

石油資源に依存しない化成品原料としてのリシノール酸の分裂酵母による高効率分泌生産技術開発

植村 浩
(産業技術総合研究所)

研究の目的

リシノール酸(RA, C18:1-OH)は水酸基を含有する特殊な脂肪酸であり、石油資源に依存しないウレタン等の原料として、グリーンイノベーション・地球温暖化防止の観点から注目されている。従来、RAは一年生のトウゴマから搾油したひまし油を原料とするが、有毒タンパク質であるリシンを副生すること、広大な作付け面積を必要とすることなど問題点が多く、新たなRAの供給源が求められているが未解決である。そこで学問的な蓄積の多いモデル生物で、RAの前駆体であるオレイン酸の含量が80%以上と他の生物と比べて格段に高い分裂酵母でRAを高効率に分泌生産する生産系の確立を目標とした研究を行った。

方法

分裂酵母 *S. pombe* 株 ARC010-1 (*h⁻leu1-32 ura4-D18*) を使用した。オレイン酸をリシノール酸に変換するヒドロキシラーゼ遺伝子(*CpFAH12*)はチアミンの存在(15 μM)で抑制にかかる *nmt1* プロモーター下で発現させ分裂酵母の染色体に組み込んだ。³⁾ 分裂酵母の培養にはEMMS培地を用いた。但しRA生産には窒素源(塩化アンモニウム)を0.1%に減らし、炭素源(グルコース)を10%に増加した培地(EMM-C/N3)を用いた。脂肪酸の分析にはガスクロマトグラフィーを用い、¹⁾ 脂質クラス分析には薄相クロマトグラフィー(TLC: silica gel 60 plate, Merck)を用いた。³⁾

結果

plg7 の強発現による遊離RAの細胞外への分泌生産⁴⁾

RAはオレイン酸の12位にOH基を持つ特殊な脂肪酸で、石油化学製品の代替材料として注目されている。我々はオレイン酸含量の高い分裂酵母にオレイン酸にOH基を付加するΔ12-hydroxylase 遺伝子(*FAH12*)を導入し、酵母の全脂肪酸の50%を超えるRAの合成に成功した。¹⁾ しかしRA生産が宿主に毒性を示し、RA生産株の増殖が阻害された。そこで宿主の増殖阻害の改善を目的に分裂酵母cDNAライブラリーをスクリーニングし、増殖阻害を解除する遺伝子としてフォスホリパーゼA2をコードする *plg7* を見いだした。*plg7* を導入した株ではRA生産量は減少せずに、増殖はRA非生産株に近いレベルまで回復した。脂質の解析から *Plg7p* を強発現した株ではリン脂質内のRA量がコントロール株に比べて減少し、遊離のRA量が増加していた。この結果より、*FAH12* はリン脂質のsn-2位のオレイン酸を水酸化する事が知られているが、*plg7* はこの位置の脂肪酸をリン脂質から切り離す活性を持つため、この作用によりRAをリン脂質から除去し、生体膜の機能阻害を解除して増殖を回復したと考えた。³⁾ 更に *plg7* の機能解析を進めたところ、*FAH12* の活性は低温で強くなるが、RA生産量を増加させた低温条件下で *plg7* を強発現させると遊離型のRAが高効率で細胞外へ分泌される事を見いだした。*plg7* を強発現させていない場合に比べて全体のRA生産量も上がり、その約半分量のRAが分泌されていた。⁴⁾ これにより、RAを遊離脂肪酸として細胞外へ分泌生産できる可能性が示された。

ptl2 遺伝子の強発現によるRA生産に伴う増殖阻害の抑制⁵⁾

宿主のRA耐性能の更なる増加を目的に *plg7* 以外の新たな耐性遺伝子の分離を試みた。*plg7* はフォスホリパーゼA2をコードするため、他のフォスホリパーゼ遺伝子にも同様の活性があるかを検討したが、増殖を回復させる遺伝子は見つからなかった。そこでリン脂質と中性脂質(TG)は代謝及び脂肪酸のリモデリングの両観点で密接に結び付いているため、TGリパ

一ゼの強発現の RA 生産に及ぼす影響を解析した。その結果、分裂酵母は配列の類似した 3 種の TG リパーゼ遺伝子 *ptl1*、*ptl2*、*ptl3* のうち²⁾、*ptl2* にのみ耐性能が見られた。*ptl2* による増殖の回復は *plg7* 破壊株でも観察されたため、*ptl2* は *plg7* とは独立の活性を持つと考えられる。脂質の解析から Ptl2p を強発現した株ではリン脂質内の RA 量がコントロール株に比べて減少し、遊離の RA 量が増加していた。更に *ptl2* による増殖の回復がフォスホリパーゼ A2 特異的な阻害剤の添加により低下した事を考え合わせて、Ptl2p は TG リパーゼ活性に加えてフォスホリパーゼ活性を持つことが示唆され、その高発現により *plg7* と同様にリシノール酸を遊離脂肪酸として細胞外へ分泌生産する事も確認された。⁵⁾

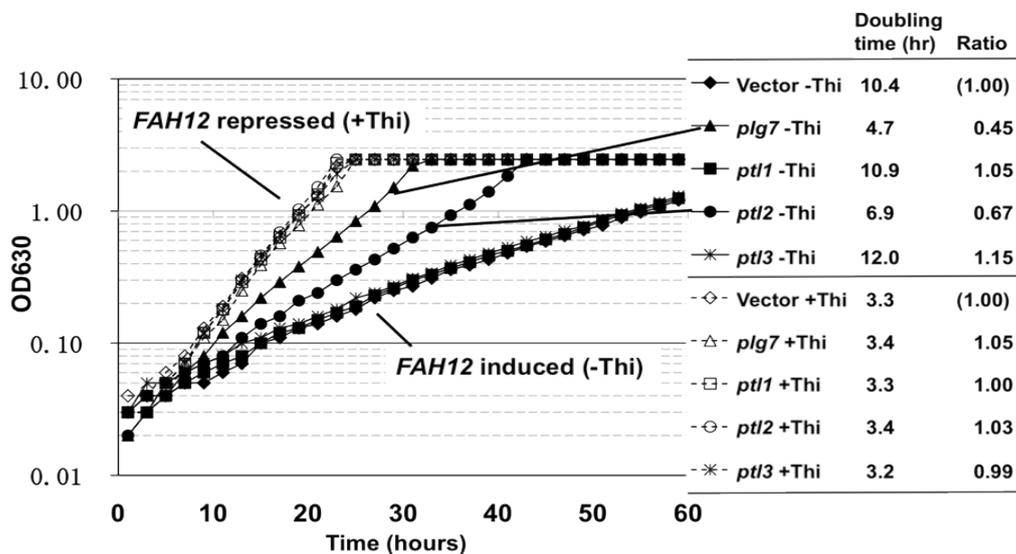


Fig. 1 Growth recovery of the CpFAH12 integrant by the overexpression of *plg7* and *ptl2* genes

The *Pnmt1*-*CpFAH12* integrants harboring various genomic clone plasmids were grown in EMM-C/N3 in the presence (dotted line) or absence (solid line) of thiamine at 30°C. Vector (diamonds): with an empty vector pAL-KS. *plg7* (triangles): with a genomic *plg7* plasmid. *ptl1* (squares): with a genomic *ptl1* plasmid. *ptl2* (circles): with a genomic *ptl2* plasmid. *ptl3* (asterisks): with a genomic *ptl3* plasmid. Ratio indicates doubling time ratio to that of the control strain under the same growth condition.

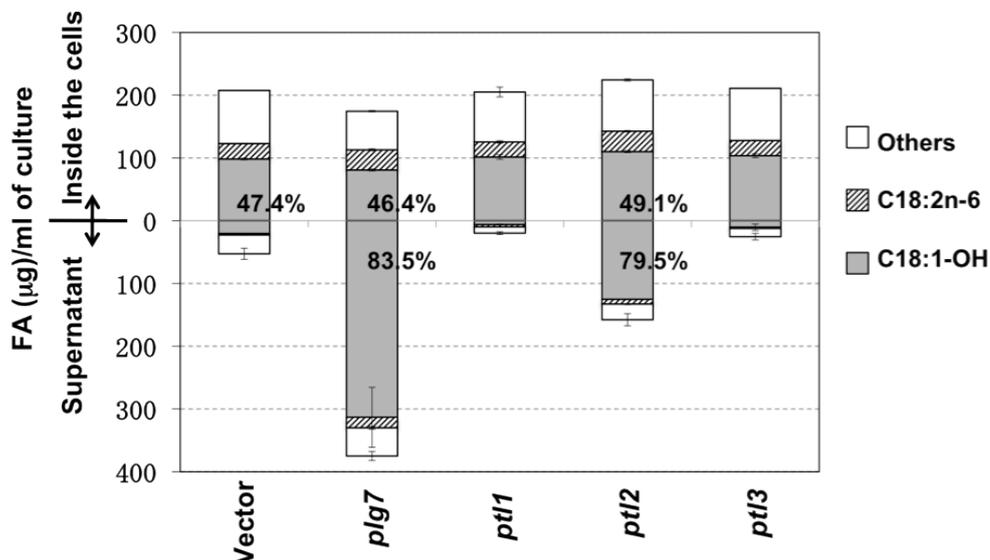


Fig. 2 Overexpression of *plg7* and *ptl2* in the CpFAH12 integrant facilitated the secretion of RA

The *Pnmt1*-*CpFAH12* integrants with various plasmids were grown in EMM-C/N3 in the absence of thiamine at 20°C for 5 days starting with an OD₆₀₀ of 2. Vector: with an empty vector pREP1. *plg7*: with *plg7* expressed in pREP41. *ptl1*: with *ptl1* expressed in pREP41. *ptl2*: with *ptl2* expressed in pREP41. *ptl3*: with *ptl3* expressed in pREP3. Upper and lower parts of the graph represent the FA composition inside the cells and culture supernatant, respectively. Fatty acids are categorized into three groups: (1) C18:1-OH (RA), (2) C18:2n-6 (linoleic acid, by-product of *FAH12*), and (3) others (all other original fatty acids). Values in the graph indicate the percentage of RA to total FA inside the cells and culture supernatants.

結論

RA は水酸基を含有する特殊な脂肪酸であり、石油資源に依存しないウレタン等の原料として注目されている。しかし、RA は水酸基を含有する特殊な脂肪酸であるため、宿主の増殖を阻害することから、今までにトウゴマに代わる生産系は確立出来ていない。我々は、オレイン酸を RA に変換するヒドロキシラーゼ遺伝子を分裂酵母に導入したが、やはり増殖阻害を生じた。しかし、遺伝子ライブラリーのスクリーニングにより高濃度 RA に対して耐性を示す遺伝子の存在を明らかにし、菌体の脂肪酸の 50%超が RA である分裂酵母株の構築に成功した。更に本遺伝子は RA を細胞外へ分泌させる事によって耐性を獲得している可能性が示唆され、細胞内の全 RA 生産量の半分以上の RA が分泌され、かつ細胞外では RA が 80%を超える純度で脂肪酸として分泌されていることを確認した。更に新たな解析から TG リパーゼの一つである *ptl2* にも同様の活性があることも明らかにした。分裂酵母は本来脂肪酸や脂質を細胞外へ分泌できないため、分泌生産の発想は今までに全く無かったが、これらの遺伝子の発見により、分泌生産という新たな RA の効率的な生産系を開発できる可能性が見いだされた。

文献

- 1) Holic R., Yazawa H., Kumagai H., and Uemura H. (2012) Engineered high content of ricinoleic acid in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Appl. Microbiol. Biotech.* **95**: 179-187.
- 2) Yazawa H., Kumagai H., and Uemura H. (2012) Characterization of triglyceride lipase genes of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Appl. Microbiol. Biotech.* **96**: 981-991.
- 3) Yazawa H., Holic R., Kumagai H., and Uemura H. (2013) Toxicity of ricinoleic acid production in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* is suppressed by the overexpression of *plg7*, a phospholipase A2 of a platelet-activating factor (PAF) family homolog. *Appl. Microbiol. Biotech.* **97**: 8193-8203.
- 4) Yazawa H., Kumagai H., and Uemura H. (2013) Secretory production of ricinoleic acid in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Appl. Microbiol. Biotech.* **97**: 8663-8671.
- 5) Yazawa H., Ogiso M., Kumagai H., and Uemura H. (2014) Suppression of ricinoleic acid toxicity by *ptl2* overexpression in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Appl. Microbiol. Biotech.* **98**:9325-9337..