

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 生嶋茂仁

地球温暖化防止に適したプラスチック原料として、光学的に高純度の L-乳酸の醗酵生産に大きな期待が寄せられている。乳酸菌では D-乳酸の副生の問題があり、純度では優れた酵母でも、収率や生産速度に問題が残されている。申請者は、増殖力や発酵力が非常に優れ、調味料の生産にも使われ安全なトルラ酵母 *Candida utilis* の利用をめざした。本論文は、この酵母に於ける遺伝子操作技術を充実させ、多重遺伝子破壊法を開発し、L-乳酸を高効率で発酵生産する菌株を育種した研究をまとめたものである。

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、プロモーターとして機能する新規配列も取得した。また、自律複製型プラスミドと染色体組込み型 DNA 断片を同時に導入する共形質転換系を開発した。まず、G418 耐性遺伝子発現カセットを持つ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 を挿入したライブラリーから、少なくとも 6 種の ARS をクローン化した。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、ARS 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した配列があった。8 時間 (2.5~3.5 世代) 培養後、プラスミド保持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欠いた G418 耐性遺伝子を持つ ARS 含有プラスミドを用いて、プロモーター活性を持つ DNA 断片を複数クローン化した。次に自律複製型プラスミドと、染色体組込み型 DNA 断片を混合して *C. utilis* の形質転換を行った結果、両者をもつクローンを取得できた。以上より、セルフクローニング株を構築しうる共形質転換系が本酵母でも利用できることを明らかにした。

第2章では、形質転換時の選択マーカーの再利用システムである Cre-*loxP* 系を *C. utilis* に導入し、本酵母の多重形質転換システムを確立した。まず、34 塩基の *loxP* 配列を両端に付与したハイグロマイシン B 耐性 (HPT) 遺伝子を持つプラスミドと、Cre 組換え酵素発現用の G418 耐性自律複製型プラスミドを構築した。*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。二重鎖組換えによる HPT 遺伝子との置換で *CuURA3* 遺伝子を破壊し、次に Cre 発現プラスミドを導入して染色体から HPT 遺伝子を除去した後、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、遺伝子破壊から耐性マーカー除去まで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には 4 回の破壊操作が必要であった。FACS 解析によると *C. utilis* は *S. cerevisiae* 1 倍体に比べ約 4 倍の DNA を含んでおり、*C. utilis* は 4 倍体である可能性が高い。

第3章では、*C. utilis* NBRC0988 を原株としてL-乳酸高生産株を造成した。ピルビン酸からL-乳酸への変換収率を高めるには、エタノールに向う経路を遮断する必要がある。まず、ピルビン酸脱炭酸酵素(PDC)をコードする *CuPDC1* 遺伝子を取得し、第2章で開発した多重形質転換系により本遺伝子の完全破壊株を作製した。この株の PDC 比活性は検出できないほど低く、エタノールをほとんど生産しなかった。次いで *CuPDC1* 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(L-LDH)遺伝子を *CuPDC1* 遺伝子座に導入した。L-LDH 遺伝子を2回組込ませた株は、1回しか組込んでいない株より高いLDH活性を示し、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。前者の株により 108.7 g/l のグルコースを含む栄養培地で発酵生産させたところ、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。従来報告された酵母と比べ、極めて高いL-乳酸生産能を有する株が造成された。

以上、本研究では、*C. utilis* を高度に利用するための遺伝子操作技術を充実させ、高光学純度のL-乳酸を高効率で発酵生産する菌株の育種に成功した。これらの研究成果は、学術上応用上寄与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。