**エタノール生産性を向上させたサッカロマイセス酵母を開発するために有効な実験アプローチ （案）ver2**

2025. 2.27

**＊詳しい手法については作業手順書ver2、および作業マニュアルver2を参照のこと**

1. **エタノール耐性株の取得**

文献調査結果からエタノール耐性とエタノール生産性が連動しているとの文献が多数あり（文献1, 6～9，47, 60, 61）まずはエタノール耐性株を得ることが有望であると考えられた。手近におこなえる方法として、実験的進化（馴らし培養）でエタノール耐性を高めていく方法がやりやすいと思われる。

実験的進化で得られた株は、他の性能（生育速度など）が元株より劣っている可能性があるため注意する。

具体的な方法としてはプレート塗布による方法と液体培養による方法があるが、両方法を並行しておこなうのが効率的であろう。

1. **呼吸欠損株の取得**

呼吸欠損株（cytochrome c oxidase欠損株）は菌体の増殖が抑えられると同時にエタノール生産性が高まるという報告がみられる.（文献44, 45）

　呼吸欠損株の検出はプレートで容易にできるので（文献46）、この方法を活用して変異株を多数評価することができる。

　当方でもCOX5遺伝子破壊によりcytochrome c oxidaseを欠損させた株を作製しており、エタノール収率向上を認めている。この株について再評価をおこない、

このアプローチの有効性を検証することが必要である。

1. **トレハロース蓄積株の取得**

トレハロースの蓄積は酵母にストレス耐性を与え、その結果エタノール生産量向上につながるものと考えられる。エタノール生産量向上を示す報告も多く（文献28～30, 33, 34）ENEOS酵母にも有効な方法であると思われる。

遺伝子改良の方法としては過剰発現株が作りやすいので、まずTPS1またはTSL1遺伝子を染色体に組み込む形で作成するのがよいであろう。

1. **エタノール分解能欠損株の取得**

エタノール脱水素酵素Adh2はエタノールからアセトアルデヒドへの変換を触媒しこの活性を抑えることで培地中のエタノール消費を防ぎ、エタノール収率の向上につながることが期待できる。ADH2遺伝子を破壊することでエタノール収率が大幅に向上したことが報告されている。（文献35, 36）

そこでADH2遺伝子の破壊をおこない、エタノール収率の向上を図る。

1. **グルコース取り込み能の増強**

グルコースの取り込み能を増強することでグルコースの消費速度を上げて

エタノール生産速度、収率を上げることが期待できる。グルコーストランスポーターの増強も一定の効果がありそうだが、解糖系酵素遺伝子の転写因子であるZNF1もしくはGCR1を増強することでより高い効果が出ることが報告されている（文献16, 17, 22）。

1. **転写因子の増強、破壊**

他に効果があるとおもわれるターゲット遺伝子として転写因子がある。

文献調査の結果から、有効であると考えられる対象遺伝子として

CTS1破壊（文献24）、HAP4破壊（文献18, 19, 21）が挙げられる。しかしながら株によって効果が異なる場合があり、またHAP4のようには破壊で効果がある場合、増強で効果がある場合と効果が異なるケースがあるので、株によって効果がはっきり現れないことも考えられる。しかし遺伝子のグローバルな改変がおこなえるので、エタノール収率改善の可能性は大きい。

1. **硫酸亜鉛の添加および関連遺伝子の増強**

硫酸亜鉛の添加、もしくは酵母菌体内の亜鉛濃度を高める遺伝子改良によって酵母のストレス耐性度が高まり、エタノール生産能も向上するという知見がある（文献49）。また硫酸亜鉛の添加によって発現が高まる遺伝子の増強によってグルコース消費速度、エタノール生産速度がはやくなるという報告がある（文献51）。特にADE17の増強は発酵速度を飛躍的に高められる可能性がある。（文献52）

硫酸亜鉛の添加効果は簡単に検証できるので、菌株や培養条件によって効果に違いがみられる可能性はあるが、試みてみる価値はありそうである。

1. **グリセロールの排出抑制**

菌体内のグリセロール生産は、還元力がエタノール生産と競合するためにエタノール生産の障害となっている。グリセロール排出にかかわるFPS1遺伝子の破壊によって菌体内のグリセロールを減少させ、エタノール生産量を高めることができる（文献55）。

グルコース・キシロース系の培養においても、キシリトールの蓄積を大幅に減少させ、エタノール生産量を上げることに成功している（文献56）。

以上の観点からエタノール収率を向上させるために、実験がやりやすく、かつ確度の高い方法として１、２、７のアプローチを進める。

同時に遺伝子改良法として　3、4、７のアプローチをいずれかを並行して進めるのが適切であると考えられる。

遺伝子改良としてはセルフクローニングを念頭に置けば、遺伝子増強株が作製しやすいので、まずはTPS1またはTSL1遺伝子の増強から始めるのがよいとおもわれる。

４および8の遺伝子破壊はまず組み換え体を作製して効果を確認したのちに、セルフ株の作製をおこなう。

以上まとめると優先順位は

1. **エタノール耐性株の取得**
2. **呼吸欠損株の取得**
3. **トレハロース蓄積株の取得（TPS1またはTSL1の増強）**
4. **エタノール分解能欠損株の取得（ADH2の破壊）**
5. **グルコース取り込み能の増強（ZNF1, GCR1の増強）**

１と２は3～5と並行しておこなうことは可能である。

遺伝子改良の優先順位は以下の通り

1. **TPS1またはTSL1の増強**
2. **ADH2の増強**
3. **ZNF1, GCR1の増強**
4. **ADE17の破壊**
5. **FPS1の破壊**

以上の改良により少なくとも10～20%程度のエタノール収率向上が期待できる。また以上の改良を組み合わせることでさらに収率が上がる可能性がある。