

1 要約

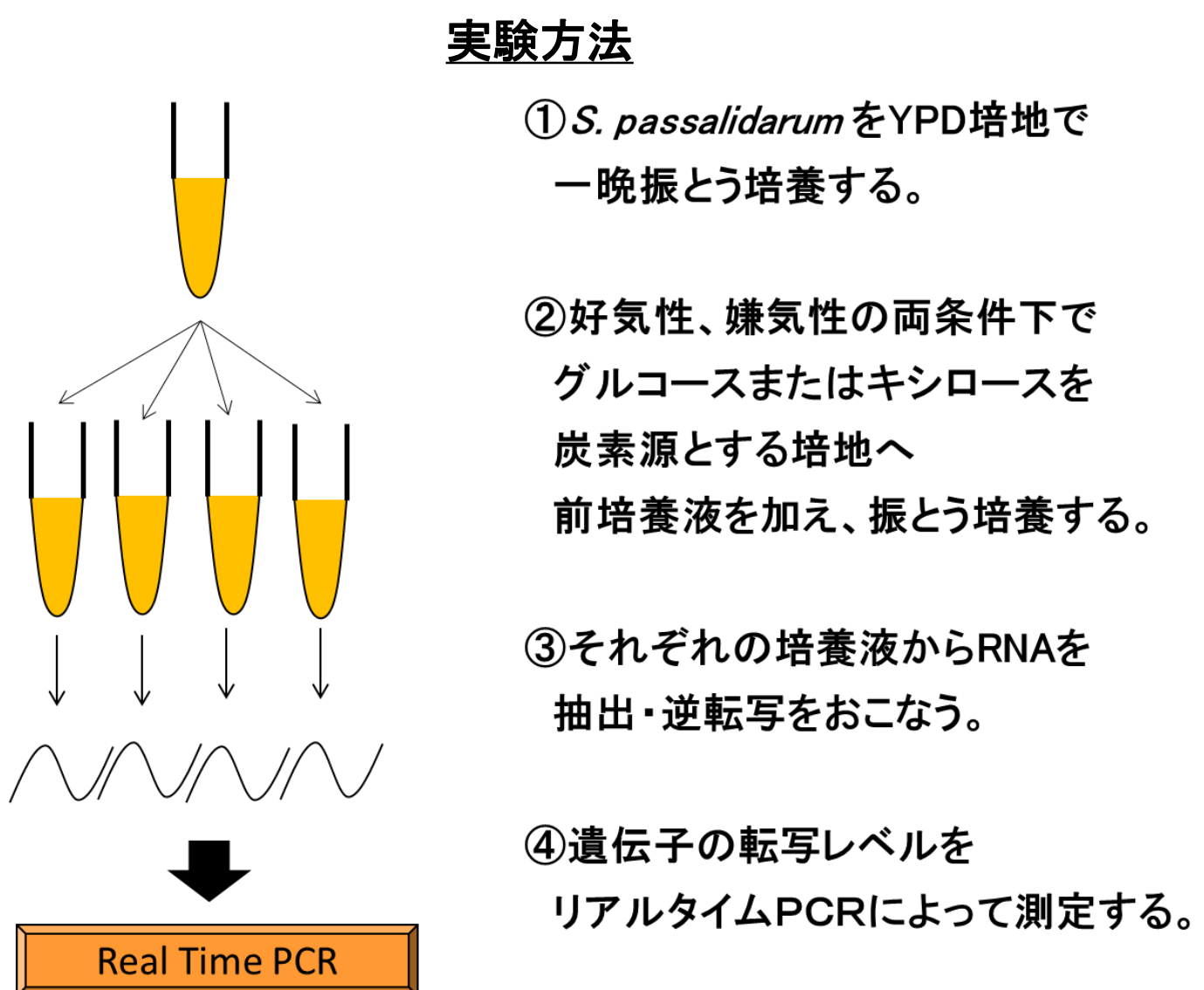
近年単離された子囊菌酵母 *Spathaspora passalidarum* は、嫌気条件においてもキシロースを効率的に発酵することが出来る。本酵母は真菌類にみられるキシロース代謝経路の酵素遺伝子 (*XYL1* と *XYL2*) がそれぞれ2コピーずつゲノム上に存在するユニークな特徴があるが、それぞれの遺伝子の役割は分かっていない。そこで、本酵母の4つの *XYL* 遺伝子それぞれの破壊株を構築した。破壊株の作製法は我々が以前に独自に開発した方法を用いた。それらの破壊株をグルコースまたはキシロース単一培地で、好気と嫌気の両条件において生育を測定した。その結果、好氣的条件下においても嫌氣的条件下においても *XYL1.2* と *XYL2.1* 遺伝子破壊株の生育は野生株よりも弱いことが分かった。さらに、キシロース培地での *XYL* 遺伝子の転写量を測定したところ、どの遺伝子もキシロースに反応して転写が増加した。特に、*XYL1.1* は好気条件で約27倍、*XYL1.2* は嫌気条件で約65倍転写量が増加した。このことから、好気条件では *XYL1.1* が、嫌気条件では *XYL1.2* がキシロース代謝に主要な役割を果たしていることが示唆された。

3 本研究の目的

Spathaspora passalidarum の持つ *XYL* 遺伝子群の機能を解析する

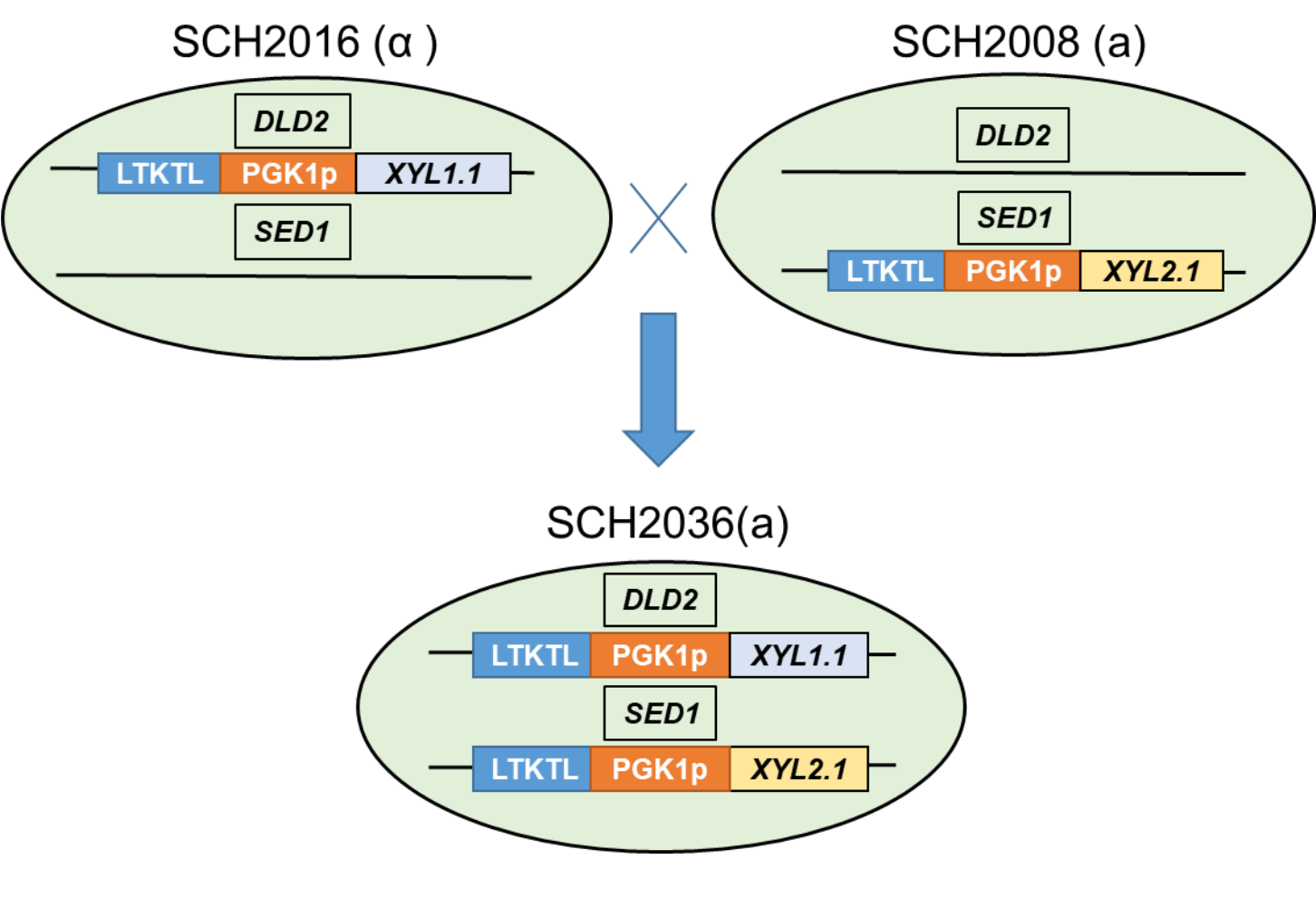
4 結果

各 *XYL* 遺伝子の転写解析



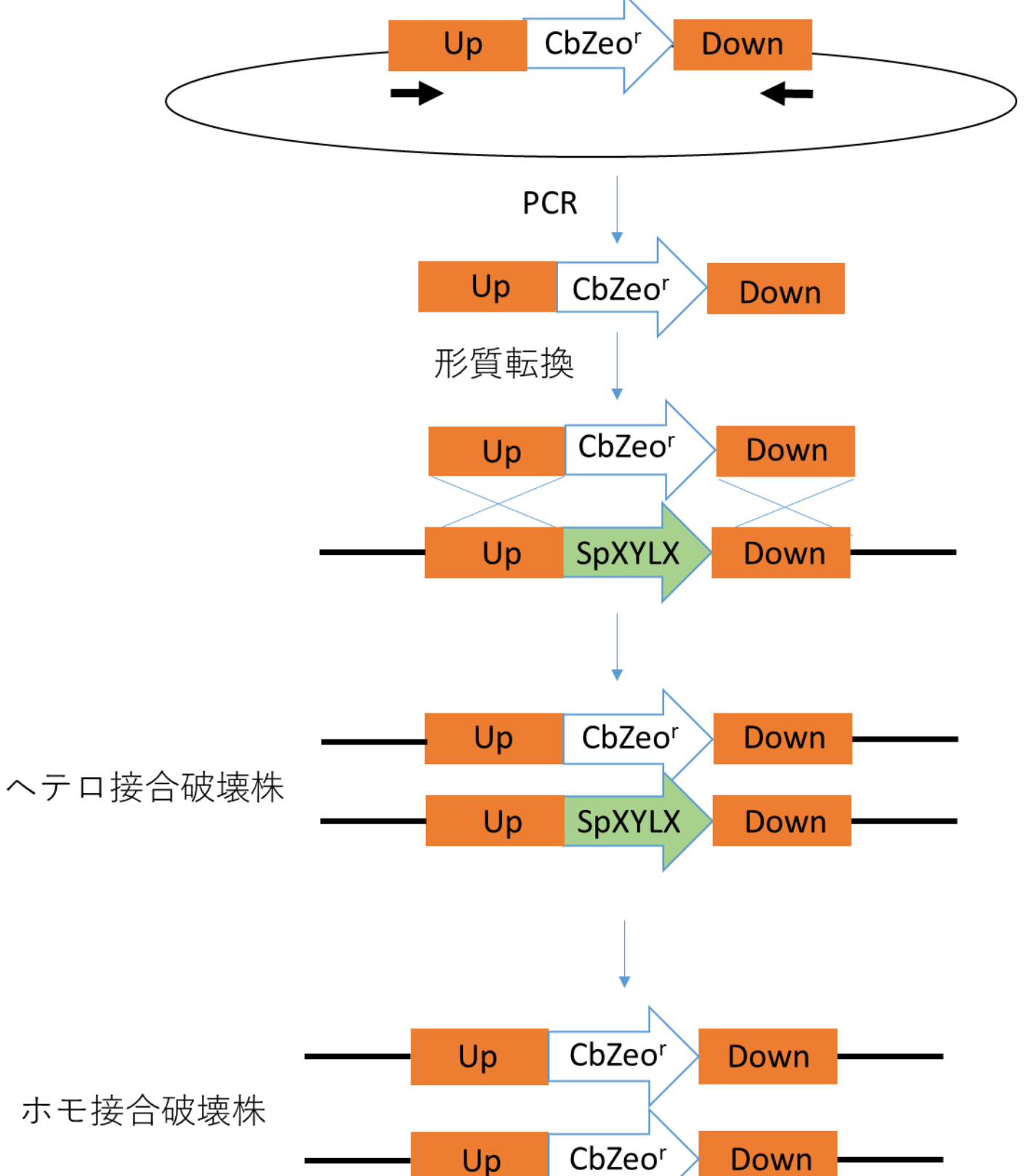
XYL 遺伝子を発現する出芽酵母の発酵試験

XYL 遺伝子を発現する出芽酵母株の作製方法



XYL 遺伝子破壊株の作製と表現型解析

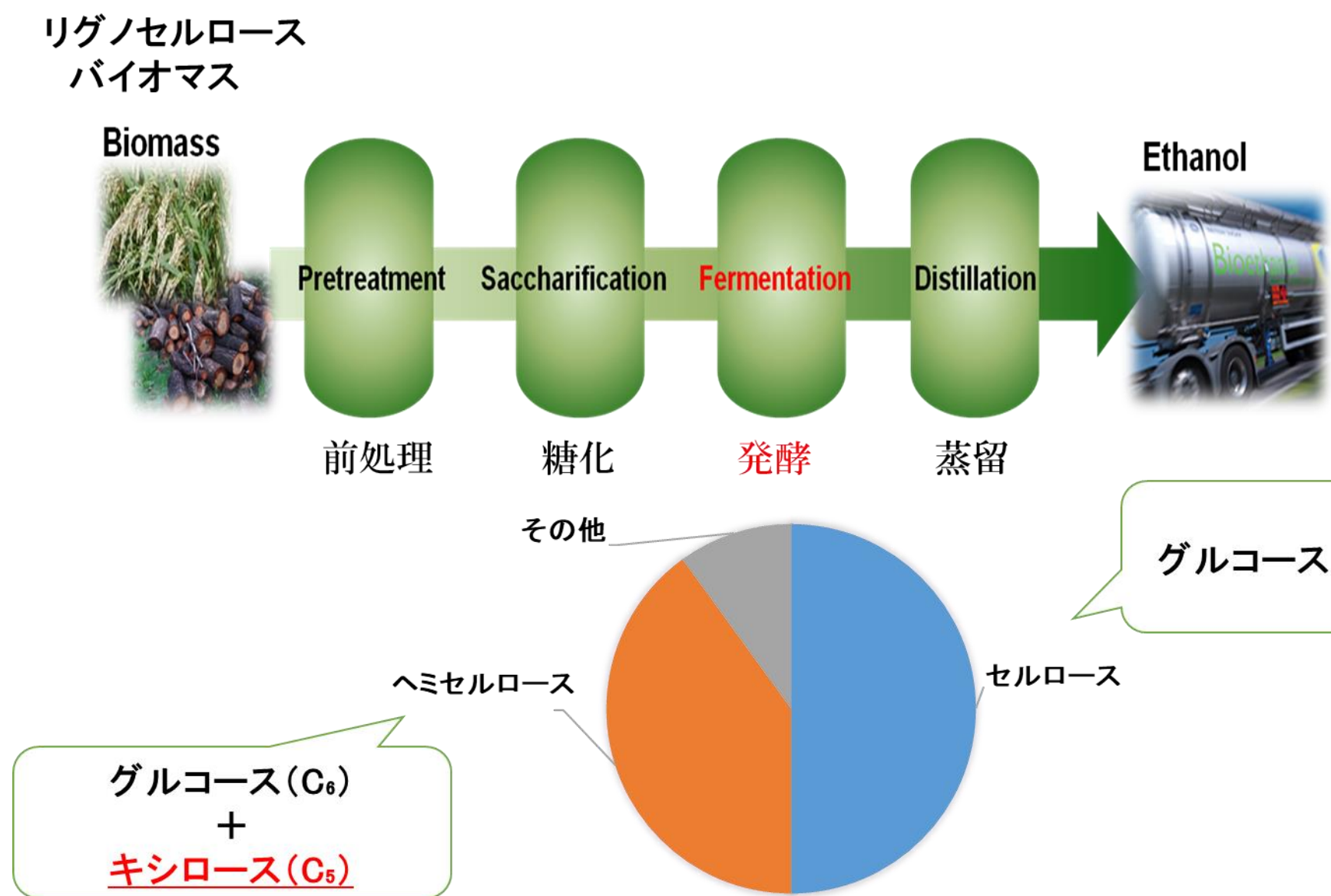
S. passalidarum における *XYL* 遺伝子破壊株の作製



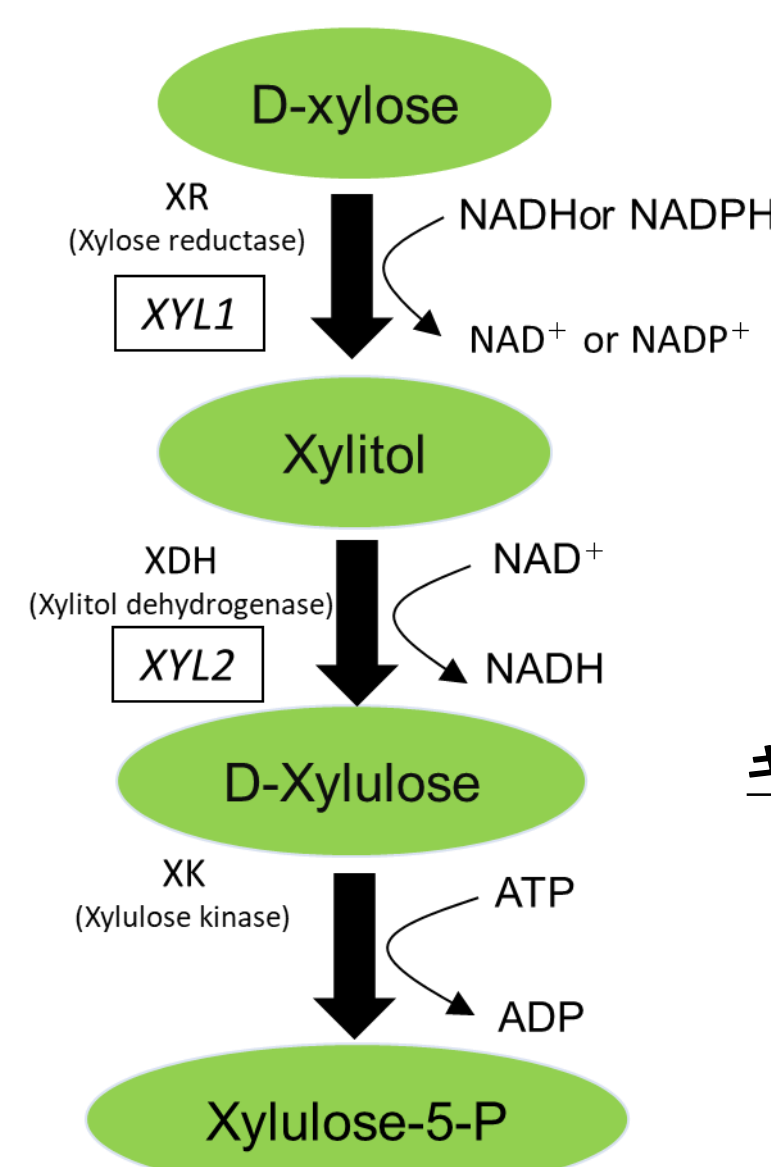
我々が独自に確立した遺伝子破壊法を用いて *XYL* 遺伝子の破壊株を作製した

2 背景

キシロース発酵について



キシロースの代謝経路

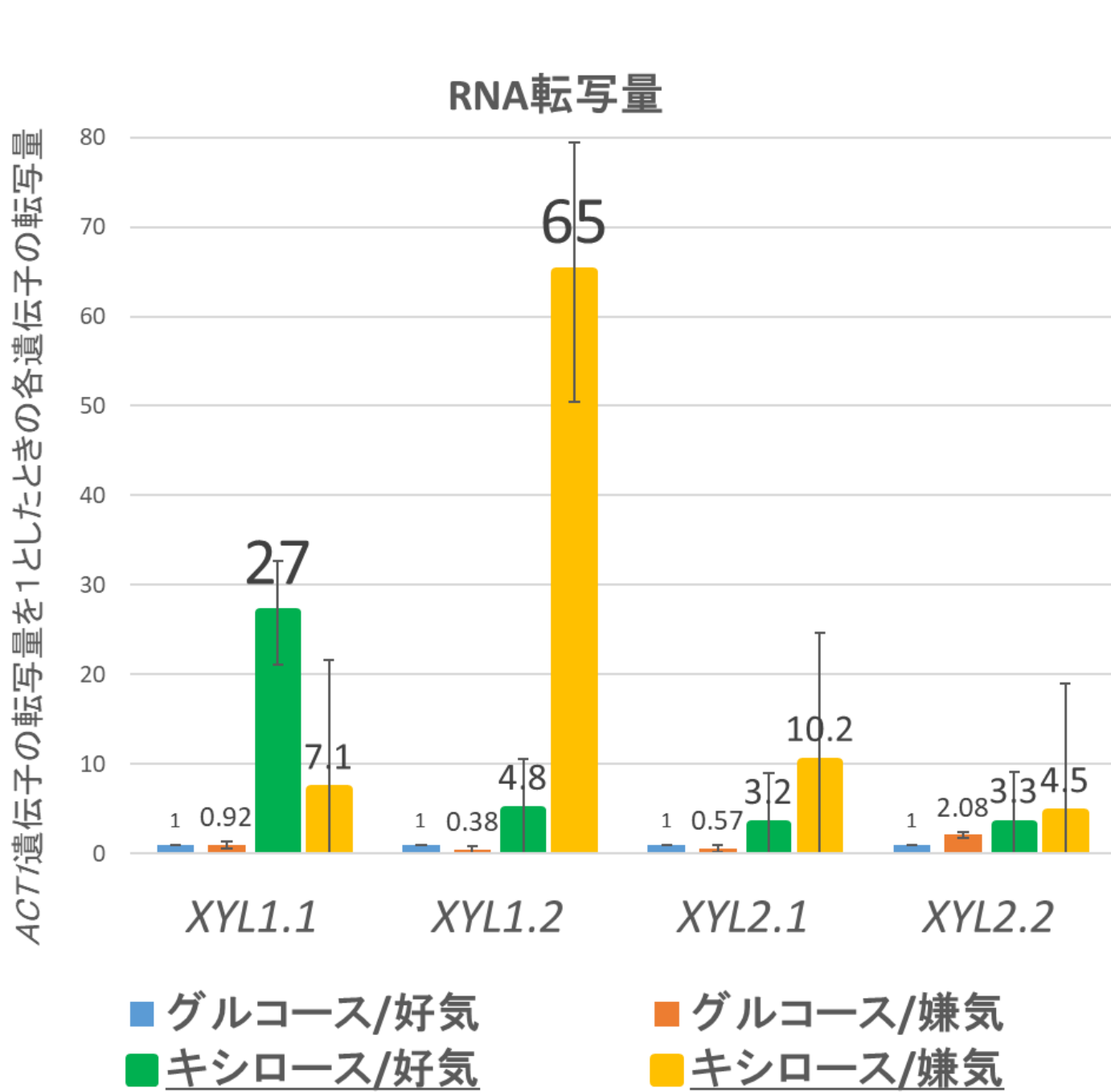


Spathaspora passalidarum

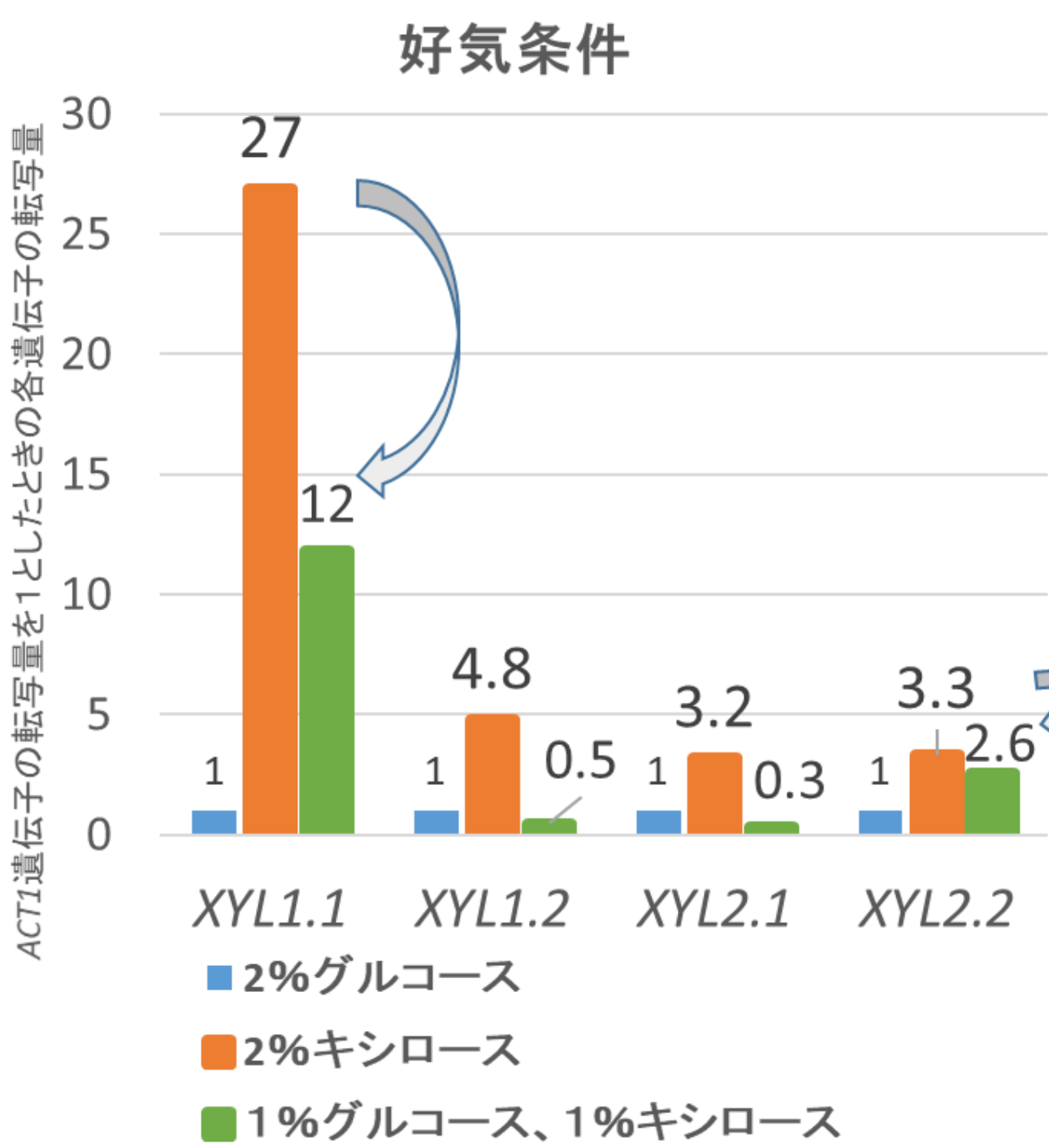
- 特徴①
XR をコードしている *XYL1* / *XDH* をコードしている *XYL2* がそれぞれ2つずつ存在している。
- 特徴②
嫌気条件でもキシロースを発酵できる。
- 特徴③
好気条件ではグルコースとキシロース混合培地で同時発酵が可能。

キシロース資化性酵母における *XYL* 遺伝子群のコピー数

Organism	XYL1	XYL2	XYL3
<i>Spathaspora passalidarum</i>	2	2	1
<i>Pichia stipitis</i>	1	1	1
<i>Candida tenuis</i>	1	1	1
<i>Pachysolen tannophilus</i>	2	1	1
<i>Hansenula polymorpha</i>	1	1	1



グルコース単一培地よりもキシロース単一培地の方が転写が強く誘導される



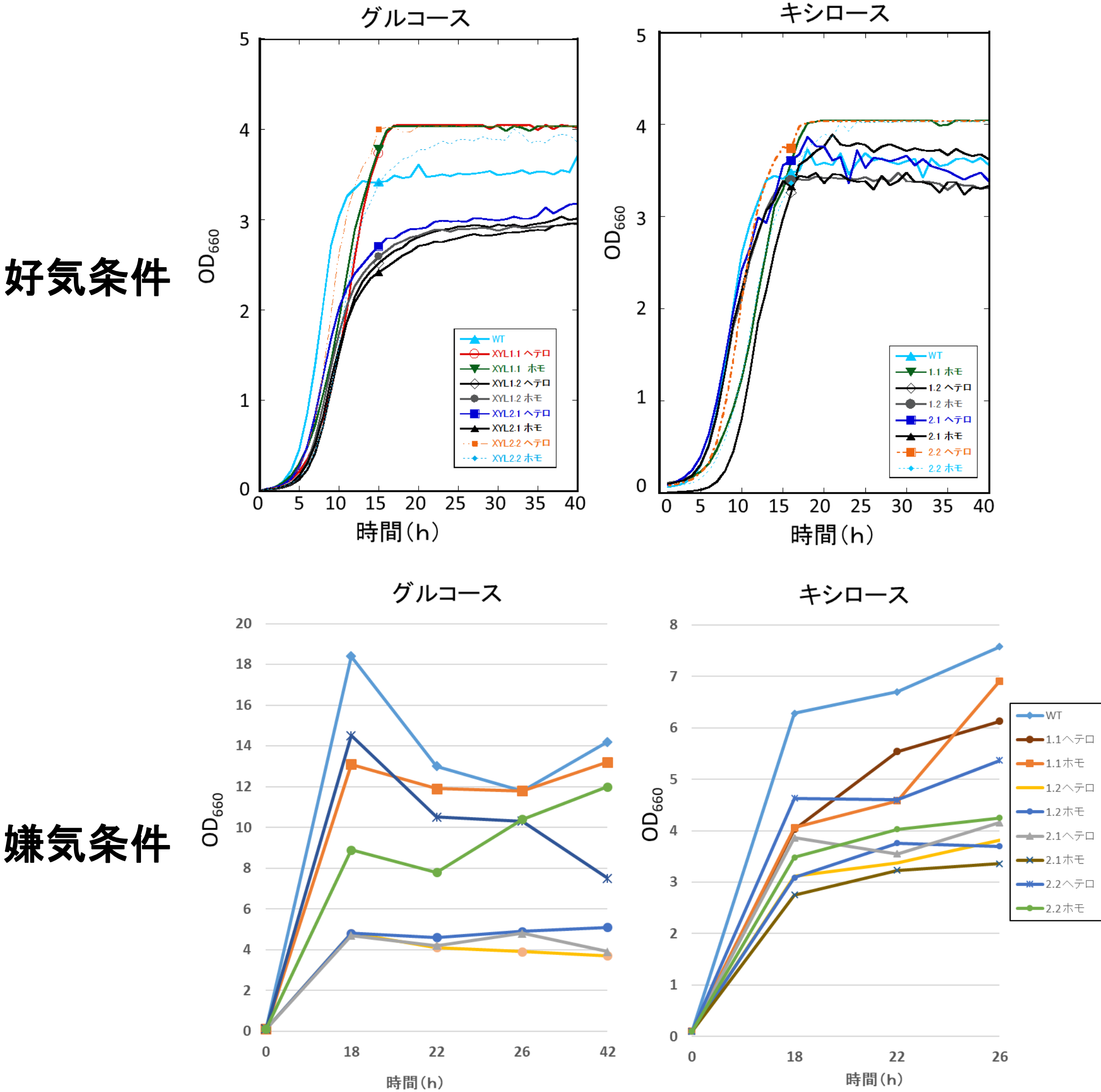
好気条件では *XYL1.1* が、嫌気条件では *XYL1.2* が強く転写が誘導される

発酵試験結果

導入遺伝子	EtOH 収率
コントロール株	66.5 % (48 hr)
<i>Ps wXYL 1</i> <i>Ps wXYL 2</i>	82.7 % (73 hr)
<i>XYL 1.1</i> <i>XYL 2.1</i>	73.5 % (96 hr)
<i>XYL 1.1</i> <i>XYL 2.2</i>	70.5 % (73 hr)
<i>XYL 1.2</i> <i>XYL 2.1</i>	87.6 % (73 hr)
<i>XYL 1.2</i> <i>XYL 2.2</i>	69.0 % (48 hr)

嫌気条件では *XYL1.2*, *XYL2.1* 発現株が最も高いエタノール収率を示した

XYL 遺伝子破壊株の生育曲線



キシロース培地において、*XYL1.2* と *XYL2.1* 破壊株の生育が特に悪かった

5 まとめと今後の展望

S. passalidarum の持つ4つの *XYL* 遺伝子 (*XYL1.1*, *XYL1.2*, *XYL2.1*, *XYL2.2*) はどれもキシロース培地で転写が誘導された。特に好気条件では *XYL1.1* が、嫌気条件では *XYL1.2* が強く転写誘導された。

XYL 遺伝子を出芽酵母で発現させたところ、*XYL1.2* と *XYL2.1* の組み合わせで発現させた株が、嫌気条件において最も高いエタノール収率 (87.6%) を示した。

XYL 遺伝子の破壊株を作製し、生育を解析した。 *XYL1.2* 破壊株と *XYL2.1* 破壊株がキシロース培地において最も顕著な生育不全を示した。

好気条件では *XYL1.1* と *XYL2.1*、嫌気条件では *XYL1.2* と *XYL2.1* が主要な遺伝子であり、 *S. passalidarum* は通気条件の違いにより *XYL* 遺伝子の使い分けを行っていることが示唆された。これにより好気でも嫌気でも効率的なキシロースからのエタノール発酵が可能となっていると考えられる。

今後は *XYL1.2* と *XYL2.1* を他コピー導入した出芽酵母株を作製し、嫌気条件においても効率的にエタノールを生産できる菌を育種する。