

Mortierella alpina 1S-4の分子育種による種々のPUFAの生産

菊川 寛史^{1,2}・奥田 知生²・安藤 晃規²・櫻谷 英治^{2,3}・小川 順^{2*}

三大栄養素として身近な脂質には、その基本骨格や構成する官能基によって数千にのぼる分子種が存在する。その脂質のなかで、もっとも基本的な構成分子の一つである「脂肪酸」は生理活性メッセンジャーやエネルギー貯蔵の役割を担っている。食卓を彩るオリーブオイルは、炭素鎖長18のオレイン酸 (18:1 ω 9, OA) やリノール酸 (18:2 ω 6, LA) を主に含む中性脂質で構成されている。近年、抗肥満作用や循環器疾患予防効果が報告されている青魚由来の魚油は、炭素鎖長20以上の高度不飽和脂肪酸 (PUFA) であるエイコサペンタエン酸 (20:5 ω 3, EPA) やドコサヘキサエン酸 (22:6 ω 3) を含有している。

これら健康増進効果が期待される機能性脂肪酸の生産・供給は、かつて植物油や魚油といった天然資源に依存していた。1980年代に、*Mucor*属や*Mortierella*属糸状菌が γ -リノレン酸 (18:3 ω 6, GLA) やアラキドン酸 (20:4 ω 6, ARA) などのPUFA 高生産菌株として見いだされたのを契機に、有用脂肪酸あるいは植物・動物からは生産しがたい希少脂肪酸を含有する油脂の微生物生産、すなわち「油脂発酵」の実用化開発が進められてきた。本稿では、油脂蓄積性糸状菌*Mortierella alpina* 1S-4株の紹介、ならびに、この糸状菌における近年の分子育種法の開発と希少脂肪酸生産への応用について紹介する。

油脂高含有糸状菌 *Mortierella alpina* 1S-4

M. alpina 1S-4株は、バイオマスに占める脂質の割合が高く、オメガ6系脂肪酸であるアラキドン酸の高含有特性を有する油脂高含有糸状菌として見いだされた。本菌の菌体内油脂生産量は最大で600 mg/g乾燥重量、アラキドン酸生産量は13 g/L/10 daysに達する顕著な脂質生産性を示す¹⁾。この性質を活かして、現在では、*M. alpina* 1S-4株の高密度培養により、アラキドン酸含量の高い中性脂質 (トリアシルグリセロール) の工業的発酵生産が行われている^{2,3)}。

M. alpina 1S-4株において、オメガ9系、オメガ6系、オメガ3系PUFAといった多彩なPUFAの生合成経路が確認されている (図1A)。脂肪酸合成酵素によって生合成されたパルミチン酸 (16:0) が初発基質となり、数種の鎖長延長酵素 (MALCE, GLELO, EL) と5つの不飽和化酵素 (Δ 9DS, Δ 12DS, Δ 6DS, Δ 5DS, ω 3DS) による変換を受けて、さまざまな不飽和脂肪酸が生合成される⁴⁾。さまざまな脂肪酸生合成酵素の欠損変異株が化学変異により誘導され、たとえば、 Δ 12DS欠損株ではオメガ9系PUFAであるミード酸⁵⁾ (図1A)、 Δ 6DS欠損株ではnon-methylene interrupted fatty acid⁶⁾ (図1B)、MALCE欠

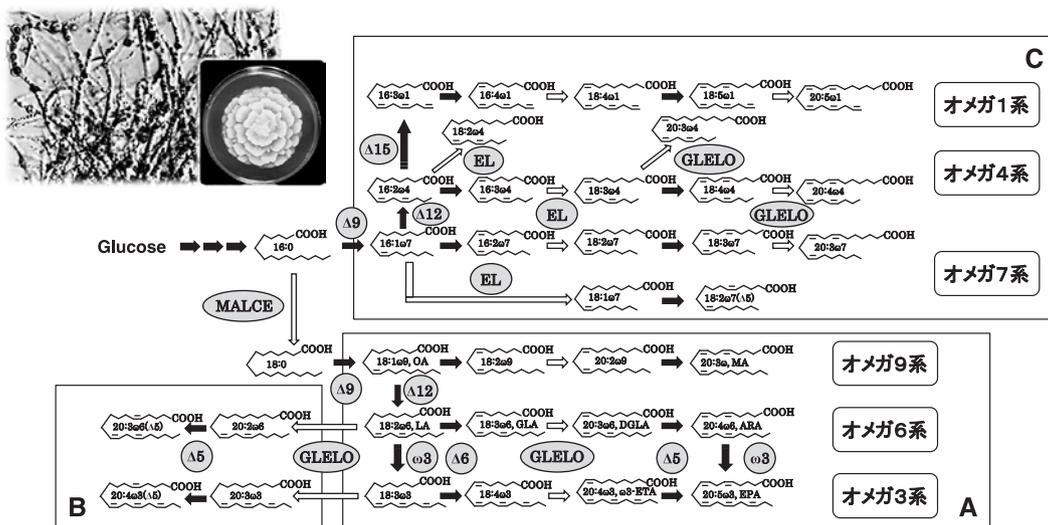


図1. *Mortierella alpina* 1S-4株の脂肪酸生合成経路。OA：オレイン酸，LA：リノール酸，GLA： γ -リノレン酸，MA：ミード酸，DGLA：ジホモ- γ -リノレン酸，ARA：アラキドン酸， ω 3-ETA： ω 3-エイコサテトラエン酸，EPA：エイコサペンタエン酸。

* 著者紹介 京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻 (教授) E-mail: ogawa.jun.8a@kyoto-u.ac.jp
¹ 静岡県立大学食品栄養科学部環境生命科学研究科 (助教) E-mail: kikukawa@u-shizuoka-ken.ac.jp
² 京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻，³ 徳島大学生物資源産学学部食料科学コース
 生物工学 第98巻 第9号 (2020)

損株ではオメガ1, 4, 7系脂肪酸 (図1C) の生産が確認されている^{2,4)}。これらの結果は、本菌の分子育種による脂肪酸代謝改変により、アラキドン酸のみならず、種々のPUFA生産が可能であることを示している。

遺伝子組換え技術の開発

2000年以降、*M. alpina* 1S-4株の遺伝子操作による油脂生産性向上、ならびに、分子育種による生産物の多様化に関する研究開発が展開された。

最初の遺伝子組換え技術として、ウラシル要求性を指標とした宿主-ベクター系が確立された。宿主としてオロチジル酸ピロホスホリラーゼ (Ura5) 活性が欠損した変異株を取得し、*ura5* 遺伝子を連結した発現ベクターをパーティクルガン法にて宿主の胞子に直接撃ち込むことで形質転換を実現した^{5,6)}。続いて、野生株に対しても形質転換ができるように、カルボキシシンやゼオシンに対する薬剤耐性遺伝子を選択マーカーとする遺伝子組換え系が確立された^{7,8)}。カルボキシシン耐性マーカーについては、*M. alpina* 1S-4株に内在するコハク酸脱水素酵素複合体Ipサブユニット遺伝子 (*sdhB*) の変異型を用いた。このように、ウラシル要求性とカルボキシシン耐性の2つの系において、セルフクロニングを念頭に置いた外来遺伝子配列を含まない形質転換が可能となった。また、新たに *Agrobacterium* を介した形質転換法が開発されたことにより、形質転換効率が向上し、胞子形成能が低い変異株においても形質転換が可能となった⁹⁾。この手法は、*Agrobacterium* 濃度を調整することで導入遺伝子コピー数を調整可能である。これにより、パーティクルガン法は複数コピーの、*Agrobacterium* を介した形質転換法は1コピーの遺伝子導入法として、研究用途による使い分けが可能となった。

近年では、*M. alpina* 1S-4株の内在性プロモーター領域の網羅的評価により、遺伝子発現レベルを自在にアレンジ可能な発現系レパートリーが整備された^{10,11)}。プロモーター機能の評価系としては、*E. coli* 由来 GUS (β -glucuronidase) 遺伝子をレポーター遺伝子として利用し、4-nitrophenyl- β -D-glucuronide を基質とする酵素活性測定により発現した GUS 活性を定量的かつ再現性良く測定するアッセイ系が構築された。*M. alpina* 1S-4株のゲノム情報および EST 解析をもとに約30種類の有用プロモーター候補を選抜し、このアッセイ系により網羅的評価を行ったところ、5つの高発現プロモーター (PP3 p, SSA2 p, PP7 p, HSC82 p, PP6 p)、4つの時期特異的発現プロモーター (PP2 p, PP3 p, PP6 p, CIT1 p)、2つのガラクトース誘導発現プロモーター (GAL1 p, GAL10 p) が見いだされた。

遺伝子過剰発現系が拡充される一方で、本菌における遺伝子発現抑制技術については、RNA干渉 (RNAi) によるサイレンシング技術が確立された¹²⁾。RNAiにより $\Delta 12$ 不飽和化酵素 ($\Delta 12DS$) の活性を低下させることでオメガ9系脂肪酸であるミード酸 (20:3 ω 9, MA) を高含有する油脂の発酵生産が可能となった。

しかし、これまでに整備された遺伝子組換え技術は、ゲノム上のランダムな位置への遺伝子挿入であり、標的とする遺伝子領域への外来遺伝子の導入は不可能であった。そのため、完全なノックアウト株の作製は実現していなかった。そこで筆者らは、*M. alpina* 1S-4株における遺伝子ターゲティング (GT) 技術の構築を目指した。

標的遺伝子のターゲティングシステム

一般的に、損傷ゲノムの修復および断片遺伝子の組換え時には、相同遺伝子配列をもとに修復を行う相同組換え (HR) とランダムな位置で修復を行う非相同末端結合 (NHEJ) の2つの機構が関与する (図2)。*M. alpina* 1S-4株を含め多くの糸状菌においては、ゲノム遺伝子が修復される際に NHEJ が優先するため、相同組換えを利用した GT の効率が低いことが課題であった。そこで、本菌の NHEJ 経路を欠損させることで GT 効率の改善を検討した。

A. *ku80* 遺伝子破壊による NHEJ のノックアウト 初めに、本菌の NHEJ に関与する *ku80* 遺伝子の塩基配列を決定した。この遺伝子配列を標的とする *ku80* 遺伝子破壊ベクターをパーティクルガン法により *M. alpina* 1S-4株の胞子に導入し、一回交差相同組換えにより GT 効率 1.3 % で *ku80* 遺伝子破壊 ($\Delta ku80$) 株を作製した (図3)。続いて、 $\Delta ku80$ 株を宿主として、DGLA をアラキドン酸に変換する $\Delta 5$ 不飽和化酵素 ($\Delta 5DS$) 遺伝子を *ku80* 遺伝子と同様の方法で破壊することで、DGLA 高生産株の分

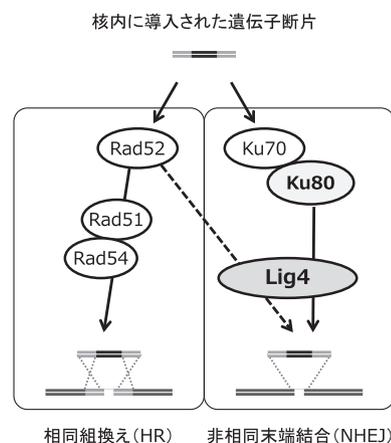


図2. 遺伝子断片の組換え機構

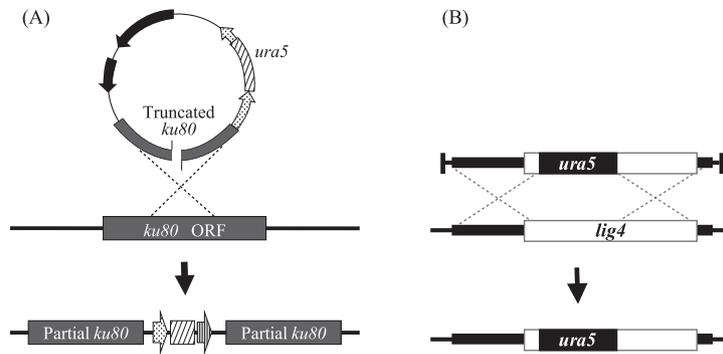


図3. (A) 一回交差および (B) 二回交差相同組換え

子育種を試みるとともに、 $\Delta ku80$ 株におけるGT効率を評価した。得られた $\Delta 5ds$ 遺伝子破壊株ではDGLA含有率が総脂肪酸の37%に向上するとともに、アラキドン酸含有率の低下が観察された¹³⁾。一方、 $\Delta ku80$ 株におけるGT効率は3%に止まったことから、NHEJの上流に位置するKU80の欠損だけでは、NHEJの阻害は不十分であることが示唆された。

B. *lig4* 遺伝子破壊によるGTシステムの確立 *lig4* 遺伝子にコードされるDNA Ligase 4は、NHEJにおいて遺伝子末端を結合する鍵酵素である(図2)。 $\Delta ku80$ 遺伝子破壊ではGT効率の改善が認められなかっただけでなく、パーティクルガン法によって破壊ベクターが複数コピー導入された。そこで、GT効率の飛躍的な改善と1コピーの破壊コンストラクトによる遺伝子破壊を試みた。本菌の*lig4* 遺伝子配列を決定し、染色体ゲノムに1コピーの遺伝子導入が可能な*Agrobacterium*を介した形質転換法を用いて*lig4* 遺伝子破壊コンストラクトを*M. alpina* 1S-4株の胞子に導入した。二回交差相同組換えによりGT効率3.2%で*lig4* 遺伝子破壊($\Delta lig4$)株を取得した(図3)。さらに、 $\Delta lig4$ 株を宿主として*lig4* 遺伝子領域を標的に再度相同組換えによるマーカー遺伝子の置換を試行したところ、 $\Delta lig4$ 株におけるGT効率は67%を示し、野生株におけるGT効率と比較して飛躍的な改善が認められた¹⁴⁾。

遺伝子ターゲティングシステムを用いた希少脂肪酸生産

本システムを適用した育種において主に生産目標としたDGLAは、抗がん作用・抗炎症作用を促進すると報告されている¹⁵⁾。しかし、DGLAを蓄積する天然資源はあまり知られておらず、本菌の野生株においても総脂肪酸のうち僅か3~4%蓄積するのみである。

ここでは、GT効率が大幅に改善された $\Delta lig4$ 株を宿主として、 $\Delta 5ds$ 遺伝子破壊によるDGLA高生産株の作製を試みた。まず、5-フルオロオロト酸を含有する寒天培地上で $\Delta lig4$ 株からウラシル栄養要求性株を選抜した。続

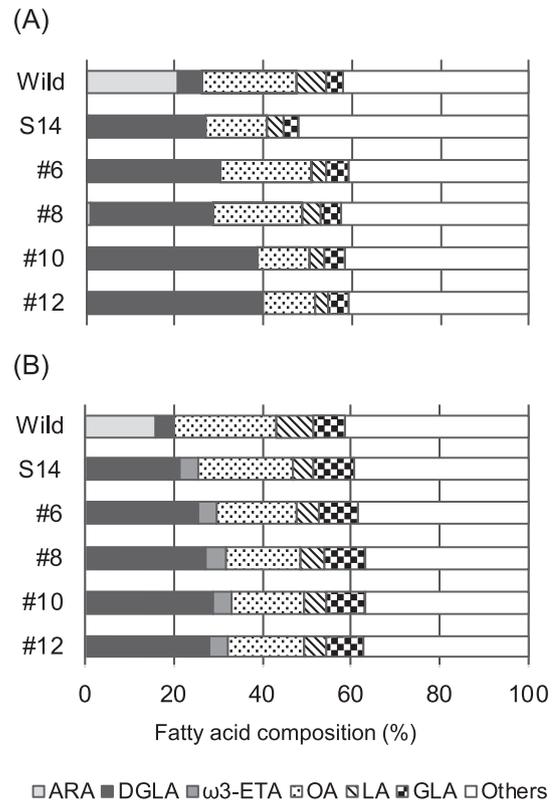


図4. GT技術により作製した $\Delta 5ds$ 遺伝子破壊株の菌体内脂肪酸組成. (A) 28 °C培養, (B) 12 °C培養. S14: $\Delta 5DS$ 欠損突然変異株, #XX: $\Delta 5ds$ 遺伝子破壊株.

いて、*Agrobacterium*を介した形質転換法にてウラシル要求性株の胞子に $\Delta 5ds$ 遺伝子破壊コンストラクトを導入し $\Delta 5ds$ 遺伝子破壊を試みた。結果、高いGT効率(50%)で $\Delta 5ds$ 遺伝子破壊株を取得した。この破壊株においては、総脂肪酸に占めるDGLAの割合が最大で40%に達した(図4)。また、化学変異導入や $\Delta ku80$ 株を宿主として得られた $\Delta 5DS$ 欠損変異株では完全にアラキドン酸を欠失させることはできなかったが、この $\Delta 5ds$ 遺伝子破壊株ではそれが実現された。さらに、化学変異におけるランダムな変異導入に起因するPUFA生産性低下および生育の

遅延はGT技術を用いた分子育種では認められなかった。その結果、これら $\Delta 5ds$ 遺伝子破壊株は、化学変異剤への暴露により得られた $\Delta 5DS$ 欠損突然変異株 (*M. alpina* S14) よりも高い脂質生産性ならびにDGLA含有率を示した (図4A)。

一方、本破壊株の低温培養 (12 °C) により *M. alpina* 1S-4株がもつ $\omega 3$ 不飽和化酵素を活性化させることで、 $\omega 3$ -エイコサテトラエン酸 (20:4 $\omega 3$, $\omega 3$ -ETA) の生産も可能となった (図4B)。 $\omega 3$ -ETAは、自然界にほとんど存在しないため詳細な機能解析研究が遅れており、今後の詳細な機能解析研究により人体に有益な生理活性機能が見いだされることが期待されている¹⁶⁾。

まとめ

以上、遺伝子ターゲティングの開発と分子育種の実例を中心に、*M. alpina* 1S-4株における遺伝子組換え技術について紹介した。本菌は、PUFA高含有油脂生産におけるポテンシャルが非常に高く、アラキドン酸高含有油脂の工業生産だけでなく、分子育種による代謝改変により、天然資源からは得がたい希少脂肪酸についても高含有油脂の生産を可能とした。今後も、*M. alpina* 1S-4株の分子育

種ツールのさらなる充実により、天然資源に依存する脂質産業に新たな供給源を提供する技術の開発が展開されるものと期待される。

文 献

- 1) Higashiyama, K. *et al.*: *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, **75**, 1501 (1998).
- 2) Sakuradani, E. *et al.*: *J. Biotechnol.*, **144**, 31 (2009).
- 3) 小川 順: *生物工学*, **90**, 723 (2012).
- 4) Kikukawa, H. *et al.*: *J. Adv. Res.*, **11**, 15 (2018).
- 5) Takeno, S. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**, 277 (2004).
- 6) Takeno, S. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **65**, 419 (2004).
- 7) Takeno, S. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **100**, 617 (2005).
- 8) Ando, A. *et al.*: *Curr. Genet.*, **55**, 349 (2009).
- 9) Ando, A. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**, 5529 (2009).
- 10) Okuda, T. *et al.*: *Curr. Genet.*, **60**, 183 (2014).
- 11) Okuda, T. *et al.*: *Curr. Genet.*, **60**, 175 (2014).
- 12) Takeno, S. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 5124 (2005).
- 13) Kikukawa, H. *et al.*: *Curr. Genet.*, **61**, 579 (2015).
- 14) Kikukawa, H. *et al.*: *J. Biotechnol.*, **208**, 63 (2015).
- 15) Wang, X. *et al.*: *Lipids Health Dis.*, **11**, 25 (2012).
- 16) Kikukawa, H. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **122**, 22 (2016).