

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	根來 宏明
論文題目	Genetic analysis of high malate-producing sake yeasts and its applications (リンゴ酸高生産清酒酵母の遺伝子解析とその応用)		
(論文内容の要旨)			
<p>清酒の香味にはアルコール、糖、有機酸、アミノ酸、エステルといった多くの成分が関与している。味わいに影響する有機酸としてコハク酸、リンゴ酸、酢酸などが挙げられ、これらは発酵中に酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) によって生成される。このうちリンゴ酸は爽やかな酸味を持ち、清酒にとって好ましい味を与えるため、リンゴ酸を高生産する酵母の様々な育種法が開発されてきた。育種された酵母の高生産に関わるメカニズムが検証されてきたが、原因となる変異遺伝子は同定されていなかった。本論文は、新たに取得したリンゴ酸高生産酵母について、原因遺伝子の同定とリンゴ酸高生産機構の解析を行い、更に得られた知見を利用して清酒醸造に応用可能な新規育種法の開発を試みたものである。</p> <p>第一章では、リンゴ酸高生産をもたらす <i>VID24</i> 遺伝子変異の同定と、高生産となる機構の解明に取り組んだ。</p> <p>清酒酵母 K-901 株を親株とし、コハク酸ジメチル感受性を指標とする手法によりリンゴ酸高生産酵母 K-901H 株を取得した。ゲノム比較解析により、K-901 株に対して K-901H 株ゲノム上の 150 個の遺伝子にアミノ酸置換を伴う変異を検出した。このうち中心代謝およびその制御因子に関連する遺伝子に注目して個別に検証した結果、<i>VID24</i> 遺伝子のミスセンス変異により K-901H がリンゴ酸高生産能を獲得したことを見出した。<i>Vid24</i> は Glucose-Induced degradation-Deficient (GID) 複合体の構成要素であり、グルコースの存在に応答して糖新生酵素の N 末端プロリン残基を認識し、糖新生酵素をユビキチン化してプロテアソームへと導く役割を持つ。リンゴ酸高生産には糖新生酵素が関わっていると推察して解析を進めると、細胞質局在リンゴ酸デヒドロゲナーゼ <i>Mdh2</i> の関与が認められた。<i>VID24</i> 変異株は <i>Mdh2</i> の N 末端プロリン残基を認識して分解する機能を欠損しており、細胞内に <i>Mdh2</i> を蓄積していた。以上の結果より、K-901H 株は <i>Vid24</i> 機能欠損によって <i>Mdh2</i> が細胞内に蓄積し、グルコース存在下でのオキサロ酢酸からリンゴ酸への反応が促進されたためリンゴ酸高生産となったと考えられた。</p> <p>第二章では、<i>VID24</i> 変異の接合型を利用したリンゴ酸高生産酵母の新たな育種法の開発を行った。</p> <p>K-901H 株は二倍体であり <i>VID24</i> 変異をヘテロ接合型として有する。遺伝子組換えにより本変異をホモ接合型とした株を作製すると、より高いリンゴ酸高生産およびコハク酸ジメチル感受性を示したため、<i>VID24</i> 変異が与える形質は不完全優性であると判明した。遺伝子組換え体は食品製造に利用しにくい側面があることから、遺伝子組換え操作を用いずに <i>VID24</i> 変異がヘテロ接合型からホモ接合型となった株を取得するために、コハク酸ジメチル感受性やリンゴ酸生産性を指標とする選抜系を構築した。その結果、紫外線照射した K-901H 株 (<i>VID24</i> 変異ヘテロ接合型) から変異がホモ接合型となった株を取得することができた。取得株は K-901H 株よりも清酒醸造において高いリンゴ酸生産を示し、狙い通りリンゴ酸生産能をさらに増強することができた。アルコール生産性などその他の醸造特性についても K-901H 株と比較して実用上問題となる差異は認められなかった。取得株を利用することで、これまで以上に清酒中のリンゴ酸量を増強することが可能となった。</p> <p>第三章では、GID 複合体構成因子がリンゴ酸生産能とタンパク質発現に与える影響を解析した。</p>			

*S. cerevisiae*におけるGID複合体は、Vid30、Rmd5、Vid24、Vid28、Gid7、Gid8、Fyv10の7つのタンパク質から構成される。また、Ubc8、Ubp14もGID複合体を介した糖新生酵素の分解を担っている。Vid24機能欠損によりリンゴ酸高生産となったことから、GID複合体の他の因子の影響も確認した。各GID遺伝子破壊株のリンゴ酸生産能を評価すると、*VID30*、*RMD5*、*UBC8*、*VID28*、*GID8*、*FYV10*をそれぞれ破壊した場合にも*VID24*破壊株と同様に高生産となった。一方、*UBP14*および*GID7*破壊株のリンゴ酸生産能は親株と同程度であった。これらの破壊株に対してターゲットプロテオーム解析を行うと、リンゴ酸高生産となるGID関連遺伝子破壊株は互いに似たタンパク質プロファイルを示した。そこで、リンゴ酸を高生産した破壊株群と、生産能が変化しなかった群の間でタンパク質発現強度を比較すると、リンゴ酸高生産群では解糖系およびエタノール生成に関与するタンパク質群の発現がそれぞれ亢進および抑制されていた。細胞内のリンゴ酸濃度の上昇に伴い、ATPあるいはNADH濃度を調節するための代謝変化を起こしたと推察された。

第四章では、リンゴ酸高生産きょうかい酵母におけるGID複合体の関与を調べた。

日本醸造協会から頒布されているNo. 28株およびNo. 77株は、清酒酵母K-7株とその他の株の掛け合わせによって育種されたリンゴ酸高生産酵母である。これらの株に対してゲノムシーケンスを行うと、K-7株に対してそれぞれ489個、1345個の遺伝子上にアミノ酸置換などを伴う変異を検出した。検出した変異のうちGID関連遺伝子に注目すると、No. 28株とNo. 77株はいずれも複数のGID関連遺伝子に変異を有していた。各GID変異について変異導入試験および野生型への復帰試験を行った結果、No. 28株は*VID24*のナンセンス変異、No. 77株は*RMD5*のナンセンス変異がリンゴ酸高生産となる唯一の要因であることが分かった。さらに、*VID24*変異がリンゴ酸生産に与える形質は不完全優性であるのに対し、*RMD5*変異は劣性であると推察された。

第五章では、リンゴ酸高生産をもたらす*PEX22*遺伝子変異の同定と、高生産となる機構の解明に取り組んだ。

清酒酵母F-701株を親株としてリンゴ酸高生産酵母F-701H株を取得し、K-901H株の場合と同様のゲノム比較解析を行った。検出した15個のアミノ酸置換を伴う変異から原因遺伝子の特定を試みた結果、F-701H株は*PEX22*のナンセンス変異によりリンゴ酸高生産となっていた。*Pex22*はペルオキシソームの恒常性を維持するperoxinの一つであり、ペルオキシソーム内へのタンパク質輸送に必要である。*PEX22*変異株がリンゴ酸高生産となる機構を調べるため、各種peroxin遺伝子破壊株のリンゴ酸生産能を評価した。その結果、peroxisome targeting signal 1 (PTS1) を保持するペルオキシソーム局在タンパク質の認識と輸送に関わるperoxinを破壊した場合にリンゴ酸高生産となったことから、PTS1保持タンパク質のペルオキシソームへの輸送異常が影響していると考えられた。PTS1保持タンパク質のうちグリオキシル酸回路の酵素に注目して解析を行うと、ペルオキシソーム局在リンゴ酸デヒドロゲナーゼMdh3の関与が認められた。Mdh3の局在を調べると、対照株ではMdh3がペルオキシソームに存在すると推察されたのに対し、*PEX22*変異株ではMdh3の局在が細胞質へと変化していた。さらに、この局在変化がリンゴ酸高生産を引き起こすことが分かった。これより、*PEX22*変異株ではperoxinによるタンパク質輸送が機能しなくなることでMdh3の局在がペルオキシソームから細胞質へと変化し、細胞質におけるオキサロ酢酸からリンゴ酸への変換が促進されたと考えられた。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

清酒中にはコハク酸、リンゴ酸、酢酸などの有機酸が含まれ、発酵中に酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) によって生成される。このうちリンゴ酸は爽やかな酸味を持ち、清酒にとって好ましい味を与えるため、リンゴ酸を高生産する酵母の育種法が数多く開発されてきた。高生産に関わるメカニズムが検証されてきたが、原因となる遺伝子は同定されていなかった。本論文は複数のリンゴ酸高生産酵母について、原因遺伝子の同定と機構の解析を試み、更に清酒醸造に応用可能な育種法の開発を試みたものである。評価すべき点として、以下の5点が挙げられる。

1. リンゴ酸高生産清酒酵母K-901H株は *VID24* 遺伝子の変異により高生産能を獲得したことを見出した。 *VID24* 変異により *Mdh2* を分解する機能が低下し、細胞内に *Mdh2* が蓄積することでリンゴ酸高生産となったことを示した。
2. 二倍体酵母におけるヘテロ接合型の *VID24* 変異は、リンゴ酸高生産の形質について不完全優性であった。非遺伝子組み換えによって *VID24* 変異をホモ接合型とする選抜系を構築し、取得した酵母によってさらにリンゴ酸濃度が高い清酒を醸造することができた。
3. *VID24* 以外のいくつかの *GID* 複合体構成因子破壊株についても、リンゴ酸高生産能が認められた。ターゲットプロテオーム解析により、リンゴ酸を高生産する破壊株では解糖系およびエタノール生成に関与するタンパク質群の発現がそれぞれ亢進、抑制されていることを示した。
4. きょうかい酵母No. 28株およびNo. 77株は、それぞれ *VID24* および *RMD5* の変異によりリンゴ酸高生産となっていることを明らかにした。
5. リンゴ酸高生産清酒酵母F-701H株は *PEX22* 遺伝子の変異により高生産能を獲得したことを見出した。 *PEX22* 変異により *Mdh3* の局在がペルオキシソームから細胞質に変化することでリンゴ酸高生産となったことを示した。

以上のように、本論文は、リンゴ酸高生産酵母の高生産に寄与する原因遺伝子を複数同定しその生化学的機構を明らかにするとともに、リンゴ酸を更に高生産する酵母の育種法を構築しており、発酵生理学、醸造学、応用微生物学の発展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、令和3年9月9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。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降（学位授与日から3ヶ月以内）