

# 脂肪酸活性化酵素アインザイムの機能とその制御に関する研究

福田良一

## 研究の目的

脂肪酸は生体膜脂質を構成するとともに、エネルギー源、脂肪性分、タンパク質の修飾、ホルモン前駆体、調節シグナル等に利用される。それに伴い、脂肪酸は細胞内でトリアシルグリセロールやリン脂質、スフィンゴ脂質、ステロールエステルなどの脂質の合成、脂肪酸の $\alpha$ 酸化および $\beta$ 酸化、脂肪酸炭素鎖の伸長、二重結合の導入と除去、タンパク質のアシル化、高級アルコールへの変換など様々な代謝を受けるが、これらの過程において脂肪酸はまず脂肪酸活性化酵素(アシルCoAシンテターゼ、ACS)によりアシルCoAに変換(活性化)される。近年のゲノム解析から脂肪酸活性化酵素には、ヒトやマウスでは26種、シロイヌナズナでは64種、出芽酵母*Saccharomyces cerevisiae*では5種と多数のアインザイムが存在することが明らかになってきた。しかしながら、脂肪酸の多彩な役割と多様な代謝にそれらがどのように関わるのかは未解明である<sup>(1, 2)</sup>。

脂肪酸活性化酵素の基本的な機能を解析する上で、アインザイムの種類が比較的少ない酵母は良いモデル生物になると考えられる。酵母*S. cerevisiae*は、真核生物のモデル生物として、細胞周期、転写、翻訳、小胞輸送、ストレス応答など様々な分野の基礎研究に用いられてきたが、一方で脂肪酸などの脂溶性炭素源の資化能や脂質の生産能が低いという欠点を持つ。油糧酵母*Yarrowia lipolytica*は $n$ -アルカンやトリグリセリド等を炭素源として利用し生育する酵母である。本酵母は、疎水性溶媒に対する耐性、脂質の高い生産能、安全性、優れた分子生物学的操作性など、脂質代謝研究のモデル生物として優れた特性を有する<sup>(3, 4)</sup>。また、これらの点から本酵母は産業酵母として高いポテンシャルも持ち、特に有用脂質の生産や脂溶性炭素源からの有用物質生産などへの応用が期待されている。実際に、最近では

本酵母に脂肪酸伸長酵素および不飽和化酵素遺伝子を導入した菌株が有用脂肪酸であるエイコサペンタエン酸<sup>(5)</sup>の生産に用いられている。

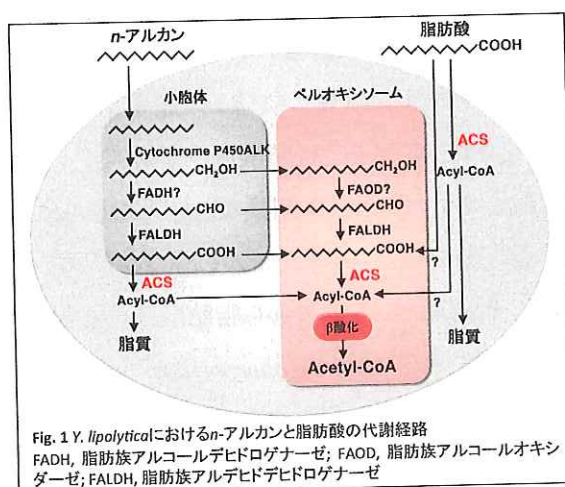
*Y. lipolytica*を用いた脂質の生物変換系を構築するためには、本酵母における脂質の代謝経路を明らかにする必要がある。*Y. lipolytica*において、*n*-アルカンは小胞体上でシトクロムP450の一種であるP450ALKによって末端が水酸化されてアルコールに変換された後、小胞体またはペルオキシソームで脂肪酸に酸化され、最終的にペルオキシソーム内でβ酸化により資化されるか、膜脂質や貯蔵脂質の合成に利用される(Fig. 1)<sup>(3,4)</sup>。一方脂肪酸は、取り込まれた後ペルオキシソームへ送られ、同様にβ酸化系で資化されるか脂質合成に利用される。しかしながら、*n*-アルカンや脂肪酸の代謝にどのようにACSアインザイムが関与しているかは未解明である。

本研究では、*Y. lipolytica*をモデル生物としてACSアインザイムの機能とその制御を調べ、脂肪酸の生理的機能との関係を解明することを目的とした。

## 方法

*Y. lipolytica* CXAU1株(*MATA ade1 ura3*)を親株にし、*ADE1*または*URA3*をマーカーとして脂肪酸活性化酵素遺伝子破壊株を作製した。多重遺伝子破壊には*URA3*マーカーを利用したpop-in-pop-out法<sup>(6)</sup>を用いた。

酵母の生育を観察する場合は、最少培地(0.17% yeast nitrogen base w/o amino acids and ammonium sulfate, 0.5% ammonium sulfate)に各炭素源を添加して培養を行った。グルコース、グリセロール、*n*-アルカンの濃度は2%とした。脂肪酸の濃度は0.1%とし、0.5% Triton X-100を添加した。



*Y. lipolytica*からの全RNAの抽出にはISOGEN(ニッポンジーン)を用いた。RLM-RACE (RNA ligase-mediated rapid amplification of cDNA ends)にはGeneRacer™ Kit For full-length, RNA ligase-mediated rapid amplification of 5' and 3' cDNA ends (RLM-RACE) (Invitrogen)を使用した。

RNA-seq解析のサンプルはIllumina社のTruSeq RNA SamplePrep Kitを用いて調製し、Illumina GAIIXを用いて両端から100 bpの塩基配列を決定した。Genomics Workbenchを用いて*Y. lipolytica* CLB122株のゲノムにマッピングし、解析を行った。

## 結果

### ACSアイソザイム遺伝子の構造

*Y. lipolytica*のゲノムには、*YAL10D17864g*、*YAL10E16016g*、*YAL10E12859g*、*YAL10B05456g*、*YAL10C09284g*の5種のACS遺伝子オルソログが存在する。*S. cerevisiae*のACSとの相同性から、これらを*FAA1*、*FAT1*、*FAT2*、*FAT3*、*FAT4*と命名した(Fig. 2)。*FAA1*はWangらにより*YAL1*と命名されているが、ここでは*FAA1*と呼ぶ<sup>(7)</sup>。

RLM-RACEにより*FAA1*と*FAT1*のmRNAの配列を決定した。*FAA1*はデータベースで予測されたとおり、692アミノ酸からなるタンパク質をコードすると推定された。一方、*FAT1*はデータベースで予想されたタンパク質より74アミノ酸少ない639アミノ酸からなるタンパク質をコードすると推定された。*Fat1*の推定アミノ酸配列のC末端にはペルオキシソーム移行シグナルであるPTS1様配列が存在した。またゲノムデータベースで推定されている*Fat2*のアミノ酸配列にもC末端にPTS1様配列が存在した。一方、*Faa1*、*Fat3*、*Fat3*の推定アミノ酸配列にはPTS1様配列は存在しなかつ

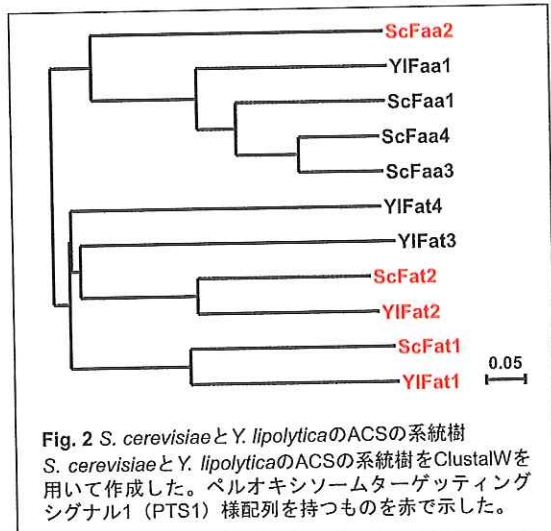


Fig. 2 *S. cerevisiae*と*Y. lipolytica*のACSの系統樹  
*S. cerevisiae*と*Y. lipolytica*のACSの系統樹をClustalWを用いて作成した。ペルオキシソームターゲティングシグナル1 (PTS1) 様配列を持つものを赤で示した。

た。以上より、Fat1およびFat2はペルオキシソームに、Faa1、Fat3、Fat4は細胞質あるいはペルオキシソーム以外のオルガネラに局在することが予想された。

### ACSアインザイム遺伝子破壊株の作製と解析

FAAI、FATI~FAT4の機能を探るため、これら遺伝子の破壊株を作製し、様々な炭素源での生育を解析した (Fig. 3)。炭素源をグルコースやグリセロールにした場合にはこれらの遺伝子破壊株の生育に異常は見られなかった。一方炭素源を*n*-アルカンにした場合には、FATI破壊株は炭素鎖長10および12の*n*-アルカンを炭素源とした場合には生育に顕著な欠損を示し、14から18の*n*-アルカンを炭素源とした場合にも部分的な生育欠損を示した。これらの結果からFat1は*n*-アルカンの代謝に関わることが示唆された。

また、グルコース培地にセルレニンを追加して脂肪酸合成を抑制した場合にはこれらの株は生育できなかったが、そこにオレイン酸を追加して脂肪酸を供給した場合には野生型株やFAT遺伝子破壊株は生育できるようになったのに対して、FAAI破壊株は生育に顕著な欠損を示した。さらに非ペルオキシソーム型のACSをコードすると推定されるFAAI、FAT3、FAT4を全て破壊した三重遺伝子破壊株を作製して生育を調べたところ、FAAI破壊株と同様にセルレニンを添加したグルコース+オレイン酸培地で生育が見られなかった。この結果から、Faa1は細胞外から取り込んだ脂肪酸の膜脂質合成への利用に欠損を持つことが示唆された。

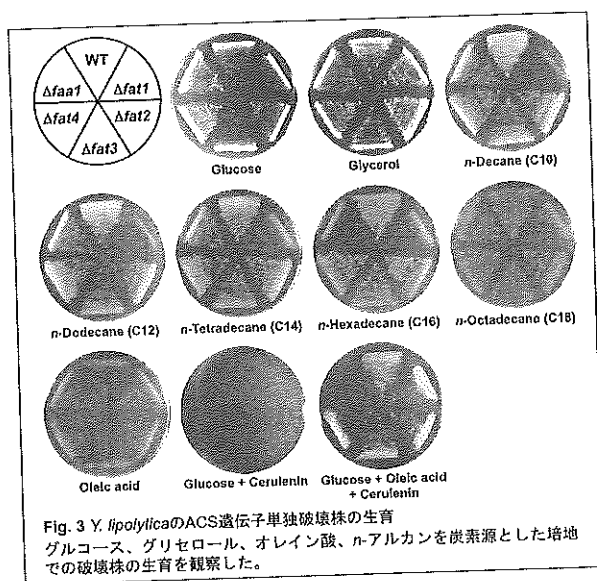


Fig. 3 *Y. lipolytica*のACS遺伝子単独破壊株の生育  
グルコース、グリセロール、オレイン酸、*n*-アルカンを炭素源とした培地  
での破壊株の生育を観察した。

## ACSアイソザイム遺伝子の発現解析

グルコース、グリセロール、*n*-デカン、オレイン酸を炭素源として培養した *Y. lipolytica* 菌体から抽出したRNAよりcDNAを合成し、高速シーケンサーを用いて網羅的に配列を解読してRNA-seq解析を行った (Fig. 4)。得られた結果からACS遺伝子群の発現量を解析したところ、*FAT1*は炭素源をグルコースやグリセロールにして培養した場合

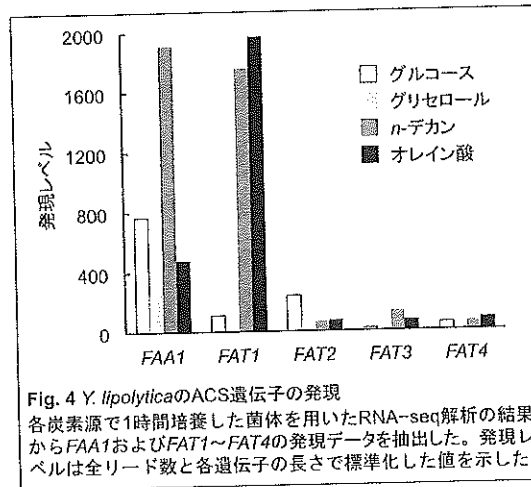


Fig. 4 *Y. lipolytica*のACS遺伝子の発現  
各炭素源で1時間培養した菌体を用いたRNA-seq解析の結果からFAA1およびFAT1~FAT4の発現データを抽出した。発現レベルは全リード数と各遺伝子の長さで標準化した値を示した。

と比較して*n*-デカンやオレイン酸を炭素源とした場合に転写が高度に活性化されること、*FAA1*も*n*-デカン存在下で転写産物が増加することが示唆された。また、発現量は少ないものの、*FAT3*の転写も*n*-デカンにより活性化されることが示唆された。さらに*FAA1*と*FAT1*についてノーザン解析により発現を確認したところ、RNA-seq解析と同様の結果が得られた。

## 結論

本研究により、*Y. lipolytica*においてペルオキシソーム局在型ACSと推定されるFat1が短鎖の*n*-アルカンの資化に関与することが示唆された。Fat1は短鎖*n*-アルカンの代謝過程で生じた脂肪酸のβ酸化のため、ペルオキシソーム内で取り込まれた脂肪酸の活性化を担っている可能性が考えられる。*FAT1*の破壊株は長鎖の*n*-アルカンの資化には弱い欠損しか示さなかったことから、長鎖*n*-アルカンの代謝過程で生じた脂肪酸の活性化には他の酵素も関与していると考えられる。その候補としてはFat1と同様にPTS1様配列を持つと推定されるFat2が考えられる。*FAT2*の単独破壊株は*n*-アルカンの資化に欠損は示さなかったが、今後*FAT1*と*FAT2*の二重破壊株を作製して検討する必要があるであろう。

はじめに述べたとおり、脂肪酸はエネルギー源として利用されるだけでなく、膜脂質の合

成などにも利用される細胞の生育に必須の成分である。*Y. lipolytica*の野生型株は、グルコース培地にセルレニンを添加すると脂肪酸合成ができなくなるため生育できなくなるが、そこにオレイン酸を添加して脂肪酸を補うと生育できるようになることから、細胞は外から取り込んだオレイン酸を膜脂質などの合成に利用していると考えられる。それに対して、非ペルオキシソーム型ACSをコードすると推定されるFAA1の破壊株はこの培地で生育できなくなったことから、Faa1は外から取り込まれた脂肪酸を細胞質またはペルオキシソーム以外のオルガネラで活性化し、膜脂質などの合成に供給している可能性が考えられる。現時点ではFat3およびFat4の機能は不明であるが、これらの発現レベルが低いことから、補助的な機能を果たしている可能性も考えられる。今後、本研究で作製したFAA1、FAT3、FAT4の三重遺伝子破壊株の表現型を詳細に解析することにより、それらの機能を明らかにできると期待される。

#### 文献

1. Black, P. N., and DiRusso, C. C. (2007) Yeast acyl-CoA synthetases at the crossroads of fatty acid metabolism and regulation. *Biochim. Biophys. Acta* **1771**, 286-298
2. Watkins, P. A., and Ellis, J. M. (2012) Peroxisomal acyl-CoA synthetases. *Biochim. Biophys. Acta* **1822**, 1411-1420
3. Fukuda, R. (2013) Metabolism of hydrophobic carbon sources and regulation of it in *n*-alkane-assimilating yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **77**, 1149-1154
4. Fukuda, R., and Ohta, A. (2013) Utilization of hydrophobic substrate by *Yarrowia lipolytica*. in *Yarrowia lipolytica Genetics, Genomics, and Physiology* (Barth, G. ed.), Springer, Heidelberg, New York, Dordrecht, London. pp 111-119
5. Xue, Z., Sharpe, P. L., Hong, S. P., Yadav, N. S., Xie, D., Short, D. R., Damude, H. G., Rupert, R. A., Seip, J. E., Wang, J., Pollak, D. W., Bostick, M. W., Bosak, M. D., Macool, D. J., Hollerbach, D. H., Zhang, H., Arcilla, D. M., Bledsoe, S. A., Croker, K., McCord, E. F., Tyreus, B. D., Jackson, E. N., and Zhu, Q. (2013) Production of omega-3 eicosapentaenoic acid by metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica*. *Nat. Biotechnol.* **31**, 734-740

6. Takai, H., Iwama, R., Kobayashi, S., Horiuchi, H., Fukuda, R., and Ohta, A. (2012) Construction and characterization of a *Yarrowia lipolytica* mutant lacking genes encoding cytochromes P450 subfamily 52. *Fungal Genet. Biol.* **49**, 58-64
7. Wang, J., Zhang, B., and Chen, S. (2011) Oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* mutants with a disrupted fatty acyl-CoA synthetase gene accumulate saturated fatty acid. *Proc. Biochem.* **46**, 1436-1441