

Title	Strategy for enhancement of lactic-acid resistance of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> to produce lactic acid without neutralization
Author(s)	Suzuki, Toshihiro
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/26844">https://doi.org/10.18910/26844</a>
rights	
Note	

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

## 論文内容の要旨

[ 題 名 ] Strategy for enhancement of lactic-acid resistance of *Saccharomyces cerevisiae* to produce lactic acid without neutralization  
(非中和での乳酸生産に向けた出芽酵母の乳酸耐性化戦略)

学位申請者 鈴木 俊宏

## 第1章 諸言

二酸化炭素循環型社会の実現を目指して植物由来のポリ乳酸プラスチックが製造されており、原料の乳酸をより安価に製造するために出芽酵母を用いて乳酸発酵を行う試みが行われている。出芽酵母は乳酸菌やウシ由来の乳酸脱水素酵素遺伝子 (*LDH*遺伝子) を導入することで高収量の乳酸生産が可能となる。また、出芽酵母は酸耐性が強く、培地の中和処理と脱塩化工程を低減できる可能性がある。しかし、現状は出芽酵母においても乳酸の蓄積による生産収率の低下が認められている。生産性をさらに高めるためには強い乳酸耐性を示す株が必要であるが、出芽酵母の詳細な乳酸ストレス応答機構は明らかとなっていない。そこで、本研究では乳酸耐性酵母の育種と乳酸ストレスの細胞への影響を調べ、非中和条件下での乳酸生産量の向上に向けた戦略の確立を目的とした。

## 第2章 破壊により乳酸耐性を示す遺伝子の多重破壊株は乳酸耐性と乳酸生産性が向上する

出芽酵母の乳酸耐性の向上が非中和条件下での乳酸生産の増加につながるか確認した。野生型株が生育できない6%乳酸に耐性を示す遺伝子破壊株を非必須遺伝子単一破壊株ライブラリー4828株からスクリーニングし、94種を同定した。中でも強い乳酸耐性を示す破壊株4種 ( $\Delta dse2$ ,  $\Delta scw11$ ,  $\Delta eaf3$ ,  $\Delta sed1$ ) を特定した。次に、4種の遺伝子破壊を組み合わせた多重破壊株を作製することで乳酸耐性が向上することを期待して、1重から4重破壊の多重破壊株を作製した(15通り)。これらの増殖曲線を調べた結果、4重破壊株が短い誘導期を示したため、最も強い耐性を示すと評価した。これらの株にウシ由来の *LDH* 遺伝子を導入し、非中和条件下で乳酸生産量を測定した結果、最も強い耐性を示した4重破壊株のみが野生型株と比較して乳酸生産量が顕著に向上した(約26%)。よって、強い乳酸耐性株の構築が非中和条件下での乳酸生産量を向上させるために有効な手段の一つであることが示唆された。

## 第3章 乳酸ストレスは液胞の断片化と細胞内遊離アミノ酸量の減少を引き起こす

乳酸ストレス応答機構の詳細は未解明であり、乳酸の影響を受ける細胞機能を明らかにすることで効果的な乳酸耐性付与に向けた知見を得ることを目指した。野生型株が生育遅延を起こさない4%乳酸に対して感受性を示す遺伝子破壊株を第2章と同じライブラリーからスクリーニングして107種を同定した。液胞の酸性化や形態に異常がある破壊株が57株あり、また、液胞輸送とアミノ酸代謝が乳酸感受性とならないために重要であることが示唆された。さらに、乳酸ストレスによって液胞は断片化し、その機能が損なわれていることが示唆された。また、乳酸添加2時間後、野生型株の細胞内アミノ酸量は添加前の2.6%に減少した。そして、アミノ酸(Ile, Tyr, Thr, Gly, Leu)をそれぞれ乳酸培地に過剰に加えると、アミノ酸代謝関連遺伝子破壊株の乳酸感受性は緩和された。この結果から、細胞内アミノ酸量が一定量維持されていることが乳酸条件下での増殖に重要であることが示唆された。

## 第4章 総括

本研究では、破壊により乳酸耐性を示す遺伝子94種、および乳酸感受性を示す遺伝子107種を同定した。また、第2章では乳酸耐性を示す遺伝子破壊を重ねることで乳酸耐性が向上し、乳酸生産量も顕著に向上することから、乳酸耐性の向上が非中和条件下での乳酸生産量を向上させるための有効な手段の一つであることがわかった。第3章では、乳酸ストレス応答には液胞と細胞内アミノ酸が特に重要であることがわかった。これらのことから、出芽酵母による非中和条件下での乳酸生産量を向上させるためには液胞機能の強化やアミノ酸の取り込みや合成、貯蔵を強化し、細胞内遊離アミノ酸量を多く保持することが有効であると考えられる。

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 ( 鈴木 俊宏 )	
論文審査担当者	(職) 氏 名
	主 査 教授 原島 俊
	副 査 教授 村中 俊哉
	副 査 教授 藤山 和仁
	副 査 教授 福崎 英一郎
	副 査 教授 紀ノ岡 正博
	副 査 教授 大竹 久夫
	副 査 教授 福井 希一
副 査 教授 渡邊 肇	
<b>論文審査の結果の要旨</b>	
<p>本論文は、出芽酵母の乳酸耐性化が出芽酵母の乳酸生産性の向上に有効であることを検証すること、および、乳酸ストレスの出芽酵母細胞への影響を解析し、出芽酵母の乳酸耐性化戦略を確立することを目的とし、その研究成果をまとめたものであり、緒論(一章)、本文(二章、三章)、総合討論(四章)の4章からなっている。</p> <p>第一章の緒論では、二酸化炭素循環型社会の形成におけるポリ乳酸プラスチックのニーズと現状の問題点について総括後、ポリ乳酸プラスチックの原料である乳酸生産に出芽酵母を用いる意義と現在の課題を述べることにより、本研究の目的と意義を明確にしている。</p> <p>第二章では、乳酸耐性を示す遺伝子破壊株の同定を、出芽酵母の非必須遺伝子破壊株ライブラリー4828株を利用して網羅的に行い、乳酸耐性を示す遺伝子破壊を組み合わせることで乳酸耐性酵母の分子育種を行っている。具体的には、6%乳酸に耐性を示す94種の遺伝子破壊株を同定し、その中で、特に強い耐性を示す破壊株4種(<math>\Delta dse2</math>, <math>\Delta scw11</math>, <math>\Delta eaf3</math>, <math>\Delta sed1</math>)を特定している。この4種の遺伝子破壊を重ねて多重破壊とすることで乳酸耐性が増加するとの推定の基、一重から四重の多重破壊株を全ての組み合わせ(15通り)で作製し、これらの破壊株の、6%乳酸条件下での増殖を調べた結果、四重破壊株が短い誘導期を示したため、最も強い耐性を示すと評価している。また、これらの株にウシ由来の乳酸脱水素酵素遺伝子を導入し、非中和条件下で乳酸生産量を測定した結果、最も強い耐性を示した四重破壊株が野生型株と比較して乳酸生産量が顕著に向上した(約26%)ことを見出している。以上の結果より、強い乳酸耐性株の構築が非中和条件下での乳酸生産量を向上させるために有効な手段の一つであると結論付けている。</p> <p>第三章では、破壊によって乳酸感受性を示す遺伝子の同定を第二章と同じ手法で行い、乳酸の影響を受ける細胞機能を明らかにすることで効果的な乳酸耐性付与に向けた知見を得ることを試みている。具体的には、破壊によって4%乳酸に感受性を示す遺伝子を107種同定し、この中で液胞の酸性化や形態に異常を示している株が57種であったこと、また、同定した遺伝子の機能情報を基に乳酸耐性の維持に重要な細胞機能の評価を行い、特に液胞機能とアミノ酸代謝が重要であることを見出している。さらに、乳酸ストレスによって液胞が断片化してその機能が損なわれている可能性と、乳酸添加2時間後の細胞内の遊離アミノ酸量が添加前の2.6%に減少することを見出している。そして、アミノ酸(Ile, Tyr, Thr, Gly, Leu)をそれぞれ乳酸培地に過剰に加えると、対応するアミノ酸の代謝関連遺伝子破壊株の乳酸感受性が緩和されることを見出している。これらの結果より、液胞の健全性と細胞内アミノ酸量が乳酸感受性とならないために重要であると結論付けている。</p> <p>第四章の総合討論では、本研究で得られた知見をまとめるとともに、他の乳酸生産の研究との比較と本研究で得られた乳酸耐性株の乳酸耐性付与に向けた戦略、および、さらなる生産性の向上に向けた展望について述べている。</p> <p>以上のように、本論文は、化石燃料に依存したCO<sub>2</sub>排出社会からCO<sub>2</sub>循環型社会への実現に向けた取り組みの一</p>	

つとして、より一層の普及が望まれている植物由来プラスチック原料の中でも最も重要な乳酸について、その生産収率を飛躍的に向上させる乳酸耐性酵母の分子育種戦略確立の基盤となる多くの知見をもたらしたものである。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。