用が待たれています。

競合技術への強み

	高度不飽和脂肪酸 ^(注4)			
	n-6	n-9	n-4/n-7	
アラキドン酸	動物体内に多く存在する	動物の血中脂肪として含有	哺乳類や甲殻類に微量含有	
自然界に存在する状態	動物体内に多く存在する	動物の血中脂肪として含有	哺乳類や甲殻類に微量含有	
本技術(各種変異株の形質転換系構築)	ST1358変異株で生産	S14株(△5不飽和化酵素欠損変異株)で生産	JT-180株(△12不飽和化酵素欠損変異株)で生産	M1株(銅長延長酵素活性低下変異株)で生産

▲高度不飽和脂肪酸が自然界に存在する状態と本技術で生産できるものの内容一覧

ドコサヘキサエン酸 (DHAのこと。C₂₂H₃₂O₂) などのn-3系PUFA^(注5)は魚類から安価で大量に得られ、食品などへ工業的に利用されています。一方でアラキドン酸やジホモ-γ-リノレン酸などのn-6系PUFA、ミード酸のようなn-9系PUFAは、実用的供給源がなく、応用が遅れているのが現状です。また、その他にもn-4系PUFAは甲殻類に、n-7系PUFAは哺乳動物に微量ながら存在が確認されている希少脂肪酸ですが、生理学的機能はまったく解明されていません。このような状況のもと、油脂蓄積性糸状菌 *Mortierella alpina* 1S-4とその誘導変異株がこれらn-6/n-9/n-4/n-7系PUFAを蓄積することを世界に先駆けて見出しました。PUFAのなかでもアラキドン酸は用途開発が進んでいますが、ジホモ-γ-リノレン酸、ミード酸、n-4/n-7系PUFAの生産も可能とする本研究成果は世界で唯一であり、きわめてオリジナリティが高いものであるとともに、これらのPUFAの実用的供給源として期待されています。さらに近年では、野生株 *M.alpina* 1S-4の形質転換系の開発にも成功しました。これにより野生株で有用脂肪酸合成に関わる酵素遺伝子の発現制御が可能となり、アラキドン酸などの有用脂肪酸の生産性を遺伝子組み換えにより、より向上させる研究が可能になりました。

ここがポイント

摂取する油脂あるいはその構成脂肪酸の量や種類が、コレステロール血症、動脈硬化、がん、アレルギーなどの生活習慣病の発症に大きく関わっていることが明らかとなり、近年、油脂と健康をめぐる関心が高まっています。特にPUFAは多岐にわたる生理機能を有し、上記の生活習慣病と密接に関係しているため、現代人に必須の機能性素材として注目されています。アラキドン酸、ジホモ-γ-リノレン酸、ミード酸などのPUFAは性状・機能とも、従来の植物や動物から得ることのできないユニークなものであり、これまでに糸状菌 *Mortierella alpina* 1S-4から誘導した変異株がこれらを蓄積することを見出しているものの、その生産性は十分とはいえません。

本研究では、特定のPUFAを生産する変異株を用い、遺伝子操作 (PUFA生合成にかかわる酵素遺伝子の過剰発現と遺伝子破壊) と育種技術を駆使して、安価な原料から *de novo* 合成^(注6) によるPUFAやPUFAと結合したトリアシルグリセロール等の有用脂質等、機能性構造脂質の効率的生産プロセス開発をめざしました。アラキドン酸、ジホモ-γ-リノレン酸、ミード酸、

n-4/n-7系PUFAをターゲットとし、4種類の有用変異株の形質転換系を構築。また並行して、有用遺伝子素材を探索し、担子菌 *Coprinus cinereus* から高活性な△12不飽和酵素^(注7) をコードする遺伝子を、*M.alpina* 1S-4から脂肪酸鎖延長酵素遺伝子をそれぞれクローニングすることにより、酵素の機能や基質特異性を解明しました。これら脂肪酸生産向上の成果として、*M.alpina* 1S-4を使った遺伝子組換えにより、n-3系PUFA 二つの脂肪酸の生産性向上を実現しました。具体的には、エイコサペンタエン酸 (EPA) の生産量を3倍、エイコサテトラエン酸 (ETA) を6倍増加させることに成功しています。

ブレイクスルーへの道のり

～2002年：1987年にアラキドン酸をつくるカビ (*Mortierella alpina*) が京大農学部キャンパス内土壌より単離された。その後、ニトロソグアニジンによる変異処理により、アラキドン酸以外の有用脂肪酸を蓄積するような変異株が数多く見出された (櫻谷もこの研究に参画)。これにより、カビによる脂肪酸発酵なる概念が誕生、微生物 (カビ) によるPUFA生合成経路が提案され、櫻谷は「微生物を使った発酵生産」を研究開発の目標に定める。安価に有用脂肪酸を生産するために変異株育種を繰り返したが、有用脂肪酸によっては十分な生産性に達しないものもあり、より高い生産性向上が求められた。PUFA生合成にかかわるさまざまな酵素遺伝子をこのカビから単離し、それらの機能が解明された。

2003年～2004年：胞子のプロトプラスト化にこだわっていたためになかなかうまくいかなかったこのカビの形質転換は、胞子に遺伝子銃で直接遺伝子を打ち込むことでうまくいくようになった。遺伝子の発現と抑制という必要最小限の技術がこの頃に備わった。

2005年：平成17年度第1回産業技術研究助成事業に応募し、採択される。遺伝子発現系に用いるために、脂質生合成にかかわる酵素遺伝子をこのカビからだけでなく、いくつかの微生物からも単離した。

2006年：有用変異株4株の形質転換系を構築した。これまでに得られた有用遺伝子を操作して有用脂肪酸生産性向上を試みた。

2007年：選択マーカーの拡充や新たな形質転換法の開発により、さらに応用性の高い形質転換系構築を達成した。

2008年：野生株や変異株の遺伝子操作により、いくつかの有用脂肪酸生産性向上を実現した。

■サクセス・キー

連携企業先であるサントリー (株) の研究員の方々と、毎年5～7人の大学院生と共に継続して研究が行えたこと、研究の進捗状況を密に相談し、研究と現場の相互理解を深められたことが大きな力となりました。また、第8回酵素応用シンポジウム研究奨励賞の受賞やNEDO産業技術研究助成を土台として、平成19年度科学研究費補助金 (若手A) 等の競争的資金獲得につながりました。

■ネクスト・ストーリー

ジホモ-γ-リノレン酸のアトピー性皮膚炎への効能が報告されるなど、アラキドン酸以外のPUFAの機能が最近になっていくつかが明らかになっています。医薬・健康食品としてのさらなるニーズに応えるため、いくつかの有効な遺伝子の過剰発現や遺伝子転写抑制を組み合わせて、PUFAをより安価で大量に供給できるよう連携企業と共同して研究を進めていく計画です。同時に、セルフクローニングによる安全性の確認も行っています。作られた脂質の菌体外生産やプロモーター^(注8)の改良なども今後の研究課題です。また、微生物とは言え、糸状菌は高等な部類に属するため、脂質代謝の制御メカニズム等も詳しくわかっていませんので、ベーシックな機構の解明にも力を注いでいきたいと考えています。本技術は、脂質蓄積能の高い糸状菌の遺伝子操作によって有用脂肪酸の生産性向上を目指したものです。今後、脂肪酸だけでなく、様々な中性脂質や極性脂質の生産にも応用したいと考えています。本糸状菌の形質転換系を利用した脂質生産に興味がある企業・研究機関はご連絡ください。

- (注1) 生体の特定の生理的調節機能に作用する性質で、この物質を疾病治療に応用したものが医薬品である。
- (注2) からだ全体に存在し、特に細胞膜中のリン脂質を構成する大必須脂肪酸のひとつ。人間の記憶や学習などの関わりが明らかになりつつある成分であり、体内に取り込んだ植物油などに含まれているある種の脂肪酸から合成できるが加齢とともにその合成能力は低下するため、老化予防の健康食品として販売されている。
- (注3) *Mortierella alpina* 1S-4株のこと。
- (注4) 不飽和結合を2つ以上持つ不飽和脂肪酸のこと。表中の「n」は、たとえば、n-6は、カルボキシル基と炭化水素鎖で構成される脂肪酸のメチル基末端側の最初の二重結合が、メチル基末端側から数えて6番目と7番目の炭素の間にある脂肪酸の総称である。
- (注5) 我々のからだにはn-6のアラキドン酸だけでなく、n-3のドコサヘキサエン酸も必要で、両方のバランスが重要だ。現在、市販されているアラピタ (健康食品) には当該株由来のアラキドン酸と魚油由来のドコサヘキサエン酸が等量ずつ配合されている。
- (注6) グルコースなどの単純な炭素から、その生物がもつ生合成経路によって化合物がつけられること。
- (注7) オレイン酸をリノール酸へ変換する酵素のこと。具体的には、オレイン酸のカルボキシル基から数えて12と13番目の炭素原子間に二重結合を導入する反応を起こす酵素。
- (注8) mRNA合成の開始に関与するDNA上の特定領域の短い塩基配列。

