

平成 26 年 2 月 14 日

崇城大学大学院

工学研究科委員会

研究科長 塩谷 捨明 殿

論文審査委員

主査 赤松 隆



### 論文審査結果の報告 (甲)

論文提出者 富高正貴 ( 1018D01 )

論文題名 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

審査委員 主査 教授 赤松 隆 (印)  
副査 教授 松岡 正佳 (印)  
副査 教授 安藤 祥司 (印)

### 論文審査結果の要旨

我が国のバイオエタノール生産目標量は2030年までに380万kLであり、2020年までに二酸化炭素排出量を1990年比で25%削減することを政府は公約した。また、交通機関からの二酸化炭素排出量の増加から、食糧と競合しないセルロース系バイオマスからの燃料用エタノール生産が緊急の課題となっている。そこで、九州各県に多く賦存する竹に注目すると、九州4県（鹿児島、熊本、福岡、宮崎）で、この10年間で竹林面積が約9万haと約2倍に拡大しており、水俣を中心に半径100km圏内の竹林面積は6万5千haもある。1万7千haの竹賦存量は約100万トンとなり、全量使用すると28万kLのエタノールを生産することができる。竹を糖化するとグルコース(セルロース)とキシロース(キシラン)が3:2から2:1の割合で含まれる。このキシロースの有効利用が、セルロース系バイオマスにおけるバイオエタノール変換技術開発の一番の問題点である。*Saccharomyces cerevisiae*は、エタノール生産能力が最も高いが、キシロースからエタノールを生産することができない。そこで、バイオマス中のグルコースとキシロースを効率良くエタノールへ発酵できる酵母の育種が望まれている。本論文では、高効率キシロース資化を導く*Saccharomyces cerevisiae*突然変異体を分離し、その解析を行うことにより、バイオエタノール生産に供しうる酵母を作製するための基礎研究と実プラントに供しうる酵母を作製することにある。

第1章では、耐熱性ホモタリク実用酵母KF7から掛け合わせと形質転換能に優れたヘテロタリク一倍体酵母を創製している。すなわち、KF7株の子嚢胞子クローンの中から2株の異なる接合型を示す酵母を分離し、遺伝的に解析し、ヘテロタリズム一倍体であることを証明している。次に、孢子形成率と孢子生存率を改善するた

めに、種内掛け合わせや繰り返し戻し交配あるいは株内掛け合わせを駆使し、それぞれ遺伝解析や育種に十分な頻度16%と83%まで高めている。また、温度35°C、pH 3.5という高温、低pHで世代時間は1 時間という増殖力を示すまで酵母の育種を進め、エタノール発酵能が高いことを確かめている。さらに、その中から形質転換能が高い株をも分離している。このように、実用酵母を実験室酵母と同様に遺伝的に解析できるように改良している。

第2章では、高効率キシロース資化を導く *Saccharomyces cerevisiae* *HEX* 突然変異体を分離し、遺伝的に解析するとともに、変異遺伝子の特定を行っている。まず、次世代シーケンサー解析に適するように、第1章で構築した酵母菌 NAM34-4C の同質系統株を構築している。次に、*XYL1-XYL2-XKS1* を遺伝子操作で付与し、キシロース資化性株に換えている。そのキシロース最少培地での最少の世代時間が5時間であると評価し、さらに改良するために、キシロース資化性が向上した *HEX* 突然変異体を4株分離している。遺伝子は3個であることを遺伝学的に証明している。2個の *HEX1* と *HEX2* の変異は優性であり、*hex3* は劣性であること、*hex3* は既知遺伝子 *PHO13* であること、残りは既知 *TAL1* 以外の新しい遺伝子変異であることを示している。さらに、*HEX2* は *GRR1* 遺伝子のプロモーターと特定している。

第3章では、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を行っている。すなわち、高効率にキシロースを資化する *HEX1<sub>2,2</sub>* 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 *Sxm<sup>+</sup>* 突然変異体を工夫した方法で2株分離している。高濃度で増殖するのに必要不可欠な遺伝子がそれぞれ1個であること、それぞれ *MTH1* と *GRR1* に変異があることを証明している。取得した *Sxm<sup>+</sup> HEX1<sub>2,2</sub>* を持つキシロース資化性株のグルコース・キシロース糖からのエタノール発酵試験評価を行っている。初発細胞濃度  $Abs_{660nm}$  が20、温度35°C、pH 4.5のYP培地で培養すると、3時間以内に60 g/Lのグルコースを消費し、キシロース濃度は24時間以内に2.4 g/Lまで減少すること、最大キシロース消費速度は、2.6 – 2.9 g/L/hr と非常に早いことを認めている。糖からエタノールへの変換を考えた理論収率当たりエタノール収率は60–65%と高い値であった。

以上のことから、グルコース・キシロース糖からキシロース消費速度を上げるためには、*MTH1* と *GRR1* 関与のカタボライト抑制解除が重要であること結論している。今後は、その下流制御遺伝子である *Hxt1* や *Hxt4* の発現量を変化させる試みやグルコース・キシロース同時消費の試み、およびエタノール生産性の向上が、提案した作業仮説から検証されることを期待すると締めくくっている。

## 最終試験結果の要旨

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という本論文に対し、分子遺伝学的なアプローチで、どのようにすればグルコース・キシロース同時発酵ができるかを解析している。キシロース代謝向上に関わる *Hex<sup>+</sup>* や *Sxm<sup>+</sup>* 突然変異を取得し、特定に至っている。実験デザイン、遺伝子操作を駆使した実験材料の構築、実験結果の解析力と考察力等が一定水準に達していると判断できる。質問に対する応答も適切かつ論理的に行われた。従って、博士を取得するに値すると判断した。