

1. 研究実施計画

課題名：低温微生物の低温適応機構と応用に関する研究

研究機関名：独立行政法人産業技術総合研究所

任期付研究員氏名：森田 直樹

①研究の意義、目的、必要性

(1) 意義

地球上の生物圏の80%以上は生物学的には低温環境にあると言われている。低温は生物の生存にとって厳しい環境であるが、多くの微生物が生息し活発に活動を営んでいる。低温微生物は低温に適応するための、温和な環境の微生物にはない特異な生理機構を有している。低温微生物はいわゆる極限環境微生物の一種であるが、高温菌や好アルカリ性菌など他の極限環境微生物の生理機構が明らかにされ、耐熱酵素や洗剤用酵素などへの利用が活発に行われるのに比べ、その生理機能や低温適応機構の多くはまだ未知でありまた応用も限られている。低温微生物のもつ特異な低温適応機構の解明は、基礎科学的には生物の進化や環境適応の解明に寄与するものであり、また応用面では低温下での省エネ的な有用物質生産や排水・廃棄物処理等への利用が期待され、低温バイオテクノロジーとしての新たな科学技術分野の構築が期待できる。しかし本研究分野はまだ基礎的な研究段階にあるため、有用低温微生物の探索、低温適応機構に関わっている物質の同定、機能の解明など、国立研究機関が積極的に推進し基盤を構築していくことが必要である。本研究では低温微生物の適応機構の重要な因子である生体膜脂質の高度不飽和化に関わる遺伝子やその発現機構を明らかにし、微生物の低温適応機構の解明とその応用に資する。

(2) 目的

本研究は低温環境下に生息する微生物の低温適応機構として極めて重要であり、また応用的にもエイコサペンタエン酸 (EPA) やドコサヘキサエン酸 (DHA) などの高度不飽和脂肪酸 (PUFA) の微生物生産に関連して重要な、微生物の生体膜脂質の高度不飽和化機構の解明を目的とする。

- (1) そのためにはまず、PUFAを生産する低温微生物が有する高度不飽和脂肪酸合成系の遺伝子クローニングとその構造解析を行う。
- (2) また、PUFA合成系遺伝子を大腸菌など他の微生物に導入して、異種微生物によるPUFAの生産系を構築する。また、組換え微生物の低温適応性を明らかにする。
- (3) 細胞膜の高度不飽和化が低温において特異的に発現される機構を明らかにする。

(3) 必要性

低温や高温などの極限環境に生きる微生物は温和な環境の微生物にはない特異な生理機構を有しており、その機構の解明は基礎科学的に重要であり、また多様な応用が期待できる。特に低温微生物については研究が緒についたばかりであり、最新の分子生物学や遺伝子工学等の知見や技術を結集した研究の速やかな推進が必要である。当所は数年前より低温バイオテクノロジーを最重点研究分野に位置付け、種々の専門分野の研究員や設備を結集し、ま

た国内外の研究機関と連携しながら低温環境生物の機能やその利用の研究を積極的に推進しており、当該研究課題を遂行するためには最適の研究機関である。

②研究の概要

低温環境に生息する微生物の低温適応機構として低温下でも生体膜の流動性を維持するための膜脂質の不飽和化、低温でも活性の高い酵素の存在、不凍タンパク質の存在等が知られている。このなかでも膜脂質の不飽和化は微生物から植物、魚類に至るまでの共通する低温適応機構と考えられている。種々の低温微生物においても膜脂質不飽和化が低温適応の重要因子であるが、なかでもEPAやDHAなどの高度不飽和脂肪酸（PUFA）は低温微生物が15℃あるいは10℃以下の低温下において特異的に生産することが報告されており、低温適応と密接な関係にあると考えられる。

PUFA合成のためには微生物が一般に有している脂肪酸合成酵素系の他に、高度不飽和化に関わる酵素系の存在が推定されているが、殆ど未知である。しかし、当所のこれまでの研究において低温微生物からDHAおよびEPA合成に関わる遺伝子系の一部と推定されるDNAを単離しており、本研究においてはこのDNAを利用してまずPUFA合成系遺伝子全体のクローニングを行う。次に異種微生物におけるPUFA合成系遺伝子の発現、低温におけるPUFA遺伝子の発現機構の解析などを行い、低温微生物の生体膜脂質高度不飽和化による低温適応機構を明らかにする。具体的には以下の研究を行う。

- (1) PUFA生産低温微生物を用いてPUFA合成系の遺伝子クローニングおよび構造解析を行う。
- (2) PUFAは低温下において特異的に生産される物質である。PUFA合成系遺伝子がどのようなメカニズムで低温下で発現が誘導されるかを検討する。このためにはPUFA合成系遺伝子の塩基配列などを解析し、発現機構を明らかにする。
- (3) 単離したPUFA合成系遺伝子を他の微生物に導入し、PUFA合成能をもった組換え微生物を人工的に作成する。また組換え微生物の耐冷性などを調べることにより、低温適応機構の解析を行う。
- (4) PUFA合成系遺伝子を他の微生物に導入し、異種微生物によるPUFAの大量生産系を開発する。

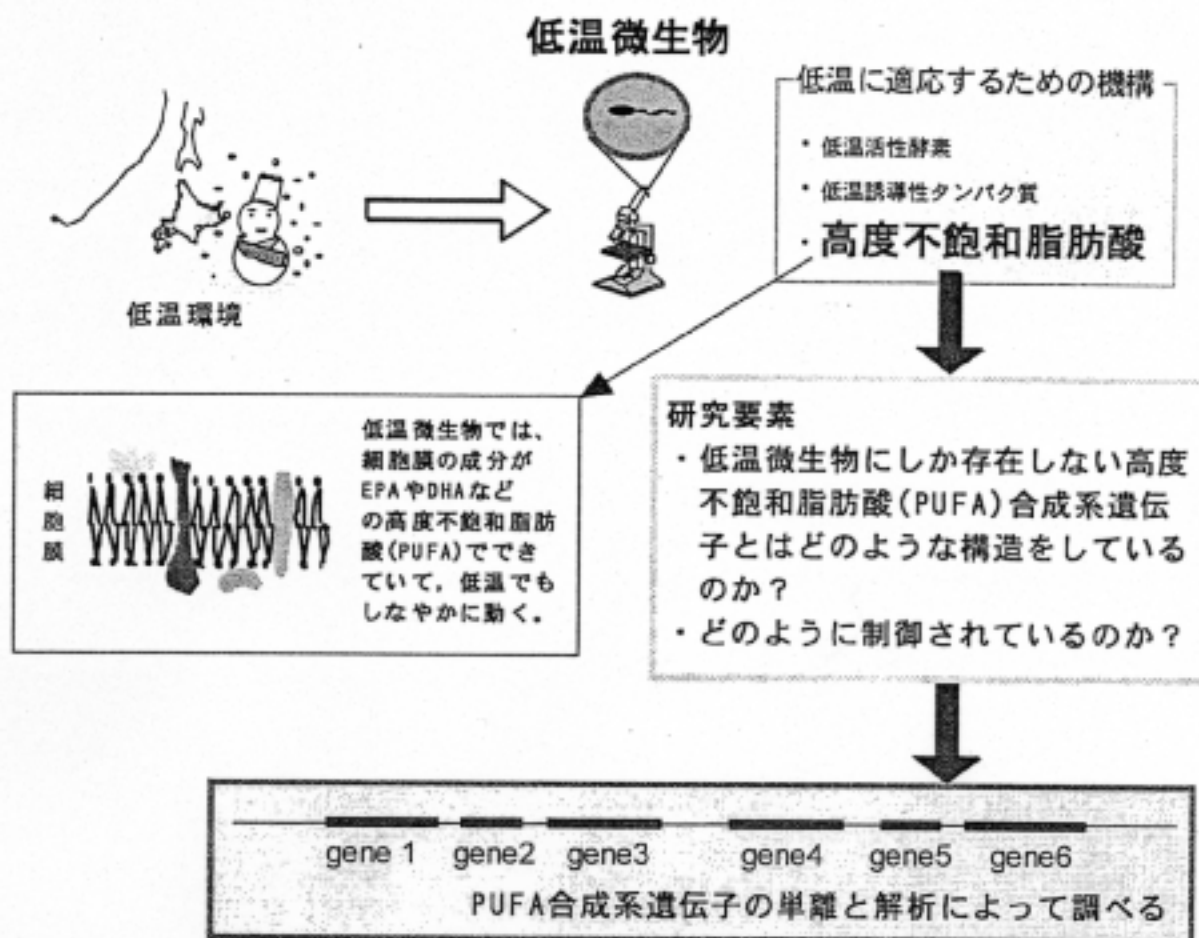
③研究目標

本制度研究期間においてはPUFAのなかでも特に不飽和度の高いDHA合成系の遺伝子クローニングとその発現機構を検討する。

- (1) DHA合成系遺伝子のクローニングと構造の解明
*Vibrio marinus*などの低温微生物からDHA合成系遺伝子をクローニングし、塩基配列や遺伝子系の構造を明らかにする。
- (2) DHA合成系遺伝子の発現機構
低温下で特異的に発現するDHA合成系遺伝子がどのようなメカニズムで低温下で発現が誘導されるかを検討する。このためにはDHA合成系遺伝子の塩基配列などを解析し、発現機構を明らかにする。

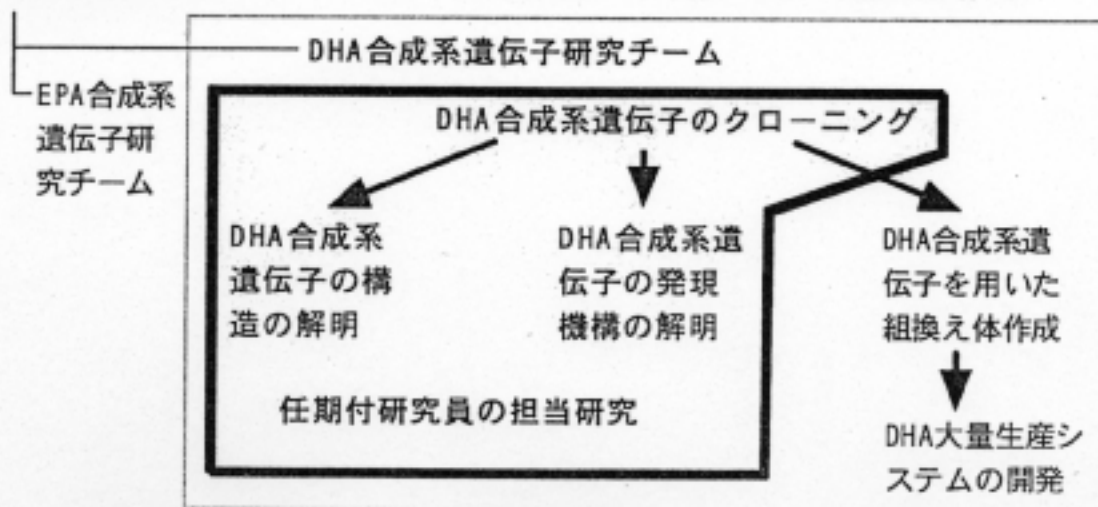
④ポンチ絵 (研究概要)

低温微生物の低温適応機構と応用に関する研究



「低温微生物の低温適応機構と応用に関する研究」における研究分担

- 低温活性酵素研究チーム
- 低温誘導性タンパク質研究チーム
- 高度不飽和脂肪酸研究チーム (PUFA合成系遺伝子の単離と解析・組換え体作成)



2. 研究成果の概要

①研究成果

研究成果は、以下の通りである。

- (1) EPA 生産細菌 *Shewanella* sp. IK-1 株からは EPA 合成酵素遺伝子群（投稿準備中）、DHA 生産細菌 *Moritella marina* MP-1 株からは DHA 合成酵素遺伝子群のクローニング（Tanaka, M., et al. Biotechnol. Lett. 21: 939 (1999)、特許出願中）に成功し（図 1）、それらの遺伝子の *Escherichia coli* における発現を確認した。EPA 合成酵素遺伝子群は、1996 年（財）相模中央化学研究所によって *Shewanella* 菌からはじめてクローニングされた以来、初めての報告である。DHA 合成酵素遺伝子については、誌上発表を 1999 年 11 月、我々のグループが世界で初めて行った。

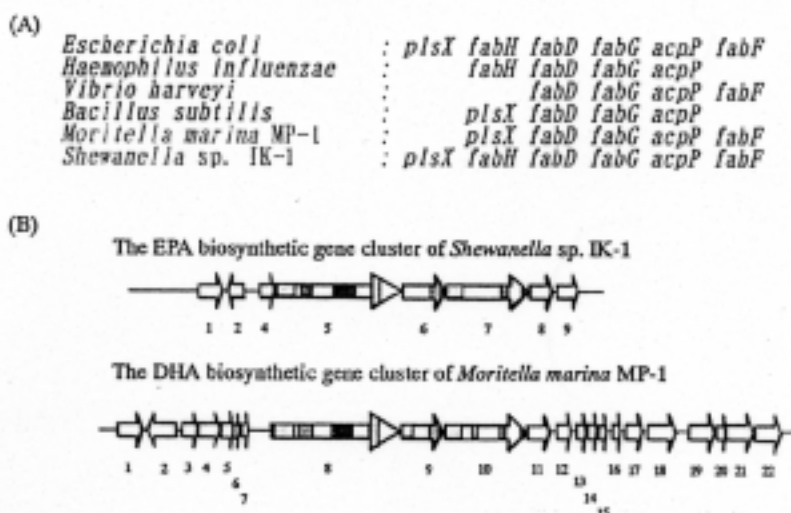


図 1 *fab* 遺伝子クラスター (A) と PUFA 合成遺伝子クラスター (B)

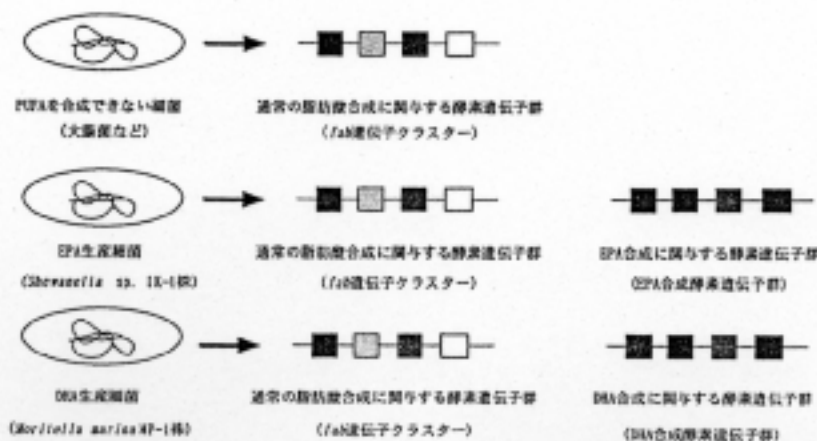


図 2 PUFA 生産細菌の脂肪酸合成酵素遺伝子群と PUFA 合成酵素遺伝子群

- (2) PUFA 生産細菌は PUFA 合成酵素遺伝子群と全く独立に短鎖や中鎖の脂肪酸合成を司る遺伝子群（脂肪酸合成酵素（FAS）遺伝子群）を併せもつことを初めて見出した（Morita, N., et al. Biotechnol. Lett. 21: 641(1999)（図 1、2））。
- (3) PUFA 生産細菌においては、通常の脂肪酸合成を介さずに、別の経路で PUFA は合成されていることを示唆する結果を得た。
- (4) DHA 合成酵素に対する抗ペプチド抗体の作製に成功した。

表 1. PUFA 生産低温細菌 *V. marinus* MP-1 株、*Shewanella* sp. IK-1 株におけるセルレニン（Cer）が PUFA 生産に及ぼす影響*（4℃）

	- Cer	+ Cer (5 μg/ml)
	(% Total)	
<i>V. marinus</i> MP-1 株	5.2 % (57.8 %) **	24.4 % (9.1 %)
<i>Shewanella</i> sp. IK-1 株	* 11.2 % (28.3 %)	19.5 % (0.5 %)

* *V. marinus* MP-1 株は DHA の割合を、*Shewanella* sp. IK-1 株は EPA の割合を示す。

** パルミトオレイン酸 (16:1) の割合。

- (5) 脂肪酸合成阻害剤であるセルレニンが、PUFA 生産細菌における PUFA の増産に有効であることを見出した（特許出願中）（表 1）。イカゴロを利用した培地で細菌を培養することによる高度不飽和リン脂質の生産法を見出し、水産廃棄物の未利用資源としての利用法を確立した（北海道新聞平成 12 年 1 月 7 日朝刊、特許出願中）。

②波及効果、発展方向、改善点等

- (1) DHA や EPA を持つ細菌は、深海や極地域の寒冷海水域で多く見出されることから、低温や高圧に対する適応に重要な機能を果たしていると考えられている。今後、PUFA 合成酵素遺伝子の温度や圧力に対する発現応答をノーザン解析や抗ペプチド抗体を用いて調べることによって、転写、翻訳レベルでの調節機構を明らかにすることが可能であり、細菌の低温適応機構等の解明に寄与できる。また、PUFA 合成酵素遺伝子を不活性化することによって、PUFA を持たない変異株と野生株との比較が可能となり、様々な環境条件での PUFA 生産細菌における PUFA の役割を明らかにすることが可能であると考えている。
- (2) 現在、DHA 及び EPA の市場は年々拡大を続け、DHA のみでその市場規模は 200 億円を超えるまでに成長している。DHA、EPA のもつ生理活性が次々と明らかにされつつあり、それに伴って、更に需要も伸びていくことが予想される。これまで PUFA

は、魚油を主供給源として生産されているが、今後は微生物、植物による生産が普及していくと予想される。本研究で得られる成果は、遺伝子組換えによる PUFA の生産系の開発に道を開き、新たな市場、新たな起業にも道を拓くものと期待される。すなわち、PUFA 合成酵素遺伝子群を導入した組換え微生物や組換え植物による PUFA の生産、水産廃棄物を原料とした培地によるコストの削減と資源の有効利用、PUFA の部分修飾による PUFA への新たな機能の付与などが実用化可能であると考えられる。

- (3) 単離した PUFA 合成酵素遺伝子群の構造から、細菌の PUFA はポリケチドの合成機構と類似の機構で合成されると予想しているが、未だ反応機構は明らかにされていない。今後、このユニークな PUFA 合成機構を明らかにすることによって合成酵素の機能も明らかになると思われる。ポリケチド合成酵素は、抗生物質合成に関与していることから精力的に研究が進められ、蛋白工学的手法による酵素の機能の改変を試みられ、コンビナトリアルケミストリーを利用した新規化合物の合成が行われている。このポリケチド合成酵素を中心に行われているコンビナトリアルケミストリーを利用した合成系に、PUFA 合成酵素の新たな反応モジュールを提供することが可能であり、新規生理活性化合物合成に貢献することが可能であると考えている。このように PUFA 合成酵素遺伝子群は、PUFA を含めた有用物質の生産に極めて有効な道具と手段になることが予想される。