

[別 紙 2]

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

申請者氏名 齋藤 聡志

酵母 *S. cerevisiae* は、パンやワインなどの酒類の製造になくてはならない重要な微生物である。本論文は、実用酵母であるワイン酵母 0C-2 株のもつ高い耐糖性、耐酸性や発酵性に着目し、0C-2 株を有用物質生産に利用することを目的として行った研究をまとめたものである。

第1章の序論に続き第2章では、様々な澱粉原材料を使用したパンの新商品開発技術を開発する事を目的として、ワイン酵母 0C-2 株を用いて δ -配列染色体導入法によりグルコアミラーゼを生産するパン酵母の育種を行った。まず、ワイン酵母 0C-2 株のトリプトファン要求性株を作製し、麹菌 *Aspergillus oryzae* のグルコアミラーゼ cDNA と δ -配列をもつ染色体組込み型プラスミドを導入した。このようにして染色体上に多コピー導入された株は澱粉を単独炭素源として生育することができ、米やコーンスターチを原料とした新たな食感を有するパンの開発の可能性を示した。

第3章では、ポリ乳酸製造のため、ワイン酵母 0C-2 株を用いて高光学純度を有する乳酸を高生産する株の育種を行った。酵母 *S. cerevisiae* はピルビン酸をアセトアルデヒドに変換する Pyruvate decarboxylase をコードする遺伝子として *PDC1*, *PDC5*, *PDC6* の3つをもつ。通常エタノール生産に主として働いている *PDC1* プロモーター制御下にウシ由来の LDH (lactate dehydrogenase) をコードする cDNA を導入する事で、LDH の高発現と高い乳酸生産性が得られることを示した。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を用いて 12.2%という高濃度の L-乳酸を生産する事に成功した。*S. cerevisiae* 実験室株での生産と比べて、はるかに高い生産性であり、実用株であるワイン酵母 0C-2 株の有用性を示している。またこのときの光学純度は 99.9% 以上であった。

一般に、ポリ乳酸のために使用される乳酸は高い光学純度が必要とされるが、乳酸菌が生産する乳酸の光学純度はあまり高くない。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、ポリ乳酸製造においても有意義であると考えられる。

第4章では、ワイン酵母 0C-2 株を用いて染色体への多コピー β -グルコシダーゼ遺伝子導入株の育種を行った。まず、多数の遺伝子を導入するために、0C-2U 株 (ウラシル要求性株) を親株として二重栄養要求性株である 0C-2HU 株 (ヒスチジン要求性、ウラシル要求性株) を作製した。さらに、30 塩基程度の繰り返し配列を *URA3* 遺伝子の両端に付加し、FOA 培地を用いたポジティブセレクションによりマーカーリサイクル法を確立し、様々な遺伝子を導入するこ

とが可能な OC-2 株のプラットフォーム化を行った。

OC-2HU 株に細胞表面提示型 β -グルコシダーゼ遺伝子を 2 コピー導入した株、4 コピー導入した株を作製し β -グルコシダーゼ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活性が顕著に増大する事を確認した。2 コピー、4 コピー導入株は 4 %セロピオースを含む YPD 培地でそれぞれ 11g/L, 15g/L のエタノールを 24 時間で生産した。

第 5 章では、菌株保存機関からセロピオースを発酵する可能性のある酵母を集め、セロピ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を行った。エタノール生産能力は酵母により大きく異なり、*Pichia pini*, *Pichia glucozyma*, *Pichia dorogensis*, *Pichia henricii* のエタノール生産性が高かった。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。この新種酵母などをセロピオースからのエタノール生産のための遺伝子資源として、プラットフォーム化した OC-2 株へ導入することにより新規な酵母の開発の可能性について論じている。

以上、本研究は、実用株であるワイン酵母 OC-2 株を用いて、様々な有用物質の生産を検討したものであり、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。