

平成 29 年 2 月 15 日

崇城大学大学院
工学研究科委員会





研究科長 山 川 烈 殿

論 文 審 査 委 員

主査 赤 松 隆



論文審査結果の報告 (甲)

論文提出者	谷 龍 典 (1318D02)
論文題名	C5C6 糖高効率発酵に資する <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 菌の解析
審査委員	主査 教授 赤 松 隆 
	副査 教授 原 島 俊 
	副査 教授 松 岡 正 佳 
	副査 教授 田 口 久 貴 

論文審査結果の要旨

本論文は、バイオエタノール生産における副産物軽減を目的に、キシリトール資化性変異体の分離とその解析、キシロース代謝と補酵素不均衡の関係解析、キシリトール輸送タンパク質の特定から、エタノール生産に適する酵母菌の遺伝子構造解明を目的とした論文である。エネルギー供給構造高度化法に基づくバイオエタノール利用目標は、2017 年までに 50 万 kL と設定され、ガソリンの 3%相当以上を 2020 年までに導入することがエネルギー基本計画である。そこで食糧と競合しないセルロース系資源作物由来の大規模なエタノール生産の研究が行われている。バイオマスを前処理し、酵素処理するとグルコースとキシロースが生じる。現時点の酵母菌では、グルコースをエタノールに効率よく変換できるが、キシロースからは、副産物キシリトールができる。この副産物軽減のために、キシリトールを資化する酵母菌の変異体分離と解析を通して、最終目標を達成しようとしている。

第 1 章では、キシリトール資化性の変異体を分離し、資化性となる機構を明らかにしている。すなわち、高効率キシロース資化性菌は、キシリトールを資化しないことを明らかにしている。そこでキシリトール資化性の自然突然変異体を 3 株分離し、次世代シーケンサ解析と系統解析で原因候補変異は、変異体に共通して存在するミスセンス変異、Gal80 Ile215Asn, Arg153Leu, Arg153Ser の *GAL80* が原因遺伝子と推定している。従って *gal80Δ*

株はキシリトール資化性を示すことが推定され、それを証明している。次に優性劣性試験から変異は劣性であり、相補性試験から、原因遺伝子は *GAL80* と特定している。続いて、転写制御タンパク *Gal80* を欠損させると透過酵素 *Gal2* が発現しキシリトールが細胞内に取り込まれるので資化性となる機構を提案している。そのことの確証する実験として、*gal80Δ gal2Δ* 株を作成してキシリトール資化性がなくなること、*TDH3p-GAL2* 株を作成して *Gal2* を高発現させると資化性となる結果を提出している。

第2章では、 NAD^+ と NAD(P)H の酸化還元不均衡と炭素源としてキシロースまたはキシリトールを用いた培養での糖代謝との関係を調べている。すなわち、キシリトール資化性株の好気的および嫌氣的培養を、キシロースもしくはキシリトールを含む栄養培地 pH 5.0 温度 30°Cで行っている。その結果、キシリトールが炭素源の嫌気発酵のみ、極端に低いキシリトール消費が見られること、その培養中にアセトアルデヒド (NADH の効率的な酸化剤) を加えるとエタノール生産とキシリトール消費が見られることを見だし、嫌気発酵では *Xyl2* 反応に必要な NAD^+ が不足し、キシリトールが蓄積するという明快な作業仮説を提出している。

第3章では、補酵素不均衡を利用して、キシリトールの細胞内外輸送タンパク質を特定する実験デザインを建てている。好気条件下で発酵すると *Xyl2* 反応に必要な NAD^+ が足りており、キシリトール代謝が早くなる。その結果、キシリトールの取り込みが継続する。実際に細胞内輸送を解析すると、*Gal2* 発現株ではキシリトールを完全に消費し、*Gal2* を欠く株、*Gal2* と *Fps1* を欠く株の順に消費が悪くなり、*Hxt15* も欠く株では消費しなくなるので、これら3個が取り込み輸送を行うと結論している。キシロースを炭素源として嫌氣的に発酵させると NAD^+ が不足し、細胞外にキシリトールを排出する。キシリトールの細胞外輸送を解析すると、キシリトールの細胞外濃度が、*Gal2* 発現株、*Gal2* を欠く株、*Fps1* も欠く株、*Hxt15* も欠く株の順に減少するが、まだ蓄積がある。従って、この3個は排出輸送を行うが、それ以外にもまだあると述べている。以上の結果をもとに、同時糖化並行複発酵に資する酵母菌の遺伝子構造に関して考察している。

最終試験結果の要旨

本論文では、キシリトール資化性の変異体を分離し、次世代シーケンサ解析などで変異を同定し、資化性となる機構を解明している。キシリトールが蓄積する要因が、 NAD^+ の不足にあること、補酵素の不均衡を利用したキシリトール輸送タンパク質の同定に成功している。これらの結果は、学術的に価値があり、新規な発見を多く含んでいる。従って、本論文の内容は、博士論文に値すると判断する。