

平成22年4月15日現在

研究種目：若手研究 (A)

研究期間：2007～2009

課題番号：19688006

研究課題名 (和文) 油糧微生物の分子育種と微生物の特異な代謝機能を活用した有用物質生産

研究課題名 (英文) Production of useful compounds by means of molecular breeding of oleaginous fungi and unique microbial metabolism

研究代表者

櫻谷 英治 (SAKURADANI EIJI)

京都大学・農学研究科・助教

研究者番号：10362427

研究成果の概要 (和文)：カビ *Mortierella alpina* 1S-4 は、生体内で有用なアラキドン酸などの脂肪酸を多く蓄積する。本研究では、より多くのこれら有用脂質を生産するために、このカビを用いた遺伝子技術の開発、有用脂質の生合成経路の解明を行った。また、このカビは、コレステロールと構造が似ているデスモステロールを多く蓄積する。デスモステロールは天然では珍しいステロールであるが、生体内での役割は不明な点が多い。そこで、このカビを用いてデスモステロールの安定供給を目指した。これらの研究成果は、微生物の脂質生産に直結するだけでなく、微生物の脂質代謝機構を解明する上でも重要だと考えられる。

研究成果の概要 (英文)：Oleaginous fungus *Mortierella alpina* 1S-4 produces various polyunsaturated fatty acids such as arachidonic acid. The researcher worked on development of homologous recombination in this strain, functional analysis of enzyme genes involved in polyunsaturated fatty acids, PUFA production through molecular breeding, elucidation of sterol biosynthetic pathways, and study on sub-terminal oxidation mechanism of *n*-alkanes. The results are considered not only to be directly connected with the field of microbial lipid production but also to be important to elucidate the mechanism of microbial lipid metabolism.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	9,100,000	2,730,000	11,830,000
2008年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2009年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総計	19,800,000	5,940,000	25,740,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：発酵生産・分子育種・アルカン・高度不飽和脂肪酸・デスモステロール

## 1. 研究開始当初の背景

これまでに、「脂質工学」のなかでも、研究代表者も関わってきた「脂肪酸発酵」と称

する分野は比較的盛んに研究され、 $\gamma$ -リノレン酸、アラキドン酸、共役リノール酸などの付加価値の高い有用脂肪酸の微生物生産法

が開発されてきた。本研究では第一に、この技術を多様な希少脂肪酸生産へと発展させることを目指した。一方で、脂肪酸を構成単位とする様々な機能性脂質を微生物により創り出す「脂質発酵」の分野はほとんど進展していないのが現状である。その背景には、脂質生合成経路や脂質蓄積機構が分子レベルで明確にされていないことが挙げられる。一方、近年の栄養学的研究成果から、脂質の機能性を左右する構造要因として、脂肪酸構造のみならず脂質構造全体の影響がクローズアップされてきており、アシル基結合位置や脂肪酸分子種が特定されたアシルグリセロール（構造脂質）、リン脂質、糖脂質などが、通常の脂質では得られない様々な優れた生理特性を示すことが報告されている。例えば、トリグリセリドの2位の位置に高度不飽和脂肪酸（PUFA）を1,3位に中鎖脂肪酸を配置する構造脂質や、2位に脂肪酸を持たないアシルグリセロールなどが高い消化吸収性を示し、燃焼型脂質として現代病である肥満の抑止に寄与することが報告されている。また、多様な脂肪酸側鎖を有するステロール類の薬理効果にも注目が集まってきている。このような背景から、脂質構造を任意に制御しうる生産技術の開発が希求されており、特に、生物生産法は有機合成が不得手とする複雑な構造の機能性脂質の供給において有効な手段であると期待されている。しかしながら、現在の技術では、脂肪酸レベルでの生産制御は可能であるものの、脂質構造レベルでの生産制御は未開拓な領域であるといえる。そこで、本研究では、微生物による油脂生産を、脂質構造レベルで制御可能なものとする新たな技術的ブレークスルーに挑んだ。

## 2. 研究の目的

近年、高機能性脂質の食品・医薬品分野への利用、油糧植物の育種改良、高機能性構造脂質構築のための有用脂肪酸の供給が世界的に注目され、「脂質工学」という新しい技術分野が誕生し現在その領域を大きく広げつつある。研究代表者は、「脂質工学」の先駆的立場から油脂の微生物生産研究を行ってきた。食品栄養学・医学分野における高機能性脂質の機能性評価研究と連携していく過程で、脂質工学のさらなる飛躍、新産業分野の開発、他分野との融合による新規研究テーマの探索のためには、油脂の機能や特性を決定する最も重要な構成単位である有用脂肪酸の分子種を拡充すること、すなわち、実用的な有用脂肪酸生産技術を確立し、供給可能な脂肪酸ライブラリーを多様化すること、ならびに、これらの脂肪酸をより機能性の高い脂質（トリアシルグリセロール、ジアシルグリセロール、リン脂質、糖脂質、ステロールエステル）に構築していく技術の開発が重要

であるという認識に至った。本研究はこの提案に基づき、次世代型「脂質工学」の創出に向け、(I)微生物機能を利用した希少有用脂肪酸の実用的生産技術の開発、ならびに、(II)機能性脂質への構造化に有用な新規脂質合成能をもつ微生物の育種と微生物酵素の探索・開発を行うものである。

## 3. 研究の方法

(1) 研究代表者らはこれまでにアラキドン酸の工業生産株 *Mortierella alpina* 1S-4 の形質転換系を開発し、PUFA 生合成関連酵素遺伝子の過剰発現と遺伝子転写抑制により脂肪酸組成の改変に成功してきた。しかしながら、実用的な分子育種株創製のためには、実用性と汎用性の高い宿主ベクター系の開発が必要である。すなわち、遺伝子相同組み換え法の開発、多重遺伝子発現系の構築、自立複製できるベクターの探索などの課題が残っている。糸状菌の相同組み換えの頻度は非常に低いと考えられており、これまでに糸状菌で報告されているいくつかの例を参考に *M. alpina* 1S-4 の相同組み換え系の構築を試みた。具体的には、非相同組み換えに関わるタンパク質 Ku80 をコードする遺伝子を相同組み換えにより破壊し、優先的に起こる相同組み換えの効率を低下させた株を構築する。さらに、この株を用いてターゲットとする $\Delta 5$  脂肪酸不飽和化酵素遺伝子の破壊効率を検討する。得られた形質転換体の脂肪酸組成を分析することで破壊効率を評価することとした。

(2) *M. alpina* 1S-4 には脂肪酸鎖長延長酵素が2種存在することがわかっていたが、様々な PUFA を生産する本菌においてはこれら以外にも脂肪酸鎖長延長酵素が存在することが考えられた。そこで、他生物由来の脂肪酸鎖長延長酵素のアミノ酸配列情報や本菌のゲノム情報を活用して、これまで未知の脂肪酸鎖長延長酵素遺伝子を単離し、機能解析することを試みた。PUFA の生合成と代謝を考える上で重要な鍵酵素であると考えられる。

(3) 野生株 *M. alpina* 1S-4 とその誘導変異株を宿主とし、これまで単離してきた PUFA 生合成に関わる酵素遺伝子を過剰発現させることで、脂肪酸組成を変化させ、特定の PUFA の生産性を向上させることを試みた。

(4) *M. alpina* は PUFA だけでなく天然では希少なデスモステロールを生産する。総ステロール生産量も微生物の中では高く、ステロール生産株として期待される。一方、デスモステロール生合成経路は未解明な点が多く、生合成に関わる酵素あるいは酵素遺伝子の解明は必要である。そこで、ステロールメチル基転移酵素に焦点をあて、その酵素遺伝子を単

離し機能を解明した。さらに、*Mortierella* 属糸状菌の中でも特にデスモステロール生産性が高い *M. alpina* FA113 株の形質転換系の構築も試みた。

(5) 酵母様微細藻プロトテカは直鎖状長鎖アルカンの5位の位置を酸化し、アルコール体、さらに、ケトン体へと変換するサブターミナル酸化経路を持つことを見出してきた。ここでは、アルカンの代謝中間体を単離精製し、構造決定することで代謝経路を考察した。さらに、アルカンを炭素源としたスクリーニングにより、新たなサブターミナル酸化経路を有する微生物を探索した。

#### 4. 研究成果

(1) *M. alpina* 1S-4 を用いて、相同組換えを利用した遺伝子破壊系の構築を目指した。糸状菌の形質転換では、相同組換えの頻度は一般的に非常に低く、*M. alpina* 1S-4 においても外来遺伝子は非相同組換えによりゲノム上へ挿入される。糸状菌において非相同組換えに関わるタンパク質 (Ku70 あるいは Ku80) 遺伝子を破壊した株では相同組換え頻度が上昇することが報告されている。そこで、非相同組換えに関わると考えられる Ku80 タンパク質に注目し、Ku80 遺伝子を相同組換えにより破壊することを試みた。まず、*M. alpina* 1S-4 から Ku80 遺伝子をクローニングした。本 Ku80 遺伝子は 2,508 bp から成り、836 個のアミノ酸をコードしていた。アミノ酸配列を他生物由来の Ku80 と比較すると、25~30%の相同性を示すことがわかった。Ku80 遺伝子破壊用コンストラクトを用いて得られた 70 株程度の形質転換体のゲノムにおいて遺伝子挿入パターンを確認したところ、1 株だけベクターが相同組換えにより目的位置に挿入されている Ku80 破壊株であることがわかった。さらに、非相同組換えの頻度が低くなっていると予想される Ku80 破壊株で  $\Delta 5$  脂肪酸不飽和化酵素遺伝子破壊を試みた。 $\Delta 5$  脂肪酸不飽和化酵素活性が低下することでアラキドン酸生産性が低くなった株が得られたので、ゲノム挿入パターンを確認したが予想されるパターンと完全に一致しなかった。今後は、非相同組換えの鍵酵素であるリガーゼ (Lig4) 遺伝子の破壊株を用いて同様の実験を進める必要がある。

(2) *M. alpina* 1S-4 から新たな脂肪酸鎖長延長酵素 MALCE1 遺伝子を単離した。酵母発現系を用いて、MALCE1 遺伝子がコードする酵素の機能を解析したところ、本酵素はパルミトレイン酸 (16:1n-7)、リノール酸 (18:2n-6)、あるいは、 $\alpha$ -リノレン酸 (18:3n-3) を効率よく鎖長延長することをみいだした。さらに、RNAi 法による gene silencing を行ったとこ

ろ、パルミチン酸 (16:0) が蓄積したことから、MALCE1 は *M. alpina* 1S-4 内でパルミチン酸をステアリン酸 (18:0) へ変換する役割を担っていることを明らかにした。また、MALCE1 とアミノ酸レベルでの相同性が 50%を示す MALCE2 をコードする遺伝子を単離し、その機能を解析した。酵母での発現実験を行ったところ、MALCE2 はペンタデセン酸 (15:1n-6)、パルミトレイン酸、オレイン酸 (18:1n-9)、 $\alpha$ -リノレン酸を鎖長延長することが明らかになった。このうち、特にパルミトオレイン酸を効率よく鎖長延長し、シスバクセン酸 (18:1n-7) へと変換することがわかった。これまでに存在が確認されたこれら 4 つの鎖長延長酵素が菌体内でどのように機能発現しているか調べることで、高度不飽和脂肪酸生産制御に応用できると考えられる。

(3) *M. alpina* 1S-4 とその誘導変異株を用いた分子育種により高度不飽和脂肪酸の生産を向上させた。すなわち、MALCE1 遺伝子を *M. alpina* 1S-4 で過剰発現させたところ、合成経路の最終脂肪酸であるアラキドン酸の生産量が約 1.3 倍となった。また、2 つの GLELO ( $\gamma$ -リノレン酸 (18:3n-6) をジホモ- $\gamma$ -リノレン酸 (20:3n-6) へ変換する鎖長延長酵素) 遺伝子を含む発現ベクターを用いて GLELO 遺伝子を過剰発現させたところアラキドン酸生産量が約 1.5 倍となった。変異株 JT-180 は  $\Delta 12$  脂肪酸不飽和化酵素活性が欠損しているが、一方で、 $\Delta 5$  と  $\Delta 6$  脂肪酸不飽和化酵素活性が *M. alpina* 1S-4 より高くなっている。JT-180 で  $\Delta 12$  脂肪酸不飽和化酵素遺伝子を発現させ、その活性を回復させることで、アラキドン酸の生産量を野生株よりも約 1.8 にすることができた。以上の知見は分子育種株による高度不飽和脂肪酸の実用生産につながる革新的な成果である。

(4) *M. alpina* 1S-4 から 2 つのステロールメチル基転移酵素 (ERG6-1 と ERG6-2) 遺伝子を単離した。本菌株内でのこれら遺伝子転写量を測定したところ、ERG6-1 遺伝子の転写量は極めて低いことがわかった。さらに、RNAi による機能解析を行ったところ ERG6-2 遺伝子の転写量が低下することでステロール組成が変化することを見出した。以上より、ERG6-2 は本菌のステロール生合成で重要な役割を担っていることを示すことができた。

*Mortierella* 属糸状菌は天然では珍しいデスモステロールをつくることができ、*M. alpina* FA113 株はその生産性が最も高いことを見出している。そこで、分子育種によるデスモステロール生産を可能とするため *M. alpina* FA113 の形質転換系を構築した。すなわち、デスモステロール生産能を維持したウラシル要求性株を取得し、選択マーカーを含

むプラスミドをパーティクルガン法により導入することで形質転換を可能とした。以上の成果は、これまで不明な点が多いデスマステロール生合成経路の解明に役立つだけでなく、*M. alpina* によるデスマステロール生産に応用できると考えられる。

(5) 酵母様微細藻プロトテカは直鎖状長鎖アルカンの5位の位置を酸化し、アルコール体、さらにケトン体へと変換するサブターミナル酸化経路を持つことを見出した。他の未知物質を同定したところ、ケトン体はバイヤビリガー反応により酸化され、1級アルコールと脂肪酸になることを明らかにした。さらに、スクリーニングを行った結果、糸状菌、放線菌、担子菌などに酸化位置が異なるアルカンのサブターミナル酸化反応を見いだした。これらの成果は、新たな酸化酵素の発見につながるだけでなく、物質変換への応用にも期待される。今後はこれら反応に関わる酵素あるいは遺伝子の機能を解明する必要がある。

#### 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 12 件)

- ① Tokuhiko K, Muramatsu M, Ohto C, Kawaguchi T, Obata S, Muramoto N, Hirai M, Takahashi H, Kondo A, 櫻谷英治, Shimizu S, Overproduction of geranylgeraniol by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae*, Appl. Environ. Microbiol., 75(17), 5536-5543, 2009, 査読有り
- ② Ando A, Sumida Y, Negoro H, Suroto DA, Ogawa J, 櫻谷英治, Shimizu S, 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, 査読有り
- ③ Muramatsu M, Ohto C, Obata S, 櫻谷英治, Shimizu S, Alkaline pH enhances farnesol production by *Saccharomyces cerevisiae*, J. Biosci. Bioeng., 108(1), 52-55, 2009, 査読有り
- ④ 櫻谷英治, Ando A, Ogawa J, Shimizu S, Improved production of various polyunsaturated fatty acids through filamentous fungus *Mortierella alpina* breeding, Appl. Microbiol. Biotechnol., 84(1), 1-10, 2009, 査読有り
- ⑤ Ando A, 櫻谷英治, Horinaka K, Ogawa J,

Shimizu S, Transformation of an oleaginous zygomycete *Mortierella alpina* 1S-4 with the carboxin resistance gene conferred by mutation of the iron-sulfur subunit of succinate dehydrogenase, Curr. Genet., 55(3), 349-356, 2009, 査読有り

- ⑥ 櫻谷英治, Ando A, Ogawa J, Shimizu S, Production of functional lipids by microorganisms: arachidonic acid and related polyunsaturated fatty acids, Tanpakushitsu Kakusan Koso, 54(6), 725-734, 2009, 査読有り
- ⑦ 櫻谷英治, Nojiri M, Suzuki H, Shimizu S, Identification of a novel fatty acid elongase with a wide substrate specificity from arachidonic acid-producing fungus *Mortierella alpina* 1S-4, Appl. Microbiol. Biotechnol., 84(4), 709-716, 2009, 査読有り
- ⑧ 櫻谷英治, Shimizu S, Single cell oil production by *Mortierella alpina*, J. Biotechnol., 144(1), 31-36, 2009, 査読有り
- ⑨ Ando A, Ogawa J, Sugimoto S, Kishino S, 櫻谷英治, Yokozeki K, Shimizu S, Selective production of *cis*-9, *trans*-11 isomer of conjugated linoleic acid from *trans*-vaccenic acid methyl ester by *Delacroixia coronata*, J. Appl. Microbiol., 106(5), 1697-1704, 2009, 査読有り
- ⑩ 櫻谷英治, Abe T, Matsumura K, Tomi A, Shimizu S, Identification of mutation sites on  $\Delta 12$  desaturase genes from *Mortierella alpina* 1S-4 mutants, J. Biosci. Bioeng., 107(2), 99-101, 2009, 査読有り
- ⑪ 櫻谷英治, Abe T, Shimizu S, Identification of mutation sites on  $\omega 3$  desaturase genes from *Mortierella alpina* 1S-4 mutants, J. Biosci. Bioeng., 107(1), 7-9, 2009, 査読有り
- ⑫ 櫻谷英治, Murata S, Kanamaru H, Shimizu S, Functional analysis of a fatty acid elongase from arachidonic acid-producing *Mortierella alpina* 1S-4, Appl. Microbiol. Biotechnol., 81(3), 497-503, 2008, 査読有り

[学会発表] (計 6 件)

- ① 櫻谷英治, ○西馬場由美, 落合美佐, 小川順, 清水昌, アラキドン酸生産性糸状菌 *Mortierella alpina* 1S-4 の脂肪酸鎖長延長酵素遺伝子の構造と機能の解明, 2010年度日本農芸化学大会, 2AUp13, 2010

- 年3月28日、東京
- ② ○櫻谷英治、野尻増俊、鈴木春奈、清水昌、アラキドン酸生産性糸状菌 *Mortierella alpina* 1S-4 の脂肪酸鎖長延長酵素遺伝子のクローニングと諸性質解明、2009年度合同沖縄大会（日本農芸化学会）、2009年10月31日、沖縄
  - ③ ○福岡義宏、櫻谷英治、清水昌、油糧微生物 *Mortierella alpina* より取得したケトコナゾール耐性変異株の諸性質解明、2009年度合同沖縄大会（日本農芸化学会）、2009年10月31日、沖縄
  - ④ ○櫻谷英治、安藤晃規、小川順、清水昌、油糧微生物による有用脂質生産と特異な脂質変換反応の探索、第61回日本生物工学会大会、2009年9月25日、愛知県（名古屋）
  - ⑤ ○櫻谷英治、安藤晃規、小川順、清水昌、アラキドン酸生産性糸状菌 *Mortierella alpina* 1S-4 の分子育種による有用脂質生産、2009年度日本農芸化学大会、2SY15-4、2009年3月28日、福岡県（博多）
  - ⑥ 櫻谷英治、岸野重信、小川順、横関健三、○清水昌、油糧微生物の代謝工学と機能性脂質生産への利用、第60回日本生物工学会大会、3S2a05、2008年8月29日、宮城（仙台）

〔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〕

ホームページ

<http://www.hakko.kais.kyoto-u.ac.jp/lab-e/index-e.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

櫻谷 英治 (SAKURADANI EIJI)

京都大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号：10362427

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし