

2B09-5 遺伝子組換え酵母による効率的なD-乳酸生産

○石田 亘広¹, 鈴木 登美子¹, 長森 英二¹, 徳弘 健郎¹,
大西 徹², 齋藤 聡志², 北本 勝ひこ³, 高橋 治雄¹
(¹豊田中研, ²トヨタ自動車, ³東大院・農生科・応生工)

【目的】CO₂循環型社会に貢献できる材料として注目されているポリ乳酸は、製造コストが高いという問題のほかに耐熱性が低い点が指摘されている。近年、L-乳酸の光学異性体であるD-乳酸のポリマーをポリL-乳酸と混合させると(ステレオコンプレックス化)、ポリ乳酸の耐熱性が向上することが報告されている。しかし一方で、純粋なD-乳酸生産に関する報告例は少ない。我々は、遺伝子組換え酵母を用いたL-乳酸生産技術について既に報告しているが¹⁾、本技術を利用して、D-乳酸を高生産する組換え酵母の構築を試みている²⁾。【方法・結果】乳酸菌*Leuconostoc mesenteroides*よりD-lactate dehydrogenase (D-LDH) 遺伝子を取得し、これを酵母染色体中のpyruvate decarboxylase 1 プロモーター制御下で発現できるようベクターを作製した。本ベクターを*Saccharomyces cerevisiae* OC2株に導入し、D-LDH遺伝子が染色体中に2コピー導入された組換え酵母を構築した。発酵試験の結果、本組換え酵母は、光学純度99.9%以上の高純度D-乳酸を高効率で生産できることを明らかにした。さらに、非中和条件下でも高い生産能があることも確認した。

- 1) Ishida, N. et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, p1964 (2005).
2) Ishida, N. et al., *J. Biosci. Bioeng.*, 101, p172 (2006).

Efficient production of D-lactic acid with metabolically engineered yeast

○Nobuhiro ISHIDA¹, Tomiko SUZUKI¹, Eiji NAGAMORI¹, Kenro TOKUHIRO¹, Toru ONISHI², Satoshi SAITOH², Katsuhiko KITAMOTO³, Haruo TAKAHASHI¹
(¹Toyota Cent. R&D Labs. Inc., ²Toyota Motor Corp., ³Dept. Biotech., Univ. Tokyo)

Key words D-lactic acid, *Saccharomyces cerevisiae*, D-lactate dehydrogenase

2B10-2 メチロトロフ酵母 *Pichia methanolica* CTA1 の一次構造とその発現制御

○藤村 朱喜, 吉田 恭子, 伊藤 尚志, 松藤 淑美, 宮地 竜郎,
中川 智行, 塚塚 登
(東農大・生物産業・食科)

【目的】メチロトロフ酵母のメタノール代謝はペルオキシソーム(Ps)局在型アルコールオキシダーゼ(AOD)によるメタノール酸化により開始される。同時にこの反応では多量のH₂O₂が産生されることから、メチロトロフ酵母にとって細胞内のH₂O₂レベルを制御するシステムは、メタノール生育上、非常に重要であることが推測される。我々はカタラーゼ(CTA)がこれらメタノール代謝制御の鍵と考え、*P. methanolica*のCTAの一次構造とその発現制御について解析を行った。【結果および考察】*P. methanolica* CTA1は1,533bpからなるORFを持ち、511残基の推定アミノ酸配列は他のメチロトロフ酵母と70.4-72.9%の高い相同性を示した。また、PmCta1pはCTA Ps active site signatureおよびheme-ligand signatureを、さらにはC末端にPs targeting signal type 1様配列を保持していた。一方、PmCta1の炭素源による発現制御を解析したところ、グルコースではほとんど誘導されないものの、メタノールにより強力に誘導された。さらに、PmCta1はメタノールのみならずオレイン酸、D-アラニンのようなPs誘導炭素源によっても強く誘導された。これらの結果から、*P. methanolica*はCTA1の発現誘導によりAODをはじめとするPs局在型オキシダーゼにより産生されるH₂O₂の細胞内レベルを調節し、メタノールをはじめとするPs誘導炭素源に対する生育を制御しているのではないかと考えられる。

Molecular characterization of catalase gene CTA1 from methylophilic yeast *Pichia methanolica*

○Shuki FUJIMURA, Kyoko YOSHIDA, Takashi ITO,
Yoshimi MATSUFUJI, Tatsuro MIYAJI, Tomoyuki NAKAGAWA,
Noboru TOMIZUKA
(Dept. Food Sci. Technol., Tokyo Univ. Agric.)

Key words *Pichia methanolica*, catalase, peroxisome

2B10-1 出芽酵母のアセトアルデヒド耐性と脂肪酸組成に関する研究

○松藤 淑美, 伊藤 尚志, 藤村 朱喜, 深山 ひとみ, 宮地 竜郎,
中川 智行, 塚塚 登
(東農大・生物産業・食科)

【目的】アセトアルデヒド(AA)は二日酔いやシックハウス症候群の原因物質の一つとして知られる有毒な揮発性化学物質である。しかし、AAは生体内において様々な代謝経路において生産され、特に出芽酵母ではアルコール発酵の際に大量に生産される重要な中間代謝物質である。我々は生物の持つAA毒性回避機構の解明を目的とし、現在まで出芽酵母のAA耐性関連遺伝子の探索を行ってきた。¹⁾その結果、脂肪酸合成系およびペントースリン酸経路がAA耐性において重要な役割を持つことを明らかにしている。そこで、本研究では出芽酵母のAAストレスに対する細胞膜構造について検討を行った。【結果・考察】出芽酵母の脂肪酸組成はパルミトリン酸(C_{16:1})が49%と最も多く、オレイン酸(C_{18:1})が26%、パルミチン酸(C_{16:0})が18%であった。これに対し、AAストレスを与えるとC_{16:1}、C_{16:0}はそれぞれ減少したのに対し、C_{18:1}は6%近く増加していた。また、ラウリン酸(C_{12:0})やミリスチン酸(C_{14:0})はAAストレスにより減少し、それに対し、ステアリン酸(C_{18:0})は増加していた。よって、AA耐性にはC_{18:1}が重要な役割を果たしており、C_{18:1}を中心に脂肪酸組成を変化させることで、細胞はAAストレスに適応していることが推測された。

¹⁾ 松藤ら 2006年度 日本農芸化学会 大会要旨集

Study on acetaldehyde stress resistance in *Saccharomyces cerevisiae*

○Yoshimi MATSUFUJI, Takashi ITO, Shuki FUJIMURA, Hitomi MIYAMA, Tatsuro MIYAJI, Tomoyuki NAKAGAWA, Noboru TOMIZUKA
(Dept. Food Sci. Technol., Tokyo Univ. Agric.)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, acetaldehyde, fatty acid

2B10-3 メタボローム、トランスクリプトーム解析を活用した亜硫酸高生産下面発酵酵母の育種: 1. 下面発酵酵母とパン酵母の比較

○井元 淳^{1,2}, 吉田 聡³, 港 紀子³, 大内 梨愛³, 石黒 達治³,
水谷 悟³, 曾我 朋義^{4,2}, 善本 裕之³
(¹慶大政策・メディア研究科, ²先端生命科学研, ³キリンビール・フロンティア技研, ⁴慶大)

ビールの醸造において、亜硫酸は鮮度を保つ上で重要であり、一方、硫化水素はオフフレーバーの原因となる。従って、酵母による亜硫酸生産量を増加させ、硫化水素生産量を減少させることが望まれる。そこで、亜硫酸高生産・硫化水素低生産酵母の育種を目標として下面発酵酵母における亜硫酸・硫化水素生産の律速段階を調査した。下面発酵酵母は亜硫酸・硫化水素生産能が高いのに対し、パン酵母はそれらの生産能が低いことに着目し、まず両酵母の硫黄代謝経路のマイクロアレイ解析とメタボローム解析を行い、代謝の挙動を比較した。マイクロアレイ解析から、両酵母の遺伝子発現調節の違いがMET14遺伝子等に見られた。また、メタボローム解析から、下面発酵酵母ではホモシステインの生成基質であるO-アセチルホモセリン(OAH)と硫化水素のうち、OAH量が少ないことが明らかとなった。これらの結果から、下面発酵酵母での亜硫酸・硫化水素生産の律速はOAH量である可能性が示唆された。

Breeding of bottom fermenting yeast for high sulfite production based on metabolomic and transcriptomic analyses: 1. Comparison of metabolites and gene expression of bottom fermenting yeast and budding yeast

○Jun IMOTO^{1,2}, Satoshi YOSHIDA³, Toshiko MINATO³,
Rie OUCHI³, Tatsuji ISHIGURO³, Satoru MIZUTANI³,
Tomoyoshi SOGA^{4,2}, Hiroyuki YOSHIMOTO³
(¹Keio Univ. Grad. Sch. Media and Governance, ²IAB, ³KIRIN Brewery Co., Ltd. Cent. Labs. Frontier Technol., ⁴Keio Univ.)

Key words sulfite, sulfide, metabolome, transcriptome