

2Fp07 マクロファージ活性化能を有する酵母の解析

○高田 裕紀¹, 酒井 裕美子¹, 伊藤 千夏², 神前 健², 渡辺 肇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・食品研 & 酵母機能開発部)

【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、*mcd4Δ*では、高いマクロファージ活性化能を有することを見出した。これは細胞壁マンナン量が極端に減少しβ-グルカンを細胞表面に露出することで活性化能が高まると考えられた。しかし、*mcd4Δ*は遺伝子組換え体で増殖も非常に遅いという問題点があり、実用的に用いることは困難である。本研究では、パン酵母の実用株を用い、変異処理により増殖に問題がないマクロファージ活性化酵母の取得を試みた。

【方法・結果】パン酵母の実用株をEMS処理し、得られた3620のコロニーについて浸透圧とSDSに対する感受性から、増殖がよく細胞壁に変異があると予想される243株を選抜した。選抜株全てをマンナン染色し観察した結果、マンナン量の減少が期待される3株を取得した。さらに、その3株について細胞壁を抽出しグルカン(グルコース)量とマンナン(マンノース)量を測定すると、マンノース量は3株とも親株の80%以下に減少していた。これら3株は全て親株と同等の増殖を示した。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量を評価した。その結果、全てにおいて親株の2倍以上の活性化能を示した。現在、変異遺伝子の同定を進めている。

Analysis of yeast which activates macrophage

○TAKADA Yuki¹, SAKAI Yumiko¹, ITO Chinatsu², KANZAKI Ken², WATANABE Hajime², TACHIBANA Taro¹, AZUMA Masayuki¹
 (¹Dept. Appl. Chem. & Bioeng., Osaka City Univ., ²Lab. Fermentation & Food. & Yeast Function Development Dep., Oriental Yeast Co., Ltd.)

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

2Fp10 L-乳酸高生産性トルラ酵母 *Candida utilis* の分子育種

○生嶋 茂仁, 足海 洋史, 玉川 英幸, 吉田 有人
 (キリンHD・フロンティア技術研)

我々は1990年代より増殖力・発酵力に優れたトルラ酵母 *Candida utilis* を対象とした分子レベルでの研究に取り組んできた。本研究ではトルラ酵母を利用して、二酸化炭素低排出社会への貢献が期待されるバイオマス・プラスチックの原料となるL-乳酸を、効率よく発酵生産できるシステムの開発を試みた。まず形質転換時の選択マーカー遺伝子を再利用できる *Cre-loxP* 系を本酵母に導入し、多重形質転換を行うことを可能にした。次にビルビン酸脱炭酸酵素遺伝子 *CuPDC1* を4重破壊により完全に欠損させ、さらにL-乳酸脱水素酵素遺伝子 *L-LDH* を2コピー組込んだ。水酸化ナトリウムを中和剤として培地のpHを5.0に保ち、本菌株を107 g/Lのグルコースを含む培地で発酵させたところ、24時間後にはほぼ全ての糖が消費され、99.9%を超える光学純度のL-乳酸を90%以上の効率で生産した。また、スクロースを単一糖源とした培地においてもグルコースの場合と同様に高効率でL-乳酸が生産した。本研究の結果より、トルラ酵母が物質生産の宿主として非常に有用である可能性が示された。

Genetic Engineering of *Candida utilis* for Efficient Production of L-lactic Acid

○Shigehito IKUSHIMA, Hiroshi ASHIGAI, Hideyuki TAMAKAWA, Aruto YOSHIDA
 (Central Laboratories for Frontier Technology, KIRIN Holdings Co., Ltd.)

Key words *Candida utilis*, *Cre-loxP*, lactic acid

2Fp08 エタノール生産糸状菌におけるバイオマス分解関連酵素の特性

○高野 真希¹, 加藤 康夫², 萩田 信二郎², 星野 一宏¹
 (¹富山大院・理工,²富山県大院・生物工)

【背景・目的】石油代替エネルギーとして、食糧と競合しない木質系や草本系バイオマスを原料としたバイオエタノール生産に関する研究が盛んに行われている。その際、バイオマスに含まれるセルロースやヘミセルロースの分解が、エタノールの生産において重要な課題となっている。効率的なエタノール生産法の一つであるバイオマスの糖化と発酵を同時に行う同時糖化発酵において、エタノール生産菌自身が糖化酵素を分泌できれば、添加する酵素量の削減が期待できる。そこで本研究ではエタノール発酵糸状菌によるバイオマス分解酵素の分泌を検討するとともに、その酵素の特性について検討した。

【実験方法・結果】グルコースおよびキシロースを炭素源とし、接合菌 82 株についてエタノール生成量を検討したところ、高エタノール収量を示す新奇な菌株を発見した。その際、対糖収率は0.505 g-ethanol/g-glucoseおよび0.226 g/g-xyloseであった。この菌株について21種類の糖質を炭素源として用いて培養したところ、単糖、二糖、多糖のうち多くの糖質で高いエタノール生成が確認できた。特に多糖類についても資化または発酵が確認できたことから、この菌株はアミラーゼ、セルラーゼ、およびヘミセルラーゼを分泌していることが示唆された。そこでこの菌株の培養液におけるSoluble Starch, Rice Starch, Avicel, CMCおよびXylanの分解活性を測定したところ、すべての基質に対して分解活性が確認できた。現在、この菌株の分泌するバイオマス分解酵素の精製を行い、その特性について詳細な検討を行っている。

Characterizations of Biomass-Degrading Enzymes from Ethanol-Fermenting Fungi

○Maki TAKANO¹, Yasuo KATO², Shinjiro OGITA², Kazuhiro HOSHINO¹
 (¹Grad. Sch. Sci. Eng., Univ. Toyama, ²Grad. Sch. Biotech., Toyama Pref. Univ.)

Key words fungus, hydrolase, biomass, bioethanol

2Fp11 深海由来酵母 *Pseudozyma hubeiensis* SY62 株が生産するバイオサーファクタント

○小西 正朗¹, 福岡 徳馬², 長濱 統彦¹, 森田 友岳², 井村 知弘², 北大 大², 秦田 勇二¹
 (¹海洋研究開発機構, ²産総研)

【背景・目的】高圧環境と深海微生物の脂質代謝は密接な関係性があると考えられる。一方で、最近機能性バイオ素材として応用開発が進んでいるバイオサーファクタント(BS);マンノシルエリスリトールリビド(MEL)は、生産菌である *Pseudozyma* 属酵母の系統学分類と主生産物のアセチル化度や脂肪酸側鎖に高い相関がある。発表者らは、特殊な脂質代謝系を有することが期待できる深海の高圧環境由来の *Pseudozyma* 属酵母を用いて、新しい構造のBSを生産できる可能性が高いと考え、JAMSTECが保有する深海由来酵母ライブラリーから *Pseudozyma* 属酵母の探索し、BS生産条件を決定した。さらに、生産されるBSの構造解析を実施した。

【実験方法・結果】探索の結果、深海由来酵母SY62株が *Pseudozyma hubeiensis* の近縁種であることがわかった。BSの生産性を調べるため、油脂を単一炭素源とする一般的なMEL生産用培地を用いた場合、BSの生産量はTLC分析の検出限界以下であった。さらに、グルコースを加えた場合、約30 g/LのBSを蓄積していることがわかった。主生産物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーを用いて精製し、¹H-, ¹³C-NMR, MALDI-TOF-MS, GC-MSを用いて、詳細に構造解析を行った結果、既存の *P. hubeiensis* 同様MEL-Cが主成分であったが、短鎖脂肪酸の含有量が多いことがわかった。深海由来酵母は陸生近縁種と系統学的に非常に近縁な微生物であっても、代謝生産物に分子構造の違いがあり、高圧等に対する代謝適応に起因する可能性がある。

Biosurfactant produced by a marine yeast, *Pseudozyma hubeiensis* SY62, isolated from the deep-sea

○Masaaki KONISHI¹, Tokuma FUKUOKA², Takahiko NAGAHAMA¹, Tomotake MORITA², Tomohiro IMURA², Dai KITAMOTO², Yuji HATADA¹
 (¹JAMSTEC, ²AIIST)

Key words Biosurfactant, Mannosylerythritol lipid, *Pseudozyma*, deep-sea