



油糧微生物の代謝工学と機能性脂質生産への応用に関する研究

京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻 助教 櫻谷 英治

1980年頃までは、微生物が大量に生成・蓄積することができる脂肪酸は炭素数が長くて18で、不飽和結合数が1か2のものしか知られていなかった。その後、*Mucor*属や*Mortierella*属糸状菌がγ-リノレン酸(18:3n-6)やアラキドン酸(AA; 20:4n-6)を著量含有する油脂の生産菌株として見いだされた。これを契機に、微生物を用いて油糧植物や動物油脂からは得がたいユニークな機能性脂質を生産する試みが多方面からなされるようになり、いわゆる「発酵油脂(Single Cell Oils)」の実用生産への道が拓かれた。以来、発酵油脂の研究を筆頭に、機能性脂質生産に微生物機能を活用する研究が最近の脂質工学研究における主要な分野となっており、新規な高機能性脂質を供給する手段として医薬・食品分野から高い注目を集めている。

本研究では、AA生産性糸状菌*Mortierella alpina*を用いた種々の高度不飽和脂肪酸(PUFA)含有油脂の生産と天然では希少なデスマステロール生産、ならびに石油分解菌として知られる*Prototheca*属微細藻のアルカン代謝経路の解明を行った。以下にその主な成果を記す。

1. 糸状菌 *M. alpina* 1S-4 による PUFA 生産

1.1 変異株の探索・育種

AAはプロスタグランジンなどの前駆体として重要であるだけでなく、乳児の発育に必須であることも注目されている。野生株*M. alpina* 1S-4は著量のAAを蓄積することからAAの工業生産菌として利用されている。本研究では、*M. alpina* 1S-4からさまざまな脂肪酸不飽和化酵素(DS)活性欠損変異株を化学的変異剤処理により取得し、代謝工学的手法を駆使して、図1に示すような多岐にわたるC20 PUFAを選択的ある

いは同時に大量に生産できることを初めて示した。例えば、Δ5DSとΔ12DS活性欠損変異株はこれまで適当な供給源が知られていなかったジホモ-γ-リノレン酸(DGLA; 20:3n-6)、ミード酸(MA; 20:3n-9)の実用生産株としてそれぞれ利用できることを示した。DGLAはアトピー性皮膚炎に、MAは関節炎に有効であることが報告され注目されている。さらに、培養液中にトリアシルグリセロールを総脂質の10~40%漏出する変異株を取得し、連続培養による総生産量の向上や脂質精製の簡便さにつながることを期待できる菌体外脂質生産の可能性を示した。さまざまなDS活性欠損変異株から脂質漏出変異株を誘導し、AAだけでなくDGLAやMAの菌体外生産も可能とした。脂質の菌体外漏出機構解明が今後の課題である。

1.2 PUFA 生合成に関与する酵素遺伝子の構造と機能の解明

図1で示したPUFA生合成経路を分子レベルで解明するために、*M. alpina* 1S-4の脂肪酸不飽和化反応に必要な電子伝達に関与するタンパク質および図1に示したすべてのDSと脂肪酸鎖延長酵素(EL)をコードする遺伝子の構造と機能を網羅的に解明した。同時に、Δ9DS、Δ6DSにはそれぞれアイソザイムがあり、個々の転写量が異なることを明らかにした。また、これまでに取得したさまざまなDS活性低下変異株のDS変異部位を同定し、DS活性に必須なアミノ酸残基を明らかにした。これらの研究は、油糧微生物から一つのまとまったPUFA生合成系を分子レベルで解明したものである。

1.3 宿主ベクター系の開発と分子育種株による PUFA 生産薬剤耐性とウラシル要求性を指標とし、*M. alpina* 1S-4の胞

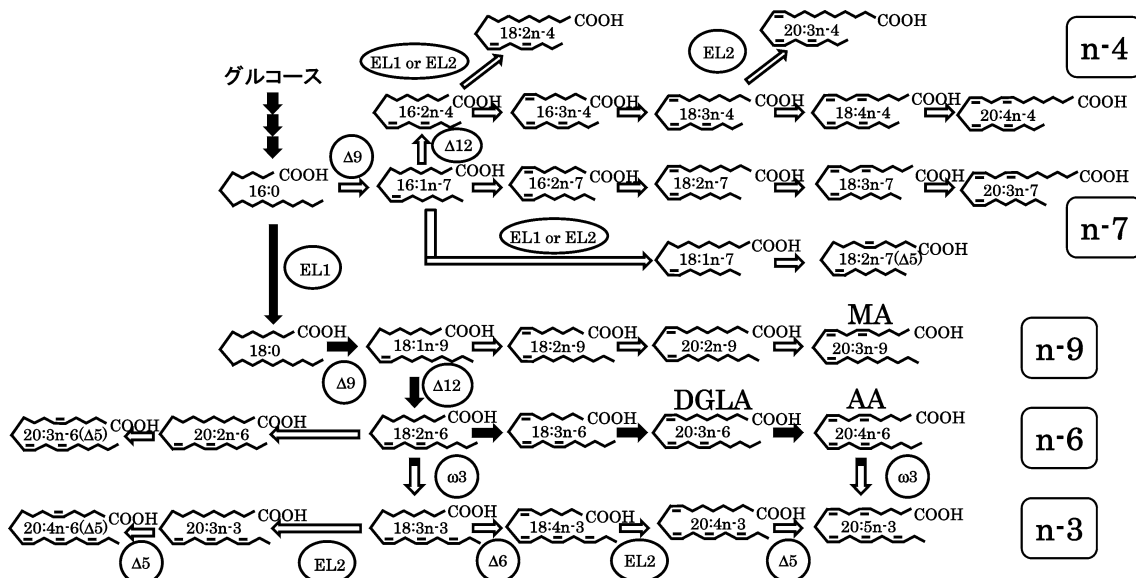


図1 *M. alpina* 1S-4とその誘導変異株により生産可能なPUFA生合成経路  
黒矢印, アラキドン酸(AA)生合成経路; ΔX (ω3), 脂肪酸不飽和化酵素(DS); EL, 脂肪酸鎖延長酵素.

表 *M. alpina* の分子育種による PUFA 生産

PUFA	宿主	ターゲット遺伝子	方法	生産技術の特徴
AA	JT-180 ( $\Delta 12DS$ 欠損株)	$\Delta 12DS$	過剰発現	JT-180 は $\Delta 12DS$ 活性が欠損し, $\Delta 5DS$ と $\Delta 6DS$ 活性が高まった変異株である. $\Delta 12DS$ 活性を復帰させることで AA 生産性が高くなる.
AA	野生株	EL2	過剰発現	AA 合成の律速と考えられている EL2 活性を高めることで AA 生産性が高くなる (4.4 g/L).
20:3n-6( $\Delta 5$ ), 20:2n-6	野生株	$\Delta 6DS$	RNAi	$\Delta 6DS$ 活性低下により 20:3n-6( $\Delta 5$ ), 20:2n-6 が蓄積する.
20:5n-3	野生株	$\omega 3DS$	過剰発現	20:5n-3 の生産性が高くなる (0.8 g/L, 30%).
20:4n-3	S14 ( $\Delta 5DS$ 欠損株)	$\omega 3DS$	過剰発現	20:4n-3 の生産性が高くなる (1.8 g/L, 35%).
MA	野生株	$\Delta 12DS$	RNAi	$\Delta 12DS$ 活性低下により 20:3n-6( $\Delta 5$ ), 20:2n-6 が蓄積する.
16:0, 16:1n-7	野生株	EL1	RNAi	EL1 活性低下により 16:0 が蓄積し, さらに $\Delta 9DS$ により 16:1n-7 が蓄積する.
n-4/n-7 PUFA	M1 (EL1 活性低下株)	MAELO	RNAi	AA などの n-6 PUFA の割合が減少し, n-4 / n-7 PUFA の生産性が高くなる.
n-7 PUFA	M1	$\Delta 12DS$	RNAi	n-4 PUFA の割合が減少し, n-7 PUFA の生産性が高くなる.
18:0, PUFA	野生株	MAELO	RNAi	22:0, 24:0 が生合成されなくなり, 18:0 とそれに続く PUFA の生産性が高くなる.
22:4n-6, 22:5n-3	野生株	<i>PavELO</i> , $\omega 3DS$	過剰発現	C 20 PUFA を C 22 PUFA へ変換する微細藻類 <i>Pavlova</i> sp. の <i>elongase</i> ( <i>PavELO</i> ) と <i>M. alpina</i> の $\omega 3DS$ 遺伝子の共発現により, 22:4n-6 と 22:5n-3 が生合成される.

子に対してパーティクルガン法により遺伝子を導入する形質転換系を確立した. この技術を用いて, 表で示すように DS や EL の過剰発現あるいは RNAi によりさまざまな C20 PUFA の生産性を向上させることに成功した. さらに, これまでに取得した有用変異株の形質転換系も構築し, 変異株がもつ特性を利用した分子育種による PUFA 生産を可能とした. すなわち, AA, DGLA, MA だけでなくエイコサペンタエン酸 (20:5n-3) やエイコサテトラエン酸 (20:4n-3) といった n-3 PUFA の生産性向上に成功した. 以上の研究成果は, 油糧微生物の分子育種による機能性脂質生産性向上を示したものである.

2. *M. alpina* によるデスモステロール生産

微生物に広く見いだされるエルゴステロールとは異なり, デスモステロールはコレステロールと同じステロイド骨格を有する天然では希少なステロールである (図 2). 微生物のステロール生産性を評価する過程で, *Mortierella* 属糸状菌はステロール生産性が高いだけでなく, デスモステロールを多く蓄積することを見いだした. 特に, *M. alpina* FA113 株がデスモステロールを著量蓄積することを見だし, 化学的変異剤処理によりその生産性が向上した変異株を単離した. また, 微生物では初めてステロール  $\Delta 7$  還元酵素遺伝子の機能を解明し, ステロールメチル基転移酵素がデスモステロール生合成に大きくかかわっていることを明らかにした. 総ステロール生産性向上とデスモステロール生合成経路の全容解明が今後の課題である.

3. 微生物による n-アルカンのサブターミナル代謝経路解明

1970 年代に石油分解菌として報告された光合成能をもたない *Prototheca* 属微細藻は, n-アルカン資化能力が高いがその n-アルカン代謝経路は明らかにされていなかった. 本研究では n-アルカン資化能力が特に高い *Prototheca zopfii* に注目し, n-アルカンに由来する代謝産物の構造を決定した. これにより, *P. zopfii* は n-アルカンの 5 位の位置を酸化し, アルコール, ケトンへと変換するユニークなサブターミナル代謝経路を有する

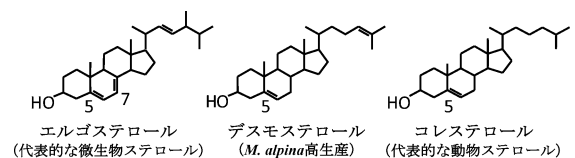


図 2 動物・微生物の代表的なステロール

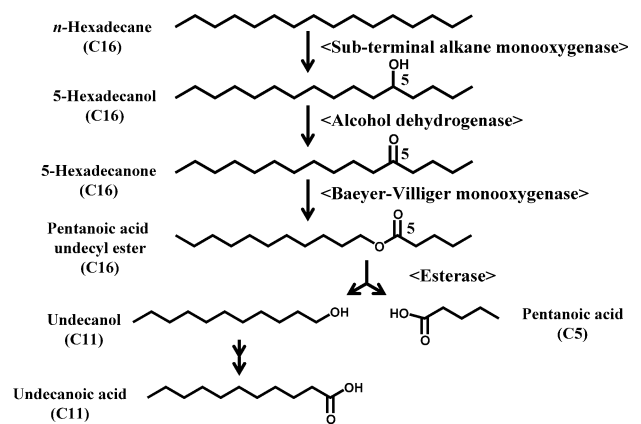


図 3 *Prototheca* 属微細藻による n-ヘキサデカンの推定代謝経路

ことを明らかにした (図 3). 微生物スクリーニングにより, *Prototheca* 属微細藻以外にも担子菌, 糸状菌, 放線菌から酸化位置が異なる活性を示す菌株の単離に成功した. 今後, これら酸化反応を担う酵素 (遺伝子) を同定し, さまざまな基質への応用が期待される.

4. おわりに

このように本研究では代謝工学的手法により変異株育種と分子育種を組み合わせることで, これまで適当な供給源が知られていなかった種々の PUFA 含有油脂や希少ステロールの生産を可能とした. AA, DGLA, ならびに MA は大量供給が可能となった

ことで、新たな機能が解明されてきたといえる。すでに、AA含有油脂は乳児用ミルクの添加物として、あるいは種々の乳製品の品質を高めるための素材として世界的に使用されている。今後、栄養補助食品素材、医薬品素材などへの用途開発に向けた需要の拡大が期待されるため、本研究で開発した育種技術を駆使してさらなる PUFA・ステロールの安定供給を目指す必要がある。また、微生物による *n*-アルカンのサブターミナル代謝経路は未解明な点が多く、報告例も少ない。*Prototheca* 属微細藻をはじめ、本研究で見いだした数種の微生物から初発の酸化反応を触媒する酵素（遺伝子）を同定し、これまで位置特異的酸化反応が困難であった基質への応用を目指していきたい。

本研究は京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻発酵生理及び醸造学分野で行われたものであり、本研究を行う機会を

与えていただき、日頃からご指導ご鞭撻を賜りました京都大学大学院教授 清水 昌先生に心より御礼申し上げます。博士後期課程まで直接のご指導ご激励をいただきました元 京都大学大学院助教授 小林達彦先生（現 筑波大学大学院教授）に深く感謝いたします。また多くのご助言、ご支援を賜りました京都大学大学院准教授 片岡道彦先生、京都大学教授 小川 順先生、京都大学大学院教授 横関健三先生に厚く御礼申し上げます。さらに本研究にかかわりここまで支援いただいた同研究室の修了生、卒業生、ならびに在学生、共同研究を行ってきた企業の研究員諸氏に厚く御礼申し上げます。長年にわたりご激励を賜りました京都大学名誉教授 山田秀明先生に深く御礼申し上げます。最後になりましたが、本奨励賞にご推薦くださいました日本農芸化学会関西支部長 山本憲二先生ならびにご支援賜った諸先生方に厚く御礼申し上げます。