

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：24403

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14069

研究課題名(和文) 酵母における独自の遺伝子発現量最適化技術を駆使した植物二次代謝産物の効率的生産

研究課題名(英文) Efficient production of plant secondary metabolites through global metabolic engineering in yeast

研究代表者

山田 亮祐 (Yamada, Ryosuke)

大阪府立大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40608626

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,700,000円

研究成果の概要(和文)：近年、遺伝子組換え酵母を用いて、種々の有用物質を生産する技術が注目されている。パチョロールはセスキテルペノイドアルコールの一種であり、産業的に重要な化合物である。本研究では、酵母にパチョロール合成遺伝子を高発現させ、さらに、パチョロール合成に関わるメバロン酸経路全体を最適化することで、パチョロールを効率的に生産する酵母の創製を目指した。酵母の広範囲の代謝経路を最適化する独自の手法を開発し、9種類の遺伝子の発現量を最適化することで、パチョロールを効率的に生産する酵母を創製することに成功した。創製した酵母のパチョロール生産量および速度は、42.1 mg/Lおよび19.8 mg/L/dであった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、酵母の広範囲の代謝経路を最適化する独自の手法を開発し、パチョロールを効率的に生産する酵母を創製することに成功した。本技術は、解糖経路やメバロン酸経路などを經由する、他の化合物を生産する代謝経路の最適化にも容易に応用可能である。従って、今後は本手法を用い、様々なバイオ燃料、バルクケミカル、ファインケミカルなどの有用物質を効率的に生産する酵母を創製することが期待される。

研究成果の概要(英文)：The use of genetically modified yeast *Saccharomyces cerevisiae* to produce a variety of useful chemicals has attracted much attention. Patchoulol is a sesquiterpenoid alcohol and is an industrially important compound. In this study, I aimed to create yeast that can efficiently produce patchoulol by highly expressing the patchoulol synthesis gene in yeast and optimizing the entire mevalonate pathway involved in patchoulol synthesis. I developed an original method for optimizing a wide range of metabolic pathways in yeast and succeeded in creating yeast that efficiently produces patchoulol by optimizing the expression levels of nine different genes. The constructed yeast produced 42.1 mg/L and 19.8 mg/L/d of patchoulol.

研究分野：生物化学工学

キーワード：酵母 代謝工学 植物二次代謝産物 CRISPR セスキテルペン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

パチョロールはセスキテルペノイドアルコールの一種であり、香水、香料、および昆虫忌避剤等として使用される。また、抗がん剤であるパクリタキセルを合成する際の原料としての利用も期待されている産業的に重要な化合物である¹⁾。パチョロールは、一般に、植物パチュリの葉から水蒸気蒸留法によって抽出されるが、このプロセスはエネルギーと資源を大量に消費する。また、植物からの微量成分の抽出は、大スケールでの生産に適していない、植物の生育に時間を要する、地域や気候条件により成分組成や濃度が変化するという問題点がある。そのため、微生物を利用したセルファクトリーによるパチョロール生産に注目が集まっている。

近年、安全性が高く、温和な条件で高密度培養が可能であり、遺伝子組換え技術を用いた代謝改変による有用物質生産効率の向上が期待できる酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用い、グルコースからパチョロールを生産することが検討されている (Fig. 1)²⁾。しかし、既往の研究では限られた数の遺伝子の高発現や抑制が行われており、グルコースからパチョロールに至る広範囲の代謝経路の調節は行われていない。

既往の研究で、複数種の遺伝子をランダムに多コピー組込むことで代謝経路全体の遺伝子発現を最適化することができる Global Metabolic Engineering Strategy (GMES) が開発された³⁾。これまでに、GMES を用いることで、酵母によるグルコースの代謝促進³⁾や、高効率の 2,3-ブタンジオール⁴⁾および D-乳酸⁵⁾などの生産が達成されている。

2. 研究の目的

本研究では、酵母 *S. cerevisiae* にパチョロール合成遺伝子を高発現させることで、パチョロール生産酵母を作製した。次に、GMES を用い、パチョロール合成遺伝子高発現酵母のメバロン酸経路を最適化することで、パチョロールを効率的に生産する酵母の創製を目指した。

3. 研究の方法

(1) 酵母株および培養方法

パチョロール生産に用いる宿主として酵母 *S. cerevisiae* YPH499 を使用した。

96 ディープウェルプレートを用いた培養は、Dodecane 200 μL と YPD 培地 (20 g/L Glucose、10 g/L Yeast extract、20 g/L Peptone) 1000 μL で 30、1500 rpm の条件で行った。500 mL 容三角フラスコを用いた培養は、ドデカン 30 mL と YPD 培地 150 mL で 30、150 rpm の条件で行った。

(2) YPH499/PATX の作製

15 種類のプロモーターと *Pogostemon cablin* 由来のパチョロール合成酵素遺伝子を連結した DNA 断片で酵母 *S. cerevisiae* YPH499 を形質転換した。得られた 178 株の形質転換体を YPH499/PATX (X; 1-178) とした (Fig. 2)。

(3) YPH499/PAT167/MVAX の作製

15 種類のプロモーターと Fig. 1 に赤字で示したメバロン酸経路の 8 種類の遺伝子を含む DNA 断片で、YPH499/PATX の中で最も高いパチョロール生産性を示した株を形質転換した。得られた 999 株の形質転換体を YPH499/PAT167/MVAX (X; 1-999) とした (Fig. 2)。

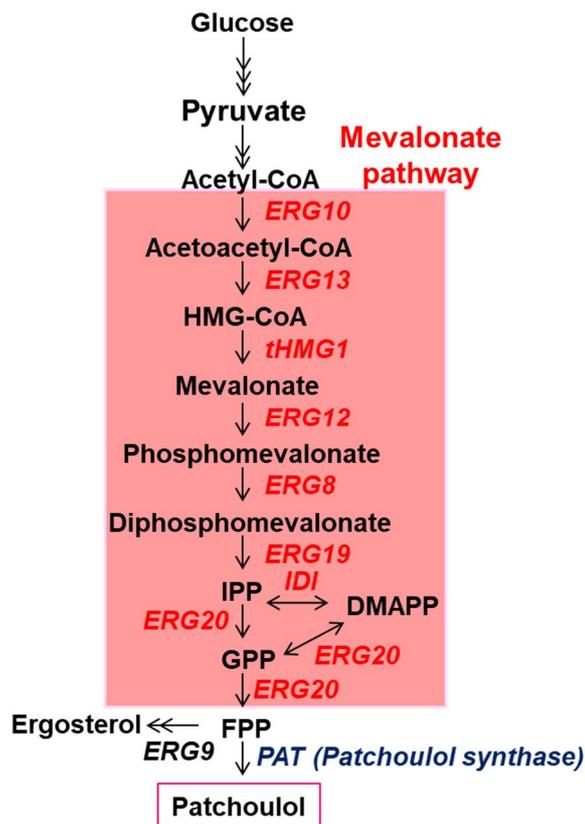


Fig. 1 酵母におけるパチョロール合成経路

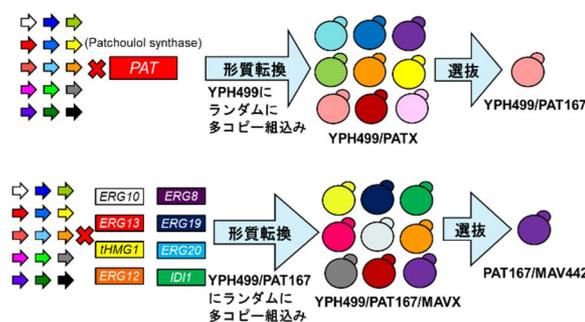


Fig. 2 パチョロール生産酵母の構築

(4) 分析方法

パチョロールの定量は培養液のドデカン相を薄層クロマトグラフ (TLC) またはガスクロマトグラフ質量分析 (GC-MS) で分析することにより行った。

TLC による分析では、培養液のドデカン相 6 μ L を TLC プレート (LiChrospher HPTLC Silica gel 60 F₂₅₄s) にアプライし、展開溶媒 (Hexane:Acetone = 9:1) で展開した。次に、発色試薬 (6 g/L Vanillin, 100 mL Ethanol, 1 mL Sulfuric acid) を噴霧し 120 $^{\circ}$ C で 6 min 静置した。発色操作後の TLC プレートをデジタルカメラで撮影し、バンドの発色強度を数値化した。パチョロール量は 0.25 μ g パチョロールの発色強度に対する相対値として算出した。

GC-MS による分析では、ガスクロマトグラフ質量分析計 GCMS-QP5050A (島津製作所) および ZB-5HT カラム (島津ジーエルシー) を用いた。GC-MS の分析にはパチョロールを標準物質として用いた。

(5) 転写量の測定

ドデカンを含む YPD 培地で 48 h 培養後の細胞から全 RNA を抽出し、逆転写反応を行うことによって cDNA を取得した。取得した cDNA をテンプレートとして用い、Real time-PCR 法によりパチョロール合成遺伝子およびメバロン酸経路に關与する 8 種類の遺伝子の転写量を測定した。内在性コントロール遺伝子として、*S. cerevisiae* YPH499 の *PDA1* 遺伝子を用いた。

4. 研究成果

(1) パチョロール高生産株の TLC によるスクリーニング

YPH499/PATX を 96 ディープウェルプレートで 72 h 培養した後に最も多いパチョロール生産量を示した株は YPH499/PAT167 であった。

YPH499/PAT167 のメバロン酸経路をランダムに代謝改変することで得られた 999 株の形質転換体 YPH499/PAT167/MVAX (X; 1-999) を 96 ディープウェルプレートで 72 h 培養した。ドデカン相中のパチョロールを TLC により分析した際の相対発色強度を Fig. 3 に示す。

YPH499/PAT167/MVAX の 999 株のうち相対発色強度が 1.2 以上となった上位 25 株 (Fig. 3 の赤プロット) を選抜し、GC-MS での定量によるパチョロール高生産株のスクリーニングに用いた。

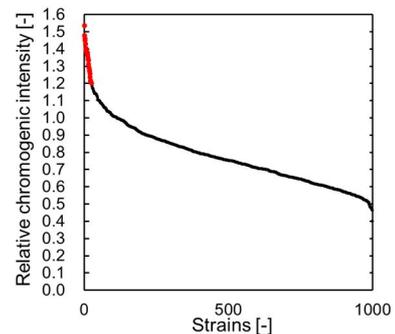


Fig. 3 TLC スクリーニング

(2) パチョロール高生産株の GC-MS によるスクリーニング

メバロン酸経路をランダムに代謝改変することで得られた YPH499/PAT167/MVAX の 999 株のうち、TLC による分析でパチョロール生産量が高かった上位 25 株および YPH499、YPH499/PAT167 を 96 ディープウェルプレートで 72 h 培養し、ドデカン相のパチョロールを GC-MS により分析した結果を Fig. 4 に示す。

宿主 YPH499 はパチョロールを全く生産しなかった。一方で、TLC によりスクリーニングした YPH499/PAT167/MVAX のパチョロール生産性上位 25 株は、何れも青いバーで示した YPH499/PAT167 と比較してパチョロール生産量が向上した。GC-MS による分析で高いパチョロール生産量を示した上位 3 株 (YPH499/PAT167/MVA442、/MVA457、/MVA682) を選抜し、パチョロール生産量の経時変化の測定に用いた。

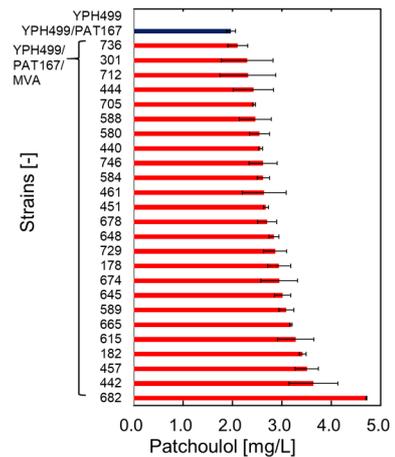


Fig. 4 スクリーニング株のパチョロール生産量

(3) パチョロール生産量の経時変化

(2) で選抜したメバロン酸経路をランダムに代謝改変することで得られた YPH499/PAT167/MVA442、/MVA457、/MVA682、パチョロール合成酵素のみを高発現した YPH499/PAT167、およびそれらの宿主 YPH499 を三角フラスコで培養した。24 h ごとにドデカン相を採取し、パチョロール濃度を GC-MS により分析した (Fig. 5 および Table. 1)。

宿主 YPH499 は何れの培養時間においてもパチョロールを生産していなかった。一方で、メバロン酸経路をランダムに代謝改変することで得られた 3 つの株 YPH499/PAT167/MVA442、/MVA457、および/MVA682 は、何れの培養時間においても、パチョロール合成酵素のみを高発現した YPH499/PAT167 よりも高いパチョロール生産量を示した。

培養 48 h において、YPH499/PAT167 は 8.4 mg/L のパチョロ

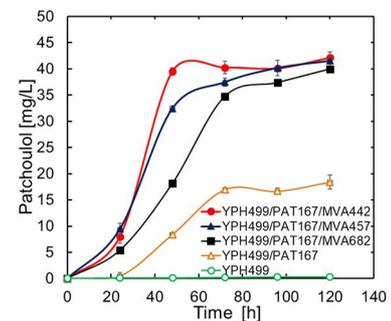


Fig. 5 パチョロール生産量の経時変化

ールを生産したのに対して、YPH499/PAT167/MVA442は39.5 mg/Lのパチヨロールを生産した。従って、メバロン酸経路を改変することで培養48 h時点でのパチヨロール生産量を4.7倍向上させることに成功した。YPH499/PAT167/MVA442は培養120 hで最大のパチヨロール生産濃度42.1 mg/Lに達した。また、YPH499/PAT167/MVA442の最大パチヨロール生産速度は19.8 mg/L/dであった。

Table 1 酵母のパチヨロール生産性

株名	株の特徴	最大パチヨロール濃度[mg/L]	最大生産速度 [mg/L/d]
YPH499	宿主	0	0
YPH499/PAT167	PAT 高発現	18.4	5.66
YPH499/PAT167/MVA442		42.1	19.8
YPH499/PAT167/MVA457	PAT 高発現/ メバロン酸改変	41.5	16.2
YPH499/PAT167/MVA682		40	11.6

(4) 転写量の測定

パチヨロール合成酵素のみを高発現した YPH499/PAT167 の遺伝子転写量を基準とした、メバロン酸経路を改変した YPH499/PAT167/MVA442 の各メバロン酸経路遺伝子とパチヨロール合成遺伝子の相対転写量を Fig. 6 に示す。YPH499/PAT167/MVA442 ではメバロン酸経路中の4つの遺伝子 *ERG20*、*tHMG1*、*ERG13* および *ERG19* が高発現していることが確認された。特に *ERG20* の転写量向上は顕著でありその相対転写量は23.6であった。

既往の研究において、酵母 *S. cerevisiae* による、メバロン酸経路を経由するカロテノイドやセスキテルペンの生産において、*tHMG1*⁶⁾ や *ERG20*⁷⁾ によって触媒される反応が律速段階となることが示唆されている。従って、YPH499/PAT167/MVA442 における *tHMG1* や *ERG20* の高発現がパチヨロール生産性の向上に寄与していると考えられる。一方で、*ERG13* や *ERG19* の高発現がメバロン酸経路を経由する化合物の生産性に与える影響は報告されていない。今後は、*tHMG1* や *ERG20* の他に *ERG13* や *ERG19* の発現がメバロン酸経路の代謝に与える影響を解析することで、メバロン酸経路経由化合物の更なる高効率生産を実現することが期待される。

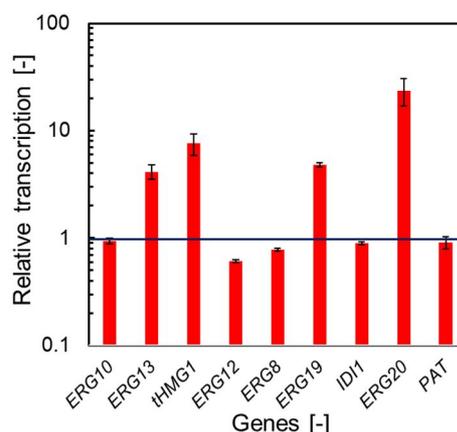


Fig. 6 最適化した株の相対遺伝子転写量

(5) まとめ

本研究では酵母 *S. cerevisiae* にパチヨロール合成遺伝子を組み込むことでパチヨロール生産酵母 YPH499/PAT167 を作製し、酵母でパチヨロールを生産することに成功した。また、YPH499/PAT167 のメバロン酸経路を代謝改変することでパチヨロール高生産酵母 YPH499/PAT167/MVA442 を創製することに成功した。YPH499/PAT167/MVA442 は既往の研究と比較して非常に高いパチヨロール生産量および生産速度を示した。

本研究では、GMES を用いてグルコースからパチヨロールに至る広範囲の代謝経路を最適化することで、パチヨロールを効率的に生産する酵母を創製することに成功した。GMES は他の化合物生産代謝経路の最適化にも容易に応用可能であるため、今後は GMES を用いた様々な有用物質生産酵母の創製が期待される。

<引用文献>

- 1) Holton RA *et al.*; *J Am Chem Soc*, 116, 1599 (1994).
- 2) Albertsen L *et al.*; *Appl Environ Microbiol*, 77, 1033 (2011).
- 3) Yamada R *et al.*; *ACS Synth Biol*, 6, 659 (2017).
- 4) Yamada R *et al.*; *Bioresour Technol*, 245, 1558 (2017).
- 5) Yamada R *et al.*; *Biotechnol Bioeng*, 144, 2075 (2017).
- 6) Li Q *et al.*; *FEMS Microbiol Lett*, 345, 94 (2013).
- 7) Ignea C *et al.*; *Microb Cell Fact*, 10, 4 (2011).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 R. Mitsui, R. Yamada, H. Ogino	4. 巻 189
2. 論文標題 Improved stress tolerance of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> by CRISPR-Cas-mediated genome evolution	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Applied Biochemistry and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 810-821
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12010-019-03040-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 R. Mitsui, R. Yamada, H. Ogino	4. 巻 35
2. 論文標題 CRISPR system in the yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i> and its application in the bioproduction of useful chemicals	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 World Journal of Microbiology and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 111
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11274-019-2688-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 R. Mitsui, R. Nishikawa, R. Yamada*, T. Matsumoto, H. Ogino	4. 巻 117
2. 論文標題 Construction of yeast producing patchouliol by global metabolic engineering strategy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biotechnology and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 1348-1356
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/bit.27284	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 R. Yamada, K. Ogura, Y. Kimoto, H. Ogino	4. 巻 35
2. 論文標題 Toward the construction of a technology platform for chemicals production from methanol: D-lactic acid production from methanol by an engineered yeast <i>Pichia pastoris</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 World Journal of Microbiology and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 37
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11274-019-2610-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Y. Sasaki, R. Mitsui, R. Yamada, H. Ogino	4. 巻 121
2. 論文標題 Secretory overexpression of the endoglucanase by <i>Saccharomyces cerevisiae</i> via CRISPR- integration and multiple promoter shuffling	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Enzyme and Microbial Technology	6. 最初と最後の頁 17-22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.enzmictec.2018.10.014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 R. Yamada, A. Yamauchi, Y. Ando, Y. Kumata, H. Ogino	4. 巻 268
2. 論文標題 Modulation of gene expression by cocktail -integration to improve carotenoid production in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioresource Technology	6. 最初と最後の頁 616-621
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biortech.2018.08.044	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 R. Yamada, Y. Kumata, R. Mitsui, T. Matsumoto, H. Ogino	4. 巻 37
2. 論文標題 Improvement of lactic acid tolerance by cocktail -integration strategy and identification of the transcription factor PDR3 responsible for lactic acid tolerance in yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 World Journal of Microbiology and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11274-020-02977-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 A. Mizobata, R. Mitsui, R. Yamada, T. Matsumoto, S. Yoshihara, H. Tokumoto, H. Ogino	4. 巻 131
2. 論文標題 Improvement of 2,3-butanediol tolerance in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> by using a novel mutagenesis strategy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 283-289
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2020.11.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 R. Mitsui, R. Yamada, T. Matsumoto, S. Yoshihara, H. Tokumoto, H. Ogino	4. 巻 104
2. 論文標題 Construction of lactic acid-tolerant <i>Saccharomyces cerevisiae</i> by using CRISPR-Cas-mediated genome evolution for efficient d-lactic acid production	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Applied Microbiology and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 9147-9158
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00253-020-10906-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 R. Mitsui, R. Yamada, T. Matsumoto, H. Ogino
2. 発表標題 Construction and analysis of engineered D-lactic acid tolerant <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
3. 学会等名 18th Asian Pacific Confederation of Chemical Engineering Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 A. Mizobata, R. Mitsui, R. Yamada, T. Matsumoto, H. Ogino
2. 発表標題 Improvement of 2,3-butandiol tolerance in yeast by a novel mutagenesis strategy
3. 学会等名 18th Asian Pacific Confederation of Chemical Engineering Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Y. Kumata, R. Mitsui, R. Yamada, T. Matsumoto, H. Ogino
2. 発表標題 Improvement of lactic acid tolerance in the yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i> by optimizing the expression of transcription factors
3. 学会等名 18th Asian Pacific Confederation of Chemical Engineering Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 R. Yamada, R. Nishikawa, R. Mitsui, T. Matsumoto, H. Ogino
2. 発表標題 Modulation of the mevalonate pathway in yeast for efficient patchoulol production by global metabolic engineering
3. 学会等名 18th Asian Pacific Confederation of Chemical Engineering Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐々木優果, 三ツ井良輔, 山田亮祐, 荻野博康
2. 発表標題 -CRISPR法とプロモーターシャッフリング法を融合した酵母によるタンパク質高生産技術
3. 学会等名 化学工学会第50回秋季大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Y. Sasaki, R. Mitsui, R. Yamada, T. Matsumoto, H. Ogino
2. 発表標題 Simultaneous use of CRISPR- integration and multiple promoter shuffling enhances secretory overexpression of endoglucanase by <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
3. 学会等名 The 10th International Symposium of Innovative BioProduction Kobe (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三ツ井良輔, 山田亮祐, 松本拓也, 吉原静恵, 徳本勇人, 荻野博康
2. 発表標題 ゲノム進化法によって創製した熱耐性酵母の遺伝子発現量解析
3. 学会等名 極限環境生物学会2020年度 (第21回)年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 溝端明日香, 三ツ井良輔, 山田亮祐, 松本拓也, 吉原静恵, 徳本勇人, 荻野博康
2. 発表標題 点変異・構造変異同時導入による2,3-ブタンジオール耐性酵母の創製
3. 学会等名 極限環境生物学会2020年度 (第21回)年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

大阪府立大学 化学工学課程/化学工学分野 反応工学グループ
<http://www2.chemeng.osakafu-u.ac.jp/group4/indexj/>

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------