

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K14772

研究課題名(和文)油糧微生物オーランチオキトリウム属を用いた中鎖脂肪酸含有脂質の効率的生産法の確立

研究課題名(英文) Establishment of an efficient production system of medium-chain fatty acid using *Aurantiochytrium* sp.

研究代表者

渡邊 研志 (Watanabe, Kenshi)

広島大学・統合生命科学研究科(先)・特任助教

研究者番号：60781242

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：海洋性真核微生物ラビリンチュラ類 *Aurantiochytrium* 属による中鎖脂肪酸の生産を試みた。同属微生物のゲノム情報中より見つかった、脂肪酸の酸化に関連するアシルCoAオキシダーゼの遺伝子を破壊したところ、これらのアシルCoAオキシダーゼは脂肪酸の炭素鎖長に対する特異性は有さない可能性が示唆された。また、ゲノム中にコードされている46個のチオエステラーゼ様遺伝子を既報のチオエステラーゼとの配列比較によって分類したところ、中鎖脂肪酸の遊離に寄与することが報告されているTesBと高いアミノ酸相同性を示すタンパク質をコードした遺伝子を発見し、同遺伝子の機能について引き続き解析している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多様な分野で需要が高まっている中鎖脂肪酸含有脂質を、気候や地理的条件によらず安定生産できる、油糧微生物による発酵生産を試みた。油糧微生物オーランチオキトリウム属の脂質代謝における脂肪酸鎖長に対する特異性について解析を行い、中鎖脂肪酸生産に向けた代謝改変を行うために有用な知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：This research aims to produce medium-chain fatty acids by marine eukaryotic microorganisms, the genus *Aurantiochytrium*. Disruption of acyl-CoA oxidase genes related to fatty acid -oxidation found in the genome of *Aurantiochytrium* sp. suggested that these acyl-CoA oxidases may not be specific to the carbon chain length of fatty acids. In addition, 46 thioesterase-like genes encoded in the genome of *Aurantiochytrium* sp. were classified by sequence comparison with previously reported thioesterases, and a gene encoding a protein with high amino acid homology to TesB, which has been reported to contribute to the release of medium-chain fatty acids, was found. We are continuing to analyze the function of this gene.

研究分野：生物学

キーワード：発酵生産 脂質 中鎖脂肪酸

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

炭素数が 8-12 の中鎖脂肪酸は炭素数が 14 以上の長鎖脂肪酸よりも速やかに消化吸収され、脂肪組織に蓄積されずに直接肝臓に輸送されてエネルギーとして分解されるため、消化器疾患患者や乳幼児の栄養食に用いられるほか、近年では肥満を抑制する低カロリー油脂としても注目されている。食品としての用途以外でも、化成品素材やバイオ燃料などの原料としても優れた性質を持ち、世界的な需要が年々高まっている。しかし、中鎖脂肪酸含有脂質の原料作物であるアブラヤシやココヤシの栽培地は、その栽培特性のために東南アジア、中南米やアフリカなどの特定の気候帯を持つ一部地域に集中している。中鎖脂肪酸含有脂質の世界的な需要の当該地域への集中的な依存は、栽培地における熱帯雨林のプランテーション化による生態系の破壊、油脂製造工場からの排水による河川や土壌の汚染や、児童労働などの社会問題を引き起こしているとともに、気候変動や地域紛争により原料油脂の供給が困難になる地政学的リスクをはらんでいる。したがって、生産地が限定される油糧作物に代わって、気候や地理的条件によらず世界中で安定生産が可能かつ高い油脂生産性の油糧微生物による中鎖脂肪酸含有脂質の発酵生産システムの確立が望まれる。

本研究代表者はこれまでに、海洋性の真核微生物ラビリンチュラ類オーランチオキトリウム属が有機物を資化して顕著に増殖して高度不飽和脂肪酸、スクアレンやカロテノイドを含む著量の脂質を生産することに着目し、食品廃棄物、非可食植物などの未利用バイオマスを培養基質として利用した脂質発酵生産プロセスの開発に携わってきた。また、独自に確立したゲノム育種技術を用いた代謝改変により、生産脂質の多様化および生産性の向上に取り組んできた。本研究ではこれらの知見を生かして、オーランチオキトリウム属による中鎖脂肪酸含有脂質の発酵生産を目指した。

2. 研究の目的

各産業分野で需要が高いが、これまでに実用に足る発酵生産技術が確立されていない中鎖脂肪酸含有脂質について、油糧微生物オーランチオキトリウム属を用いた発酵生産技術を確立するための知見を得ることを目的とした。

オーランチオキトリウム属が生産する主要脂肪酸は高度不飽和脂肪酸のドコサヘキサエン酸と炭素数 16 の長鎖飽和脂肪酸のパルミチン酸である。オーランチオキトリウム属の生育にはドコサヘキサエン酸の生産は必須であるが、同属微生物はドコサヘキサエン酸を多価不飽和脂肪酸合成酵素、パルミチン酸を脂肪酸合成酵素でそれぞれ完全に独立した生合成経路で合成するため、パルミチン酸の生合成系の生産物特異性の改変および長鎖脂肪酸の酸化分解系の強化により、オーランチオキトリウム属の生育を阻害することなく、炭素数 8-12 の中鎖脂肪酸を生成させることが可能であると考えた。また、オーランチオキトリウム属は光合成を行わないため培養に光照射の必要がなく、気候や地理的条件によらず世界中で油脂生産が可能であり、現状の中鎖脂肪酸の原料作物で生じている生産地の集中が引き起こす諸問題を解決することができると考えた。

3. 研究の方法

ガスクロマトグラフを使用して、標的とする中鎖脂肪酸を含むオーランチオキトリウム属由来の脂肪酸を高速で分離検出可能な条件を検討し、トリグリセリド高生産性の *Aurantiochytrium limacinum* SR21 株の脂質中の脂肪酸分析を行った。脂肪酸合成酵素 (FAS) において、生産する脂肪酸の炭素鎖長特異性の変化に寄与することが予測された点変異を導入した変異型 FAS の遺伝子を作成し、*A. limacinum* SR21 株に導入して脂肪酸組成に与える影響を調べた。*A. limacinum* SR21 株において脂肪酸の酸化系の反応を司るアシル CoA オキシダーゼおよびヒドロキシアシル CoA オキシダーゼの遺伝子を CRISPR-Cas9 システムにより破壊し、脂肪酸含量および脂肪酸組成に与える影響を調べることで、各酵素の酸化への関与および脂肪酸鎖長に対する特異性を調べた。*A. limacinum* SR21 株のゲノム中にコードされているチオエステラーゼ遺伝子を分類し、中鎖脂肪酸生成に寄与すると予測された遺伝子の高発現化または破壊を行った。

4. 研究成果

1) 中鎖脂肪酸分析方法の確立

Agilent 社の DB-Fast-FAME カラムを使用し、キャリアガスの流速および昇温条件を検討したところ、炭素数 6-24 の飽和、一価不飽和および多価不飽和脂肪酸メチルエステルを一括かつ高速で分離検出可能な分析条件を決定した。*A. limacinum* SR21 株より抽出した脂質をメチルエス

テル化処理して得られた脂肪酸メチルエステルを同条件にて分析したところ、炭素数 13-22 の脂肪酸が検出された。

2) 脂肪酸合成酵素の機能改変

脂肪酸合成の各反応を触媒するマルチドメインタンパク質である FAS の各ドメインのうち、アセチル (アシル) -ACP とマロニル-ACP の縮合反応を触媒するケトアシルシンターゼ (KS) ドメインと、FAS の反応系へのマロニル-ACP の導入と、伸長が済んだアシル-ACP を FAS の反応系から排出するマロニル/パルミトイルトランスフェラーゼ (MPT) ドメインが、生成する脂肪酸の炭素鎖長を制御していることが出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 由来の FAS において報告されており、KS、MPT ドメイン中の脂肪酸鎖長の認識に関与するアミノ酸も一部同定されている。これらの鎖長認識に関与するアミノ酸はオーランチオキトリウム属の FAS においても保存されていたため、*A. limacinum* SR21 株から単離した FAS 遺伝子に対して、部位特異的変異導入 PCR により当該アミノ酸に変異を導入した変異型 FAS 遺伝子を作成して *A. limacinum* SR21 株に再導入し、生成脂肪酸に与える影響を調べた。

A. limacinum SR21 株由来の FAS 遺伝子に対し、変異導入 PCR によって I182A、R1755K、G3486S および M3487W のアミノ酸置換を部位特異的に導入して、変異型 FAS 遺伝子を作成した。恒常発現性の伸長因子 1 遺伝子のプロモーターおよびターミネーターの制御下において変異型 FAS 遺伝子、抗生物質ゼオシン耐性遺伝子発現カセットおよび相同組み換え領域である 18SrRNA 遺伝子の部分断片を含んだプラスミドを作成し、エレクトロポレーション法により *A. limacinum* SR21 株に導入した。ゼオシン耐性により選抜した形質転換体の脂肪酸組成を調べたが、中鎖脂肪酸の生成は認められず、内在性の FAS に対して変異型 FAS の発現量が少ない可能性や、鎖長認識に関与するアミノ酸が他にも存在する可能性が示唆された。現在、ホモロジーモデリングにより、*A. limacinum* SR21 株の FAS の立体構造を予測し、アシル ACP 基質とのドッキングシミュレーションによって上述したアミノ酸残基が基質のアシル ACP とどの様に作用しているかを推測するとともに、新たな変異導入部位の候補の探索を進めている。また、変異型 KS ドメインおよび変異型 MPT ドメインの単独での過剰発現が *A. limacinum* SR21 株の脂肪酸生産へ与える影響を調べているところである。

3) 脂肪酸分解系の改変

一部の生物では、脂肪酸の酸化分解反応において、同じ機能を持つ酵素の遺伝子を複数有し、それらがそれぞれ異なる炭素鎖長の脂肪酸分解に関与することが報告されている。そこで、*A. limacinum* SR21 株が持つ 酸化関連酵素の遺伝子を CRISPR-Cas9 システムで破壊し、脂肪酸含量および脂肪酸組成を調べることで、各酵素の 酸化への関与および脂肪酸鎖長への特異性を調べた。

A. limacinum SR21 株のゲノム中に存在するペルオキシソーム局在型の 酸化の初発反応を司るアシル CoA オキシダーゼ (ALAcx1, 2 および 3)、ミトコンドリア局在性の 酸化に関連する酵素であるヒドロキシアシル CoA デヒドロゲナーゼ (ALHadh1) の遺伝子をそれぞれ標的とした。各遺伝子を標的とする gRNA と Cas9 タンパク質の複合体と、抗生物質ゼオシン耐性遺伝子発現カセットを標的配列の上下流の相同領域で挟んだドナー DNA をエレクトロポレーション法により *A. limacinum* SR21 株に導入して、ゼオシン含有寒天培地上でドナー DNA がノックインされた株を選抜した。ゲノム PCR およびサザンブロッティングによりドナー DNA が各標的遺伝子中に挿入され、遺伝子が破壊されたことを確認した変異株について培養を行い、増殖性と脂肪酸生産性を親株と比較した。各変異株は親株と同等の増殖性を示した。そのうち、ALAcx1 および ALAcx2 遺伝子の破壊株の細胞中の脂肪酸含有量は親株のそれと比較してそれぞれ顕著に向上した。したがって、ALAcx1 および ALAcx2 が *A. limacinum* SR21 株脂肪酸の 酸化に関与することが示唆され、その失活が脂肪酸の蓄積量の増加に資することが分かった。一方、各遺伝子破壊株の脂肪酸組成には顕著な変化は認められず、中鎖脂肪酸の生成も認められなかった。したがって、今回調べた *A. limacinum* SR21 株由来の 酸化関連酵素の脂肪酸鎖長に対する特異性は乏しい可能性が示唆された。

4) チオエステラーゼ遺伝子の改変

FAS によって合成された脂肪酸を FAS から切り出し、遊離脂肪酸を生成する酵素、チオエステラーゼについて、中鎖脂肪酸を特異的に切り出すチオエステラーゼの高発現化および長鎖脂肪酸を特異的に切り出すチオエステラーゼの不活性化により、中鎖脂肪酸を生成させることを目的とした。

微生物、植物および動物由来の既報のチオエステラーゼのアミノ酸配列をクエリーとして、*A. limacinum* SR21 株のゲノム中に存在するチオエステラーゼ遺伝子を探索し、その分類を行った。チオエステラーゼと推定された遺伝子が全部で 46 個見つかり、この内、中鎖のアシル CoA に作用することが報告されている *Escherichia coli* 由来の TesB と高いアミノ酸相同性を示す遺伝子について、その高発現化と遺伝子破壊が *A. limacinum* SR21 株の脂肪酸生産に与える影響を現在調べている。また、中鎖脂肪酸に特異的に作用する植物 *Cuphea palustris* 由来のチオエステラーゼ FatB1 の遺伝子を *A. limacinum* SR21 株で発現させ、中鎖脂肪酸が生成するかを調べているところである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kikukawa Hiroshi, Watanabe Kenshi, Kishino Shigenobu, Takeuchi Michiki, Ando Akinori, Izumi Yoshihiro, Sakuradani Eiji	4. 巻 133
2. 論文標題 Recent trends in the field of lipid engineering	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 405 ~ 413
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiosc.2022.02.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Watanabe Kenshi, Nishijima Miho, Mayuzumi Shinzo, Aki Tsunehiro	4. 巻 71
2. 論文標題 Utilization of Sugarcane Bagasse as a Substrate for Lipid Production by Aurantiochytrium sp.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Oleo Science	6. 最初と最後の頁 1493 ~ 1500
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5650/jos.ess22206	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 2件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kenshi Watanabe, Miho Nishijima, Shinzo Mayuzumi, Tsunehiro Aki
2. 発表標題 Utilization of sugar cane bagasse as a substrate for fatty acid production of Aurantiochytrium sp.
3. 学会等名 2022 AOCs Annual Meeting & Expo（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡邊 研志、西嶋 美保、黛 新造、秋 庸裕
2. 発表標題 サトウキビバガスを利用したオーランチオキトリウム属による脂質生産
3. 学会等名 第74回日本生物工学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡邊 研志
2. 発表標題 高機能性油脂発酵生産微生物の開発およびその応用
3. 学会等名 日本生物工学会西日本支部大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡邊 研志
2. 発表標題 オーランチオキトリウム属の油脂生産性向上に向けたゲノム編集の利用
3. 学会等名 広島大学先端科学セミナー “ゲノム編集” で未来社会を拓く（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 渡邊 研志、秋 庸裕（監修：鎌田 博之、中垣 隆雄、藤田 照典）	4. 発行年 2022年
2. 出版社 情報機構	5. 総ページ数 270
3. 書名 二酸化炭素利活用技術～CO2削減に向けた最新研究～	

〔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