

ゲノムワイドな網羅的解析を用いた有用微生物の創製



技術解説

平 沢 敬*

Breeding of useful microorganisms using comprehensive genome-wide analyses

Key Words : Metabolic engineering, Breeding, Transcriptome, Stress, Lactate

1. はじめに

代謝工学は「組換え DNA 技術を用いた細胞内の特定の(生化学)反応の改変や新しい反応の導入により、指定された目的物質生産や菌体の特性の改変を目指すこと」と定義されている(1)。微生物を用いた代謝工学の分野においてはこれまで、細胞内の特定の代謝経路に着目してその特性を解析する、あるいは培養プロセスの制御・改変を行うことで、目的物質の生産性向上を目指してきた。しかしながら、細胞は遺伝子・タンパク質・代謝からなる多階層のネットワークが複雑に相互作用して作られるシステムであると考えられるので、細胞状態の一部あるいは培養プロセスにおける特定のパラメータのみに着目して目的とする特性を細胞に付与することには限界がある。すなわち、目的とする特性を細胞に付与するためには、細胞内の状態を詳細かつ包括的に理解することが必要であると考えられる(2)。

1990年代後半から現在に至るまでさまざまな生物のゲノム情報が解読され、また近年のゲノムワイドな網羅的解析技術の発展により、細胞内の多階層のネットワークの変動を網羅的に解析することが可能になってきた。

本稿では、生物のゲノム上にコードされているほぼすべての遺伝子の発現を一斉に測定することが可能である DNA マイクロアレイを用いて取得した遺

伝子発現データ(トランスクリプトームデータ)をもとにした、ストレス耐性酵母の創製と組換え酵母菌株による化学物質生産における生産性の向上について、筆者らの研究を紹介する。

2. DNA マイクロアレイデータ解析をもとにした ストレス耐性酵母の創製

網羅的な遺伝子発現情報から有用特性の付与に有効な遺伝子を探索する場合、個々の遺伝子の機能や相互作用には未知のものも含まれてはいるものの、その中から有効な遺伝子を探索することが要求される。

我々は、清酒醸造や食品製造のみならず近年ではバイオエタノールなどの有用物質の生産に用いられている出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を材料に、ゲノムワイドな網羅的解析データをもとにして、浸透圧ストレスやエタノールストレスに対する耐性を酵母細胞に付与することを試みている(3・4)。酵母を用いた物質生産においては、浸透圧の上昇やエタノールや二酸化炭素の蓄積などが原因となるストレスに細胞がさらされ、その結果、基質の消費や目的物質の生産性が低下するなどの問題が生じる。すなわち、ストレス耐性は酵母を用いた物質生産の分野において非常に有効な表現型であるといえる。

ストレスに耐性を示すような酵母菌株を育種するにあたり我々は、通常実験室レベルで用いられる株(実験室酵母)と清酒醸造に用いられている醸造酵母(協会7号酵母)について、ストレス負荷後の遺伝子発現変動データを取得した。醸造酵母は実験室株に比べてストレスに対する耐性があることが知られており、菌株間の遺伝子発現の違いがストレス耐性に関係があると考えた。ここではエタノールストレスに耐性を示す酵母菌株の創製に関する研究を紹介する(図1)。



*Takashi HIRASAWA

1975年3月生
東京工業大学大学院生命理工学研究科
バイオテクノロジー専攻博士後期課程修了
(2002年)
現在、大阪大学 大学院情報科学研究科
バイオ情報工学専攻 助教 博士(工学)
分子遺伝学・代謝工学
TEL : 06-6879-7431
FAX : 06-6879-7431
E-mail : hirasawa@ist.osaka-u.ac.jp

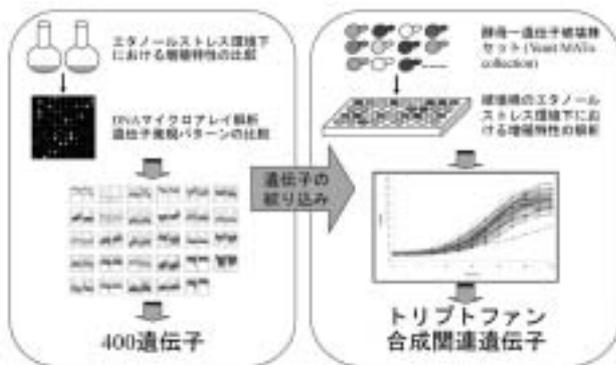


図1 トランスクリプトームデータに基づくエタノール耐性酵母の育種

実験室酵母・醸造酵母を対数増殖中期まで培養した後、5%(v/v)となるようにエタノールを投与し、その後の遺伝子発現の経時的な変動を、DNAマイクロアレイを用いて解析した。そして、取得したDNAマイクロアレイデータを、自己組織化マップと階層型クラスタリングを組み合わせたクラスタリング解析に供することで、菌株間の個々の遺伝子の発現パターンを比較した。菌株間で異なる発現パターンを示すような遺伝子が多く含まれるようなクラスタに着目したところ、着目したクラスタには、プリンヌクレオチド・エルゴステロール(コレステロールの一種)・トリプトファンやリジンなどのアミノ酸の生合成に関連のある遺伝子やストレス応答にかかわる遺伝子を含む約400の遺伝子が含まれていた。

しかしながら約400の遺伝子について過剰発現や破壊の操作を行い、エタノールに対する感受性・耐性を評価するのは困難であり、耐性付与に有効であると思われる遺伝子をさらに絞り込む必要があった。そこで我々は、市販の酵母の一遺伝子破壊株セットを用いることにした。これら400遺伝子の破壊株を96穴マイクロタイタープレートで培養し、対数増殖中期でエタノールを添加してその後の増殖を観察した。その結果、アミノ酸の一種であるトリプトファンの生合成にかかわる酵素をコードする遺伝子の破壊株が、エタノールに対して感受性を示すことが明らかとなった。そこで、トリプトファンの生合成にかかわる酵素の遺伝子を過剰発現させたところ、エタノールを添加した際の比増殖速度が元株に比べて高くなり、耐性を付与することに成功した(図2)。また、トリプトファンの取り込みにかかわるタンパク質の遺伝子の過剰発現や培地へのトリプトファン

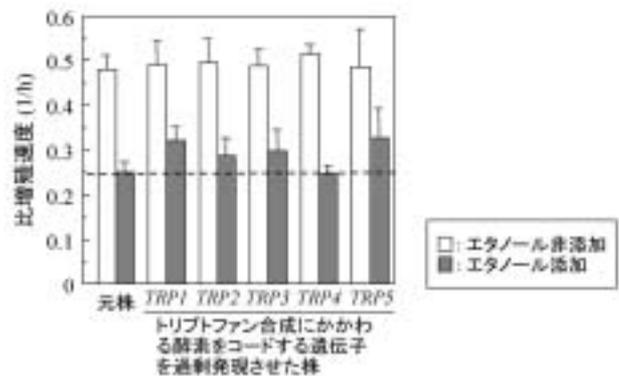


図2 トリプトファン生合成にかかわる酵素をコードする遺伝子の過剰発現によるエタノール耐性の付与
トリプトファン生合成にかかわる酵素をコードする遺伝子(TRP1・TRP2・TRP3・TRP4・TRP5)を過剰発現させた株について、エタノールを添加した際の比増殖速度(細胞のもつ増殖活性)を調べた。多くの過剰発現株において元株に比べて高い比増殖速度を示した。

の添加によってもエタノール耐性を付与することに成功した。エタノールの添加によりトリプトファンの取り込み系が何らかのダメージを受けることが予想され、細胞内のトリプトファン生合成系の強化やトリプトファンの取り込みにかかわるタンパク質の遺伝子の過剰発現により耐性が付与できたものと考えられる。

3. 遺伝子組換え酵母による乳酸生産とDNAマイクロアレイデータをもとにした生産性向上

化石資源の枯渇に備えるべく、化石資源にたよらない新しい化学物質生産、中でも微生物を用いた化学物質生産に注目が集まっている。また微生物を用いた化学物質生産においてバイオマス資源を用いることで、二酸化炭素の増加を抑えて地球環境への負荷を軽減しようとする、カーボンニュートラルな化学物質生産の重要性が高まっている(図3)。筆者らは、生分解性ポリマーの原料である乳酸の微生物による発酵生産に関して、生産微生物のトランスクリプトームデータを取得し、生産性を向上させることに取り組んでいる。

微生物による乳酸の発酵生産は乳酸菌を用いることで達成される。しかしながら、乳酸菌は自身が生産する乳酸の蓄積により引き起こされるpHの低下により、増殖や糖消費が阻害されてしまう。また、低下したpHを中和するために中和剤を添加するため、生産した乳酸の精製や廃液処理に問題が生じる。そ

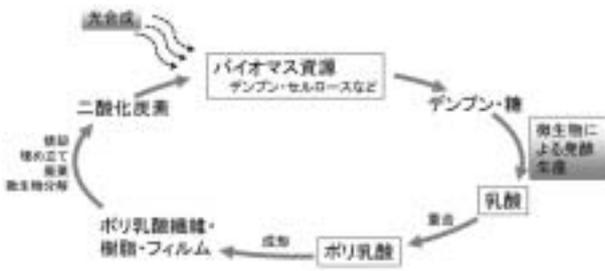


図3 バイオマス資源と微生物による発酵を利用したカーボンニュートラルな乳酸生産

ここで、低pH環境下でもある程度良好に増殖可能である酵母を用いた乳酸生産に注目が集まっており、これまでさまざまな研究がなされている(5・6)。しかしながら、収率の面では化学合成に比べるとまだまだ低いというのが現状であり、さらなる微生物を用いた乳酸生産の生産性向上が望まれる。

筆者らは、酵母に乳酸菌やウシ、ヒト由来のL-乳酸脱水素酵素をコードする遺伝子を導入した組換え酵母(図4)について、DNAマイクロアレイを用いて遺伝子発現情報を取得し、L-乳酸の生産能を付与させたことにより発現が変動した酵母の遺伝子を探索することを試みた(7)。その結果、酵母の全遺伝子(約6,000)のうち15%の遺伝子の発現が大きく上昇あるいは減少していることがわかり、特に、乳酸の資化にかかわる酵素の遺伝子の発現が大きく変動していた。乳酸の資化にかかわる酵素の遺伝子としては、ミトコンドリアに局在するL-乳酸脱水素酵素をコードするCYB2や同じくミトコンド

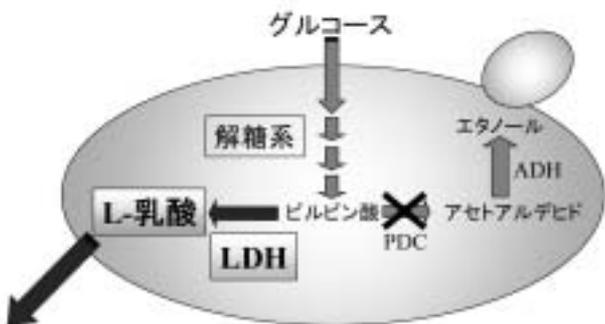


図4 遺伝子組換え酵母による乳酸生産
酵母による乳酸生産においては、ピルビン酸から1反応で乳酸へと変換する反応を触媒する乳酸脱水素酵素(LDH)をコードする遺伝子を導入した菌株を用いる。また、副生成物の生成を抑えるために、エタノール生産に向かう反応を触媒するピルビン酸デカルボキシラーゼ(PDC)をコードする遺伝子も破壊されている。

アに局在するD-乳酸脱水素酵素をコードする*DLDI*が挙げられる。筆者らは、これらの遺伝子の発現が乳酸生産能を付与することにより大きく上昇することを見出した。今回酵母に付与したのはL-乳酸の生産能であるので、*CYB2* 遺伝子の破壊が生産性の向上に有効であると予想された。そこで、L-乳酸生産能を付与した酵母の*CYB2* 遺伝子を破壊し、生産性がどのように変化するかを調べたところ、pH 3.5という低pHの環境下において*CYB2* 遺伝子を破壊した株の生産性が約1.5倍高いということを見出した(図5)。

現在は、取得したトランスクリプトームデータから乳酸生産に関連する遺伝子をさらに探索し、探索された遺伝子の過剰発現や破壊が生産性をさらに向上させることが可能であるのかを検証している。

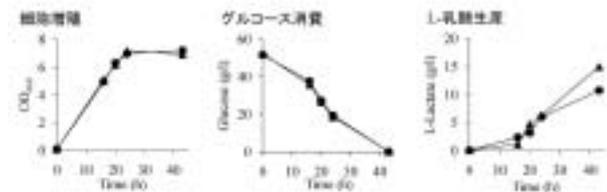


図5 遺伝子組換え酵母による乳酸生産における*CYB2* 遺伝子の破壊の効果
ヒト由来のLDHをコードするcDNAを導入した酵母をpH 3.5という酸性環境下で培養し、乳酸生産を行った。
○: 元株、□: *CYB2* 遺伝子を破壊した株。

4. おわりに

ゲノムワイドな網羅的な解析を用いた有用微生物の創製においては、どのような網羅的情報を取得するか、取得した網羅的情報をどのように処理するか、また取得した網羅的な情報からどのようにして目的とする特性を付与する方策を導き出すのか、が重要となる。しかしながら、トランスクリプトームを例にすれば、取得したトランスクリプトームデータから発現が変化する遺伝子を抽出することはできるが、どのように発現が変動した遺伝子をどのように操作すれば目的とする特性を細胞に付与することができるのか、その体系的な方法論はいまだ確立されていない。

現在筆者らは、細胞の遺伝子発現と表現型の間にはどのような関係があるのか、すなわち遺伝子発現

からどこまで表現型にせまれるか(予測できるか)を、上記の酵母の一遺伝子破壊株セットを用いて解析を行っている。4,000以上の破壊株の表現型を高精度かつハイスループットに解析する系を構築し、網羅的な表現型情報を取得し、遺伝子発現とどのような相関があるのか解析を進めている(8)。もし、遺伝子発現情報から表現型を予測することが可能になれば、有用細胞創製の分野において非常に有効なツールとなるものと期待される。

5. 参考文献

1. グレゴリ N. ステファノポラス・ジェンスニールセン・アリストス A. アリストイド著、清水 浩・塩谷捨明訳、代謝工学 原理と方法論(東京電機大学出版局)
2. 「生物生産」分野に関する科学技術未来戦略ワークショップ報告書(科学技術振興機構・研究開発戦略センター)
3. T. Hirasawa, Y. Nakakura, K. Yoshikawa, K. Ashitani, K. Nagahisa, C. Furusawa, Y. Katakura, H. Shimizu, S. Shioya.(2006) Comparative analysis of transcriptional responses to saline stress in the laboratory and brewing strains of *Saccharomyces cerevisiae* with DNA microarray. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **70**: 346-357.
4. T. Hirasawa, K. Yoshikawa, Y. Nakakura, K. Nagahisa, Y. Katakura, C. Furusawa, H. Shimizu, S. Shioya. (2007) Identification of target genes conferring ethanol stress tolerance to *Saccharomyces cerevisiae* based on DNA microarray data analysis. *J. Biotechnol.* **131**: 33-44.
5. N. Ishida, S. Saitoh, T. Onishi, K. Tokuhira, E. Nagamori, K. Kitamoto, H. Takahashi. (2006) The effect of pyruvate decarboxylase gene knockout in *Saccharomyces cerevisiae* on L-lactic acid production. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **70**: 1148-1153.
6. N. Ishida, T. Suzuki, K. Tokuhira, E. Nagamori, T. Onishi, S. Saitoh, K. Kitamoto, H. Takahashi. (2006) D-lactic acid production by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biosci. Bioeng.* **101**: 172-177.
7. 平沢 敬、大久保亜紀、吉川勝徳、永久圭介、古澤 力、清水 浩 酵母を用いたL-乳酸生産に対する *CYB2* 遺伝子破壊の効果 日本農芸化学会 2008 年度大会講演要旨集 2A25p14
8. 吉川勝徳、田中忠昌、永久圭介、平沢 敬、古澤 力、清水 浩 浸透圧・エタノールストレス環境下における酵母1遺伝子破壊株の網羅的解析 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会(BMB2007)講演要旨集 1P-1033・1T12-4

