

Title	出芽酵母の代謝解析とその応用による有用物質生産性向上に関する研究
Author(s)	早川, 謙嗣
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/61861">https://doi.org/10.18910/61861</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

## 論文内容の要旨

氏名 ( 早川 謙嗣 )

論文題名 出芽酵母の代謝解析とその応用による有用物質生産性向上に関する研究

## 論文内容の要旨

出芽酵母は、飲料、食品や S-アデノシル-L-メチオニン (SAM) 等の多数の有用物質の工業生産に用いられている微生物である。出芽酵母を用いた物質生産における生産性向上には、原料となる炭素源から目的物質への代謝物の流れが増加するように細胞内の代謝状態を改変することが求められる。そのためには、代謝状態の評価と、それに基づいた代謝改変戦略の提案が重要と考えられる。本研究で目的物質とした SAM 生産については、清酒酵母の SAM 高生産能力、エタノール資化による SAM 含量増加、L-メチオニン添加による SAM 生産性向上が報告されているが、代謝改変に向けての必要な知見は得られていない。そこで、本研究では、SAM 生産出芽酵母の代謝解析によって、(i) SAM 高生産能力に関連する代謝経路、(ii) エタノール資化による SAM 含量増加と関連する代謝経路、(iii) SAM 生産の律速段階 (ボトルネック) を探索し、解析結果から SAM 生産性向上および出芽酵母を用いた物質生産に向けた知見を抽出することを目的とした。

本学位論文は、第 1 章から第 5 章より構成される。

第 1 章では、本研究の背景と目的を記述した。

第 2 章では、SAM 生産能力と、SAM 前駆体、NADPH および ATP 供給量の関連について調べた。<sup>13</sup>C 代謝フラックス解析 (<sup>13</sup>C-MFA) を用いて、グルコース資化における対照株・実験室酵母 S288C 株と SAM 高生産株・清酒酵母協会 6 号の中央代謝の代謝フラックス分布を推定し、中央代謝からの SAM 前駆体、NADPH と ATP 供給量を算出した。SAM 高生産株では、TCA 回路フラックスと酸化的リン酸化活性が高く、ATP 再生能が向上していた。酸化的リン酸化では酸素を必要とすることから、SAM 生産性向上には、高 TCA 回路フラックスと高呼吸活性による ATP 供給量増加が重要と考えられた。

第 3 章では、エタノール資化による SAM 含量増加と代謝状態の関連について調べた。<sup>13</sup>C-MFA を用いて、SAM 高生産株のエタノール資化における中央代謝の代謝フラックス分布を推定した。第 2 章で示したグルコースと異なり、エタノール資化ではグリオキシル酸経路が活性化し、ペントースリン酸経路には、ほとんど炭素が流れていないことが分かった。さらに、エタノール資化ではグルコースより TCA 回路フラックスと酸化的リン酸化活性が高く、多くの過剰な ATP を供給していた。SAM 生産性向上には、エタノール資化による ATP 供給量増加が重要と考えられた。また、エタノール資化は、グルコースと比較して CO<sub>2</sub> の炭素収率が高く、その多くは TCA 回路で生成していた。CO<sub>2</sub> 生成量抑制には、TCA 回路を迂回するグリオキシル酸経路のフラックス増加が重要と示唆された。

第 4 章では、SAM 生産におけるボトルネックを探索し、ボトルネック解消による SAM 生産性向上を検証した。SAM 生産性が異なる培養条件の細胞内代謝物濃度の定量と多変量解析によるデータ解析によって、細胞内で蓄積または欠乏している代謝物を抽出した。SAM 高生産株は対照株より細胞内 ATP 濃度が高く、L-メチオニンを用いた高生産条件では、ATP とその前駆体の細胞内濃度が低下していた。そこで、細胞増殖に使用される ATP 量を削減するため酵母エキス未含有培地で培養したところ、初期条件 (5.0 g L<sup>-1</sup>) 培地と比較して細胞濃度が減少する一方、細胞内 ATP 濃度が増加し、SAM 生産量も 1.6 倍増加した。SAM 生産性向上には、L-メチオニン以外に ATP 供給量増加も関与し、増殖活性低下等の細胞内 ATP 消費の効率化が有効と考えられた。また、L-メチオニンを用いた条件ではメチオニンサルベージ経路中間体の細胞内濃度が増加していたことから、SAM 分解抑制には当経路フラックスの低下が重要と示唆された。

第 5 章では、本研究で得られた知見をまとめ、SAM 生産性向上に向けた戦略や出芽酵母を用いた、その他の有用物質生産性向上に代謝解析を活用する方法論について議論した。

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 ( 早川 謙嗣 )			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	清水 浩
	副 査	教授	松田 秀雄
	副 査	教授	若宮 直紀
	副 査	教授	前田 太郎
<b>論文審査の結果の要旨</b>			
<p>本論文は、出芽酵母の代謝解析とその応用による有用物質生産性向上の研究に関するものである。</p> <p>第 1 章では、本研究の背景と研究の目的について述べている。</p> <p>第 2 章では、出芽酵母の有用物質生産としてS-アデノシル-L-メチオニン (SAM) を取り上げ、異なる株の生産能力と、SAM 前駆体、NADPH および ATP 供給量の関連について調べている。<sup>13</sup>C 代謝フラックス解析 (<sup>13</sup>C-MFA) を用いて、グルコース資化における実験室酵母 S288C 株と SAM 高生産清酒酵母協会 6 号株の代謝フラックス分布解析を行い、グルコースを炭素源とした際のSAM 生産性酵母の株の違いによる代謝上の特徴を明らかにしている。</p> <p>第 3 章では、炭素源としてエタノールを用い、SAM 含量増加と代謝状態の関連について調べている。SAM 高生産株のエタノール資化における中央代謝の代謝フラックス分布を求めることで、グルコース資化時とは異なる代謝の特徴について明らかにしている。</p> <p>第 4 章では、SAM 生産における代謝の流れの律速点 (ボトルネック) を探索し、その解消によるSAM 生産性向上について検討している。代謝物濃度の解析結果からSAM生産を向上させる戦略について考案し、実証している。</p> <p>第 5 章では、本研究で得られた知見をまとめ、SAM 生産性向上に向けた戦略について総括している。さらに代謝解析に基づくSAM生産の生産性向上を通して、出芽酵母を利用した有用物質生産性向上の方法について議論している。</p> <p>このように、本研究では、SAM 生産出芽酵母の代謝解析によって、その高生産能力に関連する代謝経路、グルコースやエタノールといった異なる炭素源を資化させたときの SAM 含量増加と関連する活性化される代謝経路の解明、SAM 生産の律速段階反応の探索を通して目的物質 SAM 生産性の向上を実現しており、工学的価値が高い。また、出芽酵母の代謝フラックス解析を行う手法についても実例を通して検討しており、情報科学的に価値が高い。さらに、得られた知見から出芽酵母を用いた物質生産に向けた生産戦略立案への道筋を示している。以上より、本論文は博士 (情報科学) の学位論文として価値のあるものと認める。</p>			