

| | |
|----------|---|
| 氏名 | こ だま ゆ き こ 児 玉 由 紀 子 |
| 学位(専攻分野) | 博 士 (農 学) |
| 学位記番号 | 論 農 博 第 2441 号 |
| 学位授与の日付 | 平 成 14 年 7 月 23 日 |
| 学位授与の要件 | 学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当 |
| 学位論文題目 | Studies on Transcriptional Regulation of Transporter Genes in Brewing Yeast. (醸造用酵母におけるトランスポーター遺伝子の転写制御に関する研究) |
| 論文調査委員 | (主 査) 教 授 熊 谷 英 彦 教 授 天 知 輝 夫 教 授 清 水 昌 |

論 文 内 容 の 要 旨

酵母細胞では、外界の種々の栄養源に適応するため、その代謝に関わるタンパク質、とくに細胞内への栄養源の取り込みに携わるトランスポーターが、複雑な発現制御を受けている。この制御機構の解析は、細胞内情報伝達機構の解明に他ならず、分子細胞生物学分野での重要課題のひとつである。また、ビール等の醸造の実際においても、原料中の糖やアミノ酸の酵母による取り込みが、発酵速度や香味成分の生成に大きな影響を与えており、トランスポーターの発現制御機構を基に、これらを人為的に調節することが可能になれば、製造上の大きな利点となる。

本論文は、酵母の糖およびアミノ酸のトランスポーターの転写制御機構を明らかにし、醸造用酵母の育種に応用することを目的として行った研究をとりまとめたものであり、その内容は以下のように要約できる。

1) マルトース資化系遺伝子の構成的発現によるビール高濃度醸造

マルターゼ、マルトーストランスポーター、これらの転写制御因子をそれぞれビール酵母で構成的に発現させ、高濃度発酵を行った。マルターゼと転写制御因子の場合は効果がなかったが、マルトーストランスポーターのみを発現させた株では、親株に比べマルトースの資化が促進され、発酵時間が約30%短縮された。

2) 分枝アミノ酸トランスポーターの発現と香気成分生成

酒類の重要な香気成分である高級アルコールは、分枝アミノ酸 (Val, Leu, Ile) の代謝中間生産物であるケト酸から生成する。このケト酸は、グルコースから分枝アミノ酸生合成経路を経て生成する場合と、外界から取り込まれた分枝アミノ酸から生成する場合がある。従って、分枝アミノ酸の取り込みの制御は、酒類の香気成分の生成制御を行う上で重要である。

分枝アミノ酸トランスポーター (*BAP2*) を醸造用酵母で高発現させると、すべての分枝アミノ酸の取り込みの促進が認められたが、高級アルコールの生成量は、Leu 由来のイソアミルアルコールのみが増加し、Val, Ile 由来の高級アルコールは変化しなかった。このことから、分枝アミノ酸の取り込みと高級アルコールの生成には個別の制御機構が存在することが判明した。

3) 下面ビール酵母特有の分枝アミノ酸トランスポーターの解析

下面ビール酵母の分枝アミノ酸トランスポーター (*BAP2*) に *Saccharomyces cerevisiae* 型と、それとは異なる Lg-*BAP2* が存在することを明らかにし、Lg-*BAP2* をクローニングした。その塩基配列は *Saccharomyces bayanus* の *BAP2* と100%、*S. cerevisiae* *BAP2* とは80%の homology があつた。また、ノザン解析により、下面ビール酵母の *cerevisiae* 型 *BAP2* と Lg-*BAP2* は、各種ストレスに対するレスポンスが異なること、また、*cerevisiae* 型は、発酵期間中ほぼ一定の発現量であるのに対し、Lg-*BAP2* は発酵期間の中期以後に誘導発現され、異なる制御を受けることを明らかにした。

4) 酵母のアミノ酸センサー Ssy1 の機能解析

Ssy1 は、*BAP2*, *BAP3*, *TAT1*, *TAT2*, *AGP1*, *GNP1* などのアミノ酸トランスポーターの誘導発現の制御に関わっている。Ssy1 の未知の機能をさらに明らかにするため、SSY1 遺伝子破壊株 (*Δssy1*) を作製し、アミノ酸の資化経過を調べた。その結果、*Δssy1* では、親株に比べて Leu, Met, Glu, Asp などの資化量が減少し、アンモニア、Arg の資化量

が増加していた。

そこでアミノ酸の豊富な培地で DNA マイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子発現解析を行い、 Δ ssy1 では親株に比べていくつかのアミノ酸トランスポーターの発現量が低下していること、多くの NCR (Nitrogen Catabolite Repression) 感受性遺伝子群 (アラントイン代謝系遺伝子群, 尿素代謝系遺伝子群) の発現量が増加していること、硫酸トランスポーター、メチオニン合成系遺伝子群の発現量も増加していることを明らかにし、Ssy1 がこれらの遺伝子群の発現をも制御していることを初めて明らかにした。

論文審査の結果の要旨

微生物細胞は、様々な環境条件に適応するため、複雑かつ精密な細胞内調節機構を有している。本論文の著者は、酵母細胞におけるマルトーストランスポーター並びに分枝アミノ酸トランスポーターの発現調節機構について分子細胞生物学的研究を行い、多くの新しい知見を得るとともにその結果をビール醸造用酵母に適用し、醸造用酵母の分子育種を試みた。

その評価すべき主な点は以下のとおりである。

- 1) ビール醸造における酵母によるマルトースの資化について検討し、マルトースの細胞内への取り込みが律速段階であることを明らかにした。この結果を踏まえて、マルトーストランスポーターを高発現させることにより、ビール高濃度醸造を可能とした。
- 2) 分枝アミノ酸トランスポーター (BAP2) を醸造用酵母で高発現させることにより、ビール醸造中のすべての分枝アミノ酸の取り込みが促進されるが、ロイシン由来のイソアミルアルコールの生成量のみが特異的に増加することを明らかにした。これにより、分枝アミノ酸の取り込みと高級アルコールの生成にはそれぞれ個別の制御機構が存在することを示した。
- 3) 下面ビール酵母では、*Saccharomyces cerevisiae* と *Saccharomyces bayanus* の両方のタイプの分枝アミノ酸トランスポーター (BAP2) が存在することを見出し、それらはビール発酵中に異なる発現制御を受けていることを明らかにした。
- 4) アミノ酸センサー Ssy1 の機能を DNA マイクロアレイにより解析し、これまで知られていたアミノ酸トランスポーターの発現誘導のみではなく、NCR 感受性遺伝子群、メチオニン合成系遺伝子群の発現制御のシグナルをも Ssy1 が発している可能性を示唆した。

以上のように、本論文は、酵母のマルトース及び分枝アミノ酸トランスポーターの発現制御機構について解析し、その詳細を明らかにするとともに、高糖濃度醸造用酵母や香気成分高生成酵母の分子育種を行ったものであり、微生物分子生物学、発酵醸造学および醸造生産の実際に寄与するところが大きい。

よって、本論文は、博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成14年6月13日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士 (農学) の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。