

1Hp13 マクロファージ活性化能を有するパン酵母2倍体株の構築とその解析

○高田 裕紀¹, 伊藤 千夏², 糠谷 健二², 立花 太郎¹, 東 雅之¹
(¹阪市大院・工・化生系, ²オリエンタル酵母工業)
azuma@bioa.eng.osaka-cu.ac.jp

【背景・目的】*Saccharomyces cerevisiae* の細胞壁成分 β -グルカンは免疫担当細胞であるマクロファージを活性化することが知られている。また、マクロファージは細胞表面の受容体 (Dectin-1) を介して β -グルカンを認識することが報告されている。これまでに、パン酵母の1倍体株の変異処理により、発酵能を保持し、高いマクロファージ活性化能を有する AQ-37 株を取得した。本研究では、マクロファージ活性化能を有する二倍体酵母の構築とその解析を進めた。また、AQ-37 株の形態を指標に変異部位の同定を試みた。

【方法・結果】AQ-37 株をもとに、95 株の二倍体を得、AQ-37 株と同様に SDS 感受性がある 70 株を選抜した。さらに、染色により細胞壁マンナン量の減少が予想された 3 株を選び、細胞壁糖量を測定した。3 株とも親株と同等の増殖を示し、2 株ではマンノース量が約 70% に減少していた。次に、マクロファージ活性化能を、酵母とマクロファージの接触により分泌された TNF- α 量で評価した。その結果、3 株とも親株より高い活性化能を示し、BQ-55 株で最も高い活性化能を示した。また、変異遺伝子を同定するために、*S. cerevisiae* ゲノムライブラリーを AQ-37 株に形質転換した。AQ-37 株は浸透圧感受性と偽菌糸形態を示す。取得した 302 株のうち親株と同様に浸透圧感受性がない 88 株を得た。そのうちの 1 株は親株と同じ形態に戻っていた。プラスミドを回収し、解析を進めた結果、*NDD1* が形態を相補した。また、AQ-37 株の *NDD1* は、遺伝子前半で終止コドンをコードし、タンパク質構造に大きな変化が予想された。

Construction of diploid yeast which activates macrophage and its analysis

○Yuki TAKADA¹, Chinatsu ITO², Kenji KASUYA², Taro TACHIBANA¹,
Masayuki AZUMA¹
(¹Dept. Appl. Chem. & Bioeng., Osaka City Univ., ²Oriental Yeast Co., Ltd.)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, cell wall, glucan, macrophage

1Hp16 芳香族アルコールを用いたグルタチオン高含有酵母調製技術の開発

○富田 康之, 此枝 優希, 玉川 英幸, 吉田 聰, 生嶋 茂仁
(キリン HD・フロンティア技術研)
Yasuyuki_Tomita@kirin.co.jp

有用な生理活性を有するグルタチオン (GSH) はグリシン、グルタミン酸、およびシステインからなるトリペプチドである。酵母で生産する場合、培地に構成アミノ酸あるいは無機塩を添加することにより菌体内のグルタチオン蓄積量を上昇させることができる。ただ、そのためには高濃度の添加が必要であり、しばしば増殖阻害も引き起こすことが問題とされている。

そこで本研究では、増殖能には悪影響を与えることなくグルタチオンを高含有する酵母を生産する方法を開発することを目指した。まず、芳香族アミノ酸を前駆体とする芳香族アルコール 3 種 (フェニルエタノール、チロソール、トリプトフォール) をそれぞれ単独で添加した培地で食用酵母 *Candida utilis* を培養し、その GSH 生産能を調べた。その結果、1 mM フェニルエタノールを含む培地では菌体量の増加に伴う GSH 総生産量の向上が認められた。また、トリプトフォールを 0.5 mM の濃度で含む培地においては GSH 含有率の上昇が起こった。なお、培地に添加することで GSH 含量を高める効果をもたらすシステインを 0.5 mM の濃度で添加した条件において、さらにはトリプトフォールの前駆体であるトリプトファンをその 10 倍量添加した場合には、菌体内の GSH 含量の有意な上昇は起こらなかった。本技術は芳香族アルコールを添加することで、酵母培養物における GSH 含量を増加させることを可能とするため、今後の食品製造に大きく貢献することが期待できる。

Development of the method to produce yeast cells containing high concentration of glutathione

○Yasuyuki Tomita, Yuki Konoeda, Hideyuki Tamakawa, Satoshi Yoshida,
Shigehito Ikushima
(Central Laboratories for Frontier Technology, KIRIN Holdings Co., Ltd.)

Key words glutathione, aromatic alcohol, *Candida utilis*

1Hp15 グルタチオン合成に関する新規な酵母遺伝子の解析

○鈴木 審寛^{1,2}, 横山 亜紀¹, 辻 俊一¹, 池島 恵美子¹, 中嶋 桂子¹,
生嶋 茂仁¹, 此枝 優希¹, 小林 智佐², 吉田 聰¹
(¹キリン HD・フロンティア技術研, ²キリン協和フーズ・生産本部生産技術部)
satoshiy@kirin.co.jp

グルタチオンは酸化ストレスに対して保護作用を持つペプチドである。酵母において、細胞内グルタチオン含量に影響を与える遺伝子を同定するために、*Saccharomyces cerevisiae* の遺伝子破壊株ライブラリーを用いてスクリーニングを行った結果、対照に比べて 1.2 倍以上の含量を示す破壊株を 8 種同定した (chc1, cst6, ddc1, def1, pep12, rts1, ubp6, yih1)。また、DEF1 と CYS4 遺伝子の過剰発現が、GSH1 と同様にグルタチオン含量を上げることを見だした。さらに、今回得られたグルタチオン高含有破壊株において、GSH1 を過剰発現させると、グルタチオン含量の増加に関して相乗効果が見られた。また、def1, pep12, ubp6 破壊株と DEF1 過剰発現株のメタボローム解析の結果から、グルタチオン高含有株においては、共通して細胞内メチオニン、酸化型グルタチオンが対照に比べて高くなっていたことから、高含有株ではメチオニン合成が活性化され、また酸化ストレス状態であることが示唆された。さらに、*Candida utilis* において GSH1, CYS4, DEF1 をそれぞれ過剰発現させたところ、グルタチオン含量の増加が見られた。これらの知見は、今後、酵母において工業的なグルタチオン高生産技術の開発に貢献するものと考えられる。

Identification and characterization of genes involved in glutathione production in yeast

○Takahiro Suzuki^{1,2}, Aki Yokoyama¹, Toshikazu Tsuji¹, Emiko Ikeshima¹,
Keiko Nakashima¹, Shigehito Ikushima¹, Yuki Konoeda¹, Chisa Kobayashi²,
Satoshi Yoshida¹
(¹KIRIN Holdings Co., Ltd. Central Laboratories for Frontier Technology,
²Kirin Kyowa Foods Co., Ltd. Production Management Division)

Key words glutathione, Metabolomic analysis, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*

1Hp17 トルラ酵母 *Candida utilis* を用いたキシロースからの L-乳酸の高生産

○玉川 英幸, 生嶋 茂仁, 吉田 聰
(キリン HD・フロンティア技術研)
Hideyuki_Tamakawa@kirin.co.jp

Candida utilis は増殖力・発酵力に優れるトルラ酵母である。本酵母はキシロースを含む培地で旺盛に生育するものの、キシロースからエタノールや乳酸を発酵生産することはできない。本研究ではトルラ酵母を用いてキシロースから乳酸などの有用物質を発酵生産できる酵母株の構築を行った。

キシロースは NADPH 消費型キシロース還元酵素 (XR) と NAD+ 消費型キシリトール脱水素酵素 (XDH) によってキシロースに変換される。*C. utilis* はキシロースを高効率で発酵することができますから、XR, XDH によって生じる補酵素のインバランスがキシロースを発酵できない原因だと考えられた。そこで、*Candida shehatae* 由来の XR, XDH を変更し、補酵素要求性を変換した酵素遺伝子を作製した。これら遺伝子群を *Pichia stipitis* 由来キシロースリシン酸化酵素とともに *C. utilis* に導入したところ、補酵素要求性を NADH 消費型に変換した XR と野生型 XDH (NAD+ 消費型) を導入した株がキシロースから最も高いエタノール生産能を示した。また、代謝工学操作により乳酸生産能を付与した *C. utilis* 1) にこれらのキシロース代謝酵素遺伝子群を導入したところ、本菌株は 100 g/l のキシロースから 42 時間で高光学純度の L-乳酸を 93.8 g/l 生産した。本菌株は 26 g/l グルコースと 21 g/l キシロースを含むビール仕込み糖化液からも 78% の收率で L-乳酸を生産した。本研究の結果より、*C. utilis* 育種株は複数の糖が混在する実バイオマス由来原料を用いた場合でも L-乳酸を効率的に生産できることが示された。1) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 73, 1818-24 (2009)

Genetic Engineering of *Candida utilis* for Efficient Production of L-Lactic Acid from D-xylose

○Hideyuki Tamakawa, Shigehito Ikushima, Satoshi Yoshida
(Central Laboratories for Frontier Technology, KIRIN Holdings Co., Ltd.)

Key words *Candida utilis*, xylose, L-lactic acid, ethanol