

論文要旨

区分	甲	氏名 谷 龍 典
<p data-bbox="197 421 325 450">論文題名</p> <p data-bbox="245 465 1134 495">C5C6 糖高効率発酵に資する <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 菌の解析</p> <p data-bbox="197 562 357 591">論文の要旨</p> <p data-bbox="197 622 1423 1765">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 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 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 <i>Scheffersomyces stipitis</i> の <i>XYL1</i> (キシロースリダクターゼをコード)と <i>XYL2</i> (キシリトール脱水素酵素をコード)と内在性の <i>XKS1</i> (キシロキナーゼをコード)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 Xyl 1 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。</p> <p data-bbox="197 1794 1423 1937">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</p>		

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、ガラクトース、グルコース、キシロースと共にキシリトールも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を、*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、そこ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* 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* 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、この 3 個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* 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 と 3.8 g/L となった。この 3 個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、同時糖化発酵に資する酵母菌の遺伝子構造を推定した。