

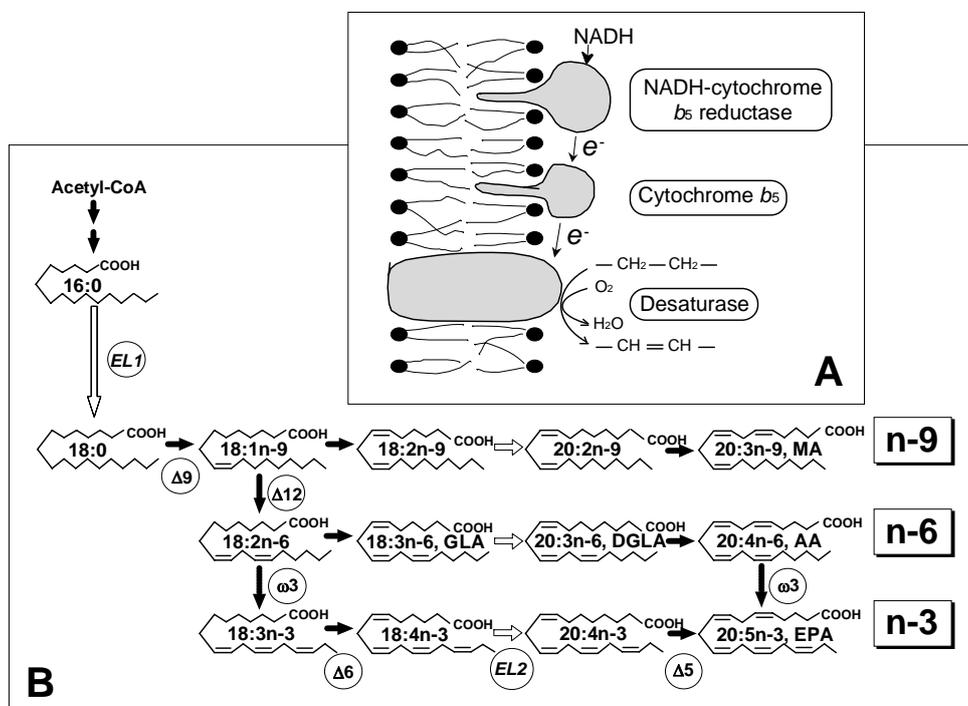
# 油糧微生物の脂肪酸不飽和化酵素遺伝子の構造機能解明と有用脂質生産への応用

## 京都大学 大学院農学研究科 櫻谷英治

高度不飽和脂肪酸 (Polyunsaturated fatty acid, PUFA) とは、炭素鎖長が 18 以上で、分子内に二重結合を 2 つ以上持つ不飽和脂肪酸である。*Mortierella alpina* 1S-4 とその誘導変異株はアラキドン酸 (20:4n-6, AA) を始めとした様々な PUFA の実用生産へと応用されてきた。これら PUFA は生体内で生理活性物質へと変換され、重要な生理機能を担う機能性脂肪酸である。PUFA 生合成に関与する酵素のほとんどはミクロソーム膜に存在する膜タンパク質である。脂肪酸不飽和化酵素 (Fatty acid desaturase, DS) は分子状酸素と電子を用いモノオキシゲナーゼ的に脂肪酸に二重結合を導入する反応に関与する。その際に必要な電子は NADH からミクロソーム電子伝達系を通して供給されると考えられている。これらのタンパク質は可溶化が困難なため精製された報告例も少ない。一方、これらをコードする遺伝子は、ここ 10 年の間に研究が活発化し、本研究における *M. alpina* 1S-4 についてもこれら遺伝子の解析は急速に進んだ。

### 1. PUFA 生合成に関わる酵素遺伝子の解明

*M. alpina* 1S-4 において、パルミチン酸 (16:0) からの PUFA 生合成経路に関わる酵素は 2 つの脂肪酸鎖長延長酵素 (Fatty acid elongase, EL)、5 つの DS、これにリンクするシトクロム  $b_5$ 、シトクロム  $b_5$  還元酵素である (下図)。これら酵素をコードする遺伝子については、我々により  $\Delta 9DS$ 、 $\Delta 12DS$ 、 $\Delta 6DS$ 、 $\omega 3DS$ 、 $EL1$ 、シトクロム  $b_5$ 、シトクロム  $b_5$  還元酵素の各遺伝子が得



ミクロソーム電子伝達系(A)と *M. alpina* 1S-4 の C20 PUFA 生合成経路(B)

られ、 $\Delta 5DS$ 、 $EL2$  のクローニングも報告されている。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  $\omega 9DS$  遺伝子や、ステアリン酸 ( $18:0$ ) を  $26:0$  ( $18:0 \rightarrow 20:0 \rightarrow 22:0 \rightarrow 24:0 \rightarrow 26:0$ ) まで鎖長延長する  $EL$  遺伝子もクローニングした。 $M. alpina$  1S-4 では、 $\Delta 9DS$  遺伝子は 2 種存在し、一方は発現せず休眠状態にある。一方、 $\Delta 6DS$  にも 2 種の遺伝子が存在するが、これらは、どちらも転写されていることを見いだした。

これら  $DS$  をそれぞれ酵母あるいは麹菌で発現させ機能解析を試みた。例えば、 $\Delta 9DS$  遺伝子を発現させると  $16:0$  や  $18:0$  の割合が減少し、パルミトオレイン酸 ( $16:1n-7$ ) やオレイン酸 ( $18:1n-9$ ) が蓄積する。 $\Delta 12DS$  遺伝子、 $\Delta 6DS$  遺伝子、 $\omega 3DS$  遺伝子の発現では、それぞれリノール酸 ( $18:2n-6$ )、 $\gamma$ -リノレン酸 ( $18:3n-6$ , GLA)、 $\alpha$ -リノレン酸 ( $18:3n-3$ ) が蓄積する。このようにそれぞれの遺伝子が他生物の宿主内で発現し効率よく機能することを示すことができた。しかし、宿主の脂質生産性が低く、得られる脂肪酸が油糧植物にも存在することを考慮すると実用性の可能性は低い。そこで、後述するように、これらの遺伝子は、近年我々が開発した  $M. alpina$  1S-4 の形質転換系を用いて C20 PUFA の生産性向上に応用されている。

## 2. *M. alpina* 1S-4 の分子育種による PUFA 生産

*M. alpina* 1S-4 の遺伝子操作による PUFA 生産性向上を目指した分子育種を行うために、*M. alpina* 1S-4 の形質転換系を開発した。上述した *M. alpina* 1S-4 の  $DS$  遺伝子あるいは  $EL$  遺伝子を過剰発現あるいは発現抑制することで任意に目的の PUFA を生産することを試みた。

### *M. alpina* 1S-4 における $EL2$ 遺伝子の過剰発現による AA 生産の効率化

*M. alpina* 1S-4 において、 $EL2$  は主に GLA をジホモ- $\gamma$ -リノレン酸 ( $20:3n-6$ , DGLA) に変換する役割を担っており、AA 生合成経路の律速段階に位置する酵素であることが示唆されてきた。 $EL2$  遺伝子の過剰発現を行い、宿主と形質転換体の脂肪酸組成を分析・比較すると、培養中期から後期にかけて形質転換体の AA 含量は宿主のそれを圧倒して増加し、培養 10 日目には形質転換体の AA 含量は 27.7 mol% に達し、宿主の 1.4 倍となった。これは、遺伝子操作による AA 生産の効率化を実現するとともに、本酵素が AA 生合成経路の律速段階に位置するというこれまでの見解を支持するものでもある。

### RNA interference (RNAi) 法による *M. alpina* 1S-4 の脂肪酸組成の改変

*M. alpina* 1S-4 における PUFA 生合成関連酵素遺伝子の発現抑制による脂肪酸組成の改変を目的として、RNAi 法による  $\Delta 12DS$  遺伝子の発現抑制を試みた。まず、 $\Delta 12DS$  遺伝子の二本鎖 RNA が菌体内で転写されるようにベクターを構築した。得られた形質転換体では  $\Delta 12DS$  欠損変異株の場合と同様にオレイン酸の大量蓄積と n-9 経路の PUFA ( $18:2n-9$ 、 $20:2n-9$ 、MA) の蓄積が確認された。

以上、*M. alpina* 1S-4 の PUFA 生合成に関わる酵素の遺伝子を網羅的に解明し、本菌株の分子育種に応用することで PUFA の効率的生産に有効であることを示すことができた。