

## 論文内容の要旨

論文題目            L-乳酸高生産性酵母 *Candida utilis* の分子育種に関する研究

氏名                生嶋 茂仁

人類が産業を持続的に発展させるためには、地球温暖化の原因となる温室効果ガス・二酸化炭素の上昇について早急に対応する必要がある。そこで、現在は化石資源に依存しているプラスチックなどの化成品をバイオマスから作ることにより、新たな炭素の大気中への排出を避ようとする取り組みに関心が寄せられている (カーボン・ニュートラル)。ポリ乳酸からなるプラスチックは乳酸、特に L-乳酸がポリマー化した化合物であり、この L-乳酸はグルコースなどの糖質から微生物の発酵により生産できる。ただ、高い品質のプラスチックを作製するためには光学純度が高い L-乳酸を高効率で生産する必要がある。以前より、*Lactobacillus* などに属する乳酸菌を用いて L-乳酸を生産するための研究が活発に行われてきたが、乳酸菌には D-乳酸を副生する株が多いなどの問題があった。そこで *Saccharomyces cerevisiae* や *Kluyveromyces lactis* を素材とした研究が 1990 年中頃より進められ、前者では約

100 g/l のグルコースから 82.3 g/l の L-乳酸 (> 99.9% e.e.) を作る株が構築された。しかしこの生産には 168 時間以上の長い時間がかかったことや、エタノールを副生したことについては、さらなる改善が望まれた。一方、産業で広く利用されている食用酵母 *Candida utilis* の宿主・ベクター系は 1990 年代に開発され、異種タンパク質が大量に発現された実績がある。本酵母は増殖力や発酵力にも優れることから L-乳酸を作らせる微生物として有望であるが、ゲノムや倍数性に関する知見は乏しく、組換え DNA 技術を使って遺伝子の完全欠損株が作製された報告はなかった。そこで本研究では *C. utilis* の遺伝子工学技術の充実化を図り、さらには L-乳酸を高い効率で発酵生産できる *C. utilis* 株の育種に取り組んだ。得られた成果の概要は以下のとおりである。

## **第 1 章 新規自律複製配列を利用した *Candida utilis* の共形質転換系の開発**

第 1 章では *C. utilis* から新たな自律複製配列 (ARS) をクローン化し、さらにはプロモーターとして機能する新規配列を獲得することを目指した。また、自律複製型プラスミドと染色体組込み型 DNA 断片の 2 種を細胞に同時に導入する共形質転換系の開発を試みた。まず、G418 耐性遺伝子 (*APT*) 発現カセットを持つが自律複製能のないプラスミドに、制限酵素で断片化した *C. utilis* ゲノム DNA を挿入して構築したライブラリーを利用することにより、少なくとも 6 種の ARS をクローン化した。その内の 2 種について、形質転換頻度や保持効率を指標とした解析を行い、自律複製活性を示す領域を 1.9 kb と 1.8 kb にまで短縮した。両断片には *S. cerevisiae* の ARS コンセンサス配列に類似の配列も見出された。なお、8 時間 (2.5~3.5 世代) の培養後、プラスミドが保持された細胞の割合は最も高いものでも 40% に満たなかった。さらにプロモーターを持たない *APT* 遺伝子を持つ ARS 含有プラスミドを用いることにより、プロモーター活性を持つ DNA 断片を複数クローン化した。この際、取得したプラスミドの中には、非選択条件で一晩培養した後も 80% 以上の細胞で保持率されたものもあった。次に自律複製型プラスミドと、リボソーマル DNA 領域を標的とする染

色体組込み型の DNA 断片を混合して *C. utilis* の共形質転換を行った結果、陽性クローンを取得することができた。目的の形質転換体の取得効率に課題が残されはしたが、遺伝子組換え株に該当しないセルフクローニング株の構築を実現しうる形質転換系が本酵母でも利用できることが明らかになったことは、今後、産業への応用を進める、特に実用株の構築を行う上で、非常に高い価値があると考えられる。

## **第 2 章 *Candida utilis* の Cre-loxP 系による効率的な多重形質転換法の開発**

第 2 章では形質転換時の選択マーカー遺伝子の再利用システムである Cre-loxP 系を *C. utilis* に導入することにより、本酵母の多重形質転換を可能とするシステムの確立を目指した。まず、34 塩基の loxP 配列が両端に付与されたハイグロマイシン B 耐性遺伝子 (*HPT*) を持つプラスミドと、Cre 組換え酵素発現用の自律複製型プラスミド (*APT* 遺伝子を有する) を構築した。次に *C. utilis* NBRC0988 株を原株としてオロチジン 5'リン酸脱炭酸酵素をコードする *CuURA3* 遺伝子の破壊を行い、本酵母で Cre-loxP 系が機能することを明らかにした。なお、本研究では二重鎖組換えによって *HPT* 遺伝子を染色体に組込み、次に *APT* 遺伝子を有する Cre 発現用プラスミドを導入することによって細胞から *HPT* 遺伝子を除去した後、その細胞を非選択条件で培養することによりプラスミドを脱落させ、遺伝子破壊からマーカー遺伝子回収までの一連の流れを実践した。さらに *CuURA3* 遺伝子の破壊を重ねたところ、ウラシル要求性株の取得のためには 4 回の破壊操作が必要であった。FACS 解析の結果では *C. utilis* 株は *S. cerevisiae* 1 倍体に比べて 3~5 倍の DNA を含んでいたことから、*C. utilis* は 3~5 倍体である可能性が示された。本章で開発した多重形質転換系と倍数性に関する新たな知見は、今後、*C. utilis* を素材とした育種を進める上で有用な情報になると考えられる。

### **3. L-乳酸を高生産する *Candida utilis* 株の構築**

第 3 章では *C. utilis* NBRC0988 を原株として L-乳酸高生産のための代謝工学を実践した。

ただ、L-乳酸の生産においてエタノールは副産物とみなされるため、L-乳酸の収率を高めるためにはエタノール生産量を減らす必要がある。そこでまず、ピルビン酸脱炭酸酵素をコードする *CuPDCI* 遺伝子のクローニングを行った後、第 2 章で開発した多重形質転換系を用いて本遺伝子の完全破壊株を取得した。なお、この株の PDC の比活性は検出できないほど低く、野生株と異なりエタノールをほとんど生産しなかった。さらに *CuPDCI* 遺伝子のプロモーターに連結された *Bos taurus* 由来の L-乳酸脱水素酵素遺伝子 (*L-LDH*) を *CuPdcI* 遺伝子座に導入した。なお、*L-LDH* 遺伝子を 2 回組込まれた株は、1 回しか組込まれていない株よりも高い LDH 活性を示し、12 時間目までの単位時間あたりの L-乳酸生産速度およびグルコース消費速度も優れていた。そこで前者の株を 108.7 g/l のグルコースを含む栄養培地での発酵に供したところ、33 時間後にはほぼ全ての糖が消費され、99.9% を超える光学純度の L-乳酸が 95.1% の効率で生産された。これまでに報告されている L-乳酸生産性酵母と比べても極めて高い L-乳酸生産能を有する株であることが明らかになった。

カーボン・ニュートラルな燃料や化成品の利用は、地球環境を保全するための重要な試みであり、今後もこのための研究開発が積極的になされると予想される。一方、本研究で新たに開発した共形質転換系や *Cre-loxP* システムによる多重形質転換系、および新規プロモーターは、L-乳酸高生産株の構築に限らず、*C. utilis* の育種における汎用的なツールとして利用できる。以上のことより、本研究の成果はポリ乳酸製プラスチックの普及拡大への貢献、さらには *C. utilis* の物質生産のホストとしての用途の拡大に貢献するものと期待される。