

論文内容の要旨

論文題目 「ワイン酵母 OC-2 による物質生産に関する研究」

氏名： 齋藤 聡志

酵母 *S. cerevisiae* は、パン、清酒、焼酎、ワインなどの人類食文化に多大な影響を与えてきた微生物の代表的存在である。

これは、遺伝子組換え技術が使用される以前より、人類の文化的側面が強いものであるが、パスツールが発酵現象を微生物による生命現象として解明したことにより、科学的な解析が進み、ひいては酵母ゲノム解析等、生物学的基礎データの蓄積が進んだ。

今後、実用化に結びつけるため、酵母宿主についての検討も重要な研究課題であると考えられる。清酒酵母等での遺伝子導入研究や、YE_p ベクターの利用による物質生産系に関する研究が検討されている。

例えば実験室酵母による乳酸生産系では Adachi らが、酵母 *S. cerevisiae* において乳酸生産は可能であるが、1%程度の低レベルの乳酸生産を報告しているに過ぎなかった。

清酒酵母において効率的にマーカー遺伝子を付与する方法等が報告されている。

本研究では、実用株であるワイン酵母 OC-2 のホモタリク性を活用し染色体へ遺伝子導入する方法論と物質生産性について検討する事を目的とした。

ワイン酵母 OC-2 を用いたデルタ配列染色体導入法によるグルコアミラ

- 削除: の
- 削除: 研究
- 削除: 遺伝子組換え
- 削除: に加え、B 型肝炎のワクチン製造の例に見られるよう (人類) ... [1]
- 削除: つづけ
- 削除: といえる
- 削除:
- 削除: ると思われる。更に
- 削除: 捉えたこ
- 削除: と
- 削除: によるところが大きいものと考えられる ... [2]
- 削除: 分子細胞レベルでの解析により有効な研究成果を ... [3]
- 削除: には
- 削除: へ
- 削除: アプローチ
- 削除: 思われる
- 削除: 酵母研究においては
- 削除: 従来
- 削除: を
- 削除: した高発現系を利用した酵 () ... [4]
- 削除: 一般的であった
- 削除: YE_p ベクターはマルチ () ... [5]
- 削除: し、導入領域、コピー数と
- 削除: との結果について検討した
- 削除: 本研究より得られた結論と () ... [6]
- 削除:

一ゼ生産パン酵母の育種 (第2章)

本研究において、澱粉原材料を多様化した新商品開発技術を開発する事を目的として、ワイン酵母 OC-2 のトリプトファン要求株を作製し、Aspergillus oryzae のグルコアミラーゼ cDNA を YEp ベクター-YIp ベクター、 δ -配列を利用した染色体への多コピー導入方法について検討した。前培養で選択圧をかけない場合 YEp ベクターにおいても、その細胞内での不安定性から高グルコアミラーゼ活性を示す事はなかったが、 δ -配列を利用した染色体導入方法は、パルスフィールドゲル電気泳動の結果より、導入遺伝子数にばらつきはあるが、複数の染色体にまたがって導入遺伝子が存在する結果ではなかった。これは、染色体上の δ -配列をターゲットに相同組換えが起き、サザン解析結果の導入遺伝子コピー数と比較するとタンデムに遺伝子導入により、遺伝子の多コピー導入が可能となったものと推察した。

削除: は…高品質で…酵母 *S. cerevisiae*へ…c DNA…YEp…
遺伝子…染色体…はばらつきが…
… [7]

この実験結果より、少なくとも染色体に 10 コピー程度の遺伝子導入できれば、従来の YEp ベクターによる遺伝子導入法と比べて、飛躍的に高物質生産性が得られるものと考えられた。

削除: 10…が可能であれば…
… [8]

しかし染色体の 10 コピーの遺伝子導入を行う事は、煩雑な実験操作である。OC-2 株と δ -配列を利用すれば、可能であるが、染色体上のターゲット領域が不明であり、得られた形質転換株のグルコアミラーゼ活性もばらつきが大きい。遺伝子コピー数、染色体の導入位置によっても物質生産量に違いがあるものと考えられる。

削除: 実験作業を考慮すると、なかなかやる気の起きる仕事とはいえない。…不…ではないが…
… [9]

削除: おそらく…ターゲット領域の違いによるものと推察した
… [10]

ワイン酵母 OC-2 を用いた高光学純度を有する乳酸高生産株の育種 (第3章)

本研究では、遺伝子導入位置を確認し、遺伝子コピー数と物質生産量との関係を明確にする事を試みた。酵母 *S. cerevisiae* 染色体中にピルビン酸をアセトアルデヒドに変換する反応を触媒する Pyruvate decarboxylase をコードする遺伝子は PDC1、PDC5、PDC6 の3種が存在することが知られている。通常 PDC1 のみが機能しており、酵母 *S. cerevisiae* のエタノール生産に大きく貢献している点に着目し、PDC1 プロモーター制御下に乳酸生産遺伝子である LDH 遺伝子を導入する事で、LDH 遺伝子の高発現と高い乳酸生産性を得る事に成功した。更に、PDC1 プロモーターと LDH 遺伝子のカセットを6コピーまで増加させ、実用培地であるケーンジュースをベースとした培地で光学純度 99.9%以上のL-乳酸を 12.2%生産する事を確認できた。

削除: OC-2
削除: の…に成功した点で前進があった
… [11]

書式変更 … [12]

これは、従来 Adachi らが報告している YEp ベクターを用いた乳酸生産量の 10 倍以上の乳酸生産性を示す事から染色体中の PDC1 プロモーターにより乳酸遺伝子である LDH 遺伝子を高発現させる事は、乳酸製造方法として有効な方法

削除: たところ…Cane juice
… [13]

削除: 10
書式変更 … [14]

削除: 少なくとも

であるといえる。

PDC1 プロモーターは培地中のグルコース濃度に依存して発現量が向上する点、PDC5 遺伝子との Autoregulation 機構の存在により PDC1 ORF が削除された場合、PDC1 プロモーター活性が向上するため、高糖濃度培地において染色体中の PDC1 プロモーター制御下に異種遺伝子を導入する方法は物質生産に有効な手法である事を確認した。

書式変更

書式変更

書式変更

書式変更

書式変更

更に、遺伝子の染色体への多コピー導入により乳酸生産量向上について検討した。細胞内の LDH 活性、乳酸生産量が向上する事を確認した事から染色体での多コピー導入の有効性を確認した。PDC1 プロモーターと LDH 遺伝子のカセットを 6 コピー導入した事により乳酸濃度は 12.2%を示し、高濃度の乳酸生産性を示した。

削除:

削除: について

削除: である事を

書式変更

書式変更

削除: 6

削除: として

削除: なは

更にポリ乳酸原料の乳酸品質は高い光学純度が要求される。バクテリアである乳酸菌が生産する乳酸の光学純度は一般的に高くない、これは乳酸菌には乳酸ラセマーゼ活性の存在により少量の D-乳酸を生産する事になるためである。その生理的意義は不明であるが、バクテリアの細胞壁構成成分として D-乳酸が必要であることを Goffin らは報告している。D-乳酸が供給されない場合、D-Ala を代替物として細胞壁構成成分とするが、この場合 vancomycin 感受性となるとの報告はバクテリアにとって D-乳酸が重要であることを示唆しており、興味深い。

酵母 *S. cerevisiae* を宿主として乳酸生産を行う場合、極めて高い光学純度となることは、ポリ乳酸製造工程においても有意義であると考えられる。また、真核生物とバクテリアにおいて差異がある点についても大変興味深いものがある。

削除: といえる

ワイン酵母 OC-2 を用いた染色体多コピー β-グルコシダーゼ遺伝子導入株の育種(第 4 章)

上述のように、染色体中に PDC1 プロモーターと乳酸生産遺伝子である LDH 遺伝子を 6 コピー導入する事で高い乳酸生産性が得られる事を示した。第 2 章、第 3 章では、OC-2T (トリプトファン要求性株) を使用し、多コピー化する際に薬剤耐性遺伝子である G418 耐性遺伝子、Phleomycin 耐性遺伝子を利用したが、いくつかの問題点がある。異種異種遺伝子からのタンパク生産は、細胞内でのタンパク輸送経路に問題が起きる可能性も示唆されており、更に形質転換時のバックグラウンドも問題となる。

削除: 前報において

書式変更

書式変更

削除: g

削除: ene

削除: 確認した

削除: 前報

また、組換え DNA 分子の安全性評価も慎重に行う必要がある。

効率的な物質生産を実現するための実用酵母としては、薬剤耐性マーカー遺伝子を使用せずに栄養要求性マーカーを使用すれば、上記問題は解決されるた

削除: 組換え DNA 分子の安全性評価が必要となる。また、不要な

削除: 否定できない事に加え

め、酵母染色体中に存在する、30塩基程度を *URA3* 遺伝子の両端に付加し、FOAプレートとの組み合わせにより、OC-2U株（ウラシル要求性株）を親株としてOC-2ダブルマーカー株である、OC-2HU株（ヒスチジン要求性、ウラシル要求性株）を作製した。

作製した OC-2HU 株に細胞表面提示型β-グルコシダーゼ遺伝子2コピー導入株、4コピー導入株を作製しPNPG活性を測定したところ、導入遺伝子のコピー数に依存してPNPG活性は顕著に増大する事を確認した。

削除: と考え

削除: 30

書式変更

削除: OC-2U

削除: OC-2HU

削除: 向上

セロビオースからエタノールを生産する酵母のスクリーニング (第5章)

The Yeasts 3rd edition にセロビオース発酵性のある酵母として登録されていた酵母を選択したが、セロビオースからのエタノール生産能力は酵母菌株により、大きく異なっていた。特に、菌株保存機関名称で *Pichia pini*, *Pichia glucozyma*, *Pichia dorogensis*, *Pichia henricii* のエタノール生産性が高かった。また *Pichia pini* の中にはエタノール生産性が低い酵母も含まれていたため、26SrDNAの解析を行い、再同定を試みたところ、エタノール生産性が低い *Pichia pini* はすべて *Pichia trehalophia* と再同定された。

また、26SrDNA解析等により *Pichia pini* と登録されていた ATCC28781 が新種酵母であることを見出し、*Ogataea neopini* と命名した。この新種酵母がセロビオースをエタノールへ変換する能力の他に、42℃での生育可能である知見を得た事から、*Ogataea neopini* は遺伝子資源として有効活用できる可能性があるため、今後プラットフォーム化したOC-2へ導入し、新規な酵母を開発したい。

削除: セロビオースからエタノールを生産する酵母の

削除:

削除: が

削除: が、

削除: 26S r DNA

削除: 26S r DNA の

書式変更

削除: り

まとめ

OC-2のホモタリク性に着目し、染色体への多コピー遺伝子導入について検討した。従来のYEpベクターの利用方法と比較すると物質生産性の点で優れている事を確認した。これはワイン酵母OC-2が本来兼ね備えている性質も有効に利用する事で高い生産性を得る事ができた。

更に、マーカーリサイクル法を二倍体酵母へ活用する事でワイン酵母OC-2のマルチマーカー株を作製する事で実用酵母のプラットフォーム化を試みた。この取組みにより、ワイン酵母OC-2を宿主とした新規酵母の育種が加速するものと考えられ、野生酵母から得られた *Ogataea neopinini* 等 *S. cerevisiae* にはない性質を付与する新規遺伝子資源の活用などが期待される。

削除:

ページ 1: [1] 削除	齋藤 聡志	2008/10/15 9:57:00
に加え、B型肝炎のワクチン製造の例に見られるよう、人類		
ページ 1: [2] 削除	齋藤 聡志	2008/10/15 10:09:00
によるところが大きいものと考えられる		
ページ 1: [3] 削除	齋藤 聡志	2008/10/11 11:15:00
分子細胞レベルでの解析により有効な研究成果を		
ページ 1: [4] 削除	齋藤 聡志	2008/10/15 9:58:00
した高発現系を利用した酵母 <i>S. cerevisiae</i> を宿主とした		
ページ 1: [5] 削除	齋藤 聡志	2008/10/11 11:17:00
YE p ベクターはマルチコピーベクターであるが、高発現させたい遺伝子の高発現レベルを明確に規定できなかつたり、安定性の点で問題があるのは、実用性の観点からは大きな課題であるといえる。		
ページ 1: [6] 削除	齋藤 聡志	2008/10/11 11:16:00
本研究より得られた結論としては、酵母 <i>S. cerevisiae</i> に高発現プロモーターに4から6コピー程度染色体導入を行う事により YE p ベクターでの導入によるよりは、高い物質生産性が得られる点である。これは、まだ一般化できるレベルではないが、異種遺伝子による発現タンパク質が細胞内毒性やタンパク分泌過程で問題について検討する事で、高物質生産性の可能性があると考えられる。		
ページ 2: [7] 削除	齋藤 聡志	2008/10/15 10:00:00
は		
ページ 2: [7] 削除	齋藤 聡志	2008/10/11 10:41:00
高品質で		
ページ 2: [7] 削除	齋藤 聡志	2008/10/11 10:42:00
酵母 <i>S. cerevisiae</i> へ		

ページ 2: [7] 削除 c DNA	齋藤 聡志	2008/10/15 10:00:00
ページ 2: [7] 削除 YE p	齋藤 聡志	2008/10/15 10:00:00
ページ 2: [7] 削除 遺伝子	齋藤 聡志	2008/10/20 14:26:00
ページ 2: [7] 削除 染色体	齋藤 聡志	2008/10/20 14:27:00
ページ 2: [7] 削除 はばらつきが	齋藤 聡志	2008/10/11 10:42:00
ページ 2: [7] 削除 が	齋藤 聡志	2008/10/11 10:42:00
ページ 2: [8] 削除 1 0	齋藤 聡志	2008/10/15 10:01:00
ページ 2: [8] 削除 が可能であれば	齋藤 聡志	2008/10/20 14:27:00
ページ 2: [8] 削除 る	齋藤 聡志	2008/10/20 14:28:00
ページ 2: [9] 削除 実験作業を考慮すると、なかなかやる気の起きる仕事とはいい難い。	齋藤 聡志	2008/10/11 10:43:00
ページ 2: [9] 削除 不	齋藤 聡志	2008/10/11 10:44:00
ページ 2: [9] 削除	齋藤 聡志	2008/10/11 10:44:00

ではないが、

ページ 2: [9] 削除	齋藤 聡志	2008/10/15 10:01:00
---------------	-------	---------------------

く、

ページ 2: [10] 削除	齋藤 聡志	2008/10/15 10:01:00
----------------	-------	---------------------

おそらく

ページ 2: [10] 削除	齋藤 聡志	2008/10/11 10:45:00
----------------	-------	---------------------

ターゲット領域の違いによるものと推察した

ページ 2: [11] 削除	齋藤 聡志	2008/10/11 10:45:00
----------------	-------	---------------------

の

ページ 2: [11] 削除	齋藤 聡志	2008/10/11 10:45:00
----------------	-------	---------------------

に成功した点で前進があった

ページ 2: [12] 書式変更	齋藤 聡志	2008/10/11 10:46:00
------------------	-------	---------------------

書式変更

ページ 2: [12] 書式変更	齋藤 聡志	2008/10/11 10:46:00
------------------	-------	---------------------

書式変更

ページ 2: [12] 書式変更	齋藤 聡志	2008/10/11 10:46:00
------------------	-------	---------------------

書式変更

ページ 2: [12] 書式変更	齋藤 聡志	2008/10/11 10:46:00
------------------	-------	---------------------

書式変更

ページ 2: [12] 書式変更	齋藤 聡志	2008/10/11 10:46:00
------------------	-------	---------------------

書式変更

ページ 2: [12] 書式変更	齋藤 聡志	2008/10/15 10:03:00
------------------	-------	---------------------

書式変更

ページ 2: [12] 書式変更 齋藤 聡志 2008/10/15 10:03:00

書式変更

ページ 2: [13] 削除 齋藤 聡志 2008/10/11 10:46:00

たところ

ページ 2: [13] 削除 齋藤 聡志 2008/10/11 10:47:00

Cane juice

ページ 2: [14] 書式変更 齋藤 聡志 2008/10/11 10:47:00

書式変更

ページ 2: [14] 書式変更 齋藤 聡志 2008/10/11 10:47:00

書式変更