



Disruption of multiple genes whose deletion causes lactic-acid resistance improves lactic-acid resistance and productivity in *Saccharomyces cerevisiae*

乳酸耐性となる遺伝子破壊を重ねることで出芽酵母の乳酸耐性と乳酸生産性が向上する

(JBB, Vol. 115, No. 5, 467–474, 2013)

鈴木 俊宏^{1a}・阪本 貴俊^{1b}・杉山 峰崇¹・石田 亘広²・神戸 浩美³・
小畑 充生³・金子 嘉信¹・高橋 治雄²・原島 俊^{1*}

石油代替資源として植物資源の活用が求められている。これまでに植物由来の原料からプラスチックが開発され、さまざまな分野に展開されてきた。ポリ乳酸を原料とするプラスチックが代表例であり、市場規模の拡大が見込まれている。しかし、従来の石油プラスチックと置き換えるためには物性の改変（耐熱性や耐衝撃性の向上、軟質化）や原料である乳酸の生産コストの低下が課題とされている。近年、高光学純度の乳酸を低コストで生産するためにさまざまな微生物を用いた試みが行われている。中でも、培養コストが安価で高密度培養が比較的容易な出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) にL-乳酸脱水素酵素遺伝子 (L-LDH) を導入することでグルコースから高純度のL-乳酸を生産できることが注目されている¹⁾。しかし、産生された乳酸によって培地pHが低下し、増殖が阻害されて乳酸生産収率が低下する。そこで、中和剤 (CaCO₃やNaOH) の添加が行われるが、乳酸塩が生じるために脱塩工程が必要となる。中和および脱塩工程が不要な乳酸生産は生産コストの削減が見込まれる。本研究では、出芽酵母の乳酸耐性を向上させることで、中和剤の添加を必要としない高効率乳酸生産株の育種を試みた。

まず、乳酸耐性株を取得するために非必須遺伝子破壊株ライブラリー4828株から1遺伝子破壊により乳酸耐性を示す遺伝子破壊株のスクリーニングを行った。野生型株が生育しない6%乳酸培地で生育する遺伝子破壊株94種を同定した。次に、乳酸耐性を示す遺伝子破壊を組み合わせて多重破壊にすることで耐性が向上することを期待して、もっとも強い乳酸耐性を示した4種 ($\Delta dse2$, $\Delta scw11$, $\Delta eaf3$, $\Delta sed1$) の破壊を組み合わせた多重破壊株を作製した。1重から4重破壊の15通りの多重破壊株の6%乳酸培地での増殖曲線を調べた結果、4重破壊株が最短の誘導期を持ち、かつ最終到達ODが最大値を

示したため、もっとも強い乳酸耐性を示すと評価した。これらの乳酸耐性株にウシ由来のL-LDHを染色体上のピルビン酸脱炭酸酵素遺伝子 (PDCI) のプロモーターの下流に導入することでL-LDHを導入するとともにPDCIを破壊した¹⁾。これにより、ピルビン酸からエタノール合成への流れが抑えられ、ピルビン酸から効率良く乳酸が合成された。これらのL-LDH導入乳酸耐性株を用いて非中和条件下でグルコース濃度100 g/LのYPD培地における乳酸生産試験を行った。その結果、もっとも強い乳酸耐性を示す4重破壊株にL-LDHを導入した株の乳酸生産性 (0.67 g/L/h) が野生型株の生産性 (0.52 g/L/h) と比較して顕著に向上した (約27%)。

本研究により、非中和条件下での生産量を増加させるためには、強い乳酸耐性を示す乳酸生産酵母を構築することが有効な戦略の一つであることが示された。今後は、乳酸耐性株のさらなる耐性の向上とともに乳酸生産性の向上を行い、中和条件下での最大生産性 (1.55 g/L/h)²⁾ を目指す必要がある。乳酸条件下での増殖には細胞内アミノ酸量が重要であることを筆者らは報告しており³⁾、この知見が乳酸耐性のさらなる向上に寄与するか今後の検討が必要である。また、LDH遺伝子のコピー数を増加させたり⁴⁾、2倍体細胞を用いたりする⁵⁾などの方法と組み合わせることで非中和条件下でのさらなる乳酸生産量の向上が見込まれると考えている。

- 1) Ishida, N. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 1964 (2005).
- 2) Tokuhira, K. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **82**, 883 (2009).
- 3) Suzuki, T. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **113**, 421 (2012).
- 4) Saitoh, S. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 2789 (2005).
- 5) Skory, C. D.: *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **30**, 22 (2003).

* 著者紹介 大阪大学大学院工学研究科 (教授) E-mail: harashima@bio.eng.osaka-u.ac.jp

¹大阪大学大学院工学研究科, ²株式会社豊田中央研究所, ³トヨタ自動車株式会社

^a現 産業技術総合研究所バイオマテリアル研究センター, ^b現 神戸大学大学院工学研究科