

3S2a04 細胞のデザイナビリティ向上に向けて

○清水 浩
(阪大院・情報・バイオ情報)

微生物を利用した物質生産のためのバイオプロセスは、環境負荷の低いプロセスとして、その重要性が高く認識されるようになってきている。微生物生産においては、微生物の持つ能力を最大限発揮させるよう代謝経路を改変することが重要である。多くの微生物のゲノムが解読され、主要な代謝経路の多くが、明らかになった今日、バイオプロセスの目的生産物質の収率や生産性を改変する合理的、かつ体系的な「代謝デザイン」の手法の確立が望まれている。我々は、遺伝子・タンパク質・代謝の網羅的情報を精度よく細胞から取り出し解析することで、目的の物質生産のための細胞デザイン法の研究を行っている。バイオプロセスにおいて細胞を取り巻く環境のストレスに強い微生物を創製すること、目的物質生産を向上させるための代謝改変デザインと評価方を開発することに焦点を当てた研究について紹介し、議論したい。

【遺伝子発現・表現型の網羅的情報にもとづく細胞創製】*Saccharomyces cerevisiae*のストレス条件下においてDNAマイクロアレイにより遺伝子発現の網羅的情報を取得した。特異的な代謝経路に特徴的な発現変化が認められる場合はその経路に着目した代謝経路の改変を行いストレス耐性を賦与することが必要である一方、より網羅的にデータを解析するために、自己組織化マップ (SOM) によるデータ処理ののち、特徴的な発現変化を示す遺伝子の一遺伝子破壊株のストレス条件下における増殖速度を網羅的に比較解析することによりストレス耐性を賦与するために重要な遺伝子を選択することにより、ストレス耐性に関係のある遺伝子を選択することが可能となった。また、一遺伝子破壊株のライブラリを利用し、ストレス環境下において増殖速度に対して重要な遺伝子を網羅的にスクリーニングする方法の開発を行った。

【目的生産物の生産を予測するゲノムスケールモデルの開発とその評価法の開発】微生物の代謝変換による生産を行う際には取り込まれた炭素源を有効に利用して目的物質の生産を向上させる必要がある。このことを目的とした代謝改変のデザインは重要である。我々は、ゲノムの明らかになった *Corynebacterium glutamicum* においてゲノムスケールのモデルを構築し、遺伝子改変予測を可能にするためのシステム開発を行っている。Metacyc(<http://metacyc.org/>) や文献情報などをもとにゲノムスケールモデルを構築した。このモデルにおいては、細胞は置かれた環境条件において増殖速度を最大化するように代謝反応を組織化するという原理に基づいてシミュレーションを行っている。一方で、現実の細胞がどのような代謝の状態を実現しているかを正確に評価する手法の開発も進めている。¹³Cで同位体標識された化合物を細胞に取り込ませ、その標識同位体がどの代謝物質に濃縮されているかを解析することにより、どの代謝経路のフラックスが活性化しているかを決定する手法の開発を行っている。この方法を利用することにより、どの代謝経路が物質生産にとって重要かを*in vivo*で代謝レベルで示ることが可能となる。*C. glutamicum*のグルタミン酸生産において、どの補充経路が活性になっているかを決定した例を通じてこの手法の有用性について議論する。

【引用文献】

Hirasawa et al., Journal of Biotechnology, 131, 33-44 (2007)

Shirai et al., Microbial Cell Factories, 6(1), e19 (2007)

3S2a05 油糧微生物の代謝工学と機能性脂質生産への利用

櫻谷 英治, 岸野 重信, 小川 順, 横関 健三, ○清水 昌
(京大院・農・応用生命)

1980年代に *Mucor* や *Mortierella* 属糸状菌が γ -リノレン酸やアラキドン酸 (AA)を含む油脂の生産菌株として見いだされた。以来、微生物を用いて機能性脂質を生産する試みが展開され、「発酵油脂」の実用生産への道が拓かれた。ここでは、演者らが展開してきたAA生産性 *Mortierella alpina* 1S-4の代謝工学と高度不飽和脂肪酸 (PUFA) 含有油脂の生産 (酸化変換) 及び嫌気性微生物の飽和化反応を利用した共役脂肪酸の生産 (還元変換) に関する最近の展開を紹介する。

M. alpina 1 S-4は安価な炭素源を含む単純な培地によく生育し、菌体内にAAに富む triacylglycerol (TG) を蓄量蓄積する (TG 含量, 500-600 mg/g dry cells; TG中の全脂肪酸に対するAAの割合30-70%; 培地当たりのAA生産量, 13-20 g/l)。現在、本菌が生産するAA含有TGは、乳児用ミルクの栄養強化のための素材として世界的に使用されている。また、AA生合成経路の諸酵素の欠損変異株が造成され、これらの変異株を用いることで、ジホモ- γ -リノレン酸 (20:3n-6) やミード酸 (20:3n-9) などの PUFA を含むユニークな発酵油脂の工業生産が可能となった。さらに、C16脂肪酸からC18脂肪酸への変換に関与する elongase (EL) 欠損変異株では、オレイン酸 (18:1n-9) に代わってパルミトオレイン酸 (16:1n-7) をハブ脂肪酸とする新しい PUFA 生合成経路 (n-7,n-4,n-1) が機能することが示され、これら経路上の15種のC16-C20PUFAの生産が可能となった。

演者らは、本菌の PUFA 生合成機構について検討し、不飽和化反応に必要な NADH-cytochrome b5 reductase, cytochrome b5 及び $\Delta 9$ -, $\Delta 12$ -, $\Delta 6$ -不飽和化酵素などの各遺伝子の構造と機能を解明した。これは油脂蓄積性の微生物からひとつのまとまった脂肪酸不飽和化反応系を分子レベルで解明した最初の例である。また、各遺伝子を他種微生物および植物に導入し、脂肪酸組成の改変ができることを示した。さらに、*M. alpina* 1S-4よりウラシル要求性変異株や薬剤耐性変異株を造成し、形質転換ベクターの構築、形質転換法の選定を含む包括的な形質転換系の確立し、油糧微生物 *M. alpina* の遺伝子組み替え変異株造成への道を拓いた。

これまで生合成経路が不明であった共役リノール酸 (CLA) が¹⁰-ヒドロキシ脂肪酸を中間体とするリノール酸の二重結合への水和反応と脱水反応によって進行することを乳酸菌を用いて解明した。これにより、反芻動物における不飽和脂肪酸の還元反応 (水素添加反応) の初発段階の機構が解明された。また、この反応を利用して乳酸菌による生理活性型CLAの大量生産法を開発した。

Toward Upgrading Designability of Cell Factories

○Hiroshi SHIMIZU
(Dept. Bioinfo. Eng., Grad. Sch. IST, Osaka Univ.)

Key words metabolic engineering, DNA microarray, metabolic pathway modification, metabolic flux analysis

Metabolic engineering of oleaginous microorganisms for the production of useful lipids

Eiji SAKURADANI, Shigenobu KISHINO, Jun OGAWA, Kenzo YOKOZEKI, ○Sakayu SHIMIZU
(Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

Key words oleaginous microorganisms, *Mortierella alpina*, functional lipids, polyunsaturated fatty acids