Mortierella alpina 1S-4 の分子育種株による 高度不飽和脂肪酸高含有油脂の発酵生産

Fermentative Production of Oils Rich in Polyunsaturated Fatty Acids by the Molecularly Bred Strains of *Mortierella alpina* 1S-4

小川 順

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研究分野
京都大学学際融合教育推進センター
生理化学研究ユニット

〒606-8502
京都市左京区北白川追分町

Jun OGAWA
Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric.,
Kyoto Univ.
Res. Unit Physiol. Chem. Kyoto Univ.
Kitashirakawa Oiwake-cho, Sakyo-ku,
Kyoto, 606-8502, Japan

奥田 知生

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研究分野
〒606-8502
京都市左京区北白川追分町

Tomoyo OKUDA
Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric.,
Kyoto Univ.
Kitashirakawa Oiwake-cho, Sakyo-ku,
Kyoto, 606-8502, Japan

菊川 寛史*

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研究分野
〒606-8502
京都市左京区北白川追分町

Hiroshi KIKUKAWA
Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric.,
Kyoto Univ.
Kitashirakawa Oiwake-cho, Sakyo-ku,
Kyoto, 606-8502, Japan

安藤 晃規

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研究分野
京都大学学際融合教育推進センター
生理化学研究ユニット
〒606-8502
京都市左京区北白川追分町

Akinori ANDO
Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric.,
Kyoto Univ.
Res. Unit Physiol. Chem. Kyoto Univ.
Kitashirakawa Oiwake-cho, Sakyo-ku,
Kyoto, 606-8502, Japan

論文要旨：アラキドン酸高含有油脂の発酵生産に代表されるように、*Mortierella alpina* 1S-4 株の高度不飽和脂肪酸（PUFA）高含有油脂生産におけるポテンシャルは高く、多面的な育種研究が展開されてきた。本稿では、*M. alpina* 1S-4 株の形質転換系の開発を俯瞰するとともに、近年取り組んだ分子育種研究である、オメガ3系エイコサペンタエン酸（EPA, 20:5n-3）の発酵生産研究、ならびに、有用プロモーター、遺伝子ターゲティングシステムの開発と多様な PUFA 生産への応用について述べる。

Abstract: As represented by fermentation production of arachidonic acid-rich oil, *Mortierella alpina* 1S-4 has a high potential in production of polyunsaturated fatty acid-rich oils, and various breeding researches have been performed. In this article, we reviewed the development of transformation systems for the *M. alpina* 1S-4 and summarized the recent molecular breeding researches on the fermentative production of omega-3 eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5n-3). Furthermore, the development of useful promoters and gene targeting systems and their application to the production of various PUFA-rich oils were also described.

Key words: *Mortierella alpina*, omega-3 fatty acid, EPA, arachidonic acid, dihomo-γ-linolenic acid

連絡者：小川 順
E-mail : ogawa@kais.kyoto-u.ac.jp
* 現) 静岡県立大学食品栄養科学部環境生命科学科

1 はじめに

1980年頃、*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 (20:4n-6) などの高度不飽和脂肪酸 (PUFA) 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特異な生理機能をしめす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。筆者らの研究室でも、およそ35年前となるが、PUFA 含有油脂の新しい供給源を微生物に探索し、糸状菌 *Mortierella alpina* 1S-4 株が脂質含量が高くオメガ6系脂肪酸であるアラキドン酸の生産菌として優れた特性を有することを見いだした。本菌においては、Fig. 1 に示すオメガ9系、オメガ6系、オメガ3系 PUFA の生合成経路が確認されている。現在、*M. alpina* 1S-4 株を高密度培養することにより、高いアラキドン酸含量の油脂 (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¹⁻⁵⁾。

2000年以降、*M. alpina* 1S-4 株の油脂生産のポテンシャルを多角的に活用すべく、遺伝子操作による油脂生産性向上、生産物の多様化を実現する分子育種法の開発が展開された。本稿では、*M. alpina* 1S-4 株の形質転換系の開発を俯瞰するとともに、近年取り組んだ分子育種研究である、オメガ3系エイコサペンタエン酸 (EPA, 20:5n-3) の発酵生産研究、ならびに、有用プロモーター、遺伝子ターゲティングシステムの開発とオメガ3系エイコサテトラエン酸 (ETA, 20:4n-3)、ジホモ- γ -リノレン酸 (DGLA, 20:3n-6) 生産への応用を紹介する。

2 形質転換系の開発

最初に開発されたのは、栄養要求性を指標とした形質転換系であり、宿主としてのウラシル要求性株が野生株から誘導された^{6, 7)}。このウラシル要求性株は、オロチジル酸ピロホスホリラーゼ活性が欠損しており、コードする遺伝子 (*ura5*) に変異が観察された。続いて、*M. alpina* ヒストンプロモーターの下流に *ura5* 遺伝子を連結したベクターが構築され、これをパーティクルガンで胞子に直接打ち込む方法により形質転換系が確立された。

その後、栄養要求性株を取得しなくても形質転換ができるよう、ゼオシンやカルボキシシンに対する薬剤耐性遺伝子を選択マーカーとする形質転換系が開発された^{8, 9)}。これにより、野生株も含めて、宿主に依存しない柔軟な形質転換法が確立された。カルボキシシンの系は、選択マーカーとして *M. alpina* 1S-4 株の内在性コハク酸脱水素酵素複合体 Ip サブユニット遺伝子 (*sdhB*) の変異遺伝子を用いることから、セルフクロニングを念頭に置いた形質転換が可能となる。さらに、*Agrobacterium* を用いた形質転換法を開発したことにより、形質転換効率が向上し、胞子形成能が低い変異株の形質転換が可能となった¹⁰⁾。これらの形質転換技術を活用して得た分子育種株により、アラキドン酸高含有油脂生産の効率化はもとより、オメガ3系脂肪酸である EPA を高含有する油脂の発酵生産が可能となっている³⁾。また、RNA interference (RNAi) により $\Delta 12$ 不飽和化酵素の活性を低下させることによりオメガ9系脂肪酸であるミード酸 (20:3n-9) を、 $\Delta 5$ 不飽和化酵素の活性を低下させ

Fig. 1 糸状菌 *Mortierella alpina* 1S-4 株の脂肪酸生合成経路。

ることによりオメガ6系脂肪酸である DGLA を高含有する油脂の発酵生産が可能となっている³⁾。

3 分子育種株によるオメガ3系エイコサペンタエン酸 (EPA) 高含有油脂の発酵生産

近年, EPA エチルエステルが医薬品として開発され, 遺伝子組換え株を用いる EPA 生産研究が活発化してきた。上述したように, *M. alpina* 1S-4 株においては, 20℃ 以下での培養で ω 3 不飽和酵素が活性化され, EPA が総脂肪酸あたり 10% 程度蓄積する。そこで, 本菌由来の ω 3 不飽和化酵素遺伝子を過剰発現させたところ, オメガ6系 PUFA からオメガ3系 PUFA への変換が活性化され, EPA 組成を向上させることに成功した。結果として, 12℃ で 14 日間培養すると, 形質転換株における EPA 含量は総脂肪酸中の 42% に達し, 宿主株の 4 倍の値となった¹⁰⁾。

一方, 上記の *M. alpina* 1S-4 株による EPA 高含有油脂生産は低温培養を必須とし, 工業生産の観点からは, 脂質生産性, 生産コストの点で問題を有していた。そこで, 常温で ω 3 不飽和化酵素と同等の働きを示す外来の不飽和化酵素を導入することで, 常温培養での EPA 生産を試みた。具体的には, 常温培養で EPA の蓄積が認

められる水カビ *Saprolegnia diclina* 由来の Δ 17 不飽和化酵素の活用を試みた。コドン頻度を *Mortierella* 様に改変した *S. diclina* 由来 Δ 17 不飽和化酵素人工遺伝子 (*sdd17m*) を, 恒常的発現プロモーターである histone プロモーター (*his p*) に連結し, *Agrobacterium* 法にて本菌に導入した。なお, 宿主として, 内在性の ω 3 不飽和化酵素を化学変異により欠損した変異株 (*M. alpina* ST315) を用いた。まず, *M. alpina* ST315 株の形質転換系の確立を目的とし, ウラシルアナログである 5-Fluoroorotic acid (5-FOA) を用いた変異処理によってウラシル要求性変異株を取得した。誘導したウラシル要求性株を用い, Δ 17 不飽和化酵素の機能を評価した。結果, 28℃, 1 週間の常温培養にて, 総脂肪酸あたり 10% の EPA, また, 12℃ の低温条件下, 1 週間の培養で 24% の EPA が蓄積し, *Mortierella* 内での外来 Δ 17 不飽和化酵素の機能的発現が確認できた。また, 低温条件では, アラキドン酸の蓄積が 1% に抑えられ, Δ 17 不飽和化酵素がオメガ6系のアラキドン酸を効率的に変換していることも確認できた。5L ジャーファーメンターを用いた常温での発酵生産検討により, 総脂肪酸あたり約 25%, 1.8 g/L の EPA 高含有油脂の生産を実現している (Fig. 2)¹¹⁾。

Fig. 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 の常温大量生産。↓: グルコースの添加, 脂肪酸の略号については Fig. 1 を参照

4 分子育種に有用な新規プロモーターの探索と評価

まず, *Escherichia coli* 由来 GUS (β -glucuronidase) 遺伝子をレポーターとするプロモーター評価系の確立を試みた。GUS 遺伝子上流に既存のプロモーター領域を挿入したアッセイ用ベクターを構築し, *M. alpina* 1S-4 ウラシル要求性株に *Agrobacterium* 法にて導入した。その結果, GUS 発現カセットが本菌の染色体上に1コピーで挿入されること, GUS が発現すること, 発現した GUS の活性値を 4-nitrophenyl- β -D-glucuronide を基質とする酵素アッセイによって定量的かつ再現性良く測定できることを確認した。

構築した GUS アッセイ系を用いて, *M. alpina* 1S-4 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, 網羅的評価を行った。その結果, 高発現プロモーターとして PP3 p, SSA2 p, PP7 p, HSC82 p, PP6 p を, 時期特異的発現プロモーターとして PP2 p, PP3 p, PP6 p, CIT1 p を, ガラクトース誘導発現プロモーターとして GAL1 p, GAL10 p を見いだした (Fig. 3)。また, これら有用プロモーターの 5' デリション解析を行ない, 発現に必要なプロモーター領域を決定した。得られた新規プロモーターに関する知見は, 多目的な分子育種に活用可能であると考えている^{12, 13)}。以下には, これらのプロモーターを活用した例としてオメガ3系エイコサテトラエン酸 (ETA, 20:4n-3) の発酵生産開発を紹介する。

5 分子育種株によるオメガ3系エイコサテトラエン酸 (ETA) の発酵生産

ETA はオメガ3系脂肪酸として人体に有益な生理活性機能を示すことが期待されているにも関わらず, 自然界にほとんど存在しないことから, 詳細な機能解析研究が遅れている。*M. alpina* S14 株は野生株である *M. alpina* 1S-4 株から変異処理によって得られた $\Delta 5$ 不飽和化

酵素活性低下変異株であり, ETA の前駆体である DGLA を著量蓄積する。また, 低温条件下で培養することにより, 内在性 $\omega 3$ 不飽和化酵素遺伝子が発現し, 微量の ETA が蓄積することが確認されている。

まず, *M. alpina* S14 株の形質転換系の確立を目的とし, 5-FOA を用いた変異処理によってウラシル要求性変異株を取得した。既存のプロモーター *his* p 制御による内在性 $\omega 3$ 不飽和化酵素遺伝子発現ベクターを遺伝子銃にて S14 株のウラシル要求性株に導入した。その結果, 12℃ 培養条件下において ETA 生産が確認された (Fig. 4A)。ETA 含有率は最大で総脂肪酸あたり 42.1% に達した。一方で, 28℃ 培養においては ETA 生産は観察できなかった。

次に, 常温培養条件下における ETA 生産を実現すべく *S. diclina* 由来 $\Delta 17$ 不飽和化酵素遺伝子 (*sdd17m*) を用いた分子育種を行なった。*sdd17m* を高発現プロモーター SSA2 p の制御下にて S14 株に導入した。遺伝子銃による導入は染色体へのベクターの多コピー挿入や菌体への物理的損傷から想定外の変異を引き起こす可能性があるため, より温和な遺伝子導入法である *Agrobacterium* 法を用いた。結果, 形質転換体において 28℃ 培養での ETA 生産が確認された (Fig. 4B)。形質転換体における ETA 含有率は最大で総脂肪酸あたり 24.9% に達した。一方で, ETA 以外のオメガ3系 PUFA である α -リノレン酸 (18:3n-3) やステアリドン酸 (18:4n-3) はほとんど検出されず, *sdd17m* の炭素数 18 の PUFA に対する基質特異性の低さが示唆された¹⁴⁾。

6 遺伝子ターゲティングシステムの構築

6・1 *ku80* 破壊による遺伝子ターゲティングシステムの構築

一般的に損傷ゲノムの修復及び遺伝子の組換え時に, 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の非相同末端結合 (NHEJ) による

Fig. 3 新規に取得した (A) 高発現プロモーター, (B) 時期特異的発現プロモーター, (C) 誘導発現プロモーターにおける活性評価結果。his p は既存の Histone プロモーター。

Fig. 4 (A) 内在性 ω 3 不飽和化遺伝子発現 *M. alpina* S14 株 (ω 3#1 株), (B) *sdd17m* 遺伝子発現 *M. alpina* S14 株 (#7 及び #10 株) における生産脂肪酸組成。培養温度は (A) 12°C, (B) 28°C。1S-4; *M. alpina* 1S-4 野生株, S14; Δ 5 不飽和化酵素欠損変異株。脂肪酸の略号については, Fig. 1 を参照。

Fig. 5 遺伝子挿入を担う相同組換え (HR) と非相同末端結合 (NHEJ)。

組換えの二機構が関与する (Fig. 5)。 *M. alpina* 1S-4 を含め糸状菌において遺伝子が修復されるとき, 非相同末端結合が優先するため, 相同組換えを利用した遺伝子ターゲティング (GT) の効率が低い。そこで, 本菌の

NHEJ を欠損させることによる GT 技術の効率改善を検討した。

まず, 本菌の NHEJ に関与する *ku80* 遺伝子の塩基配列を決定した。さらに, この配列を標的として *ku80* 遺伝子破壊ベクターを遺伝子銃法により *M. alpina* 1S-4 の胞子に導入し, 1.3% の効率で一回交差相同組換えによる *ku80* 遺伝子破壊 ($\Delta ku80$) 株を作製した。

続いて, 得られた $\Delta ku80$ 株を宿主として, DGLA をアラキドン酸に変換する Δ 5 不飽和化酵素をコードする遺伝子を *ku80* 遺伝子と同様の方法で破壊することで, *ku80* 遺伝子破壊による GT 効率の向上を評価するとともに DGLA 高生産株の作製を試みた。結果, $\Delta ku80$ 株では 3% の GT 効率で Δ 5 不飽和化酵素遺伝子破壊株が得られ, 本破壊株は非常に高い DGLA 含有率 (総脂肪酸の 37%) とアラキドン酸含有率の減少を示した¹⁵⁾。

6・2 *lig4* 遺伝子破壊による GT システムの構築

$\Delta ku80$ 株では飛躍的な GT 効率の向上が確認できない。うえ, 遺伝子銃法によって破壊ベクターが多コピー導入されていた。ここでは, 更なる GT 効率の向上と 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。

lig4 遺伝子にコードされる DNA Ligase 4 は, NHEJ における鍵酵素である (Fig. 5)。まず, 本菌のもつ *lig4*

Fig. 6 (A) $\Delta 5$ 不飽和化酵素遺伝子破壊株における生産脂肪酸組成, (B) $\Delta 5$ 不飽和化酵素遺伝子破壊株における脂肪酸生産量。Wild: *M. alpina* 1S-4 野生株, S14: $\Delta 5$ 不飽和化酵素欠損変異株, #6, #8, #10, #12: $\Delta 5$ 不飽和化酵素遺伝子破壊株。脂肪酸の略号については, Fig. 1 を参照。

遺伝子の塩基配列を決定した。続いて, 1 コピーで染色体に遺伝子導入が可能な *Agrobacterium* 法を用いて *lig4* 遺伝子破壊コンストラクトを *M. alpina* 1S-4 の胞子に導入し, 二回交差相同組換えにより 3.2% の GT 効率で *lig4* 遺伝子破壊 ($\Delta lig4$) 株を取得した。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を行い, マーカー遺伝子を置換することで GT 効率を評価した。その結果, $\Delta lig4$ 株における GT 効率は 67% を示し, 野生株を宿主とした GT 効率と比較して飛躍的な改善が認められた¹⁶⁾。

7 遺伝子ターゲティングシステムを用いた DGLA 高生産株の分子育種

$\Delta lig4$ 株を宿主として, $\Delta 5$ 不飽和化酵素遺伝子破壊による DGLA 高生産株の作製を試みた。まず, 5-FOA を含有する寒天培地上で選抜することで, $\Delta lig4$ 株由来のウラシル栄養要求性株を取得した。続いて, 取得したウラシル要求性株の胞子に *Agrobacterium* 法にて $\Delta 5$ 不飽和化酵素遺伝子破壊コンストラクトを導入し $\Delta 5$ 不飽和化酵素遺伝子破壊を試みた。結果, 50% の高い GT 効率で $\Delta 5$ 不飽和化酵素遺伝子破壊株を取得した。また, 破壊株の総脂肪酸に占める DGLA の割合は最大で 40% に達した (Fig. 6)。さらに, 低温培養条件下において破壊株の $\omega 3$ 不飽和化酵素を活性化させることで, ETA 生産を可能とした。これらの破壊株は, 化学変異剤による突然変異誘導によって取得した $\Delta 5$ 不飽和化酵素欠損変異 (*M. alpina* S14 株) 株よりも高い総脂肪酸生産性, ならびに高い DGLA, ETA 含有率を示し (Fig. 6), GT 技術による分子育種が薬剤による育種とは異なり, PUFA 生産性の低下ならびに生育の遅延を引き起こさないことを確認した¹⁷⁾。

8 おわりに

アラキドン酸高含有油脂生産に代表されるように, *M.*

alpina 1S-4 株の高度不飽和脂肪酸高含有油脂生産におけるポテンシャルは高く¹⁸⁾, 類縁菌株を含め, 多面的な育種研究が展開されている。本稿では, *M. alpina* 1S-4 株の形質転換系の開発を俯瞰するとともに, 近年取り組んだ分子育種研究である, エイコサペンタエン酸 (EPA, 20:5n-3) の発酵生産研究, ならびに, 有用プロモーター, 遺伝子ターゲティングシステムの開発と多様な PUFA 生産への応用について述べた。アラキドン酸高含有油脂の工業生産を実現した *M. alpina* の分子育種ツールのさらなる充実により, 選択性, 生産性の高い生産技術が確立され, 魚油などの天然資源に依存する高度不飽和脂肪酸市場に新たな供給源を提供しうると期待している。また, 本菌のオメガ 3 系脂肪酸合成の代謝制御により, 魚油では供給できない ETA などのオメガ 3 系脂肪酸の供給が可能となることも, 新規オメガ 3 系脂肪酸素材提供の観点から興味深い。

食品用途を想定した場合, 形質転換微生物の使用はハードルが高いが, 医薬品やその合成原料の供給において, 精製過程における分離困難な夾雑物の低減, 生産の効率化, 脂肪酸組成の向上などに貢献する技術となることを期待している。

文 献

- 1) 小川順. バイオサイエンスとインダストリー **76**, 490-493 (2018). (Ogawa, J. *Bioscience & Industry* **76**, 490-493 (2018).)
- 2) 小川順. 生物工学会誌 **90**, 723-727 (2012). (Ogawa, J. *Seibutsu-kogaku Kaishi* **90**, 723-727 (2012).)
- 3) 櫻谷英治, 安藤晃規, 清水昌, 小川順. オレオサイエンス **12**, 263-272 (2012). (Sakuradani, E. *et al. Oleoscience* **12**, 263-272 (2012).)
- 4) Sakuradani, E.; Ando, A.; Ogawa, J.; Shimizu, S. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **84**, 1-10 (2009).
- 5) Sakuradani, E.; Shimizu, S. *J. Biotechnol.* **144**, 31-36 (2009).
- 6) Takeno, S.; Sakuradani, E.; Murata, S.; Inohara-Ochiai,

- M.; Kawashima, H.; Ashikari, T.; Shimizu, S. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**, 277-285 (2004).
- 7) Takeno, S.; Sakuradani, E.; Murata, S.; Inohara-Ochiai, M.; Kawashima, H.; Ashikari, T.; Shimizu, S. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **65**, 419-425 (2004).
 - 8) Takeno, S.; Sakuradani, E.; Tomi, A.; Inohara-Ochiai, M.; Kawashima, H.; Shimizu, S. *J. Biosci. Bioeng.* **100**, 617-622 (2005).
 - 9) Ando, A.; Sakuradani, E.; Horinaka, K.; Ogawa, J.; Shimizu, S. *Curr. Genet.* **55**, 349-356 (2009).
 - 10) Ando, A.; Sumida, Y.; Negoro, H.; Suroto, D. A.; Ogawa, J.; Sakuradani, E.; Shimizu, S. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 5529-5535 (2009).
 - 11) Okuda, T.; Ando, A.; Negoro, H.; Muratsubaki, T.; Kikukawa, H.; Sakamoto, T.; Sakuradani, E.; Shimizu, S.; Ogawa, J. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **117**, 1919-1927 (2015).
 - 12) Okuda, T.; Ando, A.; Sakuradani, E.; Kikukawa, H.; Kamada, N.; Ochiai, M.; Shima, J.; Ogawa, J. *Curr. Genet.* **60**, 183-191 (2014).
 - 13) Okuda, T.; Ando, A.; Sakuradani, E.; Kikukawa, H.; Kamada, N.; Ochiai, M.; Shima, J.; Ogawa, J. *Curr. Genet.* **60**, 175-182 (2014).
 - 14) Okuda, T.; Ando, A.; Negoro, H.; Kikukawa, H.; Sakamoto, T.; Sakuradani, E.; Shimizu, S.; Ogawa, J. *J. Biosci. Bioeng.* **120**, 299-304 (2015).
 - 15) Kikukawa, H.; Sakuradani, E.; Nakatani, M.; Ando, A.; Okuda, T.; Sakamoto, T.; Ochiai, M.; Shimizu, S.; Ogawa, J. *Curr. Genet.* **61**, 579-589 (2015).
 - 16) Kikukawa, H.; Sakuradani, E.; Ando, A.; Okuda, T.; Ochiai, M.; Shimizu, S.; Ogawa, J. *J. Biotechnol.* **208**, 63-69 (2015).
 - 17) Kikukawa, H.; Sakuradani, E.; Ando, A.; Okuda, T.; Shimizu, S.; Ogawa, J. *J. Biosci. Bioeng.* **122**, 22-26 (2016).
 - 18) Kikukawa, H.; Sakuradani, E.; Ando, A.; Shimizu, S.; Ogawa, J. *J. Adv. Res.* **11**, 15-22 (2018).