

1P-145 イソブタノール生産酵母におけるトランスヒドロゲナーゼ様シャントの活性化

○石井 純¹, 松田 史生², 近藤 貴志³, 近藤 昭彦⁴
 (¹神戸大・自科・研究環, ²阪大院・情報・バイオ情報, ³横国大,
⁴神戸大院・工・応化)
 akondo@kobe-u.ac.jp

UCLA の Liao らのグループが Ehrlich 経路を大腸菌に人工的に導入することで各種のアミノ酸生成経路から様々なアルコール類を生産できることを 2008 年に報告し、バイオ燃料・バイオ化学品の分野で話題となった。そのうちの一つであるイソブタノールは、脱水することでイソブチレンに変換できることから、ポリエチレンテレフタレートやブチルゴムなどの原料として重要な基幹化学品であるイソブチレン製造をバイオベース化できると期待されている。

バイオマスからのイソブタノール生産の実用化に向けた宿主として酵母を選択した。酸耐性が高く溶菌しにくい酵母は、コンタミネーションのリスクを低減できることから、大規模なバルクケミカル製造プロセスの実用化において有望な宿主である。本研究ではイソブタノール生成経路における補酵素バランスが悪いことに着目し、酵母内因性のトランスヒドロゲナーゼ様のシャント経路を活性化することで、イソブタノールの生産量向上を目指した。

Activation of transhydrogenase-like shunt for isobutanol production in *Saccharomyces cerevisiae*

○Jun Ishii¹, Fumio Matsuda², Takashi Kondo³, Akihiko Kondo⁴
 (¹Org. Adv. Sci. Technol. Kobe Univ., ²Dept. Bioinfo. Eng., Grad. Sch. IST, Osaka Univ., ³Yokohama Natl. Univ., ⁴Dept. Chem. Sci. Eng., Grad. Sch. Eng. Kobe Univ.)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, isobutanol, Ehrlich pathway, cofactor imbalance

1P-147 出芽酵母の NADH 依存型アルコールデヒドロゲナーゼ欠損株を用いた有用物質生産

井田 祥弘¹, ○平沢 敬¹, 古澤 力², 清水 浩¹
 (¹阪大院・情報・バイオ情報, ²理研・生命システム)
 hirasawa@ist.osaka-u.ac.jp

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、低 pH の環境下において高い増殖を示すことから、バイオ燃料のみならず有機酸などの酸性物質の生産のための宿主としての利用も期待されている。しかしながら、エタノール以外の有用物質を生産する場合には、副生成物であるエタノールの生産量を低減させることが必要となる。一方、エタノール生産経路は、出芽酵母の酸化還元バランス維持のために重要な役割を果たす。本研究では、出芽酵母のエタノール生産にかかわる NADH 依存型のアルコールデヒドロゲナーゼ (ADH) について欠損株を構築するとともに、欠損株によりその生産に NADH の酸化をとまう L-乳酸の生産を試みた。

出芽酵母の主要な ADH をコードする *ADH1* 遺伝子の欠損株について、嫌気条件で連続培養を行ったところ、はじめはエタノール生産が抑制されたが、徐々にエタノール生産が回復した。そこで、NADH 依存型 ADH をコードする遺伝子である *ADH1-5* および *SFA1* を欠損したところ、エタノール生産は抑制されたが、酸化還元バランス維持のためにグリセロール合成が誘導された。そのため、グリセロール合成にかかわる酵素の遺伝子である *GPD1*・*GPD2* も破壊した欠損株を構築した。構築した欠損株のエタノール・グリセロールの生成はともに抑制されたが、嫌気条件で増殖・糖消費を行うことができなかった。しかしながら、ヒト由来の L-乳酸の生産にかかわる L-乳酸脱水素酵素をコードする遺伝子を導入したところ、糖が消費され嫌気条件でほぼ 100% の高収率で L-乳酸を生産した。

Bioproduction by *Saccharomyces cerevisiae* knockout mutant of NADH-dependent alcohol dehydrogenases

Yoshihiro Ida¹, ○Takashi Hirasawa¹, Chikara Furusawa², Hiroshi Shimizu¹
 (¹Dept. Bioinfo. Eng., Grad. Sch. IST, Osaka Univ., ²QBiC, RIKEN)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, alcohol dehydrogenase, L-lactic acid

1P-146 キシロース資化性 *Saccharomyces cerevisiae* におけるリン酸シグナル伝達系の制御によるキシロースからのエタノール生産の高効率化

○蓮沼 誠久¹, 近藤 昭彦²
 (¹神戸大・自科・研究環, ²神戸大院・工・応化)
 akondo@kobe-u.ac.jp

持続可能な低炭素社会を構築するために、再生可能で食糧と競合しないリグノセルロース系バイオマスからのエタノール生産プロセスの開発が求められているが、バイオマスからの高いエタノール収率を確保するためにはヘミセルロースの主要構成成分であるキシロースの利用が重要である。ここ数十年の研究で、真菌由来のキシロース還元酵素とキシリトール脱水素酵素の過剰発現による *Saccharomyces cerevisiae* へのキシロース資化能の付与とその向上が進められているが、副生成物としてキシリトールを培地中に放出するため、エタノールへの変換効率が低い点が大きな課題である。本研究では、リン酸シグナル伝達系である PHO 経路に着目し、PHO80 の遺伝子を欠損させることにより、細胞内リン酸濃度が増加し、対糖エタノール収率が 28% 向上するとともにエタノール非生産速度が 73% 向上することを明らかにした。リン酸代謝を制御することによりキシロース発酵能を向上させることに初めて成功した。メタボロミクス等を用いたシステムバイオロジー解析の結果からは、PHO80 欠損株では細胞内の補酵素の (NADPH や NADH) の利用率が変化していたことが示唆された。

Improvement of ethanol production from xylose by regulation of the PHO pathway in *Saccharomyces cerevisiae*

○Tomohisa Hasunuma¹, Akihiko Kondo²
 (¹Org. Adv. Sci. Technol. Kobe Univ., ²Dept. Chem. Sci. Eng., Grad. Sch. Eng. Kobe Univ.)

Key words ethanol, PHO pathway, *Saccharomyces cerevisiae*, xylose

1P-148 *Synechocystis* sp. PCC 6803 の TCA バイパス経路の解明

○日浅 夏希^{1,2}, 吉川 勝徳^{1,2}, 清水 浩^{1,2}
 (¹阪大院・情報・バイオ情報, ²JST・CREST)
 shimizu@ist.osaka-u.ac.jp

シアノバクテリアは光合成により二酸化炭素から物質を生産するため、昨今シアノバクテリアを用いた物質生産システムが注目されている。物質生産能力の向上には細胞内代謝の正確な理解が重要となる。シアノバクテリアの代謝において、TCA 回路は 2-oxoglutarate (2OG) dehydrogenase を欠くため不完全な回路であると考えられてきた。しかし、近年 *Synechococcus* sp. PCC 7002 において、この反応を補うバイパス経路が発見された (D. A. Bryant *et al.*, Science 2012)。この経路は 2OG が 2OG decarboxylase により Succinic semialdehyde (SSA) へ、SSA が SSA dehydrogenase により Succinate へと変換される 2 段階反応である。そこで本研究では、光合成のモデル生物である *Synechocystis* sp. PCC 6803 (*Synechocystis*) において、TCA バイパス経路の存在を明らかにすることを目的とした。

Synechocystis において 2OG decarboxylase をコードする遺伝子は同定されていないため、先行研究により同定された *Synechococcus* sp. PCC 7002 のアミノ酸配列をもとに相同性検索を行った結果、*ilvB* (*slr1981*) 遺伝子が最も高い相同性を示した。SSA dehydrogenase は、*gabD* (*slr0370*) 遺伝子がコードすることが知られている。それらの酵素活性を測定するために、*gabD* と *ilvB* を発現ベクター pCDFDuet-1 に導入し、*Escherichia coli* BL21(DE3) で過剰発現した。細胞粗抽出液を用いて酵素活性を測定した結果、両酵素の活性が確認された。これらの結果より、*Synechocystis* は TCA バイパス経路に関する酵素を持つことが示唆された。

Analysis of the TCA bypass pathway in *Synechocystis* sp. PCC 6803

○Natsuki Hiasa^{1,2}, Katsunori Yoshikawa^{1,2}, Hiroshi Shimizu^{1,2}
 (¹Dept. Bioinfo. Eng., Grad. Sch. IST, Osaka Univ., ²CREST, JST)

Key words *Synechocystis* sp. PCC 6803, TCA cycle, TCA bypass pathway