

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21880023

研究課題名（和文） 脂質漏出性糸状菌の漏出機構の解析と応用

研究課題名（英文） Application and analysis of the lipid excreting filamentous fungus

研究代表者

安藤 晃規 (ANDO AKINORI)

京都大学・微生物科学寄附研究部門・助教

研究者番号：10537765

研究成果の概要（和文）：我々は高度不飽和脂肪酸生産性糸状菌 *Mortierella alpina* 1S-4 を土壌より単離し、油脂発酵生産を行うとともに脂質合成経路を解明してきた。また、一連の変異処理の過程で脂質を漏出する変異株 V6 株を取得した。漏出した油滴小胞膜の脂質成分のうち、極性脂質の主要成分 3 種の分子種を単離し分析を行った結果、この内一つはステロールにグルコースが結合したステロール配糖体であると考えられた。残りの 2 種は、スフィンガジエニン型長鎖塩基から構成されるセレブロシド、および、ヒドロキシスフィンガジエニン型長鎖塩基から構成されるセレブロシドであると推定した。また、脂質の漏出の顕在化には、細胞壁の脆弱性と旺盛な生育が必要であることがわかった。一方で、*M. alpina* の分子育種法の整備を行い、一回交差による相同組換え効率を改善すべく非相同組換えに関与する *Ku80* 遺伝子の破壊、及び、複数の遺伝子機能の評価に必要な多重要求性変異株の構築に成功した。

研究成果の概要（英文）：We have isolated the oleaginous filamentous fungus *Mortierella alpina* 1S-4 from soil and studied the biosynthetic pathway of polyunsaturated fatty acid. We created an oil-excreting fungus V6 through the chemical mutation of *M. alpina* 1S-4. The polar lipids consisting the membrane of lipid particle excreted by V6 were analyzed. The presences of three kinds of glycolipids (sample 1, sample 2 and sample 3) were found in the extracellular lipids. Based on their mobility on TLC, sample 2 and sample 3 were assumed to be cerebrosides and sample 1 was assumed to be steryl glycoside. Sample 1 was identified to be a mixture of campesteryl glucoside, stigmasteryl glucoside and sitosteryl glucoside. Sample 2 and sample 3 were identified to be 1-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl-2-*N*-(2'-hydroxyalkanoyl)-9-methyl-*trans*-4,*trans*-8-sphingadienines and 1-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl-2-*N*-(2'-hydroxyalkanoyl)-8-hydroxy-9-methyl-4,8-sphingadienines, respectively.

Furthermore, we found the vigorous growth and weakness of cell wall of *M. alpina* lead to excrete lipids. On the other hand, we constructed *ku80*-disrupted strain by single-crossover homologous recombination to improve the efficiency of gene targeting and multi-auxotroph mutants to investigate multiple gene function at a time.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,110,000	333,000	1,443,000
2010 年度	1,010,000	303,000	1,313,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,120,000	636,000	2,756,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：応用微生物学

キーワード：脂質漏出性糸状菌、*Mortierella alpina*、高度不飽和脂肪酸、相同組換え

### 1. 研究開始当初の背景

我々は機能性脂質である高度不飽和脂肪酸の新たな供給源として土壌より単離した *Mortierella* 属糸状菌を見いだしている。本菌は高度不飽和脂肪酸の一種アラキドン酸をトリアシルグリセロール (TG) の形態で著量蓄積する。また、特に生産性が高かった *M. alpina* 1S-4 を用いた高度不飽和脂肪酸の大量生産系を確立すると共に、本菌における高度不飽和脂肪酸の生合成経路を解明した。また、本菌の胞子を変異処理し、本菌に存在すると考えられる脂肪酸不飽和化酵素、あるいは鎖長延長化酵素に対応する欠損変異株を取得し、これらの変異株を用いたジホモ・リノレン酸、ミード酸などの多様な高度不飽和脂肪酸の生産を可能にしている。

これらの研究を進める過程で、菌体外に脂質を多量に分泌する変異株 V 6 株を発見した。分泌される脂質の構造を解析した結果、主にアラキドン酸から構成される TG が、膜構造を有する脂肪球に封入された形で分泌されることが判明した。この脂肪球は TG を多量に含有するにもかかわらず、水溶液中に均一に分散する特異な界面活性を示すものであった。

### 2. 研究の目的

本研究では漏出性に関わる基礎的な分子機構の解明を行うとともに、漏出物の機能性評価を行い応用展開への端緒を得る。さらに、本菌の分子育種法を整備し、新たな発酵生産システムの開発、特に機能性脂質生産ならびにバイオエネルギー生産システムを構築し、バイオリファイナリー技術に資するシーズを提示することを目的としている。

### 3. 研究の方法

(1) 脂質分泌生産機構の解明に向け、脂肪球を構成する分子の構造と機能の解明を行う。すでに脂肪球膜が、極性脂質 (セレブロシド、リン脂質) とタンパク質とからなる図 2 のような構造をしていることが判明している。この知見に基づいてセレブロシド、リン脂質の単離、精製を行う。また、培地条件と漏出状態の因果関係を指標とした (細胞壁、細胞膜異常等) 漏出原因の絞り込み。さらに親株と変異株とのタンパク質発現プロファイルの比較により、変異株に特徴的に発現している、あるいはしていないタンパク質情報を抽出する。

(2) セレブロシド、リン脂質、タンパク質を用い、リポソームの再構成を行い、界面活

性や、脂質抱合能力などの機能評価を行う。

(3) *M. alpina* の薬剤耐性を指標とした選抜法と新たに開発した遺伝子導入法、アグロバクテリウム法を組み合わせ、相同組換えによるジーンターゲット法を開発する。また、先の脂肪球膜上のタンパク質情報から遺伝子情報を取得し、特異的な遺伝子の破壊を行い、脂質の漏出を誘導する。もしくは漏出性を補関する遺伝子を特定することで、漏出機構に関連する因子を特定する。

(4) 漏出を顕在化させる因子は複数存在することが予想される。そこで生育度、脂質生産性に影響を与えない因子を選抜し時期特異的発現プロモーターと組み合わせ、脂質生産系モデルシステムを構築する。また、先の遺伝子破壊系を利用した、各種 n-3 系、n-6 系、n-9 系に対応する脂質漏出生産株のライブラリー化を行う。

### 4. 研究成果

変異株 V6 株の漏出した油滴小胞膜の脂質成分のうち、極性脂質の主要成分であったセレブロシド様脂質をシリカゲルカラムクロマトグラフィー及び HPLC を用いて精製し、3 種の分子種を得た。この内一つは GLC 及び GC-MS の分析結果から、ステロールにグルコースが結合したステロール配糖体であると考えられた。残りの 2 種を GLC、GC-MS、MALDI-TOF-MS による質量分析及び NMR 分析の結果から、グルコース、炭素数 14、15、16 の 2-ヒドロキシ飽和脂肪酸、9 位にメチル基、4 位と 8 位に二重結合を持つスフィンガジエニン型長鎖塩基から構成されるセレブロシド、および、グルコース、炭素数 14、15、16 の 2-ヒドロキシ飽和脂肪酸、炭素数 19 で、2 つの二重結合と 2 つの水酸基を持つヒドロキシスフィンガジエニン型長鎖塩基から構成されるセレブロシドであると推定した。今後、これらセレブロシドの機能性を評価する予定である。また、一方で *M. alpina* 1S-4 を変異処理し、コロニーの表面が油滴小泡で覆われた変異株を選抜した結果、新たに V6 株よりも菌体外脂質生産量の多い YM19 株や、脂肪酸組成の異なる油脂を漏出する変異株を見いだした。顕微鏡観察下において、YM19 や V6 株は菌糸先端部が膨らみ溶菌する表現型を示したことから、漏出を誘発する変異と細胞壁合成との間に何らかの関係があることが予想された。そこで平板培地成分の検討を行い菌糸形態および脂質漏出への影響を検討した結果、浸透圧安定化剤、細胞壁合成前駆体、ならびにある種の抗生物質の添加にて脂質の漏出が抑制され、親株様の菌糸形態

の復帰を確認した。このことより、脂質の漏出の顕在化には、細胞壁の脆弱性と旺盛な生育が必要であることが示された。

また、脂質漏出原因因子の特定、ならびに、厳密な脂肪酸合成経路の代謝制御に必要な遺伝子ターゲティング法の開発を行った。まず、非相同組み換えに関与する *ku80* 遺伝子の前後を欠損させた *ku80* 破壊用ベクターを構築し、遺伝子銃にて導入後、一回交差による *ku80* 遺伝子の破壊を試みた。結果、PCR法により *ku80* 遺伝子の破壊を確認することができた。本結果により、低い頻度ながらも一回交差での遺伝子破壊が可能であることを示した。続いて、本破壊株をホスト株とし、 $\Delta 5$  不飽和化酵素遺伝子の破壊により脂肪酸組成の改変を試みた。しかしながら、相同組み換え頻度の向上は確認できず、本菌においては *ku80* 遺伝子が有効ではない、あるいは、一回交差の相同組み換えを利用しているため、培養中に脱落している可能性が示唆された。また、*ku80* 遺伝子と同様に非相同組み換えに関与する *lig4* 遺伝子を RNAi 法により、発現抑制を促し、相同組み換え頻度の向上を検討したが、有意な結果は得られなかった。これらの検討から、2回交差により安定した破壊株の構築が必要であることがわかった。一方で、複数の遺伝子の影響の評価には複数のマーカーが必要となる。そこで分子育種法の充実を目的に多重栄養要求性変異株の取得を行った。ウラシル要求性株の胞子に対し UV 照射を行い、生育したコロニーを最少培地にて評価した。結果、ウラシルと各リジン、ロイシン、メチオニン、ヒスチジンの二重の栄養要求性を示す変異株の取得に成功した。今後、相補実験によるマーカー遺伝子の構築を行うことで、複数の遺伝子の評価に利用できるホスト株の構築を可能とする成果である。今後、本二重変異株を活用し、相同組み換えの向上に寄与する遺伝子の評価を行う。

#### 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5件)

① Ando, A., J. Ogawa, S. Kishino, T. Ito, N. Shirasaka, E. Sakuradani, K. Yokozeki, S. Shimizu. Fatty acid desaturation and elongation reactions of *Trichoderma* sp. 1-OH-2-3. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 86 (3), 227-233 (2009).査読有り

② Ando, A., E. Sakuradani, K. Horinaka, J. Ogawa, S. Shimizu. 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

③ Ando, A., 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).査読有り

④ Sakuradani, E., A. Ando, J. Ogawa, S. Shimizu. Improved production of various polyunsaturated fatty acids through filamentous fungus *Mortierella alpina* breeding. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 84, 1-10 (2009).査読有り

⑤ 櫻谷英治, 安藤晃規, 小川 順, 清水 昌. 機能性脂質の微生物による生産 -アラキドン酸に関連する油脂の発酵生産を中心として-. *蛋白質 核酸 酵素*, 54 (6), 725-734 (2009). 査読無し

[学会発表] (計6件)

① 安藤晃規 「 $\omega 3$  系脂肪酸生産を目的とした高度不飽和脂肪酸生産性糸状菌 *Mortierella alpina* の分子育種」日本農芸化学会大会、京都、2011年度3月

② 安藤晃規 「油糧微生物 *Mortierella alpina* の多重栄養要求性変異株の構築と諸性質の評価」The 10th Conference on Fungal Genetics and Molecular Biology 広島、2010.11.18-11.19

③ 安藤晃規 「高度不飽和生産性糸状菌 *Mortierella alpina* 1S-4 株の二重栄養要求性変異株の取得」第62回日本生物工学会、宮崎、2010.10.27-10.29

④ Akinori Ando Eicosapentaenoic acid production by molecular breeding of filamentous fungus *Mortierella alpina* 101th AOCs Annual Meeting, 5.16-5.19 arizona phoenix USA 2010 招待

⑤ 安藤晃規 「低温耐性を指標とした高度不飽和脂肪酸生産性糸状菌の探索」日本農芸化学関西・中四国・西日本支部日本栄養・食料学会九州・沖縄支部日本食品化学工学会西日本支部、合同沖縄大会、沖縄、2009年度10.30-31

⑥ Akinori Ando Eicosapentaenoic acid production by an oleaginous fungus *Mortierella alpina* 1S-4 transformant bred by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated

transformation system The 5th Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences BIOACTIVE LIPID MOLECULES AND TRANSPORTERS 5.25-26 (Japan) 2009

〔図書〕（計3件）

- ① Sakuradani, E., J. Ogawa, S. Kishino, A. Ando, K. Yokozeki, S. Shimizu. Oils, Microbial Production. Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology (ed. by M.C. Flickinger) John Wiley & Sons, in press (2010)
- ② Sakuradani, E. A. Ando, J. Ogawa S. Shimizu. Part2-2 Arachidonic Acid-Producing *Mortierella alpina* : Creation of Mutants, Isolation of the Related Enzyme Genes, and Molecular Breeding. Single Cell Oils -Microbial and Algal Oils 2nd Edition-, ed. Zvi Cohen, Colin Ratledge, AOCS Press, USA, 29-49 (2010)
- ③ 小川 順, 櫻谷英治, 岸野重信, 安藤晃規, 清水 昌. 第5編-第1章-第5節 「2. 有用脂肪酸の生産」. 酵素利用技術大系 (小宮山眞監修), エヌ・ティー・エス, 430-433 (2010)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

安藤 晃規 (ANDO AKINORI)

京都大学・微生物科学寄附研究部門・助教

研究者番号：10537765

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：