

*Yarrowia lipolytica*における炭化水素の代謝

岩間 亮・福田 良一*

はじめに

石油の成分である直鎖状の飽和炭化水素(*n*-アルカン)は燃料として使用されるだけでなく、さまざまな化成品の原料としても使用される。限りある石油資源を有効に利用するためには、*n*-アルカンや代替資源となる油脂を効率よく化成品などに変換するシステムを構築する必要がある。微生物を利用した*n*-アルカンや脂肪酸の変換システムはその有効な方策の一つであると期待される。

細菌や酵母、糸状菌には、*n*-アルカンを炭素源およびエネルギー源として利用できるものが存在する。*n*-アルカンを資化できる酵母は比較的多く、The Yeasts: A Taxonomic Study 第5版に記載されている1270種の酵母のうち、少なくとも28属、180種の酵母が炭素鎖長16の*n*-ヘキサデカンの資化能を持つことが明らかとなっている。酵母の*n*-アルカン代謝については、*Candida maltosa*、*Candida tropicalis*、*Yarrowia lipolytica*などにおいて精力的に研究がなされてきたが、*n*-アルカンの代謝経路とその制御機構の理解は*Y. lipolytica*を用いた研究により大きく進展してきた。本稿では、*Y. lipolytica*とそれによる*n*-アルカンの代謝機構を紹介するとともに、*Y. lipolytica*の有用物質生産への応用の可能性について解説する。

Yarrowia lipolytica

*Y. lipolytica*は、古くは*Candida lipolytica*とも呼ばれた酵母であり、子囊菌類に属するが、酒類醸造やパン作りに利用される酵母*Saccharomyces cerevisiae*とは進化的には比較的離れた偏性好気性の二形性酵母である。*Y. lipolytica*は自然界に広く分布しており、土壌や汚水、石油で汚染された環境などから単離される。また、チーズやヨーグルト、ソーセージなど脂質やタンパク質に富む食品などからもよく単離される。*Y. lipolytica*は、一般に32~35°C以上では生育できず、ヒトに対して病原性は示さないと考えられており、米国食品医薬局によりGRAS (generally recognized As safe) にも認定されている¹⁾。

*Y. lipolytica*は、一倍体としての安定な生活環を有するヘテロタリックな酵母であり、接合による二倍体形性能

と孢子形成能を持つことから、掛け合わせによる育種や変異株の単離、遺伝学的解析が可能である。また、形質転換効率は比較的高く、分子生物学的手法も整備されている。さらに相同組換えの効率も高く、遺伝子破壊が容易である。これらのことから、*Y. lipolytica*は本稿で紹介する*n*-アルカンなどの疎水性炭素源の代謝だけでなく、ペルオキシソームの生合成や二形性、ミトコンドリアの電子伝達系などさまざまなプロセスの分子機構に関する基礎研究においてモデル生物として利用されてきた。*Y. lipolytica*はいわゆるnon-conventional yeastの中でもっとも研究の進んでいる酵母の一つである。

*Y. lipolytica*のゲノム配列は2000年代に解読され²⁾、公開されている³⁾。*Y. lipolytica*のゲノムは約20.5 Mbで、タンパク質をコードする遺伝子は約6450存在すると推定されている⁴⁾。このうち約880の遺伝子については、*Y. lipolytica*あるいはその近縁種に特異的なものと考えられている⁴⁾。

*Y. lipolytica*はグルコースやグリセロール、アルコールなどさまざまな炭素源を利用できるが、もっとも重要な特徴の一つは、*n*-アルカンや油脂などの疎水性化合物を炭素源として利用する能力を持つことである¹⁾。この*n*-アルカン資化能から、*Y. lipolytica*は1960年代には石油を材料としたタンパク質生産 (single-cell protein, SCP) の宿主として期待された。また、*n*-アルカンからクエン酸や2-オキシグルタル酸などの有機酸を生産する高い能力を持つことから注目されている。一方で、*Y. lipolytica*は脂質を高度に生産し蓄積する能力も持っており、異種由来の脂肪酸の伸長酵素遺伝子や不飽和化酵素遺伝子などを導入することにより、エイコサペンタエン酸を生産させる系が開発され、実用化されている⁵⁾。

*Y. lipolytica*は、タンパク質を分泌する能力も高く、プロテアーゼやリパーゼなどの加水分解酵素を菌体外に分泌する。特にアルカリプロテアーゼは、1~2 g/Lときわめて効率よく分泌されることから、タンパク質の生産の宿主としても可能性を持っている¹⁾。

*Y. lipolytica*は、グリセロールを炭素源として旺盛に生育するという特徴も持つ。この性質から、グリセロールを材料とした有用化合物生産の宿主としても注目されている。また、多くの生物種にはグルコースが存在する

* 著者紹介 東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻 (助教) E-mail: afukuda@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

と他の炭素源の代謝に関わる遺伝子の転写が抑制されるカタボライト抑制が存在するのに対して, *Y. lipolytica* では *n*-アルカンの代謝に関わる遺伝子の転写は *n*-アルカンの存在により誘導されるが, それらの多くはグルコースではそれほど抑制されず, グリセロールにより抑制されるという生物学的に興味深い現象が見られる⁶⁾.

*Y. lipolytica*における疎水性炭素源代謝経路

Y. lipolytica を *n*-アルカンや油脂からの物質生産に利用するためには, その代謝経路を理解する必要がある. *Y. lipolytica* において, *n*-アルカンは長鎖アルコール, 長鎖アルデヒドを経て脂肪酸に酸化され, アシルCoAに活性化された後, β 酸化により代謝されるか, 脂質合成に利用されると考えられてきた(図1)⁷⁻⁹⁾. 一方, 油脂はリパーゼによって脂肪酸に分解されて取り込まれ, アシルCoAに活性化された後, 同様に β 酸化により代謝されるか脂質合成に利用される(図1). ここでは, 筆者らの最近の研究により明らかになってきた *n*-アルカンの代謝の機構について紹介する.

***n*-アルカン末端水酸化酵素** *n*-アルカンの資化能を持つ酵母において, 取り込まれた *n*-アルカンは小胞体に輸送され, CYP52ファミリーに属するシトクロムP450 (以下P450) によって長鎖アルコールに酸化される(図1). *C. maltosa* や *C. tropicalis* などの *n*-アルカン資化酵母は複数のCYP52ファミリーのP450遺伝子を有しているが^{10,11)}, *Y. lipolytica* のゲノムにはCYP52ファミリーのP450をコードする遺伝子として *ALK1*~*ALK12* の12種が存在する(図2)^{12,13)}. これらの *ALK* 遺伝子のうち *ALK1* と *ALK2* の二重破壊株は *n*-アルカンを

単一の炭素源とした生育に重篤な欠損を示すことから, それらの産物である Alk1p と Alk2p が *n*-アルカン代謝に重要な役割を果たすと考えられる^{12,14)}. さらに, Alkタンパク質をコードする *ALK* 遺伝子がすべて破壊された $\Delta alk1-12$ 株は *n*-アルカンを炭素源とした培地で生育できないが¹⁴⁾, Alk3p, Alk6p, Alk9p, Alk10p の高生産により *n*-アルカンの資化能を獲得することから, これらのP450も *n*-アルカンの水酸化活性を持つと考えられる¹⁵⁾. これらP450のうち, Alk1p と Alk3p は炭素鎖長10~18の幅広い鎖長の *n*-アルカンに, Alk2p, Alk6p, Alk9p はより長鎖の *n*-アルカンに, Alk10p はより短鎖の *n*-アルカンに特異性を示す. 一方, Alk3p, Alk4p, Alk5p, Alk6p, Alk7p を高発現させた $\Delta alk1-12$ 株にドデカン酸を与えると12-ヒドロキシドデカン酸およびドデカン二酸が生産されることから, これらのAlkタンパク質は脂肪酸の ω 末端を水酸化する活性を持つと考えられる¹⁵⁾. Alkタンパク質の基質特異性と構造の類似性にはある程度の相関が見られ, *n*-アルカンに対して水酸化活性を示すAlk1p, Alk2p, Alk9p, Alk10pは比較的アミノ酸配列の類似性が高く, また脂肪酸の ω 末端に水酸化活性を示すAlk5pとAlk7pも高い類似性を示す(図2).

長鎖アルコールの酸化酵素 *n*-アルカン資化酵母において, *n*-アルカンの酸化により生じる長鎖アルコールは, 小胞体の長鎖アルコール脱水素酵素 (fatty alcohol dehydrogenase, FADH) またはペルオキシソームの長鎖アルコール酸化酵素 (fatty alcohol oxidase, FAOD) により長鎖アルデヒドに酸化されると考えられている(図1). FAODについては *C. tropicalis* においてコードする遺伝子 *FAOT* が単離され, 炭素鎖長18の *n*-アルカンの代謝に関わることが報告されている¹⁶⁾. 一方, FADH については未解明であった. *Y. lipolytica* のゲノムには, *S. cerevisiae* のアルコール脱水素酵素遺伝子のオルソロ

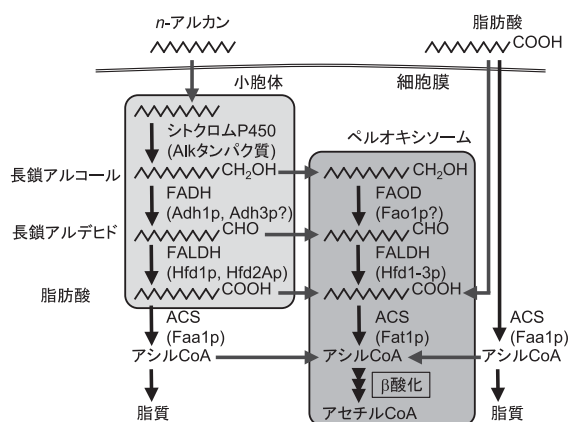


図1. *Y. lipolytica* における *n*-アルカン代謝経路. FADH: 長鎖アルコール脱水素酵素, FAOD: 長鎖アルコール酸化酵素, FALDH: 長鎖アルデヒド脱水素酵素, ACS: アシルCoA合成酵素. カッコ内には各反応に関わるタンパク質名を示した.

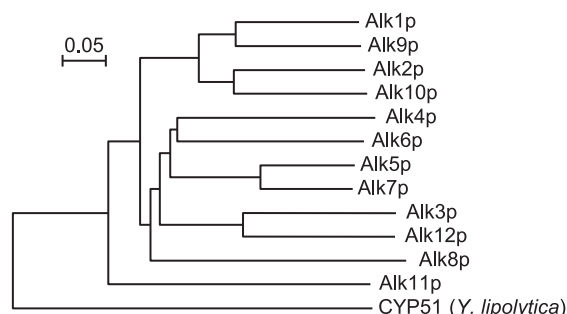


図2. *Y. lipolytica* のAlkタンパク質の分子系統樹. *Y. lipolytica* のエルゴステロール合成に関わるCYP51は外群として使用した.

グ *ADH1* ~ *ADH7*, *FADH* と, *C. tropicalis* の FAOD 遺伝子のオルソログ *FAO1* が存在する¹⁷⁾. *Y. lipolytica* は長鎖アルコールを炭素源として生育することもできるが, *ADH1*, *ADH3*, *FAO1* の3重破壊株は炭素鎖長12および14の長鎖アルコールを含む培地で生育できなくなることから, これらの遺伝子の産物 *Adh1p*, *Adh3p*, *Faolp* の3つが長鎖アルコールの資化や毒性の緩和に関与すると考えられる¹⁸⁾. *Adh1p* と *Adh3p* は細胞質タンパク質であるが, 分画すると膜画分にも検出されることから, 一過的に小胞体などに局在する可能性も考えられる. また, *Faolp* はペルオキシソームに局在する. 一方, *ADH1* ~ *ADH7*, *FADH*, *FAO1* をすべて破壊した株は炭素鎖長10および12の *n*-アルカンを単一の炭素源とした生育に部分的な欠損を示すことから, これらのうちのいずれかは *n*-アルカンの代謝に関わる可能性が考えられる. しかしながら, この株は炭素鎖長14および16の *n*-アルカンの資化には大きな欠損は示さないことから, *n*-アルカンの代謝の過程で生成した長鎖アルコールの酸化には他の酵素も関与すると考えられる¹⁸⁾.

長鎖アルデヒドの酸化酵素 *n*-アルカンの代謝の過程で生成する長鎖アルデヒドは, 小胞体またはペルオキシソームの長鎖アルデヒド脱水素酵素により酸化され脂肪酸に変換されると考えられてきた(図1). その反応を担う酵素は不明であったが, *Y. lipolytica* を用いた解析から正体が明らかになってきた. *S. cerevisiae* は長鎖アルデヒド脱水素酵素遺伝子として *HFD1* を有し, その産物 *Hfd1p* はスフィンゴシン1-リン酸の代謝過程で生成するヘキサデセナールのヘキサデセン酸への酸化を触媒する¹⁹⁾. *Y. lipolytica* のゲノムには, *S. cerevisiae* の *HFD1* のオルソログとして, *HFD1* ~ *HFD4* の4つの遺伝子が存在している. *HFD1* ~ *HFD4* をすべて破壊した $\Delta hfd1-4$ 株は炭素鎖長12~18の *n*-アルカンを単一の炭素源とした培地で生育できなくなること, 大腸菌で生産させた *Hfd* タンパク質は *in vitro* で長鎖アルデヒド脱水素酵素活性を示すことから, これらの産物が *n*-アルカン代謝の過程で生じる長鎖アルデヒドの酸化に関与すると考えられる²⁰⁾. これらのうち, *Hfd1p* は小胞体とペルオキシソームの両方に, *Hfd3p* はペルオキシソームに局在することが示唆されている. また, *HFD2* からは選択的スプライシングにより C 末端に peroxisome targeting signal 1 (PTS1) 様配列を持たない *Hfd2Ap* と PTS1 様配列を持つ *Hfd2Bp* の2つのタンパク質が生じること, *Hfd2Ap* は小胞体とペルオキシソームの両方に局在するのに対して, *Hfd2Bp* はペルオキシソームに局在することも示唆されている. 一方, $\Delta hfd1-4$ 株は培地中に添加

した長鎖アルデヒドを資化できることから²⁰⁾, 取り込まれた長鎖アルデヒドの酸化には他の酵素が関与すると考えられる.

脂肪酸の活性化酵素 脂肪酸は, 膜脂質の合成に利用されるだけでなく, 炭素源やエネルギー源, ホルモンなどの前駆体としても利用される. また, タンパク質の脂質修飾を介して細胞内情報伝達などにも関与する. これらの過程では脂肪酸はアシル CoA に変換され利用される. 脂肪酸のアシル CoA への活性化にはアシル CoA 合成酵素 (acyl-CoA synthetase, ACS) が関与する. *S. cerevisiae* は ACS 遺伝子あるいはその相同遺伝子として *FAA1* ~ *FAA4*, *FAT1*, *FAT2* の6種の遺伝子を持つのに対して, *Y. lipolytica* は, ACS をコードすると推定される遺伝子として, *FAA1* および *FAT1* ~ *FAT4* を含む15種の遺伝子を持つ²¹⁾. これらの産物のうち, ペルオキシソームに局在する *Fat1p* と細胞質および膜に局在する *Faolp* が *n*-アルカンの資化に関与する²¹⁾. また, *Faolp* は細胞外から取り込まれた脂肪酸や *n*-アルカンの代謝により生成した脂肪酸の膜脂質合成への利用に必須の役割を果たす²⁰⁾. 一方で, *FAA1* および *FAT1* ~ *FAT4* をすべて破壊した株は培地に添加した脂肪酸を炭素源として利用できることから, 細胞外から取り込んだ脂肪酸の資化には他のアシル CoA 合成酵素が関与すると考えられる.

疎水性炭素源代謝に関わる遺伝子の重複 *Y. lipolytica* のゲノムの特徴として, 疎水性化合物の代謝に関わる遺伝子を重複して持つことがあげられる. ここまで述べてきたように, *Y. lipolytica* は CYP52 ファミリーの P450 遺伝子, アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子, 長鎖アルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子, アシル CoA 合成酵素遺伝子を重複して有する. さらに, *Y. lipolytica* のゲノムには脂質の代謝に関わる遺伝子として, リパーゼ遺伝子が16, エステラーゼ遺伝子が4, スフィンゴミエリナーゼ遺伝子が11, アシル CoA オキシダーゼ遺伝子が6存在する⁴⁾. また, タンパク質の分解に関わる遺伝子の重複も見られ, 38のアスパラギン酸プロテアーゼ遺伝子と15のセリンプロテアーゼ遺伝子を有する⁴⁾. *Y. lipolytica* は, 進化の過程で脂質やタンパク質の代謝に関わる酵素遺伝子を多重化させ, 多様な基質特異性を持つ酵素を獲得することにより, それらに富む環境に適応してきた可能性が考えられる.

Y. lipolytica における疎水性炭素源代謝の改変と有用化合物生産

Y. lipolytica において, 脂肪酸の代謝系を改変することにより, 有用化合物を生産させる試みがなされてきた.

*Y. lipolytica*は、脂肪酸の β 酸化に関わるアシルCoA オキシダーゼ遺伝子をコードする遺伝子として*POX1*～*POX6*を持つ。これらのうち、*POX2*～*POX5*を破壊した株は、*n*-アルカンから香料やポリマーなどの原料としての用途をもつジカルボン酸を生産することが報告されている²²⁾。また、*POX3*～*POX5*を破壊することにより、メチルリシノール酸から香料である γ -デカラクトンを生産する系も構築されている²³⁾。一方、*n*-アルカン代謝に関わる遺伝子に関しては、*POX*遺伝子をすべて破壊した株において、さらにアルコール脱水素酵素遺伝子*ADH1*～*ADH7*および*FADH*と長鎖アルコール酸化酵素遺伝子*FAO1*を破壊した株は、ドデカン酸からプラスチックや潤滑剤、接着剤、化粧品などの原料となる12-ヒドロキシドデカン酸を生産することが報告されている¹⁷⁾。*n*-アルカン代謝の解明がさらに進めば、それを改変することにより新たな物質生産系が構築できる可能性がある。

終わりに

以上、本稿では*n*-アルカン酸化酵母*Y. lipolytica*の特性と本酵母における*n*-アルカンの代謝機構、さらにその応用の可能性について概説した。ここ数年で*n*-アルカンの代謝に関わる遺伝子の多くが明らかになってきたが、*n*-アルカンの代謝により生成する長鎖アルコールの酸化に主要な役割を果たす酵素は未だ不明である(図1)。*C. maltosa*のP450であるCYP52A3は長鎖アルコールを酸化することが報告されていることから²⁴⁾、*Y. lipolytica*においてもAlkタンパク質が長鎖アルコールの酸化を担う可能性は考えられる。また、*n*-アルカンの代謝過程で生成する長鎖アルコールや長鎖アルデヒド、脂肪酸と、細胞外から取り込んだ長鎖アルコールや長鎖アルデヒド、脂肪酸では代謝に関わる酵素が異なることも分かってきた。本酵母の疎水性化合物の代謝経路は図1のモデルより複雑なものである可能性も考えられる。酵母の*n*-アルカン代謝には、小胞体とペルオキシソームの2つのオルガネラが関与するが、*n*-アルカンがどのように取り込まれて小胞体に輸送されるのか、疎水性の代謝中間体はどのように小胞体からペルオキシソームに輸送されるのかという問題も残されている。真核細胞におけるオルガネラ間の脂質や疎水性化合物の輸送機構

は、基礎生物学的にも重要な課題である。

*Y. lipolytica*の応用としては、P450生産の宿主として利用できる可能性も考えられる。P450の異種生産には大腸菌、*S. cerevisiae*、メタノール酵母、昆虫細胞などが用いられているが、十分な生産量が得られない場合も多い。*Y. lipolytica*を*n*-アルカン炭素源として培養すると、Alk1pなどのP450が高生産されることから、本酵母はP450の高発現に適した特性を持つと考えられる。このことから、*Y. lipolytica*を新規P450の機能解析やP450を利用した有用物質生産に応用できる可能性が考えられる。

今後の*Y. lipolytica*の基礎研究のより一層の進展と、その特性を活かした応用への展開が期待される。

文 献

- 1) Barth, G. and Gaillardin, C.: *FEMS Microbiol. Rev.*, **19**, 219 (1997).
- 2) Dujon, B. et al.: *Nature*, **430**, 35 (2004).
- 3) Genome Resources for Yeast Chromosomes: <http://gryc.inra.fr/index.php?page=home> (2016/02/25)
- 4) Gaillardin, C. et al.: *Yarrowia lipolytica Genetics, Genomics, and Physiology*, P. 1 (2013).
- 5) Xue Z. et al.: *Nat. Biotechnol.*, **31**, 734 (2013).
- 6) Mori, K. et al.: *FEMS Yeast Res.*, **13**, 233 (2013).
- 7) Fickers, P. et al.: *FEMS Yeast Res.*, **5**, 527 (2005).
- 8) Fukuda, R.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **77**, 1149 (2013).
- 9) Fukuda, R. and Ohta, A.: *Yarrowia lipolytica Genetics, Genomics, and Physiology*, P. 111 (2013).
- 10) Nelson, D. R.: *Hum. Genomics*, **4**, 59 (2009).
- 11) Mauersberger, S.: *Yarrowia lipolytica Biotechnological Applications*, P. 227 (2013).
- 12) Iida, T. et al.: *Yeast*, **16**, 1077 (2000).
- 13) Hirakawa, K. et al.: *J. Biol. Chem.*, **284**, 7126 (2009).
- 14) Takai, H. et al.: *Fungal Genet. Biol.*, **49**, 58 (2012).
- 15) Iwama, R. et al.: *Fungal Genet. Biol.*, **91**, 43 (2016).
- 16) Chen, Q. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **1735**, 192 (2005).
- 17) Gatter, M. et al.: *FEMS Yeast Res.*, **14**, 858 (2014).
- 18) Iwama, R. et al.: *FEMS Yeast Res.*, **15**, f0v14 (2015).
- 19) Nakahara, K. et al.: *Mol. Cell*, **46**, 461 (2012).
- 20) Iwama, R. et al.: *J. Biol. Chem.*, **289**, 33275 (2014).
- 21) Tenagy et al.: *FEMS Yeast Res.*, **15**, f0v031 (2015).
- 22) Smit, M. S. et al.: *Biotechnol. Lett.*, **27**, 859 (2005).
- 23) Wache, Y.: *Yarrowia lipolytica Biotechnological Applications*, P. 151 (2013).
- 24) Scheller, U. et al.: *J. Biol. Chem.*, **273**, 32528 (1998).