

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：33101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07372

研究課題名(和文) 油脂酵母の油脂生産メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of mechanism for lipid production in oleaginous yeast

研究代表者

高久 洋暁 (Takaku, Hiroaki)

新潟薬科大学・応用生命科学部・教授

研究者番号：70350717

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：次世代燃料のバイオディーゼル(BDF)は、主に可食植物油のエステル交換反応により生産されている。可食油脂のBDFの利用は食料と競合するため、しばしば論点となっている。そこで我々は非可食バイオマス由来の糖を資化し、油脂を細胞内に70%以上蓄積できるユニークな油脂酵母*Lipomyces starkeyi*に注目した。

本研究では、*L. starkeyi*の実用化への課題の油脂生産性の向上のため、油脂高蓄積変異株を取得後、野生株と油脂蓄積変異株の遺伝子発現比較解析から油脂生産に關する重要遺伝子を抽出した。その遺伝子を野生株で高発現させることにより油脂生産性の向上を評価した。

研究成果の概要(英文)： Biodiesel, one of next generation fuels, is mainly produced by transesterification of edible vegetable oils. The usage of edible oils as a biodiesel feedstock is often controversial because of the competition with food production. Therefore, we noted the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*, which can convert non-edible biomass-derived carbohydrates to lipid. *L. starkeyi* is an excellent lipid producer that is able to accumulate up to 70% of its biomass as triacylglycerols. However, there are issues of lipid productivity for commercial applications.

In this study, we obtained of *L. starkeyi* mutants accumulating a high level of lipid. We extracted genes related to lipid biosynthesis by comparing gene expression profiles in the wild-type and mutants. The high-level expression of those extracted genes in the wild-type showed the high-level lipid production.

研究分野：応用微生物学

キーワード：油脂酵母 *Lipomyces* 油脂蓄積変異株 遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

近年、バイオディーゼルの主原料である油脂は、バイオ燃料需要増加に伴い、食料との競合が加速化し、油脂の安定供給に問題が生じている。さらに、植物油の増産に伴う森林破壊及び環境破壊問題、再生利用可能資源利用の観点から、微生物を利用した油脂生産が注目されている。油脂生産微生物として、酵母、糸状菌、藻類がよく知られており、それぞれが生産する主要な油脂の成分は、グリセロールの3つの水酸基に脂肪酸がそれぞれエステル結合したトリアシルグリセロール (TAG) である。酵母は植物油と脂肪酸組成が類似している TAG (代替植物油) を生産する。また、糸状菌は健康的価値の高い高度不飽和脂肪酸を有する TAG を生産し、藻類は様々な鎖長の脂肪酸を有する TAG を生産する。生産された油脂は、細胞内においてリン脂質の一重層で TAG を囲んだ脂肪球という形で蓄積される。さらに、油脂の細胞内蓄積含有量に注目すると、酵母が一步秀でており、70%以上の油脂を細胞内に蓄積することができる。このように油脂生産微生物は、油脂合成・分解及び蓄積という学術的及び産業的価値を有するが、これらの研究報告例は、培養工学的な研究に関するものばかりで、油脂合成・分解経路や油脂蓄積機構に関する報告例は少なく、分子レベルで明確にされていない。特に申請者が研究対象としている油脂酵母の特徴的な油脂合成・分解経路や油脂蓄積機構については、遺伝子工学的な技術が確立されていないことも重なり、不明な点が多く残されている。本研究では、細胞内に油脂を70%以上蓄積する非常にユニークな油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* に注目し、油脂生産 (合成・分解・蓄積) のメカニズムを分子レベルで解析し、得られた学術的知見を産業応用に展開するための基盤となる研究を行う。

2. 研究の目的

本研究では、細胞内に油脂を70%以上蓄積する非常にユニークな油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* に注目し、油脂生産 (合成・分解・蓄積) のメカニズムを分子レベルで解析し、得られた学術的知見を産業応用に展開するための基盤となる研究を行う。

3. 研究の方法

(1) 野生株 *L. starkeyi* CBS1807 株に変異源エチルメタンサルホン酸を利用して変異導入した。油脂と水の密度の違いより、油脂高蓄積細胞と油脂低蓄積細胞の密度も同様に異なる。すなわち、この密度の違いを利用することにより、油脂高蓄積細胞と油脂低蓄積細胞の分離が可能になると考え、Percoll を用いた密度勾配遠心法で油脂高蓄積株画分を分取し培養、さらに密度勾配遠心分離という操作を繰り返すことで油脂高蓄積株の濃縮を行った。得られた濃縮画分をプレートに撒き、油脂高蓄積変異候補株としてコロニー単

離を行った。その後、油脂高蓄積変異候補株を50 ml チューブで培養し、油脂染色蛍光試薬 Nile red を利用して、候補株の油脂蓄積をフローサイトメトリーにより解析し、さらに顕微鏡観察で脂肪球の大きさを確認することで油脂高蓄積変異株を選抜した。

(2) 野生株と油脂高蓄積変異株を培養し、経時的に菌体濁度、乾燥菌体重量、細胞数、油脂生産量、残グルコース量を測定した。同時に顕微鏡観察も実施した。

(3) 野生株と油脂高蓄積変異株を培養し、経時的に回収したサンプルから RNA を抽出し、リアルタイム PCR による油脂合成・分解系の発現解析を行った。

(4) スフェロプラスト-PEG 法で *L. starkeyi* 細胞内へ遺伝子を挿入した。スフェロプラスト化に利用する酵素として、スフェロプラスト化効率の高かった Westase を利用した。

4. 研究成果

(1) 油脂高蓄積変異株の取得

油脂高蓄積変異株を取得するために、*L. starkeyi* CBS1807 株に変異原物質エチルメタンサルホン酸を処理して変異を誘発させた変異株群を培養し、Percoll 密度勾配遠心法により、油脂高蓄積画分を分取した。この変異株取得方法は水と油の密度の違いを利用しており、Percoll 試薬に菌体を混合し遠心すると油脂を高蓄積した細胞を上層に分画することができると考えられた。この画分を培養し、Percoll 密度勾配遠心法による分画を繰り返すことにより、油脂高蓄積変異候補株を含むと考えられる画分を獲得した。得られた画分溶液をプレートに撒き、シングルコロニー単離を行い、249 株の油脂高蓄積変異候補株を得た。249 株の油脂生産性について、油脂染色蛍光試薬 Nile red で候補株を染色し、フローサイトメトリーによりその油脂生産性を評価、顕微鏡で直接油脂の生産性を評価の2段階のスクリーニングを実施したところ、野生株と比較して油脂生産性の高い油脂高蓄積変異株 E15, E47, A42 の3株の選抜に成功した。

(2) 野生株と油脂高蓄積変異株の油脂生産性比較

野生株と油脂高蓄積変異株 (E15 株, E47 株, A42 株) を培養し、経時的に細胞濃度、細胞の平均粒子径、残グルコース量、乾燥菌体重量、培地あたりの TAG 量、細胞あたりの TAG 量、TAG 変換率、TAG 含有率を測定及び計算した。細胞濃度は全ての株において培養1日目以降大きな変化がなくなり、一定となった。すなわち、それぞれの菌株の主な増殖期間は培養開始1日目までであった (図 1A)。細胞濃度は E15 株が最も低く、野生株の 0.78 倍であったのに対し、E47 株と A42 株は培養を通して野生株とほぼ同程度の細胞濃度であった。すなわち、E15 株は他の株と比較して、細胞分裂速度が遅い (図 1A)。

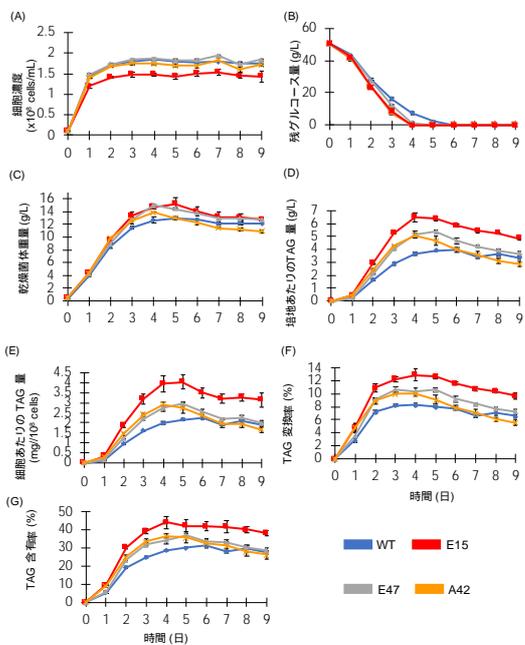


図1 野生株と変異株の油脂生産性の比較

全ての株の細胞の平均粒子径は、培養 0 日目から 5 日目にかけて徐々に大きくなり、それ以降はわずかに小さくなっていった。グルコースの消費については、野生株が培養 6 日目で培地中の全てのグルコースを消費したのに対し、油脂高蓄積変異株 3 株は培養 4 日目で培地中のグルコース濃度が 0 g/L となり野生株よりおよそ 2 日速く培地中の全てのグルコースを消費した (図 1B)。油脂高蓄積変異株 3 株のグルコース消費速度を比較すると、培養 4 日目において、これら 3 株の培地中の残存グルコースはほとんどないが、E15 株および A42 株のグルコース消費速度曲線の傾きは E47 株よりも大きかった (図 1B)。すなわち、E15 株と A42 株のグルコース消費速度は E47 株のグルコース消費速度よりも速く、E47 株よりも数時間前に培地中のグルコースが枯渇したことが予想された。全ての株において、乾燥菌体重量は培養 2 日目までは同程度に増加したが、培養 3 日目以降に油脂高蓄積変異株と野生株の間で差が生じた。E15 株及び E47 株の乾燥菌体重量は、培養 3 日目以降は野生株よりも高い値を示した。一方で A42 株は培養 4 日目までは野生株を上回っていたが、培養 5 日目で野生株と同程度にまで減少し、それ以降も減少が続いた (図 1C)。この油脂高蓄積変異株における乾燥菌体重量の高い値は、以降に述べる TAG 量の増加によるものであると考えられる。培地あたりの TAG 量においては油脂高蓄積変異株 3 株は培養を通して野生株よりも高い値を示し、その中でも E15 株は最も高い TAG 量を示した。最大の TAG 量を示した培養 4 日目においては、E15 株は野生株の 1.8 倍、E47 株及び A42 株は 1.4 倍であった (図 1D)。油脂高蓄積変異株 3 株の TAG 量は培養 5 日目以降は減少傾

向にあるが、これは油脂高蓄積変異株 3 株は培養 4 日目には培地中のグルコースを全て消費し、TAG を生産する炭素源がなく、蓄積した TAG をエネルギー源として生育しているためであると考えられる。その中でも A42 株の TAG 量の減少は顕著であり、培養 9 日目には野生株の TAG 量を下回っている。そのため、A42 株は他の株よりも TAG の分解に関連する遺伝子が高発現していることが予想される。細胞あたりの TAG 量は、特に E15 株は野生株、E47 株、A42 株よりも細胞増殖能力が低下したのにも関わらず、他の油脂高蓄積株を上回っているため、グルコースが生育のためでなく、TAG 合成に優先的に利用されていることが予想される。E47 株及び A42 株における細胞あたりの TAG 量は野生株の 1.4 倍 (培養 4 日目) であり、これは E47 株及び A42 株における培地あたりの TAG 量の野生株に対する増加率と同程度であった。しかし E15 株においては、培地あたりの TAG 量は野生株の 1.8 倍 (培養 4 日目) であったのに対し、細胞あたりの TAG 量は野生株の 2 倍 (培養 4 日目) にまで増加した。培地あたりの TAG 量や細胞あたりの TAG 量と同様に、TAG 変換率および TAG 含有率においても油脂高蓄積変異株 3 株は野生株よりも高い値を示した (図 1D-G)。これらの油脂高蓄積変異株の中でも E15 株は培地あたりの TAG 量、細胞あたりの TAG 量、TAG 変換率、TAG 含有率の項目において、全て最も高い値を示しており、特に油脂蓄積能力が高い株であるということが考えられる。

(3) 油脂合成・分解関連遺伝子の発現解析

油脂の合成・分解は以下の解糖系から DAG が合成されるまでの経路、TAG の合成と分解、アシル CoA 合成 (脂肪酸合成)、ステロールエステルの合成・分解、遊離脂肪酸からアシル CoA 再構成、酸化の 6 つの経路に分けることが可能である。に關与する遺伝子について発現解析を行った。以下には、特に野生株と油脂蓄積変異株の間で大きく発現量が異なったアシル CoA 合成 (脂肪酸合成) について報告する (図 2)。

TCA サイクルで合成されたクエン酸はミトコンドリアから細胞質に放出され、ATP-citrate lyase (Acl1p) によりオキサロ酢酸とアセチル CoA に変換される。オキサロ酢酸はその後リンゴ酸を経て malic enzyme (Mae1p) によりピルビン酸に変換される。この時にピルビン酸と同時に生産される NADPH は、脂肪酸の炭素鎖を伸長させるために fatty acid synthase (Fas1p/Fas2p) に利用されるため、TAG 合成における重要な補酵素である。脂肪酸合成の際には、アセチル CoA が acetyl-CoA carboxylase (Acc1p) によりマロニル CoA に変換される。その後、Fas1p/Fas2p による脂肪酸の伸長が行われる。全ての株において *ACL1*、*ACC1*、*FAS1*、*FAS2* はいずれも培養初期に高発現し、その後は培

養 1 日目を境に減少するという発現様式を示したが、油脂高蓄積変異株における培養 1 日目のこれら遺伝子の発現は野生株よりも高発現していた(図 2)。特に *ACL1* は野生株と油脂高蓄積変異株の発現量の差が最も大きく、E15 株は野生株の 1.4 倍、E47 株及び A42 株は 1.8 倍の発現量であった(図 2)。*ACL1*、*ACC1*、*FAS1*、*FAS2* の高発現はアシル CoA 量の増加に繋がり、ジヒドロキシアセトンリン酸、グリセロール-3-リン酸、リゾホスファチジン酸、DAG へのアシル基の供給体制が強化され、TAG も高蓄積したと考えられる。また野生株、E47 株、A42 株の *ACL1*、*ACC1*、*FAS1*、*FAS2* 発現は、培養 2 日目から 3 日目にかけて少し低下しているが、E15 株の *ACL1*、*ACC1*、*FAS1*、*FAS2* 発現は、逆に上昇していた(図 2)。この発現の違いが、培養 3 日目以降の E15 株と他の油脂高蓄積変異株の TAG 合成能の差に影響している可能性が考えられる。本研究で取得した油脂高蓄積変異株は、脂肪酸合成経路の遺伝子の発現が上昇したことにより、アシル CoA 量の増加に繋がり、アシル基の供給の促進、TAG の高生産へ繋がったと考えることができる。また、野生株の TAG の律速段階は脂肪酸合成経路であったことも予想される。

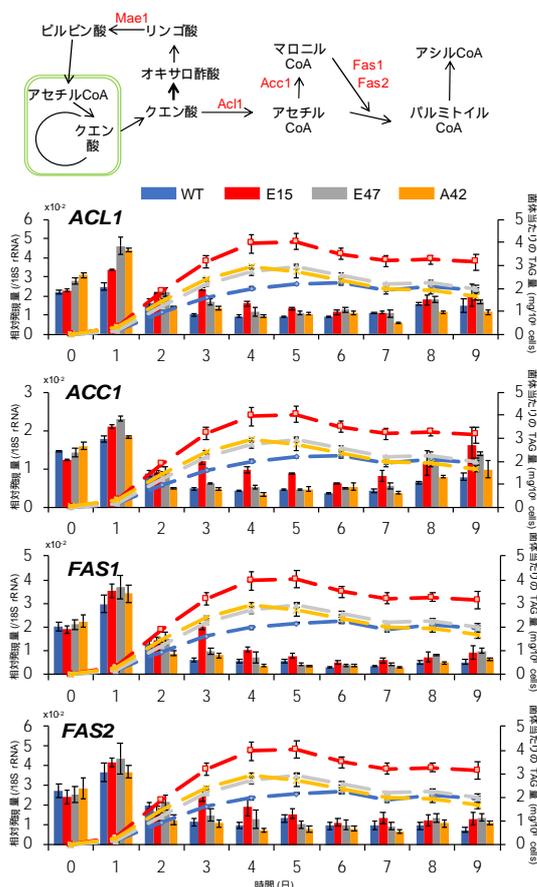


図 2 アシル CoA 合成系の発現様式の比較

(4) 遺伝子導入によるアシル CoA 合成経路の強化

アシル CoA 合成経路の *ACL1*、*ACL2*、*ACC1*

遺伝子を高発現プロモーターに繋いで、*L. starkeyi* で発現させたところ、それぞれの遺伝子単独の高発現株では、油脂生産性は野生株の 1.2-1.3 倍程度しか向上しなかったが、3 つの遺伝子の同時高発現株においては、野生株の 1.9 倍まで油脂生産性が向上した。すなわち、油脂高蓄積変異株の発現解析の結果から得られたアシル CoA 合成経路の遺伝子の上昇は、油脂生産性と深い関係があることが明らかとなった。

(5) 効率的な遺伝子相同組換え

宿主となる *L. starkeyi* のウラシル合成経路の酵素遺伝子 *LsURA3* の破壊株の取得を試みたが、標的部位に選択マーカー遺伝子が挿入されず、染色体上の別の部位に挿入されていることが分かった。細胞内に導入された遺伝子の染色体上への挿入には、DNA 修復機構の DNA 二本鎖切断修復(相同組換え・非相同末端結合)と同様の機構が働くと考えられている。すなわち、*L. starkeyi* の細胞内では、相同組換え(HR)よりも非相同末端結合(NHEJ)の方が主要機構として働いていると考えられた。*L. starkeyi* の NHEJ 経路に関与すると考えられるタンパク質をコードする遺伝子(*LsLIG4*、*LsKU70*、*LsKU80*)を破壊して、遺伝子組換えシステムの宿主とすることを試みた。その結果、 Δ *lslig4* 株の HR 効率は 72.2% を示し、劇的に上昇したことから、遺伝子組換えシステムの宿主として Δ *lslig4* 株が最適であると考えられた。

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 2 件)

Oguro Y., Yamazaki H., Ara S., Shida Y., Ogasawara W., Takagi M. and Takaku H. "Efficient gene targeting in non-homologous end-joining-deficient *Lipomyces starkeyi* strains" *Curr. Genet.* 63(4):751-763, 2017 (査読あり)

高久洋暁、山崎晴文 "油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* における遺伝子組換えシステムの構築とその応用" *オレオサイエンス* 17(3):107-116, 2017 (査読無し)

[学会発表](計 19 件)

小林鈴花、荒学志、山崎晴文、志田洋介、小笠原涉、矢追克郎、荒木秀雄、高久洋暁：油脂生産性向上に向けた油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* の脂質工学的改変；日本農芸化学会 2018 年度大会(名城大学)平成 30 年 3 月
酒井里佳子、荒学志、山崎晴文、志田洋介、小笠原涉、矢追克郎、荒木秀雄、高久洋暁：油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* の油脂低蓄積変異株の取得及びその油脂蓄積性の解析；日本農芸化学会 2018 年度大会(名城大学)平成 30 年 3 月

風間春香, 岡由佳, 小林鈴花, 荒学志, 山崎晴文, 志田洋介, 小笠原涉, 矢追克郎, 森一樹, 油谷幸代, 荒木秀雄, 高久洋暎: 赤色油脂酵母 *Rhodospiridium toruloides* の油脂高蓄積変異株の取得及びその油脂蓄積性の解析; 日本農芸化学会 2018 年度大会 (名城大学) 平成 30 年 3 月

宮島温美, 荒学志, 山崎晴文, 志田洋介, 小笠原涉, 矢追克郎, 荒木秀雄, 高久洋暎: 脂質工学への展開を視野に入れた油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* の簡易的形質転換系の開発; 日本農芸化学会 2018 年度大会 (名城大学) 平成 30 年 3 月

春日琴葉, 海老名紗也佳, 荒学志, 山崎晴文, 志田洋介, 小笠原涉, 矢追克郎, 森一樹, 油谷幸代, 荒木秀雄, 高久洋暎: 油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* の油脂超高蓄積変異株の取得及び油脂蓄積重要遺伝子の同定; 日本農芸化学会 2018 年度大会 (名城大学) 平成 30 年 3 月

小林 鈴花, 海老名紗也佳, 阿部史歩, 山崎晴文, 志田洋介, 小笠原涉, 高久洋暎: 油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* の油脂高蓄積変異株の取得と油脂合成・分解関連重要遺伝子の同定; 日本農芸化学会 2017 年度大会 (京都女子大学) 平成 29 年 3 月

海老名紗也佳, 春日琴葉, 志田洋介, 小笠原涉, 山崎晴文, 高久洋暎: 油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* における油脂高蓄積変異株の育種; 日本農芸化学会 2017 年度大会 (京都女子大学) 平成 29 年 3 月

佐野真那理, 志田洋介, 小笠原涉, 山崎晴文, 高久洋暎: 油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* における脂肪酸の分泌発酵生産; 日本農芸化学会 2017 年度大会 (京都女子大学) 平成 29 年 3 月

Ebina, S., Abe, S., Yamazaki H. and Takaku H.: Isolation of Industrial Oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi* Mutants Accumulating a High Level of Lipid; International Conference on Food for Health in Niigata 2016 (日本・新潟) 平成 28 年 11 月

Kobayashi S., Yamazaki H. and Takaku H.: Expression profile of genes responsible for lipid production in oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi* mutant K13 exhibiting high lipid accumulation; International Conference on Food for Health in Niigata 2016 (日本・新潟) 平成 28 年 11 月

Sano M., Yamazaki H. and Takaku H.: Metabolic engineering of oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi* for over production and secretion of fatty acids from glucose; International Conference on Food for Health in Niigata 2016 (日本・新潟) 平成 28 年 11 月

高久洋暎: 油脂酵母の油脂蓄積能向上へ向けて; 第 6 回合成生物工学シンポジウム (神戸大学) 平成 28 年 7 月

海老名紗也佳, 阿部史歩, 志田洋介, 小笠原涉, 山崎晴文, 高久洋暎: Expression Profile of Genes Responsible for Lipid Production and Degradation on Oleaginous Yeast *Lipomyces starkeyi* mutants Accumulating a High Level of Lipid; 日本農芸化学会 2016 年度大会 (札幌コンベンションセンター) 平成 28 年 3 月

海老名紗也佳, 志田洋介, 小笠原涉, 山崎晴文, 高久洋暎: 産業油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* の油脂高蓄積変異株の取得; バイオマス科学会議 (朱鷺メッセ) 平成 28 年 1 月

小黒芳史, 澤井隆明, 山崎晴文, 志田洋介, 小笠原涉, 高久洋暎: 有用産業油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* における油脂大量生産条件の検討; バイオマス科学会議 (朱鷺メッセ) 平成 28 年 1 月

海老名紗也佳, 阿部史歩, 志田洋介, 小笠原涉, 山崎晴文, 高久洋暎: 密度勾配遠心法を利用した油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* の油脂高蓄積変異株の取得; 日本生物工学会 2016 年度大会 (城山観光ホテル) 平成 27 年 10 月

小黒雅智, 山崎晴文, 志田洋介, 小笠原涉, 高久洋暎: 油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* における油脂低蓄積変異株の油脂合成・分解関連遺伝子の発現解析; 日本生物工学会 2016 年度大会 (城山観光ホテル) 平成 27 年 10 月

小黒芳史, 澤井隆明, 山崎晴文, 志田洋介, 小笠原涉, 高久洋暎: 油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* における油脂高生産培養条件の検討; 日本生物工学会 2016 年度大会 (城山観光ホテル) 平成 27 年 10 月

小黒雅智, 山崎晴文, 志田洋介, 小笠原涉, 高久洋暎: 油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* における油脂低蓄積変異株の油脂合成・分解関連遺伝子の発現解析; 日本生物工学会 2016 年度大会 (城山観光ホテル) 平成 27 年 10 月

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: 油脂高蓄積株、油脂高蓄積株を製造する方法、油脂高蓄積株を用いて油脂を製造する方法、及び、油脂高蓄積株の抽出物
発明者: 高久洋暎, 荒木秀雄, 山崎晴文
権利者: 学校法人 新潟科学技術学園 新潟薬科大学、不二製油グループ本社株式会社
種類: 特許

番号: 特願 2018-034748

出願年月日: 平成 30 年 2 月 28 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高久洋暎 (新潟薬科大学応用生命科学部
・教授)

研究者番号: 70350717