

メタノール資化酵母における脂肪酸不飽和化酵素遺伝子 *HpFAD2*、*HpFAD3* の機能解析

大阪大学大学院工学研究科
生命先端工学専攻 生物工学コース
ゲノム機能工学領域

塚本 智也

【背景・目的】

脂肪酸は長い炭化水素鎖をもつカルボン酸であり一般式 C_nH_mCOOH で表わされ、その炭化水素鎖中に二重結合をもたない飽和脂肪酸と、二重結合をもつ不飽和脂肪酸に大きく分けられる。脂肪酸炭素数が 12 個以上の長鎖脂肪酸のなかでも、炭化水素鎖中に複数の二重結合をもつ多価不飽和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acid; PUFA) は、細胞膜の構成要素となり膜の流動性を調節し、さらに高等生物の体内で免疫系、炎症反応、血圧調節に関わるエイコサノイドの前駆体になるなどの様々な生理活性をもつことが知られている。このように PUFA は多くの生物にとって重要な物質であるにもかかわらず、我々人間は自身で生合成することができないため食事により摂取している。PUFA の主な供給源は肉、魚、植物等であるが、これらの収穫量は気候変動の影響を受け易く、生育の際に環境中の有害物質を取り込むことで品質が低下するという問題点もある。そのため高機能性脂質の新規な供給源として微生物が注目されているが、PUFA 合成に関する詳細な分子機構は明らかとなっていない。単細胞真核生物である酵母は、精密な遺伝解析が可能なることから多細胞真核生物のモデルとして広く利用されている。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* はゲノムの全塩基配列が解読されており、遺伝子操作も容易であるためモデル生物として有用であるが、二重結合がひとつの一価不飽和脂肪酸までしか生合成することが出来ない。そこで当研究室では、遺伝解析が可能で、炭素数が 18 個の PUFA である必須脂肪酸のリノール酸 (C18:2)、 α -リノレン酸 (α C18:3) を高比率で生合成することが出来るメタノール資化酵母 *Hansenula polymorpha* を研究材料として用い、本酵母による有用脂質の生産と、脂肪酸合成機構の全体像解明を目指している。

当研究室ではこれまで、本酵母の脂肪酸不飽和化機

構に関して、脂肪酸炭化水素鎖の $\Delta 9$ 位 (脂肪酸カルボキシル炭素から 9 番目の炭素位) に二重結合を付与する *HpOLE1*、 $\Delta 12$ 位に二重結合を付与する *HpFAD2*、および $\Delta 15$ 位に二重結合を付与する *HpFAD3* をそれぞれクローン化し機能解析を進めてきた。しかし、PUFA の生合成と不飽和化機構の知見は未だ十分とはいえない (図 1)。そこで本研究では、 $\Delta 12$ 、 $\Delta 15$ -脂肪酸不飽和化酵素遺伝子である *HpFAD2*、*HpFAD3* の機能解析を進め、本酵母における脂肪酸合成機構の全容解明に繋げる知見の獲得を目的とした。

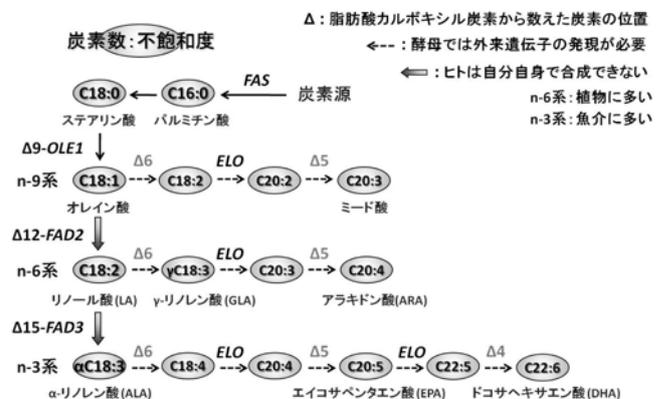


図 1 多価不飽和脂肪酸の生合成経路

ヒトは $\Delta 12$ 、 $\Delta 15$ -脂肪酸不飽和化酵素遺伝子を持たないため、自身でリノール酸 (C18:2) と α -リノレン酸 (α C18:3) を合成することができない。メタノール資化酵母 *H. polymorpha* は $\Delta 9$ 、 $\Delta 12$ 、 $\Delta 15$ -脂肪酸不飽和化酵素遺伝子を持ち、細胞内に取り込んだ炭素源から α -リノレン酸まで合成することができる。また酵母では外来遺伝子を発現させることで、 γ -リノレン酸、アラキドン酸、EPA、DHA といった高機能性脂質を細胞内で合成することができる。FAS は脂肪酸合成酵素遺伝子、ELO は脂肪酸鎖延長酵素遺伝子をあらわす。

【実験結果】

1. *Hpfad3* 破壊株は α C18:3 を合成できない

HpFAD3 遺伝子の機能解析を進めるため、まず *Hpfad3* 破壊株の作製を試みた。*HpURA3* (1.4 kb) を選択マーカーとする *HpFAD3* 破壊用断片 (3.2 kb) を調製し、これを野生型株 H50-5C (*jeu1-1 ura3-1*) に導入し、相同組換えによる *HpFAD3* 遺伝子の破壊

を行った。得られた *Hpfad3* 破壊株はリノール酸 (C18:2) から α -リノレン酸 (α C18:3) を生合成することが出来なくなると期待される。そこで、野生型株と *Hpfad3* 破壊株を YPDA 培地で 37°C、24 時間培養した菌体から脂肪酸を抽出し、脂肪酸組成を GC-MS で

分析した。その結果、図 2 および表 1 に示すように野生型株 H50-5C では α C18:3 のピークが検出されたが、*Hpfad3* 破壊株では検出されず、*HpFAD3* は本酵母において Δ 15-脂肪酸不飽和化酵素をコードする唯一の遺伝子であることがわかった。

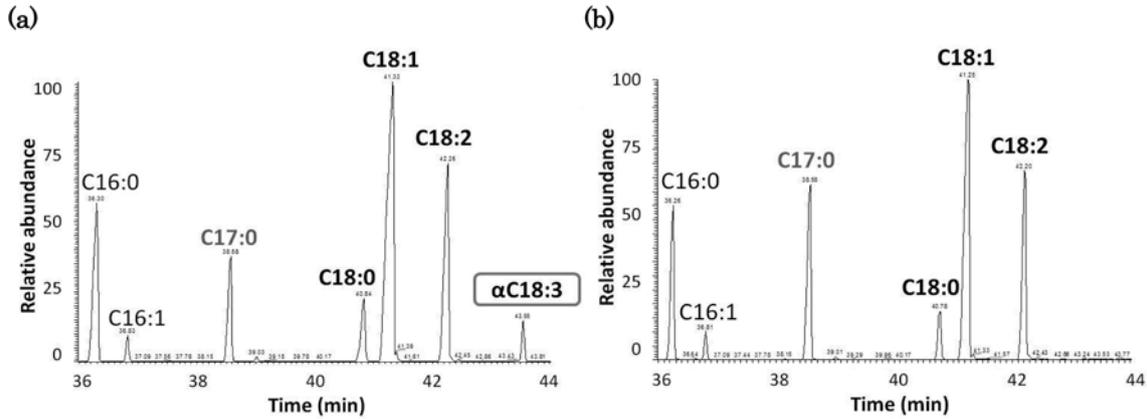


図 2 野生型株と *Hpfad3* 破壊株の GC-MS 測定

各ピークの上書いてある数値は各脂肪酸の炭素数と不飽和度を表している。横軸は固定相への保持時間を表しており、縦軸は全脂肪酸中の相対存在量を示している。内部標準として生体内で合成されない *n*-ヘプタデカン酸 (C17:0) を脂肪酸抽出時に 1 mg 加えている。各菌株は 37°C で 24 時間培養した。(a) 野生型株。(b) *Hpfad3* 破壊株。

表 1 *Hpfad3* 破壊株の脂肪酸構成比 (37°C)

脂肪酸構成比 (mol %)						
Strain	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	α C18:3
WT	19.9	1.9	6.2	47.9	21.4	2.7
<i>Hpfad3</i> Δ	19.2	2.8	5.6	48.1	24.3	0

2. *HpFAD3* 遺伝子の破壊は完全培地での生育およびメタノール培地での生育に影響を与えない

Hpfad3 破壊が本酵母に与える影響を調べるため、まず YPDA 培地での低温、高温培養条件における生育を野生型株と比較した。その結果、13°C ~ 49°C において *Hpfad3* 破壊株は野生型株と同程度の生育を示した。そのため、*H. polymorpha* の栄養増殖において α C18:3 は必須ではないことがわかった (図 3)。また *H. polymorpha* にはメタノールを唯一の炭素源として生育することができる特徴があり、メタノール培養下で強力に発現誘導する *MOX* プロモーターをもつ

など、産業的にも有用な酵母として知られている (Kang *et al.*, 2001)。本研究で作製した *Hpfad3* 破壊株を将来的に有用脂肪酸の生産工場として利用することを考慮した場合、メタノール資化能は重要な形質となる。そこで、メタノールを唯一の炭素源とする最少合成培地において生育評価を行った。その結果、*Hpfad3* 破壊株は野生型株と同様の生育を示し (図 4)、*Hpfad3* 破壊株においてもメタノール誘導性のプロモーターを異種遺伝子の発現に利用できることがわかった。

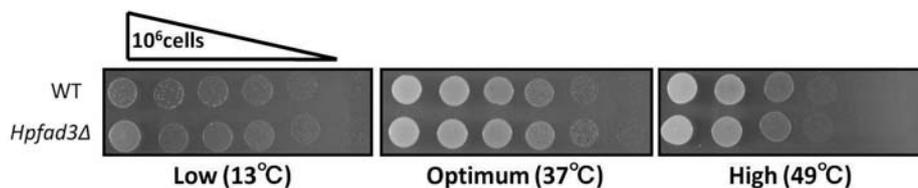


図 3 *Hpfad3* 破壊株の生育評価

野生型株 H50-5C はウラシル要求性を示すため、YPDA 培地にウラシル (20 mg/L) を加えて生育遅延を示さないようにした。生育至適温度 37°C で 1 日、低温条件として 13°C で 15 日、高温条件として 49°C で 1 日培養。

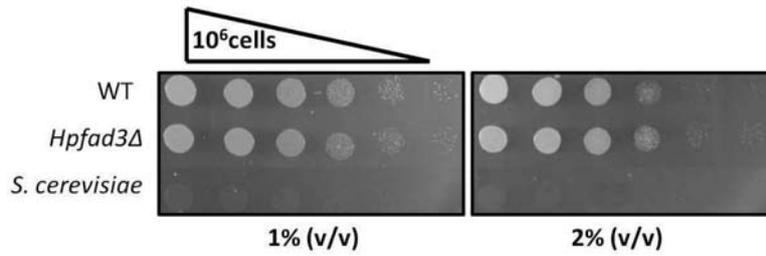


図 4 メタノール資化性評価

野生型株 H50-5C のもつロイシン、ウラシル要求性の影響を無くすため、メタノールを唯一の炭素源として含む最少合成培地にロイシン (100 mg/L)、ウラシル (20 mg/L) を加えてある。メタノールを資化できない *S. cerevisiae* (C3723-8B) をネガティブコントロールとして使用している。1% (v/v) メタノール培地において 37°C で 3 日間、2% (v/v) メタノール培地において 37°C で 4 日間培養。

3. *Hpfad3* 破壊株は野生型と比較して、C18:2 をより高比率に合成することができない

Hpfad3 破壊株は α C18:3 を合成することができないため、基質となる C18:2 を野生型より蓄積すると予想した。また細胞は低温条件において、膜中の多価不飽和脂肪酸比率を増加させることにより細胞膜の流動性を保つことが知られている (Sakamoto *et al.*, 1997)。これらのことから、*Hpfad3* 破壊株を低温条件

で培養した際に C18:2 含量は野生型株よりも高いと考えた。生育至適温度の 37°C では表 1 に示したように α C18:3 の脂肪酸構成比が低かったため、やや低温の 30°C で培養した菌体から脂肪酸を抽出し、GC-MS によりその脂肪酸組成を分析した。しかし C18:2 の脂肪酸構成比は、図 5 および表 2 に示すように *Hpfad3* 破壊株においても野生型株と比較してほぼ変化していなかった。

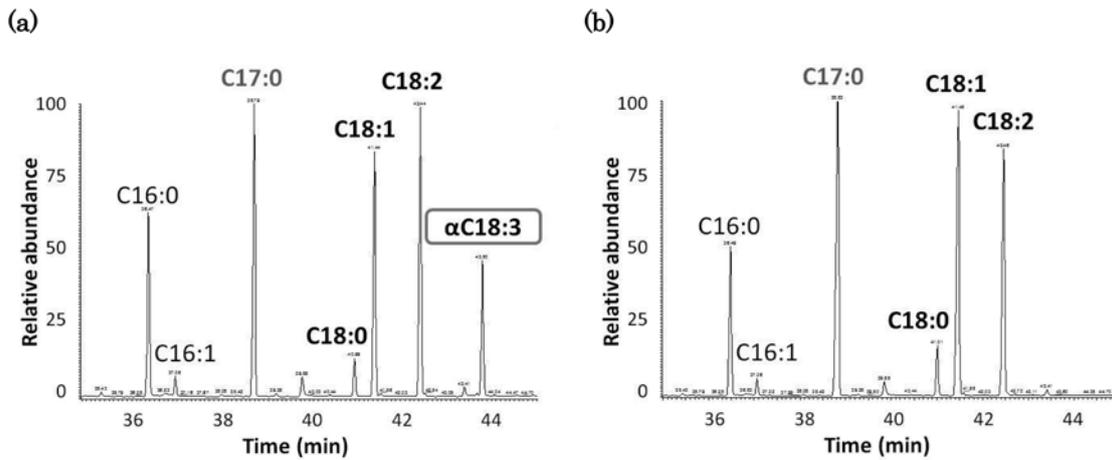


図 5 野生型株と *Hpfad3* 破壊株の GC-MS 測定

各ピークの上に見える数値は各脂肪酸の炭素数と不飽和度を表している。横軸は固定相への保持時間を表しており、縦軸は全脂肪酸中の相対存在量を示している。内部標準として生体内で合成されない n-ヘプタデカン酸 (C17:0) を脂肪酸抽出時に 1 mg 加えている。各菌体は 30°C で OD660=1.0 まで培養した。(a) 野生型株。(b) *Hpfad3* 破壊株。

表 2 *Hpfad3* 破壊株の脂肪酸構成比 (30°C)

脂肪酸構成比 (mol %)						
Strain	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	α C18:3
WT	20.5	2.4	4.0	26.7	32.4	14.0
<i>Hpfad3Δ</i>	19.2	2.2	5.8	39.3	33.5	0

4. *HpFAD2* 遺伝子の転写は C18:1、C18:2 および α C18:3 により抑制される

Hpfad3 破壊株において C18:2 が野生型株よりも高比率に合成されなかった理由として、(1) *HpFAD2* の転写が抑制されている、(2) フィードバック阻害により *HpFad2p* の酵素活性が低下している、(3) *HpFad2p* のタンパク質分解が促進されている、などが考えられる。ここで当研究室の以前の研究により、オレイン酸 (C18:1) の合成に関わる *HpOLE1* は、その産物である C18:1 を培地に 1mM 添加することで転写量が約 0.65 倍に抑えられることが明らかとなっている (Lu *et al.*, 2000)。そこで、*HpFAD2* においても同様の転写抑制が働くと考え、培地中に C18:1、C18:2 または

α C18:3 を添加した場合の *HpFAD2* の転写量を real time RT-PCR によって測定した。その結果、いずれの不飽和脂肪酸を加えた場合にも転写量は約半分に減少することが分かり、*HpFAD2* 遺伝子の転写は不飽和脂肪酸の添加により抑制されることが明らかとなった (図 6-a)。また *HpFAD3* についても同様の実験を行った結果、*HpFAD3* 遺伝子の転写は α C18:3 の添加により抑制されることがわかった (図 6-b)。C18:1 および C18:2 添加時には *HpFAD3* の転写量は変化しなかったが、これは最適生育温度の 37°C では α C18:3 の細胞内構成比が低く、元々の *HpFAD3* 発現量が少ないことによると考えられる (表 1)。

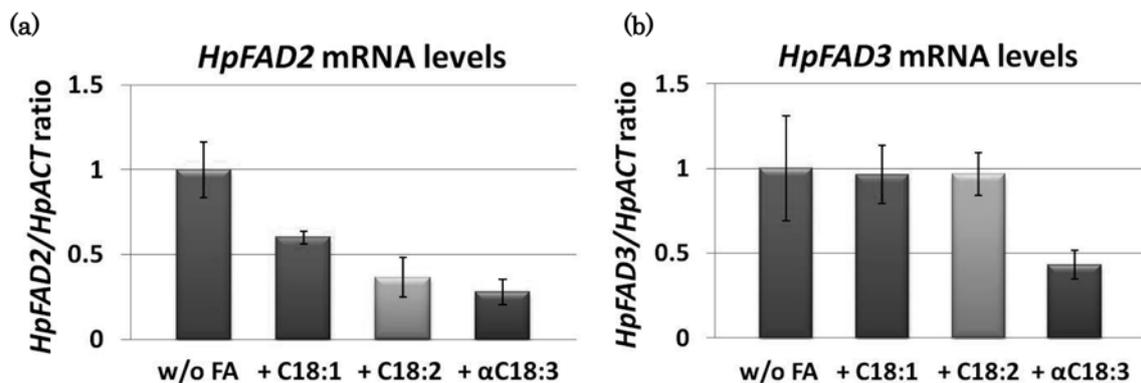


図 6 real time RT-PCR による *HpFAD2*、*HpFAD3* の転写量測定

野生型株 H50-5C を完全培地において 37°C で一晩前培養した後、各脂肪酸を 1mM 含む培地で対数増殖期まで培養し、回収した菌体から全 RNA を抽出して real time RT-PCR に用いた。横軸は培地に加えた脂肪酸を示している。w/o FA は脂肪酸無添加。数値は各脂肪酸の炭素数と不飽和度を表している。縦軸は *HpFAD2* mRNA および *HpFAD3* mRNA を内部標準の *HpACT* mRNA で標準化した値。脂肪酸無添加の場合を 1 とした時の相対値で示す。

【考察】

本研究において *HpFAD2*、*HpFAD3* 遺伝子の機能解析を進めることで、培地中への不飽和脂肪酸添加により両遺伝子の転写量が減少することがわかった。一方モデル生物である *S. cerevisiae* では *ScOLE1* が唯一の脂肪酸不飽和化遺伝子であり、不飽和脂肪酸の添加により膜のセンサータンパクである *ScSpt23p* のプロセッシングが阻害されることで、*ScOLE1* の転写が抑制されることが知られている (Choi *et al.*, 1996)。このように *S. cerevisiae* で得られている知見および本研究の結果から、*H. polymorpha* における脂肪酸不飽和化酵素遺伝子の制御モデルを考えた (図 7)。

また *H. polymorpha* は前述のとおり産業的に有用な酵母として知られている。特にメタノール誘導性の

MOX プロモーター下において他生物由来の $\Delta 6$ -脂肪酸不飽和化酵素遺伝子を発現させることで、本酵母が本来生産しない γ -リノレン酸 (γ C18:3) を合成することが既にわかっており (Laoteng *et al.*, 2005)、遺伝子組換え体を用いた γ C18:3 生産に向けた醗酵プロセスの検討も行われている (Khongto *et al.*, 2010)。本研究により作製した *Hpfad3* 破壊株は野生型株と同様の生育を示し (図 3)、メタノール誘導性プロモーターも利用できることから (図 4)、*Hpfad3* 破壊株を用いることで野生型株に比べてより高効率に γ C18:3 を生産することが期待できる。このように本研究は、*H. polymorpha* における脂肪酸生合成機構の全体像解明に資するだけでなく、有用脂質生産酵母の育種に応用できる可能性も秘めている。

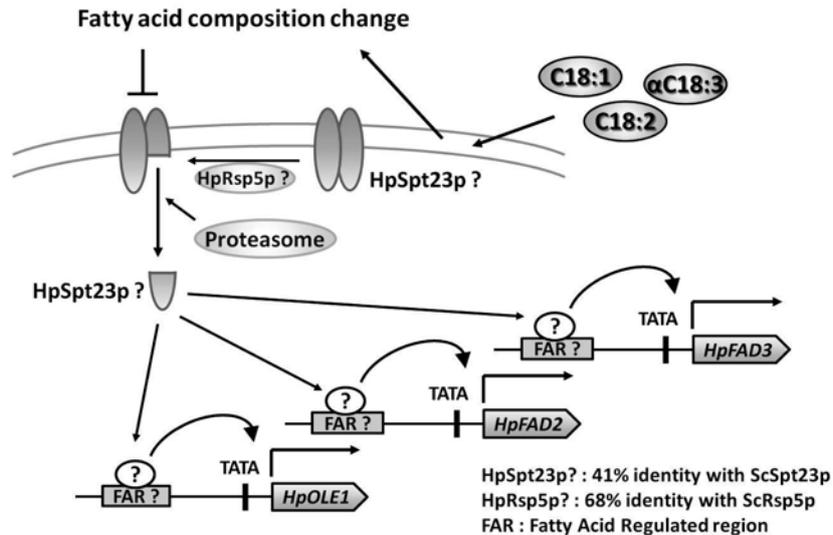


図7 脂肪酸添加時における *HpOLE1*、*HpFAD2*、*HpFAD3* の転写制御モデル

HpOLE1、*HpFAD2*、*HpFAD3* はそれぞれ、*ScSpt23p* のホモログもしくは別の新たなセンサータンパクがプロセッシングされることによって転写され、その活性化は未知の転写因子を介して行われる。細胞外に不飽和脂肪酸が添加された場合、細胞膜に取り込まれることで生じる脂肪酸組成の変化をセンサータンパクが感知して、そのプロセッシングが阻害されることで各遺伝子の転写が抑制される。先のとがった矢印と平らな矢印は、それぞれ正と負の作用をあらわす。各遺伝子のプロモーターには、*ScOLE1* の不飽和脂肪酸添加による転写抑制に不可欠な FAR 領域 (Fatty Acid Regulated element) と相同性の高い配列が存在する。

【謝辞】

本研究で脂肪酸分析を行うにあたり、ご協力を頂きました生物資源工学領域の福崎 英一郎教授に厚く御礼申し上げます。また直接測定をして頂きました馬場 健史准教授に心より感謝を致します。

<参考文献>

Choi, J. Y., Stuke, J., Hwang, S. Y., and Martin, C. E. (1996). Regulatory element that control transcription activation and unsaturated fatty acid-mediated repression of the *Saccharomyces cerevisiae* *OLE1* gene. *J. Biol. Chem.*; 271,3581-3589.

Kang HA., Kang W., Hong WK., Kim MW., Kim JY., Sohn JH., Choi ES., Choe KB., Rhee SK. (2001). Development of expression systems for the production of recombinant human serum albumin using the MOX promoter in *Hansenula polymorpha* DL-1. *Biotechnol Bioeng.* 76:175-185.

Khongto B, Laoteng K, Tongta A. (2010). Fermentation process development of recombinant *Hansenula polymorpha* for gamma-linolenic acid production. *J Microbiol Biotechnol.* 20(11):1555-62.

Laoteng K., Ruenwai R., Tanticharoen M., Cheev-adhanarak S. (2005). Genetic modification of essential fatty acids biosynthesis in *Hansenula polymorpha*. *FEMS Microbiol Lett.* 245:169-178.

Lu S-F., Tolstorukov II., Anamnart S., Kaneko Y., Harashima S. (2000). Cloning, sequencing, and functional analysis of *H-OLE1* gene encoding Δ^9 -fatty acid desaturase in *Hansenula polymorpha*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 54:499-509.

Sakamoto T, Higashi S, Wada H, Murata N, Bryant DA. (1997) Low-temperature-induced desaturation of fatty acids and expression of desaturase genes in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002. *FEMS Microbiol Lett.* 152(2): 313-20.



花王株式会社
ヒューマンヘルスケア研究センター
ヘルスケア食品研究所勤務

(応用生物 平成 22 年卒 24 年前期)