

【研究報告書】

油脂高生産酵母における遺伝子組換え技術の確立

梶原 将*

【背景】

今、アメリカ等の先進諸国に加えBRICs等の新興国のエネルギー消費量も格段に増加し続け、世界中でエネルギー不足が問題となっている。特に日本の場合、エネルギー自給率は約20%と低く、全体のエネルギー源のうちの石油の占める割合は約50%となっており石油への依存度が高い。そこで、いずれは枯渇する石油等の化石燃料の代替となるエネルギーを開発することが将来のエネルギー確保の上で有効な手段となる。

石油代替エネルギーとして期待される資源のひとつに生物が作り出す油脂(バイオディーゼル)がある。例えば、酵母には乾燥菌体重量の20~60%もの油脂(主にトリアシルグリセロール)を菌体内に蓄積する種が存在し、油脂生産酵母と呼ばれている(表1)。油脂生産酵母はこれまで食用、または工業用の油脂資源として利用すべく研究されてきた。また酵母以外の生物油脂資源としては植物や糸状菌もあり、それらによる油脂生産の研究開発も行われている。特に植物から作られるバイオディーゼルは環境にやさしい燃料として注目を

表1 油脂生産酵母の例

| 油脂生産酵母 | 資質含有量(w/w) |
|----------------------------------|------------|
| <i>Lipomyces starkeyi</i> | 46.6 |
| <i>Cryptococcus albidus</i> | 54.8 |
| <i>Lipomyces stipofer</i> | 40 |
| <i>Rhodosporidium toruloides</i> | 57.2-74.9 |
| <i>Apofootrichum curvatum</i> | 54 |
| <i>Yarrowia lipolytica</i> | 44-54 |

浴びている。しかし、菜種や大豆などの過剰な作付けは食糧と競合し、食糧の不足や価格高騰を招く。また、急激な農地開拓のための熱帯雨林伐採で環境破壊を促進し、気候変動が安定した油脂資源供給を妨げるなどの欠点もある。

一方、酵母は植物のような広いスペースを必要とせず、栄養分も農水産廃棄物や木屑等

*東京工業大学大学院 生命理工学研究科

の木質系バイオマスからの糖質の利用も可能である。しかしながら、これまでの酵母での油脂生産の例では、ほとんどが培地中の窒素成分や炭素成分を制御した上での蓄積であり、コストが高く、商業化は難しいと考えられている。

そこで安価なりサイクル栄養源でも油脂を高生産する酵母を分子育種により作出するため、油脂生産酵母の遺伝子組換え技術の確立を試みた。

【方 法】

まず、油脂生産量が高いことが報告されている酵母種数株の倍加時間、全脂質量、バイオディーゼルの原料となるトリアシルグリセロール(TAG)量を測定し、それらを比較解析することで最も油脂生産性が高い株を選出した。

次に、酵母に遺伝子を導入するためにはその遺伝子を乗せるベクターDNAが必要となる。ベクターDNAの構築には、マーカー遺伝子、遺伝子発現のためのプロモーターとターミネーター、染色体DNAに組み込まれるための遺伝子挿入因子が最小限必要である。このため、マーカー遺伝子としては、真菌の薬剤耐性を付与する遺伝子として用いられているG418耐性遺伝子 *KanMX4* を用いることとした。一方、他の因子については、選出した酵母種の Phosphoglycerate kinase 遺伝子 (*PGK*) のプロモーターとターミネーター、アクチン遺伝子 (*ACT*) のプロモーターとターミネーター、挿入因子であるリボゾーマルDNA (rDNA) を其々クローニングすることを試みた。

そして、プラスミド pBluescript II SK+ に先ず *PGK* のプロモーターを組み込み、その後 G418 耐性を付与する *KanMX4* 遺伝子、*PGK* のターミネーターを組み込み、プロモーターとターミネーターの間に *KanMX4* 遺伝子が挟まるように構築した。最後に rDNA を組み込んで遺伝子導入法開発用ベクターを構築した。

続いて構築したベクターを用いて、エレクトロポレーション法による油脂生産酵母の遺伝子導入条件の検討を行った。

【結 果】

油脂高生産酵母 *Rhodospiridium toruloides* NRRL Y-1091、*R. toruloides* AS 2-1389、

Rhodosporidium sp. N1、*Rhodosporidium* sp. N3、*Rhodosporidium* sp. S15の5株を用いて、倍加時間、全脂質量、TAG量の測定と比較分析を行った結果、全脂質量はNRRL Y-1091株が最も高く、2番目はAS 2-1389株、3番目はN3株、一方で倍加時間は、N1株が2.02 hと1番短く、2番目はN3株の2.17 hで、3番目はS15株であった。そこで、単位時間に生産される全脂質量(脂質生産速度)を算出した結果、AS 2-1389株が45 mg/g・hと最も高く、次にN3株、3番目はNRRL Y-1091株であった。さらに、全脂質中のTAGの割合を調べ、単位時間に生産されるTAG量を算出した結果、AS 2-1389株が最も優れていることが分かった。よって以降は、AS 2-1389株への遺伝子導入のためのベクター開発を行うことにした。

ベクター作製に必要な遺伝子は*Rhodosporidium*属と近縁で既に単離同定されている数種の*Rhodotorula*属と出芽酵母*Saccharomyces cerevisiae*のDNA配列を元に、その塩基配列の類似性を利用して、AS 2-1389株からクローニングを行った。まずPGK遺伝子の上流領域は約4 kb、下流は約2.2 kbの

DNA断片を得られた。そこで、プロモーターとしては開始コドン上流1459 bp (PGKp)、ターミネーターとしては終止コドン下流1032 bp(PGKi)を利用することとした。ACT遺伝子に関しては、アクチンをコードする遺伝子領域1137 bpをクローニングしたが、そのプロモーターやターミネーター領域の取得までには至らなかった。染色体挿入因子のrDNAについては、1570 bpの長さの断片が得られ、他の生物の18S rDNA

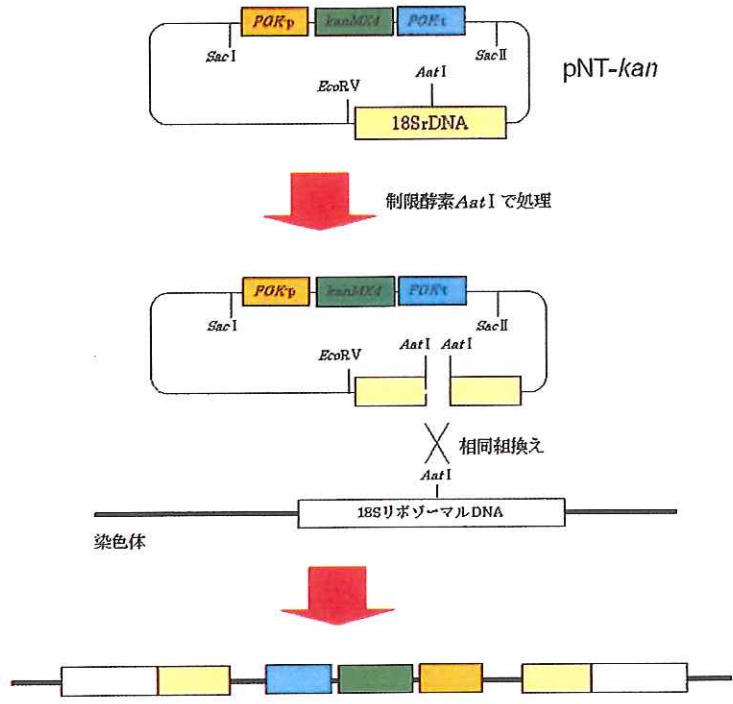


図1 プラスミドpNT-kan と染色体DNAとの相同組み換え

配列と高い相同性を有していた。そこで、そのDNA配列のうち、950 bp(18S rDNA)を染色体挿入因子として利用することとした。これらの断片を利用し、pBluescript II SK+をベースにしたプラスミドベクターpNT-kan(図1)を構築した。このベクターを制限酵素AadIで切断後、酵母細胞内に導入することで、通常染色体上に50-100コピーあるrDNA配列と相同組み換えを起こし、染色体上に挿入されることになる(図1)。

最後に、エレクトロポレーション法を用い、AadIで切断したpNT-kanをAS 2-1389株へ導入する条件の検討を行った。まず、電圧と抵抗の条件を変えたときの菌体の生存率を調べるため、電圧と抵抗の値以外を固定した条件下での生存率を調べた。そして生存率が0.66%~73%の間となる複数の条件を選んでエレクトロポレーション法による遺伝子導入を行った。結果として、電圧2.5 kV/cm、抵抗200 Ωの条件のときにいくつかの形質転換体が得られた。そこで、得られた形質転換体のうちの4つの形質転換体のゲノムDNAを用い、PCR法によりKanMX4遺伝子の存在を確認したところ、この遺伝子と同じサイズの830 bp付近にDNA断片の増幅が見られた。よってこれらの株は遺伝子が正常に挿入された形質転換体であることが示唆された。今後は本形質転換法の再現性を見るとともに、形質転換体の最適条件の検討を行う予定である。

【結 論】

- 1) 油脂生産性が高いことが知られている酵母種数株の増殖や油脂生産性を比較することで、最も効率よく油脂を生産する酵母*Rhodosporidium toruloides* AS 2-1389株を選出した。
- 2) *R. toruloides* AS 2-1389株から、PGK遺伝子、ACT遺伝子、18S rDNAをクローニングした。
- 3) *R. toruloides* AS 2-1389株のPGK遺伝子のプロモーターとターミネーター、rDNA断片、KanMX4遺伝子を用い、遺伝子導入法開発用ベクターを構築した。
- 4) エレクトロポレーション法による遺伝子導入の条件を検討したところ、電圧2.5 kV/cm、抵抗200 Ω、キャパシティ25 mFの時に、幾つかの形質転換株が得られた。PCR法により、これらの染色体には少なくともKanMX4遺伝子が存在することがわかり、この条件で、R.

toruloides AS 2-1389株に遺伝子が導入されたと考えられた。

【謝 辞】

本研究の一部は、平成19年度杉山産業化学研究所の研究助成金により行われた。杉山産業化学研究所関係者の皆様に深く御礼申し上げます。

以上。