

(学位第9号様式)

No. 1

最終試験結果の要旨			
学位申請者 氏名	小橋 有輝		
審査委員	主査	鹿児島大学	教授 高峯和則
	副査	鹿児島大学	教授 玉置尚徳
	副査	琉球大学	准教授 水谷 治
	副査	鹿児島大学	准教授 吉崎由美子
	副査	鹿児島大学	准教授 二神泰基
審査協力者			
実施年月日	令和 6年 1月29日		
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。)			<input checked="" type="checkbox"/> 口答 <input type="checkbox"/> 筆答
<p>主査及び副査は、令和6年1月29日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士（農学）の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有すると認めた。</p>			

学位申請者 氏 名	小橋 有輝
<p>[質問 1] <i>THI3</i> の破壊は高級アルコール生産に直接的というより、チアミンの供給源としての間接的に影響して、イソアミルアルコールを低下させるとの理解でいいのか。</p> <p>[回答 1] そのように考えている。</p> <p>[質問 2] イソアミルアルコール生産性の低い酵母を育種して焼酎を造ることも有用と考えられるが、どのようなストラテジーでこのような株を育種していく予定か。</p> <p>[回答 2] これまでのイソアミルアルコール生成量制御で注目されていた <i>THI3</i> 破壊株は、チアミン生合成ができず外界のチアミンへ依存しており、その上で外界から獲得できるチアミン量が少ない時にイソアミルアルコール生成量が低下するということが明らかになった。方法の一つとして <i>THI3</i> 破壊株を用いて、仕込み環境のチアミン量を低下させることでイソアミルアルコールを低減できると考えられる。しかし、ここで問題があり、このストラテジーではイソアミルアルコール生成量と同時に、生育やアルコール生成の方も落ちてしまう。と考えられる。そのため、<i>THI3</i> 破壊と同時に、ケト酸の還元には関与していない <i>PDC</i> 系の遺伝子発現を高めるといった方法によって、イソアミルアルコール低減株を育種できる可能性はある。また、本研究とは関連が少ないが、既知の高級アルコール生成関連遺伝子や生成経路以外にも、未知の関連遺伝子や生合成経路の存在は示唆されており、その探索も育種のヒントになると考えている。</p> <p>[質問 3] 背景の 3 において、<i>THI3</i> と <i>ADH2</i> の二重破壊や、<i>BAT2</i> との二重破壊でイソアミルアルコールが低下するとのことだが、本博士論文で提唱するチアミンの生合成遺伝子 <i>THI3</i> との関係性から考えると、なぜ二重破壊でイソアミルアルコールが低下すると考えられるのか。</p> <p>[回答 3] <i>THI3</i> と <i>ADH2</i> の二重破壊や、<i>THI3</i> と <i>BAT2</i> の二重破壊によるイソアミルアルコール生成量低下の報告について、まず <i>THI3</i> と共に <i>ADH2</i> や <i>BAT2</i> を破壊した影響も現れていると考えている。そして、<i>THI3</i> の破壊による影響については、私の研究結果から考えると、<i>THI3</i> 破壊株はチアミン依存度が高い状態であると考えられる。先行研究における生育環境のチアミン量が明らかではないため断言はできないが、チアミンの不足がイソアミルアルコール生成量低下の原因であると考えられる。</p> <p>[質問 4] チアミンが少ない環境であれば、<i>THI3</i> 遺伝子を破壊するだけでイソアミルアルコールが減少してしまうということか。</p> <p>[回答 4] そのように考えている。</p>	

〔質問 5〕今回開発した遺伝子破壊方法の不具合と感じる部分があるか。あるいは、改良できる部分はあるか。

〔回答 5〕本手法を用いて標的遺伝子が完全に破壊した後、ループアウトによってカセットを段階的に除去する部分で、5-FOA プレート ⇒  $\alpha$ -AA プレート ⇒ 5-FOA プレートと三回のセレクションが必要だが、理論上は  $\alpha$ -AA プレート ⇒ 5-FOA プレートと二段階のセレクションに短縮できるはずである。実際にはこのセレクションの短縮はコロニーが生じずうまくいかなかったが、セレクション工程の簡略化は改良できる部分であると考え。また、本手法では *URA3* と *LYS5* の二重破壊株を事前に取得する必要がある、さらに破壊が完了したら *URA3* と *LYS5* を再び戻す必要も考えられる。問題なく行える実験操作なので、作業量の問題であるが、改良の余地はあると考える。

〔質問 6〕チアミン存在下では、*THI3* 破壊株でもイソアミルアルコール生産量が減少しないということだが、焼酎の醪にはチアミンがどの程度含まれているのか。

〔回答 6〕実際の醪のチアミン量を分析したことはないが、*THI3* 破壊株を用いた小仕込み試験の醪では、破壊株のイソアミルアルコール生成量低下は起こらないことを確認している。醪の栄養環境に近い麴汁培地を分析したところ、チアミン濃度は約 80  $\mu\text{g/L}$  であった。これは *THI3* 破壊株でイソアミルアルコール生成量低減が起こらない数値と考える。

〔質問 7〕イソアミルアルコールは GC-MS で測定しているのか。

〔回答 7〕その通りである。

〔質問 8〕焼酎醪でその他の成分で変化した揮発成分はなかったか。

〔回答 8〕*THI3* の破壊によって増殖は低下するので、菌体当たりの生成量で考えると、割る数である菌数が低下する分、むしろ全体的にやや高くなるという結果になった。

〔質問 9〕焼酎酵母 K2 ではなく、C4 を使用した理由としてイソアミルアルコール生成量が多いためとのことだが、なぜ C4 は生成量が多いのか。

〔回答 9〕明確な答えは持っていないが、以前 K2 や H5 という他の焼酎酵母も用いて小仕込み試験を行った際、C4 の重量減少量すなわち  $\text{CO}_2$  発生量が若干少ないという印象を受けている。そのため、アルコール発酵における脱炭酸にメインで関与し、 $\alpha$ -ケト酸の脱炭酸への関与は少ない *PDC* 系の遺伝子より、*ARO10* などの  $\alpha$ -ケト酸をメインで脱炭酸する遺伝子の発現や働きが強い、といったことが関係していると考えている。

〔質問 10〕麴汁培地に TPP はどの程度含まれているのか。

〔回答 10〕TPP は測定していないので分からないが、ある程度含まれていると考える。

〔質問 11〕*THI3* 破壊株を実用化するとなると、環境中のチアミンや TPP を減少させる必要があると思うが、どのような方法が考えられるか。精米歩合の検討など考えられるのか。

[回答 11] 原料から持ち込まれるチアミンや TPP 量の低減させるのは非常に難しい問題であると考えている。方法としては、精米歩合を下げるということが考えられる。米のビタミンや脂質、タンパク質は、米の外側に局在する傾向があるので、米の精米歩合を下げるのは有効であると考えられる。

[質問 12] 清酒醸造であれば、この株の特性を利用できるということか。

[回答 12] その通りだと思う。

[質問 13] 細胞内の TPP 量が減少する内容のところで、チアミンピロホスホキナーゼ活性が低下する理由は Thi3 の直接的影響ではなく、チアミン合成が減少することで、TPP 活性が減少するということの具体的な関係性はわかっているのか。

[回答 13] *THI3* の破壊によってチアミンピロホスホキナーゼ活性が低下するという報告の中では、実際に活性が低下したという現象論での報告だったので、その理屈はわからない。しかし、Thi3 がチアミン合成関連遺伝子のレギュレーターであることから、チアミンピロホスホキナーゼをコードする遺伝子も、Thi3 の調節を受けているのではないかと考えている。

[質問 14] 後半の内容で、高い確率で株を取得できると思うが、外れの株もあると思うがどのような株であるか。

[回答 14] 頻度測定の際に実際に観測されたものであるが、ダブルΔ (*URA3/LYS5*) から シングルループアウト 1 (loop-out/*LYS5*) を取得した際、ループアウトによって *URA3* が除去されて 5-FOA プレートで生育できるという、目的株のパターンとは別に、LOH によって破壊カセットがホモになり *LYS5/LYS5* という遺伝子セットにあることで 5-FOA プレート上に生えてくるというものがある。

[質問 15] 培養のみでループアウト株がとれるということだが、どこかでチェックしておくべき点はあるのか。

[回答 15] シングルループアウト 1 (loop-out/*LYS5*) からシングルループアウト 2 (loop-out/*URA3*) を取得する際、LOH によって一気に最終段階であるダブルループアウト (loop-out/loop-out) となる興味深い現象を確認した。よって、例えば工程を短縮したいとか作業量を減らしたいとかであれば、ダブルΔからシングルループアウト 1 を取得する際は 5-FOA でのセレクションのみで複数株取っておき、一気に最終段階の株が生じる可能性があるシングルループアウト 2 の取得時のみ詳細に遺伝子を確認するといった、確認すべきポイントみたいなものがあると思う。

[質問 16] リピート配列の内側と外側にある配列の長さはどのぐらいにしているのか。

[回答 16] 数 100 bp である。

[質問 17] 長さが長いほどループアウトしやすいのか。また、配列に特徴があることでいきやすいなどの報告はあるのか。

[回答 17] 適正の長さや配列的特徴については詳細に調べていない。調べてみたいと思う。

[質問 18] 内側からループアウトする方が効率がよいのか。

[回答 18] 内側のリピート配列でのループアウトせずに外側のリピート配列でループアウトしたという現象は確認できていないので、やはりリピート配列間の距離は重要であると考えられる。

[質問 19] 2 回目の実験が 1 回目と比較すると若干パーセンテージが落ちてると思うが、何度も繰り返すと、このパーセンテージとどうなっていくのか。

[回答 19] スライドで示したパーセンテージはあくまで平均値であり、標準偏差も考慮すると一回目から有意に低下するものではない。