

## Triacylglycerol を分泌する *Saccharomyces cerevisiae* の育種

小郷貴之、藤井洋紀、池本ひとみ、松崎浩明\*、秦野琢之

油脂生産微生物のほとんどは、生産油脂を菌体内に蓄積する油脂蓄積型微生物である。油脂生産能の強化と抽出コストの低減による有用油脂の効率的生産を目的として、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において油脂蓄積型から油脂分泌型への変換を目指した。過去の研究で triacylglycerol (TG) を含む脂質を菌体外に生産する変異株 (STG1 株) を取得し、TG 分泌抑制遺伝子の存在が示唆された。本研究では、*S. cerevisiae* の Yeast knock-out collection (YKO コレクション) の中から TG を分泌する遺伝子破壊株を探索した。その結果、*spc72* Δ 株、*hof1* Δ 株、*vms10* Δ 株、*cnm67* Δ 株、および *chc1* Δ 株の5株ではっきりと菌体外に TG が検出された。さらに、STG1 株の親株である YP1 株でも *SPC72* 遺伝子や *HOF1* 遺伝子の破壊で TG を菌体外に分泌することができ、*S. cerevisiae* において油脂蓄積型から油脂分泌型への変換システムを構築できた。また、TG 分泌形質を示す YKO 株において TG 分泌が起こる培養時間以降に脂肪滴の形態や細胞内局在の変化が観察された。

キーワード：分泌生産、triacylglycerol、脂肪滴、*Saccharomyces cerevisiae*

脂質は多くの生物において細胞膜など生体膜の重要な構築要素、エネルギー貯蔵体、シグナル分子など多彩な機能をもつ。ヒトでは、脂質が血圧、ホルモン調節、免疫系などで個体の恒常性を維持することで健康も担っている。近年、高血圧、動脈硬化、抗脂血症などの生活習慣病を抑制する機能性油脂の存在が明らかとなった<sup>1,2)</sup>。さらに、脂質は食用油脂のみならず、機能性油脂を添加した食品、医薬品、石鹸、化粧品など幅広いニーズを有しており、その利用価値は高くなっている。

現在、有用油脂は家畜や魚類などの動物や植物からの抽出生産に依存している。しかし、残留農薬や抗生物質などの汚染による安全性の問題や気候変動により安定しない生産が懸念されている。一方で、近年、油糧植物のバイオ燃料への利用が始まり、今後油脂生産の増大が必要と考えられる。微生物は動植物とは異なり、生育を人為的にコントロールでき、組成の明らかな培地で培養できることから、安全な油脂を安定して供給することが可能である。さらに、微生物が生産する油脂には高度不飽和脂肪酸が多く含まれていることが明らかとなり、機能性油脂として産業面でも注目されている<sup>3)</sup>。現在知られている油脂生産微生物には、糸状菌の *Mortierella* 属<sup>4)</sup> や *Mucor* 属<sup>5)</sup>、酵母の *Candida* 属<sup>6)</sup>、*Lipomyces* 属<sup>7)</sup>、*Rhodotorula* 属<sup>8)</sup>、および *Yarrowia* 属<sup>9)</sup> が挙げられる。しかし、これらの微生物は菌体内で油脂を生産し蓄積する「油脂蓄積型微生物」であり、菌体内に

\*〒729-0292 広島県福山市学園町1番地三蔵 福山大学生命工学部生物工学科  
Tel: +81-84-936-2111、 Fax: +81-84-936-2023、 E-mail: matsuzaki@fukuyama-u.ac.jp

油脂がある程度蓄積すると油脂の生産を停止する。また、菌体からの油脂の回収には菌体の破碎や分離・抽出操作が必要となり、手間やコスト面で効率的ではない。このような背景から、我々は、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* をモデル微生物として生産油脂を菌体自ら体外へ分泌する「油脂分泌型微生物」の育種を行い、手間やコストの削減および油脂生産能の強化を実現する有用油脂分泌生産システムを確立することを目指している。

過去の研究で、脂肪酸資化能を有する YP1 株に Ethyl methane sulfate (EMS) 処理で変異導入を行い、ハロ検定によるスクリーニングを経て約 80,000 コロニーの中から Triacyl glycerol (TG) を菌体外に分泌（漏出）する STG1 変異株を取得した<sup>10)</sup>。本変異株は、グルコース 2 g を基質とした YPAD 液体培地（100 ml）で 72 時間振とう培養した場合、菌体内脂質量は親株 YP1 株の約 1.8 倍の蓄積量であり、総脂質の約 6.0% を菌体外に分泌していた。さらに、STG1 株に大腸菌由来の *lacZ* 遺伝子を導入し、菌体内外の  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を測定したところ、菌体外にほとんど活性が認められなかったことから、菌体外 TG は溶菌ではなく分泌によって生じたと判断した。また、四分子解析から STG1 株の TG 分泌形質を示す変異は一遺伝子変異であることが推定された。そこで、本研究では、*S. cerevisiae* の非必須遺伝子の破壊株のコレクションである Yeast knock-out collection (YKO コレクション)<sup>11)</sup>を用いて油脂分泌型の遺伝子破壊株をハロ検定と菌体外脂質の薄層クロマトグラフィー (TLC) 解析によってスクリーニングした。その結果、TG の分泌が確実な候補株を 5 株取得できた。これら候補株で破壊された遺伝子は、*SPC72*、*HOF1*、*VMS1*、*CNM67*、および *CHC1* であった。*S. cerevisiae* をモデル微生物としてこれらの遺伝子を操作することにより油脂蓄積型から油脂分泌型への変換システムを構築できた。

## 材料と方法

### 酵母菌株

本研究で使用した酵母 *S. cerevisiae* の菌株を Table 1 に示す。STG1 株としては、STG1 変異株と

Table 1 Strains used in this study

Strain	Description	Reference
YP1	<i>MATa ura3-52 lys2-801<sup>amber</sup> ade2-101<sup>ochre</sup></i>	(10)
STG123 ac H.13	<i>MATa ura3-52 lys2 trp1</i>	(10)
KD115	<i>MATa ole1</i>	(12)
BY4742	<i>MATa his3 leu2 lys2 ura3</i>	Open Biosystems
YKO collection	BY4742 [(none essential gene):: <i>kanMX</i> ]	Open Biosystems
YP1/ <i>spc72Δ</i>	YP1 [ <i>spc72Δ</i> :: <i>KanMX</i> ]	This study
YP1/ <i>hof1Δ</i>	YP1 [ <i>hof1Δ</i> :: <i>KanMX</i> ]	This study

Triacylglycerol を分泌する *Saccharomyces cerevisiae* の育種

Table 2 Oligonucleotides used in this study

Oligonucleotide	Nucleotide sequence
SPC72sn5-1	5'-CCCACAGACCATGCTACGTT-3'
SPC72sn3-1	5'-GGTCATACGATTCGTGATCG-3'
HOF1s5-1	5'-GTGTAATCGTCAGAGTGCAC-3'
HOF1s3-1	5'-GTTACAAATCCGGAGAGGTG-3'

KA311B 株の交雑株（ヘテロ二倍体）由来で安定的な halo<sup>+</sup>一倍体である STG123 acH.13 株を使用した（以下、STG123 株と表記する）。YKO 株（Yeast knock-out collection : Open Biosystems）は、*S. cerevisiae* の約 6,200 個の遺伝子のうち、4,775 個の非必須遺伝子を一個ずつ破壊した株のコレクションである<sup>11)</sup>。また、本研究で YP1 株において遺伝子破壊株を作製するために使用したオリゴヌクレオチドを Table 2 に示す。YP1 株由来の SPC72 および HOF1 遺伝子の破壊株（YP1/*spc72Δ*株および YP1/*hof1Δ*株）は、各 YKO 株の染色体 DNA を鋳型として SPC72sn5-1 と SPC72sn3-1 (*spc72Δ*株)、および HOF1s5-1 と HOF1s3-1 (*hof1Δ*株)のプライマーを用いた PCR<sup>13)</sup>で各破壊用 DNA 断片（各遺伝子の ORF が *kanMX* 遺伝子で置換され、上流と下流に *S. cerevisiae* の相同配列をもつ）を増幅し、この DNA 断片を、酢酸リチウム法<sup>14)</sup>を改良した高効率形質転換法<sup>15)</sup>で YP1 株に導入して作製した（*Kan<sup>r</sup>*で選択）。*S. cerevisiae* 細胞からの染色体 DNA の調製は、Hereford らの方法<sup>16)</sup>で行った。*S. cerevisiae* における菌株作製と相補性試験は、Rose らによる酵母実験書<sup>17)</sup>に基づいて行った。

#### 培地および培養

酵母の培養には、完全培地と最少培地としてそれぞれ YPAD 培地と YNBD 培地を使用した。YPAD 培地の組成は、1% 酵母エキス、2% Bacto-peptone (Difco Laboratory)、2% グルコース、および 0.06% アデニンである。また、YNBD 培地の組成は、0.17% yeast nitrogen base w/o amino acids and ammonium sulfate (Difco)、0.5% 硫酸アンモニウム、2% グルコース、および 0.06% アデニンであり、必要に応じてアミノ酸と核酸の塩基を加えた。KD115 株は YPOD 培地 [1% 酵母エキス、2% Bacto-peptone、2% グルコース、0.2% オレイン酸、および 1% Brij 58 (ナカライテスク)] で培養した。YKO 株の培養と保存および破壊用 DNA 断片による YP1 株の形質転換における選択培地として YPAD 培地に G-418 Sulfate (Geneticin Disulfate: 和光純薬工業) を 0.02% (w/v) となるように添加した YPAD + G418 培地を使用した。プレートには、2% 寒天を添加した。酵母は 28°C あるいは 25°C で培養した。酵母の振とう培養は、120 stokes/min の振とう速度で行った。

#### Bioassay 法による菌体外 TG の検出（ハロ検定）

*S. cerevisiae* による菌体外への TG 分泌を検定するために Bioassay 法のハロ検定<sup>18)</sup>を行った。検定を行う *S. cerevisiae* 菌体を YPAD 液体培地 5 ml に植菌し、28°C で一晩前培養を行った。前培養液 50 μl を YPAD 液体培地 5 ml に植菌し、28°C で一晩本培養を行った。培養液 1 ml を集菌（4°C、14,000

rpm、1分間：MX-100 微量高速冷却遠心分離機、トミー精工）した。菌体を滅菌水 1 ml で懸濁し、再び集菌（4℃、14,000 rpm、1分間：MX-100 微量高速冷却遠心分離機）し、菌体を洗浄した。再度、菌体を洗浄し、菌体を滅菌水 300  $\mu$ l で懸濁した。この菌体懸濁液 5  $\mu$ l を YPAD 平板培地にスポットし、28℃で4日間静置培養した。一方、検定菌（KD115 株）を YPOD 液体培地 5 ml に植菌し、28℃で一晩前培養を行った。前培養液 50  $\mu$ l を YPOD 液体培地 5 ml に植菌し、28℃で一晩本培養を行った。培養液を集菌（4℃、3,000 rpm、5分間：CF7D2 遠心分離機、日立工機）した。菌体を滅菌水 5 ml で懸濁し、集菌（4℃、3,000 rpm、5分間：CF7D2 遠心分離機）し、菌体を洗浄した。再度、菌体を洗浄し、菌体を滅菌水 5 ml で懸濁した。懸濁液の菌濃度をトーマ血球計算盤（EKDS 血球計算盤：萱垣製作所）で測定し、プレート1枚当たり  $5.0 \times 10^6$  cells あるいは  $9.0 \times 10^6$  cells 相当となる細胞懸濁液量を求めた。また、5%リパーゼ溶液を作製した。リパーゼ PS（31.6 U/mg、天野エンザイム）の5%（w/v）水溶液をソニケーター（Ultrasonic Cleaner、島津製作所）で90秒間超音波処理を行い、さらに4℃で1時間スターラーで攪拌した。全量を遠心分離（4℃、3,000 rpm、5分間：CF7D2 遠心分離機）した。メンブレンフィルター（Millex-GV、0.22  $\mu$ m Millipore）を用いて上清を濾過滅菌し、5%リパーゼ溶液とした。5%リパーゼ溶液 5 ml と検定菌の細胞懸濁液（ $5.0 \times 10^6$  cells あるいは  $9.0 \times 10^6$  cells を含む）を混合して検定菌-リパーゼ混合液とした。重層時のコロニー流出を防ぐ目的で、検定する菌を培養したプレートに紫外線を1時間照射し、さらに、蛍光灯で可視光を10分間照射して、コロニーを乾燥させた。60℃程度に保温しておいた YNBD 重層培地 5 ml に検定菌-リパーゼ混合液 5 ml を加え、混合後、コロニーの上に穏やかに重層した。28℃で静置培養し、コロニーの周囲に形成される検定菌のマイクロコロニーの有無を確認した。マイクロコロニー（halo）が出現した場合を halo<sup>+</sup>としてTG分泌形質を示す株と判断した。

#### 菌体外脂質の抽出とTGの検出

*S. cerevisiae* 菌株を YPAD 液体培地 5 ml に植菌し、YP1 株と STG1 株は 28℃で、BY4742 株、YKO 株、および交配株は 25℃で一晩振とう培養して前培養を行った。この前培養液 0.5 ml を YPAD 液体培地 50 ml（坂口フラスコ）に植菌し、YP1 株と STG1 株は 28℃で、BY4742 株、YKO 株、および交配株は 25℃で 24~120 時間振とう培養して本培養を行った。坂口フラスコにクロロホルム 16 ml を加え、2分間穏やかに攪拌した。全量をビーカーに移し、20分間静置した。上層をデカンテーションで坂口フラスコに戻し、下層を遠心分離（4℃、3,000 rpm、5分間：CF7D2 遠心分離機）した。遠心分離後の下層（クロロホルム層）を回収し、上層は坂口フラスコに戻した。再度、坂口フラスコにクロロホルム 16 ml を加え、同様の抽出操作を行った。この操作を計3回行った後、3回のクロロホルム層を集め、ロータリーエバポレーター（REN-1000、Iwaki）でクロロホルムを減圧乾固した。乾固物にクロロホルム 2.5 ml を加えて脂質を溶解し、菌体外脂質抽出液とした。保存は -30℃（フリーザー、新明和）で行っ

## Triacylglycerol を分泌する *Saccharomyces cerevisiae* の育種

た。脂質抽出液中の脂質の種類と量は TLC で分析した。TLC プレート (Uniplate、Silica gel G、250 microns、100×200 mm : Analtech) にマーカー [オレイン酸 (FA)、オリーブ油 (TG)、オレイン酸エチルエステル (FAE)、各 5 mg/ml クロロホルム溶液] 2  $\mu$ l、脂質抽出液 10  $\mu$ l をスポットし、展開溶媒 [*n*-ヘキサン : ジエチルエーテル : 酢酸 = 80 : 20 : 1 (v/v/v)] で展開した。脂質はヨウ素で発色させた。

### YKO コレクション株からの TG 分泌形質を示す株のスクリーニング

YKO コレクションの合計 4,775 株の中からの TG 分泌形質を示す株のスクリーニングは、以下の方法で行った。96 ウェルプレート (Microtest Tissue Culture Plate 3072 : Falcon) に YPAD + G418 液体培地を 150  $\mu$ l ずつ分注し、これに 96 ピンマイクロプレート (P96005S : Falcon) を使用して YKO 株を植菌し、25°C で 5~6 日間静置して前培養を行った。前培養液をマイクロプレート型シャーレ (S01F02S : 東京硝子機器) に作製した YPAD プレートにスタンプし、25°C で 4~5 日間本培養を行った。「Bioassay 法による菌体外 TG の検出 (ハロ検定)」の項と同様に検定菌-リパーゼ混合液を作製し、60°C 程度に保温しておいた YNBD 重層培地 8 ml に検定菌-リパーゼ混合液 8 ml を加え、混合後、コロニーの上に穏やかに重層した。28°C で培養し、halo<sup>+</sup>形質を示す YKO 株を選択した。

### Sudan Black 染色

*S. cerevisiae* 細胞内の脂質の観察は、Sudan Black 染色<sup>19)</sup>で行った。菌体を YPAD 液体培地 5 ml に植菌し、YP1 株、STG1 株は 28°C で、BY4742 株、YKO 株、および交配株は 25°C で一晩前培養を行った。前培養液 50  $\mu$ l を YPAD 液体培地 50 ml に植菌し、24~120 時間本培養を行った。培養液 1 ml を集菌 (4°C、3,000 rpm、5 分間 : MX-100 微量高速冷却遠心分離機) した。菌体を滅菌水 1 ml で懸濁し、再度集菌 (4°C、3,000 rpm、5 分間 : MX-100 微量高速冷却遠心分離機) し、菌体を洗浄した。菌体を Sudan black B 溶液 [0.3% (w/v) Sudan black B / 70% (v/v) エタノール] 300~400  $\mu$ l で懸濁した。室温で 5~15 分間放置し、菌体を染色した。集菌 (4°C、3,000 rpm、5 分間 : MX-100 微量高速冷却遠心分離機) した後、菌体をイオン交換水 300~400  $\mu$ l で懸濁し、顕微鏡観察を行った。

## 結果

### YKO コレクション株からの TG 分泌形質を示す株のスクリーニング

過去の研究で、STG1 株は TG 分泌抑制遺伝子が突然変異によって機能を欠損したことで TG を菌体外に分泌できるようになったことが示唆された。この TG 分泌抑制遺伝子を明らかにするために *S. cerevisiae* の約 6,200 個の遺伝子のうち、4,775 個の非必須遺伝子を一個ずつ破壊した株のコレクションである YKO コレクションの中から TG を分泌する破壊株を探索することにした。まず、ハロ検定で halo<sup>+</sup>形質を示す株のスクリーニングを行った。多数の遺伝子破壊株について検定するために、96 ウェルプレ

ートで液体培養を行った多数の破壊株（最多 96 株まで）をマイクロプレート型の YPAD プレートにスタンプして培養した後に、一挙にハロ検定を行った。この方法を繰り返して合計 4,775 株の YKO 株について検定した結果、48 株が halo<sup>+</sup>形質を示した。これらの菌株の中で 20 株が halo<sup>+</sup>形質を比較的安定に保持していた。この 20 株について、菌体を含む培養液から菌体外脂質を抽出し、TLC で菌体外 TG 量を調べた結果、長時間の培養（72 時間）において計 5 株で菌体外 TG がはっきりと検出された (Fig. 1)。これら 5 株で破壊されている遺伝子は、*HOF1*、*VMS1*、*SPC72*、*CNM67*、および *CHC1* であった (Table 1)。また、*pag1* Δ株と *och1* Δ株で、非常に僅かな量の菌体外 TG が検出されたが、候補から除外することにした。菌体外 TG がはっきりと確認できた 5 株の遺伝子の中には脂質の代謝や輸送に直接関わるものではなく、細胞骨格の形成に働く遺伝子 (*HOF1*、*SPC72*、および *CNM67*)、分泌小胞に関与する遺伝子 (*CHC1*)、およびタンパク質の品質管理に働く遺伝子 (*VMS1*) が存在した<sup>20)</sup>。さらに、*CHC1* はアクチン細胞骨格の形成に関与し、*VMS1* のヌル変異はアクチン細胞骨格の形態異常を引き起こす。このように TG 分泌形質は、細胞骨格や分泌小胞の異常に関与している可能性が示唆される。次に、それらの 5 つの遺伝子の中に STG1 株の TG 分泌変異の原因となる TG 分泌抑制遺伝子があるかを知るために、それらの各 YKO 株を STG123 株と交配し、halo<sup>+</sup>形質の相補性を調べた。その結果、*spc72* Δ株との交配株のみが halo<sup>+</sup>形質を示し、相補しなかった (結果省略)。また、*chc1* Δ株は、STG123 株との交配株が形成されず、ハロ検定ができなかった。一方、各交配株の菌体外 TG を TLC で確認すると、TG 分泌量に差があるが、*spc72* Δ株の他に *hof1* Δ株と *cnm67* Δ株の交配株において非常に僅かな量の菌体外 TG が検出され (Fig. 2)、これらは STG123 株の TG 分泌形質を完全には相補しないと判断した。*spc72* Δ株の交配株の TG 分泌量が顕著であった。halo<sup>+</sup>形質と菌体外 TG が検出される形質とが一致しない株が存在したが、これは各々の実験方法での検出限界の違いが関係していると思われる。さらに、STG123 株は、有糸分裂期の細胞でスピンドル微小管の方向性が異常となり細胞極性が失われている可能性がある、多核

Table 1 Genes showing halo<sup>+</sup> phenotype by gene disruption

Plate No.	Clone No.	Gene Name	Description
103	G - 6	<i>HOF1</i>	F-BAR protein that regulates actin cytoskeleton organization.
110	C - 10	<i>VMS1</i>	Peptidyl-tRNA hydrolase involved in protein quality control. Null mutant presents abnormality in actin cytoskeleton morphology.
135	G - 5	<i>SPC72</i>	γ-Tubulin small complex (γ-TuSC) receptor involved in microtubule nucleation. Component of the SPB.
171	B - 1	<i>CNM67</i>	Component of the SPB outer plaque required for spindle orientation and mitotic nuclear migration.
171	D - 1	<i>CHC1</i>	Clathrin heavy chain, subunit of the major coat protein involved in intracellular protein transport and endocytosis.

Triacylglycerol を分泌する *Saccharomyces cerevisiae* の育種

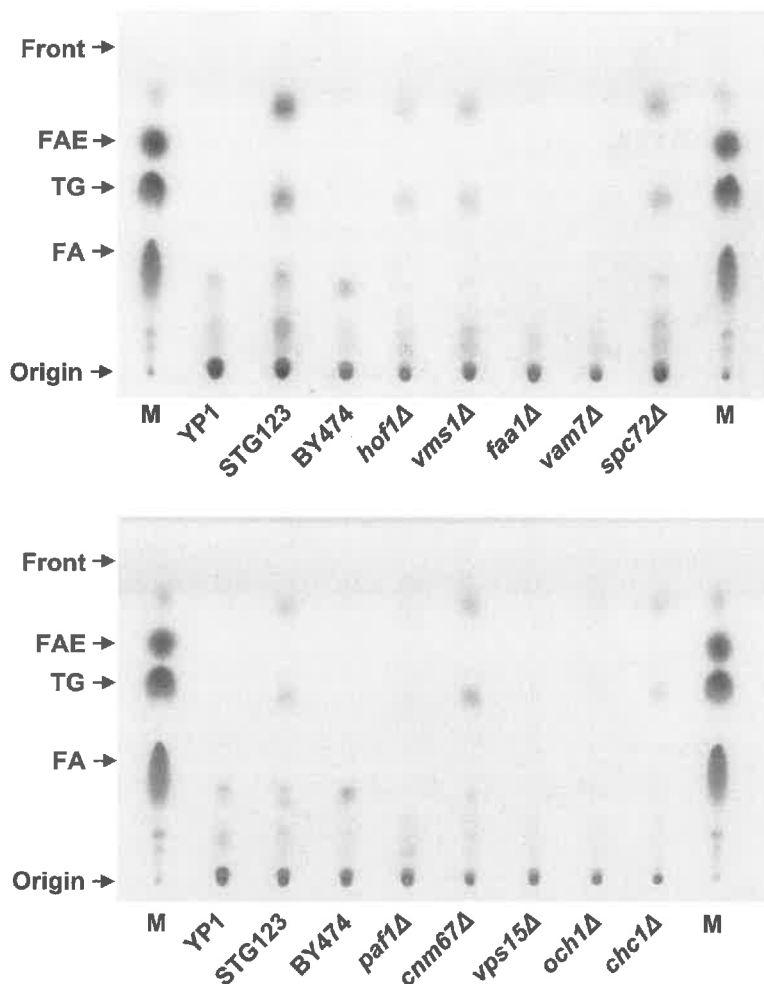


Fig. 1 TLC chromatograms of lipids excreted into culture fluids (YKO strains). Cells of YKO strains were cultivated in liquid YPAD for 72 hr. Extracellular lipids extracted from culture fluids containing cells were analyzed on TLC. Conditions were described in the text. Lane M was spotted with marker materials: oleic acid (FA), olive oil (TG), and ethyl oleate (FAE).

の細胞が出現し、それぞれの核に微小管が見られるなど、微小管および核に関して、*spc72* 遺伝子欠損株で報告されている形質と同じ形質を示した (結果省略)。スピンドル極体 (spindle pole body: SPB) には異常は認められなかった。そこで、STG123 株の *SPC72* 遺伝子のシーケンシングを行い、変異点の確認を試みたが、親株との塩基配列の違いは見出せなかった (*SPC72* 遺伝子の上流 414 塩基から下流 218 塩基までシーケンシングを行った)。

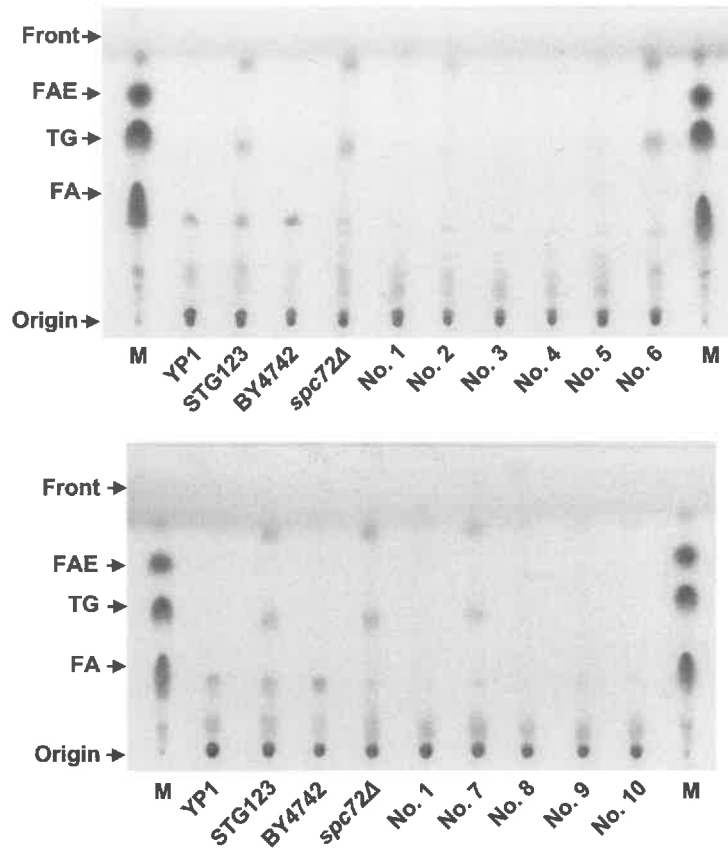


Fig. 2 TLC chromatogram of lipids excreted into culture fluids (complementation test). Cells of hybrid strains were cultivated in liquid YPAD for 72 hr. Extracellular lipids extracted from culture fluids containing cells were analyzed on TLC. Conditions were described in the text. Hybrid strains were No. 1: STG123 × BY4742, No. 2: STG123 × *hof1Δ*, No. 3: STG123 × *vms1Δ*, No. 4: STG123 × *faa1Δ*, No. 5: STG123 × *vam7Δ*, No. 6: STG123 × *spc72Δ*, No. 7: STG123 × *paf1Δ*, No. 8: STG123 × *cnm67Δ*, No. 9: STG123 × *vps15Δ*, No. 10: STG123 × *och1Δ*. Lane M was spotted with marker materials: oleic acid (FA), olive oil (TG), and ethyl oleate (FAE).

#### YP1 株の *SPC72* 遺伝子および *HOF1* 遺伝子の破壊

YKO 株以外の株でも普遍的に *SPC72* および *HOF1* 遺伝子の破壊で TG 分泌形質を付与できるかを YP1 株での遺伝子破壊で検討した。YKO 株由来のゲノム DNA を鋳型として PCR を行い、*spc72Δ* および *hof1Δ* DNA を増幅し、それらの DNA で YP1 株を形質転換し、相同組換えにより YP1 株の各候補遺伝子を破壊した。目的の形質転換体であるかは PCR 解析によって確認した (結果省略)。破壊株の菌体



## Triacylglycerol を分泌する *Saccharomyces cerevisiae* の育種

外脂質を TLC で確認した結果、*spc72Δ* 破壊株で TG の分泌が確認できた (Fig. 3)。しかし、菌体外 TG 量は YKO 株よりも少なかった。また、*hof1Δ* 株は TLC の結果が見にくいですが、菌体外 TG を検出でき、菌体外 TG 量は少なかった。この結果から、*S. cerevisiae* において *SPC72* 遺伝子や *HOF1* 遺伝子の破壊により、TG 蓄積型を TG 分泌型に変換することが可能であることが示された。また、その中でも *SPC72* 遺伝子の破壊がより高い TG 分泌形質を示すことが確認された。

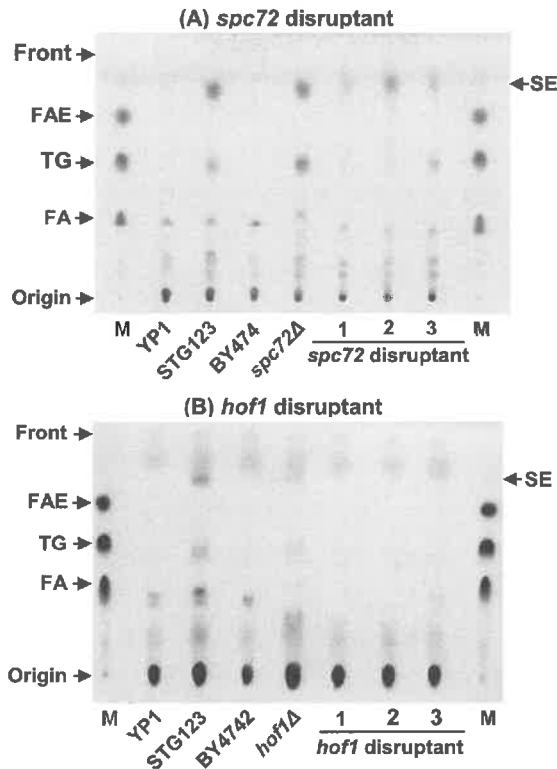


Fig. 3 TLC chromatograms of lipids excreted into culture fluids (disruption in YP1 strain). Cells of hybrid strains were cultivated in liquid YPAD for 72 hr. Extracellular lipids extracted from culture fluids containing cells were analyzed on TLC. Conditions were described in the text. (A) *spc72* disruptant. (B) *hof1* disruptant. In each disrupted gene, three disruptants indicated by 1, 2, and 3 were examined. Lane M was spotted with marker materials: oleic acid (FA), olive oil (TG), and ethyl oleate (FAE). SE: steryl esters.

### Sudan Black 染色による脂肪滴の観察

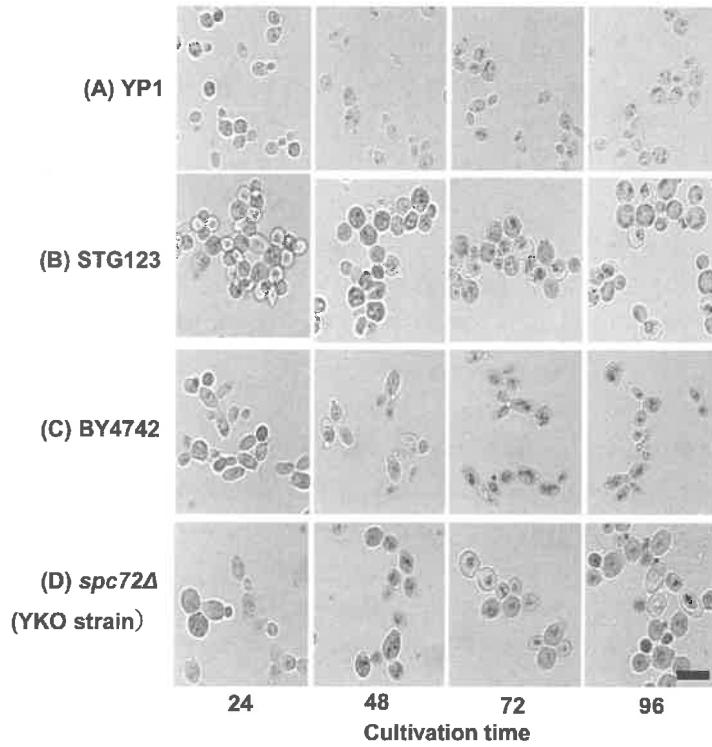
これまでの結果から、*spc72Δ* 株、*hof1Δ* 株、*vms1Δ* 株、*cnm67Δ* 株、および *chc1Δ* 株で TG の分泌が確認された。Fei ら<sup>21, 22)</sup>は、脂質の輸送や蓄積がヒト疾患に与える影響を明らかにする目

的で、YKO コレクションを用いて、脂肪滴 (lipid droplet: LD) の形態形成に関わる遺伝子のスクリーニングを行った。その過程において野生株と各遺伝子破壊株の定常期での LD 量 (個数) を比較し、YKO 株のうち計 116 株で LD が増加し、計 17 株で LD が減少していることを明らかにした。LD 増加株には、*spc72*  $\Delta$  株、*cnm67*  $\Delta$  株、*och1*  $\Delta$  株、および *chc1*  $\Delta$  株が含まれ、このうち *spc72*  $\Delta$  株での増加は特に顕著であった。一方、*hof1*  $\Delta$  株では LD 量が減少した。このことを確認するため、本研究においても、Sudan Black を用いて各株の LD を染色し、経時的に観察した (Fig. 4)。まず、YPI 株と BY4742 株の LD は培養を通じて大きな変化はなく、LD の大きさも一定であった (Fig. 4, 1 (A)と(C))。一方、STG123 株と *spc72*  $\Delta$  株は培養 72 時間以降、LD の数の増加、LD の巨大化、LD の細胞の中心への局在などが観察されるようになった (Fig. 4, 1 (B)と(D))。STG123 株と *spc72*  $\Delta$  株は培養 72 時間以降に TG 分泌形質が顕著に現れるため LD の変化と TG 分泌との関係が示唆される。さらに、TG 分泌形質を示した *hof1*  $\Delta$  株、*cnm67*  $\Delta$  株、および *chc1*  $\Delta$  株について観察を行った (Fig. 4, 2)。その結果、これらの株で培養 72 時間以降に LD の形態や細胞内局在が変化した (Fig. 4, 2、*chc1*  $\Delta$  株の結果は省略)。このように、TG 分泌形質 (*halo*<sup>+</sup>) を示す YKO 株においても LD の形態や細胞内局在の変化が観察されたことから、LD の存在態様と TG の分泌とが深く関わっていることが示唆された。

### 考察

本研究で、*S. cerevisiae* において *SPC72* および *HOF1* 遺伝子を破壊することによって TG 分泌形質を付与できることが明らかになった。特に *SPC72* 遺伝子の破壊が顕著な TG 分泌形質を示した。脂質は細胞内で LD に蓄積される。LD は直径 100 ~ 400 nm 程度の球状の細胞内オルガネラで、TG と Steryl esters (SE) がその構成成分の 95% を占め、表層をリン脂質の一重膜と数種類のタンパク質が覆っている<sup>23,24)</sup>。これらのタンパク質は脂肪滴の生合成、発達、および安定性に関わっており、*S. cerevisiae* では 40 種類に及ぶタンパク質が LD 表層に存在することが知られている。また、近年の研究から、LD は他の細胞内オルガネラと相互作用することが明らかとなり、これら *S. cerevisiae* 変異株は、脂質によって引き起こされるヒト疾患の解明モデルとして注目を集めている。酵母における LD の形成は、小胞体で合成された TG と SE が小胞体二重膜に蓄積して球状の形態を形成し、これが小胞体から遊離した後、リン脂質の一重膜とタンパク質で覆われて起こる。動物細胞では小さな LD が互いに融合して発達していくことが知られている。Boström ら<sup>24)</sup>は微小管に依存して LD 同士が融合し、モータータンパク質であるダイニンが微小管同士の接触をサポートしていることなどを明らかにしている。一方、Spc72p は 622 アミノ酸残基からなり、coiled-coil 構造を有している。Spc72p は酵母の微小管形成中心である SPB の outer plaque に局在し、Tub4p、Spc97p、および Spc98p から構成される微小管結合複合体に結合して微小管を SPB に固定する働きをしており、細胞質微小管や星状体微小管の形成に関与している<sup>20,25-28)</sup>。*SPC72* 遺伝子の欠損株は、星状体微小管が非常に短小化し、方向性が失われるため、細胞分裂時の核の移動に支障が生じ、多核細胞や無核細胞となる<sup>26,27)</sup>。これらの知見を本実験での結果と照らし合わせると、

1. Parent, STG123, and *spc72Δ* strains



2. *hof1Δ* and *cmn67Δ* strains (YKO strains)

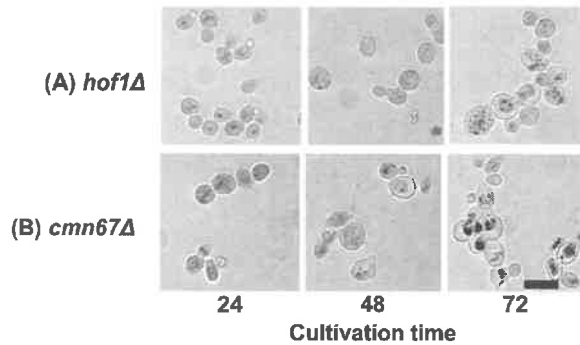


Fig. 4 Cells stained with Sudan black. 1. Parent, STG123, and *spc72Δ* strains. (A) YP1, (B) STG123, (C) BY4742, (D) *spc72Δ* strain (YKO strain). 2. *hof1Δ* and *cmn67Δ* strains (YKO strains). Cells were cultivated in liquid YPAD for indicated time. Cells were stained with Sudan Black as described in the text. Bar = 10  $\mu$ m.

*SPC72* 遺伝子の欠損によって引き起こされる細胞質微小管の短小化や細胞極性の消失が、LD の形態形成や局在に欠損を生じさせている可能性が推測される。さらに、Hof1p (Cyk2p) はアクチンケーブルの形成や細胞質分裂に関与している<sup>20,29-32)</sup>。*S. cerevisiae* においてアクチンケーブルは母-芽軸に沿って細胞内に整列し、細胞の極性の形成や様々な物質の母細胞から芽への輸送に機能している。Hof1p は細胞の有糸分裂セプチン複合体として bud neck (分裂部位) に局在し、アクチン繊維やアクチンケーブルの形成に働く Bnr1p と結合する<sup>29,30)</sup>。Hof1p のアクチン結合ドメインを欠失するとアクチンケーブルの形成が *in vivo* で欠損する<sup>30)</sup>。また、*hof1Δ*株はアクトミオシンリングを形成できず、母細胞と芽(娘細胞)との隔離が行えなく、大きく細長くなった芽をもつ細胞を形成する<sup>29,31)</sup>。さらに、Lippincot ら<sup>31)</sup>は *HOF1* 遺伝子の過剰発現によりセプチンが bud neck から消失したことから Hof1p がセプチンの局在を制御している可能性を示唆した。セプチン複合体には Cdc12p が含まれており、Kusch ら<sup>32)</sup>は *cdc12-1* 変異株において、野生株と比較して微小管形成が異常になることを示している。これらのことから *hof1Δ*株ではアクチンケーブルにおける欠損によって *spc72Δ*株同様に細胞極性を損失し、LD の局在を不安定にすることで TG 分泌形質を獲得している可能性が考えられる。また、*CNM67* は細胞骨格の形成に働き、*CHC1* は分泌小胞、エンドサイトーシス、およびアクチン細胞骨格の形成などに関与し、*VMS1* はアクチン細胞骨格の形成に関与する。一方、TG 分泌形質を示す遺伝子破壊株は、LD の形態や局在に変化が生じている。これらの結果から、TG 分泌形質は、細胞骨格、分泌小胞、エンドサイトーシスの異常により LD の形態や局在が変化して引き起こされた可能性が示唆される。野生株では、細胞骨格が LD の局在や細胞内輸送を巧妙かつ厳格に制御して細胞膜への接触を防ぎ、TG の分泌を抑制しているのかもしれない。

本研究からは、STG1 株の TG 分泌変異の原因となる TG 分泌抑制遺伝子を同定することはできなかった。TG 分泌形質を示した YKO 株を STG123 株と交配した相補性試験では、野生型遺伝子と変異型遺伝子をもつ状態でも相補しなかった場合と同じ表現型を示し、原因遺伝子を同定できなかった可能性がある。5 個の候補遺伝子全てについて確実に塩基配列の解析を行う必要が考えられる。また、STG1 変異株は細胞凝集性を示し、これが様々な解析を困難にしている可能性がある。

本研究では、パン製造や酒の醸造に利用される酵母である *S. cerevisiae* において *SPC72* 遺伝子や *HOF1* 遺伝子の破壊によって TG 分泌形質を付与できた。油脂の工業的大量生産を目的として、これまでに幾つかの油脂生産性の高い酵母が見出されてきた<sup>33)</sup>。油脂高生産酵母には、*Rhodotorula toruloides*<sup>8)</sup>、*Candida* 属<sup>6)</sup>、*Lipomyces starkeyi*(油脂を細胞内に 60%以上蓄積)<sup>7)</sup>、*Yarrowia lipolytica*<sup>9)</sup>、*Kluyveromyces lactis*<sup>34,35)</sup>などが存在する。しかし、これらは、いずれも油脂蓄積型酵母である。Spc72p はスピンドル極体の構成成分であり、Hof1p はアクチンケーブル形成に機能するので、これらのタンパク質は普遍性が高い。それゆえに、種々の酵母に *SPC72* 遺伝子や *HOF1* 遺伝子のオルソログが存在すると推定される。実際に、*SPC72* 遺伝子のオルソログが *K. lactis* に存在し、*HOF1* 遺伝子のオルソログが *Y. lipolytica* に存在する。オルソログの遺伝子の破壊によって油脂高生産酵母を油脂分泌型酵母に変換することができれば、油脂生産量を顕著に向上でき、手間や生産コストも大いに低減できると考えられる。また、複数の

## Triacylglycerol を分泌する *Saccharomyces cerevisiae* の育種

オルソログの遺伝子を破壊すれば、さらに効果が増し、油脂の分泌生産をより一層増強できる可能性も考えられる。本研究の成果は、酵母による油脂の工業的大量生産を大きく進展させることができると期待できる。

### 謝辞

本研究にご協力いただきました福山大学生命工学部生物工学科遺伝子工学研究室の皆様に厚く感謝します。

### 文献

- 1) 柳田晃良、池田郁男、永尾晃治. 食品の機能性成分の特徴と作用機序-3 機能性脂質. 化学と生物, **44**, 563-568 (2006)
- 2) 永田純一. 生活習慣病改善効果が期待される機能性構造油脂. 日本未病システム学会雑誌, **10**, 279-282 (2004)
- 3) 清水昌. Single cell oil 微生物によって作られる有用油脂類. 化学と生物, **31**, 312-322 (1993)
- 4) L. Hansson and M. Dostalek. Effect of culture conditions on mycelial growth and production of  $\gamma$ -linolenic acid by the fungus *Mortierella ramanniana*. *Appl. Microbiol. Biotech.*, **28**, 240-246 (1988)
- 5) X. Tang, H. Chen, Y. Q. Chen, W. Chen, V. Garre, Y. Song and C. Ratledge. Comparison of biochemical activities between high and low lipid-producing strains of *Mucor circinelloides*: an explanation for the high oleaginicities of strain WJ11. *Plos One*, DOI:10.1371/journal.pone.0128396 (2015)
- 6) K. Thangavelu, P. Sundararaju, N. Srinivasan, I. Muniraj and S. Uthandi. Simultaneous lipid production for biodiesel feedstock and decontamination of sago processing wastewater using *Candida tropicalis* ASY2. *Biotechnol. Biofuels*, **13**, 35 (2020)
- 7) J. Brandenburg, J. Blomqvist, J. Pickova, N. Bonturi, M. Sandgren and V. Passoth. Lipid production from hemicellulose with *Lipomyces starkeyi* in a pH regulated fed-batch cultivation. *Yeast*, **33**, 451-462 (2016)
- 8) M. Chmielarz, J. Blomqvist, S. Sampels, M. Sandgren and Volkmar Passoth. Microbial lipid production from crude glycerol and hemicellulosic hydrolysate with oleaginous yeasts. *Biotechnol. Biofuels*, **14**, 65 (2021)
- 9) Y. A. Tsigie, C.-Y. Wang, N. S. Kasim, Q.-D. Diem, L.-H. Huynh, Q.-P. Ho, C.-T. Truong and Y.-H. Ju. Oil production from *Yarrowia lipolytica* Po1g Using Rice Bran Hydrolysate. *J. Biomed. Biotechnol.*, **2012**, 378384 (2012)
- 10) Y. Nojima, A. Kibayashi, H. Matsuzaki, T. Hatano and S. Fukui. Isolation and characterization of triacylglycerol-secreting mutant strain from yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **45**, 1-6 (1999)
- 11) E. A. Winzeler *et al.*. Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science*, **285**, 901-906 (1999)
- 12) A. D. Keith, M. R. Resnick and A. B. Haley. Fatty acid desaturase mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, **98**, 415-420 (1969)
- 13) R. K. Saiki, D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis and H. A. Erlich.

- Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-491(1988)
- 14) H. Ito, Y. Fukuda, K. Murata and A. Kimura. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.*, **153**, 163-168 (1983)
- 15) J. Mark, L. Riles and J. H. Hegemann. Gene disruption. In C. Gerald (eds.). Guide to yeast genetics and molecular and cell biology part B. Academic Press, Inc, New York (2002)
- 16) L. Hereford, K. Fahrner, J. Woolford, Jr., M. Rosbash, D. B. Kaback. Isolation of yeast histone genes H2A and H2B. *Cell*, **18**, 1261-1271 (1979)
- 17) M. D. Rose, F. Winston and P. Hieter. Methods in yeast genetics. A laboratory course manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, pp. 19-29 (1990)
- 18) T. Yagi, A. Hatano, T. Nakanishi, T. Hatano and S. Fukui. Extracellular production of palmitoleic triglycerides by a yeast, *Trichosporon*. *J. Ferment. Bioeng.*, **77**, 164-168 (1994)
- 19) 野島康弘. 酵母菌による脂質の分泌生産に関する研究. 広島大学博士論文. (1999)
- 20) *Saccharomyces* Genome Database; SGD URL: <https://www.yeastgenome.org>
- 21) W. Fei, G. Shui, B. Gaeta, X. Du, L. Kuerschner, P. Li, A. J. Brown, M. R. Wenk, R. G. Parton and H. Yang. Fld1p, a functional homologue of human seipin, regulates the size of lipid droplets in yeast. *J. Cell Biol.*, **180**, 473-482 (2008)
- 22) W. Fei, G. Alfaro, B.-P. Muthusamy, Z. Klaassen, T. R. Graham, H. Yang, C. T. Beh. Genome-wide analysis of sterol-lipid storage and trafficking in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell*, **7**, 401-414 (2008)
- 23) T. Czabany, A. Wagner, D. Zweytick, K. Lohner, E. Leitner, E. Ingolic and G. Daum. Structural and biochemical properties of lipid particles from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **283**, 17065-17074 (2008)
- 24) P. Boström, M. Rutberg, J. Ericsson, P. Holmdahl, L. Andersson, M. A. Frohman, J. Borén and S.-O. Olofsson. Cytosolic lipid droplets increase in size by microtubule-dependent complex formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, **25**, 1945-1951 (2005)
- 25) M. Knop and E. Schiebel. Receptors determine the cellular localization of a  $\gamma$ -tubulin complex and thereby the site of microtubule formation. *EMBO J.*, **17**, 3952-3967 (1998)
- 26) G. Pereira, U. Grueneberg, M. Knop and E. Schiebel. Interaction of the yeast  $\gamma$ -tubulin complex-binding protein Spc72p with Kar1p is essential for microtubule function during karyogamy. *EMBO J.*, **18**, 4180-4195 (1999)
- 27) S. Souès and I. R. Adams. *SPC72*: a spindle pole component required for spindle orientation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Sci.*, **111**, 2809-2818 (1998)
- 28) D. Hoepfner, F. Schaerer, A. Brachat, A. Wach and P. Philippsen. Reorientation of mispositioned spindles in short astral microtubule mutant *spc72Δ* is dependent on spindle pole body outer plaque and Kar3 motor protein. *Mol. Biol. Cell*, **13**, 1366-1380 (2002)
- 29) T. Kamei, K. Tanaka, T. Hihara, M. Umikawa, H. Imamura, M. Kikyo, K. Ozaki and Y. Takai. Interaction of Bnr1p with a novel Src homology 3 domain-containing Hof1p. *J. Biol. Chem.*, **273**, 28341-28345 (1998)

## Triacylglycerol を分泌する *Saccharomyces cerevisiae* の育種

- 30) M. V. Garabedian, A. Wirshing, A. Vakhrusheva, B. Turegun, O. S. Sokolova and B. L. Goode. A septin-Hof1 scaffold at the yeast bud neck binds and organizes actin cables. *Mol. Biol. Cell*, **31**, 1988-2001 (2020)
- 31) J. Lippincott and R. Li. Dual function of Cyk2, a cdc15/PSTPIP family protein, in regulating actomyosin ring dynamics and septin distribution. *J. Cell Biol.*, **143**, 1947-1960 (1998)
- 32) J. Kusch, A. Meyer, M. P. Snyder, and Y. Barral. Microtubule capture by the cleavage apparatus is required For proper spindle positioning in yeast. *Genes Dev.*, **16**, 1627-1639 (2002)
- 33) A. Beopoulos, J. M. Nicaud. Yeast: a new oil producer? *OCL.*, **19**, 22-28 (2012)
- 34) 高桑直哉. 農業副産物を活用した有用油脂の生産. *オレオサイエンス*, **18**, 27-34 (2018)
- 35) A. Y. Alghamdi. Response of *Kluyveromyces lactis* to sodium chloride salt stress and the possibility of enhanced lipids production. *J. Pure Appl. Microbiol.*, **11**, 529-534 (2017)

\*\*\*\*\*

Annu. Rep. Fac. Life Sci. Biotechnol, Fukuyama Univ. (21), 1-15 (2022)

### Breeding of *Saccharomyces cerevisiae* secreting triacylglycerol

Takayuki Ogo, Hiroki Fujii, Hitomi Ikemoto, Hiroaki Matsuzaki and Takushi Hatano

Department of Biotechnology, Faculty of Life Science and Biotechnology,  
Fukuyama University, Fukuyama, Hiroshima 729-0292, Japan

Most of the lipid-producing microorganisms accumulate produced lipids in their cells. For the purpose of efficient production of useful lipid by enhancing the lipid-producing ability and reducing extraction costs, we aimed to convert the yeast *Saccharomyces cerevisiae* from the lipid-accumulating type to the lipid-secreting type. In a previous study, we obtained a mutant strain (strain STG1) that extracellularly produces lipids containing triacylglycerol (TG), suggesting the presence of a gene that suppresses TG secretion. In this study, we searched for gene disruption strains that secrete TG from the Yeast knock-out collection (YKO collection) of *S. cerevisiae*. As a result, extracellular TG was detected clearly in *spc72Δ*, *hof1Δ*, *vms10Δ*, *cnm67Δ*, and *chc1Δ* strains. In a complementation test, the *spc72Δ* strain did not complement the TG secretion mutation of the STG1 strain. Furthermore, disruption of the *SPC72* and *HOF1* genes in the *S. cerevisiae* YP1 strain allowed TG to be extracellularly secreted. Thus, a conversion system from the lipid-accumulating type to the lipid-secreting type was constructed in *S. cerevisiae*. Morphological changes of lipid droplets were observed in YKO strains exhibiting TG-secreting traits.

**Keywords:** secretory production, triacylglycerol, lipid droplet, *Saccharomyces cerevisiae*