

# 油糧酵母におけるトリグリセリド蓄積機構の解明

高桑 直也

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構  
北海道農業研究センター

## 研究の目的

油脂(トリグリセリド, TG)は、食用・工業用として生活に不可欠のものであり、通常、広く油糧植物や動物から採取されている。しかし、日本の油脂自給率は 13%であり、世界的な油脂原料の需給逼迫に備え、油脂原料の確保は極めて重要な課題となっている。

油糧植物に頼らない TG の製造法の一つに、*Yarrowia* 属、*Lipomyces* 属および *Cryptococcus* 属などの油糧酵母からの抽出法が古くから試みられている。しかし、これらの油糧酵母はこれまで食経験がないため、食品として利用するには安全性が懸念される。また、これらの油糧酵母の TG を構成する脂肪酸には、低温下で固形化しやすい飽和型が多量に含まれるため、北海道などの寒冷地ではバイオディーゼル燃料用途には適していない。

一部の *Kluyveromyces* 属酵母は、古くから食経験を有するとともに、全ゲノム配列が解読済みであるため、TG の蓄積機構を解明するための格好のモデル細胞として利用できる。本研究では、食用および燃料用の双方で活用可能な TG の効率的生産技術を目指す一環として、*Kluyveromyces* 属酵母の TG の合成系遺伝子の機能および培養条件による TG の生産量の変動について解析した。

## 方法

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の遺伝子配列情報を基に、ジヒドロキシアセトンリン酸 (DHAP) から TG の合成に至るまでの 11 種の酵素遺伝子について、*K.lactis* のゲノム DNA からポリメラーゼ連鎖反応によって増幅した。増幅されたそれぞれの遺伝子は、既報<sup>1)</sup>に従って遺伝子発現ベクターに連結した後、*K.lactis* のゲノム DNA に組み込んだ。それぞれの遺伝子過剰発現株の TG の含量は、既報<sup>2)</sup>に従って解析した。

また、*K.lactis* よりも高濃度に TG を蓄積する *Kluyveromyces* 属酵母を新規に見出す一環として、生乳における酵母の分布を調べた。スイートソルガムの搾汁液を培養培地として、生乳から分離した *K. marxianus* の TG の含量を解析した。

## 結果

作成した 11 種の遺伝子過剰発現株は、菌体収量については親株と差は認められなかった。一方、培養菌体における TG の含量は、3 種の遺伝子過剰発現株において増加傾向が見られた (図 1)。最も TG の含量が増加したのは *DGAI* 遺伝子過剰発現株であり、

親株と比べて 1.4 倍増加した。また、*LPPI* 遺伝子過剰発現株および *ARE* 遺伝子過剰発現株ではそれぞれ 1.3 倍の増加傾向が見られた。*DGAI* 遺伝子、*LPPI* 遺伝子および *ARE* 遺伝子は、TG の合成に至るまでの中間体であるホスファチジン酸(PA)の合成以降に作用する遺伝子であった。PA は細胞膜に存在するリン脂質の合成系にも利用され、*S.cerevisiae* においては *SNF2* (RNA ポリメラーゼ II 転写因子、ATP アーゼ) を欠損させた菌株では TG 収量が増加し、リン脂質収量が減少するという報告がある<sup>3)</sup>。そのため、*K.lactis* でも PA の合成以降の遺伝子 (*LPPI*、*DGAI* および *ARE*) の過剰発現によって、リン脂質の合成系が細くなり、結果として TG の生産量が増加したと予想される。

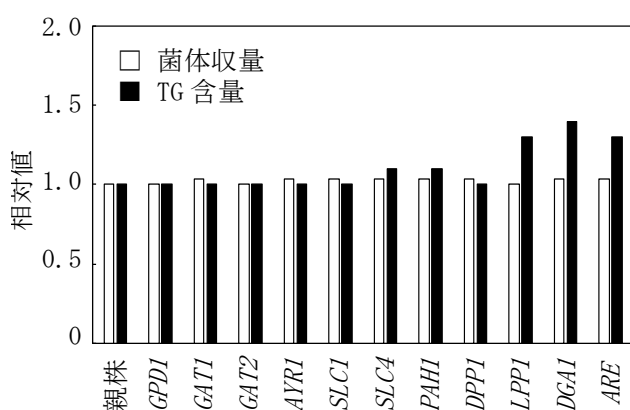


図 1. 11 種の TG 合成系遺伝子を過剰発現させた *K.lactis* の菌体収量と TG 含量。GPD1, グルセロール-3-リン酸 (G3P) 脱水素酵素; GAT1 および GAT2, G3P アシル基転移酵素; AYRI, 1-アシル DHAP 還元酵素; SLC1 および SLC4, 1-アシル G3P アシル基転移酵素; PAH1, DPP1 および LPPI, ホスファチジン酸脱リン酸化酵素; DGAI および ARE, ジアシルグリセロール アシル基転移酵素。

また、生乳から分離した *K.marxianus* は、その標準株および *K.lactis* と比べて効率的に TG を生産した。分離株の TG 収量が最大となる培地の初期 pH は、pH5.0 から pH 6.0 の範囲であり、この範囲では 4.1 g/L の TG が生産可能と推定された。分離株が生産した TG の構成脂肪酸は、いずれも食用油の TG に見出されるものであった。また、分離株が生産した TG の脂肪酸組成は、動粘度やセタン価など、脂肪酸組成から推定可能なバイオディーゼル規格にすべて適合していた (表 1)。

表 1. *K.marxianus* が生産するバイオディーゼルの燃料特性

特性	密度 (g/cm <sup>3</sup> )	動粘度 (mm <sup>2</sup> /s)	引火点(°C)	セタン価	ヨウ素価
<i>K.marxianus</i> (分離株)	0.88	4.9	162	59	97
規格(EU および日本)	0.86-0.90	3.5-5.0	≥120	≥51	≤120

## 結論

酵母 *K.lactis* においては、DHAP から TG の合成に至るまでの酵素遺伝子うち、PA の合成以降の酵素遺伝子の過剰発現によって TG の生産性が向上することが明らかとなった。酵母 *Y.lipolytica* では、TG の分解系の酵素遺伝子の破壊や、脂肪酸合成系の酵素遺伝子の過剰発現によって TG の生産性が向上することが明らかになっている<sup>4)</sup>。そのた

め、*K.lactis* においてもこれらの遺伝子の機能改変によって、TG の生産性が向上する可能性がある。

また、生乳から分離した *K. marxianus* は、食品および燃料用途の双方に使用可能な TG の生産能に優れた菌株であることが示唆された。この分離株においても TG の合成系遺伝子の改変が可能であれば、更なる TG の収量向上が期待できるものと考えられる。

## 文献

- 1) Takakuwa, N., Ohnishi, M., and Oda, Y. (2008) Significance of the *KILAC1* gene in glucosylceramide production by *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast Res.* **8**: 839-845.
- 2) Takakuwa, N., Nagahama, S., Matsumura, H., Kinoshita, M., and Ohnishi, M. (2013) Efficient conversion of crude glycerol into triacylglycerol by the yeast *Pseudozyma* sp. TYC-2187 for biodiesel production. *J. Oleo Sci.* **62**: 605-612.
- 3) Kamisaka, Y., Noda, N., Tomita, N., Kimura, K., Kodaki, T., and Hosaka, K. (2006) Identification of genes affecting lipid content using transposon mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **70**: 646-653.
- 4) Tai, M., and Stephanopoulos, G. (2013) Engineering the push and pull of lipid biosynthesis in oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for biofuel production. *Metab. Eng.* **15**: 1-9.