

3P-061 好気・低濃度グルコース条件下における *Saccharomyces cerevisiae* の転写解析

○崎濱 由梨¹, 蓮沼 誠久^{1,2}, 近藤 昭彦^{1,3}
 (¹TRAHED, ²神戸大・自科・研究環, ³神戸大院・工)
 akondo@kobe-u.ac.jp

【目的】*Saccharomyces cerevisiae* は好気条件下において酸素消費抑制され、エタノール生成するクラブトリーポジティブの酵母であるが、クラブトリー効果は低濃度のグルコースの培養条件では起こらないとされている。一方、グルコース濃度の異なる条件ではグルコースのシグナル応答が異なることが報告されている。そこで本研究ではクラブトリー効果が起こらないグルコース濃度条件下における転写制御を明らかにするためにグルコース添加速度の異なる条件での網羅的転写解析を試みた。

【方法および結果】*S. cerevisiae* BY4741 株を好気条件下で 0.3 g/L/h あるいは 15 g/L/h の速度になるようにグルコースを添加する流加培養を行った。その結果、15 g/L/h のグルコース添加速度条件下のみエタノール生成が確認され、0.3 g/L/h の添加条件ではクラブトリー効果が起こらないことが確認された。そこで両条件において経時的に RNA を抽出し、マイクロアレイによる網羅的転写解析を行った。培養 4 時間後の 0.3 g/L/h の添加条件における転写を確認したところ、15 g/L/h の添加速度条件と比べ転写量の増減が 4 倍以上あった遺伝子は全体の約 33% を占めており、遺伝子転写発現の状況が大きく異なることが明らかとなった。また経時的な転写プロファイルを確認したところ、0.3 g/L/h の添加条件下ではエタノール・酢酸代謝、TCA 回路、グリオキシル酸回路中の複数遺伝子の転写の恒常的な亢進が確認された。

なお本研究は、経済産業省委託事業「次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発」の一部として実施した。

Transcriptional analysis in *Saccharomyces cerevisiae* under aerobic and glucose-limited conditions

○Yuri Sakihama¹, Tomohisa Hasunuma^{1,2}, Akihiko Kondo^{1,3}
 (¹TRAHED, ²Org. Adv. Sci. Technol. Kobe Univ., ³Grad. Sch. Eng. Kobe Univ.)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, Crabtree effect, transcription

3P-062 微生物における新規チオ硫酸代謝経路の同定

○辰巳 恭平, 秦野 智行, 舟橋 依里, 河野 祐介, 大津 厳生,
 高木 博史
 (奈良先端大・バイオ)
 iohitsu@bs.naist.jp

硫黄は生命に必須な元素の 1 つである。地球上の生命のうち、動物は無機性の硫黄源（硫酸塩、チオ硫酸塩）を利用できないが、植物および微生物は無機性の硫黄源から有機性の硫黄化合物（メチオニン、システインなど）を合成することができる。我々は大腸菌 *Escherichia coli* において、硫黄源を硫酸塩からチオ硫酸塩に変更することで、生育促進効果やシステイン発酵生産性の向上について報告した。さらにチオ硫酸塩の代謝に必須であるシステイン合成酵素 CysM を介さない新規なチオ硫酸塩からのシステイン合成経路を明らかにした。しかしながら、他の生物において、チオ硫酸塩の代謝経路はほとんど明らかになっていない。そこで本研究では、産業上重要な真核微生物であり、強力な遺伝学的解析基盤を有する出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* と分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* について、チオ硫酸塩が生育に及ぼす影響を解析するとともに、チオ硫酸塩の同化に関与する遺伝子を探索した。まず、これまでに構築した LC-MS/MS による硫黄のメタボローム解析システムを利用して、チオ硫酸塩を単一硫黄源とした場合の細胞内の硫黄関連代謝物を定量した。その結果、硫酸塩の場合と比べて、亜硫酸イオンや硫化物イオン、ホモシステインやグルタチオンの蓄積が認められた。さらに、硫黄代謝経路の遺伝子破壊株を用いた解析から、出芽酵母および分裂酵母において、大腸菌の新規経路と同様に硫黄転移酵素がチオ硫酸塩の同化に関与することが強く示唆された（本研究は、農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業の支援を受けて実施した）。

Identification of a novel thiosulfate assimilation pathway in microorganisms

○Kyohei Tatsumi, Tomoyuki Hatano, Eri Funahashi, Yusuke Kawano, Ohtsu Iwao, Hiroshi Takagi
 (Grad. Sch. Biol. Sci., NAIST)

Key words Sulfur assimilation, Thiosulfate, Rhodanese, yeast

3P-063 リンゴ酸を高速度で無中和発酵生産する遺伝子組換え分裂酵母の開発

○原 太志, 木村 修一郎, 田中 博己, 田中 崇之
 (旭硝子)
 futoshi-hara@agc.com

【背景と目的】リンゴ酸は 4 個の炭素からなるジカルボン酸であり、バイオマスの微生物発酵などにより商業的に製造されている。例えば天然の微生物を用いる方法として、アスペルギルス・フラバスの培養によるリンゴ酸の生産が知られている。また非天然型としてはサッカロミセス・セレビシエの遺伝子組換え体を用いる報告などがある。

しかしながら、これまで報告されている微生物でのリンゴ酸の生産速度はいずれも 1g/(L・h) 未満であり、また生産時に中和が行われている。より安価なリンゴ酸の生産のため、生産速度が速く中和工程の無いプロセスの開発が望まれる。【方法】耐酸性の強い分裂酵母の染色体にリンゴ酸生産酵素の遺伝子を挿入して、リンゴ酸生産株を作製した。この株を 36g-dcw/L となるよう培地（10% グルコース、11% 炭酸カルシウム）に植菌し、リンゴ酸の生産量を確認した。さらに炭酸カルシウムを含まない培地（10% グルコースのみ）で、無中和でのリンゴ酸の発酵生産を行った。

【結果】遺伝子組換えにより必須遺伝子である *pdh2* を削除し、かつ生育のよい ASP5135 株を得た。この形質転換体のリンゴ酸生産速度は 25g/(L・h) であり、従来の方法の 25 倍以上に相当する。この際のリンゴ酸濃度は 50g/L であり、一方無中和でも 40g/L のリンゴ酸の生産が確認された。

Construction of malic acid producing fission yeast.

○Futoshi Hara, Shuichiro Kimura, Hiroki Tanaka, Takayuki Tanaka
 (Asahi Glass Co., Ltd.)

Key words *Schizosaccharomyces pombe*, malic acid, fermentation, neutralization

3P-064 *Wickerhamomyces pijperi* を利用した香気成分生産条件の検討

○伊澤 直樹, 工藤 美有紀, 中村 結花子, 水越 晴美, 北田 貴裕,
 曾根 俊郎
 (ヤクルト中央研究所)
 naoki-izawa@yakult.co.jp

【背景・目的】

Wickerhamomyces pijperi はバターミルク、花、草などから分離された酵母である。我々は本酵母の培養液がフルーツ様の芳香を有するのを見出した。本研究では、*W. pijperi* の培養液を食品や化粧品に応用するための基礎的なデータを得ることを目的として、香気成分生産に適した菌株や培養条件について検討した。

【方法・結果】

7 株の *W. pijperi* をグルコース添加ホエイ培地(Whey-g)で培養し、培養液に含まれる香気成分を HS-GC-FID および HS-GC-MS で分析した結果、アルコール、エステル等合計 11 種類が同定され、それぞれの生産量は株によって異なっていた。特に、2 株(YIT 8095 および YIT 12779)の培養液は、強いフルーツ様の芳香を有しており、これらの培養液には安息香酸エチルが多く検出された。次に、この 2 株を Whey-g、脱脂粉乳、YM および YPD 培地で培養したところ、安息香酸エチルは Whey-g でのみ高生産された。YM および YPD 培地ではバラ様香気成分である 2-フェニルエタノールが検出された。両菌株を Whey-g を用いて 15℃、20℃、25℃、30℃ および 35℃ で培養したところ、菌体増殖は 20℃ および 25℃ で良好であり、35℃ では増殖しなかった。アルコール類は温度依存的、経時的に産生されたが、フルーツ様の芳香を特徴付けているエステル類は 20℃ および 25℃ で高生産され、培養 24 時間以降に減少するものがあった。その結果培養液は好ましくない芳香を呈した。以上より、食品や化粧品への応用には、YIT 8095 および YIT 12779 を使用し、培養温度 20℃-25℃ で 24 時間培養することが適していると考えられた。

Effects of fermentation conditions on aroma compounds production by *Wickerhamomyces pijperi*.

○Naoki Izawa, Miyuki Kudo, Yukako Nakamura, Harumi Mizukoshi,
 Takahiro Kitada, Toshiro Sone
 (Yakult Cent. Inst.)

Key words *Wickerhamomyces pijperi*, aroma compounds, fermentation