

ウルイ ミヤ

氏 名（本籍）	潤井 みや（大阪府）
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	博第 53 号
学位授与年月日	令和 6 年 3 月 5 日
学位授与の条件	学位規程第 3 条第 1 項該当者
学位論文の題名	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
論文審査委員	主 査 教 授 奥田 健介 副 査 教 授 土反 伸和 副 査 准教授 大山 浩之

論文内容の要旨

緒言

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、生産している植物の減少や、植物中の含量が少ないなど、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 [1]。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

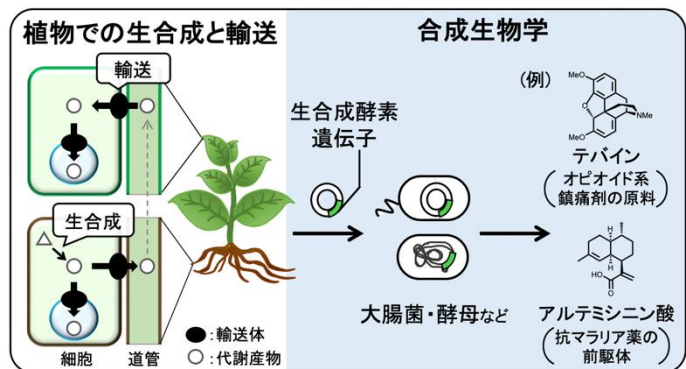


図 1. 合成生物学の概略図

ら生合成酵素遺伝子の単離・解析が行われてきた (図 1 左)。さらに、植物から単離した遺伝子を大腸菌や酵母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 (図 1 右)。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など複数の有用化合物の生産が報告されている [2～7]。

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 [8, 9] 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、全経路を構築する場合よりも容易となる。特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など共通した中間体から多様に派生している (図 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構築、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 [10]。共培養に用いられ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 [11]、ピキア酵母

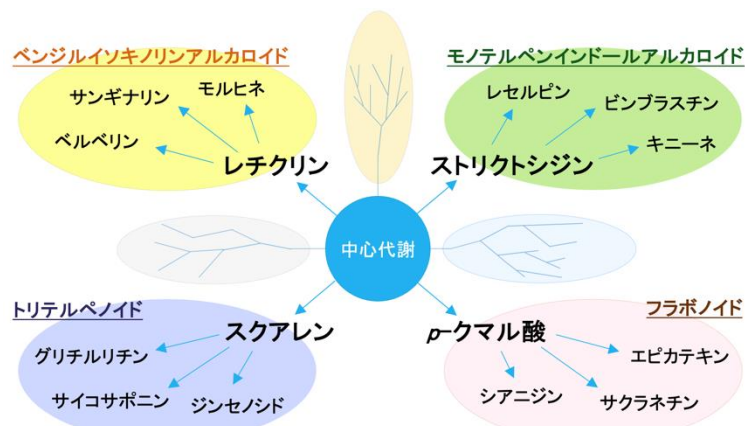


図 2. 共通中間体から派生して作られる様々な植物特化代謝産物

[*Pichia pastoris* (Komagataella phaffii)] 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、生物変換の新たなホストとして近年に注目を集めている [12]。しかし、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-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 [9]、生合成工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おり [13]、関連する知見は増えてきたが [14-15]、ピキア酵母を用いた報告例はなく、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。

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

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。そこで本研究ではモデルとして、植物有用アルカロイドの中間体であるレチクリンをグリセロールなどの安価な炭素源から生産できる大腸菌 [16] 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 [17] を用いた (図 3)。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。

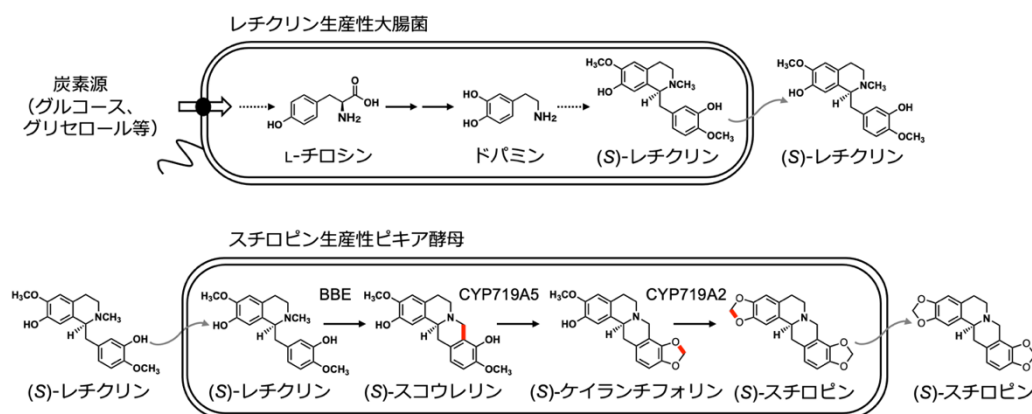


図 3. 炭素源からのスチロピン生産に使用した大腸菌とピキア酵母

まず、ピキア酵母用の培地 MM、BMM、BM、BMMY 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。MM 培地ではスチロピンは生産されず、残る 3 つの培地では、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。

一方で、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 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。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。

そこで、BMMY 培地を用いて、大腸菌とピキア酵母の共培養による、安価な炭素源グリセロー

ルからのスチロピンの生産を検討した。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 OD₆₀₀ 値が 0.3:0.1 / 0.2:0.2 / 0.1:0.3 となるよう植菌した。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、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。

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を確立できたと考えた [18]。また菌の混合比率は、大腸菌の割合が多い方が生産性が高いことが判明した。

一方、共培養によるスチロピン生産量が、レチクリン生産量から想定される量よりも少ないことが明らかとなり、ピキア酵母との共培養で大腸菌の増殖とレチクリン生産が抑制されていることが原因と考えられた。そこで、共培養の前に BMMY 培地で大腸菌を前培養（誘導培養）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。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混合比率について検討を行い、スチロピン生産を指標に評価した（図 4）。

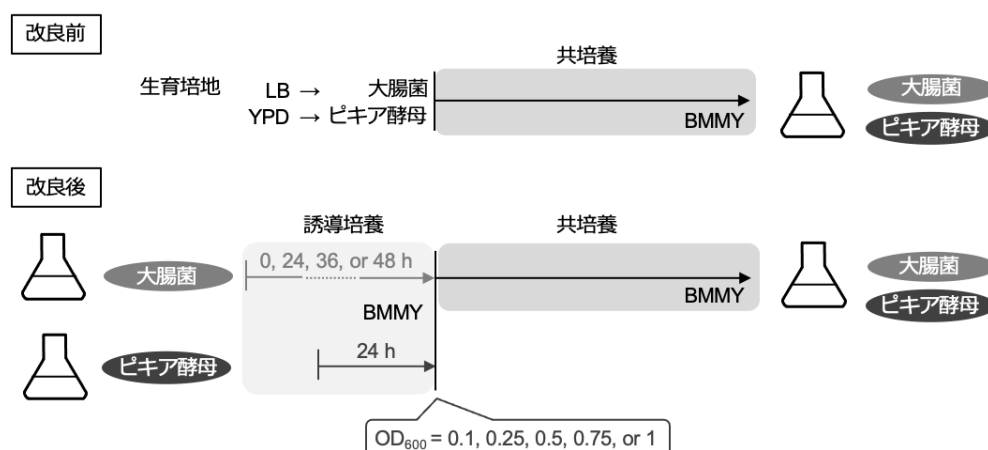


図 4. 改良前と改良後の方法の違い

まず、大腸菌の誘導培養時間の検討を行った。誘導培養の時間は 24、36、48 時間の 3 点を検討した。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、36 時間と 48 時間の誘導培養によっても向上した。

次に、共培養開始時のピキア酵母の混合比率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 OD₆₀₀ = 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 OD₆₀₀ = 0.1 で植菌した場合にスチロピン生産は最大となった。すなわち、ピキア酵母の植菌時 OD₆₀₀ 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。

続いて、メタノールにより、スチロピン生産に関わる BBE、CYP719A5、CYP719A2 の発現が維持され、スチロピンの生産性がさらに向上することを期待して、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、追加添加しなかった場合と比べて 1.7 倍に増加した。

最終的に、大腸菌とピキア酵母の共培養において、共培養前にそれぞれの菌を誘導培養すること、ピキア酵母よりも大腸菌の割合を多くすること、メタノールを追加添加することで改良前と比べて 80 倍生産性を改善させることができた [19]。

以上の結果より、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

第 1 章で確立した大腸菌とピキア酵母の共培養系の、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生合成工学の報告はあるが [5, 14]、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 [20]。生産した化合物を細胞外 (培地中) へ排出できれば、負の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ほとんど無く、どの輸送体がピキア酵母で発現・機能し、最終産物を培地中へ排出するかなどの知見はわかっていない。

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 [21]。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。pPIC3.5K_NtJAT1 ベクターを制限酵素 *PmeI* 処理により線状化し、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。コロニー PCR で遺伝子導入を確認した 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、4 つのコロニーで Geneticin 0.75 mg/mL への耐性、2 つのコロニーで Geneticin 0.50 mg/mL への弱い耐性が認められた。

次に、ピキア酵母での NtJAT1 の発現を比較するために、上記で得られた形質転換体から Geneticin 耐性の異なる 6 つを選び、メタノール含有培地で培養し、NtJAT1 の発現を誘導した。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。

ウェスタンブロット解析の結果から、形質転換体により NtJAT1 発現量が異なることがわかり、発現量の異なる形質転換体を用いてスチロピン生産性を検討した。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、コントロールである pPIC3.5K を形質転換したピキア酵母と比べて、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。特に発現量の高い形質転換体を培養した際には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。

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強く発現させることで、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

第 1 章では、大腸菌とピキア酵母の共培養系の確立を試み、培地などの条件を検討した。その結果、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。さらに、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。

第 2 章では、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。NtJAT1 高発現ピキア酵母と大腸菌を共培養すると、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。

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 [6] を生産する大腸菌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、様々な化合物の生産への応用ができると考えられる。

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、微生物での化合物生産の可能性が広がることが期待される。

文献

- 1 Raskin, I., *et al.*, *Trends Biotechnol.*, **20**, 10 (2002).
- 2 Ro, D.K., *et al.*, *Nature*, **440**, 940-943 (2006).
- 3 Galanie, S., *et al.*, *Science*, **349**, 1095-1100 (2015).
- 4 Nakagawa, A., *et al.*, *Nat. Commun.*, **7**, 10390 (2016).

- 5 Srinivasan, P. & Smolke, C.D., *Nature*, **585**, 614-619 (2020).
- 6 Yuan, S.F., *et al.*, *Microb. Cell Fact.*, **19**, 143 (2020).
- 7 Zhang, J., *et al.*, *Nature*, **609**, 341-347 (2022).
- 8 Sasaki, K., *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 759-761 (2009).
- 9 Ro, D.K., *et al.*, *BMC Biotechnol.*, **8**, 83 (2008).
- 10 Wang, R., *et al.*, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **62**, 65-71 (2020).
- 11 Pyne, M.E., *et al.*, *Plant Physiol.*, **179**, 844-861 (2019).
- 12 Zahrl, R.J., *et al.*, *FEMS Yeast Res.*, **17**, fox068 (2017).
- 13 Belew, Z.M., *et al.*, *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.*, **33**, 100576 (2022).
- 14 Dastmalchi, M., *et al.*, *Plant Physiol.*, **181**, 916-933 (2019).
- 15 Yamada, Y., *et al.*, *Metab. Eng. Commun.*, **13**, e00184 (2021).
- 16 Matsumura, E., *et al.*, *Sci. Rep.*, **8**, 7980 (2018).
- 17 Hori, K., *et al.*, *Sci. Rep.*, **6**, 22201 (2016).
- 18 Urui, M., *et al.*, *Microb. Cell Fact.*, **20**, 200 (2021).
- 19 Urui, M., *et al.*, *Biol. Pharm. Bull.*, **46**, 1494-1497 (2023).
- 20 Yamada, Y., *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **86**, 865-869 (2022).
- 21 Morita, M., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **106**, 2447-2452 (2009).

論文審査の結果の要旨

植物は様々な特化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、生産している植物の減少や、植物中の含量が少ないなど、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。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。合成生物学的研究により特化代謝産物の生産も可能となってきたが、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ネガティブフィードバックなどにより、菌体内での生産量が少ないなどの課題も存在する。本学位論文では、それら課題を解決した有用代謝産物の安定供給系の確立を目指して、以下2つのアプローチで研究を行った。

第1章では、大腸菌とピキア酵母の共培養系の確立を試み、培地などの条件を検討した。その結果、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。さらに、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を示した。

第2章では、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。NtJAT1 高発現ピキア酵母と大腸菌を共培養すると、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を示した。

以上、本研究は、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りうることを示すとともに、輸送工学と共培養系の融合によりさらに生産性を向上させられる可能性を示した。これらの知見は、希少な植物有用代謝産物の安定供給に有益な情報を提供するものと評価される。

本論文は博士（薬学）論文として、適当と判定する。