

博士論文

清酒酒質の多様化に資する醸造用酵母変異株
の育種とその特性解析

**(Breeding and characterization of sake yeast
mutants contributing to the diversity of sake quality)**

2017年3月

高橋俊成

立命館大学審査博士論文

清酒酒質の多様化に資する醸造用酵母変異株
の育種とその特性解析

**(Breeding and characterization of sake yeast
mutants contributing to the diversity of sake quality)**

2017年3月

March 2017

高橋 俊成

TAKAHASHI Toshinari

主査：若山 守 教授

Principal referee : Professor WAKAYAMA Mamoru

目 次

緒 言	・ ・ ・	1
第 1 章	GABA 低資化性酵母変異株の育種とその特性解析	・ ・ ・ 7
第 1 節	GABA 低資化性酵母変異株の育種	・ ・ ・ 9
第 2 節	GABA 低資化性酵母変異株 GAB7-1 株および GAB7-2 株の 特性解析	・ ・ ・ 18
第 2 章	低精白米仕込みにおいて酢酸イソアミルを高生産する酵母 変異株の育種とその特性解析	・ ・ ・ 29
第 1 節	酢酸イソアミル高生産性酵母変異株の育種	・ ・ ・ 30
第 2 節	酢酸イソアミル高生産性酵母変異株 <i>hia1</i> 株の特性解析	・ ・ ・ 36
第 3 章	低精白米仕込みにおいてカプロン酸エチルおよび酢酸イソ アミルを高生産する酵母変異株の育種とその特性解析	・ ・ ・ 56
第 1 節	カプロン酸エチルおよび酢酸イソアミル高生産性酵母変異株 の育種	・ ・ ・ 57
第 2 節	カプロン酸エチルおよび酢酸イソアミル高生産性酵母変異株 <i>hec2</i> 株の特性解析	・ ・ ・ 64
総 括	・ ・ ・	79
投稿論文目録	・ ・ ・	84
謝 辞	・ ・ ・	85

緒 言

清酒は、米と米麴を原料とし、米麴による米デンプンの糖化と酵母によるアルコール発酵の両過程を同一容器内で同時に行うこと（並行複発酵）を特徴とする日本伝統のアルコール飲料である。税法上、米と米麴以外の副原料を使用することが認められているが、米と米麴に由来する風味が、清酒の味わいの核となっている。そのため、従来、清酒の「味わいの幅」は比較的狭いものであったが、近年はその「幅」が広がりつつある。すなわち、精米技術を始めとする醸造技術の進歩によって、あるいは食の欧米化や健康意識の向上にともなって、高い香り（吟醸香）や味などの嗜好性だけでなく機能性の面でも、酒質の多様性が求められるようになってきているからである。清酒酒質の多様性に影響を与える因子は、醸造方法や原料米の品種・品質、あるいは醸造に関与する微生物などであるが、最も多様性に寄与する因子は醸造微生物である。特に酵母の影響が顕著であるので、その能力改善によって酒質の多様化を図ることができる。

清酒醸造に使用する清酒酵母は、分類学的には *Saccharomyces cerevisiae* に属するが、高濃度アルコールの生産能や低温での優れた発酵能など、実験室酵母や各種の醸造用酵母とは異なる性質を持っている。清酒酵母の能力改善については多くの報告があるが、そのほとんどは、目的とする形質を有する株同士の掛け合わせにより交雑株を育種する方法、または突然変異を誘発することにより得られた変異株から、目的形質を持つ変異株を選抜する方法^{1,2)}が用いられている。なお、二倍体である清酒酵母の場合、一倍体では検出可能な劣性変異株を得るのが困難であるので、優性変異株を何らかの薬剤に対する耐性株として選抜することが多い。

機能性の面から清酒酒質の多様化に資する酵母変異株の育種例としては、肝機能の改善が期待されるグルタチオンを高含有する清酒を醸造するために、目的形質を有する酵母と醸造用酵母の交雑によって、液胞の生理機能を欠損した酵母変異株を育種^{3,4)}したり、あるいは各種ペプチド類を高濃度含む清酒を造るために、清酒酵母に突然変異を誘発し、銅耐性を指標に清酒醪に含まれるペプチド類の取込能が低下した変異株を育種^{5,6)}したなどがあるが、二倍体の清酒酵母に突然変異を誘発し、目的形質を有する酵母の生育特性を指標に劣性変異株を育種した例は、栄養要

求性変異株以外ではこれまでにほとんどない。

なお、清酒中には、血圧上昇抑制作用や精神安定作用などの機能を持つ γ -アミノ酪酸 (GABA) ⁷⁻¹² も含まれるが、その濃度は極めて低い。GABA は、麹菌 (*Aspergillus oryzae*) のグルタミン酸脱炭酸酵素によって生成し、米麹中に多量に蓄積するが、清酒醪の発酵初期に酵母によって資化されるからである ^{13, 14}。

嗜好性の面からの清酒酒質の多様化に資する酵母変異株の育種例としては、吟醸酒の特徴である酢酸イソアミルおよびカプロン酸エチルを主成分とする吟醸香成分を高生産する清酒酵母変異株について多くの報告がある ^{1, 2} が、これら吟醸香高生産性の酵母変異株を清酒醸造に用いる場合でも、通常の吟醸酒を造る場合と同様に、原料米の高精白と低温での長期発酵が必要である。特に、高精白米の使用が避けられないのは、米の外層部に局在する不飽和脂肪酸などの成分が、酢酸イソアミルやカプロン酸エチルの酵母細胞内での生合成を阻害するからである ¹⁵⁻¹⁷。一方、高精白することにより、吟醸香は高くなるが、米の外層部に由来する清酒本来の旨み成分が減少することになる。

本研究は、清酒酒質の多様化に資する醸造用酵母の育種原理を考察することを目的とし、まず機能性の観点から、GABA 高含有清酒の醸造を可能にする酵母変異株を育種し、育種株の生理的特性を明らかにする。次いで、嗜好性の観点から、低精白米を用いても吟醸香の主成分である酢酸イソアミルやカプロン酸エチルを高生産する酵母変異株を育種し、これらの生理的特性を明らかにする。

以下に、得られた結果の概要を示す。

第1章では、GABA を高含有する清酒醸造に利用できる酵母変異株を育種した。まず、酵母の GABA 取り込み、あるいは GABA 分解に関与する遺伝子の破壊株を作製した。次いで、これら破壊株を用いた清酒小仕込み試験を行い、① GABA 分解に関与する GABA トランスアミナーゼをコードする *UGAI* 破壊株を用いると、製成酒の GABA 量が増加すること、ならびに ② 本破壊株が、GABA を単一窒素源として生育できないことを明らかにした。② に示した *UGAI* 破壊株の表

現型に注目して選抜された GABA 資化能が低下した突然変異株 (GAB7-1 株と GAB7-2 株) を用いて醸造した清酒においても GABA 量の増加が認められた。GAB7-1 株では GABA トランスアミナーゼをコードする *UGA1* にホモ接合型のナンセンス変異が、GAB7-2 株ではコハク酸セミアルデヒド脱水素酵素をコードする *UGA2* にヘテロ接合型のミスセンス変異が起こっていた。これらの変異によって、GAB7-1 株あるいは GAB7-2 株の菌体内では、GABA トランスアミナーゼまたはコハク酸セミアルデヒド脱水素酵素の機能が低下したために GABA が蓄積し、その結果として GABA 資化能が低下したと考えられる。

第 2 章では、イノシトールホスホリルセラミド合成酵素の阻害剤であるオーレオバシジン A に対して耐性能を持つ酵母変異株の中から、低精白米仕込みでも酢酸イソアミルを高生産する変異株を 4 株 (*hial*, 2, 4, 6 株) 取得し、低精白米を用いても酢酸イソアミルを高含有する清酒醸造に利用できることを示した。これら酢酸イソアミル高生産性変異株のうち、*hial* 株について詳細な検討を行い、酢酸イソアミルの生合成に関与するアルコールアセチルトランスフェラーゼ (AATase) をコードする *ATF1* の発現量が増加することにより恒常的に AATase が生合成されるだけでなく、不飽和脂肪酸による *ATF1* の発現量の低下も起こらない、ということも示した。一方、全ゲノム解析によって、*ATF1* の転写活性化因子である *MGA2* にホモ接合型のナンセンス変異が生じており、さらに酢酸イソアミル高生産性変異株 4 株のゲノム DNA を混合した全ゲノム解析によって、*MGA2* のホモ接合型ナンセンス変異が 4 株で共通しており、本変異が不飽和脂肪酸による *ATF1* の発現抑制を緩和することも明らかとなった。

第 3 章では、*MGA2* のナンセンス変異が脂肪酸合成酵素をコードする *FAS1* および *FAS2* の発現量を増加させることを示し、第 2 章で得た、酢酸イソアミル高生産性変異株 *hial* 株を親株として変異操作を行い、脂肪酸合成酵素の阻害剤であるセルレニンに耐性を示す酵母変異株の中から、低精白米仕込みにおいてカプロン酸エチルを高生産する変異株 (*hec2*, 3, 6 株) を取得した。これら *hec* 株を用いた清酒小仕込み試験の結果、製成酒のカプロン酸エチル含量の増加が認められた。

一方、酢酸イソアミルは *hial1* 株に比べ低下するが、既存の清酒に比べ顕著に高いことから、低精白米を用いたカプロン酸エチルおよび酢酸イソアミル高含有清酒の醸造に *hec* 株を利用できることを示した。既にセルレニン耐性酵母では、脂肪酸合成酵素の α サブユニットをコードする *FAS2* に変異が生じ、これによってカプロン酸エチルが高生産される、ということが報告¹⁸⁾ されているので、*hec2* 株についても、その *FAS2* の塩基配列を調べたところ、既報告と同様の変異がホモ接合型で生じていることが明らかとなった。そこで、親株である *hial1* 株の *FAS2* に、改めて同じ変異をホモ接合型で人為的に導入したが、カプロン酸エチル生産能の向上は、*hec2* 株の場合に観察されるほど顕著ではなかった。この結果は、*hec2* 株が *FAS2* 変異以外の原因によってカプロン酸エチルを高生産するようになっている、ということを示唆するものである。そこで、*hec2* 株のカプロン酸エチル生合成経路の遺伝子の発現量を解析したところ、脂肪酸合成酵素をコードする *FAS1* と *FAS2* の発現量が増加していた。またカプロイル-CoA とエタノールからカプロン酸エチルを生合成するアシル-CoA : エタノール O-アシルトランスフェラーゼをコードする *EEB1* も高発現し、かつ酵素活性も増大していることが明らかとなった。すなわち、カプロン酸の生合成反応だけでなく、エステル化反応も活性化されている、ということを示した。

以上の結果を総合し、清酒酒質の多様化に資する醸造用酵母の育種原理を考察した。

参 考 文 献

- 1) 清酒酵母麹研究会編: 清酒酵母の研究 80年代の研究 (1992).
- 2) 清酒酵母麹研究会編: 清酒酵母の研究 90年代の研究 (2003).
- 3) **Kitamoto, K., Yoshizawa, K., Ohsumi, Y., and Anraku, Y.:** Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with defective vacuolar function, *J. Bacteriol.*, **170**, 2687-2691 (1988).
- 4) 澤野泰治, 藤井史子, 神田晃敬, 浜地正昭: グルタチオン含有清酒の醸造 日本農芸化学会誌, **65**, 1089-1095 (1991).
- 5) **Yamada, T., Furukawa, K., Hara, S., and Mizoguchi, H.:** Effect of amino acids on peptide transport in sake yeast, *J. Biosci. Bioeng.*, **99**, 383-389 (2005).
- 6) **Yamada, T., Furukawa, K., Hara, S., and Mizoguchi, H.:** Isolation of copper-tolerant mutants of sake yeast with defective peptide uptake, *J. Biosci. Bioeng.*, **100**, 460-465 (2005).
- 7) **Roberts, E. and Frankel, S.:** γ -Aminobutyric acid in brain, its formation from glutamic acid, *J. Biol. Chem.*, **187**, 55-63 (1950).
- 8) **Awapara, J., Landau, A. J., Fruest, R., and Seale, B.:** Free gamma-aminobutyric acid in brain, *J. Biol. Chem.*, **187**, 35-39 (1950).
- 9) **Stanton, H. C. and Thompson, J. F.:** Mode of action of gamma-aminobutyric acid on the cardiovascular system. *Arch. Int. Pharmacodyn.*, **143**, 195-204 (1963).
- 10) **Kohama, Y., Matsumoto, S., Mimura, T., Tanabe, N., Inada, A., and Nakanishi, T.:** Isolation and identification of hypotensive principles in red-mold rice, *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 2484-2489 (1987).
- 11) **Omori, M., Yano, T., Okamoto, J., Tsushida, T., Murai, T., and Higuchi, M.:** Effect of anaerobically treated tea (Gabaron Tea) on blood pressure of spontaneously hypertensive rats, *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, **61**, 1449-1451 (1987) (in Japanese).
- 12) **Saikusa, T., Horino, T., and Mori, Y.:** Accumulation of γ -aminobutyric acid (Gaba) in rice germ during water soaking, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 2291-2292 (1994).
- 13) **Kato, Y., Kato, Y., Furukawa, K., and Hara, S.:** Cloning and nucleotide sequence of the glutamate

- decarboxylase-encoding gene *gadA* from *Aspergillus oryzae*, Biosci. Biotech. Biochem., **66**, 2600-2605 (2002).
- 14) **Takahashi, T., Iwai, Y., Mizoguchi, H., and Hara, S.:** GABA uptake in *Saccharomyces cerevisiae* during sake mash fermentation, The Society for Biotechnology, Japan meeting abstract, 62 (2000).
- 15) **Yoshioka, K. and Hashimoto, N.:** Cellular fatty acid and ester formation by brewers' yeast, Agri. Biol. Chem., **47**, 2287-2294 (1983).
- 16) **Fujii, T., Kobayashi, O., Yoshimoto, H., Furukawa, S., and Tamai, Y.:** Effect of aeration and unsaturated fatty acids on expression of the *Saccharomyces cerevisiae* alcohol acetyltransferase gene, Appl. Environ. Microbiol., **63**, 910-915 (1997).
- 17) **Furukawa, K., Yamada, T., Mizoguchi, H., and Hara, S.:** Increased ethyl caproate production by inositol limitation in *Saccharomyces cerevisiae*, J. Biosci. Bioeng., **95**, 448-454 (2003).
- 18) **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).

第1章

GABA 低資化性酵母変異株の育種とその特性解析 (a)

清酒醸造に利用される米麴の製造工程において、血圧上昇抑制作用や精神安定作用などの機能性を持つ GABA は、黄麹菌 *Aspergillus oryzae* のグルタミン酸脱炭酸酵素によりグルタミン酸から生合成される¹⁾。米麴中の全アミノ酸に占める GABA の割合は約 6% であり、蒸米と米麴を用いて酵母を純粋培養したアルコール発酵のスターターである酒母においても GABA は全アミノ酸のうち約 4.5% を占める。しかしながら、製成酒中の GABA の割合は 1% 程度にまで減少する²⁾(FIG.1-1)。これは、米麴、酒母を用いて仕込んだ清酒醪において GABA 濃度が低下することを示している。清酒醪においては発酵初期の総アミノ酸量は低く、酵母が窒素源として GABA を資化するため、結果として製成酒の GABA 量が低下する²⁾(FIG.1-2)。

本章では、GABA を高含有する清酒の開発に有効な、GABA 資化能が低下した酵母変異株 (GABA 低資化性変異株) の育種およびその特性解析を行った。

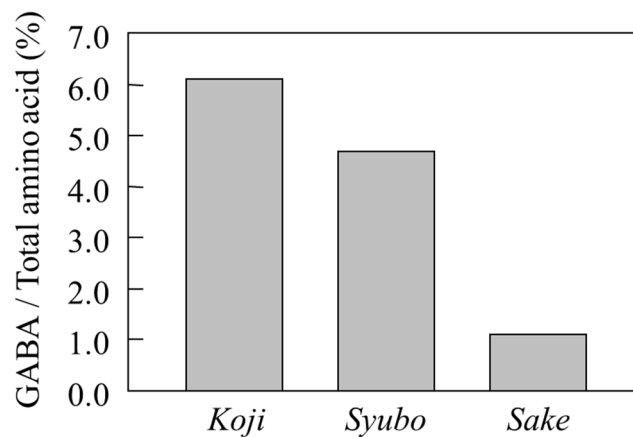


FIG. 1-1 GABA ratio to total amino acids in sake brewing

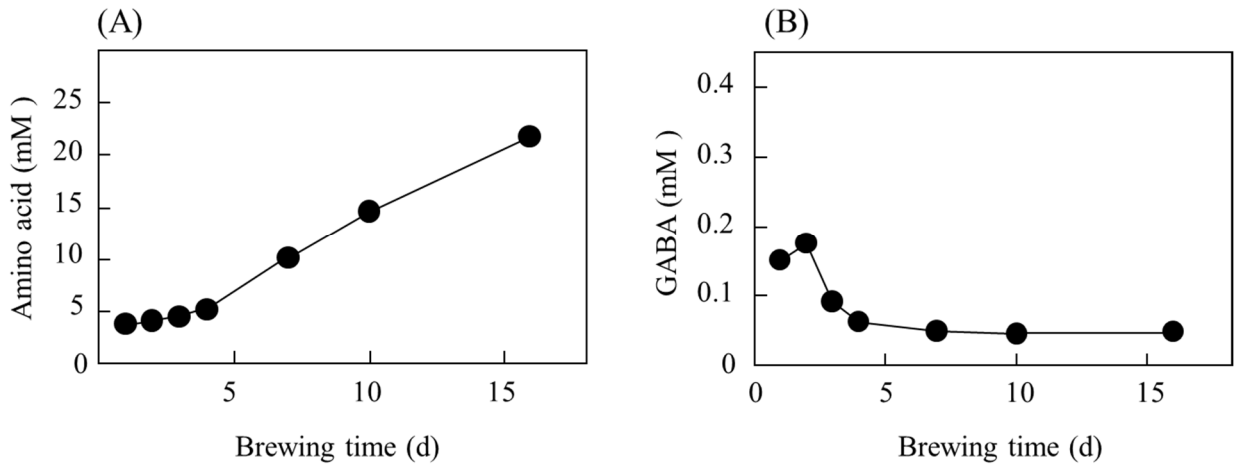


FIG. 1-2 Changes in the concentration of amino acids during the sake brewing test using strain K701. (A) total amino acid concentration. (B) GABA concentration

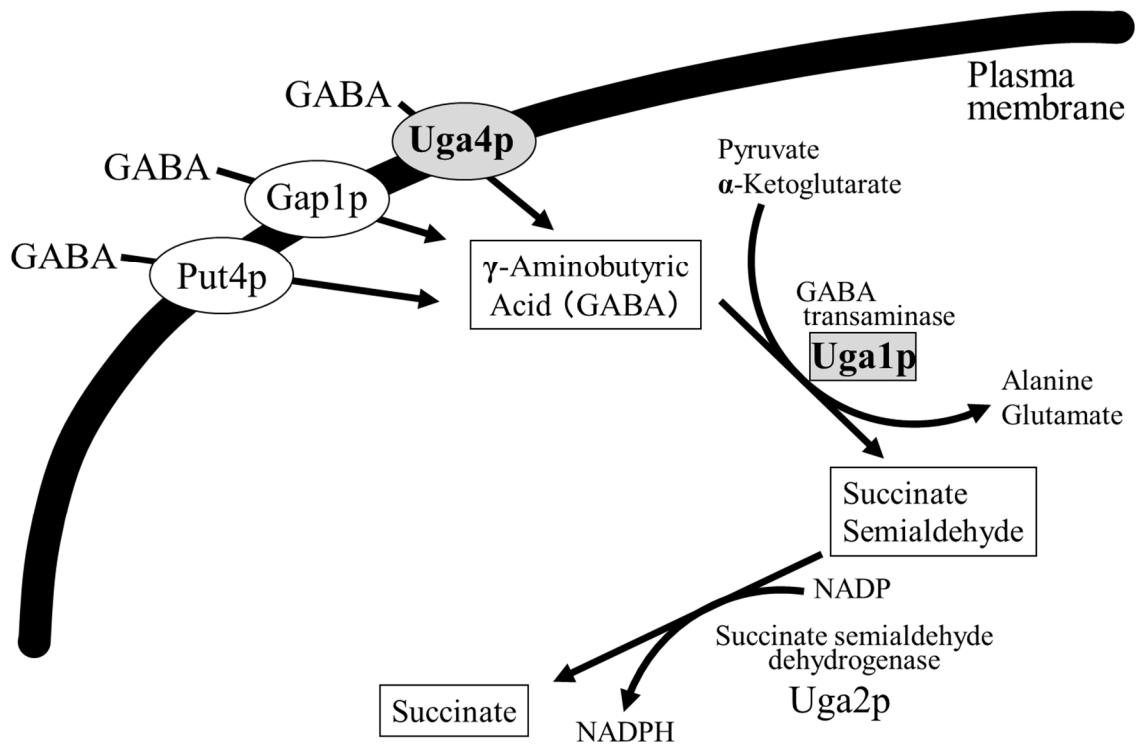


FIG. 1-3 The transport of GABA into yeast cells is mediated by three transport systems: the general amino acid permease encoded by *GAP1*, the specific proline permease encoded by *PUT4*, and a specific GABA permease encoded by *UGA4*. GABA transported into yeast cells is catabolized to succinate semialdehyde with the transamination of the gamma-amino group to 2-oxoglutarate by GABA transaminase and then to succinate by its degradation by succinate semialdehyde dehydrogenase.

第 1 節 GABA 低資化性酵母変異株の育種

GABA の酵母菌体内への輸送に関しては、FIG. 1-3 に示す総アミノ酸輸送体 Gap1p、プロリン特異的な輸送体 Put4p、GABA 特異的な輸送体 Uga4p の 3 つの経路が知られており、これらの 3 重変異株 (*gap1, put4, uga4*) は GABA を単一窒素源として生育できないこと³⁾ や、ワイン酵母の同様の変異株でワインを醸造した場合、製成酒の GABA 含量が増加すること⁴⁾ が報告されている。しかし、ワインのような単発酵と異なり、清酒醸造は並行複発酵であるため、醪初期のアミノ酸濃度は低く、発酵に伴い米のタンパク質が麹菌の酸性プロテアーゼや酸性カルボキシペプチダーゼにより分解されてアミノ酸が徐々に生じるため、清酒醸造においては 3 重変異株 (*gap1, put4, uga4*) では、アミノ酸取り込み能低下による発酵力の低下を招くと考えられる。したがって、GABA を高含有する清酒醸造のためには、発酵力の低下を抑制し、清酒醪における GABA 取り込み能が低下した酵母変異株を育種することが必要となる。

Ramos らは、GABA を単一窒素源とする培地で増殖できない実験室酵母変異株の解析から、GABA の資化経路上の GABA トランスアミナーゼをコードする *UGA1*⁵⁾ またはコハク酸セミアルデヒド脱水素酵素をコードする *UGA2*⁶⁾ の変異が、GABA 資化能低下の原因であることを報告している⁷⁾。

GABA の酵母細胞内への輸送には、総アミノ酸輸送体 Gap1p、プロリン特異的な輸送体 Put4p、GABA 特異的な輸送体 Uga4p の 3 つの経路が存在し、酵母細胞内へ取り込まれた GABA は GABA トランスアミナーゼ、コハク酸セミアルデヒド脱水素酵素によりコハク酸にまで分解される^{8,9)} (FIG. 1-3)。そこで、GABA 取り込み能が低下した酵母変異株を育種するにあたり、GABA 特異的な輸送体または GABA トランスアミナーゼをそれぞれコードする *UGA4* と *UGA1* の各遺伝子破壊株を清酒酵母より作製し、清酒小仕込み試験を行い、製成酒中の GABA 濃度を比較した。さらにこれら遺伝子破壊株の生育特性を指標として、清酒醪において GABA 資化能が低下した酵母変異株を育種することにした。

実験方法

使用菌株および培地 遺伝子破壊の親株として、協会7号酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 泡なし株 (K701株) のウラシル、トリプトファン要求性変異株 UT-1 株¹⁰⁾ を使用した。GABA 低資化性酵母変異株の選抜には K701 株を用いた。プラスミドの増幅には大腸菌 *E. coli*, strain DH5 α を使用した。酵母の完全培地として、YPD 培地 (1 % yeast extract, 2 % Bacto-peptone and 2 % glucose) を使用した。UT-1 株の形質転換にはトリプトファン欠合成完全 (SC-TRP) 培地 (0.67 % Bacto-yeast nitrogen base without amino acids, 2 % glucose and 0.74 % CSM-Trp) およびトリプトファン、ウラシル欠合成完全 (SC-TRP-URA) 培地 (0.67 % Bacto-yeast nitrogen base without amino acids, 2 % glucose and 0.72 % CSM-Trp-Ura) を使用した。遺伝子破壊株の生育特性の解析には、最小(SD) 培地 (0.67 % Bacto-yeast nitrogen base without amino acids and 2 % glucose) および GABA を単一窒素源とする最小培地 (GABA 培地) (0.17 % Bacto-yeast nitrogen base without amino acids and ammonium sulfate, 2 % glucose and 0.5 % GABA) を使用した。GABA 低資化性酵母変異株の選抜には、無窒素最小培地 (0.17 % Bacto-yeast nitrogen base without amino acids and ammonium sulfate and 2 % glucose)、SD 培地および GABA 培地を使用した。*E. coli*, strain DH5 α の増殖には 100 μ g/mL ampicillin を含む LB 培地 (1 % Bacto-tryptone, 0.5 % yeast extract and 1 % NaCl) を使用した。

遺伝子破壊 *UGA1* の破壊は FIG. 1-4 に示す手順に従って行った。ゲノム DNA 抽出・精製キット Dr. GenTLE[®] (from Yeast) High Recovery (Takara) を用いて K701 株より回収したゲノム DNA を鋳型とし、UGA1-F : 5'-TTAGAGCTCTCATTGTATAGGAAGCCAGCC-3' および UGA1-R : 5'-AGAGAGCTCAAAGTTGTTTCGGTGAGTAAGC-3' (下線部は *SacI* 切断部位) を用いて、PCR により *UGA1* の ORF とその 5' および 3' 側隣接領域を含む 2.56 kb の DNA 断片を増幅し、*SacI* 処理後、pAUR112 (Takara) の *SacI* サイトにクローニングすることにより pUGA1 を作製した。次に、pUC18-TRP1 または pUC18-URA3 を鋳型とし、M4 : 5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3' および RV : 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3' を用いて、PCR により *TRP1* または *URA3* を増幅後、BKL kit (Takara) を用いて pUGA1 の *SfoI* サイトにそれぞれクローニングし、pDUGA1T または pDUGA1U を作製

した。

pDUGA1T を鋳型とし、UGA1-F および UGA1-R を用いて PCR により増幅した *UGA1* 破壊用 DNA 断片をエレクトロポレーションにより UT-1 株に導入し、1 M ソルビトールを含む SC-TRP 培地で 30°C、3 日間静置することによりヘテロ接合型 *UGA1* 破壊株 (*UGA1/Δuga1::TRP1*) を取得した。次に、pDUGA1U を鋳型とし、UGA1-F および UGA1-R を用いて PCR により増幅した *UGA1* 破壊用 DNA 断片をエレクトロポレーションによりヘテロ接合型 *UGA1* 破壊株 (*UGA1/Δuga1::TRP1*) に導入し、1 M ソルビトールを含む SC-TRP-URA 培地で 30°C、3 日間静置することによりホモ接合型 *UGA1* 破壊株 (*Δuga1::TRP1/Δuga1::URA3*) を取得した。

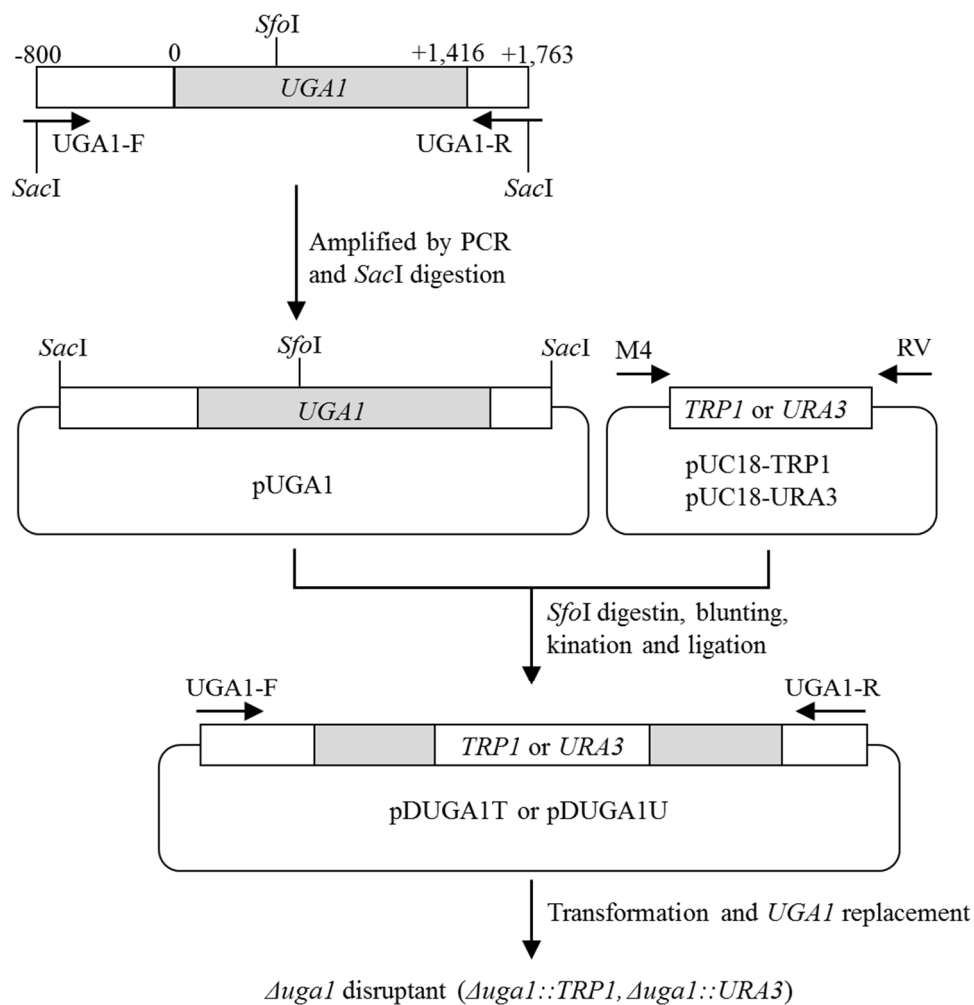


FIG. 1-4 Strategy for the disruption of *UGA1* of strain UT-1

UGA4 の破壊は FIG. 1-5 に示す手順に従って行った。ゲノム DNA 抽出・精製キット Dr. GenTLE[®] (from Yeast) High Recovery (Takara) を用いて K701 株より回収したゲノム DNA を鋳型とし、*UGA4*-F : 5'-CCCGAGCTCATCTGTTTCATTCCATTTTTCG-3' および *UGA4*-R : 5'-TTAGAGCTCCTTGCTCGATTACCTCTCCTC-3' (下線部は *SacI* 切断部位) を用いて、PCR により *UGA4* の ORF とその 5' および 3' 側隣接領域を含む 2.97 kb の DNA 断片を増幅し、*SacI* 処理後、pAUR112 (Takara) の *SacI* サイトにクローニングすることにより p*UGA4* を作製した。次に、pUC18-*TRP1* または pUC18-*URA3* を鋳型とし、M4 : 5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3' および RV : 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3' を用いて、PCR により *TRP1* または *URA3* を増幅後、BKL kit (Takara) を用いて p*UGA4* の *XbaI* サイトにそれぞれクローニングし、pD*UGA4*T または pD*UGA4*U を作製した。

UGA4 破壊株の作製は、UT-1 株を親株とし、*UGA1* 破壊と同様の方法により行った。

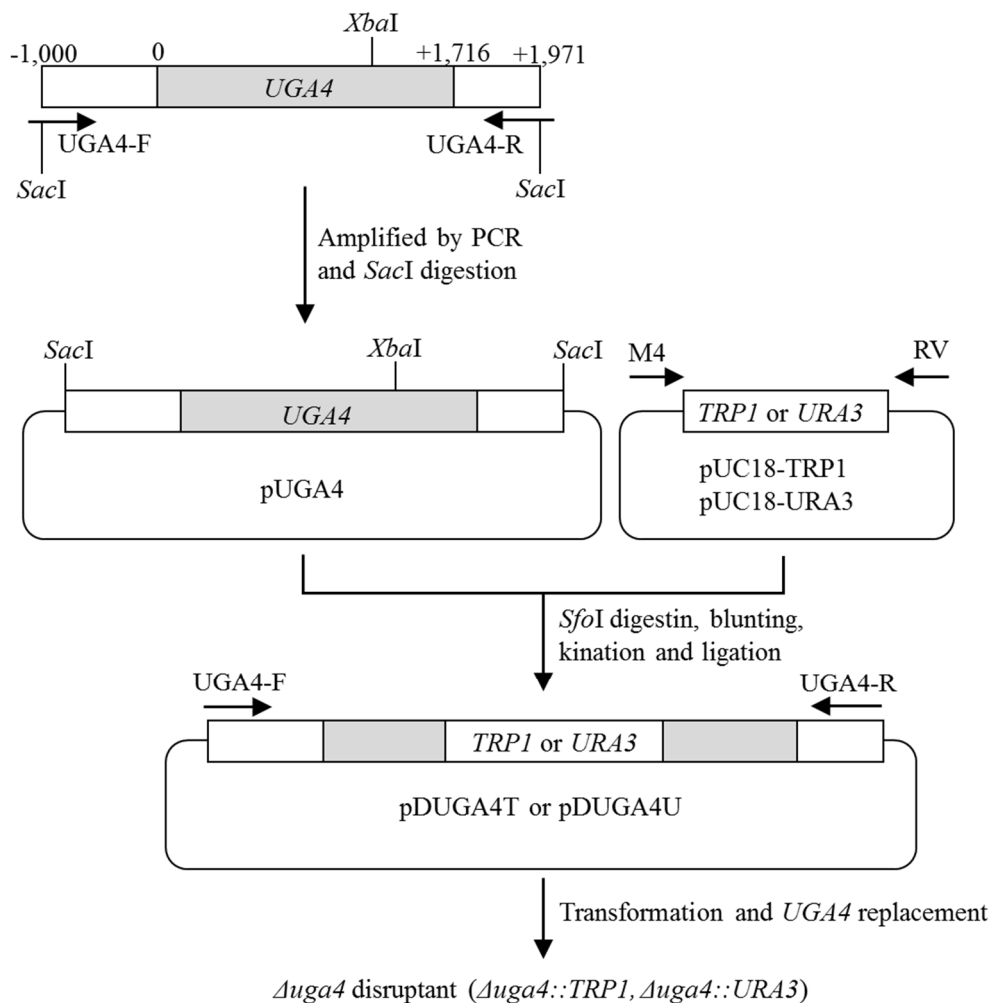


FIG. 1-5 Strategy for the disruption of *UGA4* of strain UT-1

清酒小仕込み試験 清酒小仕込み試験は、精米歩合 70%の α 米および米麴を用いて、難波らの方法¹¹⁾により総米 200 g の三段仕込みを行った。仕込み後の醪の温度は 15°C 一定とし、発酵経過は炭酸ガスの発生に伴う醪重量の減少量を測定し、炭酸ガス減量が 60 g に達した時点で遠心分離により製成酒と酒粕に分離した。製成酒について、国税庁所定分析法¹²⁾に従い、アルコール濃度、酸度、アミノ酸度および日本酒度を測定した。なお、日本酒度は 15°Cでの比重値より次の計算式により算出した。

$$\text{日本酒度} = (1/\text{比重} - 1) \times 1443$$

製成酒の GABA 量の測定は、製成酒に 10% TCA を等量添加、ボルテックスにより混合後、遠心分離 (15,000 rpm, 15 min)、0.45 μ m フィルターろ過を行い、アミノ酸アナライザー (L-7100, Hitachi)を用いて行った。

GABA 低資化性酵母変異株の選抜 K701 株を YPD 液体培地 5 mL で 30°C、一晩、振とう培養し、菌体を回収後、滅菌水により 2 回洗浄した。回収した菌体を 5% エチルメタンサルホン酸 (EMS) 処理 (30°C, 1h) 後、YPD 液体培地 50 mL で 30°C、一晩、振とう培養を行った。菌体を回収し、無窒素最小培地 50 mL で振とう培養 (30°C, 3h) 後、GABA 培地 9 mL に移し、振とう培養 (30°C, 3.5h) した。この培養液に 100 μ g/mL ナイスタチン溶液 1 mL を添加し、さらに振とう培養 (30°C, 1.5h) 後、SD 培地に塗抹し、30°C、3 日間静置した。SD 培地で生育したコロニーをレプリケーターを用いて、SD 培地および GABA 培地にレプリカし、30°C、3 日間静置後、SD 培地で生育できるが、GABA 培地では生育できない株を選抜した。

結果および考察

GABA 資化経路に関連する遺伝子破壊が製成酒の GABA 濃度に及ぼす影響 協会 7 号酵母泡なし株 (K701 株) のウラシル・トリプトファン要求性変異株 UT-1 株を用いて *UGA1*、*UGA4* の各遺伝子破壊株を作製し、精米歩合 70%の α 米および米麴を用いた小仕込み試験を行ったところ、

TABLE 1-1 に示すように *UGAI* 破壊株 (*Δugal*) および *UGA4* 破壊株 (*Δuga4*) を用いた製成酒の総アミノ酸濃度は親株とほぼ同等であったが、*UGAI* 破壊株を用いた製成酒では、GABA 濃度が 1.5 倍となり、製成酒中の GABA 量の顕著な増加が認められた。一方、*UGA4* 破壊株を用いた製成酒においては GABA 濃度の増加は認められなかったことから、Uga4p の機能低下を Put4p、Gap1p が相補したと考えられる。

以上の結果は、細胞内において GABA の分解に関与する GABA トランスアミナーゼ (Uga1p) の機能が低下した酵母変異株を育種することにより、清酒醪での GABA 資化能を低下させ、製成酒の GABA 量を増加させることが可能であることを示唆している。

TABLE 1-1. Amino acid composition of sake brewed with gene disruptants

	K701	<i>Δugal</i>		<i>Δuga4</i>	
	mM	mM	Ratio ^a	mM	Ratio ^a
Asp	0.47	0.52	1.1	0.44	0.9
Thr	0.32	0.39	1.2	0.31	1.0
Ser	0.62	0.73	1.2	0.62	1.0
Asn	0.49	0.56	1.1	0.53	1.1
Glu	1.61	1.88	1.2	1.58	1.0
Gln	0.54	0.57	1.1	0.46	0.8
Pro	1.24	1.27	1.0	1.39	1.1
Gly	2.16	2.27	1.0	2.17	1.0
Ala	3.48	4.18	1.2	4.08	1.2
Val	0.97	1.01	1.0	1.03	1.1
Cys	0.11	0.16	1.4	0.14	1.2
Met	0.04	0.06	1.3	0.06	1.4
Ile	0.63	0.67	1.1	0.64	1.0
Leu	1.19	1.29	1.1	1.23	1.0
Tyr	0.75	0.78	1.0	0.77	1.0
Phe	0.44	0.49	1.1	0.47	1.1
GABA	0.26	0.38	1.5	0.29	1.1
Lys	0.54	0.66	1.2	0.57	1.0
His	0.29	0.35	1.2	0.34	1.2
Arg	2.07	1.98	1.0	2.08	1.0
Total	18.25	20.19	1.1	19.19	1.1

^a mutant/K701

***UGAI* 破壊株の生育特性** 清酒小仕込み試験の結果から、*UGAI* を標的とし、Uga1p の機能が低下した変異株を育種することにした。Uga1p の機能が低下した変異株の育種を行うためには、その生育特性を指標にして選抜を行う必要がある。同一種の酵母であっても、遺伝子の働きはその株ごとに異なることが多い。例えば、清酒酵母はパン酵母 (実験室酵母) と同一の種に属するが、

清酒酵母においては、*RIM15* にナンセンス変異が生じることにより、その発酵力が向上することが知られている¹³⁾。その他にも清酒酵母と実験室酵母の遺伝子の機能の違いについては多くの報告がある¹⁴⁾。したがって、これまでに報告がある *Uga1p* の機能が低下した変異株が示す GABA を単一窒素源とする最小培地 (GABA 培地) で増殖できない⁷⁾ という生育特性が、清酒酵母でも見られるか調べたところ、UT-1 株の *UGA1* 破壊株も実験室酵母と同様に GABA 培地で生育できないことが明らかとなった (FIG. 1-6 A)。

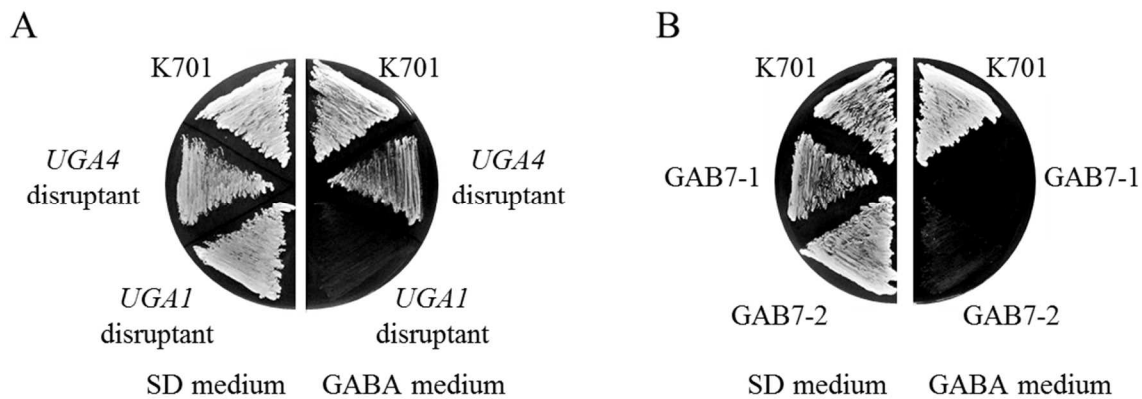


FIG. 1-6 Growth on SD medium and GABA medium as sole nitrogen source. (A) K701 (wild type), *UGA4* and *UGA1* disruptant cells were streaked on SD medium and minimal GABA medium and incubated at 30°C for 2 d. (B) K701 (wild type), GAB7-1 and GAB7-2 cells were streaked on SD medium and minimal GABA medium and incubated at 30°C for 2 d.

GABA 低資化性酵母変異株の選抜

清酒酵母の *UGA1* 破壊株が GABA 培地で生育できない

ことが明らかになったので、K701 株を親株として突然変異を誘発し、得られた突然変異株の中から GABA 培地で生育できない変異株を選抜することにした。K701 株を EMS 処理した後、GABA 培地でナイスタチン濃縮を行った。ナイスタチンは細胞膜のエルゴステロール合成を阻害することにより、酵母を死滅させる。したがって、GABA 培地で生育可能な酵母は増殖に伴う細胞膜形成が阻害され死滅するが、GABA 培地で生育できない酵母はナイスタチンの影響を受けないため、EMS 処理により得られた突然変異株に占める GABA 低資化性変異株の比率を高めることができる。このような GABA 低資化性変異株の濃縮培養後に SD 培地で約 4000 個のコロニーを分離した。次に得られたコロニーを SD 培地および GABA 培地にレプリカし、SD 培地で生育できるが、GABA 培地では生育できない変異株を 2 株 (GAB7-1, GAB7-2) 取得した (FIG. 1-6 B)。

株を清酒醸造へ応用するため、総米 200g の清酒小仕込み試験を行ったところ、FIG.1-7 に示すように対照である K701 株を用いた場合には、醪中の GABA 濃度は徐々に低下したのに対し、GAB7-1 あるいは GAB7-2 株を用いて仕込んだ醪では、発酵初期から GABA 濃度が増加し、その後減少することなく、製成酒の GABA 濃度は K701 株に比べ、GAB7-1 株の場合で 2.1 倍、GAB7-2 株の場合で 2.0 倍となった (FIG. 1-7, TABLE 1-2)。この結果は GABA を単一窒素源とする培地で増殖できない変異株 GAB7-1 株と GAB7-2 株の清酒醪における GABA 資化能が低下していることを示唆している。酵母が取り込んだ GABA を分解できないため、菌体内の GABA 濃度が高くなり、その結果として GABA 取り込み能が阻害を受けたと考えられる。また、TABLE 1-2 に示すように、清酒の品質管理の指標である成分分析の結果は、K701 株を用いた場合とほぼ同じであり、本変異株を用いることにより GABA を高含有する清酒の醸造が可能となった。

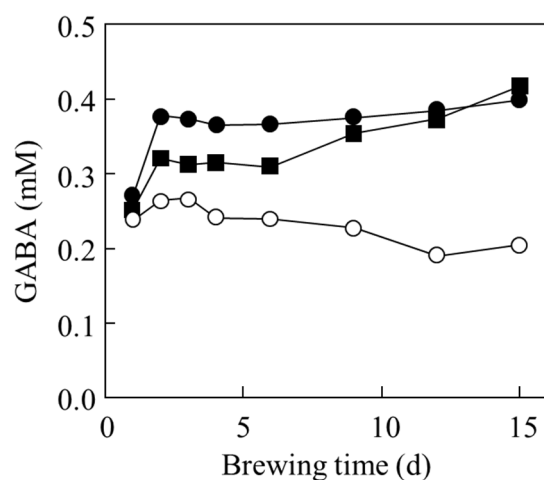


FIG. 1-7 Changes in the concentration of GABA during the sake brewing test with K701 (wild type), GAB7-1 and GAB7-2. *Open circles*, K701; *closed circles*, GAB7-1; *closed squares*, GAB7-2.

TABLE 1-2. Properties of experimental sake in the brewing test

	Alcohol (%)	Sake meter	Total acidity (ml)	Amino acidity (ml)	GABA (mM)
K701	18.5	-3.8	3.0	1.7	0.20
GAB7-1	18.6	-5.2	3.0	1.9	0.40
GAB7-2	18.0	-9.0	2.8	2.1	0.42

要 約

1. GABA の分解に関与する GABA トランスアミナーゼをコードする *UGAI* の破壊株を用いて醸造した清酒中の GABA 濃度は、親株を用いた場合と比べて 1.5 倍高い値を示した。
2. EMS 処理によって得られた K701 株由来突然変異株の中から、*UGAI* 破壊株の生育特性を指標として GABA 低資化性酵母変異株を 2 株 (GAB7-1 株、GAB7-2 株) 取得した。
3. 清酒小仕込み試験を行ったところ、GAB7-1 株、あるいは GAB7-2 株を用いて醸造した清酒中の GABA 量は、親株を用いて醸造した清酒の場合より約 2 倍高かった。これらの変異株を用いて清酒醸造を行うことにより GABA を高含有する清酒醸造が可能であることが明らかとなった。

第2節 GABA 低資化性酵母変異株 GAB7-1 株および

GAB7-2 株の特性解析

UGA1 破壊株の生育特性を指標として育種した GABA 低資化性酵母変異株 2 株 (GAB7-1 株、GAB7-2 株) では、GABA の分解経路に変異が生じていると考えられる。そこで、GABA 資化能低下の原因を明らかにするため、GABA 資化経路に関連する遺伝子を用いて GABA 資化性相補試験を行い、GABA 資化能低下に寄与する変異遺伝子を同定し、同定遺伝子の塩基配列の解析により変異点を明らかにすることにした。

実験方法

使用菌株および培地 K701 株の形質転換にはパントテン酸欠培地 (20 g glucose, 0.5 g ammonium sulfate, 1.5 g KH₂PO₄, 0.5 g MgSO₄·7H₂O, 0.16 g citric acid, 200 μg thiamine, 200 μg riboflavin, 200 μg nicotinic acid, 1 mg inositol, 200 μg *p*-aminobenzoic acid, 0.2 μg biotin, 40 μg β-alanine and 30 g agar per 1L of medium [pH 5.0]) を使用した。無細胞抽出液の調製および遺伝子発現解析には YPD 培地またはグルタミン酸および GABA を窒素源とする最小培地 (Glu+GABA 培地) (0.17 % Bacto-yeast nitrogen base without amino acids and ammonium sulfate, 2 % glucose, 0.1% glutamate and 0.05 % GABA) を使用した。*E. coli*, strain DH5α の増殖には 100 μg/mL ampicillin を含む LB 培地 (1 % Bacto-tryptone, 0.5 % yeast extract and 1 % NaCl) を使用した。

GABA 低資化性酵母変異株の遺伝子相補性試験 下飯らの方法に従い¹⁵⁾、K701 株の 35°C でのパントテン酸要求性を相補するケトパントイン酸ヒドロキシメチルトランスフェラーゼをコードする *ECM31* を YCp 型プラスミドベクター pRS416¹⁶⁾ の *Xba*I サイトにクローニングし、pECM31 を作製した。次にゲノム DNA 抽出・精製キット Dr. GenTLE® (from Yeast) High Recovery (Takara) を用いて K701 株より回収したゲノム DNA を鋳型とし、*UGA4* 相補試験用には、UGA4-1 : 5'-

ATCTGTTTCATTCCATTTTTTCG-3' および UGA4-2 : 5'-CTTGCTCGATTACCTCTCCTC-3' を用いて、UGA4 の ORF とその 5' および 3' 側隣接領域を含む -1,000 ~ +1,971 に相当する 2.97 kb の DNA 断片を増幅した。UGA1 相補試験用には、UGA1-1 : 5'-TCATTGTATAGGAAGCCAGCC-3' および UGA1-2 : 5'-AAAGTTGTTTCGGTGAGTAAGC-3' を用いて、UGA1 の ORF とその 5' および 3' 側隣接領域を含む -800 ~ +1,763 に相当する 2.56 kb の DNA 断片を増幅した。UGA2 相補試験用には、UGA2-1 : 5'-GGTTTAAACAAGGCCTAGC-3' および UGA2-2 : 5'-GTACATGAAACAAGGTCCG-3' を用いて、UGA2 の ORF とその 5' および 3' 側隣接領域を含む -600 ~ +1,820 に相当する 2.42 kb の DNA 断片を増幅した。PCR により増幅した各 DNA 断片を BKL kit (Takara) を用いて pECM31 の *SacI* サイトにクローニングし、pECM31-UGA4、pECM31-UGA1、pECM31-UGA2 を作製した。これらのプラスミドを用いて、GABA 低資化性変異株をエレクトロポレーションにより形質転換後、パントテン酸欠培地で 35°C、3 日静置することにより形質転換体を取得した。得られた形質転換体を SD 培地および GABA 培地にストリークし、30°C、3 日静置後に増殖の判定を行った。

無細胞抽出液の調製 YPD 培地または Glu+GABA 培地で対数増殖期 (OD₆₆₀=1.0) まで培養した酵母菌体を遠心分離により回収、滅菌水を用いて洗浄後、菌体を 1 tablet Complete Mini EDTA-free (Roche)、1 mM PMSF を含む 0.1 M リン酸カリウム緩衝液 pH8.2 に懸濁した。細胞懸濁液 200 μ L を 0.2 g のガラスビーズの入ったマイクロチューブに移し、マルチビーズショッカー (安井機械) により細胞を破碎 (On: 30 sec, Off: 60 sec, 10 cycles, 4°C) し、遠心分離 (15,000 rpm, 15 min) により上清を回収後、同緩衝液に対して 4°C で一晚透析を行い、無細胞抽出液とした。無細胞抽出液のタンパク質濃度は、Pierce BCA Protein Assay kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。

GABA トランスアミナーゼ活性測定 Ramos らの方法⁷⁾ に従い、TABLE 1-3 に示す反応液を用いて、反応で生成する NADH の増加量を 340 nm における吸光度で測定した。GABA トランスアミナーゼ活性の 1 単位は、TABLE 1-3 の条件下で 1 時間に 1 μ mol の GABA を分解する酵素量とした。なお、NADH の 340 nm におけるモル吸光係数は 6.22×10^3 とした。

TABLE 1-3. Reaction mixture for GABA transaminase activity assay

100 mM	Potassium phosphate buffer (pH8.2)
0.2 mM	EDTA
7.5 mM	Potassium 2-oxoglutarate
7.5 mM	GABA
0.2 mM	NAD
1-4 mg	Cell-free extracts

コハク酸セミアルデヒド脱水素酵素活性測定 Ramos らの方法⁷⁾に従い、TABLE 1-4 に示す反応液を用いて、反応で生成する NADH の増加量を 340 nm における吸光度で測定した。コハク酸セミアルデヒド脱水素酵素活性の 1 単位は、TABLE 1-4 の条件下で 1 時間に 1 μ mol のコハク酸セミアルデヒドを分解する酵素量とした。なお、NADH の 340 nm におけるモル吸光係数は 6.22×10^3 とした。

TABLE 1-4. Reaction mixture for succinate semialdehyde dehydrogenase activity assay

100 mM	Potassium phosphate buffer (pH8.2)
0.2 mM	EDTA
0.2 mM	NAD
0.1 mM	succinate semialdehyde
0.1-0.3 mg	Cell-free extracts

酵母菌体内 GABA 量の測定 K701 株および GABA 低資化性変異株を Glu+GABA 培地 100 mL を用いて OD660=1.0 まで 30°C で振とう培養後、遠心分離により集菌を行なった。滅菌水で 2 回洗浄後、菌体を抽出用緩衝液 (20 mM Tris-HCl pH7.5, 1 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 5 % glycerol, 3 mM DTT, 1 mM PMSF and 1 tablet Complete Mini EDTA-free [Roche]) に懸濁し、OD660=100 に調整した。細胞懸濁液 200 μ L を 0.2 g のガラスビーズの入ったマイクロチューブに移し、マルチビーズショッカー (安井機械) により細胞を破碎 (On: 30 sec, Off: 60 sec, 10 cycles, 4°C) し、遠心分離 (15,000 rpm, 15 min) により上清を回収した。無細胞抽出液に 10% TCA を等量添加、ボルテックスにより混合後、遠心分離 (15,000 rpm, 15 min) により沈殿を除去した。回収した上清を 0.45 μ m フィルターろ過し、アミノ酸アナライザー (L-7100, Hitachi) に供した。

遺伝子発現解析 Glu+GABA 培地を用いて 30°C で OD660=1.0 まで振とう培養した K701 株および GABA 低資化性変異株より、ホットフェノール法を用いて総 RNA を抽出した¹⁷⁾。RNA 10 µg を用いて 2.2 M ホルムアルデヒドを含む 1% アガロースゲル電気泳動 (100V, 40min) を行った後、Hybond-N+ membranes (Amersham Biosciences) に転写し、PCR DIG Synthesis kit (Roche) を用いて DIG 標識した *UGA1* または *UGA2* プロンプを用いてハイブリダイズを行った。*UGA1* のプロンプは、K701 株のゲノム DNA を鋳型とし、5'-primer : 5'-ATGTCTATTTGTGAAC-3'、3'-primer : 5'-CACACACA ACTGATGAG-3' を用いて、PCR により増幅した DIG ラベル PCR 断片を用いた。同様に *UGA2* のプロンプは K701 株のゲノム DNA を鋳型とし、5'-primer : 5'-GCTAGAAA ACCAGCTAC-3'、3'-primer : 5'-CAATCATTACAAAGAATC-3' を用いて、PCR により増幅した DIG ラベル PCR 断片を用いた。ノーザン解析は DIG Luminescent Detection kit (Roche Diagnostics) のマニュアルに従った。

結果および考察

GABA 低資化性酵母変異株の変異遺伝子の同定 GABA 低資化性酵母変異株の GABA 資化能低下に寄与する変異遺伝子を同定するため、親株 K701 株の GABA 資化経路に関連する各遺伝子を GAB7-1 株、GAB7-2 株に導入し、GABA 資化能が回復するか調べた。まず、K701 株の染色体 DNA を鋳型として PCR で増幅した *UGA1*、*UGA2*、*UGA4* 配列を協会 7 号酵母の 35°C でのパンテン酸要求性を相補する遺伝子 *ECM31* を選択マーカーとするシングルコピープラスミドにクローニングし、各プラスミドを用いて GAB7-1 または GAB7-2 株を形質転換した。得られた形質転換体の GABA 培地での生育を調べたところ、GAB7-1 株では *UGA1*、GAB7-2 株では *UGA2* が導入された場合においてのみ増殖の回復が認められた (FIG. 1-8)。これらの結果は、GAB7-1 株では *UGA1* によってコードされる GABA トランスアミナーゼ、GAB7-2 株では *UGA2* によってコードされるコハク酸セミアルデヒド脱水素酵素 (SSADH) の機能が低下していることを示唆している。

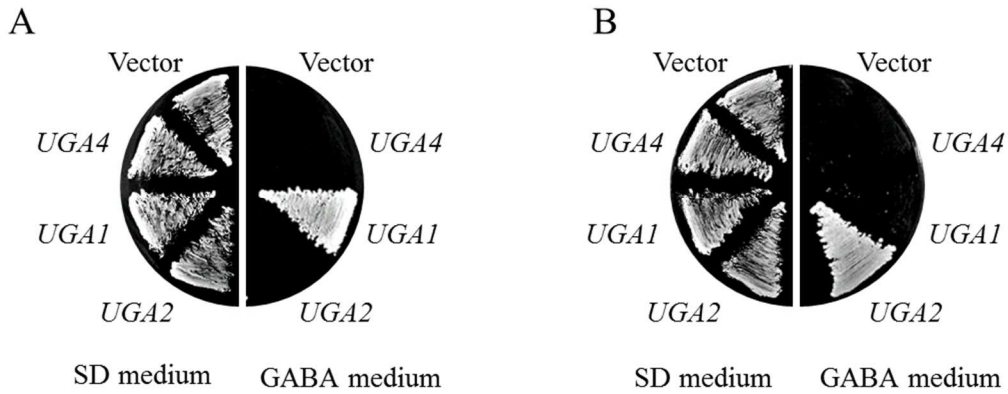


FIG. 1-8 Complementation of growth defects of GAB mutants on GABA as sole nitrogen source with each plasmid carrying *UGA4*, *UGA1* or *UGA2*. GAB7-1 transformants (A) and GAB7-2 transformants (B) with pECM31, pECM31-*UGA4*, pECM31-*UGA1* and pECM31-*UGA2* were streaked on SD medium and minimal GABA medium and incubated at 30°C for 2 d.

次に各変異株の機能が低下している酵素タンパク質をコードする遺伝子の変異点を同定することにし、GAB7-1 株の *UGA1*、GAB7-2 株の *UGA2* の塩基配列を決定し、K701 株との比較を行った。GAB7-1 株では、*UGA1* の 923 番目の G が A に置換 (G923A) されることにより、アミノ酸配列の 308 番目のトリプトファンが終止コドンに変化したホモ接合型ナンセンス変異 (Trp308*) が検出された (FIG. 1-9, FIG. 1-11)。一方、GAB7-2 株では、*UGA2* の 740 番目の G が A に置換 (G740A) されることにより、アミノ酸配列の 247 番目のグリシンがアスパラギン酸に変化したヘテロ接合型ミスセンス変異 (Gly247Asp) が検出された (FIG. 1-10, FIG. 1-11)。

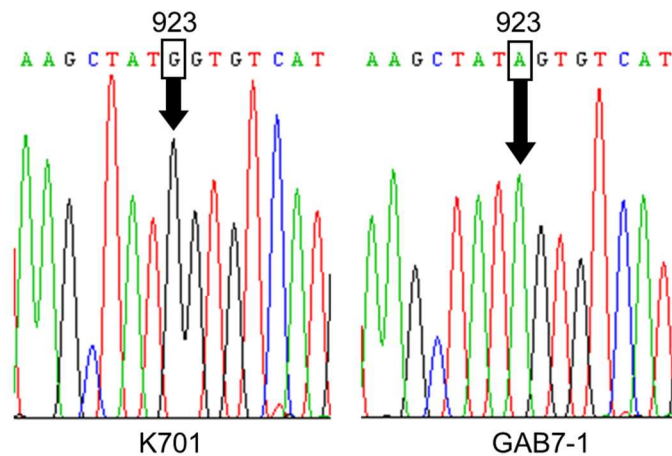


FIG. 1-9 Comparison of nucleotide sequences of *UGA1* between strain K701 and GAB7-1. *UGA1* ORF (1416 bp) amplified from the respective genomic DNAs of K701 and GAB7-1 by PCR were sequenced.

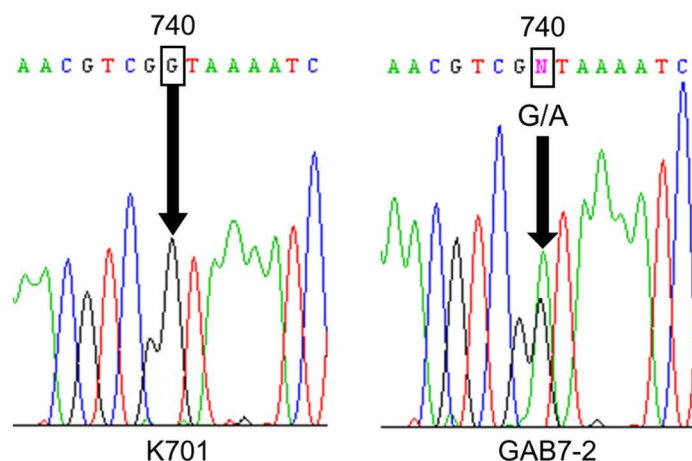


FIG. 1-10 Comparison of nucleotide sequences of *UGA2* between strain K701 and GAB7-2. *UGA2* ORF (1494 bp) amplified from the respective genomic DNAs of K701 and GAB7-2 by PCR were sequenced.

<i>UGA1</i>					<i>UGA2</i>								
K701	916	AAG	CTA	TGG	TGT	CAT	K701	733	AAC	GTC	GGT	AAA	ATC
		K	L	W	C	H			N	V	G	K	I
GAB7-1	916	AAG	CTA	TAG	TGT	CAT	GAB7-2	733	AAC	GTC	G ^G _A T	AAA	ATC
		K	L	*	C	H			N	V	G/D	K	I
				308							247		

FIG. 1-11 Comparisons of nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of mutated gene between K701 (wild type) and GAB mutants.

さらにこれらの遺伝子の変異点の接合型を確かめるため、変異遺伝子配列の制限酵素による切断パターンを調べることにした。*UGA1* の塩基配列中には制限酵素 *SfcI* の切断部位は存在しないが、G923A 変異により *SfcI* の切断部位が生じる。K701 株と GAB7-1 株の *UGA1* を PCR により増幅したフラグメントを *SfcI* で切断したところ、GAB7-1 株において *SfcI* による切断が認められた (FIG. 1-12)。この結果は GAB7-1 株の *UGA1* の G923A 変異がホモ接合型で生じていることを支持するものである。

一方、*UGA2* の塩基配列中には制限酵素 *TaqI* の切断部位は存在しないが、G740A 変異により *TaqI* の切断部位が生じる。K701 株と GAB7-2 株の *UGA2* を PCR により増幅したフラグメントを *TaqI* で切断したところ、GAB7-2 株において *TaqI* で切断されたフラグメントと切断されないフラグメントが認められた (FIG. 1-13)。この結果は GAB7-2 株の *UGA2* の G740A 変異がヘテロ接合型で生じていることを支持するものである。

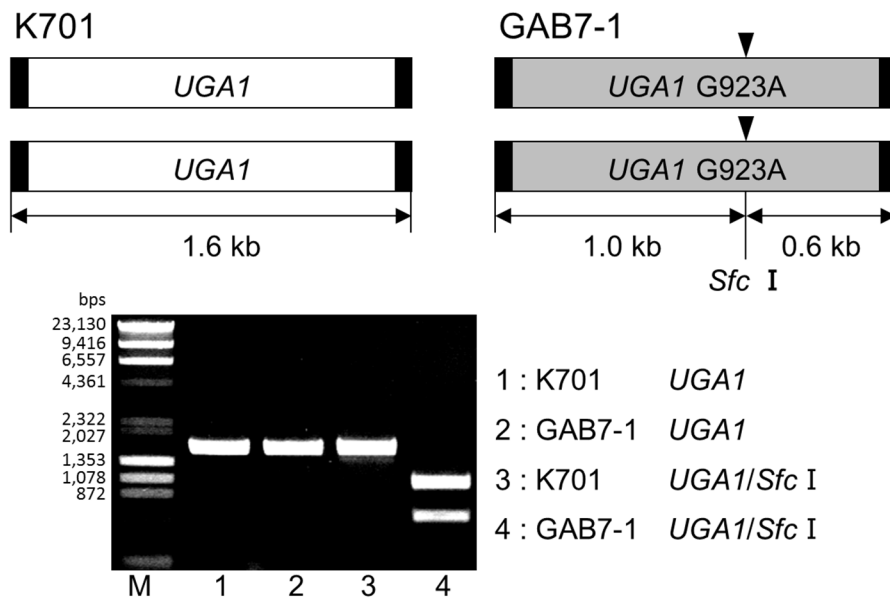


FIG. 1-12 Digestion patterns of *UGA1* sequence by restriction enzyme. A 1.6 kb DNA fragments containing *UGA1* coding region of K701 and GAB7-1 were cut with *SfcI*.

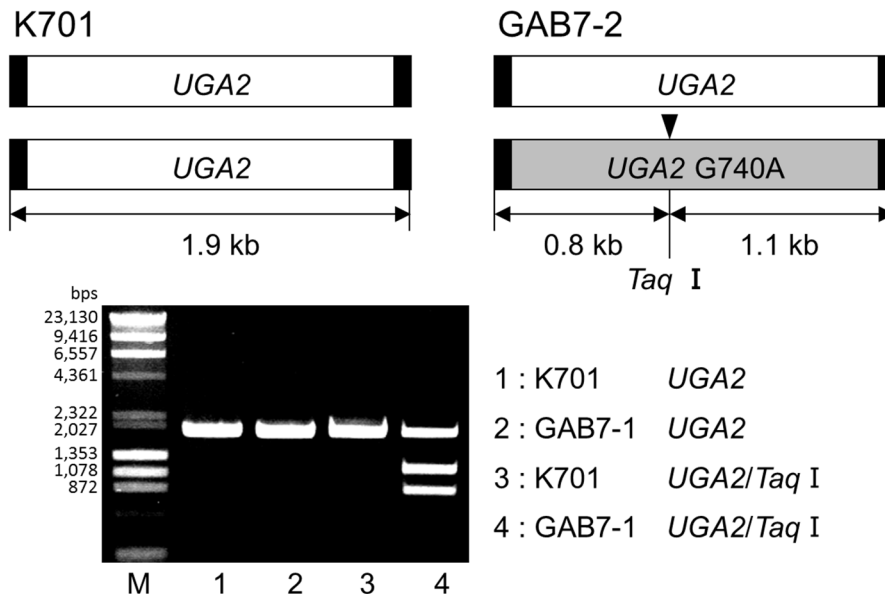


FIG. 1-13 Digestion patterns of *UGA2* sequence by restriction enzyme. A 1.9 kb DNA fragments containing *UGA2* coding region of K701 and GAB7-2 were cut with *TaqI*.

GABA 低資化性酵母変異株の GABA 分解活性の評価

GAB7-1 株では *UGA1* のホモ接合型ナ

ンセンス変異による GABA トランスアミナーゼ、GAB7-2 株では *UGA2* のヘテロ接合型ミスセンス変異による SSADH、各酵素機能が低下したと考えられる。そこで、YPD 培地もしくは Glu+GABA 培地で増殖した菌体より無細胞抽出液を調製し、各酵素活性を測定したところ、K701 株の GABA トランスアミナーゼおよび SSADH は、Glu+GABA 培地における酵素タンパク質合成誘導による酵素活性の増加が認められたが、GAB7-1 株の GABA トランスアミナーゼおよび GAB7-2 株の

SSADH では、酵素タンパク質合成誘導による酵素活性の増加は認められなかった (TABLE 1-5)。GAB7-1 および GAB7-2 株では GABA の分解経路に変異が生じているため、GABA の分解活性が低下し、菌体内に GABA が高蓄積すると考えられる。そこで、菌体内の GABA 量を測定したところ、GAB7-1 株、GAB7-2 株それぞれの GABA 量は、K701 株の 29 倍、10 倍であり、菌体内において GABA が分解されずに高蓄積することが明らかとなった (FIG. 1-14)。

TABLE 1-5. GABA transaminase and SSADH activities of GAB mutants

	Activity (U/mg of protein)			
	GABA transaminase		SSADH ^a	
	Glu ^b + GABA	YPD	Glu + GABA	YPD
K701	1.27	0.24	0.95	0.28
GAB7-1	0.08	0.11		
GAB7-2			0.14	0.25

^a Succinate semialdehyde dehydrogenase

^b glutamate

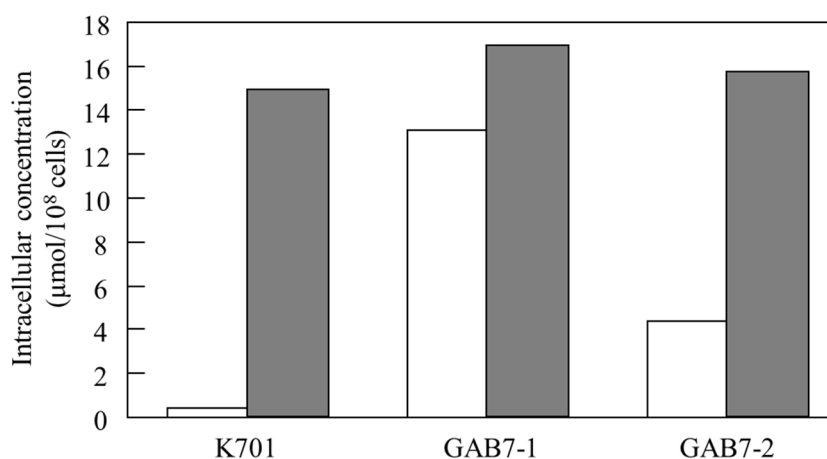


FIG. 1-14 Intracellular GABA content of yeast cells. Amino acid concentration in yeast cells were grown in minimal medium supplemented with 0.1% glutamate and 0.05% GABA as nitrogen sources at 30°C until OD660 = 1.0 was analyzed with amino acid analyzer. *Open bar*, GABA; *filled bar*, total amino acid.

さらに両変異株において活性が低下した酵素タンパク質をコードする遺伝子の発現解析を行った。Glu+GABA 培地を用いて 30°C で OD660=1.0 まで振とう培養した K701 株および GABA 低資化性変異株についてノーザン解析を行ったところ、GAB7-1 株および GAB7-2 株において *UGA1*、*UGA2* の発現量は K701 株のそれと差はなかった (FIG. 1-15)。以上の結果は、TABLE 1-5 に示したこれら酵素活性の低下が各変異遺伝子の発現量の低下でなく、塩基配列の変異によりコードされるタンパク質の機能が低下したことを示している。

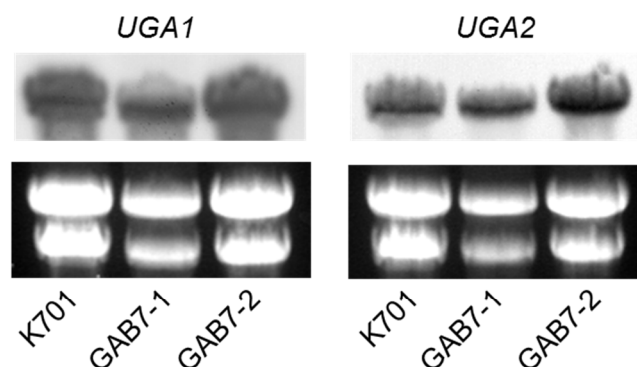


FIG.1-15 Northern blot analysis of *UGA1* and *UGA2*. Ten μg of total RNA extracted from yeast cells grown in minimal medium supplemented with 0.1% glutamate and 0.05% GABA as nitrogen sources at 30°C until $\text{OD}_{660} = 1$ was separated on formaldehyde-containing agarose gels, transferred onto Hybond-N+ membranes and hybridized with DIG labeled *UGA1* and *UGA2* probes.

酵母の GABA トランスアミナーゼは補酵素としてピリドキサルリン酸を必要とするアミノトランスフェラーゼであり、そのアミノ酸配列の 329 番目のリジンにピリドキサルリン酸が結合する^{18,19)}。GAB7-1 株では、*UGA1* の 308 番目のトリプトファンが終止コドンにホモ接合型で変異することにより、ピリドキサルリン酸の結合部位まで翻訳されないため、不完全なタンパク質となり機能が低下したと考えられる。一方、GAB7-2 株は、*UGA2* のヘテロ接合型ミスセンス変異株であり、SSADH の機能低下の作用機構については、今後さらに検討の余地がある。

要 約

1. GAB7-1 株は *UGA1* にホモ接合型のナンセンス変異 (Trp308*)、GAB7-2 株は *UGA2* にヘテロ接合型のミスセンス変異 (Gly247Asp) を持つ変異株であった。
2. GAB7-1 株では GABA トランスアミナーゼ活性が、GAB7-2 株ではコハク酸セミアルデヒド脱水素酵素活性が低下していたが、*UGA1* や *UGA2* の発現量の低下は認められなかった。
3. GAB7-1、GAB7-2 株では菌体内における GABA 分解活性が低下するため、菌体内に GABA が高蓄積し、その結果として GABA の資化能が低下したと考えられる。

参 考 文 献

- 1) **Kato, Y., Kato, Y., Furukawa, K., and Hara, S.:** Cloning and nucleotide sequence of the glutamate decarboxylase-encoding gene *gadA* from *Aspergillus oryzae*, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **66**, 2600-2605 (2002).
- 2) **Takahashi, T., Iwai, Y., Mizoguchi, H., and Hara, S.:** GABA uptake in *Saccharomyces cerevisiae* during sake mash fermentation, *The Society for Biotechnology, Japan meeting abstract*, 62 (2000).
- 3) **Grenson, M., Muyldermans, F., Broman, K., and Vissers, S.:** 4-aminobutyric acid (GABA) uptake in baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by the general amino-acid permease, the proline permease and a GABA-specific permease integrated into the GABA-catabolic pathway, *Biochem. (Life. Sci. Adv.)*, **6**, 35-39 (1987).
- 4) **Kishimoto, M. and Sodeyama, M.:** Production of wine containing higher γ -aminobutyric acid levels using wine yeast mutant carrying *gap1 put4 uga4* triple mutations, *J. Brew. Soc. Japan.*, **98**, 737-742 (2003) (in Japanese).
- 5) **Andre, B. and Jauniaux, J. C.:** Nucleotide sequence of the yeast *UGAI* gene encoding GABA transaminase, *Nucleic Acids Res.*, **18**, 3049 (1990).
- 6) **Coleman, S. T., Fang, T. K., Rovinsky, S. A., Turano, F. J., and Moye-Rowley, W. S.:** Expression of a glutamate decarboxylase homologue is required for normal oxidative stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.*, **276**, 244-250 (2001).
- 7) **Ramos, F., el Guezzar, M., Grenson, M., and Wiame, J. M.:** Mutations affecting the enzymes involved in the utilization of 4-aminobutyric acid as nitrogen source by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Eur. J. Biochem.*, **149**, 401-404 (1985).
- 8) **Scott, E. M. and Jakoby, W. B.:** Soluble γ -aminobutyric-glutamic transaminase from *Pseudomonas fluorescens*, *J. Biol. Chem.*, **234**, 932-936 (1959).
- 9) **Jakoby, W. B. and Scott, E. M.:** Aldehyde oxidation, succinic semialdehyde dehydrogenase, *J. Biol. Chem.*, **234**, 937-940 (1959).

- 10) **Kitamoto, K., Oda, K., Gomi, K., and Takahashi, K.:** Construction of uracil and tryptophan auxotroph mutants from sake yeasts by disruption of *URA3* and *TRP1* genes, *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 2979-2987 (1990).
- 11) **Namba, Y., Obata, T., Kayashima, S., Yamasaki, Y., Murakami, M., and Shimoda, T.:** Method of small scale-brewing test, *J. Brew. Soc. Jpn.*, **73**, 295-300 (1978) (in Japanese).
- 12) **Nishiya, T. (ed.):** National Tax Administration of Japan prescript analysis methods with note (4th ed.), 7-33, Brewing Society of Japan, Tokyo (1993) (in Japanese).
- 13) **Watanabe, D., Araki, Y., Zhou, Y., Maeya, N., Akao, T., and Shimoi, H.:** A loss-of-function mutation in the PAS kinase Rim15p is related to defective quiescence entry and high fermentation rates of *Saccharomyces cerevisiae* sake yeast strains, *Appl. Environ. Microbiol.*, **78**, 4008-4016 (2012).
- 14) **Watanabe, D.:** Genetic study of high fermentation ability of sake yeast, *Seibutsu-kogaku*, **91**, 2-9 (2013) (in Japanese).
- 15) **Shimoi, H., Okuda, M., and Ito, K.:** Molecular cloning and application of a gene complementing pantothenic acid auxotrophy of sake yeast kyokai No. 7, *J. Biosci. Bioeng.*, **90**, 643-647 (2000).
- 16) **Sikorski, R. S. and Hieter, P.:** A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*, *Genetics*, **122**, 19-27 (1989).
- 17) **Kohrer, K. and Domdey, H.:** Preparation of high molecular weight RNA, *Methods Enzymol.*, **194**, 398-405 (1991).
- 18) **Toney, M. D., Pascarella, S., and De Biase, D.:** Active site model for gamma-aminobutyrate aminotransferase explains substrate specificity and inhibitor reactivities, *Protein Sci.*, **4**, 2366-2374 (1995).
- 19) **Storici, P., De Biase, D., Bossa, F., Bruno, S., Mozzarelli, A., Peneff, C., Silverman, R. B., and Schirmer, T.:** Structures of gamma-aminobutyric acid (GABA) aminotransferase, a pyridoxal 5'-phosphate, and [2Fe-2S] cluster-containing enzyme, complexed with gamma-ethynyl-GABA and with the antiepilepsy drug vigabatrin, *J. Biol. Chem.*, **279**, 363-373 (2004).

第 2 章

低精白米仕込みにおいて酢酸イソアミルを 高生産する酵母変異株の育種とその特性解析 (b)

酢酸イソアミルは酵母が生合成する吟醸香の主要成分の一つであり、ロイシン生合成経路から分岐して生合成されるイソアミルアルコールとアセチル-CoA を基質とし、*ATF1* または *ATF2* によってコードされるアルコールアセチルトランスフェラーゼ (AATase, EC 2.3.1.84) によって生合成される¹⁻⁴⁾ (FIG. 2-1)。

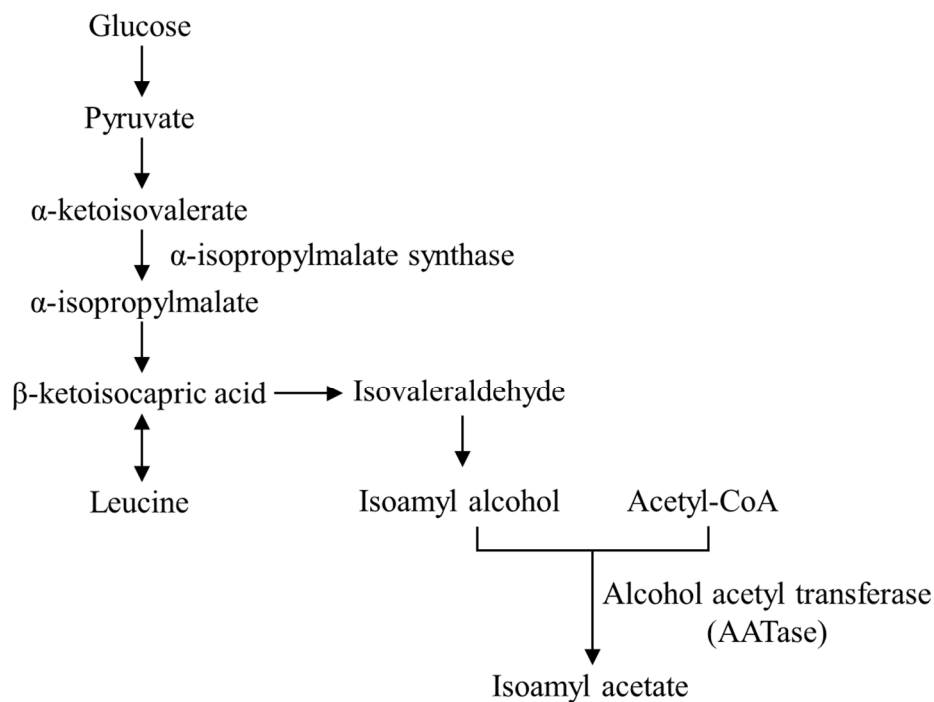


FIG. 2-1 Biosynthesis pathway of isoamyl acetate

ATF1 または *ATF2* 単独破壊株の解析からビール醸造において AATase をコードする主要な遺伝子が *ATF1* であることが明らかとなった⁵⁾。*ATF1* は不飽和脂肪酸によってその発現量が抑制される^{6,7)} ため、吟醸香の高い清酒を醸造する場合、原料となる白米を高精白することにより、米の外層部に存在する不飽和脂肪酸を取り除く必要がある。

本章では、高い吟醸香を有する清酒の効率的な醸造方法の確立を目指して、低精白米を用いた清酒醸造において酢酸イソアミルを高生産する酵母変異株の育種およびその特性解析を行った。

第1節 酢酸イソアミル高生産性酵母変異株の育種

これまでに酢酸イソアミルを高生産する酵母変異株の育種についていくつかの報告がある。ロイシン生合成経路上の α -イソプロピルリンゴ酸合成酵素はロイシンによるフィードバック阻害を受けるが、ロイシンアナログである 5',5',5'-トリフルオロロイシンに耐性を示す酵母変異株ではロイシンによるフィードバック阻害が解除されるため、イソアミルアルコール量が増加するとともに酢酸イソアミル量も増加することが知られている⁸⁾。さらにカナバニン、1-ファルネシルピリジニウム、ハイグロマイシン B などの薬剤に耐性を示す酵母変異株では、酢酸イソアミル生合成能が向上することが報告されている⁹⁻¹¹⁾。なお、これら酵母変異株の育種に関する報告において不飽和脂肪酸による *ATF1* の発現抑制が解除されているということは記されていない。

一方、FIG. 2-2 に示すように、スフィンゴ脂質生合成経路における初発反応、すなわちセリンとパルミトイル-CoA の縮合反応を触媒するセリンパルミトイルトランスフェラーゼは、抗生物質ミリオシン (*ISP-1*) によって阻害されるが、N-アセチルトランスフェラーゼをコードする *SLII* を高発現させた酵母では *ISP-1* に耐性を示すようになり、*ISP-1* によるスフィンゴ脂質合成経路の阻害が解除される¹²⁾。*Sli1p* は、*Atf1p* および *Atf2p* と相同性があることから、*AATase* はエステル化反応だけでなく、スフィンゴ脂質生合成経路においても重要な役割を果たす可能性がある。また、フィトセラミドからグリセロリン脂質への代謝に関与する長鎖脂肪酸アシル-CoA 合成酵素をコードする *FAA1*、*FAA4*¹³⁾ の二重破壊株では、不飽和脂肪酸による *OLE1* の発現抑制が緩和されることが知られている¹⁴⁾。したがってフィトセラミドからグリセロリン脂質への代謝経路を抑制する、すなわちフィトセラミドからの別の代謝経路を活性化すれば *FAA1*、*FAA4* 二重破壊株と同様の形質を示し、*OLE1* と協調的な制御を受ける *ATF1* の不飽和脂肪酸による発現抑制も解除されると考えられる。そこで、イノシトールホスホリルセラミド合成酵素の阻害剤であるオーレオバシジン A (*AbA*)¹⁵⁾ に耐性を示す酵母変異株の中から、不飽和脂肪酸による *ATF1* の発現抑制が解除された酢酸イソアミル高生産性酵母変異株を選抜することにした。

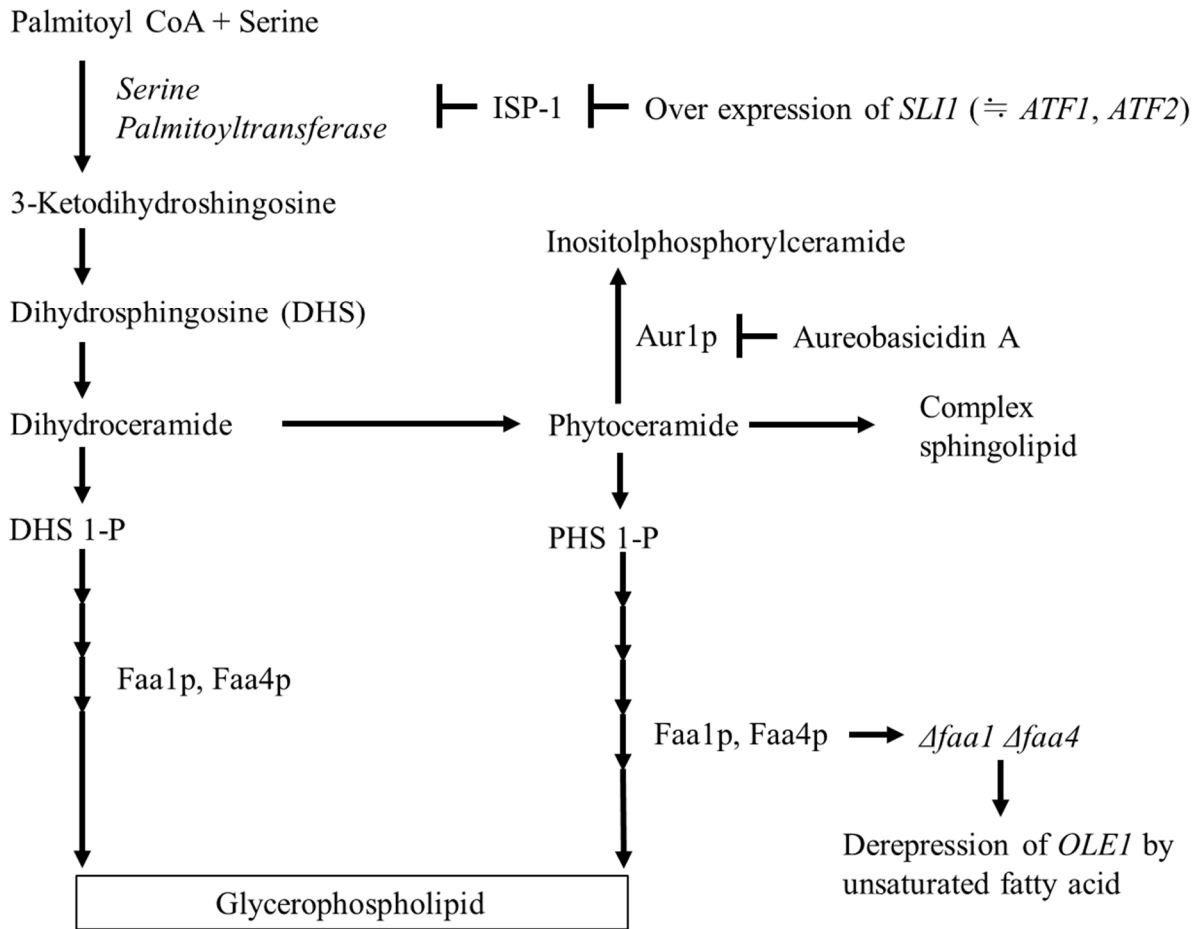


FIG. 2-2 Metabolic pathway of sphingolipid

実験方法

使用菌株および培地 酢酸イソアミル高生産性酵母変異株選抜のための親株として、清酒酵母協会9号酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 泡なし株 (K901株) 由来アルギナーゼ欠損株 Km97株を使用した。酵母の富栄養培地として、YPD培地 (1% yeast extract, 2% Bacto-peptone and 2% glucose) を使用した。

AbA耐性酵母変異株の選抜 Km97株をYPD培地5mLで30°C、一晩、振とう培養し、菌体を回収後、滅菌水により2回洗浄した。回収した菌体を4%エチルメタンサルホン酸 (EMS) 処理 (30°C, 1h) 後、1 μg/mL AbAを含むYPD培地で、30°C、4日間静置培養し、生育した菌株をAbA耐性株とした。

香氣成分分析 GC-FID は GC-2010 Plus gas chromatograph (Shimadzu)、ヘッドスペースオートサンプラーは Turbo Matrix HS40 headspace sampler (PerkinElmer Life Sciences)、カラムは DB-WAX (length, 60 m; internal diameter, 0.32 mm; layer thickness, 1.2 μm ; J&W Scientific) を用いて、ヘッドスペース GC-FID 法により、酢酸イソアミルおよびイソアミルアルコールの分析を行った。分析サンプル (清酒) はヘッドスペースオートサンプラーで、60°C、30 分加温後、GC-FID 分析に供した。注入温度は 200°C、検出器温度は 240°C に設定した。カラムオープンの温度設定は、40°C (5min hold) \rightarrow 100°C (5°C min⁻¹) \rightarrow 230°C (20°C min⁻¹) \rightarrow 230°C (5 min hold) とした¹⁶⁾。酢酸イソアミルのイソアミルアルコールに対する割合を E/A 比として算出した¹⁷⁾。

発酵試験 精米歩合 70%の α 米 64g、米麴 36g および水 200mL を混合し、糖化 (55°C, 4 h) を行った後、糖化液に水 120 mL を加え、乳酸を用いて酸度 4.0 に調整した。糖化液を試験管に 10 mL ずつ分注し、AbA 耐性株を接種後、15°C、11 日間発酵試験を行った。発酵終了後、遠心分離により上清を回収し、ヘッドスペース GC-FID 法を用いて酢酸イソアミル濃度を測定した。

清酒小仕込み試験 清酒小仕込み試験は、第 1 章 第 1 節に示す方法に従い行った。

結果および考察

酢酸イソアミル高生産性酵母変異株の選抜 清酒酵母 Km97 株を親株として EMS 処理により突然変異を誘発し、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AbA を含む YPD 培地で生育可能な変異株の単離を 4 回試み、1 回目には 85 株、2 回目には 42 株、3 回目には 184 株、4 回目には 117 株を単離した。これら AbA 耐性株を用いて発酵試験を行い、発酵終了後の酢酸イソアミル濃度が 5 mg/L 以上となる酵母変異株 *hia* (high isoamyl acetate) 株を 6 株取得した (FIG. 2-3)。*hia3-5* 株は同一の EMS 処理により取得された変異株のため同一クローンの可能性があるが、それ以外の *hia1* 株、*hia2* 株、*hia6* 株は独立した変異操作により取得された変異株のため、同一のクローンではない。

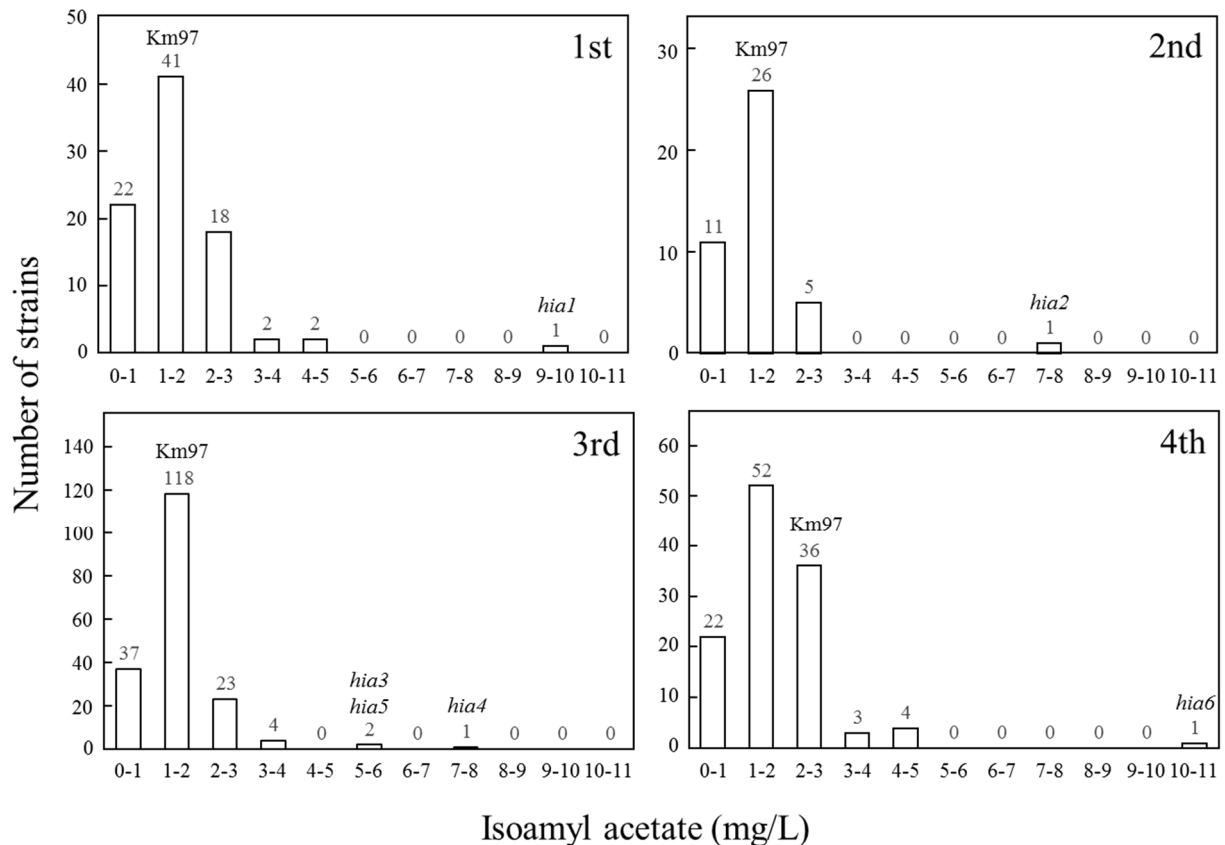


FIG. 2-3 Isoamyl acetate concentration in fermented medium. After four independent rounds of EMS mutagenesis, we isolated 428 AbA-resistant mutants derived from the parental strain Km97. They were inoculated in the rice-saccharified liquid medium and fermented at 15 °C for 11 d. After recovery of the supernatant of the fermented medium by centrifugation, the isoamyl acetate content was analyzed by the headspace gas chromatography

酢酸イソアミル高生産性酵母変異株 *hia* 株の醸造特性

発酵試験で選抜された酢酸イソアミル

高生産性酵母変異株 6 株 (*hia1-6* 株) について、精米歩合 70%の α 米および米麴を用いた清酒小仕込み試験を行った。清酒醪の発酵は 15°C 一定で、炭酸ガス減量が 60g に達した時点で遠心分離により製成酒と酒粕を分離し、製成酒の成分分析および香気成分分析を行った。成分分析値を TABLE 2-1 に、香気成分分析結果を FIG. 2-4 に示した。

hia 株の発酵はやや緩慢で、製成酒のアルコール度数が親株に比べて低いものの、他の成分分析結果も含め、実醸造に使用できる醸造特性を有していた (TABLE 2-1)。一方、香気成分分析の結果は、*hia1*、2、4 および 6 株を用いた製成酒の酢酸イソアミル濃度は、親株を用いた場合よりも高く、それぞれ 2.6、3.0、2.7 および 2.9 倍であったが、*hia3* と *hia5* 株を用いた場合は著しい増加は認められなかった。また、*hia1*、2、4 および 6 株を用いた製成酒の E/A 比も 24 以上と極めて高

い値を示した。E/A 比は吟醸酒の香りの指標となっており、その値が高ければ官能評価も高くなる¹⁵⁾が、これまでに E/A 比が 20 を超える酵母変異株の報告例はない。

以上の結果より、今回得られた *hia1*、2、4 および 6 株は新規な酢酸イソアミル高生産性酵母変異株であり、これらを用いて清酒醸造を行うことにより、低精白米を用いても酢酸イソアミルを高含有する清酒の醸造が可能となった。これらの製成酒の官能評価を行い、最も評価の高かった *hia1* 株を中心に以後の解析を行うことにした。

TABLE 2-1. Properties of experimental sake in the brewing test

	Km97	<i>hia1</i>	<i>hia2</i>	<i>hia3</i>	<i>hia4</i>	<i>hia5</i>	<i>hia6</i>
Alcohol (%)	19.8	18.8	18.1	18.3	19.4	19.5	18.9
Sake meter	-5.3	-12.6	-6.1	-16.3	-4.1	-6.8	-13.1
Total acidity (ml)	2.7	2.5	3.2	2.6	2.5	2.6	2.5
Amino acidity (ml)	2.1	2.6	2.0	2.6	2.1	2.0	2.5

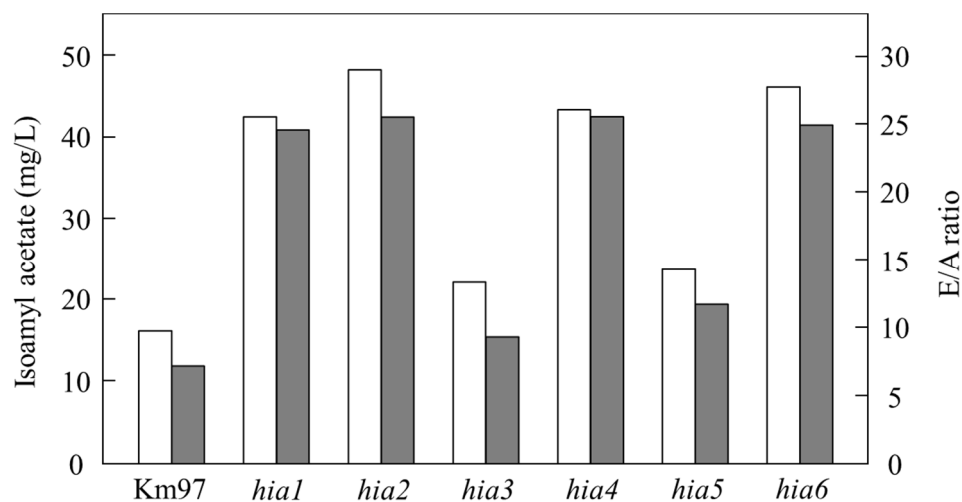


FIG. 2-4 Comparison of the isoamyl acetate contents and E/A ratios (ratio of isoamyl acetate to isoamyl alcohol) in sake brewed with the strain Km97 and the *hia* mutant. Laboratory-scale sake brewing was carried out using 200 g of α -rice and rice-koji with a polishing ratio of 70%. The temperature of the sake mash was maintained at 15 °C through the entire fermentation period. Blank white bars, isoamyl acetate contents; dark bars, E/A ratios.

要 約

1. 清酒酵母 Km97 株を親株として突然変異を誘発し、得られた AbA 耐性株 428 株について、精米歩合 70%の α 米および米麴を用いた発酵試験および清酒小仕込み試験を行い、製成酒の酢酸イソアミル濃度が親株の 2.6 倍以上となる酢酸イソアミル高生産性酵母変異株を 4 株 (*hial*, 2, 4, 6 株) 取得した。
2. これら 4 株を用いて醸造した清酒の E/A 比は 24 以上となり、これまでに報告がない高い値を示す新規な酢酸イソアミル高含有清酒の醸造が可能となった。

第2節 酢酸イソアミル高生産性酵母変異株 *hia1* 株の特性解析

低精白米仕込みにおいて酢酸イソアミルを高生産する酵母変異株 *hia* 株では、不飽和脂肪酸による *ATF1* の発現抑制が解除されていると考えられる。本節では、*hia* 株の酢酸イソアミル高生産のメカニズムを明らかにするため、不飽和脂肪酸が *ATF1* の発現に及ぼす影響を調べるとともに、全ゲノム DNA 解析により変異箇所の特定を行うことにした。

実験方法

使用菌株および培地 AATase 活性測定、*ATF1* 発現解析および全ゲノム DNA 解析には *hia1* 株および親株である Km97 株を使用した。全ゲノム DNA プール解析には *hia1*, 2, 4, 6 株を使用した。遺伝子の導入実験の宿主には、実験室酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) BY4743 Δ *mga2* 株を使用した。プラスミドの増幅には大腸菌 *E. coli*, strain DH5 α を使用した。酵母の富栄養培地として、YPD 培地 (1 % yeast extract, 2 % Bacto-peptone and 2 % glucose) を使用した。*ATF1* 発現および AATase 活性測定には、10% グルコース最小 (SD10) 培地 (0.67% Bacto-yeast nitrogen base without amino acids and 10% glucose) を使用した。BY4743 Δ *mga2* 株の形質転換には、ウラシル欠合成完全 (SC-URA) 培地 (0.67% Bacto-yeast nitrogen base without amino acids, 2% glucose and 0.077% CSM-URA) を使用した。BY4743 Δ *mga2* 形質転換体の *ATF1* 発現の解析には、10% グルコース・ウラシル欠合成完全 (SC10-URA) 培地 (0.67% Bacto-yeast nitrogen base without amino acids, 10% glucose, 0.077% CSM-URA, 1 mM linoleic acid and 1% Brij[®] 58) を使用した。*E. coli*, strain DH5 α の増殖には 100 μ g/mL ampicillin を含む LB 培地 (1 % Bacto-tryptone, 0.5 % yeast extract and 1 % NaCl) を使用した。

AATase 活性測定 酵母無細胞抽出液の調製は、bufferA (25 mM imidazole-HCl at pH 7.5, 0.1 M NaCl, 20% glycerol, 1 mM dithiothreitol, 46 mM isoamyl alcohol and 0.1% Triton X-100) を用いて第 1

章 第 2 節の方法により行った。AATase 活性の測定は峰時らの方法¹⁸⁾を改変した。すなわち 1.6 mM アセチル-CoA を含む bufferA 1 mL と酵母無細胞抽出液 1 mL を混合し、25°C、1 時間反応後、飽和 NaCl 2.25 mL を添加することにより反応を停止した。この反応液にエタノール 0.75 mL を加えた後、第 2 章 第 1 節の方法に従い、ヘッドスペース GC-FID 法により酢酸イソアミル濃度を測定した。AATase 活性の 1 単位は、25°C、1 時間に 1 μ mol の酢酸イソアミルを生成する酵素量とした。

遺伝子発現解析 酵母菌体からの総 RNA の抽出は、RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて行った。総 RNA の純度は OD₂₆₀/OD₂₈₀ により評価した。High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) を用いて総 RNA 1 μ g より合成した cDNA を鋳型とし、TABLE 2-2 に示すプライマーを用いて、TABLE 2-3 に示す反応液組成で Quantitative real-time PCR (RT-qPCR) を行った。RT-qPCR の反応条件は、TABLE 2-4 のとおりである。ATF1、ATF2、IAHI、OLE1 の各遺伝子の発現量は TFC1 (transcription factor class C) をリファレンス遺伝子として、 $\Delta\Delta$ Ct 法¹⁹⁾により相対値として算出した。

TABLE 2-2. Gene-specific primers used for RT-PCR

Primer	Sequence
TFC1-F	5'-CCATGGTACCCGAAAACAAGA-3'
TFC1-R	5'-ATCACCAGCAGCGATACCC-3'
ATF1-F	5'-AAAAGACGCGGAGGTACATTG-3'
ATF1-R	5'-ACAAACACCCAAGGAAAATGC-3'
ATF2-F	5'-GCACCCTAACACCCTTCATTC-3'
ATF2-R	5'-ACCTTCTTGCGTTGCTTGG-3'
IAHI-F	5'-TTCAACAGGAAGGTGGTGATG-3'
IAHI-R	5'-TTGGGATGATATTGGGGGTAG-3'
OLE1-F	5'-GCACCAAGAATTGTCAACGG-3'
OLE1-R	5'-TCCTTTTCTAGCAGACGATCCA-3'

TABLE 2-3. Reaction mixture for RT-qPCR

cDNA	2 μ L
Forward primer (10 μ M)	1 μ L
Reverse primer (10 μ M)	1 μ L
SYBR [®] Premix EX Taq II	12.5 μ L
distilled water	8.5 μ L
	25 μ L

TABLE 2-4. RT-qPCR reaction condition

95 °C	30 s	1 cycle
95 °C	5 s	40 cycles
60 °C	30 s	

全ゲノム DNA 解析 YPD 培地でそれぞれ振とう培養 (30°C, 1 d) した Km97 株および *hial* 株を滅菌水で 2 回洗浄後、ゲノム DNA 抽出・精製キット Dr. GenTLE[®] (from Yeast) High Recovery kit (Takara) を用いてゲノム DNA を抽出した。各菌株の全ゲノム解析には、抽出した各 DNA それぞれを塩基配列解析に供した。また、全ゲノム DNA プール解析には、*hial*, 2, 4, 6 株それぞれより

抽出したゲノム DNA を等量混合した後、塩基配列解析に供した。塩基配列解析のための DNA ライブラリー作製には TruSeq Nano DNA LT Sample Prep Kit (Illumina) を用い、DNA シーケンサー Illumina HiSeq™ 2000 を用いてペアエンド法により 100bp 以下の短い DNA 配列情報を取得した。得られたリードデータに対して、Cutadapt (version 1.1) を用いて Illumina アダプター配列の除去および Trimmomatic (version 0.32) を用いて低品質領域の除去を行った後、Burrows-Wheeler Aligner (version 0.7.10) を用いて協会 7 号酵母のゲノム配列 (Sake Yeast Genome Database; <http://nrifl.nrib.go.jp/SYGD/>) に対してマッピングを行った。さらに得られたマッピングデータの精度を高めるため、SAMtools (version 1.1) および GATK (The Genome Analysis Toolkit) (Lite version 2.3.0) を用いて再度配列を整列させた後、Picard (version 1.115) を用いてリードデータに含まれる PCR duplicates の除去を行った。

プラスミド ゲノム DNA 抽出・精製キット Dr. GenTLE® (from Yeast) High Recovery (Takara) を用いて K901 株または *hial* 株より回収したゲノム DNA を鋳型とし、upstream primer : 5'-G CAGCCCGGGGATCCTTTCGTAGATTAAGACTGAA-3' および downstream primer : 5'-TAGAACT AGTGGATCCCCTCACAAACCCCATCCC-3' (下線で示した塩基は YCp 型ベクター pRS416 を *Bam*H I 処理により線状化したときの両端の配列を示す) を用いて、PCR により *MGA2* の ORF とその 5' および 3' 側隣接領域 (-1,018 to +3,762) を含む DNA 断片を増幅し、In-Fusion® HD Cloning Kit (Clontech) を用いて pRS416 の *Bam*HI 切断部位にクローニングした。K901 株または *hial* 株に由来する *MGA2* を有するプラスミドをそれぞれ pRS416-wMGA2、PRS416-mMGA2 とした。

AbA 耐性試験 SC-URA 培地で振とう培養 (30°C, 24 h) した Km97 株および *hial* 株を滅菌水で 2 回洗浄後、滅菌水に懸濁し、菌体懸濁液の濁度 (OD660) を 1.0 に調整した。この菌体懸濁液を滅菌水で 10 倍ずつ 3 段階に希釈した後、各菌体懸濁液 5 µL を SC-URA または 0.05 mM AbA を含む SC-URA 培地にスポットし、30 °C、2 日間静置した。

結果および考察

清酒醪における AATase 活性および酢酸イソアミル生合成経路関連遺伝子の発現 *hial* 株の

酢酸イソアミル高生産能が AATase 活性の増加に起因するのかが検討するため、清酒醪より回収した酵母菌体の無細胞抽出液を用いて AATase 活性を測定したところ、*hial* 株の AATase 活性は、Km97 株の同活性に比べ、4 倍以上の高い値を示した (FIG. 2-5 A)。また、AATase 活性の増加が、*ATF1* 発現量の増加に起因するのかが検討するため、清酒醪より回収した酵母菌体より総 RNA を抽出し、AATase をコードする *ATF1* および *ATF2* に加え、酢酸イソアミルを分解するエステラーゼをコードする *IAH1*²⁰⁾ の発現量を RT-qPCR により評価したところ、*hial* 株の *ATF1* の発現量は Km97 株の 2 倍以上であったが、*ATF2* および *IAH1* の発現量に差は認められなかった (FIG. 2-5 B)。これらの結果は、*hial* 株では低精白米仕込みの清酒醪において、米外層部由来の不飽和脂肪酸による *ATF1* の発現抑制が解除され、恒常的に発現することにより AATase 活性が増加し、酢酸イソアミルの生合成能が高くなった可能性を示している。

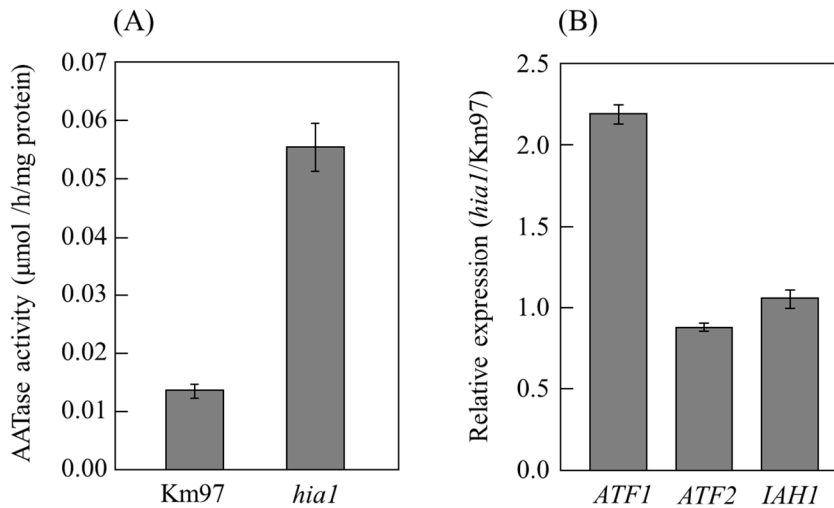


FIG. 2-5 AATase activity (A) and the expression of genes (*ATF1*, *ATF2*, and *IAH1*) associated with isoamyl acetate biosynthesis (B) during sake brewing in the Km97 and *hial* mutant strains. Yeast cells were recovered from sake mash prepared using 200 g of α -rice and rice-*koji* with a polishing ratio of 70%, and fermented at 15 °C for 6 d. (A) Alcohol acetyltransferase (AATase) activity was measured with cell-free extracts. (B) Quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR) experiments with strain Km97 and *hial* mutant cells. The relative expression is represented as the ratio of the expression levels obtained for the *hial* mutant to those obtained for strain Km97. Values shown are the means from three independent experiments, and the error bars indicate standard deviations.

不飽和脂肪酸が *hial* 株の *ATF1* 発現に及ぼす影響

前項において、*hial* 株が不飽和脂肪酸に

よる *ATF1* 発現抑制が解除された変異株である可能性が示されたことから、*hial* 株の *ATF1* 発現に及ぼす不飽和脂肪酸の影響を調べることにした。すなわち SD10 培地または 1mM リノール酸を添加した SD10 培地で静置培養 (30°C, 20 h) した菌体を用いて AATase 活性測定および *ATF1* の発現解析を行ったところ、リノール酸無添加の場合、清酒醪における実験同様、*hial* 株の AATase 活性は Km97 株に比べ 2 倍以上高い値を示した (FIG. 2-6 A)。さらに AATase 活性はリノール酸の添加により Km97 株では顕著に低下するのに対して、*hial* 株では活性の低下は認められず、恒常的に AATase が生合成されることが明らかとなった (FIG. 2-6 A)。また AATase 活性の結果と同様に *ATF1* の発現も同様の傾向を示した (FIG. 2-6 B)。これらの結果は、*hial* 株では不飽和脂肪酸による *ATF1* の発現抑制が解除され、恒常的に発現する結果、酵素タンパク質量が増加することにより酢酸イソアミル生合成能が向上したことを示唆するものである。

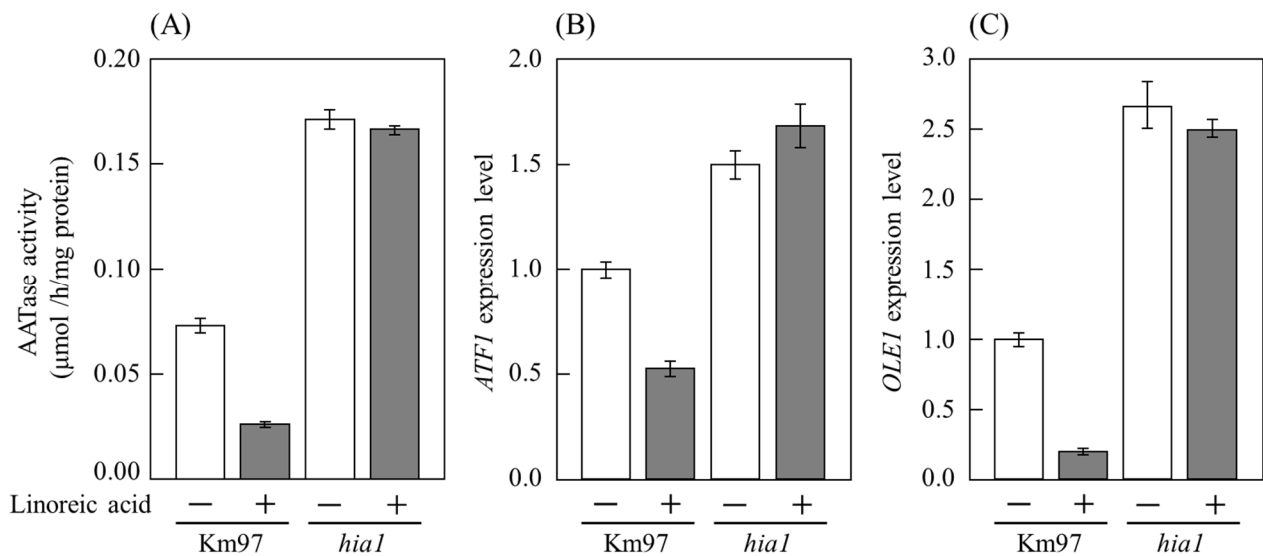


FIG. 2-6 AATase activity (A) and expression of *ATF1* (B) and *OLE1* (C) in Km97 and the *hial* mutant strains in the presence and absence of linoleic acid. Values shown are the means of three independent experiments, and the error bars indicate standard deviations. Cell-free extracts and total RNA were prepared from yeast cells grown in SD10 medium without or with 1 mM linoleic acid at 30 °C for 20 h. (A) AATase activity was measured with the cell-free extracts. *ATF1* (B) and *OLE1* (C) expression was measured by RT-qPCR. The relative expression levels are presented as fold-changes relative to the expression level obtained for strain Km97 without linoleic acid.

Δ -9 脂肪酸不飽和化酵素をコードする *OLE1* は *ATF1* と同様に不飽和脂肪酸による発現抑制を受けることが知られている^{21,22)}。そこで *hia1* 株の *OLE1* も *ATF1* と同様に不飽和脂肪酸による抑制が解除されるか検討したところ、*OLE1* の発現は *ATF1* と同様の挙動を示した (FIG.2-6C)。この結果は、*hia1* 株において *ATF1* と *OLE1* に共通する転写機構に変異が生じていることを示唆している。

***hia1* 株の全ゲノム DNA 解析** *hia1* 株の酢酸イソアミル高生産能のメカニズムを明らかにするため、Km97 株および *hia1* 株の全ゲノム DNA の塩基配列を解析した。得られた塩基配列は、清酒酵母 K7 株の全ゲノム DNA 配列を対照としてマッピングを行った。Km97 株と *hia1* 株間の一塩基多型 (SNP) を抽出した結果を TABLE 2-5、TABLE 2-6 に示す。ヘテロ接合型ミスセンス変異は 200 個の遺伝子中に 207 箇所検出された (TABLE 2-6)。この SNP の中には AbA 耐性に関与するイノシトールホスホリルセラミド合成酵素をコードする *AURI*²³⁾ の変異も含まれていた。*hia1* 株の *AURI* (*YKL004w*) 配列は、377 および 469 番目の C がともに T に置換されており、その結果、アミノ酸配列 126 番目のスレオニンがイソロイシン (Thr126Ile) に、157 番目のヒスチジンがチロシン (His157Tyr) にそれぞれ変異していた (TABLE 2-6)。Aur1p の His157Tyr 変異は AbA 耐性を付与することが報告されている²⁴⁾。またホモ接合型ミスセンス変異は 13 箇所検出された。さらにヘテロ接合型ナンセンス変異は 11 箇所、ホモ接合型ナンセンス変異は 1 箇所のみ検出された (TABLE 2-5)。

TABLE 2-5. Whole-genome sequence analysis of *hial1* mutant

Zygoty	Missense mutation		Nonsense mutation	
	Gene	amino acid change	Gene	amino acid change
hetero	207 amino acid changes in 200 genes listed in TABLE 2-6.		<i>YBR168w / PEX32</i>	Trp 320 *
			<i>YGL124c / MON1</i>	Tyr 137 *
			<i>YGR060w / ERG25</i>	Trp 85 *
			<i>YGR157w / CHO2</i>	Trp 536 *
			<i>YGR184c / UBR1</i>	Gln 262 *
			<i>YIL146c / ATG32</i>	Trp 390 *
			<i>YJL108c / PRM10</i>	Trp 203 *
			<i>YJL107c</i>	Trp 590 *
			<i>YJL058c / BIT61</i>	Gly 281 *
			<i>YML128c / MSC1</i>	Trp 112 *
			<i>YOL145c / CTR9</i>	Gln 958 *
homo	<i>YCR014c / POL4</i>	Leu 500 Val		
	<i>YCL016c / DCC1</i>	Gln 36 Lys		
	<i>YCL025c / AGP1</i>	Ala 530 Ser		
	<i>YCL073c / GEX1</i>	Ala 602 Thr		
	<i>YLR042c</i>	Thr 112 Met		
	<i>YLR143w / DPH6</i>	Val 254 Ile		
	<i>YLR153c / ACS2</i>	Ala 101 Val	<i>YIR033W / MGA2</i>	Ser 706 *
	<i>YLR207w / HRD3</i>	Pro 43 Ser		
	<i>YLR357w / RSC2</i>	Arg 817 Ser		
	<i>YLR358c</i>	His 90 Gln		
	<i>YLR431c / ATG23</i>	Leu 241 Met		
	<i>YNL264c / PDR17</i>	Glu 17 Lys		
	<i>YNL307c / MCK1</i>	Gln 220 Lys		

TABLE 2-6. Heterozygous missense mutations in *hial* mutant

Gene			Gene		
Systematic name	Standard name	amino acid change	Systematic name	Standard name	amino acid change
<i>YAL001c</i>	<i>TFC3</i>	Ala 190 Thr	<i>YEL005c</i>	<i>VAB2</i>	Ala 106 Thr
<i>YAL047c</i>	<i>SPC72</i>	Glu 334 Lys	<i>YEL020c</i>		Glu 517 Lys
<i>YAL048c</i>	<i>GEM1</i>	Val 143 Met	<i>YEL055c</i>	<i>POL5</i>	Thr 648 Ile
<i>YAR023c</i>		Val 119 Ile	<i>YEL073c</i>		Pro 79 Ser
<i>YBL019w</i>	<i>APN2</i>	Arg 257 Lys	<i>YER016w</i>	<i>BIM1</i>	Gly 77 Arg
<i>YBL101c</i>	<i>ECM21</i>	Arg 472 Lys	<i>YER027c</i>	<i>GAL83</i>	Ser 271 Asn
<i>YBR073w</i>	<i>RDH54</i>	Thr 129 Ile	<i>YER032w</i>	<i>FIR1</i>	Asp 290 Asn
<i>YBR079c</i>	<i>RPG1</i>	Arg 7 Cys	<i>YER051w</i>	<i>JHD1</i>	Gly 119 Ser
<i>YBR104w</i>	<i>YMC2</i>	Gly 52 Glu	<i>YER111c</i>	<i>SWI4</i>	Val 212 Ile
<i>YBR111c</i>	<i>YSA1</i>	Gly 79 Asp	<i>YER114c</i>	<i>BOI2</i>	Ala 37 Thr
<i>YBR160w</i>	<i>CDC28</i>	Pro 293 Ser	<i>YER122c</i>	<i>GLO3</i>	Ser 422 Phe
<i>YBR179c</i>	<i>FZO1</i>	Asp 59 Asn	<i>YER141w</i>	<i>COX15</i>	Ala 317 Val
<i>YBR192w</i>	<i>RIM2</i>	Val 144 Ile	<i>YER147c</i>	<i>SCC4</i>	Glu 190 Lys
<i>YBR207w</i>	<i>FTH1</i>	Ala 205 Thr	<i>YER151c</i>	<i>UBP3</i>	Lys 677 Asn
<i>YBR235w</i>	<i>VHC1</i>	Ser 476 Phe	<i>YER164w</i>	<i>CHD1</i>	Ser 770 Phe
<i>YBR245c</i>	<i>ISW1</i>	Gly 788 Arg	<i>YFL022c</i>	<i>FRS2</i>	Thr 24 Ile
<i>YBR286w</i>	<i>APE3</i>	Gly 211 Asp	<i>YFL033c</i>	<i>RIM15</i>	Ala 1670 Val
<i>YBR289w</i>	<i>SNF5</i>	Thr 401 Ile	<i>YFL033c</i>	<i>RIM15</i>	Thr 939 Ile
<i>YCL030c</i>	<i>HIS4</i>	Cys 213 Tyr	<i>YFL053w</i>	<i>DAK2</i>	Gly 458 Ser
<i>YCL045c</i>	<i>EMC1</i>	Gly 172 Arg	<i>YFL054c</i>		Ser 414 Leu
<i>YCR057c</i>	<i>PWP2</i>	Glu 678 Lys	<i>YFR051c</i>	<i>RET2</i>	Asp 23 Asn
<i>YCR073c</i>	<i>SSK22</i>	Glu 508 Lys	<i>YGL041c-B</i>		Phe 51 Ile
<i>YCR090c</i>		Thr 37 Ile	<i>YGL081w</i>		Cys 144 Tyr
<i>YCR102c</i>		Ala 365 Val	<i>YGL083w</i>	<i>SCY1</i>	Gly 141 Asp
<i>YDL030w</i>	<i>PRP9</i>	Gly 271 Arg	<i>YGL092w</i>	<i>NUP145</i>	Asp 413 Asn
<i>YDL122w</i>	<i>UBP1</i>	Gly 790 Asp	<i>YGL101w</i>		Glu 114 Lys
<i>YDL145c</i>	<i>COPI</i>	Asp 503 Asn	<i>YGL133w</i>	<i>ITC1</i>	Asp 451 Asn
<i>YDL174c</i>	<i>DLD1</i>	Thr 321 Ile	<i>YGL138c</i>		Arg 331 Ser
<i>YDL220c</i>	<i>CDC13</i>	Val 853 Met	<i>YGL167c</i>	<i>PMR1</i>	Pro 899 Ser
<i>YDL223c</i>	<i>HBT1</i>	Arg 717 Cys	<i>YGL168w</i>	<i>HUR1</i>	Gly 104 Asp
<i>YDR001c</i>	<i>NTH1</i>	Ser 196 Phe	<i>YGL205w</i>	<i>POX1</i>	Ala 740 Val
<i>YDR002w</i>	<i>YRB1</i>	Glu 83 Lys	<i>YGL206c</i>	<i>CHC1</i>	Cys 672 Tyr
<i>YDR011w</i>	<i>SNQ2</i>	Ala 237 Val	<i>YGL211w</i>	<i>NCS6</i>	Ala 5 Thr
<i>YDR025w</i>	<i>RPS11A</i>	Gly 147 Asp	<i>YGL256w</i>	<i>ADH4</i>	Ala 358 Val
<i>YDR071c</i>	<i>PAA1</i>	Val 68 Ile	<i>YGR004w</i>	<i>PEX31</i>	Glu 48 Lys
<i>YDR085c</i>	<i>AFR1</i>	Ser 240 Asn	<i>YGR032w</i>	<i>GSC2</i>	Arg 218 Ser
<i>YDR170c</i>	<i>SEC7</i>	Val 629 Ile	<i>YGR060w</i>	<i>ERG25</i>	Trp 85 Cys
<i>YDR190c</i>	<i>RVB1</i>	Glu 287 Lys	<i>YGR072w</i>	<i>UPF3</i>	Lys 294 Asn
<i>YDR213w</i>	<i>UPC2</i>	Thr 38 Ile	<i>YGR086c</i>	<i>PIL1</i>	Ala 176 Val
<i>YDR242w</i>	<i>AMD2</i>	Leu 434 Phe	<i>YGR097w</i>	<i>ASK10</i>	Asp 72 Asn
<i>YDR270w</i>	<i>CCC2</i>	Asn 651 Lys	<i>YGR099w</i>	<i>TEL2</i>	Ser 251 Asn
<i>YDR285w</i>	<i>ZIPI</i>	Ser 347 Leu	<i>YGR109w-B</i>		Thr 1023 Ile
<i>YDR292c</i>	<i>SRP101</i>	Val 441 Ile	<i>YGR112w</i>	<i>SHY1</i>	Ala 6 Thr
<i>YDR292c</i>	<i>SRP101</i>	Gly 287 Arg	<i>YGR117c</i>		Ala 318 Val
<i>YDR300c</i>	<i>PRO1</i>	Gly 214 Ser	<i>YGR168c</i>		Pro 121 Leu
<i>YDR341c</i>		Gly 258 Asp	<i>YGR217w</i>	<i>CCH1</i>	Arg 1992 Lys
<i>YDR346c</i>	<i>SVF1</i>	Asp 344 Asn	<i>YGR218w</i>	<i>CRM1</i>	Glu 470 Lys
<i>YDR358w</i>	<i>GGA1</i>	Ser 508 Asn	<i>YGR227w</i>	<i>DIE2</i>	Pro 48 Leu
<i>YDR387c</i>		Thr 498 Ile	<i>YGR238c</i>	<i>KEL2</i>	Ala 484 Thr
<i>YDR439w</i>	<i>LRS4</i>	Gly 43 Asp	<i>YHL004w</i>	<i>MRP4</i>	Ala 101 Val
<i>YDR457w</i>	<i>TOM1</i>	Glu 1403 Lys	<i>YHL030w</i>	<i>ECM29</i>	Ala 1047 Thr
<i>YDR501w</i>	<i>PLM2</i>	Ala 131 Val	<i>YHL034c</i>	<i>SBP1</i>	Pro 74 Leu

Gene		amino acid change	Gene		amino acid change
Systematic name	Standard name		Systematic name	Standard name	
<i>YHR033w</i>		Glu 366 Lys	<i>YNL041c</i>	<i>COG6</i>	Ser 100 Phe
<i>YHR080c</i>	<i>LAM4</i>	Arg 816 Lys	<i>YNL176c</i>	<i>TDA7</i>	Leu 469 Ile
<i>YHR084w</i>	<i>STE12</i>	Gly 70 Ser	<i>YNL199c</i>	<i>GCR2</i>	Asp 463 Asn
<i>YHR089c</i>	<i>GARI</i>	Val 52 Ile	<i>YNL201c</i>	<i>PSY2</i>	Gly 246 Glu
<i>YHR099w</i>	<i>TRAI</i>	His 943 Tyr	<i>YNL216w</i>	<i>RAP1</i>	Leu 326 Phe
<i>YHR169w</i>	<i>DBP8</i>	Thr 273 Ile	<i>YNL224c</i>	<i>SOS1</i>	Ser 666 Asn
<i>YHR178w</i>	<i>STB5</i>	Arg 216 His	<i>YNR011c</i>	<i>PRP2</i>	Pro 160 Leu
<i>YHR186c</i>	<i>KOG1</i>	Ala 1505 Thr	<i>YNR013c</i>	<i>PHO91</i>	Thr 116 Ile
<i>YIL005w</i>	<i>EPS1</i>	Val 614 Met	<i>YNR014w</i>		Ser 98 Leu
<i>YIL038c</i>	<i>NOT3</i>	Asp 73 Asn	<i>YNR018w</i>	<i>RCF2</i>	Ser 219 Phe
<i>YIL109c</i>	<i>SEC24</i>	Arg 183 Lys	<i>YNR031c</i>	<i>SSK2</i>	Ser 1570 Phe
<i>YIL115c</i>	<i>NUP159</i>	Gly 355 Ser	<i>YNR059w</i>	<i>MNT4</i>	Arg 112 His
<i>YIL140w</i>	<i>AXL2</i>	Ala 512 Val	<i>YNR060w</i>	<i>FRE4</i>	Met 477 Ile
<i>YIL143c</i>	<i>SSL2</i>	Gly 512 Glu	<i>YOR011w</i>	<i>AUS1</i>	Ala 1205 Val
<i>YIL144w</i>	<i>NDC80</i>	Pro 257 Leu	<i>YOR038c</i>	<i>HIR2</i>	Gly 611 Glu
<i>YIR014w</i>		Asp 119 Asn	<i>YOR054c</i>	<i>VHS3</i>	Ser 174 Asn
<i>YIR034c</i>	<i>LYS1</i>	Lys 368 Ile	<i>YOR098c</i>	<i>NUP1</i>	Ala 1001 Thr
<i>YJL005w</i>	<i>CYR1</i>	Gly 1782 Ser	<i>YOR100c</i>	<i>CRC1</i>	Ala 199 Thr
<i>YJL007c</i>		Ala 42 Val	<i>YOR123c</i>	<i>LEO1</i>	Asp 84 Asn
<i>YJL080c</i>	<i>SCP160</i>	Val 915 Ile	<i>YOR151c</i>	<i>RPB2</i>	Gly 1131 Ser
<i>YJL081c</i>	<i>ARP4</i>	Lys 374 Asn	<i>YOR191w</i>	<i>ULS1</i>	Ala 303 Val
<i>YJL085w</i>	<i>EXO70</i>	His 606 Tyr	<i>YOR196c</i>	<i>LIP5</i>	Met 382 Ile
<i>YJL114w</i>		Glu 8 Lys	<i>YOR219c</i>	<i>STE13</i>	Gly 552 Asp
<i>YJL123c</i>	<i>MTC1</i>	Val 255 Ile	<i>YOR256c</i>	<i>TRE2</i>	Glu 706 Lys
<i>YJL130c</i>	<i>URA2</i>	Glu 940 Lys	<i>YOR272w</i>	<i>YTM1</i>	Ser 281 Phe
<i>YJL206c</i>		Asp 279 Asn	<i>YOR322c</i>	<i>LDB19</i>	Gly 785 Ser
<i>YJR005w</i>	<i>APL1</i>	Glu 225 Asp	<i>YOR348c</i>	<i>PUT4</i>	Gly 446 Asp
<i>YJR042w</i>	<i>NUP85</i>	Glu 34 Lys	<i>YOR370c</i>	<i>MRS6</i>	Ala 111 Thr
<i>YJR042w</i>	<i>NUP85</i>	Asp 717 Asn	<i>YOR371c</i>	<i>GPB1</i>	Gly 8 Glu
<i>YJR119c</i>	<i>JHD2</i>	Asp 297 Glu	<i>YPL022w</i>	<i>RAD1</i>	Gly 745 Asp
<i>YJR137c</i>	<i>MET5</i>	Thr 1220 Ile	<i>YPL080c</i>		Ala 55 Val
<i>YJR138w</i>	<i>IML1</i>	Glu 1222 Lys	<i>YPL085w</i>	<i>SEC16</i>	Glu 1381 Lys
<i>YKL004w</i>	<i>AUR1</i>	Thr 126 Ile	<i>YPL106c</i>	<i>SSE1</i>	Ala 495 Val
<i>YKL004w</i>	<i>AUR1</i>	His 157 Tyr	<i>YPL150w</i>		Glu 830 Lys
<i>YKL029c</i>	<i>MAE1</i>	Ala 412 Thr	<i>YPL164c</i>	<i>MLH3</i>	Thr 215 Ile
<i>YKL044w</i>		Pro 59 Leu	<i>YPL169c</i>	<i>MEX67</i>	Gly 522 Asp
<i>YKL089w</i>	<i>MIF2</i>	Gly 360 Arg	<i>YPL187w</i>	<i>MFa1</i>	Val 80 Ile
<i>YKL161c</i>	<i>KDX1</i>	Thr 41 Ile	<i>YPL208w</i>	<i>RKM1</i>	Glu 490 Asp
<i>YKR010c</i>	<i>TOF2</i>	Ser 701 Leu	<i>YPL252c</i>	<i>YAH1</i>	His 10 Gln
<i>YKR050w</i>	<i>TRK2</i>	Ala 607 Thr	<i>YPR047w</i>	<i>MSF1</i>	Glu 131 Lys
<i>YKR054c</i>	<i>DYN1</i>	Leu 2808 Phe	<i>YPR072w</i>	<i>NOT5</i>	Pro 329 Ser
<i>YKR054c</i>	<i>DYN1</i>	Gly 393 Asp	<i>YPR091c</i>	<i>NVJ2</i>	Ile 29 Met
<i>YKR063c</i>	<i>LAS1</i>	Gly 132 Ser	<i>YPR092w</i>		Asp 2 Asn
<i>YLR129w</i>	<i>DIP2</i>	Val 509 Met	<i>YPR095c</i>	<i>SYT1</i>	Asp 450 Asn
<i>YLR334c</i>		Leu 34 Phe	<i>YPR112c</i>	<i>MRD1</i>	Leu 535 Met
<i>YLR460c</i>		Ala 322 Val	<i>YPR112c</i>	<i>MRD1</i>	Arg 231 Lys
<i>YML020w</i>		Ser 456 Leu	<i>YPR115w</i>	<i>RGC1</i>	Val 716 Ile
<i>YML025c</i>	<i>YML6</i>	Ser 235 Asn	<i>YPR120c</i>	<i>CLB5</i>	Ala 96 Thr
<i>YMR089c</i>	<i>YTA12</i>	Gly 394 Ser	<i>YPR127w</i>		Val 139 Ile
<i>YMR257c</i>	<i>PET111</i>	Thr 224 Ile	<i>YPR159w</i>	<i>KRE6</i>	Ser 116 Asn
<i>YMR272c</i>	<i>SCS7</i>	Glu 94 Lys	<i>YPR159w</i>	<i>KRE6</i>	Gly 323 Asp
<i>YMR319c</i>	<i>FET4</i>	Asp 426 Asn			

hial 株では AATase 活性の増加がみられたことから、*ATF1* の ORF およびプロモーター領域の塩基配列を調べたところ、Km97 株と異なる配列は検出されなかった。したがって *hial* 株の酢酸イソアミル高生産能は *Atf1p* のアミノ酸配列および *ATF1* のプロモーター領域の変異ではなく、転写機構の何らかの変異によるものと推察された。一方、スフィンゴ脂質からグリセロリン脂質代謝に関与する長鎖脂肪酸アシル-CoA 合成酵素をコードする *FAA1*、*FAA4*¹³⁾ の二重破壊株では、不飽和脂肪酸による *OLE1* の発現が抑制を受けない¹⁴⁾ ため、*hial* 株において *FAA1*、*FAA4* に変異が生じているか調べたところ、両遺伝子の配列に変異は認められなかった。

1 箇所のみ検出されたホモ接合型ナンセンス変異は、*ATF1* および *OLE1* の転写活性化因子をコードする *MGA2* 内に存在した。*Mga2p* は小胞体 (ER) 膜に前駆体として局在し、その後プロセッシングを受けて活性型に変換後、核内へ移行し、*ATF1* および *OLE1* の転写を活性化する²⁵⁾。*Km97* 株では *MGA2* の 2,117 番目の塩基がヘテロ接合型 (C/A) であるが、*hial* 株ではホモ接合型変異 (A/A) に変化したことにより、アミノ酸配列 706 番目のセリンが終止コドンに変化 (Ser706*) することになる。

***hia* 株の全ゲノム DNA プール解析** *hial* 株において、*MGA2* にホモ接合型ナンセンス変異 (Ser706*) が検出されたので、酢酸イソアミル高生産能を示す残りの *hia2*, 4, 6 株の *MGA2* の ORF を PCR で増幅し、塩基配列を決定したところ、いずれの株においても *MGA2* にホモ接合型ナンセンス変異 (Ser706*) が生じていることが明らかとなった。そこで、*hia1*, 2, 4, 6 株に共通の変異点を同定するため、4 株のゲノム DNA をそれぞれ抽出した後、等量混合し、全ゲノム DNA 解析を行った。シーケンスデータは 100bp 以下の塩基配列 (リード) 情報の集合であり、その情報を重ね合わせるにより、変異点を抽出することができる。そこで、ある 1 塩基を含む全リード数に対して、その 1 塩基に SNP が生じる頻度を *Mutant allele frequency* と定義した (FIG. 2-7)。ゲノム解析データより SNP の *Mutant allele frequency* を算出し、その染色体上の分布を FIG.2-8 に示した。4 菌株に共通なホモ接合型の変異が生じていれば、理論的には *Mutant allele frequency* が 1.0 となる。TABLE 2-7 に *Mutant allele frequency* が 0.2 以上となる変異点を有する遺伝子を抽出した。

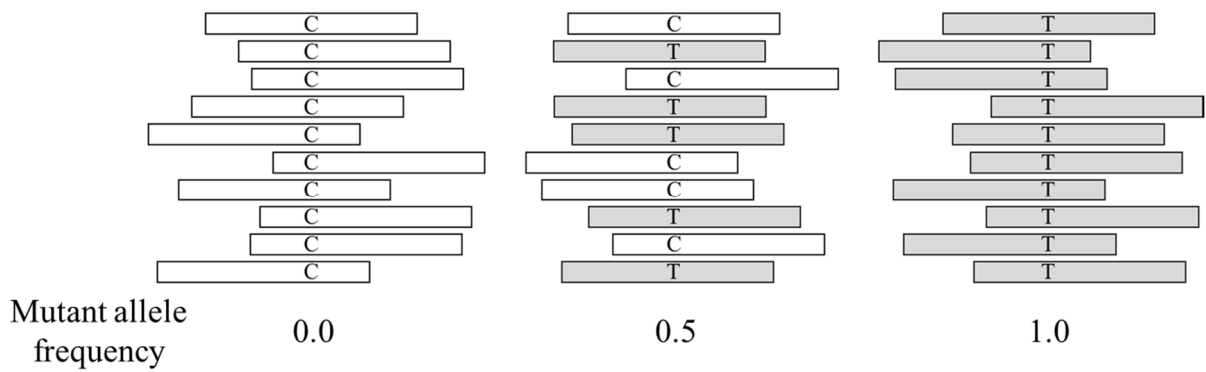


FIG. 2-7 Calculation of mutant allele frequency from whole-genome sequence analysis

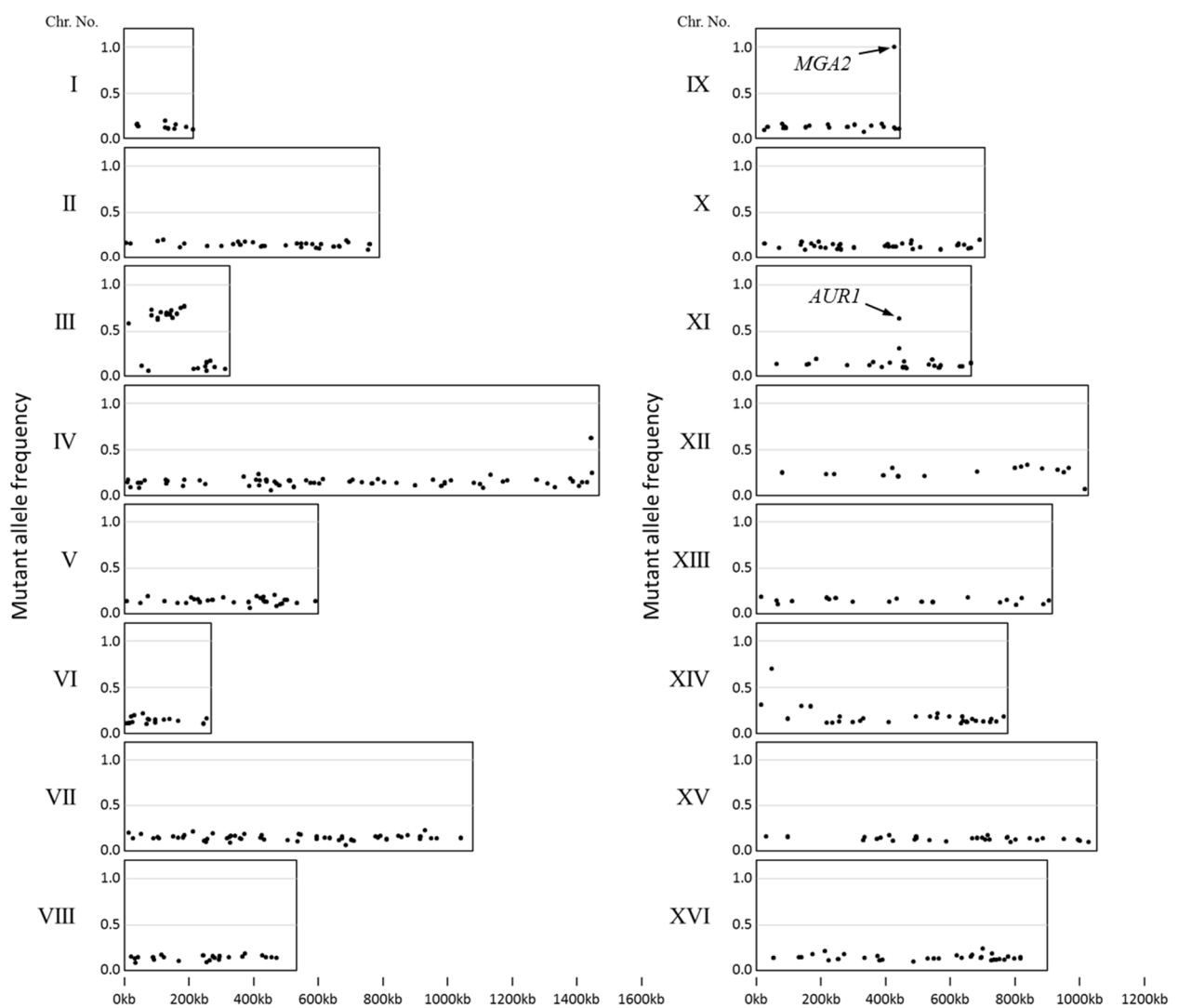


FIG. 2-8 Genome-wide distribution of mutant allele frequencies of SNPs from pooled *hia* mutant sequences. A genomic DNA pool of the *hia* mutants was constructed by combining equal amounts of genomic DNA extracted from the *hia1*, *hia2*, *hia4* and *hia6* mutants. The pool was then sequenced by using Illumina HiSeq 2000. The mutant allele frequency was calculated as the ratio of the number of reads containing the mutant allele to that of the wild-type allele.

TABLE 2-7. Pooled-*hia* mutants whole-genome sequence analysis

Mutated gene	Amino acid change	Number of Read	Mutant allele frequency	Mutation in <i>hial</i>	
				Zygosity	Mutant type
<i>YIR033w / MGA2</i>	Ser 706 *	142	1.000	homo	nonsense
<i>YCL025c / AGPI</i>	Ala 530 Ser	221	0.724	homo	missense
<i>YCR014c / POL4</i>	Leu 500 Val	214	0.715	homo	missense
<i>YNL307c / MCK1</i>	Gln 220 Lys	134	0.694	homo	missense
<i>YCR011c / ADP1</i>	Leu 742 Leu	202	0.673	homo	synonymous
<i>YCR011c / ADP1</i>	Gly 753 Gly	234	0.667	homo	synonymous
<i>YCL025c / AGPI</i>	Ser 445 Ser	187	0.663	homo	synonymous
<i>YCL016c / DCC1</i>	Gln 36 Lys	121	0.636	homo	missense
<i>YKL004w / AUR1</i>	His 157 Tyr	149	0.624	hetero	missense
<i>YCL016c / DCC1</i>	Asp 26 Asp	108	0.611	homo	synonymous
<i>YCL073c / GEX1</i>	Ala 602 Thr	116	0.578	homo	missense
<i>YLR382c / NAM2</i>	Thr 846 Met	132	0.333	hetero	missense
<i>YLR371w / ROM2</i>	His 37 His	129	0.310	homo	synonymous
<i>YKL004w / AUR1</i>	Thr 126 Ile	142	0.303	hetero	missense
<i>YNL327w / EGT2</i>	Ser 367 Ser	126	0.302	homo	synonymous
<i>YLR143w / DPH6</i>	Val 254 Ile	137	0.299	homo	missense
<i>YLR440c / SEC39</i>	Ile 344 Ile	151	0.298	homo	synonymous
<i>YLR357w / RSC2</i>	Arg 817 Ser	172	0.297	homo	missense
<i>YLR358c</i>	His 90 Gln	172	0.297	homo	missense
<i>YNL264c / PDR17</i>	Glu 17 Lys	128	0.289	homo	missense
<i>YLR299w / ECM38</i>	Gly 199 Gly	158	0.253	homo	synonymous
<i>YLR431c / ATG23</i>	Leu 241 Met	153	0.248	homo	missense
<i>YPR095c / SYT1</i>	Asp 450 Asn	121	0.231	hetero	synonymous
<i>YLR042c</i>	Thr 112 Met	149	0.228	homo	missense
<i>YLR057w / MNL2</i>	Leu 27 Leu	172	0.227	homo	synonymous
<i>YDR358w / GGA1</i>	Ser 508 Asn	131	0.221	hetero	missense
<i>YGR227w / DIE2</i>	Pro 48 Leu	122	0.221	hetero	missense
<i>YLR129w / DIP2</i>	Val 509 Met	143	0.217	hetero	missense
<i>YFL037w / TUB2</i>	Val 333 Val	141	0.213	hetero	synonymous
<i>YLR207w / HRD3</i>	Pro 43 Ser	142	0.211	homo	missense
<i>YNL022c / RCM1</i>	Lys 223 Lys	138	0.210	hetero	synonymous
<i>YLR153c / ACS2</i>	Ala 101 Val	137	0.204	homo	missense
<i>YPL169c / MEX67</i>	Gly 522 Asp	113	0.204	hetero	missense
<i>YER100w / UBC6</i>	Pro 76 Pro	125	0.200	hetero	synonymous

染色体上の SNP の分布図より、第 3 番染色体上の 75,166bp から 185,144bp の領域において、Mutant allele frequency が 0.58 から 0.76 と他の染色体上の Mutant allele frequency に比べて高い値を示した (FIG. 2-8)。清酒酵母 K7 株の第 3 番染色体は、ヘテロ接合型の領域が蓄積していることが報告されている²⁶⁾。したがって、*hia* 株の第 3 番染色体上の 75,166bp から 185,144bp の領域において、大規模なヘテロ接合型の喪失 (Loss of heterozygosity) が生じたと考えられる。

遺伝子の ORF 内に変異が生じ、Mutant allele frequency が 1.0 となったのは、ホモ接合型 *MGA2* ナンセンス変異 (Ser706*) のみであった (FIG. 2-8, TABLE 2-7)。また、*hial* 株の *AUR1* ヘテロ接

合型ミスセンス変異 (His157Tyr) の Mutant allele frequency は 0.624 であることから、*hia* 株 4 株に共通のヘテロ接合型の変異が生じていると考えられた。そこで、4 菌株の *AURI* のそれぞれ塩基配列解析を行ったところ、4 菌株において同様のヘテロ接合型変異が生じていることが確認できた (Data not shown)。

以上の全ゲノム DNA 解析の結果より、*hia* 株における酢酸イソアミル高生産能は、*MGA2* のホモ接合型変異 (Ser706*) に起因する可能性が高くなった。

***MGA2* ナンセンス変異が *ATF1* 発現に及ぼす影響** *MGA2* ナンセンス変異 (Ser706*) が *ATF1* の発現を増加させるか、さらに不飽和脂肪酸による *ATF1* の発現抑制が解除されるか検討するため、実験室酵母 BY4743 株の *MGA2* 破壊株 (*Amga2* 株) に、FIG. 2-9 に示す正常型 *MGA2* (w*MGA2*) またはナンセンス変異型 *MGA2* (m*MGA2*) を導入し、*ATF1* の発現解析を行った。

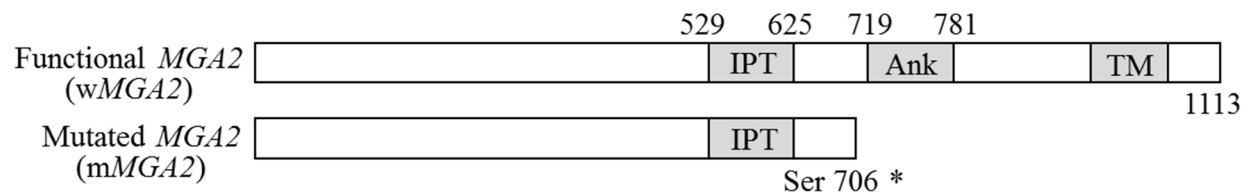


FIG. 2-9 Schematic depiction of wild-type and mutant Mga2p; the latter lacks the ankyrin repeat and transmembrane domains because of a nonsense mutation (Ser706*). The positions of IPT, ankyrin repeat (Ank), and transmembrane (TM) domains are indicated.

pRS416-w*MGA2*、pRS416-m*MGA2* および対照として pRS416 を用いて BY4743*Amga2* 株を形質転換し、得られた形質転換体を 1mM リノール酸添加または無添加の SC10-URA 培地で培養 (30°C, 9 h) 後の菌体より総 RNA を抽出し、RT-qPCR 解析を行ったところ、*ATF1* 発現量は w*MGA2* 導入の場合に比べ、m*MGA2* の導入により 2 倍以上高い値を示したが、その発現量は *hia1* 株の場合と異なり、リノール酸の添加により約 40% 低下した (FIG. 2-10 A)。しかしながら、リノール酸を添加しない場合の w*MGA2* よりも *ATF1* の発現量は高いことから、Atf1p として十分な機能があると考えられる。次に m*MGA2* が *OLE1* 発現に及ぼす影響を検討したところ、*ATF1* と同様に m*MGA2* により *OLE1* 発現量が増加したが、リノール酸添加によりその発現は部分的に抑制された (FIG.

2-10 B)。しかしながら、その阻害の程度は *wMGA2* の場合に比べ顕著に低かった (FIG. 2-10 B)。

なお、膜貫通領域 (TM) を欠失した *Mga2p* は不飽和脂肪酸による *OLE1* の発現抑制を解除することできないが、不飽和脂肪酸無添加の場合、*OLE1* の発現量を増加させることが報告されている²⁷⁾。これらの結果から、ナンセンス変異 (Ser706*) によってアンキリンリピートおよび膜貫通領域を欠失した *Mga2p* は、*ATF1* および *OLE1* の発現量を増加させるとともに不飽和脂肪酸による発現抑制も緩和することが明らかとなった。

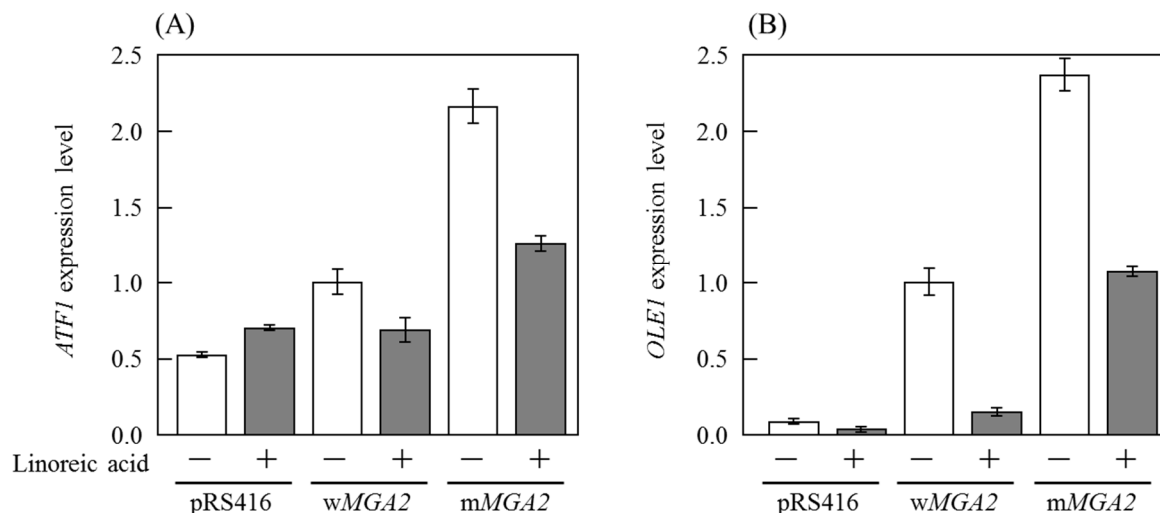


FIG. 2-10 Evaluation of *Mga2p* function using the BY4743 Δ *mga2* strain complemented with either wild-type *MGA2* (*wMGA2*) or mutant *MGA2* (*mMGA2*). Total RNA was prepared from yeast cells grown in SC10-URA medium without or with 1 mM linoleic acid at 30 °C for 9 h. *ATF1* (A) and *OLE1* (B) expression in the presence and absence of linoleic acid in BY4743 Δ *mga2* complemented with *wMGA2*, *mMGA2*, or control plasmid (pRS416). Expression levels are shown as fold-changes relative to that of *wMGA2* without linoleic acid.

Mga2p は 1,113 アミノ酸で構成され、ER 膜に局在するタンパク質である。*Mga2p* は前駆体 (p120) として合成された後、IPT 領域を介して二量体化する。その後、*Rsp5p* によるユビキチン化、プロテアソームによる部分分解を受け、アンキリンリピートおよび膜貫通領域が除去された単量体の成熟タンパク質 (p90) へ変換された後、核内へ移行し、*ATF1* や *OLE1* などの標的遺伝子の発現を活性化する (FIG. 2-11)。しかしながら、不飽和脂肪酸は *Mga2p* の転写活性化機構の機能を低下させる^{28, 29)}。一方、これまでの遺伝子組み換え体を用いた研究で、*Mga2p* および *Mga2p* と構造的に関連がある NFκB においてアンキリンリピートおよび膜貫通領域を欠失させることにより転写活性が増加することが報告されている^{30, 31)}。以上の結果およびこれまでの報告から、ナンセ

ンス変異 (Ser706*) によりアンキリンリピートおよび膜貫通領域を欠失した Mga2p は恒常的に活性化状態となることで、*ATF1* の発現量を増加させるとともに不飽和脂肪酸による抑制効果が緩和されたと考えられる。ただし、*hial* 株では不飽和脂肪酸による *ATF1* の発現抑制は全く認められなかった (FIG. 2-6) ことから、このような部分的な抑制が起こる原因としては、清酒酵母と実験室酵母の遺伝学的背景の違いや Mga2p とは別の要因が関与している可能性が考えられる。

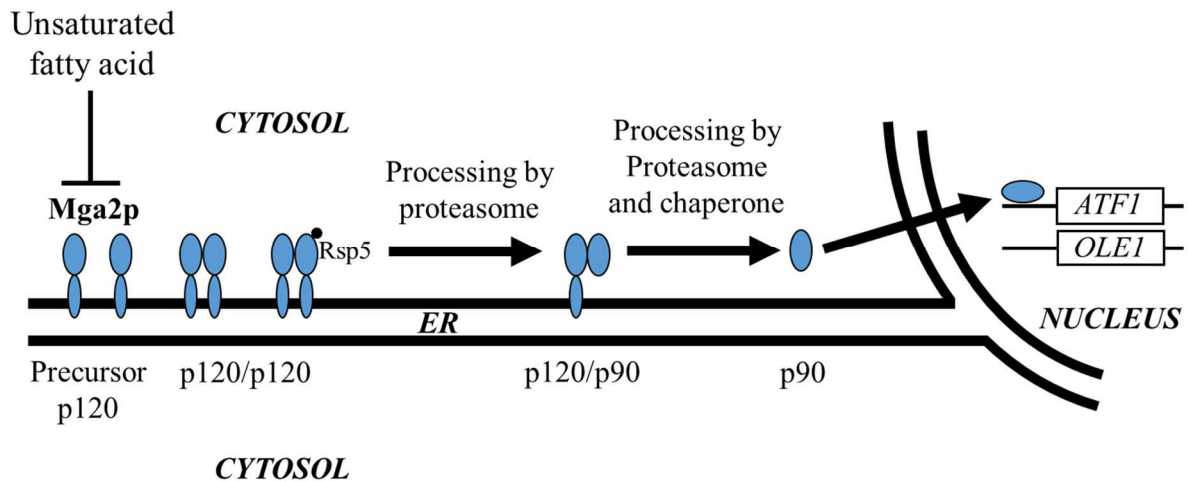


FIG. 2-11 Mga2p consists of 1,137 amino acids and localizes to the ER membrane, where it undergoes homodimerization mediated by its central IPT (Ig-like, plexins, transcription factors) domain. Subsequently, it is partially cleaved at the C-terminus, which contains ankyrin repeat and transmembrane domains, in a ubiquitin/proteasome-dependent process. The N-terminal transcription factor domain then translocates into the nucleus to activate the expression of target genes such as *ATF1* and *OLE1*

MGA2 ナンセンス変異が AbA 耐性に及ぼす影響

hial, 2, 4, 6 株は AbA 耐性株 428 株の中

から選抜された変異株であり、AbA 耐性株の中に占める酢酸イソアミル高生産性酵母変異株の割合は 1% 近いことになる。このように比較的高頻度で酢酸イソアミル高生産性酵母変異株が出現していることから、*MGA2* ナンセンス変異 (Ser706*) が AbA 耐性を付与している可能性がある。そこで、pRS416-wMGA2、pRS416-mMGA2 および対照として pRS416 を用いて BY4743Δ*mga2* 株を形質転換し、得られた形質転換体の AbA 耐性を調べたところ、pRS416-mMGA2 の導入により AbA 耐性能の向上が認められた (FIG. 2-12)。この結果より、*AUR1* 変異 (His157Tyr) に *MGA2* 変異 (Ser706*) が加わることにより、AbA 培地でのコロニーの形成速度が上昇したため、約 1% という比較的高頻度で *MGA2* 変異 (Ser706*) を有する酵母変異株が選抜されたと考えられる。

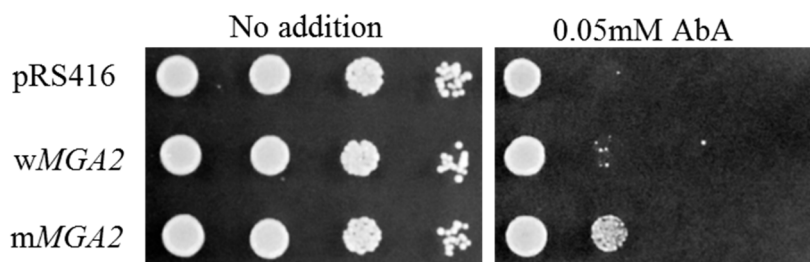


FIG. 2-12 Aureobasidin A (AbA) resistance of BY4743 $\Delta mga2$ complemented with wMGA2, mMGA2, or control plasmid (pRS416). Left panel depicts growth on SC-URA agar medium in the absence of AbA, while right panel depicts growth in the presence of 0.05 mM AbA. Yeast cells were grown in SC-URA at 30 °C for 24 h and diluted with distilled water to an OD660 value of 1.0. Five-microliter aliquots of serial dilutions (left to right) of cell suspension were placed on SC-URA agar medium containing 0 mM or 0.05 mM AbA, and incubated at 30 °C for 2 d.

要 約

1. 清酒醪において、酢酸イソアミル高生産性酵母変異株 *hial* 株の AATase 活性および *ATF1* 発現量が増加していた。
2. *hial* 株における *ATF1* 発現量の増加は不飽和脂肪酸による抑制を受けず、恒常的な活性化状態であることが明らかとなった。
3. 独立した4回の変異処理により得られた *hial*, 2, 4, 6 株において *ATF1* の転写活性化因子をコードする *MGA2* にホモ接合型のナンセンス変異 (Ser706*) が生じていた。
4. *MGA2* のナンセンス変異 (Ser706*) は *ATF1* の発現量を増加させるとともに、不飽和脂肪酸による発現抑制を緩和した。

参 考 文 献

- 1) Howard, D. and Anderson, R. G.: Cell-free synthesis of ethyl acetate by extracts from *Saccharomyces cerevisiae*, J. Int. Brew., **82**, 70-71 (1976).
- 2) Yoshioka, K. and Hashimoto, N.: Ester formation by alcohol acetyltransferase from brewers' yeast, Agri. Biol. Chem., **45**, 2183-2190 (1981).

- 3) **Fujii, T., Nagasawa, N., Iwamatsu, A., Bogaki, T., Tamai, Y., and Hamachi, M.:** Molecular cloning, sequence analysis, and expression of the yeast alcohol acetyltransferase gene, *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 2786-2792 (1994).
- 4) **Nagasawa, N., Bogaki, T., Iwamatsu, A., Hamachi, M., and Kumagai, C.:** Cloning and nucleotide sequence of the alcohol acetyltransferase II gene (*ATF2*) from *Saccharomyces cerevisiae* Kyokai No. 7, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 1852-1857 (1998).
- 5) **Fujii, T., Yoshimoto, H., and Tamai, Y.:** Acetate ester production by *Saccharomyces cerevisiae* lacking the *ATF1* gene encoding the alcohol acetyltransferase, *J. Ferment. Bioeng.*, **81**, 538-542 (1996).
- 6) **Yoshioka, K. and Hashimoto, N.:** Cellular fatty acid and ester formation by brewers' yeast, *Agri. Biol. Chem.*, **47**, 2287-2294 (1983).
- 7) **Fujii, T., Kobayashi, O., Yoshimoto, H., Furukawa, S., and Tamai, Y.:** Effect of aeration and unsaturated fatty acids on expression of the *Saccharomyces cerevisiae* alcohol acetyltransferase gene, *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 910-915 (1997).
- 8) **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).
- 9) **Akita, O., Hasuo, T., Hara, S., and Yoshizawa, K.:** Brewing of an alcoholic beverage and aroma compounds formation by an L-canavanine resistant sake-yeast, *Hakko-kogaku*, **67**, 7-14 (1989) (in Japanese).
- 10) **Hirooka, K., Yamamoto, Y., Tsutsui, N., and Tanaka, T.:** Improved production of isoamyl acetate by a sake yeast mutant resistant to an isoprenoid analog and its dependence on alcohol acetyltransferase activity, but not on isoamyl alcohol production, *J. Biosci. Bioeng.*, **99**, 125-129 (2005).
- 11) **Inoue, T., Iefuji, H., and Katsumata, H.:** Characterization and isolation of mutants producing increased amounts of isoamyl acetate derived from hygromycin B-resistant sake yeast, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **76**, 60-66 (2012).
- 12) **Momoi, M., Tanoue, D., Sun, Y., Takematsu, H., Suzuki, Y., Suzuki, M., Suzuki, A., Fujita, T., and**

- Kozutsumi, Y.:** *SLI1 (YGR212W)* is a major gene conferring resistance to the sphingolipid biosynthesis inhibitor ISP-1, and encodes an ISP-1 N-acetyltransferase in yeast, *Biochem. J.*, **381**, 321-328 (2004).
- 13) **Johnson, D. R., Knoll, L. J., Levin, D. E., and Gordon, J. I.:** *Saccharomyces cerevisiae* contains four fatty acid activation (FAA) genes: an assessment of their role in regulating protein N-myristoylation and cellular lipid metabolism, *J. Cell Biol.*, **127**, 751-762 (1994).
- 14) **Choi, J. Y., Stukey, J., Hwang, S. Y., and Martin, C. E.:** Regulatory elements that control transcription activation and unsaturated fatty acid-mediated repression of the *Saccharomyces cerevisiae OLE1* gene, *J. Biol. Chem.*, **27**, 3581-3589 (1996).
- 15) **Zhong, W., Jeffries, M. W., and Georgopapadakou, N. H.:** Inhibition of inositol phosphorylceramide synthase by aureobasidin A in *Candida* and *Aspergillus* species, *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **44**, 651-653 (2000).
- 16) **Yoshizawa, K.:** Rapid method for determining flavor components in sake by headspace gas chromatography, *J. Soc. Brew. Jpn.*, **68**, 59-61 (1973) (in Japanese).
- 17) **Yoshizawa, K.:** Higher alcohols and their esters in sake, *J. Soc. Brew. Jpn.*, **75**, 451-457 (1980) (in Japanese).
- 18) **Minetoki, T., Bogaki, T., Iwamatsu, A., Fujii, T., and Hamachi, M.:** The purification, properties and internal peptide sequences of alcohol acetyltransferase isolated from *Saccharomyces cerevisiae* Kyokai No. 7, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **57**, 2094-2098 (1993).
- 19) **Livak, K. J. and Schmittgen, T. D.:** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) method, *Methods*, **25**, 402-408 (2001).
- 20) **Fukuda, K., Kiyokawa, Y., Yanagiuchi, T., Wakai, Y., Kitamoto, K., Inoue, Y., and Kimura, A.:** Purification and characterization of isoamyl acetate-hydrolyzing esterase encoded by the *IAH1* gene of *Saccharomyces cerevisiae* from a recombinant *Escherichia coli*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **53**, 596-600 (2000).
- 21) **Bossie, M. A. and Martin, C. E.:** Nutritional regulation of yeast delta-9 fatty acid desaturase activity, *J.*

- Bacteriol., **171**, 6409-6413 (1989).
- 22) **Fujiwara, D., Yoshimoto, H., Sone, H., Harashima, S., and Tamai, Y.:** Transcriptional co-regulation of *Saccharomyces cerevisiae* alcohol acetyltransferase gene, *ATF1* and delta-9 fatty acid desaturase gene, *OLE1* by unsaturated fatty acids, *Yeast*, **14**, 711-721 (1998).
- 23) **Hashida-Okado, T., Ogawa, A., Endo, M., Yasumoto, R., Takesako, K., and Kato, I.:** *AURI*, a novel gene conferring aureobasidin resistance on *Saccharomyces cerevisiae*: a study of defective morphologies in Aur1p-depleted cells, *Mol. Gen. Genet.*, **251**, 236-244 (1996).
- 24) **Heidler, S. A. and Radding, J. A.:** Identification of an essential gene conferring resistance to LY295337 (R106-1) in *Saccharomyces cerevisiae*, Abstract of the 1994 Yeast Genetics and Molecular Biology Meeting, Seattle, 16-21 (1994).
- 25) **Jiang, Y., Vasconcelles, M. J., Wretzel, S., Light, A., Martin, C. E., and Goldberg, M. A.:** *MGA2* is involved in the low-oxygen response element-dependent hypoxic induction of genes in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 6161-6169 (2001).
- 26) **Akao, T., Yashiro, I., Hosoyama, A., Kitagaki, H., Horikawa, H., Watanabe, D., Akada, R., Ando, Y., Harashima, S., Inoue, T., and other 25 authors:** Whole-genome sequencing of sake yeast *Saccharomyces cerevisiae* Kyokai no. 7, *DNA Res.*, **18**, 423-434 (2011).
- 27) **Chellappa, R., Kandasamy, P., Oh, C. S., Jiang, Y., Vemula, M., and Martin, C. E.:** The membrane proteins, Spt23p and Mga2p, play distinct roles in the activation of *Saccharomyces cerevisiae* *OLE1* gene expression, *J. Biol. Chem.*, **276**, 43548-43556 (2001).
- 28) **Hoppe, T., Matuschewski, K., Rape, M., Schlenker, S., Ulrich, HD., and Jentsch, S.:** Activation of a membrane-bound transcription factor by regulated ubiquitin/proteasome-dependent processing, *Cell*, **102**, 577-586 (2000).
- 29) **Bhattacharya, S., Shcherbik, N., Vasilescu, J., Smith, J. C., Figeys, D., and Haines, D. S.:** Identification of lysines within membrane-anchored Mga2p120 that are targets of Rsp5p ubiquitination and mediate mobilization of tethered Mga2p90, *J. Mol. Biol.*, **385**, 718-725 (2009).

- 30) **Piwko, W.:** Mechanism of Proteasome-Mediated Processing of Proteins, Ludwig-Maximilians-Universität München (2007). PhD thesis.
- 31) **Cohen, S., Orian, A., and Ciechanover, A.:** Processing of p105 is inhibited by docking of p50 active subunits to the ankyrin repeat domain, and inhibition is alleviated by signaling via the carboxyl-terminal phosphorylation/ ubiquitin-ligase binding domain, *J. Biol. Chem.*, **276**, 26769-26776 (2001).

第3章

低精白米仕込みにおいてカプロン酸エチルおよび酢酸イソアミルを高生産する酵母変異株の育種とその特性解析 (c)

清酒の吟醸香の主要成分は酢酸イソアミルとカプロン酸エチルであり、第2章において低精白米仕込みにおいて酢酸イソアミルを高生産する酵母変異株 (*hia* 株) の育種について論じた。カプロン酸エチルは酵母菌体内において、アセチル-CoA とマロニル-CoA を出発物質とする脂肪酸合成経路上の中間体であるカプロン酸とエタノールを基質としてエステラーゼにより生合成される経路とカプロイル-CoA とエタノールを基質としてアシル-CoA : エタノール O-アシルトランスフェラーゼ (AEATase) により生合成される経路が存在する¹⁾ (FIG. 3-1)。

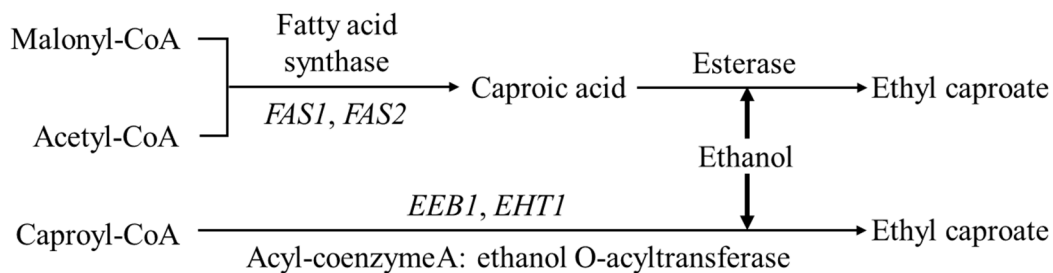


FIG. 3-1 Biosynthesis pathway of ethyl caproate

カプロン酸エチルも酢酸イソアミル同様、低精白米を用いた清酒醸造において酵母による生成量が低下する²⁾ ため、製成酒中のカプロン酸エチルの含量を増加させるには、原料となる白米を高精白する必要がある。

本章では、前章で得られた低精白米仕込みにおいて酢酸イソアミルを高生産する酵母変異株 (*hial* 株) を親株とすることにより、低精白米仕込みにおいてカプロン酸エチルおよび酢酸イソアミルを高生産する酵母変異株の育種およびその特性解析を行うことにした。

第1節 カプロン酸エチルおよび酢酸イソアミル 高生産性酵母変異株の育種

清酒醪においてカプロン酸エチル生合成の律速因子の一つはカプロン酸の生成量であることが知られている³⁾。酵母の脂肪酸合成酵素 (FAS) は7つの反応の触媒活性を併せ持つ多機能酵素である⁴⁾。アセチル-CoA とマロニル-CoA を出発物質として、マロニル-CoA 由来の C₂ 単位が付加されて脂肪酸の鎖長の伸長反応が進行し、通常パルミチン酸 (C16:0) またはステアリン酸 (C18:0) が合成される。したがって炭素数 6 のカプロン酸のような中鎖脂肪酸は脂肪酸合成経路の中間体であり、その生成量は少なく、カプロン酸の生成量だけを増加させることは困難である。一方、FAS が有する 7 種類の触媒活性のうち、縮合活性とパルミチン酸転移活性の比が変化することにより生成する脂肪酸の組成が変化すること⁵⁾、また FAS の阻害剤であるセルレニン⁶⁾ は、FAS の縮合活性部位に不可逆的に結合して、その活性を阻害することが報告されている⁷⁾。これらの知見をもとに市川らは、セルレニン耐性を示す酵母では FAS の縮合活性部位に変異が生じることにより FAS の活性が変化し、これによって生成する脂肪酸の組成が変化すると考え、清酒酵母よりセルレニン耐性株を取得し、清酒醸造試験を行ったところ、酵母菌体内のカプロン酸の生成量が増加し、これに伴い清酒醪中のカプロン酸エチルの生成量も増加することを見出した³⁾。FAS は、 α および β サブユニットより構成される六量体 ($\alpha_3\beta_3$) であり、それぞれのサブユニットは、*FAS2* および *FAS1* によってコードされている^{8,9)}。セルレニン耐性株では、縮合反応を触媒する α サブユニットをコードする *FAS2* に変異 (Gly1250Ser) が生じるため、縮合活性とパルミチン酸転移活性の比が変化することにより、脂肪酸の組成が変化して、カプロン酸の生合成能が向上したと考えられている^{10,11)}。

FAS1 および *FAS2* は協調的な転写制御を受けることが知られており¹²⁾、清酒酵母において、*FAS2* を高発現させても酵母の菌体内カプロン酸量の増加は認められないが、*FAS1* を高発現させることにより菌体内のカプロン酸量が増加し、*FAS1* および *FAS2* の両遺伝子を同時に高発現させると、菌体内のカプロン酸量が相乗的に増加することが知られている²⁾。一方、*Cryptococcus*

neoformans において Mga2p が *FAS1* の転写を制御していることが知られている¹³⁾。以上の知見より、*MGA2* にホモ接合型ナンセンス変異 (Ser706*) を有する *hial* 株では、*FAS1* および *FAS2* の発現量が増加し、菌体内カプロン酸量が増加している可能性がある。

本節では、*MGA2* のナンセンス変異 (Ser706*) が *FAS1* および *FAS2* の発現量を増加させることを示すとともに、*FAS1* および *FAS2* を高発現する *hial* 株にセルレニン耐性を付与することにより、低精白米仕込みにおいて酢酸イソアミルおよびカプロン酸エチルを高生産する酵母変異株を育種することにした。

実験方法

使用菌株および培地 *MGA2* が *FAS* 遺伝子発現および菌体内カプロン酸含量に及ぼす影響を評価するための小仕込み試験には、清酒酵母協会 9 号酵母泡なし株 (K901 株) 由来アルギナーゼ欠損株 Km97 株および Km97 株由来酢酸イソアミル高生産性酵母変異株 *hial* 株を用いた。プラスミドで *MGA2* を導入するための親株として、実験室酵母 BY4743 Δ *mga2* 株を使用した。カプロン酸エチル高生産性酵母変異株選抜のための親株として、酢酸イソアミル高生産性酵母 *hial* 株を使用した。清酒小仕込み試験の対照株として、*FAS2* にヘテロ接合型のミスセンス変異 (G3748A) を有する協会酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) K1801 株 (*FAS2/fas2*) を使用した。酵母の富栄養培地として、YPD 培地 (1 % yeast extract, 2 % Bacto-peptone and 2 % glucose) を使用した。セルレニン耐性株の選抜には、5 μ g/mL セルレニンを含む SD 培地を使用した。

プラスミド 第 2 章 第 2 節で構築した K901 株または *hial* 株由来 *MGA2* を有する pRS416-w*MGA2*、PRS416-m*MGA2* を使用した。

発酵試験 発酵試験は、第 2 章 第 1 節に示す方法に従って行った。

清酒小仕込み試験 清酒小仕込み試験は、第1章 第1節に示す方法に従い行った。

香気成分分析 香気成分分析は、第2章 第1節に示す方法に従い行った。

遺伝子発現解析 TABLE 3-1 に示すプライマーを用いて、第2章 第2節に示す方法に従い、*FAS1* および *FAS2* の発現解析を行った。各遺伝子の発現量は *TFC1* (transcription factor class C) をリファレンス遺伝子として、 $\Delta\Delta C_t$ 法¹⁴⁾により相対値として算出した。

TABLE 3-1. Gene-specific primers used for RT-PCR

Primer	Sequence
TFC1-F	5'-CCATGGTACCCGAAAACAAGA-3'
TFC1-R	5'-ATCACCAGCAGCGATACCC-3'
FAS1-F	5'-GCTGTCGCCATAGCTGAGAC-3'
FAS1-R	5'-TGGATGGTGGTAGGGAAGTG-3'
FAS2-F	5'-GCCAAGGTTAGCGCCAGAGA-3'
FAS2-R	5'-CACGGGCTAATGGGTCCAAG-3'

菌体内カプロン酸の定量 清酒醪より酵母菌体を回収し、凍結乾燥後、乳鉢で粉砕した。Fatty Acid Methylation Kit (Nacalai) および Fatty Acid Methyl Ester Purification Kit (Nacalai) を用いて粉砕化した酵母菌体よりメチルエステル化した脂肪酸を抽出した。脂肪酸の分析は GCMS-QP2010 Plus (Shimadzu) を用いて行った。カラムは Ulbon-HR-SS-10 (length, 50 m; internal diameter, 0.25 mm; Shinwa Chemical) を用いた。カラムオープン温度は 60°C (1min hold) → 200°C (10°C min⁻¹) → 220°C (6°C min⁻¹) → 220°C (9 min hold) 保持した。その他の設定は、気化温度 220°C、インターフェース温度 220°C、イオン源温度 200°C とした。

結果および考察

MGA2 ナンセンス変異 (Ser706*) が *FAS* 遺伝子発現に及ぼす影響

Km97 株および *MGA2* に

ホモ接合型ナンセンス変異を有する *hial* 株を用いて精米歩合 70% の小仕込み試験を行い、6 日目の醪より菌体を回収し、RT-qPCR による *FAS* 遺伝子の発現解析を行ったところ、Km97 株に比べ、*hial* 株では *FAS1* および *FAS2* の発現量が増加していた (FIG. 3-2 A)。また、*FAS* 遺伝子の発現量の増加を反映して、*hial* 株では菌体内カプロン酸含量の増加が認められた (FIG. 3-2 B)。

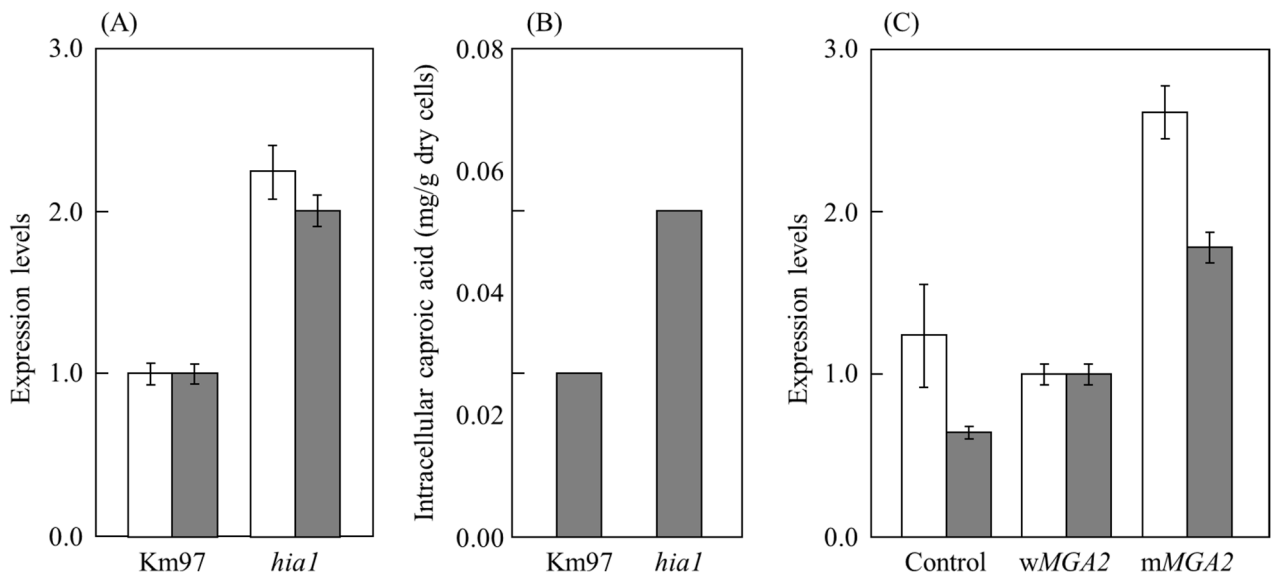


FIG. 3-2 *FAS* genes expression and the intracellular caproic acid content in the strain *hial*. Total RNA and cell-free extracts were prepared from yeast cells were recovered from sake mash prepared using 200 g of α -rice and rice-koji with a polishing ratio of 70%, and fermented at 15 °C for 6 d. (A) The expressions of *FAS1* and *FAS2* were measured by RT-qPCR. The relative expression levels are presented as fold-changes relative to the expression level obtained for strain Km97. (B) Yeast cells were lyophilized and pulverized in a mortar. The caproic acid content was analyzed with GC-MS after methyl esterification. (C) Evaluation of Mga2p function using the BY4743 $\Delta mga2$ strain complemented with either wild-type *MGA2* (wMGA2) or mutant *MGA2* (mMGA2). Total RNA was prepared from yeast cells grown in SC10-URA medium at 30 °C for 9 h for RT-qPCR. Expression levels are shown as fold-changes relative to that of wMGA2. (A, C) Blanc white bars, *FAS1*; dark bars, *FAS2* mutant. Values shown are the means from three independent experiments, and the error bars indicate standard deviations.

以上の結果より *MGA2* のナンセンス変異 (Ser706*) が *FAS* 遺伝子の発現量を増加させると考え、pRS416-wMGA2、pRS416-mMGA2 および対照として pRS416 を用いて BY4743 $\Delta mga2$ 株を形質転換し、得られた形質転換体を SC10-URA 培地で培養 (30°C, 9h) 後、菌体より総 RNA を回収し、RT-qPCR による遺伝子発現解析を行ったところ、*FAS1* および *FAS2* の発現量は wMGA2 導入の場合に比べ、mMGA2 の導入により顕著に高い値を示した (FIG. 3-2C)。これらの結果は、*FAS1*

および *FAS2* は *MGA2* の転写調節を受けること、さらに *MGA2* のナンセンス変異 (Ser706*) が *FAS1* および *FAS2* の発現を活性化することを示唆している。以上の結果より、*FAS* 遺伝子の発現量増加により菌体内カプロン酸量が高い *hial* 株にセルレニン耐性を付与することにより、カプロン酸エチルおよび酢酸イソアミルを高生産する酵母変異株が取得可能であると考えた。

カプロン酸エチル高生産性酵母変異株の選抜 酢酸イソアミル高生産性酵母 *hial* 株を親株として EMS 処理により突然変異を誘発し、5 µg/mL セルレニンを含む SD 培地で生育可能な変異株を 44 株単離した。これらのセルレニン耐性株を用いて、発酵試験を行い、発酵終了後の発酵液の香気を臭覚により評価し、カプロン酸エチル様の香気が高い変異株 *hec* (high ethyl caproate) 株を 7 株取得した。

カプロン酸エチル高生産性酵母変異株の醸造特性 発酵試験で選抜されたカプロン酸エチル高生産性酵母変異株 7 株 (*hec1-7* 株) について、精米歩合 70% の α 米および米麴を用いた清酒小仕込み試験を行った。清酒醪の発酵は 15°C 一定で、炭酸ガス減量が 60g に達した時点で遠心分離により製成酒と酒粕を分離し、製成酒の成分分析および香気成分分析を行った。*hec* 株の発酵能は親株と同程度であり、他の成分分析結果も含め、実醸造に使用できる醸造特性を有していた (TABLE 3-2)。一方、香気成分分析の結果、*hec2, 3, 6* 株の製成酒のカプロン酸エチル濃度は親株のそれに比べ、9.5、11.3 および 9.2 倍と高い値を示したが、*hec1, 4, 5, 7* 株では、親株に比べてカプロン酸エチル濃度の増加は認められなかった。また、*FAS2* にヘテロ接合型変異 (G3748A) を持つカプロン酸エチル高生産性酵母 K1801 株と比べても、*hec2, 3, 6* 株の製成酒のカプロン酸エチル濃度は顕著に高かった。一方、*hec2, 3, 6* 株を用いた製成酒の酢酸イソアミル濃度は、親株である *hial* 株に比べ低下した。しかしながら、カプロン酸エチル濃度と同様に K1801 株に比べ高い値を示した。

TABLE 3-2. Properties of experimental sake in the brewing test

	<i>hial</i>	<i>hec1</i>	<i>hec2</i>	<i>hec3</i>	<i>hec4</i>	<i>hec5</i>	<i>hec6</i>	<i>hec7</i>	K1801
Alcohol (%)	17.8	18.3	17.5	17.8	17.2	18.0	18.2	17.7	19.0
Sake meter	-1.0	-1.5	-6.4	-7.1	-11.6	-3.3	-3.0	-2.2	+5.7
Total acidity (ml)	2.5	2.4	2.5	2.6	2.5	2.7	2.2	3.3	2.4
Amino acidity (ml)	1.8	2.1	2.1	2.0	2.1	1.8	2.1	1.6	1.6

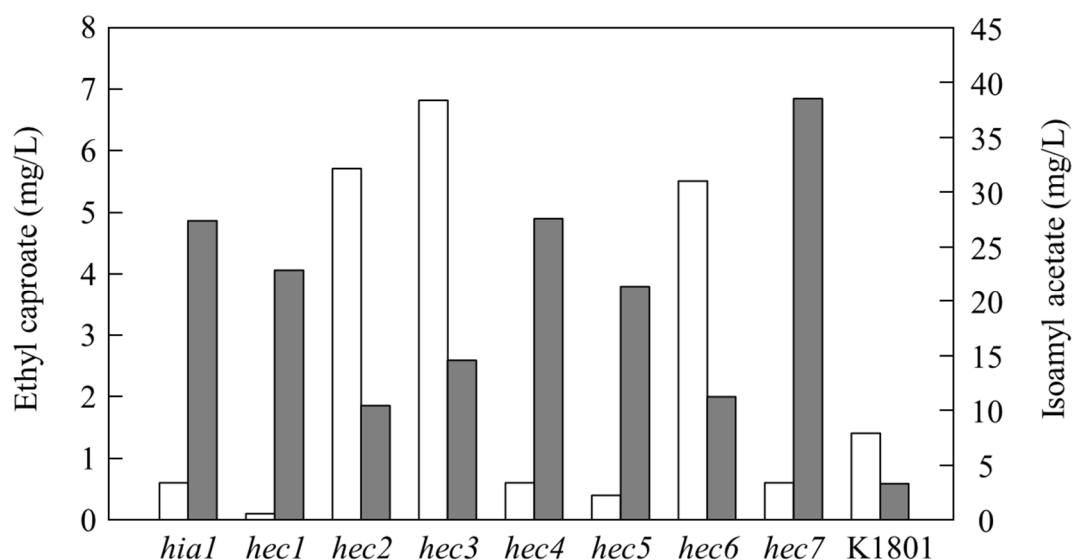


FIG. 3-3 Comparison of the ethyl caproate contents and isoamyl acetate contents in sake brewed with the strain *hial*, the strain K1801 and the *hec* mutants. Laboratory-scale sake brewing was carried out using 200 g of α -rice and rice-koji with a polishing ratio of 70%. The temperature of the sake mash was maintained at 15 °C through the entire fermentation period. Blank white bars, ethyl caproate contents; dark bars, isoamyl acetate contents.

そこで製成酒の官能能評価が最も高かった *hec2* 株を用いて、菊正宗酒造株式会社菊栄蔵にて、精米歩合 70%、総米 6t の純米酒醸造を行い、製成酒を商品化処理 (ろ過→殺菌→4 ヶ月貯蔵後→再度ろ過→殺菌) した後、香氣成分分析を行ったところ、カプロン酸エチル濃度は精米歩合 70% の市販酒に比べると顕著に高く、精米歩合 50% 以下の高精白米を用いた大吟醸酒と同程度の高い値を示した。また、酢酸イソアミル濃度も既存の市販酒の酢酸イソアミル濃度 (1-2 mg/L) に比べ顕著に高い値を示した (FIG. 3-4)。

以上の結果より、今回得られた *hec2* 株を用いて清酒醸造を行うことにより、低精白米を用いてもカプロン酸エチルおよび酢酸イソアミル含量の高い清酒の醸造が可能であることが示された。

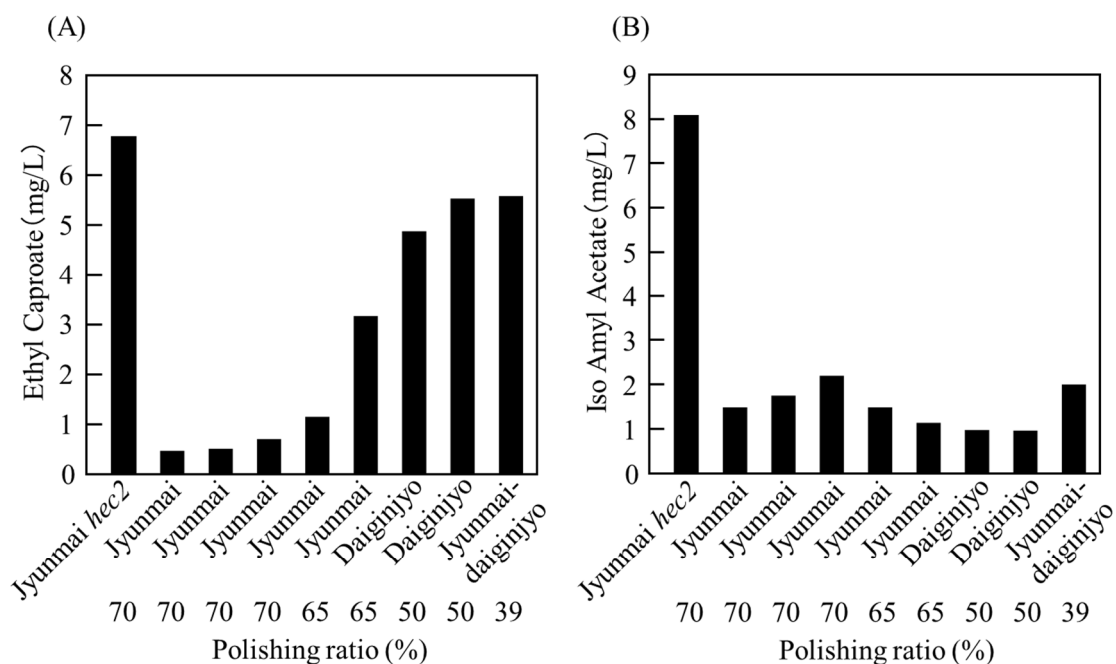


FIG. 3-4 Comparison of the ethyl caproate contents and isoamyl acetate contents in sake brewed with the strain *hec2* mutant and the sake on the market. Industrial -scale sake brewing was carried out using 6t of polished rice and rice-koji with a polishing ratio of 70% with *hec2* mutant. After fermentation, sake was filtrated, pasteurized, stored for 4 months, refiltrated, filled and repasteurized.

要約

1. *MGA2* にホモ接合型ナンセンス変異 (Ser706*) を有する酢酸イソアミル高生産性酵母変異株 *hia1* 株では、親株である Km97 株に比べ、*FAS1* および *FAS2* の発現量および菌体内カプロン酸量の増加が認められた。
2. 実験室酵母 BY4743Δ*mga2* 株の解析から *MGA2* のナンセンス変異 (Ser706*) が *FAS1* および *FAS2* の発現量を増加させることが明らかとなった。
3. *hia1* 株に突然変異を誘発し、得られたセルレニン耐性株 44 株について発酵試験および清酒小仕込み試験を行い、製成酒のカプロン酸エチル濃度が親株の 9 倍以上となる酵母変異株を 3 株 (*hec2*, 3, 6 株) 取得した。
4. *hec2* 株を用いて醸造した清酒の酢酸イソアミル濃度は親株を用いた場合に比べ減少したが、吟醸酒造りに広く利用されている K1801 株を用いて醸造した清酒や既存の市販清酒に比べ顕著に高く、*hec2* 株を用いることにより、低精白米を用いたカプロン酸エチルおよび酢酸イソアミル高含有清酒の醸造が可能となった。

第2節 カプロン酸エチルおよび酢酸イソアミル 高生産性酵母変異株 *hec2* 株の特性解析

カプロン酸エチルおよび酢酸イソアミル高生産性酵母変異株 *hec2* 株を用いて清酒小仕込み試験を行ったところ、*FAS2* にヘテロ接合型ミスセンス変異 (G3748A) を有する K1801 に比べ、醸成酒のカプロン酸エチル濃度が顕著に増加していたことから、*hec2* 株では *FAS2* 変異に加え、*FAS2* 変異以外の要因により、カプロン酸エチル生合成能が向上したと考えられる。そこで、*hec* 株のカプロン酸エチル高生産のメカニズムを明らかにするため、*hec2* 株の特性解析を行うことにした。

実験方法

使用菌株および培地 清酒小仕込み試験には、清酒酵母協会9号酵母泡なし株 (K901株) 由来アルギナーゼ欠損株 Km97株、酢酸イソアミル高生産性酵母 *hial* 株、カプロン酸エチル高生産性酵母変異株 *hec2* 株、およびカプロン酸エチル高生産性協会酵母 K1801株を使用した。全ゲノムDNA解析には、Km97株、*hial* 株および *hec2* 株を使用した。形質転換体の選抜には5 または 10 $\mu\text{g/mL}$ セルレニンを含む SD 培地、AEATase およびアルコールアセチルトランスフェラーゼ (AATase) 活性測定には 10% グルコース最小 (SD10) 培地 (0.67% Bacto-yeast nitrogen base without amino acids and 10% glucose) を使用した。

清酒小仕込み試験 清酒小仕込み試験は、第1章 第1節に示す方法に従って行った。

香気成分分析 香気成分分析は、第2章 第1節に示す方法に従って行った。

遺伝子置換を利用した *FAS2* 変異の導入 FIG.3-5 に示す方法により、遺伝子置換を利用して *FAS2* 変異の導入を行った。すなわち *FAS2* の 3,748 番目の G を A に変えた 3,733-3,762 に相当する

DNA (5'-AACTGTTCTGGTTCTAGTATGGGTGGTGT-3')とその相補配列に相当する DNA (5'-AACACCACCCATACTAGAACCAGAACAGTT-3') を 95°C、10m の変性処理を行った後、室温で一晩放置することによりアニーリングを行った（下線は 3,748 番目の変異導入塩基 G>A を示す）。得られた二本鎖 DNA を用いてエレクトロポレーション法により *hia1* 株を形質転換し、*hia1Ff* 株 (*FAS2/fas2*) を 5 µg/mL セルレニンを含む SD 培地 (0.67% Bacto-yeast nitrogen base without amino acids and 2% glucose) で選択した。次に同様の二本鎖 DNA を用いて *hia1Ff* 株 (*FAS2/fas2*) を形質転換し、*hia1ff* 株 (*fas2/fas2*) を 10 µg/mL セルレニンを含む SD 培地で選択した。なお変異導入の確認は変導入部を含む領域を PCR で増幅後、塩基配列解析することにより行った。

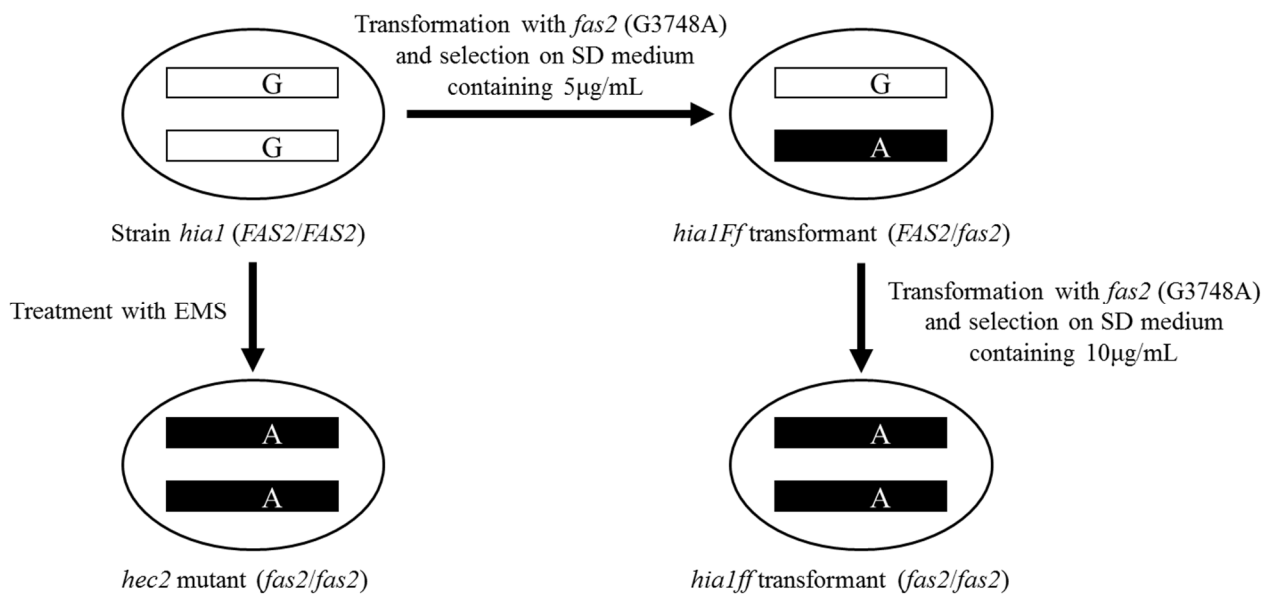


FIG. 3-5 Strategy for introduction of *FAS2* mutation by using gene replacement

菌体内カプロン酸の定量 第3章 第1節に示す方法に従い行った。

遺伝子発現解析 *FAS1*、*FAS2* に関しては、第3章 第1節 TABLE 3-1 に示すプライマーを用いて、*EEB1*、*EHT1*、*ATF1*、*ATF2*、*IAH1* に関しては、TABLE 3-3 に示すプライマーを用いて、第2章 第2節に示す方法に従い、RT-qPCR による遺伝子発現解析を行った。各遺伝子の発現量は *TFC1* (transcription factor class C) をリファレンス遺伝子として、 $\Delta\Delta Ct$ 法¹⁴⁾により相対値として算出した。

TABLE 3-3. Gene-specific primers used for RT-PCR

Primer	Sequence
TFC1-F	5'-CCATGGTACCCGAAAACAAGA-3'
TFC1-R	5'-ATCACCAGCAGCGATACCC-3'
EEB1-F	5'-CGGAACATCATTTGGAGCAG-3'
EEB1-R	5'-ACCACCAATCATGAGCCAAC-3'
EHT1-F	5'-TTCTCGGATGGTGGAGTTG-3'
EHT1-R	5'-TAAACGAGGCCATCCTTCTG-3'
ATF1-F	5'-AAAAGACGCGGAGGTACATTG-3'
ATF1-R	5'-ACAAACACCCAAGGAAAATGC-3'
ATF2-F	5'-GCACCCTAACACCCTTCATTC-3'
ATF2-R	5'-ACCTTCTTGCGTTGCTTGG-3'
IAH1-F	5'-TTCAACAGGAAGGTGGTGATG-3'
IAH1-R	5'-TTGGGATGATATTGGGGGTAG-3'

AEATase 活性測定 酵母無細胞抽出液の調製は、bufferA (25 mM imidazole-HCl at pH 7.8, 0.1 M NaCl, 20% glycerol, 1 mM dithiothreitol, 0.153 M ethanol and 0.1% Triton X-100) を用いて第 1 章 第 2 節の方法により行った。AEATase 活性の測定は、0.6 mM カプロイル-CoA を含む bufferA 1 mL と酵母無細胞抽出液 1 mL を混合し、25°C、1 時間反応後、NaCl 4 g を添加することにより反応を停止した。この反応液にエタノール 0.75 mL および蒸留水 2.25 mL を加えた後、第 2 章 第 1 節の方法に従い、ヘッドスペース GC-FID 法によりカプロン酸エチル濃度を測定した。AEATase 活性の 1 単位は、25°C、1 時間に 1 μ mol のカプロン酸エチルを生成する酵素量とした。

AATase 活性測定 Km97、*hial* 株、*hec2* 株、K1801 株を用いて、第 2 章 第 2 節に示す方法に従い行った。

全ゲノム DNA 解析 Km97 株、*hial* 株、*hec2* 株を用いて、第 2 章 第 2 節に示す方法に従い行った。

結果および考察

hec2 株の FAS2 配列解析 セルレニン耐性を指標に選抜した *hec2* 株の *FAS2* 塩基配列を調べたところ、これまでの報告^{10, 11)}と同様に、開始コドンから 3,748 番目の G が A に変異していた。また FIG. 3-6 に示すように 3,748 番目には A のシグナルのみが検出されたことから、この変異はホモ接合型であり、この変異によりアミノ酸配列の 1,250 番目のグリシンがセリンにホモ接合型で置換 (Gly1250Ser) されることになる。

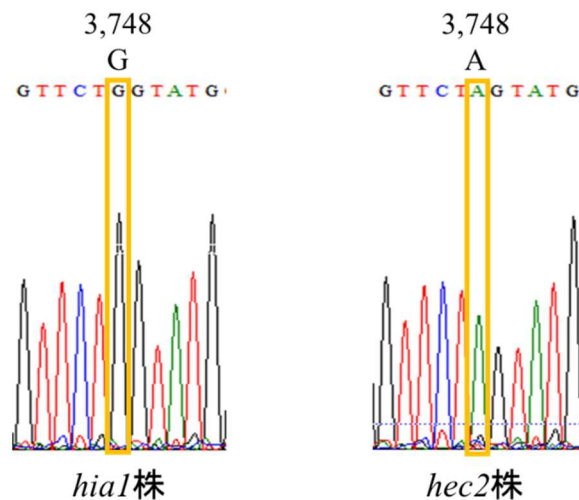


FIG. 3-6 Comparison of nucleotide sequence of *FAS2* between strain *hial* and *hec2* mutant. the homozygous G>A mutation at position 3,748, resulting in amino acid replacement at position 1250 (Gly1250Ser) was identified in *FAS2* sequence.

菌体内カプロン酸含量 *hec2* 株では、*FAS2* にホモ接合型変異 (Gly1250Ser) が生じていたことから、カプロン酸エチルの前駆体であるカプロン酸含量が増加していると考えられる。そこで、精米歩合 70%の α 米および米麴を用いた清酒小仕込み試験を行い、発酵 7 日目の醪より酵母菌体を回収し、菌体内の脂肪酸量を測定したところ、*hial* 株および *hec2* 株では、カプロン酸、カプリル酸、カプリン酸などの短鎖脂肪酸含量が高く (FIG. 3-7 A)、*hec2* 株においてカプロン酸量の顕著な増加が認められた (FIG. 3-7 B)。 *FAS2* にヘテロ接合型変異 (Gly1250Ser) を有する K1801 株と比べて菌体内カプロン酸含量が顕著に高いことから、*hec2* 株におけるカプロン酸エチルおよびカプロン酸生成能の増加には *FAS2* 変異 (Gly1250Ser) 以外の他の要因も関係すると考えられる。

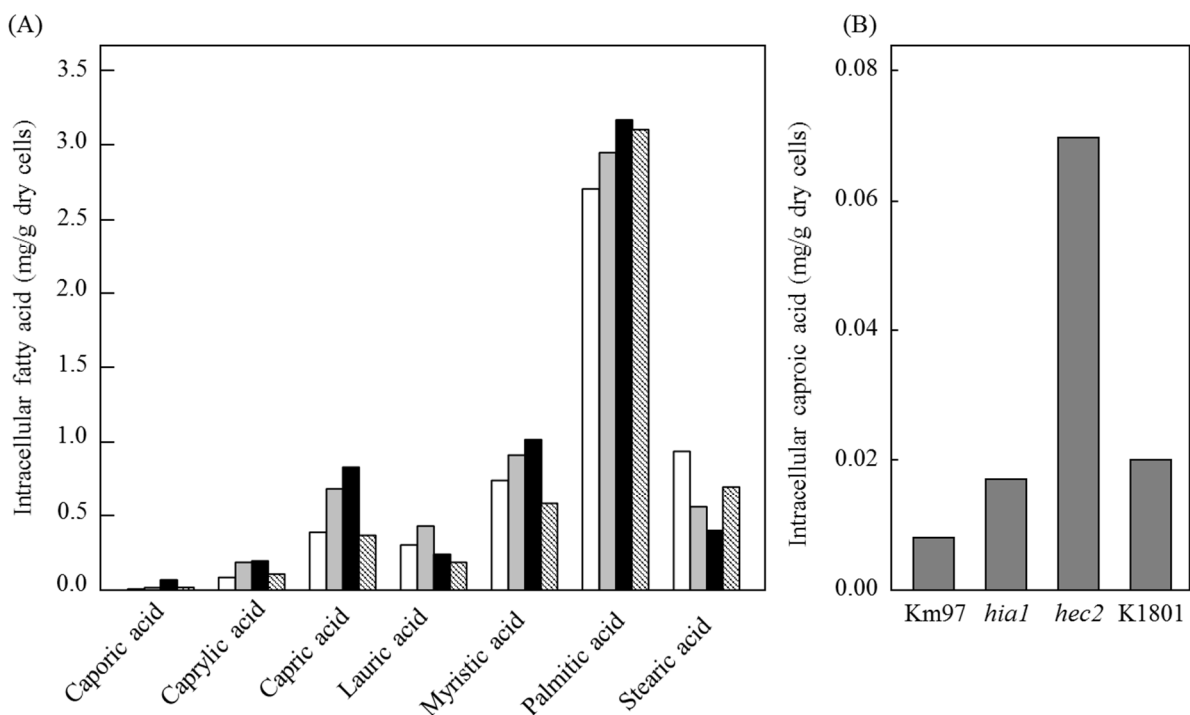


FIG. 3-7 Comparison of the intracellular fatty acid (A) and caproic acid (B) contents in the strain Km97, *hial1*, K1801 and the *hec2* mutant. Yeast cells were recovered from sake mash prepared using 200 g of α -rice and rice-koji with a polishing ratio of 70%, and fermented at 15 °C for 6 d. Yeast cells were lyophilized and pulverized in a mortar. Methyl esterified fatty acid derivatives were prepared from obtained yeast powder with Fatty Acid Methylation Kit (Nacalai tesque, Kyoto, Japan) and Fatty Acid Methyl Ester Purification Kit (Nacalai tesque, Kyoto, Japan). The fatty acid content was analyzed with GC-MS. (A) Blanc white bars, strain Km97; Shaded bars, strain *hial1*; dark bars, *hec2* mutant; Striped bars, strain K1801.

FAS2 変異 (Gly1250Ser) が *hial1* 株のカプロン酸エチル生産能に及ぼす影響 *hec2* 株のカプロン酸エチル高生産能に *FAS2* 以外の因子が関与しているか調べるため、FIG.3-5 に示す方法により、*FAS2* にホモ接合型の変異 (Gly1250Ser) を導入した *hial1ff* 株を用いて清酒小仕込み試験を行い、醪中の香气成分分析を行ったところ、*hial1ff* 株のカプロン酸エチル生産能は K1801 株より高かったが、*hec2* 株には及ばなかった (FIG. 3-8 A)。一方、*hial1ff* 株の酢酸イソアミル生産能は、*hec2* 株のそれと同程度であった (FIG. 3-8 B)。さらに発酵7日目の清酒醪より酵母菌体を回収し、菌体内カプロン酸量を測定したところ、*hial1ff* 株の菌体内カプロン酸量は K1801 株と同程度であるが、カプロン酸エチル量の結果と同様に *hec2* 株に比べ顕著に低かった (FIG. 3-8 C)。

カプロン酸エチル高生産能に *FAS2* 以外の因子が関与しているか調べるため、FIG.3-5 に示す方法により、*FAS2* にホモ接合型の変異 (Gly1250Ser) を導入した *hial1ff* 株を用いて清酒小仕込み試験を行い、醪中の香气成分分析を行ったところ、*hial1ff* 株のカプロン酸エチル生産能は K1801 株より高かったが、*hec2* 株には及ばなかった (FIG. 3-8 A)。一方、*hial1ff* 株の酢酸イソアミル生産能は、*hec2* 株のそれと同程度であった (FIG. 3-8 B)。さらに発酵7日目の清酒醪より酵母菌体を回収し、菌体内カプロン酸量を測定したところ、*hial1ff* 株の菌体内カプロン酸量は K1801 株と同程度であるが、カプロン酸エチル量の結果と同様に *hec2* 株に比べ顕著に低かった (FIG. 3-8 C)。

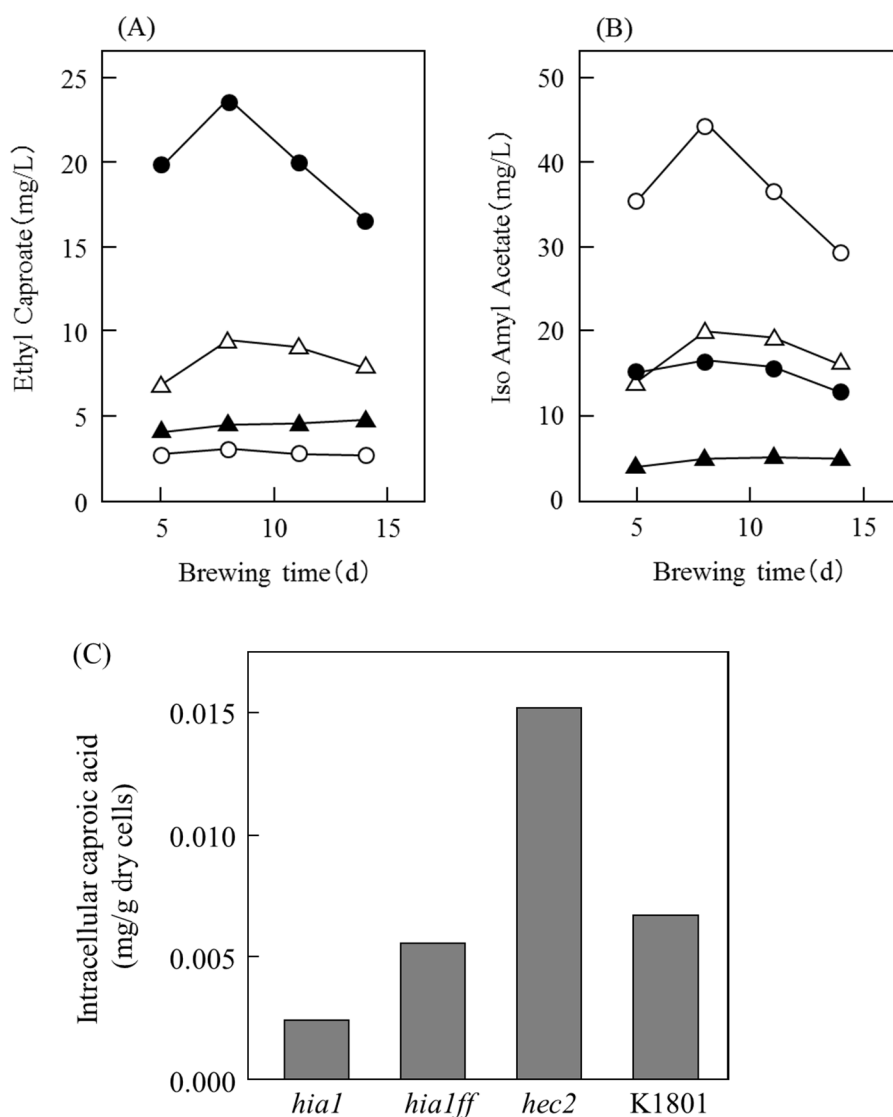


FIG. 3-8 Comparison of ethyl caproate (A) and isoamyl acetate (B) contents in sake brewed with yeast mutant strains. Laboratory-scale sake brewing was carried out using 200 g of α -rice and rice-koji with a polishing ratio of 70%. The temperature of the sake mash was maintained at 15 °C through the entire fermentation period. Open circle, strain *hial* (*FAS2/FAS2*); open triangle, strain *hialff* (*fas2/fas2*); closed circle, *hec2* (*fas2/fas2*); closed triangle, strain K1801 (*FAS2/fas2*). (C) Comparison of the intracellular caproic acid contents in strain *hial*, *hialff*, K1801 and *hec2* mutant cells recovered from sake mash fermented at 15 °C for 6 d.

hec2 株のカプロン酸エチル高生産能の原因が *FAS2* 変異だけであれば、*hec2* 株と *hialff* 株のカプロン酸エチルおよびカプロン酸の生産能は同程度になるはずであるが、両成分の生産能が *hec2* 株で顕著に高いことから、*hec2* 株のカプロン酸エチル高生産能にはホモ接合型 *FAS2* 変異 (Gly1250Ser) によるカプロン酸量の増加以外の因子が関与していると考えられる。また、*hial* 株の酢酸イソアミル高生産能はホモ接合型 *FAS2* 変異 (Gly1250Ser) の導入により *hec2* 株と同程度まで低下したことから、*hec2* 株における酢酸イソアミル生産能の低下はホモ接合型 *FAS2* 変異 (Gly1250Ser) が原因であると考えられる。

カプロン酸エチルおよび酢酸イソアミル生合成経路に関連する遺伝子の発現解析 *hec2*株に

においてカプロン酸エチルおよびカプロン酸生産能の向上が認められたため、カプロン酸エチル生合成経路に関連する遺伝子の発現解析を行うことにした。清酒小仕込み試験を行い、発酵 6 日目の醪より回収した酵母菌体を用いて、脂肪酸合成酵素の α 、 β サブユニットをそれぞれコードする *FAS2*、*FAS1* およびカプロイル-CoA とエタノールを基質としてカプロン酸エチルを生合成する AEATase をコードする *EEB1* および *EHT1*¹⁵⁾ を対象として RT-qPCR による遺伝子発現解析を行ったところ、*hial* および *hec2* 各株の *FAS1* および *FAS2* の発現量は、Km97 株や K1801 株に比べ高かったが、*hial* 株と *hec2* 株間ではほとんど差はなかった (FIG. 3-9 A, B)。したがって *FAS1* および *FAS2* の遺伝子発現量が増加するという表現型は、Km97 株から *hial* 株を育種する際に獲得した *MGA2* のナンセンス変異 (Ser706*) に由来する形質であると考えられる。次に *EEB1* および *EHT1* の発現解析を行ったところ、Km97 株、*hial* 株、K1801 株に比べ、*hec2* 株において *EEB1* の発現量の顕著な増加が認められた (FIG. 3-9 C)。一方、*hial* 株および *hec2* 株の *EHT1* の発現量は、Km97 株および K1801 株に比べやや低下する傾向を示したが、4 菌株で大きな差は認められなかった (FIG. 3-9 D)。*hec2* 株において *EEB1* の発現量の増加が認められたことから、SD10 培地で培養した酵母菌体より無細胞抽出液を調製し、カプロイル-CoA とエタノールを基質として、カプロン酸エチルを生合成する AEATase 活性を測定したところ、*hec2* 株において酵素活性の増大も認められた (FIG.3-10)。

次に酢酸イソアミル生合成経路に関連する遺伝子について発現解析を行った。AATase をコードする *ATF1* の発現量は Km97 株および K1801 株に比べ、*hial* 株および *hec2* 株において顕著に増加していた (FIG. 3-9 E) が、酢酸イソアミル生合成への関与が低い遺伝子 *ATF2* および酢酸イソアミルの分解に関与するエステラーゼ遺伝子 *IAHI*¹⁶⁾ の発現量については 4 菌株間で大きな差は認められなかった (FIG. 3-9 F, G)。*hec2* 株では *hial* 株と同程度の *ATF1* の発現量の増加が認められたが、酢酸イソアミル生産能は *hial* 株に比べて半分以下に低下していた (FIG. 3-8 B) ことから、SD10 培地で培養した酵母菌体より無細胞抽出液を調製し、AATase 活性を測定したところ、*hec2* 株の AATase 活性は、*hial* 株のそれと同程度であった (FIG. 3-11)。

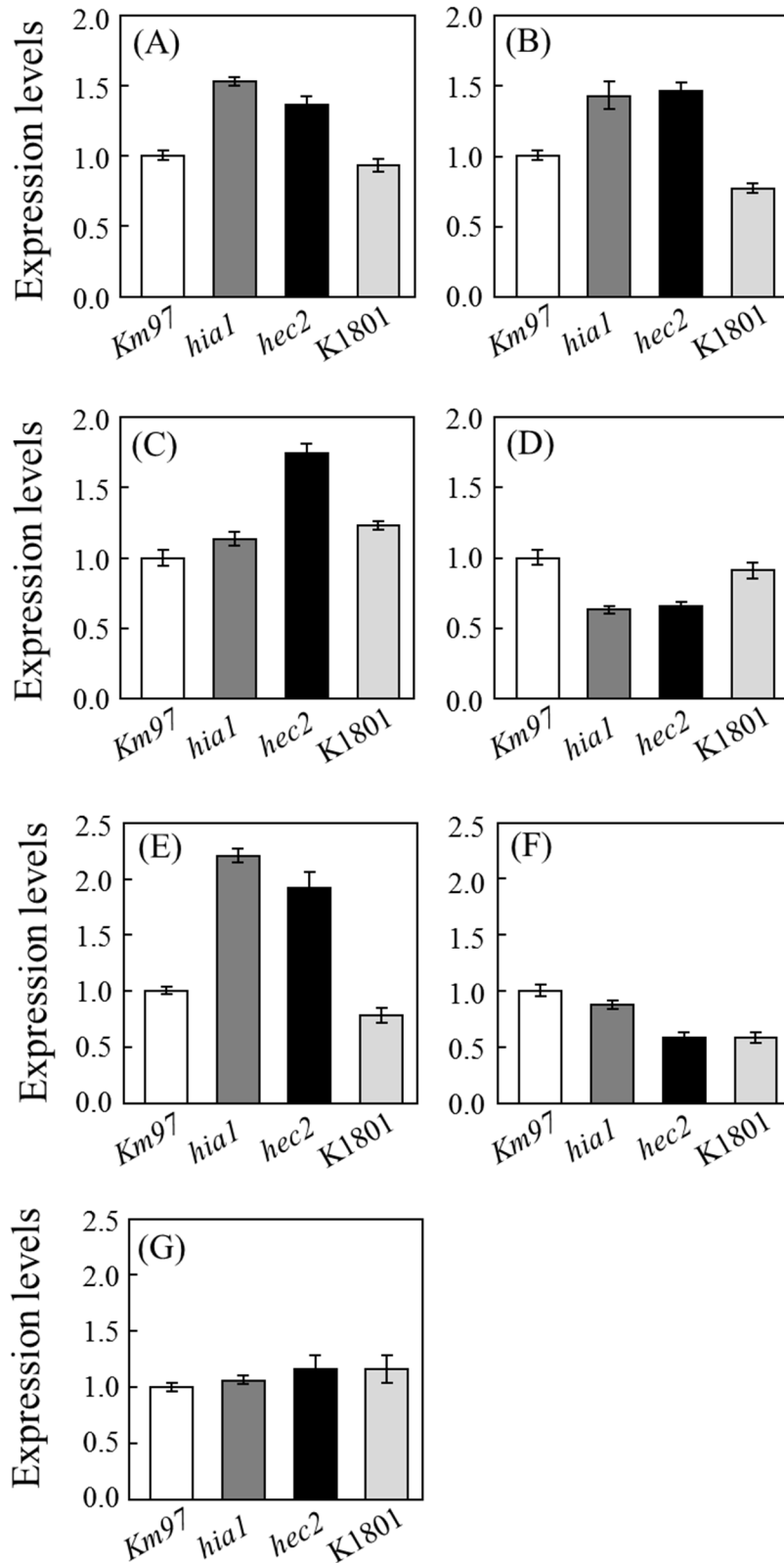


FIG. 3-9 The expression of genes associated with ethyl caproate (A-D) or isoamyl acetate (E-G) biosynthesis during sake brewing in yeast strains. Yeast cells were recovered from sake mash prepared using 200 g of α -rice and rice-koji with a polishing ratio of 70%, and fermented at 15 °C for 6 d. (A) *FAS1*, (B) *FAS2*, (C) *EEB1*, (D) *EHT1*, (E) *ATF1*, (F) *ATF2*, and (G) *IAH1*. Values shown are the means from three independent experiments, and the error bars indicate standard deviations.

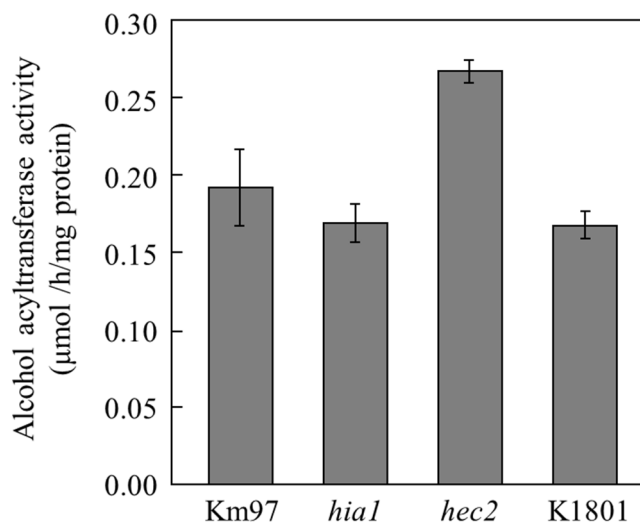


FIG. 3-10 Alcohol acyltransferase activity was measured with cell-free extracts. Cell-free extracts were prepared from yeast cells grown in SD10 medium at 30 °C for 20 h.

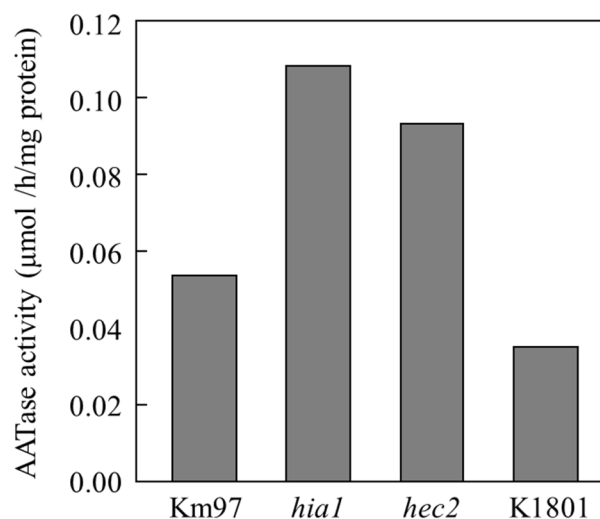


FIG. 3-11 Alcohol acetyltransferase activity was measured with cell-free extracts. Cell-free extracts were prepared from yeast cells grown in SD10 medium at 30 °C for 20 h.

これらの結果から、*hec2* 株では脂肪酸生合成経路が活性化されるため、脂肪酸生合成経路の最初の反応と酢酸イソアミル生合成反応の共通の基質であるアセチル-CoA の利用が拮抗し、脂肪酸生合成経路に優先的に利用されるため、酢酸イソアミル生合成能が低下したと推察される。

hec2 株の全ゲノム DNA 解析

hec2 株のカプロン酸エチル高生産能のメカニズムを明らかに

するため、hec2 株の全ゲノム DNA 解析を行った。得られた塩基配列データは清酒酵母 K7 株の全ゲノム DNA 配列を対照としてマッピングを行い、hial1 株と hec2 株間の一塩基多型 (SNP) を抽出した結果を TABLE 3-4、TABLE 3-5 に示す。

TABLE 3-4. Mutations discovered in the whole-genome sequence analysis of the *hec2* mutant

Zygosity	Missense mutations		Nonsense mutations	
	Gene	amino acid change	Gene	amino acid change
Heterozygous	93 amino acid changes in 92 genes, listed in TABLE 3-4.		<i>YGL093W/SPC105</i>	Glu170*
	<i>YCL027W/FUS1</i>	Thr106Pro		
	<i>YCR011C/ADP1</i>	Glu708Gln		
	<i>YCR018C-A</i>	Val59Ile		
	<i>YCR018C-A</i>	His57Pro		
	<i>YCR021C/HSP30</i>	Asp307Glu		
	<i>YCR030C/SYP1</i>	Asn760Ser		
	<i>YGR032W/GSC2</i>	Arg218Ser		
	<i>YHR186C/KOG1</i>	Ala1505Thr		
	<i>YKL182W/FAS1</i>	Gly909Arg		
	<i>YKL185W/ASH1</i>	Arg43Lys		
	<i>YLR042C</i>	Thr112Met		
	<i>YLR129W/DIP2</i>	Val509Met		
	<i>YLR334C</i>	Leu34Phe		
Homozygous	<i>YLR382C/NAM2</i>	Thr846Met	<i>YOL145C/CTR9</i>	Gln958*
	<i>YMR013C/SEC59</i>	Asp207Glu		
	<i>YMR019W/STB4</i>	Gly910Glu		
	<i>YMR089C/YTA12</i>	Gly394Ser		
	<i>YPL080C</i>	Ala55Val		
	<i>YPL085W/SEC16</i>	Glu1381Lys		
	<i>YPL106C/SSE1</i>	Ala495Val		
	<i>YPL150W</i>	Glu830Lys		
	<i>YPL164C/MLH3</i>	Thr215Ile		
	<i>YPL169C/MEX67</i>	Gly522Asp		
	<i>YPL187W/MF(ALPHA)1</i>	Val80Ile		
	<i>YPL208W/RKM1</i>	Glu490Asp		
	<i>YPL231W/FAS2</i>	Gly1250Ser		
	<i>YPL252C/YAH1</i>	His10Gln		
	<i>YPR095C/SYT1</i>	Asp450Asn		

TABLE 3-5. Heterozygous missense mutations in *hec2* mutant

Gene			Gene		
Systematic name	Standard name	amino acid change	Systematic name	Standard name	amino acid change
<i>YAL026c</i>	<i>DRS2</i>	Val 142 Met	<i>YJR001w</i>	<i>AVT1</i>	Ala 249 Val
<i>YAL023c</i>	<i>PMT2</i>	Ser 101 Phe	<i>YJR037w</i>		Arg 106 His
<i>YAL023c</i>	<i>PMT2</i>	Leu 60 Ser	<i>YJR102c</i>	<i>VPS25</i>	Ser 155 Asn
<i>YBL106c</i>	<i>SRO77</i>	Gly 1000 Arg	<i>YJR121w</i>	<i>ATP2</i>	Lys 78 Asn
<i>YBL022c</i>	<i>PIM1</i>	Glu 437 Lys	<i>YKL203c</i>	<i>TOR2</i>	Gly 59 Asp
<i>YBR150c</i>	<i>TBS1</i>	Ser 759 Phe	<i>YKL048c</i>	<i>ELM1</i>	Val 369 Ile
<i>YBR166c</i>	<i>TYR1</i>	Ser 314 Asn	<i>YKL011c</i>	<i>CCE1</i>	Arg 192 Gln
<i>YBR273c</i>	<i>UBX7</i>	Arg 162 Lys	<i>YKR028w</i>	<i>SAP190</i>	Asp 630 Asn
<i>YCL069w</i>	<i>VBA3</i>	Val 288 Ile	<i>YKR028w</i>	<i>SAP190</i>	Glu 850 Asp
<i>YCL025c</i>	<i>AGPI</i>	Ala 467 Val	<i>YKR084c</i>	<i>HBS1</i>	Gly 286 Arg
<i>YCR046c</i>	<i>IMG1</i>	Arg 99 His	<i>YLR006c</i>	<i>SSK1</i>	Ala 254 Thr
<i>YDL195w</i>	<i>SEC31</i>	Glu 697 Lys	<i>YLR071c</i>	<i>RGR1</i>	Ser 1080 Asn
<i>YDL166c</i>	<i>FAP7</i>	Arg 101 Lys	<i>YLR104w</i>	<i>LCL2</i>	Val 46 Ile
<i>YDL117w</i>	<i>CYK3</i>	Gly 26 Asp	<i>YLR140w</i>		Cys 9 Tyr
<i>YDL003w</i>	<i>MCD1</i>	Thr 415 Ile	<i>YLR146c</i>	<i>SPE4</i>	Arg 189 Lys
<i>YDR105c</i>	<i>TMS1</i>	Gly 343 Asp	<i>YLR207w</i>	<i>HRD3</i>	Ser 85 Phe
<i>YDR127w</i>	<i>ARO1</i>	Val 1538 Ile	<i>YLR246w</i>	<i>ERF2</i>	Cys 178 Tyr
<i>YDR440w</i>	<i>DOT1</i>	Thr 394 Ile	<i>YLR409c</i>	<i>UTP21</i>	Arg 240 Lys
<i>YDR466w</i>	<i>PKH3</i>	Arg 486 Lys	<i>YML130c</i>	<i>ERO1</i>	Arg 44 Lys
<i>YDR498c</i>	<i>SEC20</i>	Ser 227 Asn	<i>YML093w</i>	<i>UTP14</i>	Ala 235 Thr
<i>YDR505c</i>	<i>PSP1</i>	Asp 487 Asn	<i>YML085c</i>	<i>TUB1</i>	Gly 437 Asp
<i>YEL065w</i>	<i>SIT1</i>	Ser 41 Phe	<i>YML046w</i>	<i>PRP39</i>	Glu 493 Lys
<i>YEL061c</i>	<i>CIN8</i>	Val 988 Met	<i>YMR246w</i>	<i>FAA4</i>	Pro 96 Ser
<i>YER018c</i>	<i>SPC25</i>	Ala 187 Thr	<i>YNL268w</i>	<i>LYP1</i>	Glu 323 Lys
<i>YER157w</i>	<i>COG3</i>	Thr 614 Ile	<i>YNL256w</i>	<i>FOL1</i>	Ala 303 Thr
<i>YFL012</i>		Ser 50 Asn	<i>YNL188w</i>	<i>KAR1</i>	Arg 241 Lys
<i>YFR010a</i>		Leu 38 Phe	<i>YNL187w</i>	<i>SWT21</i>	Asp 9 Asn
<i>YGL203c</i>	<i>KEX1</i>	Ser 380 Pro	<i>YNL162w</i>	<i>RPL42A</i>	Gly 94 Asp
<i>YGL197w</i>	<i>MDS3</i>	Pro 1430 Ser	<i>YNL147w</i>	<i>LSM7</i>	Ser 103 Asn
<i>YGL171w</i>	<i>ROK1</i>	Phe 475 Leu	<i>YNL102w</i>	<i>POL1</i>	Val 1199 Ile
<i>YGL151w</i>	<i>NUT1</i>	Pro 263 Leu	<i>YNL091w</i>	<i>NST1</i>	Gly 1038 Asp
<i>YGL150c</i>	<i>INO80</i>	Val 1012 Ile	<i>YNL042b</i>		Ser 59 Leu
<i>YGL140c</i>		Val 715 Ile	<i>YNR057c</i>	<i>BIO4</i>	Thr 76 Ile
<i>YGL139w</i>	<i>FLC3</i>	Thr 192 Ile	<i>YOL110w</i>	<i>SHR5</i>	Glu 8 Lys
<i>YGL133w</i>	<i>ITC1</i>	Ser 938 Asn	<i>YOL066c</i>	<i>RIB2</i>	Pro 428 Leu
<i>YGL123w</i>	<i>RPS2</i>	Cys 162 Tyr	<i>YOR011w</i>	<i>AUS1</i>	Thr 16 Ile
<i>YGL093w</i>	<i>SPC105</i>	Glu 170 Lys	<i>YOR092w</i>	<i>ECM3</i>	Gly 162 Ser
<i>YGL073w</i>	<i>HSF1</i>	Asp 589 Asn	<i>YOR160w</i>	<i>MTR10</i>	Ala 866 Thr
<i>YGR097w</i>	<i>ASK10</i>	Pro 998 Ser	<i>YOR206w</i>	<i>NOC2</i>	Asp 699 Asn
<i>YGR145w</i>	<i>ENP2</i>	Ala 399 Thr	<i>YOR372c</i>	<i>NDD1</i>	Ser 219 Asn
<i>YGR217w</i>	<i>CCH1</i>	Gly 1893 Arg	<i>YPL270w</i>	<i>MDL2</i>	Val 246 Ile
<i>YHL007c</i>	<i>STE20</i>	Gly 414 Arg	<i>YPL074w</i>	<i>YTA6</i>	Gly 623 Glu
<i>YHR012w</i>	<i>VPS29</i>	Leu 252 Phe	<i>YPR030w</i>	<i>CSR2</i>	Val 499 Ile
<i>YHR115c</i>	<i>DMA1</i>	Gly 279 Glu	<i>YPR122w</i>	<i>AXL1</i>	Ser 942 Leu
<i>YHR188c</i>	<i>GPI16</i>	Gly 565 Asp	<i>YPR147c</i>		Pro 136 Leu
<i>YIL147c</i>	<i>SLN1</i>	Arg 509 Lys	<i>YPR161c</i>	<i>SGV1</i>	Val 403 Ile
<i>YIL115c</i>	<i>NUP159</i>	Glu 117 Lys			

ヘテロ接合型ミスセンス変異は 92 遺伝子中に 93 箇所、ホモ接合型のミスセンス変異は、*FAS2* 変異 (Gly1250Ser) を含む 27 箇所検出された。興味深いことに *FAS1* にもホモ接合型のミスセンス変異 (Gly909Arg) が生じていた (TABLE 3-4)。その他にヘテロ接合型およびホモ接合型のナンセンス変異がそれぞれ 1 箇所ずつ検出された。

以上の結果より、*hec2* 株においてカプロン酸エチル生産能が向上した原因の一つは、カプロン酸エチル高生産能を付与する既知の *FAS2* のミスセンス変異 (Gly1250Ser) と考えられる (FIG. 3-6)。さらに発酵において、中鎖脂肪酸エチルエステル、特にカプロン酸エチル生合成に主要な役割を果たす AEATase をコードする *EEB1* が高発現し、酵素活性も増大している (FIG. 3-9 E, FIG. 3-10) ことも挙げられる。*EEB1* の発現量の増加は、*FAS2* 変異および *FAS1*、*FAS2* の発現量の増加に伴い、基質となるカプロイル-CoA が増加したためと考えられる。Saerens らは実験室酵母を用いた解析から *EEB1* を破壊するとカプロン酸エチルの生産能が顕著に低下するが、高発現をさせても生産能は増加しないことから、Eeb1p はカプロン酸エチルの合成と分解の両方を担っているのではないかと報告している^{15,17)}。一方、栄養培地を用いた発酵試験において *EEB1* の発現量とカプロン酸エチルの生成量に正の相関があることも報告している¹⁸⁾。他方、Lilly らはワイン酵母を用いた解析により、*EHT1* の高発現がカプロン酸エチルの生成量を増加させることを報告しており¹⁹⁾、カプロン酸エチル生合成に関与する酵素種の違いが、解析に供する菌株の遺伝学的背景に基づくと考えられている。したがって清酒酵母より育種した *hec2* 株において、*EEB1* の発現量とカプロン酸エチルの生成量に正の相関が認められたことは、妥当な結果と考えられる。さらにゲノム解析の結果、*FAS1* のホモ接合型ミスセンス変異 (Gly909Arg) も FAS 活性に影響を与えるため、カプロン酸の生合成能が高まった可能性がある。*FAS1* のホモ接合型ミスセンス変異 (Asp171Glu) が酵母菌体内のカプロン酸量を増加させるという報告²⁰⁾ もあることから、検出された *FAS1* のホモ接合型ミスセンス変異 (Gly909Arg) についても FAS 活性に影響を及ぼすか今後検討の余地がある。

要 約

1. *hec2* 株のカプロン酸エチル高生産能には既知の *FAS2* ミスセンス変異 (Gly1250Ser) 以外の因子が関与することを示した。
2. *hec2* 株では脂肪酸合成経路に関与する *FAS1*、*FAS2* 両遺伝子の発現量が増加していた。また、カプロイル-CoA からのカプロン酸エチル生合成に関与する AEATase をコードする主要な遺伝子 *EEB1* が高発現し、酵素活性も増大していた。
3. *hec2* 株の清酒醪での酢酸イソアミル生産能は *hial* 株より低下したが、AATase 活性および *ATF1* 発現に両変異株で大きな差がなかったことから、酢酸イソアミル生合成のための基質である アセチル-CoA が脂肪酸生合成経路に優先的に利用されたと考えられる。
4. *hec2* 株の全ゲノム DNA 解析の結果、*FAS1* にホモ接合型ミスセンス変異 (Gly909Arg) が検出された。

参 考 文 献

- 1) **Liu, S. Q., Holland, R., and Crow, V. L.:** Esters and their biosynthesis in fermented dairy products, *Int. Dairy J.*, **14**, 923-945 (2004).
- 2) **Furukawa, K., Yamada, T., Mizoguchi, H., and Hara, S.:** Increased ethyl caproate production by inositol limitation in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biosci. Bioeng.*, **95**, 448-454 (2003).
- 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) **Lynen, F.:** On the structure of fatty acid synthetase of yeast, *Eur. J. Biochem.*, **112**, 431-442 (1980).
- 5) **Sumper, M., Oesterhelt, D., Riepertinger, C., and Lynen, F.:** Synthesis of various carboxylic acids by the fatty acid synthetase multienzyme complex of yeast and the explanation for their structure, *Eur. J. Biochem.*, **10**, 377-387 (1969).
- 6) **Omura, S.:** The antibiotic cerulenin, a novel tool for biochemistry as an inhibitor of fatty acid synthesis,

- Bacteriol. Rev., **40**, 681-697 (1976).
- 7) **Funabashi, H., Kawaguchi, A., Tomoda, H., Omura, S., Okuda, S., and Iwasaki, S.:** Binding site of cerulenin in fatty acid synthetase, *J. Biochem.*, **105**, 751-755 (1989).
 - 8) **Mohamed, A. H., Chirala, S. S., Mody, N. H., Huang, W. Y., Wakil, S. J.:** Primary structure of the multifunctional alpha subunit protein of yeast fatty acid synthase derived from *FAS2* gene sequence, *J. Biol. Chem.*, **263**, 12315-12325 (1988).
 - 9) **Schweizer, M., Roberts, L. M., Höltke, H. J., Takabayashi, K., Höllerer, E., Hoffmann, B., Müller, G., Köttig, H., and Schweizer, E.:** The pentafunctional *FAS1* gene of yeast: its nucleotide sequence and order of the catalytic domains, *Mol. Gen. Genet.*, **203**, 479-486 (1986).
 - 10) **Ichikawa, E.:** Sake yeast with improved ethyl caproate productivity, *J. Soc. Brew. Jpn.*, **88**, 101-105 (1993). (in Japanese)
 - 11) **Inokoshi, J., Tomoda, H., Hashimoto, H., Watanabe, A., Takeshima, H., and Omura, S.:** Cerulenin-resistant mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with an altered fatty acid synthase gene, *Mol. Gen. Genet.*, **244**, 90-96 (1994).
 - 12) **Schüller, H. J., Schütz, A., Knab, S., Hoffmann, B., and Schweizer, E.:** Importance of general regulatory factors Rap1p, Abf1p and Reb1p for the activation of yeast fatty acid synthase genes *FAS1* and *FAS2*, *Eur. J. Biochem.*, **225**, 213-222 (1994).
 - 13) **Kraus, P. R., Boily, M. J., Giles, S. S., Stajich, J. E., Allen, A., Cox, G. M., Dietrich, F. S., Perfect, J. R., and Heitman, J.:** Identification of *Cryptococcus neoformans* temperature-regulated genes with a genomic-DNA microarray, *Eukaryot. Cell*, **3**, 1249-1260 (2004).
 - 14) **Livak, K. J. and Schmittgen, T. D.:** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method, *Methods*, **25**, 402-408 (2001).
 - 15) **Saerens, S. M., Verstrepen, K. J., Van Laere, S. D., Voet, A. R., Van Dijck, P., Delvaux, F. R., and Thevelein, J. M.:** The *Saccharomyces cerevisiae* *EHT1* and *EEB1* genes encode novel enzymes with medium-chain fatty acid ethyl ester synthesis and hydrolysis capacity, *J. Biol. Chem.*, **281**, 4446-4456

(2005).

- 16) **Fukuda, K., Kiyokawa, Y., Yanagiuchi, T., Wakai, Y., Kitamoto, K., Inoue, Y., and Kimura, A.:**
Purification and characterization of isoamyl acetate-hydrolyzing esterase encoded by the *IAHI* gene of *Saccharomyces cerevisiae* from a recombinant *Escherichia coli*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **53**, 596-600 (2000).
- 17) **Saerens, S. M., Delvaux, F., Verstrepen, K. J., Van Dijck, P., Thevelein, J. M., and Delvaux, F. R.:**
Parameters affecting ethyl ester production by *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation, *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 454-461 (2008).
- 18) **Saerens, S. M., Verbelen, P. J., Vanbeneden, N., Thevelein, J. M., and Delvaux, F. R.:** Monitoring the influence of high-gravity brewing and fermentation temperature on flavour formation by analysis of gene expression levels in brewing yeast, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **80**, 1039-1051 (2008).
- 19) **Lilly, M., Bauer, F. F., Lambrechts, M. G., Swiegers, J. H., Cozzolino, D., and Pretorius, I. S.:** The effect of increased yeast alcohol acetyltransferase and esterase activity on the flavour profiles of wine and distillates, *Yeast*, **23**, 641-659 (2006).
- 20) **Namise, M., Nagayoshi, M., Hata, Y., Kawato, A., Abe, Y., and Shimoi, H.:** Japan Patent 4935969 (May. 23, 2012)

総括

精米技術を始めとする醸造技術の進歩によって、あるいは食の欧米化や健康意識の向上にともなう、高い香り（吟醸香）や味などの嗜好性だけでなく機能性の面でも、酒質の多様性が求められるようになってきた。このような背景のもとに本論文では、遺伝子組み換え技術を使用せずに実醸造に使用できる醸造用酵母変異株を育種し、その生理的特性を明らかにした。すなわち、機能性の面から、血圧上昇抑制作用や精神安定作用などの機能を持つ GABA の資化能が低下した酵母変異株を育種することにより、GABA を高含有する清酒醸造に成功し、GABA 資化能低下に寄与する特性を明らかにした。また、嗜好性の面から、吟醸香の主要成分である酢酸イソアミルおよびカプロン酸エチルに着目し、従来の高精白米を用いた吟醸酒造りとは異なり、低精白米を用いた清酒醸造において、これら吟醸香成分を高生産する酵母変異株を育種することにより、低精白米を用いた吟醸香の高い清酒醸造に成功し、吟醸香成分の高生産能に関する特性を明らかにした。

緒言においては、清酒酒質の多様化に資する酵母変異株育種の重要性および本研究の意義を明らかにし、本論文の概要を述べた。

第 1 章では、機能性の面から清酒酒質の多様化を図るべく、GABA を高含有する清酒醸造に利用できる酵母を育種するため、GABA 資化能が低下した酵母変異株を育種することにした。はじめに酵母の GABA 取り込みに関与する GABA 特異的輸送体をコードする *UG44*、および菌体内での GABA の分解に関与する GABA トランスアミナーゼをコードする *UGAI* 破壊株を清酒酵母を用いて作製し、これら遺伝子破壊株を用いて清酒小仕込み試験を行ったところ、*UGAI* 破壊株を用いると、製成酒の GABA 量が親株を用いた場合に比べ増加すること、ならびに本破壊株が GABA を単一窒素源として生育できないことを明らかにした。

次に *UGAI* 破壊株が示す GABA を単一窒素源とした最小培地で生育できないという生育特性に基づき、K701 株を親株として EMS 処理により突然変異を誘発し、得られた突然変異株の中から GABA 資化能が低下した変異株を 2 株 (GAB7-1 株、GAB7-2 株) 取得することに成功した。GAB7-

1、GAB7-2 株を用いた清酒小仕込み試験の結果、両変異株ともに醪初期における GABA 資化能が抑制され、最終的に製成酒の GABA 濃度が親株の約 2 倍になることが明らかとなり、これら GABA 低資化性酵母変異株を用いることにより、GABA 高含有清酒醸造が可能であることを示した。

得られた GABA 低資化性酵母変異株の GABA 低資化性に寄与する因子を明らかにするため、*UGA4*、*UGA1*、*UGA2* 各遺伝子による GABA 資化能相補試験を行ったところ、GAB7-1 株では GABA トランスアミナーゼをコードする *UGA1*、GAB7-2 株ではコハク酸セミアルデヒド脱水素酵素 (SSADH) をコードする *UGA2* の導入により GABA 資化能が回復した。そこで、両変異株の原因遺伝子の DNA 配列解析を行ったところ、GAB7-1 株では、*UGA1* にホモ接合型ナンセンス変異 (Trp308*) が検出され、GABA トランスアミナーゼ活性が低下した。一方、GAB7-2 株では、*UGA2* にヘテロ接合型ミスセンス変異 (Gly247Asp) が検出され、SSADH 酵素活性が低下していることが明らかとなった。

第 2 章では、嗜好性の面から酒質の多様化を図るべく、低精白米仕込みにおいて吟醸香の主要成分の一つである酢酸イソアミルを高生産する酵母変異株を育種することにした。低精白米仕込みにおいて酢酸イソアミルを高生産するためには、白米外層部に由来する不飽和脂肪酸による *ATF1* の発現抑制を解除する必要がある。本研究では、イノシトールホスホリルセラミド合成酵素阻害剤であるオーレオバシジン A (AbA) に耐性を示す酵母変異株の中から酢酸イソアミル高生産性酵母変異株を選抜し、その特性を明らかにした。協会 9 号酵母泡なし株由来のアルギナーゼ欠損株 Km97 株を親株として EMS 処理により突然変異を誘発し、得られた AbA 耐性を示す酵母変異株について精米歩合 70% の α 米および米麴を用いた発酵試験および清酒小仕込み試験を行い、酢酸イソアミルを高生産する変異株を 4 株 (*hia1*, 2, 4, 6 株) 選抜することに成功した。これら *hia* 株は清酒小仕込み試験において親株の 2.6 倍以上の酢酸イソアミルを生産することが明らかとなった。すなわちこれら酢酸イソアミル高生産性酵母変異株 *hia* 株を用いることにより、低精白米を用いた酢酸イソアミル高含有清酒醸造が可能であることを示した。

得られた *hia* 株の酢酸イソアミル高生産能に寄与する因子を明らかにするため、清酒醪より *hia1* 株を回収し、AATase 活性測定および *ATF1* の発現解析を行ったところ、親株である Km97 株に比

べ *hia1* 株では、AATase 活性の上昇および *ATF1* 発現量の増加が認められた。次に *hia1* 株の *ATF1* 発現が不飽和脂肪酸によって抑制されるか検討したところ、*Km97* 株では不飽和脂肪酸による発現抑制を受けたが、*hia1* 株では不飽和脂肪酸による発現抑制を受けることなく、恒常的に発現量が増加していることが明らかとなった。また、*ATF1* と同様の転写制御機構により不飽和脂肪酸による発現抑制を受ける Δ -9 脂肪酸不飽和化酵素をコードする *OLE1* も、*ATF1* と同様に *hia1* 株では不飽和脂肪酸による発現抑制を受けなかったことから、*hia1* 株では *ATF1* および *OLE1* に共通な転写制御機構に変異が生じていると考えられた。そこで、*hia1* 株の全ゲノム DNA 解析を行ったところ、*ATF1* および *OLE1* に共通な転写因子をコードする *MGA2* にホモ接合型ナンセンス変異 (Ser706*) を見出した。さらに、*hia1* 株と同様の表現型を示す *hia* 株 (*hia2*, 4, 6 株) に共通な変異点を同定するため、*hia* 株 4 株それぞれのゲノム DNA を等量混合し、全ゲノム DNA 解析を行ったところ、4 菌株に共通なホモ接合型変異として検出されたのは、*MGA2* ホモ接合型変異 (Ser706*) のみであった。そこで、この変異型 *MGA2* をプラスミドを用いて *MGA2* を破壊した実験室酵母に導入したところ、不飽和脂肪酸による *ATF1* 発現抑制が緩和されたことから、*MGA2* ホモ接合型変異 (Ser706*) は、低精白米を用いた清酒醸造において *hia1* 株が酢酸イソアミルを高生産する原因の一つであることを示した。

第 3 章では、低精白米を用いた清酒醸造において、吟醸香の主要成分であるカプロン酸エチルおよび酢酸イソアミルを高生産する酵母変異株を育種し、その特性を明らかにした。まず、*MGA2* のナンセンス変異 (Ser706*) が *FAS1* および *FAS2* の発現量を増加させること、および *hia1* 株ではそれらの遺伝子の高発現に伴い、菌体内カプロン酸量も増加することから、*hia1* 株がカプロン酸エチル高生産性酵母変異株育種のための親株として有用であることを示した。そこで、*hia1* 株を親株として EMS 処理により突然変異を誘発し、得られたセルレニン耐性を示す変異株について、精米歩合 70%の α 米および米麴を用いた発酵試験および清酒小仕込み試験を行い、カプロン酸エチルおよび酢酸イソアミルを高生産する酵母変異株を 3 株 (*hec2*, 3, 6 株) 選抜することに成功した。*hec2* 株を用いて醸造した清酒は、既存の市販酒に比べ、カプロン酸エチルおよび酢酸イソアミル含量が高いことから、*hec2* 株を用いることにより、低精白米を用いたカプロン酸エチルおよ

び酢酸イソアミル高含有清酒醸造が可能であることを示した。

得られた *hec* 株のカプロン酸エチル高生産能に寄与する因子を明らかにするため、カプロン酸エチル高生産能を付与する既知の *FAS2* 変異 (Gly1250Ser) が *hec2* 株においても生じているか調べたところ、同変異がホモ接合型で検出された。しかし、*hec2* 株においてカプロン酸エチル前駆体であるカプロン酸の菌体内含量が、*FAS2* 変異 (Gly1250Ser) を有する K1801 株に比べて顕著に増加していたことから、*hec2* 株のカプロン酸エチル高生産能には *FAS2* 変異以外の因子が関与していると考えられる。そこで、*FAS2* のホモ接合型変異 (Gly1250Ser) を導入した *hial* 株 (*hialff* 株) を用いて清酒小仕込み試験を行い、清酒醪中の香气成分分析を行ったところ、*hialff* 株のカプロン酸エチル生産能は K1801 株より高かったが、*hec2* 株には及ばなかった。併せて清酒醪より回収した酵母菌体内カプロン酸量を測定したところ、カプロン酸エチル量の結果と同様に *hec2* 株に比べ顕著に低い値を示した。以上の結果は、*hec2* 株のカプロン酸エチル高生産能には *FAS2* 変異 (Gly1250Ser) によるカプロン酸量の増加以外の因子が関与していることを支持するものである。次にカプロン酸エチル生合成経路に関連する遺伝子の発現解析を行ったところ、*hec2* 株において、脂肪酸合成酵素の α 、 β サブユニットをそれぞれコードする *FAS2* および *FAS1* 両遺伝子が高発現していた。また、カプロイル-CoA とエタノールを基質としてカプロン酸エチルを生合成する酵素 AEATase をコードする *EEB1* の発現量が増加し、酵素活性も増加していることも示した。酢酸イソアミル生合成経路に関連する遺伝子についても発現解析を行ったところ、*hec2* 株では *ATF1* の発現量が増加していた。また AATase 活性も高かったことから、*hec2* 株では脂肪酸生合成経路が活性化されるため、脂肪酸生合成経路の最初の反応と酢酸イソアミル生合成反応に共通する基質であるアセチル-CoA が脂肪酸生合成経路に優先的に利用されるため、酢酸イソアミル生合成能が低下したと推察される。最後に *hec2* 株について全ゲノム DNA 解析を行ったところ、*FAS1* のホモ接合型ミスセンス変異 (Gly909Arg) が検出された。この変異が *hec2* 株のカプロン酸エチル高生産能に及ぼす影響については今後検討の余地がある。

以上のように本論文では、清酒酒質の多様化に資する醸造用酵母の育種原理を考察することを目的とし、清酒酵母に突然変異を誘発し、得られた突然変異株の中から目的形質を有する変異株の育種を行い、得られた変異株の生理的特性解析を行った。すなわち、機能性の観点から GABA 高含有清酒の醸造を可能にする酵母変異株を育種し、その生理的特性を明らかにした。次いで、嗜好性の観点から、低精白米を用いても、吟醸香の主要成分である酢酸イソアミルを高生産する酵母変異株を育種し、その生理的特性を明らかにした。さらに育種した酢酸イソアミル高生産性酵母変異株より、カプロン酸エチルおよび酢酸イソアミルを高生産する酵母変異株を育種し、その生理的特性を明らかにした。

実醸造に利用するための酵母変異株の育種には、遺伝子組み換え技術を利用することはできないため、目的形質を有する菌株同士の交雑法もしくは突然変異株の中から目的とする形質を有する酵母変異株を選抜する方法が広く利用されている。後者の場合、優性の変異を有する酵母変異株は、薬剤耐性などを指標にポジティブスクリーニングにより比較的容易に育種可能であるが、劣性の変異を有する酵母変異株を育種するためには、ネガティブスクリーニングを行う必要がある。すなわち、突然変異株 1 株ずつの表現型を評価する必要があり、手間と時間を有することになる。したがって、目的とする表現型を有する酵母変異株の特性を理解したうえで、最適な選抜方法を選択することが実用酵母育種には不可欠であり、本論文の育種原理は今後の醸造用酵母育種に大いに役立つものと考えられる。

投稿論文目録

- a) **Takahashi, T., Furukawa, A., Hara, S., and Mizoguchi, H.:** Isolation and characterization of sake yeast mutants deficient in γ -aminobutyric acid utilization in sake brewing,
J. Biosci. Bioeng., **97**, 412-418 (2004).
- b) **Takahashi, T., Ohara, Y., Sawatari, M., and Sueno, K.:** Isolation and characterization of sake yeast mutants with enhanced isoamyl acetate productivity,
J. Biosci. Bioeng., **123**, 71-77 (2017).
- c) **Takahashi, T., Ohara, Y., and Sueno, K.:** Breeding of a sake yeast mutant with enhanced ethyl caproate productivity in sake brewing using rice milled at a high polishing ratio,
J. Biosci. Bioeng., <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2017.01.014> (in press).

謝 辞

本論文をまとめるに際し、ご懇篤なるご指導、ご激励を賜りました立命館大学大学院 生命科学研究科 若山 守教授に心から感謝の意を表します。

また、有益な御助言を賜りました立命館大学大学院 生命科学研究科 三原久明教授、笠原賢洋教授、並びに常に暖かい励ましをいただきました学生時代の恩師である立命館大学 生命科学部 立木 隆名誉教授に心から感謝の意を表します。

著者に対して暖かい励ましとご指導をいただきました、岩手大学 下飯 仁教授、奈良先端科学技術大学院大学 渡辺大輔助教に心より感謝いたします。

本研究を進めるにあたり、その機会を与えていただきました菊正宗酒造株式会社 嘉納毅人代表取締役社長、岡本英輔前常務取締役、末野和男常務取締役、並びに終始ご指導、ご鞭撻いただきました菊正宗酒造株式会社 元常務取締役 原 昌道博士、古川彰久元取締役総合研究所長、元執行役員総合研究所長 溝口晴彦博士、元菊正宗酒造株式会社 古川恵司博士に深く感謝いたします。

本研究の共同研究者である元菊正宗酒造株式会社 杉本紗代氏、並びに菊正宗酒造株式会社 猿渡通代氏、大原佑介氏ほか、菊正宗酒造株式会社 総合研究所の皆様にご感謝いたします。