

る遺伝子の3'非翻訳領域はAREを持つ頻度が高いことが報告されており、炎症応答制御において特に早期に誘導され厳密にコントロールされる遺伝子に関してmRNA分解が重要ではないかと考えられる⁹⁾。我々は、TLR刺激により誘導されるZc3h12aがRNaseとして働き、IL-6などの遺伝子群のmRNA安定性を制御することにより炎症をコントロールし、炎症性疾患発症を抑制していることを明らかにした(図1)。最近、Zc3h12aはIL-1 β のmRNA安定性を制御していることも報告されている^{10,11)}。しかしながら、Zc3h12aによる炎症抑制メカニズムに関してはまだ不明な点が多い。例えば、現在明らかになっているZc3h12aターゲット遺伝子の3'-UTR配列間に相同性はない。Zc3h12aが他の分子と複合体を形成することにより特異性を規定している可能性があると考えられ、その複合体同定が興味深い。また、micro RNAも炎症応答のfine-tuningに関わっており、ZCCHC11以外にも、例えばTTPはAREに結合するmiR-16と協調作用しTNFのmRNAを不安定化させていることが報告されている¹²⁾。今後、他のRNA分解機構とmicro RNAとの関連が明らかになることが期待される。また、mRNA安定化制御と免疫応答制御の関連の研究は緒に就いたばかりであり、今後そのメカニズムの詳細が明らかになることが期待される。

謝辞

本稿で紹介したZc3h12aに関する筆者らの研究は、大阪大学免疫学フロンティア研究センター審良静男研究室で行われ、多くの実験は大学院生であった松下一史君によって行われました。本研究に関し、構造モデリングにおいて御協力いただいた、大阪大学蛋白質研究所中村春木教授、大阪大学免疫学フロンティア研究センターDaron Standley准教授、および他の共同研究者の方々に感謝いたします。

- 1) Takeuchi, O. & Akira, S. (2010) *Cell*, **140**, 805–820.
- 2) Anderson, P. (2010) *Nat. Rev. Immunol.*, **10**, 24–35.
- 3) Liang, J., Song, W., Tromp, G., Kolattukudy, P.E., & Fu, M. (2008) *PLoS One*, **3**, e2880.
- 4) Carballo, E., Lai, W.S., & Blakeshear, P.J. (1998) *Science*, **281**, 1001–1005.
- 5) Taylor, G.A., Carballo, E., Lee, D.M., Lai, W.S., Thompson, M.J., Patel, D.D., Schenkman, D.I., Gilkeson, G.S., Broxmeyer, H.E., Haynes, B.F., & Blakeshear, P.J. (1996) *Immunity*, **4**, 445–454.
- 6) Jones, M.R., Quinton, L.J., Blahna, M.T., Neilson, J.R., Fu, S., Ivanov, A.R., Wolf, D.A., & Mizgerd, J.P. (2009) *Nat. Cell Biol.*, **11**, 1157–1163.
- 7) Matsushita, K., Takeuchi, O., Standley, D.M., Kumagai, Y.,

- Kawagoe, T., Miyake, T., Satoh, T., Kato, H., Tsujimura, T., Nakamura, H., & Akira, S. (2009) *Nature*, **458**, 1185–1190.
- 8) Paschoud, S., Dogar, A.M., Kuntz, C., Grisoni-Neupert, B., Richman, L., & Kuhn, L.C. (2006) *Mol. Cell Biol.*, **26**, 8228–8241.
- 9) Hao, S. & Baltimore, D. (2009) *Nat. Immunol.*, **10**, 281–288.
- 10) Mizgalska, D., Wegrzyn, P., Murzyn, K., Kasza, A., Koj, A., Jura, J., & Jarzab, B. (2009) *FEBS J.*, **276**, 7386–7399.
- 11) Skalniak, L., Mizgalska, D., Zarebski, A., Wyrzykowska, P., Koj, A., & Jura, J. (2009) *FEBS J.*, **276**, 5892–5905.
- 12) Jing, Q., Huang, S., Guth, S., Zarubin, T., Motoyama, A., Chen, J., Di Padova, F., Lin, S.C., Gram, H., & Han, J. (2005) *Cell*, **120**, 623–634.

竹内 理

(大阪大学免疫学フロンティア研究センター自然免疫学)

Regulation of immune responses by mRNA stability control
Osamu Takeuchi (Laboratory of Host Defense, WPI Immunology Frontier Research Center (IFReC), Osaka University, 3-1 Yamada-oka, Suita, Osaka 565-0871, Japan)

多様な高度不飽和脂肪酸生合成経路と生産への応用

1. はじめに

高度不飽和脂肪酸とは炭素鎖長が18以上で不飽和結合数が二つ以上の長鎖脂肪酸のことであり、生体内では細胞膜に取り込まれて膜の流動性に関与するだけでなく、血圧調節・抗炎症作用などの機能を持つプロスタグランジンははじめとする生理活性物質へと変換される。一部の高度不飽和脂肪酸は脂質メディエーターへと変換されその機能が注目されているだけでなく¹⁾、健康食品や医薬品への応用へと展開している。例えば、特定の高度不飽和脂肪酸は乳児の発育に必要であることが分かり、アラキドン酸(20:4)やドコサヘキサエン酸(22:6)が配合された粉ミルクが販売されている。高度不飽和脂肪酸の生合成に関わる酵素として不飽和化酵素と鎖長延長酵素が挙げられるが、これらの酵素のほとんどは膜酵素であるため構造や反応メカニズムに関する研究はあまり進んでいないとは言えない。しかしながら、この約20年の間に様々な生物種から高度不飽和脂肪酸の生合成に関与する遺伝子が単離され、多様な生合成経路が明らかになった²⁾。筆者らは、アラキドン酸生産性糸状菌 *Mortierella alpina* 1S-4株の高度不飽和脂肪酸生合成に関わる酵素遺伝子を網羅的に解析し、育種技術を

用いて様々な高度不飽和脂肪酸の生産研究に関わってきた^{3,4)}。ここでは、高度不飽和脂肪酸の生合成経路とそれに関わる不飽和化酵素に焦点をあて、これらの生合成経路を利用した高度不飽和脂肪酸の微生物生産に関する研究を紹介したい。

2. 高度不飽和脂肪酸生合成経路

まず、これまでに明らかにされた代表的なオメガ9, オメガ6, オメガ3に属する高度不飽和脂肪酸の生合成経路を図1に示す。糸状菌 *M. alpina* 1S-4 はグルコースを炭素源として培養すると菌体内に大量のアラキドン酸をトリアシルグリセロールの形で蓄積する。脂肪酸合成酵素により生合成されたパルミチン酸 (16:0) がステアリン酸 (18:0) へ鎖長延長される。その後、 Δ^9 不飽和化、 Δ^{12} 不飽和化、 Δ^6 不飽和化、鎖長延長化、 Δ^5 不飽和化によりアラキドン酸が生合成される (オメガ6経路)。他の多くの糸状菌が持つオメガ6脂肪酸はリノール酸 (18:2) であることから、リノール酸からアラキドン酸生成に関わる Δ^6 不飽和化酵素、 Δ^6 鎖長延長酵素、 Δ^5 不飽和化酵素は *Mortierella* 属糸状菌に特有の酵素であることが示唆さ

れる。すなわち、他の多くの糸状菌では、アラキドン酸は全く蓄積されず、リノール酸からアラキドン酸生成に関わるこれら酵素をコードする遺伝子も見つかっていない。本菌を 20℃ 以下の低温で培養すると ω^3 不飽和化反応が活性化されエイコサペンタエン酸 (20:5) が蓄積する。我々は、高等植物の ω^3 不飽和化酵素が炭素鎖長 18 のオメガ6脂肪酸を基質にするのに対して、*M. alpina* 1S-4 の ω^3 不飽和化酵素は炭素鎖長 18 と 20 のオメガ6脂肪酸を対応するオメガ3脂肪酸へと変換することを明らかにした⁵⁾。線虫由来の ω^3 不飽和化酵素と基質特異性が似ているものの、*M. alpina* 1S-4 の ω^3 不飽和化酵素はより効率よくアラキドン酸をエイコサペンタエン酸へ変換することが分かった。また、 Δ^{12} 不飽和化活性が欠損した変異株 (JT-180株) ではオレイン酸 (18:1) からオメガ9経路でミード酸 (20:3) が蓄積する。このように油糧微生物 *M. alpina* 1S-4 は様々な炭素鎖長 20 の高度不飽和脂肪酸を生合成することができる³⁾。

一方、動物においては Δ^{12} 不飽和化酵素と ω^3 不飽和化酵素の活性が欠損しているため、リノール酸と α -リノレン酸 (18:3) が必須脂肪酸となる。食事から摂取された

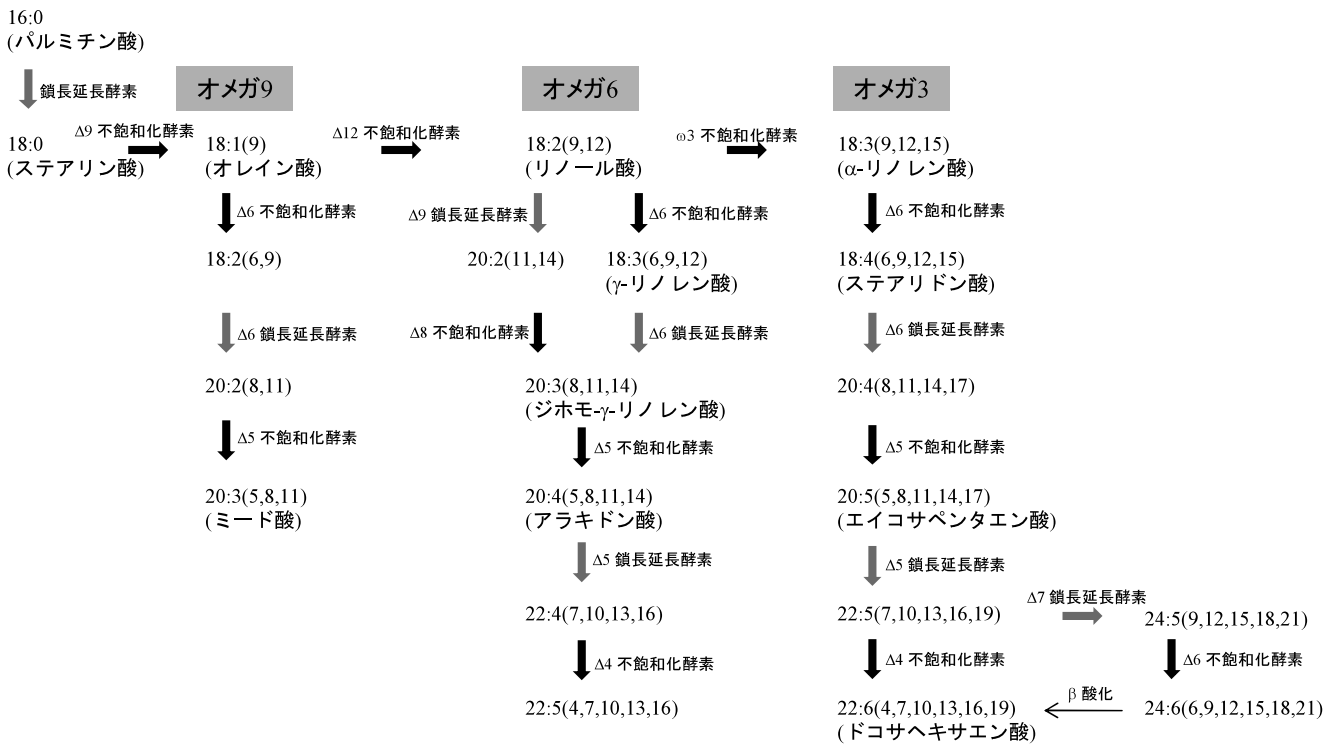


図1 好気的な高度不飽和脂肪酸生合成経路

脂肪酸合成酵素により生合成されたパルミチン酸 (16:0) から様々な高度不飽和脂肪酸が生合成される。ここには様々な生物種が持つオメガ9, オメガ6, オメガ3脂肪酸生合成経路をひとつにまとめた。

これら必須脂肪酸から $\Delta 6$ 不飽和化反応を経由したオメガ6経路でアラキドン酸が、 β 酸化を経由したオメガ3経路でドコサヘキサエン酸がつくられる。しかしそれらの生合成活性は高いとはいえないため、食事からアラキドン酸やドコサヘキサエン酸を摂取することが望まれる。高等植物には $\Delta 6$ 鎖長延長酵素の活性がないため炭素鎖長20以上の高度不飽和脂肪酸は存在せず、リノール酸や α -リノレン酸が主な高度不飽和脂肪酸となる。

海洋性微生物 *Schizochytrium* sp. や *Thraustochytrium* sp. はドコサヘキサエン酸をつくることが報告された^{6,7)}。海洋性微生物 *Thraustochytrium* sp. から $\Delta 5$ 鎖長延長酵素と $\Delta 4$ 不飽和化酵素遺伝子が単離され、オメガ6経路により22:5が、オメガ3経路によりドコサヘキサエン酸が生合成されると予想された^{8,9)}。一方で、*Schizochytrium* sp. ではポリケチド合成酵素複合体によりドコサヘキサエン酸が生産されることが報告された¹⁰⁾。ポリケチド合成酵素複合体はマロニルCoAを初発物質とし、脂肪酸合成酵素複合体に類似した機構で、アセチルCoA単位の伸張、トランス-シス異性化、エノイル還元反応によりドコサヘキサエン酸を生合

成する。これら二種の海洋性微生物は近縁であり、これら二つの経路をあわせ持ちドコサヘキサエン酸を生合成しているとも考えられているが、両経路が同時に機能しているかどうかは未だ明らかにされていない。好気的な不飽和化酵素反応経路と嫌気的なポリケチド合成酵素複合体経路が近縁種に存在することは興味深いといえる。淡水原生物ミドリムシ (*Euglena gracilis*) から $\Delta 8$ 不飽和化酵素遺伝子が単離されたことから、リノール酸が $\Delta 9$ 鎖長延長酵素により20:2へ変換された後、 $\Delta 8$ 不飽和化を受けジホモ- γ -リノレン酸(20:3)へと変換されるオメガ6の新たな経路も提唱された¹¹⁾。

3. 脂肪酸不飽和化酵素の構造と機能

脂肪酸不飽和化酵素は脂肪酸誘導体(アシル acyl-carrier protein, アシル CoA, アシルリピッド)を基質として分子状酸素と電子を利用してモノオキシゲナーゼ的に二重結合を導入する酵素である。高等植物の $\Delta 9$ 不飽和化酵素は可溶性であるが、不飽和化酵素のほとんどは膜貫通型の膜タンパク質である。酵母や糸状菌、動物の不飽和化酵素は小

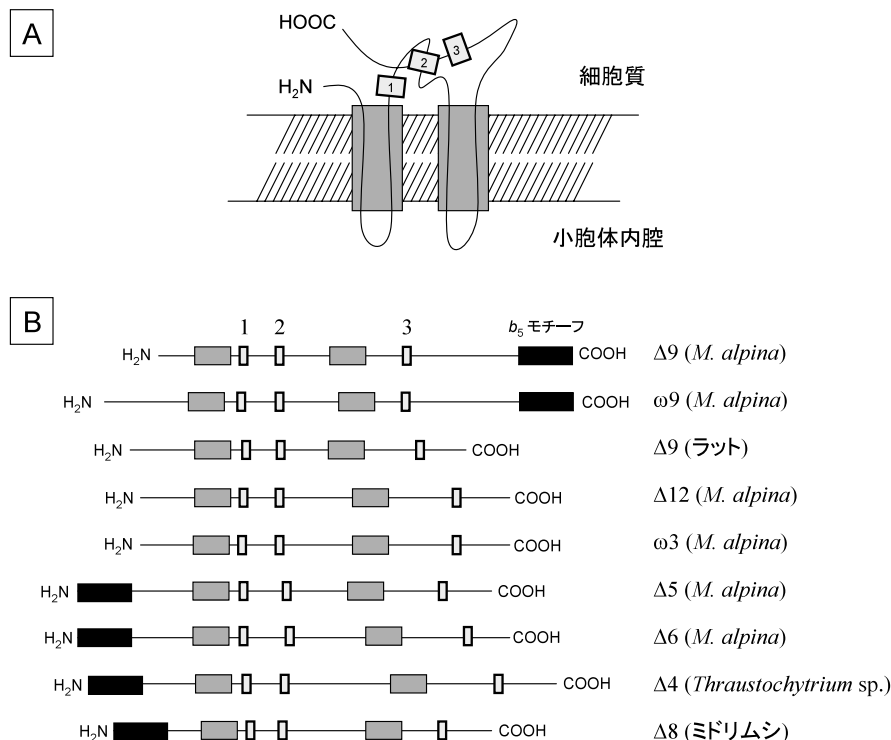


図2 膜結合型脂肪酸不飽和化酵素の構造

(A) 小胞体膜に存在する不飽和化酵素の模式図。1-3で示す三つのHis-boxと二つの膜貫通領域を示す。(B) これまでに報告されている代表的な不飽和化酵素に存在するHis-box(1-3)とシトクロム b_5 モチーフの位置を示す。

胞体膜に存在し、反応中心が細胞質側に向いていると考えられている(図2A)。活性中心には三つのヒスチジンリッチな領域(His-box)が存在し、鉄イオンと複合体を形成していると予想される。高等植物トウモロコシの可溶性 $\Delta 9$ 不飽和化酵素の構造解析から、二つの鉄イオンが酸素原子と結合し脂肪酸に二重結合を導入することが示唆された¹²⁾。

M. alpina 1S-4には $\Delta 9$ 不飽和化酵素、 $\omega 9$ 不飽和化酵素、 $\Delta 12$ 不飽和化酵素、 $\Delta 6$ 不飽和化酵素、 $\Delta 5$ 不飽和化酵素、 $\omega 3$ 不飽和化酵素が存在し、 $\Delta 9$ 不飽和化酵素と $\Delta 6$ 不飽和化酵素をコードする遺伝子はそれぞれ二つ存在することが分かっている⁴⁾。酵母や糸状菌の $\Delta 9$ 不飽和化酵素には、動物や高等植物の $\Delta 9$ 不飽和化酵素と異なり、C末端側にシトクロム b_5 モチーフが存在する(図2B)。また、*M. alpina* 1S-4に特徴的な(24:0を24:1へ不飽和化する) $\omega 9$ 不飽和化酵素にもC末端側にシトクロム b_5 モチーフが存在する。さらに、既存の二重結合とカルボキシル末端との間に二重結合を導入する $\Delta 6$ 不飽和化酵素、 $\Delta 5$ 不飽和化酵素、*Thraustochytrium* sp.の $\Delta 4$ 不飽和化酵素、ミドリムシの $\Delta 8$ 不飽和化酵素はfront-endタイプの不飽和化酵素として定義され、これらのN末端側にはシトクロム b_5 モチーフが存在する。一方、既存の二重結合とメチル末端との間に二重結合を導入する $\Delta 12$ 不飽和化酵素と $\omega 3$ 不飽和化酵素はmethyl-endタイプの不飽和化酵素として定義され、これらにシトクロム b_5 モチーフは存在しない。シトクロム b_5 モチーフの変異型酵素の研究からこのモチーフが活性に必須であり、小胞体膜結合型の内在性のシトクロム b_5 では代替できないことが示された¹³⁾。しかしながら、シトクロム b_5 還元酵素が直接これらシトクロム b_5 モチーフに電子を受け渡すかどうかは明らかにされていない

い。front-endタイプの三つ目のHis-box(QXXHH)のひとつのヒスチジン(H)はグルタミン(Q)に置換されている。このグルタミンをヒスチジンに置き換えた変異型酵素では活性が失われたことから、グルタミン残基が活性に必須であることが示された¹⁴⁾。

M. alpina 1S-4から誘導された $\Delta 9$ 不飽和化活性低下変異株では、野生株では転写されていないもうひとつの $\Delta 9$ 不飽和化酵素遺伝子が転写され機能していることが分かった⁴⁾。転写活性化因子が同定されれば、高度不飽和脂肪酸合成の代謝活性化と脂肪酸変化に起因する新たな転写活性化機構の発見につながることを期待される。また、これまで*M. alpina* 1S-4において低温で $\omega 3$ 不飽和化酵素遺伝子が転写されることで活性が現れると考えられてきたが、通常の培養温度でも遺伝子は転写されていることが明らかになった。低温により翻訳が活性化されるのか、酵素自体が活性化されるのかは大変興味深い。

4. 油糧微生物による高度不飽和脂肪酸生産

油糧微生物は、高度不飽和脂肪酸をトリアシルグリセロールとして菌体内の油滴小胞に大量に蓄積する。油滴小胞が発達し、脂質蓄積能が高いため、乾燥菌体重量の半分を油脂が占める。*M. alpina* 1S-4はグルコースを炭素源とした培地で旺盛に生育し、アラキドン酸の生産量は3.6 g/l、総脂肪酸の35%に達する³⁾(表1)。また、糸状菌*Mortierella ramanniana*(現在*Umbelopsis ramanniana*に分類される)では γ -リノレン酸(18:3)が総脂肪酸の21%、海洋性微生物*Thraustochytrium roseum*ではドコサヘキサエン酸が総脂肪酸の58%に達する。

筆者らは*M. alpina* 1S-4を変異剤ニトロソグアニジンで

表1 油糧微生物による高度不飽和脂肪酸生産

育種法と菌株	高度不飽和脂肪酸
野生株育種	
<i>M. alpina</i> 1S-4	アラキドン酸 (3.6 g/l/7 days, 総脂肪酸の35%)
<i>Mortierella ramanniana</i>	γ -リノレン酸 (0.32 g/l/6 days, 総脂肪酸の21%)
<i>Thraustochytrium roseum</i>	ドコサヘキサエン酸 (0.89 g/l/5 days, 総脂肪酸の58%)
変異株育種	
<i>M. alpina</i> JT-180 ($\Delta 12$ 不飽和化活性欠損変異株)	ミード酸 (2.6 g/l/14 days, 総脂肪酸の35%)
<i>M. alpina</i> M226-9 ($\Delta 5$ と $\Delta 12$ 不飽和化活性欠損変異株)	20:2(8,11) (2.2 g/l/14 days, 総脂肪酸の37%)
<i>M. alpina</i> S14 ($\Delta 5$ 不飽和化活性欠損変異株)	ジホモ- γ -リノレン酸 (4.1 g/l/7 days, 総脂肪酸の42%)
分子育種	
<i>M. alpina</i> 1S-4 ($\omega 3$ 不飽和化酵素遺伝子過剰発現)	エイコサペンタエン酸 (0.8 g/l/11 days, 総脂肪酸の30%)
<i>M. alpina</i> S14 ($\omega 3$ 不飽和化酵素遺伝子過剰発現)	20:4(8,11,14,17) (1.8 g/l/11 days, 総脂肪酸の35%)

処理し、脂肪酸組成が変化した変異株を多種取得した。脂肪酸組成の変化から変異酵素を特定し、脂肪酸合成経路を推測した。変異酵素の多くは脂肪酸不飽和化酵素であり、それらをコードする遺伝子の変異部位を決定することで酵素の活性に必要な領域や RNA スプライシングのミスを引き起こす変異パターンを見いだした⁴⁾。 $\Delta 12$ 不飽和化酵素活性が欠損した JT-180 株ではオメガ 9 経路でミード酸を総脂肪酸の 35% 蓄積し、 $\Delta 5$ 不飽和化酵素活性が欠損した変異株 S14 株では $\Delta 5$ 不飽和化酵素の基質となるジホモ- γ -リノレン酸が総脂肪酸の 42% 蓄積し、 $\Delta 5$ と $\Delta 12$ 不飽和化酵素活性が両方欠損した M226-9 株では 20 : 2 (オメガ 9) が総脂肪酸の 37% 蓄積する³⁾。このように代謝経路上の特定の酵素活性が欠損すると、単純に、その酵素の基質となる脂肪酸、あるいは、それにより派生する脂肪酸が蓄積することが分かった。

様々な不飽和化酵素遺伝子が単離されたことで、油糧微生物の分子育種も可能となった。低温培養することで *M. alpina* 1S-4 はエイコサペンタエン酸を総脂肪酸の 10% 程度蓄積するが、本菌由来の $\omega 3$ 不飽和化酵素遺伝子を過剰発現させるとエイコサペンタエン酸が総脂肪酸の 30% を占める。同様に、 $\Delta 5$ 不飽和化酵素活性が欠損した S14 株で $\omega 3$ 不飽和化酵素遺伝子を過剰発現させると 20 : 4 (オメガ 3) が総脂肪酸の 35% を占める⁴⁾。このように変異株育種と分子育種を組み合わせるとこれまで *M. alpina* 1S-4 では難しかったグルコースからのオメガ 3 脂肪酸発酵を可能とした。

5. おわりに

脂肪酸不飽和化酵素は基質とする脂肪酸に対してある程度選択性を持つようだが、二重結合を導入する炭素の位置は厳密に決められている。多くの膜結合型の不飽和化酵素がどのように基質と反応し二重結合を導入するかは今後の課題といえる。世界的には、高度不飽和脂肪酸合成に関わる不飽和化酵素や鎖長延長酵素遺伝子を用いた組換え植物からアラキドン酸やドコサヘキサエン酸を含む付加価値の高い植物油をつくる試みがなされている¹⁵⁾。筆者らは、特定の高度不飽和脂肪酸を高純度含む発酵油脂 (single cell oil) をつくるだけでなく、脂肪酸以外の様々な脂質の生産者として *M. alpina* 1S-4 の育種技術を開発していきたい。

1) 有田 誠, 磯部洋輔 (2008) 生化学, 80, 1042-1046.

2) Sperling, P., Ternes, P., Zank, T.K., & Heinz, E. (2003)

Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids, 68, 73-95.

- 3) Sakuradani, E. & Shimizu, S. (2009) *J. Biotechnol.*, 144, 31-36.
- 4) Sakuradani, E., Ando, A., Ogawa, J., & Shimizu, S. (2009) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 84, 1-10.
- 5) Sakuradani, E., Abe, T., Iguchi, K., & Shimizu, S. (2005) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 66, 648-654.
- 6) Bajpai, P., Bajpai, P.K., & Ward, O.P. (1991) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 35, 706-710.
- 7) Nakahara, T., Yokochi, T., Higashihara, T., Tanaka, S., Yaguchi, T., & Honda, D. (1996) *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 73, 1421-1426.
- 8) Qiu, X., Hong, H., & MacKenzie, S.L. (2001) *J. Biol. Chem.*, 276, 31561-31566.
- 9) Meyer, A., Kirsch, H., Domergue, F., Abbadi, A., Sperling, P., Bauer, J., Cirpus, P., Zank, T.K., Moreau, H., Roscoe, T.J., Zähringer, U., & Heinz, E. (2004) *J. Lipid Res.*, 45, 1899-1909.
- 10) Metz, J.G., Roessler, P., Facciotti, D., Levering, C., Dittrich, F., Lassner, M., Valentine, R., Lardizabal, K., Domergue, F., Yamada, A., Yazawa, K., Knauf, V., & Browse, J. (2001) *Science*, 293, 290-293.
- 11) Wallis, J.G. & Browse, J. (1999) *Arch. Biochem. Biophys.*, 365, 307-316.
- 12) Shanklin, J., Guy, J.E., Mishra, G., & Lindqvist, Y. (2009) *J. Biol. Chem.*, 284, 18559-18563.
- 13) Guillou, H., D'Andrea, S., Rioux, V., Barnouin, R., Dalaine, S., Pedrono, F., Jan, S., & Legrand, P. (2003) *J. Lipid Res.*, 45, 32-40.
- 14) Hongthong, A., Subudhi, S., Sirijuntarat, M., & Cheevadhanarak, S. (2004) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 66, 74-84.
- 15) Napier, J.A. (2007) *Annu. Rev. Plant Biol.*, 58, 295-319.

櫻谷 英治

(京都大学大学院農学研究科 応用生命科学専攻
発酵生理及び醸造学分野)

Diverse polyunsaturated fatty acid biosynthetic pathways and application for their production

Eiji Sakuradani (Division of Applied Life Sciences, Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Kitashirakawa-Oiwakecho, Sakyo-ku Kyoto 606-8502, Japan)

細胞性粘菌の細胞分化と走化性運動を制御する低分子化合物

1. はじめに

走化性運動 (chemotaxis) は、細胞 (あるいは生物) が「特定の物質 = 走化性誘導因子 (chemoattractant) の濃度勾配」を感知しながら、その物質源に向かって移動する運動