

## 審査の結果の要旨

氏名 西内 博章

論文提出者による研究は、酵母を用いたグルタチオン（GSH）及び $\gamma$ -グルタミルシステイン（ $\gamma$ -GC）の製法において、その生産性を菌体内含有量と菌体生育の観点から解析し、これら化合物の工業的生産に関する理解を大きく前進させた研究である。

GSHは、グルタミン酸、システイン、グリシンからなるトリペプチドであり、抗酸化作用や解毒作用を中心とした様々な生理活性を有している。 $\gamma$ -GCは、グルタミン酸、システインからなるジペプチドであり、GSHの前駆体である。GSHは、その効用から医薬品として用いられており、主に、酵素反応法、或いは、酵母菌体からの抽出法により工業的に生産されている。また、GSHは加工食品の原料として加工食品にコク味を付与する目的で用いられている。一方、論文提出者は $\gamma$ -GCを調理条件下で加熱するとシステインが遊離することを報告しており、 $\gamma$ -GCを加工食品に用いることにより、加工食品にシステインの効能を付与可能なことを提案している。このように、GSH及び $\gamma$ -GCは加工食品の品質向上に有益な化合物である。ところで、一般に、加工食品の品質向上に有益な化合物は、食品添加物として加工食品の製造工程で使用する場合もあるが、ある一定の割合で、これら有益な化合物を含む食品素材を加工食品の製造工程に使用したいとのニーズがある。酵母は、このようなニーズに合致する食品素材である。このような背景を踏まえ、論文提出者は、変異育種及び分子育種の手法を活用することで、GSH及び $\gamma$ -GCの生産に適した酵母菌株を創出することを目的とした。

論文提出者は、研究目的を達成するためにまず第1章にてGSH及び $\gamma$ -GCのシステイン残基を蛍光色素で誘導体化し、高速液体クロマトグラフィーを用いて分離・定量する迅速分析手法を構築した。

次に、論文提出者は、第2～第4章にて、分子育種及び変異育種によりGSHの生産に適した酵母菌株を創出した。第2章では、フローサイトメトリーを用いて独自のGSH高含有酵母のスクリーニング方法を考案した。親株をDNA変異剤により変異処理し、更に、変異株集団の中でGSH含量の高い菌株の

存在確率を高める為に、変異株集団を特定の薬剤を用いて馴致培養し、フローサイトメトリーを用いてG S H含量が向上した変異株を特異的に分取した。このようにして取得した変異株を用いて、第3章にて、菌体内G S H含量と菌体生育の関係を調べたところ、両者に負の相関があることを見出し、G S Hの細胞質への蓄積は生育阻害を引き起こすことを明らかにした。工業的視点から、G S Hの蓄積に伴う生育阻害を回避する必要がある。第3章では、さらに、細胞質に高濃度で存在するG S Hを液胞へと輸送し、蓄積させる菌株を分子育種することにより、両者を両立させることに成功した。具体的には、グルタミン酸とシステインから $\gamma$ -G Cを生成する酵素をコードする*G S H 1*遺伝子を過剰発現させ、カドミウムをキレートしたG S Hを液胞に輸送するトランスポーターをコードする*Y C F 1*遺伝子を過剰発現させた。さらに、液胞でのG S H分解酵素を破壊した菌株を創出した。本菌株は、親株の約6倍ものG S Hを菌体内に含有し、また、親株以上の生育を示した。本研究により、G S Hの生産に適した酵母菌株が創出されたと考えられる。更に、第4章では、G S Hによるアデニン前駆体の液胞への輸送機構を利用するスクリーニング系を確立し、菌体内G S H含量と菌体生育を両立する変異酵母の取得に成功した。

次に、論文提出者は、 $\gamma$ -G Cの生産に適した酵母菌株を創出する為に $\gamma$ -G Cを代謝する*G s h 2 p*をコードする遺伝子を破壊した。その結果、同遺伝子を完全欠損させると菌体内の $\gamma$ -G C含量は向上するが、生育が過度に悪化することを見出した。一方、*G s h 2 p*を微弱な活性が残存するように改変すると菌体内の $\gamma$ -G C含量は完全欠損株程に向上しないが、生育が比較的良好となることを見出した。更に、後者の菌株のシステイン生成経路を強化することにより菌体内の $\gamma$ -G C含量が増加することを見出した。具体的には、*M E T 3 0*遺伝子の改変、及び、パントテン酸要求性の付与、により菌体内の $\gamma$ -G C含量が完全欠損株以上に増加することを明らかとした。また、本菌株をパントテン酸が欠乏した培地で培養することにより $\gamma$ -G C含量が培養経時的に増加するとの知見も導いている。本研究により、 $\gamma$ -G Cの生産に適した酵母菌株が創出されたと考えられる。

以上の知見により、論文提出者は、酵母を用いたG S H及び $\gamma$ -G Cの工業的な生産に関して、特に、目的物質と菌体生育の観点から新たな知見を導いたと考えられる。よって本論文は博士（工学）の学位請求論文として合格と認められる。