

n-アルカン資化酵母 *Yarrowia lipolytica* における *n*-アルカンへの吸着と取り込みに関する研究

東京大学大学院農学生命科学研究科 准教授 福田良一

1. はじめに

Yarrowia lipolytica は、石油成分である *n*-アルカンなどの疎水性化合物を資化する能力と、脂質を高生産し細胞内に高度に蓄積する能力を持つ子囊菌系の酵母である。これらの特徴から、*Y. lipolytica* は菌類における疎水性化合物代謝のモデルとして研究されているだけでなく、*n*-アルカンからの有用物質生産や石油で汚染した土壌や海洋の浄化への応用も期待されている酵母である。*Y. lipolytica* を用いて効率的な *n*-アルカンの変換系や浄化系を構築するためには、本酵母における *n*-アルカンの代謝機構を理解する必要がある。これまでの解析より、本酵母において、細胞内に取り込まれた *n*-アルカンは小胞体へ輸送されてシトクロム P450ALK によりアルコールに変換され、その後小胞体内またはペルオキシソーム内で脂肪酸に酸化されて利用されることが明らかになっている (図 1)(1)。しかしながら、疎水性の *n*-アルカンが細胞内に取り込まれ小胞体に輸送される機構は未解明である。本研究では *Y. lipolytica* における *n*-アルカンの取り込み機構を解明することを目的とする。

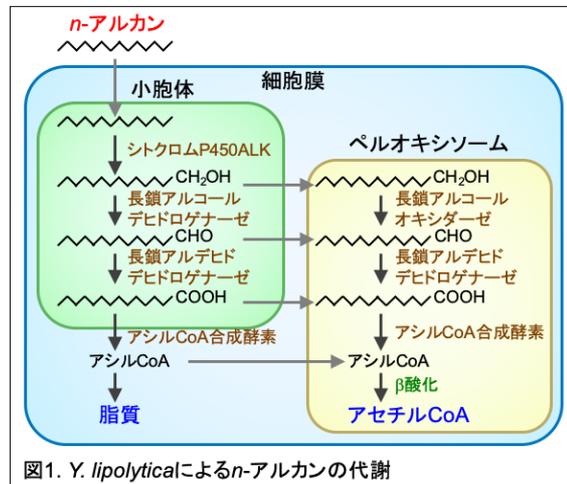


図1. *Y. lipolytica*による*n*-アルカンの代謝

2. 結果と考察

Y. lipolytica が *n*-アルカンを取り込む機構としては、*n*-アルカンの油滴に吸着してそれを取り込む機構が予想されているが、詳細は未解明である。*Y. lipolytica* において *n*-アルカンの取り込み機構を明らかにするため、*n*-アルカンに吸着できない変異株を単離し解析することにした。*Y. lipolytica* の培養液に *n*-アルカンを加えて攪拌し遠心により *n*-アルカンに吸着しない細胞を回収して新たな培地に植菌する操作を 5 回繰り返すことにより、*n*-アルカンに対する吸着性が低下した細胞を濃縮した。*Y. lipolytica* は酵母型と菌糸型の 2 つの細胞形態をとる二形性酵母であるが、得られた細胞を固体培地に植菌したところ、菌糸生長に欠損を示す株が多く得られた。これらの株について *n*-アルカン吸着性を解析したところ、菌糸生長の欠損と *n*-アルカン吸着性の欠損に相関が見られたことから、菌糸生長に欠損を持つ株を選択し解析を行なうこととした。最終的に菌糸生長に欠損を持つ変異株を 80 株単離した。本研究では、これらの変異株の変異遺伝子を特定し、その機能について解析を行った。

(1) *n*-アルカンに吸着できない変異株の解析と変異遺伝子の特定

得られた変異株のうち、最も *n*-アルカン吸着性が低下した変異株 No. 62 について解析を行うこととした。まず変異株 No. 62 について様々な培地での生育を解析した。変異株 No. 62 はグリセロールを炭素源とした培地では野生型株と同程度の生育を示したが、グルコースを炭素源とした場合にはわずかに生育の悪化を示した。さらに *n*-アルカン炭素源とした培地では、野生型株では菌糸型生長が高度に誘導されたのに対して、変異株 No. 62 は菌糸型生長に欠損を示した。

No. 62 についてゲノムシーケンスにより変異遺伝子の解析を行ったところ、この株は *YALI0B02266g* に変異を有することが明らかとなった。*YALI0B02266g* は DNA との結合に関わると予想される HMG box を持つ 916 アミノ酸からなる機能未知のタンパク質をコードすると推定される遺伝子であるが、変異株 No. 62 では *YALI0B02266g* の 265 番目の塩基 C が T に置換され、89 番目のグルタミンが終止コドンに変化していることが明らかになった。*S. cerevisiae* と *C. albicans* で *YALI0B02266g* のホモログを探索したところ、それぞれ *ROX1* と *RFG1* が見いだされた。Rox1 は低酸素条件で誘導される遺伝子の転写抑制因子であるのに対して(2)、Rfg1 は菌糸生長に関わる遺伝子の転写抑制因子でこれを破壊した株では菌糸生長が促進されることが示唆されている(3)。変異株 No. 62 に *YALI0B02266g* をプラスミドで導入したところ菌糸型生長の欠損が回復したことから、*YALI0B02266g* の変異がこの変異株の表現型の原因であることが示唆された。そこで *YALI0B02266g* を *MARI* (Morphology and *n*-alkane Absorption Regulator)と命名して、以下の解析を行った。

(2) *n*-アルカンの吸着に関わる遺伝子の解析

MARI の破壊株を作製し、その生育を解析した。その結果、*MARI* 破壊株は菌糸型生長の欠損を示した。また、*n*-アルカンに対する吸着性を調べたところ、*MARI* 破壊株では変異株 No. 62 と同様に *n*-アルカンに対する吸着レベルが低下していた。電子顕微鏡観察により細胞形態を観察したところ、*MARI* 破壊株では細胞壁に異常な構造が観察された。*Y. lipolytica* において菌糸生長に必要な遺伝子 *RAS2*、*HOY1*、*MHY1* の *MARI* 破壊株での発現量を RT-PCR により解析したところ、*MARI* 破壊株ではこれらの遺伝子の転写産物の量が野生型株と比較して低下していた。さらに Mar1 と EGFP との融合タンパク質を発現させ、その局在を観察したところ、Mar1-EGFP は核に局在することが示唆された。以上の結果から、Mar1p は転写制御因子として機能する可能性が示唆された。

以上、本研究により、*Y. lipolytica* において *n*-アルカンへの吸着と菌糸型生長に必要な遺伝子 *MARI* が見いだされた。さらに、*MARI* はこれらのプロセスを制御する転写制御因子をコードすることが示唆された。本研究で得られた成果は、*Y. lipolytica* を用いた *n*-アルカンからの有用物質生産系や浄化系の構築に貢献するものであると期待される。また、菌類を用いて発酵生産系を試みる場合、細胞形態を一定に保つことは再現性のある結果を得るために重要である。本研究で得られた結果は、菌類の発酵生産への有効利用を図る上でも重要な知見をもたらすものと期待される。

3. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成を賜りました一般財団法人杉山産業化学研究所に厚く御礼申し上げます。

4. 参考文献

1. Fukuda, R. (2013) Metabolism of hydrophobic carbon sources and regulation of it in *n*-alkane-assimilating yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **77**, 1149-1154
2. Deckert, J., Rodriguez Torres, A. M., Simon, J. T., and Zitomer, R. S. (1995) Mutational analysis of Rox1, a DNA-bending repressor of hypoxic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 6109-6117
3. Khalaf, R. A., and Zitomer, R. S. (2001) The DNA binding protein Rfg1 is a repressor of filamentation in *Candida albicans*. *Genetics* **157**, 1503-1512