油糧糸状菌の分子育種基盤の構築と有用油脂生産への展開

京都大学大学院農学研究科　安　藤　晃　規

はじめに

近年，多様な脂質の需要の拡大，環境立脚型の物質生産システム構築の要請などにより，安全性・選択性に優れた微生物生産プロセスに大きな期待が寄せられている．とりわけ，近年の新たな脂質生理機能の解明に伴い，自然界では希少な脂質や，化学合成では多量に調製しがたい発酵生産脂質に注目が集まっている．我々は，これまでに土壌より油糧糸状菌*Mortierella alpina* 1S-4を見いだし，アラキドン酸（ARA, 20:4ω6）の商業生産を実現し，育種により多様な脂質生産株の創出を報告してきた．

本講演では，油糧植物に代わる脂質発酵生産を実現した本菌*M. alpina* 1S-4を題材に，油糧微生物による脂質生産において未開であった分子生物学的基礎研究に関し，薬剤選択マーカーや効率的な遺伝子導入法の開発，有用な新規プロモーターの評価とライブラリー化，また，遺伝子破壊法の開発などを紹介し，新たに開発した分子育種ツールを活用した多様な有用脂質の選択的生産や，実用的な大量生産について紹介する．

1. *Mortierella alpina* 1S-4の新規薬剤マーカー遺伝子と遺伝子導入法の開発

油糧糸状菌*M. alpina*は，油糧植物に比肩する脂質生産性を示し，ARAをはじめとした高度不飽和脂肪酸（PUFA）の生産能を有することから，脂質発酵という新たな発酵生産技術の展開を実現した菌である．また，微生物特有の良好な操作性や，安定生産が見込め，既存油糧資源や石油資源を代替する脂質生産プラットフォームとしてさらなる展開が期待できる（図1）．

M. alpina 1S-4の宿主–ベクター系において，栄養要求性を指標とするマーカーはホスト株の構築が必要であり汎用性に問題がある．そこでまず選択薬剤の探索を行い，担子菌に特異性の高い薬剤カルボキシンが，本菌の菌糸の成長ならびに胞子の発芽を阻害できることを明らかにした．カルボキシンのターゲットであるコハク酸脱水素酵素複合体のIpサブユニット遺伝子を本菌より単離し，耐性機構に関与する1塩基変異を導入した遺伝子を本菌に導入した結果，形質転換株がカルボキシンに対して充分な耐性を示し，マーカー遺伝子としての有効性を示すことができた．続いて，本系を用いて外来の大腸菌由来のβ-グルクロニダーゼ遺伝子（GUS遺伝子）のコドン頻度を*Mortierella*様に改変し本菌への導入を検討したところ，形質転換株の選抜，ならびに，GUS遺伝子の発現が確認でき，宿主–ベクター系としての有効性を確認した．加えて，本系をレポーター遺伝子として活用する生化学的解析の展開が可能になった．さらに，*M. alpina* 1S-4への遺伝子導入法として，植物の形質転換に利用される*Agrobacterium tumefaciens*を介した遺伝子導入法（アグロバクテリウム法）を試みた．結果，充分な形質転換効率，ならびに安定した形質の保持を達成することができた．また，染色体上に単コピーで挿入されることを明らかにし，先のGUSアッセイ系を活用したプロモーター解析や，遺伝子破壊法構築に有用であることを明らかにした．

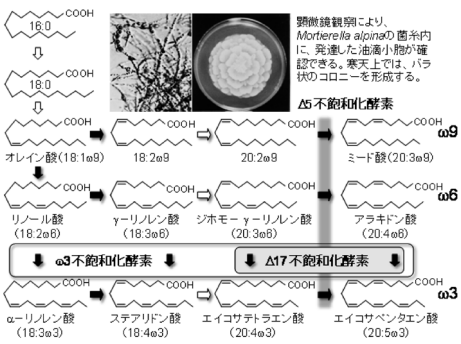

図1　糸状菌*Mortierella alpina* 1S-4の脂肪酸生合成経路

2. *Mortierella alpina* 1S-4の有用プロモーターの取得と評価

*M. alpina*のゲノム情報及びEST解析結果をもとに約30種類の有用プロモーター候補を選抜し，確立した評価系を用いて機能評価を行った．その結果，既存のプロモーターの約5倍の活性を示す高発現プロモーター，時期特異的発現プロモーター，ガラクトース誘導発現プロモーター等，分子育種に有用と考えられる特徴を示す新規プロモーターを多数見いだした（表1）．

3. *Mortierella alpina* 1S-4の分子育種

実際にここまでに開発した分子育種法の有用性を評価するべく，エイコサペンタエン酸（EPA, 20:5ω3）生産株の構築に取

表1　*M. alpina* 1S-4にて開発した分子育種基盤技術

・宿主	*M. alpina* 1S-4（wild株）
	ST1358株（ω3不飽和化酵素低下株）
	S14株（Δ5不飽和化酵素低下株）
・選択マーカー	薬剤カルボキシン耐性
・形質転換方法	アグロバクテリウム法
・プロモーター	高発現プロモーター
	・SSA2 p（構成的）
	・CIT1 p（培養初期特異的）
	・PP6 p（培養中期特異的）
	・PP3 p（培養後期特異的）
	誘導発現プロモーター
	・GAL10 p（ガラクトース誘導）
・遺伝子素材	PUFA生合成に関わる内在生酵素遺伝子
	・Δ5不飽和化酵素遺伝子
	・ω3不飽和化酵素遺伝子
	外来遺伝子
	・大腸菌由来β-グルクロニダーゼ遺伝子
	・糸状菌*Saprolegnia diclina*由来Δ17不飽和化酵素遺伝子
・遺伝子破壊系	宿主（*lig4*破壊株）
	Δ5不飽和化酵素遺伝子破壊（DGLA生産菌）
・分子育種株	EPA常温生産株　EPA 1.8 g/L, 26%（28°C）
	ETA常温生産株　ETA 0.6 g/L, 25%（28°C）
	DGLA生産株　DGLA 0.8 g/L, 40%（28°C）

り組んだ．EPA は近年エチルエステル誘導体が高脂血症に対する医薬品として認可されるなど，医薬品原料としての需要が高まっているが，資源を魚油に依存しており供給の安定性，安全性の観点から代替生産法の開発が望まれている．これまで，*M. alpina* 1S-4 の低温誘導性ω3不飽和化酵素（ω3DS）を活用した EPA 発酵生産の開発，ならびに本ω3DS 高発現株の育種を試みてきたが，低温培養時の生育低下に起因する生産効率の低さが大きな問題であった．そこで，常温条件下でω3DS として機能する糸状菌 *Saprolegnia diclina* 由来Δ17不飽和化酵素遺伝子（*sdd17m*）を用いた分子育種を行なった（図1）．宿主として，EPA 前駆体であるアラキドン酸生産性が高くω3DS 活性低下変異株である *M. alpina* ST1358株に，先の検討で見いだした高発現プロモーター *SSA2*p 制御による *sdd17m* 発現ベクターを導入した結果，28°C 培養条件下にて，総脂肪酸あたり 26.4％の EPA 常温生産を達成した（図2）．

さらに，*M. alpina* の化学変異処理により構築されたΔ5不飽和化酵素活性低下変異株である *M. alpina* S14株の分子育種により，エイコサテトラエン酸（ETA, 20:4ω3）生産株の構築に取り組んだ（図1）．ETA はエイコサノイドアナログ前駆体として有益な生理活性機能を示すことが期待されているが，天然でも希少であり充分な供給源がなかったことから，詳細な機能解析が遅れている．そこで S14株に，高発現プロモーター *SSA2*p 制御による *sdd17m* 発現ベクターを導入した．結果，28℃培養条件下にて，総脂肪酸あたり 24.9％の ETA 常温生産を達成した．

4. *Mortierella alpina* 1S-4 の遺伝子破壊法の確立と本技術を活用した分子育種

従来は化学変異剤処理による突然変異誘導によって多様な PUFA 高生産株を創生してきたが，ランダムな突然変異誘導では，意図する変異株の取得が困難なうえ，標的遺伝子以外にも変異が導入され生育や脂肪酸生産性にも影響を及ぼす．PUFA の高生産株取得を容易にするには，標的とする単一遺伝子の破壊により生産株を取得することが望ましい．そこで，糸状菌の遺伝子組換え時に機能する相同組換えならびに非相同組換えの２つの機構のうち，相同組換えの効率を上げるべく，非相同組換え時におこる非相同末端結合の鍵酵素 Ligase 4 をコードする *lig4* 遺伝子の破壊によってジーンターゲティング（GT）効率の改善を試みた．まず，本菌の *lig4* 遺伝子の塩基配列を決定し，先の検討で構築したアグロバクテリウム法を用いて *lig4* 破壊ベクターを *M. alpina* 1S-4 に導入し，二回交差相同組換えによる *lig4* 破壊株を 3.2％の GT 効率で取得した．続いて，*lig4* 破壊株を宿主として GT 効率を評価した結果，野生株の 21 倍，67％に達し，顕著な GT 効率の改善を実現した．

実際に，開発した *Lig4* 破壊株を用いる GT システムを活用し，Δ5不飽和化酵素遺伝子破壊により希少脂肪酸であるジホモ-γ-リノレン酸（DGLA, 20:3ω6）高生産株の分子育種を試みた（図1）．*M. alpina lig4* 破壊株に，アグロバクテリウム法にてΔ5不飽和化酵素遺伝子破壊コンストラクトを導入した結果，50％の高い GT 効率でΔ5不飽和化酵素破壊株を取得した．また，破壊株の示す DGLA 含有率は最大で 40％に達した．さらに，低温培養条件下において本破壊株のω3DS を活性化させることで，ETA の生産を可能とした（図3）．これら破壊株は，化学変異剤による突然変異誘導によるΔ5不飽和化酵素低下変異株（S14株）よりも高い DGLA，ETA 含有率を示した．このように本 GT システムにより PUFA 生産性の低下や生育の遅延を引き起こさない分子育種が可能になった．また，本技術を基盤に食品用途への展開を可能とするセルフクローニングによる分子育種技術を構築した．

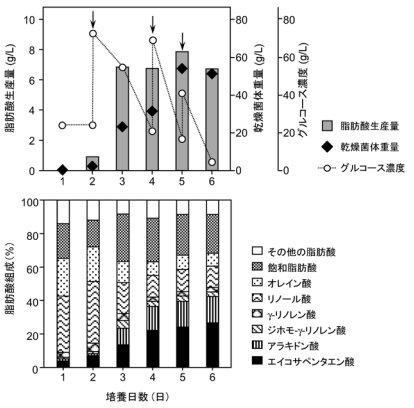

図2 *M. alpina* 分子育種株を用いた，5L ジャーファーメンターによる EPA の大量常温生産．↓；グルコースの添加

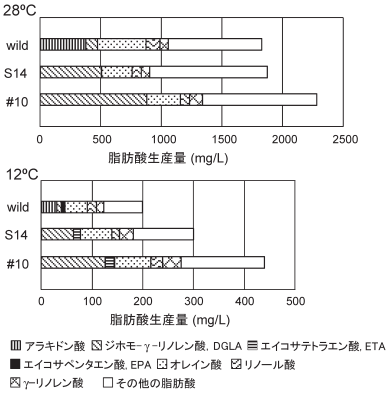

図3 Δ5不飽和化酵素遺伝子破壊株の脂肪酸組成と脂質生産性の評価　培養温度28°C，12°C 時の脂肪酸生産量と脂肪酸組成．wild，野生株；S14，化学変異剤による破壊株；#10，分子育種による破壊株

おわりに

現在，これらの技術を基盤に，食品・医薬品用途が期待される様々な希少脂肪酸の生産をはじめ，脂質生産性向上による油脂燃料生産，化成品原料生産への新たな研究を推進しており，バイオリファイナリーに資する技術開発を実現しつつある．今後も，油糧糸状菌の基礎・応用研究を介して応用微生物学，微生物生態学の発展に寄与し，循環型で持続的な未来社会を支援する農芸化学研究に貢献していきたい．

謝　辞　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および京都大学学際融合教育研究推進センター生理化学研究ユニットで行われたものです．本研究のご指導，ご支援を賜りました清水昌名誉教授，横関健三前客員教授，小川順教授，片岡道彦教授（現大阪府立大学），櫻谷英治教授（現徳島大学），島純教授（現龍谷大学）に心より御礼申し上げます．また，様々な面からご支援いただいた同大学応用生命科学専攻の教員の方々，事務員の方々，研究室の諸先生方，研究員，スタッフ，卒業生，在学生，大学・企業の共同研究者の方々に深く感謝いたします．