

1P-173 インドネシア産キシロース利用酵母の多様性の評価

○小林 隆一¹, Kanti Atit², 川崎 浩子¹
 (¹NBRC・NITE, ²LIPI, Indonesia)
 kobayashi-ryuichi@nite.go.jp

地球規模課題対応国際科学技術協力事業 (SATREPS) に基づくインドネシア共和国との共同研究では、新規有用微生物の探索と生態学的研究を行っている。一つのテーマとして五単糖利用酵母に関する研究に取り組み、木質系バイオマスの有効利用に資する酵母の取得を目的とし、2013年と2014年にスマトラ島西部・バリ島・ジャワ島ボゴール周辺の3か所でのサンプリングおよびキシロースを炭素源とする選択培地による酵母の分離を行った。その結果、新種候補17種を含む99種299株のキシロースを利用できる酵母が得られた。どの分離源からも幅広い種が取得され、子嚢菌酵母が9割を占めた。特に *Lodderomyces* 属、*Cyberlindnera* 属、*Saturnispora* 属、*Yamadazyma* 属、*Wickerhamomyces* 属、*Ogataea* 属が全体の五割を占め、担子菌酵母は1割程度であった。またキシロース発酵能が知られている *Scheffersomyces stipitis* も分離できた。これらの酵母について、NBRCコレクションに保存されているキシロース発酵酵母ならびに資化酵母との比較を行い、またインドネシア産キシロース資化酵母の多様性を評価したところ、今後のバイオリファイナリーへの展開が期待できる。さらにインドネシアで初めて分離された新規酵母も取得され、いくつかはタイ、中国で分離された酵母と近縁であったが、他方で新規性の高い酵母の取得も確認された。本発表では、これらインドネシア産酵母の多様性の評価について報告する。なお、これらの株はNBRCコレクションより分譲可能である。

Diversity of xylose utilizing yeasts isolated in Indonesia.

○Ryuichi Kobayashi¹, Atit Kanti², Hiroko Kawasaki¹
 (¹NBRC・NITE, ²LIPI, Indonesia)

Key words yeast diversity, isolation, D-xylose, Indonesia

1P-174 グルコース・キシロース同時発酵を行う *Saccharomyces cerevisiae* 株の遺伝子構造

○田口 久貴, 赤松 隆
 (崇城大・生物生命)
 taguchi@bio.sojo-u.ac.jp

【目的】キシロース資化性 *S. cerevisiae* 株からキシロース資化能が向上した Hex⁺変異体を分離し、ゲノム配列と同定解析で新規な遺伝子変異部位を特定した。本変異体でグルコースとキシロースからエタノール発酵を行った結果、他の報告と同様に Hex⁺変異体でも、主たる副産物はグリセロールとキシリトールであった。本報では、グリセロールを蓄積しない株を育種し解析したので、その結果について報告する。

【方法と結果】グリセロール蓄積に関わる遺伝子 *GPD1* と *GPD2* の両遺伝子を破壊した。まず、*loxP* 配列を両末端に有する *kanMX* カセット (*loxP-P_{TEF}-kanMX-T_{TEF}-loxP*) で Hex⁺変異体 SCB38 (*MATa*) の *GPD2* を破壊した。同質系統株である SCD16-4C (*MATa*) の *GPD1* も同様に破壊した。両株の2倍体から、4胞子を単離した。G418^r:G418^s が 2:2 に分離した胞子囊を選択し、二重欠損株 (*gpd1::kanMX, gpd2::kanMX*) を取得した。YPD85X35 培地 (グルコース 85 g/L, キシロース 35 g/L) での発酵試験で、親株 SCB38 と二重欠損株 SCE1003-5A を比較した。SCB38 はグルコースを4時間で完全に消費したが、SCE1003-5A は8-10時間で消費した。24時間後のキシロース残存量は、SCB38 で約 13 g/L、1003-5A で約 0.8 g/L であった。24時間後のエタノール生産量は、SCB38 で約 44 g/L (全糖収率 72%)、SCE1003-5A で約 49 g/L (全糖収率 81%) であった。SCE1003-5A で、グルコース消費時に明らかなキシロース消費を認めた。*GPD1-GPD2* 二重欠損とキシロース消費速度の上昇およびグルコース・キシロース同時発酵の関連が認められた。本研究の一部は NEDO の委託研究として実施した。

Genetic structure of a *Saccharomyces cerevisiae* strain co-fermenting glucose and xylose.

○hisataka taguchi, takashi akamatsu
 (Fac. Biotechnol. Life Sci., Sojo Univ.)

Key words ethanol fermentation, *Saccharomyces cerevisiae*, glycerol, xylose

1P-175 エタノールとキシリトールを同時生産する組換え型 *Saccharomyces cerevisiae* 株の構築

○谷 龍典¹, 田口 久貴¹, 平木 純², 浅野 正志², 小栗 康臣²,
 内園 浩幸², 赤松 隆¹
 (¹崇城大・生物生命, ²JNC(株))
 g1318d02@m.bio.sojo-u.ac.jp

【目的】地球温暖化対策の一手段として我が国は年産 600 万 kL(2030 年目標値)のバイオエタノール生産を目指している。食糧と競合しない竹から国際競争力を有し環境に負荷をかけない効率的エタノール生産プロセスを確立し、環境モデル都市で地産地消による低炭素社会の実現、新産業創出による地域の活性化を目指している。5000 kL/年の小規模プラントでは、エタノールとともに高付加価値な物質の回収・生産が有望である。そこでエタノールとキシリトール同時生産を行う組換え酵母の構築を行う。【方法と結果】酵母染色体上に *Pichia stipitis* の *XYL1* と *XYL2* とプロモーターを変えた *XKSI* を1つずつ加え、キシロース代謝向上する *HEX1-22* を持つ株を親株とした。キシロース代謝向上のため、染色体上に *XYL1* を2個組入れた。50 g/L グルコースと 30 g/L キシロースを含む培地 pH 5.0、32.5℃の発酵試験では、グルコースは4時間、キシロースは24時間以内に消費した。48時間後のエタノール、キシリトール、グリセロール濃度(g/L)は、31.5、9.6、5.8であり、糖からの理論収率当たり、エタノール77%、キシロース糖からのキシリトール収率32%であった。グリセロールを蓄積しない変異体では、エタノール、キシリトール、グリセロール濃度は、それぞれ35.3、10.7、0.8であり、理論収率当たり、エタノール86%、キシリトール収率34%であった。温度が上昇するとエタノール収率は下がり、キシリトール収率は高くなった。

Construction of a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain efficiently producing ethanol and xylitol

○Tatsunori Tani¹, Hisataka Taguchi¹, Jun Hiraki², Masashi Asano², Yasuomi Oguri²,
 Hiroyuki Uchizono², Takashi Akamatsu¹
 (¹Fac. Biotechnol. Life Sci., Sojo Univ., ²JNC Corp.)

Key words biomass, ethanol, *Saccharomyces cerevisiae*, xylitol

1P-176 翻訳抑制を誘導する高濃度バニリン存在下で発現する酵母 *VEP3* 遺伝子の解析

○Nguyen Trinh TM, 井沢 真吾
 (京工繊大院・工芸科学)
 mytrinhqh@yahoo.com

木質・草本系バイオマスの糖化前処理などで生じるバニリンは、酵母の生育と発酵能を抑制する発酵阻害物質であり、バイオエタノールの製造効率改善や普及をはかる上で大きな障壁となっている。高濃度バニリン存在下では、酵母の翻訳活性が抑制され、さらに P-body や stress granule などの形成が誘導されるため、限られた一部の遺伝子のみが翻訳されると考えられている(*PLoS One* 8, e61748, 2013; *J. Biosci. Bioeng.* 118, 263-269, 2014)。そこで我々は、翻訳を抑制する高濃度バニリン存在下でも優先的に発現する遺伝子を探査し、*VEP1-3* 遺伝子を同定した。今回、高濃度バニリンストレス下における *VEP3* の発現について解析を行い、その応用についても検討した。バニリンの無毒化に寄与することが知られている *ADH6* 遺伝子は、6.0-15 mM のバニリンストレス処理によって転写量は増加したが、タンパク質レベルは増加せず翻訳は抑制されていた。一方、同様のストレス処理を行った場合、*VEP3* 遺伝子の発現は転写レベルだけでなくタンパク質レベルも顕著に上昇し、20 mM バニリン存在下でも発現の誘導が確認された。また、*VEP3* プロモーターを用いることで、高濃度バニリン存在下において任意の遺伝子の発現を誘導することが可能であった。以上の結果から、*VEP3* プロモーターを用いた遺伝子発現系はバニリンによる翻訳抑制を回避して遺伝子発現を誘導することが可能であり、酵母のバニリン耐性や発酵能の改善に活用できると考えられた。

Study on the yeast *VEP3* gene that overcomes translational repression caused by vanillin

○Trinh Nguyen, Shingo Izawa
 (Grad. Sch. Sci. Technol., Kyoto Inst. Technol.)

Key words lignocellulosic materials, vanillin, translational repression, polysome profile