

「グリセロール-バイオリファイナリー」への活用に向けた C₁ 酵母のグリセロール応答型有用タンパク質生産系の開発

岐阜大学 応用生物科学部 応用生命科学課程

中川 智行

1. はじめに

国内で実用化されているバイオディーゼル燃料（BDF）は、廃食油とメタノールを原料としたアルカリ触媒法により製造されている。しかし、BDF 製造など油脂生産過程では約 20%の割合で副産物として排出されるグリセロールが産業廃棄物として処理されている。

一方、メタノールを唯一の炭素源として利用可能でメタノール誘導性プロモータを用いた有用タンパク質発現系の宿主として利用されている C₁ 酵母 *Komagataella phaffii* はグリセロールを炭素源として超高密度培養が可能であることから、グリセロールを出発原料とした有用タンパク質生産などの発酵生産系「グリセロール-バイオリファイナリー」への活用が期待でき、副産物の有効利用を通して BDF の環境循環型エネルギーとしての価値を付与できる。¹⁾ しかし、これまで *K. phaffii* のグリセロール生育・応答に関する研究報告はほとんどなく、C₁ 酵母の「グリセロール-バイオリファイナリー」への活用の道はこれまで未開拓である。

本研究では、*K. phaffii* の強力なグリセロール誘導性プロモータを探索し、また本酵母のグリセロールに対する細胞応答・生育を強化することでグリセロール応答型有用タンパク質生産系の基盤を構築し、*K. phaffii* の「グリセロール-バイオリファイナリー」への活用の可能性を見出し、BDF に環境循環型エネルギー源としての価値を付与することを目的とする。

2. BDF 生産の副産物グリセロールの C₁ 酵母による有効利用と課題

BDF は環境循環型エネルギーとしてカーボンニュートラル社会実現の鍵エネルギーの一つであるものの、製造過程で約 20%の割合で生じる副生産物グリセロールは大部分が産業廃棄物として廃棄されている。BDF の有効利用という意味では、廃棄されるグリセロールの活用で廃棄油由来の炭素を余すことなく有効活用でき、BDF に環境循環型エネルギー源としての付加価値を付与し、カーボンニュートラル社会を導く技術として発展させることが可能である。²⁾

一方、グリセロールを炭素源とした場合、C₁ 酵母である *K. phaffii* は OD_{660nm}=100 を超えるほどの超高密度で培養できる特徴がある。現在の *K. phaffii* の有用タンパク質生産では、強力なメタノール誘導性プロモータを用いた異種タンパク質生産系であるため、一度、生育が良いグリセロールで細胞収率を上げたあと、誘導環境であるメタノール培養系に移行する必要がある。もし、*K. phaffii* がメタノールと同様に、グリセロール培養時に利用できる高発現可能なプロモータを有していれば、メタノール培養への切り替え無しに「1 ステップ型高タンパク質生産系」が達成でき、培養コストの削減、発酵時間の短縮など、より経済的な有用タンパク質生産が達成でき、低環境負荷型技術として提示できる。

3. C₁酵母のグリセロール生育特性

まず最初に、いくつかの C₁ 酵母を用いてグリセロール生育特性を比較し、最もグリセロール培養に適した C₁ 酵母の選抜を試みた。C₁ 酵母はアルコール酸化酵素の多様性から 4 つのクラスターに分類されることから³⁾、各クラスターから *Candida boidinii*、*Ogataea angusta*、*Ogataea methanolica*、*K. phaffii* を選抜した。これら C₁ 酵母のグリセロール生育を 2%、15%、20% グリセロール/YNB 培地にて観察したところ、図 1 に示すように 2%グリセロール条件において *O. methanolica* の生育は若干弱いものの、全ての C₁ 酵母株は十分なグリセロール生育を示した(図 1)。グリセロール濃度が 15%になると *O. methanolica* は生育できず、*C. boidinii*、*O. angusta*、*K. phaffii* は十分なグリセロール生育を示した一方、20%グリセロールでは全ての C₁ 酵母株は生育できなかった(図 1)。

これらのことから、高メタノール環境においても良好なグリセロール生育を示す *C. boidinii*、*O. angusta*、*K. phaffii* が本研究におけるターゲット C₁ 酵母の候補としてピックアップされたが、ゲノム情報を web 上にて閲覧でき、遺伝子組み換え技術のツールが豊富な *K. phaffii* を「グリセロール-バイオリファイナリー」構築におけるホストとして選抜することにした。

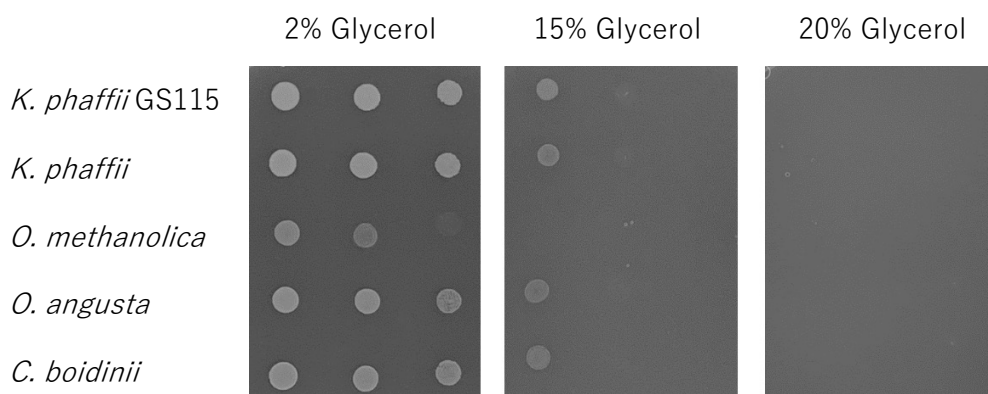


図 1. C₁ 酵母のグリセロール生育.

4. *K. phaffii* のグリセロール生育特性

「グリセロール-バイオリファイナリー」構築におけるホストとして選抜した *K. phaffii* GS115 株のグリセロール生育特性を詳細に観察することにした。GS115 株は 10%グリセロールまでは十分な生育を示し、最終細胞収率は OD_{600nm}=14.0 まで上昇した。また、グリセロール濃度の上昇に伴って生育は低下し、20%グリセロールでは最終細胞収率は OD_{600nm}=6.0 まで低下し、20%グリセロールでは全く生育することができなかった。

これらの結果から、*K. phaffii* GS115 株はグリセロール濃度が 10%付近までは生育阻害を示さず、20%グリセロール環境下付近まで生育遅延を示しながらも生育が可能であることが明らかとなった。

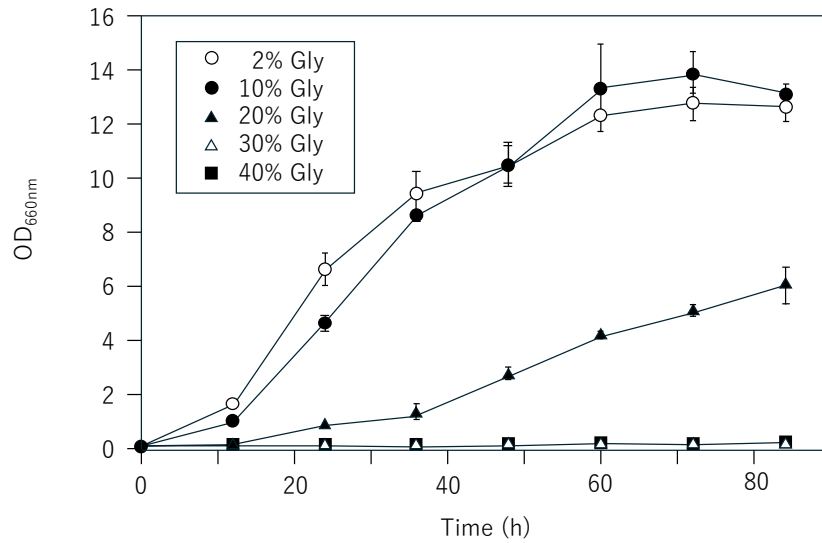


図 2. *K. phaffii* のグリセロール生育.

5. *K. phaffii* のグリセロール生育細胞の遺伝子発現プロファイル

K. phaffii GS115 株のグリセロール生育時における遺伝子発現プロファイルを示すことを目的に、2%グリセロール生育細胞（誘導時間 2 h）を回収し、RNA を抽出後、RNA seq にてトランスクリプトーム解析を行った。コントロール区分には 2%グルコース生育細胞を用いた。

グリセロール生育細胞では、グルコース生育細胞と比較して 541 遺伝子の発現が有意に上昇しており、そのなかでもグルコース生育細胞と比較して 5 倍以上発現が上昇した 34 遺伝子を同定した。一方、グルコース生育細胞に対して発現が減少していた遺伝子数は 509 遺伝子であり、なかでも発現が 1/5 倍以下に減少していた遺伝子は 6 遺伝子であった。これら発現データをボルケーノプロットにて示した（図 3）。

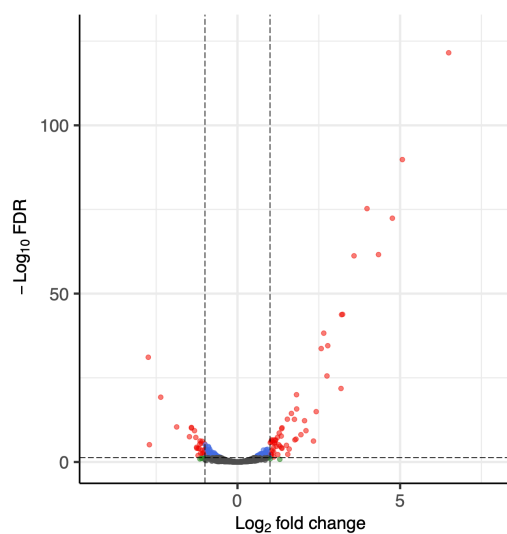


図 3. *K. phaffii* のグリセロール生育細胞とグルコース生育細胞における遺伝子発現変化のボルケーノプロット.

これら *K. phaffii* GS115 株においてグリセロール依存的に発現が最も上昇した遺伝子はギ酸脱水素酵素コードする *FDHI* であった。*FDHI* は欠損によりメタノール生育が著しく低下するが、⁴⁾ グリセロールに対する生育は変化なかった。また、*FDHI* のグリセロールによる遺伝子発現を qPCR にて解析をしたところ、その発現上昇は見られなかったことから、RNA seq におけるデータはグリセロール応答ではなく 2 次的な代謝産物に対する応答であると判断した。また *FDHI* 以外のグリセロール依存的に発現が上昇する遺伝子はその発現量が著しく低かった。

次に *K. phaffii* GS115 株においてグリセロール代謝経路に関する遺伝子群のグリセロール発現応答を解析したところ、グリセロール代謝酵素であるグリセロールキナーゼ(GlpK)とグリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(G3PDH)をコードする遺伝子は、グルコース生育細胞に比べてそれぞれ 6.36 倍および 2.05 倍に遺伝子発現が上昇していた (図 4)。一方、解糖系酵素群はグリセロールにより抑制されていることが明らかとなった (図 4)。

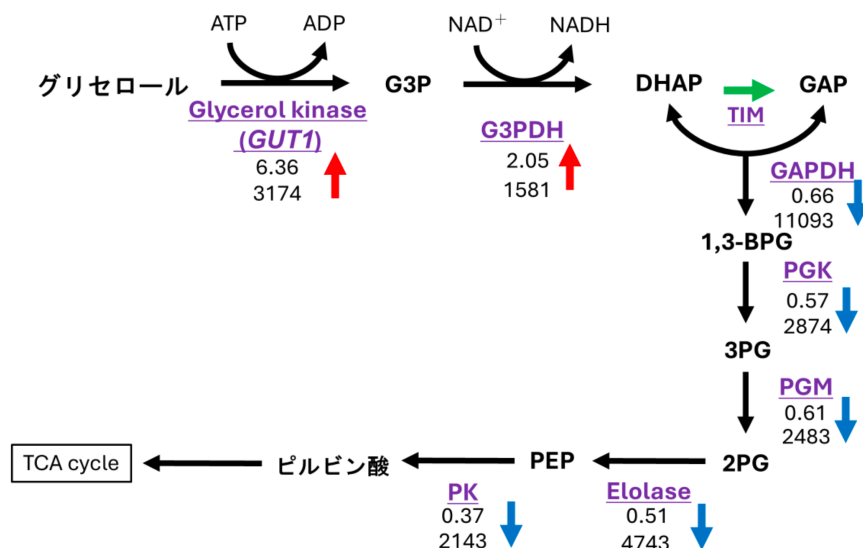


図 4. *K. phaffii* のグリセロール代謝経路に関わる酵素群のグリセロールに対する遺伝子発現応答。

6. まとめ

本研究では、BDF 製造において約 20%の割合で副産物として排出されるグリセロールを発酵炭素源として活用する目的で、メタノールを唯一の炭素源として利用でき、かつ有用タンパク質発現系の宿主として利用されている *C₁* 酵母の発酵生産系「グリセロールバイオリファイナー」への活用の可能性について検証を行った。

C₁ 酵母はグリセロールを唯一の炭素源として生育可能であることはすでに報告されているが、本研究によって、種によってそのグリセロール資化能力が異なることがわかった。*O. methanolica* など、グリセロールは資化できるものの生育能力が低い種がいる一方で、*K. phaffii* などグリセロールを炭素源として超高密度培養が可能なグリセロール生育型 *C₁* 酵母も見出す

ことができた。一般的に C₁ 酵母はグリセロールによりメタノール代謝酵素系の遺伝子発現が抑制されることが知られているが、私たちはこれまで *O. methanolica* は他の C₁ 酵母で報告されているグリセロールによるカタボライト抑制による遺伝子発現制御は存在しないことを報告してきた。⁵⁾ 今回、*O. methanolica* はグリセロールに対する生育能が著しく低いことが明らかとなり、これらグリセロール抑制とグリセロール生育に関するなんらかの関連性があることが考えられる。

一方、*K. phaffii* は 20%グリセロール環境でも生育が可能であり、また遺伝子発現ツールも豊富であることから、グリセロール生育型 C₁ 酵母のモデル株として *K. phaffii* GS115 株を選抜し、GS115 株のグリセロール特異発現型遺伝子の探索を RNA seq にて行った。遺伝子発現プロファイリングの結果、GS115 株でグリセロールにて最も発現が上昇する遺伝子として *FDH1* を同定したものの、本遺伝子はメタノール、ホルムアルデヒド、ギ酸など C₁ 化合物に応答し、発現が上昇することが知られている。⁶⁾ 本研究では、qPCR による解析の結果、今回の *FDH1* の発現はグリセロールによるものではなく、GS115 株のグリセロール代謝の代謝産物による 2 次的な発現であることが考えられた。一方、*FDH1* 以外に高発現でグリセロール応答型の発言パターンを示す遺伝子は同定されず、「グリセロール-バイオリファイナリー」で活用できる新たな遺伝子プロモータの同定には至らなかった。

一方で、グリセロール代謝系の酵素グリセロールキナーゼ (GlpK) をコードする遺伝子 *GUT1* はグリセロールにて 6.36 倍程度の発現上昇ではあるが、発現量が多く、グリセロール応答型プロモータとしての活用の可能性を示すことができた。今後、*GUT1* 遺伝子プロモータの機能と発現制御を詳細に解析し、その能力を最大限に活用できる変異型プロモータの開発などを通して、C₁ 酵母の発酵生産系「グリセロール-バイオリファイナリー」への活用が可能な新たなグリセロール誘導型プロモータの開発を目指していく。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、公益財団法人 天野工業技術研究所から多大なご支援を頂きました。ここに記して謝意を示します。

参考文献

- 1) Carneiro CVGC, Serra LA, Pacheco TF, Ferreira LMM, Brandão LTD, Freitas MNdM, Trichez D, Almeida JRMD. 2022. Advances in *Komagataella phaffii* engineering for the production of renewable chemicals and proteins. *Fermentation*. 8:575.
- 2) da Silva GP, Mack M, Contiero J. 2009. Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnol Adv*. 27:30-39.
- 3) Ito T, Fujimura S, Uchino M, Tanaka N, Matsufuji Y, Miyaji T, Takano K, Nakagawa T, Tomizuka N. 2007. Distribution, diversity and regulation of alcohol oxidase isozymes, and phylogenetic relationships of methylotrophic yeasts. *Yeast*. 24: 523-532.
- 4) Zhu J, Cai HL, Goto S, Shimada M, Yurimoto H, Sakai Y, Yoko-O T, Chiba Y, Nakagawa T. 2025.

Physiological role of the *FDH1* gene in methylotrophic yeast *Komagataella phaffii* and carbon recovery as formate during methylotrophic growth of the *fdh1*-deletion strain. *J Biosci Bioeng.* 139:206-212.

- 5) Nakagawa T, Wakayama K, Hayakawa T. 2015. Selection of suitably non-repressing carbon sources for expression of alcohol oxidase isozyme promoters in the methylotrophic yeast *Pichia methanolica*. *J Biosci Bioeng.* 120:41-44.
- 6) Sakai Y, Murdanoto AP, Konishi T, Iwamatsu A, Kato N. 1997. Regulation of the formate dehydrogenase gene, *FDH1*, in the methylotrophic yeast *Candida boidinii* and growth characteristics of an *FDH1*-disrupted strain on methanol, methylamine, and choline. *J Bacteriol.* 179:4480-4485.