

3P-077 出芽酵母によるマンニトールからのL-乳酸の生産

○田中 秀樹¹, 柏原 貴幸¹, 村田 幸作², 河井 重幸¹
 (¹京大院・農, ²摂南大・理工)
 kawai@kais.kyoto-u.ac.jp

【背景】 褐藻類は陸性バイオマスに比べ、食糧との競合が少ない、生育速度が早い等の利点を有する有望なバイオマス資源である。褐藻類の主要成分はアルギン酸とマンニトールである。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は安全かつ有用な物質生産微生物であるが、アルギン酸とマンニトールを資化できない。しかし最近、米国のグループにより、DEH 代謝遺伝子 (DEH 輸送遺伝子など4遺伝子) とマンニトール代謝遺伝子 (*DSF1* と *HXT17*) の強制発現によって、アルギン酸分解物 DEH とマンニトールからのエタノール生産が可能となった出芽酵母が開発された¹⁾。当分野でも、出芽酵母 BY4742 株の転写コリプレッサー *Tup1-Cyc8* 遺伝子への自然変異を介して、マンニトールからエタノールを生産する出芽酵母 MK4416 株を開発している²⁾。L-乳酸は生分解性ポリマーの原材料等で有用な化合物である。本研究では、出芽酵母によるマンニトールからのL-乳酸生産系の構築を目指している。

【結果】 MK4416 株にL-乳酸脱水素酵素遺伝子を導入し、グルコース含有合成 (SC) 培地およびマンニトール含有合成 (SM) 培地で培養したところ、SM 培地では SC 培地に比べL-乳酸の生産量が大幅に減少した。そこで、マンニトールからのL-乳酸生産性の向上を図るために、宿主 (実験室出芽酵母 BY4742 株) と物質生産で実績のある出芽酵母 D452-2 株) およびマンニトール利用能付与法 (*CYC8* への部分変異と *DSF1/HXT17* の強制発現) などの検討を行った。

¹⁾ *Nature* 505:239-243 (2014)

²⁾ *Appl. Environ. Microbiol.* 81:9-16 (2015)

Production of L-lactic acid from mannitol using *Saccharomyces cerevisiae*

○Hideki Tanaka¹, Takayuki Kashiwara¹, Kousaku Murata², Shigeyuki Kawai¹
 (¹Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., ²Sci.Eng., Setsunan Univ.)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, mannitol, L-lactic acid, brown algae

3P-078 酵母 *Kluyveromyces marxianus* 2-フェニルエタノール産生向上株にみられた代謝変動

○小柳 喬¹, 岸 名帆子¹, 渡邊 幹雄¹, 原井 彩子¹, 山下 陽子¹, 谷内口 悠佳¹, 中尾 真実¹, 玉置 尚徳², 片山 高嶺³, 熊谷 英彦¹
 (¹石川県大・生資環, ²鹿児島大院・連農, ³京大院・生命)
 koyataka@ishikawa-pu.ac.jp

酵母 *Kluyveromyces marxianus* はバラ香気成分 2-フェニルエタノール (2PE) の高い産生能を持つ。我々はこれまでに、フェニルビルビン酸からフェニルアセトアルデヒドを生産するフェニルビルビン酸炭酸酵素 (Ppd, EC 4.1.1.43) の構造遺伝子 (*PPD*) のコピー数向上が 2PE 産生増大に有効であることを明らかにしている。本研究では、本現象の生理的基盤を解明するため、2PE 産生向上株における CE-TOFMS メタボローム解析を実施し代謝変動を詳細に把握した。遺伝子導入前の宿主株 (*delta-ura3 delta-trp1 delta-leu2*)、本株ゲノム上への *PPD* 追加導入株、および栄養要求性マーカー遺伝子のみを導入株について菌体内内容を解析した結果、*PPD* 追加導入株において、解糖系およびペントースリン酸経路の中間体であるグルコース-6-リン酸、フルクトース-6-リン酸、フルクトース-1,6-二リン酸、ジヒドロキシアセトンリン酸、およびセドヘプツコース-7-リン酸の蓄積量向上がみられた。このことから、Ppd の発現量向上により 2PE 合成フローが増大し、それに伴ってペントースリン酸経路および解糖系の代謝が充進したことが伺われた。すなわち、Ppd の発現量調節が中央代謝から 2PE 合成までの経路全体の制御につながることが示唆された。

Change of metabolic flow observed for the yeast *Kluyveromyces marxianus* strain with the enhanced ability of 2-phenylethyl alcohol production

○Koyanagi Takashi¹, Nahoko Kishi¹, Mikio Watanabe¹, Ayako Harai¹, Yoko Yamashita¹, Yuka Yachiguchi¹, Mami Nakao¹, Hisanori Tamaki², Takane Katayama³, Hidehiko Kumagai¹
 (¹Fac. Bioresour. Environ. Sci., Ishikawa Pref. Univ., ²United. Grad. Sch. Agric. Sci., Kagoshima Univ., ³Grad. Sch. Biostud., Kyoto Univ.)

Key words yeast, metabolic pathway modification

3P-079 メチロトロフ酵母 *C₁* 固定の鍵因子キシルロース 5-リン酸の供給系に関する酵素遺伝子の解析

福岳 寛隆¹, 〇川瀬 貴斗¹, 由里本 博也², 阪井 康能², 早川 享志¹, 中川 智行¹
 (¹岐阜大・応生科, ²京大院・農)
 t_nakaga@gifu-u.ac.jp

【目的】 メチロトロフ酵母はペルオキシソーム (Ps) で生じたホルムアルデヒドをキシルロース 5-リン酸 (Xu5P) に固定 (*C₁* 固定) することで、メタノール由来炭素を細胞構成成分へと導く。これまでメタノール代謝における Xu5P の供給は糖新生とペントースリン酸経路 (PPP) の一部酵素が関与すると推定されてきたものの、その詳細な解析はほとんどない。本研究では *Pichia pastoris* の *C₁* 固定における Xu5P 供給系に関する遺伝子群を同定し、解析した。

【結果・考察】 メタノール代謝の Xu5P 供給には、糖新生のフルクトース-1,6-P アルドラーゼ (FBA), フルクトース-1,6-P ホスファターゼ (FBP), PPP のトランスアルドラーゼ (TAL), トランスケトラーゼ (TKT) の関与が考えられる。そこでこれらの遺伝子を *P. pastoris* ゲノムデータベースから探索した結果、FBA, TAL をコードする遺伝子は 2 コピー、FBP と TKT は 1 コピー、ゲノム上に存在した。これらのうち、*FBP1* の欠損はメタノール生育の著しい低下を導いた。また、これら遺伝子の発現応答を調べたところ、*FBA2*, *FBP1*, *TAL2* はメタノール誘導性であり、*FBA1* と *TAL1* は構成的発現、*TKT1* はメタノールにより発現が顕著に低下した。一方、*Tal2p* は PTS1 配列を持ち、TKT 活性を示す *Das1p* とともに Ps に局在していた。よって Xu5P 供給系は細胞質のみならず、Ps にも局在する可能性が示された。

Analysis of Xu5P-supplying pathway genes in yeast methanol metabolism

Hirotaoka Fukuoka¹, 〇Takato Kawase¹, Hiroya Yurimoto², Yasuyoshi Sakai², Takashi Hayakawa¹, Tomoyuki Nakagawa¹
 (¹Fac. Appl. Biol. Sci., Gifu Univ., ²Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

Key words methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*, methanol metabolism, pentose phosphate pathway

3P-080 高級アルコール生産に向けた酵母の細胞内補酵素バランスの改変

○野村 悠太, 森田 啓介, 松田 史生, 清水 浩
 (阪大院・情報)
 shimizu@bio.eng.osaka-u.ac.jp

【目的】

出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) は様々なストレスに耐性を持つため、高級アルコール生産に有利な宿主である。しかし、バクテリアなどの他の宿主と比べるエタノール以外の物質生産能は初歩的なレベルにとどまっている。その原因として、イソブタノール生合成の際に生じる補酵素の酸化還元アンバランスを解消できないことが挙げられる。そこで、酵母由来の NADPH 供給反応を活性化し出芽酵母株を構築し、イソブタノール生合成に与える影響を解析した。

【方法】

出芽酵母 BY4742, BY4739 株を宿主として用いた。2 ミクロン型の複製開始点を持つプラスミドを構築し、酢酸リチウム法により酵母に導入した。構築した株を 20 g/L のグルコースを炭素源とする SD 培地 (5mL) で培養した。培地中のイソブタノール濃度はガスクロマトグラフィー (Agilent 7890A) を用いて測定した。

【結果】

PFK1 を欠損した出芽酵母株にイソブタノール生合成経路とペントースリン酸経路の *ZWF1* および NADH をリン酸化する *POS5* の過剰発現プラスミドを導入した株を構築した。発酵性試験を行ったところ、イソブタノール生合成経路を導入したコントロール株 (YBH020) における 48 時間目の生産量は 21.4 mg/L だったが、*ZWF1* と *POS5* を過剰発現した株 (YBH025) では 35.1 mg/L に向上了。 *ADH* を欠損した出芽酵母株にイソブタノール生合成経路と *POS5* の過剰発現用プラスミドを導入した株を構築した。同条件で培養したところ、イソブタノール生合成経路を導入したコントロール株 (YBA014) における 72 時間目の生産量が 9.7 mg/L であったのに対し、*POS5* を過剰発現した株 (YBA019) では、22.5 mg/L に向上了。

Engineering of co-factor balance for higher alcohol production in yeast

○Yuta Nomura, Keisuke Morita, Fumio Matsuda, Hiroshi Shimizu
 (Grad. Sch. IST, Osaka Univ.)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, biosynthesis