

氏 名	たま い ゆき お 玉 井 幸 夫
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	論 農 博 第 2660 号
学位授与の日付	平 成 19 年 11 月 26 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 the mating-type switching genes, chromosome organization and regulation of ester formation in brewing yeasts (醸造酵母の接合型変換遺伝子, 染色体構成及びエステル生成制御に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 阪 井 康 能 教 授 清 水 昌 教 授 村 田 幸 作

論 文 内 容 の 要 旨

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、交配、四分子解析、遺伝子操作などの遺伝情報操作技術を自由に適用可能なことから基礎生物学研究に広く用いられている。食品産業で用いられている多くの醸造酵母も *Saccharomyces* 属に分類されている。しかし法的理由により醸造酵母に対して遺伝子組み換え技術を適用できないばかりか、醸造酵母は接合型を変換して二倍体化するため接合能を失っており、接合による交配もできない。もし醸造酵母において接合による交配育種が可能になれば、有用な形質を持つ醸造酵母どうしを交配して、優れた性質の醸造酵母を得ることができであろう。しかし下面発酵ビール酵母 *Saccharomyces pastorianus* やワイン酵母 *Saccharomyces bayanus* を対象とし、かつ交配育種を目的とした遺伝子レベルでの知見はほとんどない。一方、酒類の品質を決める重要な要素の一つにエステル成分がある。しかし、醸造中のエステル生成を制御する技術については、工業生産現場で経験的な知見が蓄積されてはいるが、エステル生成機構に関する分子レベルでの研究は少ない。

本論文は、醸造酵母を対象に、接合型変換を支配しているエンドヌクレアーゼ遺伝子 (*HO*) の構造とゲノムを構築している染色体の構成を、分子生物学的手法を用いて明らかにし、さらにその成果を基に新たな交配育種技術を示したものである。さらに醸造過程におけるエステルの過剰生成を抑制する手法の実効性を実証し、その理論的根拠を明確に示している。得られた結果は以下の点に要約できる。

- 1) 下面発酵ビール酵母 *S. pastorianus* から二種類の *HO* 遺伝子を取得し、その塩基配列を決定した。そのうち一つは、実験室酵母 *S. cerevisiae* の *HO* 遺伝子 (Lab-*HO*) とほぼ同一であることを明らかにし Sc-*HO* と命名した。もう一つの *HO* 遺伝子は、下面発酵ビール酵母特有の遺伝子であったので Lg-*HO* と命名した。Lg-*HO* 遺伝子は、新たに得られた *S. bayanus* *HO* 遺伝子 (Sb-*HO*) と極めて相同性が高かった。これにより、*S. pastorianus* の染色体が *S. cerevisiae* と *S. bayanus* の染色体に由来することを明示した。
- 2) *S. pastorianus* の染色体をパルスフィールド電気泳動によって分離し、適当な間隔で染色体に分布している遺伝子をプローブとして用いたサザン解析を行い、*S. pastorianus* の染色体構成を明らかにした。*S. pastorianus* には、*S. cerevisiae* 型の染色体と、*S. bayanus* 型の染色体が共存していることを示し、*S. pastorianus* が両酵母に由来した雑種である事を明確にした。
- 3) ワイン酵母の一種である *S. bayanus* var. *uvarum* から *HO* 遺伝子 (Uv-*HO*) を取得し、その塩基配列を決定した。Uv-*HO* は、*S. bayanus* 由来 *HO* 遺伝子に最も高い相同性を示した。さらに、*S. bayanus* に属する酵母が、*HO* 遺伝子により 3 つのサブグループ、すなわち、Sb-*HO* のみを持つ酵母、Uv-*HO* のみを持つ酵母、Sb-*HO* と Uv-*HO* の両者を持つ酵母、に分類できることを明らかにした。この結果から、*S. bayanus* に分類されている酵母が、共通の祖先から一旦分岐した後に、接合による雑種形成と減数分裂による染色体の再構成を経て成立したとする説を提唱した。
- 4) 醸造酵母における各 *HO* 遺伝子の分布を調べた結果、上面発酵ビール酵母、酒酵母、ウィスキー酵母は Lab-*HO* を、下

面発酵ビール酵母はLab-*HO*とLg-*HO*の両者を持っていた。またワイン酵母にはLab-*HO*のみを持つ酵母と、Sb-*HO*またはUv-*HO*のいずれかを持っている酵母のあることを明らかにした。醸造酵母が持つこれら三種類の*HO*遺伝子の内部に薬剤耐性優性マーカーと接合型検出カセットを組み込んだ、醸造酵母用*HO*遺伝子破壊プラスミドを作成した。このプラスミドを用いて醸造酵母を形質転換し、得られた*HO*遺伝子破壊株の胞子から接合可能株を単離できることを示した。その結果、二倍体株から接合可能株を検出して単離できることを初めて示した。

- 5) 酢酸エステル類の合成を触媒する酵素アルコールアセチルトランスフェラーゼをコードする遺伝子を下面発酵ビール酵母から取得し、この遺伝子のコピー数を変化させることやプロモーターを交換することにより、エステル量を増減できることを醸造酵母を用いて明らかにした。
- 6) 酢酸エチル生成に対するヘミアセタール脱水素反応の寄与を検討し、*Candida utilis*ではこの反応が酢酸エチル生成の主たる経路であること、一方、*S. cerevisiae*ではその寄与が小さいことを明らかにした。
- 7) ビール醸造過程において、無栄養状態で保存されている酵母への麦汁へ添加する前の通気が、主発酵過程における、酸素による遺伝子抑制制御因子*ROX1*遺伝子の発現亢進とその支配下にあるエステル生成酵素の活性抑制を引き起こすことを示した。この結果から、主発酵へ添加する前の酵母への通気により主発酵過程における遺伝子発現が影響を受け、エステル過剰生成が抑制されていることを示した。また、このとき細胞内貯蔵糖であるトレハロースが消費されていること、エステル生成の抑制には適切な通気量が必要なことを示した。

論文審査の結果の要旨

酒類の発酵生産に用いられる醸造酵母の多くは*Saccharomyces*属に属しており上面発酵ビール酵母*Saccharomyces cerevisiae*、下面発酵ビール酵母*Saccharomyces pastorianus*の他、ワイン酵母としては*S. cerevisiae*や*Saccharomyces bayanus*などが知られている。このうち*S. pastorianus*と*S. bayanus*についての遺伝子レベルでの情報は極めて乏しい。接合による交配育種は、優れた特性を有する醸造酵母を開発するための途をひらくが、酵母が接合型変換により二倍体化し、接合能を失うため困難であった。一方、醸造過程におけるエステル生成の制御は、高い品質の酒類を得るために重要な技術であるが、酵素活性測定の煩雑さなどから、エステル生成に関与する酵素や遺伝子レベルでの研究は少ない。本論文は、数種の醸造酵母を対象に、接合型変換を支配しているエンドヌクレアーゼ遺伝子(*HO*)の構造、染色体構成、アルコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子(*ATF1*)の構造を明らかにして、醸造酵母における種の形成過程に関する仮説を提唱するとともに、接合による醸造酵母の育種技術並びにエステル生成制御技術を開発したものであり、評価すべき点は以下の6点である。

- 1) 下面発酵ビール酵母*S. pastorianus*から二種の*HO*遺伝子を取得し、その塩基配列を決定した。そのうちの 하나가、*S. bayanus*由来*HO*遺伝子と極めて高い相同性を示した。この結果は、*S. pastorianus*のゲノムを構成している染色体が、他の二種の酵母 *S. cerevisiae*と*S. bayanus*の染色体に由来することを示している。従来、*S. pastorianus*には、*S. cerevisiae*由来の*HO*遺伝子とは構造の異なる*HO*遺伝子の存在が予測されていたが、本論文はこれを塩基配列レベルで初めて実証したものである。
- 2) *S. pastorianus*の染色体を対象に、パルスフィールド電気泳動の後、染色体上に分布する多数の遺伝子をプローブとして用いたサザン解析を行った結果、*S. pastorianus*が、*S. cerevisiae*型染色体に加えて、*S. bayanus*型染色体を持っていることを初めて示した。これにより、*S. pastorianus*が*S. cerevisiae*と*S. bayanus*の雑種であることが明確に示された。
- 3) ワイン酵母*S. bayanus* var. *uvareum*より新規な*HO*遺伝子を取得した。取得した*HO*遺伝子構造をもとに、*S. bayanus*種に属する多数の株について解析したところ、*S. bayanus*は均一な種ではなく、*S. bayanus* var. *uvareum*はサブグループに属することを示した。得られた結果をもとに*S. bayanus*種の形成過程に関する仮説を提唱した。
- 4) 醸造酵母が、*S. cerevisiae*型、*S. bayanus*型と*S. uvareum*型の三種の*HO*遺伝子を、単独または組み合わせて有することを明らかにした。接合可能株を効率的に取得することを目的として、*HO*遺伝子破壊ベクターを三種類構築し、これらを適宜、宿主とする醸造酵母に応じて用い形質転換を行った。得られた形質転換体からは、平板培地上で容易に接合

可能株が検出できた。以上の結果は、従来、不可能であった二倍体からも接合可能な株が取得できることを示したもので、醸造酵母の接合による育種を可能にする技術である。

- 5) *S. pastorianus* から、二種のアルコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子 *ATF1* 及び *Lg-ATF1* を取得した。これらの遺伝子の過剰発現により酢酸エステル生成量が増加し、その遺伝子破壊により酢酸エステル生成量が減少することを、上面発酵ビール酵母 *S. cerevisiae* を用いた小規模ビール発酵により示した。また *S. cerevisiae* と *Candida utilis* における酢酸エステル生成の機構について検討し、前者ではアルコールアセチルトランスフェラーゼ反応が、後者ではヘミアセタール脱水素反応が主たる経路である事を示した。
- 6) 麦汁添加前の酵母への通気が、主発酵過程における、酸素による遺伝子抑制制御因子 *ROX1* 遺伝子の発現亢進とその支配下にあるエステル生成酵素の活性の抑制を引き起こすことを生化学的・分子生物学的に実証した。またエステル生成の抑制のためには適切な通気量が存在することを示した。

以上のように本論文は、二種の醸造酵母 *S. pastorianus* と *S. bayanus* を対象に、接合型変換に関わる *HO* 遺伝子の構造、染色体構成、エステル生成に関与する酵素遺伝子を明らかにして、種間の相互関係から醸造酵母種の全体像を把握するとともに、エステルの過剰生成を制御する工業的手段に対して初めて実験的根拠を与えたものである。さらに、従来不可能であった接合による醸造酵母の育種に途を拓いた。従って、本研究は、微生物育種技術や発酵制御技術の開発のための基盤的知見を与えるものであり、制御発酵学、微生物生理学、応用微生物学に貢献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19年9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。