

植物有用アルカロイドの安定供給を目指した  
大腸菌－ピキア酵母共培養系の確立と輸送工学

2024

医薬細胞生物学

潤井 みや



# 目次

## 略語表

序論-----	1
本論-----	8

## 第1章 植物有用アルカロイド生産を目的とした

大腸菌 – ピキア酵母共培養系の構築と改良-----	8
1-1 緒言-----	8
1-2 結果-----	10
1-2-1 複数のピキア酵母用培地による ピキア酵母の増殖およびスチロピン生産性の検討-----	10
1-2-2 ピキア酵母用 BMMY 培地での大腸菌の増殖とレチクリン生産性の検討-----	13
1-2-3 大腸菌とピキア酵母の共培養によるスチロピン生産性の検討-----	16
1-2-4 スチロピン生産性低下の原因と課題-----	18
1-2-5 大腸菌の誘導培養導入による共培養系の改良-----	20
1-2-6 ピキア酵母の植菌量によるスチロピン生産性の検討-----	22
1-2-7 メタノールの追加添加によるスチロピン生産性の増加-----	23
1-3 考察-----	24
1-4 小括-----	26

## 第2章 植物有用アルカロイド生産の効率化を目指した

大腸菌 – ピキア酵母共培養系での輸送体発現による生産性の検討-----	27
2-1 緒言-----	27
2-2 結果-----	28
2-2-1 NtJAT1 遺伝子導入ピキア酵母の作出-----	28
2-2-2 NtJAT1 発現ピキア酵母の選抜-----	29
2-2-3 NtJAT1 発現によるスチロピン生産性の検討-----	30
2-3 考察-----	31
2-4 小括-----	32
総括-----	33
謝辞-----	35
実験の部-----	36
使用試薬・機器等について-----	36
第1章 実験の部-----	40
第2章 実験の部-----	45
参考文献-----	49

## 略語表

本文において以下の略語を用いた。

ABC: ATP-binding cassette

*Ab: Atropa belladonna*

AOX: alcohol oxidase

*At: Arabidopsis thaliana*

ATP: adenosine triphosphate

BBE: berberine bridge enzyme

BIA: benzylisoquinoline alkaloid

BMM: buffered minimal methanol

BMMY: buffered methanol-complex medium

BUP: BIA uptake permease

CBB: coomassie brilliant blue

*Cj: Coptis japonica*

CNMT: coclaurine *N*-methyltransferase

CYP: cytochrome P450

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid

ESI: electron spray ionization

IPTG: isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside

JAT: jasmonate-inducible alkaloid transporter

LB: Luria Bertani

MAO: monoamine oxidase

MATE: multidrug and toxic compound extrusion

MD: minimal dextrose

MM: minimal methanol

NCS: norcoclaurine synthase

N.D.: not detected

NPF: nitrate transporter1/peptide transporter family

*Nt*: *Nicotiana tabacum*

OD: optical density

OMT: *O*-methyltransferase

PBS: phosphate-buffered saline

PCR: polymerase chain reaction

PUP: purine permease

PVDF: polyvinylidene difluoride

RDB: regeneration dextrose base

rpm: revolutions per minute

SD: standard deviation

SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

TE: Tris and EDTA

UMAMIT: usually multiple amino acids move in and out transporter

UPLC-MS: ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry

YNB: yeast nitrogen base

YPD: yeast extract, peptone and dextrose

## 序論

植物は様々な特化 (二次) 代謝産物を生産しており、その中には医薬品やその原料として用いられているものも多い。しかし中には、植物中の含有量が少ない、植物自体を輸入に依存している、その化学合成が困難で高コストといった、現在または今後の供給に向けて課題がある化合物も存在する。<sup>1)</sup> 例えば抗がん剤アブラキサン<sup>®</sup>の原料であるタキソール (パクリタキセル) はイチイの樹皮から抽出されているが、乾燥重量当りに含まれるタキソールは約 0.01% である。タキソールの全合成の方法は解明されているが、50 ステップ以上の工程を要し、商業的な生産にはコストがかかりすぎる。抗がん剤エクザール<sup>®</sup>の原料であるビンブラスチンやオンコビンの原料であるビンクリスチンもニチニチソウから抽出されており、乾燥した葉にビンブラスチンは 0.00003%、ビンクリスチンは 0.0004% しか含まれていない。<sup>2)</sup> また立体中心が複数あるため、多段階の化学合成では大量生産が困難である。<sup>3)</sup> この問題を解決するため、これまでに生合成研究が進められ、植物や培養細胞から生合成酵素遺伝子の単離・解析が行われてきた。さらに、植物から単離した遺伝子子を大腸菌 (*Escherichia coli*) や出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) などの微生物に導入し、植物の有用化合物を微生物に生産させる合成生物学が発展してきた (Fig. 0-1)。これまでに、オピオイド系鎮痛剤の原料となるテバインや、抗マラリア薬アルテミシニンの前駆体であるアルテミシニン酸、鎮痙剤の原料となるスコポラミンなど複数の有用化合物の微生物生産が報告されている。<sup>4-9)</sup>

しかし、生合成経路の伸長による微生物の増殖不良や、基質や生産物からの生合成酵素へのネガティブフィードバック<sup>10, 11)</sup> などにより、菌体内での生産量が少ない化合物もある。また、全ての生合成経路を 1 細胞内で構築することは、実験作業的にも大変困難である。この課題の解決策として、微生物共培養法が挙げられる。この方法では、2 つ以上の菌体を使用するため、生合成経路を複数の細胞に分割することにより、代謝による菌体への負担も軽減され、またそれぞれの細胞内代謝経路を構築する困難さも、全ての経路を構築する場合よりも容易となる。とくに、多くの植物特化代謝産物は、レチクリンやストリクトシジン、スクアレンなど共通した中間体から多様に派生している (Fig. 0-2)。そのため、中間体までを生産する菌株と、中間体以降の反応を担う菌株とをそれぞれ構築し、それらを共培養することで、より短時間かつ効率的に目的化合物の生産が可能になると考えられる。<sup>12)</sup> 共培養法では生合成経路の部分的な最適化を行いやすく、例えば Jones らは、大腸菌の共培養で炭素源や培養温度、菌株の混合比率などを検討することで、フラボノイドの生産性を、1 細胞内

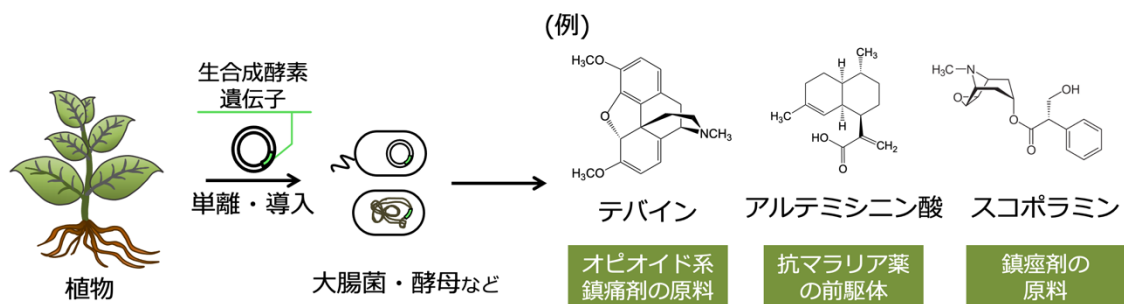


Fig. 0-1. 合成生物学のイメージ図

植物から単離した生合成酵素の遺伝子を微生物に導入し、それらに植物特化代謝産物を生産させることができる。

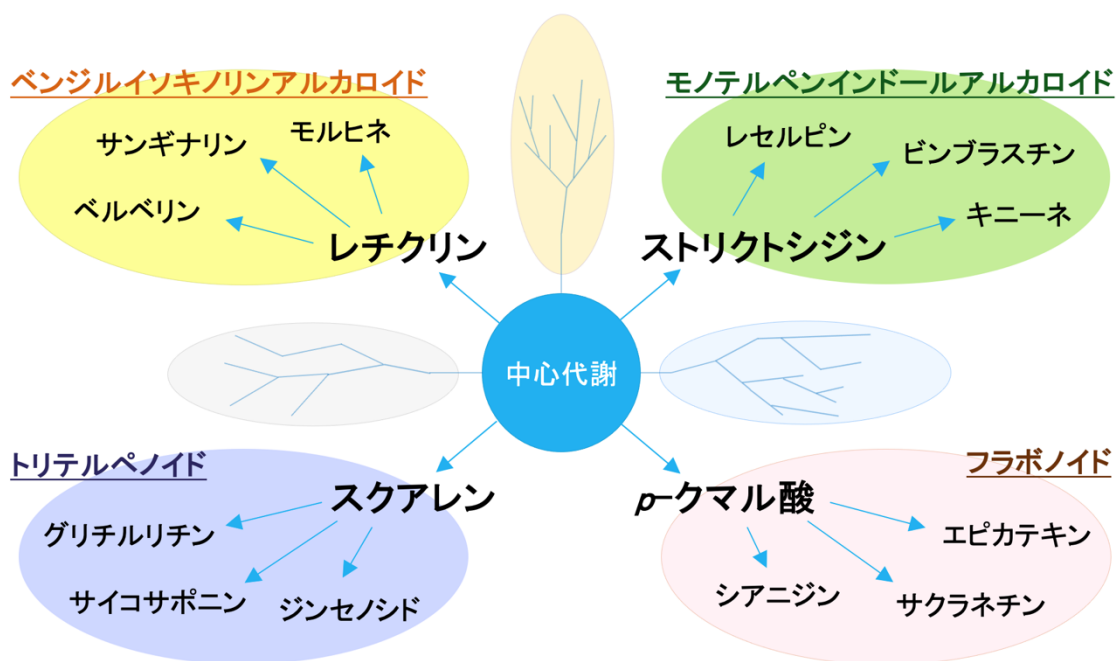


Fig. 0-2. 共通中間体から派生して作られる様々な植物特化代謝産物



で構築した場合に比べて、970 倍向上させた。<sup>13)</sup> その他にも大腸菌同士の共培養によって抗菌活性や抗炎症活性を有するサクラネチン<sup>14)</sup> や染料として用いられるインディゴ<sup>15)</sup> などの生産が報告されている。

また、生合成経路内では様々な種類の生合成酵素が働いているが、それぞれの発現・機能に適した宿主生物や細胞内小器官などは異なっている。1つの菌株を用いる単培養では1つの生物や細胞内小器官しか提供できないため、選択した宿主生物が生合成経路に含まれる全ての生合成酵素の発現・機能に適している訳ではない。一方、複数の宿主生物を組み合わせられる共培養では、それぞれの生合成酵素に適した宿主を選択することができる。例えば、CYP (cytochrome P450) は一般的に大腸菌での機能的発現は難しいとされており、真核生物で小胞体など細胞内小器官を有する出芽酵母などでの発現が一般的である。そこで Zhou らは、生合成経路中の CYP を出芽酵母に組み込むことで、大腸菌と出芽酵母の共培養により、単一菌体ではできなかったタキソール前駆体の生合成に成功している。<sup>16)</sup> この例のように、複数種類の微生物を使うことで、より効率の良い生産が可能となる場合がある。これまでに、大腸菌と出芽酵母の共培養によりマグノフロリンやナリングニン、レスベラトロールなどの生産が報告されている。<sup>8, 17, 18)</sup> 最適な増殖温度や環境の異なるこれら微生物の共培養では、用いる培地や培養温度、微生物の混合比率が重要な検討事項となる。Yuan らは、大腸菌と出芽酵母の共培養でグルコースからレスベラトロールの生産系を構築したが、まず培地の検討を行い、細胞の増殖とレスベラトロールの生産性が良い培地を選んだ。<sup>8)</sup> 次に、培養温度と菌の混合比率を検討し、生産性の高い培養温度を決定するとともに、後半の生合成経路を担う酵母の割合が多い方がレスベラトロールの生産性が高くなることを見出した。ただし、酵母の割合が多いほど生産性が高くなる訳では無く、酵母：大腸菌 = 1:1 で最も高く、10:1、100:1 の順で生産性は低下した。大腸菌と出芽酵母以外にも、出芽酵母と放線菌 (*Actinotalea fermentans*)<sup>19)</sup> や大腸菌とコリネバクテリウム (*Corynebacterium glutamicum*)<sup>20)</sup> の共培養による化合物生産も報告されている。

宿主生物としては、これまで大腸菌や出芽酵母が主に用いられてきたが<sup>21)</sup>、ピキア酵母 [*Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*)、メタノール資化性酵母] はタンパク質を大量に発現でき、CYP などオルガネラ膜に発現する酵素による修飾にも適することから、生物変換の新たな宿主として近年に注目を集めている。<sup>22)</sup> これまでにピキア酵母を用いて、ノートカトン<sup>23)</sup>、ダンマレジオール II<sup>24)</sup>、モナコリン J やロバスタチン<sup>25)</sup>、スチロピン<sup>26)</sup>、ナリングニンやノルコクラウリン<sup>27)</sup> など様々な特化代謝産物の生産が報告されている。最近では、ビンブラスチンを構成するカサランチンの生産も報告されている。<sup>28)</sup> ピキア酵母は

メタノールを炭素源として利用できるメタノール資化性酵母である。アルコールオキシダーゼ [AOX (alcohol oxidase)] でペルオキシソーム内のメタノールを酸化し、生じたホルムアルデヒドを代謝し、エネルギーや細胞膜構成成分として利用している。ピキア酵母の AOX には AOX1 と AOX2 があるが、主な働きは AOX1 が担っている。AOX1 遺伝子の上流には強力な誘導性プロモーターが存在し、その遺伝子発現はメタノールにより厳格に制御されている。そこで、ピキア酵母で異種タンパク質を発現させる場合、目的タンパク質の遺伝子を AOX1 プロモーターの制御下に導入することで、目的タンパク質の転写、翻訳をメタノールにより誘導している。これらメタノールを含むピキア酵母用の培地には、MM、BMM、BMMY など複数の組成のものがあり、また先行研究においてピキア酵母でのタンパク質発現に BM という培地も用いられているが (Table 0-1)、それら培地による目的産物の生産性変化についてはほとんど知見がなく、また、他の菌株との共培養系についても報告がない。ピキア酵母に関するこれら知見を得ることで、新たな有用代謝物生産系の構築が可能になると期待される。

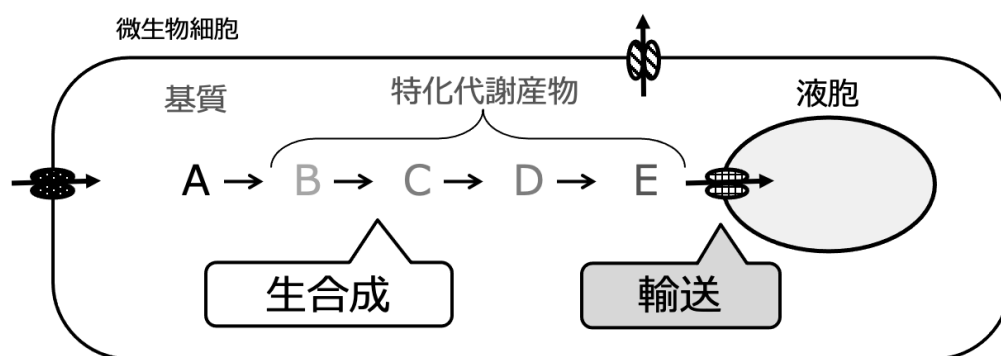
共培養系により、様々な有用化合物の生産が可能になってきたが、より効率的な生産系の構築のためには、中間体の化合物の菌体間での受け渡し (排出と取り込み) や、最終産物の培地への排出の促進などが求められる。また、アルテミシニン酸を生産させた出芽酵母では、ABC [ATP (adenosine triphosphate) -binding cassette] 輸送体を含めたストレス応答遺伝子が発現誘導されることも報告されており<sup>11)</sup>、合成生物学による多様な有用化合物の安定かつ大量生産系を構築するためには、さらなる手法の開発が求められている。これらの課題解決の一つの手法として、植物特化代謝産物に対する輸送体分子の導入・発現による輸送工学が注目されている (Fig. 0-3)。<sup>29)</sup>

輸送工学は、植物における特化代謝産物の輸送体の解析とともに進んできた。植物細胞での特化代謝産物の安定生産は、生合成と輸送が協調することが重要であることがわかってきたこともあり<sup>30)</sup>、これまで、特化代謝産物を輸送する多くの植物輸送体が単離・同定されてきている。<sup>30-35)</sup> 同定された特化代謝産物の輸送体タンパク質は、ABC、MATE (multidrug and toxic compound extrusion)、NPF (nitrate transporter1/peptide transporter family)、PUP (purine permease) および UMAMIT (usually multiple amino acids move in and out transporter) の5つのファミリーに分類される。<sup>29, 36)</sup> ABC 輸送体は ATP の加水分解によるエネルギーで基質を輸送しており、アルカロイドやフラボノイド、テルペノイドなど多様な特化代謝産物の輸送を担う。例えばオウレン (*Coptis japonica*) 植物において、ベルベリンは根で生合成された後、根茎へと転流・蓄積されていることが知られているが、ABC 輸送体である CjABCB1 と

**Table 0-1.** ピキア酵母用培地の組成

成分 (終濃度)	MM	BMM	BM	BMMY
Methanol	0.5%	0.5%	1%	0.5%
YNB (Yeast Nitrogen Base)	1.34%	1.34%	-	1.34%
Biotin	$4 \times 10^{-5} \%$	$4 \times 10^{-5} \%$	-	$4 \times 10^{-5} \%$
Potassium phosphate buffer, pH 6.0	-	100 mM	-	100 mM
Yeast extract	-	-	0.5%	1%
Peptone	-	-	-	2%

MM: minimal methanol BMM: buffered minimal methanol BMMY: buffered methanol-complex medium



**Fig. 0-3.** 微生物での効率的な特化代謝生産モデル

微生物の細胞膜や液胞膜に輸送体を発現させ、基質の細胞内への取り込みを促進したり、代謝産物を細胞外や液胞内に隔離することで細胞質中の濃度を下げたりすることで、より効率的な生産を目指す輸送工学が発展してきている。

CjABCB2 が根茎の道管付近の細胞の細胞膜で発現し、ベルベリンを道管から細胞内に取り込んでいると考えられている。<sup>37-39)</sup> MATE 輸送体はプロトンアンチポーター (対向輸送体) として基質を細胞質から細胞外や液胞内などに排出し、アルカロイドやフラボノイドの輸送報告が多い。例えばタバコ (*Nicotiana tabacum*) 植物において、細胞質から液胞内へのニコチンの輸送に関与する NtJAT1 (jasmonate-inducible alkaloid transporter 1) は液胞膜に局在し、ニコチン/プロトンアンチポーターとして機能することが報告されている。<sup>40)</sup> NPF と PUP ファミリーに属する輸送体は、プロトンシンポーター (共輸送体) として基質を細胞質へと取り込む。例えばトマト果実において、未成熟期には苦み成分である  $\alpha$  トマチンは液胞内に蓄積されているが、成熟期になると液胞膜に局在する NPF 輸送体 GORKY により液胞から細胞質へ輸送され、苦みのないエスクレオシドに変換される。<sup>41)</sup> PUP の例としては、ケシ (*Papaver somniferum*) 植物において、チロシンからテバインまでは師部細胞で生合成された後、乳管細胞の細胞膜で発現するベンジルイソキノリンアルカロイド [benzyloisoquinoline alkaloid (BIA)] 輸送体 BUP1 (BIA uptake permease 1) によってテバインが乳管細胞に輸送され、モルヒネに変換される。<sup>42)</sup> アミノ酸輸送体として知られる UMAMIT は、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 植物において辛味成分であるグルコシノレート、電気化学的勾配に従って生合成細胞からアポプラストへ排出することで種子におけるグルコシノレート蓄積に働くことが近年見出された。<sup>36)</sup>

輸送体に関するこれら知見を活かして、生産菌に輸送体を発現させた輸送工学の解析が進んできた。MATE 輸送体については、上記の NtJAT1 をレチクリン生産性大腸菌に発現させたところ、培地へのレチクリン分泌が 14 倍向上したことが報告されている。<sup>43)</sup> 同じく MATE 輸送体であるシロイヌナズナ由来の AtDTX1 に関しても、レチクリン生産性大腸菌に発現させたところ、レチクリンの培地への分泌が 11 倍向上しており、さらにトランスクリプトーム解析から、菌体内でのレチクリン生産に関わる代謝経路が亢進していることも明らかとされた。<sup>44)</sup> PUP 輸送体である BUP1 を、レチクリンからテバインを生産するよう改変された出芽酵母に発現させ、培地中にレチクリンを添加したところ、その生産性が 5 倍以上向上したことも報告されている。<sup>42)</sup> またベラドンナ (*Atropa belladonna*) 植物において、スコポラミンやヒヨスチアミンは液胞内を含めた様々な細胞内小器官を介して生合成される。その生合成経路を模倣し、液胞などを介してヒヨスチアミンを生産するよう改変された出芽酵母に、液胞内へ中間体を輸送する MATE 型輸送体 NtMATE2 と、液胞内で代謝を受けて生産されたリットリンを細胞質に輸送する AbPUP1 も発現させたところ、ヒヨスチアミンの生産性が 100 倍以上向上した。<sup>45)</sup> このように輸送工学に関する知見は報告例が増えて

きたが、ピキア酵母を用いた特化代謝産物に関する報告例はなく、また共培養系での事例も限られているのが現状である。

そこで著者は、微生物による有用物質生産の可能性をさらに開拓することを目指し、新たな微生物共培養法の確立と、輸送工学の実例を増やすことを考えた。第一に、アミノ酸など一次代謝産物の大量生産能を有し、アミノ酸から派生するアルカロイド中間体の生合成に適した大腸菌と、以降の CYP などによる修飾反応に適したピキア酵母の共培養による、簡便で効率的な化合物の生産系の開発を着想した。すなわち、大腸菌とピキア酵母の共培養系を世界に先駆けて確立し、多様な物質生産を可能とすることを目指した。第二に、ピキア酵母に排出輸送体を導入して、目的産物の生産が共培養系においても向上できるかを検討することとした。そのモデルとして、植物有用アルカロイドの中間体であるレチクリンをグルコースやグリセロールなどの安価な炭素源から生産できる大腸菌<sup>46)</sup> と、レチクリンから植物有用アルカロイドであるスチロピンを生産できるピキア酵母<sup>26)</sup> を用いた。まず、第1章では、異なる微生物の共培養で重要な検討事項である培地の種類や大腸菌とピキア酵母の混合比率について検討を行い、スチロピン生産性を指標に評価し、共培養の条件を決定した。第2章では、第1章で構築した共培養系の生産性をより高めるために、排出輸送体をピキア酵母に発現させ、スチロピン生産性を指標に評価した。

## 本論

### 第1章 植物有用アルカロイド生産を目的とした

#### 大腸菌 - ピキア酵母共培養系の構築と改良

##### 1-1. 緒言

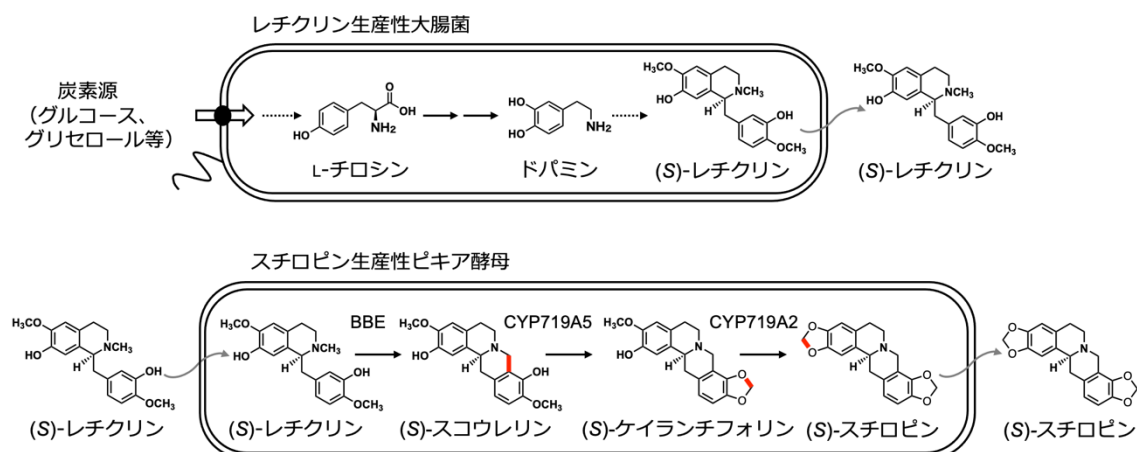
本章では、大腸菌とピキア酵母の共培養系の確立を試みた。そのモデルとして、グルコースなどの炭素源からアルカロイドの重要中間体レチクリンを生産する大腸菌 (AN2104 株) とレチクリンからスチロピンアルカロイドを生産するピキア酵母 (B52株) を用いることとした (Fig. 1-1)。

レチクリン生産性大腸菌は、大腸菌 BL21 株に、グルコースなどの炭素源からレチクリンの生成に関与する 14 遺伝子が 4 つのベクター (抗生物質耐性はそれぞれ、ampicillin、chloramphenicol、spectinomycin、tetracycline) により導入されている。炭素源からペントースリン酸経路を経てチロシン、ドパミンを生産し、さらにレチクリンへの変換を担う酵素 MAO (monoamine oxidase)、NCS (norcoclaurine synthase)、6OMT (norcoclaurine 6-*O*-methyltransferase)、CNMT (coclaurine *N*-methyltransferase)、4'OMT (3'-hydroxy-*N*-methyl-(*S*)-coclaurine 4'-*O*-methyltransferase) によりレチクリンを高生産する。<sup>46)</sup> これらの酵素の発現は、IPTG (isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside) の添加により誘導される。

スチロピン生産性ピキア酵母は、イソキノリンアルカロイドの共通中間体レチクリンからのアルカロイド生産のモデルとして、レチクリンからスチロピンまでの経路が構築されている。BBE (berberine bridge enzyme) によってレチクリンからスコウレリンを生成し、さらに CYP719A5 がスコウレリンをケイランチフォリンに、CYP719A2 がケイランチフォリンをスチロピンに変換する。<sup>26)</sup> これら酵素遺伝子は pAO815 ベクターによりピキア酵母 GS115 株に導入され、相同組換えによってピキア酵母のゲノム中に組み込まれている。pAO815 は、異種タンパク質の発現誘導のために強力な AOX1 プロモーターを利用しており、導入したこれら生合成遺伝子の転写・翻訳はメタノールの添加で誘導される。

大腸菌とピキア酵母に関しては、これまでに共培養生産系の報告は一例もなく、培地選択などの検討を必要とした。そこで本章では、これらの菌の培養にあたり、スチロピン生産に適したピキア酵母の培地の選択を行い、そのピキア酵母用の培地での大腸菌の増殖とレチ

クリン生産を確認した。さらに、共培養時の大腸菌とピキア酵母の混合比率を検討するとともに、より生産性の高い改良系の開発を試みた。



**Fig. 1-1.** 炭素源からのスチロピン生産に使用した大腸菌とピキア酵母

レチクリン生産性大腸菌 (AN2104 株) はグルコースやグリセロールなどの炭素源から (S)-レチクリンを生産する。スチロピン生産性ピキア酵母 (B52 株) は (S)-レチクリンから BBE、ケイランチフォリン合成酵素 (CYP719A5)、スチロピン合成酵素 (CYP719A2) により (S)-スチロピンを生産する。

## 1-2. 結果

### 1-2-1. 複数のピキア酵母用培地によるピキア酵母の増殖およびスチロピン生産性の検討

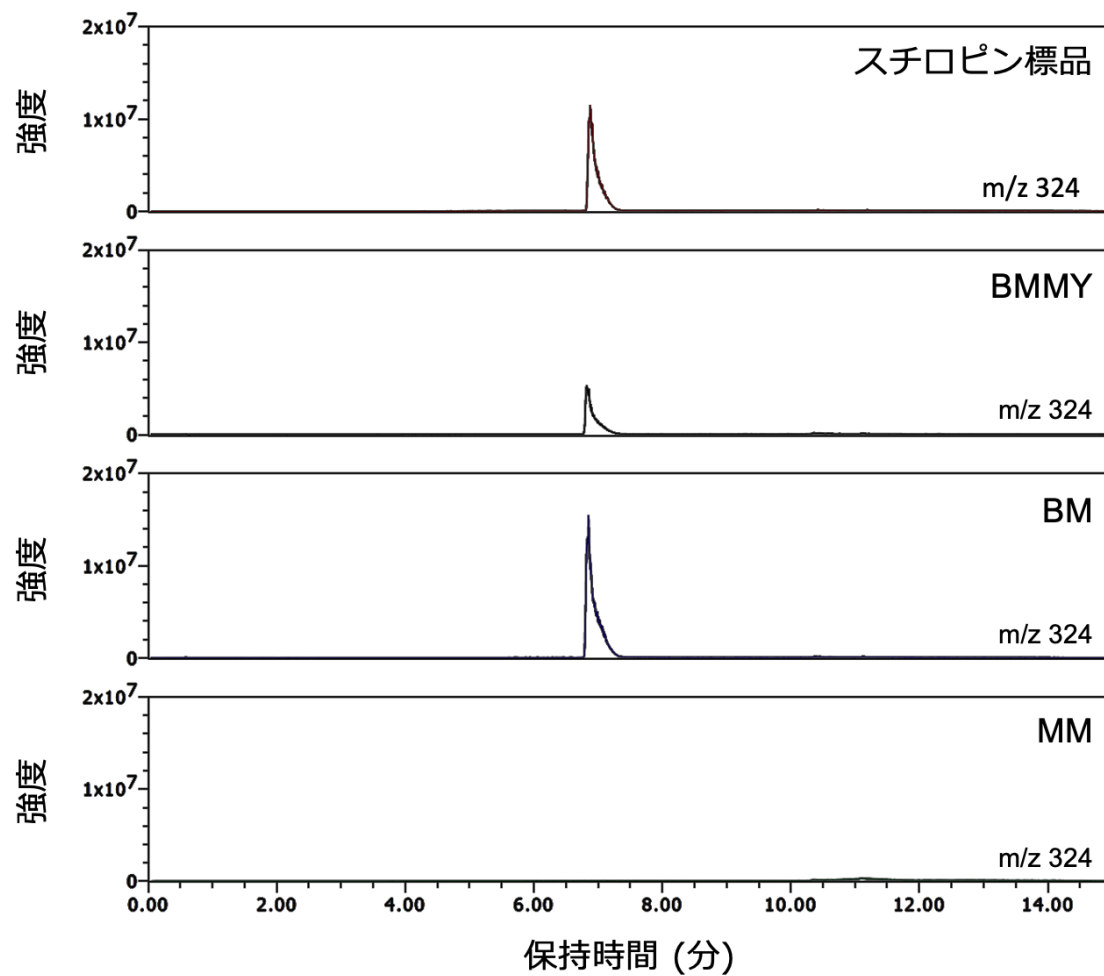
大腸菌とピキア酵母を共培養するにあたり、ピキア酵母用の培地 MM、BMM、BM、BMMY (Table 0-1) によるピキア酵母におけるスチロピン生産性の違いを調べ、ピキア酵母を用いた微生物変換に適した培地の検討を行った。

まずスチロピン生産性ピキア酵母を YPD (yeast extract, peptone and dextrose) 培地で培養し、生合成酵素の発現が誘導されるメタノール含有培地 MM、BMM、BM、BMMY に OD (optical density) <sub>600</sub> = 0.6 で植菌した。そこにレチクリン (終濃度 100  $\mu$ M) を基質として添加し、培養開始から 6、18、24、48、72 時間の時点で細胞の増殖を測定するとともに、菌体と培地に分けてサンプリングを行った。スチロピン生産量について UPLC-MS (ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry) を用いて定量解析したところ、MM 培地を用いた場合は菌体、培地ともにスチロピン ( $m/z$ =324、ポジティブイオンモードで検出) が検出されなかったが、その他の培地を用いた際にはスチロピンの生産が観察された (Fig. 1-2、1-3)。

ピキア酵母の増殖は、吸光度計で測定した OD<sub>600</sub> 値を指標に計測した。18~24 時間まで指数関数的な増殖を示し、その後は定常期を示した (Fig. 1-3a)。BMM 培地を用いた場合は OD<sub>600</sub> = 4 で定常期に入ったが、BM 培地を用いた際には OD<sub>600</sub> = 14、BMMY 培地を用いた際には OD<sub>600</sub> = 12 で定常期に入った。すなわち、BM や BMMY 培地を用いた場合、BMM 培地を用いた場合より増殖が良好で、両培地間でその増殖に大きな差は無かった。

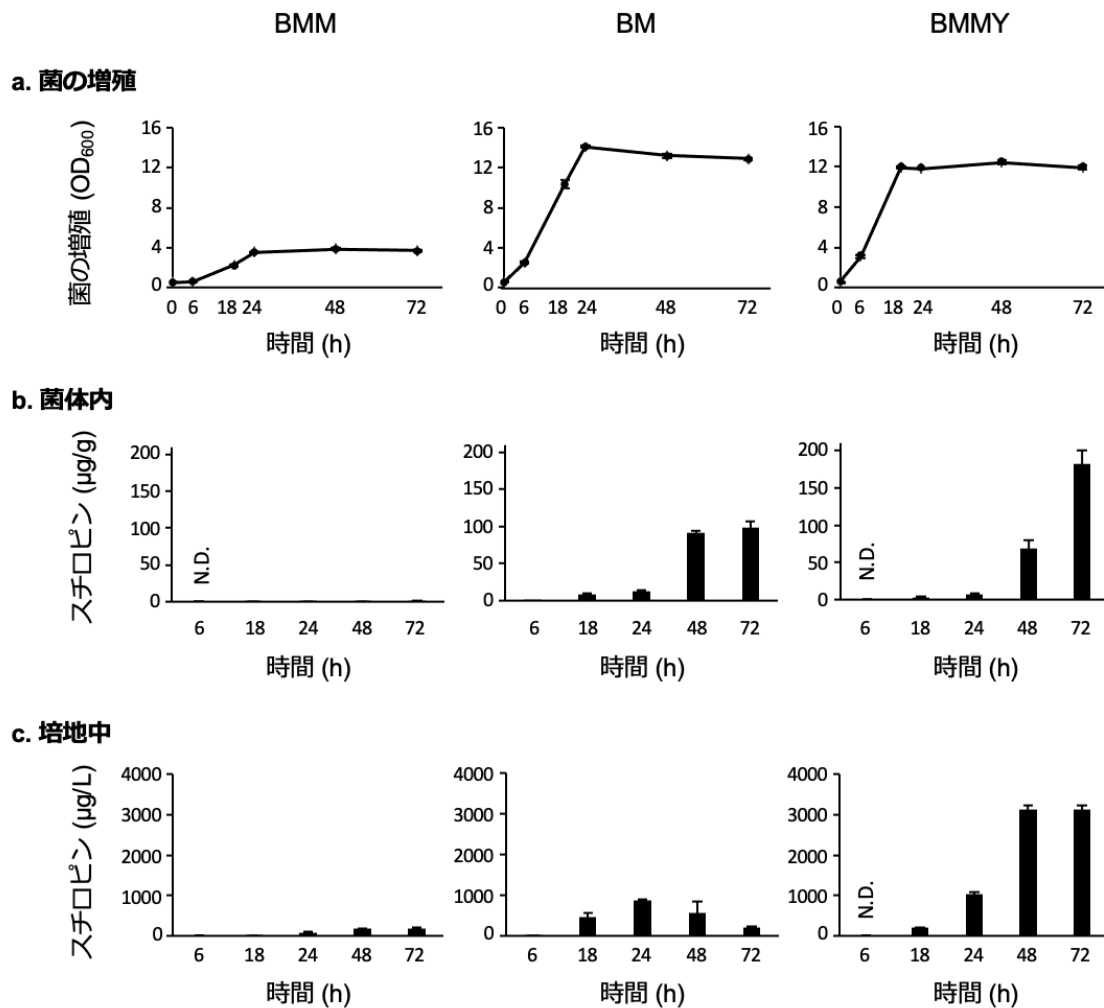
スチロピンは主に 24 時間以降のサンプルから検出され、フラスコ当たりの菌体内 (Fig. 1-3b) と培地中 (Fig. 1-3c) それぞれのスチロピン量を菌体重量または培地量で補正した。その結果、BMM 培地を用いた際に生産性が最も低かった (72 時間後の菌体内のスチロピン量は 1.3  $\mu$ g/g で、培地中のスチロピン量は 191  $\mu$ g/L)。BMMY を用いた場合の菌体内のスチロピン量は BM 培地を用いた場合の 1.9 倍 (BMMY: 182  $\mu$ g/g、BM: 98.4  $\mu$ g/g)、培地中のスチロピン量は 14.3 倍 (BMMY: 3125  $\mu$ g/L、BM: 218  $\mu$ g/L) となり、BMMY 培地はスチロピンを多く生産し、また培地中に分泌する傾向があることがわかった。これらの結果から、最終産物の培地からの効率的な回収が可能なことも考慮すると、BMMY 培地がピキア酵母を用いたスチロピン生産に適していると考えられた。





**Fig. 1-2.** 各ピキア酵母用培地でのスチロピンの検出

スチロピン標品と各培地で培養したピキア酵母の菌体抽出物を UPLC-MS 分析に供し、ポジティブイオンモードで検出した。



**Fig. 1-3.** ピキア酵母用の培地によるスチロピン生産性ピキア酵母の増殖と  
スチロピン生産性の検討

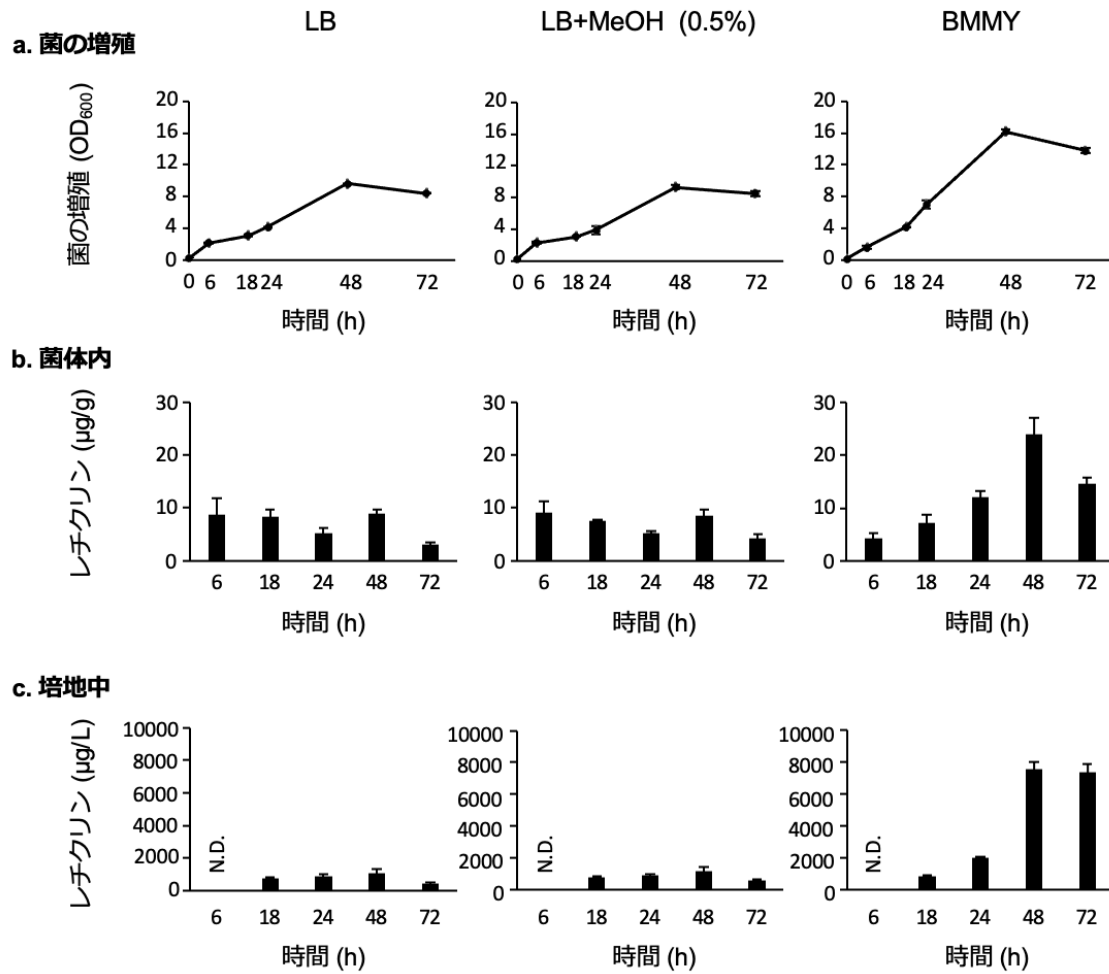
各グラフは、培地ごとの OD<sub>600</sub> 値を指標に計測したピキア酵母の増殖 (a)、菌体内 (b) と培地中 (c) のスチロピン量の経時的変化を示す。各培地に終濃度 100 µM のレチクリンを添加し反応させた。N.D. (not detected) は検出限界以下を示す。[n=3、±SD (standard deviation)]

### 1-2-2. ピキア酵母用 BMMY 培地での大腸菌の増殖とレチクリン生産性の検討

ピキア酵母でのスチロピン生産には BMMY 培地が適していたが、本培地には、ピキア酵母での目的タンパク質の発現を誘導するためにメタノールが含まれており、レチクリン生産性大腸菌に適しているかはわかっていない。そこで、レチクリン生産性大腸菌を BMMY 培地で培養し、その増殖とレチクリン生産性を検討した。一般に大腸菌の培養に用いられる LB (Luria Bertani) 培地と、LB 培地に BMMY 培地と同じ割合 (0.5%) でメタノールを加えた LB+MeOH 培地を比較対象とした (Table 1-1)。まずレチクリン生産性大腸菌を LB 培地で培養し、LB、LB+MeOH、BMMY に OD<sub>600</sub>=0.2 で植菌した。すべての培地には、グリセロール (終濃度 5 g/L)、ベクター保持のための抗生物質、レチクリン生合成酵素を誘導するための IPTG (終濃度 0.1 mM) を添加した。培養開始から 6、18、24、48、72 時間の時点で細胞の増殖を OD<sub>600</sub> 値を指標に計測するとともに、菌体と培地に分けてサンプリングを行った。大腸菌の増殖 (a)、菌体内のレチクリン量 (b)、培地中のレチクリン量 (c) を示す (Fig. 1-4)。LB 培地における大腸菌の増殖とレチクリン生産性は、メタノールを培地に添加しても影響を受けなかった。また、BMMY 培地での大腸菌の増殖とレチクリン生産は、LB 培地よりも良い傾向が観察された。24 時間以降のレチクリン生産について、LB に比べ BMMY で菌体内では 2~3.5 倍、培地中では 2~13 倍、レチクリン生産性が向上していた。BMMY 培地での培養において、本共培養系の中間体であるレチクリンが培地中に多く分泌されていたため、本培地は今回の共培養に適していると判断し、大腸菌とピキア酵母の共培養には BMMY 培地を用いることとした。

Table 1-1. 培地組成表

成分 (終濃度)	LB	LB+MeOH	BMMY
Methanol	-	0.5%	0.5%
YNB (Yeast Nitrogen Base)	-	-	1.34%
Biotin	-	-	$4 \times 10^{-5}\%$
Potassium phosphate buffer, pH 6.0	-	-	100 mM
Yeast extract	1%	1%	1%
Peptone	-	-	2%
Tryptone	1%	1%	-
NaCl	1%	1%	-

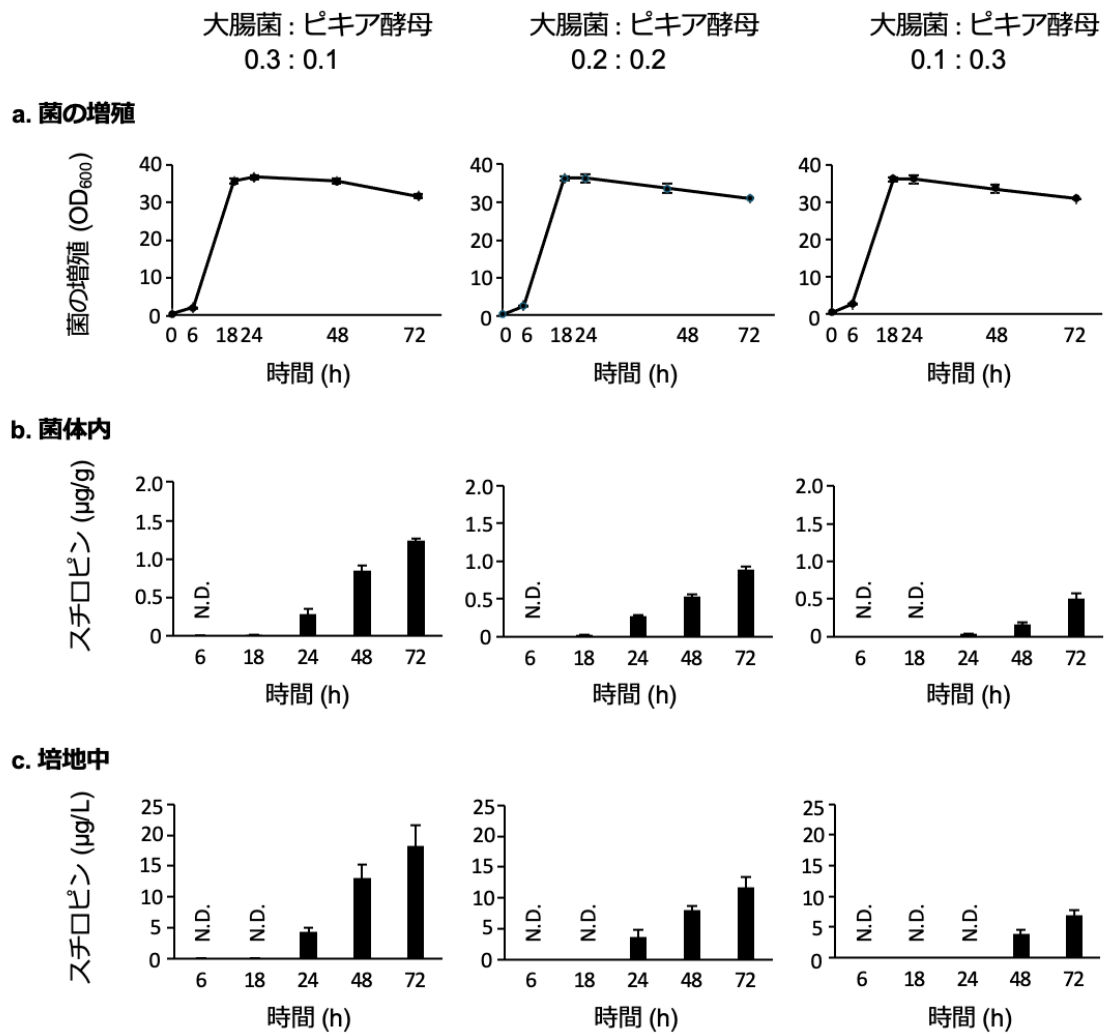


**Fig. 1-4.** BMMY 培地によるレチクリン生産性大腸菌の増殖とレチクリン生産性の検討  
各グラフは、培地ごとの OD<sub>600</sub> 値を指標に計測した大腸菌の増殖 (a)、菌体内 (b) と培地中 (c) のレチクリン量の経時的変化を示す。各培地には IPTG (0.1 mM) とグリセロール (終濃度 5 g/L) と抗生物質を添加した。N.D.は検出限界以下を示す。(n=3、±SD)

### 1-2-3. 大腸菌とピキア酵母の共培養によるスチロピン生産性の検討

BMMY 培地を用いて、レチクリン生産性大腸菌とスチロピン生産性ピキア酵母の共培養による、単純な炭素源からのスチロピンの生産を検討した。炭素源としては、グルコースはタンパク質の発現を制御する AOX1 プロモーターによる転写を抑制してしまうため、グリセロールを用いた。<sup>47)</sup> まず大腸菌は LB 培地、ピキア酵母は YPD 培地でそれぞれ前培養し、その後、メタノール含有培地である BMMY 培地で大腸菌とピキア酵母の共培養を開始した。この時、グリセロール (終濃度 5 g/L) とレチクリン生合成酵素を誘導するための IPTG (終濃度 0.1 mM) を添加した。共培養開始時の大腸菌とピキア酵母の混合比率がスチロピン生産へ及ぼす影響を見るため、大腸菌とピキア酵母の OD<sub>600</sub> 値が 0.3:0.1 / 0.2:0.2 / 0.1:0.3 となるよう植菌した。その結果、菌体の増殖はいずれも同様に、共培養開始から 18 時間まで指数関数的に増殖し、その後は定常期を示した (Fig. 1-5a)。スチロピンの生産はいずれの条件でも観察されたが、大腸菌の割合が大きくなるほど、生産性が高くなる傾向が認められ (Fig. 1-5b, c)、大腸菌 : ピキア酵母 = 0.3:0.1 の条件で、菌体内 1.2 µg/g、培地中 18.2 µg/L と生産性が最も高かった。

以上より、BMMY 培地でレチクリン生産性大腸菌とスチロピン生産性ピキア酵母を共培養し、培地中にグリセロールを添加するのみで、スチロピンが生産される系を確立できたと考えた。菌の混合比率は、大腸菌の割合が多い方がスチロピンの生産性が高いことが判明した。さらに OD<sub>600</sub> = 1 の時の細胞数は、大腸菌がおおよそ  $8 \times 10^8$  cells/mL、ピキア酵母がおおよそ  $5 \times 10^7$  cells/mL であり、同じ OD<sub>600</sub> 値でも細胞数としては大腸菌の方が 10 倍以上多いことも考慮すると、大腸菌の細胞数や生産性がスチロピン生産の律速になっていることが示唆された。



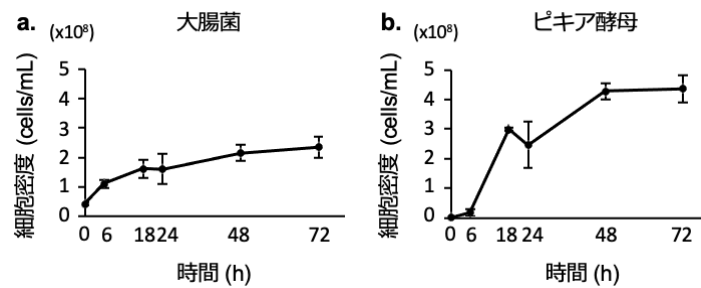
**Fig. 1-5.** 大腸菌とピキア酵母の共培養による菌の増殖とスチロピン生産性の検討  
レクチリン生産性大腸菌は LB 培地で、スチロピン生産性ピキア酵母は YPD 培地でそれぞれ前培養後、大腸菌とピキア酵母の OD<sub>600</sub> 値が 0.3:0.1/0.2:0.2/0.1:0.3 となるように BMMY 培地で共培養した。BMMY 培地には IPTG (終濃度 0.1 mM)、グリセロール (終濃度 5 g/L)、抗生物質を添加した。各グラフは、混合比率ごとの OD<sub>600</sub> 値を指標に計測した菌の増殖 (a)、菌体内 (b) と培地中 (c) のスチロピン量の経時的変化を示す。N.D.は検出限界以下を示す。(n=3、±SD)

#### 1-2-4. スチロピン生産性低下の原因と課題

スチロピンを生産させる基本的な系が構築できた一方で、共培養によるスチロピン生産量が、レチクリン生産量 (Fig. 1-4) から想定される量 (培地中、mg/L 程度) よりも少ないことが明らかとなった。この原因を解明するために、共培養下での大腸菌とピキア酵母の 1 mL 当たりの細胞数 (細胞密度) を顕微鏡で計測した (Fig. 1-6)。共培養開始時には、大腸菌の方が多くなるよう植菌しているにもかかわらず、共培養すると大腸菌の細胞密度はピキア酵母より低く、大腸菌を BMMY 培地で単独で培養した際 (Fig. 1-4) に比べても、大腸菌の増殖が抑えられていると考えられた。

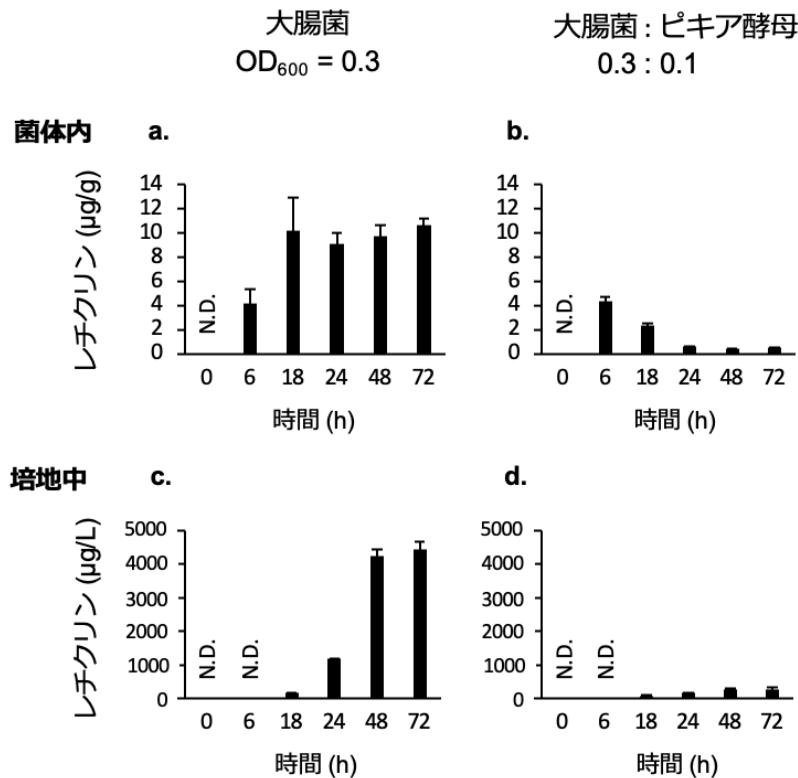
そこで、大腸菌のレチクリン生産性に対するピキア酵母の影響を見るために、スチロピンを生産しないピキア酵母 GS115 株をレチクリン生産性大腸菌と共培養し、レチクリン生産性を確認した。その結果、大腸菌の単独培養に比べ、ピキア酵母との共培養で、レチクリンの生産性が大幅に低下していることが明らかとなった (Fig. 1-7)。これらのことより、共培養でのスチロピン生産において、大腸菌の増殖とレチクリン供給が律速になっていることが示唆された。共培養でスチロピン生産量をさらに増やすためには、大腸菌を単独培養している際に、先に IPTG などによりレチクリン生合成酵素などを誘導発現させてレチクリンを生産させてから、ピキア酵母との共培養に持ち込むのが良いのではないかと考えられた。





**Fig. 1-6.** 大腸菌とピキア酵母の共培養時の細胞密度

レチクリン生産性大腸菌は LB 培地で、スチロピン生産性ピキア酵母は YPD 培地でそれぞれ前培養した。大腸菌とピキア酵母の OD<sub>600</sub> 値が 0.3:0.1 となるように BMMY 培地で共培養した。BMMY 培地には IPTG (終濃度 0.1 mM)、グリセロール (終濃度 5 g/L)、抗生物質を添加した。大腸菌の細胞密度 (a) とピキア酵母の細胞密度 (b) の経時的変化を示す。細胞数はセルカウンターと顕微鏡を用いて 3 回計数した。



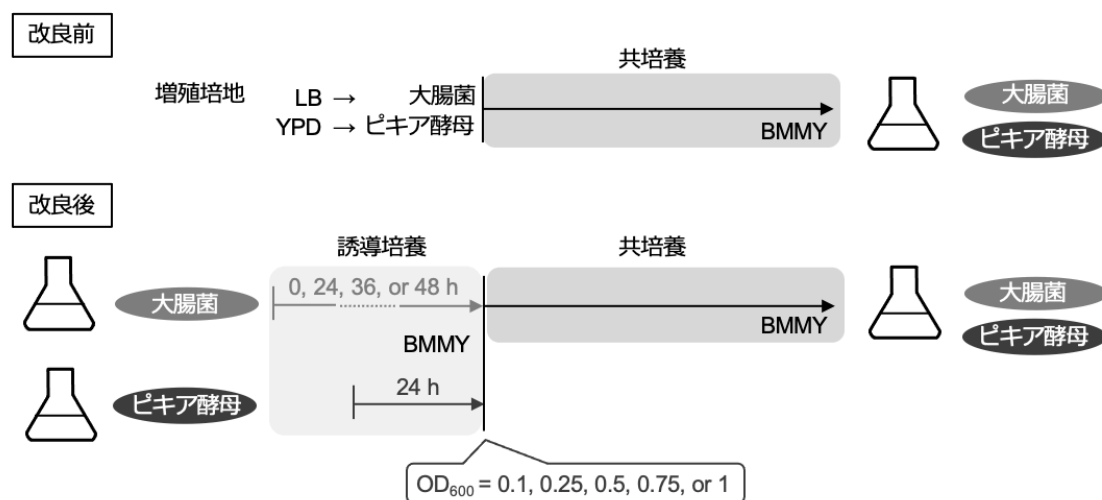
**Fig. 1-7.** 大腸菌のレチクリン生産性に対するピキア酵母の影響

レチクリン生産性大腸菌は LB 培地で、スチロピンを生産しないピキア酵母は YPD 培地でそれぞれ前培養した。BMMY 培地で大腸菌のみを培養したときの菌体内のレチクリン (a)、培地中のレチクリン (c) を示す。大腸菌とピキア酵母 (GS115 株) の OD<sub>600</sub> 値が 0.3:0.1 となるように BMMY 培地で共培養した時の菌体内のレチクリン (b)、培地中のレチクリン (d) を示す。BMMY 培地には IPTG (終濃度 0.1 mM)、グリセロール (終濃度 5 g/L)、抗生物質を添加した。N.D.は検出限界以下を示す。(n=3、±SD)

#### 1-2-5. 大腸菌の誘導培養導入による共培養系の改良

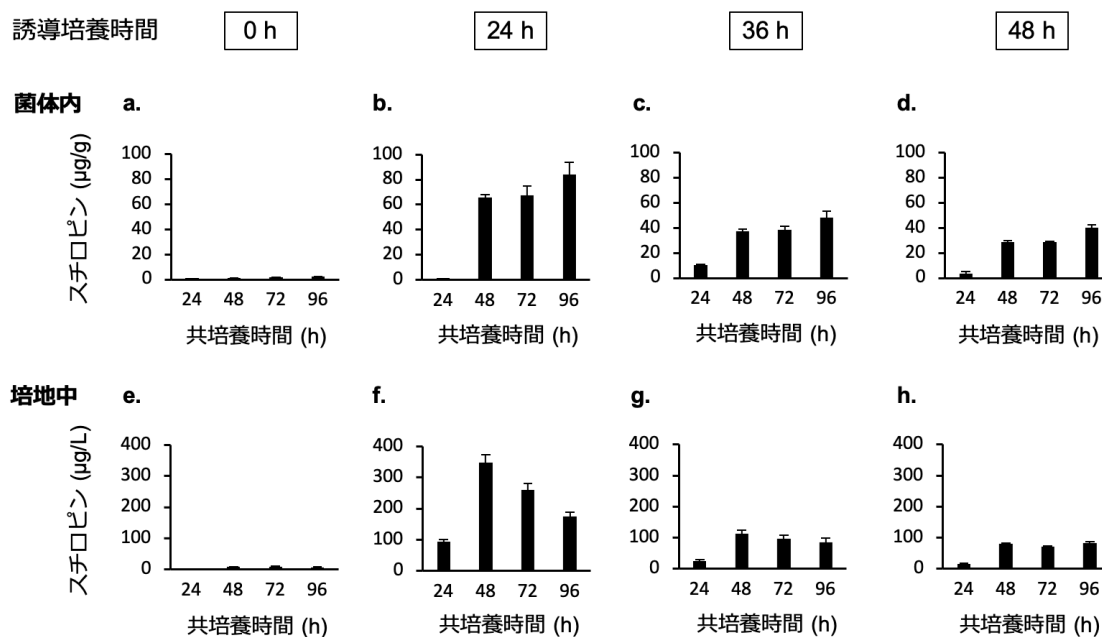
これまでの結果より、共培養下での大腸菌の増殖とレチクリン生産がピキア酵母により抑制されていることがわかった。そこで、共培養の前に BMMY 培地で大腸菌を前培養することで大腸菌の増殖とレチクリン生産性を改善し、結果としてスチロピンの生産性を向上させられるのではないかと考えた (Fig. 1-8)。なお、共培養の前に BMMY 培地で前培養することを「誘導培養」と定義する。大腸菌の誘導培養時間ならびに大腸菌のフラスコにピキア酵母を植菌する際のピキア酵母の植菌量について検討を行い、スチロピン生産を指標に評価した。

まず、大腸菌の誘導培養時間の検討を行った (Fig. 1-8)。誘導培養の時間は 24、36、48 時間の 3 点を検討し、培地は抗生物質と IPTG を含む BMMY を用いた。ピキア酵母の誘導培養時間は、Fig. 1-3 において 24 時間で酵素の発現が誘導されていると考えられたため、24 時間とし、培地は BMMY を用いた。誘導培養後のピキア酵母の培養液を、誘導培養した大腸菌のフラスコに  $OD_{600}=0.1$  となるように植菌し、共培養開始から 24 時間毎にサンプリングを行った。その結果、大腸菌の 24 時間の誘導培養により、培地中のスチロピン量は非誘導培養時と比べ 41 倍向上し (共培養 48 時間後の培地中のスチロピンについて非誘導培養時は  $8.4 \mu\text{g/L}$ 、24 時間誘導培養時は  $347.5 \mu\text{g/L}$ )、36 時間と 48 時間の誘導培養によっても向上した (Fig. 1-9)。これらのことから、共培養の前に大腸菌とピキア酵母をそれぞれ BMMY 培地で誘導培養することで、スチロピンの生産性が向上することがわかった。



**Fig. 1-8.** 改良前と改良後の方法の違い

本改良では、共培養の前に、大腸菌を BMMY 培地で 24、36、48 時間誘導培養すること、またピキア酵母の植菌量を検討した。

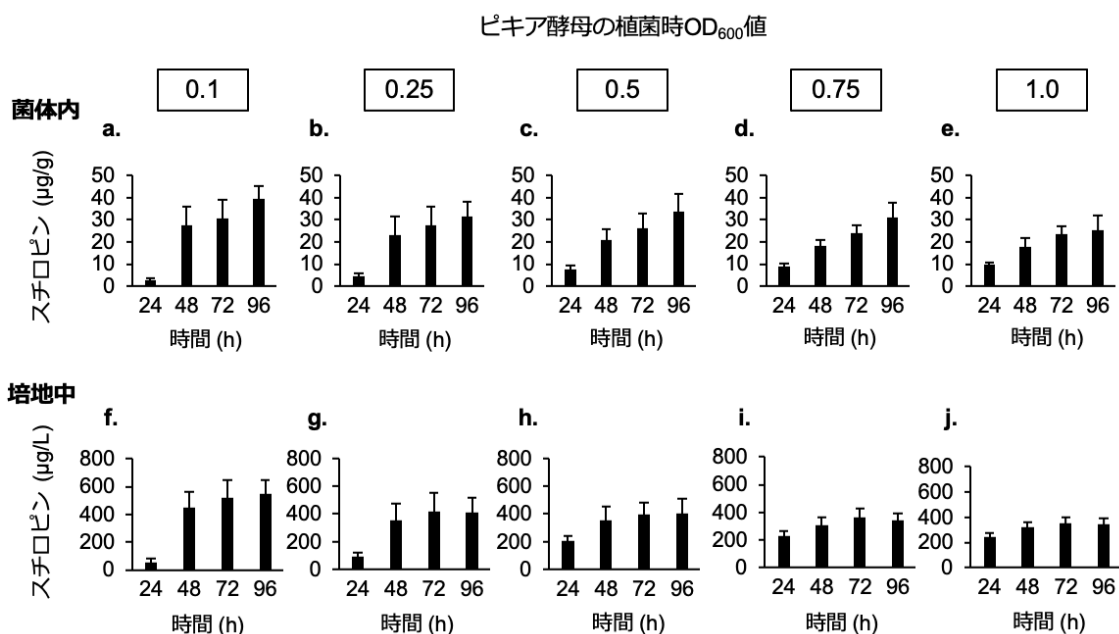


**Fig. 1-9.** 大腸菌の誘導培養時間によるスチロピン生産性の検討

レクチリン生産性大腸菌は LB 培地で、スチロピン生産性ピキア酵母は YPD 培地でそれぞれ前培養後、さらに BMMY 培地でそれぞれ誘導培養した。BMMY 培地には IPTG (終濃度 0.1 mM)、グリセロール (終濃度 5 g/L)、抗生物質を添加した。大腸菌を 0 時間 (a、e)、24 時間 (b、f)、36 時間 (c、g)、48 時間 (d、h) 誘導培養し、24 時間誘導培養したピキア酵母を大腸菌のフラスコに OD<sub>600</sub> = 0.1 となるよう植菌し共培養した。菌体内のスチロピン (a-d) と培地中のスチロピン (e-h) の経時的な変化を示す。(n=3、±SD)

### 1-2-6. ピキア酵母の植菌量によるスチロピン生産性の検討

次に、共培養開始時のピキア酵母の植菌量について検討を行った。誘導培養したピキア酵母の培養液を、誘導培養した大腸菌のフラスコに  $OD_{600} = 0.1 / 0.25 / 0.5 / 0.75 / 1.0$  となるように植菌し、共培養を行った。その結果、全ての条件でスチロピン生産は認められ、ピキア酵母を  $OD_{600} = 0.1$  で植菌した場合にスチロピン生産は最大となった (Fig. 1-10)。すなわち、ピキア酵母の植菌時  $OD_{600}$  値が低いほどスチロピンの生産性が高くなる傾向が見られた。これまでの結果より、大腸菌とピキア酵母の共培養において、それぞれの菌を誘導培養し、ピキア酵母の割合を少なくすることで、スチロピンの生産性を高めることができた。

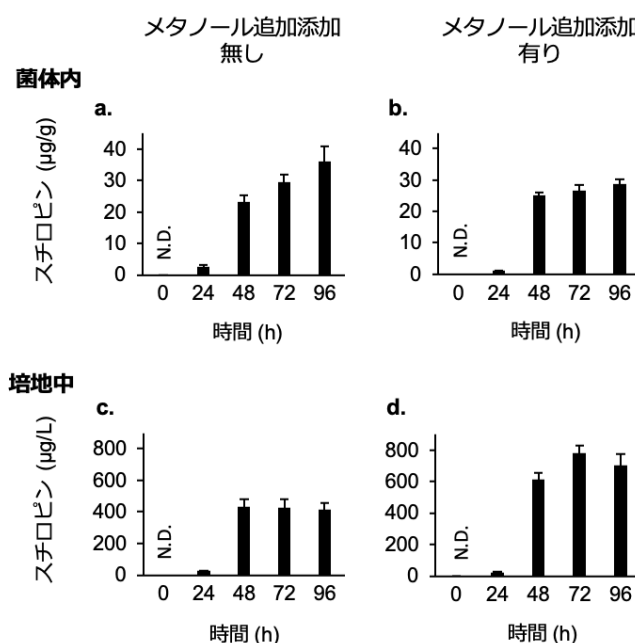


**Fig. 1-10.** ピキア酵母の植菌量によるスチロピン生産性の検討

レチクリン生産性大腸菌は LB 培地で、スチロピン生産性ピキア酵母は YPD 培地でそれぞれ前培養後、さらに BMMY 培地でそれぞれ誘導培養した。BMMY 培地には IPTG (終濃度 0.1 mM)、グリセロール (終濃度 5 g/L)、抗生物質を添加した。大腸菌を 48 時間誘導培養し、24 時間誘導培養したピキア酵母を大腸菌のフラスコに  $OD_{600} = 0.1$  (a, f)、0.25 (b, g)、0.5 (c, h)、0.75 (d, i)、1.0 (e, j) となるよう植菌し共培養した。菌体内のスチロピン (a-e) と培地中のスチロピン (f-j) の経時的な変化を示す。 (n=3、 $\pm$ SD)

### 1-2-7. メタノールの追加添加によるスチロピン生産性の増加

誘導培養に加えて、さらなる改良により生産性の向上が可能かを検討した。ピキア酵母に関するMulti-Copy Pichia Expression Kitのマニュアル<sup>47)</sup>の基本プロトコルによると、ピキア酵母において目的タンパク質の発現を維持するためには24時間毎のメタノールの追加添加(終濃度0.5%)が推奨されている。一方、これまでの培養においては、培養開始時に培地にメタノールを添加したのみで、追加添加は行っていなかった。そこで、メタノールを24時間毎に追加することで、スチロピン生産に関わるBBE、CYP719A5、CYP719A2(Fig. 1-1)の発現が維持され、さらなるスチロピンの生産性向上が可能なのではないかと考え、本改良培養系でメタノールの追加添加を検討した。誘導培養後、大腸菌のフラスコにピキア酵母をOD<sub>600</sub>=0.1となるよう植菌し、培地に50%メタノールを終濃度0.5%となるよう添加した。共培養を開始してから24時間毎に、メタノールを終濃度0.5%となるよう培地中に追加添加した。その結果、共培養96時間後の培地中のスチロピン量は707 µg/Lとなり、追加添加しなかった場合(415 µg/L)と比べて1.7倍に増加した(Fig. 1-11)。



**Fig. 1-11.** メタノールの追加添加によるスチロピン生産性の検討

レクチリン生産性大腸菌は LB 培地で、スチロピン生産性ピキア酵母は YPD 培地でそれぞれ前培養後、さらに BMMY 培地でそれぞれ誘導培養した。BMMY 培地には IPTG (終濃度 0.1 mM)、グリセロール (終濃度 5 g/L)、抗生物質を添加した。48 時間誘導培養した大腸菌のフラスコに、24 時間誘導培養したピキア酵母を OD<sub>600</sub>=0.1 となるよう植菌し共培養した。メタノールを追加添加しなかった時のスチロピン (a, c) と 50%メタノールを共培養開始時と 24 時間毎に追加添加 (終濃度 0.5%) したときのスチロピン (b, d) の経時的変化を示す。N.D.は検出限界以下を示す。(n=3、±SD)

### 1-3. 考察

本章では、大腸菌とピキア酵母の共培養系を確立することで、多様な物質生産を可能とすることを旨とし、レチクリン生産性大腸菌とスチロピン生産性ピキア酵母をモデルとして、共培養系に用いる培地や菌体の混合比率について検討を行い、スチロピン生産性を指標に評価した。ピキア酵母の培地 MM、BMM、BM、BMMY (Table 0-1) を用いた検討で、BMM 培地を用いた場合はスチロピンの生産性が低く、BM、BMMY 培地を用いた際に生産性が高かった (Fig. 1-3)。これは、BM 培地と BMMY 培地に含まれる yeast extract や peptone により菌の増殖が良かったためと考えられる。BM 培地を用いた際と BMMY 培地を用いた際には、菌体内と培地中のスチロピンの分布が異なり、その要因として培地組成の違いが考えられる。BM 培地と比較して、BMMY 培地には YNB、biotin、potassium phosphate buffer (pH 6.0)、peptone が含まれており、これらによって、BMMY 培地で生産物が培地中へ排出されやすくなっていると考えられる。

BMM 培地と異なり potassium phosphate buffer (pH 6.0) を含まない最小培地である MM を用いた場合には、スチロピンが生産されなかったことから (Fig. 1-2)、スチロピン生産が培地の pH などによる影響を受けていることが示唆された。そこで各培地の pH を測定したところ、MM 培地は 5.3、BMM 培地と BM 培地は 5.9、BMMY 培地は 6.2 であった。MM 培地では特に pH が低く、培地の環境が生物変換に適さなかった可能性が考えられる。スチロピン生産性ピキア酵母でレチクリンをスコウレリンに変換する酵素 BBE は、活性酸素種に対する高い感受性を有することが示唆されている。<sup>26)</sup> 出芽酵母では酸性環境で活性酸素種が産生されることが報告されており<sup>48)</sup>、ピキア酵母においても同様の事象が発生すると仮定すると、MM 培地での低 pH 環境でピキア酵母が活性酸素種を生じ、BBE の機能に影響を与えた可能性が考えられる。

微生物での物質生産において、化合物を培地から回収できれば、菌体から回収するよりも容易で効率的であるため、BMMY 培地は物質生産に適することが示唆された。BMMY 培地でレチクリン生産性大腸菌を培養した際にも、LB 培地で培養した場合に比べて、レチクリンをより培地に分泌しており (Fig. 1-4)、本培地の有用性が示された。培地の種類により、スチロピンの生産性や菌体内と培地中のスチロピン分布が異なることは大変興味深く、BMMY 培地で生産物が培地中へ排出されるメカニズムを解明することで、さらに効率良く生産物が培地中へ排出される系の構築が可能となる。

また、ピキア酵母との共培養により、大腸菌のレチクリン生産性が低下してしまうことがわかったが (Fig. 1-7)、共培養前に大腸菌を誘導培養すること (Fig. 1-9)、ピキア酵母よりも

大腸菌の割合を多くすること (Fig. 1-10)、メタノールを追加すること (Fig. 1-11) で改良前と比べて 80 倍生産性を改善させることができた (共培養 72 時間後の培地中のスチロピンについて改良前は 9.8  $\mu\text{g/L}$ 、改良後は 782.2  $\mu\text{g/L}$ )。最終的に、大腸菌とピキア酵母を共培養している培地に、安価な炭素源であるグリセロールを添加するのみで、最終産物のスチロピンが生産される系の確立に成功した。

共培養でのグリセロールからのスチロピン生産 (Fig. 1-5) において、培地 20 mL に 5 g/L の濃度で 100 mg 添加したグリセロールから、スチロピンは 1.0  $\mu\text{g}$  生産され (72 時間後回収した一部のサンプル解析結果から、1 フラスコ当たりの菌体内と培地中の合計を推定)、グリセロールからスチロピンへの変換効率は物質質量当たり 0.0003%であった。グリセロールがレチクリンへの変換だけでなく、エネルギー代謝など複数の経路へ流れるため、変換効率は高くなかったと考えられ、また正確な収率を算出することは困難である。誘導培養などの改良により、スチロピンは 32.3  $\mu\text{g}$  生産され (72 時間後回収した一部のサンプル解析結果から、1 フラスコ当たりの菌体内と培地中の合計を推定)、変換効率は物質質量当たり 0.009%まで 30 倍向上した。誘導培養などの改良法で 1 mg のスチロピンを生産するために必要なグリセロールは 5 mL と推定され、グリセロールの販売価格は 500 mL 1,870 円 (ナカライテスク、2024 年 1 月現在、定価) であり、本共培養系により 1 mg のスチロピンを 18.7 円分のグリセロールから生産できると考えられる。一方、スチロピンは 1 mg 8,000~19,100 円 [5 mg 40,000 円 (長良サイエンス)、1 mg 19,100 円 (セレックバイオテック)、2024 年 1 月現在、定価] で販売されていることから、培地の試薬に関わる費用を考慮しても、本共培養系はより安価なスチロピン生産法と考えられる。

本研究では、共通中間体であるレチクリンからのスチロピン生産のみを検討したが、大腸菌 - 大腸菌または大腸菌 - 出芽酵母の共培養系で、レチクリンや *p*-クマル酸などの共通中間体からマグノフロリンやレスベラトロールなどの生産が報告されている。<sup>8, 13, 14, 17)</sup> さらにピキア酵母 - ピキア酵母共培養系によるロバスタチン<sup>25)</sup> やスチロピン<sup>26)</sup> 生産が報告されていることから、大腸菌やピキア酵母は様々な中間体の分泌や取り込みを比較的行いやすい細胞なのかもしれない。植物有用特化代謝産物は、中心代謝で生産される様々な共通中間体から様々な生合成されており、本研究で確立した共培養系において、用いるピキア酵母を変えることで、モルヒネなど多様なイソキノリンアルカロイドの生産が可能となるだろう。さらなる発展としては、ビンブラスチンなどのモノテルペンインドールアルカロイドや他の特化代謝産物の生産にも適応できると期待される。

#### 1-4. 小括

1. 4 種類のピキア酵母用培地 MM、BMM、BM、BMMY を用いて、スチロピン生産性ピキア酵母によるスチロピン生産を検討した。MM 培地を用いた場合にはスチロピンは生産されなかった。残る 3 つの培地を用いた場合では、培地により菌体内と培地中でのスチロピン量が全く異なることが明らかとなり、最も生産性が高かった BMMY 培地は、スチロピンを培地中に分泌する傾向にあり、目的化合物の培地からの回収に適することが示唆された。
2. レチクリン生産性大腸菌とスチロピン生産性ピキア酵母を共培養し、培地に安価な炭素源であるグリセロールを添加するのみで、スチロピンが生産される系を確立した。<sup>49)</sup>
3. 共培養における生産性を高めるため、共培養前に大腸菌を誘導培養すること、共培養時の大腸菌の割合を多くすること、さらにはメタノールを追加添加すること、の 3 点の改良を行うことにより、スチロピン生産性が向上することを見出した。<sup>50)</sup>

以上より、本研究で確立した大腸菌 - ピキア酵母共培養系が、低コストで簡便な有用化合物生産に応用できる基盤となる可能性が示された。



## 第2章 植物有用アルカロイド生産の効率化を目指した

### 大腸菌 – ピキア酵母共培養系での輸送体発現による生産性の検討

#### 2-1. 緒言

第1章では、大腸菌とピキア酵母の共培養系を確立し、誘導培養により生産性を向上させることに成功した。本章では、より効率的な化合物の生産と培地からの回収を目指し、ピキア酵母に輸送体を発現させ、共培養系のさらなる効率化を試みることにした。

植物特化代謝産物の微生物生産において、すでに輸送工学を用いた合成生物学の報告はあるが<sup>7,42)</sup>、それらは化合物の細胞小器官での輸送や、細胞内への基質取り込みに輸送体を用いており、細胞外への排出に輸送体を用いた例は少ない。<sup>44)</sup> 生産した化合物を細胞外 (培地中) へ排出できれば、ネガティブフィードバックや化合物の毒性を回避でき、化合物生産に関わる代謝経路の亢進による生産性の向上が期待される。さらに、化合物が培地中に排出されれば、化合物を菌体から抽出することなく培地から回収できるため、より効率的な化合物の生産システムの構築につながると考えられる。一方、ピキア酵母での化合物生産において輸送工学を用いた例は中心代謝に関する数例のみであり<sup>51-55)</sup>、特化代謝に関して、ピキア酵母で発現・機能し、最終産物を培地中へ排出する輸送体に関する知見はない。

そこで本章では、スチロピン生産性ピキア酵母をモデルとして、排出輸送体遺伝子を導入し、輸送体発現による最終産物 (スチロピン) の生産性を検討した。排出輸送体には、タバコ由来の MATE 輸送体である NtJAT1 を選んだ。NtJAT1 は、出芽酵母で細胞膜に発現し、ニコチンを細胞外へ排出すること、また基質としてベルベリンなどのアルカロイドも輸送することが報告されている。<sup>40)</sup> これらのことから、NtJAT1 はピキア酵母でも発現し、ベルベリンと構造の似たスチロピンを基質として輸送するのではないかと考えた。

はじめに、*Ntjat1* 遺伝子を組み込んだベクターを、スチロピン生産性ピキア酵母へ導入し、得られたコロニーによる NtJAT1 発現の比較とスチロピン生産性を検討することとした。

## 2-2. 結果

### 2-2-1. NtJAT1 遺伝子導入ピキア酵母の作出

これまでに大木学士 (2019 卒) によってピキア酵母用の発現ベクターである pPIC3.5K に *Ntjat1* 遺伝子を組み込んだベクター pPIC3.5K\_NtJAT1 が作製されている。ピキア酵母への形質転換においては、線状化したベクターをエレクトロポレーション法により導入することで、相同組換えにより目的遺伝子をゲノム中に挿入することができる。そこで、作製されたベクターを制限酵素 PmeI 処理により線状化し、Multi-Copy Pichia Expression Kit のマニュアル<sup>47)</sup> に従い、エレクトロポレーション法によりスチロピン生産性ピキア酵母に形質転換した。

pPIC3.5K の中には kanamycin 耐性遺伝子が組み込まれており、ピキア酵母においてアミノグリコシド系抗生物質である Geneticin (G418) への耐性を付与するため、形質転換体は Geneticin 含有培地で選抜できる。しかし、エレクトロポレーション後すぐに Geneticin 含有 YPD 培地 (YPD-G) に播種しても増殖できないため、一度 YPD で増殖させた後 YPD-G (0.25、0.50、0.75 mg/mL) に蒔き直し、選抜を行うこととした。215 個のコロニーが得られ、132 個をコロニーPCR (polymerase chain reaction) に供した。遺伝子導入が確認された 38 コロニーから 12 個を選び、Geneticin に対する耐性の度合いの検討を、Geneticin 濃度 0.50 または 0.75 mg/mL の YPD-G で試みた。その結果、コロニーNo. 1、3、4、10 で Geneticin 0.75 mg/mL への耐性、No. 9 と No. 12 で Geneticin 0.50 mg/mL への弱い耐性が認められた (Fig. 2-1)。

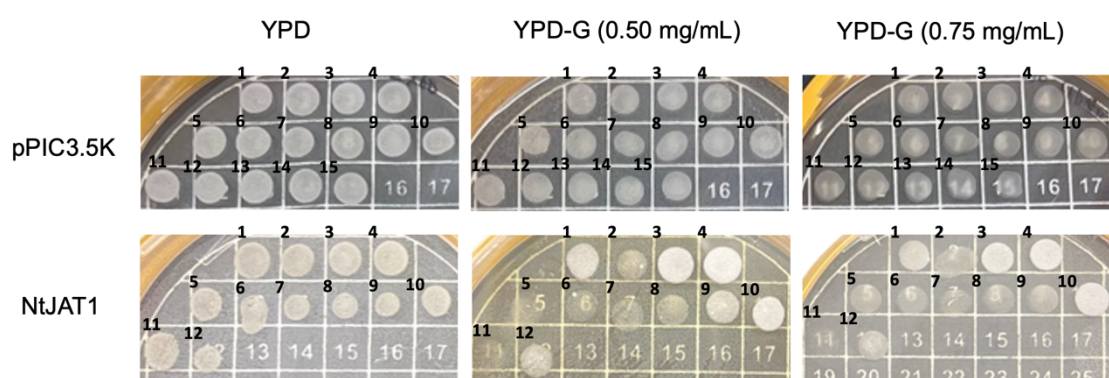
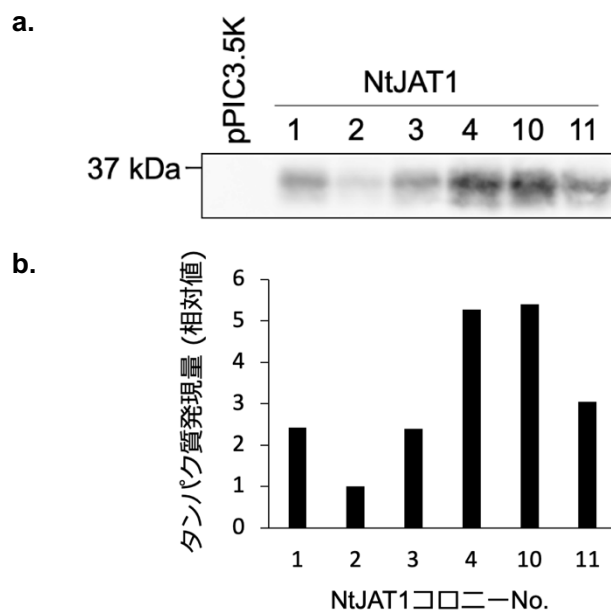


Fig. 2-1. Geneticin に対する耐性の度合い

Geneticin 濃度 0 mg/mL、0.50 mg/mL または 0.75 mg/mL のプレートに OD<sub>600</sub> = 0.5 の培養液を 5  $\mu$ L スポットした。

## 2-2-2. NtJAT1 発現ピキア酵母の選抜

2-2-1 で作製した形質転換体から Geneticin 耐性の異なる 6 つ (No. 1、2、3、4、10、11) を選び、YPD 培地で培養後、BM 培地に OD<sub>600</sub> = 1 で植菌し 24 時間培養した。回収したピキア酵母にガラスビーズと抽出バッファーを加えて破碎し、1,500 g で遠心分離した。この上清をさらに 20,000 g で遠心分離し、ペレットを粗タンパク質として単離した。このタンパク質を SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) (10%) で分離し、NtJAT1 特異的な抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った。NtJAT1 は出芽酵母においては 37 kDa 付近にバンドが観察されるが<sup>40)</sup>、今回のピキア酵母の解析の結果、比較対象である pPIC3.5K (空ベクター) 形質転換体ではその付近にバンドは観察されず、NtJAT1 形質転換体では 37 kDa 付近にバンドが観察された (Fig. 2-2)。このことから、これら形質転換体において NtJAT1 タンパク質が発現していると考えられた。各バンド強度を ImageJ<sup>56)</sup> を用いて定量し、タンパク質の発現量 (相対値) を求めた。その結果、NtJAT1 発現量は No. 2 で最も低く、No. 2 と比較して No. 1 と No. 3 は 2 倍、No. 11 は 3 倍、No. 4 と No. 10 は 5 倍程度高いことが明らかとなった (Fig. 2-2b)。



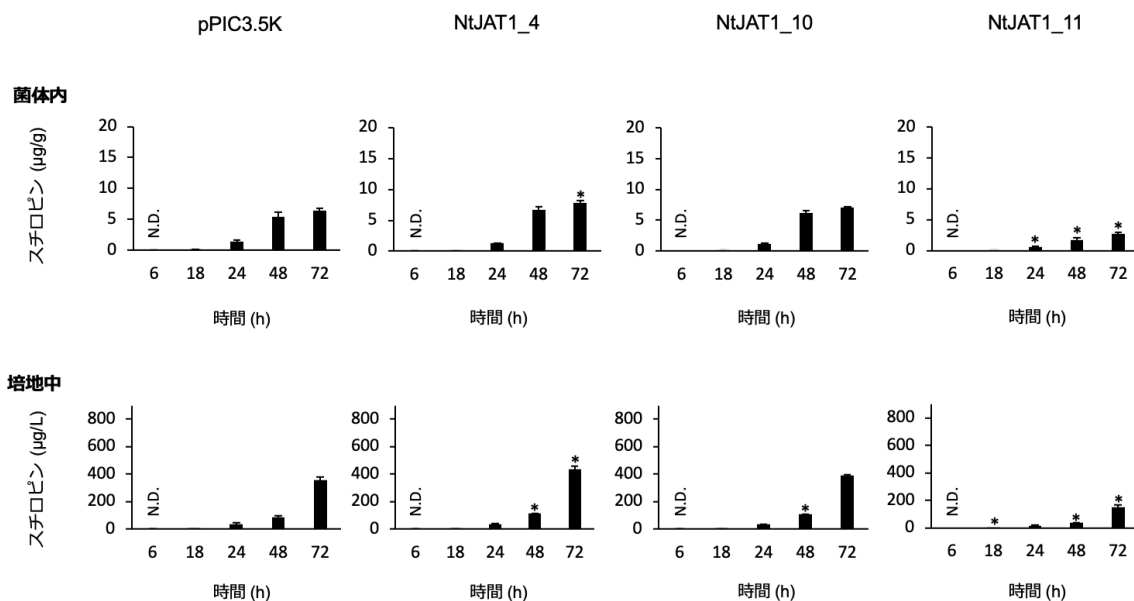
**Fig. 2-2.** メタノールによる NtJAT1 タンパク質発現

NtJAT1 発現は 1%メタノール含有の BM 培地で 24 時間培養することで誘導した。タンパク質 (10 μg) を SDS-PAGE (10%) で分離し、PVDF (polyvinylidene difluoride) メンブレンに転写後、抗 NtJAT1 抗体で発現を確認した (a)。各タンパク質のバンド強度を ImageJ を用いて定量した (b)。各バンドの強度を対応するサンプルの CBB (coomassie brilliant blue) 染色結果を用いて補正し、No. 2 の発現量を 1 として相対値で示した。

### 2-2-3. NtJAT1 発現によるスチロピン生産性の検討

先行研究において、輸送体の発現が強いと菌の増殖が低下するという報告もあるため<sup>44)</sup>、発現を確認した 6 つの菌体から、発現量の異なる No. 4、10、11 を用いてスチロピン生産性を検討した。

大腸菌は LB 培地、ピキア酵母は YPD 培地でそれぞれ前培養し、メタノール含有培地である BMMY 培地に、大腸菌とピキア酵母の OD<sub>600</sub> 値が 0.3:0.1 となるよう植菌した。グリセロール (終濃度 5 g/L) と IPTG (終濃度 0.1 mM) を添加し共培養を開始し、6、18、24、48、72 時間の時点で菌体と培地に分けてサンプリングを行った。スチロピン生産量について UPLC-MS を用いて定量解析したところ、NtJAT1 の No. 4 と No. 10 を用いた場合に、コントロールの pPIC3.5K を用いた場合と比べてスチロピン生産は増加傾向にあり、特に No. 4 を用いた場合、72 時間後の菌体内と培地中のスチロピン量は 1.4 倍に増加した (Fig. 2-3)。一方、No. 11 を用いた場合、スチロピン生産は減少した。



**Fig. 2-3. NtJAT1 発現ピキア酵母によるスチロピン生産**

大腸菌を LB 培地、ピキア酵母を YPD 培地で前培養後、BMMY 培地に大腸菌とピキア酵母の OD<sub>600</sub> 値が 0.3:0.1 となるよう植菌した。BMMY 培地には IPTG (終濃度 0.1 mM)、グリセロール (終濃度 5 g/L)、抗生物質を添加した。N.D.は検出限界以下を示す。

(n=3、±SD、\**P* < 0.05)

## 2-3. 考察

本章では、第1章で確立した共培養系の生産性を改善するために、ピキア酵母に輸送体遺伝子を導入し、輸送体発現量の比較と、スチロピン生産性の検討を行った。アルカロイド輸送能が報告されている MATE 型輸送体 NtJAT1 を用い、ピキア酵母に形質転換したところ、Geneticin に対する耐性を持つコロニー215 個が得られた。そのうち 132 個をコロニーPCR に供し、38 コロニーで遺伝子導入が確認された。Geneticin に対する耐性の度合いの検討を Geneticin 濃度 0.50 mg/mL または 0.75 mg/mL の YPD-G で試み、12 コロニー (No. 1~12) の内、4 コロニー (No. 1、3、4、10) で Geneticin 0.75 mg/mL への耐性、2 コロニー (No. 9、12) で Geneticin 0.50 mg/mL への弱い耐性が認められた (Fig. 2-1)。Geneticin 耐性の異なる 6 コロニー (No. 1、2、3、4、10、11) を用いて NtJAT1 特異的な抗体により発現を検討したところ、全てのコロニーで NtJAT1 の発現が確認され、ピキア酵母で NtJAT1 を発現させることに成功した (Fig. 2-2)。またその発現量は No. 4 と No. 10 で高く、No. 1、3、11 は中程度、No. 2 で低く、No. 11 を除き Geneticin 耐性との対応が見られた。

次に、発現量の異なるコロニーNo.4、10、11 を用いてスチロピン生産性を検討した。No. 4 と No. 10 のコロニーを用いた場合、コントロールである pPIC3.5K を形質転換したピキア酵母を用いた場合と比べて、スチロピンの生産は増加傾向であったことから、ピキア酵母で発現した NtJAT1 がスチロピンを培地中に排出して生産性が向上することが示唆された (Fig. 2-3)。特に No. 4 のコロニーを用いた場合、スチロピン生産量が 1.4 倍に向上し、共培養系にさらに輸送工学も導入することで、生産性が向上することが示唆された。一方、発現量が No. 4 や No. 10 より低い No. 11 のコロニーを用いた場合にはスチロピン生産が減少した。これらのことから、スチロピンの生産性を高めるためには、NtJAT1 の発現量は高い方がよく、低い発現量では逆に生産性を下げてしまうと考えられた。

## 2-4. 小括

1. スチロピン生産性ピキア酵母に、エレクトロポレーション法により MATE 型輸送体 NtJAT1 遺伝子を導入した。
2. 抗生物質 Geneticin を用いて形質転換体の選抜を行い、Geneticin 耐性の異なるコロニーを得た。
3. ウェスタンブロット解析を行ったところ、メタノール誘導によってピキア酵母で NtJAT1 が発現していることを確認した。
4. NtJAT1 を高発現するスチロピン生産性ピキア酵母をレチクリン生産性大腸菌と共培養したところ、スチロピンの生産性が向上した。

以上の結果より、大腸菌 – ピキア酵母共培養系において、ピキア酵母に排出輸送体遺伝子を導入し高発現させることで、より効率的な有用化合物生産系となる可能性が示された。

## 総括

本研究では、多様な化合物生産を可能とする大腸菌 – ピキア酵母共培養系の確立を目的に、1. 培地や菌体の混合比率を最適化した共培養系の構築、2. 構築した共培養系の生産性向上を目的としたピキア酵母での輸送体発現、について検討し、以下の知見を得た。

### 1. 植物有用アルカロイド生産を目的とした大腸菌 – ピキア酵母共培養系の構築と改良

微生物を用いた代謝産物の生産に一般に用いられる大腸菌と、タンパク質の高発現特性や CYP の高活性などから近年注目を集めているピキア酵母の共培養系の確立を試みた。培地などの条件を検討した結果、安価なグリセロールから植物有用アルカロイドの生産に成功した。本共培養系での化合物生産に適した培地として、ピキア酵母用の培地である MM、BMM、BM、BMMY を検討したところ、BMMY 培地を用いた場合では生産性が高く、培地中にスチロピンが分泌される傾向にある一方で、MM 培地を用いた場合では生産されず、培地によって全く生産性が異なるという知見は、ピキア酵母を用いた物質生産に有用な情報を提供するものと考えられる。

さらに共培養における生産性を高めるため、共培養前に大腸菌を誘導培養すること、共培養時の大腸菌の割合を多くすること、さらにはメタノールを追加すること、の3点の改良を行った。これらにより、スチロピン生産性が大きく向上することを見出し、大腸菌 – ピキア酵母共培養系が、低コストで簡便な有用化合物生産に応用できる基盤となる可能性が示された。

### 2. 植物有用アルカロイド生産の効率化を目指した大腸菌 – ピキア酵母共培養系での輸送体発現による生産性の検討

第1章で構築した大腸菌 – ピキア酵母共培養系でのより効率的なアルカロイド生産を目的として、スチロピン生産性ピキア酵母に MATE 型輸送体 NtJAT1 を導入・発現させた。抗生物質に対する耐性の度合いの検討や、ピキア酵母での NtJAT1 の発現確認を行い、レチクリン生産性大腸菌と共培養した。その結果、NtJAT1 を高発現するピキア酵母との共培養により、スチロピンの生産をより向上させることができ、共培養系に輸送工学を融合させることで生産性を高められる可能性が示された。

植物の特化代謝産物は、レチクリンやストリクトシジンなどの共通中間体から多様に派生している。<sup>57)</sup> 本研究では共培養生産系の確立や検討のモデルとして、イソキノリンアルカロイドの共通中間体であるレチクリンを生産する大腸菌と、レチクリンを基質としてスチロピンを生産するピキア酵母を用いたが、フラボノイドの共通中間体である *p*-クマル酸を生産する大腸菌<sup>8)</sup> や、テルペノイドの共通中間体であるスクアレンを生産する大腸菌<sup>58)</sup> や、モノテルペンインドールアルカロイドの共通中間体であるストリクトシジンを生産する出芽酵母<sup>59)</sup> など多様な微生物が既に存在している。そのため今後、用いる大腸菌やピキア酵母などを様々に変えていくことで、さらに多様な化合物の生産への応用ができると考えられる。

また、共培養系をさらに発展、効率化させていくためには、最終産物を排出させるだけでなく、基質の取り込みや、中間体の菌体間の輸送なども重要と思われる。輸送工学によりそれら輸送も促進させることで、より生産性の高い培養系の構築が可能になると期待される。

以上の知見より、本研究で確立した共培養系が低コストで簡便な微生物での化合物生産ならびに多様な化合物の効率的な生産の基盤となる可能性が示された。これらにより、微生物共培養系のホスト選択肢が増え、微生物での有用化合物生産の可能性が広がることが期待される。



## 謝辞

本研究を進めるに当たり、素晴らしい研究環境を与えてくださり、終始ご懇篤なご指導、ご鞭撻を賜りました本学医薬細胞生物学講座教授・土反伸和先生に心より深く感謝致します。先生の直接のご指導により、研究とは何たるかを一から学ばせて頂きました。

本研究に際し、研究内容への助言、実験や研究に対する姿勢など様々なご指導を賜りました本学医薬細胞生物学講座講師・山田泰之先生に深謝致します。

本研究を遂行するに当たり、種々の有益なご助言とご指導を賜りました滋賀医科大学医学部附属病院薬剤部准教授・池田義人先生、本学医薬細胞生物学講座助教・市野琢爾先生、薬用植物園講師・西山由美先生に深謝致します。

本研究論文の審査にあたり、有益なご助言とご教示を賜りました本学薬化学講座教授・奥田健介先生、生命分析化学講座准教授・大山浩之先生に深く感謝致します。

本研究で使用した微生物について、大腸菌 AN2104 株をご分与頂いた石川県立大学応用微生物学研究室准教授・南博道先生と講師・中川明先生、ピキア酵母 B52 株をご分与頂いた京都大学名誉教授（元 京都大学大学院生命科学研究科 全能性統御機構学分野 教授）・佐藤文彦先生に深く感謝致します。

ウェスタンブロット解析にあたり、抗 NuJAT1 抗体をご分与頂いた久留米大学医学部客員教授・森山芳則先生に深く感謝します。

本研究に際し、多大なご協力を頂きました本学医薬細胞生物学講座の中原洋子研究員をはじめとする諸先輩、後輩の皆様に心より感謝致します。皆様のおかげで研究生活を円滑に送ることができました。

これまでの研究生生活において、終始応援し支えてくれた家族に心から感謝致します。

末筆ながら、博士課程において経済的支援を賜りました日本薬学会長井記念薬学研究奨励支援、大学女性協会、独立行政法人日本学生支援機構のご支援に深く感謝致します。

## 実験の部

### 研究全般に関する項目

本研究では、遺伝子組換え微生物などを用いており、全て P1 レベルの実験である。国および神戸薬科大学組換え DNA 実験安全委員会の定める遺伝子組換え DNA 実験の安全指針に基づいて実験室内で行った。また、著者は日本学術振興会が提供する研究倫理 e-Learning 教育を受講し、研究を行う上での様々な科学上の法令、倫理などを遵守した。

### 使用微生物

- ・レチクリン生産性大腸菌 AN2104 株<sup>46)</sup> は石川県立大学応用微生物学研究室准教授・南博道先生、講師・中川明先生より分与頂いた。
- ・スチロピン生産性ピキア酵母 B52 株<sup>26)</sup> は京都大学名誉教授 (元 京都大学大学院生命科学研究科全能性統御機構学分野教授)・佐藤文彦先生から分与頂いた。
- ・ピキア酵母 GS115 株は Invitrogen 社製 (C18100) を使用した。

### 試薬・機器

#### <培養用試薬・機器類>

- ・ Agar powder (ナカライテスク、01028-85)
- ・ D-Biotin (ナカライテスク、04822-91)
- ・ Dipotassium hydrogenphosphate (ナカライテスク、28727-95)
- ・ D-(+)-Glucose (ナカライテスク、16806-25)
- ・ Glycerol (ナカライテスク、17018-25)
- ・ IPTG (ナカライテスク、19742-81)
- ・ Methanol (ナカライテスク、21915-35)
- ・ Peptone (Gibco、211677)
- ・ Potassium dihydrogenphosphate (ナカライテスク、28721-55)
- ・ Reticuline (既報<sup>46)</sup> に基づき単離したものを、石川県立大学応用微生物学研究室准教授・南博道先生、講師・中川明先生より分与頂いた。)
- ・ Sodium chloride (キシダ化学、008-71265)
- ・ Tryptone (Gibco、211705)
- ・ Yeast extract (Gibco、212750)

- Yeast nitrogen base (YNB) (Invitrogen、55-0240)
- 培養液用濁度計 (Biochrom、CO8000)
- バッフル付き三角フラスコ 100 mL (柴田化学、016310-100A)
- バッフル付き三角フラスコ 300 mL (柴田化学、016310-300A)
- バッフル付き三角フラスコ 100 mLに用いたシリコ栓 (アズワン、6-343-15、C-30)
- バッフル付き三角フラスコ 300 mLに用いたシリコ栓 (アズワン、6-343-16、C-40)

#### <抗生物質>

- Ampicillin (Sigma-Aldrich、A9518-5G)
- Chloramphenicol (ナカライテスク、08027-14)
- Geneticin® (G418) (富士フイルム和光純薬、074-06801)
- Spectinomycin (ナカライテスク、32147-81)
- Tetracycline (ナカライテスク、33031-64)

#### <化合物の分析用試薬・機器類>

- Acetic acid (高速液体クロマトグラフ用、ナカライテスク、08963-02)
- Acetonitrile (高速液体クロマトグラフ用、ナカライテスク、00430-83)
- ACQUITY ultra-performance liquid chromatography mass spectrometry (UPLC-MS) system with a QDa mass detector (Waters、H class)
- ACQUITY UPLC® BEH C18 column (2.1 ×100 mm、1.7 μm) (Waters、186002352)
- Cosmospin filter H (ナカライテスク、06540-34)
- Hydrochloric acid (キシダ化学、000-37585)
- Reticuline (培養用試薬・機器類の項を参照)
- Stylophine [coptisine を sodium borohydride で還元したものを、京都大学名誉教授 (元 京都大学大学院生命科学研究科全能性統御機構学分野教授)・佐藤文彦先生から分与頂いた。]
- Trichloroacetic acid (ナカライテスク、06275-24)

#### <化合物の合成および分析用試薬>

- Coptisine chloride (富士フイルム和光純薬、038-22001)
- Ethyl acetate (ナカライテスク、14623-75)
- Methanol (ナカライテスク、21915-35)

- Sodium borohydride (ナカライテスク、31228-22)
- Sodium carbonate (ナカライテスク、31310-35)

<細胞密度の計測用試薬・機器類>

1×PBS (phosphate-buffered saline) 組成

	終濃度
Sodium chloride	137 mM
Disodium hydrogenphosphate 12-water	8.10 mM
Potassium chloride	2.68 mM
Potassium dihydrogen phosphate	1.47 mM

- Disodium hydrogenphosphate 12-water (ナカライテスク、31723-35)
- Potassium chloride (富士フイルム和光純薬、163-03545)
- Potassium dihydrogen phosphate (ナカライテスク、28721-55)
- Sodium chloride (ナカライテスク、31320-05)
- 顕微鏡 (OLYMPUS、CX21FS1)
- ワンセルカウンター (ワンセル、OC-C-S02)

<分子生物学用試薬・機器類>

- Acid washed glass beads (0.425-0.6 mm) (Sigma-Aldrich、G8772-500G)
- Agarose for ≥1kbp fragment (ナカライテスク、01163-05)
- Anti-rabbit IgG (GE Health Care UK Limited、NA934-1ML)
- Beads crusher (タイテック、μT-12)
- Blocking One (ナカライテスク、03953-95)
- Chemi-Lumi One Super (ナカライテスク、02230-30)
- Cute mixer (EYELA、CM-1000)
- CutSmart<sup>®</sup> (New England BioLabs、B7204S)
- ImageQuant<sup>™</sup> LAS4000 (GE Health Care、71-3274-31)
- KOD One<sup>®</sup> PCR Master Mix -Blue- (dye-containing 2×PCR master mix) (東洋紡、KMM-201)
- PmeI (New England BioLabs、0560S) 10,000 units/mL
- pPIC3.5K (Invitrogen、K1750-01)

- PVDF メンブレン (Millipore、IPVH000100)
- Qubit™ dsDNA Broad Range assay kit (Invitrogen、Q32850)
- Qubit™ fluorometer (Invitrogen、Q32857)
- D-Sorbitol (ナカライテスク、32021-95)
- T100™ Thermal Cycler (BIO-RAD、1861096J1)
- Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega、A9282)
- 泳動槽 PAGERUN (ATTO、AE-6531)
- エレクトロポレーション用キュベット GenePulser® cuvettes、0.2 cm (BIO-RAD、1652086)
- エレクトロポレーター (MicroPulser) (BIO-RAD、1652086)
- 抗 NtJAT1 抗体は久留米大学医学部客員教授・森山芳則先生より分与頂いた。
- セミドライトランスファー装置 Trans-Blot® SD Cell (BIO-RAD、221BR)
- 卓上型超音波洗浄機 (本多電子株式会社、W-113)
- トランスファー用電圧装置 myPowerII300 (ATTO、AE-8135)

## 第 1 章 実験の部

### 【1】異なる培地によるピキア酵母のスチロピン生産

スチロピン生産性ピキア酵母を YPD 培地 (1% yeast extract、2% peptone、2% glucose) で 30°C、200 rpm (revolutions per minute) で一晚培養した。100 mL バッフル付き三角フラスコで新たな YPD 培地に OD<sub>600</sub> = 0.6 で植菌し、OD<sub>600</sub> = 3 に達するまで 30°C、200 rpm で培養した。菌体を遠心 (室温、3,000 g、5 分) して回収後、MM (1.34% YNB、4 × 10<sup>-5</sup>% biotin、0.5% methanol)、BMM (100 mM potassium phosphate、pH 6.0、1.34% YNB、4 × 10<sup>-5</sup>% biotin、0.5% methanol)、BM (0.5% yeast extract、1% methanol) または BMMY (1% yeast extract、2% peptone、100 mM potassium phosphate、pH 6.0、1.34% YNB、4 × 10<sup>-5</sup>% biotin、0.5% methanol) 培地 1 mL でそれぞれ懸濁し、遠心 (室温、3,000 g、5 分) し上清を除いた。菌体を 100 mL バッフル付き三角フラスコで各培地 20 mL に OD<sub>600</sub> = 0.6 となるよう懸濁した。終濃度 100 μM となるよう (S)-レチクリンを添加し、30°C、250 rpm で培養し 6、18、24、48、72 時間後に培養液を 1 mL ずつ 1.5 mL チューブに回収した。培養液を遠心 (4°C、15,000 g、1 分) し上清と菌体に分け、上清を -20°C で保管した。菌体は氷冷滅菌水 1 mL を加え懸濁後、遠心 (4°C、15,000 g、1 分) して上清を除いた。水分をよく除くため、再度遠心 (4°C、15,000 g、1 分) して上清を除き、重量を測定してから -20°C で保管した。

### 【2】BMMY 培地での大腸菌のグリセロールからのレチクリン生産

レチクリン生産性大腸菌を LB 培地 (1% tryptone、0.5% yeast extract、1% sodium chloride) で 30°C、200 rpm で一晚培養した。新たな LB 培地に OD<sub>600</sub> = 0.2 となるよう植菌し、OD<sub>600</sub> = 0.6 に達するまで 30°C、200 rpm で培養した。菌体を遠心 (室温、3,000 g、5 分) して回収後、LB 培地、メタノール (終濃度 0.5%) 含有 LB 培地または BMMY 培地 1 mL でそれぞれ懸濁し、遠心 (室温、3,000 g、5 分) し上清を除いた。菌体を 100 mL バッフル付き三角フラスコで各培地 20 mL に OD<sub>600</sub> = 0.2 になるよう懸濁し、IPTG (終濃度 0.1 mM) とグリセロール (終濃度 5 g/L) を添加後、30°C、250 rpm で培養した。6、18、24、48、72 時間後に培養液を 1 mL ずつ 1.5 mL チューブに回収した。サンプリングは【1】と同条件で行った。

なお、大腸菌を培養する場合は、レチクリン生産用のベクター保持のため、培地に抗生物質 (80 mg/L ampicillin、30 mg/L chloramphenicol、100 mg/L spectinomycin、2 mg/L tetracycline) を加えて培養を行った。

### 【3】大腸菌とピキア酵母の共培養によるスチロピン生産

レチクリン生産性大腸菌を【2】と同条件で前培養した。スチロピン生産性ピキア酵母を【1】と同条件で前培養した。菌体を遠心 (室温、3,000 g、5 分) して回収後、BMMY 培地 1 mL で懸濁し遠心 (室温、3,000 g、5 分) し上清を除いた。100 mL バッフル付き三角フラスコで BMMY 培地 (抗生物質を含む) 20 mL に、植菌時 OD<sub>600</sub> 値が大腸菌：ピキア酵母 = 0.3:0.1、0.2:0.2、0.1:0.3 となるよう植菌し、IPTG (終濃度 0.1 mM) とグリセロール (終濃度 5 g/L) を添加後、30°C、250 rpm で培養し 6、18、24、48、72 時間後に培養液を 1 mL ずつ 1.5 mL チューブに回収した。サンプリングは【1】と同条件で行った。

### 【4】細胞数の計測

【3】と同条件で前培養と共培養をし、0、6、18、24、48、72 時間後に培養液を 100 µL ずつ 1.5 mL チューブに回収した。培養液を 1×PBS で 5 倍希釈し、セルカウンターと顕微鏡を用いて目視で細胞数を計測した。これを 3 回行った。

### 【5】大腸菌のレチクリン生産性に対するピキア酵母の影響の検討

レチクリン生産性大腸菌とスチロピンを生産しないピキア酵母 GS115 株は【3】と同条件で前培養し、菌体を遠心 (室温、3,000 g、5 分) して回収後、BMMY 培地 1 mL で懸濁し遠心 (室温、3,000 g、5 分) し上清を除いた。100 mL バッフル付き三角フラスコで BMMY 培地 (抗生物質を含む) 20 mL に、大腸菌を OD<sub>600</sub> = 0.3 となるように懸濁し、IPTG (終濃度 0.1 mM) とグリセロール (終濃度 5 g/L) を添加後、30°C、250 rpm で培養した。また、ピキア酵母との共培養は、植菌時 OD<sub>600</sub> 値が大腸菌：ピキア酵母 = 0.3:0.1 となるよう植菌し、IPTG (終濃度 0.1 mM) とグリセロール (終濃度 5 g/L) を添加後、30°C、250 rpm で培養した。0、6、18、24、48、72 時間後に培養液を 1 mL ずつ 1.5 mL チューブに回収した。サンプリングは【1】と同条件で行った。

### 【6】大腸菌の誘導培養時間によるスチロピン生産性の検討

レチクリン生産性大腸菌とスチロピン生産性ピキア酵母は【3】と同条件で前培養し、菌体を遠心 (室温、3,000 g、5 分) して回収後、BMMY 培地 1 mL で懸濁し遠心 (室温、3,000 g、5 分) し上清を除いた。100 mL バッフル付き三角フラスコで BMMY 培地 (抗生物質を含む) 20 mL に、大腸菌を OD<sub>600</sub> = 0.2 となるように懸濁し、IPTG (終濃度 0.1 mM) とグリセロール (終濃度 5 g/L) を添加後、30°C、250 rpm で 24、48、72 時間誘導培養した。ピキア酵母も 100 mL バッフル付き三角フラスコで BMMY 培地 (抗生物質を含む) 20 mL に OD<sub>600</sub>

=0.6 となるように懸濁し、30°C、250 rpm で 24 時間誘導培養した。誘導培養した大腸菌のバッフル付き三角フラスコに、24 時間誘導培養したピキア酵母を  $OD_{600} = 0.1$  となるように植菌した。30°C、250 rpm で培養し 24、48、72、96 時間後に培養液を 1 mL ずつ 1.5 mL チューブに回収した。サンプリングは【1】と同条件で行った。

#### 【7】ピキア酵母の植菌時 $OD_{600}$ 値によるスチロピン生産性の検討

レクチリン生産性大腸菌とスチロピン生産性ピキア酵母は【3】と同条件で前培養し、菌体を遠心 (室温、3,000 g、5 分) して回収後、BMMY 培地 1 mL で懸濁し遠心 (室温、3,000 g、5 分) し上清を除いた。100 mL バッフル付き三角フラスコで BMMY 培地 (抗生物質を含む) 20 mL に、大腸菌を  $OD_{600} = 0.2$  となるように懸濁し、IPTG (終濃度 0.1 mM) とグリセロール (終濃度 5 g/L) を添加後、30°C、250 rpm で 48 時間誘導培養した。【6】と同条件で誘導培養したピキア酵母を BMMY 培地 (抗生物質を含む) に  $OD_{600} = 2、5、10、15、20$  となるよう懸濁した。誘導培養した大腸菌のバッフル付き三角フラスコから 1 mL 培養液を除き、ピキア酵母の各菌液を  $OD_{600} = 0.1、0.25、0.5、0.75、1$  となるよう大腸菌のフラスコに 1 mL ずつ植菌し、最終 20 mL となるようにした。30°C、250 rpm で培養し 24、48、72、96 時間後に培養液を 1 mL ずつ 1.5 mL チューブに回収した。サンプリングは【1】と同条件で行った。

#### 【8】メタノールの追加添加によるスチロピン生産性の検討

レクチリン生産性大腸菌とスチロピン生産性ピキア酵母は【3】と同条件で前培養し、【7】と同条件で誘導培養した。誘導培養した大腸菌のバッフル付き三角フラスコに、24 時間誘導培養したピキア酵母を  $OD_{600} = 0.1$  となるように植菌し、30°C、250 rpm で培養した。共培養開始時と開始後 24 時間毎にメタノールを終濃度 0.5% となるよう追加添加し、共培養 24、48、72、96 時間後に培養液を 1 mL ずつ 1.5 mL チューブに回収した。サンプリングは【1】と同条件で行った。

#### 【9】化合物の分析

全ての培養液サンプルは遠心分離により上清 (培地) と沈殿 (菌体) に分けた。培地サンプルからタンパク質などの夾雑物を除くために、トリクロロ酢酸を終濃度 2% となるように加え懸濁して 30 分氷上で静置後、4°C、15,000 g、20 分の遠心分離操作後の上清を分析に用いた。菌体サンプルは湿重量 1 mg 当たり 20  $\mu$ L の 0.01 N HCl 含有メタノールを加え懸濁し



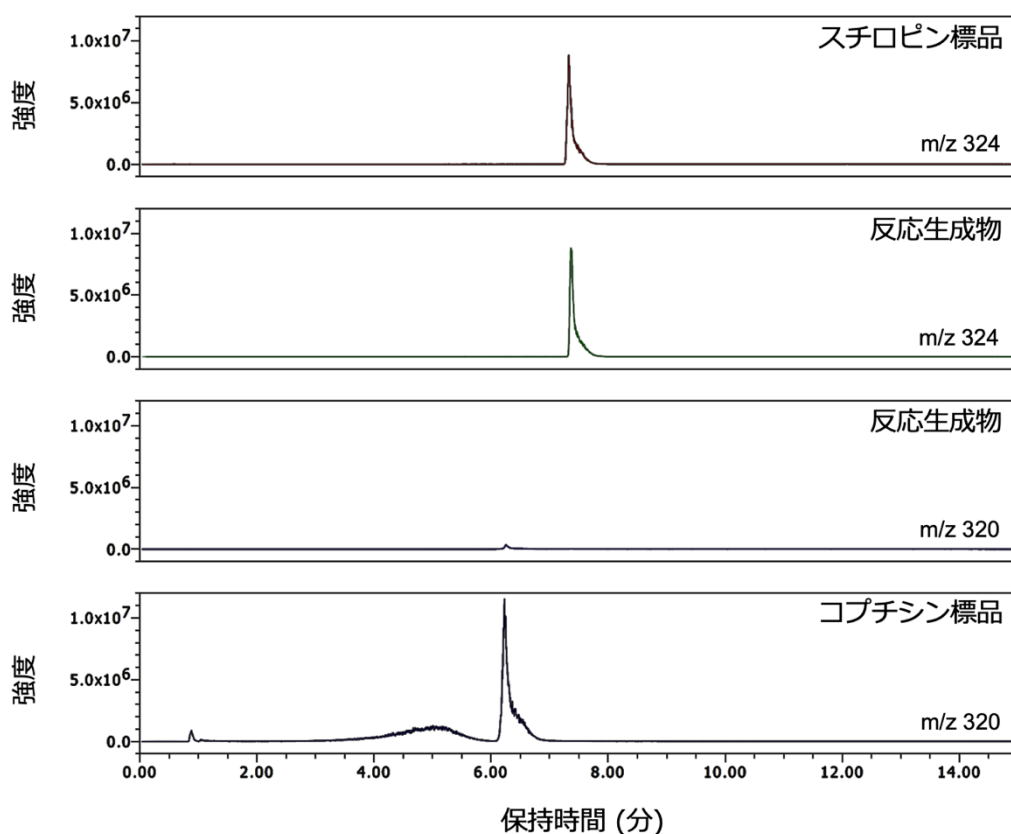
た。卓上型超音波洗浄機 (28 kHz) で破碎抽出し、一晚室温で静置してアルカロイドを抽出した。この細胞破碎液を 4℃、15,000 g、15 分で遠心分離し、上清を細胞抽出液として分析に用いた。全てのサンプルは、UPLC-MS のカラムに通す前に 0.45  $\mu\text{m}$  コスモスピンフィルターH に通して不純物を除去し、ACQUITY UPLC system with QDa mass detector を用いた UPLC-MS 分析に供した。移動相には、0.01% (v/v) 酢酸水 (solvent A) と 0.01% (v/v) 酢酸アセトニトリル (solvent B) を使用した。アルカロイドは以下のようなグラジエントにより分離した。

時間 (分)	流量 (mL/分)	%A	%B
0.00	0.300	95.0	5.0
9.00	0.300	60.0	40.0
12.00	0.300	50.0	50.0
15.00	0.300	95.0	5.0

40℃にコントロールされた ACQUITY UPLC® BEH C18 カラムに注入量 2  $\mu\text{L}$ 、流量 0.3 mL / 分で流し、QDa 条件はコーン電圧 15 V、キャピラリー電圧 0.8 kV、ソース温度 600℃として分析を行った。イオン化法は ESI (electron spray ionization)、検出モードはポジティブイオンモードとした。菌体および培地中のレチクリン ( $m/z = 330$ ) とスチロピン ( $m/z = 324$ ) 量は single-ion recording (SIR) モードを用いて検出したピークエリアを元に、標品を用いて作製した検量線から算出した。

#### 【10】 コプチシンの還元によるスチロピンの合成

メタノールに 2.5 mM となるよう溶解したコプチシン 50  $\mu\text{L}$  (125 nmol) を 1.5 mL チューブに入れ、水 50  $\mu\text{L}$  と水素化ホウ素ナトリウム粉末を 3.03 mg (80 nmol) 加えた。その直後に 0.5 M の炭酸ナトリウム水溶液を 100  $\mu\text{L}$  (50  $\mu\text{mol}$ ) 加え懸濁し、酢酸エチルを 200  $\mu\text{L}$  加え懸濁した。4℃、15,000 g、10 分遠心した上層を別の 1.5 mL チューブへ移し、下層に酢酸エチルを 200  $\mu\text{L}$  加え懸濁した。4℃、15,000 g、10 分遠心した上層を、先ほど分離した上層と同じチューブへ移し、小さな穴を開けたパラフィルムで蓋をし、自然乾燥で一晩酢酸エチルを揮発させた。乾燥したコプチシンを 50  $\mu\text{L}$  のメタノールに溶かし、2.5 mM スチロピン溶液とした。スチロピン合成は、溶液の色がコプチシンの黄色からスチロピンの無色に変わったこと、また UPLC-MS によりスチロピン ( $m/z = 324$ ) とコプチシン ( $m/z = 320$ ) のクロマトグラムで確認した (下図)。



## 第2章 実験の部

### 【1】ベクターの線状化

本研究室 大木学士 (2019 卒) が作製したピキア酵母用の発現ベクターである pPIC3.5K\_NtJAT1 を用いた。本ベクター 30  $\mu\text{g}$  を下表の組成で全量 100  $\mu\text{L}$  として制限酵素 PmeI (20 units) と混合し、37°Cで一晩インキュベートし線状化した。一部を 0.8 %アガロースゲルで電気泳動して切断を確認した後、残りを Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System を用いて精製、TE [Tris and EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid)]<sub>10/1</sub> (10 mM Tris-HCl buffer、1 mM EDTA) で溶出、回収した。回収した DNA の濃度は Qubit dsDNA Broad Range assay kit を用い、Qubit fluorometer で測定した。コントロールとして pPIC3.5K も同様に処理した。

DNA	20 $\mu\text{L}$
10 $\times$ Buffer (CutSmart)	10 $\mu\text{L}$
H <sub>2</sub> O	68 $\mu\text{L}$
PmeI	2 $\mu\text{L}$

### 【2】スチロピン生産性ピキア酵母への形質転換

Multi-Copy Pichia Expression Kit (invitrogen、K1750-01) のマニュアルに従い、コンピテントセルを作製した。スチロピン生産性ピキア酵母を YPD 培地で 30°C、200 rpm で一晩培養した。新たな YPD 培地 115 mL に OD<sub>600</sub> = 0.3 となるよう植菌し、500 mL 三角フラスコで OD<sub>600</sub> = 1.3~1.5 に達するまで 30°C、200 rpm で培養した。培養液全量を遠心 (4°C、1,500 g、5 分) して上清を除き、50 mL の氷冷滅菌水に懸濁した。遠心 (4°C、1,500 g、5 分) して上清を除き、25 mL の氷冷滅菌水に懸濁した。遠心 (4°C、3,000 g、5 分) して上清を除き、20 mL の 1 M 氷冷ソルビトールに懸濁した。遠心 (4°C、1,500 g、5 分) して上清を除いて、10 mL の 1 M 氷冷ソルビトールに懸濁した。遠心 (4°C、1,500 g、5 分) して上清を除いて、675  $\mu\text{L}$  の 1 M 氷冷ソルビトールに懸濁し、コンピテントセル溶液とした。

コンピテントセル溶液 80  $\mu\text{L}$  と線状化 DNA 5  $\mu\text{g}$  (10  $\mu\text{L}$ ) を混合し、氷冷した 0.2 cm キュベットに移し、氷上で 5 分間インキュベートした。エレクトロポレーターでピキア酵母用のパラメーターを選択し、パルス (2 kv、5 ms) をかけた。すぐに 1 mL の 1 M 氷冷ソルビトールをキュベットに添加し、懸濁した液を別の滅菌チューブに移した。マニュアルでは、ヒ

スチジン要求性である MD (minimal dextrose) や RDB (regeneration dextrose base) プレートに播種すると記載があるが、スチロピン生産性ピキア酵母の作出時にすでにヒスチジン選抜されていた。そのため、pPIC3.5K の kanamycin 耐性遺伝子がピキア酵母においてアミノグリコシド系抗生物質である Geneticin (G418) への耐性を付与することを利用し、Geneticin 含有培地で選抜することとした。しかし、エレクトロポレーション後すぐに Geneticin 含有 YPD 培地 (YPD-G) に播種しても増殖できないため、一度 YPD で増殖させた後 YPD-G (0.25、0.50、0.75 mg/mL) に蒔き直し、選抜を行うこととした。菌液を YPD プレートに 25、50、75、100  $\mu$ L ずつ播種 (各 2 枚) し 20°C、15 時間培養し、4°C、2 日間静置した。

### 【3】抗生物質 Geneticin (G418) による選抜

菌が増殖してきた YPD プレートから、密集度の低いプレートを選び、1 枚当たり 1 mL の滅菌水で回収した。希釈し、顕微鏡でセルカウンターを用いて菌体数を数え、 $10^6 \sim 10^7$  の細胞数程度の菌体を、Geneticin を 0.25、0.50、0.75 mg/mL の濃度で含む YPD 培地のプレートに蒔き 27°C で培養した。

### 【4】コロニーPCR による形質転換体の確認

YPD-G プレートで良好な増殖を示したコロニーについて、コロニーを TE<sub>10/1</sub> 20  $\mu$ L に懸濁し、卓上型超音波洗浄機で 28 kHz、2 分間ピキア酵母を懸濁、静置後の上清 0.5  $\mu$ L を DNA サンプルとした。これを直接 PCR 反応液 14.5  $\mu$ L に添加し、T100 Thermal Cycler を用いて 94°C、2 分、(98°C、10 秒| 60°C、5 秒| 68°C、1 秒) を 30 サイクル行った。プライマーは pPIC3.5K の kanamycin 耐性をコードする配列約 300 bp のサイズを増幅するよう設計した。

pPIC3.5k\_KanR\_4663Fw, AACTCATCGAGCATCAAATGAA

pPIC3.5k\_KanR\_4955Rv, TGGCCTGTTGAACAAGTCTG

#### PCR 反応液組成

Fw primer (10 $\mu$ M)	0.45 $\mu$ L
Rv primer (10 $\mu$ M)	0.45 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	6.1 $\mu$ L
KOD One PCR master mix -blue-	7.5 $\mu$ L

#### 【5】 Geneticin に対する耐性の度合いの検討

遺伝子導入が確認された 38 コロニーから 12 個を選び、試験管で 3 mL の YPD 培地で、30°C、200 rpm で一晩培養した。その培養液を  $OD_{600} = 0.5$  となるよう YPD 培地で希釈し、Geneticin を 0、0.50、0.75 mg/mL の濃度で含む YPD プレートに 5  $\mu$ L ずつスポットし 27°C で培養した。

#### 【6】 NtJAT1 形質転換ピキア酵母のメタノールによる発現誘導

基本プロトコルは Multi-Copy Pichia Expression Kit のマニュアルに従って行った。NtJAT1 形質転換ピキア酵母を YPD 培地で  $OD_{600} = 3$  に達するまで 30°C、200 rpm で培養した。菌体を遠心 (室温、3,500 g、5 分) して回収後、滅菌水 1 mL に懸濁し、再度遠心 (室温、3,500 g、5 分) して上清を除いた。BM 培地 (0.5% yeast extract、1% methanol) 1 mL で懸濁し、遠心 (室温、3,500 g、5 分) し上清を除いた。300 mL バッフル付き三角フラスコで BM 培地 25 mL に  $OD_{600} = 1$  となるよう懸濁し、30 °C、250 rpm で 24 時間培養した。遠心 (室温、3,500g、5 分) して菌体を回収し、滅菌水 1 mL を加えて懸濁した。遠心 (室温、3,500g、5 分) して菌体を-20°Cで保存した。

#### 【7】 NtJAT1 形質転換ピキア酵母の NtJAT1 発現確認

膜タンパク質である NtJAT1 を抽出するため、glass beads を用いて菌体を破碎した。 $OD_{600} = 50-100$  となるよう 45 OD 分の菌体に resuspension buffer (10 mM Tris-HCl、1 mM EDTA、5% glycerol) を 480  $\mu$ L 加え、250  $\mu$ L ずつ 2 本に分け、それぞれに acid washed glass beads 0.2 g を加えた。よく懸濁し、Cute mixer で 30 秒破碎、30 秒氷上を 8 セット繰り返した。次に、Beads crusher で 3,200 rpm、120 秒破碎し、さらに、ボルテックスミキサーを用いて手で懸濁破碎 30 秒、氷上 30 秒を 4 セット繰り返した。この破碎液を 4°C、1,500 g、5 分で遠心し、上清をさらに 4°C、20,000 g、30 分で遠心し、その上清を除いた。ペレットを 20  $\mu$ L の resuspension buffer で懸濁し、タンパク質の粗抽出液として以降の実験に用いた。

SDS-PAGE (10%) により、泳動槽 (PAGERUN、ATTO) を用いてタンパク質 10  $\mu$ g/lane を分離し、PVDF メンブレンにセミドライトランスファー装置 (Trans-Blot SD Cell、BIO-RAD) を用いて転写した。一次抗体に Anti-NtJAT1 <sup>40)</sup> (500 倍希釈)、二次抗体に Anti-rabbit IgG (7,000 倍希釈)、検出試薬に Chemi-lumi One Super を用い、LAS4000 で検出した。

ウェスタンブロットのメンブレン画像の解析は ImageJ <sup>56)</sup> (version1.54g, Java1.8.0\_345, 64 bit) を用いて行った。画像のバンド部分および背景画像の任意の場所をボックスで囲み測定

した。背景画像の定量値を各バンド画像の定量値から減算し、各バンドに対応するグレースケールの CBB 染色画像の定量値で補正した。一番値の小さい No. 2 を 1 として相対値を算出した。

#### 【8】 NtJAT1 発現ピキア酵母によるスチロピン生産

レチクリン供給源としてレチクリン生産性大腸菌と、【7】で NtJAT1 の発現を確認したピキア酵母を共培養した。培養は、第 1 章【3】と同様の条件で行い、植菌時 OD<sub>600</sub> 値が大腸菌：ピキア酵母 = 0.3:0.1 となるように混合した。スチロピン生産性の評価は、第 1 章【9】と同様の条件で UPLC-MS 分析を行い、スチロピン量を算出して行った。

## 参考文献

- 1) Raskin I, Ribnicky DM, Komarnytsky S, Ilic N, Poulev A, Borisjuk N, Brinker A, Moreno DA, Ripoll C, Yakoby N, O'Neal JM, Cornwell T, Pastor I and Fridlender B. Plants and human health in the twenty-first century. *Trends Biotechnol*, **20**, 10 (2002).
- 2) Jeong WT and Lim HB. A UPLC-ESI-Q-TOF method for rapid and reliable identification and quantification of major indole alkaloids in *Catharanthus roseus*. *J. Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **1080**, 27-36 (2018).
- 3) Ishikawa H, Colby DA, Seto S, Va P, Tam A, Kakei H, Rayl T, Hwang I and Boger DL. Total synthesis of vinblastine, vincristine, related natural products, and key structural analogues. *J. Am. Chem. Soc*, **131**, 4904-4916 (2009).
- 4) Ro DK, Paradise EM, Ouellet M, Fisher KJ, Newman KL, Ndungu JM, Ho KA, Eachus RA, Ham TS, Kirby J, Chang MC, Withers ST, Shiba Y, Sarpong R and Keasling JD. Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature*, **440**, 940-943 (2006).
- 5) Galanie S, Thodey K, Trenchard IJ, Filsinger Interrante M and Smolke CD. Complete biosynthesis of opioids in yeast. *Science*, **349**, 1095-1100 (2015).
- 6) Nakagawa A, Matsumura E, Koyanagi T, Katayama T, Kawano N, Yoshimatsu K, Yamamoto K, Kumagai H, Sato F and Minami H. Total biosynthesis of opiates by stepwise fermentation using engineered *Escherichia coli*. *Nat Commun*, **7**, 10390 (2016).
- 7) Srinivasan P and Smolke CD. Biosynthesis of medicinal tropane alkaloids in yeast. *Nature*, **585**, 614-619 (2020).
- 8) Yuan SF, Yi X, Johnston TG and Alper HS. De novo resveratrol production through modular engineering of an *Escherichia coli*-*Saccharomyces cerevisiae* co-culture. *Microb Cell Fact*, **19**, 143 (2020).
- 9) Zhang J, Hansen LG, Gudich O, Viehrig K, Lassen LMM, Schrubbers L, Adhikari KB, Rubaszka P, Carrasquer-Alvarez E, Chen L, D'Ambrosio V, Lehka B, Haidar AK, Nallapareddy S, Giannakou K, Laloux M, Arsovska D, Jorgensen MAK, Chan LJG, Kristensen M, Christensen HB, Sudarsan S, Stander EA, Baidoo E, Petzold CJ, Wulff T, O'Connor SE, Courdavault V, Jensen MK and Keasling JD. A microbial supply chain for production of the anti-cancer drug vinblastine. *Nature*, **609**, 341-347 (2022).
- 10) Sasaki K, Tsurumaru Y and Yazaki K. Prenylation of flavonoids by biotransformation of yeast expressing plant membrane-bound prenyltransferase SfN8DT-1. *Biosci Biotechnol Biochem*, **73**, 759-761 (2009).
- 11) Ro DK, Ouellet M, Paradise EM, Burd H, Eng D, Paddon CJ, Newman JD and Keasling JD.

- Induction of multiple pleiotropic drug resistance genes in yeast engineered to produce an increased level of anti-malarial drug precursor, artemisinic acid. *BMC Biotechnol*, **8**, 83 (2008).
- 12) Wang R, Zhao S, Wang Z and Koffas MAG. Recent advances in modular co-culture engineering for synthesis of natural products. *Curr Opin Biotechnol*, **62**, 65-71 (2020).
  - 13) Jones JA, Vernacchio VR, Sinkoe AL, Collins SM, Ibrahim MHA, Lachance DM, Hahn J and Koffas MAG. Experimental and computational optimization of an *Escherichia coli* co-culture for the efficient production of flavonoids. *Metab Eng*, **35**, 55-63 (2016).
  - 14) Wang X, Li Z, Policarpio L, Koffas MAG and Zhang H. De novo biosynthesis of complex natural product sakuranetin using modular co-culture engineering. *Appl Microbiol Biotechnol*, **104**, 4849-4861 (2020).
  - 15) Chen T, Wang X, Zhuang L, Shao A, Lu Y and Zhang H. Development and optimization of a microbial co-culture system for heterologous indigo biosynthesis. *Microb Cell Fact*, **20**, 154 (2021).
  - 16) Zhou K, Qiao K, Edgar S and Stephanopoulos G. Distributing a metabolic pathway among a microbial consortium enhances production of natural products. *Nat Biotechnol*, **33**, 377-383 (2015).
  - 17) Minami H, Kim JS, Ikezawa N, Takemura T, Katayama T, Kumagai H and Sato F. Microbial production of plant benzyloquinoline alkaloids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 7393-7398 (2008).
  - 18) Zhang W, Liu H, Li X, Liu D, Dong XT, Li FF, Wang EX, Li BZ and Yuan YJ. Production of naringenin from D-xylose with co-culture of *E. coli* and *S. cerevisiae*. *Eng Life Sci*, **17**, 1021-1029 (2017).
  - 19) Bayer TS, Widmaier DM, Temme K, Mirsky EA, Santi DV and Voigt CA. Synthesis of methyl halides from biomass using engineered microbes. *J Am Chem Soc*, **131**, 6508-6515 (2009).
  - 20) Sgobba E, Stumpf AK, Vortmann M, Jagmann N, Krehenbrink M, Dirks-Hofmeister ME, Moerschbacher B, Philipp B and Wendisch VF. Synthetic *Escherichia coli*-*Corynebacterium glutamicum* consortia for L-lysine production from starch and sucrose. *Bioresour Technol*, **260**, 302-310 (2018).
  - 21) Pyne ME, Narcross L and Martin VJJ. Engineering plant secondary metabolism in microbial systems. *Plant Physiol*, **179**, 844-861 (2019).
  - 22) Zahrl RJ, Pena DA, Mattanovich D and Gasser B. Systems biotechnology for protein production in *Pichia pastoris*. *FEMS Yeast Res*, **17**, fox068 (2017).
  - 23) Wriessnegger T, Augustin P, Engleder M, Leitner E, Muller M, Kaluzna I, Schurmann M, Mink D, Zellnig G, Schwab H and Pichler H. Production of the sesquiterpenoid (+)-nootkatone by metabolic engineering of *Pichia pastoris*. *Metab Eng*, **24**, 18-29 (2014).



- 24) Liu XB, Liu M, Tao XY, Zhang ZX, Wang FQ and Wei DZ. Metabolic engineering of *Pichia pastoris* for the production of dammarenediol-II. *J Biotechnol*, **216**, 47-55 (2015).
- 25) Liu Y, Tu X, Xu Q, Bai C, Kong C, Liu Q, Yu J, Peng Q, Zhou X, Zhang Y and Cai M. Engineered monoculture and co-culture of methylotrophic yeast for de novo production of monacolin J and lovastatin from methanol. *Metab Eng*, **45**, 189-199 (2018).
- 26) Hori K, Okano S and Sato F. Efficient microbial production of stylopine using a *Pichia pastoris* expression system. *Sci Rep*, **6**, 22201 (2016).
- 27) Kumokita R, Bamba T, Inokuma K, Yoshida T, Ito Y, Kondo A and Hasunuma T. Construction of an  $L$ -tyrosine chassis in *Pichia pastoris* enhances aromatic secondary metabolite production from glycerol. *ACS Synth Biol*, **11**, 2098-2107 (2022).
- 28) Gao J, Zuo Y, Xiao F, Wang Y, Li D, Xu J, Ye C, Feng L, Jiang L, Liu T, Gao D, Ma B, Huang L, Xu Z and Lian J. Biosynthesis of catharanthine in engineered *Pichia pastoris*. *Nat Synth*, **2**, 231-242 (2023).
- 29) Belew ZM, Poborsky M, Nour-Eldin HH and Halkier BA. Transport engineering in microbial cell factories producing plant-specialized metabolites. *Curr Opin Green Sustain Chem*, **33**, 100576 (2022).
- 30) Shitan N. Secondary metabolites in plants: transport and self-tolerance mechanisms. *Biosci Biotechnol Biochem*, **80**, 1283-1293 (2016).
- 31) de Brito Francisco R and Martinoia E. The vacuolar transportome of plant specialized metabolites. *Plant Cell Physiol*, **59**, 1326-1336 (2018).
- 32) Gani U, Vishwakarma RA and Misra P. Membrane transporters: the key drivers of transport of secondary metabolites in plants. *Plant Cell Rep*, **40**, 1-18 (2021).
- 33) Lv H, Li J, Wu Y, Garyali S and Wang Y. Transporter and its engineering for secondary metabolites. *Appl Microbiol Biotechnol*, **100**, 6119-6130 (2016).
- 34) Shitan N, Kato K and Shoji T. Alkaloid transporters in plants. *Plant Biotechnol*, **31**, 453-463 (2014).
- 35) Shitan N and Yazaki K. Dynamism of vacuoles toward survival strategy in plants. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, **1862**, 183127 (2020).
- 36) Xu D, Sanden NCH, Hansen LL, Belew ZM, Madsen SR, Meyer L, Jorgensen ME, Hunziker P, Veres D, Crocoll C, Schulz A, Nour-Eldin HH and Halkier BA. Export of defensive glucosinolates is key for their accumulation in seeds. *Nature*, **617**, 132-138 (2023).
- 37) Shitan N, Bazin I, Dan K, Obata K, Kigawa K, Ueda K, Sato F, Forestier C and Yazaki K. Involvement of CjMDR1, a plant multidrug-resistance-type ATP-binding cassette protein, in alkaloid transport in *Coptis japonica*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 751-756 (2003).
- 38) Otani M, Shitan N, Sakai K, Martinoia E, Sato F and Yazaki K. Characterization of vacuolar transport of the endogenous alkaloid berberine in *Coptis japonica*. *Plant Physiol*, **138**, 1939-

- 1946 (2005).
- 39) Shitan N, Dalmas F, Dan K, Kato N, Ueda K, Sato F, Forestier C and Yazaki K. Characterization of *Coptis japonica* CjABCB2, an ATP-binding cassette protein involved in alkaloid transport. *Phytochemistry*, **91**, 109-116 (2013).
  - 40) Morita M, Shitan N, Sawada K, Van Montagu MCE, Inzé D, Rischer H, Goossens A, Oksman-Caldentey K-M, Moriyama Y and Yazaki K. Vacuolar transport of nicotine is mediated by a multidrug and toxic compound extrusion (MATE) transporter in *Nicotiana tabacum*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 2447-2452 (2009).
  - 41) Kazachkova Y, Zemach I, Panda S, Bocobza S, Vainer A, Rogachev I, Dong Y, Ben-Dor S, Veres D, Kanstrup C, Lambertz SK, Crocoll C, Hu Y, Shani E, Michaeli S, Nour-Eldin HH, Zamir D and Aharoni A. The GORKY glycoalkaloid transporter is indispensable for preventing tomato bitterness. *Nat Plants*, **7**, 468-480 (2021).
  - 42) Dastmalchi M, Chang L, Chen R, Yu L, Chen X, Hagel JM and Facchini PJ. Purine Permease-Type Benzyloquinoline Alkaloid Transporters in Opium Poppy. *Plant Physiol*, **181**, 916-933 (2019).
  - 43) Yamada Y, Nakagawa A, Sato F, Minami H and Shitan N. Transport engineering using tobacco transporter NtJAT1 enhances alkaloid production in *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem*, **86**, 865-869 (2022).
  - 44) Yamada Y, Urui M, Oki H, Inoue K, Matsui H, Ikeda Y, Nakagawa A, Sato F, Minami H and Shitan N. Transport engineering for improving the production and secretion of valuable alkaloids in *Escherichia coli*. *Metab Eng Commun*, **13**, e00184 (2021).
  - 45) Srinivasan P and Smolke CD. Engineering cellular metabolite transport for biosynthesis of computationally predicted tropane alkaloid derivatives in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **118**, e2104460118 (2021).
  - 46) Matsumura E, Nakagawa A, Tomabechei Y, Ikushiro S, Sakaki T, Katayama T, Yamamoto K, Kumagai H, Sato F and Minami H. Microbial production of novel sulphated alkaloids for drug discovery. *Sci Rep*, **8**, 7980 (2018).
  - 47) Invitrogen, Multi-Copy *Pichia* Expression Kit. *Cat. no. K1750-01* (2010).
  - 48) Guaragnella N, Zdravlečić M, Antonacci L, Passarella S, Marra E and Giannattasio S. The role of mitochondria in yeast programmed cell death. *Front Oncol*, **2**, 70 (2012).
  - 49) Urui M, Yamada Y, Ikeda Y, Nakagawa A, Sato F, Minami H and Shitan N. Establishment of a co-culture system using *Escherichia coli* and *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) for valuable alkaloid production. *Microb Cell Fact*, **20**, 200 (2021).
  - 50) Urui M, Yamada Y, Nakagawa A, Sato F, Minami H and Shitan N. Enhanced co-culture system using *Escherichia coli* and *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) for improved microbial production of valuable plant alkaloids. *Biol Pharm Bull*, **46**, 1494–1497 (2023).

- 51) de Lima PB, Mulder KC, Melo NT, Carvalho LS, Menino GS, Mulinari E, de Castro VH, Dos Reis TF, Goldman GH, Magalhães BS and Parachin NS. Novel homologous lactate transporter improves *L*-lactic acid production from glycerol in recombinant strains of *Pichia pastoris*. *Microb Cell Fact*, **15**, 158 (2016).
- 52) Xu Q, Bai C, Liu Y, Song L, Tian L, Yan Y, Zhou J, Zhou X, Zhang Y and Cai M. Modulation of acetate utilization in *Komagataella phaffii* by metabolic engineering of tolerance and metabolism. *Biotechnol Biofuels*, **12**, 61 (2019).
- 53) Zhang Q, Wang X, Luo H, Wang Y, Wang Y, Tu T, Qin X, Su X, Huang H, Yao B, Bai Y and Zhang J. Metabolic engineering of *Pichia pastoris* for *myo*-inositol production by dynamic regulation of central metabolism. *Microb Cell Fact*, **21**, 112 (2022).
- 54) Qian D, Zhang C, Deng C, Zhou M, Fan L and Zhao L. De novo biosynthesis of 2'-fucosyllactose in engineered *Pichia pastoris*. *Biotechnol Lett*, **4**, 521-536 (2023).
- 55) Sae-Tang K, Bumrungham P, Mhuanong W, Champreda V, Tanapongpipat S, Zhao XQ, Liu CG and Runguphan W. Engineering Flocculation for improved tolerance and production of *D*-lactic acid in *Pichia pastoris*. *J Fungi (Basel)*, **9**, 409 (2023).
- 56) Schneider CA, Rasband WS and Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*, **9**, 671-675 (2012).
- 57) Croteau R, Kutchan TM and Lewis NG. Natural products (Secondary Metabolites). *Biochem Mol Biol Plants*, **24**, 1250-1318 (2000).
- 58) Meng Y, Shao X, Wang Y, Li Y, Zheng X, Wei G, Kim SW and Wang C. Extension of cell membrane boosting squalene production in the engineered *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng*, **117**, 3499-3507 (2020).
- 59) Brown S, Clastre M, Courdavault V and O'Connor SE. De novo production of the plant-derived alkaloid strictosidine in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **112**, 3205-3210 (2015).