

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：33101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05401

研究課題名（和文）油脂酵母の油脂合成・分解・蓄積機構の解明とその応用

研究課題名（英文）Mechanism analysis for lipid synthesis, degradation, and accumulation and its application in the 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） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* は、様々な糖を資化して、細胞内に油脂を蓄積するユニークで産業価値の高い酵母である。しかしながら、産業化へ向けた応用用途へ活用する油脂酵母の油脂生産の基礎的な知見が少ない。そこで本研究では、油脂蓄積変異株を取得し、油脂蓄積性、油脂生産関連遺伝子の解析を行った。その結果、クエン酸を介したアシルCoA合成経路が油脂生産の鍵となる経路であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

油脂生産メカニズムに関する研究は、飢えの危険にさらされてきた生命が、余分なエネルギーを摂取したときに、それを脂肪の形で蓄積し、飢餓時にはその脂肪を利用して生きのびる現象であり、学術的な意義は高い。また、近年、世界人口の増加による油脂に需要増加は著しく、需要に対する油脂の安定供給や地球環境問題の観点から、廃棄物から油脂生産が可能な微生物による油脂生産メカニズムの解明は社会的意義が高い。

研究成果の概要（英文）：Oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi* is a unique and industrially valuable yeast, which converts various saccharides into lipid. However, there have been few reports about the lipid production of oleaginous yeasts used for applications for industrialization. Therefore, mutants with increased or decreased lipid accumulation were obtained and analyzed the expression of lipid synthesis-related genes in this study. As a result, it was clarified that the citrate-mediated acyl-CoA synthesis pathway plays an important role in lipid synthesis.

研究分野：応用微生物学

キーワード：油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* トリアシルグリセロール 変異株 アシルCoA

1. 研究開始当初の背景

近年、新興国の成長とともにエネルギー、食糧などのあらゆる資源の需要増加に拍車が掛かり、資源争奪戦、資源価格の乱高下を引き起こし、さらに地球温暖化問題への影響も懸念されている。このような状況は、我々の生活に深い関係がある油脂（国内市場 2 兆円/年）についてもあてはまり、今後の油脂の燃料（バイオディーゼル）原料への利用拡大も考慮すると、油脂自給率がわずか 13%しかない日本の安定的な油脂原料の確保は重要な問題である。さらに、需要にあわせた植物油増産に伴う森林破壊及び環境破壊問題、再生利用可能資源の活用の観点から、油糧微生物を利用した油脂生産が注目されている。

これらの背景から、近年、酵母・糸状菌・藻類の油糧微生物の研究が進められている。油糧微生物が生産する油脂の主成分は、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。油脂酵母が生産する TAG の脂肪酸組成は、植物油と非常に類似しており、代替植物油としての期待が高い。また、油糧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。このように油糧微生物は、油脂合成・分解・蓄積の観点において学術的及び産業的価値を有するが、これまでの研究報告例は、培養工学的な研究に関するものが多く、一部の微生物でのみ油脂合成・分解・蓄積機構に関する報告例がある程度で、分子レベルで油脂合成・分解・蓄積機構は明確にされていない。特に本研究対象の油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* の特徴的な油脂合成・分解・蓄積機構については、遺伝子工学的な解析技術が確立されたばかりであることから不明な点が多く残されており、油脂合成・分解・蓄積機構を理解した上での油脂生産性向上が課題である(図1)

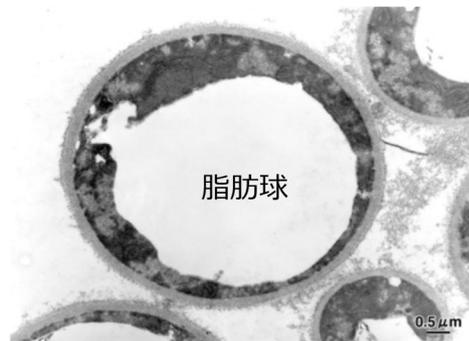


図1 油脂酵母*Lipomyces starkeyi*の脂肪球

2. 研究の目的

本研究では、細胞内に油脂を 70%以上蓄積するユニークな油脂酵母 *L. starkeyi* の油脂生産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知見を下記(1)、(2)を実施して獲得する。

- (1)油脂生産メカニズム解明の糸口となる油脂蓄積変異株を取得し、油脂蓄積性を解析する。
- (2)野生株と油脂蓄積変異株の油脂生産に関連する遺伝子の発現比較解析を行い、油脂生産に重要な遺伝子を同定する。

3. 研究の方法

(1)油脂蓄積変異株の取得及び油脂蓄積性の解析

油脂高蓄積変異株の取得

油脂と水の密度の違いを利用し、油脂高蓄積細胞と油脂低蓄積細胞を密度勾配遠心法で分離する技術を確認していた。油脂の高蓄積に關与する遺伝子情報を得るためには、油脂高蓄積変異株を解析することが効果的である。野生株を変異原 (UV、EMS) で処理後、培養し、上記技術で油脂高蓄積細胞を濃縮した。濃縮画分を固体培地プレートへ撒き、得られたコロニーをランダムにピックアップして、油脂生産性を指標としてスクリーニングを行った。

油脂低蓄積変異株の取得

上記油脂高蓄積変異株の取得の場合と同様に、油脂生産メカニズムに關する遺伝子情報を得るには、油脂低蓄積変異株の解析も効果的であると考えられる。そこで、上記した密度勾配遠心法で分離する技術で、野生株を変異原処理した細胞群の油脂低蓄積細胞を濃縮した。濃縮画分を固体培地プレートに撒き、コロニーを形成させた。その後、コロニーをランダムにつつき、油脂生産性を指標としてスクリーニングを行った。

変異株の油脂蓄積性の解析

スクリーニングを経て取得された油脂高蓄積及び低蓄積変異株の油脂蓄積性の特徴を明らかにするために、変異株を培養し、経時的に細胞濃度、乾燥菌体重量、油脂量、消費糖量を測定し、細胞あたりの対糖油脂収率を算出した。また、形態学的な特徴及び脂肪球の同在を明らかにするために顕微鏡観察も行った。

(2)野生株と油脂蓄積変異株の油脂生産に関連する遺伝子の発現比較解析

L. starkeyi において予想される油脂合成経路の 16 遺伝子のリアルタイム PCR による遺伝子発現解析を行った (図 2)。RNA を抽出後、逆転写反応により、cDNA を合成し、さらにその cDNA をテンプレートとしてリアルタイム PCR で各遺伝子の発現を測定した。相対定量法により各遺伝子発現量を比較定量した。*L. starkeyi* で培養期間をほぼ一定量発現することが確認されている 18S rRNA をリファレンス遺伝子として用いた。

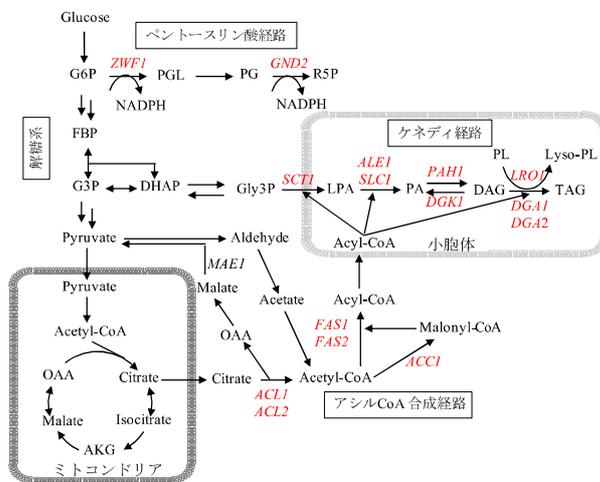


図2 油脂酵母*L. starkeyi*の予想油脂合成経路

4. 研究成果

(1)油脂高蓄積変異株の取得とその油脂蓄積性

UV 及び EMS 処理を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、油脂高蓄積細胞画分を分取した。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、油脂高蓄積変異細胞の濃縮画分を獲得した。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った。その後、候補コロニーを培養し、培養 3 日目の油脂量を定量し、油脂高蓄積変異株 HA1, HA2, HA3 の 3 株を取得した。

野生株と油脂高蓄積変異株 HA1, HA2, HA3 を 30 の条件下で培養し、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 含有率、TAG 変換率を経時的に測定した。細胞の増殖速度は、変異株が野生株に比べて遅延し、さらに最終到達細胞濃度も低下した。油脂の生産性については、最も大きな変化のあった培養開始 4 日目の結果を表 1 に示した。変異株の細胞あたりの TAG 量が野生株に比べて、HA1 は約 2 倍、HA2 は約 4.6 倍、HA3 は約 7.2 倍上昇していたこともあり、変異株の細胞濃度は低下しても、培地あたりの TAG 量は野生株を大きく上回った。特に HA3 の培地あたりの TAG 量は野生株の約 3.8 倍を示した。変異株の TAG 含量、TAG 変換率ともに野生株と比較して上昇しており、HA2, HA3 は、野生株の約 2 倍の TAG 含量、TAG 変換率を示していた。すなわち、取得された HA1, HA2, HA3 の油脂生産性は野生株と比較して大きく向上しており、その向上の程度は特に HA2, HA3 が大きかった。このような油脂生産性の向上の程度の異なる複数の変異株の油脂生産に関連する経路の遺伝子発現解析は有用な情報を与える可能性を有する。

表 1 野生株と油脂高蓄積変異株の油脂生産性 (day4)

株名	細胞あたりのTAG量 (mg/10 ⁸ cells)	培地あたりのTAG量 (g/L)	TAG含有量 (%)	TAG変換率 (%)
野生株	2.4	4.2	33.2	10.3
HA1	4.9	6.9	43.6	13.7
HA2	11.1	14.7	65.0	20.0
HA3	17.2	15.9	64.8	20.9

(2)油脂低蓄積変異株の取得とその油脂蓄積性

油脂高蓄積変異株の取得の場合と同様に、EMS 処理を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、油脂低蓄積細胞画分を分取した。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、油脂低蓄積変異細胞の濃縮画分を獲得した。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った。その後、候補コロニーを培養し、顕微鏡写真の脂肪球の大きさ等を指標として、油脂低蓄積変異株 LA1, LA2 の 2 株を取得した。

野生株と油脂低蓄積変異株 LA1, LA2 を 30 の条件下で培養し、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 含有率、TAG 変換率を経時的に測定した。細胞の増殖速度は、LA2 と野生株は同等であったが、LA1 が野生株に比べて速く、さらに最終到達細胞濃度も高くなった。油脂の生産性については、野生株が培地中のグルコースを全て消費しきった培養開始 7 日目の結果を表 2 に示した。油脂低蓄積変異株 LA1, LA2 の細胞あたりの TAG 量、培地あたりの TAG 量、TAG 含量、TAG 変換率は、野生株よりも低下していた。特に LA2 は油脂生産性を示す全ての項目において、大きく低下していた。以上のように、油脂低蓄積性の程度のことなる油脂低蓄積変異株の取得ができた。

表2 野生株と油脂低蓄積変異株の油脂生産性 (day7)

株名	細胞あたりのTAG量 (mg/10 ⁸ cells)	培地あたりのTAG量 (g/L)	TAG含有量 (%)	TAG変換率 (%)
野生株	3.0	4.7	37.1	8.9
LA1	1.2	2.1	26.3	4.6
LA2	0.4	0.6	11.9	1.6

(3)野生株と油脂蓄積変異株の油脂生産に関連する遺伝子の発現比較解析

図2に示した経路のように細胞内に取り込まれたグルコースは、解糖系を経てピルビン酸に変換される。このピルビン酸はミトコンドリアへ移送され、アセチル CoA、クエン酸へ変換された後、このクエン酸はミトコンドリアから細胞質へ放出され、アシル CoA 合成経路の ATP-クエン酸リアーゼ (ACL)によりオキサロ酢酸とアセチル CoA に変換される。この酵素は一般的な微生物には存在せず、油脂酵母や哺乳類特有の酵素である。細胞質基質内の AcCoA はアセチル CoA カルボキシラーゼ (ACC)によりマロニル CoA(MalCoA)に変換後、さらに脂肪酸合成酵素(FAS)複合体によりパルミトイルアシルキャリア蛋白質(C16:0-ACP)が形成され、伸長、不飽和化のために小胞体へ移送される。また、アシル鎖の伸長に必要な補酵素 NADPH はペントースリン酸経路で合成された NADPH が供給されている。

TAG 形成のため、アシル CoA 合成経路で合成された 3 分子のアシル CoA が 1 分子の G3P にケネディ経路を介して結合する。はじめに G3P は G3P アシルトランスフェラーゼ (SCT1)にアシル化され、リゾホスファチジン酸 (LPA)へ変換され、次に LPA アシルトランスフェラーゼ (SLC1)が作用し、アシル化し、ホスファチジン酸(PA)へ変換される。PA は PA ホスファターゼ (PAP)により脱リン酸化され、ジアシルグリセロール (DAG) となり、その後アシル基の供与体として Acyl-CoA を利用する DAG アシルトランスフェラーゼ (DGA1, DGA2)によるアシル化により TAG が合成される。また、DAG のアシル化には、グリセロリン脂質がアシル基の供与体となるリン脂質 DAG アシルトランスフェラーゼ (LRO)による反応もある。

野生株と油脂高蓄積変異株において、上記した TAG 合成に重要であると考えられるアシル CoA 合成経路、ケネディ経路、ペントースリン酸経路に関する遺伝子の発現比較を行った。その結果、培養開始 1, 3 日目において、油脂高蓄積変異株のアシル CoA 合成経路に関する全ての遺伝子 (*ACL1*, *ACL2*, *ACC1*, *FAS1*, *FAS2*)の発現が、野生株よりも向上していた。さらにそれらの遺伝子の発現の向上は、特に油脂生産性が大きかった HA2, HA3 で飛躍的に向上していた(図 3A)。また、油脂低蓄積変異株 LA1, LA2 のアシル CoA 合成経路に関する全ての遺伝子の発現は、野生株と比較して、低下していた。以上のことから、のアシル CoA 合成経路に関する遺伝子の発現と油脂生産性に強い関連性があることが明らかとなった。

油脂高蓄積変異株のケネディ経路の遺伝子 *SCT1*, *SLC1*, *PAH1*, *DGA1*, *DGA2* のいずれかの遺伝子の発現が、野生株と比較して向上していた。このなかで、油脂生産性の向上と関連性が深いのは、*SLC*, *DGA1*であった(図 3B)。また、ペントースリン酸経路の *ZWF1*, *GND2* の発現解析をしたところ、油脂高蓄積変異株の各遺伝子の発現は野生株と比較して、向上していた(図 3C)。すなわち、アシル鎖伸長に供給される NADPH にはペントースリン酸経路が貢献していると考えられた。

以上、野生株と油脂蓄積変異株の遺伝子発現比較解析から、クエン酸を介したアシル CoA 合成経路の遺伝子の発現様式と油脂生産性に大きな相関があり、クエン酸を介したアシル CoA 合成経路が油脂生産の鍵となる経路であることが明らかとなった。

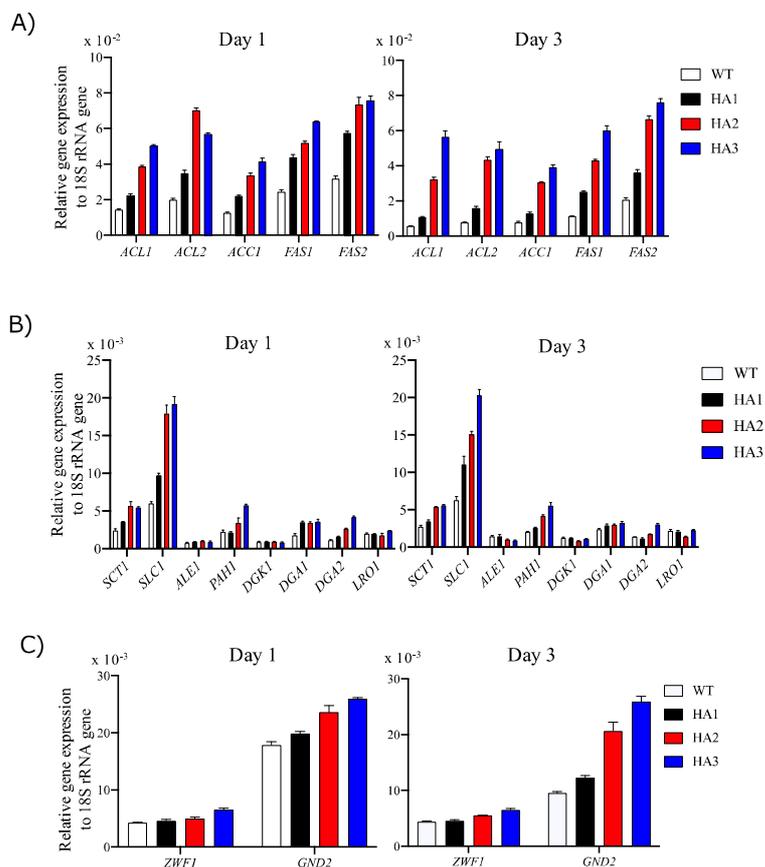


図3 野生株と油脂高蓄積変異株の遺伝子発現比較
A)アシルCoA合成経路、B)ケネディ経路、C)ペントースリン酸経路

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takaku Hiroaki, Miyajima Atsumi, Kazama Haruka, Sato Rikako, Ara Satoshi, Matsuzawa Tomohiko, Yaoi Katsuro, Araki Hideo, Shida Yosuke, Ogasawara Wataru, Yamazaki Harutake	4. 巻 169
2. 論文標題 A novel electroporation procedure for highly efficient transformation of <i>Lipomyces starkeyi</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Microbiological Methods	6. 最初と最後の頁 105816 ~ 105816
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.mimet.2019.105816	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamazaki Harutake, Kobayashi Suzuka, Ebina Sayaka, Abe Shiho, Ara Satoshi, Shida Yosuke, Ogasawara Wataru, Yaoi Katsuro, Araki Hideo, Takaku Hiroaki	4. 巻 103
2. 論文標題 Highly selective isolation and characterization of <i>Lipomyces starkeyi</i> mutants with increased production of triacylglycerol	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Applied Microbiology and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 6297 ~ 6308
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00253-019-09936-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takaku Hiroaki, Ebina Sayaka, Kasuga Kotoha, Sato Rikako, Ara Satoshi, Kazama Haruka, Matsuzawa Tomohiko, Yaoi Katsuro, Araki Hideo, Shida Yosuke, Ogasawara Wataru, Ishiya Koji, Aburatani Sachiyo, Yamazaki Harutake	4. 巻 131
2. 論文標題 Isolation and characterization of <i>Lipomyces starkeyi</i> mutants with greatly increased lipid productivity following UV irradiation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 613 ~ 621
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiosc.2021.01.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 5件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 寺澤 大輝、白井 智量、松田 史夫、油谷 幸代、荒 学志、山崎 晴丈、志田 洋介、小笠原 涉、矢追 克郎、荒木 秀雄、高久 洋暁
2. 発表標題 フラックスバランス解析を活用した油脂酵母の油脂生産性の改良
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 風間 春香、森 一樹、油谷 幸代、荒 学志、山崎 晴丈、志田 洋介、小笠原 涉、矢追 克郎、荒木 秀雄、田代 康介、高久 洋暁
2. 発表標題 比較ゲノム解析による油脂酵母Lipomyces starkeyiの新規油脂蓄積制御因子の同定とその機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 庭山 ひかる、油谷 幸代、荒 学志、山崎 晴丈、志田 洋介、小笠原 涉、矢追 克郎、荒木 秀雄、高久 洋暁
2. 発表標題 情報科学を活用した油脂酵母Lipomyces starkeyiの新規油脂生産制御因子の獲得
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤 里佳子、山田 日向子、森 一樹、油谷 幸代、荒 学志、山崎 晴丈、志田 洋介、小笠原 涉、矢追 克郎、荒木 秀雄、田代 康介、高久 洋暁
2. 発表標題 比較ゲノム解析による油脂酵母 Lipomyces starkeyiの油脂低蓄積原因遺伝子の同定
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山本 大雅、荒 学志、山崎 晴丈、志田 洋介、小笠原 涉、矢追 克郎、荒木 秀雄、高久 洋暁
2. 発表標題 油脂酵母Lipomyces starkeyiのトリアシルグリセロール分解酵素の機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高久 洋暁、山崎 晴丈、小笠原 渉、矢追 克郎、荒木 秀雄、荒木 通啓、油谷 幸代
2. 発表標題 機能性油脂生産へ向けた情報科学を利用した油脂酵母の改良
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高久洋暁
2. 発表標題 機能性油脂生産へ向けた油脂酵母の改良
3. 学会等名 モノづくり日本会議 第20回新産業技術促進技術検討会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高久洋暁
2. 発表標題 油脂酵母を肥満へと導くスマートな戦略とは？
3. 学会等名 第22回 酵母合同シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高久洋暁
2. 発表標題 油脂生産性の飛躍的向上を目指した油脂酵母の改良
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 風間 春香、小林 鈴花、荒 学志、山崎 晴丈、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 洋暁
2. 発表標題 遺伝子発現解析による油脂酵母の油脂高蓄積重要遺伝子の同定
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 荒 学志、小林 鈴花、山崎 晴丈、吉田 崇伸、志田 洋介、小笠原 涉、矢追 克郎、荒木 秀雄、蓮沼 誠久、高久 洋暁
2. 発表標題 油脂酵母 <i>Lipomyces starkeyi</i> のアシルCoA合成酵素の高発現による油脂生産性の向上
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林 彩子、小林 鈴花、荒 学志、山崎 晴丈、吉田 崇伸、志田 洋介、小笠原 涉、矢追 克郎、荒木 秀雄、蓮沼 誠久、高久 洋暁
2. 発表標題 油脂酵母 <i>Lipomyces starkeyi</i> の中性脂質合成酵素の高発現による油脂生産性の向上
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 酒井 里佳子、阿部 紗也、荒 学志、山崎 晴丈、志田 洋介、小笠原 涉、矢追 克郎、森 一樹、油谷 幸代、荒木 秀雄、田代 康介、高久 洋暁
2. 発表標題 油脂低蓄積変異株の原因遺伝子の同定と解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高久 洋暁、油谷 幸代、荒木 秀雄、正木 和夫、家藤 治幸、長沼 孝文、山崎 晴丈、高木 正道
2. 発表標題 産業利用を目指した油脂酵母の油脂生産機構の解明とその応用
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 高久洋暁、荒木秀雄、小笠原渉、田代康介、蓮沼誠久、油谷幸代、矢追克郎	4. 発行年 2018年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 230
3. 書名 スマートセルインダストリー -微生物細胞を用いた物質生産の展望-	

〔産業財産権〕

〔その他〕

新潟薬科大学 応用生命科学部 応用微生物・遺伝子工学研究室ホームページ http://www2.nupals.ac.jp/~oubi/index.html
--

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------