

平成 30 年 4 月 23 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06579

研究課題名(和文) 精密代謝分析にもとづく高級アルコール高生産酵母の構築

研究課題名(英文) Metabolic Engineering of yeast strains producing higher alcohols based on the precise metabolic characterization

研究代表者

松田 史生 (Matsuda, Fumio)

大阪大学・情報科学研究科・教授

研究者番号：50462734

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：バイオマス原料から、化成品原料のブタノールを生産する出芽酵母の構築を目指した。そのために、細胞内代謝中間体濃度の絶対定量値から各反応のギブス自由エネルギー変化を推定し、代謝律速を同定する熱力学レベルの解析法を確立した。エタノール非生産酵母株の代謝状態を精密に測定することに成功し、代謝フローをエタノール生合成から他経路へと転換するには、細胞内コンパートメントを考慮したNADH過剰の解消が必要なことを明らかにした。これらの知見をもとに、ピルビン酸のミトコンドリア輸送に着目し、新たなイソブタノール高生産株の構築に成功した。

研究成果の概要(英文)：The central carbon metabolism in budding yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) was engineered to improve the production of butanols from biomass. For the purpose, a precise characterization of yeast metabolism was performed by developing a method to determine concentration of intracellular metabolites as well as to estimate levels of Gibb's free energy change of metabolic reactions. The results of the precise analysis suggested that an activation of excess NADH consumption was essential with considering intracellular compartmentalization of yeast cells. Based on the findings, the isobutanol production by yeast was improved by an overexpression of mitochondrial pyruvate carrier proteins.

研究分野：代謝工学

キーワード：酵母 高級アルコール 代謝工学 メタボローム分析 プロテオーム解析

## 1. 研究開始当初の背景

我が国では地球温暖化の防止に向け、温室効果ガスの排出量を大幅に削減する政策目標を掲げている。その実現には、さまざまな化成品原料をバイオマスから微生物発酵法で大量生産するバイオプロダクション技術が大きく貢献すると期待されている。

バイオプロダクション技術の課題は、高級アルコールなどのバイオ化成品原料を安価に大量生産可能な代謝改変微生物の分子育種である。大腸菌などのバクテリア宿主では、

目的化合物の生合成経路の追加導入に加えて、競合経路を遮断することで、多彩な化合物の高生産株が作成された。しかしバクテリア宿主は、ファージ汚染や易溶菌性など、バイオマスを原料とする実生産プロセスに耐えうる堅牢性に欠けるという弱点がある。一方、出芽酵母は、低 pH、高温などの様々なストレスに耐性があり、バイオエタノール生産に用いられた実績がある。出芽酵母の堅牢性を生かし、生産可能な化合物を多様化することが、バイオ化学品生産の低コスト化につながる。

しかし、出芽酵母に目的化合物の生合成経路を追加導入し、競合経路を遮断するアプローチを採っても、高い収率が得られないことが多い。その原因を解明し、酵母の基本代謝経路をドラスティックに改変する技術の開発が求められている。申請者はこれまでブタノール生産酵母の開発を題材に、これらの課題に取り組んできた。計算機を用いた代謝シミュレーション解析から酵母内に構築したイソブタノール生合成経路を活性化する独創的な手法を見出し、世界に先駆けて約 1.2g/l の生産量を達成した。

また、競合するエタノール生合成経路の遮断が、さらなるイソブタノール生産能の向上に必須である。エタノール生合成経路の遮断で余剰となったピルビン酸と還元力が、イソブタノール生合成へとオーバーフローすると期待される。

そこで、これまで困難とされてきた、アルコール脱水素酵素 (ADH) のホモログ遺伝子の 5 重破壊株およびピルビン酸脱炭酸酵素 (PDC) ホモログ遺伝子の 3 重破壊株の作成を達成した。イソブタノール生合成経路の追加導入とエタノール生合成遮断を組み合わせた株では、エタノール収率が低下していたものの、期待されていたイソブタノール生産能の向上は起きなかった。

## 2. 研究の目的

そこで、本研究では、エタノール生合成経路の遮断時に代謝のオーバーフローが起きない原因を解明し、見出した解決法の有用性の実証を目指して研究を行う。

(1) 代謝解析に基づく律速部位の特定：これまでの予備解析から、エタノール生合成経路の遮断時の酵母細胞内では、余剰の還元力 (NADH) は生じる一方で、ピルビン酸の過剰

は起きないことを明らかにしている。そこで本研究ではピルビン酸脱炭酸酵素 (PDC) およびアルコール脱水素酵素 (ADH) 破壊酵母株から、炭素中心代謝経路中間体の含量や酵素量のデータを取得して、エタノール生合成経路の遮断時に律速となる反応を特定する。

(2) 実験室進化株の取得と原因変異の解析：また、PDC および ADH 破壊酵母株では、増殖速度の著しい低下が起きる。これらの破壊株にイソブタノール生合成経路を追加導入した株では、ピルビン酸と還元力が、イソブタノール生合成へと利用されると、増殖速度も向上することが、代謝シミュレーション解析から明らかとなっている。そこで、PDC および ADH 破壊酵母株の継代培養を行い、増殖速度が向上した実験室進化株の取得を試みる。得られた株のゲノム配列の解析から原因変異を特定する。

(3) ブタノール高生産株の作成：得られた知見を元に、新たな方法論でイソブタノール生産株の構築を行う。まず、律速反応酵素を改修し、これにイソブタノール生合成経路の構築および PDC および ADH 破壊酵母を組み合わせた株を作成して、ブタノール生産試験を行ってその効果を検証する。

## 3. 研究の方法

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* S288C 株、アルコール脱水素酵素破壊株 (ADHΔ, BY4739 adh1Δadh2Δadh3Δadh4Δ adh5Δsfa1Δ)、ピルビン酸脱炭酸酵素 (PDCΔ, YPH499 pdc1Δ pdc5Δpdc6ΔMTH1AT) およびその実験室進化株を用いた。

非標識または [U-<sup>13</sup>C] グルコース含む SD 培地 (100 mL) で回分培養し、菌体を回収後、タンパク質を抽出し、定法に従ってトリプシン消化を行った。トリプシン消化物は nanoLC-UFMS (Prominence nano+LCMS-8040) を用いて分析した (カラム: L-column C18, 0.1\*150mm, 移動相: アセトニトリル/水/ギ酸、流量: 400 nl/min, ESI ポジティブイオンモード、検出: MRM)。205 タンパク質を測定する MRM 条件 (3062 ch) を作成した。各ペプチドの非標識体と [U-<sup>13</sup>C] 標識体のピーク面積比から相対タンパク量を求めた。データ解析には Skyline ver 2.5 を用いた。

非標識または [U-<sup>13</sup>C] グルコース含む SD 培地 (100 mL) で回分培養し、菌体を回収後、フィルター法でクエンチを行い、クロロホルムメタノール水法で代謝物質を抽出した。液体クロマトグラフ・トリプル四重極型質量分析装置 (LC-MS/MS, AB SCIEX API3200) の MRM モードで各代謝物の非標識体と [U-<sup>13</sup>C] 標識体を別個に測定し、そのピーク面積比から代謝物濃度を求めた。各代謝物質の絶対定量濃度値から、ギブス自由エネルギー変化を推定した。

代謝シミュレーションには化学量論式で構成された酵母ゲノムスケールモデル iMM904 (904 遺伝子、1577 反応、1226 代謝物)

に各イソブタノール生産経路を追加導入した。FBA を実施する際には細胞増殖速度を最大、代謝定常を仮定し、グルコース取り込み速度および酸素取り込み速度をそれぞれ 10 および 0.5 (mmol/gDW/h) に設定した。計算は全て MATLAB2013a(MathWorks Inc.) 上の COBRA toolbox および linear programming solver(GLPK)を用いた。

*S. cerevisiae* YPH499 株およびピルビン酸脱炭酸酵素 (PDC) 欠損変異株に酢酸リチウム法でベクターを導入し形質転換体を得た。株のイソブタノール発酵能評価は 5 mL の 20 g/L グルコース SD 培地を用い、培養開始から 2 日目の培液をガスクロマトグラフィーで測定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 実験室進化株の取得と原因変異の解析

*S. cerevisiae* YPH499 株由来の PDC 欠損変異株を長期継代培養することで、増殖速度が向上した実験室進化株 (PDCΔ) が得られている。次世代シーケンサーを用いて得たゲノム配列情報を比較したところ、PDCΔ ではグルコースセンサーに関わるシグナル伝達経路を担う遺伝子に変異が観察された。これらの結果から、実験室進化株では、グルコースセンサーの感度が低下し、カタボライト抑制が緩和されることで、過剰の NADH を TCA サイクルなどで消費することが可能となったため、解糖系の流量が増加し、増殖速度が向上したと推測された。

##### (2) 代謝解析に基づく律速部位の特定

出芽酵母のさまざまな代謝機能は、酵素量の変化を通じて制御されている。そこで、ナノ LC と高速動作が可能な UFMS (ultra-fast mass spectrometry)を用いた定量プロテオーム解析系を構築し、代謝酵素遺伝子を破壊した酵母株の中心代謝酵素プロファイル解析した。アルコール脱水素酵素破壊株 (ADHΔ) を、SD 培地で培養し、タンパク質を抽出した。内部標準としては [U-<sup>13</sup>C]グルコースを含む SD 培地で培養した S288C 株から得たタンパク質を用いた。粗タンパク質は還元アルキル化後、トリプシン消化を行い、ペプチドサンプルを調整し、LC-MS 分析に供した。解析対象の中心代謝酵素 205 タンパク質のうち 137 個を相対定量できた。ADHΔ 株ではアルコール脱水素酵素タンパク (Adh1p, Adh3p) のシグナル強度がゼロになっていたことから、定量プロテオーム解析系が正しく機能していることを確かめた。酵素発現プロファイルを S288C 株と ADHΔ で比較したところ、解糖系、ペントースリン酸経路、TCA サイクルの酵素量がすべて増加していたことから、代謝のオーバーフローが起きない原因は、特定の酵素発現量の不足ではないことを確認できた。

そこで、代謝物濃度の精密定量法を開発した。S288C 株を [U-<sup>13</sup>C]グルコースを含む SD 培地で培養し、フル <sup>13</sup>C ラベル中心代謝中間

体の抽出液を作成した。フルラベル抽出液中の代謝物濃度は非ラベル標準化合物を用いた内部標準法で決定した。非標識グルコースを含む SD 培地で培養した酵母株の抽出時に、フル <sup>13</sup>C ラベル抽出液を内部標準として加えて分析サンプルを調整し、LC-MS/MS 分析を行って解糖系、ペントースリン酸経路に属する中間体代謝物質の絶対濃度を求めた。ペントースリン酸経路の中間体の含量 (0.08~0.001 μmol/g 湿菌体重量) は、F6P, G6P などの解糖系中間体 (1.2~0.02 μmol/g 湿菌体重量) に比べて低濃度であった。さらに、ペントースリン酸経路の Ru5P を R5P と Xu5P に変換する 2 反応のギブス自由エネルギーを算出したところ、いずれの株でも ΔG が 0 に近く、平衡に近い反応であることが明らかになった。さらに NADPH, NADP<sup>+</sup>, NADH, NAD<sup>+</sup>, ATP, ADP および AMP の <sup>13</sup>C 標識パターンを調べたところ、[U-<sup>13</sup>C]標識体と部分標識体のシグナル強度値を累計することで内部標準物質として利用可能であることを確認した。また、TCA 回路中間体濃度を正確に測定するために、GC-MS を用いた外部検量線法を構築した。さらに、ビーズと超音波を用いた細胞破砕法と比較し、15 代謝物質中 12 代謝物質で超音波法の抽出効率が高いことを明らかにした。

次に、本法を用いてエタノール非生産株である ADHΔ および PDCΔ を解析した。まず野生株 BY4742, BY4739, YPH499 株の ATP, ADP および AMP 含量から Energy charge を計算したところ、それぞれ 0.79, 0.94, 0.95 となり、妥当な範囲 (0.8-0.95) にあることがわかった。培養試験から、PDCΔ は全くエタノールとグリセロールの生産を行わないのに対し、ADHΔ のエタノール濃度の最終到達点は 60 mM であり、グリセロール濃度の最高到達点は 50 mM であった。ADHΔ および PDCΔ の共通点として細胞の増殖速度は低く、細胞内代謝物質ではピルビン酸は若干増加するものの、過剰蓄積は起きていなかった。一方で、補酵素類では NADH の濃度が野生株に比べると増加していることが分かった。さらに、ペントースリン酸経路の各反応のギブス自由エネルギー変化はゼロに近く、ADHΔ および PDCΔ でも大きく変化しないことから、増殖低下時でも熱力学的な状態には変化がみられないことが明らかとなった。

以上の精密代謝解析から、ADHΔ および PDCΔ では、代謝全体に抑制がかかっていると示唆された。また、細胞内コンパートメント等を考慮しつつ、過剰の NADH を消費する経路を活性化することで、解糖系の流量を増加させ、代謝のオーバーフローを起こせる可能性が示唆された。

##### (3) ブタノール高生産株の作成

これらの知見をもとに、NADH をリン酸化し、NADPH に変換して消費する反応に着目した。ADHΔ にイソブタノール生合成経路と

本反応を触媒する酵素をコードする *POS5* の過剰発現プラスミドを導入した株を構築した。同条件で培養したところ、72 時間目のイソブタノール生産量を 9.7 mg/L から 22.5 mg/L に向上できた。

ついで、代謝物や還元力のミトコンドリア-細胞質間の輸送に着目した。イソブタノールはピルビン酸から 5 反応で生成し、酵母では前半 3 反応がミトコンドリアに存在しているそこで、イソブタノール生合成経路の最適な細胞内局在を、計算機シミュレーション法で検討した。出芽酵母代謝モデル iMM904 から PDC 反応を除いたモデルを用いて、シミュレーションを行ったところ、代謝シミュレーションでは、後半 2 反応を細胞質に追加した場合イソブタノールの理論最大収率は 28% となったが、5 反応全てを細胞質かミトコンドリアに局在化すると収率を 54% と 86% まで増加できることを見出した。

そこで、後半 2 反応を触媒する代謝酵素を細胞質で発現させた *S. cerevisiae* YPH499 株を構築した。この株のイソブタノール生産収率は 0.9% と低く経路の活性化の必要性が示唆された。さらに前半 3 反応の代謝酵素を細胞質で発現した株ではイソブタノール生産収率を 1.3% に向上することに成功した。さらに PDCΔ に同経路を導入した株では収率が 2.9% まで増加した。

一方で後半 2 反応の代謝酵素をミトコンドリアで発現した株では収率が 2.2% となった。ミトコンドリアでのイソブタノール生産にはピルビン酸の供給が重要であると考え、ピルビン酸輸送タンパクをコードする *MPC1* 欠損株を培養した。その結果イソブタノール生産収率は 1/5 に減少し、輸送タンパクの重要性が示唆された。この知見をもとにピルビン酸輸送タンパク、*Mpc1p*、*Mpc2*、および *Mpc3p* を恒常的に発現した株を構築したところ、イソブタノール生産濃度を 49% 向上することに成功した。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 7 件)

1. Yuki Narazaki, Yuta Nomura, Keisuke Morita, Hiroshi Shimizu, and Fumio Matsuda (2018) Expression of *Saccharomyces cerevisiae* cDNAs to enhance the growth of non-ethanol-producing *S. cerevisiae* strains lacking pyruvate decarboxylases. *J. Biosci. Bioeng.* In press. doi: 10.1016/j.jbiosc.2018.03.008
2. Keisuke Morita, Yuta Nomura, Jun Ishii, Fumio Matsuda, Akihiko Kondo and Hiroshi Shimizu (2017) Heterologous expression of bacterial phosphoenol pyruvate carboxylase and Entner-Doudoroff

pathway in *Saccharomyces cerevisiae* for improvement of isobutanol bio-production. *J. Biosci. Bioeng.* 124(3), 263-270, doi: 10.1016/j.jbiosc.2017.04.005

3. Fumio Matsuda, Syohei Kinoshita, Shunsuke Nishino, Atsumi Tomita and Hiroshi Shimizu (2017) Targeted proteome analysis of single-gene deletion strains of *Saccharomyces cerevisiae* lacking enzymes in the central carbon metabolism. *PLoS ONE* 12(2), e0172742, doi: 10.1371/journal.pone.0172742
4. Li Shen, Yuya Nishimura, Fumio Matsuda, Jun Ishii, and Akihiko Kondo (2016) Overexpressing enzymes of the Ehrlich pathway and deleting genes of the competing pathway in *Saccharomyces cerevisiae* for increasing 2-phenylethanol production from glucose. *J. Biosci. Bioeng.* 122(1), 34-39 doi: 10.1016/j.jbiosc.2015.12.022
5. Shuichi Kajihata, Fumio Matsuda, Mika Yoshimi, Kenshi Hayakawa, Chikara Furusawa, Akihisa Kanda and Hiroshi Shimizu (2015) <sup>13</sup>C-based metabolic flux analysis of *Saccharomyces cerevisiae* with a reduced Crabtree effect. *J. Biosci. Bioeng.* 120(2), 140-144 doi: 10.1016/j.jbiosc.2014.12.014
6. Shunsuke Nishino, Nobuyuki Okahashi, Fumio Matsuda and Hiroshi Shimizu (2015) Absolute quantitation of glycolytic intermediates reveals thermodynamic shifts in *Saccharomyces cerevisiae* strains lacking *PFK1* or *ZWF1* genes. *J. Biosci. Bioeng.* 120(3), 280-6. doi: 10.1016/j.jbiosc.2015.01.012
7. Kengo Ida, Jun Ishii, Fumio Matsuda, Takashi Kondo and Akihiko Kondo (2015) Eliminating the isoleucine biosynthetic pathway to reduce competitive carbon outflow during isobutanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories*. 14, 62 doi: 10.1186/s12934-015-0240-6

[学会発表](計 14 件)

8. 森田 啓介、松田 史生、岡本 浩二、石井 純、近藤 昭彦、清水 浩 (2017) ピルビン酸代謝フローの転換による出芽酵母 2,3-ブタンジオール生産性の向上 第 69 回日本生物工学会大会
9. 森田 啓介、松田 史生、岡本 浩二、石井 純、近藤 昭彦、清水 浩 (2017) マイトファジー抑制による出芽酵母の細胞物質生産能力向上 日本農芸化学会 2017 年度大会
10. Fumio Matsuda (2016) Transomics analysis of the central metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*, "Yeast fermentation in Asia", International Commission on Yeasts
11. Keisuke Morita, Fumio Matsuda, Jun Ishii, Akihiko Kondo, Hiroshi Shimizu (2016) Heterologous gene expression in

- Saccharomyces cerevisiae* for higher isobutanol production Metabolic Engineering XI
12. 松田 史生、富田淳美、清水 浩(2016)定量プロテオミクスを用いた出芽酵母中心代謝安定化機構の解析 第 68 回日本生物工学会大会
  13. 森田 啓介、松田 史生、伊田賢吾、石井純、近藤 昭彦、清水 浩(2016)イソブタノール生産酵母の構築：オルガネラ局在の検討 第 68 回日本生物工学会大会
  14. Fumio Matsuda (2016) Trans-omics analysis of the central metabolism in yeast, 日本プロテオーム学会 2016 年会
  15. 松田史生、伊田賢吾、森田啓介、石井寛子、木下翔平、石井純、近藤昭彦、清水浩 (2016) 2,3-ブタンジオール高生産出芽酵母株の構築 日本農芸化学会 2016 年度大会
  16. 森田 啓介、松田 史生、石井 純、近藤 昭彦、清水 浩 (2016)異種遺伝子発現による出芽酵母イソブタノール合成活性化 日本農芸化学会 2016 年度大会
  17. 松田史生 (2016) 酵母代謝工学に向けた中心代謝システムの解析 酵母研究会第 81 回講演会
  18. Fumio Matsuda (2015)Integrated metabolome, proteome, and fluxome analysis of central carbon metabolism in microbial cell factories. iBioK アジアシンポジウム
  19. 松田史生 (2015) 出芽酵母中心代謝における細胞質とミトコンドリアの使い分け, 日本分子生物学会 2015 年会
  20. 松田史生、西野駿佑、清水 浩 (2015) 出芽酵母中心代謝制御のトランスオミクス解析 第 67 回日本生物工学会大会
  21. 野村 悠太、森田 啓介、松田 史生、清水 浩 (2015) 高級アルコール生産に向けた酵母の細胞内補酵素バランスの改変 第 67 回日本生物工学会大会

〔その他〕

ホームページ等

<http://www-symbio.ist.osaka-u.ac.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

松田 史生 (MATSUDA, Fumio)

大阪大学大学院・情報科学研究科・教授

研究者番号：5 0 4 6 2 7 3 4

(2)連携研究者

石井 純 (ISHII, Jun)

神戸大学大学院・科学技術イノベーション研究科・教授

研究者番号：4 0 5 1 2 5 4 6

(3)研究協力者

森田 啓介 (MORITA, Keisuke)

西野 駿佑 (NISHINO, Shunsuke)

野村 悠太 (NOMURA, Yuta)

木下 翔平 (KINOSHITA, Shohei)