

微生物代謝工学に基づく必須および新規脂肪酸の大量生産

筑波大学 応用生物化学系

小林 達彦

Polyunsaturated fatty acids (PUFAs) play important roles as structural components of membrane phospholipids, and as precursors of the eicosanoids of signaling molecules including prostaglandins, thromboxanes and leukotrienes. The principal PUFAs are dihomo- γ -linolenic acid (n-6 PUFA; $\Delta 8, \Delta 11, \Delta 14-20:3$), arachidonic acid (n-6 PUFA; $\Delta 5, \Delta 8, \Delta 11, \Delta 14-20:4$), and eicosapentaenoic acid (n-3 PUFA; $\Delta 5, \Delta 8, \Delta 11, \Delta 14, \Delta 17-20:5$). All mammals synthesize eicosanoids which are involved in the inflammatory response, reproductive function and so on. Therefore, studies on PUFAs are important in both the medical and pharmaceutical fields. We have studied the fatty acid metabolism in the filamentous fungus, *Mortierella*, which produces some C-20 PUFAs (e.g., dihomo- γ -linolenic acid, arachidonic acid and eicosapentaenoic acid). In this study, at the gene level, we investigated desaturase and elongase involved in PUFA metabolism of this strain. We cloned $\Delta 9$ -desaturase b gene from the gene library of this *Mortierella* strain. The predicted amino acid sequence showed similarity to those of other $\Delta 9$ -desaturases including stearoyl-CoA desaturase from several living organisms including yeast, rat and so on. This sequence also contained a cytochrome b5-like domain at the C-terminus, being different from the *Mortierella* $\Delta 6$ -desaturase which has the corresponding domain at the N-terminus. This finding suggests that this domain in the desaturase would play the role of a unique electron transport system, binding a heme group. We also cloned a part of the elongase gene from the *Mortierella* strain for the first time. Further works would lead to the overproduction of various PUFA through gene manipulation in the *Mortierella* strain.

1. 緒言

必須脂肪酸である γ -リノレン酸はアトピー性皮膚炎等アレルギーの軽減作用があり、また、アラキドン酸は皮膚の乾燥抑制効果がある。これらの高度不飽和脂肪酸 (PUFA) は、これらの作用だけでなくコスメトロジーにおける重要な素材である。近年、これらの PUFA を化粧品分野で利用せんとする試みが世界的規模で進行しているが、これらの油脂類の供給源に目を向けると、魚介類以外には有効な供給源すら知られていない。また、我が国では有効な生産手段を持たず、海外からの供給に対する依存度が高く、気候などの変動による供給量、品質などの変動を受けやすいこと、また、海洋汚染による資源自体の汚染も問題となりつつある。

Mortierella 属糸状菌はアラキドン酸などの炭素鎖が 20 の PUFA を生産することができる¹⁾。本研究者らは現在、糸状菌 *Mortierella* における PUFA 生合成に関わる酵素・タンパク質を分子レベルで検討しつつある²⁻⁷⁾。本研究では、脂肪酸の $\Delta 9$ の位置に二重結合を導入する $\Delta 9$ 不飽和化酵素、および、炭素鎖が 20 以上の PUFA の生合成において、C18 脂肪酸生産微生物の C20 脂肪酸生産株への変換に必

須のステップを担う(炭素鎖 18 から 20 へ鎖長を延長する)鎖長延長酵素を対象とし、分子レベルでの検討を行った。これらの PUFA の生合成に関わる酵素・タンパク質遺伝子を遺伝子工学の手法を用いて親株の *Mortierella* で特異的に発現させることや遺伝子破壊などの方法を組み合わせることによって、様々な PUFA を選択的に生産あるいは新規な PUFA を代謝工学的に生産できる可能性がある。

2. 実験・結果・考察

3.1 不飽和化酵素遺伝子の解析

SuperCos 1 cosmid vector を用いて作製した糸状菌 *Mortierella* のゲノムライブラリーに由来する大腸菌ライブラリーに対して、(本研究者らによって)既にクローン化している $\Delta 9$ -Desaturase cDNA a をプローブとした指標によってポジティブクローンを取得した。本クローンに対して、上記のプローブを用いて切り縮めを行った結果、4,988 bp から成る一つのオープンリーディングフレームを認めた(図1)。また、真核生物に一般的な転写開始部位の近傍によく見られ、RNA ポリメラーゼの転写効率を上昇させると考えられる特異配列である CAAT box と TATA box を検索した結果、TATA box は認められなかったが、CAAT box に類似の配列(ATCCAAT)が開始コドン ATG の 359 bp 上流に存在することが判明した。

得られた遺伝子から推定されるアミノ酸配列は、 $\Delta 9$ -Desaturase a や(ラットや *Saccharomyces* などの)の真核生物由来の Stearoyl-CoA desaturase と高い相同性を示し(図2)、従って、 $\Delta 9$ -Desaturase b 遺伝子と命名した。他の生物由来の Stearoyl-CoA desaturase とは相同性は低



Overproduction of essential and new fatty acids through microbial metabolic engineering

Michihiko Kobayashi

University of Tsukuba

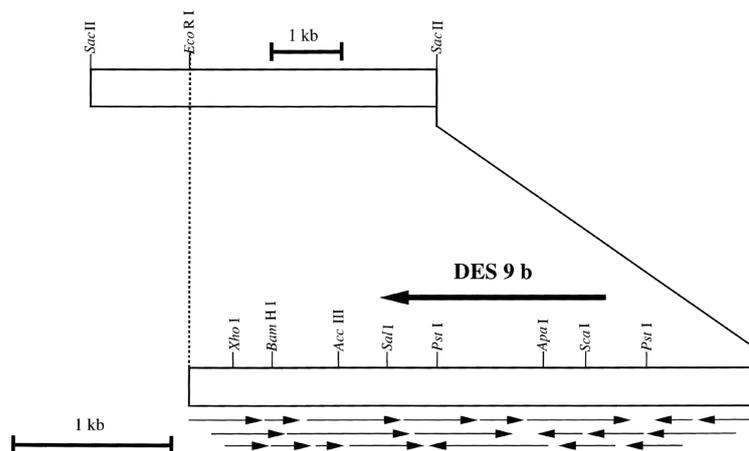


図1 ポジティブクローンの制限酵素地図
矢印は、 Δ 9-Desaturase b ゲノム遺伝子

YEAST	MPTSGTTIELIDDQFPKDDSSASSGIVDEVDLTEANILATGLNKKAPRIVNGFGLSMGSKE	60
MOUSE	MPAHLQEISSSYTTTTTI	19
RAT	MPAHLQEISSSYTTTTTTEP	22
DES9b	MATPLPPTFTVPASSTETRRDPLRHEVLPPLFNMKVMILNIWKYLDWKHVIGLV	56
DES9a	MATPLPPTFTVPATQETRRDPLQHEELPPLF-PEKITIYNLWRYLDYKXVGLGL	55
YEAST	MVSVFDDKKGNEKSNLDRLEKDNQEKKEAKTKIHISEQPWTLNWHQHLNWLMMVIVC	120
MOUSE	TAPPSGNEREKVKTVPLHLEEDIRPEMKEDIHDETYQDEE--GPPPKLEYVWRNII-IMV	76
RAT	PSGNLQNGREKMKVPLYLEEDIRPEMREDIHDPSYQDEE--GPPPKLEYVWRNII-IMA	79
DES9b	T-PLVALY-C-IFTELOTKTLVWSIIYYEATGLGITAGYHRLWAHRAYNAGPAMSMALA	113
DES9a	T-PLVALY-C-LLTTELOTKTLVWSIIYYEATGLGITAGYHRLWAHRAYNAGPAMSFVLA	112
YEAST	GMPMIGWYFALSGKVPVHLNVFLFSVFYVAVGCVSITAGYHRLWSHRVSAHWPLRLFYA	180
MOUSE	LLHLGGLY-CITLVPSCKLYTALFCIFYMITSALGITAGAHRLWSHRTYKARLPLRIFLI	135
RAT	LLHVVALY-CITLVPSCKLYTALFCIFYMITSALGITAGAHRLWSHRTYKARLPLRIFLI	138
DES9b	LFGAGAVEGSIKWSRGRHRAHHRWTDTEKDPYSAHRCIFYSHLGWLL-IKRPGWKIGHA-	171
DES9a	LLGAGAVEGSIKWSRGRHRAHHRWTDTEKDPYSAHRCIFFSHIGWML-IKRPGWKIGHA-	170
YEAST	IFGCASVEGSAKWWGHSRTHHRYTDTLRDPYDARRGLWYSHMGWML-LKPNPKYKARA-	238
MOUSE	IANTMAFQNDVYDWARDHRAHHRKFSETHADPHNSRRCFEFSHVGWLLVRKHPAVKEKGGK	195
RAT	IANTMAFQNDVYDWARDHRAHHRKFSETHADPHNSRRCFEFSHVGWLLVRKHPAVKEKGGK	198
DES9b	-DMEDLNKNAVLQVQHKHYPLVLLMGLVFPTAVAGLWGDWRGGYFY-AAILRLIFVHH	229
DES9a	-DVDLNLKSKLVQWQHKNYLPLVLLMGVFPPTLAVAGLWGDWRGGYFY-AAILRLIFVHH	228
YEAST	-DITDMDDDWTIRFOHRHYIILMLLTAFVPTLTCGYFFNDYMGGLIY-AGFIRVVFVIQQ	296
MOUSE	LDMSDLKAEKLVMFORRYKPGLLMCFILPTLVPWYCWGETFVNSLFFVSTFLRYTLVLN	255
RAT	LDMSDLKAEKLVMFORRYKPGLLMCFILPTLVPWYCWGETFVNSLFFVSTFLRYTLVLN	258
DES9b	ATFCVNSLAHWLGDGPFDDRRHTPRDHFITAFVTLGEGYHNFHHQFPQDYRNAIRFYQYDP	289
DES9a	ATFCVNSLAHWLGDGPFDDRRHSPRDHFITAFVTLGEGYHNFHHQFPQDYRNAIRFYQYDP	288
YEAST	ATFCVNSLAHYITGQPFDDRRHTPRDNWITAVTTEGEGMHNHHEFPDYRNAIKWYQYDP	356
MOUSE	ATWLVNSAAHLYGVRPYDKNIQSRENILVSLGAVGEGPHNHHTFPFDYSASEYRWHINF	315
RAT	ATWLVNSAAHLYGVRPYDKNIQSRENILVSLGAVGEGPHNHHTFPFDYSASEYRWHINF	318
DES9b	TKWLTATCAFFGLASHLKTFFENEIRKGLQMIKQVLDKRTKQWGTPIADLPILSPED	349
DES9a	TKWLTALCAFFGLASHLKTFFENEVRKGLQMIKQVLEKRTKQWGTPIADLPILSPED	348
YEAST	TKVITLYLTSLVGLAYDLKQFSQNAIEEALIQOQEKKINKKAKINWGPVLTDLPMWDRQT	416
MOUSE	TFFFDCMAALGLAYDRKVKSKATVLRARIKRTGDGSHKSS	355
RAT	TFFFDCMAALGLAYDRKVKSKAAVLARIKRTGDGSHKSS	358
DES9b	FQHACKNDSKQWILLEGVVYDVADEAVEHPGGEKYIKMGVGDMTAAFNGGMYDHSNAAR	409
DES9a	FQHACKNDKQWILLEGVVYDVADEFMSEHPGGEKYIKMGVGDMTAAFNGGMYDHSNAAR	408
YEAST	FLAKSR-ENKGLVLIISGIVHDVSGYISEHPGGEFLIKTALGKDATAFSGGVYRHSNAAQ	475
DES9b	NLLSLMRVAVVEFGGEVEAOKSRPSVPPYV-EGSKEE	445
DES9a	NLLSLMRVAVVEFGGEVEAOKKMPSPPIYCTDHAKAE	445
YEAST	NVLADMRVAVIKESKNSAIRMASKRGEIYETGKFF	510

図2 Δ 9-Desaturase b と各生物由来の不飽和化酵素のアミノ酸配列上の比較
DES9b, *Mortierella* sp. の Δ 9-Desaturase b
DES9a, *Mortierella* sp. の Δ 9-Desaturase a
YEAST, *Saccharomyces cerevisiae* の Stearoyl-CoA desaturase
MOUSE, マウスの Stearoyl-CoA desaturase
RAT, ラットの Stearoyl-CoA desaturase

DES9b	336	GTPIADLPILSFEDFQHACKNDKQWILLRGGVYDVADFAVEHPGGEKYIKMGVCKDM	393
Cb5M	1	MALKSFSTLADLSQHTTKDSLVLATHGKVDCTCFIDEHPGGEVLEIDEACRDA	54
Cb5R	1	AEQSDKDKYKYYTLEEIQKHKRSKSTWVILHKKVYDLTRFLEHPGGEVLEREQAGDA	59
Cb5S	1	MPKVYSYQEVAEHNGPQNFVIIIDDKVYDVSQFKDEHPGGEDEILMDLGCQDA	52

DES9b	394	TAAFNNGMYDHSNAA-RNLLS-LMRVAVVEFGGEVEAQSRPSPVPVYGEHSKEE	445
Cb5M	55	TESFE--DVCHSDEA-ROIMSKILVGEFKTDSSSEKPKAKSPSSSTRPIPAESDSG	108
Cb5R	60	TENFE--DVCHSDEA-RE-LSKTYIIGELHPDDRSKIAPSETLITVENSNSWW	110
Cb5S	53	TESF--VDICHSDEALR-LLKGLYIGVDRTSERVSVKRVSTSENQSKGS	99

図3 Δ9-Desaturase b のアミノ末端領域と各生物由来の Cytochrome b5 の部分アミノ酸配列の比較
 DES9, *Mortierella* sp. の Δ9-Desaturase b
 Cb5M, *Mortierella* sp. の Cytochrome b5
 Cb5M, ラットの Cytochrome b5
 Cb5M, *Saccharomyces cerevisiae* の Cytochrome b5
 矢印は、高度に保存されているヒスチジン残基

いものの、ヘム鉄が配位結合すると考えられる2ヶ所のヒスチジン残基とヘム鉄を包み込む領域はよく保存されていた。本 Δ9-Desaturase b のアミノ酸配列は、植物の脂肪酸不飽和化酵素と相同性がなく、ラットや *Saccharomyces* の Stearoyl-CoA desaturase と相同性を示したことから、Δ9-Desaturase b はアシル-ACP やリン脂質ではなくアシル-CoA を基質とすることが推測された。

さらに、Δ9-Desaturase b は、Δ9-Desaturase a や酵母の Stearoyl-CoA desaturase と同様に、カルボキシル末端領域はラットや *Saccharomyces* の Stearoyl-CoA desaturase より110アミノ酸残基ほど長く、また、互いによく保存されており、他生物由来の Cytochrome b5 の一部と相同性を示した。ラットや *Saccharomyces* の Cytochrome b5 と、Δ9-Desaturase b のカルボキシル末端領域とは約30%の低い相同性であったが、ヘム鉄が配位結合すると考えられる2ヶ所のヒスチジン残基と、ヘム鉄を包み込む領域はよく保存されていた(図3)。さらに、Cytochrome b5 family に属する Nitrate reductase とも相同性を示したが、Δ9-Desaturase b が Cytochrome b5 様ドメインを含んでいることも鑑みると、脂肪酸不飽和化の際に独自の電子伝達を行っている可能性が示唆された。続いて、Hydropathy プロット解析を行った結果、上記のいずれのタンパク質を比較しても疎水パターンの形状は似通っており、特に、Stearoyl-CoA desaturase に関しては、小胞体膜に結合していると考えられる疎水性の高い領域もよく保存されていた(図4)。

また、Δ9-Desaturase b の遺伝子には5'末端がGTで3'末端がAGの94bpから成るイントロンが一つ存在することが推察された。Δ9-Desaturase a は Δ9-Desaturase b と同様に唯一つのイントロンを持つが、イントロンの塩基配列は互いに相同性が低く、Δ9-Desaturase b のイントロンが94bpであるのに対し、Δ9-Desaturase a のイントロンは153bpであり塩基数も異なっていた。しかしながら、興味深いことに、イントロンの挿入部位は、ラ

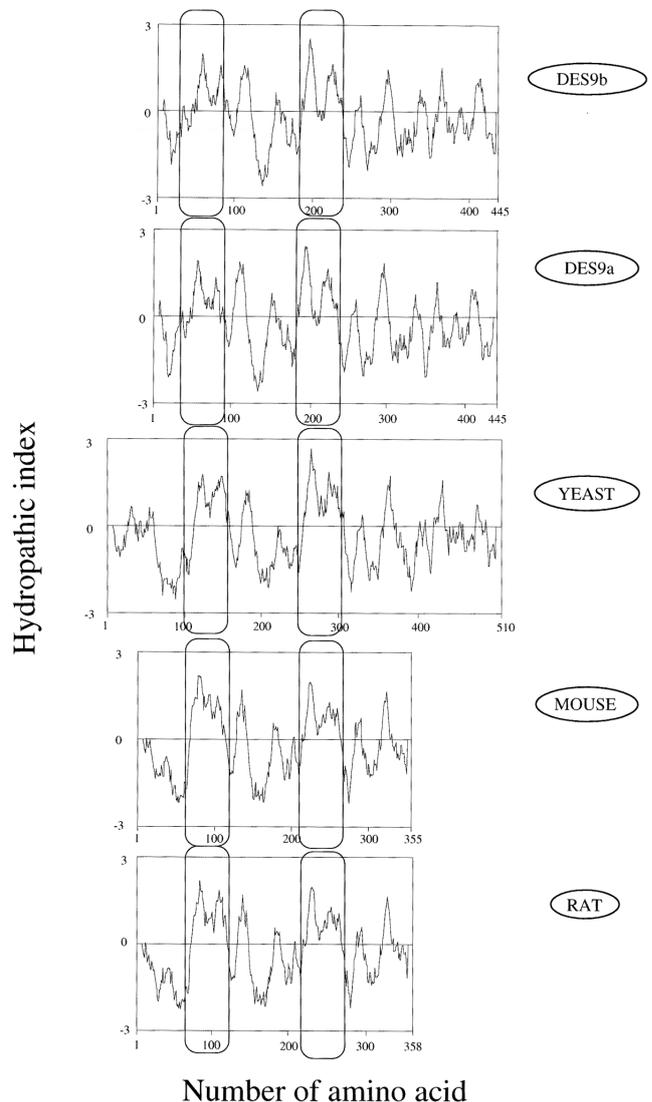


図4 各生物由来の Δ9 不飽和化酵素のアミノ酸配列の Hydropathy プロットの比較
 DES9b, *Mortierella* sp. の Δ9-Desaturase b
 DES9a, *Mortierella* sp. の Δ9-Desaturase a
 YEAST, *Saccharomyces cerevisiae* の Stearoyl-CoA desaturase
 MOUSE, マウスの Stearoyl-CoA desaturase
 RAT, ラットの Stearoyl-CoA desaturase
 丸囲みは、小胞体膜に結合していると考えられる領域

ットや *Saccharomyces* の Stearoyl-CoA desaturase でよく保存されている最も N 末端側のヒスチジンに富む領域の同じ部位に挿入されており、これらを鑑みるに、2つの $\Delta 9$ -Desaturase の起源は同じであるが進化の過程で非翻訳部位であるイントロンの修飾が独自に行われたのではないかと推察された。

3.2 鎖長延長酵素遺伝子の解析

(炭素鎖 18 から 20 へ鎖長を延長する) 鎖長延長酵素の遺伝子クローニング実験に関しては、まず、鎖長延長酵素欠損変異 *Mortierella* 株の変異の相補性を指標とし、本酵素遺伝子のクローニングを目指したが、うまくいかなかった。従って、以下のように戦略を変えた実験を行い、本酵素遺伝子の一部のクローニングに成功した。一般に脂肪酸の C 鎖長延長反応は、アシル-CoA とマロニル-CoA から 3-オキソアシル-CoA を生成する 3-Oxoacyl-CoA 合成酵素、3-オキソアシル-CoA を D-3-ヒドロキシアシル-CoA に変換する 3-Oxoacyl-CoA 還元酵素、D-3-ヒドロキシアシル-CoA をエノイル-CoA に変換する 3-Hydroxyacyl-CoA 脱水酵素、エノイル-CoA をアシル-CoA に変換する Enoyl-CoA 還元酵素から成る。初発酵素である 3-Oxoacyl-CoA 合成酵素の一部を、他生物の脂肪酸合成に関わる本酵素のアミノ酸配列の情報を基に合成オリゴヌクレオチドプライマー (センスプライマーおよびアンチセンスプライマー) を作製し、*Mortierella* のゲノム DNA を鋳型として Polymerase chain reaction (PCR) 法を用いて、本酵素遺伝子のクローニングを試みた。増幅した DNA 断片を電気泳動ゲルから回収し、ベクターにサブクローニングし、DNA シークエンサーで本 DNA 配列を決定した結果、大腸菌などの他生物由来の 3-Oxoacyl-CoA 合成酵素遺伝子と高い相同性を示し、本遺伝子の一部がクローニングできたことが示唆された。しかしながら現在のところ、完全長の遺伝子クローニングには至っていない。

一方、以下の実験を併せて行ったが、成果を挙げる事ができなかった。

(iA) $\Delta 6$ -Desaturase 遺伝子を導入した *Mortierella* 株は本酵素を発現することができず、 γ -リノレン酸 ($\Delta 6, \Delta 9, \Delta 12-18:3$) 生産が増強されなかった。

(iB) *Mortierella* 株から既に本研究者らが取得している各不飽和化酵素遺伝子に対して亜硝酸法によってランダム変異を行い、(産業的に重要な微生物である) *Aspergillus oryzae* 産に導入し、得られた形質転換体とコントロールに対して各 PUFA の含量の変化を検討したが、特に生産量の変化は見られず、また、新規な脂肪酸と思われる物質は検出されなかった。変化を与える変異に至らなかったことが示唆された。

謝 辞

本研究を遂行するに当たり、ご支援をいただきました (財) コスメトロジー研究振興財団および共同研究者に深く感謝申し上げます。

(引用文献)

- 1) Shimizu, S., Ogawa, J., Kataoka, M. and Kobayashi, M. : Screening of novel microbial enzymes for the production of biologically and chemically useful compounds, In : Scheper, T. (ed): *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Vol.58, Springer-Verlag. Berlin, 45-87, 1997.
- 2) Kobayashi, M., Sakuradani, E. and Shimizu, S. : Genetic analysis of cytochrome b5 from arachidonic acid-producing fungus, *Mortierella alpina* 1S-4: Cloning, RNA editing and expression of the gene in *Escherichia coli*, and purification and characterization of the gene product. *J. Biochem.*, **125**: 1094-1103, 1999.
- 3) Sakuradani, E., Kobayashi, M. and Shimizu, S. : $\Delta 6$ -Fatty acid desaturase from an arachidonic acid-producing *Mortierella* fungus: Gene cloning and its heterologous expression in a fungus, *Aspergillus*. *Gene*, **238**: 445-453, 1999.
- 4) Sakuradani, E., Kobayashi, M. and Shimizu, S. : $\Delta 9$ -Fatty acid desaturase from arachidonic acid-producing fungus: Unique gene sequence and its heterologous expression in a fungus, *Aspergillus*. *Eur. J. Biochem.*, **260**: 208-216, 1999.
- 5) Sakuradani, E., Kobayashi, M., Ashikari, T. and Shimizu, S. : Identification of $\Delta 12$ -fatty acid desaturase from arachidonic acid-producing *Mortierella* fungus by heterologous expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and the fungus *Aspergillus oryzae*. *Eur. J. Biochem.*, **261**: 812-820, 1999.
- 6) Sakuradani, E., Kobayashi, M. and Shimizu, S. : Identification of an NADH-cytochrome b5 reductase gene from an arachidonic acid-producing fungus, *Mortierella alpina* 1S-4, by sequencing of the encoding cDNA and heterologous expression in a fungus, *Aspergillus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**: 3873-3879, 1999.
- 7) Certik, M., Sakuradani, E., Kobayashi, M. and Shimizu, S. : Characterization of the second form of NADH-cytochrome b5 reductase gene from arachidonic acid-producing fungus *Mortierella alpina* 1S-4. *J. Biosci. Bioeng.*, **88**: 667-671, 1999.