

3Fp03 野生酵母からの出発：産膜機構の解明

○飯村 穰
(山梨大院・医工総合・生命)
iimura@go.tvm.ne.jp

産膜は酵母が液体の表面で繁殖し皮膜状となる現象である。この現象の産業との関わりについてはワインの産膜病のように香味を劣化する負のイメージが強いが、一方でスペインにおけるシェリー製造のように産膜を利用して独特のワインを作る例も見られる。そこで、産膜の防止と有効利用のため、基礎的知見としての機構解明を目指してきた。

1. 野生産膜性酵母の分離 ワイン製造では原料の加熱処理を行わないため、原料ブドウに付着した野生酵母はそのまま発酵工程に持込まれる。ワインの産膜はこのような原料ブドウ由来の産膜性酵母が発酵終了後まで生き残り、貯蔵ワインの表面で皮膜を形成する現象であると考えられる。そこで貯蔵中に産膜がおきたワインを多数採取し、それらから産膜能を示す酵母25株を単離した。それらの産膜能には違いが見られたが、多くが子嚢胞子を形成し、糖の資化性等も類似していた。その中で特に産膜能の高い3株を選抜し産膜機構解明のための供試株とした。なお、これら供試株は rDNA を解析すると *S. cerevisiae* の近縁種であった。

2. 炭素源の産膜性への影響 供試株は炭素源が糖質では産膜しないが、エタノール、乳酸、酢酸などの有機酸を単一炭素源として高い産膜能を示す。その際、グリオキシル酸回路のキー酵素であるイソクエン酸リアーゼおよびリンゴ酸シンターゼ遺伝子の転写レベルが上昇する。したがってグリオキシル酸回路の活性は産膜にとってきわめて重要であると考えられる。なお、グルコースが共存するとカタボライトリプレッションによって、両遺伝子の発現は抑えられ産膜もおきない。

3. 産膜因子の特定 通常の *S. cerevisiae* の実験室株は産膜能を示さない。そこで、この実験室株に多コピーベクターの遺伝子ライブラリーを導入し、産膜能を示す形質転換体の分離を試みた。その結果、形質転換体には *NRG1* の C 末端相当部位が欠落し DNA 結合能が変化した遺伝子が導入されていた。*NRG1* は *FLO11* の発現抑制因子であることから *FLO11* が産膜の主要な因子であることが示唆された。さらに産膜能の付与にともなって細胞表層の疎水性が上昇したことから、疎水性が産膜の主要因である可能性が示された。

そこで供試野生産膜性酵母（いずれも二倍体）についてヘテロ破壊株 (*Aflol1* / *FLO11*) およびホモ破壊株 (*Aflol1* / *Aflol1*) を作製しその産膜能を調べた結果、野生型に比較しその著しい低下が認められたことから野生産膜性酵母の産膜において *FLO11* が必須であることが明らかとなった。またシェリー酵母 A9 株（二倍体）においても同様に *FLO11* に関するホモ破壊株では産膜能が全く見られないことから、*FLO11* が必須因子であることが明らかとなった。

FLO11 の発現については供試産膜性株においては炭素源がエタノールで上昇しグルコースで低下する。また、対照の非産膜性株において発現は極めて低い。

4. 産膜の利用 供試産膜性株は高い産膜能とともに高いアルコール発酵能を有する。すなわち産膜は嫌気から好氣的増殖へと切り替わる diauxic shift の現象であると考えられる。ここで産膜性株を利用した気-液界面でのエタノール発酵を考えると、グルコース存在下での産膜が必要である。それには炭素源の種類によらない *FLO11* の構成的な高い発現が必須条件である。ここではその方法についても考察する。

3Fp04 *Yarrowia lipolytica* : SCP から新産業酵母へ

○太田 明徳^{1,2}, 福田 良一²
(¹東農大・バイオサイエンス,²東大・農・応生工)
aaohta@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

Yarrowia lipolytica は *n*-アルカンを資化する酵母であり、今から40年前の、石油が安価であった時代には SCI (single cell protein)、いわゆる石油タンパク質を製造するための酵母として注目された。しかしながら、多くの企業が関わった石油タンパク質製造の研究は、石油由来の発がん性物質の混入がないことを証明できず、また、原料とする *n*-アルカンに由来する炭素数が奇数である脂肪酸の人体に対する影響の懸念を払拭できなかったために、実際の生産技術として結実することはなかった。この酵母はまた、多種の炭素源を利用して著量のクエン酸を生産するので、かつてヨーロッパでは生産菌として利用され、米国 FDA より GRAS として認定されたが、クエン酸生産生物としては *Aspergillus niger* を凌ぐことはできなかった。結局、*n*-アルカン資化やクエン酸生産の機構について十分に理解されることはなく、脂質代謝の基礎的研究のために細々と利用されるのみで、本酵母の存在はいわば歴史に埋没しつつあったと言える。ところが、幸いにしてヨーロッパの酵母グループによってゲノム塩基配列が2003年に明らかにされ、当研究室による遺伝子操作技術の向上や、近年の分子解析技術と細胞技術の著しい発達もあって、本酵母の特異な性質について解明し、改めて生産酵母として育種する条件が生れている。

これまでに講演者らは *Y. lipolytica* における *n*-アルカンと脂肪酸の末端水酸化を行うチトクローム P450 をコードする *ALK* 遺伝子群の発現を解析した。*n*-アルカン存在下に最も強く誘導される *ALK1* の転写は *Yas1*, *Yas2* によって活性化され、*Yas3* によって抑制される。*n*-アルカン存在時に *Yas3* は核から小胞体に局在を変え、これは *Yas3* が膜脂質ホスファチジン酸を介して膜に結合するためであることを示唆した。最近 *Yas3* が様々なホスホイノシチドに結合するデータが得られているので、*n*-アルカン存在時におけるこれらシグナルリン脂質の細胞内における挙動が *Yas3* の局在と *ALK1* の誘導発現に重要な役割を果たす可能性がある。*Y. lipolytica* 野生型株および上記転写因子遺伝子の破壊株について、*n*-デカンの有無によるトランスクリプトーム解析を行ったところ、*n*-アルカン代謝に直接的に関わる遺伝子だけでなく、機能未知の遺伝子を含む多彩な遺伝子が *n*-デカンにより誘導されること、また、遺伝子発現に *Yas2* と *Yas3* が関わる遺伝子群について推定することができた。

以上に加えて、CYP52 に含まれる全ての *ALK* 遺伝子 12 種を破壊した株の作成とそれから得られた各 *ALK* 遺伝子の機能の解析、および脂肪酸代謝を制御する制御因子 *POR1* の性質についても報告する。

本講演では以上の結果と、本酵母に関するこれまでの他研究者の研究成果を総合し、*Y. lipolytica* のアルカンあるいは油脂を原料とする物質生産についての可能性を考察する。

Study on Wild Yeasts: Mechanism of Pellicle Formation

○Yuzuru Iimura
(Dept. Biotech., Grad. Sch. Med. Eng., Univ. Yamanashi)

Key words wild yeasts, flor yeasts, pellicle formation

Yarrowia lipolytica: From SCP to a novel industrial yeast

○Akinori Ohta^{1,2}, Ryouichi Fukuda²
(¹Dept. Biosci., Tokyo Univ. Agricul., ²Dept. Biotechnol., Univ. Tokyo)

Key words *Yarrowia lipolytica*, yeast, lipid metabolism, P450