

論文の内容の要旨

論文題目 A study on the efficient production of lactic acid with metabolically
engineered *Saccharomyces cerevisiae*
(遺伝子組換え酵母による乳酸の効率生産に関する研究)

氏名 石田 亘 広

近年の地球温暖化問題により、化石燃料に依存した CO₂ 排出型社会から CO₂ 循環型(カーボンニュートラル)社会への転換が、21 世紀の重要課題として取り上げられている。特にポリ乳酸に代表される植物由来プラスチックは、循環型社会に貢献できる材料として大きく注目されている。

ポリ乳酸は、植物由来のでんぷん・糖などを原料に、乳酸発酵を経て生産される L-乳酸を重合して得られるポリマーであり、農業用シートや家電の一部に採用されるなどして実用化されている。しかし、耐熱性および耐衝撃性が低く、製造コストも高いことから、あまり普及していないのが現状である。そのため、ポリ乳酸を汎用プラスチック並みに展開するためには、耐熱性、耐衝撃性の向上とコストの低減が不可欠であると指摘されている。一般的に、原料である L-乳酸の生産技術としては、乳酸菌を用いた手法が主流である。しかし乳酸菌の場合、高い栄養要求性や高密度培養が難しいといった課題がある。さらに、ポリ乳酸の高性能化に必須であるといわれている L-乳酸の光学純度が低い(約 95%程度)ことも指摘されており、これらの問題点がポリ乳酸のコストを上げる要因となっている。

一方で、*Saccharomyces cerevisiae* に代表される酵母は、高密度培養が可能で、ケージユースなどの低コスト培地からでも発酵が行えることから、エタノールを中心とする発酵産業に欠かせない真核生物として知られている。一般的に酵母は、乳酸脱水素酵素遺伝子 (lactate dehydrogenase; 以下 LDH と称す) を持たないことから、乳酸は生産されない。しかし、LDH 遺伝

子を発現させることにより、酵母での乳酸生産は可能である(図 1)。この場合、発酵生産される乳酸の光学純度は高いことが予想されると同時に、酵母は低 pH にも比較的耐性を示すことから、非中和条件下でフリー乳酸を生産できる可能性もある。さらに酵母は、高密度培養が可能であり、培養における栄養要求性も乳酸菌ほど高くない。このような期待から、*S. cerevisiae* で *L*-LDH 遺伝子を発現させ *L*-乳酸を発酵生産させる試みが、これまでに数件報告されている。しかし、いずれの報告においても 10~20g/liter 程度の *L*-乳酸しか得られず(グルコースからの変換効率として 20%前後)、高い生産効率は認められな

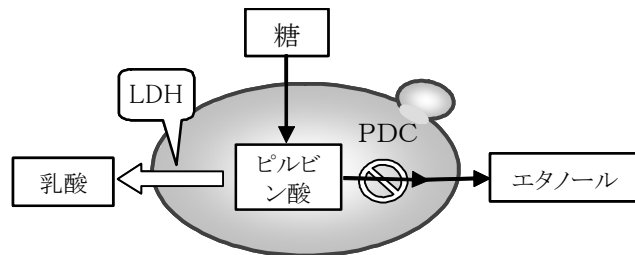


図1 遺伝子組換え酵母による乳酸生産

かった。元来 *S. cerevisiae* は強いエタノール生産能を有することから、酵母で効率的な乳酸生産を実現するためには、エタノール生産に関わるピルビン酸脱炭酸酵素遺伝子 (pyruvate decarboxylase;

以下 *PDC* と称す) の発現を制御することが指摘されていた。そこで、高光学純度の *L*-および *D*-乳酸を高効率で生産させることを目的に、代謝工学的手法を基盤とした乳酸生産酵母構築に関する以下の研究に取り組んだ。

1、酵母染色体の *PDC1* 部位への *L*-LDH 遺伝子導入は、効率的な *L*-乳酸生産をもたらす

遺伝子組換え酵母による *L*-乳酸の生産は、従来、2 μ m DNA を含んだマルチコピー型ベクターを利用した試みが主流であった。しかしその場合、高い乳酸生産は確認されていない。そこで、*S. cerevisiae* 第 12 番染色体上に位置する *PDC1* プロモーター下流に *L*-LDH 遺伝子を導入し、*PDC1* ORF 遺伝子のみが破壊される新しい遺伝子発現系を試みた。本手法で作製した組換え酵母は、導入された *L*-LDH 遺伝子が内在性の *PDC1* プロモーター制御下で発現される特徴をもつ。作製した組換え酵母と、マルチコピー型ベクターを使って作製した従来株とを比較した結果、*PDC1* 遺伝子部位への染色体導入株では、*L*-LDH 遺伝子が染色体中に 2 コピーしか挿入されていないにも関わらず、高い LDH 活性を示した。さらに、100g/liter グルコース含有 YPD 培養液による発酵試験の結果、58g/liter の高い *L*-乳酸生産を確認することができた(図 2)。

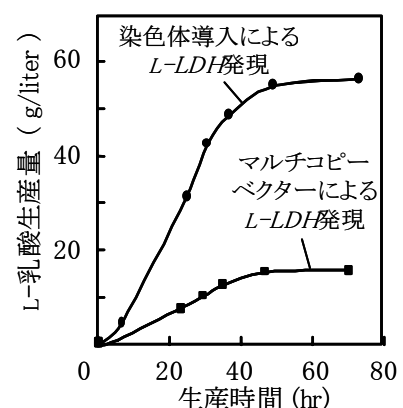


図2 染色体導入による *L*-乳酸生産の効果

2、*pdcl pdc5* 二重破壊株において、高い LDH 発現が発酵速度改善に寄与する

S. cerevisiae は、エタノール生産に関与する *PDC1* の破壊に応答して、相同性の高い *PDC5* が高発現するオートレギュレーション機構が存在している。上記1での組換え酵母は、乳酸生産収率 60%と高い生産効率を示しているものの、依然としてエタノールの生産は確認されており、これが *PDC5* に起因することが予想された。そこで、*PDC1* および *PDC5* 遺伝子を破壊した組換え酵母を作製し、乳酸生産酵母における *pdcl pdc5* 二重破壊の効果を検証した。その結果、対糖収率 80%以上と、これまでの報告をはるかに上回る高い乳酸生産効率の向上効果を確認した(図 3)。しかし同時に、極端な増殖、発酵速度の低下が観察された。2 種類の *L-LDH*(ウシ由来、乳酸菌由来)を個々に導入した *pdcl pdc5* 破壊株での検証の結果、ウシ由来 *L-LDH* 導入株において、速度改善効果があったことから、高い LDH 活性が細胞内レドックスバランスの改善に寄与していることが考察された。

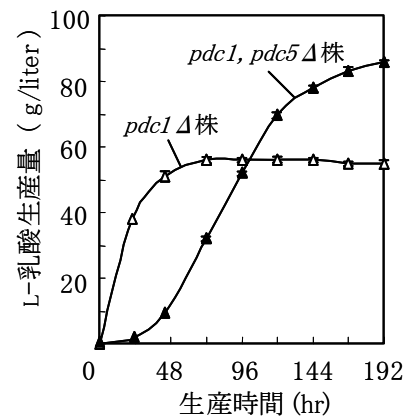


図3 *pdcl pdc5*二重破壊株におけるL-乳酸生産の効果

3、*L-LDH* 遺伝子を染色体中に複数コピー導入することでL-乳酸生産能は向上する

上記 2 では、効率的な乳酸生産収率を達成したものの、菌体増殖速度が低下するという新たな課題が発生した。そこで *PDC5* 破壊ではなく、ウシ由来 *L-LDH* 遺伝子を酵母染色体中に複数コピー導入し、乳酸生産量への影響を調べた。

L-LDH 遺伝子を染色体中に 6 コピーまで導入した組換え酵母での解析の結果、導入コピー数の向上とともに、LDH 活性の向上が観察された。同時に、乳酸生産量もコピー数に比例して上昇することが確認された(図 4)。*L-LDH* 遺伝子を 6 コピー導入した株は、ケーンジュースより作成した低コスト培地であっても 120 g/liter 以上の L-乳酸生産能を示し、生産される L-乳酸の光学純度は、99.9%以上を示していた。これらの結果から、乳酸菌での L-乳酸生産において課題となっていた、低コスト培地の利用や光学純度に関する問題が、乳酸生産酵母によって、解決できることが明らかになった。

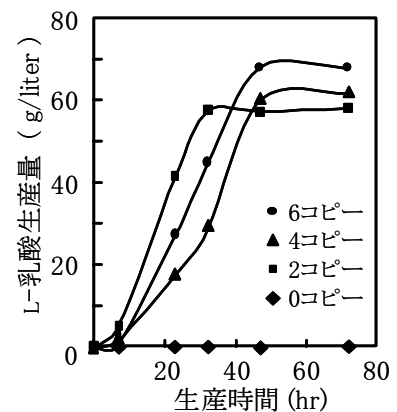


図4 *L-LDH* 遺伝子導入コピー数の検討

4、本技術は、D-乳酸の高効率生産へも利用可能である

ポリ L-乳酸は、製造コストが高いという問題のほかに耐熱性が低いという点も指摘されている。近年、L-乳酸の光学異性体として知られるD-乳酸のポリマーをポリL-乳酸と混合させると、ポリL-乳酸の耐熱性が58°Cから120°Cにまで向上することが報告されている。しかし一方で、純粋なD-乳酸生産に関する報告例は少ない。そこでL-乳酸生産で行った技術を利用して、D-乳酸を高生産する酵母の構築を試みた。D-乳酸を生産する乳酸菌 *Leuconostoc mesenteroides* よりD-LDH遺伝子を取得し、これを染色体中の *PDC1* プロモーター下流に導入したところ、L-乳酸の場合と同様に、高いD-乳酸生産を確認することができた。また中和条件下のみならず、非中和条件下でもフリー乳酸を生産していることも確認された(図5)。

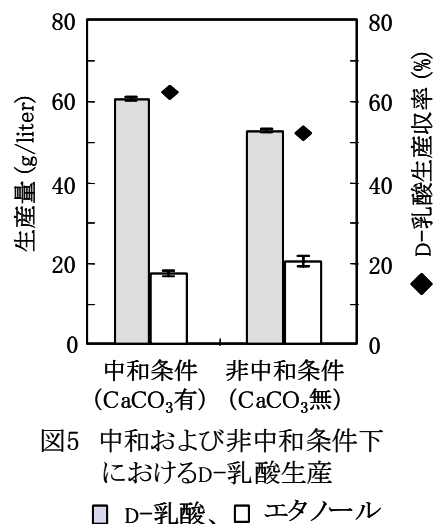


図5 中和および非中和条件下におけるD-乳酸生産
□ D-乳酸、□ エタノール

5、まとめ

ポリ乳酸の低コスト生産を目指し、高光学純度を有するL-およびD-乳酸を効率的に生産可能な遺伝子組換え酵母の研究に取り組んだ。その結果、染色体の *PDC1* プロモーター下流領域に *L-LDH* 遺伝子を導入することによって、高効率でL-乳酸を生産できることを証明した(本文第2章)。さらに、エタノール生産への代謝経路の制御(本文第3章)や、*L-LDH* 活性の増強(本文第4章)などの手段により、L-乳酸の生産効率を飛躍的に高めることに成功した。また本手法は、L-乳酸だけに限らず、D-乳酸の高生産においても利用可能であり、ポリ乳酸のもう一つの課題である耐熱性向上への糸口を見出した(本文第5章)。これらの研究成果により、乳酸菌を用いた従来の生産法とは異なる新しい乳酸生産手法を開発することができた。乳酸菌で指摘されていた問題点が本アプローチによって解決され、低コストでの乳酸生産が可能になると考えられる。

なお本研究には、宿主として2倍体酵母 *S. cerevisiae* OC-2 株を利用した。*S. cerevisiae* OC-2 株は、東京大学名誉教授 坂口謹一郎博士によって単離されたワイン酵母であり、生育速度が速く、培養適性に優れた酵母として広く知られている。*S. cerevisiae* は、アルコール製造を中心とする発酵産業に欠かせない微生物であると同時に、古くより遺伝学のモデル生物としても扱われている。さらに近年のゲノム解読や遺伝子破壊ライブラリーなどの充実により、基礎的な知見の進展も目覚ましい。今後は、本成果をさらに発展させ、基礎並びに応用的な側面から、乳酸生産酵母に関する研究を深めていきたいと考えている。