

乳酸耐性酵母の創製 — 効率的な乳酸生産に向けて —

杉山 峰崇

(大阪大学大学院工学研究科)

研究の目的

近年の地球温暖化問題によって化石燃料に依存したCO₂排出型社会からCO₂循環型社会への転換が強く求められている。植物由来の乳酸モノマーから合成されるポリ乳酸等のプラスチックはその実現に大きく貢献できる材料として期待される。出芽酵母は低pHにも比較的耐性を示し、乳酸発酵において培地の中和とその後の乳酸塩の脱塩化処理を省略できる可能性を持つことから、非中和条件下で遺伝子組換え酵母による高光学純度のL-乳酸発酵が検討されている¹⁾。しかし、培養後期にはpHの低下によって(pH 2.8)、出芽酵母においても乳酸生産収率の低下が認められており、この条件で生産性をさらに高めるためには強い酸耐性を示す株が必要である。そこで、本研究では乳酸耐性株を構築するために、i) 過剰発現で乳酸耐性を付与する遺伝子の探索と機能解析、ii) 申請者らが独自に開発した染色体分断技術を用いた乳酸耐性となる遺伝子組成の最適化に関する検討、iii) 乳酸ストレス耐性化に必須な遺伝子の網羅的な同定を行った。

方法

乳酸耐性付与遺伝子の探索は、酵母染色体DNA(約 10 kb)がYEpl3 プラスミド (*LEU2* マーカー) に挿入された酵母多コピーライブラリー(ATCC 37323)を使用した。出芽酵母の染色体分断は、2 回のPCRと1度の形質転換で何度でも染色体を分断できるPCR-mediated Chromosome Splitting (PCS)法²⁾に従った。乳酸耐性試験は6.5%(w/v)、感受性は4%(w/v)のL-乳酸を含む完全平板培地における生育を観察することにより行なった。

結果

i) 過剰発現で乳酸耐性を付与する酵母遺伝子の探索と機能解析

乳酸ストレスに対する弱点や応答経路を直接強化できれば効率的に乳酸耐性株が構築できると考えた。そこで、酵母多コピーライブラリーから過剰発現で乳酸耐性を付与する遺伝子の単離を行なった。約6万の形質転換体から野生型株では生育できない6%乳酸培地(pH 2.6)で生育可能な株をスクリーニングしたところ、61株の候補株を得た。プラスミド脱落試験、制限酵素処理、部分塩基配列の決定等から3種の染色体挿入断片が耐性に関与していることがわかった。その後のサブクローニング解析から、*WHI2*、*HAA1*、及び *ESBP6* 遺伝子が耐性付与遺伝子であることが明らかとなった。*WHI2* はストレス転写因子 Msn2p の活性化に必要と考えられる因子を、*HAA1* は多剤排出輸送体遺伝子等の転写活性化因子を、*ESBP6* はモノカルボン酸輸送体様のタンパク質をコードしていた。

WHI2、*HAA1*、*ESBP6* 遺伝子が乳酸ストレス応答に必須であるか否かを調べるために、

遺伝子破壊株を作成した。その結果、これらの遺伝子破壊株が乳酸感受性を示したことから、同定した3つの遺伝子は乳酸ストレス応答に重要な機能を持つことが明らかとなった。これらの遺伝子の過剰発現が他のストレスにも耐性を付与するか否か調べるために、熱ショック、過酸化水素、酢酸、エタノール、NaCl に対する耐性を調べた。その結果、*HAA1* の過剰発現のみが0.5%の酢酸に対して耐性を付与した。従って、これらの遺伝子は酸あるいは乳酸ストレス応答に特異的に関与していることが示唆された。

乳酸耐性付与遺伝子を安定して過剰発現させるために、染色体上の *HAA1* と *ESBP6* 遺伝子のプロモーターを *TDH3* 遺伝子の構成発現型プロモーターに改変した株を構築した。これらのプロモーター改変株も乳酸耐性を示したことから、これらの遺伝子がコードするタンパク質の機能強化により乳酸耐性が付与されていることが示唆された。

ii) 染色体分断を用いた乳酸耐性となる遺伝子組成の最適化に関する検討

これまでに申請者らの研究を含め約 5,000 株の酵母非必須遺伝子破壊株ライブラリーから乳酸耐性となる破壊変異が明らかとなっている。しかし、それらの組み合わせによる乳酸耐性向上の効果は検討されていない。多くの破壊変異の組み合わせの中から目的に合致した最適の組み合わせを決定する育種技術は開発されていない。そこで、まず強い乳酸耐性を付与する $\Delta sed1$, $\Delta dse2$, $\Delta eaf3$, $\Delta scw11$, $\Delta irc8$ の5つの単独破壊変異を選び、我々が開発した新しいゲノム機能解析技術である染色体分断法を用いてすべての組み合わせ (31 通り) の中から最も強い乳酸耐性となる破壊変異の組み合わせを持つ菌株を取得することができるか否か検討した。

まず、野生型株の当該遺伝子を含む領域を染色体分断によって7-31 kb の5つのミニ染色体に分断した。酵母では染色体のサイズが50 kb 以下になると細胞分裂時に高頻度で脱落することから、乳酸培地で長時間継代培養を行うことによって選択的なミニ染色体の脱落を誘導した後、4%乳酸平板培地に塗布して増殖がよい50コロニーを回収した。5つのミニ染色体の有無を調べたところ、すべての株において *IRC8* を含むミニ染色体のみが脱落しており、野生型株よりも若干乳酸耐性を示すことがわかった。しかし、比較のために作成した $\Delta sed1 \Delta dse2 \Delta eaf3 \Delta scw11 \Delta irc8$ 五重破壊株は最も強い乳酸耐性を示したことから、期待したような強い耐性を付与する脱落の組み合わせを得ることはできなかった。脱落した *IRC8* 以外のミニ染色体上に欠失すると乳酸感受性となる乳酸ストレス応答に必須な遺伝子があることが示唆された。

iii) 乳酸ストレス耐性化に必須な遺伝子の網羅的な同定

乳酸ストレス応答に必須な因子を網羅的に同定することは、乳酸ストレス応答の分子機構を理解するためだけでなく、乳酸耐性株を構築する上でも重要となる。そこで、約5,000株の酵母非必須遺伝子破壊株ライブラリーから野生型株でも生育可能な4%乳酸培地で感受性を示す破壊変異の同定を行なった。その結果、180種以上の感受性変異を同定した。細胞内機能で分類するとテロメア形成、液胞の形成と酸性化、小胞輸送、シグナル伝達、クロマチンリモデリング、及び脂質代謝に関する遺伝子の変異が多く見られた。従って、これらの生理的プロセスが乳酸ストレス応答経路を構成しており、これ

らの機能を強化することによってさらに乳酸耐性化を図れる可能性が示唆された。

結論

i) 過剰発現で乳酸耐性を付与する酵母遺伝子の探索と機能解析からは、乳酸耐性を付与する遺伝子が3種単離できた。現在、耐性遺伝子を組み合わせるなどして乳酸生産量についての検討を進めている。ii) 染色体分断を用いた乳酸耐性となる遺伝子組成の最適化に関する検討では、期待通りの組み合わせは得られなかった。しかし、その解析を通じて乳酸ストレス応答に重要な遺伝子が多数存在することが示唆された。iii) 乳酸ストレス応答に必須な遺伝子の網羅的な同定では、180種以上の乳酸感受性変異を同定できた。今回同定した感受性変異を足がかりにして乳酸ストレス応答経路の解析を行い、耐性化に必要な細胞機能の強化と乳酸生産量の検討を進めて行く予定である。

文献

- 1) Ishida, N., Saitoh, S., Tokuhira, K., Nagamori, E., Matsuyama, T., Kitamoto, K., and Takahashi, H. Efficient production of L-lactic acid by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* with a genome-integrated L-lactate dehydrogenase gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(4):1964-1970 (2005).
- 2) Sugiyama, M., Ikushima, S., Nakazawa, T., Kaneko, Y., and Harashima, S. PCR-mediated repeated chromosome splitting in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechniques* 38(6):909-914 (2005).