



Title	Production of preferable high-oleic acid yeast lipid as an alternative source of biodiesel in the oleaginous yeast <i>Rhodospiridium toruloides</i>
Author(s)	Tsai, Yung-Yu
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/72354">https://doi.org/10.18910/72354</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

## 論文内容の要旨

氏 名 ( T S A I , Y U N G - Y U )	
論文題名	<p>Production of preferable high-oleic acid yeast lipid as an alternative source of biodiesel in the oleaginous yeast <i>Rhodospiridium toruloides</i></p> <p>( 高脂質生産酵母<i>Rhodospiridium toruloides</i>を用いた代替バイオディーゼル源としての高オレイン酸含有脂質の生産 )</p>
論文内容の要旨	
<p>Chapter 1, the general introduction of biodiesel production in an oleaginous yeast was described. Natural lipids (plants, animals, microorganisms) can be utilized for industrial applications such as renewable fuel or lipid-related chemicals. Microorganisms found from different natural environments are able to produce high amount of lipid with varied substrates. <i>Rhodospiridium toruloides</i>, a basidiomycetous oleaginous (lipid-producing) yeast which could accumulate lipids over 70% of its own dry cell weight is thus considered a new source of renewable lipid production. However, limited understanding on the genetic manipulating system and gene regulation has confined its further study and application. This study aimed to establish an efficient transformation system for <i>R. toruloides</i> and apply it for the production of preferable lipid towards the uses as diesel fuel or lipid related chemicals.</p> <p>In chapter 2, to achieve the genetic engineering in <i>R. toruloides</i>, an accessible and stable tool is needed. To the date of present study started, only a few transformation systems has been reported. Here, I tried to establish a lithium acetate (Li-Ac) based method which a generally known way that used for transformation in conventional yeasts but has yet been done by any for <i>R. toruloides</i>. Without a need of using cell wall digesting enzyme for protoplast preparation, Li-Ac based method is much easier to access genetic engineering with only the treatment of intact cells. Vital parameters such as applying DNA amount, incubation effect of the mixture, and temperature treatment were examined. Finally, the transformation was done by 417-fold enhanced efficiency with stable insertion of target gene in the host <i>R. toruloides</i> strain.</p> <p>In chapter 3, high-oleic acid lipid production in <i>R. toruloides</i> was reported. Further, I tried to produce oleic acid (OA C18:1) enriched lipid that could offer better oxidative stability for application to lubricants or biodiesel. For this purpose, I thus examined the function of <math>\Delta 9</math> fatty acid desaturase (<math>\Delta 9FAD</math>) gene from <i>R. toruloides</i> (<i>Rt<math>\Delta 9FAD</math></i>) with the <i>OLE1</i> gene (<math>\Delta 9FAD</math> encoding) from <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (<i>ScOLE1</i>) as a control. Thereafter, both of <i>ScOLE1</i> and <i>Rt<math>\Delta 9FAD</math></i> gene were introduced into <i>R. toruloides</i> strains for the production of desire OA-enriched lipid. Successful expression of <i>ScOLE1</i> and <i>Rt<math>\Delta 9FAD</math></i> enabled gaining higher OA content by the proportion over 60% in total lipid. The transformants also provided higher lipid productivity compared with wild-type strains. Moreover, I have observed the different effects on the product that has been brought by applying protein coding sequence (CDS) and genomic sequence. Overall, the <i>ScOLE1</i> and <i>Rt<math>\Delta 9FAD</math></i> in <i>R. toruloides</i> strains could supply OA-enriched lipid as a suitable source of designed biodiesel.</p> <p>In chapter 4, the conclusion of this thesis was described. The established Li-Ac based method could provide a time-saving process of transformation. By treating the intact cell, genome insertion and disruption is now achievable in <i>R. toruloides</i>. This study also presented decisive parameters that could be adjusted for method optimization in varied <i>R. toruloides</i> strains. With the developed method, <i>R. toruloides</i> strains have enhanced OA content was created and the lipid productivity was improved to obtain 3-fold increment. An interesting result of varied product that caused by the using of CDS and genomic sequence was firstly observed in the oleaginous yeast <math>\Delta 9FAD</math> genes implied us the unknown mechanism yet to be declared. The present system could be applied for the further metabolic engineering, and the current results could also be used as the reference for the understanding of gene expression in <i>R. toruloides</i> strains.</p>	

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 ( TSAI, YUNG-YU )			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	藤山 和仁
	副 査	教授	福崎 英一郎
	副 査	教授	紀ノ岡 正博
	副 査	教授	大政 健史
	副 査	教授	渡邊 肇
	副 査	教授	村中 俊哉
	副 査	教授	内山 進
	副 査	教授	永井 健治

論文審査の結果の要旨

世界のエネルギー消費量は年々増加しており、化石燃料の枯渇が懸念されている。そのため再生可能代替燃料としてバイオディーゼルが注目を浴びている。現在、バイオディーゼルは主に植物油を原料として生産されている。植物油をバイオディーゼルの原料とする場合、原料競合による食料価格の高騰、植物生産耕地の競合などの問題を引き起こすことが明らかになってきている。そこで、バイオディーゼル生産の代替法として微生物を用いる方法が期待されている。一方で、最近タイ王国で単離された担子菌酵母 *Rhodospiridium toruloides* は乾燥菌体重量辺り 70% もの多量の脂質を菌体内に蓄積する高脂質生産酵母であることが報告された。しかし、本酵母は新規に単離された酵母であることもあり、本酵母において有効な遺伝子組換えシステムは構築されておらず、遺伝子組換えを伴った分子育種の障害となっていた。そこで本論文では、本酵母における遺伝子組換えのための高効率形質転換系の構築と、この系を用いてバイオディーゼル生産に適した脂質を生産する組換え酵母の分子育種を行っている。

第一章では、化石燃料に替わるバイオディーゼル燃料の位置づけ、現在のバイオディーゼル生産の世界的動向、現在のバイオディーゼル生産の課題、バイオディーゼル生産の先行研究を示し、本研究を着想するに至った経緯および目的について記述している。

第二章では、本酵母における酢酸リチウム法を用いた形質転換を試みている。投入 DNA 断片量、投入 DNA 断片長、培養時間、熱ショック温度、細胞壁強度を弛める試薬の効果、復帰培養時間等の種々パラメーターを調べた結果、パラメーター検討結果前に比べて 417 倍の形質転換効率の上昇を達成している。また、PCR 法およびサザンブロット法を用いた導入 DNA 断片コピー数の調査も行い、クローン毎に異なるコピー数を有することを見出している。次に、本形質転換法を用いて緑色蛍光タンパク質の組換えタンパク質生産、および内在性遺伝子破壊への応用可能性を実証している。

第三章では、高品質バイオディーゼル生産を目指したオレイン酸生産量が増加した組換え酵母の分子育種を試みている。オレイン酸生合成の最終段階に関与する  $\Delta 9$ -脂肪酸不飽和化酵素遺伝子を出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* および *R. toruloides* 酵母よりクローニングし、発現ベクターを構築後、本酵母に導入し形質転換酵母を構築している。本形質転換酵母の脂質プロファイル、脂質生産性を調査したところ、両遺伝子発現酵母において顕著にオレイン酸の生産量がそれぞれ 40% および 20% 上昇していることが明らかとなっている。また、興味深いことに両遺

伝子発現酵母供、総脂質生産量が野生株と比べて5倍に増加していることが明らかとなっている。

第四章では、結論として第二章および第三章で得られた結果について総括すると共に、本研究の学術的インパクトおよび今後の課題について、詳細に記載している。

以上のように、本論文はタイ王国で新規に単離された高脂質生産酵母において、初めて酢酸リチウム法を用いた形質転換系を確立し、分子育種への第一段階を突破している。また、構築した本形質転換系の分子育種への応用例を実証し、高品質なバイオディーゼル生産原料となる高オレイン酸含量の脂質をより多量に生産することができる組換え *R. toruloides* 酵母の分子育種に成功している。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。