

ゲノム編集により海洋真核微生物の高度不飽和脂肪酸を自在に作り分ける —遺伝子組換えを伴わずに炭素鎖長や不飽和度の異なる様々な有用脂肪酸の生産が可能に—

ポイント

- ① DHA や EPA などの高度不飽和脂肪酸 (PUFA) ^{※1} はヒトの健康に寄与する有用脂質であるが、天然資源に依存した供給源は持続可能性に課題があり、安定かつ安心・安全な代替供給源の確立が求められている
- ② 海洋真核微生物ラビリンチュラ類^{※2} を対象として、抗生物質耐性遺伝子などの外来 DNA を必要としないゲノム編集法により、様々な有用 PUFA を生産するシステムを構築した
- ③ 本成果はラビリンチュラ類の品種改良に貢献し、有用 PUFA の産業生産、希少 PUFA^{※3} の生産における基盤技術となることが期待される

概要

DHA や EPA に代表される高度（多価）不飽和脂肪酸 (PUFA) は、ヒトの健康に寄与する有用脂質です。PUFA は、分子を構成する炭素の数や不飽和結合の数・位置に応じて、異なる機能を発揮すると考えられています。ラビリンチュラ類は PUFA を生合成し、高レベルで蓄積する海洋真核微生物です。私たちは、その一属である *Parietichytrium* 属が、パルミチン酸（炭素鎖数 16 の飽和脂肪酸）から複数の脂肪酸伸長酵素と不飽和化酵素の反応によって、最終産物として DHA（炭素数 22、不飽和結合数 6）を合成する経路を完備することを報告しています（[2021 年プレスリリース](#)）。

今回、九州大学 大学院農学研究院の石橋洋平 助教、沖野 望 教授、伊東 信 名誉教授、生物資源環境科学府の谷村龍治氏および安宅祐輔氏（大学院生、研究当時）、熊谷堯敏 大学院生の研究グループは、甲南大学 理工学部 本多大輔 教授との共同研究により、ラビリンチュラ類に対して外来 DNA 不使用のゲノム編集技術^{※4} が適用できることを世界で初めて実証しました。本研究では、先行研究で使用した抗生物質耐性遺伝子を一切用いることなく、*Parietichytrium* 属の PUFA 合成経路を改変することで、炭素数や不飽和結合の数が異なる様々な PUFA を『作り分け』^{※5} 可能なシステムを構築しました。現在、DHA や EPA の主な供給源は天然海産魚に由来する魚油ですが、漁獲量の低下、気候変動の懸念、世界的な PUFA 需要の高まりなどを背景に、より安定かつ安心・安全な代替供給源の確立が求められています。本研究は、天然資源に依存しない持続可能な PUFA の産業生産の実現に貢献することが期待されます。また、単に既存システムの代替にとどまらず、魚油などの天然資源にはほとんど含まれない『希少 PUFA』の生産も可能となりました。これら希少 PUFA は、これまで見逃されていた有益な機能を秘めている可能性があります。今後は、これら希少 PUFA の機能解明や有用性の検証にも挑戦したいと考えています。また、本論文で用いた外来 DNA 不使用のゲノム編集技術は、*Parietichytrium* 属だけでなく、*Aurantiochytrium* 属など既に産業利用が進んでいる他属のラビリンチュラ類に対しても適用可能であることも確認しました。有用脂質の安定的供給源として注目されるラビリンチュラ類の可能性をさらに拡げる品種改良技術として、幅広い利用が期待されます。

本研究成果は Elsevier 刊行の『Chemical Engineering Journal』に 2025 年 11 月 28 日（金）（日本時間）にオンライン掲載されました。

本研究グループからひとこと：私たちは 2021 年にラビリンチュラ類の *Parietichytrium* 属が PUFA 合成に関わるすべての脂肪酸伸長酵素および不飽和化酵素の遺伝子を備えていることを報告しました。今回の成果は、当時から構想していたゲノム編集による代謝経路改変を実現したものです。構築した手法や得られたゲノム編集株は、ラビリンチュラ類の研究の発展に貢献し、将来的な応用にもつながると期待しています。

【参考図】

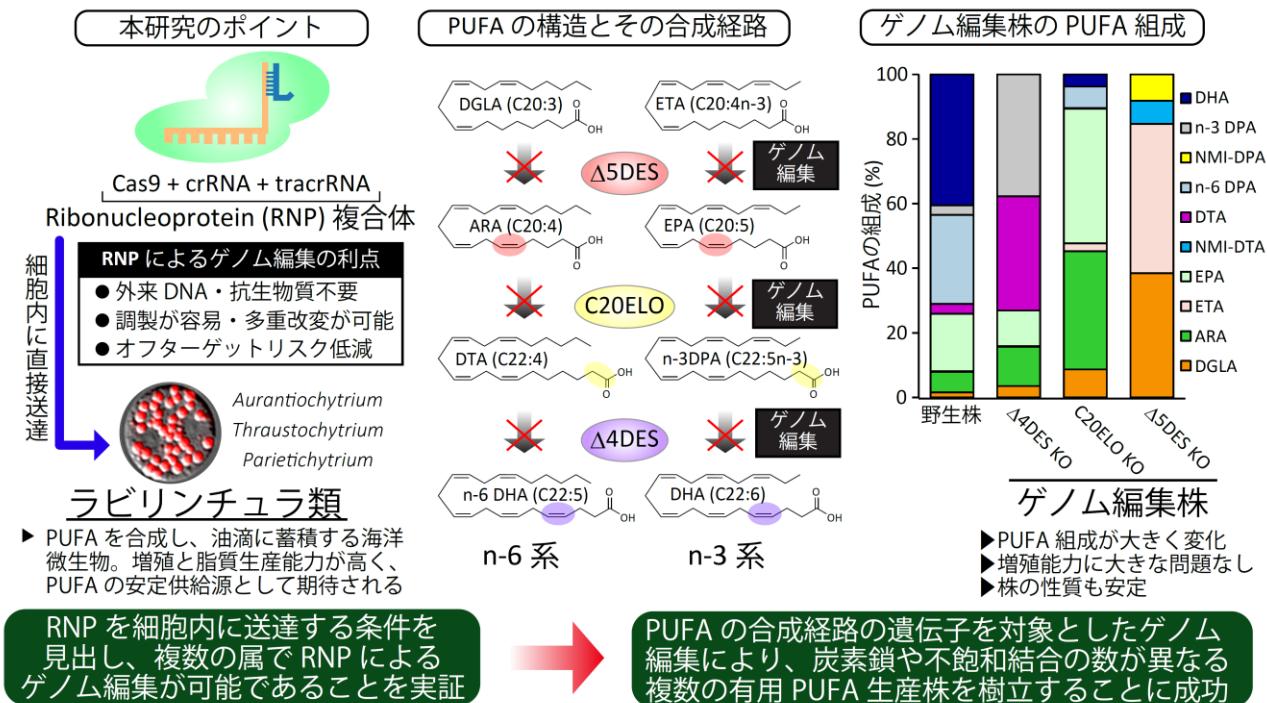


図 1 本研究成果の概要

【研究の背景と経緯】

近年、医薬品や機能性食品、化成品などの有用物質を微生物によって生産する技術が大きな注目を集めています。従来、これらの物質は石油資源や動植物由来の原料に依存してきましたが、資源の有限性や環境負荷の観点から、より持続可能な代替生産技術として微生物利用への期待が高まっています。こうした微生物生産を産業的に成立させるためには、生産性を向上させるための育種技術の開発が不可欠です。遺伝子組換え技術は微生物育種における強力な手法ですが、抗生物質耐性遺伝子などの外来遺伝子を利用する場合が多く、食品分野を中心に慎重な対応を求める国も少なくありません。一方、ゲノム編集技術は外来遺伝子を導入せずに目的変異を付与でき、自然界で生じる変異と同等の改変が可能であることから、より安全性の高い育種技術として産業応用が期待されています。

ドコサヘキサエン酸 (DHA) やエイコサペンタエン酸 (EPA) などの高度不飽和脂肪酸 (PUFA) は、ヒトの健康維持に重要な脂肪酸であり、その主要な供給源は天然海産魚に由来する魚油です。しかし、PUFA の需要が世界的に増加する一方で、気候変動や魚資源の減少、環境負荷の観点から、魚油に依存した供給体系の持続可能性に懸念が生じています。このような背景のもと、PUFA の代替供給源として注目されているのが、本研究の対象である PUFA 生産能を有する海洋真核微生物ラビリンチュラ類です。

【研究の内容と成果】

これまでに私たちの研究グループは、ラビリンチュラ類が属によって異なる PUFA 合成経路をもつこと、その中でも *Parietichytrium* 属は、炭素鎖を伸長する『鎖長伸長酵素 (ELO)』と、不飽和結合を形成する『不飽和化酵素 (DES)』の組み合わせによる好気的な『ELO/DES 経路』を用いて DHA を合成することを明らかにしています。パルミチン酸 (炭素数 16 の飽和脂肪酸) を出発材料として、複数の ELO と DES の反応により炭素鎖 22、不飽和結合数 6 の DHA へと変換されますが、この経路の過程では炭素鎖数や不飽和結合の数が異なる様々な PUFA が中間産物として形成されます。この経路を改变することで、本来作られるはずの DHA ではなく、その合成途上の PUFA を作らせることができます (図 1)。本研究では、各種 ELO、DES 遺伝子を標的とした外来 DNA 不使用のゲノム編集を行い、構造の異なる様々な PUFA を生産するラビリンチュラゲノム編集株の樹立に成功しました。なお、ゲノム編集株は継代を繰り返しても、目的の PUFA を安定的に生産することを確認しています。興味深いことに、これらのゲノム編集株は PUFA 組成が大きく変化するにも関わらず、その増殖特性は野生株と同等で、目的 PUFA を効率よく生産できることが分かりました。また、本研究で構築したゲノム編集の方法は *Parietichytrium* 属だけでなく、ラビリンチュラ類のなかでも特に実用化が進んでいるオーランチオキトリウム (*Aurantiochytrium* 属) や *Thraustochytrium* 属にも適用可能であることを確認しました。

【今後の展開】

本研究で構築したゲノム編集法を利用して、さらなる品種改良を行い、目的とする有用 PUFA の生産量を最大化することを試みます。また、本研究で樹立したゲノム編集株を用いれば、天然資源では調達が難しい希少 PUFA も生産できるので、今後は希少 PUFA の機能や有用性の検証なども行いたいと考えています。

【用語解説】

※1 高度 (多価) 不飽和脂肪酸 (PUFA)

1 つのメチレン基で区切られたシス配置の不飽和結合を 2 つ以上持つ脂肪酸 (図 1)。炭素鎖 20 (C20) 以上の PUFA は Long chain-PUFA (LC-PUFA) と呼ばれ、本研究は主に LC-PUFA を対象としている。PUFA はメチル末端の不飽和結合の位置に基づいて、n-3 系または n-6 系のいずれかに分類される (図 1)。炭素鎖の数、不飽和結合の数と位置に応じて異なる機能を発揮すると考えられている。ドコサヘキサエン酸 (DHA、C22 : 6) とエイコサペンタエン酸 (EPA、C20 : 5n-3) は、サプリメントや医薬品として使用される有益な n-3 系 PUFA として知られている。

※2 ラビリンチュラ類

PUFA を合成し、油滴に高レベルで蓄積する海洋真核微生物で、系統的には珪藻やコンブが含まれる褐藻などの黄色藻類と近縁その一属であるオーランチオキトリウム (*Aurantiochytrium* 属、シゾキトリウム *Schizochytrium* という属名が使われることもある) の産業利用が進んでいる。ラビリンチュラ類は PUFA を合成するが、その経路には異なる 3 つのタイプがあり、①ポリケチド様酵素複合体・PUFA 合成酵素を用いて前駆物質から直接 DHA を合成するタイプ、②鎖長伸長酵素 (ELO) と不飽和化酵素 (DES) を段階的に用いて、炭素鎖や不飽和度が異なる各種脂肪酸を経由して DHA を合成するタイプ (図 1)、③その両方の経路を使うタイプの 3 タイプが見出されている ([2021 年プレスリリース](#))。本研究では、①の経路をもつ *Aurantiochytrium* 属、②の経路をもつ *Parietichytrium* 属、③の経路をもつ *Thraustochytrium* 属、異なる 3 属において外来 DNA フリーのゲノム編集が可能であることを示した。

※3 希少 PUFA

本研究では、DHA や EPA のように魚油などの天然資源に豊富に含まれる PUFA とは異なり、天然資源中にごく少量しか存在しない、あるいはほとんど含まれない PUFA を「希少 PUFA」と定義した。具体例として、 $\Delta 5$ DES 遺伝子を欠損させた株で生成される ETA、 $\Delta 4$ DES 欠損株で得られる DTA や n-3DPA などが挙げられる（図 1）。さらに本論文では、 $\Delta 5$ DES 欠損株において、通常なら不飽和化が起こる箇所がそのまま残り、後続の反応が進むことで、非メチレン介在型 PUFA (NMI-PUFA) が合成されることも明らかにしている（図 1）。これらの希少 PUFA、NMI-PUFA は、DHA や EPA とは異なる機能や有用性を持つ可能性がある。その機能の解明には、モデル生物を用いた検証に十分な量の希少 PUFA が必要であるが、天然資源に含まれる量が少ないため調達が困難である。本研究で報告したゲノム編集株を用いることで、これらの希少 PUFA を安定的かつ必要量生産できるため、その機能を検証する研究の推進に貢献することが期待される。

※4 ゲノム編集技術

生物の DNA 配列を狙った場所で改変する技術の総称。代表的な手法に「CRISPR-Cas9」があり、本研究でも本法を利用している。高精度・高効率で特定の遺伝子を切断・修正することで、農作物や水産資源、産業微生物などの品種改良に幅広く活用されている。本研究では外来 DNA を用いないゲノム編集として、RNP (Ribonucleoprotein) のみを用いる方法の検討を行った。具体的には、Cas9 タンパク質とガイド RNA (crRNA+tracrRNA) を組み合わせた RNP を調製し、エレクトロポレーション法により直接細胞に送達し、標的遺伝子が改変された株を選出した。この方法では抗生物質耐性遺伝子などの外来 DNA を使用しないため、対象生物のゲノム DNA への外来 DNA の挿入（=遺伝子組換え）を回避可能である。また、従来の遺伝子組換え技術で課題となる選択マーカーの数的制限や、選択マーカーを再利用するための追加操作が不要である点も大きな利点となる。さらに、RNP は細胞内で速やかに分解されるため、Cas9 の持続的な発現によるオフターゲット（=標的ではない遺伝子が誤って改変）効果を低減することも期待できる。実際、本研究で樹立したゲノム編集株は増殖や PUFA の生産・蓄積能力の低下は認められず、PUFA 生産微生物として問題となるオフターゲットは起こらなかったと考えている。

※5 PUFA の作り分け

Aurantiochytrium 属のラビリンチュラ類は増殖も速く、PUFA の生産・蓄積能力も高いため、産業利用が進んでいるが、PUFA の種類としては PUFA 合成酵素の産物である DHA と n-6 系のドコサペンタエン酸 (n-6DPA) に限定される。一方、*Parietichytrium* 属は炭素鎖長や不飽和度の異なる様々な脂肪酸を経由して DHA へと変換されるため、経路における特定の酵素遺伝子を欠損させることで、そのステップよりも上流の PUFA で留めることができる（図 1）。本研究ではゲノム編集によって、 $\Delta 4$ 不飽和化酵素 ($\Delta 4$ DES) を標的とし、DHA の代わりに n-3DPA、n-6DPA の代わりにドコサテトラエン酸 (DTA) を主要な PUFA として合成する株 ($\Delta 4$ DES KO 株) を作出した（図 1）。同様に、C20 鎮長伸長酵素 (C20ELO) を欠損させることで EPA やアラキドン酸 (ARA) を生産する株 (C20ELO KO 株)、 $\Delta 5$ 不飽和化酵素 ($\Delta 5$ DES) を欠損させエイコサテトラエン酸 (ETA) およびジホモ γ リノレン酸 (DGLA) を生産する株 ($\Delta 5$ DES KO 株) を樹立することに成功した（図 1）。これらのゲノム編集された *Parietichytrium* 属を用いることで、DHA や n-6DPA 以外の有用 PUFA を高い収量で微生物生産することが可能となった。

【謝辞】

本研究は JSPS 科研費 (18K19183, 24K08702, 24K09042) の助成を受けたものです。

【論文情報】

掲載誌 : Chemical Engineering Journal

タイトル : Transgene-Free Protein-Based Genome Editing in Thraustochytrids Enables Customizable Modulation of Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acid Profiles

著者名 : Yohei Ishibashi*, Ryuji Tanimura, Yusuke Ataka, Akito Kumagai, Daisuke Honda, Makoto Ito, Nozomu Okino

DOI : 10.1016/j.cej.2025.171156

【お問合せ先】

<研究に関するご質問>

九州大学 大学院農学研究院 助教 石橋 洋平 (イシバシ ヨウヘイ)

TEL : 092-802-4705

Mail : ishibashiyo@agr.kyushu-u.ac.jp

<報道に関するご質問>

九州大学 広報課

TEL : 092-802-2130 FAX : 092-802-2139

Mail : koho@jimu.kyushu-u.ac.jp