

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

崇城大学大学院工学研究科

応用微生物工学専攻 微生物遺伝学講座

富 高 正 貴

目次

	頁
緒論	1
第 1 章 耐熱性ホモタリック実用酵母 KF7 から掛け合わせと形質転換能に優れたヘテロタリック一倍体酵母の創製	4
第 1 節 緒言	4
第 2 節 実験材料と実験方法	6
1-2-1. 菌株, プラスミド, オリゴヌクレオチドプライマー	6
1-2-2. 培地	9
1-2-3. 形質転換	10
1-2-4. 酵母染色体 DNA の調製	11
1-2-5. 酵母遺伝学で用いる標準方法	12
1-2-6. 大腸菌からのプラスミド調製	13
1-2-7. High Pure Plasmid Isolation Kit を用いた大腸菌からの プラスミド DNA 抽出	14
1-2-8. プラスミド DNA への制限酵素処理	14
1-2-9. アガロースゲル電気泳動	15
1-2-10. エリューションによる DNA 断片の回収	15
1-2-11. PCR 法による DNA 断片の増幅	16
1-2-12. コロニーからの直接 PCR 法	16
1-2-13. 塩基配列決定	17
1-2-14. 非凝集性酵母 KFG4-6BD の分離	17
1-2-15. 選択カセットプラスミドの構築	18
1-2-16. バイオフォトレコーダーを用いた細胞増殖の解析	18
1-2-17. 回分発酵試験	18

第3節 結果	19
1-3-1. ホモタリック二倍体酵母 KF7 からヘテロタリック一倍体 KF7-5C および KF7-4B 株のスクリーニング	19
1-3-2. KF7-5C, KF7-4B およびその子孫間の株内掛け合わせ, または KF7-5C と実験室酵母 SH6710 との掛け合わせおよび戻し交配による接合能, 胞子形成能, および胞子生存率の改良	20
1-3-3. KFG4-6B 株の繰り返し培養による増殖速度の改善	22
1-3-4. 高い増殖能, 高効率形質転換能, 乳酸資化性能を示す NAM34-4C 株の 構築	23
1-3-5. 低 pH, 高温条件下での回分発酵	26
第4節 考察	26
第5節 要約	28
第2章 高効率キシロース資化を示す <i>Saccharomyces cerevisiae</i> HEX 突然変異体の 分離とその解析	29
第1節 緒言	29
第2節 実験材料と実験方法	31
2-2-1. 菌株, プラスミド, オリゴヌクレオチドプライマー	31
2-2-2. 培地	39
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	40
2-2-4. 大腸菌からのプラスミド調製および High Pure Plasmid Isolation Kit を 用いた大腸菌からのプラスミド DNA 抽出,	40
2-2-5. プラスミド DNA への制限酵素処理, アガロースゲル電気泳動および エリューションによる DNA 断片の回収	40
2-2-6. PCR 法による DNA 断片の増幅, コロニーからの直接 PCR 法および	41

塩基配列決定	
2-2-7. プラスミドの構築	41
2-2-8. キシロース資化遺伝子 <i>XYL1</i> , <i>XYL2</i> , <i>XKS1</i> を持つ <i>S. cerevisiae</i> の構築	43
2-2-9. バイオフォトレコーダーを用いた細胞増殖の解析	44
2-2-10. <i>cre</i> 発現による <i>kanMX</i> マーカーの除去	44
2-2-11. 高効率キシロース資化を示す変異体の分離	44
2-2-12. 回分発酵試験	45
2-2-13. グルコース, キシロース, エタノール濃度の解析	45
2-2-14. 二重形質転換	46
2-2-15. 次世代シーケンサー解析	46
第3節 結果	47
2-3-1. <i>S. cerevisiae</i> NAM34-4C 株の同質系統株の構築	47
2-3-2. キシロースを資化できる組換え <i>S. cerevisiae</i> SCB7 株の構築	52
2-3-3. 高効率なキシロース資化を示す変異体の分離 (Hex^+ 変異体)	54
2-3-4. Hex^+ を導く突然変異の遺伝的解析	55
2-3-5. Hex^+ 変異体の回分発酵試験	57
2-3-6. <i>HEX</i> 突然変異遺伝子の特徴づけ	59
第4節 考察	67
第5節 要約	70
第3章 高濃度キシロースを効率的に資化できる <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>SXM</i>	71
突然変異体の分離とその解析	
第1節 緒言	71
第2節 実験材料と実験方法	72
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	72

3-2-2. 培地	75
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	75
3-2-4. 大腸菌からのプラスミド調製および High Pure Plasmid Isolation Kit を 用いた大腸菌からのプラスミド DNA 抽出	75
3-2-5. プラスミド DNA への制限酵素処理, アガロースゲル電気泳動および エリューションによる DNA 断片の回収	76
3-2-6. PCR 法による DNA 断片の増幅, コロニーからの直接 PCR 法および 塩基配列決定	76
3-2-7. バイオフォトレコーダーを用いた細胞増殖の解析	76
3-2-8. <i>cre</i> 発現による <i>kanMX</i> マーカーの除去	76
3-2-9. 高濃度キシロースを高効率に資化する Sxm^+ 突然変異体の分離	76
3-2-10. 回分発酵試験	77
3-2-11. グルコース, キシロース, エタノールの解析	77
3-2-12. 二重形質転換	77
3-2-13. 次世代シーケンサー解析	77
第3節 結果	77
3-3-1. <i>HEXI</i> _{2,2} 変異体 SCB14 に対する増殖阻害キシロース濃度の解析	77
3-3-2. 高濃度キシロースを高効率に資化する突然変異体の分離	78
3-3-3. Sxm^+ を導く突然変異の遺伝的解析	79
3-3-4. Sxm^+ 変異体の回分発酵試験	83
(1) 低い初発細胞濃度からの回分発酵試験	83
(2) 高い初発細胞濃度からのグルコース・キシロース共存発酵試験	83
3-3-5. <i>SXMI</i> と <i>SXM2</i> 遺伝子の特定	86
3-3-6. <i>SXMI</i> ₃₂ と <i>sxm2</i> ₃₃ の特徴づけ	89
第4節 考察	91

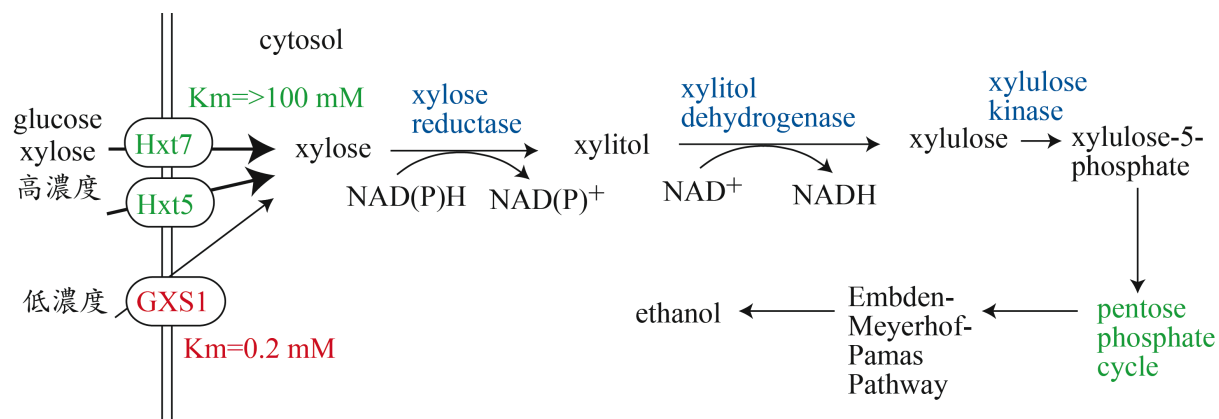
第 5 節 要約	95
総括	96
引用文献	98
本論文に関する主な報告	110
謝辞	111

緒論

平成 18 年に提案された新・国家エネルギー戦略で次のような指針が提出された；「日本のガソリン消費量は 2030 年には 6000 万 kL になると予想される。ガソリン消費を少なくし二酸化炭素量を減らすために、ガソリン消費量の 10%、600 万 kL のエタノールを生産し、E10 ガソリンとする」(1)。この目的を達成するために、*Saccharomyces cerevisiae* 酵母菌を使用したエタノール生産が開始されている。原料はトウモロコシなどのデンプン質系材料であるため、食糧の不足と高騰に繋がっている (2)。食糧と競合しないセルロース系バイオマス、中でも竹からのエタノール生産が着目され、研究が始まっている (3)。竹は世界的な未利用バイオマスで、成長が非常に早く、再生可能である。竹の乾物あたりのホロセルロース、脂質およびリグニンの割合は、それぞれ約 70%、3%、30% であり、1 年生、3 年生、5 年生の竹のホロセルロース含量は、それぞれ 70%、69%、66% と年齢による違いはあまり見られない (4)。また、セルロースとヘミセルロースの濃度比は約 2 : 1 である (4)。亜臨界処理 (200℃) ではヘミセルロースは分解され、酵素糖化ではグルコースだけが検出される。栄養塩類を添加せずに、この糖化液で回分発酵試験を行うと、24 時間で発酵は終了するが、生成エタノール濃度は 4 g/L 強にすぎない (4)。セルラーゼ酵素剤の価格を 1000 円/kg として、このときの酵素添加量からエタノール 1 L あたりのセルラーゼ酵素剤の値段を算出すると約 200 円となる。したがって、亜臨界水処理・酵素糖化だけでなく、前処理した後に酵素糖化する方法は、現時点では経済的に採算がとれないプロセスである。一方、濃硫酸糖化では竹のホロセルロース濃度に対する糖回収率は 60% であるが、糖化液にはグルコースだけでなくキシロースも存在しており、陰イオン交換樹脂で酸糖分離した糖化液に栄養塩類を添加し回分発酵試験を行うと 24 時間で発酵が終了し、約 50 g/L のエタノールを生成する (4)。また、竹の乾燥重量トン当たり約 0.35 kL のエタノールが生産できる。九州地区の竹は 713.4 万トンであるので 250 万 kL のエタノールの生産が見込まれる。3 年ごとに伐採していくと考えても 80 万 kL のエタノールに相当し、

必要な 600 万 kL の内、1/8 量のエタノールが竹からできると推定できる。

そこで、竹の前処理から生じるグルコースとキシロースを同時に発酵できる実用酵母が望まれている。しかしながら、野生型の *S. cerevisiae* はグルコース存在下でキシロースを取り込むことができない (図 0-1)。



- 1: 取り込み ; グルコース存在下でキシロースを取り込ませる。
Saccharomyces cerevisiae の *Hxt7* や *Hxt5* を発現させる。
Candida intermedia の *GXS1* を発現させる。
- 2: キシルロキナーゼとペントースリン酸回路の酵素を構成的に発現させる
- 3: 耐熱性と耐酸性の付与 pH3.5, 38°C
- 4: ヘテロタリズム酵母の構築 (ホモタリズムからヘテロタリズムへ変換)

図 0-1 グルコースとキシロースの共存下でエタノール発酵する耐熱性と耐酸性実用酵母に望まれる性質

このことはヘキソース輸送系タンパク質である *Hxt7* や *Hxt5* を構成的に発現させるか、あるいはガラクトース取り込み系である *Gal2* を構成的に発現させれば問題が解決できるように考えられる。しかしながら、これら取り込み系のキシロースに対する親和性は、Km 値で 100 mM から数 100 mM と極端に低く、グルコースに対する親和性よりも低い (2)。このように、最初にグルコースを消費し、次にキシロースの消費が起こることが考えられ、同時発酵は困難である。*Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*) の *Trxlt1* 産物は、キシロースのみを取り込むので、*S. cerevisiae* のキシロース取り込みを改良する有力な候補である。しかしながら、キシロースに対する親和性は、Km 値

で 130 mM から 900 mM と低く、円滑な同時発酵には向いていない。最も適する取り込み系は、*Candida intermedia* のキシロース/グルコース- H^+ 共輸送系 Gxs1 と考えられる。この輸送系のキシロースに対する親和性は、 $K_m = 0.2 \text{ mM}$ (30 mg/L) と非常に高く、竹から抽出した溶液中のグルコースとキシロースの濃度（糖濃度 60g/L 前後、グルコース/キシロース = 2）を考えると十分に目的に沿うと推定できる。

細胞内に取り込まれたキシロースは、図 0-1 に示したようにキシロースリダクターゼ (XR) によってキシリトールへ代謝される。続いてキシリトール脱水素酵素 (XDH) によってキシルロースへ代謝される。この両酵素を *S. cerevisiae* は持たない。そこで、*Pichia (Scheffersomyces) stipitis* の両遺伝子を構成的に発現するように遺伝操作した *S. cerevisiae* 株が構築されている (2)。キシルロースはキシルロキナーゼによってキシルロース-5-リン酸に代謝される。この酵素発現もグルコース抑制を受けるので、構成的に発現するように遺伝子操作した酵母菌が構築されている (2)。キシルロース-5-リン酸はペントースリン酸回路系の酵素によって代謝され、さらにエンブデン・マイヤーホフ・パルナス回路に入りエタノールへと変換される。

竹を濃硫酸法で糖化した溶液は酸性になるため、できるだけ酸性で発酵できる酵母が望ましい。pH 4.0 の酸性条件下では雑菌汚染もしにくい。発酵熱の冷却に要するエネルギーを軽減するため、一般的に耐熱性の酵母が用いられている (5)。耐熱性と耐酸性を併せ持ち、形質転換活性が高く遺伝子操作がしやすく、かつ掛け合わせ能に優れた酵母が、グルコースとキシロース糖を含む溶液の発酵に望まれる。

そこで、本研究の第 1 章では、耐熱性と耐酸性に優れた *S. cerevisiae* 実用酵母 KF7 を掛け合わせ能と形質転換能の高い酵母に変えることを目的とした。第 2 章では、自然突然変異法でキシロース資化能を高め、その遺伝子を特定し、キシロース代謝向上に関わる機構を明らかにすることを目的とした。また、第 3 章では、実プラントに用いる 20 g/L から 40 g/L のキシロース濃度でも十分に増殖・発酵できる変異体を分離し、遺伝子を特定し、その機構を明らかにし、発酵試験で評価することを目的とした。

第1章 耐熱性ホモタリック実用酵母 KF7 から

掛け合わせと形質転換能に優れたヘテロタリック一倍体酵母の創製

第1節 緒言

竹を濃硫酸で糖化するとグルコースとキシロースを含む酸性のバイオマスが得られる。そこからエタノールを生産するには、耐酸性の酵母が望ましい。また、発酵熱を冷却するのに必要なエネルギーを軽減するには、耐熱性の酵母が望ましい。耐酸性と耐熱性を示すエタノール発酵性実用酵母として *Saccharomyces cerevisiae* KF7 株が報告されている (5)。この KF7 株は実用酵母で良く見られるホモタリズムを示す二倍体酵母であり形質転換能も低い。グルコースとキシロースの混合糖からエタノールを生産させるには、耐熱性と耐酸性に加えて、キシロース資化性も付与する必要がある。これらの性質を併せ持たせるためには、ホモタリズム酵母ではなく、一倍体を維持できるヘテロタリズムの性質が必要である。なぜならば、掛け合わせで性質を併せ持たせることが、簡便で迅速に行えるからである。ヘテロタリズム酵母とホモタリズム酵母になる機構は、次のように報告されている (6-9)。酵母第3番染色体上には、*MATa* もしくは *MATα* 遺伝子カセットがあり、そこからそれぞれ発現される **a** ペプチドと **α** ペプチドによって2種類の接合型が決まる。*MATa* を維持する、あるいは *MATα* を維持する株がヘテロタリズム酵母である。*MATa* 株と *MATα* 株が混合すると接合が生じ二倍体となる。一方、酵母第4番染色体上に座位する HO エンドヌクレアーゼが活性型である時、酵母第3番染色体上に座位する *MATα* を切り出し、同じ染色体上にある *HMR* を複製し、その複製産物を切り出した部分に挿入する。その結果、*MATα* から *MATa* への接合型変換が起こる (図 1-1)。一般的に、この接合型変換は、子嚢胞子を発芽・増殖させる時に娘細胞の中で起こる。その娘細胞と母細胞とが接合し二倍体となる。このようにして接合型変換が起こるのがホモタリズム酵母の特徴である。

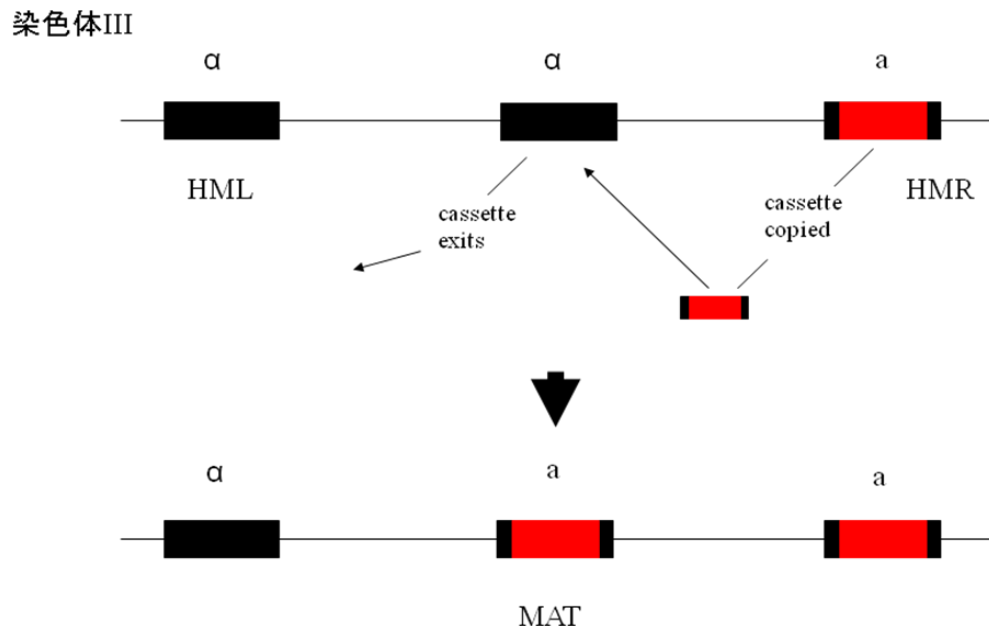


図 1-1 接合型変換カセットモデル

耐熱性と耐酸性が異なる一倍体を掛け合わせて、それらの性質を併せ持つヘテロな二倍体を容易に作成できる。しかし、ホモタリズム二倍体の場合は、2種類の性質を併せ持たせることは困難である。このような理由から、ホモタリズムではなくヘテロタリズム一倍体が、実験室酵母では一般的に用いられる。ホモタリズム酵母をヘテロタリズム酵母にするには、*HO* 遺伝子を破壊すれば良いが、実用酵母は形質転換能が低く、遺伝子操作しにくい。KF7 株は耐熱性 EP1 と凝集性 IR2 の由来株間の細胞融合と子嚢胞子解剖から得た二倍体酵母であり、*HO* 遺伝子配列が異なる可能性がある (5)。

本章では、KF7 株の子嚢胞子を分離し、ヘテロタリズム一倍体を選抜することにした。また、得られた一倍体の掛け合わせ能や胞子形成能や胞子発芽能の優れた株を株内掛け合わせあるいは種内掛け合わせ・戻し交配を行い、KF7 株の遺伝背景に近くする実験デザインで育種することを目的とした。そこから形質転換能の高い株を選別し、併せて、発酵試験で評価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

本研究で使用した菌株とプラスミドを表 1-1 に示した。*S. cerevisiae* KF7 は耐熱性・凝集性のホモタリズム実用酵母で，本研究の親株として用いた (5)。KF7-5C はヘテロタリズム一倍体であり，KF7 の子嚢 4 胞子から得た。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。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 (9, <http://www.yeastgenome.org/>) の情報に基づいた。

表 1-1 本研究で使用した菌株及びプラスミド

微生物およびプラスミド	遺伝子型または表現型	起源，由来，文献
微生物		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
KF7	<i>MATa/MATa HO/HO Flo⁺</i>	5
KAG5	<i>MATa/MATa HO/HO</i>	鹿児島焼酎酵母 5 号
MIY1	<i>MATa/MATa HO/HO</i>	宮崎焼酎酵母 1 号
EP1	<i>MATa/MATa HO/HO</i>	5
BY611 (S288C)	<i>MATa SUC2 mal mel gal2 CUP1 flo1 flo8-1 SSD1-v1</i>	YGRS ^a
KF7-5C	<i>MATa ho Flo⁺</i>	KF7 の子嚢胞子から分離したヘテロタリック一倍体
KF7-4B	<i>MATa ho Flo⁺</i>	KF7 の子嚢胞子から分離したヘテロタリック一倍体
KFG1-1B	<i>MATa ho Flo⁺</i>	Haploid (KF7-5C × KF7-4B) ^b
KFG1-4B	<i>MATa ho Flo⁺</i>	Haploid (KF7-5C × KF7-4B)

表 1-1 続き

KFG2-17D	<i>MATa ho Flo⁺</i>	Haploid (KFG1-1B × KFG1-4B)
KFG2-20A	<i>MATa ho Flo⁺</i>	Haploid (KFG1-1B × KFG1-4B)
KFG3-4A	<i>MATa ho Flo⁺</i>	Haploid (KFG2-17D × KFG2-20A)
KFG3-20B	<i>MATa ho Flo⁺</i>	Haploid (KFG2-17D × KFG2-20A)
KFG3-2B	<i>MATa ho Flo⁺</i>	Haploid (KFG2-17D × KFG2-20A)
KFG4-6B	<i>MATa ho Flo⁺</i>	Haploid (KFG3-4A × KFG3-2B)
KFG4-4B	<i>MATa ho Flo⁺</i>	Haploid (KFG3-4A × KFG3-2B)
KFG4-6BD	<i>MATa/MATa HO/HO Flo⁺</i>	KFG4-6B から分離したホモタリ ック二倍体
BY4848	<i>MATa ho ura3-1 leu2-3,112 trp1-1 his3-11,15 ade2-1 can1-100 rad5-535</i>	YGRS
BY4849	<i>MATa ho ura3-1 leu2-3,112 trp1-1 his3-11,15 ade2-1 can1-100 rad5-535</i>	YGRS
SH6710	<i>MATa ho dse2::kanMX sed1::Sh ble his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0</i>	YGRS
NAM2-2B	<i>MATa ho dse2::kanMX sed1::Sh ble ura3Δ0 his3Δ1</i>	Haploid (KF7-5C × SH6710)
NAM3-15D	<i>MATa ho ura3Δ0 dse2::kanMX sed1:: Sh ble</i>	Haploid (NAM2-2B × KF7-5C)
NAM5-15D	<i>MATa ho ura3Δ0 dse2::kanMX sed1:: Sh ble</i>	Haploid (NAM3-15D × KF7-5C)
NAM6-22C	<i>MATa ho ura3Δ0 dse2::kanMX sed1:: Sh ble</i>	Haploid (NAM5-15D × KFG1-1B)
NAM8-22B	<i>MATa ho ura3Δ0 dse2::kanMX sed1:: Sh ble</i>	Haploid (NAM6-22C × KFG2-17D)
NAM9-13D	<i>MATa ho ura3Δ0 dse2::kanMX sed1:: Sh ble</i>	Haploid (NAM8-22B × KFG3-20B)
NAM11-2C	<i>MATa ho ura3Δ0 dse2::kanMX sed1:: Sh ble</i>	Haploid (NAM9-13D × KFG3-20B)
NAM11-9C	<i>MATa ho</i>	Haploid (NAM9-13D × KFG3-20B)
NAM11-13A	<i>MATa ho</i>	Haploid (NAM9-13D × KFG3-20B)
NAM12	<i>MATa ho / MATa ho</i>	Diploid (NAM11-9C × NAM11-13A) ^c
NAM21-2C	<i>MATa ho ura3Δ0 dse2::kanMX sed1:: Sh ble</i>	Haploid (KFG4-6BD spore × NAM11-2C)

表 1-1 続き

NAM23-8A	<i>MATa ho</i>	Haploid (KFG4-6BD spore × NAM21-2C)
NAM23-5D	<i>MATa ho ura3Δ0 dse2::kanMX sed1:: Sh ble</i>	Haploid (KFG4-6BD spore × NAM21-2C)
NAM26-15A	<i>MATa ho</i>	Haploid (NAM23-8A × KFG4-4B)
NAM26-14A	<i>MATa ho</i>	Haploid (NAM23-8A × KFG4-4B)
NAM34-4C	<i>MATa ho</i>	Haploid (NAM26-15A × NAM26-14A)
NAM35	<i>MATa ho/ MATa ho</i>	Diploid (NAM26-15A × NAM34-4C)
NAM27-8C	<i>MATa ho ura3</i>	Haploid (NAM23-5D × KFG4-6B)
NAM1-5C	<i>MATa ho dse2::kanMX sed1:: Sh ble his3 leu2 ura3 lys2Δ0 ade2-1</i>	Haploid (BY4848 × SH6710)
<i>Escherichia coli</i>		
DH10B	<i>F⁻ mcrA Δ(mrr⁻ hsdRMS mcrBC) Φ80 lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara leu)7697 galU galK λ⁻ rpsL nupG)</i>	Invitrogen, 16
プラスミド		
pBluescript II KS+	<i>bla</i>	16
pBlu-TDH3	TDH3 promoter (P_{TDH3}) ^d	本研究で構築
pBlu-LTKTL-TDH3	$loxP-P_{TEF}-kanMX-T_{TEF}-loxP-P_{TDH3}$ ^e	本研究で構築

^a YGRS : Yeast Genetic Resource Center.

^b Haploid (KF7-5C × KF7-4B) は KF7-5C と KF7-4B 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。

^c Diploid (NAM11-9C × NAM11-13A) は NAM11-9C と NAM11-13A とを掛け合わせるにより得た 2 倍体を指し示す。

^d P_{TDH3} は *TDH3* プロモーターを指し示す。

^e $loxP-P_{TEF}-kanMX-T_{TEF}-loxP-P_{TDH3}$ は *loxP*, *TEF* プロモーター, *kanMX* 遺伝子, *TEF* ターミネーター, *loxP*, *TDH3* プロモーターから成り立つ遺伝構造を指し示す。

表 1-2 PCR 増幅に用いたオリゴヌクレオチドプライマー

Number	Name	Primer sequence (5' to 3')
1	TDH3-F3	tttgaattc actttgaccctattttcgagg
2	TDH3-R2	tttctgc agttgtttgtttatgtgtgtattcgaa
3	F-pUG6-LTKTL-(EcoRI)	tttgaattc ggccgccagtcgaagcttcg
4	R-pUG6-LTKTL-(EcoRI)	tttgaattc aggccactagtggatctgat
5	F-JEN1 G418	<u>atgctgcgtcaattacagatgagaaaatatctgg</u> tgaacggccgccagctgaagcttcg
6	R-JEN1 G418	<u>ttaa</u> acggctc caat atgctcctcatatgtctttgagacgaggccactagtggatctgat
7	F-LTKTL-(Hxt7)	<u>acatttgctctgctggataatttcagaggcaacaaggaggccgccagctgaagc</u> ttcg
8	R-TDH3-(Hxt7)	<u>ccacaggagtttgctctgcaa</u> atgcagcagctgcttgtagacattttgtttgttatgtgtttattcga

プライマー配列の斜体は制限酵素認識部位を表し、太字の 3 塩基は制限酵素部位の認識改善のために付加した。プライマー1 と 2 は *S. cerevisiae* 染色体の *TDH3* プロモーターの相同領域を 21 bp または 27 bp 含む。プライマー3 と 4 は pBlu-LTKTL-TDH3 の *kanMX* の相同領域を 20-bp 含む。プライマー5 と 6 は pBlu-LTKTL-TDH3 の *kanMX* の相同領域を 20-bp と下線で示した *JEN1* の相同領域を 40-bp 持つ。プライマー7 と 8 は pBlu-LTKTL- TDH3 の *kanMX* の相同領域を 20-bp と下線で示した *HXT7* の相同領域を 40-bp 持つ。

1-2-2. 培地

S. cerevisiae の増殖に用いた 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 に調整した。回分培養発酵培地に用いた YPD15 培地は、YPD 培地と同じ組成で 20 g/L グルコースの代わりに 150 g/L グルコースを用いた。MS 培地は、Yeast nitrogen base 1.7g, (NH₄)₂SO₄ 5g を蒸留水 1L 当りに含み pH 5.5 に調整した。MSD 培地は MS 培地 1 L 中に 20 g グルコースを含む。MSL 培地は MS 培地 1 L 中に 20 g L-乳酸を含む。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。SpoKI 胞子形成培地は、酢酸カリウム 10 g を蒸留水 1 L 当たりに含み、pH 5.5 に調整し寒天を 20 g 加えた。

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 当たりに含み pH 7.2 に調整した (10)。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。コンピテントな大腸菌の調製に用いた M9 培地は、NH₄Cl 1.0 g, Na₂HPO₄ 6.0 g, KH₂PO₄ 3.0 g, NaCl 0.5 g, 1 M MgSO₄ 2 mL, 200 g/L グルコース 10 mL, 1M CaCl₂ 0.1 mL を蒸留水 1 L あたりに含み pH7.5 に調整した (11)。

1-2-3. 形質転換

S. cerevisiae の形質転換は、Gietz と Woods の方法で行った (12)。受容菌を 5 mL の 2 × YPDA 培地に植菌し、30°C で一晩振盪培養し (120 回/分 往復振盪, 120 rpm) , 吸光度 Abs_{600 nm} を測定した (2.5×10^8 細胞/mL)。予め 30°C に保温した 2 × YPDA 培地 50 mL に初発濃度が 5×10^6 細胞/mL となるように、細胞濃度と吸光度の関係式 (1×10^6 細胞/mL : Abs_{600 nm}=0.1) を用い培養液を加えた。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 2500 × g, 5 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。25 mL の滅菌水を加え懸濁し、遠心分離し上澄みを捨て、ボルテックスミキサーで混ぜ細胞を洗浄し、1.0 mL の滅菌水に懸濁した。細胞懸濁液を 1.5 mL のマイクロ遠心管に移し、20,400 × g で 30 秒間遠心分離し、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、1.0 mL 容量とした。100 µL の 10^8 個の酵母細胞懸濁液を 1.5 mL のマイクロ遠心管に移し、20,400 × 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、形質転換時に使用する混合溶液 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。30 秒 20,400 × 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。1 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 2-4 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		
	1	5(×6)	10(×11)
PEG3500 50%w/v ^a	240 μL	1440 μL	2640 μL
酢酸リチウム 1M ^b	36 μL	216 μL	396 μL
煮沸 ss-キャリア DNA ^c	50 μL	300 μL	550 μL
プラスミド DNA+水	34 μL	204 μL	374 μL
全量	360 μL	2160 μL	3960 μL

^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 (12)。すなわち、200 mg の高分子量精子 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、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. 酵母染色体 DNA の調製

YPD 寒天培地上で 30°C 1 日培養したフレッシュな酵母菌を 25 mL の YPD 液体培地に 1 白金線植菌し、30°C で一晩振盪培養した。この培養液の 0.5 mL を新しい 50 mL の YPD 培地に植え継いだ。Abs_{660 nm} が 1.5 になるまで 30°C で振盪培養し、培養液 30 mL を遠心分離した (6000 × g, 2 分間)。上澄みを捨て、集めた細胞に 4 mL の緩衝液を加え懸濁した。マルチビーズショッカーで 2700 rpm 2 分間処理し、酵母菌を破碎した。上澄みを取り出し、等量のフェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール (25:24:1 (v/v)) を加え、65°C で 5 分間緩やかに振盪した。遠心分離後 (1800 × g, 15 分間)、水層部分を取り、1/10 量の 3 M 酢酸ナトリウムと 0.6 量のイソプロピルア

ルコールを加え、インバージョンした。これを遠心分離し (2800× g, 10 分間), 冷エタノールで洗浄後, 1 mL の TE 緩衝液に溶解した。3 倍量のエタノールを加え, -50°C で 20 分間保冷した。遠心分離後 (1800 × g, 15 分間), 冷エタノールで洗浄し, 適量の TE 緩衝液を加え DNA 溶液とした。

1-2-5. 酵母遺伝学で用いる標準方法 (13)。

(1) 孢子形成と孢子形成の観察

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

(2) 集団接合

酵母菌細胞を滅菌した白金線で 2 mL の YPD 液体培地に植菌した。さらに実験室酵母 (例えば BY4849 菌) 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 で数時間静置培養した。その培養液の 5 µL を滅菌したピペットマン P20 で取り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。

(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 50 µL 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 200, Singer Instruments, Roadwater, Watchet, Somerset TA23 0RE, UK) を用いて, 顕微鏡下, 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 (14)

胞子形成培地上の細胞を 300 $\mu\text{g/mL}$ 最終濃度で zymolyase20 を含む 0.15 M リン酸カルウム緩衝液 pH7.5 の 75 μL 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。マイ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。

(6) 細胞・胞子接合と接合の確認

細胞・胞子接合は Winge と Laustsen の方法で行った (15)。ホモタリック株である KFG4-6BD の 10~20 個の胞子を 4 胞子解剖し、ヘテロタリックな NAM11-2C 株またはその子孫である NAM21-11C と掛け合わせ、細胞・胞子接合を行った。KFG4-6BD 株の野生型胞子は G418 感受性 (G418-s) と非栄養要求性であり、上記の 2 株は G418 耐性とウラシル要求性である。細胞・胞子の混合から生じるコロニーを G418 含有 MSD 培地に拡げた。30°C で 3-4 日間培養後に選択培地で増殖したコロニーを胞子形成させ、マイクロマニプレーターで解剖し、4 胞子解析した。細胞・胞子接合は *MATa* あるいは *MAT α* の G418 感受性で非要求性の株が分離できることにより確認した。

1-2-6. 大腸菌からのプラスミド調製

プラスミド調製は、Birnboim と Doly の方法に従った (16)。25 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 $\times g$, 3 分間, 4°C) で集菌し、上澄みを捨てた。菌体に 1.0 mL の溶液 1 (1mM グルコース, 10 mM EDTA 2Na, 25 mM Tris-HCl, pH 8.0) を加え、よく懸濁し、氷中で 5 分間保冷した。これに 2.0 mL の溶液 2 (0.2 N NaOH, 1.0% SDS) を加え、氷中で 10 分間保冷した。次に、1.5 mL の溶液 3 (3 M 酢酸・5M カリウム, pH 4.8) を加え、インバージョンでよく混和し、遠心分離し (20,400 $\times g$, 15 分間, 4°C), 沈殿物や浮遊物を取らないように上澄みを採取した。上澄みに対して 0.6 倍量のイソプロパノールを加えて、よく混和後、遠心

分離 ($9100 \times g$, 5 分間, 4°C) して, 得られたペレットを適当量の冷エタノールで洗浄した。ペレットを $500 \mu\text{L}$ の TE 緩衝液 (10 mM Tris-HCl , 1 mM EDTA 2Na , $\text{pH } 8.0$) に溶解後, $500 \mu\text{L}$ の 3 M 塩化リチウム溶液を加えて, よく混和し, 氷中で 15 分間保冷した。遠心分離し ($20,400 \times g$, 15 分間, 4°C), 沈殿物を取らないように上澄みを採取した。上澄みに対して 3 倍量の冷エタノールを加え, よく混和し, フリーザー (-35°C) で 20 分間放置した。遠心分離 ($13,000 \times g$, 10 分間, 4°C) で, DNA を回収し, 適当量の冷エタノールで洗浄した。得られた DNA を適当量の蒸留水または TE 緩衝液に溶解し, プラスミド DNA 溶液とした。

1-2-7. High Pure Plasmid Isolation Kit を用いた大腸菌からのプラスミド DNA 抽出

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 ($2300 \times g$, 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 $250 \mu\text{L}$ 加えよく混和後, Lysis Buffer ②を $250 \mu\text{L}$ 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 $350 \mu\text{L}$ 加え, 緩やかに混和し氷中で 5 分間保冷した。遠心分離し ($13,000 \times g$, 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 ($20,400 \times g$, 1 分間, 4°C), Collection Tubes に溜まった溶液を捨て, Wash Buffer II ⑤を $700 \mu\text{L}$ の High Pure Filter Tubes に加えた。遠心分離し ($20,400 \times g$, 1 分間, 4°C), Collection Tubes に溜まった溶液を捨て, 遠心分離後 ($20,400 \times g$, 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 $100 \mu\text{L}$ 加え, 遠心分離した ($20,400 \times g$, 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。

1-2-8. プラスミド DNA への制限酵素処理

制限酵素供給元の添付プロトコールに従い、DNA を制限酵素で加水分解した。その後、DNA を次のようにして精製した。DNA 溶液に等量のフェノールクロロホルムを加えよく混和し、遠心分離（ $100 \times g$ ，5 分間，室温）した。遠心分離後，上澄みを新しいエッペンドルフに回収し等量のクロロホルムを加えよく混和し遠心分離した（ $100 \times g$ ，5 分間，室温）。上澄みを新しいエッペンドルフに回収し，1/10 量の 3 M 酢酸カリウムと 3 倍量の冷エタノールを加えよく混和し， -35°C で 20 分間保った。遠心分離し（ $9100 \times g$ ，5 分間， 4°C ），上澄みを捨て，DNA を適当量の冷エタノールで洗淨・乾燥後に，元の DNA 溶液と同量の蒸留水に溶解した。

1-2-9. 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 もしくはシグマ社製）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 $\mu\text{g/mL}$ 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。

1-2-10. エリューションによる DNA 断片の回収

ゲルからの DNA 断片の回収は，次のようにして行った。1/2× TAE 緩衝液（緩衝液 1 L 当たり 4.84 g Tris-HCl, 1.4 mL 氷酢酸, 0.37 g EDTA・2Na を含む）に 1.0-2.0% となるようにアガロースを加え，オートクレーブ（ 121°C ，1 分間）で溶解後にゲルを作成した。10-20 μL の DNA 溶液に対して 1-2 μL のローディング緩衝液を加えてゲルのウェルにチャージし，電気泳動システムを用いて 50 V，90 分間電気泳動した。DNA サイズマーカーを 1 レーン分チャージし，サンプル DNA も 2 レーンもしくは 3

レーン分チャージした。サイズマーカーとその隣に位置しているサンプルレーンをカッターで切り取った。その切断ゲルを 0.5 µg/mL のエチジウムブロマイドを含む TAE 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。その後、目的の断片を含むゲルのみを切り出し、少量の TAE 緩衝液と共に加熱処理した透析膜チューブ (TAE 緩衝液に浸し 121°C, 1 分間のオートクレーブ処理) 中に入れ、その両側をクロージャーで閉じた。電気泳動浴槽につけて通電し、DNA 断片をゲルから抽出した。得られた DNA 溶液に、その容量の 2.5 倍量のエタノール、1/10 量の 3 M 酢酸カリウム、1/40 量の 2 mg/mL グリコーゲン溶液を添加し、-35°C で 20 分間保った。DNA 断片を遠心分離し (9100 × g, 5 分間, 4°C) 回収した。

1-2-11. PCR 法による DNA 断片の増幅

Ready・To・Go PCR Beads キット (Amersham Pharmacia Biotech Inc 製) を用いて PCR 反応を行った。反応試薬に 50 ng の鋳型 DNA 溶液と 25 pmol のプライマー溶液を加え、25 µL とした。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、95°C で 30 秒間、54°C で 30 秒間、72°C で 1 分間のサイクルを 35 回繰り返し増幅した。反応後、2.5 倍量の冷エタノールと 10 分の 1 量の 3 M 酢酸カリウム溶液を添加し、-35°C で 20 分間保冷した。保冷後、遠心分離し (13,000 × g, 10 分間, 4°C)、適当量の冷エタノールで数回洗浄した。ペレットを乾燥させ、適当量の蒸留水あるいは TE 溶液に溶解したものを PCR 産物とした

1-2-12. コロニーからの直接 PCR 法

コロニーを滅菌水 45 µL に植菌し、3 mg/mL の zymolyase20 を 5 µL 加えて 30°C で 10 分間保温し溶菌させた。その溶液を鋳型 DNA 溶液とした。PCR 反応は KOD FX キット (TOYOBO 社製, 大阪, 日本) を用いて行った。反応溶液 50 µL 当たり、25 µL の 2× KOD FX 用 PCR 緩衝液, 0.4 mM dNTPs, 鋳型 DNA (~200 ng), プライマー (0.3

pmol), KOD FX DNA ポリメラーゼ (1.0 U/μL) となるようにした。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, 94°C で 15 秒間, 54°C で 30 秒間, 68°C で 1 分間のサイクルを 30 回繰り返し, その後 68°C で 5 分間保持することによって増幅した。

1-2-13. 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 アニール, 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 μL の 125 mM EDTA・2Na を加えた後, 60 μL 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 × g で 20 分間 遠心分離し上澄みを除去した。その後, 60 μL の 70%エタノールを加え, 20,400 × 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 μL の Junction 緩衝液を加え 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, シーケンサーにセットし, 塩基配列決定した。

1-2-14. 非凝集性酵母 KFG4-6BD の分離

凝集性酵母 KFG4-6B 株を YPD 培地 (pH5.5, 500 mL 三角フラスコに 50 mL) で 35°C, 24 時間培養した。その後, 凝集性細胞を沈殿させるために数分間静置し, 上層培地を新たな YPD 培地に植菌した。この操作を数回繰り返し行い, 非凝集性細胞を得た。

細胞を YPD 寒天培地上で分離し，マイクロマニプレーターで単細胞分離した。
KFG4-6BD 変異株は非凝集性を示した株の一つである。

1-2-15. 選択カセットプラスミドの構築

pBlu-LTKTL-TDH3 は，*S. cerevisiae* の染色体 DNA 内に *kanMX* または *kanMX-TDH3* プロモーターDNA 断片を導入するために用いた選択カセットプラスミドである。*S. cerevisiae* S288C の *TDH3* プロモーターDNA 領域を，一対のプライマーである TDH3-F3 と TDH3-R2 を用いて増幅した。その 1010 bp の増幅を *EcoRI* と *PstI* で処理し，pBluescript II KS+ (17) の *EcoRI* と *PstI* の間に組み換え pBlu-TDH3 を作成した。*S. cerevisiae* SH6710 の *kanMX* DNA 領域を，一対のプライマーである F-pUG6-LTKTL-(*EcoRI*)と R-pUG6-LTKTL-(*EcoRI*)を用いて増幅した。その 1609 bp の *loxP-P_{TEF}-kanMX-T_{TEF}-loxP* 断片を制限酵素 *EcoRI* で切断し，pBlu-TDH3 の *EcoRI* 部位に挿入し，pBlu-LTKTL-TDH3 を作成した。

1-2-16. バイオフォトレコーダーを用いた細胞増殖の解析

YPD 固形培地で 30°C，一晚培養した被試験菌を 10 mL の YPD 培地に植菌し，30°C で 24 時間振盪培養した (120 rpm)。4°C，2400 × g，1 分間の遠心分離で細胞を集め滅菌水に懸濁した。細胞初発濃度が $\text{Abs}_{660\text{ nm}} = 0.014$ となるように，L 字試験管中の 5 mL MSD 液体培地，または 500-mL 三角フラスコ中の 50 mL MSD 液体培地に植菌した。それぞれの細胞濃度を，前者はバイオフォトレコーダー (TVS062CA; Advantec Toyo Kaisha, Tokyo) の自記記録で，後者はフォトレコーダー (U-2900; Hitachi, Tokyo) で測定した。その後，世代時間，増殖遅延，最終細胞濃度の解析を行った。

1-2-17. 回分発酵試験

YPD 固形培地で 30°C，一晚培養した KFG4-6BD を 25 mL の YPD 培地 (pH4.0) に植菌し，30°C，18 時間振盪培養した (180 rpm)。10 mL の細胞懸濁液を 100 mL の YPD15

培地 (pH4.0) に植菌し 37°C, 48 時間振盪培養した。発酵培地中のエタノールとグルコースの濃度を決定するために, 4°C, 20,400 × g で 5 分間遠心分離して上澄みを得た。エタノール濃度は, 上澄みを炎イオン検出器と AOC-20i オートサンプラー (Shimadzu, Kyoto, Japan) を備えた GC-2014 ガスクロマトグラフ (GC) で解析した。エタノール測定条件は, カラム, TSG-1 (3.1 m × 3.2 mm, Shimadzu) ; カラム温度, 105°C; 注入場所温度, 260°C ; 検出温度, 260°C; キャリヤーガス, N₂, 30 mL/分 ; H₂, 50 mL/分; 空気, 50 mL/分で行った。糖濃度は内部標準物質としてアラビノースを用いた HPLC 糖解析システム (Shimadzu) で測定した。測定条件は, 解析カラム, Shim-pack ISA-07/S2504 (4.6 mm × 250 mm) ; カラム温度, 65°C (CTO-10ACvp) ; 移動相, 0.4 M ホウ酸; 流速, 0.6 mL/min (LC-10AD) ; アルギニンとの反応温度, 150°C (CRB-6A) ; 反応試薬, 3%ホウ酸 1%アルギニン ; 反応試薬の流速, 0.5 mL/min (LC-10AD) ; 検出波形長, 430 nm (RF-10AXL)で行った。エタノール収率 (%) は生産したエタノール濃度 (g/L) と理論上の最大エタノール濃度 (g/L) {0.51×初期グルコース濃度 (g/L)} の比 (%) として定義した。

第3節 結果

1-3-1. ホモタリック二倍体酵母 KF7 からヘテロタリック一倍体 KF7-5C および KF7-4B 株のスクリーニング

酵母の育種には, 掛け合わせ能が高いことや掛け合わせで得られる二倍体の孢子形成能や 4 孢子生存能が高いことが必要であるが, 実用酵母である KF7 はホモタリック二倍体酵母であり, 孢子形成能や孢子生存率や接合能が低く, 育種が大変難しい株である。そこで, この株の子嚢胞子のうち 4 孢子を解析し, ヘテロタリックな一倍体の分離を行った。20 個の 4 孢子形成した子嚢を解析し, 5 個の 4 孢子生存子嚢を得た。その内, 3 個からの子嚢胞子は, すべて孢子形成したことからホモタリズムを示すこ

とが分かった。残り 2 個の子嚢 (8 孢子クローン) について解析するために、実験室酵母 BY4848 (*MATa*) 株および BY4849 (*MATa*) 株と掛け合わせた。その結果、KF7-5C と KF7-4B がそれぞれ *MATa* と *MATa* の接合型を示した。残り 6 個の子嚢孢子クローンは、ホモタリズムの性質を示した。KF7-5C と BY4849 (*MATa ho ura3-1 leu2-3,112 trp1-1 his3-11,15 ade2-1 can1-100 rad5-535*) とを掛け合わせて得た二倍体を孢子形成させ、15 子嚢を調べたところ、全ての子嚢で、*MATa : MATa*, *URA3 : ura3*, *LEU2 : leu2*, *TRP1 : trp1*, *HIS3 : his3* が 2+ : 2- 分離した。また、KF7-4B と BY4848 (*MATa ho ura3-1 leu2-3,112 trp1-1 his3-11,15 ade2-1 can1-100 rad5-535*) とを掛け合わせて解析した結果も、調べた 5 子嚢で、全てが 2+ : 2- 分離した。このことから、KF7-5C と KF7-4B はヘテロタリックな一倍体であると結論した。

1-3-2. KF7-5C, KF7-4B およびその子孫間の株内掛け合わせ、または KF7-5C と実験室酵母 SH6710 との掛け合わせおよび戻し交配による接合能、孢子形成能、および孢子生存率の改良

一倍体の孢子形成率と孢子生存率を改善するために、2 つの方法を行った。1 つ目は、種内掛け合わせを用いる方法である。実験室酵母 SH6710 (*MATa dse2::kanMX sed1::Sh ble his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0*) と KF7-5C (*MATa ho Flo⁺*) とを掛け合わせ、アミノ酸と核酸の非要求性かつ G418 耐性を示すヘテロ二倍体を得た (表 1-4)。この二倍体を孢子形成させ、その中から孢子形成率と孢子生存率に優れた NAM2-2B を選別した。孢子形成と孢子生存率の良さは、実験室酵母 SH6710 から由来すると考えられる。一方、耐熱性や耐酸性やエタノール発酵能の良さは KF7-5C が保持するが選択していない。染色体がランダムに混ざり合うと考えると、染色体の半分は KF7-5C に由来し、半分は SH6710 に由来すると考えられる。そこで、掛け合わせ・孢子形成・孢子発芽に優れた性質を選択の性質に選び、KF7-5C 系統株に戻し交配していけば、順々に KF7-5C の遺伝背景に近づくことが期待できる。

表 1-4 KF7 の子孫間の掛け合わせで得た二倍体の孢子形成率と 4 孢子生存率

Diploid or cross between haploids	Diploid strain number	Sporulation ratio (%) ^a	Four spores viability (%) ^b
KF7	KF7	< 0.1	25
KF7-5C × KF7-4B	KFG1	0.5–1.0	50
KFG1-1B × KFG1-4B	KFG2	0.5–1.0	87
KFG2-17D × KFG2-20A	KFG3	2–3	96
KFG3-4A × KFG3-2B	KFG4	10	90
KFG4-6B × KFG4-4B	KFG5	2–3	83
<hr/>			
SH6710 × KF7-5C	NAM2	0.1	80
NAM2-2B × KF7-5C	NAM3	0.1–0.5	80
NAM3-15D × KF7-5C	NAM5	0.5	91
NAM5-15D × KF7-5C	NAM6	0.5–1.0	88
NAM6-22C × KFG1-1B	NAM8	2–3	93
NAM8-22B × KFG2-17D	NAM9	6	89
NAM9-13D × KFG3-20B	NAM11	16	83
NAM34-4C × NAM26-15A	NAM35	16	96

^a 孢子形成率は孢子形成培地上で 30℃ で 2–5 日間培養した後の二倍体細胞に対する子嚢胞子の数の割合である。

^b 4 孢子生存率は子嚢胞子に対する 4 孢子全てが生存した子嚢数の割合である。

NAM2-2B と KF7-5C とを掛け合わせて得た二倍体 NAM3 株を分離し、得られた 4 胞

子の中から NAM3-15D を選択した。同様に NAM3-15D と KF7-5C とを掛け合わせて二倍体 NAM5 を分離し、その子孫である NAM5-15D を得た。このような戻し交配をさらに 4 回繰り返して、遺伝背景を KF7 系統株に近づけた (表 1-4)。最終的に得た 2 倍体 NAM11 の孢子形成率と 4 孢子生存率はそれぞれ 16% と 83% であった (表 1-4)。

2 つ目の方法は、株内掛け合わせを用いる方法である。KF7-5C と KF7-4B およびそれらの子孫の間の株内掛け合わせを繰り返して接合能・孢子形成能・孢子発芽能の良い株を選んだ。その結果、二倍体 KFG1, KFG2, KFG3, KFG4, KFG5 と掛け合わせが進むにつれて、孢子形成率と 4 孢子生存率が高くなり、それぞれ 2-10% と 90% に達した。

このようにして目的の孢子形成と高い孢子生存率を持つ株を得た。実験室酵母 SH6710 と KF7-5C との掛け合わせで得た二倍体 NAM2 の孢子形成率が 0.1% と比較的低いのは、染色体の構造が両者で異なっていることを示唆している。

1-3-3. KFG4-6B の繰り返し培養による増殖速度の改善

繰り返しの戻し交配で得た NAM11-9C 株と NAM11-13A 株が、直接的には選択していない KF7 の性質である耐熱性を持っているのかどうかを、掛け合わせで得た二倍体 NAM12 を用いて解析した。YPD 培地 (pH 5.5) で NAM12 株の増殖を解析したところ、最も早い世代時間は 30°C, 32.5°C, 35°C, 37.5°C, 40°C で、それぞれで 1 hr, 0.9 hr, 0.85 hr, 0.95 hr, 1.6 hr であり、世代時間が 30-37°C まで変化がない。すなわち、NAM12 は KF7 株と同様に耐熱性を示している。耐酸性に関しても YPD 培地、35°C で解析した。最も早い世代時間は pH 5.5, pH 4.5, pH 3.5, pH 3.0, pH 2.6, pH 2.5 それぞれで 0.85 hr, 0.89 hr, 1 hr, 1.4 hr, 1.4 hr, 3.1 hr であった。従って、二倍体 NAM12 は、KF7 株と同様に耐酸性を示している (5)。このように、戻し交配を繰り返し行うことにより、直接的には選択しなくても遺伝背景が親株の KF7 に近づくことを示している。

KFG4-6B (*MATa* Flo⁺) 株は、凝集性酵母であるので、非凝集性酵母の分離を試みた。YPD 液体培地 (pH 5.5) 温度 35°C で 24 時間振盪培養した。その培養液を静置す

るとほとんどの細胞が凝集性を示して沈殿した。上澄みの培養液を新しい YPD 液体培地 (pH 5.5) に移し、35°C でまた振盪培養した。このような操作を繰り返し行くと培養液は濁り始め、凝集性を示しにくくなった。培養液を適当に希釈し、YPD 固形培地に塗抹し、単細胞分離を行った。その内の一株が KFG4-6BD である。この株の増殖を YPD 液体培地で解析したところ、温度 35°C、pH 3.0 で世代時間 1.1 hr と非常に高い増殖速度を示した。

1-3-4. 高い増殖能、高効率形質転換能、乳酸資化性能を示す NAM34-4C 株の構築

KFG4-6BD 株の栄養細胞は、卵型であり二倍体と推定できた。そこで、孢子形成培地に移し、子嚢胞子の観察を行ったところ、孢子形成を認めた。4 胞子のクローンを解析したところ、そのクローンもまた子嚢胞子を形成した。従って、ホモタリズム二倍体であることが確認された。

一倍体 NAM11-2C (*MAT α ho ura3 Δ 0 dse2::kanMX sed1::Sh ble*) 株に KFG4-6BD (*MAT α /MAT α*) 株の耐酸性・耐熱性・良好な増殖能を掛け合わせで併せ持たせるために、KFG4-6BD 株の子嚢胞子と NAM11-2C 株の栄養細胞をマイクロマニプレーターで接触させ、細胞・孢子接合を行った。G418 を加えた最少培地に生じたコロニーを移し、30°C、2 日間 静置培養することでヘテロ二倍体を分離した。その二倍体を孢子形成させ、ウラシル要求性・ゼオシン耐性・G418 耐性の一倍体で接合型 α の NAM21-2C 株 (*MAT α ho ura3 Δ 0 dse2::kanMX sed1::Sh ble*) を得た。この株を再度 KFG4-6BD 株の子嚢胞子と細胞・孢子接合を行った。その 4 胞子の 1 つが NAM23-8A 株 (*MAT α ho*) である。この NAM23-8A 株と KFG4-4B (*MAT α ho Flo⁺*) を掛け合わせ、二倍体 NAM26 を得た。その二倍体の子嚢胞子クローンが NAM26-14A 株と NAM26-15A 株である。NAM26-15A 株は、YPD 培地、pH 2.5、35°C で世代時間 1.6 hr を示し、顕著な耐酸性と耐熱性を示すことを認めた。NAM26-14A 株と NAM26-15A 株を掛け合わせて得た NAM34-4C 株は、偶然ではあるが、標準的な実験室酵母である BY4849 と比べても遜色ない、またはより良い形質転換効率を示すことを見出した

(表 1-5)。すなわち、DNA 末端に 40 mer の相同性しかない供与体 DNA を用いても μg DNA 当たり約 100 個の形質転換体を得られた。一方、実用酵母の親株である KF7 株では、この DNA 濃度では形質転換体は出現しなかった (表 1-5)。このことから、NAM34-4C 株を遺伝的操作に適する株と判断した。

表 1-5 NAM34-4C 株, NAM26-15A 株, 実験室酵母 BY4848 株および KF7 株の形質転換効率

Recipient (relevant genotype)	Genetic structure of donor DNA	Homologous DNA length (base)	Selection	Transformation efficiency (μg DNA)
NAM34-4C (wild type)	<i>P_{JEN1}-kanMX-T_{JEN1}</i>	40	G418-r	144 \pm 11
NAM34-4C (wild type)	<i>P_{Hxt7}-kanMX-P_{TDH3}- HXT7</i>	40	G418-r	71 \pm 5
NAM26-15A (wild type)	<i>P_{JEN1}-kanMX-T_{JEN1}</i>	40	G418-r	68 \pm 6
NAM26-15A (wild type)	<i>P_{Hxt7}-kanMX-P_{TDH3}- HXT7</i>	40	G418-r	53 \pm 6
BY4849 (wild type)	<i>P_{JEN1}-kanMX-T_{JEN1}</i>	40	G418-r	11 \pm 2
BY4849 (wild type)	<i>P_{Hxt7}-kanMX-P_{TDH3}- HXT7</i>	40	G418-r	14 \pm 4
KF7 (wild type)	<i>P_{JEN1}-kanMX-T_{JEN1}</i>	40	G418-r	<0.1
KF7 (wild type)	<i>P_{Hxt7}-kanMX-P_{TDH3}- HXT7</i>	40	G418-r	<0.1

P_{JEN1}-kanMX-T_{JEN1} DNA (1.7 kb) は選択マーカーの *kanMX* 遺伝子を含んでいる。その DNA 領域は pBlu-LTKTL-TDH3 を一対のプライマーである F-JEN1-G418 と R-JEN1-G418 を用いて増幅し作成した。*P_{Hxt7}-kanMX-P_{TDH3}-HXT7* DNA (2.7 kb) は、pBlu-LTKTL-TDH3 を一対のプライマーである F-LTKTL-(Hxt7)と R-TDH3-(Hxt7)を用いて増幅し作成した。提示したデータは 3 回行った実験の平均と標準偏差である。

NAM34-4C 株は、KF7 の遺伝背景に近い。酸性やストレスに対しても抵抗性がある。

そこで、乳酸の資化性があるかどうかを乳酸最少培地（MSL, pH 4.0）温度 35℃ で解析した。その結果、L-乳酸を資化し、顕著な増殖を認めた（図 1-2）。この性質は、KF7, NAM12, KFG-6BD, NAM35 で見られ、実験室酵母 S288C や焼酎酵母 MIY1 では見られないので、親の KF7 由来であることを示している。乳酸最少培地でこれほど顕著に増殖できる *S. cerevisiae* は、我々の知る限りこれまでに報告例がない。また、焼酎製造酵母 KAG5 もまた弱いながらも乳酸を資化しているので耐酸性に優れた酵母の性質である可能性がある。乳酸培地での増殖は一倍体に比べて二倍体の方が早いので、二倍体の方がストレス耐性に優れていると考えられた。

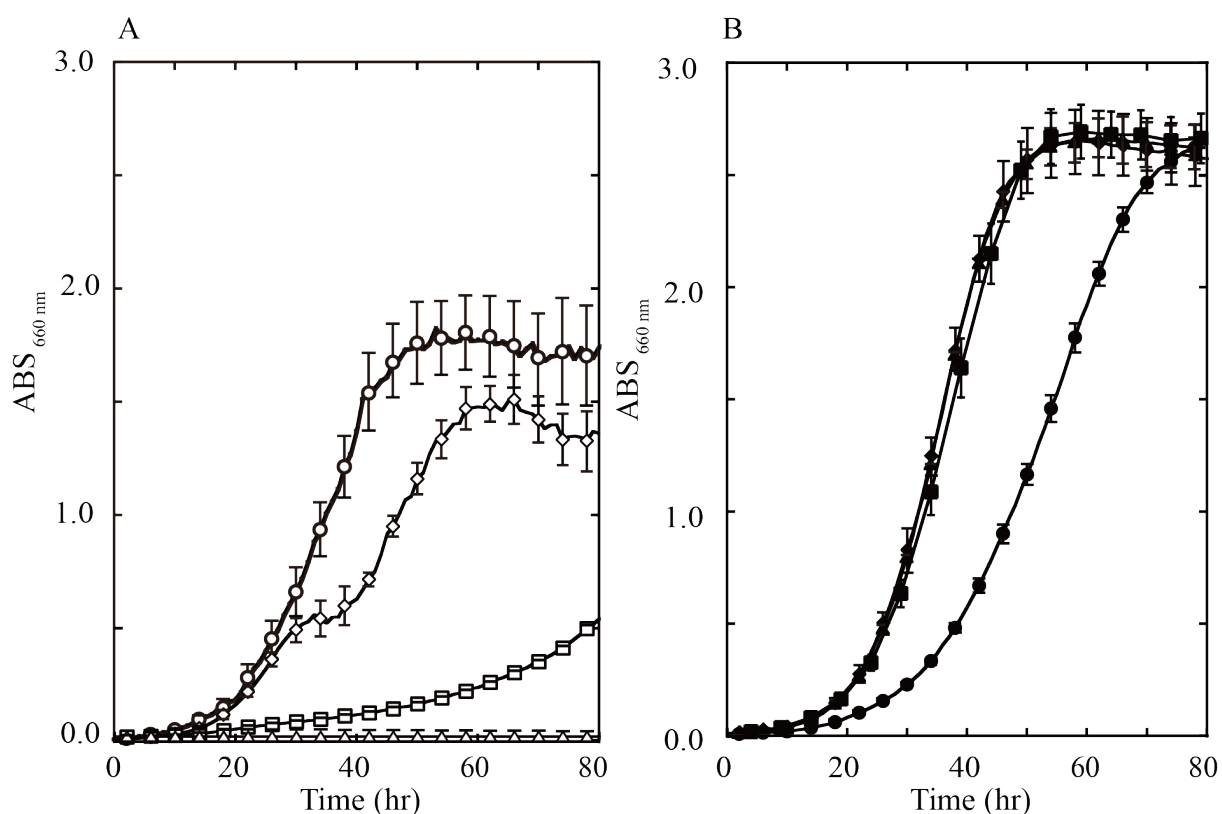


図 1-2 *Saccharomyces cerevisiae* KF7, KAG5, MIY1, S288C, NAM12, KFG-6BD, NAM35 と NAM34-4C 株の乳酸培地での増殖試験。

8 個の菌株を 5 mL の 20 g/L 濃度で乳酸を含む最少培地（MSL 培地, pH 4.0）に植菌し、温度 35℃ で振盪培養した。細胞濃度はバイオフィトレコーダー自記記録計で経時的に測定した。測定データは独立した 3 回の平均値と標準偏差である。記号：○, KF7; ◇, KAG5; △, MIY1; □, 実験室酵母 S288C; ◆, NAM12, △, KFG4-6BD, ■, NAM35 ; ●, NAM34-4C。

1-3-5. 低 pH, 高温条件下での回分発酵

KFG4-6BD 株が繰り返し戻し交配で, KF7 由来のエタノール発酵能の高さも受け継いでいるのかどうかを低 pH 高温条件下の回分発酵で調べた。グルコース 150 g/L を含む YPD 培地 (pH 4.0) に初期細胞濃度 $\text{Abs}_{660\text{nm}}=1.0$ となるように植菌し, 37°C で発酵試験を行った。発酵開始から 24 時間以内に 65 g/L のエタノールを生産し, エタノール収率は 85% だった。この生産量は KF7 が 24 時間以内に生産したエタノール量 (50 g/L) よりも 1.3 倍高く, 発酵 48 時間後の生産量 (65 g/L) と似ていた。このように, KFG4-6BD 株は増殖能の高い性質を獲得したので, 生産速度も早くなったと考えられた。

第 4 節 考察

工業用 *S. cerevisiae* 実用酵母は, 一般的にホモタリズムの性質を示し, 孢子形成や孢子生存率や接合能が低い (18)。KF7 株もホモタリズム株のため, 孢子形成しても一倍体は一時的である。一倍体は接合が容易であるが, 一般的に二倍体の接合はできないために育種するのが困難である。強制接合するには, 細胞とホモタリック二倍体の子嚢孢子とを顕微鏡で観察しながら, ミクロマニプレーターで隣接する位置に置き, 接合が起きるのを待つしかない。接合体を観察できても, 接合体を選択できなければヘテロ二倍体を分離できない (15, 18)。ホモタリズムは 1 個の *HO* 遺伝子によって支配されており, *HO* は対立遺伝子 *ho* に対して優性である (19)。ホモタリックな二倍体の子嚢孢子が発芽して細胞増殖する間に二倍体になるのは, 娘細胞の中で *HO* エンドヌクレアーゼを介した接合型変換が起き, その娘細胞と母細胞とが接合するためである (20–22)。リジン要求性で凝集性の KM1 株とイソロイシン・バリン要求性で耐熱性の HM2 株とのプロトプラスト融合により作成したホモタリック四倍体の子嚢孢子的のひとつが KF7 である (5)。本研究で分離した KF7-5C や KF7-4B は, それぞれ子嚢 4

孢子の中にひとつだけ見つけることができた。従って、KF7 株の *HO* 遺伝子領域間で組換えを起し、エンドヌクレアーゼが不活化となり、ヘテロタリック一倍体株ができたと推定できる。

ヘテロタリックな KF7-5C と KF7-4B を種内交配と繰返し戻し交配または繰返し株内交配を行うことで、孢子形成と孢子生存率の高い株に改良した (表 1-4)。改良した子孫の孢子形成能と 4 孢子生存率は、それぞれ親株が 0.1% と 25% に対し、2-3% と 80% に増加した (表 1-4)。KF7-5C と KF7-4B のゲノムのヌクレオチドがわずかに異なるため、掛け合わせの組み合わせで 2 つの性質が大幅に改良できたと推察できる。

KF7 が持つ耐熱性と耐酸性の性質を、育種の過程で選ばなくても子孫である NAM12, KFG4-6BD, NAM35, NAM34-4C に伝わっていた。これは KF7 の遺伝背景を持つ株と繰返し戻し交配したためと考えられる。NAM34-4C 株の形質転換活性は、他の子孫 NAM26-15A や実験室酵母 BY4849 と比較して高かった (表 1-5)。*S. cerevisiae* の形質転換機構は、詳細には解明されていない。しかしながら、高い形質転換能を持つ NAM34-4C 株の育種に対して、簡便かつ迅速な酵母の遺伝学的技術が使用できるので、様々な物質生産の親株となり得ると考えられる。

工業用酵母には、実験室酵母にはない特徴がある。耐熱性や耐酸性に加えて、ストレス耐性である。NAM34-4C は実験室酵母とは異なり、L-乳酸最少培地で顕著な増殖を示した (図 1-2)。酵母細胞内に取り込まれた L-乳酸は、ミトコンドリア内膜にあるチトクロム b2 (L-乳酸チトクロム c 酸化還元酵素) によってピルビン酸に変換される (23-29)。そのピルビン酸がミトコンドリアのマトリックスに輸送される経路あるいは細胞質に輸送されて代謝される経路の何れかが NAM34-4C 株と実験室酵母で異なっており、増殖の違いを示すと考えられる。NAM34-4C 株の形質転換能が、実験室酵母 BY4848 や BY4849 よりも高いことから、掛け合わせによる染色体のシャフリングで、さらに高頻度な形質転換能を持つ株の育種が可能であることを強く示唆している。

第5節 要約

耐熱性ホモタリズム二倍体 KF7 から掛け合わせに優れたヘテロタリズム一倍体を子嚢胞子クローンの中から分離した。その2株 KF7-5C と KF7-4B は、それぞれ *MATa* と *MATα* 接合型を示した。実験室酵母 BY4848 または BY4849 と掛け合わせ4孢子解析したところ、*MATa*:*MATa*, *URA3*:*ura3*, *LEU2*:*leu2*, *TRP1*:*trp1*, *HIS3*:*his3* が 2+:2-分離した。それゆえ、2株はヘテロタリズム株であると結論した。

さらに、種内掛け合わせと繰り返し戻し交配あるいは株内繰り返し掛け合わせを行い、孢子形成率と孢子生存率を改善した。KF7-5C 株と実験室酵母 SH6710 を掛け合わせて二倍体を作製し、子嚢胞子クローン NAM2-2B を選んだ。掛け合わせ能に優れ、かつ KF7 の遺伝背景に近づけるために、繰り返し戻し交配で NAM11 二倍体を得た。その孢子形成率と4孢子生存率は 16%と 83%であった。一方、KF7-5C 株、KF7-4B 株とその子孫の株内掛け合わせを繰り返し、二倍体 KFG5 を得た。その孢子形成率と4孢子生存率は、それぞれ 2-10%と 90%と良好であった。

NAM12 株の YPD 培地, pH 5.5 での世代時間は、35°C で 0.85 hr と耐熱性を示し、35°C, pH 3.5 での世代時間は1時間であり、耐酸性も示すことが分かった。KFG4-6B 株から分離した非凝集性 KFG4-6BD 変異体は、温度 35°C, pH 3.0 で世代時間 1.1 hr と強い増殖を示した。この性質を2回の細胞・孢子接合で NAM11-2C 株に取り込んだ。その誘導体 NAM26-15A は、YPD 培地, pH 2.5, 35°C で世代時間 1.6 hr を示した。また、NAM34-4C 株は実験室酵母 BY4849 よりも高い形質転換効率を示した。

KFG4-6BD の回分発酵を、グルコース 150 g/L を含む YPD 培地, pH 4.0, 温度 37°C, 初発細胞濃度 $\text{Abs}_{660\text{nm}}=1.0$ で行った。発酵開始から24時間以内に 65 g/L のエタノールを生産し、エタノール収率は 85%だった。これは親株の KF7 が、24時間以内に生産したエタノール量 (50 g/L) よりも 1.3 倍高かった。このように、低い pH と高温での強い発酵性を認めた。

第2章 高効率キシロース資化を導く

Saccharomyces cerevisiae HEX 突然変異体の分離とその解析

第1節 緒言

竹は地球上でも早い成長をする植物であり、リグノセルロース系バイオマスの1つとして知られている。日本における総竹面積は10年前と比べ約2倍に増加している。従って、このバイオマスは食糧と競合せず、エタノール生産に用いるのに適している。リグノセルロース系バイオマスは一般的にセルロース、ヘミセルロース、リグニンと少量の化合物の複雑な混合物であり、乾燥竹重量のセルロースとヘミセルロースの比率は約2:1である (30–34)。 *S. cerevisiae* はキシロースを単一炭素源として効率的に利用することができず、全てのキシロース代謝経路を持っているにも関わらずキシロースからエタノールへと発酵することができない (35)。 *S. cerevisiae* は促進拡散によりキシロースを取り込む (35, 36)。キシロースの促進拡散は *HXT* 遺伝子群によりコードされているヘキソーストランスポーターを通して起こる (37)。 *S. cerevisiae* のヘキソーストランスポーターには、グルコースに対して高い親和性 (Hxt2, Hxt6, Hxt7) を示すものと低い親和性 (Hxt1, Hxt3, Hxt4) を示すものがあり、その活性はそれぞれ低濃度と高濃度のグルコース条件下で見られる (38–41)。グルコーストランスポーターの中には、キシロースの取り込みを行うものがあるが (Hxt7, Gal2, Hxt4, Hxt5), グルコースに比べて取り込み効率が顕著に悪い (42)。また、 *S. cerevisiae* はキシロースを単一炭素源とした時、 *HXT5* と *HXT7* のみ発現していることから、これらの2つの Hxt タンパク質はキシロース輸送に特に重要だと考えられている (43)。

酵母細胞内で、キシロースは酸化還元反応と異性化反応の2段階でキシリロースに変換される (44)。キシロースは最初に NADPH または NADH 依存キシロースリダクターゼ (EC 1.1.1.21; XR) によりキシリトールへ還元される。キシリトールはその後

NAD 依存キシリトールデヒドロゲナーゼ (EC 1.1.1.14; XDH) によりキシロースへ酸化される。キシロースはキシロキナーゼ (XK) により C5-OH の位置でリン酸化されることによりキシロース 5-リン酸 (X5P) を生じ、さらにペントースリン酸経路 (PPP) を通して、グリセルアルデヒド 3-リン酸 (GA3P) やフルクトース 6-リン酸 (F6P) のような解糖系中間産物になる。これらの中間産物はエムデン-マイヤーホフ-パルナス経路内でピルビン酸に変換される (45)。嫌気条件下で、ピルビン酸はピルビン酸デカルボキシラーゼによりアセトアルデヒドに脱炭酸され、その後アルコールデヒドロゲナーゼによりエタノールに還元される。

S. cerevisiae は工業用エタノール生産に適した微生物である。なぜならば、酵母はエタノール生産において広い基質範囲と高いエタノール耐性をもつためである。また、高いエタノール収率とリグノセルロース加水分解物に存在する阻害物質に耐性があるからである (46)。しかしながら、キシロースを単一炭素源として効率的に利用することができない (47)。組換え型 *S. cerevisiae* が *Pichia stipitis* の *XYL1* と *XYL2*, *S. cerevisiae* の *XKS1* を組み込むことにより構築されている。この株は 2%キシロース単一炭素源培地で遅いながらも好気増殖したが (47), エタノール生産は非常に低かった。それゆえ, *S. cerevisiae* が, キシロースをエタノールに変換する上での律速段階を知ることが重要と考えられた。組換え型 *S. cerevisiae* が, キシロース培地で一般的に増殖できないのは, キシロースの取り込みが悪いため (48), キシロースからキシロースへの酸化還元代謝に必要な補酵素のバランスが悪いため (49), XK 活性が低いあるいは PPP 回路の酵素活性が弱いため (50), などと考えられた。五炭糖代謝が解糖系の下流の反応を活性化することができないこともキシロースで増殖できなくなる理由であると示唆された (51, 52)。商業的採算がとれるようなエタノール収率と生産性を得るためには, キシロースの取り込みと代謝の両方が最適化されることが必要である。組換え型 *S. cerevisiae* のキシロース輸送やキシロース消費の初期段階の速度が, 代謝工学で改善されはじめている (53)。しかしながら, エタノール生産は, やはり未だ低い。

S. cerevisiae を馴養培養してキシロース発酵に適するように改変する方法が用いられ、成果をあげている。これらの方法は、キシロース代謝経路におけるボトルネックを見つける方法でもある。これまでに組換え型 *S. cerevisiae* と野生型 *S. cerevisiae* を用いて 3 つの方法が試みられている。第一番目は、好氣的な環境で、組換え型 *S. cerevisiae* を増殖させ、徐々に嫌氣的な環境に適応させる方法である (54)。第二番目は、組換え型 *S. cerevisiae* をキシロースのみで培養し、その後キシロース・グルコース混合物に切り替え、さらにキシロースに切り替えることを繰り返し行う方法である (55)。第 3 番目は、選択圧をうまく利用することであり、キシロース培地で、ゆるやかな増殖を示す変異体を徐々に蓄積する方法である (56)。しかしながら、キシロース消費速度とエタノール生産速度は未だ低い。この低い消費と生産という問題点の理由の 1 つとしておそらく解析に実験室酵母を用いているためであることが考えられる。

そこで、本章では耐熱・耐酸性実用酵母 NAM34-4C を親株として、キシロース資化性酵母を構築し、高効率なキシロース資化、キシロース消費、エタノール生産を導く変異体を分離し、その機構の解明を目的とした。

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

本章で使用した菌株とプラスミドを表 2-1 に示した。ヘテロタリズム酵母の遺伝子型 *ho* の記載は、第 2 章では省略した。酵母 NAM34-4C は、第 1 章で示したように、耐熱・耐酸性で乳酸を資化できる酵母であり親株として用いた。NAM201 株と NAM203 株は、それぞれ表 2-1 で示した 1 と 2 のアンプリコン DNA による NAM34-4C の G418 耐性転換体であり Ura^r と Leu^r を示す。NAM34-4CG2 株は一倍体株で、NAM201 と NAM203 との接合体から生じた子嚢胞子クローンである。NAM300 株は、表 2-1 で示したアンプリコン 3 の DNA による NAM34-4CG2 株の G418 耐性転換体で二倍体

細胞である。SCA1 株と SCA2 株は、NAM300 株から得た一倍体で、それぞれ *MATa* と *MATα* を示す。SCA3 株は、SCA1 株から *kanMX* 領域を除去した株である。この株は (i) pZeo プラスミドを用いた SCA1 株の形質転換、(ii) Cre タンパク質を発現させることによる *kanMX* 領域の除去、(iii) pZeo プラスミドの除去等の一連の遺伝子操作により構築した。pTEF1/Zeo は 3.6 kb のベクターで大腸菌と酵母の両方にゼオシン耐性を与える。DNA の構造は、*P_{TEF}*-EM7-*Sh ble*-*T_{CYC1}*-multi-cloning site-*bla*-*ori_{pUC}*-multi-cloning site である。このプラスミドは EM7 プロモーターにより大腸菌にゼオシン耐性 (Zeo-r) を与える。pSH47 は 6.8 kb のベクターで DNA の構造は、*CEN/ARSH4*-*URA3*-*T_{CYC1}*-*CRE*-*P_{GALI}*-*bla* である (57)。pS-LTKTL- *MATa* は、*S. cerevisiae* の接合型を変換するために用いた。SCB38 株は SCB14 株の *kanMX* 遺伝子を *URA3* 遺伝子と置き換えることによって作製した *URA*⁺株である。本研究で用いたプライマー (Genenet, Fukuoka, Japan) は Primer3 (第 1 章 第 2 節) 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 (第 1 章 第 2 節) の情報もしくは NAM34-4C 株のドラフト塩基配列 (未発表) に基づいた。

表 2-1 本研究で使用した菌株及びプラスミド

Bacterial Strain	Genotype or phenotype	Reference, source or derivation
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
NAM34-4C	<i>MATα</i>	第 1 章 Tfm (NAM34-4C: <i>kanMX</i> DNA,
NAM201	<i>MATα ura3Δ::kanMX</i>	G418-r) ^a 。pBlu-LTKTL-TDH3 の <i>kanMX</i> 領域をプライマー F-LTKTL(URA) と R-LTKTL(URA) で増幅した。 Tfm (NAM34-4C: <i>kanMX</i> DNA,
NAM203	<i>MATα leu2Δ::kanMX</i>	G418-r)。pBlu-LTKTL-TDH3 の <i>kanMX</i> 領域をプライマー F-LTKTL(LEU2) と R-LTKTL(LEU2) で増幅した。
NAM34-4CG2	<i>MATα</i>	Haploid (NAM201 × NAM203) ^b

表 2-1 続き

NAM300	<i>MATα/MATa pho87Δ::kanMX</i>	Tfm (NAM34-4CG2: <i>pho87::kanMX</i> DNA, G418-r).
SCA1	<i>MATa pho87Δ::kanMX</i>	NAM300 二倍体からの子嚢胞子クローンのひとつ
SCA2	<i>MATα</i>	NAM300 二倍体からの子嚢胞子クローンのひとつ
SCA3	<i>MATa pho87Δ</i>	SCA1 の <i>kanMX</i> 領域を欠失
S288C	<i>MATα SUC2 mal mel gal2 CUP1 flo1 flo8-1 SSD1-v1</i>	第 1 章
SH6710	<i>MATa ho dse2::kanMX sed1::Sh ble his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0</i>	第 1 章
SH6703	<i>MATa sed1:: Sh ble eaf3::HIS3</i>	YGRS ^c
KF7	<i>MATa/MATα HO/HO FLO⁺</i>	第 1 章
SCB4	<i>MATa pho87Δ ura3Δ::XM₂^d</i>	Tfm (SCA3: XM ^d DNA, G418-r)
SCB5	<i>MATa pho87Δ ura3Δ::XM₃^e</i>	Tfm (SCA3: XM DNA, G418-r)
SCB6	<i>MATa pho87Δ ura3Δ::XM₇^d</i>	Tfm (SCA3: XM DNA, G418-r)
SCB7	<i>MATa pho87Δ ura3Δ::XM₈^d</i>	Tfm (SCA3: XM DNA, G418-r)
SCB11-6B	<i>MATa ura3Δ::XM₈</i>	Haploid (SCA2 × SCB7)
SCB11-8A	<i>MATa ura3Δ::XM₈</i>	Haploid (SCA2 × SCB7)
SCB11-8C	<i>MATa ura3Δ::XM₈</i>	Haploid (SCA2 × SCB7)
SCB101	<i>MATα/ MATa pho87Δ</i>	Diploid (SCA2 × SCA3) ^f
SCB101-7C	<i>MATα</i>	Haploid (SCA2 × SCA3)
SCB101-2B	<i>MATa pho87Δ</i>	Haploid (SCA2 × SCA3)
SCB102	<i>MATα/ MATa pho87Δ</i>	Diploid (SCB101-7C × SCB101-2B)
SCB102-3D	<i>MATa pho87Δ</i>	Haploid (SCB101-7C × SCB101-2B)
SCB103	<i>MATa ura3Δ::XM₈/ MATa pho87Δ</i>	Diploid (SCB11-8C × SCB102-3D)
SCB103-5B	<i>MATa pho87Δ ura3Δ::XM₈</i>	Haploid (SCB11-8C × SCB102-3D)
SCB103-10D	<i>MATa ura3Δ::XM₈</i>	Haploid (SCB11-8C × SCB102-3D)
SCB13	<i>MATa pho87Δ ura3Δ::XM₈ hex3₁₋₅</i>	SCB7 株から分離した自然突然変異体
SCB14	<i>MATa pho87Δ ura3Δ::XM₈ HEX1₂₋₂</i>	SCB7 株から分離した自然突然変異体
SCB15	<i>MATa pho87Δ ura3Δ::XM₈ HEX2₂₋₃</i>	SCB7 株から分離した自然突然変異体
SCB16	<i>MATa pho87Δ ura3Δ::XM₈ HEX1₂₋₉</i>	SCB7 株から分離した自然突然変異体
KF7M	<i>MATa / MATα HO / HO trp1 / trp1::P_{TEF}-ERG25 P_{TDH3} / P_{TDH3}::P_{TDH3}-BGL1-TRP1 ura3 / ura3::URA3-P_{TDH3}-XYL1-T_{TDH3}-P_{TDH3}-XYL2-T_{TDH3}-P_{TDH3}-XKS1-T_{TDH3}</i>	A. Kondo ^g

表 2-1 続き

SCB104	<i>MATa pho87Δ ura3Δ::XM₈ hex3₁₋₅/MATa ura3Δ::XM₈</i>	Diploid (SCB13 × SCB103-10D)
SCB104-2B	<i>MATa pho87Δ ura3Δ::XM₈ hex3₁₋₅</i>	Haploid (SCB13 × SCB103-10D)
SCB104-7B	<i>MATa pho87Δ ura3Δ::XM₈ hex3₁₋₅</i>	Haploid (SCB13 × SCB103-10D)
SCB104-5D	<i>MATa pho87Δ ura3Δ::XM₈ hex3₁₋₅</i>	Haploid (SCB13 × SCB103-10D)
SCB105	<i>MATa pho87Δ ura3Δ::XM₈ HEX1₂₋₂/MATa ura3Δ::XM₈</i>	Diploid (SCB14 × SCB103-10D)
SCB105-3B	<i>MATa ura3Δ::XM₈ HEX1₂₋₂</i>	Haploid (SCB14 × SCB103-10D)
SCB105-3A	<i>MATa ura3Δ::XM₈ HEX1₂₋₂</i>	Haploid (SCB14 × SCB103-10D)
SCB105-7A	<i>MATa ura3Δ::XM₈ HEX1₂₋₂</i>	Haploid (SCB14 × SCB103-10D)
SCB106	<i>MATa pho87Δ ura3Δ::XM₈ HEX2₂₋₃/MATa ura3Δ::XM₈</i>	Diploid (SCB15 × SCB103-10D)
SCB106-8D	<i>MATa pho87Δ ura3Δ::XM₈ HEX2₂₋₃</i>	Haploid (SCB15 × SCB103-10D)
SCB106-1D	<i>MATa ura3Δ::XM₈ HEX2₂₋₃</i>	Haploid (SCB15 × SCB103-10D)
SCB107	<i>MATa pho87Δ ura3Δ::XM₈ HEX1₂₋₉/ MATa ura3Δ::XM₈</i>	Diploid (SCB16 × SCB103-10D)
SCB107-5C	<i>MATa pho87Δ ura3Δ::XM₈ HEX1₂₋₉</i>	Haploid (SCB16 × SCB103-10D)
SCB107-8D	<i>MATa ura3Δ::XM₈ HEX1₂₋₉</i>	Haploid (SCB16 × SCB103-10D)
SCB108	<i>MATa pho87Δ ura3Δ::XM₈ hex3₁₋₅/ MATa ura3Δ::XM₈ hex3₁₋₅</i>	Diploid (SCB104-7B × SCB104-5D)
SCB109	<i>MATa pho87Δ ura3Δ::XM₈ HEX1₂₋₂/ MATa ura3Δ::XM₈ HEX1₂₋₂</i>	Diploid (SCB105-3B × SCB105-3A)
SCB110	<i>MATa pho87Δ ura3Δ::XM₈ HEX2₂₋₃/ MATa ura3Δ::XM₈ HEX2₂₋₃</i>	Diploid (SCB106-8D × SCB106-1D)
SCB111	<i>MATa pho87Δ ura3Δ::XM₈ HEX1₂₋₉/ MATa ura3Δ::XM₈ HEX1₂₋₉</i>	Diploid (SCB107-5C × SCB107-8D)
SCB112	<i>MATa pho87Δ ura3Δ::XM₈ / MATa ura3Δ::XM₈</i>	Diploid (SCB103-5B × SCB103-10D)
SCB113	<i>MATa pho87Δ ura3Δ::XM₈ HEX1₂₋₉/ MATa ura3Δ::XM₈ HEX1₂₋₂</i>	Diploid (SCB107-8D × SCB105-3A)
SCB114	<i>MATa pho87Δ ura3Δ::XM₈ HEX2₂₋₃/ MATa ura3Δ::XM₈ HEX1₂₋₂</i>	Diploid (SCB106-8D × SCB105-3A)
SCB115	<i>MATa pho87Δ ura3Δ::XM₈ hex3₁₋₅/ MATa ura3Δ::XM₈ HEX1₂₋₂</i>	Diploid (SCB104-7B × SCB105-3A)
SCB116	<i>MATa pho87Δ ura3Δ::XM₈ hex3₁₋₅/ MATa ura3Δ::XM₈ HEX2₂₋₃</i>	Diploid (SCB104-7B × SCB106-1D)

表 2-1 続き

MYA-3666 TM	<i>MATa ura3-Δ1 ade2-101 his3Δ200 trpΔ1 lys2 met14</i>	ATCC ^h
SCB38	<i>MATa pho87Δ URA3::XM₁ⁱ HEX1₂₋₂</i>	Tfm (SCB14: URA ⁺ DNA, URA ⁺ , G418-s)
SCC2-11B	<i>MATa pho87Δ URA3::XM₁</i>	Haploid (SCB38 × SCB103-10D)
SCB44	<i>MATa pho87Δ URA3::XM₁ P_{TAL1} Δ::kanMX-P_{TDH3}-TAL1</i>	Tfm (SCC2-11B: <i>kanMX</i> DNA, G418-r)
SCB45	<i>MATa pho87Δ URA3::XM₁ pho13Δ::kanMX</i>	Tfm (SCC2-11B: <i>kanMX</i> DNA, G418-r)
SCB47	<i>MATa pho87Δ URA3::XM₁ P_{TAL1} Δ::kanMX-P_{TDH3}-TAL1/ MATα pho87Δura3Δ::XM₈ HEX1₂₋₂</i>	Diploid (SCB44 × SCB105-7A)
SCB48	<i>MATa pho87Δ URA3::XM₁ P_{TAL1} Δ::kanMX-P_{TDH3}-TAL1/ MATα pho87Δura3Δ::XM₈ HEX1₂₋₃</i>	Diploid (SCB44 × SCB106-1D)
SCB49	<i>MATa pho87Δ URA3::XM₁ pho13Δ::kanMX/ MATα pho87Δura3Δ::XM₈ hex3₁₋₅</i>	Diploid (SCB45 × SCB104-2B)
SCB52	<i>MATa ura3Δ1::kanMX ade2-101 his3Δ200 trpΔ1 lys2 met14</i>	Tfm (MYA-3666 TM : <i>kanMX</i> DNA, G418-r)
SCC101	<i>MATa pho87Δ URA3::XM₁ HEX1-22(CDC19-22)::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-CDC19-kanT300 and R-CDC19-kanT300.
SCB1021	<i>MATa pho87Δ URA3::XM₁ HEX2-23</i>	Tfm (SCB15: <i>URA3</i> DNA, URA ⁺ , G418-s). The <i>URA3</i> DNA region of pURA3 was amplified using primers F-URA3-STR and R-URA3-DWN300(GAPDH).
SCC102	<i>MATa pho87Δ URA3::XM₁ HEX1-29(CDC19-29)::kanMX</i>	Tfm (SCB1031: <i>kanMX</i> DNA, G418-r). The <i>kanMX</i> DNA region of pBlu-LTKTL-TDH3 was amplified using primers F-CDC19-kanT300 and R-CDC19-kanT300.

表 2-1 続き

SCB1031	<i>MATa pho87Δ URA3::XM₁ HEX1-29</i>	Tfm (SCB16: <i>URA3</i> DNA, <i>URA</i> ⁺ , G418-s). The <i>URA3</i> DNA region of pURA3 was amplified using primers F-URA3-STR and R-URA3-DWN300(GAPDH).
SCC104	<i>MATa pho87Δ URA3::XM₁ P_{GRR1}</i>	Tfm (SCC12: <i>ADE</i> ⁺ and <i>P_{GRR1-23}</i> DNA, <i>Ade</i> ⁺ <i>P_{GRR1-23}</i>). The <i>ADE</i> ⁺ DNA region of pADE1 was amplified using primers F-ADE1-UP1k and R-ADE1-DWN1k. The <i>P_{GRR1-23}</i> DNA region of pGRR1 was amplified using primers F-GRR1-up1k and R-GRR1-in647.
SCC105	<i>MATa pho87Δ URA3::XM₁ CDC19-22::kanMX</i>	Tfm (SCC2-11B: <i>kanMX-CDC29-22</i> DNA, G418-r). The <i>kanMX-CDC19-22</i> DNA region of chromosomal DNA of the SCC101 was amplified using primers F-CDC19-in314 and R-CDC19-down810.
SCC106	<i>MATa pho87Δ URA3::XM₁ CDC19-29::kanMX</i>	Tfm (SCC2-11B: <i>kanMX-CDC19-29</i> DNA, G418-r). The <i>kanMX-CDC19-29</i> DNA region of chromosomal DNA of the SCC102 was amplified using primers F-CDC19-in314 and R-CDC19-down810.
SCC12	<i>MATa pho87Δ ade1Δ::Ty-kanMX URA3::XM₁</i>	Tfm (SCC2-11B: <i>Ty-kanMX</i> DNA, G418-r)
SCC24	<i>MATa pho87Δ URA3::XM₁ GRR1</i>	Tfm (SCC12: <i>ADE</i> ⁺ DNA, <i>GRR1</i> DNA <i>ADE</i> ⁺ , G418-s)
<i>Escherichia coli</i>		
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, 29
Plasmid and amplicon DNA		
pBluescript II KS+	<i>bla</i>	34
pBlu-TDH3	<i>TDH3</i> promoter (<i>P_{TDH3}</i>)	本研究で構築

表 2-1 続き

pBlu-LTKTL-TDH3	<i>loxP-P_{TEF}-kanMX-T_{TEF}-loxP-P_{TDH3}</i>	本研究で構築
pS-MATa	<i>MATa</i> locus (SH6703)	本研究で構築
pS-LTKTL-MATa	<i>pho87'-loxP-P_{TEF}-kanMX-T_{TEF}-loxP-MATa</i> locus (SH6703)	本研究で構築
pXR	<i>P_{TDH3}-XYL1-T_{TDH3}</i>	本研究で構築
pXDH	<i>P_{TDH3}-XYL2-T_{TDH3}</i>	本研究で構築
pXK	<i>P_{TDH3}-XKS1-T_{TDH3}</i>	本研究で構築
pKX1X2XKS	<i>loxP-P_{TEF}-kanMX-T_{TEF}-loxP-P_{TDH3}-XYL1-T_{TDH3}-P_{TDH3}-XYL2-T_{TDH3}-P_{TDH3}-XKS1-T_{TDH3}</i>	本研究で構築
pSH47	<i>CEN6 / ARSH4 URA3 P_{GAL1} CRE TER_{CYC1} bla ori_{pUC}</i>	6.8 kb, 28
pTEF1/Zeo	<i>P_{TEF1} EM7 ZEOCIN TER_{CYC1} bla ori_{pUC}</i>	Life technologies
pZeo	<i>CEN6 / ARSH4 URA3 P_{GAL1} CRE TER_{CYC1} bla ori_{pUC} P_{TEF1} EM7 ZEOCIN TER_{CYC1}</i>	本研究で構築
pTy-kan	<i>ura3'-Ty- loxP-P_{TEF}-kanMX-T_{TEF}-loxP-'ura3</i>	本研究で構築
pADE1	<i>ADE1</i> (NAM34-4C)	本研究で構築
pGRR1	<i>HEX2₂₋₃</i>	本研究で構築
amplicon 1	<i>ura3'-loxP-P_{TEF}-kanMX-T_{TEF}-loxP-'ura3</i>	本研究で構築
amplicon 2	<i>leu2'-loxP-P_{TEF}-kanMX-T_{TEF}-loxP-'leu2</i>	本研究で構築
amplicon 3	<i>pho87'-loxP-P_{TEF}-kanMX-T_{TEF}-loxP-BUD5-MATa-'taf2</i>	本研究で構築
XM8	<i>loxP-P_{TEF}-kanMX-T_{TEF}-loxP-P_{TDH3}-XYL1-T_{TDH3}-P_{TDH3}-XYL2-T_{TDH3}-P_{TDH3}-XKS1-T_{TDH3}</i>	本研究で構築
XM3	<i>loxP-P_{TEF}-kanMX-T_{TEF}-loxP-P_{TDH3}-XYL1-T_{TDH3}-P_{TDH3}-XYL2-T_{TDH3}</i>	本研究で構築

^a Tfm, transformation; Tfm (NAM34-4C: *kanMX* DNA, G418-r) は *kanMX* DNA を用いた NAM34-4C の G418 形質転換体を示す。 *kanMX* DNA のフランキング領域に置き換える DNA 領域の相同領域を 40 bp 持つ。

^b Haploid (NAM201 × NAM203) は NAM201 と NAM203 との掛け合わせで得た 4 胞子の内の 1 つを示す。

^c YGRS, Yeast Genetic Resource Center.

^d XM, XM₂, XM₇, XM₈ は *loxP*, *TEF* プロモーター, *kanMX* 遺伝子, *TEF* ターミネーター, *loxP*, *TDH3* プロモーター, *TDH3* ターミネーターを含む, *loxP-P_{TEF}-kanMX-T_{TEF}-loxP-P_{TDH3}-XYL1-T_{TDH3}-P_{TDH3}-XYL2-T_{TDH3}-P_{TDH3}-XKSI-T_{TDH3}* の遺伝子構造をもつ DNA 断片である。

^e XM₃ は *loxP-P_{TEF}-kanMX-T_{TEF}-loxP-P_{TDH3}-XYL1-T_{TDH3}-P_{TDH3}-XYL2-T_{TDH3}* の遺伝子構造をもつ DNA である。

^f Diploid (SCA2 × SCA3) は SCA2 と SCA3 との掛け合わせで得た二倍体を示す。

^g 神戸大学大学院 工学研究科 応用化学専攻 生物化学工学研究室

^h ATCC, American Type Culture Collection

ⁱ XM₁ は *P_{TDH3}-XYL1-T_{TDH3}-P_{TDH3}-XYL2-T_{TDH3}-P_{TDH3}-XKSI-T_{TDH3}* の遺伝子構造をもつ DNA 断片である。

表 2-2 PCR 増幅に用いたオリゴヌクレオチドプライマー

Number	Name	Primer sequence (5' to 3')
1	F-ZeoPTEF1(ApaI)	tttgggccccccacacccatagctt
2	R-ZeocyclTT(KpnI)	tttgggtaccagcttgcaaattaaagcctt
3	F-MAT-UP1.5k(ApaI)	tttgggcccagagaaagtgtagaatctcatttc
4	R-MAT-DWN300(BamHI)	tttggatccaggaagtaacctctactgtg
5	F-LTKTL(MAT+ApaI)	tttgggcccgtctaactcaattgttctcgttaatatgttcccatctccgccagctgaagctt
6	R-LTKTL(ApaI)	tttgggcccaggccactagtggatct
7	F-GAPDHp(ApaI)	tttgggcccaccagttctcacacggaa (18)
8	R-XDH3	acttgaagtacttacataaggtac
9	F-XR3	aacacttctccattgttcgag
10	R-XK3	tggttctaattgtgcaatttcag
11	F-XDH3	atgactgctaacccttc
12	R-GAPDHt(URA+SacII)	tttccgcggtagttttgtctggccgcattctctcaaatatgcttcccagtcacatcaatgaatcgaaaatgtcatta
13	F-LTKTL(URA+ApaI)	tttgggcccagtcgaaagctacatataaggaacgtgctgctactcatccgccagctgaagctt
14	R-LTKTL(ApaI)	tttgggcccaggccactagtggatct
15	F-URA3-STR	atgtcgaaagctacatataagg
16	R-URA3-STR	ttagttttgtgcccgcac
17	M13 Rev	caggaaacagctatgacc
18	-21 M13	tgtaaaacgacggccagt
19	TDH3-F3	tttgaattcactttgaccctattttcgagg
20	TDH3-R2	tttctgcagttgtttgtttatgtgttattcgaa

表 2-2 続き

21	R-URA3-DWN300(GAPDH)	<u>gaatttgtgtccattagtgggtgtccgtgtgagaactgggttccttcatttgctttgttcca</u>
22	F-LTKTL(pho13)	<u>cttagcttgccctgacaaagaatatacaactcgggaaaccgccagctgaagctt</u>
23	R-LTKTL(pho13)	<u>ttcaaaaagtaattctacccaagattttgcattgctcctaggccactagtggatct</u>
24	F-LTKTL(UP600)	<u>tcacccgacatacatctgtacactaggaagccctgttttggccgccagctgaagctt</u>
25	R-TDH3P(StartTAL1)	<u>tgtagcaacctttgtttctttgagctgggttcagacattttgtttgttatgtgtgtttatc</u>
26	F-LTKTL(Ty)3	<u>tcccaacaattatctcaacattcacatatttctcagtaccccgccagctgaagctt</u>
27	R-LTKTL(Ty)3	<u>tgggacctaagtcttcaactaactccagtaattccttgtaggccactagtggatct</u>
28	F-URA3-STR(NotI)	tttgcggccgcatgtcgaaagctacatataagg
29	R-URA3-STR(NotI)	tttgcggccgcttagtttgcgtggccgcac
30	F-GRR1-up2.5k(NOT1)	tttgcggccgctgctggttttagcaatgttct
31	R-GRR1-down980b(NOT1)	tttgcggccgctactggaagatgtgtctgtg
32	F-GRR1-up1k-P	agcaatgccattattagaagatg
33	R-GRR1-in647-P	ccatgttttctgtctctagc
34	F-ADE1-UP2k(ApaI)	tttgggccctcaaccggttcagacttttc
35	R-ADE1-DWN2k(ApaI)	tttgggccccaaagatgagcgtagtaatttgc
36	F-ADE1-UP1k	tgtagccttctttccaaattgt
37	R-ADE1-DWN1k	ttattgactgcgctctataaatg
38	F-Ty(ADE1)	<u>cattgcttacaagaatacacatacgaatatataacgataatgttcgtacctgttgga</u>
39	R-LTKTL(ADE1)	<u>gaggagttacactggcgacttgtagtatatgtaaatcacaggccactagtggatct</u>

プライマー1-7, 12-14, 19 と 20, 28-31, 34 と 35 は斜体で示した 6 塩基の制限酵素認識部位を持つ。また, 太字で示した酵素処理改善のための 3 つの付加塩基も持つ。プライマー5, 12, 13, 21-27, 38, 39 は下線で示した 40 bp の相同領域を持つ。

2-2-2. 培地

YPD 培地, LB 培地, MSD 培地, M9 培地は, 第 1 章 第 2 節で示したものをを用いた。回分発酵試験に用いた YPX3 培地は, YPD 培地と同じ組成で 20 g/L グルコースの代わりに 30 g/L キシロースを用いた。組換え酵素 Cre の誘導に用いた YPGal 培地は, YPD 培地と同じ組成で 20 g/L グルコースの代わりに 20 g/L ガラクトースを用い

た。pZeo を構築するのに用いた LLB 培地は、バクトトリプトン 10 g, バクト酵母エキス 5 g, NaCl 5 g を蒸留水 1 L 当たりに含み pH 7.5 に調整した。固形培地には寒天 15g を加えた。抗生物質は必要に応じて、ゼオシン (Zeo) を最終濃度 25 mg/L となるように加えた。キシロース資化性の確認に用いた MSX 培地または MSX3 培地は、MSD 培地と同じ組成で、20 g/L グルコースの代わりに 20 g/L キシロースまたは 30 g/L キシロースをそれぞれ用いた。胞子形成条件の検討に用いた培地は、SpoKII, SpoNa, 1/2SpoNa, SpoNaII 培地であり、SpoKII 培地は、酢酸カリウム 10g, バクト酵母エキス 1g, グルコース 0.5g, 寒天 20g を蒸留水 1L 当りに含み、SpoNa 培地は、酢酸ナトリウム 10g, 寒天 20g を蒸留水 1L 当りに含み、1/2SpoNa 培地は、酢酸ナトリウム 5g, 寒天 20g を蒸留水 1L 当りに含み、SpoNaII 培地は、酢酸ナトリウム 10g, バクト酵母エキス 1g, グルコース 0.5g, 寒天 20g を蒸留水 1L 当りに含み、pH5.5 に調整した。

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. 大腸菌からのプラスミド調製および 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. プラスミド DNA への制限酵素処理、アガロースゲル電気泳動およびエリユーションによる DNA 断片の回収

制限酵素処理、アガロースゲル電気泳動およびエリユーションによる DNA 断片の回収は、第 1 章の第 2 節で示した方法で行った。

2-2-6. PCR 法による DNA 断片の増幅，コロニーからの直接 PCR 法および塩基配列決定

DNA 断片の増幅，コロニーからの直接 PCR 法および塩基配列決定は，第 1 章の第 2 節で示した方法で行った。

2-2-7. プラスミドの構築

ガラクトース誘導すると Cre タンパク質を発現するゼオシン耐性プラスミド pZeo を pSH47 から構築した。pTEF1/Zeo 鋳型 DNA と 1 対のプライマー F-ZeoPTEF1(ApaI) と R-Zeocyc1TT(KpnI) (表 2-2) を用いて PCR を行い，1.2 kb の P_{TEF} -EM7-*Sh ble*- T_{CYC1} 領域を増幅した。制限酵素 *ApaI* と *KpnI* で切断した DNA 断片を，pSH47 の *ApaI* と *KpnI* 領域の間に組み入れ pZeo を構築する実験デザインであったが，構築したプラスミドの遺伝子構造は，1.2 kb の *ApaI*-*KpnI* 領域との置き換えではなく，1.2 kb の P_{TEF} -EM7-*Sh ble*- T_{CYC1} と pSH47 の *ApaI*-*KpnI* が pSH47 に挿入された構造であった。ただし，本章で示すが Cre タンパク質による *kanMX* 除去は正常に行うことができた。

プラスミド pKX1X2XKS はキシロース資化遺伝子 (*XYL1*, *XYL2*, *XKS1*) と *kanMX* マーカーを持つプラスミドであり，次のようにして構築した (図 2-1)。最初に，KF7M 株の染色体 DNA と 1 対のプライマーである F-GAPDHp(*ApaI*)と R-XDH3 (表 2-2) を用いて PCR を行い， P_{TDH3} -*XYL1*- T_{TDH3} 領域を増幅した。この増幅断片を *ApaI* と *XhoI* で切断し，pBluescript II KS+にクローン化し pXR を構築した。2 番目に，KF7M 株の染色体 DNA と 1 対のプライマーである F-XR3 と R-XK3 (表 2-2) を用いて PCR を行い， P_{TDH3} -*XYL2*- T_{TDH3} 領域を増幅した。この増幅断片を *XhoI* と *Eco52I* で切断し，pBluescript II KS+にクローン化し pXDH を構築した。3 番目に，KF7M 株の染色体と 1 対のプライマーである F-XDH3 と R-GAPDHt(URA+*SacII*) (表 2-2) を用いて PCR を行い， P_{TDH3} -*XKS1*- T_{TDH3} 領域を増幅した。この増幅断片を *Eco52I* と *SacII* で切断し，pBluescript II KS+にクローン化し pXK を構築した。この pXK を制限酵素 *Eco52I* で切

断し, この間に *loxP*-*P_{TEF}*-*kanMX*-*T_{TEF}*-*loxP* 配列と *XYL1* 領域, *XYL2* 領域を組み込んだ。すなわち (i) pBlu-LTKTL-TDH3 の *kanMX* 領域を 1 対のプライマーである F-LTKTL(URA+*ApaI*)と R-LTKTL(*ApaI*) (表 2-2) を用いて増幅し, *ApaI* で処理した。(ii) pXR の *XYL1* 領域を 1 対のプライマーである M13Rev と -21M13 (表 2-2) を用いて増幅し, *ApaI* と *XhoI* で処理した。(iii) pXDH の *XYL2* 領域を 1 対のプライマーである M13Rev と -21M13 (表 2-2) を用いて増幅し, *XhoI* と *Eco52I* で処理した。(iv) pXK を *ApaI* と *Eco52I* で処理し, (i)-(iii)で作成した DNA 断片を連結することで pKX1X2XKS を構築した。

プラスミド pTy-kan は野生型株である Hex⁻ 株に二重転換能を持たせるために用いた。pBlu-LTKTL-TDH3 と 1 対のプライマーである F-LTKTL(Ty)3 と R-LTKTL(Ty)3 (表 2-2) を用いて PCR を行い, *loxP*-*P_{TEF}*-*kanMX*-*T_{TEF}*-*loxP* 断片を作成した。この DNA 断片を MYA-3666 株の *ura3* 領域に挿入し SCB52 を作成した。この時の遺伝子構造は *ura3*'-Ty-*kanMX*-'*ura3* である。次に SCB52 株の染色体と 1 対のプライマーである F-URA3-STR(*NotI*)と R-URA3-STR(*NotI*) (表 2-2) を用いて増幅した。この増幅断片を *NotI* で切断し, pBluescript II KS+にクローン化することで pTy-kan を構築した。

プラスミド pADE1 と pGRR1 は, 二重形質転換に用いる増幅 DNA 断片の鋳型 DNA として用いた。pADE1 は NAM34-4C 株の染色体 DNA と 1 対のプライマーである F-ADE1-UP2k(*ApaI*)と R-ADE1-DWN2k(*ApaI*) (表 2-2) を用いて PCR を行い, *P_{ADE1}*-*ADE1*-*T_{ADE1}* 領域を増幅した。この増幅断片を *ApaI* で切断し, pBluescript II KS+にクローン化し pADE1 を構築した。pGRR1 は *HEX2_{2,3}* 株の染色体 DNA と 1 対のプライマーである F-GRR1-up2.5k(*NOT1*)と R-GRR1-down980b(*NOT1*) (表 2-2) を用いて PCR を行い, *GRR1* 領域を増幅した。この増幅断片を *NotI* で切断し, pBluescript II KS+にクローン化することで pGRR1 を構築した。

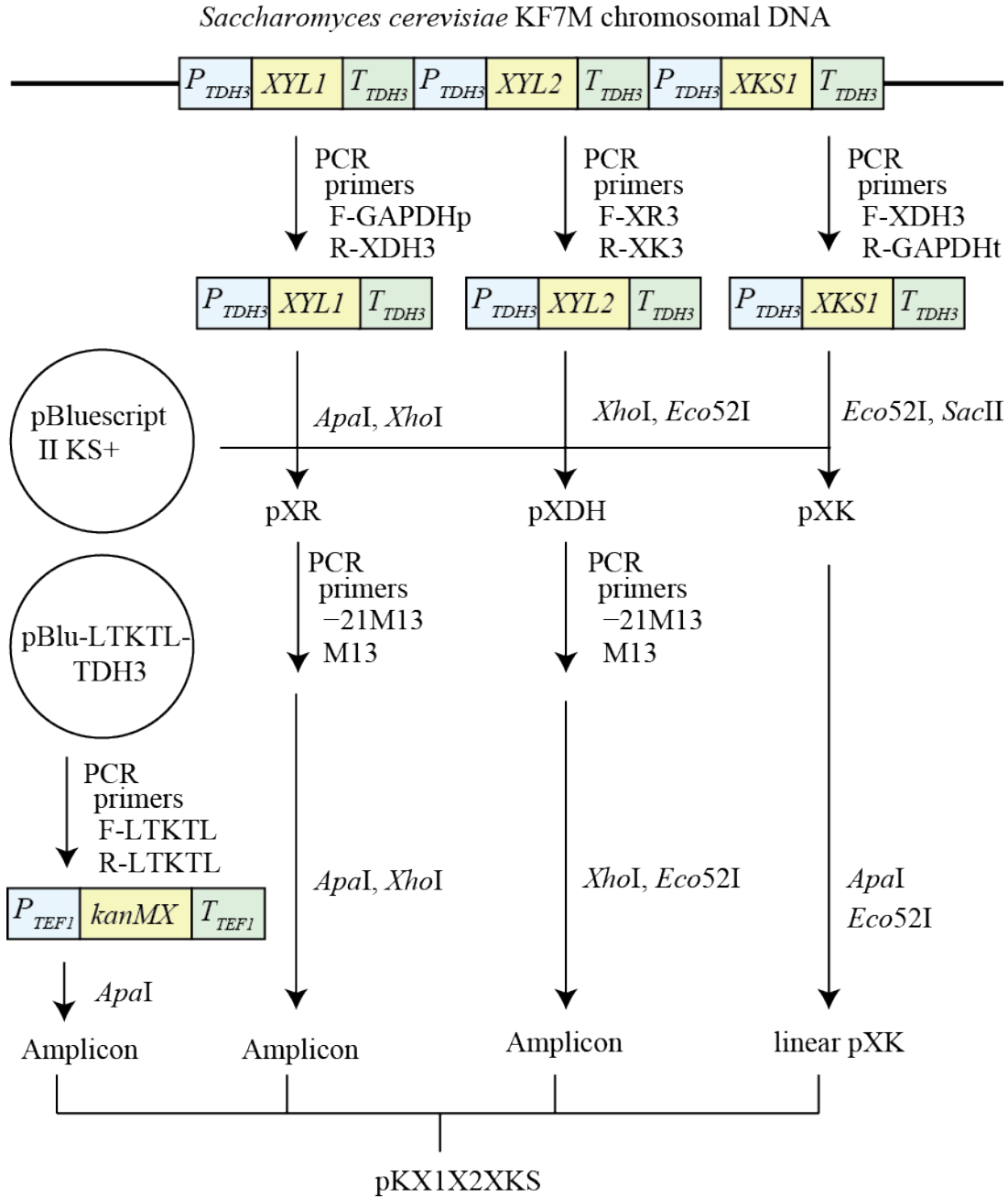


図 2-1 pKX1X2XKS プラスミドの構築

S. cerevisiae KF7M と pBlu-LTKTL-TDH3 は, *XYL1*, *XYL2* と *XKS1*, および *kanMX* 領域を増幅するための鋳型 DNA 源として用いた。

2-2-8. キシロース資化遺伝子 *XYL1*, *XYL2*, *XKS1* を持つ *S. cerevisiae* の構築

pKX1X2XKS の *kanMX* 領域から *XKS1* 領域までを 1 対のプライマーである F-LTKTL(URA+*ApaI*)と R-GAPDHt(URA+*SacII*) (表 2-2) を用いて増幅した。その後,

増幅 DNA による SCA3 株の G418 耐性転換体を選択した。この 2 つのプライマーは *ura3* 遺伝子の相同領域を持つので、G418 耐性転換体はウラシル要求性を示す。

2-2-9. バイオフォトレコーダーを用いた細胞増殖の解析

細胞増殖の解析は、第 1 章の第 2 節で示した方法で行った。

2-2-10. *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 の方法に従った (57)。*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、5mL 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 Abs_{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。

2-2-11. 高効率キシロース資化を示す変異体の分離

SCB7 株を 10 mL の YPD 培地で 30°C, 24 時間, 振盪培養し, 細胞を $2400 \times g$, 4°C, 1 分間の遠心分離で集め, 滅菌水に懸濁した。細胞懸濁液を初期濃度 $\text{Abs}_{660\text{nm}}=0.014$ となるようにウラシルを含む 5 mL MSX 培地 (5-mL の L 字試験管) に植菌し, バイオフォトレコーダーにより増殖を解析した。濁度が急激に増加した時, 懸濁液を MSX 固形培地に塗抹し, 30°C で 2-3 日間培養した。大きなコロニーを選び, YPD 培地に移した。必要に応じて, ミクロマニプレーター (Singer MSM systems series 400, Minerva Tech., K.K., Tokyo, Japan) で単細胞分離を行った。突然変異体であることを確認するためにバイオフォトレコーダーで増殖を解析した。独立した突然変異体を分離するために, 1 つの変異体は独立した L 字試験管から分離した。

2-2-12. 回分発酵試験

YPD 固形培地で 30°C, 一晚培養した被試験菌を 50 mL の YPD 培地 (pH4.0) に植菌し, 30°C, 24 時間振盪培養した (120 rpm)。その後, 細胞懸濁液を 50 mL の YPX3 培地に初期濃度 $\text{Abs}_{660\text{nm}}=1.0$ となるように植菌し, 35°C, 48 時間振盪培養した。発酵培地中のエタノールとグルコースの濃度を決定するために, 4°C, $20,400 \times g$ で 5 分間遠心分離して上澄みを得, サンプル溶液とした。

2-2-13. グルコース, キシロース, エタノール濃度の解析

グルコース, キシロース, エタノールの濃度は, 自動サンプラーBF30ASX, 過酸化水素電極, 二次元検出システムを備えた 4 チャンネルバイオセンサーBF7M (Oji Scientific Instruments, Hyogo, Japan) を使用して測定した。酵素は, グルコースにはグルコースオキシダーゼ (E. C. 1. 1. 3. 4), キシロースにはピラノースオキシダーゼ (E. C. 1. 1. 3. 10), エタノールにはアルコールオキシダーゼ (E. C. 1. 1. 3. 13) を用いた。反応の際に生じる過酸化水素をプラチナ電極で電気分解し, 生じる電圧の変化を検出器で測定した。エタノール収率 (%) は, 第 1 章の第 2 節で定義した割合を用いた。

2-2-14. 二重形質転換

酵母の二重形質転換は基本的には第1章の第2節で示した方法を用いた。形質転換時に使用する混合溶液は、酵母と接触させる1時間前に調整を開始した。2種類の20 μg のDNAとPEGとを混合し、ボルテックスミキサーでよく攪拌した。10分間、氷中で静置した後、煮沸処理で一本鎖にしたキャリアDNAを加え、よく攪拌した。10分間、氷中で静置した後、1M酢酸リチウムを加えよく攪拌した。その後、酵母と接触させるまで10分毎によく攪拌した。その詳細なプロトコルを図2-2に示した。

酵母を2×YPDAU培地に植菌し、1晩培養する。



ABS 600nmを測定し、菌数が 5×10^6 個/mlとなるように50mlの2×YPDAU培地に植え継ぐ。



4時間培養

ABS 600nmを測定し、菌数が 2×10^7 個/mlになっていれば集菌し、滅菌水で洗浄する。



洗浄後、滅菌水1mlに懸濁(10^9 個)し、それを100 μl 分注(10^8 個)し、遠心分離した後、上澄みを取り除く。



形質転換混合溶液と接触させ、よく混合する。



42°C、40分間ヒートショックする。



懸濁液を滅菌水で洗浄した後、滅菌水に懸濁し、任意のプレートに塗抹する。

形質転換混合溶液の調製

接触させる1時間前に、2種類のDNAをそれぞれ20 μg とポリエチレングリコール(PEG)を加えボルテックスでよく混合する。



10分後、鮭精子DNAを加えボルテックスでよく混合する。



10分後、1M酢酸リチウムを加えボルテックスでよく混合する。



酵母と接触させるまで、10分毎にボルテックスでよく混合する。

図 2-2 二重形質転換プロトコル

2-2-15. 次世代シーケンサー解析

ライフテクノロジー社の5500x1 SOLiD™ システムで*S. cerevisiae*の全ゲノムDNAを解析した。

第3節 結果

2-3-1. *S. cerevisiae* NAM34-4C 株の同質系統株の構築

突然変異解析では、二倍体を用いた優性劣性試験や4孢子解析による突然変異遺伝子数の決定などを行うが、遺伝背景が同じ株の掛け合わせでないと表現型と遺伝子型の詳細な解析ができない。そこで、接合型 *MAT α* の NAM34-4C 株から *MAT α* 株の分離を第1章で示した集団接合法で試みた。*MAT α* 株から *MAT α* 株への自然突然変異体は、およそ置換突然変異体の出現頻度で生じる。その接合型変換株を検出するために、栄養要求性株間の掛け合わせを行い、非栄養要求生株を分離し、子嚢胞子を作成して目的の株を分離する方法を行った。すなわち、NAM34-4C 株からウラシル要求性の NAM201 株 (*MAT α ura3::kanMX*) とロイシン要求性の NAM203 株 (*MAT α leu2 Δ ::kanMX*) を構築し、それらを掛け合せ、MSD 培地上、30℃で4日間静置培養し、5株の非栄養要求生株を分離した。それらを 1-1, 1-2, 6-1, 6-2, 8-1 と名付け、SpoK 孢子形成培地に移して孢子形成を調べたところ、30℃、1週間後でも胞子を形成しなかった。そこで、孢子形成培地の条件検討を次の4個の孢子形成培地で行った (表 2-3)。

表 2-3 NAM34-4C から得た isogenic 二倍体の孢子形成化

分離株	孢子形成			
	SpoKII	SpoNa	1/2SpoNa	SpoNaII
1-1	○	×	×	×
1-2	×	×	×	×
6-1	○	×	×	×
6-2	×	×	×	×
8-1	×	×	×	×

記号○と×は、孢子形成する、孢子形成しないに対応する。

SpoKII, SpoNa, 1/2SpoNa, SpoNaII 培地で孢子形成させたところ、1 週間後、SpoKII 孢子形成培地においてのみ 1-1 と 6-1 の 2 株で子嚢孢子の形成を観察した（表 2-3）。しかしながら、4 孢子の形成は観察できず、ほとんどが 2 孢子か 3 孢子であった。

上記で得られた 2 孢子または 3 孢子のウラシル要求性、ロイシン要求性、接合型を解析した（表 2-4）。その結果、ロイシン要求性、ウラシル要求性、ロイシンとウラシ

表 2-4 同質系統二倍体の 4 孢子解析

クラス 1			子嚢番号		クラス 2			子嚢番号		クラス 3			子嚢番号	
Leu	Ura	G418	1-1	6-2	Leu	Ura	G418	1-1	6-2	Leu	Ura	G418	1-1	6-2
－	＋	R	1	0	＋	－	R	2	1	－	＋	R		
＋	＋	S	1	0	－	＋	R			－	－	R	1	1
＋	－	R	1	0	＋	＋	S	1	0	＋	－	R		
－	－	R	1	0	＋	－	R			－	＋	R		
					＋	＋	R	0	1	＋	－	R	1	1
					－	＋	R			＋	－	R		
					＋	＋	S	0	1	＋	＋	S		
					－	－	R			－	－	R	1	0
					－	－	R	0	2	－	－	R		
					－	－	R			＋	＋	S		
					＋	＋	R	0	1	＋	＋	S	3	1
					＋	＋	R			－	－	R		
										－	＋	R		
										＋	－	R	1	3
										－	＋	R		
										＋	＋	S		
										－	＋	R	1	0
										－	－	R		
										－	＋	R		
										＋	＋	S	0	1
										＋	－	R		
										＋	－	R		
										－	－	R	0	1
										＋	＋	S		

ル要求性，野生型などが分離しており，同質系統の二倍体であることを認めた。しかしながら，接合型 *a* 株は得られなかった。以上の結果から，NAM34-4C 株は孢子形成が悪いこと，接合型 *a* に変換するカセット遺伝子 *HMR* に欠損があると推測した。接合型 *a* 株の中で，接合能と孢子形成能に優れた株として NAM34-4CG2 株を選び，この株から出発して，実験室酵母の接合型 *a* 領域を NAM34-4CG2 株に組み換える実験デザインを建てた。その構築に至る操作を図 2-3 に示した。

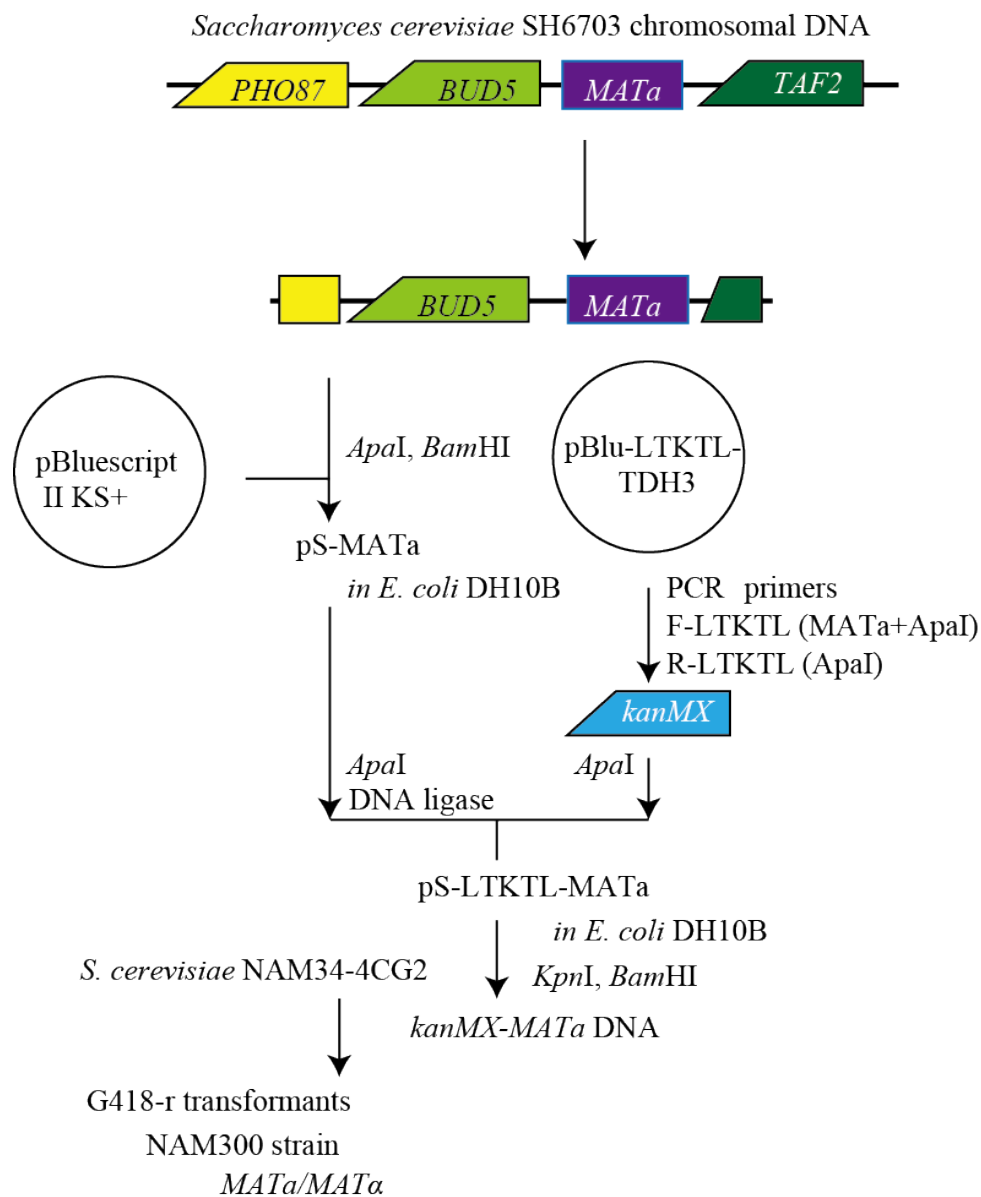


図 2-3 *S. cerevisiae* NAM300 の構築図

最初に, *S. cerevisiae* SH6703 (*MATa sed1::Sh ble eaf3::HIS3*) 株の DNA を鋳型に, 一対のプライマー F-MAT-UP1.5k(ApaI) と R-MAT-DWN300(BamHI) で 4.3 kb の *ApaI-pho87'-BUD5-MATa-'taf2-BamHI* 領域を増幅した。制限酵素 *ApaI* と *BamHI* で切断し, pBluescript II KS+の *ApaI* と *BamHI* の間に挿入し, *E. coli* DH10B の Ap-r Lac⁻ 株として回収した。この組換えプラスミドを pS-MATa と名付けた。次に, pBlu-LTKTL-TDH3 プラスミドを鋳型に, 一対のプライマー F-LTKTL(MAT+*ApaI*) と R-LTKTL(*ApaI*) で *pho87* 領域を含む *ApaI-'pho87'-loxP-P_{TEF}-kanMX-T_{TEF}-loxP-ApaI* を増幅した。制限酵素 *ApaI* で切断後に, pS-MATa プラスミドの *ApaI* 部位に挿入し, *E. coli* DH10B 株のカナマイシン耐性株として組換えプラスミドを回収した。このプラスミドを pS-LTKTL-MATa と名付けた。このプラスミドを *KpnI* と *BamHI* で切断し, 電気透析して集めた DNA による NAM34-4CG2 株の形質転換体を G418 耐性株として 14 個分離した。この中から *MATa* が *MATa* に組換えた株があるかどうかを解析した。形質転換体を顕微鏡で観察すると, 二倍体のような大きな細胞が観察された。この株を NAM300 と名付けた。

NAM300 株を SpoKII 培地で 30°C, 2-3 日間培養すると 4 孢子形成を認めた。NAM300 株の 4 孢子を解析した結果, 16 子囊の内, 15 子囊が 4 孢子とも生存し, 生存率は 94% であった (表 2-5)。4 孢子は *MATa* : *MATa* と G418-r : G418-s に関して 2+ : 2- に分離した。従って, 規則正しいメンデル分離を認めた。この中で接合能, 孢子形成能に優れた NAM300-10B (*MATa*) 株と NAM300-1C (*MATa*) 株をそれぞれ SCA1 (*MATa pho87 Δ::kanMX*) 株と SCA2 (*MATa*) 株と名付けた。*BUD5* と *TAF2* 遺伝子が必須遺伝子であること, *MATa* と *BUD5* が重複遺伝子であること, *BUD5* と *PHO87* の遺伝子間の距離がほとんどないこと, および *PHO87* は必須遺伝子ではないことから, *PHO87* の一部を欠損するような実験デザインになった。後述するように, *PHO87* を欠失しても増殖速度に影響を及ぼさず, キシロース代謝速度にも影響しなかった。次に, SCA1 株が持つ *kanMX* 領域を取り除いた。すなわち, ガラクトース誘導で Cre タンパク質

表 2-5 NAM300 株の表現型

子嚢番号	子嚢胞子			
	A	B	C	D
1	diploid, G	a, H, G	α , H	α , H
2	a, H, G	α , H	α , H	a, H, G
3	a, H, G	a, H, G	α , H	α , H
4	a, H, G	α , H	α , H	a, H, G
5	a, H, G	α , H	α , H	a, H, G
6	a, H, G	α , H	a, H, G	α , H
7	α , H	α , H	a, H, G	a, H, G
8	α , H	α , H	a, H, G	a, H, G
9	α , H	a, H, G	a, H, G	α , H
10	α , H	a, H, G	α , H	a, H, G
11	α , H	a, H, G	a, H, G	α , H
12	a, H, G	α , H	a, H, G	α , H
13	α , H	α , H	a, H, G	a, H, G
14	a, H, G	a, H, G	α , H	α , H
15	a, H, G	α , H	α , H	a, H, G

a, α : 接合型, H: 一倍体, G: G418-r

を発現する pZeo プラスミドを SCA1 株に形質転換法で移し、誘導処理で *kanMX* を取り除いた G418 感受性株を分離した。続いてゼオシンを含まない YPD 培地 pH5.5 温度 35°C で一晩振盪培養することにより、プラスミドを除去した。このようにして、SCA3 (*MATa pho87 Δ*) 株を構築した。また、SCA1 株、SCA2 (*MAT α*) 株と SCA3 (*MATa*) 株を同質系統株の親株として用いた。

2-3-2. キシロースを資化できる組換え *S. cerevisiae* SCB7 株の構築

SCA3 株に *P. stipitis* 由来の *XYL1* と *XYL2* 遺伝子および *S. cerevisiae* の *XKS1* 遺伝子を付与した SCB7 株を構築した。すなわち、pKX1X2XKS を鋳型 DNA に用い、表 2-2 に示した 1 対のプライマー F-URA3-STR と R-URA3-STR で PCR 増幅した。増幅産物 3 の DNA (表 2-1) による SCA3 株の G418 耐性転換体を 8 株分離した。ウラシルを加えたキシロース最少培地 (MSXU, pH 5.5) 温度 35°C で、転換体の増殖試験を行ったところ 4 株が増殖した (図 2-4)。これらの株をそれぞれ SCB4, SCB5, SCB6, SCB7 株と名付けた。

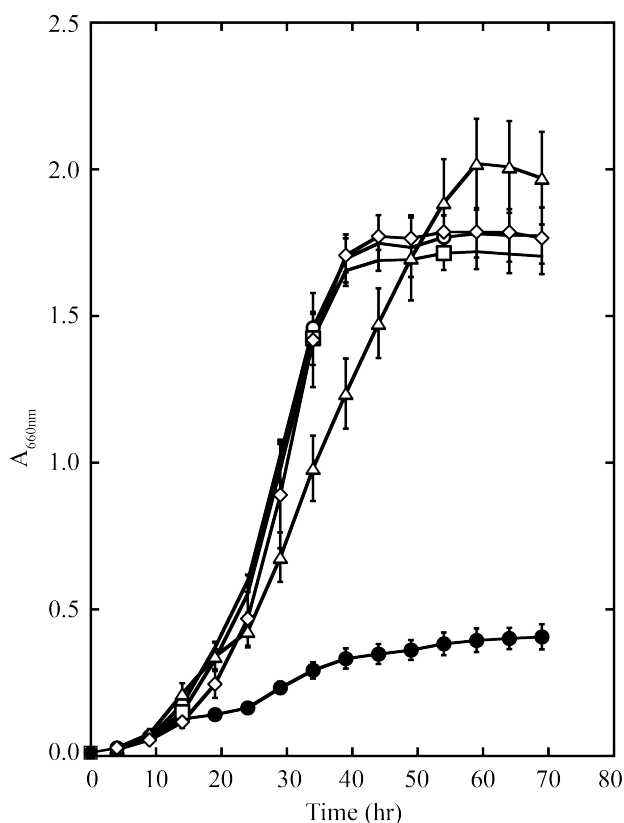


図 2-4 キシロース資化性 *S. cerevisiae* SCB4, SCB5, SCB6, SCB7 と親株 SCA3 株のキシロース培地での増殖。

5 株を 5 mL のウラシル含有キシロース最少培地 (MSXU, pH 5.5) 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。データは 3 回の実験の平均値と標準偏差である。記号：○, SCB4; △, SCB5; □, SCB6; ◇, SCB7; ●, SCA3。

SCB4, SCB6, SCB7 の 3 株は、同じような増殖速度を示したが、SCB5 株の増殖は悪かった。最も早い世代時間 (G_{short}) は SCB7 株では 5 時間であったが、SCB5 株の G_{short} は 10 時間であった。キシロースを資化できる SCB4, SCB6, SCB7 株の遺伝子構造を解析したところ、期待通りの $loxP$ - P_{TEF} - $kanMX$ - T_{TEF} - P_{TDH3} - $XYL1$ - T_{TDH3} - P_{TDH3} - $XYL2$ - T_{TDH3} - P_{TDH3} - $XKS1$ - T_{TDH3} であることを PCR 解析と塩基配列解析で確認した。しかしながら、SCB5 株は $XKS1$ 領域が欠失していることが分かった (表 2-6)。これらの結果は、*S. cerevisiae* SCB7 株において $XYL1$ と $XYL2$ の 1 コピーずつだけで十分にキシロースを資化できること、内在する P_{XKS1} - $XKS1$ と P_{TDH3} - $XKS1$ で遺伝子産物を高発現すると増殖速度が約 2 倍速くなること、および同様の遺伝背景では、これまでで最も早い増殖を示すことが分かった (35)。

表 2-6 pKX1X2XKS プラスミドおよびキシロース資化性株が持つ 3 遺伝子 ($XYL1$, $XYL2$ と $XKS1$) の PCR および塩基配列解析結果

プラスミドとキシロース 資化性株	$XYL1$ (XR)	$XYL2$ (XD)	$XKS1$ (XKS)
pKX1X2XKS カセットベクター	Promoter ΔA (ChrVII) 884,241	Promoter +A (ChrVII) 884,241	ORF H60N, S413N, A522T G25G, L247L, Y549Y (G→A) (A→G) (T→C)
SCB4 (XM _{2,3}) XM ₂ >二倍体≒XM ₃			Promoter +A (ChrVII) 884,241 ORF L97S (T→C)
SCB5 (XM ₃) 親株(XM ₃)と同程度		Promoter (G→A) 884,353 ↓ MSN4	Δ (ORF) ↓
SCB7 (XM ₈₋₁) XM ₈ >二倍体>XM ₃		Promoter G→A (ChrVII) 884,078 ↑ PHO2	

PHO2: Homeobox transcription factor MSN4: Transcriptional activator related to Msn2p
Xylose → Xylitol → Xylulose → Xylulose-5-P



2-3-3. 高効率なキシロース資化を示す変異体の分離 (Hex^+ 変異体)

キシロース資化に必要な 3 遺伝子を持つ株の最少世代時間 G_{short} は 5 時間である。さらにキシロース培地で増殖の早い自然突然変異体を分離し、キシロース代謝向上を目指した。SCB7 株をウラシル含有 MSUX 培地 (pH5.5), 35°C で振盪培養し、早い増殖を示す独立した 4 個の突然変異体を分離した。単細胞分離後に、その 4 個の突然変異体の増殖をキシロース最少培地で調べ、親株 SCB7 株と比較した。その結果を示したのが図 2-5 である。4 個の突然変異体は、ほぼ同じような増殖速度を示した。

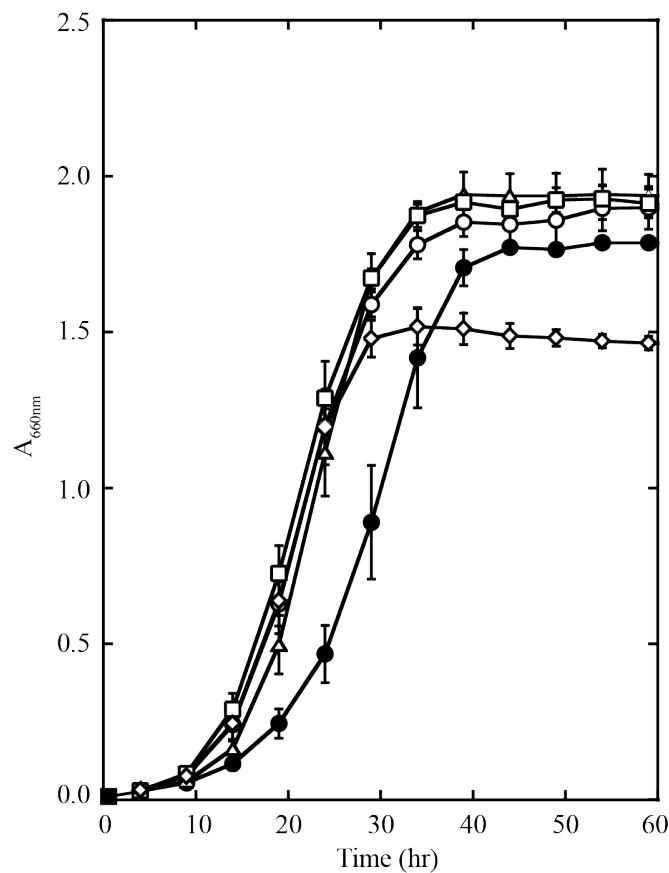


図 2-5 *S. cerevisiae* Hex^+ 突然変異体 (SCB13, SCB14, SCB15, SCB16) と親株 SCB7 株のキシロース培地での増殖。

被試験菌を 5 mL のウラシル含有キシロース最少培地 (MSXU, pH 5.5) 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。データは 3 回の実験の平均値と標準偏差である。記号：○, Hex^+ 1-5 株 SCB13; △, Hex^+ 2-2 株 SCB14; □, Hex^+ 2-3 株 SCB15; ◇, Hex^+ 2-9 株 SCB16; ●, Hex^- 株 SCB7。

SCB14 株の G_{short} は 2.5 時間であり、この値は親株である SCB7 株の $G_{\text{short}}=5$ 時間の半分であった。この高効率キシロース資化性を導く変異を high efficiency of xylose assimilation (*HEX*) mutation と名付け、その表現型を Hex^+ と定めた。

2-3-4. Hex^+ を導く突然変異の遺伝的解析

Hex^+ 表現型を導く突然変異の遺伝解析を次の様にして行った。(i) 4 個の変異体を持つ変異数の決定；(ii) 野生型対立遺伝子に対し、変異が優性・劣性であるかの試験；(iii) 変異間の連鎖解析。最初に SCB14 株に関して変異数を解析した。 Hex^+ 株である SCB14 株 (*MATa pho87Δ ura3Δ::XM₈ Hex⁺*) と野生型株である Hex^- 株 SCB103-10D (*MATa ura3Δ::XM₈*) とを掛け合わせヘテロな二倍体を作成し孢子形成させた。調べた 24 子囊において、全ての孢子は $\text{Hex}^+ : \text{Hex}^-$ が 2+ : 2- に分離した。ウラシルを添加した MSX 培地 (pH5.5), 35°C での典型的な増殖パターンを図 2-6(a) に示す。残りの Hex^+ 株 (SCB13, SCB15, SCB16) と野生型株の SCB103-10D とを掛け合わせた結果も、全て $\text{Hex}^+ : \text{Hex}^-$ が 2+ : 2- に分離した。調べた子囊の数は SCB13, SCB15, SCB16 においてそれぞれ 30 子囊, 24 子囊, 30 子囊である。これらの結果は、突然変異体は、それぞれ 1 遺伝子変異によって Hex^+ の表現型になることを示している。

4 個の Hex^+ 表現型を導く突然変異が、野生型対立遺伝子対して優性なのか劣性なのかを解析するために、4 個の Hex^+ 変異体 (SCB13, SCB14, SCB15, SCB16) と Hex^- の野生型株 SCB103-10D とを掛け合わせて得た二倍体をウラシル含有 MSX 培地 (pH5.5), 35°C で解析した。 Hex^+ の SCB13 株と Hex^- の SCB103-10D 株とを掛け合わせて生じた $\text{Hex}^+1-5/\text{Hex}^-$ の二倍体 SCB104 は、 $\text{Hex}^-/\text{Hex}^-$ 野生型二倍体 SCB112 と同様の増殖を示した (図 2-6 (b))。このことは SCB13 株の *hex₁₋₅* 変異は、野生型対立遺伝子に対して劣性であることを示している。他の 3 個の二倍体は Hex^+ 変異体と同様に早い増殖を示した (図 2-6(c), 2-6(d), 2-6(e))。従って、3 個の変異体 SCB14, SCB15, SCB16 が持つ変異は、野生型対立遺伝子に対して優性であった。そこで、3 個の変異をそれぞれ *HEX₂₋₂*, *HEX₂₋₃*, *HEX₂₋₉* と定義した。

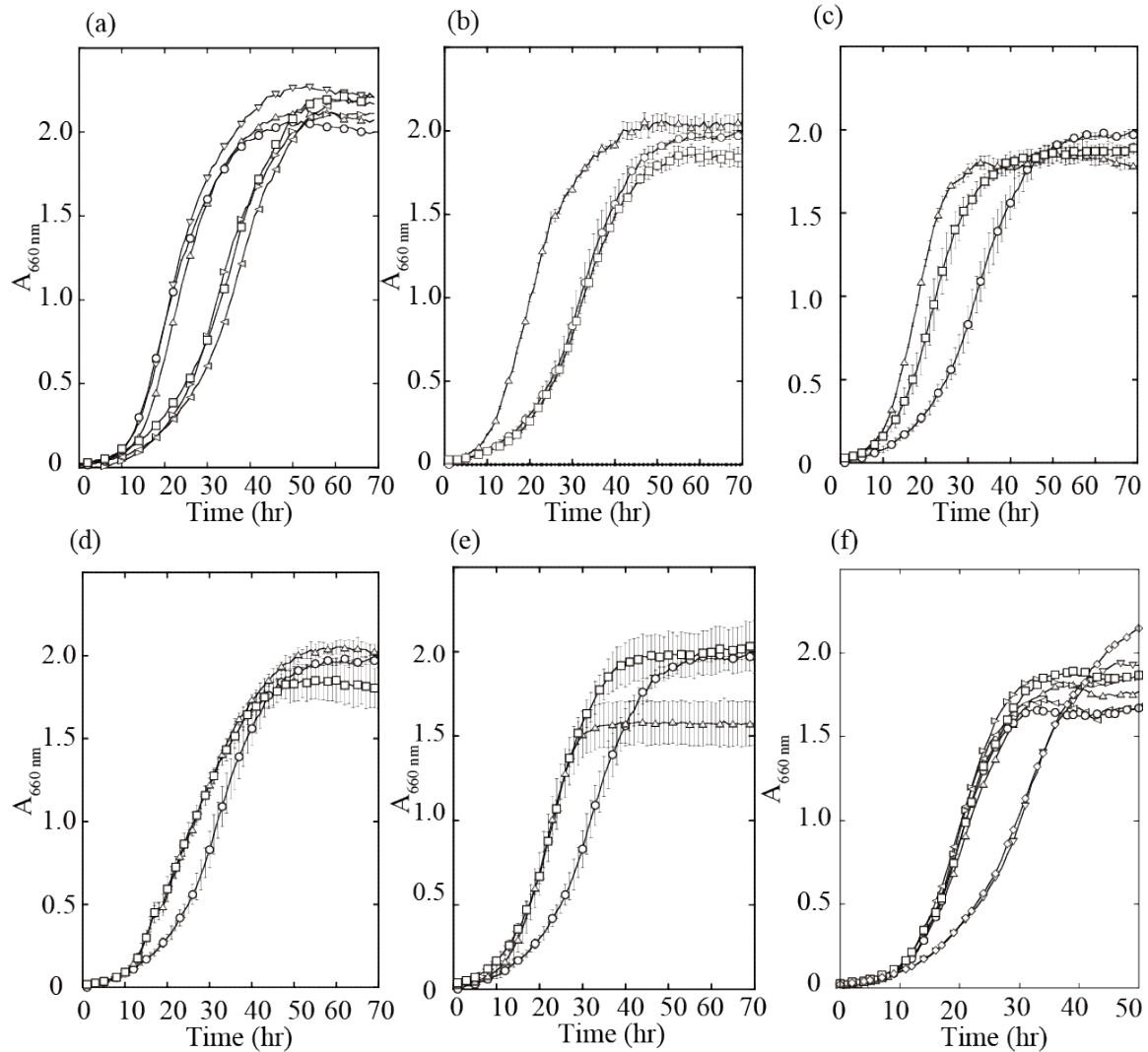


図 2-6 *S. cerevisiae* Hex⁺突然変異体 (SCB13, SCB14, SCB15, SCB16) の遺伝解析。

被試験菌を 5 mL のウラシル含有キシロース最少培地 (MSXU, pH 5.5) 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。(a) 4 個の Hex⁺突然変異体の解析。Hex⁺2-2 変異体 (SCB14) と野生型 Hex⁻株 (SCB103-10D) の掛け合わせで得られた 4 孢子クローンと親株を解析した。記号: ○, SCB14; □, SCB103-10D; および 4 孢子クローン, △, SCB105-5A; ▽, SCB105-5B; ▷, SCB105-5C; ◁, SCB105-5D。(b)–(e) *hex1-5* (b), *HEX2-2* (c), *HEX2-3* (d) および *HEX2-9* (e) の野生型に対する優性劣性試験。記号: ○, Hex⁻/Hex⁻二倍体 (SCB112); △, Hex⁺/Hex⁺二倍体 (SCB108, SCB109, SCB110 と SCB111); □, Hex⁺/Hex⁻ヘテロ二倍体 (SCB104, SCB105, SCB106 と SCB107)。(f) 連関関係 (アレリズム試験)。*HEX2-2* 変異体 SCB105-3A, *HEX2-3* 変異体 SCB106-8D, 野生型株 SCB103-10D と *HEX2-2* と *HEX2-3* の掛け合わせで得た 4 孢子クローン SCB114-5A, -5B, -5C, -5D を解析した。記号: ○, SCB105-3A; □, SCB106-8D; ◇, SCB103-10D; および 4 孢子クローン: △, SCB114-5A; ▽, SCB114-5B; ▷, SCB114-5C; ◁, SCB114-5D。データは三回の平均値と標準偏差である。

*hex*₁₋₅, *HEX*₂₋₂, *HEX*₂₋₃, *HEX*₂₋₉ 変異の連鎖関係を解析するために、変異体間の掛け合わせを行った (*HEX*₂₋₂ × *HEX*₂₋₉, *HEX*₂₋₂ × *HEX*₂₋₃, *HEX*₂₋₂ × *hex*₁₋₅, *hex*₁₋₅ × *HEX*₂₋₃)。 *HEX*₂₋₂ 変異体 SCB105-3A と *HEX*₂₋₉ 変異体 SCB107-8D を掛け合わせて生じた二倍体 SCB113 を孢子形成させた。調べた 16 子嚢において、全ての 4 胞子は、Hex⁺ : Hex⁻ が 4+ : 0- に分離した。他の掛け合わせ (*HEX*₂₋₂ × *HEX*₂₋₃, SCB114 ; *HEX*₂₋₂ × *hex*₁₋₅, SCB115 ; *hex*₁₋₅ × *HEX*₂₋₃, SCB116) から得た二倍体を孢子形成させた結果、Hex⁺ : Hex⁻ が 4+ : 0-, 3+ : 1-, 2+ : 2- に分離した。調べた子嚢の数は SCB114 が 11 子嚢, SCB115 が 8 子嚢, SCB116 が 8 子嚢であり, 4+ : 0-, 3+ : 1-, 2+ : 2- の分離比はそれぞれ 2:8:1, 3:4:1, 2:4:2 であった。ウラシルを添加した MSX 培地 (pH5.5), 35°C で 3+ : 1- 分離した SCB114 の 4 胞子の典型的な増殖パターンを図 2-6(f) に示した。

以上のことから、*hex*₁₋₅, *HEX*₂₋₂, *HEX*₂₋₃ 変異はそれぞれ連鎖しておらず異なる遺伝子であること、*HEX*₂₋₂ と *HEX*₂₋₉ 変異は近傍に位置し、恐らく同じ遺伝子であること示している。そこで、*HEX*₂₋₂ または *HEX*₂₋₉ 変異遺伝子を *HEX1*, *HEX*₂₋₃ 変異遺伝子を *HEX2*, *hex*₁₋₅ 変異遺伝子を *hex3* と命名した。

2-3-5. Hex⁺変異体の回分発酵試験

4 個の Hex⁺変異体 SCB13, SCB14, SCB15, SCB16 株とその親株である SCB7 株の回分発酵試験を行い、キシロースからのエタノール生産を解析した。キシロース 30 g/L を含む YPX 培地, pH 4.0 に初期細胞濃度 Abs_{660nm}=1.0 となるように植菌し, 35°C で振盪培養した (60 rpm)。全ての Hex⁺変異体は培養時間が進むにつれて迅速に増殖したが、SCB7 株では培養初期で遅延が見られた (図 2-7(a))。キシロース消費とエタノール生産は、増殖に比例してそれぞれ減少と増加が見られた (図 2-7(b), 2-7(c))。 *HEX1*₂₋₂ 変異体は、発酵開始から 24 時間以内に 4.8 g/L のエタノールを生産し、SCB7 株が 24 時間で生産したエタノール量 (3.4 g/L) よりも 1.4 倍高かった。 *HEX1*₂₋₂ 変異体のエタノール収率は 47% だった。 *HEX1*₂₋₃ 変異体のエタノール生産量と収率は、 *HEX1*₂₋₂ 変異体と類似していた。キシロース濃度は、4 個の Hex⁺変異体で類似してお

り、24 時間までに 1 g/L/hr で減少した。これらの結果は *HEX1*, *HEX2*, *hex3* 変異は、発酵初期で効率的なキシロース消費とエタノール生産を行うことを示している。

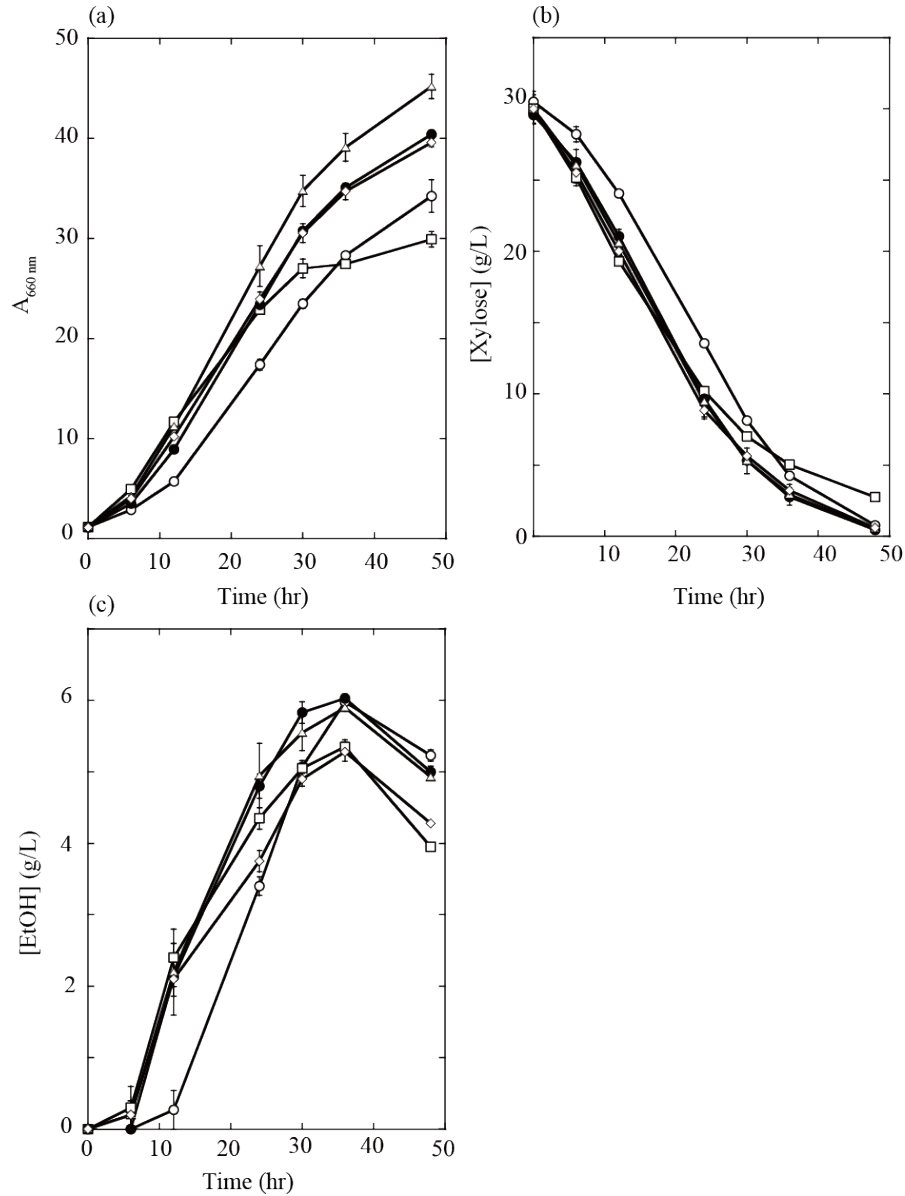


図 2-7 *S. cerevisiae* Hex⁺突然変異体 (SCB13, SCB14, SCB15 と SCB16) および親株 SCB7 の回分発酵試験。

30g/L キシロースを含む 50 mL の YPX 培地 pH 4.0, 温度 35°C で振盪培養し、発酵試験を行った。(a) 細胞濃度 ; (b) キシロース濃度 (g/L); (c) エタノール濃度。実験は 3 回の平均値と標準偏差で表した。記号 : ○, SCB7; □, SCB13; ●, SCB14; △, SCB15; ◇, SCB16。

2-3-6. *HEX* 突然変異遺伝子の特徴づけ

キシロース資化性向上突然変異として、これまでに少なくとも 2 個の遺伝子が報告されている (58)。そのひとつは *pho13* 欠失変異で、もうひとつは *TDH3* プロモーターなどの支配下に置いた高発現型 *TAL1* 遺伝子である。そこで、3 個の *HEX* 突然変異遺伝子が *PHO13* や *TAL1* 遺伝子であるかどうかを解析した。*pho13* 欠失変異は Pho13 タンパク質を生産しないので、野生型対立アレルに対し劣性になることを利用し、劣性変異 *hex3₁₋₅* 遺伝子が *PHO13* 遺伝子かどうかを解析する実験デザインを建てた (図 2-8)。まず、*pho13* 欠失変異 (*pho13Δ::kanMX*) を作成した。pBlu-LTKTL-TDH3 を鋳型に一对のプライマー F-LTKTL(*pho13*)と R-LTKTL(*pho13*)で *kanMX* 領域を増幅し、増幅 DNA による SCC2-11B 株 (*MATa pho87Δ::loxP URA3::XM₁*) の G418 耐性転換体として *pho13* 欠失株を構築した (図 2-8(a))。次に、SCA 系統株でも *pho13* 欠失株が、Hex⁺を示すかどうかをキシロース培地で確認したところ、キシロース培地での増殖は、野生型株の増殖よりも明らかに早く ($G_{short}=2.5$ 時間)、*hex3₁₋₅* 変異体と類似していた (図 2-9(a))。また、*pho13* 欠失変異は、野生型に対し劣性であることを確認した (図 2-8(b)と図 2-9(b))。すなわち、*pho13Δ*/野生型の二倍体の増殖は、*pho13Δ/pho13Δ* の二倍体よりも遅く、野生型/野生型の二倍体増殖に極めて似ていた (図 2-9(b))。そこで、*pho13 Δ/hex3₁₋₅* ヘテロ二倍体を構築し、この二倍体の増殖が、*pho13Δ/pho13Δ* や *hex3₁₋₅/hex3₁₋₅* 二倍体と類似しており、野生型/野生型の二倍体よりも早いことを確かめることにより、*pho13* と *hex3* は同じ遺伝子内の変異であることを解析した (図 2-8(c))。その結果、*pho13 Δ/hex3₁₋₅* 二倍体の増殖は、変異型二倍体の増殖を示し、*hex3* は *pho13* 変異であることを認めた(図 2-9(b))。

HEX₁₂₋₂ および *HEX₂₋₃* は、*TAL1* 遺伝子変異であるかどうかを解析した。最初に、*P_{TDH3}-TAL* 株を構築した。すなわち、pBlu-LTKTL-TDH3 を鋳型に一对のプライマー F-LTKTL(UP600)と R-TDH3P(StartTAL1)で *kanMX-P_{TDH3}* 領域を増幅した。その増幅 DNA による SCC2-11B (*MATa pho87Δ::loxP URA3::XM₁*) 株の G418 耐性転換体

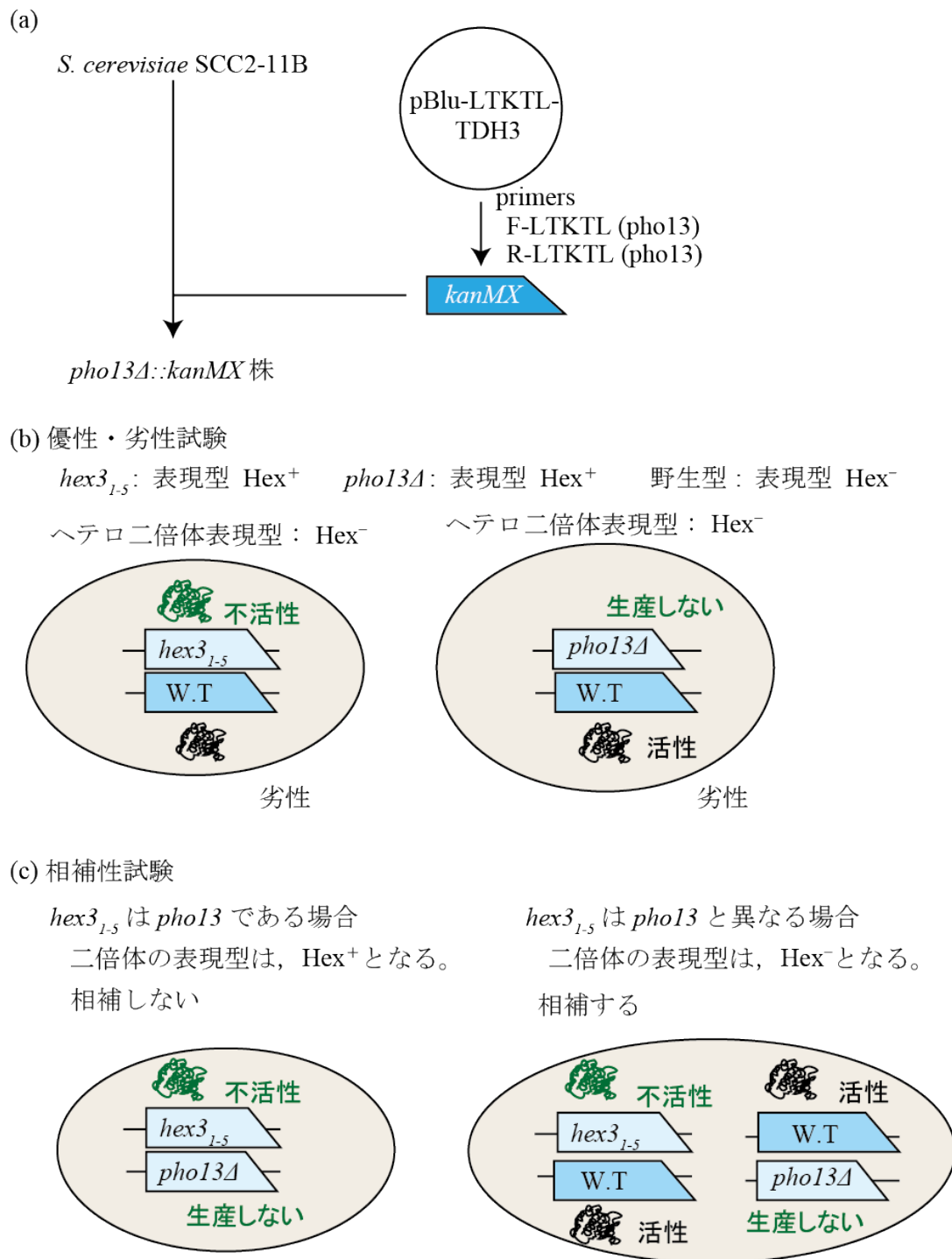


図 2-8 *hex3₁₋₅* 突然変異遺伝子が, *PHO13* であることを解析する実験デザイン。

(a) *pho13Δ* 株の構築, *kanMX* 領域を一对のプライマーで増幅し, 酵母染色体内に組み換えた。; (b) *pho13Δ* は, 遺伝子産物を生産しないので, 野生型対立アレルに対し劣性になる。; (c) *hex3₁₋₅* と *pho13Δ* の掛け合わせで得られる二倍体を用いた相補性試験。

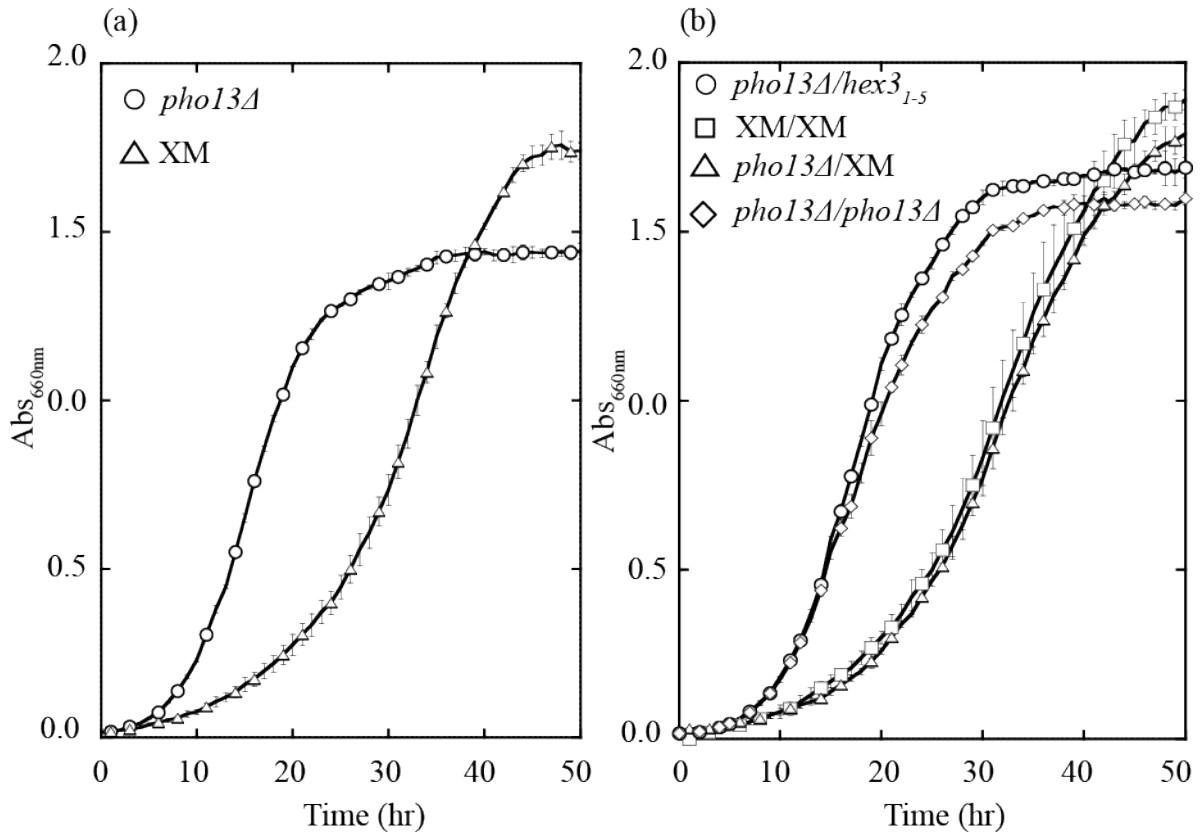


図 2-9 *S. cerevisiae* *hex3*₁₋₅ 突然変異遺伝子は, *PHO13* 遺伝子変異であることを示す遺伝的解析

被試験菌を 5 mL のウラシル含有キシロース最少培地 (MSXU, pH 5.5) 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。(a) *pho13Δ* 株のキシロース培地での増殖。記号: ○, *pho13Δ* 株; △, XM 株。(b) *pho13Δ*/+ 二倍体の優性・劣性試験と *pho13Δ/hex3*₁₋₅ 二倍体の相補性試験。記号: ○, *pho13Δ/hex3*₁₋₅ ヘテロ二倍体; ◇, *pho13Δ/pho13Δ* 二倍体; △, *pho13Δ*/+ 二倍体; □, XM/XM 二倍体。データは三回の平均値と標準偏差である。

として *TAL1* 高発現株を構築した。*TAL1* 領域の遺伝子構造は, *loxP-kanMX-loxP-P_{TDH3}-TAL1* である。次に, SCA 系統株でも *P_{TDH3}-TAL1* 株が, Hex⁺を示すかどうかをキシロース培地で確認した。キシロース培地での増殖は, 野生型株の増殖よりも明らかに早く, G_{short} は 2.5 時間と *HEX1*₂₋₂ や *HEX2*₂₋₃ 変異体と類似していた (図 2-10)。

そこで, *HEX1*₂₋₂ または *HEX2*₂₋₃ と *P_{TDH3}-TAL1* 株と掛け合わせヘテロ二倍体を分離し, 胞子形成後に 4 分子の中に野生型株が生じるかどうかで変異遺伝子間の連鎖関係を解析した。*HEX2*₂₋₂ × *P_{TDH3}-TAL1* と *HEX2*₂₋₃ × *P_{TDH3}-TAL1* から得た二倍体を胞子形成させた

ところ、 $\text{Hex}^+ : \text{Hex}^-$ が $4+ : 0-$, $3+ : 1-$, $2+ : 2-$ に分離した。すなわち、野生型株が出現したので、 HEX1_{2-2} および HEX2_{2-3} は TAL1 遺伝子とは異なることを認めた。さらに、二重株の相加的および相乗的效果は見られなかった。調べた子囊の数は、 $P_{\text{T}DH3}\text{-TAL1}/\text{HEX1}_{2-2}$ 二倍体 SCB47 で 20 子囊、 $P_{\text{T}DH3}\text{-TAL1}/\text{HEX1}_{2-3}$ 二倍体 SCB48 で 20 子囊であり、 $4+ : 0-$, $3+ : 1-$, $2+ : 2-$ の分離比はそれぞれ $4 : 12 : 4$ と $5 : 12 : 3$ であった。

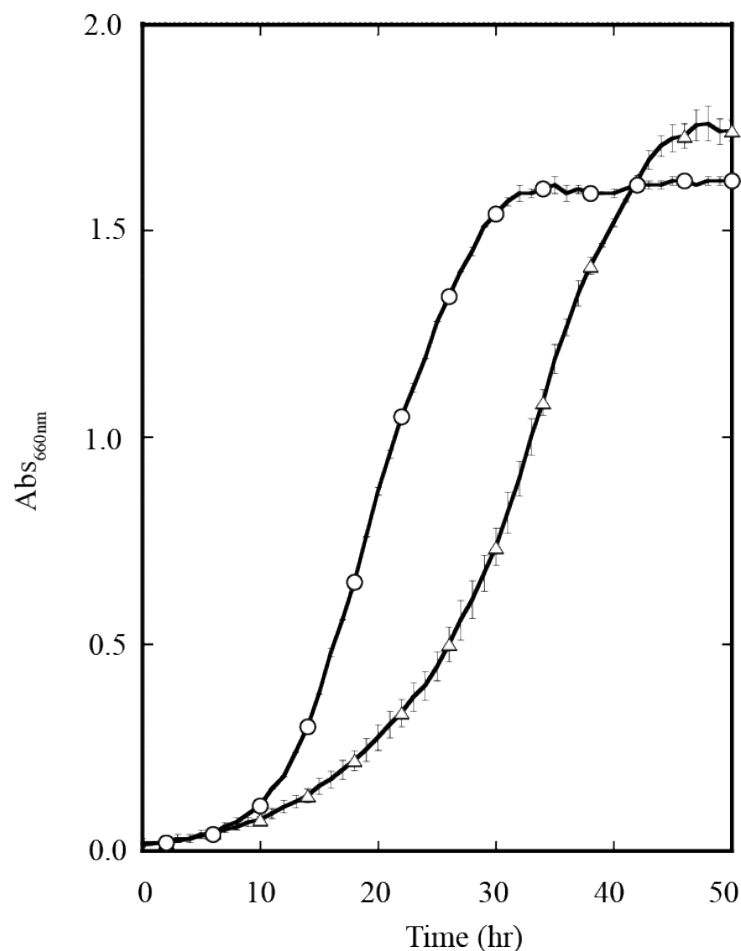


図 2-10 *S. cerevisiae* $P_{\text{T}DH3}\text{-TAL1}$ 株のキシロース最少培地での増殖。

被試験菌を 5 mL のウラシル含有キシロース最少培地 (MSXU, pH 5.5) 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：○, $P_{\text{T}DH3}\text{-TAL1}$ 株; △, XM 株。データは三回の平均値と標準偏差である。

実験の過程で HEX1 は ADE1 遺伝子に連鎖していることが分かった。すなわち、 $\text{ade1}\Delta::\text{Ty-kanMX URA3}::\text{XM}_1$ 株と HEX1_{2-2} 株との間で 4 分子解析を行ったところ、調

べた 24 子囊で，親型 (*ade1 : ade1 : HEX1 : HEX1*) : テトラ型 (*ade1 : ade1 HEX1 : W.T : HEX1*) : 非親型 (*ade1 HEX1 : ade1 HEX1 : W.T : W.T*) が，20 : 4 : 0 であった。このように，*ade1* と *HEX1* の間の組換え頻度が低いことから，*HEX1* 遺伝子は酵母 1 番染色体 *ADE1* に連鎖していることを認めた。次世代シーケンサー解析の結果（産業総合研究所との共同研究）から *HEX1*₂₋₂ と *HEX1*₂₋₉ の候補遺伝子で一番染色体 *ADE1* に連鎖した変異は，*CDC19* のみであり，*HEX1*₂₋₂ の有力な候補であると考えられた。そこで *CDC19* が *HEX1*₂₋₂ 変異かどうかを確かめる実験デザインを建てた(図 2-11)。

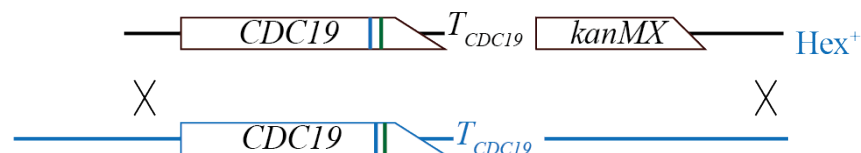
- (a) *HEX1*₂₋₂ 候補遺伝子近傍の遺伝子構造を *Saccharomyces* データベースで解析する。



- (b) *kanMX* 遺伝子を *HEX1*₂₋₂ 遺伝子候補のフランキング領域に挿入する。挿入組換えにより *Hex*⁺ 表現型が維持されるかどうかを確かめる。



- (c) *Hex*⁺ 表現型を示す場合，*kanMX* と変異を含む DNA による形質転換を行う。



G418 耐性転換体が，*Hex*⁺ を示せば，*HEX1*₂₋₂ は *CDC19* である。

必要であれば，形質転換体が確かに変異を含んでいるかどうかを確認する。

図 2-11 *HEX1*₂₋₂ が *CDC19* 遺伝子変異であることを解析する実験デザイン

最初に，*CDC19* 遺伝子近傍の構造を *Saccharomyces* ゲノムデータベース ([http:// www.yeastgenome.org/](http://www.yeastgenome.org/)) で解析する (図 2-11a)。次に，*CDC19* のフランキング領域に形質転換法で *kanMX* を組み込む。この転換体が *Hex*⁺ の性質を維持するかどうかを確かめる (図 2-11b)。*Hex*⁺ を維持していれば，*CDC19* から *kanMX* 遺伝子までを PCR 増幅する。この DNA を用いて形質転換を行い，*kanMX* と *Hex*⁺ と同時転換するかどうかを調べる。同時転換すれば，*HEX1* 遺伝子は，*CDC19* 遺伝子であると証明できる。

HEX1 変異体の *CDC19* フランキング領域に *kanMX* を組み込んだ形質転換体は Hex^+ を示し, *kanMX* 挿入による Hex^+ 表現型への影響は見られなかった (図 2-12(a)と 2-12(c))。

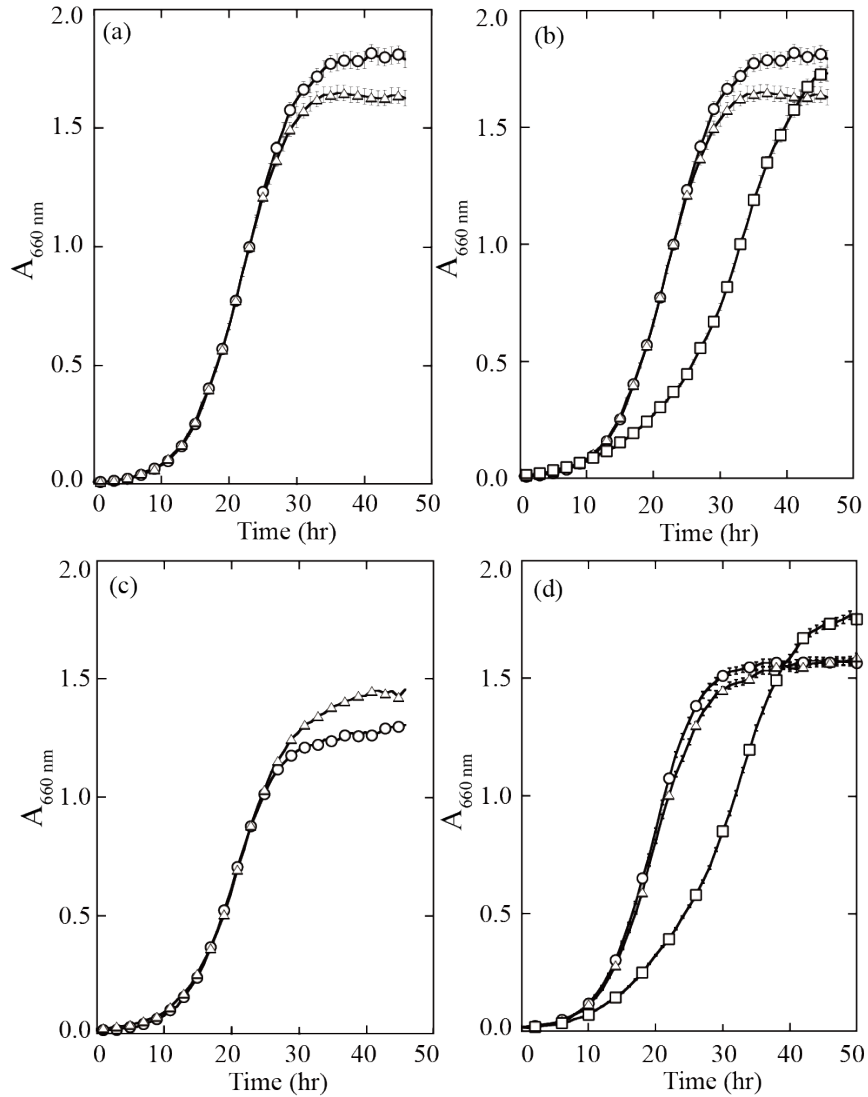


図 2-12 *HEX1*_{2.2} および *HEX1*_{2.9} 変異遺伝子の特定

被試験菌を 5 mL のキシロース最少培地 (MSX, pH 5.5) 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。(a)と(c) *HEX1* 変異体の *CDC19* フランキング領域に *kanMX* を挿入しても Hex^+ に影響しないことを調べる解析。(a) \triangle , SCB38 ; \circ , *kanMX* 転換体 (SCC101)。(c) \triangle , SCB1031 ; \circ , *kanMX* 転換体 (SCC102)。(b)と(d) *kanMX*-*CDC19*_{2.9} または *kanMX*-*CDC19*_{2.2} DNA による野生型 Hex^- 株 SCC2-11B の G418 耐性 Hex^+ 形質転換体の解析。(b) \triangle , SCB38 ; \square , 野生型 Hex^- 株 SCC2-11B ; \circ , *kanMX*- Hex^+ 転換体 (SCC105)。(d) \triangle , SCB1031 ; \square , 野生型 Hex^- 株 SCC2-11B ; \circ , *kanMX*- Hex^+ 転換体 (SCC106)。データは三回の平均値と標準偏差である。

次に, *kanMX-CDC19* の DNA を PCR 増幅し, その DNA による野生型 *Hex*⁻ 株 SCC2-11B の G418 耐性形質転換体を得た。それら転換体 100 個中 29 個が *Hex*⁺ を示した (図 2-12(b) と 2-11(d))。また, それら *Hex*⁺ を示した形質転換体の *CDC19* 遺伝子内には, 期待通り *HEX1*_{2,2} および *HEX1*_{2,9} の変異が確認できた。以上のことから, *HEX1*_{2,2} および *HEX1*_{2,9} は *CDC19* 遺伝子であると結論した。

HEX2 遺伝子は次世代シーケンサー解析から *GRR1* プロモーター変異と考えられた。そこで, 図 2-13 で示した実験デザインでそのことを確認した。

*HEX2*_{2,3} 株の変異型 *P*_{*GRR1*} 遺伝子構造

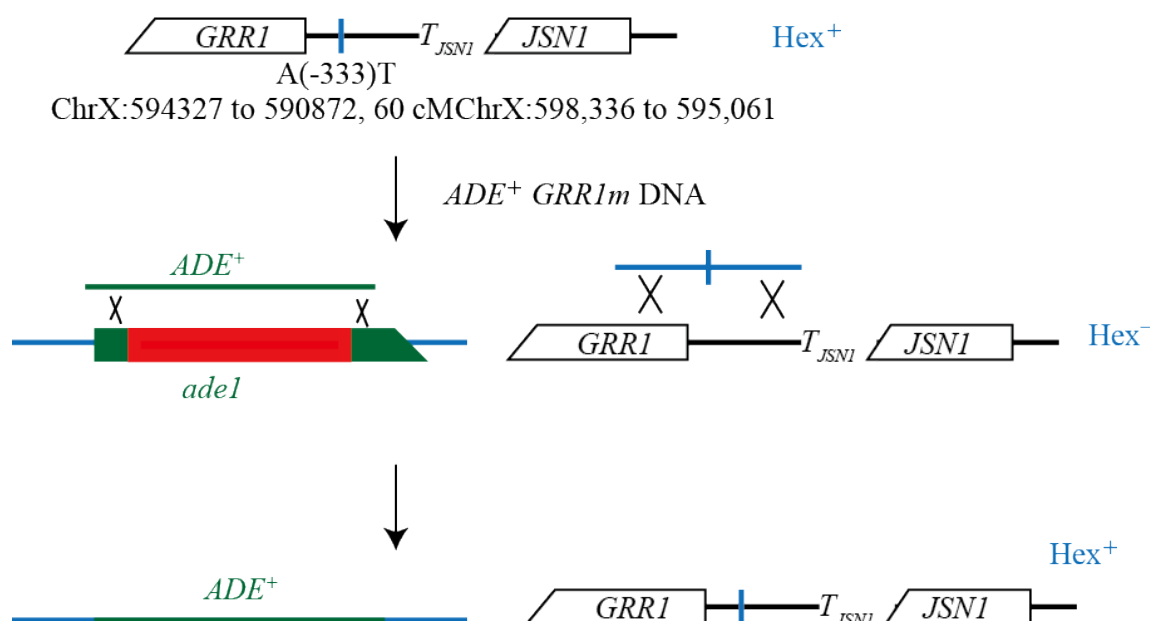


図 2-13 二重形質転換による *HEX2*_{2,3} 変異の特定方法

ade1Δ XM 株を受容菌に, *Ade*⁺ DNA と *GRR1* プロモーターの変異部位の下流と上流 1 kb からなる DNA による *Ade*⁺ 形質転換体を得る。*Ade*⁺ 形質転換体の中に変異部位を含む転換体があるかどうかをキシロース培地で検定する方法である。最終の遺伝子構造が, *GRR1* XM₁ 遺伝子構造となるので, XM₁ 株と明確に区別できる利点がある。

すなわち, *ade1* XM 株に *ADE1*⁺ DNA と変異型 *GRR1* DNA を加え, *Ade*⁺ 形質転換体を得た。次に, この形質転換体を 100 個選び, 10 g/L のキシロースを含む MSX 最少固

形培地 pH 5.5 に白金線でストリークし、30℃で2-4日静置培養した。培養した後に生じたコロニーを2個選び、MSX培地 pH 5.5 で増殖確認したところ、Hex⁺を示す増殖を得た (図 2-14)。さらに、*GRR1* 近傍の塩基配列を決定したところ、次世代シーケンサーで認められた *GRR1* のプロモーター置換変異を確認した。このことから *HEX2₂₋₃* 遺伝子は *GRR1* のプロモーター変異であることと結論した。

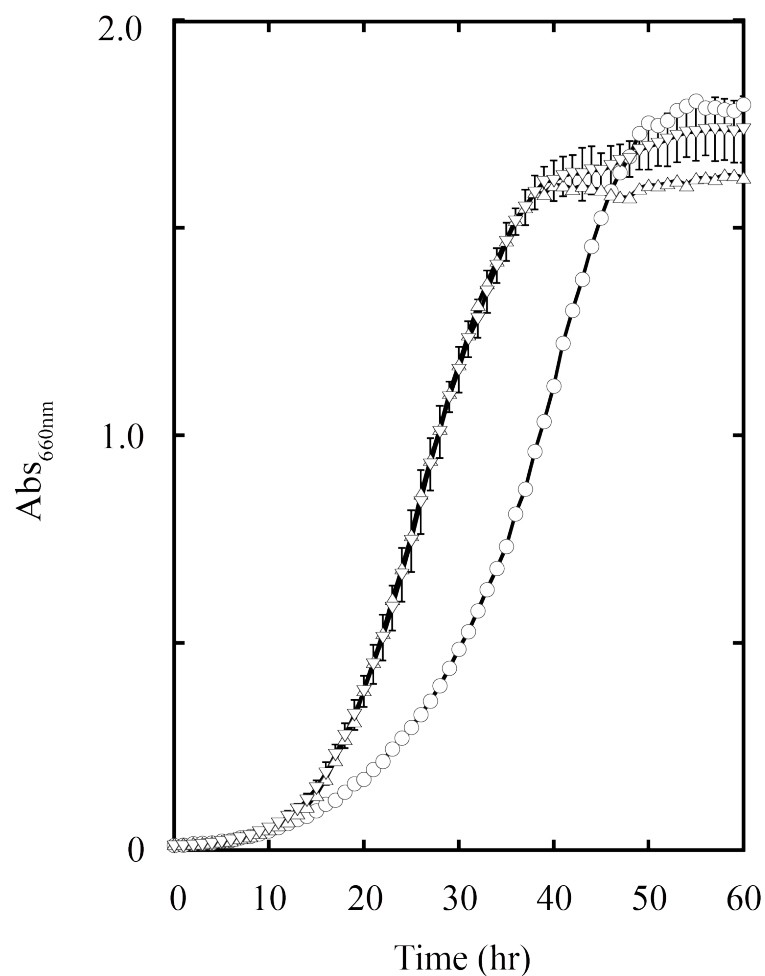


図 2-14 *HEX2₂₋₃* が *GRR1* プロモーター変異であることの特異実験

記号：○，SCC12 株 (*XM₁*)；△，SCB1021 株 (*HEX2₂₋₃ XM₁*)；▽，Ade⁺ *GRR1* 二重形質転換体 SCC24 株 (*GRR1 XM₁*)。

第4節 考察

耐熱性・耐酸性・凝集性・ホモタリズム二倍体である燃料用エタノール生産酵母 *S. cerevisiae* KF7 から構築したヘテロタリズム一倍体酵母 NAM34-4C 株は、接合能と形質転換能に優れ、育種や遺伝操作に適していた（第1章）。その株からキシロース資化に必要な遺伝子を付与した後にキシロース代謝向上した自然突然変異を分離し、遺伝的に解析し、掛かり合う遺伝子を特定するには、同質系統株が必要である。突然変異の優性・劣性や変異遺伝子数を解析するには、遺伝背景が同じ株でないと表現型と遺伝子型の対応が詳細に解析できない。そこで、NAM34-4C 株から同質遺伝子系統株である SCA3 (*MATa pho87Δ::loxP*) と SCA2 (*MATa*) を構築した。また、NAM34-4C 株の全ドラフト塩基配列の情報は、解析済みであるため（非公開）、次世代シーケンサーによる変異解析も容易である。

同質遺伝子系統株を用いて *P. stipitis* の *XYL1*, *XYL2* と *S. cerevisiae* の内在性 *XKS1* を *TDH3* プロモーターで発現する組換え型キシロース資化性酵母 SCB7 を構築した。*S. cerevisiae* の5番染色体 *ura3* 領域に3遺伝子を1個ずつ挿入した。この SCB7 株はウラシル含有最少キシロース培地、pH5.5, 35°C で、最も早い世代時間 (G_{short}) は5時間であった（図2-4）。このキシロース資化能力は、既知の株と比べて非常に早かった (2)。恐らく、エタノール製造酵母 KF7 株由来の遺伝背景がこの主たる要因と考えられる。また、*P_{TDH3}-XKS1* 遺伝子が欠失すると、*XKS1* 遺伝子は内在性の *P_{XKS1}-XKS1* のみになる。この株のキシロース培地での G_{short} は10時間となるので、キシロース資化には従来報告されているように *XKS1* 遺伝子の高発現が必要であった (2)。

Hex^+ 自然突然変異体の G_{short} は、キシロース最少培地で2.5時間と非常に早かった。4個の変異体は3個の連関群 *HEX1₂₋₂* と *HEX1₂₋₉*, *HEX2₂₋₃*, *hex3₁₋₅* に分類された（図2-5）。3個の変異 *HEX1₂₋₂*, *HEX1₂₋₉*, *HEX2₂₋₃* は、野生型対立遺伝子に対して優性であり、もう1個の変異 *hex3₁₋₅* は劣性であった。*HEX1₂₋₂* と *HEX2₂₋₃*, *HEX1₂₋₂* と *hex3₁₋₅*, *HEX2₂₋₃* と *hex3₁₋₅* の二重突然変異を組み合わせても、単独変異と比較してキシロース

資化性の付加的または相乗的な効果は見られなかった (MSX 培地, pH5.5, 35°C で $G_{\text{short}}=2.5$ 時間)。それゆえ, G_{short} が 1 時間弱のグルコース資化能に匹敵するようなキシロース資化能を得るには, 他の変異が必要であると考えられる。

pho13 欠失変異は, Hex^+ の表現型を示すことが報告されている (58)。SCB7 株に *pho13Δ* 変異を組換えると, 実験室酵母が Hex^+ になることから, 実験室酵母と実用酵母でキシロース代謝に関わる遺伝子群は類似しており, 耐熱性や耐酸性と遺伝子群は異なっていると考えられる。*pho13* 欠失変異は, Pho13 産物を生産しないので劣性を示すと考えられるが, 予想通り *pho13Δ* 株は, 劣性変異であった (図 2-9)。*pho13Δ* と *hex3₁₋₅* は, とともに劣性変異であるので, 相補性試験を行ったところ, 同じ遺伝子変異であった (図 2-9)。 Hex^+ を示すのに遺伝子産物が必要ではないことを示している。SCB7 株に *P_{TDH3}-TAL1* 遺伝子構造を組換えると実験室酵母は Hex^+ 表現型を示した (58)。*TAL1* 高発現の効果もまた実験室・実用酵母で類似していると考えられる。

P_{TDH3}-TAL1 株と *HEX1₂₋₂* および *HEX2₂₋₃* 株の掛け合せの 4 分子解析から 3 遺伝子は異なる遺伝子であった。変異の組み合わせから生じる 2 重変異株で, より強いキシロース資化性を示す株は構築できていない。キシロース資化性の向上には, 異なる変異が必要であるのかもしれない。

組換え型 *S. cerevisiae* と Hex^+ 変異体の回分発酵をキシロース単一炭素源 YPX3 培地で解析した。 Hex^+ 変異体では, キシロース濃度の減少と共にエタノール濃度が増加した (図 2-7)。組換え型 *S. cerevisiae* のキシロース消費は, 培養の初期段階では緩やかに起こる特徴があり, その結果, エタノール生産は非常に低い。それゆえ, キシロース消費とエタノール生産は連動すると考えられる。

HEX1₂₋₂ と *HEX1₂₋₉* は *CDC19* (*PYK1*) がコードするピルビン酸キナーゼの変異であった (*Saccharomyces* Genome Database, <http://www.yeastgenome.org/>)。酵素はホモテトラマーとして機能し, 解糖系のひとつの反応であるホスホエノールピルビン酸からピルビン酸の反応を行う (59–61)。酵母の染色体上には, *PYK2* パラログがあり, 遺伝子重複から生じたと考えられている。*Pyk1* は主要なピルビン酸キナーゼであり, 環

境に応答してリン酸化を受けることが知られている (62)。その酵素は、またフラクトース 1, 6-ビスリン酸によるアロステリック活性化を受ける (62)。酵素がアロステリック調節や共有結合による修飾を受けると一般的に迅速な代謝応答調節を受ける。グルコースが取り除かれるとホスホエノールピルビン酸の蓄積が起これ、それゆえピルビン酸キナーゼによる代謝は急激に減速する。この応答はプロテインキナーゼ A もしくは AMP-活性化プロテインキナーゼによっては生じない。また、リン酸化を受けない変異型 Cdc19 S9A, T21A, S22A, S9E, T21E, S22E によっても影響しない (63)。一方、フラクトース 1, 6-ビスリン酸によるアロステリックな活性化を受けない *CDC19* の点変異 (Cdc19 E392A) によっては、環境応答が起きなくなる。*HEX1* のミスセンス変異は、Cdc19 P272T および Cdc19 A344P であったので、フラクトース 1, 6-ビスリン酸によるアロステリック活性化の場所とは異なっている。Cdc19 アミノ酸残基の 313-349 からなる 34 残基のポリペプチド鎖は、子牛筋肉ピルビン酸キナーゼの ADP 結合部位と類似している。*HEX1*_{2,9} のミスセンス優性変異は、この 37 残基からなるストレッチの中にあるので、ADP 結合部位への変化により Hex⁺表現型が生じている可能性がある。なぜならば、エネルギー値が高くなった時、ATP は解糖系の代謝を弱めるようにアロステリック的にピルビン酸キナーゼを阻害するからである。ピルビン酸から合成されるアラニンもまたアロステリック的にピルビン酸キナーゼを阻害する (64)。このようにアロステリック的な調節や酵素修飾による調節が知られているが、優性変異である *HEX1*_{2,2} の掛かり合いは、現在のところ不明である。また、Grr1 の上流であり、Jsn1 の下流にある優性変異 *HEX1*_{2,3} の機能もまた現時点では不明である (*Saccharomyces* Genome Database, <http://www.yeastgenome.org/>)。解糖系代謝の鍵となる反応のひとつがピルビン酸キナーゼ反応である (59-61)。キシロース代謝が促進する株として、変異型 Cdc19 や高発現型 Tal1 があることは、これらの 2 反応がグルコース非存在下での鍵となる反応であることを強く示唆しており、キシロースからのエタノール発酵を高効率にする上でその活性制御は考慮すべきであると推測された。

第5節 要約

NAM34-4C 株から同質系統株 SCA2 (*MAT α*) と SCA3 (*MAT α pho87 Δ ::loxP*) を構築した。*P. stipitis* の *XYL1* と *XYL2* および *S. cerevisiae* の *XKS1* 遺伝子を SCA 株の *ura3* 領域に組み込み、それぞれ TDH3 プロモーターで発現するキシロース資化性株を構築した。キシロース最少培地での最も早い世代時間 G_{short} は、SCB7 株で 5 時間であり、3 遺伝子が発現すれば、染色体上の 1 コピーで十分なキシロース資化が起こることを認めた。SCB7 株から高効率にキシロースを資化する Hex^+ 変異体を 4 株分離した (SCB13–SCB16 株)。変異体は互いに似た増殖を示し、SCB14 株の G_{short} は 2.5 時間であった。4 個の変異体と野生型 Hex^- 株とを掛け合わせ 4 孢子解析すると、調べた子囊はすべて $\text{Hex}^+ : \text{Hex}^-$ が 2+ : 2- に分離したので、1 遺伝子変異により Hex^+ の表現型が生じていた。変異が優性か劣性かを調べた。*hex₁₋₅* 変異/野生型の二倍体は野生型/野生型の二倍体と似た増殖を示したので、*hex₁₋₅* は劣性変異であった。残りの *HEX₂₋₂*/野生型、*HEX₂₋₃*/野生型、*HEX₂₋₉*/野生型の二倍体は、 $\text{Hex}^+/\text{Hex}^+$ の二倍体の増殖に似ていたので優性変異であった。変異間の連鎖関係を解析した。*HEX₂₋₂* \times *HEX₂₋₉* では、 $\text{Hex}^+ : \text{Hex}^-$ が 4+ : 0- に分離し、*HEX₂₋₂* \times *HEX₂₋₃*、*HEX₂₋₂* \times *hex₁₋₅*、*hex₁₋₅* \times *HEX₂₋₃* では、4+ : 0-、3+ : 1-、2+ : 2- に分離したので、*HEX₂₋₂* と *HEX₂₋₉* は連鎖し、*hex₁₋₅*、*HEX₂₋₂*、*HEX₂₋₃* は異なる遺伝子であった。そこで、*HEX₂₋₂* と *HEX₂₋₉* 変異遺伝子を *HEX1*、*HEX₂₋₃* 変異遺伝子を *HEX2*、*hex₁₋₅* 変異遺伝子を *hex3* と命名した。変異体の回分発酵試験を YPX3 培地で行った。SCB14 株は 24 時間以内に 4.8 g/L のエタノールを生産し、SCB7 株よりも 1.4 倍高かった。エタノール収率は 47% で、キシロースは 1 g/L/hr で減少した。*HEX* と既知遺伝子との比較を行った。*hex3₁₋₅* 株と *pho13* 欠失株とを掛け合わせて得た二倍体は *hex3₁₋₅* 株と同様の増殖を示したので、同じ遺伝子であることが分かった。次世代シーケンサー解析で変異箇所を解読し、そのいずれが Hex^+ の原因変異であるかを遺伝的に特定した。その結果、*HEX1₂₋₂* および *HEX1₂₋₉* は *CDC19* 遺伝子変異であり、*HEX2₂₋₃* は *GRR1* プロモーターの変異であった。

第3章 高濃度キシロースを効率的に資化できる

Saccharomyces cerevisiae SXM 突然変異体の分離とその解析

第1節 緒言

野性型 *S. cerevisiae* 株に *Pichia stipitis* の *XYL1* と *XYL2* および *S. cerevisiae* の *XKS1* を *TDH3* プロモーターで高発現した組換え酵母を作成したが、キシロース最少培地での最少の世代時間 G_{short} は、約 5 時間と遅かった (第 2 章)。キシロースを高効率に資化する *HEX* 突然変異体を分離したが、最少培地での G_{short} は 2.5 時間程度であり、グルコース培地での約 1.5 時間と比較すると遅かった (第 2 章)。また、発酵試験で用いる栄養源の豊富な培地では、キシロース消費の開始が、*HEX* 変異体では早くなるが、野生型株のキシロース消費速度との差は比較的少ない。竹を濃硫酸で糖化した溶液には、グルコースとキシロースが約 2 : 1 の割合で含まれ、その濃度は前者が 40 g/L から 60 g/L であり、後者はその半分の濃度である (65)。このように、組換え酵母で、キシロース消費速度が遅いことは、グルコース・キシロース共存下でエタノール発酵を行う上で問題となる (34)。

HEX 突然変異体を組み合わせてできる多重 *HEX* 突然変異体でもキシロース消費速度の相加効果や相乗効果は見られなかった (第 2 章)。異なる遺伝背景が必要であると考えられる。また、高濃度のキシロース培地では、酵母菌の増殖が阻害されることが見出されている (4)。

そこで、次のような実験デザインを建て、キシロース消費速度が向上する突然変異体を分離し、遺伝的に解析し、変異を特定し、発酵試験で評価することを本章の目的とした。また、その結果に基づいて、グルコース・キシロース共存発酵を行う上で必要なキシロース代謝制御に関して作業仮説を提案することを目的とした。本章では、最初に、高濃度キシロースの濃度勾配を利用して細胞内にキシロースを取り込ませ、

酵母菌の増殖が阻害するキシロース濃度を解析した。次に培地組成によってキシロース消費速度の影響が異なるので、突然変異体を取得するのに適する培地を調べた。その後、突然変異体を分離し、遺伝的に解析した。最後に、次世代シーケンサー解析と遺伝的な解析で、突然変異遺伝子を特定した。また、発酵試験で評価を行った。その結果に基づいて、作業仮説を提案した。

第2節 実験材料と実験方法

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

本章で使用した菌株とプラスミドを表 3-1 に示した。キシロース資化性組換え型酵母 SCB7 株は, *P. stipitis* 由来の *XYL1*, *XYL2* と内在性 *XKS1* を 1 コピーずつ持ち *TDH3* プロモーターで発現する酵母である (第 2 章)。SCB14 株はキシロース単一炭素源最少培地で早い増殖 ($G_{\text{short}} = 2.5 \text{ hr}$) を示す *HEX1*₂₋₂ 変異体であり (第 2 章), 高濃度キシロースを高効率に資化する突然変異を分離するための親株として用いた。本研究で用いたプライマーは (Genenet, Fukuoka, Japan), Primer3 (第 1 章) 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/>) の情報もしくは NAM34-4C 株のドラフト塩基配列 (未発表) に基づいた。

表 3-1 本研究で使用した菌株及びプラスミド

微生物名	遺伝子型又は表現型	起源, 由来または文献
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
NAM34-4C	<i>MATα</i>	第 1 章
SCA1	<i>MATα pho87Δ::kanMX</i>	第 2 章
SCA2	<i>MATα</i>	第 2 章

表 3-1 続き

SCA3	<i>MATa pho87Δ</i>	第 2 章
SCB7	<i>MATa pho87Δ ura3::XM₈</i>	第 2 章
SCB11-8C	<i>MATα ura3::XM₈</i>	第 2 章
SCB101	<i>MATα / MATa pho87Δ</i>	第 2 章
SCB101-7C	<i>MATα</i>	第 2 章
SCB101-2B	<i>MATa pho87Δ</i>	第 2 章
SCB102	<i>MATα / MATa pho87Δ</i>	第 2 章
SCB102-3D	<i>MATa pho87Δ</i>	第 2 章
SCB103	<i>MATα / MATa pho87Δ</i>	第 2 章
SCB103-10D	<i>MATα</i>	第 2 章
SCB14	<i>MATa pho87Δ ura3::XM₈ HEXI₂₋₂</i>	第 2 章
SCB38	<i>MATa pho87Δ URA3::XM₁ HEXI₂₋₂</i>	第 2 章
SCB105	<i>MATa pho87Δ ura3::XM₈</i> <i>HEXI₂₋₂/MATα ura3::XM₈</i>	第 2 章
SCB105-3A	<i>MATα ura3Δ::XM₈ HEXI₂₋₂</i>	第 2 章
SCB105-7A	<i>MATα ura3::XM₈ HEXI₂₋₂</i>	第 2 章
SCB32	<i>MATa SXM1₃₂ sxmcl pho87Δ</i> <i>ura3::XM₈ HEXI₂₋₂</i>	SCB14 株から分離した Sxm ⁺ 自然突然変異体
SCB33	<i>MATa sxm2₃₃ pho87Δ ura3::XM₈</i> <i>HEXI₂₋₂ Sxm⁺</i>	SCB14 株から分離した Sxm ⁺ 自然突然変異体
SCB39	<i>MATa SXM1₃₂ sxmcl₃₂ pho87Δ</i> <i>URA3::XM₁ HEXI₂₋₂</i>	Tfm (SCB32: URA ⁺ DNA, URA ⁺ , G418-s) ^a
SCB40	<i>MATa sxm2₃₃ pho87Δ URA3::XM₁</i> <i>HEXI₂₋₂ Sxm⁺</i>	Tfm (SCB33: URA ⁺ DNA, URA ⁺ , G418-s)
SCB42	<i>MATa SXM1₃₂ sxmcl₃₂ pho87Δ URA3::</i> <i>XM₁ HEXI₂₋₂ / MATα HEX₂₋₂ ura3::XM₈</i>	Diploid (SCB39 × SCB105-3A) ^b
SCB43	<i>MATa sxm2₃₃ pho87Δ URA3::XM₁</i> <i>HEXI₂₋₂ / MATα HEX₂₋₂ ura3::XM₈</i>	Diploid (SCB40 × SCB105-7A)
SCC2-11B	<i>MATa pho87Δ URA3::XM₁</i>	第 2 章
SCC21	<i>MATa pho87Δ ade1Δ::Ty-kanMX</i> <i>URA3::XM₁ HEXI₂₋₂</i>	Tfm (SCB38: <i>Ty-kanMX</i> DNA, G418-r)
SCC22	<i>MATa MTH1₃₂::kanMX sxmcl₃₂ pho87Δ</i> <i>URA3::XM₁ HEXI₂₋₂</i>	Tfm (SCB39: <i>kanMX</i> DNA, G418-r)
SCC23	<i>MATa pho87Δ URA3::XM₁ HEXI₂₋₂</i> <i>MTH1₃₂::kanMX</i>	Tfm (SCB38: <i>kanMX</i> DNA, G418-r)
SCC25	<i>MATa pho87Δ URA3::XM₁ HEXI₂₋₂</i> <i>grr1₃₃</i>	Tfm (SCC21: ADE ⁺ DNA, <i>SXM2</i> DNA ADE ⁺ , G418-s)

表 3-1 続き

SCB41-2B	<i>MATa pho87Δ URA3::XM₁ HEXI₂₋₂</i>	Haploid (SCB38 × SCB105-3A)
SCC107	<i>MATa pho87Δ URA3::XM₁ HEXI₂₋₂ grr1₃₃/MATa pho87Δ URA3::XM₈ HEXI₂₋₂</i>	Diploid (SCC25 × SCB41-2B)
SCC108	<i>MATa pho87Δ URA3::XM₁ MTH1₃₂::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-MTH1-kanT200 and R-MTH1-kanT200.
<i>Escherichia coli</i>		
DH10B	<i>F⁻ mcrA Δ(mrr⁻ hsdRMS mcrBC) Φ80 lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara leu)7697 galU galK λ⁻ rpsL nupG)</i>	Invitrogen, 16
Plasmid		
pBlu-LTKTL-TDH3	<i>loxP-P_{TEF}-kanMX-T_{TEF}-loxP-P_{TDH3}</i>	第 2 章
pTy-kan	<i>ura3'-Ty- loxP-P_{TEF}-kanMX-T_{TEF}-loxP -ura3</i>	第 2 章
pADE1	<i>ADE1</i> (NAM34-4C)	第 2 章
pGRR1	<i>HEX2₂₋₃</i>	第 2 章

^a Tfm, transformation; (SCB32: URA⁺ DNA, URA⁺, G418-s) および ^b Diploid (SCB39 × SCB105-3A)の記載に仕方は、第 2 章と同様である。

表 3-2 PCR 増幅に用いたオリゴヌクレオチドプライマー

Number	Name	Primer sequence (5' to 3')
1	F-URA3-STR	atgtcgaaagctacatataagg
2	R-URA3-DWN300(GAP DH)	gaatttggtgccattagtggtgtccgtgtgagaactgggttccttcattgctttgttcca
3	F-Ty(ADE1)	cattgcttacaagaatacacatacgaaatattaacgataatgttcgtacctgttgaata
4	R-LTKTL(ADE1)	gaggagtacactggcgactttagtatatgtaaatcacgaggccactagtggatct
5	F-GRR1-in840	gagctcatcctaattgcat
6	R-GRR1-in2930	ctggtgttatagagaaacgtag

表 3-2 続き

7	F-ADE1-UP1k	tgtagccttctttccaaattgt
8	R-ADE1-DWN1k	ttattgactgcgctctataaatg
9	F-MTH1-kanT200	<u>tatagagatttagtaataagaattttatgggaacgtggtaccgccagctgaagctt</u>
10	R-MTH1-kanT200	<u>catcgatggtttgatcttcgctacccttgactctttactaggccactagtggatct</u>
11	F-MTH1-clo-58UP	caagcagcaatacaaaagagaatttt
12	R-MTH1-clo-down1485	tgatcgaaaaatcattcagagtc

プライマー2-4, 9, 10 は下線で示した 40 bp の相同領域を持つ。

3-2-2. 培地

YPD 培地, MSX 培地, SpoKII 培地, YPGal 培地, LB 培地, LLB 培地, MSD 培地, M9 培地は, 第 2 章で示したものをを用いた。回分発酵に用いた YPX5 培地は 30 g/L キシロースの代わりに 50 g/L キシロースを加えた点以外は, 第 2 章で示した YPX3 培地と同じ組成である。MYPD6X4 培地は, 16 g/L ペプトン, 8 g/L 酵母エキス, 60 g/L グルコース, 40 g/L キシロースを加えた培地である。突然変異体の分離および分離した株の増殖確認に用いた YPX_n 培地は, 30 g/L キシロースの代わりに $n \times 10$ g/L キシロースを用いたこと以外は, YPX3 培地と同じ組成である。例えば, YPX18 培地は 30 g/L キシロースの代わりに 180 g/L のキシロースを含む。

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. 大腸菌からのプラスミド調製および High Pure Plasmid Isolation Kit を用いた大腸菌からのプラスミド DNA 抽出

プラスミド調製およびプラスミド抽出は, 第 1 章の第 2 節で示した方法を用いて行った。

3-2-5. プラスミド DNA への制限酵素処理, アガロースゲル電気泳動およびエリクションによる DNA 断片の回収

制限酵素処理, アガロースゲル電気泳動および DNA 断片の回収は, 第 1 章の第 2 節 1 で示した方法で行った。

3-2-6. PCR 法による DNA 断片の増幅, コロニーからの直接 PCR 法および塩基配列決定

PCR 反応, コロニーからの直接 PCR 法および塩基配列決定は, 第 1 章の第 2 節で示した方法で行った。

3-2-7 バイオフォトレコーダーを用いた細胞増殖の解析

バイオフォトレコーダーを用いた細胞増殖の解析は第 1 章の第 2 節で示した方法で行った。

3-2-8. *cre* 発現による *kanMX* マーカーの除去

cre 発現による *kanMX* マーカーの除去は, 第 2 章の第 2 節で示した方法で行った。

3-2-9. 高濃度キシロースを高効率に資化する Sxm^+ 突然変異体の分離

SCB14 株を 10 mL の YPD 培地で 30°C, 24 時間, 振盪培養し (120 rpm), 2400 × g, 4°C, 1 分間 遠心分離した後, 滅菌水に懸濁した。5 mL のウラシル含有 YPX18 培地に初期細胞濃度 $Abs_{660nm}=0.014$ で培養を始め, バイオフォトレコーダーで増殖をモニターした。濁度が急激に増加した時, 培養液を YPX18 固形培地に塗抹し, 30°C で 2-3 日間培養した。大きなコロニーを選び, YPD 培地に移した。必要に応じて, ミクロマニプレーター (Singer MSM systems series 400, Minerva Tech., K.K., Tokyo, Japan) により単細胞分離を行った。突然変異体であることを確認するために, 細胞増殖をバイオフォトレコーダーで解析した。独立した突然変異体を分離するために, 1 個の変異体

は独立した L 字試験管から分離した。

3-2-10. 回分発酵試験

変異体の回分発酵試験は第 2 章の第 2 節で示した方法で行った。変異体の高濁度回分発酵試験は YPD 固形培地で 30°C，一晚培養した被試験菌を 50 mL の YPD 培地 (pH4.0) に植菌し，30°C，24 時間振盪培養した (120 rpm)。その後，細胞懸濁液を 50 mL の YPD6X4 培地に初期濃度 $Abs_{660nm}=20$ となるように植菌し，35°C，24 時間振盪培養した。発酵培地中のエタノールとグルコースの濃度を決定するために，4°C， $20,400 \times g$ で 5 分間遠心分離して上澄みを得た。

3-2-11. グルコース，キシロース，エタノールの解析

上澄み中のグルコース，キシロース，エタノールの濃度の解析は，第 2 章の第 2 節で示した方法で行った。

3-2-12. 二重形質転換

酵母の二重形質転換は第 2 章の第 2 節で示した方法を用いた。

3-2-13. 次世代シーケンサー解析

変異体の次世代シーケンサー解析は第 2 章の第 2 節で示した方法を用いた。

第 3 節 結果

3-3-1. *HEX1_{2,2}* 変異体 SCB14 に対する増殖阻害キシロース濃度の解析

キシロース濃度を 20 g/L から 200 g/L まで変化させた YPX 培地に SCB14 株を植菌し，35°C で振盪培養した。細胞の増殖をバイオフィトレコーダーで解析した結果，

キシロース濃度が増加するにつれて SCB14 株は増殖阻害を受け、180 g/L キシロース以上の濃度では増殖しなくなった (図 3-1(a)と 3-1(b))。そこで、高濃度キシロースでも高効率に資化できる突然変異を分離するための培地を YPX18 培地に定めた。

3-3-2. 高濃度キシロースを高効率に資化する突然変異体の分離

SCB14 株から高濃度キシロースを資化できる変異体を分離した。すなわち、180 g/L キシロースを含む YPX18 培地 pH 4.0 に SCB14 株を植菌し、温度 35°C で振盪培養した。図 3-1(b)に示したように、培養後期で急激に細胞濃度が増えた時、L 字試験管培

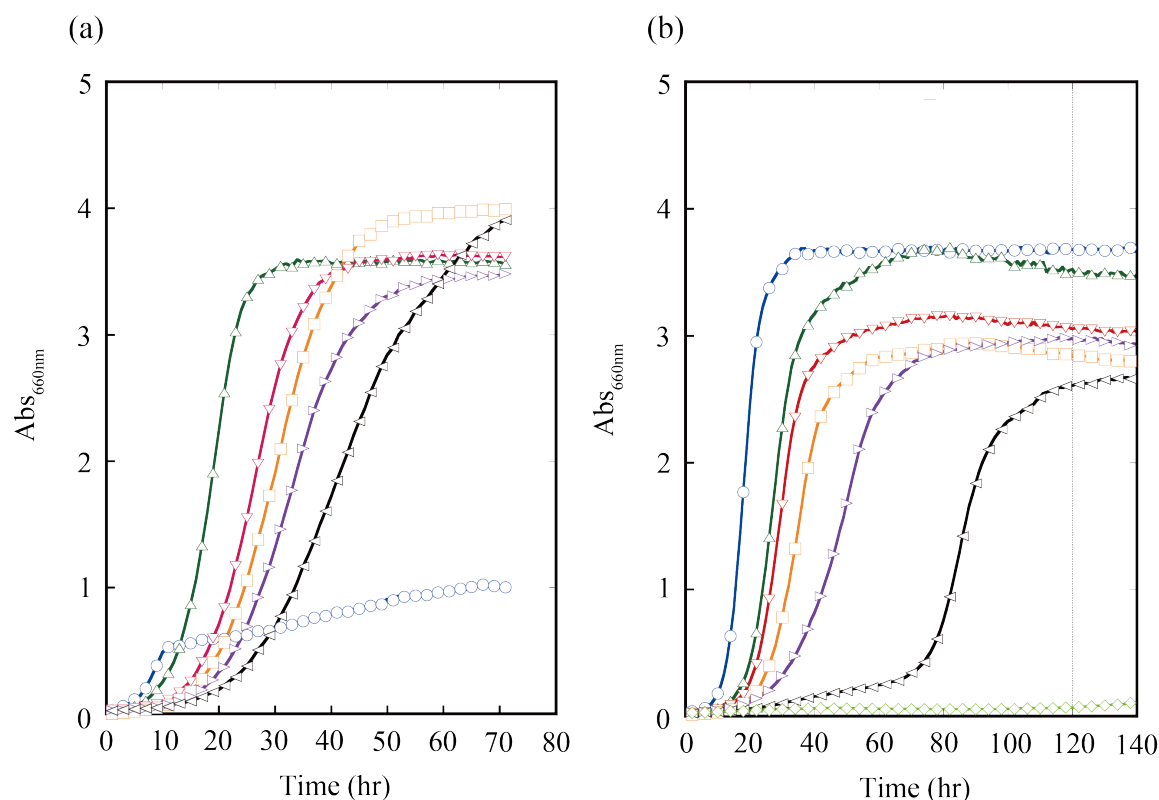


図 3-1 酵母菌の増殖を阻害するキシロース濃度の解析

(a) キシロース濃度が 0 g/L から 100 g/L までの濃度を含む YPXn 培地での増殖。(b) キシロース濃度が 20 g/L から 200 g/L までの濃度を含む YPXn 培地での増殖。記号:(a)○, 0 g/L; △, 20 g/L; ▽, 40 g/L; □, 60 g/L; ▷, 80 g/L; ◁, 100 g/L ; (b) ○, 20 g/L; △, 100 g/L; ▽, 120 g/L; □, 140 g/L; ▷, 160 g/L; ◁, 180 g/L; ◇, 200 g/L。

養液を YPX18 平板培地に適当に希釈・塗抹し、30°C で 2-4 日静置培養した。その結

果，増殖の早い大きなコロニーを独立して2個分離した。単細胞分離後にその2個のコロニーの増殖をキシロース最少培地で調べ，親株 SCB14 株と比較した。2個の細胞は，YPX18 培地で増殖を示したのに対し，親株は増殖しなかった (図 3-2)。そこで，この高濃度キシロース培地で効率よくキシロースを資化する突然変異体を super xylose assimilation metabolism (Sxm) 変異体と名付け，その表現型を Sxm⁺と定めた。

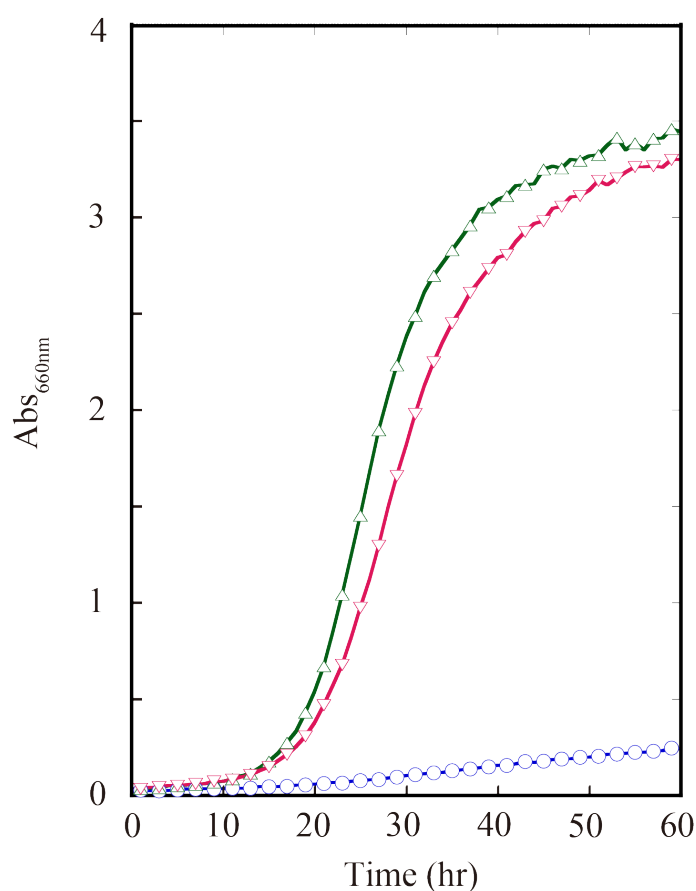


図 3-2 Sxm⁺突然変異体の高濃度キシロース培地での増殖。

2 個の被試験菌を 5 mL のウラシルを加えた YPX18 培地 pH 4.0 に初発細胞濃度 Abs_{660nm}=0.014 となるように植菌し，増殖をバイオフィトレコーダーで解析した。記号：○, *HEX12-2* 親株；△, Sxm⁺突然変異体 1 番；▽, Sxm⁺突然変異体 2 番。

3-3-3. Sxm⁺を導く突然変異の遺伝的解析

Sxm⁺表現型を導く突然変異の数を第 2 章と同様の手順で解析した。最初に，SCB32 変異体 (*MATa pho87Δ ura3::loxP-P_{TEF}-kanMX-T_{TEF}-loxP-P_{TDH3}-XYL1-T_{TDH3}-P_{TDH3}-*

XYL2-T_{TDH3}-P_{TDH3}-XKS1-T_{TDH3} HEX1₂₋₂ Sxm⁺) を解析した。SCB32 株は G418 耐性 ウラシル要求性であるので、URA⁺ DNA による SCB32 株の Ura⁺ G418 感受性の形質転換体を分離し、要求性を取り除いた。その遺伝子構造と表現型は、*MATa pho87Δ URA3::P_{TDH3}-XYL1-T_{TDH3}-P_{TDH3}-XYL2-T_{TDH3}-P_{TDH3}-XKS1-T_{TDH3} HEX1₂₋₂ Sxm⁺* であり SCB39 株と名付けた。その Sxm⁺ 株と Sxm⁻ 株である SCB105-3A (*MATa ura3Δ::XM₈ HEX1₂₋₂ Sxm⁻*) とを掛け合わせ二倍体を作成し、4 分子解析した。4 孢子クローンの YPX18 液体培地 pH 4.0 温度 35°C での増殖を調べたところ、調べた 24 子囊すべて、増殖するクローンが 2 個と増殖しないクローンが 2 個に分離した。すなわち、Sxm⁺ : Sxm⁻ (野生型) が 2+ : 2- に分離した。その増殖を図 3-3 に示す。詳細に調べると Sxm⁺ 突然変異体と同様の早い増殖を示すグループ (図 3-3a) と Sxm⁺ より遅い増殖を示すグループ (図 3-3b) に分かれた。このことは、1 個の変異が YPX18 培地での増殖に必要であり、他の変異は YPX18 培地での細胞増殖を導かないが、促進させると考えられた。すなわち、少なくとも 2 個の変異を持つことが推定され、それぞれの遺伝子を *SXM1* と *SXMC1* と名付け、その変異型遺伝子を仮に *sxm1* と *sxmc1* と名付けた。例えば、図 3-3 に示した SCB39 株の 4 孢子の遺伝子型は *sxm1* 単独変異 (SCB42-3C と SCB42-3D), *sxmc1* 単独変異 (SCB42-3A と SCB42-3B), *sxm1 sxmc1* 二重変異 (SCB42-4A と SCB42-4D) と推測された。このことを確認するために、Sxm⁺ の親株 (*sxm1 sxmc1*) と *sxm1* または *sxmc1* 単独株とを掛け合わせて二倍体を作成し、4 孢子解析した。調べた 24 子囊において、*sxm1 sxmc1* (早い増殖) : *sxm1* (遅い増殖) または *sxm1 sxmc1* (早い増殖) : *sxmc1* (非増殖) が 2+ : 2- に分離した。以上のことから、SCB39 株の Sxm⁺ を導く遺伝子型を *sxm1 sxmc1* と定めた。

次に SCB33 株に関して解析した。SCB33 株からも URA⁺ DNA による SCB33 株の Ura⁺ G418 感受性の形質転換体を得た。Sxm⁺ 株である SCB40 (*MATa pho87Δ URA3::P_{TDH3}-XYL1-T_{TDH3}-P_{TDH3}-XYL2-T_{TDH3}-P_{TDH3}-XKS1-T_{TDH3} HEX1₂₋₂ Sxm⁺*) と

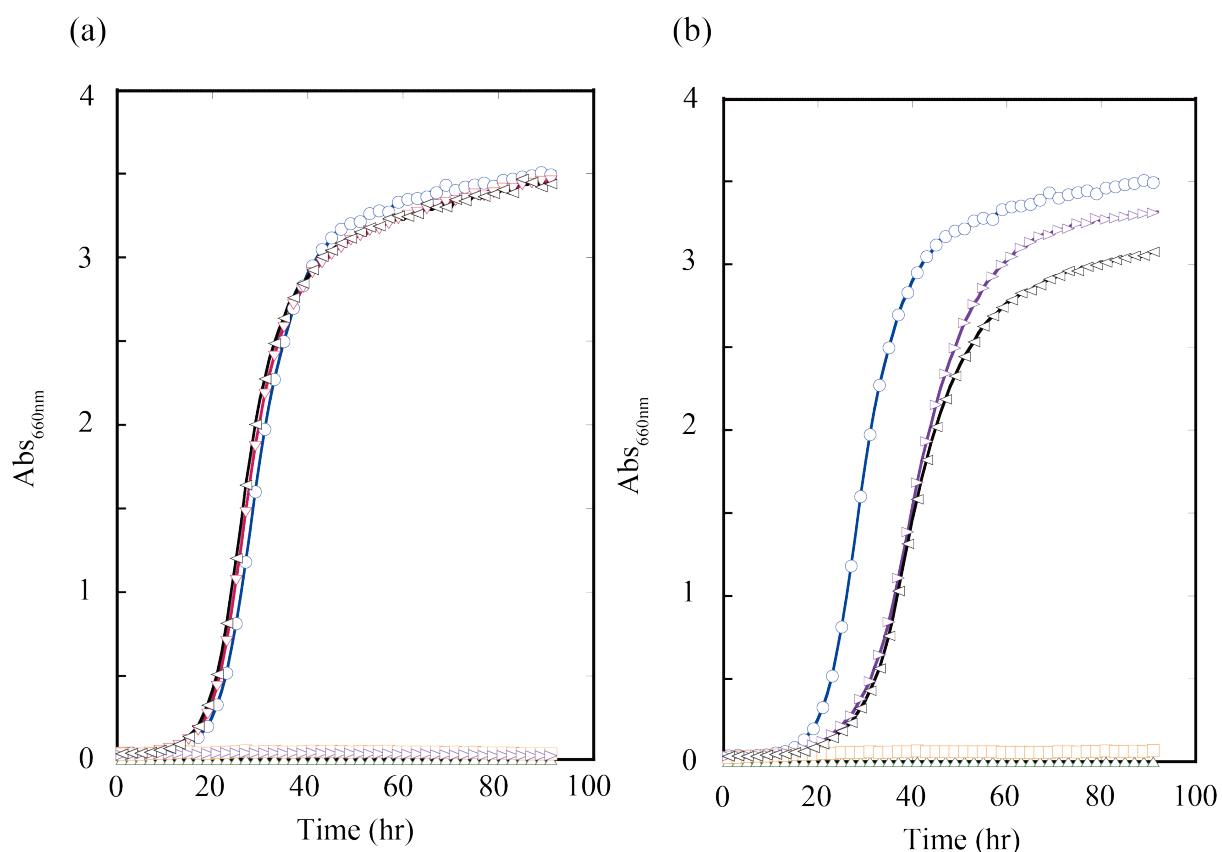


図 3-3 *Sxm*⁺株 SCN39 と親株の掛け合わせの 4 胞子解析。

Sxm⁺株である SCB39 株 (*MATa Sxm*⁺ *Hex1*₂₋₂), 親株 SCB105-3A 株 (*MATa Sxm*⁻ *HEX1*₂₋₂), およびそれらの掛け合わせから得られた SCB42 二倍体の 4 胞子クローン SCB42-4A, -4B, -4C, -4D および SCB42-3A, -3B, -3C, -3D を用いた。10 個の被試験菌を 5 mL のウラシルを加えた YPX18 培地 pH 4.0 に初発細胞濃度 Abs_{660nm}=0.014 となるように植菌し, 増殖をバイオフォトレコーダーで解析した。(a) SCB42-4 の解析。記号: ○, *Sxm*⁺突然変異体 (*sxm1 sxm1*); △, *HEX1*₂₋₂株; ▽, SCB42-4A; □, SCB42-4B; ▷, SCB42-4C; ◁, SCB42-4D。(b) SCB42 の 3 の解析。記号: ○, *Sxm*⁺突然変異体 (*sxm1 sxm1*); △, *HEX1*₂₋₂株; ▽, SCB42-3A; □, SCB42-3B; ▷, SCB42-3C; ◁, SCB42-3D。

Sxm⁻株である SCB105-7A (*MATa ura3Δ::XM₈ HEX1*₂₋₂ *Sxm*⁻) とを掛け合わせ二倍体を作成し, 4 胞子解析した。4 胞子クロンの YPX18 液体培地 pH 4.0 温度 35°C での増殖を調べたところ, 調べた 8 子囊すべてにおいて, 増殖するクローンが 2 個と増殖しないクローンが 2 個分離した。すなわち, *Sxm*⁺:*Sxm*⁻ (野生型) が 2+:2-に分離した。その増殖を図 3-4 に示す。

詳細に調べると *Sxm*⁺突然変異体と同様の早い増殖を示す株は得られず, *Sxm*⁺変異

体より遅い増殖を示すグループとそれよりさらに遅い増殖を示すグループの2グループが新たに出現した (図 3-4(a)と 3-4(b))。このことは、1 個の変異が YPX18 培地で増殖に必要であり、他の変異は YPX18 培地での細胞増殖を導かないが、促進させると考えられた。また、 Sxm^+ の表現型になるためには、少なくとも3つの変異が必要であるように推定できた。YPX18 培地での増殖を導く突然変異遺伝子に対し、仮に *sxm2* と名付けた。この作業仮説を確かめるために Sxm^+ 突然変異体と SCB43-1 および

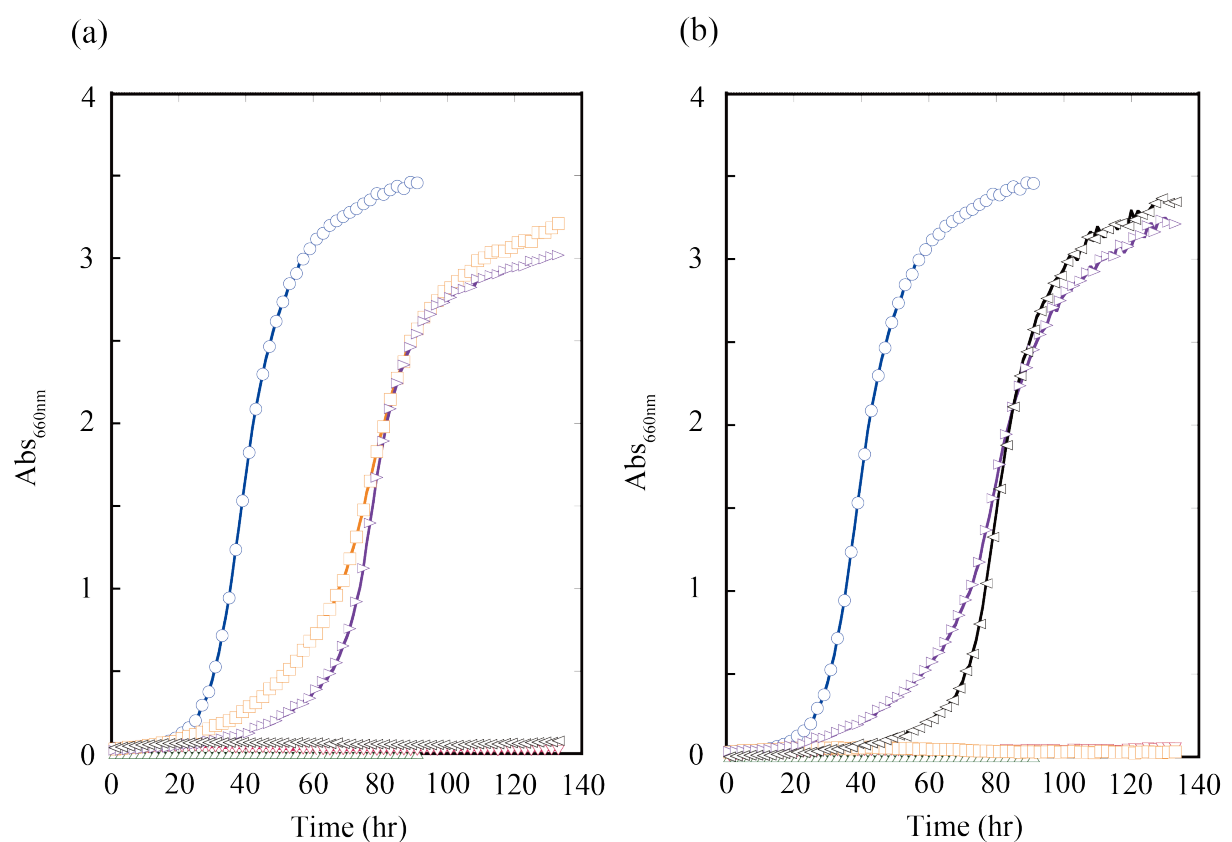


図 3-4 Sxm^+ 株 2 番と親株の掛け合わせの 4 孢子解析。

SCB40 株 ($MATa Sxm^+ Hex1_{2.2}$), 親株 SCB105-7A 株 ($MATa Sxm^- HEX1_{2.2}$), およびそれらの掛け合わせから得られた SCB43 二倍体の 4 孢子クローン SCB43-1A, -1B, -1C, -1D および SCB43-2A, -2B, -2C, -2D を用いた。10 個の被試験菌を 5 mL のウラシルを加えた YPX18 培地 pH 4.0 に初発細胞濃度 $Abs_{660nm}=0.014$ となるように植菌し、増殖をバイオフィトレコーダーでモニターした。(a) SCB43-1 の解析。記号: ○, Sxm^+ 突然変異体; △, $HEX1_{2.2}$ 株; ▽, SCB42-1A; □, SCB43-1B; ▷, SCB43-1C; ◁, SCB43-1D。(b) SCB43 の 2 の解析。記号: ○, Sxm^+ 突然変異体; △, $HEX1_{2.2}$ 株; ▽, SCB43-2A; □, SCB43-2B; ▷, SCB43-2C; ◁, SCB43-2D。

SCB43-2 の掛け合わせ可能な α 株を掛け合わせて二倍体を作製した。しかしながら、胞子形成は極めて悪く、4 胞子揃って生存した子嚢は得られなかった。すなわち、現時点でこれ以上遺伝的解析を進めることはできなかった。

3-3-4. Sxm^+ 変異体の回分発酵試験

(1) 低い初発細胞濃度からの回分発酵試験

Sxm^+ *HEXI₂₋₂* XM_8 遺伝背景の 2 株 SCB32 と SCB33, *HEXI₂₋₂* XM_8 の SCB14 株, XM_8 の SCB7 株を用いて回分発酵を行い、高濃度キシロースからのエタノール生産性を解析した (図 3)。キシロース 50 g/L を含む YPX 培地, pH 4.5, に、初期細胞濃度が $Abs_{660nm}=1.0$ となるように植菌し、32.5°C で振盪培養した (60 rpm)。SCB32 株は培養の初期から時間の増加とともに迅速に増殖した。その次には、SCB14 株の増加速度が早く、最終細胞濃度は Abs_{660nm} で 35 と最も高かった。その次は、SCB7 株で、SCB33 株の増殖は最も悪く、最終細胞濃度も 20 弱であった (図 3-5(a))。SCB32 株のキシロース消費は、培養初期では遅いが、12 時間から 18 時間の間では迅速であり、4 株の中で最も早かった。そのキシロースの最大消費速度は 1.6 g/L/hr であった (図 3-5(b))。SCB14 株では、細胞の増殖が活発な 24 時間から 48 時間にかけてのキシロース消費は早い、細胞当たりで最も早いのは、SCB32 または SCB33 であった (図 3-5(b))。SCB32 株のエタノール生産は、キシロースの消費に伴って増加し、4 株の中で SCB32 株が最も早かった (図 3-5(c))。しかしながら、細胞当たりの収率では、SCB33 も高いと考えられた。

(2) 高い初発細胞濃度からのグルコース・キシロース共存発酵試験

高い初発細胞濃度からのグルコース・キシロース共存発酵試験を Sxm^+ *HEXI₂₋₂* XM_1 の 2 株, SCB39 と SCB40, *HEXI₂₋₂* XM_1 の SCB38 株, XM_1 の SCC2-11B 株を用いて行った。実証プラントに用いる可能性がある株のため、*ura3::kanMX* 領域を *URA3* に

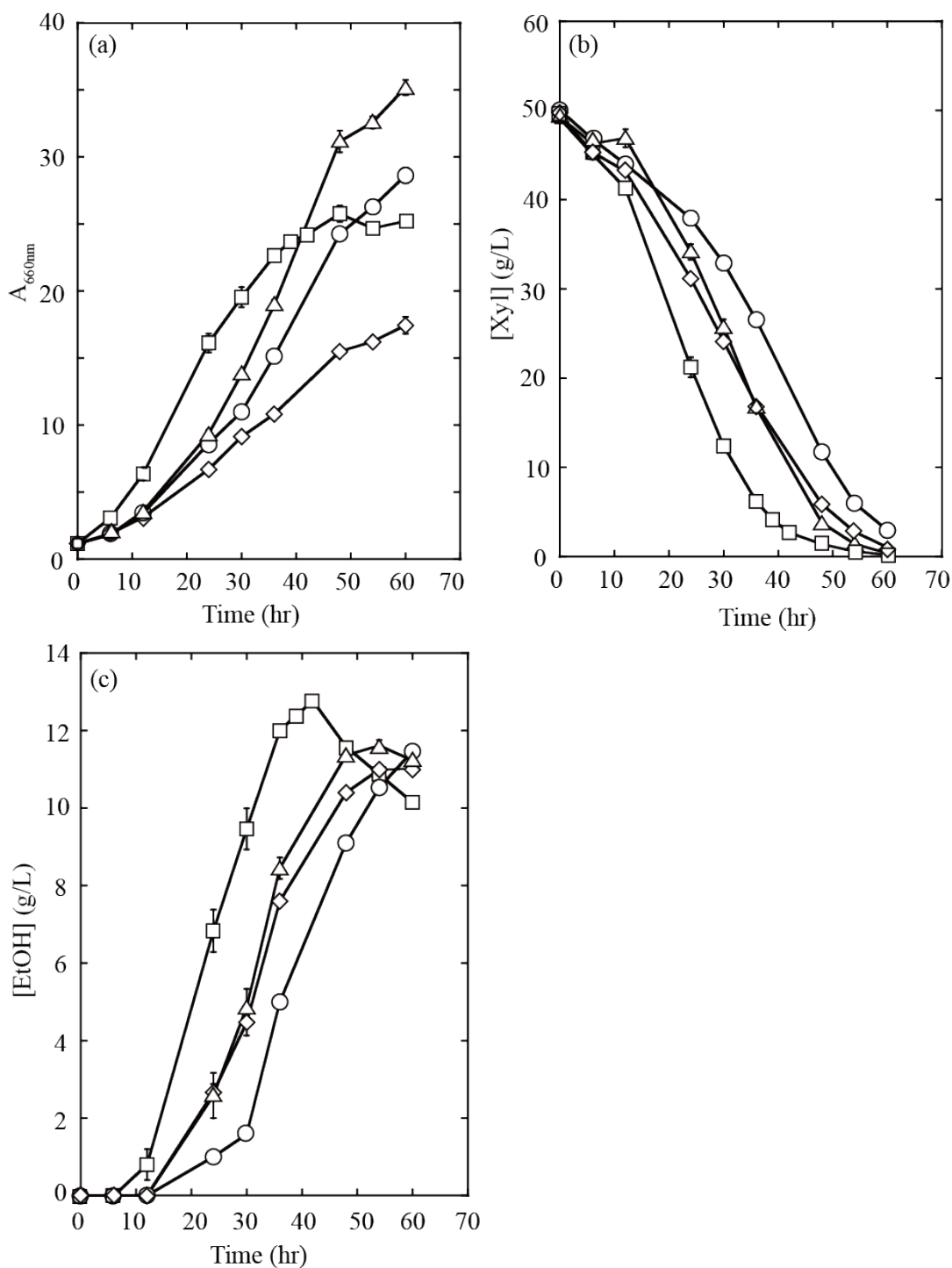


図 3-5 低初発細胞濃度からの回分発酵試験

Sxm^+ *HEX1*₂₋₂ XM 突然変異体 2 株 (SCB32 と SCB33), *HEX1*₂₋₂ XM 株 (SCB14), XM 株 (SCB7) の 4 株で発酵試験を行った。(a) 増殖, (b) キシロース濃度, (c) エタノール濃度。記号: □, SCB32 株; ◇, SCB33 株; △, SCB14 株; ○, SCB7 株。

組換えたウラシル非要求性を用いた。グルコース 60 g/L, キシロース 40 g/L を含む MYPD6X4 培地, pH 4.5 に初期細胞濃度 $Ab_{660nm}=20$ となるように植菌し, 32.5°C で

振盪培養した (60 rpm)。SCB40 株以外の全ての株は良く似た増殖を示し、培養 24 時間で細胞濃度は $Abs_{660nm} = 40$ 強に達した (図 3-6(a))。

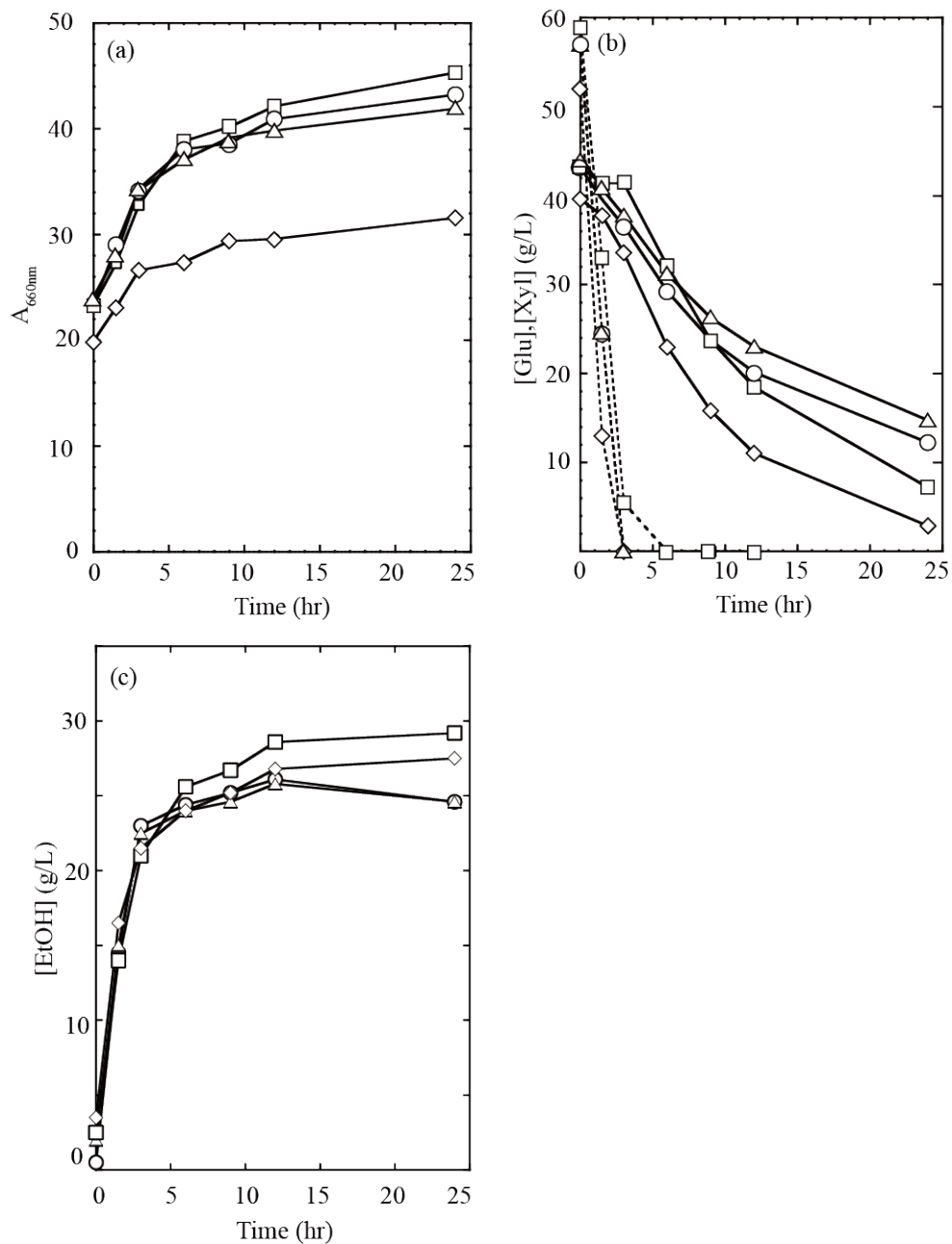


図 3-6 高初発細胞濃度からの回分発酵試験

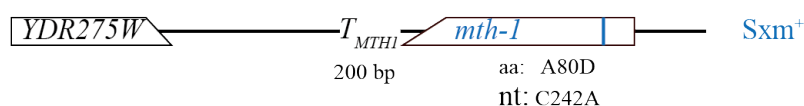
Sxm⁺ *HEX1*₂₋₂ XM 突然変異体 2 株 (SCB39 と SCB40), *HEX1*₂₋₂ XM 株 (SCB38), XM 株 SCC2-11B) の 4 株で発酵試験を行った。(a) 増殖, (b) グルコースとキシロース濃度, (c) エタノール濃度。記号: □, SCB39 株; ◇, SCB40 株; △, SCB38 株; ○, SCB2-11B 株。図 3-6(b) でのグルコース濃度は破線で示し、キシロース濃度は実線で示した。

一方, SCB40 株だけは増殖が悪く, 24 時間の細胞濃度は, $\text{Abs}_{660\text{nm}} = 30$ 程度であった。60 g/L 濃度のグルコースを全ての株は 3 時間以内に消費した。2 個の変異体 SCB39 と SCB40 は他の 2 個の株より迅速にキシロースを消費した。この時の最大キシロース消費速度は SCB39 株で 2.6 g/L/hr, SCB40 株で 2.9 g/L/hr であった (図 3-6(b))。特に, SCB40 株のキシロース消費は高く, 細胞の増加は少ないにも関わらず, 残留キシロース濃度は 24 時間以内に 2.4 g/L まで減少した。2 個の変異体 SCB39 と SCB40 は, 発酵開始 24 時間でエタノールをそれぞれ 29.2 g/L と 27.5 g/L 生産し, エタノールの理論収率は, 初発の糖濃度が両者で異なるものの, それぞれ 60% と 65% だった。

3-3-5. *SXM1* と *SXM2* 遺伝子の特定

SXM1 と *SXM2* 遺伝子は, 次世代シーケンサー解析からそれぞれ *MTH1* 構造遺伝子内変異と *GRR1* 構造遺伝子内変異と考えられた。そこで, 最初に, *SXM1* は *MTH1* であるのかどうかを図 3-7 で示した実験デザインで解析した。すなわち, Sxm^+ 株の *MTH1*

(a) Sxm^+ 株の変異型 *mth-1* 近傍の遺伝子構造



(b) 変異型 *mth1* 近傍への *kanMX* 挿入は, Sxm^+ に影響しないかどうかの確認



(c) 変異型 *mth1* と野生型 *MTH1* を組み換えると Sxm^+ となるかどうかの検定

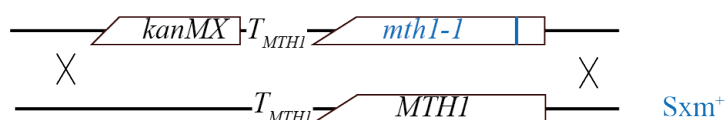


図 3-7 *SXM1* 変異の特定方法

酵母ゲノムデータベース (<http://www.yeastgenome.org/>) 公開株である S288C 株と NAM34-4C 株のドラフトゲノム解析から *MTH1* 近傍遺伝子構造を解析した。また, どの部位に *kanMX* 遺伝子を挿入するのが, *MTH1* や近傍遺伝子の発現に影響しにくいのかを推定した。

遺伝子の下流領域に *kanMX* DNA を挿入しても Sxm^+ の表現型に影響しないことを確認し、その後、*MTH1* 変異箇所と *kanMX* 遺伝子からなる DNA を PCR 増幅し、 Sxm^- 株の染色体と置き換えることで Sxm^+ になるかどうかを解析する方法である。もしも *SXMI* 遺伝子が *MTH1* であれば、G418 耐性形質転換体の中に Sxm^+ を示す転換体がいるはずである。また、その株の *MTH1* は次世代シーケンサー解析で解読された変異型の塩基配列を持つはずである。 Sxm^+ 株である SCB32 株の *MTH1* 遺伝子の下流領域に *kanMX* を組換えた株を構築した (図 3-7(b))。その株の増殖を YPX18 培地 pH 4.0 温度 35°C で調べたところ、親株の SCB32 株と同様に増殖を認めた (図 3-8(a))。

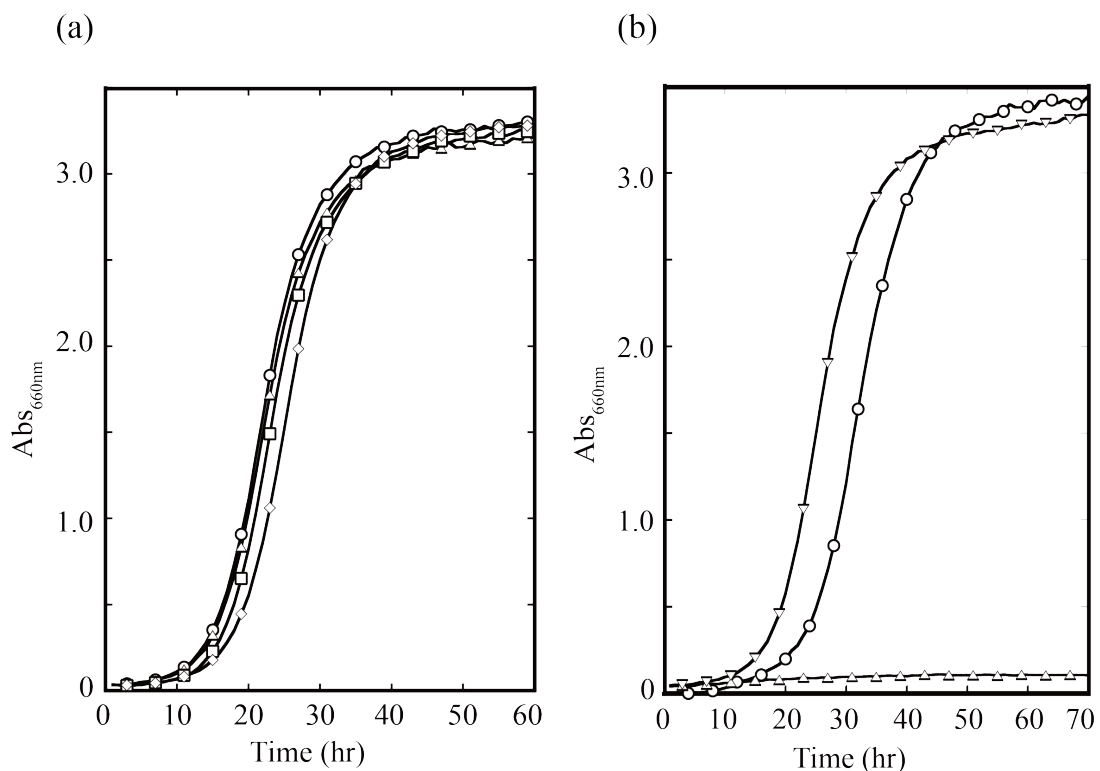


図 3-8 変異型 *SXMI* 遺伝子の特定実験

(a) Sxm^+ 株 SCB39 およびその *kanMX* 転換体の増殖試験。記号: (a) △, SCB39 株; ○, □, ◇, *kanMX* 変異型 *MTH1* 株。(b) *HEX1₂₋₂* 株の *kanMX* 変異型 *MTH1* DNA による転換体の増殖試験。記号: △, SCB38 株; ▽, SCB39 株; ○, *kanMX* 変異型 *MTH1* *HEX1₂₋₂* 形質転換体。

従って、*kanMX* 遺伝子を変異型 *MTH1* 下流領域に挿入しても Sxm^+ の表現型に影響しないことを確認した。次に、染色体 DNA の *MTH1* 変異箇所と *kanMX* 遺伝子を含む領

域を PCR 増幅し、その増幅 DNA による Sxm^- $HEX1_{2-2}$ 株である SCB38 株の G418 耐性形質転換体を得た (図 3-7(c))。この転換体の YPX18 培地 pH 4.0, 温度 35°C での増殖を調べたところ、 Sxm^+ 変異株と同様に増殖を示した (図 3-8(b))。従って、変異型 $SXMI$ 遺伝子は、 $MTH1$ 遺伝子内の変異であることが分かった。また、変異型 $MTH1$ の塩基配列を決定したところ、構造遺伝子内の置換変異を確認した。

次に、 $sxm2$ 変異型遺伝子が $GRR1$ 遺伝子であるのかどうかを図 3-9 で示した実験デザインで解析した。すなわち、 $ade1 \Delta 1$ $HEX1_{2-2}$ 株に $ADE1^+$ DNA と変異型 $grr1$ DNA を加え、 Ade^+ 形質転換体を得た。この形質転換体を 100 個選び、180 g/L のキシロースを含む SX18 最少固形培地 pH 5.5 に白金線でストリークし、30°C で 2-4 日静置培養

Sxm^+ 株の変異型 $grr1$ 近傍の遺伝子構造

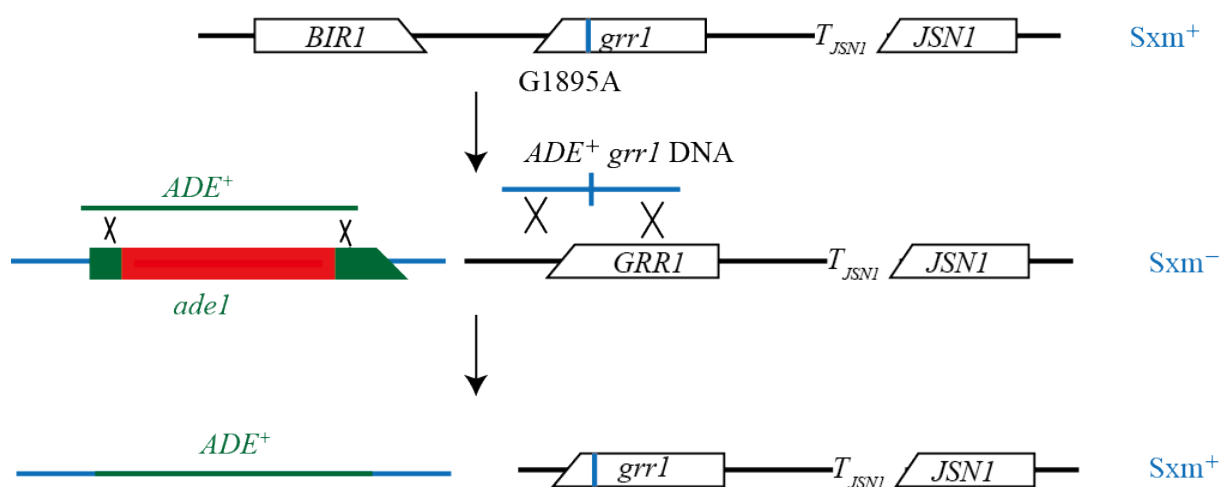


図 3-9 二重形質転換による $sxm2$ 変異遺伝子の特定方法

$ade1 \Delta$ $HEX1_{2-2}$ XM 株を受容菌に、 ADE^+ DNA と $grr1$ 変異遺伝子の変異部位の下流と上流 1 kb からなる DNA による Ade^+ 形質転換体を得る。 Ade^+ 形質転換体の中に変異部位を含む転換体があるのでそれをキシロース培地で検定する方法である。最終の遺伝子構造が、 $grr1$ $HEX1_{2-2}$ XM 遺伝子構造となるので、 $HEX1_{2-2}$ XM 株と明確に区別できる利点がある。

した。生じたコロニーを2個選び、YPX18 培地 pH 5.5 で増殖確認したところ、増殖を認めた (図 3-10)。さらに *grr1* 遺伝子の塩基配決定したところ、構造遺伝子内に変異型の置換変異を認めた。このことから *sxm2* 遺伝子変異は、*GRR1* 遺伝子内にあると結論した。

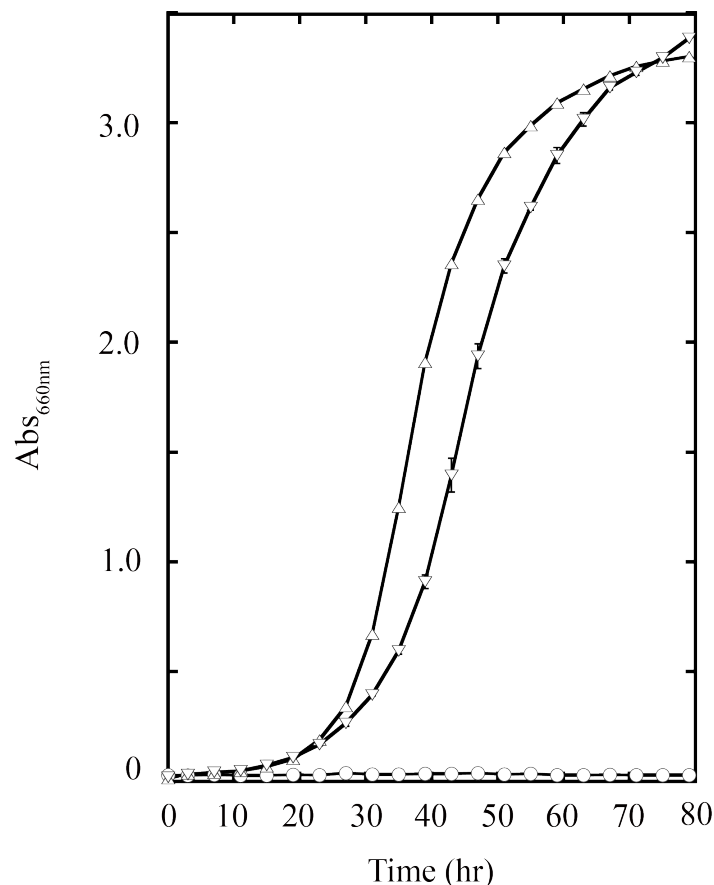


図 3-10 *SXM2* の特定実験

記号：○，SCB38 株 (*HEX1₂₋₂* XM₁)；△，SCB40 株 (*Sxm⁺ HEX1₂₋₂* XM₁)；▽，*Ade⁺ grr1* 二重形質転換体 SCC25 株 (*grr1 HEX1₂₋₂* XM₁)

3-3-6. *SXM1₃₂* と *sxm2₃₃* の特徴づけ

SXM1 の変異型が野生型対立アレルに対して優性かどうかを解析した。*SXM1* の変異を持つプラスミド pMTH1 を最初に構築し、プラスミドを *HEX1₂₋₂* 株に移した。その構築した SCB38 (pMTH1) 株が YPX18 培地 pH 4.0 温度 35°C で増殖するかどうかを調べたところ、*Sxm⁺* 株 SCB39 と同様に増殖を示したので、変異は優性である

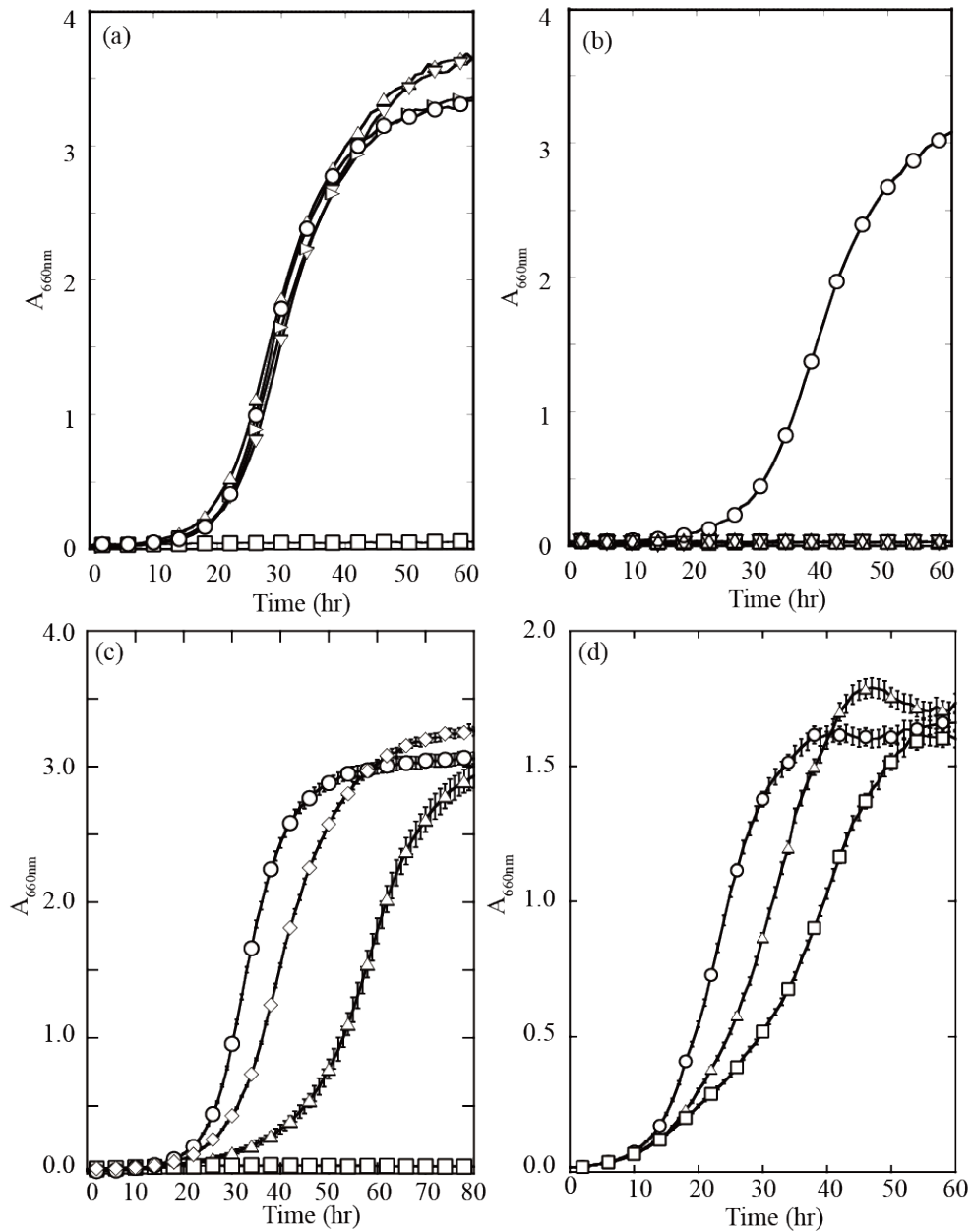


図 3-11 $SXM1_{32}$ と $sxm2_{33}$ の特徴付け。

16 株の菌株を YPX18 培地 pH 4.0, (a)–(c) もしくは MSX 培地 pH 5.5, (d), に植菌して 35°C で振盪培養し, 増殖をバイオフィトレコーダーでモニターした。3 回の独立した実験から得たデータから平均値と標準偏差を求めた。(a) $SXM1_{32}$ と (b) $sxm2_{33}$ の優性試験, 記号: (a) ○, Sxm^+ 変異体 (SCB39); □, 野生型 Sxm^- 株 (SCB38); △, ▽, ▷, SCB38 (pMTH1) 株; (b) ○, Sxm^+ 変異体 (SCB40); □, 野生型 Sxm^- 株 (SCB41-2B); △, ▽, $SXM2/sxm2_{33}$ 二倍体 (SCC107)。(c) $MTH1_{32}$ 単独変異体の増殖試験。記号, ○, Sxm^+ 変異体 (SCB39); □, 野生型 Sxm^- 株 (SCC2-11B); △, $MTH1_{32}$ 単独変異体 (SCC108); ◇, $MTH1_{32} HEX1_{2-2}$ 二重変異体 (SCB42-3C)。(d) $MTH1_{32}$ 単独変異体は Hex^+ を示す。記号: ○, Hex^+ 変異体 (SCB38); □, 野生型 Hex^- 株 (SCC2-11B); △, $MTH1_{32}$ 単独変異体 (SCC108)。

ことが分かった (図 3-11(a))。そこで、この *SXMI* 変異を *SXMI*₃₂ とした。

SXM2 の変異型が優性であるかどうかを解析した。*Sxm*⁺株 SCC25 株と *Sxm*⁻野生型株 SCB41-2B とを掛け合わせて二倍体 SCC107 を構築した。YPX18 培地 pH 4.0 温度 35°Cでの増殖を調べたところ、*Sxm*⁻株と同様に増殖しなかったので、変異は劣性であることが分かった (図 3-11(b))。そこで、この変異を *sxm2*₃₃ とした。

*SXMI*₃₂ 単独変異株の増殖を YPX18 培地 pH 4.0 温度 35°Cで解析した。その増殖は、*SXMI*₃₂ *HEXI*₂₋₂ 二重変異株と比較して顕著に遅かった (図 3-11(c))。すなわち、*SXMI*₃₂ と *HEXI*₂₋₂ の相乗効果が見られた。

高濃度キシロース培地で増殖を導く *SXMI*₃₂ と *sxm2*₃₃ 変異は、高効率キシロース資化性である *Hex*⁺を示すのかどうかを解析した。両株の増殖を MSX 培地 pH 4.0 温度 35°Cで調べた。その結果、*SXMI*₃₂ 株 SCC108 は、野生型の *Hex*⁻株 SCC2-11B と比較して明らかに早い増殖を示した (図 3-11(d))。しかしながら、*sxm2*₃₃ 株は SCC2-11B よりも増殖が遅かった (データには示さない)。

第 4 節 考察

グルコースとキシロースを含む培地での発酵試験で、*Sxm*⁻株のグルコースの消費は 20 g/L/hr と早く、キシロース消費は 1.8 g/L/hr と遅い (図 3-6)。一方、*Sxm*⁺変異株のキシロース消費速度は、2.5-2.8 g/L/hr と *Sxm*⁻株のそれよりも早い。*Sxm*⁺表現型を導く主たる遺伝子変異は *SXMI*-32 と *sxm2*-33 であり、その内、*SXMI* は *MTH1* 遺伝子内の優性変異である。*MTH1* は、酵母 IV 番染色体の 1,015,702 から 1,014,401 に在位し、グルコースセンシング伝達経路の負の制御因子である (66-67)。*Mth1* は *Rgt1* と相互作用し、*Rgt1* リプレッサーのコリプレッサーとして機能する (67-68)。*S. cerevisiae* において、グルコースはいくつかのヘキソース輸送系遺伝子 *HXT* の発現を誘導し輸送を促進させる (69-71)。グルコース制限下では、リプレッサー *Rgt1* は *HXT* プロモ

ーターに結合する。すなわち、Rgt1 は普遍的なコリプレッサーである Ssn6 や Tup1 (72-75) をリクルートし、Mth1, Ssn6, Tup1 と制御複合体を形成して *HXT* プロモーターに結合する (74)。グルコースが多いと Mth1 の分解が起こり、その結果、制御複合体の形成が妨げられ、Rgt1 は *HXT* プロモーターから離れ、*HXT* の発現が誘導される (67, 68, 76, 77)。グルコースシグナルは Mth1 の修飾を導く。すなわち、Mth1 はリン酸化とそれに続く Skp1-Cullin-F ボックス複合体である SCF^{Grr1} によるユビキチン化を受ける (67, 68, 77)。そのユビキチン化された Mth1 は、最終的に 26S プロテオソームで分解される (66, 78)。これまでに *MTH1* の優性変異体として HTR1-23 や BPC1-1 株が分離されている (79-81)。その変異は、Mth1 I85 が Mth1 85N に変わった変異であり、*HXT* の転写が損なわれ、細胞内のグルコースが減少し、グルコース抑制が顕著に減少する。優性変異 *SXMI-32* は、Mth1 A81 が Mth1 81D に変わった置換変異であり、その部位は Mth1 85 に隣接している。それゆえ、生じた変異は、Mth1 I85N と類似の効果をもたらす変異と考えられる。言い換えると優性変異型 Mth1 は 26S プロテオソームの分解を受けずに活性型の Mth1 を維持し、*HXT* 輸送系の発現を押さえ、グルコース抑制が軽減され则认为られる。

残りの *sxm233* 変異は、*GRR1* 遺伝子内の劣性変異であった。*GRR1* は酵母 X 番染色体の 594,327 から 590,872 に在位し、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いる (77)。SCF^{Grr1} は Gic2, Mks1, Mth1, Cln1, Cln2 と Cln3 のような基質をユビキチン化し、カーボンカタボライト抑制、グルコース依存カチオン輸送、グルコース輸送、形態形成、亜硫酸解毒作用に掛かり合っている (68, 82-87)。ユビキチン依存の分解は、基質であるタンパク質のリジン残基にユビキチンが共有結合することが引き金となる。すなわち、修飾された基質タンパク質は、26S プロテオソームで分解される (66-67)。SCF はユビキチン活性化酵素 (E1)、ユビキチン結合酵素群 (E2)、ユビキチンリガーゼ複合体 (E3) から成っている (88)。F ボックスタンパク質は、アダプターサブユニットとして機能し、Cdc53, Cdc34, Hrt1/Rbx1 と Skp1 からなるコアの SCF リガーゼ複合体に基質タンパク質をリクルートする機能を持つ

(89, 90)。多くの SCF の基質は、ユビキチン化が起こる前にリン酸化を必要とし、多くの部位での基質タンパク質のリン酸化が、F ボックスタンパク質の結合に必要な場合もある (91)。従って、タンパク質の分解前に、ある濃度以上のキナーゼ活性が必要となる (92)。F ボックスタンパク質である Grr1 は、核内にも細胞質にも存在し、有糸分裂後期には出芽のくびれに蓄積し、サイトキネシスリング上の Hof1 を分解するのに必要であり、それによってアクトミオシンリングの効率的な収縮や細胞分離が生じることになる (93–95)。このように、Grr1 のユビキチン化は、多くの代謝に影響を及ぼすが、Grr1 欠損が Sxm^+ 表現型を導くのは、活性型の Mth1 が 26S プロテオソームによる分解を受けずに活性を維持することにあると考えられる。優性変異活性型 Mth1 の維持によるグルコース輸送の低下とそれから生じるカタボライト抑制の解除は、*SXMI*₃₂ 変異によって引き出されることと一致すると考えられる。すなわち、*SXMI*₃₂ と *sxm233* は、酵母細胞に類似の変化をもたらすと考えられる。

*HEX*_{2,3} は第 2 章で論じたように優性の変異であり、*GRR1* と *JSN1* の間にある変異である。Jsn1 は RNA 結合タンパク質の内の Puf ファミリーに属する (96)。Jsn1 は膜に結合したタンパク質をコードしている mRNA と相互作用し、Arp2/3 複合体がミトコンドリアに局在化することに掛かり合っている。その高発現はベノミルに高感受性となる (97–98)。*HEX*_{2,3} の変異部位は、*GRR1* の上流 -333 の T から A への置換変異であり、*JSN1* の下流 +400 に位置する。すなわち、*GRR1* 上流の変異と考える方が、矛盾が少なく *GRR1* のプロモーター変異と考えられる。この変異により Hex^+ となるが、 Sxm^+ とは成らない。一方、*sxm233* は *GRR1* 構造遺伝子内に起きた劣性の変異であり、 Hex^+ ではなく Sxm^+ となる。優性変異により Grr1 の発現レベルは高くなっているように考えられるが、キシロース資化性への掛かり合いは不明である。

野生型株と *HEX*_{1,2} 変異体の最大キシロース消費速度は類似しているが、野生型株の方がその速度に達するまでに時間がかかる (図 3-5)。一方、 Sxm^+ *HEX*_{1,2} 二重変異体のキシロース消費速度は他の 2 株よりも早く、その速度に達するまでに要する時間も早い。グルコース・キシロース共存培地でも二重変異体のキシロース消費速度は最

も早い (図 3-6)。すなわち、野生型株または *HEXI*₂₋₂ 変異体の遺伝背景に *SXM*₃₂ または *sxm2*₃₃ が加わると、キシロース消費速度が早くなる。*SXMI*₃₂ 変異による Mth1 A81D あるいは *sxm2*₃₃ 劣性変異による不活性型 Grr1 C632Y のために活性型の Mth1 が維持されると、細胞内へのグルコースの取り込みが悪くなり、カタボライト抑制の軽減に繋がると考えられる。このことにより Mth1 制御下にある遺伝子群の発現が起こり、キシロース消費速度が向上すると推測される。高濃度のキシロースは、*SXMI*₃₂ や *sxm2*₃₃ 株ではなく、*HEXI*₂₋₂ や野生型株の増殖を阻害したので、活性型 Mth1 があるとキシロースによる阻害も軽減されるのであろう (図 3-1, 3-2, 3-11)。このように、グルコース信号を通したカーボンカタボライト抑制の解除機構を解明することは、キシロース代謝を向上させる上で重要であると考えられる。

キシロース消費速度は、優性変異型ピルビン酸キナーゼである Pyk1 A344P や Pyk1 P272T, Pho13 欠損、トランスアルドラーゼの高発現、*GRR1* の上流の置換変異、優性変異型 Mth1 A81D によって起きる。ピルビン酸キナーゼの掛かり合いは第 2 章の考察で論じた。トランスアルドラーゼの掛かり合いに関しては、次のように考えられている。リブロース-5-リン酸とキシロース-5-リン酸が、トランスケトラーゼによってセドヘプツロース-7-リン酸とグリセルアルデヒド-3-リン酸に代謝されるが、次のトランスアルドラーゼの反応が律速になると、グリセルアルデヒド-3-リン酸が解糖系に流れる。するとセドヘプツロース-7-リン酸が蓄積し、この段階が代謝の律速段階と成る (58, 99)。このように、ピルビン酸キナーゼとトランスアルドラーゼ/トランスケトラーゼの反応は、キシロース資化性にとって重要である。

PHO13 遺伝子を破壊するとトランスアルドラーゼ反応が盛んになるとともに (58, 100), トキシン耐性の減少, 競合的適応の減少, 栄養源の利用の増加など多面的な影響が出る。また, Pho13 はキシロース-5-リン酸の脱リン酸化を行う (101)。この内、いずれがキシロース資化性に掛かり合っているかは現在のところ不明である。

第5節 要約

高効率にキシロースを資化する Hex^+ 変異体 SCB14 から高濃度のキシロースを効率的に資化できる突然変異体を分離した。最初に、キシロースによる増殖阻害を解析したところ、180 g/L 以上のキシロース濃度で顕著な阻害を認めた。YPX18 培地で馴養培養することで、高濃度キシロース培地で増殖する自然突然変異体を 2 個分離した。変異体 SCB32 株と SCB33 株の遺伝解析を行った。2 個の Sxm^+ 変異体と野生型 Sxm^- 株とを掛け合わせ、4 孢子解析したところ、調べた子囊は全て $\text{Sxm}^+ : \text{Sxm}^-$ が 2+ : 2- に分離した。従って、原因遺伝子は両株とも 1 遺伝子であった。しかしながら、SCB32 株では、 Sxm^+ 変異体より遅い増殖を示す孢子クローンがあり、遺伝学的に 1 遺伝子が増えると増殖促進することが分かった。SCB33 株では、 Sxm^+ 変異体と同程度の増殖を示すクローンが得られず、遅い増殖を示すもの、さらに遅い増殖を示すものが見られ、少なくとも 3 個の遺伝子が、高濃度キシロース培地での増殖に関わっていることが示唆された。2 個の Sxm^+ 変異体と Hex^+ 株と XM 株で YPX5 培地中での発酵試験を行った。SCB32 株は親株と比べて、迅速に増殖したが、SCB33 株の増殖は遅かった。SCB32 株は 12 時間から 18 時間の間で迅速なキシロース消費を示し、最大消費速度は 1.6 g/L/hr であり、迅速なエタノール発酵を示した。また、SCB33 株も発酵能は高かった。高い細胞濃度でグルコースとキシロース混合糖からのエタノール生産性を解析した。SCB40 株だけが増殖が悪かった。全ての株で 3 時間以内に 60 g/L のグルコースを消費した。2 個の Sxm^+ 変異体は迅速にキシロースを消費し、最大キシロース消費速度は、SCB39 株で 2.6 g/L/hr、SCB40 株で 2.9 g/L/hr であった。SCB40 株のキシロース消費は高く、残留キシロース濃度は 24 時間以内に 2.4 g/L まで減少した。また、SCB39 と SCB40 株は、発酵開始 24 時間でエタノールをそれぞれ 29.2 g/L と 27.5 g/L 生産し、エタノールの理論収率はそれぞれ 60% と 65% であった。

Sxm^+ 突然変異を解読したところ、*MTH1* と *GRR1* に変異があり、カタボライト抑制解除を通してキシロース消費速度の向上が見られることが推測できた。

総括

平成 18 年の新・国家エネルギー戦略で「日本のガソリン消費量は 2030 年には 6000 万 kL になると予想され、ガソリン消費を少なくし、二酸化炭素量を減らすためにも、ガソリン消費量の 10% をエタノール生産し、E10 ガソリンとする」という指針が提出された。そこで、*Saccharomyces cerevisiae* 菌を使用したエタノール生産が開始されている。トウモロコシなどのデンプン質系の原料を使用しているために、食糧の不足と高騰が起こっている。食糧と競合しないセルロース系バイオマスとして、世界的な未利用なバイオマスで、成長が早く再生可能である竹が着目されている。九州地区には 713.4 万トンの竹があり、3 年ごとに伐採していくとしても 80 万 kL のエタノールの生産が見込まれ、この量は E10 ガソリンに必要な量の 1/8 量に相当する。濃硫酸等で竹を糖化すると、グルコースとキシロースが濃度比で約 2 : 1 の溶液ができる。そこで、グルコースとキシロースを同時に発酵できる酵母が望まれているが、野生型の *S. cerevisiae* はキシロースを代謝できない。細胞内のキシロースは、キシロースリダクターゼによってキシリトールへ、続いてキシリトール脱水素酵素によってキシルロースへ代謝される。この両酵素を *S. cerevisiae* は持たないが、遺伝子操作で *Pichia stipitis* の遺伝子を組換えて発現させた酵母菌が構築されている。キシルロースはキシルロキナーゼによってキシルロース-5-リン酸に代謝され、ペントースリン酸回路の酵素とエンブデン・マイヤーホフ・パルナス回路の酵素によってエタノールへと変換される。十分なエタノール生産収率が、代謝経路から期待できるが、これまでに構築された酵母菌のエタノール収率は低い。実験室酵母が用いられているのが要因と考えられる。

そこで、第 1 章では、実用酵母 *S. cerevisiae* KF7 株を、掛け合わせ能と形質転換能に優れた酵母に改変することを目的とした。KF7 株は耐熱性ホモタリズム二倍体であるので、遺伝的手法を用いてヘテロタリズム一倍体で接合型の異なる KF7-5C と

KF7-4B 株を構築した。種内掛け合わせと反復戻し交配および株内反復掛け合わせで、遺伝と育種が容易な子孫を作製した。また、形質転換能にも優れた NAM34-4C 株を創製した。この株は親株の耐熱性・耐酸性を持っており、親株の KF7 株よりも優れたエタノール発酵能を示すことを見出した。

第 2 章では、遺伝解析が容易な同質系統株を第 1 章で得た NAM34-4C 株から構築すること、キシロース資化性を付与して解析すること、キシロース資化性に優れた自然変異体を分離してその遺伝子変異の特定と特徴づけを行うこと、代謝機構を解析することを目的とした。同質系統株 SCA2 と SCA3 株を構築した。接合型を決める領域以外はすべて同じ塩基配列であることおよびドラフトゲノム配列も決めた。遺伝子操作でキシロース資化性を持つように *XYL1*, *XYL2*, *XKS1* 遺伝子を付与した。この組換え酵母のキシロース資化性は、これまでの報告例よりも高かった。さらにキシロース資化性が向上した Hex⁺自然突然変異体を 4 株分離した。それぞれ 1 個の遺伝子変異によって Hex⁺の性質が生じていること、変異遺伝子は 3 個であり、優性変異 *HEX1*₂₋₂, *HEX1*₂₋₉, *HEX2*₂₋₃ と劣性変異 *hex3*₁₋₅ に分類できた。*HEX1* は *CDC19* であり、*HEX2* は *GRR1* のプロモーター領域の変異であり、*hex3* は *PHO13* と特定できた。これらの変異により、キシロース消費が高く、エタノール収率も向上した。

第 3 章では、実プラントに用いるキシロース濃度でも十分に増殖・発酵できるような自然突然変異体を分離し、解析すること、併せて現時点での発酵試験評価を行うことを目的とした。高濃度のキシロースでも十分に資化できる Sxm⁺突然変異体を 2 個分離した。それぞれ 1 個ずつの変異により資化できるようになり、その他の変異が合わさると増殖の促進が見られると考えられた。この Sxm⁺変異体のグルコース・キシロース消費は、これまでの酵母よりも高く、エタノール発酵は 24 時間で終了することが期待できた。この Sxm⁺変異を特定したところ、*MTH1* と *GRR1* であった。いずれもカタボライト抑制解除と関連することが強く示唆され、さらに改良するための作業仮説を建てることができた。

引用文献

1. 経済産業省・資源エネルギー庁: 新・国家エネルギー戦略要約版,
<http://www.enecho.meti.go.jp/topics/energy-strategy/>, p.1–pp.35 (2006).
2. Chu, B. C. H. and Lee, H.: Genetic improvement of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose fermentation, *Biotechnol. Advances*, **25**, 425–441 (2007).
3. 富高正貴, 燃料用エタノール生産実用酵母の遺伝育種 平成21年度 崇城大学修士論文 (2010).
4. 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, 九州産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
5. 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).
6. Herskowitz, I.: Cellular differentiation, cell lineages, and transposable genetic cassettes in yeast, *Curr. Top. Dev. Biol.*, **18**, 1–14 (1983).
7. Hicks, J. B. and Herskowitz, I.: Interconversion of yeast mating types I. direct observations of the action of the homothallism (*HO*) Gene, *Genetics*, **83**, 245–258 (1976).
8. Hicks, J. B. and Herskowitz, I.: Interconversion of yeast mating types II. restoration of mating ability to sterile mutants in homothallic and heterothallic strains, *Genetics*, **85**, 373–393 (1977).
9. *Saccharomyces* Genome Database, <http://www.yeastgenome.org/>

10. Takeno, M., and Taguchi, H., and Akamatsu, T.: Role of ComFA in controlling the DNA uptake rate during transformation of competent *Bacillus subtilis*, *J. Biosci. Bioeng.*, **111**, 618–623 (2011).
11. Maniatis, T., Fritsch, E. F., and Sambrook, J.: *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory (1982).
12. 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).
13. Sherman, F., Fink, G. R., and Hicks, J. B.: *Laboratory course manual for methods in yeast genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N. Y., (1989).
14. Johnston, J. R. and Mortimer, R. K.: Use of snail digestive juice in isolation of yeast spore tetrads, *J. Bacteriol.*, **78**, 292 (1959).
15. Winge, O. and Laustsen, O.: Artificial species hybridization in yeast, *C. R. Trav. Lab. Carlsberg Ser. Physiol.*, **22**, 235–247 (1938).
16. Birnboim, H. C. and Doly, J.: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA, *Nucleic. Acids. Res.*, **7**, 1513–1523 (1979).
17. Alting-Mees, M. A. and Short, J. M.: pBluescript II: gene mapping vectors, *Nucleic Acids Res.*, **17**, 9494 (1989).
18. Bakalinsky, A. T. and Snow, R.: Conversion of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae* to heterothallism, *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 849–857 (1990).
19. Winge, O., and C. Roberts, C.: A gene for diploidization in yeast, *C. R. Trav. Lab. Carlsberg Ser. Physiol.*, **24**, 341–346 (1949).
20. Harashima, S., Y. Nogi, and Oshima, Y.: The genetic system controlling homothallism in *Saccharomyces yeasts*, *Genetics*, **77**, 639–650 (1974).

21. Hicks, J. B., Strathern, J. N., and Herskowitz, I.: Interconversion of mating types in yeast. III. Action of the homothallism (*HO*) gene in cells homozygous for the mating type locus, *Genetics*, **85**, 395–405 (1977).
22. Kostriken, R. and Heifron, F.: The product of the *HO* gene is a nuclease: purification and characterization of the enzyme, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **44**, 89–96 (1984).
23. Casal, M., Paiva, S., Andrade, R. P., Gancedo, C., and Leao, C.: The lactate proton symport of *Saccharomyces cerevisiae* is encoded by *JEN1*. *J. Bacteriol.*, **181**, 2620–2623 (1999).
24. Makuc, J., Paiva, S., Schauen, M., Kramer, R., Andre, B., Casal, M., Leao, C., and Boles, E.: The putative monocarboxylate permeases of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* do not transport monocarboxylic acids across the plasma membrane, *Yeast*, **18**, 1131–1143 (2001).
25. Andrade, R. P. and Casal, M.: Expression of the lactate permease gene *JEN1* from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Fungal Genet. Biol.*, **32**, 105–111 (2001).
26. Lodi, T. and Ferrero, I.: Isolation of the *DLD* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encoding the mitochondrial enzyme D-lactate ferricytochrome c oxidoreductase, *Mol. Gen. Genet.*, **238**, 315–324 (1993).
27. Guiard, B.: Structure, expression and regulation of a nuclear gene encoding a mitochondrial protein: the yeast L(+)-lactate cytochrome c oxidoreductase (cytochrome b2), *EMBO J.*, **4**, 3265–3272 (1985).
28. Rojo, E. E, Guiard, B., Neupert, W., and Stuart, R. A.: Sorting of D-lactate dehydrogenase to the inner membrane of mitochondria, *J. Biol. Chem.*, **273**, 8040–8047 (1998).
29. Lodi, T. and Guiard, B.: Complex transcriptional regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* *CYB2* gene encoding cytochrome b2: *CY1(HAP1)* activator binds to the *CYB2*

- upstream activation site UAS1-B2, *Mol. Cell. Biol.*, **11**, 3762–3772 (1991).
30. Zhang, X.Y., Yu, H. B., Huang, H. Y., and Liu, Y. X.: Evaluation of biological pretreatment with white rot fungi for the enzymatic hydrolysis of bamboo culms, *Int. Biodeter. Biodegr.*, **60**, 159–164 (2007).
 31. Shimokawa, T., Ishida, M., Yoshida, S., and Nojiri, M.: Effects of growth stage on enzymatic saccharification and simultaneous saccharification and fermentation of bamboo shoots for bioethanol production, *Bioresour. Technol.*, **100**, 6651–6654 (2009).
 32. Yamashita, Y., Shono, M., Sasaki, C., and Nakamura, Y.: Alkaline peroxide pretreatment for efficient enzymatic saccharification of bamboo, *Carbohydr. Polym.*, **79**, 914–920 (2010).
 33. Sun, Y. and Lin, L.: Hydrolysis behavior of bamboo fiber in formic acid reaction system, *J. Agric. Food Chem.*, **58**, 2253–2259 (2010).
 34. Sun, Z. Y., Tang, Y. Q., Iwanaga, T., Sho, T., and Kida, K.: Production of fuel ethanol from bamboo by concentrated sulfuric acid hydrolysis followed by continuous ethanol fermentation, *Bioresour. Technol.*, **102**, 10929–10935 (2011).
 35. Batt, C. A., Carvallo, S., Easson, D. D., Akedo, M., and Sinskey, A. J.: Direct evidence for a xylose metabolic pathway in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotechnol. Bioeng.*, **28**, 549–553 (1986).
 36. van Zyl, C., Prior, B. A., Kilian, S. G., and Kock, J. L.: D-xylose utilization by *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Gen. Microbiol.*, **135**, 2791–2798 (1989).
 37. Kruckeberg, A. L.: The hexose transporter family of *Saccharomyces cerevisiae*, *Arch. Microbiol.*, **166**, 283–292 (1996).
 38. 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).

39. Boles, E. and Hollenberg, C. P.: The molecular genetics of hexose transport in yeasts, *FEMS Microbiol. Rev.*, **21**, 85–111 (1997).
40. 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).
41. 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).
42. Busturia, A. and Lagunas, R.: Catabolite inactivation of the glucose transport system in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Gen. Microbiol.*, **132**, 379–85 (1986).
43. Diderich, J. A., Schepper, M., van Hoek, P., Luttik, M. A., van Dijken, J. P., Pronk, J. T., Klaassen, P., Boelens, H. F. M., de Mattos, J. T., van Dam, K., and Kruckeberg, A. L.: Glucose uptake kinetics and transcription of *HXT* genes in chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.*, **274**, 15350–15359 (1999).
44. Webb, S. R. and Lee, H.: Regulation of D-xylose utilization by hexoses in pentose-fermenting yeasts, *Biotechnol. Adv.*, **8**, 685–697 (1990).
45. Hahn-Hägerdal, B., Linden, T., Senac, T., and Skoog, K.: Ethanolic fermentation of pentoses in lignocellulose hydrolysates, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **28–29**, 131–144 (1991).
46. Aristidou, A. and Penttilä, M.: Metabolic engineering applications to renewable resource utilization, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **11**, 187–98 (2000).
47. Eliasson, A., Christensson, C., Wahlbom, C. F., and Hahn-Hägerdal, B.: Anaerobic xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* carrying *XYL1*, *XYL2*, and *XKS1* in mineral medium chemostat cultures, *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 381–3386 (2000).

48. Kotter P. and Ciriacy, M.: Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*, Appl. Microbiol. Biotechnol., **38**, 776–83 (1993).
49. 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).
50. Walfridsson, M., Hallborn, J., Penttila, M., Keranen, S., and Hahn-Hägerdal, B.: Xylose-metabolizing *Saccharomyces cerevisiae* strains overexpressing the *TKL1* and *TAL1* genes encoding the pentose phosphate pathway enzymes transketolase and transaldolase, Appl. Environ. Microbiol., **61**, 4184–4190 (1995).
51. Boles, E., Lehnert, W., and Zimmermann, F. K.: The role of the NAD dependent glutamate dehydrogenase in restoring growth on glucose of a *Saccharomyces cerevisiae* phosphoglucose isomerase mutant, Eur. J. Biochem., **217**, 469–77 (1993).
52. Muller, S., Boles, E., May, M., and Zimmermann, F. K.: Different internal metabolites trigger the induction of glycolytic gene-expression in *Saccharomyces cerevisiae*, J. Bacteriol., **177**, 4517–4519 (1995).
53. Gardonyi, M., Jeppsson, M., Liden, G., Gorwa-Grauslund, M. F., and Hahn-Hägerdal, B.: Control of xylose consumption by xylose transport in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*, Biotechnol. Bioeng., **82**, 818–824 (2003).
54. Sonderegger, M. and Sauer, U.: Evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for anaerobic growth on xylose, Appl. Environ. Microbiol., **69**, 1990–1998 (2003).
55. Pitkanen, J. P., Rintala, E., Aristidou, A., Ruohonen, L., and Penttila, M.: Xylose chemostat isolates of *Saccharomyces cerevisiae* show altered metabolite and enzyme levels compared with xylose, glucose, and ethanol metabolism of the original strain, Appl.

Microbiol. Biotechnol, **67**, 827–837 (2005).

56. Attfield, P. V. and Bell, P. J.: Use of population genetics to derive nonrecombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains that grow using xylose as a sole carbon source, FEMS Yeast Res., **6**, 862–868 (2006).

57. Güldener, 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).

58. Van Vleet, J. H., Jeffries, T. W., and Olsson, L.: Deleting the para-nitrophenyl phosphatase (pNPPase), *PHO13*, in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* improves growth and ethanol production on D-xylose, Metab. Eng., **10**, 360–369 (2008).

59. Burke, R. L, Tekamp–Olson, P., and Najarian, R.: The isolation, characterization, and sequence of the pyruvate kinase gene of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem., **258**, 2193–2201 (1983).

60. Pearce, A. K., Crimmins, K., Groussac, E., Hewlins, M. J., Dickinson, J. R., Francois, J., Booth, I. R., Brown, A. J.: Pyruvate kinase (Pyk1) levels influence both the rate and direction of carbon flux in yeast under fermentative conditions, Microbiology, **147**, 391–401 (2001).

61. Byrne, K. P. and Wolfe, K. H.: The Yeast Gene Order Browser: combining curated homology and syntenic context reveals gene fate in polyploid species, Genome Res, **15**, 1456–1461 (2005).

62. Xu, Y. F., Zhao, X., Glass, D. S., Absalan, F., Perlman, D. H., Broach, J. R., Rabinowitz, J. D.: Regulation of yeast pyruvate kinase by ultrasensitive allostery independent of phosphorylation, Mol. Cell, **48**, 52–62 (2012).

63. Johnson, S. C., Bailey, T., Becker, R. R., and Cardenas, J. M.: Isolation and sequence

- determination of a peptide located in or near the active site of bovine muscle pyruvate kinase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **90**, 525–530 (1979).
64. Fenton, A. W. and Hutchinson, M.: The pH dependence of the allosteric response of human liver pyruvate kinase to fructose-1,6-bisphosphate, ATP, and alanine, *Arch. Biochem. Biophys.*, **484**, 16–23 (2009).
65. Liu, Z. S., WU, X. L., Kida, K., and Tang, Y. Q.: Corn stover saccharification with concentrated sulfuric acid: Effects of saccharification conditions on sugar recovery and by-product generation, *Bioresource technol.*, **119**, 224–233 (2012).
66. 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).
67. Kim, J. H. Brachet, V., Moriya, H., and Johnston, M.: Integration of transcriptional and posttranslational regulation in a glucose signal transduction pathway in *Saccharomyces cerevisiae*, *Eukaryotic Cell*, **5**, 167–173 (2006).
68. Flick, K. M., Spielewoy, N., Kalashnikova, T. I., Guaderrama, M., Zhu, Q., Chang, H. C., and Wittenberg, C.: Grr1-dependent inactivation of Mth1 mediates glucose-induced dissociation of Rgt1 from *HXT* Gene promoters, *Mol. Cell. Bio.*, **14**, 3230–3241 (2003).
69. Ozcan, S. and Johnston, M.: Function and regulation of yeast hexose transporters, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **63**, 554–569 (1999).
70. Rolland, F., Winderickx, J., and Thevelein, J. M.: Glucose-sensing and -signalling mechanisms in yeast, *FEMS Yeast Res.*, **2**, 183–201 (2002).
71. Johnston, M. and Kim, J. H.: Glucose as a hormone: receptor-mediated glucose sensing in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochem. Soc. Trans.*, **33**, 247–252 (2005).

72. Ozcan, S. and Johnston, M.: Three different regulatory mechanisms enable yeast hexose transporter (*HXT*) genes to be induced by different levels of glucose, *Mol. Cell Biol.*, **15**, 1564–1572 (1995).
73. Ozcan, S. and Johnston, M.: Two different repressors collaborate to restrict expression of the yeast glucose transporter genes *HXT2* and *HXT4* to low levels of glucose, *Mol. Cell Biol.*, **16**, 5536–5545 (1996).
74. Kim, J. H., Polish, J., and Johnston, M.: Specificity and regulation of DNA binding by the yeast glucose transporter gene repressor Rgt1, *Mol. Cell Biol.*, **23**, 5208–5216 (2003).
75. Kim, J. H.: Immobilized DNA-binding assay, an approach for in vitro DNA binding assay, *Anal. Biochem.*, **334**, 401–402 (2004).
76. Mosley, A. L., Lakshmanan, J., Aryal, B. K., and Ozcan, S.: Glucose-mediated phosphorylation converts the transcription factor Rgt1 from a repressor to an activator, *J. Biol. Chem.*, **278**, 10322–10327 (2003).
77. Spielowoy, N., Flick, K., Kalashnikova, T. I., Walker, J. R., Wittenberg, C.: Regulation and recognition of SCF^{Grr1} targets in the glucose and amino acid signaling pathways, *Mol. Cell Biol.*, **24**, 8994–9005 (2004).
78. Pasula, S., Jouandot, D., and Kim, J. H.: Biochemical evidence for glucose independent induction of *HXT* expression in *Saccharomyces cerevisiae*, *FEBS Lett.*, **581**, 3230–3234 (2007).
79. Ozcan, S., Freidel, K., Leuker, A., and Ciriacy, M.: Glucose uptake and catabolite repression in dominant *HTR1* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Bacteriol.*, **175**, 5520–5528 (1993).
80. Gamo, F. J., Lafuente, M. J., and Gancedo, C.: The mutation *DGT1-1* decreases glucose

- transport and alleviates carbon catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*, J. Bacteriol., **176**, 7423–7429 (1994).
81. Lafuente, M. J., Gancedo, C., Jauniaux, J.-C., and Gancedo, J. M.: Mth1 receives the signal given by the glucose sensors Snf3 and Rgt2 in *Saccharomyces cerevisiae*, Mol. Microbiol., **35**, 161–172 (2000).
82. Skowyra, D., Craig, K. L., Tyers, M., Elledge, S. J., Harper, J. W.: Reconstitution of G1 cyclin ubiquitination with complexes containing SCF^{Grr1} and Rbx1, Cell, **91**, 209–219 (1997).
83. Berset C, Griac P, Tempel R, La Rue J, Wittenberg C, Lanker S.: Transferable domain in the G(1) cyclin Cln2 sufficient to switch degradation of Sic1 from the E3 ubiquitin ligase SCF(Cdc4) to SCF(Grr1), Mol Cell Biol., **22**, 4463–4476 (2002).
84. Liu, Z., Spirek, M., Thornton, J., and Butow, R. A.: A novel degron-mediated degradation of the RTG pathway regulator, Mks1p, by SCF^{Grr1}, Mol. Biol. Cell, **16**, 4893–4904 (2005).
85. Conklin, D. S., Kung, C., and Colbertson, M. R.: The *COT2* gene is required for glucose-dependent divalent cation transport in *Saccharomyces cerevisiae*, Mol. Cell. Biol., **13**, 2041–2049 (1993).
86. Blondel, M., Galan, J. M., Peter, M.: Isolation and characterization of *HRT1* using a genetic screen for mutants unable to degrade Gic2p in *Saccharomyces cerevisiae*, Genetics, **155**, 1033–1044 (2000).
87. Avram, D. and Bakalinsky, A. T.: Multicopy *FZF1* (*SUL1*) suppresses the sulfite sensitivity but not the glucose derepression or aberrant cell morphology of a *grr1* mutant of *Saccharomyces cerevisiae*, Genetics, **144**, 511–521 (1996).
88. Landry, B. D., Doyle, J. P., Toczyski, D. P., and Benanti, J. A.: F-box protein specificity for g1 cyclins is dictated by subcellular localization, PLoS Genet., **8**, e1002851 (2012).

89. Ciechanover, A. and Schwartz, A. L.: Ubiquitin-mediated degradation of cellular proteins in health and disease, *Hepatology*, **35**, 3–6 (2002).
90. Peters, J. M.: SCF and APC: the Yin and Yang of cell cycle regulated proteolysis, *Curr Opin Cell Biol* **10**, 759–768 (1998).
91. Patton, E. E., Willems, A. R., and Tyers, M.: Combinatorial control in ubiquitin-dependent proteolysis: don't Skp the F-box hypothesis, *Trends Genet.*, **14**: 236–243 (1998).
92. Tyers, M. and Jorgensen, P.: Proteolysis and the cell cycle: with this RING I do thee destroy. *Curr Opin Genet Dev.*, **10**, 54–64 (2000).
93. Deshaies, R. J.: Phosphorylation and proteolysis: partners in the regulation of cell division in budding yeast, *Curr Opin Genet Dev.*, **7**, 7–16 (1997).
94. Nash, P., Tang, X., Orlicky, S., Chen, Q., Gertler, F. B., Mendenhall, M. D., Sicheri, F., Pawson, T., and Tyers, M.: (2001) Multisite phosphorylation of a CDK inhibitor sets a threshold for the onset of DNA replication, *Nature*, **414**, 514–521 (2001).
95. Blondel, M., Galan, J. M., Chi, Y., Lafourcade, C., Longaretti, C., Deshaies, R. J., and Peter, M.: Nuclear-specific degradation of Far1 is controlled by the localization of the F-box protein Cdc4, *EMBO J.*, **19**, 6085–6097 (2000).
96. Gerber, A. P., Herschlag, D., Brown, P. O.: Extensive association of functionally and cytotoxically related mRNAs with Puf family RNA-binding proteins in yeast, *PLoS Biol.*, **2**, 342–354 (2004).
97. Machin, N. A., Lee, J. M., and Barnes, G.: Microtubule stability in budding yeast: characterization and dosage suppression of a benomyl-dependent tubulin mutant, *Mol. Biol. Cell.*, **6**, 1241–1259 (1995).

98. Fehrenbacher, K. L., Boldogh, I. R. and Pon, L. A.: A role for Jsn1p in recruiting the Arp2/3 complex to mitochondria in budding yeast, *Mol. Biol. Cell.* **16**, 5094–5102 (2005).
99. Hasunuma, T., Sanda, T., Yamada, R., Yoshimura, K., Ishii, J., and Kondo, A.: Metabolic pathway engineering based on metabolomics confers acetic and formic acid tolerance to a recombinant xylose-fermenting strain of *Saccharomyces cerevisiae*, *Microb. Cell Fact.*, **10**, 2, (2011).
100. Fujitomi, K., Sanda, T., Hasunuma, T., and Kondo, A.: Deletion of the *PHO13* gene in *Saccharomyces cerevisiae* improves ethanol production from lignocellulosic hydrolysate in the presence of acetic and formic acids, and furfural, *Bioresour. Technol.*, **102**, 1537–1544 (2011).
101. Kim, S. R., Skerker, J. M., Kang, W., Lesmana, A., Wei, N., Arkin, A. P., Jin, Y. S.: Rational and evolutionary engineering approaches uncover a small set of genetic changes efficient for rapid xylose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*, *PLOS one*, **8**, e57048 (2013).

本論文に関する主な報告

1. Potent L-lactic acid assimilation of the fermentative and heterothallic haploid yeast *Saccharomyces cerevisiae* NAM34-4C. Masataka Tomitaka, Hisataka Taguchi, Masayoshi Matsuoka, Shigeru Morimura, Kenji Kida, and Takashi Akamatsu: J. Biosci. Bioeng., **117**(1), 65–70 (2014).
2. Isolation and characterization of a mutant recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain with high efficiency xylose utilization. Masataka Tomitaka, Hisataka Taguchi, Kohsai Fukuda, Takashi Akamatsu, and Kenji Kida: J. Biosci. Bioeng., **116**(6), 706–715 (2013).

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 准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 松岡正佳 教授、安藤祥司 教授に厚く御礼申し上げます。

実用酵母を快く御分与下さいました熊本大学 木田健二 教授に感謝いたします。

さらに、本研究において御協力下さいました武田優人 氏、岡部晃幸 氏をはじめ、研究室の皆様に厚く感謝いたします。

最後になりましたが、9年間に渡り支援してくださいました両親に深く感謝いたします。