

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23560945

研究課題名(和文) 海洋性油糧微生物ラビリンチュラ類における遺伝子転移機構の解明と応用

研究課題名(英文) Studies on the molecular mechanisms of gain-of-function in thraustochytrids

研究代表者

秋 庸裕 (Aki, Tsunehiro)

広島大学・先端物質科学研究科・准教授

研究者番号：80284165

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：高機能性油脂を著量生産することから実用化が期待される海洋性真核微生物ラビリンチュラ類において、カロテノイドなどの生理活性脂質の生産能は進化系統的に特異な生物機能と考えられるため、その機能獲得の機構解明および応用技術の確立を目的とした。ゲノム・遺伝子発現情報をもとに解析した結果、新規な遺伝子転移因子や脂質生合成酵素が見いだされたので、その構造と機能を明らかにするとともに、当該遺伝子の獲得機構について考察した。

研究成果の概要(英文)：Thraustochytrids are marine eukaryotic microorganisms that are industrially promising due to their ability of value-added lipid production and are considered to gain the evolutionarily characteristic function of such lipid biosynthesis. To evaluate the hypothesis and elucidate its molecular mechanism, factors involving the gene transfer and lipid biosynthesis were analyzed based on genome and transcriptome data. This revealed novel transposons and carotenoid synthase, which provided a model suitable for examining the gain of specific function.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：発酵生産 脂質 不飽和脂肪酸 カロテノイド 炭化水素

1. 研究開始当初の背景

ラビリンチュラ類は、菌類、藻類や原生生物とは異なるクロミスタ界に属する従属栄養性の真核微生物である。温帯・熱帯域の海洋に広く分布し、一次分解者としての役割や進化系統的に重要なモデル生物としての位置付けが指摘されるほか、ドコサヘキサエン酸などの高度不飽和脂肪酸 (PUFA) を蓄積することから、魚油などに代わる PUFA 供給源として注目されてきた。著者らも当初、PUFA を標的として新規供給源を探索していたが、単離株の中に、同微生物群において報告がなかったアスタキサンチンなどの抗酸化性カロテノイド、キサントフィルを生産する新種株を見いだした (後にオーランチオキトリウム属と命名)。これを端緒に、新規株の収集と系統分類、PUFA ケモタクソミーの提唱、阻害物質を用いた脂質生合成系の解析、組成脂質の酵素化学的改変などの研究を通じて、油脂バイオテクノロジーの分野に新たな局面を切り開いた。また、植物及び動物性ステロールの生合成中間体であるスクアレンを蓄積する株群を発見し、産業界へライセンスするとともに、海洋生物における脂質生合成の格好の研究対象になりうることを示した。さらに、分子育種法を独自に開発し、ラビリンチュラ細胞をプラットフォームとする脂質の生合成・生産研究をさらに飛躍させる環境を整えてきた。

2. 研究の目的

ラビリンチュラ類の進化系統に関する考察及び予備研究において示唆された外因性遺伝子獲得機構に着目している。すなわち、ポリケチド・脂肪酸合成系と類似した PUFA 生合成系やキサントフィルを生産する形質がラビリンチュラ類の特定の一群 (主にオーランチオキトリウム属) において顕著であることから、同微生物群が遺伝子伝播の「ホットスポット」となっている可能性が考えられた。そこで同群における遺伝子転移因子及び脂質生合成遺伝子の解析を通じて外因性遺伝子獲得機構を解明したいと考えた。

3. 研究の方法

オーランチオキトリウム属の形質転換は、著者らが取得した特許第 4796786 号及び第 4796787 号に記載の方法で、ゲノム相同組換えによって行った。酵母における異種遺伝子発現は、Gal1 プロモーターをもつベクターを用いて誘導発現することにより行った。その他の遺伝子操作と発現、解析ならびにタンパク質や脂質の分析は常法に従って行った。

4. 研究成果

遺伝子転移モデルを構築するために、抗生物質ゼオシンに感受性を示すオーランチオキトリウム属株と、同株から単離した構成発現プロモーターの制御下にプレオマイシン (ゼオシン) 耐性遺伝子を置いたプラスミドをも

つ大腸菌株 (カナマイシン感受性) を作成した。これらを混合培養あるいは重層培養して、耐性遺伝子を獲得することによってゼオシン / カナマイシン耐性となったオーランチオキトリウム属株の単離を試みた。培地組成、培養温度や初期細胞数・比などについて鋭意検討したが、当初想定した安定的な結果が得られなかったため、引き続き検証していくこととした。

オーランチオキトリウム属株の全ゲノム塩基配列と、異なる増殖フェーズや培養温度での全遺伝子発現プロファイルの情報をもとに、遺伝子転移因子や脂質生合成酵素の遺伝子について解析した。その結果、遺伝子転移に関わるトランスポゾンにコードされるトランスポザーゼとして、他生物の既知遺伝子との相同性から2種類存在することが分かった。それらは、トランスポザーゼと相同な領域のほか、レゾルパーゼやRNAポリメラーゼと相同性を示す領域を含んでおり、新たなタイプの多機能型酵素である可能性が示唆された。

同様に、PUFAの生合成に関わる3つの酵素遺伝子を同定した。脱水素酵素ドメインとそれに近接する機能未知ドメインをコードする遺伝子を破壊して抗生物質耐性遺伝子カセットを導入するプラスミドを作成し、オーランチオキトリウム属株のゲノムDNAに挿入したところ、不飽和脂肪酸要求性の変異株が取得できたことから、同遺伝子がPUFA生合成に必須であることが分かった。この栄養要求性に対して各種の不飽和脂肪酸で相補試験を行ったところ、相補の程度が脂肪酸の炭素鎖長や不飽和度に相関しないという興味深い結果が得られた。特に、野生株に多く含まれるドコサヘキサエン酸と構造が似ているエイコサペンタエン酸の相補活性が低かったことは意外であり、脂質膜の安定化において特異な構造要求性が存在することが示唆された。

さらに、カロテノイド生合成系についても検討し、特に新規に見いだしたカロテノイド合成酵素の構造機能について考察した。本酵素は、他の生物においては独立して存在する3種の酵素の融合タンパクであり、生合成経路上で連続する3つの酵素反応を1酵素分子で触媒する。同酵素の酵素学的諸性質や構造機能相関を解析するため、同種あるいは酵母などの異種宿主において発現生産系を構築し、その機能を確認した。また、同酵素の遺伝子発現量は同経路上で働く他の酵素と比較して格段に低レベルであることから律速酵素であると考えられたが、栄養飢餓状態で発現亢進することから、ストレス応答に関わる分子機構についても鋭意解析しているところである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

- (1) Aki T., Yamamoto M., Takahashi T., Tomita K., Toyoura R., Iwashita K., Kawamoto S., Hosokawa M., Miyashita

- K., Ono K. (2014) Regulation of polyunsaturated fatty acid biosynthesis by seaweed fucoxanthin and its metabolite in cultured hepatocytes. *Lipids* **49**: 133-141. 査読有、DOI: 10.1007/s11745-013-3856-5
- (2) Matsumoto R., Aki T., Okamura Y., Tajima T., Nakashimada Y., Matsumura Y. (2014) Behavior of organics in kelp during hydrothermal pretreatment of kelp and effect of salt on it. *J. Jpn. Inst. Energy*, accepted. 査読有
- (3) Watanabe Y., Sato S., Sera S., Sato C., Yoshinaga K., Nagai T., Sato R., Iwasaka H., Aki T. (2014) Modification in enzymatic protocol for regiospecific analysis of solid fat, and evaluation of acylmigration in regiospecific transesterification by CALB using structured lipid. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, accepted. 査読有
- (4) Iwasaka H., Aki T., Adachi H., Watanabe K., Kawamoto S., Ono K. (2013) Utilization of waste syrup for production of polyunsaturated fatty acids and xanthophylls by *Aurantiochytrium*. *J. Oleo Sci.* **62**: 729-736. 査読有、DOI: 10.5650/jos.62.729
- (5) Matsumoto R., Aki T., Okamura Y., Tajima T., Nakashimada Y., Matsumura Y. (2013) The behavior of sugar in hydrothermal pretreatment of laminaria. 21st European Biomass Conference and Exhibition (2013. 6. 3-7, Copenhagen, Denmark) 査読無
- [学会発表](計 17 件)
- (1) 秋 庸裕: 海洋微生物を用いた高付加価値油脂の生産. 「知的クラスター形成に向けた研究拠点構築事業」シンポジウム(沖縄産業支援センター、2013.12.19)
- (2) Aki T., Arafles K., Iwasaka H., Okamura Y., Matsumura Y., Nakashimada Y.: Bioconversion of seaweed saccharides to value-added lipids. 9th International Symposium on Biocatalysis and Agricultural Biotechnology (Piestany, Slovak Republic, Oct 15, 2013)
- (3) 岩坂宏明、佐藤亮太、Kim Arafles、秋 庸裕: ラビリンチュラ類の分子育種による機能開発. 第 15 回マリンバイオテクノロジー学会大会シンポジウム「ラビリンチュラ類を用いたバイオテクノロジーの展望」(沖縄県市町村自治会館、2013.6.2)
- (4) 岩坂宏明、小柳 亮、秋 庸裕: 有用微細藻類のゲノム解読とその応用. 第 15 回マリンバイオテクノロジー学会大会シンポジウム「マリンゲノミクス その新たな躍動」(沖縄県市町村自治会館、2013.6.1)
- (5) T. Aki: Production of high value-added lipids by marine thraustochytrids. 2nd International Symposium on Marine Biomass Utilization (Hiroshima University, Apr 11, 2013)
- (6) 秋 庸裕: 海洋微生物による高付加価値油脂の生産. 第 6 回中国地域バイオマス利用研究会シンポジウム/第 10 回広島大学バイオマスプロジェクト研究センター講演会「動き出した海洋バイオマス研究—CREST プロジェクト」(広島放送大学、2013.3.29)
- (7) T. Aki: Oil production using microbes. 1st International Symposium on Marine Biomass Utilization (Hiroshima University, Jan 28, 2013)
- (8) 秋 庸裕: ラビリンチュラにおける機能性脂質の生合成機構. 第 3 回学際的脂質創生研究部会講演会(京都大学、2013.1.25)
- (9) 秋 庸裕: 海洋微生物ラビリンチュラ類による機能性脂質の生産. 第 4 回広島大学バイオマスイブニングセミナー(広島大学、2012.12.17)
- (10) Y. Watanabe, S. Sato, S. Sera, C. Sato, T. Nagai, R. Sato, and T. Aki: Improvement in enzymatic regiospecific analysis of TAG. 8th International Symposium on Biocatalysis and Agricultural Biotechnology (California, USA, Oct 28, 2012)
- (11) 秋 庸裕: 海洋微生物ラビリンチュラにおける機能性脂質の生合成とその利用. 第 5 回オレオライフサイエンス部会セミナー「海洋性生物と機能性脂質 -その新しい展開」(東京海洋大学、2012.6.19)
- (12) T. Aki, H. Iwasaka, H. Adachi, S. Kawamoto, K. Ono: Biosynthesis and function of polyunsaturated fatty acids in thraustochytrid. 103rd American Oil Chemists' Society Annual Meeting & Expo (Long Beach, CA, USA, May 1, 2012)
- (13) 秋 庸裕: 微生物による機能性脂肪酸生産のための遺伝子利用技術. 日本水産学会春季大会シンポジウム「水産物由来健康機能成分の機能解析と利用技術開発 -有効利用と次なる展開-」(東京海洋大学、2012.3.26)
- (14) T. Aki: Analysis, modification, and utilization of functional lipids from thraustochytrids. Workshop in Vietnam National University (Hanoi, Vietnam, Dec. 16, 2011)
- (15) 秋 庸裕: ラビリンチュラ類(オーランチオキトリウム属)による高機能性油脂の生産. 知的クラスター形成に向けた研究拠点構築事業・沖縄バイオサイエンスセミナー(沖縄県工業技術センター、2011.11.11)
- (16) T. Aki, H. Iwasaka, H. Adachi, S. Kawamoto, K. Ono: Analysis and

modification of polyunsaturated fatty acid biosynthesis in thraustochytrid. 7th International Symposium on Biocatalysis and Agricultural Biotechnology (Kyoto, Oct 11, 2011)

- (17) T. Aki, H. Iwasaka, H. Adachi, S. Kawamoto, K. Ono: Biosynthesis and utilization of polyunsaturated fatty acids in thraustochytrid. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, symposium "Frontiers of marine thraustochytrid biotechnology" (as convener; Sapporo, Sep 7, 2011)

〔図書〕(計1件)

- (1) 冷牟田修一、須田彰一郎、秋 庸裕
(2012) 石油業界からみたバイオマスエネルギー、p 226-231、微細藻類によるエネルギー生産と事業展望、竹山春子監修、シーエムシー出版

〔その他〕

ホームページ

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/aki/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秋 庸裕 (AKI, Tsunehiro)

広島大学・大学院先端物質科学研究科・准教授

研究者番号：80284165