

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：13701

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19875

研究課題名（和文）低環境負荷型技術への実践的活用に向けた高メタノール環境適応C1酵母の戦略的育種

研究課題名（英文）Strategic breeding of highly methanol-adapted C1 yeast for application to low environmental load technology

研究代表者

中川 智行（Nakagawa, Tomoyuki）

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：70318179

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、メタノールを出発原料にした高生産・高効率な発酵生産系「メタノール-バイオリファイナリー技術」の実現に向けて、C1酵母の高メタノール代謝適応機構の理解と、その知識を利用した「スーパー-C1酵母」の育種を試みた。まず、これまで不明であったC1酵母のメタノール代謝の鍵経路であるキシロース5-リン酸合成経路を同定し、高メタノール適応条件下でのC1酵母の細胞機能プロファイリングを示した。これらのデータを総合的に考察した結果、C1酵母の高メタノール適応におけるメタノール代謝フローを制御することでより高いメタノール濃度に適応したC1酵母の育種が可能であると結論づけた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、C1酵母のメタノール代謝の解析から、「スーパー-C1酵母」の育種の可能性を示すことができた。実際、現在、ランダム変異法により8%メタノール濃度にまで適応できるC1酵母を育種することに成功している。これらデータはC1酵母のメタノール代謝制御の分子機構を明らかにするのみならず、その機能を活用した新たな「メタノール-バイオリファイナリー技術」の実現に向けて大きく前進する基盤を築けたと考えている。

研究成果の概要（英文）：In this study, in order to realize a high-production/high-efficiency fermentation production system [methanol-biorefinery technology] using methanol as a starting material, we tried to understand the adaptation mechanism of C1 yeast to high methanol condition. We identified the xylose-5-phosphate synthesis pathway, a key pathway of methanol metabolism in C1 yeast, which was unknown well, and we examined metabolomic analysis of C1 yeast grown under high methanol adaptation conditions. We conclude that it is possible to breed C1 yeast adapted to higher methanol concentration by controlling the methanol metabolic flow in high methanol condition.

研究分野：応用微生物学

キーワード：C1酵母 Pichia methanolica Pichia pastoris 高メタノール環境

1. 研究開始当初の背景

人類が豊かで美しい社会を未来永劫にわたり持続的に発展させるには環境調和型の低環境負荷技術を駆使した新たな社会構造の形成が必要である。しかし、バイオエタノールをはじめバイオリファイナリー技術の発酵炭素源は主に私たちの食糧と競合する穀物由来であるため、現在、低環境負荷型技術に応用でき、安定供給が可能な代替炭素源を見出す必要がある。

一方、植物が年間1億トン蒸散する主要な揮発性有機化合物 (BVOC) であるメタノールは、植物バイオマス、温暖化ガス CH_4 や CO_2 から合成でき、燃焼時に水と CO_2 に完全酸化されることから、最も環境負荷の少ない次世代エネルギー源の一つとされる。もしメタノールを出発原料にした高生産・高効率な発酵生産系「メタノールバイオリファイナリー技術」が実現できれば、画期的なカーボンニュートラルな物質循環システムの構築に貢献できる。

さらに、自然界に存在するメタノールを利用できる生物群は「 C_1 微生物」のみであることから、 C_1 微生物はメタノールバイオリファイナリー技術を具現化できる唯一の生物資源であり、特に、高密度培養が容易で分子遺伝学的ツールが豊富な C_1 酵母の細胞機能を高メタノール環境下で最大限に引き出せれば、革新的な低環境負荷型技術に応用できる可能性が限りなく大きくなる。

2. 研究の目的

本研究では、「メタノールバイオリファイナリー技術」の実現を見据えた C_1 酵母を用いた革新的な低環境負荷型技術の基盤を築くことを目的に、 C_1 酵母のメタノール代謝の制御機構の詳細を解明し、その知見を活用することで超高メタノール環境に適応できる「スーパー- C_1 酵母」の戦略的な分子育種を試みる。

3. 研究の方法

a. メタノール代謝における鍵経路キシルロース 5-リン酸 (Xu15P) 再生経路の証明

Pichia pastoris のゲノム情報をもとに推定される Xu15P 経路に關与する遺伝子群を同定し、その発現制御を、*lacZ* をを用いたレポーターアッセイ、また、それら遺伝子の欠損株を作成し、Xu15P の詳細を証明していく。

b. 高メタノール環境下における細胞機能プロファイリング

P. methanolica を 0.5% および 5% メタノールで 8 時間培養し、その代謝産物を CE-TOFMS にて網羅的に解析した。また、*P. pastoris* を同様に 0.5% および 5% メタノールで 6 時間培養し、mRNA を回収し、RNA seq にて遺伝子発現応答を網羅的に解析した。

3. 高メタノール耐性酵母の分子育種

P. pastoris TK3 株を親株に、7% メタノール培地から徐々にメタノール濃度を上昇させる馴化培養にて、より高メタノール環境に馴化された株の育種を試みた。

4. 研究成果

a. メタノール代謝における鍵経路キシルロース 5-リン酸再生経路の証明

C_1 酵母のメタノール代謝は、メタノールが酸化されて生産される毒性中間体ホルムアルデヒド (FA) を Xu15P に固定することで資化経路に供給している。つまり、Xu15P はメタノール代謝において、細胞内の FA の資化・毒性回避の上で最も重要な意味をもつ鍵化合物と言える。しかし、これまで Xu15P の再生経路の大まかな流れは推定されていたものの、その詳細は全くわかっていなかった。

一方、私たちは *P. pastoris* のゲノム上に Xu15P 再生経路に關与するフルクトースビスリン酸アルドラーゼおよびトランスアルドラーゼをコードする遺伝子がそれぞれ 2 コピー存在し、それらのうち片方が共にペルオキシソームへの移行シグナル PTS1 を持ち合わせていることを明らかにした。また GFP タグによる細胞内局在を観察したところ、Fba2p および Tal2p 共にペルオキシソームに局在していた。また一般的な *FBA1* および *TAL1* は構成的に発

現し、PTS1 をもつ *FBA2* および *TAL2* はメタノールで大きく誘導された。ただ、*FBA2* および *TAL2* の欠損株はメタノール培地にも生育可能であることから、*P. pastoris* のメタノール代謝では、*Fba2p* および *Tal2p* は共にメタノール代謝で重要な働きを担っているのは間違いのないものの、*Fba1p* および *Tal1p* の機能を助ける補助的な役割であることが明らかとなった (Fig.1)。

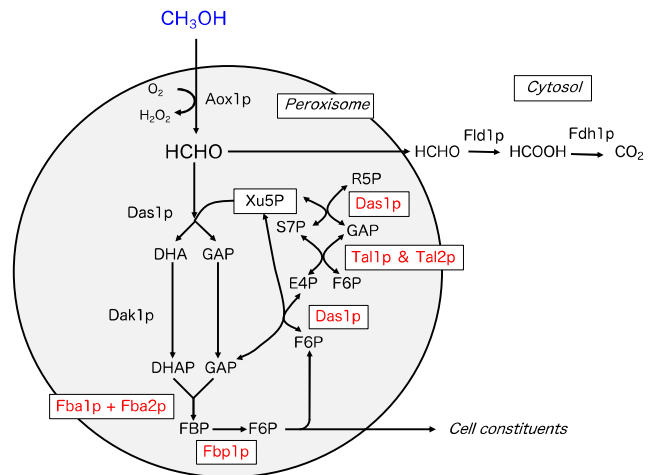


Fig. 1. Xu5P 再生経路

b. 高メタノール環境下における細胞機能プロファイリング

P. methanolica および *P. pastoris* を用いて高メタノール環境下での細胞応答を観察し、これら C_1 酵母の高メタノール環境下における細胞機能のプロファイリングを行った。

P. methanolica ではメタボローム解析による代謝プロファイリングを行った。*P. methanolica* は高メタノール環境下では、メタノール代謝系全体の代謝フローを低下させていたものの、ATP や NADH などのエネルギーレベルは低下させず、一定のレベルを保っていた。また、グルタチオンレベルも上昇させるなど、高メタノール環境下で様々な対策をとっていることが明らかとなった。

一方、*P. pastoris* では rRNA seq による高メタノール環境下において発現レベルが大きく変化する遺伝子群の同定を行った。その結果、高メタノール環境下で発現量が 2 倍以上に上昇した遺伝子は 1,917 個存在し、そのうち 82 個の遺伝子が 10 倍以上、発現レベルが上昇した。一方、1,942 遺伝子は発現量が 1/2 以下に低下し、そのうち 126 遺伝子の発現は 1/10 以下に低下していた (Fig.2) 。それら遺伝子群のうち、高メタノール環境下では酸化系の遺伝子群の発現が顕著に上昇し、抗酸化系の遺伝子群の発現が軒並み上昇し、ペントースリン酸経路の活性化も観察された。一方、高メタノール環境下では、*P. pastoris* は脂肪酸合成系の遺伝子群の発現が著しく低下させ、ミトコンドリア遺伝子や転写・翻訳に関する遺伝子の発現も低下させていた。

これらデータからすると、 C_1 酵母は高メタノール環境下ではメタノール代謝を低下させ、抗酸化機能を強化することで高メタノール環境に対する対策をし、細胞内のエネルギーレベルを維持する方向に制御していることが明らかとなった。

0.5% MeOH vs 5% MeOH

3,862 genes/5,040 genes ($p < 0.05$)

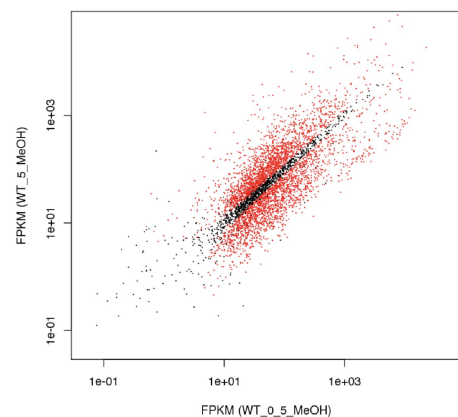


Fig. 2. *P. pastoris* の高メタノール環境下における転写発現の変化。
赤点が優位に発現が変化した遺伝子。

c. 高メタノール環境下に適応可能な C_1 酵母の育種

P. pastoris TK3 株は 7% のメタノール濃度においても生育可能な高メタノール適応型変異株である。この TK3 株を親株に、7% メタノール培地から徐々にメタノール濃度を上昇させる馴化培養にて、より高メタノール環境に馴化された高メタノール適合株の育種を試みた。

その結果、9% の高メタノール環境下においても十分生育可能な変異株 TK3-2 株を獲得した。本株は野生株や TK3 株と比べて明らかに高メタノール環境に適応し、十分なメタノール代謝能を持ち合わせていることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hirota Fukuoka, Takato Kawase, Masahide Oku, Hiroya Yurimoto, Yasuyoshi Sakai, Takashi Hayakawa, Tomoyuki Nakagawa	4. 巻 127
2. 論文標題 Peroxisomal Fba2p and Tal2p complementally function in the rearrangement pathway for xylulose 5-phosphate in the methylotrophic yeast <i>Pichia pastoris</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Biootechnology	6. 最初と最後の頁 33-38
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Tomoyuki Nakagawa
2. 発表標題 Regulation of methanol metabolism in the methylotrophic yeast <i>Pichia methanolica</i>
3. 学会等名 International Conference Non-conventional Yeasts: from Basic Research to Application（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

〔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
研究 分 担 者	稲垣 瑞穂 (Inagaki Mizuho) (50626356)	岐阜大学・応用生物科学部・准教授 (13701)	