

C5C6 糖高効率発酵に資する
Saccharomyces cerevisiae 菌の解析

2017 年 3 月

崇城大学大学院工学研究科
応用微生物工学専攻 微生物遺伝工学講座

谷 龍典

目次

	頁
緒論	1
第1章 キシリトール資化性の <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 突然変異体の分離と特徴 づけ	9
第1節 緒言	9
第2節 実験材料と実験方法	11
1.2.1 菌株, プラスミド, オリゴヌクレオチドプライマー	11
1.2.2 培地	16
1.2.3 酵母の形質転換	18
1.2.4 酵母遺伝学で用いる標準方法	19
1.2.5 酵母染色体 DNA の調製	20
1.2.6 High Pure Plasmid Isolation Kit を用いた大腸菌からのプラスミド DNA 抽 出	21
1.2.7 アガロースゲル電気泳動	22
1.2.8 PCR 法による DNA 断片の増幅	22
1.2.9 塩基配列決定	23
1.2.10 酵母の全ゲノム塩基配列の再解析	23
1.2.11 <i>cre</i> 発現による <i>kanMX</i> マーカーの除去	24
1.2.12 キシリトール資化性突然変異体の分離	24
第3節 結果	25
1.3.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> のキシリトール資化性突然変異体の分離	25
1.3.2 <i>Xyt</i> ⁺ 変異体 SCC7, SCC8, SCC15 の変異箇所の解析	28
1.3.3 <i>xyt-7</i> , <i>xyt-8</i> , <i>xyt-15</i> の特定	29
1.3.4 キシリトール資化における Gal2 輸送体の役割	32

第4節	考察	35
第5節	要約	37
第2章	キシリトールとキシロース資化性 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> のキシリトール代謝解析	38
第1節	緒言	38
第2節	実験材料と実験方法	39
2.2.1	菌株とプラスミド, オリゴヌクレオチドプライマー	39
2.2.2	培地	43
2.2.3	形質転換, 酵母染色体 DNA の調製および酵母遺伝学で用いる標準方法	44
2.2.4	High Pure Plasmid Isolation Kit を用いた大腸菌からのプラスミド DNA 抽出	44
2.2.5	アガロースゲル電気泳動	44
2.2.6	塩基配列決定	44
2.2.7	回文培養	44
2.2.8	HPLC 分析	44
第3節	結果	46
2.3.1	<i>xyt-15</i> 突然変異体と親株の嫌氣的条件下での発酵試験	46
2.3.2	<i>gal80Δ</i> 株と <i>TDH3p-GAL2</i> 株の好氣的および嫌氣的発酵解析	48
2.3.3	キシリトール代謝に及ぼすアセトアルデヒド(NADH の効果的な酸化剤)の効果	52
第4節	考察	54
第5節	要約	56

第 3 章	キシリトール資化性の <i>Saccharomyces cerevisiae</i> を用いたキシリトール 輸送タンパクの解析	57
第 1 節	緒言	57
第 2 節	実験材料と実験方法	59
3.2.1	菌株とプラスミド, オリゴヌクレオチドプライマー	59
3.2.2	培地	64
3.2.3	形質転換, 酵母染色体 DNA の調製および酵母遺伝学で用いる標準方法	64
3.2.4	High Pure Plasmid Isolation Kit を用いた大腸菌からのプラスミド DNA 抽出	64
3.2.5	アガロースゲル電気泳動, PCR 法による DNA 断片の増幅, 塩基配列 決定	64
3.2.6	回文培養	65
3.2.7	HPLC 分析	65
3.2.8	キシリトールの細胞内への取り込み解析	65
3.2.9	キシリトールの細胞外への排出解析	66
第 3 節	実験デザイン	66
第 4 節	結果	69
3.4.1	キシリトールの取り込みを行う Gal2, Fps1, Hxt15	69
3.4.2	キシリトールの細胞外輸送を行う Gal2 と Fps1	71
3.4.3	キシリトールの細胞外輸送に対する Hxt15 と Hxt11 の役割	71
第 5 節	考察	74
第 6 節	要約	77
	総括	78
	引用文献	81

本論文に関する主な報告	91
謝辞	92

緒論

内閣府ホーム／内閣府の施策／総合科学技術・イノベーション会議／専門調査会・懇談会等／戦略協議会・ワーキンググループ／エネルギー戦略協議会（第3回）が、2014年1月29日に開催された（http://www8.cao.go.jp/cstp/tyousakai/juyoukadai/energy/3kai/haifu_energy_03.html）。その中の議題（3）平成26年度アクションプラン特定施策レビューで、「バイオ燃料」などの施策プレゼンテーションが発表された（資料3-4、バイオ燃料施策説明資料）。経済産業省では、大規模かつ安定的にバイオ燃料を生産するための技術開発に集中的に取り組み、国内の生産にとどまらず、開発輸入を念頭に入れたバイオ燃料生産技術の開発を行っている。農林水産省では、国内に賦存するバイオマスを活用し、農山漁村地域におけるエネルギーの地産地消を進めるために、それぞれの地域を活かした研究を実施する。文部科学省では、長期的にバイオマスの利用・安定供給が可能な技術の創出に向けて、次世代のバイオマス技術に関する基礎的研究を推進する。また、技術的課題を解決するための研究を関係3省庁で実施する。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。農山漁村に豊富に存在する再生可能資源「バイオマス」は、グリーン・イノベーションが実現すると新たな雇用と経済成長を生み出す重要な資源となる。このようなバイオマスの活用推進が必要である。ただし、バイオマスを利用した産業を確立していくためには、様々な技術的課題が存在する。農山漁村に由来するバイオマスの活用を推進し、地産地消とエネルギー源の多様化を図るために、食糧と競合しない原料を用いた燃料化を目指し、ガソリン・軽油等に対抗しうるバイオ燃料製造コストが求められる。その目標達成やエネルギー基本計画に掲げられた導入量の目標達成に加え、高付加価値物質を創出し、実践的な生産技術の確立を目

指すことが、バイオマス研究の目標である。

「バイオ燃料技術研究開発」に関する経済産業省の概要は、以下の通りである。セルロース系バイオマスからエタノールを生産するシステム総合開発実証事業を行う。事業の概要と目的は、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により、事業化に向けたコスト低減を目指すことである。そのために、1) 実用化レベルにあるエタノール生産の要素技術について、技術の総棚卸しを行い、具体的に最適な技術の組合せを検討し、2) 検討結果から、プレ商用段階での大規模一貫生産システムにおける適用を想定し、セルロース系バイオマス原料と適合性の高い前処理技術、酵素コスト低減のための糖化技術および発酵効率向上技術を選択し、技術の組合せ評価を行う等、事業化を見据えた検証・開発を実施し、3) 米国等の最新の開発動向、持続可能性の評価方法等についての調査研究を実施することである。

アルカリや酸溶液でセルロース系バイオマスを浸漬した後に蒸気処理や蒸気爆砕処理し (1, 2), 続いてセルラーゼやヘミセルラーゼなどの酵素処理でグルコースとキシロースに加水分解しながら同時に発酵も行う同時糖化並行複発酵法は (3, 4), 濃硫酸などの化学的処理でバイオマス原料を糖に加水分解する方法 (5)とは異なり、硫酸処理やその硫酸回収工程が必要ないので環境に優しく、燃料用エタノール生産の主要なプロセスのひとつとなっている。野生型の酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、グルコースをエタノールに変換できるが、キシロースをエタノールにはできない (6)。そこで、キシロースからキシルロースへ代謝できる組み換え酵母が作成されている (6)。すなわち、*Scheffersomyces (Pichia) stipitis* の *XYL1* (キシロースリダクターゼ XR をコードする)と *XYL2* (キシリトール脱水素酵素 XDH をコードする)を *S. cerevisiae* で発現させてキシロースをキシルロースに代謝するか、*Piromyces* sp. (7, 8), *Orpinomyces* sp. (9), や *Clostridium* 属細菌 (10)などのキシロースイソメラーゼ *xylA* を *S. cerevisiae* で発現する組み換え酵母菌が作成されている (11)。キシルロースは *S. cerevisiae* のキシルロキナーゼによってキシルロース 5-リン酸に変換され、次にペントースリン酸回

Candida intermedia のキシロース/グルコース-H⁺共輸送タンパク Gxs1 のキシロースに対する親和性は、 $K_m = 0.2 \text{ mM}$ (30 mg/L)と非常に高いが、グルコースに対する親和性の方がより高く、取り込み量も非常に低い (15, 16)。Gxs1 をグルコース存在下で高発現させるために、*TDH3* (グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素をコードする)プロモーターの支配下に *GXS1* を置いてもエタノール生産に顕著な効果は及ぼしていない (17)。キシロース代謝が弱ければ、取り込まれたキシロースあるいは中間代謝物質が蓄積し、結果として、取り込み効率が向上しないのかもしれない。

キシロース代謝を円滑にするために、キシロースから解糖系に至る律速段階の反応を強めるような遺伝子構造の改変が試されている。キシロースからキシロース 5-リン酸への反応は律速反応のひとつであり、そのためにキシロキナーゼを高発現するか、あるいは遺伝子数を増やすようにすると代謝改善が認められている (18)。トランスポゾン挿入を行い、キシロース代謝が改善する突然変異体を分離し、原因遺伝子を特定した例もある (19)。すなわち、ペントースリン酸回路の酵素トランスアルドラーゼ (*Tal1*)の発現が律速であり、高発現により代謝改善できること、機構はよく分からないが *Pho13* (p-ニトロリン酸特異的アルカリホスファターゼとプロティンホスファターゼ活性を示す)を欠失させると代謝改善が起きる。また、ペントースリン酸回路の酵素発現は低いため、キシロース 5-リン酸からリブローズ 5-リン酸への変換を行う L-リブローズ 5-リン酸エピメラーゼ (*Rpe*)、リブローズ 5-リン酸からリボース 5-リン酸への変換を行うリボース 5-リン酸エピメラーゼ (*Rki*)、キシロース 5-リン酸とリボース 5-リン酸からセドヘプツロース 7-リン酸とグリセルアルデヒド 3-リン酸に、あるいはキシロース 5-リン酸とエリスロース 4-リン酸からフラクトース 6-リン酸とグリセルアルデヒド 3-リン酸に変換するトランスケトラーゼ (*Tkl*)、セドヘプツロース 7-リン酸とグリセルアルデヒド 3-リン酸からフラクトース 6-リン酸とエリスロース 4-リン酸に変換するトランスアルドラーゼ (*Tal1*)のすべてを高発現する酵母菌

も作成され、代謝改善が認められている (20–22)。

燃料用エタノール生産酵母 *S. cerevisiae* KF7 株は、凝集性酵母で耐熱性や耐酸性や高濃度の廃糖蜜も長期連続発酵できる実用酵母である (23)。また、乳酸を資化する性質も併せ持っている (24)。実用酵母特有のホモタリズムの性質を持つが、孢子形成能や掛け合わせ能は極端に悪い。そこで、それらを改善し、かつ形質転換能も実験室酵母と同等か、あるいはそれ以上に優れたヘテロタリズム一倍体酵母 NAM34–4C 株が構築された。その株から同質系統株が構築され、その株にキシロースからキシルロース 5-リン酸の変換に必要な *TDH3p* (*TDH3* プロモーター)–*XYL1*–*TDH3t* (*TDH3* ターミネーター)–*TDH3p*–*XYL2*–*TDH3t*–*TDH3p*–*XKS1* (キシルロキナーゼをコードする)–*TDH3t* 遺伝子構造を酵母の染色体に組み込んだ株 SCB7 が構築された (25)。この株は単一炭素源としてキシロースを含む最少培地で増殖でき、最も早い世代時間 G_{short} は 5 時間を示し、一般的に実験に用いられている酵母よりも増殖能が高い。その株から G_{short} が 2.5 時間とキシロース資化性が高くなった *HEX* (High efficiency xylose assimilation) 突然変異体が分離された (25)。この酵母の遺伝背景でキシロースの資化性に及ぼす遺伝子の解析が行われている。また、キシロースは 10 g/L 以上になると増殖阻害が起こり始め、180 g/L 濃度のキシロースを含む培地では増殖できないが、そのような高濃度のキシロース培地でも増殖できる *SXM* (super xylose consumption metabolism) 変異体も分離され (26)、高濃度キシロース代謝に及ぼす遺伝子の解析も行われている (26, 27)。

自然突然変異体を分離し、その突然変異体を持つ変異を次世代シーケンサで解読する。続いて、系図学的手法を用いて有力な原因候補遺伝子変異を絞り込み、遺伝学的に特定するという一連の方法が開発され、日本だけでなく国際特許の申請もなされている (27, 28)。この方法で 4 個の *HEX* 変異と 2 個の *SXM* 変異の全てが解読・特定されている。また、6 個の変異のうち 4 個が優性変異であり、遺伝子破壊では得られない情報が多々得られるようになった。自然突然変異体を分離し、特定するまでに 1 ヶ

月もかからないほどの迅速さで研究が進む状況になっており、この手法は様々な領域の研究に役立つと考えられる。

酵母菌は嫌気状態でエタノール発酵を効率よく行う。この状態で酸素を供給すると発酵が抑制され、糖の消費速度が減少するとともに酸素呼吸が促進され、酵母菌の比増殖速度が増加し、菌体収率が高くなる。この現象はパスツール効果と呼ばれている(29)。一方、一定以上のグルコースが存在すると好気条件下でも酸素呼吸が抑制されエタノール発酵が生じ、酵母菌の比増殖速度と菌体収率が減少するクラブトリー効果が生じる(29, 30)。酵母菌をグルコース培地で培養し、生じる二酸化炭素を補足する酸素制限法で自然発酵させると、グルコース糖の97%が91%のエタノールと5.6%のグリセロールに変換される(赤松, 田口 私信)。この高効率エタノール発酵法で、グルコースとキシロースを自然発酵させると、*HEX* 変異体のひとつ *SCB38* 株は、糖の89%を74%のエタノールとそれ以外の主要な副産物キシリトールとグリセロールに変換する(赤松, 田口 私信)。このように、高効率エタノール発酵法でもグリセロールとキシリトールの副産物が、エタノール収率の妨げとなっている。

グリセロールは解糖系の中間代謝物質であるジヒドロキシアセトンリン酸からグリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (*GPD1* および *GPD2* がコードする)でグリセロール 3-リン酸になり、続いてグリセロール-3-ホスファターゼでグリセロールになる。この *GPD1* と *GPD2* 遺伝子を破壊した *SCB38* 株の誘導体を自然発酵させると、グルコースとキシロース糖の96%から84%のエタノールとそれ以外はキシリトールが蓄積し、グリセロールの蓄積は極僅かとなる(31)。このように、高効率エタノール発酵で問題点なるのは、副産物キシリトールの蓄積と考えられる。

キシロースをキシリトールへ変換する *XR* 酵素は、反応に補酵素 *NADPH* あるいは *NADH* を要求する(6)。一方、キシリトールからキシロースへ変換する *XDH* 酵素は、反応に補酵素 NAD^+ を要求する(6)。この補酵素要求性の不均衡によりキシリトールが蓄積し、細胞外に排出されると考えられているが詳細な排出機構は解かれてい

ない。また、細胞外のキシリトールが細胞内に輸送されないとも考えられるが、やはり詳細は分かっていない。補酵素の不均衡を解決するために、補酵素要求性を変えた *XYL1* や *XYL2* 遺伝子の変異体が分離されている。そのひとつは、XR 酵素の 270 番目のアミノ酸 リジンをアルギニンに、272 番目のアスパラギンをアスパラギン酸に置換する変異体である。この変異により、XR 酵素の補酵素の要求性が、NADPH から NADH に変わる (32)。第二番目は、XDH 酵素を 4 重アミノ酸置換 ARSdR (D207A/I208R/ F209S/N211R) させる変異であり、XDH 酵素の補酵素要求性は、NAD⁺ から NADP⁺ に変わる (33)。また、XR 酵素のアミノ酸置換 AA (E223A/S271) させることにより、XDH 酵素の補酵素要求性を NADPH 依存にした変異体も構築されている (34)。これらを組み合わせてキシリトールの蓄積が軽減されるかが調べられているが、キシリトール蓄積は顕著には減少せず、その影響は僅かである (6)。変異体と野生型の酵素活性が異なるため、XR と XD 酵素反応速度の不均衡が生じている可能性がある。また、嫌氣的条件下で、補酵素 NADPH/NADP⁺ や NADH/NAD⁺ の回転がどの程度に進むのかも現時点では分かっていない。そこで、キシロースからの代謝とエタノール発酵を解析するだけでなく、キシリトールからの代謝と発酵を解析して、補酵素の回転が迅速に行われずに代謝律速が生じている可能性等を調べる必要があると考えられる。そのために、キシリトール資化性の自然突然変異体を分離し、その解析を通して副産物キシリトールの蓄積の要因を解明し、高効率発酵に資する酵母菌の遺伝子構造を考察しようと考えた。

本研究の第 1 章では、キシリトール資化性の自然突然変異体を分離し、次世代シーケンサ解析によって候補変異遺伝子を絞り込み、その中から原因遺伝子を特定することを目的とした。また、キシロース資化性の組み換え酵母菌が、キシリトールを資化しない機構を明らかにすることを目的とした。第 2 章では、キシリトール資化性の自然突然変異体を用いて、キシロースやキシリトールを炭素源とした好氣的および嫌氣的発酵培養で炭素源の代謝を解析し、代謝律速段階を特定し、キシリト

ールの蓄積機構を明らかにすることを目的とした。第3章では、キシリトール輸送に関わるタンパク質を特定し、この変異体とエタノール生産収率に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。これらの結果をもとに、グルコースとキシロースから高効率発酵に資する酵母菌の遺伝子構造に関して考察する。

第1章 キシリトール資化性の *Saccharomyces cerevisiae*

突然変異体の分離と特徴づけ

第1節 緒言

S. cerevisiae におけるグルコースからエタノールへの代謝は嫌氣的 (fermentative) 条件下で起こる。解糖系のグリセルアルデヒド 3-リン酸脱水素酵素反応でグリセルアルデヒド 3-リン酸から 1, 3-ビスホスホグリセリン酸ができる際に、補酵素 NAD^+ は NADH に変わる。アルコール脱水素酵素反応でアセトアルデヒドからエタノールができる際に、 NADH は嫌気条件下でも NAD^+ に還元される。このように、補酵素 NADH/NAD^+ の割合は保たれていると考えられる。一方、キシロースからエタノールへの代謝は、細胞濃度が高ければ嫌氣的条件でも十分に起こる。組み換え型酵母 *S. cerevisiae* において、*Scheffersomyces stipitis* のキシロースリダクターゼ XR 反応でキシロースはキシリトールへ代謝されるが、このとき補酵素 NADH が NAD^+ に変わるか、あるいは NADPH が NADP^+ に変わる。キシリトールは、*S. stipitis* のキシリトール脱水素酵素 XDH 反応でキシロースに代謝される時に、 NAD^+ は NADH にかわる。嫌氣的な発酵条件で、野生型酵母 *S. cerevisiae* が NADH から NAD^+ への酸化反応を十分に起こさなければ、 NADH/NAD^+ の割合を保つには XDH 反応に必要な NAD^+ は XR 反応によって作られることになる。このことが正しければ、XR 酵素反応が補酵素 NADPH を使用する時、 NAD^+ 不足となる。嫌氣的な発酵条件下でもペントースリン酸回路の側鎖反応であるグルコース 6-リン酸脱水素酵素 Zwfl 反応や 6-ホスホグルコン酸脱水素酵素 (Gnd1 と Gnd2) 反応で NADPH は生じるので (35), XR 反応に必要な NADPH は供給される。このように、XR 反応は進み、XDH 反応は補酵素 NAD^+ の不足によって遅延すると考えられる。そして、このことがキシリトールの蓄積の要因と

予想される。このことを確かめるには、キシロースからの代謝とキシリトールからの代謝を比較する必要がある。

キシロースからの代謝とキシルロースからの代謝の報告例はあるが(36), キシリトールからの代謝やキシリトールの細胞内輸送の報告例はない。そこで、キシリトールを資化する自然突然変異体を分離し、その遺伝子を特定することから解析を始めることを考えた。自然突然変異体の原因遺伝子特定は、時間と労力がかかる方法であった。しかしながら、ドラフトゲノム塩基配列が解読され (37), 同質系統株を使用菌株に用いれば (24, 25), 変異体 DNA を次世代シーケンサで解析し、親株や変異体間の遺伝学的系統解析を行うと(27, 28), 候補遺伝子変異を迅速に絞り込めることができるようになった (26–28)。その後、候補遺伝子の隣接する部位に *kanMX* マーカーを組み換え、変異型の表現型が変わらないことを確認した後、*kanMX* と変異部位を含む DNA による親株の形質転換体を分離し、キシリトール資化性の表現型の出現の有無で特定する方法あるいは二重形質転換法で、原因遺伝子変異を特定できる (26)。このように、キシリトール資化性の自然突然変異体を分離して解析する方法で、資化の要因や機構を簡便で迅速に解明できる背景にある。

細胞内に取り込まれたキシリトールが、迅速に代謝されると資化性の観察を容易に行うことができる。緒論で述べたが *S. stipitis* の *XYL1* と *XYL2* と内在性の *XKSI* を酵母染色体上に組み換え、高発現プロモーターである *TDH3* プロモーター (*TDH3p*) でキシロース代謝遺伝子を発現させた SCB7 株は、キシロース培地でも最も短い世代時間が 5 時間である。従って、キシロースからキシリトールへの Xyl1 酵素反応での代謝、キシリトールからキシルロースへの Xyl2 酵素反応での代謝、キシルロースからキシルロース 5-リン酸への Xks1 酵素反応での代謝も円滑に進む(26)。さらに、*PYK1* 遺伝子 (ピルビン酸キナーゼをコードする) 内に生じた優性変異である *HEX1-22* により最も短い世代時間は 2.5 時間になる。Pyk1 酵素の活性促進には、フラクトース 1, 6-ビスリン酸の結合が必要であるが、グルコース代謝とは異なりキシ

ロース代謝では、その供給が少ないと考えられる。キシロース代謝時の Pyk1 酵素活性低下の軽減に働いていると考えられている(26)。キシリトールの取り込み能が低い場合には、高濃度のキシリトールを用いる必要があるかもしれない。高濃度のキシロースを代謝することができ、高効率キシロース資化を導く性質がある変異として、*SXMI-32* 変異と *sxm2-33* 変異が分離されている (26)。*SXMI-32* と *sxm2-33* 変異は、*MTH1* 遺伝子 (グルコースセンシング伝達経路の負の制御因子をコードする) の優性変異と *GRR1* 遺伝子 (SCF ユビキチンリガーゼ複合体の F ボックスタンパク質成分をコードし、カタボライト抑制を導く) の劣性変異であり、いずれもヘキソース輸送タンパク質の細胞内への輸送制限を通してカタボライト抑制の解除を行う。このように、キシリトール資化性の突然変異体を分離するための親株設計もできるようになった。

そこで、第 1 章では、キシリトール資化性の自然突然変異体を分離すること、次世代シーケンサ解析と遺伝学的系統解析で原因候補遺伝子変異を絞り込むこと、原因遺伝子変異を特定すること、併せて、キシリトール資化性となる機構を解析することを目的とした。

第 2 節 実験材料と実験方法

1.2.1 菌株, プラスミド, オリゴヌクレオチドプライマー

本研究の第 1 章で使用した菌株とプラスミドを表 1-1 に、オリゴヌクレオチドプライマーを表 1-2 に示した。酵母 SCB39 株と SCB40 株は SCB14 株から構築した変異体であり、高濃度キシロース (180 g/L) を含んだ培地において速い増殖を示す (26)。pZeo プラスミドは、*kanMX* マーカーを Cre タンパク質の発現によって除去するために用いた。*S. cerevisiae* NAM34-4C は耐熱性・耐酸性・乳酸資化性・形質転換能の高いエタノール生産に用いられている実用酵母の誘導體で本研究の親株として用いた

(24)。大腸菌 DH10B はプラスミド DNA による形質転換の受容菌として用いた (25)。本研究で用いたプライマー (Genenet, Fukuoka, Japan) は, GENETYX®-MAC 遺伝情報処理ソフトウェア/Macintosh 版 Primer3 (ゼネティックス, 東京, 日本) あるいは Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) によってデザインし, 表 1-2 に記した。 *S. cerevisiae* 遺伝子の塩基配列は, *Saccharomyces* Genome Database ([http:// www.yeastgenome.org/](http://www.yeastgenome.org/)) の情報に基づいた。 *S. cerevisiae* NAM34-4C 株のドラフトゲノムの塩基配列は, DDBJ/EMBL/GenBank アクセション番号 BAUH01000001 から BAUH01000154 に登録されている。

表 1-1 本研究で使用した菌株及びプラスミド

菌株	遺伝子型または表現型	起源, 由来, 引用文献
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
SCB14	<i>MATa</i> <i>pho87Δ</i> <i>ura3Δ::XM8^a</i> <i>HEX1-22</i>	25, <i>HEX1-22</i> mutant showed highly efficient growth in a medium containing low concentration of xylose (20 g/L).
SCB32	<i>MATa</i> <i>pho87Δ</i> <i>ura3Δ::XM8</i> <i>HEX1-22</i> Sxm ⁺ (<i>SXMI-32</i> <i>sxm1-32</i>)	Spontaneously isolated Sxm ⁺ mutant obtained from SCB14. Sxm ⁺ showed efficient growth in a medium containing high concentration of xylose.
SCB33	<i>MATa</i> <i>pho87Δ</i> <i>ura3Δ::XM8</i> <i>HEX1-22</i> Sxm ⁺ (<i>sxm2-33</i>)	Spontaneously isolated Sxm ⁺ mutant obtained from SCB14
SCB38	<i>MATa</i> <i>pho87Δ</i> <i>URA3::XM1^b</i> <i>HEX1-22</i>	25
SCB39	<i>MATa</i> <i>pho87Δ</i> <i>URA3::XM1</i> <i>HEX1-22</i> Sxm ⁺ (<i>SXMI-32</i> <i>sxm1-32</i>)	Tfm (SCB32: <i>URA3</i> DNA, URA ⁺ , G418-s) ^c . The <i>URA3</i> DNA region of p <i>URA3</i> was amplified using primers F- <i>URA3-STR</i> and R- <i>URA3-DWN300</i> (<i>GAPDH</i>).
SCB40	<i>MATa</i> <i>pho87Δ</i> <i>URA3::XM1</i> <i>HEX1-22</i> Sxm ⁺ (<i>sxm2-33</i>)	Tfm (SCB33: <i>URA3</i> DNA, URA ⁺ , G418-s). The <i>URA3</i> DNA region of p <i>URA3</i> was amplified using primers F-

NAM34-4C	<i>MATα</i>	URA3-STR and R-URA3-DWN300(GAPDH). 24
SCC7	<i>MATα pho87Δ URA3::XM1 HEXI-22 Sxm⁺ (SXM1-32 sxmcl-32) Xyt⁺ (xyt1-7)</i>	Spontaneously isolated Xyt ⁺ mutant obtained from SCB39
SCC8	<i>MATα pho87Δ URA3::XM1 HEXI-22 Sxm⁺ (sxm2-33) Xyt⁺ (xyt1-8)</i>	Spontaneously isolated Xyt ⁺ mutant obtained from SCB40
SCC15	<i>MATα pho87Δ URA3::XM1 HEXI-22 Sxm⁺ (sxm2-33) Xyt⁺ (xyt1-15)</i>	Spontaneously isolated Xyt ⁺ mutant obtained from SCB40
SCD200	<i>MATα pho87Δ URA3::XM1 HEXI-22 Sxm⁺ gal80Δ::kanMX</i>	Tfm (SCB39: <i>kanMX</i> DNA, G418-r). The <i>kanMX</i> DNA region of pBlu-LTKTL-TDH3 was amplified using primers F-GAL80-LTKTL and R-GAL80-LTKTL.
SCD201	<i>MATα pho87Δ URA3::XM1 HEXI-22 Sxm⁺ gal80Δ::loxP</i>	The <i>kanMX</i> in SCD200 strain was removed.
SCD202	<i>MATα pho87Δ URA3::XM1 HEXI-22 Sxm⁺ gal80Δ::loxP gal2Δ::kanMX</i>	Tfm (SCD201: <i>kanMX</i> DNA, G418-r). The <i>kanMX</i> DNA region of pBlu-LTKTL-TDH3 was amplified using primers F-GAL2 Δ -LTKTL and R-GAL2 Δ -LTKTL.
SCD203	<i>MATα pho87Δ URA3::XM1 HEXI-22 Sxm⁺ gal2pΔ::kanMX-TDH3p-GAL2</i>	Tfm (SCB39: <i>kanMX</i> DNA, G418-r). The <i>kanMX</i> DNA region of pBlu-LTKTL-TDH3 was amplified using primers F-GAL2c-LTKTL and R-GAL2c-TDH3p.
SCB42-4A	<i>MATα pho87Δ URA3::XM1 HEXI-22 Sxm⁺</i>	Haploid (SCB39 \times SCB105-3A) ^d
SCD204	<i>MATα pho87Δ URA3::XM1 HEXI-22 Sxm⁺ xyt1-7 / MATα pho87Δ URA3::XM1 HEXI-22 Sxm⁺ XYTI</i>	Diploid (SCC7 \times SCB42-4A) ^e
SCD205	<i>MATα pho87Δ URA3::XM1 HEXI-22 Sxm⁺ xyt1-8 / MATα pho87Δ URA3::XM1 HEXI-22 Sxm⁺ XYTI</i>	Diploid (SCC8 \times SCB42-4A)
SCD206	<i>MATα pho87Δ URA3::XM1 HEXI-22 Sxm⁺ xyt1-15 / MATα pho87Δ URA3::XM1 HEXI-22 Sxm⁺ XYTI</i>	Diploid (SCC15 \times SCB42-4A)
SCD207	<i>MATα pho87Δ URA3::XM1 HEXI-22 Sxm⁺ gal80Δ::kanMX / MATα</i>	Diploid (SCD200 \times SCB42-4A)

	<i>pho87Δ URA3::XM1 HEX1-22</i> <i>Sxm⁺ GAL80</i>	
SCD208	<i>MATa pho87Δ URA3::XM1 HEX1-22 Sxm⁺ / MATα pho87Δ URA3::XM1 HEX1-22 Sxm⁺</i>	Diploid (SCB39 × SCB42-4A)
SCD216	<i>MATα pho87Δ URA3::XM1 HEX1-22 Sxm⁺ gal80Δ::kanMX</i>	Tfm (SCB42-4A: <i>kanMX</i> DNA, G418-r). The <i>kanMX</i> DNA region of pBlu-LTKTL-TDH3 was amplified using primers F-GAL80-LTKTL and R-GAL80-LTKTL.
SCD218	<i>MATa pho87Δ URA3::XM1 HEX1-22 Sxm⁺ xyt1-7 / MATα pho87Δ URA3::XM1 HEX1-22 Sxm⁺ gal80Δ::kanMX</i>	Diploid (SCC7 × SCD216)
SCD220	<i>MATa pho87Δ URA3::XM1 HEX1-22 Sxm⁺ xyt1-8 / MATα pho87Δ URA3::XM1 HEX1-22 Sxm⁺ gal80Δ::kanMX</i>	Diploid (SCC8 × SCD216)
SCD222	<i>MATa pho87Δ URA3::XM1 HEX1-22 Sxm⁺ xyt1-15 / MATα pho87Δ URA3::XM1 HEX1-22 Sxm⁺ gal80Δ::kanMX</i>	Diploid (SCC15 × SCD216)
SCD224	<i>MATa pho87Δ URA3::XM1 HEX1-22 Sxm⁺ gal80Δ::kanMX / MATα pho87Δ URA3::XM1 HEX1-22 Sxm⁺ gal80Δ::kanMX</i>	Diploid (SCD200 × SCD216)
SCC2-11B	<i>MATa pho87Δ URA3::XM1</i>	25
SCD302	<i>MATa pho87Δ URA3::XM1 gal80Δ::kanMX</i>	Tfm (SCC2-11B: <i>kanMX</i> DNA, G418-r). The <i>kanMX</i> DNA region of pBlu-LTKTL-TDH3 was amplified using primers F-GAL80-LTKTL and R-GAL80-LTKTL.
SCD303	<i>MATa pho87Δ URA3::XM1 gal2pΔ::kanMX-TDH3p-GAL2</i>	Tfm (SCC2-11B: <i>kanMX</i> DNA, G418-r). The <i>kanMX</i> DNA region of pBlu-LTKTL-TDH3 was amplified using primers F-GAL2c-LTKTL and R-GAL2c-TDH3p.
<i>Escherichia coli</i>		
DH10B	<i>F⁻ mcrA Δ(mrr⁻ hsdRMS mcrBC) Φ80 lacZAM15 ΔlacX74 recA1</i>	Life technologies, 25

endA1 araD139 Δ(ara leu)7697
galU galK λ⁻ rpsL nupG

Plasmid and
 amplicon DNA

pBluescript II *bla* 25

KS+

pBlu-LTKTL- *loxP-TEFp-kanMX-TEFt-loxP-* 25
 TDH3 *TDH3p*

pZeo *CEN6 / ARSH4 URA3 GAL1p CRE* 25
CYC1t bla ori_{pUC} TEF1p EM7 Sh ble
CYC1t

pURA3 *URA3p-URA3-URA3t* The *URA3p-URA3-URA3t* DNA region of strain NAM34-4C was amplified using primers F-URA3-UP2.1k(EcoI) and R-URA3-DWN2.1k(EcoRI). The amplicons were treated with restriction enzyme *EcoRI* and cloned into the *EcoRI* site of pBluescript II KS+ to generate pURA3.

^a XM8 は *loxP-TEFp-kanMX-TEFt-loxP-TDH3p-XYL1-TDH3t-TDH3p-XYL2-TDH3t-TDH3p-XKS1-TDH3t* の遺伝子構造を持ち, *loxP*, *TEF* プロモーター, *kanMX*, *TEF* ターミネーター, *TDH3* プロモーター, *XYL1* {*Scheffersomyces stipitis* の *XYL1* (キシロースリダクターゼ XR をコードする)}, *TDH3* ターミネーター, *XYL2* {*S. stipitis* の *XYL2* (キシリトール脱水素酵素 XD をコードする)}, *XKS1* {*S. cerevisiae* の *Xks1* (キシロキナーゼをコードする)}。

^b XM1 は *TDH3p-XYL1-TDH3t-TDH3p-XYL2-TDH3t-TDH3p-XKS1-TDH3t* の遺伝子構造を持つ。

^c Tfm, 形質転換; Tfm (SCB32: *URA3* DNA, *URA*⁺, G418-s) は, SCB32 株の *URA*⁺ DNA による *Ura*⁺ G418-s 形質転換体を示す。

^d Haploid (SCB39 × SCB105-3A) は, SCB39 株と SCB105-3A 株を掛け合わせるにより得た二倍体を 4 胞子解剖して得た一倍体を指し示す。

^e Diploid (SCC7 × SCB42-4A) は, SCC7 株と SCB42-4A 株を掛け合わせて得た二倍体を指し示す。

表 1-2 PCR 増幅に用いたオリゴヌクレオチドプライマー

番号	プライマー名	プライマー塩基配列 (5'から 3')
1	F-URA3-STR	<u>atgtcgaagctacatataagg</u>
2	R-URA3- DWN300(GAPDH)	<u>gaatttgtgccattagtggtgttccgtgtgagaactggttccttcatttgctttgtcca</u>
3	F-GAL80-LTKTL	<u>caatctcgatagttggttccgttcttccactcccgtcggccgagctgaag</u>
4	R-GAL80-LTKTL	<u>cgctcgtgcactggggccaagcacagggcaagatgctagggcactagtgatct</u>
5	F-Gal2Δ-LTKTL	<u>atggcagttgaggagaacaatatgcctgttgtttcacagcggccgagctgaa</u>
6	R-Gal2Δ-LTKTL	<u>ttatttagcatggccttgaccacggttgcgtcatgtagggcactagtgatct</u>
7	F-Gal2c-LTKTL	<u>gcccttcccactcaagatggggagcaaatggcattatacggccgagctgaag</u>
8	R-Gal2c-TDH3p	<u>gctgtgaacaacaggcatattgttctcctcaactgccatttgtttgttatgtgtttattcgaa</u>
9	F-URA3-UP2.1k(EcoI)	tttgaattcttaagggtcaactaaatacagttg
10	R-URA3- DWN2.1k(EcoRI)	tttgaattcccggaactcgaatgtgtg

プライマーのアンダーラインで指し示した部分は、染色体 DNA との相同領域である。プライマー9 とプライマー10 のイタリック体で指し示した部分は、制限酵素の 6 塩基の認識部位であり、太字で示した 3 塩基は、制限酵素切断を改善するために加えられた塩基部分である。

1.2.2 培地

酵母エキス, ペプトン, グルコース (YPD)培地は, グルコース 20 g, バクト酵母エキス 10 g, バクトペプトン 20 g を蒸留水 1 L 当たりを含み pH 5.5 に調整し, *S. cerevisiae* 株の増殖に用いた。キシリトール資化性突然変異株の分離に使用した改

変キシリトール最小培地 (LXYP)は、キシリトール 20 g/L と低濃度栄養成分 (LYP) 3.75 g/L (バクトペプトン 2.5 g/L, バクト酵母エキス 1.25 g/L)を蒸留水 1 L 当りに含み、pH4.5 に調整した。

キシロース資化能の解析に使用した改変キシロース培地 (LYPX)は、キシロース 20 g/L, LYP 3.75 g/L を蒸留水 1 L 当りに含み、pH4.5 に調整した。酵母エキス・バクトペプトン・キシロース (YPX)培地、および Cre 組み換え酵素の誘導に使用した酵母エキス・バクトペプトン・ガラクトース (YPG)培地は、YPD 培地に含まれるグルコース 20 g/L を、キシロース 20 g/L, ガラクトース 20 g/L にそれぞれ置き換えた以外は YPD 培地と同じであり、Cre リコンビナーゼの発現誘導に用いた。グルコース最少 (MSD) 培地は、グルコース 20 g/L, アミノ酸と $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を含まない酵母窒素源ベース (YNB w/o, Becton, Dickinson and company sparks, MD21152) 1.7g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5g を蒸留水 1L 当りに含み pH 5.5 に調整した。キシロース最小培地 (MSX)は、MSD 培地のグルコース 20 g/L をキシロース 20 g/L に置き換えた。合成完全 (SC)培地は、1 L 当たり 20 g グルコース, 6.7 g YNB w/o, 0.83 g 合成完全添加混合物 (2.0 g アデニン, 2.0 g L-アルギニン, 2.0 g L-ヒスチジン, 2.0 g L-イソロイシン, 2.0 g L-ロイシン, 2.0 g L-リジン, 2.0 g L-メチオニン, 2.0 g L-フェニルアラニン, 2.0 g L-セリン, 2.0 g L-トレオニン, 2.0 g L-トリプトファン, 2.0 g L-チロシン, 2.0 g L-ウラシル, 2.0 g L-バリン) を含み、pH 5.5 に調整した。培地には必要に応じて最終濃度がアデニンで 50 mg/L, ウラシルで 50 mg/L, アミノ酸で 40 mg/L となるように加えた。G418 二硫酸塩 (G418) は、必要に応じて最終濃度が 360 mg/L となるように加えた。固形培地には、培地 1 L 当たり 20 g の寒天を加えた。孢子形成 (SpoK2)培地は、酢酸カリウム 10 g, 1 g/L 酵母エキス, 0.5 g/L グルコース, 20 g/L 寒天沫を蒸留水 1 L 当りに含み、pH 5.5 に調整した。

大腸菌の増殖培地として用いた Luria-Bertani (LB)培地は、バクトトリプトン 10 g, バクト酵母エキス 5 g, NaCl 10 g を蒸留水 1 L 当りに含み pH 7.2 に調整した (38)。

固形培地には培地 1 L 当たり 15 g の寒天を加えた。ビタミンは必要に応じて、チアミンを最終濃度 5 mg/L となるように加えた。抗生物質は必要に応じて、最終濃度がアンピシリン (Amp) とカナマイシン (Km) で 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように加えた。コンピテントな大腸菌の調製に用いた M9 培地は (38), NH_4Cl 1.0 g, Na_2HPO_4 6.0 g, KH_2PO_4 3.0 g, NaCl 0.5 g, 1 M MgSO_4 2 mL, 200 g/L グルコース 10 mL, 1M CaCl_2 0.1 mL を蒸留水 1 L あたりに含み pH7.5 に調整した。

1.2.3 酵母の形質転換

S. cerevisiae の形質転換は, Gietz と Woods の方法で行った (39)。受容菌を 5 mL の 2 \times YPDA 培地に植菌し, 30°C で一晩振盪培養し (120 回/分 往復振盪), 吸光度 A_{600} を測定した (2.5×10^8 細胞/mL)。予め 30°C に保温した 2 \times YPDA 培地 50 mL に, 初発濃度が 5×10^6 細胞/mL となるように培養液を加えた。30°C 120 rpm で約 4 時間振盪培養し, 細胞濃度が 2.0×10^7 細胞/mL になれば, $9100 \times g$, 2 分間遠心分離した。上澄みを捨て, ボルテックスミキサーで混ぜた。20 mL の滅菌水を加え懸濁し, 遠心分離し ($9100 \times g$, 2 分) 上澄みを捨て, ボルテックスミキサーで混ぜて細胞を洗浄した。洗浄は 2 回行った。細胞懸濁液を 1.5 mL のマイクロ遠心管に移し, $13,000 \times g$ で 1 分間遠心分離し, 上澄みを捨て, ボルテックスミキサーで混ぜ, 滅菌水を加えて 1.0 mL 容量とした ($1.0 \times 10^9/\text{mL}$)。酵母細胞懸濁液 100 μL を 1.5 mL のマイクロ遠心管に移し, $13,000 \times g$ で 30 秒間遠心分離し, 上澄みを捨てた。形質転換混合溶液を表 1-3 の容量で調製し, 形質転換混合溶液 360 μL をマイクロ遠心管に移し, ボルテックスミキサーで良く混ぜ, 42°C で 40 分保温した。1 分 $13,000 \times g$ で遠心分離した後, 1 mL の滅菌水を加えた。マイクロピペットチップで沈殿酵母を混ぜ, その後ボルテックスミキサーで攪拌した。0.5 mL の YPD 液体培地を加え, 30°C で 4 時間保温した後, G418 を含む YPD 選択培地に塗抹し, 30°C で 2 日静置培養した。

表 1-3 形質転換時に使用する混合溶液の割合

試薬	混合溶液
PEG3500 50%w/v ^a	240 μ L
酢酸リチウム 1M ^b	36 μ L
煮沸 ss-キャリア DNA ^c	50 μ L
プラスミド DNA+水	34 μ L
全量	360 μ L

^a 50 (w/v)%ポリエチレングリコール溶液は、50 g のポリエチレングリコール 3350 に滅菌水 35 mL を加えオートクレーブした。^b 1 M LiCl 溶液を調整後にオートクレーブ滅菌した。^c キャリア DNA の調製は Gietz と Woods の方法で行った (39)。すなわち、200 mg の高分子量さけ精子 DNA を 100 mL の TE 緩衝液 (10 mM Tris-HCl, pH8.0–1.0 mM EDTA) に加えた。10 mL のピペットで繰り返し上下して DNA を剪断した。その後、マグネティックスターラーで 2–3 時間完全に溶解するまで攪拌した。必要に応じて 4°C で一晩保温した。適量に分け、–20°C で保存した。使用前に 1.0 mL のキャリア DNA を 5 分間沸騰させた後、氷水中で冷やした。集菌中にこの操作を行った。

1.2.4 酵母遺伝学で用いる標準方法

(1) 孢子形成と孢子形成の観察

被試験酵母菌を 30°C, 1 日 YPD 固形培地上で静置培養した。滅菌した爪楊枝で増殖したコロニーを孢子形成培地に移し、30°C, 2–3 日静置培養して孢子を形成させた。サンプルを滅菌爪楊枝で取り、スライドガラス上に置いた 5 μ L の滅菌水に懸濁した。光学顕微鏡で (300 倍, 対物レンズ \times 20, 接眼レンズ \times 10, 中間変倍 \times 1.5, オリンパス光学顕微鏡 BH2) 孢子形成を観察した。

(2) 接合型判定のための集団接合

滅菌した白金線で酵母菌細胞を 2 mL の YPD 液体培地に植菌した。さらに、解析ずみの *MATa* 株および *MAT α* 株を滅菌した白金線で同じ培地に植菌し、30°C で静置培養

した。

(3) 接合子の判定

集団接合した培養液を 30°C で 1 日 静置培養した。その培養液 5 μ L をスライドガラスにのせた。その上にカバーガラスをのせ、光学顕微鏡で観察した。*MATa* と *MATa* との掛け合わせた溶液をスライドガラスの隣に置き、比較しながら顕微鏡観察した。細胞が典型的な一倍体酵母と異なり、細胞形が不規則になれば接合に向かっていると判断した。

(4) ミクロマニプレーターによる酵母菌の二倍体分離

集団接合した培養液を 30°C で静置培養し、数時間後に一度 ボルテックスミキサーで混合し、1 日 静置培養した。新しい YPD 液体培地 2 mL に 75 μ L の培養液を加え、30°C で 1 日 静置培養した。培養液を火炎滅菌した白金耳で 20 mL の YPD 固形培地の上に載せた。ミクロマニプレーター (シンガーMSM システム 400, Singer Instruments, Roadwater, Watchet, Somerset TA23 0RE, UK) を用いて、典型的な二倍体酵母である卵形に近い形の単細胞を分離した。30°C で 2 日間 静置培養し、単細胞から増殖した二倍体を得た。

(5) 子嚢胞子の解剖

胞子形成培地上の細胞を 300 μ g/mL 最終濃度で zymolyase20-T を含む 0.15 M リン酸カリウム緩衝液 pH7.5 の 75 μ L に懸濁し、30°C で 20 分保温した。滅菌した白金耳で胞子懸濁液を取り、YPD 固形培地上に移した。ミクロマニプレーターで 4 胞子を単胞子ずつ解剖した後、30°C で 2 日から 3 日間、静置培養した。

1.2.5 酵母染色体 DNA の調製

DNA 抽出は Gen とるくん TM (酵母用) High Recovery (タカラバイオ株式会社, 京都, 日本) を用い、キット供給元の説明書に従って調整した。簡単には、30°C 1 日 YPD 寒天培地上で培養した酵母菌を 2 mL の YPD 液体培地に 1 白金線植菌し、適当に希釈

した。その 0.1 mL を 20 mL の YPD 液体培地に植菌し、30°C で一晩振盪培養した。A₆₆₀=1.0 に近い培養液を以下の操作に用いた。培養液を 5 mL 容エッペンに 2-3mL ずつ分注し、12,000 rpm 5 分遠心した。上澄みを捨て 1 mL の滅菌水を加えて洗浄し、もう 1 度遠心した。0.5 mL の溶液 A を菌体沈殿に加えてボルテックスミキサーで混合した。振盪培養機に入れ、37°C で 1 時間ゆるやかに振盪した。また、時々取り出し緩やかに混合した。0.1 mL の溶液 B を加え、穏やかに混合後、70°C で 10 分間加熱した。0.2 mL の溶液 C を加え、穏やかに混合後、氷中で 5 分間冷やした。12,000 rpm で 5 分間遠心分離し、沈殿を吸わないよう注意深く上澄みを取り、新しい 1.5 mL 容サンプル管に移した (沈殿物を取り除くために同じ操作を 2 回行った)。回収した液量の 1/2 量のイソプロパノールを加え、緩やかなインバージョンで混合した。12,000 rpm で 5 分間、4°C で遠心後、上澄みを捨てた。よく冷えた 99.5% エタノールを 1 mL 加えて遠心分離し上澄みを捨てた。次に、よく冷えた 70%エタノールを 0.5 mL 加え、12,000 rpm で 1 分間遠心分離し、上澄みを捨てて乾燥させた。常温のミリ Q 水を壁の DNA を溶かすように 0.1 mL 加えた。

1.2.6 High Pure Plasmid Isolation Kit を用いた大腸菌からのプラスミド DNA 抽出

プラスミド抽出には、High Pure Plasmid Isolation Kit (ロッシュ・ダイアグノスティック株式会社、東京、日本)を用い、供給元のプロトコルで調整した。5 mL の LB 液体選択培地に (必要に応じて抗生物質、ビタミンを添加)、プラスミドを保持する大腸菌を 1 白金耳植菌し、37°C で一晩振盪培養した。遠心分離 (2300 × g, 3 分間, 4°C) で集菌し上澄みを捨てた。菌体に High Pure Plasmid Isolation Kit の RNase/Suspension Buffer (1)を 0.25 mL 加え、よく混和後に Lysis Buffer (2)を 0.25 mL 加え、緩やかに混和し、氷中で 5 分間保冷した。これに予め氷中で冷やしておいた Binding Buffer (3)を 0.35 mL 加え、緩やかに混和し、氷中で 5 分間保冷した。遠心分離し (13,000 × g, 10 分間, 4°C), 沈殿物や浮遊物を取らないように上澄みを Collection Tubes にセットした High

Pure Filter Tubes に回収した。遠心分離し (20,400 × g, 1 分間, 4°C), Collection Tubes に溜まった溶液を捨て, Wash Buffer II (5)を 0.7 mL の High Pure Filter Tubes に加えた。遠心分離し (20,400 × g, 1 分間, 4°C), Collection Tubes に溜まった溶液を捨て, 遠心分離後 (20,400 × g, 1 分間, 4°C), High Pure Filter Tubes を滅菌したエッペンドルフにセットした。High Pure Filter Tubes に Elution Buffer (6)を 0.1 mL 加え, 遠心分離した (20,400 × g, 1 分間, 4°C)。遠心後, High Pure Filter Tubes を捨てエッペンドルフに得られた液をプラスミド DNA 溶液とした。

1.2.7 アガロースゲル電気泳動

1/2× TBE 緩衝液 (緩衝液 1 L 当たり 5.4 g Tris-HCl, 2.75 g ホウ酸, 0.47 g EDTA · 2Na を含む)に 0.8~2.0 %となるようにアガロース (宝酒造社製 L03 もしくはナカライ社製)を加え, 121°C で 1 分間の蒸気加熱で溶解後にゲルを作成した。1-10 μL の DNA 溶液に対して 1-2 μL のローディング緩衝液 (0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol, 30%グリセロール)を加え, ゲルのウェルにチャージした。ミニゲル電気泳動システム (mupid-2 コスモバイオ株式会社製)を用いて 50 V, 90 分間電気泳動した。0.5 μg/mL のエチジウムブロマイドを含む TBE 緩衝液に 15 分間浸して染色した。染色したゲルをトランスイルミネーター上で観察した。

1.2.8 PCR 法による DNA 断片の増幅

PCR 反応は, KOD FX (TOYOBO 社製) を用いて行った。反応試薬に鋳型 DNA とプライマーを添加した (合計 50 μl)。軽くスピンドウンし, 94°C に保持されたサーマルサイクラーにセットした。PCR 反応時間は増幅断片の大きさによって変えた。1 kb の断片を増幅するときは, 95°C で 15 秒, 50°C で 30 秒, 60°C で 1 分のサイクルを 25 回繰り返した。その後 68°C で 5 分保持することによって増幅した。

1.2.9 塩基配列決定

Applied Biosystems 3130 ジェネティックアナライザを使用し塩基配列決定した。配列決定用のキットは、BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit または BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit を使用した。鋳型 DNA の希釈は、増幅する断片のサイズを考慮し適切な濃度で行った。すなわち、プラスミド DNA であれば、150～300 ng になるように希釈した。精製した鋳型 DNA を使用し、96°C で 1 分間の DNA 変性後、96°C で 1 分間 DNA 変性、50°C で 5 分間 アニーリング、60°C で 4 分間 DNA 伸長反応を 25 サイクル行った。その後、4°C の氷水中で急冷した。エタノール沈殿し、DNA を回収した。エタノール沈殿は、5 μ L の 125 mM EDTA \cdot 2Na を加えた後、60 μ L の 99.5% エタノールを加え、良く混合し、室温で 15 分間静置した。20,400 \times g で 20 分間 遠心分離し上澄みを除去した。その後、60 μ L の 70%エタノールを加え、20,400 \times g で 5 分間 遠心分離し、上澄みを除去した。5 分間の減圧乾燥後、アルミホイルで覆い、4°C で保存した。使用する際は、20 μ L のホルムアミドを加え 95°C で 3 分間 変性後、4°C の氷水中で急冷操作を行った。調整した DNA 溶液の全量を反応プレートに入れ、シーケンサにセットし、塩基配列決定した。

1.2.10 酵母の全ゲノム塩基配列の再解析

変異体 DNA を供給元のプロトコル (Life Technologies, Inc., Carlsbad, CA, USA) に基づき SOLiD 5500xl システムで、国立研究開発法人 産業技術総合研究所 (産総研) で解析された。産総研は、NEDO 国立研究開発法人 新エネルギー・産業技術総合開発機構の「バイオマスエネルギー技術研究開発／バイオ燃料製造の有用要素技術開発事業／有用微生物を用いた発酵生産技術の研究開発」プロジェクト番号 P13011 で委託先日揮株式会社、学校法人君が淵学園 崇城大学、国立研究開発法人 産業技術総合研究所 (産総研)、一般財団法人バイオインダストリー協会の中のひとつの機関である。すなわち、得られた個々の塩基配列を参照する NAM34-4C 株のゲノム DNA 配列に整

列させた (BAUH01000001 to BAUH01000154)。変異した配列をデータ解析 LifeScope2.5 ソフトの標準パラメーターのセットでバリエーションコーラー (diBayes)により検出した。さらに、必要な情報は、参照ゲノムのドラフト配列染色体番号、遺伝子名もしくは隣接遺伝子名 (変異が遺伝子間にある場合)、Ruby プログラムで記載されている変異の信頼性を示す P 値などを抽出した。親株や 3 株のキシリトール変異体の変異を比較し、原因遺伝子変異の候補を P 値の高い順に抽出した。続いて、親株と 3 株のキシリトール変異体間で遺伝学的系統解析を行い、候補遺伝子変異を絞り込んでいった。

1.2.11 *cre* 発現による *kanMX* マーカーの除去

kanMX 選択マーカーで遺伝子操作した株から *kanMX* を取り除く方法は、Guldener らの方法 (40)に従った。*loxP-kanMX-loxP* 領域を含む株に、*cre* 発現プラスミド pZeo を形質転換法で移し、ゼオシン耐性転換体を得た。次に、5 mL のゼオシンを加えた YPDAU 培地に被試験菌を 1 白金線植菌し、30°C で約 16 時間振盪培養した。この培養液の A_{600nm} を測定し、濁度が 1 以上になっていれば培養液 4 mL を 3500 × g, 1 分間遠心分離した。上澄みを捨て、ボルテクスミキサーで混ぜ、4 mL の滅菌水に懸濁した。この操作を 2 回繰り返す、細胞を洗浄した。菌体を 1 mL の滅菌水に懸濁し、100 μL を 5 mL の YPGalAU 培地に植菌し、30°C で 1 時間培養した。培養液 4 mL を 3500 × g, 1 分間遠心分離した。上澄みを捨て、ボルテクスミキサーで混ぜ、4 mL の滅菌水に懸濁した。これを 2 回繰り返す、細胞を洗浄した。懸濁液を適当に希釈して、YPDAU 平板培地に塗抹し、30°C で 1-2 日静置培養した。生じたコロニーを YPDAU, YPDAU+G418, ゼオシンを含む YPDAU 平板培地にそれぞれ 50 個ずつ移し、G418 感受性株を選択した。

プラスミドを除去するために、G418 感受性でゼオシン耐性株を 5 mL の YPDAU 培地に 1 白金線植菌し、30°C で約 16 時間振盪培養した。培養液を適当に希釈して、

YPDAU 培地に塗抹し、30°Cで1日静置培養した。生じたコロニーを YPDAU、ゼオシンを含む YPDAU 平板培地に50個ずつ移し、ゼオシン感受性株を選択した。

1.2.12 キシリトール資化性自然突然変異体の分離

S. cerevisiae SCB39 株と SCB40 株の栄養細胞を YPD 培地 pH 4.5 で24時間、振盪培養 (30°C, 120 rpm)した。遠心分離 (4°C, 2400 × g, 1分)で集菌し、滅菌水に懸濁した。初発細胞濁度 $A_{660}=0.014$ となるように5 mL容量のL型試験管内の、キシリトール 100 g/L を含んでいる XLYP 培地もしくは LYP 培地 5 mL へと植菌した。

第3節 結果

1.3.1 *Saccharomyces cerevisiae* のキシリトール資化性突然変異体の分離

細胞内に取り込まれたキシリトール代謝の早い株が、キシリトール資化性突然変異体を分離する親株には望まれる。そこで、*HEX1-22* と *SXMI-32* あるいは *HEX1-22* と *sxm2-33* 変異を持つキシロース資化性が高い組み換え酵母菌 *S. cerevisiae* SCB39 株 (*MATa URA3::TDH3p-XYL1-TDH3t-TDH3p-XYL2-TDH3t-TDH3p-XKSI-TDH3t HEX1-22 SXMI-32 sxm1-32*) 株もしくは SCB40 株 (*MATa URA3::TDH3p-XYL1-TDH3t-TDH3p-XYL2-TDH3t-TDH3p-XKSI-TDH3t HEX1-22 sxm2*) を親株として突然変異体を分離することにした。

最初に、キシリトール以外の栄養物であるペプトンと酵母エキスの、親株 SCB39 に対する増殖の影響を調べた。ペプトンと酵母エキスを、それぞれ 2.5 g/L と 1.25 g/L, 5.0 g/L と 2.5 g/L, 10 g/L と 5.0 g/L, および 20 g/L と 10 g/L 含む 5 mL の 20 g/L キシリトール培地 pH 4.5 を用い、温度 35°C で自記記録計バイオフィトレコーダーで増殖を解析した。ペプトン 20 g/L と酵母エキス 10 g/L を含むキシリトール培地で

は、10 時間以降も緩やかな増殖を示したが、ペプトン 2.5 g/L, 酵母エキス 1.25 g/L では、増殖が観察されなかった (図 1-1a)。また、その間の濃度では、濃度に応じて両者の中間的な増殖を示した。従って、高い栄養物の濃度では、キシリトール非依存の増殖を示しており、キシリトール依存の増殖を解析するためには、ペプトン 2.5 g/L と酵母エキス 1.25 g/L が良いと結論した。

続いて、ペプトン 2.5 g/L と酵母エキス 1.25 g/L を含むキシリトール培地のキシリトール濃度を 20 g/L から 140 g/L まで濃度を変化させて増殖を解析した。キシロース資化株 SCB39 と SCB40 は、キシロース資化に必須である *XYL1*, *XYL2*, *XKS1* の 3 遺伝子、高効率キシロース代謝変異 *HEX1-22*, 高濃度キシロース代謝変異 *SXMI-32* あるいは *sxm2-33* を持っているが、いずれの培地でも生育は見られなかった (図 1-1b, 図 1-1d)。濃度勾配によるキシリトールの細胞内輸送も起こっていないと考えられる。従って、ペプトン 2.5 g/L, 酵母エキス 1.25 g/L, キシリトール 100 g/L を含むキシリトール培地で増殖する突然変異体を分離することにした。

SCB39 と SCB40 株をキシリトール 100 g/L を含む XLYP 培地で 30°C 5-7 日間、バイオフィトレコーダーで培養した後、速やかに増殖する独立した変異体を SCB39 株から 1 個 (SCC7), SCB40 株から 2 個 (SCC8, SCC15) 取得した。一方、キシリトールを含まない LYP 培地では、増殖は認められなかった。得られたキシリトール資化性の突然変異体をマイクロマニプレーターで単細胞分離し、3 個のキシリトール資化性の突然変異体の増殖をキシリトール培地で調べた。親株 SCB39 株と比較して変異体 SCC7 株では、キシリトール培地で顕著な増殖が見られ (図 1-1c), 親株 SCB40 と比較して 2 個の変異体 SCC8 と SCC15 は、顕著な増殖が見られた (図 1-1d)。そこで、キシリトール資化性突然変異体株の表現型を Xyt^+ と記載し、この表現型を導く変異を SCC7 株では *xyt-7*, SCC8 株では *xyt-8*, SCC15 株では *xyt-15* と仮に記載することにした。

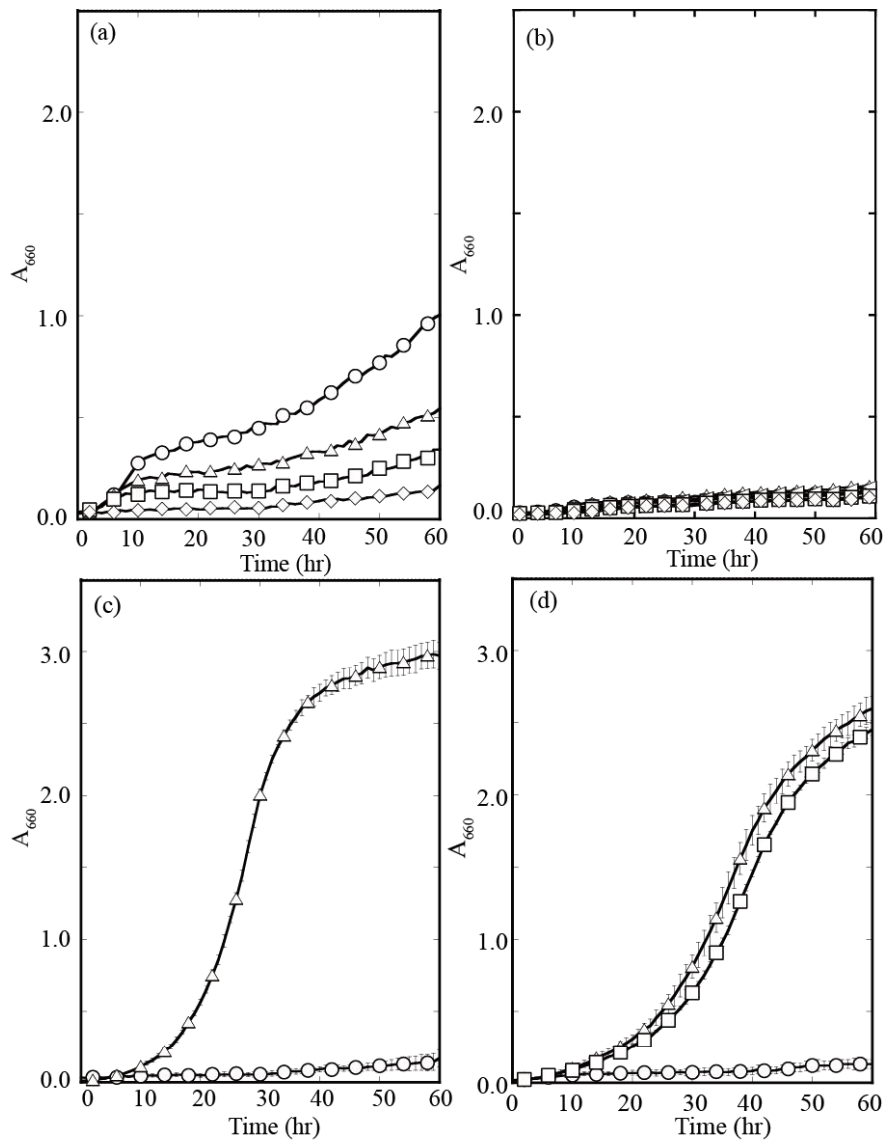


図 1-1 *S. cerevisiae* 株 SCB39, SCB40 と Xyt⁺突然変異体の増殖。(a) ペプトンと酵母エキス濃度の、*S. cerevisiae* SCB39 株のキシリトール資化性に及ぼす影響。Sxm⁺株 SCB39 株の細胞を 5 mL の 2.5–20 g/L ペプトンと 1.25–10 g/L 酵母エキスを含むキシリトール培地 pH 4.5 に植菌し、35°C で振盪培養した。細胞濃度をバイオフィトレコーダーで測定した。記号: ○, 20 g/L ペプトンと 10 g/L 酵母エキス; △, 10 g/L ペプトンと 5 g/L 酵母エキス; □, 5 g/L ペプトンと 2.5 g/L 酵母エキス; ◇, 2.5 g/L ペプトンと 1.25 g/L 酵母エキス。(b) SCB39 株は、キシリトール非資化性である。SCB39 株の細胞を 5 mL の 20–140 g/L のキシリトールを含む LYP 培地 pH 4.5 に植菌し、35°C で振盪培養した。細胞濃度をバイオフィトレコーダーで測定した。記号: ○, 20 g/L; △, 40 g/L; ▽, 60 g/L; ▷, 80 g/L; ◁, 100 g/L; □, 120 g/L; ◇, 140 g/L。(c) Xyt⁺突然変異体の増殖。Xyt⁺変異体 (SCC7) と親株 (SCB39) を 5 mL の XLYP 培地 pH 4.5 に植菌し、35°C で振盪培養した。記号: ○, SCB39; △, SCC7。(d) Xyt⁺突然変異体の増殖。Xyt⁺変異体 (SCC8 と SCC15) と親株 (SCB40) を 5 mL の XLYP 培地 pH 4.5 に植菌し、35°C で振盪培養した。記号: ○, SCB40; △, SCC8; □, SCC15。(c)と(d)のデータは、3回の独立した実験による平均値と標準偏差である。

1.3.2 Xyt⁺変異体 SCC7, SCC8, SCC15 の変異箇所の解析

得られた3株のキシリトール資化突然変異株 SCC7, SCC8, SCC15 株と親株 SCB39, SCB40 の塩基配列の再解析を次世代シーケンサ SOLiD 5500xl システムにより行った。NAM34-4C 株の塩基配列に対して、SCC7, SCC8, SCC15 株で検出された変異は、それぞれ 1242 個, 1231 個, 1235 個であった (データには示さない)。キシリトール資化性突然変異株は、異なる実験から独立して分離されたため、変異体に共通した位置に変異が出現するとは考え難い。さらに、変異体は1倍体であるため、P値は少なくとも50%以上であるはずである。なぜならば、ヘテロな二倍体の1塩基多形 (SNP, Single Nucleotide Polymorphism) の場合に予測される値が50%であるため。それゆえ、そのような不確実な変化 (変異) をノイズとして排除し、信頼度の高い、遺伝系統学的解析で、もっともらしい原因遺伝子変異の候補を挙げた。その結果、有力な変異は SCC7 株では、ORF (open reading frame) 内の変異として *GAL80* (T644A, Ile215Asn), 遺伝子間の変異で *SCO1*, *URA3*, *GLC7* の下流に変異が見つかった。SCC8 株では、ORF 内の変異として *GAL80* (G458T, Arg153Leu), 遺伝子間の変異で *GLC7*, *PAC11*, *RPS14B*, *FLO9*, *PAU94* の下流に変異が見つかり、SCC15 では、ORF 内の変異として *GAL80* (C457A, Arg153Ser), 遺伝子間の変異で *GLC7*, *PAC11*, *RPS14B*, *SCO1* の下流に変異が見つかった。その結果を表 1-4 に示した。変異のうち、*GAL80* の変異は3株に共通して存在し、変異点もそれぞれの株で異なっていることから *GAL80* の変異がキシリトール資化性を導く原因であると考えて特定を行うことにした。

表1-4 親株と変異体の遺伝学的系統解析より得られた原因遺伝候補変異

SCC7株の候補変異

Scaffold No.	snps_pos_genome	ref	mut	P-value	depth of coverage	gene1				gene2			
						gene	orientation	rel_pos_gene	type	gene	orientation	rel_pos_gene	type
40	110942	G	A	93.73	255	URA3	+	730	ORF	ND	ND	ND	ND
40	427286	G	A	88.3	94	GLC7	+	246	3'-UTR	ND	ND	ND	ND
40	427288	A	G	84.38	94	GLC7	+	248	3'-UTR	ND	ND	ND	ND
49	164797	T	A	82.67	224	GAL80	+	644	ORF	ND	ND	ND	ND
19	100876	C	A	65.71	67	SCO1	-	839	ORF	ND	ND	ND	ND
23	63981	T	C	57.69	62	BUD31	-	-83	5'-UTR	YCR061W	-	781	3'-UTR
55	23026	C	C/T	52.64	695	FLO9	-	1999	ORF	ND	ND	ND	ND
15	6938	A	A/G	44.06	200	SHU1	-	-245	5'-UTR	MRP4	+	-181	5'-UTR
21	947574	A	A/G	43.24	411	IMA1	+	618	3'-UTR	ENB1	+	-719	5'-UTR
32	4206	C	C/G	40.8	417	ND	ND	ND	ND	PAU3	-	1575	3'-UTR

SCC8株の候補変異

Scaffold No.	snps_pos_genome	ref	mut	P-value	depth of coverage	gene1				gene2			
						gene	orientation	rel_pos_gene	type	gene	orientation	rel_pos_gene	type
40	427286	G	A	91.74	108	GLC7	+	246	3'-UTR	ND	ND	ND	ND
49	164611	G	T	91.57	248	GAL80	+	458	ORF	ND	ND	ND	ND
17	76538	A	T	90.51	157	PAC11	-	1232	ORF	ND	ND	ND	ND
40	427288	A	G	89.81	108	GLC7	+	248	3'-UTR	ND	ND	ND	ND
8	49392	G	A	89.36	188	RPS14B	+	112	ORF	ND	ND	ND	ND
55	23035	T	A	66.67	501	FLO9	-	1990	ORF	ND	ND	ND	ND
7	647132	G	C	64.44	1814	PAU9	+	760	3'-UTR	YER188C-A	-	259	3'-UTR
7	647096	T	G	59.35	1865	PAU9	+	724	3'-UTR	YER188C-A	-	295	3'-UTR
23	63981	T	C	58.33	40	BUD31	-	-83	5'-UTR	YCR061W	-	781	3'-UTR
7	647077	C	T	57.55	999	PAU9	+	705	3'-UTR	YER188C-A	-	314	3'-UTR
21	947574	A	A/G	46.92	418	IMA1	+	618	3'-UTR	ENB1	+	-719	5'-UTR
21	947581	C	C/T	42.49	418	IMA1	+	625	3'-UTR	ENB1	+	-712	5'-UTR

SCC15株の候補変異

Scaffold No.	snps_pos_genome	ref	mut	P-value	depth of coverage	gene1				gene2			
						gene	orientation	rel_pos_gene	type	gene	orientation	rel_pos_gene	type
17	76538	A	T	89.23	195	PAC11	-	1232	ORF	ND	ND	ND	ND
8	49392	G	A	88.64	263	RPS14B	+	112	ORF	ND	ND	ND	ND
40	427286	G	A	82.03	127	GLC7	+	246	3'-UTR	ND	ND	ND	ND
40	427288	A	A/G	77.52	127	GLC7	+	248	3'-UTR	ND	ND	ND	ND
19	100876	C	A	71.2	184	SCO1	-	839	ORF	ND	ND	ND	ND
49	164610	C	A	69.88	258	GAL80	+	457	ORF	ND	ND	ND	ND
55	23035	T	A/T	58.15	973	FLO9	-	1990	ORF	ND	ND	ND	ND
7	647077	C	T	57.92	1459	PAU9	+	705	3'-UTR	YER188C-A	-	314	3'-UTR
23	63981	T	C	56.31	81	BUD31	-	-83	5'-UTR	YCR061W	-	781	3'-UTR
55	22729	A	A/G	54.79	965	FLO9	-	2296	ORF	ND	ND	ND	ND
55	23026	C	C/T	54.61	948	FLO9	-	1999	ORF	ND	ND	ND	ND
55	22829	C	C/T	51.86	986	FLO9	-	2196	ORF	ND	ND	ND	ND
29	140162	T	C/T	48.12	551	XKS1	-	978	ORF	ND	ND	ND	ND

1.3.3 *xyt-7*, *xyt-8*, *xyt-15* の特定

3個のキシリトール資化性突然変異は、Gal80の215番目のアミノ酸残基 Ile が Asn に、153番目のアミノ酸残基 Arg が Leu もしくは Ser に変わった置換変異である。変異部位の内、153番目の残基と215番目の残基は、位置的に離れており、すべてが野生型対立アレルに対して優性であるとは考え難い。むしろ、すべて劣性変異

であり *gal80* 欠損となっていると考える方が説明しやすいように思われる。その考え方が、もしも正しければ、*GAL80* を欠失させた *gal80Δ* 株もキシリトール資化性になることが予想される。そこで、*gal80Δ* 株 SCD200 を構築し、キシリトール XLYP 培地 pH4.5, 35°C で増殖を調べたところ、顕著な増殖を認めた (図 1-2a)。すなわち、SCD200 株は推定通りキシリトール資化性を示した。

キシリトール資化性を示す変異、*xyt-7*, *xyt-8*, *xyt-15* の変異遺伝子は *GAL80* であることを確かめるために、優性劣性試験と相補性試験を行った。優性劣性試験では、変異体 3 株と野生型 *Xyt⁻* 株 SCB42-4A とを掛け合わせ、それぞれの二倍体を構築した (SCD204, SCD205, SCD206)。また、対照として *gal80Δ* 株どうしと野生型 *Xyt⁻* 株どうしとを掛け合わせて二倍体を構築した (SCD207 と SCD208)。構築した二倍体株の増殖をキシリトール XLYP 培地 pH4.5 温度 35°C で調べたところ、SCD204 株 (*xyt-7/+*)、SCD205 株 (*xyt-8/+*)、SCD206 株 (*xyt-15/+*)、SCD207 株 (*gal80Δ/+*) は、SCD208 株 (+/+) と同じ野生型 *Xyt⁻* の性質を示すことが分かった (図 1-2b)。一方、SCD224 株 (*gal80Δ/gal80Δ*) は、期待通りキシリトール資化性を示した (図 1-2c)。このことは、キシリトール資化性を導く *xyt* 変異は、野生型対立アレルに対して劣性であることを示している。

3 個の *Xyt⁺* 変異株と *gal80Δ* 株を掛け合わせて得た二倍体を構築した。それら二倍体と *gal80Δ* 株どうしを掛け合わせた SCD224 株の増殖試験をキシリトール培地で調べたところ、二倍体株 SCD218 (*gal80Δ/xyt-7*)、SCD220 (*gal80Δ/xyt-8*)、SCD222 (*gal80Δ/xyt-15*) は、SCD224 株 (*gal80Δ/gal80Δ*) と同様にキシリトール資化性を示した (図 1-2c)。これらの結果は、3 株の変異箇所は *GAL80* 遺伝子内に存在していることを示しており、それら変異遺伝子をそれぞれ *xyt1-7*, *xyt1-8*, *xyt1-15* と記載することにした。また、*Gal80* の欠失もしくは 3 個のミスセンス変異 *GAL80* (T644A, Ile215Asn), *GAL80* (G458T, Arg153Leu), *GAL80* (C457A, Arg153Ser) によりキシリトール資化性となること

が分かった。

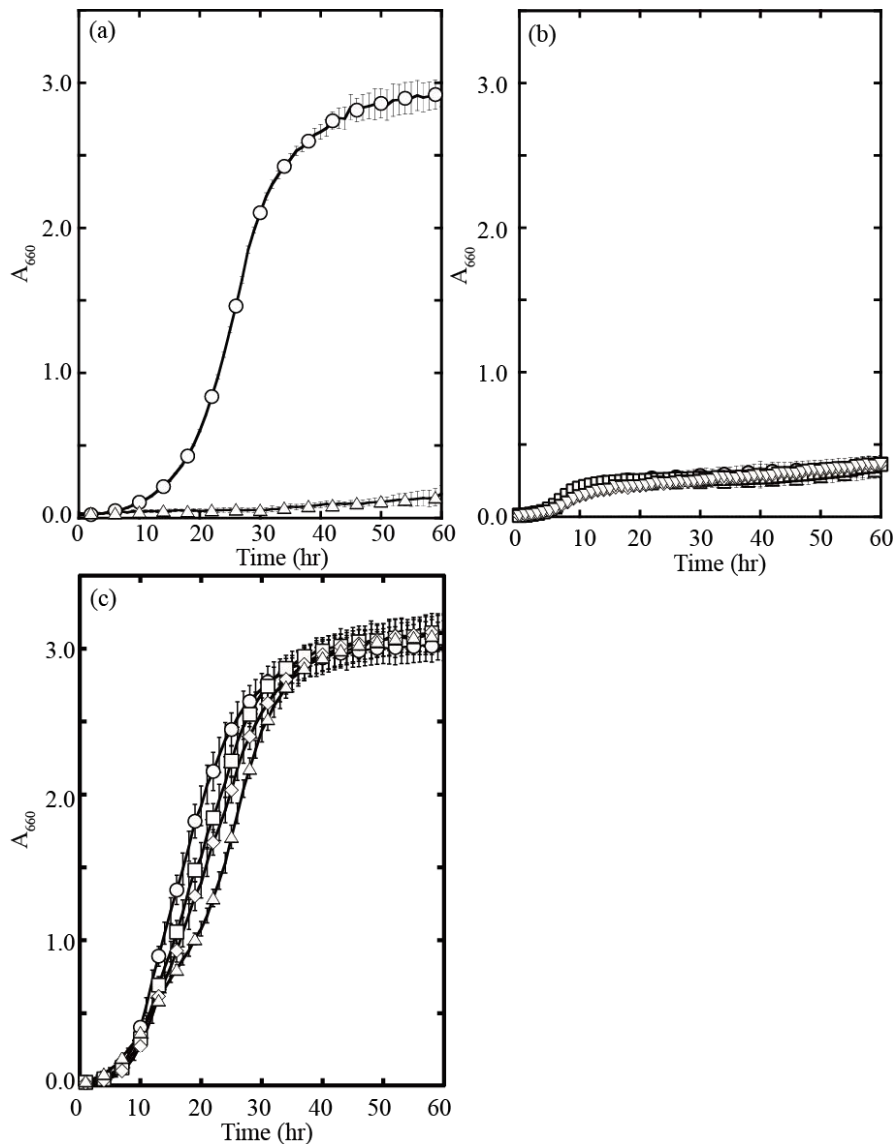


図 1-2 *S. cerevisiae gal80Δ* 株が Xyt^+ 表現型をしめすかどうかの解析, および *S. cerevisiae xyt-7, xyt-8, xyt-15* 変異体 (SCC7, SCC8, SCC15) の遺伝解析

(a) *gal80Δ* 株 SCD200 が Xyt^+ 表現型を示すかどうかの解析。SCB39 株と SCD200 株の細胞を 5 mL の XLYP 培地 pH4.5 に植菌し, 35°C で振盪培養した細胞濃度はバイオフォトレコーダーにより測定した。記号: ○, SCD200 (*gal80Δ*); △, SCB39 (野生型)。(b) *xyt-7, xyt-8, xyt-15* と *gal80Δ* 変異の野生型対立遺伝子に対する優性劣性試験。記号: ○, *xyt-7*/野生型 二倍体株(SCD204); △, *xyt-8*/野生型 二倍体株 (SCD205); □, *xyt-15*/野生型 二倍体株(SCD206); ◇, *gal80Δ*野生型 二倍体株 (SCD207); ▽, 野生型/野生型 二倍体株 (SCD208)。(c) *gal80Δ* 欠損と *xyt-7, xyt-8*, または *xyt-15* 変異体の相補性試験。記号: ○, *gal80* 補性試験 *t-8*, 二倍体株 (SCD224); △, *gal80Δ/xyt-7* 二倍体株 (SCD218); □, *gal80Δ/xyt-8* 二倍体株 (SCD220); ◇, *gal80Δ/xyt-15* 二倍体株 (SCD222)。(a)から(c)のデータは, 3 回の独立した実験からの平均と標準偏差である。

1.3.4 キシリトール資化における Gal2 輸送体の役割

Gal80 は *GAL* 遺伝子 (*GAL2*, *GAL1*, *GAL7*, *GAL10*, *GAL3*, *GAL80* と *MEL1*; [Saccharomyces Genome Database, http://www.yeastgenome.org/](http://www.yeastgenome.org/), 41, 42)の発現にかかわる制御因子であるため, *gal80* 欠損変異体は, これらの遺伝子産物を生産していると考えられる。これらの遺伝子産物のうち, ガラクトース透過酵素 (*Gal2*, 43, 44) は, キシリトールの細胞内輸送を行うと仮定するとこれまでの結果を説明できる。*GAL2* 遺伝子のキシリトール資化性に対する役割を解析するために, *gal80Δ* の背景で *GAL2* を *kanMX* で破壊した *gal80Δ gal2Δ* 株 (SCD202)を構築した。*Gal2* がキシリトール輸送を行うのであれば, キシリトール資化性がなくなることが推定できる。一方, *gal80* の欠失により *Gal4* (DNA 結合の転写因子)が活性化し, *Gal4* 制御の下流にある数多くの遺伝子の発現のいずれかが ([Saccharomyces Genome Database](http://www.yeastgenome.org/)), キシリトール資化性に必要であれば, *gal80Δ gal2Δ* 株のキシリトール資化性に及ぼす影響は無く, キシリトール資化性を示すと推定できる。そこで, SCD202 株の増殖試験をキシリトール XLYP 培地 pH 4.5, 温度 35°Cで行った。その結果, *gal80Δ* 株とは異なり増殖が認められなくなった (図 1-3a)。従って, キシリトール資化には *Gal2* が必要であると考えられた。また, *Gal80* 野生型株において *GAL2* を *TDH3* プロモーターにより高発現した株を構築し, 同様の条件で増殖試験を行ったところ, 顕著な増殖が見られた (図 1-3a)。以上のことからキシリトールの資化性は, キシリトールの *Gal2* による細胞内輸送を通して生じており, *Gal2* 以外の *Gal80* 制御下にある遺伝子産物が, キシリトール資化の主たる要因とは考え難い。

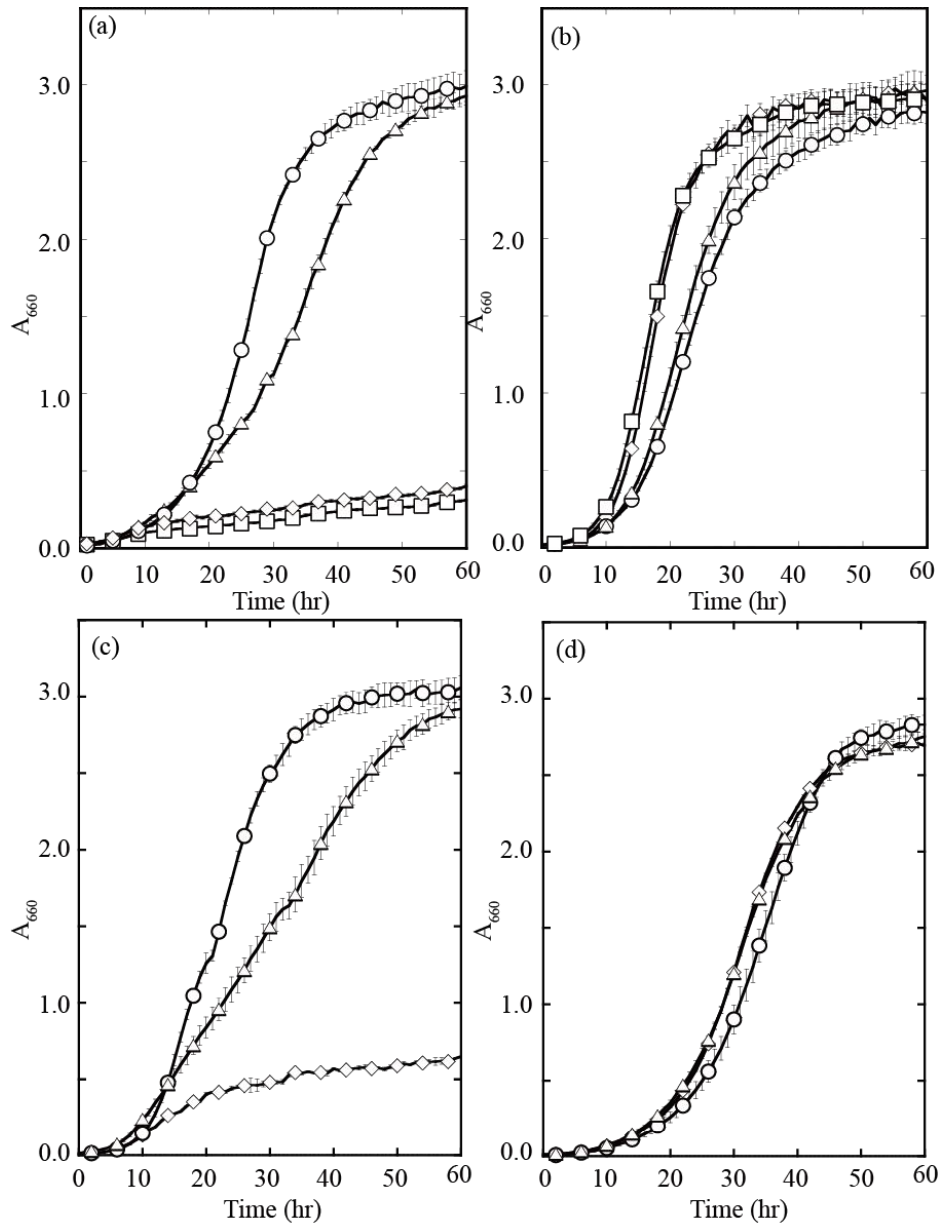


図 1-3 キシリトールもしくはキシロース資化における Gal2 (D-ガラクトース透過酵素)の役割 Gal2 高発現株と gal2 破壊株の (a)キシリトール資化, または (b)キシロース資化の解析。gal80Δ 株, TDH3p-GAL2 株, gal80Δ gal2Δ 株, 野生型株の細胞を 5 mL の XLYP 培地 pH 4.5 もしくは 5 mL の LYPX 培地 pH 4.5 に植菌し, 35°C で振盪培養した。細胞濃度はバイオフィトレコーダーにより測定した。記号: ○, SCD201 (gal80Δ); Δ, SCD203 (TDH3p-GAL2); □, SCD202 (gal80Δ gal2Δ); ◇, SCB39(野生型)。HEX1-22 と SXMI-32 変異の影響がでない遺伝背景での (c)キシリトール資化, または (d)キシロース資化の解析。野生型の HEX1 と SXMI をそれぞれ持つ gal80Δ 株, TDH3p-GAL2 株, 野生型株の細胞を 5 mL の XLYP 培地 pH 4.5 もしくは 5 mL の LYPX 培地 pH 4.5 に植菌し, 35°C で振盪培養した。細胞濃度は, バイオフィトレコーダーにより測定した。記号: ○, SCD302 (gal80Δ); Δ, SCD303 (TDH3p-GAL2); □, SCC2-11B (野生型)。(a)から(d)のデータは独立した最低 3 回の実験の平均と標準偏差である。

ただし、*gal80Δ* 株よりもやや *TDH3p-GAL2* 株のキシリトール培地での増殖が遅いことは、Gal2 以外の遺伝子産物も資化性の強さに影響することを強く示唆している。ヘキソースの輸送タンパク Hxt5 や Hxt7 と同様に、Gal2 はキシロースの細胞内への輸送を行うことが知られている (12, 45)。そこで、*gal2* 欠失のキシロース資化性に及ぼす影響を解析した。*gal80Δ* 株 (SCD201)、*gal2Δ gal80Δ* 株 (SCD202) のキシロース資化能をキシロース LYPX 培地 pH 4.5, 35°C で調べたところ、*gal80Δ* の遺伝背景では、むしろ *gal2* 欠失株の方が、キシロース資化性が良いことが分かった (図 1-3b)。野生型株 (SCB39) と Gal2 高発現 *TDH3p-GAL2* 株 (SCD203) でも比較すると前者の方が、キシロース資化性が良かった (図 1-3b)。このように、Gal2 が発現すると、むしろキシロース資化速度が遅くなることが分かった。

SCB39 株は、*MTH1-32* と *HEX1-22* 変異を持つ。特に、*MTH1-32* 変異によりグルコースの細胞内輸送が遅くなり、よってカタボライト抑制が解除される。この解除により多面的に遺伝子発現が影響されるので、これらの影響を除外するために、野生型 *MTH1* と *HEX1* の遺伝背景でキシリトール資化性を調べることにした。*gal80Δ* 株 (SCD302) と野生型株 (SCC2-11B) と *TDH3p-GAL2* 株 (SCD303) でキシリトール資化性をキシリトール XLYP 培地 pH 4.5 温度 35°C で調べたところ、*MTH1-32* と *HEX1-22* の変異型であろうと野生型であろうと、キシリトール資化性は Gal2 が発現しているかどうかには依存していた (図 1-3c)。キシロース資化性に及ぼす *MTH1-32* と *HEX1-22* 変異の影響をキシロース LYPX 培地 pH 4.5 温度 35°C で調べたところ、*gal80Δ* では増殖が野生型株よりはやや遅くなる傾向にあったが、キシリトール培地で見られたほどの差は、*MTH1-32 HEX1-22* 株と野生型で見られなかった (図 1-3d)。

第4節 考察

酵母 NAM34-4C 株は、耐熱性や耐酸性や乳酸資化を示し形質転換能も高く、同質系統株が構築されており (24)、ドラフトゲノム配列も決定されている実用酵母である (37)。 *Scheffersomyces stipitis* の *XYL1* や *XYL2* および内在性の *XKSI* を *TDH3p* の支配下で発現させるように染色体に組み込んだ SCB7 株は、キシロース最少培地で増殖できる (25)。さらに、高効率キシロース資化性を示す変異体 (25) や高濃度キシロースも資化する変異体も分離されている (26)。その原因遺伝子は、次世代シーケンサ解析・遺伝学的系統解析・簡便で迅速な特定法で同定されている (26)。このような変異体分離と原因遺伝子変異を特定する解析を、キシリトール資化性の解析に初めて適用し、*GAL80* 遺伝子内のミスセンス変異が、キシリトール資化を導くことを次の理由から明らかにした； 3 個のキシリトール資化性を導く変異 *xyt-7*, *xyt-8* と *xyt-15* は、*GAL80* 内に劣性のミスセンス変異を持つ (*Gal80 Ile215Asn*, *Gal80 Arg153Leu* と *Gal80Arg153Ser*); 構築した *gal80Δ* 株もキシリトール資化性を示す (図 1-2a); 3 個の *xyt* 変異遺伝子と *gal80Δ* は同じシストロンに分類できる。

グルコースが無い時、*gal80Δ* 株は転写活性因子である Gal4 を最も高く生産する。その結果、ガラクトース代謝関連の遺伝子群 (*GAL2*, *GAL1*, *GAL7*, *GAL10*, *GAL3* と *MEL1*) など数多くの遺伝子が発現する (42)。Gal2 はガラクトース透過酵素であり、D-ガラクトースだけでなく、D-グルコースを細胞内可溶質に輸送する (46)。さらに、この酵素はキシリトールの細胞内輸送を次の理由から行うと考えられる：
gal80Δ 株は野生型株と異なりキシリトール資化性 Xyt^+ を示す; *gal2Δ* を *gal80Δ* 株に付与するとキシリトール資化性を示さなくなる; *TDH3* プロモーターで *GAL2* を高発現させると、*gal80Δ* の遺伝背景でなくてもキシリトール資化性を示す。しかしながら、Gal2 欠失株でもキシロース培地で増殖できるので、Gal2 はキシロースの主要な輸送タンパクではないと考えられる (12, 45)。

Saccharomyces cerevisiae の *FPS1* は、主要な膜チャネル分子ファミリーのアクアグリセロポリンをコードし、グリセロールや水を透過させる (47–51)。また、Fps1 はキシリトールの排出輸送を行うと考えられている (52)。しかしながら、野生型株は Fps1 を発現しているけれどもキシリトール資化性を示さないこと、*gal80Δ* や *TDH3p-GAL2* の遺伝子背景で Gal2 が発現するとキシリトールの資化性が現れるので (図 1-3a)、キシリトールの細胞内輸送に対する Fps1 の掛かり合いは、主要ではないと考えられる。Gal2 はキシリトールの主要なトランスポーターと考えられるが、キシリトールの排出輸送にはおける関与は強くはないと考えられる。このことに関しては、本論文第 3 章で論議する。

gal80Δ 株のキシリトール資化能は、*TDH3p-GAL2* 株よりも高い (図 1-3a)。それゆえ、キシリトール資化に関わる Gal80 の影響は、*GAL4* を介した *GAL2* の発現誘導を起こしているだけでなく (42)、キシリトール代謝も上方制御している可能性がある。野生型の *S. cerevisiae* 株では、Gal2 によるキシリトールの細胞内取り込みや代謝は起こらないので、キシリトールは Gal2 の発現を誘導しないと考えられる。野生型株や *gal80Δ gal2Δ* 株のキシロース消費は、*TDH3p-GAL2* や *gal80Δ* 株よりも高いので (図 1-3b)、Gal2 を通して細胞内可溶質に輸送されるキシロース量は、野生型株と比較して少ないかもしれない。キシリトールの資化能は、*gal80Δ* 株と 3 個のミスセンス変異株とで同程度である。これらミスセンス変異の 2 個は、Gal80 Arg153 が 153Leu あるいは 153Ser に置換したもので、残りの 1 個は Gal80 Ile215 が 215Asn に置換したものである。これら 3 個の変異により低い Gal80 活性となると推定できる。

第5節 要約

高効率キシロース資化性を示す組換え酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 株は、キシロースをキシリトールに代謝する Xyl1 (*Schefferosomyces stipitis* のキシロースリダクターゼをコードする)と、キシリトールをキシルロースに代謝する Xyl2 (*S. stipitis* のキシリトール脱水素酵素をコードする)と、キシリトールをキシルロースに代謝する Xks1 (内在性のキシルロキナーゼをコードする)をグリセルアルデヒド 3-リン酸キナーゼのプロモーターで高発現しているが、キシリトールを資化しなかった。そこで、キシリトール資化性機構を明らかにしキシロース代謝の知見を得るために、キシリトール資化性の自然突然変異体を3株分離した。変異体のゲノム DNA を次世代シーケンサで解析し、遺伝学的系統解析により原因遺伝子変異の候補を解読した。3個の変異体に共通して存在する遺伝子変異として *gal80* のミスセンス変異が有力候補であると推定できた。*gal80Δ* 株を構築し、キシリトール資化性を調べたところ、推定通り資化性を示した。変異株と野生型株との二倍体がキシリトール資化性を示さなくなったことから、キシリトール資化性を導く変異は野生型対立アレルに対し劣性であり、*gal80Δ* 株と変異株とを掛け合わせて得た二倍体がキシリトール資化性を示すことから原因遺伝子は *GAL80* であることが分かった。キシリトール資化性は、*gal80Δ* でも、*GAL80* のミスセンス変異 Ile215Asn, Arg153Leu, Arg153Ser でも起こる。ガラクトース遺伝子発現を抑制する転写制御タンパク Gal80 の調節を受けるガラクトース糖化酵素 Gal2 は、キシロースやグルコースを細胞内に取り込むが、キシリトールも取り込むと考えられた。そこで、*gal80Δ* 株に *gal2Δ* を付与するとキシリトールの資化性がなくなること、*GAL2* を *TDH3p* の支配下で発現させるとキシリトール資化性になることの実験結果を得た。

第2章 キシリトールとキシロース資化性

Saccharomyces cerevisiae のキシリトール代謝解析

第1節 緒言

キシロースからキシルロース 5-リン酸の代謝に必要な *TDH3p-XYL1-TDH3t-TDH3p-XYL2-TDH3t-TDH3p-XKS1-TDH3t* 遺伝子構造 (XM1) を酵母の染色体に組み込んだ SCB7 株が構築されている (25)。さらに、キシロース資化性が高くなる *HEX1-22* 変異を付与した SCB38 株は、キシロースを資化するがキシロースから代謝されて生産されるキシリトールを炭素源として資化できない (第1章)。キシリトールを細胞内に取り込む Gal2 が発現していないためである。Gal2 発現には少なくとも *gal80A* や *TDH3p-GAL2* などの遺伝背景が必要である。Gal2 が発現している *gal80A* または *TDH3p-GAL2* XM1 *HEX1-22* 株は、キシリトールを細胞内に取り込み、Xyl2 酵素によりキシリトールと補酵素 NAD⁺ からキシルロースと補酵素 NADH を生産する。XM1 *HEX122* 株がキシルロースを代謝する時と比較すると、キシリトールからキシルロースへの代謝を行う Xyl2 反応が増えているので、NADH/NAD⁺ の割合が変わり、補酵素 NAD⁺ が少なく、補酵素 NADH が多くなると考えられる。好氣的培養条件では、NADH の NAD⁺ への酸化は、ミトコンドリアの Nde1 (II 型 NAD(P)H: キノン酸化還元酵素で、細胞質の NADH を酸化する) や Nde2 (Nde1 のパラログ), 細胞質の Gdh2 (NAD⁺ 依存グルタミン酸脱水素酵素で、グルタミン酸をアンモニアと α -ケトグルタミン酸に分解する) および細胞増殖時の脂質合成反応などで行われる (53-55)。嫌氣的培養条件では、Gpd1 (NAD⁺ 依存グリセロール 3-リン酸脱水素酵素で、浸透圧ストレス下での増殖に必須である) や Gpd2 (*GPD1* のパラログ) 反応で NADH から NAD⁺ の酸化が行われ、生じるグリセロール 3-リン酸は、続く Gpp1 (D, L-グリセロール 3-リン酸ホスフ

ァターゼ)や Gpp1 (Gpp2 のパラログ)反応によりグリセロールとなる。従って、キシロースからエタノールへの代謝時の副産物として、しばしばグリセロールが蓄積され、エタノールの収率を下げることになる。しかしながら、嫌期的培養条件で、Xyl2 酵素反応がどの程度に補酵素 NAD⁺不足となり、Xyl2 酵素反応がキシロース代謝を律速しているかは明らかにされていない。XM1 *HEX1-22* 遺伝背景で、かつ Gal2 が発現している株がキシロースを代謝する時、Xyl1 酵素はキシロースと NADH または NADPH からそれぞれキシリトールと NAD⁺または NADP⁺を生産する。NAD⁺が生産されれば、補酵素 NAD⁺が不足とはならないので、次の Xyl2 反応は進むと考えられる。一方、NADP⁺が生産されれば、NAD⁺の不足は解決されない。NADP⁺はペントースリン酸側鎖の第 1 段階の反応 Zwfl (グルコース 6-リン酸脱水素酵素)、その次の反応 Gnd1 (6-ホスホグルコン酸脱水素酵素(脱炭酸))と Gnd2 (Gnd1 のホモログ) (35)で NADPH に還元されるので Xyl1 反応は続くことになる。それ故、キシリトールが蓄積されるのだろうと考えられている。しかしながら、先ほど述べたように Xyl2 反応がどの程度に補酵素 NAD⁺不足となり、Xyl2 酵素反応がキシロース代謝を律速しているのかは明らかにされていないので、キシリトール蓄積の機構も明確でない。

そこで、第 2 章では、キシリトール資化性の自然突然変異体を用いて、キシロースやキシリトールを炭素源として好気的および嫌气的に培養することにより炭素源の代謝を解析し、代謝律速段階を特定し、キシリトールの蓄積機構を明らかにすることを目的とした。

第 2 節 実験材料と実験方法

2.2.1 菌株, プラスミド, オリゴヌクレオチドプライマー

本研究の第 2 章で使用した菌株とプラスミドを表 2-1 に、オリゴヌクレオチドプライマーを表 2-2 に示した。キシロース資化性で高効率キシロース代謝を示す SCB38 株

をキシリトール資化性の株を構築する上での親株として用いた (26)。SCF201 株と SCF202 株はそれぞれ *TDH3p-GAL2* と *gal80Δ* の遺伝子構造を持ち、キシリトールを細胞内に取り込ませるために Gal2 発現させたキシリトール資化性株である。*gal80Δ* により Gal4 が発現し、数多くの遺伝子が発現するので、キシリトールの取り込みとキシリトール代謝の関係を強く対応させるための株として *TDH3p-GAL2* 株を構築した。pZeo プラスミドは、*kanMX* マーカーを Cre タンパク質の発現によって除去するために用いた。大腸菌 DH10B はプラスミド DNA による形質転換の受容菌として用いた (25)。本研究で用いたプライマー (Genenet, Fukuoka, Japan) は、GENETYX[®]-MAC 遺伝情報処理ソフトウェア/Macintosh 版 Primer3 (ゼネティックス, 東京, 日本) あるいは Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) によってデザインし、表 2-2 に記した。*S. cerevisiae* 遺伝子の塩基配列は、*Saccharomyces* Genome Database ([http:// www.yeastgenome.org/](http://www.yeastgenome.org/)) の情報に基づいた。*S. cerevisiae* NAM34-4C 株のドラフトゲノムの塩基配列は、DDBJ/EMBL/GenBank アクセッション番号 BAUH01000001 から BAUH01000154 に登録されている。

表 2-1 本研究で使用した菌株及びプラスミド

菌株	遺伝子型もしくは表現型	起源, 由来, 引用文献
<i>Saccharomyces</i>		
<i>cerevisiae</i>		
NAM34-4C	<i>MATa</i>	24, 37
SCC15	<i>MATa pho87Δ URA3::XM1^a HEXI-22 sxm2-33 xyt1-15</i>	第 1 章
SCB40	<i>MATa pho87Δ URA3::XM1 HEXI-22 sxm2-33</i>	第 1 章

SCB38	<i>MATa pho87Δ URA3::XM1</i>	25
	<i>HEX1-22</i>	
SCF201	<i>MATa pho87Δ URA3::XM1</i>	Tfm (SCB38: <i>kanMX</i> DNA, G418-r) ^b . The <i>kanMX</i> DNA region of pBlu-LTKTL-TDH3 was amplified using primers F-GAL2c-LTKTL and R-GAL2c-TDH3p.
	<i>HEX1-22 gal2pΔ-kanMX-TDH3p-GAL2</i>	
SCF202	<i>MATa pho87Δ URA3::XM1</i>	Tfm (SCB38: <i>kanMX</i> DNA, G418-r). The <i>kanMX</i> DNA region of pBlu-LTKTL-TDH3 was amplified using primers F-GAL80-LTKTL and R-GAL80-LTKTL.
	<i>HEX1-22 gal80Δ::kanMX</i>	
SCD16-4C	<i>MATα URA3::XM1 HEX1-22</i>	Haploid (SCB38 × SCB105-7A) ^c
SCB105-7A	<i>MATα ura3Δ::XM8^d HEX1-22</i>	25
SCG22-2B	<i>MATa URA3::XM1 HEX1-22</i>	Haploid (SCF202 × SCD16-4C)
	<i>gal80Δ::kanMX</i>	

Escherichia coli

DH10B	<i>F⁻ mcrA Δ(mrr⁻ hsdRMS mcrBC) Φ80 lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara leu)7697 galU galK λ⁻ rpsL nupG)</i>	Life technologies, 25
-------	--	-----------------------

Plasmid

pBlu-LTKTL-TDH3	<i>loxP-TEFp-kanMX-TEFt-loxP-TDH3p</i>	25
-----------------	--	----

pZeo

CEN6 / ARSH4 URA3 GAL1p CRE 25

CYC1t bla ori_{pUC} TEF1p EM7 Sh ble

CYC1t

^aXM1 は第 1 章第 2 節で記載したように, *TDH3p-XYL1-TDH3t-TDH3p-XYL2-TDH3t-TDH3p-XKS1- TDH3t* の遺伝子構造を持つ DNA 断片であり, *TDH3* プロモーター, *XYL1* (*Scheffersomyces stipitis* のキシロースリダクターゼ XR をコードする), *TDH3* ターミネーター, *XYL2* (*S. stipitis* のキシリトール脱水素酵素 XD をコードする), *XKS1* (*S. cerevisiae* のキシロキナーゼ XK をコードする)を含む。

^bTfm, 形質転換; Tfm (SCB38: *kanMX* DNA, G418-r) の記載方法は, 第 1 章第 2 節で述べたように, SCB38 株の *kanMX* DNA による G418 耐性形質転換体を表す。

^cHaploid (SCB38 × SCB105-7A) の記載方法は, 第 1 章第 2 節で述べたように, SCB38 株と SCB105-7A 株を掛け合わせるにより得た二倍体を 4 孢子解剖して得た一倍体を指し示す。

^dXM8 の略号は, 第 1 章第 2 節で述べたように, *loxP-TEFp-kanMX-TEFt-loxP-TDH3p-XYL1-TDH3t-TDH3p-XYL2-TDH3t-TDH3p-XKS1- TDH3t* の遺伝子構造を持つ DNA 断片であり, *loxP*, *TEF* プロモーター, *kanMX*, *TEF* ターミネーター, XM1 を含む。

表 2-2 PCR 増幅に用いたオリゴヌクレオチドプライマー

番号	プライマー名	プライマー塩基配列 (5'から 3')
1	F-Gal2c-LTKTL	<u>gcccttcccatctcaagatggggagcaaatggcattatacggccgccagctgaag</u>
2	R-Gal2c-TDH3p	<u>gctgtgaaacaacaggcatattgttctcctcaactgccattttgtttgttatgtgtgtttattcgaa</u>
3	F-GAL80-LTKTL	<u>caatctcgatagttggttcccggttcttccactcccgtcggccgccagctgaag</u>
4	R-GAL80-LTKTL	<u>cgttcgtgcactggggccaagcacagggcaagatgctaggccactagtgatct</u>
5	F-Gal2Δ-LTKTL	<u>atggcagttgaggagaacaatatgcctgttgtttcacagcggccgccagctgaa</u>
6	R-Gal2Δ-LTKTL	<u>ttattctagcatggccttgtaccacggtttgcgtcatgtaggccactagtgatct</u>

プライマーのアンダーラインで指し示した部分は、染色体 DNA との相同領域である。

2.2.2. 培地

S. cerevisiae の増殖用 YPD 培地, 改変キシリトール最少培地 (XLYP), 改変キシロース最少培地 (LYPX), キシロース培地 (YPX), Cre 酵素の発現誘導に用いたガラクトース培地 (YPG), グルコース最少培地 (MSD), キシロース最少培地 (MSX), 合成完全培地 (SC), 孢子形成培地 (SpoK2)は, 第 1 章 第 2 節で示したものをを用いた。YPD4 培地は, 20 g/L グルコースの代わりに 40 g/L のグルコースを用いた以外は YPD 培地と同じである。培地には必要に応じて最終濃度がアデニンで 50 mg/L, ウラシルで 50 mg/L, アミノ酸で 40 mg/L となるように加えた。G418 二硫酸塩 (G418) は, 必要に応じて最終濃度が 360 mg/L となるように加えた。固形培地には, 培地 1 L 当たり 20 g の寒天を加えた。回分培養に使用したキシロース発酵培地 (MYPX)およびキシリトール発酵培地 (MXYP)は, 酵母エキス 8 g/L, バクトペプトン 16 g/L, キシロースもしくはキシリトール 20 g/L を蒸留水 1 L 当たりを含み, pH5.0 に調整した。大腸菌の

増殖培地として用いた Luria-Bertani 培地 (LB), コンピテントな大腸菌の調製に用いた M9 培地は, 第 1 章 第 2 節で示したものを使用し, 固形培地には培地 1 L 当たり 15 g の寒天を加えた。ビタミンは必要に応じて, チアミンを最終濃度 5 mg/L となるように加えた。抗生物質は必要に応じて, 最終濃度がアンピシリン (Amp) とカナマイシン (Km) で 50 µg/mL となるように加えた。

2.2.3 形質転換, 酵母染色体 DNA の調製および酵母遺伝学で用いる標準方法

形質転換, 染色体 DNA の調製および酵母遺伝学で用いる標準方法は, 第 1 章の第 2 節で示した方法を用いた。

2.2.4 High Pure Plasmid Isolation Kit を用いた大腸菌からのプラスミド DNA 抽出

プラスミド調製, High Pure Plasmid Isolation Kit を用いたプラスミド DNA 抽出は, 第 1 章の第 2 節で示した方法を用いた。

2.2.5 アガロースゲル電気泳動, PCR 法による DNA 断片の増幅

アガロースゲル電気泳動, PCR 法による DNA 断片の増幅は, 第 1 章の第 2 節で示した方法で行った。

2.2.6 塩基配列決定

塩基配列決定は, 第 1 章の第 2 節で示した方法で行った。

2.2.7 回分培養

YPD 固形培地で 30°C, 一晚培養した *S. cerevisiae* 株を 200 mL の YPD4 培地 pH5.5 に初発細胞濁度が $A_{660}=0.2$ となるように植菌し, 30°C, 16 時間振盪培養した。その後, 遠心分離により集菌し, 滅菌水により 2 回の洗浄を行った。10 mL の細胞懸濁液を 50

mL の XMYP 培地 pH 5.0 もしくは MYPX 培地 pH 5.0 に初発細胞濃度 A_{660} が 20 となるように植菌し、30°C 96 時間 緩やかに振盪培養した (85 rpm)。酸素を制限しない好気的な培養では、100 mL 容の三角フラスコに綿栓で栓をした。また、酸素を制限した 100 mL 容の三角フラスコに二つの針を刺したシリコン栓で栓をした: 針のひとつにはシリコン管をつけ、ホフマンピンチコックで栓をし、サンプリングはこの管から行った; 残りの針にはシリコン管をつけ、そこに注射筒をつけ、二酸化炭素を補足するために風船をつけた。培養を始めると風船が膨らみ、培養器が嫌氣的に保たれ、サンプリング時には風船の二酸化炭素が培養器に戻るために嫌気性は保たれる。経時的にサンプリングを行い、発酵培地中のエタノール、グルコース、キシロース、キシリトール、グリセロールの濃度を決定するために 4°C, 12,000 rpm で 5 分間遠心分離して上澄みを得た。各物質の濃度を測定するために、上澄み液を HPLC によって測定した。

2.2.8 HPLC 分析

キシロース、キシリトール、グリセロール、エタノールの濃度は、培地上清を高速液体クロマトグラフィー(HPLC 島津製作所製)によって測定した。カラムは Aminex HPX-87H (7.8 mm×300 mm;Bio-Rad, Richmond, CA, USA) を使用した。検出器は、RID-20A 示差屈折検出器 (島津製作所), を使用した。分析は、CTO-20AC カラムオーブンにより 60°Cで行い、移動相の条件は 5 mM 硫酸, 流量 0.6 mL/分 とした。キシロースとキシリトール発酵でのエタノール収率 (%)は,理論最大エタノール収率 (g/L)に対する生産エタノール濃度 (g/L)の比率 (%)で求めた。[0.51 × 消費 D-キシロース 濃度 (g/L), もしくは 0.50 × 消費 D-キシリトール濃度 (g/L)]

第3節 結果

2.3.1 *xyt-15* 突然変異体とその親株の嫌氣的条件下での発酵試験

キシリトール資化性の突然変異体 SCC15 とその親株 SCB40 の発酵試験を 20 g/L キシロースを含む MYPX 培地, 30°C で行った。SCC15 株と SCB40 株の増殖は, 初発細胞濃度からわずかに増加しただけであった (図 2-1a と 2-1b)。培養開始から 8 時間での SCC15 株と SCB40 株のキシロース消費速度は, それぞれ 2.3 g/L/h と 2.1 g/L/h であり, 両株ともに高く, 24 時間以内にすべて消費した。培養開始から 100 時間の時点で, SCC15 株では 93.6%, SCB40 株では 94.5% のキシロースが, エタノール, キシリトール, グリセロールへと変換した。SCC15 株と SCB40 株の各物質の収率は, エタノールが 64.6 % (SCC15 株), 65.5 % (SCB40 株), キシリトールが 23.8 % (SCC15 株), 25.9 % (SCB40 株), グリセロールが 3.9 % (SCC15 株), 3.3 % (SCB40 株) であった。キシリトール消費とエタノール生産様式は, SCC15 株と SCB40 株では異なっていた。SCC15 株では発酵開始から 12 時間以内にキシロースが消費され, 蓄積したキシリトールの濃度は時間経過とともに減少し, エタノール濃度が増加した (図 2-1a)。これは SCC15 株において発現している Gal2 透過酵素がキシリトールを細胞質へと取り込み, エタノールが生産されたことを示唆している。一方, SCB40 株においては, 発酵開始から 24 時間以内にキシロースが消費され, 蓄積されたキシリトール濃度は緩やかに減少したが, エタノール濃度は一定であった (図 2-2b)。また, 発酵開始から 100 時間の時点で SCC15 株のグリセロール濃度は, SCB40 株よりも高くなった (SCC15 株, 0.82 g/L; SCB40 株, 0.67 g/L)。このことは, キシロースのエタノール発酵中に生成されるグリセロールの代謝(生産?)があることを示している。

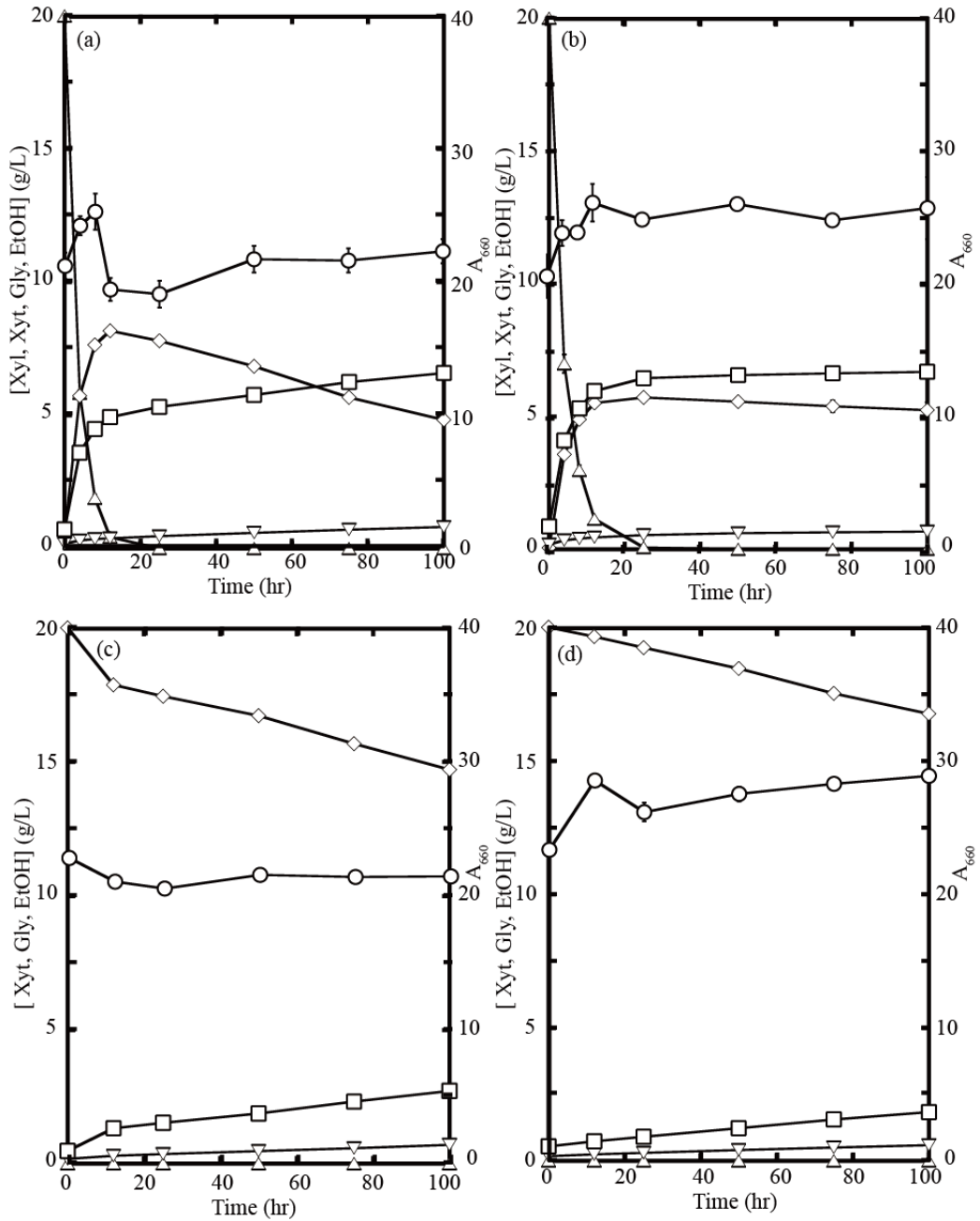


図 2-1 *S. cerevisiae* xyt-15 突然変異体 (SCC15)とその親株 (SCB40)の回分発酵。SCC15 株と SCB40 株の細胞を 60 mL のキシロース培地 (MYPX) pH 5.0 またはキシリトール培地 (XMYP) pH 5.0 に植菌し、酸素制限下で振盪培養した。細胞濃度、キシロース濃度、キシリトール濃度、グリセロール濃度、エタノール濃度を解析した。(a) SCC15 株, MYPX 培地; (b) SCB40 株, MYPX 培地; (c) SCC15 株, XMYP 培地; (d) SCB40 株, XMYP 培地。データは 3 回の独立した実験の平均値と標準偏差である。記号: ○, 細胞濃度 (A_{660}); △, キシロース濃度 (g/L); □, エタノール濃度 (g/L); ◇, キシリトール濃度 (g/L); ▽, グリセロール (g/L)。

キシリトール資化性の突然変異体 SCC15 と親株 SCB40 の発酵試験を 20 g/L キシリトールを含む XMYP 培地, 30°C で行った。SCC15 株のキシリトール消費は, 培養 100 時間後で 6.0 g/L であり, SCC40 株のキシリトール消費は, わずか 3 g/L であった (図 2-1c と 2-1d)。このように, キシリトールの消費速度は非常に遅く, キシロース消費が 24 時間以内に終わるのと比較すると対照的であった。比較的低いキシリトール消費ではあるが, エタノール収率は両株で 100% であった。

2.3.2 *gal80Δ* 株と *TDH3p-GAL2* 株の好気的および嫌气的発酵解析

嫌气的な発酵では, キシロースの消費と比較して, キシリトールの消費が極端に遅いことを確かめるために, SCB40 株の遺伝背景 *grr1-33* だけではなく, 野生型 *GRR1* の遺伝背景での確認実験を行った。なぜならば, *GRR1* は SCF ユビキチンリガーゼ複合体の F ボックスタンパク質をコードしており, この遺伝子の変異により少なくともグルコースの細胞内輸送が減少してカタボライト抑制解除になり, 多数の遺伝子が発現されたり抑制されたりすると考えられるためである。また, 多くの遺伝子発現を誘導する Gal4 の活性化が起こる *gal80Δ* の遺伝背景だけでなく, *TDH3p-GAL2* の遺伝背景でも確認実験を行った。キシリトール資化株 SCF202 (*gal80Δ*) と SCF201 (*TDH3p-GAL2*) を 20 g/L のキシリトールを含む XMYP 培地 pH 5.0, 温度 30°C の酸素制限条件下および酸素非制限条件下で発酵を行い解析した。酸素制限条件下では, 培養開始から 96 時間後の時点で, キシリトール消費が SCF202 株と SCF201 株でそれぞれ 3.7 g/L と 4.0 g/L と非常に低く, *GRR1* の遺伝背景でも, *TDH3p-GAL2* や *gal80Δ* の遺伝背景でも, 嫌气的培養ではキシリトールの消費は非常に遅いことが分かった (図 2-2a と 2-2b)。キシリトール消費率は, 18.5% と 20% であった。キシリトール消費は, 著しく低いにもかかわらず, 両株のエタノール収率は高かった (SCF202 株で 100%, SCF201 株で 92%)。細胞濃度は 96 時間で, 初発細胞濃度からわずかに増加しただけであっ

た。

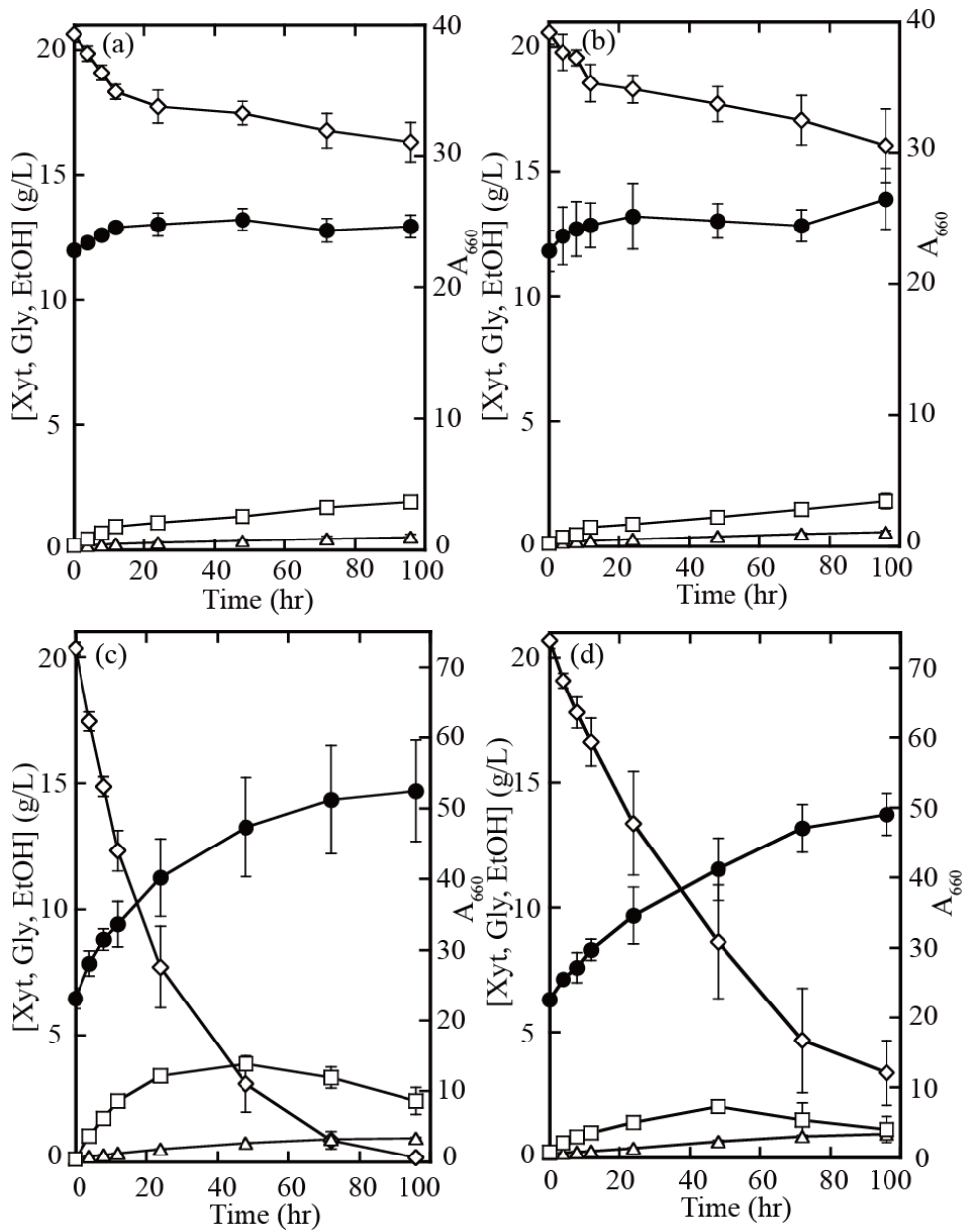


図 2-2 *S. cerevisiae* SCF202 株と SCF201 株の、キシリトールを炭素源として用いた回分発酵。SCF202 株と SCF201 株を 60 mL のキシリトール (XMYT) 培地 pH 5.0 に植菌し、30°C で酸素制限下の嫌氣的条件もしくは酸素非制限下の好氣的条件で振盪培養した。(a) SCF202 株, 嫌氣的; (b) SCF201 株, 嫌氣的; (c) SCF202 株, 好氣的; (d) SCF201 株, 好氣的。データは 3 回の独立した実験の平均値および標準偏差である。記号: ●, 細胞濃度 (A_{660}); ◇, キシリトール濃度 (g/L); □, エタノール濃度 (g/L); ▽, グリセロール濃度 (g/L)。

酸素非制限下の好气的条件では、培地中のキシリトールを培養開始から 96 時間で 100 % (SCF202 株)と 83 % (SCF201 株) 消費し (図 2-2c と 2-2d), キシリトールの消費の極端な遅さは、嫌气的条件下で起こることが分かった。また、好气的条件下では、細胞は顕著に増加した (初発細胞濃度 $A_{660}=20$ から $A_{660}=50$)。培養の 48 時間から 96 時間の間では、好气的条件でしばしば観察されるように、エタノールの減少を認めた (SCF202 株で 3.8 g/L から 2.4 g/L, SCF201 株で 2.0 g/L から 1.1 g/L)。最大エタノール収率は、培養開始から 48 時間後で 45 % (SCF202 株)と 36 % (SCF201 株) であった。

次に、SCF202 株と SCF201 株を 20 g/L のキシロースを含む MYPX 培地 pH 5.0 温度 30°C で発酵を行った。酸素制限条件下で、両株の細胞濃度は、初発細胞濃度よりもわずかに増加しただけであった (図 2-3a と 2-3b)。培養開始から最初の 8 時間でキシロース消費速度は SCF202 株で 1.9 g/L/h, SCF201 株で 1.9 g/L/h であり、キシリトール消費速度 (両株とも 0.04 g/L/h) よりも顕著に高かった。すなわち、キシロースは、嫌気条件下でも十分に代謝されることを示している。培養開始から 96 時間後に SCF202 株と SCF201 株は、それぞれ培地中の 20 g/L キシロースの 90.3 %と 88.8 %をエタノール (55.5 %と 58.2%), キシリトール (31.1 %と 27.0 %)と少量のグリセロール (3.6 %と 3.7 %)に変換した。酸素非制限下では、培地中のキシロースの 96.3 % (SCF202 株)と 93.2 % (SCF201 株)を発酵開始から 12 時間以内に消費した (図 2-3c と 2-3d)。両株の細胞は、初発細胞濃度 $A_{660}=20$ から $A_{660}=50$ と顕著に増加した。培養の 12 時間から 96 時間間に、SCF202 株と SCF201 株のエタノール濃度は、それぞれ 5.4 g/L から 0.8 g/L と 5.5 g/L から 1.5 g/L へと著しく減少した。キシロースからの最大エタノール収率は、培養開始から 12 時間の時点において、SCF202 株で 55.2 %, SCF201 株で 57.7%であった。培養開始から 8-12 時間と 96 時間でのキシリトール濃度は、SCF202 株は 3.6 g/L から 0.0 g/L, SCF201 株では培養開始から 96 時間の 3.3 g/L から 0.8 g/L であり、両株とも明らかな減少を示した。これらの結果から、酸素制限条件において、 NAD^+ 依存型キシリトール脱水素酵素の反応には、 $NAD(P)H$ 依存型キシロース還元酵

素反応によって生産された NAD^+ が必要であると考えられた。

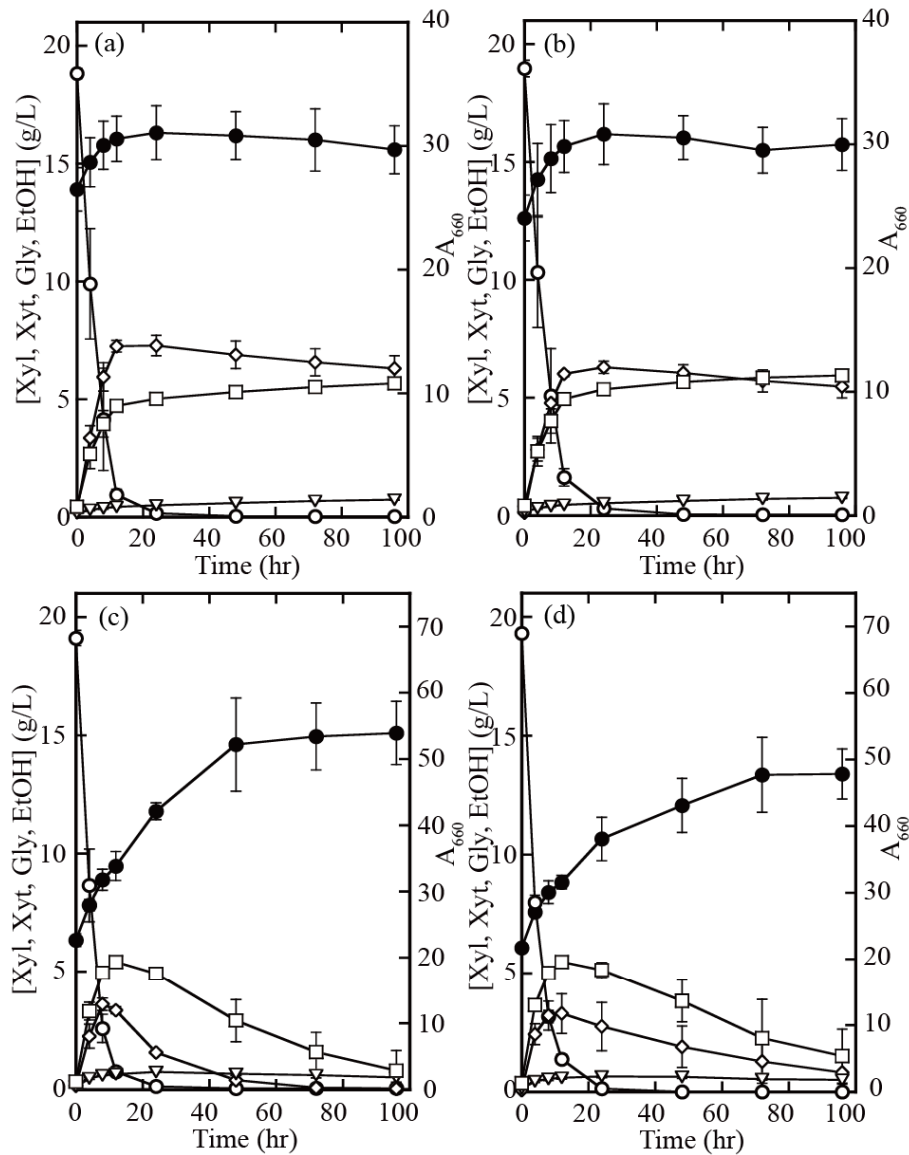


図 2-3 *S. cerevisiae* SCF202 株と SCF201 株の、キシロースを炭素源として用いた回分発酵。SCF202 株と SCF201 株を 60 mL のキシロース (MYPX) 培地 pH 5.0 に植菌し、30°C で酸素制限下の嫌氣的条件もしくは酸素非制限下の好氣的条件で振盪培養した。(a) SCF202 株, 嫌氣的; (b) SCF201 株, 嫌氣的; (c) SCF202 株, 好氣的; (d) SCF201 株, 好氣的。データは 3 回の独立した実験の平均値および標準偏差である。記号: ●, 細胞濃度 (A_{660}); ○, キシロース濃度 (g/L); ◇, キシリトール濃度 (g/L); □, エタノール濃度 (g/L); ▽, グリセロール濃度 (g/L)。

一方で、酸素非制限下では、 NAD^+ 依存型キシリトール脱水素酵素反応は、ミトコンドリアによる NADH から NAD^+ の酸化を必要とすると考えられた。

2.3.3 キシリトール代謝に及ぼすアセトアルデヒド (NADH の効果的な酸化剤) の効果

キシリトールを炭素源として嫌氣的に培養するとキシリトールが消費されないのは、 Xyl2 反応に必要な NAD^+ が欠乏しているためと考えられる。この考え方が正しいければ、好氣的培養で起こるように、キシリトールは Gal2 によって細胞内に取り込まれているが、 NAD^+ 不足で Xyl2 反応が起こらない状態にあると予想できる。この時、細胞外に NADH の効果的な酸化剤であるアセトアルデヒドを添加すれば、 Xyl2 反応は進み、キシリトールは代謝されることが期待できる、なぜならば、アセトアルデヒドは細胞膜やミトコンドリア膜を迅速に通過できること、細胞内でアセトアルデヒドをエタノールにする Adh5 (アルコール脱水素酵素アイソザイム) の反応で、 NADH から NAD^+ が生産され、 NAD^+ 不足が解消されるためである。すなわち、アセトアルデヒドを添加すれば、エタノールが迅速に増え、生じる NAD^+ によって、速やかにキシリトールが消費されていくと予測できる。そこで、この作業仮説を確かめるために、キシリトール資化性株 SCG22-2B (*gal80Δ*) の発酵を嫌氣的に行った。すなわち、20 g/L のキシリトールを含む XMYP 培地 pH 5.0, 温度 30°C, 酸素制限条件で培養を行った。培養開始から 12 時間後に、アセトアルデヒドを最終濃度が 100 mM となるように加え、アセトアルデヒド無添加の対照実験と比較しながら、キシリトール消費とエタノール生産を観察した。結果として、アセトアルデヒドの添加により、迅速なエタノール生産が見られ、同時に顕著なキシリトール消費が観察された (図 2-4)。以上のことから、嫌氣的条件でキシリトール消費が非常に悪いのは、 NADH の NAD^+ への酸化が起こらないためであり、 NAD^+ がキシリトール消費 (NAD^+ 依存型キシリトール脱水素酵素反応) に必要であると結論した。

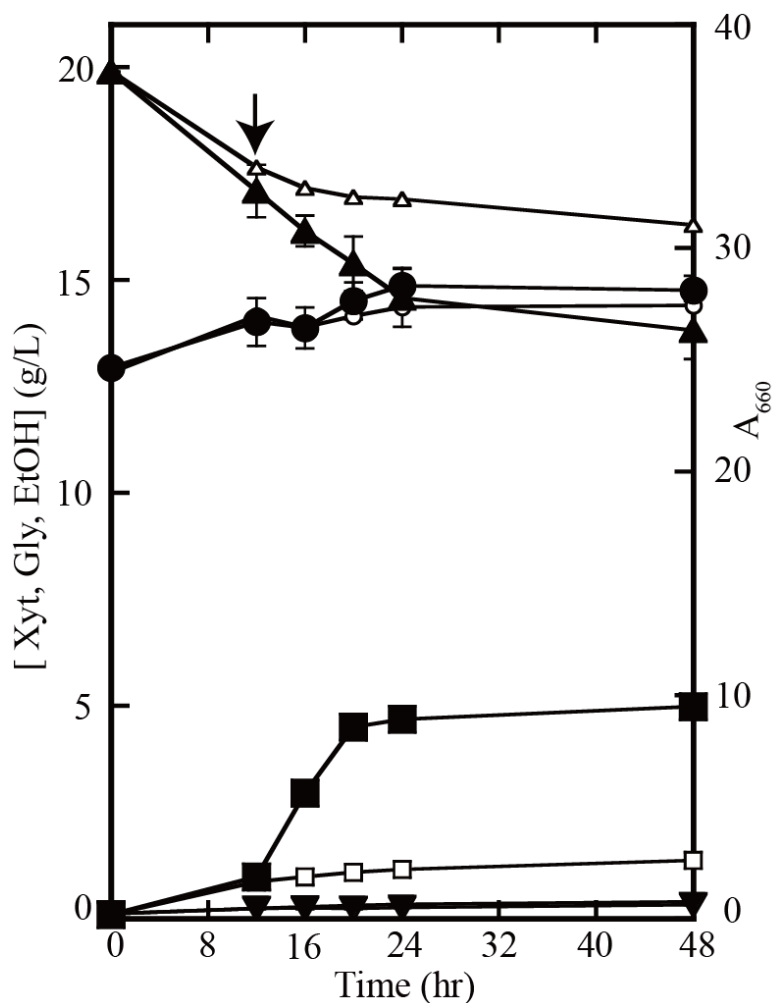


図 2-4 アセトアルデヒドの酸素制限下でのキシリトール消費に及ぼす効果。
gal80Δ 株 SCG22-2B の細胞を 60 mL のキシリトール (XMYP) 培地 pH 5.0 に植菌し、
 30°C で酸素制限下の嫌気的条件下で振盪培養した。12 時間後に 100 mM のアセトアル
 デヒド (最終濃度) を培養液に添加した。記号: ●と○は、アセトアルデヒドの添加とア
 セトアルデヒド無添加を表す。データは 3 回に独立した実験の平均値と標準偏差を表
 す。●と○, 細胞濃度 (A_{660}); ▲と△, キシリトール濃度 (g/L); ■と□, エタノール濃度
 (g/L); ▼と▽, グリセロール濃度 (g/L)。

第4節 考察

耐熱性や耐酸性や乳酸資化・発酵性を示し形質転換能も高い実用酵母 NAM34-4C 株には (24), 同質系統株が構築されており (25), ドラフトゲノム配列も決定されている (37)。それ故, 遺伝学的な解析や遺伝子操作, 突然変異取得や次世代シーケンサ解析, 系統学的解析や原因遺伝子変異特定などの解析法 (26-28)を用いることができる。そこで, 第1章で分離したキシリトール資化性の自然突然変異体を用いて, キシロースまたは, キシリトールを炭素源として好気的および嫌氣的に培養を行い, 両炭素源の代謝を解析から代謝律速段階を特定し, キシリトールの蓄積機構を明らかにしようと考え解析したところ, 次の結果を得た: 嫌氣的条件で発酵を行うと炭素源であるキシリトールは, 代謝されにくい (培養 100 時後でも 4 g/L 程度); 好气的条件下では, 炭素源であるキシリトールは, 迅速に代謝される (培養 100 時間後には 20 g/L を消費); 炭素源であるキシロースの代謝は, 好气的でも嫌氣的でも迅速に起こる (培養 12 時間の間消費速度は, 0.6 g/L/h); 炭素源としてキシリトールを用いた嫌氣的な条件下でも, アセトアルデヒドを発酵培養液に添加するとエタノールが生産されるとともにキシリトールが生産される。アセトアルデヒドは, 細胞膜やミトコンドリアを迅速に通過し, Adh5 などの NADH 依存のアルコール脱水素酵素と反応し, エタノールと NAD⁺を生産する。従って, 生じた NAD⁺により不足が解消され, キシリトール脱水素酵素 Xyl2 が, キシリトールをキシロースに変換し代謝が進むと考えられ, 得られた結果と矛盾しない。嫌氣的な発酵条件下 (fermentative conditions)では, ミトコンドリアの呼吸鎖は機能しないこと (54-56), ミトコンドリア膜の細胞質側で働くオキシダーゼ (Nde1 や Nde2)は, NADH の NAD⁺への酸化を行うこと (30, 55), 炭素源としてキシリトールを用いた嫌氣的発酵では NAD⁺不足になるが, 好气的培養では NAD⁺不足にならないことより, ミトコンドリア膜の細胞質側で働くオキシダーゼ (Nde1 や Nde2)は, 恐らく好气的条件での NAD⁺依存キシリトール脱水素酵素の反応

(従って、キシリトールの消費)に必要なと考えられる。

gal80Δ 株のキシロース消費は、嫌氣的条件下でも好氣的条件下でも非常に早い (2.1 g/L)。すなわち、NAD(P)H 依存のキシロースリダクターゼ反応で生じる NAD⁺が、酸素制限下での NAD⁺不足を補い、従って、キシリトール消費に必要なことを示している。このように、*Scheffersomyces stipitis* の *XYL2* を染色体に組み込んだ組換え酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 株は、キシリトールを炭素源とした培地で嫌氣的に発酵させると、NAD⁺/NADH 酸化還元割合が崩れると考えられる。

キシロースが消費される時、キシリトールは、NADPH と NADH の両方に依存したキシロースリダクターゼ (*Xyl1*)反応を通して生産される。それ故、キシロースと NADH と *Xyl1* 酵素の反応からキシリトールと NAD⁺が生じた時は、NAD⁺不足とはならず、次の NAD⁺依存キシリトール脱水素酵素 *Xyl2* の反応でキシロースと NADH が生じ、反応は進んでいく。一方、キシロースと NADPH と *Xyl2* 酵素で反応した時は、キシリトールと NADP⁺ができ、従って NAD⁺不足となり次の *Xyl2* 反応は滞る。NADP⁺はペントースリン酸側鎖の第 1 番目の反応であるグルコース 6-リン酸脱水素酵素の反応や、その次の反応である 6-ホスホグルコン酸脱水素酵素(脱炭酸)の反応で NADPH へと還元される (35)。従って、嫌氣的な条件下でも *Xyl1* 反応は進み、それ故にキシリトールが蓄積し細胞外へと排出されると推定できる。補酵素代謝に関して野生型 *Saccharomyces cerevisiae* 菌の遺伝背景に、外来の *XYL2* を組み込むことによって生じる NAD⁺/NADH 割合が変化すると、別の補酵素代謝を変化させて元の割合に戻すことが容易ではないことを指し示している。遺伝子操作によって外来の *XYL1* を組み込むことや本来の酵母菌が持つ補酵素依存の代謝遺伝子産物をコードする遺伝子を操作する必要があると考えられる。その候補遺伝子としては、前述の *Nde1* や *Nde2*、細胞質にある *Gdh1* (NADP⁺-依存グルタミン酸脱水素酵素) や *Gdh2* (NAD⁺-依存グルタミン酸脱水素酵素)が考えられる。

第5節 要約

NAD⁺/NAD(P)H 酸化還元割合の変化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代謝の関係を明らかにするために、組換え酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の好気的および嫌氣的回分培養を、20 g/L キシロースもしくは 20 g/L キシリトールを含む栄養培地 pH 5.0 温度 30°C で行い解析した。キシリトールを細胞内に取り込ませるために、その輸送タンパク Gal2 を発現する *TDH3p-GAL2* 株もしくは *gal80Δ* 株を解析に用いた。*TDH3p-GAL2* 株または *gal80Δ* 株は、24 時間以内にキシロースを完全に消費し、好気的に 92–100% のキシリトールを 96 時間以内に消費した。一方、嫌氣的には 96 時間後でも 20% のキシリトールを消費したに過ぎなかった。しかしながら、両菌株は好気的には良好にキシリトール培地で増殖した。キシリトールのキシロースへの代謝には NAD⁺ が必要なので、この補酵素が欠乏していると考え、NADH の効果的な酸化剤であり、細胞膜やミトコンドリアにも迅速に透過できるアセトアルデヒドを嫌氣的培養に添加したところ、キシリトールの消費が顕著に進み、エタノールの増加を認めた。これらの結果は、嫌氣的な培養では、NAD(P)H 依存キシロースリダクターゼ反応で生じる NAD⁺ は、NAD⁺ 依存キシリトール脱水素の反応に必要であることを示しており、一方、好気的培養では、ミトコンドリア内で起こる NADH の酸化によって生じる NAD⁺ が、キシリトール脱水素酵素反応に必要である。

第3章 キシリトール資化性の *Saccharomyces cerevisiae* を用いた

キシリトール輸送タンパクの解析

第1節 緒言

耐熱性や耐酸性や乳酸資化・発酵性を示し、形質転換能も高い実用酵母 NAM34-4C 株には、同質系統株が構築されており (24), ドラフトゲノム配列も決定されている (37)。それ故、遺伝学的な解析や遺伝子操作, 突然変異取得や次世代シーケンサ解析, 系統学的解析や原因遺伝子変異特定などの解析法 (26-28)が, 本研究に適用できる。キシリトール資化性の突然変異体を分離し, 原因遺伝子は *GAL80* であり, その遺伝子に変異が起きると Gal2 が発現し, その Gal2 がキシリトールを取り込むことによりキシリトール資化性となるという機構が, 第1章で明らかとなった。もちろん Gal2 を *TDH3p-GAL2* の遺伝子構造で発現させると期待通りにキシリトール資化性となる。酸素が制限された嫌氣的発酵では, キシリトールからキシロースへ代謝を行う NAD^+ 依存キシリトール脱水素酵素 (*Xyl2*)反応が, NAD^+ 不足で起こりにくいこと, キシロースからキシリトールへの代謝を行う NAD(P)H 依存のキシロースリダクターゼ (*Xyl1*)は, 補酵素 NADP^+ もしくは NAD^+ を生じさせるが, NADP^+ はペントースリン酸回路の側鎖反応 *Zwf1* や次の反応 *Gnd1* や *Gnd2* で NADPH となるので *Xyl1* 酵素反応は続き, *Xyl2* 酵素反応は滞るので, 細胞外にキシリトールが蓄積するという機構が, 第2章で明らかとなった。

このように, キシリトールの蓄積を軽減するには, 嫌氣的な発酵で補酵素 NADH から NAD^+ への酸化を行わせるか (NAD^+ 不足の解消), *Xyl1* 酵素の補酵素要求性を NADH 依存に換え, *Xyl2* 酵素の補酵素要求性 NAD^+ と合わせて補酵素の割合を一定に保たせるとともに両者の酵素活性も合わせる遺伝子操作が必要と考えられる。これま

での前者の変異体では、まだ顕著なキシリトールの蓄積が見られる (32–34)。細胞内の NAD^+ が、ある時間で欠乏していたとしても、キシリトールが細胞外にでなければ、 NADH から NAD^+ への酸化が起こり、キシリトールはキシロースに代謝されキシリトールの蓄積が下がる可能性がある。そのためには、最初にキシリトールの細胞内輸送や細胞外輸送に関わるタンパク質の特定が必要である。ヘキソース輸送系は、3 個のクラスに分類されており、高い親和性を持つクラス (Hxt2, Hxt6, Hxt7 と Gal2), 低い親和性を示すクラス (Hxt1 と Hxt3), 中間のクラス (Hxt4 and Hxt5) である (18, 57–59)。キシロースの取り込みは、高い親和性のヘキソース輸送系 (Hxt7 と Gal2) や中間の親和性を持つヘキソース輸送系 (Hxt4 と Hxt5) が行うが、グルコースの取り込みよりは効率が悪い (12, 13, 18)。細胞外のキシリトールの細胞内への輸送は、ガラクトース輸送タンパク質 Ga2 によって行われる (第 1 章, 60–63)。主要な膜タンパクの一種 (Major intrinsic proteins, MIP) であるアクアグリセロポリンは、細胞膜に存在する細孔をもったタンパク質であるが、イオンなどは通さずに水分子を選択的に通す。このグループに属する Fps1 は、細胞内外へのグリセロールの流出入や細胞外へのキシリトールの排出を行い、細胞内への酢酸や亜ヒ酸、アンチモナイトの流入を行う (47–52, 64–66)。特に、グリセロールの細胞外への流出は、補酵素による酸化還元の均衡を維持するために重要な役割を果たしている。

このように、キシリトール輸送には、ポリオールの輸送を行うと考えられているヘキソース輸送タンパク質やアクアグリセロポリンのグループが掛かり合っている。キシリトールを炭素源とした好氣的発酵では、キシリトールの細胞内輸送が顕著に起こり、キシロースを炭素源とする嫌氣的発酵では、細胞外に顕著なキシリトールの蓄積が見られる (第 2 章)。

そこで、第 3 章では、キシリトールの細胞内や細胞外に輸送するタンパク質を解析する実験デザインを建て、キシリトール輸送に関わるタンパク質を特定し、この変異体とエタノール生産に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。これらの結果を

もとに、グルコースとキシロースから高効率発酵に資する酵母菌の遺伝子構造に関して考察し総括する。

第 2 節 実験材料と実験方法

3.2.1 菌株, プラスミド, オリゴヌクレオチドプライマー

本研究の第 3 章で使用した菌株とプラスミドを表 3-1 に、オリゴヌクレオチドプライマーを表 3-2 に示した。キシリトールの細胞内輸送を行う *S. cerevisiae gal80Δ* 株 SCF202 を本章で用いる株の親株に用い、掛け合わせで *gal80Δ gal2Δ* 株, *gal80Δ gal2Δ fps1Δ* 株を構築し、キシリトールの細胞内輸送や細胞外輸送に対する効果の解析に用いた。pZeo プラスミドは、3 重欠失株の *kanMX* マーカーを Cre タンパク質の発現によって除去するために用いた。*kanMX* を除去した *gal80Δ gal2Δ fps1Δ* 株を受容菌に *kanMX* DNA による形質転換を行い、*gal80Δ gal2Δ fps1Δ hxt15Δ* 株や *gal80Δ gal2Δ fps1Δ hxt11Δ* 株を構築した。*S. cerevisiae* NAM34-4C は耐熱性・耐酸性・乳酸資化性・形質転換能の高いエタノール生産に用いられている実用酵母の誘導體で本研究の親株として用いた (24)。大腸菌 DH10B はプラスミド DNA による形質転換の受容菌として用いた (25)。本研究で用いたプライマー (Genenet, Fukuoka, Japan) は、GENETYX[®]-MAC 遺伝情報処理ソフトウェア/Macintosh 版 Primer3 (ゼネティックス, 東京, 日本) あるいは Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) によってデザインし、表 3-2 に記した。*S. cerevisiae* 遺伝子の塩基配列は、*Saccharomyces* Genome Database (<http://www.yeastgenome.org/>) の情報に基づいた。*S. cerevisiae* NAM34-4C 株のドラフトゲノムの塩基配列は、DDBJ/EMBL/GenBank アクセッション番号 BAUH01000001 から BAUH01000154 に登録されている。

表 3-1 本研究で使用した菌株及びプラスミド

菌株	遺伝子型または表現型	起源, 由来, 引用文献
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
NAM34-4C	<i>MATα</i>	24, 37
SCB38	<i>MATα pho87Δ URA3::XM1^a HEX1-22</i>	25
SCF201	<i>MATα pho87Δ URA3::XM1 HEX1-22</i>	第 2 章 第 2 節
SCF202	<i>MATα pho87Δ URA3::XM1 HEX1-22 gal80Δ::kanMX</i>	第 2 章 第 2 節
SCG25-1B	<i>MATα pho87Δ URA3::XM1 HEX1-22 gal2Δ::kanMX gal80Δ::kanMX</i>	Haploid (RS12 \times SCG22-4C) ^b
SCG103-41C	<i>MATα URA3::XM1 HEX1-22 gal80Δ::kanMX gal2Δ::kanMX fps1Δ::kanMX</i>	Haploid (SCG22-2B \times SCG101-31B)
RS12	<i>MATα pho87Δ URA3::XM1 HEX1-22 gal2Δ::kanMX</i>	Tfm (SCB38: <i>kanMX</i> DNA, G418-r) ^c . The <i>kanMX</i> DNA region of pBlu-LTKTL-TDH3 was amplified using primers F-GAL2 Δ -LTKTL and R-GAL2 Δ -LTKTL.
SCG22-4C	<i>MATα URA3::XM1 HEX1-22 gal80Δ::kanMX</i>	Haploid (SCF202 \times SCD16-4C)
SCD16-4C	<i>MATα URA3::XM1 HEX1-22</i>	Haploid (SCB38 \times SCB105-7A)
SCB105-7A	<i>MATα ura3Δ::XM8^d HEX1-22</i>	25
SCG22-2B	<i>MATα URA3::XM1 HEX1-22 gal80Δ::kanMX</i>	Haploid (SCF202 \times SCD16-4C)
SCG101-31B	<i>MATα URA3::XM1 HEX1-22 gal2Δ::kanMX fps1Δ::kanMX</i>	Diploid (RS12 \times SCE1084-5B) ^e
SCE1084-5B	<i>MATα URA3::XM1 HEX1-22 gpd1Δ gpd2Δ</i>	Diploid (SCE1010 \times SCE1007-11A)

SCE1010	<i>MATa pho87Δ URA3::XM1 HEX1-22 fps1Δ::kanMX</i>	Tfm (SCB38: <i>kanMX</i> DNA, G418-r). The <i>kanMX</i> DNA region of pBlu-LTKTL-TDH3 was amplified using primers F-FPS1Δ-LTKTL and R-FPS1Δ-LTKTL.
SCE1007-11A	<i>MATα URA3::XM1 HEX1-22 gpd1Δ gpd2Δ</i>	Haploid (SCE1006-9B × SCE1003-5A)
SCE1006-9B	<i>MATa pho87Δ URA3::XM1 HEX1-22 gpd1Δ gpd2Δ</i>	A haploid strain obtained from the tetrads which was constructed from the SCE1006 diploid
SCE1006		The <i>kanMX</i> in SCE1005 was removed.
SCE1005	<i>MATa pho87Δ URA3::XM1 HEX1-22 / MATα URA3::XM1 HEX1-22 gpd1Δ::kanMX gpd2Δ::kanMX</i>	Diploid (SCB38 × SCE1003-5A)
SCE1003-5A	<i>MATα URA3::XM1 HEX1-22 gpd1Δ::kanMX gpd2Δ::kanMX</i>	Haploid (SCB38dG2 × SCD16dG1)
SCB38dG2	<i>MATa pho87Δ URA3::XM1 HEX1-22 gpd2Δ::kanMX</i>	Tfm (SCB38: <i>kanMX</i> DNA, G418-r). The <i>kanMX</i> DNA region of pBlu-LTKTL-TDH3 was amplified using primers F-GPD2Δ-LTKTL and R-GPD2Δ-LTKTL.
SCD16dG1	<i>MATa pho87Δ URA3::XM1 HEX1-22 gpd1Δ::kanMX</i>	Tfm (SCB38: <i>kanMX</i> DNA, G418-r). The <i>kanMX</i> DNA region of pBlu-LTKTL-TDH3 was amplified using primers F-GPD1Δ-LTKTL and R-GPD1Δ-LTKTL.
SCG120	<i>MATα URA3::XM1 HEX1-22 gal80Δ gal2Δ fps1Δ</i>	SCG103-41C 株?から <i>kanMX</i> を除去した株
SCG126	<i>MATα URA3::XM1 HEX1-22 gal80Δ gal2Δ fps1Δ hxt11Δ::kanMX</i>	Tfm (SCG120: <i>kanMX</i> DNA, G418-r). The <i>kanMX</i> DNA region of pBlu-LTKTL-TDH3 was amplified using primers F-HXT11Δ-LTKTL and R-HXT11Δ-LTKTL.
SCG127	<i>MATα URA3::XM1 HEX1-22 gal80Δ gal2Δ fps1Δ hxt15Δ::kanMX</i>	Tfm (SCG120: <i>kanMX</i> DNA, G418-r). The <i>kanMX</i> DNA region of pBlu-LTKTL-TDH3 was amplified using primers F-HXT15Δ-LTKTL and R-HXT15Δ-LTKTL.

Escherichia coli

DH10B	F^- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr</i> – <i>hsdRMS mcrBC</i>)	Life technologies, 25
	Φ 80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i>	
	<i>endA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>ara leu</i>)7697	
	<i>galU galK</i> λ - <i>rpsL nupG</i>)	
Plasmid		
pBlu-LTKTL- TDH3	<i>loxP</i> - <i>TEFp</i> - <i>kanMX</i> - <i>TEFt</i> - <i>loxP</i> - <i>TDH3p</i>	25
pZeo	<i>CEN6</i> / <i>ARSH4</i> <i>URA3</i> <i>GAL1p</i> <i>CRE</i> <i>CYC1t</i> <i>bla</i> <i>ori</i> pUC <i>TEF1p</i> EM7 <i>Sh</i> <i>ble</i> <i>CYC1t</i>	25

^a XM1 は第 1 章第 2 節で記載したように、*TDH3p*-*XYL1*-*TDH3t*-*TDH3p*-*XYL2*-*TDH3t*-*TDH3p*-*XKS1*-*TDH3t* の遺伝子構造を持つ DNA 断片であり、*TDH3* プロモーター、*XYL1* (*Scheffersomyces stipitidis* のキシロースリダクターゼ XR をコードする)、*TDH3* ターミネーター、*XYL2* (*S. stipitidis* のキシリトール脱水素酵素 XD をコードする)、*XKS1* (*S. cerevisiae* のキシロキナーゼ XK をコードする)を含む。

^b Haploid (RS12 × SCG22-4C) の記載方法は、第 1 章第 2 節で述べたように、RS12 株と SCG22-4C 株を掛け合わせるにより得た二倍体を 4 孢子解剖して得た一倍体を指し示す。

^c Tfm, 形質転換; Tfm (SCB38: *kanMX* DNA, G418-r) の記載方法は、第 1 章第 2 節で述べたように、SCB38 株の *kanMX* DNA による G418 耐性形質転換体を表す。

^d XM8 の略号は、第 1 章第 2 節で述べたように、*loxP*-*TEFp*-*kanMX*-*TEFt*-*loxP*-*TDH3p*-*XYL1*-*TDH3t*-*TDH3p*-*XYL2*-*TDH3t*-*TDH3p*-*XKS1*-*TDH3t* の遺伝子構造を持つ DNA 断片であり、*loxP*, *TEF* プロモーター、*kanMX*, *TEF* ターミネーター、XM1 を含む。

^e Diploid (RS12 × SCE1084-5B)は、RS12 株と SCE1084-5B 株を掛け合わせて得た二倍体を指し示す。

表 3-2 PCR 増幅に用いたオリゴヌクレオチドプライマー

番号	プライマ名	プライマーの塩基配列 (5'から 3')
1	F-URA3-STR	<u>atgtcgaagctacataaagg</u>
2	R-URA3- DWN300(GAPDH)	<u>gaatttgtgccattagtgggttccgtgtgagaactggtccttcatttgctttgtcca</u>
3	F-GAL80-LTKTL	<u>caatctcgatagttggttcccgttcttccactcccgtcggccgccagctgaag</u>
4	R-GAL80-LTKTL	<u>cgttcgctgcactggggccaagcacagggcaagatgctagccactagtggatct</u>
5	F-Gal2Δ-LTKTL	<u>atggcagttgaggagaacaatatgcctgttgtttcacagcggccgccagctgaa</u>
6	R-Gal2Δ-LTKTL	<u>ttattctagcatggcctgtaccacggttgcgtcatgtagccactagtggatct</u>
7	F-Gal2c-LTKTL	<u>gcccttcccactcaagatggggagcaaatggcattatacggccgccagctgaag</u>
8	R-Gal2c-TDH3p	<u>gctgtgaacaacaggcatalttgttctcctcaactgccatttggttgttatgtgtttattcgaa</u>
9	F-URA3-UP2.1k(EcoI)	tttgaattcttaagggtcaactaaatacagttg
10	R-URA3- DWN2.1k(EcoRI)	tttgaattcccgaactcgatgtggt
11	F-Hxt15-kanMX	<u>tcttctagcctcagttccctggaagaagctcctctctgcccgccagctgaa</u>
12	R-Hxt15-kanMX	<u>atggcaagcgaacagtcctcactagaaattaatgcagataaggccactagtggatct</u>
13	F-Hxt11-kanMX	<u>atgtcaggtttaataatacatccgcaaatgagttatctaggccgccagctgaa</u>
14	R-Hxt11-kanMX	<u>ggacaaaagaaaagacataaaagtatgcaaaaaccagacaaggccactagtggatct</u>

プライマーのアンダーラインで指し示した部分は、染色体 DNA との相同領域である。プライマー9 とプライマー10 のイタリック体で指し示した部分は、制限酵素の 6 塩基の認識部位であり、太字で示した 3 塩基は、制限酵素切断を改善するために加えられた塩基部分である。

3.2.2 培地

S. cerevisiae の増殖用 YPD 培地, 改変キシリトール最少培地 (XLYP), 改変キシロース最少培地 (LYPX), キシロース培地 (YPX), Cre 酵素の発現誘導に用いたガラクトース培地 (YPG), グルコース最少培地 (YPD), キシロース最少培地 (MSX), 合成完全培地 (SC), 孢子形成培地 (SpoK2)は, 第 1 章 第 2 節で示したものをを用いた。培地には必要に応じて最終濃度がアデニンで 50 mg/L, ウラシルで 50 mg/L, アミノ酸で 40 mg/L となるように加えた。G418 二硫酸塩 (G418) は, 必要に応じて最終濃度が 360 mg/L となるように加えた。固形培地には, 培地 1 L 当たり 20 g の寒天を加えた。回分培養に使用したキシロース発酵培地 (MYPX)およびキシリトール発酵培地 (MXYP)は, 第 2 章 第 2 節で示したものをを用いた。大腸菌の増殖培地として用いた Luria-Bertani 培地 (LB), コンピテントな大腸菌の調製に用いた M9 培地は, 第 1 章 第 2 節で示したものを使用し, 固形培地には培地 1 L 当たり 15 g の寒天を加えた。ビタミンは必要に応じて, チアミンを最終濃度 5 mg/L となるように加えた。抗生物質は必要に応じて, 最終濃度がアンピシリン (Amp)とカナマイシン (Km)で 50 µg/mL となるように加えた。

3.2.3 形質転換, 酵母染色体 DNA の調製および酵母遺伝学で用いる標準方法

形質転換, 染色体 DNA の調製および酵母遺伝学で用いる標準方法は, 第 1 章の第 2 節で示した方法を用いた。

3.2.4 High Pure Plasmid Isolation Kit を用いた大腸菌からのプラスミド DNA 抽出

High Pure Plasmid Isolation Kit を用いたプラスミド DNA 抽出は, 第 1 章の第 2 節で示した方法を用いた。

3.2.5 アガロースゲル電気泳動, PCR 法による DNA 断片の増幅, 塩基配列決定

アガロースゲル電気泳動，PCR 法による DNA 断片の増幅，塩基配列決定は，第 1 章の第 2 節で示した方法で行った。

3.2.6 回分培養

回分培養は，第 2 章の第 2 節で示した方法で行った。

3.2.7 HPLC 分析

HPLC 分析は，第 2 章の第 2 節で示した方法で行った。

3.2.8 キシリトールの細胞内への取り込み解析

第 2 章の第 2 節で記載した方法で，キシリトールを炭素源とする好気的な回分培養を行った。培養液の調整およびキシリトール濃度 (g/L)，グリセロール濃度 (g/L)，エタノール濃度 (g/L) の解析は，第 2 章 第 2 節で記載した代謝物解析方法で行った。

3.2.9 キシリトールの細胞外への排出解析

第 2 章の第 2 節で示したキシロースを炭素源とする嫌気的な回分培養を行い，代謝物解析方法で培養液の調整およびキシロース濃度 (g/L)，キシリトール濃度 (g/L)，グリセロール濃度 (g/L)，エタノール濃度 (g/L) を解析した。

第3節 実験デザイン

キシリトールの細胞内輸送を解析する方法およびキシリトールの細胞外排出を解析する方法の実験デザインを構築した。第1章で示したようなキシリトールの資化性に基づく判定法では、主要な細胞内輸送タンパク質を同定することはできる。しかし、増殖を指標にしているため、培地に使用するキシリトールを細胞増殖に必要な生体内分子の炭素源に代謝変換できなければならない。その代謝変換を軽減するために、ペプトンや酵母エキスなどの栄養物を低濃度に培地に加える方法を第1章では考えたが、キシリトール無添加の培地で増殖しないことを確認しておかなければならない。この方法で見いだすことができる輸送系は主要なものに限定される。なぜならば、輸送タンパク質の輸送能が、野生型の20%程度でも増殖できないことが多いこと、主要な輸送系以外の取り込み能は低いことなどによる。そこで、細胞増殖を輸送の判定に用いない方法が望ましい。

取り込み輸送では、細胞内に取り込まれたキシリトールが速やかに代謝されないと細胞内のキシリトール濃度の減少が少ないので取り込みが滞り測定が難しい。キシリトール資化性株 SCF202 (*gal80Δ*) は、好氣的条件でキシリトールを非常によく消費する。なぜならば、第2章で示したようにミトコンドリアの Nde1 や Nde2 などにより NAD⁺が生産されるため、キシリトールからキシルロースへの代謝を行う Xyl2 反応に必要な NAD⁺が欠乏しないためである。*gal80Δ* 株と *gal80Δ gal2Δ* 株を、キシリトールを炭素源として好氣的に培養すると、Gal2 は細胞内へのキシリトール取り込みを行うので、Gal2 を欠く *gal80Δ gal2Δ* 株は、Gal2 を発現している *gal80Δ* 株と比較すると培地中のキシリトールの減少率が低くなると推定できる。もしも Fps1 がキシリトールの細胞内輸送を行うのであれば、*gal80Δ gal2Δ fps1Δ* 株のキシリトール減少率は、*gal80Δ gal2Δ* 株よりも低くなると推定できる。Gal2 や Fps1 を欠いても取り込み輸送が止まらなければ、取り込みに関わると考えられている Hxt15 を欠く 4 重欠損株を構

築し、*gal80Δ gal2Δ fps1Δ* 株のキシリトールの減少と比較すると、前者の方が低いと推定できる。このようにして解析を進めれば、取り込みが完全に止めることができると考えられる。

キシリトールの細胞外排出輸送の検定には、キシロースを炭素源として培養した時に、キシリトールを細胞内に蓄積しやすい条件が求められる。キシロースを炭素源とする培地で SCF202 株を嫌氣的に培養すると第 2 章で示したようにキシリトールを高濃度に蓄積する。なぜならば、Xyl1 酵素の補酵素要求性は、NADPH と NADH のいずれかであり、Xyl1 反応で NAD⁺が生じれば、次の Xyl2 反応は進むが、NADP⁺ができれば Xyl2 反応は進まない。NADP⁺はペントースリン酸側鎖の反応 Zwfl や Gnd1, Gnd2 によって NADPH になるので Xyl1 反応は進むためである。もしも Gal2 がキシリトールの細胞外輸送を行っているならば、炭素源としてキシロースを含む培地で *gal80Δ gal2Δ* 株と *gal80Δ* 株を嫌氣的に培養すれば、*gal80Δ gal2Δ* 株のキシリトール排出濃度は、*gal80Δ* 株のそれよりも低くなることが推定できる。また、Fps1 がキシリトールの排出輸送を行うのであれば、*gal80Δ gal2Δ fps1Δ* 株のキシリトール排出濃度は、*gal80Δ gal2Δ* 株のそれよりも低くなると考えられる。Gal2 や Fps1 を欠いても細胞外への排出輸送が止まらなければ、それら以外の排出輸送タンパク質が存在すると考えられる。もしも Hxt15 がキシリトールの排出輸送を行うのであれば、*gal80Δ gal2Δ fps1Δ hxt15* 株のキシリトール排出濃度は、*gal80Δ gal2Δ fps1Δ* 株のそれよりも低くなると考えられる。このような解析を続けていけば、排出が完全に止まるまで排出輸送タンパク質を同定できることが期待できる。

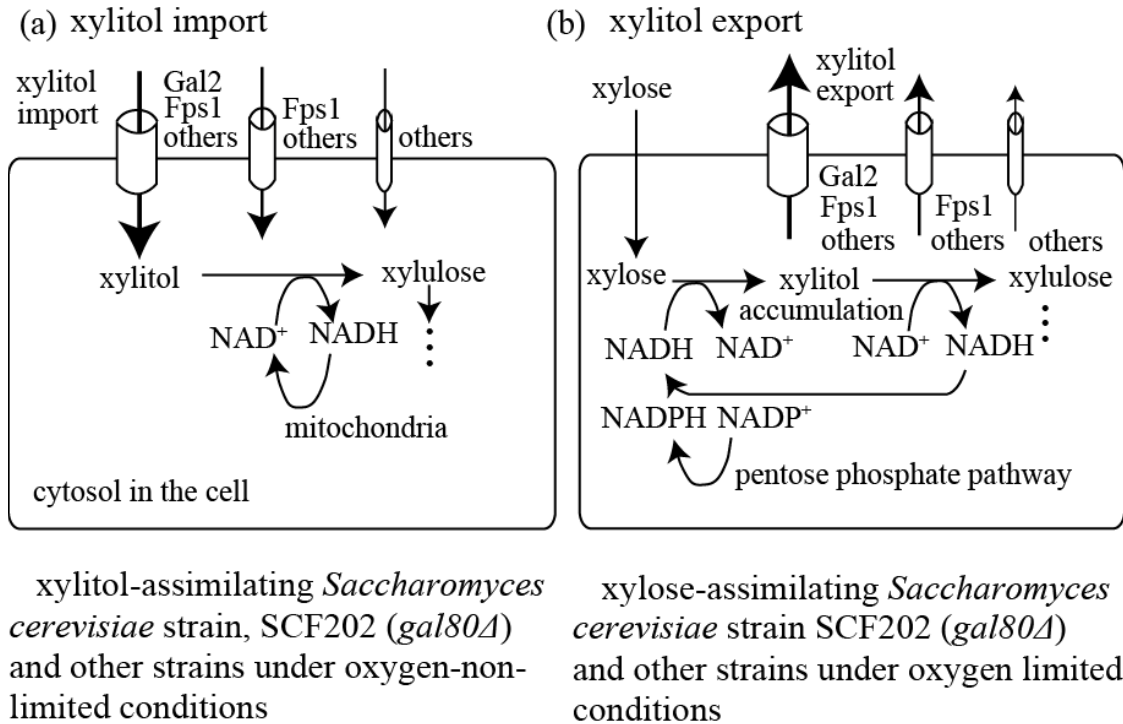


図 3-1 キシリトールの細胞内への取り込みと細胞質からの排出を解析する実験デザイン

(a) キシリトールの細胞内輸送を解析する方法。キシリトール資化性株 SCF202 (*gal80Δ*)は、好気培養においてキシリトールを非常によく消費する。なぜならば、第 2 章で示したようにミトコンドリアの Nde1 や Nde2 などにより NAD⁺の欠乏がないためである。もしも Gal2 と Fps1 が細胞内へキシリトール取り込みを行うならば、Gal2 を欠く *gal80Δ gal2Δ* 株と Gal2 と Fps1 を欠く *gal80Δ gal2Δ fps1Δ* 株を、キシリトールを炭素源として好氣的に培養すると、キシリトール消費は *gal80Δ* 株よりも低くなると推定できる。Gal2 や Fps1 を欠いても取り込み輸送が止まらなければ、取り込みに関わる輸送タンパクを欠くように 4 重欠損株、5 重欠損株と順次加えていき、取り込みが完全に止まるまで解析を続けることができる。

(b) キシリトールの細胞外排出を解析する方法。キシロースを炭素源とする培地で、SCF202 株を嫌氣的に培養すると、第 2 章で示したようにキシリトールを高濃度に蓄積する。もしも Gal2 と Fps1 がキシリトールの細胞外輸送を行っているならば、*gal80Δ gal2Δ* 株と *gal80Δ gal2Δ fps1Δ* 株のキシリトール排出は、*gal80Δ* 株よりも低くなると推定できる。Gal2 や Fps1 を欠いても細胞外への排出輸送が止まらなければ、排出に関わる輸送タンパクを欠くように 4 重欠損株、5 重欠損株と順次加えていき、排出が完全に止まるまで解析を続けることができる。

第4節 結果

3.4.1 キシリトールの取り込みを行う Gal2, Fps1, Hxt15

Gal2 がキシリトールの細胞内取り込みを行うことを第3章 第3節で述べた実験デザインに基づいて調べた。Gal2 を発現している *gal80Δ* 株と Gal2 を欠く *gal80Δ gal2Δ* 二重破壊株を、キシリトールを炭素源とする XMYP 培地 pH 5.0, 温度 30°C で好気的に振盪培養した。対照株 SCF202 は、20 g/L のキシリトールを 96 時間以内にすべて消費した (第1章 図 2-1a, 図 3-2a)。一方、*gal80Δ gal2Δ* 二重破壊株 SCG25-1B では、キシリトール消費割合が *gal80Δ* 株と比較して 81 %減少し、培養開始から 96 時間でも僅か 3.8 g/L のキシリトールの消費を示しただけであった (図 3-2b)。このことにより、少なくとも *gal80Δ* の遺伝背景で、Gal2 はキシリトール輸送において主要な役割を担っていることを示している。Gal2 を欠く遺伝背景で、キシリトールの細胞内輸送を行うタンパク質の候補として、細胞外輸送を行うと考えられている Fps1 を選び、実験デザインに基づいて解析した。*gal80Δ gal2Δ fps1Δ* 三重破壊株 SCG103-41C では、キシリトール消費割合が、*gal80Δ* 株と比較して 88 %減少し、培養開始から 96 時間でも僅か 2.4 g/L 消費しているだけであった (図 3-2c)。従って、Fps1 もキシリトールの取り込み輸送を行っているが、その割合は Gal2 ほどではないことが分かった。キシリトール取り込み輸送を行う候補タンパク質としてポリオール輸送を行うことが推定されている Hxt15 の掛かり合いを実験デザインに基づいて解析した。*gal80Δ gal2Δ fps1Δ hxt15Δ* 四重破壊株 SCG127 では、キシリトールは、培養から 96 時間経っても基本的に消費しなかった (図 3-2d)。従って、Hxt15 もキシリトールの取り込み輸送を行っていることが分かった。これら全ての結果から、Gal2 と Fps1 と Hxt15 が、キシリトール細胞内輸送のほとんどを行っていることが分かった。その中でも Gal2 の輸送に関わる割合が最も多かった。

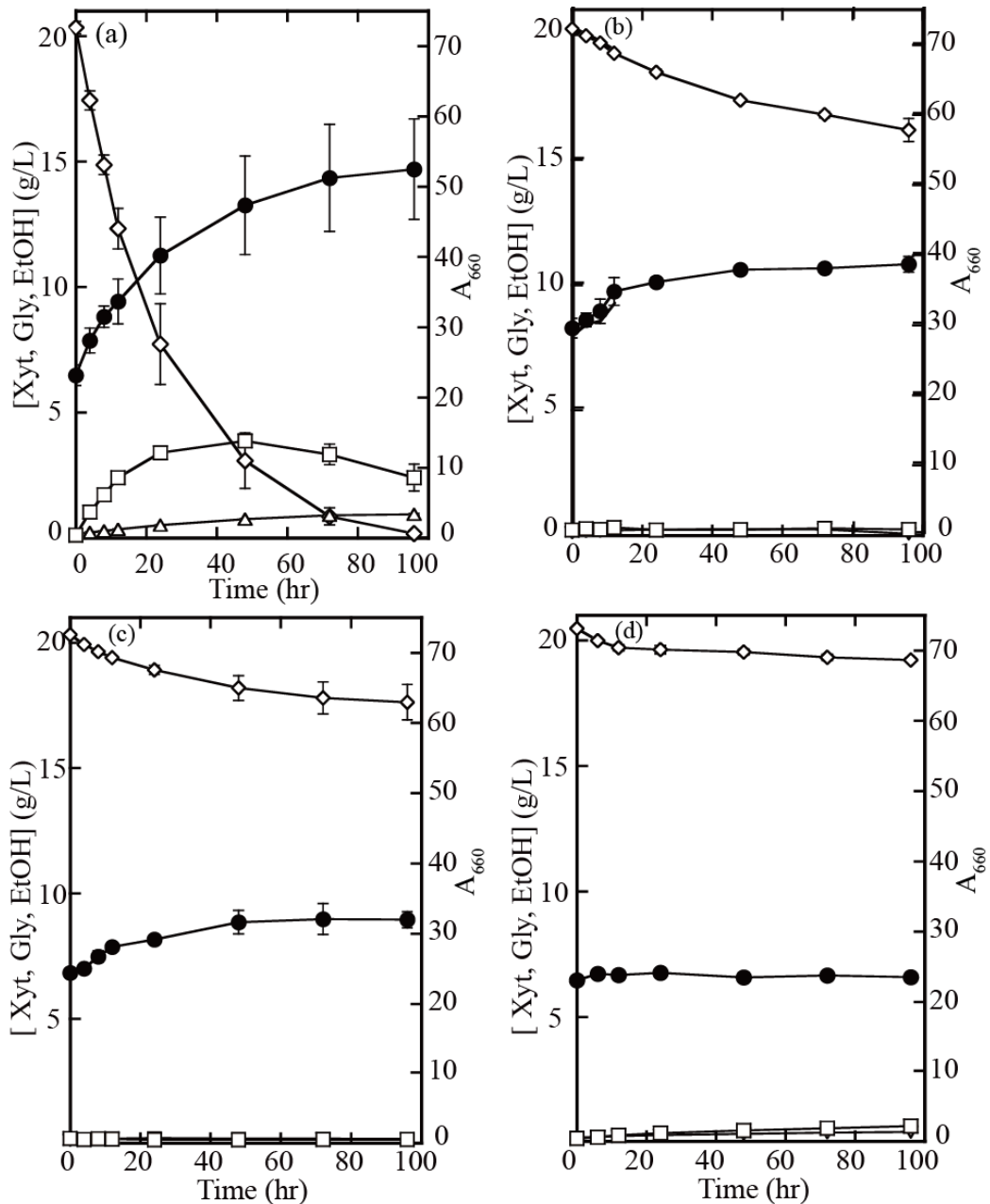


図 3-2 Gal2, Fps1 と Hxt15 は、キシリトールの細胞内輸送を行う。

S. cerevisiae SCF202 株, SCG25-1B 株, SCG103-41C 株, SCG127 株をキシリトールを炭素源とする 60 mL の XMYE 培地 pH 5.0 温度 30°C で好氣的に振盪培養した。(a) SCF202 株, (b) SCG25-1B, (c) SCG103-41C, (d) SCG127 株。データは独立した 3 回の実験の平均値および標準偏差である。記号: ●, 細胞濃度 (A_{660}); ◇, キシリトール濃度 (g/L); □, エタノール濃度 (g/L); ▽, グリセロール濃度 (g/L)。なお, Gal2 と Fps1 と Hxt15 のキシリトール取り込み輸送の比較を容易にするために, 対照株 *gal80Δ* のデータを第 2 章 図 2-2c で既に指し示しているが, 図 3-2a として再び用いた。

3.4.2 キシリトールの細胞外輸送を行う Gal2 と Fps1

細胞内キシリトール輸送を行う Gal2 と Fps1 が、細胞外キシリトール排出輸送も行うかを調べるために、SCF202 株 (*gal80Δ*), SCG25-1B 株 (*gal80Δ gal2Δ*), SCG103-41C 株 (*gal80Δ gal2Δ fps1Δ*)と SCG127 株 (*gal80Δ gal2Δ fps1Δ hxt15Δ*) を MYPX 培地 pH 5.0 温度 30°C で嫌氣的に培養して解析した。キシリトールの細胞外蓄積濃度は、SCF202 株が培養開始から 12 時間で 7.25 g/L となった (図 3-3a)。Gal2 を欠く SCG25-1B (*gal80Δ gal2Δ*)株では、発酵開始から 12 時間で細胞外に蓄積されたキシリトール濃度は 5.30 g/L (SCF202 株より 27 %減少)と *gal80Δ* 株よりも低くなった (図 3-3b)。従って、Gal2 が細胞外へのキシリトール排出輸送を行っている結論した。Gal2 とともに Fps1 も欠く SCG103-41C 株 (*gal80Δ gal2Δ fps1Δ*)では、培養開始から 12 時間で細胞外に蓄積されるキシリトール濃度は、4.27 g/L (SCF202 株より 41 %減少)とさらに減少した (図 3-3c)。すなわち、Fps1 も細胞外キシリトール輸送を行う。このように Gal2 は確かに細胞外輸送を行うこと、Fps1 は細胞内輸送も行うと結論した。

3.4.3 キシリトールの細胞外輸送に対する Hxt15 と Hxt11 の役割

キシリトール取り込みを行う Hxt15 と推定ポリオール輸送タンパク Hxt11 のキシリトール排出における役割を解析した。Gal2, Fps1 と Hxt15 も欠く SCG127 株 (*gal80Δ gal2Δ fps1Δ hxt15Δ*)および Gal2, Fps1 と Hxt11 も欠く SCG126 株 (*gal80Δ gal2Δ fps1Δ hxt11Δ*)は、それぞれ、培養開始から 12 時間で細胞外に蓄積されるキシリトール濃度は、3.90 g/L と 3.80 g/L (SCF202 株より 46%減少と 48 %減少)と親株 SCF103-41C 株の 4.27 g/L よりも減少した。従って、Hxt15 と Hxt11 もキシリトールの排出輸送を行う。しかしながら、Gal2, Fps1, Hxt15 や Gal2, Fps1, Hxt11 を欠くとキシリトールの細胞内への再取り込みがほとんど起こらず、培養開始 12 時間後でもキシリトール濃度が減少しない。それが要因であるのか定かではないが、培養 24 時間

では, *gal80Δ gal2Δ fps1Δ* 株の濃度よりは低い近い濃度になるので詳細な解析が必要である。

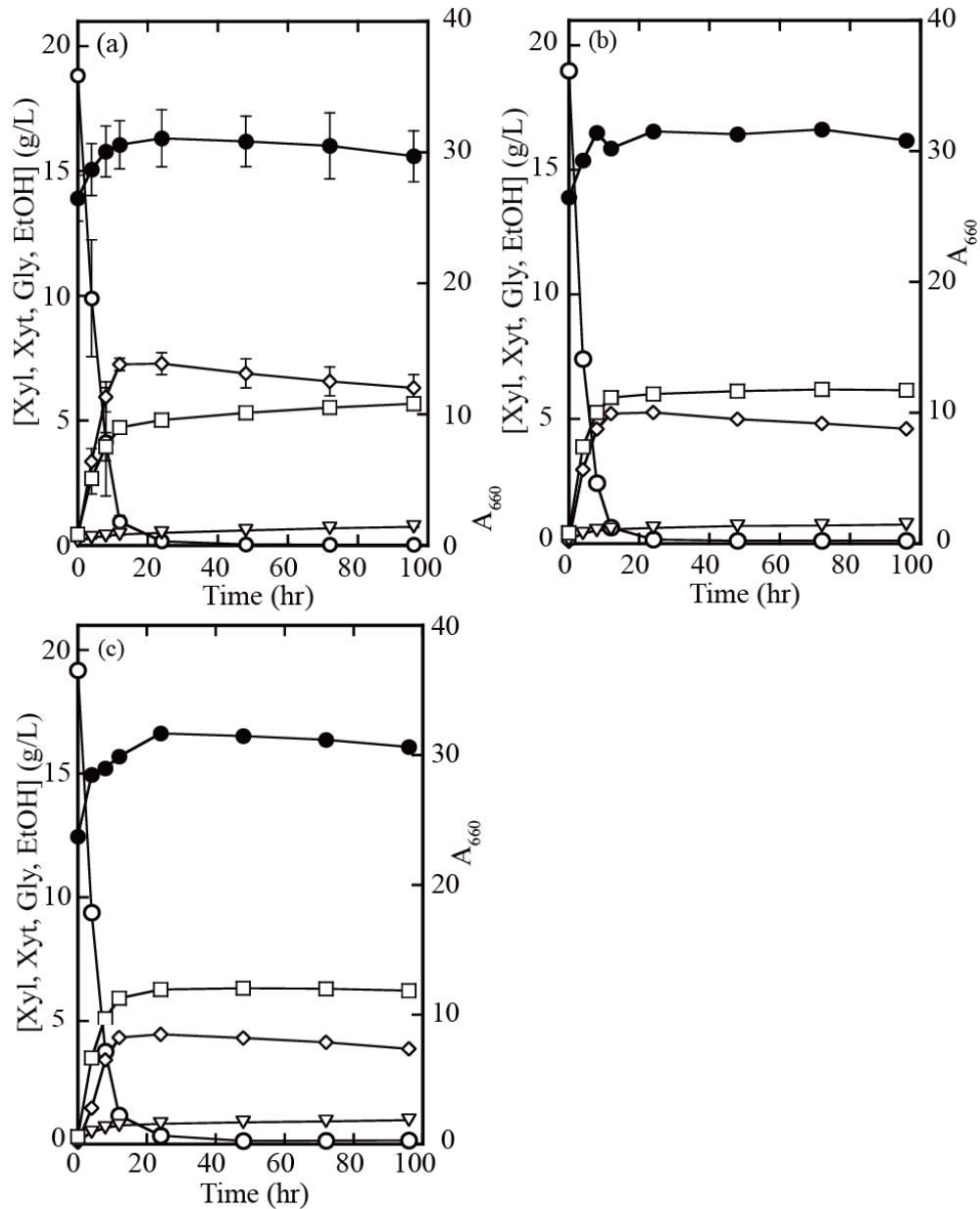


図 3-3 Gal2 と Fps1 は, キシリトールの細胞外輸送を行う。

S. cerevisiae SCF202 株, SCG25-1B 株と SCG103-41C 株をキシロースを炭素源とする 60 mL の MYPX 培地 pH 5.0 温度 30°C で嫌氣的に振盪培養した。(a) SCF202 株, (b) SCG25-1B, (c) SCG103-41C。データは独立した 3 回の実験の平均値および標準偏差である。記号: ●, 細胞濃度 (A_{660}); ○, キシロース濃度 (g/L); ◇, キシリトール濃度 (g/L); □, エタノール濃度 (g/L); ▽, グリセロール濃度 (g/L)。なお, Gal2 と Fps1 と Hxt15 のキシリトール排出輸送の比較を容易にするために, 対照株 *gal80Δ* のデータを第 2 章 図 2-3a で指し示しているが, 図 3-3a として再び用いた。

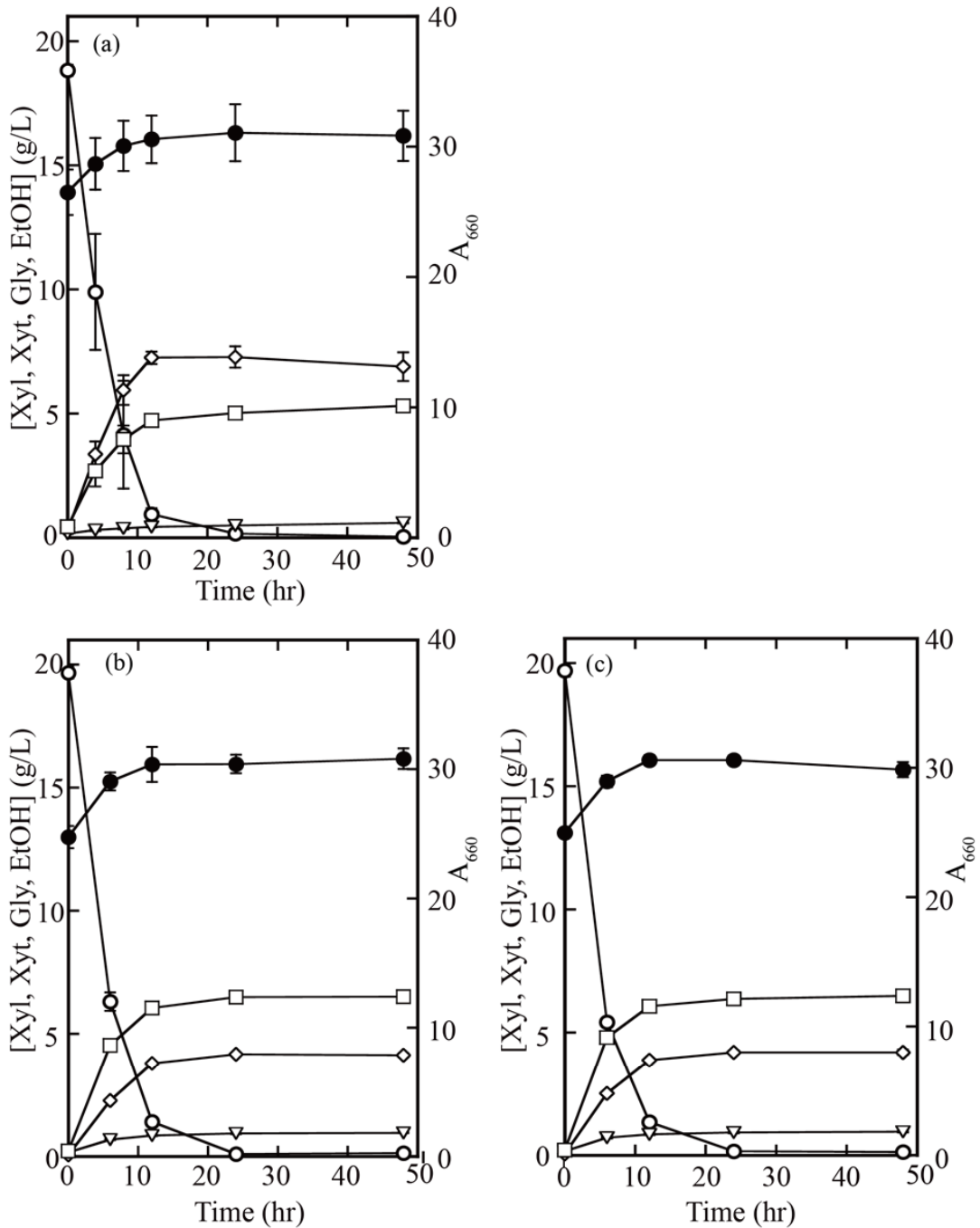


図 3-4 Hxt11 と Hxt15 の、キシリトールの細胞外輸送に対する役割

S. cerevisiae SCF202 株, SCG126 株, SCG127 株をキシロースを炭素源とする 60 mL の

XYMP 培地 pH 5.0 温度 30°C で嫌氣的に振盪培養した。(a) SCF202 株, (b) SCG127, (c)

SCG126。データは独立した 3 回の実験の平均値および標準偏差である。記号: ●, 細胞濃度

(A_{660}); ○, キシロース濃度 (g/L); ◇, キシリトール濃度 (g/L); □, エタノール濃度 (g/L); ▽,

グリセロール濃度 (g/L)。なお, Gal2, Fps1, Hxt11, Hxt15 のキシリトール排出輸送の比較

を容易にするために, 対照株 *gal80Δ* のデータを第 2 章 図 2-3a で指し示しているが, 図 3-4a

として再び用いた。

第5節 考察

バガスやエリアンサスやユーカリなどのバイオマスから燃料用エタノールを生産する際の糖化過程で、グルコースとキシロースが生じる。グルコースをエタノールへ嫌氣的に発酵する時、グルコース代謝が非常に早いと、代謝中間体であるグリセルアルデヒド3-リン酸からジヒドロキシルアセトンリン酸を経てグリセロールができる (30)。発酵の初期に酵母の増殖を行わせると、ジヒドロキシルアセトンリン酸からグリセロール3-リン酸を経て脂肪酸ができる (68-70)。脂肪酸への代謝ではなく Gpp1 (DL-グリセロール-3-リン酸ホスファターゼ) や Gpp2 (Gpp1 のホモログ) によりグリセロール3-リン酸の脱リン酸化が起こればグリセロールができる。このようなエタノール生産過程で生じる副産物グリセロールを蓄積しにくい酵母が構築されている。ジヒドロキシルアセトンリン酸からグリセロール3-リン酸を代謝する酵素 (NAD⁺依存グリセロール-3-リン酸脱水素酵素, Gpd1 や Gpd2 (Gpd1 のホモログ) を欠く酵母である (71-73)。エタノール生産過程で生じる別の副産物キシリトールは、キシロースからの代謝物質であるが、酸化還元不均衡などで細胞内のキシリトール濃度が高くなると細胞外へ排出される (74-79)。このキシリトールの細胞内への取り込みが非常に遅いので副産物となる。そこで、このキシリトールの細胞外への排出を押さえることができると、細胞内で生じている NAD⁺不足も時間の経過とともに生じるであろう NADH の酸化によって解消され、キシリトールからキシロースを経てエタノールへと代謝されるかもしれない。そこで、NAD⁺不足とならないミトコンドリアが活発な好氣的な条件下で、初発細胞濃度の高い発酵法を、キシリトールの細胞内への取り込み解析に用いる実験デザインを建て解析を行った。キシリトールを炭素源とする好氣的な発酵で、Gal2 発現株は最も早くキシリトールを消費した (20 g/L のキシリトールは 96 時間以内に消費した)。Gal2 を欠く細胞では、キシリトールの消費割合の減少は 81%と大きく (消費速度: 3.8 g/L/96 時間)、Gal2 と Fps1 を

欠く細胞では、キシリトールの消費割合の減少はさらに 88%と大きく (消費速度: 2.4 g/L/96 時間), Gal2 と Fps1 と Hxt15 では, 96 時間後でもほとんど消費しなくなった。このように, キシリトールの細胞内への取り込みは, 消費速度から推定すると Gal2 が最も高く, 次に Hxt15 であり, Fps1 が最も低いと考えられる。キシリトールの資化性を細胞内輸送のスクリーニング法にして, Hxt15 と Hxt11 がキシリトール輸送を行うことが最近見いだされた (11)。17 個のヘキソース輸送系を破壊し (*hxt1-17Δ*), ガラクトース輸送系を破壊し (*gal2Δ*), グリセロールの輸送系を破壊し (*ydr536WΔ*)(80), α -グルコシドトランスポーターを破壊し (*agt1Δ*)(81), α -グルコシド糖化酵素である MPH2 と MPH3 を破壊 (*mph2Δ* と *mph3Δ*)した遺伝背景に, マルチコピープラスミド p426H7 (2 μ m プラスミド, *URA3*)に *HXT15* などを 1 個ずつクローン化し, かつキシリトールが細胞内に取り込まれたときに代謝が進むように p425H7 (2 μ m プラスミド, *URA3*) にポリオール脱水素酵素を発現させたプラスミドを持つ株でキシリトール資化性を検定している。このような検定では, *HXT15* と *HXT11* を, それぞれ p427H7 に持つ株が, 4 世代増えるのに 270 時間かかったが, 資化性が見られている ($A_{600}=3.0$ 弱/ $A_{600}=0.2$)(11)。一方, Gal2 を発現する株では, 染色体上の 1 コピーの *GAL2* 株で, 9 世代増殖するのに 60 時間もかからない ($A_{660}=3.0$ / $A_{660}=0.014$)(第 1 章)。このような比較からも Gal2 の細胞内輸送が最も高く, 次に Hxt15 であり, Fps1 が最も低いと考えられる。

Xyl1 酵素反応に必要な NADPH や NADH が不足しないが, Xyl2 酵素の反応に必要な NAD⁺が不足となる嫌気的な条件下で初発細胞濃度の高い発酵法を, キシリトールの細胞外排出輸送を解析する実験デザインを建てた。20 g/L キシロースを炭素源とする好気的な発酵で, Gal2 発現株は 7.25 g/L のキシリトールを細胞外に排出した (培養開始から 12 時間後)。Gal2 を欠く細胞では, キシリトールの細胞外濃度は減少し (培養 12 時間後で 5.30 g/L), Gal2 と Fps1 を欠く細胞では, キシリトールの細胞外濃度は さらに減少した (培養 12 時間後で 4.27 g/L), Gal2 と Fps1 と Hxt15 を

欠く株や Gal2 と Fps1 と Hxt11 を欠く株では、それぞれ、キシリトールの蓄積濃度は、3.80 g/L と 3.90 g/L となった。このように、Gal2, Fps1, Hxt15, Hxt11 は、キシリトールの細胞外への排出輸送を行うことが分かった。しかしながら、排出輸送は止まっていない。

第6節 要約

キシリトールの細胞内外輸送を行うタンパク質を特定する実験デザインを建てた。キシリトールの細胞内輸送が継続的に起こるような以下の条件を設定した: 1) キシリトール代謝反応を行う NAD^+ 依存 Xyl2 酵素に必要な NAD^+ が不足しない好氣的発酵を行う; 2) 細胞増殖を伴わないように高濃度の細胞を用いる; 3) キシリトールを炭素源とする培地で培養し, 残存キシリトール濃度を測定する。キシリトール輸送タンパク Gal2 とキシリトール排出輸送タンパク Fps1 について細胞内へのキシリトール輸送を解析した。Gal2 を発現する *gal80Δ* 株は, 96 時間以内にキシリトールを消費したが, Gal2 を欠く *gal80Δ gal2Δ* 二重変異株では, 96 時間後でも 3.8 g/L しか消費しなかった。Fps1 も欠く三重変異株 *gal80Δ gal2Δ fps1Δ* では, 96 時間後でも 2.4 g/L しか消費しなかった。このように, Gal2 と Fps1 が, 細胞内輸送タンパク質である。さらに, ヘキソース輸送タンパク Hxt15 を欠くと細胞内輸送は, 基本的に停止した。

細胞外へのキシリトール輸送は, キシロースを炭素源として嫌氣的に培養し, キシリトールが細胞外に排出されやすい以下の条件を設定した: 1) NAD^+ 依存 Xyl2 酵素に必要な NAD^+ が不足する嫌氣的条件で培養する; 2) キシロースからキシリトールへの代謝酵素 NAD(P)H 依存 Xyl1 と NAD^+ 依存 Xyl2 酵素の反応でキシリトールが蓄積されやすくする; 3) 細胞増殖を伴わないように高濃度の細胞を用いる; 4) キシロースを炭素源とする培地で培養し, 培養液中に蓄積されるキシリトール濃度を測定する。キシリトールの蓄積濃度は, *gal80Δ* 株では, 培養 24 時間で 7.25 g/L, *gal80Δ gal2Δ* 二重変異株では, 5.30 g/L, 三重変異株 *gal80Δ gal2Δ fps1Δ* では, 4.27 g/L, 四重変異株 *gal80Δ gal2Δ fps1Δ hxt15Δ* と *gal80Δ gal2Δ fps1Δ hxt11Δ* では, それぞれ 3.80 g/L と 3.90 g/L となった。このように, Gal2, Fps1, Hxt15, Hxt11 は, 細胞外輸送タンパク質であった。

総括

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。バガス・エリアンサスなどを前処理し、酵素での糖化と酵母菌での複発酵を並行して行うプロセスは、環境に優しく有力なエタノール生産法である。糖化でグルコースとキシロースが約2:1の割合でできるが、野生型の *Saccharomyces cerevisiae* はキシロースを代謝できない。実用酵母菌 NAM34-4C は、耐熱性・耐酸性・高形質転換能で、同質系統株が作成されている。またドラフトゲノム配列も解かれており、遺伝解析や遺伝子操作・次世代シーケンサ解析や系統学的解析・自然突然変異体の変異特定を容易に行うことができる。その誘導株に *Scheffersomyces stipitis* の *XYL1* (キシロースリダクターゼをコードする) と *XYL2* (キシリトール脱水素酵素をコードする) と内在性の *XKS1* (キシロキナーゼをコードする) を高発現するようにして染色体に組換えた株はキシロール資化性を示す。また高効率キシロース資化性突然変異体取得とその特定も行われている。取得株はグルコースとキシロースを高効率にエタノール変換するが、副産物としてキシリトールができる。これを軽減すればエタノール収率が高くなると推定される。キシロースをキシリトールに代謝する NAD(P)H 依存 Xyl1 酵素とキシリトールをキシロースに代謝する NAD⁺依存 Xyl2 酵素の反応に必要な補酵素の不均衡が、キシリトール蓄積の要因と推定されているが明確ではない。そこで、キシリトール資化性の自然突然変異体を分離して原因を解明し、キシロースとキシリトールの代謝と補酵素との関係を解析し、キシリトール輸送系を解析し、副産物軽減と高効率発酵に資する遺伝子構造解明を目的とした。

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

することを目的とした。高効率キシロース資化性菌はキシリトールを資化しなかった。そこで、キシリトール資化性の自然突然変異体を3株分離した。次世代シーケンサ解析と系統解析で原因候補変異を解読し、変異体に共通した異なるミスセンス変異 Gal80 Ile215Asn, Arg153Leu, Arg153Ser を *GAL80* 内に見いだした。それが原因遺伝子と推定し、*gal80Δ* 株を構築してキシリトール資化性を示すことを明らかにした。遺伝解析から変異は劣性であり、*gal80Δ* 株と変異株との相補性試験から、原因遺伝子を *GAL80* と特定した。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、キシリトールを細胞内に取り込むと考え、*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 高発現させると資化性となることを示した。

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代謝の関係を解明するために、キシリトール資化性株の好気的および嫌氣的回分培養を、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で行った。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の消費が見られ、そのような培養液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た。すなわち、嫌気発酵では Xyl2 酵素反応に必要な NAD^+ が不足し、キシリトールが蓄積することが分かった。

第3章では、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た。好気条件下で発酵すると、Xyl2 酵素反応に必要な NAD^+ が不足せず、キシリトール代謝が早くなり細胞内にキシリトールが継続して取り込まれる。この条件下で細胞内輸送を解析すると、Gal2 を欠く株では培地中の 84%のキシリトールが残存し、さらに Fps1 を欠くと 88%のキシリトールが残存し、Hxt15 も欠くと消費しなくなった。従って、これら3個のタンパク質が取り込み輸送を行う。嫌気条件下でキシロースを炭素源として発酵すると、Xyl2 酵素反応に必要な NAD^+ が不足し、細胞外にキシリトールを多く排出する。その条件下でキシリトールの細胞外輸送を解析すると、Gal2 発

現株では、キシリトールの細胞外濃度は 7.3 g/L, Gal2 を欠くと 5.3 g/L, Fps1 も欠くと 4.3 g/L, Hxt11 または Hxt15 もそれぞれ欠くと 3.9 g/L または 3.8 g/L となった。このように 4 個のタンパク質は排出輸送を行うが、それ以外にもまだあることが分かった。以上のことから、C5C6 糖の高効率発酵に資する酵母菌の遺伝子構造として、キシロース代謝に必要な *XYL1 XYL2 XKS1*, 高効率キシロース代謝に必要な *HEX1-22* および/または *SXMI-32*, グリセロール副産物軽減のために *gpd1Δ gpd2Δ* を持つことに加えて、本研究で得られたキシリトール副産物軽減のために *gal80Δ gal2Δ, fps1Δ, hxt15Δ, hxt11Δ* の組み合わせを駆使することが必要であると推定することができた。キシリトールの排出輸送は、完全には止まっていないので詳細な解析が必要であると考えられる。特に、キシロースの取り込みに関わっているヘキソース細胞内輸送タンパク質 Hxt7 や Hxt5, 少し大きな糖輸送を行う *AGT1* (α -グルコシド輸送体で別名マルトース輸送体をコードし, マルトトリオースなど基質特異性は低い), *MPH2* (α -グルコシド透過酵素をコードし, マルトース, マルトトリオース, α -メチルグルコシド, ツラノースを輸送する)や *MPH3* (*MPH2* のホモログでほとんど配列が一致している) は, 有力な候補ではないかと推定している。

引用文献

1. **Canilha, L., Chandel, A. K., dos Santos Milessi, T. S., Antunes, F. A. F., da Costa Freitas, W. L., das Gracas Almeida Felipe, M., and da Silva, S. S.:** Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: an overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification, and ethanol fermentation, *J. Biomed. Biotechnol.*, **2012**, doi: 10.1155/2012/989572.
2. **Aden, A. and Foust, T.:** Technoeconomic analysis of the dilute sulfuric acid and enzymatic hydrolysis process for the conversion of corn stover to ethanol, *Cellulose*, **16**, 535–545 (2009).
3. **Pia-Maria Bondesson, P-M. and Galbe, M.:** Process design of SSCF for ethanol production from steam-pretreated, acetic-acid-impregnated wheat straw, *Biotechnol. Biofuels*, **9**: 222 doi 10.1186/s13068-016-0635-6 (2016).
4. **Gubicza, K., Nieves, I. U., Sagues, W.J., Barta, Z., Shanmugam, K. T., Ingram, L. O.:** Techno-economic analysis of ethanol production from sugarcane bagasse using a liquefaction plus simultaneous saccharification and co-fermentation process, *Bioresour. Technol.*, **208**, 42–48 (2016).
5. **Sun, Z-Y., Wang, T., Tan, L., Tang, Y-Q., and Kida, K.:** Development of a more efficient process for production of fuel ethanol from bamboo, *Bioprocess. Biosyst. Eng.*, **38**, 1033–1043 (2015).
6. **Chu, B. C. H. and Lee, H.:** Genetic improvement of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose fermentation, *Biotechnol. Advances*, **25**, 425–441 (2007).
7. **Zhou, H., Cheng, J-s., Wang, B. L., Fink, G. R., and Stephanopoulos, G.:** Xylose isomerase overexpression along with engineering of the pentose phosphate pathway and evolutionary engineering enable rapid xylose utilization and ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*, *Metab., Eng.*, **14**, 611–622 (2012).

8. **Kuyper, M., Harhangi, H. R., Stave, A. K., Winkler, A. A., Jetten, M. S. M., de Laat, W. T. A. M., den Ridder, J. J. J., Op den Camp, H. J. M., van Dijken, J. P., Pronk, J. T.:** High-level functional expression of a fungal xylose isomerase: the key to efficient ethanolic fermentation of xylose by *Saccharomyces cerevisiae*? *FEMS Yeast Res.*, **4**, 69–78 (2003).
9. **Madhavan, A., Tamalampudi, S., Ushida, K., Kanai, D., Katahira, S., Srivastava, A., Fukuda, H., Bisaria, V. S., and Kondo, A.:** Xylose isomerase from polycentric fungus *Orpinomyces*: gene sequencing, cloning, and expression in *Saccharomyces cerevisiae* for bioconversion of xylose to ethanol, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **82**, 1067–1078 (2009).
10. **Brat, D., Boles, E., and Wiedemann, B.:** Functional expression of a bacterial xylose isomerase in *Saccharomyces cerevisiae*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**, 2304–2311 (2009).
11. **Jordan, P., Choe, J. Y., Boles, E., and Oreb, M.:** Hxt13, Hxt15, Hxt16 and Hxt17 from *Saccharomyces cerevisiae* represent a novel type of polyol transporters, **21**: 6 doi: 10.1038/srep23502., *Sci. Rep.*, (2016).
12. **Hamacher, T., Becker, J., Gardonyi, M., Hahn-Hägerdal, B., and Boles, E.:** Characterization of the xylose-transporting properties of yeast hexose transporters and their influence on xylose utilization, *Microbiology*, **148**, 2783–2788 (2002).
13. **Busturia, A. and Lagunas, R.:** Catabolite inactivation of the glucose transport system in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Gen. Microbiol.*, **132**, 379–85 (1986).
14. **Saloheimo, A., Rauta, J., Stasyk, O. V., Sibirny, A. A., Penttilä, M., Ruohonen, L.:** Xylose transport studies with xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing heterologous and homologous permeases, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **74**, 1041–1052 (2007).
15. **Leandro, M. J., Gonçalves, P., and Spencer-Martins, I.:** Two glucose/xylose transporter genes from the yeast *Candida intermedia*: first molecular characterization of a yeast xylose–H⁺ symporter, *Biochem. J.*, **395**, 543–549 (2006).
16. **Leandro, M. J., Spencer-Martins, I., and Gonçalves, P.:** The expression in

Saccharomyces cerevisiae of a glucose/xylose symporter from *Candida intermedia* is affected by the presence of a glucose/xylose facilitator, *Microbiol.*, **154**, 1646–1655 (2008).

17. 平成 19–平成 20 年度 新エネルギー技術研究開発/新エネルギーベンチャー技術革新事業（バイオマス）成果報告書，九州発ビレッジテクノロジー構築に向けた竹からのバイオエタノール変換の技術開発，（委託先）崇城大学，国立大学法人熊本大学大学院

18. **Jin, Y-S., Ni, H., Laplaza, J. M., and Jeffries, T. W.:** Optimal growth and ethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* require moderate D-xylose kinase activity, *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 495–503 (2003).

19. **Ni, H., Laplaza, J.M., and Jeffries, T. W.:** Transposon mutagenesis to improve the growth of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* on D-Xylose, *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 2061–2066 (2007).

20. **Johansson, B. and Hahn-Hagerdal, B.:** Overproduction of pentose phosphate pathway enzymes using a new *CRE-loxP* expression vector for repeated genomic integration in *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast*, **19**, 225–231 (2002).

21. **Novy, V., Krahulec, S., Wegleiter, M., Müller, G., Longus, K., Klimacek, M., and Nidetzky, B.:** Process intensification through microbial strain evolution: mixed glucose-xylose fermentation in wheat straw hydrolyzates by three generations of recombinant *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotechnol. Biofuels*, **7**: 49, (2014).

22. **Romaní, A., Pereira, F., Johansson, B., Domingues, L.:** Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* ethanol strains PE-2 and CAT-1 for efficient lignocellulosic fermentation, *Bioresour. Technol.*, **179**, 150–158 (2015).

23. **Kida, K., Kume, K., Morimura, S., and Sonoda, Y.:** Repeated-batch fermentation process using a thermotolerant flocculating yeast constructed by protoplast fusion, *J. Biosci. Bioeng.*, **74**, 169–173 (1992).

24. **Tomitaka, M., Taguchi, H., Matsuoka, M., Morimura, S., Kida, K., and Akamatsu,**

- T.:** Potent L-lactic acid assimilation of the fermentative and heterothallic haploid yeast *Saccharomyces cerevisiae* NAM34-4C, *J. Biosci. Bioeng.*, **117(1)**, 65–70 (2014).
25. **Tomitaka, M., Taguchi, H., Fukuda, K., Akamatsu, T., and Kida, K.:** Isolation and characterization of a mutant recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain with high efficiency xylose utilization, *J. Biosci. Bioeng.*, **116(6)**, 706–715 (2013).
26. **富高正隆,** 高効率キシロース資化を導く *Saccharomyces cerevisiae* 突然変異体の分離とその解析 2014年3月 学位論文 (工学) (2014).
27. 扇谷悟, 鎌形洋一, 藤森一浩, 佐原健彦, 赤松隆, 田口久貴: キシロース発酵能が強化された酵母とその利用, 公開番号, 2015-033342 (公開日 19, Feb, 2015)
28. 扇谷悟, 鎌形洋一, 藤森一浩, 佐原健彦, 赤松隆, 田口久貴: キシロース発酵能が強化された酵母とその利用, 公告番号, WO2015020216 A1 (公開日 12, Feb, 2015)
29. **Weusthuis, R. A., Visser, W., Pronk, J. T., Scheffers, W. A., and van Dijken, J. P.:** Effects of oxygen limitation on sugar metabolism in yeasts: a continuous-culture study of the Kluyver effect, *Microbiol.*, **140**, 703–715 (1994).
30. **Vemuri, G. N., Eiteman, M. A., McEwen, J. E., Olsson, L., and Nielsen, J.:** Increasing NADH oxidation reduces overflow metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104(7)**, 2402–2407 (2007).
31. **富田麻衣,** 高効率にエタノールを生産する *Saccharomyces cerevisiae* の構築 平成26年度 崇城大学 卒業論文 (2014).
32. **Watanabe, S., Saleh, A. A., Pack, S. P., Annaluru, N., Kodaki, T., and Makino, K.:** Ethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing protein-engineered NADH-preferring xylose reductase from *Pichia stipitis*, *Microbiology*, **153**, 3044–3054 (2007).
33. **Watanabe, S., Kodaki, T., and Makino, K.:** Complete reversal of coenzyme specificity of xylitol dehydrogenase and increase of thermostability by the introduction of structural zinc, *J. Biol. Chem.*, **280**, 10340–10349 (2005).

34. **Khattab, S. M. R., Watanabe, S., Saimura, M., and Kodaki, T.:** A novel strictly NADPH-dependent *Pichia stipitis* xylose reductase constructed by site-directed mutagenesis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **404**, 634–637 (2011).
35. **Henningsen, B. M., Hon, S., Covalla, S. F., Sonu, C., Argyros, D. A., Barrett, T. F., Wiswall, E., Froehlich, A. C., and Zelle, R. M.:** Increasing anaerobic acetate consumption and ethanol yields in *Saccharomyces cerevisiae* with NADPH-specific alcohol dehydrogenase, *Appl. Environ. Microbiol.*, **81(23)**, 8108–8117 (2015).
36. **Chiang, L-C., Gong, C-S., Chen, L-F., and Tsao, G. T.:** D-xylulose fermentation to ethanol by *Saccharomyces cerevisiae*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **42**, 284–289 (1981).
37. **Sahara, T., Fujimori, K. E., Nezu, M., Tsukahara, M., Tochigi, Y., Ohgiya, S., Tang, Y-Q., Kida, K., Taguchi, H., Akamatsu, T., and Kamagata, Y.:** Draft genome sequence of *Saccharomyces cerevisiae* NAM34–4C, a lactic acid-assimilating industrial yeast strain, *Genome A.*, **2**, e01145–13 (2014).
38. **Maniatis, T., Fritsch, E. F., and Sambrook, J.:** *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory (1982).
39. **Gietz, R. D. and Woods, R. A.:** Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method, *Methods Enzymol.*, **350**, 87–96 (2002).
40. **Guldener, U., Heck, S., Fielder T, Beinhauer, J., and Hegemann, J. H.:** A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast, *Nucleic Acids Res.*, **24**, 2519–2524 (1996).
41. **Tschopp, J. F., Emr, S. D., Field, C., and Scheckman, R.:** *GAL2* codes for a membrane-bound subunit of the galactose permease in *Saccharomyces cerevisiae*, **166**, 313–318 (1986).
42. **Lohr, D., Venkov, P., and Zlatanova, J.:** Transcriptional regulation in the yeast *GAL* gene family: a complex genetic network, *FASEB J.*, **9**, 777–787 (1995).
43. **Ramos, J., Szkutnicka, K., and Cirillo, V. P.:** Relationship between low- and high-affinity glucose transport systems of *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Bacteriol.*, **170**, 5375–5377

(1988).

44. **Ramos, J., Szkutnicka, K., and Cirillo, V. P.:** Characteristics of galactose transport in *Saccharomyces cerevisiae* cells and reconstituted lipid vesicles, *J. Bacteriol.*, **171**, 3539–3544

(1988).

45. **Sedlak, M. and Ho, N.W.:** Characterization of the effectiveness of hexose transporters for transporting xylose during glucose and xylose co-fermentation by a recombinant *Saccharomyces* yeast, *Yeast*, **21**, 671–684 (2004).

46. **Maier, A., Volker, B., Boles, E., and Fuhrmann, G. F.:** Characterisation of glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae* with plasma membrane vesicles (countertransport) and intact cells (initial uptake) with single Hxt1, Hxt2, Hxt3, Hxt4, Hxt6, Hxt7 or Gal2 transporters, *FEMS Yeast Research*, **2**, 539–550 (2002).

47. **Hedfalk, K., Bill, R. M., Mullins, J. G. L., Karlgren, S., Filipsson, C., Bergstrom, J., Tamas, M. J., Rydstrom, J., and Hohmann, S.:** A regulatory domain in the C-terminal extension of the yeast glycerol channel Fps1p, *J. Biol. Chem.*, **279**, 14954–14960 (2004).

48. **Andre, B.:** An overview of membrane transport proteins in *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast*, **11**, 1575–1611 (1995).

49. **Wysocki, R., Chery, C. C., Wawrzycka, D., Hulle, M. V., Cornelis, R., Thevelein, J. M., and Tamas, M. J.:** The glycerol channel Fps1p mediates the uptake of arsenite and antimonite in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol Microbiol.*, **40**, 1391–1401 (2001).

50. **Oliveira, R., Lages, F., Silva-Graca, M., and Lucas, C.:** Fps1p channel is the mediator of the major part of glycerol passive diffusion in *Saccharomyces cerevisiae*: artefacts and re-definitions, *Biochim. Biophys. Acta*, **1613**, 57–71 (2003).

51. **Navarrete, C., Nielsen J., and Siewers, V.:** Enhanced ethanol production and reduced glycerol formation in *fps1Δ* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* engineered for improved redox balancing, *AMB express*, **4**: 86 (2014)

52. **Wei, N., Xu, H., Kim, S. R., and Jina, Y-S.:** Deletion of *FPS1*, encoding

- aquaglyceroporin Fps1p, improves xylose fermentation by engineered *Saccharomyces cerevisiae*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **79**, 3193–3201 (2013).
- 50 (53). **Alting-Mees, M. A. and Short, J. M.:** pBluescript II: gene mapping vectors, *Nucleic Acids Res.*, **17**, 9494 (1989).
53. **Ballester-Tomás, L., Randez-Gil, F., Pérez-Torrado, R., and Prieto, J. A.:** Redox engineering by ectopic expression of glutamate dehydrogenase genes links NADPH availability and NADH oxidation with cold growth in *Saccharomyces cerevisiae*, *Microb. Cell Fact.*, **14**: 100 (2015).
54. **Bruinenberg, P. M., Debot, P. H. M., Vandijken, J. P., and Scheffers, W. A.:** NADH linked aldose reductase – the key to anaerobic alcoholic fermentation of xylose by yeasts, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **19**, 256–260 (1984).
55. **Bruinenberg, P. M., de Bot, P. H. M., van Dijken, J. P., and Scheffers, W. A.:** The role of redox balances in the anaerobic fermentation of xylose by yeasts, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **18**, 287–292 (1983).
56. **Ballester-Tomás, L., Randez-Gil, F., Pérez-Torrado, R., and Prieto J. A.:** Redox engineering by ectopic expression of glutamate dehydrogenase genes links NADPH availability and NADH oxidation with cold growth in *Saccharomyces cerevisiae*, *Microb. Cell. Fact.*, **14**:100. doi: 10.1186/s12934-015-0289-2. (2015).
57. **Bisson, L. F., Coons, D. M., Kruckeberg, A. L., and Lewis, D. A.:** Yeast sugar transporters, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **28**, 259–308 (1993).
58. **Boles, E. and Hollenberg, C. P.:** The molecular genetics of hexose transport in yeasts, *FEMS Microbiol. Rev.*, **21**, 85–111 (1997).
59. **Lee, W. J., Kim, M. D., Ryu, Y. W., Bisson, L. F., and Seo, J. H.:** Kinetic studies on glucose and xylose transport in *Saccharomyces cerevisiae*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **60**,

186–191 (2002).

60. **Ramos, J., Szkutnicka, K., and Cirillo, V.P.:** Relationship between low- and high-affinity glucose transport systems of *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Bacteriol.*, **170(11)**, 5375–5377 (1988).

61. **Ramos, J., Szkutnicka, K., and Cirillo, V.P.:** Characteristics of galactose transport in *Saccharomyces cerevisiae* cells and reconstituted lipid vesicles, **171(6)**, 3539–3544 (1989).

62. **Hawkins, K. M. and Smolke, C. D.:** The Regulatory roles of the galactose permease and kinase in the induction response of the *GAL* network in *Saccharomyces cerevisiae*, **281(19)**, 13485–13492 (2006).

63. **Peng, G. and Hopper, J. E.:** Gene activation by interaction of an inhibitor with a cytoplasmic signaling protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99(13)**, 8548–8553 (2002).

64. **Wang, C., Bao, X., Li, Y., Jiao, C., Hou, J., Zhang, Q., Zhang, W., Liu, W., and Shen, Y.:** Cloning and characterization of heterologous transporters in *Saccharomyces cerevisiae* and identification of important amino acids for xylose utilization, *Metab. Eng.*, **30**, 79–88 (2015).

65. **Moriya, H. and Johnston, M.:** Glucose sensing and signaling in *Saccharomyces cerevisiae* through the Rgt2 glucose sensor and casein kinase I, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 1572–1577 (2000).

66. **Ozcan, S., Dover, J., Rosenwald, A. G., Wolfl, S., and Johnston, M.:** Two glucose transporters in *Saccharomyces cerevisiae* are glucose sensors that generate a signal for induction of gene expression, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 12428–12432 (1996).

67. **Pagac, M., Vazquez, H. M., Bochud, A., Roubaty, C., Knöpfli, C., Vionnet, C., and Conzelmann, A.:** Topology of the microsomal glycerol-3-phosphate acyltransferase Gpt2p/Gat1p of *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol Microbiol.*, **86(5)**, 1156–1166 (2012).

68. **Zheng, Z. and Zou, J.:** The initial step of the glycerolipid pathway: identification of glycerol 3-phosphate/dihydroxyacetone phosphate dual substrate acyltransferases in

Saccharomyces cerevisiae, J. Biol. Chem., **276(45)**, 41710–41716 (2001).

69. **Athenstaedt, K. and Daum, G.:** 1-Acyldihydroxyacetone-phosphate reductase (Ayr1p) of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* encoded by the open reading frame YIL124w is a major component of lipid particles, J. Biol. Chem., **275(1)**, 235–240 (2000).

70. **Ploier, B., Scharwey, M., Koch, B., Schmidt, C., Schatte, J., Rechberger, G., Kollroser, M., Hermetter, A., and Daum, G.:** Screening for hydrolytic enzymes reveals Ayr1p as a novel triacylglycerol lipase in *Saccharomyces cerevisiae*, J. Biol. Chem., **288(50)**, 36061–36072 (2013).

71. **Nissen, T. L., Hamann, C. W., Kielland-Brandt, M. C., Nielsen, J., and Villadsen, J.:** Anaerobic and aerobic batch cultivations of *Saccharomyces cerevisiae* mutants impaired in glycerol synthesis. Yeast, **16**, 463–474, (2000).

72. **Guadalupe-Medina, V., Metz, B., Oud, B., van Der Graaf, C. M., Mans, R., Pronk, J. T., and van Maris, A. J.:** Evolutionary engineering of a glycerol-3-phosphate dehydrogenase-negative, acetate-reducing *Saccharomyces cerevisiae* strain enables anaerobic growth at high glucose concentrations, Microb. Biotechnol., **7(1)**, 44-53 (2014).

73. **Wang, J., Liu, W., Ding, W., Zhang, G., Liu, J.:** Increasing ethanol titer and yield in a *gpd1Δ gpd2Δ* strain by simultaneous overexpression of *GLT1* and *STL1* in *Saccharomyces cerevisiae*, Biotechnol. Lett., **35(11)**, 1859–1864 (2013).

74. **Bakker, B. M., Bro, C., Kötter, P., Luttk, M. A., van Dijken, J. P., and Pronk, J. T.:** The mitochondrial alcohol dehydrogenase Adh3p is involved in a redox shuttle in *Saccharomyces cerevisiae*, J. Bacteriol., **182(17)**, 4730–4737 (2000).

75. **Patil, K. R. and Nielsen J.:** Uncovering transcriptional regulation of metabolism by using metabolic network topology, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **102(8)**, 2685–2689 (2005).

76. **Overkamp, K. M., Bakker, B. M., Kötter, P., van Tuijl, A., de Vries, S., van Dijken, J. P., and Pronk, J. T.:** In vivo analysis of the mechanisms for oxidation of cytosolic NADH by *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria, J. Bacteriol., **82(10)**, 2823–2830 (2000).

77. **Luttik, M. A., Overkamp, K. M., Kötter, P., de Vries, S., van Dijken, J. P., and Pronk, J. T.:** The *Saccharomyces cerevisiae* *NDE1* and *NDE2* genes encode separate mitochondrial NADH dehydrogenases catalyzing the oxidation of cytosolic NADH, *J. Biol. Chem.*, **273(38)**, 24529–24534 (1998).
78. **dos Santos Moreira, M., Thygesen, G., Kötter, P., Olsson, L., and Nielsen, J.:** Aerobic physiology of redox-engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains modified in the ammonium assimilation for increased NADPH availability, *FEMS Yeast Res.*, **4(1)**, 59–68 (2003).
79. **Roca, C., Nielsen, J., and Olsson, L.:** Metabolic engineering of ammonium assimilation in xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* improves ethanol production, **69(8)**, 4732–4736. (2003).
80. **Ferreira, C., van Voorst, F., Martins, A., Neves, L., Oliveira, R., Kielland-Brandt, M. C., Lucas, C., and Brandt, A.:** A member of the sugar transporter family, Stl1p is the glycerol/H⁺ symporter in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Bio. Cell*, **16(4)**, 20682076.
81. **Alves, S. L. Jr., Herberts, R. A., Hollatz, C., Trichez, D., Miletto, L. C., de Araujo, P. S., Stambuk, B. U.:** Molecular analysis of maltotriose active transport and fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* reveals a determinant role for the *AGT1* permease, *Appl. Environ. Microbiol.*, **74(5)**, 1494-501 (2008).
82. **Day, R. E., Higgins, V. J., Rogers, P. J., Dawes, and I. W.:** Characterization of the putative maltose transporters encoded by YDL247w and YJR160c, *Yeast*, **19(12)**, 10151027 (2002).

本論文に関する主な報告

1. Isolation and characterization of xylitol-assimilating mutants of recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. Tatsunori Tani, Hisataka Taguchi, Kazuhiro E. Fujimori, Takehiko Sahara, Satoru Ohgiya, Yoichi Kamagata, and Takashi Akamatsu: J. Biosci. Bioeng., **122**(4), 446–455 (2016)

2. Analysis of metabolisms and transports of xylitol using xylose- and xylitol-assimilating *Saccharomyces cerevisiae*. Tatsunori Tani¹, Hisataka Taguchi, and Takashi Akamatsu: JBIOSC2042, J. Biosci. Bioeng., doi.10.1016/j.jbiosc.2016.12.012 掲載可

謝辞

本研究を遂行するにあたり、始終懇篤に御指導・御鞭撻くださいました崇城大学・生物生命学部・応用微生物工学科 赤松隆 教授並びに田口久貴 教授に深謝いたします。

また、本論文を作成するにあたり、御校閲並びに御助言をしていただきました崇城大学生物生命学部・応用微生物工学科 原島俊 教授、松岡正佳 教授に厚く御礼申し上げます。

さらに、次世代シーケンサ解析結果を提供して下さいました産業総合研究所の皆様、並びに微生物遺伝学講座の皆様にも厚く感謝いたします。

最後になりましたが、10年間に渡り支援してくださいました家族に深く感謝いたします。