

令和 4 年 5 月 15 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15734

研究課題名（和文）酵母代謝物センサを利用した効率的な高付加価値物質高生産法の開発と応用展開

研究課題名（英文）Development and applications of yeast-based metabolite sensor for high efficient production of valuable products

研究代表者

中村 泰之（Nakamura, Yasuyuki）

神戸大学・科学技術イノベーション研究科・特命助教

研究者番号：40733184

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：有用物質高生産株の取得のためのメタボライトセンサを開発し、目的物質の生産量に対するメタボライトセンサの応答性の評価を行なうことで物質生産への応用を試みた。本研究では、代謝改変した酵母株が発酵生産するドーパミンの生産量を緑色蛍光タンパク質（GFP）の発現により簡便に評価できるメタボライトセンサを構築し、蛍光強度からドーパミンの生産量をモニタリングすることが可能なシステムの開発に成功した。本システムは、使用するGPCRの種類を変更することにより、ドーパミン以外の他の物質へのメタボライトセンサ開発にも適用可能であるため、様々な有用物質高生産株開発への応用が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、目的物質であるドーパミンのメタボライトセンサを構築し、代謝改変した酵母株が発酵生産するドーパミンの生産量に応じて酵母細胞がセンシングを行なうシステムの開発に成功した。本研究で構築したドーパミンセンサを用いることで、ドーパミン高生産能力を示す菌株育種への応用が期待される。本研究で用いたメタボライトセンサ構築技術は、ドーパミン以外の有用化合物のセンサ構築にも応用できるものであり、様々な高付加価値物質の高生産株の育種技術開発のためのフレームワークを提供する。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we constructed the G protein-coupled receptor (GPCR) metabolite sensor that permits the easy evaluation of dopamine production levels by a green fluorescent protein (GFP) reporter gene using the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, and further established several fundamental techniques for enabling the high-throughput screening of modified strains with higher levels of dopamine production. Using the constructed yeast metabolite sensor, we verified that the fluorescence values obtained have correlated well with the dopamine concentrations produced in engineered strains. In near future, the use of constructed sensors will make it possible to quickly attain the strain breeding for high productivity from a large-scale library. Since this system is applicable to the development of metabolite sensors to detect other compounds except for dopamine by replacing the GPCRs, we expectedly envision the applications to the rapid strain development.

研究分野：合成生物学

キーワード：酵母 バイオセンサ ドーパミン シグナル伝達 Gタンパク質共役型受容体 レポーター遺伝子

1. 研究開始当初の背景

自然界には多様な二次代謝産物が存在し、医薬品、香料、染料、食品添加物、化粧品などとして我々の身の回りに様々な形で利用されている。近年隆起してきた合成生物学の進展により、これら二次代謝産物を微生物により発酵生産する研究が盛んに行われており、学術的にも重要なテーマである。植物や微生物が保有する特殊な代謝経路を移植することで本来生産しない化合物の生産を可能にしたり、さらには、自然界には存在しない人工的な代謝反応を生み出すことで新たな化合物の生産を可能にする、といった様々な取り組みが報告されている。例えば、アルテミシニン（抗マラリア薬原料）の前駆物質（Ro *et al.*, 2006 Nature）、オピオイド（鎮痛剤）（Galanie *et al.*, 2015 Science）といった植物からの抽出に頼っているような、構造が複雑で化学プロセスでは合成困難な物質が酵母で発酵生産可能となっている。一方で、工業レベルでこれらの化合物を生産するためには、大幅な生産性の向上が必要である。そこで近年、大腸菌などの微生物にバイオセンサを搭載し、スクリーニング系を構築することで、有用物質高生産株の取得を試みる研究が増えつつある。しかし、酵母を宿主とし、バイオセンサを利用して有用物質高生産株の取得を行なう研究は少ない。申請者はこれまでに様々な物質に対するバイオセンサの開発を行ってきた実績があり、従来システムをベースに改良を加えることで、代謝工学や発酵生産に応用可能なバイオセンサを開発できるのではないかと考えた。

目的化合物の生産性を向上させるために、代謝経路に關与する酵素の過剰発現や競合経路の破壊、補酵素のバランスの改善等行われているが、戦略通りに代謝の流れが変わるとは限らない。そこで、多様な菌株集団やライブラリからの高生産株のスクリーニングが有効な手段であるが、生産評価系として一般的に、生産した物質をクロマトグラフィー等の分析機器を用いてその濃度を定量することで評価を行なっている。しかし、一日で処理できる検体数は数十から数百程度で、構築した菌株の評価に関するスループットは決して高くはない。そこで、標的物質の生産量を簡便かつ迅速に評価できる技術が望まれており、レポーター遺伝子を利用したメタボライトセンサの開発が近年進められている。メタボライトセンサにより分析スループットが大幅に向上すれば、これまでの数百倍以上の菌株評価が可能となり、多様なコンストラクトやライブラリなど膨大な数の改変体評価に応用することで、高生産株や目的機能を有する変異株を取得できる可能性が劇的に高まることが期待される。

2. 研究の目的

本研究では、酵母を宿主とし、異種由来 G タンパク質共役型受容体 (GPCR) を用いて、ランダム変異等により生じる膨大な改変株ライブラリの生産性を簡便かつ迅速に評価できるメタボライトセンサを構築することを目的とした。本システムの有効性を実証するため、目的生産物のモデルとしてドーパミンを選択した。ドーパミンは、アルカロイド生合成の重要な中間物質であり、付加価値の高い医薬品や香料などの原料として用いられることから、高生産株の取得が望まれている。

GPCR は、膜タンパク質の中で最大のファミリーを形成する受容体であり、7 回膜貫通型の共通構造を有している。ヒト、酵母などの真核生物において普遍的に存在しており、細胞外から刺激を受け取るとその受容体に特異的な三量体 G タンパク質を活性化し、細胞内にシグナルを伝達するという共通のメカニズムを持つ。この共通のメカニズムを利用して、シグナル伝達の活性化により緑色蛍光タンパク質 (GFP) の発現が誘導されるようにゲノムを改変した酵母においてヒト由来 GPCR を酵母の細胞内 G タンパク質と共役させることで、リガンド結合を感知できるレポーター発現系が開発されている。そこで、高度な遺伝子組み換えが可能で、ヒト由来 GPCR を細胞膜上で発現できる *Saccharomyces cerevisiae* (出芽酵母) を宿主として用いて、代謝改変した酵母株が発酵生産するドーパミンの生産量を GFP の発現により簡便に評価できるメタボライトセンサを構築し、高速スクリーニングによる高生産株取得を目指した基盤技術開発を行なった。

3. 研究の方法

本研究では、高付加価値物質として知られるドーパミンをモデルとし、酵母を宿主としたドーパミン生産経路の構築および、GPCR ドーパミンセンサの開発を行なった。

(1) ドーパミン生産酵母株の構築

先行研究をもとに、ドーパミン生産酵母株を構築するとともに、ドーパミン生産に寄与する有用遺伝子を組み合わせることで、高いドーパミン生産を示す株の取得を行なった。

(2) GPCR ドーパミンセンサの構築

ドーパミン *in vivo* バイオセンサを開発するために、酵母のシグナル伝達経路に着目し、ドー

パミンをリガンドとして感知して情報を伝達するドーパミン受容体を利用することとした。酵母内在性のシグナル伝達経路の下流に GFP を発現するように遺伝子改変した酵母株を構築し、この酵母株にヒト由来ドーパミン受容体を機能発現させた。ドーパミンがドーパミン受容体に結合することで、酵母内在性のシグナル伝達経路と共役してシグナル伝達が起こり、GFP が発現するので、フローサイトメーター（FCM）により蛍光強度を測定した。また、受容体の発現量や、G タンパク質の種類の変更、受容体の感度変化を行なうことで、GPCR センサの機能改変手法の確立に取り組んだ。さらに、取得したドーパミンセンサを用いて、実際に発酵生産した生産量の評価を行なった。

4. 研究成果

(1) ドーパミン生産酵母株の構築

はじめに、これまでに報告のあった *Beta vulgaris* 由来の *CYP76AD1* と *Pseudomonas putida* 由来の *DODC* (ドーパ脱炭酸酵素) を導入したドーパミン生産株 DOCY 株を作出した。酵素 *CYP76AD1* は、過去の報告に基づいて、チロシンヒドロキシラーゼ活性を高めるアミノ酸変異 (W13L および F309L) を導入し、生産量を GC/MS により評価した。その結果、作出した酵母株により約 30 μM のドーパミンを生産することに成功した。次にドーパミン高生産株を取得するため、律速反応であることが報告されている L-Tyrosine から L-DOPA への変換を触媒する酵素の発現強化に取り組んだ。具体的には、先行研究で、最も高いチロシンヒドロキシラーゼ活性を示したオルソログ (*CYP76AD5*) を DOCY 株に導入した DOCY5 株を構築した。その結果、DOCY 株と比較して、DOCY5 株が、約 2 倍のドーパミンを生産したことを確認した。

さらなるドーパミン生産力価を達成するため、*S. cerevisiae* の細胞内 L-Tyrosine 濃度を増加させることが報告されている酵素 Aro4、Aro7 のフィードバック非感受性変異体を発現させた。その結果、Aro4 の K229L 変異体と Aro7 の G141S 変異体を同時に導入した場合、DOCY5 株と比較して、約 5 倍のドーパミンを生産することに成功した。

(2) GPCR ドーパミンセンサの構築

G タンパク質共役型受容体 (GPCR) を利用した酵母ドーパミンセンサの開発を行なった。ヒトドーパミン受容体の中から、酵母内で機能する受容体の探索を行なったところ、D2 型に分類されるサブタイプ (DRDX; X=2, 2S, 4) が、ドーパミン濃度に応じた蛍光強度の上昇を確認した (図 1)。さらに、微生物が発酵生産した物質の生産量を評価するため、検出濃度域の変更および高い ON/OFF 比を示すセンサの取得に取り組んだ。酵母のゲノムにコドン最適化した DRD2 (short form) をコードする遺伝子を組み込んだ株 (DRD2S_Sc) が、酵母内で最も低濃度域までドーパミン測定が可能で、高精度かつ高出力なセンサとして機能することが明らかとなった (図 1)。また、GPCR と直接相互作用する $G\alpha$ の種類を使い分けることで、センサの感度改変ができることを確認した。

そして、ドーパミンと類似構造を有した中間体 (L-Tyrosine、L-DOPA) との応答性を確認した結果、全く機能を示さないことからドーパミンに対して高い特異性を有していることを確認した。

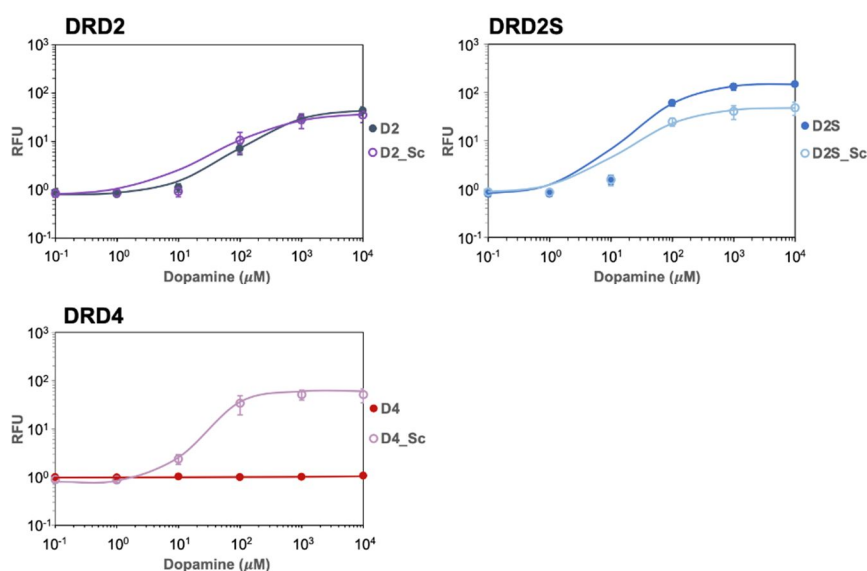


図 1. GPCR ドーパミンセンサの濃度反応曲線

(3) 受容体への変異導入によるセンサの感度改変

これまでの検討から、GPCR のサブタイプの検討、および発現量を調節することでは、劇的に感度を変更させることは困難であると分かった。そこで、受容体の活性を変化させることで、センサの感度を変化できるのではないかと考えた。先行研究から、ヒト細胞でドーパミン受容体を発現させた場合に、受容体の感度に関する変異が複数報告されている。本研究では、ヒト細胞で特に感度変化に効果のあった 3 つの変異体 (F6.44I, T5.54M, F5.51M) を作製し、機能評価を行なった。

評価した変異体のうち、F6.44I 変異体は酵母での機能を失うことが確認された。一方で、DRD2S_Sc の膜貫通領域内に変異導入した T5.54M, F5.51M 変異体は、野生型と比較して、感度の変化したセンサとして機能することを確認した。さらに、変異体 DRD2S_Sc (T5.54M) は、野生型と比べて ON/OFF 比が約 2 倍増加したことに加え、より低濃度域 (約 5~250 μM) において応答するセンサとして機能することを確認した。

(4) 実際の生産量と FCM による蛍光値による相関性確認

最後に、CDC5 株により発酵生産させたドーパミンを含む培養上清と取得したセンサ株を用いて、生産株のドーパミン生産量を評価できるか確認するために FCM による蛍光強度測定を行なった。その結果、センサ株に DRD2S_Sc (野生型) を使用した場合、蛍光は全く確認できなかった。一方で、センサ株に変異体 DRD2S_Sc (T5.54M) を用いた場合、実際の生産量に応じた蛍光値を示した。これは、センサ株 DRD2S_Sc (野生型) の応答濃度域は、約 100 μM ~10 mM の範囲である一方、センサ株 DRD2S_Sc (T5.54M) は、より低濃度域 (約 5~250 μM) において応答するセンサとして機能し、CDC5 株の生産濃度に対応していたためだと考えられる。このことから、ドーパミン生産量の評価には適切な検出濃度域を示すセンサ株の構築が重要であることが確認された。以上の結果から、FCM での蛍光値と実際の生産量を評価し、相関性があることを確認した。

今後、取得したドーパミンセンサを利用することで、膨大な数の菌株を含むライブラリの中から、高生産能力を示す菌株育種を迅速に達成可能にする。本システムは、使用する GPCR の種類を変更することにより、ドーパミン以外の他の物質へのメタボライトセンサ開発にも適用可能であるため、様々な有用物質の高生産因子探索や迅速な高生産株開発への応用が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 中村泰之、近藤昭彦、石井純	4. 巻 53
2. 論文標題 酵母シグナル伝達経路を利用したリガンド検出システムの開発とメタボライトセンサへの応用	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 37～40
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 中村泰之、近藤昭彦、石井純	4. 巻 5
2. 論文標題 酵母細胞を用いたG蛋白質共役型受容体リガンド検出システムの開発とメタボライトセンサへの応用	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 58～63
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 中村泰之、近藤昭彦、石井純	4. 巻 4
2. 論文標題 酵母細胞を用いたG蛋白質共役型受容体リガンドスクリーニングシステムの開発とメタボライトセンサへの応用	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Precision Medicine	6. 最初と最後の頁 60～65
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 Nakamura Yasuyuki, Asama Ririka, Tabata Takuya, Morita Kenta, Maruyama Tatsuo, Kondo Akihiko, Ishii Jun	4. 巻 118
2. 論文標題 Comparative analyses of site directed mutagenesis of human melatonin MTNR1A and MTNR1B receptors using a yeast fluorescent biosensor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biotechnology and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 863～876
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/bit.27609	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10件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 浅間梨々花, 中村泰之, 中村朋美, 近藤昭彦, 石井純
2. 発表標題 ドーパミン受容体を用いた酵母メタボライトセンサの開発と微生物生産評価への応用
3. 学会等名 化学工学会第51回秋季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 浅間梨々花, 中村泰之, 中村朋美, 近藤昭彦, 石井純
2. 発表標題 ドーパミン発酵生産性を簡易的に評価するGPCRメタボライトセンサの開発
3. 学会等名 日本農芸化学会 関西支部 第513回講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 浅間梨々花, 田畑琢也, 中村泰之, 加藤寛子, 近藤昭彦, 石井純
2. 発表標題 メラトニン発酵生産性を簡便に評価する酵母メタボライトセンサの開発
3. 学会等名 生物工学若手研究者の集い 夏のセミナー2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Matsueda A, Sakurai T, Iizuka R, Nakamura Y, Ishii J, Kondo A, Yoon D.H, Sekiguchi T, Shoji S, Tsuda S, Funatsu T
2. 発表標題 Feasibility study of the method to obtain peptide agonists for G protein-coupled receptors using water-in-oil microdroplets
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Jun Ishii, Takuya Tabata, Tomomi Nakamura, Hiroko Kato, Ririka Asama, Yasuyuki Nakamura, Akihiko Kondo
2. 発表標題 Construction of melatonin metabolite sensor using yeast signal transduction machinery
3. 学会等名 2019 Asian Synthetic Biology Association (ASBA) Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Jun Ishii, Takuya Tabata, Tomomi Nakamura, Hiroko Kato, Ririka Asama, Yasuyuki Nakamura, Akihiko Kondo
2. 発表標題 Construction of metabolite sensor using yeast signal transduction machinery for monitoring melatonin production
3. 学会等名 The 10th Symposium on Innovative Bioproduction Taichung (iBioT2019) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浅間梨々花、田畑琢也、中村泰之、中村朋美、加藤寛子、近藤昭彦、石井純
2. 発表標題 メラトニン生産性を簡便かつハイスループットに評価するメタボライトセンサの開発
3. 学会等名 日本農芸化学会関西支部 支部例会 (第511回講演会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------