

( 続紙 1 )

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                              |    |       |  |  |  |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|-------|--|--|--|
| 京都大学                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 博士 ( 農 学 )                                                                                                   | 氏名 | 小高 敦史 |  |  |  |
| 論文題目                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | A novel breeding method useful for industrial diploid yeast and its applications<br>(二倍体清酒酵母の新しい育種法の開発とその応用) |    |       |  |  |  |
| (論文内容の要旨)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                              |    |       |  |  |  |
| <p>清酒酵母は、出芽酵母<i>Saccharomyces cerevisiae</i>に属するが、エタノール発酵に関する形質は実験室で使用されている出芽酵母と大きく異なっている。二倍体である清酒酵母はエタノール生産に有用な形質を有する一方で、一倍体取得に必要な孢子形成能が非常に低く、交配による育種や劣性変異株の取得が難しいといった性質も持ち合わせている。これまでに清酒酵母の孢子形成能に関する様々な研究がなされているが、二倍体清酒酵母を一倍体実験室酵母と同じように扱いやすい酵母へ育種するまでには至っていない。そこで、孢子形成に頼らない二倍体清酒酵母の新しい育種方法の開発とその応用について検討した。</p>                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                              |    |       |  |  |  |
| <p>1. High-efficiency loss of heterozygosity (HELOH) 法の開発と多重劣性変異株の作製</p> <p>清酒酵母を遺伝子工学用宿主として利用することを促進するためには、清酒酵母への劣性形質（栄養要求性、プロテイナーゼ欠損など）の付与や遺伝子発現カセットの多コピー化を容易にできる技術の開発が必要である。そこで二倍体清酒酵母に劣性形質を効率的に導入するために、ヘテロに導入された変異領域を高頻度でホモ化する方法を開発した。具体的には、選択マーカーである<i>URA3</i>を挿入後、選択マーカーの脱落を5-フルオロオロチン酸耐性を指標にしたポジティブスクリーニングにより、ヘテロ接合性の消失（loss of heterozygosity）が生じた株、すなわち破壊領域がホモ化されたものを選抜し、目的とするホモ型遺伝子破壊株を取得した。得られた株の形質は、破壊した遺伝子の表現型以外は親株とほぼ同等であり、このことから二倍体清酒酵母の特性を損わない劣性変異の導入や宿主の育種が初めて可能になった。また、本法を繰り返し利用することにより、多重栄養要求性やプロテイナーゼA欠損という、産業上、有用な形質をもつ清酒酵母を作製することができた。</p> |                                                                                                              |    |       |  |  |  |
| <p>2. 清酒酵母の機能強化—カプロン酸エチル超生産酵母の育種—</p> <p>酵母の変異型<i>FAS2</i>は、酵母にセルレニン耐性と清酒の重要な香気成分であるカプロン酸エチルの高生産をもたらす。この変異は優性の変異で、二倍体清酒酵母にはこの変異は通常ヘテロで導入されている。そこでまずHELOH法で変異型<i>FAS2</i>をホモ化した。その結果、ホモ変異株は、野生型やヘテロ変異株より清酒醸造においてより多くのカプロン酸エチルを生成した。また、ホモ変異株は野生型やヘテロ変異株より高濃度のセルレニンに対して耐性を示した。次に、現在、遺伝子組換え体は食品分野での利用が難しいため、<i>FAS2</i>ホモ変異株を遺伝子組換え技術を用いずに取得する方法も検討した。ヘテロ変異株を培養後、菌体を高濃度セルレニン培地に塗布したところ、ホ</p>                                                                                                                                                                          |                                                                                                              |    |       |  |  |  |

モ変異株となったものを取得することができた。ホモ変異非組換え酵母もヘテロ変異株よりもカプロン酸エチルを多く生成し、ヘテロ変異株の2.2倍に達した。この非組換えFAS2ホモ変異株を用いることにより、カプロン酸エチルの非常に華やかな香りを有する清酒を醸造することができた。

### 3. 清酒酵母を利用したバイオエタノール生産技術の開発

清酒酵母が高濃度のエタノールを生産することに着目し、清酒酵母を利用したバイオエタノール生産技術の開発を行った。

まず、糖質加水分解酵素を細胞表層に提示した清酒酵母を用いて、デンプンや $\beta$ -グルカンから直接エタノール発酵を行う酵母を開発した。麴菌由来グルコアミラーゼを細胞表層に提示した清酒酵母を使用して50 g/lのデンプンから30℃で直接エタノール発酵を行ったところ、発酵開始から48時間後にエタノール濃度は18.5 g/lに達した（収率64.9%）。また、麴菌由来の $\beta$ -グルコシダーゼとエンドグルカナーゼを細胞表層に共提示した清酒酵母を使用して直接エタノール発酵を行ったところ、20 g/lの $\beta$ -グルカンから24時間で7.9 g/lのエタノールを生産することができた（収率69.6%）。このように、糖化と発酵を同時に行うことができ、効率よくエタノールを生産することができた。

バイオエタノール生産をさらに効率よく行うために、清酒酵母宿主の改良を行った。まず、細胞表層提示に重要なGPIアンカータンパク質をコードする遺伝子が破壊された株を25株選抜し、これらに $\beta$ -グルコシダーゼを表層提示させた。その結果、 $\Delta sed1$ 株では有意に $\beta$ -グルコシダーゼ活性が上昇することを見出した。次に、清酒酵母の*SED1*を削除した株を、HELOH法を利用することにより作製した。作製した株に $\beta$ -グルコシダーゼを表層提示させ、細胞表層での $\beta$ -グルコシダーゼ活性を評価したところ、*SED1*破壊株は、親株の1.6倍の $\beta$ -グルコシダーゼ活性を示し、バイオエタノール生産性の向上に成功した。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し  
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(論文審査の結果の要旨)

清酒酵母は実験室で使用されている出芽酵母と同様に *Saccharomyces cerevisiae* に属するが、エタノール高生産性などの特徴は、実験室酵母と大きく異なっている。清酒酵母のこのような特徴を、酒類醸造のみならず、バイオ燃料生産に利用するためには、清酒酵母の用途に応じた育種が必要である。ところで、清酒酵母は二倍体であるが、孢子形成能が低いため、その育種が困難である。本研究は、二倍体清酒酵母を孢子形成に依存せずに育種する方法を開発し、さらに、酒類醸造やバイオ燃料生産への応用を検討したものである。成果として評価すべき点は以下の通りである。

1. 清酒酵母のヘテロ接合性の消失を利用して、ゲノム中の目的とするヘテロな変異領域をホモ化する方法 high-efficiency loss of heterozygosity (HELOH) 法を開発した。これにより、従来、困難であった二倍体清酒酵母の育種が容易になったことを多重栄養要求性株やプロテイナーゼ欠損株を取得することにより示した。
2. HELOH法と高濃度セルレニン耐性を活用した選抜法により、*FAS2*ヘテロ変異株から *FAS2*ホモ変異株を効率よく取得することができた。この *FAS2*ホモ変異株は、清酒中の重要な香気成分であるカプロン酸エチルをヘテロ変異株の2.2倍生産することを示した。この変異は優性の変異であるため、二倍体細胞においては、ヘテロであっても十分であると考えられたが、HELOH法により、変異遺伝子のホモ化をすることにより、清酒風味にとって重要な香気成分の生産性が向上できることを示した。
3. 糖質加水分解酵素を細胞表層に提示した清酒酵母を用いて、デンプンや $\beta$ -グルカンから直接エタノール発酵を行うことができた。より効率的なバイオエタノール生産を目的として *SEDI*を欠失させた清酒酵母を、HELOH法を利用することにより作製した。この株と親株に $\beta$ -グルコシダーゼを提示したところ、*SEDI*破壊株は親株の1.6倍の酵素活性を示した。このように、HELOH法を活用することにより、清酒酵母宿主の改良も容易にできることがわかり、バイオエタノール生産の更なる効率化が可能となった。

以上のように本論文は、清酒酵母のヘテロ接合性の消失という現象を利用することによる新しい育種法を開発し、孢子形成をほとんどしない二倍体清酒酵母を容易に産業上重要な株に育種できることを示したものである。さらに本法は、醸造用実用酵母やバイオエタノール生産実用酵母の容易な育種を初めて可能にしたものであり、応用微生物学、制御発酵学、微生物科学および生体高分子化学に寄与するところが多い。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成23年2月10日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) Webでの即日公開を希望しない場合は、以下に公開可能とする日付を記入すること。  
要旨公開可能日：                      年                      月                      日以降