

多様な炭素源を利用する メタノール資化性酵母の遺伝子発現系

高木 忍¹・由里本博也^{2*}・阪井 康能²

¹ 合同酒精株式会社 酵素医薬品研究所（千葉県松戸市上本郷字仲原 250）

² 京都大学大学院農学研究科 応用生命科学専攻（京都市左京区北白川追分町）

（2021 年 7 月 13 日受付 2021 年 8 月 20 日受理）

要約：メタノール資化性酵母では、主にメタノール資化に関わる酵素遺伝子の強力なメタノール誘導性プロモーターを利用したタンパク質生産が行われてきたが、近年、メタノールを使用せずにグルコースやグリセロール、エタノールなど、メタノール以外の多様な炭素源を利用したタンパク質の発現系が開発されている。さまざまな可能性を秘めたメタノール資化性酵母による遺伝子発現系を紹介する。

キーワード：メタノール資化性酵母，異種遺伝子発現，酵素生産，メタノール非依存的発現，脱抑制

はじめに

Komagataella phaffii (*Pichia pastoris*), *Candida boidinii*, *Ogataea* (*Hansenula*) *polymorpha* などのメタノール資化性酵母は、各々 10 g/L 以上の異種タンパク質生産量が得られた例が知られている。これは *Saccharomyces cerevisiae* に比べると格段に高い生産量で、素材や触媒など安価に多量に供給したいタンパク質の生産には大いに魅力的な宿主といえる。メタノール資化性酵母における異種遺伝子発現には、通常、アルコールオキシダーゼ（AOX）やジヒドロキシアセトンシンターゼ（DAS），ギ酸デヒドロゲナーゼ（FDH）などメタノール代謝（Fig. 1）に関わ

る酵素遺伝子のプロモーターが用いられるが、いずれもメタノールによる誘導性が高く、タンパク質生産のための炭素源にはメタノールが使われる。一方、これらのメタノール代謝酵素遺伝子の発現はグルコースで抑制されるが、メタノールによる誘導に加えて、この抑制が解除された「脱抑制」による発現が知られており、これを利用したタンパク質生産技術も開発されている。このほか、メタノール誘導性遺伝子の転写制御因子（転写因子）やそのプロモーター結合領域（シスエレメント）を利用した、メタノールの添加を必要としないメタノール非依存的発現系も開発が進んでいる。本稿では、これらのメタノールに代わる炭素源を利用したメタノール資化性酵母によるタンパク質生産技術について論じる。

種々の炭素源による

メタノール誘導性遺伝子の発現制御

メタノール誘導性遺伝子の発現は培地中の炭素源の影響を大きく受けるが、その発現制御はメタノール資化性酵母の種により異なっている。一般に、これらの遺伝子発現はグルコースとエタノールで抑制され、*K. phaffii* ではグリセロールによっても抑制される。しかし、培養が進みグルコースなど発現を抑制する炭素源が枯渇した場

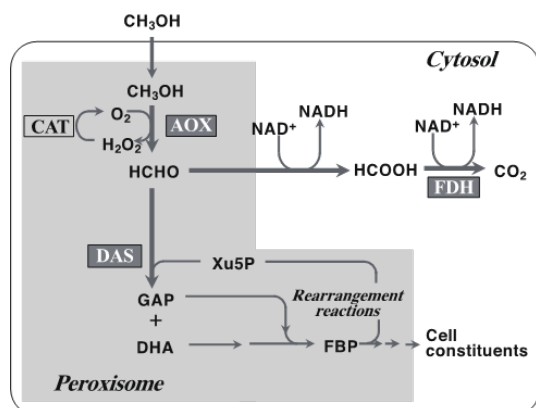


Fig. 1. Methanol metabolism in methylotrophic yeasts.

合、あるいは本来、発現抑制のかからない炭素源を用いた場合、誘導物質であるメタノールが存在しなくても「脱抑制」によって遺伝子が発現する。*C. boidinii* では AOX 遺伝子 (*CbAOD1*) が脱抑制時にメタノール添加時の 20 % 程度のレベルで発現するのに対し、*O. polymorpha* の AOX 遺伝子 (*OpMOX*) は、脱抑制条件下でメタノール添加時の 70 % 程度の発現量が得られる¹⁾。一方、*C. boidinii* でも DAS 遺伝子 (*CbDAS1*) は脱抑制時にはほとんど発現しない。

Mombenia ら²⁾は、*K. phaffii* でこの *OpMOX* プロモーターを利用したタンパク質生産を試み、*K. phaffii* でも *O. polymorpha* と同様に脱抑制条件下でメタノールの添加なしに高発現が得られることを見いだした。さらに Vogl ら³⁾は、*OpMOX* プロモーターについて同様の結果を得たのに加え、同じく *O. polymorpha* の FDH 遺伝子 (*OpFMD*) のプロモーターが脱抑制条件下でさらに強い転写活性を示し、メタノール誘導下での *K. phaffii* の *KpAOX1* プロモーターと同程度のタンパク質生産量が得られることを確認した。また、グルコース・グリセロールの炭素源制限によるケモスタット培養では、*OpFMD* プロモーター支配下の異種タンパク質生産速度が、構成的なグリセルアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子 (*GAP*) プロモーター支配下よりも 9 倍高かったほか、酵母の生育を制御することにより、さらに生産性を最適化できる可能性が示唆された⁴⁾。

メタノール誘導性遺伝子の発現を制御する転写因子

遺伝子の発現は転写因子によって制御される。多くの誘導性酵素遺伝子は、対象となる誘導基質の存在下で転写を正に制御する転写因子が活性化され、その転写因子によって遺伝子の転写が活性化されて発現する。筆者らは、メタノール誘導性遺伝子の転写活性化において、脱抑制とメタノール誘導の 2 段階の制御に働く転写因子群を、主に *C. boidinii* を用いて同定した (Fig. 2)⁵⁾。グルコース抑制には、他の酵母でもよく知られている Mig1 のホモログ CbMig1 が働くが、脱抑制には CbTrm2、メタノール誘導には CbTrm1、CbMpp1、CbHap 複合体 (CbHap2/3/5) などの複数の転写制御因子が関与する。このうち、CbMig1 と CbTrm2 は C₂H₂ 型、CbTrm1 と CbMpp1 は Zn(II)₂Cys₆ 型の zinc finger モチーフをもつ転写因子であり、C₂H₂ 型は GC box に富む領域に、Zn(II)₂Cys₆ 型は CGG トリプレットによるパリンδροーム形成領域に結合するが、*C. boidinii* における結合領域は未同定である。出芽酵母などの Hap 複合体は CCAAT 領

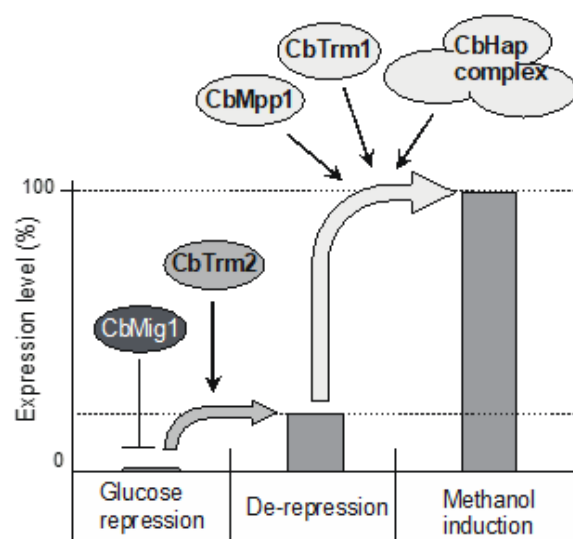


Fig. 2. Transcription factors controlling the expression of methanol-inducible genes in *C. boidinii*.

域に結合することが知られているが、CCAAT 配列を欠失した *CbAOD1* や *CbDAS1* プロモーターでは活性がやや減少する程度であったことから、*C. boidinii* では CCAAT 領域には結合しない可能性がある⁶⁾。後述するようにそれぞれのホモログは *K. phaffii* にも存在するが、よく研究が進んでいるものとして、CbTrm2 のホモログである KpMxr1 や CbMpp1 のホモログ KpMit1 がある。

酵母のグルコース抑制と脱抑制

「脱抑制」について、もう少し述べる。酵母のグルコース抑制と脱抑制の機構は、*S. cerevisiae* で解明が進んでいる。すなわち、環境中にグルコースが高濃度で存在する場合はグルコースの代謝（解糖系）が活発となり、エタノールやグリセロール、酢酸など代替炭素源の代謝や糖新生・呼吸に関わる遺伝子は抑制されるが、環境中のグルコース濃度が低下 (0.2 % 以下) または枯渇すると、これらの遺伝子の抑制が解除され代替炭素源の代謝や糖新生、呼吸が活発となる^{7,8)}。これが「脱抑制」である。ここで中心的役割を果たすのがセリン・スレオニンプロテインキナーゼである Snf1 で、高濃度のグルコース存在下では Glc7/Reg1 複合体による脱リン酸化あるいは自己阻害により不活化され、グルコース濃度が低下すると上流のキナーゼあるいは自身によるリン酸化により活性化されて、種々の転写因子など制御因子の活性を制御する (Fig. 3)。たとえば、前述の高濃度のグルコースによる遺伝子の抑制は負の転写因子 Mig1 によってなされるが、グルコース濃度が低下して Snf1 が活性化されると、Mig1 がリン酸化を受けて核外に輸送され、抑制が解除される。

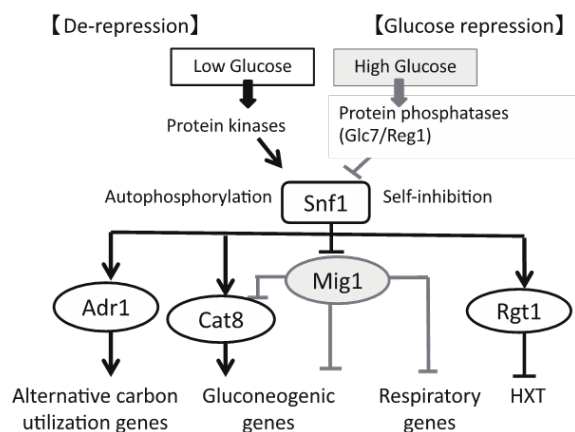


Fig. 3. Glucose repression and de-repression in *S. cerevisiae* (from ⁷⁾ with modification). Gray lines indicate the reactions in glucose repression. Black lines show the reactions under de-repression. Arrow means activation, T-line means repression. Snf1, protein kinase; Adr1, Cat8, Mig1, and Rgt1, transcription factors; HXT, hexose transporter genes.

また、代替炭素源の代謝や糖新生に関わる遺伝子を正に制御する転写因子 Adr1 や Cat8 は、間接的または直接的に Snf1 により活性化され、これらの遺伝子を発現させる。Adr1 は直接 Snf1 のリン酸化は受けないが、DNA の結合に Snf1 活性を必要としている⁷⁾。これは、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ Gcn5 を介したクロマチンリモデリングによるものと考えられている。

培地中のグルコース濃度はヘキソース輸送体 (HXT) ファミリーのグルコースセンサー Rgt2/Snf3 によって感知され、負の転写因子 Rgt1 を介して親和性の異なる輸送体 Hxt1/2/4/6 の発現がグルコース濃度に応じて制御されるが⁹⁾、この Rgt1 による抑制にも Snf1 が関与している⁷⁾。このように、Snf1 はグルコースの脱抑制に主要な働きをするが、グルコースセンサーから Snf1 までのシグナル伝達の詳細は未だ明らかとなっていない。

S. cerevisiae アルコール脱水素酵素遺伝子 *ADH2* の活性化には正の転写因子 Adr1 が必要だが、Adr1 は脂肪酸代謝、グリセロール代謝に関わる遺伝子の発現も制御していると考えられている。前述の CbTrm2 は Adr1 のホモログであり、Adr1 と類似のメカニズムで脱抑制時にメタノール誘導性遺伝子の転写を活性化すると考えられるが、詳細は明らかになっていない。

転写因子エンジニアリングによる *K. phaffii* のメタノール非依存的発現系の開発

前述のように、転写因子は環境の変化を感知して遺伝子の発現を制御している。この転写因子の発現を人工的に制御することにより、通常と異なる遺伝子発現が可能

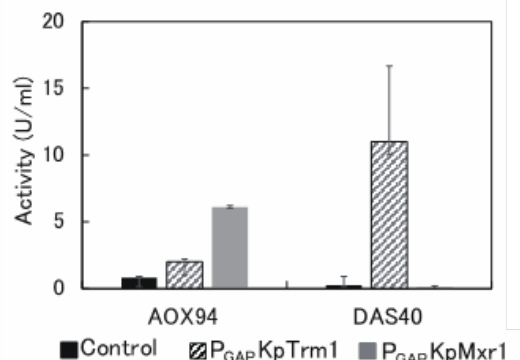


Fig. 4. Enzyme production with glucose by co-expression of positive transcription factors ¹⁰⁾. AOX94, the strain expressing phytase using *AOX1* promoter; DAS40, the strain expressing phytase using *DAS1* promoter; Control, without co-expression; P_{GAP}KpTrm1 and P_{GAP}KpMxr1, co-expressing KpTrm1 or KpMxr1 with *GAP* promoter, respectively.

となる。メタノール誘導性遺伝子の正の転写因子をメタノール非依存的に発現させることにより、メタノール誘導性遺伝子プロモーターをメタノール非依存的に活性化できると予測し、*K. phaffii* による新しい発現系の開発を試みた¹⁰⁾。CbTrm1 のホモログである KpTrm1 と CbTrm2/ScAdr1 のホモログである KpMxr1 について、各々の遺伝子 (*KpTRM1*, *KpMXR1*) を *GAP* プロモーターの支配下で炭素源に依存せず構成的に発現するカセット (P_{GAP}KpTrm1 および P_{GAP}KpMxr1) を構築し、*AOX1* プロモーターまたは *DAS1* プロモーター支配下で細菌由来フィターゼ遺伝子を発現する *K. phaffii* AOX94 株と DAS40 株に導入した。得られた菌株についてグルコースを炭素源として酵素生産を試みたところ、元株はグルコース培地でフィターゼ活性がほとんどみられなかったのに対し、P_{GAP}KpTrm1 を導入した株では、AOX94 株由来、DAS40 株由来ともに有意にフィターゼの生産がみられた (Fig. 4)。興味深いことに P_{GAP}KpMxr1 を導入した場合、AOX94 株では KpTrm1 よりも高いフィターゼ活性が得られたのに対し、DAS40 株ではほとんど活性がみられなかった。これは、*DAS1* プロモーターがメタノール誘導時に作用する KpTrm1 では活性化されるが脱抑制時にはたらく KpMxr1 では活性化されないことを示しており、これは *C. boidinii* の *DAS1* プロモーターの挙動と一致した。

一方、Chang ら¹¹⁾は脱抑制で活性化される *AOX2* プロモーターで *KpMXR1* を、同様に Vogl ら¹²⁾は脱抑制時に発現するペルオキシソーム型カタラーゼ遺伝子 *CAT1* のプロモーターを用いて *KpMXR1* や KpMit1 遺伝子

(*KpMIT1*) を発現させ、各々 *AOX1* プロモーター支配下でタンパク質生産をする株に共発現させたところ、いずれも脱抑制時にタンパク質生産が著しく向上することを見いだした。これは上記のプロモーターの使用で *KpMXR1* の発現が自己制御される形となり、脱抑制時に *KpMXR1* の発現量が増加したことが一因と考えられる。また、Wang ら¹³⁾は、*AOX1* プロモーターの3つのグルコース抑制因子 *KpMig1/KpMig2/KpNrg1* を欠損させたうえで *KpMIT1* を *GAP* プロモーターで発現させたところ、グリセロールを用いた培養で *AOX1* プロモーターによるタンパク質生産がメタノール誘導時の 77 %程度となった。さらに、培養条件をグルコースによる回分培養からグリセロールによる流加培養にシフトさせることにより、メタノール誘導時と同程度のタンパク質生産量を得ることに成功した。このように、メタノール資化性酵素遺伝子の転写因子の発現を操作することにより、新たなメタノール非依存的発現技術が開発されている。

転写因子のシスエレメントを利用した発現系の改良

転写因子を利用した発現系の改良には、転写因子が結合するプロモーター領域（シスエレメント）も活用できる。たとえば、糸状菌のアミラーゼ関連遺伝子では、正の転写因子のシスエレメントを増幅させると転写活性が向上することが知られている¹⁴⁾。メタノール非依存的発現の転写活性を向上させる目的で、*DASI* プロモーターにおける正の転写因子のシスエレメントの増幅を試みた¹⁰⁾。前述の実験結果から、*KpTrm1* が *DASI* プロモーターによく作用することが分かったので、*DASI* プロモーター中の正のシスエレメントを含む転写活性化領域（UAS）の同定を試みたところ、*DASI* 構造遺伝子上流-255~355 にメタノール誘導に必須である UAS_{DASI} を得た。同様にメタノール誘導活性を抑制する転写抑制領域（URS）が見いだされたため、これを除いた短い *DASI* プロモーターに UAS_{DASI} を 3 コピー増幅した改変型 *DASI* プロモーターを構築し、細菌由来フィターゼ遺伝子の発現を試みたところ、メタノール培地でのフィターゼ活性がフラスコ培養で 2.8 倍、培養槽における高密度培養で 1.4 倍に向上した。しかし、期待に反して P_{GAP}*KpTrm1* を導入しても、グルコース培地でのタンパク質生産量を向上するに至らなかった。改めて検証したところ、*DASI* 構造遺伝子上流-355~455 が *KpTrm1* による転写活性化に重要であることが示されたため、この領域を ESP_{DASI} [Enhancing Sequence for *KpTrm1* (Prm1)] とした。この ESP_{DASI} を増幅することにより、グルコー

ス培地での *DASI* プロモーターの転写活性が増幅すると考えられる。また、得られた結果から、*DASI* プロモーターには *KpTrm1* や *KpMxr1* とは別にメタノール誘導に関わる因子が存在することが明らかとなった。これは前述の *KpMit1* である可能性が高いが、未だ確認されていない。

このほか、Prielhofer ら¹⁵⁾は、*AOX1* プロモーターに代わる有力なプロモーター候補として脱抑制で高活性にはたらくグルコース高親和性輸送体遺伝子 *GTH1* のプロモーターを見だし、このプロモーター中の *Mxr1/Adr1* や *Cat8*, *Hap1* などの転写因子のシスエレメントが密集している領域を重複させることにより、脱抑制条件下でメタノール誘導による *AOX1* プロモーターの 2.2 倍のタンパク質生産性を得た。また、Ergün ら¹⁶⁾は、*S. cerevisiae* のエタノール代謝酵素遺伝子の脱抑制に重要な *Adr1* と *Cat8* のシスエレメントを *AOX1* プロモーター中に 3 コピーずつ導入し、さらに *S. cerevisiae* のエタノール代謝に必須な転写因子 *Aca2* のシスエレメントと類似の配列を *K. phaffii* のアルコール脱水素酵素 *ADH2* プロモーターから見だし、これを加えた改変 *AOX1* プロモーターを作製したところ、エタノールを炭素源として本来の *AOX1* プロモーターによるメタノール誘導時の 1.3 倍の転写活性を得ることに成功した。*Aca2* のシスエレメント単独ではエタノールによる転写活性を誘導できなかったことから、エタノール誘導には *Adr1* や *Cat8* など他の因子が必要であることが分かる。興味深いことに、この改変プロモーターはメタノールによる誘導活性も野生型の 1.6 倍に向上していた。これは、*S. cerevisiae* の *Adr1* や *Cat8* のシスエレメントを認識し、かつメタノールの誘導活性を向上させる転写因子が *K. phaffii* に存在することを示している。これは Sc*Adr1* のホモログである *KpMxr1* や、Sc*Cat8* と同じ Zn(II)₂Cys₆ 型の *KpTrm1* や *KpMit1* がこれらのシスエレメントを認識した可能性もある。いずれにしても、ユニークで興味深い発現系といえる。

まとめ

メタノール資化性酵母では、メタノール誘導性遺伝子の二種類の誘導メカニズム、すなわちメタノール誘導と脱抑制、ならびにこれらに特異的な転写因子を利用して、メタノールに依存しない他の炭素源を用いたタンパク質の発現系の開発が進んでいる。筆者らは *K. phaffii* の *DASI* プロモーターと正の転写因子 *KpTrm1* を利用したグルコースによる発現系を開発したが、他の研究グループでは脱抑制で働くプロモーターや転写因子を利用した発現系

の開発例が多い。さらに転写因子のシスエレメントの増幅や脱抑制の培養方法を最適化することにより、メタノール誘導時と遜色ないタンパク質生産量が得られている。今後さらにさまざまなプロモーターの転写因子や制御機構の解明が進めば、さまざまな原料を用いた生産性の高いタンパク質発現系が開発されると期待できる。

謝 辞

筆者らのメタノール非依存的発現系の開発は、高木がノボライムズ社在職中に行われた。当時ご協力いただいた同僚に感謝します。

文 献

- 1) Yurimoto, H., Oku, M., and Sakai, Y.: *Int. J. Microbiol.*, **2011**, 101298 (2011).
- 2) Mombeni, M., Arjmand, S., Siadat, S. O. R., Alizadeh, H., and Abbasi, A.: *Enzyme Microb. Technol.*, **139**, 109582 (2020).
- 3) Vogl, T., Fischer, J. E., Hyden, P., Wasmayer, R., Sturmberger, L., and Glieder, A.: *AMB Express*, **10**, 38 (2020).
- 4) Garrigós-Martínez, J., Vuoristo, K., Nieto-Taype, M. A., Tähtiharju, J., Uusitalo, J., Tukiainen, P., Schmid, C., Tolstorukov, I., Madden, K., Penttilä, M., Montesinos-Seguí, J. L., Valero, F., Glieder, A., and Garcia-Ortega, X.: *Microb. Cell Fact.*, **20**, 74 (2021).
- 5) Yurimoto, H. and Sakai, Y.: *Curr. Issues Mol. Biol.*, **33**, 197-210 (2019).
- 6) Oda, S., Yurimoto, H., Nitta, N., Sasano, Y., and Sakai, Y.: *Eukaryot. Cell*, **14**, 278-285 (2015).
- 7) Kayikci, Ö. and Nielsen, J.: *FEMS Yeast Res.*, **15**, fov068 (2015).
- 8) Gancedo, J. M.: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **62**, 334-361 (1998).
- 9) Kaniak, A., Xue, Z., Macool, D., Kim, J.H., and Johnston, M.: *Eukaryot. Cell*, **3**, 221-231 (2004).
- 10) Takagi, S., Tsutsumi, N., Terui, Y., Kong, X. Y., Yurimoto, H., and Sakai, Y.: *FEMS Yeast Res.*, **19**, foz059 (2019).
- 11) Chang, C. H., Hsiung, H. A., Hong, K. L., and Huang, C. T.: *BMC Biotechnol.*, **18**, 81 (2018).
- 12) Vogl, T., Sturmberger, L., Fauland, P. C., Hyden, P., Fischer, J. E., Schmid, C., Thallinger, G. G., Geier, M., and Glieder, A.: *Biotechnol. Bioeng.*, **115**, 1037-1050 (2018).
- 13) Wang, J., Wang, X., Shi, L., Qi, F., Zhang, P., Zhang, Y., Zhou, X., Song, Z., and Cai, M.: *Sci. Rep.*, **7**, 41850 (2017).
- 14) 坪井宏和, 幸田明生, 峰時俊貴, 坊垣隆之: 生物工程, **95**, 659-661 (2017).
- 15) Prielhofer, R., Reichinger, M., Wagner, N., Claes, K., Kiziak, C., Gasser, B., and Mattanovich, D.: *Biotechnol. Bioeng.*, **115**, 2479-2488. (2018).
- 16) Ergün, B. G., Demir, I., Özdamar, T., H., Gasser, B., Mattanovich, D., and Çalık, P.: *Adv. Biosyst.*, **4**, e1900172 (2020).

Seibutsu-kogaku, Volume 99 Issue 10 Pages ●-● (2021)

Technologies for heterologous protein production by methylotrophic yeasts using various carbon sources other than methanol

Shinobu Takagi¹, Hiroya Yurimoto^{2*}, and Yasuyoshi Sakai²

¹Enzymes & Pharmaceuticals Laboratory, Godo Shusei Co., Ltd.

(250 Nakahara, Kamihongo, Matsudo, Chiba, Japan)

²Division of Applied Life Sciences, Graduate School of Agriculture, Kyoto University

(Kitashirakawa-Oiwake, Sakyo-ku, Kyoto, Japan)

Abstract: Methylotrophic yeasts have been used for heterologous protein production using strong methanol-inducible promoters where methanol is used as a carbon source as well as an inducer. Recently, several new technologies for protein production utilizing such promoters have been developed, where carbon sources other than methanol, such as glucose, glycerol, and ethanol, are used. Here we introduce these technologies including our own work.

Key words: methylotrophic yeast, heterologous gene expression, enzyme production, methanol-independent, de-repression