

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：82401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25889071

研究課題名(和文) Non-Conventional 酵母によるテーラーメイド芳香族化合物合成法の開発

研究課題名(英文) Development of the tailor-made biosynthesis system of aromatic compounds using microbe

研究代表者

野田 修平 (Noda, Shuhei)

独立行政法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・特別研究員

研究者番号：30710131

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：エタノール非生産酵母のスクリーニングを行った結果、*Kluyveromyces lactis*の一種について、エタノールをほとんど生産しないということを見出した。この株は、様々な有用物質への変換に関わる補酵素や、様々な有用物質の骨格となるアセチルCoA等の細胞内物質が、*S. cerevisiae*と比較して格段に多く蓄積しているということを見出した。本研究でスクリーニングした*K. lactis*は、有用物質を発酵法で生産するためのプラットフォームになり得ることが示唆された。さらに、いくつかの芳香族化合物修飾酵素のスクリーニングにも成功し、テーラーメイド型芳香族化合物合成法開発の基盤を構築した。

研究成果の概要(英文)：And it was cultured characterization for a variety of yeast, were screened for ethanol non-production type yeast. As a result, we have found that for the kind of *Kluyveromyces lactis*, hardly produce ethanol. As a result of this *K. further lactis* strain analysis, coenzymes and the like ATP and NADPH involved in the conversion into various useful substances, are important intracellular substance such as acetyl coenzyme A to be the skeleton of various useful substances, *S. it was found that are significantly more storage compared to cerevisiae. K. lactis* were screened in this study, suggesting that it can become a platform for the production by fermentation of various useful substances. In addition, some enzymes to modify aromatic residues can be successfully screened. We here constructed research base for "tailor-made biosynthesis system of aromatic compounds."

研究分野：生物化学工学

キーワード：*Kluyveromyces lactis* NADPH アセチル-CoA Tyrosine decarboxylase

1. 研究開始当初の背景

資源・エネルギー問題、環境問題を克服し、安全で持続的に発展できる低炭素循環型未来社会を実現する上で、再生可能な資源バイオマスから様々なバイオベース製品の生産を行なうバイオリファイナーへの転換を図るグリーン・イノベーションの実現は極めて重要である。バイオリファイナーは、巨大な市場を創出して工業及び農林水産業を活性化するという側面を持っており、化石資源への全面依存から脱却して低炭素社会を構築することができる。バイオ化成品市場も世界規模で拡大の一途をたどっており、2025年に世界市場は6,000億ドルを超えると推定されており、CO₂排出低減の期待と相まって社会からの要請は非常に高い。

微生物菌体触媒を用いた芳香族化合物生産は、バイオリファイナーにおける重要な分野の一つである。近年注目されているシェールオイル革命により、今後、メタン、プロパノールやブタノール等の炭素数の少ないエネルギー・化成品原料コストは低下すると考えられる。よって、芳香族化合物のような、より複雑な構造をしたエネルギー・化成品原料の需要が急激に高まってくると予想されている。申請者らは、放線菌 *Streptomyces* 属に芳香族化合物合成経路を導入することにより、安息香酸や p-ヒドロキシ桂皮酸などを生産する技術の開発に成功してきた(申請者業績一覧参照)。しかし、高等植物由来の芳香族修飾経路の発現ができないといった分子生物学的な問題や、嫌気培養ができないといったライフサイクルアセスメント(LCA)の側面からの問題があり、より多様な芳香族化合物の生産及び産業的な応用を考えた場合に大きなブレイクスルーが必要とされている現状がある。

2. 研究の目的

本研究では、Non-Conventional 酵母を生体触媒として用いることにより望み通りの芳香族化合物を合成可能なシステムの開発を行う。芳香環修飾酵素ライブラリーから任意の修飾酵素を選択・導入することにより、望みの芳香族化合物を自在に生産可能なテララーメイド型微生物セルファクトリーの開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) Non-conventional 酵母のスクリーニング

まず、物質生産に最適な酵母を単離するため、様々な酵母の代謝解析を行った。単離のポイントとしては、エタノールを生産しないこと、ATP、NADPH等の物質生産を行う上で重要な補酵素が豊富であることを念頭に置いた。

(2) *K. lactis* 形質転換系の確立

スクリーニングの結果、*K. lactis* の一種である株が、最適な宿主になり得ることが見出された。しかしながら、形質転換実績に乏しく、形質転換系を最適化することを目指した。

(3) 芳香族化合物修飾酵素のスクリーニング

芳香族アミノ酸を修飾する酵素、芳香族アミノ酸合成経路から派生する反応を修飾する酵素等から様々な酵素をスクリーニングし、そのいくつかに対して特徴づけを行い、モデル微生物細胞内で芳香族化合物合成経路の再設計を行った。

4. 研究成果

(1) Non-conventional 酵母のスクリーニング

様々な酵母に対して代謝解析を適用することにより、エタノール非生産性、ATP、NADPHが豊富、という物質生産を行う上で理想的な細胞内環境を持つ *K. lactis* のスクリーニングに成功した。通常の *K. lactis* はエタノールを生産するが、本研究で単離された株は、エタノールを一切生産しないという珍しい特徴^oを有していた。

(2) *K. lactis* 形質転換系の確立

物質生産のための理想的な宿主になり得る株として、*K. lactis* が単離されたが、この株は形質転換実績に乏しく、まず形質転換系の最適化を行った。既存の酢酸リチウム法を改良することにより、ある程度の効率で細胞内にプラスミドを導入することに成功した。

(3) 芳香族化合物修飾酵素のスクリーニング

テララーメイド型の芳香族化合物合成システム確立のため、様々な芳香族化合物修飾酵素のスクリーニング・特性解析を行った。そのうちのいくつかについて報告する。

チロシンの脱炭酸反応を触媒する酵素を、様々な植物種からスクリーニングした。その中でも、草本系モデル植物である *Brachypodium distachyon* 由来のチロシン脱炭酸酵素は高活性を示し、モデル微生物中においても高いチロシン脱炭酸活性を示した。Fig. 1 に示すように、モデル酵母 *S. cerevisiae* を用いてグルコースからチロシンの脱炭酸化合物であるチラミンの大量生産に成功した。

さらに、芳香族アミノ酸合成経路から2段階の反応で合成できるサリチル酸合成酵素についても同様にスクリーニングを行った。大腸菌由来のイソコリスミ酸転移酵素と緑膿菌由来のイソコリスミ酸脱ピルビン酸酵素を組み合わせることにより、高いサリチル酸変換能示すことが分かった。Fig. 2 に示すように、培養48時間で1g/Lを超えるサリチル酸の生産に成功し、高活性なサリチル酸合成酵素のスクリーニングに成功したといえる。

以上のように、物質生産のために理想的な細胞内環境を持つ宿主(*K. lactis*)のスクリーニングに成功し、さらに、いくつかの高活性な芳香族化合物修飾酵素のスクリーニングにも成功した。本研究により、テララメイド型芳香族化合物合成システム開発に向けた重要な基盤が整備されたといえる。

Figure 1. *B. distachyon* 由来チロシン脱炭酸酵素を発現する酵母を用いたチラミン生産

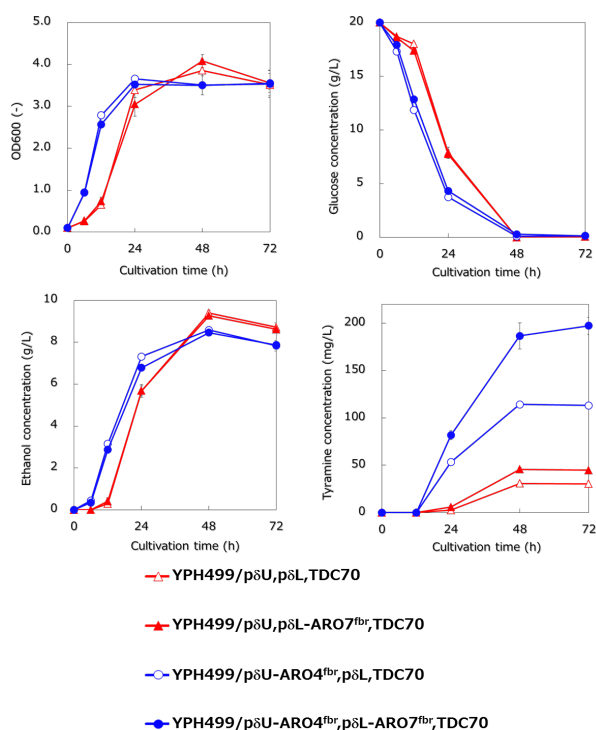
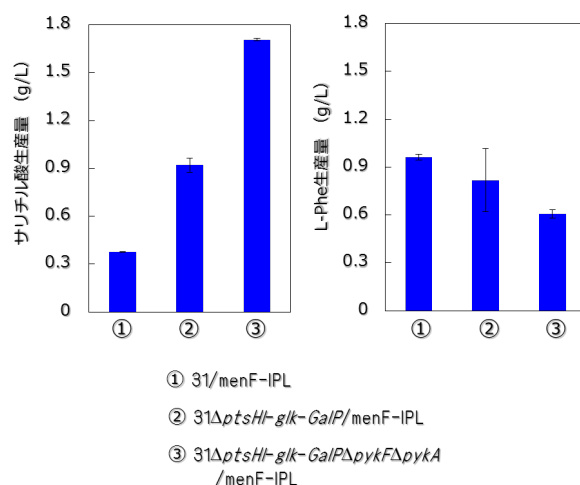


Fig.2 サリチル酸生産



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 1 件)

Shuhei Noda, Tomokazu Shirai, Keiichi Mochida, Fumio Matsuda, Sachiko Oyama, Mami Okamoto, Akihiko Kondo, 査読有, Evaluation of *Brachypodium distachyon* L-Tyrosine Decarboxylase Using L-Tyrosine Over-Producing *Saccharomyces cerevisiae*, PLoS ONE, Published: May 21, 2015, DOI: 10.1371/journal.pone.0125488

[学会発表](計 3 件)

野田修平, 白井 智量、持田 恵一、松田 史夫、近藤 昭彦、チロシン合成経路におけるフィードバック阻害を解除した酵母を用いたチロシン誘導体合成, 化学工学会秋季大会, 2014.9.17, 九州大学伊都キャンパス、福岡市、福岡県

野田修平, 白井 智量、持田 恵一、松田 史夫、近藤 昭彦、草本系モデル植物ブラキポディウム由来芳香族脱炭酸酵素を用いた酵母によるチラミン合成, 生物工学会, 2014.9.10, 札幌コンベンションセンター、札幌市、北海道

野田修平, 白井 智量、持田 恵一、松田 史夫、近藤 昭彦、Metabolic engineering of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to enhance tyramine production, Biocat2014, 2014.8.31-9.4, Hamburg, Germany

[図書](計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：サリチル酸の製造方法
発明者：野田修平、白井智量
権利者：理化学研究所
種類：特願
番号：2014-222462
出願年月日：2014 年 10 月 31 日
国内外の別： 国内

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

野田 修平 (NODA Shuhei)

独立行政法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・特別研究員

研究者番号：30710131

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：