

1P-136 油脂酵母 *Lipomyces starkeyi*における形質転換系の開発

○小黒 芳史¹, 山崎 晴丈¹, 志田 洋介², 小笠原 渉², 高久 洋暁¹
(¹新潟薬大・応生命, ²長岡技科大)
oguro@nupals.ac.jp

油脂自給率がカロリーベースで約3%と低い日本において、輸入に依存せず安定した食用油脂生産プロセスの開発が課題となっている。そこで我々は、細胞内に油脂を蓄積することのできる油脂酵母に注目した。現在、我々の研究グループでは、油脂酵母 *Lipomyces starkeyi*を利用した油脂生産を試みている。*L. starkeyi*は高い油脂蓄積能を有しているが、油脂の蓄積に関する詳細な機構は明らかとなっていない。そこで、本研究では、油脂蓄積機構を明らかとするためのツールの1つと成りうる形質転換系の構築を行った。

本研究では、プロトプラスト-PEG法を利用した形質転換系の構築に取り組んだ。宿主*L. starkeyi* CBS 1807株がハイグロマイシン感受性を示したことより、薬剤耐性マークーとしてハイグロマイシン耐性遺伝子(*hph*)を選択した。また、細胞内で *hph*を発現させるため、グリセラルデヒド-3-リン酸脱水素酵素遺伝子(*TDH3*)プロモーター及びターミネーター領域をクローニングして利用した。上記3つの遺伝子断片を連結させ、*hph*発現ユニットを構築した。この発現ユニットをゲノム上の18S rDNAにプロトプラスト-PEG法により導入したところ、ハイグロマイシン耐性を有する形質転換体を得た。得られた形質転換体より、遺伝子断片が挿入されていることをコロニーPCR及びサザン解析により確認した。すなわち、*L. starkeyi* CBS 1807株における遺伝子工学的技術の礎となる形質転換システムの構築に成功した。

本研究は「農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業」の支援を受けて行われた。

Development of transformation system in oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*

○Yoshifumi Oguro¹, Harutake Yamazaki¹, Yosuke Shida², Wataru Ogasawara², Hiroaki Takaku¹
(¹Fac. Appl. Life Sci., Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci., ²Nagaoka Univ. Technol.)

Key words *Lipomyces starkeyi*, oleaginous yeast, transformation

1P-138 油脂酵母 *Lipomyces starkeyi*における油脂高生産株の開発

○通野 和人¹, 宮田 淳史¹, 志田 洋介¹, 山崎 晴丈², 正木 和夫³, 森 一樹⁴, 久原 哲⁴, 高久 洋暁², 小笠原 渉¹
(¹長岡技科大, ²新潟薬大・応生命, ³酒総研, ⁴九大院・農)
s123338@stn.nagaokaut.ac.jp

【背景と目的】 *Lipomyces starkeyi*は細胞内に大量の油脂を蓄積する酵母である。非可食バイオマス由来の糖を炭素源とした本菌による油脂生産は、新たなバイオリファイナリー技術として期待されている。*L. starkeyi*による油脂生産効率の向上のためには、本菌の油脂生産機構を理解して利用する必要がある。我々は、本菌全遺伝子の発現挙動を追うためのマイクロアレイチップを開発し評価した。また、突然変異導入による本菌の油脂高蓄積・低蓄積株を作出した。これら変異株を解析することで本菌の油脂生産機構を明らかにすることを目的としている。

【方法】 本菌の全8192遺伝子をターゲットとしたDNAチップを作製し、油脂生産条件下で調整したmRNAを用いたマイクロアレイ解析を行った。本菌に対してUV照射を行い、脂肪染色試薬 Nile redで染色した後セルソーターにて油脂高蓄積株および低蓄積株を取得した。

【結果と考察】 マイクロアレイ解析結果より、推定の油脂生産関連遺伝子のうち油脂生産条件において高発現している遺伝子を明らかにした。現在、変異株の作出を進めしており、得られた変異株について表現型解析とマイクロアレイ解析を進めている。なお、本研究は農林水産省「農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業」の支援を受けて行われた。

Development of high lipid-producing strain in the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*

○Kazuto Tsuno¹, Atsushi Miyata¹, Yosuke Shida¹, Harutake Yamazaki², Kazuo Masaki³, Kazuki Mori⁴, Satoru Kuwara⁴, Hiroaki Takaku², Wataru Ogasawara¹
(¹Nagaoka Univ. Technol., ²Fac. Appl. Life Sci., Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci., ³NRIB, ⁴Fac. Agric., Kyushu Univ.)

Key words *Lipomyces starkeyi*, oleaginous yeast, microarray, cell sorter

1P-137 油脂酵母 *Lipomyces starkeyi*の油脂蓄積に関与する遺伝子の発現解析

○山崎 晴丈¹, 坂井 真人¹, 志田 洋介², 小笠原 渉², 高久 洋暁¹
(¹新潟薬大・応生命, ²長岡技科大)
htakaku@nupals.ac.jp

【背景と目的】 日本の油脂自給率はカロリーベースで約3%と低いため、輸入に依存しない油脂自給システムの構築は喫緊の課題である。油脂酵母 *Lipomyces starkeyi*は細胞内に油脂（トリアシルグリセロール）を高蓄積できるため、この酵母を産業利用できれば上記の課題克服に貢献できると考えられる。産業利用の基盤とすべく、本研究では *L. starkeyi*が油脂を蓄積する過程での油脂合成遺伝子の発現様式の知見を得ることを目的とした。

【方法】 *L. starkeyi*を S 培地 (5% Glucose, 0.05% MgSO₄, 0.01% CaCl₂, 0.5% (NH₄)₂SO₄, 0.1% KH₂PO₄, 0.01% NaCl, 0.1% Yeast extract) で経時的に培養し、定量 PCR を用いて油脂合成関連遺伝子群の発現量について検討を行った。

【結果と考察】 ジアシルグリセロールからトリアシルグリセロールを合成する酵素の遺伝子発現量は培養初期に上昇し、その後一定していた。アセチル CoA や脂肪酸合成に関与する遺伝子発現量は培養初期に一過的に上昇したが、それ以降は低下した。トリアシルグリセロール分解酵素遺伝子の発現量は培養を通して変化は見られなかった。以上から、アセチル CoA や脂肪酸を合成する経路の遺伝子を恒常的に高発現できれば、油脂量の増加に繋がるのではないかと推察している。

本研究は「農林水産省、農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業」の支援を受けて行われた。

Expression pattern of genes responsible for triacylglycerol accumulation in oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*

○Harutake Yamazaki¹, Manato Sakai¹, Yosuke Shida², Wataru Ogasawara², Hiroaki Takaku¹
(¹Fac. Appl. Life Sci., Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci., ²Nagaoka Univ. Technol.)

Key words *Lipomyces starkeyi*, oleaginous yeast, triglyceride

1P-139 油脂酵母 *Rhodosporidium toruloides*の油脂生産機構の解明

○宮田 淳史¹, 通野 和人¹, 志田 洋介¹, 山崎 晴丈², 正木 和夫³, 森 一樹⁴, 久原 哲⁴, 高久 洋暁², 小笠原 渉¹
(¹長岡技科大, ²新潟薬大・応生命, ³酒総研, ⁴九大院・農)
s111086@stn.nagaokaut.ac.jp

【背景と目的】 油脂高生産酵母 *R. toruloides*は、菌体内に最大70%の油脂を蓄積できる。油脂酵母によって生産された油脂を食用油脂やバイオ燃料として利用することは、新たなバイオリファイナリー技術として期待されている。しかし、本菌の油脂生産機構についての全容は明らかになっていない。本研究では、突然変異導入によって、*R. toruloides*の油脂高・低蓄積株を作出し、これら変異株の表現型を網羅的に解析して油脂生産機構を解明することを目的としている。また、解析基盤としての *R. toruloides*の全ゲノム配列を決定およびそれに対するアノテーション付与を行った。

【方法】 *R. toruloides*を次世代シーケンサーで解析し、得られたゲノムデータに対して *Yarrowia lipolytica*の遺伝子モデルを用いた遺伝子予測を行った。また、紫外線照射による変異導入を行った。その後、脂質染色試薬 Nile redで菌体を染色し、セルソーターを使用して油脂高・低蓄積株を分離した。

【結果と考察】 解析の結果、ゲノムサイズ 23.5 Mb、7,149 個の遺伝子と予測され、推定の油脂生産関連遺伝子が見出された。現在、これらのデータを基にマイクロアレイチップを作製している。また、セルソーターで分離して得られた変異株の表現型を解析予定である。なお、本研究は農林水産省「農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業」の支援を受けて行われた。

he elucidation of the oil-fats production mechanism of oleaginous yeast *R. toruloides*.

○Atsushi Miyata¹, Kazuto Tuno¹, Yosuke Shida¹, Harutake Yamazaki², Kazuo Masaki³, Kazuki Mori⁴, Satoru Kuwara⁴, Hiroaki Takaku², Wataru Ogasawara¹
(¹Nagaoka Univ. Technol., ²Fac. Appl. Life Sci., Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci., ³NRIB, ⁴Fac. Agric., Kyushu Univ.)

Key words *R. toruloides*, oil, genetic analysis, cell sorter