

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 13 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22380051

研究課題名（和文） 新規脂質変換反応の探索と機能性脂質生産プロセスの開発

研究課題名（英文） Screening of new reactions for lipid conversion and development of production processes for functional lipids

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

研究成果の概要（和文）：微生物油脂をつくることのできるカビ *Mortierella alpina* の油脂生産性を向上させるための研究を行った。まず、遺伝子の組み換え系を構築し、代謝改変を行うことで油脂の生産性を強化した。またこの菌は、アラキドン酸やエイコサペンタエン酸などの有用脂肪酸だけでなくユニークなステロール類も生産する。そこで、ステロール生合成に関わる酵素遺伝子の機能を評価し、ステロール生産を向上させることができた。

研究成果の概要（英文）：We worked on the research related with filamentous fungus *Mortierella alpina* which produces microbial oils rich in beneficial fatty acids such as arachidonic acid and eicosapentaenoic acid. First, we constructed a gene manipulation system of this fungus and enhanced the lipid productivities by metabolic engineering. This strain accumulates not only beneficial fatty acids but also unique sterols. Second, we evaluated enzyme genes involved in sterol biosynthetic pathways to improve sterol productivities by molecular breeding of this fungus.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	8,400,000	2,520,000	10,920,000
2011年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2012年度	2,600,000	780,000	3,380,000
年度			
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

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：油脂発酵、*Mortierella alpina*、アラキドン酸、高度不飽和脂肪酸、ステロール

1. 研究開始当初の背景

「脂質工学」のなかで、研究代表者らがこれまでに深く携わってきた「脂肪酸発酵」と称する分野においては、ミード酸、ジホモ- γ -リノレン酸、アラキドン酸などの付加価値の高い高度不飽和脂肪酸（PUFA）の微生物生産法が開発されてきた。これらの脂肪酸は微生物発酵生産法で比較的安価で安定して供給

し得るものとなった。これにより、ミード酸は関節炎に、ジホモ- γ -リノレン酸はアトピー性皮膚炎に、アラキドン酸は乳幼児の発育に有効であることが解明され、健康食品・医薬品・プロバイオティクス食品への用途開発も展開されている。しかしながら、より安価で大量に供給するためのより発展的な生産法の開発が希求されている。PUFAのさらなる生

産性向上のために、本研究では、油糧微生物 *Mortierella alpina* 1S-4 及びその誘導変異株に代わる PUFA 生産株創製のために、これまでに申請者が培ってきた遺伝子操作基盤技術を駆使してセルフクローニングを念頭に置いた実用的分子育種株の開発を行うこととした。また、「脂質工学」の中でも「脂肪酸発酵」の分野は多方面に展開した例であるが、「脂質発酵」の分野はあまり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。トリアシルグリセロール以外の脂質の実用発酵生産はほとんど行われていない。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り、微生物を用いたステロイドホルモンへの変換研究も行われている (*Nat. Biotechnol.*, 1998, 16(2):186-189)。また、リン脂質・スフィンゴ脂質は、脳細胞や神経細胞に多く存在し、シグナル伝達などに関与する重要な構造脂質として認識されている (*Biochim. Biophys. Acta*, 2008, 1781(4):145-183)。しかしながら、現状ではこれら脂質の微生物発酵生産は未開拓の領域であるといえる。そこで、本研究では、ステロールあるいはリン脂質蓄積性微生物を探索し、*M. alpina* の分子育種法を融合した次世代の脂質発酵の展開を目指した。

2. 研究の目的

近年、高機能性脂質は新たな物性・生理学的機能が発見され、化学・食品・医薬品分野へと応用展開されてきている。それら高機能性脂質の多くは構造が複雑なため有機化学合成法により得難く、天然での存在も希なためその供給量が懸念されている。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するために、本研究では微生物の能力を活用して、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ライブラリーを多様化する有用脂肪酸生産技術の開発、これまで供給困難であった機能性の高い脂質の生産プロセスの開発、ならびに、脂溶性物質の新規代謝反応の探索とその応用、安価な原料からの高機能性脂質生産を目指す。

3. 研究の方法

(1) 糸状菌 *Mortierella alpina* 1S-4 の遺伝子破壊系の構築をめざし、非相同組換えに関与する2つの遺伝子、*ku80* と *lig4* の破壊をまず試みた。それら遺伝子を含む約5 kb 程度の断片を糸状菌発現ベクターに挿入し、2 回交叉による遺伝子破壊株の取得を試みた。得られた破壊株を用いて遺伝子破壊頻度の程度を評価した。

(2) *M. alpina* の PUFA 生合成に関わる ω 3 脂肪酸不飽和化酵素遺伝子の新たな機能を評価した。本酵素の主要な機能としてアラキドン酸をエイコサペンタエン酸に変換することはこれまで明らかとなっている。酵母発現系を用いた様々基質の添加実験により、本酵素が多機能酵素であることを見いだした。

(3) *M. alpina* のステロール生合成経路を解明し、ステロール類生産性を向上させるため関連酵素遺伝子の評価を行った。ここでは4,4-Dimethylzymosterol を Zymosterol へ変換する C4 脱メチル化酵素複合体を小胞体膜につなぎとめる働きを考えると考えられている ERG28、遊離ステロールとアシル CoA からステロールエステルを合成する反応を触媒する sterol acyltransferase (SAT) をコードする遺伝子の機能を酵母発現系と *M. alpina* での過剰発現系を用いて評価した。

(4) 細胞内の脂質はリピッドボディという細胞小器官に蓄積されることが分かっており、その構成タンパク質もいくつか報告されている。カレオシンというタンパク質はその構造維持に重要であると考えられており、菌体内で過剰発現させることでリピッドボディ形成の活性化、さらには脂質蓄積量の増加が可能かを評価した。

(5) 新たな脂肪酸分子種の微生物生産スクリーニングを行ったところ、微生物では稀なエイコセン酸を著量蓄積する *Mortierella chlamydospora* を見いだした。本菌の脂肪酸、脂質生産性を評価し、新たな微生物油脂を提案した。

4. 研究成果

(1) 糸状菌 *Mortierella alpina* 1S-4 での脂質代謝経路の解明及びより厳密な代謝制御による PUFA の高生産を行うために、遺伝子ターゲティング技術の開発を目指した。非相同組換えに関わる *KU80* をコードする *ku80* 遺伝子を相同組み換えにより破壊した株を用いて、PUFA 生合成に関わる Δ 5 不飽和化酵素遺伝子の破壊を試みた (図1)。約40株の形質転換株の脂肪酸組成を分析したところ、 Δ 5 不飽和化酵素活性の低下によるアラキドン酸蓄積量の減少が確認された。また、サザン解析の結果、本形質転換株における Δ 5 不飽和化酵素遺伝子への破壊用ベクターの挿入が示唆された。また、*Ku80* と同様に非相同組換えに関わると考えられる DNA リガーゼ (*Lig4*) にも注目し、*lig4* 遺伝子の転写量を RNAi あるいは、アンチセンスで抑制した転写抑制株をまず作製することとした。転写後2本鎖 RNA が形成されるコンストラクトとアンチセンス鎖が転写されるコンストラクトを

構築し、形質転換に用いた。形質転換体の *lig4* 遺伝子の転写量をリアルタイム PCR で測定し、転写量が 4 分の 1 に低下した転写抑制株を得ることに成功した。さらに、2 回交叉による *lig4* 遺伝子の置換により *lig4* 破壊株の構築にも成功した。現在これら破壊株を宿主とした PUFA 生合成に関わる酵素の遺伝子破壊株構築を試みている。今後、本結果を参考に、ターゲティング頻度の向上を目指す。

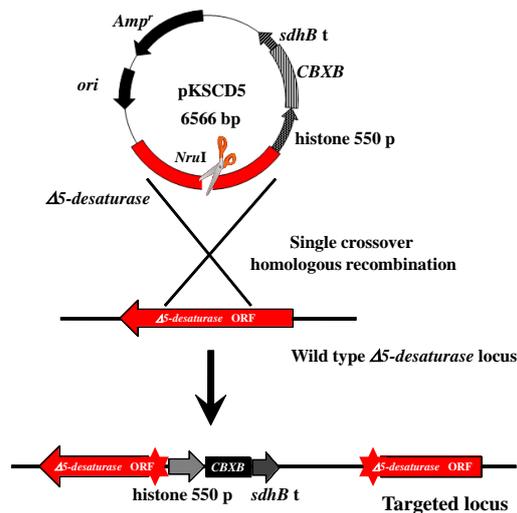


図1. *ku80* 遺伝子破壊株を用いた $\Delta 5$ 不飽和化酵素遺伝子破壊

(2) *M. alpina* 1S-4 は培養温度が低くなるとエイコサペンタエン酸を蓄積する。これは、 $\omega 3$ 脂肪酸不飽和化酵素が低温域で活性化されるためと考えられてきた。酵母発現系を用いた本酵素遺伝子の機能解析を行ったところ、2 つの新たな未知脂肪酸を見いだした。同定の結果、2 つの未知脂肪酸 (UK1 と UK2) はそれぞれ hexadecatrienoic acid (9cis, 12cis, 15-16:3) と hexadecadienoic acid (9cis, 12cis-16:2) であることがわかった (図2)。このことから本酵素は $\omega 3$ 位だけでなく $\Delta 12$ 位にも二重結合を導入することがわかった。さらに、様々な脂肪酸の変換効率を調べたところ、低温ではなく通常の培養温度でも本酵素活性による産物を検出することができた。基質・酵素複合体の温度変化による構造特異性に興味もたれる。

(3) *M. alpina* 1S-4 は、天然で希少なデスマステロールを蓄積することが知られている。しかしながら、その生合成経路については不明な点が多い。我々は、デスマステロールを含む微生物ステロールの生産を目指した分子育種を試みた。小胞体膜貫通タンパク質である ERG28p は 4, 4-Dimethylzymosterol を Zymosterol へ変換する C4 脱メチル化酵素複合体を小胞体膜につなぎとめる働きをされると考えられている。そこで、*M. alpina* 1S-4

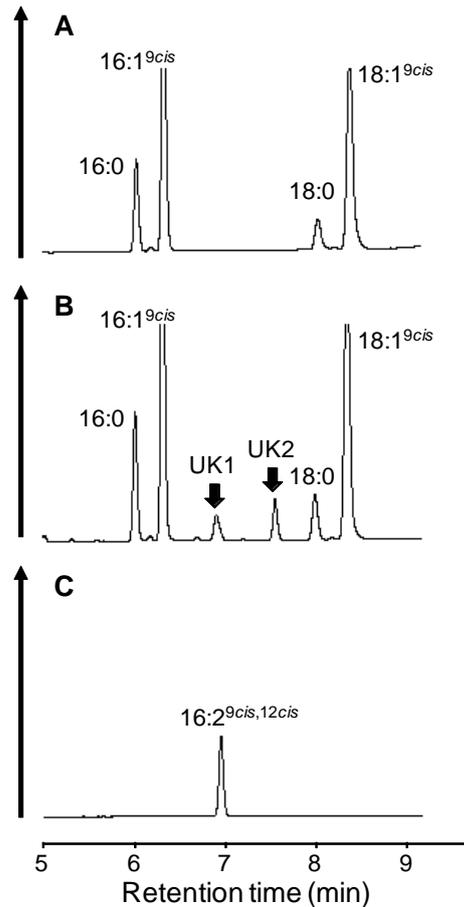


図2. 酵母形質転換体の総脂肪酸メチルエステルのガスクロマトグラム
コントロール株(A)、組換え体(B)、標品(C)

から *erg28* 遺伝子を単離し、過剰発現させることでステロール生産性向上を試みた。その結果、コントロール株が単位培地当たり 13.0 mg/l であったのに対し、*erg28* 発現株では 20.0 mg/l となったことから、ステロール生産量を約 1.5 倍高めることに成功した。一方、sterol acyltransferase (SAT) は遊離ステロールとアシル CoA からステロールエステルを合成する反応を触媒する。これまでに酵母において内在性 SAT の過剰発現や欠損により菌体内ステロールとステロールエステルの存在比が変化することが報告された。そこで、*M. alpina* 1S-4 の SAT ホモログ遺伝子 (*msat1*) を本菌株よりクローニングし、*msat1* 過剰発現株でのステロール生産性を評価した。総ステロール量を分析したところ過剰発現株は宿主株にくらべ約 1.6 倍のステロールを生産することが分かった。次に、酵母発現系を用いた *msat1* の機能解析を行ったところ、MASAT1 はエルゴステロールを基質とすることや、添加した PUFA をステロールエステルへ変換することがわかった。

(4) 細胞内の脂質貯蔵体である油滴小胞の

外膜上には caleosin などの油滴小胞特有のタンパク質が存在する。caleosin は油滴小胞の構造安定化に寄与すると推測される。これまでにシロイヌナズナの caleosin が油滴小胞の肥大化を促進することが報告されている。そこで、アラキドン酸生産性糸状菌 *M. alpina* 1S-4 株から caleosin をコードする 2 つ遺伝子を単離し、過剰発現させることで脂質蓄積への影響を評価した。これら 2 つの caleosin のアミノ酸配列は互いに 61% の相同性を示した。2 種の caleosin 過剰発現株はコントロール株と比べて特に培養初期から中期において脂質蓄積が速やかに進行することが観察された。

(5) 新たな微生物油脂の探索研究において、総脂肪酸当たり 20% 以上のエイコセン酸 (C20:1 Δ 11) を蓄積する *Mortierella chlamydospora* を見いだした。エイコセン酸は植物油脂に比較的多く存在し、保湿効果があることから化粧品などへ応用される有用脂肪酸である。各脂質画分中の脂肪酸の定性・定量分析を行ったところ、エイコセン酸は 25% がトリアシルグリセロールに、24% が遊離脂肪酸画分に存在していることが確認された。

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 9 件)

- ① E. Sakuradani, A. Ando, S. Shimizu, J. Ogawa, Metabolic engineering for the production of polyunsaturated fatty acids by oleaginous fungus *Mortierella alpina* 1S-4, *J. Biosci. Bioeng.*, in press, 査読有, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.04.008>
- ② 櫻谷英治, 岸野重信, 安藤晃規, 新井洋由, 植田和光, 小川 順. オメガ 3 脂肪酸含有油脂の微生物による生産と変換. *BIOINDUSTRY*, 査読無, 30(2): 32-39 (2013).
- ③ 櫻谷英治, 安藤晃規, 清水 昌, 小川 順. アラキドン酸および関連高度不飽和脂肪酸を含む微生物油脂生産. *オレオサイエンス*, 査読無, 12 (7): 263-272 (2012).
- ④ E. Sakuradani. Advances in the production of various polyunsaturated fatty acids through oleaginous fungus *Mortierella alpina* breeding. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 査読有, 74(5):

908-917 (2010).

DOI: 10.1271/bbb.100001

[学会発表] (計 15 件)

- ① E. Sakuradani, A. Ando, T. Okuda, H. Kikukawa, S. Shimizu, J. Ogawa. Microbial lipid production by molecular breeding of oleaginous fungus *Mortierella alpina*. 15th International Biotechnology Symposium and Exhibition, in Daegu, Korea (September 19, 2012)
- ② E. Sakuradani, T. Asaoka, H. Kikukawa, T. Okuda, A. Ando, M. Ochiai, J. Ogawa. Improvement of polyunsaturated fatty acid productivity in oleaginous fungus *Mortierella alpina* 1S-4 by overexpression of its acyl-CoA synthetase genes. The 20th International Symposium on Plant Lipids, in Seville, Spain (July 12, 2012)
- ③ E. Sakuradani, Y. Fukuoka, S. Shimizu, J. Ogawa. Unusual sterol production by oleaginous fungus *Mortierella alpina*. 103rd American Oil Chemists' Society (AOCS) Annual Meeting & Expo, in Long Beach, CA, USA (April 30, 2012)

[図書] (計 3 件)

- ① E. Sakuradani, A. Ando, J. Ogawa, S. Shimizu. Arachidonic Acid-Producing *Mortierella alpina*: Creation of Mutants, Isolation of the Related Enzyme Genes, and Molecular Breeding. *Single Cell Oils* (eds. by Z. Cohen and C. Ratledge), AOCS Press, IL, pp.29-49 (2010).

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

安藤 晃規 (ANDO AKINORI)
京都大学・生理化学研究ユニット・特定助教
研究者番号: 10537765
萩下 太郎 (HAGISHITA TAIRO) (2012 年度のみ)
京都大学・大学院農学研究科・特定准教授
研究者番号: 20432346