

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

小林 達彦

筑波大学 応用生物化学系

必須脂肪酸である ω -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。

本研究では、脂肪酸の 9 の位置に二重結合を導入する 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。

【結果および考察】

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、既にクローン化している 9-Desaturase cDNA 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。得られた遺伝子から推定されるアミノ酸配列は、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、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 9-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、9-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、9-Desaturase b は、9-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、9-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。さらに、Cytochrome b5 family に属する Nitrate reductase

とも相同性を示したが、9-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。また、9-Desaturase b の遺伝子には5'末端が GT で3'末端が AG の94 bp から成るイントロンが一つ存在することが推察された。

9-Desaturase a は9-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、9-Desaturase b のイントロンが94 bp であるのに対し、9-Desaturase a のイントロンは153 bp であり塩基数も異なっていた。

鎖長延長酵素遺伝子の解析

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ン化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。