

戦略的創造研究推進事業(ALCA)
技術領域(プロジェクト名)「革新技術領域」

課題名「遊離脂肪酸を基幹化合物とする新たなバ
イオリピッドプラットフォームの開発」

終了報告書

研究開発期間 平成28年10月～平成31年3月

研究開発代表者: 櫻谷 英治
(徳島大学大学院社会産業理工学研
究部、教授)

○報告書要約 (和文)

研究開発代表研究者 : 徳島大学 教授 櫻谷英治

研究開発課題名 : 遊離脂肪酸を基幹化合物とする新たなバイオリピッドプラットフォームの開発

1. 研究開発の目的

低炭素社会の実現に向け、物質生産の観点から重要な取り組みとして、①石油からバイオマスへの原料転換、ならびに、②製造プロセスの効率化によるエネルギー消費削減、の2点が挙げられる。具体的には、遊離脂肪酸(FFA)生産宿主株の開発、リピドーム解析に基づくFFA生産性の向上、FFAを基幹化合物として酵素変換による同一宿主内での有用脂質化合物生産に取り組む。これにより、石油工業/化学工業によりつくられてきた脂質化合物をバイオテクノロジー技術に置き換えるバイオリピッドプラットフォームの基盤技術を構築する。本研究によりバイオテクノロジー(合成生物学)技術と化学工業の連結を効果的に促進し、温室効果ガスの大幅な排出削減を目指す。

2. 研究開発の概要

(1)内容: 3つの研究グループ(徳島大学・櫻谷グループ、京都大学・岸野グループ、九州大学・馬場グループ)のもとで以下の課題に取り組んだ。まず、宿主としては油糧糸状菌 *Mortierella alpina* を用い、内在性の遺伝子を過剰発現させることで脂質(FFA)の生産性向上、菌体外脂質生産を目指した(京都大)。FFAの中でも化成品の原料となりえる水酸化脂肪酸については特に焦点を当て、新たな水酸化脂肪酸生産株の取得、糸状菌由来オレイン酸水和酵素遺伝子の単離と *M. alpina* での異種発現を行った(徳島大)。京都大や徳島大で得られる変異株や組換え株の脂質を詳細に定性定量分析するために新たなリピドーム解析手法が構築された(九州大)。それらリピドーム解析の情報をもとに、FFAを含む脂質が細胞内でどのように合成され、どの反応がボトルネックになっているかを推測することとした(九州大)。

(2)成果: 遊離脂肪酸(FFA)生産株として自然界より見出した糸状菌 *Fusarium* sp. D2株は、菌体内における水酸化脂肪酸HYA(10(OH)_c12-18:1)およびHYB(10(OH)-18:0)生産能を示した。本菌より、オレイン酸水和酵素遺伝子を単離し、*M. alpina* で発現させたところ、HYBの生成が確認された(徳島大)。*M. alpina* の内在性リパーゼ(TGL4)とacyl CoAチオエステラーゼ(ACOT8R)の過剰発現により、有意な遊離脂肪酸(FFA)の生産性向上が確認された(京都大)。また、菌体外に漏出されるタンパク質の解析により、特定のタンパク質の過剰発現により、有意に菌体外脂質量が増加することが分かった(京都大)。FFAだけでなく、極性脂質、中性脂質も精密に定量解析可能なリピドーム解析法を構築した(九州大)。上記で得られた変異株や組換え株のリピドーム解析からFFAの蓄積に寄与している因子(反応ステップ)を推測した(九州大)。

(3)今後の展開:*M. alpina* の脂質蓄積能力・菌体外脂質生産の可能性は魅力的な特質である。一方で、遊離の水酸化脂肪酸蓄積能力はD2株の方が高いと予想された。それぞれの特質を示す基礎的な研究を行い、双方の能力を引き出すことが重要であると考えている。*M. alpina* においては菌体外脂質漏出に関わるタンパク質群の解析、D2株においてはFFAに反応する酵素群を発現させることに注力する。構築した新たなリピドーム解析手法により、菌体内外の脂質解析や分析が困難な両親媒性脂質の解析も今後継続する。

○Report summary (English)

Principal investigator: Tokushima University professor Eiji SAKURADANI

R & D title: Development of a new bio-lipid platform utilizing free fatty acid as a basic compound

1. Purpose of R & D

From the viewpoint of material production, two important challenging for the realization of a low-carbon society are: (1) conversion of raw materials from petroleum to biomass, and (2) reduction of energy consumption by streamlining the manufacturing process. Specifically, we will develop the construction of host strains for free fatty acid (FFA) production, the improvement of FFA productivity based on lipidome analysis, and the production of useful lipid compounds in the same host by enzymatic conversion using FFA as a basic compound. We will build the basic technology of the bio-lipid platform that replaces the lipid compounds created by the petroleum industry/chemical industry with the biotechnology technology. Through the whole research, we will effectively promote the link between the biotechnology (synthetic biology) field and the chemical industry and aim to significantly reduce greenhouse gas emissions.

2. Outline of R & D

(1) Contents:

The following issues were addressed under three research groups (Tokushima Univ./Sakuradani Group, Kyoto Univ./Kishino Group, Kyushu Univ./Bamba Group). First, we tried to improve lipid (FFA) productivity and extracellular lipid production by overexpressing endogenous genes using *Mortierella alpina* as a host. We focused especially on hydroxy fatty acids as FFAs, which can be a raw material for chemical products, obtained new hydroxy fatty acid-producing strains, isolated the oleic acid hydase gene from a filamentous fungus, and expressed it in *M. alpina* (Tokushima Univ.). A new lipidome analysis method was constructed for the detailed qualitative and quantitative analysis of lipids from mutant strains and recombinant strains obtained at Kyoto University and Tokushima University (Kyushu Univ.). Based on the information of these lipidome analysis, we estimated how the lipid containing FFA is biosynthesized in the cell and which reactions are the bottleneck (Kyushu Univ.).

(2) Achievements:

Filamentous fungus *Fusarium* sp. D2 isolated from the natural sample as a free fatty acid (FFA)-producing strain showed the productivity of hydroxy fatty acids, HYA (10(OH)*c*12-18:1) and HYB (10(OH)-18:0) in cells. When the oleic acid hydase gene was isolated from D2 strain and expressed in *M. alpina*, the production of HYB was confirmed (Tokushima Univ.). Overexpression of endogenous lipase (TGL4) and acyl CoA thioesterase (ACOT8R) genes in *M. alpina* was confirmed to significantly improve the productivity of free fatty acids (FFA) (Kyoto Univ.). Analysis of proteins leaked out of the cells revealed that overexpression of specific proteins significantly increased extracellular lipid levels (Kyoto Univ.). In addition to FFA, we constructed a lipidome analysis method that enables accurate quantitative analysis of polar and neutral lipids (Kyushu Univ.). From the lipidome analysis of the mutants and the recombinants obtained through the above process, the factors (reaction steps) contributing to the accumulation of FFA was estimated (Kyushu Univ.).

(3) Future developments:

The lipid-accumulating ability and the possibility of extracellular lipid production of *M. alpina* are attractive characteristics. On the other hand, strain D2 was expected to have a higher ability to accumulate free hydroxylated fatty acids. We believe that it is important to conduct a basic research on both strains and to bring out their capabilities. We will focus on analysis of proteins involved in extracellular lipid leakage in *M. alpina* and expression of enzymes that react with FFA in strain D2. We will continue to analyze lipids inside and outside the cells and analysis of amphipathic lipids using the newly constructed lipidome analysis method.