

氏名	チョウ 張	サク 朔
学位(専攻分野)	博士(農学)	
学位記番号	農博第1590号	
学位授与の日付	平成18年11月24日	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当	
研究科・専攻	農学研究科応用生命科学専攻	
学位論文題目	Characterization and application of the fungal genes involved in the biosynthesis of polyunsaturated fatty acid and sterol (高度不飽和脂肪酸とステロール生合成に関わる真菌由来遺伝子の諸性質解明とその応用)	
論文調査委員	(主査) 教授 清水 昌	教授 喜多恵子 教授 阪井康能

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、微生物、特に真菌類を用いて、高度不飽和脂肪酸(PUFA)やステロール生合成に関与する酵素遺伝子の構造と機能を解明し、ユニークなPUFAやステロール類を含む有用脂質生産への応用を目的として行った研究成果をまとめたものである。以下にその概要を記す。

(1) 油糧微生物 *Mortierella alpina* 1S-4 の誘導変異株を用いて、新規な n-8 系 PUFA の生産性を評価した。 $\Delta 12$ 脂肪酸不飽和化酵素 ($\Delta 12$ -DS) 活性がほぼ完全に欠損した変異株 JT-180 は、n-9 系 PUFA 生合成経路によりミード酸 (5, 8, 11-eicosatrienoic acid) を大量に蓄積する。奇数鎖 n-アルカンを添加した培地で JT-180 を培養すると、3種の新たな脂肪酸が蓄積することを見出し、同定の結果、6, 9-heptadecadienoic acid (17:2n-8), 8, 11-nonadecadienoic acid (19:2n-8) と 5, 8, 11-nonadecatrienoic acid (19:3n-8) であることを明らかにした。さらに、これら脂肪酸の生産性を評価するために、4%の n-heptadecane を添加した培地で、本菌株を培養したところ、17:2n-8, 19:2n-8, 19:3n-8 の脂肪酸は、それぞれ乾燥菌体 1 グラム当たり 20.3, 3.6, 5.8 mg 蓄積することがわかった。これら奇数鎖 PUFA は、ミード酸などの n-9 系 PUFA の生合成に関与する酵素系によって n-8 経路で生合成されていると予想した。よって、これまで供給できなかった稀少な奇数鎖 PUFA の生産が可能となった。

(2) 担子菌 *Coprinus cinereus* TD#822-2 由来新規 DS の諸性質を解明した。本菌株から DS ホモログ遺伝子をクローニングし、酵母発現系において遺伝子の機能解析を行ったところ、形質転換体にはコントロール株にない4つの新たな脂肪酸が検出された。同定の結果、それらは 9, 12-hexadecadienoic acid (16:2n-4, 全脂肪酸当たり 8%), 9, 12, 15-hexadecatrienoic acid (16:3n-1, 1%) リノール酸 (18:2n-6, 30%) と α -リノレン酸 (18:3n-3, 0.6%) であることが判明した。以上の結果より、本酵素は、 $\Delta 12$ 不飽和化活性により、パルミトオレイン酸 (16:1n-7) やオレイン酸 (18:1n-9) を効率よく 16:2n-4 やリノール酸に変換できること、さらに 16:2n-4 やリノール酸の $\Delta 15$ 位にも不飽和結合を挿入できる新規な多機能酵素 ($\Delta 12/\Delta 15$ -DS) であることを明らかにした。

(3) *M. alpina* 1S-4 由来 7-dehydrosterol Δ^7 reductase (DHSR7) 遺伝子の機能解析を行った。DHSR7 は、還元反応によりステロール骨格の 7 位の二重結合を飽和化し、本菌株におけるデスモステロールの生合成に関与していると考えられる。本菌株の DHSR7 遺伝子の推定アミノ酸配列は *Xenopus laevis* (African clawed frog) 由来の DHSR7 と最も高い 51% の相同性を示した。酵母発現系を用いた遺伝子の機能解析を行ったところ、ステロールの 7 位の二重結合を飽和化することを明らかにした。また、*M. alpina* 1S-4 の形質転換系を用い、RNAi 法による本遺伝子の発現抑制を行ったところ、デスモステロールの蓄積量が減少し、前駆体の cholesta-5, 7, 24-trien-3 β -ol が蓄積することを認めた。以上より、微生物では初めて本酵素が DHSR7 として機能し、*Mortierella* 属糸状菌に特有なステロールであるデスモステロールの生合成に関与することを明らかにした。

(4) *M. alpina* 1S-4 に存在する 2 つのステロールメチルトランスフェラーゼ (ERG6) 遺伝子を解析した。ERG6 は、

一般的に、*S*-アデノシルメチオニンをメチル基供与体として用い、ザイモステロールをフェコステロールに変換する酵素である。*M. alpina* 1S-4では、デスモステロール（総ステロールの63%）が主なステロール成分であるものの、ERG6を經由して生合成されると考えられるステロール類も存在する。本菌株のステロール合成経路の全貌解明を目的とし、ERG6遺伝子をクローニングした。その結果、2種のERG6ホモログ（ERG6-1とERG6-2）遺伝子が存在し、それぞれ334個、391個のアミノ酸からなるタンパク質をコードし、互いに61%の相同性を示すことが明らかになった。

論文審査の結果の要旨

これまでに、油脂蓄積性の糸状菌 *Mortierella alpina* 1S-4 を用いてアラキドン酸などの様々な高度不飽和脂肪酸（PUFA）の生産研究が展開されてきた。PUFA は炭素鎖長あるいは二重結合の位置や数が異なることで、その生理学的な機能も異なる。本論文では、*M. alpina* 1S-4 やスクリーニングにより新たに分離したリノール酸蓄積性担子菌 *Coprinus cinereus* TD#822-2 を用い、ユニークな PUFA やステロール類などの有用脂質生産の可能性について検討を加えた。特に、その生合成に関与する酵素遺伝子の構造と機能を解明した結果がまとめられている。以下に示す点が成果として評価できる。

(1) *M. alpina* 1S-4 から誘導した $\Delta 12$ 脂肪酸不飽和化酵素（ $\Delta 12$ -DS）活性がほぼ完全に欠損した変異株 JT-180 を奇数鎖 *n*-アルカンを添加した培地で培養すると3種の新たな脂肪酸が蓄積することを見出し、同定の結果、6,9-heptadecadienoic acid (17:2n-8)、8,11-nonadecadienoic acid (19:2n-8) と5,8,11-nonadecatrienoic acid (19:3n-8)であることを明らかにした。これにより、これまで供給できなかった稀少な奇数鎖 PUFA を生産することが可能となった。

(2) 担子菌 *C. cinereus* TD#822-2 から新規な多機能酵素（ $\Delta 12/\Delta 15$ -DS）を見出した。本酵素は、 $\Delta 12$ 不飽和化活性により、パルミトオレイン酸 (16:1n-7) やオレイン酸 (18:1n-9) を効率よく9,12-hexadecadienoic acid (16:2n-4) やリノール酸 (18:2n-6) に変換できること、さらに16:2n-4 やリノール酸の $\Delta 15$ 位にも不飽和結合を挿入できることを明らかにした。本酵素遺伝子は強力な $\Delta 12$ -DS活性をコードする有用遺伝子としてだけでなく、 $\Delta 12$ -DSと $\Delta 15$ -DSの進化を考える上で重要であることが示された。

(3) 微生物では初めて *M. alpina* 1S-4 から7-dehydrosterol Δ^7 reductase (DHSR7) 遺伝子の単離に成功した。遺伝子の機能解析により、本酵素はステロール骨格の7位の二重結合を飽和化し、本菌株内ではcholesta-5,7,24-trien-3 β -olをデスモステロールに変換する反応を触媒することを見出した。微生物では初めて本酵素がDHSR7として機能し、*Mortierella*属糸状菌のデスモステロール生合成経路の一部を解明することに成功した。

(4) *M. alpina* 1S-4 のステロール合成経路の全貌解明を目的とし、本菌株から2つのステロールメチルトランスフェラーゼ (ERG6) 遺伝子を単離することに成功した。2種のERG6ホモログ (ERG6-1とERG6-2) 遺伝子はそれぞれ334個、391個のアミノ酸からなるタンパク質をコードし、互いに61%の相同性を示すことを明らかにした。これは、*M. alpina* 1S-4 の複雑なステロール生合成経路を考察する上で重要な知見といえる。

以上のように、本論文はPUFAとステロール生合成に関わる真菌由来遺伝子の諸性質を解明し、有用脂質の微生物生産への可能性を示したものである。得られた成果は、これまで十分に解明されていなかったPUFAおよびステロールの生合成経路の解明に繋がるものである。また、脂質生産のための遺伝子ツールとして応用できる強力な有用遺伝子の獲得に道を拓いたものであり、応用微生物学、分子生物学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成18年10月19日、論文ならびにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分にあるものと認めた。