

有用脂質生産微生物の代謝工学的研究

櫻谷 英治

(京都大学大学院農学研究科 応用生命科学専攻)

研究の目的

アラキドン酸(AA)などの高度不飽和脂肪酸(Polyunsaturated fatty acid、PUFA)は、リン脂質の膜の構成成分としてだけでなく、哺乳動物ではエイコサノイド類の前駆体として機能することが知られている。糸状菌*Mortierella alpina* 1S-4 は高脂質含量でAAを生産することができる油糧微生物である。さらに、本菌により実用的工業生産される「発酵油脂」は性状・機能とも従来の植物や動物からは得ることのできないユニークなものである。工業生産菌である本菌の遺伝子組み換え技術により、PUFA生合成系・脂質蓄積系に関わる酵素遺伝子の過剰発現あるいはその遺伝子破壊が可能となれば、PUFA生産性向上に加え、誘導変異株では困難であった代謝制御による様々なPUFAの生産、脂質蓄積のメカニズムの解明に応用できるといえる。

方法と結果

1) 目的遺伝子発現用形質転換系の開発

これまでに、野生株(*M. alpina* 1S-4)から誘導したウラシル要求株(*ura5* 株)を宿主とし、それを相補する*ura5* 遺伝子を野生株から単離しマーカー遺伝子とした宿主ベクター系を開発している(1)。そこでこの系を応用して、まず、蛍光タンパク質(EGFP)遺伝子を発現させることを試みた。既に構築した選択マーカー(*ura5*)遺伝子を含む形質転換用ベクター(pDura5)に、EGFP遺伝子カセットを挿入してEGFP発現用ベクター(pDura5GFP)を構築した。*ura5* 株の胞子にパーティクルガンを用いて形質転換したところ、数個の形質転換体を得ることに成功した。胞子を蛍光観察した結果、コントロール株(*ura5* 株)と比較して、形質転換体の胞子では強い蛍光が観察された。

2) 脂肪酸鎖長延長酵素遺伝子過剰発現による AA 生産性の向上

-リノレン酸(GLA)をジホモ- -リノレン酸(DGLA)へ変換する鎖長延長酵素(GLELO)を*ura5* 株で過剰発現させることを試みた。先のpDura5GFPと同様に、GLELO発現用ベクター(pDura5GLELO)を構築した。36 個の形質転換体の中から、*ura5* 株と比較して全脂肪酸に対するGLAの割合が低くAAの割合が高い形質転換体#3 株を選抜した。5%グルコース、1%酵母エキスから成る培地で 28°C、10 日間振とう培養を行ったところ、比較対象となる*ura5* 株の全脂肪酸量が約 10.2 mg/ml of culture broth、AA含量が 19.8%であるのに対して、#3 株ではそれぞれ 12.8 mg/ml of culture broth、28.1%であった。また、リアルタイム定量PCRにより、GLELO遺伝子の転写量を測定したところ、#3 株では*ura5* 株よりも 7.4 倍高い値を示すことが明らかとなった(2)。

結論

ウラシル要求性を指標とした形質転換系を応用して目的遺伝子の発現に成功した。まず、EGFP 遺伝子の発現では、胞子の蛍光観察により目的遺伝子の過剰発現が視覚的に確認できた。さらに、AA 生合成経路の律速段階と考えられている GLELO 遺伝子を過剰発現させることにより、形質転換体の脂肪酸組成を改変し、AA 生産性を向上させることに成功した。

文献

- (1) Takeno S., Sakuradani E., Murata S., Inohara-Ochiai M., Kawashima H., Ashikari T., and Shimizu S. (2004) Establishment of an overall transformation system for an oil-producing filamentous fungus, *Mortierella alpina* 1S-4. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **65**, 419–425.
- (2) 竹野誠記、櫻谷英治、清水昌、(2004)、油糧微生物 *Mortierella alpina* 1S-4 の宿主ベクター系の開発とその応用、応用微生物学研究、Vol. 2、 p.82-87
<http://www.kuicr.kyoto-u.ac.jp/labos/bm2/oubikyo/2004120107.pdf>