

## 学位論文要旨

氏名 Suprayogi

題目 Basic study on thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042 toward efficient conversion of cellulosic biomass to ethanol

High-temperature fermentation technology with thermotolerant microbes has been expected to reduce the cost of conversion of biomass to useful materials. Bioethanol from cellulosic biomass is an environment-friendly alternative to fossil fuels but materials derived from such biomass contain various sugars including glucose, which inhibits the assimilation of other sugars via the glucose-repression mechanism. Thermotolerant ethanologenic yeast *Kluyveromyces marxianus* is capable of fermenting various sugars including xylose but exhibits the glucose repression to hamper the utilization of other sugars. In this study, four research topics in the yeast were performed: 1) isolation and characterization of spontaneous mutants bearing glucose repression-defectiveness, 2) isolation and characterization of *kanMX4*-inserted mutants bearing glucose repression-defectiveness, 3) determination of complete genome sequence and analysis of transcriptome and 4) analysis of assimilation of xylose and/or arabinose via a random *kanMX4* insertion mutagenesis.

To acquire glucose repression-defective mutants, 33 isolates as 2-deoxyglucose (2-DOG)-resistant mutants were isolated and characterized on their sugar consumption abilities and cell growth and ethanol accumulation along with cultivation time. As a result, they were classified into three groups. The first group (3 isolates) utilized glucose and xylose in similar patterns along with cultivation to those of the parental strain, presumably due to reduction of the uptake of 2-DOG or enhancement of its export. The second group (29 isolates) showed greatly delayed utilization of glucose, presumably by reduction of the uptake or initial catabolism of glucose. The last group, only one isolate, showed enhanced utilization ability of xylose in the presence of glucose. Further analysis revealed that the isolate had a single nucleotide mutation to cause amino acid substitution (G270S) in *RAG5* encoding hexokinase and exhibited very low activity of the enzyme.

2-DOG-resistant mutants were also isolated from randomly *kanMX4*-inserted mutants. Analysis of the sugar utilization ability revealed that there were two categories of the intragenically *kanMX4*-inserted mutants including the *mig1* mutant as a control. One group showed enhanced utilization of xylose in the presence of glucose, presumably due to a defect in the glucose-repression mechanism, and the other group showed delayed utilization of glucose, probably by reduction of the uptake or initial catabolism of glucose. Considering the possible functions of the disrupted genes in these mutants, it is assumed that *K. marxianus* has undiscovered mechanisms for glucose repression and complex regulation for the uptake or initial catabolism of glucose.

The complete genome sequence of *K. marxianus* DMKU 3-1042 as one of the most thermotolerant strains in the same species has been determined. Comparison of its genomic information with those of other yeasts and transcriptome analysis revealed that the yeast bears beneficial properties of temperature resistance, wide-range bioconversion ability and production of proteins. The transcriptome analysis

clarified distinctive metabolic pathways under three different growth conditions, static culture, high temperature and xylose medium, in comparison to the control condition of glucose medium under a shaking condition at 30°C. Interestingly, the yeast appears to overcome the issue of reactive oxygen species, which tend to accumulate under all three conditions. This study provides many gene resources for the ability to assimilate various sugars in addition to species-specific genes in *K. marxianus*, and the molecular basis of its attractive traits for industrial applications including high-temperature fermentation.

In order to identify key factors involved in pentose metabolism, *K. marxianus* DMKU 3-1042 was mutagenized by a random *kanMX4*-insertion mutagenesis and screened mutants that were unable to assimilate xylose and/or arabinose as a sole carbon source. Consequently, three mutants of *COX15*, *ATP25* and *CYC3* encoding a cytochrome oxidase assembly factor (singleton), a transcription factor required for assembly of the Atp9p subunit of mitochondrial ATP synthase and cytochrome *c* heme lyase, respectively, were obtained. They exhibited incapability of growth on non-fermentable carbon sources, such as acetate or glycerol, and thermosensitiveness. Their biomass formation in glucose medium was reduced, but ethanol yields were increased with a high ethanol level in the medium, compared to those of the parental strain. Experiments with respiratory inhibitors showed that *cox15* and *cyc3*, but not *atp25*, were able to grow in glucose medium containing antimycin A and that the *atp25* mutant was KCN-resistant. Activities of NADH and ubiquinol oxidases in membrane fractions of all mutants became a half of that of the parent and negligible, respectively, and their remaining NADH oxidase activities were found to be resistant to KCN. Absolute absorption spectral analysis revealed that the peak corresponding to  $\alpha+a_3$  was very small in *atp25* and negligible in *cox15* and *cyc3*. These findings suggest that the *K. marxianus* strain possesses an alternative KCN-resistant oxidase that is located between primary dehydrogenases and the ubiquinone pool and that the respiratory activity is essential for utilization of pentose.

日本語又は英語で作成する。

## 学位論文審査の結果の要旨

|   |          |       |           |
|---|----------|-------|-----------|
| 報告番号  | 乙 第1078号 | 氏名    | SUPRAYOGI |
| 論文審査担当者   | 主査       | 山田 守  |           |
|   | 副査       | 内海 俊彦 |           |
|   | 副査       | 松井 健二 |           |
|   | 副査       | 薬師 寿治 |           |
|   |          |       |           |
| 学位論文題目名 (題目名が英文の場合は、行を変えて和訳を括弧書きで記載する。)<br>Basic study on thermotolerant yeast <i>Kluyveromyces marxianus</i> DMKU 3-1042 toward efficient conversion of cellulosic biomass to ethanol<br>(セルロース系バイオマスの効率的なエタノール変換に向けた耐熱性酵母 <i>Kluyveromyces marxianus</i> DMKU3-1042 の基盤研究)  |          |       |           |
| 関連論文 (題目名が英文の場合は、行を変えて和訳を括弧書きで記載する。)<br><基礎となる学術論文>   |          |       |           |
| 題目: A <i>Kluyveromyces marxianus</i> 2-deoxyglucose-resistant mutant with enhanced activity of xylose utilization<br>(キシロース資化能力が向上した <i>Kluyveromyces marxianus</i> の2-デオキシグルコース耐性変異株)<br>掲載誌: <i>International Microbiology</i> , in press<br>(2016年6月 掲載・ <span style="border: 1px solid black;">掲載予定</span> )  |          |       |           |
| 題目: Characteristics of <i>kanMX4</i> -inserted mutants that exhibit 2-deoxyglucose resistance in thermotolerant yeast <i>Kluyveromyces marxianus</i><br>(耐熱性 <i>Kluyveromyces marxianus</i> における2-デオキシグルコース耐性を示す <i>kanMX4</i> 挿入変異株の特性)<br>掲載誌: <i>The Open Biotechnology Journal</i> , in press<br>(2016年6月 掲載・ <span style="border: 1px solid black;">掲載予定</span> )        |          |       |           |
| 題目: Genetic basis of the highly efficient yeast <i>Kluyveromyces marxianus</i> : complete genome sequence and transcriptome analyses<br>(発酵生産性の高い <i>Kluyveromyces marxianus</i> の遺伝学的基盤:完全ゲノム配列とトランスクリプトームの解析)<br>掲載誌: <i>Biotechnol biofuels</i> , 8:47. doi:10.1186/s13068-015-0227-x (2015)<br>(2015年3月 <span style="border: 1px solid black;">掲載</span> ・掲載予定)           |          |       |           |
| 題目: Essentiality of respiratory activity for pentose utilization in thermotolerant yeast <i>Kluyveromyces marxianus</i> DMKU 3-1042<br>(耐熱性酵母 <i>Kluyveromyces marxianus</i> DMKU 3-1042において呼吸活性はペントース利用に必須である)<br>掲載誌: <i>Antonie van Leeuwenhoek</i> , 103:933-945 (2013) DOI 10.1007/s10482-012-9874-0<br>(2013年4月 <span style="border: 1px solid black;">掲載</span> ・掲載予定) |          |       |           |
| <参考論文><br>なし  |          |       |           |

(論文審査の要旨)

耐熱性微生物を用いた高温発酵技術は、バイオマスの有用物質への変換コストを削減すると期待されている。特に、セルロース系バイオマスは食料と拮抗しない第2世代バイオマスであり、これを原料とするバイオエタノールは環境に優しい化石燃料の代替燃料であるが、セルロース系バイオマスから調製した原料は種々の糖を含み、その中のグルコースがグルコース抑制と呼ばれる仕組みによって他の混在する糖の資化を妨げる。耐熱性でエタノール生産性の酵母 *Kluyveromyces marxianus* は種々の糖を資化できる特性を有するが、グルコース抑制機構をもっている。本研究では本酵母に関する4つの研究課題：1) グルコース抑制変異をもつ自然突然変異株の分離とその解析、2) グルコース抑制変異をもつ *kanMX4* 挿入変異株の分離とその解析、3) 完全ゲノム解析とトランスクリプトーム解析、4) *kanMX4* 挿入変異によるキシロースおよびアラビノース資化の解析について実施している。

1) では、2-デオキシグルコース (2-DOG) 耐性変異株を分離し、その中からグルコース抑制変異株の取得を目指したものである。獲得した 2-DOG 耐性変異株は表現型から3つに分類され、その1つのグループは親株と同様なグルコースおよびキシロースの資化パターンを示した。2つ目のグループは、グルコース資化が大きく遅延し、おそらく、グルコースの取り込みあるいは初期の異化代謝に不具合があると思われる。3つ目のグループは、グルコース存在下でキシロースの資化が親株よりも増進されており、ゲノム解析からヘキソキナーゼをコードする *RAG5* に変異があり、G270S のアミノ酸置換を起こしていることが予測され、また、ヘキソキナーゼ活性が低下していることが示されている。

2) では、*kanMX4* カセットが挿入され、かつ、2-DOG に耐性を示す変異株を分離し、その中からグルコース抑制変異株を取ろうとしたものである。ここでは *kanMX4* 挿入によって遺伝子が破壊された変異株を解析対象としている。表現型の解析から変異株は2つに分類され、その1つのグループはグルコース存在下でキシロースの資化が親株よりも亢進あるいは同様なパターンを示していた。もう1つのグループは、グルコース資化が大きく遅延していた。解析した破壊株は異なる代謝に係る遺伝子が破壊されていたことから、*K. marxianus* はグルコース抑制やグルコースの取り込みや初段階の異化反応に未知の機構が存在すると推測される。

3) では、耐熱性の強い *K. marxianus* DMKU3-1042 株の完全ゲノム解析とトランスクリプトーム解析を行い、他の酵母のものと比較することによって、この株が高温耐性、種々の糖資化能力、蛋白生産能力等に優れていることを示している。特に、トランスクリプトーム解析は4培養条件で行い、グルコール培地、キシロース培地、静置条件および高温条件での解析から異なる条件で代謝が大きく異なることを示唆した。また、今回得られた遺伝子情報や転写解析情報は基礎研究や応用研究に有用な情報になると思われる。

4) では、キシロースおよびアラビノース資化能力を解析するために *kanMX4* 挿入変異株ライブラリーからキシロースおよびアラビノースを資化できない変異株3株を分離した。*kanMX4* 挿入部位の解析から、それぞれの株は *COX15* (チトクロームオキシダーゼ複合体形成ファクター)、*ATP25* (ATP 合成酵素の Atp9p の組込に必要な転写因子) あるいは *CYC3* (チトクローム *c* ヘムリアーゼ) が破壊されていることを示している。

以上のように、申請者は、第2世代バイオマスの利用に好適な *K. marxianus* を研究対象として、第2世代バイオマスの利用に向けて問題となるグルコース抑制やペントース利用を中心として、ゲノムや網羅的転写を含めて研究を進めている。このように一貫した研究方針でまとめられた学位論文となっており、その研究成果は筆頭著者および共著者の論文として発表されている。また、研究内容は産業利用を目指しながらもしっかりとした基礎研究に基づいたものである。これらのことから、質の高い研究成果を挙げていると判断される。