

出芽酵母の有用物質生産宿主としての汎用性拡大に関する基礎研究

平沢 敬

(大阪大学大学院 情報科学研究科)

研究の目的

酵母のグルコース代謝に関しては、グルコース存在下で呼吸に必要な酵素の遺伝子の発現が抑制されることにより、高濃度のグルコース存在下では非常に高い効率でエタノールを生成する現象 (crabtree effect)が知られている。この特性を生かし、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* はアルコール飲料や近年注目度の高いバイオエタノールなどの生産に主に用いられている。しかしながら、グルコース濃度が高い環境下では出芽酵母の代謝フラックス (流束・フロー)はエタノール生成以外には流れにくいので、出芽酵母を用いてグルコースからエタノール以外の物質を生産させようとする場合には、この重要な特性が障壁となる場合がある。すなわち、酵母を用いてアルコール以外の有用物質を生産させるためには、エタノール生産能の低い宿主を用いることが望ましい。本研究では、出芽酵母の有用物質生産用宿主としての汎用性を拡大させることを目的として、ゲノムスケールの代謝反応モデルを用いた *in silico* でのシミュレーションと一遺伝子破壊株を用いた網羅的解析により、グルコース濃度が高い環境下でもエタノールを生産しないような酵母の破壊株を探索することを試みた。

方法

(1) 酵母 1 遺伝子破壊株セットを用いたエタノールを生産しない破壊株の同定

*S. cerevisiae*の一遺伝子破壊株セット (Yeast *MAT*alpha collection; Open Biosystems)¹⁾をYP10D培地 (2% bacto yeast extract、1% bacto peptone、10%グルコース)にて、96 穴プレートを用いて培養を行った。培養は 30℃ で 2 日間行い、プレートをシールで覆いかつ菌体の沈殿を防ぐために振とうしながら行った。培養終了後遠心分離により培養上清を回収し、エタノール濃度測定に供した。エタノール濃度の測定にはE-液状キットエタノール (Scil Diagnostics GmbH)およびマイクロプレートリーダー (Perkin Elmer)を用いた。得られた測定データから、顕著にエタノール生産が減少した破壊株を同定した。

(2) ゲノムスケールモデルを用いた代謝フラックス予測

本研究では、Duarteらにより再構築された*S. cerevisiae*のゲノムスケールモデル *iND750*²⁾を基盤としたゲノムスケールモデルを用いた。これは、1,268 の反応、646 の代謝物質を扱うモデルとなっている。これらの反応は、細胞質・ミトコンドリア・ペルオキシソーム・核・ゴルジ体・液胞・小胞体の各区画および細胞内外の物質の輸送系を考慮したモデルとなっている。そして、増殖を最大にするという評価を満足するような代謝フラックス分布を、線形計画法を用いて計算した。代謝フラックスの予測はMATLAB 2006b (The Mathworks Inc.)を用いて行い、線形計画法の計算はLINDO API (LINDO Systems Inc.)を用いた。なお本研究では、各代謝反応のフラックスの上限と下限の値を

それぞれ1000 および 1000 (mmol/g dry cell/h)とした。

結果

(1) 酵母 1 遺伝子破壊株セットを用いたエタノールを生産しない破壊株の同定

酵母 1 遺伝子破壊株 4,826 株について、10% グルコースを加えた YP10D 培地にて培養し生成エタノール濃度を測定した。全破壊株のエタノール生産濃度の平均は 33 g/l であった。そこで、本研究では、2 回の培養実験において、ともに 10 g/l 以下という比較的低いエタノール生産濃度を示した破壊株を破壊によりエタノール生産が減少した株とすることとした。その結果、75 株の一遺伝子破壊株を破壊によりエタノール生産が減少した株として同定した。しかしながら、この 75 株のうち 7 株は増殖が他の破壊株に比べて低いためエタノール生産が減少したと考えられたので、以降の解析から除外した。なお、この 7 株の中には酵母のエタノール生産にかかわる主要なアルコールデヒドロゲナーゼをコードする *ADH1* 遺伝子の破壊株が含まれていた。

エタノール生産が減少した株として同定された破壊株において破壊されている遺伝子の機能カテゴリ分類を Table 1 に示す。破壊によりエタノール生産が減少するような遺伝子の機能は多岐にわたることが示されたが、これらの機能の統計的有意性は見いだされなかった (超幾何解析、 $p < 0.01$; data not shown)。

(2) ゲノムスケールモデルを用いた代謝フラックス予測を用いた破壊によりエタノールを生成しない代謝経路の探索

次に、ゲノムスケール代謝反応モデルを用いた代謝フラックス予測をすることにより、破壊によりエタノールを生成しない代謝経路の探索を試みた。なお、すでに報告されている酵母の代謝フラックス分布³⁾と本研究で用いたゲノムスケールによる代謝フラックス分布の予測結果とは良い一致を示すことは確認されている (data not shown)。本研究における代謝フラックスの予測の際には、グルコース比消費速度を 15 mmol/g dry cell/h に、酸素比消費速度を 1 mmol/g dry cell/h に設定した。その結果、エタノール生成の経路以外に解糖系のトリオースリン酸イソメラーゼにより触媒される反応の破壊がエタノールの生成を抑制させることが予測された。しかしながら、この反応を破壊するとエタノール生成は抑制されるものの、解糖系で生じた NADH を再酸化するためにグリセロール生成のフラックスが増加することが明らかとなった。また、この代謝経路以外に破壊することによりエタノール生成が抑えられるような代謝経路を推定することはできなかった。このことは、細胞内の酸化還元バランスを保つためにエタノール生成経路が摂動に対して高い頑強性を有していることを示唆している。

Table 1 Functional categories of the genes whose deletion showed decreased ethanol production by *S.*

GO term	Gene
Transport	<i>PHO88, NUP84, ATG9, PEX7, CUP5, ECM10, FTR1, ATP7, MRS4, PEP3, VRP1, NPL6, YDJ1, TOM70, SLG1, VTC3</i>
Response to chemical stimulus	<i>PRX1, GRX7, BRE1, DHH1, MNI1, HSP104, PEP3, STE11, ASC1, YDJ1</i>
RNA metabolic process	<i>BRE1, DHH1, DEG1, TAD1, CTK2, DLS1, MRS4, DCS1, IKI3, NPL6</i>
Membrane organization	<i>NUP84, ATG9, CUP5, PEP3, VRP1, TOM70, SLG1, VTC3</i>
Response to stress	<i>PRX1, GRX7, NUP84, ATG9, HSP104, STE11, NPL6, SLG1</i>
Transcription	<i>BRE1, CTK2, DLS1, IKI3, NPL6</i>
Protein modification process	<i>BRE1, RUB1, UBP6, CTK2, STE11</i>
Cellular homeostasis	<i>PRX1, FYV5, CUP5, FTR1, VMA13</i>
Protein folding	<i>CNE1, ECM10, HSP104, YDJ1</i>
Generation of precursor metabolites and energy	<i>CYC7, YVH1, ATP7, GLG1</i>
Cell cycle	<i>SAP4, YVH1, BFA1, VRP1</i>
Protein complex biogenesis	<i>ATG9, PEX7, ATP7, PKR1</i>
Vesicle-mediated transport	<i>CUP5, PEP3, VRP1, SLG1</i>
Cytoskeleton organization	<i>VRP1, SLG1, CTF19</i>
Vacuole organization	<i>CUP5, PEP3, VTC3</i>
Chromosome organization	<i>HHT1, BRE1, NPL6</i>
Cellular carbohydrate metabolic process	<i>YVH1, GLG1, HSP104</i>
Mitochondrion organization	<i>ECM10, YDJ1, TOM70</i>
Cellular component morphogenesis	<i>DHH1, VRP1, SLG1</i>
Transposition	<i>HHT1, BRE1, ASC1</i>
Signal transduction	<i>STE11, ASC1, SLG1</i>
Heterocycle metabolic process	<i>GUD1, HIS1, ATP7</i>
Conjugation	<i>DHH1, STE11</i>
Translation	<i>CTK2, ASC1</i>
Cell wall organization	<i>UTR2, SLG1</i>
Peroxisome organization	<i>PEX32, PEX7</i>
Cellular protein catabolic process	<i>CNE1, YDJ1</i>
Cytokinesis	<i>VRP1</i>
Cellular respiration	<i>CYC7</i>
Chromosome segregation	<i>CTF19</i>
Meiosis	<i>YVH1</i>
Vesicle organization	<i>ATG9</i>
Sporulation resulting in formation of a cellular spore	<i>YVH1</i>
Cellular amino acid and derivative metabolic process	<i>HIS1</i>
Nucleus organization	<i>NUP84</i>
Pseudohyphal growth	<i>STE11</i>
Ribosome biogenesis	<i>NUP84</i>
Cellular lipid metabolic process	<i>LRO1</i>
Cell budding	<i>VRP1</i>
Cellular aromatic compound metabolic process	<i>GUD1</i>
Biological process unknown	<i>YBL083C, YBR013C, YDL071C, YDL094C, YDR010C, YDR015C, OMS1, AIM8, YEL028W, MTC7, YEL068C, EMC4, YIL024C, YKR012C, YKR075C, YMR082C, JLP2, YMR279C, YNL043C, YOR059C</i>

Gene ontology (GO) slim terms (process) were used as functional categories. Analysis was performed by using *Saccharomyces* genome database (SGD) gene ontology slim mapper (<http://www.yeastgenome.org/cgi-bin/GO/goSlimMapper.pl>).

結論

本研究では、一遺伝子破壊株の培養実験によるエタノールを生成しない破壊株のスクリーニングとゲノムスケールモデルを用いた代謝フラックス予測に基づいた破壊によりエタノール生成が抑制される代謝経路の探索を試みた。その結果、いくつかの遺伝子を破壊することでエタノール生成を減少させることを可能にすることが示唆された。

本研究で挙げられた候補遺伝子について破壊を行うことでエタノール生成を抑制させ、エタノール以外の有用物質生産に適用させた際の代謝の振る舞いを解析する必要がある。しかしながら、いずれの解析においても、破壊によりエタノール生成が抑えられると予想される遺伝子や代謝経路の候補数は非常に少なかった。このことは、酵母におけるエタノール生成反応は代謝経路の遮断という摂動に対しては非常に頑強であることを示唆しているのかもしれない。今後は、出芽酵母の有用物質生産用宿主としての汎用性を拡大させることめざすには、この頑強なシステムに対して大きなインパクトを与えられるような遺伝子操作あるいは培養条件の設定等が必要になるのかもしれない。

文献

- 1) Winzeler EA, Shoemaker DD, Astromoff A, Liang H, Anderson K, Andre B, Bangham R, Benito R, Boeke JD, Bussey H, Chu AM, Connelly C, Davis K, Dietrich F, Dow SW, El Bakkoury M, Foury F, Friend SH, Gentalen E, Giaever G, Hegemann JH, Jones T, Laub M, Liao H, Liebundguth N, Lockhart DJ, Lucau-Danila A, Lussier M, M'Rabet N, Menard P, Mittmann M, Pai C, Rebischung C, Revuelta JL, Riles L, Roberts CJ, Ross-MacDonald P, Scherens B, Snyder M, Sookhai-Mahadeo S, Storms RK, Véronneau S, Voet M, Volckaert G, Ward TR, Wysocki R, Yen GS, Yu K, Zimmermann K, Philippsen P, Johnston M, Davis RW. (1999) Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science*, **285**, 901–906.
- 2) Duarte NC, Herrgård MJ, Palsson BØ. (2004) Reconstruction and validation of *Saccharomyces cerevisiae* iND750, a fully compartmentalized genome-scale metabolic model. *Genome Res.*, **14**, 1298–1309.
- 3) Jouhten P, Rintala E, Huuskonen A, Tamminen A, Toivari M, Wiebe M, Ruohonen L, Penttilä M, Maaheimo H. (2008) Oxygen dependence of metabolic fluxes and energy generation of *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK113-1A. *BMC Syst. Biol.*, **2**, 60.