

出芽酵母の多重遺伝子発現系を利用した紅藻スサビノリ由来脂肪酸合成関連酵素遺伝子の機能解析

応用生物学専攻 生命分子化学講座 基礎環境微生物学分野 渡部 智弘

1. 緒言

ドコサヘキサエン酸 (DHA) やエイコサペンタエン酸 (EPA) 等の高度不飽和脂肪酸 (PUFA) は、様々な生理活性を示すことから機能性脂質と呼ばれている。現在これら脂肪酸の主な供給は魚油に依存している。一方、微生物による機能性脂質の生産は、資源量や品質の変動に影響されることなく安定な生産が期待できる。そこで本研究では、微生物で機能性脂質生産を行うための基盤技術を整備することを目的に、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) を宿主とする複数の遺伝子を発現できるシステムを活用し、紅藻スサビノリ (*Porphyra yezoensis*) 由来の脂肪酸合成関連遺伝子を複数発現させ、脂肪酸組成の変動を調べることで各遺伝子の機能解析を行った。

2. 方法

紅藻スサビノリ由来 $\Delta 9$, $\Delta 6$, $\Delta 12$, $\omega 3$, $\Delta 5$ 各脂肪酸不飽和化酵素遺伝子ホモログ (*Py* $\Delta 9$, *Py* $\Delta 6$, *Py* $\Delta 12$, *Py* $\omega 3$, *Py* $\Delta 5$) 及び脂肪酸鎖長伸長酵素候補遺伝子ホモログ (*PyElo1*, *PyElo2*, *PyElo3*, *PyElo4*, *PyElo5*) を、自己切断ペプチドをコードした TaV 配列を介して複数連結した多重遺伝子発現カセットを作成した後、酵母低温誘導性発現プラスミド (pLTex321sV5H, 以下 pLTex) に各多重遺伝子発現カセットを導入した。 $\Delta 9$ 脂肪酸不飽和化酵素 (OLE1) 遺伝子欠失酵母変異株 *ole1* Δ 株を、多重遺伝子発現カセットを有する各プラスミドで形質転換し、得られた形質転換体の脂肪酸組成の分析は GC を、形質転換体の各脂肪酸の同定は GC/MS を用いて行った。

3. 結果・考察

pLTex/*Py* $\Delta 9$ _TaV_*Py* $\Delta 12$ を導入した形質転換体からはリノール酸 18:2(9, 12)が検出された。pLTex/*Py* $\Delta 9$ _TaV_*Py* $\Delta 6$ _TaV_*Py* $\Delta 12$, pLTex/*Py* $\Delta 9$ _TaV_*Py* $\Delta 12$ _TaV_*Py* $\omega 3$ を導入した形質転換体からは各々 γ -リノレン酸 18:3(6, 9, 12), α -リノレン酸 18:3(9, 12, 15)が検出された。よって本研究で用いた紅藻スサビノリ由来遺伝子ホモログ *Py* $\Delta 9$, *Py* $\Delta 6$, *Py* $\Delta 12$, *Py* $\omega 3$ は、それぞれ $\Delta 9$, $\Delta 6$, $\Delta 12$, $\omega 3$ 各脂肪酸不飽和化酵素遺伝子であることが判明した。各脂肪酸鎖長伸長酵素候補遺伝子をそれぞれ pLTex/*Py* $\Delta 9$ _TaV_*Py* $\Delta 6$ _TaV_*Py* $\Delta 12$ に連結したプラスミドを *ole1* Δ 株へ導入したところ、*PyElo4* を連結したプラスミドで形質転換された株からはジホモ- γ -リノレン酸 20:3(8, 11, 14)が検出され、*PyElo5* を連結したプラスミドで形質転換された株からはエイコサモノエン酸 20:1(11)が検出された。一方、*PyElo1*, *PyElo2*, *PyElo3* を連結したプラスミドで形質転換された株では脂肪酸鎖長伸長酵素の産物と思われる脂肪酸は検出されなかった。出芽酵母内で EPA を合成するには、18:3(6, 9, 12)を 20:3(8, 11, 14)へ鎖長伸長させる経路が必須であることから、本研究で用いた脂肪酸鎖長伸長酵素候補の中では *PyElo4* が EPA 合成に有用であることが示唆された。以上の機能同定済み脂肪酸不飽和化酵素遺伝子と *PyElo4* に加え、新たに *Py* $\Delta 5$ を連結した pLTex/*Py* $\Delta 9$ _TaV_*Py* $\Delta 6$ _TaV_*Py* $\Delta 12$ _TaV_*Py* $\omega 3$ _TaV_*PyElo4*_TaV_*Py* $\Delta 5$ で形質転換した株からは EPA を検出することができた。よって、*Py* $\Delta 5$ は $\Delta 5$ 脂肪酸不飽和化酵素遺伝子であることが判明した。

本研究の成果である出芽酵母における代謝工学的取り組みを通して、出芽酵母による EPA 生産が可能になるとともに、これまで適当な供給源が知られていなかった種々の PUFA 含有油脂の生産が可能になると思われる。