

不飽和化酵素機能を活用したオメガ3脂肪酸の生産

京都大学 学際融合教育研究推進センター
生理化学研究ユニット 安藤 晃規

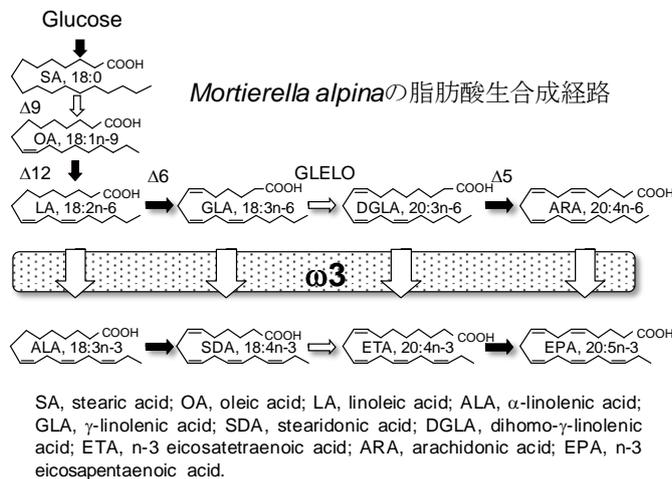
【略歴】

2008年 5月 京都大学大学院農学研究科博士後期課程応用生命科学専攻修了 博士（農学）取得
2008年 5月 京都大学大学院 農学研究科 教務補佐員
2008年 11月 京都大学 全学寄付研究部門 微生物科学寄附研究部門 特定助教
2011年 7月 京都大学学際融合教育研究推進センター生理化学研究ユニット 特定助教

はじめに

近年、エイコサペンタエン酸（EPA）やドコサヘキサエン酸などのオメガ3脂肪酸が、生活習慣病予防、脳機能発達促進やアレルギー抑制などの多様な生理機能を有していることが明らかになり、医薬品、食料品としての需要が急速に拡大している。現在、オメガ3脂肪酸の供給は魚油に依存しており、汚染物質や魚臭の回避や、安定した供給のための代替生産法が希求されている。我々は、これまでに油糧蓄積性微生物 *Mortierella alpina* を活用した有用脂質生産研究に取り組んできた。*M. alpina* は、高度不飽和脂肪酸であるアラキドン酸の商業生産を可能とした糸状菌であり、油糧植物に代わる脂質発酵生産の新たな展開を実現した微生物である。本菌は低温下において ω 3 不飽和化酵素が活性化され、エイコサペンタエン酸を総脂質あたり 10%程度生産することが知られているが、酵素活性が弱く、また、生育に影響を与える低温培養は実生産には不適であるなど、本菌を活用したオメガ3脂肪酸生産には課題があった。本研究では、*Mortierella alpina* の脂質生産性を活用すべく分子育種ツールの拡充と、常温下で酵素活性を示す基質特性に優れた ω 3 不飽和化酵素の探索を行い、既存資源である魚油を代替するオメガ3脂肪酸生産可能な分子育種株の創生を試みた。

遺伝子導入法の開発と内在性 ω 3 不飽和化酵素の過剰発現



従来、*M. alpina* では、遺伝子導入法として直接胞子に形質転換ベクターを打ち込む遺伝子銃法のみが有効な方法であったが、形質転換効率、安定性ともに低いことが問題であった。そこで、新たに植物の形質転換に利用される *Agrobacterium tumefaciens* を介した遺伝子導入法（ATMT法）を試みた。宿主として栄養要求性変異株を用い、胞子を受容体として形質転換を試みた結果、十分な形質転換効率ならびに、安定した形質の保持を実現した。また、導入遺伝子が染色体上に単コピーで挿入されることを明らかにした。さら

に、恒常的発現プロモーターである histone プロモーターにて制御した本菌由来の ω 3 不飽和化酵素遺伝子を、1カセット、および、複数個タンデムに挿入したバイナリーベクターを構築し、ATMT法により *M. alpina* に導入した。得られた形質転換株を低温条件下にて培養後、脂肪酸組成を分析した結果、 ω 3 不飽和化酵素遺伝子一つのもので全脂肪酸あたりおよそ 30%、二つのものでおよそ 40%の EPA 生産を確認した。

有用プロモーターの単離と機能解析

続いて、本株の分子育種に有用な新規プロモーターの取得を目的とし、染色体上に単コピーでの挿入が

可能なATMT法を活用し、プロモーター評価系の確立および確立した評価系を用いたプロモーター解析を行なった。*Escherichia coli*由来 β -glucuronidase (GUS)遺伝子をレポーターとするアッセイ用ベクターを構築し、*M. alpina* 1S-4 ウラシル要求性株にATMT法にて導入した。得られた形質転換体において、GUS 発現カセットが染色体上に1コピーで挿入されていること、GUS 活性値を4-nitrophenyl- β -D-glucuronide を基質とする酵素アッセイによって定量的かつ再現性良く測定できることを確認した。続いて、本株のゲノム情報及びEST解析結果をもとに約30種類の有用プロモーター候補を選抜し、上述の評価系を用いて活性を評価した。その結果、従来のhistoneプロモーターの約5倍の活性を示す高発現プロモーター、時期特異的発現プロモーターなど、分子育種に有用と考えられる特徴を示す新規プロモーターを多数見いだした。

外来 ω 3不飽和化酵素遺伝子の探索と機能解析

*M. alpina*由来の ω 3不飽和化酵素は低温下においてのみ弱い活性を示す。実生産を想定した場合、常温環境下で生産できることが望ましい。そこで、まずアラキドン酸(ARA)含有液体培地を用いて集積培養を行い、常温下においてEPAへの変換能を有する微生物の探索を行った。結果、土壌より常温培養にてEPAを生産する*Pythium* sp.を見いだした。*Pythium* sp.のゲノムDNAとcDNAを鋳型とし、近縁種の ω 3ds遺伝子のアミノ酸相同配列をもとに設計した縮重プライマーを用いてクローニングを行った結果、369残基のアミノ酸からなるタンパク質をコードする ω 3dsホモログ遺伝子を取得した。また、本 ω 3dsホモログ遺伝子発現酵母にて遺伝子産物の機能解析を行った結果、 ω 6脂肪酸を対応する ω 3脂肪酸へと変換する ω 3不飽和化活性を示すことを確認した。続いて、コドン頻度を*M. alpina* 1S-4様に改変した本 ω 3dsを先の検討で取得した高発現プロモーターの制御下に配置した形質転換ベクターをATMT法により*M. alpina* 1S-4に導入した。得られた形質転換株の総脂肪酸をガスクロマトグラフィーにて分析したところ、常温(28°C)培養において ω 3脂肪酸の蓄積を確認し、結果、7日間培養における脂肪酸生産性は約0.4 g/L、その際のEPA含量は総脂肪酸の約20%に達した。

まとめと展望

油糧蓄積性微生物*Mortierella alpina*における、分子育種に有用な遺伝子導入法、ならびに、有用なプロモーターを取得し、それらを活用したオメガ3脂肪酸の発酵生産を実現した。さらには、常温で活性を示す有用な外来 ω 3不飽和化酵素遺伝子を見だし、分子育種による常温オメガ3脂肪酸の発酵生産を実現した。今後、さらに高活性な ω 3不飽和化酵素遺伝子の探索を行い、オメガ3脂肪酸の実生産を実現したい。

謝辞

本研究は、京都大学大学院農学研究科発酵生理及び醸造学研究分野で行われたものであり、小川順教授、岸野重信助教、日比慎特定助教、清水昌名誉教授、片岡道彦准教授(現大阪府立大学教授)、櫻谷英治助教(現徳島大学大学院教授)、ならびに、本研究に関わった大学院生、学部学生に心より感謝を申しあげます。

参考文献

1. A. Ando, Y. Sumida, H. Negoro, D.A. Suroto, J. Ogawa, E. Sakuradani, S. Shimizu. Establishment of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of an oleaginous fungus, *Mortierella alpina* 1S-4, and its application for eicosapentaenoic acid producer breeding. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75 (17), 5529-5535 (2009).
2. Okuda, T., A. Ando, E. Sakuradani, H. Kikukawa, N. Kamada, M. Ochiai, J. Shima, J. Ogawa. Selection and characterization of promoters based on genomic approach for the molecular breeding of oleaginous fungus *Mortierella alpina* 1S-4. *Curr. Genet.*, 60 (3), 183-191 (2014)
3. Okuda, T., A. Ando, H. Negoro, T. Muratsubaki, H. Kikukawa, T. Sakamoto, E. Sakuradani, S. Shimizu, J. Ogawa. Eicosapentaenoic acid (EPA) producing by an oleaginous fungus *Mortierella alpina* expressing heterologous Δ 17-desaturase gene under ordinary temperature. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, in press.