

包括的転写制御による効率的物質生産に向けた ストレス耐性育種

黒田 浩一*・植田 充美

地球環境への負荷が増大しつつあるなかで、環境にやさしい有用物質生産が注目を集めており、特に微生物などの生物機能を利用した生体触媒による物質生産に対して期待が高まりつつある。その利点として、多段階反応が可能、穏やかな反応条件、副産物や異性体の低減、省エネルギーコストなどがあげられる。しかし、実応用へ向けて生産効率を向上させていく必要がある。そのため、生命現象を網羅的、多角的に解析するオミクス解析の発展とともに、物質生産を担う代謝経路の導入、効率化を行う代謝デザインが盛んに行われつつある。また、物質生産効率の向上に向けて、使用する細胞のストレス耐性も重要な因子である。すなわち、物質生産を行う環境は、細胞に適した通常の培養条件とは異なる場合が多く、酸、塩基、重金属、有機溶媒、塩、温度など、物質生産反応に応じてさまざまなストレスを受ける。また、生産物自体が疎水性で細胞毒性を示す場合は生産物によるストレスを受ける。そのため、これらのストレスにより、物質生産を担う代謝経路が期待通り働かず、生産効率の低下を招く原因となる。そこで、ストレス環境下でも代謝活動を維持し、物質生産を促進する上で、用いる細胞にストレス耐性を付与していくことが重要な課題である。本稿では、有機溶媒耐性酵母や耐熱性酵母の単離と、有機溶媒耐性酵母の解析により耐性への関与が明らかになった転写因子に着目した、転写因子デザインによるストレス耐性酵母の分子育種について紹介する。

有機溶媒耐性を与える因子

物質生産において、基質や生産物が疎水性物質である場合、親水性溶媒にはほとんど溶解しないため、反応系に有機溶媒が用いられる。特に水/有機溶媒二相系では生体触媒を水相に、基質や生産物あるいはその両者が有機溶媒相に局在し、基質や生産物と生体触媒が相で分離されるため、毒性による影響が低減される有用な系である。しかし、二相の境界面で反応を行うため、有機溶媒との接触は避けられず、有機溶媒耐性の有無が重要な因子となる。

これまでにドライイーストDY-1株を固定化し、イソオクタン存在下での長期連続培養を行うなかで、有機溶

媒耐性酵母 *Saccharomyces cerevisiae* KK-211株が単離された¹⁾。原核生物とは異なり、真核生物での有機溶媒耐性は例がなく、これが真核生物の中では最初の例であった。単離したKK-211株は野生株では生育できないイソオクタン、ノナン、オクタン、ジフェニルエーテルなどの有機溶媒存在下でも生育することができる。有機溶媒耐性には細胞表層環境が重要であると考えられ、KK-211株よりリン脂質を抽出し、その脂肪酸組成を解析した結果、飽和脂肪酸量の増大が見られ、膜流動性の低下と有機溶媒耐性の関連が示唆された。また、細胞とイソオクタンを混合した後のイソオクタン滴に対する親和性が大きく異なっており、野生株ではほとんどの細胞がイソオクタン滴に吸着するのに対して、KK-211株ではほとんど吸着しない(図1)。したがって、KK-211株では細胞表層をより親水的にしていることも考えられた²⁾。

このように有機溶媒耐性という表現型に大きな変化が見られたため、トランスクリプトーム解析を行い、耐性に関与する因子の同定を試みた³⁾。KK-211株と野生株を有機溶媒が存在しない通常の培地で生育させて解析を行ったところ、KK-211株においてABCトランスポーターや細胞表層タンパク質など計12個の遺伝子の転写上昇が見られた。またKK-211株の転写レベルをイソオ

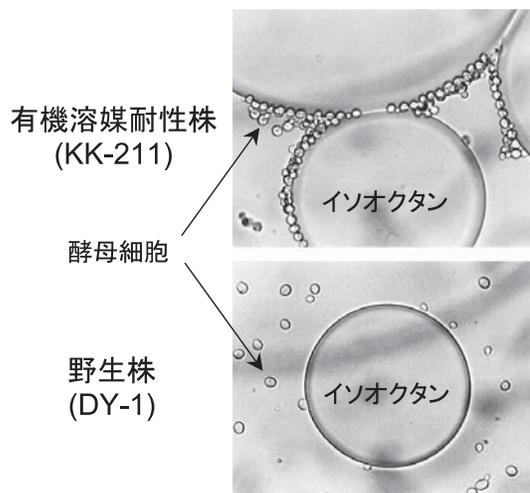


図1. 有機溶媒耐性酵母のイソオクタン滴に対する親和性

* 著者紹介 京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻(准教授) E-mail: k_kuro@kais.kyoto-u.ac.jp

クタン存在下、非存在下で比較すると、転写レベルの変化がほとんど見られなかったため、イソオクタンに対する応答性が変化しただけではなく、イソオクタン非存在下ですでにKK-211株特有の遺伝子発現プロファイルを示していることが示唆された。転写上昇が見られた遺伝子群の大きな特徴として、12個のうち6個の遺伝子のプロモーター領域にPleotropic Drug Response Element (PDRE)⁴⁾と呼ばれる転写因子Pdr1pの認識配列が見つかり、さらに転写変動の大きい上位5個すべてがこの特徴を有していた。したがってKK-211株ではPdr1pによる転写制御パターンが変化した結果、下流の遺伝子群が同時に転写活性化されたと推察された。そこで、KK-211株の*PDR1*遺伝子の配列を調べたところ、野生株と比較して4か所(18, 94, 820, 821番目のアミノ酸残基)においてアミノ酸置換変異を発見した⁵⁾。

転写因子デザインによる有機溶媒耐性付与

上記のように有機溶媒耐性KK-211株においてPdr1pの4か所のアミノ酸変異が見られたため、これが有機溶媒耐性の原因となっている可能性がある。そこで、実験室酵母に*PDR1*遺伝子変異を導入し、耐性を示すかどうか調べることによってその可能性を検証した⁵⁾。4か所の変異のうち、821番目のアミノ酸残基での変異(*PDR1*-R821S)に着目し、ゲノム相同組換えによってこの変異を導入したところ(R821S株)、イソオクタンやノナンといった有機溶媒存在下においても生育することが可能になり、有機溶媒耐性を示した(図2)。また、これらの疎水性有機溶媒だけでなく、DMSOのような親水性有機溶媒に対しても耐性を示し(図3)、*PDR1*-R821Sは酵母に親水性・疎水性のどちらの有機溶媒に対しても耐性を与える因子であることが分かった。また、この結果より、同定した有機溶媒耐性因子*PDR1*-R821Sを導入することによって、任意の酵母株を有機溶媒耐性化することも可能であることが示唆された。

さらに、*PDR1*-R821S変異を導入した有機溶媒耐性株(R821S株)を用い、水/有機溶媒二相系中で物質変換反応を試みた⁵⁾。イソオクタンを用いた二相系中で、3-オキソブタン酸ブチルの還元反応を行ったところ、野生株ではイソオクタンの毒性により生体触媒活性が失われたが、R821S株ではすべての基質を還元することができ、イソオクタン存在下においても生体触媒活性を示した(図4)。したがって、このような有機溶媒耐性株は、有機溶媒存在環境中での効率的物質生産に利用することができる。また、転写因子の1アミノ酸変異のみで表現型が大きく変化し、有機溶媒耐性を付与できたことは興

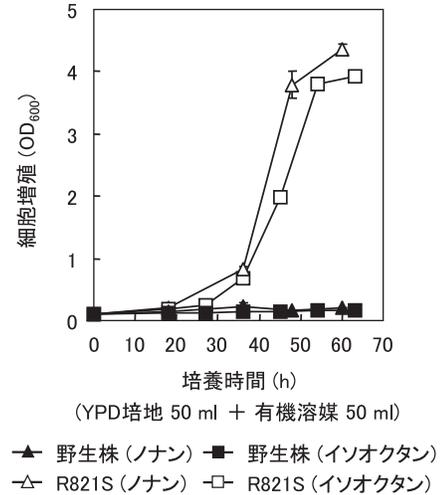


図2. 疎水性有機溶媒に対する耐性

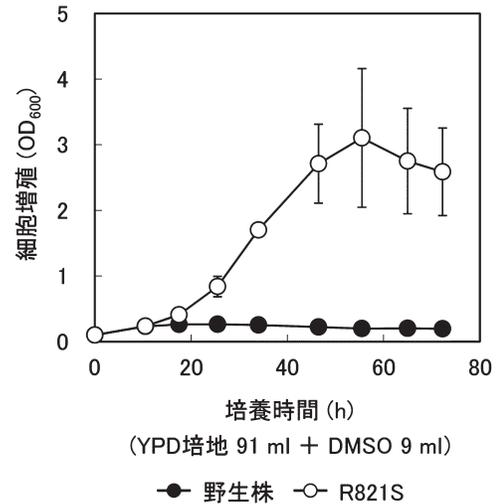


図3. 親水性有機溶媒に対する耐性

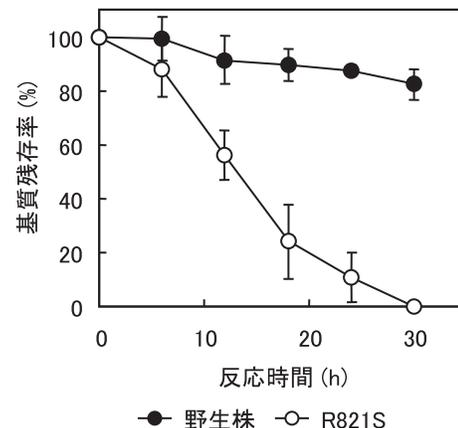


図4. イソオクタン存在下での3-オキソブタン酸ブチルの還元反応

味深く、細胞分子育種のストラテジーとして転写因子デザインの可能性が示された。

PDR1の下流で耐性に直接関わる因子

R821S株では、Pdr1pに制御される下流の遺伝子群が転写誘導された結果、有機溶媒耐性を獲得したと考えられるが、これらの遺伝子群の中で有機溶媒耐性に直接関わる遺伝子の同定を試みた⁶⁾。KK-211株で転写レベルの上昇した遺伝子群の中でABCトランスポーター群(Yor1p, Pdr15p, Pdr10p, Snq2p)に着目し、それぞれを過剰発現した酵母を作製した。ABCトランスポーターのC末端に融合したEGFPにより発現と局在を確認したのち、各種有機溶媒耐性への影響を調べたところ、デカンなどの疎水性有機溶媒に対してはPDR10, SNQ2過剰発現株で耐性が向上し、一方、親水性有機溶媒であるDMSOに対してはSNQ2, YOR1過剰発現株で耐性の向上が見られた(図5)。これらの結果から、Pdr1pによって転写制御されるABCトランスポーター群の中でPdr10p, Snq2p, Yor1pが有機溶媒耐性に関与しており、特にPdr10pは疎水性有機溶媒に、またYor1pは親水性有機溶媒に特異的に関与していることが明らかとなった。これらのABCトランスポーターは薬剤を細胞外に排出することによって薬剤耐性に関与しているため、薬剤排出と同様に有機溶媒を細胞外に排出している可能性も考えられる。また、ABCトランスポーター中のnucleotide-binding domains (NBDs)のアミノ酸配列に基づいた分類分けによると、Pdr10p, Snq2p, Pdr15pはABCサブファミリーG (ABCG)に属し、Yor1pはABCサブファミリーC (ABCC)に属する⁷⁾。ABCG

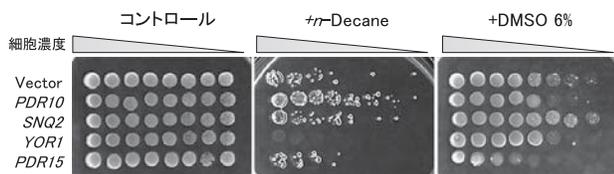


図5. ABCトランスポーター過剰発現株の有機溶媒耐性

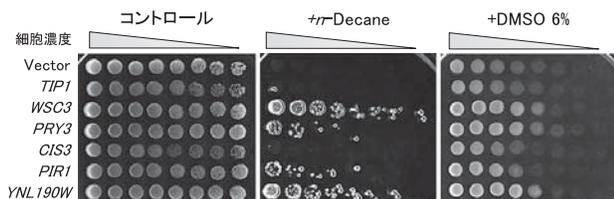


図6. 細胞壁過剰発現株の有機溶媒耐性

に属するものはコレステロール、ステロイド、リン脂質などの疎水性物質を排出し⁸⁾、ABCCに属するものはグルタチオンやグルクロニドの付加を経て薬剤を排出する⁹⁾ことを考えると、Pdr10やYor1pの有機溶媒特異性はこのような排出機構の違いに起因していると思われる。

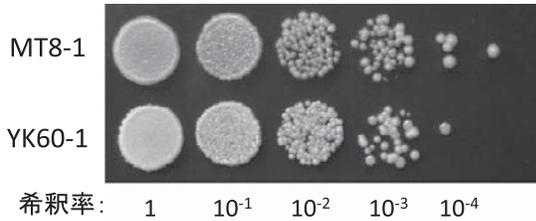
さらに、KK-211株で転写誘導されていた細胞壁タンパク質群(Tip1p, Wsc3p, Pry3p, Cis3p, Pir1p, Ynl190wp)についても同様に過剰発現株を作製し、寒天培地上で耐性試験を行った(図6)。その結果、デカンに対してはWSC3, PRY3, PIR1, YNL190w過剰発現株で耐性を示し、DMSOに対してはWSC3, PRY3, YNL190w過剰発現株で耐性が向上した。Wsc3pはPkc1-Mpk1経路を活性化するストレスセンサーであり、細胞壁完全性の維持に関わっている¹⁰⁾。また、Ynl190wpはGly含量6%以上、hydrophilicity index1.0以上を示すハイドロフィリンであるため¹¹⁾、細胞壁中のYnl190wpが増大し、細胞表層をより親水的にすることによって有機溶媒耐性に寄与していることも考えられる。

耐熱性酵母の適応育種

物質生産の際に細胞が受ける環境ストレスとして、上述のような有機溶媒だけでなく、熱ストレスも克服すべき重要なストレスである。酵母の発酵によりエタノールなどの物質生産を行う場合、発酵と同時に発酵熱が生じるため、高温ストレスがかかり生産効率低下の原因となる。そのため、系の温度を下げる冷却設備を用いることになるが、コストを考えた場合、望ましい解決策ではない。そこで、高温環境下でも良好に生育し、発酵生産を行うことが可能な耐熱性酵母を取得することができれば、冷却エネルギーの削減や物質変換反応を担う酵素の活性を引き出すことができると考えられるため、コスト、エネルギー、生産効率において有利になると期待できる。そこで我々は有機溶媒耐性酵母だけでなく耐熱性酵母の取得を試みた。

耐熱性酵母獲得の方策として、酵母を通常生育させる温度より高い温度にて継代培養を繰り返す、適応育種を行った。具体的には実験室酵母*S. cerevisiae* MT8-1株を親株とし、生育温度を30°Cから2°C上昇させて継代培養を繰り返していき、親株30°CのOD₆₀₀よりも高いOD₆₀₀を示した時点でさらに2°Cずつ温度を上昇させて継代培養を行った。継代培養を60回行った結果、40°Cでも生育可能な耐熱性酵母YK60-1株を取得することに成功した(図7)¹²⁾。また、YK60-1株は興味深いことに通常の生育条件である30°Cにおいても親株と比較して良好な生育を示した。

30°Cでの生育



40°Cでの生育

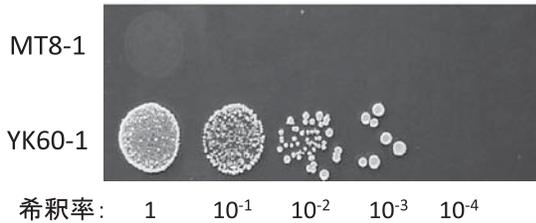


図7. 適応変異にて取得した耐熱性酵母YK60-1株

さらに取得したYK60-1株についてトランスクリプトーム解析を行い、耐熱性獲得機構の解明を試みた。MT8-1 (30°C) とYK60-1 (30°C) での比較、およびMT8-1 (40°C) とYK60-1 (40°C) での比較のいずれにおいても、400個以上の遺伝子で2倍以上の転写レベルの変化が見られた。また、YK60-1株ではトレハロース合成系を含む多数の遺伝子の転写レベルが変化していたことから、情報伝達の下流にある多数の遺伝子群を制御するマスターレギュレーターのような因子の関与も考えられるが、耐熱性の原因因子については、さらに現在同定を試みているところである。

おわりに

我々が単離した有機溶媒耐性酵母KK-211株を解析した結果、転写因子Pdr1pの1アミノ酸変異(R821S)が有機溶媒耐性の原因であることを突き止めた。実際に同定したPDR1-R821S変異を導入するだけで任意の酵母株に有機溶媒耐性を付与することができ、転写因子デザインによる細胞分子育種の有効性が示唆された。このような広範な遺伝子発現に影響を及ぼす転写因子の改変は

global transcription machinery engineering (gTME) と呼ばれ、近年、転写因子に着目した包括的転写制御による多様な表現型の創出も行われている¹³⁾。また、KK-211株において転写活性化されていた各種ABCトランスポーター、細胞壁タンパク質に着目し、それらの過剰発現株を作製することによって耐性に直接関与する因子を同定することができた。これらの中には有機溶媒の種類によって耐性への関与が異なるものも見られたため、この情報を基に、目的とする有機溶媒に応じて発現を強化すべき因子を選択することもできる。また、個々の機能性タンパク質をコードする遺伝子を過剰発現した株と転写因子を改変したR821S株とで耐性を比較すると、R821S株の方が強い耐性を示すことから、個々の遺伝子の過剰発現や遺伝子破壊よりも、転写因子デザインにより下流の複数遺伝子を同時に活性化することが重要であり、複数の因子が相乗的に耐性に寄与している可能性も考えられる。また、取得した耐熱性酵母についても、今後耐熱性の原因因子を同定することによって任意の酵母株に耐熱性を付与できるであろう。

文 献

- 1) Kawamoto, T. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **55**, 476 (2001).
- 2) Miura, S. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 4883 (2000).
- 3) Matsui, K. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **71**, 75 (2006).
- 4) Katzmann, D. J. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **271**, 23049 (1996).
- 5) Matsui, K. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 4222 (2008).
- 6) Nishida, N. *et al.*: *J. Biotechnol.*, **165**, 145 (2013)
- 7) Paumi, C. M. *et al.*: *Mol. Biol. Rev.*, **73**, 577 (2009).
- 8) Schmitz, G. *et al.*: *J. Lipid Res.*, **42**, 1513 (2001).
- 9) Homolya, L. *et al.*: *Biofactors*, **17**, 103 (2003).
- 10) Verna, J. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 13804 (1997).
- 11) Garay-Arroyo, A. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **275**, 5668 (2000).
- 12) Satomura, A. *et al.*: *Biotechnol. Prog.*, DOI: 10.1021/btpr.1754
- 13) Alper, H. *et al.*: *Metab. Eng.*, **9**, 258 (2007).