

## 論文要旨

区分	甲	氏 名 富 高 正 貴
<p>論文題名</p> <p>高効率キシロース資化を導く <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 突然変異体の分離とその解析</p> <p>論文の要旨</p> <p>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、<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 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 <i>S. cerevisiae</i> 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 <i>S. cerevisiae</i> は持たないが、遺伝子操作で <i>Pichia stipitis</i> 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。</p>		

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<sup>+</sup>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<sup>+</sup>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*<sub>2,2</sub>, *HEX1*<sub>2,9</sub>, *HEX2*<sub>2,3</sub> と劣性変異 *hex3*<sub>1,5</sub> 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<sup>+</sup>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<sup>+</sup>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<sup>+</sup>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。