

## 論文の内容の要旨

論文題目 代謝工学を用いた酵母によるグルタチオン及び $\gamma$ -グルタミルシステインの生産  
氏名 西内 博章

### 1. 背景

グルタチオン (L- $\gamma$ -glutamyl-L-cysteinyl-glycine、以下 GSH) は、グルタミン酸 (Glu)、システイン (Cys)、及びグリシン (Gly) からなるトリペプチドである。ただし、Glu と Cys の結合は通常のペプチド結合ではなく、Glu 側鎖の $\gamma$ -カルボキシ基と Cys の $\alpha$ -アミノ基が縮合した $\gamma$ -グルタミル結合である。 $\gamma$ -グルタミルシステイン (L- $\gamma$ -glutamyl-L-cysteine、以下 $\gamma$ -GC) は GSH の前駆体であり、Glu 及び Cys からなるジペプチドである。

GSH は、「 $\gamma$ -GC 合成酵素の作用により Glu と Cys から $\gamma$ -GC が生合成する」段階と、「GSH 合成酵素の作用により $\gamma$ -GC と Gly から GSH が生合成する」段階、にて生合成される。GSH には、抗酸化作用や解毒作用等の生理活性が知られており、白内障の進行を遅らせる点眼薬としても使用されている。一方、 $\gamma$ -GC の薬理作用についての報告例は皆無である。GSH は酵素反応法、或いは酵母菌体からの抽出法により工業生産されている。GSH の化学合成法は、構造上の特徴により通常のペプチド合成よりも手間がかかり、現生産法に対するコスト優位性がない。

医薬分野で有用性が着目された GSH であるが、食品分野でも有用性が着目されている。料理の隠し味に使われるニンニクの有効成分の探索の結果、GSH がコク味物質の 1 つと同定され、コク味の付与等の目的で加工食品に利用されている。 $\gamma$ -GC の有用性は明確でないが、私は $\gamma$ -GC を調理条件下で加熱することで Cys が遊離することを報告した。Cys は、古くからパンや麺類の物性改善や加熱フレーバー製造時の原料として加工食品の製造に利用されている。このように、GSH 及び $\gamma$ -GC は、加工食品の呈味、風味、物性の改善に有効な化合物である。

これら有用化合物は、一般に食品添加物として加工食品の製造工程で利用されるが、ある一定の割合でこれら有用化合物を含有する食材を加工食品の製造工程に利用したいとのニーズがある。酵母は、このニーズに合致する食材である。

酵母の GSH 代謝経路及び GSH 高含有酵母の育種に関し数多くの報告があるが、その大部分が酵母の GSH 含量に着目した報告であり、菌体生育に着目した報告はほとんどない。一般に、酵母が速く増殖する程、酵母の生産性が高まる。工業的には、酵母の GSH 又は $\gamma$ -GC 含量と菌体生育を両立させた生産系が必要である。

### 2. 目的

GSH 及び $\gamma$ -GC を加工食品の品質改善に利用することを目的に、全世界で受容性の高い酵母に着目し、これらペプチドの大量生産に適した酵母菌株を育種することを目標とした。

### 3. 結果

#### 3. 1. 分析系の構築 (第 1 章)

酵母の GSH 及び $\gamma$ -GC 含量を正確に測定する為に、GSH 及び $\gamma$ -GC 中の Cys 残基を蛍光色素で誘導体化し、高速液体クロマトグラフィーを用いて分離・定量する迅速分析系を構築した。

#### 3. 2. GSH 含量と生育の関係 (第 2 章、3 章)

酵母の GSH 含量と菌体生育の関係を探索する為には、単一の親株から GSH 含量が向上した菌株を多数取得する必要がある。そこで、フローサイトメーター (FCM) を活用した迅速スクリーニ

ング系の構築を目指し、GSH 含量の異なるモデル株を用いて FCM の有効性を評価した。その結果、細胞内 GSH に結合した蛍光色素から発せられる蛍光強度を指標にした分離方法では、サンプル中に GSH 含量が高い菌株が一定割合で存在する場合にのみ FCM にて目的菌株が取得可能なことが判明した。更なる効率向上を目的に、酵母の変異株を特定の薬剤で馴致培養し、サンプル中に GSH 含量が高い菌株の存在確率を高めた後、FCM を用いて GSH 含量の高い菌株の取得を試みた。その結果、薬剤耐性と FCM の併用により、GSH 含量が高い変異株の取得効率が大幅に向上した。

次に、併用法により育種した変異株を用いて GSH 含量と生育の関係を探した結果、両者に負の相関が観察された (図 1)。

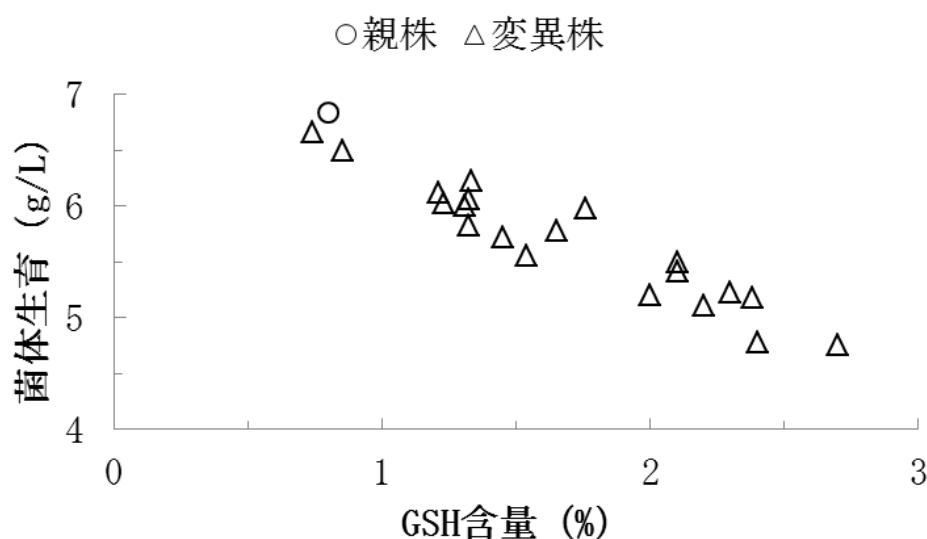


図 1. 親株と GSH 含量が向上した変異株の菌体生育と GSH 含量の関係

### 3. 3. GSH 含有酵母の育種 (第 3 章、4 章)

前項でみられた負の相関は GSH 含量上昇に伴う過剰な生理活性によるものと考え、目的菌株を育種する為には、過剰な量の GSH を液胞に隔離する必要があると考えた。この仮説に基づき、GSH の液胞への輸送単体である *YCF1* の発現量を増強し、液胞での GSH 分解酵素をコードする *ECM38* を破壊した菌株を育種した。親株、対象株 ( $P_{ADHI}-GSH1$ )、そして育種株 ( $P_{ADHI}-GSH1 P_{PGK1}-YCF1 ura3\Delta0 ecm38\Delta0::URA3$ ) は、GSH を各々約 0.7%、1.0%、4.3% 含有していた。一方で、対象株の生育は、親株よりも低下していたが、育種株の生育は親株よりも向上していた。このようにして GSH 含量と生育を両立しうる菌株を分子育種した。

一方、*ADE1* または *ADE2* に変異が生じるとアデニン合成の中間体が細胞内に蓄積する。これら化合物は無色であるが、GSH と結合し液胞に運ばれ、赤色のポリマーを形成し、アデニン要求性酵母が赤く呈色する。私は、中間体の存在量から、酵母の赤色度合は細胞内の GSH 含量に依存し、呈色強度を指標に GSH 含量の上昇した酵母が分離可能と推測した。変異剤を用いて親株 (GSH 含量約 2.0%) より、*ade2* 株 (約 2.8%) を取得した。更に、変異処理を繰り返して、より赤色の菌株 (約 3.3%、約 4.0%) を取得した。同一条件でこれらと比較したところ、これら菌株の赤色強度は GSH 含量と相関することを見出した。構築した系を改良し、アデニン非要求性酵母に適用できるスクリーニング系を構築した。具体的には、ビオチン欠乏メチオニン含有培地で、酵母野生株が赤色を呈したとの報告に着目し、同培地を用いてアデニン非要求性酵母を親株にした GSH 含量向上酵母の取得を試み、GSH 含量向上株 (1.9%⇒3.8%) の取得に成功した。同酵母は、親株と同

等の生育も示した。

### 3. 4. $\gamma$ -GC 含有酵母の育種 (第 5 章)

一般に、 $\gamma$ -GC のような代謝中間体を高生産させるためには、その代謝経路を遮断する必要がある。GSH 合成酵素をコードする *GSH2* を破壊した所、既報の通り前駆体である  $\gamma$ -GC が細胞内に蓄積した (0.05%⇒1.70%)。一方で、菌体生育に大幅な遅延が観察された。そこで、GSH 合成酵素活性を弱体化させる変異を導入したところ、菌体生育に若干の改善が見られたが、 $\gamma$ -GC 含量が低下した (1.70%⇒1.10%)。生育とのバランスを目指し、弱体化株の  $\gamma$ -GC 含量向上を目的に、添加実験での効果をもとに、弱体化株の Cys 生合成経路を強化した (*met30* 変異及びパントテン酸要求性を付加)。取得菌株をパントテン酸欠乏培地で培養した所、培養経時的に菌体内の  $\gamma$ -GC 含量が増加した。菌体を増殖させる培養ステージと菌体内の  $\gamma$ -GC 含量を増加させる培養ステージに分割することにより、 $\gamma$ -GC 含量と生育を両立可能なことを見出した。

## 4. 考察

生体内で GSH は、ストレス応答の他に、細胞内酸化還元電位の維持、細胞内で発生するラジカルの除去、Cys の貯蔵、などの役割を担っており、細胞の状態に応じて細胞内の GSH 含量を一定レベルに制御するために、GSH の生合成経路は厳格に制御されている。その為、特定の遺伝子のみを改変し、酵母細胞内の GSH 含量を無理に増加させようとするとう過剰な生理活性を誘導し、生育遅延をもたらすと考えられた。そこで私は、GSH を生理活性の場から隔離するように菌株を育種した。具体的には、カドミウムと結合した GSH の輸送単体として報告されていた Ycf1p に着目し、同遺伝子を過剰発現させたところ、菌体生育が改善した。この結果より、Ycf1p がフリーの GSH の液胞輸送も担っており、*YCF1* の過剰発現により、細胞質の GSH 含量が一定に維持され、余剰の GSH は液胞に隔離された状態で菌体内に含有されていると考えられる。また、*YCF1* の過剰発現株では、細胞質に存在する GSH 量は少ないと考えられるため、GSH による  $\gamma$ -GC 合成酵素のフィードバック阻害が解除され、GSH の生合成も促進され酵母の GSH 含量が大幅に高まったと考えられる。これら効果により、*YCF1* の過剰発現株では、GSH 含量と菌体生育が両立したと推測された。また、酵母の呈色を指標に取得した菌株中に GSH 含量と生育を両立させた菌株が存在した。遺伝子レベルでの解析の結果、分子育種した菌株とは異なる遺伝子変異により GSH 含量と生育を両立させていると推測できる。

$\gamma$ -GC は、ストレス応答時に GSH 含量を高める為に、前駆体としてその生合成量が増加する。 $\gamma$ -GC 酵母の育種の為には、GSH 合成酵素の弱体化が不可欠であったが、 $\gamma$ -GC は GSH の機能を十分に補完できず、また、過剰に  $\gamma$ -GC が蓄積すると酸化還元電位のバランスが崩れる為、GSH を完全欠損させた過剰蓄積株では生育が悪化したと考えられた。そこで、生育と  $\gamma$ -GC 含量のバランスを維持させるために、2 段階の培養方法が有効であったと推測できる。

## 5. まとめ

GSH を液胞に隔離させることにより、GSH 含量と生育を両立し、2 段階の培養方法を組み合わせることにより  $\gamma$ -GC 含量と生育を両立可能なことを見出した。これら菌株は、GSH 及び  $\gamma$ -GC の大量生産に適している。