***Saccharomyces cerevisiae*のエタノール生産能向上に関する文献調査（２）**

**（遺伝子増強、破壊による方法）**

エタノール生産能を向上させるためには遺伝子操作によるのが一般的である。遺伝子の増強、または破壊によりエタノール収率を向上させた報告例を挙げる。

＊遺伝子改良としては*Saccharomyces cerevisiae*自身のもつ遺伝子を利用した文献のみをとりあげた。外来遺伝子を使用した報告や遺伝子に人工的な変異を加える改良に関する報告はとりあげていない。

１．転写因子の増強または破壊

グルコースやキシロースからのエタノールへの代謝の流れを円滑に進めるためには全体のバランスが重要であり、個々の遺伝子に注目するだけではうまくいかないことが多い。

転写因子（transcription factor）は個々の遺伝子の働きを統括し、代謝全体の流れを制御しており、これをターゲットにすることにより、効果的な改変が期待できる。転写因子にかかわる遺伝子の増強や破壊に関する報告も多く、最近の報文をまとめた。

このうちZNF１増強（文献16, 17）、GCR１増強（文献22）、CAT8破壊（文献23）、ACE2,　SWI5, CTS1破壊（文献24）について効果が高いと考えられた。

HAP4については欠損によりキシロースからのエタノール生産に効果がみられた報告（文献18, 19）、増強によりエタノール生産に効果がみられた報告（文献21）があった。またエタノール発酵にかかわる転写因子PHO4の置換によって

エタノール生産量の向上がみられた報告もある。（文献26）

　RIM15はグルコースからピルビン酸に至る代謝にかかわる転写因子であるが

発酵能の強い醸造酵母では機能が失われている。RIM15を欠損させることでエタノール収率が向上した例が報告されている（文献43）。この方法を適用するにはENEOS酵母のRIM15遺伝子の配列を確認する必要がある。

２．トレハロースの蓄積、分解抑制

トレハロースは酵母内に存在する貯蔵糖であるが、この蓄積が酵母のストレス耐性にかかわることが知られている。トレハロース合成能を増強することで

エタノール収率が向上した例がある。（文献28, 29, 33, 34, 37）またトレハロース分解を抑制することにより、エタノール発酵速度が大幅に上がった例がある。（文献30, 37）

３．エタノール分解抑制

　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, 40）

４．アセチルCoA合成の抑制

　エタノールはピルビン酸からPDC1（ピルビン酸脱炭酸酵素遺伝子）を経て合成されるが、この経路と競合するPDH(ピルビン酸デヒドロゲナーゼ) 経路（アセチルCoAを合成）を抑制することにより、エタノール生産量を上げることができる。（文献48）

５．グルコース取り込み能増強

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。解糖系酵素遺伝子の転写因子である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22）

６．呼吸能の欠損

呼吸欠損株（cytochrome c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）.

７．ストレス耐性の増強

「２．トレハロースの蓄積、分解抑制」もストレス耐性向上にかかわっているが硫酸亜鉛の添加でストレス耐性が付与されることがわかっている（文献49）。

硫酸亜鉛の添加によりプリン合成能が高まり、結果としてストレス耐性に関与する遺伝子の発現が高まり、エタノール発酵能も改善されている。特にADE17遺伝子の増強により高い効果が得られた（文献52）。また液胞に存在する亜鉛トランスポーター遺伝子ZRF3を破壊することでエタノール生産量が向上している（文献54）。

酢酸は酵母の生育を阻害し、エタノール生産量低下の主要な原因であるが酢酸トランスポーターを破壊することで酢酸存在下でもエタノール生産速度、エタノール生産量を上げることに成功している（文献53）。また転写因子SET5, PPR1を過剰発現することで酢酸耐性が強まり、結果としてエタノール生産性が改善されている（文献57）。この報告では過剰発現株は菌体内の活性酸素が減少していた。酢酸は活性酸素を誘発することが知られている。

８．グリセロールの排出抑制

　グリセロールの排出にかかわるFPS1遺伝子を破壊することで、グリセロール生産を抑制しエタノール収率が上がることが報告されている（文献55）。

またグルコース・キシロース培養系でのエタノール生産においても、キシリトールの生産を抑えエタノール収率が上がっており、FPS1遺伝子の破壊によりキシリトール蓄積への流れをエタノール生産に回すことに成功している（文献56）。

９．その他

９－１　機械学習によるプロモーター最適化

機械学習の活用により、解糖系の酵素遺伝子のプロモーターの探索をおこなった報告がある（文献31）。 この報告ではPDC1の強化がもっとも有効であることが示されている。

９－２　ミトファジーの阻害

酵母のミトコンドリアのオートファジー（ミトファジー）関連遺伝子を破壊することにより、グルコース発酵時の発酵能、エタノール生産能を向上させる方法が報告されている。（文献32）

９－３　菌体内ATP含量の枯渇

　菌体内のATPを消費してATPが不足する状況になると、酵母はATP量のバランスをとるためエタノール生産量が増えることが報告されている。自前の遺伝子を利用した例では非特異的なATP分解酵素Pho8を発現させてATP生産量が向上した例がある。（文献25）　また大腸菌のATPaseを発現させることでエタノール生産量が増加することが報告されているが、酵母のATPaseではどうかは不明である（文献39）。