

γ-リノレン酸の微生物生産

鈴木 修 (元 工業技術院 化学技術研究所)

1. はじめに

1988年に化学技術誌 MOL で、化学工業界の時の話題として、筆者自身が紹介し、取り上げられた化学技術研究所の調査研究報告書「バイオテクノロジーによる化学コンビナート構想 (バイオケミカルファーム)」(1986年度)における全体構想の図1 (参考文献1) を転載する。

1986年時点での本調査研究における副題は「機能性脂質の生産・分離・精製とその変換」となっており、本図は脂質化学研究分野での化学技術研究開発における未来予測とそのための研究技術開発課題を縦列的に行ったものである。

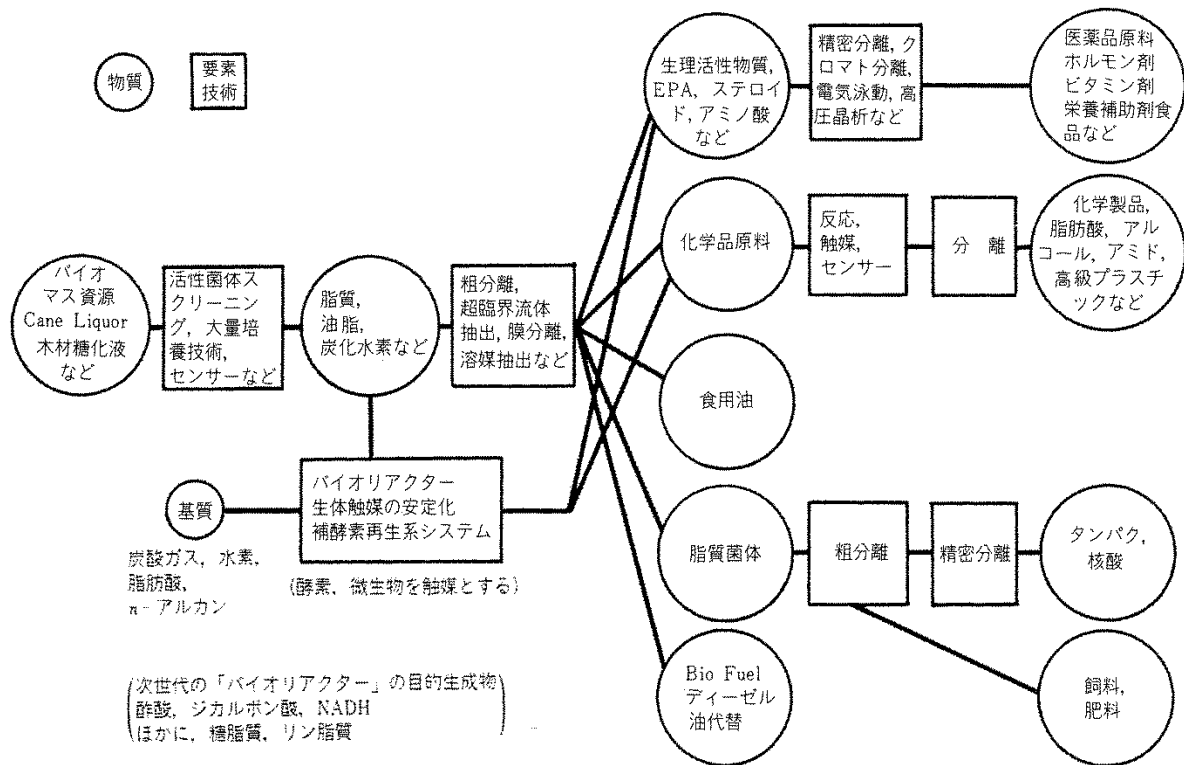


図1 バイオケミカルファームプロジェクトシステム図 (バイオテクノロジーによる有用化学品生産に関するプロジェクト)

30年前に行われた調査研究における課題の拾い出しにおいては、当時の技術レベルでバイオテクノロジーにおいての遺伝子組み換え技術発展への展望を過小評価したなどの限界があったものの、現在(2016年)の研究技術開発における到達点を見るに、この図に示された技術開発課題の多くが実用化レベルまでの発展を遂げており、未来予測が正鵠を射たものであることが示されている。

例えば、「ミドリムシ燃料を20年実用化」(参考文献2)と題した新聞報道が昨年(2015年)の12月発表されている。即ち、藻類ユーグレナ的一种ミドリムシから搾った油を航空燃料に利用するものである。環境に負荷を与えないクリーンエネルギーとして開発、実用化が図られ、生産設備の建設が始ま

る。

化学技術研究開発の動向を見ても、グリーンケミストリー全盛の時代を迎えており、予測に従ったものであることが分かる。

以下、本調査研究における中核研究として位置付けられた筆者らが手掛けたγ-リノレン酸 (GLA) 及びその含有脂質の微生物生産技術の研究開発について、研究課題として取り上げ研究を始める動機、発想、研究での試行錯誤など、さらには、研究成果とその実用化への展開、特に、企業との技術協力の重要性とそれによる新しい飛躍の実態を述べる。その他、現在に至る関連研究技術開発の幅広い展開の様子を特許の出願状況などを参考に概観する。

2. γ-リノレン酸及びその含有脂質微生物生産技術の開発

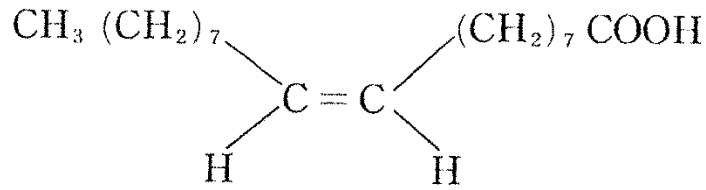
(1) 技術開発に至る背景と研究の端緒

GLA 及びその含有脂質の微生物生産技術の研究がスタートした当時は、本課題が当初から設定されていたわけではなく、油脂の微生物生産の技術開発を目的とし、我が国の食糧資源としての新しい油脂資源の開発による食糧問題の解決を意図したものであった。本技術開発課題の研究に取り組むにあたっての筆者の考え方及び研究に至る端緒などについては、1989年に日刊工業新聞社から発行された書籍「国の技術を活かせ」(参考文献3)で筆者自身が執筆した文章に詳しく書かれている。30年近い過去の記憶をたどるよりも文献に記載された文章の方が当時の状況をより正確に伝えることが出来ると考え、少し長くなるが以下にそのまま引用する。誤解を避けるため、あくまでも原文を忠実に転載し、加筆・訂正は行っていない。

“昭和48年、衝撃的な第一次オイルショックにより、日本経済は高度成長から安定成長へと大きき転換することになった。それまでの海外の石油に依存した重化学工業偏重の経済に資することを目的とした研究開発課題から、新しいエネルギー資源の開発など、またより生活に密着した課題に取り組む必要がありそれが我が国の基盤を強化する基になることが考えられた。ちょうどその時、ローマクラブのレポート「成長の限界」が発表され、全世界に大きな衝撃を与えた。それは地球上の人口が20年後に50億人に達し、この人口増加による食糧資源の枯渇を問題とした提言であった。

油脂化学の研究者として筆者らは、当時、油脂の工業的な利用、即ち界面活性剤、潤滑油、塗料などへの利用を考えた種々の脂肪酸誘導体の合成をおこなっていたが、そもそもそもそも油脂は食糧として三大栄養源の一つであり、その消費の8割は食糧であり、しかも工業的な用途としても2割が利用されている極めて重要な資源であることがこのレポートを通じて思い知らされた。

それは、再生可能な石油代替品として、又まさに食糧資源としての新しい油脂資源の開発を示唆していた。しかも、わが国の場合、年間の油脂の消費は250万トンであり、その油脂資源の95%を海外に依存しているという現実があった。そこで“油脂が工業的に合成できないか”の発想になるわけであるが、脂肪酸一つをとっても飽和脂肪酸は合成できるが、栄養的に意味のある不飽和脂肪酸の合成は、その単純な構造にもかかわらず、少なくとも工業的な合成は不可能であった。このことは現在においても全く変わらず、例えば、図のオレイン酸一つをとっても炭化水素鎖の中間に *cis* 型の不飽和結合を持つ化合物を純科学的に合成することが極めて難しいことから考えて当然である。



バイオテクノロジーという言葉自体が全くない時代であったが、油脂が天然の産物であり、生物ではたくましくしてそれらを作り出していることから、酵素反応による合成を考えた。しかし脂質関連酵素として不飽和化酵素などは、現在に至っても単離されていないことから、発想当時としては不可能との結論になった。従って、もっとも単純に微生物細胞を脂肪酸合成から油脂合成に至る酵素あるいは触媒の袋と考え、油脂の微生物による生産の可能性について研究することとなった。この発想自体は珍しいものではなく、第2次大戦下のドイツで油脂資源の逼迫により、研究が手掛けられ、油脂生産酵母 *Lipomyces starkey* が発見されたいきさつがある。しかし、高度不飽和脂肪酸などの付加価値の高い脂肪酸を含む油脂を効率よく、しかも、バイオマスなどの未利用炭素源を利用して、安価に生産するという考えでの研究開発は行われておらず、これは新しい視点であり、その開発のための微生物としても酵母でなく、糸状菌を用いる必要があるなど、従来の技術から一歩踏み出した技術開発を要請された。

糸状菌は従来の感覚では、まず菌糸で増殖するため、高濃度培養が困難であり、酵母などと比べて菌体の生産性はかなり劣っており、油脂の場合それが菌体内で蓄積されるため、結果として生産性は極めて低いレベルであるとされていた。その他、糸状菌に限らず微生物一般に油脂の蓄積と菌体増殖は相反した事象と考えられていた。事実、それまでは油脂含量の高い菌体を得るためには、栄養源として窒素源を炭素源に対して少なくして増殖を行い、その結果、菌体増殖量が抑制され、培地あたりに対する油脂の生産性は低いという現象しか認められていなかった。

そこで、まず目的に合う菌体のスクリーニングをフラスコスケールで行うこととし、菌株の分譲を受けるなどしてできるだけ集めた。ただし、スクリーニングに際しては闇雲に菌体の培養を行い、油脂含量、油脂の生産量、油脂の生産性あるいは構成脂肪酸などの油脂の組成を求めたのではなく、油脂の生産性の高いことが知られていたもの、構成脂肪酸に高度不飽和脂肪酸の多いもの、さらにはセルロースなどバイオマスを資化する能力の認められている糸状菌菌株中心に行った。しかし、基本的には糸状菌についての菌体内脂質に対するデータは極めて少なく、かなり幅広く調べる必要であった。

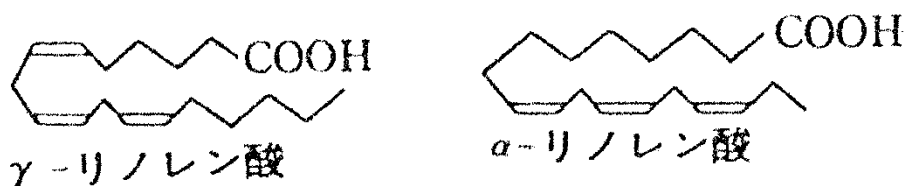
このような一次スクリーニング段階で、例えばγ-リノレン酸を組成脂肪酸として含み脂質含量の高い *Mortierella* 属菌、セルロース資化性を持ちリノール酸含量の高い *Pellicularia* 属菌、n-アルカンの資化性を持ち脂質含量の高い *Fusarium moniliforme* などの菌株が見いだされた。各々の菌株について培養条件と脂質の生産性の検討を行い、培養槽を用いる実験へと進んだわけである。“

引用文中におけるローマクラブのレポートなどは、それが発表されて50年近くたった今では忘れ去られている。それは、現在の世界の人口は70億人を超えて、それでも、アフリカ、北朝鮮など一部地域を除いて食糧資源の不足は認められておらず、このことはこの間の食糧生産技術が、遺伝子組み換え作物の技術開発などを含めて飛躍的に進歩を遂げたことによる。

微生物による油脂生産を意図してスタートした研究ではあったが、実用化技術として定着して行くためには、付加価値の高い油脂の生産に研究開発の標的を絞る必要があることが、油脂生産糸状菌のスク

リーニングが進んで行く中で、当然の帰結として考えられた。

γ -リノレン酸は必須脂肪酸（ビタミン F）の一種として知られており、サラダオイルなどの植物油脂中に多く含まれるリノール酸（LA）が生体内で多彩な生理活性を持つプロスタグランジン（PG）に変換する際の間接物質である。従って、 γ -リノレン酸は必須脂肪酸としての生理機能と共に PG 合成の前駆物質として PG の持つ様々な生理作用に関与している（参考文献 4、5）。その構造は図に示された如く、炭化水素鎖の末端のカルボン酸から 6,9,12 番目の炭素に *cis* 型の不飽和結合を持つ炭素数 18 の脂肪酸である。多くの植物油脂中にその存在が認められ通常リノレン酸と呼ばれている α -リノレン酸であり、図のように不飽和結合の位置が異なる。



γ -リノレン酸は母乳、月見草の種子などで存在が認められていた。当時、カナダで生産された月見草の種子から抽出された植物油脂が月見草オイルとしてわが国で市販され始めており、1 キログラムが数万円単位の値で取引されていた。月見草オイルの主成分はトリアシルグリセロールであり、その構成脂肪酸中に 7% 程度の γ -リノレン酸が含まれていた。なお、現在では、ボラージの様な GLA 含有油脂を作る新しい植物が見いだされ、又、微生物生産も行われ GLA 含有オイルの価格は下がっている。

筆者らは、先に記述したように、既に γ -リノレン酸を組成脂肪酸として含み、脂質含量も高い菌株をスクリーニングしていたので、それらの菌株、特に、*Mortierella* 属菌に絞って、 γ -リノレン酸及びその含有脂質の生産技術についての研究開発に取り組んだ。本格的な研究の立ち上げに先立って“ γ -リノレン酸含量の高い脂質の製造方法”として 1981 年に特許を出願していた。出願した特許は国有特許として、1984 年 3 月に日本特許第 1196043 号として確定、登録された。

(2) γ -リノレン酸生産微生物の選別

γ -リノレン酸及びその含有脂質を微生物による生産技術として、その工業化を図るためには生産性において優れて性能を持つことが当然要求される。その為、*Mortierella* 属菌の中での γ -リノレン酸生産微生物について、GLA 含量、培地あたりの GLA 及びそれを含む脂質の生産性などを指標に選別を行った。財団法人発酵研究所（IFO）から *Mortierella* 属菌の保存菌株のほぼすべてについて分譲を受け、工業的な生産に適した菌株を選別した。

その結果、*M.isabellina*, IFO7884、IFO7824、*M.vinacea*, IFO6738、*M.nana*, IFO6744、*M.ramanniana* var. *angulispora* IFO8187 の菌株において、かなり目標に近い能力を持ち、工業化の可能性を秘めていることが確認された。

例えば、*M.isabellina*, IFO7884 株については、30L 培養槽を用いた培養実験において、グルコース濃度が 390g/L という高濃度の培地で生育し、培養時間は 168 時間とかかったが、培地の炭素源を完全に消費し、結果、菌体が乾燥重量として 156g/L、脂質の生成量、83g/L、脂質含量は 53%、それぞれ培地

の単位体積当たりの脂質の生成量としては従来にない高い値が示された。

この実験が行われた時の様子が、先に引用した「国の技術を活かせ」（参考文献3）にやはり筆者により記載されているので、再度、そのまま引用する。

“昭和57年の初冬、寒々とした大空間の片隅に置かれた30L培養槽のガラス窓から見える糸状菌菌体の増殖の様子に二人の研究者は目を凝らしていた。約400g/Lと途方もなく高い濃度のグルコースを培地として用いた培養を試みており、植菌してすでに4日が経過していた。それまで一向に菌体の増殖が認められなかったのに、4日目にして少し増殖が見えたのであった。それ以後、菌体増殖はどんどん進み、さらに4日経過したときには、あれだけ高い濃度のグルコースは完全に食い尽くされ、菌体で攪拌もままならないほどになっていた。これほどの高密度の菌体増殖は糸状菌では認められておらず、しかも菌体を分析した結果、油脂を50%以上含むことが認められ、一つのブレイクスルーを成し遂げたとの思いを抱いたものであった。”

M.isabellina, IFO7884株については、さらなる実験で、まず種菌の培養において高濃度のグルコースに慣養することにより、培養時間の短縮が図れること、また、安価な糖蜜を炭素源として用いることが出来ることも明らかにした。しかし、本菌株は、 γ -リノレン酸の培地あたりの生産量としては高いが、組成脂肪酸としての γ -リノレン酸含量が、4.5%と月見草オイルにおけるそれよりも低い点が、油脂製品としての市場価値を下げる危惧があった。したがって、生産性において *M.isabellina*, IFO7884株に匹敵し、組成脂肪酸としての γ -リノレン酸含量が月見草オイルの7%とほぼ同じレベルのオイルを生産することが出来る菌株の選別を行った結果、*M.ramanniana* var. *angulispora* IFO8187株が最適であることを見出した。

以後、工業的な生産技術の開発においては、*M.ramanniana* var. *angulispora* IFO8187株を用いて実験を進めた。

（3） 工業的製造技術の開発

菌株 *M.ramanniana* var. *angulispora* IFO8187について、30L培養槽における基本的な操作条件を確立し、炭素源であるグルコース濃度、窒素源である尿素の濃度、培地のpH、培養の温度などを変えて、菌体の増殖量、脂質の生成量及び γ -リノレン酸生成量を求めた。その結果、グルコース濃度は200g/L、尿素濃度は6g/L、培地のpHは4.0、培養温度は30℃の時の γ -リノレン酸の生産性が最も高く、2.2g/Lに達していた。この条件下では、培養を開始して84時間で炭素源であるグルコースは完全に消費され、菌体が80g/L、脂質量が29g/Lであった。

30L培養槽で得られた培養条件に基づいて、さらに、発酵槽は300L、3m³、300m³とスケールアップして培養実験が行われ、安定生産のための培養条件検討がなされた。これらは、国有特許の使用契約を行った企業に技術移転した後、企業サイドで主に行われた。

γ -リノレン酸含有脂質は増殖菌体の細胞内に蓄積されているため、工業的製造技術として脂質の培養菌体からの抽出がもう一つの開発課題であった。

最終製品を食用油脂として利用することを前提とした場合、抽出溶媒は食品衛生法で使用が認められているn-ヘキサンである。従って、n-ヘキサンをを用いた培養菌体からの油脂の抽出について、培養菌体の前処理などを含めて抽出技術の確立を行った。さらに、当時、安全な抽出媒体として食品への利用が検討されていた超臨界二酸化炭素による培養菌体からの脂質の抽出について、化学技術研究所内の化学

システム部、佐古猛グループと共同研究を行い、抽出技術を確立した。本技術についても特許を出願し、1990年日本特許として登録された（参考文献6、7）。

3. 技術の企業への移転と発酵法 γ -リノレン酸を用いた商品の開発

(1) 企業への技術移転

筆者らにより‘ γ -リノレン酸及びその含有脂質の微生物を用いた生産技術’がほぼ確立し、主要な特許の出願を終えた1984年の5月の時点で、化学技術研究所の業務課特許係からの依頼で、筆者が日刊工業新聞の北村記者から取材に応じることになった。新しく得られた上記成果について、概要を説明したところ大変興味を持ってもらい、翌日の朝刊の一面中央に記事は掲載された（参考文献8）。

この記事の反響が大きくて、化学技術研究所の窓口である業務課には民間企業からの技術内容の問い合わせが殺到した。個別に対応することは不可能と考え、当時、工業技術院の外郭団体である財団法人日本産業技術振興協会（現、一般社団法人 産業研究・産業技術振興協会、技振協と略称）を窓口として、技術内容の説明会を開催することとなった。説明会は、つくばの化学技術研究所 6階会議室で行われ、参加した民間企業の関係者は約40社、100名近くに及んだ。

説明会で、筆者が先の技術の概要を説明し、この後、技振協の担当者から国有特許技術の民間企業への開示など、手続きについて説明が行われた。説明会の後、技術ライセンスの窓口である技振協に技術開示を申請した企業は20社を超えた。

技術開示申請が行われた企業すべてについて、技術指導を行い、技術移転と言うことは時間的、また人的に対応が不可能であったので、絞り込みが行われ、それでも出来る限り希望に添うべく11社に及ぶ企業について、技術開示は行われた。技術開示が行われた企業は、(株)資生堂、出光石油化学(株)、(株)明治製菓、日本油脂(株)、理研ビタミン(株)、鐘淵化学(株)、高砂香料(株)、日東電工(株)、キリンビール(株)などであった。

技術開示に関しては、各企業の研究開発担当者を化学技術研究所に派遣してもらい、技術指導契約の下で、一週間かけて、 γ -リノレン酸生産系状菌の培養実験などを通じて技術を習得してもらい、最後に、菌株を渡す方式で行われた。この1984年は、夏場、筆者らは2か月以上にわたって企業への技術開示を集中的に行った。

上記技術に関しては、新聞報道がなされる以前に、知り合いの企業研究者などに、興味ある結果が得られていることなどを紹介していたにもかかわらず、あまり関心を持って貰えなかった。しかし、新聞報道の結果、多くの企業から強い関心もたれたことは、研究者レベルで伝わった技術情報では、いわゆるボトムアップで、それを企業の開発課題として採用されることにはなりえず、企業のトップが経営戦略の中で、将来的な可能性を見込んだ時に初めて、技術開発課題として取り上げるか、少なくとも経営的な可能性を判断すべく関連技術の内容の把握、検討に努めるために、いわゆるトップダウンで指示が出されることによる結果と考えられた。

また、上記のような多くの企業から関心をよせられたことは、特に、企業が国の開発技術に実施料を払ってまで利用したいとするのは、技術そのものが絶対的に新規であり、企業の研究所でも発想から従来持っていなかったレベルのものであって初めて可能になるものと考えられた。

新聞報道について、企業が注目をしたもう一つの理由としては、報道のタイミングにもあった。すなわち、この年、我が国において英国のエファモール社と提携したエーザイが「リーレン G」のブランド

で見見草オイルの販売を開始していた。見見草オイルは γ -リノレン酸を含みダイエット効果があると報道され一つのブームが起こっていたことが、企業にとって、全く新しい γ -リノレン酸含有オイルの素材として注目を引いた背景があった。

(2) 微生物生産 γ -リノレン酸含有オイルを用いた商品開発

企業への γ -リノレン酸含有脂質の生産技術の移転が終わった後は、それぞれの企業で工業化に向けて、糸状菌培養におけるスケールアップ、工業的な抽出技術の開発、さらには商品開発などがなされた。

商品素材として、糸状菌の培養による、新しい製造法に基づいて生産された γ -リノレン酸含有オイルを特に食品として利用するためには、素材の安全性について徹底的に検査する必要があった。

安全性の検査に関しては、技振協を窓口として、参加企業を募り、検査費用を企業分担の下に、素材としての γ -リノレン酸含有オイルのスペックを定め、その製造を明治製菓に依頼して、製造されたオイルをサンプルとして(財)食品分析センターに急性毒性、亜急性毒性、慢性毒性、催奇性など毒性の生物学試験、理化学試験さらには安定性試験などを行った。その結果、微生物産生 γ -リノレン酸含有オイルは見見草オイルと比べても熱や酸化安定に優れており、食品としての安全性が確認された(参考文献9)。

微生物オイルが示す酸化安定性については、オイルの脂肪酸組成において、見見草のそれは γ -リノレン酸以外の脂肪酸の70%以上がリノール酸であり、一方、微生物産生オイルではリノール酸は10%台と低く、残りはオレイン酸とパルミチン酸が多く、その差から後者が安定性に優れていることが分かる。この事実からも、微生物産生オイルは見見草オイルとは全く異なる素材であることが示された。

γ -リノレン酸含有オイルの商品開発を図るためには、その素材としての特徴を知る必要がある。

まず、 γ -リノレン酸については、図2に示すようにリノール酸から変換酵素($\Delta 6$ -デサチュラーゼ)により変換生成し、さらに、ジホモ γ -リノレン酸、プロスタグランジン(PG、局所ホルモンの一種)へと変換する重要な生理活性物質の一つである。乳幼児や老人においてリノール酸からの変換酵素($\Delta 6$ -デサチュラーゼ)の活性が弱く、結果としてアレルギー性疾患や成人病などの健康障害が多くみられる。母乳に γ -リノレン酸が含まれていることも乳幼児にとって必要であることの証左である。

また、健康な人であっても、偏食によるビタミンやミネラル類の不足、アルコール摂取、イライラや睡眠不足等により変換酵素の活性が低下し、結果としてPG合成が阻害され、疾病の原因になることが指摘されている。

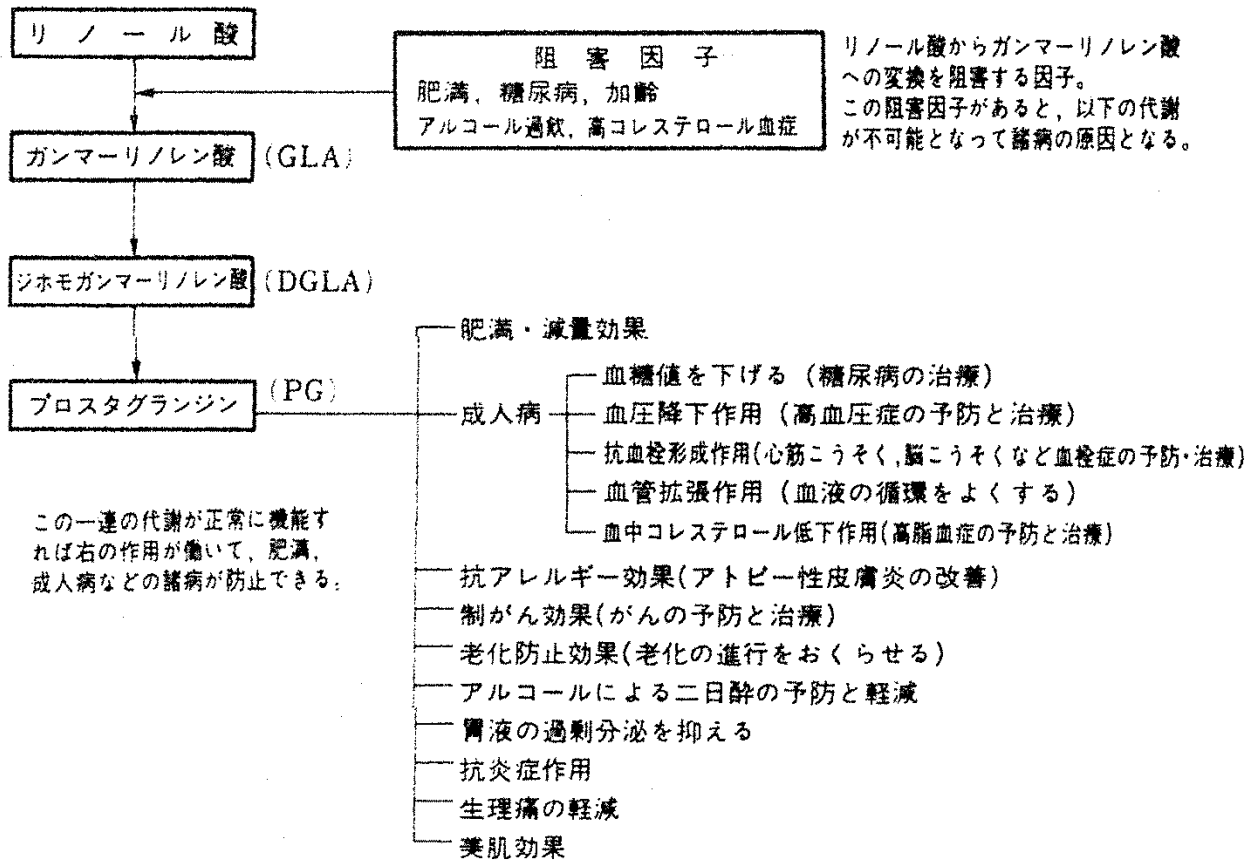


図2 γ -リノレン酸の代謝とその作用、

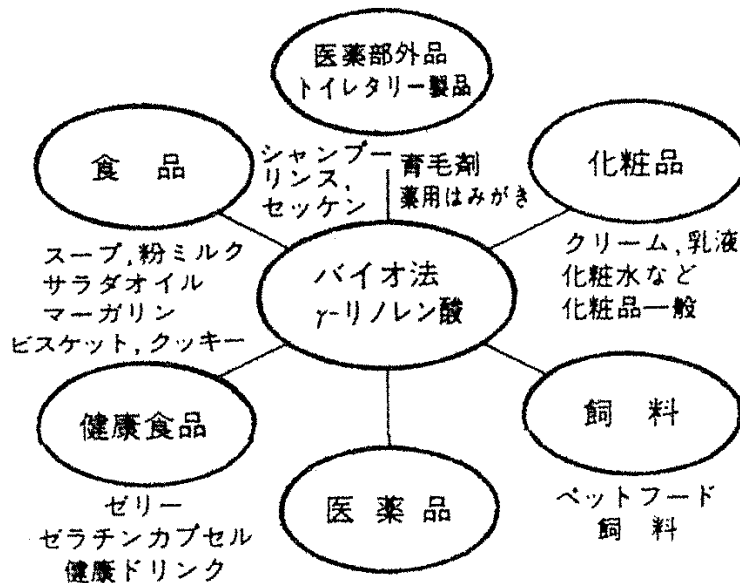


図3 バイオ法 γ -リノレン酸オイルの応用分野

γ -リノレン酸含有オイルを用いての商品開発については、図3に示すように様々な分野における商品の可能性が考えられた。その中で、まず、オイルそのものをゼラチンカプセルに封入して、健康食品と

して直接摂取するサプリメント製品が出光ケミカルズにより商品名「プロスタミン」として上市された。

化粧品への応用に関しては、資生堂による商品開発の取り組みを例示する。

微生物産生 γ -リノレン酸オイルの化粧品成分としての利用に際しては、皮膚に直接塗布して用いるため、その皮膚刺激性有無などの検査を行い、安全性の確認を必要とした。その結果、本素材が皮膚刺激性を持たない上に、皮膚の保湿効果や皮膚改善効果を持っていることから、化粧品原料として適切であることが明らかになった（参考文献10）。

資生堂は、この微生物産生 γ -リノレン酸オイルとバイオヒアルロン酸の両成分を有効に配合した商品は、BX-クリーム及びBX-エマルジョンの商品名で1986年9月から発売した。国の特許技術開示後、約2年が経過していた。

4. γ -リノレン酸及びその含有脂質の微生物生産技術の開発による波及効果

(1) γ -リノレン酸及びその含有脂質の微生物生産技術関連特許出願から見る波及効果

1981年3月に、筆者らの発明により、工業技術院長が出願した特許①「 γ -リノレン酸含量の高い脂質の製造方法」は1982年9月公開、1983年5月公告、1984年3月に確定、特許第1196043として登録された。この特許を端緒となって、どの様に企業の特許出願に影響したかを、野村総合研究所（NRI）のサイバーパテント2による引用マップ解析結果に基づいて展望する。

まず、特許①が第1世代として位置付けられる。第2世代は、筆者らが発明者であり、出願人が工業技術院長の特許②「 γ -リノレン酸含有グリセリドの濃縮方法」（特許第1525417）、特許③「 γ -リノレン酸含量の高い脂質の製造方法」（特許第1467116）、続いて、筆者らとの共同研究による得られた発明で、出願人が工業技術院長と理研ビタミン株式会社の特許④「 γ -リノレン酸含有油脂を含む組成物」（特開昭61-130237）、出願人が工業技術院長と株式会社資生堂の特許⑤「化粧品」（特許第2047980）、出願人が工業技術院長と理研ビタミン株式会社の特許⑥「 γ -リノレン酸含有油脂を含む化粧用又は皮膚用組成物」（特許第1875461）などの他、工業技術院長を出願人としたヨーロッパ特許EP0125764B、EP0155420Bなどが位置付けられた。第2世代の特許は、いずれも発明者に筆者らが参加し、工業技術院長あるいは工業技術院長との共同研究企業とが出願人となっており、内容的には第1世代特許を補完するものであり、特許として登録されている。

第3世代としては、伊藤製油(株)が出願人である特許⑦「水添ヒマシ油改質物の製造法」（特開平3-84099）、マーテック・バイオサネンシーズコーポレーションなどが出願人の特許⑧「脂肪種子および微生物供給源からの脂質の抽出および脱ろう」（特許第4647212）、ディーエスエム・アイピー・アッセツピー・ブイなどが出願人の特許⑨「脂肪種子および微生物供給源からの脂質の抽出および脱ろう」（特開2010-196060）、続いて、筆者らが発明者で工業技術院長が出願人である特許3件、特許⑩「微生物菌体の製造方法」（特許第1497685）、特許⑪「カカオ脂類似の油脂の製造方法」（特許第1467128）、特許⑫「 γ -リノレン酸濃縮物の製造方法」（特許第1471834）が挙げられる。さらに、丸田和光が出願人の特許⑬「 γ -リノレン酸含有食用組成物」（特許第1861246）、株式会社ヤクルト本社が出願人の特許⑭「皮膚刺激感抑制剤及びこれを配合した化粧品」（特許第2529571）、サントリー株式会社が出願人の特許⑮「高度不飽和脂肪酸成分添加人工乳」（特許第2697834）、エファモル・ホールディングス・ピ、エル、シィが出願人の特許「皮膚改善用組成物とその方法」（特開平2-149508）、日本合成化学工業株式会社が出願人の特許⑯「風味改良剤」（特許第2141522）、ソシエテ デ プロデュイ ネットスルソシエテ アノニム

が出願人の特許⑰「香粧製品用脂質組成物」(特表平 7-509005)、ユニリーバー・ナームローゼ・ベンオートシャープが出願人の特許⑱「乳化したペトロラクタムを含有する皮膚保護組成物」(特許第 3888470)、出光興産株式会社が出願人の特許⑲「皮膚外用剤組成物」(特開 2005-179211)などが第 3 世代と位置付けられた。

第 3 世代の特許については、工業技術院長を出願人とする特許以外は、第 1 世代及び第 2 世代の特許が出願の拒絶理由に使われている。例えば特許②は特許⑦、⑧、⑨などに対して拒絶理由の引用文献とされているなどである。第 3 世代に入って、多様な企業から関連の特許出願がなされていることが分かる。

第 4 世代では、さらに大きな広がりを見せており、出願特許は、現在に至る 70 件ほどがリストアップされている。

リストアップされた幾つかなの特許を例示する。即ち、日本農産工業が出願人の特許⑳「キャットフード」(特許第 1839834)、工業技術院長が出願人の特許㉑「脂質の製造方法」(特許第 1699926)、同じく工業技術院長が出願人の特許㉒「 γ -リノレン酸含量の高いホスファチジルコリンの製造方法」(特許第 1492187)、国立大学法人山梨大学及び独立行政法人酒類総合研究所が出願人の特許㉓「油脂生産菌の培養方法」(特許第 5709196)、日本水産株式会社、サントリー酒類株式会社、サントリー株式会社が出願人の特許㉔「高度不飽和脂肪酸及びこれを含有する脂質の製造方法」(特許第 3354608)、花王株式会社が出願人の特許㉕「化粧料」(特許第 3113844)、ライオン株式会社が出願人の特許㉖「毛髪化粧料」(特許第 5003870)、久光製薬株式会社が出願人の特許㉗「骨粗鬆症治療用外用剤」(特許第 4738007)、雪印乳業株式会社が出願人の特許㉘「高不飽和脂肪酸配合育児用粉乳」(特許第 2525624)、株式会社資生堂が出願人の特許㉙「油状組成物」(特許第 4066369)、株式会社ノエビアが出願人の特許㉚「皮膚外用剤」(特許第 3643645)、株式会社コーセーが出願人の特許㉛「化粧料」(特許第 4373226)などである。

以上、筆者らの開発した技術「 γ -リノレン酸及びその含有脂質の微生物生産」はそれが工業化を果たし、新しい素材を生み出したことから用途開発を含めて、又、脂質の微生物生産の可能性が見いだされ、これに触発され、新しい素材を求めての研究開発が進展していった様子が関連特許の出願から理解できる。なお、上記で出願人が工業技術院長となっている特許は、現在、出願人および権利者は独立行政法人産業技術総合研究所(以後産総研と略称)と変わっている。

(2) 各種高度不飽和脂肪酸(PUFA)及びその含有脂質の微生物による生産技術開発への波及
 γ -リノレン酸あるいはその含有脂質の微生物による生産技術が、実用化技術として確立されて行く過程で、様々な生理機能を持つことが知られている各種高度不飽和脂肪酸を標的とした、その微生物生産技術に関する研究・開発が始まった。即ち、図 4 に示した、動物の体内でリノール酸の代謝により γ -リノレン酸を経由して PG 合成に至る、あるいは α -リノレン酸から PG 合成に至る、その前駆脂肪酸であるアラキドン酸(AA)、ジホモ- γ -リノレン酸(DGLA)あるいは、エイコサペンタエン酸(EPA)、さらには EPA から合成されるドコサヘキサエン酸(DHA)などの高度不飽和脂肪酸であった(参考文献 11)。

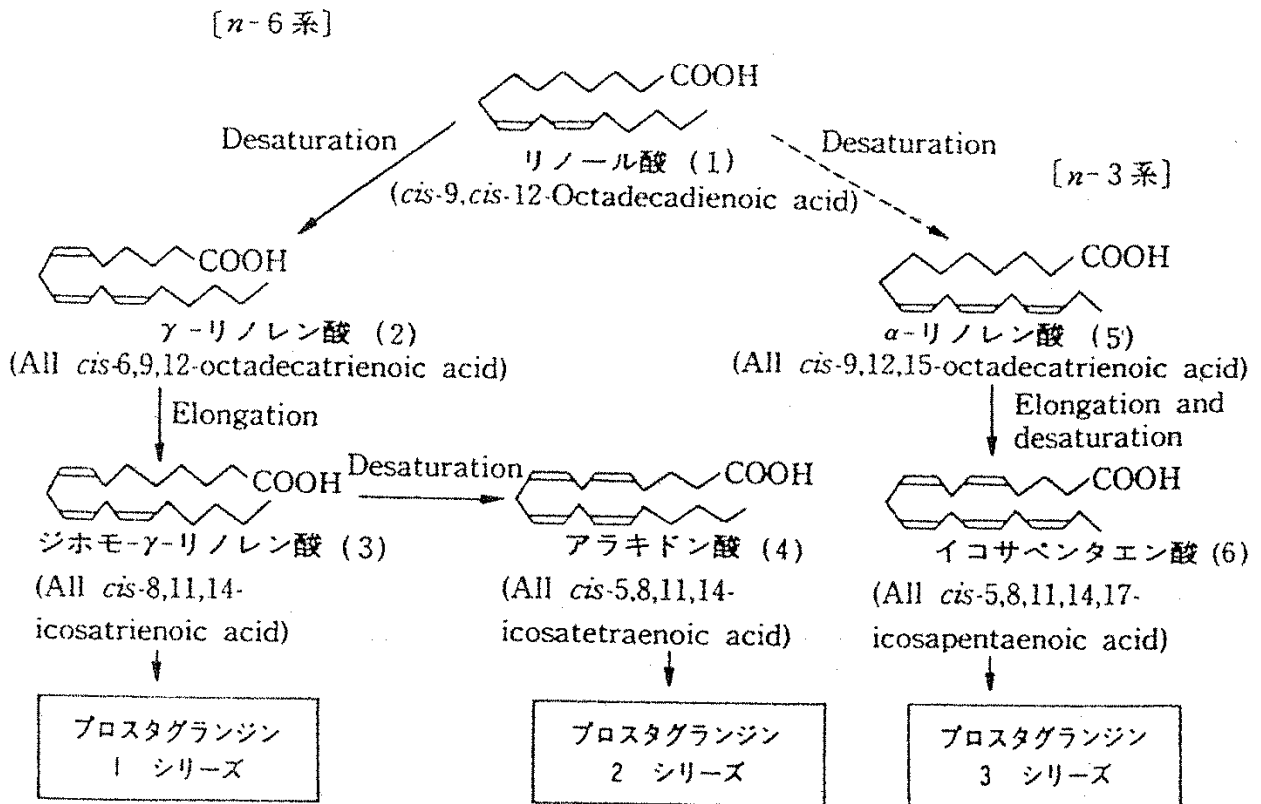


図4 高度不飽和脂肪酸の代謝経路

アラキドン酸 (AA) を標的とした微生物による生産技術の開発は、京都大学の清水昌教授らにより精力的に行われ、AA 生産菌として *Mortierella alpina* IS-4 を見出し、生産の実用化につなげた。発酵生産された AA 含有油脂は乳児用ミルクの添加物あるいはサプリメントなどとして利用されている (参考文献 1 2, 1 3)。なお、筆者も広島大学大学院先端物質科学研究科に移籍後、AA 生産菌の探索を行った。研究室の秋庸裕博士 (現先端研教授) らは東広島の溜池から、比較的安価な炭素源であるでんぶんの資化性に優れ、AA 生産性が高い新規の *Mortierella* 属菌 *M.alliacea*YN-15 を発見し、共同研究者のサントリー株式会社が出願した (参考文献 1 4, 1 5)。

ジホモ-γ-リノレン酸 (DGLA) の微生物生産に関しては、清水らは AA 生産を目的として選別した *M.alpine* の培養に際して、ごま油を添加することにより AA の生合成が阻害され DGLA が蓄積されることを見出し、発酵生産を確立した (参考文献 1 6)。DGLA は AA などと異なり最終生成物とはなりえないため、DGLA を蓄積する野生の生産菌は見つかっていない。

エイコサペンタエン酸 (EPA) の生産菌としては藻類が知られており、*Porphyridium cruentum* あるいは *Novicula saprophilla* による EPA 生産についての技術開発が報告された (参考文献 1 7)。さらに、清水らは AA 生産菌 *M.alpina* あるいは *M.hygrphilla* などの培養に際して、培地に α-リノレン酸を添加し、低温化で培養することにより EPA が生産されることを報告した (参考文献 1 8)。

ドコサヘキサエン酸 (DHA) 生産の微生物の発見とそれを用いた DHA の生産技術の開発については、工技院の生命工学工業技術研究所 (生命研と略称、現産総研) の横地俊弘博士 (現、産総研、生命工学領域、研究戦略部パテントオフィサー) らが世界において先導的な役割を果たした。即ち、マンガ

ローブ水域の表層水から分離した *Schizochytrium limacinum* SR21 株が既存の *Thraustochytrium* 属や *Schizochytrium* 属菌と比べて高い DHA 生産能を有し、増殖性と脂質蓄積性においても優れていることを見出した。培養条件など詳細な検討により、生産能をさらに高めることに成功し、これらの結果は、特許「ドコサヘキサエン酸生産能を有する新規微生物及びそれを用いたドコサヘキサエン酸の製造方法」(特許第 2764572) となっている(参考文献 19、20)。この DHA 生産技術は内外の企業に技術移転がなされ、実用化に向けた開発が進んでいる。広島大学の秋らもまた、広島湾の海水から分離した *Thraustochytrium* 属菌 KK17-3 株が、DHA 産生能に優れ、同時にカロテノイドの生産性も高いことを見出し、特許を出願した(参考文献 21、22)。なお、この開発技術は、本菌株の培養菌体をエビなどの魚介類の飼料としてそのまま用いることが考案され、特許が出願されている(参考文献 23)。

横地らは、さらに、中原東郎博士(元産総研特許生物寄託センター副センター長)と共に全国各地の沿岸域から *Labyrinthulid* 属菌の分離を行い、n-6 系ドコサペンタエン酸(n-6DPA)を生産する株(L59 株)などを見出している。(参考文献 24)。

引き続き、遺伝子組み換え技術の進展に伴って、PUFA の合成経路にかかわる酵素群の同定による遺伝子組み換え植物あるいは培養の容易な酵母への組み替えなどでの付加価値の高い油脂製品の生産への技術開発の取り組みが行われている。

PUFA 生合成に係る酵素においてカギとなるものは、リノール酸から γ -リノレン酸への変換酵素であり、オレイン酸あるいは α -リノレン酸の変換による PUFA の生合成に重要な役割を持つ $\Delta 6$ 不飽和化酵素である。 $\Delta 6$ 不飽和化酵素に関しては、筆者が広島大学在籍中の 1998 年頃にはその遺伝子のクローニングが世界的に競われていた。秋らは哺乳類のラット肝の遺伝子ライブラリーから PCR 法及びハイブリダイゼーション法により、最初に単離されたボラージとの相同遺伝子を単離した。本遺伝子はヒスチジンクラスターを含むと共に、アミノ末端領域にチトクロム b_5 と相同な配列を含んでいることを認めた。この単離された遺伝子を酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 内で発現させたところ、リノール酸あるいは α -リノレン酸の存在化で、 $\Delta 6$ 不飽和化産物である γ -リノレン酸及びステアリドン酸が生成された。その結果、単離された遺伝子が $\Delta 6$ 不飽和化酵素であると同定された。 $\Delta 6$ 不飽和化酵素遺伝子の哺乳類からの単離同定は世界で初めての結果であり、国際特許を出願し、登録された(参考文献 25、26)。この $\Delta 6$ 不飽和化酵素遺伝子のクローニングは、 γ -リノレン酸の全く新しい生産技術をもたらし、例えば、植物による PUFA 生産技術の開発など新しい展開を図るターニングポイントとなるものとして、筆者にとっては γ -リノレン酸生産の技術開発に努め、それをライフワークとしてきたことから、愁眉を飾るものであった(参考文献 27)。

最後に、遺伝子組み換え技術の進展に伴い、その技術を用いての、PUFA 合成あるいは油脂蓄積機構の解明など最近の新しい成果について、身近な産総研の研究者らによる結果を紹介する。

植村浩博士(産総研、生物プロセス研究部門)らは酵母 *S. cerevisiae* に *Kluyveromyces lactis* 由来の $\Delta 12$ 不飽和化酵素遺伝子、ラット由来の $\Delta 6$ 不飽和化酵素遺伝子並びに同じくラット由来の脂肪酸鎖長延長遺伝子を導入することにより、酵母に DGLA を産生させることに成功し、その際に培地にリノール酸などの脂肪酸を添加する必要もないことを発表している(参考文献 28)。又、近年、植村らは、植物由来の樹脂、ナイロンなどが注目されており、それら高分子材料の原料脂肪酸として需要が高まっているリシノール酸(RA)の微生物による生産技術を開発した。即ち、分裂酵母 *Schizosaccharomyces*

pombe に *Claviceps purpurea* 由来のオレイン酸 $\Delta 12$ ヒドロオキシ化酵素遺伝子を導入し、RA を生産した。しかし、産生される RA が酵母 *S.pombe* の細胞には毒として作用するため、さらに、ホスホリパーゼ A2 をコードする遺伝子 *plg7* を導入過剰発現することにより、RA は遊離脂肪酸として培地中に分泌され、この問題を解決した (参考文献 29)。

神坂泰博士 (産総研、生物プロセス研究部門) らは酵母 *S. cerevisiae* の脂質蓄積に関与する遺伝子群を見出だし、通常、野生株では 10% 以下の脂質含量しかないものを遺伝子操作により 50% 近くの脂質含量の油脂生産酵母への変換を成功させた。具体的には、転写因子遺伝子 *SNF2* の欠損株にトリアシルグリセロール合成酵素遺伝子 (*DGAI*) 等を過剰発現させたりしている (参考文献 30)。

さらに、神坂らは得られた油脂蓄積酵母を用いて、新たに生理活性が注目されているパルミトオレイン酸 (POA) の生産を試み、POA 含量の高い油脂を生産する技術を開発した (参考文献 31)。木村和義氏 (産総研、生物プロセス研究部門) らは同じく油脂蓄積性酵母に $\Delta 6$ 不飽和化酵素を組み込むことにより、 α -リノレン酸からステアリドン酸を効率よく生産することに成功している (参考文献 32)。

PUFA 関連の遺伝子組み換え技術を用いた研究開発は、世界各地で行われており、ここに記載したものととどまるものではないことはもちろんである。

5. おわりに

2014 年度の JPEC (一般財団法人石油エネルギー技術センター) レポートは、「藻類を用いた燃料油生産の世界における取組状況」を報告している (参考文献 33)。これによれば、すでにアメリカを中心にフィンランド、ブラジルなどで幾つかのプロジェクトが進行し、それぞれ規模の拡大を務めており、燃料油生産が年間 12 万トンに達するプロジェクトもある。さらに、いずれのプロジェクトでも PUFA など高付加価値の複製品の開発、商品化に取り組んでいる。本稿の「はじめに」の図 1 に記載した、未来予測におけるバイオケミカルファームプロジェクトそのものが 30 年を経た現在、実施、稼働しているのである。わが国では、先にも記載したようにユーグレナが年産 125 キロリットルの燃料生産を目指してのプロジェクトがスタートしたばかりである。

γ -リノレン酸を始め PUFA に関連するサプリメント、化粧品、医薬品 (例えば、独、英などアトピーの治療薬) などの商品は、現在巷にあふれ生活に密着した存在になっている。これらは高齢化の進む国々の人々の健康維持あるいは健康寿命の上昇の一助となっている。 γ -リノレン酸を含む各 PUFA の微生物による生産技術の開発が、生理活性を有する機能性素材としての利用拡大を後押ししたことは間違いないと思われる。筆者としてはこれら研究開発の端緒に携われたことを誇りに思う。

最後に、本研究「糸状菌を用いた γ -リノレン酸及びその含有油脂の生産並びに利用技術の開発と工業化」は、1988 年 3 月、第 22 回日本油化学協会賞、工業技術賞を授与された。受賞者は以下の各氏である。工技院化学技術研究所、鈴木修、横地俊弘、出光石油化学株式会社、天野和俊、佐野敏郎、株式会社資生堂、瀬戸進、大津祐、日本油脂株式会社、石田祀朗、岩本茂夫、森岡憲祐、明治製菓株式会社、佐藤篤行、魚谷和道。

さらに、 γ -リノレン酸の関連研究を通じて、産総研、横地俊弘 (京都大学、農学)、中原東郎 (筑波大学、医学)、株式会社明治、蛭田修 (筑波大学、農学) の 3 人の論文博士が誕生している。

本稿を書くにあたって、いろいろとお世話になった中村吉宏博士、ご意見、資料提供をいただいた横地俊弘博士、神坂泰博士に感謝いたします。

参考文献

- 1) 化学技術誌 *MOL*, **26**, (6) p2 (1988)
- 2) 日本経済新聞, 2015,12,1
- 3) 先端技術利用研究会編, 国の技術を活かせ-先端技術活用例-, p87 (1989)
- 4) 日本ビタミン学会編, “ビタミン学-脂溶性ビタミン”, 東京化学同人, p209 (1980)
- 5) .H.Horrobin, “Clinical Uses of Essential Fatty Acid”, Edden Press,(1982)
- 6) 佐古猛他, *BIO INDUSTRY*, **3**, (9), 750 (1986)
- 7) 佐古猛他, 「モルティエセラ属糸状菌体の超臨界流体による抽出方法」日本特許第 1540141, 出願人: 工業技術院長
- 8) 日刊工業新聞, 5月 (1984)
- 9) 鈴木修, 油化学, **36**, (10),718 (1987)
- 10) 鈴木修他, 油化学, **37**, (12), 1081 (1988)
- 11) 横地俊弘他, 海洋と生物, **23**, (1), 39 (2001)
- 12) 小川順, 生物工程, **90**, (11), 723 (2012)
- 13) 清水昌、他, *BIO INDUSTRY*, **7**, 438 (1990)
- 14) T.Aki et al., *J. Am. Oil Chem. Soc.*,**78**, 599 (2001)
- 15) 鈴木修他, 「高度不法脂肪酸及びこれを含む脂質の製造方法」 WO9839468 及び US2006014268 (US20060146784), EP0972844, 出願人: サントリー株式会社
- 16) S.Shimizu et al., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **66**, 237 (1989)
- 17) Zvi Cohen, “Proceedings of World Conference on Biotechnology for the Fats and Oils Industry” (T.H.Applewhite,ed.) AOCS, p.285 (1988)
- 18) S.Shimizu et al., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **66**, 342 (1989)
- 19) T.Nakahara et al., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **73**,1421 (1996)
- 20) T.Yokochi et al., *Appl. Microbiol. Biotech.*,**49**, 72 (1998)
- 21) J.Huang et al, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **78**, 605-611 (2001)
- 22) 秋庸裕他 「海洋微生物と、この微生物を用いたカロテノイド系および/または高度不飽和脂肪酸の製造方法」 特開 2003-52357, 出願人: 科学技術振興財団
- 23) 小埜和久他 「飼料」 特開 2004-057206, 出願人: 池田食研株式会社
- 24) 中原東郎, 産総研 TODAY, 2005-7, 26
- 25) T.Aki et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **255**, 575 (1999)
- 26) 鈴木修他, 「脂肪酸 $\Delta 6$ 不飽和化酵素遺伝子、該遺伝子を含むプラスミドおよび形質転換体」 WO02081702, 出願人: 出光石油化学株式会社
- 27) 秋庸裕他, 科学と工業, **75**, 61 (2001)
- 28) H.Yazawa et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 6965 (2007)
- 29) H.Yazawa et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **97**, 8663 (2013)
- 30) Y. Kamisaka et al., *Biochem. J.*,**408**, 61 (2007)
- 31) Y. Kamisaka et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*,**99**, 201 (2015)

3 2) K.Kimura et al., *J. Biosci. Bioeng.*, **117**, 53 (2014)

3 3) 2014 年度 JPEC レポート(第 30 回) , “藻類によるバイオ燃料製造の最新状況”

著者略歴

鈴木 修 (1939 年 3 月 19 日生)

1965 年 東京大学 化学系大学院 林産学専攻 修士課程 修了

同年 通産省入省 (工業技術院 東京工業試験所研究官)

1979 年 東京工業試験所は化学技術研究所に改称

1982 年 同所、天然有機化学部第 2 課長

1986 年 同所、合成化学部長

1989 年 同所、次長

1992 年 工業技術院 微生物工業技術研究所、所長

1993 年 工業技術院 生命工学工業技術研究、所長 (組織再編による)

1996 年 広島大学、工学部、発酵工学講座、教授

1998 年 広島大学大学院、先端物質科学研究科、分子生命機能科学専攻、教授

2002 年 独立行政法人産業技術総合研究所 生物機能工学研究部門 研究顧問

現在、無所属

その他

1971 年 工学博士 (東京大学) 「不飽和脂肪酸エステルの付加反応に関する研究」

受理日 : 2016 年 4 月 1 日