

博士論文

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)

2026 年 3 月

江部 聡

山口大学大学院創成科学研究科

要旨

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 *Saccharomyces cerevisiae* が広く用いられている。一方で、*S. cerevisiae* 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 *Kluyveromyces marxianus* 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、*S. cerevisiae* を用いた研究は、現在の発酵生産や酵母の生産に貢献し、*K. marxianus* 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 *S. cerevisiae* と *K. marxianus* 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。

S. cerevisiae 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も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ことで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。

K. marxianus は、マンニトール、セロビオースなど *S. cerevisiae* が資化できない糖を資化することができる。しかし、*K. marxianus* 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、*K. marxianus* 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。

ABSTRACT

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 *Saccharomyces cerevisiae* has been traditionally and exclusively used. *S. cerevisiae* has high fermentative capability and cell growth capacity. Various studies have been conducted on *S. cerevisiae*. 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 *Kluyveromyces marxianus* is expected to be used in fermentative production for cost reduction. *K. marxianus* can grow using mannitol and cellobiose that *S. cerevisiae* cannot assimilate. However, the cell growth efficiency of *K. marxianus* is low using mannitol and cellobiose. In this study, the nutrient promoting fermentation was revealed using *S. cerevisiae* and cell growth efficiency of *K. marxianus* was improved for the efficient sugar utilization.

S. cerevisiae 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 *K. marxianus*. 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, KmMLEV2025 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 KmSTL1 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 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.

目次

第1章 序論.....	1
第2章 増殖せずに酵母がエタノール発酵を特異的に促進する栄養因子	
2.1 緒言.....	4
2.2 実験材料および実験操作	
2.2.1 使用培地と酵母.....	6
2.2.2 発酵条件.....	6
2.2.3 エタノール濃度の解析.....	6
2.3 実験結果	
2.3.1 YEを含む培地での発酵.....	8
2.3.2 細胞増殖条件下での発酵に必要な栄養素.....	9
2.3.3 酵母が増殖しない条件下での発酵を促進する栄養素の同定.....	10
2.3.4 pHの維持がAspによる発酵促進効果に寄与する.....	12
2.4 考察	
2.4.1 発酵および細胞増殖のための栄養素.....	15
2.4.2 AspとGluが発酵に及ぼす影響.....	16
第3章 糖利用促進のための酵母 <i>Kluyveromyces marxianus</i> が持つ糖アルコール輸送体と代謝酵素遺伝子の同定	
3.1 緒言.....	18
3.2 実験材料および実験操作	
3.2.1 使用培地と酵母.....	20
3.2.2 プラスミドおよび株の構築.....	20
3.2.3 酵素活性測定と糖濃度分析.....	21
3.3 実験結果	
3.3.1 CRISPR-Cas9とNHEJを介したマーカー遺伝子挿入を利用した遺伝子破壊.....	22
3.3.2 糖資化能欠損を示す輸送体変異体のスクリーニング.....	22
3.3.3 KmSAT1の破壊による糖アルコール消費および資化への影響.....	24
3.3.4 KmXyl2pのソルビトール脱水素酵素としての機能.....	25
3.3.5 <i>K. marxianus</i> におけるマンニトール脱水素酵素の同定.....	26
3.3.6 KmSAT1の過剰発現による糖アルコールの利用促進.....	28
3.4 考察	
3.4.1 CRISPR-Cas9とNHEJによる遺伝子破壊.....	29
3.4.2 KmSat1pと既知の糖アルコール輸送体のアミノ酸配列比較.....	29

3.4.3 <i>K. marxianus</i> における糖アルコール代謝の脱水素酵素.....	30
3.4.4 <i>K. marxianus</i> での KmSAT1 の過剰発現による糖アルコール利用促進.....	31
第4章 <i>Kluyveromyces marxianus</i> および <i>Saccharomyces cerevisiae</i> におけるセロビオース利用能向上のためのセロビオース輸送体 KmStl1p の同定と改変	
4.1 緒言.....	33
4.2 実験材料および実験操作	
4.2.1 使用培地と増殖の解析.....	35
4.2.2 株の構築.....	35
4.2.3 解析方法.....	36
4.3 実験結果	
4.3.1 <i>K. marxianus</i> におけるセロビオース輸送体の同定.....	37
4.3.2 グルコース依存的な KmStl1p の分解.....	37
4.3.3 KmStl1pC 末端変異体による酵母でのセロビオース利用能の増強.....	41
4.4 考察	
4.4.1 <i>K. marxianus</i> の主要なセロビオース輸送体をコードする KmSTL1.....	43
4.4.2 α -アレスチンにより糖依存的な制御を受けた KmStl1p の細胞膜局在.....	43
4.4.3 KmStl1p の改変によるセロビオース利用能の増強.....	44
第5章 総括	46
参考文献	48
補足資料	58
研究業績	84
謝辞	86

第1章 序論

現在、多種多様な微生物が幅広い産業で利用されている。それらの微生物の一群である酵母は、古くから発酵食品に利用され、酒類、パン、酵母エキス、醤油、味噌などの生産に現在でも利用されている。また、酵母の特長の一つであるエタノール発酵はエネルギー分野にも重要であり、バイオエタノール生産に貢献している。また酵母は、自身の細胞を作って増殖するために、アミノ酸や脂質など様々な成分を細胞内で合成する。つまり、酵母はヒトにとって栄養の集まりであり、酵母エキスとして、食品添加物、化粧品、健康食品などの製品に利用されている (図 1-1)。また、食用として熱処理した酵母の販売も行われている。さらに、遺伝子組換え技術を用いることで、酵母の産業利用は、伝統的発酵にとどまらず医療分野にまで広がっており、ワクチンタンパク質の生産にも利用されている。つまり、様々な産業に欠かせない役割を担っている。

最も酵母が利用されているのはエタノール発酵を利用したバイオエタノール生産であろう。バイオエタノールは植物などのバイオマスを原料として生産され、2022 年には世界で 1057 億トンも消費されている [1]。植物は空気中の二酸化炭素を利用して成長するため、バイオエタノール生産時に排出される二酸化炭素は成長に使われた二酸化炭素の再放出と考えられる。つまり、バイオエタノール生産は実質的な空気中の二酸化炭素量を変化させないという利点があり、近年、より注目度は高まっている。これまでのバイオエタノール生産では発酵能が高い酵母 *Saccharomyces cerevisiae* が主に利用されてきた (図 1-1)。高い発酵能に加え、高い増殖能などの特長も持つことから様々な研究に利用され、*S. cerevisiae* は育種、目的物質の高生産、遺伝子組換えなど多くのバイオテクノロジーの発展に貢献してきた。

S. cerevisiae を利用したバイオテクノロジーの発展により、現在では一部のワクチン用タンパク質も *S. cerevisiae* が生産している (図 1-1)。例えば、子宮頸がんや B 型肝炎のワクチンが既に製品として作られている。これらの製品はウイルスの遺伝子を *S. cerevisiae* に導入し、生産されるタンパク質を精製しているため、食品に広く利用されてきた *S. cerevisiae* は感染などのリスクがなく安全であるため広く利用されている。つ

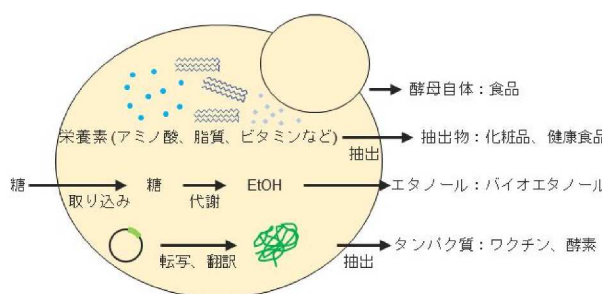


図 1-1 酵母を用いて生産される製品の酵母内での生産経路

酵母を用いて工業的に生産されるタンパク質やエタノールの生産経路と酵母が生命活動のために産生する成分の抽出を示した。薄い黄色は酵母、水色の丸はアミノ酸、濃い青は脂質、薄い青四角はビタミン、黄緑は有用タンパク質をコードする遺伝子、濃い緑は有用タンパク質を示した。

まり酵母は、酵母、バイオエタノール、タンパク質生産など多種多様な産業に利用されている。

酵母の生産、発酵生産、ワクチン生産などを行うためには、酵母のエネルギーや炭素源となる糖が必須である。*S. cerevisiae* は糖のうち、グルコース、ガラクトース、マルトースなどを取り込み、代謝することができる (図 1-2)。糖は酵母の細胞膜を貫通することができないので、酵母は糖を細胞内に取り込むための輸送体を持つ。この輸送体を介して糖が細胞内に入った後、糖をエネルギーや生体構成物質に変換する必要がある。そこで、代謝酵素が必要になる。例えば、ガラクトースは、輸送体を介して細胞内に輸送された後、ガラクトキナーゼにより、ガラクトース-1-リン酸に変換され、ガラクトース-1-リン酸ウリジリルトランスフェラーゼにより、グルコース-1-リン酸に変換され、ホスホグルコムターゼによりグルコース-6-リン酸となり解糖系に入り、増殖に利用される (図 1-2) [2]。他の糖を資化する場合も解糖系を介して、多種多様な代謝酵素によって様々な物質に変換される (図 1-2)。このことは、*S. cerevisiae* がグルコース、ガラクトース、マルトースの輸送体とそれぞれの糖の代謝酵素を持つことを示す一方で、セロビオースなどの利用できない糖の輸送体や代謝酵素は持たないことを示している。より多くの種類の糖を資化できる酵母が利用できれば、種々のバイオマスに由来する糖を原料として有効利用できるようになる。

様々な糖を資化できる酵母として *Kluyveromyces marxianus* がいる。*K. marxianus* は、グルコース、ガラクトース、マルトースに加え、*S. cerevisiae* が資化できないマンニトール、セロビオース、ラクトース、アラビノース、キシロースも資化できる (図 1-3) [3]。また、*S. cerevisiae* より優れた耐熱性も持つため [3]-[6]、*K. marxianus* を産業的に利用することで発酵プロセスの冷却コストや蒸留のための加熱コストの削減につながる [7]、[8]。しかし、*K. marxianus* はマンニトール、セロビオース、ソルビトールからエタノールを作らない。そのため、これらの糖のバイオエタノール生産への利用は困難であると考えられるが、エタノールを作らないということは炭素源を細胞外に排出しにくく、細胞の構築にこれらの糖を利用していると言い換えることができる。つまり、エタノールではなく酵母細胞や種々の物質の生産にこれらの糖は有用である。

K. marxianus の糖の資化について、セロビオース、ラクトース、アラビノースの代謝酵素の多くは他の生物が持つ代謝酵素のアミノ酸配列との比較により同定され、キシロ

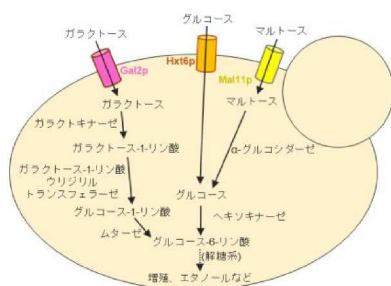


図 1-2 酵母によるグルコース、ガラクトース、マルトースの資化の経路と資化に関わるタンパク質

グルコース、ガラクトース、マルトースの酵母内への輸送から増殖やエタノールまでの資化経路とそれぞれの資化に関わる輸送体や代謝酵素を示した。橙はグルコース輸送体、桃はガラクトース輸送体、黄はマルトース輸送体、矢印は資化経路、点線の矢印は解糖系を示した。

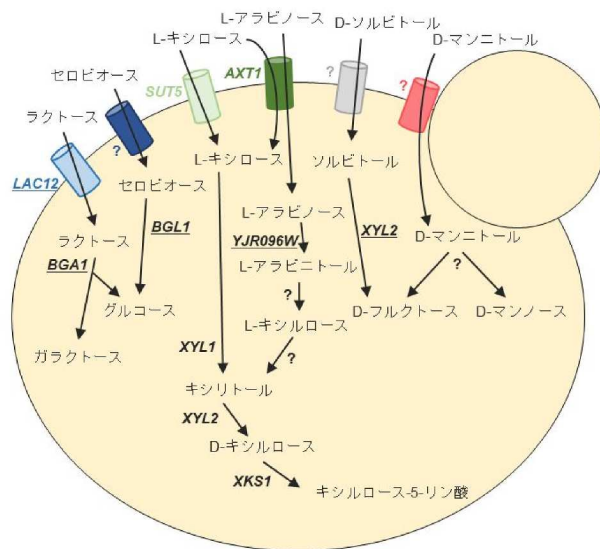


図 1-3 *K. marxianus* の 6 つの糖の資化に関わるタンパク質とその代謝経路

既に分かっているラクトース、セロビオース、キシロース、アラビノース、ソルビトール、マンニトールの資化に関わる *K. marxianus* のタンパク質とその代謝経路について示した。?は未同定の遺伝子、下線は別の生物のタンパク質との相同性から導かれた遺伝子、太字は各糖の資化に関わる遺伝子、矢印は各物質の代謝経路、薄い青はラクトース輸送体、濃い青はセロビオース輸送体、薄い緑はキシロース輸送体、濃い緑はアラビノースとキシロースの輸送体、灰はソルビトール輸送体、赤はマンノース輸送体を示した。

ースの代謝酵素は実験的に明らかとなっている (図 1-3) [9]-[12]。しかし、糖輸送体については、ラクトース輸送体 Lac12p、キシロース輸送体 Sut5p、アラビノースとキシロースの輸送体 Axt1p は同定されているが [13]-[15]、セロビオース輸送体、ソルビトール輸送体、マンニトール輸送体など多くの糖輸送体は同定に至っていない。糖輸送体や代謝酵素を同定することができれば、遺伝子工学的な糖の利用効率上昇を日指すことができる。また、代謝酵素が明らかでも細胞内に糖を取り込めなければ糖を利用することすらできないため、輸送体の同定と機能評価は重要と考えられる。

発酵能の高い *S. cerevisiae* の効率的な糖の利用はエタノール生産に重要である。また、*S. cerevisiae* が資化できない糖を資化できる *K. marxianus* を用いた糖の効率的利用は酵母や他の物質生産への貢献に期待できる。つまり、両酵母を用いれば、様々な糖を効率よく利用することができる。そこで、本研究では産業的に利用されている *S. cerevisiae* と今後利用拡大が期待されている *K. marxianus* の両酵母を用いて、糖の利用能を高めることを目指した。

第2章

非増殖条件で酵母のエタノール発酵を促進する栄養因子の同定

Nutrient factors specifically promoting ethanol fermentation but not growth in yeast

2.1 緒言

エタノール発酵は、アルコール飲料および燃料エタノールを生産する技術である。世界の年間アルコール飲料消費量は、推定で4,460億リットルに達する。近年、世界の燃料エタノール生産量は1,000億リットルを超えている [16]。このように、高い需要があるため、エタノール生産において、高い生産性、収率、費用対効果が重要な要素となる。

発酵液中の栄養素がエタノール生産に影響を与えることはよく知られている。例えば、分子レベルでは、栄養シグナルを伝達するキナーゼで制御される *RIM15* が欠損すると、日本酒のアルコール含有量が高まる [17]。エタノール発酵への栄養素の影響について様々な報告があり、実験室でのエタノール発酵において、栄養素の添加がエタノール発酵と酵母の増殖どちらにも影響することが知られている。例えば、酵母エキス (YE)、ペプトン、グルコース培地に Mg^{2+} を添加すると、細胞増殖とエタノール発酵の両方が増加する [18]。グルコース溶液に小麦ふすまやイーストナイトロジェンベース (YNB) を栄養素として加えることで、酵母の増殖とエタノール生産が増える [16]。Breisha は、炭素/窒素比や、YE とチアミンの濃度を調整することにより、30%のスクロースが完全に消費され、14%のエタノールが生産されたことを示したが、この発酵中、生細胞数は 2×10^6 /mL から 135×10^6 /mL に増加していた [20]。

アルコール飲料やそのモデルの発酵においても、栄養素は発酵だけでなく、生細胞数にも影響すると報告されている。ビール生産モデルの発酵では、Lys-Leu ジペプチドの補充により最終アルコール含有量が増加し、この時、培養液中の生細胞数も増加した [21]。合成培地を用いたワイン発酵モデルでは、グルコースとアンモニウムの濃度が発酵だけでなく、細胞増殖率、細胞生存率にも影響していた [22]。ワイン発酵中、高窒素濃度でのエルゴステロール、パントテン酸、ニコチン酸の欠乏により、細胞生存率の低下が加速し、同時に発酵レベルも下がった。つまり、これらの報告では増殖を促進する栄養素を発酵培地へ添加することで、発酵が促進されていると考えることができる [23]。

燃料エタノールの主な原料は、ブラジルではサトウキビ汁、米国では糖化デンプンである。しかし、食用の農産物をエネルギー生産に使用することは、食品や飼料の価格に関する経済問題を引き起こす。そのため、食品廃棄物を含む様々な種類のバイオマスがエタノール生産のために検討されてる [24]。ここでも培地成分の発酵への影響が調べられており、ソルガム汁のバッチ発酵では、YE の添加がエタノール生産と細胞増殖を増強した [25]。蒸気による前処理を行ったトウモロコシの茎や葉を用いた同時糖化発酵では、YE や乾燥蒸留穀物の補充がない場合、エタノール生産も増殖もしないが、こ

れらを補充すると細胞増殖とともにエタノール蓄積が生じた [26]。食品廃棄物を用いたエタノール発酵は近年注目を集めており、原料として生ごみを利用したラボスケールでの同時糖化発酵プロセスでは、グルコース消費とエタノール生産が酵母細胞数と相関していた [27]。糖を含むサイダー廃棄物は栄養素が限られているため、直接エタノール生産に使用できない。YE またはアンモニア、リン酸、マグネシウム、亜鉛から構成される栄養素の添加により、糖消費、エタノール生産量が増加するが、バイオマスの増加を伴う [28]。バイオエタノール生産において、窒素、亜鉛、マグネシウム、およびマンガンは、酵母の増殖と発酵に必須である [29]。これまでに報告された事例のすべてにおいて、エタノール生産の増加は酵母細胞数や生細胞数の増加を伴っていたため、エタノール生産を増加させる栄養素が、直接的にエタノール代謝へ影響していない可能性が考えられた。つまり、報告されている栄養素は、エタノール生産自体ではなく、細胞増殖に必要なものである可能性がある。細胞増殖に必要な栄養素と区別して、エタノール発酵に特異的に必要とされる栄養素を特定した実験は、これまで報告されていないようである。

そこで本研究では初めに、エタノール発酵に必要最低限な栄養素を調べるため、合成培地中の栄養素に基づいて、発酵と細胞増殖に必要な栄養素を決定した。増殖の影響を除いたエタノール発酵に特異的に必要な栄養素を明らかにするため、決定した培地において、グルコース濃度と植菌量を変えることで増殖しない条件を確立した。また、この培地を利用することで、発酵を効果的に促進する栄養素としてアスパラギン酸ナトリウムとグルタミン酸ナトリウムが同定できた。これらのナトリウム塩の効果の一つは発酵過程での pH の維持である。この研究の結果は、工業的なバイオエタノール発酵プロセスの最適化において非常に重要であると考えられる。

2.2 実験材料および実験操作

2.2.1 使用培地と酵母

焼酎製造に用いられる酵母 *Saccharomyces cerevisiae* RIB1019 株を酒類総合研究所から入手して用いた。前培養として、この株を YPD 培地 (1%YE、2%ペプトン、2%グルコース) に植菌し、30°C、150 rpm で培養した。培養時間は、利用する菌量が少量の時は 24 時間、多量の時は 48 時間とした。栄養混合物である AY の組成を表 2-1 に示した。AY 中の栄養素は 4 つのサブグループに分類した (表 2-1)。この分類は大まかに培地で使用される量に基づいている。各グループに含まれる全栄養素を含む溶液を調製し、発酵用栄養素として添加した。Y+3 培地の組成は 2.0 g/L YE、1.0 g/L KH_2PO_4 、0.50 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、5.0 g/L アスパラギン酸ナトリウムである。

2.2.2 発酵条件

前培養液を 50 mL チューブに回収し、室温で 6300×g、30-60 s 間遠心分離した。上清を取り除き、酵母を水、培地、または 130 mM MES-KOH (pH 5.4) の液に再懸濁した。高密度に細胞を懸濁した液を植菌液として調製した。懸濁液の 600 nm における濁度 (OD_{600}) は、適切な希釈後、分光光度計 (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。 OD_{600} を測定し、植菌に使用する細胞懸濁液量を決定した。例えば、本培養のために $\text{OD}_{600}=2$ の発酵培地を調製する場合、 $\text{OD}_{600}=10$ の前培養懸濁液 1 mL を 200 mL ガラス瓶に入れ、栄養分を加えた後、細胞懸濁液調製に使用した溶液と同一の溶液を用いて発酵培地の体積を 5 mL に調整した。高濃度の YE、ペプトンまたはビタミンと Fe と Zn の混合物 (表 2-1、VitFeZn) 溶液を調製し、添加した。その他の栄養素またはその混合物は粉末または顆粒として添加した。グルコースも顆粒として 5 mL 溶液に添加した。したがって総容量は 5 mL から変化することから、グルコース濃度は重量パーセントで示した。瓶はシリコンチューブがついたキャップで密閉し、30°C で 60 rpm の往復振盪下で培養した。瓶内の酸素消費により嫌気条件で培養を行った。発酵中に発生したガスを Fermograph II-W (ATTO) のマノメーターの 1 つに導入し、発酵を定量した。ガスの量は 30 分毎に測定し、それらの値の合計をグラフ化した。各条件下で発酵を少なくとも 3 回実施し、平均値と標準偏差を示した。

2.2.3 エタノール濃度の解析

培養上清中のエタノール濃度は、SHIM-PACK SPR-Pb 250 mm×7.8 mm カラム (島津製作所) を搭載した高速液体クロマトグラフィーシステム (島津製作所) を用いて測定した。各試料 10 μL を注入し、屈折率検出器 RID-10A (島津製作所) を用いてエタノールを検出した。カラム温度は 80°C に維持した。移動相には超純水を用い、流量 0.6 mL/min で流した。

表 2-1 AY の成分とサブグループの構成

サブグループ	栄養素	濃度 (g/L)
KPMAAI	KH ₂ PO ₄	1.00
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.50
	アスパラギン酸ナトリウム一水和物	5.00
	アルギニン塩酸塩	10.00
	リジン塩酸塩	1.00
	プロリン	1.00
	グルタミン酸ナトリウム一水和物	1.00
	メチオニン	0.10
	グリシン	0.10
	myo-イノシトール	1.00
10AA	アラニン	1.00
	イソロイシン	1.00
	フェニルアラニン	1.00
	バリン	1.00
	N-アセチルチロシン	1.00
	セリン	0.50
	スレオニン	0.50
	アスパラギン一水和物	0.50
	グルタミン	5.00
	システイン塩酸塩一水和物	0.01
5AB	ロイシン	5.00
	トリプトファン	0.10
	ヒスチジン塩酸塩	0.10
	アデニンヘミ硫酸塩	0.10
	ウラシル	0.10
VitFeZn	パントテン酸カルシウム	4000.0 × 10 ⁻⁶
	ニコチン酸	4000.0 × 10 ⁻⁶
	ピリドキシン塩酸塩	400.0 × 10 ⁻⁶
	チアミン塩酸塩	400.0 × 10 ⁻⁶
	ビオチン	2.0 × 10 ⁻⁶
	塩化鉄 (III) 六水和物	4000.0 × 10 ⁻⁶
	硫酸亜鉛七水和物	400.0 × 10 ⁻⁶

2.3 実験結果

2.3.1 YE を含む培地での発酵

低植菌量条件 ($OD_{600}=2$) で 9.1% グルコース溶液培地において、栄養素の添加による発酵への影響を調べた (図 2-1A)。エタノール発酵の指標としてガス発生量を測定した。栄養素を添加していない培地では酵母はほとんどガスを発生しなかった。一方、9.1% グルコース培地に 1% YE と 2% ペプトンを添加した (YP) 場合、8 時間で約 110 mL のガスが発生し、この条件下では YE とペプトンに含まれる複数の栄養素が発酵に必要であることがわかる。さらに、9.1% グルコースのみ (添加なし) と YP 培地における 24 時間

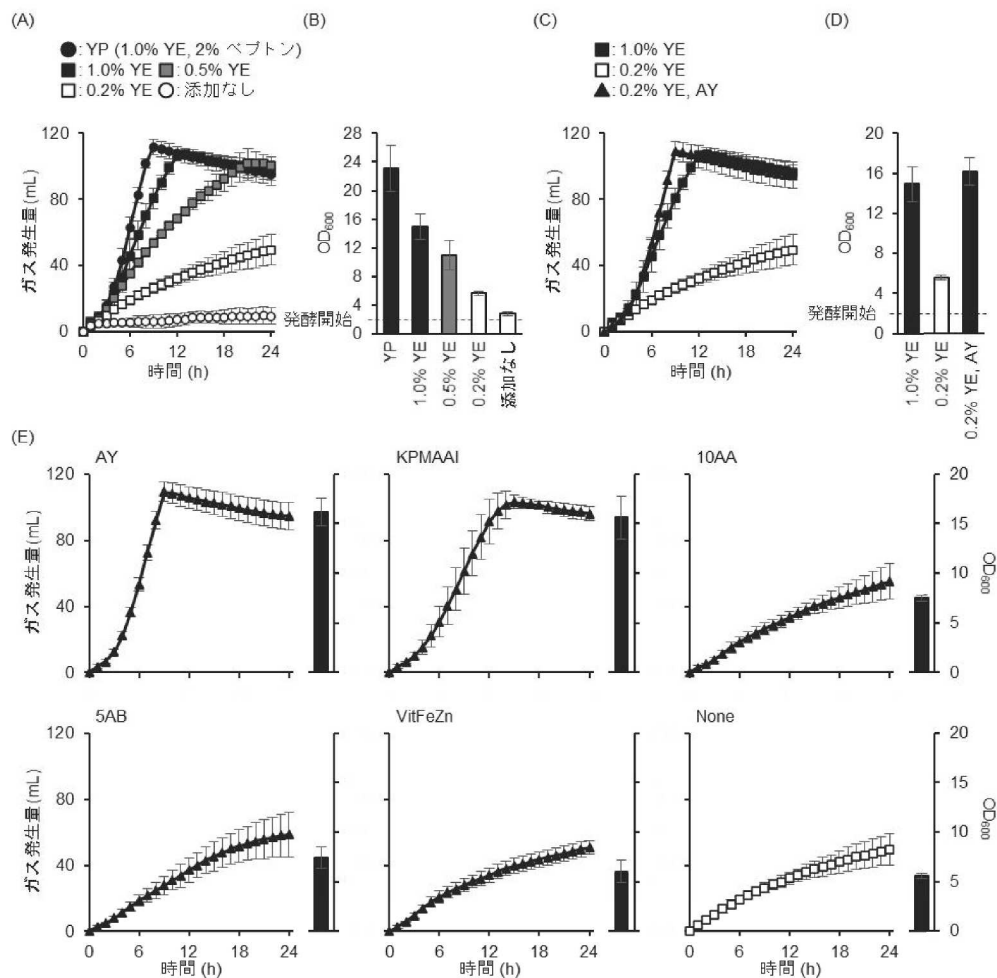


図 2-1 天然培地と半合成培地が発酵に及ぼす影響

天然栄養素および化学的栄養素を添加した 9.1% グルコース培地に酵母を植菌した。発酵実験を 3 回繰り返し、Fermograph II を用いてガス発生量を記録した。1 時間毎の平均値と標準偏差をプロットした (A, C)。各培地における 24 時間後の OD₆₀₀ も測定し、平均値と標準偏差を棒グラフで示した (B, D)。YP (1% 酵母エキス (YE) と 2% ペプトン)、示した濃度の YE または AY を 9.1% グルコース溶液に添加した。(E) AY 中の栄養素を 0.2% YE を含む 9.1% グルコースに添加し、発酵に使用した。発酵および OD₆₀₀ はパネル A に示すように測定した。AY 中の栄養素サブグループの組成を表 2-1 に示した。

後の細胞増殖 (OD_{600}) は、それぞれ 3 と 23 であった (図 2-1B)。YP からペプトンを除去 (1.0%YE) しても、YP の添加と比較して最大ガス発生量に大きな影響は認められなかったが、発酵速度はわずかに遅延した (図 2-1A)。そこからさらに、YE の量を減少させると発酵速度と最大ガス発生量が低下し、0.2%YE による増強効果は小さかった (図 2-1A)。特に、YE の減少に伴い発酵中の細胞増殖が低下した (図 2-1B)。これは効率的な発酵に酵母の増殖が必須であることを示唆する。これらの条件下でのエタノール生成量およびグルコース消費量は、最大ガス発生量と一致していた (補足図 S2-1)。これらの結果は、YE が細胞増殖を伴う効率的な発酵に必須の栄養素を含んでいることを示している。

2.3.2 細胞増殖条件下での発酵に必要な栄養素

発酵に必要な栄養素を特定するため、合成栄養混合物 AY (表 2-1) 中の化学物質の発酵への効果を調べた。2%グルコースと AY からなる培地において、2%グルコースと YP からなる培地と同等の良好な増殖を示した (補足図 S2-2)。9.1%グルコースに 0.2%YE を加えた培地に AY の全栄養素を添加すると、発酵と細胞増殖が著しく促進された (図 2-1C、D)。ガス発生量は 10 時間以内に 109 mL でピークに達した。これらの結果は、少量の YE を含む 9.1%グルコース培地において、AY が酵母の増殖を伴う最大ガス発生レベルに達するために十分な栄養素を含んでいることを示している。

AY には KH_2PO_4 、アミノ酸、ビタミン、金属イオンを含む 32 種類の栄養素が含まれる (表 2-1)。効率的な発酵に必要な栄養素を特定するため、AY の栄養素を KPMAAI、10AA、5AB、VitFeZn の 4 群に分類した (表 2-1)。各栄養素群を 0.2%YE を含む 9.1%グルコースに添加し発酵を調べた (図 2-1E)。KPMAAI はガス発生量が AY と同等であったが、ガス発生速度はやや低下した。一方、他の群では発酵レベルが低く速度も遅く、KPMAAI 中の栄養素の一部が完全な発酵に十分であることがわかった。栄養素を特定するため、KPMAAI 中の各栄養素を除去した。最大ガス発生量は大きく影響を受けなかった (図 2-2A 上)。しかし、ガス発生量が最大となる時間 (最大ガス量時間) は変動した (図 2-2A 下)。最大ガス発生量は栄養素除去の影響を受けなかったことから、最大ガス量時間が発酵速度に相当することを示唆している。グルタミン酸ナトリウム (Glu) やアルギニン塩酸塩 (Arg) などの栄養素の除去は最大ガス量時間に影響しなかった。対照的に、アスパラギン酸ナトリウム (Asp)、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (Mg)、myo-イノシトール (Ino)、 KH_2PO_4 の欠如は発酵を遅延させ、ガス発生量が最大となるまで 16 時間以上を要した。これはこれら 4 つの栄養素が効率的な発酵に重要な役割を果たすことを示唆している。4 種の栄養素の影響を調べるため、各栄養素を 0.2%YE を含む 9.1%グルコース培地に添加し、発酵を調べたが、発酵への影響は最小限であった (補足図 S2-3)。そこで栄養素を組み合わせた (図 2-2C)。Asp だけを添加しても発酵は促進されなかったが、Mg と Asp のを組み合わせるとガス発生量は 45 mL から 89 mL へ著しく増加した。さらに

KH₂PO₄と Ino を添加すると発酵速度がわずかに増加し、4 栄養素全てを配合すると KPMAAI と同等の発酵速度と最大ガス発生量が得られた。これらの結果は、Asp と Mg が効率的な発酵に必須である一方、KH₂PO₄と Ino は補助的な役割であることを示唆する。ここで注意すべきこととして、栄養素数の増加に伴い酵母の増殖が促進された点が挙げられる (図 2-2C)。

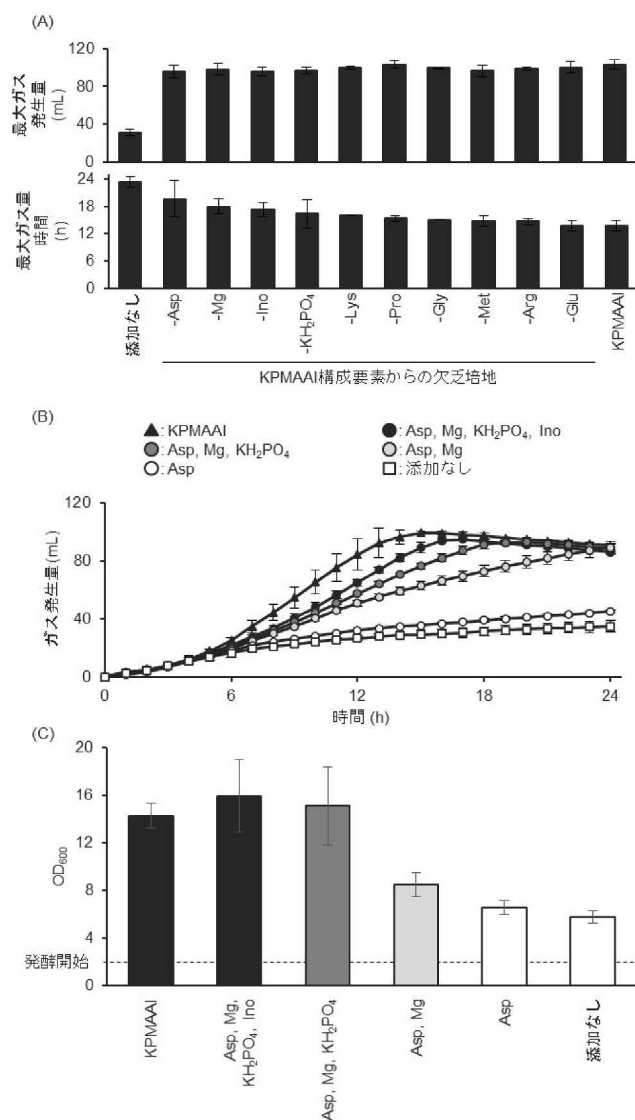


図 2-2 KPMAAI の栄養素が発酵に及ぼす影響

(A) 示した栄養素を除去した培地における発酵を測定した。最大ガス発生量および最大ガス発生時間が最大となる時間 (最大ガス量時間) を決定した。KPMAAI から除去された栄養素を示した。コントロールとして、KPMAAI の栄養素を添加しない条件 (添加なし) でも行った。Lys : リジン塩酸塩、Arg : アルギニン塩酸塩。(B) 0.2% YE と 9.1%グルコース培地に示した栄養素を添加した時の発酵。(C) パネル B の発酵中の細胞増殖。発酵終了時 (24 時間) に OD₆₀₀ を測定。初期 OD₆₀₀ は点線で示す。発酵は 3 回実施し、平均値と標準偏差を示した。

2.3.3 酵母が増殖しない条件下での発酵を促進する栄養素の同定

前述のように、酵母が培地中で増殖すると、効率的な発酵を示した。これは酵母細胞数が効率的な発酵の要因であることを示唆している。細胞量の影響を調べるため、植菌量を増加させ、1.0%YE を添加した 9.1%グルコース培地、または 0.2%YE、Asp、Mg、KH₂PO₄からなる栄養混合物 (Y+3) を添加した培地で発酵を測定した (補足図 S2-4A)。

植菌量を増加させることで、最大ガス量に到達する時間が短縮された。これらの条件下で酵母は増殖したことから (補足図 S2-4B)、植菌量 $OD_{600}=2$ の条件下では発酵効率が増殖に依存する可能性が示唆された。さらに、1.0%YE と Y+3 の差が縮小した。

植菌量を 16 および 32 の条件下でグルコース濃度を増加させた (補足図 S2-5、S2-6)。グルコース濃度の上昇に伴い発酵速度は低下した。しかし、Y+3 を添加した場合でも、最大ガス発生量およびエタノール生産量はグルコース濃度 28.6%まで一貫して増加を示した。これは、Y+3 の栄養素がグルコース濃度 28.6%までエタノール発酵能を維持するのに十分であることを示している。さらに、28.6%および 37.5%グルコース濃度では、どちらの植菌量条件においても酵母の増殖が減少した (補足図 S2-5B、C)。これらの結果から、高グルコース濃度および大量植菌条件にすることで酵母の増殖が抑制され、発酵に必須の栄養素を解析するのに有用であることを示唆している。

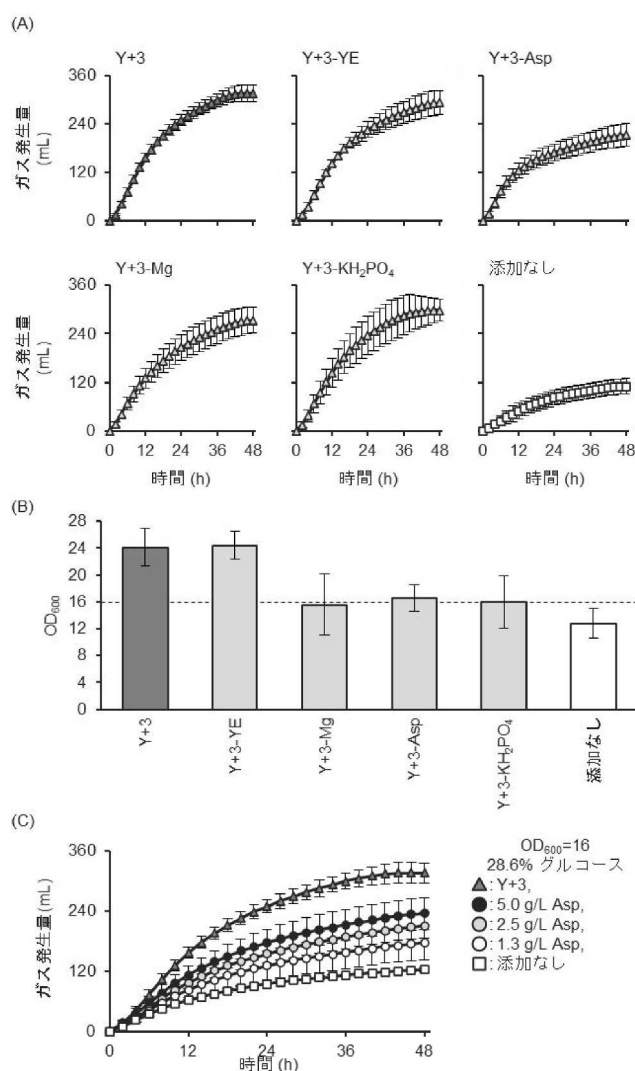


図 2-3 Asp による発酵促進効果

(A) Y+3 およびその構成成分を 1 成分欠いた混合栄養物を添加した 28.6%グルコース培地における発酵。植菌量は OD_{600} で 16 とした。(B) パネル A の培養 48 時間後の OD_{600} 。(C) Asp の濃度の影響。Asp は 5.0 g/L (●)、2.5 g/L (○)、1.3 g/L (○) の濃度で 28.6%グルコース培地に添加した。発酵は 3 回実施し、平均値と標準偏差を示した。

酵母が増殖しない条件で発酵に必要な栄養素を特定するため、Y+3 中の栄養素を除去し、植菌量 16 およびグルコース濃度 28.6%で発酵を測定した (図 2-3A)。YE、Mg、KH₂PO₄の除去は発酵にほとんど影響を与えなかった。一方、アスパラギン酸ナトリウム欠損培地 (Y+3-Asp) では最大ガス発生量が約 320 mL から約 210 mL に減少した。この結果は Asp が効率的な発酵に必要なことを示している。さらに、Asp、Mg、KH₂PO₄を除去すると細胞増殖が極めて弱くなった (図 2-3B)。この現象は YE の除去では見られなかった。

Asp 単独添加の効果を評価するため、5 g/L の Asp を含む 28.6%グルコース培地での発酵を調べた。Asp の添加により、グルコース培地と比較して発酵が 1.9 倍促進された (図 2-3C)。2.5 g/L の Asp でも同様の増強効果が認められた (図 2-3C)。さらに、Asp を含む 28.6%グルコース中では発酵中に酵母は増殖しなかった (補足図 S2-7)。他のアミノ酸が発酵に及ぼす影響を観察するため、28.6%グルコースに 2.5 g/L のアミノ酸を添加した (図 2-4)。グルタミン酸ナトリウム (Glu) と Asp を除き、他のアミノ酸の発酵促進効果は有意ではなかった。これらの結果は、発酵と細胞増殖が分離可能であり、高グルコース濃度かつ大量植菌条件下では Asp が発酵を促進するが増殖は促進しないことを示している。システインがエタノール発酵に悪影響を与える理由は後述する。

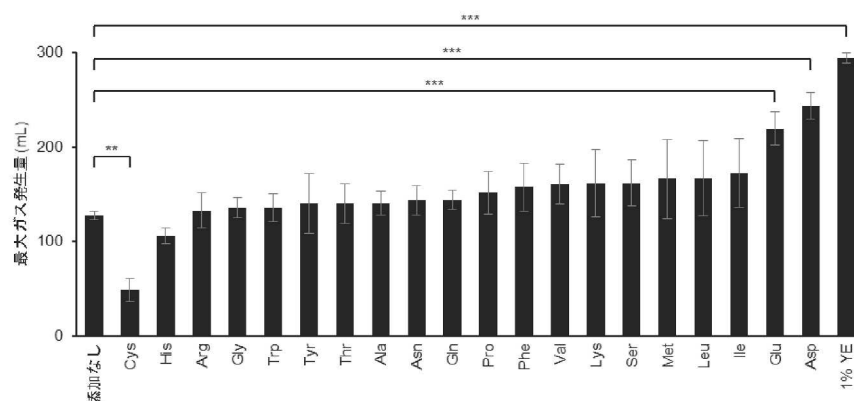


図 2-4 アミノ酸が発酵に及ぼす影響

28.6%グルコースと 2.5 g/L のアミノ酸を含む培地を使用した。アミノ酸の代わりに YE (1%) も使用した。植菌量は OD₆₀₀ で 16 とした。最大ガス発生量は図 2-2A に示すように測定し、3 回繰り返した。平均値と標準偏差を示した。Cys : システイン塩酸塩一水和物、His : ヒスチジン塩酸塩、Arg : アルギニン塩酸塩、Lys : リジン塩酸塩。統計的有意性はダネットの多重比較検定により評価し、有意水準は $p < 0.001$ を***、 $p < 0.01$ を**で示した。

2.3.4 pH の維持が Asp による発酵促進効果に寄与する

Asp の発酵への影響を分析するため、Asp をアスパラギン酸 (AspF) と塩化ナトリウム (NaCl) に置き換えた。置換した濃度は 2.5 g/L Asp を基準に、それぞれ AspF 2.1 g/L、NaCl 0.93 g/L とした。グルコース培地において、AspF または NaCl、あるいは両方の添加による顕著な発酵増加は見られなかった (図 2-5A)。Asp は弱塩基性を示す。Asp の添加により発酵前の培地の pH は 4.32 から 4.95 になり、発酵後は 3.03 から 3.55 に変化

した (表 2-2)。一方、AspF および NaCl は培地の pH を塩基性側に上昇させなかった (表 2-2)。培地の pH の影響を調べるため、AspF と NaCl を添加した培地の pH を MES-KOH で 5.4 程度に調整した。この培地での発酵は Asp 添加時と同等であった (図 2-5B)。AspF、Na、pH 調整の効果を個別に確認するため、これらのパラメータを単独で試験した (図 2-5C)。MES-KOH による pH 調整によりガス発生量は約 174 mL に増加した。一方、28.6% グルコース培地では 107 mL であった。pH 調整済みの培地に NaCl を添加しても、ガス発生量のさらなる増加は見られなかった。これに対し、AspF は pH 調整済みグルコース培地と比較して約 42 mL のガス発生量増加をもたらした (図 2-5C)、発酵レベルは Asp の添加時と同等であった。培養液の pH (3.65 ± 0.042) は Asp 添加時 (pH 3.55、表 2-2) と類似していた。Glu は pH 調整培地において発酵を顕著に促進しなかった (補足図 S2-8)。アルカリ性化合物で pH を調整した培地でも発酵を調べた (図 2-5D)。KOH の添加により培地の初期 pH は 10.19 に変化した (表 2-3)。このアルカリ性 pH は発酵を阻害せず、効率的な発酵期間はグルコース培地よりも長く、ガス発酵量は 207 mL に達した。48 時間後、培養液の pH は 3.97 に達した。28.6%グルコース培地において 24 時間後に同量の KOH を添加した場合もガス発生が促進され、48 時間で合計 198 mL のガスが生成された。グルコース培地の pH は 24 時間後に 3.26 となり、ガス発生速度は低下した。24 時間後に KOH を添加すると pH は 4.86 に変化した、発酵速度は回復した (表 2-3 および図 2-5D)。これらの結果は、培地の pH が発酵における重要な因子であり、pH が維持された培地において Asp がポジティブな効果を持つことを示している。

表 2-2 発酵中の Asp、NaCl、AspF の添加による pH への影響

測定時間	加えた成分				
	添加なし	AspF	NaCl	AspF NaCl	Asp
0 h (発酵前)	4.32±0.879	3.35±0.265	3.97±0.618	3.43±0.586	4.95±0.250
48 h (発酵後)	3.03±0.035	3.13±0.119	2.89±0.115	2.93±0.071	3.55±0.204

表 2-3 発酵中の KOH の添加による pH への影響

加えた溶液または 操作	添加時間 (h)	測定時間 (h)			
		0	24		48
			添加前	添加後	
2 M KOH 100 μ L	0	10.19±0.095	データなし	データなし	3.97±0.098
2 M KOH 100 μ L	24	4.41±0.526	3.26±0.173	4.86±0.162	4.41±0.056
滅菌水 100 μ L	24	4.41±0.520	3.26±0.162	3.27±0.172	3.22±0.180
蓋開封	24	4.34±0.306	データなし	データなし	3.12±0.025
添加なし	-	4.53±0.696	データなし	データなし	3.11±0.080

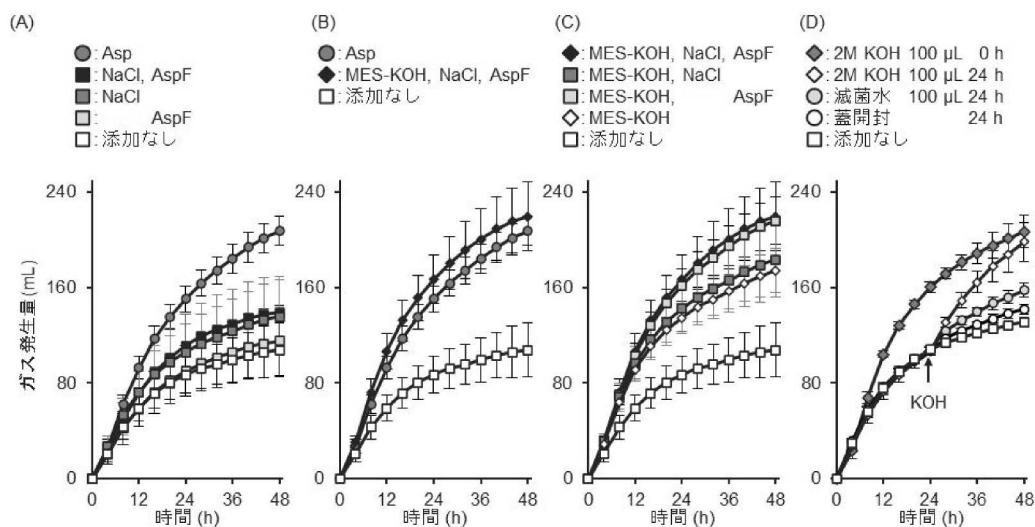


図 2-5 AspF の添加および pH 維持による発酵促進効果

(A-C) 28.6%グルコース溶液に、示した栄養素や pH 維持用溶液を添加した。OD₆₀₀ が 16 の植菌量で発酵を行い、記録した。(D) 28.6%グルコース溶液に、示した KOH を添加した。OD₆₀₀ で 16 の植菌量を用いて発酵を行い、記録した。24 時間後に KOH を添加するため、瓶を開封し、2 M KOH または滅菌水 100 μ L を添加した (矢印)。蓋を閉めた後のガス発生量を測定した。別の瓶で、0 時間に 2 M KOH 100 μ L を添加し、48 時間蓋を開けなかった (◆)。発酵は 3 回実施し、平均値と標準偏差を示した。

2.4 考察

2.4.1 発酵および細胞増殖のための栄養素

多くの研究で酵母によるエタノール発酵を調べられ、発酵に対する栄養素の影響が分析されている [19]-[30]。しかし、エタノール生産量の増加は細胞増殖や生存細胞数の増加を伴っており、これは栄養素が発酵に直接及ぼす影響は明らかではないことを示唆している。一般的な発酵条件下では、酵母は糖をエタノールに変換するだけでなく、発酵培地中の栄養素の助けにより増殖にも糖を利用している。本研究では、高グルコース濃度下で酵母の増殖が抑制された。さらに、大量の植菌により発酵に必要な栄養素の分析が可能となった。この条件下で栄養素を順次除去した結果、Asp が発酵を促進する化合物として同定された。この条件下では細胞数 (OD_{600}) が増加せず、Asp が細胞増殖に影響を与えずに発酵を促進する栄養素であることを示している。

ブラジルの工業用エタノール発酵では、高濃度の糖と酵母が細胞増殖を抑制し、酵母バイオマス向けの炭素供給を減少させることで高いエタノール収率をもたらすことが報告されている [30]、[31]。典型的なブラジルの産業プロセスを模倣したラボスケールの発酵において、糖の量が合計の約 1/5 と 10% (w/v) の酵母を植菌した場合、酵母を再利用した発酵を 5 サイクル実施した後の増殖率はわずか 8.2% であった [32]。糖はサトウキビジュースと糖蜜の混合物として供給された。これらの原料には窒素、ミネラル、ビタミン、糖類が含まれるが、酵母の増殖は抑制されることになる [33]。本研究では、 OD_{600} が 32 において 1.0% の YE を添加した 28.6% グルコース溶液中で増殖は見られなかった。つまり、高い糖濃度と大量の酵母は、エタノール発酵以外の酵母代謝を阻害することを示している。

低植菌量条件下では、エタノール発酵レベルは酵母の増殖と一致していた (図 2-1、図 2-2)。9.1% グルコースと 0.2% YE に AY を添加した場合、発酵終了時のガス発生量と OD_{600} は 9.1% グルコースと 1.0% YE の場合と同等であった (図 2-1C、D)。これは合成栄養混合物 AY が、発酵および細胞増殖において 1% YE と同等の栄養素を含むことを示している。発酵に必要な栄養素を特定するため、AY の 4 つの栄養のサブグループについて発酵試験を行った。KPMAAI は AY と同等の発酵レベルを示したが、他のサブグループは示さなかった (図 2-1E)。グラフの傾きは発酵速度を示す。10AA、5AB、VitFeZn の発酵速度は AY および KPMAAI と比較して非常に遅かった。発酵のレベルと速度は発酵終了時の OD_{600} と一致しており、効率的な発酵には多数の細胞が生成される必要があることを示唆している。KPMAAI における最大ガス量時間は AY と比較して 7-8 時間遅延したが、最大ガス発生量は同等であった。本研究では、ガス発生量を測定するため密閉瓶で発酵を行ったため、発酵中の増殖は測定できなかった。KPMAAI を用いた場合の増殖は AY よりも遅い可能性がある。これらの結果は、効率的な発酵に十分な数の細胞を生産するために必要な栄養素の大部分が KPMAAI に含まれていることを示している。

高濃度のグルコースと大量の酵母植菌条件下での増殖を測定すると、28.6%グルコースと Y+3 で培養した酵母は 0.2%YE を除去しても増殖は阻害されなかった (図 2-3B)。しかし、Mg、Asp、 KH_2PO_4 の 3 栄養素のうちいずれか 1 つを除去すると、0.2% YE が存在しても増殖は完全に阻害された。-Asp、-Mg、- KH_2PO_4 での培養の最終 OD_{600} はそれぞれ 15.6、16.6、16.0 であった。これらの結果は、3 つの栄養素が細胞増殖に必須であることを示している。また、これらの栄養素は低植菌量条件下での効率的な発酵にも必要である (図 2-2)。Asp は窒素源として利用される可能性がある。Asp を窒素源として代謝するには Mg と KH_2PO_4 が必要である。Asp の存在下でこれらを除去すると増殖が停止した (図 2-3B)。リン酸塩は核酸合成に必須である。Y+3 培地で KH_2PO_4 を NaH_2PO_4 に置換しても最終 OD_{600} はわずかに低下したのみであった (図表なし)。これは細胞増殖に必須なのはリン酸塩でありカリウムではないことを示唆する。Mg は増殖に必須であるとともに [29]、DNA 合成や ATP 合成など多様な代謝反応に関わる 300 以上の酵素の補因子として機能する [34]。細胞増殖に不可欠な代謝反応を行うためには、Asp などの窒素源、Mg、 KH_2PO_4 が必要となる。

2. 4. 2 Asp と Glu が発酵に及ぼす影響

Asp と Glu は酵母が増殖しない条件下で発酵を促進した。図 2-2A に示すように、Glu を除去しても最大ガス発生量に達するまでの時間は延長されなかった。KPMAAI 培地には比較的多量の Asp が含まれるため、Glu の除去が発酵に影響を与えなかった可能性がある。これらのナトリウム塩を培地に添加すると、培養液の初期および最終 pH が上昇した。緩衝液 (MES) による pH 維持も発酵を促進した。KOH 添加による pH 調整では、Asp 添加時と同等の発酵レベルが得られた。これらの結果は、効率的な発酵にはより高い pH が必要であることを示唆する。Caspeta らは、9.1%グルコースを含む合成培地において、グルコースの消費が不完全になり、エタノール蓄積が停止することを報告している [35]。この時の培地の初期 pH は 5 であったが、発酵中に 3.5 を下回った。対照的に pH 6 では 15%グルコースの完全消費とともに 6%エタノールが生産された。Lin らは pH4.0-5.0 がエタノール発酵に最適と報告している [36]。両研究で使用された発酵条件下では酵母が増殖した。したがって、pH が発酵に及ぼす具体的な影響は不明なままであった。リン酸カリウム緩衝液で pH を維持した場合、ガス発生量は促進されなかった (補足図 S2-9A)。リン酸カリウムは低植菌条件下における酵母の増殖に必要な栄養素であり、細胞に悪影響を及ぼすことはないと考えられる。リン酸カリウム緩衝液が発酵促進に適さない理由は明らかではないが、効率的なエタノール発酵を達成するためには pH 維持の方法を検討する必要がある。

MES を加えたグルコース溶液への AspF の添加は発酵を促進した。さらに、Asp の添加は KOH の添加よりも発酵促進効果が高いようである。これらの結果は、Asp が pH 維持だけでなく栄養源としても機能する可能性を示唆した。Asp が栄養源として機能する

かを確認するため、MES を加えたグルコース溶液中における L-AspF および D-AspF の発酵への影響を測定した。その結果、図 2-5C に示すように L-AspF は発酵を促進したものの、D-AspF は発酵を阻害する効果を示したことから、結論には至らなかった (補足図 S2-9B)。Asp の栄養源としての役割を解明するには、さらなる解析が必要である。

本研究ではシステイン塩酸塩をシステインとして使用した。システイン塩酸塩の添加により pH が 2.4 に低下し、これが発酵低下の一因と考えられる (図 2-4)。YE、ペプトン、マルトデキストリンからなる天然培地では、pH4 におけるエタノール生産量は pH4.5-5.5 と比較して低下した [37]。したがって、低い pH でのエタノール生産量低下は、本研究で使用了栄養制限培地特有のものではないと言える。Y+3 におけるガス発生量と生存細胞数の増加が、+2.5 g/L Asp と比較して同等であった点は注目に値する (図 2-3C および補足図 S2-7)。さらなる発酵の増強には、発酵過程で生成される新鮮な酵母が必要となる可能性がある。

Lam らは pH の上昇に伴い生存細胞数が増加することを報告している [38]。我々は Asp 添加により生存細胞数が維持される可能性があると考え、発酵後の生存細胞数を調べてみたが、Asp の有り無しに関わらず同程度であった (図表なし)。これは Asp が細胞生存率を向上させる役割ではないことを示唆する。これはまた、Asp を含まない 28.6% グルコース培地中の酵母は生存しているものの、おそらく低 pH のためグルコースをエタノール生産に利用できないことを示唆している。

酸性 pH における酵母のプロトン恒常性は、プロトンポンプ Pma1p による排出と受動拡散による流入によって維持されるが、エタノールの存在はこのバランスを乱す [39]。28.6%グルコース培地における最終エタノール濃度は約 8%であった。この濃度では、30°C においてプロトン排出は約半分に減少するが、プロトン流入は影響を受けない [40]。発酵が進むにつれ、細胞内および細胞外 pH は酸性化する可能性があり、低い細胞内 pH はエタノール生成のための酵素活性を阻害するかもしれない。グルコース培地での発酵低下に関する別の可能性として、糖輸送障害が考えられる。*S. cerevisiae* は 20 種類のヘキソース輸送体を有する [41]。このうち Hxt1p、Hxt2p、Hxt3p、Hxt4p、Hxt5p、Hxt6p、Hxt7p は、濃度勾配に依存する受動輸送を行う促進輸送体である [42]、[43]。グルコース輸送にプロトン濃度勾配は必須ではないが、低 pH 条件下では促進輸送体の活性が阻害される可能性も考えられる。

酵母によるエタノール発酵に必要な栄養素は特定されていなかった。本研究では、増殖しない条件下で発酵を効果的に促進する栄養素としてアスパラギン酸ナトリウムとグルタミン酸ナトリウムが同定された。これらのナトリウム塩の効果の一つは、発酵過程における pH の維持である。本研究の知見は酵母代謝の理解を深めることに寄与し、バイオエタノール生産や工業発酵プロセスへの応用が期待される。

第3章

糖利用促進のための酵母 *Kluyveromyces marxianus* が持つ

糖アルコール輸送体と代謝酵素遺伝子の同定

Identification and overexpression of genes encoding sugar alcohol transporter and metabolic enzymes for accelerated utilization in the yeast *Kluyveromyces marxianus*

3.1 緒言

Kluyveromyces marxianus は耐熱性を持つエタノール生産酵母である。高温発酵に *K. marxianus* を用いる場合、耐熱性を持つため、*Saccharomyces cerevisiae* を用いた従来のエタノール発酵と比較して、冷却コストと二酸化炭素排出量を削減できる [7]、[8]、[44]。さらに、*K. marxianus* はキシロース、キシリトール、アラビノース、ソルビトール、ラクトース、セロビオースなど多様な糖を資化できる [3]。広範囲な糖資化能は、様々なバイオマスを原料とした有用物質のバイオプロダクションに有利である。

K. marxianus のゲノム配列解析により、*K. marxianus* が利用する糖の代謝経路に関わる遺伝子が保存されていることが明らかになった [9]。さらに、ガラクトース、マンノース、キシロース、アラビノース、スクロース、ラクトース、セロビオースの代謝に関わる遺伝子の存在も明らかになった。これらの糖のうち、キシロース代謝に必要な遺伝子の機能は、キシロース還元酵素、キシリトール脱水素酵素、キシルロキナーゼについてはそれぞれをコードする *KmXYL1*、*KmXYL2*、*KmXKS1* を破壊することでキシロース代謝に必須であることが検証された [10]-[12]。また、*KmINU1* がコードする細胞外酵素はスクロース資化に必須であることも遺伝子破壊により示されている [45]。これまでに同定されている遺伝子との高い相同性は、これらの遺伝子が糖代謝に関与していることを強く示唆するが、その他の糖代謝関連遺伝子は実験的に機能の同定がされていない。

一方、糖の資化には輸送体が必須である。*K. marxianus* ゲノムでは 27 の輸送体候補遺伝子がアノテーションされている [9]。このうち、他に 3 つの相同遺伝子を持つ *KmLac12p* は遺伝子破壊により主要なラクトース輸送体であることが明らかになった [13]。また、キシロース、キシリトール、アラビノース代謝に関わる複数のペントース輸送体も、CRISPR-Cas9 システムを用いて 12 個の輸送体を除去した変異体で同定された [14]。しかし、他の糖輸送体の機能は実験的に決定されていない。

ペントース輸送体を同定した Donzella らの研究と同様に、*K. marxianus* での CRISPR-Cas9 システムが利用可能である [14]。CRISPR-Cas9 と修復による繰り返しの切断で生じる突然変異を利用した遺伝子機能の破壊である遺伝子編集技術である CRISPR-Cas9 システムを用いて、*KmADH2* と *KmATF1* がそれぞれエタノール及び酢酸エチル生産に果たす役割を評価した [46]。遺伝子編集に加え、CRISPR-Cas9 システムを用いた標的遺伝子の組換えも効率的に行われている [47]-[51]。一般的に標的破壊のためには標的部位に相同な配列を持つ DNA 断片が調製される。なぜなら、CRISPR-Cas9 での DNA の切

断後の標的部位への DNA 導入は相同組換えに依存するためである。本研究で使用した *K. marxianus* は高い非相同末端結合 (NHEJ) 活性を持ち、酵母における組換えプラスミド構築に利用可能なほどである [52]。高い NHEJ 活性は相同組換えを阻害すると考えられるが [53]、NHEJ は CRISPR-Cas9 による標的部位切断を介した遺伝子破壊にも利用できる可能性が考えられた。

そこで本研究では、NHEJ を利用して新たな CRISPR-Cas9 システムを開発した。従来のシステムとは異なり、相同配列を持たないマーカー遺伝子を用いて遺伝子破壊を行った。この手法では、マーカー遺伝子は DNA 修復機構である NHEJ を介して染色体に導入される。この手法を用いて糖輸送体および代謝酵素の候補遺伝子を破壊し、糖アルコール代謝に必須な遺伝子を同定した。

3.2 実験材料および実験操作

3.2.1 使用培地と酵母

本研究で使用した *K. marxianus* は補足表 S3-1 に記載する。YPD 培地 (1%酵母エキス、2%ポリペプトン、2%グルコース)、YPGal 培地 (YPD 中の 2%グルコースを 2%ガラクトースに置換)、SD 培地 (2%グルコース、0.17%イーストナイトロジェンベース、0.5%硫酸アンモニウムに、ロイシン、メチオニン、リジン、ヒスチジン、トリプトファン、アデニンヘミ硫酸塩、ウラシルの中から適切な栄養素を添加) を用いた。栄養要求性マーカーを用いた形質転換では、ウラシル (SD-Ura)、ロイシン (SD-Leu)、リジン、アデニンヘミ硫酸塩を添加栄養素から除外した。糖質化能解析のため、YPD 培地のグルコースを同濃度のフルクトース、スクロース、ガラクトース、マルトース、キシロース、キシリトール、アラビノース、ラクトース、セロビオース、マンニトール (YPMann)、マンノース、トレハロース、ソルボース、またはソルビトール (YPSor) で置換した。スクリーニング時には、破壊株を 24 ウェルプレート内の 1 mL 培地で培養した。酵母増殖を順次測定する実験では、細胞を L 字型試験管内の 5-6 mL 培地に植菌し、70 rpm で振盪しながらフォトバイオレコーダー (TVS062CA、アドバンテック) を用いて 15 分毎に OD₆₆₀ を自動記録した。正確な細胞増殖を測定するためには、培養液を適切に希釈し分光光度計で OD₆₆₀ を測定した。

3.2.2 プラスミドおよび株の構築

KOD One (東洋紡) および PrimeSTAR GXL (タカラバイオ) を用いて PCR により DNA 断片を増幅した。株構築に使用したオリゴヌクレオチド DNA は補足表 S3-2 に示した。*K. marxianus* および *S. cerevisiae* の形質転換は既に報告した方法に従った [52]、[54]。

CRISPR-Cas9 による遺伝子破壊のため、新規プラスミド YCpScGAL10pCas9nogRNA (図 3-1A) を補足表 S3-1 に示す通り構築した。このプラスミドは形質転換マーカーとして *URA3* 遺伝子を持ち、gDNA 配列を含まず、Cas9 はガラクトース誘導性プロモーター (*P_{ScGAL10}*) によって転写するように設計されている。gDNA 配列は以下のようにプラスミドに挿入した。標的配列は CRISPRdirect (<https://crispr.dbcls.jp/>) を用いて提案された候補から選択した。配列はプラスミド増幅用プライマーに付加し、HHc-ScTDH3-1c を PCR 用カウンタープライマーとして使用した。増幅した DNA 断片は *K. marxianus* に導入することで、CRISPR-Cas9 プラスミドを形成した。得られた形質転換体で Cas9 を発現させるため YPGal 培地で 24 時間培養し、PCR 増幅マーカー遺伝子による形質転換に用いた。寒天培地上で形成したコロニーに対し PCR を利用し、標的部位へのマーカー遺伝子挿入を確認した。遺伝子破壊に成功した株は、FOA 培地 (1 mg/mL 5-フルオロオロチン酸を含む SD 培地) 上で CRISPR-Cas9 プラスミドを除去した後、実験に使用した。

K. marxianus においてタンパク質を発現させる際、コーディング領域 (CDS) は PCR

で増幅した。C 末端をコードする配列にアニーリングするオリゴ DNA には、ScURA3 の 772-786 番目の配列 (ScURA3+772786) とストップコドンが付加した。ベクター DNA については、RAK14016 のプラスミドを鋳型として、ScTDH3-1c および ScURA3+771c のプライマーを用いて DNA 断片を増幅した。プラスミド内で *S. cerevisiae* 由来の TDH3 プロモーター下流に CDS をクローニングするため、ベクターと CDS の DNA 断片を混合し、形質転換を行った。*K. marxianus* のゲノムへ発現カセットを導入する場合には、ScTDH3-572 および ScURA3-223 のプライマーを利用し、発現カセットを含むプラスミドを鋳型として PCR を行った。LEU2 マーカー付き発現カセットを導入するため、*S. cerevisiae* の YCp プラスミドにおいて、ギャップ修復クローニングにより P_{ScTDH3} と LEU2 (逆向き) の間に CDS を挿入し [54]、ScTDH3-572 および ScLEU2-400 のプライマーを用いて発現カセットを PCR により増幅した。得られた DNA 断片を形質転換に用い、形質転換体は SD-Ura または SD-Leu プレート上で選別した。残った栄養要求性は、マーカー遺伝子を導入することで相補した。

3. 2. 3 酵素活性測定と糖濃度分析

酵母を YPD 培地で培養した。ガラスビーズの存在下で激しく攪拌し冷却することにより、細胞からタンパク質を抽出した。細胞抽出液の上清中の総タンパク質量は、Qbit 蛍光光度計 (Thermo Fisher Scientific) を用いた Quant-iT タンパク質アッセイキットにより測定した。反応混合液は、500 mM 糖アルコール、1 mM NAD^+ 、100 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 9) と 1.4 mg の総タンパク質を含む液とした。反応は糖アルコールの添加により開始し、340 nm における吸光度を測定した。吸光度変化を算出するため、糖を含まない反応をブランクとして用意した。生成した NADH 量はモル吸光係数 $6220 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ を用いて算出した。

酵母培養液中の糖濃度は、Shim-Pack SPR-Pb(G)カラム (50 L×7.8 mm、島津製作所) を搭載した HPLC システムを用いて、以前報告した方法に従い分析した [45]。

3.3 実験結果

3.3.1 CRISPR-Cas9 と NHEJ を介したマーカー遺伝子挿入を利用した遺伝子破壊

K. marxianus に Km $ADE2$ の gDNA を含むプラスミド pUDP082 [49] を導入すると、一部の形質転換コロニーが赤色を呈し、Km $ADE2$ 遺伝子の変異が生じることが分かった (図表無し)。このように切断部位に変異が存在する場合、その部位は再度切断されず、CRISPR-Cas9 による切断およびその後の DNA 挿入が不可能となる。CRISPR-Cas9 プラスミド導入段階での変異を防ぐため、Cas9 を発現させるプロモーターをガラクトース誘導性 Sc $GAL10$ プロモーターに変更した。標的配列を除去して得られたプラスミドを YCpSc $GAL10$ pCas9nogRNA と命名した (図 3-1A)。Km $ADE2$ を編集するためのプラスミド導入時には、赤色コロニーがほとんど形成されず、この条件下で Cas9 が十分に抑制されていることを示した。図 3-1B に YCpSc $GAL10$ pCas9nogRNA を用いた破壊の模式図を示した。標的配列を導入するため PCR を行い、増幅した DNA を *K. marxianus* に導入した (ステップ 1)。形質転換体において CRISPR-Cas9 プラスミドが形成される (ステップ 2)。形質転換体では、ガイド RNA は発現するが Cas9 は発現しないため標的配列の切断が起こらない。プラスミドを導入した酵母を YPGal 培地で培養し (ステップ 3)、標的部位との配列相同性を持たないマーカー遺伝子で形質転換し (ステップ 4)、適切な選択培地プレート上でコロニーを発生させる (ステップ 5)。ステップ 4 で用いたマーカー遺伝子は NHEJ を介して切断された標的部位に組み込まれる。まず、pUDP082 内の標的配列を用いて Km $ADE2$ を編集し、破壊効率を調べることにした (図 3-1C)。形質転換のコロニーを YPD および YPGal 培地で培養した結果、YPD 培地で培養した酵母では赤色コロニーが発生しなかった (図 3-1C、Glu-U)。YPGal 培地で培養した酵母では約 13% の赤色コロニーが発生し、Km $ade2$ が壊れていることを示している (図 3-1C、Gal-U)。YPGal 培地で培養した酵母へ相同配列を持たない *LEU2* マーカー遺伝子を導入すると、赤色コロニー数は 79-94%に増加した (図 3-1C、Gal-L)。赤色コロニーにおける Km $ADE2$ 遺伝子座を PCR するとバンド位置が上方にシフトしたため (図表無し)、*LEU2* マーカー遺伝子が Km $ADE2$ に効率的に導入されていることがわかった。さらに、3 つの独立した実験において SD-L プレート上で 600 以上のコロニーが得られた。従って、NHEJ を介したマーカー DNA 挿入と、CRISPR-Cas9 システムを用いた標的位置の切断により多数の正しい破壊株が得られる系を作れた。

3.3.2 糖資化能欠損を示す輸送体変異体のスクリーニング

K. marxianus ゲノムにおいて、既知の輸送体との相同性に基づき、糖輸送体をコードする可能性のある候補として 27 の遺伝子が示されている。開発した手法を用いて候補遺伝子を破壊し、得られた株の各糖を含む培地における生育を調べ、輸送体遺伝子の同定を行うことにした。破壊を試みた 17 遺伝子中、13 遺伝子で破壊に成功した。これらの破壊株を、グルコース、ガラクトース、マルトース、スクロース、マンニトール、ト

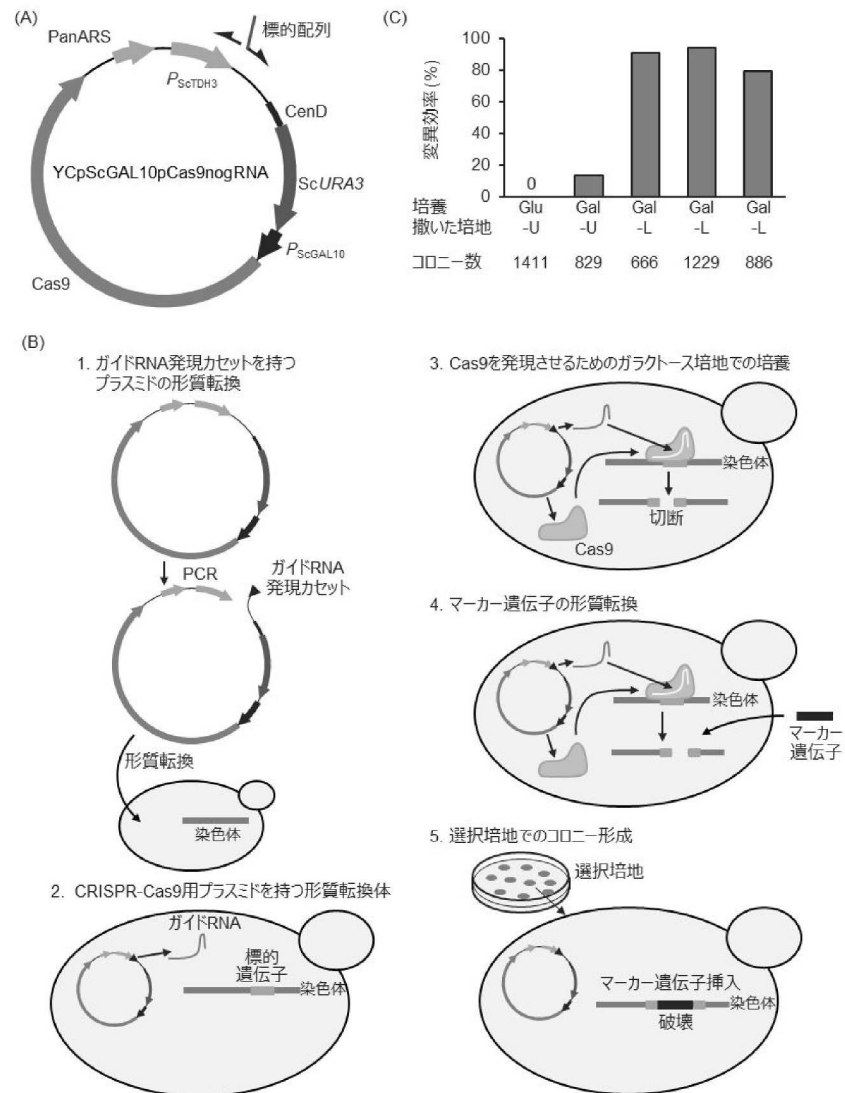


図 3-1 NHEJ と CRISPR-Cas9 システムを用いた遺伝子破壊

(A) 本研究で開発した CRISPR-Cas9 プラスミド (YCpScGAL10pCas9nogRNA) の模式図。細い矢印は標的配列を追加するための PCR 増幅に使用したプライマーを示す。PanARS は、パンゲノム酵母の複製起点、 P_{ScTDH3} は、*S. cerevisiae* 由来の *TDH3* プロモーター、CenD は、*K. marxianus* 由来のセントロメア配列、ScURA3 は、*S. cerevisiae* 由来の *URA3* マーカー遺伝子、 $P_{ScGAL10}$ は、*S. cerevisiae* 由来の *GAL10* プロモーター、Cas9 は、*Streptococcus pyogenes* 由来の Cas9 遺伝子 (D147Y P411T 変異を含む) を示している。(B) パネル A に示すプラスミドを用いた遺伝子破壊の模式図を示した。ガイド RNA は、シングルガイド RNA、染色体は、染色体 DNA、マーカー遺伝子は、遺伝子破壊および形質転換体選択用のマーカー DNA 断片を示している。(C) KmADE2 の変異効率を示した。KmADE2 のガイド DNA を含むプラスミド YCpScGAL10pCas9 を保有する酵母を YPD および YPGal 培地で培養した。細胞を希釈後 SD-Ura (-U) プレート、または *LEU2* マーカー遺伝子で形質転換後 SD-Leu プレート (-L) に撒いた。赤色および白色コロニーを数え、変異効率を算出した。各プレート上のコロニー総数 (コロニー数) も併せて示している。*LEU2* マーカー遺伝子を用いた破壊実験は独立して 3 回繰り返し実施し、各実験のデータを示した。

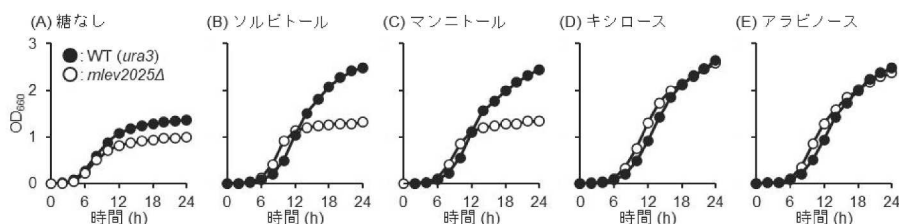


図 3-2 糖アルコール培地における *Kmmlex2025Δ* 破壊株の増殖欠損

(A-E) *K. marxianus ura3* 株 (野生型、●) と *Kmmlex2025Δ* 破壊株 (*mlex2025Δ*、○) を、示した糖を含むまたは糖を含まない (糖なし) YP 培地で培養した。OD₆₀₀ を自動記録し、2 時間ごとのデータを示した。

レハロース、マンノース、ソルボース、キシロース、フルクトース、アラビノース、ラクトース、キシリトール、ソルビトール、またはセロビオースを含む培地に植菌した。破壊株 *Kmmlex2025Δ* (KLMA_70145、*MLEV2025* は N 末端 4 つの推定アミノ酸とストップコドンを含む CDS をコードするヌクレオチド数を示す) は、野生型と比較してソルビトール、マンニトール、キシロース、アラビノース培地で比較的弱い増殖を示した (図表無し)。糖資化を詳しく解析するため、フォトバイオレコーダーを用いて増殖を記録した。その結果、*Kmmlex2025Δ* はアラビノースおよびキシロース培地では良好に増殖したが、ソルビトールおよびマンニトール培地では増殖しなかった (図 3-2)。ソルビトールおよびマンニトール培地における増殖レベルは、糖を添加していない YP 培地と同等であり、*KmMLEV2025* が糖アルコール輸送体であることを示唆した。この輸送体を *KmSAT1* と命名した。

3.3.3 *KmSAT1* の破壊による糖アルコール消費および資化への影響

Kmsat1Δ 破壊株を培養した液の OD₆₀₀ を適切な希釈後に測定し、培養液中の糖濃度を測定して糖アルコール消費を分析した。コントロールとして野生型 *K. marxianus* DMKU3-1042 株を同じ培地で培養した。YPSor 培地 (図 3-3A) では、野生株は 2 日後からソルビトール消費を開始した。*ura3* 変異株 (RAK3605) では長い増殖遅延がなかったこととは対照的である (図 3-2)。ソルビトールはその後 2 日間で完全に消費され、増殖は停止した。野生株とは対照的に、*Kmsat1Δ* 破壊株は 5 日間ソルビトールを消費せず増殖も認められなかった (図 3-3A)。*Kmsat1Δ* 破壊株への *KmSAT1* の相補により、ソルビトール資化能が部分的に回復した (図 3-3A)。YPMann 培地では、野生株は培養開始 4 日後に増殖を開始し、マンニトールが消費された (図 3-3B)。しかし *Kmsat1Δ* 破壊株では 7 日間、マンニトールを消費せず増殖しなかった (図 3-3B)。ソルビトール培地と同様に、YPMann 培地における *Kmsat1Δ* 破壊株の増殖欠損は部分的に回復した。グルコース培地では野生株、破壊株、相補株の間に増殖と糖の消費の明らかな差は認められなかった (図 3-3C)。これらの結果から、*KmSAT1* は *K. marxianus* における糖アルコール利用に必須であると考えられる。糖アルコール培地ではグルコース培地よりも最終 OD₆₀₀ が高かったことにも着目すべきである。

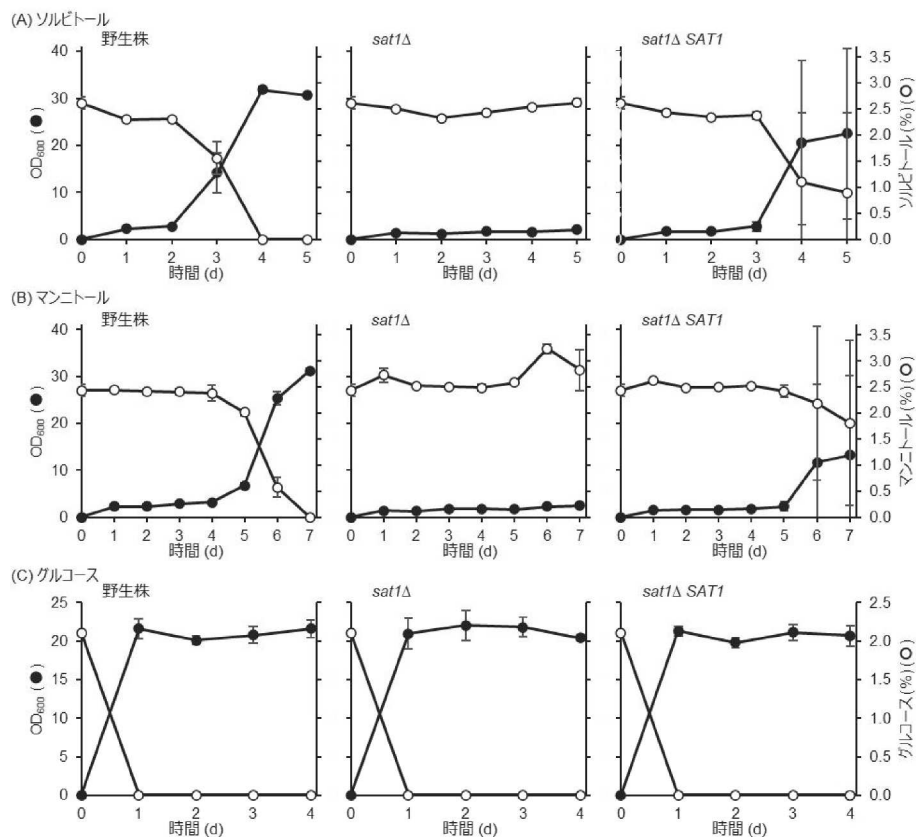


図 3-3 野生株、*Kmsat1Δ* 破壊株および相補株による糖アルコール資化

DMKU3-1042 野生株、*Kmsat1Δ* 破壊株 (*sat1Δ*)、および相補株 (*sat1Δ SAT1*) を YPSor (ソルビトール、A)、YPMan (マンニトール、B)、および YPD (グルコース、C) 培地で培養した。培養液の OD₆₀₀ (●) は適切な濃度になるよう希釈して測定した。糖濃度 (○) は HPLC を用いて分析した。培養は 3 回繰り返し、平均値と標準偏差を示した。

3.3.4 KmXyl2p のソルビトール脱水素酵素としての機能

一般に、細胞内に取り込まれたソルビトールはソルビトール脱水素酵素によってフルクトースに変換され、解糖系で代謝される。*S. cerevisiae* には *ScSOR1* と *ScSOR2* の 2 つのソルビトール脱水素酵素遺伝子があるものの、その発現には数週間の増殖遅延を必要とする [55]。*K. marxianus* ゲノムにおいて、KmXyl2p は ScSor1p と最も高い相同性 (同一性 66%、類似性 92%) を示した。KmXYL2 はキシリトール脱水素酵素をコードし、キシロース代謝に必須である [10]。本研究で開発した NHEJ を介した遺伝子破壊法を用いて遺伝子を破壊し、KmXYL2 がソルビトール代謝にも関与するかを解析した。得られた *Kmxy12Δ* 破壊株は YPSor 培地で増殖せず (図 3-4A)、KmXYL2 の過剰発現により増殖が部分的に回復した。これは KmXyl2p がソルビトール資化に必須であり、*K. marxianus* においてキシリトール脱水素酵素としてだけでなく、ソルビトール脱水素酵素としても機能することを示唆している。

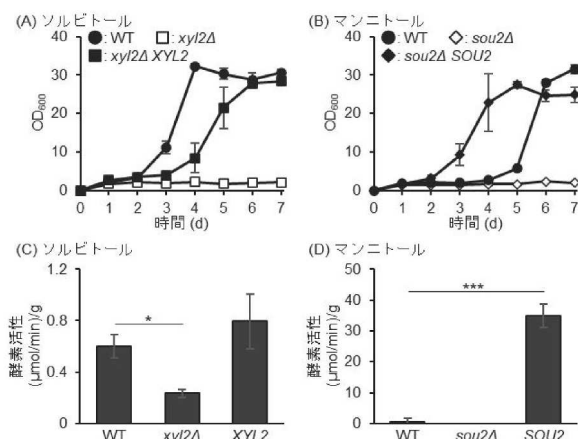


図 3-4 ソルビトール脱水素酵素 KmXYL2 とマンニトール脱水素酵素 KmSOU2 の同定

Km*xyl2Δ* 破壊株 (*xyl2Δ*, □) と Km*sou2Δ* 破壊株 (*sou2Δ*, ◇) を、それぞれ YPSor (A) と YPMan (B) 培地で培養した。DMKU3-1042 野生株 (WT, ●) と相補株 (*xyl2Δ XYL2* (■) と *sou2Δ SOU2* (◆)) も培養した。培養液の OD₆₀₀ は適切な濃度になるよう希釈して測定した。培養は 3 回繰り返し、平均値と標準偏差を示した。(C、D) YPD で培養した株の粗抽出物を酵素活性測定に使用した。基質としてソルビトール (C) およびマンニトール (D) を用いた。各株の 3 つの異なる培養物から粗抽出物を調製し、反応に使用した。平均値と標準偏差を示した。統計的有意差はダネットの多重比較検定を用いて評価し、 $p < 0.05$ を*、 $p < 0.001$ を***で示した。

3.3.5 *K. marxianus* におけるマンニトール脱水素酵素の同定

マンニトールは脱水素酵素によってフルクトースに変換される。しかし、Km*xyl2Δ* 破壊株は YPMan 培地において増殖欠損を示さなかった (補足図 S3-1)。これはマンニトール資化に別の脱水素酵素が関与していることを示している。Km*SOU1* (KLMA_10783) はマンニトール資化に関与すると考えられている [9]。しかし、Km*SOU1* の破壊も YPMan 培地における増殖欠損を引き起こさなかった (補足図 S3-1)。逆に、この破壊株は野生株よりも早く増殖を開始した。Km*Xyl2p* と 24-28%の相同性 (カバー率 90-98%) を示す Km*ADH4*、Km*BDH1*、Km*BDH2*、Km*SFA1*、Km*MFRK1161* 遺伝子も破壊したが、これらの破壊株は増殖欠損を示さなかった (図表無し)。

別の未同定遺伝子である Km*SOU2* (KLMA_10715) も破壊した。この遺伝子は脱水素酵素をコードしている可能性がある。Km*sou2Δ* 破壊株はマンニトール培地で 7 日間培養しても増殖しなかったが、野生株は 4 日間の増殖遅延の後に増殖を開始した (図 3-4B)。さらに、*TDH3* プロモーターを用いた Km*SOU2* の相補により、破壊株の増殖が回復した。これらの結果は、Km*SOU2* がマンニトール資化に必須であることを示した。グルコース培地で培養した各株を破碎して得た粗抽出液の酵素活性を測定すると、ソルビトール脱水素酵素活性は Km*xyl2Δ* 破壊株で有意に低下したが、完全な消失とはならなかった。この結果から他にもソルビトール脱水素酵素が存在することが示唆された。また、過剰発現による活性増加は有意ではなかった (図 3-4C)。Km*Sou2p* の場合、破壊によりマンニトール脱水素酵素活性は完全に消失し、過剰発現株の抽出液では明らかに高

い活性が認められた (図 3-4D)。これらの結果から、KmXyl2p と KmSou2p はそれぞれ NAD 依存性ソルビトール脱水素酵素およびマンニトール脱水素酵素であることが示唆された。

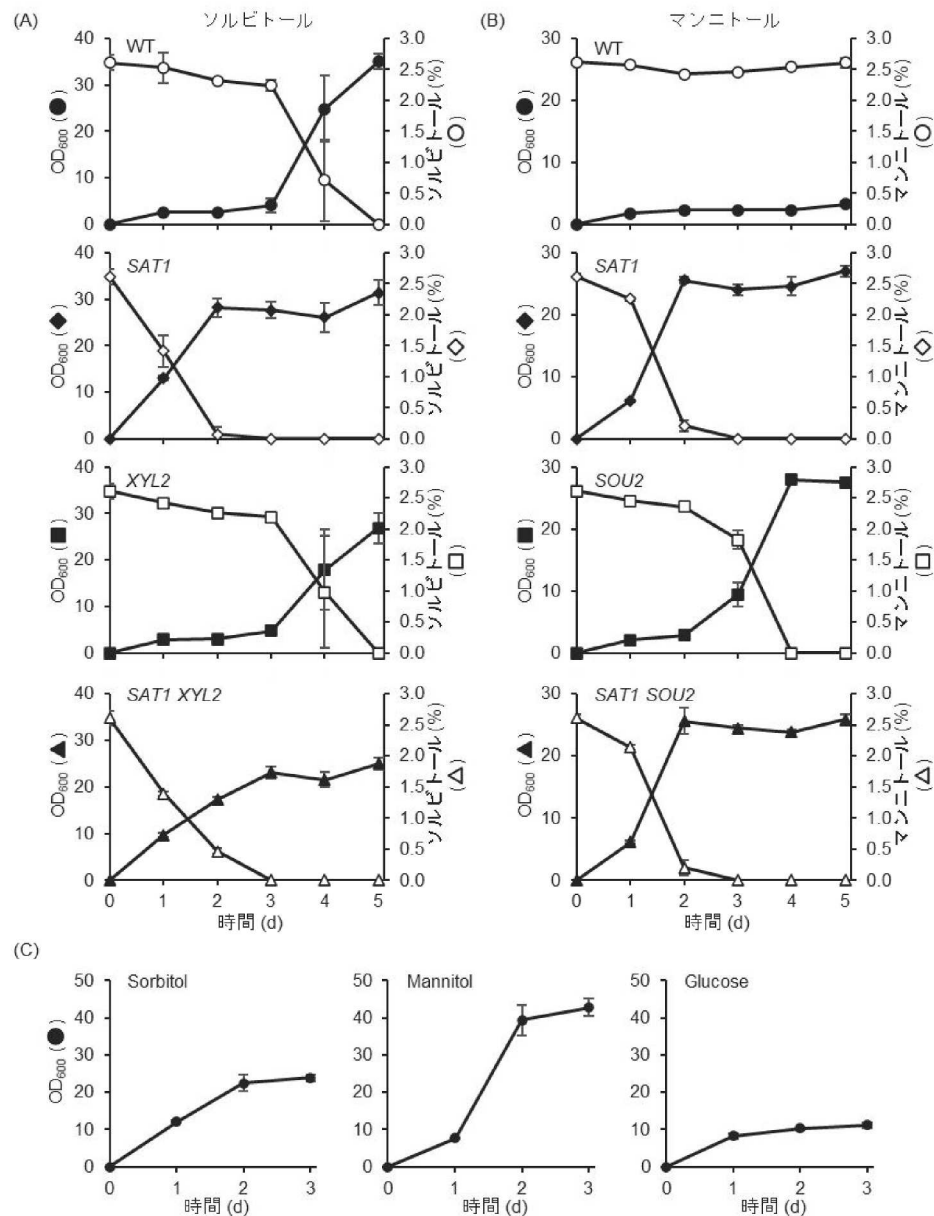


図 3-5 KmSAT1 の過剰発現による糖アルコール発酵の促進

DMKU3-1042 野生株 (WT、丸)、ScTDH3 プロモーターを用いた KmSAT1 (SAT1、菱形)、KmXYL2 (XYL2、四角)、KmSOU2 (SOU2、四角) の過剰発現株、または共発現株 (SAT1 XYL2 (三角) と SAT1 SOU2 (三角)) を YPSor (A) および YPMan (B) で培養し、細胞増殖 (OD₆₀₀、黒) および糖消費量 (白) を調べた。(C) 10%ソルビトール、マンニトール、またはグルコースを含む YP 培地での KmSAT1 過剰発現株の増殖を示した。OD₆₀₀ は図 3-3 と同様に測定した。培養は 3 回繰り返す、平均値と標準偏差を示した。

3.3.6 KmSAT1 の過剰発現による糖アルコールの利用促進

K. marxianus 野生株はソルビトールおよびマンニトール消費において増殖遅延を示した。バイオテクノロジー的な応用では糖の早い消費が不可欠である。糖アルコール資化促進の効果を調べるため、KmSAT1 および KmXYL2 または KmSOU2 を過剰発現させた。YPSor 培地において、KmSAT1 過剰発現株は遅延なく増殖を開始し、48 時間以内に OD₆₀₀=28 に達した (図 3-5A)。ソルビトール消費は最初の 24 時間以内に開始され、48 時間後に完全に消費した。実質の増殖していた期間とソルビトールを消費した期間は野生株と類似していた。一方で、KmXYL2 の過剰発現ではソルビトール消費は早くならなかった。これら 2 遺伝子を過剰発現すると、KmSAT1 過剰発現株と比較して弱くネガティブな効果を示した。YPMann において、KmSAT1 過剰発現株はソルビトール培地と同様に増殖と糖消費を早めた (図 3-5B)。KmSOU2 過剰発現株は野生株と比較してマンニトール資化を促進したが、KmSAT1 過剰発現株よりも遅れていた。KmSOU2 に KmSAT1 を加えても、マンニトール資化をそれ以上早めなかった。これらの結果は、*K. marxianus* における糖アルコール代謝において糖の取り込みが律速段階であり、KmSAT1 の過剰発現が効率的な糖アルコール利用に重要であることを示した。KmSAT1 過剰発現株を 10% の糖を含む YP 培地で 3 日間培養した。ソルビトール、マンニトール、グルコース培地における最終 OD₆₀₀ はそれぞれ 23.9、42.8、11.1 であった (図 3-5C)。これは糖アルコールがグルコースと比較して大量の細胞生産に適していることを示している。

3.4 考察

3.4.1 CRISPR-Cas9 と NHEJ による遺伝子破壊

本研究では、*K. marxianus* におけるソルビトールおよびマンニトールの資化に必要な輸送体と脱水素酵素を同定した。これらの遺伝子同定には新しく開発した破壊法を用いた。開発した方法では、CRISPR-Cas9 システムによる切断を利用して、相同配列を持たないマーカー遺伝子を NHEJ を介して標的遺伝子に導入する。*K. marxianus* では、形質転換用選択マーカーなどの DNA 断片が NHEJ により染色体にランダムに導入されるため、遺伝子ターゲティング効率は低いことが報告されている [53]。DNA 断片の末端に 1000 bp の相同配列を追加した場合でも、効率は最大 10%であった [53]。NHEJ を介して DNA 断片を標的部位に導入するには、標的部位の選択的切断が必要である。CRISPR-Cas9 システムは標的位置の DNA を特異的に切断する。近年、CRISPR-Cas9 による突然変異導入法は多くの生物で頻繁に用いられている。少数のヌクレオチド欠失や置換などの変異は、NHEJ による DNA 修復過程のエラーによって引き起こされる。これらの変異は DNA シーケンシングを用いて確認する必要がある。CRISPR-Cas9 切断部位における相同組換えを介した挿入や置換は、精密な遺伝子破壊によく用いられる [57]-[59]。*K. marxianus* においても CRISPR-Cas9 による切断と相同組換えを用いた遺伝子破壊が行われている [48]-[52]。このような場合、導入された DNA 断片には相同配列を追加する必要がある。従って、導入される DNA 断片は標的部位に特異的である。本研究ではこれらの手法とは対照的に、CRISPR-Cas9 システムを NHEJ と組み合わせて破壊を行った。このシステムでは、CRISPR-Cas9 による特異的な切断の後、相同配列を持たないマーカー遺伝子が標的部位に導入される。この手法の利点は、マーカー遺伝子の汎用性が高い点である。NHEJ を介した破壊は、ゼブラフィッシュとマウスを用いた先行研究 2 件でも報告されている [60]、[61]。これらの研究では、プラスミド DNA を CRISPR-Cas9 で切断し、細胞内で染色体に導入される DNA 断片を生成している。これに対し、本研究では PCR で増幅した線状 DNA 断片をドナー DNA として使用し、破壊株の取得に成功した。線状 DNA は他の生物における破壊のドナーとしても使用可能と考えられる。

KmADE2 用に最適化された pUDP082 の gDNA 配列を利用した KmADE2 の破壊効率は 79%以上であった。しかし、本研究では一部の候補輸送体遺伝子は破壊されなかった。そのため、破壊効率は gDNA 配列の影響を受ける可能性があるといえる。

3.4.2 KmSat1p と既知の糖アルコール輸送体のアミノ酸配列比較

GFP を付加した KmSat1p は細胞膜周辺に局在した。つまり、KmSat1p が糖アルコールを取り込むための輸送体として機能することが示唆された (補足図 S3-2)。また、細胞内の球状の蛍光は輸送体の分解によるものであると考えられる。KmSat1p の推定アミノ酸配列は、*S. cerevisiae*、*Arabidopsis thaliana*、*Malus domestica* (リンゴ)、*Prunus cerasus* (サクラランボ) の輸送体と比較して、比較的長い N 末端配列を有する (補足図 S3-3)。

Debaryomyces hansenii の輸送体も長い N 末端配列を持ち、KmSat1p との相同性は約 50% であるのに対し、他の輸送体では 23-26% であった。KmSat1p の N 末端配列がその機能に必須であるかを調べるため、アミノ酸 90 および 92 の N 末端を削除した。アミノ酸 91 および 93 のメチオニン残基を開始コドンとして用いたが、N 末端削除変異体はソルビトール資化能を示さなかった (補足図 S3-4A)。これは KmSat1p の N 末端配列がソルビトール輸送に必須であることを示している。

KmSat1p と *S. cerevisiae* の輸送体の相同性は 23% である。さらに、ソルビトールと水素結合を形成すると予測される *S. cerevisiae* Hxt15p の Glu336 残基は、KmSat1p では保存されていない [62]。したがって、これらの輸送体は異なる進化を遂げて生じた可能性がある。*S. cerevisiae* の糖アルコール輸送体を *K. marxianus* で発現させたところ、得られた株は KmSat1p と同等の増殖速度と最終細胞密度 (OD₆₆₀) を示した (補足図 S3-4B)。これは KmSat1p が *S. cerevisiae* のソルビトール輸送体と同等のソルビトール輸送活性を持つことを示唆している。

3. 4. 3 *K. marxianus* における糖アルコール代謝の脱水素酵素

本研究では、糖アルコール代謝に必要な酵素として KmXyl2p および KmSou2p を同定した。Km~~xyl2~~ Δ破壊株および Km~~sou2~~ Δ破壊株の増殖欠損を確認するため、これらの破壊株において KmSAT1 を過剰発現させた。得られた株は 2-3 日間増殖を示さなかったが、野生株における KmSAT1 過剰発現では OD₆₀₀ が 23.8 および 29.4 に達した (補足図 S3-5)。これらの結果から、KmXYL2 と KmSOU2 がそれぞれソルビトールおよびマンニトール代謝に必須であることが示された。また、GFP を付加した KmXyl2p および KmSou2p はソルビトールおよびマンニトール培地において細胞質に局在していたことから、細胞内に取り込まれた糖アルコールを代謝するために解糖経路でフルクトースに変換されることが示唆された。

KmXyl2p はキシリトール脱水素酵素としても機能する。キシリトール脱水素酵素は酵母 *Meyerozyma caribbica*、*D. hansenii*、*Candida tropicalis* から調製され、既にその基質特異性が決定されている。これらの脱水素酵素は他の糖と比較してキシリトールに対して最も高い活性を示し、ソルビトールに対する活性はキシリトールに対する活性の約 50-75% であった [63]-[65]。しかし、これらのキシリトール脱水素酵素はマンニトールに対してほとんど活性を示さず、キシリトールに対する相対活性は最大でも 2% であった [63]-[65]。したがって、KmXYL2 の破壊がマンニトール資化に影響を与えなかったことは理にかなっている (図 3-4)。

DSF1 および MAN2 は *S. cerevisiae* においてマンニトール脱水素酵素をコードする [62]。 *K. marxianus* ゲノムには Dsf1p または Man2p のホモログは存在しない。KmSou2p と既知の菌類のマンニトール脱水素酵素との配列の同一性は 30-44% であった (補足図 S3-6)。これらの酵素は古くから知られるマンニトール脱水素酵素に似た短いペプチド

の脱水素酵素/還元酵素 (SDR) 群である。一般的に SDR は配列の同一性が低い、ロスマン型 NAD 結合モチーフ (TGxxxGxG および TGxxGxxG) と、チロシンを含む保存された YxxxK パターン (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cd05352>) を持つ。補足図 S3-6 に示すように、KmSou2p は他のマンニトール脱水素酵素と同様の位置に TGxxGxxG (TGGAGAIG) 配列と YxxxK (YNASK) 配列を有する。さらに、活性部位形成に寄与するセリンやアスパラギン残基も保存されている。図 3-4C に示す保存配列と酵素活性から、KmSou2p が *K. marxianus* のマンニトール脱水素酵素であると結論付けた。GFP を付加した KmXyl2p と KmSou2p はソルビトールまたはマンニトール培地で細胞質に局在した。このことから細胞内に輸送された糖アルコールは代謝されるためにフルクトースへ変換されることが示唆された。

3. 4. 4 *K. marxianus* での KmSAT1 の過剰発現による糖アルコール利用促進

KmSat1p の過剰発現はソルビトールとマンニトールの利用を促進した。しかし KmXyl2p では促進されず、KmSou2p の促進効果は KmSat1p よりも小さかった。これらの結果は、*K. marxianus* における糖アルコール資化において糖の取り込みが律速段階であることを示唆している。マンニトール条件下で進化した *Yarrowia lipolytica* では、2 つの糖輸送体の発現が増加していた。これらの輸送体は進化株でのマンニトールの取り込みを促進していた可能性がある [66]。ソルビトール脱水素酵素遺伝子の過剰発現は、酵母 *Komagataella kurtzmanii* の増殖速度を上げることが報告されている [67]。これは、ソルビトール資化の律速段階が酵母種間で異なることを示唆している。また、破壊株における KmSAT1 遺伝子の相補では、ソルビトールおよびマンニトール資化は完全には回復しなかった。相補された DNA には CDS に加えて 5' と 3'-1000 bp 領域を与えている。従って、より長い領域が KmSAT1 の発現に関与している可能性が考えられる。

K. marxianus DMKU3-1042 株はソルビトールおよびマンニトール培地で増殖遅延を示した (図 3-3)。一方、その *ura3* 変異株 (RAK3605) では増殖遅延はなかった (図 3-2)。*S. cerevisiae* はソルビトール資化において増殖遅延がより長い [56]、[68]。しかし、転写の抑制因子 Tup1p-Cyc8p の変異により増殖遅延が消失する [68]、[69]。*ura3* 変異株はこのような調節遺伝子に変異を持っている可能性がある。破壊および過剰発現に用いた宿主 (RAK4174 および RAK4178) は、栄養要求性変異株の交配と胞子形成を経て得たものである [70]。RAK4174 および RAK4178 の形質転換体は野生株と同様の増殖遅延を示したこと、糖アルコール代謝に影響を与える変異は、育種過程で失われたと考えられる。増殖遅延は KmSAT1 の過剰発現によって解消された。しかし、赤色蛍光タンパク質を用いたレポーターアッセイの結果、蛍光レベルはソルビトールまたはマンニトール培地ではグルコース培地と比較して増強されていなかった (補足図 S3-7)。つまり、増殖遅延は転写の増強によって起こるわけではないことが示唆された。糖アルコール培地での増殖の切り替えに対するメカニズムを明らかにするため、さらなる研究が必要で

ある。

結論として、輸送体 KmSat1p はソルビトールやマンニトールなどの糖アルコールの資化に共通して必要である。しかし、代謝に必要な脱水素酵素は異なり、KmXyl2p と KmSou2p がそれぞれソルビトールとマンニトール代謝に必須である。*K. marxianus* における糖アルコール資化では糖輸送が律速段階であり、KmSAT1 の過剰発現により増殖遅延を短縮できた。さらに、ソルビトール及びマンニトールを用いた時の細胞収量はグルコース使用時よりも高かった。KmSAT1 のような輸送体遺伝子の過剰発現は、バイオテクノロジーによる効率的な糖アルコール利用のために有効な手法である。

第4章

Kluyveromyces marxianus および *Saccharomyces cerevisiae* における セロビオース利用能向上のためのセロビオース輸送体 KmStl1p の同定と改変 Identification and engineering of a cellobiose transporter KmStl1p to enhance cellobiose utilization in *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*

4.1 緒言

Kluyveromyces marxianus は、40°C や 45°C といった高温下でもエタノールを生産できる耐熱性酵母である [3]-[6]。そのため高温発酵に利用され、約 30°C で行われる従来の発酵と比較してエネルギーとコストを削減できる [7]、[8]。さらに、*K. marxianus* はリグノセルロース系バイオマスの主要成分であるセロビオースやキシロースを含む様々な糖を資化できるのに対し、従来の *Saccharomyces cerevisiae* はこれらの糖を資化できない [3]。

K. marxianus のバイオマス利用効率を高めるための様々な遺伝子工学的手法が開発されてきた。例えば、複数の栄養要求性変異体を用いた形質転換、交配および孢子形成による育種、過剰発現用の複数のプロモーター、遺伝子破壊などが挙げられる [50]、[54]、[70]-[73]。さらに、自律複製型プラスミドの利用が報告されており、対象の遺伝子が非同相末端結合 (NHEJ) を介してプラスミドに直接クローニングされる [53]。CRISPR-Cas9 によるマーカーフリーノックアウト技術も開発された [72]。したがって、*K. marxianus* は、様々な糖を用いた発酵生産において、産業、バイオテクノロジー、合成生物学への応用に向けた有望な酵母と考えられている [73]-[75]。

代謝経路と糖輸送の改変は、様々な糖を利用した効率的物質生産に不可欠である。*K. marxianus* DMKU3-1042 株の全ゲノム配列解析により、セロビオース、キシロース、ラクトース代謝に関与する主要酵素が明らかになった [9]。キシロース代謝に必要なキシロース還元酵素 (KLMA_10683)、キシリトール脱水素酵素 (KLMA_70044)、キシルロキナーゼ (KLMA_80066) がゲノムにコードされており、これらの遺伝子はキシロース代謝の改善を目的として同定された [76]。セロビオース代謝に関して、*K. marxianus* は β -グルコシダーゼ遺伝子 KmBGL1 (KLMA_30009) を持つ。推定されたアミノ酸配列には N 末端に分泌シグナルがないため、*K. marxianus* が環境中からセロビオースを細胞内に取り込む輸送体を持つことが示唆される。しかし、*K. marxianus* におけるセロビオース輸送体は実験的に同定されていない。セロビオース利用効率を高めるためには、セロビオース輸送体の同定とその改良が有効であると考えられる。

いくつかのセロビオース利用可能な糸状菌から、 β -グルコシダーゼ遺伝子と輸送体候補遺伝子を *S. cerevisiae* で共発現させることでセロビオース輸送体が同定されてきた。*S. cerevisiae* はセロビオースを資化しないので、これらの組換え体が増殖すれば輸送体候補遺伝子のセロビオース輸送活性を明確に示すことになる。*Neurospora crassa* 由来の

CDT-1 および CDT-2 遺伝子は、*S. cerevisiae* にセロビオース資化能を付与した [77]。また、*Aspergillus nidulans* では、CltA および CltB の 2 つのセロビオース輸送体が、CDT-1 との配列相溶性およびセロビオース培地における発現プロファイルからセロビオース輸送体であることが示唆された。これらの破壊はセロビオース培地で明らかに増殖レベルを落とし、*S. cerevisiae* での発現により CltA がセロビオース輸送体、CltB がセロビオースセンサーであることが示された [78]。同様に、糸状菌 *Penicillium chrysogenum*、*Penicillium oxalicum*、*Trichoderma reesei*、酵母 *Lipomyces starkeyi* においてもセロビオース輸送体が同定されている [79]-[82]。これらのセロビオース輸送体候補は、配列相溶性やセロビオース培地での発現増強に基づいてリストアップされたことも着目すべきである。

K. marxianus のゲノム配列からは、ガラクトースやグルコースを輸送する能力を持つものを含む多くの糖輸送体が明らかになった [75]、[83]。ヘキソース輸送体に加え、ペントース輸送体遺伝子座が破壊された株を用いてペントース輸送体が同定された [46]。ゲノム内で同定された 3 つのラクトースパーミアーゼのホモログのうち、*LAC12* は *K. marxianus* である複数の株においてラクトースを輸送した。一方、DMKU3-1042 株を含む他のいくつかの株では、*LAC12* は機能を示さず、これらの株はラクトースを効率的に資化しない [13]。株依存的な糖資化能の違いは、糖輸送に関与する遺伝子の同定に利用できる可能性がある。

本研究では、*K. marxianus* が株によりセロビオース条件下で様々な増殖レベルを示すことを明らかにした。もし、セロビオース輸送能が輸送体の発現や活性に依存するならば、株依存的な増殖レベルを用いて *K. marxianus* のセロビオース輸送体が同定できると考えた。そこで、セロビオースを資化できない株において資化できる株由来の輸送体候補遺伝子を過剰発現させることで、*K. marxianus* のセロビオース輸送体の同定を行った。ここでは、*K. marxianus* NCYC2791 株の *KmSTL1* (DMKU3-1042 株のゲノムにおける *LAC12-4* (KLMA_30728) に相当) をセロビオース輸送体として同定した。さらに、*KmSTL1* がコードするタンパク質を改変し、*K. marxianus* および *S. cerevisiae* におけるセロビオース利用能を向上させた。

4.2 実験材料および実験操作

4.2.1 使用培地と増殖の解析

酵母の培養には、YPD 培地 (1%酵母エキス、2%ポリペプトン、2%グルコース) と YPCello 培地 (YPD のグルコースを 2%セロビオースに置換) を用いた。形質転換体の選択のために、SD 培地 (2%グルコース、0.17%イーストナイトロジェンベース、0.5%硫酸アンモニウムに、ロイシン、メチオニン、リジン、ヒスチジン、トリプトファン、アデニンヘミ硫酸塩、ウラシルの中から適切な栄養素を添加) を用いた。寒天プレート調製には、培地に 2%寒天を添加した。エンドサイトーシスを阻害するため、ラトランクリン A (LatA) (富士フイルム和光) を 100 μ M の濃度で培地に添加した。

形質転換体は YPD 培地で前培養し、本培養への植菌に利用した。輸送体遺伝子を発現する *K. marxianus* は、L 字型試験管 (TSV062CA、アドバンテック) 内の 5 mL の YPCello 培地に植菌し、振盪インキュベーターを用いて、30°C、70 rpm の条件下で培養した。培養液の 600 nm における吸光度 (OD_{600}) は、適切な希釈後、分光光度計 (GENESYS10 UV、Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。*S. cerevisiae* について、酵母前培養液の一部を 24 ウェルプレート内の YPCello 培地 1 mL に植菌し、プレートを 30°C、150 rpm で振盪培養した。培養液の OD_{600} は PowerWave XS マイクロプレートリーダー (Biotek) で希釈せずに測定した。セロビオースの消費量と酵母の増殖を分析するため、上記と同様に振盪インキュベーター内で 6 mL の培地を用いて酵母を培養した。緑色蛍光タンパク質 (GFP) との融合タンパク質とした輸送体の局在観察には、24 ウェルプレートに加えた 1 mL の YPD または YPCello 培地中で、30°C、150 rpm の振盪条件下で培養した酵母を用いた。

4.2.2 株の構築

本研究で使用した酵母を補足表 S4-1 に示した。*K. marxianus* における発現プラスミドは、欠損したマーカー遺伝子配列を補うことで機能を回復させる方法を用いて構築した [53]。PCR は KOD One (東洋紡) または PrimeSTAR GXL (タカラバイオ) を用いて行った。ベクター DNA として、プロモーター P_{ScTDH3} または $P_{KmCDC19}$ を持つ YCp プラスミド pKM100 を用い [53]、PCR により線状化および増幅した。ベクターに挿入する DNA 断片も、線状化プラスミド内のマーカー遺伝子機能を相補する配列を含むプライマーを用いて PCR により増幅した。これらの DNA 断片を用いて、*K. marxianus* における発現プラスミドを構築するための形質転換を行った。選択培地上で形質転換体を作製した後、PCR を行い、クローニングが正しく行われていることを確認した。発現カセットを *K. marxianus* の染色体に組み込むために、プロモーター、コーディング配列、形質転換マーカー遺伝子からなる DNA 断片を PCR で増幅し、形質転換に使用した。

α -アレクチン遺伝子を破壊するため、CRISPR-Cas9 システムによる DNA 切断を経て、相同配列を持たない *ScLEU2* 遺伝子を標的部位に NHEJ により挿入した。NCYC2791

株の *Kmstl1* 破壊株はマーカー遺伝子を導入せずに得た。CRISPR-Cas9 システムによる *KmSTL1* を破壊するための株の培養後、SD-Ura (ウラシル欠損 SD 培地) プレート上でコロニーを形成させ、いくつかのコロニーの *KmSTL1* 配列を決定した。開始コドンから 148 番目と 149 番目の 2 塩基欠失した株 (RAK45068) を実験に使用した。

S. cerevisiae では、輸送体は *URA3* マーカー付き YEp プラスミドにクローニングし [84]、 β -グルコシダーゼをコードする *KmBGL1* は、PCR およびギャップ修復クローニングにより [55]、*LEU2* マーカー付き YCp プラスミドにクローニングした [85]。株の構築に使用した鋳型 DNA およびオリゴ DNA を補足表 S4-1 および補足表 S4-2 に示した。

4.2.3 解析方法

顕微鏡観察のため、酵母を遠心分離により回収し、水に懸濁した。緑色および赤色蛍光をそれぞれ観察するため、38HE フィルターと 43HE フィルターを備えた Axio Imager A1 蛍光顕微鏡 (Carl Zeiss) を使用した。セロビオース濃度は、以前報告した方法に従い、Shim-Pack SPR-Pb(G)カラム (50 L×7.8 mm) (島津製作所) を備えた HPLC システムを用いて測定した [45]。

4.3 実験結果

4.3.1 *K. marxianus* におけるセロビオース輸送体の同定

K. marxianus はセロビオースを資化するが、資化レベルは株間で異なる。NBRC0272、NBRC10005、NCYC2791 株は、試験した 19 株の中で最高の成長レベルを示した (補足図 S4-1)。一方、DMKU3-1042 株と NCYC587 株の増殖は低かった。NCYC587 株において NCYC2791 株由来の *KmBGL1* を過剰発現させても、YPCello 培地での増殖は促進されなかった (補足図 S4-2)。これらの結果から、セロビオース資化能の低い株では、セロビオース輸送体の発現や活性が律速段階であることが示唆された。

DMKU3-1042 株のゲノム配列において、複数の糖輸送体候補遺伝子がアノテーションされている。DMKU3-1042 株の情報を用いて、NCYC2791 株のゲノムから 11 の輸送体候補遺伝子を増幅し、*K. marxianus* においてグルコース条件下で強力なプロモーターである *KmCDC19* (*P_{KmCDC19}*) を用いて DMKU3-1042 株で発現させた [86]。得られた株を YPCello 培地で培養し、セロビオース資化能を測定した。すると、*KmSTL1* は菌株の増殖をわずかに促進した (図 4-1A 上)。これらの候補遺伝子は、 β -グルコシダーゼをコードする *KmBGL1* とともに *S. cerevisiae* EBY.VW1000 株でも発現させた。EBY.VW1000 株は 18 種類のヘキソース輸送体全てを持たず、マルトースのみを資化できる [41]。*P_{KmCDC19}* をプロモーター配列とした輸送体遺伝子を *K. marxianus* から増幅し、*S. cerevisiae* に導入した。*KmBGL1* のみを発現する株は YPCello 培地で 72 時間培養しても増殖せず、宿主株にセロビオースの取り込み活性がないことを示した (図 4-1A 下)。一方で、*KmSTL1* を発現する株は初期 OD₆₀₀ である 0.01 から 24 時間後に 3.3 まで増殖し、他の株 (OD₆₀₀=1.7-2.3、図 4-1A 下) と比較してわずかに高い増殖レベルを示した。また、48 時間および 72 時間後、培養液の OD₆₀₀ はそれぞれ 4.9 および 7.5 に増加した。*KmSTL1* の発現によりセロビオースの資化を示した *K. marxianus* および *S. cerevisiae* のセロビオースの消費量を分析した (図 4-1B、C)。その結果、*K. marxianus* ではセロビオースが完全に消費されなかったものの、セロビオースの消費に伴い OD₆₀₀ が 2 日間増加した。DMKU3-1042 野生株 (WT) はセロビオースを消費し、糖を添加しない YP 培地よりも高い増殖レベルであった (図 4-1B)。これはある一定量のセロビオースの消費を示唆し、水の蒸発によりセロビオースの消費が隠れている可能性が考えられた。*S. cerevisiae* は 4 日間でセロビオースを完全に消費し、増殖はセロビオースの消費と一致していた (図 4-1C)。*KmSTL1* によるセロビオースの輸送は、NCYC2791 株における遺伝子破壊でも確認された。*Kmstl1* 破壊株は増殖もセロビオースの消費もわずかであったが、野生型株は良好に成長し、2 日以内にセロビオースを完全に消費した (図 4-1D)。これらの結果から、*KmSTL1* が *K. marxianus* における主要なセロビオース輸送体であることが示された。

4.3.2 グルコース依存的な *KmStl1p* の分解

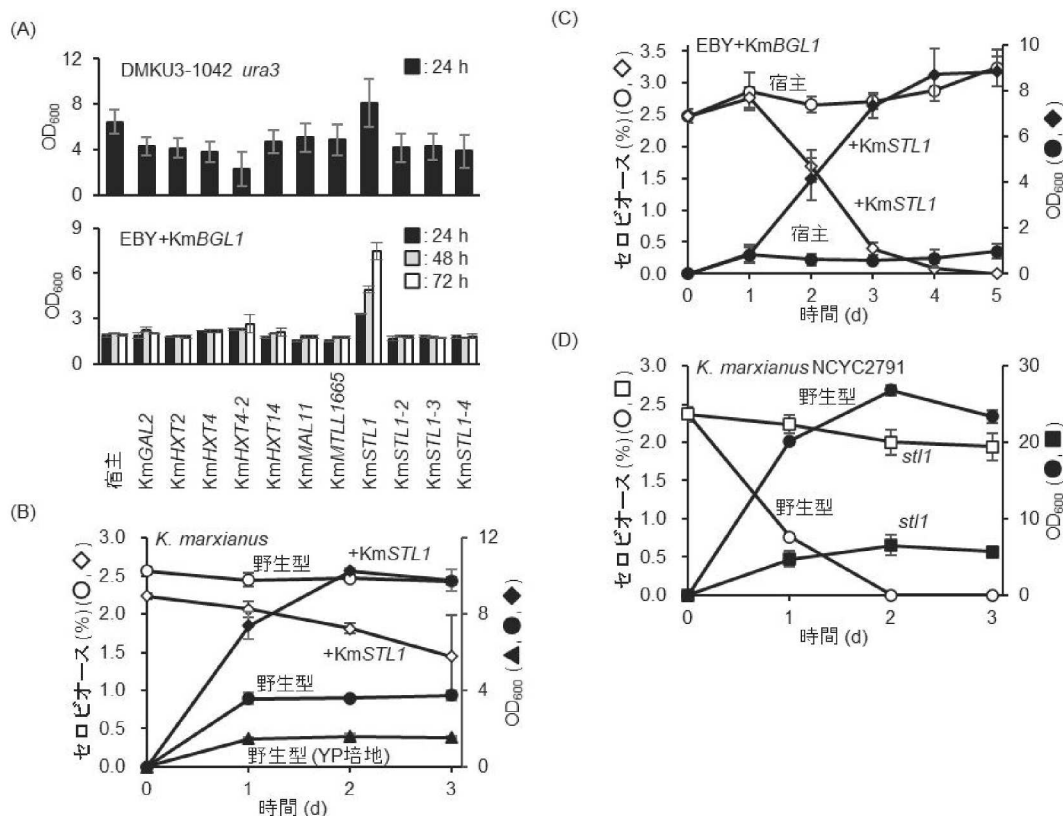


図 4-1 セロピオース輸送体をコードする遺伝子 KmSTL1 の同定

(A) *K. marxianus* DMKU3-1042 株由来の *ura3* 変異株 (RAK3605) および EBY.VW1000 へ P_{ScTDH3} -KmBGL1 を導入した *S. cerevisiae* (RAK43552) において、糖輸送体候補遺伝子を発現する株の YPCello 培地での増殖 (OD₆₀₀)。 (B-D) YPCello 培地における 3 日または 5 日間での増殖 (OD₆₀₀, 黒) およびセロピオースの濃度 (白)。

(B) *K. marxianus* DMKU3-1042 株 (野生型、●と○) および KmSTL1 を発現する株 (+KmSTL1、◆と◇)。野生型は YP 培地 (糖なし、▲) でも培養した。 (C) *S. cerevisiae* EBY.VW1000 株を、まず KmBGL1 発現プラスミド (宿主、●と○) で形質転換し、次に KmSTL1 発現プラスミド (+KmSTL1、◆と◇) で形質転換した。 (D) NCYC2791 株 (野生型、●と○) とその *Kmstl1* 破壊株 (*stl1*、■と◇) の YPCello 培地での増殖 (OD₆₀₀, 黒) およびセロピオースの濃度 (白)。培養は 3 回繰り返した。結果は平均値と標準偏差で示した。

糖輸送体は環境中から糖を取り込むため、細胞膜上に存在するはずである。*K. marxianus* における KmStl1p の局在を観察するため、GFP との融合タンパク質を発現させた。GFP-KmStl1p を発現する形質転換体を YPCello 培地で培養すると、GFP の蛍光が細胞膜上と細胞内双方で観察された (図 4-2A)。これは YPCello 培地において KmStl1p の一部が細胞膜上で機能していることを示唆する。一方、YPD 培地では蛍光は細胞内のみで観察され、グルコース条件下での KmStl1p の分解を示唆している (図 4-2A)。他の糖輸送体の挙動を観察するため、*K. marxianus* DMKU3-1042 株の *ura3* 変異株において、KmHxt2p および ScHxt6p を GFP との融合タンパク質として発現させた。KmHxt2p

は *S. cerevisiae* のグルコース輸送体 ScHxt1p、ScHxt3p、ScHxt5p、ScHxt6p、ScHxt7p と 70-72%の相同性および 98%のカバー率を示す。GFP-KmHxt2p および GFP-ScHxt6p の蛍光は YPD 培地と YPCello 培地どちらも細胞膜上で観察された (図 4-2A)。また、液胞膜を染色する試薬である FM4-64 を用いた染色により、細胞内の GFP の蛍光が液胞内に存在することが示された (図 4-2B)。これらの結果は、グルコース存在下における KmStl1p の液胞への選択的移行を示している。輸送タンパク質の液胞への移行はエンドサイトーシスを介して行われることが知られている [87]。そこで、エンドサイトーシスを介した KmStl1p の移行を評価した。YPCello 培地で培養した GFP-KmStl1p を発現する株を、エンドサイトーシス阻害剤 LatA を含むまたは含まない YPD 培地に移した。2 時間培養後、LatA を添加していない培地では GFP 蛍光が液胞のみで観察された (図 4-2C)。一方、LatA 存在下では蛍光が細胞膜上に保持された (図 4-2C)。これらの結果から、KmStl1p がエンドサイトーシスを介して液胞へ輸送されることが明らかとなった。

膜タンパク質は、標的タンパク質と結合しユビキチンリガーゼを輸送して液胞への移行を促す α -アレスチンを介してユビキチン化されることが知られている [88]。 α -アレスチンの関与を調べるため、*K. marxianus* のゲノム内の 7 つのオルソログをコードする遺伝子 KmALY1、KmART5、KmBUL1、KmECM21、KmLDB19、KmRIM8、KmROG3 を破壊し、破壊株で GFP-KmStl1p を発現させた。その結果、Kmrog3 Δ のみが KmStl1p の移行を部分的に阻害した (図 4-3A)。Kmrog3 Δ の効果は、セロビオース培地で培養し

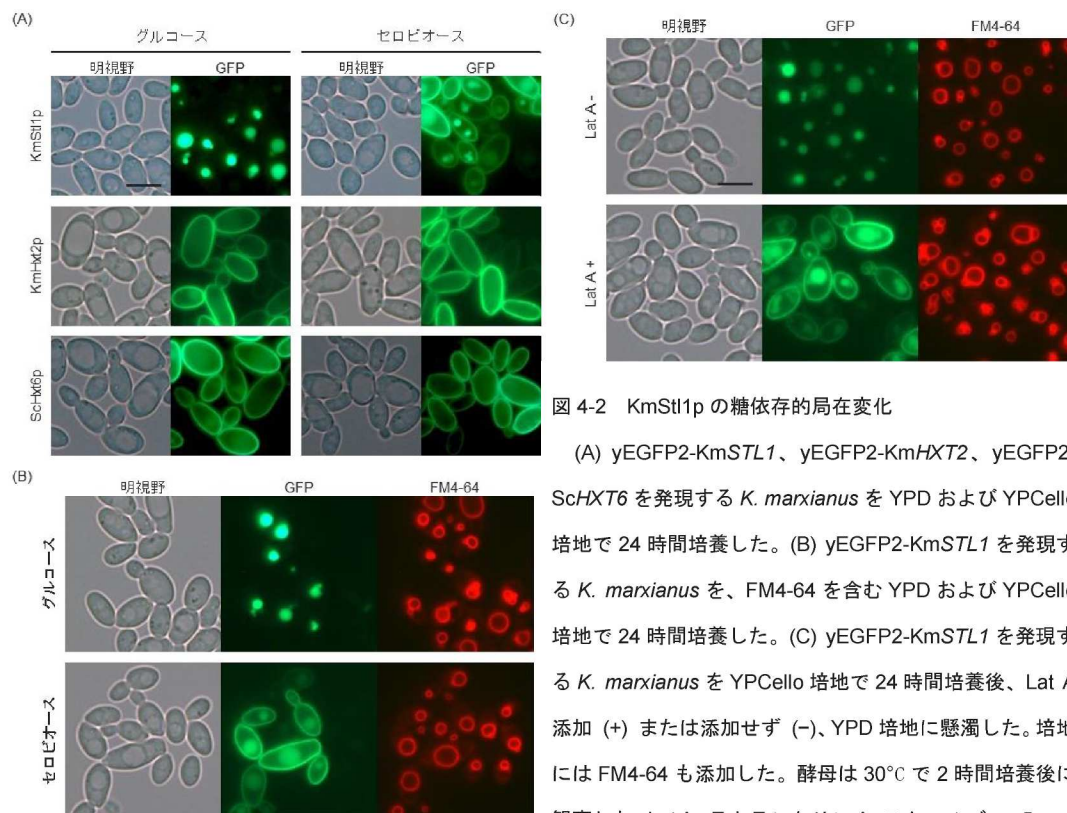


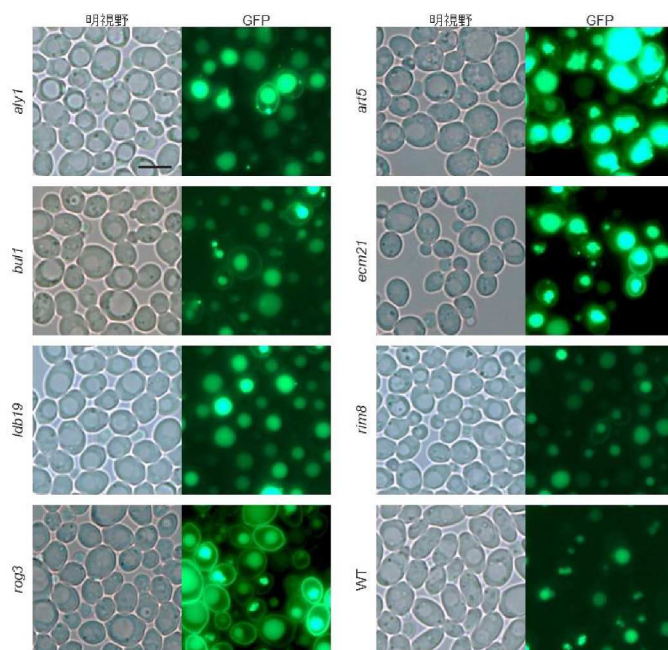
図 4-2 KmStl1p の糖依存的局在変化

(A) yEGFP2-KmSTL1、yEGFP2-KmHXT2、yEGFP2-ScHXT6 を発現する *K. marxianus* を YPD および YPCello 培地で 24 時間培養した。(B) yEGFP2-KmSTL1 を発現する *K. marxianus* を、FM4-64 を含む YPD および YPCello 培地で 24 時間培養した。(C) yEGFP2-KmSTL1 を発現する *K. marxianus* を YPCello 培地で 24 時間培養後、Lat A 添加 (+) または添加せず (-)、YPD 培地に懸濁した。培地には FM4-64 も添加した。酵母は 30°C で 2 時間培養後に観察した。LatA: ラトランクリン A。スケールバー: 5 μ m。

た細胞を YPD 培地に移した後、短時間で観察された (図 4-3B)。野生株では、GFP-KmStl1p は 60 分以内に液胞へ輸送された。対照的に、*Kmrog3Δ* では 60 分後も細胞膜上で GFP の蛍光が観察され、KmRog3p が α -アレスチンであり、グルコース条件下での KmStl1p の移行に関与していることを示した。

KmRog3p と相互作用する領域を特定するため、KmStl1p の N 末端および C 末端配列を欠失させた (図 4-4)。N 末端欠失変異 ($\Delta 1_{-52}$) は YPD 培地における KmStl1p の移行に影響を与えなかった。C 末端の 3 アミノ酸欠失変異 ($\Delta 564_{-566}$) も KmStl1p の移行に影響しなかったが、さらに 1 アミノ酸を欠失させた変異 ($\Delta 563_{-566}$) では液胞への移行が阻害された。14 アミノ酸の欠失変異 ($\Delta 553_{-566}$) でも KmStl1p を細胞膜上に保持した (図 4-4)。これらの結果は、C 末端配列が KmRog3p の標的であることを示している。 α -アレスチンは酸性アミノ酸を含む配列を認識するが [88]、KmStl1p の C 末端配列には 5 つの酸性アミノ酸が存在する。C 末端に存在する 3 つの酸性アミノ酸をアルギニンに置換した場合 (E559R_E560R_D562R) も、グルコース条件下で KmStl1p の移行を阻害した。この結果は、置換に利用した 3 つの酸性アミノ酸が KmRog3p との相互作用に重要であることを示している。

(A)



(B)

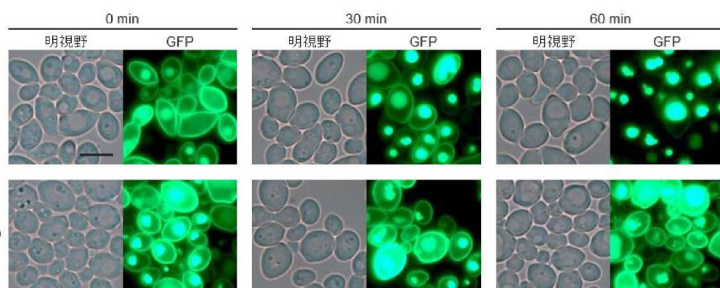


図 4-3 グルコース条件下における KmStl1p の移行への α -アレスチン KmRog3p の関与

(A) 示した α -アレスチン破壊株および RAK3605 (野生型) において yEGFP2-KmSTL1 を発現させた。形質転換体を YPD 培地で 24 時間培養し、GFP の蛍光を観察した。(B) yEGFP2-KmSTL1 を発現する RAK3605 (野生型) および *Kmrog3Δ* を YPCello 培地で 24 時間培養した。回収した細胞を YPD 培地に再懸濁し、30°C で培養した。0、30、60 min 後に GFP の蛍光を観察した。スケールバー: 5 μ m。

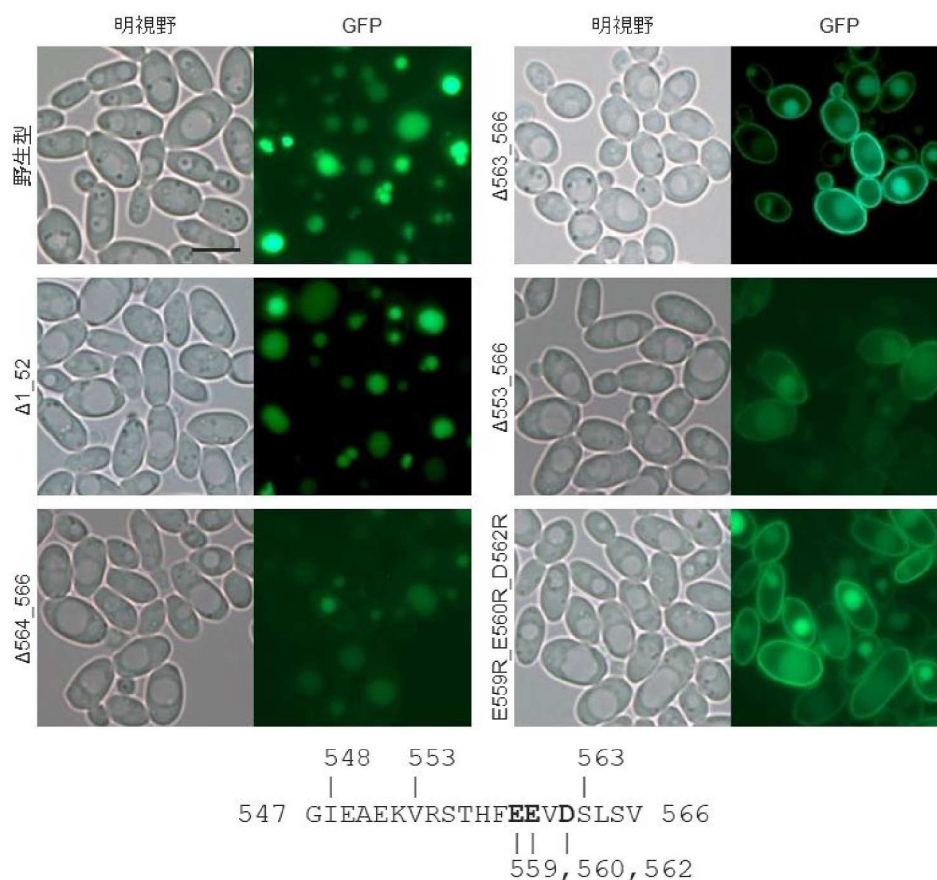


図 4-4 KmStl1p の C 末端修飾による液胞への移行の阻害

KmStl1p の N 末端 ($\Delta 1_{-}52$) および C 末端 (その他の変異) 配列を図の通り修飾した。菌株を YPD 培地で 24 時間培養後、GFP の蛍光を観察した。図の下部に C 末端 20 アミノ酸の配列を示した。スケールバー：5 μm 。

4.3.3 KmStl1p C 末端変異体による酵母でのセロビオース利用能の増強

グルコース存在下での KmStl1p の液胞への移行は C 末端変異体によって阻害された (図 4-4)。セロビオース条件下では液胞内にも GFP の蛍光が一部観察された (図 4-2A)。さらに、*K. marxianus* DMKU3-1042 株における KmSTL1 の過剰発現は、NCYC2791 株と同等の増殖レベルとはならなかった (図 4-1B、D)。これらの結果は、C 末端修飾をした KmStl1p を発現すると、セロビオース条件下においても、生成されるタンパク質の安定化を通じてセロビオース資化を促進する可能性を示唆した。この仮説を検証するため、KmBGL1 も過剰発現させた *K. marxianus* を用いて C 末端修飾がセロビオースの資化に及ぼす影響を調べた (図 4-5A)。その結果、KmBGL1 と KmSTL1 の共発現により、KmSTL1 単独発現時よりも完全なセロビオースの消費と高い増殖レベルを示し、DMKU3-1042 株における KmBGL1 の発現が不十分であることを示唆した。C 末端の 4 アミノ酸欠失変異 ($\Delta 563_{-}566$) は KmStl1p と比較してセロビオースの消費を減少させた。さらに 10 アミノ酸も欠失 ($\Delta 553_{-}566$) させると、野生型 KmStl1p を発現する株と比較してセロビオ

ースの消費と増殖が促進された。特に、セロビオースは2日以内に完全に消費されたが、野生型 KmStl1p を発現する株では糖の完全な消費に4日を要した。また、 α -アレスチンの機能に必要な3つの酸性アミノ酸の置換 (ER_ER_DR) は、セロビオースの消費を阻害した。

C末端変異の影響を *S. cerevisiae* でも評価した (図4-5B)。ここでは、増殖に対するC末端変異の効果を感度良く検出するため、 $P_{KmCDC19}$ (図4-1A) に代えて P_{ScTDH3} の制御下で KmSTL1 を発現させた。なお、レポーターアッセイの結果、YPD 培地で培養した *S. cerevisiae* において、 P_{ScTDH3} の転写活性は $P_{KmCDC19}$ よりも弱いことを明らかにしている (補足図 S4-3)。 P_{ScTDH3} による KmSTL1 の発現ではセロビオースの資化は起こらなかったが、KmStl1p $\Delta 563_566$ を発現する株では増殖とセロビオースの消費の両方が認められた。また、アミノ酸配列をさらに欠失させてもセロビオースの資化は増強せず、ER_ER_DR 変異体は欠失変異体と同等の増殖および消費レベルを示した。*S. cerevisiae* において KmStl1p 変異体によるセロビオースの消費が促進されたにもかかわらず、培養4日後でも0.25-0.4%のセロビオースが残っていた。これらの結果は、*K. marxianus* と *S. cerevisiae* の両方で KmStl1p のC末端修飾がセロビオースの資化を促進し得ることを示している。一方で、酵母における修飾効果の完全な一致は見られなかった。

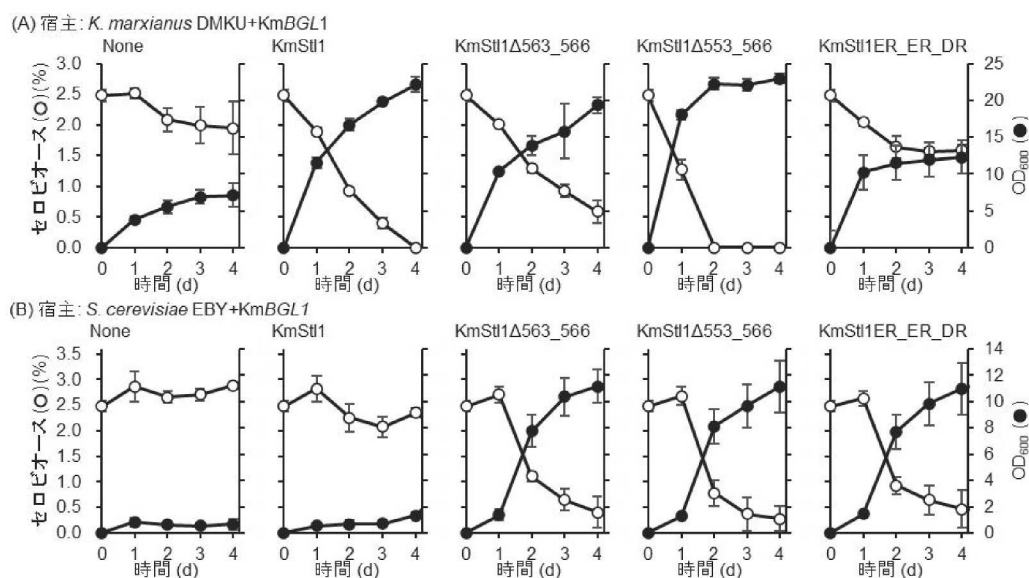


図4-5 KmStl1pのC末端修飾によるセロビオース資化能の増強

K. marxianus (A) および *S. cerevisiae* (B) において、KmSTL1のC末端変異体を発現させ、YPCello培地で4日間培養した。OD₆₀₀ (●) とセロビオースの濃度 (○) を測定した。酵母には KmBGL1 も発現させた。培養は3回繰り返した。結果は平均値と標準偏差で示した。

4.4 考察

4.4.1 *K. marxianus* の主要なセロビオース輸送体をコードする KmSTL1

本研究では、高いセロビオース資化能を持つ NCYC2791 株から得られた 11 の輸送体候補遺伝子を、セロビオース資化能の低い DMKU3-1042 株の *ura3* 変異株で発現させることにより、*K. marxianus* においてセロビオース輸送体 KmStl1p を実験的に同定した。NCYC2791 株と DMKU3-1042 株の KmSTL1 のコーディング配列は同じであったため、プロモーター活性が異なる可能性があったが、プロモーター配列 (1000 塩基対) の相違点は開始コドン上流 528 塩基対に位置する 1 塩基のみであった。この相違は両株における発現に深刻な影響を与えていないと考えている。*K. marxianus* の増殖は、細胞がセロビオースに反応するメカニズムに依存している可能性がある。

本研究において、セロビオースの取り込み能が弱い株の機能解析により、KmStl1p がセロビオース輸送体であることが同定された。KmStl1p は既知のセロビオース輸送体との配列の相同性が低く (補足図 S4-4)、最も相同性の高い *P. chrysogenum* のセロビオース輸送体でも同一性は 37% だけであった。一方、8 つの輸送体間で完全に保存されているアミノ酸残基が複数存在し、これらがセロビオース輸送において重要であることを示唆している。KmStl1p のアミノ酸配列をデータベース上の配列と比較できる BLAST 検索にかけると、約 90% のカバー率と 50% の同一性を示す複数のラクトースパーミアーゼの候補遺伝子が確認された。*P. oxalicum* 由来のセロビオース輸送体 CdtG は、*S. cerevisiae* EBY.VW5000 においてラクトースとセロビオースの両方を輸送した [82]。しかし、本研究で β -ガラクトシダーゼをコードする KmBGAI と KmSTL1 を共発現させた *S. cerevisiae* EBY.VW1000 株はラクトース培地で増殖しなかった (図表無し)。これは KmStl1p がセロビオース特異的な輸送体であることを示唆している。本研究の結果、NCYC2791 の Kmstl1 Δ 株はセロビオースをわずかに消費した (図 4-1D)。これは、*K. marxianus* に別のセロビオース輸送体が存在することを示しているが、その活性は KmStl1p よりもはるかに弱い。

4.4.2 α -アレスチンにより糖依存的な制御を受けた KmStl1p の細胞膜局在

N. crassa 由来の CDT-1 および CDT-2 を *S. cerevisiae* で発現させた研究では、セロビオース条件下では輸送体が α -アレスチン依存的に細胞内へ取り込まれるが、グルコース条件下では取り込まれないことが報告されている [89]。本研究における *K. marxianus* の KmStl1p と、前述の研究における輸送体の挙動は反対である。一方、*S. cerevisiae* における CDT-2 の C 末端欠失変異体と [89]、*K. marxianus* における KmStl1p の挙動は類似していた。タンパク質分解の基盤となるメカニズムは同一であるが、異種輸送体タンパク質は非生理的な方法で認識、分解される可能性がある。*K. marxianus* におけるセロビオース輸送体 KmStl1p の挙動は、セロビオース存在下では細胞膜上に存在し、機能が不要な時には分解されていた。

S. cerevisiae において、*ROD1*、*ROG3*、*ALY1*、*ALY2* の 4 つの α -アレスチン遺伝子を同時に欠損させると、CDT-1 および CDT-2 の内部移行が阻害された [89]。本研究では、*Kmrog3 Δ* はグルコース培地における *KmStl1p* の分解を遅延させ、*K. marxianus* において *KmRog3p* が *KmStl1p* の膜局在を調節する α -アレスチンであることを示した。 α -アレスチンはユビキチンリガーゼをリクルートするために膜タンパク質の N 末端または C 末端の細胞質領域にある酸性アミノ酸を認識する [88]。従って、タンパク質分解を防ぐ方法として、ユビキチン化の標的となる酸性アミノ酸残基やリジン残基を除去することが考えられた。CDT-2 におけるリジンのアルギニンへの変異は、細胞膜における輸送体の安定化に有効であった [89]。さらに、C 末端の 11 アミノ酸の欠失もその分解を阻害した [89]。削除された 11 残基には 3 つのグルタミン酸残基と 1 つのリジン残基が含まれていた。本研究では、酸性アミノ酸やリジン残基を全く含まない 4 残基の削除のみが *KmStl1p* の分解を阻害した。これらの知見は、 α -アレスチンが標的タンパク質と結合するには比較的長い配列を必要とし、そのような配列の一部を削除することで α -アレスチンとの結合が失われ、最終的に安定化につながる可能性を示唆している。本研究では、C 末端修飾がセロビオース資化に及ぼす影響が *S. cerevisiae* と *K. marxianus* で異なった (図 4-5)。つまり、輸送活性を損なわず生成タンパク質を安定化させる修飾が、バイオテクノロジー的な応用に有効である。

4. 4. 3 *KmStl1p* の改変によるセロビオース利用能の増強

これまでの *S. cerevisiae* にセロビオース資化能を付与する研究では、セロビオース輸送体と β -グルコシダーゼを共発現させている [90]。これらの研究では、*N. crassa* 由来の CDT-1 が頻繁に使用された。これらの遺伝子を用いた組換え株のセロビオースの消費速度は、約 0.19-2.7 g/L/h と推定され (補足表 S4-3)、宿主株や培養条件の影響を受けることが示唆された。本研究では、*S. cerevisiae* における *KmSTL1* の発現に用いたプロモーターがセロビオースの資化に影響を与えることが示された。驚くべきことに、レポーターアッセイにより、*S. cerevisiae* において $P_{KmCDC19}$ による発現が P_{ScTDH3} による発現よりも高いことが明らかになった (補足図 S4-3)。 $P_{KmCDC19}$ の制御下で *KmStl1p* を発現する *S. cerevisiae* (RAK42642) は、24-72 時間の間に約 0.50 g/L/h の速度でセロビオースを消費した。本研究で使用した β -グルコシダーゼ遺伝子は先行研究とは異なるが、*KmStl1p* の輸送速度は CDT-1 と同等と考えられる。特に、 P_{ScTDH3} による *KmStl1p* Δ 553_566 の発現では、24-48 時間の間に 0.79 g/L/h のセロビオース消費速度を示した。これらの結果は、強力なプロモーターによる C 末端修飾型 *KmStl1p* の発現が、*S. cerevisiae* におけるセロビオース資化をさらに促進する可能性を示唆している。本研究では、セロビオースを資化できる全ての *S. cerevisiae* で 1 日のタイムラグを示した。その理由是不明であるが、セロビオース資化を開始するにあたり、細胞状態を変化させるためにタイムラグが必要な可能性がある。C 末端修飾が *K. marxianus* と *S. cerevisiae* におけるセロビオ

ース資化に及ぼす影響は完全に一致しなかった (図 4-5)。2 種の酵母の膜組成が KmStl1p 変異体の機能や安定性に影響を与える可能性がある。*K. marxianus* は耐熱性酵母であり、40°C 以上でも良好に増殖する。この温度条件下では *S. cerevisiae* は深刻な増殖異常を示す。*K. marxianus* の耐熱性メカニズムは解明されていないが、*K. marxianus* の膜組成がその耐熱性に関与している可能性がある。2 種の酵母の膜組成を直接比較した報告はないものの、*K. marxianus* の飽和脂肪酸比率は *S. cerevisiae* よりも高い [91]、[92]。KmStl1p 変異体の機能や安定性は、酵母の膜組成によって影響を受けているかもしれない。

セロビオース輸送体を発現する *S. cerevisiae* において、ランダム突然変異誘発と実験室進化がセロビオース資化能を高めることが示されている。例えば、C 末端領域に変異を持つ 2 つの CDT-2 変異体は、 α -アレスチンとの結合を変化させることで安定化されることが示唆されている [93]、[94]。一方、他の変異体の変異部位は、セロビオース輸送体の C 末端の細胞質領域に存在しないため、 α -アレスチン結合に関与していないと考えられている [95]-[98]。これらの変異は安定化ではなく、セロビオース輸送効率の向上に寄与しているかもしれない。安定化と輸送速度向上を組み合わせると、酵母におけるセロビオース利用能のさらなる促進に有用であると考えられる。

結論として、*K. marxianus* で同定されたセロビオース輸送体の局在は環境中の糖によって調節される。この調節において、C 末端配列はグルコース存在下で α -アレスチンにより認識され、輸送体を分解する。C 末端配列の改変は、*K. marxianus* および *S. cerevisiae* においてセロビオース条件下でのセロビオース利用能を促進させた。輸送体の改変は、酵母における糖利用能を高める戦略となるだろう。

第5章

総括

本研究では、酵母 *S. cerevisiae* が発酵できるが増殖できない培養条件を見出し、これを利用して発酵を促進する因子を特定することで、培養工学的に糖利用を高めるとともに *K. marxianus* の遺伝子破壊と過剰発現を利用して糖輸送体と代謝酵素を同定することで、遺伝子工学的に *K. marxianus* の糖利用能の改善に成功した。

第2章では *S. cerevisiae* の発酵促進に特異的な成分を同定した。この同定した成分のうちグルタミン酸ナトリウムは 500 - 1000 円/kg と最も安価であることから、発酵能の低い廃棄物などからのエタノール生産ではグルタミン酸ナトリウムを加えることで *S. cerevisiae* によるエタノール生産を効率化できると考えられる。しかし、藻類、木材、菌類などをバイオマスとした時、*S. cerevisiae* が資化できないマンニトールやセロビオースなどの糖は残る。第3、4章で *K. marxianus* のマンニトールやセロビオース資化能を向上させた結果から、この残りの糖に対し過剰発現や細胞膜上での安定化を行った糖輸送体を持つ *K. marxianus* を用いることで、バイオマスを有効利用して酵母生産ができると考えられる。つまり、*S. cerevisiae* と遺伝子組換えを行った *K. marxianus* を使い分けることで天然に存在するバイオマスを無駄なく利用することができると考えられる。また、別の酵母についても糖輸送体の制御の基本は同じであると考えられるため、輸送体の過剰発現や細胞膜上での安定化により、様々な酵母の糖資化能を改善できると考えられる。従って、利用できる糖と生産したい物質に合わせて他の酵母も用いることで、これまで廃棄されていた未利用バイオマスを活用できる可能性が広がる。

また、*S. cerevisiae* においても輸送体が糖の利用能に律速である可能性がある。第2章で得られた発酵促進成分を含む増殖しない培地では初発糖濃度が高いこともあり、完全にはグルコースが消費されず残っていた。そのため、適切なグルコース輸送体を過剰発現させることで、グルコースをさらに利用できるかもしれない。

第2章では培養終了時にグルコースが残っていたが、これまでに産業的エタノール生産に用いられていない酵母を利用することで、全ての糖を利用できる可能性がある。例えば、本研究で用いた増殖しない培地は糖濃度が高いため、浸透圧耐性酵母を用いれば発酵量や速度が改善できる可能性がある。pH が発酵促進に重要であったことから、培地 pH をより高く設定して耐アルカリ性の酵母を用いることでも発酵を改善できる可能性があり、このような酵母に新たな価値を与えられるかもしれない。

第3章では遺伝子破壊によりソルビトールとマンニトールの輸送体と代謝酵素を同定し、第4章では遺伝子の過剰発現を用いてセロビオース輸送体遺伝子を同定した。遺伝子破壊では、破壊した遺伝子が機能を失うが、その生物に同じ機能をもつ別の遺伝子もあると破壊の影響が出ない。また、遺伝子過剰発現では、感受性株を宿主として過剰発現を行うため、感受性株を見つけ出さなければならない。つまり、どちらにも不利な

点があり、同定にはこれらを必要に応じて使い分けることが有効である。

第4章では、19種の *K. marxianus* のセロビオース資化能を基に、資化に優れる株とそうでない株を明らかにできたことで、セロビオース輸送体の同定に至った。このことから、多くの株で別の糖の資化能の違いを調べることで、新たな糖の輸送体の同定にも利用できる。

本研究では、発酵促進因子の解明やいくつかの糖を原料とした酵母の増殖能の改善を行った。これらの成果を総合的に考察すると、本研究で扱っていない糖輸送体を過剰発現さらには細胞膜上で安定化させた株を構築することで種々の糖の資化能を上げ、未利用バイオマスを活用できると考えられた。今後、天然および遺伝子工学的に育種した種々の酵母を目的に応じて使い分け、幅広いバイオマスを原料とした様々な有用物質の生産が期待される。

参考文献

- [1] Renewables 2023 : Analysis and forecast to 2028 (参照 2025 年 11 月 1 日). (2024). <https://www.iea.org/reports/renewables-2023>.
- [2] V. E. Gopinarayanan and N. U. Nair. (2019). Pentose Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: The Need to Engineer Global Regulatory Systems. *Biotechnol. J.*, Vol. 14, e1800364. doi: 10.1002/biot.201800364.
- [3] S. Nonklang, B. M. A. Abdel-Banat, K. Cha-aim, N. Moonjai, H. Hoshida, S. Limtong, M. Yamada and R. Akada. (2008). High-temperature ethanol fermentation and transformation with linear DNA in the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* DMKU3-1042. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 74, 7514–7521. doi: 10.1128/AEM.01854-08.
- [4] P. J. Anderson, K. McNeil and K. Watson. (1986). High-efficiency carbohydrate fermentation to ethanol at temperatures above 40°C by *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* isolated from sugar mills. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 51, 1314–1320. doi: 10.1128/aem.51.6.1314-1320.1986.
- [5] J. Szczodrak and Z. Targoński. (1988). Selection of thermotolerant yeast strains for simultaneous saccharification and fermentation of cellulose. *Biotechnol. Bioeng.*, Vol. 31, 300–303. doi: 10.1002/bit.260310404.
- [6] S. Kumar, S. P. Singh, I. M. Mishra and D. K. Adhikari. (2009). Ethanol and xylitol production from glucose and xylose at high temperature by *Kluyveromyces* sp. IIPE453. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 36, 1483–1489. doi: 10.1007/s10295-009-0636-6.
- [7] B. M. A. Abdel-Banat, H. Hoshida, A. Ano, S. Nonklang and R. Akada. (2010). High-temperature fermentation: how can processes for ethanol production at high temperatures become superior to the traditional process using mesophilic yeast? *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 85, 861–867. doi: 10.1007/s00253-009-2248-5.
- [8] H. Hoshida and R. Akada. (2025). Thermotolerant Yeasts and High-Temperature Fermentation. in: A. A. Sibirny (ed.). *Biotechnology of Yeasts and Filamentous Fungi* 2nd edition. *Springer, Cham*. 49–76.
- [9] N. Lertwattanasakul, T. Kosaka, A. Hosoyama, Y. Suzuki, N. Rodrussamee, M. Matsutani, M. Murata, N. Fujimoto, Suprayogi, K. Tsuchikane, S. Limtong, N. Fujita and M. Yamada. (2015). Genetic basis of the highly efficient yeast *Kluyveromyces marxianus*: complete genome sequence and transcriptome analyses. *Biotechnol. Biofuels*, Vol. 8, 47. doi: 10.1186/s13068-015-0227-x.
- [10] L. Lulu, Z. Ling, W. Dongmei, G. Xiaolian, T. Hisanori, K. Hidehiko and H. Jiong. (2013) Identification of a Xylitol Dehydrogenase Gene from *Kluyveromyces marxianus* NBRC1777. *Mol. Biotechnol.*, Vol. 53, 159–169. doi: 10.1007/s12033-012-9508-9.

- [11] B. Zhang, L. Zhang, D. Wang, X. Gao and J. Hong. (2011). Identification of a xylose reductase gene in the xylose metabolic pathway of *Kluyveromyces marxianus* NBRC1777. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 38, 2001–2010. doi: 10.1007/s10295-011-0990-z.
- [12] R. Wang, L. Zhang, D. Wang, X. Gao and J. Hong. (2011). Identification of a xylulokinase catalyzing xylulose phosphorylation in the xylose metabolic pathway of *Kluyveromyces marxianus* NBRC1777. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 38, 1739–1746. doi: 10.1007/s10295-011-0963-2.
- [13] J. A. Varela, N. Montini, D. Scully, R. Van der Ploeg, M. Oreb, E. Boles, J. Hirota, R. Akada, H. Hoshida and J. P. Morrissey. (2017). Polymorphisms in the *LAC12* gene explain lactose utilization variability in *Kluyveromyces marxianus* strains. *FEMS Yeast Res.*, Vol. 17, fox021. doi: 10.1093/femsyr/fox021.
- [14] X. Luo, X. Tao, G. Ran, Y. Deng, H. Wang, L. Tan and Z. Pang. (2024). Molecular Modification Enhances Xylose Uptake by the Sugar Transporter KM_SUT5 of *Kluyveromyces marxianus*. *Int. J. Mol. Sci.*, Vol. 25, 8322. doi: 10.3390/ijms25158322.
- [15] E. P. Knoshaug, V. Vidgren, F. Magalhães, E. E. Jarvis, M. A. Franden, M. Zhang and A. Singh. (2015). Novel transporters from *Kluyveromyces marxianus* and *Pichia guilliermondii* expressed in *Saccharomyces cerevisiae* enable growth on L-arabinose and D-xylose. *Yeast*, Vol. 32, 615–628. doi: 10.1002/yea.3084.
- [16] A. Bušić, N. Mardetko, S. Kundas, G. Morzak, H. Belskaya, M. I. Šantek, D. Komes, S. Novak and B. Šantek. (2018). Bioethanol production from renewable raw materials and its separation and purification: a review. *Food Technol. Biotechnol.*, Vol. 56, 289–311. doi: 10.17113/ftb.56.03.18.5546.
- [17] D. Watanabe, T. Kajihara, Y. Sugimoto, K. Takagi, M. Mizuno, Y. Zhou, J. Chen, K. Takeda, H. Tatebe, K. Shiozaki, N. Nakazawa, S. Izawa, T. Akao, H. Shimoi, T. Maeda and H. Takagi. (2019). Nutrient signaling via the TORC1-Greatwall-PP2A^{B55δ} pathway is responsible for the high initial rates of alcoholic fermentation in sake yeast strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 85, e02083-18. doi: 10.1128/AEM.02083-18.
- [18] K. M. Dombek and L. O. Ingram. (1986). Magnesium limitation and its role in apparent toxicity of ethanol during yeast fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 52, 975–981. doi: 10.1128/aem.52.5.975-981.1986.
- [19] A. Nakanishi, M. Mori, N. Yamamoto, S. Nemoto, N. Kanamaru, M. Yomogita, N. Omino and R. Matsumoto. (2023). Evaluation of cell responses of *Saccharomyces cerevisiae* under cultivation using wheat bran as a nutrient resource by analyses of growth activities and comprehensive gene transcription levels. *Microorganisms*, Vol. 11, 2674. doi: 10.3390/microorganisms11112674.

- [20] G. Z. Breisha. (2010). Production of 16 % ethanol from 35 % sucrose. *Biomass Bioenergy*, Vol. 34, 1243–1249. doi: 10.1016/j.biombioe.2010.03.017.
- [21] H. Yang, X. Zong, C. Cui, L. Mu and H. Zhao. (2018). Peptide (Lys–Leu) and amino acids (Lys and Leu) supplementations improve physiological activity and fermentation performance of brewer's yeast during very high-gravity (VHG) wort fermentation. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, Vol. 65, 630–638. doi: 10.1002/bab.1634.
- [22] D. D'Amato, M. R. Corbo, M. A. Del Nobile and M. Sinigaglia. (2006). Effects of temperature, ammonium and glucose concentrations on yeast growth in a model wine system. *Int. J. Food Sci. Technol.* Vol. 41, 1152–1157. doi: 10.1111/j.1365-2621.2005.01128.x.
- [23] C. Duc, M. Pradal, I. Sanchez, J. Noble, C. Tesnière and B. Blondin. (2017). A set of nutrient limitations trigger yeast cell death in a nitrogen-dependent manner during wine alcoholic fermentation. *PLoS One*, Vol. 12, e0184838. doi: 10.1371/journal.pone.0184838.
- [24] M. Y. Akbas and B. C. Stark. (2016). Recent trends in bioethanol production from food processing byproducts. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 43, 1593–1609. doi: 10.1007/s10295-016-1821-z.
- [25] N. Phukoetphim, A. Salakkam, P. Laopaiboon and L. Laopaiboon. (2017). Kinetic models for batch ethanol production from sweet sorghum juice under normal and high gravity fermentations: logistic and modified Gompertz models. *J. Biotechnol.*, Vol. 243, 69–75. doi: 10.1016/j.jbiotec.2016.12.012.
- [26] D. Bi, D. Chu, P. Zhu, C. Lu, C. Fan, J. Zhang and J. Bao. (2011). Utilization of dry distiller's grain and solubles as nutrient supplement in the simultaneous saccharification and ethanol fermentation at high solids loading of corn stover. *Biotechnol. Lett.*, Vol. 33, 273–276. doi: 10.1007/s10529-010-0429-z.
- [27] Y. F. Wang, L. Tan, T. Wang, Z. Y. Sun, Y. Q. Tang and K. Kida. (2017). Production of ethanol from kitchen waste by using flocculating *Saccharomyces cerevisiae* KF-7. *Environ. Technol. (UK)*, Vol. 38, 316–325. doi: 10.1080/09593330.2016.1192224.
- [28] L. G. Seluy, R. N. Comelli, M. T. Benzzo and M. A. Isla. (2018). Feasibility of bioethanol production from cider waste. *J. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 28, 1493–1501. doi: 10.4014/jmb.1801.01044.
- [29] A. Devi, S. Bajar, P. Sihag, Z. U. D. Sheikh, A. Singh, J. Kaur, N. R. Bishnoi and D. Pant. (2023). A panoramic view of technological landscape for bioethanol production from various generations of feedstocks. *Bioengineered*, Vol. 14, 81–112. doi: 10.1080/21655979.2022.2095702.
- [30] A. E. Wheals, L. C. Basso, D. M. G. Alves and H. V. Amorim. (1999). Fuel ethanol after 25 years. *Trends Biotechnol.*, Vol. 17, 482–487. doi: 10.1016/s0167-7799(99)01384-0.

- [31] J. P. de Souza, C. D. do Prado, E. C. A. Eleutherio, D. Bonatto, I. Malavazi and A. F. da Cunha. (2018). Improvement of Brazilian bioethanol production-challenges and perspectives on the identification and genetic modification of new strains of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts isolated during ethanol process. *Fungal Biol.*, Vol. 122, 583–591. doi: 10.1016/j.funbio.2017.12.006.
- [32] L. C. Basso, H. V. de Amorim, A. J. de Oliveira and M. L. Lopes. (2008). Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. *FEMS Yeast Res.*, Vol. 8, 1155–1163. doi: 10.1111/j.1567-1364.2008.00428.x.
- [33] M. A. Clarke. (2003). Syrups. in: B. Caballero, P. Finglas and F. Toldrá (eds.). Encyclopedia of food sciences and nutrition (2nd ed.). *Academic Press, Amsterdam*. 5711–5717.
- [34] R. B. de Souza, J. A. S. de Menezes, R. de F. R. de Souza, E. D. Dutra and M. A. de Morais Jr.. (2015). Mineral composition of the sugarcane juice and its influence on the ethanol fermentation. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, Vol. 175, 209–222. doi: 10.1007/s12010-014-1258-7.
- [35] L. Caspeta, J. Coronel, A. M. de Oca, E. Abarca, L. González and A. Martínez. (2019) Engineering high-gravity fermentations for ethanol production at elevated temperature with *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.*, Vol. 116, 2587–2597. doi: 10.1002/bit.27103.
- [36] Y. Lin, W. Zhang, C. Li, K. Sakakibara, S. Tanaka and H. Kong. (2012). Factors affecting ethanol fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* BY4742. *Biomass Bioenergy*, Vol. 47, 395–401. doi: 10.1002/yea.2924.
- [37] N. V. Narendranath and R. Power. (2005). Relationship between pH and medium dissolved solids in terms of growth and metabolism of lactobacilli and *Saccharomyces cerevisiae* during ethanol production. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 71, 2239–2243. doi: 10.1128/AEM.71.5.2239-2243.2005.
- [38] F. H. Lam, A. Ghaderi, G. R. Fink and G. Stephanopoulos. (2014). Engineering alcohol tolerance in yeast. *Science*, Vol. 346, 71–75. doi: 10.1126/science.1257859.
- [39] T. Viana, M. C. Loureiro-Dias, V. Loureiro and C. Prista. (2012). Peculiar H⁺ homeostasis of *Saccharomyces cerevisiae* during the late stages of wine fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 78, 6302–6308. doi: 10.1128/AEM.01355-12.
- [40] A. Madeira, L. Leitão, G. Soveral, P. Dias, C. Prista, T. Moura and M. C. Loureiro-Dias. (2010). Effect of ethanol on fluxes of water and protons across the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.*, Vol. 10, pp. 252–258. doi: 10.1111/j.1567-1364.2010.00607.x.
- [41] R. Wiczorke, S. Krampe, T. Weierstall, K. Freidel, C. P. Hollenberg and E. Boles. (1999).

- Concurrent knock-out of at least 20 transporter genes is required to block uptake of hexoses in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.*, Vol. 464, 123–128. doi: 10.1016/s0014-5793(99)01698-1.
- [42] A. Maier, B. Völker, E. Boles and G. F. Fuhrmann. (2002). Characterisation of glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae* with plasma membrane vesicles (countertransport) and intact cells (initial uptake) with single Hxt1, Hxt2, Hxt3, Hxt4, Hxt6, Hxt7 or Gal2 transporters. *FEMS Yeast Res.*, Vol. 2, 539–550. doi: 10.1111/j.1567-1364.2002.tb00121.x.
- [43] S. Ozcan, M. Johnston. (1999). Function and regulation of yeast hexose transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, Vol. 63, 554–569. doi: 10.1128/MMBR.63.3.554-569.1999.
- [44] K. Matsushita, Y. Azuma, T. Kosaka, T. Yakushi, H. Hoshida, R. Akada and M. Yamada. (2016). Genomic analyses of thermotolerant microorganisms used for high-temperature fermentations. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, Vol. 80, 655–668. doi: 10.1080/09168451.2015.1104235.
- [45] H. Hoshida, K. Kidera, R. Takishita, N. Fujioka, T. Fukagawa and R. Akada. (2018). Enhanced production of extracellular inulinase by the yeast *Kluyveromyces marxianus* in xylose catabolic state. *J. Biosci. Bioeng.*, Vol. 125, 676–681. doi: 10.1016/j.jbiosc.2017.12.024
- [46] L. Donzella, J. A. Varela, M. J. Sousa and J. P. Morrissey. (2021). Identification of novel pentose transporters in *Kluyveromyces marxianus* using a new screening platform. *FEMS Yeast Res.*, Vol. 21, foab026. doi: 10.1093/femsyr/foab026.
- [47] A. K. Löbs, R. Engel, C. Schwartz, A. Flores and I. Wheeldon. (2017). CRISPR-Cas9-enabled genetic disruptions for understanding ethanol and ethyl acetate biosynthesis in *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnol. Biofuels*, Vol. 10, 164. doi: 10.1186/s13068-017-0854-5.
- [48] D. Bever, I. Wheeldon and N. Da Silva. (2022). RNA polymerase II-driven CRISPR-Cas9 system for efficient non-growth-biased metabolic engineering of *Kluyveromyces marxianus*. *Metab. Eng. Commun.*, Vol. 15, e00208. doi: 10.1016/j.mec.2022.e00208.
- [49] Y. Nambu-Nishida, K. Nishida, T. Hasunuma and A. Kondo. (2017). Development of a comprehensive set of tools for genome engineering in a cold- and thermo-tolerant *Kluyveromyces marxianus* yeast strain. *Sci. Rep.*, Vol. 7, 8993. doi: 10.1038/s41598-017-08356-5.
- [50] H. Juergens, J. A. Varela, A. R. G. de Vries, T. Perli, V. J. M. Gast, N. Y. Gyurchev, A. S. Rajkumar, R. Mans, J. T. Pronk, J. P. Morrissey and J. M. G. Daran. (2018). Genome editing in *Kluyveromyces* and *Ogataea* yeasts using a broad-host-range Cas9/gRNA co-expression plasmid. *FEMS Yeast Res.*, Vol. 18, foy012. doi: 10.1093/femsyr/foy012.
- [51] M. H. Lee, T. L. Hsu, J. J. Lin, Y. J. Lin, Y. Y. Kao, J. J. Chang and W. H. Li. (2020).

- Constructing a human complex type *N*-linked glycosylation pathway in *Kluyveromyces marxianus*. *PLoS One*, Vol. 15, e0233492. doi: 10.1371/journal.pone.0233492.
- [52] M. Li, X. Lang, M. M. Cabrera, S. De Keyser, X. Sun, N. Da Silva and I. Wheeldon. (2021). CRISPR-mediated multigene integration enables Shikimate pathway refactoring for enhanced 2-phenylethanol biosynthesis in *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnol. Biofuels*, Vol. 14, 3. doi: 10.1186/s13068-020-01852-3.
- [53] H. Hoshida, N. Murakami, A. Suzuki, R. Tamura, J. Asakawa, B. M. A. Abdel-Banat, S. Nonklang, M. Nakamura and R. Akada. (2014). Non-homologous end joining-mediated functional marker selection for DNA cloning in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Yeast*, Vol. 31, 29–46. doi: 10.1002/yea.2993.
- [54] B. M. A. Abdel-Banat, S. Nonklang, H. Hoshida and R. Akada. (2010). Random and targeted gene integrations through the control of non-homologous end joining in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Yeast*, Vol. 27, 29–39. doi: 10.1002/yea.1729.
- [55] Y. Misumi, S. Nishioka, A. Fukuda, T. Uemura, M. Nakamura, H. Hoshida and R. Akada. (2019). YHp as a highly stable, hyper-copy, hyper-expression plasmid constructed using a full 2- μ m circle sequence in *cir0* strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, Vol. 36, 249–257. doi: 10.1002/yea.3371.
- [56] A. V. Sarthy, C. Schopp and K. B. Idler. (1994). Cloning and sequence determination of the gene encoding sorbitol dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, Vol. 140, 121–126. doi: 10.1016/0378-1119(94)90741-2.
- [57] Q. Wang and J. J. Coleman. (2019). Progress and challenges: development and implementation of CRISPR/Cas9 technology in filamentous fungi. *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, Vol. 17, 761–769. doi: 10.1016/j.csbj.2019.06.007.
- [58] N. Guo, J. B. Liu, W. Li, Y. S. Ma and D. Fu. (2022). The power and the promise of CRISPR/Cas9 genome editing for clinical application with gene therapy. *J. Adv. Res.*, Vol. 40, 135–152. doi: 10.1016/j.jare.2021.11.018.
- [59] M. Tyumentseva, A. Tyumentsev and V. Akimkin. (2023). CRISPR/Cas9 landscape: current state and future perspectives. *Int. J. Mol. Sci.*, Vol. 24, 16077. doi: 10.3390/ijms242216077.
- [60] K. Suzuki, Y. Tsunekawa, R. Hernandez-Benitez, J. Wu, J. Zhu, E. J. Kim, F. Hatanaka, M. Yamamoto, T. Araoka, Z. Li, M. Kurita, T. Hishida, M. Li, E. Aizawa, S. Guo, S. Chen, A. Goebel, R. D. Soligalla, J. Qu, T. Jiang, X. Fu, M. Jafari, C. R. Esteban, W. T. Berggren, J. Lajara, E. Nuñez-Delicado, P. Guillen, J. M. Campistol, F. Matsuzaki, G. H. Liu, P. Magistretti, K. Zhang, E. M. Callaway, K. Zhang and J. C. I. Belmonte. (2016). In vivo genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homology-independent targeted integration. *Nature*, Vol. 540, 144–149. doi: 10.1038/nature20565.
- [61] Y. Kimura, Y. Hisano, A. Kawahara and S. Higashijima. (2014). Efficient generation of

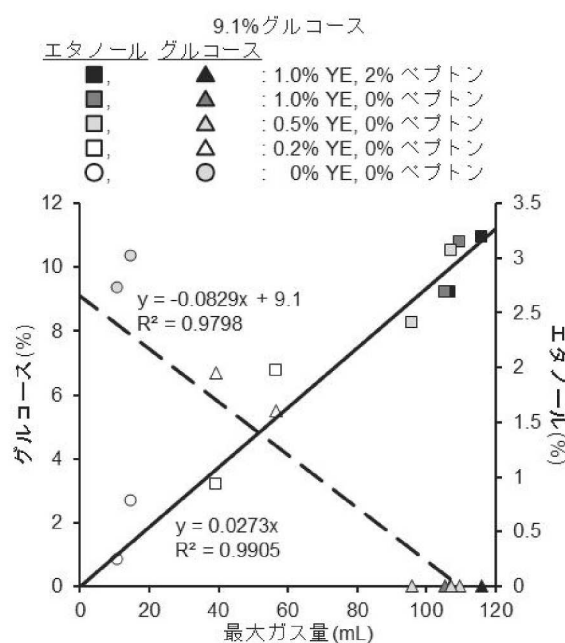
- knock-in transgenic zebrafish carrying reporter/driver genes by CRISPR/Cas9-mediated genome engineering. *Sci. Rep.*, Vol. 4, 6545. doi: 10.1038/srep06545.
- [62] P. Jordan, J. Y. Choe, E. Boles and M. Oreb. (2016). Hxt13, Hxt15, Hxt16 and Hxt17 from *Saccharomyces cerevisiae* represent a novel type of polyol transporters. *Sci. Rep.*, Vol. 6, 23502. doi: 10.1038/srep23502.
- [63] S. K. Byoung, C. J. Heung and H. K. Jung. (2006). Molecular cloning and characterization of NAD⁺-dependent xylitol dehydrogenase from *Candida tropicalis* ATCC 20913. *Biotechnol. Prog.*, Vol. 22, 1708–1714. doi: 10.1021/bp060263i.
- [64] D. Biswas, M. Datt, M. Aggarwal and A. K. Mondal. (2013). Molecular cloning, characterization, and engineering of xylitol dehydrogenase from *Debaryomyces hansenii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 97, 1613–1623. doi: 10.1007/s00253-012-4020-5.
- [65] W. Sukpipat, H. Komeda, P. Prasertsan and Y. Asano. (2017). Purification and characterization of xylitol dehydrogenase with L-arabitol dehydrogenase activity from the newly isolated pentose-fermenting yeast *Meyerozyma caribbica* 5XY2. *J. Biosci. Bioeng.*, Vol. 123, 20–27. doi: 10.1016/j.jbiosc.2016.07.011.
- [66] A. R. G. Sierra, S. Yook, S. Coleman, M. Bansal and H. S. Alper. (2025). Developing a *Yarrowia lipolytica* platform for conversion of mannitol-containing waste streams. *Bioresource Technol.*, Vol. 437, 133161. doi: 10.1016/j.biortech.2025.133161.
- [67] P. Akentyev, D. Sokolova, A. Korzhenkov, I. Gubaidullin and D. Kozlov. (2023). Expression level of *SOR1* is a bottleneck for efficient sorbitol utilization by yeast *Komagataella kurtzmanii*. *Yeast*, Vol. 40, 414–424. doi: 10.1002/yea.3884.
- [68] M. Chujo, S. Yoshida, A. Ota, K. Murata and S. Kawai. (2015). Acquisition of the ability to assimilate mannitol by *Saccharomyces cerevisiae* through dysfunction of the general corepressor Tup1-Cyc8. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 81, 9–16. doi: 10.1128/AEM.02906-14.
- [69] H. Tanaka, K. Murata, W. Hashimoto and S. Kawai. (2020). Hsp104-dependent ability to assimilate mannitol and sorbitol conferred by a truncated Cyc8 with a C-terminal polyglutamine in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One*, Vol. 15, e0242054. doi: 10.1371/journal.pone.0242054.
- [70] T. Yarimizu, S. Nonklang, J. Nakamura, S. Tokuda, T. Nakagawa, S. Lorreungsil, S. Sutthikhumpha, C. Pukahuta, T. Kitagawa, M. Nakamura, K. Cha-aim, S. Limtong, H. Hoshida and R. Akada. (2013). Identification of auxotrophic mutants of the yeast *Kluyveromyces marxianus* by non-homologous end joining-mediated integrative transformation with genes from *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 30, 485–500. doi: 10.1002/yea.2985.
- [71] S. Nonklang, A. Ano, B. M. A. Abdel-Banat, Y. Saito, H. Hoshida and R. Akada. (2009).

- Construction of flocculent *Kluyveromyces marxianus* strains suitable for high-temperature ethanol fermentation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, Vol. 73, 1090–1095. doi: 10.1271/bbb.80853.
- [72] A. S. Rajkumar and J. P. Morrissey. (2022). Protocols for marker-free gene knock-out and knock-down in *Kluyveromyces marxianus* using CRISPR/Cas9. *FEMS Yeast Res.*, Vol. 22, foab067. doi: 10.1093/femsyr/foab067.
- [73] A. S. Rajkumar, J. A. Varela, H. Juergens, J. M. G. Daran and J. P. Morrissey. (2019). Biological parts for *Kluyveromyces marxianus* synthetic biology. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, Vol. 7, 97. doi: 10.3389/fbioe.2019.00097.
- [74] M. Nurcholis, N. Lertwattanasakul, N. Rodrussamee, T. Kosaka, M. Murata and M. Yamada. (2020). Integration of comprehensive data and biotechnological tools for industrial applications of *Kluyveromyces marxianus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 104, 475–488. doi: 10.1007/s00253-019-10224-3.
- [75] L. V. Leonel, P. V. Arruda, A. K. Chandel, M. G. A. Felipe and L. Sene. (2021). *Kluyveromyces marxianus*: a potential biocatalyst of renewable chemicals and lignocellulosic ethanol production. *Crit. Rev. Biotechnol.*, Vol. 41, 1131–1152. doi: 10.1080/07388551.2021.1917505.
- [76] R. Wang, L. Li, B. Zhang, X. Gao, D. Wang and J. Hong. (2013). Improved xylose fermentation of *Kluyveromyces marxianus* at elevated temperature through construction of a xylose isomerase pathway. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 40, 841–854. doi: 10.1007/s10295-013-1282-6.
- [77] J. M. Galazka, C. Tian, W. T. Beeson, B. Martinez, N. L. Glass and J. H. D. Cate. (2010). Cellodextrin transport in yeast for improved biofuel production. *Science*, Vol. 330, 84–86. doi: 10.1126/science.1192838.
- [78] T. F. Dos Reis, P. B. A. De Lima, N. S. Parachin, F. B. Mingossi, J. V. De Castro Oliveira, L. N. A. Ries and G. H. Goldman. (2016). Identification and characterization of putative xylose and cellobiose transporters in *Aspergillus nidulans*. *Biotechnol. Biofuels*, Vol. 9, 204. doi: 10.1186/s13068-016-0611-1.
- [79] J. Li, G. Liu, M. Chen, Z. Li, Y. Qin and Y. Qu. (2013). Cellodextrin transporters play important roles in cellulase induction in the cellulolytic fungus *Penicillium oxalicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 97, 10479–10488. doi: 10.1007/s00253-013-5301-3.
- [80] Y. H. Bae, K. H. Kang, Y. S. Jin and J. H. Seo. (2014). Molecular cloning and expression of fungal cellobiose transporters and β -glucosidases conferring efficient cellobiose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biotechnol.*, Vol. 169, 34–41. doi: 10.1016/j.jbiotec.2013.10.030.
- [81] W. Zhang, Y. Kou, J. Xu, Y. Cao, G. Zhao, J. Shao, H. Wang, Z. Wang, X. Bao, G. Chen

- and W. Liu. (2013). Two major facilitator superfamily sugar transporters from *Trichoderma reesei* and their roles in induction of cellulase biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, Vol. 288, 32861–32872. doi: 10.1074/jbc.M113.505826.
- [82] J. C. de Ruijter, K. Igarashi and M. Penttilä. (2020). The *Lipomyces starkeyi* gene Ls120451 encodes a cellobiose transporter that enables cellobiose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.*, Vol. 20, foaa019. doi: 10.1093/femsyr/foaa019.
- [83] J. A. Varela, M. Puricelli, N. Montini and J. P. Morrissey. (2019). Expansion and diversification of MFS transporters in *Kluyveromyces marxianus*. *Front. Microbiol.*, Vol. 9, 3330. doi: 10.3389/fmicb.2018.03330.
- [84] S. Keppler-Ross, C. Noffz and N. Dean. (2008). A new purple fluorescent color marker for genetic studies in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Genetics*, Vol. 179, 705–710. doi: 10.1534/genetics.108.087080.
- [85] R. S. Sikorski and P. Hieter. (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, Vol. 122, 19–27. doi: 10.1093/genetics/122.1.19.
- [86] A. Suzuki, H. Fujii, H. Hoshida and R. Akada. (2015). Gene expression analysis using strains constructed by NHEJ-mediated one-step promoter cloning in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *FEMS Yeast Res.*, Vol. 15, fov059. doi: 10.1093/femsyr/fov059.
- [87] J. Hovsepian, Q. Defenouillère, V. Albanèse, L. Váchová, C. García, Z. Palková and S. Léon. (2017). Multilevel regulation of an α -arrestin by glucose depletion controls hexose transporter endocytosis. *J. Cell Biol.*, Vol. 216, 1811–1831. doi: 10.1083/jcb.201610094.
- [88] J. Kahlhofer, S. Leon, D. Teis and O. Schmidt. (2021). The α -arrestin family of ubiquitin ligase adaptors links metabolism with selective endocytosis. *Biol. Cell*, Vol. 113, 183–219. doi: 10.1111/boc.202000137.
- [89] A. Sen, L. Acosta-Sampson, C. G. Alvaro, J. S. Ahn, J. H. D. Cate and J. Thorner. (2016). Internalization of heterologous sugar transporters by endogenous α -arrestins in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 82, 7074–7085. doi: 10.1128/AEM.02148-16.
- [90] K. Y. Hara, J. Kobayashi, R. Yamada, D. Sasaki, Y. Kuriya, Y. Hirono-Hara, J. Ishii, M. Araki and A. Kondo. (2017). Transporter engineering in biomass utilization by yeast. *FEMS Yeast Res.*, Vol. 17, fox061. doi: 10.1093/femsyr/fox061.
- [91] J. Mejía-Barajas, R. Montoya-Pérez, S. Manzo-Avalos, C. Cortés-Rajo, H. Riveros-Rosas, C. Cervantes and A. Saavedra-Molina. (2018). Fatty acid addition and thermotolerance of *Kluyveromyces marxianus*. *FEMS Microbiol. Lett.*, Vol. 365, fny043. doi: 10.1093/femsle/fny043.

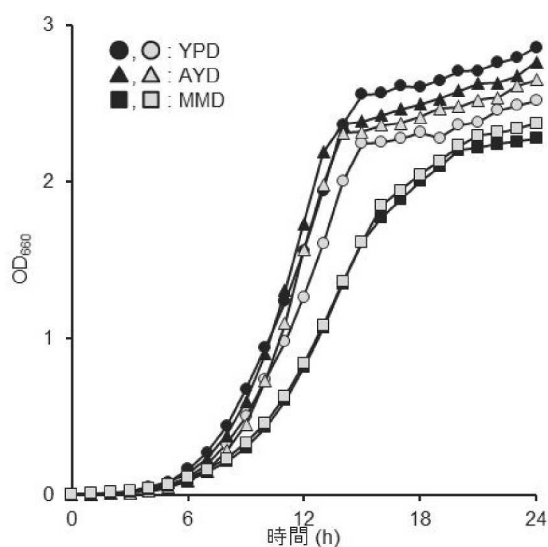
- [92] C. Kelso, A. T. Maccarone, A. I. P. M. de Kroon, T. W. Mitchell and M. F. Renne. (2025). Temperature adaptation of yeast phospholipid molecular species at the acyl chain positional level. *FEBS Lett.*, Vol. 599, 530–544. doi: 10.1002/1873-3468.15060.
- [93] J. Lian, Y. Li, M. Hamedirad and H. Zhao. (2014). Directed evolution of a cellodextrin transporter for improved biofuel production under anaerobic conditions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.*, Vol. 111, 1521–1531. doi: 10.1002/bit.25214.
- [94] E. J. Oh, S. Kwak, H. Kim and Y. S. Jin. (2017). Transporter engineering for cellobiose fermentation under lower pH conditions by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresour. Technol.*, Vol. 245, 1469–1475. doi: 10.1016/j.biortech.2017.05.138.
- [95] D. T. Eriksen, P. C. H. Hsieh, P. Lynn and H. Zhao. (2013). Directed evolution of a cellobiose utilization pathway in *Saccharomyces cerevisiae* by simultaneously engineering multiple proteins. *Microb. Cell Fact.*, Vol. 12, 61. doi: 10.1186/1475-2859-12-61.
- [96] S. J. Ha, J. M. Galazka, E. J. Oh, V. Kordić, H. Kim, Y. S. Jin and J. H. D. Cate. (2013). Energetic benefits and rapid cellobiose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* expressing cellobiose phosphorylase and mutant cellodextrin transporters. *Metab. Eng.*, Vol. 15, 134–143. doi: 10.1016/j.ymben.2012.11.005.
- [97] H. Kim, E. J. Oh, S. T. Lane, W. H. Lee, J. H. D. Cate and Y. S. Jin. (2018). Enhanced cellobiose fermentation by engineered *Saccharomyces cerevisiae* expressing a mutant cellodextrin facilitator and cellobiose phosphorylase. *J. Biotechnol.*, Vol. 275, 53–59. doi: 10.1016/j.jbiotec.2018.04.008.
- [98] S. J. Ha, H. Kim, Y. Lin, M. U. Jang, J. M. Galazka, T. J. Kim, J. H. D. Cate and Y. S. Jin. (2013). Single amino acid substitutions in HXT2.4 from *Scheffersomyces stipitis* lead to improved cellobiose fermentation by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 79, 1500–1507. doi: 10.1128/AEM.03253-12.

補足資料



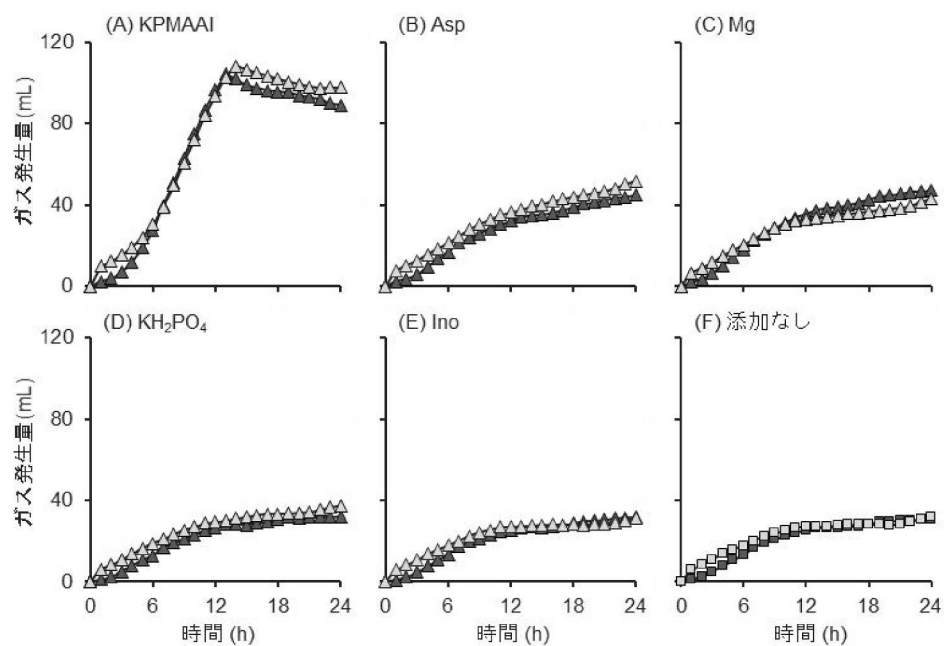
補足図 S2-1 最大ガス発生量とエタノール濃度の相関関係

図 2-1 の発酵後、高速液体クロマトグラフィーシステムを用いてグルコースおよびエタノール濃度を測定した。最大ガス発生量と 24 時間後のグルコースまたはエタノール濃度をプロットした。実線はグルコース濃度に関する近似線、破線はエタノール濃度に関する近似線。図 2-1A の発酵実験のうち 2 実験でグルコースとエタノールの測定を実施し、データをプロットした。



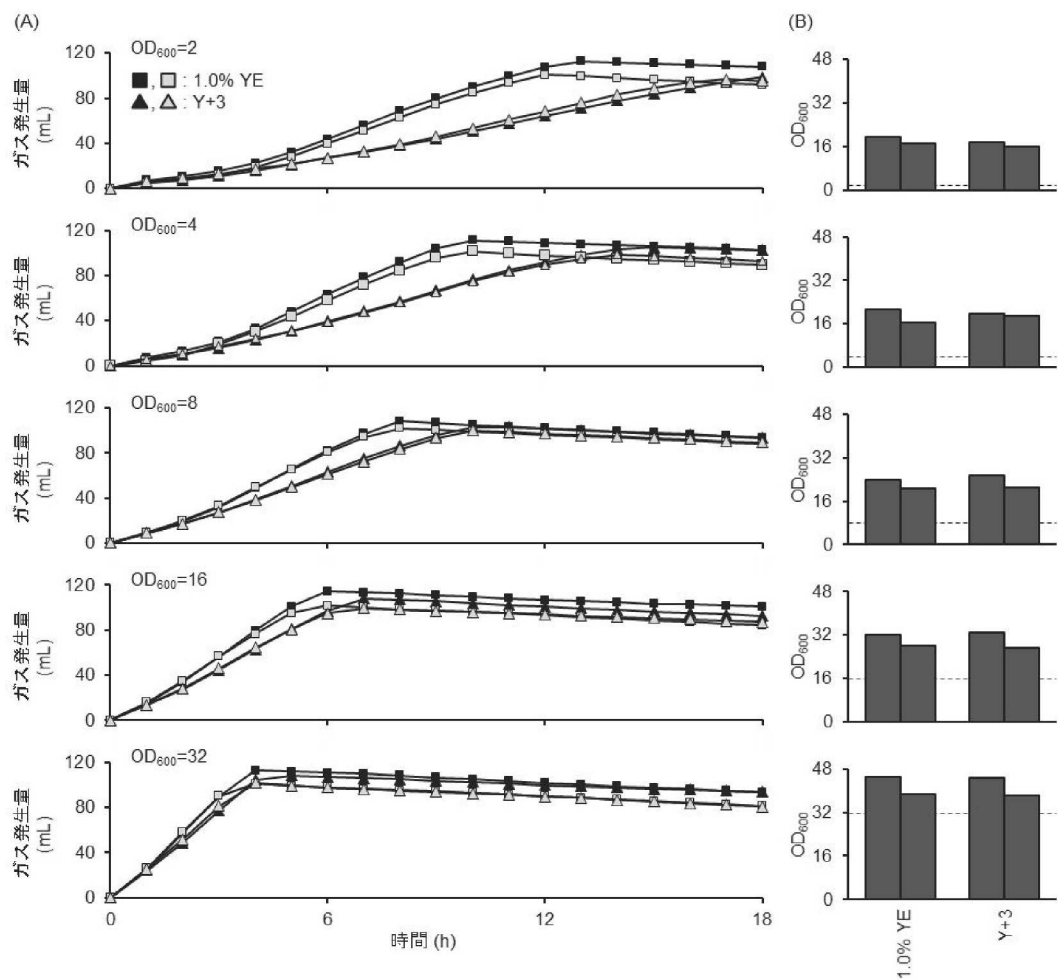
補足図 S2-2 AYD 培地における酵母の増殖

YPD (●と○)、AYD (▲と△)、MMD (■と□) 培地における培養液の OD₆₆₀ をバイオフィトレコーダー (タイテック) を用いて測定、記録し、1 時間毎にデータをプロットした。植菌量は OD₆₀₀ で 0.01 とした。AYD 培地は AY 栄養素 (表 2-1) と 2% グルコースで構成される。MMD 培地は 1.7% 酵母窒素ベース、5% 硫酸アンモニウム、2% グルコースで構成される。実験は 2 回繰り返し実施し、データをプロットした。



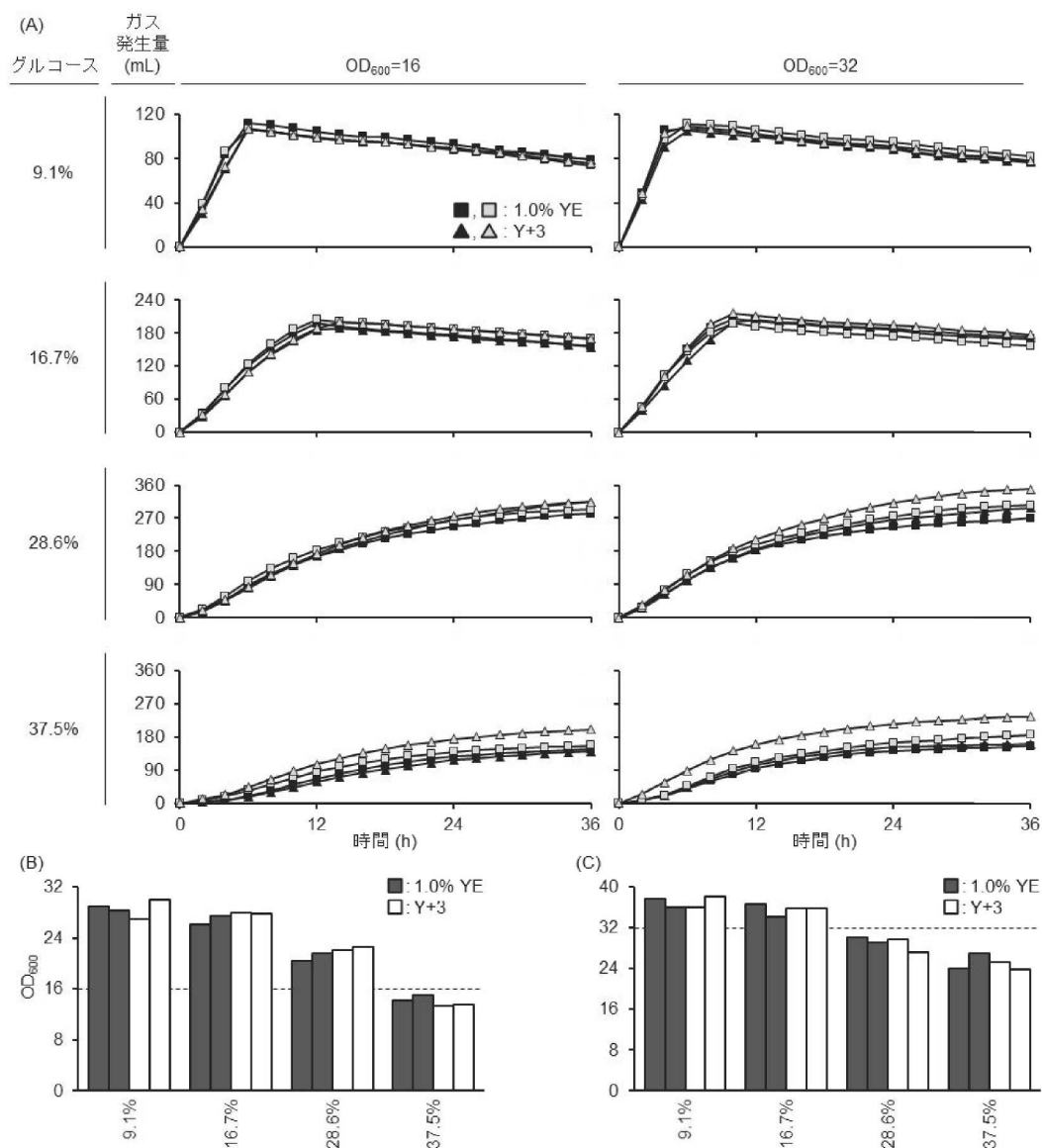
補足図 S2-3 KPMAAI 中の各栄養素が発酵に及ぼす影響

(A-F) 発酵は図 2-1 と同様に測定した。基礎培地は 9.1%グルコースと 0.2%酵母エキス (YE) で構成される。KPMAAI 中のアスパラギン酸 (Asp)、マグネシウム (Mg)、リン酸二水素カリウム (KH_2PO_4)、またはイノシトール (Ino) を基礎培地に添加した。実験は 2 回繰り返し実施し、データをプロットした。



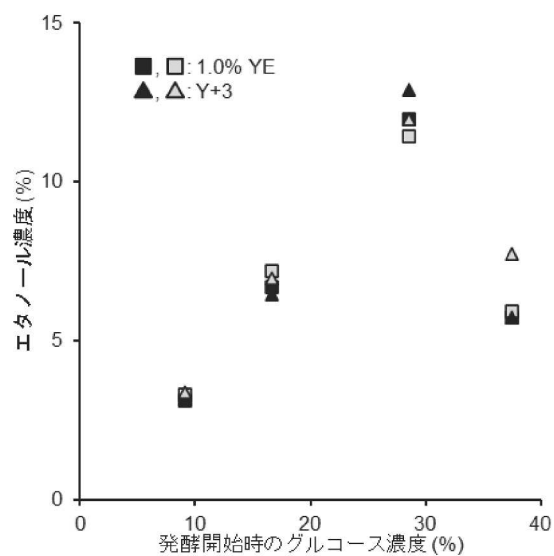
補足図 S2-4 植菌量が発酵に及ぼす影響

植菌量を OD_{600} で 2 から 32 まで変化させた。9.1%グルコースを含む培地を用い、1.0%YE (■と□) または Y+3 (▲と△) を添加した。(A) 発酵は図 2-1 と同様に記録、プロットした。(B) 培養液の OD_{600} を 18 時間後に測定。発酵開始時の植菌量 (OD_{600}) は点線で示した。実験は 2 回繰り返し実施し、データをグラフ化した。



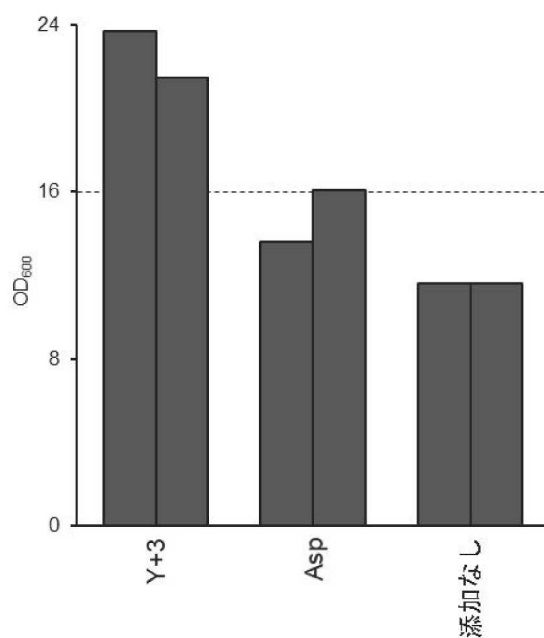
補足図 S2-5 高グルコース濃度が発酵および増殖に及ぼす影響

1.0% YE (■と□) または Y+3 (▲と△) を含む培地中のグルコース濃度を、図に示すように変化させた。(A) OD_{600} が 16 および 32 の植菌量で開始した発酵中のガス発生量を 2 時間毎にプロットした。(B、C) 48 時間後の培養液の OD_{600} を測定した。発酵開始時の植菌量は点線で示している。48 時間後のエタノール濃度は補足図 S2-6 に示した。発酵は 2 回繰り返し実施し、データをグラフ化した。



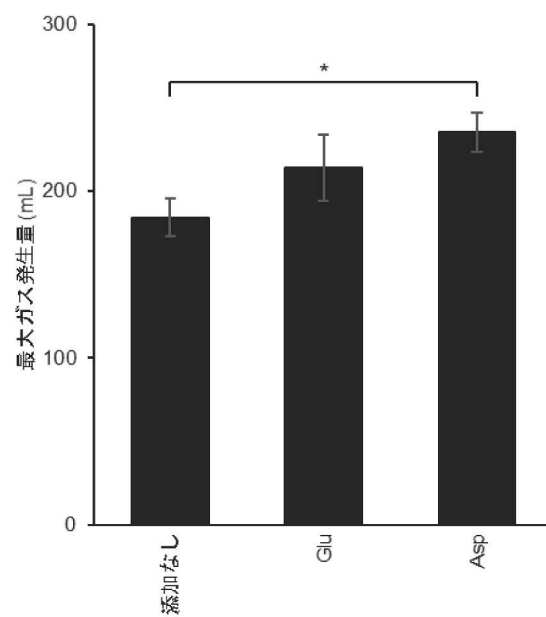
補足図 S2-6 異なるグルコース濃度培地における発酵過程で生成されたエタノール濃度

補足図 S2-5 ($OD_{600}=16$) の48時間後のエタノール濃度を高速液体クロマトグラフィーシステムで測定した。エタノール濃度を発酵開始時のグルコース濃度に対してプロットした。実験は2回繰り返し実施し、データをプロットした。



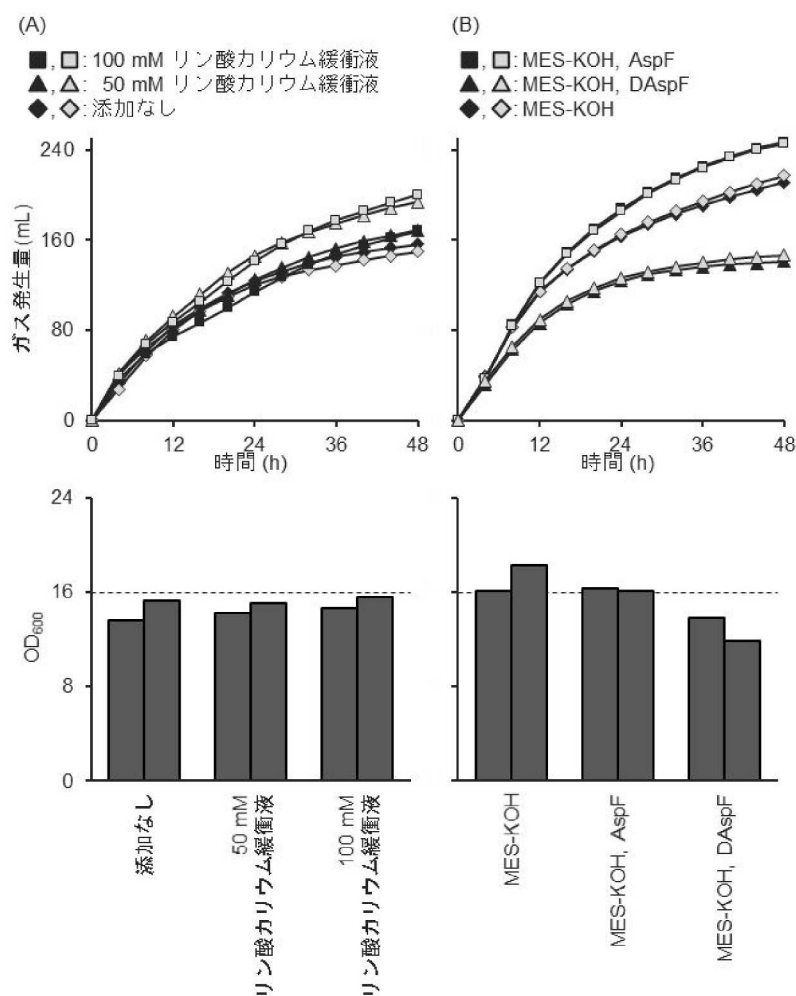
補足図 S2-7 Asp が増殖に及ぼす影響

28.6%グルコース培地に Y+3 または Asp を添加して発酵させた。植菌量は OD_{600} が 16 とした。48 時間後に適切な希釈液を用い分光光度計で OD_{600} を測定した。実験は2回繰り返し、データを棒グラフで示した。



補足図 S2-8 pH 調整培地における発酵へのアミノ酸の影響

発酵は図 2-1 と同様に測定した。28.6%グルコースを含む培地の pH を MES-KOH で pH5.4 に調整した。示したアミノ酸を 2.5 g/L で添加した。発酵は 3 回実施した。最大ガス発生量の平均値と標準偏差を示した。p < 0.05 を*で示した。



培養時の pH			培養時の pH		
リン酸カリウム緩衝液	測定時間		添加した AspF	測定時間	
	0 h	48 h		0 h	48 h
添加なし	4.04, 4.45	3.17, 3.10	添加なし	5.36, 5.33	3.66, 3.58
50 mM	6.31, 6.50	4.49, 4.36	L-AspF	4.85, 5.34	3.94, 3.96
100 mM	6.46, 6.52	4.95, 4.78	D-AspF	5.17, 5.25	3.61, 3.66

補足図 S2-9 pH 調整用リン酸カリウムと L-Asp または D-Asp の添加が培養に及ぼす影響

培養は図 2-1 と同様に 28.6%グルコース培地で測定した。(A) リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.5) を 50 mM (▲と△) および 100 mM (■と□) 濃度で添加。(B) 28.6%グルコース培地に 130 mM MES-KOH (pH 5.4) を添加し、L-Asp (■と□) および D-Asp (▲と△) を 2.5 g/L で添加した。48 時間後、培養液の OD₆₀₀ を測定した。発酵前 (0 時間) と発酵後 (48 時間) に培養液の pH を測定した。発酵を 2 回繰り返して、データをグラフに示した。

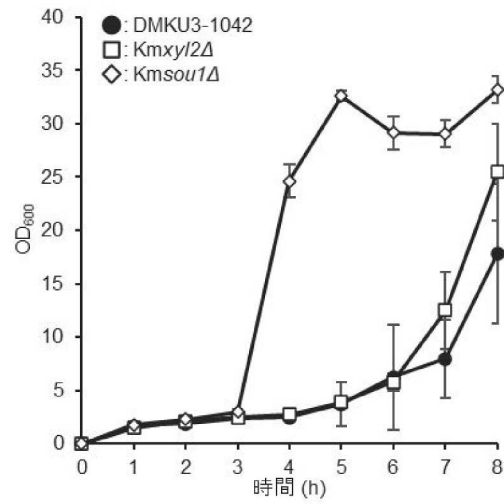
補足表S3-1 第3章で使した酵母

株名	遺伝子型	宿主	テンプレート1	オリゴDNA1:1オリゴDNA2:2テンプレート2	オリゴDNA2:1オリゴDNA2:2	テンプレート3オリゴDNA3:1オリゴDNA3:2	参考文献	
RAK3605	DMKU3-1042 <i>ura3-1</i>	-	-	-	-	-	Nonklang et al., (2008)	
RAK3363 (BY4741)	MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	-	-	-	-	-	Brachmann et al., (1996)	
RAK3596	DMKU3-1042 WT	-	-	-	-	-	Limtong et al., (2007)	
RAK4174	DMKU3-1042 <i>ura3-1 leu2-2</i>	-	-	-	-	-	Yamizu et al., (2013)	
RAK4178	DMKU3-1042 <i>ura3-1 ade2-2 leu2-2 lys2-2</i>	-	-	-	-	-	Yamizu et al., (2013)	
RAK14016	DMKU3-1042 <i>ura3-1 ade2-1 [pKM100-ScADE2-ScTDH3p-yEGFP2-ScURA3]</i>	-	-	-	-	-	This study	
RAK32445	RAK4174 [YCP-ScGAL10p <i>ura3-1</i> - <i>Spcaas9</i> ^{ScTDH3p-HH-gRNAKmADE2-HDV-ScCYC1t-KmCenD-ScURA3}]	RAK3363 [YCP-ScGAL10p <i>ura3-1</i> - <i>Spcaas9</i> ^{ScTDH3p-HH-gRNAKmADE2-HDV-ScCYC1t-KmCenD-ScURA3}]	RAK4174 [YCP-ScGAL10p <i>ura3-1</i> - <i>Spcaas9</i> ^{ScTDH3p-HH-gRNAKmADE2-HDV-ScCYC1t-KmCenD-ScURA3}]	ScURA3+375ScURA3+376	-	-	This study	
RAK35658	RAK4174 <i>mlev2025-ScLEU2 (saftt-ScLEU2)</i>	RAK4174 [YCP-ScGAL10p <i>ura3-1</i> - <i>Spcaas9</i> ^{ScTDH3p-HH-gRNAKmADE2-HDV-ScCYC1t-KmCenD-ScURA3}]	RAK4174 [YCP-ScGAL10p <i>ura3-1</i> - <i>Spcaas9</i> ^{ScTDH3p-HH-gRNAKmADE2-HDV-ScCYC1t-KmCenD-ScURA3}]	CRISPRKmM CRISPRKmM LEV2025+41 LEV2025+41	-	-	This study, the plasmid was removed	
RAK43288	RAK4174 <i>mlev2025-ScLEU2 (saftt-ScLEU2)</i>	RAK4174 [YCP-ScGAL10p <i>ura3-1</i> - <i>Spcaas9</i> ^{ScTDH3p-HH-gRNAKmADE2-HDV-ScCYC1t-KmCenD-ScURA3}]	RAK4174 [YCP-ScGAL10p <i>ura3-1</i> - <i>Spcaas9</i> ^{ScTDH3p-HH-gRNAKmADE2-HDV-ScCYC1t-KmCenD-ScURA3}]	CRISPRKmM CRISPRKmM LEV2025+41 LEV2025+41	-	-	This study, the plasmid was removed	
RAK45121	RAK4174 <i>mlev2025-ScLEU2 (saftt-ScLEU2)</i>	RAK4174 [YCP-ScGAL10p <i>ura3-1</i> - <i>Spcaas9</i> ^{ScTDH3p-HH-gRNAKmADE2-HDV-ScCYC1t-KmCenD-ScURA3}]	RAK4174 [YCP-ScGAL10p <i>ura3-1</i> - <i>Spcaas9</i> ^{ScTDH3p-HH-gRNAKmADE2-HDV-ScCYC1t-KmCenD-ScURA3}]	CRISPRKmM LEV2025+41	-	-	This study, the plasmid was removed	
RAK45122	RAK4174 <i>mlev2025-ScLEU2 (saftt-ScLEU2)</i>	RAK4174 [YCP-ScGAL10p <i>ura3-1</i> - <i>Spcaas9</i> ^{ScTDH3p-HH-gRNAKmADE2-HDV-ScCYC1t-KmCenD-ScURA3}]	RAK4174 [YCP-ScGAL10p <i>ura3-1</i> - <i>Spcaas9</i> ^{ScTDH3p-HH-gRNAKmADE2-HDV-ScCYC1t-KmCenD-ScURA3}]	CRISPRKmM LEV2025+41	-	-	This study, the plasmid was removed	
RAK45180	RAK4174 <i>mlev2025-ScLEU2 (saftt-ScLEU2)</i>	RAK4174 [YCP-ScGAL10p <i>ura3-1</i> - <i>Spcaas9</i> ^{ScTDH3p-HH-gRNAKmADE2-HDV-ScCYC1t-KmCenD-ScURA3}]	RAK4174 [YCP-ScGAL10p <i>ura3-1</i> - <i>Spcaas9</i> ^{ScTDH3p-HH-gRNAKmADE2-HDV-ScCYC1t-KmCenD-ScURA3}]	CRISPRKmM CRISPRKmM LEV2025+41 LEV2025+41	MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i> [YEP-ScTDH3p-ATG-KmHAT4 _{40L} - <i>ura3-1</i> ScURA3c]	ScURA3-223 ScURA3+771c	RAK3596 ScURA3+77278 6-TGA-KmSAT1-1000 13025c	This study, the plasmid was removed
RAK45181	RAK4174 <i>mlev2025-ScLEU2 (saftt-ScLEU2)</i>	RAK4174 [YCP-ScGAL10p <i>ura3-1</i> - <i>Spcaas9</i> ^{ScTDH3p-HH-gRNAKmADE2-HDV-ScCYC1t-KmCenD-ScURA3}]	RAK4174 [YCP-ScGAL10p <i>ura3-1</i> - <i>Spcaas9</i> ^{ScTDH3p-HH-gRNAKmADE2-HDV-ScCYC1t-KmCenD-ScURA3}]	CRISPRKmM CRISPRKmM LEV2025+41 LEV2025+41	MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i> [YEP-ScTDH3p-ATG-KmHAT4 _{40L} - <i>ura3-1</i> ScURA3c]	ScURA3-223 ScURA3+771c	RAK3596 ScURA3+77278 6-TGA-KmSAT1-1000 13025c	This study, the plasmid was removed
RAK45182	RAK4174 <i>mlev2025-ScLEU2 (saftt-ScLEU2)</i>	RAK4174 [YCP-ScGAL10p <i>ura3-1</i> - <i>Spcaas9</i> ^{ScTDH3p-HH-gRNAKmADE2-HDV-ScCYC1t-KmCenD-ScURA3}]	RAK4174 [YCP-ScGAL10p <i>ura3-1</i> - <i>Spcaas9</i> ^{ScTDH3p-HH-gRNAKmADE2-HDV-ScCYC1t-KmCenD-ScURA3}]	CRISPRKmM CRISPRKmM LEV2025+41 LEV2025+41	MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i> [YEP-ScTDH3p-ATG-KmHAT4 _{40L} - <i>ura3-1</i> ScURA3c]	ScURA3-223 ScURA3+771c	RAK3596 ScURA3+77278 6-TGA-KmSAT1-1000 13025c	This study, the plasmid was removed
RAK43525	RAK4178 <i>xy12-ScL YS2 ScURA3 ScADE2 ScLEU2</i>	RAK4178 [YCP-ScGAL10p <i>ura3-1</i> - <i>Spcaas9</i> ^{ScTDH3p-HH-gRNAKmADE2-HDV-ScCYC1t-KmCenD-ScURA3}]	RAK4178 [YCP-ScGAL10p <i>ura3-1</i> - <i>Spcaas9</i> ^{ScTDH3p-HH-gRNAKmADE2-HDV-ScCYC1t-KmCenD-ScURA3}]	HHc-ScTDH3- CRISPRKmXY L2+91c	-	-	-	This study, the plasmid was removed
RAK45948	RAK4178 <i>xy12-ScL YS2 ScTDH3p-KmXYL2-ScLEU2c ScURA3 ScADE2</i>	RAK4178 [YCP-ScGAL10p <i>ura3-1</i> - <i>Spcaas9</i> ^{ScTDH3p-HH-gRNAKmADE2-HDV-ScCYC1t-KmCenD-ScURA3}]	RAK4178 [YCP-ScGAL10p <i>ura3-1</i> - <i>Spcaas9</i> ^{ScTDH3p-HH-gRNAKmADE2-HDV-ScCYC1t-KmCenD-ScURA3}]	HHc-ScTDH3- CRISPRKmXY L2+91c	MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i> [pRS315-ScTDH3p-KmXYL2-ScLEU2c]	ScTDH3-572 ScLEU2-400	-	This study, the plasmid was removed
RAK45833	RAK4174 <i>sou2-ScLEU2 ScURA3</i>	RAK4174 [YCP-ScGAL10p <i>ura3-1</i> - <i>Spcaas9</i> ^{ScTDH3p-HH-gRNAKmADE2-HDV-ScCYC1t-KmCenD-ScURA3}]	RAK4174 [YCP-ScGAL10p <i>ura3-1</i> - <i>Spcaas9</i> ^{ScTDH3p-HH-gRNAKmADE2-HDV-ScCYC1t-KmCenD-ScURA3}]	HHc-ScTDH3- CRISPRKmSO ₂ U2+94	-	-	-	This study, the plasmid was removed
RAK45850	RAK4174 <i>sou2-ScLEU2 ScTDH3p-KmSOU2-ScURA3c</i>	RAK4174 [YCP-ScGAL10p <i>ura3-1</i> - <i>Spcaas9</i> ^{ScTDH3p-HH-gRNAKmADE2-HDV-ScCYC1t-KmCenD-ScURA3}]	RAK4174 [YCP-ScGAL10p <i>ura3-1</i> - <i>Spcaas9</i> ^{ScTDH3p-HH-gRNAKmADE2-HDV-ScCYC1t-KmCenD-ScURA3}]	HHc-ScTDH3- CRISPRKmSORAK3363 [YCP-ScTDH3p-U2+94 KmSOU2-ScLEU2c]	ScTDH3-572 ScLEU2-400	-	-	This study, the plasmid was removed
RAK43526	RAK4178 <i>ScTDH3p-KmXYL2-ScLEU2c ScURA3 ScADE2 ScL YS2</i>	RAK4178 [YCP-ScGAL10p <i>ura3-1</i> - <i>Spcaas9</i> ^{ScTDH3p-HH-gRNAKmADE2-HDV-ScCYC1t-KmCenD-ScURA3}]	RAK4178 [YCP-ScGAL10p <i>ura3-1</i> - <i>Spcaas9</i> ^{ScTDH3p-HH-gRNAKmADE2-HDV-ScCYC1t-KmCenD-ScURA3}]	ScTDH3-572 ScLEU2-400	-	-	-	This study
RAK45823	RAK4174 <i>ScTDH3p-KmSOU2-ScLEU2c ScURA3</i>	RAK4174 [YCP-ScGAL10p <i>ura3-1</i> - <i>Spcaas9</i> ^{ScTDH3p-HH-gRNAKmADE2-HDV-ScCYC1t-KmCenD-ScURA3}]	RAK4174 [YCP-ScGAL10p <i>ura3-1</i> - <i>Spcaas9</i> ^{ScTDH3p-HH-gRNAKmADE2-HDV-ScCYC1t-KmCenD-ScURA3}]	ScTDH3-572 ScLEU2-400	-	-	-	This study
RAK43296	RAK4174 <i>ScTDH3p-KmSAT1-ScURA3c ScLEU2</i>	RAK4174 [YCP-ScGAL10p <i>ura3-1</i> - <i>Spcaas9</i> ^{ScTDH3p-HH-gRNAKmADE2-HDV-ScCYC1t-KmCenD-ScURA3}]	RAK4174 [YCP-ScGAL10p <i>ura3-1</i> - <i>Spcaas9</i> ^{ScTDH3p-HH-gRNAKmADE2-HDV-ScCYC1t-KmCenD-ScURA3}]	ScTDH3-572 ScURA3-223	-	-	-	This study
RAK41463	RAK4174 <i>ScTDH3p-KmSAT1-ScURA3c ScTDH3p-KmXYL2-ScLEU2c</i>	RAK4174 [YCP-ScGAL10p <i>ura3-1</i> - <i>Spcaas9</i> ^{ScTDH3p-HH-gRNAKmADE2-HDV-ScCYC1t-KmCenD-ScURA3}]	RAK4174 <i>mlev2025-ScLEU2 [pKM100-ScADE2-ScTDH3p-KmSAT1-ScURA3c]</i>	ScTDH3-572 ScURA3-223	MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i> [pRS315-ScTDH3p-KmXYL2-ScLEU2c]	ScTDH3-572 ScLEU2-400	-	This study
RAK45826	RAK4174 <i>ScTDH3p-KmSAT1-ScURA3c ScTDH3p-KmSOU2-ScLEU2c</i>	RAK4174 [YCP-ScGAL10p <i>ura3-1</i> - <i>Spcaas9</i> ^{ScTDH3p-HH-gRNAKmADE2-HDV-ScCYC1t-KmCenD-ScURA3}]	RAK4174 <i>mlev2025-ScLEU2 [pKM100-ScADE2-ScTDH3p-KmSAT1-ScURA3c]</i>	ScTDH3-572 ScURA3-223	RAK3363 [YCP-ScTDH3p-KmSOU2-ScLEU2c]	ScTDH3-572 ScLEU2-400	-	This study

RAK45130	RAK1474 sou1::ScLEU2-ScURA3	RAK4174 [YCP-ScGAL100 ³³⁶ →SpCas9 ⁹⁷ IN7-PAIT::ScPHO3-panARS(OPT)-ScTDH3p-HDV-ScCYC1t-KmCenD-ScURA3]	Hhc-ScTDH3-1c	CRISPRKcmSO U1+106	-	-	-	-	-	This study, the plasmid was removed
RAK42437	RAK1174 ScTDH3p-yEGFP2-KmSAT1-ScURA3c-ScTDH3p-KmXYL2-ScLEU2c	RAK4174 MATa his3Δ1 leu2Δ60 ura3Δ30 [RS315-ScTDH3p-KmXYL2-ScLEU2c]	ScTDH3-572	ScLEU2-400	RAK3605 [pKm100-ScTDH3p-yEGFP2-KmSAT1-ScURA3c]	-	ScTDH3-572	ScURA3-223	-	This study
RAK42534	RAK1178 ScADE2-ScTDH3p-KmXYL2-yEGFP-ScTDH3p-KmSAT1-ScURA3c	RAK4178 RAK1174 miev2025::ScLEU2 [pKm100-ScADE2-ScTDH3p-KmSAT1-ScURA3c]	ScTDH3-572	ScURA3-223	DMK103-1042 ura3-1 ade2-1 [pKm100-ScTDH3p-KmXYL2-yEGFP-ScURA3c]	-	ScADE2-200	ScURA3+51	-	This study
RAK46548	RAK3605 [pKm100-ScADE2-ScTDH3p-yEGFP2-KmSOU2-ScURA3c]	RAK3605 RAK14016	ScTDH3-1c	yEGFP2+471c	RAK3596	KmSOU2+1	-	-	-	This study
RAK39873	RAK1174 miev2025::ScLEU2 (saft::ScLEU2) [pKm100-ScADE2-ScTDH3p-KmSAT1-ScURA3c]	RAK4174 [YCP-ScGAL100 ³³⁶ →SpCas9 ⁹⁷ IN7-PAIT::ScPHO3-panARS(OPT)-ScTDH3p-HDV-ScCYC1t-KmCenD-ScURA3]	CRISPRKcmM LEV2025+41	CRISPRKcmM LEV2025+41	RAK3596	KmMLEV2025(GA) +1	RAK14016	ScTDH3-1c	ScURA3+777c	This study, the plasmid was removed
RAK40462	RAK1174 miev2025::ScLEU2 (saft::ScLEU2) [pKm100-ScADE2-ScTDH3p-SchXT13-ScURA3c]	RAK4174 [YCP-ScGAL100 ³³⁶ →SpCas9 ⁹⁷ IN7-PAIT::ScPHO3-panARS(OPT)-ScTDH3p-HDV-ScCYC1t-KmCenD-ScURA3]	CRISPRKcmM LEV2025+41	CRISPRKcmM LEV2025+41	RAK3363 (BY4741)	ScURAT3+772786-TGA-SchXT13+1695c-ScURA3+772786-	RAK14016	ScTDH3-1c	ScURA3+777c	This study, the plasmid was removed
RAK40464	RAK1174 miev2025::ScLEU2 (saft::ScLEU2) [pKm100-ScADE2-ScTDH3p-SchXT17-ScURA3c]	RAK4174 [YCP-ScGAL100 ³³⁶ →SpCas9 ⁹⁷ IN7-PAIT::ScPHO3-panARS(OPT)-ScTDH3p-HDV-ScCYC1t-KmCenD-ScURA3]	CRISPRKcmM LEV2025+41	CRISPRKcmM LEV2025+41	RAK3363 (BY4741)	ScURAT3+772786-TGA-SchXT15+1704c-ScURA3+772786-	RAK14016	ScTDH3-1c	ScURA3+777c	This study, the plasmid was removed
RAK40457	RAK1174 miev2025::ScLEU2 (saft::ScLEU2) [pKm100-ScADE2-ScTDH3p-SchXT17-ScURA3c]	RAK4174 [YCP-ScGAL100 ³³⁶ →SpCas9 ⁹⁷ IN7-PAIT::ScPHO3-panARS(OPT)-ScTDH3p-HDV-ScCYC1t-KmCenD-ScURA3]	CRISPRKcmM LEV2025+41	CRISPRKcmM LEV2025+41	RAK3363 (BY4741)	ScHX1T17+1 TGA-SchXT17+1695c-ScURA3+772786-	RAK14016	ScTDH3-1c	ScURA3+777c	This study, the plasmid was removed
RAK40459	RAK1174 miev2025::ScLEU2 (saft::ScLEU2) [pKm100-ScADE2-ScTDH3p-KmSAT1 ²⁰⁸⁴⁻²⁰²⁰ -ScURA3c]	RAK4174 [YCP-ScGAL100 ³³⁶ →SpCas9 ⁹⁷ IN7-PAIT::ScPHO3-panARS(OPT)-ScTDH3p-HDV-ScCYC1t-KmCenD-ScURA3]	CRISPRKcmM LEV2025+41	CRISPRKcmM LEV2025+41	RAK3596	KmMLEV2025(GA) +268	RAK14016	ScTDH3-1c	ScURA3+777c	This study, the plasmid was removed
RAK40461	RAK1174 miev2025::ScLEU2 (saft::ScLEU2) [pKm100-ScADE2-ScTDH3p-KmSAT1 ²²¹⁴⁻²⁰²⁰ -ScURA3c]	RAK4174 [YCP-ScGAL100 ³³⁶ →SpCas9 ⁹⁷ IN7-PAIT::ScPHO3-panARS(OPT)-ScTDH3p-HDV-ScCYC1t-KmCenD-ScURA3]	CRISPRKcmM LEV2025+41	CRISPRKcmM LEV2025+41	RAK3596	KmMLEV2025(GA) +274	RAK14016	ScTDH3-1c	ScURA3+777c	This study, the plasmid was removed
RAK43527	RAK1178 ylx2::ScLSY2-ScTDH3p-KmSAT1-ScURA3c-ScADE2-ScLEU2	RAK4174 [YCP-ScGAL100 ³³⁶ →SpCas9 ⁹⁷ IN7-PAIT::ScPHO3-panARS(OPT)-ScTDH3p-HDV-ScCYC1t-KmCenD-ScURA3]	Hhc-ScTDH3-1c	CRISPRKcmM L2+91c	RAK4174 miev2025::ScLEU2 [pKm100-ScADE2-ScTDH3p-ScTDH3-572-ScURA3-223]	-	-	-	-	This study, the plasmid was removed
RAK45818	RAK1178 sou2::ScLEU2-ScTDH3p-KmSAT1-ScURA3c-ScADE2-ScYS2	RAK4174 [YCP-ScGAL100 ³³⁶ →SpCas9 ⁹⁷ IN7-PAIT::ScPHO3-panARS(OPT)-ScTDH3p-HDV-ScCYC1t-KmCenD-ScURA3]	Hhc-ScTDH3-1c	CRISPRKcmM U2+94	RAK4174 miev2025::ScLEU2 [pKm100-ScADE2-ScTDH3p-ScTDH3-572-ScURA3-223]	-	-	-	-	This study, the plasmid was removed
RAK45133	RAK1174 [pKm100-ScURA3-KmTDH1p-yEnRFP-ScADE2c]	RAK4174 RAK3605 [pKm100-ScURA3-KmTDH1p-yEnRFP-ScADE2c]	ScURA3+51	ScURA3+50c	-	-	-	-	-	This study
RAK45134	RAK4174 [pKm100-ScURA3-KmTDH1p-yEnRFP-ScADE2c]	RAK4174 RAK3605 [pKm100-ScURA3-KmTDH1p-yEnRFP-ScADE2c]	ScURA3+51	ScURA3+50c	-	-	-	-	-	This study
RAK45135	RAK1174 [pKm100-ScURA3-KmTDH1p-yEnRFP-ScADE2c]	RAK4174 RAK3605 [pKm100-ScURA3-KmTDH1p-yEnRFP-ScADE2c]	ScURA3+51	ScURA3+50c	-	-	-	-	-	This study
RAK45139	RAK4174 [pKm100-ScURA3-KmSAT1p-yEnRFP-ScADE2c]	RAK4174 RAK3605 [pKm100-ScURA3-KmSAT1p-yEnRFP-ScADE2c]	ScURA3+51	ScURA3+50c	-	-	-	-	-	This study
RAK45140	RAK4174 [pKm100-ScURA3-KmSAT1p-yEnRFP-ScADE2c]	RAK4174 RAK3605 [pKm100-ScURA3-KmSAT1p-yEnRFP-ScADE2c]	ScURA3+51	ScURA3+50c	-	-	-	-	-	This study
RAK45141	RAK1174 [pKm100-ScURA3-KmSAT1p-yEnRFP-ScADE2c]	RAK4174 RAK3605 [pKm100-ScURA3-KmSAT1p-yEnRFP-ScADE2c]	ScURA3+51	ScURA3+50c	-	-	-	-	-	This study

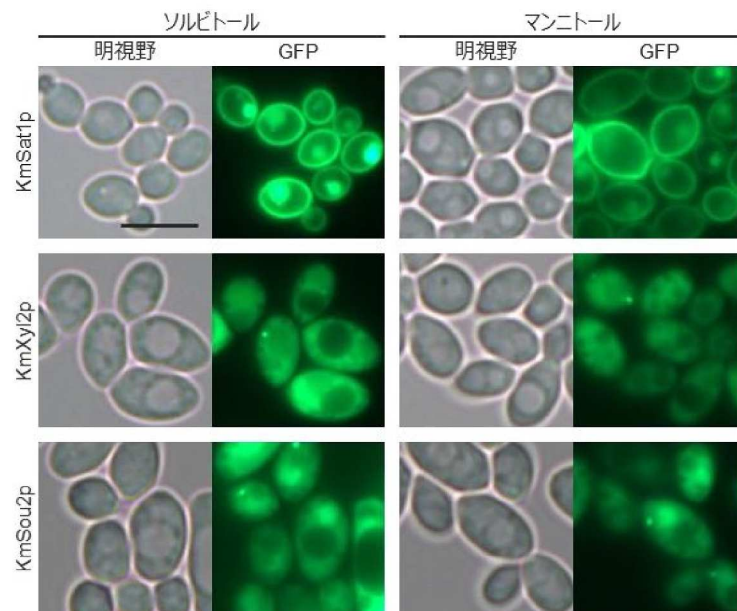
補足表S3-2 第3章で株の構築に利用したオリゴDNA

オリゴDNA名	オリゴDNA配列
CRISPRKmMLEV2025+41	TTCGTCCTCACGGACTCATCAGccgacaTTTGTTTGTATGTGTGTTATTC
CRISPRKmMLEV2025+41	ACGAGTAAGCTCGTCccgacactaattcgtcgacgGTTTATAGAGCTAGAAATAGCAAGTT
HHc-ScTDH3-1c	gacgagcttactcgttctgcctcacggactcatcagTTTGTTTGTATGTGTGTTATTCGAAACTAAGTCTTG
CRISPRKmXYL2+91c	aatgaggatctttaattctGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT
CRISPRKmSOU1+106	actgggtgatctcaggtatGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT
CRISPRKmSOU2+94	cttcgdtattcagccaaaGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT
KmMLEV2025+1 (KmSAT1+1)	ATGCTTGAAGTGAGCCAGACAAGA
KmMLEV2025+268 (KmSAT1+268)	atgaacatggccgtgcattgacag
KmMLEV2025+274 (KmSAT1+274)	atgggccgtgcattgcagccaagt
ScURA3+772786-TGA-KmMLEV2025+2025c	gcataattgagaagaTGatcattctcatcttcctattca
ScTDH3-1c	TTTGTTTGTATGTGTGTTTATTCGAAACTAAGTCTTGGTGTTTAAAACTAAAAAAA
ScTDH3-572	GCTGTAACCCGTACATGCCCAAAAT
ScURA3-223	AAGCTTTCAATTCATCTTTTTTTTTTTGTTCTTTTTTTGATTCCGGTTCTTTGAAA
ScURA3+375c	CACCACACCGTGTGCATTCGTAATG
ScURA3+376	ggcccAGGTATTGTTAGCGGTTTGA
ScURA3+771c	TCCCAGCCTGCTTTTCTGTAACGTTCAAC
TGAc-ScURA3+786c	tcaTCTTCTCAAATATGCTTCCCAGCCT
ScURA3+772786-TGA-KmMLEV2025-1000	gcataattgagaagaTGAaagttccaaatggataagtactac
KmMLEV2025+3025c (KmSAT1+3025c)	CTTACGTTCAAGCTAACCCTCAAT
ScHXT13+1	ATGTCTAGTGCACAATCCTCTATTG
ScURA3+772786-TGA-ScHXT13+1695c	gcataattgagaagaTGATCAATCAGAATCTTTGAGAACTTC
ScHXT15+1	ATGGCAAGCGAACAGTCTCACCAG
ScURA3+772786-TGA-ScHXT15+1704c	gcataattgagaagaTGATCAATTAAGCTCTTTGGGAACCTC
ScHXT17+1	ATGCAATCATCCACTGAAAGTGATA
ScURA3+772786-TGA-ScHXT17+1695c	gcataattgagaagaTGATCAATCAGAACCTTTGAGAACTTC
ScADE2-200	CAAATGACTCTTGTTCATGGCTACGAACC
ScADE2+1716c	TTACTTGTTTTCTAGATAAGCTTCG
ScLEU2-400	GAATACTCAGGTATCGTAAGATGCAAGAGT
ScLEU2+1095c	TTAAGCAAGGATTTTCTAACTTCTCGGC
RAF1+547(+30)-ScLYS2-293	GTCTTCGGTAAAGCGCTAGACTATATTAagaggcatcgacagtttagcgag
ScADE2+1669-ScLYS2+4179c	CAAAAGTTAGAAACTGTCGGTTACGAAGCTTATCTATAAttaagctgctgaggctccacga



補足図 S3-1 マンニトール培地における KmxyI2 破壊株および Kmsou1 破壊株の増殖

K. marxianus 野生株 (DMKU3-1042 株、●)、KmxyI2 破壊株 (□)、および Kmsou1 破壊株 (◇) を YPMan 培地で培養し、24 時間ごとに適切な希釈倍率で希釈し、OD₆₀₀ を測定した。独立した 3 回の培養の平均値と標準偏差を示した。

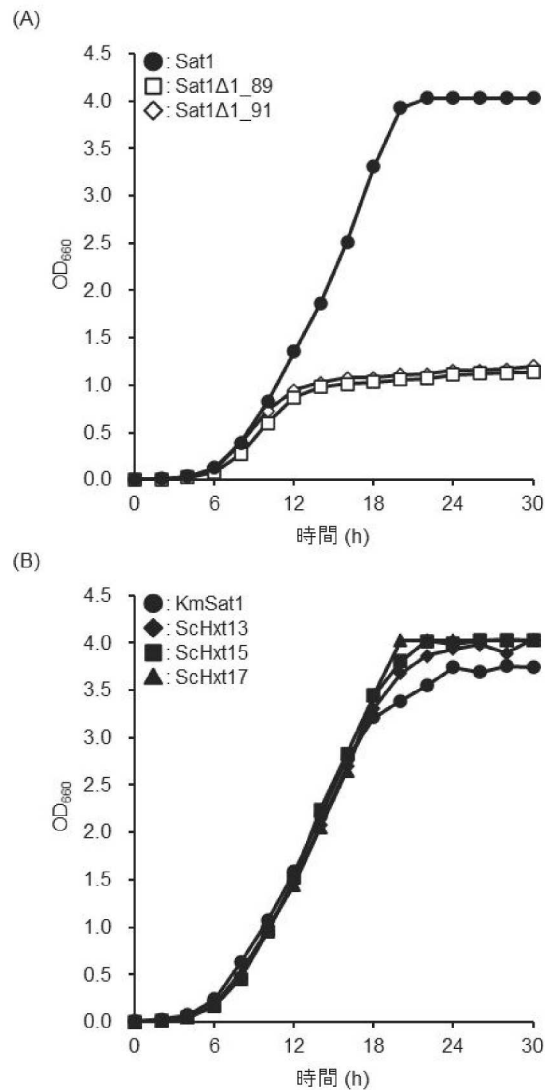


補足図 S3-2 ソルビトールまたはマンニトール培地での KmSat1p、KmXyl2p、KmSou2p の局在
yEGFP2-KmSAT1、KmXYL2-yEGFP または yEGFP2-KmSOU2 を過剰発現させた *K. marxianus* をソルビトールまたはマンニトール培地で 24 時間培養した。スケールバー：5 μ m。

KmSat1	1	MLEVLPDKSSNSESDTNSSTRKSGDVLVKDETSVHHKDFTSPTGGVFVPLNDDDTSLSSAAAGEDPEKRDPTLKQDQNVLSYSEEQVM	90
DhSyl1	1	-----MSSSAINEKPIMTDSDEANPDVGLFEPSNSSIVEEKKRVSELESVHS-----KIAEEGGQGEKGNILSCYSEKQVM	71
DhSyl2	1	-----MPSEINPEKPVALRSDNPHEENGLFEHSSNSSFNE-KRRVSELESISHS-----KIAEEGGQGEKGNILSCYSEKQVM	70
ScHxt13	0	-----	0
ScHxt15	0	-----	0
ScHxt17	0	-----	0
AtPlt5	0	-----	0
MdSot3	0	-----	0
PcSot1	0	-----	0
KmSat1	91	NMGRAPAAKYNLNDDDDIFGRAAALARRPTEYDRMDHLKEDERIACYDEIHHPFRMPKRLNVAIAA--AMGAAVQGMDETIVINGANLFY	178
DhSyl1	72	QMGRNYALKYDM--DPDLFASAAALARTDEDFNAMPFLSEEQKALHKESTKKWHIEKLIQVIALG--SMAAAVQGMDESIVINGAVLFY	157
DhSyl2	71	QMGRNYALKYDL--DPDLFASAAALARTDEDFNAMPFLTEEEKCALHKEHTKKWHIEKLIQVIALG--SMAAAVQGMDESIVINGAVLFY	156
ScHxt13	1	-----MSSAQSSISDSGDVR--DADIHVAPVEKEWSDGFDNEVINGDNVEPKRGLIGYLVILLCYFISFGFLPFGWDSGITAGFINMD	85
ScHxt15	1	-----MASQSSPEINADNLNSAADYHVQPPGSEKEWSDGFDNEVINGDNVEPKRGLIGYLVILLCYFISFGFLPFGWDSGITAGFINMD	88
ScHxt17	1	-----MQSSTESDRDIQDGFADHIVAPVEKEWSDGFDNEVINGDNVEPKRGLIGYLVILLCYFISFGFLPFGWDSGITAGFINMD	83
AtPlt5	1	-----MQSSTESDRDIQDGFADHIVAPVEKEWSDGFDNEVINGDNVEPKRGLIGYLVILLCYFISFGFLPFGWDSGITAGFINMD	83
MdSot3	1	-----MDRAEENAVTGGPQNTS--EDFDEPMKERTSKFAIACALLA--SMTSILLGYDIGNVMSGASYI	64
PcSot1	1	-----MDRAEENAVTGGPQNTS--EDFDEPMKERTSKFAIACALLA--SMTSILLGYDIGNVMSGASYI	63
KmSat1	179	FEELGLG-AKTKRN---DNLQSLVNGAPYLCCAGVSCWTTDFLNNRFGRKKVIFITCCISAITCFLQAFGPASTRGWHYLFAMFLLGF	263
DhSyl1	158	ENYMGVGRGEYNRFYDPTDLGLNLNGAPYLCASCLACWADSWNRLGRKWTIFWGLISAITCFWQSE---TNTWHLPIARFMLGF	243
DhSyl2	157	ENYMGVGRGEYNRFYDPTDLGLNLNGAPYLCASCLACWADSWNRLGRKWTIFWGLISAITCFWQSE---TNTWHLPIARFMLGF	242
ScHxt13	86	NFMNFGSYKHSHTGEYVLSNVRMGLLVAMFSGICATGGIFARLADTLGRRLAIVVVLVYVMVGAIITQISSN--HKMYQYVFVGRIGLYGL	172
ScHxt15	89	NFMNFGSYKHSHTGEYVLSNVRMGLLVAMFSGICATGGIFARLADTLGRRLAIVVVLVYVMVGAIITQISSN--HKMYQYVFVGRIGLYGL	175
ScHxt17	86	NFMNFGSYKHSHTGEYVLSNVRMGLLVAMFSGICATGGIFARLADTLGRRLAIVVVLVYVMVGAIITQISSN--HKMYQYVFVGRIGLYGL	172
AtPlt5	65	KDDEKKN-----DLQIGILAGSLN-----IYSLIGSAAAGRTSDWI GRRTIVLAVGAFVAGAIIMGLSE-----NYAFIMVGRFVAGI	138
MdSot3	64	QENLKIS-----DVQVEVLATLIN-----IYSLIGSAAAGRTSDWI GRRTIVLAVGAFVAGAIIMGLSE-----NYAFIMVGRFVAGI	137
PcSot1	56	QDDEKIS-----DVEVEILIGILN-----LYSLIGSAAAGRTSDWI GRRTIVFAGAFVAGAIIMGLAT-----NYAFIMVGRFVAGI	129
KmSat1	264	GIGKPSATVSVYLAECSTFKQLRGIVCMNWQTFAPGIMMGYVESLIFYKVGRAGIAGGLNWRIMLASAMIPAILVLFQIPFCPESEFRWLM	353
DhSyl1	244	GIGKISATVPYAAECTPFQIRGALVNLQFFTPAGIMLGYVACIAPYHVGDHSGGGLNWRIMLGSAICPAIVLFPQIPFVPESEFRWLM	333
DhSyl2	243	GIGKISATVPYAAECTPFQIRGALVNLQFFTPAGIMLGYVACIAPYHVGDHSGGGLNWRIMLGSAICPAIVLFPQIPFVPESEFRWLM	332
ScHxt13	173	GAGGCVLCPMLLSEIAPTDLRGLVLSLYQNMTFGIFLGYCSVYGRKYDNT-----ACNRVPLGLCLFWALLIIIGMLLVPESEFRYLI	257
ScHxt15	176	GAGGCVLCPMLLSEIAPTDLRGLVLSLYQNMTFGIFLGYCSVYGRKYDNT-----ACNRVPLGLCLFWALLIIIGMLLVPESEFRYLI	260
ScHxt17	173	GAGGCVLCPMLLSEIAPTDLRGLVLSLYQNMTFGIFLGYCSVYGRKYDNT-----ACNRVPLGLCLFWALLIIIGMLLVPESEFRYLI	257
AtPlt5	139	GVGYALMIAPVYTAEVSPASSRGFLNSFFEVFNAGIMLGYVSNLAESNPLK-----VQWRMLGIGAVSVILAVGLAMPSEFRWLV	223
MdSot3	138	GVGYGMIAPIVYTAISPASFRGLTSFFEVFNAGIMLGYVSNLAESNPLK-----VQWRMLGIGAVSVILAVGLAMPSEFRWLV	222
PcSot1	130	GVGYALMIAPVYNAEVSPASSRGALTSFFEVFNAGIMLGYVSNLAESNPLK-----VQWRMLGIGAVSVILAVGLAMPSEFRWLV	214
KmSat1	354	GEGRYQAEVSESTLIR-----NKKILACRDLFYQHVLLMEENSLQ-MSYDRFRKVEVTVRRNRNALVTAFICAFMQQFCAINV	430
DhSyl1	334	GEGRHKDSYDLSLCQLR-----LDKIAAADTFYQYVLLQEEASYQGIPTWKRLVEMPTIRNRNGALGAWVMFMQOQCGINA	411
DhSyl2	333	GEGRHKDSYDLSLCQLR-----LDKIAAADTFYQYVLLQEEASYQGIPTWKRLVEMPTIRNRNGALGAWVMFMQOQCGINA	410
ScHxt13	258	ECERHEEACVSIKAKN-----KVSPEDEPWLKQADEINAGVLAQRELGEASWKELFSVKRK--VLQRLITGILVQTFLOLTGENY	335
ScHxt15	261	ECERHEEACVSIKAKN-----KVSPEDEPWLKQADEINAGVLAQRELGEASWKELFSVKRK--VLQRLITGILVQTFLOLTGENY	338
ScHxt17	258	ECERHEEACVSIKAKN-----KVSPEDEPWLKQADEINAGVLAQRELGEASWKELFSVKRK--VLQRLITGILVQTFLOLTGENY	335
AtPlt5	224	MGRLGDKARKVLDKTSDSPTTEATRLLEDIKHAAGIPADCHDDVQVSRNRSHSGEGVWRELLIRPTEP-AVRVRVMAIAIGHFQOASGIDA	312
MdSot3	223	MGRLGDKARKVLDKTSDSPTTEATRLLEDIKHAAGIPADCHDDVQVSRNRSHSGEGVWRELLIRPTEP-AVRVRVMAIAIGHFQOASGIDA	310
PcSot1	215	MGRLGDKARKVLDKTSDSLEEAQRLRLADIKHAAGIPERCVEDVQVFKH-SHGEVWRELLIRPTEP-PVRHIDIAAIGHFQOASGIDA	302
KmSat1	431	IAYYSSAIFLQSGFS-EVSSSLCASLGFGLNFFFAIPAFFMIDRFGRRFLLHHTFPLWAVFLLIAG---FSFWIDD---RDKRIGV	510
DhSyl1	412	IYYNKTIFIRAGFT-EVAALTSAGWFGMVNLFALPTEYTDITDTPGRNLLLTFFELMSIFLLWTG---GFLASN---DTRIGIV	491
DhSyl2	411	IYYNKTIFIRAGFT-EVAALTSAGWFGMVNLFALPTEYTDITDTPGRNLLLTFFELMSIFLLWTG---GFLASN---DTRIGIV	491
ScHxt13	336	FFFGTTFIFKSVGLT---DGFETSVLGTVNFESTIIIVMVVDKIGRRKCLLFGAAGMMACMVIFASIGVKCLYPHGQDGFSSKAGNAGM	422
ScHxt15	339	FFFGTTFIFKSVGLT---DGFETSVLGTVNFESTIIIVMVVDKIGRRKCLLFGAAGMMACMVIFASIGVKCLYPHGQDGFSSKAGNAGM	425
ScHxt17	336	FFFGTTFIFKSVGLT---DGFETSVLGTVNFESTIIIVMVVDKIGRRKCLLFGAAGMMACMVIFASIGVKCLYPHGQDGFSSKAGNAGM	422
AtPlt5	313	VVLSPRIEIKTAGLKTDRHQCLLATVAVGVKTSFILVATFLLDLRRPPLLLTSVGVGAVLSAALG---TSLTITDSEKRVMAVVA	388
MdSot3	311	VVLSPRIEIKTAGLKTDRHQCLLATVAVGVKTSFILVATFLLDLRRPPLLLTSVGVGAVLSAALG---TSLTITDSEKRVMAVVA	396
PcSot1	303	VVLSPRIEIKTAGLKTDRHQCLLATVAVGVKTSFILVATFLLDLRRPPLLLTSVGVGAVLSAALG---TSLTITDSEKRVMAVVA	388
KmSat1	511	SMGIYVFSAIYSFGQGVVFPVIAGEVFPPLYVRAIGASLFTIVLMGFNFILSLTWFSMLRAFQPGSGFGFYAAWNVIGWFLVYFFMPETKQ	600
DhSyl1	492	ASGVYIFSAIYSAEGSPVETISAEAPFLYINDLGMGFATCWFNFILALTWKPLVSSFTSTGAFGWAAWNIYVGFVFLVLFLEETKQ	581
DhSyl2	492	ASGVYIFSAIYSAEGSPVETISAEAPFLYINDLGMGFATCWFNFILALTWKPLVSSFTSTGAFGWAAWNIYVGFVFLVLFLEETKQ	581
ScHxt13	423	IVFPCYIFPCPATTWAPVAIIVVAESPPSKVKSRAKMSISAFNMLWQFLIGFTTFITGSIHFYGYVEVG-CLVAMFLYVFFLEETIG	511
ScHxt15	426	IVFPCYIFPCPATTWAPVAIIVVAESPPSKVKSRAKMSISAFNMLWQFLIGFTTFITGSIHFYGYVEVG-CLVAMFLYVFFLEETIG	514
ScHxt17	423	IVFPCYIFPCPATTWAPVAIIVVAESPPSKVKSRAKMSISAFNMLWQFLIGFTTFITGSIHFYGYVEVG-CLVAMFLYVFFLEETIG	511
AtPlt5	399	IATVMYVATFSLGAPITWVYSSEIPPLRLRSQSSMGVVVNRVTSGVVISISFLMSKAMTIGSAFYLFGGIATVAVVFFVLEETQK	488
MdSot3	397	MAVMYVATFSLGAPITWVYSSEIPPLRLRSQSSMGVVVNRVTSGVVISISFLMSKAMTIGSAFYLFGGIATVAVVFFVLEETQK	486
PcSot1	389	LMVILAYVGFSSIGMGPPIAWVYSSEIPPLKLRAGCSMGTAANRIMSGLMSFISLYKAITMGTEFLYAGIATVGVVFFVLEETQK	478
KmSat1	601	LPLEELDEVFDVPLMTRARHOLLNLNWFQIHLPLRREGVLOPPLDRHHRMAIKAAEWNEKAEVEEPIRKDEE	674
DhSyl1	582	LPLEELDEVFVSTRKKHAKQTRHFLNGIQRVLLRRHIDPPLPLYEHQKRLAVTNDNNNRTEAHIE-----	649
DhSyl2	582	LPLEELDEVFVSTRKKHAIYQTKSILNSQQRVLLRRHIDPPLPLYEHQKRLAVTNDNNNRTEAHIE-----	649
ScHxt13	512	LSLEEIQLLYEEGIKPKWSASWVPPSRRGIPSEESKTEKKDKWKEFLFKSGNSD-----	564
ScHxt15	515	LSLEEIQLLYEEGIKPKWSASWVPPSRRGIPSEESKTEKKDKWKEFLFKSGNSD-----	567
ScHxt17	512	LSLEEIQLLYEEGIKPKWSASWVPPSRRGIPSEESKTEKKDKWKEFLFKSGNSD-----	564
AtPlt5	489	RMLDEMDLESGFR-WRDSKSKPKPGNEKTVPNPEVEIGSNKQKWKEDTQSS-----	539
MdSot3	487	RMLDEMDLESGFR-WRDSKSKPKPGNEKTVPNPEVEIGSNKQKWKEDTQSS-----	526
PcSot1	479	RMLDEMDLESGKFWRWREGVALLR-NKRAVVC-----	509

補足図 3-3 KmSat1p と既に同定されているソルビトール輸送体のアミノ酸配列比較

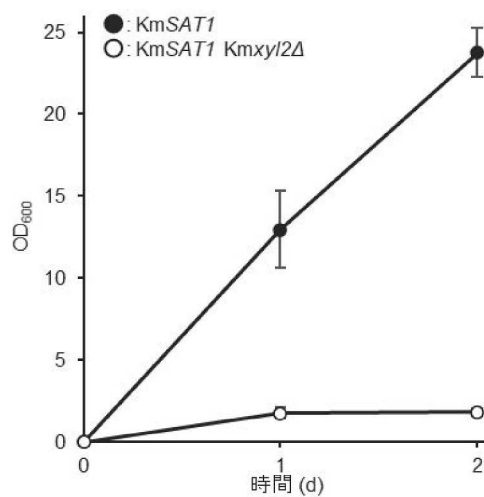
KmSat1p と [4-8] で示したソルビトール輸送体のアミノ酸配列を比較した。KmSat1p と同じアミノ酸残基は灰色の背景で示した。Dh は、*Debaryomyces hansenii*、Sc は、*Saccharomyces cerevisiae*、At は、*Arabidopsis thaliana*、Md は、*Malus domestica* (リンゴ)、Pc は、*Prunus cerasus* (サクランボ) を示した。



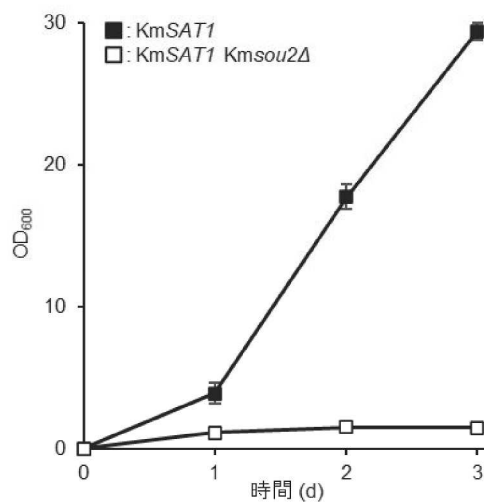
補足図 3-4 KmSAT1 変異体および *S. cerevisiae* 由来のソルビトール輸送体を発現する *K. marxianus* のソルビトール培地中での増殖

(A) KmSAT1 (Sat1、●) およびその N 末端欠失変異体 (Sat1Δ1_89 (□)、 Sat1Δ1_91 (◇)) を *K. marxianus* で発現させた。これらの株を YPSor 培地で培養し、増殖 (OD₆₆₀) をフォトバイオレコーダーで記録した。(B) KmSAT1 (●) および *S. cerevisiae* 由来の輸送体 (ScHXT13 (◆)、ScHXT15 (◆)、ScHXT17 (▲)) を *K. marxianus* で発現させ、(A)と同様にして増殖を測定した。

(A) ソルビトール

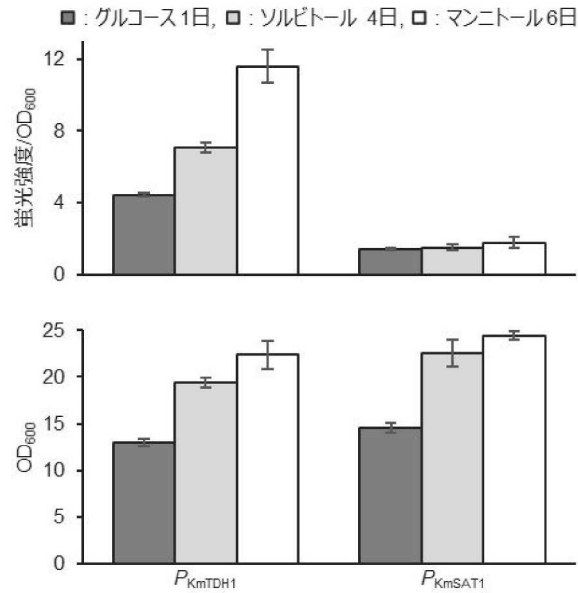


(B) マンニトール



補足図 3-5 KmSAT1 を過剰発現する *K. marxianus* における KmXYL2 および KmSOU2 の破壊が糖アルコール資化に及ぼす影響。

(A) YPSor 培地における KmSAT1 過剰発現株 (●) とその Kmxy12 破壊株 (○) の増殖。(B) YPMan 培地における KmSAT1 過剰発現株 (■) とその Kmsou2 破壊株 (□) の増殖。OD₆₀₀ は、培養物を適切な希釈倍率で希釈した後、分光光度計で測定した。独立した 3 つの培養の平均値と標準偏差を示した。



補足図 S3-7 グルコース、ソルビトールまたはマンニトール培地での P_{KmTDH1} と P_{KmSAT1} のレポーターアッセイ

P_{KmTDH1} または P_{KmSAT1} を過剰発現した *K. marxianus* をグルコース、ソルビトールまたはマンニトール培地でそれぞれ 1 日、4 日、6 日培養した。その後、蛍光強度と OD₆₀₀ (下) を測定した。蛍光強度の測定のために培養液を水に置き換え、励起波長と蛍光波長をそれぞれ 578 nm、613 nm とした分光蛍光光度計 FP-8200 (日本分光) を用いて測定した。蛍光強度/OD₆₀₀ (上) は、これらの値から算出した。独立した 3 つの培養の平均値と標準偏差を示した。

補足表 S4-1 第4章で使した酵母

株名	遺伝子型	宿主	テンプレート1	オリゴDNA1-1	オリゴDNA1-2	テンプレート2	オリゴDNA2-1	オリゴDNA2-2	参照
RAK40743	MATa leu2-3 112 ura3-52 trp1-289	-	-	-	-	-	-	-	Wieczorko et al., (1999)
(EBY VV1000)	his3-Δ1 MAL2-8' SUC2 hxt17Δ	-	-	-	-	-	-	-	Erachmann et al., (1998)
RAK3363	MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0	-	-	-	-	-	-	-	Lim Tong et al., (2007)
(BY4741)	ura3Δ0	-	-	-	-	-	-	-	Nonklang et al., (2008)
RAK3596	DMKU3-1042 WT	-	-	-	-	-	-	-	Yamizu et al., (2013)
RAK3605	DMKU3-1042 ura3-1	-	-	-	-	-	-	-	
RAK4174	DMKU3-1042 ura3-1 leu2-2	-	-	-	-	-	-	-	
RAK28041	RAK3605 [pKM100-ScADE2-KmCDC19p-KmGAL2-ScURA3c]	RAK3605	RAK4174 [pKM100-ScADE2-KmCDC19p-yEmRFP-ScURA3c]	KmCDC19-1c	ScURA3+771c	RAK3696	KmGAL2+1	ScURA3+772786-TGA-KmGAL2+1298c	This study
RAK28044	RAK3605 [pKM100-ScADE2-KmCDC19p-KmHXT2-ScURA3c]	RAK3605	RAK4174 [pKM100-ScADE2-KmCDC19p-yEmRFP-ScURA3c]	KmCDC19-1c	ScURA3+771c	RAK3696	KmHXT2+1	ScURA3+772786-TGA-KmHXT2+1689c	This study
RAK28039	RAK3605 [pKM100-ScADE2-KmCDC19p-KmHXT4-ScURA3c]	RAK3605	RAK4174 [pKM100-ScADE2-KmCDC19p-yEmRFP-ScURA3c]	KmCDC19-1c	ScURA3+771c	RAK3696	KmHXT4+1	ScURA3+772786-TGA-KmHXT4+1713c	This study
RAK28037	RAK3605 [pKM100-ScADE2-KmCDC19p-KmHXT4-2-ScURA3c]	RAK3605	RAK4174 [pKM100-ScADE2-KmCDC19p-yEmRFP-ScURA3c]	KmCDC19-1c	ScURA3+771c	RAK3696	KmHXT4-2+1	ScURA3+772786-TGA-KmHXT4-2+1701c	This study
RAK28054	RAK3605 [pKM100-ScADE2-KmCDC19p-KmHXT14-ScURA3c]	RAK3605	RAK4174 [pKM100-ScADE2-KmCDC19p-yEmRFP-ScURA3c]	KmCDC19-1c	ScURA3+771c	RAK3696	KmHXT14+1	ScURA3+772786-TGA-KmHXT14+1895c	This study
RAK28048	RAK3605 [pKM100-ScADE2-KmCDC19p-KmMAL11-ScURA3c]	RAK3605	RAK4174 [pKM100-ScADE2-KmCDC19p-yEmRFP-ScURA3c]	KmCDC19-1c	ScURA3+771c	RAK3696	KmMAL11+1	ScURA3+772786-TGA-KmMAL11+1566c	This study
RAK28036	RAK3605 [pKM100-ScADE2-KmCDC19p-KmMTLL1665-ScURA3c]	RAK3605	RAK4174 [pKM100-ScADE2-KmCDC19p-yEmRFP-ScURA3c]	KmCDC19-1c	ScURA3+771c	RAK3696	KmMTLL1665+1	ScURA3+772786-TGA-KmMTLL1665+1665c	This study
RAK28033	RAK3605 [pKM100-ScADE2-KmCDC19p-KmSTL1-ScURA3c]	RAK3605	RAK4174 [pKM100-ScADE2-KmCDC19p-yEmRFP-ScURA3c]	KmCDC19-1c	ScURA3+771c	RAK3696	KmSTL1+1	ScURA3+772786-TGA-KmSTL1+1701c	This study
RAK28052	RAK3605 [pKM100-ScADE2-KmCDC19p-KmSTL1-2-ScURA3c]	RAK3605	RAK4174 [pKM100-ScADE2-KmCDC19p-yEmRFP-ScURA3c]	KmCDC19-1c	ScURA3+771c	RAK3696	KmSTL1-2+1	ScURA3+772786-TGA-KmSTL1-2+1701c	This study
RAK28046	RAK3605 [pKM100-ScADE2-KmCDC19p-KmSTL1-3-ScURA3c]	RAK3605	RAK4174 [pKM100-ScADE2-KmCDC19p-yEmRFP-ScURA3c]	KmCDC19-1c	ScURA3+771c	RAK3696	KmSTL1-3+1	ScURA3+772786-TGA-KmSTL1-3+1842c	This study
RAK28050	RAK3605 [pKM100-ScADE2-KmCDC19p-KmSTL1-4-ScURA3c]	RAK3605	RAK4174 [pKM100-ScADE2-KmCDC19p-yEmRFP-ScURA3c]	KmCDC19-1c	ScURA3+771c	RAK3696	KmSTL1-4+1	ScURA3+772786-TGA-KmSTL1-4+1368c	This study
RAK43552	RAK40743 [pRS315-ScTDH3p-KmBGL1-ScLEU2c]	RAK40743	RAK3363 ura3Δ0-10CA-ScTDH3p-KmBGL1-TGA-15C-ScURA3	ScTDH3-572	ScLEU2+1548c-KmBGL1+2538c	MATa leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 [pRS315]	ScTDH3-548c-ScLEU2+1573c	ScLEU2+1572c	This study
RAK43777	RAK40743 [pRS315-ScTDH3p-KmBGL1-ScLEU2c] [YE-p-KmCDC19p-KmGAL2-ScURA3c]	RAK40743 [YE-p-KmCDC19p-KmGAL2 (derived from NBR0219) -ScURA3c]	RAK3363 ura3Δ0-10CA-ScTDH3p-KmBGL1-TGA-15C-ScURA3	ScTDH3-572	ScLEU2+1548c-KmBGL1+2538c	MATa leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 [pRS315]	ScTDH3-548c-ScLEU2+1573c	ScLEU2+1572c	This study
RAK42638	RAK40743 [pRS315-ScTDH3p-KmBGL1-ScLEU2c] [YE-p-KmCDC19p-KmHXT2-ScURA3c]	RAK43552	RAK3363 [YE-p-KmCDC19p-yEmRFP-ScURA3c]	KmCDC19-1c	ScURA3+771c	RAK3605 [pKM100-ScADE2-KmCDC19p-KmHXT2-ScURA3c]	KmCDC19-140	ScURA3+51	This study
RAK42639	RAK40743 [pRS315-ScTDH3p-KmBGL1-ScLEU2c] [YE-p-KmCDC19p-KmHXT4-ScURA3c]	RAK43552	RAK3363 [YE-p-KmCDC19p-yEmRFP-ScURA3c]	KmCDC19-1c	ScURA3+771c	RAK3605 [pKM100-ScADE2-KmCDC19p-KmHXT4-ScURA3c]	KmCDC19-140	ScURA3+51	This study
RAK42640	RAK40743 [pRS315-ScTDH3p-KmBGL1-ScLEU2c] [YE-p-KmCDC19p-KmHXT4-2-ScURA3c]	RAK43552	RAK3363 [YE-p-KmCDC19p-yEmRFP-ScURA3c]	KmCDC19-1c	ScURA3+771c	RAK3605 [pKM100-ScADE2-KmCDC19p-KmHXT4-2-ScURA3c]	KmCDC19-140	ScURA3+51	This study
RAK42641	RAK40743 [pRS315-ScTDH3p-KmBGL1-ScLEU2c] [YE-p-KmCDC19p-KmHXT14-ScURA3c]	RAK43552	RAK3363 [YE-p-KmCDC19p-yEmRFP-ScURA3c]	KmCDC19-1c	ScURA3+771c	RAK3605 [pKM100-ScADE2-KmCDC19p-KmHXT14-ScURA3c]	KmCDC19-140	ScURA3+51	This study
RAK42648	RAK40743 [pRS315-ScTDH3p-KmBGL1-ScLEU2c] [YE-p-KmCDC19p-KmMAL11-ScURA3c]	RAK43552	RAK3363 [YE-p-KmCDC19p-yEmRFP-ScURA3c]	KmCDC19-1c	ScURA3+771c	RAK3605 [pKM100-ScADE2-KmCDC19p-KmMAL11-ScURA3c]	KmCDC19-140	ScURA3+51	This study
RAK42647	RAK40743 [pRS315-ScTDH3p-KmBGL1-ScLEU2c] [YE-p-KmCDC19p-KmMTLL1665-ScURA3c]	RAK43552	RAK3363 [YE-p-KmCDC19p-yEmRFP-ScURA3c]	KmCDC19-1c	ScURA3+771c	RAK3605 [pKM100-ScADE2-KmCDC19p-KmMTLL1665-ScURA3c]	KmCDC19-140	ScURA3+51	This study
RAK42642	RAK40743 [pRS315-ScTDH3p-KmBGL1-ScLEU2c] [YE-p-KmCDC19p-KmSTL1-ScURA3c]	RAK43552	RAK3363 [YE-p-KmCDC19p-yEmRFP-ScURA3c]	KmCDC19-1c	ScURA3+771c	RAK3605 [pKM100-ScADE2-KmCDC19p-KmSTL1-ScURA3c]	KmCDC19-140	ScURA3+51	This study

RAK42643	RAK40743 [pRS315-ScTDH3p-KmBGL1-ScLEU2] [YEp-KmCDC19p-KmSTL1-2-ScURA3c]	RAK43552	RAK3363 [YEp-KmCDC19p-yEmRFP-ScURA3c]	KmCDC19-1c	ScURA3+771c	RAK3605 [pKM100-ScADE2-KmCDC19p-KmSTL1-2-ScURA3c]	KmCDC19-140	ScURA3+51	This study
RAK42644	RAK40743 [pRS315-ScTDH3p-KmBGL1-ScLEU2] [YEp-KmCDC19p-KmSTL1-3-ScURA3c]	RAK43552	RAK3363 [YEp-KmCDC19p-yEmRFP-ScURA3c]	KmCDC19-1c	ScURA3+771c	RAK3605 [pKM100-ScADE2-KmCDC19p-KmSTL1-3-ScURA3c]	KmCDC19-140	ScURA3+51	This study
RAK42645	RAK40743 [pRS315-ScTDH3p-KmBGL1-ScLEU2] [YEp-KmCDC19p-KmSTL1-4-ScURA3c]	RAK43552	RAK3363 [YEp-KmCDC19p-yEmRFP-ScURA3c]	KmCDC19-1c	ScURA3+771c	RAK3605 [pKM100-ScADE2-KmCDC19p-KmSTL1-4-ScURA3c]	KmCDC19-140	ScURA3+51	This study
RAK3686	NCYC2791 WT	-	-	-	-	-	-	-	National Collection of Yeast Cultures, UK
RAK10455	NCYC2791 <i>ura3</i>	-	-	-	-	-	-	-	This study
RAK45068	RAK10455 <i>adi1</i> ScURA3	RAK10455	RAK4174 [YCp-ScGAL10p ₁₀₀₋₁ Spcas9 ^{richy null} -ScPHO3-panARS(OPT)-ScTDH3p-HDV-ScCYCfl-KmCanD-ScURA3]	CRISPR/KmSTL1+133	CRISPR/KmSTL1+133	-	-	-	This study, Removed the plasmid
RAK39532	RAK4174 <i>aly1</i> -ScLEU2	RAK4174	RAK4174 [YCp-ScGAL10p ₁₀₀₋₁ Spcas9 ^{richy null} -ScPHO3-panARS(OPT)-ScTDH3p-HDV-ScCYCfl-KmCanD-ScURA3]	HHc-ScTDH3-1c	CRISPR/KmALY1+34	-	-	-	This study, Removed the plasmid
RAK44163	RAK39532 [pKM100-ScADE2-ScTDH3p-yEGFP2-KmSTL1-ScURA3c]	RAK39532	RAK29061	ScURA3+51	ScURA3+50c	-	-	-	This study
RAK37476	RAK4174 <i>art5</i> -ScLEU2	RAK4174	RAK4174 [YCp-ScGAL10p ₁₀₀₋₁ Spcas9 ^{richy null} -ScPHO3-panARS(OPT)-ScTDH3p-HDV-ScCYCfl-KmCanD-ScURA3]	HHc-ScTDH3-1c	CRISPR/KmART5+22	-	-	-	This study, Removed the plasmid
RAK37478	RAK37476 [pKM100-ScADE2-ScTDH3p-yEGFP2-KmSTL1-ScURA3c]	RAK37476	RAK29061	ScURA3+370c	ScURA3+371	-	-	-	This study
RAK43745	RAK4174 <i>bul1</i> -ScLEU2	RAK4174	RAK4174 [YCp-ScGAL10p ₁₀₀₋₁ Spcas9 ^{richy null} -ScPHO3-panARS(OPT)-ScTDH3p-HDV-ScCYCfl-KmCanD-ScURA3]	HHc-ScTDH3-1c	CRISPR/KmBUL1+24	-	-	-	This study, Removed the plasmid
RAK44166	RAK43745 [pKM100-ScADE2-ScTDH3p-yEGFP2-KmSTL1-ScURA3c]	RAK43745	RAK29061	ScURA3+51	ScURA3+50c	-	-	-	This study
RAK37477	RAK4174 <i>ecm21</i> -ScLEU2	RAK4174	RAK4174 [YCp-ScGAL10p ₁₀₀₋₁ Spcas9 ^{richy null} -ScPHO3-panARS(OPT)-ScTDH3p-HDV-ScCYCfl-KmCanD-ScURA3]	HHc-ScTDH3-1c	CRISPR/KmECM21+19	-	-	-	This study, Removed the plasmid
RAK37479	RAK37477 [pKM100-ScADE2-ScTDH3p-yEGFP2-KmSTL1-ScURA3c]	RAK37477	RAK29061	ScURA3+370c	ScURA3+371	-	-	-	This study
RAK39534	RAK4174 <i>ldb19</i> -ScLEU2	RAK4174	RAK4174 [YCp-ScGAL10p ₁₀₀₋₁ Spcas9 ^{richy null} -ScPHO3-panARS(OPT)-ScTDH3p-HDV-ScCYCfl-KmCanD-ScURA3]	HHc-ScTDH3-1c	CRISPR/KmLDB19+46	-	-	-	This study, Removed the plasmid
RAK44165	RAK39534 [pKM100-ScADE2-ScTDH3p-yEGFP2-KmSTL1-ScURA3c]	RAK39534	RAK29061	ScURA3+51	ScURA3+50c	-	-	-	This study
RAK39533	RAK4174 <i>nm8</i> -ScLEU2	RAK4174	RAK4174 [YCp-ScGAL10p ₁₀₀₋₁ Spcas9 ^{richy null} -ScPHO3-panARS(OPT)-ScTDH3p-HDV-ScCYCfl-KmCanD-ScURA3]	HHc-ScTDH3-1c	CRISPR/KmRIM8+36	-	-	-	This study, Removed the plasmid
RAK44164	RAK39533 [pKM100-ScADE2-ScTDH3p-yEGFP2-KmSTL1-ScURA3c]	RAK39533	RAK29061	ScURA3+51	ScURA3+50c	-	-	-	This study
RAK39643	RAK4174 <i>rog3</i> -ScLEU2	RAK4174	RAK4174 [YCp-ScGAL10p ₁₀₀₋₁ Spcas9 ^{richy null} -ScPHO3-panARS(OPT)-ScTDH3p-HDV-ScCYCfl-KmCanD-ScURA3]	HHc-ScTDH3-1c	CRISPR/KmROG3+27	-	-	-	This study, Removed the plasmid

RAK39375	RAK39643 [pKM100-ScADE2-ScTDH3p-yEGFP2-KmSTL1-ScURA3c]	RAK39643	RAK29061	ScURA3+370c	ScURA3+371	-	-	-	This study
RAK29061	RAK3605 [pKM100-ScADE2-ScTDH3p-yEGFP2-KmSTL1-ScURA3c]	RAK3605	DMKU3-1042 <i>ura3-1 leu2-2 ade2 lys2</i> [pKM100-ScADE2-ScTDH3p-yEGFP2-ScURA3c]	yEGFP2+717c	ScURA3+771c	RAK3596	KmSTL1+1	ScURA3+77286-TGA-KmSTL1+1701c	This study
RAK34615	RAK3605 [pKM100-ScADE2-ScTDH3p-yEGFP2-ScHXT6-ScURA3c]	RAK3605	RAK3363	ScHXT6+1	ScURA3+772786-TGA-ScHXT6+1713c	RAK29061	yEGFP2+717c	ScURA3+771c	This study
RAK40498	RAK3605 [pKM100-ScADE2-ScTDH3p-yEGFP2-KmHXT2-ScURA3c]	RAK3605	RAK3596	KmHXT2+1	ScURA3+772786-TGA-KmHXT2+1689c	DMKU3-1042 <i>ura3-1 ade2</i> [pKM100-ScADE2-ScTDH3p-yEGFP2-ScURA3c]	yEGFP2+717c	ScURA3+771c	This study
RAK37463	RAK3605 [pKM100-ScADE2-ScTDH3p-yEGFP2-KmSTL1- <i>lys100</i> -ScURA3c]	RAK3605	RAK29061	KmSTL1+157	ScURA3+371	RAK3605 [pKM100-ScADE2-ScTDH3p-yEGFP2-ScHXT6-ScURA3c]	yEGFP2+717c	ScURA3+370c	This study
RAK35339	RAK3605 [pKM100-ScADE2-ScTDH3p-yEGFP2-KmSTL1- <i>lys100</i> -taa-ScURA3c]	RAK3605	RAK29061	KmSTL1+1689c	taa-TGAc-ScURA3+786c	-	-	-	This study
RAK35333	RAK3605 [pKM100-ScADE2-ScTDH3p-yEGFP2-KmSTL1- <i>lys100</i> -taa-ScURA3c]	RAK3605	RAK29061	KmSTL1+1686c	taa-TGAc-ScURA3+786c	-	-	-	This study
RAK43886	RAK3605 [pKM100-ScADE2-ScTDH3p-yEGFP2-KmSTL1- <i>lys100</i> -taa-ScURA3c]	RAK3605	RAK29061	KmSTL1+1656c	taa-TGAc-ScURA3+786c	-	-	-	This study
RAK44179	RAK3605 [pKM100-ScADE2-ScTDH3p-yEGFP2-KmSTL1- <i>lys100</i> -taa-ScURA3c]	RAK3605	RAK29061	KmSTL1[E659R_E660R_D562R]+1686c	ScURA3+50c	RAK29061	KmSTL1+1687	ScURA3+51	This study
RAK45090	RAK4174 ScTDH3p-KmBGL1-ScLEU2c	RAK4174	RAK43562	ScTDH3-572	ScLEU2-400	-	-	-	This study
RAK45111	RAK45090 ScTDH3p-KmSTL1-ScURA3c	RAK45090	RAK29061	ScTDH3-572	ScURA3-223	-	-	-	This study
RAK45113	RAK45090 ScTDH3p-KmSTL1- <i>lys100</i> -taa-ScURA3c	RAK45090	RAK3605 [pKM100-ScADE2-ScTDH3p-KmSTL1- <i>lys100</i> -taa-ScURA3c]	ScTDH3-572	ScURA3-223	-	-	-	This study
RAK45115	RAK45090 ScTDH3p-KmSTL1- <i>lys100</i> -taa-ScURA3c	RAK45090	RAK3605 [pKM100-ScADE2-ScTDH3p-KmSTL1- <i>lys100</i> -taa-ScURA3c]	ScTDH3-572	ScURA3-223	-	-	-	This study
RAK45117	RAK45090 ScTDH3p-KmSTL1- <i>lys100</i> -taa-ScURA3c	RAK45090	RAK43562 [YEp-ScTDH3p-KmSTL1- <i>lys100</i> -taa-ScURA3c]	ScTDH3-572	ScURA3-223	-	-	-	This study
RAK43518	RAK40743 [pRS315-ScTDH3p-KmBGL1-ScLEU2c] [YEp-ScTDH3p-RAK43552-KmSTL1-ScURA3c]	RAK43552	RAK3605 [pKM100-ScADE2-ScTDH3p-KmSTL1- <i>lys100</i> -taa-ScURA3c]	ScTDH3-242	ScURA3+772786-TGA-KmSTL1+1701c	RAK3363 [YEp-ScTDH3p-yEmRFP-ScURA3c]	ScTDH3-1c	taa-TGAc-ScURA3+786c	This study
RAK43517	RAK40743 [pRS315-ScTDH3p-KmBGL1-ScLEU2c] [YEp-ScTDH3p-RAK43552-KmSTL1- <i>lys100</i> -taa-ScURA3c]	RAK43552	RAK3605 [pKM100-ScADE2-ScTDH3p-KmSTL1- <i>lys100</i> -taa-ScURA3c]	ScTDH3-242	ScURA3+51	RAK3363 [YEp-ScTDH3p-yEmRFP-ScURA3c]	ScTDH3-1c	ScURA3+771c	This study
RAK43516	RAK40743 [pRS315-ScTDH3p-KmBGL1-ScLEU2c] [YEp-ScTDH3p-RAK43552-KmSTL1- <i>lys100</i> -taa-ScURA3c]	RAK43552	RAK3605 [pKM100-ScADE2-ScTDH3p-KmSTL1- <i>lys100</i> -taa-ScURA3c]	ScTDH3-242	ScURA3+51	RAK3363 [YEp-ScTDH3p-yEmRFP-ScURA3c]	ScTDH3-1c	ScURA3+771c	This study
RAK45071	RAK40743 [pRS315-ScTDH3p-KmBGL1-ScLEU2c] [YEp-ScTDH3p-RAK43552-KmSTL1- <i>lys100</i> -taa-ScURA3c]	RAK43552	RAK44179	ScTDH3-25-KmSTL1+1	ScURA3+51	RAK3363 [YEp-ScTDH3p-ATG-KmHXT4- <i>ura3</i> -ScURA3c]	ScTDH3-1c	ScURA3+771c	This study
RAK4010	NBRC0219	-	-	-	-	-	-	-	独立行政法人製 品質管理技術基盤 機構 (日本)
RAK4011	NBRC0260	-	-	-	-	-	-	-	独立行政法人製 品質管理技術基盤 機構 (日本)
RAK4022	NBRC0272	-	-	-	-	-	-	-	独立行政法人製 品質管理技術基盤 機構 (日本)
RAK4012	NBRC0273	-	-	-	-	-	-	-	独立行政法人製 品質管理技術基盤 機構 (日本)

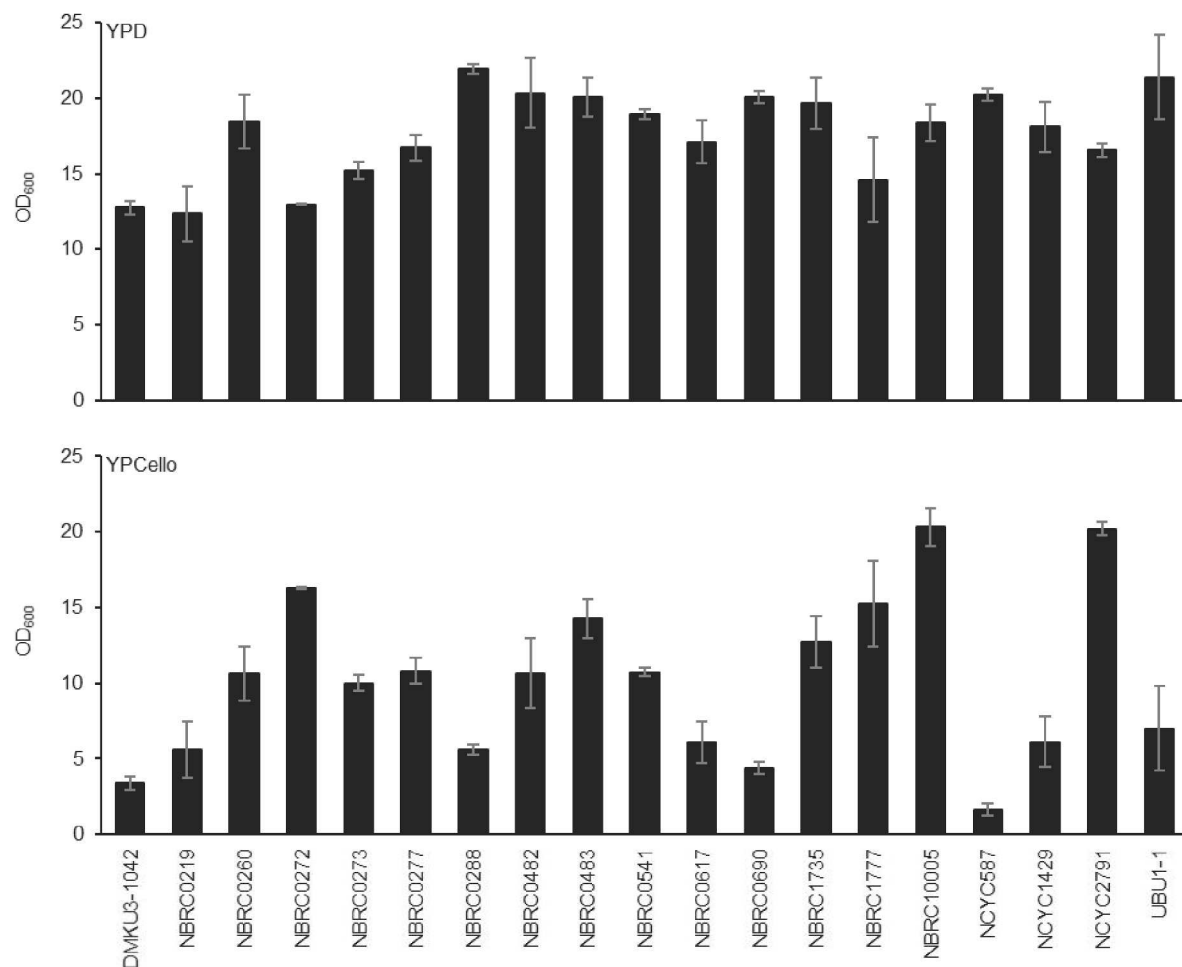
RAK4013	NBRC0277	-	-	-	-	-	-	-	独立行政法人製 品評定技術基盤 機構 (日本)
RAK4014	NBRC0288	-	-	-	-	-	-	-	独立行政法人製 品評定技術基盤 機構 (日本)
RAK4015	NBRC0482	-	-	-	-	-	-	-	独立行政法人製 品評定技術基盤 機構 (日本)
RAK4016	NBRC0483	-	-	-	-	-	-	-	独立行政法人製 品評定技術基盤 機構 (日本)
RAK4019	NBRC0541	-	-	-	-	-	-	-	独立行政法人製 品評定技術基盤 機構 (日本)
RAK4020	NBRC0617	-	-	-	-	-	-	-	独立行政法人製 品評定技術基盤 機構 (日本)
RAK4017	NBRC0590	-	-	-	-	-	-	-	独立行政法人製 品評定技術基盤 機構 (日本)
RAK4023	NBRC1735	-	-	-	-	-	-	-	独立行政法人製 品評定技術基盤 機構 (日本)
RAK4021	NBRC1777	-	-	-	-	-	-	-	独立行政法人製 品評定技術基盤 機構 (日本)
RAK4024	NBRC10005	-	-	-	-	-	-	-	独立行政法人製 品評定技術基盤 機構 (日本)
RAK3684	NCYC587	-	-	-	-	-	-	-	National Collection of Yeast Cultures (UK)
RAK3685	NCYC1429	-	-	-	-	-	-	-	National Collection of Yeast Cultures (UK)
RAK5406	UBI1-1	-	-	-	-	-	-	-	Hoshida et al. (2012)
RAK10508	NCYC587 <i>ura3</i>	-	-	-	-	-	-	-	This study
RAK27432	RAK10508 [pKM100-ScADE2- KmCDC19p-KmBGL1-ScURA3c]	RAK10508	RAK4174 [pKM100-ScADE2- KmCDC19p-yEmRFP-ScURA3c]	KmCDC19-1c	ScURA3+771c	RAK3684	KmBGL1+1	ScURA3+772786-TGA- KmBGL1+2721c	This study
RAK45105	RAK3363 [YEp-ScURA3-ScTDH3p- yCLuc]	RAK3363	RAK3363 [pRS316-ScTDH3p- yCLuc-ScURA3]	ScURA3+851-ScTDH3-698	YEpGAPend(-25)- yCLuc+1662c	RAK3363 [YEp-ScTDH3p-ATG- KmHX74 ₄₈₋₁₇₃ -ScURA3c]	ScURA3+880c	YEpGAPendc	This study
RAK45106	RAK3363 [YEp-ScURA3-ScTDH3p- yCLuc]	RAK3363	RAK3363 [pRS316-ScTDH3p- yCLuc-ScURA3]	ScURA3+851-ScTDH3-698	YEpGAPend(-25)- yCLuc+1662c	RAK3363 [YEp-ScTDH3p-ATG- KmHX74 ₄₈₋₁₇₃ -ScURA3c]	ScURA3+880c	YEpGAPendc	This study
RAK45107	RAK3363 [YEp-ScURA3-ScTDH3p- yCLuc]	RAK3363	RAK3363 [pRS316-ScTDH3p- yCLuc-ScURA3]	ScURA3+851-ScTDH3-698	YEpGAPend(-25)- yCLuc+1662c	RAK3363 [YEp-ScTDH3p-ATG- KmHX74 ₄₈₋₁₇₃ -ScURA3c]	ScURA3+880c	YEpGAPendc	This study
RAK45108	RAK3363 [YEp-ScURA3- KmCDC19p-yCLuc]	RAK3363	RAK3605 [pKM100-ScURA3- KmCDC19p-yCLuc-ScADE2c]	ScURA3+51	YEpGAPend(-25)- yCLuc+1662c	RAK3363 [YEp-ScTDH3p-ATG- KmHX74 ₄₈₋₁₇₃ -ScURA3c]	ScURA3+880c	YEpGAPendc	This study
RAK45109	RAK3363 [YEp-ScURA3- KmCDC19p-yCLuc]	RAK3363	RAK3605 [pKM100-ScURA3- KmCDC19p-yCLuc-ScADE2c]	ScURA3+51	YEpGAPend(-25)- yCLuc+1662c	RAK3363 [YEp-ScTDH3p-ATG- KmHX74 ₄₈₋₁₇₃ -ScURA3c]	ScURA3+880c	YEpGAPendc	This study
RAK45110	RAK3363 [YEp-ScURA3- KmCDC19p-yCLuc]	RAK3363	RAK3605 [pKM100-ScURA3- KmCDC19p-yCLuc-ScADE2c]	ScURA3+51	YEpGAPend(-25)- yCLuc+1662c	RAK3363 [YEp-ScTDH3p-ATG- KmHX74 ₄₈₋₁₇₃ -ScURA3c]	ScURA3+880c	YEpGAPendc	This study

補足表S4-2 第4章で株の構築に利用したオリゴDNA

オリゴDNA名	オリゴDNA配列
CRISPRKmSTL1+133	ACGAGTAAGCTCGTCatggatgagacagatctgccGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT
CRISPRKmSTL1+133	TTGCTCCTCACGGACTCATCAGatggatTTTGTGTTTATGTGTGTTTATTC
HHc-ScTDH3-1c	gacgagcttactggttctgctccacggactcatcagTTTGTGTTTATGTGTGTTTATTCGAAACTAAGTCTCTG
CRISPRKmALY1+34	ttccatcagaaatgctctatGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT
CRISPRKmART5+22	ggaagcagtgagcagtggaGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT
CRISPRKmBUL1+24	acaacggaagatgagatGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT
CRISPRKmECM21+19	cacgagcatggcaagagagGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT
CRISPRKmLDB19+45	atcatctgccccatctdgcGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT
CRISPRKmRIM8+36	ggccaggagcaccactgatGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT
CRISPRKmROG3+27	ttgttgaaataagattagGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT
ScLEU2+1548-KmBGL1+2538c	GAAACGGCCTTAACGACGTAGTCGAttacaagccttccaatacaattct
KmCDC19-140	CCACTTTTATGTGTGTTGAC
KmCDC19-1c	TGCGTACGGTTTTTTTTGTGTGAGTGATGTGTCAAGG
KmGAL2+1	ATGTACGGCCGTCGTAATTGGGTTAA
ScURA3+772786-TGA-KmGAL2+1299c	gcatatttgagaagaTGATTAATGCTTCAACAAAGCCTTGATC
KmHXT2+1	ATGTCTAATCAATTGACGGCAAGTA
ScURA3+772786-TGA-KmHXT2+1689c	gcatatttgagaagaTGATTTATTTCAAAGAAATCCTCTTGATC
KmHXT4+1	ATGTCTGAAGCTGCTGCTGATTTAC
ScURA3+772786-TGA-KmHXT4+1713c	gcatatttgagaagaTGATTAATGCTTCATCATGCGCTTGATC
KmHXT4-2+1	ATGTCCGAAGCTGCTGCTGTACAAA
ScURA3+772786-TGA-KmHXT4-2+1701c	gcatatttgagaagaTGATTTATTCATCATAGCCTTGATCAT
KmHXT14+1	ATGGGAATAAAATGTTACTGTCAAC
ScURA3+772786-TGA-KmHXT14+1695c	gcatatttgagaagaTGATTTACTCAGTGAGAGCATATAGTTTG
KmMAL11+1	ATGACAAGCGACAAAGATGTTGAAT
ScURA3+772786-TGA-KmMAL11+1566c	gcatatttgagaagaTGATTACGGAGTATACAATCACCATCA
KmMTLL1665+1	ATGACATTGCTGGaCAAGCTTTTGC
ScURA3+772786-TGA-KmMTLL1665+1665c	gcatatttgagaagaTGATTAATTAGATTGACTGTTGGAATCA
KmSTL1+1	ATGACAGAAAGTGGAGTGAATCAT
ScURA3+772786-TGA-KmSTL1+1701c	gcatatttgagaagaTGATCAAACTGATAGTGAATCAACCTCT
KmSTL1-2+1	ATGGCAGACACTTCTAGCTTGCTT
ScURA3+772786-TGA-KmSTL1-2+1701c	gcatatttgagaagaTGATCAAACTGACTCTTTATTTTGATT
KmSTL1-3+1	ATGCTAAACAAAGTATCTGCAAAAG
ScURA3+772786-TGA-KmSTL1-3+1842c	gcatatttgagaagaTGATTTCCGAGCTGTTGGATGATTGT
KmSTL1-4+1	ATGGACTGGAAAGGAAGAAACCAG
ScURA3+772786-TGA-KmSTL1-4+1368c	gcatatttgagaagaTGATTTAACTGATCCAAATCGGAGACT
ScHXT6+1	ATGTCCAAAGACGCTGCTATTGACAGCAAA
ScURA3+772786-TGA-ScHXT6+1713c	gcatatttgagaagaTGATTTATTTGGTGCTGAACATTCTCTTG
ScTDH3-25-KmSTL1+1	GAATAAACACACATAAAACAAACAAatgacagaaagtgagtgatcat
KmSTL1+157	TATCTATCAAAGCAATACCTACCAT
KmSTL1+1656c	CTTTTCAGCTTCTATACCTCTCAT
KmSTL1+1686c	ATCAACCTCTTCAAAATGGGTGCTT
KmSTL1+1689c	TGAATCAACCTCTTCAAAATGGGTGC
yEGFP2+717c	cttgtacaattcgtccataccgttg
ScURA3+851-ScTDH3-698	gagcttcaatttaattatcagttattacATAAAAAACACGCTTTTTCAGTTCGAGTTT
ScTDH3-572	gctgtaacccgtacatgccccaaat
ScTDH3-242	CTTACACCTTCTATTACCTTCTGCTCTCTGATTGGAA
ScTDH3-1c	TTTGTGTTGTTATGTGTGTTTATTCGAAACTAAGTCTTGGTGTTTTAAACTAAAAAA
ScURA3-223	AAGCTTTTCAATTCATCTTTTTTTTTTTGTTCTTTTTTTGATTCCGGTTCTTTGAAA
ScURA3+50c	ACAGGACTAGGATGAGTAGCAGCAC
ScURA3+51	TGCTGCCAAGCTATTTAATATCATG
ScURA3+370c	CACCGTGTGCATTCTGAATGTCTGC
ScURA3+371	TGGTGGGCCAGGTATTGTTAGCGG
ScURA3+771c	ttcccagcgtcttctgtaacgttcacc
TGAc-ScURA3+786c	tcaTCTTCTCAAATATGCTTCCCAGCCT
taa-TGAc-ScURA3+786c	taaTCActcttcaaatatgctccagcc
ScURA3+880c	GGGTAATAACTGATATAATTAAATTGAAGC
ScLEU2-400	GAATACTCAGGTATCGTAAGATGCAAGAGT
ScLEU2+1095c	TTAAGCAAGGATTTTCTAACTTCTTCGGC
ScLEU2+1572c	TCGACTACGTCGTTAAGGCCGTTTC
ScTDH3-548c-ScLEU2+1573	ATTTTGGGCATGTACGGGTTACAGCTatggtgactctcagtaaatctg
YEpGAPend(-25)-yCLuc+1662c	ccgcgcgttggccgattcataatcTACTTGCACTCATCTGGGACCTCT
KmSTL1(E559R_E560R_D562R)+1686c	tctaactctdaaaatgggtgcttctacctttca
KmSTL1+1687	TCACTATCAGTTTAATCATCTTCTC
KmBGL1+1	atgtctaaattgatgtgaacagt
ScURA3+772786-TGA-KmBGL1+2721c	gcatatttgagaagaTGACACTTTGATACCTATTCAATTCATG
YEpGAPendc	qattaatgaatcgcccaacgcgcgggagaga

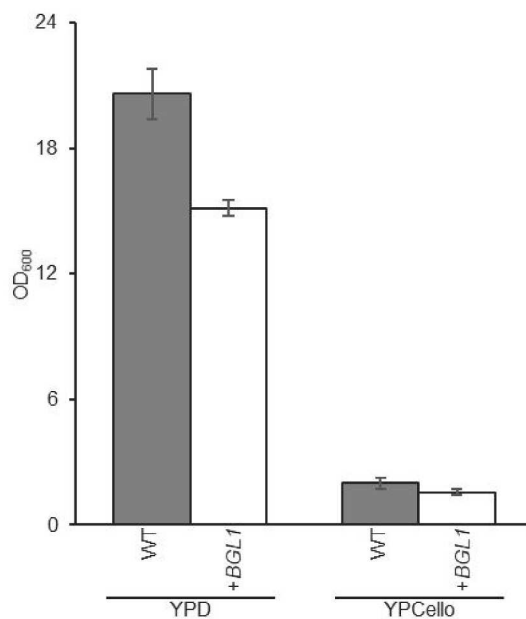
補足表S3-3 セロビオース輸送体とβ-グルコシダーゼの発現により改変した*S. cerevisiae*のセロビオース消費速度の比較

宿主	輸送体 (KmSTL1またはCDT-1)		β-グルコシダーゼ (KmBGL1またはgh1-1)		初期濃度 (g/L)	最終濃度 (g/L)	糖消費時間 (h)	糖消費速度 (g/L/h)	培養方法	参照
	プラスミド	プロモーター	プラスミド	プロモーター						
EBY.VW1000	YE _p	KmCDC19	YC _p	TDH3	28	4	48 (24-72)	0.50	L字管	This study
D452-2	YC _p	PGK1	YC _p	PGK1	75	4	136 (24-160)	0.52	フラスコ (通期無し)	(1)
D452-2	YC _p	PGK1	YC _p	PGK1	80	5	60 (0-60)	1.3	フラスコ (通期有り)	(2)
SSTDY*2	YC _p	TEF1	YC _p	PYK1	88	7	30 (13-43)	2.7	フラスコ (通期有り)	(3)
D452-2	YC _p	PGK1	YC _p	PGK1	82	2	36 (0-36)	2.2	フラスコ (通期有り)	(4)
D452-2	YC _p	PGK1	YC _p	PGK1	82	2	30 (0-30)	2.7	フラスコ (通期有り)	(5)
YPH499	YE _p	PGK1	YE _p	PGK1	20	2	96 (0-96)	0.19	フラスコ (通期無し)	(6)
SSTDY*2	YE _p	ENO2	YE _p	PDC1	80	0	210 (0-210)	0.39	フラスコ (通期有り)	(7)
SyBE001601	YE _p	PGK1	YE _p	PGK1	44	4	48 (0-48)	0.83	フラスコ (通期無し)	(8)
YPH499	YE _p	PGK1	YE _p	PGK1	40	0	24 (0-24)	1.7	フラスコ (通期無し)	(9)



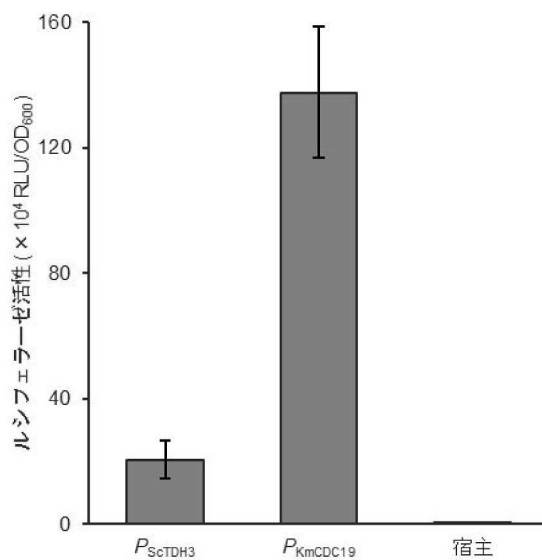
補足図 S4-1 セロビオース培地における *K. marxianus* の増殖

K. marxianus の 19 の野生型株を YPD および YPCello で 24 時間培養し、OD₆₀₀ を測定した。独立した 3 つの実験の平均値と標準偏差を示した。



補足図 S4-2 *KmBGL1* の過剰発現が NCYC587 株のセロビオース資化に及ぼす影響

K. marxianus NCYC2791 株由来の *KmBGL1* を、NCYC587 株の *ura3* 変異体において P_{ScTDH3} により過剰発現させた。この株 (+*BGL1*、白) と NCYC587 (WT、灰) を YPD および YPCello 培地で 24 時間培養し、OD₆₀₀ を測定した。3 回の独立した実験の平均値と標準偏差を示した。



補足図 S4-3 *S. cerevisiae* における P_{ScTDH3} および $P_{KmCDC19}$ のレポーターアッセイ

P_{ScTDH3} -yCLuc または $P_{KmCDC19}$ -yCLuc を導入した *S. cerevisiae* および宿主 (BY4741) を YPD 培地で 24 時間培養し、OD₆₀₀ とルシフェラーゼ活性を測定した。これらの値から算出したルシフェラーゼ活性を示した。3 回の独立した実験の平均値と標準偏差を示した。

KmStl1	1	-----MTEKWESESSSLHKNTPLGAVEHKETSDSENKYHFAEDTNETNIMDETDLPGYLS-KOYLPLYGMCF	66
AnCltA	1	-----MGKDTFTLAG-----REWPKVNWWMKGMRSVYTLG	32
AnCltB	1	-----MG---EINEEKHDIS---VTEGAKVATMHGMTAEKPGATTKSVFNAELFAAINETKIERWSKTSIHLYCAVCIF	68
LsCelloT	1	-----MVAGGVVNTNSGSD---EYKTLRNNTERWIKDKGLRRLNIGIG	40
NcCDT1-1	1	MSSHGSHDGASTEKLHATHDIAPTHDAIKIVPKHGQTATKPGAQKEVRNAALFAAIKESNIKPWSKESIHLY--FAIF	78
NcCDT1-2	1	-----MGIFNKKPVAQAVDLNQIQEEAPQFERVDWKKDPGLRKLYFYAF	44
PcST	1	-----MAQDKKAQEEVYGIS-TAVEDPARVIGGYGKETIKRHGAKTKEVQNADLFAAIEETKIERWSKESLHY--FCIF	71
TrSpt1	1	-----MADVHVADAFGRKQSIGIHTTQDVEHIEAPITWKAYLMCA	41
KmStl1	67	IVYLCSTMQGYDGSMLMSIYTQKAYLNYYHLDVNSSTG---TGLVFSIYNIGQICGAFFAP-IMDWKGRKPAILIGCGFV	142
AnCltA	33	AAMVTSATNGYDGSMLNGLEALDDWKRSYNH-PEGAT---LGLLAASMSIGSILAIPVVPYVADLFGRR-----LIG	100
AnCltB	69	VSFCCACANGYDGSMLGAVFAMDHYQATFNTGMTGQK---VSVVTSLYTVGSMVATPESAVISDNFGRKCMFVGWVI	144
LsCelloT	41	LMFSSAAANGFDGSLMNGLLALPQFIKNLGN-VNANI---LGLIIAGISLGGTPTTIPASFYADHFGRRTCVCIGSLIM	115
NcCDT1-1	79	VAFCCACANGYDGSMLMTGIIAMDKFCNQFTGDTGPK---VSVIFSLYTVGAMVGAPFAILSDRFGRKKMGFIGGFI	154
NcCDT1-2	45	ILCIASATTGYDGMFFNSVQNFETWIKYFGD-PRGSE---LGLLGALYQIGSIGSIPFVPLLTDFNFRKRTPIIIGCVIM	119
PcST	72	VAFCCACANGYDGSMLMSILAMHYQNVFKTGMDGPK---VSLVTSLYTVGSIVCTPISAIITSLRLGRKRCMFVGWVI	147
TrSpt1	42	FASFGGIFFGYDSGYINGVNSAIFYKAVEGINATKLSDSHTSLITSILSCGTTFFGALIAGDVSDWIGRKWTVIIGCVIY	121
KmStl1	143	VAASVVTAA---TSTKSALIGGRWMLSFFATIACSAAPAYCVEVSPMHLRGKVAGLYNTLWYVGSIVAFTTYGTNKNFP	219
AnCltA	101	ACVALGTNN---IKG-----	112
AnCltB	145	IIGSIVAT---ASTLAHFIVGRFILGFGIOMVVSAPAYAAEISPPHWRGRAVGLYNCGWFGGSIPAACTVYGC---NYI	219
LsCelloT	116	VCAAIQAA---THGRWAFFGTRLMMGVGLGFAQTAAPPLTTEVAHPRHRGAVTAIFQAIWYWGAIVSAAVTLGT---LYV	190
NcCDT1-1	155	IVGSIIVAS---SSKLAQFVVGRFVLGLGIAIMTVAAPAYSIEIAPPHWRGRCTGFYNCGWFGGSIPAACTVYGC---YFI	229
NcCDT1-2	120	IVGAVLQAT---AKNLDTFMGGRMTLGFEGNSLAQIASPMLLTELHAHPQHRARLTITYNCLNWVGLVWSVLAFTG---NYI	194
PcST	148	IIGSVIST---AMTLPQFVVGRFILGLGIOMVVSAPAYAVEISPPHWRGRAVGFYNCGWFGGSIPAAALTYGT---NEI	222
TrSpt1	122	MLGVVQMITAPNHALGPIVAGRLIAGLGVGFESAIVILYMSIICPRKVRGALVAGYQFCITIGILLASCVVYGT---KDF	199
KmStl1	220	NSSKAFKIPLYCQMIFFGLVCIFGWLLESPSRWLGVGREGEEAREFIKHYFNGNREHPLIDFEMSEIIESPHGI---NMS	297
AnCltA	113	-NDWSWRVPCLLQGVPSVCOLIFIWVFPESPRWLISKGSEKAKKILAYVHAQGDDEDLNVNVEFEIQOTIA---LEK	187
AnCltB	220	DSNWSWRVPELLQCFASVIVIIISVWFIPESPRWLIAHGKEEEAIAILAKYHNGDPNARLVRLAEADMERGIR---QDG	295
LsCelloT	191	NKSWSWRVPCILQALFPGLLGLAIIPESPRWLISQGRKDEALQILARYHANGDLDDSLVQFEFNEICAAIE---IDK	266
NcCDT1-1	230	KSNWSWRIPILQAFCTCLIVMSVFFLPESPRWLFANGRDAEAVAFVLYKHNGDPNSKLVLETEEMRDGIR---TDG	305
NcCDT1-2	195	NNDWSWRIPALLQAFPSIIQLLGIWWVPESPRFLIAKDHDEALHILAKYHANGDPNHPVQFREFREIKETIR---LEM	270
PcST	223	DNNYSWRIPFICQCFACIIIVISVWFIPESPRWLIAHNGEAEAFVLYKHNGDPNARLVRLAEADMERGIR---IDG	298
TrSpt1	200	TNTGAYRIPIALQFPWALILGGLLFLPDSPRYFYKKGIEQKAINSLSRVRGQPE-DSEYVQNEIAEITANEYERALIP	278
KmStl1	298	APLEVLDLRLPLFR---KRSRDRYRLGLVIAMAFGQFSGNNVCSYYLPTMLTSVGMKSVSVNVLMNGVYSIVSWVASII	372
AnCltA	188	QLEGS-GWSELWS---TPGNRHRSIILISIGFESQWSGNGIVSYFLPKVLELIGITDSHKVLTINSVLNAVNVVSATG	261
AnCltB	296	IDKRWWDYRPFLL---SHNGRWRFAQVIMISIFGQWSGNGLG-YFNPAIYEALGYTSSMQLLNLVNSIVGAIGALT	369
LsCelloT	267	ALATKNDWISFVS---TAGARRRLAICILVGFMIQWAGNGIVSYVYLAIPILQTVGITDPTQAGINLGLQVWNAICAAG	341
NcCDT1-1	306	VDSVWWDYRLEFM---THSGRWRMAQVLMISIFGQFSGNGLG-YFNTVIFKNIGVTSTSCQLAYNLNSVISAIGALT	379
NcCDT1-2	271	ESTKNSSYLDFFK---SRGNRYRLAILLSLGFESQWSGNAIISNYSSKLYETAGVTDSTAKGLSAGQGTGLALIVSVT	345
PcST	299	IDKRWWDYRPFVL---TKSGRWRFAQVIMISIFGQWSGNGLG-YFNATIFKAIYESSSTQLLLNLVNSIISAVGALT	372
TrSpt1	279	STTWFGSWANCCKGSLWTGKSNLRRITLGTSLQMMQQTGVNFIFFYSTPFLQSTGAIKN---SFLSILFSLVNVCTPL	356
KmStl1	373	GSFCHDKVGRKRMFMISTLGAALALSGLAICTARYQAG---SKGAS-----KGTLVFIYLF	426
AnCltA	262	ICEFVDKLGRRKLELTSVTCMLLCFISTTIALARFPHGPGGADHDAG-----NAVIVFIIFY	319
AnCltB	370	AVYYCDRMPRRTVLVWGTLGCAICMAVNGVSQPLIPQRNAGETLDP-----TFGRALAFYIFYLF	430
LsCelloT	342	GAIAAEKYGRPLWMISTVLMLIFFVIIITALSAIFAEK---HIKAA-----SAVVAFLFLF	396
NcCDT1-1	380	AVSMTDRMPRAVLIIGTFMCAALATNSGLSATLKDQQRGTQINLQGMNEQDAKDNYLHVDSNYAKGALAAAYFLN	459
NcCDT1-2	346	MALLVDKLGRLAFLASTGGMCGTFVLTTLTAGLYGEH---RLKAD-----KAMIFFIWF	400
PcST	373	AVFFTDKMRRPVLIIGTFACAVAGINAGILQEVANTSGISGRK-----GEAAIAFYIFYLFN	429
TrSpt1	357	SFWTVERFGRRTILIAAGAFGLICQLVAIIIGTVGFNKTHTPDPSPNPDALADN-----IPAVNAQTAFTAIIFI	425
KmStl1	427	VIFSFAFTPMQPIYPSEVSTNLMSKAQLVNNVAGVAQFVNQFAAPKAMKNIK---YWFYVFYVFFDIEFIIIVYFFF	502
AnCltA	320	ISYNIGFSGLLVSSEILPYRLRAKGLTLMFFCVALSLLFNQYVNPIALLDIG---WKYIIVCVWLLLEFLVWVKYY	395
AnCltB	431	VVFSEFTYTLQGVPAEALETTTRAKGLALSGFLVSGTSEISQYASPIALGNIS---TNYFWIFVGVWDVVEACWYLF	506
LsCelloT	397	GSYDIATPLSIAIYVEILPFYLRKGLSLNLTVFATGFFNQVNPIALDAIA---WKYFVFIWIGCLFSFIIFYFLF	472
NcCDT1-1	460	VIFSFTYTLQGVIPTEALETTIRKGLALSGFIVNAMGFIHQFAGPIALHNIG---YKYIFVFGWDLIEVAVWYFFG	535
NcCDT1-2	401	IFYSLAWSGLLVGAIETILPYRLRGKGLMVNMNSVQCALTNTYANPVAFDYFGPDHSWKLYLYITCWIAAEFVVFVEM	480
PcST	430	VIFSFTYTLQGVIPAEALETTTRSKGLALSGFMVSSIIFISQFATPIGLANIS---TNYFWIFVGVWDVVEVSVCC---	501
TrSpt1	426	FFFASTWGPAGWIVIGEIFPLPIRSRGVALSTASNLWNTIISVITPYMVGTDKGNLKSSVFFIWGGLCTCAFYVSYFLI	505
KmStl1	503	VETKGTLEELAFAVFEAPNF---RKASTDPVFAAQVREQMAKESEMREGIEAEKVRSTHFEEVDSLSV-----	566
AnCltA	396	VETKNTPLEEIVKFEDGDQAVLGGAAATEKIHETVQARSABETLGEKGPVLAALFIISKVMPISIGGRTLNSE	470
AnCltB	507	VEAQGRTLELEYIYNQYP---VKASKKRDVNVQDGHVTEKISADEA-----	553
LsCelloT	473	PETKGTLEELIAIVFDGAQA---GADMHFDLALGGTHMRTNNDKMFQSP-----FKPEVEQIA-----	528
NcCDT1-1	536	VESQGRTLEQLEWYDQPNF---VKASLKVEKVVVQADGHVSEAIVA-----	579
NcCDT1-2	481	VETKGTLEELAKVIDGDEA-----DVAHIDIHQVEKEVEIHEHEG-----KSAV-----	525
PcST	502	VESQGRTLEQLEWYQQPNP---VKASLNVDKVVQEDGTVTKEIADA-----	547
TrSpt1	506	PETKGLSLEQVDKMMEESSP---RTSSKWKPTTTFAAQMGTEGYIEKPTAEV-----	554

補足図 S4-4 KmStl1p と既知の真菌のセロピオース輸送体のアミノ酸配列比較

KmStl1p とセロピオース輸送体のアミノ酸配列を並べた。KmStl1p と同一のアミノ酸残基は灰色の背景色で示した。An : *Aspergillus nidulans*, Ls : *Lipomyces starkeyi*, Nc : *Neurospora crassa*, Pc : *Penicillium chrysogenum*, Tr : *Trichoderma reesei*.

研究業績

本研究に関する発表論文

(a) 査読のある雑誌等

- (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*, Volume 140, Issue 3, Pages 146-153, 2025.
(本論文との関連: 第 2 章)
- (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*, Volume 140, Issue 6, Pages 386-394, 2025.
(本論文との関連: 第 4 章)
- (3) Satoshi Ebe, Hitomi Nakamura¹, Mitsunari Matsuda, Yuki Terauchi, Rinji Akada and Hisashi Hoshida. Identification and overexpression of sugar alcohol transport and metabolic genes for accelerated utilization in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, (2025 年 12 月掲載決定).
(本論文との関連: 第 3 章)

本研究に関する学会発表

(a) 国際学会

- (1) Satoshi Ebe, Hisashi Hoshida and Rinji Akada, Targeted gene disruption using CRISPR/Cas9 system in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. The 16th Young scientist seminar, Yamaguchi-ken Seminar Park, 2019/10/12-13
- (2) Riko Kobayashi, Satoshi Ebe, Yuki Terauchi, Rinji Akada and Hisashi Hoshida, Identification of sugar transporters in the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* using a sugar transport-deficient *Saccharomyces cerevisiae* strain. The 22th Young scientist seminar, Yamaguchi University Tokiwa Campus, 2025/12/6-7

(b) 国内学会

- (1) 江部聡、丸岡生行、高下秀春、星田尚司、赤田倫治、モデル化焼酎醸造系における発酵促進成分の探索、第 75 回日本生物工学会大会、名古屋大学東山キャンパス、2023/9/3-5
- (2) 星田尚司、江部聡、小林莉子、寺内裕貴、赤田倫治、輸送体 C 末端配列の改変に

よる酵母 *Kluyveromyces marxianus* と *Saccharomyces cerevisiae* のセロビオース資化能の改善、日本農芸化学会 2026 年度大会、同志社大学今出川・室町キャンパス、2026/3/9-12

(C) 研究報告会

- (1) 江部聡、星田尚司、赤田倫治、*Kluyveromyces marxianus* における CRISPR/Cas9 を用いた標的配列へのマーカー遺伝子挿入、微生物研究推進体研究集会、山口大学常盤キャンパス、2020/12/28
- (2) 江部聡、丸岡生行、高下秀春、星田尚司、赤田倫治、酵母増殖抑制条件においてエタノール発酵を促進させる物質の探索、微生物研究推進体 R5 研究成果発表会、山口大学吉田キャンパス大学会館、2023/12/25
- (3) 小林莉子、江部聡、寺内祐貴、赤田倫治、星田尚司、*Saccharomyces cerevisiae* 糖輸送能欠損株を用いた高温発酵酵母 *Kluyveromyces marxianus* の糖輸送体の同定、第 41 回イーストワークショップ、鹿児島大学郡元キャンパス、2024/11/9-10
- (4) 小林莉子、江部聡、香川智哉、寺内祐貴、赤田倫治、星田尚司、酵母 *Kluyveromyces marxianus* における糖トランスポーターの同定とその分解メカニズムの解析、山口大学中高温微生物研究センター発酵部門セミナー、山口大学中高温微生物研究センター、2026/3/6

本研究に関する受賞歴

- (1) Topics of 2023、第 75 回日本生物工学会大会、「モデル化焼酎醸造系における発酵促進成分の探索」、2023/9/3-5

謝辞

本研究を遂行するにあたり、多大なご支援とご協力を賜りました方々に深く感謝を申し上げます。

指導教員である星田尚司教授には、大変ご迷惑をおかけしました。毎日のようにともに結果の考察を行い、学部4年生の時から考察力を向上させていただいたおかげで、ここまで成長することができました。また、学会先での食事やスポーツ観戦など、研究以外でも大変お世話になりました。今後も様々な場面でお力添えいただきたいと思いますので、よろしく願いいたします。

ゲノム生命科学研究室の赤田倫治教授には、たくさんの叱咤激励をいただきました。赤田倫治教授の柔軟な発想により、様々な実験を行うことができました。発表練習や中間報告で様々な助言をいただくことができたからこそ、発想力を磨くことができました。これからも研究に対する力を磨いていく所存です。

寺内裕貴助教には、この研究室にはない技術や知識を教えてくださいました。糸状菌の理解に乏しい私にも理解できるように説明いただいたことで、様々な知識を得ることができました。今後も様々な菌を扱う可能性があるので、ご教授いただければ幸いです。

研究補助員である美澄幸恵氏には、研究から庶務全般まで幅広く研究の手助けをしていただきました。また、精神的な面でも支えていただきました。博士前期課程では、実験キットについて菌や培地の取り扱い、事務手続き、発送など様々なことを一から教えていただきました。また、元研究補佐員の岡田裕子氏にも短い間でしたがお世話になりました。

第2章では共同研究先の高下秀春氏、丸岡生行氏に多大なご支援とご協力をいただきました。研究報告では様々な視点から貴重なアドバイスをいただきました。また、論文の添削などを行っていただいたことにも感謝しています。

中村美紀子准教授には短い間でしたが実験手法などを教えてくださいました。信州大学に着任後は、学会で声をかけていただき大変嬉しかったことを覚えています。今後も学会などでお会いすることがあると思いますので、よろしくお願いいたします。

昨年の卒業生である菊田浩希氏には、修士後期課程の学生としての在り方を教えてくださいました。菊田浩希氏が在籍していたからこそ、私は博士後期課程へ行くことを決断できました。また、同い年ということもあり、精神的な面でもお世話になりました。さらに、研究だけでなく授業や様々な書類の添削など、多方面で力を貸していただきました。卒業後も、気にかけてくださりありがとうございます。これからは社会人として切磋琢磨していきましょう。また、博士後期課程在籍中の柏原大輝氏、武田隼弥氏、垂井修氏、卒業生の皆様、博士前期課程在籍中の皆様、学部4年生の皆様、これまで関わっていただいたすべての皆様に感謝申し上げます。

最後になりますが、経済的にも精神的にも支えていただいた家族に感謝申し上げます。