The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Enhancing lipid production in a novel thermotolerant strain L1-1 isolated from an oleaginous Rhodotorula toruloides DMKU3-TK16 yeast by adaptive evolution toward biodiesel generation
Author(s)	呉, 志展
Citation	大阪大学, 2021, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/85366
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　WU　CHIH-CHAN　）	
論文題名	Enhancing lipid production in a novel thermotolerant strain L1-1 isolated from an oleaginous *Rhodotorula toluroides* DMKU3-TK16 yeast by adaptive evolution toward biodiesel generation （適応的進化法により得た脂質酵母*Rhodotorula toruloides* DMKU3-TK16由来新規高熱耐性L1-1株によるバイオディーゼル燃料用脂質の生産強化）

論文内容の要旨

再生可能で生分解性の燃料であるバイオディーゼルは、我々の日常生活で化石燃料の有望な代替物として使用されている。近年、主要な原料として使用されている植物由来のバイオディーゼルの代替品として、油糧酵母 *Rhodotorula toruloides* から生産される脂質が大きな注目を集めている。しかし、様々なストレス環境下での培養が強いられる工業規模での生産時には、マルチストレス下で脂質を生成できる菌株の使用が望まれる。さらに、*R. toruloides* がもつ油脂生産能力の向上と工業規模の油脂生産で実用的に利用可能な菌株の取得は、油糧酵母による植物由来の油脂生産に対して経済的に競争力のある油脂生産系を確立する上で必要不可欠である。

本研究では、油糧酵母として *R. toruloides* DMKU3-TK16（TK16）に注目し、工業利用に資する油糧酵母株の育種を目指した。この *R. toruloides* DMKU3-TK16（TK16）は、最適化された条件下では細胞の乾燥重量の最大約 70%を生産することが可能である。油糧酵母を用いたい脂質生産プロセス中において発生し得る物理的、化学的ストレスのうち、温度ストレスに注目し、その耐性株取得を試みた。まず TK16 を 37°C において適応的進化法を用いて育種することで 37℃での熱耐性を示す菌株 L1-1 を分離することができた。分離した L1-1 株は、野生型に比べ高い脂質生産能を示し、バイオディーゼルに欠かせないオレイン酸を高含有量で含む脂質を生産することがでた。さらに、この熱耐性 L1-1 株は複数のストレス耐性を示し、またエタノールと H_2O_2 によって誘発される酸化ストレス下においても脂質生産量の向上が確認できた。続いて、*R. toruloides* の内因性 C18 脂肪酸不飽和化酵素遺伝子（*RtFAD1* および *RtFAD2*）を過剰発現させることで、L1-1 株の脂質生産性を高めることにも成功した。

以上、本研究では複数のストレス耐性を示す油糧酵母の熱耐性株 L1-1 を適応的進化法を用いた育種により単離し、この L1-1 株の脂質生産能力を遺伝子工学的手法により引き出すことで、脂質生産における新たなプラットフォームとして L1-1 株を提案することができた

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　WU CHIH-CHAN　）			
論文審査担当者	（職）		氏　名
	主 査	教授	藤山和仁
	副 査	教授	松田史生
	副 査	教授	本田孝祐

論文審査の結果の要旨

第一章　概略紹介

バイオディーゼルは再生可能かつ生分解性のある燃料で、通常使用されている化石燃料に代わる。近年、脂質酵母 *Rhodotorula toruloides* による脂質生産は、顕著な脂質生産性（約 70%含量）と広範囲な糖質および産業廃棄物を利用する能力により注目を受けている。しかし、工業規模の発酵中のマルチストレス下で脂質を生産するための堅牢な菌株が不足しているため、大量の脂質生産への応用が制限されている。それゆえに、脂質生産の強化と工業規模の発酵のための堅牢性は、バイオディーゼル生産のための経済的な脂質を生産するための重要な問題である。そこで、適応進化によって *R. toruloides* から耐熱性株を分離し、ストレス曝露と代謝工学戦略によってその脂質生産性を調査することを目指している。

第二章　*R. toruloides* の耐熱性変異体 L1-1 の分離

R. toruloides DMKU3-TK16（TK16）は、オレイン酸（OA）に富む脂質を生成する能力があるため、耐熱性株を分離するための親株として使用している。OA に富む脂質は、長期保存中のその酸化的安定性と低温での適切な流動性のため、バイオディーゼル生産に望ましい原料である。新規の耐熱性突然変異体 L1-1 を、37℃で TK16 から適応育種により単離している。スポットアッセイと増殖曲線分析は、この菌株が耐熱性を改善し、野生型 TK16 は 37℃では増殖できないにもかかわらず、37℃で増殖できることを示している。脂質生産の結果はまた、L1-1 株がその増殖を維持するだけでなく、37℃で脂質生産の増強を示すことを示している。さらに、37℃で培養した場合の L1-1 株の脂肪酸組成を水素炎イオン化検出器付ガスクロマトグラフ装置（GC-FID）で分析し、OA 含有量（86%）が野生型 TK16（60%）よりも高いことを明らかにしている。これらの結果から、耐熱性 L1-1 株は高温に対して堅牢な菌株であり、バイオディーゼル生産の代替原料として OA に富む脂質を提供できることを示している。

第三章　酸化ストレス（エタノールと H_2O_2）による耐熱性 *R. toruloides* L1-1 の脂質蓄積の強化

発酵中、酵母細胞は、熱、高浸透圧、阻害化合物などの化学的および物理的ストレス要因に絶えず接している。これらのストレス要因は、細胞生理状況を中断させ、生産量を減少させることがある。従って、複数のストレスに対する耐性を示す酵母菌株は、産業用途に有利である。スポットアッセイによってさまざまなストレスに対する耐性を調査することにより、L1-1 株はエタノール（30 g/L）、H_2O_2（4 mM）、高濃度グルコース（250 g/L）および DMSO（40 g/L）のストレス要因に耐性があることも解明している。最大比増殖速度と最大細胞密度の結果により、耐熱性 L1-1 株がこれらのストレス条件下で増殖性能を改善したことを確認している。さらに、2'-7 'ジクロロフルオレシンジアセテートで活性酸素種（ROS）の細胞内レベルを測定し、細胞壁溶解酵素（Uzukizyme）で細胞壁強度を評価することにより、

ROS ホメオスタシスの維持と、細胞壁の堅牢化は、L1-1 株のさまざまなストレスに対する防御と相関している。特に、窒素制限培地でこれらのストレス条件下で L1-1 株を培養すると、エタノールストレスが L1-1 株の脂質含有量を 2 倍増加させること示している。さらに、L1-1 の脂質力価は、エタノールおよび H_2O_2 ストレス下で 2 g / L から 3g / L に増加している。以上をまとめると、これらのデータは、強化された耐熱性がより大きなエタノールおよび H_2O_2 耐性に関連している可能性があることを示唆している。これらの知見は、*R. toruloides* の合理的な発酵プロセスの設計にも貢献する。

第四章　C18 脂肪酸の不飽和化に関与する 2 つの脂肪酸デサチュラーゼ FAD1 および FAD2 の過剰発現による耐熱性 L1-1 の脂質生産の改善

脂肪酸デサチュラーゼ（Fad）は膜結合タンパク質であり、脂肪酸炭化水素鎖への二重結合の導入を触媒する。Δ9-Fad はステアリン酸（C18：0）の炭素 9 と 10 の間に二重結合を導入して OA（C18：1）を生成する酵素であり、Δ12-Fad は OA の炭素 12 と 13 の間に二重結合を導入して、リノール酸（C18：2）を合成する。これらの 2 つの Fad は、酵母での C18 脂肪酸の合成に関わる重要な酵素である。 C18 脂肪酸は L1-1 株で 80%以上を占めるため、これら 2 つの FAD を過剰発現させると、この菌株の C18 脂肪酸量をさらに増加させる可能性がある。この章では、ネイティブ Δ12-FAD（FAD2）の過剰発現およびネイティブ Δ9-FAD（FAD1）と FAD2 の共発現により、耐熱性 L1-1 株の脂質産生を増強することを目的としている。ゲノムが解明されている *R. toruloides* NBRC8766 から単離した 2 つの遺伝子を、それぞれ選択マーカー（Hyg^r あるいは Zeo^r）を持ち、菌株自身の酵素（GPD1、グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ 1）に由来する構成的プロモーターとターミネーターの制御下に配置したで 2 種の過剰発現カセットを構築している。FAD1 および FAD2 を、酢酸リチウム形質転換法によって L1-1 株のゲノムにランダムに導入し、FAD2 過剰発現株および FAD1 + FAD2 共過剰発現株を作成している。FAD2 および FAD1 + FAD2 株の脂質力価は、L1-1 株より 1.7 倍および 1.5 倍に増加している。FAD2 および FAD + FAD2 株の脂質含有量も、L1-1 株より 1.6 倍および 1.4 倍増加している。結果は、FA 合成に関連する他の遺伝子を発現するなどの異なる戦略が、近い将来 L1-1 株に適用できる可能性があることを示している。

第五章　結論

R. toruloides は卓越した脂質生産能力を持つことから、最近、バイオディーゼル生産に向けた微生物由来の脂質に大きな可能性を引出すことが可能である。*R. toruloides* のストレス耐性能力を改善してその産業用途を広げるために、*R. toruloides* から耐熱性 L1-1 を分離している。これは *R. toruloides* の耐熱性株の最初の報告である。L1-1 株は、耐熱性が改善されて脂質生成が強化されることにより、37℃で好ましい OA に富む脂質を生成する能力を示している。さらに、L1-1 株は、エタノールと H2O2 によって誘発される、改善されたマルチストレス耐性と脂質生成の上昇を示している。最後に、菌株自身の FAD を過剰発現させることによって L1-1 株の脂質産生をさらに高めることが達成している。これらの結果は、この新規菌株が、バイオディーゼル生産に適した脂質を生産するための代替プラットフォームとして、また *R. toruloides* におけるストレス応答と脂質合成との相関関係を研究するためのモデルとしての可能性を持っていることを示している。この新しい菌株を操作する可能性は、将来、その脂質生産とバイオディーゼル産業にとって好ましい脂肪酸プロファイルを改善するために適用できる。

以上のように、本論文では、高脂質生産を目指し、脂質酵母 *R. toruloides* より耐熱性突然変異体 L1-1 を取得している。L1-1 株は高オレイン酸含有量を示し、酸化的ストレスに耐性があった。特にエタノールと H_2O_2 により L1-1 株の脂質の蓄積強化にも関連している。また、C18 脂肪酸の不飽和化に関与する 2 つの脂肪酸デサチュラーゼ遺伝子の過剰発現により、耐熱性 L1-1 の脂質生産が向上している。脂質酵母 *R. toruloides* 耐熱性菌株が、バイオディーゼル生産に適した脂質を生産するための代替プラットフォームとして、ストレス応答と脂質合成との相関関係を研究するモデルとを提供している。

よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。