

令和 4 年 5 月 11 日現在

機関番号：23303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05796

研究課題名（和文）テルペノイドと油脂を高生産する海藻（褐藻）バイオリファイナリー

研究課題名（英文）Construction of the brown macroalgae-based biorefinery system for the high production of terpenoid and lipids

研究代表者

河井 重幸（Kawai, Shigeyuki）

石川県立大学・生物資源環境学部・教授

研究者番号：00303909

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、油糧酵母（*Yarrowia lipolytica*: Yli酵母）のテルペノイド合成系を強化（*ylacs1*、*ylHmg1*、*ylAcl1*各遺伝子の強発現）するため、これらの発現用プラスミドをGolden Gate法で構築した。またYli酵母（親株）へDEH資化能を付与し、アルギン酸分解物DEHを調製する最適条件（アルギン酸リアーゼの最適濃度等）を明らかにした。また、本研究で構築したDEH資化能を示すYli酵母を用いてグルコースとDEHの各々から油脂を生産し、油脂組成の定量分析をGC-MSで行った。グルコース由来油脂よりもDEH由来油脂の生産量は低かった。両者の組成は類似していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

海藻（褐藻）資源は、広大な管轄水域を有する日本で豊富に得られる有望な資源だが、その利用には微生物への褐藻主要成分アルギン酸（DEH）資化能の付与等による、海藻（褐藻）バイオリファイナリー技術（微生物の利活用により褐藻から有用成分を生産する技術）の開発が鍵となる。本研究では、はじめて海藻資源（アルギン酸由来のDEH）からの油脂の生産に成功し、持続可能な新しい同技術開発の重要な基盤となる成果を得た。

研究成果の概要（英文）：In this study, the plasmid for the expression of *ylacs1*, *ylHmg1*, and *ylAcl1* was constructed to improve the biosynthetic pathway of terpenoid in *Yarrowia lipolytica*. Moreover, the capacity to utilize DEH was conferred on *Y. lipolytica*, resulting in YliDEH+ strain. The condition to produce DEH from sodium alginate was optimized e.g. through optimizing the amounts of endo- and exo-type alginate lyases. Lipids were produced from each glucose and DEH by using the YliDEH+ strain and analyzed by GC-MS. Composition of the lipid from DEH was similar to that from glucose. The amount of the former was lower than that of the latter.

研究分野：応用微生物学

キーワード：酵母 テルペノイド 褐藻 海藻 アルギン酸 油脂 アルギン酸リアーゼ DEH

## 1. 研究開始当初の背景

テルペノイド(植物二次代謝産物)や油脂(バイオディーゼル燃料やバイオジェット燃料の原料)の供給源を、植物のみに依存し続けることは困難である。解決策の一つは、多様かつ豊富な炭素源から微生物発酵によりテルペノイドや油脂を高生産するバイオリファイナリー技術の開発である。海藻(特に褐藻)は、耕地は狭いが広大な管轄水域を有する日本で豊富に得られる有望な炭素源資源である。しかし褐藻の主要成分アルギン酸が難利用性であり、褐藻利用の妨げとなっていた。アルギン酸からテルペノイドや油脂を高生産できるバイオリファイナリー技術の開発が求められていた。

## 2. 研究の目的

本研究では、テルペノイドとしてバレリアノールを選定した(図1)。本研究の目的は、油脂蓄積酵母 *Yarrowia lipolytica* (Yli) 酵母にアルギン酸資化能を付与し、アルギン酸からテルペノイド(バレリアノール)と油脂の各々を高生産する Yli 酵母を構築することである。その過程で、テルペノイド合成系の鍵酵素 HMG-CoA レダクターゼの活性制御機序の一端も明らかにする。具体的には、(1)HMG-CoA レダクターゼのリン酸化による活性制御機序の解明とテルペノイド(バレリアノール)高生産 Yli 酵母の構築、(2)アルギン酸と硝酸塩からテルペノイド(バレリアノール)と油脂を高生産する Yli 酵母(次頁 図2)の構築である。

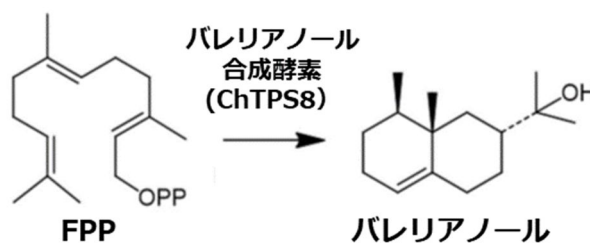


図1 バレリアノールの合成反応

## 3. 研究の方法

(1) HMG-CoA レダクターゼのリン酸化による活性制御機序の解明とテルペノイド(バレリアノール)高生産 Yli 酵母の構築

分裂酵母では、HMG-CoA レダクターゼ(Hmg1)は、Sty1によりリン酸化されて酵素活性が低下し、Sds23 遺伝子欠損株では恒常的に脱リン酸化され、低グルコースシグナル等によりリン酸化される。同 Hmg1 のリン酸化部位(Ser-1024 と Thr-1028)は Yli 酵母 Hmg1 (yIHmg1: 図2)にも保存されている(Ser-973 と Thr-977)。そこで本研究では、まずは yIHmg1 の推定リン酸化部位を Ala 残基に置換してリン酸化されないと予想される yIHmg1 をバレリアノール生産 Yli 株で発現させ、バレリアノール前駆体のメバロン酸の生産量を測定した。もし、Ala 残基に置換した yIHmg1 を発現させた Yli 株のメバロン酸生産量が増大すれば、リン酸化により Hmg1 が活性を抑制されることが示唆されると期待され、さらにバレリアノール高生産 Yli 酵母の構築にもつながると期待された。

油脂合成系の弱化によるテルペノイド(バレリアノール)高生産 Yli 酵母の構築は以下の方法で行った。アセチル CoA からの油脂合成の最初の反応を触媒するアセチル CoA カルボキシラーゼ(Yli 酵母では yIAcc1)遺伝子の破壊による、油脂合成系の遮断は不可能である(破壊は致死性のため)。そこで油脂合成系の弱化のために、ゲノム編集技術を応用した STEPS (Systematically Test Enzyme Perturbation) 法を適用した。同法は、DNA への結合能は保持しているがヌクレアーゼ活性を欠失した dCas9 と転写抑制因子(Mxi1)の融合タンパク質(dCas9-

Mxi1)を対象細胞内で発現させ、ターゲット遺伝子上流の各点(-10 bp~-1,000 bp)に結合させ、その転写抑制を微調整する技術である。本研究では、バレリアノール高生産 Yli 酵母の yIAcc1 遺伝子上流域各点に dCas9-Mxi1 を結合させ、yIAcc1 遺伝子の転写抑制を微調整して油脂合成系を適度に弱化させることでテルペノイド合成系を強化し、グルコースからのバレリアノールの生産量を最大にすることを試みた。

(2) アルギン酸と硝酸塩からテルペノイド(バレリアノール)と油脂を高生産する Yli 酵母の構築

パン酵母への DEH 資化能付与の方法に基づき、コドンをも Yli 酵母型に最適化した 4 遺伝子( DEH 輸送体 [yIDHT1]、DEH レダクターゼ [yIA1-R']、KDG キナーゼ [yIleda]、KDPG アルドラーゼ [yIleda] 各遺伝子: 図 2) を Yli 酵母のゲノム DNA の特定の領域にゲノム編集技術により導入し、DEH 資化能を付与した Yli 酵母を構築した。ゲノム編集技術には pHR-XXX-hrGFP と pCRISPRyI シリーズのプラスミドを用いた。

エンド型アルギン酸リアーゼ A1-1 とエキソ型アルギン酸リアーゼ Atu3025 は大腸菌を宿主として発現させ、TALON アフィニティークロマトグラフィーで精製した。KdgF は遺伝子を人工合成し、発現ベクターにクローニング後、同様に発現させ精製した。酵素は全て、既報に基づき酵素活性を測定した。

4. 研究成果

(1) HMG-CoA レダクターゼのリン酸化による活性制御機序の解明とテルペノイド(バレリアノール)高生産 Yli 酵母の構築

Yli 酵母にバレリアノール合成酵素遺伝子(コドンをも最適化した yIChTPS8 遺伝子: 図 1) を導入し、バレリアノール生産 Yli 酵母を構築した。GC-MS により、バレリアノールの定性的な生産を確認した。Yli 酵母 Hmg1 の推定リン酸化部位(Ser-973 と Thr-977) を各々Ala に置換した Hmg1\_TA (Ala 置換により細胞内でリン酸化されなくなると予想)ならびに Yli 酵母 Hmg1 を発現させるプラスミドを構築し、これらをコントロール(ベクター)とともにバレリアノール生産 Yli 酵母に導入した。両者の生産するメバロン酸(バレリアノール合成の前駆体)を HPLC で定量することで、これらの Ala 置換が Hmg1 活性に及ぼす効果を検証した。その結果、コントロールと比較して、Hmg1\_TA 導入株のメバロン酸量は増加していなかった(むしろ 2 割ほど低下していた)。すなわち、Ala 置換には効果が無いことが分かった。

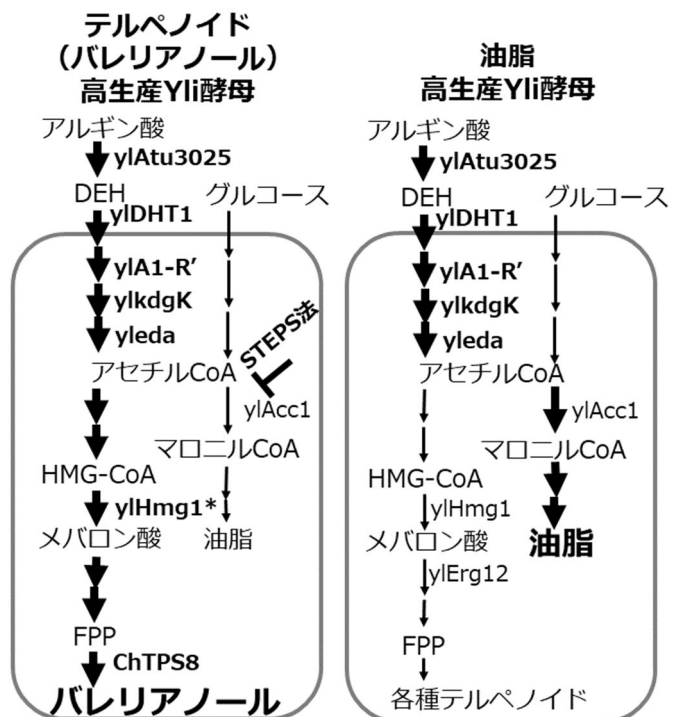


図2 本研究で構築するYli酵母: 代謝図は略図。導入して強発現させる遺伝子(太字)。yIHmg1\*: 恒常的リン酸化yIHmg1。DEH資化能は本研究で付与。

油脂合成経路の弱化による方法でもバレリアノールの高生産を試みるため、ターゲット遺伝

子(Yli 酵母では yIAcc1)の上流域(-550, -442, -135, -10の各々)をターゲットとする STEPS 法のプラスミドを構築し、これらをコントロール(ベクター)とともに上記バレリアノール生産 Yli 酵母に導入した。これらの生産するメバロン酸を HPLC で定量したが、コントロールと比較して、STEPS 法によりメバロン酸量は増加していなかった。すなわち、今回の STEPS 法ではバレリアノールの増量には至らなかった。

そこで、別の方法つまりバレリアノール前駆体合成系の強化(yIacs1、yIHmg1、yIAcl1 各遺伝子の強発現)を試みるため、これらの発現用プラスミドを Golden Gate 法で構築した。構築したプラスミドは、今後のテルペノイド高生産 Yli 酵母の育種に寄与すると期待された。

## (2) アルギン酸と硝酸塩からテルペノイド(バレリアノール)と油脂を高生産する Yli 酵母の構築

コドン Yli 酵母型に最適化した 4 遺伝子を Yli 酵母に導入完了し、導入株の DEH(アルギン酸分解物)での生育と油脂の定性的な蓄積を GC-MS により確認した。蛍光試薬 Bodipy493/503 を用いた油脂蓄積の可視化も実施した。なお、DEH 培地での植えつぎを介した適応進化による DEH 資化能の向上には至らなかった。

アルギン酸からの DEH 調製の最適条件を明らかにした。すなわち、大腸菌を宿主として発現させて精製した、エンド型アルギン酸リアーゼとエキソ型アルギン酸リアーゼの添加最適量を決定した。さらに、両リアーゼの作用で精製する不飽和ウロン酸単糖から DEH への変換が低 pH で促進されるか、および酵素 KdgF で促進されるかを調べたが、ともに促進されないことを明らかにした。

本研究で構築した DEH 資化能を示す Yli 酵母を用いてグルコースと DEH の各々から油脂を生産し、油脂組成の定量分析を GC-MS を用いて行った。その結果、DEH からの油脂生産量はグルコースからの生産量と比べて低いことが分かったものの、確かに DEH からの油脂の生産を確認した。DEH から生産された油脂とグルコースから生産された油脂の組成は類似していた。生産された油脂は、パルミトレイン酸、パルミチン酸、リノール酸、オレイン酸、ステアリン酸を含んでおり、大豆油の組成と類似していた。DEH からのバレリアノール生産の確認には至らなかった。

アルギン酸から油脂を生産すべく、エキソ型アルギン酸リアーゼ Atu3025 遺伝子を Yli 型に最適化し、Yli 酵母で分泌発現させるべく発現プラスミドの構築を試みたが、配列の困難さもあり、構築には至らなかった。また硝酸塩利用能の付与にも至らなかったものの、DEH と常温常圧で反応しない窒素源の中から最適な窒素源の探索を行い、プロリン、イソロイシン、グルタミン酸、ロイシン、バリン等が最適な窒素源であることを見いだした。DEH 資化能を付与したパン酵母ではアスパラギンは良好な窒素源であったが、同 Yli 酵母ではアスパラギンは窒素源として機能しなかった。尿酸が DEH と常温常圧で反応しないことも見いだしたが、尿酸は良好な窒素源として機能しなかった。

本研究により、褐藻の主要成分であるアルギン酸から調製した DEH からの初めての油脂の生産に成功した。アルギン酸からの DEH 調製の詳細な最適条件および最適な窒素源も明らかにすることができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Shigeyuki Kawai & Wataru Hashimoto	4. 巻 27:338
2. 論文標題 4-Deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronate (DEH) and DEH reductase: Key molecule and enzyme for the metabolism and utilization of alginate	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules27020338	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hideki Tanaka, Kousaku Murata, Wataru Hashimoto & Shigeyuki Kawai	4. 巻 15(11):e0242054
2. 論文標題 Hsp104-dependent ability to assimilate mannitol and sorbitol conferred by a truncated Cyc8 with a C-terminal polyglutamine in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PloS one	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0242054	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shota Nakata, Mamoru Hio, Ryuichi Takase, Shigeyuki Kawai, Daisuke Watanabe & Wataru Hashimoto	4. 巻 526(4)
2. 論文標題 Polyunsaturated fatty acids-enriched lipid from reduced sugar alcohol mannitol by marine yeast <i>Rhodospiridiobolus fluvialis</i> Y2	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 1138-1142
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.04.032	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 河井重幸、橋本 渉	4. 巻 78(5)
2. 論文標題 褐藻の主要多糖類アルギン酸の分解物が示す特定アミノ基との反応性	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 バイオサイエンスとインダストリー	6. 最初と最後の頁 396-397
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shota Nakata, Kousaku Murata, Wataru Hashimoto & Shigeyuki Kawai	4. 巻 9:17147
2. 論文標題 Uncovering the reactive nature of 4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronate for the utilization of alginate, a promising marine biopolymer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-53597-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件(うち招待講演 1件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 森 大輔, 橋本 涉, 河井 重幸
2. 発表標題 代謝改変した油糧酵母 <i>Yarrowia lipolytica</i> によるブルーカーボンアルギン酸からの油脂生産
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中田 翔太, 高瀬 隆一, 河井 重幸, 渡辺 大輔, 橋本 涉
2. 発表標題 海洋酵母と細菌の共生による海藻多糖アルギン酸の利用
3. 学会等名 日本農芸化学会 2021年度西日本・中四国・関西中部支部合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 河井 重幸
2. 発表標題 酵母を用いた「海から陸」への炭素循環へ向けて～アルギン酸モノマー(DEH)の代謝と反応性～
3. 学会等名 第87回酵母研究会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shigeyuki Kawai, Shota Nakata, Wataru Hashimoto & Kousaku Murata
2. 発表標題 Uncovering the crucial property of 4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronate for the utilization of alginate, a promising marine biomass
3. 学会等名 29th International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中田 翔太, 日尾 守, 高瀬 隆一, 河井 重幸, 渡辺 大輔, 橋本 涉
2. 発表標題 海洋由来酵母による褐藻類主要成分マンニトールからの油脂生産
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

石川県立大学 > 教員情報 > 河井 重幸 <a href="https://www.ishikawa-pu.ac.jp/staff/staffname/kawai-shigeyuki/">https://www.ishikawa-pu.ac.jp/staff/staffname/kawai-shigeyuki/</a>
--

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
研究分担者	橋本 涉  (Hashimoto Wataru)  (30273519)	京都大学・農学研究科・教授    (14301)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	三沢 典彦  (Misawa Norihiko)  (30393466)	石川県立大学・生物資源環境学部・教授     (23303)	

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