

高効率物質生産に向けた転写因子デザインによる ストレス耐性工学

里村 淳*・黒田 浩一・植田 充美

枯渇しつつある化石資源、高まるエネルギー需要、悪化する環境汚染の中、環境に優しい物質生産手法の開発が望まれている。特に微生物を用いた有用物質の発酵生産は常温常圧で、多段階反応を一括して行うことができること、有害な副産物が少ないことなど、従来の化学的手法よりもエネルギー消費量や、環境負荷が少ない手法である。しかし、一般に微生物を用いた物質生産は生育に伴うものであり、微生物の生育が可能である環境条件に限られている。たとえば、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いたエタノール生産では、発酵熱により酵母の生育が抑制されてしまう。また、出発基質として疎水性基質を有機溶媒に溶解して用いる反応系の場合、酵母の生育や発酵が有機溶媒により阻害される。これらの問題を解決するため、遺伝子工学を用いたストレス耐性 *S. cerevisiae* 株の構築が行われてきた。しかし、これらの株を構築するためには、非常に複雑な遺伝子操作を必要とすることが多く見受けられる。そこで、我々はマスターレギュレーターとなる転写因子の改変に注目している。マスターレギュレーターとは下流にある多数の遺伝子を一括して制御する転写因子である。一つのマスターレギュレーターの働きを改変することで、下流のストレス応答やシグナル伝達などに関わる遺伝子発現を誘導できるだけでなく、それにより誘導された転写因子やクロマチン再構成などにより、さらに下流の遺伝子発現まで包括的に調節できる(図1)。本稿では、我々が取り組んできている、酵母 *S. cerevisiae* のマスターレギュ

レーターとなる転写因子の機能改変によるストレス耐性工学について紹介する。

1. 有機溶媒耐性工学

微生物を用いた物質生産において、基質や生産物が疎水性物質の場合、水溶液と有機溶媒の二相系で発酵を行うことがある。このような二相系の利点は基質や生産物の溶解度を高めることに加えて、生産物を有機溶媒層に偏在させることで生産物阻害を回避できることにある。しかし、有機溶媒自体の毒性は回避することはできない。水・有機溶媒二相系での反応を効率的に行うためには、有機溶媒環境下でも良好に生育を示す有機溶媒耐性微生物が求められる。これまでに、有機溶媒環境下において生育を示す大腸菌などの原核生物は単離されているが、酵母をはじめとする真核生物での例は皆無であった。世界初の有機溶媒耐性酵母 KK-211 は、*S. cerevisiae* をイソオクタン存在化で長期連続培養することで単離されてきた¹⁾。KK-211 は育種親株が生育しないイソオクタン、*n*-ノナンなどの有機溶媒環境下でも良好に生育することができた²⁾。育種親株と KK-211 の違いは細胞表層のレベルでも示されている。イソオクタン環境下において、育種親株はイソオクタンの油滴に吸着されるのに対して、KK-211 は油滴に吸着されず、水溶液中に拡散していることがわかった。また、両者の違いは転写レベルでも見いだされている。DNA マイクロアレイ解析によると、KK-211 は細胞壁タンパク質関連遺伝子である *TIP1*, *WSC3*, *CIS3*, *PRY3*, *PIR1*, *YNL190W* や ABC トランスポーター関連遺伝子である *PDR10*, *SNQ2*, *YOR1*, *PDR15* の発現が強く誘導されており、多くの遺伝子の転写レベルが変化していた³⁾。また、これらの遺伝子をそれぞれ実験室株で過剰発現させたところ、多くの株が疎水性有機溶媒 (*n*-ウンデカンや *n*-デカン) や水溶性有機溶媒 (DMSO) 環境下において耐性を示したことから、これらの遺伝子の有機溶媒耐性への関与が伺える^{4,5)}。これらの遺伝子のうち、特に ABC トランスポーター関連遺伝子はすべて上流に pleiotropic drug response element (PDRE) という転写因子 Pdr1p の結合

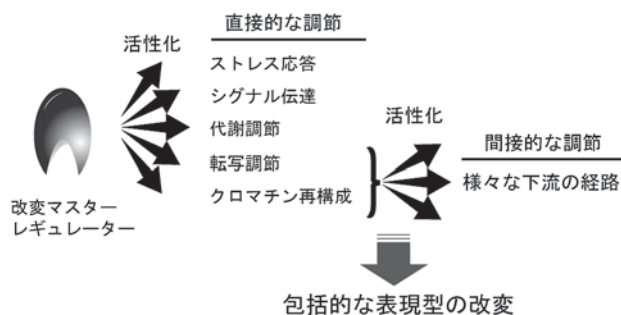


図1. マスターレギュレーターによる包括的転写調節

*著者紹介 京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻(博士後期課程, 日本学術振興会特別研究員 DC1)
E-mail: satomura.atsushi.77w@st.kyoto-u.ac.jp

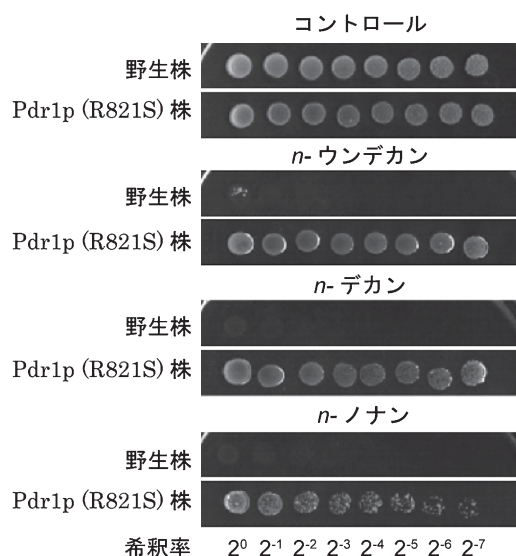


図2. Pdr1p (R821S) 株酵母の有機溶媒耐性

モチーフを持つ。Pdr1pはジンクフィンガーモチーフをもつ転写因子で、酵母の多剤耐性に関わるマスターレギュレーターでもある。シクロヘキシミドなど薬剤に曝されると活性化して、下流のABCトランスポーター関連遺伝子群を誘導する働きがある。KK-211において、Pdr1pの活性変化による下流の遺伝子の発現誘導が予想されたことから、実際に*PDR1*のDNA配列を調べたところ、ORF部位にR821Sとなる変異が確認された。実験室株にPdr1p (R821S)となる変異を導入すると、実際に、*n*-ウンデカン、*n*-デカン、*n*-ノナンなどの有機溶媒に対して耐性を獲得することが示された(図2)。また、下流のABCトランスポーター関連遺伝子の常時過剰発現もKK-211と同様に認められたことより、実際にPdr1p (R821S)がPDREをもつ遺伝子を過剰発現することで、有機溶媒耐性を誘導していることがわかった⁶⁾。また、単純な一アミノ酸置換により任意の酵母に有機溶媒耐性を付与可能であることも示唆された。

酵母には、Pdr1pと一部機能が重複する転写因子Pdr3pが存在する。Pdr3pを欠損すると有機溶媒応答が弱まるが、Pdr1pを欠損すると有機溶媒応答がより誘導されることから、Pdr3pはPdr1pと同じ配列を認識して、Pdr1pと競合していると予想される⁷⁾。Pdr1p (R821S)は変異により、有機溶媒の有無にかかわらず常時下流の遺伝子を活性化する活性を獲得したと考えている。

この一アミノ酸置換により構築した有機溶媒耐性酵母は水・有機溶媒二相系での反応に応用可能である。特に、生成物が疎水性物質の場合、反応担体である酵母と生成物が直接混ざり合わないため生成物阻害が起これにく

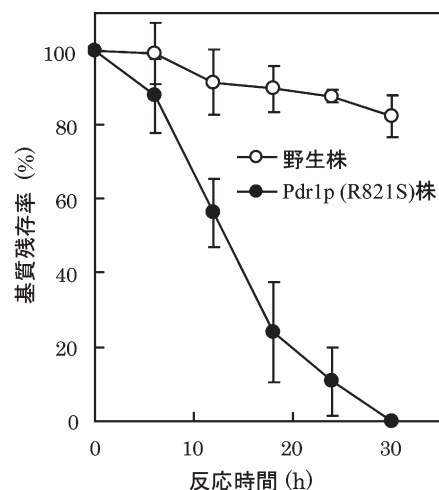


図3. Pdr1p (R821S) 株酵母による3-オキソブタン酸ブチルの還元

く、非常に高い反応効率が望める。実際に、野生株の酵母を用いて、イソオクタンに溶解させた3-オキソブタン酸ブチルを水・有機溶媒二相系で還元反応を行うと、イソオクタンによる生育阻害により基質はわずかししか還元されない(図3)。一方で、Pdr1p (R821S)株では有機溶媒環境においても生体反応を示すことができるため、ほぼ100%の効率で還元を達成することができた⁸⁾。今後の展開としては、合成生物工学的に種々の有用物質合成経路を導入した酵母にさらに、このPdr1p (R821S)となる一塩基置換を導入し、疎水性物質を基質として効率的に変換反応を進めることが期待できる。

2. 熱耐性工学

耐熱性酵母を用いたバイオエタノール生産は、冷却エネルギーの削減、発酵の迅速化などの利点があり、低コストなバイオエタノール生産には不可欠である。通常の酵母を用いたエタノール生産は発酵熱による酵母への熱ストレスが問題となるため、系の冷却が必要となる。バイオエタノール生産力が高い酵母に熱耐性を付与することで、冷却が不要となるだけでなく、高温発酵が可能となるためエタノール発酵速度の増加が期待できる。

酵母*S. cerevisiae*の熱耐性に関わる転写因子を活性化させるような一アミノ酸置換・欠損はいくつか見つかった。たとえば、Hsf1p (R206S)⁹⁾やHsf1p (Δ V210)¹⁰⁾など、熱耐性に関わる転写因子であるHsf1pだけでも少なくとも6種類の変異が見いだされている。これらはHsf1pのDNA結合ドメイン上の変異であり、ターゲットサイトへの結合力を上昇させることでHsf1pを常時活性化する。しかし、再構成実験によって、一塩基置換に

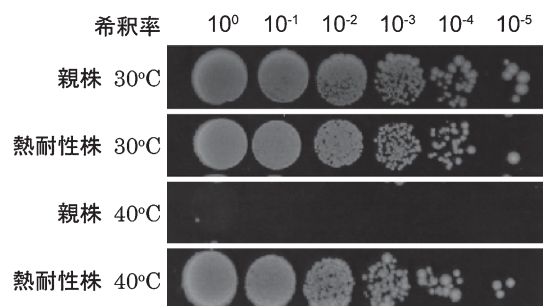


図4. 適応育種株の熱耐性確認実験

よりHsf1pを活性化させることで、下流の熱耐性に関わる因子を過剰発現しても熱耐性自体はさほど誘導されていない。これは、酵母の熱耐性に関わる転写調節因子として、Hsf1pに加えてMsn2pやMsn4pなども存在するため、Hsf1pの活性化だけでは熱耐性に関わる因子を十分に発現誘導できないためであると考えられる。そこで、我々は非熱耐性酵母から熱耐性酵母を育種することで、包括的な遺伝子発現量の変化を通じて、酵母を耐熱化しうの変異の同定を試みた。熱耐性酵母取得の方策として、酵母を通常生育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¹¹⁾。得られた熱耐性酵母は親株が生育できない40°Cにおいても良好な生育を示した(図4)。本熱耐性酵母は転写レベルで400以上の遺伝子制御が変化しており、特にヒートショックタンパク質や中央代謝系に関わる因子が強く誘導されていた。これより包括的に遺伝子発現を調節するような上流の因子に変異が入り、転写因子が操るマリオネットのように下流(末端)の表現型を変化させていることが予想される¹²⁾。次世代シーケンサーを用いた網羅的なゲノム解析が酵母の熱耐性を分子レベルで解く鍵になると考えられる。

3. 展 開

もっとも上流に位置する転写因子をデザインすることで、包括的に遺伝子発現を制御して、細胞の表現型を大きく改変させることができた。また近年では、ジンクフィンガーのDNA結合モチーフをランダムに組み合わせたDNA結合ドメインと転写活性化因子を共役させる

ことで、人工転写因子の創製も行われている。適した転写因子活性を有する株をスクリーニングすることで、熱ストレスや浸透圧ストレス耐性を有する細胞を人工的にデザインして構築することができることも提唱されている¹³⁾。人工転写因子は理論上任意の遺伝子の発現を誘導することが可能であり、さまざまな表現型を示す株を構築することができる。しかし、人工転写因子では、耐性に関する遺伝子群のみを誘導することが難しく、耐性以外の表現型も変化してしまう恐れがある。マスターレギュレーターとなる転写因子の変異デザインによりストレス耐性を誘導できれば、より合理的に耐性酵母を育種することが期待できる。実際に、Pdr1p(R821S)株と個々のABCトランスポーターを過剰発現した株を比べると、Pdr1p(R821S)株の方が有機溶媒環境下で良好に生育することができる。今後さらに、有機溶媒耐性だけでなく熱耐性に関しても、包括的に遺伝子発現を制御して熱耐性を付与することなど、我々が新たに提唱しているマスターレギュレーターをベースにした「マリオネット制御」をコアとする「ストレス耐性工学」を確立していきたい¹⁴⁾。

文 献

- 1) Kanda, T. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **49**, 377 (1998).
- 2) Miura, S. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 4883 (2000).
- 3) Matsui, K. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **71**, 75 (2006).
- 4) Nishida, N. *et al.*: *J. Biotechnol.*, **165**, 145 (2013).
- 5) 黒田浩一：合成生物学の隆起—有用物質の新たな生産法構築を目指して—(第七章), p. 124, シーエムシー出版(2012).
- 6) Nishida, N. *et al.*: *Curr. Genet.*, **60**, 149 (2013).
- 7) Nishida-Aoki, N. *et al.*: *Curr. Genet.*, **61**, 1 (2014).
- 8) Matsui, K. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 4222 (2008).
- 9) Sewell, A. K. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **270**, 25079 (1995).
- 10) Hardy, J. A. *et al.*: *J. Mol. Biol.*, **295**, 393 (2000).
- 11) Satomura, A. *et al.*: *Biotechnol. Prog.*, **29**, 1116 (2013).
- 12) 黒田浩一, 植田充美：生物工学, **6**, 342 (2013).
- 13) Park, K. S. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **21**, 1208 (2003).
- 14) Satomura, A. *et al.*: *Curr. Environ. Eng.*, **1**, 149 (2014).