

# 油脂酵母における油脂合成メカニズム

高久洋暁

(新潟薬科大学 応用生命科学部)

近年、世界人口の増加とともにエネルギー・食糧などの需要増加に伴う資源問題、地球温暖化等の環境問題が顕在化している。多くの分野で利用される油脂も同様な問題を抱えている。その油脂需要に応じ、パーム油（植物油生産量の4割）の生産が拡大しているが、熱帯雨林破壊、森林火災等によるCO<sub>2</sub>排出量増加、生物多様性の消失などの「持続可能な開発目標（SDGs）」を逸脱した問題が生じている。このような中、SDGsを指向した油糧微生物による油脂生産が注目されている。

油糧微生物（酵母・糸状菌・藻類）の生産油脂の主成分は、グリセロールの水酸基に脂肪酸が結合したトリアシルグリセロール（TAG）である。油糧微生物は、リン脂質一重層の脂肪球にTAGを蓄積し、そのTAGの特徴は脂肪酸組成に大きく依存する。油脂酵母は、糸状菌、藻類よりも油脂蓄積含有率が高く（70%以上）、植物油と脂肪酸組成が近似し、植物代替油脂として期待が高い。また、油脂酵母は、様々な廃棄物由来の糖を原料とし、持続可能な油脂生産を提供できる。このような産業的価値の高い油脂酵母の研究は、従来は培養工学的な研究が中心で、油脂合成・分解・蓄積機構に関しては一部の種のみにとどまり、未だ不明瞭な部分が多い。これまで我々は、パーム油と油脂脂肪酸組成が類似する油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* の油脂高/低蓄積変異株を取得し<sup>1-3)</sup>、遺伝子発現解析により、油脂合成における脂肪酸アシル CoA 合成の重要性を明らかにしてきた<sup>2,3)</sup>。また、世界に先駆け開発してきた *L. starkeyi* 遺伝子組換え技術<sup>4,5)</sup>で脂肪酸アシル CoA 合成初発酵素が生育と油脂合成に重要であることを分子レベルで明らかにしてきた<sup>2)</sup>。本研究では、油脂酵母 *L. starkeyi* の油脂蓄積変異株の取得とその解析、さらに油脂蓄積変異株のゲノム比較解析から見出された油脂合成経路の制御因子について紹介したい。

1) Yamazaki, H. et al.: Appl Microbiol Biotechnol. 103(15):6297 (2019)

2) Sato, R. et al.: Microorganisms. 9(8):1693 (2021)

3) Takaku, H. et al.: J Biosci Bioeng. 131(6):613 (2021)

4) Oguro, Y. et al.: Biosci Biotechnol Biochem. 79(3):512 (2015)

5) Takaku, H. et al.: J Microbiol Methods. 169:105816 (2020)

# 油脂酵母の脂質代謝関連酵素の機能解析

松沢智彦

(香川大学 農学部)

生物の脂質組成は種ごとに少しずつ異なり、各生物が保有する脂質代謝関連酵素、例えば脂肪酸不飽和化酵素や脂肪酸伸長酵素も異なる。これらの酵素の機能を明らかにすることで、生物が生産する脂質の『質』を変化させることが可能である。例えば、油脂酵母 *Yarrowia lipolytica* において微細藻類等の脂質代謝関連酵素を発現させることにより、エイコサペンタエン酸 (EPA、C20:5) などの  $\omega$ -3 脂肪酸を高蓄積させた *Y. lipolytica* 改変株等が報告されている。

一言に「酵母」といっても、各酵母が生産する脂肪酸の種類は異なる。例えば、モデル出芽酵母である *Saccharomyces cerevisiae* ではパルミトレイン酸 (C16:1) とオレイン酸 (C18:1) が主要な構成脂肪酸であるのに対し、油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* ではパルミチン酸 (C16:0) とオレイン酸が主要な構成脂肪酸である。また、*S. cerevisiae* とは異なり、*L. starkeyi* はリノール酸 (C18:2) や  $\alpha$ -リノレン酸 (C18:3) などの高価不飽和脂肪酸も生産している。*L. starkeyi* では脂質の『量』だけでなく、その『質』も制御されており、高価不飽和脂肪酸は低温で培養した際に生産される。オレイン酸からリノール酸や  $\alpha$ -リノレン酸などの高価不飽和脂肪酸を合成するためには  $\Delta$ 12 脂肪酸不飽和化酵素や  $\Delta$ 15 脂肪酸不飽和化酵素が必要である。*L. starkeyi* にはオレイン酸をリノール酸に変換する  $\Delta$ 12 脂肪酸不飽和化酵素 (LsFad2) とオレイン酸を  $\alpha$ -リノレン酸に変換する  $\Delta$ 12/ $\Delta$ 15 二機能性脂肪酸不飽和化酵素 (LsFad3) が存在しており、これらの酵素が *L. starkeyi* の多価不飽和脂肪酸の生産を担っている。脂肪酸不飽和化酵素に加えて、脂肪酸伸長酵素もまた油脂酵母が生産する脂質の質の変化に重要である。*L. starkeyi* では2つの脂肪酸伸長酵素 (LsElo1 および LsElo2) の機能が解析されており、LsElo1 は長鎖飽和脂肪酸 (C24) の合成に関与しており、LsElo2 は C16 脂肪酸を C18 脂肪酸へ伸長する。*L. starkeyi* 以外にも *Rhodospiridium* 属油脂酵母などにおいても脂質代謝関連酵素の機能解析が報告されており、油脂酵母が生産する脂質を『量』と『質』の両面から制御する研究が国内外において活発に進められている。

# 1 細胞 RNA-seq プロファイルの経時変化から見えてきた 休眠胞子の目覚めシステム

佐藤政充

(早稲田大学 理工学術院)

細胞の休眠およびそこから目覚めは、真核生物に共通してみられる現象であり、環境応答・有性生殖・細胞周期・遺伝子発現制御・細胞寿命・がん化など、数多くの細胞現象がクロストークする細胞生物学の陰の主演といえるかもしれない。

私たちがともに暮らす酵母において、休眠とその打破の代表例としては胞子とその発芽が挙げられる。1970年代には分裂酵母・出芽酵母等を用いた細胞周期研究の黎明期に、そのひとつの切り口として胞子発芽の現象についても研究が始まった。しかし依然として、発芽の背景にある分子レベルでのメカニズム解明には至っていない。

私たちは分裂酵母を用いて胞子からの発芽のメカニズムを解明したいと考え、RNA-seqに基づく発現プロファイリングをその突破口とすることにした。すなわち、栄養に富む培地に休眠胞子に移すことで発芽を誘導し、発芽の最初期の時点にある細胞集団からのRNA抽出によって遺伝子発現を捉える方法である。しかし、既に知られているように細胞集団における胞子の発芽はあまり同調的に起きないため、そこから得られるRNA-seqデータは時間解像度が低いと思われた。そこで私たちは休眠胞子ならびに発芽の最初期にある1細胞からのRNA-seq (scRNA-seq: シングルセルRNA-seq) をおこなうための手法を開発し、これを実践した。

顕微鏡下で目視しながらマイクロピペットを用いて発芽の最初期にあたる胞子の採取を試みたが、どの細胞が発芽の最初期にあたるものかを外形から判定することは不可能である。そこで、細胞のステージを考慮せずに64個の胞子(休眠または発芽開始後)をシングルセルとして単離し、それぞれの細胞からRNAを採取し、RNA-seq発現プロファイルを作成した。各細胞から得られた発現プロファイルどうしをインフォマティクス解析により比較し、プロファイル間の類似性が高いものが時間的に近いものだと想定して仮想的な時系列順に並べることによって、目視では困難であった発芽最初期の細胞を特定するに至った。

これらのscRNA-seq解析の結果、休眠期から発芽の最初期においては、ヒストンH3のmRNA量が有意に変動することが分かった。私たちはこの結果から、発芽の最初期にはヒストンの量が減少することによってクロマチン構造が変化し、ゲノム規模での遺伝子発現が誘発される可能性があり、これが発芽を促進するとの仮説を立てた。現在はさらなるオミクス解析によりその追究を深めている。

# 出芽酵母ならではのプロテオーム解析

紀藤圭治

(明治大学 農学部)

出芽酵母は最初にゲノム配列が解読された真核生物であり、ゲノム情報全体の機能を読み取ることが目的としたプロテオーム研究に広く活用されてきた。プロテオーム解析には様々な実験技術や解析手法が活用されており、一部の解析手法ではその技術開発や解析能力評価のモデルとしても、出芽酵母は多くの貢献を果たしてきた。とくに、プロテオームの主要な解析手法である質量分析およびその分析試料調製の技術開発では、出芽酵母が主たる研究対象ではない研究グループでも、解析対象として最初に用いられることも多い。

その理由は、単細胞真核生物であるためシンプルかつヒトとの共通性が高い、といった生物としての扱いやすさや生物学的な重要性だけではない。先に述べたようにタンパク質をコードするゲノム配列情報が早い時期から整備されてきたこと、クロマチン構造や転写調節因子のデータ、転写領域および ORF 配列の情報などが充実していること、古くからの遺伝学または分子生物学などによる解析から多くの遺伝子産物の機能情報が豊富であることなども、その理由として挙げられる。それは、数千から一万を超える種類のタンパク質解析の解析データを解釈する際に、配列から機能までの様々な情報の統合的な活用が求められるからである。

このように、出芽酵母はプロテオームの解析対象として有用なモデル生物であるが、我々はこれまでに、出芽酵母を単なるモデルとしてだけでなく、その特徴を生かしたプロテオーム解析を進めることに注力してきた。例えば、接合と減数分裂のサイクルを回すことが容易、母細胞と娘細胞の区別や分離が可能、近縁種酵母間でのゲノム構造の違い、などがその特徴として挙げられる。本講演では、それらの特徴を活用したプロテオームまたはタンパク質の解析として、主に3つの研究を紹介したい。1つは、質量分析によるタンパク質解析の効率化を図るためのアプローチとして、CRISPR/Cas9 を活用したペプチドタグの利用である。2つ目は、酵母種間の比較プロテオーム解析から解釈される細胞内プロテオームバランスと細胞増殖能との関連性についてである。3つ目は、安定同位体標識を用いた酵母老化に関わるタンパク質の質的変化の解析である。

とくに国内では、プロテオーム研究はヒトを対象とした研究がその多くを占める。様々な生物種の特徴を生かしたプロテオミクス研究またはオミクス研究の広がりが、生命科学に興味を抱く若い世代の増加やその発展に少しでも資することを期待したい。