

氏 名	三 浦 裕
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	論 農 博 第 2291 号
学位授与の日付	平 成 12 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学 位 論 文 題 目	Studies on the high-level production of various food-related materials in the food yeast <i>Candida utilis</i> (酵母 <i>Candida utilis</i> を宿主とした種々の有用食品関連物質の高生産に関する研究)

論文調査委員 (主 査) 教 授 伏 木 亨 教 授 加 藤 暢 夫 教 授 熊 谷 英 彦

論 文 内 容 の 要 旨

酵母 *Candida utilis* は安価なバイオマス由来の糖であるモラセスやパルプ亜硫酸廃液中の五単糖を資化する酵母であり、好気的な条件下ではエタノールを生産せず高密度培養が可能である。同酵母は *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* と共に米国食品医薬品局 (FDA) により安全と認定されており、食品関連物質を生産するうえで非常に有望と考えられている。近年同酵母についての形質転換系が開発され、異種遺伝子の導入が可能となってきた。本研究では酵母 *C. utilis* についての菌体内高生産技術の開発を行うとともに、食品関連の有用物質である、甘味タンパク質モネリン、耐熱性 α -アミラーゼ、カロチノイドの高生産に応用した。内容は以下のように要約される。

1. 甘味タンパク質モネリンの生産

モネリンは砂糖の 3000 倍の甘味を有する植物由来の甘味タンパク質である。天然型モネリンは 2 本鎖のポリペプチドで構成されているが、タンパク質工学的な手法により 1 本鎖にしたものの発現を試みた。モネリンの高発現のための最適な条件を探索した結果、*C. utilis* 由来の解糖系酵素であるグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (GAP) 遺伝子のプロモーターの利用、および薬剤耐性遺伝子のプロモーター領域を部分欠失させたベクターを使用することによりモネリンの生産量を菌体可溶性タンパク質あたり 50% 以上にまで高めることに成功した。また、染色体 URA 3 遺伝子座を組み込み部位とすることによって、植え継ぎ 50 世代以上でも発現量が高く維持され、遺伝子の脱落が生じていないことを明らかにした。

2. 耐熱性 α -アミラーゼの生産

デンプンからのトレハロースの安価な生産に必須である *Sulfolobus solfataricus* 由来の耐熱性 α -アミラーゼの生産を *C. utilis* を宿主として行った。*C. utilis* の GAP 遺伝子でのコドン使用頻度に基づいて耐熱性 α -アミラーゼの遺伝子に相当する DNA の全合成を行い、発現ベクターに組み込むことによって、可溶性タンパク質の 50% を越える高発現に成功した。天然型 α -アミラーゼ遺伝子 DNA と合成した DNA とのキメラを用いて発現量を検討した結果、高発現のためには合成 DNA の配列が遺伝子全体の領域に必須であることが確認された。また、合成 DNA による発現量増加の主因は転写段階にあることを明らかにした。

3. カロチノイド (リコペン, アスタキサンチン) の生産

カロチノイドは自然界に多く存在する色素であり、複数の遺伝子から構成される特異的合成系により生成される。細菌由来の 3 種の遺伝子に相当する DNA を *C. utilis* の GAP 遺伝子のコドン使用頻度に合わせて全合成を行った。合成した DNA をそれぞれ *C. utilis* 由来のプロモーターを用いて発現させリコペンの生産を試みたところ、乾燥重量比で 0.11% の生産量を達成した。さらにアスタキサンチンの合成に必要な細菌由来の 6 種の遺伝子を *C. utilis* に導入することによって、アスタキサンチンを乾燥重量比で 0.04% 生産する酵母を得ることに成功した。

また、カロチノイド合成の基質を供給する代謝経路上の律速酵素と考えられる HMG-CoA 還元酵素の高発現、並びに同一

の基質を利用するスクワレン合成酵素遺伝子群の部分破壊を行うことによって、リコペンの生産量を乾燥重量比で 0.78% にまで上昇させ得た。

論文審査の結果の要旨

近年、いわゆる遺伝子操作技術などを利用した食品関連物質の生産に対して、安全性を懸念する声が強くなっている。消費者の不安を可能な限り払拭する意味で、より安全性の高い物質生産システムの開発は重要である。本研究では、米国食品医薬品局 (FDA) により食用として安全と認定された酵母 *Candida utilis* についての菌体内高生産技術の開発を行うとともに、これを食品関連の有用物質である甘味タンパク質モネリン、耐熱性 α -アミラーゼ、カロチノイドの高生産に応用したものであり、評価すべき点は次の通りである。

1. グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (GAP) 遺伝子のプロモーターの使用、ベクター上の薬剤耐性遺伝子の部分欠失、組み込み部位として URA 3 遺伝子座の使用によって、*C. utilis* の菌体内でのモネリンの高発現に成功した。その発現量は可溶性タンパク質の 50% 以上に達した。

2. 耐熱性 α -アミラーゼについても *C. utilis* GAP 遺伝子のコドン使用頻度に従って相当する DNA の全合成を行なった。上記ベクターを用いて発現を試み、 α -アミラーゼが可溶性タンパク質の 50% 以上を占める高い発現を達成するに至った。同菌体について基質の流加による高密度培養を行ったところ乾燥菌体重量は 92 g/L、酵素の生産量は 12 g/L であった。遺伝子 DNA の全合成による発現上昇の主因は mRNA への転写効率の上昇によるものであることを示した。

3. カロチノイド合成系に必要な細菌由来の 6 遺伝子を *C. utilis* に導入しアスタキサンチンの合成能を同酵母に付与することに成功した。またリコペンについても HMG-CoA 還元酵素の高発現、およびスクワレン合成酵素遺伝子群の部分破壊による基質合成系の強化により乾燥重量比で 0.78% の生産量を達成した。

以上のように、本研究は、食品関連物質の生産にとって安全性の面からも望ましい酵母である *C. utilis* について菌体内高生産技術の基盤を確立するとともに、有用な食品関連物質の高生産を実現したもので、微生物生産学、食品科学に寄与するところが多い。

よって、本論文は博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成 12 年 1 月 20 日、論文ならびにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士 (農学) の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。