

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 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。

一般に原料である 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、乳酸菌は高い栄養要求性を示し、高密度培養が難しく、生産される L-乳酸の光学純度が低いなどの欠点を有している。これに対して *Saccharomyces cerevisiae* に代表される酵母は、高密度培養が可能で、低コスト培地からでも発酵が行えること、乳酸脱水素酵素 (LDH) 遺伝子を発現させることにより光学純度の高い乳酸の生産が期待されるなどの利点を有する。しかし、*S. cerevisiae* での高効率な L-乳酸の発酵生産はこれまで報告されていない。

本論文は、代謝工学的手法を基盤とした乳酸生産技術の開発を目的として、*S. cerevisiae* のピルビン酸脱炭酸酵素 (PDC) 遺伝子の発現制御によってエタノール生産を抑制し、高光学純度の L-および D-乳酸を効率的に生産させることを試みたものであり、序章および 4 章から構成されている。

序章では、研究の背景と様々な宿主を用いた乳酸生産の現状を紹介し、本研究の意義と目的について述べている。

第一章では、*S. cerevisiae* 染色体の *PDC1* 部位への L-LDH 遺伝子導入による効率的な L-乳酸生産について述べている。従来、遺伝子組換え酵母による L-乳酸の生産は多コピーベクターを利用した試みが主流であったが、高い乳酸生産は確認されていない。そこで、*S. cerevisiae* の *PDC1* プロモーター下流にウシ L-LDH 遺伝子を導入した新しい遺伝子発現系を試みた。作製した組換え酵母は従来株に比べ高い LDH 活性を示し、58 g/liter という高い L-乳酸生産が確認された。

第二章では *pdcl pdc5* 二重遺伝子破壊が乳酸生産に及ぼす効果について述べている。*S. cerevisiae* には *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する。第一章での組換え酵母は 60% という高い乳酸生産収率を示したものの、依然としてエタノールの生産が認められ、これが *PDC5* に起因すると予想された。そこで、*PDC1* および *PDC5* を破壊した組換え酵母を作製し乳酸生産への効果を検証した。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を示すことを確認した。しかし同時に、極端な増殖の低下が観察された。

第三章では L-LDH 遺伝子の染色体上でのコピー数を増加させることによる L-乳酸生産能の向上について述べている。第二章では高効率な乳酸生産が達成されたものの、増殖速度が低下するという新たな課題が生じた。そこで *PDC5* 破壊は行わず、L-LDH 遺伝子を酵母染色体中に複数コピー導入した株での乳酸生産量を調べた。その結果、導入コピー数の増加とともに LDH 活性および乳酸生産量の上昇が確認された。この株はケーンジュースより作成した低コスト培地においても 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%以上を示した。以上の結果から、乳酸菌での L-乳酸生産において課題となっていたコスト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。

第四章では第三章までの手法を D-乳酸の生産へ適用した結果について述べている。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、D-乳酸のポリマーをポリ L-乳酸と混合させるとポリ L-乳酸の耐熱性が向上することが報告されている。しかし、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。

以上、本研究は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するための酵母発現系の開発に取り組み、乳酸菌を用いた従来法とは異なる新しい乳酸生産手法を提示したものであり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は本論文が博士(農学)の学位論文として価値あるものと認めた。