

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K04851

研究課題名(和文) 定量プロテオミクスによる代謝制御機構の解明と有用物質生産酵母構築への応用

研究課題名(英文) Quantitative proteomics for metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*

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) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：有用物質を大量生産可能な出芽酵母株を分子育種するには、酵母細胞内代謝経路の律速段階を同定し、その制御メカニズムを解明して、解消していくことが必須となる。そこで実用酵母株の高い発酵能力に着目し、実験室酵母と清酒酵母、パン酵母、ワイン酵母、計7株の発酵特性、代謝フラックスと、酵素発現量プロファイルの比較を行った。その結果、ATP再生及び消費にかかわる酵素発現量の変動が、ATPの供給量の増加につながり、さらに、代謝熱の生成による低温耐性およびエタノール生産速度の向上に寄与することを見出した。これらの知見をもとに、解糖系代謝速度の向上に寄与する代謝改変に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、出芽酵母実用株(清酒酵母、パン酵母、ワイン酵母)の優れた発酵能力の背景にあるメカニズムの解明を試みた。その結果、実用株ではエネルギーの生産、消費が多くなるよう、代謝酵素発現量が調節されており、酵母の低温耐性や高いエタノール生産速度の向上に寄与することを明らかにした。これらの知見は、出芽酵母のストレス耐性を生かしつつ微生物発酵法で化成品原料を生産するバイオプロダクション技術の実現に寄与する。

研究成果の概要(英文)：For the metabolic engineering of budding yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) for the bio-production of useful chemicals, it is essential to identify rate-determining steps in the central carbon metabolism. In this study, we focused on the high fermentation ability of industrial yeast strains, and compared the fermentation characteristics, metabolic flux, and enzyme expression level profile of a total of 7 strains of laboratory yeast, sake yeast, baker's yeast, and wine yeast. The results showed that fluctuations in the expression level of enzymes involved in ATP regeneration and consumption lead to an increase in the supply amount of ATP, and further contribute to the improvement of low temperature tolerance and ethanol production rate. Based on these findings, a novel metabolic engineering approach to improve the glycolytic metabolic flux rate was developed.

研究分野：代謝工学

キーワード：出芽酵母 代謝工学 定量プロテオミクス 代謝フラックス解析

1. 研究開始当初の背景

化成品原料をバイオマスから、微生物発酵法で生産するバイオプロダクション技術の実現は、温室効果ガス排出量削減の政策目標達成に大きく貢献すると期待されている。特に、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) のストレス耐性を生かしつつ、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。

高級アルコールや有機酸を大量生産可能な代謝改変酵母を分子育種するには、競合するエタノール生合成経路を遮断し、代謝フローを目的化合物の生合成へと転流させる必要がある。しかし、代謝工学出芽酵母株には、物質生産収率、速度に依然改善の余地が多く残されている。この問題を解決するには、酵母細胞内代謝経路の律速段階を同定し、その制御メカニズムを解明して、解消していくことが必須となる。

しかしながら、代謝フラックス、代謝物濃度データの解読には依然困難が多い。従来の代謝解析には、中心代謝反応を触媒する酵素タンパク質発現量のデータが欠けており、代謝制御の因果関係を直接的、理論的に解析できない限界がある

2. 研究の目的

そこで本研究では出芽酵母中心代謝経路の制御メカニズムを解明することを目指し、定量プロテオーム解析がもたらす酵素発現量データを活用して、次の3点を目的として研究を行う。

- 1) 酵素発現量プロファイル比較による代謝制御機構の解析: ATP 再生を担う TCA サイクル、解糖系の制御に関わる代謝反応が不明である。そこで、実用酵母株が実験室酵母とは異なる発酵特性を持つことに着目し、実験室酵母と清酒酵母、パン酵母、ワイン酵母の発酵プロファイルと、酵素発現量プロファイルの株間比較を行い、TCA サイクル、解糖系の制御に関わる酵素の同定を試みる。
- 2) 代謝フラックスとの比較解析による代謝制御機構の解明: 代謝フラックス、代謝物濃度データと統合して代謝制御機構を解明する方法論の開発を試みる。
- 3) 代謝工学による検証: 得られた知見をもとに代謝経路を改変した出芽酵母株を構築し、メバロン酸生産およびイソブタノール生産に及ぼす影響を実証する。これにより、出芽酵母の代謝を合理的に解析し、改変する新たな方法論を確立することを目指す。

3. 研究の方法

出芽酵母 7 株 (実験室酵母 (BY4947) と実用酵母 6 株 (清酒酵母: Kyoukai7, Kyoukai9, パン酵母: RedStar, NBRC0555, ワイン酵母: QA23, EC1118) の計 7 株) を用いた。50 mL の SD 培地を入れた 200 mL 容バツフル付き三角フラスコに植え継いだものを本培養とし、30 °C、120 rpm で定常期になるまで振盪培養した (n = 3)。

酵素タンパク質発現量データの取得には、定量プロテオミクス法を用いた[参考文献 1]。プロテオーム解析用のサンプルは対数増殖中期 (OD600 = 1.2-1.7) まで培養した。培養液 100 mL を遠心分離した上清を定量プロテオミクス用サンプルとした。タンパク質 50 µg 量のサンプルに変性緩衝液を加え、還元アルキル化、トリプシン消化を行った。脱塩処理後、乾固させたサンプルを 10% formic acid で 3 倍希釈し、nano LC-MS/MS (LCMS-8060, Shimadzu) で分析を行った。分析メソッドの作成と分析結果の解析には、Skyline ver 2.0 を使用した。

中心代謝フラックス分の測定には ¹³C-代謝フラックス解析法 (¹³C-MFA) を用いた。[1-¹³C]グルコース含有 SD 培地 (50 ml, 30°C) で回分培養し、対数増殖期の菌体を回収した。培地中のグルコース、グリセロール、酢酸の濃度は HPLC で、エタノールの濃度は GC で分析した。得られた情報から比速度を算出することで細胞内外の物質収支を決定した。菌体のタンパク質由来アミノ酸の ¹³C 標識割合を GC-MS で分析し、ソフトウェア mFapy で代謝フラックス分布を算出した。

4. 研究成果

1) 酵素発現量プロファイル比較による TCA サイクル制御機構の解析:

実験室酵母 BY4947、清酒酵母協会 7 号、酵母協会 9 号、パン酵母 Red Star, NBRC0555、ワイン酵母 QA23, EC1118 の計 7 株を SD 培地で培養し、発酵能と比較した。実験室酵母 BY4947 に比べ実用株 6 株の比増殖速度は 10-20% 高かった。パン酵母 2 株は株間で発酵能が大きく異なった。一方、清酒酵母 2 株とワイン酵母 2 株の発酵能をそれぞれ比較すると、類似する傾向があった。エタノール比生産速度の平均値は、清酒酵母の方が 1.8 倍大きく、高い発酵能力を示した。

同条件下で出芽酵母 7 株の培養を行い、対数増殖期中期の菌体からタンパク質を抽出し、タンパク質発現プロファイルを比較した。290 個のタンパク質を分析する MRM メソッドを用いてター

ゲットプロテオーム解析を行った。その結果、SD 培地では 196 個の酵素タンパク質の定量に成功した(図 1)。7 株のタンパク質発現プロファイルと比較すると、SD 培地では実験室酵母 BY4947 の解糖系タンパク質発現量が、他の株に比べて全体的に高い傾向があった。実験室酵母 BY4947 は、解糖系タンパク質群の合成に多大なエネルギーを必要とするため、比増殖速度が小さくなったと考えた。次に、SD 培地培養時の清酒酵母とワイン酵母のタンパク質発現プロファイルと比較すると、悪影響を及ぼす H₂S を代謝する、硫黄代謝タンパク質群と TCA 回路酵素タンパク質の発現量がワイン酵母で増加していた。

2) 代謝フラックスとの比較解析による代謝制御機構の解明:

実験室酵母 BY4947、ワイン酵母 QA23、パン酵母 RedStar、清酒酵母協会 7 号を SD 培地中で培養し、培養プロファイルの再現性を確認した。QA23、酵母協会 7 号のグルコース比消費速度はそれぞれ 13.6、18.5 mmol/g-dcw/h であったのに対し、RedStar は 20.4 mmol/g-dcw/h と最も高い値を示した。RedStar はエタノール比生産速度も最高だった (26.5 mmol/g-dcw/h)。QA23 は実用酵母 3 株中でエタノール収率が最も低く、クラブツリー効果が抑制されていることが分かった。グリセロール最高到達濃度がそれぞれ 0.24、2.20、1.49 mM であり、RedStar が最もグリセロールを生産していた。これらの結果から、培養プロファイルの再現性を確認できた。

¹³C 代謝フラックス解析(¹³C-MFA)を行った結果、実験室酵母 (BY4947) に比べ、解糖系フラックスは清酒酵母協会 7 号、パン酵母 RedStar で 20-30% 増加していた。また、TCA 回路フラックス値は、3 種の実用酵母株すべてで 50-150% 程度増加していた。これらの結果と酵素タンパク質プロファイルと比較すると、ワイン酵母 QA23 の TCA 回路において、酵素タンパク質発現量と代謝フラックスの増加が相関して起きていた。一方、清酒酵母協会 7 号、パン酵母 RedStar ではこの相関が観察されなかった。また、解糖系においても、酵素タンパク質発現量と代謝フラックスの相関に株間の共通点がなかった。これらの結果から、酵素タンパク質発現量による代謝制御は株特異的なものであると推測された。一方、酵素タンパク質プロファイルから、ATP 再生及び消費にかかわる酵素の発現量が、それぞれの株で向上していることを見出した。

これらの知見をもとに ATP の消費量と発酵能力との関連を解析した。ATP 再生速度と比増殖速度の関係は式 $r_{ATP} = Y_{xATP} \mu + m_{ATP}$ で表され、 r_{ATP} は ATP 再生速度 (mmol/gDCW/h)、 Y_{xATP} は理論最大 ATP 収率 (mmol/gDCW)、 m_{ATP} は細胞維持エネルギー定数 (mmol/gDCW/h) である。そこで、¹³C-MFA 結果のフラックス値から算出した ATP 再生速度と比増殖速度のプロットを作製したところ、 m_{ATP} が負の値となる結果となった。これは、野生株と比較して m_{ATP} が実用株では大きいことを示唆する。そこで、¹³C-MFA 結果から得た細胞内外の物質収支から、代謝熱の生成量を見積もったところ、野生株に比べて実用株では、2-3 倍ほど高い結果となった。スポットアッセイにより、低温時の増殖能を比較したところ、実験室酵母株にくらべ、とくに日本酒酵母株、パン酵母株で低温ストレスに対する耐性が観察された。

3) 代謝工学による検証:

以上の結果は、実用酵母株では ATP の消費量が多く、それが電子伝達鎖および基質レベルのリン酸化による ATP 供給の増加につながり、さらに、代謝熱の生成による低温耐性およびエタノール生産速度の向上に寄与すると考えられた。これらの知見をもとに、ブタノール等の高生産株の代謝デザインを行った。解糖系代謝速度を向上可能な代謝設計を行い、実際に代謝工学株を構築したところ解糖系フラックスが 5-10% 程度向上していた[未公表データ]。

参考文献

[1] Matsuda, F., et al. (2017) PLoS ONE 12(2): e0172742.

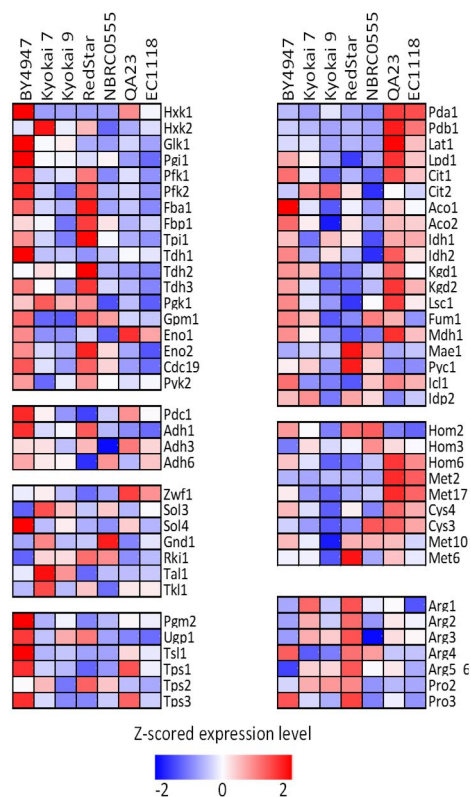


図1 出芽酵母7株の中心代謝酵素タンパク質発現プロファイル 発現量はタンパク質ごとに正規化し、ヒートマップで示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Morita Keisuke, Matsuda Fumio, Okamoto Koji, Ishii Jun, Kondo Akihiko, Shimizu Hiroshi	4. 巻 18
2. 論文標題 Repression of mitochondrial metabolism for cytosolic pyruvate-derived chemical production in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbial Cell Factories	6. 最初と最後の頁 177
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12934-019-1226-6	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 -
1. 著者名 Kiyoka Uebayashi, Hiroshi Shimizu, Fumio Matsuda	4. 巻 102
2. 論文標題 Comparative analysis of fermentation and enzyme expression profiles among industrial <i>Saccharomyces cerevisiae</i> strains	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Applied Microbiology and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 7071-7081
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00253-018-9128-9	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 -
1. 著者名 Kenshi Hayakawa, Fumio Matsuda, Hiroshi Shimizu	4. 巻 17
2. 論文標題 13C-metabolic flux analysis of ethanol-assimilating <i>Saccharomyces cerevisiae</i> for S-adenosyl-L-methionine production	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Microbial Cell Factories	6. 最初と最後の頁 82
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12934-018-0935-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Seike Taisuke, Narazaki Yuki, Kaneko Yoshinobu, Shimizu Hiroshi, Matsuda Fumio	4. 巻 7
2. 論文標題 Random Transfer of <i>Ogataea polymorpha</i> Genes into <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Reveals a Complex Background of Heat Tolerance	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Fungi	6. 最初と最後の頁 302 ~ 302
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/jof7040302	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 松田史生
2. 発表標題 出芽酵母中心代謝の計測と応用
3. 学会等名 第116回醗酵学懇話会（招待講演）
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Fumio Matsuda, Kazuki Yamazaki, Shunsuke Nishino, Hiroshi Shimizu
2. 発表標題 Trans-omic analysis of the central metabolism of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> by integration of metabolome, metabolic flux, and proteome data
3. 学会等名 International Conference of Systemes Biology 2019（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 松田 史生
2. 発表標題 出芽酵母中心代謝は教科書通り動いているのか？
3. 学会等名 酵母合同シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 谷田部 楓太, 岡橋 伸幸, 清家 泰介, 松田 史生
2. 発表標題 実用酵母株の代謝フラックス解析による発酵能力と代謝熱の関連の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 谷田部楓太 岡橋伸幸 松田史生
2. 発表標題 細胞構成成分の測定による ¹³ C代謝フラックス解析の高精度化
3. 学会等名 第68回質量分析総合討論会（大阪）
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 谷田部楓太 岡橋伸幸 松田史生
2. 発表標題 ¹³ C代謝フラックス解析法による出芽酵母実用株の代謝比較
3. 学会等名 第14回ゲノム微生物学会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 松田史生
2. 発表標題 出芽酵母中心代謝の計測と応用
3. 学会等名 第116回醗酵学懇話会（招待講演）
4. 発表年 2019年～2020年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 久原哲監修	4. 発行年 2018年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 240
3. 書名 スマートセルインダストリー -微生物細胞を用いた物質生産の展望-	

1. 著者名 馬場 健史、平山 明由、松田 史生、津川 裕司	4. 発行年 2021年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 334
3. 書名 メタボロミクス実践ガイド	

〔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
---------	---------