

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：33910

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24380045

研究課題名(和文)産業酵母 *Yarrowia lipolytica* における脂質代謝機構の解明研究課題名(英文) Study on lipid metabolism in the industrial yeast *Yarrowia lipolytica*

研究代表者

太田 明德 (OHTA, Akinori)

中部大学・応用生物学部・教授

研究者番号：30125885

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：n-アルカン資化酵母におけるn-アルカンの初発水酸化以後の経路について以下の新規知見を得た。*Yarrowia lipolytica*の長鎖アルコールの酸化については、8種のデヒドロゲナーゼ遺伝子と1種のオキシダーゼ遺伝子のうち、ADH1、ADH3、FAO1が外部の長鎖アルコールの資化に重要であった。また、4種のアルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子HFD1～HFD4が全て長鎖アルデヒドの酸化に関わっていた。5種の脂肪酸アシルCoAシンテターゼ遺伝子のうち、FAA1とFAT1がn-アルカンと外部脂肪酸の資化に必要であった。これらはn-アルカン資化系遺伝子の多重化と多様化による進化を示している。

研究成果の概要(英文)：We analyzed metabolism of hydrocarbons after initial hydroxylation of n-alkanes in n-alkane-assimilating yeast *Yarrowia lipolytica*. We revealed that genes ADH1, ADH3, and FAO1 are important for oxidation of long chain fatty alcohols, which are the initial hydroxylation products by cytochromes P450Alk, among 8 genes encoding alcohol dehydrogenase and 1 gene encoding alcohol oxidase. Four genes HFD1, HFD2, HFD3, and HFD4 encoding long chain aldehyde dehydrogenase are involved in further oxidation of the oxidised long chain alcohols. In addition, FAA1 and FAT1 that are encoding fatty acyl CoA synthetase are necessary for assimilation of exogenous fatty acids. These results show that the genes that are encoding enzymes in n-alkane metabolism have been multiplied and diversified during adaptive evolution of this yeast.

研究分野：農芸化学

キーワード：n-アルカン資化酵母 *Yarrowia lipolytica* シトクロームP450Alk YAS3 転写制御 酸性リン脂質への結合 脂肪酸アシルCoAシンテターゼ ペルオキシソーム

1. 研究開始当初の背景

産業酵母 *Yarrowia lipolytica* の可能性

本研究で対象とする酵母 *Y. lipolytica* は *n*-アルカンの末端を水酸化して長鎖アルコールに変換し、さらに脂肪酸まで酸化し、そのまま油脂の合成に利用するか、さらに ω 末端酸化あるいは β 酸化系などを経由して様々な物質に代謝する能力を持つ。脂肪酸のみを代謝する微生物とは異なって有用な代謝物を生成する可能性があり、本酵母は産業生物としての魅力を備えている。

Y. lipolytica は *n*-アルカンや脂肪酸などの脂質を唯一の炭素源として生育可能な子囊菌酵母で、実験室酵母とは系統学上近縁でない。油脂など各種炭素源を原料としてクエン酸などを大量に分泌するため、有機酸の工業的生産に利用され、米国 FDA から GRAS (Generally Regarded As Safe) として認定されている。一倍体で生育する本酵母はゲノム塩基配列も解読済みで遺伝子の操作が容易である。申請者研究室は独自に構築した遺伝子操作系を用いて研究を進めている (飯田ら、*Yeast*, 14:1387(1998))。本酵母の研究について申請者らは世界最先端にある。

n-アルカンによる遺伝子発現調節研究の現状と課題

Y. lipolytica を *n*-アルカンの存在下に培養すると、アルカンの末端を酸化するシトクローム P450Alk (P450Alk) をコードする *ALK* 遺伝子が誘導発現される。ゲノム情報から 12 種の *ALK* が同定され、全 *ALK* 遺伝子欠失株を用いた解析 (高井ら (2011)) によれば、*ALK1* と *ALK2* が *n*-アルカンの酸化に特に重要であった。山神らは *n*-アルカンによって最も強く誘導される *ALK1* のプロモーター上の ARE1 (Alkane-Responsive Element 1) に結合する転写活性化因子 Yas1p と Yas2p を同定した (JBC, 279:22183(2004)、*Eukaryot Cell*, 6:734 (2007))。さらに、平川らは転写抑制因子 Yas3p が Yas2p に結合

すること、アルカンの有無によって小胞体と核の間で局在を変えることを報告した (JBC, 284:7126 (2009))。その後、Yas3p がホスファチジン酸 (PA) (小林ら、2009 年酵母遺伝学フォーラム) と、ポリホスホイノシチド (PIPn) に特異的に結合することなどから、*n*-アルカンが小胞体上のこれら脂質シグナル分子を増加させ、Yas3p を小胞体に留めるといふ、調節機構を想定した。

油脂による遺伝子発現調節研究の現状

本酵母は油脂を菌体外に分泌したリパーゼによって分解し、細胞内で代謝する。申請者らは、脂肪酸による遺伝子誘導が、転写活性化因子 Por1p 及び Cfu1p によって行われていることを発見した (Poopanitpan ら、*BBRC*, 402:731 (2010))。これらの調節因子と脂肪酸代謝関連遺伝子群の制御及びパーオキシソームを介する有機酸生産等との関連の分析は本菌における有用な脂肪酸代謝産物生産のために重要と考えられた。

アルカンと脂肪酸の β 酸化系に至る代謝初期過程の違い

n-アルカンの初期酸化過程では、末端の水酸化以降の、長鎖アルデヒドを経て脂肪酸となる 2 段階の反応を担う酵素と遺伝子が不明である。これらの特定は *n*-アルカンや脂肪酸代謝物の利用にも重要であり、本研究が解明すべき課題であった。

また、脂肪酸のアシル-CoA への活性化については古く 2 種の acyl-CoA synthetase (ACS) が報告され、うち 1 つはパーオキシソーム酵素であった (上領ら、*EJB*, 89:321(78))。我々は、*S. cerevisiae* の場合の 6 種に対して、本酵母のゲノムデータ解析から多種の ACS 遺伝子を抽出しており、起源と鎖長を異にする脂肪酸には異なる ACS が働き、それらの代謝過程を制御していると仮定した。このような脂肪酸の初期代謝過程における ACS の細胞内局在と反応特性の違いの解明も、本研究の重要な課題の一つである。

2. 研究の目的

- (1) *Y. lipolytica* のユニークなアルカンによる脂質シグナルの発生の機構と転写調節因子 Yas2p と Yas3p の機能及びそれらのシステム生物学的意義を解明する。
- (2) *n*-アルカンの水酸化以降の酸化に関わる酵素と遺伝子を解明する。
- (3) 各 ACS の起源と長さの違う脂肪酸の代謝との関係を解明する。

3. 研究の方法

(1) *YAS1*, *YAS2*, *YAS3* を介する *n*-アルカンによる制御についての解析

- ① 転写因子 Yas3p の脂質シグナル結合領域等機能領域の決定

YAS3 遺伝子の欠失変異により Yas3p のドメイン解析を行う。脂質結合性はプレート法と BICORE を用いて検証する。

- ② Yas1p, Yas2p, および Yas3p の変異導入による構造解析

主要な因子である Yas2p と Yas3p について変異を導入し、転写活性化に関わる領域を検出し、それらの役割を解析する。

(2) *n*-アルカンの水酸化以降の脂肪酸生成に至る過程の解明

- ① ゲノム情報から長鎖アルコールのデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子が複数存在することが予想されたので、候補遺伝子を抽出し、申請者研究室で成功したポップイン・ポップアウト法により、網羅的に破壊して、長鎖アルコールを炭素源とする生育に関わる遺伝子を探索する。

(3) Acyl-CoA synthetase (ACS) の特性と局在の解析

- ① ACS をコードする遺伝子の破壊による機能の分析

申請者研究室の朴らはゲノムデータベースから ACS 遺伝子を見だし、それぞれの遺伝子破壊株を作製し、それらの機能を推定する。

② ACS の局在の分析

GFP などの蛍光蛋白質との融合蛋白質の細胞内分布から各 ACS の局在部位を推定する。

4. 研究成果

- (1) *Y. lipolytica* のゲノムには、*n*-アルカンの初発酸化を行うと考えられるシトクローム P450 をコードする遺伝子は 12 種 (*ALK1* ~ *ALK12*) が抽出されている。これら全てを遺伝子の破壊によって失った $\Delta alk1-12$ 株は 10~16 炭素の *n*-アルカン炭素源として生育できなかつた。しかしながら、*n*-ドデカンの誘導体である *n*-ドデカノール、*n*-ドデカナル、ドデカン酸を炭素源としては野生株と同等の生育を示した。これらの結果は 12 種の *ALK* 遺伝子が *n*-アルカンの資化に重要であることを示している。*ALK1* プロモーターの活性化は、*n*-ドデカン誘導体の存在下では起きなかつたので、*n*-アルカンそのものが誘導物質であると思われた。(発表論文 14)

- (2) *Y. lipolytica* の *n*-アルカン水酸化酵素シトクローム P450 をコードする *ALK1* の転写はヘテロ二量体形成する helix-loop-helix 型転写活性化因子 Yas1p と Yas2p によって制御されている。これらの転写因子は *ALK1* のプロモータ上の ARE1 配列に特異的に結合する。Opi1p ファミリーの転写因子である Yas3p は Yas2p に結合して *ALK1* の転写を抑制する。グルコースを炭素源として生育させると、Yas3p は核に局在していたが、*n*-アルカン炭素源として生育させると、小胞体に局在した。また、Yas3p はホスファチジン酸 (PA) やホスファチジルイノシトールリン酸 (PIPn) などの酸性リン脂質に特異的に結合した。さらに、ARE1 依存の転写は PA ホスファターゼをコードする *S. cerevisiae* の *PAH1* オルソログ遺伝子破壊株と、PIP ホスファターゼをコ

ードする *S. cerevisiae* の *SAC1* オルソログ遺伝子の不活性化株では上昇した。これらの結果は *Yas3p* の酸性リン脂質への結合が *Yas3p* の小胞体への局在に重要であることを示唆している。(発表論文 10)

- (3) *Y. lipolytica* のゲノムに、長鎖アルデヒドの酸化酵素遺伝子の候補として、4 種 (*HFD1*~*HFD4*) の長鎖アルデヒドデヒドロゲナーゼ (*FALDH*) をコードする遺伝子を見だし、これらが *n*-アルカンの代謝に関わることを示した。すなわち、4 種の *HFD* 遺伝子を全て欠く変異株 ($\Delta hfd1-4$ 株) は 12~18 炭素の *n*-アルカンを炭素源として生育できなかつた。この変異株にどの *HFD* 遺伝子を戻しても生育ができるように回復した。野生型株ではデカン培地で上昇する *FALDH* 活性が $\Delta hfd1-4$ 株では見られなかつた。また、大腸菌でどの *HFD* 遺伝子を発現させても対照に比べて高い *FALDH* 活性が検出された。これらは *HFD* 遺伝子の重複によって長鎖アルデヒドの解毒と資化が効率よく行われていることを示唆する。(発表論文 6)
- (4) *Y. lipolytica* の 8 種のアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子 (*ADH1*~*ADH7* 及び *FADH*) と長鎖アルコールオキシダーゼ (*FAO1*) の働きについて調べた。これら全てを欠失させた変異株 *ALCY02* は、長鎖アルコールによる生育が強く抑制され、グルコース培地における長鎖アルコールに対する感受性が増した。*n*-テトラデカン、*n*-ヘキサデカンを炭素源とする培地では野生株と同様に生育し、*n*-デカン、*n*-ドデカンを炭素源とする培地では生育が低下した。*n*-ドデカン培地では 1-ドデカノールを蓄積し、ドデカン酸の生産が低下した。*ADH1*、*ADH3*、あるいは *FAO1* を *ALCY02* 株に導入して発現させると、長鎖アルコール上における生育が回復した。他の 6 種の

遺伝子ではそのようにならなかつた。

Adh1p と *Adh3p* は細胞質ゾル中に、*Fao1p* はペルオキシソームに局在することが示唆された。これらの結果は、*Adh1p*、*Adh3p*、*Fao1p* が、細胞外からの長鎖アルコールの利用に働くことを示唆する。(発表論文 5)

- (5) *Y. lipolytica* は複数の脂肪酸アシル CoA シンターゼをコードする遺伝子 *FAA1*、*FAT1*、*FAT2*、*FAT3*、*FAT4* を持っている。*FAA1* 遺伝子の欠損変異株は *n*-ヘキサデカンにおける生育が低下した。また *FAT1* 欠損変異株は炭素数 10 から 18 の *n*-アルカンにおける生育が低下した。*FAT2*、*FAT3*、*FAT4* の欠損変異株は *n*-アルカンによる生育に変化を見せなかつた。これらの結果は *FAA1* と *FAT1* の産物が *n*-アルカン由来の脂肪酸の代謝に関わっていることを示している。一方、どの遺伝子の変異株も脂肪酸による生育に異常を示さなかつた。野生株は脂肪酸合成酵素の阻害剤であるセルレニンの存在下でもオレイン酸かオクタデカンが存在すれば生育できる。しかしながら、同じ条件下で *FAA1* 欠損変異株は生育できなかつたので、*FAA1* が長鎖脂肪酸の利用に必須であるとえられた。さらに、*Fat1p* はペルオキシソームに、*Fao1p* は細胞質と膜に存在する証左が得られた。(発表論文 3)
- (6) *Y. lipolytica* の *n*-アルカン初発水酸化に最も重要な役割を果たすシトクローム P450 *Alk1* をコードする遺伝子は *ALK1* である。この遺伝子の高度の発現は転写抑制因子 *Yas3p* の核から細胞質 ER への局在の変化によってもたらされる。*Yas3p* の Trp (360) 及び Cys (361) を Arg に置換すると、この局在の変化が妨げられ、*ALK1* プロモーターの誘導が抑制された。また、259-422 残基を有する *Yas3p* の部分タンパク質は酸性リン脂質には結合しないが、*n*-アルカンによる誘導条件下では ER に結合

して分布した。この部分タンパク質の Trp (360) 及び Cys (361) を Arg に置換した変異型誘導体は ER への局在をしなかった。これらの結果は、Yas3p のこれらの残基は酸性リン脂質への結合を介さないERへの結合に関わることを示唆している。(発表論文 2)

- (7) *Y. lipolytica* の 12 種の CYP52 ファミリーのシトクローム P450 の基質特異性を検討し、これらが 4 つのカテゴリに区別されることを見いだした。Alk1p、Alk2p、Alk9p、Alk10p は *n*-アルカンの水酸化、Alk4p、Alk5p、Alk7p はドデカン酸の ω 末端の水酸化、Alk3p、Alk6p は *n*-アルカンとドデカン酸の水酸化活性があり、Alk8p、Alk11p、Alk12p はこれらの基質についてほとんど活性を示さない。12 種の *ALK* 遺伝子群、及び 4 種の脂肪族アルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子を欠損する変異株のドデカノールあるいはドデカナルを含む培地における生育を調べたところ、*ALK* 遺伝子産物がドデカノールの無毒化とドデカナルの資化に関わることが示された。(発表論文 1)

5. 主な発表論文等 (研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 15 件)

1. R. Iwama, S. Kobayashi, C. Ishimaru, A. Ohta, H. Horiuchi, and R. Fukuda. Functional roles and substrate specificities of twelve cytochromes P450 belonging to CYP52 family in *n*-alkane assimilating yeast *Yarrowia lipolytica*. **Fungal Genet. Biol.**, 91 43-54 (2016) doi: 10.1016/j.fgb.2016.03.007. (査読有)
2. S. Kobayashi, S. Tezaki, H. Horiuchi, R. Fukuda, and A. Ohta. Acidic phospholipid-independent interaction of Yas3p, an Opi1-family transcriptional repressor of *Yarrowia lipolytica*, to the endoplasmic reticulum. **Yeast**, 32 691-701 (2015) doi: 10.1002/yea.3096.

(査読有)

3. Tenagy, J. Park, R. Iwama, S. Kobayashi, A. Ohta, H. Horiuchi, and R. Fukuda. Involvement of acyl-CoA synthetase genes in *n*-alkane assimilation and fatty acid utilization in yeast *Yarrowia lipolytica*. **FEMS Yeast Res.**, 15 (2015) pii: fov031. doi: 10.1093/femsyr/fov031. (査読有)
4. S. Tian, A. Ohta, H. Horiuchi, and R. Fukuda. Evaluation of sterol transport from the endoplasmic reticulum to mitochondria using mitochondrially targeted bacterial sterol acyltransferase in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, 79 1608-1614 (2015) doi: 10.1080/09168451.2015.1058702. (査読有)
5. R. Iwama, S. Kobayashi, A. Ohta, H. Horiuchi, and R. Fukuda. Alcohol dehydrogenases and an alcohol oxidase involved in the assimilation of exogenous fatty alcohols in *Yarrowia lipolytica*. **FEMS Yeast Res.**, 15 (2015) pii: fov014. doi: 10.1093/femsyr/fov014. (査読有)
6. R. Iwama, S. Kobayashi, A. Ohta, H. Horiuchi, and R. Fukuda. Fatty aldehyde dehydrogenase multigene family involved in the assimilation of *n*-alkanes in *Yarrowia lipolytica*. **J. Biol. Chem.**, 289 33275-33286 (2014) doi: 10.1074/jbc.M114.596890. (査読有)
7. S. Kobayashi, A. Mizuike, H. Horiuchi, R. Fukuda, and A. Ohta. Mitochondrially-targeted bacterial phosphatidylethanolamine methyltransferase sustained phosphatidylcholine synthesis of a *Saccharomyces cerevisiae* $\Delta pem1 \Delta pem2$ double mutant without exogenous choline supply. **Biochim. Biophys. Acta**, 1841 1264-1271 (2014) doi: 10.1016/j.bbali.2014.05.003. (査読有)
8. S. Tian, J. Ohtsuka, S. Wang, K. Nagata, M. Tanokura, A. Ohta, H. Horiuchi, and R. Fukuda. Human CTP:phosphoethanolamine cytidyltransferase: enzymatic properties and unequal catalytic roles of CTP-binding motifs in two

- cytidyltransferase domains. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 449 26-31 (2014) doi: 10.1016/j.bbrc.2014.04.131. (査読有)
9. H. Kishino, H. Eguchi, K. Takagi, H. Horiuchi, R. Fukuda, and A. Ohta. Acyl-chain remodeling of dioctanoyl-phosphatidylcholine in *Saccharomyces cerevisiae* mutant defective in *de novo* and salvage phosphatidylcholine synthesis. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 445 289-293 (2014) doi: 10.1016/j.bbrc.2014.01.136. (査読有)
10. S. Kobayashi, K. Hirakawa, H. Horiuchi, R. Fukuda, and A. Ohta. Phosphatidic acid and phosphoinositides facilitate liposome association of Yas3p and potentiate derepression of ARE1 (Alkane-Responsive Element One)-mediated transcription control. **Fungal Genet. Biol.**, 61 100-110 (2013) doi: 10.1016/j.fgb.2013.09.008. (査読有)
11. Y. Sagehashi, H. Horiuchi, R. Fukuda, and A. Ohta. Identification and characterization of a gene encoding an ABC transporter expressed in dicarboxylic acid-producing yeast *Candida maltosa*. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, 77 2502-2504 (2013). doi:10.1271/bbb.130595 (査読有)
12. K. Mori, R. Iwama, S. Kobayashi, H. Horiuchi, R. Fukuda, and A. Ohta. Transcriptional repression by glycerol of genes involved in the assimilation of *n*-alkanes and fatty acids in yeast *Yarrowia lipolytica*. **FEMS Yeast Res.**, 13 233-240 (2013). doi: 10.1111/1567-1364.12025. (査読有)
13. K. Takagi, K. Iwamoto, S. Kobayashi, H. Horiuchi, R. Fukuda, and A. Ohta. Involvement of Golgi-associated retrograde protein complex in the recycling of the putative Dnf aminophospholipid flippases in yeast. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 417 490-494 (2012) doi: 10.1016/j.bbrc.2011.11.147. (査読有)
14. H. Takai, R. Iwama, S. Kobayashi, H. Horiuchi, R. Fukuda, and A. Ohta. Construction and characterization of a *Yarrowia lipolytica* mutant lacking genes encoding cytochromes P450 subfamily 52. **Fungal Genet Biol.**, 49 58-64 (2012). doi: 10.1016/j.fgb.2011.11.003. (査読有)
- [図書] (計 1 件)
1. R. Fukuda and A. Ohta. Utilization of hydrophobic substrate by *Yarrowia lipolytica*. “*Yarrowia lipolytica*-Genetics, Genomics, and Physiology” Microbiology Monographs Vol. 25, Ed. by G. Barth. p. 111-119 Springer. (2013)
6. 研究組織
(1) 研究代表者
太田 明德 (OHTA, Akinori)
中部大学・応用生物学部・教授
研究者番号：30125885
- (2) 研究分担者
堀内 裕之 (HORIUCHI, Hiroyuki)
東京大学・農学生命科学研究科・教授
研究者番号：00209280
- 吉川 博文 (YOSHIKAWA, Hirofumi)
東京農業大学・応用生物科学部・教授
研究者番号：50175676
(2012 年度と 2013 年度の分担者)
- (3) 研究協力者
福田 良一 (FUKUDA, Ryouichi)
東京大学・農学生命科学研究科・助教