

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23667

研究課題名（和文）トリテルペノイド生産に適した出芽酵母株の構築

研究課題名（英文）Establishment of a yeast strain for production of plant triterpenoids

研究代表者

安本 周平（Yasumoto, Shuhei）

大阪大学・工学研究科・助教

研究者番号：80853142

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：トリテルペノイドは様々な生物活性を持つ有用な化合物であるが、その生産は植物の生育に依存している。近年植物由来の生合成酵素遺伝子を出芽酵母などの異種宿主に導入し、有用代謝産物を生産する試みが多数報告されているが、その生産性の低さが問題となっている。本研究ではトリテルペノイド生産の上流経路であるメバロン酸経路の増強による代謝改変によって出芽酵母におけるトリテルペノイド生産性が向上することを確認するとともに、新たな代謝工学ツールとして、AID法を利用することでトリテルペノイド生産に適した出芽酵母の作出を試みた。複数のメバロン酸経路の酵素遺伝子を導入することでトリテルペノイド生産量の向上が確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

酵母代謝工学における新たな研究ツールとして、AID システムの適用可能性を検討することができた。また、新たに取得する植物トリテルペノイド生合成酵素遺伝子の機能解析に有用な酵母株の作出に成功した。現在有用な植物トリテルペノイドは植物からの抽出に依存しており、その安定的な生産が課題となっている。本研究により得られた知見は、出芽酵母を用いたトリテルペノイドの安定的な生産へ寄与することが期待できる。また、現在では自生植物からの抽出に頼っているトリテルペノイド生産が、新たな生産法へ移行することで、植物資源の保全が促進される。

研究成果の概要（英文）：Plants produce a variety of specialized metabolites. Among them, triterpenoids are the most structurally diverse specialized metabolites with useful biological activity. The production of plant triterpenoids depends on the growth of the plant. Recently, heterologous production of plant specialized metabolites in microorganisms have been recognized as an alternative strategy for the production. In this study, I attempted to establish a yeast strain for the production of plant triterpenoids by overexpression of mevanolate pathway enzymes and suppression of competitive endogenous pathway by auxin-inducible degron system.

研究分野：植物代謝工学

キーワード：出芽酵母 トリテルペノイド 合成生物学

1. 研究開始当初の背景

植物は多種多様な低分子有機化合物(代謝物)を生産することが知られている。そのうち二次代謝産物あるいは特化代謝産物として知られる化合物の中には生物活性を知られるものが多く存在する。しかし、これらの代謝産物は特定の植物種の、特定の組織においてのみ合成・蓄積していることが多く、植物からの抽出によって安定的に目的代謝物を生産することが困難である。また、その化学構造の複雑さから、有機合成による大量合成も難しい。近年、植物の代謝酵素遺伝子を大腸菌や酵母と行った異種宿主に導入することで植物有用成分を安定的に生産する合成生物学的手法が注目されている。トリテルペノイドは、最も化学構造が多様な植物二次代謝産物であり、様々な生物活性を示すトリテルペノイドが知られている。トリテルペノイドは共通の前駆体である2,3-オキシドスクアレンが環化酵素(OSC)により変換されることで合成されている。トリテルペノイド骨格はさらにシトクロム P450 モノオキシゲナーゼによる酸化、配糖化酵素による配糖化修飾を受けることで、多様な化学構造が合成されている。

出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)はエルゴステロール等の内在ステロールを生合成している。エルゴステロールも植物トリテルペノイドと同様に2,3-オキシドスクアレンから合成されることが知られており、OSCや修飾酵素遺伝子を導入することで、植物トリテルペノイドを生産することが可能となっている。しかし、その生産量は低いため、工業的なトリテルペノイド生産には至っていなかった。出芽酵母はラノステロール合成酵素(ERG7)によって2,3-オキシドスクアレンからエルゴステロールの前駆体物質であるラノステロールを合成しており、ERG7の抑制によって、酵母におけるトリテルペノイド生産量の向上が期待され、先行研究においてプロモーターの置換によるERG7の転写抑制による代謝改変が試みられていた。ERG7を抑制することで、トリテルペノイドの生合成量の向上が確認されたが、内在ステロールの蓄積も確認され、プロモーター置換による転写の抑制ではERG7の機能の抑制が不十分であることが推察された。

オーキシシグロン(AID)法はAIDタグを付加したタンパク質の分解を植物ホルモンであるオーキシシンの添加によって急速に誘導することを可能とするシステムである。ノックアウト体の作出が不可能な必須遺伝子の機能解析に用いられてきたが、代謝工学への応用はあまり報告がなかった。

2. 研究の目的

本研究は出芽酵母の代謝改変による、植物トリテルペノイド生産に有用な酵母株の作出を目的とした。具体的には、(1)上流経路の増強、(2)競合代謝経路の抑制によりトリテルペノイドの効率的な生産に適した酵母株を作出する。

(1) 上流経路の増強

トリテルペノイド共通前駆体である2,3-オキシドスクアレンは酵母内でメバロン酸経路によって合成されている。メバロン酸経路における律速段階はヒドロキシメチルグルタリル-CoA(HMG-CoA)がメバロン酸に還元される反応であり、本反応を触媒するHMG-CoA還元酵素(HMGR)を過剰発現させることでトリテルペノイドの生合成量が増強されることが知られている。本研究ではHMGRと他のメバロン酸経路に属する代謝酵素やスクアレン合成酵素(ERG9)、スクアレンエポキシダーゼ(ERG1)を共発現させることで、2,3-オキシドスクアレンへの代謝流量を増強させ、トリテルペノイド生産量の向上を目指した。

(2) 競合代謝経路の抑制

酵母にはトリテルペノイド前駆体である2,3-オキシドスクアレンを出発物質とするステロール化合物の代謝経路が存在しており、ERG7が触媒する2,3-オキシドスクアレンからラノステロールへの変換が内在ステロールと導入トリテルペノイド生合成の分岐反応となっている。ERG7遺伝子は酵母の生育に必須であるため、ノックアウト体をトリテルペノイド生産に利用することは困難である。本研究では、植物ホルモンであるオーキシシンを用いたタンパク質分解系(AID法)の利用によるタンパク質レベルでの制御を行うことでトリテルペノイド生合成の競合経路である内在ステロール生合成を正確に制御し、トリテルペノイド生産量の向上を目指した。

3. 研究の方法

(1) 上流経路の増強

先行研究により作成されていたβ-アミリン合成酵素、tHMGR発現酵母株にtHMGR、ERG9(スクアレン合成酵素)、ERG1(スクアレンエポキシ化酵素)発現ベクターを導入し、基本的なトリテルペノイド骨格であるβ-アミリンの生産量をGC-MSにより測定した。

(2) 競合代謝経路の抑制

AIDシステムを酵母で使用するために、AtTIR1発現カセットを酵母染色体ゲノムに組み込み、導入した。AtTIR1導入酵母株中の染色体ERG7遺伝子の下流にin-frameとなるようにAID-tag配列を導入した。得られた酵母株について、更にβ-アミリン合成酵素発現ベクターを導入

し、トリテルペノイド骨格である β -アミリンと酵母内在のステロールであるエルゴステロールについて生産量を GC-MS により測定した。

4. 研究成果

(1) 上流経路の増強

HMGR はメバロン酸経路の律速酵素であると知られており、先行研究において1コピーの tHMGR (膜結合に関わる部位を覗いた酵素活性ドメイン) の導入によって、トリテルペノイド生産性の向上が確認されていた。本研究ではさらに tHMGR 発現ベクターを導入したが、トリテルペノイドである β -アミリン生産量の有意な変化は見られなかった。しかし、メバロン酸経路の下流、スクアレンからトリテルペノイド共通前駆体である 2,3-オキシドスクアレンへの反応を触媒する ERG1 酵素遺伝子発現ベクターを導入することで、 β -アミリン量の有意な変化が確認できた。

(2) 競合代謝経路の抑制

AtTIR1 発現カセットと ERG7 へ AID-tag を導入した酵母株に、 β -アミリン合成酵素発現ベクターを導入した形質転換体について、AID の誘導剤であるオーキシシン (IAA) を含む、あるいは含まない培地で培養を行い、 β -アミリン生産量を GC-MS により測定したところ、生産量の有意な上昇は確認できなかった。また、AID によって抑制を行った ERG7 の下流代謝産物であるエルゴステロールについても測定を行ったが、顕著な減少は見られなかった。また、当該酵母株の生育が元株よりも悪くなっており、エルゴステロール量を測定したところ、オーキシシンの有無に関わらず、AID システム酵母株では元株と比較してエルゴステロールの減少が見られた。以上のことから、AID システムのリークな活性により、AID の誘導前から ERG7 タンパク質の分解が誘導され、酵母の生育が阻害されており、トリテルペノイド生産量も予想していたように上昇しなかったと考えられる。

本研究では AID システムとして 2014 年頃に報告されたもの (Nishimura and Kanemaki, 2014) を使用したが、最近になって同じ研究グループから改良された AID2 システムが報告されている (Yesbolatova et al., 2020)。その報告では、変異型の TIR と、新たなオーキシシンアナログを使用することで、従来の AID システムで問題となっていたオーキシシンがない状態での AID-tag 付加タンパク質の分解を抑えることに成功している。この AID2 システムを使用することで、菌体の増殖時には細胞増殖を抑制することなく、目的化合物 (例えば植物トリテルペノイド) を生産する際の代謝スイッチングを正確に制御することが可能になると期待される。

<引用文献>

Nishimura, Kohei, and Masato T. Kanemaki. "Rapid depletion of budding yeast proteins via the fusion of an auxin-inducible degron (AID)." *Current protocols in cell biology* 64.1 (2014): 20-9.

Yesbolatova, Aisha, et al. "The auxin-inducible degron 2 technology provides sharp degradation control in yeast, mammalian cells, and mice." *Nature communications* 11.1 (2020): 1-13.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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 |
|---------|---------|
|---------|---------|