

学 位 論 文 要 旨 (Summary of the Doctoral Dissertation)	
学位論文題目 (Dissertation Title)	産業用酵母の遺伝子工学的および培養工学的手法による糖利用能の向上 (Accelerated sugar utilization of industrial yeasts through genetic and fermentation engineering)
氏 名(Name)	江部 聡
現在、酵母を用いた発酵生産では、再生可能エネルギーであるバイオエタノールやワクチン用タンパク質などが生産されている。また、パン製造用や酵母エキスとして酵母細胞自体も工業的に生産されている。これらの生産では、酵母の増殖能や発酵能など様々な能力が重要である。 発酵生産や酵母の生産では、伝統的発酵生産に由来する酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> が広く用いられている。一方で、<i>S. cerevisiae</i> よりも熱に強く、セロビオースやマンニトールも資化できる酵母 <i>K. marxianus</i> の今後の発酵生産での利用拡大が期待されている。しかし、これらの糖の資化はグルコースの資化よりも時間がかかる。つまり、<i>S. cerevisiae</i> を用いた研究は、現在の発酵生産や酵母の生産に貢献し、<i>K. marxianus</i> を用いた研究は、今後の発酵生産や酵母の生産に貢献する。そこで、本研究では <i>S. cerevisiae</i> と <i>K. marxianus</i> それぞれに対し、糖の利用能改変を培養工学的及び遺伝子工学的に行った。 <i>S. cerevisiae</i> の最も大きな特徴はエタノール生産能の高さである。発酵では、酵母が糖を細胞内に取り込み代謝することでエタノールが生産される。発酵効率を上げるために、様々な研究が行われてきたものの、いずれも増殖を伴う発酵であった。つまり、これらで示された成分は増殖と発酵のどちらに効果があるか判断できない。増殖と分けて発酵を促進する成分は決められていない。そのような成分を特定するには増殖しない発酵培地が必要である。第 2 章では、増殖しない発酵培地を決定することに成功し、この培地を利用して発酵を促進する成分を特定し、その要因を調べた。その培地は、高い糖濃度でそこへ酵母を大量に植菌すると増殖しない発酵条件が得られた。糖、水、酵母だけの増殖しない発酵培地では発酵が悪かったことから、栄養素を加えることで発酵促進物質を探した。様々な栄養素を加えた結果、アスパラギン酸ナトリウムを添加すると、増殖せずに発酵を促進することが分かった。また添加により、pH も変化していたため、pH が発酵に重要であると考え、pH の発酵への影響を調べた結果、発酵中 pH を中性に維持することも良好な発酵に重要であることが分かった。 <i>K. marxianus</i> は、マンニトール、セロビオースなど <i>S. cerevisiae</i> が資化できない糖を資化することができる。しかし、<i>K. marxianus</i> DMKU3-1042 株は、2%のグルコースを 1 日で資化するのに対し、マンニトールの資化には 7 日かかり、セロビオースはほとんど資化しない。これらの糖利用能を遺伝子工学的に上げるためには、各糖の輸送体と代謝酵素遺伝子を特定する必要がある。 遺伝子同定の手法として CRISPR-Cas9 を用いた標的遺伝子の破壊がある。この方法では、DNA 切断酵素 Cas9 と Cas9 を標的位置へ誘導するガイド RNA を利用して標的遺伝子を破壊する。また、切断部位への遺伝子挿入を組み合わせた遺伝子破壊法もある。しかし、従来の遺伝子挿入では相同組換えを利用しており、<i>K. marxianus</i> のように非相同末端結合修復が優勢の生物では効率が良くない。そこで、非相同末端結合修復を利用した遺伝子挿入を組み合わせた遺伝子破壊法を第 3 章で開発した。開発した方法では、遺伝子挿入時以外に DNA 切断が起きないように、Cas9 のプロモーターを誘導系として発現させた。また、標的位置付近と相同な配列を付加したマーカー遺伝子を用いないため、標的位置毎に新た	

な DNA 断片を構築することなく同じ DNA 断片が利用できることもメリットである。開発した遺伝子破壊法を DMKU3-1042 株に利用した結果、13 の糖輸送体候補遺伝子破壊株を取得できた。各株の糖輸送能を調べたところ、KmMlev2025p はソルビトールとマンニトールの輸送体であることが明らかになった。つまり、開発した遺伝子破壊法は遺伝子同定に有効であることが示された。DMKU3-1042 株のマンニトール資化を早めるため、KmMLEV2025 過剰発現株での増殖を調べた結果、輸送体過剰発現株は 2 日で糖をほとんど資化できるようになった。つまり、開発した遺伝子破壊法を用いることで輸送体が明らかとなり、過剰発現により増殖を改善させることができた。

K. marxianus はマンニトール、セロビオースを資化し、マンニトールの輸送体が同定できたため、第 4 章ではセロビオース輸送体の同定を行った。DMKU3-1042 株のセロビオース輸送能は低いため、DMKU3-1042 株の遺伝子を破壊してもセロビオース輸送体は特定できない。そこで、セロビオース資化能の高い株に由来する糖輸送体候補遺伝子を DMKU3-1042 株で過剰発現させることで、セロビオース輸送体を同定することを考えた。*K. marxianus* 19 株のセロビオース培地での増殖を調べたところ、NCYC2791 株は 1 日で増殖し、2 日で糖を完全に消費した。DMKU3-1042 株に NCYC2791 株由来の糖輸送体候補遺伝子をそれぞれ過剰発現させたところ KmSTL1 過剰発現株で増殖が最も強かった。従って、過剰発現によりセロビオース輸送体を同定できたが、セロビオースの完全な消費に 4 日もかかった。緑色蛍光タンパク質 GFP を KmStl1p の遺伝子上流に付加した株を作製し局在観察を行うと、セロビオース培地では細胞膜上に局在したが、セロビオースがない培地では液胞に局在し、分解されていると考えられた。KmStl1p の細胞膜上でのさらなる安定化により増殖効率が改善できると考え、KmStl1p の末端配列を削除し、セロビオースがない培地で細胞膜局在を示す KmStl1p 変異体を探索した結果、C 末端配列削除株が細胞膜局在を示した。従って、C 末端配列の削除により細胞膜上での KmStl1p の安定化ができると考え、C 末端配列を削除した KmSTL1 を過剰発現させた DMKU3-1042 株のセロビオース資化能を調べたところ、2 日で糖を完全に消費できるようになった。末端配列を削除することで輸送体を細胞膜上で安定化させることができ、これにより増殖効率が改善された。

本研究では、増殖せずに発酵できる培地を決定し、遺伝子破壊と過剰発現による *K. marxianus* の遺伝子同定と輸送体の C 末端削除解析を行った。これらの知見は、本研究で扱った酵母のみならず、多くの酵母での糖利用能改変に貢献する。

学 位 論 文 要 旨 (Summary of the Doctoral Dissertation)	
学位論文題目 (Dissertation Title)	Accelerated sugar utilization of industrial yeasts through genetic and fermentation engineering (産業用酵母の遺伝子工学的および培養工学的的手法による糖利用能の向上)
氏 名(Name)	Satoshi Ebe
Yeasts are used to produce various materials. For example, bioethanol is produced as energy and yeast cells are produced for bread making and yeast extract. In these productions, the sugars as feed stock should be efficiently utilized and metabolized. In bioethanol production, the yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i> has been traditionally and exclusively used. <i>S. cerevisiae</i> has high fermentative capability and cell growth capacity. Various studies have been conducted on <i>S. cerevisiae</i>. However, the nutrients that specifically promote fermentation has not been revealed. Identifying the nutrient promoting fermentation is scientifically valuable and contributes to the efficient utilization of sugar for ethanol production. Meanwhile, thermotolerant and various sugar assimilating yeast <i>Kluyveromyces marxianus</i> is expected to be used in fermentative production for cost reduction. <i>K. marxianus</i> can grow using mannitol and cellobiose that <i>S. cerevisiae</i> cannot assimilate. However, the cell growth efficiency of <i>K. marxianus</i> is low using mannitol and cellobiose. In this study, the nutrient promoting fermentation was revealed using <i>S. cerevisiae</i> and cell growth efficiency of <i>K. marxianus</i> was improved for the efficient sugar utilization. <i>S. cerevisiae</i> takes up sugars into the cell and metabolizes it to produce ethanol. Various studies have been conducted to identify the nutrients for improving fermentation efficiency. However, the nutrients also improved cell growth. Therefore, it is not clear whether the nutrients are the cell growth factor or the fermentation promoting factor. A condition in which yeast cells do not grow will be useful to identify a fermentation promoting factor. In chapter 2, such a fermentation condition was explored and determined as high-dose inocula and high glucose concentration. Since the fermentation level was low in the condition, the nutrient promoting fermentation was explored by addition of various nutrients. As a result, sodium aspartate and glutamate promoted fermentation with no yeast growth. In this study, the fermentation condition in which yeast cells do not grow and the nutrient promoting fermentation were revealed. To enhance mannitol and cellobiose assimilation, identification of the sugar transporter genes will be helpful. A possible method to identify a gene responsible for a phenotype is gene disruption. One of the gene disruption methods is gene insertion using CRISPR-Cas9 systems. However, the disruption efficiency is low. Because this gene insertion is performed through homologous recombination, though non-homologous end-joining (NHEJ) activity is high in many organisms like <i>K. marxianus</i>. Therefore, in chapter 3, the gene disruption method through NHEJ and CRISPR-Cas9 was developed. In the developed method, the Cas9 promoter was expressed as an inducible	

promoter to prevent DNA cleavage before the gene insertion step. A marker gene DNA fragment can be used to disrupt each target site, because it does not have any homologous sequence. By applying the developed gene disruption method to the DMKU3-1042 strain, 13 disruptants of sugar transporter candidate genes was obtained. Growth of the disruptants in various sugar media revealed that KmMlev2025p transported sorbitol and mannitol. To accelerate mannitol and sorbitol assimilation, Km*MLEV2025* was overexpressed. As a result, the overexpression eliminated long lag time compared with wild-type strain. Consequently, sugar alcohol transporter was identified by the developed gene disruption method and the cell growth was improved by the overexpression of the transporter.

In chapter 4, a cellobiose transporter was identified to improve cellobiose assimilation. Although *K. marxianus* strains assimilate cellobiose, the cellobiose assimilation ability of the DMKU3-1042 strain is too low. We overexpressed transporter genes derived from cellobiose high-assimilating strain in the DMKU3-1042 strain. The cell growth of 19 overexpression strain on cellobiose medium was examined. The strain overexpressing Km*STL1* showed the highest growth level. While KmStl1p is identified as a cellobiose transporter, complete cellobiose consumption of the overexpression strain required 4 days. The localization of KmStl1p fused with green fluorescent protein GFP indicated that some of KmStl1p was degraded in the cells. To stabilize KmStl1p, KmStl1p mutants was designed and their localizations were observed. As a result, KmStl1p with C-terminus deletions showed cell membrane localization and degradation. Expression of C-terminus deletion mutants accelerated cellobiose assimilation, suggesting that a terminus deletion of transporter causes stabilization of the transporter on cell membrane and improvement of cell growth efficiency.

In this study, the nutrients promoting fermentation were identified in *S. cerevisiae*. In *K. marxianus*, the transporters were identified through gene disruption and overexpression. Using the nutrients and transporters sugar utilization for ethanol production by *S. cerevisiae* and cell growth of *K. marxianus* were improved. These results contribute to accelerate sugar utilization not only in the yeasts studied here, but in many yeasts species.

(様式 9 号)

学位論文審査の結果及び最終試験の結果報告書

山口大学大学院創成科学研究科

氏 名	江部 聡
審 査 委 員	主 査：星田 尚司
	副 査：赤田 倫治
	副 査：吉本 誠
	副 査：吉本 則子
	副 査：寺内 裕貴
論 文 題 目	産業用酵母の遺伝子工学的および培養工学的手法による糖利用能の向上 (Accelerated sugar utilization of industrial yeasts through genetic and fermentation engineering)
【論文審査の結果及び最終試験の結果】 生物による物質生産においては生産物質の炭素源及び合成エネルギー源となる糖の利用速度が物質生産効率に大きく影響することから、バイオマスに由来する種々の糖の利用効率化が求められている。本研究はエタノール、酵母エキス（酵母菌体）や有用物質の生産に用いることができる産業用酵母の糖利用を促進することを目的としたものである。 第1章では酵母を用いた物質生産や、酵母ごとの資化可能な糖の違いやそれら糖の輸送体と代謝経路など、これまでの知見と課題についてまとめ、それらを踏まえた本研究の目的を述べている。 第2章では酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> のエタノール発酵を促進する培養条件の決定について述べている。世界のほぼすべてのエタノール発酵は <i>S. cerevisiae</i> が担っているが、実は発酵を促進する培養条件は明らかにされていない。それは、エタノール発酵時は常に酵母の増殖を伴っており、これまでに発酵促進に効果があるとされてきたものは、増殖に寄与しているか、発酵特異的に促進しているかが不明なためである。そこで本研究では、まず酵母が増殖せずに発酵できる条件を見出し、その条件下で発酵を促進できる物質を探索した。その結果、培養中の pH を高く維持しながら、アスパラギン酸またはグルタミン酸を存在させることが、発酵、つまり、糖の利用促進に有効であることを明らかにした。この知見は拡大するバイオエタノール生産に貢献できる。 第3章及び4章では、耐熱性があり CO₂ 排出量の少ない発酵生産系の構築に有用な酵母である <i>Kluyveromyces marxianus</i> の糖輸送体を新たに同定し、それらを改変することで糖利用を改善することに成功した。第3章では <i>K. marxianus</i> の特性を生かした新しい遺伝子破壊法を開発し、これを糖輸送体候補遺伝子に適用することで糖アルコール輸送体を新たに同定した。さらに、同定した糖アルコール輸送体遺伝子を過剰発現することで、糖アルコールの資化にかかる時間を大きく短縮した。糖アルコールを用いた培養ではエタノールは	

生産されず、菌体の生産量を高められることも明らかにした。第 4 章では *K. marxianus* が持つ糖輸送体候補遺伝子を、セロビオース輸送能を持たない *S. cerevisiae* で発現させることで、セロビオース輸送体を同定した。さらに同定したセロビオース輸送体の不安定さを遺伝子工学的に解消し、*K. marxianus* のセロビオース資化の量と速度を高めることに成功した。同じ手法により *S. cerevisiae* においてもセロビオース資化能を向上した。セロビオースは最も多く存在するバイオマスであるセルロースに由来する糖であり、セロビオース資化の促進は未利用バイオマスの活用に有効である。

第 5 章では各章の結論から論文全体を総括し、エタノール発酵を促進する培養法の工業的有効性、遺伝子同定法の使い分け、遺伝子工学的な糖輸送能向上の汎用性などについて考察している。

なお、本審査申請時の論文題目は、「産業用酵母の培養工学的および遺伝子工学的手法による糖利用能の向上」であったが、本審査会での意見を受けて、「産業用酵母の遺伝子工学的および培養工学的手法による糖利用能の向上」に修正された。英文題目は申請時から変更はない。

公聴会には 37 名の参加者があり、主な質問内容は、アスパラギン酸、グルタミン酸によるエタノール発酵の促進、高グルコース濃度条件での酵母の増殖抑制、輸送体の分解制御機構とその生理学的な意味、バイオマス中に存在する種々の糖の利用法、高濃度の糖アルコールの資化などに関するものであった。いずれの質問に対しても発表者からの的確な回答がなされた。

以上より本研究は独創性、信頼性、有効性、実用性ともに優れ、博士（生命科学）の論文に十分値するものと判断した。

論文内容及び審査会、公聴会での質問に対する応答などから、最終試験は合格とした。

なお、関連論文の発表状況は下記のとおりである。（関連論文 計 3 編、参考論文 計 0 編）

1. Satoshi Ebe, Yukie Misumi, Yuki Terauchi, Naruyuki Maruoka, Hideharu Takashita, Hisashi Hoshida and Rinji Akada. Nutrient factors specifically promoting ethanol fermentation but not growth in yeast. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 140, 3, 146-153 (2025).
2. Satoshi Ebe, Takuya Abe, Shogo Motozono, Tomoya Kagawa, Riko Kobayashi, Yuki Terauchi, Rinji Akada and Hisashi Hoshida. Identification and engineering of a cellobiose transporter KmStl1p to enhance cellobiose utilization in *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 140, 6, 386-394 (2025).
3. Satoshi Ebe, Hitomi Nakamura, Mitsunari Matsuda, Yuki Terauchi, Rinji Akada, Hisashi Hoshida. Identification and overexpression of genes encoding sugar alcohol transporter and metabolic enzymes for accelerated utilization in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *in press*.