

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22360342

研究課題名（和文） 酵母の有機溶媒耐性に関わる転写制御カスケードの解明とその応用

研究課題名（英文） Analysis of transcriptional regulation cascade of organic solvent tolerant yeasts and its application

研究代表者

植田 充美 (UEDA MITSUYOSHI)

京都大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：90183201

研究成果の概要（和文）：我々の国際特許出願を可能にした世界初の有機溶媒耐性酵母の転写因子 *PDR1* の変異による多様な有機溶媒（親水的及び疎水的有機溶媒）耐性の表現型を分類し、これらの中から包括的に取得した制御因子群と多様な有機溶媒耐性との対応を整理し、有機溶媒耐性ストレスへの情報伝達システムのカスケード検索ならびに転写制御因子間の相互作用を基礎的に解析して、育種につなげることを目的とした。*PDR1*-*R821S* 変異を導入することにより野生型酵母に有機溶媒耐性を付与することができたが、*R821S* 変異をもった *Pdr1p* の制御下で、*PDR1* の変異により転写レベルの上昇した ABC トランスポーター群と細胞壁タンパク質に着目し、ABC トランスポーター群は疎水性有機溶媒と親水性有機溶媒のそれぞれに対する耐性への関与によって分類することができた。このような分類は、薬剤排出の時と同じような機構によって有機溶媒排出が行われている可能性を示唆した。

研究成果の概要（英文）：As solvents for the chemical reactions are usually highly toxic to the catalytic carrier organism, organic solvent tolerance is necessary for effective bioproduction. Specific expression of the identified genes would improve the tolerance to particular organic solvents for practical use. We demonstrated the *PDR1* *R821S* mutant is tolerant to hydrophilic organic solvent, DMSO, as well as hydrophobic organic solvents. Furthermore, we identified and discriminated genes encoding ABC transporters and cell wall proteins involved in tolerance to hydrophobic or hydrophilic organic solvents.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
2011年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2012年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
年度			
年度			
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：有機溶媒耐性、転写制御因子、ストレス応答、ABC トランスポーター、*PDR1* 変異、薬剤耐性、情報伝達システム、相互作用

1. 研究開始当初の背景

これまでのところ有機溶媒耐性を有する	真核微生物についての研究はほとんどない。
--------------------	----------------------

このような状況の中で、当研究室で有機溶媒存在下でのドライイーストの連続培養から、イソオクタンに対して耐性を有する酵母 *Saccharomyces cerevisiae* KK-211 株を世界で初めて単離した。この株は親株の生育できないイソオクタン (logPow=4.8) 存在下において生育することができる。また、この株においては細胞膜脂質中の飽和脂肪酸の割合が増加していることが確認された。親株と KK-211 株では細胞表層のイソオクタンに対する親和性が異なり、また、この株はイソオクタンを資化できず、耐性のみを持つ。このような特性を持つ KK-211 株における有機溶媒に対する耐性機構を明らかにするため、2種類の方法で遺伝子発現を行った。一つが mRNA Differential Display 法 (DD-PCR) を用いた転写解析、もう一つが DNA チップを用いた解析である。その結果、多数の遺伝子の転写レベルの変化が確認された。

2. 研究の目的

微生物、ここでは特に、真核微生物の機能を有機溶媒の中でも発揮できるように改変するために、我々が世界で初めて発見し、国際特許出願 (PCT/JP2007/0638876) にまで評価された有機溶媒耐性酵母の分子育種法である「転写因子変異による細胞機能改変手法」を展開する。具体的には、国際特許出願の鍵となった転写因子 PDR1 の網羅的変異による多様な有機溶媒耐性の表現型を分類し、これらの中から包括的に取得した制御因子群と多様な有機溶媒耐性との対応を整理し、有機溶媒耐性ストレスへの新たな情報伝達システムのカスケード検索ならびに転写制御因子間の相互作用を基礎的に解析にして、その成果を真に実用的な株の育種につなげる。

3. 研究の方法

DNA チップによる KK-211 株の遺伝子転写パターンとの調査結果を分析したところ、転写因子 *PDR1* (*YGL013c*) の変異株におけるパターンと強い類似性が見られた。*PDR1* は薬剤耐性に関連する多くの遺伝子の発現を制御し、このタンパクの特定のアミノ酸に変異をかけると薬剤耐性が向上することが報告されている。また、*PDR1* の制御を受ける遺伝子はその上流配列に PDRE (Pleiotropic Drug Response Element) を持つことが知られているが、KK-211 株で発現が増加した遺伝子の多くがこれに該当したので、この *PDR1* という転写制御因子を中心に相互作用因子の検索を試みる。

PDR1 変異株が様々な薬剤に対して耐性を持つことから、KK-211 株についても薬剤耐性を調べる。ここでは最も代表的な抗真菌剤であるシクロヘキシミドを用い調査する。これまで、細菌において、有機溶媒耐性と薬剤耐性の関連性が数多く報告されていることから、KK-211 株の有機溶媒耐性の原因もこの *PDR1* にあるのではないかと考え、この配列の分析を行う。初歩的な配列分析では、KK-211 株は親株や実験室株とアミノ酸レベルで数ヶ所の差異が見られ、特に注目すべきなのは、821 番目のアミノ酸アルギニンがセリンに置換している (R821S) 部位である。これと同一の残基に変異が入った株 MS35 (R821H) が、薬剤耐性を持つことが以前に報告されている。この遺伝子は複数の遺伝子の転写を制御していることが考えられているので、相互作用因子を網羅かつ包括的に取得するために、この *PDR1* と相互作用の考えられる因子を各相互作用検出法で取得していく。

PDR1 を中心に、KK-211 株の薬剤および有機溶媒耐性の原因を特定した後、実験室酵母に変異型の *PDR1* をプラスミドとして導入し、プラスミドにより変異型 *PDR1* (F815S) を導

入した酵母を用いて、有機溶媒耐性を確認する。

4. 研究成果

有機溶媒存在下での長期連続培養中に単離した有機溶媒耐性酵母 *S. cerevisiae* KK-211 株のトランスクリプトーム解析を行っていく中で、耐性の原因となる転写因子の 1 アミノ酸変異を同定することができた。KK-211 株では ABC トランスポーターや各種細胞表層タンパク質をコードする遺伝子の転写レベルの上昇が見られ、これらの遺伝子上流配列を調べたところ、幾つかの遺伝子での Pleiotropic Drug Response Element (PDRE) という転写因子 Pdr1p 認識配列の存在が原因因子同定の手掛かりとなった。Pdr1p は通常条件下では制御下の遺伝子の転写抑制を行っているが、薬剤存在下では Xenobiotic Binding Domain (XBD) を介して様々な薬剤と相互作用し、薬剤排出ポンプ遺伝子など各種薬剤耐性関連遺伝子の転写を活性化させる転写因子である。KK-211 株の *PDR1* 遺伝子配列を調べたところ 4 ヶ所のアミノ酸変異が見られ、その中で 821 番目のアミノ酸変異 (R821S) を実験室株に導入することによって、実際に有機溶媒耐性を示すことが明らかとなった。したがって、このようなアミノ酸変異を導入することにより、任意の酵母株に有機溶媒耐性付与が可能となる。さらにこの *PDR1*-R821S 変異株を用い、水/有機溶媒二相系中での 3-オキソブタン酸ブチルの還元反応を行ったところ、野生株では有機溶媒毒性により反応がほとんど進行しなかったのに対して、変異株では全ての基質を還元することができた。

PDR1-R821S 変異により転写活性化された Pdr1p の下流の遺伝子の中で、さらに直接有機溶媒耐性に関与しているものを明らかにするため、Pdr1p 下流の遺伝子を個々に過剰

発現させた株を構築し、耐性試験を行った。その結果、4 種の ABC トランスポーター遺伝子 (*YOR1*, *PDR15*, *PDR10*, *SNQ2*) が直接有機溶媒耐性に関与していることが分かった。しかも興味深いことに、有機溶媒の種類によって耐性に有効な ABC トランスポーターが異なっており、疎水性有機溶媒と親水性有機溶媒のそれぞれに対応したグループ分けが見られた。個々の ABC トランスポーターを過剰発現した株はいずれも有機溶媒耐性を示したが、*PDR1*-R821S 変異株と比べて耐性は弱いため、1 種のトランスポーターだけでなく複数の因子が同時に転写活性化することが耐性獲得に重要であると推察された。

従来の耐性育種戦略としては、外来遺伝子の導入や元来細胞が有している遺伝子の強化・破壊といった個々の遺伝子に着目したものが主であった。しかし、本研究のように、複数の遺伝子発現を制御している転写因子を改変することによって、下流の複数遺伝子の発現を同時に変えることができるため、個々の遺伝子の制御だけでは効果が表れにくい耐性などの様々な表現型を付与する上で効果的な戦略であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 5 件)

1. C. Inaba, S. Higuchi, H. Morisaka, K. Kuroda, M. Ueda, Synthesis of functional dipeptide, carnosine, from nonprotected amino acids using carnosinase -displaying yeast cells, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 査読有, 86, 1895-1902 (2010). doi.org/10.1007/s00253-009-2396-7
2. A. Kotaka, H. Sahara, K. Kuroda, A. Kondo, M. Ueda, Y. Hata, A. Kotaka, H. Sahara, K. Kuroda, A. Kondo, M. Ueda, Y. Hata, Enhancement of beta-glucosidase activity on the cell-surface of sake yeast

by disruption of *SEDI*, J. Biosci. Bioeng.,
査読有, 109, 442-446 (2010).

doi.org/10.1016/j.jbiosc.2009.11.003

3. 植田充美, 分子ディスプレイ法による革
新的有機溶媒内酵素反応の開拓, 薬学雑誌,
査読有, 130, 1479-1485 (2010).

4. A. Nakanishi, K. Kuroda, M. Ueda, Direct
fermentation of newspaper after
laccase-treatment using yeast
codisplaying endoglucanase, cellobio-
-hydrolase, and beta-glucosidase,
Renewable Energy, 査読有, 44, 199-205
(2012).

doi.org/10.1016/j.renene.2012.01.078

5. N. Nishida, N. Ozato, K. Matsui, K.
Kuroda, M. Ueda, ABC transporters and cell
wall proteins involved in organic solvent
tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*, J.
Biotechnol., 査読有, in press.

doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.03.003

[学会発表] (計3件)

1. N. Nishida et al., Molecular
analysis of XBD in Pdr1p mutants leading
to multidrug resistance and
organic-solvent tolerance in yeast
Saccharomyces cerevisiae, Pacjficchem 2010,
2010.12.18, Hawaii, USA

2. N. Nishida et al., Functional
analysis of Pdr1p in multidrug resistance
and organic-solvent tolerance in yeast,
2011 American Society for Biochemistry and
Molecular Biology Annual Meeting,
2011.4.11, Washington DC, USA

3. N. Nishida et al., ABC transporters
and cell wall proteins involved in yeast
organic solvent tolerance, 15th European
Congress of Biotechnology, 2012.9.23,
Istanbul, Turkey

[その他]

ホームページ等

<http://www/tenko.kais.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

植田 充美 (UEDA MITSUYOSHI)

京都大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号: 90183201