

下面発酵ビール酵母の不安定性と
低温増殖不良原因遺伝子に関する研究

2010 年

山岸 裕美

目次

	頁
第1章 序論	1
第2章 下面発酵ビール酵母の染色体構造の解明	10
第1節 緒言	11
第2節 材料及び方法	13
第3節 結果	17
1. 下面発酵ビール酵母に含まれる <i>S. bayanus</i> 第14番染色体について	17
2. 下面発酵ビール酵母に含まれる <i>S. bayanus</i> 第12番染色体について	18
3. 下面発酵ビール酵母に含まれる <i>S. bayanus</i> 第8番染色体及び第9番染色体について	18
4. 下面発酵ビール酵母の染色体構造について	20
第4節 考察	25
第3章 下面発酵ビール酵母低温増殖不良株の単離と表現型解析	27
第1節 緒言	28
第2節 材料及び方法	29
第3節 結果	31
1. 下面発酵ビール酵母 NBRC2003 単離株の発酵能	31
2. 低温増殖不良株の表現型解析	31
3. 低温増殖不良と高温耐性の相関について	32
4. その他の下面発酵ビール酵母高温耐性株の低温増殖能について	33
5. 高温耐性を利用した低温増殖不良株存在率	34
第4節 考察	45

	頁
第4章 <i>S. cerevisiae</i> 実験室酵母における低温増殖不良原因遺伝子のクローニング	47
第1節 緒言	48
第2節 材料及び方法	50
第3節 結果	57
1. <i>S. cerevisiae</i> 実験室酵母高温耐性株の単離及び表現型解析	57
2. <i>S. cerevisiae</i> 遺伝子ライブラリーの低温増殖不良株への形質転換及び原因遺伝子の同定	57
3. <i>KEX2</i> 破壊株の造成及び表現型解析	58
4. 高温耐性株の <i>KEX2</i> 相補試験	58
5. 破壊株の形態	59
第4節 考察	69
第5章 下面発酵ビール酵母の <i>KEX2</i> 遺伝子破壊株の造成及び表現型解析	72
第1節 緒言	73
第2節 材料及び方法	74
第3節 結果	79
1. 下面発酵ビール酵母 <i>S. cerevisiae</i> -type- <i>KEX2</i> 遺伝子破壊株及び <i>S. bayanus</i> -type- <i>KEX2</i> 遺伝子破壊株の造成	79
2. 下面発酵ビール酵母 <i>S. cerevisiae</i> -type- <i>KEX2</i> 遺伝子破壊株及び <i>S. bayanus</i> -type- <i>KEX2</i> 遺伝子破壊株の表現型解析	79
第4節 考察	89
第6章 総括及び今後の展望	91
参考文献	95
原著論文	100

	頁
関連論文	100
特許	100
謝辞	101

第 1 章

序論

ビールの歴史は今から 7000 年前にさかのぼる (原田 1990)。しかし、ビール酵母の発見はそれからかなり遅れ、1680 年にレーヴェンフックがビール中の酵母を顕微鏡で観察し、1876 年にパストゥールが「ビールの研究」(斉藤 1995)で酵母によって発酵が行われビールができることを実証したことに始まる。ビールの歴史の中で当初から使われていた酵母は、発酵後期に上面に浮き低温を好まない上面発酵ビール酵母で、1883 年 Hansen によりイギリスの醸造場から単離され *Saccharomyces cerevisiae* と命名された。一方下面発酵ビール酵母は、1908 年 Hansen によりデンマークの Carlsberg 醸造場から発酵後期にタンク底に沈む酵母として単離され、*Saccharomyces carlsbergensis* Hansen var. *carlsbergensis* と命名された。下面発酵ビール酵母は、ビール醸造においては約 100 年という歴史の浅い酵母であるが、この 100 年の間に世界に広がり、現在各地で下面発酵ビール酵母として使用されるようになった。この年月と使用された環境の違いにより性状の違う酵母が選択され品質の違う多くのビールが作られるようになった。現在の日本のビールのほとんどはこの下面発酵ビール酵母によって生産されている。

以上のように、下面発酵ビール酵母は現在では最もポピュラーなビールを生産する酵母である。しかし、その分類学上の位置付けは、分類学書 THE YEASTS A TAXONOMIC STUDY の版が改訂されるたびに変わるほど混沌としていた (Fig. 1)。第 1 版 (Lodder and Kreger-van Rij 1952) では下面発酵ビール酵母は *S. carlsbergensis* に分類された。その後、第 2 版 (Lodder 1970) ではメルビオース資化性のある *S. uvarum* に分類され、接合能を分類の大きな要素と考えた第 3 版 (Kreger-van Rij 1984) では *S. cerevisiae* に分類された。しかし、DNA 相同性を推定すると、第 3 版の *S. cerevisiae* には低い相同性を示すグループが含まれていることがわかった (Fig. 2) (Martini and Martini 1987)。そこで更に第 4 版 (Kurtzman and Fell 1998) では孢子発芽性や DNA 相同性の検討により *S. pastorianus* に分類され、現在に至っている。分類とは、その時代の科学的知見に裏付けられた分類基準により属種が定まり、その後に個々がどの属種に含まれるかを当てはめていくものである。下面発酵ビール酵母の分類も同様で、

Saccharomyces carlsbergensis Hansen var. *carlsbergensis* がその時代の分類基準によりどの属種に含まれるかによって決まってきた。

加えて下面発酵ビール酵母の分類学的な変遷に大きく影響したのは、その染色体構造の複雑さである。パルスフィールド電気泳動技術 (Casey *et al.* 1988, Takata *et al.* 1989) や *S. cerevisiae* 全ゲノム配列の公開 (*Saccharomyces* Genome Database) により、混沌とした分類が少しずつクリアになってきた。下面発酵ビール酵母の研究は、*S. cerevisiae* 実験室酵母の知見を参考に行われ (Watari *et al.* 1994, Fujii *et al.* 1994)、徐々に *S. cerevisiae* 実験室酵母とは違った下面発酵ビール酵母特有の性質も明らかになってきた。下面発酵ビール酵母の香気生成に関わる遺伝子 *ATF1* (alcohol acetyltransferase) に関して、*S. cerevisiae* タイプの *ATF1* 遺伝子の他に下面発酵ビール酵母特有の *Lg-ATF1* 遺伝子が存在することが報告されている (Fujii *et al.* 1996)。また凝集に関わる *FLO1* 遺伝子に関して *S. cerevisiae* タイプの *FLO1* 遺伝子の他に下面発酵ビール酵母特有の *Lg-FLO1* 遺伝子が存在すると報告されている (Kobayashi *et al.* 1998)。私は、第 1 章において、下面発酵ビール酵母の染色体構造の解明を行い、*S. pastorianus* に分類される下面発酵ビール酵母が *S. cerevisiae* と *S. bayanus* の交雑体であることを染色体構造の面から明らかにした。その後、*S. cerevisiae* 実験室酵母に遅れて下面発酵ビール酵母の全ゲノム配列が解読され、下面発酵ビール酵母に含まれる *S. cerevisiae* タイプと *S. bayanus* タイプの両遺伝子の配列が公開された (Nakao *et al.* 2009)。従って、下面発酵ビール酵母は、*S. cerevisiae* 由来の染色体と *S. bayanus* 由来の染色体の両方を併せ持っている。このことは、現在の下面発酵ビール酵母の分類学的な位置づけを裏付けるものである。

ビール醸造において酵母は、麦汁中の糖を発酵してエタノールを生成する他に、麦汁中の成分を取り込み代謝して香気成分や有機酸などのビールの香味成分を生成し、一方で硫化水素などの不快臭を生成したり、アミノ酸や糖を取り込み残してその結果ビールの香味を作り出し、ビールの香味に直接影響するという重要な役割を担っている。また、下面発酵ビール酵母のハンドリングの面で重要な性質としては凝集性があげられる。下面発酵ビール酵母は発酵後期にタンク内で凝集

して沈降する。ビール醸造では、この沈降した酵母をタンク底から回収して次の発酵に用いる、ということを繰り返し行う (Fig. 3)。酵母の凝集沈降するという自然の能力を生かすことにより機械的に酵母を回収することなく、また酵母を再利用することにより時間や設備の面からも効率的なハンドリングを行っている。更に、下面発酵ビール酵母の重要な性質としては、低温での増殖能があげられる。ビール醸造における発酵工程では、麦汁に添加された酵母は低温 (10 前後) で糖を利用して増殖し、その後、糖を発酵させてエタノールを生成する。この低温での増殖及び発酵能の違いは、エタノールの生成量や残糖量による香味、発酵日数など、ビールの品質と生産効率に影響するため、ビール醸造にとっては極めて重要な性質である。このような下面発酵ビール酵母の重要な性質のわずかな違いやバリエーションが、香味の大きな違いとなってビールを差別化し、またハンドリングの違いとなって生産効率に影響を及ぼしている。ビール醸造においてこれらの重要な性質が安定していることは、特徴的な同じ香味のビールを再現よく効率的に生産するために極めて重要なことである。

しかし、下面発酵ビール酵母の染色体構造や、ビール醸造における下面発酵ビール酵母のハンドリングが原因で下面発酵ビール酵母の性質が不安定となることがある。下面発酵ビール酵母の不安定性に関しては、いくつかの原因が考えられる。1つは、下面発酵ビール酵母の重要な特性をコードする遺伝子の構造である。麦汁中に約 6% 含まれるマルトースを資化する特性は下面発酵ビール酵母にとって重要な特性である。そのマルトース資化性に関する *MAL* 遺伝子は染色体の端に位置し (Charron and Michels 1988)、繰り返し配列を持つため (Bell *et al.* 1997)、欠失が起こりやすくマルトース資化性が不安定になることが報告されている。前述したように、ビール醸造では発酵終了時に凝集して沈降した酵母を回収し次の発酵に用いることから、凝集性は重要な特性である。この凝集性に関しても、繰り返し配列の存在による不安定性が報告されている (Watari *et al.* 1994, Sato *et al.* 2001)。凝集性を失った下面発酵ビール酵母が *S. cerevisiae* 由来第 VIII 番染色体の一部を欠失していること (Jibiki *et al.* 2001) や、凝集性に関連する *FLO* 遺伝子の繰り返し配列部分が欠失し繰り返し回数が減った酵母は凝集

性が劣ること (Ogata *et al.* 2008) も報告されている。このように下面発酵ビール酵母の重要な特性をコードする *MAL* 遺伝子の染色体上の位置や繰り返し配列、*FLO* 遺伝子の繰り返し配列が、これらの性質の不安定性の原因になっている。下面発酵ビール酵母の不安定性の原因の 2 つめとしては、複雑な染色体構造が考えられる。前述のように、下面発酵ビール酵母は *S. cerevisiae* タイプ染色体と *S. bayanus* タイプ染色体の両遺伝子染色体を基本的には 2 セットずつ持っている 4 倍体である。通常は一つの遺伝子に対して *S. cerevisiae* 由来の 2 アレル及び *S. bayanus* 由来の 2 アレルを保有していることになる。同じ遺伝子が複数存在し、その相同性が約 70% であることは、部分的な欠失や組み換えを起こす原因となり、性質が変化する可能性がある。更に、以上のように性状が変化した酵母の存在率を高める要因として、ビール醸造における酵母のハンドリングがあげられる。下面発酵ビール酵母は、発酵が終了したタンク底から回収され次の発酵に使用するというように、繰り返し長期に使用される。この繰り返し長期使用が性状変化した酵母を出現させ、性状が変化した酵母を含んだまま更に長期使用することにより性状変化した酵母の含有率を高めてしまう可能性がある。以上のように、下面発酵ビール酵母は、遺伝子の不安定性、複雑な染色体構造に加えて、長期繰り返し使用というハンドリングからも、性状が変化した酵母が出現しそのまま使用していると健全な発酵を行えなくなることがある。従って、性状の変化した酵母を早い時期に検出すること、及び性状の変化が起こりにくい安定な酵母を選択することが重要である。

本研究では、下面発酵ビール酵母の重要な特性である低温増殖能について詳細な解析を行い、低温増殖能が劣る酵母を早期に検出する技術の開発を行った。また、下面発酵ビール酵母の染色体構造を考慮して低温増殖不良酵母の原因遺伝子の解明を行った。下面発酵ビール酵母の遺伝子を解析する際に考慮しなければならないのは、下面発酵ビール酵母が *S. cerevisiae* タイプと *S. bayanus* タイプの両遺伝子を 2 セットずつ保有し、それらの遺伝子の相同性は約 70% であることである。従って、一つ一つの遺伝子に対し、両タイプの遺伝子が機能しているのか、どちらか一方が機能しているのかを見極める必要がある。破壊株によって遺伝子

機能を調べるためには、両タイプ各々を破壊した株を作製し解析しなければならない。このような観点から私は、下面発酵ビール酵母低温増殖不良原因遺伝子の解析を *S. cerevisiae* タイプと *S. bayanus* タイプの両遺伝子について行った。

本論文では、まず、下面発酵ビール酵母の特性について遺伝的アプローチを行うために下面発酵ビール酵母の染色体構造を解明した結果を第 2 章において述べる。更に、第 3 章では、下面発酵ビール酵母の不安定な性質の一つである低温増殖不良について、低温増殖不良株と低温増殖優良株を単離して性質を比較した。また、低温増殖不良株と低温増殖優良株の性質の違いから開発した簡易で有効な低温増殖不良株検出方法を述べる。第 4 章では、近縁種である *S. cerevisiae* 実験室酵母においても同様の現象を確認し、*S. cerevisiae* 実験室酵母の低温増殖不良株を利用して、*S. cerevisiae* 遺伝子ライブラリーから原因遺伝子 *KEX2* をクローニングした。第 5 章では、下面発酵ビール酵母の低温増殖不良原因遺伝子を同定するために、染色体構造を考慮して、*S. cerevisiae*-type-*KEX2* と *S. bayanus*-type-*KEX2* の両遺伝子について破壊株を作成し、これら遺伝子と低温増殖不良との関係を明らかにした。本論文は、下面発酵ビール酵母の特徴的な染色体構造を考慮した上で、下面発酵ビール酵母の特性の 1 つである低温増殖能に関する原因遺伝子を同定し、その不安定性について考察したものである。



Fig. 1 下面発酵ビール酵母の分類の変遷

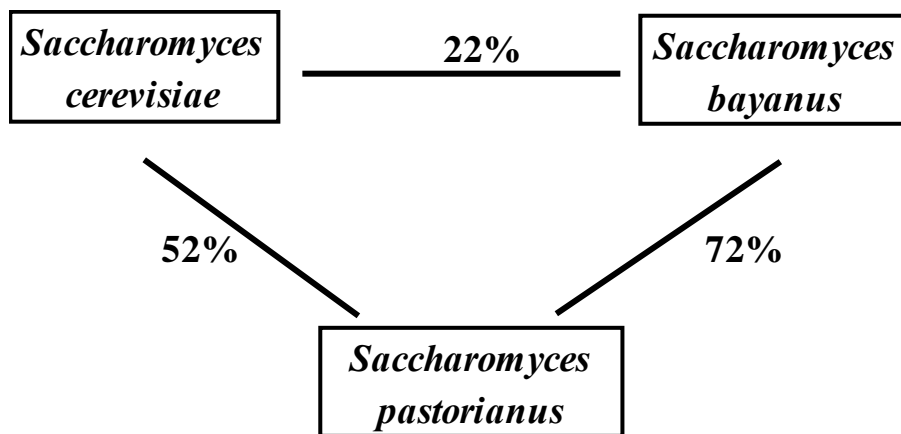


Fig. 2 DNA relatedness among *Saccharomyces sensu stricto*. The extent of DNA reassociation was determined spectrophotometrically (Martini and Martini 1987).

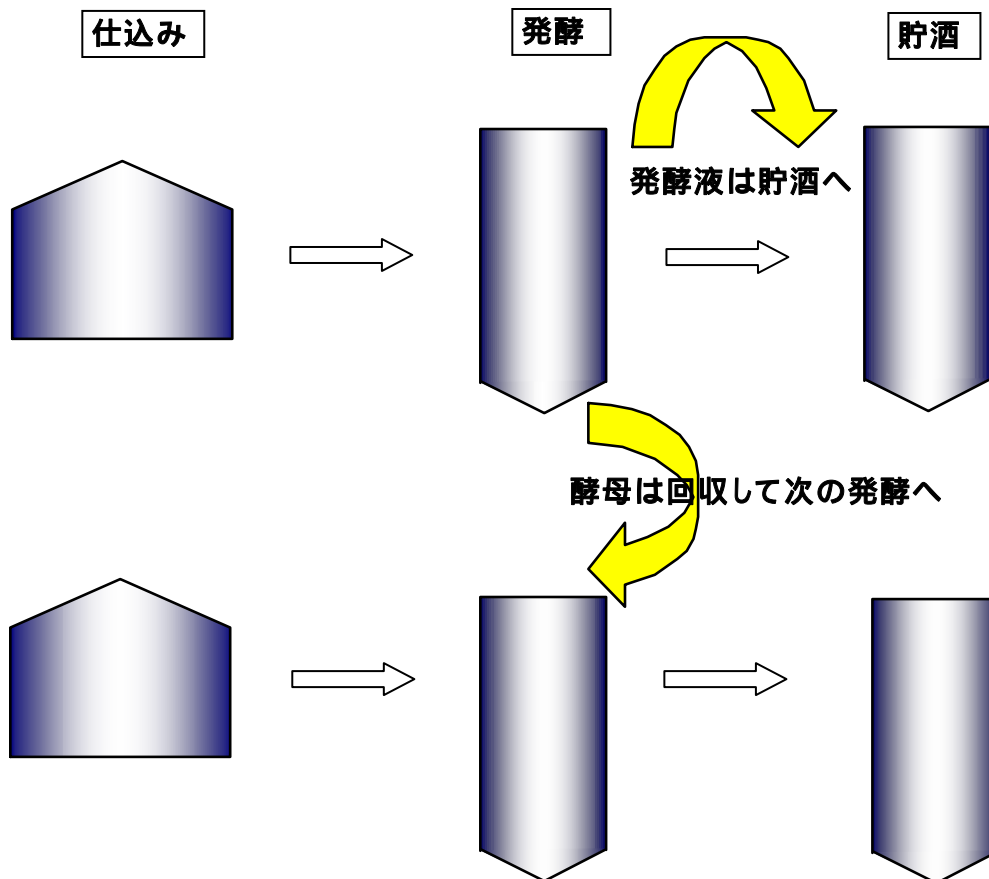


Fig. 3 ビールの醸造工程

第 2 章

下面発酵ビール酵母の染色体構造の解明

第 1 節 緒言

下面発酵ビール酵母の遺伝子に関する研究は、近縁種である *S. cerevisiae* 実験室酵母の知見を参考に行われてきたが、下面発酵ビール酵母特有な性質に関する研究はそれでは不十分であった。その原因の一つとして下面発酵ビール酵母の複雑な染色体構造があげられる。本研究に着手した当初、下面発酵ビール酵母の染色体は、実験室酵母と比較してその数が多く完全な同定がなされていなかった。従って、下面発酵ビール酵母の遺伝子に関する研究を行うためには、*S. cerevisiae* と同様の遺伝子を対象にするだけでは不十分であり、保有するすべての遺伝子を対象とする必要があった。その後、パルスフィールド電気泳動の技術開発及び酵母の染色体分離条件の開発 (Casey *et al.* 1988, Takata *et al.* 1989) が行われ、ビール酵母やその他の実用酵母に関して染色体レベルでの研究が行えるようになった。Martini らは、DNA 相同性により下面発酵ビール酵母は *S. cerevisiae* と *S. bayanus* の交雑体である *S. pastorianus* に分類されると報告している (Martini and Martini 1987)。また、Ryu らは *S. bayanus* の染色体の一部は *S. cerevisiae* の染色体が組み換わったキメラ構造をとっていることを報告している (Fig. 4) (Ryu *et al.* 1996, Ryu *et al.* 1998)。なお、*S. bayanus* の染色体番号は *S. cerevisiae* の染色体番号と区別して算用数字で表す。これらの報告を利用すると、下面発酵ビール酵母に含まれていると推定される *S. cerevisiae* 由来染色体と *S. bayanus* 由来染色体を、染色体とその代表遺伝子とのサザンハイブリダイゼーションにより容易に区別することができる。本章ではパルスフィールド電気泳動及びサザンハイブリダイゼーションを行うことにより、下面発酵ビール酵母の染色体の同定を行い下面発酵ビール酵母の染色体の構造を明らかにした。

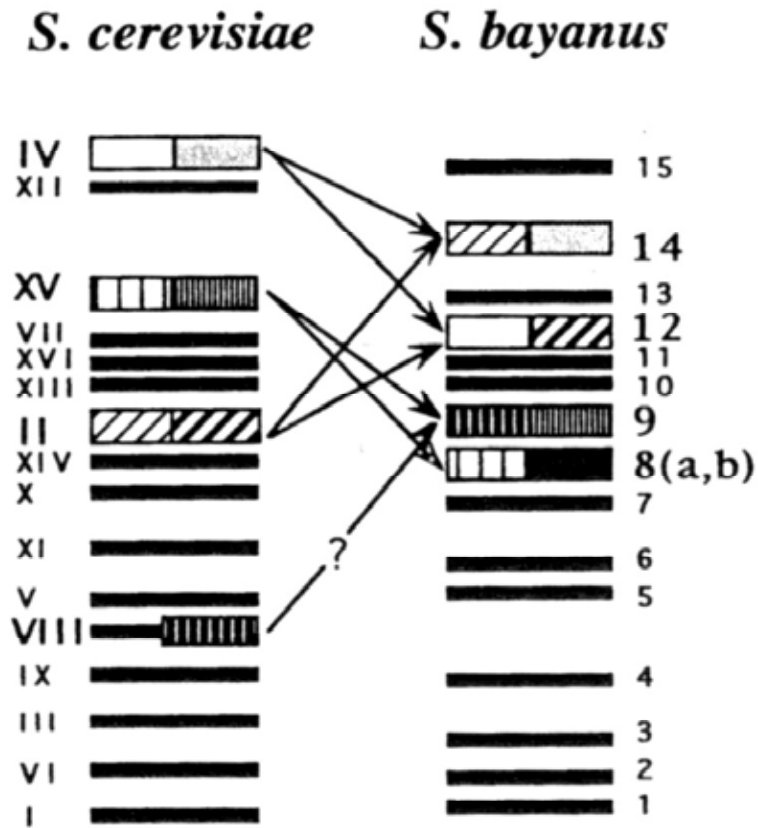


Fig. 4 Chromosomal structures of *S. cerevisiae* and *S. bayanus*.

Bars and boxes indicate chromosomes. Rearrangement of *S. cerevisiae* chromosomes to *S. bayanus* chromosomes are indicated by arrows.

(Ryu *et al.* 1996)

第 2 節 材料及び方法

1. 菌株

試験に用いた菌株を Table 1 に示す。

2. 培地

酵母の培養には YPD 培地 (1% yeast extract, 2% Bacto peptone, 2% Glucose) を用いた。寒天培地の場合は、2% 寒天を加えた。

3. パルスフィールドゲル電気泳動

試料は、Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA) のプロトコールにより調整した。パルスフィールドゲル電気泳動は、CHEF DR chiller system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) を用いて行った。

4. DNA の調整

酵母 DNA を 10-min DNA preparation method (Kaiser *et al.* 2000) により単離した。Southern hybridization に用いる DNA プローブは、目的遺伝子の ORF 内を増幅できるようにプライマーを設計し Polymerase chain reaction (PCR) により増幅した。PCR は Gene Amp PCR System 2400 (Perkin-Elmer Norwalk, CT, USA) を用い以下の PCR 条件により行った。

step1: 94 2 min, step2: 92 1 min, step3: 50 1 min, step4: 72 2 min,
step5 : step2-4 29 cycles, step6 : 75 10 min, step7 : maintain at 4

増幅した DNA 断片は、GeneClean Kit (BIO 101, Lajolla, CA, USA) によって精製した。増幅した遺伝子領域、PCR のプライマーシーケンス、*S. cerevisiae* 及び *S. bayanus* の染色体上における位置を Table 2 に示す。

5. Southern hybridization

パルスフィールドゲル電気泳動後、ゲルを 0.25M HCl につけて 15 分間振とう

し、変性及び中和した後、プロトコールに従って hybond N⁺ nylon membrane (Amersham Pharmacia Buckinghamshire, UK)に DNA を転写した。プローブ DNA をラベルし、ハイブリダイズ後、membrane を洗淨した。ハイブリダイズしたプローブ DNA をプロトコールに従って enhanced chemiluminescence (ECL) direct nucleic acid labeling and detection system (Amersham Pharmacia Buckinghamshire, UK) により検出した。

Table 1 Yeast strains

strains	species	Source and remarks
X2180-1A	<i>S. cerevisiae</i>	from the Yeast Genetic Stock Center
TF1	<i>S. cerevisiae</i>	Top fermenting yeast from our own stock
BF1	<i>S. pastorianus</i>	Bottom fermenting yeast from our own stock
BF2	<i>S. pastorianus</i>	Bottom fermenting yeast from our own stock
CBS 1513	<i>S. carlsbergensis</i>	Type strain of <i>S. carlsbergensis</i> , Carlsbergensis bottom fermenting yeast No.1
NBRC 2003	<i>S. pastorianus</i>	Bottom fermenting yeast, used in München brewery
CBS 1538	<i>S. pastorianus</i>	Type strain of <i>S. pastorianus</i>
CBS 1503	<i>S. monacensis</i>	Type strain of <i>S. monacensis</i>
Sb-5	<i>S. bayanus</i>	Spore clone isolated from <i>S. bayanus</i> CBS 380, type strain of <i>S. bayanus</i> (Kaneko and Banno 1991)

Table 2 DNA probe

Gene	Sequences of the primers for PCR	<i>S. cerevisiae</i> chromosome	<i>S. bayanus</i> chromosome*
<i>PKC1</i>	ATGAGTTTTTCAACAATTGGA TCATAAATCCAAATCATCTG	II	14
<i>HIR1</i>	ATGAAAGTGGTAAAGTTTCC TTATTTATATAACGACCAAC	II	14
<i>PDC2</i>	ATGCTTTCCATTTCAGCAAAG CTAAAAAAGCCTGTGTTAC	IV	14
<i>RAD9</i>	ATGTCAGGCCAGTTAGTTCA TCATCTAACCTCAGAAATAG	IV	14
<i>PDX3</i>	ATGAGCGGTGAATTAGCAAA TCATGGGGCTAGTCTAACGA	II	12
<i>CDC28</i>	ATGAGCGGTGAATTAGCAAA TTATGATTCTTGGAAGTAGG	II	12
<i>STE7</i>	ATGTTTCAACGAAAGACTTT TCAATGGGTTGATCTTTCCG	IV	12
<i>THI3</i>	ATGAATTCTAGCTATACACA TCAGTATCCAACCTTGATTTT	IV	12
<i>GCD1</i>	ATGTCAATTCAGGCTTTTGT TTAACGCTCAAATAATCCGT	XV	9
<i>IRA2</i>	ATGTCCCAGCCCCTAAGAA CTAAGCAGAACATGACATCC	XV	8
<i>GUT1</i>	ATGTTTCCCTCTCTCTCCG TTATTGGAAGTTTTCTAGAA	VIII	9
<i>ARG4</i>	ATGTCAGACGGCACTCAAAA CTAATTTAATTGGGATTTCA	VIII	8
<i>CEN12</i>	TTGCATAATTCATCTCATTTTTGATCTTACTTC GATCAAAAGGGCGGTTCGAGTGTGAGTACCTC	XII	
<i>CDC5</i>	ATGTCGTTGGGTCTCTTAA TTAATCTACGGTAACAATTG	XIII	
<i>GAL4</i>	ATGAAGCTACTGTCTTCTAT TTACTCTTTTTTTGGGTTTG	XVI	
<i>URA1</i>	ATGACAGCCAGTTTAACTAC AAATGCTGTTCAACTTCC	XI	
<i>CAP2</i>	ATGTCTGATGCTCAATTCA CTATAAAGACTGTAAACCTC	IX	

*The location of *S. bayanus* homologous genes are deduced from Ryu et al.'s report (Ryu *et al.* 1996) and our observations.

第 3 節 結果

1. 下面発酵ビール酵母に含まれる *S. bayanus* 第 14 番染色体について

Ryu らは、パルスフィールドゲル電気泳動とサザンハイブリダイゼーションにより、*S. bayanus* 第 14 番染色体が、*S. cerevisiae* 第 II 番染色体左腕及び第 IV 番染色体右腕に由来するキメラ構造をとっていることを報告している (Ryu *et al.* 1996) (Fig. 5a)。このことを手がかりに、私は、下面発酵ビール酵母の染色体構造を調べた。*S. cerevisiae* 実験室酵母 (X2180-1A)、上面発酵ビール酵母 (TF1)、下面発酵ビール酵母 4 株 (BF1、BF2、*S. carlsbergensis* CBS 1513、*S. pastorianus* NBRC 2003)、*S. bayanus* (Sb-5)、*S. monacensis* CBS 1503 について、パルスフィールドゲル電気泳動及びサザンハイブリダイゼーションを行った。*S. cerevisiae* 第 II 番染色体左腕に位置する *PKC1* 遺伝子 (Fig. 5b) 及び *HIR1* 遺伝子 (Fig. 5c) の ORF をプローブとして用いた場合、*S. cerevisiae* 実験室酵母 (レーン 1) 及び上面発酵ビール酵母 (レーン 2) は、*S. cerevisiae* 第 II 番染色体とハイブリダイズし、*S. bayanus* (レーン 7) は、*S. bayanus* 第 14 番染色体とハイブリダイズした。一方、下面発酵ビール酵母 4 株 (レーン 3-6) はいずれも、*S. cerevisiae* 第 II 番染色体と同サイズ及び *S. bayanus* 第 14 番染色体と同サイズの染色体 2 本にハイブリダイズした。このことから、下面発酵ビール酵母はいずれも *S. cerevisiae* 第 II 番染色体及び *S. bayanus* 第 14 番染色体を持っていると推定された。同様に、*S. cerevisiae* 第 IV 番染色体右腕に位置する *PDC2* 遺伝子 (Fig. 5d) 及び *RAD9* 遺伝子 (Fig. 5e) の ORF をプローブとして用いた場合、*S. cerevisiae* 実験室酵母 (レーン 1) 及び上面発酵ビール酵母 (レーン 2) は、*S. cerevisiae* 第 IV 番染色体とハイブリダイズし、*S. bayanus* (レーン 7) は、*S. bayanus* 第 14 番染色体とハイブリダイズした。一方、下面発酵ビール酵母 4 株 (レーン 3-6) はいずれも、*S. cerevisiae* 第 IV 番染色体と同サイズ及び *S. bayanus* 第 14 番染色体と同サイズの染色体 2 本にハイブリダイズした。このことから、下面発酵ビール酵母はいずれも *S. cerevisiae* 第 IV 番染色体及び *S. bayanus* 第 14 番染色体を持っていると推定された。

2. 下面発酵ビール酵母に含まれる *S. bayanus* 第 12 番染色体について

Ryu らは、*S. bayanus* 第 12 番染色体が、*S. cerevisiae* 第 IV 番染色体左腕及び第 II 番染色体右腕に由来するキメラ構造をとっていることを報告している (Ryu *et al.* 1996) (Fig. 6a)。このことを手がかりに、私は、下面発酵ビール酵母の染色体構造を調べた。*S. cerevisiae* 第 II 番染色体右腕に位置する *CDC28* 遺伝子 (Fig. 6b) 及び *PDX3* 遺伝子 (Fig. 6c) の ORF をプローブとして用いた場合、*S. cerevisiae* 実験室酵母 (レーン 1) 及び上面発酵ビール酵母 (レーン 2) は、*S. cerevisiae* 第 II 番染色体とハイブリダイズし、*S. bayanus* (レーン 7) は、*S. bayanus* 第 12 番染色体とハイブリダイズした。一方、下面発酵ビール酵母 4 株 (レーン 3-6) はいずれも、*S. cerevisiae* 第 II 番染色体と同サイズ及び *S. bayanus* 第 12 番染色体と同サイズの染色体 2 本にハイブリダイズした。このことから、下面発酵ビール酵母はいずれも *S. cerevisiae* 第 II 番染色体及び *S. bayanus* 第 12 番染色体を持っていると推定された。同様に、*S. cerevisiae* 第 IV 番染色体左腕に位置する *STE7* 遺伝子 (Fig. 6d) 及び *THI3* 遺伝子 (Fig. 6e) の ORF をプローブとして用いた場合、*S. cerevisiae* 実験室酵母 (レーン 1) 及び上面発酵ビール酵母 (レーン 2) は、*S. cerevisiae* 第 IV 番染色体とハイブリダイズし、*S. bayanus* (レーン 7) は、*S. bayanus* 第 12 番染色体とハイブリダイズした。一方、下面発酵ビール酵母 4 株 (レーン 3-6) はいずれも、*S. cerevisiae* 第 IV 番染色体と同サイズ及び *S. bayanus* 第 12 番染色体と同サイズの染色体 2 本にハイブリダイズした。このことから、下面発酵ビール酵母はいずれも *S. cerevisiae* 第 IV 番染色体及び *S. bayanus* 第 12 番染色体を持っていると推定された。

3. 下面発酵ビール酵母に含まれる *S. bayanus* 第 8 番染色体及び第 9 番染色体について

Ryu らは、*S. bayanus* 第 8 番染色体が、*S. cerevisiae* 第 XV 番染色体左腕及び第 VIII 番染色体右腕に由来するキメラ構造を、*S. bayanus* 第 9 番染色体が、*S. cerevisiae* 第 VIII 番染色体左腕及び第 XV 番染色体右腕に由来するキメラ構

造をとっていることを報告している (Ryu *et al.* 1996) (Fig. 7a)。このことを手がかりに、私は、下面発酵ビール酵母の染色体構造を調べた。*S. cerevisiae* 第 XV 番染色体右腕に位置する *GCD1* 遺伝子 (Fig. 7b) の ORF をプローブとして用いた場合、*S. cerevisiae* 実験室酵母 (レーン 1) 及び上面発酵ビール酵母 (レーン 2) は、*S. cerevisiae* 第 XV 番染色体とハイブリダイズし、*S. bayanus* (レーン 7) は、*S. bayanus* 第 9 番染色体とハイブリダイズした。一方、下面発酵ビール酵母 4 株 (レーン 3-6) はいずれも、*S. cerevisiae* 第 XV 番染色体と同サイズ及び *S. bayanus* 第 9 番染色体と同サイズの染色体にハイブリダイズした。このことから、下面発酵ビール酵母はいずれも *S. cerevisiae* 第 XV 番染色体及び *S. bayanus* 第 9 番染色体を持っていると推定された。*S. cerevisiae* 第 XV 番染色体左腕に位置する *IRA2* 遺伝子 (Fig. 7c) の ORF をプローブとして用いた場合、*S. cerevisiae* 実験室酵母 (レーン 1) 及び上面発酵ビール酵母 (レーン 2) は、*S. cerevisiae* 第 XV 番染色体とハイブリダイズし、*S. bayanus* (レーン 7) は、*S. bayanus* 第 8 番染色体とハイブリダイズした。一方、下面発酵ビール酵母 4 株 (レーン 3-6) はいずれも、*S. cerevisiae* 第 XV 番染色体と同サイズ及び *S. bayanus* 第 8 番染色体と同サイズの染色体にハイブリダイズした。このことから、下面発酵ビール酵母はいずれも *S. cerevisiae* 第 XV 番染色体及び *S. bayanus* 第 8 番染色体を持っていると推定された。*S. cerevisiae* 第 VIII 番染色体右腕に位置する *ARG4* 遺伝子 (Fig. 7d) の ORF をプローブとして用いた場合、*S. cerevisiae* 実験室酵母 (レーン 1) 及び上面発酵ビール酵母 (レーン 2) は、*S. cerevisiae* 第 VIII 番染色体とハイブリダイズし、*S. bayanus* (レーン 7) は、*S. bayanus* 第 8 番染色体とハイブリダイズした。一方、下面発酵ビール酵母 4 株 (レーン 3-6) はいずれも、*S. cerevisiae* 第 VIII 番染色体と同サイズ及び *S. bayanus* 第 8 番染色体と同サイズの染色体 2 本にハイブリダイズした。このことから、下面発酵ビール酵母はいずれも *S. cerevisiae* 第 VIII 番染色体及び *S. bayanus* 第 8 番染色体を持っていると推定された。更に、*S. cerevisiae* 第 VIII 番染色体左腕に位置する *GUT1* 遺伝子 (Fig. 7e) の ORF をプローブとして用いた場合、*S. cerevisiae* 実験室酵母 (レーン 1) 及び上面発酵ビール酵母 (レーン 2) は、*S. cerevisiae* 第

VIII 番染色体とハイブリダイズし、*S. bayanus*(レーン 7) は、*S. bayanus* 第 9 番染色体とハイブリダイズした。一方、下面発酵ビール酵母 4 株(レーン 3-6) はいずれも、*S. cerevisiae* 第 VIII 番染色体と同サイズ及び *S. bayanus* 第 9 番染色体と同サイズの染色体 2 本にハイブリダイズした。このことから、下面発酵ビール酵母はいずれも *S. cerevisiae* 第 VIII 番染色体及び *S. bayanus* 第 9 番染色体を持っていると推定された。

4. 下面発酵ビール酵母の染色体構造について

下面発酵ビール酵母 BF1 について、パルスフィールド電気泳動を行い、*S. cerevisiae* 実験室酵母の各染色体に位置する遺伝子の ORF をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションをおこなった結果をまとめて Fig. 8 に示す。下面発酵ビール酵母のパルスフィールド電気泳動では、*S. cerevisiae* 実験室酵母より多い染色体が検出される(レーン 1)。ハイブリダイゼーションの結果から、*S. cerevisiae* 実験室酵母と同サイズの染色体がそれぞれ同定され(レーン 2-11)、更に *S. cerevisiae* 実験室酵母の染色体と比較してキメラ構造をとっている *S. bayanus* 染色体と同サイズの染色体が同定された(レーン 3,4,8,10)。この結果から、下面発酵ビール酵母の染色体には、*S. cerevisiae* 実験室酵母に由来する染色体がすべて含まれ、更に *S. bayanus* に由来する染色体も含まれていることが明らかになった。

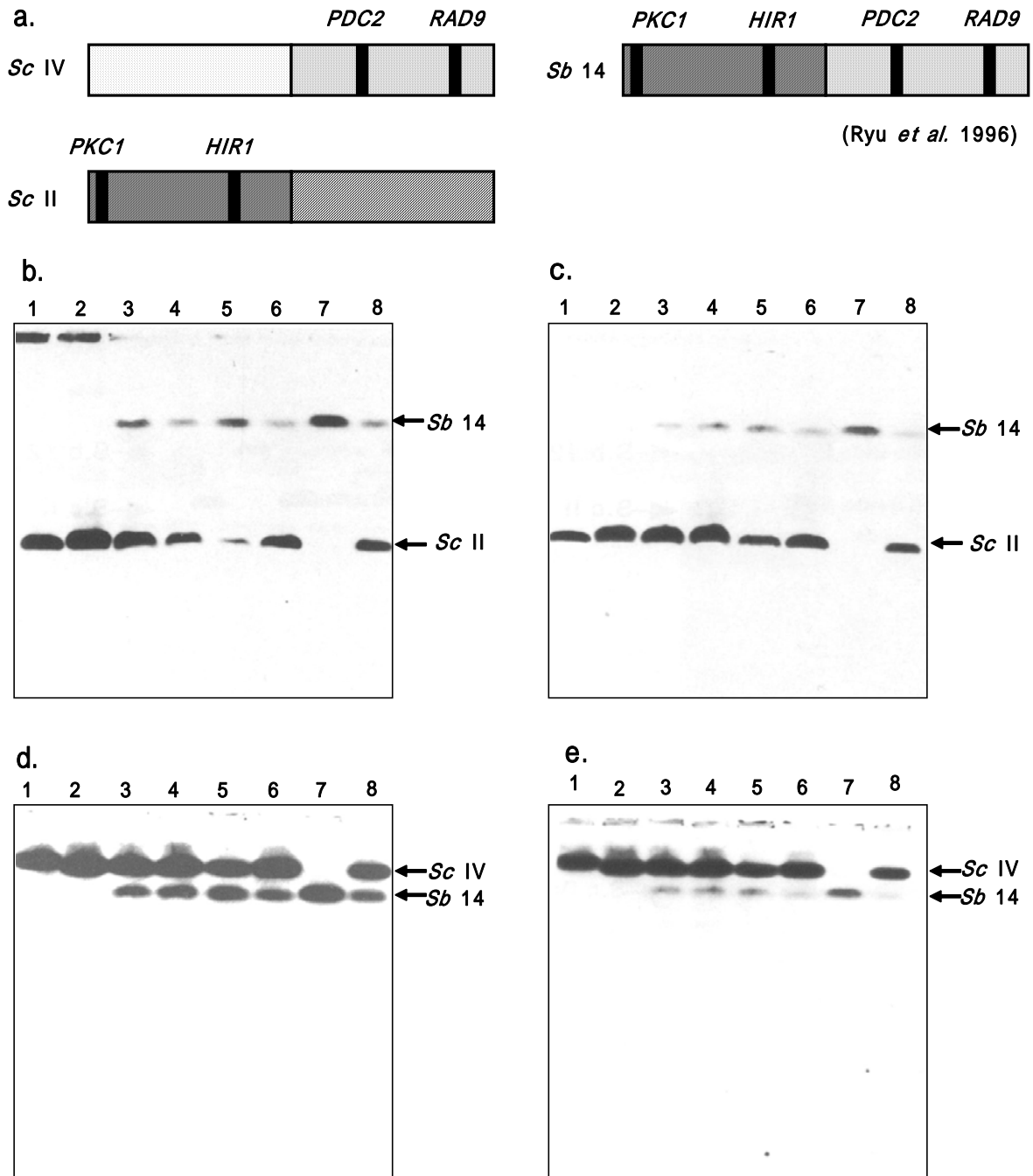


Fig. 5 Chromosomal assignment of bottom-fermenting brewer's yeasts with four genes located on *S. cerevisiae* chromosomes II and IV, and their homologous genes located on *S. bayanus* chromosome 14.

a. Chromosomal structures of *S. cerevisiae* chromosomes II and IV, and *S. bayanus* chromosome 14.

Southern hybridization was performed using *S. cerevisiae* *PKC1* gene (b), *HIR1* gene (c), *PDC2* gene (d), *RAD9* gene (e) as the probe. Lane 1, *S. cerevisiae* X2180-1A; lane 2, Brewing Yeast TF1; lane 3, Brewing Yeast BF1; lane 4, Brewing Yeast BF2; lane 5, *S. carlsbergensis* CBS 1513; lane 6, *S. pastorianus* NBRC 2003; lane 7, *S. bayanus* Sb-5; lane 8, *S. monacensis* CBS 1503.

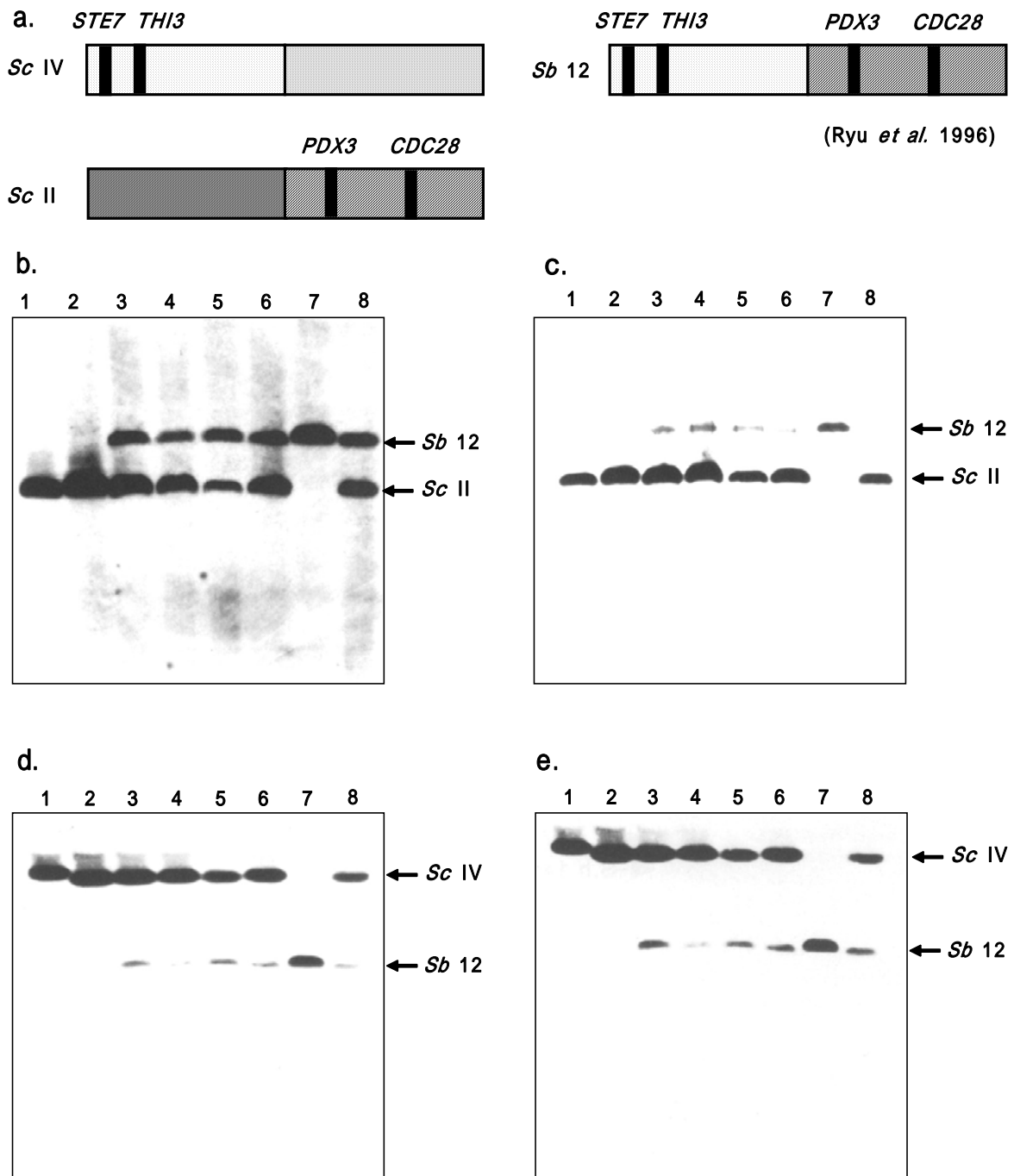


Fig. 6 Chromosomal assignment of bottom-fermenting brewer's yeasts with four genes located on *S. cerevisiae* chromosomes II and IV, and their homologous genes located on *S. bayanus* chromosome 12.

a. Chromosomal structures of *S. cerevisiae* chromosomes II and IV, and *S. bayanus* chromosome 12.

Southern hybridization was performed using *S. cerevisiae* *CDC28* gene (b), *PDX3* gene (c), *STE7* gene (d), *THI3* gene (e) as the probe. Lane 1, *S. cerevisiae* X2180-1A; lane 2, Brewing Yeast TF1; lane 3, Brewing Yeast BF1; lane 4, Brewing Yeast BF2; lane 5, *S. carlsbergensis* CBS 1513; lane 6, *S. pastorianus* NBRC 2003; lane 7, *S. bayanus* Sb-5; lane 8, *S. monacensis* CBS 1503.

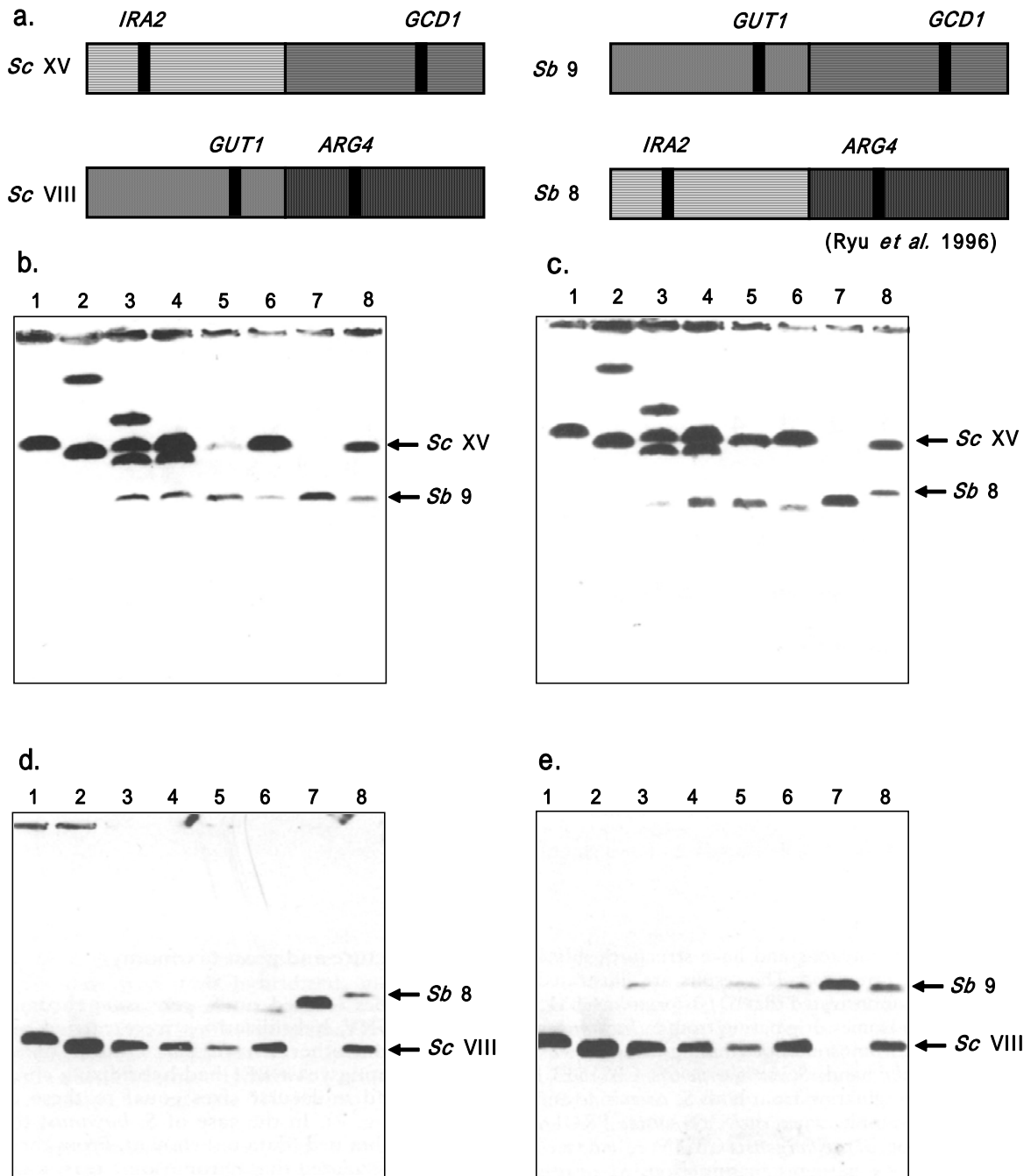


Fig. 7 Chromosomal assignment of bottom-fermenting brewer's yeasts with four genes located on *S. cerevisiae* chromosomes XV and VIII, and their homologous genes located on *S. bayanus* chromosome 8 and 9.

a. Chromosomal structures of *S. cerevisiae* chromosomes XV and VIII, and *S. bayanus* chromosome 8 and 9.

Southern hybridization was performed using *S. cerevisiae* *GCD1* gene (b), *IRA2* gene (c), *ARG4* gene (d), *GUT1* gene (e) as the probe. Lane 1, *S. cerevisiae* X2180-1A; lane 2, Brewing Yeast TF1; lane 3, Brewing Yeast BF1; lane 4, Brewing Yeast BF2; lane 5, *S. carlsbergensis* CBS 1513; lane 6, *S. pastorianus* NBRC 2003; lane 7, *S. bayanus* Sb-5; lane 8, *S. monacensis* CBS 1503.

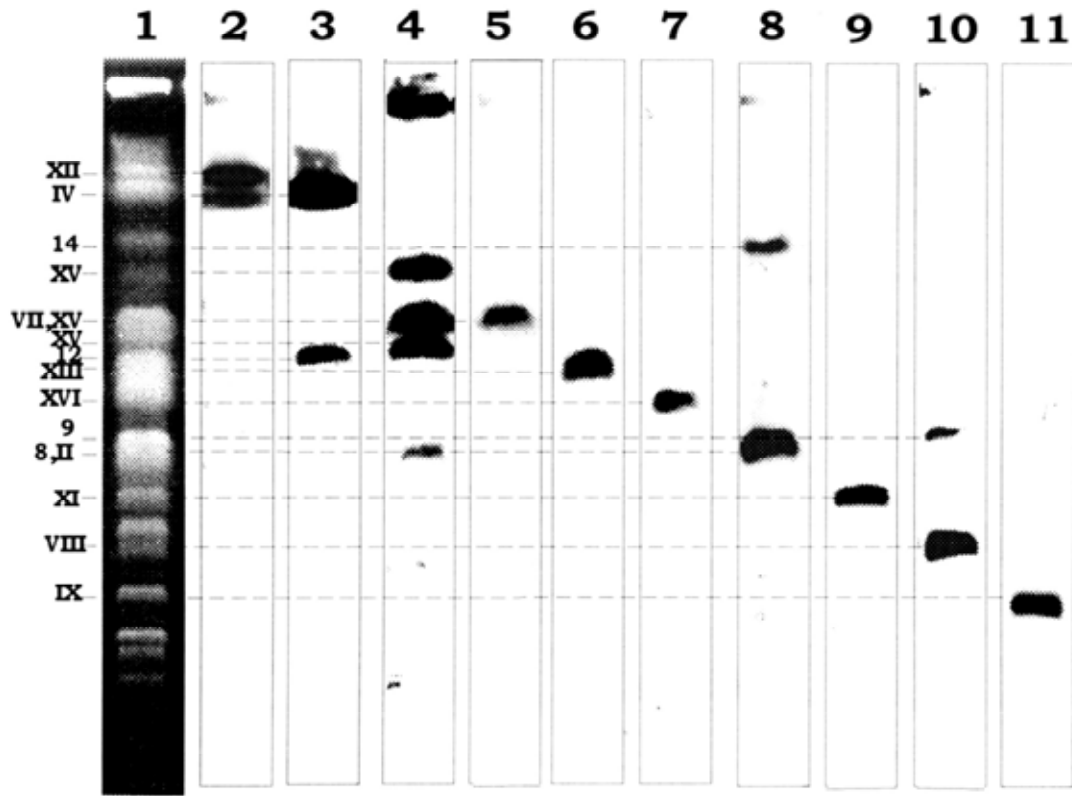


Fig. 8 Chromosomal assignment of bottom-fermenting brewer's yeasts BF1.

Electric karyotype (lane 1) and hybridization patterns with *CEN12* (lane 2), *THI3* (lane 3), *IRA2* (lane 4), *TRP5* (lane 5), *CDC5* (lane 6), *GAL4* (lane 7), *PKC1* (lane 8), *URA1* (lane 9), *GUT1* (lane 10) and *CAP2* (lane 11), as probes.

第 4 節 考察

本研究により、下面発酵ビール酵母は、DNA 相同性のみならず染色体構造においても *S. cerevisiae* と *S. bayanus* の交雑体であると推定された。Ryu らが報告していた *S. bayanus* 染色体のキメラ構造 (Ryu *et al.* 1996, Ryu *et al.* 1998) は、下面発酵ビール酵母中の *S. bayanus* 由来染色体の構造でも確認された。すなわち、*S. cerevisiae* と *S. bayanus* は共通の祖先を有していたが、その後染色体の一部がキメラ構造化したものが出現し、*S. cerevisiae* から *S. bayanus* が分化した。その後、*S. cerevisiae* と *S. bayanus* が交雑して下面発酵ビール酵母の属する *S. pastorianus* が出現したと考えられる。これは、下面発酵ビール酵母中に *S. cerevisiae* 由来染色体とキメラ構造をそのまま維持した *S. bayanus* 由来染色体が含まれることから推察される。また、上面発酵ビール酵母は *S. cerevisiae* に分類されているが、染色体構造からも *S. cerevisiae* 由来の染色体のみ持っていることから、矛盾がないことを確認した。

本研究では、下面発酵ビール酵母は、*S. cerevisiae* 由来染色体及び *S. bayanus* 由来染色体の両方を持っていることが染色体レベルで明らかになった。その後 2009 年に Nakao らは下面発酵ビール酵母の全ゲノム配列を公開し (Nakao *et al.* 2009)、下面発酵ビール酵母には *S. cerevisiae* 実験室酵母と 100% 近い相同性を持つ配列のゲノムと 70% 前後のゲノムが含まれていることを示し、ゲノム配列からも両菌種由来の染色体を持っていることが明らかとなっている。これらの結果から、ビール醸造において重要な遺伝子についての研究を行う際には、*S. cerevisiae* 由来遺伝子及び *S. bayanus* 由来遺伝子を解析する必要性が明らかとなった。また、それまでわかっていなかった下面発酵ビール酵母の染色体構造や遺伝子情報を得ることができるようになった。以下に、下面発酵ビール酵母の遺伝子について *S. cerevisiae* タイプの遺伝子と *S. bayanus* タイプの遺伝子を区別して研究した例を示す。

Fujii ら及び Yoshimoto らは、下面発酵ビール酵母には *S. cerevisiae* タイプの alcohol acetyltransferase 遺伝子 (*ATF1* 遺伝子) の他に、75.7% の相同性を持

つ別の遺伝子 *Lg-ATF1* 遺伝子が存在することを明らかにした (Fujii *et al.* 1996, Yoshimoto *et al.* 1998)。 *Lg-ATF1* 遺伝子はその後の下面発酵ビール酵母ゲノム解析 (Nakao *et al.* 2009) の結果から *S. bayanus* タイプの *ATF1* 遺伝子と考えられる。その後、Verstrepen らは、下面発酵ビール酵母で *ATF1* 遺伝子及び *Lg-ATF1* 遺伝子を高発現させることによりそれぞれの遺伝子の機能を解析し、 *Lg-ATF1* 遺伝子高発現株より *ATF1* 遺伝子高発現株の方が酢酸エステルの生成が高くなることを示した (Verstrepen *et al.* 2003)。

Kodama らは、下面発酵ビール酵母には、 *S. cerevisiae* タイプの Branched-Chain Amino Acid Permease 遺伝子 (*BAP2* 遺伝子) の他に、88% の相同性を持つ *S. bayanus* タイプの遺伝子 *Lg-BAP2* が存在することを報告している (Kodama *et al.* 2001)。 *Lg-BAP2* 遺伝子の転写はロイシンの添加により誘導されず、エタノール及び有機酸の存在によって抑制され、 *BAP2* 遺伝子とは違う制御を受けていることを報告している。

Iijima らは、下面発酵ビール酵母の *S. cerevisiae* タイプの亜硫酸排出に関わる遺伝子 (*Sc-SSU1* 遺伝子) と *S. bayanus* タイプの *Sb-SSU1* 遺伝子についてセルフクローニングにより高発現株を造成した (Iijima and Ogata 2010)。 *Sc-SSU1* 遺伝子高発現株及び *Sb-SSU1* 遺伝子高発現株のいずれも、親株に比べて発酵液中の亜硫酸濃度が高くなった。一方、S系臭の原因となる硫化水素、3-メチル-2-ブチル-1-チオール (MBT) 及び 2-メルカプト-3-メチル-1-ブタノール (2M3MB) の濃度は親株に比べて低くなった。

以上のように、下面発酵ビール酵母の研究において、 *S. cerevisiae* タイプの遺伝子のみ解析されていた時代から、 *S. cerevisiae* タイプの遺伝子及び *S. bayanus* タイプの両遺伝子を解析される時代が変わり、含まれるすべての遺伝子について解析することが可能となった。これにより、これまで解析しきれなかった下面発酵ビール酵母の特性について、更に解析が進むことが期待される。

第 3 章

下面発酵ビール酵母低温増殖不良株の単離と表現型解析

第1節 緒言

ビール醸造では、発酵を終了した酵母を回収して次の発酵に用いるということを繰り返し行うため、酵母を長期に使用する。この過程では、性状が変化した酵母が出現する可能性があるが、回収酵母中に性状変化した酵母が含まれていても、それらは単離して除外されることなくそのまま使用される。この性状変化は、出現頻度が低いとビール品質に大きな影響を及ぼさないが、繰り返し使用することにより性状変化した酵母の割合が多くなり、ビール品質に影響を及ぼす懸念がある。従って、ビール品質に影響が出るくらい多い存在割合になる前に、性状の変化した酵母を早期に検出することが重要である。また、性状の変化した酵母を出現させない条件、出現しても繰り返し使用するうちに淘汰されるような条件を見出すこと、更に、性状の変化がおこりにくい安定な酵母を選択することが、ビール醸造において重要である。

下面発酵ビール酵母の重要かつ変化しやすい特性として低温増殖能があげられる。同品質のビールを醸造する上では、低温増殖能が劣る酵母が出現することは脅威となる。低温増殖不良を示す酵母が含まれていると、麦汁エキス低下速度が遅延して発酵プロセスに時間がかかり、またそれに伴う香味の変化が生じる懸念がある。しかし、ビール醸造では、稀ではあるが性状が変化して低温増殖能が劣った酵母が出現することが経験的に知られている。低温増殖能を評価する方法としては、フラスコスケールで低温増殖及び発酵させたときの酵母数やエキスの低下を測定する方法があるが、時間がかかる上に実際にビール工場で起きている現象を必ずしも再現できているとはいえない。低温増殖能の正確で簡易で迅速な評価方法の確立は急務である。

本研究では、まず、下面発酵ビール酵母から低温増殖能が優れた酵母と劣った酵母を単離し、両株の性状を比較した。その結果、高温生育性に差異が認められ、この性質を利用することにより、簡易で確実な発酵能が劣った酵母の検出が可能になったので報告する。

第 2 節 材料及び方法

1. 菌株

試験に用いた菌株を Table 3 に示す。

2. 培地

酵母の培養には YPD 培地 (1% Yeast extract, 2% Bacto peptone, 2% Gulcose)、YPM 培地 (1% yeast extract, 2% Bacto peptone, 2% Maltose)、YPM 6 培地 (1% yeast extract, 2% Bacto peptone, 6% Maltose) を用いた。寒天培地の場合は、2% 寒天を加えた。

3. Colony-forming ability

酵母懸濁液を水で適当な濃度に希釈して YPM 寒天培地に表面塗沫し、25 で 3 日間培養した。33-35 の高温で培養する場合は、シャーレを 150 mm × 250 mm のプラスチック製の袋に入れてシールし、温度コントロールされた水槽に沈めて 1 週間培養した。各温度で生育したコロニー数を測定し、25 で生育したコロニー数を 100% として、各温度におけるコロニー生育率を算出した。

4. 液体培地での増殖

YPM 液体培地で 25 1 日培養した酵母を 10 ml YPM 液体培地に一定量植菌し、各温度で培養して吸光度 (OD₆₆₀) を測定した。

5. 発酵試験

発酵は 2 L の麦汁を用いて 15 で行い、DA-510 density/specific gravity meter (Kyoto Electronics, Japan) で外観エキスを測定した。

Table 3 Yeast strains

strains	species	Source and remarks
NBRC 2003	<i>S. pastorianus</i>	Bottom fermenting yeast, used in München brewery
NBRC 2003-H1 to H7	<i>S. pastorianus</i>	High-temperature-resistant variants from NBRC 2003
NBRC 2003-L1 to L6	<i>S. pastorianus</i>	Control strains from NBRC 2003
BF1	<i>S. pastorianus</i>	Bottom fermenting yeast from our own stock
BF1-H1 to H7	<i>S. pastorianus</i>	High-temperature-resistant variants from BF1
BF1-L1	<i>S. pastorianus</i>	Control strain from BF1
BF2	<i>S. pastorianus</i>	Bottom fermenting yeast from our own stock
BF2-H1 to H7	<i>S. pastorianus</i>	High-temperature-resistant variants from BF2
BF2-L1	<i>S. pastorianus</i>	Control strain from BF2

第 3 節 結果

1. 下面発酵ビール酵母 NBRC 2003 単離株の発酵能

下面発酵ビール酵母 NBRC 2003 は麦汁でよく発酵し、一般的な香味のビールを生産する酵母である。NBRC 2003 の低温増殖能の不安定性について解析するために、低温増殖能の優れた株と劣った株の単離を試みた。NBRC 2003 を YPM 液体培地で繰り返し培養した培養液を適当に希釈後 YPM 寒天培地に塗抹して 25℃ で培養し、増殖の速い株 2 株 (NBRC 2003-L2, L3) と遅い株 2 株 (NBRC 2003-H1, H2) を単離した。これら単離株について、麦汁を用いた低温増殖・発酵試験を行った。その結果、NBRC 2003-L2, L3 は麦汁のエキス低下速度が速く、NBRC 2003-H1, H2 はエキス低下速度が遅かった (Fig. 9)。単離された株は低温でのエキス低下が劣る株であることが明らかとなったので、今後これらの株を低温増殖能の解析に用いた。

2. 低温増殖不良株の表現型解析

低温増殖優良株と低温増殖不良株の性質の違いを明らかにし、その性質の違いをもとにタンク中に発生した低温増殖不良株を簡易に検出する方法の開発をおこなった。まず低温増殖優良株 NBRC 2003-L2, L3 及び低温増殖不良株 NBRC 2003-H1, H2 の性状 (培養温度による生育性、培地の pH による生育性、薬剤耐性等) を比較した。その結果、培養温度による生育性に、低温増殖優良株と低温増殖不良株の差異が観察された。各菌株を 25℃、32℃、33℃、34℃、35℃ で培養し、生育したコロニー数を計測した。25℃ 生育コロニー数を 100% として、コロニー形成能 (colony forming ability) を算出し、Fig. 10 に示した。NBRC 2003-L2, L3 は、32℃ までは生育するものの、33℃ 以上では生育が認められなかった。一方、NBRC 2003-H1, H2 は 33℃ 及び 34℃ でも生育が認められ、NBRC 2003-H2 に関しては、34℃ でも 60% のコロニー形成能が認められた。これらの結果から、低温増殖不良を示す NBRC 2003-H1, H2 は、高温耐性があり、高温で培養することによって容易に検出できる可能性が示唆された。

次に、各温度での生育性を液体培養により調べた。各株を 1×10^5 cells/ml となるように YPD 液体培地 10 ml に植菌して 25、33、34 で振とう培養し、経時的に OD₆₆₀ を測定した。その結果、25 では、寒天培地で単離した時と同様に NBRC 2003-L2, L3 は増殖が速く、NBRC 2003-H1, H2 は増殖が遅い結果を示した (Fig. 11a)。一方、33 では逆転して、NBRC 2003-H1, H2 の増殖が速く、NBRC 2003-L2, L3 の増殖が遅い結果を示し (Fig. 11b)、34 では NBRC 2003-H1, H2 は増殖するのに対して NBRC 2003-L2, L3 の増殖はほとんど認められなかった (Fig. 11c)。これらの結果から、NBRC 2003-H1, H2 は低温 (25) では増殖不良を示し、高温 (33-34) では生育できることが明らかとなった。以降の実験では NBRC 2003-H1, H2 を低温増殖不良/高温耐性株、NBRC 2003-L2, L3 を低温増殖優良/高温感受性株と呼ぶ。

3. 低温増殖不良と高温耐性の相関について

NBRC 2003-H1, H2 は低温 (25) では増殖不良を示し、高温 (33-34) 耐性であった。この低温増殖不良と高温耐性の関係について、サンプル数を増やして調べようと考えた。低温増殖に関しては個々の株の液体培養では差異がでて表現型がとらえられるが、集団の中から低温増殖不良株を検出するのはネガティブセレクションとなるため困難である。そこで、プレート培養で表現型をとらえることができポジティブセレクションである高温耐性を利用して、逆に高温耐性株が低温増殖不良を示すかどうかを調べた。NBRC 2003 を YPM 液体培地で繰り返し培養した培養液を適当に希釈後 YPM 寒天培地で高温 (33) 培養し、生育したコロニーを単離した (NBRC 2003-H3-7)。すでに単離されている低温増殖不良/高温耐性株 NBRC 2003-H1, H2 に加えて、高温耐性株 NBRC 2003-H3-H7 を以降の実験に用いた。一方、25 で生育したコロニーを単離し 33 で生育できないことを確認した。すでに単離されている低温増殖優良/高温感受性 NBRC 2003-L2, L3 に加えて、高温感受性株 NBRC 2003-L1, L4-L6 を以降の実験に用いた。単離株を 1×10^5 cells/ml となるように YPM6 液体培地 10 ml に植菌して 25 で振とう培養し、20 時間後の OD₆₆₀ を比較した (Fig. 12)。その結果、高温耐性

株 NBRC 2003-H1-6 はすべて、高温感受性株 NBRC 2003-L1-6 に比べて低温（25℃）での増殖が劣っていた。以上の結果から、高温耐性と低温増殖不良の間には相関が認められた。また、YPD 寒天培地で 25℃ 3日間培養した場合においても、NBRC 2003-L2 に比べて NBRC 2003-H1-7 のコロニーは小さく、増殖が劣っていることが観察された（Fig. 13）。NBRC2003-H1,H2 と同様に NBRC-H3-H7 も低温増殖不良/高温耐性であり、NBRC2003-L2,L3 と同様に NBRC-L1,L4-L6 も低温増殖優良/高温感受性であった。したがって、発酵タンク中に低温増殖不良株が出現した場合、出現頻度が低くても、ポジティブセレクションである高温耐性を利用することにより、低温増殖不良株を簡単に検出できるようになった。

4. その他の下面発酵ビール酵母高温耐性株の低温増殖能について

その他のビール酵母でも高温耐性株が低温増殖不良を示すかどうかを調べた。下面発酵ビール酵母 BF1 及び BF2 について、33℃、34℃、35℃ でのコロニー形成能を比較した。その結果、コロニー形成能は菌株によって差異があった（Fig. 14）。34℃ で培養した場合の BF1 のコロニー形成能は 0.9%、BF2 のコロニー形成能は 7.0%であった。BF1 及び BF2 の 34℃ 生育コロニーから高温耐性株として BF1-H1～BF1-H7 及び BF2-H1～BF2-H7 を単離した。一方、25℃ で生育したコロニー（BF1-L1、BF2-L1）を単離し 34℃ で生育できないことを確認した。これらの単離株について YPM 液体培地で 25℃ 増殖能を調べた。その結果、NBRC 2003 と同様に高温耐性株 BF1-H1～BF1-H7 は高温感受性株 BF1-L1 に比べて 25℃ での増殖能が劣っていた（Fig. 15a）。一方、34℃ では BF1-L1 がわずかに増殖したのに対し、BF1-H1～BF1-H7 はよく増殖した（Fig. 15b）。BF1-L1 は、YPM 寒天培地では 34℃ でコロニーを形成しなかったが、YPM 液体培地ではわずかに増殖した。BF2 についても同様の結果であった（data not shown）。また、YPD 寒天培地で 25℃ 3日間培養した場合においても、BF1-L1 に比べて BF1-H1-7 のコロニーは小さく、増殖が劣っていることが観察された（Fig. 16）。したがって、高温耐性株が低温増殖不良を示すのは下面発酵ビール酵母に共通す

る性質であると考えられた。

高温感受性株 (BF1-L1) と高温耐性株 (BF1-H1 及び BF1-H2) について、麦汁を用い 15 °C での低温増殖・発酵試験を行った。その結果、高温耐性株は高温感受性株に比べてエキス低下が遅延した (Fig. 17)。

5. 高温耐性を利用した低温増殖不良株存在率

頻度が低い場合でも簡単に低温増殖不良株を検出できる本法を、低温増殖不良株の検出に用いた。本法を用いて、培養温度の違いによる低温増殖不良株の出現頻度を調べた。NBRC 2003-L2, L3 を 12 °C、16 °C、18 °C、20 °C、22 °C、24 °C、25 °C で培養した後、YPD 寒天培地に塗抹して 25 °C 及び 33 °C で培養した。生育したコロニー数を計測し、25 °C 生育コロニー数を 100% として、低温増殖不良株の出現頻度を算出した (Fig. 18)。その結果、22 °C 以下の培養では低温増殖不良株はほとんど出現しないが、24 °C 以上の培養により 4% 以下の頻度ではあるが、低温増殖不良株が出現することがわかった。このように、本検出法を用いることにより、わずかの頻度であっても低温増殖不良株の出現しやすい条件を検討したり、発酵タンク中の低温増殖不良株を検出することができるようになった。

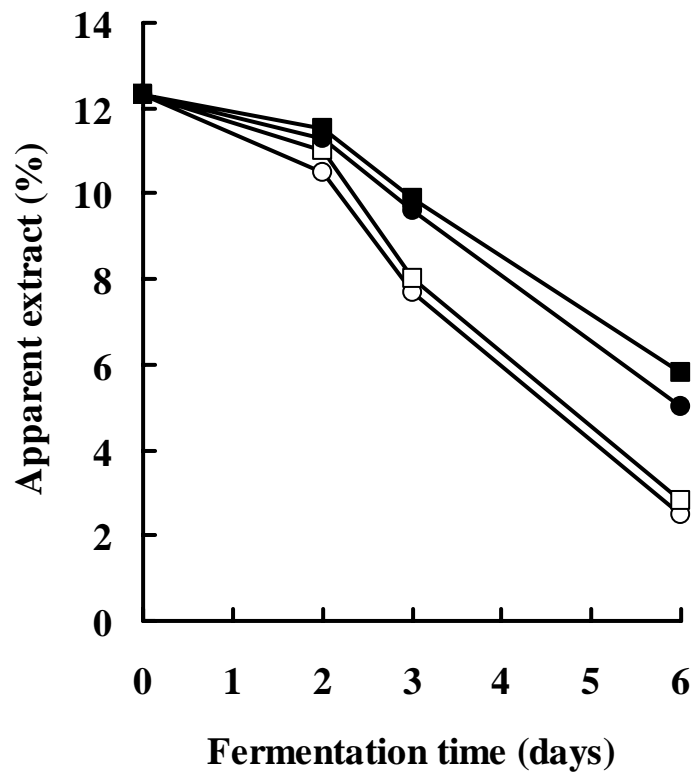


Fig. 9 Fermentation profile of NBRC 2003 variants.

The yeast cells were inoculated into wort to make 1×10^7 cells/ml.

: strain NBRC 2003-L2,

: strain NBRC 2003-L3,

: strain NBRC 2003-H1,

: strain NBRC 2003-H2

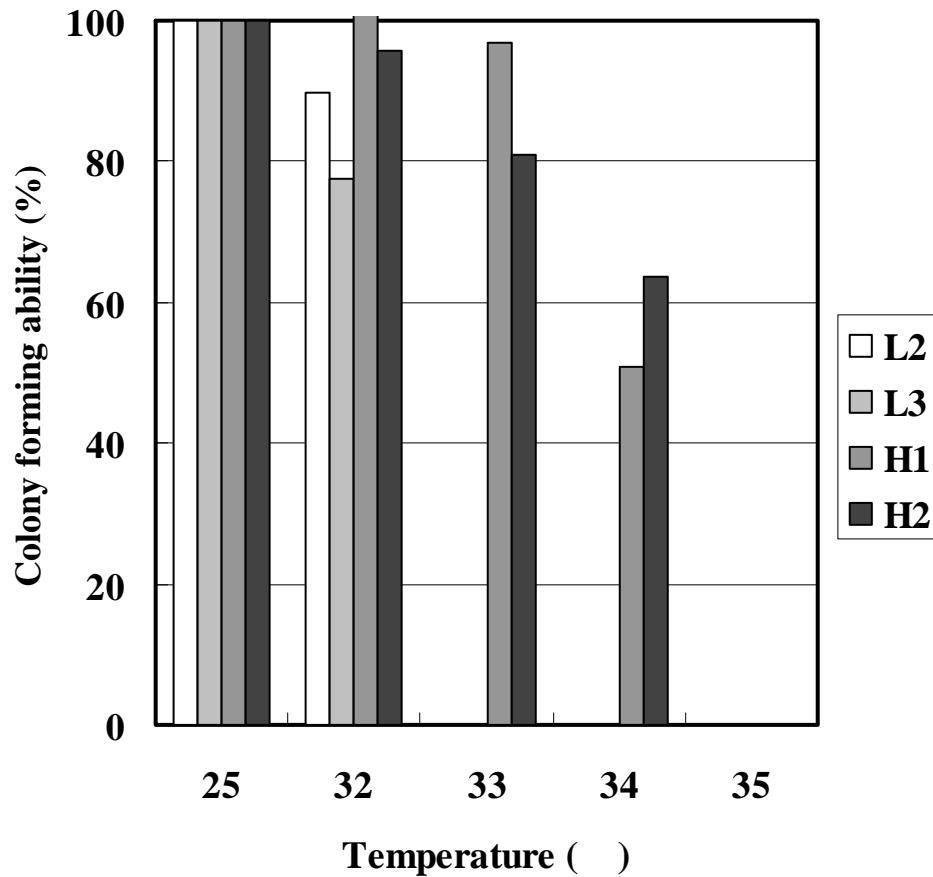


Fig. 10 Colony forming ability of NBRC 2003 variants.

The yeast cells were spread on YPD at 200 cells/plate, incubated at 25 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, and 35 °C for 3 days. To examine temperature-sensitive phenotype with relatively narrow range of the temperature, we always sunk a sealed polyethylene bag (150 mm × 250 mm) with two YPD agar plates in it into a temperature-controlled water bath. The colony forming ability was calculated as colony counts incubated at 25 °C was 100 %.

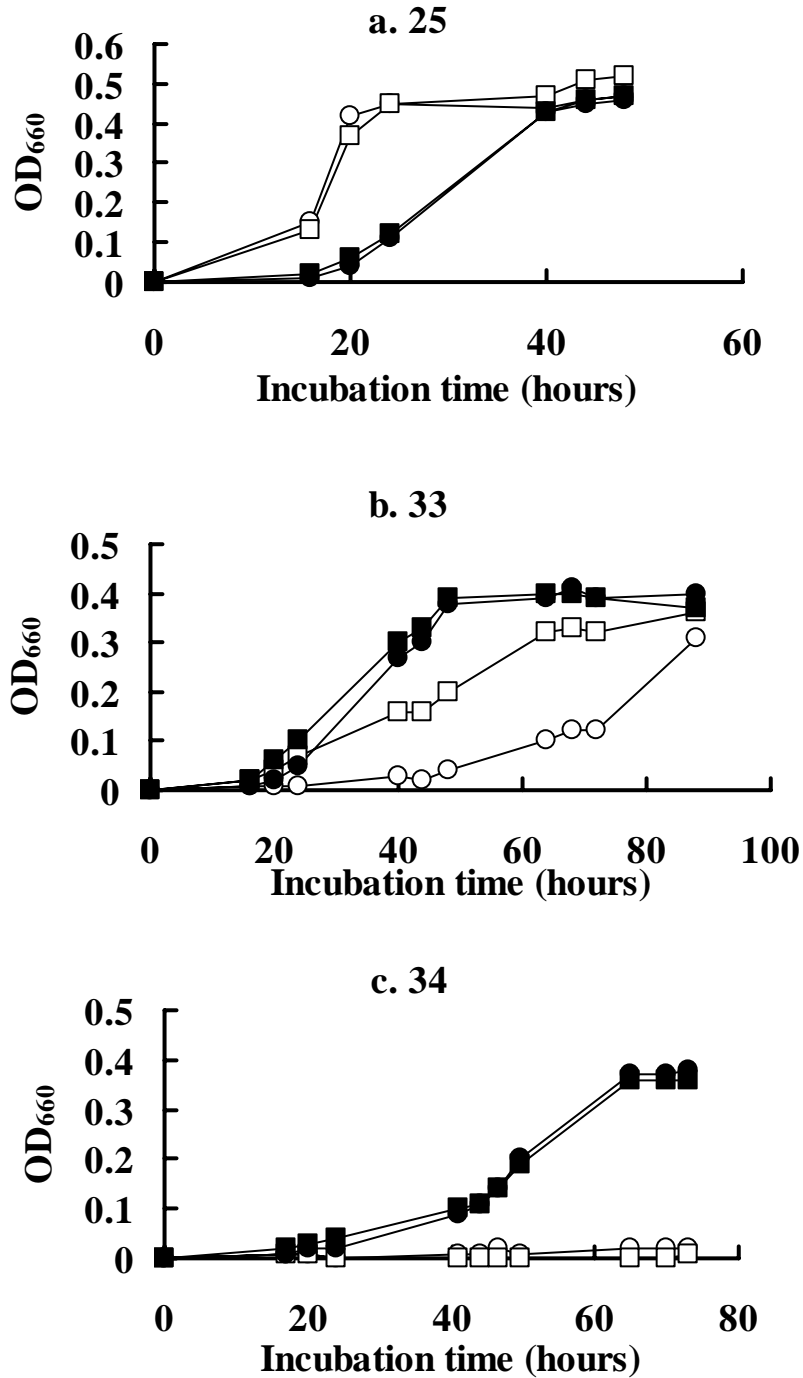


Fig. 11 Growth phenotypes of NBRC 2003 variants.

The yeast cells were inoculated into YPD to make 1×10^5 cells/ml, incubated at 25 (a), 33 (b) and 34 (c) with shaking, and OD₆₆₀ was measured.

■ : strain NBRC 2003-L2,

● : strain NBRC 2003-L3

□ : strain NBRC 2003-H1,

○ : strain NBRC 2003-H2

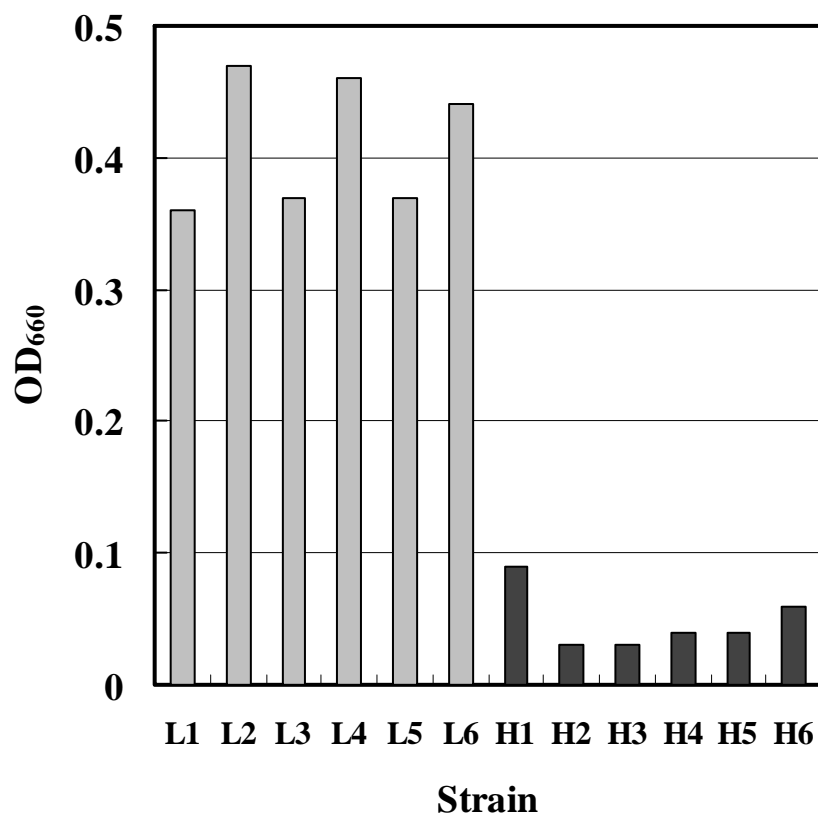


Fig. 12 Growth ability of NBRC 2003 variants at 25 °C.

The yeast cells were grown in YPM and then inoculated in 10 ml YPM 6 to make 1×10^5 cells/ml, incubated at 25 °C for 20 h, and OD₆₆₀ was measured.

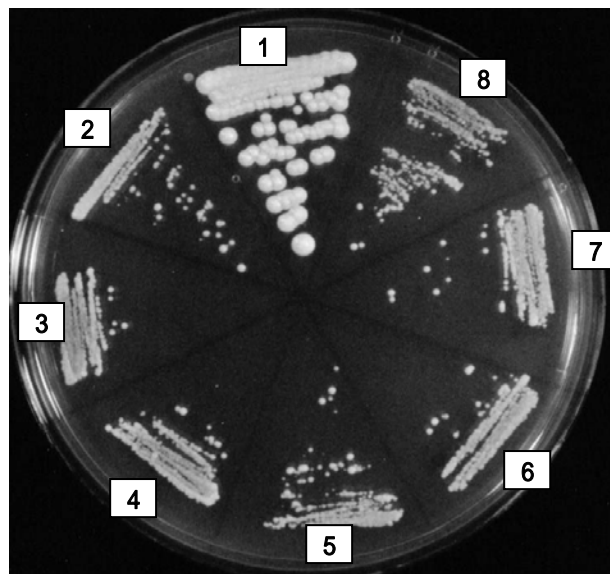


Fig. 13 Growth phenotypes of NBRC 2003 variants at 25 °C.
The yeast cells were streaked onto a YPD plate and incubated at 25 °C. 1, NBRC 2003-L2, 2 ~ 8, NBRC 2003-H1 ~ NBRC 2003-H7

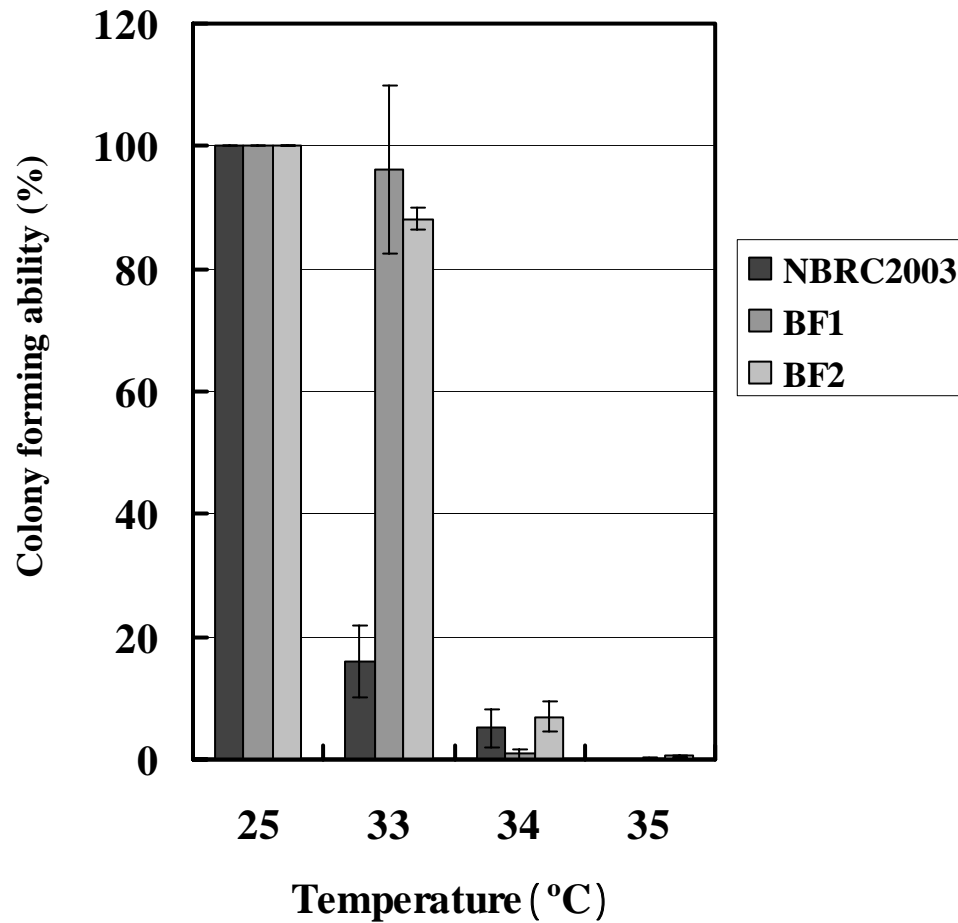


Fig. 14 Colony forming ability of bottom-fermenting brewer's yeast.

Yeast cells were spread on YPM at a density of 200 cells / plate and incubated at 25 °C for 3 days. They were also spread on YPM at a density of 200 or 2,000 cells/plate, and incubated at 33 °C, 34 °C, 35 °C for 1 week; the colonies were then counted. The colony count at 25 °C was considered to be 100%.

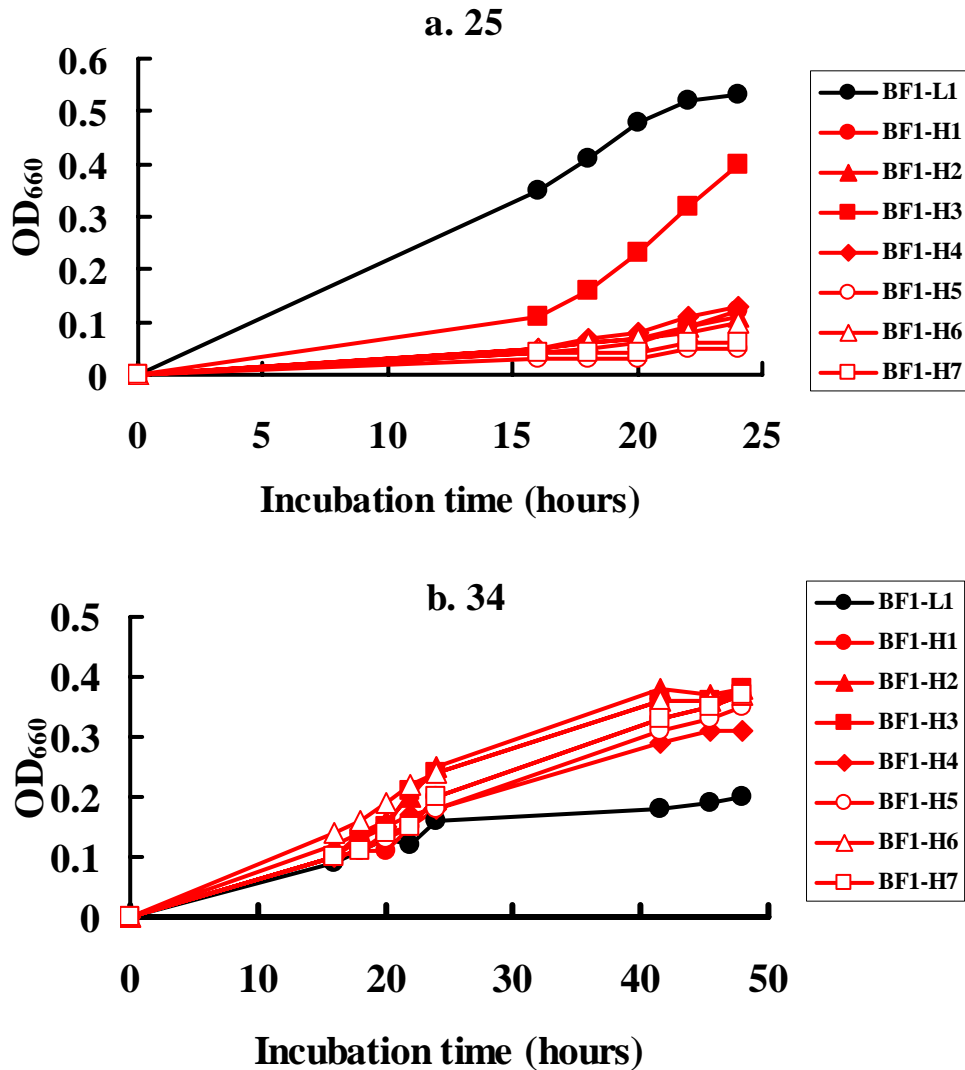


Fig. 15 Growth phenotype of BF1 variants at 25 (a) and 34 (b).

Yeast cells were inoculated into YPM at a density of 2×10^5 cells/ml and incubated at 25°C with shaking; the OD₆₆₀ was then measured (a).

Yeast cells were inoculated into YPM at a density of 5×10^5 cells/ml and incubated at 34°C with shaking; the OD₆₆₀ was then measured (b).

Black symbol, BF1-L1; Red symbols, BF1-H1 ~ BF1-H7.

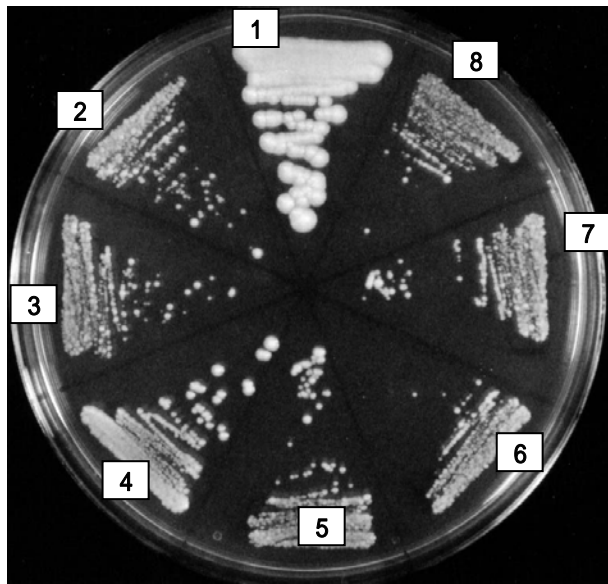


Fig. 16 Growth phenotypes of BF1 variants at 25 °C.

The yeast cells were streaked onto a YPD plate and incubated at 25 °C. 1, BF1-L1, 2 ~ 8, BF1-H1 ~ BF1-H7

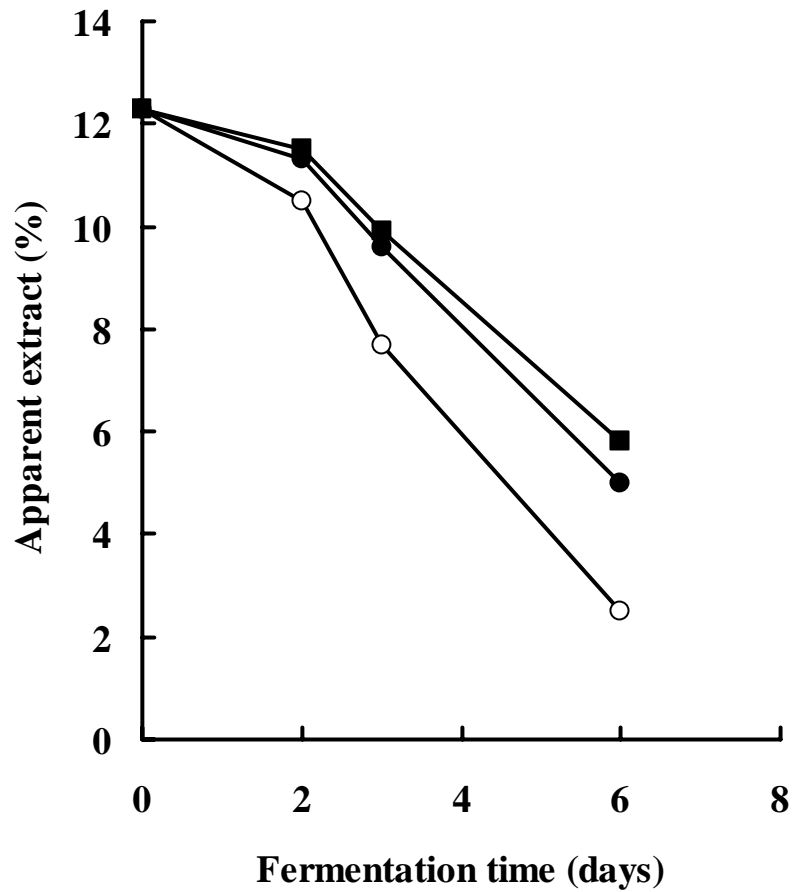


Fig. 17 Fermentation profiles of BF1 variants.

Yeast cells were inoculated into wort at a density of 2×10^7 cells/ml, and apparent extract was measured. \circ , BF1-L1; \bullet , BF1-H1; \blacksquare , BF1-H2.

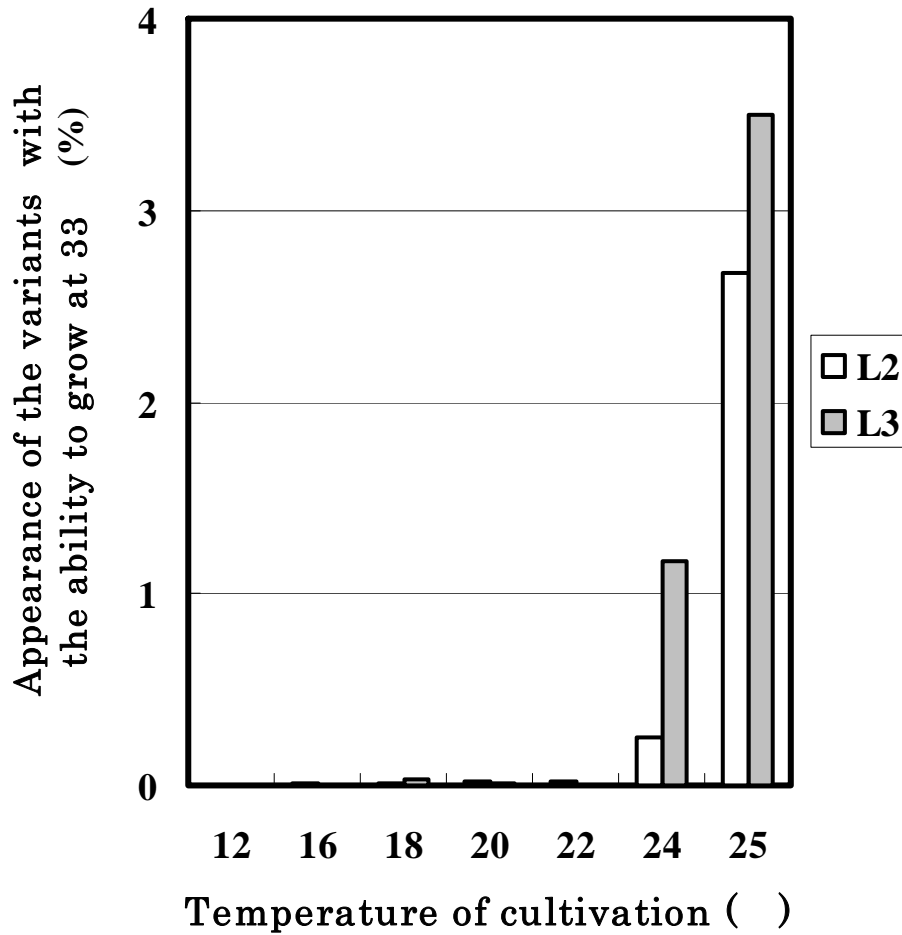


Fig. 18 Effects of cultivation temperature on appearance of the variants.

The yeast cells were inoculated in 10 ml of YPD. After cultivation at the various temperatures, the yeast cells were spread on YPD to make 200 cells / plate, incubated at 33 °C, and the temperature-resistant variants were counted.

第 4 節 考察

本研究では、低温増殖不良株が高温耐性を持っていることが明らかとなった。逆に、高温耐性株は低温増殖不良を示すことも明らかとなった。正常な下面発酵ビール酵母は通常の培養温度である 25 で最も良く増殖し、33-34 ではほとんど増殖しない。それに対し、低温増殖不良株は 25 での増殖が正常株に比べて劣り、33-34 では増殖する。このことから、低温増殖不良株では、酵母の生育温度範囲がわずかではあるが通常より高い温度帯にシフトしているのではないかと考えられる。酵母の至適生育温度の上限は酵母種によって異なり、*S. cerevisiae* が 35-43 、*S. pastorianus* 及び *S. carlsbergensis* が 28-35 、*S. bayanus* が 30-34 と報告されている (Barnett *et al.* 2000)。*S. pastorianus* に分類される下面発酵ビール酵母は、通常 25 以下で培養を行う。また、37 では生育しないことから、37 培養は *S. cerevisiae* のようなビール醸造における野生酵母に汚染された場合の検出方法として利用されている。生育上限温度が *S. cerevisiae* > *S. bayanus* = *S. pastorianus* であることから、下面発酵ビール酵母の低温増殖不良株は、生育温度範囲が *S. cerevisiae* 側にシフトしてしまったと考えられる。

低温増殖不良と高温耐性という 2 つの形質は、一見全く別の形質に見えるが、至適温度での増殖という意味では 1 つの形質と考えられる。低温増殖不良と高温耐性を至適温度増殖という 1 つの形質と考えた場合、もし増殖に必須なタンパク質の構造が違ったとしたら酵母の要求する至適増殖温度が変わるということはないだろうか。*S. cerevisiae* と *S. bayanus* ではこの増殖に必須なタンパク質の構造が違い至適増殖温度が違っているということはないだろうか。また下面発酵ビール酵母は至適温度での増殖に関しては *S. bayanus* の形質が優性で、*S. cerevisiae* に比べてより低温を好むのではないだろうか。

これまでの酵母の低温増殖能評価には、フラスコなどの小スケールで実際に低温増殖・発酵させて、エキス低下を測定していた。しかし、この方法では実際に低温増殖・発酵を行うため、前培養やならし培養を含めて約 2 週間の日数が必要であった。また、現場とのスケールの違いや、タンクとフラスコという発酵容器

の形状の違いなどにより、現場での低温増殖能を正確に反映できるものではなかった。更に、一部の酵母の低温増殖能が劣っていた場合、シングルコロニーを複数とって各々低温増殖能を測定しなければならない。低温増殖能の劣った酵母を検出したい場合には、頻度が低ければ評価するシングルコロニーの数を増やさないと検出できなかった。しかし、高温耐性を利用することにより、下面発酵ビール酵母の低温増殖能を正確に簡易に迅速に評価できるようになった。高温耐性株は低温増殖不良株であることから、高温耐性株存在率を調べることにより低温増殖能が正確に評価できる。また、本評価方法は培地に酵母を一定量塗抹して高温で培養するという簡易な方法で、実際に低温増殖・発酵試験を行うのに比べて手間もかからず、高温での培養時間として1週間を要するだけである。また、本方法が低温増殖能・発酵試験に比べて最も優位と考えられるのは、含まれている低温増殖不良株の割合がかなり低くてもその低温増殖不良株を検出できることである。つまり、培地に多量の酵母を塗抹しても高温での培養では高温耐性株、すなわち低温増殖不良株のみがコロニーを形成するため、それらを容易に検出し単離することが可能である。

この検出方法を利用することにより、低温増殖能が劣った株の出現しやすい培養温度を調べ、培養温度が低いと低温増殖不良株の出現頻度が低いが、培養温度が高いと低温増殖不良株の出現頻度が高いことが明らかとなった。その他にも、どのような条件で低温増殖能が劣った株が出現しやすいかを調べることができる。また、全体的にはまだ低温増殖能が悪くなっていなくても、低温増殖能が劣る株の出現を検出することにより全体の低温増殖能が劣る前に対応することが可能である。

第 4 章

S. cerevisiae 実験室酵母における低温増殖不良原因遺伝子の クローニング

第 1 節 緒言

下面発酵ビール酵母は、*S. cerevisiae* 由来遺伝子と *S. bayanus* 由来遺伝子の両方を保有することから、下面発酵ビール酵母を用いて低温増殖不良の原因遺伝子を同定するためには、*S. cerevisiae* 由来遺伝子及び *S. bayanus* 由来遺伝子の両方について解析しなければならない。また、下面発酵ビール酵母は 4 倍体であり孢子形成能がないため、実験をしやすい 1 倍体を取得することができない。更に、下面発酵ビール酵母にはアミノ酸要求性などの遺伝子マーカーが付与されていないため、形質転換した際の選択マーカーとしては G418、Aureobasidin A、hygromycin B などに対する薬剤耐性を使うしか方法がないが、*S. cerevisiae* に比べてこれらの薬剤に対する感受性が高く、目的の株を選択するのが困難な場合が多い。また、下面発酵ビール酵母の形質転換頻度は *S. cerevisiae* に比べて約 1/100 であることから、遺伝子ライブラリーを用いた網羅的な実験は難しい。これらの理由から、下面発酵ビール酵母から直接原因遺伝子を同定することは困難であると考えた。一方、*S. cerevisiae* 実験室酵母は、遺伝子組み換え技術が確立され、またアミノ酸要求性などの選択マーカーが自在に使い、遺伝子ライブラリーがすでに構築されている。これまでも、*S. cerevisiae* の知見を参考に下面発酵ビール酵母について調べ、更に下面発酵ビール酵母特有の性質について研究するという手法がとられている。凝集遺伝子 *FLO1* については、まず *S. cerevisiae* から *FLO1* 遺伝子がクローニングされ (Watari *et al.* 1994)、その後 *FLO1* と相同性の高い *Lg-FLO1* が下面発酵ビール酵母からクローニングされ、ビール醸造において実際に下面発酵ビール酵母で機能しているのは *Lg-FLO1* であることが報告されている (Kobayashi *et al.* 1998)。

そこで私は、*S. cerevisiae* を用いて低温増殖不良の原因遺伝子をクローニングし、その結果を下面発酵ビール酵母に応用することを考えた。本章ではまず、*S. cerevisiae* 実験室酵母から高温耐性株を単離し、その表現型を解析した。更に *S. cerevisiae* 実験室酵母の低温増殖不良株に *S. cerevisiae* 遺伝子ライブラリーを形質転換し、形質を相補する低温増殖不良原因遺伝子のクローニングを行い、遺

伝子の働きを調べた。

第 2 節 材料及び方法

1. 菌株及びプラスミド

試験に用いた菌株及びプラスミドを Table 4 に示す。

2. プライマー

試験に用いたプライマーを Table 5 に示す。

3. 培地

酵母の培養には YPD 培地 (1% yeast extract, 2% Bacto peptone, 2% glucose) を用いた。寒天培地の場合は、2% 寒天を加えた。

接合能を判定するための培地は、2 倍体選択培地 (0.67% yeast nitrogen base without amino acids, 2% glucose, 20ppm uracil, 20ppm L-histidine-HCl, 30 ppm L-leucine, 2% agar) を用いた。

S. cerevisiae 実験室酵母の *KEX2* 破壊株選択培地は、leucine-free medium (0.67% yeast nitrogen base without amino acids, 2% glucose, 20 ppm adenine sulfate, 20 ppm uracil, 20 ppm L-tryptophan, 20 ppm L-histidine-HCl, 30 ppm L-lysine-HCl, 2% agar) を用いた。

KEX2 相補試験選択培地は、uracil-free medium (0.67% yeast nitrogen base without amino acids, 2% glucose, 20 ppm adenine sulfate, 30 ppm L-leucine, 20 ppm L-tryptophan, 20 ppm L-histidine-HCl, 30 ppm L-lysine-HCl, 2% agar) を用いた。

大腸菌の培養には、LB-Amp 培地 (0.5% yeast extract, 1% NaCl, 1% tryptone, 50µg/ml ampicillin) を用いた。

4. Colony-forming ability

酵母懸濁液を水で適当な濃度に希釈して YPD 寒天培地に表面塗沫し、25 °C で 3 日間培養した。38-41 °C の高温で培養する場合は、シャーレを 150 mm × 250 mm

のプラスチック製の袋に入れてシールし、温度コントロールされた水槽に沈めて 1 週間培養した。各温度で生育したコロニー数を測定し、25 °C で生育したコロニー数を 100% として、各温度におけるコロニー生育率を算出した。

5. 液体培地での増殖

YPD 液体培地で 25 °C 1 日培養した酵母を 10 ml YPD 液体培地に一定量植菌し、各温度で培養して吸光度 (OD₆₆₀) を測定した。

6. 接合能の判定

S. cerevisiae 実験室酵母 YPH500 (α 型) に由来する変異株の接合型判定は、*S. cerevisiae* 実験室酵母 BY4741 (a 型) と接合できるかを調べることにより行った。試験菌株と BY4741 を YPD 寒天培地に交叉するように画線し 30 °C で 1 日培養した。交叉した部分に生育した酵母を 2 倍体選択培地に移し 30 °C で 1 日培養し、生育が認められた場合、試験菌株に接合能があると判定した。

7. 酵母の形質転換

酵母の形質転換はリチウム法により行った (Kaiser *et al.* 2000)。

8. 大腸菌の形質転換

大腸菌の形質転換は One Shot INVαF⁺ competent cells (Invitrogen, USA) を用い、プロトコールに従って行った。

9. 酵母からのプラスミド DNA の抽出

酵母からのプラスミド DNA の抽出は BIO101 Yeast Plasmid Isolation Kit (BIO101, USA) を用いて行った。

10. 酵母からのゲノム DNA の抽出

酵母からのゲノム DNA の抽出は 10-min DNA preparation method (Kaiser *et*

al. 2000) により行った。

11. 大腸菌からのプラスミド DNA の抽出

大腸菌からのプラスミド DNA の抽出は、Qiagen Plasmid Mini Kit 及び Qiagen Plasmid Midi Kit (Qiagen Science, USA) を用いて行った。

12. 低温増殖不良原因遺伝子のクローニング

YPH500 から単離した高温耐性/低温増殖不良/接合不能の性質をもつ YPH500-H5 に *S. cerevisiae* 遺伝子ライブラリーを形質転換し、高温耐性及び接合不能を相補する遺伝子を同定した。

13. PCR (Polymerase Chain Reaction)

PCR は Gene Amp PCR System 2400(Perkin-Elmer Norwalk, CT, USA) を用い以下の PCR 条件により行った。

step1 : 94 2min, step2 : 92 1min, step3 : 50 1min, step4 : 72 2min,
step5 : step2-4 29cycles, step6 : 75 10min, step7 : maintain at 4

14. *S. cerevisiae* 実験室酵母の *KEX2* 破壊株の作製

S. cerevisiae 実験室酵母 YPH500 の *KEX2* 破壊株は、*KEX2* 遺伝子 open reading frame(ORF) を *Candida glabrata LEU2* 遺伝子に置き換えることにより作製した (Sakumoto *et al.* 1999)。 *C. glabrata LEU2* 遺伝子をプライマー A 及び B を用いて増幅し *S. cerevisiae* 実験室酵母 YPH500 に導入し、leucin-free 培地で選択した。*S. cerevisiae* 実験室酵母での *KEX2* 破壊の確認は、プライマー C-F を用いた PCR により行った。

15. 形態の比較

野生株と *kex2* 変異株の形態を定量的に比較するために、酵母細胞 (実験あたり 200cells 以上) を YPD を用いて 25 °C で培養し、formaldehyde で固定した。

核、アクチン、細胞表面をそれぞれ可視化するために、DAPI、rhodamine phalloidine、FITC-ConA で染色し、各々の染色細胞を波長を変えて蛍光顕微鏡で観察して 3 種類の画像を取得した。この 3 種類の画像を定量的な形態学的データが得られる CalMorph (Ohya *et al.* 2005) で解析した。CalMorph の概略を Fig. 19 に示す。例えば細胞の形を解析する場合は、FITC-ConA で染色した細胞の画像から、各々の細胞の長軸と短軸を測定しその比を求める。また、アクチンの局在を解析する場合は、rhodamine phalloidine で染色した細胞の画像から、染色されたアクチンの細胞内の位置を測定する。このような CalMorph による解析では、3 重染色した細胞の画像から多くのパラメーターを得ることができる。それぞれの株の 5 つの独立した実験から得られた定量的なデータを Mann-Whitney *U*-test で検定した。*U*-test の *p*-value に相当する *Q*-value は、QVALUE (Storey *et al.* 2004)を用いて計算した。*Q*-value は、false discovery rate(FDR)または *p*-value を計算するために用いた(Benjamini and Hochberg 1995)。

Table 4 Yeast strains and plasmid

strains	Source and remarks
YPH 500	<i>S. cerevisiae</i> laboratory strain, <i>MATa ade2 lys2 leu2 trp1 ura3 his3</i>
YPH 500-H1 to H10	High-temperature-resistant variants from YPH 500
W 303	<i>S. cerevisiae</i> laboratory strain, <i>MATa ade2 leu2 trp1 ura3 his3 can1</i>
NKY 899	<i>S. cerevisiae</i> laboratory strain, <i>MATa ho::hisG lys2 leu2::hisG ura3 ade2::LK</i>
BY 4741	<i>S. cerevisiae</i> laboratory strain, <i>MATa his3 leu2 met15 ura3</i>
BY 4741- <i>kex2</i>	<i>KEX2</i> disruptant of European <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Archive for Functional Analysis (EUROASARF)
pRS 316	Sikorski and Hieter 1989

Table 5 Primers

Primers	Sequences
A	TTTTTGGCCTCGTCACATAATTATAAACTACTAACCATTATC AGTCGAGGTCGACGGTATC
B	AAAAAATGCTATTTTGTAATTTGAAGCTTTCTGTACATATC GAACGCTCTAGAACTAGTGGATC
C	AGGGGTCGTGGCTGCCATTGT
D	CTAGGAG AGGAAAGTTTTTTA
E	TCGAGGTCGACGGTATC
F	CGCTCTAGAACTAGTGGATC

CalMorph

CalMorph is a program that outputs a large amount of data on cell cycle phase, cell forms, etc., for individual cells, from a set of pictures of cell walls, cell nuclei, and actins.

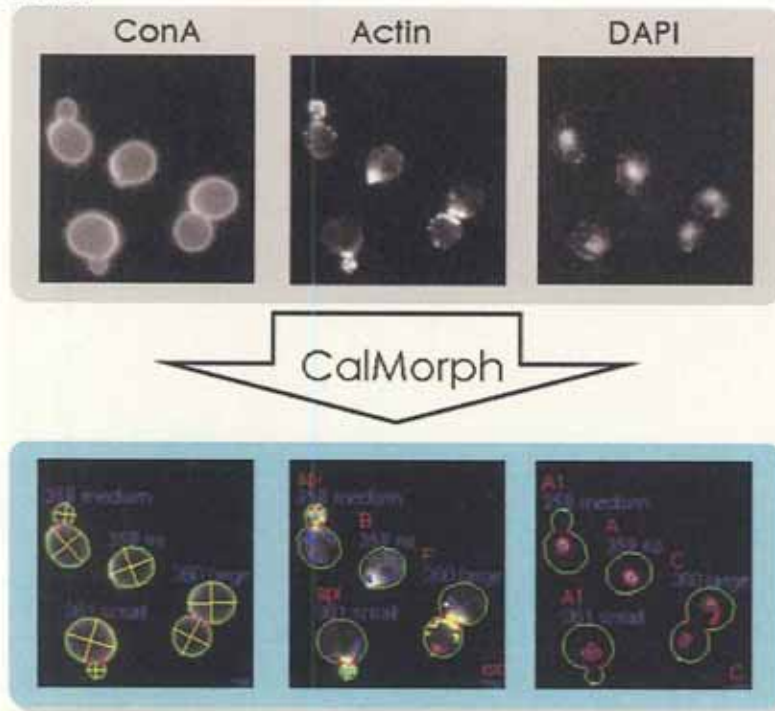


Fig. 19 Outline of CalMorph (<http://scmd.gi.k.u-tokyo.ac.jp>)

第 3 節 結果

1. *S. cerevisiae* 実験室酵母高温耐性株の単離及び表現型解析

S. cerevisiae 実験室酵母の高温耐性株の単離を行うため、*S. cerevisiae* 実験室酵母を 38 °C、39 °C、40 °C、41 °C で培養した。*S. cerevisiae* 実験室酵母の高温での生育性は、下面発酵ビール酵母の場合と同様に、菌株によって違った (Fig. 20)。38 °C で培養した場合の YPH500 のコロニー形成能は 0.2%であった。YPH500 の 38 °C 生育コロニーから高温耐性株として YPH500-H1 ~ YPH500-H10 を単離した。これらの単離株の 25 °C 増殖能を調べた結果、下面発酵ビール酵母と同様に高温耐性株 YPH500-H1 ~ YPH500-H10 は YPH500 に比べて 25 °C での増殖能が劣っていた (Fig. 21a)。一方、38 °C では YPH500 がわずかに増殖したのに対し、高温耐性株 YPH500-H1 ~ YPH500-H10 はよく増殖した (Fig. 21b)。このことから、下面発酵ビール酵母と同様に *S. cerevisiae* 実験室酵母でも、高温耐性株は低温増殖不良を示すことが明らかとなった。

また、単離した 10 株の高温耐性株の性質を調べていたところ、そのうちの 2 株 (YPH500-H5、YPH500-H10) が接合能を失っていることが判明した (Fig. 22)。下面発酵ビール酵母は接合能をほとんど持たないため、高温耐性株の一部が接合不能となっていることは *S. cerevisiae* 実験室酵母で初めて明らかとなった。

2. *S. cerevisiae* 遺伝子ライブラリーの低温増殖不良株への形質転換及び原因遺伝子の同定

S. cerevisiae 実験室酵母の高温耐性株の示す高温耐性、低温増殖不良、接合能喪失の性質を利用して低温増殖不良の原因遺伝子を同定しようと考えた。ところが、理由は不明であるが、YPD 培地 25 °C で観察された高温耐性株の低温増殖不良は、SD 培地 25 °C では観察することができず、正常株と差異のない生育を示した。そのため原因遺伝子クローニングに利用する SD 培地を基本とした leucine-free medium や uracil-free medium などの選択培地では、低温増殖不良の形質を利用してクローニングをすることができないと考えられた。そこで、低

温増殖不良/高温耐性/接合不能の 3 形質を持つ YPH500-H5 を用い、高温耐性/接合不能の 2 形質を利用して原因遺伝子のクローニングを試みた。まず、YPH500-H5 に *S. cerevisiae* 遺伝子ライブラリーを形質転換した。得られた約 50,000 形質転換株中、高温耐性及び接合不能の両形質を相補する株を 3 株取得した。これら 3 株の保持するプラスミドは、いずれも同様の約 7kb の断片を含んでいた。7kb 断片をシーケンスしたところ、第 XIV 番染色体の *KEX2* 遺伝子及び *YTP1* 遺伝子を含んでいた。YPH500-H5 は接合不能であることから、 α -フェロモンのプロセッシングに関与している *KEX2* が、低温増殖不良/高温耐性/接合不能の原因遺伝子なのではないかと考えた。

3. *KEX2* 破壊株の造成及び表現型解析

KEX2 が低温増殖不良の原因遺伝子であることを確認するために、*KEX2* 破壊株を作製してその表現型を解析した。まず、YPH500 の *KEX2* ORF を *Candida glabrata* *LEU2* 遺伝子に置き換えた *KEX2* 破壊株を作製し、PCR により破壊の確認を行った (Fig. 23)。破壊株では *KEX2* ORF が *Candida glabrata* *LEU2* に置き換わって増幅産物長が短くなっていること(レーン 2,3)や、破壊株が *Candida glabrata* *LEU2* の配列を含んでいること(レーン 4-7)が確認された。

次に破壊株の表現型を解析した。25 で培養した結果、YPH500- Δ *kex2* は YPH500 に比べて増殖が遅く、低温増殖不良を示した (Fig. 24a)。一方、38 で培養したところ、YPH500 が生育しないのに対して YPH500- Δ *kex2* はよく生育し、高温耐性を示した (Fig. 24b)。また、接合能を調べたところ、YPH500- Δ *kex2* は接合不能であった (Fig. 24c)。これらの結果から、*KEX2* 遺伝子が、YPH500 高温耐性株における低温増殖不良/高温耐性/接合不能の原因遺伝子であると考えられた。

4. 高温耐性株の *KEX2* 相補試験

YPH500 高温耐性株の形質が *KEX2* により相補されるかどうかを調べた。まず、*KEX2* 遺伝子をプラスミド pRS316 にクローニングした。プラスミドマップを Fig.

25 に示す。YPH500-H1 ~ H10 に pRS316-*KEX2* を形質転換した。低温増殖不良は前述したように SD 培地を基本とした選択培地では形質を確認することができないため、高温耐性が相補されるかを調べた。その結果、高温耐性株 10 株中 5 株が、*KEX2* 遺伝子導入により高温感受性となった (Table 6)。また接合不能の 2 株 (YPH500-H5、YPH500-H10) については *KEX2* 遺伝子導入により接合能が回復した。

5. 破壊株の形態

正常株と低温増殖不良株を形態により簡単に区別できる可能性を探るために、BY4741 と BY4741- Δ *kex2* の形態比較を CalMorph を用いて行った。その結果 FDR 0.01 で 501 パラメーターのうち 258 パラメーターで有意な差が検出された。BY4741 に比べて BY4741- Δ *kex2* の方が細胞の大きさが大きく、細胞の形が丸く、細胞のアクチン領域が大きく、芽のない細胞におけるアクチン脱局在細胞の割合が大きく、*vma* (vacuolar membrane ATP) 変異株と似た形態を示した。パラメーターを比較した結果を Fig. 26 に、有意差のあったパラメーターのうち代表的なパラメーターの統計解析の結果を Table 7 に示す。*kex2* 変異株が *vma*(-)-like phenotype を示すという報告 (Oluwatosin and Kane 1998, Sambade *et al.* 2005) があることから、本結果はリーズナブルな結果であると考えられる。

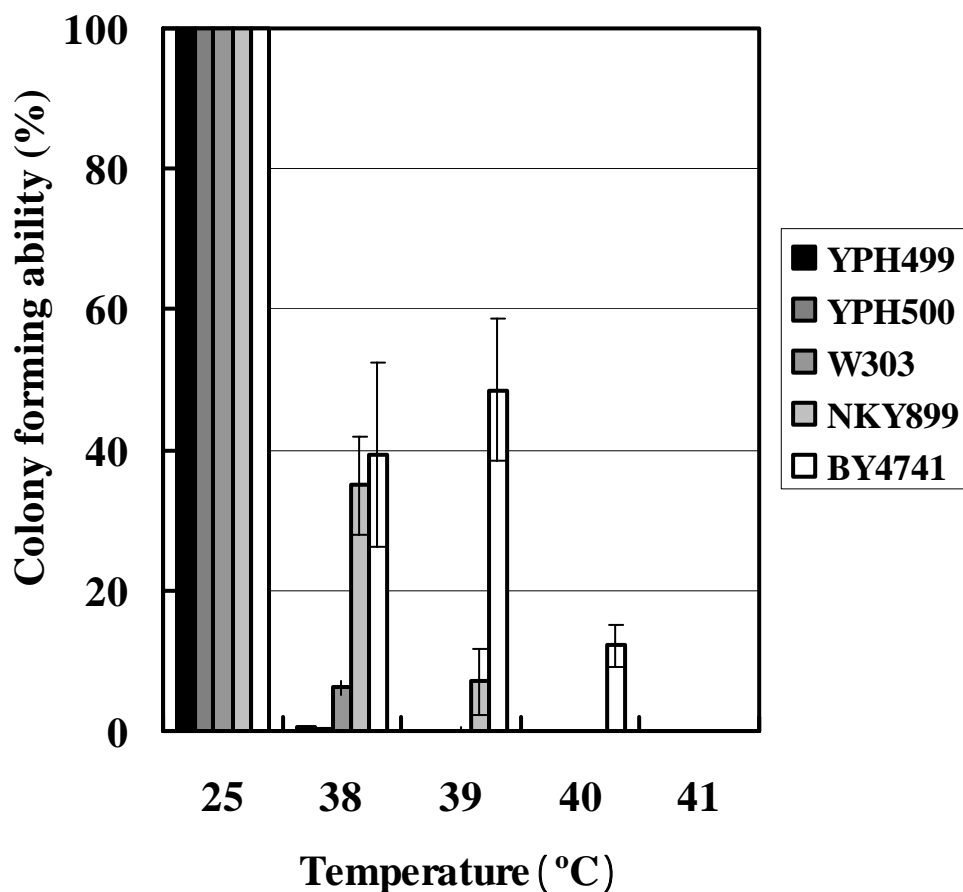


Fig. 20 Colony forming ability of *S. cerevisiae* strains.

Yeast cells were spread on YPD at a density of 200 cells / plate and incubated at 25 °C for 3 days. They were also spread on YPD at a density of 200 or 2,000 cells / plate and incubated at 38 °C, 39 °C, 40 °C and 41 °C for 1 week; the colonies were then counted. The colony count at 25 °C was considered to be 100%.

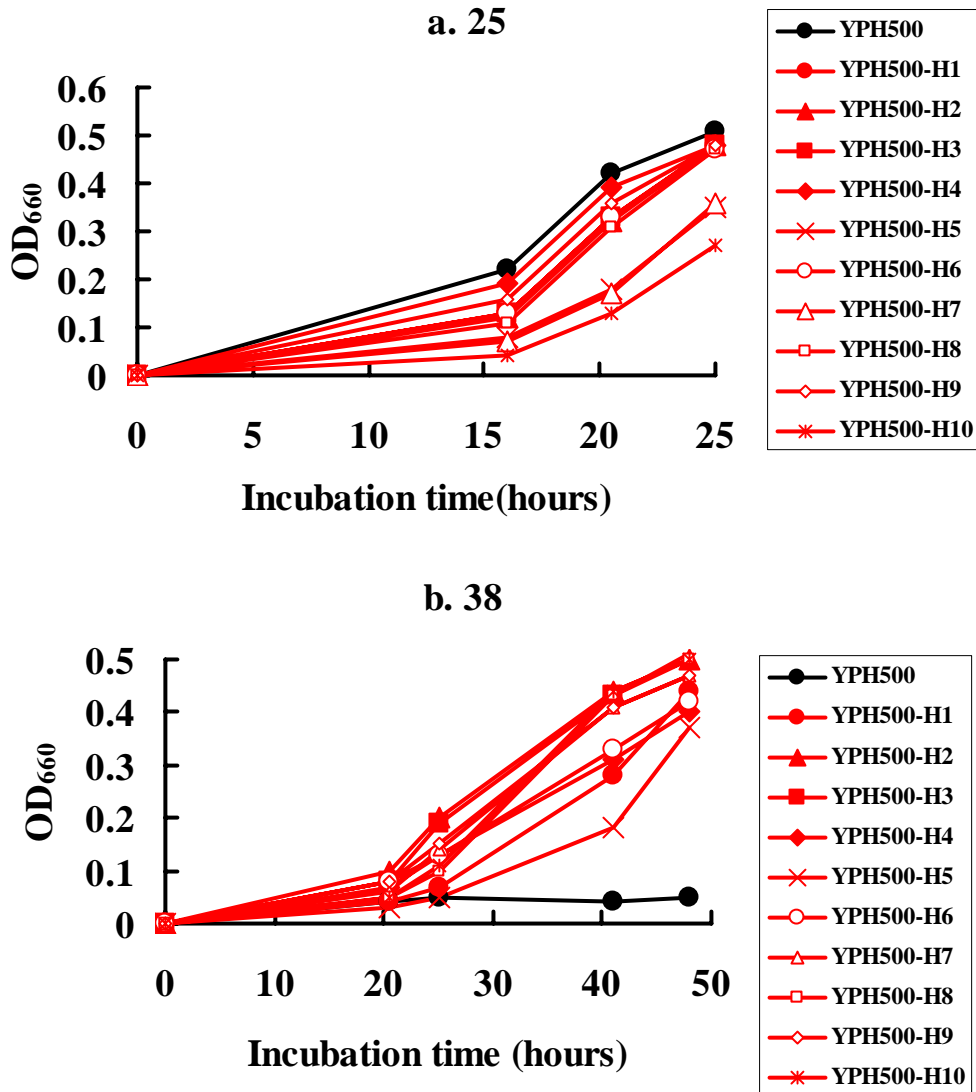


Fig. 21 Growth phenotype of YPH 500 and its temperature-resistant variants at 25 (a) and 38 (b).

Yeast cells were inoculated into YPD at a density of 1×10^5 cells / ml and incubated at 25°C with shaking; the OD₆₆₀ was then measured (a).

Yeast cells were inoculated into YPD at a density of 5×10^5 cells / ml and incubated at 38°C with shaking; the OD₆₆₀ was then measured (b).

Black symbol, YPH 500; Red symbols, YPH 500-H1 ~ YPH 500-H10.

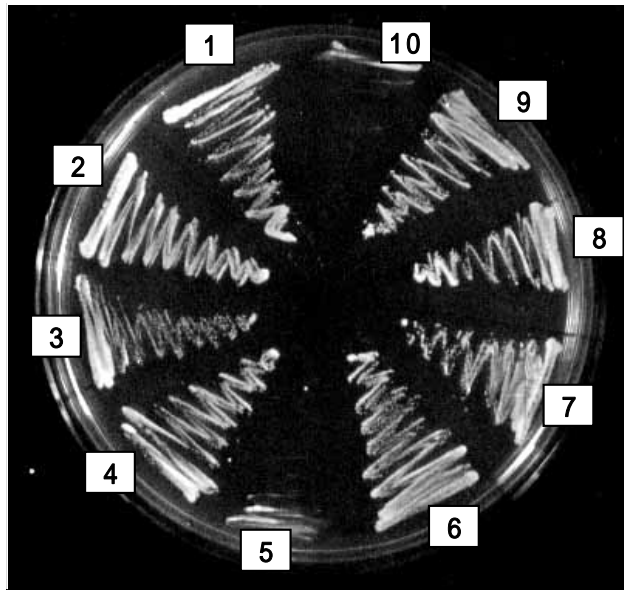


Fig. 22 Mating ability.

YPH 500 temperature-resistant strains were streaked onto a YPD plate and crossed with BY4741 (*MATa*). The crossed cells were transferred to a selection plate on which only yeast with mating ability could grow, and were incubated at 25 °C. 1 ~ 10, YPH 500-H1 ~ YPH 500-H10.

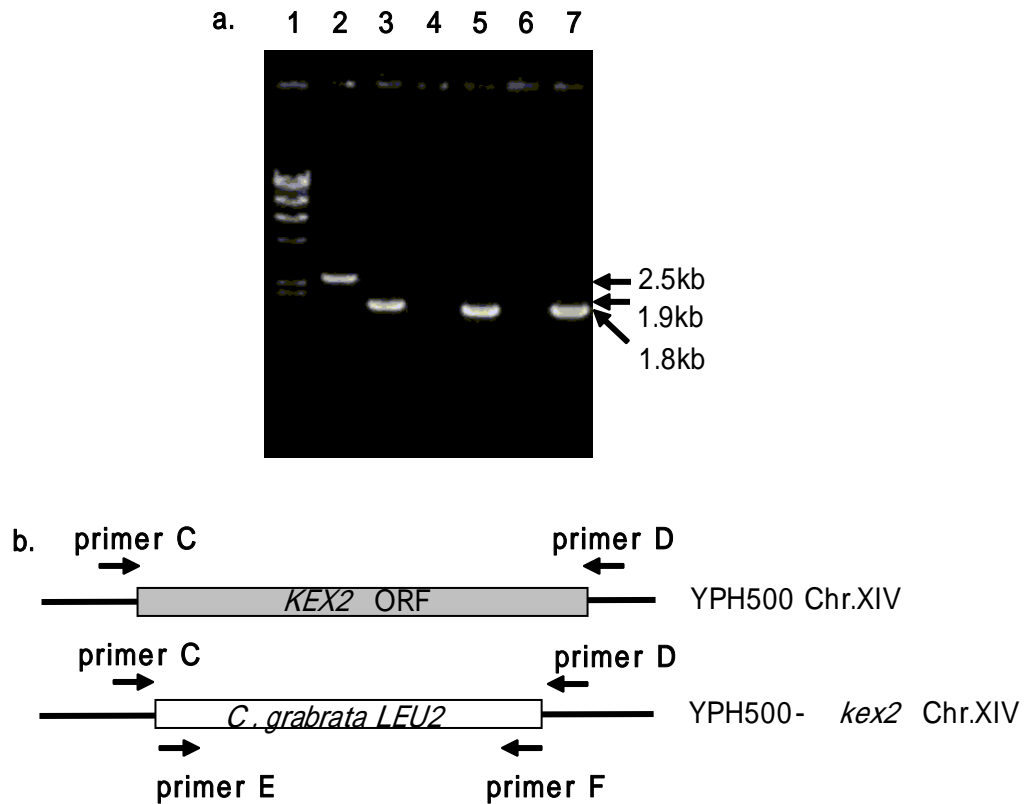


Fig. 23 PCR of YPH 500 and YPH 500- *kex2* (a) and positions of primers (b).

Lane 1, λ -*Hin* dIII; lanes 2, 4, and 6, YPH 500; lanes 3, 5 and 7, YPH 500- Δ *kex2*. Lanes 2 and 3, PCR using primers C and D; lanes 4 and 5, PCR using primers C and F; lanes 6 and 7, PCR using primers E and D.

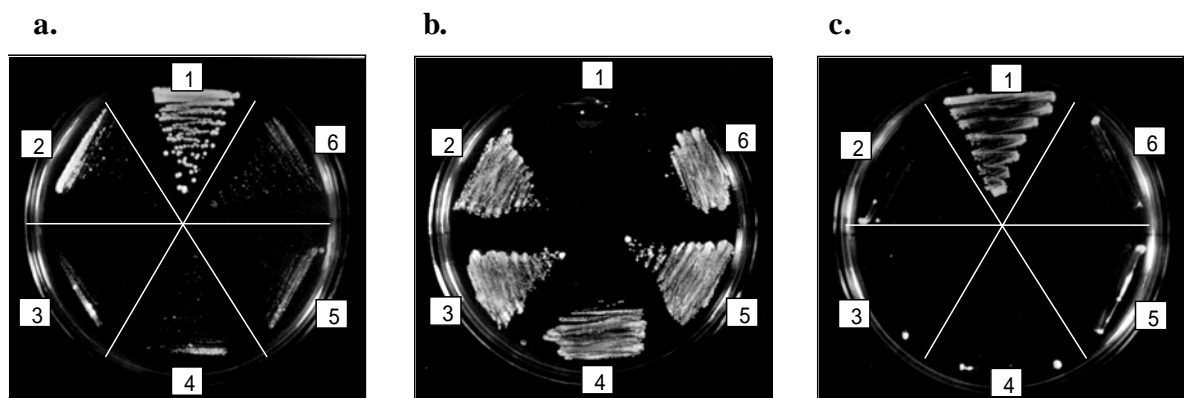


Fig. 24 Growth phenotype at 25 (a) and 38 (b) on YPD, and mating ability on a selection plate (c).

1, YPH 500; 2, YPH 500-H5; 3–6, YPH 500- *kex2* .

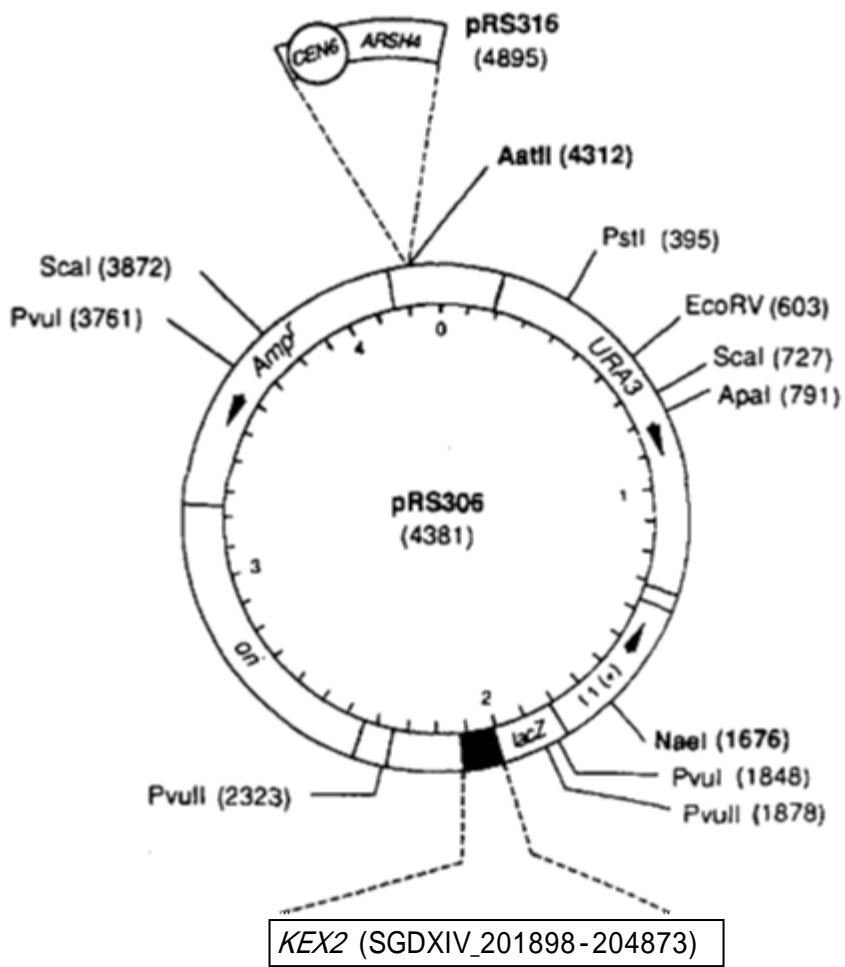


Fig. 25 MAP of Plasmid pRS316-KEX2

Table 6 Mating abilities and growth phenotypes of YPH 500 temperature-resistant variants transformed with pRS 316-*KEX2*.

Strains	Mating ability		Growth phenotype at 38°C	
	With pRS 316	With pRS 316- <i>KEX2</i>	With pRS 316	With pRS 316- <i>KEX2</i>
YPH 500-H1	+	+	++	±
YPH 500-H2	+	+	++	±
YPH 500-H3	+	+	++	±
YPH 500-H4	+	+	++	—
YPH 500-H5	—	+	++	—
YPH 500-H6	+	+	++	—
YPH 500-H7	+	+	++	++
YPH 500-H8	+	+	++	—
YPH 500-H9	+	+	++	++
YPH 500-H10	—	+	++	—

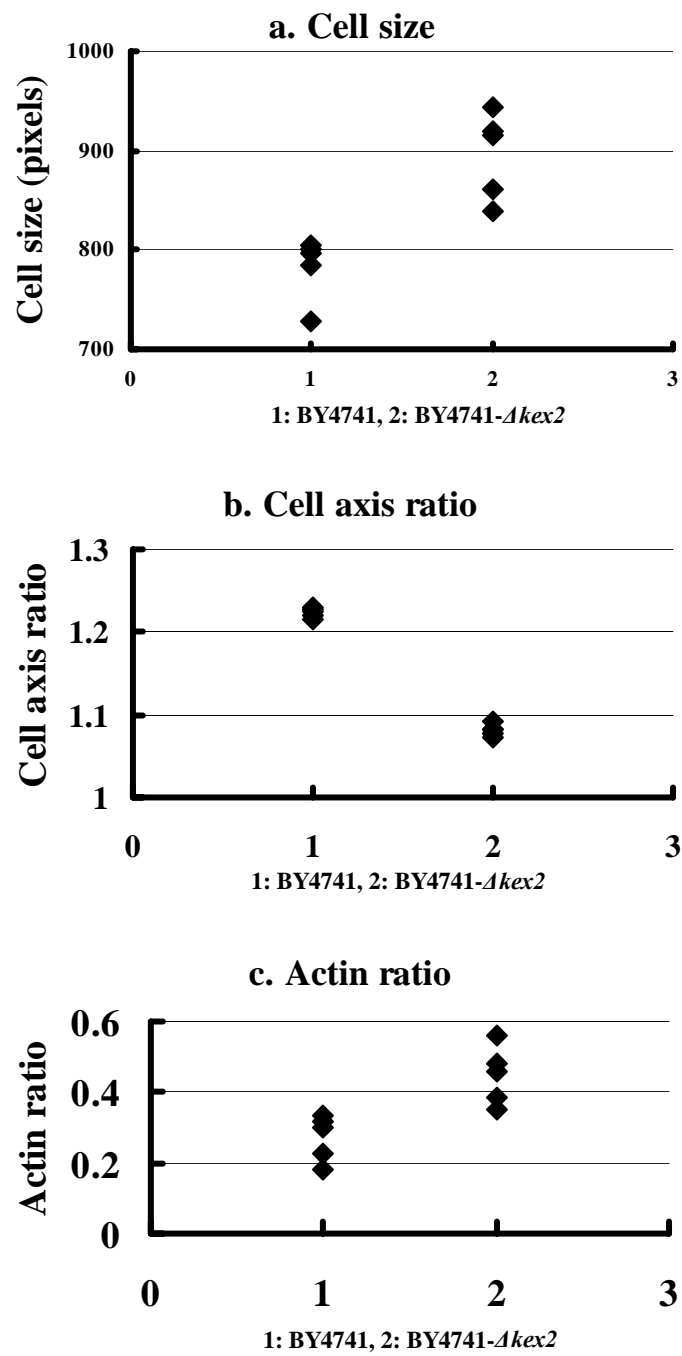


Fig. 26 Comparison of morphology
 a. cell size, b. cell axis ratio, c. actin ratio

Table 7 Quantitative comparison of morphology.

Morphology	Parameter identifier	Direction ^a	p-value ^b	q-value ^c	Description
Cell size	C11-1_A	+	0.0079	0.0056	Whole cell size
	C11-1_A1B	+	0.0079	0.0056	Mother cell size
	C101_A1B	+	0.0079	0.0056	Whole cell size
	C11-1_C	+	0.0079	0.0056	Mother cell size
	C101_C	+	0.0079	0.0056	Whole cell size
Cell shape	C115_A	–	0.0079	0.0056	Whole cell axis ratio
	C114_A1B	–	0.0079	0.0056	Bud axis ratio
	C115_A1B	–	0.0079	0.0056	Mother axis ratio
	C114_C	–	0.0079	0.0056	Bud axis ratio
	C115_C	–	0.0079	0.0056	Mother axis ratio
Size of actin region	A7-1_A	+	0.0079	0.0056	Size of actin region
	A101_A	+	0.0079	0.0056	Actin region ratio in whole cell
	A7-1_A1B	+	0.0079	0.0056	Size of actin region in mother
	A7-1_C	+	0.0079	0.0056	Size of actin region in mother
Actin ratio	A105_A	+	0.0079	0.0056	Actin a ratio
	A106_A	–	0.0079	0.0056	Actin b ratio
	A106	–	0.0079	0.0056	Actin b ratio
	A114	+	0.0079	0.0056	Actin a ratio to no bud cells
	A115	–	0.0079	0.0056	Actin b ratio to no bud cells

a) Symbols “+” and “–” indicate the increase and the decrease of parameter values by *kex2* gene deletion, respectively.

b) Values were estimated by the null distribution of the rank sum of the U test ($n = 5$).

c) Values were estimated by the QVALUE of the R package (see Materials and Methods).

第 4 節 考察

S. cerevisiae 実験室酵母の高温生育限界温度は 38-41 であり、一方 *S. pastorianus* に属する下面発酵ビール酵母の高温生育限界温度は 33-34 である (Barnett *et al.* 2000)。これは、下面発酵ビール酵母がビール醸造に適した低温環境で自然に選択されてきたことにより、生育温度がより低温にシフトし、低い温度でも生育できる性質を獲得したものと考えられる。このような生育温度範囲に差異のある両菌種であるにもかかわらず、高温耐性株は低温増殖不良であるという関係が両者に確認された。従って、両菌株はこの表現型に関して共通する遺伝子や生育メカニズムを持っていると推察される。

KEX2 遺伝子は α ファクターなどの蛋白質のプロセッシングを行うプロテアーゼ Kexin をコードする遺伝子 (Komano and Fuller 1995, Oluwatosin and Kane 1998) で、*kex2* 変異株は低温感受性となることが報告されている。*kex2* 高温耐性変異株は、低温感受性を示すことが報告されている (Martin and Young 1989)。また、*kex2* 変異株は *vma* 変異株と類似した pH に依存した増殖、カルシウム感受性、非発酵性糖での増殖不能、細胞の形態を示すことが報告されている (Oluwatosin and Kane 1998)。V-ATPase は液胞膜に結合するプロトン輸送性の ATPase (Anraku 1996)、V0 セクターと V1 セクターからなり、13 種類のサブユニットから構成されている (Fig. 27)。Oluwatosin らは、V-ATPase の構成タンパク質の一つが *KEX2* によるプロセッシングにより活性化されており、*kex2* 変異株では V-ATPase の構成タンパク質の一つがプロセッシングされないため V-ATPase が活性化されず、*vma* 変異株と同じ表現型を示すのではないかと考えた (Oluwatosin and Kane 1998)。

KEX2 の低温感受性に関しては、*kex2* 変異株が *vma* 変異株と類似した表現型を示す (Oluwatosin and Kane 1998) ことから、*kex2* の低温感受性は液胞輸送系に関連する可能性がある。液胞は、細胞質に取り込まれたアミノ酸のうち特定のアミノ酸の細胞質内濃度を調節する役割を持っている (Kitamoto *et al.* 1988)。また、それらのアミノ酸は ATP に依存した H⁺/アミノ酸 antiport system によつ

て液胞に取り込まれ V-ATPase が関与していると考えられている (Ohsumi and Anraku 1981, Sato *et al.* 1984)。Oluwatosin らが考察したように、*kex2* 変異株では V-ATPase の構成タンパク質の一つがプロセッシングされないため V-ATPase が活性化されないとしたら、細胞内のアミノ酸濃度の調節ができず、細胞増殖に影響することが考えられる。

また、細胞が栄養飢餓条件に曝されたとき、不要タンパク質や過剰に存在するリボゾームタンパク質を非選択的に液胞内に取り込み分解再利用するオートファジー機能がある。この生態防御機構には V-ATPase の関与が必須である (Takeshige *et al.* 1992, Anraku 2005)。KEX2 変異株では V-ATPase の構成タンパク質の一つがプロセッシングされないため V-ATPase が活性化されないとしたら、オートファジーが機能せず低温での細胞増殖に影響することも考えられる。

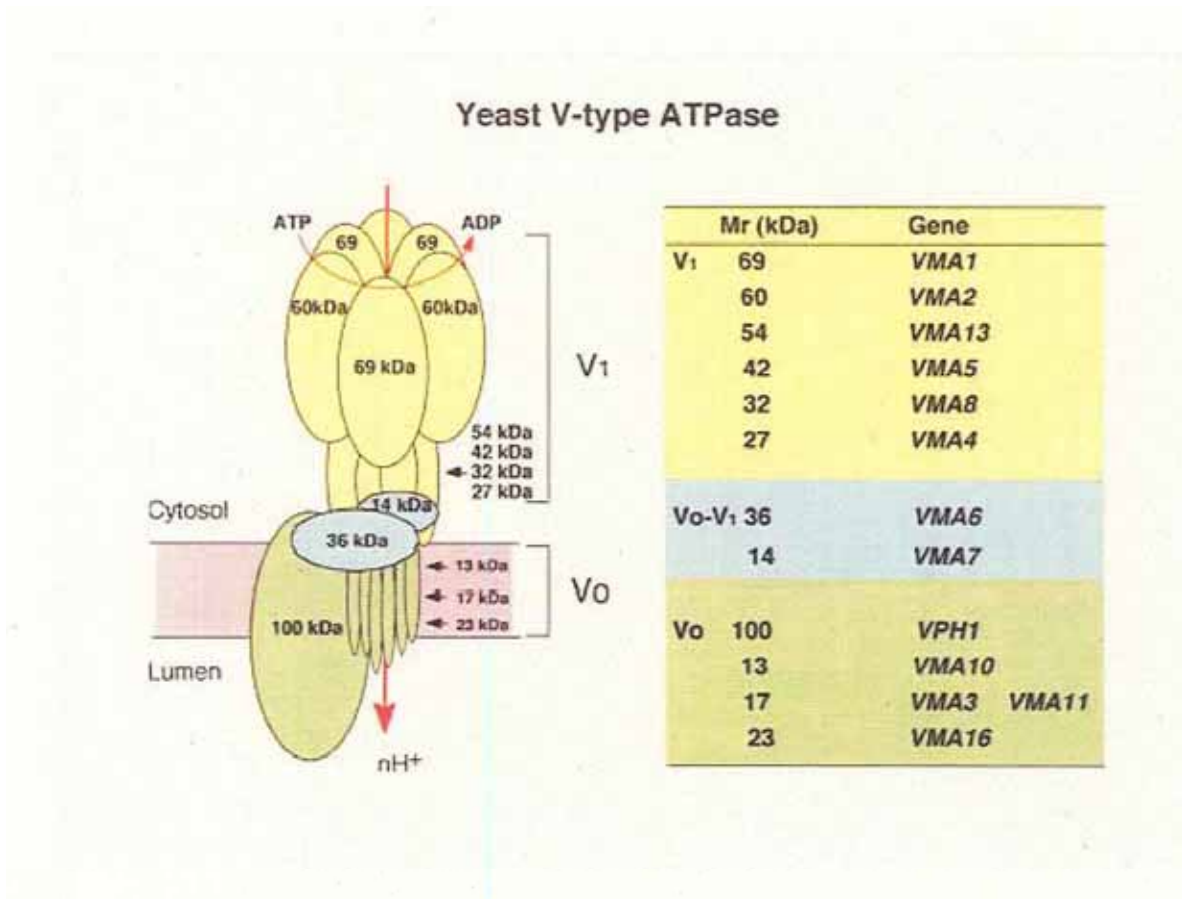


Fig. 27 Molecular model of V-ATPase (Anraku 1996)

第 5 章

下面発酵ビール酵母の *KEX2* 遺伝子破壊株の造成及び表現型 解析

第 1 節 緒言

S. pastorianus に属する下面発酵ビール酵母は、*S. cerevisiae* 由来染色体と *S. bayanus* 由来染色体の両方を併せ持っている。下面発酵ビール酵母においてある遺伝子の機能を考えた場合、*S. cerevisiae* 由来の遺伝子のみが機能しているのか、*S. cerevisiae* と相同性のある *S. bayanus* 由来遺伝子のみが機能しているのか、どちらとも機能しているのか、不明である。またそれは個々の遺伝子によって違うと考えられる。従って、下面発酵ビール酵母の遺伝子について解析する場合、*S. cerevisiae* 由来遺伝子と *S. bayanus* 由来遺伝子の両方について解析する必要がある。

S. bayanus の遺伝子配列は一部公開されているものの、*S. cerevisiae* と比べて遺伝子名や機能などの情報は少ない。*S. cerevisiae* と *S. bayanus* の相同性は約 70% である。この配列の違う *S. cerevisiae* 由来遺伝子と *S. bayanus* 由来遺伝子を複数持っていることが、下面発酵ビール酵母としての特性にどのように関係してくるかは非常に興味深い。私は、*S. cerevisiae* 実験室酵母で同定された低温増殖不良に関係する遺伝子 *KEX2* に関して、下面発酵ビール酵母の *S. cerevisiae* 由来遺伝子と *S. bayanus* 由来遺伝子の両方を解析することにした。まず、*S. cerevisiae* の配列との相同性をもとに下面発酵ビール酵母から *S. bayanus* 由来 *KEX2* 遺伝子をクローニングし配列を決定した。その後 *S. cerevisiae* 由来 *KEX2* 遺伝子の破壊株及び *S. bayanus* 由来 *KEX2* 遺伝子の破壊株を作成することにより、下面発酵ビール酵母における *KEX2* 遺伝子の低温増殖不良との関与について調べた。

第 2 節 材料及び方法

1. 菌株

試験に用いた菌株を Table 8 に示す。

2. プライマー

試験に用いたプライマーを Table 9 に示す。

3. 培地

酵母の培養には YPM 培地 (1% yeast extract, 2% Bacto peptone, 2% maltose) を用いた。寒天培地の場合は、2% 寒天を加えた。

下面発酵ビール酵母の *Sc-KEX2* 破壊株選択培地は、YPM-hygromycin 培地 (1% yeast extract, 2% Bacto peptone, 2% Maltose, 23 µg/ml hygromycin B) を用いた。また *Sb-KEX2* 破壊株選択培地は、YPM-Aureobasidine 培地 (1% yeast extract, 2% Bacto peptone, 2% maltose, 0.1 µg/ml Aureobasidine A) を用いた。

大腸菌の培養には、LB-Amp 培地 (0.5% yeast extract, 1% NaCl, 1% tryptone, 50 µg/ml ampicillin) を用いた。

4. 液体培地での増殖

YPM 液体培地で 25 ℃ 1 日培養した酵母を 10 ml YPM 液体培地に一定量植菌し、各温度で培養して吸光度 (OD₆₆₀) を測定した。

5. 酵母の形質転換

酵母の形質転換はリチウム法により行った (Kaiser *et al.* 2000)。

6. 大腸菌の形質転換

大腸菌の形質転換は One Shot INVαF⁺ competent cells (Invitrogen, USA) を用い、プロトコールに従って行った。

7. 酵母からのプラスミド DNA の抽出

酵母からのプラスミド DNA の抽出は BIO101 Yeast Plasmid Isolation Kit (BIO101, USA)を用いて行った。

8. 酵母からのゲノム DNA の抽出

酵母からのゲノム DNA の抽出は 10-min DNA preparation method (Kaiser *et al.* 2000) により行った。

9. 大腸菌からのプラスミド DNA の抽出

大腸菌からのプラスミド DNA の抽出は、Qiagen Plasmid Mini Kit 及び Qiagen Plasmid Midi Kit (Qiagen Science, USA)を用いて行った。

10. PCR (Polymerase Chain Reaction)

PCR は Gene Amp PCR System 2400 (Perkin-Elmer Norwalk, CT, USA)を用い以下の PCR 条件により行った。

step1: 94 2 min, step2: 92 1 min, step3: 50 1 min, step4: 72 2 min,
step5 : step 2-4 29 cycles, step6 : 75 10 min, step7 : maintain at 4

11. 遺伝子配列決定

遺伝子の配列決定は、CEQ2000 DNA analysis system(Beckman Coulter, USA)を用いて行った。*Sb-KEX2* の配列決定には、*S. bayanus* の部分的ゲノム配列 (GenBank accession numbers AL400950 及び AACG01001612) から設計したプライマー G 及び H を用いた。

12. 下面発酵ビール酵母の *Sc-KEX2* 破壊株の作製

下面発酵ビール酵母の *Sc-KEX2* 破壊株は、*Sc-KEX2* 遺伝子 open reading frame (ORF)の一部を hygromycin B 耐性遺伝子 *hph* に置き換えることにより作

製した。まず、*S. cerevisiae* 第 XIV 染色体 (*Saccharomyces* Genome Database) の塩基配列 202948-204426 を *hph* 遺伝子の塩基配列 580-1996 (GenBank accession numbers DQ407919) に置き換えた DNA 断片を作製した。次に、*hph* 遺伝子を含む *Sc-KEX2* 領域をプライマー I 及び J を用いて増幅し、増幅産物を下面発酵ビール酵母 BF1-L1 に導入して YPM-hygromycin 培地で選択した。*Sc-KEX2* 破壊の確認は、プライマー K-N を用いた PCR により行った。また、*Sc-KEX2* 特異的 PCR にはプライマー O 及び P を用いた。

13. 下面発酵ビール酵母の *Sb-KEX2* 破壊株の作製

下面発酵ビール酵母の *Sb-KEX2* 破壊株は、*Sb-KEX2* 遺伝子 open reading frame(ORF)の一部を Aureobasidin A 耐性遺伝子 *AUR1-C* に置き換えることにより作製した。まず、*S. bayanus* 塩基配列 509-853 (GenBank accession numbers AB444609) を *AUR1-C* 遺伝子の塩基配列 (GenBank accession numbers AB012284) に置き換えた DNA 断片を作製した。次に、*AUR1-C* 遺伝子を含む *Sb-KEX2* 領域をプライマー Q 及び R を用いて増幅し、増幅産物を下面発酵ビール酵母 BF1-L1 に導入して YPM-Aureobasidin 培地で選択した。*Sb-KEX2* 破壊の確認は、プライマー G 及び S を用いた PCR により行った。また、*Sb-KEX2* 特異的 PCR にはプライマー T 及び U を用いた。

Table 8 Yeast strains

Strains	Source and remarks
BF1-L1	<i>S. pastorianus</i> , Control strain from BF1, Bottom-fermenting brewer's yeast
YPH 500	<i>S. cerevisiae</i> laboratoly strain, <i>MATa ade2 lys2 leu2 trp1 ura3 his3</i>
NBRC 1127	Type strain of <i>S. bayanus</i>

Table 9 Primers

Primers	Sequences
G	AGTATCATCCATGCCCATATC
H	TGGGTGCTTTGGCAAATAAC
I	ACCCAATGGGTGCTTTGGCC
J	AGGCACGTCACCACGGATGG
K	GAATTGCCAAAAGAGCTGGC
L	CACAAGTGCATTGTAAGAGG
M	GATCTGTTTAGCTTGCCTTG
N	TTATTCCTTTGCCCTCGGAC
O	AACATCCGCTCTTGTATCAT
P	ATGTAGAAGTAGCGCTGATG
Q	ACGCAAAAAACTGGAATTTGA
R	TCATGGCTGTCCAGAAGCCGG
S	ATGGCAAACCCTTTTTCGAGA
T	GACCACACAACACGACAATAT
U	TGTTTGGGTCTGAATCGGGGT

第 3 節 結果

1. 下面発酵ビール酵母 *S. cerevisiae*-type-*KEX2* 遺伝子破壊株及び *S. bayanus*-type-*KEX2* 遺伝子破壊株の造成

下面発酵ビール酵母が保有する *Sc-KEX2* 及び *Sb-KEX2* のうち、私はまず、配列のわかっていない *Sb-KEX2* をクローニングし配列を決定した。*Sc-KEX2* と *Sb-KEX2* の DNA 配列の比較を Fig. 28 に、アミノ酸配列の比較を Fig. 29 に示す。両者の DNA 配列の相同性は 79%、アミノ酸配列の相同性は 73%であった。

Sc-KEX2 ORF の一部を *hph* 遺伝子 (hygromycin B 耐性遺伝子) に置き換えることにより、*Sc-KEX2* 破壊株を造成した。また、*Sb-KEX2* ORF の一部を *AUR1-C* 遺伝子 (Aureobasidin A 耐性遺伝子) に置き換えることにより、*Sb-KEX2* 破壊株を造成した。破壊の確認は PCR により行った。その結果、BF1-L1 には認められなかった挿入断片が、破壊株には認められた (Fig. 30a,d)。しかし、*Sc-KEX2* 破壊株にはもう一つのアレルの *Sc-KEX2* 遺伝子が残っており (Fig. 30b)、*Sb-KEX2* 破壊株にはもう一つのアレルの *Sb-KEX2* 遺伝子がまだ残っていた (Fig. 30e)。下面発酵ビール酵母 BF1 は 4 倍体と考えられるので、*Sc-KEX2* 破壊株、*Sb-KEX2* 破壊株共に、1 つの遺伝子が破壊されたもののまだ 1 つの遺伝子が残っていると考えられた。

2. 下面発酵ビール酵母 *S. cerevisiae*-type-*KEX2* 遺伝子破壊株及び *S. bayanus*-type-*KEX2* 遺伝子破壊株の表現型解析

私は、BF1-L1、*Sc-KEX2* 破壊株及び *Sb-KEX2* 破壊株の YPM 液体培地における 25 °C 及び 34 °C の増殖能を調べた (Fig. 31)。*Sc-KEX2* 破壊株は 25 °C では BF1-L1 と同程度の増殖能であったが、34 °C では BF1-L1 より増殖能がやや優れていた。一方、*Sb-KEX2* 破壊株は 25 °C では BF1-L1 より増殖能が劣っており、34 °C では BF1-L1 より増殖能がやや優れていた。これらの結果から、*Sb-KEX2* の破壊によって低温増殖不良となることがわかった。

次に、ビール酵母 BF1-L1 及び BF1-L1-*Sb-kex2* の形態を比較したところ、

両者の間で有意な差は検出されなかった。染色細胞の顕微鏡写真を Fig. 32 に、細胞の大きさ、形態、及びアクチンの局在の比較を Fig. 33 に示す。一倍体である *S. cerevisiae* 実験室酵母 BY4741 と違って、ビール酵母 BF1 が多倍体であり、BF1-L1- *Sb-kex2* には *Sc-KEX2* 及び *Sb-KEX2* 遺伝子がまだ残っていたために表現型がでにくいのではないかと考えられる。

SbKEX2 a.a.: 1 MKVRKSI I LCLWVVLSEPL I VLSQHI PLKDHTTRQYFA I ESNETLSRLGE I HPNWQYEHDVRLGNHNVFSKEVLSLGR 80
 ||||| | || || | | || ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||

ScKEX2 a.a.: 1 MKVRKYI TLCFWWAFSTSA LVSSQI PLKDHTSRQYFAVESNETLSRLEEMHPNWKYEHDVRLGPLNHVYFSKELLKLGKR 80

SbKEX2 a.a.: 81 SSLVELQENNDHI LSVHDLSPRNDFKRLP I PAPPVDSLLP I KEAEDKLS I NDPLFERQWHL I NPRFPDSD I NVVDLW 160
 ||| ||| | ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||

SbKEX2 a.a.: 81 SSLEELQGDNDHI LSVHDLFPRNDFKRLPVPAPPMDSSLLPVKEAEDKLS I NDPLFERQWHLVNPSPDSD I NVLDLW 160

SbKEX2 a.a.: 161 YNNITGAGVVA I VDDGLGYENEDLKNFCAEGSWDFNDNTNLPKRLADDDYHGTRCAGE I AAKKGNDFCGVGVGNNAKI 240
 ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||

SbKEX2 a.a.: 161 YNNITGAGVVA I VDDGLDYENEDLKNFCAEGSWDFNDNTNLPKRLSDDYHGTRCAGE I AAKKGNDFCGVGVGNNAKI 240

SbKEX2 a.a.: 241 SGIRI LSGEITTEDEAASLI YGLDTNDI YSCSWGPADDGRHLQGPSDLVKKALVKGVTEGRGSKGA I YVFASNGGARGD 320
 ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||

SbKEX2 a.a.: 241 SGIRI LSGDITTEDEAASLI YGLDVNDI YSCSWGPADDGRHLQGPSDLVKKALVKGVTEGRD SKGA I YVFASNGGTRGD 320

SbKEX2 a.a.: 321 NCNYDGYTNSI YSITIGA I DHKDLHPPYSESCSAVMAVYSSSGGEYI HSSDINGKCSDSHGGSAAAPLAAGVYTLLE 400
 ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||

SbKEX2 a.a.: 321 NCNYDGYTNSI YSITIGA I DHKDLHPPYSEGC SAVMAVYSSSGGEYI HSSDINGRCSNSHGGSAAAPLAAGVYTLLE 400

SbKEX2 a.a.: 401 ANPLSWRDVQYLS ILSAVGLEKNSDGDWQDSAMGK KYSRHYGFGKI DAYKLVEMAKTWNVNPQTWYVLYPTLYVSKSTN 480
 || | ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||

SbKEX2 a.a.: 401 ANPNLTWRDVQYLS ILSAVGLEKNADGDWRDSAMGK KYSRHYGFGKI DAHKL I EMSKTWENVNAQTWFYVLYPTLYVSKSTN 480

SbKEX2 a.a.: 481 STEETLESA I NISQESLKEGNFKRTEHVTVD I DTFRGT TTDVLI SPAGI VSKLGVVRSRDDSSGGFKGWTFMSVAHW 560
 ||||| || || || ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||

SbKEX2 a.a.: 481 STEETLESV I TISEKSLQDANFKR I EHVTVVD I DTE I RGT TTDVLI SPAGI I SNLGVVVRPRDVSSEGFKDWTFMSVAHW 560

SbKEX2 a.a.: 561 GESGAGEWK I KVKT TVNGHK I NFHSWR LKLFGES I DPSKTET FVFGNDKEEVEPATTEGS I SASSTGTGSTSSTGTGFTA 640
 || | ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||

SbKEX2 a.a.: 561 GENGVGDWK I KVKT TENGHR I DFHSWR LKLFGES I DSSKTET FVFGNDKEEVEPAATESTVSQY-----SASSTS I S I SA 635

SbKEX2 a.a.: 641 TDTGTSTAT TGTGSMAT TSLGVESSAAATS I TA I TDPDSDPNTPK- -NSPLQ- I KPC I T- F*--PYF*SVLYLWYTLCF 714
 | | | ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||

SbKEX2 a.a.: 636 TS-----TSSI ---SIGVETSA I PQT TASTDPDSDPNTPKLSSPRQAMHYFLT I FL I GATF I LVLYFMFFMKSR 702

SbKEX2 a.a.: 715 S*NQEGESEGQERKLMNLTS-LTRT-PNTIPP*ITVLP ELLS-----LGK RKTLS I FPMKT TLQACLHLKTAMLNIQSI 787
 | | | | ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||

SbKEX2 a.a.: 703 RRIRRSRAETYEFDI IDTDSEYDSTLDNGTSG-IT-EPEEVEDFDLSD EDHLASLSSENG-DA-EH--T----IDSV 772

SbKEX2 a.a.: 788 AC*QTKIHSATLQRKIP 804
 | |

SbKEX2 a.a.: 773 LTNENPF-SDPIKQKFP 788

Fig. 29 Amino acids sequence comparison of *Sc-KEX2* and *Sb-KEX2*

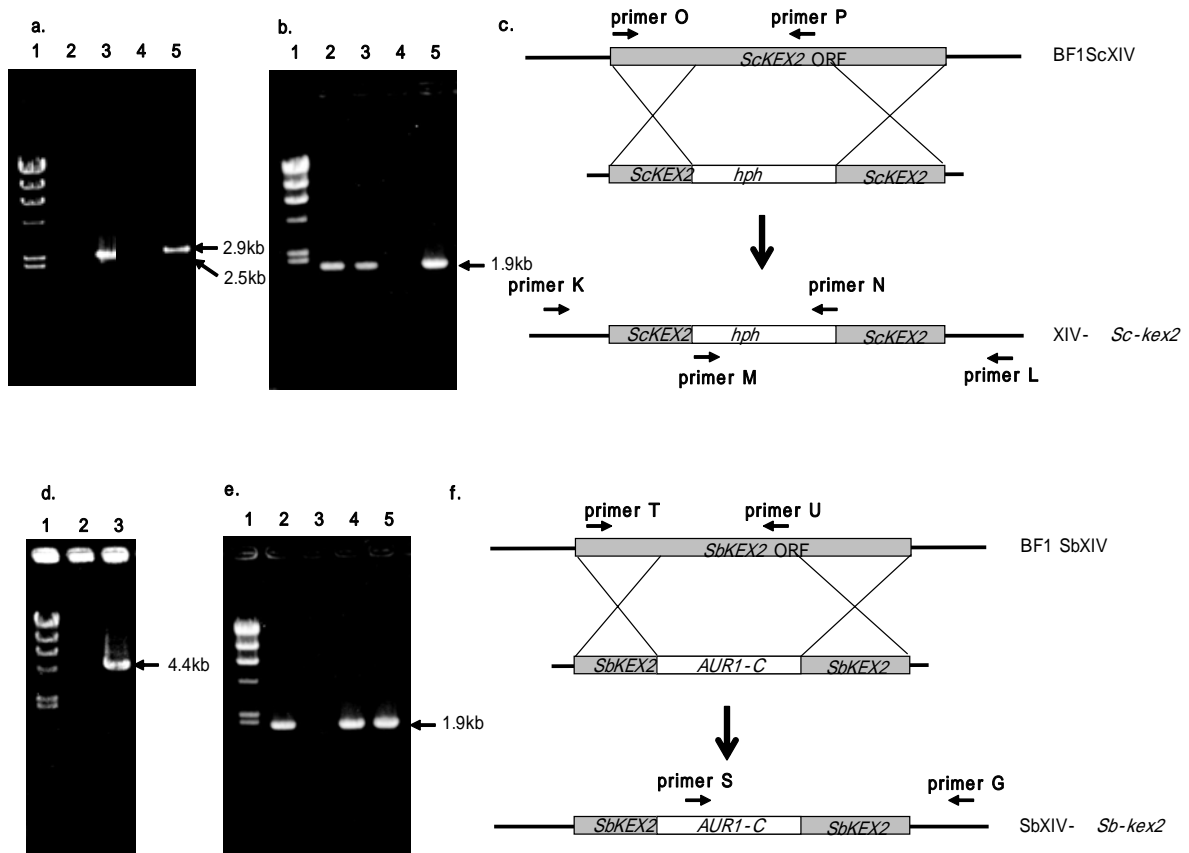


Fig. 30 Confirmation of disruption of *ScKEX2* and *SbKEX2*

a. Confirmation of disruption of *ScKEX2* using primers M and L (lanes 2 and 3), and using primers K and N (lanes 4 and 5). Lane 1, λ -*Hin* dIII; lanes 2 and 4, strain BF1-L1; lanes 3 and 5, strain BF1-L1- Δ *Sckex2*.

b. Specific PCR of *ScKEX2* using primers O and P. Lane 1, λ -*Hin* dIII; lane 2, BF1-L1; lane 3, YPH 500; lane 4, NBRC 1127; lane 5, strain BF1-L1- Δ *Sckex2*.

c. Positions of primers K-P.

d. Confirmation of disruption of *SbKEX2* by PCR using primers S and G. Lane 1, λ -*Hin* dIII; lane 2 BF1-L1; lane 3, strain BF1-L1- Δ *Sbkek2*.

e. Specific PCR of *SbKEX2* using primers T and U. Lane 1, λ -*Hin* dIII; lane 2, BF1-L1; lane 3, YPH 500; lane 4, NBRC 1127; lane 5, strain BF1-L1- Δ *Sbkek2*.

f. Positions of primers G, S-U.

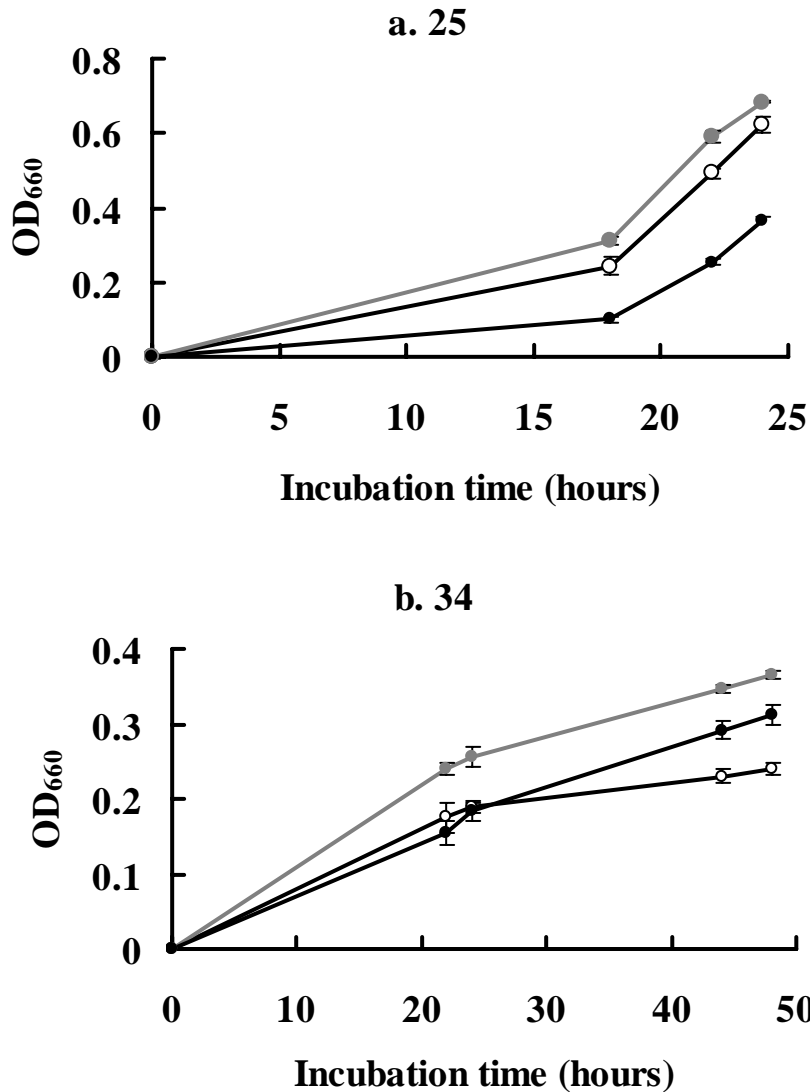


Fig. 31 Growth phenotypes of BF1-L1, its *ScKEX2* and its *SbKEX2* disruptant at 25°C (a) and 34°C (b).

Cells were inoculated into YPM at 2×10^5 cells/ml and incubated at 25°C with shaking; the OD₆₆₀ was then measured (a). Cells were inoculated into YPM at 5×10^5 cells/ml and incubated at 34°C with shaking; the OD₆₆₀ was then measured (b). Open circles, strain BF1-L1; gray circles, strain BF1- $\Delta ScKex2$; black circles, strain BF1- $\Delta SbKex2$.

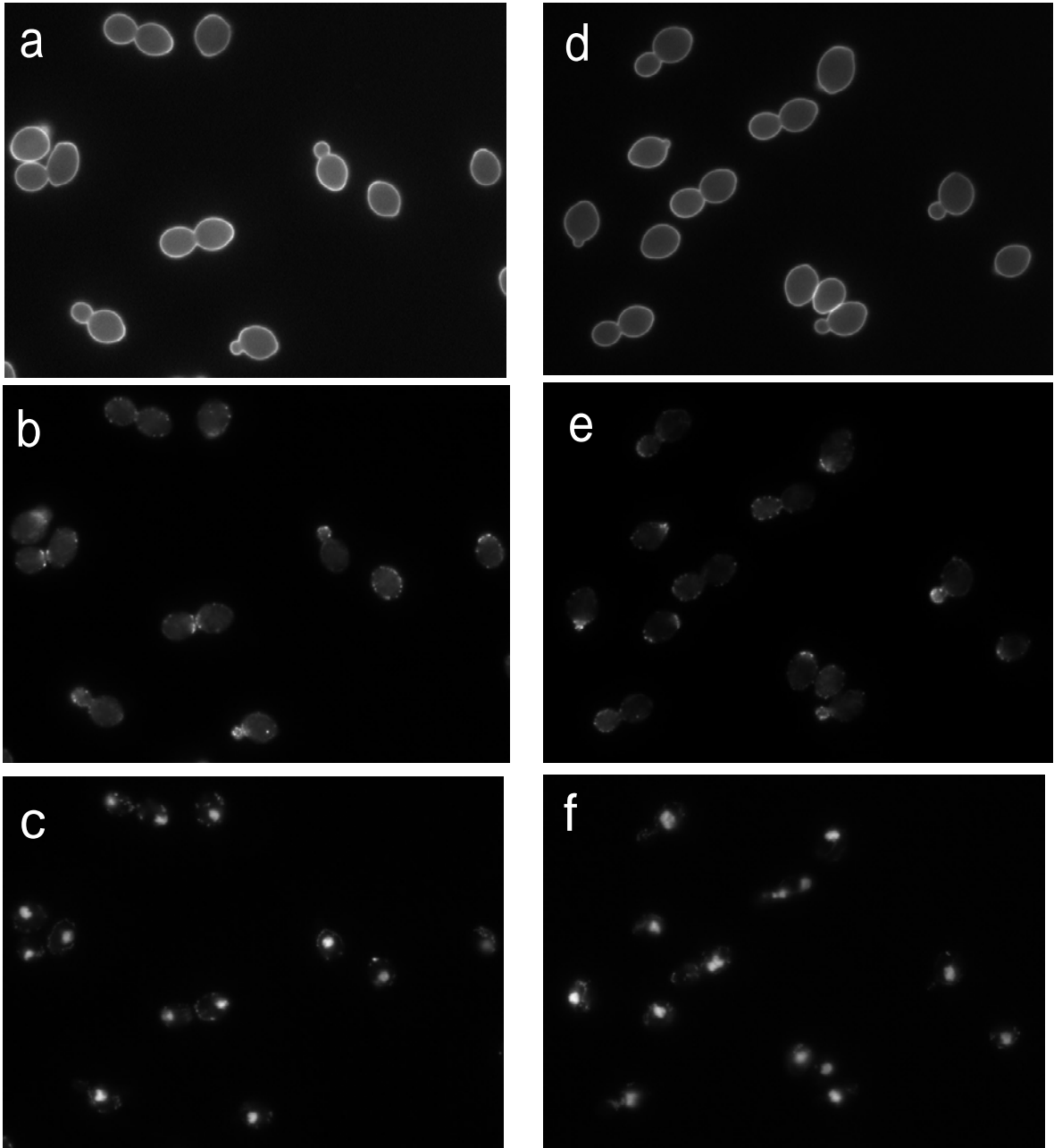


Fig. 32 Cell morphology

Cells was stained with FITC-ConA (a and d), rhodamine phalloidine (b and e) and DAPI (c and f). BF1 : a-c, BF1- *Sbkex2* : d-f

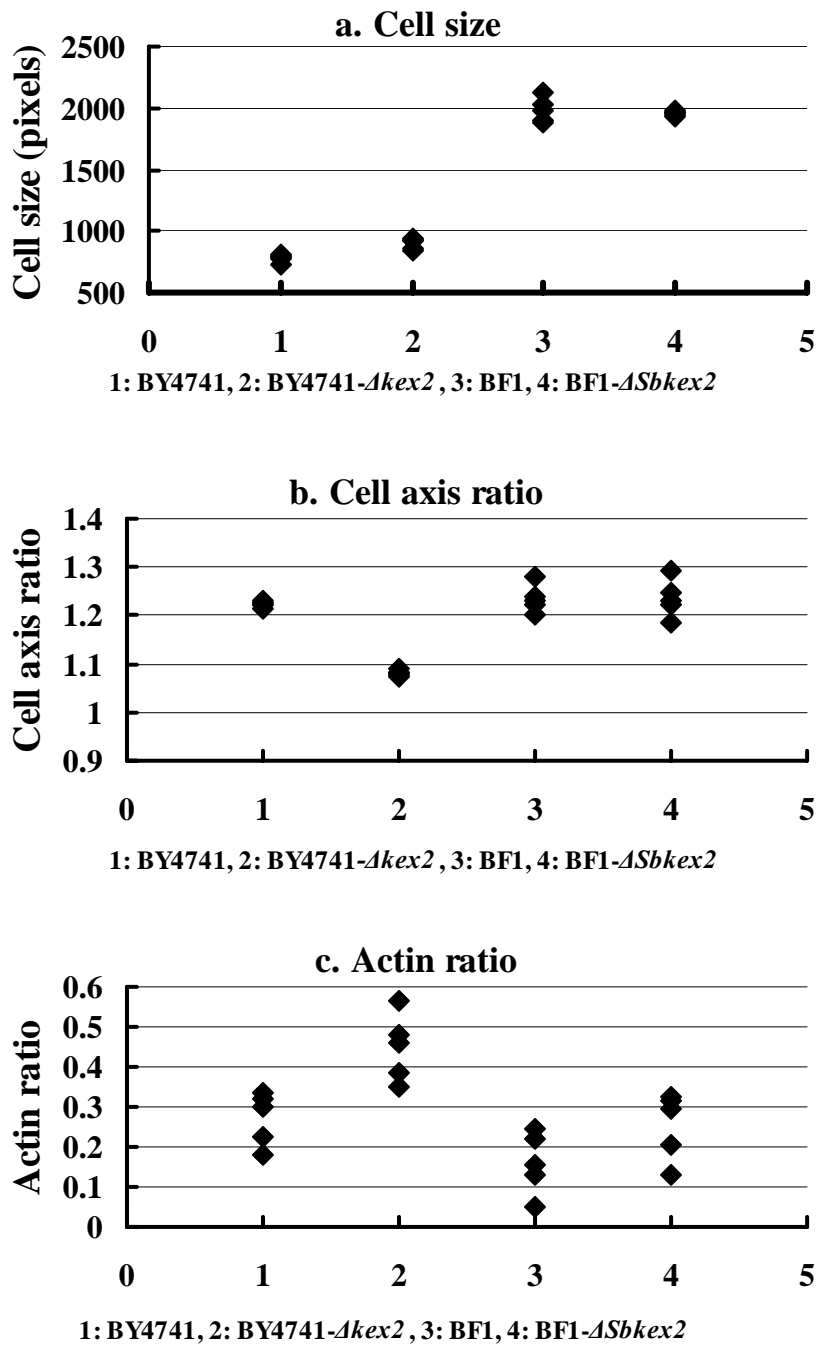


Fig. 33 Comparison of morphology
 a. cell size, b. cell axis ratio, c. actin ratio

第 4 節 考察

下面発酵ビール酵母の形質転換を行う場合、アミノ酸要求性などの *S. cerevisiae* で汎用されている選択マーカーを持たないため、選択マーカーとしては Aureobasidine A や hygromycin B などの薬剤耐性を用いるしか手立てがない。しかし、これら薬剤耐性に関しても *S. cerevisiae* に比べて感受性がかなり高く、選択は困難である。本研究では、選択マーカーとして Aureobasidin A、hygromycin B 及び G-418 を用いて 2 つの *Sc-KEX2* 遺伝子及び 2 つの *Sb-KEX2* 遺伝子の破壊を試みたが、Aureobasidin A、hygromycin B を選択マーカーとした場合にしか形質転換株が得られなかった。また、下面発酵ビール酵母の形質転換は頻度がかかなり低く、また対象とする遺伝子により形質転換の容易さが異なることを経験している。本研究で対象とした *KEX2* 遺伝子も形質転換しにくい遺伝子であるため、*KEX2* 破壊株は、*S. cerevisiae* 由来遺伝子が一つ破壊された株及び *S. bayanus* 由来遺伝子が一つ破壊された株しか取得することはできなかった。しかし、*KEX2* 遺伝子と低温増殖能との関連を解明するためには、*Sc-KEX2* 完全破壊株、*Sb-KEX2* 完全破壊株、*Sc-KEX2/Sb-KEX2* 完全破壊株を作成し、表現型を調査することが重要であると考えられる。そのためには下面発酵ビール酵母の遺伝子組み換え技術の改良を行っていくことが必要である。

本研究では、下面発酵ビール酵母の 2 つの *Sc-KEX2* 及び 2 つの *Sb-KEX2* のすべては破壊できなかったものの、1 つの *Sb-KEX2* の破壊で低温増殖不良が示された。一方、1 つの *Sc-KEX2* の破壊では低温増殖能に変化は認められなかった。このことから、下面発酵ビール酵母においては、*Sc-KEX2* 遺伝子ではなく *Sb-KEX2* 遺伝子が低温増殖能に関与していると考えられる。また、*Sb-KEX2* は 1 つでも破壊されると低温増殖能に影響すると考えられる。*Sb-KEX2* を 2 本破壊した場合、*Sb-KEX2* の機能に gene dosage 効果があるかどうかは興味深い。

第 3 章の考察で述べたように、下面発酵ビール酵母の低温増殖不良株は、低温増殖能に関してより高温で生育できる *S. cerevisiae* 側にシフトしているのではないかと考察した。このことは、*Sb-KEX2* 遺伝子が破壊された場合にのみ低温増

殖不良が観察されていることから興味深い。すなわち、ビール醸造に適した特性を保有する下面発酵ビール酵母は、*S. cerevisiae* と、より低温温度範囲で生育する *S. bayanus* の交雑により出現したと考えられる。その *S. bayanus* 由来遺伝子が何らかの理由で機能しなくなることにより、ビール醸造には適さない低温増殖不良株が発生し、より *S. cerevisiae* の性質に近づいたのではないだろうか。下面発酵ビール酵母は、低温の環境で、低温発酵に適した酵母として選択されてきた中で、*S. cerevisiae* 由来染色体に加えて、より低温で生育する *S. bayanus* の染色体を持つようになったと考えられる。低温の環境が取り除かれた場合には、下面発酵ビール酵母は新たな環境で生育していくために *S. bayanus* の遺伝子が機能しなくなった方向へ、すなわち *S. cerevisiae* に近づいていくのではないだろうか。

S. cerevisiae の *KEX2* 破壊株は知見どおりの形態変化を示したが、下面発酵ビール酵母では、1 つの *Sb-KEX2* 破壊で低温増殖不良を示したが、形態の変化は小さかった。*KEX2* が低温増殖能に及ぼす影響と形態変化に及ぼす影響の大きさが異なっているのであろうか。形態変化に関しても、*Sb-KEX2* を 2 本破壊した場合、及び *Sc-KEX2* を 2 本破壊した場合に形態変化がおきるかどうかは興味深い。

第 6 章

総括及び今後の展望

本研究で下面発酵ビール酵母の染色体構造が明らかとなった。その後、中尾らにより下面発酵ビール酵母の全ゲノム配列が決定された (Nakao *et al.* 2009)。これにより、下面発酵ビール酵母の遺伝子を解明する際には、*S. cerevisiae* タイプと *S. bayanus* タイプの両遺伝子の配列情報から、両遺伝子を区別して解析することが可能になった。このことは、下面発酵ビール酵母の特性を解明する上では大きな進歩である。それまでのような *S. cerevisiae* の知見や *S. cerevisiae* のゲノム配列を元にした研究では、*Saccharomyces* 属としての共通の特性は解明できるものの、*S. cerevisiae* とは異なる下面発酵ビール酵母に特有の性質を解明することはできなかった。しかし、*S. cerevisiae* とは異なる下面発酵ビール酵母に特有の性質こそが、下面発酵ビール酵母の研究で解明したいものである。下面発酵ビール酵母の染色体構造が明らかになったことにより、下面発酵ビール酵母の多くの特性の解明が期待される。

私は、下面発酵ビール酵母の特性のうち、ビールの香味や生産効率を左右する低温増殖について、まず、*S. cerevisiae* 実験室酵母の低温増殖不良原因遺伝子として *KEX2* 遺伝子を同定した。更に *KEX2* 遺伝子が下面発酵ビール酵母でも関与しているかを、*Sc-KEX2* 及び *Sb-KEX2* の両遺伝子を解析することにより調べた。本研究では下面発酵ビール酵母の特性として低温増殖不良を取り上げたが、今後その他の特性に関与する遺伝子を解明する際にも、*S. cerevisiae* タイプ及び *S. bayanus* タイプの両遺伝子を解析していくことが重要である。下面発酵ビール酵母の特性は、*S. cerevisiae* タイプの染色体と *S. bayanus* タイプの染色体を併せ持っていることに大きく影響を受けている。両染色体に由来する遺伝子を持っているからこそ、下面発酵ビール酵母としての特性が現れると考えられる。重要な遺伝子の欠失が起こったり、*S. cerevisiae* タイプ遺伝子と *S. bayanus* タイプ遺伝子のバランスが崩れて下面発酵ビール酵母の特性が失われることが、下面発酵ビール酵母の不安定性につながる。下面発酵ビール酵母の特性は特殊な染色体構造によるものであるが、同時に下面発酵ビール酵母の不安定性もまたこの特殊な染色体構造によるものでもある。下面発酵ビール酵母の染色体構造の複雑さはビール酵母の特性と不安定性の両方に深く関わっているといえる。このような下面

発酵ビール酵母の特徴を十分理解したうえで、ビール醸造に関係する特性とその不安定性について研究を行い、またビール生産に応用していく必要がある。

本研究の最大の成果は、下面発酵ビール酵母の高温耐性を利用して、低温増殖不良株を検出できる方法を開発したことである。従来の低温増殖能の評価方法は、フラスコスケールで増殖・発酵させた時のエキス低下を測定する方法があるのみで、時間がかかり現場の現象を必ずしも再現できているとはいえなかった。本方法は、試験したい酵母を一定量培地に塗抹後、34℃で培養するといった非常に簡便な方法でありながら、34℃で生育した酵母は程度の差はあるもののすべて低温増殖不良であることから、確実に低温増殖能を評価できる方法である。更に本方法のメリットは、正常な株は生育せず低温増殖不良株のみが生育する、すなわちポジティブセレクションであるため、たとえ試料中に低温増殖不良株が存在する割合が低くても検出が可能な点である。この検出方法を用いた応用がいくつか考えられる。

まず、生産現場において発酵タンク中の低温増殖不良株の存在率を把握し、品質管理に応用できる。前述のように、下面発酵ビール酵母は長期に繰り返し使用する。低温増殖能が不良となった酵母が出現しても、全体の増殖に影響がなければその出現に気付かないまま使い続け、その結果、全体の増殖に影響が出るほどまで低温増殖不良株の存在率が高くなってしまい、生産に影響を及ぼすことが考えられる。本方法を用いて定期的に低温増殖不良株存在率を把握しておくことにより、低温増殖不良株の存在率が増加した場合でも、全体の増殖に影響が出る前に対策をとることが可能である。

また、本方法は、低温増殖不良株を増加させない増殖条件や発酵条件を調査し、醸造技術の改善に応用できる。ビール醸造の発酵過程は10℃前後の低温であるが、酵母を立ち上げて増殖させる過程は25℃前後で行われる。比較的高温で培養する増殖過程で低温増殖不良株を出現させない条件を検討したり、低温増殖不良株が出現してもそれ以上増加させない条件を検討することにより、安定な醸造を行えるよう醸造技術を改善することができる。

更に、本方法は、安定な醸造を行うために、低温増殖能の安定な下面発酵ビー

ル酵母の選択に応用できる。低温増殖不良株の出現頻度が低い、より安定した下面ビール酵母を使用することは、生産現場での低温増殖不良出現のリスクを減らすことができる。

以上のように、本方法の開発は現場の生産に応用ができ、ビール品質や生産効率におきな効果をもたらすものと考えられ、ビール生産への貢献が期待される。

参考文献

- Anraku, Y. (1996) Structure and function of the yeast vacuolar membrane H⁺-ATPase, In : Konings, W. N., Kaback, H. R. and Lolkema, J. S. (eds) *Handbook of Biological Physics*, Elsevier Science B. V., Amsterdam, **2**, 93-109.
- Anraku, Y. (2005) Structure and function of the yeast vacuolar membrane ATPase. 帝京科学大学紀要 **1**. 1-12.
- Barnett, J. A., Payne, R. W. and Yarrow, D. (2000) *Yeasts: characteristics and identification* third edition. Cambridge University Press.
- Bell, P. J., Higgins, V. J., Dawes, I. W. and Bissinger, P. H. (1997) Tandemly repeated 147bp elements cause structural and functional variation in divergent *MAL* promoters of *Saccharomyce cerevisiae*. *Yeast* **13**, 1135-1144.
- Benjamini, Y. and Hochberg, Y. (1995) Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B (Methodological)* **57** (No. 1), 289-300.
- Casey, G. P., Xiao, W. and Rank, G. H. (1988) Application of pulsedfield chromosome electrophoresis in the study of chromosome XIII and the electrophoretic karyotype of industrial strains of *Saccharomyces* yeast. *J. Inst. Brew.* **97**, 239-243.
- Charron, M. J. and Michels, C. A. (1988) The naturally occurring alleles of *MAL1* in *Saccharomyces* species evolved by various mutagenic processes including chromosomal rearrangement. *Genetics* **120**, 83-93.
- Fujii, T., Nagasawa, N., Iwamatsu, A., Bogaki, T., Tamai, Y. and Hamachi, M. (1994) Molecular cloning, sequence analysis, and expression of the yeast alcohol acetyltransferase gene. *Appl. Environ. Microbiol.* **60** (8), 2786-2792.

- Fujii, T., Yoshimoto, H., Nagasawa, N., Bogaki, T., Tamai, Y. and Hamachi, M. (1996) Nucleotide sequence of alcohol acetyltransferase genes from lager brewing yeast, *Saccharomyce carlsbergensis*. *Yeast* **12**, 593-598.
- 原田恒雄 (1990) 金のジョッキに銀の泡. たる出版株式会社
- Iijima, K. and Ogata, T. (2010) Construction and evaluation of self-cloning bottom-fermenting yeast with high *SSU1* expression. *J. Appl. Microbiol.* **109** (6), 1906-1913.
- Jibiki, M., Ishibiki, T., Yuuki, T. and Kagami, N. (2001) Application of polymerase chain reaction to determine the flocculation properties of brewer's lager yeast. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **59**, 107-110.
- Kaiser, C., Michaelis, S. and Mitchell, A. (2000) *Methods in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Kaneko, Y. and Banno, I. (1991) Reexamination of *Saccharomyces bayanus* strains by DNA-DNA hybridization and electrophoretic karyotyping. *IFO Res. Comm.* **15**, 30-41.
- Kitamoto, K., Yoshizawa, K., Ohsumi, Y. and Anraku, Y. (1988) Dynamic aspects of vacuolar and cytosolic amino acid pools of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **170** (6), 2683-2686.
- Kobayashi, O., Hayashi, N., Kuroki, R. and Sone, H. (1998) Region of Flo1 proteins responsible for sugar recognition. *J. Bacteriol.* **180** (24), 6503-6510.
- Kodama, Y., Omura, F. and Ashikari, T. (2001) Isolation and characterization of a gene specific to lager brewing yeast that encodes a branched-chain amino acid permease. *Appl. Environ. Microbiol.* **67** (8), 3455-3462.
- Komano, H. and Fuller, R. S. (1995) Shared functions in vivo of a glycosyl-phosphatidylinositol-linked aspartyl protease, Mkc7, and the proprotein processing protease Kex2 in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 10752-10756.

- Kreger-van Rij (1984) *The Yeasts a taxonomic study*. third edition. Elsevier Science Publishers.
- Kurtzman, C. P. and Fell, J. W. (1998) *The Yeasts a taxonomic study*. fourth edition. Elsevier Science Publishers.
- Lodder, J. (1970) *The Yeasts a taxonomic study*. Second edition. Elsevier Science Publishers.
- Lodder, J. and Kreger-van Rij (1952) *The Yeasts a taxonomic study*. Elsevier Science Publishers.
- Martin, C. and Young, R. A. (1989) *KEX2* mutations suppress RNA polymerase II mutants and alter the temperature range of yeast cell growth. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 2341-2349.
- Martini, A. V. and Martini, M. (1987) Three newly delimited species of *Saccharomyces sensu stricto*. *Antonie van Leeuwenhoek* **53**, 77-84.
- Nakao, Y., Kanamori, T., Itoh, T., Kodama, Y., Rainieri, S., Nakamura, N., Shimonaga, T., Hattori, M. and Ashikari, T. (2009) Genome sequence of the lager brewing yeast, an interspecies hybrid. *DNA Research* **16**, 115-129.
- Ogata, T., Izumikawa, M., Kohno, K. and Shibata, K. (2008) Chromosomal location of *Lg-FLO1* in bottom-fermenting yeast and the *FLO5* locus of industrial yeast. *J. Appl. Microbiol.* **105**, 1186-1198.
- Ohsumi, Y. and Anraku, Y. (1981) Active transport of basic amino acids driven by a proton motive force in vacuolar membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **256** (5), 2079-2082.
- Ohya, Y., Sese, J., Yukawa, M., Sano, F., Nakatani, Y., Saito, T. L., Saka, A., Fukuda, T., Ishihara, S., Oka, S., Suzuki, G., Watanabe, M., Hirata, A., Ohtani, M., Sawai, H., Fraysse, N., Latgé, J. P., François, J. M., Aebi, M., Tanaka, S., Muramatsu, S., Araki, H., Sonoike, K., Nogami, S. and Morishita, S. (2005) High-dimensional and large-scale phenotyping of

- yeast mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 19015–19020.
- Oluwatosin, Y. E. and Kane P. M. (1998) Mutations in the yeast *KEX2* gene cause a Vma(-)-like phenotype: A possible role for the Kex2 endoprotease in vacuolar acidification. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 1534-1543.
- Ryu, S. -L., Murooka, Y. and Kaneko, Y. (1996) Genomic reorganization between two sibling yeast species, *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **12**, 757-764.
- Ryu, S. -L., Murooka, Y. and Kaneko, Y. (1998) Reciprocal translocation at duplicated *RPL2* loci might cause speciation of *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* **33**, 345-351.
- 斉藤日向 監修, 竹田正一郎・北畠克顕 共訳 (1995) パスツール ビールの研究. 大阪大学出版協会
- Sakumoto, N., Mukai, Y., Uchida, K., Kouchi, T., Kuwajima, J., Nakagawa, Y., Sugioka, S., Yamamoto, E., Furuyama, T., Mizubuchi, H., Ohsugi, N., Sakuno, T., Kikuchi, K. K., Matuoka, I., Kaneko, Y. and Harashima, S. (1999) A series of protein phosphatase gene disruptants in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **15**, 1669-1679.
- Sambade, M., Alba, M., Smardon, A. M., West, R. W. and Kane, P. M. (2005) A genomic screen for yeast vacuolar membrane ATPase mutants. *Genetics* **170** (4), 1539-1551.
- Sato, M., Watari, J. and Shinotsuka, K. (2001) Genetic instability in flocculation of bottom-fermenting yeast. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **59**, 130-134.
- Sato, T., Ohsumi, Y. and Anraku, Y. (1984) Substrate specificities of active transport systems for amino acids in vacuolar-membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **25**, 11505-11508.
- Sikorski, R. S. and Hieter, P. (1989) A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces*

- cerevisiae*. *Genetics* **122**, 19-27.
- Storey, J. D., Taylor, J. E. and Siegmund, D. (2004) Strong control, conservative point estimation, and simultaneous conservative consistency of false discovery rates: A unified approach. *J. R. Stat. Soc. Ser. B* **66** (Part 1), 187–205.
- Takata, Y., Watari, T., Nishikawa, N. and Kamada, K. (1989) Electrophoretic banding patterns of chromosomal DNA from yeasts. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **47**, 109-113.
- Takeshige, K., Baba, M., Tsuboi, S., Noda, T. and Ohsumi, Y. (1992) Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *J. Cell. Biol.* **119** (2), 301-311.
- Verstrepen, K. J., Van Laere, S. D. M., Vanderhaegen, B. M. P., Derdelinckx, G., Dufour, J-P., Pretorius, I. S., Winderickx, J., Thevelein, J. M. and Delvaux, F. R. (2003) Expression levels of the yeast alcohol acetyltransferase genes *ATF1*, *Lg-ATF1*, and *ATF2* control the formation of a broad range of volatile esters. *Appl. Environ. Microbiol.* **69** (9), 5228-5237.
- Watari, J., Takata, Y., Ogawa, M., Sahara, H., Koshino, S., Onnela, M. –L., Airaksinen, U., Jaatinen, R., Penttila, M. and Keranen, S. (1994) Molecular cloning and analysis of the yeast flocculation gene *FLO1*. *Yeast* **10**, 211-225.
- Yoshimoto, H., Momma, T., Fujiwara, D., Sone, H., Kaneko, Y. and Tamai, Y. (1998) Characterization of the *ATF1* and *Lg-ATF1* genes encoding alcohol acetyltransferases in the bottom fermenting yeast *Saccharomyces pastorianus*. *J. Ferment. Bioeng.* **86**, 15-20.

原著論文

Yamagishi, H. and Ogata, T. (1999) Chromosomal structure of bottom fermenting yeast. *System. Appl. Microbiol.* **22**, 341-353.

Yamagishi, H., Yuuki, T., Kagami, N., Yokogawa, Y., Shibata, K., Minemura, M. and Ohya, Y. (2001) Appearance of poor-fermenting variants in brewing yeast culture. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65 (10)**, 2361-2363.

Yamagishi, H., Ohnuki, S., Nogami, S., Ogata, T. and Ohya, Y. (2010) Role of bottom-fermenting brewer's yeast *KEX2* in high temperature resistance and poor proliferation at low temperatures. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **56**, 297-312.

関連論文

Yamagishi, H., Otsuta, Y., Funahashi, W., Ogata, T. and Sakai, K. (1999) Differentiation between brewing and non-brewing yeasts using a combination of PCR and RFLP. *J. Appl. Microbiol.* **86**, 505-513.

特許

特開 2003-000296 酵母の評価方法

特開 2006-034123 新規オリゴヌクレオチドとそれを用いた酵母評価方法

謝辞

本研究を行うにあたりご指導とご高配を賜りました東京大学・北本勝ひこ教授ならびに東京大学・大矢禎一教授に深甚なる謝意を表します。

本研究を行うにあたりご指導とご高配を賜りました東京大学・依田幸司教授に深甚なる謝意を表します。

研究を遂行する上で共同研究者として貴重なご助言をいただきました東京大学・野上識助教、東京大学・大貫慎輔博士、浅川（峯村）昌代氏に深く感謝致します。

研究を遂行する上で貴重なご助言をいただきました広島大学・湯川格史助教、酒類総合研究所・渡辺大輔博士に深く感謝致します。

本研究の遂行に格別の御理解と御高配を賜りましたアサヒビール株式会社・荻田伍代表取締役会長兼 CEO、泉谷直木代表取締役社長兼 COO、川面克行常務取締役兼常務執行役員、青木賢吉酒類研究開発本部長、笹本武志酒類開発研究所長兼酒類技術研究所長、尾形智夫酒類微生物技術部長に深く感謝致します。

研究を遂行する上で貴重なご助言と暖かい激励を頂きましたアサヒビール株式会社・柴田和憲生産本部副本部長兼生産部長、加賀美昇福島工場長、北川泰食品技術研究所長、横川幸知氏、結城敏文博士、河野克典博多工場醸造部長に深く感謝致します。

長年にわたり、ご指導とご高配と激励を賜りましたアサヒビール株式会社 OB 藪内精三博士に深く感謝いたします。

研究を遂行する上で御理解と御高配を賜りましたアサヒビール株式会社 OB・廣野辰彦氏、中川正人氏、江藤正和氏、坂井和久博士に深く感謝致します。

研究を遂行する上でご助言と暖かい激励を頂きましたアサヒビール株式会社・山下博博士、大竹康之研究開発戦略部長、望月直樹食の安全研究所長、鰐川彰香味成分解析部長、船橋互氏、本山靖朗博士、只見秀代食品微生物技術部長、地引真紀子氏、鈴木康司名古屋工場品質管理部長、安原貴臣氏、飯島和丸博士、岸本

徹博士、大内佳奈子氏、石引智子氏、田中美和氏、浅野静氏、四方美穂博士に深く感謝致します。

研究を遂行する上で貴重な実験データを提供いただきました稲垣綾子氏、ミルン繭子氏、横山東氏、関友子氏、相澤紘子氏に心から御礼申し上げます。

多くのご支援を頂きましたアサヒビール株式会社・研究開発センター、本店、工場の皆様に厚く御礼申し上げます。

最後に、研究生活をサポートしてくれた家族に感謝いたします。