

Study on the Biosynthetic Pathway of Polyunsaturated Fatty Acids in Unicellular Marine Eukaryotes Aiming for Industrial Applications

松田, 高宜
九州大学大学院生物資源環境科学府

<https://doi.org/10.15017/21692>

出版情報：九州大学, 2011, 博士（農学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：

氏 名 : 松田 高宜

論文題目 : Study on the Biosynthetic Pathway of Polyunsaturated Fatty Acids in Unicellular Marine Eukaryotes Aiming for Industrial Applications (産業利用を目指した海洋性真核微生物の高度不飽和脂肪酸生合成経路に関する研究)

区 分 : 甲

論 文 内 容 の 要 旨

n-3系高度不飽和脂肪酸 (PUFA) であるエイコサペンタエン酸 (EPA) およびドコサヘキサエン酸 (DHA) は、様々な生理作用を有していることから、近年その需要が急速に高まってきている。これらの PUFA は、現在魚油を主原料として精製されているが、魚資源量の減少などの問題点が指摘されている。そこで、魚油に代わる代替資源として、DHA などの有用 PUFA の生産能・蓄積能が極めて高い、ラビリンチュラ類に注目が集まっている。これらの微生物を遺伝子工学的に操作することで、有用 PUFA の選択的な大量生産が可能になることが期待される。しかしながら、ラビリンチュラ類における遺伝子操作技術に関する報告はほとんどなく、PUFA 生合成経路の詳細も不明である。本研究は、ラビリンチュラ類を利用して PUFA を産業生産することを目指し、その基盤技術となる形質転換系の開発と PUFA 生合成経路の解明を目的とした。

初めに、ラビリンチュラ類の形質転換系の開発を行った。まず、ラビリンチュラ内で発現可能なプロモーターを取得するため、house keeping 遺伝子である EF-1 α 遺伝子の発現調節領域を *Thraustochytrium aureum* ATCC34304 株から単離した。この EF-1 α 遺伝子発現調節領域と薬剤耐性遺伝子を用いた、ラビリンチュラ類の形質転換ベクターを構築した。エレクトロポレーション法によって *Thraustochytrium* sp. ATCC26185 株に導入し、薬剤耐性の獲得、PCR とサザンブロッティングによって形質転換の可否を検討した。その結果、本法によってラビリンチュラ類の形質転換が可能であることが分かった。さらに、本発現ベクターに組み込みこんだ緑色蛍光タンパク質 (EGFP) 遺伝子を *Aurantiochytrium limacinum* mh0186 株および *T. aureum* ATCC34304 株に導入したところ、EGFP 由来の緑色蛍光を発する形質転換体が得られた。

次に、細胞内に EPA を蓄積していることが知られているピンギオ藻から脂肪酸不飽和化酵素 (desaturase) 遺伝子を単離した。塩基配列を解析したところ、取得した遺伝子は 437 アミノ酸をコードする 1,314 bp の ORF を有し、他生物由来の $\Delta 12$ desaturase 遺伝子と有意な相同性を示すことが分かった。取得遺伝子を出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* に導入した結果、C18:1^{A9} を C18:2^{A9,12} に変換する $\Delta 12$ desaturase 活性を示すことが明らかになった。また、ピンギオ藻由来の $\Delta 12$ -fatty acid desaturase 遺伝子を *A. limacinum* mh0186 株に発現させた形質転換体の培養系に、オレイン酸 (C18:1^{A9}) を添加したところ、空ベクター挿入体 (mock transfectant) では見られないリノール酸 (C18:2^{A9,12}) の生成が確認された。この結果は、*A. limacinum* mh0186 株で発現した $\Delta 12$ -fatty acid desaturase がオレイン酸をリノール酸に変換したことを示している。以上の結果は、今回開発した形質転換系を用いることで、ラビリンチュラ類に外来遺伝子を発現させ、脂肪酸代謝改変株を作製することが可能なことを示している。

ラビリンチュラ類は、ポリケタイド合成酵素 (PKS) に類似した酵素群によってマロニル CoA を出発基質として PUFA を生合成していると考えられている (PUFA synthase 経路)。しかし、通常の実核生物のように、ラビリンチュラ類が desaturase と脂肪酸鎖延長酵素 (elongase) から構成される

standard 経路によって PUFA を生合成しているかどうかは明確ではない。そこで、*T. aureum* ATCC34304 株において、standard 経路における PUFA 生合成の鍵酵素である Δ 12-fatty acid desaturase 遺伝子を破壊した。その結果、破壊株では、オレイン酸の蓄積とリノール酸およびその下流の PUFA の減少が確認された。しかし、DHA 量に有意な変化は見られなかった。遺伝子破壊株の脂肪酸組成は、 Δ 12-fatty acid desaturase 遺伝子を発現させることによってほぼ野生株と同等になった。以上の結果は、*T. aureum* ATCC34304 株では、standard 経路と PUFA synthase 経路の両方の経路が機能しており、DHA は特に後者によって合成されていることを示している。ラビリンチュラ類において standard 経路によって PUFA が生合成されていることが本研究によって初めて立証された。