

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15433

研究課題名(和文)環境中における高度不飽和脂肪酸誘導体の分布と応用展開

研究課題名(英文) Distribution of polyunsaturated fatty acid derivatives in the environment and development of their application

研究代表者

奥田 知生 (Okuda, Tomoyo)

京都大学・農学研究科・特定研究員

研究者番号：50766194

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：アラキドン酸(ARA)・エイコサペンタエン酸(EPA)生産菌 *Mortierella alpina* に種々のリポキシゲナーゼ(LOX)・シクロオキシゲナーゼ(COX)遺伝子を導入することにより、ARA、EPA誘導体であるLOX・COX産物が生合成されることを明らかにした。さらに上記形質転換株に脂肪酸17不飽和化酵素遺伝子を共発現させ *M. alpina* 自身のEPA生産能を向上させることにより、EPA由来LOX・COX産物の生産性向上に成功した。また、 α -リノレン酸(ALA)誘導体化酵素遺伝子を *M. alpina* に導入しALA添加条件で培養することにより、ALAをALA誘導体に変換できることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

上記の結果から、種々のCOX、LOXは異種生物間でも問題なく機能すること、すなわち、これら脂肪酸誘導体化酵素遺伝子が自然界において普遍性の高いものであることを示すと同時に、脂肪酸高生産菌である *M. alpina* を宿主として用いることにより、より効率的な脂肪酸誘導体生産を実現できる可能性を提示した。これら希少な機能性脂質の生産技術を確認し試料の安定供給を可能にすることは、医学・生理学分野において未解明の点が多い脂質機能解析を促進するものとなるだろう。また、これら脂質は飼料・食品素材・医薬品としての応用が期待されるものであり、養殖業・食品・医薬品業界を刺激するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated the production of polyunsaturated fatty acid derivatives from arachidonic acid (ARA) and eicosapentaenoic acid (EPA) by introducing various lipoxygenase (LOX) and cyclooxygenase (COX) genes into *Mortierella alpina*, an ARA and EPA-producing fungus. Furthermore, by co-expressing the fatty acid Δ -17 desaturase gene in the above transformant to improve the EPA productivity of *M. alpina* itself, we succeeded in improving the productivity of EPA-derived LOX / COX products. It was also shown that ALA can be converted to an ALA derivative by introducing the α -linolenic acid (ALA) derivatizing enzyme gene into *M. alpina* and culturing under ALA-added conditions.

研究分野：応用微生物学

キーワード：プロスタグランジン シクロオキシゲナーゼ リポキシゲナーゼ 脂肪酸誘導体

1. 研究開始当初の背景

近年、ヒトにおいて、多価不飽和脂肪酸 (PUFA) が、免疫、生体防御、血圧調節、痛みや発熱、消化管活動、細胞の増殖、分裂と分化制御など、様々な生理機能に関与していることが明らかになりつつある。PUFA は生体内の様々な酵素によって、酸化脂質やプロスタグランジン、トロンボキサンやロイコトリエンなどの様々な誘導体に変換されることが知られており、これらの PUFA 誘導体もまた、微量で PUFA 以上の様々な生理活性を持つことが明らかになっている。

一方、海洋微生物ラビリントラ類を始めとしたドコサヘキサエン酸 (DHA) 生産菌やエイコサペンタエン酸 (EPA) 生産菌、藻類、海洋生物共生菌などの、PUFA 生産生物については、その PUFA 生産能についてすでに広く研究され商業生産にも利用されているものの、生産 PUFA を基質とする PUFA 誘導体の網羅的な解析が行われた報告はほとんどない。近年になり、ゼブラフィッシュのプロスタグランジン E2 が脊椎動物の造血幹細胞の恒常性を調節すること (*Nature* 447, 1007-1011)、魚の求愛行動を促進するフェロモン受容体にプロスタグランジン F2 が働きかけること (*Nat Neurosci.* 19(7):897-904) など、ヒト以外においても、PUFA 誘導体の新たな機能が報告されつつある。PUFA が陸上より豊富な海洋環境においては、PUFA 生産微生物による PUFA 誘導体が生態系への影響や恒常性の維持に関与し、また、海洋中の餌から取得される PUFA 誘導体が、魚介類の発生・成熟・産卵などに大きく関与している可能性があるが、脂質代謝物の観点からの取り組みはほとんどなく、PUFA 誘導体の分布や存在比および消長など、全貌は未解明であった。

そこで本研究では、DHA および EPA 生産菌、藻類、海洋生物共生菌などにおける PUFA 誘導体の分子種の多様性、分布、組成比、消長を明らかにし、さらに生合成関連酵素群の機能解析によってどのような環境条件で発現しているのかを明らかにすることで、自然環境下における PUFA 誘導体の役割の端緒を得るとともに、応募者が有する ω 9 系、 ω 6 系、 ω 3 系の PUFA 生産株ライブラリと宿主ベクター系を活用し、先の検討で明らかにした生合成関連酵素群を活用し、分子種特異的な PUFA 誘導体の発酵生産を試みた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、自然環境下における PUFA 由来機能性脂質の分子種及び関連酵素群の多様性を明らかにするとともに、自然環境下での PUFA 誘導脂質の役割の端緒を得ることである。また、得られた知見を多彩な機能性脂質の発酵生産へと応用し、自然環境中での役割の解析、生理機能解析へと還元することを目的とした。

3. 研究の方法

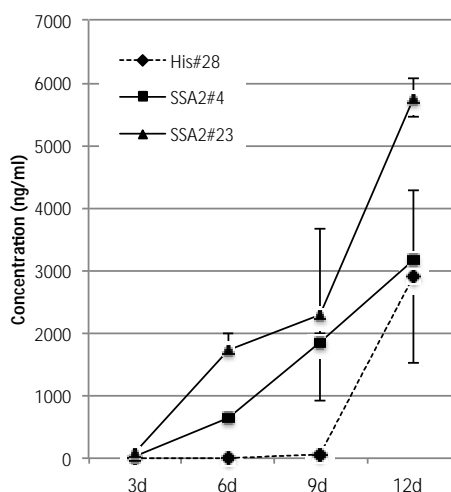
公開されているゲノム情報等に基づき、多様な生物種から種々の脂肪酸誘導体化酵素遺伝子を選抜した。これら遺伝子に対して宿主に合わせたコドン最適化および発現ベクター構築を行ない、アラキドン酸・エイコサペンタエン酸生産微生物 *Mortierella alpina* にアグロバクテリアウム法または遺伝子銃法にて導入した。得られた形質転換株をグルコース・酵母エキス培地にて液体培養し、総脂質を抽出後、LC、LC/MS にて脂肪酸誘導体の定性および定量分析を行なった。

4. 研究成果

(1) オゴノリ由来シクロオキシゲナーゼを用いた *Mortierella alpina* の分子育種による PUFA 誘導体生産

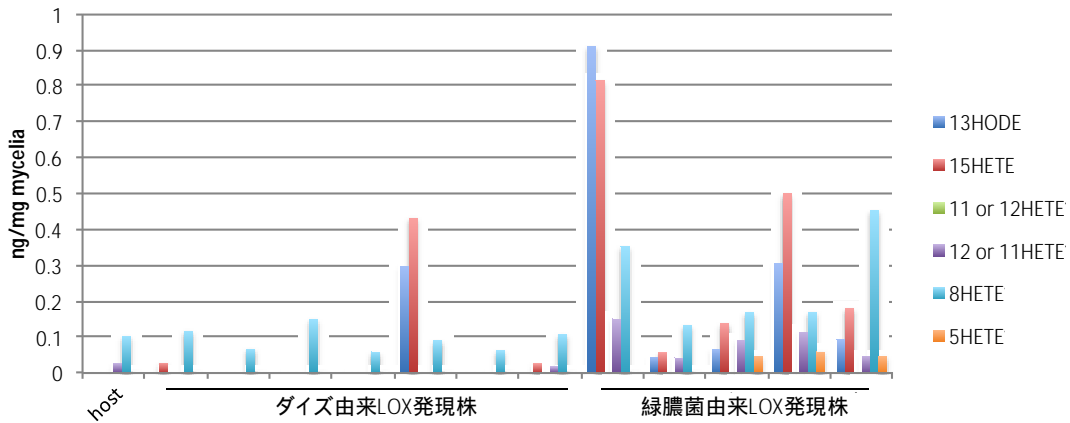
これまでに、アラキドン酸生産微生物 *M. alpina* にてオゴノリ由来シクロオキシゲナーゼ (COX) 遺伝子を導入・発現させることにより、グルコースからアラキドン酸を経て、アラキドン酸誘導体であるプロスタグランジン PGF2 を 5 mg/L 程度生産する技術開発に成功している。今回、新たに高発現プロモーター SSA2p の下流に COX 遺伝子を挿入した高発現ベクターを作製し、*M. alpina* に導入したところ、既存の COX 発現株と比較して、PGF2 蓄積量は 1.14 倍向上した。本株は既存の COX 発現株よりも迅速に PGF2 を蓄積した (右図、HisP は従来の恒常発現プロモーター)。

また、この高発現株を紫外線照射による変異処理に供して、変異株スクリーニングを行なったところ、PGF2 蓄積量がさらに 1.3 倍向上した変異株が得られた。



(2) ダイズ及び緑膿菌由来リポキシゲナーゼを用いた *Mortierella alpina* の分子育種による PUFA 誘導体生産

自然界には反応部位の特異性が異なる数種類のリポキシゲナーゼ(LOX)が存在する。そのうち 15-LOX 活性を有するダイズ・緑膿菌由来の LOX 遺伝子を *M. alpina* に導入・発現させたところ、宿主株には見られないアラキドン酸由来体 15-HETE をはじめとする新規ピークが複数検出された(下図)。

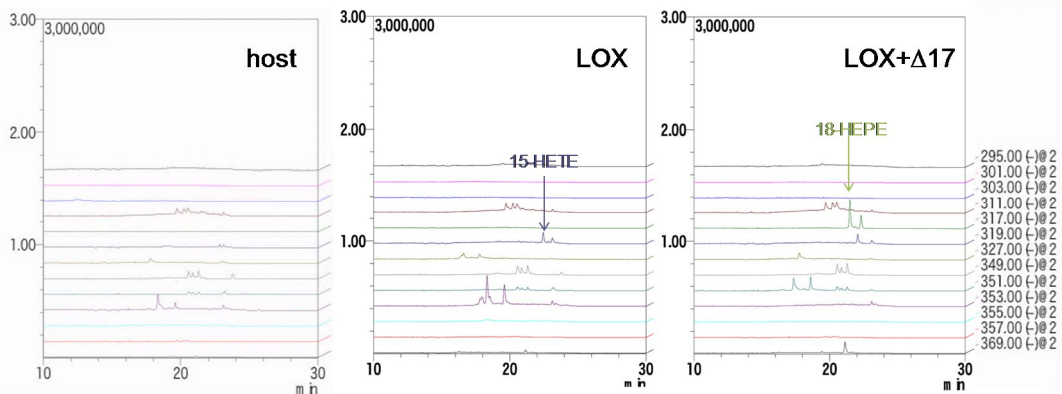


(3) 種々の新規シクロオキシゲナーゼを用いた *Mortierella alpina* の分子育種による PUFA 誘導体生産

(1)と同様に、ヒト、アブラツノザメ、バチルス、ゼブラフィッシュ由来 COX を *M. alpina* に導入・発現させたところ、PGF2 の他、5~15-HETE の生合成が確認できた。いずれも少量であったが、由来生物の異なる COX を用いることにより、多様な PUFA 誘導体の発酵生産が可能となることを示した。

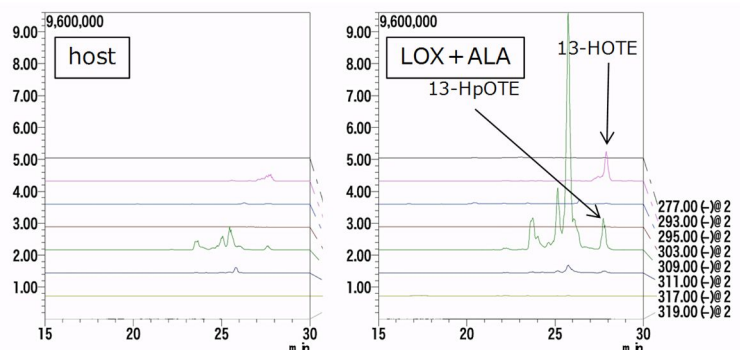
(4) ダイズ及び緑膿菌由来リポキシゲナーゼ遺伝子と脂肪酸 $\Delta 17$ 不飽和酵素遺伝子の共発現による *Mortierella alpina* の分子育種を用いた PUFA 誘導体生産

(2)で得られた 15-LOX 発現株に脂肪酸ミズカビ由来 $\Delta 17$ 不飽和化酵素を共発現させることにより、アラキドン酸からエイコサペンタエン酸を経て 18-HEPE を生合成することに成功した(下図)。



(5) ダイズ由来リポキシゲナーゼ導入 *M. alpina* 株への基質添加による PUFA 誘導体生産

(2)で得られた 15-LOX 発現株に α -リノレン酸(ALA)を添加し培養することにより、13-HOTE を生合成することに成功した(右図)。しかしながら培養を進行させると菌体内で消失していく現象が見られたため、その機構の解明が必要である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------