

バイオものづくり微生物中代謝ボトルネック解消のための 計測技術の開発



研究ノート

松田 史生*

Measurement of yeast metabolism for biochemical production

Key Words : Biotechnology, Bioinformatics, Metabolic engineering,
Budding yeast, Metabolic flux analysis

はじめに—出芽酵母代謝計測の目的

近年、持続可能な社会の構築に向け、再生可能資源であるバイオマスから微生物発酵法で様々な化学原料を生産するバイオものづくり技術の開発が活発化している。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* はグルコースをエタノールに効率よく変換する強い発酵能力を持ち、醸造や製パンなどの食品の工業生産、近年ではバイオエタノール生産宿主として活用されている。さらに、代謝経路を書き換えて、さまざまな有用物質を生産する代謝工学研究の宿主としても広く活用されている。

バイオものづくり技術の実用化には、出芽酵母がグルコースから目的物を生産する収率および速度のさらなる向上が重要である。微生物発酵は、微生物がもともと持つ代謝機能に立脚している。つまり代謝計測技術の目的は、細胞内の代謝状態を定量的にとらえ、出芽酵母代謝経路中のボトルネック反応を特定することである [1]。われわれはバイオテクノロジーと情報解析技術に立脚した代謝計測技術を開発し、出芽酵母の代謝ボトルネック推定に活用してきた。出芽酵母には、研究用の実験室株に加えて、日本酒醸造、製パン用などに選抜育種された、高いエタノール発酵能力を持つ実用株が存在する。本稿では実用株と実験室株の中心代謝経路の流束を ^{13}C 代謝フラックス解析 (^{13}C -MFA) で比較し、エタノール

発酵のボトルネックを推定した例を紹介する。

代謝フラックス解析による代謝解析の利点

図1は出芽酵母の主要な中心代謝経路を示したものである。この図では入り口部分の代謝物であるグルコースと、鍵中間体のピルビン酸、および出口となるエタノールとグリセロールを示している。それ以外の中間体と反応はすべて省略して実線で描いている。例えば、図1aでは出芽酵母実験室株 BY4947 を合成培地中、好気条件下 (50 ml, 30°C) で回分培養したときの ^{13}C -MFA 解析結果を示している [2]。グルコースが流入する入り口の代謝フラックス値は乾燥菌体 1g あたり 1時間あたり 14.3 mmol であることがわかる。同様に、エタノール合成経路のフラックスの値は、21 mmol (g 乾燥菌体重 h)⁻¹ と推定された。また、中心代謝経路の代謝フラックス解析結果からはエネルギー通貨代謝物であるアデノシン 3リン酸 (ATP) の再生量を見積もることができる。中心代謝経路では、グルコースを分解して得たエネルギーを用いて、アデノシン 2リン酸 (ADP) とリン酸を脱水縮合して ATP を再生する。この ATP が ADP とリン酸に加水分解する時に放出されるエネルギーが、さまざまな細胞機能を駆動している。例えば図1aの実験室株 BY4947 の代謝フラックス分布から、ATP 再生速度は 26.0 mmol (g 乾燥菌体重 h)⁻¹ であると算出された。



* Fumio MATSUDA

1974年11月生まれ
京都大学大学院農学研究科応用生命科学
専攻博士後期課程 (2001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 教授 農学博士
TEL : 06-6879-7433
FAX : 06-6879-7433
E-mail : fmatsumada@ist.osaka-u.ac.jp

^{13}C 代謝フラックス解析 (^{13}C -MFA) の方法

この代謝フラックス値の測定手法が ^{13}C 代謝フラックス解析 (^{13}C -MFA) である。 ^{13}C -MFA では、代謝フラックス値を 2つのデータを組み合わせて測定する。1つは培地中代謝物の時系列濃度解析データである。例えば培地中のグルコース濃度は出芽酵母が消費するため、培養時間が進むにしたがって減少

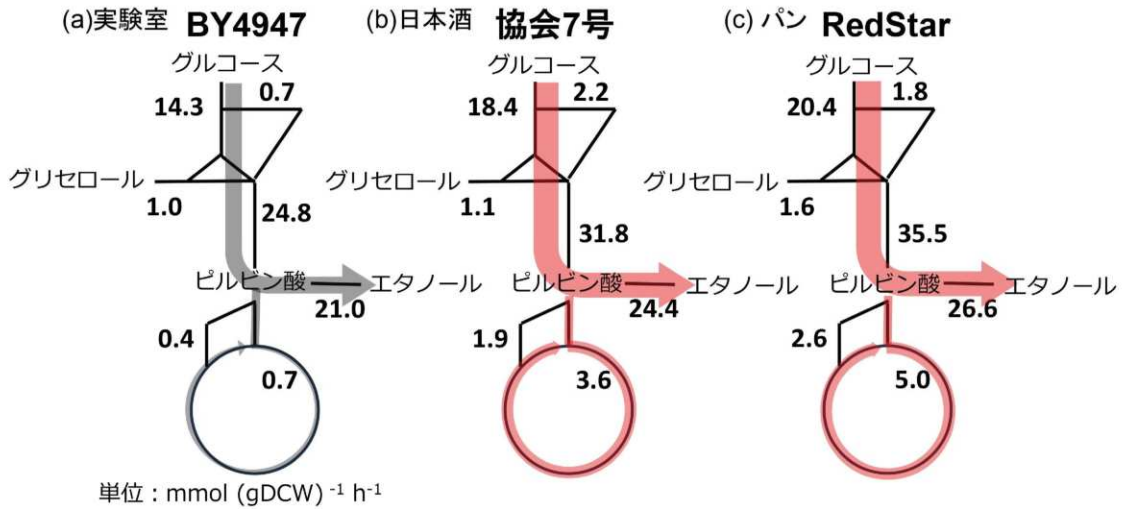


図1 ¹³C-代謝フラックス解析結果。簡略化した代謝マップ上に示した。

する。そこで、グルコース濃度の時系列変化を液体クロマトグラフィーという手法で測定し、その傾きから上述のグルコース代謝経路に流入する部分の代謝フラックス値 (14.3 mmol (g 乾燥菌体重 h)⁻¹) を決定している。

一方、図 1a では、グルコースが流入した直後に 0.7 mmol (g 乾燥菌体重 h)⁻¹ が分岐し、ペントースリン酸経路に迂回していることがわかる。この経路の代謝フラックスを直接測定することは難しい。そこで、グルコースを [1-¹³C] グルコースで置換した培地で出芽酵母を培養する (図 2)。もし [1-¹³C] グルコースの全量が中心代謝経路をまっすぐ下に降りてピルビン酸が生成した場合、半分が ¹³C で標識される (図 2 経路赤)。そこで、細胞内からピルビン酸を抽出し、質量分析法 (MS) を用いてピルビン酸を分析すると、非標識と ¹³C 標識のピルビン酸に由来するシグナルが 1 対 1 の強度で観測されることになる。一方、グルコースの全量がペントースリン酸経路を迂回していた場合、途中で 1 位の ¹³C 原子が脱離して失われるため、非標識のピルビン酸のみが生成する (図 2 経路青)。つまり、ピルビン酸の標識割合の測定値から回路への分岐比を測定できる。図 1a の例では分岐比が 4.9% だったことから代謝フラックス値を、14.3 * 0.049 = 0.7 mmol (g 乾燥菌体重 h)⁻¹ と推定できた。実際の ¹³C-MFA では複数の細胞内代謝物の標識割合を測定し、測定データを最もよく説明する代謝フラックス分布を測定する。我々のグループでは非線形最適化手法などの情報

解析機能を集めた Python モジュールである mfapy の開発を進めている (<https://github.com/fumiomatsuda/mfapy>)。

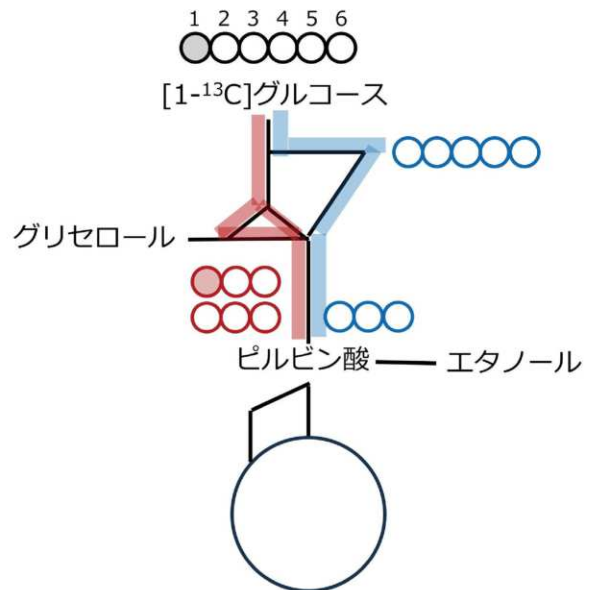


図2 ¹³C-MFA の原理 [1-¹³C] グルコースを炭素源としたときのペントースリン酸経路への分岐比 (青) はピルビン酸の標識割合から推定できる。

出芽酵母実用株の ¹³C-MFA と ATP 浪費によるエタノール生産能の向上

我々は、日本酒醸造用の協会 7 号と、パン酵母の RedStar の代謝フラックス分布を推定した (図 1b, c)。その結果、協会 7 号と RedStar とエタノール生産速度は、実験室株 BY4947 の 21.0 mmol (g 乾燥菌

体重 h^{-1} に比べて 24.4 および 26.6 mmol (g 乾燥菌体重 h^{-1}) と 1.3 および 1.4 倍に向上していた。つまり、高いエタノール発酵能力を示した。また、それに伴い活性化した経路を調べると、全経路の代謝フラックスが増加する傾向が見られた。代謝フラックス分布から、ATP 再生速度を推定したところ、協会 7 号と RedStar では、実験室株に比べて 1.9 倍と 2.3 倍に増加していた (図 1)。実用株は代謝経路全体が活性化し、多量の ATP を再生していることが明らかとなった [2]。

ATP は細胞中で再生⇌加水分解のサイクルを非常に速く回っており、ATP の再生速度とは、ATP の加水分解速度と同じである。つまり、実用株では ATP の需要が何らかの理由で多く、ATP 供給量を増やすためにエタノール生産を含む代謝全体が活性化していると解釈できると考えた。もし、ATP の加水分解がエタノール生産のボトルネックの一つであるなら、ATP を人為的に「浪費」させてボトルネックを解消すれば、エタノール発酵を向上できると考えた。そこで、出芽酵母実験室株 BY318 に、ATP 加水分解酵素である ATPase を発現させてみた。大腸菌 *Escherichia coli* および *S. cerevisiae* 由来 ATPase をコードする遺伝子を発現させた株を構築し、発酵試験を行った。その結果、BY318-ATPase 株 (大腸菌由来の ATPase を発現) では、エタノール

生産速度が 45% 増加した [3]。この結果から、ATP 消費がエタノール生産速度のボトルネックになっていることを確かめることができた。また、2,3-ブタンジオール生産など他の有用物質生出芽酵母産株でも有効であったことから、ATP 浪費が有用物質生産能向上の方法論として有用であることを確かめた [3]。今後も、計測技術と情報解析技術を組み合わせたバイオ情報計測学を発展させることを通じてバイオものづくり実現に寄与していきたいと考えている。

参考文献

- 1) Matsuda, F. *et al.*: Learning from quantitative data to understand central carbon metabolism. *Biotechnol. Adv.*, 35, 971-980 (2017)
- 2) Yatabe, F. *et al.*: Comparative ^{13}C -metabolic flux analysis indicates elevation of ATP regeneration, carbon dioxide, and heat production in industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Biotechnol. J.*, e2000438 (2021)
- 3) Yatabe, F. *et al.*: Improvement of ethanol and 2,3-butanediol production in *Saccharomyces cerevisiae* by ATP wasting. *Microb. Cell Fact.*, 22, 204 (2023)



カワセミ