

コエンザイム Q10 高生産酵母の育種

川向 誠

(島根大学 生物資源科学部)

研究の目的

コエンザイム Q (CoQ、ユビキノン) は呼吸鎖電子伝達系の必須成分として、真核生物においてはミトコンドリア内で、エネルギー産生に関わる生体内の重要な分子である。コエンザイム Q は、キノン骨格とイソプレノイド鎖からなり、鎖長の異なった種類が自然界には存在する。イソプレノイド鎖が 10 単位のコエンザイム Q10 は年間 300 トンレベルの生産が行われている食品サプリメントとして、市場規模は 1000 億円に達している。CoQ10 の生産はこれまで微生物を用いて行なわれているが、現在使用されている微生物が必ずしも最適化されたものを使っているわけではない。CoQ10 の生産菌は、古典的な変異体を用いた手法で開発されているが、遺伝子工学を利用した CoQ10 生産はまだ取り組まれていない¹⁾。そこで、我々が長年研究対象としてきた分裂酵母に着目して CoQ10 の生合成と生産の研究を行なうことを目的とした。

出芽酵母が CoQ6 (イソプレノイド鎖が 6) を合成するのに対し、分裂酵母は CoQ10 (イソプレノイド鎖が 10) を合成する酵母であるため、ヒト型と同じ CoQ10 を合成する最適な微生物種である。しかしながら、コエンザイム Q の生合成経路は完全には解明されていない。むしろ、これまで想定されていなかった pABA(p-アミノ安息香酸)を介した別の経路が存在することが示唆されていることから、より複雑な生合成経路を想定しないとイケない状況である。そこで、まずはコエンザイム Q の生合成に関わると考えられる 10 個の遺伝子の機能の同定を試みた。それぞれの遺伝子破壊株を作成し、そこで蓄積してくる前駆体の同定を試みた。第 2 に、これまでの研究によって単離したコエンザイム Q 合成に関わる 10 種の遺伝子を分裂酵母内で高発現させることにより、あるいはプロテインキナーゼの遺伝子の欠損株を網羅的に解析して、コエンザイム Q10 の生産を向上させることを目指した。

方法

各種 CoQ 合成の遺伝子を高発現させるために、大腸菌を介した遺伝子のクローニングを行なった。使用したベクターは pREP1 あるいは pREP41 である。分裂酵母で遺伝子破壊株を作成するために、マーカー遺伝子を染色体の相同配列で挟んだ形のものを PCR 法により作成し、相同組換えにより破壊株を作成した。破壊株の確認には、PCR 法とサザンブロット法を用いた。PCR は KOD ポリメラーゼを使用し、標準的な反応条件で行なった。CoQ10 の生産性の検討では、分裂酵母より脂溶性画分を抽出し、薄相クロマトグラフィーで展開した後に、HPLC で分離することにより CoQ10 を定量した。内部標準品に CoQ6 を利用した。硫化水素の定量はメチレンブルー法を用いた²⁾。

結果

分裂酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)のコエンザイム Q 合成に関する遺伝子に関しては、これまでの結果から 10 種の遺伝子の関与が推定される (図 1)³⁾。それらには、イソプレノイド側鎖を合成する酵素としてプレニル 2 リン酸合成酵素 (Dps1+Dlp1) が、その側鎖と PHB を結合させる PHB-トランスフェラーゼ (Ppt1) が、そして、キノン骨格合成していくために、オキシゲナーゼ (Coq6, Coq7)、C-メチルトランスフェラーゼ (Coq5)、O-メチルトランスフェラーゼ (Coq3) がある。加えて、脱炭酸化と水酸化の反応が不可欠であるが、その酵素は同定されていない。一方で、Coq4, Coq8, Coq9 など、CoQ10 の合成には必要であるが、どの反応に関わっているか機能不明の遺伝子産物も報告されている。

そこで、まずはそれらの *coq* 遺伝子破壊株を作成し、その性質を検討した。その結果、呼吸欠損株であること、CoQ10 の合成ができないことを確認した。加えて、硫化水素の発生、定常期における生存率の低下、EMM 最小培地変異株での生育不全、ウラシルの合成系の不全など多面的な表現型が示された。Sulfide-キノン酸化還元酵素が働く反応がミトコンドリア内で存在し、CoQ がその反応に必須であるために、CoQ 欠損株では硫化水素が多量に発生する。新生ウラシル合成系の不全に関する表現型は、CoQ がジヒドロオロト酸の酸化に必要であることを示している⁴⁾。これらの表現型は、コエンザイム Q が呼吸鎖、電子伝達系の必須成分であることと、他の酸化還元反応に必要なこととの多面的な機能を反映したものであると考えられる。

次に各破壊株において、前駆体の蓄積が認められないかを、HPLC とマスマスペクトロメーターで同定を試みた。分裂酵母の *coq7* 破壊株において検出された前駆体と思われる化合物は、マスマスペクトロメーターで同定を行なったところ、DMQ10 であることが判明した。分裂酵母 *coq5* 破壊株においても前駆体と思われる化合物が検出されたが、こちらの化合物は、分子量の推定はできたが、化合物の同定には至らなかった。加えて、これらの研究の過程で、コエンザイム Q をシクロデキストリンに包摂した形で、外から加えた時の生育の影響を評価した。包摂体のコエンザイム Q が分裂酵母の *coq* 欠損株の生育を回復させる能力を有し、抗酸化能力をサポートしていることが判明した⁵⁾。

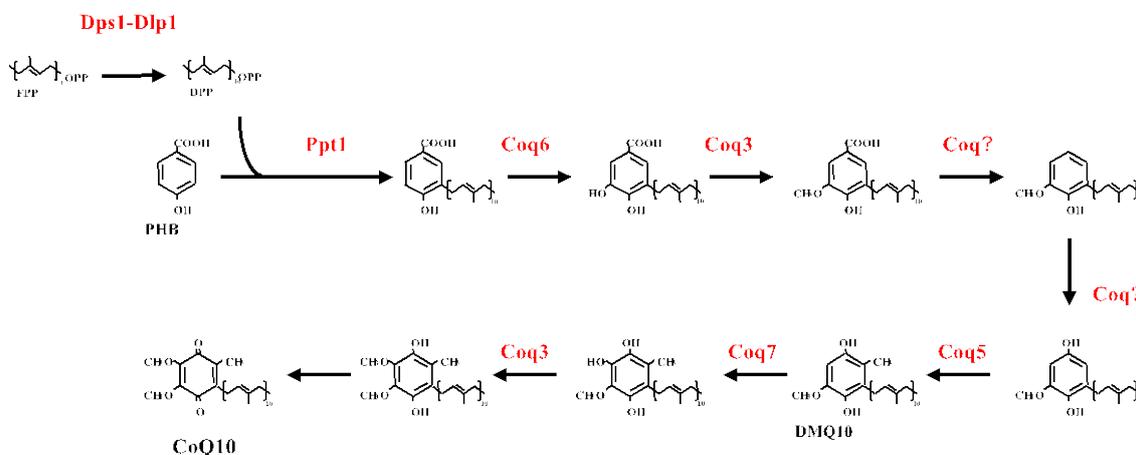


図 1、分裂酵母の推定 CoQ10 合成経路

それぞれの遺伝子産物がどの反応に関与しているかを示している。2カ所に同定されていない酵素がある。これ以外に CoQ10 合成に関わるが、どの反応に関わるかが不明な遺伝子 (*coq4*, *coq8*, *coq9*) が 3 つ存在する。

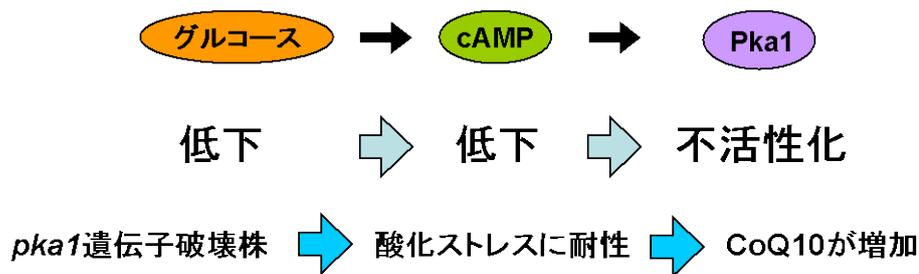


図2、cAMP-PKA シグナル伝達と CoQ10 の生産性への影響

グルコースが低下するとアデニル酸シクラーゼの活性化が起こらず、cAMPは減少し、PKA(プロテインキナーゼ A)は調節サブユニット(Cgs1)と結合したままで、不活性化状態にある。低グルコースの状況下では、CoQ10の量が増加する。

次に、CoQ10の合成に関わる遺伝子を順次発現させる実験を行なった。10種類の遺伝子(*dps1*, *dlp1*, *ppt1*, *coq3*, *coq4*, *coq5*, *coq6*, *coq7*, *coq8*, *coq9*)をベクターに組み込み、単独で発現させるプラスミドを作成した。それぞれの遺伝子を発現させた後、CoQ10の合成量を測定した。その中では、PHB-プレニルトランスフェラーゼをコードする *ppt1/coq2* 遺伝子の高発現が比較的生産性に寄与したが、それでも3割程度の生産性の上昇に留まっていた。さらに、2種類の遺伝子を1つのベクターに組み込み、別々のマーカを有したプラスミドを作成した。2種類を発現させた場合も、期待したほど顕著に CoQ10量を増加させることはなかった。最大、8種の遺伝子を同一の酵母で発現できるように4種のプラスミドを作成した。しかしながら、複数の遺伝子の高発現を試みたところ、逆に生育阻害を引き起こす結果になり、あまり良好な結果は得られなかった。そこで、視点を変えて、分裂酵母のプロテインキナーゼ遺伝子破壊株に注目して、CoQ10の測定を行なった。約70種類あるプロテインキナーゼ遺伝子破壊株の CoQ10を全て測定したところ、*pka1*の破壊株が CoQ10の生産性を顕著に上昇させることが分かった。*Pka1*は調節サブユニットにより制御されるが、その調節サブユニットの *Cgs1*を破壊した株では、CoQ10の生産性は低かった。*Pka1*はcAMP依存性的プロテインキナーゼとして知られている真核生物に保存されているキナーゼであり、分裂酵母内ではグルコースのシグナルに関わっている。そこで、グルコース濃度を変化させた時の CoQ10を測定したところ、低グルコースの方が CoQ10の生産性が高く、高グルコースの時は CoQ10の生産性が低いことが判明した。グルコースが高濃度の時は、*Pka1*が活性化状態にあり、低い時は不活性化状態にあることが分かっているので、グルコースが PKA シグナル伝達系を介して CoQ10の生産に大きく影響することを発見した(図2)。

結論

分裂酵母のコエンザイム Q10 生合成に関わる遺伝子には少なくとも10種あることを見いだした。それぞれの遺伝子破壊株の中には前駆体と思われる物質が蓄積しているものがあり、*coq7* 破壊株では DMQ10 の確認ができた。CoQ10 生合成に関わる遺伝子の高発現により CoQ10 の合成を上昇させるものはあったが、あまり劇的な効果を示すものはなかった。一方、*pka1* 遺伝子を破壊することにより CoQ10 の生産が上昇し、その有用性が示唆された。

文献

- 1) 川向 誠 (2011) コエンザイム Q10 生産微生物の開発、生物工学会誌、89:323-325
- 2) Makoto Kawamukai. (2009) Biosynthesis and bioproduction of coenzyme Q10 by yeasts and other organisms. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 53:217-226
- 3) Risa Miki, Ryoichi Saiki, Yoshihisa Ozoe, and Makoto Kawamukai. (2008) Comparison of a *coq7* deletion mutant with other respiration-defective mutants in fission yeast. *FEBS J.* 275:5309-5324
- 4) Yuzy Matsuo, Kouhei Nishino, Kouhei Mizuno, Takashi Akihiro, Takashi Toda, Yasuhiro Matsuo, Tomohiro Kaino and Makoto Kawamukai. (2013) Polypeptone induces dramatic cell lysis in *ura4* deletion mutants in fission yeast *PLoS ONE* 8(3):e59887
- 5) Tatsuro Nishida, Tomohiro Kaino, Ryo Ikarashi, Daisuke Nakata, Keiji Terao, Masahiro Ando, Hiroo Hamaguchi, Makoto Kawamukai, and Tatsuyuki Yamamoto. (2013) The effect of coenzyme Q10 included by gamma-cyclodextrin on the growth of fission yeast studied by microscope Raman spectroscopy. *J. Molecular Structure.* 375-381