

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24658188

研究課題名(和文) 海洋性油糧微生物由来のドコサペンタエン酸合成系を導入した出芽酵母の創製

研究課題名(英文) Design and Development of Genetically Engineered Saccharomyces Yeasts for Production of Docosapentaenoic acid

研究代表者

森田 直樹 (MORITA, NAOKI)

独立行政法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・研究グループ長

研究者番号：60371085

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ドコサペンタエン酸(DPA)生産海洋性ラビリンチュラ微生物L59株より全く未知であるDPA合成酵素遺伝子群を単離すること、単離したDPA合成酵素遺伝子群の出芽酵母におけるポリシストロニックな発現を実現することを目的として行った。

DPA生産海洋性ラビリンチュラ微生物L59株は、細菌(特にサイクロバクター属細菌LB004株)との混合培養によって増殖が活性化されるが、DPAが検出できなくなるトラブルに見舞われた。凍結保存していた寒天片中のL59株細胞のゲノムDNAを得た後、次世代シーケンサーを用いて、L59株のドラフトゲノムDNA配列を決定することを試みている。

研究成果の概要(英文)：The aims of this study was the isolation of unknown docosapentaenoic acid (DPA) biosynthetic genes from DPA-producing marine Labyrinthulid, *Labyrinthuila* sp. strain L59, and the polycistronic expression of the isolated DPA synthetic genes in *Saccharomyces* yeast.

Proliferation of DPA-producing *Labyrinthuila* sp. strain L59 is known to be activated by co-cultivation with bacteria (especially with *Psychrobacter phenylpyruvicus* strain LB004). But DPA could not be found using this co-cultivation method. After obtaining genomic DNA from cryopreserved agar block containing cells of *Labyrinthuila* sp. strain L59, we try to determine the draft genomic DNA sequence of *Labyrinthuila* sp. strain L59 using a next-generation sequencing to find the DPA biosynthetic genes.

研究分野：分子生物学

キーワード：ドコサペンタエン酸 ラビリンチュラ微生物 高度不飽和脂肪酸 ポリシストロニック発現 出芽酵母

1. 研究開始当初の背景

ドコサペンタエン酸 (DPA) は、グリーンランドの先住民イヌイット人に動脈硬化症が少ないことからその機能が注目を集めるようになった高度不飽和脂肪酸 (PUFA) で、エイコサペンタエン酸 (EPA) の 10~20 倍ものコレステロール低下作用があることが知られている。また母乳中にはドコサヘキサエン酸 (DHA) と同レベルの DPA が含まれており、アラキドン酸や DHA と並び乳幼児の発育に重要な働きを持つ PUFA であると考えられている。DPA は EPA や DHA の主な供給源である魚油にはあまり含まれていないため、現在ハーブシール (アザラシ抽出油) をその主な原料としているが、十分な供給源とは成り得ていない。

ラビリンチュラ微生物は PUFA を高度に蓄積する微生物として知られている。我々が所属する産業技術総合研究所 (産総研) では、海洋性ラビリンチュラ微生物の中から DPA を高度に蓄積する新規菌株の単離に世界で初めて成功した (Kumon et al., Appl Microbiol Biotechnol, 63:22-28, 2003)。本菌株は DPA の供給源として非常に有望であるが、本菌株が有している DPA 合成酵素遺伝子は、PUFA 合成関連遺伝子資源としても有用である。したがって、これまで全く未知である DPA 合成酵素遺伝子群を単離するとともに、分子生物学的手法を用いて当該酵素の性質等を調べることで DPA 合成機構の解明が可能である。更に我々が有している海洋性細菌由来 DHA 及び EPA 合成酵素遺伝子群 (Okuyama et al. Appl Environ Microbiol, 73:665-670, 2007) と併せ、有用 PUFA 生産を目的とする「脂肪酸デザイン」技術の確立に大きく貢献することが可能である。

新規 DPA 生産微生物株を用いて全く未知である DPA 合成酵素遺伝子の単離と機能解明を目指す点に本研究の学術的特色がある。本研究で得られる成果は、「脂肪酸デザイン」

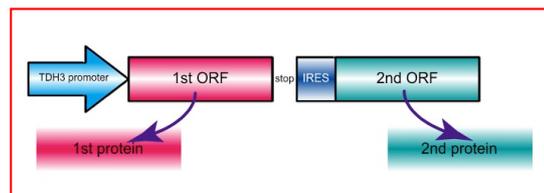
技術の基盤となるものであり、多種多様な PUFA の生合成を基にした新規な生理活性を有する機能性脂質・脂肪酸生産系の構築に資する礎となる。また、出芽酵母における複数タンパク質の同時発現およびタンパク質発現量向上のための技術開発という面でも重要な意義を有している。

2. 研究の目的

産総研では、海洋性ラビリンチュラ微生物の中から DPA を高度に蓄積する新規菌株の単離に世界で初めて成功した。本菌株は DPA の供給源として非常に有望であるとともに、本菌株が有している DPA 合成酵素遺伝子群は PUFA 合成関連遺伝子資源としても有用である。本研究では、①全く未知である DPA 合成酵素遺伝子群を単離すること、②単離した DPA 合成酵素遺伝子群の出芽酵母におけるポリシストロニックな発現と希少 PUFA 生産酵母の創出を実現することを目的とする。

(1) DPA 合成に関与する遺伝子 (群) の単離と発現; DPA 生産海洋性ラビリンチュラ微生物 L59 株を実験材料として用い、DPA 合成に関与する遺伝子群のクローニングを行う。

(2) 出芽酵母におけるポリシストロニックな発現; 我々のグループでは、複数タンパク質の同時発現およびタンパク質発現量向上のための技術として出芽酵母における IRES (Internal Ribosome Entry Site) を利用したポリシストロニックな発現系の開発を試



出芽酵母におけるポリシストロニック発現システム

みている。FMDV (foot-and-mouth disease virus) の 2A region によって、(1) で単離

された DPA 合成酵素遺伝子群の各 ORF を連結することで、ポリシストロニック発現と DPA 生産酵母創出を実現する。

3. 研究の方法

(1) DPA 合成に関与する遺伝子群のクローニング；産総研で単離した DPA 生産海洋性ラビリンチュラ微生物を実験材料として用い、既知のポリケチド合成酵素 (PKS) 様 PUFA 合成酵素遺伝子の情報を基に縮合プライマーをデザインし、RT-PCR 法及び RACE 法により目的の遺伝子の増幅を試みる。DPA 合成に関与している各構成酵素をコードする総ての完全長 cDNA クローン単離と塩基配列の決定を行う。

(2) 出芽酵母におけるポリシストロニックな発現；(1) でクローニングした各 ORF を FMDV の 2A region 連結することによってポリシストロニックな発現ベクターを構築する。構築したポリシストロニック発現ベクターを出芽酵母に導入し、DPA 生産性を確認する。

4. 研究成果

DPA 生産海洋性ラビリンチュラ微生物 L59 株は産総研で単離された菌株であり、同菌株を単離した産総研の研究者から譲渡してもらおう予定であった。しかし、東日本大震災の際に産総研も被害を受け、施設が停電になったため、超低温フリーザーに保存してあった凍結菌株がダメージを受けてしまった。そのため、L59 株の復活は難しい旨の連絡があった。幸いにも当菌株は菌株保存機関 (特許微生物寄託センター) に寄託してあったため、同センターより分譲していただき、実験を開始することができる様になった。

(1) DPA 合成に関与する遺伝子群のクローニング

(i) サイクロバクター属細菌 LB004 株の

培養特性；DPA 生産海洋性ラビリンチュラ微生物 L59 株は、細菌 (特にサイクロバクター属細菌 LB004 株) との混合培養によって増殖が活性化されるが、その状態で抽出されたゲノム DNA には、L59 株と LB004 株のものが混ざってしまう恐れがある。そこで、細菌 LB004 株のクロラムフェニコール感受性を確認した。LB004 株は 10 μ g/mL 以上では生えないことが解った。よって、培養条件記録書には、クロラムフェニコール 200 μ g/mL を含む培地で培養することによって L59 株を純粋化できるとあるが、もう少し低い濃度で L59 株を純粋化できる可能性があることが解った。しかし、更に検討を続けた結果、同条件での L59 株の生育は非常に遅く、L59 株菌体を十分に得ることは難しく、L59 株を純粋培養できる可能性が低いことがわかった。

(ii) 当初は、研究方法に記載の様に、これまでに得られている PUFA 合成酵素遺伝子の情報をもとに、RT-PCR、RACE 法等を用いて DPA 合成に関与している各構成酵素をコードする総ての完全長 cDNA クローンの単離と塩基配列の決定を行う予定であった。しかし、DPA 合成に関与する遺伝子 (群) の単離について、まず L59 株よりゲノム DNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いてドラフトゲノム DNA が配列を決定し、その配列を解析することによって、DPA 合成酵素遺伝子群を構成すると予想される各構成酵素をコードする遺伝子領域を確認することとした。

しかし、L59 株と LB004 株の菌体混合物の脂肪酸組成はガスクロマトグラフィーで分析するが、DPA が検出できなくなってしまった。寒天培地上での培養や液体培地での培養など、様々な培養条件を検討したが、改善に至っていない。現在、更に検討中である。

また、L59 株を再分譲してもらおうために、菌株保存機関に依頼したが、再分譲は「不可」であるとの連絡を受けた。よって、新たな菌

株の入手は不可能となった。

そこで、L59株のゲノムDNAを得るために、寒天ブロック片として超低温フリーザーに保存してあったL59株菌体を入手した(※上述の様に、これら菌体はダメージを受けているので復活はできない)。現在、この寒天ブロック片から直接L59株のゲノムDNAを得ることを検討中である。得られたゲノムDNAをゲノムDNA増幅試薬で増幅し、次世代シーケンサーを用いてドラフトゲノムDNA配列を決定する予定である。

(2) 出芽酵母におけるポリシストロニックな発現

こちらの実験まで進むことができなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0件)

[学会発表] (計 0件)

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計 0件)

[その他]

特になし

6. 研究組織

(1)研究代表者

森田 直樹 (MORITA NAOKI)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・
生命工学領域 生物プロセス研究部門・

研究グループ長

研究者番号：60371085

(2)研究分担者

佐原 健彦 (SAHARA TAKEHIKO)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・
生命工学領域 生物プロセス研究部門・
主任研究員

研究者番号：40357166