

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25820400

研究課題名(和文) 中心代謝機能の拡張による酵母有用物質生産能の強化

研究課題名(英文) Expansion of the central carbon metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*

研究代表者

松田 史生 (Matsuda, Fumio)

大阪大学・情報科学研究科・准教授

研究者番号：50462734

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：酵母を多様なバイオ化成品原料を大量生産可能な宿主へと改良するために、バクテリアにユニークな中心代謝反応を追加導入し、酵母の中心代謝機能を拡張することを試みた。大腸菌のエントナー-ドウドロフ(ED) および光合成微生物のホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ(PPC)経路を導入した酵母株を作成し、経路が機能していること、高級アルコール類の一つであるイソブタノール生産能力の向上に寄与することを示した。

研究成果の概要(英文)：The central carbon metabolism in baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, was expanded by introducing metabolic pathways of other microorganisms to improve a capability of the yeast metabolism for more efficient bioproduction of useful chemicals. The metabolically engineered *S. cerevisiae* strains expressing bacterial Entner-Doudrouf and phosphoenolpyruvate carboxylase pathways were constructed whose functions were confirmed by the labeling experiment and isobutanol fermentation test.

研究分野：代謝情報工学

キーワード：バイオプロダクション 出芽酵母 代謝シミュレーション 中心代謝経路

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大量生産可能な代謝改変微生物の分子育種である。現在、代謝経路を合理的にデザインし、大規模に改変する代謝工学分野の技術開発が世界的な競争となっている。その重要性から、韓国、米国、ヨーロッパで多額の研究資金が投入されており、我が国でも積極的な取り組みが求められている。これまでにわれわれは、実生産に有利な特性を持つ出芽酵母に着目して、イソブタノール生産酵母の開発にとり組み、世界に先駆けて約 0.12g/l の生産量を達成している。しかし、酵母でエタノール以外のバイオアルコールを高濃度 ($> 10\text{g/l}$) に生産した例は少なく、独創的なアイデアに基づくブレイクスルーが求められている。

2. 研究の目的

そこで、計算機を用いた代謝シミュレーション解析を実施し、中心代謝経路に反応を追加して機能を拡充することで、酵母を多様なバイオ化成品原料を大量生産可能な宿主へと改良する、新たな方法論を見いだした。

従来の代謝改変の方法論に従い、酵母内にバイオアルコール生合成経路を構築後、競合するエタノール生合成経路を遮断すると、細胞内の酸化還元状態がアンバランスになる。このアンバランスを解消する反応が中心代謝経路に欠けていることが、酵母のバイオアルコール生産能が低い原因であることを突き止めた。そこで、大腸菌などバクテリアにユニークな中心代謝反応を追加導入して、酵母の中心代謝機能を拡張すると、上記のアンバランスが解消可能になることを見いだした。

本研究ではイソブタノール生合成能が向上すると予想された①エントナーードロフ経路、②ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ反応を追加した酵母株を作成し、その効果を代謝中間体の分析および代謝フラックス解析で追加経路の機能を確認することを目的とした。さらに、イソブタノール生産能をモデルケースとして評価することを目的とした。

3. 研究の方法

酵母のゲノムスケール代謝モデルとして、57 の反応、53 の代謝物質から構成される iBKSec50 を使用した。イソブタノール生合成経路が追加された酵母代謝モデルについて、グルコースの取り込み速度を 10mmol/gDW/h 、酸素の取り込みを 0.1mmol/gDW/h に設定し

代謝フラックスを計算した。全ての計算には MATLAB (MathWorks Inc., Natic, MA, USA) 上の COBRA toolbox を用いた。また、線形計画法ソルバーとして GLPK (GNU Linear Programming Kit) を用いた。

出芽酵母株 (BY4742 株) およびその 1 遺伝子破壊株を宿主として用いた。2 ミクロン型の複製開始点を持つプラスミドを構築し、酢酸リチウム法により酵母へ導入した。培養はグルコースあるいは $[1-^{13}\text{C}]$ グルコースを炭素源とする SD 培地を用いて行った。5 g/l の $[1-^{13}\text{C}]$ グルコースを単一炭素源とする培養の対数増殖期に菌体を回収し、加水分解、誘導体化後、ガスクロマトグラフィー質量分析 (GC-MS Agilent 7890A/5975C) で測定したアラニンの ^{13}C 濃縮度から、ED 経路の代謝流束を推定した。培地中のイソブタノール濃度は GC (Agilent 7890A) で測定した。

4. 研究成果

(1) 大腸菌のエントナーードロフ (ED) 経路を導入した酵母株の作成

イソブタノール生産時に生じる酸化還元アンバランスを解消可能なエントナーードロフ経路 (ED 経路) を酵母内に構築することを試みた。ED 経路の機能を計算機シミュレーションで評価した後、実際に酵母株を構築し、代謝フラックス比解析で ED 経路を流れる代謝物流束を調べた。

まず、イソブタノール生合成経路を追加した酵母中心代謝モデルで微好気条件下の代謝シミュレーションを行った。その結果、ADH 反応の削除時にイソブタノール生産収率が $0.598\text{mol/mol glucose consumed}$ まで向上すると予測された。しかし、多量のグリセロール副生産を伴うことから、酸化還元アンバランスが起きていると推定された。これに ED 経路を追加したモデルでシミュレーションを行うと、グリセロール副生産が抑制されることで、イソブタノール収率が $0.938\text{mol/mol glucose consumed}$ まで 1.5 倍程度上昇すると予測された。

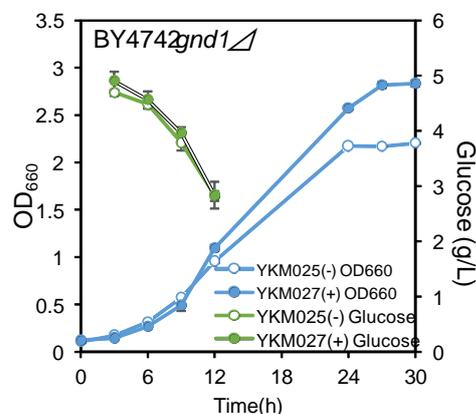


図1 ED 経路導入株とコントロール株の培養曲線
空ベクターコントロール株と ED 経路導入株

の培養結果を示した (YKM025、YKM027)。OD660 を青、グルコース濃度を緑で表した。ED(-)および ED(+)はそれぞれコントロール株と ED 経路導入株を示した。エラーバーは試行数 N=3 の独立した培養結果の標準誤差を示した。

そこで、ED 経路の前駆体である 6-ホスホグルコン酸の蓄積が期待できる PFK1 および GND1 遺伝子の欠損変異株 (BY4742pfk1 Δ , BY4742gnd1 Δ) に大腸菌由来の *eda*, *edd* 遺伝子を強発現した株を作成した。BY4742pfk1 Δ 株では ED 経路導入による培養挙動の変化はほとんど見られなかった。一方、BY4742gnd1 Δ に ED 経路を導入した YKM027 株では空ベクター株 (YKM025) に比べて比増殖速度が $0.19 \pm 0.007 \text{ h}^{-1}$ から $0.22 \pm 0.004 \text{ h}^{-1}$ に上昇した (図 1)。この結果から導入した ED 経路が機能していると推測された。

(2) 大腸菌のエントナー-ドウドロフ (ED) 経路を導入した酵母株の機能解析

前項の培養試験から、BY4742 *gnd1* Δ 株に ED 経路を導入したときに、ED 経路が機能することによって代謝状態が変化すると推測された。そこで、酵母の細胞内に導入した ED 経路の代謝流束を決めるために、 ^{13}C ラベルグルコースを用いた同位体ラベル実験を行った。1 位の炭素を標識した $[1-^{13}\text{C}]$ グルコースを炭素源に用いて培養すると、グルコースが資化されてピルビン酸に変換される。この時、エムデン-マイヤーホフ経路 (EM 経路)、ペントースリン酸経路 (PP 経路)、ED 経路に依存してピルビン酸の標識位置が異なる。つまり、抽出したピルビン酸を質量分析装置 (MS) で測定し、観測される同位体のシグナル強度比から経路の流束を推定できる。ピルビン酸の直接の測定は困難であるが、ピルビン酸から 1 ステップで生成され同じ ^{13}C 濃縮度情報を持つアラニン測定することで同様の情報を得ることができる (図 2)。

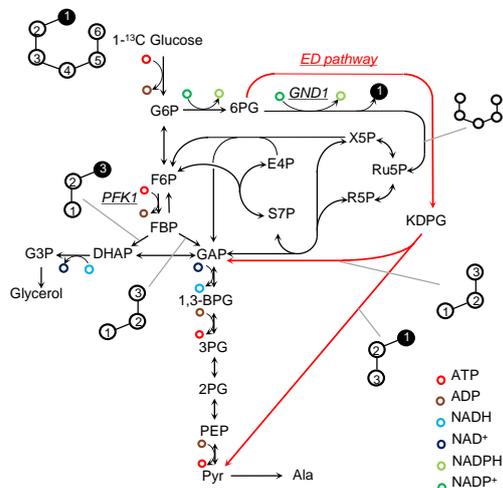


図 2 $[1-^{13}\text{C}]$ グルコースからピルビン酸への代謝と炭素骨格

1 位が ^{13}C 標識されたグルコースは EM 経路で資化されると、FBP の開裂をへて 3 位の炭素が標識されたピルビン酸と、標識のないピルビン酸が 1 分子ずつ生じる。PP 経路で資化されると、6PG の反応で 1 位の標識炭素が二酸化炭素として抜けてしまうので、1 分子のグルコースから標識の無いピルビン酸が 5/3 分子生じる。ED 経路を利用した場合、KDPG の開裂を経て、1 位の炭素が ^{13}C 標識されたピルビン酸と、無標識のピルビン酸が 1 分子ずつ生じる。これらのピルビン酸の ^{13}C 濃縮度はそのままアラニンに引き継がれる。

ED 経路の代謝流束を推定するために、 $[1-^{13}\text{C}]$ グルコースを単一炭素源に用いた培地で培養を行い、対数増殖期の菌体をサンプリングした。菌体を構成するたんぱく質を酸加水分解してアラニンを含むアミノ酸混合物を得て、MTBSTFA で誘導体化後、GC-MS でアラニン誘導体の M-57 および M-85 フラグメントの強度を測定した。BY4742 *gnd1* Δ 株に空ベクターを導入したコントロール株 (YKM025 株) のフラックス比は EM 経路が 85.8%、PP 経路が 14.1%、ED 経路 0.1% だった。これに対し、ED 経路導入株 (YKM027 株) では EM 経路が 88.4%、PP 経路が 10.8%、ED 経路 0.8% となった。コントロール株 (YKM025、 $0.28 \pm 0.21 \mu\text{mol/gDW/h}$) に比べ YKM027 株では ED 経路の代謝フラックスが $2.65 \pm 0.18 \mu\text{mol/gDW/h}$ まで約 10 倍増加しており、導入した経路の機能が確認できた。

(3) 大腸菌のホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (PPC) 反応経路を導入した酵母株の作成

酵母の代謝モデルにイソブタノール生合成経路を付加し、さらにエタノール生合成経路を破壊したモデルを用いて、代謝シミュレーションを実施した。そこでホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (PPC) 経路の追加によってイソブタノールの理論最大収率を 94% まで 1.5 倍増加できることを見出した。

ホスホエノールピルビン酸をオキサロ酢酸に変換する PPC と補充経路を組み合わせると効率的に NADPH を供給できる。そこで、大腸菌、コリネ型最近、シアノバクテリアの 3 種類の生物から PPC をコードする遺伝子をクローニングし、酵母の細胞内で過剰発現させた株を複数構築した。このうち、シアノバクテリアの PPC を導入した YKP006 株 ($1.13 \pm 0.02\%$) はコントロール株 (YKP003: $0.78 \pm 0.04\%$) に比べてイソブタノール生産収率が 1.45 倍増加した。また、補充経路をさらに強発現した YKP106 株のイソブタノール生産収率はコントロール株の 1.7 倍である $1.34 \pm 0.07\%$ まで増加した。この結果から、デザインした PPC 経路拡張代謝ネットワークがイソブタノール生産に有効であり、また、シアノバクテリアの PPC が酵母で機能することが初

めて示された。

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5件)

① Fumio Matsuda, Jun Ishii, Takashi Kondo, Kengo Ida, Hironori Tezuka and Akihiko Kondo (2013) Increased isobutanol production in *Saccharomyces cerevisiae* by eliminating competing pathways and resolving cofactor imbalance. *Microbial Cell Factories*. 査読有, 12, 119.

② Sastia P. Putri, Yasumune Nakayama, Fumio Matsuda, Takato Uchikata, Shizu Kobayashi, Atsuki Matsubara, Eiichiro Fukusaki (2013) Current metabolomics: Practical applications. *J. Biosci. Bioeng.* 115(6), 査読有, 579-89.

③ Kengo Ida, Jun Ishii, Fumio Matsuda, Takashi Kondo, Akihiko Kondo (2015) Eliminating the isoleucine biosynthetic pathway to reduce competitive carbon outflow during isobutanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories*. 査読有, In press

④ Kengo Ida, Jun Ishii, Fumio Matsuda, Takashi Kondo, Akihiko Kondo (2015) Eliminating the isoleucine biosynthetic pathway to reduce competitive carbon outflow during isobutanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories*. 査読有, In press

⑤ 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.* 査読有, In press

[学会発表] (計6件)

① 森田 啓介、梶島 秀一、石井 純、松田 史生、清水 浩 ED 経路導入による酵母中央代謝系路の拡張 日本農芸化学会 2014 年度大会 2014/3/29

② 西野 駿佑、岡橋 伸幸、松田 史生、清水 浩 安定同位体標識比率を用いた酵母細胞内代謝物質濃度の絶対比の測定 第8回メタボロームシンポジウム 2013/10/3

③ 石井 純、松田 史生、近藤貴志、近藤昭彦 イソブタノール生産酵母におけるトランスヒドロゲナーゼ様シャントの活性化 第65回日本生物工学会大会 2013/9/18

④ 松田 史生 質量分析による中心代謝の解析 BMSカンファレンス 2014 2014/7/8

⑤ 松田 史生、西野俊介、小倉泰郎、岡橋伸幸、富田淳美、平野一郎、清水浩 Integrated targeted metabolome and

proteome analysis for dissecting energy metabolism in yeast International Metabolome Conference 2014 2014/6/24

⑥ 森田 啓介、富田 淳美、松田 史生、石井 純、近藤 昭彦、清水 浩 長期継代培養によるエタノール非生産酵母の増殖改善株の取得 日本農芸化学会 2015 年度大会 2015/3/28

[その他]

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松田 史生 (MATSUDA, Fumio)

研究者番号 : 50462734

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

石井 純 (Ishii, Jun)

研究者番号 : 40512546

(4) 研究協力者

森田 啓介 (MORITA, Keisuke)

野村 悠太 (NOMURA, Yuta)