

Title	Genetic Improvement of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> for Alcohol Fermentation from Xylose.
Author(s)	Manee, Tantirungkij
Citation	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/38221">https://hdl.handle.net/11094/38221</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	マニー タンティルンキ Manee Tantirungkij
博士の専攻分野の名称	博士(工学)
学位記番号	第10726号
学位授与年月日	平成5年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 工学研究科醸酵工学専攻
学位論文名	Genetic Improvement of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> for Alcohol Fermentation from Xylose. (キシロースからのエタノール生産に適したアルコール発酵酵母の育種)
論文審査委員	(主査) 教授 吉田 敏臣 (副査) 教授 大嶋 泰治    教授 新名 惇彦    教授 卜部 格 教授 今中 忠行    教授 山田 靖宙    教授 高野 光男 教授 菅 健一    教授 二井 将光

### 論文内容の要旨

本論文は、農林産廃資源のエネルギー資源化の観点から、主要構成糖であるキシロースからエタノールを生産するプロセスを開発するため、遺伝子組換え技術を用いたアルコール発酵酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の育種および培養工学的検討に関する研究をまとめたもので、緒論と総括を含めて5章からなる。

第1章では、本研究の背景を述べるとともに、キシロースからのエタノール生産の問題点を概説し、キシロース資化経路を考慮した育種法の方針について述べている。

第2章では、キシロースをキシリトールに変換するキシロースリダクターゼに対応する遺伝子の、*S. cerevisiae* への導入について述べている。キシロース資化酵母である *Pichia stipitis* 由来のキシロースリダクターゼ遺伝子を単離し、酵母ベクタープラスミドと強発現エノラーゼ遺伝子プロモータを用い *S. cerevisiae* に導入している。得られた形質転換体は、充分高いキシロースリダクターゼ活性を示したが、キシロースを資化できなかったため、その原因について考察している。

第3章では、キシリトールをキシロースに変換するキシリトールデヒドロゲナーゼに対応する遺伝子の導入について述べている。*P. stipitis* 由来のキシリトールデヒドロゲナーゼ遺伝子を *S. cerevisiae* に導入したところ、形質転換体は高い酵素活性を示すもののキシロースを資化することができなかったが、キシロースリダクターゼとキシリトールデヒドロゲナーゼの遺伝子を同時に導入した形質転換体は、好氣的条件下でキシロースを資化することを認め、キシロース資化アルコール発酵酵母の育種に成功したことを述べている。

第4章では、キシロース培地でより速く増殖する変異株の分離とエタノール生産について述べている。変異株は、キシロキナーゼの活性が増強されており、また、プラスミド上の両酵素遺伝子が染色体へ組み込まれていたことを見いだしている。さらに、エタノール生産が、キシリトールデヒドロゲナーゼの補酵素 NAD により律速されていると考え、NAD 再生に必要な酸素の供給速度、キシリトール代謝速度に見合ったキシロース供給速度を設定した培養を検討し、生産性を改良している。

第5章では、以上の結果を要約し、本研究で得られた主たる結論を総括するとともに、今後の育種に関する討論を行っている。

## 論文審査の結果の要旨

化石燃料に代わる多様なエネルギー資源の利用が提案されているが、太陽エネルギーを使って再生産が可能であるリグノセルロース系バイオマスの液体燃料化も重要な課題の一つとなっている。リグノセルロース系バイオマスをエタノールに変換するために、その構成成分の大部分を資化しエタノール発酵する微生物株を育種することができれば、大幅なプロセスの効率化が可能となる。本論文は、アルコール発酵に広く用いられている *Saccharomyces cerevisiae* に、遺伝子操作の技術を用いて、リグノセルロース系バイオマスの主要構成成分の一つであるキシロースからエタノールに変換する機能を賦与し、新しいエタノール生産プロセスを開発するための基盤的研究をまとめたもので、以下に要約するよういくつかの重要な知見ならびに結論を得ている。

- (1) *S. cerevisiae* においてキシロース資化の代謝経路におけるキシロースからキシロースへの変換反応が機能していないことから、その反応に必要なキシロースリダクターゼならびにキシリトールデヒドロゲナーゼ両酵素の遺伝子を有しそれらを同時に発現させ得る酵母ベクタープラスミドを構築し、*S. cerevisiae* の高エタノール生産株に導入する方法によって、キシロース資化性の *S. cerevisiae* 形質転換株を新規に作成している。
- (2) 得られた形質転換株から、エチルメタンサルホン酸を用いる変異操作によって、キシロース培地において速く増殖する変異株を取得し、変異株においてキシロース代謝の最初の反応を触媒する酵素であるキシロキナーゼの活性が高くなっていることを確認している。また、プラスミド上の両遺伝子が  $\delta$  配列を介すると考えられる組換えによって宿主酵母の染色体に組み込まれていることを見いだしている。
- (3) 野生株ならびに変異株のキシロース代謝経路の酵素活性を比較し、変異株の中でも、キシロースリダクターゼの活性がキシリトールデヒドロゲナーゼの活性に比較して弱くなっている株が、キシリトールの蓄積が少なく、エタノール生産が良好になっていることを見いだしている。これらの結果に基づいて、遺伝子発現の調節とキシロース代謝の制御を中心とする代謝工学的考察を行い、キシロースからの効率的なエタノール生成のための指針を与えている。
- (4) 代謝工学的考察に基づき、キシロースの供給を制限する流加培養を行い、キシリトールの蓄積を抑え、エタノール生産収率を高めることが可能であることを示している。また、酸素供給を調節することによってキシロースリダクターゼおよびキシリトールデヒドロゲナーゼの反応にカップリングする補酵素の再生を制御できることを示している。

以上のように、本論文は遺伝子組換えによる代謝制御について価値ある知見を得ており、醗酵工学、特に遺伝子工学ならびに代謝工学の分野に貢献するところが大きい。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。