

1S3p01 遺伝子組換えワイン酵母による新しい乳酸生産技術

○石田 亘広¹, 高橋 治雄¹, 大西 徹²
(¹豊田中研,²トヨタ自動車)

【緒言】石油資源の枯渇対策や地球温暖化問題などにより、バイオリファイナリー社会への転換が 21 世紀の重要課題として取り上げられている。特に最近、ポリ乳酸を中心とする植物由来プラスチックが注目を集めており、農業用シートや家電材料の一部に採用されるなどして実用化されている。しかし、ポリ乳酸をポリエチレンやポリプロピレン並みの汎用性プラスチックとして本格的に展開するためには、耐熱性や耐衝撃性といった物性・機能性の向上が不可欠である。我々は、ワイン酵母 OC2 を利用した新しい乳酸生産技術についてこれまで報告しており、本シンポジウムにおいては、醸造用微生物のもつ新たな可能性の一例として紹介したい。

【ワイン酵母による乳酸生産の特徴と可能性】ワイン酵母 OC2 は、高い発酵能を有するとともに、生育速度が速く、培養特性に優れた実用株として、広く知られている。また 2 倍体で、胞子形成能が高く、ホモタリックであるという特徴も有している。通常、本酵母において乳酸は生産されないが、遺伝子組換え技術によって生産が可能になると、高光学純度の乳酸生産が予想されると同時に、低 pH ストレスにも比較的耐性を示すことから、中和を必要としない条件下であってもフリー乳酸を生産できる可能性が期待される。また高密度培養が可能であり、培養における栄養要求性もそれほど高くない。

このような期待から、本酵母を利用した高い乳酸生産系を確立することを目的に、代謝工学的手法による開発を試みた。本株がホモタリックであるという特長を生かし、胞子分離を利用して、L-乳酸脱水素酵素遺伝子を複数導入させ、光学純度 99.9% 以上の L-乳酸を高効率で生産できることを確認した。

一方でポリ乳酸は、実用上の耐熱性は極めて低いという課題を抱えている。耐熱性を高める目的で、層状ケイ酸塩とのナノコンポジット化やケナフ繊維添加による方法が報告されているが、L-乳酸の光学異性体として知られる D-乳酸のポリマーを L-乳酸ポリマーと混合させたステレオコンプレックス化ポリ乳酸が、耐熱性を高める手段として注目されている。そこで、同様の手段でワイン酵母中に D-乳酸脱水素酵素遺伝子を導入し、高純度 D-乳酸酵母の作製も可能であることが確認できた。

ポリ乳酸を本格的に展開するためには、物理特性の向上が必要であるが、ワイン酵母 OC2 を利用することにより、高い光学純度を維持した L-もしくは D-乳酸の高効率生産が可能である。さらには本酵母を利用することで、セルロースを中心とする廃棄バイオマスからの乳酸生産技術への展開も期待できる。今後これらの技術を発展させ、基礎的並びに応用的な側面から、本醸造用微生物のさらなる可能性が広がることを期待したい。

Efficient production of lactic acid with metabolically engineered wine yeast

○Nobuhiro ISHIDA¹, Haruo TAKAHASHI¹, Toru ONISHI²
(¹Toyota Cent. R&D Labs. Inc., ²Toyota Motor Co.)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, Lactic acid fermentation, Optical purity, Stereo complex

1S3p02 清酒酵母の栄養特性物質生産と醸造特性、飼料特性

○家藤 治幸, 金井 宗良
(酒総研)

S-アデノシルメチオニン(以下 SAM と略)は生体内の主要なメチル基供与体であり、DNA や蛋白質のメチル化、リン脂質合成など、生体内のほとんどのメチル基供与に関与する重要な物質である。近年、アルコール性肝臓疾患やうつ病などに治療効果を有することが実証され注目されており、欧米では臨床薬およびサプリメントとして利用されている。この SAM は、微生物の中で酵母が、特に清酒酵母が高い生産蓄積を示すことが知られている。

我々は、先に酵母 *S. cerevisiae* のアルコール耐性にエルゴステロールが重要な役割をしていることを示した。このエルゴステロールの生合成には SAM が必要であり、SAM の生合成にはメチオニン、さらにそのメチオニンの合成には、もう一つの生体内メチル基供与物質である葉酸が必要である。清酒酵母は他の酵母に比較し、この葉酸の蓄積量が多く、実験室酵母(X2180)の 10 倍以上もの蓄積を示すことを、我々は明らかにした。葉酸はメチル基やホルミル基など一炭素基を供与する補酵素として核酸やアミノ酸(メチオニン、グリシン、セリン)の合成に必要であり、その欠乏は悪性貧血、心臓病、神経管欠損、精神分裂病、がんなど人の病気に関係する重要な物質である。

一方、酵母のアルコール発酵において、ピルビン酸からアセトアルデヒド、エタノールへの変換のキーとなっているのがピルビン酸脱炭酸酵素であり、その酵素を働かすには補酵素であるチアミン(ビタミン B1)が必須である。我々はモデルもろみ液中の清酒酵母において、このチアミンを合成するための酵素遺伝子が全遺伝子の中で最も多く発現していることを、EST 解析(全遺伝子の中で絶対的な発現量を比較解析する方法)で見出した。

以上のことより、清酒酵母の高エタノール耐性、高アルコール生産力という醸造特性は、エルゴステロール(ビタミン D 前駆体)や SAM、葉酸、そしてチアミンなど各種の栄養特性物質により裏支えされており、清酒酵母の醸造特性と栄養特性は極めて密接な関係がある、と言うことが可能であろう。

さて、清酒酵母は様々な栄養物質を豊富に含む微生物であり、それを多量に含む液化仕込み清酒粕など醸造副産物は優れた飼料特性を持つことが考えられる。そこで我々は、近中四農研センターと連携し、牛への給餌試験を行い、その効果について調べている。牛など反芻動物の第一胃におけるワラ類、牧草類飼料の消化率を上昇させることは、その肥育にとって重要な項目である。清酒酵母および液化仕込み清酒粕の給与は、牛第一胃の微生物活性を向上させ、粗飼料の分解率を有意に向上させることが示された。また、離乳後の黒毛和種子牛の体重を有意に増加させる効果も確認された。

さて、我々は SAM のさらなる高生産を目指した研究を行っている。そして、ナイスタチン耐性株を取得することで、その中に容易に SAM 高蓄積株を見いだせることを示した。また、アデノシンキナーゼ(*ADOI*)の欠損株が、YPD 培地のようなメチオニン含量の多くない培地においても、著量の SAM 高生産蓄積を行うことを見いだした。この *adoI* 欠損株においては、SAM が高蓄積するだけでなく、ポリリン酸も高蓄積していた。また、*MET6*、*SAM2*、*SAHI* などメチオニンサイクル遺伝子群、*PHO89*、*PHO5* などリン酸取り込み、および HXT1,2,3,4,6 など糖取り込みに関与する遺伝子群が高発現していた。

清酒酵母は、高いアルコール生産能、耐性能を持ち、酒造り用酵母として優れている。と同時に、生理活性物質である SAM などを高生産高蓄積する微生物でもあり、これら有用物質の cell factory としても魅力ある酵母である。

Study on sake yeast about nutritional, brewing and feeding properties

○Haruyuki IEFUJI, Muneyoshi KANAI
(Natl. Res. Inst. Brewing)

Key words Sake yeast, S-adenosyl methionine, folic acid