

平成 31 年 4 月 25 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17878

研究課題名(和文)有用物質高生産のための酵母バイオセンサの開発とその応用

研究課題名(英文)Development and applications of yeast-based biosensor 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バイオセンサを開発し、目的物質の生産量に対するバイオセンサの応答性の評価を行うことで物質生産への応用を試みた。本研究では、メラトニン生合成経路を再構築したメラトニン生産株を作製し、メラトニンの生産性を評価するために構築したセンサを適用した。その結果、蛍光強度からメラトニ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。今後は、本研究で構築したメラトニンセンサを応用し、代謝工学や進化学と組み合わせることでメラトニン高生産株を迅速に育種することが可能になると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、目的物質であるメラトニンのバイオセンサを構築し、メラトニン生合成代謝経路を導入することで、メラトニンの生産量に応じて酵母細胞がセンシングを行うシステムの開発に成功した。本研究で構築したメラトニンセンサを用いることで、メラトニ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、メラトニ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)：The aim of this study is to develop the biosensor for the rapid identification of high-producing microbes from large genetic libraries. We tried to evaluate the response of the biosensor for the productivity of the constructed strains. In this study, we created the melatonin-producing yeast strain in which the melatonin biosynthetic pathway was artificially reconstructed, and the constructed metabolite sensor was applied to evaluate the productivity of melatonin. As a result, this system displayed fluorescence in response to the produced melatonin and the intensities were varied depending on the productivity. Combining metabolic engineering with evolutionary engineering, the melatonin sensor constructed will be possible to apply for the rapid breeding of melatonin high-producing yeast strains.

研究分野：合成生物学、生物化学工学、応用微生物学

キーワード：バイオセンサ 出芽酵母 シグナル伝達 G蛋白質共役型受容体 メラトニン レポーター遺伝子 発酵

1. 研究開始当初の背景

化石資源や天然抽出物を原料として製造・供給される多様な化合物を微生物の発酵能力により再生可能なバイオマスや糖から生産することで持続可能な環境調和型社会を構築しようとする努力がなされている。しかし、微生物の本来持つ発酵能力のみでこれらの化合物を大量に生産することは不可能であり、異種生物由来の遺伝子を組み合わせた人工的な代謝経路を大腸菌や酵母などの微生物に導入することで多様な化合物を大量に生産しようとする研究が行われている。こうした異種由来の生合成経路を導入することで燃料や化成品原料だけでなく、複雑な構造を有する高付加価値品や医薬品原料を微生物で生産された例は年々増加している。

このように異種由来の生合成経路を導入することで様々な目的産物を生産できる一方で、元来その微生物が有していない代謝経路を利用するため収率は一般的に低いことが多い。そこで、異種由来生合成経路を導入した微生物の高生産株を迅速に取得することが望まれている。しかし、従来のクロマトグラフィなどを用いたスクリーニング方法では、1菌株ごとに目的化合物の生産性を定量するため、非常に手間がかかる上、低スループットとなっている。そのため、作出した菌株の生産性を簡便かつハイスループットに評価できるメタボライトセンサが注目を集めている。本研究提案の目的とする有用物質高生産株の取得のためのバイオセンサ開発のためには、目的物質の生産量に応じて酵母細胞がセンシングを行うシステムの開発が求められる。

2. 研究の目的

医薬品の一つであるメラトニンは脳の松果腺から分泌されるホルモンの一つであり、トリプトファンからセロトニンを経て合成される化合物である。メラトニンは、細胞膜上に存在するG蛋白質共役型受容体(GPCR)の1種、メラトニン受容体に結合してシグナルを伝達することが知られており、強い抗酸化作用を持つことから米国では栄養補助食品やサプリメントとして市販されている。また、概日リズムに関与していることから、不眠症や時差ボケの解消など睡眠障害の治療薬として使用されている。近年、本来メラトニンを合成しない酵母に生合成経路を導入することで、メラトニンの生産が可能であることが報告されている。

GPCRは、膜蛋白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蛋白質を活性化し、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蛋白質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蛋白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。

本研究ではGPCRのシグナル伝達機構を利用したメタボライトセンサを開発することを目的とした。ヒト由来メラトニン受容体をモデルとして選択し、酵母の細胞膜表面に機能発現させることで酵母内在性のシグナル伝達経路と共役してメラトニンの結合を感知できるレポーター発現系を構築した。受容体の発現量やメラトニンに対する親和性を改変することにより感度域を調節し、様々な濃度のメラトニンを検出できるシステムの構築を目指した。さらに、メラトニン生合成代謝経路を導入し、開発したセンサを適用することで、メラトニンの生産量に応じて酵母細胞がセンシングを行うシステムの開発を目指した(図1)。

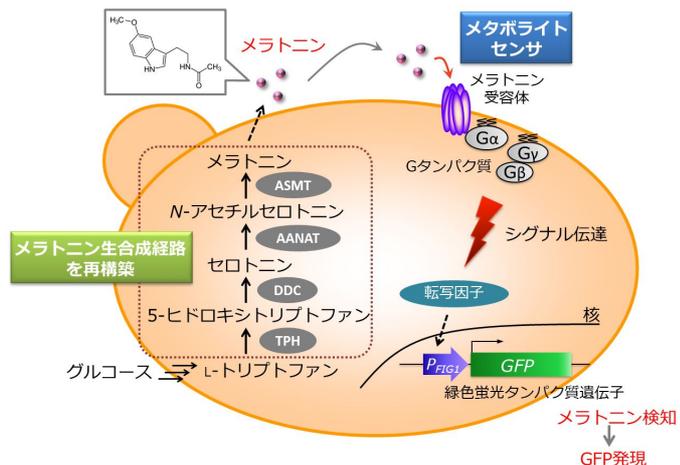


図1 メラトニンセンシングシステムの開発

3. 研究の方法

(1)メラトニン *in vivo* バイオセンサの開発

メラトニン *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、メラトニンをリガンドとして感知して情報を伝達するメラトニ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緑色蛍光蛋白質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メラトニン受容体を機能発現させた。メラトニンがメラトニ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、緑色蛍光蛋白質が発現するので、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、バイオセンサの感度調節を可能にするために、受容体の発現量やメラトニンに対する親和性を改変した変異型の受容体を構築した。

(2)メラトニンセンサを用いたメラトニン生産株の生産性評価

メラトニンを生産する酵母株を構築するために既報のメラトニン生合成代謝経路を導入した。作出した酵母株によりメラトニンを発酵生産させ、生産能を評価するとともに、蛍光レポーターによるバイオセンサの応答性を確認した。

4. 研究成果

(1)メラトニン *in vivo* バイオセンサの開発

GPCR のシグナル伝達検出には、リガンド刺激に応答するとレポーター遺伝子として緑色蛍光蛋白質 (ZsGreen) が発現するようゲノムを改変した酵母株を用いた。GPCR としてヒト由来メラトニン受容体 MTNR1A 及び MTNR1B をベースとして、それぞれを出芽酵母にコドン最適化した配列 (MTNR\_Sc) や MTNR1A の 1 アミノ酸変異体 (N124A 及び Y126A) をコードする配列などを恒常発現型プロモーター制御下で発現させるプラスミドを構築した。

構築したプラスミドを酵母に形質転換し、得られた形質転換体を様々なメラトニン濃度 ( $10^{-11}$ ~ $10^{-3}$ M) に調製した培地で培養後、FCM による緑色蛍光強度の測定を行った。その結果、受容体の種類やプロモーターの種類に応じて、メラトニン濃度に依存したレポーター発現強度の違いが見られ、様々なメラトニンに対する検出感度を持ったメタボライトセンサの開発に成功した (図 2)。また、添加するリガンドをメラトニンからメラトニン生合成経路の中間代謝物質であるセロトニン及び、*N*-アセチルセロトニンに変更し、同様に FCM による測定を行ったところ、MTNR1A の変異体を用いることで、メラトニン生合成経路の中間代謝物質は検知せずにメラトニンのみを特異的に検知することのできるメタボライトセンサの開発に成功した (図 3)。

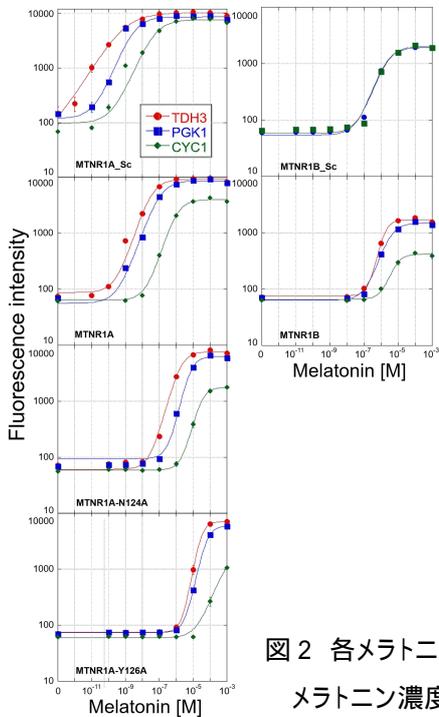


図 2 各メラトニンセンサのメラトニン濃度依存曲線

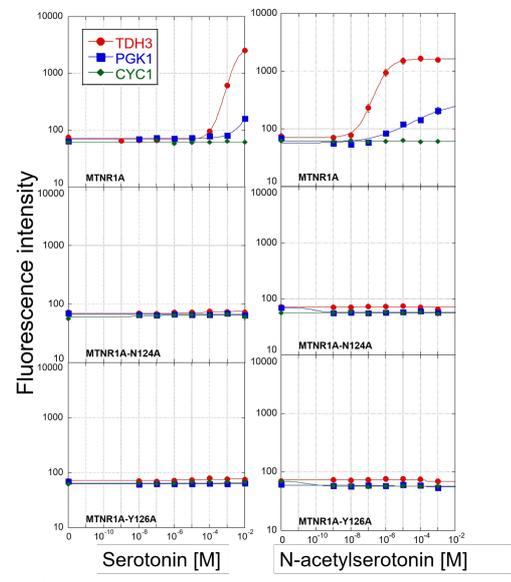


図 3 中間代謝物に対する各センサの応答性評価

(2)メラトニンセンサを用いたメラトニン生産株の生産性評価

さらに、外来由来のメラトニン生合成経路を人工的に再構築したメラトニン生産酵母株を作製し、構築したセンサを適用してメラトニン生産性を評価した (図 4)。メラトニン生産株の培養上清をセンサ株でセンシングする 2 細胞系、及び、メラトニン生産株にセンサを導入した 1 細胞系、の 2 つのアプローチを試みたところ、ともにメラトニンの生産性に依って蛍光を示す結果が得られた (図 5)。

これらのアプローチを応用することで、作出したメラトニン生産株のメラトニン生産性を蛍光強度により迅速に評価することが可能となる。これにより、メラトニン生産株ライブラリの中から蛍光強度の

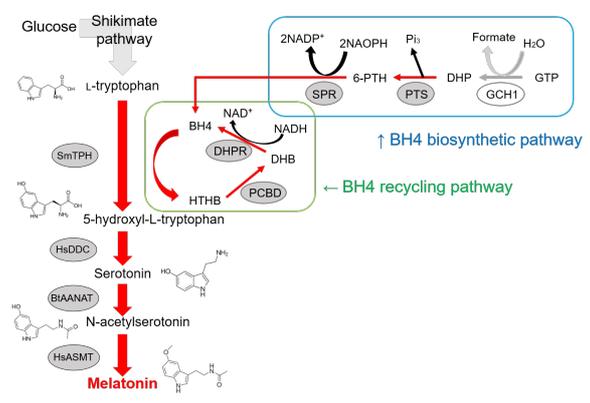


図 4 メラトニン生合成経路

高い細胞を選抜することで、メラトニン生産量の向上した酵母株を取得可能であることが示唆される。本研究のメタボライトセンサ構築技術は、メラトニン以外の有用化合物にも応用でき、代謝工学や進化工学と組み合わせることで様々な高付加価値物質に対する高生産株を迅速に育種することが可能となる。また、センサにより最適な培養条件検討を行うことができるため、生産性の更なる向上が期待される。

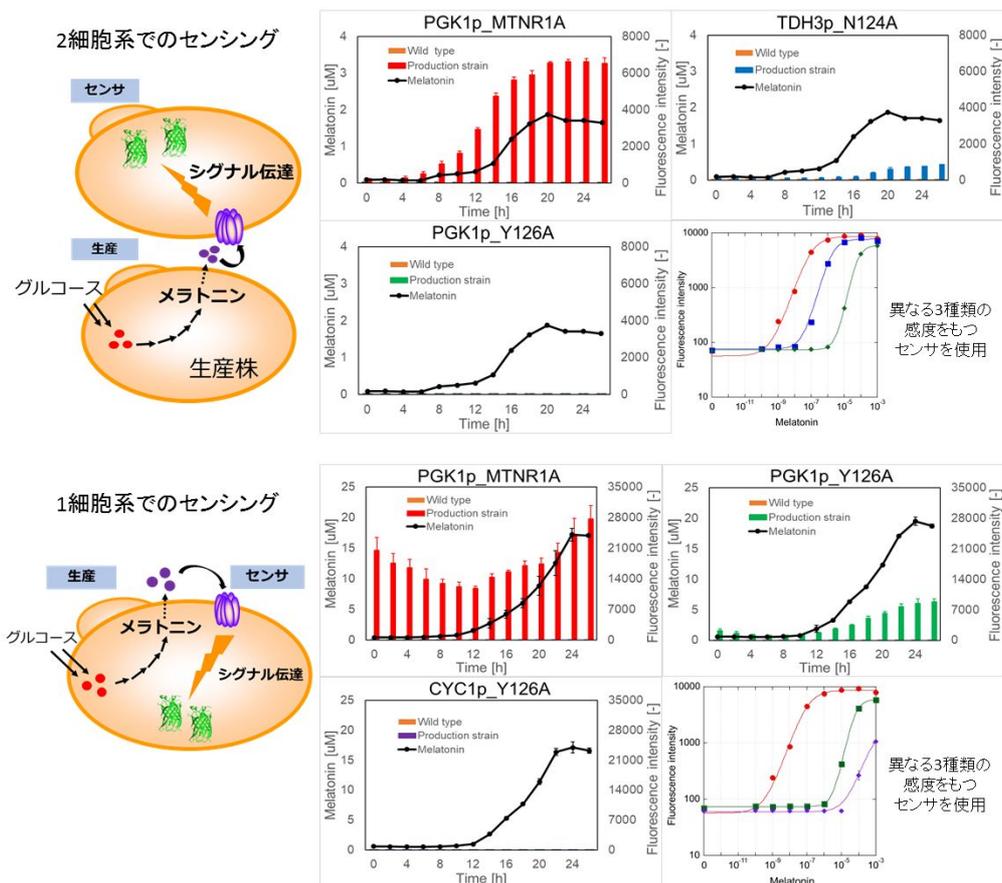


図5 メラトニンセンサを用いたメラトニン生産株の評価

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計5件)

Nakamura Y, Nishi T, Noguchi R, Ito Y, Watanabe T, Nishiyama T, Aikawa S, Hasunuma T, Ishii J, Okubo Y, Kondo A. A Stable, Autonomously Replicating Plasmid Vector Containing *Pichia pastoris* Centromeric DNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 査読有, 84(15), 2018, e02882-17, DOI: 10.1128/AEM.02882-17

Nakamura Y, Kondo A, Ishii J. Biosensing techniques in yeast: G-protein signaling and protein-protein interaction assays for monitoring ligand stimulation and oligomer formation of heterologous GPCRs. *Peripheral Membrane Proteins, IntechOpen*, 査読有, Chapter 3, 2018, 25-48, DOI: 10.5772/intechopen.76330

Ito Y, Watanabe T, Aikawa S, Nishi T, Nishiyama T, Nakamura Y, Hasunuma T, Okubo Y, Ishii J, Kondo A. Deletion of DNA ligase IV homolog confers higher gene targeting efficiency on homologous recombination in *Komagataella phaffii*. *FEMS Yeast Research*, 査読有, 18(7), 2018, foy074, DOI: 10.1093/femsyr/foy074

Hashi H, Nakamura Y, Ishii J, Kondo A. Modifying Expression Modes of Human Neurotensin Receptor Type 1 Alters Sensing Capabilities for Agonists in Yeast Signaling Biosensor. *Biotechnology Journal*, 査読有, 13(4), 2018, e1700522, DOI: 10.1002/biot.201700522

Ryo S, Ishii J, Matsuno T, Nakamura Y, Matsubara D, Tominaga M, Kondo A. Positive Feedback Genetic Circuit Incorporating a Constitutively Active Mutant Gal3 into Yeast GAL Induction System. *ACS Synthetic Biology*, 査読有, 6(6), 2017, 928-935, DOI: 10.1021/acssynbio.6b00262

〔学会発表〕(計 18 件)

Jun Ishii, Takuya Tabata, Yasuyuki Nakamura, Akihiko Kondo. Yeast-based in vivo metabolite sensor using signal transduction machinery. The 1st international symposium of the Asian Synthetic Biology Association 2018, 2018

田畑 琢也, 中村 泰之, 加藤 寛子, 近藤 昭彦, 石井 純, 酵母細胞における生理活性物質メラトニンをモニタリングするための G タンパク質共役型受容体 (GPCR) を用いたメタボライトセンサの開発, 第 70 回日本生物工学会大会, 2018 年

橋 弘樹, 中村 泰之, 近藤 昭彦, 石井 純, 発酵制御に向けたグルコースを感知する in vivo バイオセンサーの構築, 第 3 回デザイン生命工学研究会, 2018 年

Takuya Tabata, Yasuyuki Nakamura, Akihiko Kondo, Jun Ishii. Development of G-protein-coupled receptor (GPCR)-based metabolite sensor for monitoring physiological chemical melatonin in eukaryotic yeast cells. The 9th International Symposium of Innovative BioProduction Kobe, 2018

田畑 琢也, 中村 泰之, 石井 純, 近藤 昭彦, ヒト由来生理活性物質を特異的に検知する酵母 in vivo バイオセンサ, 神戸大学 研究基盤センター 若手フロンティア研究会 2017, 2017 年

田畑 琢也, 中村 泰之, 石井 純, 近藤 昭彦, メラトニン濃度をモニタリングするための酵母 in vivo メタボライトセンサ, 化学工学会第 49 回秋季大会, 2017 年

田畑 琢也, 中村 泰之, 石井 純, 近藤 昭彦, 特定の生理活性物質を濃度依存的に感知する酵母メタボライトセンサの開発, 生物学若手研究者の集い 夏のセミナー2017, 2017 年

〔図書〕(計 1 件)

中村 泰之, 伊藤 洋一郎, 梅津 光央, 石井 純, 近藤 昭彦, 低分子抗体医薬の開発展望, シーエムシー出版, 月刊バイオインダストリー, 34(6), 54-62, 2017

〔その他〕

ホームページ等

<http://www2.kobe-u.ac.jp/~akondo/index.html>

受賞

田畑 琢也, 中村 泰之, 石井 純, 近藤 昭彦, メラトニン濃度をモニタリングするための酵母 in vivo メタボライトセンサ, 化学工学会第 49 回秋季大会, バイオ部会優秀ポスター賞

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。