



清酒の風味を改良する有用酵母の育種  
に関する研究

# 目次

緒論	1
第1章 清酒の香りに影響を与える有用酵母の育種 ( $\beta$ -フェネチルアルコール高生産性酵母の分子育種)	3
第一節 緒言	3
第二節 $\beta$ -チエニルアラニン(THA)耐性変異遺伝子のクローニング	4
1. 実験材料及び方法	4
2. 実験結果及び考察	5
第三節 遺伝子組換えによる $\beta$ -フェネチルアルコール高生産性清酒酵母の育種	15
1. 目的	15
2. 実験材料及び方法	15
3. 実験結果及び考察	16
第四節 要約	17
第2章 $\beta$ -チエニルアラニン耐性変異遺伝子の利用	19
第一節 緒言	19
第二節 優性的な選択が可能な酵母-大腸菌シャトルベクターの構築	20
1. 実験材料及び方法	20
2. 実験結果及び考察	20
第三節 遺伝子破壊用カセットの構築	23
1. 実験材料及び方法	23
2. 実験結果及び考察	23
第四節 要約	25
第3章 実験室株を用いた酵母の有機酸生産機構の解明	27

第一節 緒言	27
第二節 実験室株の TCA 回路およびグリオキシル酸回路酵素遺伝子の破壊	30
1.実験材料及び方法	30
2.実験結果及び考察	32
第三節 フマル酸還元酵素遺伝子の破壊	38
1.実験材料及び方法	38
2.実験結果及び考察	39
第四節 フマル酸還元酵素遺伝子破壊株の増殖性	43
1.実験材料及び方法	43
2.実験結果及び考察	43
第五節 酵母のコハク酸生産機構	49
1.実験材料及び方法	49
2.実験結果及び考察	49
第六節 要約	56
第 4 章 清酒の味に影響を与える有用酵母の育種	59
(有機酸生産性の異なる清酒酵母の育種)	
第一節 緒言	59
第二節 協会 901 号の <i>ACO1</i> , <i>KGD1</i> , <i>ICL1</i> , <i>SDH1</i> , <i>FUM1</i> および <i>OSM1</i> 遺伝子の破壊	59
1.実験材料及び方法	59
2.実験結果及び考察	60
第三節 破壊株の醗酵試験	66
1.実験材料及び方法	66
2.実験結果及び考察	66
第四節 清酒醸造試験	67
1.実験材料及び方法	67
2.実験結果及び考察	67
第五節 変異処理による有機酸生産性に特徴を持つ清酒酵母の育種	72

1.目的	72
2.実験材料及び方法	72
3.実験結果及び考察	73
第六節 育種酵母の有機酸生産性	76
第七節 要約	78
総括および結論	79
謝辞	82
本研究に関する発表論文等	83
引用文献	85
英文 Summary	91

略 語 表

略語	意味
遺伝子	
<i>ACO1</i>	アコニターゼ遺伝子
<i>ARO3</i>	7-phospho-2-keto-3-deoxyarabinoheptonate(DAHP) 合成酵素 (フェニルアラニンによる制御を受ける) 遺伝子
<i>ARO4</i>	7-phospho-2-keto-3-deoxyarabinoheptonate(DAHP) 合成酵素 (チロシンによる制御を受ける) 遺伝子
<i>ARO4<sup>m</sup></i>	<i>ARO4</i> 変異遺伝子 ( <i>THA<sup>r</sup></i> と同一)
<i>ARS1</i>	酵母の自己増殖配列
<i>CEN4</i>	酵母第4染色体の減数および体細胞分裂時の必須領域の遺伝子配列
<i>FRDS</i>	フマル酸還元酵素 (細胞質局在) 遺伝子
<i>FUM1</i>	フマラーゼ遺伝子
<i>HIS3</i>	imidazoleglycerol-phosphate dehydratase遺伝子 (ヒスチジン合成系)
<i>ICL1</i>	イソクエン酸リアーゼ遺伝子
<i>KGDI</i>	$\alpha$ -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ遺伝子
<i>Km<sup>r</sup></i>	カナマイシン耐性遺伝子
<i>LEU2</i>	beta-IPM (isopropylmalate) dehydrogenase 遺伝子 (ロイシン合成系)
<i>OSM1</i>	フマル酸還元酵素 (プロミトコンドリア局在) 遺伝子
<i>SDH1</i>	コハク酸デヒドロゲナーゼ遺伝子
<i>THA<sup>r</sup></i>	$\beta$ -チエニルアラニン耐性変異遺伝子 ( <i>ARO4<sup>m</sup></i> と同一)
<i>URA3</i>	orotidine-5'-phosphate decarboxylase遺伝子 (ウラシル合成系必須遺伝子)
-----	
その他	
DAHP	7-phospho-2-keto-3-deoxyarabinoheptonate
Km	カナマイシン
THA	$\beta$ -チエニルアラニン

# 緒 論

## 緒論

酵母は最も下等な真核生物として、細胞の機能研究等のモデル生物として長い研究の歴史がある。特に *Saccharomyces cerevisiae* は、その学名がラテン語の酒から名付けられた様に、アルコール発酵の主体として産業的にも極めて重要な微生物である。近年、この酵母の全塩基配列がゲノム計画により明らかになり、益々研究の速度は早まっている。清酒醸造においても、この微生物はアルコール生産の主体であるのみならず、清酒の風味に影響を与える様々な物質を生産していることから、麹菌と並んで重要な地位を占めている。清酒の風味に影響を与える要因としては、色、香り、味およびテクスチャーが考えられる。この中で、香りと味に影響を与える物質の多くが酵母により生産されている。

清酒の香り成分は同定されているものだけでもアルコール、エステル、酸、カルボニル化合物、アミンおよび含硫化合物等で 80 種以上が知られており[1]、大別すると香氣成分として好ましい成分と、異臭として知覚される望ましくない成分がある。それらの大部分が酵母によって生産されることから、育種により前者を増強させる研究や、後者を除去または減量化する研究の産業的意味合いは大きいと考えられる。既に清酒中に含まれる香氣成分を代表する酢酸イソアミルやカプロン酸エチルの様な吟醸香成分を酵母の育種により増強する試みがなされ[2, 3]、産業への応用が図られている。筆者らも細胞融合法により同様な株の育種を試み、報告している[4]。また清酒中に微量に含まれる香氣成分であり、バラ様香を示す $\beta$ -フェネチルアルコールを高生産する株を変異処理により育種している[5]。異臭成分を酵母の育種により、軽減する研究は、清酒酵母では、あまりみあたらないが、ビール酵母では $\alpha$ -アセト乳酸脱炭酸酵素遺伝子の導入により、未熟臭の主成分であるダイアセチル生成が抑制された株が報告されている[6]。

一方、清酒中には、有機酸、アミノ酸、糖類等の多数の呈味成分が存在している。それぞれの成分が官能的に、どの様な寄与をしているのか、また相互的に如何に働いているのかは不明であるが、酒の味はそれら多数の物質の調和の中で決まるものと思われる。さらに人間が官能的に酒の味と言っているものの中には、大きく香り成分の影響を受けるものもあり、その評価は極めて難しいのが実情である。この様な中で、清酒の味を化学的な分析値から客観的に評価する試みがなされている[7]。その結果、



清酒の味の評価に、清酒の滴定酸度と直糖濃度の分析値から求めた、濃淡と甘辛という2つの指標が導入された。この指標は清酒の製品設計や品質管理に多用されているが、実際には市販されている酒の2つの指標の数値に大きな差はなく、銘柄間での差異を表わすには不十分であると考えられた。筆者らは、個々の味成分ではなく、清酒の味そのものに応答する味覚センサの研究を別に行っており、より細かな清酒の味の分別を試みている[8, 9]。その中でも、酒の味に対する、酸味成分の寄与の大きさを再確認している。清酒中の酸味物質としては、有機酸が主要なものと考えられるが、その約70%は酵母により生産されると報告されている[10]。また同じ有機酸であっても、個々の物質間では、官能的に酸味の質が異なっていることも良く知られている。これらの事は、酵母が生成する総有機酸生成量や組成を変えることにより、清酒の味が異なる製品を生み出す可能性を示唆している。既に、多数の有機酸生産性の異なる株が分離されているが、その変異機作は不明なものが多い[11-13]。これは、清酒もろみ中における酵母の有機酸生産機構が不明な点に由っている。このことは、育種の障害になっているのみならず、酒もろみ中での有機酸生成制御を困難にしている。よって酵母の有機酸生産機構、特に酒もろみ中での機構を明らかにすることは、上記目的の達成にとって重要なことと考えられる。

本研究においては、清酒の風味、特に香りと味に着目して、酵母を育種することにより風味の異なる製品の開発を試みるものである。第1章においては、バラ香成分である $\beta$ -フェネチルアルコール高生産性変異酵母の変異遺伝子のクローニングを行い、変異遺伝子が *ARO4* 遺伝子の変異型であることを明らかにし、変異点を決定するとともに、遺伝子組換えによる分子育種を試みた。第2章においては、クローニングした *ARO4* 変異遺伝子のポジティブセレクションマーカーとしての有効性を利用して、種々のベクターや遺伝子破壊用カセットを構築した。第3章においては、様々な TCA 回路酵素遺伝子の破壊および酵母の還元的有機酸生成の重要な酵素であるフマル酸還元酵素の遺伝子の破壊が酵母の有機酸生産性に及ぼす効果を実験室株を用いて検討するとともに、酵母の有機酸生産機構について考察した。第4章においては、清酒酵母の各種有機酸生成関連遺伝子の破壊株を造成し、清酒もろみ中での酵母の有機酸生産機構を検討した。またそれらの知見を元に、変異処理よりグリセロール非資化性変異株およびフェニルコハク酸耐性変異株から有機酸生産性の異なる酵母の分離を試みた。本論文は、以上の実験的事実、並びに考察を詳細に論述したものである。

# 第1章

## 清酒の香りに影響を与える 有用酵母の育種

( $\beta$ -フェネチルアルコール高生産性酵母の分子育種)

# 第1章 清酒の香りに影響を与える有用酵母の育種

## ( $\beta$ -フェネチルアルコール高生産酵母の分子育種)

### 第一節 緒言

清酒の香りは、主として酵母により生産されており、品質評価のための重要な要素となっている。特に吟醸香と呼ばれる酢酸イソアミル、またはカプロン酸エチルの香りは、吟醸酒などの高級酒では不可欠の要素といえることができる。近年、酒中の吟醸香成分の含有量を、酵母の育種によって高める研究が多数なされ、成果を収めている[2, 3]。しかし、酵母の生産する香気には、これら吟醸香成分以外にも様々なものが存在する。その例として $\beta$ -フェネチルアルコール、およびその酢酸エステルである酢酸 $\beta$ -フェネチルが挙げられる。これらはバラ様の香り成分として知られているが、清酒中では含量的に低いため官能的にあまり認識されない。 $\beta$ -フェネチルアルコールは、芳香族アミノ酸であるフェニルアラニンと同一の経路で合成され、その生成はフェニルアラニンと同様に制御されている (Fig. 1-1)。既にこれら成分についても、アナログ耐性変異株の中より高生産性株が分離されている[14, 15]。筆者らもフェニルアラニンのアナログである $\beta$ -チエニルアラニン (THA)耐性変異株の中より、小仕

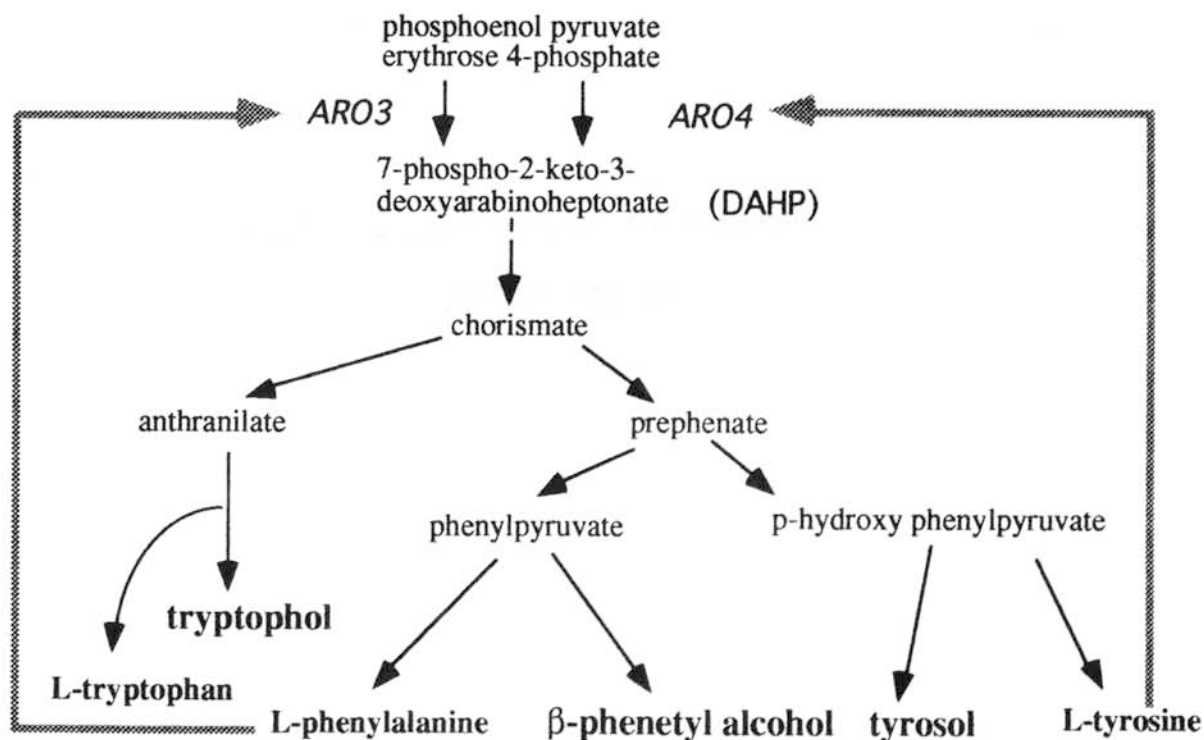


Fig. 1-1. Regulation of aromatic amino acid biosynthesis in *S. cerevisiae* (partial).  
Line:  $\longrightarrow$ , feed back inhibition.

込試験において親株の約4倍の $\beta$ -フェネチルアルコールを生産する K901-T12 株を分離した[5]。この株はチロシン添加で $\beta$ -フェネチルアルコール生産が抑制されず、チロシン生合成の副生物であるチロソールも過剰に生産した。このことはチロシン生合成の制御に関わる遺伝子に変異が起きている可能性を示唆している。K901-T12 株は、実醸造においても高い生産性を示し、得られた清酒において官能的にバラ様の香りが認知された。ところで、清酒醸造に用いられる酵母は、日本醸造協会が配付している協会酵母をはじめ多種多様である。これらの酵母を、新たに $\beta$ -フェネチルアルコール高生産性に改変するには、再度、変異およびスクリーニングを行わなければならない、多大な労力を必要とする。そこで変異株の遺伝子バンクより変異遺伝子を分離し、組換えによる酵母の分子育種を試みた。

## 第二節 $\beta$ -チエニルアラニン (THA) 耐性変異遺伝子のクローニング

### 1 実験材料および方法

#### 1-1 使用菌株およびプラスミド

酵母: K901(*Saccharomyces cerevisiae* Kyokai No.901)、THA 耐性変異株 K901-T12[5]、実験室株 DBY747[16] (*MATa*, *ura3-52*, *his3*, *trp1-289*, *leu2-3,112*)

大腸菌: MC1061[17], JM83[18], DH5 $\alpha$ [19]

プラスミド: YCU<sub>p</sub>4 (pUC13[17]の *SspI* 部位に YC<sub>p</sub>50[20]の *CEN4* および *ARS1* が挿入され、*EcoO109I* 部位に *URA3* を含む *HindIII-SmaI* 断片が組み込まれた YC<sub>p</sub> 型酵母-大腸菌シャトルベクター)、PL1[21] (pUC19[22]に 2 $\mu$ m オリジンおよび *LEU2* が組み込まれた YEp 型酵母-大腸菌シャトルベクター), pUC118[23], pHSG398[24]

#### 1-2 使用培地

酵母の培養用には YPD 培地 (2%ポリペプトン、1%酵母エキス、2%グルコース) および SD 最少培地 (yeast nitrogen base w/o amino acid, Difco, 2%グルコース) を用いた。SD 最少培地には適宜必要なアミノ酸を加えた。THA 耐性になった形質転換株の分離には、宿主として DBY747 株を用いた場合、SD 最少培地に  $\beta$ -2-

チエニル-DL-アラニン を 0.02mg/ml で添加し、K901 を用いた場合には 5mg/ml で添加した。大腸菌の培養には 2YT 培地 (Bacto trypton 1.6%, yeast extract 1%, NaCl 0.5%, pH7.0) および L 培地 (Bacto trypton 1%, yeast extract 0.5%, NaCl 0.5%, pH7.0) を用いた。

### 1-3 醗酵試験および $\beta$ -フェネチルアルコールの定量

醗酵試験は 15% グルコースを含む SD 最少培地で 25℃、9 日間醗酵させた。

$\beta$ -フェネチルアルコールの定量は、前報[5]同様に秋田らの方法[14]に準じて行った。

### 1-4 遺伝子工学的手法

酵母の形質転換は、伊藤らの酢酸リチウム法[25]に準じて行った。

部分欠損 DNA の作成には、デレーションキット (日本ジーン) を用いた。

DNA 配列の決定は、ABI model 370A DNA シーケンサーにより行った。

その他の手法は、Molecular Cloning[26]に従った。

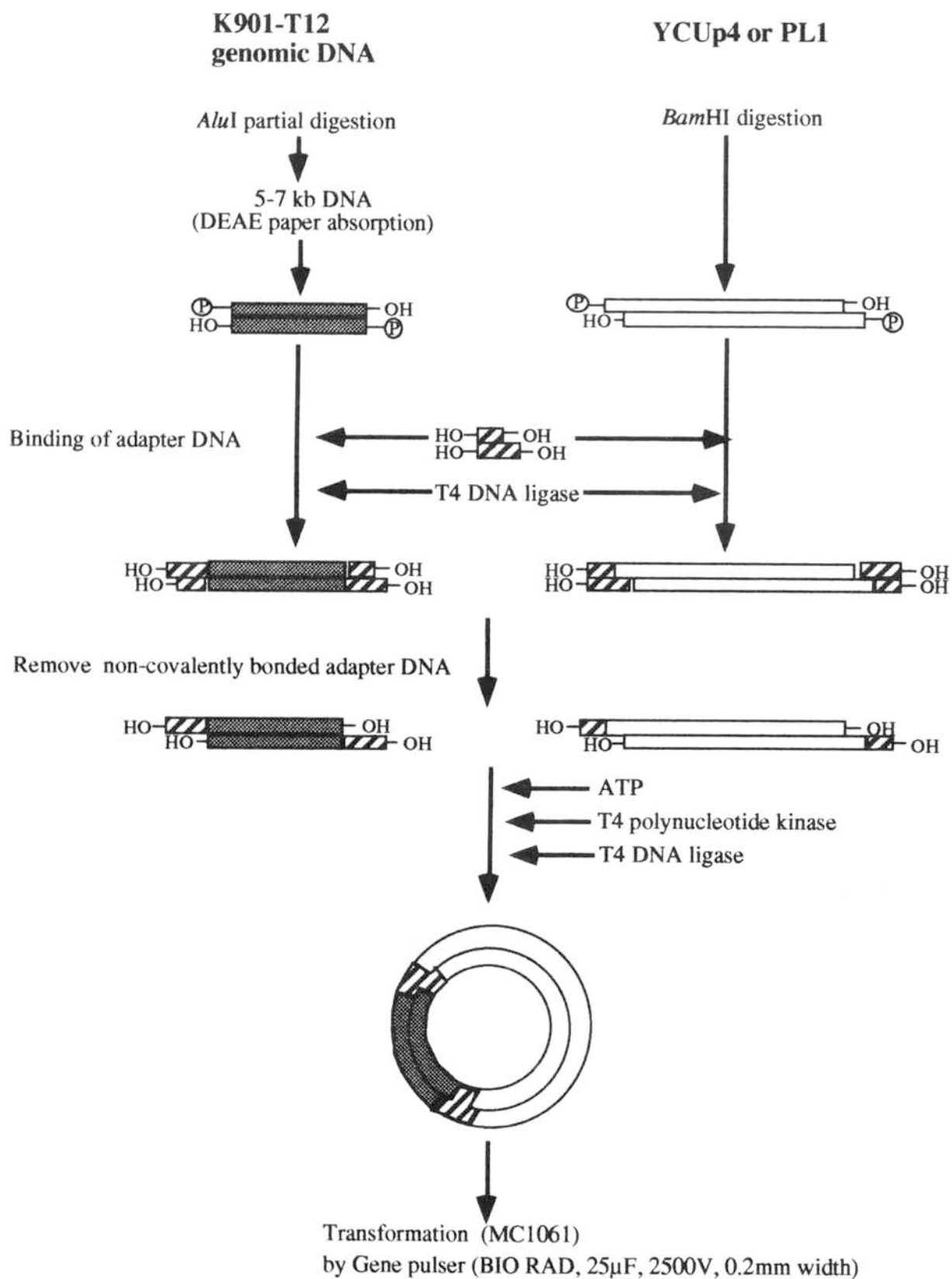
## 2 実験結果および考察

### 2-1 変異酵母染色体 DNA の遺伝子バンクの作成

THA 耐性変異株 K901-T12 の培養菌体よりゲノム DNA を抽出し、*AluI* で部分分解した。この DNA を 0.7% アガロース中で電気泳動し、5 から 7Kb の断片を DEAE 81paper を用いて回収した。部分消化 DNA 断片、および *Bam*HI で消化したベクター-YCUp4(YCp 型)、または *Bam*HI で消化したベクター-PL1(YEp 型) をアダプター DNA を介して結合させた後、大腸菌 MC1061 株をエレクトロポレーションにより形質転換してバンクを作成した(Fig. 1-2)。アダプター DNA の配列は、以下の通りである。

(5'-GATCCGGCAACGAAGGTACCATGG-3')

5'-CCATGGTACCTTCGTTGCCG-3') このアダプター DNA は粘着末端側が *Bam*HI で切断したベクター DNA に結合する。また平滑末端側が部分消化 DNA 断片に結合する。それぞれのリン酸結合にあずからない鎖を除去した後、ベクターと部分消化 DNA 断片を結合させることにより、ベクターの再環状化を防ぐとともに、新たに生じた粘着末端によりライゲーション効率を上昇させることが可能になる。



**Fig. 1-2.** Construction of genomic DNA library of *S. cerevisiae* strain K901-T12 .

## 2-2 変異遺伝子のクローニング

K901-T12 株のゲノムを用いて作成したベクターYCU<sub>p</sub>4 (YC<sub>p</sub> 型)、およびベクターPL1 (YE<sub>p</sub> 型)の遺伝子バンクを用いて、*S.cerevisiae* DBY747 株を形質転換し、0.02mg/ml の THA を含む SD 寒天培地で成育が可能となったコロニーをそれぞれ1個得た。これらの形質転換体から、プラスミドを回収することによって、THA 耐性遺伝子を含むクローン pAF1(YC<sub>p</sub> 型) および pAF2 (YE<sub>p</sub> 型) を得た。これら2つのプラスミド中にはそれぞれ 5.5kb および 6.0kb の挿入断片が含まれていたが、制限酵素地図の一致から、同一領域を含むことがわかった (Fig. 1-3)。またクローニング断片をプローブとして用いて、パルスフィールドグラジエント (PFG) 電気泳動を行ったところ、酵母の第II染色体にハイブリシ、含まれる遺伝子は同染色体上の遺伝子であることがわかった (Fig. 1-4)。それらのプラスミドで形質転換した DBY747 株は、発酵試験において、ベクターのみで形質転換したものよりも高いβ-フェネチルアルコール生産性を示した (Fig. 1-5)。このことよりクローニングした THA 耐性変異遺伝子は、優性的に酵母をβ-フェネチルアルコール高生産性に形質転換することが確認された。

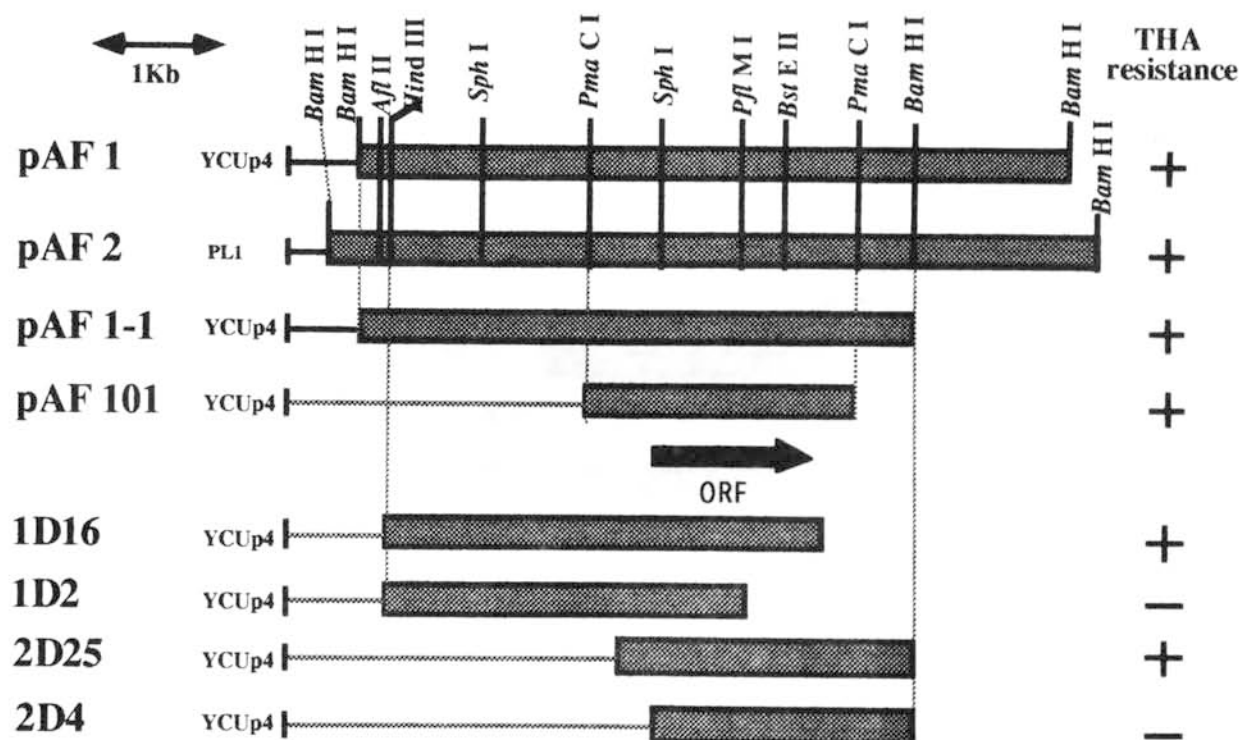
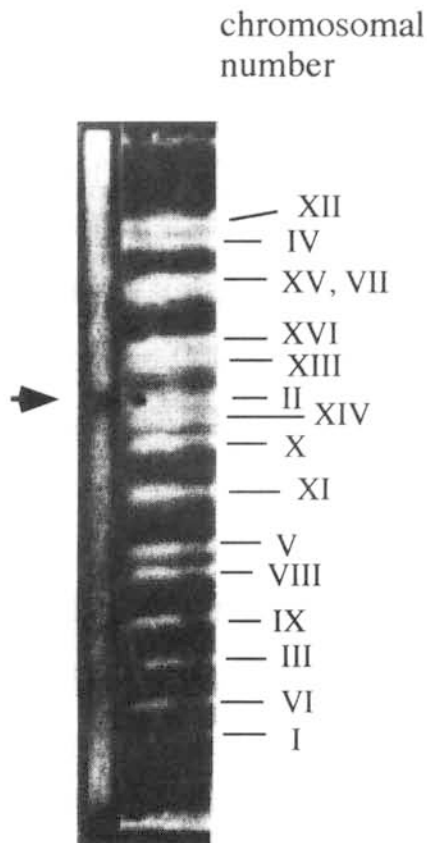
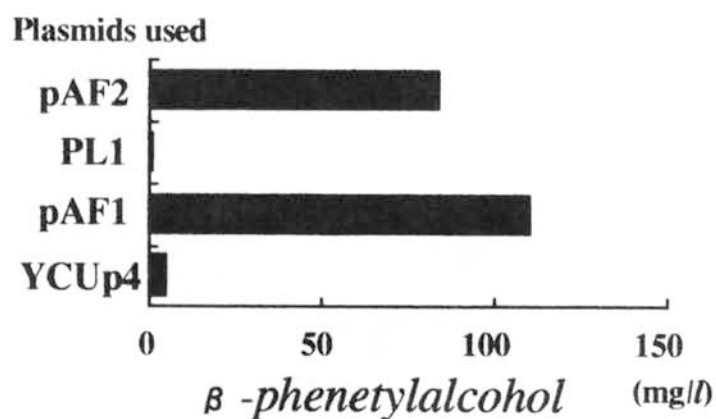


Fig. 1-3 The structure of plasmid pAF1 and pAF2 containing THA resistant gene, and its subclones and deletion plasmids. Plasmid DNAs were used to transform *S.cerevisiae* DBY747. Plasmids which conferring THA resistance phenotype are shown as (+).



**Fig.1-4.** Localization of THA resistant gene on the yeast chromosomes. A preparation of yeast chromosomal DNA from *S. cerevisiae* YNN295 (BIO RAD) was separated by pulse field gradient (PFG) gel electrophoresis in a 1.5% agarose gel and blotting to a nylon filter. The BamHI fragment of pAF1-1 was used to probe. On the figure Roman numerals indicate chromosome number.



**Fig. 1-5**  $\beta$ -phenethylalcohol productivity of transformants in fermentation test. Cells were grown in minimal medium with 15% glucose (30°C, 9days). Host strain: DBY747. pAF2 (YE<sub>p</sub> type, THA resistance); pL1 (YE<sub>p</sub> type); pAF1 (YC<sub>p</sub> type, THA resistance); YCU p4 (YC<sub>p</sub> type)



### 2-3 THA 耐性遺伝子の塩基配列と変異点の決定

THA 耐性形質をコードする遺伝子領域を限定するため、サブクローニングを行った。Fig. 1-3 の様にサブクローニングを行い、THA 耐性遺伝子の限定を行った。その結果、THA 耐性を示す領域は、2.1kb の *Pma*CI 断片内にあることが明かとなったため、この領域について塩基配列の決定を行った。遺伝子配列を Fig. 1-6 に示す。

配列を検討したところ、この THA 耐性変異遺伝子は、Künzler らにによって報告された *ARO4* 遺伝子[27]の変異型(*ARO4<sup>m</sup>*)であることが判明した。しかし筆者らがクローニングした変異型と Künzler 等の報告した配列とでは、コーディング領域で 2 箇所の違い（後述）がみられたため、変異点の決定を行った。

変異型遺伝子の塩基配列より 2.1kb の *Pma*CI 断片を挟み込む様なプライマーを合成し (Fig. 1-7)、協会 901 号の染色体 DNA の *Eco*RI 完全消化物を鋳型として PCR 法によりクローニングした。得られた野生型遺伝子と変異型遺伝子間で Fig. 1-8 に示す様な、様々な融合遺伝子を作成したところ、変異点は *Sph*I-*pf*MI 断片内に存在することが判明した。そこで野生型の *Sph*I-*pf*MI 断片のシーケンスを行い、変異型と比較したところ、開始コドンの下流 584 番目の C が T に変異していることがわかった (Fig. 1-6)。この結果コードするアミノ酸も 195 番目のセリンがフェニルアラニンにおきかわっていると推定された。なお福田ら[28, 29]も、オルソフルオロフェニルアラニン耐性変異株の染色体 DNA を鋳型として、PCR 法により *ARO4* の変異型遺伝子をクローニングしたことを報告している。

今回、筆者らがクローニングした変異型および野生型 *ARO4* (*ARO4<sup>m</sup>*)遺伝子の塩基配列と、報告されている *ARO4* 遺伝子の塩基配列[27, 28] との差異を Table 1-1 にまとめた。Künzler らの報告した配列と、先に述べた様にコーディング領域で 2 箇所の違いがみられたが、一つは先に示した変異点と考えられる箇所であり、もうひとつは+613~621 の配列の有無であった。後者においては、福田ら[28]の報告した配列には存在しているので、今回の変異には関係ないものと思われる。一方、福田ら[28]の報告した変異型遺伝子では、開始コドン下流 496 番目の C が A に変異していると報告されており、筆者らがクローニングした変異遺伝子とは変異点は異なっていた。なお THA 耐性を示す遺伝子の変異箇所は、酵母の *ARO4* および *ARO3*[30]、大腸菌の DAHP 合成酵素 (3 種類) 全てで保存されている部位に生じていた (Fig.1-9)。

```

CACGTGATCA ACAGCAAATT ATGTACTCGT ATATATGCAA GCGCATTCCCT TATATTGACA -492
CTCTTTTCATT GGGCATGAGG CTGTGTAAAC ATAAGCTGTA ACGGTCTCAC GGAACACTGT -432
GTAGTTGCAT TACTGTCAGG CAGTTATGTT GCTTAATATA AAGGCAAAGG CATGGCAGAA -372
TCACTTTAAA ACGTGGCCCC ACCCGCTGCA CCCTGCGCAT TTTGTACGTT ACTGCGAAAT -312
GACTCAACGA TGAAATGAAA AAATTCTGCT TGAAATTTTG AAAAAAAAAAT GTGCGGGACG -252
CATTGTTAGC TCATTGAATA CATCGTGATC GAATCCAATC AATGTTTAAAT TTCATATTAA -192
TACAGAAACT TTTTCTCATA CTTTCTTCTT CTTTTCATTG GTATATTATC TATATATCGT -132
GTTAATTCTT CTTTCGTCAT TTTTAGCATC GTTATAAGAG TAATTAAGAA TAACTAGAAG -72
AGTCTCTCTT TATATTCGTT TATTTTATAT ATTTAACCGC TAAATTTAGT AAACAAAAGA -12

          +1                               SphI
ATCTATCAGA A      ATG AGT GAA TCT CCA ATG TTC GCT GCC AAC GGC ATG +36
                   MET Ser Glu Ser Pro Met Phe Ala Ala Asn Gly Met

CCA AAT GTA AAT CAA GGT GCT GAA GAA GAT GTC AGA ATT TTA GGT TAC GAC +87
Pro Asn Val Asn Gln Gly Ala Glu Glu Asp Val Arg Ile Leu Gly Tyr Asp

CCA TTA GCT TCT CCA GCT CTC CTT CAA GTG CAA ATC CCA GCC ACA CCA ACT +138
Pro Leu Ala Ser Pro Ala Leu Leu Gln Val Gln Ile Pro Ala Thr Pro Thr

TCT TTG GAA ACT GCC AAG AGA GGT AGA AGA GAA GCT ATA GAT ATT ATT ACC +189
Ser Leu Glu Thr Ala Lys Arg Gly Arg Arg Glu Ala Ile Asp Ile Ile Thr

GGT AAA GAC GAC AGA GTT CTT GTC ATT GTC GGT CCT TGT TCC ATC CAT GAT +240
Gly Lys Asp Asp Arg Val Leu Val Ile Val Gly Pro Cys Ser Ile His Asp

TTA GAA GCC GCT CAA GAA TAC GCT TTG AGA TTA AAG AAA TTG TCA GAT GAA +291
Leu Glu Ala Ala Gln Glu Tyr Ala Leu Arg Leu Lys Lys Leu Ser Asp Glu

TTA AAA GGT GAT TTA TCC ATC ATT ATG AGA GCA TAC TTG GAG AAG CCA AGA +342
Leu Lys Gly Asp Leu Ser Ile Ile Met Arg Ala Tyr Leu Glu Lys Pro Arg

ACA ACC GTC GGC TGG AAA GGT CTA ATT AAT GAC CCT GAT GTT AAC AAC ACT +393
Thr Thr Val Gly Trp Lys Gly Leu Ile Asn Asp Pro Asp Val Asn Asn Thr

TTC AAC ATC AAC AAG GGT TTG CAA TCC GCT AGA CAA TTG TTT GTC AAC TTG +444
Phe Asn Ile Asn Lys Gly Leu Gln Ser Ala Arg Gln Leu Phe Val Asn Leu

ACA AAT ATC GGT TTG CCA ATT GGT TCT GAA ATG CTT GAT ACC ATT TCT CCT +495
Thr Asn Ile Gly Leu Pro Ile Gly Ser Glu Met Leu Asp Thr Ile Ser Pro

CAA TAC TTG GCT GAT TTG GTC TCC TTC GGT GCC ATT GGT GCC AGA ACC ACC +546
Gln Tyr Leu Ala Asp Leu Val Ser Phe Gly Ala Ile Gly Ala Arg Thr Thr

```

**Fig. 1-6** Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the mutated *S.cerevisiae* K901-T12 *ARO4* gene (THA resistance gene), and wild type sequence from K901. The nucleotide sequence is numbered from the initiation codon ATG(+1).

GAA TCT CAA TTG CAC AGA GAA TTG GCC TCC GGT TTG TTT TTC CCA GTT GGT +597  
 Glu Ser Gln Leu His Arg Glu Leu Ala Ser Gly Leu Phe Phe Pro Val Gly  
 TCT  
 Ser  
 Wild type

TTC AAG AAC GGT ACC GAT GGT ACT TTA AAT GTT GCT GTG GAT GCT TGT CAA +648  
 Phe Lys Asn Gly Thr Asp Gly Thr Leu Asn Val Ala Val Asp Ala Cys Gln

PfIMI

GCC GCT GCT CAT TCT CAC CAT TTC ATG GGT GTT ACT AAG CAT GGT GTT GCT +699  
 Ala Ala Ala His Ser His His Phe Met Gly Val Thr Lys His Gly Val Ala

GCT ATC ACC ACT ACT AAG GGT AAC GAA CAC TGC TTC GTT ATT CTA AGA GGT +750  
 Ala Ile Thr Thr Thr Lys Gly Asn Glu His Cys Phe Val Ile Leu Arg Gly

GGT AAA AAG GGT ACC AAC TAC GAC GCT AAG TCC GTT GCA GAA GCT AAG GCT +801  
 Gly Lys Lys Gly Thr Asn Tyr Asp Ala Lys Ser Val Ala Glu Ala Lys Ala

CAA TTG CCT GCC GGT TCC AAC GGT CTA ATG ATT GAC TAC TCT CAC GGT AAC +852  
 Gln Leu Pro Ala Gly Ser Asn Gly Leu Met Ile Asp Tyr Ser His Gly Asn

TCC AAT AAG GAT TTC AGA AAC CAA CCA AAG GTC AAT GAC GTT GTT TGT GAG +903  
 Ser Asn Lys Asp Phe Arg Asn Gln Pro Lys Val Asn Asp Val Val Cys Glu

CAA ATC GCT AAC GGT GAA AAC GCC ATT ACC GGT GTC ATG ATT GAA TCA AAC +954  
 Gln Ile Ala Asn Gly Glu Asn Ala Ile Thr Gly Val Met Ile Glu Ser Asn

ATC AAC GAA GGT AAC CAA GGC ATC CCA GCC GAA GGT AAA GCC GGC TTG AAA +1005  
 Ile Asn Glu Gly Asn Gln Gly Ile Pro Ala Glu Gly Lys Ala Gly Leu Lys

TAT GGT GTT TCC ATC ACT GAT GCT TGT ATA GGT TGG GAA ACT ACT GAA GAC +1056  
 Tyr Gly Val Ser Ile Thr Asp Ala Cys Ile Gly Trp Glu Thr Thr Glu Asp

GTC TTG AGG AAG TTG GCT GCT GCT GTC AGA CAA AGA AGA GAA GTT AAC AAG +1107  
 Val Leu Arg Lys Leu Ala Ala Ala Val Arg Gln Arg Arg Glu Val Asn Lys

AAA TAG ATGTTTTTTT AATGATATAT GTAACATACA TTCTTTCTC TACCACTGCC +1163  
 Lys \*\*\*

AATTCGGTAT TATTTAATTG TGTTTAGCGC TATTTACTAA TTAAGTAGAA ACTCAATTTT +1223

TAAAGGCAAA GCTCGCTGAC CTTTCACTGA TTTCGTGGAT GTTATACTAT CAGTTACTCT +1283

TCTGCAAAAA AAAATTGAGT CATATCGTAG CTTTGGGATT ATTTTCTCT CTCTCCACGG +1343

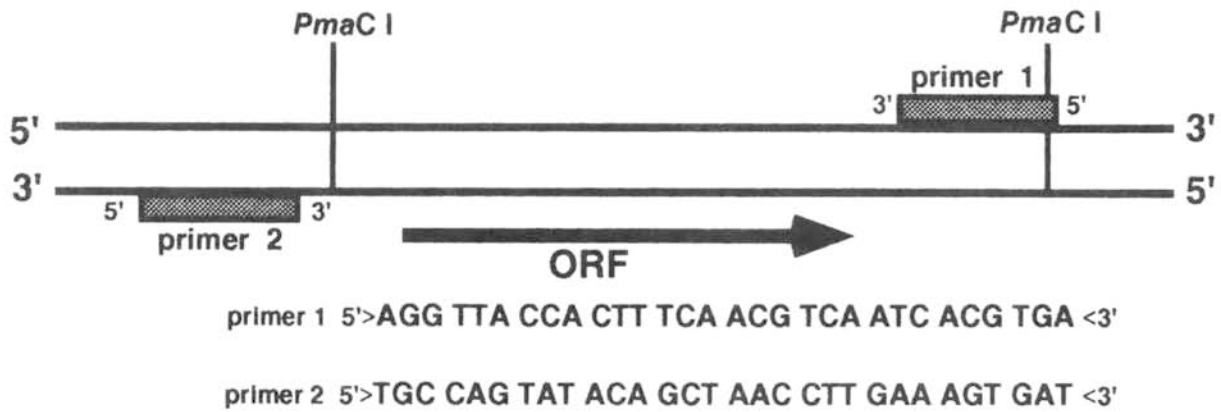
CTAATTAGGT GATCATGAAA AAATGAAAAA TTCATGAGAA AAGAGTCAGA CATCGAAACA +1403

TACATAAGTT GATATTCCTT TGATATCGAC GACTACTCAA TCAGGCTTTA AAAGAAAAGA +1463

GGCAGCTATT GAAGTAGCAG TATCCAGTTT AGGTTTTTTG ATTATTTATA AGTAAAGAAA +1523

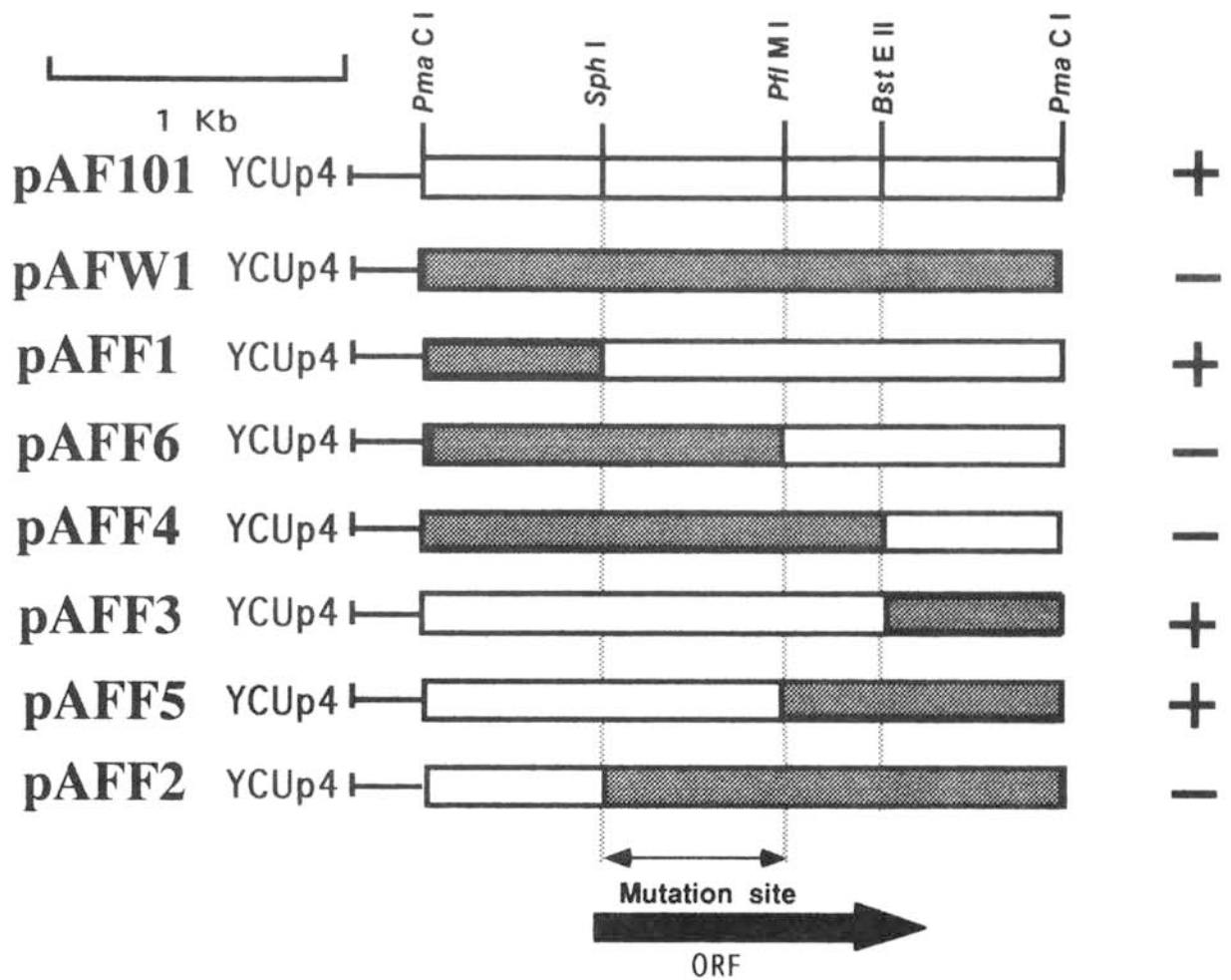
AAGAAAATGC CGGTCGTTCA CGTG +1547

Fig. 1-6 continued.



**Fig. 1-7** Amplification of wild type gene corresponding to *THA'* gene by PCR. The PCR was done in a 100  $\mu$ l volume with the following components: 10  $\mu$ l 10xTaq DNA polymerase reaction buffer (100mM Tris-HCl pH8.3, 500mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% gelatin), 4  $\mu$ l dNTP mixture (2.5mM), 1  $\mu$ l upstream and downstream primer (25uM), 0.5  $\mu$ l Taq DNA polymerase (5U/  $\mu$ l), Takara, 5.6  $\mu$ l template DNA solution which were *Eco*RI-digested fragments of K901 chromosomal DNA (0.176  $\mu$ g /  $\mu$ l), and 78  $\mu$ l H<sub>2</sub>O. A layer of mineral oil was placed over the reaction mixture. Amplifications were carried out in a QUICK THERMO II (NIPPON GENETICS), using the step-cycle program set to denaturing at 96°C for 30sec, annealing at 65°C 30sec, extending at 72°C for 3min, 35 cycles.

*ARO4* 遺伝子は、芳香族アミノ酸生合成系の出発物質である DAHP の合成酵素 (DAHP synthetase) をコードする遺伝子である。この酵素には、*S.cerevisiae* では、2 種のアイソザイムが存在し、一つはチロシンによりフィードバック阻害を受け、もう一つはフェニルアラニンで阻害を受ける (*ARO3* でコードされている) 点で異なっている (Fig. 1-1)。*ARO4* タンパク質は、これらのうちのチロシンにより阻害を受ける酵素である [31, 32]。このことより *THA* 耐性株 K901-T12 における耐性変異機構は、DAHP 合成酵素のチロシンによるフィードバック阻害からの脱感作によるものと考えられる。つまり脱感作により、チロシンとともに濃度が増大するフェニルアラニンでアナログ効果が希釈されるため、耐性を獲得したものと思われる。その結果、耐性株ではフェニルアラニン生合成の副生物である  $\beta$ -フェネチルアルコールが多量に生産されたものと考えられる。



**Fig. 1-8** Location of the *S. cerevisiae* strain K901-T12 THA resistant mutation. pAFF1-6 were constructed from pAF101 containing *THAr* gene and pAFW1 containing wild-type gene by partial exchange in 2.1Kb PmaCI fragments. Plasmid DNAs were used to transform *S. cerevisiae* DBY747. Plasmids which transformed to THA resistance are shown as (+).

Table 1-1. The list of differences in the nucleotide sequence of the *ARO4* genes from different sources.

Position* <sup>1</sup>	Künzler et al.27)	Fukuda et al.28)	This study	Change in ORF* <sup>2</sup>
	S288C	X1B-0-1/X2180-1B	K901-T12/K901	
	wild haploid	mutant/wild haploid	mutant/wild diploid	
-336	T	T	C	
-286	T	T	C	
-264	G	G	A	
-123	C	C	T	
42	G	G	T	
241	C	C	T	
496	C	A/C	C	Gln to Lys
556	C	C	T	
584	C	C	T/C	Ser to Phe
+613~621	deleted	GATGGTACC	GATGGTACT	Asp,Gly,Thr* <sup>3</sup>
+1059(+1068)	A	A	G	
+1130(+1139)	G	G	A	

\*1: Numbering refers to the A(+1) of the first ATG in the ORF of the *ARO4* gene isolated by Künzler et al.27) ( ) indicates position of Fukuda et al. and this study.

\*2: *ARO4* mutant genes isolated by Fukuda et al.28) or this study compared with the *ARO4* gene isolated by Künzler et al.27)

\*3: inserted

			(1)	(2)	
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Aro4</i> <sup>27</sup>	170	DLVSFGAIGARTTESQLHRELASGLFPPVGFKNGT	DGTLNVAVDACQAAA	219
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Aro4</i>	170	DLVSFGAIGARTTESQLHRELASGLSFPVGFKNGT	..LNVAVDACQAAA	216
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Aro3</i>	163	DCFSLGAIGARTTESQLHRELASGLSFPVGFKNGT	DGGLQVAIDAMRAAA	205
<i>E. coli</i>	<i>AroF</i>	156	DLFSWSAIGARTTESQTHREMASGLSMPVGFKNGT	DGSLATAINAMRAAA	212
<i>E. coli</i>	<i>AroG</i>	155	DLMSWGAIGARTTESQVHRELASGLSCPVGFKNGT	DGTIKVAIDAINAAG	204
<i>E. coli</i>	<i>AroH</i>	154	DLISWGAIGARTTESQIHREMASALS	CPVGFKNGT DGNITRIAVDAIRAAA	203

Fig. 1-9. Partial comparison of deduced DAHPs amino acids sequences from various species. Sequences derived from *S.cerevisiae* (*S.c. ARO4*: Künzler et al.<sup>27</sup>); *S.c. ARO3*: Teshida et al.<sup>30</sup>), *E.coli* (*E.c. aroF*: Schultz et al.<sup>73</sup>), *E.c. aroG*: Davies and Davidson,<sup>74</sup>); *E.c. aroH*: Zurawski et al.<sup>75</sup>) were aligned, and the deduced amino acid sequence of THA resistant gene, mutated *ARO4*(top lines). (1) : The different site of deduced amino acid between the THA resistant gene and one of the reported *ARO4* (Künzler et al.<sup>27</sup>). (2) : The region of deduced amino acid sequences contained in the THA resistant gene, which was not exist in the reported *ARO4* (Künzler et al.<sup>27</sup>).

### 第三節 遺伝子組換えによるβ-フェネチルアルコール高生産性清酒酵母の育種

#### 1 目的

プラスミド pAF1 (Fig. 1-3)および相同組換え用プラスミド pAF1-9P, pAF101P1 を用いてβ-フェネチルアルコール高生産性清酒酵母の分子育種を試みた (Fig. 1-10)。

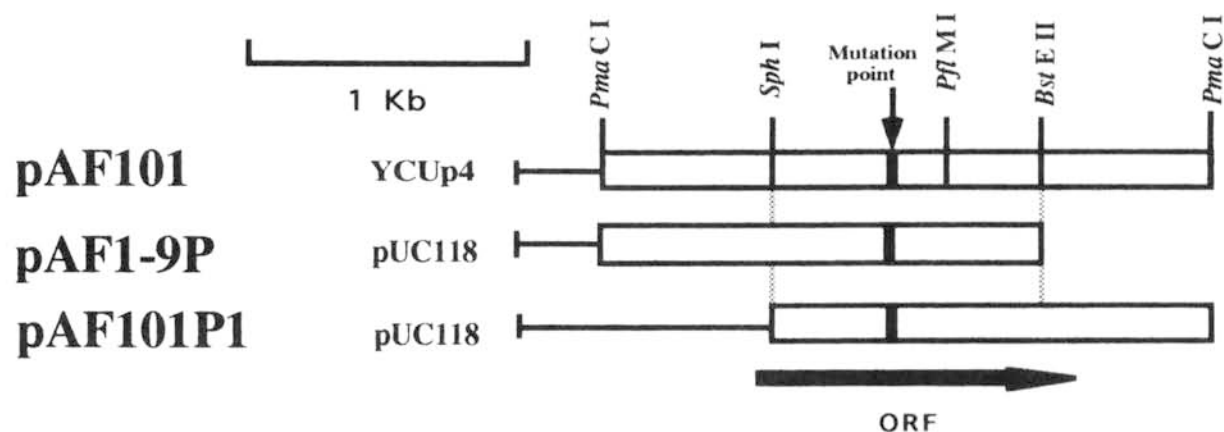


Fig. 1-10 Plasmids used for homologous recombination. ORF indicate the *ARO4* gene.

#### 2 実験材料および方法

難波らの方法[33]に準じて総米 200 gで行った。仕込み配合を Table 1-2 に示す。15℃一定温度で、留め後 17 日目に遠心分離により上槽した。

Table 1-2. Components in sake mash.

addition	first <sup>*3</sup>		second (naka)	last (tome)	Total
	(mizu koji)	(soe)			
Total rice (g)	10	25	65	100	200
Steamed rice <sup>*1</sup> (g)		25	55	80	160
Koji rice <sup>*2</sup> (g)	10		10	20	40
Water (ml)	70		100	190	360

\*1: α rice

\*2: dried koji

\*3: 2ml lactic acid solution (5ml lactic acid, 0.65g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.25g NaCl / 100ml water) was added.

### 3 実験結果および考察

#### 3-1 プラスミドベクターを利用した育種

安定性の高い YCp 型のプラスミド pAF1 を形質転換に用い、5mg/ml の THA を含む SD 寒天培地に塗布して、生じたコロニーより協会 901 号の形質転換体を分離した。4 株の形質転換体を用いて小仕込試験を行ったところ、形質転換株は全て、THA 耐性変異株と同等の  $\beta$ -フェネチルアルコール高生産性を示した (Table 1-3)。また変異株同様[5]、清酒のごく味成分[7]であるチロソールおよびトリプトフォールも高生産した。

Table 1-3 Aroma components in crude sake.

Strain	PheOH	PheOAC	Tyrosol	Tryptophol
	mg/l			
K901	152	5.8	158	11.4
K901-T12	589	19.1	773	47.5
TF-1	617	19.7	718	19.2
TF-2	592	20.0	713	47.5
TF-3	608	20.3	659	42.3
TF-4	597	18.9	713	48.2

TF1~4: Transformants of K901 by plasmid pAF1.

PheOH,  $\beta$ -phenethyl alcohol; PheOAC,  $\beta$ -phenethyl acetate

#### 3-2 相同的組換えを利用した育種

安定で外来遺伝子を含まない組換え体を造成するため、酵母内での自律増殖が不可能で変異を持つ *ARO4* 遺伝子を含むプラスミド pAF1-9P、および pAF101P1 を用い、相同的組換え法による育種を試みた。プラスミド pAF101-P1 は、プラスミド pAF101 の *SphI*-*PmaCI* 間 1.5Kbp 断片を平滑末端化した後、プラスミド pUC118 の *SmaI* 部位に挿入して構築した。またプラスミド pAF1-9p は、プラスミド pAF101 より *PmaCI*-*BstEII* 間 1.5Kbp 断片を平滑末端化した後、プラスミド pUC118 の *SmaI* 部位に挿入して構築した。前者では *ARO4<sup>m</sup>* 遺伝子の N 末側を、後者では C 末側を欠失している。それぞれのプラスミド(25 $\mu$ g)を *EcoRI* または *BamHI* で消化して直鎖化した後、協会 901 号を形質転換し、5mg/ml の濃度で THA を含む最少培地に塗布した。pAF101-P1 で形質転換したものは、シャーレに 144 個のコロニーが生じ、



pAF1-9P では 208 個が生じた。この時、プラスミド YCU<sub>p</sub>4 で形質転換したプランクにはコロニーは生じなかった。それぞれのシャーレより 3 株ずつを形質転換体として分離して、発酵試験に供したところ、高い  $\beta$ -フェネチルアルコール生産性を示し、実醸造への使用の可能性が示唆された (Fig. 1-11)。

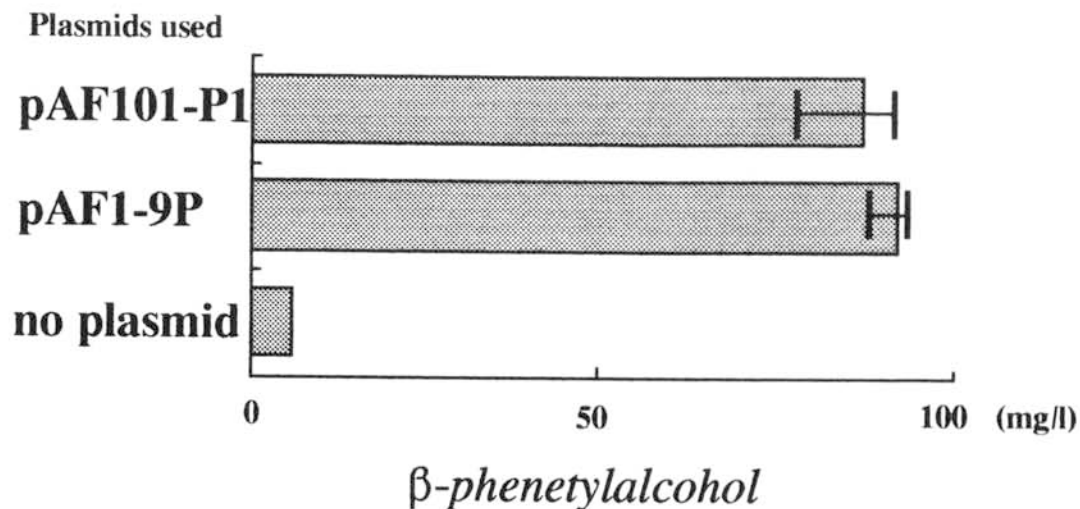


Fig.1-11  $\beta$ -phenethylalcohol productivity of transformants in fermentation test. Host strain is K901. Bar indicates the average  $\pm$  standard deviation ( $n = 3$ ). Plasmid pAF101-P1 was constructed by inserting the 1.5-Kbp *SphI*-*PmaCI* fragment of pAF101 at the *SmaI* site of pUC118 after blunt-ending the *SphI* end. Plasmid pAF1-9P was constructed by inserting the 1.5-Kbp *PmaCI*-*BstEII* fragment of pAF101 at the *SmaI* site of pUC118 after blunt-ending the *BstEII* end. Plasmid pAF101P1 and pAF1-9P were used for homologous recombination after digestion with *Bam*HI, and *Eco*RI, respectively.

#### 第四節 要約

$\beta$ -フェネチルアルコール高生産性酵母を遺伝子組換え法により育種するため、 $\beta$ -チエニルアラニン耐性変異株 (K901-T12)より遺伝子バンクを作成し、ショットガンクローニングにより  $\beta$ -フェネチルアルコール高生産性を付与する THA 耐性変異遺伝子をクローニングした。この遺伝子は、塩基配列より、*ARO4* 遺伝子の変異型 (*ARO4<sup>m</sup>*)であり、その変異は構造遺伝子中での点変異によるものであることがわかった。協会 901 号をこの *ARO4<sup>m</sup>* 遺伝子を含む YC<sub>p</sub> 型のプラスミド pAF1 で形質転換したところ、形質転換株は、清酒の小仕込試験において、親株に比べ約 4 倍の  $\beta$ -フェネチルアルコール高生産性を示した。また変異点を含む *ARO4<sup>m</sup>* 欠失遺伝子を挿入した 2 種類のプラスミド pAF101-P1 および pAF1-9P を用いて、相同的組換え法により協会 901 号を形質転換したところ、得られた形質転換株は発酵試験において高い  $\beta$ -フェネチルアルコール生産性を示した。

## 第 2 章

# $\beta$ -チエニルアラニン耐性変異遺伝子の 利用

## 第2章 $\beta$ -チエニルアラニン耐性変異遺伝子の利用

### 第一節 緒言

酵母の分子育種のためには、形質転換株の選択のため、マーカーとなる遺伝子が必要とされる。一般には、アミノ酸等の栄養要求性を持つ宿主を用い、その栄養要求性を相補する遺伝子をマーカーとして用いられることが多い。醸造用酵母では、栄養要求性を付与するための変異処理は、醸造特性に関与する遺伝子を傷つける可能性があるため、できるかぎり避けたい。この変異処理によるダメージを最少限に押さえる手法がいくつか開発されてはいる[34, 35]が、一般的には宿主に変異処理を施すことを必要としないベクターが望ましい。そこで、今回分離した $\beta$ -チエニルアラニン耐性変異 ( $THA^r$ )遺伝子 ( $ARO4^m$  遺伝子のことであるが、以降マーカーとして使用する場合は、こちらの略称を用いる) を用い、優性的な選択が可能なベクターの開発を試みた。なお同様な試みは、近年他の遺伝子を用いて多数なされている[36]。

一方、遺伝子の導入だけでなく、酵母の遺伝子を破壊する操作が、それらの遺伝子が持つ役割を解明する上で必須の項目となってきている。その場合にも、破壊株の選択にはマーカー遺伝子が必要とされる。実験室株では、宿主に多数の栄養要求性が付与されており、それらを相補する遺伝子がマーカーとして用いられている。しかし複数の遺伝子の多重破壊には、破壊する遺伝子の数だけマーカー遺伝子が必要とされていた。既に、 $THA^r$  遺伝子は酵母の出芽制御に関わる遺伝子の多重破壊にマーカーとして用いられ、良好な結果を得ており[37]、活用が可能と考えられた。また先に述べた様に、栄養要求性が付与されていない醸造用酵母の破壊には、ポジティブセレクションが可能な  $THA^r$  遺伝子は、より適したマーカーであるとも考えられた。遺伝子破壊の操作は、まず目的遺伝子の構造遺伝子部位にマーカー遺伝子を挿入し、破壊用プラスミドを構築する。次に、プラスミドを制限酵素処理して直鎖化した後、酵母に導入して低頻度で起こる相同組換え株をマーカーを指標として選択する。しかし実際には、破壊用プラスミドの構築に多大な労力を必要とする。なぜなら挿入されたマーカー遺伝子は、一部を除き酵母のみに有効であり、破壊用プラスミドを選択する場合必要とされる大腸菌でのマーカーにはならない。さらに目的遺伝子はベクターに挿入されているため、新たにマーカー遺伝子が挿入されたプラスミドが作成できても、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性による選択ができない。そのため、多数の形質転換体のスクリ

ーニング、もしくは RI を用いたコロニーハイブリダイゼーションや PCR をしなければ、破壊用プラスミドの選択ができない。そこで、より簡便に酵母遺伝子の破壊を行うため、酵母でのマーカー遺伝子と大腸菌でのマーカー遺伝子をセットとして組み込んだ、遺伝子破壊用カセットの構築を試みた。

## 第二節 優性的な選択が可能な酵母-大腸菌シャトルベクターの構築

### 1 実験材料および方法

使用プラスミド： pUF01 (Fig. 2-1 参照), pCV6[22] (Fig. 2-1 参照)

その他の菌株、プラスミド、使用培地、遺伝子工学的な手法および形質転換法は第 1 章と同じ。

### 2 実験結果および考察

プラスミド pAF1 の THA 耐性変異遺伝子領域を含む 4.2 kb *Bam*HI 断片を切り出し、クロラムフェニコール耐性のプラスミド pHSG398 の *Bam*HI 部位に挿入し、プラスミド pAFp1-1 を得た。このプラスミドを *Pma*CI 消化後、*Eco*O109I 消化後平滑末端化した 2 ミクロンオリジンを持つプラスミド pUF01 と混和・ライゲーションし *THA<sup>r</sup>* 遺伝子(2.1 kb *Pma*CI 断片)、2 ミクロンオリジン、アンピシリン耐性およびマルチクローニングサイトを有する YEp 型ベクター pAFT1 を造成した (Fig. 2-1)。同様に *CEN4* 及び *ARS1* を持つプラスミド pCV6 の *Nar*I 部位への *ARO4<sup>m</sup>* 遺伝子を含む *Pma*CI 断片の挿入により、YCp 型のベクター pAFH2 を造成した。これらのベクターを用いた酵母の形質転換効率は、*URA3* を選択符合とする YCU<sub>p</sub>4 に比べ約 1/3 ほどに下がったが、効率的に THA 耐性の形質転換株を分離できた (2x10<sup>3</sup> 個/μgDNA, DBY747 株)。

さらに相同組換え用に、プラスミド pAF2D25 (Fig. 1-2)と pUC118 の *Eco*RI による消化物の結合により、プラスミド pAF2D25p (Fig. 2-2) を構築した。このプラスミドは、*THA<sup>r</sup>* 遺伝子コード領域のほか、その下流約 800 bp の領域を含んでいる。この領域には制限酵素 *Ba*II、*Pma*CI 切断部位が存在する。実験例として、*URA3* 遺伝子を含む *Hind*III-*Sma*I 断片を平滑末端化した後、pAF2D25p の *Ba*II 部位に挿入しプラスミド pUURT25 (Fig. 2-2) を構築した。このプラスミドを *Bam*HI で消化し

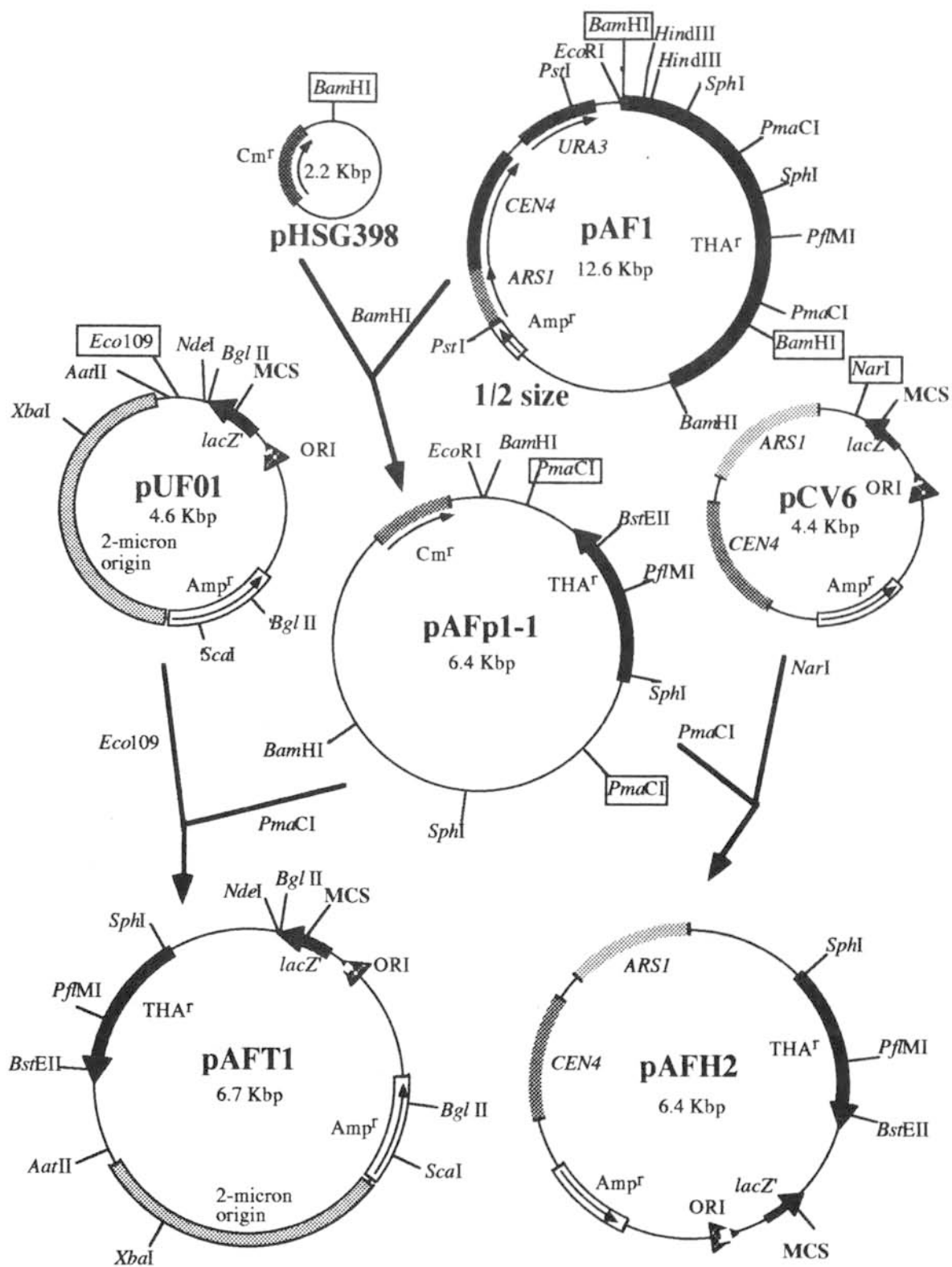


Fig. 2-1. Construction of plasmids pAFT1 and pAFH2 used for dominant selection.

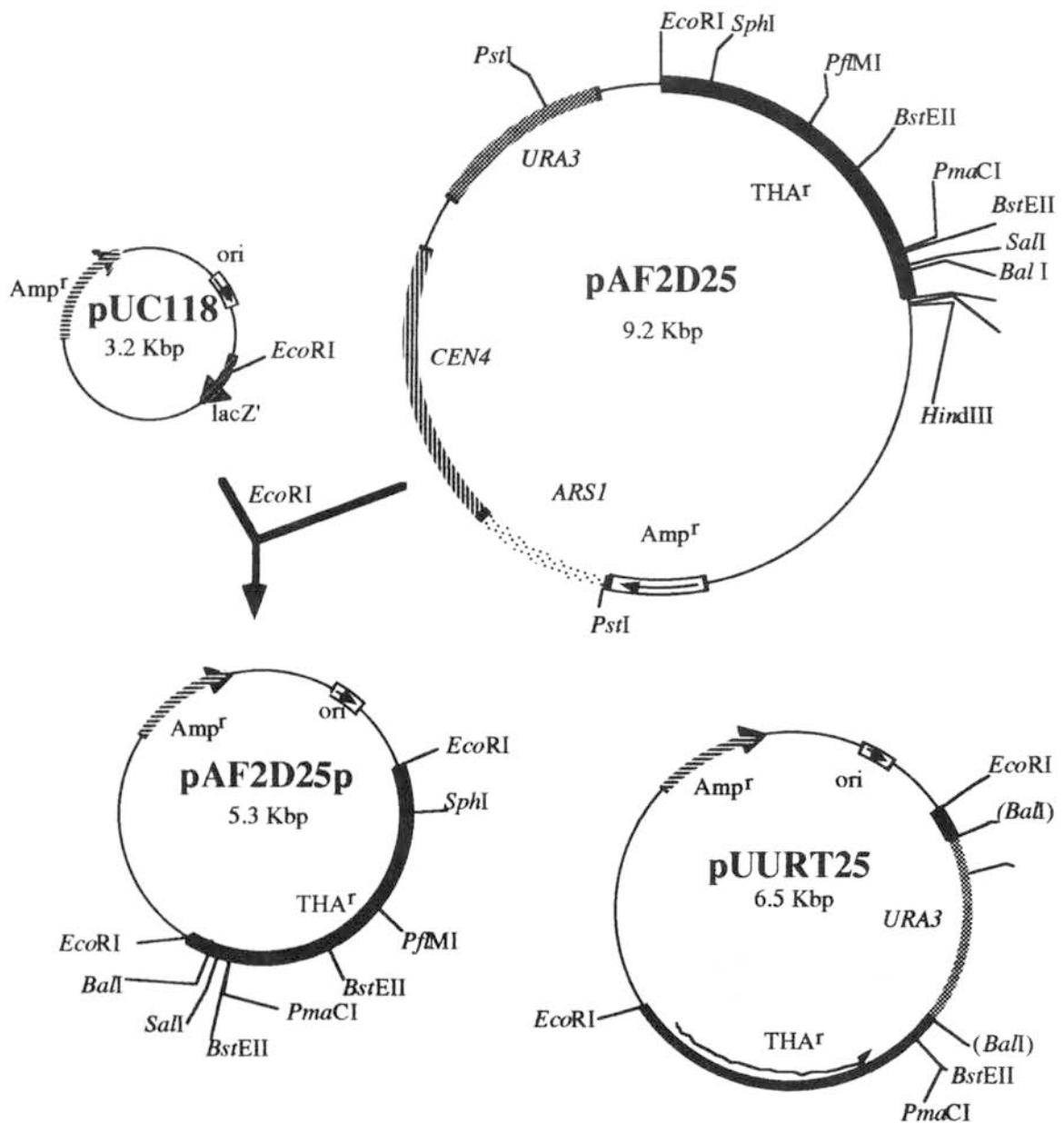


Fig. 2-2. Construction of plasmid pAF2D25p used for homologous recombination. Plasmid pUURT25 was constructed by insertion of a 1.1 kb *HindIII-SmaI* *URA3* fragment gene to the *BalI* site of plasmid pAF2D25p after blunt-ending the *HindIII* end.

て直鎖化した後、DBY747株を形質転換し、0.02mg/mlの濃度でTHAを含む最少培地(*leu, trp, his* 添加)に塗布したところ、頻度は低いもののTHA耐性かつウラシル非要求性組換え株を分離することができた(3個/ $\mu$ gDNA)。このことは相同的な組換え法で形質転換した場合、形質転換体の選択が難しい遺伝子でも、*THA<sup>r</sup>*遺伝子およびその下流の遺伝子で、挿入したい遺伝子を挟み込む形のDNAを作成しておけば、相同的組換えによって、外来遺伝子を染色体の*ARO4*遺伝子下流に組み込むことが可能であることを示唆した。

### 第三節 遺伝子破壊用カセットの構築

#### 1 実験材料および方法

使用プラスミド:大腸菌での選択マーカーとして有効なカナマイシン耐性遺伝子を含むプラスミドpNH-Kan/*oriT*[38]。その他の菌株、プラスミド、使用培地、遺伝子工学的な手法および形質転換法は第1章と同じ。

#### 2 実験結果および考察

THA耐性変異遺伝子を有する遺伝子破壊用カセットは以下の様に構築した(Fig. 2-3)。

THA耐性遺伝子を含むプラスミドpAFp1-1(Fig. 2-1)の3.2kb、*EcoRI-HindIII*断片を切り出し、pUC13の*EcoRI-HindIII*部位に挿入した(pAF111)。このことによりTHA耐性遺伝子の停止コドン下流の2箇所の*EcoRV*切断部位を1箇所にした。その残った*EcoRV*部位(停止コドン下流225bp)にプラスミドpNH-Kan/*oriT*の1.8kb, *Km<sup>r</sup>*遺伝子を含む*BamHI*断片を平滑末端化した後、挿入した。このままでも利用は可能であったが、さらにこの構築したプラスミドの*THA<sup>r</sup>*および*Km<sup>r</sup>*遺伝子を含む5kb、*HindIII*断片(THAカセット)をプラスミドpHSG398に移し換え、プラスミドpHTHAKmを構築した。実際に用いる場合には、破壊したい遺伝子(アンピシリン耐性のマーカーを持つベクターに乗っている)の構造遺伝子部分に切断箇所を持つ適当な制限酵素部位に(平滑末端を作る酵素または粘着末端を作る酵素でも平滑末端化すれば可能、但しベクターに存在しないもの)、pHTHAKmを*HindIII*で切断し、*Fill-in*により平滑末端化した断片の挿入を行えば良い。目的プラスミドを

持つ大腸菌形質転換体のスクリーニングは、アンピシリンとカナマイシンを含む培地に生育してきたクローンを選択することにより容易に行なえる。

同様に pUC13 の *Hind*III, *Bam*HI 部位にそれぞれ *URA3* 遺伝子 1.1 kb *Hind*III およびプラスミド pNH-Kan/*ori*T 由来の 1.8kb, *Km*<sup>r</sup> 遺伝子 *Bam*HI 断片を挿入して、酵母での選択マーカーとして *URA3* を、また大腸菌での選択マーカーを *Km*<sup>r</sup> とする遺伝子破壊用カセットを構築した(Fig. 2-3)。なお、このままでは *URA3* 遺伝子と *Km*<sup>r</sup> 遺伝子の間に多数の制限酵素部位が存在してしまうため、*Hind*III で切断後、再ライゲーションして、それら多数の制限酵素部位を持つ小断片を除去した。この様にして作成したプラスミド pURAKm より、*URA3* および *Km*<sup>r</sup> 遺伝子を含む 2.4 kb *Sma*I 断片 (*URA3* カセット) を切り出して使用することにより、遺伝子破壊用プラスミドの構築が容易にできる。後述する (第 3 章および第 4 章) 各種有機酸生成関連遺伝子の破壊に上記 2 種類の破壊用カセットを用いたところ、容易に破壊用プラスミドの構築が可能であった。またそれらプラスミドを用いた TCA 回路群酵素遺伝子の破壊では、得られた形質転換体 1~4 株の内 1 株はグリセロール資化性を失った目的株であり (Table 2-1)、実用的に十分満足できるものであった。なお現在では、一つのマーカー遺伝子を複数回用いて酵母の遺伝子を多重破壊する手法が開発されている[39] が、それにしても手数がかかるため、今回構築した破壊用カセットは簡易に酵母遺伝子の破壊が行える点で有効であると思われる。

Table 2-1 Integration efficiencies.

Strain	plasmid <sup>a</sup>	ORF	percent transformants harbouring the correct integration <sup>b</sup>	
DBY747 <sup>c</sup>	pACOU1	<i>ACO1</i>	32	(6/19)
DBY747	pKGDU1	<i>KGD1</i>	97	(35/36)
DBY747	pFUMU1	<i>FUM1</i>	75	(9/12)
DBY747	pFUMT1	<i>FUM1</i>	81	(29/36)
K901SDHU1 <sup>d</sup>	pSDHT1	<i>SDH1</i>	47	(17/36)

<sup>a</sup>See Table3-2 and 4-2.

<sup>b</sup>Correct integration was determined by glycerol assimilation property (number of glycerol non-assimilating transformants/total number of transformants checked).

<sup>c</sup> *his3-Δ1, leu2-3, 112, trp1-289a, ura3-52, Mat a*

<sup>d</sup> *SDH1::URA3, Mat a/α*



#### 第四節 要約

クローニングした THA 耐性遺伝子を用いて、マルチクローニング部位を有し、優性的な選択が可能な YEp 型および YCp 型の酵母-大腸菌シャトルベクター、ならびに相同的な組換え法において組換え株の選択が難しい遺伝子を、酵母染色体上の *ARO4* 遺伝子下流部位に挿入し、THA 耐性を指標として選択を可能にする相同組換え用ベクターを構築した。また THA 耐性遺伝子下流に大腸菌での選択マーカーとして  $Km^r$  遺伝子を挿入した遺伝子破壊用カセットを含むプラスミド pHTHAKm を構築した。さらに酵母での選択マーカーとして *URA3* 遺伝子を持つ、遺伝子破壊用カセットを有するプラスミド pURAKm も構築した。



## 第3章

### 実験室株を用いた酵母の 有機酸生産機構の解明

### 第3章 実験室株を用いた酵母の有機酸生産機構の解明

#### 第一節 緒言

清酒中に含まれる有機酸は風味に影響を与える物質として重要である。主としてその生成は酵母によると考えられており、TCA 回路の順回転（酸化的）による生成、逆回転（還元的）による生成、プリン合成系さらには醗末期におけるグリオキシル酸回路による生成等が提唱されている。しかしその生成機構については、未だ明かではない。この情報の欠如は、清酒もろみ中での有効な酸生成制御法の開発や有機酸生産性の異なる酵母の育種を難しくしている。そこで我々は、上記生成機構に関連する遺伝子を破壊して、酵母の有機酸生産機構について検討した。

若井ら[40]はコハク酸の還元的生成を提唱している。彼等は、各種培養条件において、酒酵母培養液中に様々な有機酸を添加して酵母のコハク酸生産性について検討した。その結果、酒もろみ中のコハク酸は、主として還元的生成系でリンゴ酸からフマル酸を経て形成されると報告している。

一方、曲淵ら[41]は実験室株 DBY746 のフマラーゼ遺伝子 (*FUM1*) [42]を破壊した株を作成し、液体培地での発酵試験および清酒醸造試験により、破壊株の有機酸生産性の検討を行った。その結果、発酵試験および清酒醸造試験のいずれにおいても、破壊株ではフマル酸の蓄積が観測されたことより、彼らはコハク酸およびリンゴ酸は TCA 回路の酸化方向の動きで生成されているのではないかと推測している。

これらの考察は真っ向から対立しており、どちらが正しいのかは明らかではない。

そこで清酒醸造時における、酵母のコハク酸、リンゴ酸およびフマル酸の生成経路を明らかにするため、各種の TCA 回路、グリオキシル酸回路の各種酵素遺伝子およびフマル酸還元酵素遺伝子の破壊を行い、その破壊による影響を検討した。清酒酵母は過去においては *Saccharomyces sake* に分類されていた時期もあったが、現在ではワイン酵母やパン酵母と同じ *Saccharomyces cerevisiae* に分類されている。既に、この酵母の TCA 回路酵素群の遺伝子は、クローニングされている。またその周辺領域もゲノムプロジェクトにより明らかにされている。さらに遺伝子破壊の手法も確立されており、TCA 回路酵素群の遺伝子破壊株の取得は可能であると判断した。本章は、TCA 回路酵素群の内、複数のアイソザイムが存在しないと考えられているアコニターゼ、 $\alpha$ -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ、コハク酸デヒドロゲナーゼ

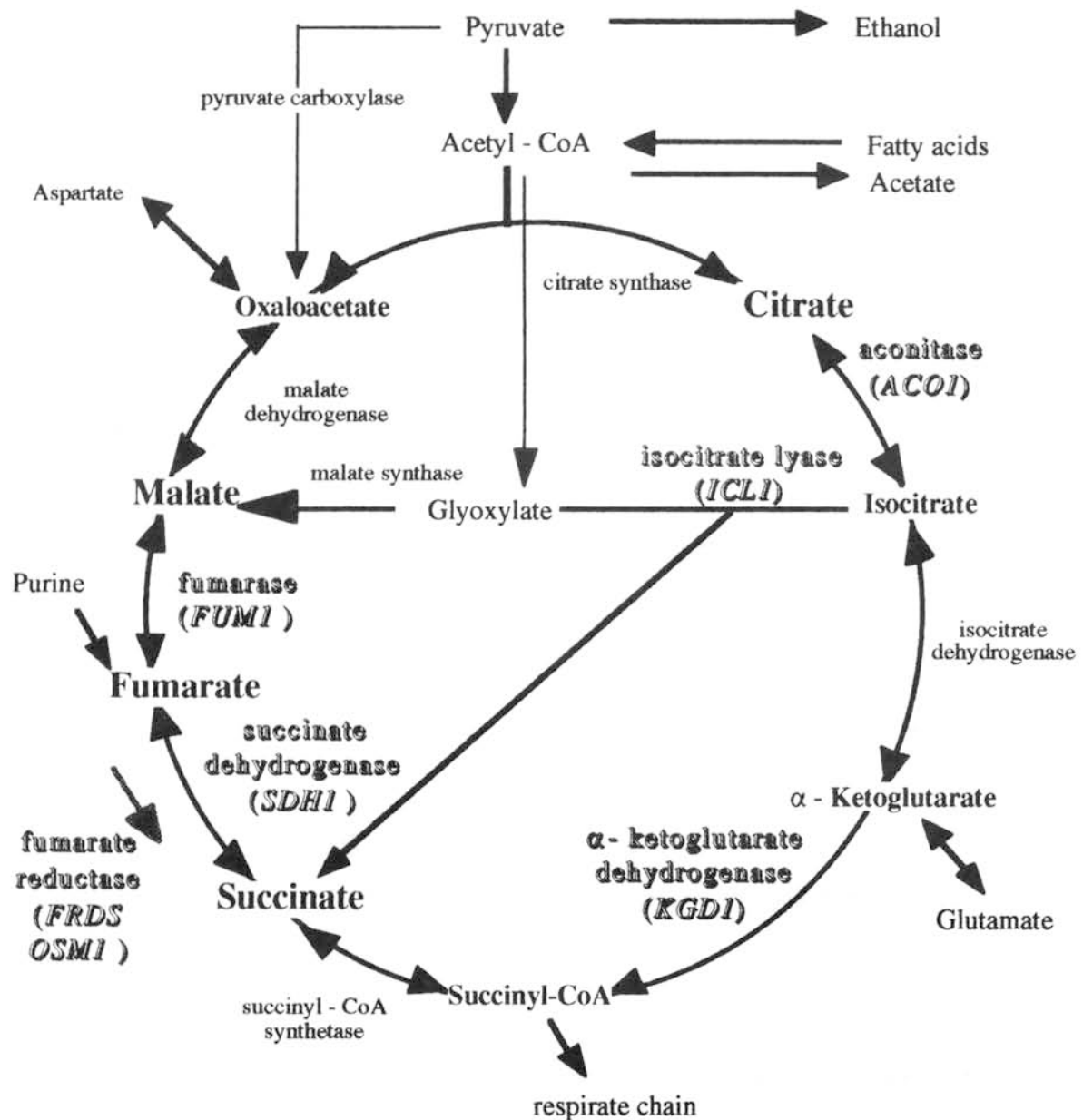


Fig. 3-1. TCA and glyoxylate cycles

およびフマラーゼ遺伝子、並びにグリオキシル酸回路の主要酵素であるイソクエン酸リアーゼ遺伝子の破壊株を造成し、それらの有機酸生産性の検討を行った(Fig. 3-1)。また細胞質での還元的コハク酸生成系で重要な役割を果たしていると考えられるフマル酸還元酵素遺伝子破壊株についても、併せて検討した(Fig. 3-1)。

TCA 回路酵素群の一つであるアコニターゼ(EC4.2.1.3)はACO1[43]にコードされ、クエン酸からイソクエン酸への酸化を可逆的に触媒する。またα-ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ(KGDI[44])は、α-ケトグルタル酸を脱炭酸し、サクシニル CoA

を生成する $\alpha$ -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ複合体の構成酵素である。遺伝子 *SDHI*[45]は、コハク酸からフマル酸への酸化を可逆的に触媒するコハク酸デヒドロゲナーゼのフラボプロテインサブユニットをコードする。さらにフマラーゼ(*FUM1*)はフマル酸からリンゴ酸への酸化を可逆的に触媒する。いずれの遺伝子も単一に存在し、アイソザイムの存在は知られていない。また上記酵素群はフマラーゼを除き、全てミトコンドリアに局在している。フマラーゼは単一の遺伝子にコードされているが、遺伝子の翻訳開始点の差により細胞質およびミトコンドリア両方に存在する。これらの TCA 回路群の酵素遺伝子の破壊は、有機酸の酸化経路での生成の有無を検討するのに有効と思われた。

グリオキシル酸回路は、幾分好気的でグルコース濃度が低い条件の酒もろみ末期では、ある程度働いているのではないかと考えられている。イソクエン酸リアーゼ (*ICL1*[46])は、このサイクルの初めに位置し、イソクエン酸をグリオキシル酸とコハク酸に分解する酵素であり、アイソザイムの存在は知られていない。

酵母のフマル酸還元酵素はフマル酸を不可逆的にコハク酸に還元する[47]。酵母の上記酵素は補酵素である flavin adenin dinucleotide (FAD)には強固に結合しないが、大腸菌[48]および *Vibrio succinognes*[49]の酵素は FAD に強固に結合し弱いながらも逆反応であるコハク酸酸化活性を有している。このことから FAD への結合性の違いが酵母の酵素の不可逆性の理由と考えられている。酵母には DE52 カラムでの吸着性の違いから少なくとも 2 種類のアイソザイムが存在すると思われ、非吸着性の酵素蛋白として *FRDS1* (細胞質局在) が、また吸着成分として *FRDS2* (プロミトコンドリア) が精製された[50]。最近、*FRDS1* をコードする遺伝子として *FRDS*[51]が、また *FRDS2* をコードする遺伝子として *OSM1*[52]がクローニングされた。既に *OSM1* については、その欠落により酵母の浸透圧耐性が低下すること[53]が報告されているが、両遺伝子がコードする酵素の代謝上の役割は未だ明らかではない。

最終的には、清酒もろみ中での実用酵母の有機酸生産機構を明らかにするのが目的ではあるが、実用酵母は倍数体のため、その遺伝子破壊は半数体の実験室株に比べると困難が予想された。また実験室株には存在しない様なアイソザイムが含まれる可能性もあった。そこで、酒もろみに類似した条件である高糖濃度下での酵母の有機酸生産機構について検討を加える目的で、まず実験室株を用い遺伝子破壊実験を試みた。

## 第二節 実験室株の TCA 回路およびグリオキシル酸回路酵素遺伝子の破壊

### 1 実験材料および方法

#### 1-1 使用菌株およびプラスミド

使用菌株、プラスミドは Table 3-1, 2 のとおり。

#### 1-2 使用培地

新たに用いた YPG,SG および YPE,SE は、それぞれ YPD,SD 培地の糖源をグルコースから 4%グリセロールおよび 3%エタノールに変更したものである。YPGG,SGG は YPG,SG にグルタミン酸を 100mg/L 濃度で添加したものである。

Table 3-1. Genotypes and sources of *S. cerevisiae* strains used in this study

Strain	Genotype* <sup>1</sup>	Source
DURA	<i>his3-Δ1, leu2-3, 112, trp1-289a, URA3</i> * <sup>2</sup>	This study
DACO	<i>ACO1::URA3, his3-Δ1, leu2-3, 112, trp1-289a</i>	This study
DKGD	<i>KGD1::URA3, his3-Δ1, leu2-3, 112, trp1-289a</i>	This study
DICLU	<i>ICL1::URA3, his3-Δ1, leu2-3, 112, trp1-289a</i>	This study
DFUMU	<i>FUM1::URA3, his3-Δ1, leu2-3, 112, trp1-289a</i>	This study
DFRDS	<i>FRDS::URA3, his3-Δ1, leu2-3, 112, trp1-289a</i>	This study
DOSM	<i>OSM1::URA3, his3-Δ1, leu2-3, 112, trp1-289a</i>	This study
DFRDOSM	<i>FRDS::URA3, OSM1::THAr, his3-Δ1, leu2-3, 112, trp1-289a</i>	This study
DSDHFUM	<i>SDH1::HIS3, FUM1::URA3, leu2-3, 112, trp1-289a</i>	This study
DFRDSDH	<i>FRDS::URA3, SDH1::HIS3, leu2-3, 112, trp1-289a</i>	This study
DBY747	<i>his3-Δ1, leu2-3, 112, trp1-289a, ura3-52</i>	YGSC* <sup>3</sup>
DSDHH	<i>SDH1::HIS3, leu2-3, 112, trp1-289a, ura3-52</i>	This study
DICLL	<i>ICL1::LEU2, his3-Δ1, trp1-289a, ura3-52</i>	This study
DFUMT	<i>FUM1::THAr, his3-Δ1, leu2-3, 112, trp1-289a, ura3-52</i>	This study

\*1 All strains were *Mat a* genotype.

\*2 Strain DURA was obtained by integrating the *URA3* gene into strain DBY747.

\*3 The Yeast Genetic Stock Center.

Table 3-2. Plasmids used in this study.

Plasmids	Contained yeast genes	Source
pSE-31	2 $\mu$ m replication origin, <i>URA3, ACO1</i>	(43)
pG70/T1	2 $\mu$ m replication origin, <i>URA3, KGD1</i>	(44)
pG5/T2	2 $\mu$ m replication origin, <i>URA3, FUM1</i>	(41)
pICL1.1	2 $\mu$ m replication origin, <i>URA3, ICL1</i>	(46)
pSS1	<i>SDH1::HIS3</i>	(45)
YDp-icl1	<i>ICL1::LEU2</i>	(46)
pACO1	<i>ACO1</i>	This study
pKGD1	<i>KGD1</i>	This study
pFUM1	<i>FUM1</i>	This study
pICL1	<i>ICL1</i>	This study
pACOU1	<i>ACO1::URA3</i>	This study
pKGDU1	<i>KGD1::URA3</i>	This study
pFUMU1	<i>FUM1::URA3</i>	This study
pFUMT1	<i>FUM1::THAr</i>	This study
pICLU1	<i>ICL1::URA3</i>	This study

### 1-3 遺伝子操作および形質転換

酵母の遺伝子破壊は Rothstein の one-step gene replacement 法[54]に準じて行った。サザンプロットハイブリダイゼーションは random primer labeling and the signal amplification system for a fluoroimager (Amersham)でラベリングし、蛍光検出器 (STORM, Molecular Dynamics)を用いて検出した。その他の遺伝子操作は第1章と同様に行った。

### 1-4 粗酵素液の調整と酵素活性の測定

粗酵素液の調整は、次の様に行った。30℃、48時間振盪培養(100ml YPD, 300ml 三角フラスコ)した細胞を集菌洗浄後、20mM K,Na リン酸緩衝液(pH 7.5)に懸濁し、直径 0.5 mm のガラスビーズで BEAD-BEATER (Biospec Productions)を用いて破碎した。10,000g で 20 分間遠心した上清を粗酵素液として用いた。



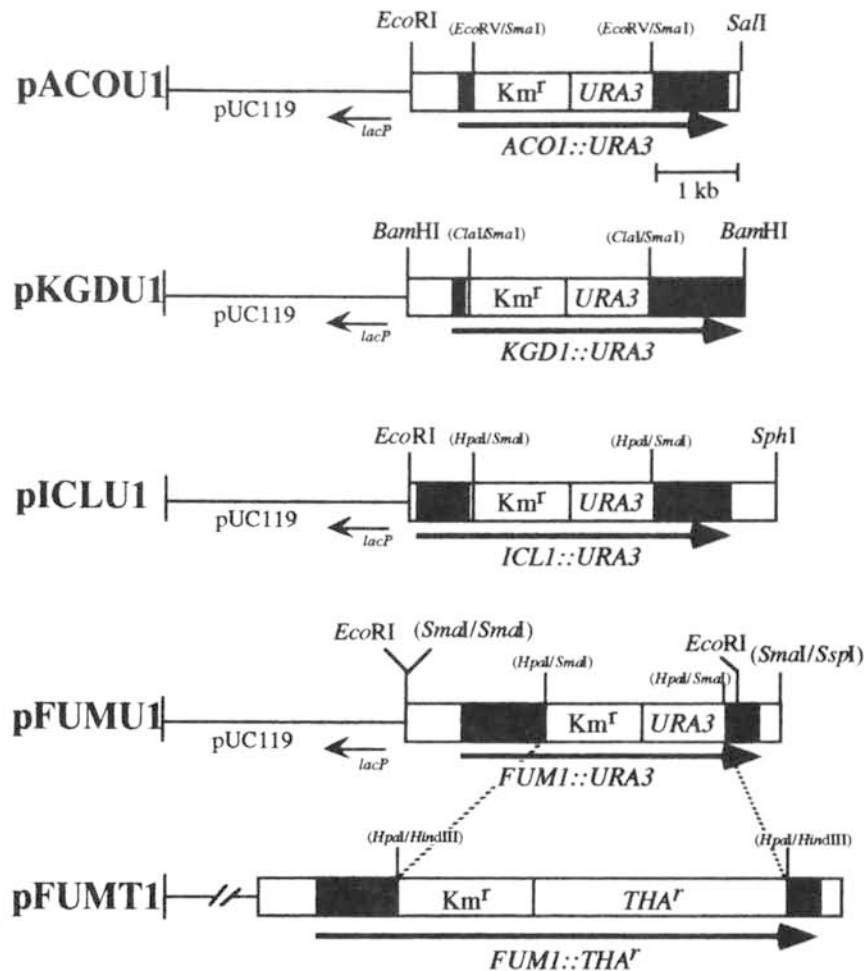
アコニターゼ活性は Fansler-Lowenstein の方法[55]に準じて測定した。 $\alpha$ -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性は ferricyanide の還元性を利用した方法で測定した[56]。イソクエン酸リアーゼ活性、コハク酸デヒドロゲナーゼ活性およびフマラーゼ活性は既報[57-59]に従って測定した。タンパク質の定量は、Lowly 法[60]で行った。

## 2 実験結果および考察

### 2-1 遺伝子破壊用プラスミドの構築

まず遺伝子破壊用プラスミドの構築を容易にするため、譲渡を受けた各遺伝子を含むプラスミドより目的遺伝子断片を切り出し、以下の様にプラスミド pUC119 に移し換え、プラスミド pACO1, pKGD1, pICL1 および pFUM1 を構築した。プラスミド pSE31 の ACO1 を含む 3.3-kb *EcoRI-SalI* 断片(-647~+2653[開始コドンをも+1として])を切り出し、*EcoRI-SalI* で消化した pUC119 に挿入して pACO1 を作成した。プラスミド pKGD1 はプラスミド pG70/T1 の *KGD1* 遺伝子を含む 2kb *BamHI* 断片(-691~+1335)を pUC119 の *BamHI* 部位に挿入して作成した。プラスミド pICL1 は、プラスミド pICL1.1 の *ICL1* 遺伝子を含む 2.4-kb *EcoRI-SphI* 断片(-168~+2242)を同酵素で消化した pUC119 に挿入して作成した。プラスミド pFUM1 は、プラスミド pG5/T2 の *FUM1* 遺伝子を含む 2.5-kb *SmaI-SspI* 断片を pUC119 の *SmaI* 部位に挿入して作成した。

次に以下に示す様にして、それぞれの遺伝子内部に *URA3* カセットまたは *THA'* カセットを挿入して破壊用プラスミドの構築を行った(Fig. 3-2)。pACO1 の *ACO1* 構造遺伝子中に含まれる 1.2 kb *EcoRV* 断片(+147~1368)を除いて、そこに 2.4 kb の pURAKm より取り出した *URA3* および *Km<sup>r</sup>* 遺伝子を含む断片(*URA3* カセット)を挿入して *ACO1* 破壊用のプラスミド pACOU1 を作成した。目的プラスミドを含むクローンの選択はカナマイシン耐性を指標として容易に行えた。*KGD1* 破壊用プラスミドの構築は pKGD1 の *Clal* 部位(+158 *KGD1*ORF)に *URA3* カセットを挿入して行った。同様に pICLU1 および pFUMU1 の構築もそれぞれの構造遺伝子中の *HpaI*



**Fig. 3-2.** Plasmids constructed for gene disruption.

The plasmids pACOU1, pKGDU1, pICLU1, pFUMU1 and pFUMT1 were constructed by the insertion of *URA3* or *THA<sup>r</sup>* cassettes into the ORF gene contained in the plasmid pACO1, pKGD1, pICL1 and pFUM1, respectively, as described below. The plasmid pACO1 was constructed by the insertion of a 3.3-kb *EcoRI-SalI* fragment (-647 to +2653, relative position to the start codon [+1]) containing the *ACO1* gene in the plasmid pSE31 (43), into the *EcoRI-SalI* site of pUC119. The plasmid pKGD1 was constructed by the insertion of a 2.0-kb *BamHI* fragment (-691 to +1335) containing a part of the *KGD1* gene in the plasmid pG70/T1 (44), into the *BamHI* site of pUC119. The plasmid pICL1 was constructed by the insertion of a 2.4-kb *EcoRI-SphI* fragment (-168 to +2242) containing the *ICL1* gene in the plasmid pICL1.1 (46), into the *EcoRI-SphI* site of pUC119. The plasmid pFUMU1 was constructed by the insertion of a 2.5-kb *SmaI-SspI* fragment (-800 to +1710) containing the *FUM1* gene in the plasmid pG5/T2 (41) into the *SmaI* site of pUC119.

部位 (+686、+1050) に *URA3* カセットを挿入して行った。さらにプラスミド pFUMT1 は pFUMU1 と同様の部位にプラスミド pHTHAKm より切り出した 5.1 Kb の THA 耐性遺伝子と  $Km^r$  遺伝子を含む断片 (THA カセット) を挿入し構築した。

形質転換時には pACOU1, pKGDU1, pICLU1, pFUMU1 および pFUMT1 をそれぞれ *EcoRI*-*Sall*, *Bam*HI, *EcoRI*-*pfl*MI, *EcoRI* および *EcoR*I で消化し、破壊用断片を切り離して使用した。

なお *SDH1* 遺伝子の破壊には、譲渡された *SDH1::HIS3* を含むプラスミド pSS1 [45] を *Hind*III-*Pst*I で消化した後、使用した。*ICL1* 遺伝子の破壊には *ICL1::LEU2* を含むプラスミド YDP-*icl1* [46] も *Not*I-*Cl*aI 消化して用いた。

## 2-2 遺伝子破壊株の分離

既に、*ACO1*, *KGD1*, *SDH1*, *FUM1* および *ICL1* の破壊株では、糖源としてグリセロールまたはエタノールのみを含む培地では生育しないことが知られている [42-46]。そこで第一段のスクリーニングとして、それぞれの形質転換により生育してきたクローンを SD および SG, SE 培地にレプリカし、SD 培地のみには生育する株を各破壊株の候補として選択した。なお *ACO1* 破壊株ではグルタミン酸要求性となる [61] ことが知られているため、それぞれの培地にグルタミン酸を添加したものをを用いた。

次に、選択した株について、サザンハイブリダイゼーションによる破壊の確認を行った。Fig. 3-3 の F は、プラスミド pNH-Kan/*orfT* 中の  $Km^r$  遺伝子を含む 1.8kb の断片をプローブとしたものであるが、*ACO1* (lane1), *ICL1* (lane2), *KGD1* (lane3), *FUM1* (*FUM1::THA<sup>r</sup>*) (lane4) および *FUM1* (*FUM1::URA3*) (lane5) 破壊株で想定された大きさの 5.1kb, 3.6kb, 4.4kb, 2.3kb, 7.8kb および 2.3kb のバンドを検出した。また *SDH1* 遺伝子をプローブとした時 (Fig. 3-3G)、予想どおり野性型の DBY747 株のレーンでは 3.5kb に単一のシグナルが現れたが、*SDH1* 破壊株と考えられた株では 4.1kb にシフトした。この結果も予想したものに一致している。さらに *ICL1* 遺伝子をプローブとして行った実験では (Fig. 3-3H), *ICL1* 遺伝子を *ICL1::LEU2* 断片で破壊した株では全くハイブリするバンドは検出されなかった。この時、野性型では想定された大きさ (3.6kb) にバンドを検出した。Fig. 3-3D からわかる様に、この破壊ではプローブとして用いた領域が完全に欠除すると考えられるので、正確に破壊が起きたものと考えられる。

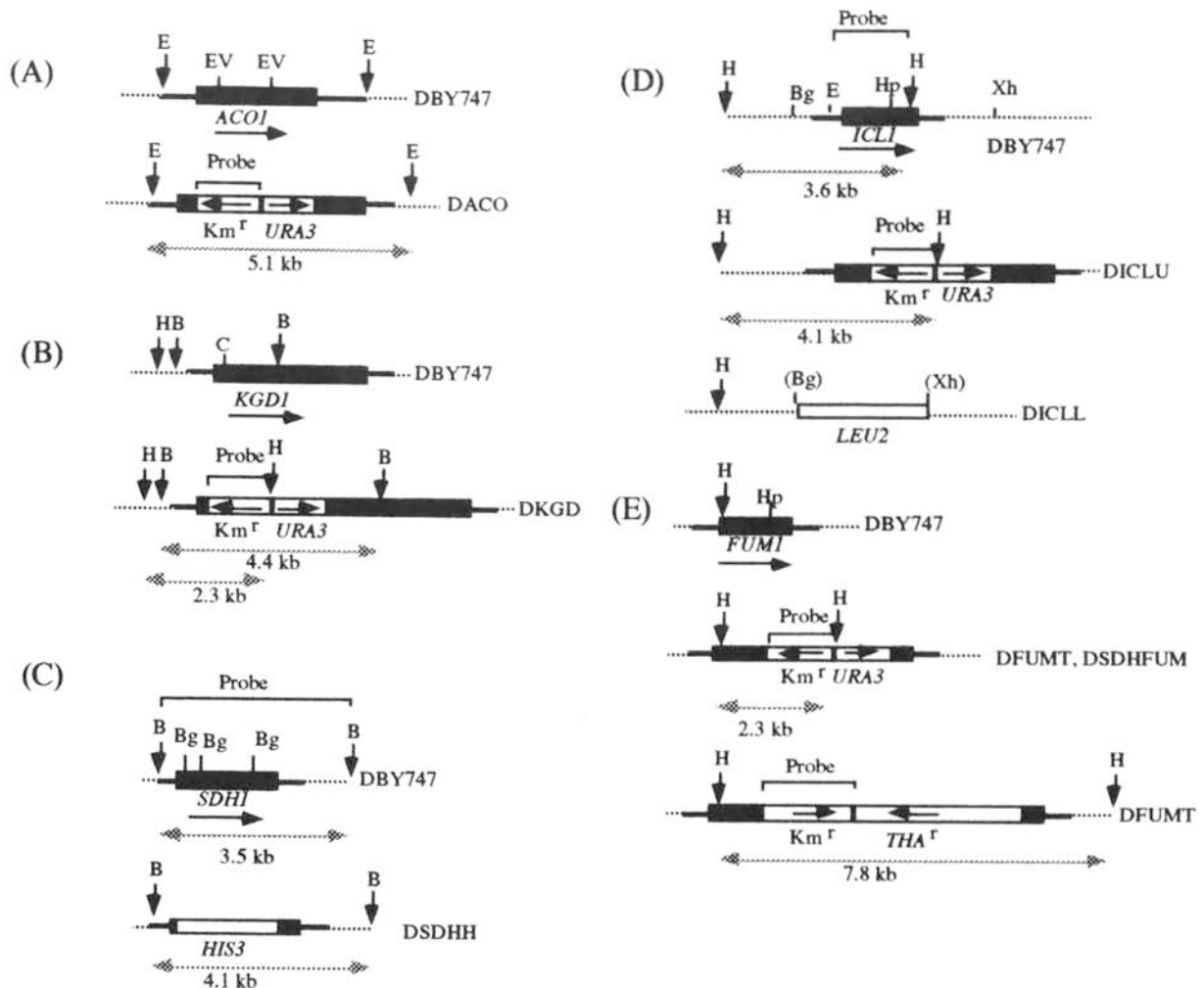


Fig. 3-3. Southern blot analysis of genomic DNAs from the wild-type strain and disruptants. The construction used to disrupt the *ACO1* (A), *KGD1* (B), *SDHI* (C), *ICL1* (D) and *FUM1* (E) genes. The locations of the *EcoRI* (E), *EcoRV* (EV), *HindIII* (H), *BamHI* (B), *BglIII* (Bg), *HpaI* (Hp) and *XhoI* (Xh) sites are marked. The *ACO1*, *KGD1*, *SDHI*, *ICL1* and *FUM1* genes are depicted by solid bars. The arrows at the gene show the direction of transcription. Genomic DNAs were digested with *EcoRI* (A), *HindIII* or *BamHI* (B), *BamHI* (C) and *HindIII* (D, E), separated on 1% agarose gels, and then transferred onto a nylon membrane. A 1.8-kb *BamHI* fragment bearing the *Km<sup>r</sup>* gene (F), a 3.5-kb *BamHI* fragment containing the *SDHI* gene (G) or a 1.7-kb *EcoRI-HindIII* fragment containing the *ICL1* gene (H), labeled with fluorescein, were used as probes. (F): lane 1, DACO (genomic DNA was digested with *EcoRI*); lane 2, DICLU (*HindIII*); lane 3, DKGD (*BamHI*); lane 4, DKGD (*HindIII*); lane 5, DSDHFUM (*HindIII*); lane 6, DFUMT (*HindIII*) and lane 7, DFUMU (*HindIII*). No fragment was detected by the *Km<sup>r</sup>* gene probe in the genomic DNA of DBY747 (data not shown). (G): lane 1, DBY747 (*BamHI*) and lane 2, DSDHH (*BamHI*). (H): lane 1, DBY747 (*HindIII*) and lane 2, DICLL (*HindIII*). A *HindIII* digest of lambda DNA was used as the size standard.

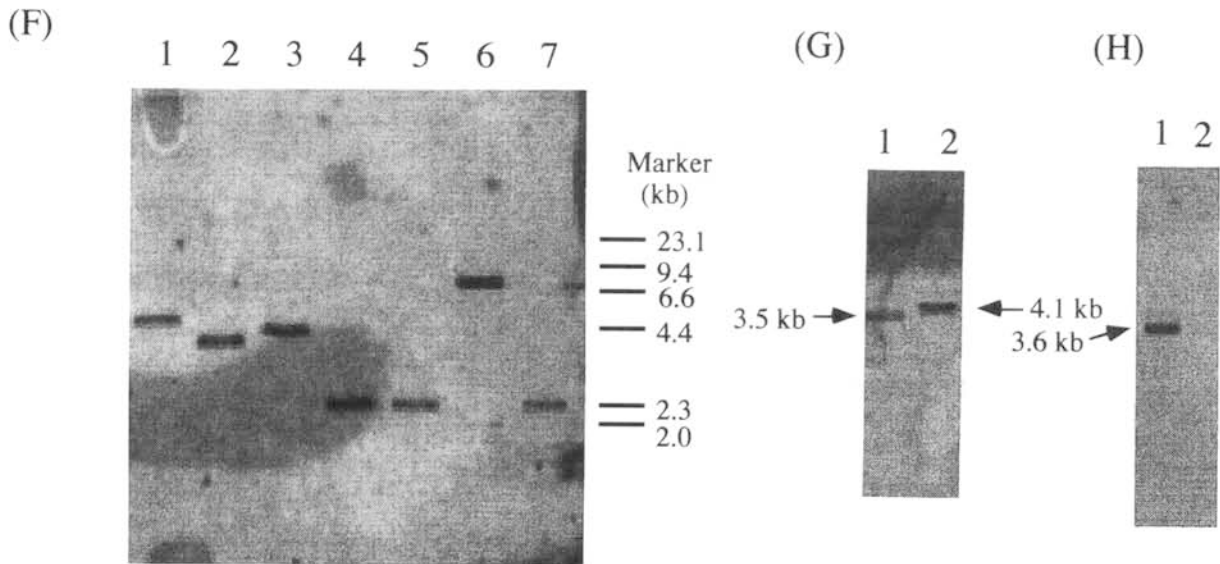


Fig. 3-3. continued.

以上の結果から、形質転換株 DACOU,DKGDU, DICLU, DFUMU, DFUMT, DSDH および DICLL は、それぞれ DBY747 株の *ACO1*, *KGD1*, *ICL1*, *FUM1*, *FUM1*, *SDH1* および *ICL1* 遺伝子が予想どおりに破壊された株と断定した。

上記の株は、全て一つの遺伝子を単独に破壊した株であるが、複数の遺伝子を破壊した株の造成も試みた。*SDH1* 破壊株 DSDH の *FUM1* 遺伝子を *FUM1::URA3* カセットを用いて破壊し、*SDH1*, *FUM1* の 2 重破壊株 DSDHFUM を造成した。また先に造成した *FRDS* 遺伝子破壊株 DFRDS を *SDH1::HIS3* カセットで破壊することにより、*FRDS*, *SDH1* の 2 重破壊株 DFRDSDH を造成した。

Table 3-3 に造成した破壊株の増殖特性をまとめて示す。またそれぞれの株の破壊した遺伝子がコードする蛋白の酵素活性について Table 3-4 に示す。破壊株の粗酵素抽出液中には該当する酵素活性が検出できず、破壊が再確認された。

Table 3-3. Growth properties of disruptants

Strain	Genotype	Rich media		Minimal media				
		YPD	YPG	SD	SG	SE	SDG	SGG
DURA	<i>URA3</i> <sup>+</sup>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
DACO	<i>ACO1::URA3</i>	++	-	-	-	-	++	-
DKGD	<i>KGD1::URA3</i>	+++	-	+++	-	-	+++	-
DICLU	<i>ICL1::URA3</i>	+++	+++	+++	-	-	+++	-
DFUMU	<i>FUM1::URA3</i>	+++	-	+++	-	-	+++	-
DFRDS	<i>FRDS::URA3</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
DOSM	<i>OSM1::URA3</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
DFRDOS	<i>FRDS::URA3</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
M	<i>OSM1::THA'</i>							
DSDHFU	<i>SDH1::HIS3</i>	+++	-	+++	-	-	-	-
M	<i>FUM1::URA3</i>							
DFRDSD	<i>FRDS::URA3</i>	+++	+	+++	-	-	-	-
H	<i>SDH1::HIS3</i>							
DBY747	<i>ura3</i> <sup>-</sup>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
DSDHH	<i>SDH1::HIS3</i>	+++	+	+++	-	-	-	-
DICLL	<i>ICL1::LEU2</i>	+++	+++	+++	-	-	-	-
DFUMT	<i>FUM1::THA'</i>	+++	-	+++	-	-	-	-

Growth in the various media was scored after 2, 4, and 7 d of incubation at 30°C. The most rapid growth is indicated by three plus signs. Minus signs indicate absence of growth.

Table 3-4. Enzyme activities of cell-free extracts in wild-type and disruptants

Enzyme	Strains	Gene disruption	Specific activity ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein)
Aconitase	DBY747		0.26
	DACO	<i>ACO1::URA3</i>	N.D.* <sup>1</sup>
$\alpha$ -Ketoglutarate dehydrogenase	DBY747		0.94
	DKGD	<i>KGD1::URA3</i>	N.D.
Isocitrate lyase	DBY747		0.048
	DICLU	<i>ICL1::URA3</i>	N.D.
	DICLL	<i>ICL1::LEU2</i>	N.D.
Succinate dehydrogenase	DBY747		0.08
	DFRDSDH	<i>FRDS::URA3</i>	N.D.
		<i>SDH1::HIS3</i>	
	DSDHH	<i>SDH1::HIS3</i>	N.D.
Fumarase	DBY747		2.8
	DFUMU	<i>FUM1::URA3</i>	N.D.
	DSDHFUM	<i>SDH1::HIS3</i>	N.D.
		<i>FUM1::URA3</i>	
	DFUMT	<i>FUM1::THAr</i>	N.D.

Yeast cells were grown in 300 ml Erlenmeyer flasks containing 100 ml YPD for 24 h at 30°C with shaking.

\*1 Not detected (less than 1% of the parent DBY747).

### 第三節 フマル酸還元酵素遺伝子の破壊

#### 1 実験材料および方法

##### 1-1 フマル酸還元酵素遺伝子

杏林大学の村椿春博博士よりフマル酸還元酵素の2種類のアイソザイムFRDS1およびFRDS2をそれぞれコードする遺伝子 *FRDS*[51]および *OSM1*[52]を含むプラスミド pFRDS および pOSM1 を提供していただいた。

##### 1-2 使用菌株およびプラスミド

大腸菌株 XL1-Blue は Stratagene (Heidelberg, Germany)より入手した。増殖性の

検討のための対照に用いた *Saccharomyces cerevisiae* DURA (*MATa*, *his3-Δ leu2-3 leu2-112 trp1-289a URA3*) は DBY747 の染色体上に *URA3* 遺伝子を挿入して作成した。遺伝子 *FRDS* または *OSM1* を含むプラスミド pFRDS および pOSM1 は遺伝子破壊用プラスミドの構築に用いた。

酵母遺伝子ライブラリーは第 1 章で調整したもの[62]を用いた。

### 1-3 培地

酵母の培養には YPD(2%ペプトン、1%酵母エキス、2%グルコース)、YPD10 (YPD のグルコース濃度のみ 10%) および YPD15 (同グルコース 15%) を用いた。嫌気的な培養の場合にはエルゴステロール溶液 (エルゴステロール 100mg, Tween 80 22.5ml, Ethanol 27.5ml) を培地 1L に対して 6ml 添加した。形質転換株の分離には必要量のアミノ酸を加えた最少培地 (yeast nitrogen base w/o amino acids 0.67% (Difco), グルコース 2%) を用いた。なお THA 耐性株の分離には最少培地に 0.02 mg/ml の THA を培地に加えた。大腸菌の培養には 2YT 培地 (1.6% Trypton, 1% yeast extract, 0.5% NaCl, 0.1mg/ml thiamin)を用いた。必要に応じて 0.1mg/ml のアンピシリン, 0.025mg/ml のカナマイシンを培地に添加した。

### 1-4 遺伝子操作および形質転換

第二節と同様に行った。

### 1-5 フマル酸還元酵素活性の測定

粗酵素液の抽出は、以下の様に行った。YPD10 を 400ml 入れた 500ml 容の坂口フラスコに細胞を接種後、8 時間ごとに緩やかな攪拌をして、30℃で 2 日間培養した。集菌した細胞を 4 倍量の 5mM mercaptoethanol を含む 20mM K,Na-phosphate buffer(pH7.5)に懸濁し、フレンチプレス (2000 kg/cm)で細胞を破碎した。3900g、20min で遠心分離した上清を粗酵素液とした。酵素活性は村椿らの方法[50]に準じて測定した。蛋白含量の測定は Lowly 法[60]で行った。

## 2 実験結果および考察



## 2-1 遺伝子破壊用プラスミドの構築

*FRDS* または *OSM1* 遺伝子に *URA3* カセットまたは *THA'* カセットを挿入して破壊用プラスミドの構築を行った (Fig. 3-4)。

pFRDS のベクター上の *HincII* 部位を *HindIII*-*SalI* 消化、平滑末端化および再ライゲーションして除去した後 (pFRDH)、構造遺伝子中に含まれる 796bp *HincII* 断片

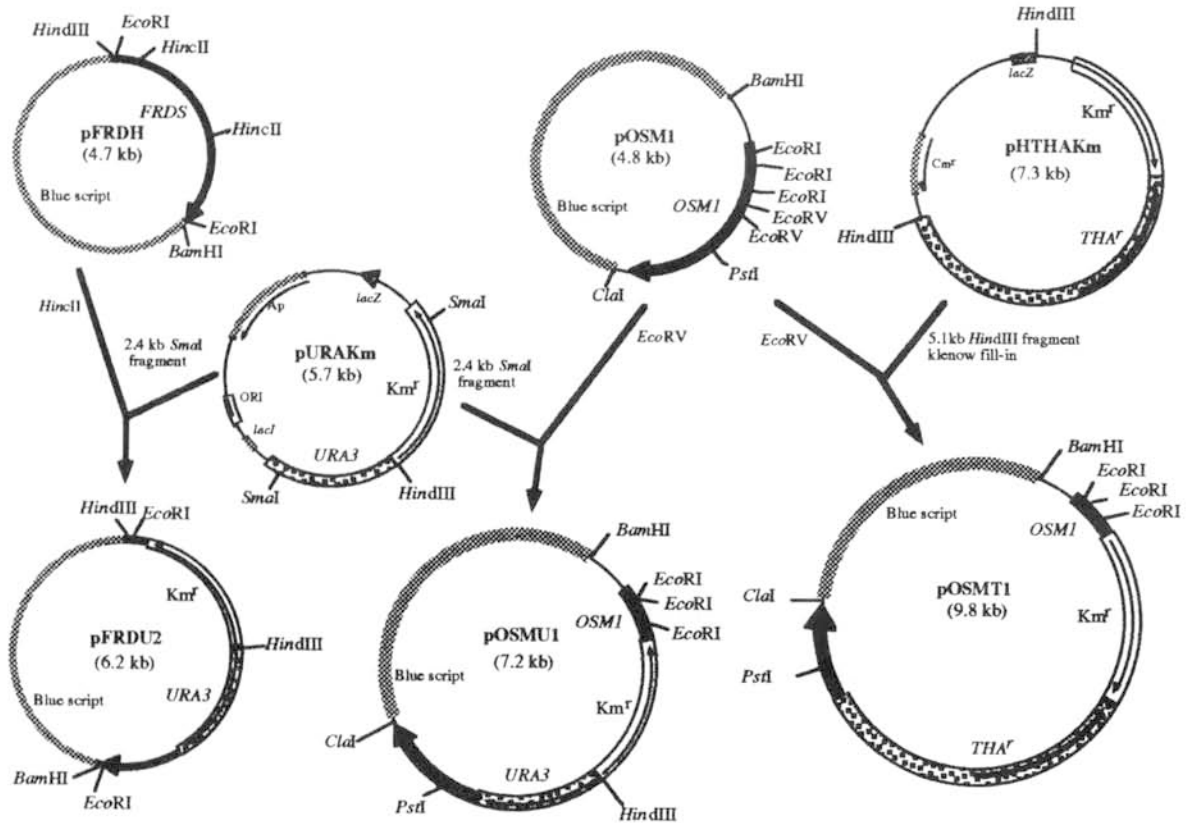


Fig. 3-4. Construction of plasmids for disruption of the *FRDS* and *OSM1* genes.

Plasmid pFRDU2 was constructed for *FRDS* disruption. A 796-bp *HincII* fragment (+69 to +864) of the *FRDS* ORF was removed from pFRDH (the unique *HincII* site at the multirestriction site of plasmid pFRDS was deleted by *HindIII*-*SalI* digestion) and replaced with a 2427-bp *SmaI* fragment containing the *URA3* and *Km<sup>r</sup>* genes prepared from pURAKm. The plasmids pOSMU1 and pOSMT1 were constructed for *OSM1* disruption. A 57-bp *EcoRV* fragment (+531 to +588) of the *OSM1* ORF was removed, and replaced respectively with a fragment containing the *URA3*-*Km<sup>r</sup>* gene and a blunt-ended 5065-bp *HindIII* fragment containing the *THA'* and *Km<sup>r</sup>* genes from pHTHAKm.

(+69~864)を除いて、そこに pURAKm より取り出した 2.4 kb *URA3* および *Km<sup>r</sup>* 遺伝子を含む断片 (*URA3* カセット) を挿入して *FRDS* 破壊用のプラスミド pFRDU2 を作成した。目的プラスミドを含むクローンの選択はカナマイシン選択により容易に行なえた。*OSM1* 破壊用プラスミド pOSMU1 および pOSMT1 の構築は、pOSM1 の構造遺伝子中の 57 bp *EcoRV* 断片 (+531~588) を除いて *URA3* カセットまたは pHTHAKm 由来の 5 kb *THA'* カセットを挿入して行った。

## 2-2 遺伝子破壊株の分離

*FRDS* 遺伝子破壊株を得る為に、プラスミド pFRDU2 を *EcoRI* で消化して得た *FRDS::URA3* 断片で DBY747 株を形質転換した。その結果、約 50 株のウラシル非要求性株を分離した。同様に *OSM1* 破壊株を得る為に、pOSMU1 を *BamHI-ClaI* で消化し、得られた *OSM1::URA3* 断片により DBY747 株を形質転換した。それぞれの形質転換により得られたクローンからランダムに 5 株選び、染色体 DNA を抽出し、*HindIII* で完全消化した後、サザンハイブリダイゼーションにより確認を行った (Fig. 3-5)。なおプローブとしては、プラスミド pNH-kan/*oriT* より調整した *Km<sup>r</sup>* 遺伝子を用いた。*FRDS::URA3* 断片で形質転換した株の 1 株,DFRDS において 2.9-kb の想定されたバンドが検出された。また *OSM1::URA3* 断片で形質転換した株の 1 株,DOSM において 4.8-kb の想定されたバンドが検出されたことから、DFRDS を *FRDS* 破壊株、DOSM を *OSM1* 破壊株とした。次に DFRDS をプラスミド pOSMT1 から *BamHI-ClaI* 消化して得られた *OSM1::THA<sup>r</sup>* 断片で形質転換し、THA 耐性株の中から *FRDS* および *OSM1* の二重破壊株、DFRDOSM を得た。

Table 3-5. Fumarate reductase activity of the wild-type strain and fumarate reductase gene-disrupted strains.

Strain	Genotype	Specific activity <sup>a</sup> ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ protein)
DBY747	<i>FRDS<sup>+</sup>, OSM1<sup>+</sup></i>	6.7
DFRDS	<i>FRDS::URA3</i>	2.6
DOSM	<i>OSM1::URA3</i>	4.9
DFRDOSM	<i>FRDS::URA3, OSM1::THA<sup>r</sup></i>	Not detected

<sup>a</sup> Activities were assayed in extracts of cells grown on YPD10.

二重破壊株は後で述べる様に、完全な嫌気条件では生育しなかったため、静置培養条件 (1-5 参照) で培養した細胞の抽出液について酵素活性を検討した。Table3-5 に示した様に *FRDS* 遺伝子破壊株 DFRDS では、親株の DBY747 の酵素活性に比べ 39%の酵素活性しか示さなかった。また *OSM1* 破壊株 DOSM1 の粗酵素活性は 73%であった。さらに *FRDS,OSM1* の二重破壊株の粗酵素液では全くフマル酸還元酵素が検出されなかった。これらのことより遺伝子の破壊が再確認されるとともに、

*FRDS* および *OSMI* 遺伝子以外にフマル酸還元酵素をコードする遺伝子が存在しないことが明らかになった。

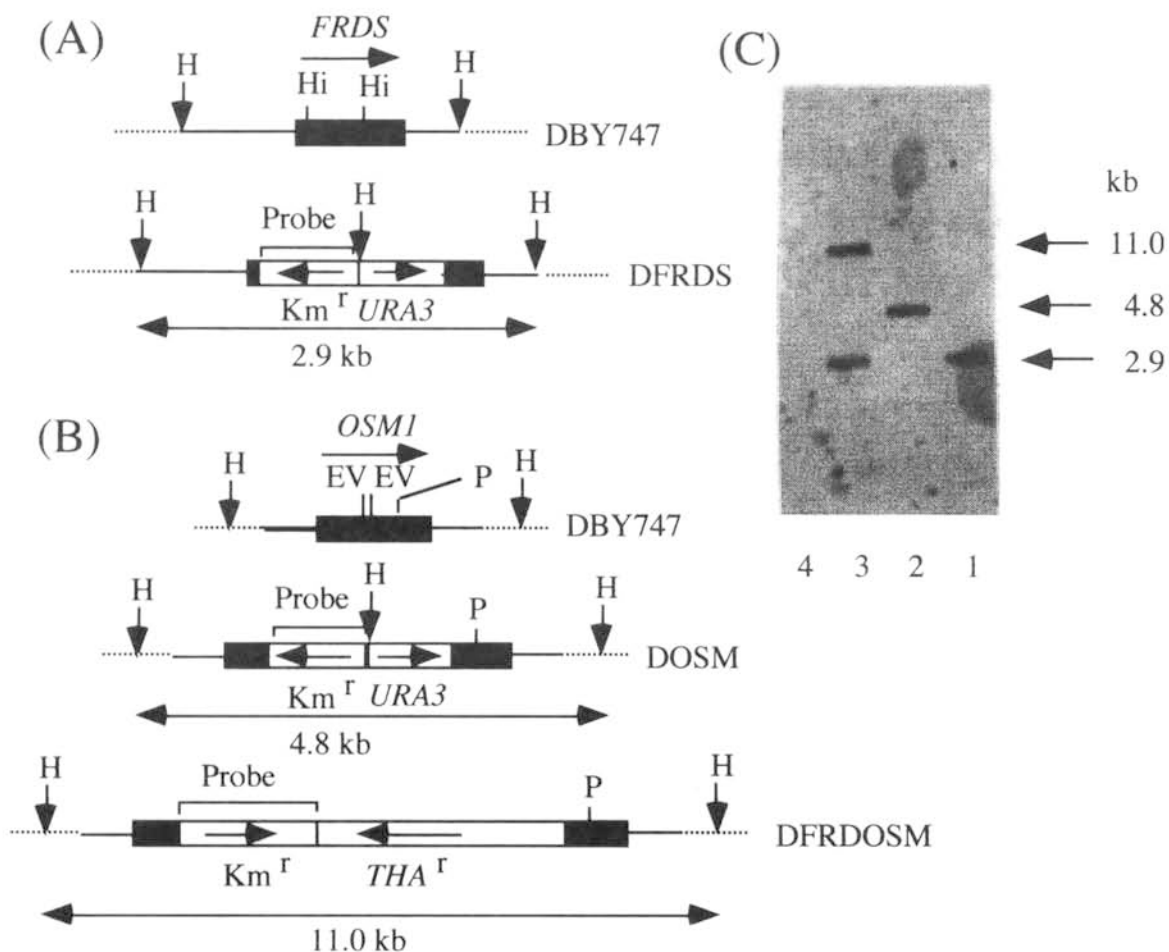


Fig. 3-5. Southern blot analysis of genomic DNAs from the wild-type strain and disruptants.

The construction used to disrupt the *FRDS* (A) and *OSMI* (B) genes. The locations of the *Hind*III (H), *Hinc*II (Hi), *Eco*RV (EV) and *Pst*I (P) sites are marked. The *FRDS* and *OSMI* genes are depicted by solid bars. The arrows with the gene show the direction of transcription. Genomic DNAs were digested with *Hind*III, separated on 1% agarose gels, and then transferred onto a nylon membrane. The probe DNA was a 1.8-kb *Bam*HI fragment bearing the *Km<sup>r</sup>* gene labeled with fluorescein. (C): lane 1, *DFRDS*; lane 2, *DOSM*; lane 3, *DFRDOSM* and lane 4, *DBY747*. A *Hind*III digest of lambda DNA was used as a size standard.

## 第四節 フマル酸還元酵素遺伝子破壊株の増殖性

### 1 実験材料および方法

#### 1-1 酵母の増殖性試験

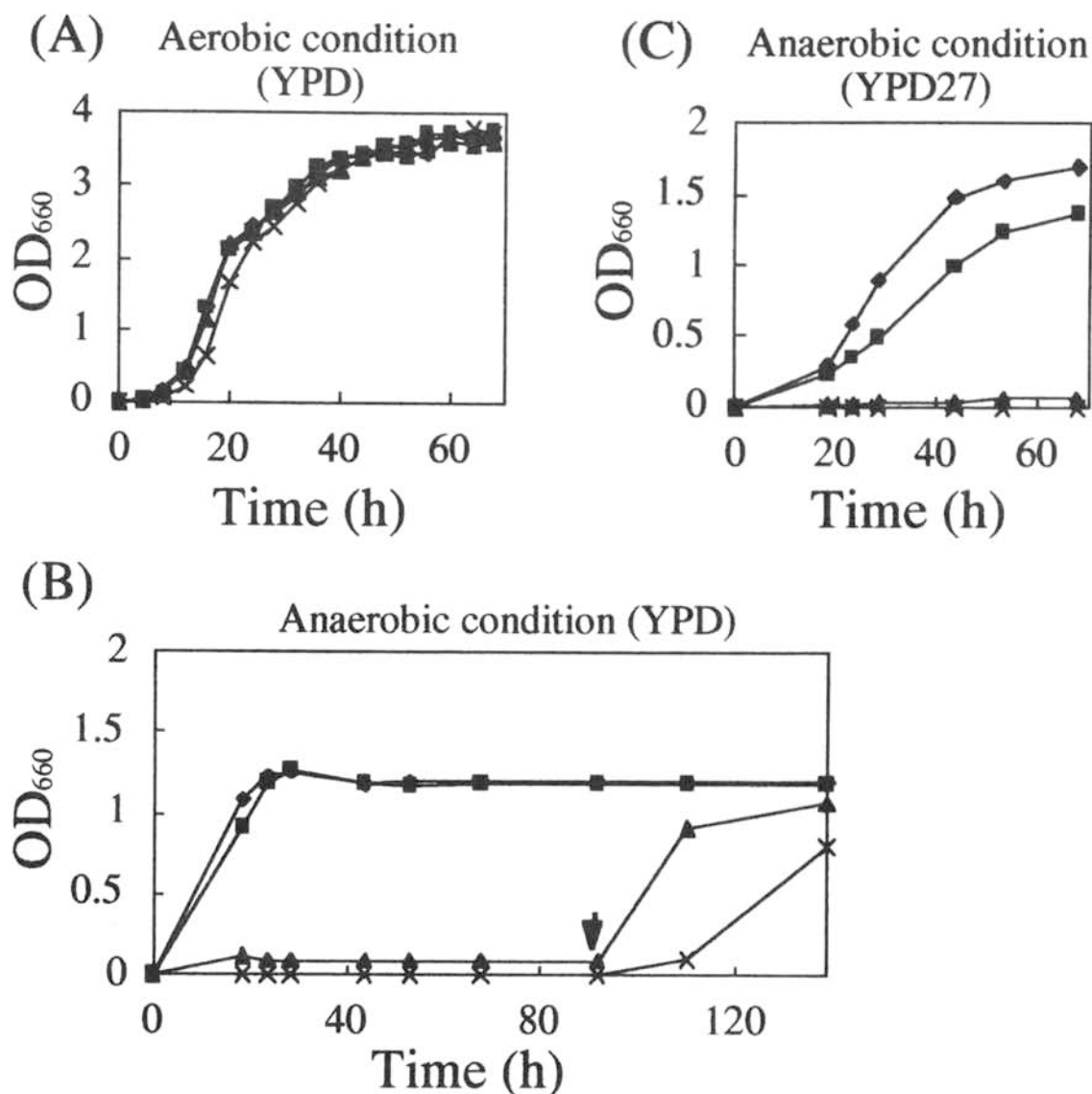
好気条件での増殖性の検討は 12ml 容量の L 字管に培地を 5ml 入れ、そこに定常期の細胞を 0.1ml 接種し、Biophotorecorder TN-1506 (Advantec)を用いて 40 rpm, 30℃で培養して、OD<sub>660nm</sub> をモニタリングした。

嫌気条件での培養は 30ml 容量の試験管に 20ml 培地を入れ細胞を 0.4ml 接種後、1.5ml (1cm の深さ) の流動パラフィンを重ねし、30℃で静置培養を行った。測定時には緩やかにスターラーで攪拌した。泡消しには適宜シリコンオイルを添加した。

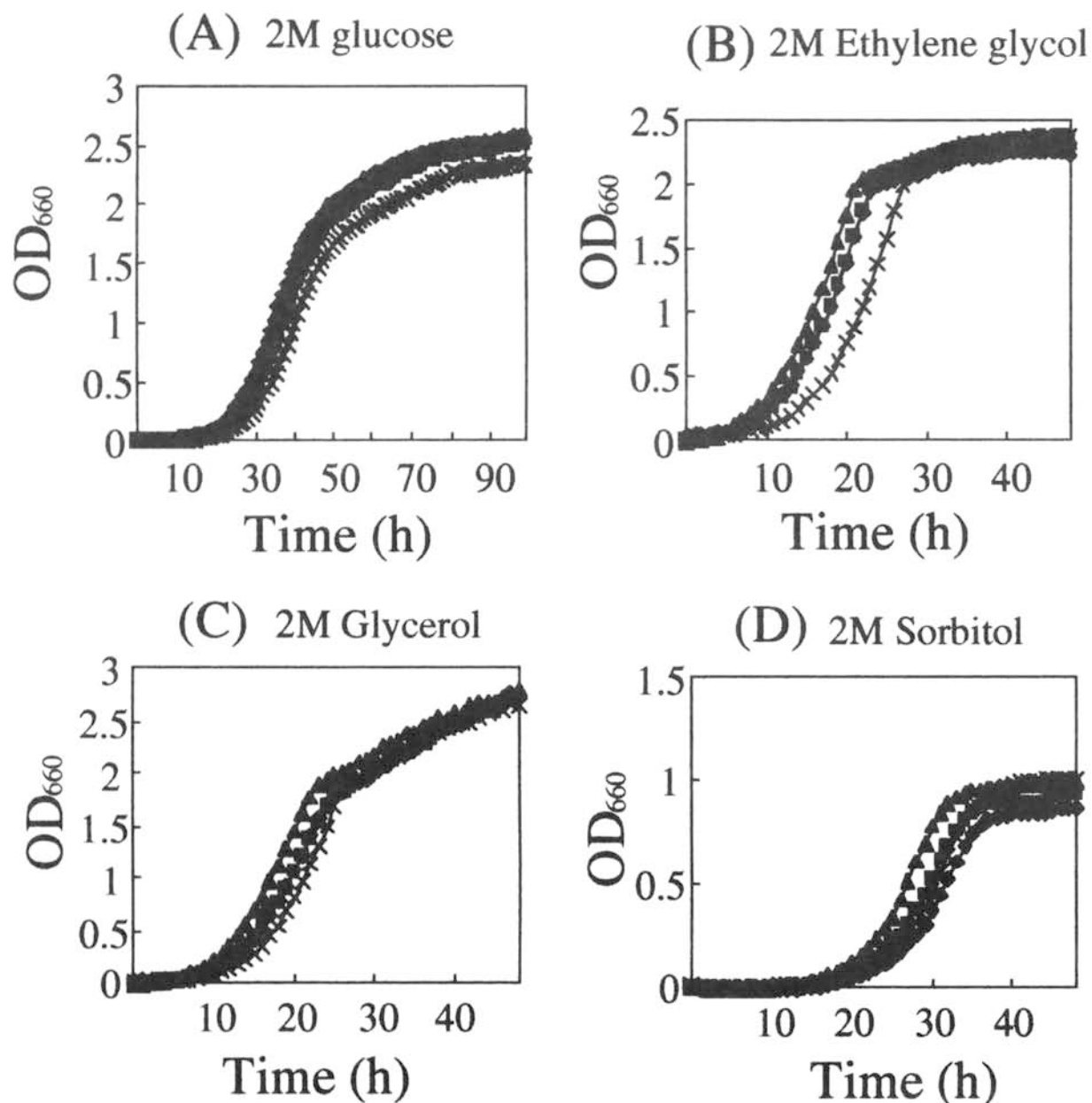
### 2 実験結果および考察

Fig. 3-6A に破壊株および野性型株 (DURA)の増殖性を示す。なお DURA 株はウラシル要求性が増殖に及ぼす影響を排除するため、標準として DBY747 株の替りに用いた。好気条件での増殖性はいずれの破壊株も野性型(DURA)と変わらなかった。Singh ら[53]は *OSM1* 破壊により酵母の浸透圧耐性が低下すると報告しているが、*OSM1* 破壊株 DOSM では、2M グルコース、2M エチレングリコールおよび 2M ソルビトール存在下でも生育の阻害が認められなかった (Fig. 3-7)。Singh らの用いた *OSM1* deletion mutant では *OSM1* 以外に iso-1-cytochrome c をコードする *CYC* 遺伝子も脱落しており、その影響により浸透圧耐性が低下したのではないかと思われる。一方、驚いたことに嫌気条件では *FRDS*, *OSM1* 遺伝子の 2 重破壊株 DFRDOSM が全く生育しなかった (Fig. 3-6B,C)。また *OSM1* の単独破壊株 DOSM でも、わずかな増殖しか観測されなかった。なお図の矢印の点でパラフィンと培地の一部 (15ml) を抜き、激しい震盪を加えることで培地中に空気を送り込むことにより、両株とも増殖性を回復した。*FRDS* 単独破壊株 DFRDS では Fig. 3-6C に示す様にグルコースを高濃度で含む培地でのみ、わずかに増殖の遅れが観測された。この様な嫌気条件における増殖性の低下は固体培養でも同様に観測された (Fig. 3-8,9)。嫌気条件では DFRDS が全く生育していない (Fig. 3-8 B) が、これを好気条件に戻すと生育してきた (C)。また、DOSM の増殖性の遅れは、明らかではなかった (Fig. 3-8) が、希釈列

を作って培養すると (Fig 3-9)、DOSM のコロニーが極めて小さいことがわかる。これらのことより、フマル酸還元酵素遺伝子 *FRDS* および *OSM1*、特に *OSM1* は酵母の嫌気条件での増殖に必須であると思われる。しかし好気条件に戻すことにより増殖性を回復することより、その破壊の効果は致死ではないと思われる。また、*OSM1* の破壊は、酵素活性の低下 (Table 3-5) に及ぼす効果に比べ、嫌気増殖に及ぼす効果の方が大きい様に見える。これは酵素活性測定が完全嫌気とは言えない条件で測定したためか、あるいはその酵素蛋白の局在箇所における重要性を物語っているものと思われる。なお DFRDOSM 株を酵母の遺伝子バンクを用いて形質転換したところ、嫌気条件での成育を可能にする 5 種類のクローンを分離したが、いずれの挿入断片にも *OSM1* が含まれていた。なぜフマル酸還元酵素が、酵母の嫌気生育に必須であるかは明らかではないが、今のところ菌体内での酸化還元バランスを保つために、この酵素が働いているものと推測している。最近、最少培地を用いている点で、筆者の研究とは異なるが、glycerol-3-phosphate dehydrogenase の 2 つのアイソザイムをコードする *GPD1* および *GPD2* の二重破壊株で細胞内の NADH の蓄積が嫌気条件での増殖不良を導くことが報告された[63]。また嫌気条件では、酵母がエルゴステロールを生産せず、生育にはその添加が必用であることは良く知られているところではある[64]。しかし酵母の嫌気条件での成育に必須な遺伝子についての報告は上記以外にはなく、そのメカニズムの解明について、今後の研究の発展が望まれる。



**Fig. 3-6.** Growth characteristics of the wild-type strain and the fumurate reductase gene-disruptants on YPD medium under aerobic or anaerobic conditions. (A): Aerobic condition maintained by shaking (40 rpm) in YPD; (B): Anaerobic condition (static culture overlaid with liquid paraffin) in YPD; and (C): Anaerobic condition (static culture overlaid with liquid paraffin) in YPD27. Strains are (◆) DURA; (■) DFRDS; (▲) DOSM; and (X) DFRDOSM. After 90 h (time of the arrow) of anaerobic cultivation (B), liquid paraffin and 15 ml of culture were removed and the tubes were vigorously shaken for 5 min.



**Fig. 3-7.** Growth characteristics of the wild-type strain and the fumurate reductase gene-disruptants under aerobic conditions maintained by shaking (40 rpm) (A): YPD (2M glucose); (B): YPD + 2M ethylene glycol; (C): YPD + 2M glycerol, and (D): YPD + 2M sorbitol. Strains are (◆) DURA; (■) DFRDS; (▲) DOSM; and (X) DFRDOSM.

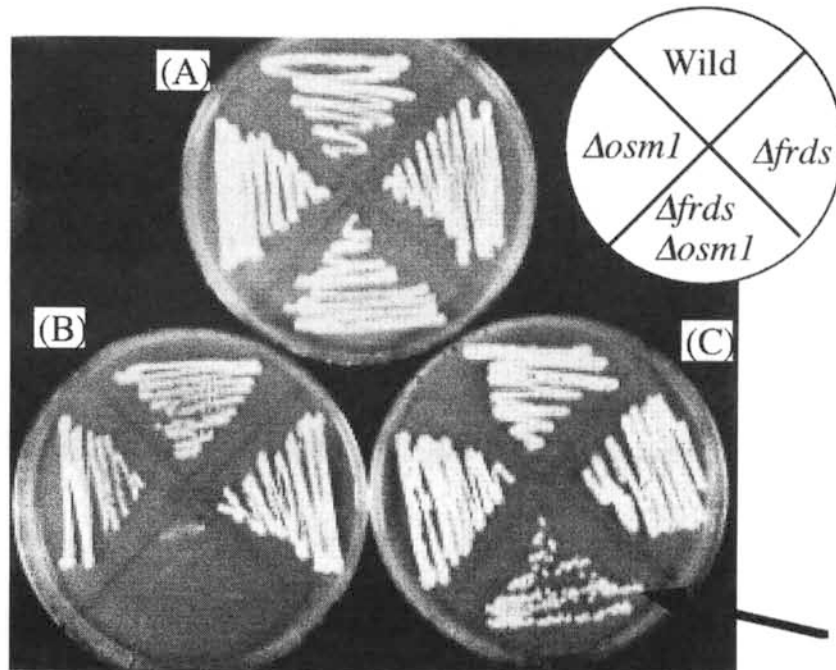


Fig. 3-8. Cell growth of fumarate reductase gene disruptants.  
 (A): aerobic condition (30°C, 3days)  
 (B): anaerobic condition 30°C 3days  
 (C): After incubated under anaerobic condition (30°C,3days), the plate was transferred to aerobic condition (30C, 2days)



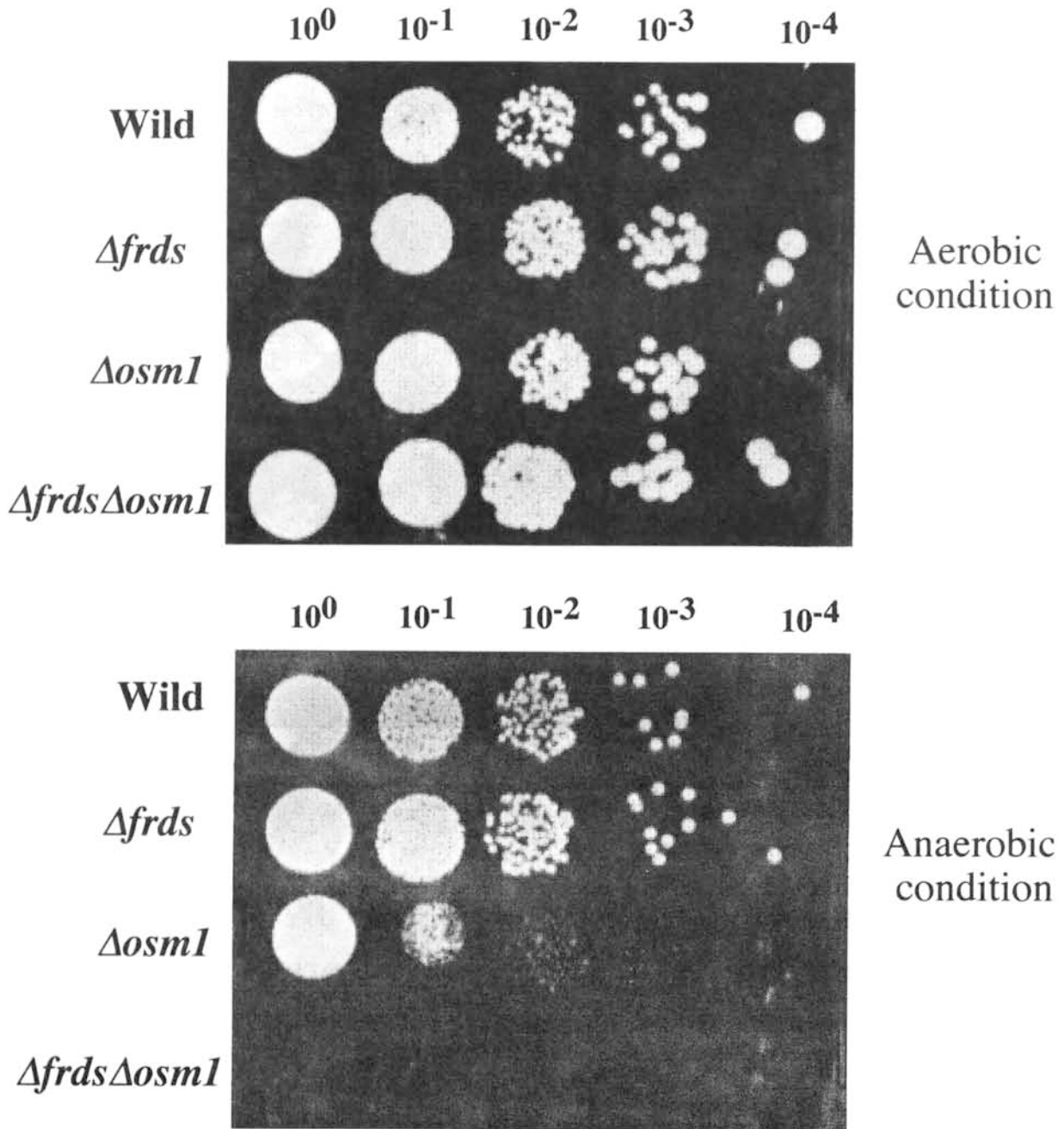


Fig. 3-9. Cell growth of fumarate reductase gene disruptants in anaerobic condition.  
 $10^0$ : 6 $\mu$ l of yeast culture ( $5.5 \times 10^6$  cells/ml) was spotted on the agar medium.  
 $10^{-n}$  indicates the spot (6 $\mu$ l) of cell suspension after dilution at  $10^{-n}$ .  
 Incubation time : 3days (30 $^{\circ}$ C)  
 Gas pak system was used for anaerobic conditions.

## 第五節 酵母の有機酸生産機構

### 1 実験材料および方法

#### 1-1 発酵試験

酵母の発酵試験は、第五節の方法で 50 時間培養した培養液の菌体を遠心分離した後、上清の有機酸濃度を有機酸分析システム（HPLC、日本分光）で分析した。

#### 1-2 非増殖細胞のコハク酸生産性の検討

上記（1-1）の嫌気発酵条件では、第四節で示した様に、フマル酸還元酵素 2 重破壊株である DFRDOSM 株が生育できないため、有機酸生産性の検討ができなかった。そこでこの株がぎりぎり成育できる様な条件で培養した細胞についてグルコース溶液を用いて検討した。

下記に示した方法で調整した細胞（160mg dry cells）を、グルコース緩衝溶液（4% グルコース、50mM K,Na-リン酸緩衝液（pH6.4））で培養し、村椿ら[65]の方法に準じて経時的にサンプリングし、溶液中のコハク酸濃度を測定した。好氣的生育細胞は、500ml の三角フラスコ中に 100ml の YPD 培地を加え、そこに 2% の濃度に菌体を接種して、30℃、2 日間振盪培養した後、集菌して調整した。微好気培養細胞は、5L の三角フラスコに 1L の YPD 培地を入れ、菌体を接種して、30℃3 日間静置培養して調整した。

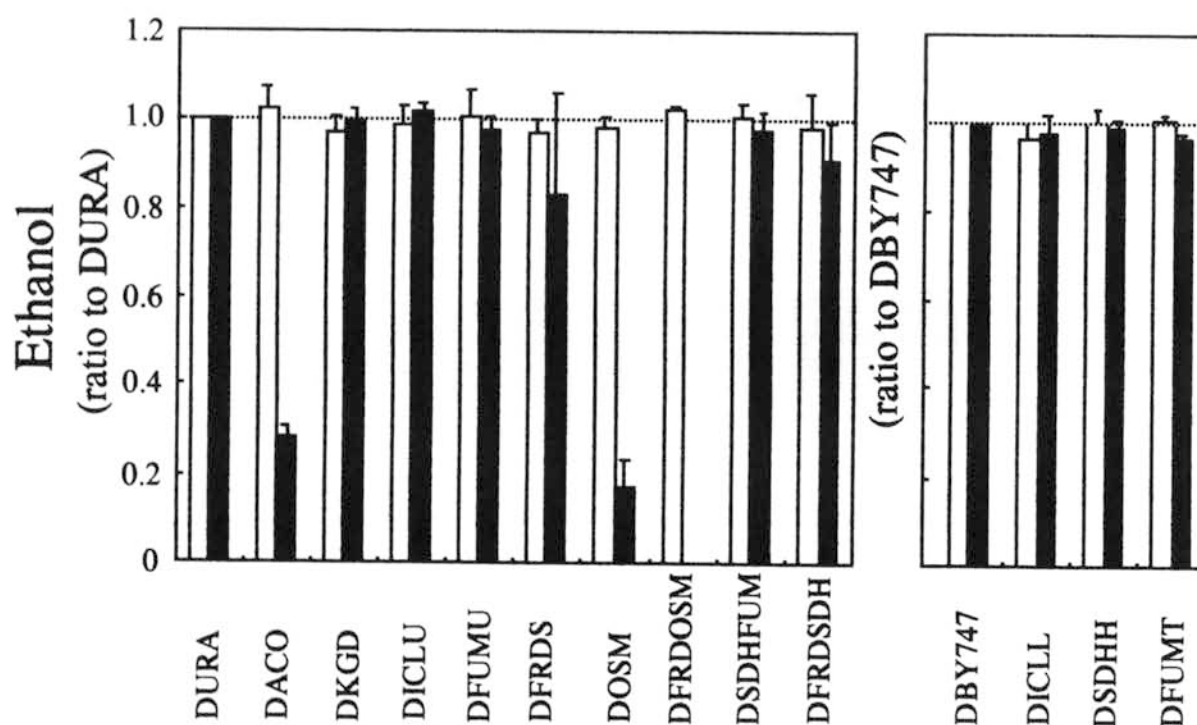
### 2 実験結果および考察

#### 2-1 高濃度グルコースを含む液体培地における破壊株のコハク酸生産性

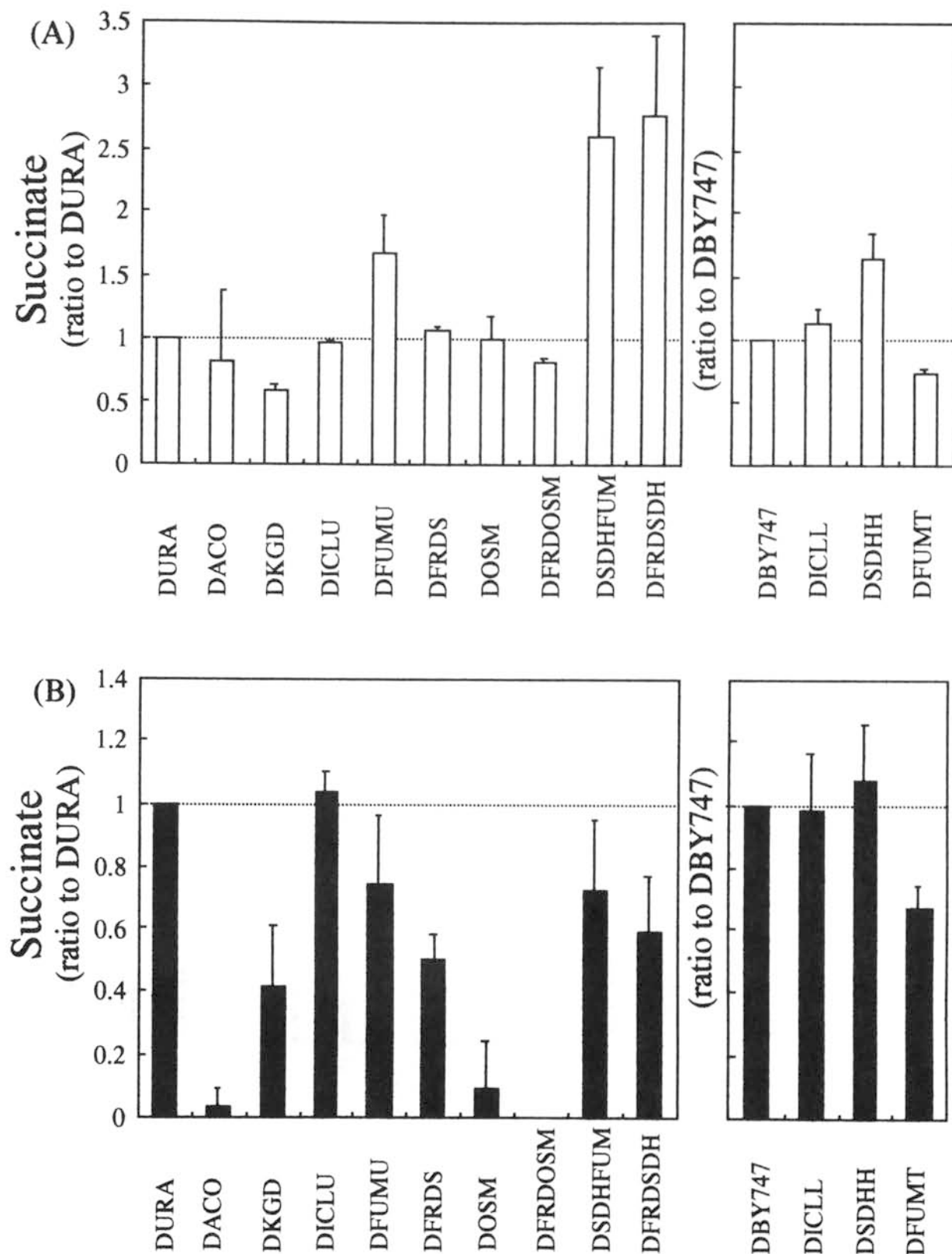
造成した 9 種類の遺伝子破壊株および先に造成した 3 種類の破壊株について 15% グルコースを含む YPD15 培地で発酵試験を行った(Fig. 3-10~12)。なお遺伝的バックグラウンドが異なるため、マーカー遺伝子に *URA3* を用いた破壊株（ウラシル非要求性株）では、DBY747 株の染色体上に *URA3* 遺伝子が挿入された DURA 株の結果を対照とした。その他の破壊株については DBY747 株と比較した。

コハク酸生産性を Fig. 3-11 に示す。好気条件においては *KGD1* 破壊株 DKGD のコハク酸生産性が DURA 株に比べ 1.7 倍低下した。また *SDHI* 遺伝子の破壊された 3 種類の株 DSDHFUM, DFRDSDH および DSDHH では、それぞれ対照の 2.6、2.7 および 1.6 倍にコハク酸生産性が上昇した。嫌気条件での培養では、第 3 章で示した様に、*OSM1* 破壊株 DOSM の増殖が極めて遅く、*FRDS* との 2 重破壊株 DFRDOSM では全く生育しなかった。さらに *ACO1* 破壊株 DACO の増殖性も極めて低下していた。その結果、これら 3 種の株ではエタノールをほとんど生産しなかった (Fig. 3-10)。嫌気条件では、DKGD 株では好気条件での培養と同様にコハク酸生産性が低下した。しかし *SDHI* 破壊ではいずれの株でも好気条件での様なコハク酸の生産性の増大は観測されなかった。*FUM1* 破壊株 DFUMU、DFUMT、そして *FRDS* 破壊株 DFRDS ではそれぞれ対照に比べ 26%、33%、および 50% までコハク酸生産性が低下した。

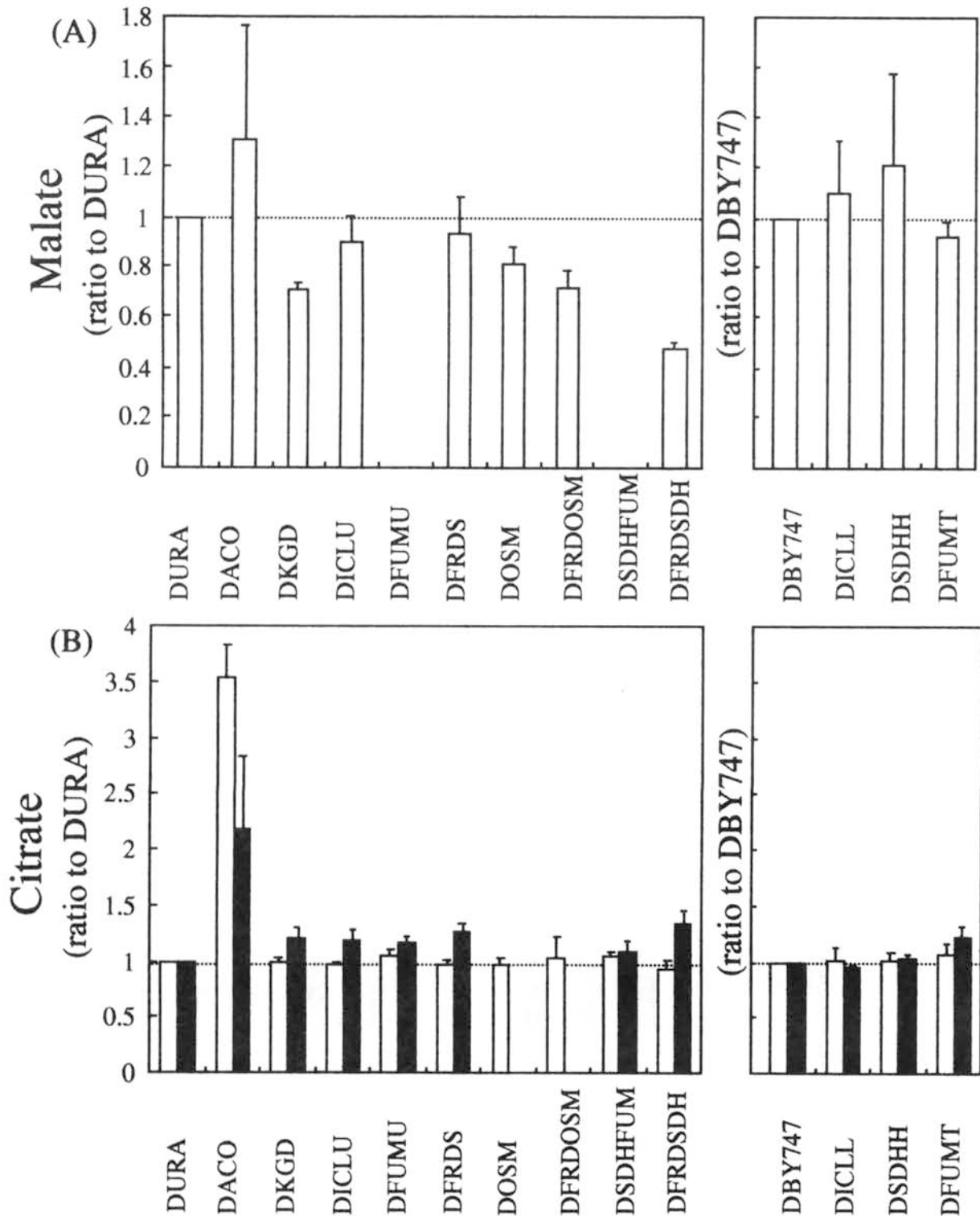
2 種の *ICL1* 破壊株 DICLU, DICLL では、好気、嫌気いずれの培養でも、コハク酸生産性は対照と変わらなかった。



**Fig. 3-10.** Ethanol concentration in YPD15 liquid culture. Ethanol concentration under aerobic conditions (□) and anaerobic conditions (■). Each value represents the mean of triplicate samples, and bars indicate the standard error. The productivity of disruptants that did not require uracil was comparable to that of DURA, while the productivities of other disruptants (uracil auxotrophs) were comparable to that of DBY747. The ethanol concentrations of a culture of DURA under aerobic and anaerobic conditions were 5.3 and 6.4%, respectively. The ethanol concentrations of a culture of DBY747 under aerobic and anaerobic conditions were 5.5 and 6.4%, respectively.



**Fig. 3-11.** Succinic acid concentration in YPD15 liquid culture. Succinic acid concentration under aerobic conditions (A) and under anaerobic conditions (B). Each value represents the mean of triplicate samples, and bars indicate the standard error. The productivity of disruptants that did not require uracil was comparable to that of DURA, while the productivities of other disruptants (uracil auxotrophs) were comparable to that of DBY747. The succinate concentrations of cultures of DURA and DBY747 under aerobic conditions were 90 and 524 mg/L, respectively. The succinate concentrations of cultures of DURA and DBY747 under anaerobic conditions were 98 and 264 mg/L, respectively.



**Fig. 3-12.** Malic (A), citric (B) and fumaric (C) acid concentration under aerobic conditions (□) and anaerobic conditions (■). Each value represents the mean of triplicate samples, and bars indicate the standard error. Malate and citrate productivities of disruptants that did not require uracil was comparable to that of DURA, while the productivities of other disruptants (uracil auxotrophs) were comparable to that of DBY747. The malate concentrations of cultures of DURA and DBY747 under aerobic conditions were 69 and 58 mg/L, respectively. The citrate concentrations of a culture of DURA under aerobic and anaerobic conditions were 243 and 112 mg/L, respectively. The citrate concentrations of a culture of DBY747 under aerobic and anaerobic conditions were 274 and 147 mg/L, respectively.

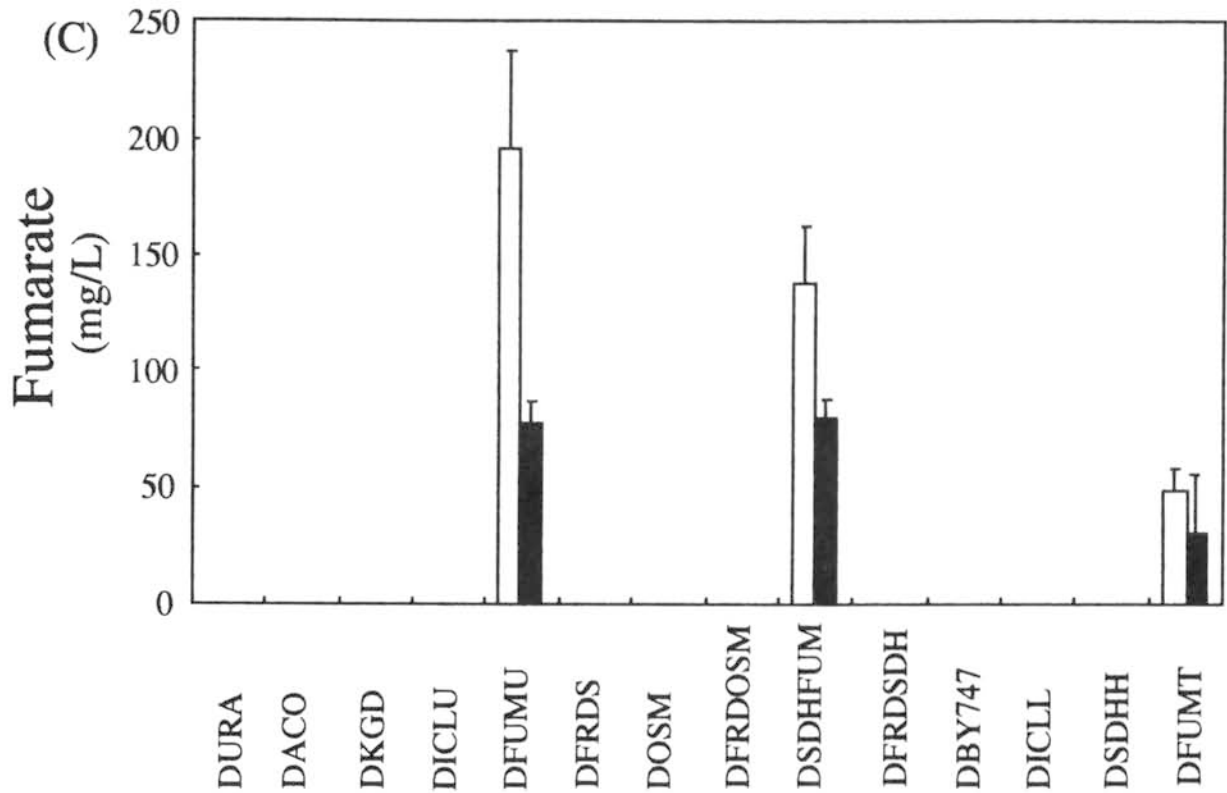
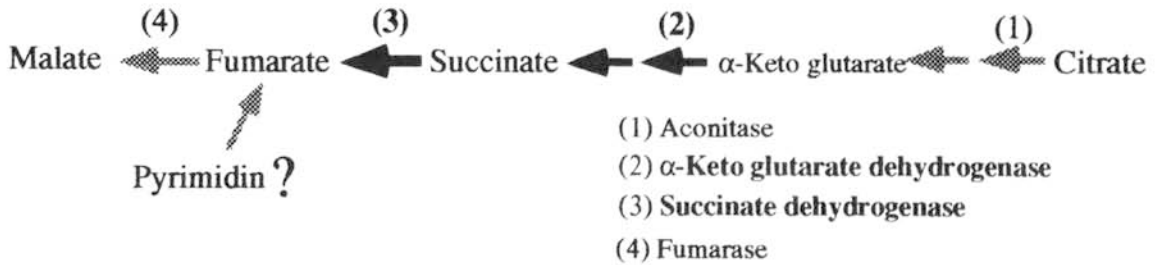


Fig. 3-12. continued.

Under aerobic conditions



Under anaerobic conditions

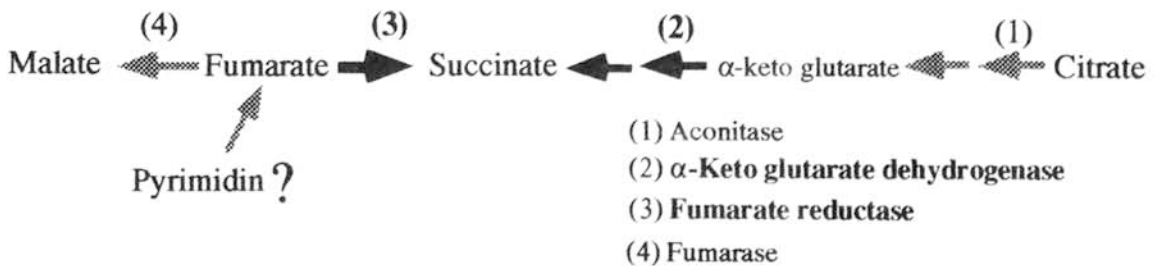


Fig. 3-13. Model of organic acids production of *S.cervisiae* in YPD15.

## 2-2 遺伝子破壊株のコハク酸以外の有機酸の生産性

Fig. 3-12 にコハク酸以外の有機酸の生産性について示す。

リンゴ酸は、好気条件の培養において、ウラシル非要求性の *FUM1* 破壊株 DFUMU, DSDHFUM の培養液中で検出されなかった。しかしウラシル要求性の破壊株 DFUMT では、対照と同じ程度に検出された。嫌気条件では、供試した全ての株で生成量が低く、検討できなかった。

フマル酸については、好気、嫌気いずれの培養でも、3種類の *FUM1* 破壊株すべてにおいて、対照にみられなかった培養液中への蓄積が観測された。この結果は、Magarifuchi らが報告している事と一致している。ただ遺伝的背景の異なる DFUMU 株と DFUMT 株では後者の蓄積量の方が低かった。

*ACO1* 破壊株 DACO の培養液中には、好気嫌気いずれにおいてもクエン酸が蓄積した。この結果は Ogur らが報告した *glt1* 変異株 ( $\Delta$  *aco1*) の結果[61]と一致する。

## 2-3 グルコース溶液での非増殖細胞のコハク酸生産性

嫌気条件の培養では破壊株 DOSM, DACO, DFRDOSM の増殖が極めて低いか全く生育しなかったため、それらの株のコハク酸生産性の検討ができなかった。そこでフマル酸還元酵素遺伝子の2重破壊株 DFRDOSM がぎりぎり成育できる微好気的な培養を行い、得られた非増殖細胞を用いて、グルコース緩衝溶液を用いた検討を行った。結果を Table 3-6 に示す。

Table 3-6. Succinate productivities of non-proliferating cells.

Strains	Genotype	Succinate productivity ( $\mu\text{mol/h/g}$ dry cells)	
		cells grown under aerobic conditions	cells grown under slightly aerobic conditions
DURA	<i>URA3</i> <sup>*</sup>	113	49
DACO	<i>ACO1::URA3</i>	34	21
DFRDS	<i>FRDS::URA3</i>	130	44
DOSM	<i>OSM1::URA3</i>	94	30
DFRDOSM	<i>FRDS::URA3</i> , <i>OSM1::THAr</i>	103	24

微好氣的条件下で培養した細胞では、対照の DURA 株に比べ DACO 株では 44% に、DOSM では 61% に、そして DFRDOSM では 49% にコハク酸生産性が低下していた。一方好気培養で集めた細胞では、DACO 株のみ生産性が低下していた（DURA の 30%）。

#### 2-4 酵母のコハク酸生産機構について

四節の結果より、Fig. 3-13 の様な酵母の有機酸生成経路を提案する。

高グルコース存在下では、TCA 回路酵素のほとんどは抑制または分解され、十分な機能を果たすことができないと考えられていた。しかし今回の研究において、好気条件下では *KGD1* 遺伝子破壊株でコハク酸生産性の減少がおこる事、*SDH1* 破壊株で逆にコハク酸の蓄積がおこる事、さらに *FUM1* 破壊株でフマル酸の蓄積とリンゴ酸の消失が観測されたことから、グルコースが高濃度（15%）に存在する条件においても、TCA 回路酵素のほとんどが機能していることが推測された。

一方、嫌気条件下においても、好気条件下と同様に *KGD1* 破壊株でのコハク酸生産性の減少が観測された。また *FUM1* 破壊株での培養液中でのフマル酸の蓄積も観測された。しかし *SDH1* 破壊株の培養液中にはコハク酸の過剰な蓄積が見られなかった。Rossi ら[47]は、in-vitro の系を用いて測定したところ、嫌気条件下ではコハク酸デヒドロゲナーゼ活性が抑制されることを報告しており、in-vivo においても同様な抑制がかかっているものと推測される。これらのことより、嫌気培養下においては好気条件下とは異なり、TCA 回路の回転は完全には繋がっていないことが推測される。また第四節で述べたとおり、フマル酸還元酵素遺伝子の 2 重破壊株が嫌気条件下では生育しないことや、グルコース緩衝溶液中での非増殖細胞のコハク酸生産性の減少が観測されたことより、この酵素の有機酸生産におよぼす寄与の程度は不明ではあるが、少なくともフマル酸の還元によってコハク酸が生成する経路も存在するものと思われる。

*FUM1*, *SDH1* の 2 重破壊株では、嫌気、好気を問わずフマル酸を蓄積した。*SDH1* 破壊により少なくとも、TCA 回路の酸化方向の動きでのフマル酸の蓄積は考えられない。また *FUM1* が破壊されていることよりリンゴ酸の還元系からの蓄積も考えられない。つまりこの株の培養液中のフマル酸蓄積はそれら以外のフマル酸が生成する経路の存在によるものと推測される。Kanda ら[66]は、アデニン合成系の中で生じる



フマル酸もコハク酸やリンゴ酸生成の前駆体となり得ることを、変異株の検討から提案しており、今回この2重破壊株で観測されたフマル酸の生成経路として有力ではないかと考えられる。

今回の実験において、当初予想していなかったものに、ウラシル要求性がコハク酸の過剰な生産をひき起こしたことがある。また *FUM1* 破壊でも *URA3* カセットで破壊したものと、*THA1* で破壊したものでは、フマル酸およびリンゴ酸の生産性が異なった。*URA3* 欠損が、どの様な機構によってこのような現象をひき起こすのかは不明であり、今後の検討が必要と思われる。また *ACO1* 破壊により嫌気条件での生育性が低下したことは、グルタミン酸要求性との関連性を含め、これも今後の検討が必要と思われる。

## 第六節 要約

実験室株 DBY747 株の各種 TCA 回路およびグリオキシル酸回路遺伝子の破壊を行い、破壊株を造成した。得られた破壊株は全て、グリセロール資化性を失うとともに、それぞれの酵素活性を失った。また DBY747 株の2種類のフマル酸還元酵素遺伝子を破壊した株は嫌気条件で生育できなくなった。さらに *OSM1* のみを破壊した株でも嫌気条件では極度に増殖性が低下した。これらの結果は、*S. cerevisiae* のフマル酸還元酵素は嫌気増殖に必須であることを意味するものと考えられる。

酵母の有機酸生産に関わると考えられる各種酵素遺伝子の破壊株について YPD15 (グルコース 15%) 培地で 30℃ 3 日間培養し、それらの培養液中の有機酸濃度を HPLC (発色検出) で測定した。好気条件での培養では *ACO1* 破壊によるクエン酸生産性の増大 (嫌気条件でも同様)、*KGD1* 破壊によるコハク酸生産性の減少、*SDH1* 破壊によるコハク酸生産性の増大および *FUM1* 破壊によるリンゴ酸の減少 (検出限界以下) 等が観測されたことより、高糖濃度下でも TCA 回路での有機酸生産の寄与が大きいと推測された。一方、嫌気条件では *KGD1* 破壊によるコハク酸生産性の減少は、好気培養と同一であったが、*SDH1* 破壊による増大は観測されなかった。これは嫌気条件でも TCA 回路の酸化経路の動きでコハク酸は生成するが、コハク酸からフマル酸の生成は起きていないことを意味する。またフマル酸還元酵素の2種のアイソザイム遺伝子を破壊した株では、増殖が著しく低下するとともに、無窒素培養において非増殖菌体のコハク酸生産能の低下が認められた。これらのことは、嫌気条件に

においてフマル酸還元が行なわれていることを示すものと思われる。なお *ura3-* を相補しない破壊株と相補した破壊株の有機酸生産性を比較したところ、ウラシル合成または代謝系からと考えられるフマル酸生成および *ura3-* 株におけるコハク酸生産性の増大が観測された。

## 第4章

### 清酒の味に影響を与える 有用酵母の育種 (有機酸生産性の異なる清酒酵母の育種)

## 第4章 清酒の味に影響を与える有用酵母の育種

### (有機酸生産性の異なる清酒酵母の育種)

#### 第一節 緒言

前章において、高糖濃度培地における実験室株 DBY747 の有機酸生産性を検討した。その結果、グルコースを 15% も含む培地でも、好気条件では TCA 回路の通常の動き（酸化方向）により有機酸が生産されることが明らかになった[67]。しかし嫌気条件では、コハク酸の生成経路として、TCA 回路の酸化、フマル酸の還元という少なくとも 2 つの経路が存在することが明らかになった。

この章においては、実用酵母の有機酸関連遺伝子の破壊を行い、清酒もろみ中での酵母の有機酸生産性の検討を試みた。

#### 第二節 協会 901 号の *ACO1*, *KGD1*, *ICL1*, *SDH1*, *FUM1* および *OSM1* 遺伝子の破壊

##### 1 実験材料および方法

使用菌株と使用プラスミドを Table 4-1, 2 に示した。なお破壊試験に用いた協会 901 号の *ura3-ura3*-変異株 Kura は定法[68,35]により、フルオロオロチン酸耐性変異株より分離した。

プラスミド pSDH1 はプラスミド pKC36 の *SDH1* 遺伝子を含む 3.6kb *Bam*HI 断片 (-273~+3295) を pUC119 の *Bam*HI 部位に挿入して構築した。

Table 4-1. Genotypes and sources of *S. cerevisiae* strains used in this study.

Strain	Genotype	Source
K901	<i>Mat a/α</i> wild-type	BSJ*1
KACO	<i>Mat a/α, ACO1::URA3, ACO1::THA'</i>	This study
KKGD	<i>Mat a/α, KGD1::URA3, KGD1::THA'</i>	This study
KICL	<i>Mat a/α, ICL1::URA3, ICL1::THA'</i>	This study
KSDH	<i>Mat a/α, SDH1::URA3, SDH1::THA'</i>	This study
KFUM	<i>Mat a/α, FUM1::URA3, FUM1::THA'</i>	This study
KOSM	<i>Mat a/α, OSM1::URA3, OSM1::THA'</i>	This study
Kura	<i>Mat a/α, ura3/ura3</i>	This study

\*1: The Brewing Society of Japan.

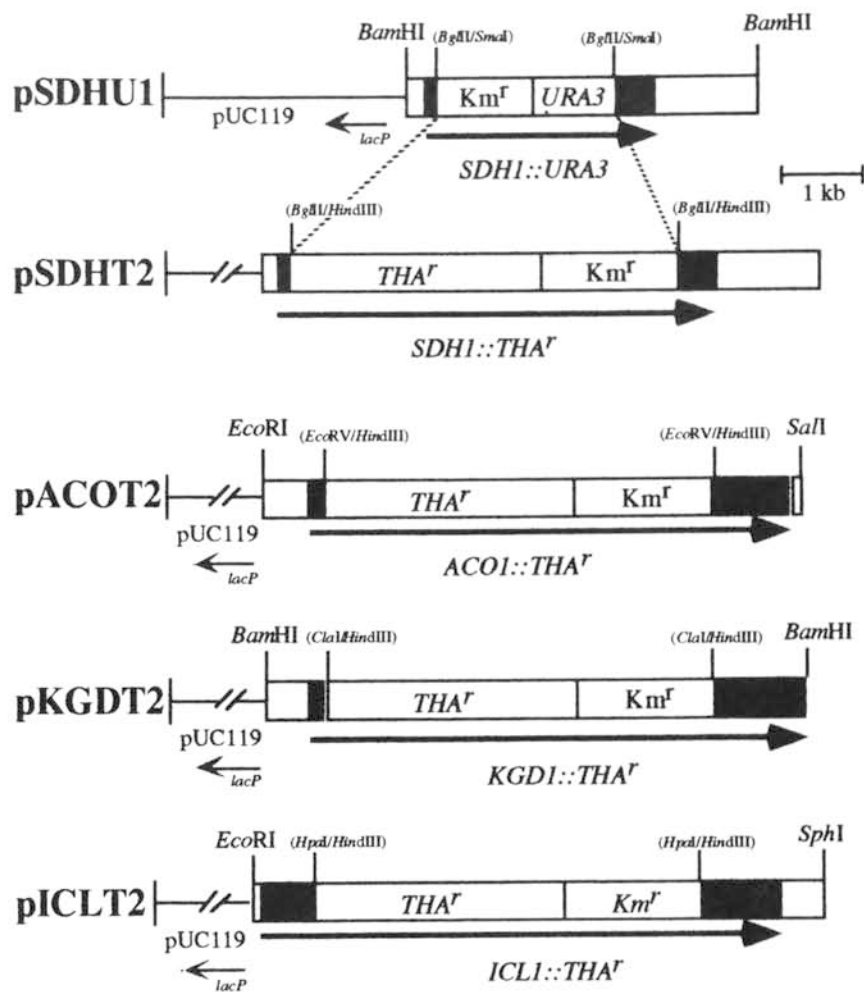
Table 4-2. Plasmids used in this study.

Plasmids	Contained yeast genes	Source
pKC36	<i>2μm replication origin, URA3,SDH1</i>	(45)
pACO1	<i>ACO1</i>	(67)
pKGD1	<i>KGD1</i>	(67)
pSDH1	<i>SDH1</i>	This study
pFUM1	<i>FUM1</i>	(67)
pICL1	<i>ICL1</i>	(67)
pURAK <sub>m</sub>	<i>URA3</i>	(67)
pHTHAK <sub>m</sub>	<i>THA<sup>r</sup></i>	(67)
pACOU1	<i>ACO1::URA3</i>	(67)
pKGDU1	<i>KGD1::URA3</i>	(67)
pSDHU1	<i>SDH1::URA3</i>	This study
pFUMU1	<i>FUM1::URA3</i>	(67)
pICLU1	<i>ICL1::URA3</i>	(67)
pOSMU1	<i>OSM1::URA3</i>	(72)
pACOT1	<i>ACO1::THA<sup>r</sup></i>	This study
pKGDT1	<i>KGD1::THA<sup>r</sup></i>	This study
pSDHT1	<i>SDH1::THA<sup>r</sup></i>	This study
pFUMT1	<i>FUM1::THA<sup>r</sup></i>	(67)
pICLT1	<i>ICL1::THA<sup>r</sup></i>	This study
pOSMT1	<i>OSM1::THA<sup>r</sup></i>	(72)

## 2 実験結果および考察

### 2-1 遺伝子破壊用プラスミドの構築

*SDH1* 遺伝子破壊用プラスミド pSDHU1 の構築は pSDH1 の *SDH1* 構造遺伝子中の 1.4kb の *Bgl*III 断片(+118~1495)を除去し、そこに *URA3* カセットを挿入して行い、*Bam*HI で消化後、酵母の破壊に用いた。*ACO1*,*KGD1*,*ICL1* および *SDH1* 遺伝子破壊用のプラスミド pACOT1,pKGDT1,pICLT1 および pSDHT1 の構築は、破壊用カセットとして *URA3* カセットの代わりに *THA<sup>r</sup>* カセットを用いた事を除いて、pACOU1,pKGDU1,pICLU1 および pSDHU1 の構築と同様に行なった(Fig. 4-1)。



**Fig. 4-1.** Plasmids constructed for gene disruption. The plasmids pSDHU1 and pSDHT1 were constructed by the insertion of *URA3* or *THA'* cassettes into the ORF contained in the plasmid pSDH1 (see Materials and Methods). The plasmids pACOT1, pKGDT1 and pICLT1 were constructed using the same procedure as pACOU1, pKGDU1 and pICLU1 (67), respectively, except that the inserted fragment for gene disruption was the *THA'* cassette instead of the *URA3* cassette.

## 2-2-2 遺伝子の破壊

協会 901 号は倍数体のため、2 段階の破壊により破壊株を造成した。まずプラスミド pACOU1, pKGDU1, pICLU1, pFUMU1, pOSMU1 および pSDHU1 から破壊用断片 *ACO1::URA3*, *KGD1::URA3*, *ICL1::URA3*, *FUM1::URA3*, *OSM1::URA3* および *SDH1::URA3* を切り出し、Kura 株の破壊を行った。それぞれの形質転換により得られた URA3+クローンをランダムに 5 株を選び、サザンハイブリダイゼーションにより正確に破壊されたクローンを選抜した。次にプラスミド pACOT1, pKGDT1, pICLT1, pFUMT1, pOSMT1 および pSDHT1 から破壊用断片 *ACO1::THA<sup>r</sup>*, *KGD1::THA<sup>r</sup>*, *ICL1::THA<sup>r</sup>*, *FUM1::THA<sup>r</sup>*, *OSM1::THA<sup>r</sup>* および *SDH1::THA<sup>r</sup>* を切り出し、2 段階目の形質転換を行った。2mg/ml の THA を含む SD 培地に塗布し、生育してきたコロニーを SD および SG 培地にレプリカして SD 培地にのみ生育するクローンを選択した。その後それらの株よりゲノム DNA を抽出し、Km<sup>r</sup> 遺伝子をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行い、破壊を確認した (Fig. 4-2)。なお *ACO1* 破壊では SD 培地にグルタミン酸を塗布した培地を用いて選択した。また *OSM1* 遺伝子の破壊はサザンハイブリダイゼーションだけで確認を行った。

それぞれの破壊株の酵素活性を Table 4-3 に示す。*ACO1*, *KGD1*, *ICL1*, *FUM1* および *SDH1* 破壊株では、それぞれの酵素の活性は検出されなかった。また *OSM1* 破壊株のフマル酸還元酵素活性は、K901 の 80% に低下しており、実験室株 DBY747 株の *OSM1* 破壊株 (73%) とほぼ同程度の活性低下であった。

遺伝子破壊株の増殖特性を Table 4-4 にまとめた。この中で実用株の結果と実験室株の結果で異なる点は、実験室株の *ACO1* 破壊株がグルタミン酸要求性を示したのに対して、実用株の *ACO1* 破壊株 KACO ではグルタミン酸要求性を示さなかったことである。KACO 株ではアコニターゼ活性が認められないので、もしかすると TCA 回路を経由しない、他のグルタミン酸生成系が実用株では存在するのかもしれない。

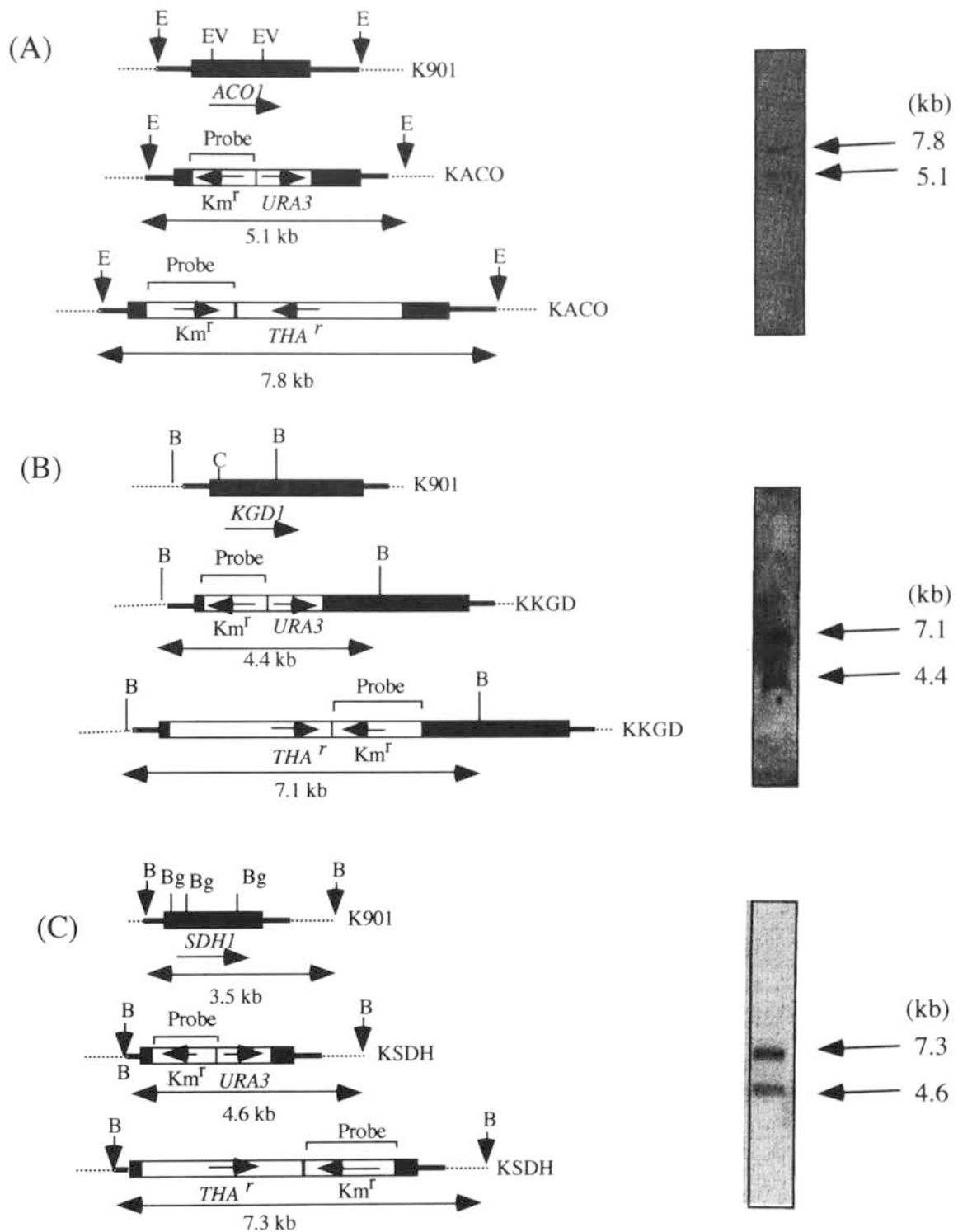


Fig. 4-2. The construction used to disrupt the *ACO1* (A), *KGD1* (B), *SDH1* (C), *ICLI* (D), *FUMI* (E) and *OSMI* genes (F). The locations of the *EcoRI* (E), *EcoRV* (EV), *HindIII* (H), *BamHI* (B), *BglIII* (Bg), *HpaI* (Hp), *ClaI* (C) and *PstI* (P) sites are marked. The *ACO1*, *KGD1*, *SDH1*, *ICLI*, *FUMI* and *OSMI* genes are depicted by solid bars. The arrows at the gene show the direction of transcription. Genomic DNAs were digested with *EcoRI* (A), *BamHI* (B, C) and *HindIII* (D, E, F), separated on 1% agarose gels, and then transferred onto a nylon membrane. A 1.8-kb *BamHI* fragment bearing the *Km<sup>r</sup>* gene labeled with fluorescein were used as probes. No fragment was detected by the *Km<sup>r</sup>* gene probe in the genomic DNA of K901 (data not shown). A *HindIII* digest of lambda DNA was used as the size standard.



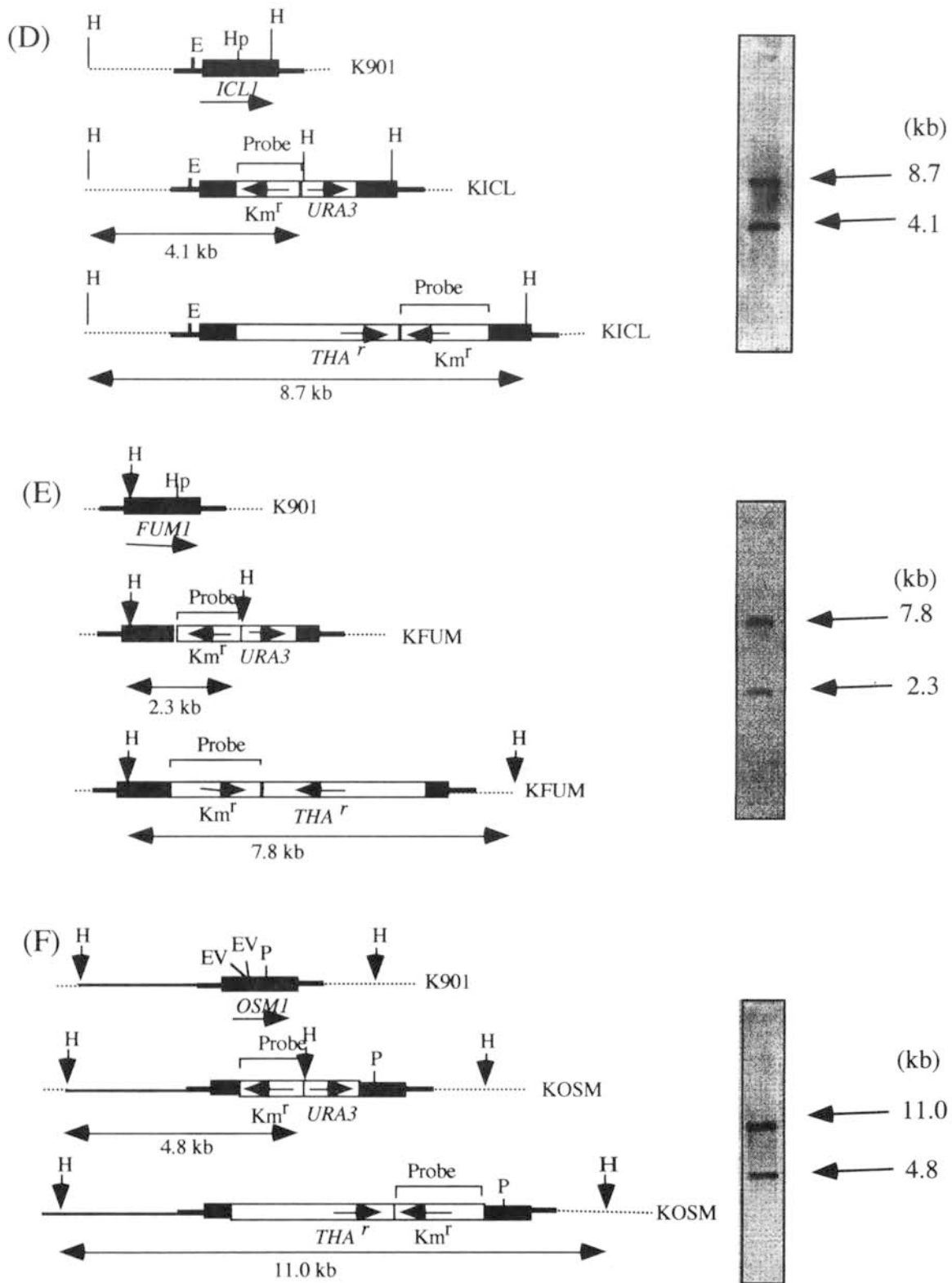


Fig. 4-2. continued.

Table 4-3. Enzyme activities in wild-type strains and disruptants.

Enzyme	Strain	Genotype	Specific activity
			( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein)
Aconitase	K901		0.77
	KACO	<i>ACO1::URA3,ACO1::THA'</i>	N.D.* <sup>1</sup>
$\alpha$ -Ketoglutarate dehydrogenase	K901		0.7
	KKGD	<i>KGD1::URA3,KGD1::THA'</i>	N.D.
Isocitrate lyase	K901		0.014
	KICL	<i>ICL1::URA3,ICL1::THA'</i>	N.D.
Succinate dehydrogenase	K901		4.4
	KSDH	<i>SDH1::URA3,SDH1::THA'</i>	N.D.
Fumarate reductase	K901		0.044
	KOSM	<i>OSM1::URA3,OSM1::THA'</i>	0.035
Fumarase	K901		4.4
	KACO	<i>ACO1::URA3,ACO1::THA'</i>	0.5
	KFUM	<i>FUM1::URA3,FUM1::THA'</i>	N.D.

Yeast cells were grown in 300ml Erlenmeyer flasks containing 100ml YPD for 24h at 30°C with shaking. Cell free extract was prepared and used for enzyme assay.

\*1 Not detected (less than 1% of the parent K901).

Table 4-4. Growth properties of disruptants.

Strain	Genotype	Rich media		Minimal media		
		YPD	YPG	SD	SG	SE
K901	<i>Mat a/<math>\alpha</math></i>	+++	+++	+++	+++	+++
KACO	<i>ACO1::URA3,ACO1::THA'</i>	++	-	+++	-	-
KKGD	<i>KGD1::URA3,KGD1::THA'</i>	++	-	+++	-	-
KICL	<i>ICL1::URA3,ICL1::THA'</i>	+++	+++	+++	+/-	-
KSDH	<i>SDH1::URA3,SDH1::THA'</i>	+++	+	+++	-	-
KFUM	<i>FUM1::URA3,FUM1::THA'</i>	++	-	+++	-	-
KOSM	<i>OSM1::URA3,OSM1::THA'</i>	+++	+++	+++	+++	+++

Growth on the various media was scored after 2, 4, and 7d of incubation at 30°C. The most rapid growth is indicated by three plus signs. The minus sign indicates the absence of growth.

### 第三節 破壊株の発酵試験

#### 1 実験材料および方法

酵母の発酵試験は、第3章と同様に行った。

#### 2 実験結果および考察

6種類の破壊株の発酵試験を YPD15 培地でおこなった(Table 4-5)。嫌気条件での培養では実験室株の破壊株でもみられた様に *OSM1* 破壊株 KOSM の増殖性が極めて低かった(Fig. 4-3)。他の破壊株の増殖性およびエタノール生産性は野性型 K901 と変わりなかった。破壊株 KACO ( $\Delta$  *ACO1*), KKGD ( $\Delta$  *KGD1*)および KFUM ( $\Delta$  *FUM1*)では、K901 に比べコハク酸生産性がそれぞれ 42%、24%および 59%に低下していた。また、KSDH ( $\Delta$  *SDH1*)および KICL ( $\Delta$  *ICL1*)では K901 と同程度であった。さらに、KFUM の培養液中にはフマル酸の蓄積とともに、リンゴ酸の消失が観測された。以上の結果は、実験室株と同様であった。しかし実験室株の破壊株でみられた様な、*ACO1* 破壊によるクエン酸の蓄積はみられなかった。なお好気条件での培養では、*SDH1* 破壊でコハク酸の蓄積がみられる等、ほぼ実験室株と同様な結果が得られている。

Table 4-5. Analysis of ethanol and organic acids in fermentated YPD15 medium

Strain	Ethanol (%)	Organic acid concentrations (mg/l)				
		citrate	malate	succinate	fumarate	acetate
K901	5.8±0.1	148± 2	46± 2	464±10	<10	114±11
KACO	5.6±0.5	152±10	69±19	193±24	<10	91±18
KKGD	6.0±0.4	124± 6	30± 3	112±28	<10	115±18
KICL	6.0±0.4	129± 2	36± 1	394±11	<10	103±18
KSDH	6.1±0.3	132± 9	39± 2	406±34	<10	95±13
KFUM	5.9±0.5	150± 2	<10	276±23	36±0	105±36
KOSM* <sup>1</sup>	N.D.* <sup>2</sup>	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Kura	5.8±0.1	155±16	68±27	737±170	<10	158±44

Fermentation time: 2 days

The values given are the means ± S.E. of three different tests.

\*1 The strain showed very poor growth (Fig. 1).

\*2 N.D.: Not detected

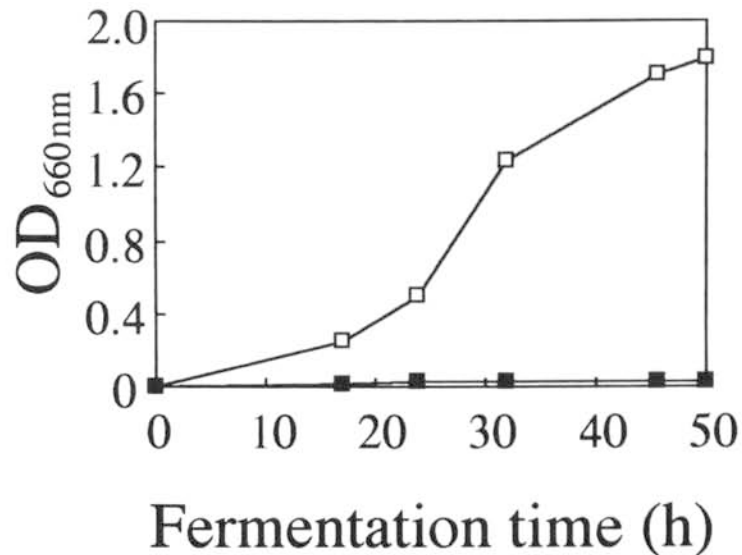


Fig. 4-3 Growth characteristics of the wild-type strain and the *OSM1* gene disruptant on YPD15 medium under anaerobic condition. Symbols: (□) K901, (■) KOSM  
At the indicated times, the culture was gently stirred, and the turbidity was measured at 660 nm.

#### 第四節 清酒醸造試験

##### 1 実験材料および方法

Table 1-2 の仕込み配合により難波らの方法[33]に準じて実験室規模の清酒醸造試験を行った。なお発酵は 15℃一定温度で行ない、炭酸ガス減量を測定し発酵経過をモニタリングした。得られた酒の一般分析は国税庁所定分析法[69]に従い行った。

##### 2 実験結果および考察

破壊株の小仕込み試験を行い、酒もろみ中における有機酸の生成機構の検討を行った。OSM1 破壊株 KOSM および破壊用の元株である Kura を除き、他の破壊株では炭酸ガス減量、およびエタノール生成経過とも野性型 K901 とほとんど差がなかった。KOSM および Kura の発酵性は低下していた(Fig. 4-4)。しかしこの結果については、見方を変えると、KOSM 株は完全嫌気での培養ではほとんど生育しないにも関わらず酒もろみでは生育が可能であったとも言える。つまり嫌気性が高いと考えられていた酒もろみでも、その嫌気性は完全ではないと考えられる。

18 日間、15℃で醸造したもろみを 3000 回転 30 分の遠心分離を行い上槽した。生

成酒の一般分析および有機酸分析結果を Table 4-6 に示す。破壊株 KACO および KOSM の滴定酸度は K901 に比べ上昇した (3ml 以上)。生成酒中のコハク酸含量は KACO, KKGD および KFUM で野性型 K901 の 53%、63% および 63% に低下した。一方 KOSM で醸造した酒には野性型の 1.5 倍のコハク酸が含まれていた。また KACO で醸造した酒には 2.1 倍のリンゴ酸が含まれていた。しかし発酵試験でみられた様な KFUM でのフマル酸の蓄積およびリンゴ酸の消失は観測されなかった。なおウラシル要求性株 Kura で醸造した酒には過剰のコハク酸およびリンゴ酸が含まれており、滴定酸度も 7.8ml と極めて高い値をとった。

清酒醸造試験における破壊株 KKGD と KFUM のコハク酸生成量は、同程度に低下していたが、その生成経過については異なっていた (Fig. 4-5)。KKGD ではもろみ初期でのコハク酸生産が野性型の約 50% (発酵 5 日目) に低下していたが、もろみ中期以降のコハク酸生成経過は野性型と同一であった。一方、KFUM では発酵初期では親株に比べわずかに生成量が低下したものの (約 10%)、中期以降でコハク酸がほとんど生成しなかった。よって KKGD と KFUM のもろみ中でのコハク酸生産性の低下は異なるメカニズムによるものと考えられる。つまり窒素源も豊富で、エタノール濃度も低く、細胞が盛んに増殖している発酵初期においては、*KGD1* 遺伝子の破壊によりコハク酸生成量が低下したことより、TCA 回路の酸化方向の動きで主にコハク酸が生成しているのではないかと考えられる。逆に窒素源の濃度が低下し、エタノール濃度も高く、細胞の増殖が止まる時期にあたる発酵後期では、*FUM1* 破壊によりコハク酸がほとんど生成しなかったことより、還元的な経路により大部分のコハク酸が生成するのではないかと考えられる (Fig. 4-6)。

*ACO1* 破壊株ではリンゴ酸の高生産とコハク酸の低生産性が観測された (Table 4-6)。Magarifuchi らは呼吸欠損株 ( $\rho^-$ ) で同様な生産性を報告している。彼らは、呼吸欠損株でのリンゴ酸およびコハク酸生成は、細胞質酵素により、オキザロ酢酸を経由して還元的に起こるのではないかと推測している。*ACO1* 破壊株においても、同様なことが言えるのかもしれない。アコニターゼが働かず、順回転の TCA 回路での消費が抑制される場合、acetyl-CoA が蓄積すると考えられる。Acetyl-CoA はピルビン酸カルボキシラーゼを活性化するので、オキザロ酢酸がピルビン酸から過剰に生産されるのではないかと考えられる。もしオキザロ酢酸を起点とする還元的コハク酸生産系が動いているとすると、理由は不明であるが、*ACO1* 破壊株でのフマラーゼ活性の極

度な低下 (Table 4-3) と相まって、リンゴ酸が蓄積し、コハク酸が減少したのではないかと考えられる。

Table 4-6. Properties of sake made using disruptants.

Strain	Sake meter	Ethanol (%)	Total acidity (ml)	Amino acidity (ml)	Organic acid concentrations (mg/L)				
					malate	succinate	lactate	fumarate	acetate
K901	+10.0	19.0	2.8	2.6	202	667	321	<10	<10
KACO	+6.0	17.7	3.3	2.7	428	355	269	<10	<10
KKGD	+6.0	18.7	2.6	2.4	270	419	312	<10	<10
KICL	+7.0	18.1	2.6	2.4	284	601	334	<10	<10
KSDH	+7.0	18.1	2.6	2.4	286	578	332	<10	<10
KFUM	+6.0	18.0	2.6	2.2	341	417	283	<10	<10
KOSM	-13.0	15.6	3.1	3.3	159	996	357	<10	<10
Kura	+0.0	13.6	7.8	1.8	643	2324	360	<10	<10

Fermentation time: 18 days

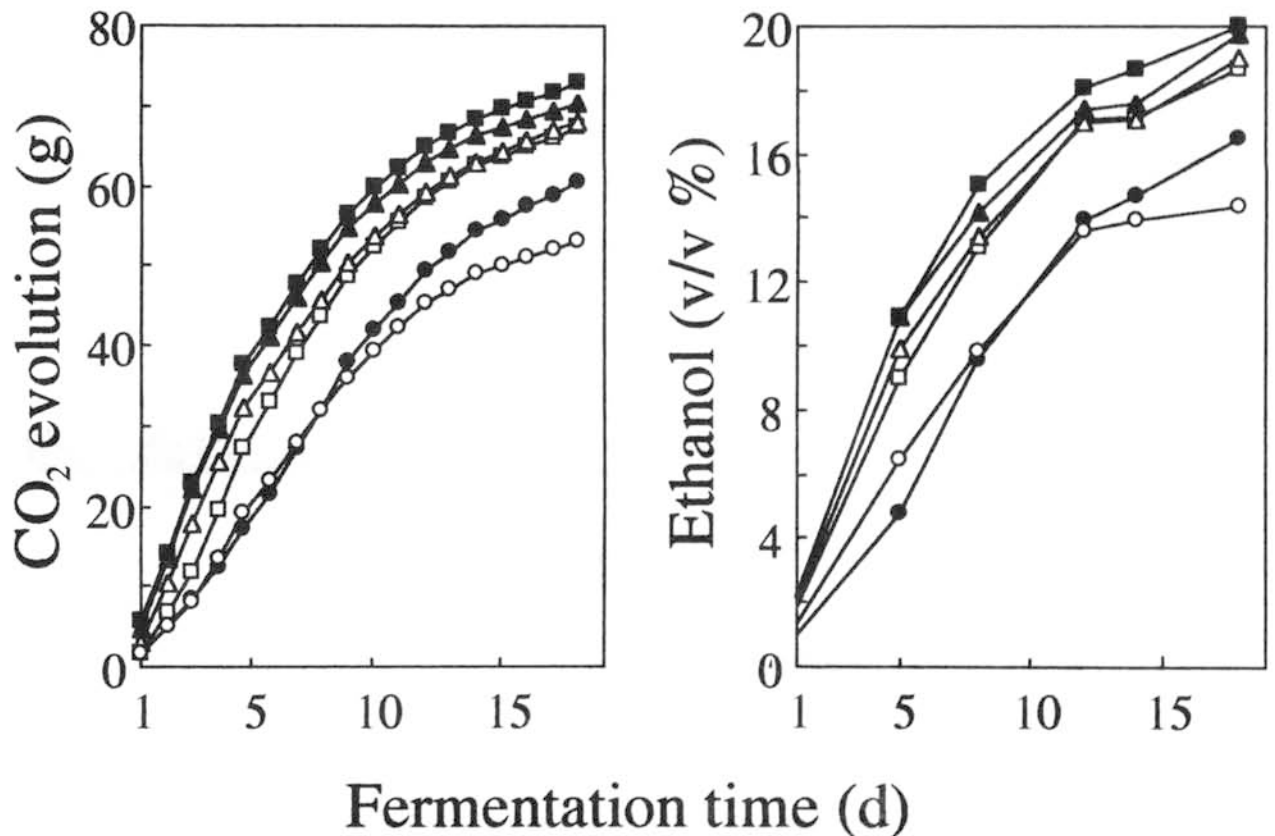


Fig. 4-4. Time-courses of CO<sub>2</sub> evolution and ethanol concentration during sake fermentation using disruptants. (A): CO<sub>2</sub> evolution, (B): ethanol concentration. Strains KICL and KSDH exhibited similar time courses to strain K901. Symbols: ■, K901; □, KACO; ▲, KKGD; △, KFUM; ●, KOSM, ○Kura.

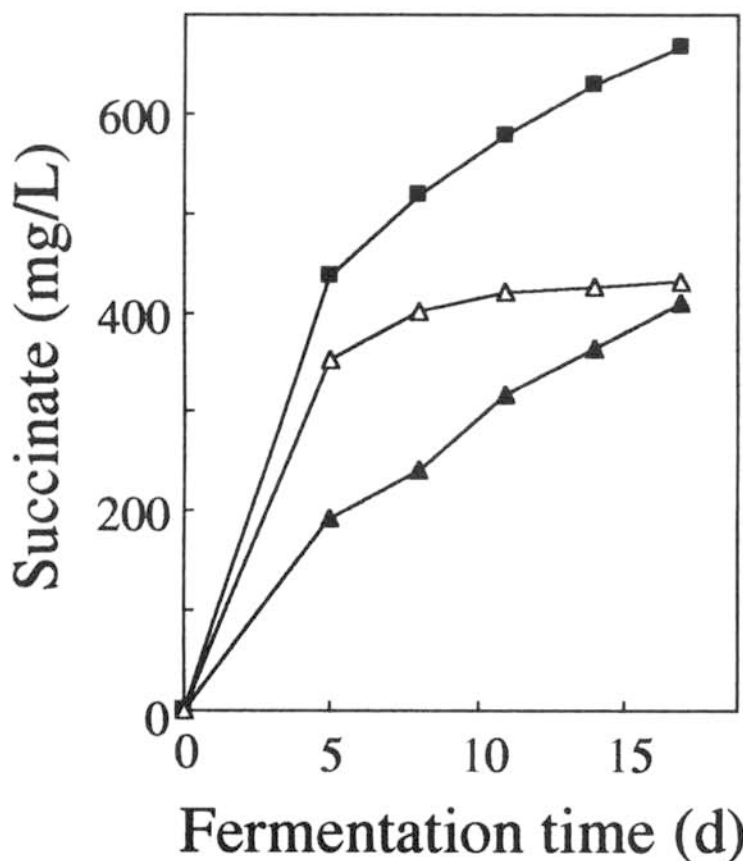


Fig. 4-5. Time course of succinate production of sake fermented by disruptants. Symbols: ■, K901; ▲, KKGD; △, KFUM.

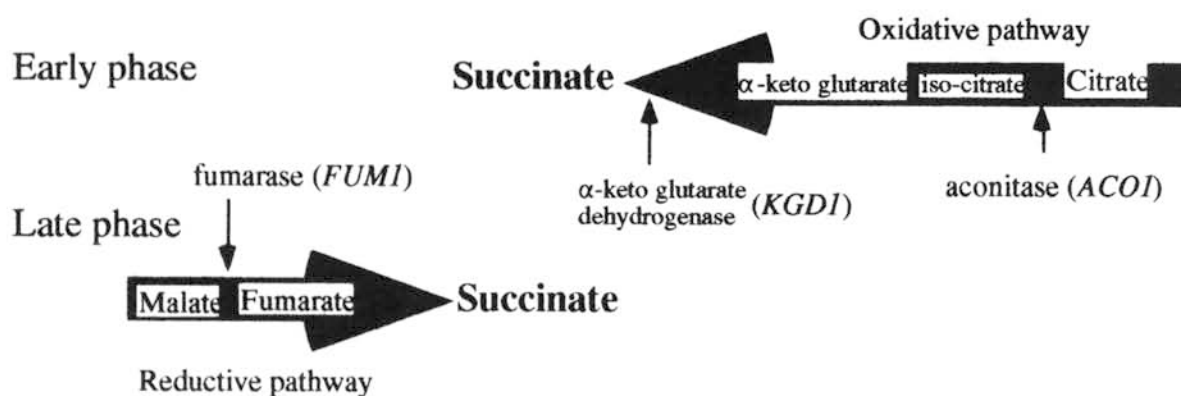


Fig. 4-6. Main pathway for succinate formation during sake fermentation.

当初、フマル酸還元酵素の一つのアイソザイムをコードする遺伝子 *OSMI* 破壊株では、コハク酸生産性の低下が観測されるのではないかと考えられた。実際、実験室株の *OSMI* 破壊株の非増殖細胞では、グルコース溶液でのコハク酸生産性が低下してい

た。しかしこの実用株の破壊株 KOSM では、逆にもろみ中にコハク酸を野性型よりも多く蓄積した(Table 4-6)。フマル酸還元酵素のもう一つのアイソザイムをコードする *FRDS* 遺伝子を破壊していないので、確かなことはわからないが、還元系が抑制された結果、TCA 回路の酸化系が活性化したのではないかと推測している。なぜなら KOSM のコハク酸の蓄積は、大部分がアルコール濃度が 10%程度に達するまでに起きているからである (Fig. 4-7)。野性型では同アルコール濃度の時点までは、増殖が続いており、もろみ初期の段階と考えられ、先に述べた様に、その段階での主要なコハク酸生成系は TCA 回路の酸化による経路と推定している。但し、*FRDS* がコードするアイソザイムの活性化等も考えられるため、今後の検討が必要と思われる。

*FUMI* 破壊株 KFUM のフマル酸およびリンゴ酸の生産性は、YPD15 培地を用いた発酵試験と酒の仕込み試験では異なっていた(Table 4-5,6)。発酵試験では、培養液中のフマル酸の蓄積とリンゴ酸の消失が観測されたが、酒もろみではその様な現象は観測されなかった。培地中に含まれるアミノ酸やビタミンなどの様々な物質が酵母の有機酸生産性に影響を与えることが報告されており[70,40,65]、この違いも培地またはもろみ中に含まれる物質の影響と考えられる。今後、造成した様々な破壊株を用いて、組成の異なる培地や各種成分を添加したもろみでの有機酸生産性や代謝経路を検討することにより、上記影響をより詳細に検討することが可能であり、酒もろみ中での有効な有機酸生成制御法の開発に結びつくのではないかと考えている。

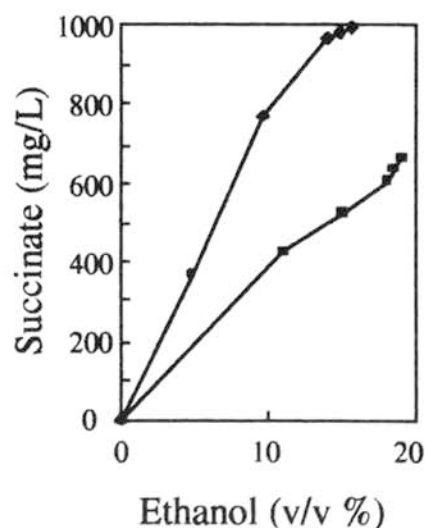


Fig. 4-7 Time course of succinate production of sake fermented by disruptants. Symbols: ■, K901; ◆, KOSM.



## 第五節 変異処理による有機酸生産性に特徴を持つ清酒酵母の育種

### 1 目的

前節において遺伝子破壊株の有機酸生産性の検討を行ったところ、TCA 回路酵素の遺伝子を破壊することにより、コハク酸生産性が低下した株またはリンゴ酸生産性が増大した株が得られた。しかしこれらの株は遺伝子組換え体であるため、実用化には問題が残されている。そこで TCA 回路酵素遺伝子破壊株ではグリセロールの資化性を失うことに着目し、その特性を利用してランダムな変異処理により得た変異株の中から破壊株と同等の有機酸生産性を示す株の分離を試みた。また前節の結果は、酒もろみ中での有機酸蓄積に、酵母のミトコンドリアが大きく関与していることを示している。そこでミトコンドリアと細胞質の間のリンゴ酸輸送に関わる遺伝子に変異がおこれば、有機酸生産性に特徴を持つ清酒酵母の育種ができるのではないかと考え、上記輸送阻害剤であるフェニルコハク酸[71]の耐性株の分離を試みた。

### 2 実験材料および方法

#### 2-1 グリセロール非資化性変異株の分離

YPD プレート上で2日間 30℃で培養した協会901号(K901)の細胞を200mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH8.0)9.7ml に懸濁し ( $2.5 \times 10^7$  cells/ml),そこにエチルメタンсульフォネート(EMS)を0.3ml 加え 30℃で1時間緩やかに振とうして変異処理した。培養後、2回滅菌水で洗浄し、そこに5mlのYPD培地を加え30℃で一夜培養した。真菌抗生物質であるナイスタチンを取込み易くするため、細胞を集菌、洗浄後5mlの窒素源を含まない YCB 培地 (Yeast Carbon Base 1.17%, Difco)に移し、30℃で1日窒素飢餓培養を行った。そして一回洗浄した後、10mlのSG培地に移して4時間培養した。培養後0.1mlのナイスタチン (4400units/mg, wako)溶液 (1mg/ml)を添加し、さらに1時間培養した。濃縮効率をあげるためSG培地での培養およびナイスタチン処理をさらに1度繰り返したのち、YPDプレートに塗布した。30℃で3日間培養し、出現したコロニーをSDおよびSGプレートにレプリカして、SD培地のみに生育する株をグリセロール非資化性株として分離した。

#### 2-2 フェニルサクシネート耐性変異株の分離

協会 901 号を上記と同様に EMS で変異処理した後、フェニルコハク酸を含む SD 培地に塗布し、生育してきたコロニーを耐性株として分離した。なお薬剤濃度は、あらかじめ行った予備実験の結果から、3mg/ml に設定した。

### 3 実験結果および考察

#### 3-1 グリセロール非資化性変異株の性質

EMS 処理後、ナイスタチン濃縮を行なって分離した 1200 株についてグリセロールの資化性を検討した結果、11 株の非資化性株を分離できた。その内 6 株は発酵試験において親株と異なるコハク酸またはリンゴ酸の生産性を示したが、フマル酸を蓄積する株は存在しなかった。これらの 6 株を用いて清酒の仕込み試験を実施した結果を Table 4-7 に示す。変異株 KAYG1 および KAYG4 はリンゴ酸高生産性を示した。また

Table 4-7. Properties of sake made using glycerol non-assimilating mutants.

Strain	Sake meter	Ethanol (%)	Total acidity (ml)	Amino acidity (ml)	Organic acid concentrations (mg/l)				
					malate	succinate	lactate	fumarate	acetate
K901	+9.5	19.0	2.5	2.0	236	666	316	<10	<10
KAYG1	+7.5	18.2	4.3	1.9	498	626	254	<10	257
KAYG4	-2.0	15.4	3.7	2.3	529	428	268	<10	<10
KAYG7	+1.0	17.9	3.0	2.4	463	330	273	<10	<10
KAYG8	+4.5	18.5	2.4	2.0	219	430	262	<10	<10
KAYG9	+6.0	17.7	2.9	2.1	484	431	270	<10	<10
KAYG11	+7.5	18.3	2.3	2.4	279	369	278	<10	<10

Fermentation time: 18 days

変異株 KAYG7 および KAYG9 はリンゴ酸高生産性かつコハク酸低生産性を示した。さらに変異株 KAYG8 および KAYG11 はコハク酸低生産性を示した。これらの変異株の中で、リンゴ酸のみを高生産する KAYG1 および KAYG4 は、遺伝子破壊実験では得られていなかったタイプの株であった。変異を受けた遺伝子を探る目的で、*ACO1* 遺伝子破壊株 KACO と類似の有機酸生産性を示した KAYG7 および KAYG9 については *ACO1* を含むプラスミド pSE31 で、また *KGD1* 遺伝子破壊株 KKGD と類似していた KAYG8 および KAYG11 株については、*KGD1* を含むプラスミド pG70/T1 で形質転換した。その結果 KAYG8 株を pG70/T1 で形質転換した時のみ、グリセロール非資化

性が相補され SG 培地に生育してくる形質転換体を得た(Table 4-8)。また KAYG8 株は Fig. 4-8 に示す様に KGD1 破壊株と類似のコハク酸生成経過を示した。これらの結果から、KAYG8 株は *kgd1* 変異によりコハク酸低生産性を示したのではないかと推定される。他のグリセロール非資化性株については、酵母の遺伝子バンクで形質転換したが、非資化性を相補するクローンは得られていない。

得られた変異株は実醸造に使用することが可能であり、今後の利用が期待される。

Table 4-8. Transformation of non-glycerol assimilation mutants by plasmids containing *ACO1* or *KGD1* genes.

Strain	used plasmids	SG <sup>*3</sup>
KAYG1	pSE31 <sup>*1</sup>	-
KAYG4	pSE31	-
KAYG7	pSE31	-
KAYG8	pG70/T1 <sup>*2</sup>	+
KAYG9	pSE31	-
KAYG11	pG70/T1	-

\*1 Plasmid pSE31 contains *ACO1* gene.

\*2 Plasmid pG70/T1 contains *KGD1* gene.

\*3 The growth on synthetic glycerol medium. + denotes that the strain could assimilate glycerol by introduction of plasmid.

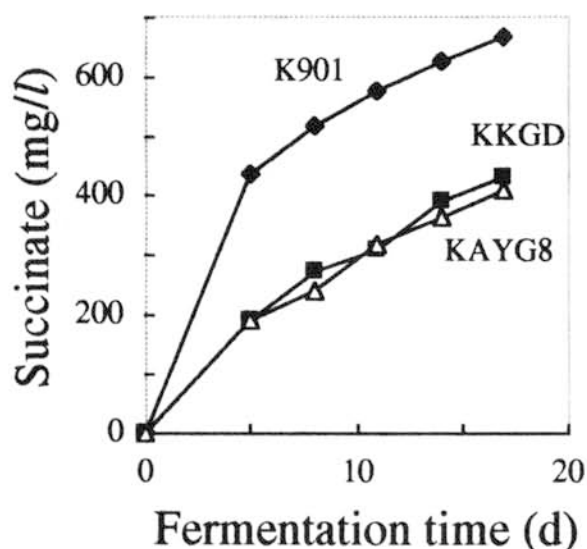


Fig. 4-8. Time course of succinate production of sake fermented by disruptants. Symbols: ◆, K901; ■, KKGD; △, KAYG8.

### 3-2 フェニルサクシネート耐性変異株の性質

協会 901 号を EMS 処理した後、フェニルサクシネートを含む SD 培地に塗布し出現したコロニー(頻度:  $1 \times 10^{-5}$ )をランダムに選び、発酵試験で予備スクリーニングをした後、12 株の耐性変異株について清酒醸造試験を行った。Fig. 4-9 に示す様に全ての株でリンゴ酸生産性の低下が観測された。その内の一株 KNPR3 は発酵経過も良好であり、実用への利用が期待された(Table 4-9)。耐性を獲得した機構については、当初予想したミトコンドリアからのリンゴ酸膜輸送系の変異とも考えられるが、今後の検討が必要と思われる。

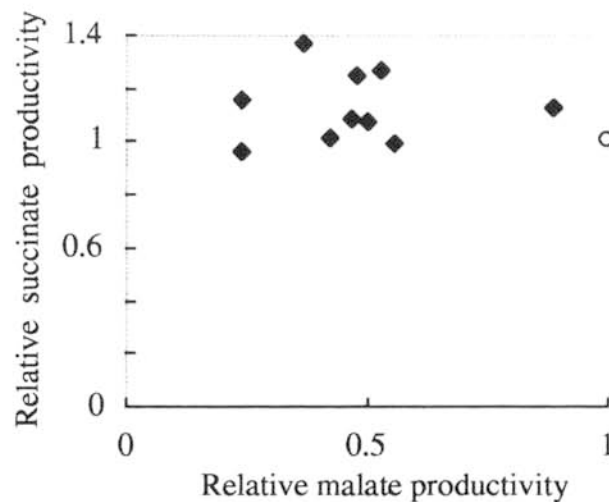


Fig. 4-9 Succinate and malate productivities of phenyl succinate resistant mutants in sake fermentation. Symbols: ◆, phenyl succinate resistant mutants, ○, K901. Succinate and malate productivities of strains were compared to that of K901.

Table 4-9. Properties of sake made using one of phenyl succinate resistant mutants.

Strain	Sake meter	Ethanol (%)	Total acidity (ml)	Amino acidity (ml)	Organic acid concentrations (mg/L)				
					malate	succinate	lactate	fumarate	acetate
K901	-17.0	18.7	2.8	1.8	393	580	421	<10	<10
KNPR3	-27.0	17.6	2.6	2.1	197	650	428	<10	<10

Fermentation time: 12 days

## 第六節 育種酵母の有機酸生産性

遺伝子破壊または変異処理により、有機酸生産性に特徴を有する様々な株を育種することができた (Fig. 4-10)。コハク酸低生産性株として破壊株 KKGD, KFUM およびグリセロール非資化性変異株 KAYG8 が得られた。またコハク酸低生産性かつリンゴ酸高生産性株として破壊株 KACO およびグリセロール非資化性変異株 KAYG7 が得られた。リンゴ酸のみを高生産する株としては、グリセロール非資化性変異株 KAYG1 が得られた。さらにウラシル要求性変異株 Kura、OSM1 破壊株 KOSM およびフェニルコハク酸耐性変異株 KNPR3 は、それぞれコハク酸・リンゴ酸高生産性、コハク酸高生産性、およびリンゴ酸低生産性を示した。これらの育種株は、味の面で高付加価値化および差別化された酒の開発に寄与するものと考えられる。なお破壊株 KKGD でわずかにリンゴ酸生産量が親株 K901 に比べ上昇している様に見える。これは、*kgd1* 変異と思われる KAYG8 株が親株と同じリンゴ酸生成量を示したことより、KKGD に正常な *URA3* 遺伝子が一つしか含まれていないためではないかと考えている。また TCA 回路酵素遺伝子破壊株と異なる有機酸生産性を持つ株が遺伝子破壊または変異により得られたことより、酒もろみ中における酵母の有機酸生産には TCA 回路酵素群以外の様々な遺伝子が関与していると考えられ、今後のさらなる研究が必要と思われる。

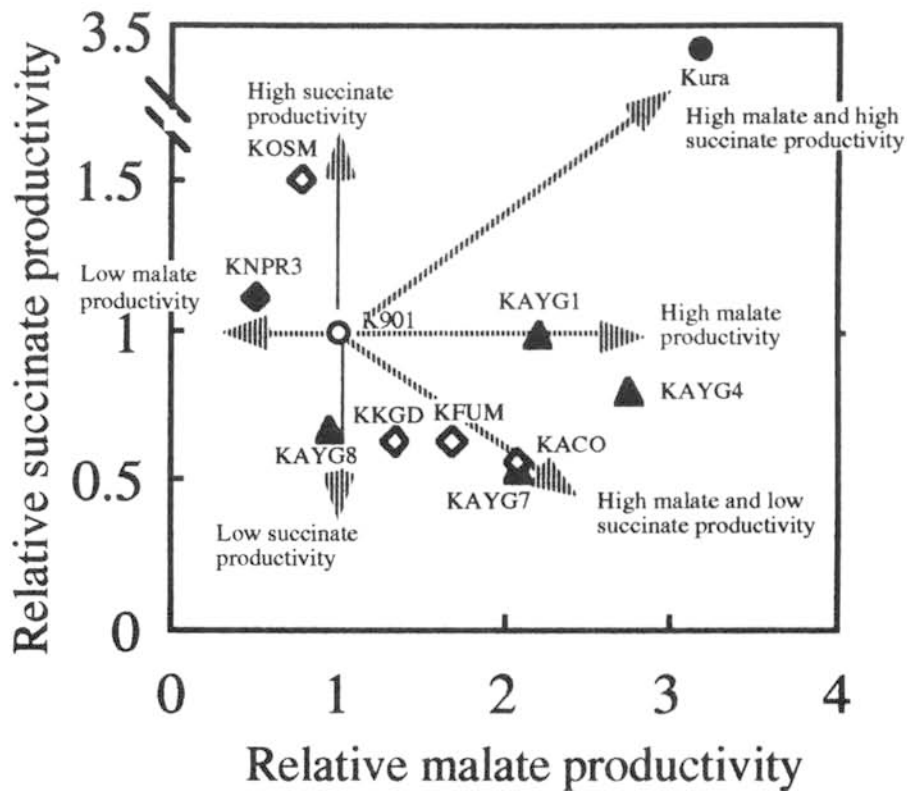


Fig. 4-10. Succinate and malate productivities of gene disruptants and mutants in sake fermentation. Symbols:  $\diamond$ , disruptants;  $\bullet$ , uracil auxotrophic mutant;  $\blacktriangle$ , glycerol non-assimilating mutants,  $\blacklozenge$ , phenyl succinate resistant mutants. Succinate and malate productivities of strains were compared to that of K901 at each sake brewing. Since strains KAYG9 and KAYG11 exhibited similar productivities to strains KAYG7 and KAYG8, respectively, those points were eliminated from the figure.

## 第七節 要約

清酒酵母協会 901 号の有機酸生産関連遺伝子 (*ACO1*, *KGDI*, *SDHI*, *FUM1*, *ICL1* および *OSMI*) の破壊株を作成し、これらの株の酒もろみ中での有機酸生産性の検討をおこなった。アコニターゼ遺伝子 (*ACO1*) 破壊株は清酒仕込み試験において親株に比べ 2 倍のリンゴ酸生産性と 0.5 倍のコハク酸生産性を示した。またフマル酸還元酵素遺伝子 (*OSMI*) 破壊株は 1.5 倍のコハク酸生産性を示した。さらにケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ遺伝子 (*KGDI*) およびフマラーゼ遺伝子 (*FUM1*) 破壊株は、コハク酸低生産性を示した。しかし *KGDI* 破壊株と *FUM1* 破壊株では、もろみ中でのコハク酸生成経過に違いが見られた。*KGDI* 破壊株では、発酵初期においてコハク酸生産性の低下がみられたのに比べ、*FUM1* 破壊株では発酵初期でのコハク酸生成量の低下はわずかであり、むしろ発酵後期におけるコハク酸生産がほとんどみられない点が特徴的であった。これらの結果は、発酵初期においては TCA 回路の酸化方向の動きによりコハク酸が主に生成し、発酵後期においては還元的な経路でコハク酸が生成することを示すものと思われる。一方、遺伝子破壊実験から得られた情報を元に、変異処理でも有機酸生産性に特徴を持つ変異株を分離した。得られたグリセロール非資化性変異株の中には、コハク酸低生産性、リンゴ酸高生産性およびリンゴ酸高生産かつコハク酸低生産性の株が見い出された。特にコハク酸低生産性変異株の内、一株は *kgd1* 変異によるものと思われた。またフェニルサクシネート耐性変異株の中から、リンゴ酸低生産性株を分離した。これらの遺伝子破壊株および変異株は、風味の面で高付加価値化および差別化された酒の開発に寄与するものと考えられる。

## 総括および結論

本論文は、清酒の風味に影響を与える酵母の育種に関する研究成果をまとめたものであり、緒論並びに本編五章と総括・結論から構成されている。

緒論において、本研究を進めるに至った背景について概説し、本研究の目的について述べた。

清酒の風味に影響を与える要因の中で、香りと味に関しては酵母によって生産される物質が寄与している。よって酵母を改変することにより、様々な風味を有する清酒の開発が可能であると考えられた。香りに関しては、酵母の生産する $\beta$ -フェネチルアルコールに着目し、遺伝子組換えによる過剰生産株の育種を試み、以下の本編1章と2章の成果を得た。また味に関しては、酵母の生産する有機酸に着目し、未解明であった高糖濃度、嫌気条件下または清酒もろみ中での酵母の有機酸生産機構について、遺伝子破壊の手法を用いて検討を加えるとともに、遺伝子破壊および変異処理による育種を試み、以下の本編3章から4章の成果を得た。

第1章では  $\beta$ -フェネチルアルコール高生産性酵母を遺伝子組換え法により育種するため、清酒用酵母協会901号の $\beta$ -チエニルアラニン (THA)耐性変異株

(K901-T12)より遺伝子バンクを作成し、ショットガンクローニングにより $\beta$ -フェネチルアルコール高生産性を付与するTHA耐性変異( $THA^r$ )遺伝子をクローニングした。この遺伝子は、塩基配列より、*ARO4* 遺伝子の変異型であり、その変異は構造遺伝子中での点変異によるものであることがわかった。協会901号をこの $THA^r$  遺伝子を含むYCp型のプラスミドpAF1で形質転換したところ、形質転換株は、清酒の小仕込試験において、変異株と同様、親株に比べ約4倍の $\beta$ -フェネチルアルコール高生産性を示した。また変異点を含む $THA^r$  遺伝子を挿入した2種類のプラスミドpAF101-P1およびpAF1-9Pを用いて、相同的組換え法により協会901号を形質転換したところ、得られた形質転換株は発酵試験において高い $\beta$ -フェネチルアルコール生産性を示した。

第2章では、クローニングしたTHA耐性変異遺伝子を用いて、マルチクローニング部位を有し、優性的な選択が可能なYEep型およびYCp型の酵母-大腸菌シャトルベクター、ならびに相同的組換え法において組換え株の選択が難しい遺伝子を、酵母染色体上の*ARO4* 遺伝子下流部位に挿入し、 $\beta$ -チエニルアラニン耐性を指標とし



て選択を可能にする相同組換え用ベクターを構築した。また THA 耐性変異遺伝子下流に大腸菌での選択マーカーとしてカナマイシン耐性 ( $Km^r$ ) 遺伝子を挿入した遺伝子破壊用カセットを含むプラスミド pHTHAKm を構築した。さらに酵母での選択マーカーとして *URA3* 遺伝子を持つ、遺伝子破壊用カセットを有するプラスミド pURAKm も構築した。破壊用カセットの中に大腸菌での選択マーカーである  $Km^r$  遺伝子を組み込むことにより、遺伝子破壊用プラスミドの構築が極めて容易になった。

第 3 章では、酵母の有機酸生産に関わると考えられる各種酵素遺伝子の破壊株について YPD15 (グルコース 15%) 培地で 30°C 3 日間培養し、それらの培養液中の有機酸濃度を HPLC (発色検出) で測定した。好気条件での培養では *ACO1* 破壊によるクエン酸生産性の増大 (嫌気条件でも同様)、*KGD1* 破壊によるコハク酸生産性の減少、*SDHI* 破壊による増大および *FUM1* 破壊によるリンゴ酸の減少 (検出限界以下) 等が観測されたことより、高糖濃度下でも TCA 回路での有機酸生産の寄与が大きいと推測された。一方、嫌気条件では *KGD1* 破壊によるコハク酸生産性の減少は、好気培養と同一であったが、*SDHI* 破壊による増大は観測されなかった。これは嫌気条件でも TCA 回路の酸化経路の動きでコハク酸は生成するが、コハク酸からフマル酸の生成は起きていないことを意味する。一方、2 種類のフマル酸還元酵素遺伝子を破壊した株は嫌気条件で生育できなくなった。*OSM1* のみを破壊した株でも嫌気条件では極度に増殖性が低下した。これらの結果は、*S. cerevisiae* のフマル酸還元酵素は嫌気増殖に必須であることを意味する。また無窒素培養においてフマル酸還元酵素遺伝子の二重破壊株では非増殖菌体のコハク酸生産性の低下が認められた。これらのことは、嫌気条件においてフマル酸還元が行なわれていることを示すものと思われる。よって嫌気条件では TCA 回路の酸化系およびフマル酸からの還元系、少なくとも 2 種類のコハク酸生産系が存在することが明らかになった。なお *ura3-* を相補しない破壊株と相補した破壊株の有機酸生産性を比較したところ、ウラシル合成または代謝系からと考えられるフマル酸生成および *ura3-* 株におけるコハク酸生産性の増大が観測された。

第 4 章では、清酒酵母協会 901 号の有機酸生産関連遺伝子 *ACO1*, *KGD1*, *SDHI*, *FUM1*, *ICL1* および *OSM1* の破壊株を作成し、これらの株の酒もろみ中での有機酸生産性の検討をおこなった。アコニターゼ遺伝子 (*ACO1*) 破壊株は清酒仕込み試験において親株に比べ 2 倍のリンゴ酸生産性と 0.5 倍のコハク酸生産性を示した。またフマ

ル酸還元酵素遺伝子 (*OSMI*) 破壊株は 1.5 倍のコハク酸生産性を示した。さらにケトグルタール酸デヒドロゲナーゼ遺伝子 (*KGDI*) およびフマラーゼ遺伝子 (*FUMI*) 破壊株は、コハク酸低生産性を示した。しかし *KGDI* 破壊株と *FUMI* 破壊株では、もろみ中でのコハク酸生成経過に違いが見られた。*KGDI* 破壊株では、発酵初期においてコハク酸生産性の低下がみられたのに比べ、*FUMI* 破壊株では発酵初期でのコハク酸生成量の低下はわずかであり、むしろ発酵後期におけるコハク酸生産がほとんどみられない点が特徴的であった。これらの結果は、発酵初期においては TCA 回路の酸化方向の動きによりコハク酸が主に生成し、発酵後期においては還元的な経路でコハク酸が生成することを示すものと思われる。一方、遺伝子破壊実験から得られた情報を元に、変異処理でも有機酸生産性に特徴を持つ変異株を分離した。得られたグリセロール非資化性変異株の中には、コハク酸低生産性、リンゴ酸高生産性およびリンゴ酸高生産かつコハク酸低生産性の株が見い出された。特にコハク酸低生産性変異株の内、一株は *kgd1* 変異によるものと思われた。またフェニルコハク酸耐性変異株の中から、リンゴ酸低生産性株を分離した。これらの遺伝子破壊株および変異株は、味で高付加価値化および差別化された酒の開発に寄与するものと考えられる。

本章では、本研究を総括した。

## 謝辞

本論文をまとめるにあたり、終始ご懇切な御指導と励ましを賜りました、信州大学大学院工学研究科 岡崎光雄教授、下坂 誠助教授、ならびに御高見を賜るとともに、励ましを賜りました、兒玉 徹教授、神田鷹久教授、小島峯雄教授、関口順一教授、林田信明助教授に衷心から感謝の意を表します。

また、大学院在学中の三年間、本研究の遂行に対して様々有益なご教示を賜りました、信州大学遺伝子実験施設 田口悟朗助手、ならびに遺伝子工学研究室の学生諸君に厚くお礼申しあげます。

さらに、大学での卒業研究テーマとして本研究の一翼を担っていただいた黒柳智子嬢、小林美里嬢ならびに吉澤孝太郎君に感謝申しあげます。

大学院進学のお機会を与えてくださりました、長野県および前食品工業試験場長 馬場 茂博士はじめ大池和威場長、福澤幹雄生物工学部長および試験場の先輩、同僚の皆様に厚くお礼申しあげます。

さらに遺伝子工学的手法に関して多大な御助言を賜りました工業技術院 生物工学工業技術研究所 藤田 篤博士、ならびに遺伝子を譲渡していただくとともに酵母の有機酸生成に関して貴重な御討論を頂きました、杏林大学保健栄養学部 村椿春博助教授、榎本慶一郎助手の共同研究者の皆様に厚く感謝申し上げます。

最後に、学生生活を送るわがまを許してくれた、我が妻みどりに感謝します。

## 本研究に関する発表論文等

蟻川幸彦、藤田 篤、馬場 茂、小栗 勇： $\beta$ -フェネチルアルコール高生産酵母の分子育種、生物工学会誌、72、95-100 (1994)

Arikawa, Y., Fujita, A., Baba, S. and Oguri, I.: Molecular breeding of yeast producing a large amount of  $\beta$ -phenethyl-alcohol. *Seibutsukougaku kaishi*, 72, 95 - 100(1994)

Arikawa, Y., Enomoto, K., Muratubaki, H., and Okazaki, M.: Soluble fumarate reductase isoenzymes from *Saccharomyces cerevisiae* are required for anaerobic growth. *FEMS Microbiol. letter*, 165, 111-116 (1998)

Arikawa, Y., Kuroyanagi, T., Shimosaka, M., Enomoto, K., Muratsubaki, H., Kodaira, R., and Okazaki, M.: Effect of gene disruptions of the TCA cycle on production of succinic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biosci. Bioeng.*, 87, 29-37 (1999)

Arikawa, Y., Kobayashi, Kodaira, R., M., Shimosaka, M., Muratsubaki, H., Enomoto and Okazaki, M.: Isolation of sake yeast strains possessing various levels of Succinate- and/or malate producing abilities by gene Disruption or Mutation. *J. Biosci. Bioeng.*, 87, 333-339 (1999)

## 参考発表論文等

蟻川幸彦、馬場 茂、近藤君夫、桑原秀明、宮崎忠雄：プロトプラスト融合法による清酒酵母（長野酵母 NP<sub>14</sub>）の改良、醸協誌、83、605-609 (1988)

Arikawa, Y., Baba, S., Kondou, K., Kuwahara, H. and Miyazaki, T.: Improvement of the sake yeast. Nagano yeast NP<sub>14</sub>, by protoplast fusion technique. *J. Brew. Soc. Japan*, 83, 605-609(1988)

蟻川幸彦、馬場 茂、近藤君明、桑原秀明、吉川茂明、小栗 勇： $\beta$ -(2-チエニル)アラニン耐性変異株からの $\beta$ -フェネチルアルコール、酢酸 $\beta$ -フェネチル高生産性清酒酵母の分離 醸協誌、86、616-618 (1991)

Arikawa, Y., Baba, S., Kondou, K., Kuwahara, H., Yoshikawa, S. and Oguri, I.: Breeding of sake-yeast producing a large quantity of  $\beta$ -phenethyl alcohol and  $\beta$ -phenethyl acetate from  $\beta$ -(2-thienyl) -DL-alanine-resistant mutants. *J. Brew. Soc. Japan*, 83, 605-609(1988)

Arikawa, Y., Kiyoshi, T., Ikezaki, H., Shinha, Y., Ito, Y., Oguri, I. and Baba, S.: Analysis of sake taste using multielectrode taste sensor; *Sens. Mater.*, 7, 261-270(1995)

Arikawa, Y., Kiyoshi, T., Ikezaki, H., Shinha, Y., Ito, Y., Oguri, I. and Baba, S.: Analysis of sake mash using multichannel taste sensor; *J. Ferment. Bioeng.*, 82, 371-376(1996)

Fujita, A., Oka, C., Arikawa, Y., Katagai, T., Tonouchi, A., Kuhara, S. and Misumi, Y.: A yeast gene necessary for bud-site selection encodes a protein similar to insulin-degrading enzymes; *Nature*, 372,567-570(1994)

共著

清酒酵母研究会編：清酒酵母の研究-80年代の研究-（1992）

## 引用文献

- [1] 清酒酵母研究会編：清酒酵母の研究、p144-153、清酒酵母研究会 (1972)
- [2] Ashida, S., Ichikawa, E., Suginami, K. and Imayasu S.: Isolation and application of mutants producing sufficient isoamyl acetate, a sake flavor component. *Agric. Biol.Chem.*, **51**, 2061-2065(1987).
- [3] Ichikawa, E., Hosokawa, N., Hata, Y., Abe, Y., Suginami, K and Imayasu, S.: Breeding of a Sake yeast with improved ethyl caproate productivity. *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 2153-2154(1991)
- [4] 蟻川幸彦、馬場 茂、近藤君夫、桑原秀明、宮崎忠雄：プロトプラスト融合法による清酒酵母（長野酵母 NP<sub>14</sub>）の改良、*醸協誌*、**83**、605-609（1988）
- [5] 蟻川幸彦、馬場 茂、近藤君明、桑原秀明、吉川茂明、小栗 勇： $\beta$ -（2-チエニル）アラニン耐性変異株からの $\beta$ -フェネチルアルコール、酢酸 $\beta$ -フェネチル高生産性清酒酵母の分離 *醸協誌*、**86**、616-618（1991）
- [6] 曾根秀隆：ビール酵母の分子育種、*バイオサイエンスとインダストリー*、**51**、724-729（1993）
- [7] 佐藤 信：美酒の設計図、p 86、大日本図書（1974）
- [8] Arikawa, Y., Toko, K., Ikezaki, H., Shinha, Y., Ito, Y., Oguri, I. and Baba, S.: Analysis of sake mash using multichannel taste sensor; *J. Ferment. Bioeng.*, **82**, 371-376(1996)
- [9] Arikawa, Y., Toko, K., Ikezaki, H., Shinha, Y., Ito, Y., Oguri, I. and Baba, S.: Analysis of sake taste using multielectrode taste sensor; *Sens. Mater.*, **7**, 261-270(1995)
- [10] Tomizawa, M., Yonezaki, H., Ueda, R., and Hayashida, M.: Studies on utilization rate of raw materials on sake-making industry (part9). *Hakkokogaku*, **38**, 342-350 (1960). ( in Japanese).
- [11] 相川元庸、水津哲義、市川英治、川戸章嗣、安倍康久、今安 聰：リンゴ酸生成能の高い清酒酵母の育種、*醸酵工学会誌*、**70**、473-477（1992）
- [12] 吉田 清、稲橋正明、中村欽一、野白喜久雄：Cycloheximide 耐性株から得られたリンゴ酸高生産性酵母、*醸協誌*、**88**、645-647（1993）
- [13] 右原由紀子、神田晃敬、浜地正昭、熊谷知栄子：プリン生合成系のフィードバック制御を解除した清酒酵母の性質、平成7年度日本醸造学会大会要旨集、p10、（1995）
- [14] Akita, O., Ida, T., Obata, T. and Hara, S.: Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* producing a large quantity of  $\beta$ -phenethyl alcohol and  $\beta$ -phenethyl acetate. *J. Ferment. Bioeng.*, **69**, 125-128(1990).

- [15] Fukuda, K., Watanabe, M., Asano, K. and Ueda, H.: Breeding of brewing yeast producing a large amount of  $\beta$ -phenylethyl alcohol and  $\beta$ -phenylethyl acetate. *Agric. Biol. Chem.* **54**, 269-271(1990).
- [16] Botstein, D., Falco, S. C., Stewart, S. E., Brennan, M., Scherer, S., Stinchcomb, D. T., Struhl, K. and Davis, R. W.: Sterile host yeasts (SHY): a eukaryotic system of biological containment for recombinant DNA experiments. *Gene* **8**, 17-24(1979).
- [17] Casadaban, M. J. and Cohen, S. N.: Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **138**, 179-207(1980).
- [18] Vieira, J. and Messing, J.: The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* **19**, 259-268(1982).
- [19] Hanahan, D.: Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557 (1983)
- [20] Johnston M, Davis RW.: Sequences that regulate the divergent *GAL1-GAL10* promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **4**, 1440-1448(1984).
- [21] 橋本英明 私信
- [22] Yanisch-Perron, C., J. Vieira, and J. Messing.: Improved M13 phage cloning vectors and host strains:nucleotide sequence of the M13mp 18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103(1985).
- [23] Vieira, J. and Messing, J.: Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods Enzymol.* **153**, 3-11(1987).
- [24] Takeshita, S., Sato, M., Toba, M., Masahashi, W. and Hashimoto-Gotoh, T.: High-copy-number and low-copy-number plasmid vectors for *lacZ*-complementation and chloramphenicol- or kanamycin-resistance selection. *Gene*, **61**, 63-74(1987).
- [25] Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. and Kimura, A.: Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.*, **153**, 163-168 (1983).
- [26] Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Mniatis, T.: *Molecular cloning*, 2nd Edition; A Laboratory Manual (1989). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, Cold Spring Harbor, NY.
- [27] Künzler, M., Paravicini, G., Egli, C. M., Irniger, S. and Braus, G. H.,: Cloning, primary structure and regulation of the *ARO4* gene, encoding the tyrosine-inhibited 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, **113**, 67-74(1992).
- [28] 福田和郎 :  $\beta$ -フェネチルアルコール高生産酵母の分子育種. *醸協誌*, **83**, 22-28 (1993)
- [29] Fukuda. K., Watanabe, M., Asano, K., Ouchi, K. and Takasawa, S.: A mutated *ARO4* gene for feedback-resistant DAHP synthase which causes both o-fluoro-DL-phenylalanine resistance and  $\beta$ -phenethyl-alcohol overproduction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet*, **20**, 453-456(1991).

- [30] Teshida, S., Furter, R., Niederberger, P., Braus, G., Paravicini, G. and Hutter, R.: Cloning of the *ARO3* gene of *Saccharomyces cerevisiae* and its regulation. *Mol. Gen. Genet.*, **205**, 353-357(1986)
- [31] Lingens, F., Goebel, W. and Uessler, H.: Regulation der biosynthese der aromatischen aminosäuren in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem*, **1**, 363-374(1967).
- [32] Takahashi, M., Chan, WWC.: Separation and properties of isozymes of 3-deoxy-Darabino-heptulosonate-7-phosphate synthetase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Can. J. Biochem*, **49**, 1015-1025(1971).
- [33] 難波康之祐, 小幡孝之, 萱島 進, 山崎与四良, 村上光彦, 下田高久: 小仕込試験法の設定、醸協誌, **73**, 295-298(1978).
- [34] Chattoo, B. B., Sherman, F., Azubalis, D. A, Fjellstedt, T. A., Mehnert, D. and Ogur, M.: *Genetics*, **93**, 51-65(1979).
- [35] Boeke, J. D., LaCroute, F. and Fink, G. R.: A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance. *Mol. Gen. Genet.* **197**, 345-346 (1984).
- [36] Van Den Berg, M.A. and Yde Steensma, H.: Expression Cassettes for Formakdehyde and Fluoroacetate Resistance, two dominant markers in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **13**, 551-559(1997)
- [37] Fujita, A., Oka, C., Arikawa, Y., Katagai, T., Tonouchi, A., Kuhara, S. and Misumi, Y.: A yeast gene necessary for bud-site selection encodes a protein similar to insulin-degrading enzymes; *Nature*, **372**, 567-570(1994)
- [38] Hengen, P.N. and Iyer, V.N.: DNA cassettes containing the origin of transfer (*oriT*) of two broad-host-range transfer systems. *BioTechniques*, **13**, 60-62 (1992)
- [39] Güldener, M., Heck, S., Fiedler, T., Beinhauer, J. and Hegemann, J.H.: A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Research*, **24**, 2519-2524(1996)
- [40] 若井芳則、嶋崎孝行、原 昌道: 清酒醪ならびにワイン醪中におけるコハク酸の生成、醸酵工学、**58**、363-368 (1980)
- [41] Magarifuchi, T., Goto, K., Iimura, Y., Tadenuma, M. and Tamura, G.: Effect of yeast fumarase gene (*FUM1*) disruption on production of malic, fumaric and succinic acids in sake mash. *J. Ferment. Bioeng.*, **80**, 355-361 (1995).
- [42] Wu, M. and Tzagoloff, A.: Mitochondrial and cytoplasmic fumarase in *Saccharomyces cerevisiae* are encoded by a single nuclear gene *FUM1*. *J. Biol. Chem.*, **262**, 12275-12282 (1987).
- [43] Gangloff, S. P., Marguet, D. and Lauquin, G. J.-M.: Molecular cloning of the yeast mitochondrial aconitase gene (*ACO1*) and evidence of a synergistic regulation of expression by glucose plus glutamate. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 3551-3561 (1990).



- [44] Repetto, B. and Tzagoloff, A.: Structure and regulation of *KGD1*, the structural gene for Yeast  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 2695-2705 (1989).
- [45] Chapman, K. B., Solomon, S. D. and Boeke, J. D.: *SDHI*, the gene encoding the succinate dehydrogenase flavoprotein subunits from *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, **118**, 131-136 (1992).
- [46] Fernandez, E. Moreno, F. and Rodicio, R.: The *ICLI* gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **204**, 983-990 (1992).
- [47] Rossi, C., Hauber, J. and Singer, T. P. Mitochondrial and cytoplasmic enzymes for the reduction of fumarate to succinate in yeast. *Nature* **204**, 167 - 170 (1964)
- [48] Weiner, J. H. and Dickie, P. J. Fumarate reductase of *Escherichia coli* : elucidation of the covalent-flavin component. *J. Biol. Chem.* **254**, 8590 - 8593 (1979)
- [49] Uden, G., Hackenberg, H. and Kroger, A. Isolation and functional aspects of the fumarate reductase involved in the phosphorylative electron transport of *Vibrio succinogenes*. *Biochim. Biophys. Acta.* **591**, 275 - 288 (1980)
- [50] Muratsubaki, H. and Katsume, T. Purification and properties of fumarate reductase from baker's yeast. *Agric. Biol. Chem.* **46**, 2909 - 2917 (1982)
- [51] Enomoto, K., Ohki, R. and Muratsubaki, H. Cloning and sequencing of the gene encoding the soluble fumarate reductase from *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Res.* **3**, 263 - 267 (1996).
- [52] Muratsubaki, H. and Enomoto, K. One of the fumarate reductase isoenzymes from *Saccharomyces cerevisiae* is encoded by the *OSMI* gene. *Arch. Biochem. Biophys.* **352**, 175-181(1998)
- [53] Singh, A. and Sherman, F. Deletions of the iso-1-cytochrome c and adjacent genes of yeast: discovery of the *OSMI* gene controlling osmotic sensitivity. *Genetics* **89**, 653 - 665(1978)
- [54] Rothstein, R. J. One-step gene disruption in yeast, in Wu, R. and Grossman, L. (ed.), *Methods Enzymol.*, **101**. p. 202-211. Academic Press, New York, N. Y(1983)
- [55] Fansler, B., and Lowenstein, J. M.: Aconitase from pig heart. *Methods Enzymol.* **13**, 26-31 (1969).
- [56] Reed, L. J., and Mukherjee, B. B.:  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase complex from *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* **13**, 55-61 (1969).
- [57] Dixon, G. H. and Kornberg, H. L.: Assay methods for key enzymes of the glyoxylate cycle. *Biochem. J.* **72**, 3 (1959).
- [58] King, T. E.: Preparation of succinate dehydrogenase and reconstitution of succinate oxidase. *Methods Enzymol.* **10**, 322-331 (1967).
- [59] Kanarek, L. and Hill, R. L.: The preparation and characterization of fumarase from swine heart muscle. *J. Biol. Chem.*, **239**, 4202-4206 (1964).
- [60] Lowly, O.H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265 - 275 (1951)

- [61] Ogur, M., Coker, L., and Ogur, S.: Glutamate auxotrophs in *Saccharomyces*, I. The biochemical lesion in the *glt-1* mutants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **14**, 193-197 (1964).
- [62] 蟻川幸彦、藤田 篤、馬場 茂、小栗 勇： $\beta$ -フェネチルアルコール高生産酵母の分子育種、*生物工学会誌*、**72**、95-100 (1994)
- [63] Ansell, R., Granath, K., Hohmann, S., Thevelein, J.M., Adler, L. The two isoenzymes for yeast NAD<sup>+</sup>-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase encoded by *GPD1* and *GPD2* have distinct roles in osmoadaptation and redox regulation. *EMBO J.* **16**, 2179 - 2187(1997)
- [64] Andreasen, A.A. and Stier, T.J.B.: Anaerobic nutrition of *Saccharomyces cerevisiae*, I. Ergosterol requirement for growth in a defined medium. *J. Cell. Comp. Physiol.* **41**, 23-26(1953)
- [65] Muratubaki, H.: Regulation of reductive production of succinate under anaerobic conditions in baker's yeast.: *J. Biochem.* **102**, 705-714 (1987).
- [66] 神田晃敬、石川有紀子、浜地正昭、布川弥太郎：清酒酵母による有機酸生成に関する研究（第1報）有機酸生成に与えるアデニン生合成系の影響、平成5年度日本生物工学会大会要旨集、p52(1993)
- [67] Arikawa, Y., Kuroyanagi, T., Shimosaka, M., Enomoto, K., Muratubaki, H., Kodaira, R., and Okazaki, M.: Effect of gene disruptions of the TCA cycle on production of succinic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biosci. Bioeng.*, **87**, 29-37(1999)
- [68] 北本勝ひこ：清酒酵母からのウラシル要求性変異株の取得法、*醸協* **84**, 849-851 (1989)
- [69] 国税庁所定分析法注解、第3版、日本醸造協会
- [70] 若井芳則：清酒醸造における有機酸、*醸協誌*、**83**、579-583 (1988)
- [71] 日高弘義 編：阻害剤研究法、p277, 共立出版 (1985)
- [72] Arikawa, Y., Enomoto, K., Muratubaki, H., and Okazaki, M.: Soluble fumarate reductase isoenzymes from *Saccharomyces cerevisiae* are required for anaerobic growth. *FEMS Microbiol. letter*, **165**, 111-116 (1998)
- [73] Shultz, J., Hermodson M.A, Garner C.C., and Herrmann K.M.: The nucleotide sequence of the *aroF* gene of *Escherichia coli* and the amino acid sequence of the encoded protein, the tyrosine-sensitive 3-deoxy-D-heptulosonate 7-phosphate synthase. *J. Biol. Chem.*, **259**, 9655-9661 (1984)
- [74] Davis, W.D., and Davidson B.E.: The nucleotide sequence of *aroG*, the gene for 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthetase(phe) in *Escherichia coli* K12. *Nucleic Acids Res.* **10**, 4045-4058 (1982)

[75] Zurawski,G., Gunsalus,R.P., Brown K.D., and Yanofsky C.: Structure and regulation of *aroH*, the structural gene for the tryptophan repressible 3-deoxy-D-heptulosonate 7-phosphate synthase of *Escherichia coli*. J. Mol. Biol., **145**, 47-73 (1981)

# Study on the breeding of the Sake yeast having distinctive productivities of flavor and taste substrates.

Yukihiko Arikawa

## Summary

### Chapter 1. [Molecular breeding of high productive yeast of $\beta$ -phenethyl-alcohol]

$\beta$ -(2-Thienyl)-DL-alanine(THA)-resistant mutant K901-T12 which overproduced  $\beta$ -phenethyl-alcohol were isolated from a fermentation strain of *Saccharomyces cerevisiae* K901. pAF1 containing 5.5Kb insert fragment which showed THA resistance and high productivity of  $\beta$ -phenethyl-alcohol in *Saccharomyces cerevisiae* was cloned from a gene library of K901-T12 by shotgun cloning. In sake brewing, transformed strains by pAF1 indicated high productivity of  $\beta$ -phenethyl-alcohol. Sequencing of 2.1Kb *PmaCI* fragment in 5.5Kb fragment revealed *ARO4* gene coding 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphanate(DAHP) synthase inhibition by tyrosine. The mutation was determined to be a missense mutation comparing with wild type gene cloned by PCR. By homologous recombination between genomic *ARO4* of K901 and the mutated *ARO4* gene, high productive strains of  $\beta$ -phenethyl-alcohol were isolated.

### Chapter 2. [Applying $\beta$ -thienyl alanine resistant gene (*THA'*) for construction of vectors and gene disruption cassettes]

YCp and YEpl type shuttle vectors between *Saccharomyces cerevisiae* and *E.coli* which could be selected positively were constructed by using the mutated *ARO4* gene (*THA* resistant gene), and vector which could insert other genes into site of *ARO4* gene via homologous recombination was constructed.

Two plasmids, the pURAKm containing the *URA3* gene and the kanamycin resistant (*Km<sup>r</sup>*) gene, and the pHTHAKm containing  $\beta$ -thienyl alanine resistant (*THA'*) gene and the *Km<sup>r</sup>* gene, were constructed and used for an efficient construction of the disruption cassettes. The *Km<sup>r</sup>* gene is useful for a selection of a clone harboring a gene disruption plasmid in *E. coli*, and *URA3* and *THA'*, for the selection of the gene-disruptants in *S. cerevisiae*.

The plasmid pURAKm was constructed by an insertion of a 1.8-kb *Bam*HI fragment bearing the kanamycin resistant (*Km<sup>r</sup>*) gene from the pNH-Kan/*oriT* plasmid, and a 1.3-kb *Hind*III fragment containing the *URA3* gene into the *Bam*HI and *Hind* III site of pUC13, respectively. Plasmid pHTHAKm was constructed by an insertion of a 5.1-kb *Hind*III fragment containing

the *THA'* gene (-1837 to +1427) that confers resistance to  $\beta$ -thienyl alanine, and the *Km<sup>r</sup>* gene (inserted the blunt-ended 1.8-kb *Bam*HI fragment into the *Eco*RV site located 255-bp downstream from stop codon of the *THA'* ORF) into pHSG398.

### **Chapter 3. [Effect of gene disruptions of TCA cycle and fumarate reductase on production of succinic acid in *Saccharomyces cerevisiae*.]**

Succinate is the main taste component produced by yeasts during sake (Japanese rice wine) fermentation. The pathway leading to accumulation of succinate was examined in liquid culture in the presence of a high concentration (15%) of glucose under aerobic and anaerobic conditions in a series of strains of *Saccharomyces cerevisiae* in which various genes of the TCA cycle were disrupted. When cultured in YPD containing 15% glucose under aerobic conditions, the *KGDI* ( $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase) gene disruptant produced a lower level of succinate compared to the wild-type strain, while the *SDHI* (succinate dehydrogenase) gene disruptant showed an increased level of succinate. On the other hand, the *FUMI* (fumarase) gene disruptant produced significantly higher levels of fumarate but did not form malate at all. These results indicate that succinate, fumarate and malate are mainly synthesized through the TCA cycle (oxidative direction) even in the presence of glucose at concentration of as high as 15%. When the growth condition was shifted from aerobic to anaerobic, the increased level of succinate in *SDHI* disruptants was not noted any longer, whereas the decreased level in *KGDI* disruptant was still observed. Simultaneous disruption of fumarate reductase genes (*OSMI* and *FRDS*) resulted in the inability of the yeasts to grow anaerobically on glucose as a carbon source, and disruption of the *OSMI* gene caused poor growth under anaerobic conditions. These results suggest that the fumarate reductase isoenzymes in *Saccharomyces cerevisiae* are essential for anaerobic growth. Double disruptant for the two fumarate reductase isozyme genes (*OSMI* and *FRDS*) showed a succinate productivity of 50% as compared to the parent when cells were incubated in glucose-buffered solution. These results indicate that succinate could be synthesized through two pathways, namely, TCA cycle oxidation and fumarate reduction under anaerobic conditions.

### **Chapter 4. [Isolation of sake yeast strains having various levels of succinate and/or malate producing abilities by gene disruption or mutation]**

Succinate and malate are the main taste components produced by yeast during sake (Japanese alcohol beverage) fermentation. Sake yeast strains having various organic acid productivities were isolated by gene disruption. Sake fermented using the aconitase gene (*ACO1*) disruptant contained a twofold higher concentration of malate and a twofold lower concentration of succinate than that made using the wild-type strain K901. The fumarate reductase gene (*OSMI*) disruptant produced sake containing a 1.5-fold higher concentration of succinate as compared to the wild-type, and  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase gene (*KGDI*) and fumarase

gene (*FUM1*) disruptants produced sake containing a lower concentration of succinate. The  $\Delta$ *kgd1* disruptant showed a lower succinate productivity in the early phases of sake fermentation, while the  $\Delta$ *fum1* disruptant showed a lower succinate productivity in the later phases. These results indicate that succinate was mainly produced by an oxidative pathway of the TCA cycle in the early phases of sake fermentation, and by a reductive pathway in the later phases. On the other hand, breeding of sake yeasts with low succinate productivity and/or high malate productivity was performed by isolating mutants unable to assimilate glycerol as a carbon source. Low malate producing yeasts were also obtained from phenyl succinate resistant mutants. The mutation of one of these mutant strains with low succinate productivity was found to occur in the *KGD1* gene. These strains having various succinate and/or malate producing abilities are promising for the production of sake with distinctive tastes.