

酵母を育種しバラ・ハチミツの匂いをつくる

小柳 喬

(石川県立大学 生物資源環境学部 食品科学科)

研究の目的

酵母 *Kluyveromyces marxianus* は、耐熱性、幅広い栄養源資化性、および発酵能の高さ等から、産業上有用な菌種として注目を集めつつある。本酵母は、バラ香气成分 2-フェニルエタノール (2PE) の高い産生能をもつことが知られている。2PE は食品や化粧品など様々な着香に使用される香料成分であり全世界で数千トン規模の工業生産が行われているが、そのほとんどは化学合成により担われている¹⁾。

2PE は、ペントースリン酸経路およびシキミ酸経路を経る芳香族アミノ酸合成経路の分岐経路により合成される。フェニルアラニンの前駆体であるフェニルピルビン酸からフェニルピルビン酸脱炭酸酵素 (Ppd, EC 4.1.1.43) によりフェニルアセトアルデヒドが生じ、アルコール脱水素酵素 (Adh, EC 1.1.1.1) により 2PE が生成する (図 1)。²⁾ さらに、アミノ酸からアルコールを生じる Ehrlich 経路により、芳香族アミノ酸アミノ基転移酵素 (EC 2.6.1.5 or 2.6.1.57) の反応を経てフェニルアラニンからフェニルピルビン酸が生じ、2PE 合成が起こることも知られている。本研究では、微生物を生産媒体とした新たな 2PE 合成プロセスの確立を目指して、*K. marxianus*

の 2PE 産生に関わる遺伝子群を取得し組換え体を作製することにより、2PE の生産量を向上させることを試みた。また、中央代謝をはじめとする主要代謝経路のメタボローム解析も実施し、2PE 産生向上株における代謝フロー変化も詳細に解析したので、報告する。

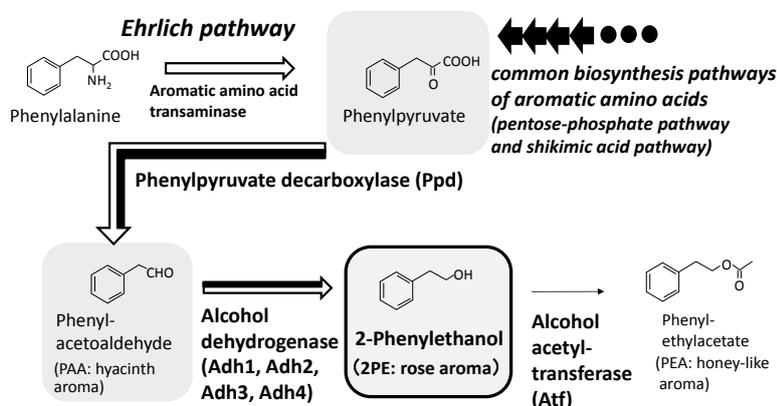


図 1 2PE の生合成経路

方法

1. *K. marxianus* 2PE 産生向上株の作製および評価

本研究に先立ち、Ppd、Adh、および 2PE を酢酸エステル化してフェニル酢酸エチルを合成することが報告されているアルコールアセチル基転移酵素 (Atf, EC 2.3.1.84) のホモログ遺伝子を *K. marxianus* NBRC1777 株のゲノムから探索し、それぞれを欠損する株群を作製している。本欠損株群 (Adh については 4 つのアイソザイムのうちいずれか一つずつを欠損したもの)³⁾ の中で顕著な 2PE 合成低下をみたのは Ppd 欠損株のみであったことから、Ppd が本経路の鍵酵素であると判断した。本酵素の構造遺伝子 (*KmPPD*) をゲノム DNA より PCR

にて増幅し、*Saccharomyces cerevisiae* 由来構成発現プロモーターである glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase プロモーター (*GAPDHp*) の制御下に置き、酵母-大腸菌シャトルベクターである pDblet⁴ 上に導入した。本プラスミドをそのまま *K. marxianus* Δ ura3 Δ trp1 Δ leu2 (NBRC1777 由来株) に導入した菌株、および栄養要求性マーカー (*Schizosaccharomyces pombe* 由来 *URA4* 遺伝子) を含む *GAPDHp*-*KmPPD* 領域を PCR にて増幅した断片をゲノム上に挿入した菌株を作製した。それぞれの株の完成を、PCR およびジゴキシゲニン標識を用いたサザンハイブリダイゼーションにより確認した。2PE 産生量の評価は、培養上清を逆相カラム (Inertsil ODS3, GL Science) を用いた高速液体クロマトグラフィーに供することにより行った。

2. 2PE 産生向上株の代謝物網羅解析

2PE 産生向上株について、メタボローム解析により細胞内の存在化合物を総合的に評価し、*KmPPD* 遺伝子非導入株と比較した。メタボローム解析は、ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ社による CE-TOFMS (カチオンおよびアニオンモード) を用いた受託解析により行った。

結果

KmPPD 遺伝子を *K. marxianus* に導入し追加発現を行った結果、酵母用完全合成培地 (Synthetic complete medium, SC) の培養上清中への 2PE 蓄積量が野生株よりも顕著に向上することが明らかになった (図 2)。このことから、*KmPPD* 遺伝子のコピー数向上が本酵母の 2PE 産生効率を増大させる有効な手段であることが確認された。また、プラスミドにて遺伝子導入を行った株よりも、ゲノム上に遺伝子導入を行った株の方が 2PE 蓄積量が高かった (野生株の数倍) ことから、ゲノムへの遺伝子導入が生産性向上に有効であることが明らかになった。また、生産速度についても、ゲノム導入株において野生株の約 8 倍に向上していた。本株から total RNA を抽出して cDNA を合成し、*KmPPD* 特異的プライマーを使用したリアルタイム PCR に供したところ、遺伝子追加導入による転写量の顕著な向上が確認された。

本結果を受け、遺伝子導入に用いた宿主株 (*K. marxianus* Δ ura3 Δ trp1 Δ leu2)、ゲノム上への *KmPPD* 遺伝子導入株 (Δ ura3 Δ trp1 Δ leu2 *URA4*⁺ *S. pombe*-*KmPPD*⁺)、および栄養要求性マ

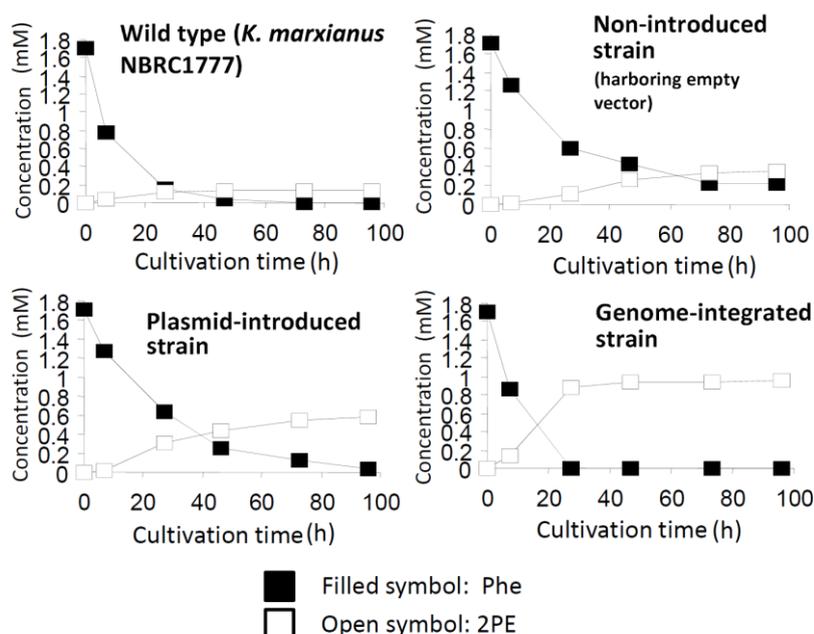


図 2 *KmPPD* 遺伝子導入株による培養上清中への 2PE 蓄積量
 左上: 野生株 (NBRC1777)、右上: ベクターのみの導入株、左下: *KmPPD* 導入株 (プラスミド使用)、右下: *KmPPD* 導入株 (ゲノム上に挿入)

カー遺伝子のみを導入株 ($\Delta ura3 \Delta trp1 \Delta leu2 URA4^+_{S. pombe}$) について、SC 培地を用いて 37°C、140 rpm にて振とうの後に菌体を回収し、菌体内容物をメタボローム解析に供した。その結果、*KmPPD* 追加導入株において、解糖系におけるグルコース-6-リン酸、フルクトース-6-リン酸、フルクトース-1,6-二リン酸、およびジヒドロキシアセトンリン酸の顕著な蓄積が見られ (それぞれ、栄養要求性マーカーのみを導入株よりも 3.4、3.3、5.1、および 4.2 倍の上昇 (検出ピークの面積値より))、ペントースリン酸経路の中間体であるセドヘプツロース-7-リン酸の蓄積量も有意に向上していた (4.1 倍の上昇)。このことから、Ppd の発現量向上によりシキミ酸経路 (フェニルピルビン酸) から分岐する 2PE 合成経路の代謝フローが増大し、それに伴って芳香族アミノ酸合成経路に直結するペントースリン酸経路および解糖系の代謝亢進が見られたことが強く示唆された。すなわち、中央代謝から 2PE 合成に至る一連の経路全体を Ppd の発現量のみを調整することでチューンナップすることが可能であることが示唆された。

結論

酵母 *K. marxianus* における 2PE 合成の鍵酵素である Ppd の構造遺伝子を本菌ゲノム上へ追加導入することにより、2PE 蓄積量を顕著に向上できることが明らかになった。また、同株のメタボローム解析を通して、Ppd 追加発現により解糖系およびペントースリン酸経路の代謝フローが増大し、2PE 産生量の向上につながったことが示唆された。これらの結果から、Ppd の発現量調節が、中央代謝から 2PE 合成までの代謝フロー全体の制御につながることを示唆された。

文献

- 1) Wittmann, C., Hans, M., and Bluemke, W. (2002) Metabolic physiology of aroma-producing *Kluyveromyces marxianus*. *Yeast* **19**:1351-1363.
- 2) Etschmann, M.M.W., Bluemke, W., Sell, D., and Schrader, J. (2002) Biotechnological production of 2-phenylethanol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **59**:1-8.
- 3) Lertwattanasakul, N., Sootsuwan, K., Limtong, S., Thanonkeo, P., and Yamada, M. (2007) Comparison of the gene expression patterns of alcohol dehydrogenase isozymes in the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* and their physiological functions. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**:1170-1182.
- 4) de Souza Junior, C.G. and de Moraes Junior, M.A. (2000) The use of the replicating pDblet plasmid as a cloning vector with enhanced stability in *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnol. Lett.* **22**:43-45.