

細胞融合及び組換えDNA技法を用いた
ビール酵母の育種

Breeding of brewer's yeast by use of
protoplast fusion and recombinant DNA
technology

渡 淳 二

①

細胞融合及び組換え DNA 技法を用いた
ビール酵母の育種

Breeding of brewer's yeast by use of
protoplast fusion and recombinant DNA
technology

サッポロビール株式会社 醸造技術研究所

渡 淳二

目次

第一章	序論	1
第二章	実験室酵母 <i>S. cerevisiae</i> および実用ビール酵母の高頻度細胞融合体取得のための諸条件の検討	8
第三章	細胞融合による抗汚染菌性ビール酵母の育種	24
第四章	酵母 <i>S. cerevisiae</i> の凝集性を支配する遺伝子 <u>FL01</u> , <u>FL05</u> の遺伝学的研究	49
第五章	凝集性を支配する遺伝子のクローン化と組換え DNA 技術を用いた実用凝集性酵母の育種	62
第六章	ビール酵母の育種の今後の展望	97
	材料と方法	99
	文献	106
	謝辞	111
	論文要旨	

第一章

序論

酵母はビール製造工程において中心的な役割を果し、製品ビールの香味に最も大きな影響を与える(図 1-1)¹⁾。設計した品質のビールを造るために、醸造技術者は発酵工程における発酵管理を綿密な計算と長い経験に基づき慎重に行っている。しかし、最も重要なことは用いる酵母の選択であり、望ましい性質を持つ酵母を選抜していくこと及びそれを常に最良の状態に維持していくことは、醸造技術者にとって最大関心事のひとつである(図 1-2)。また、近年のビールの種類の多様化並びに個性化のトレンドにおいても、用いる酵母を変えることによりビールの香味を微妙に調節して消費者の要求に対応したものも多く見られる。

では、このような、酵母に対する要求に各ビール会社はどのように対処しているのだろうか(表 1-1)。各社はそれぞれ独自の酵母バンク(数多くの実用ビール酵母のコレクション)を有しており、通常は醸造技術者の要求する性質を持ったビール酵母を検索し供給することができる。しかし、今後の製品の種類の多様化(通常のビール以外の特殊なビール)や醸造工程(醸造設備や醸造条件)の改変への対応を考えた場合、既存の酵母バンクの利用だけでは必ずしもそれらに答えられる酵母の供給は難しいと想像される。ここに、より目的に合致したビール酵母を積極的に造る、即ち育種によるビール酵母の造成が必要になってくる理由がある。

従来より、ビール酵母の育種は突然変異法を中心に試みられてきたが²⁾、ビール酵母は通常二倍体以上の高次倍数体であり変異株を取得するのが困難で、また仮にある望む変異が起きたとしても同時に他の望ましくない別の変異を伴うことが多く、実用上成功した例はほとんどない。また、ビール酵母以外の産業用実用酵母(ワイン酵母、ウイスキー酵母、日本酒酵母等)の場合は交配による育種もある程度行えるが³⁻⁵⁾、ビール酵母、特に下面ビール酵母は、胞子形成率および胞子発芽率は非常に低く接合子の取得は困難で、事実上性的交配による育種は不可能である⁶⁻⁷⁾。

このような背景のもとに、1970年代後半より急速に進展してきた分子生物学的手法と知識が、1980年代前半にはビール酵母を含む産業用酵母の育種に応用され始めて⁴⁻⁸⁾、現在では細胞融合や組換え DNA 技術等の手法が有力な育種技術として定着している(表 1-2)。このような新しい育種技術は酵母の性や倍数性に関係なく行うことができ、また同種の酵母からだけではなく異種異属の酵母、また酵母以外の異種

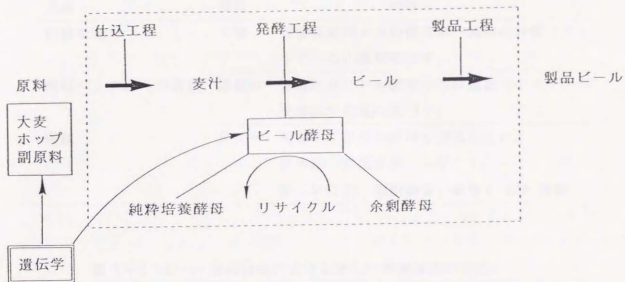


図 1-1 ビール製造における酵母の役割

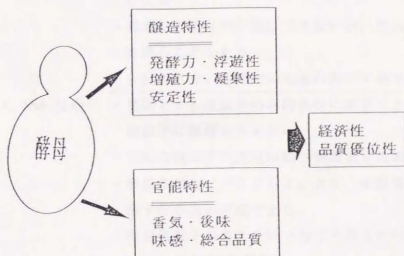


図 1-2 ビール製造および品質に与える酵母の影響

表 1-1 ビール酵母の選抜方法

方法	場所	内容
純粋培養	工場	保管種酵母からの優良単一細胞の分離（リントナーの小滴培養法等）
酵母バンクからの選抜	研究所	各種保存ビール酵母からの選抜（小スケール発酵試験結果に基づく）
育種	研究所	積極的に優良な酵母を造成していく 従来法：突然変異、交配 新しい方法：細胞融合、組換え DNA 技術

表 1-2 ビール酵母育種における新しい育種技術の利点

方法	利点
細胞融合	<ul style="list-style-type: none"> ・複雑な遺伝的支配を受ける形質の導入が可能である（一度に複数の遺伝子の導入が可能である） ・適当な遺伝的マーカーがある株どうしてであれば手軽に行える ・必ずしも結果の予測はできないが、思わぬ好結果を得ることがある ・交配できない株間での雑種取得が可能である
組換え DNA 技術	<ul style="list-style-type: none"> ・目的とする遺伝子のみ特異的に改変できるので、他の遺伝子に影響を与えない ・目的の遺伝子の発現時期と発現量を調節できる ・多種多様な（バクテリア、カビ、植物等由来の）有用遺伝子の利用が可能である ・有用遺伝子の導入だけでなく不要または有害な遺伝子の特異的な破壊ができる

生物（例えばバクテリア、かび、動植物等）の有用な遺伝子を目的の酵母内で発現させることができる画期的な手法である。ここに、従来現実的に不可能であったビール酵母の育種の道が開けてきた。

本序論においては、まず具体的なビール酵母の育種ターゲットについて解説し、さらに近年ビール酵母の育種に用いられている新しい手法についての紹介を行う。

1) 育種ターゲット

育種ターゲットは、ビール醸造工程の工程改善（工程の効率化）に寄与するものと、ビールそのものの品質改善や特種製品生産（一部の新製品）に寄与するものに大別される（表 1-3）²⁾。いずれの育種ターゲットも、基本的にはビール製造設備の改変（例えば、遠心分離装置を用いれば必ずしも凝集性酵母を用いる必要はない、工程全般にわたる微生物管理が十分であれば抗汚染菌性酵母を用いる必要はない等）や醸造工程の改変（例えば、麦汁の仕込み過程で酵素 β -グルカナーゼの投入により麦汁中の β -グルカンを分解する、後発酵を十分行いビールを十分熟成させてジアセチル等の未熟成分の除去をはかる等）によってある程度回避可能ではある。しかし、工場の製造設備の改変には巨額の設備投資が必要であり、工程の改変は製造コストの面から不利であり、また酵素剤の使用もある程度不純物の混入を念頭に置かなければならず、やはり酵母自身の改良がなされるなら製造プロセス的にも品質改善的にも最も安価にかつ安定してビールを製造できると考えられる。

表 1-3 ビール酵母の育種目標例

目的	育種内容	目標
工程の効率化	<ul style="list-style-type: none"> ・凝集性酵母 ・大麦由来 β-グルカン分解性酵母 ・抗汚染菌性酵母（キラー酵母等） 	作業性向上、連続発酵用 ビールろ過性向上、混濁防止 野生酵母・細菌汚染防止
品質改善 新製品 等	<ul style="list-style-type: none"> ・ジアセチル非生成酵母 ・硫化水素非生成酵母 ・タンパク質分解性酵母 ・でんぷん発酵性酵母 	未熟臭の防止 硫化水素臭の防止 混濁防止 ダイエットビール製造

2) 育種手法

新しい育種手法は、細胞融合法、組換え DNA 技術の利用、および近年の分子生物学的各種実験技術の利用等である。細胞融合は、酵母 *S. cerevisiae* の実験室株においては 1976 年に Solingen *et al.*⁹⁾ により初めて報告された。また、ビール酵母を用いた細胞融合実験はすでに 1970 年代末に報告されている¹⁰⁾。しかし、実験室酵母の場合に比べてビール酵母の場合は融合体の取得頻度が極端に低く(筆者らの経験ではうまくいっても約 1/10 から 1/100 程度は低い)、育種上の妨げになっていた。これは、ビール酵母のプロトプラストから正常な細胞への再生効率が低いこと、ビール酵母は倍数性が高く融合体はさらに倍数性が上がり遺伝的に不安定になり、仮に融合しても元の親株に近い遺伝的組成に戻ってしまう、等が主な理由と思われる。さらに、細胞融合法は望んだとおりの結果が必ずしも得られないという欠点がある。これは、特にビール酵母を用いた場合顕著なものとなる。つまり、得られた融合体はその両親株の望ましい性質のみを示すようになるわけではなく、むしろ両親株よりも劣る株が得られることがしばしばである。実際にビール醸造に用いられている実用ビール酵母株は、長い年月の間にわたって選抜されてきた、ある意味で一応完成された株であり、それを細胞融合等で染色体レベルで大きく操作することは、全体の遺伝的組成のバランスを壊すことになるからであると考えられる。もし改変したい性質が遺伝学的にはっきり分かっているなら、後述する組換え DNA 技術を利用する方が親株に与える悪影響は遙かに少ないと考えられる。しかし、結果が予測できないが故にたまたま優良株を取得できる可能性を秘めており、細胞融合法は魅力的な面もある。つまり、ビールの香味改良等のような、酵母の遺伝学的知識からはなかなか研究の糸口がみつけないような問題の場合、数多くの融合体を丹念に調べて行けば面白い香味の特徴を示す株が得られるかもしれないということである。

組換え DNA 技術は実験室酵母 *S. cerevisiae* において 1978 年 Hinnen *et al.*¹¹⁾ により初めて報告された。ビール酵母のような実用酵母は、実験室酵母(主に一倍体)とは異なり通常の宿主-ベクター系の構築に必要な栄養要求性株の取得が困難で(倍数性が高い)、またそのような変異株を取得するために行う変異処理は親株の優良な性質をも損なうことになりやすい。このことから、薬剤耐性遺伝子等を利用する、形質転換体の直接選抜が実用株の形質転換法として望まれていた。1980 年代半ばになってようやくアミノグリコシド系の抗生物質である G418 の耐性遺伝子 (Tn903)^{12) 13)} や銅耐性遺伝子 (CUP1)¹⁴⁾ の利用が報告さ

れ、最近ではその他に農業の一種である sulfometuron methyl に対する耐性遺伝子 (SMR1)¹⁵⁾ が用いられている。組換え DNA 技術の最大のメリットは、前述のように狙った遺伝子のみ操作することができ、他の遺伝子には影響を与えないということである。しかし、逆に改変すべき性質についての遺伝学的な知識がなければ事実上組換え DNA 技術を用いた改変を行うことができないし、また改変すべき性質に関与する遺伝子が数多くあればこれもまた一挙に改変することは難しい。ともかく、現在では実験室酵母でできるほとんどの組換え DNA 技術をビール酵母等実用酵母に応用することが可能であり、プラスミドによる遺伝子の導入、染色体 DNA への遺伝子の組み込み (integration)、染色体上の好ましくない遺伝子の破壊 (gene disruption) や改変優良遺伝子との交換 (gene replacement) 等の染色体工学的な手法も試み始められてきている¹⁶⁾。また、人工染色体の利用¹⁷⁾、巨大 DNA である染色体 DNA そのものを用いた形質転換法も開発され¹⁸⁾、通常の遺伝子操作ではなし得なかった、一度に数多くの遺伝子を酵母細胞に導入することも可能になった。今後、ビール酵母の育種技術として、ますます進展するであろう分子生物学的知識の恩恵を受けながら、組換え DNA 法が主流になっていくことは疑う余地のないことである。その他、近年開発された分子生物学的技術には、例えば、染色体 DNA の電気泳動法 (Pulsed-field Gel Electrophoresis)¹⁹⁻²⁰⁾ による核型解析 (Karyotyping)、RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) を利用した DNA フィンガープリンティング法 (染色体 DNA あるいはミトコンドリア DNA)²¹⁻²²⁾ による個々の株の識別等、ビール酵母の育種に利用できる有用なものが多い。

このような状況下で、筆者は 1980 年初頭よりビール酵母の分子育種をめざして実験を始めた。まず、細胞融合法によるビール酵母の育種を手掛けた。当時は、まだ多くの研究室で酵母 *S. cerevisiae* の実験室株において、安定して融合体が取得できるプロトプラストの調製が確立されていなかった。筆者は、まずその点の検討を行った。次に、実験室株で確立した条件を用いて、実際に実用ビール酵母を用いた細胞融合実験 (抗汚染菌性ビール酵母の育種) を行った。その後、1986 年に筆者らは日本で初めて各種醸造酵母の電気泳動法 (パルスフィールド電気泳動法) による染色体 DNA の分離に成功したことを報告した²³⁾。この技術を用いて、当時は解析できなかった融合体ビール酵母の染色体 DNA 構造の解析を行ない、当時得られた融合体は間違いなく核融合体であることを証明した。²⁴⁾ 次に、筆者は酵母、特に下面ビール酵母の凝集性の

分子レベルでの解明をめざして凝集性遺伝子の研究を始めた。ビール酵母の凝集性は、現象としてはすでにバスツールが 1876 年にその著書で紹介している²⁵⁾。しかし、現象としての定量性に欠ける、つまり凝集性の強さを客観的に測定する良い方法がない(凝集性の有無だけでなくその強さも考慮しなければならない)、また遺伝学的にも非常に複雑であること等から、現在に至るまで、酵母の凝集性についてほとんど学問的な解明はなされていない。ただ、酵母の凝集性のもつ産業的重要性については古くから着目されており、ビール醸造(特に下面ビール酵母)においての実用的研究(発酵条件、麦汁組成、菌株の種類等の凝集性への影響)は膨大なものがある。筆者は、ビール酵母の凝集性の分子レベルでの解明をめざすにあたり、いくらか遺伝学的な解析の進んでいる凝集性遺伝子 $FL01^{26, 27, 28)}$ と非常に強い凝集性を示す $FL05^{10, 28)}$ の二つの遺伝子に注目した。まず、これらの遺伝子の遺伝学的な研究を行い、次にそれらの遺伝子をクローン化し、最終的にはこれらのクローン化した遺伝子を用いた優良実用凝集性ビール酵母の育種を目標とした。

第二章

実験室酵母 *S. cerevisiae* および実用ビール酵母の高頻度細胞融合体取得 のための諸条件の検討

序

細胞融合法によりビール酵母を育種していくためには、効率よく細胞融合体を得る技術の確立が必須である。通常の実験室酵母 *S. cerevisiae* を用いた場合細胞融合体が得られる頻度は、供与プロトプラスト当たり 10^{-5} ~ 10^{-6} (再生体当たりではその 1/10 から 1/100) 以下と言われており非常に低い。²⁹⁾ 細胞融合体が得られるまでには、1) 正常細胞からのプロトプラストの形成、2) プロトプラストの融合、3) プロトプラストから正常細胞への再生、の三つのステップを経る必要がある。本章においては、プロトプラストの調製方法を綿密に検討し、プロトプラスト化率が高く、かつ正常細胞への再生率が高いプロトプラストを、常に安定して得られる条件を見いだすことを目的とした。この条件は、高頻度に細胞融合体を得るための前提条件となる。まず、最初に実験室酵母 *S. cerevisiae* について種々の条件検討をし、その結果をもとに、次章において実際のビール酵母についての細胞融合実験結果を示す。

第一節

プロトプラスト調整時における浸透圧安定剤の選択

結果

プロトプラスト化反応は Solingen *et al.* の方法³⁾を参考にし、以下種々の改良を図った。融合に用いる菌体は一般に対数増殖期の細胞がよいとされている。³⁰⁾それは、定常期の細胞のように培養齢を増すと細胞壁が厚くなり、細胞壁溶解酵素チモリアーゼ (Zymolyase) に対する感受性が低くなるためと考えられている。我々は、当初 16 時間培養の菌体を用いていたが、チモリアーゼがうまく作用せず、プロトプラスト化がうまくいかなかった。そこで、チモリアーゼに対する感受性を上げる試みとして、16 時間培養の菌体を集菌し同量の新たな培地に植え替え 3 時間培養を行ったところ、再現性よくプロトプラスト化を行うことができたので、以後菌の培養は本法に従った。新しい培地に植え替えることにより、菌の成育がリフレッシュしたためかもしれない。尚、酵母の形質転換体を取得する場合においても本培養法は有効であり (プロトプラストを用いて形質転換を行う場合でも、リチウム法等プロトプラスト化しない菌体を用いる場合のいずれでも)、チモリアーゼに対する感受性だけではなく、リチウム処理などの細胞表層の処理にも菌の培養条件は大きな影響を与える可能性があることが示唆された。

次に、実際のプロトプラスト化の諸条件について検討した。まず、プロトプラスト化を行う際の浸透圧安定剤について調べた。プロトプラストは浸透圧に対して感受性なので、チモリアーゼ反応液において必ず 0.6-1.0 M のソルビトールや塩化カリウムなどの浸透圧安定剤を加える必要がある。プロトプラスト化の程度をモニターする方法として、反応液 (浸透圧安定剤を含んでいる) の一部を水または高張緩衝液 (反応液と同じ浸透圧安定剤を含む) に希釈し、経時的に濁度の変化を調べた。プロトプラスト化の進行と共に、浸透圧に感受性のプロトプラストは水希釈により破裂して濁度は減少する。まず、1 M のソルビトールまたは 1 M の塩化カリウムを用いた場合を比較した (図 2-1)。60 分程度の反応時間において、ソルビトールを用いた場合は、プロトプラスト形成率が悪く (水希釈での濁度の減少率が低い)、またできたプロトプラストも高張緩衝液中で破裂していく傾向があった。しかし、塩化カリウムを用いた場合は、プロトプラストの形成率が高く (水希釈での濁度の減少が速やか)、ま

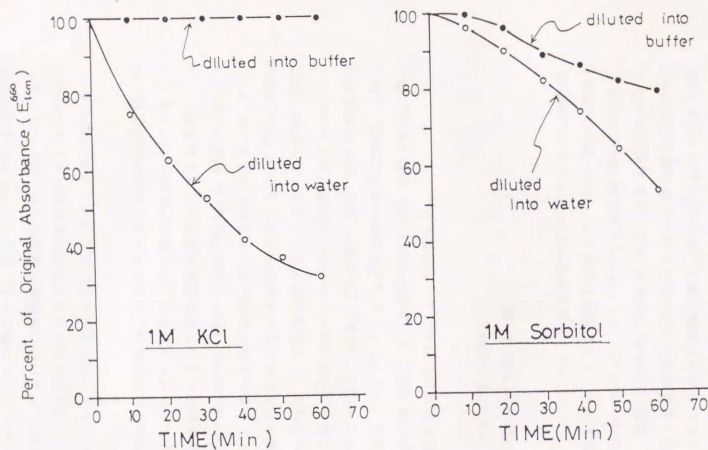


図 2-1 プロトプラスト形成反応における浸透圧安定剤の比較

一倍体実験室酵母 *S. cerevisiae* 0708-11-16A のプロトプラスト形成過程を二種類の浸透圧安定剤を用いて比較した。プロトプラスト化反応液は 1 M KCl または 1 M Sorbitol を含む 5 mM トリスマレイン酸, pH7.5, Zymolyase-5000 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 50 mM β -Mercaptoethanol である (初発菌濃度は $1 \sim 2 \times 10^8$ cells/ml で全体で 20 ml スケール)。10 分ごとに 0.1 ml ずつサンプリングし、3 ml の水または高張緩衝液 (1 M KCl または 1 M Sorbitol を含む 5 mM トリスマレイン酸, pH7.5) で希釈し、濁度の変化をモニターした。

たできたプロトプラストは高張緩衝液中で破裂せず物理的に安定であった。次に、塩化カリウムの濃度について調べたところ (0.4-1.0 M)、0.8 M 以下では高張緩衝液中での濁度の低下をまねいた。ソルビトールの場合でも、濃度を上げてやれば高張緩衝液中での濁度の減少を防げるかもしれないが、反応液の粘性が上昇し扱いにくくなり実用的でなく、またソルビトールではプロトプラストの形成率が塩化カリウムの場合に比べて悪いので、以後プロトプラスト化反応液においては 0.8-1.0 M の塩化カリウムを浸透圧調節剤として用いた。

細胞壁溶解酵素はいくつか市販されているが、チモリアーゼ (生化学工業社製) が最も入手しやすいのでそれを用いた。プロトプラスト化の際の反応液中のチモリアーゼの濃度は、使う菌の種類や菌体濃度によって最適濃度が異なるようであるが、Zymolyase-5000 の場合では我々の条件では一般的に 100-300 $\mu\text{g/ml}$ 程度がよいようである。濃すぎるとプロトプラストの再生率が極端に低下するからである。尚、チモリアーゼは酵素の精製度により種々の比活性のものが発売されているが、必ずしも活性はメーカーの示す数値とパラレルではなく、実験者は各グレードごとに自分の扱う菌について最適条件を検討すべきである (現在 Zymolyase-5000 は発売されていない)。

以上の条件をまとめると図 2-2 のようになる。この方法で、ほぼ 100% の形成率のプロトプラストが調製でき、またプロトプラストから正常細胞への再生率は、実験室酵母 *S. cerevisiae* の場合 20-30% 程度、ビール酵母の場合 10% 程度である。尚、プロトプラストの形成率および再生率は次の式によって計算した。

$$\text{プロトプラスト形成率 (\%)} = (N-B)/N \times 100$$

$$\text{プロトプラスト再生率 (\%)} = (A-B)/(N-B) \times 100$$

ここで、N (cells/ml) は、プロトプラスト化反応開始時にサンプリングし希釈後 YEPD 寒天培地 (2% 寒天含有) プレート上に塗布し出現したコロニー数から計算した菌濃度 (初発菌数)。A (cells/ml) は、プロトプラスト反応終了時にサンプリングし高張緩衝液で希釈後、高張 YEPD培地 (YEPD に 0.8-1.0 M の塩化カリウムと 3% の寒天を添加) に菌液を重層培養して得られたコロニー数 (再生したプロトプラスト数とプロトプラスト化しなかった菌数の和)、B (cells/ml) は、A と同様にサンプリングし水で希釈した後 YEPD 寒天培地上に塗布して出現したコロニー数 (プロトプラスト化しなかった菌数)。プロトプラスト化がうまく進行した場合は、B は N や A に対して十分小さいので、プロトプラスト形成率は 100% を示し、またプロトプラスト再生率は $A/N \times 100$ で計算できる。

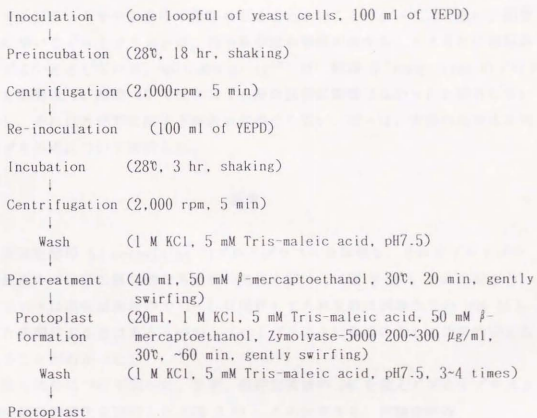


図 2-2 プロトプラストの調製方法

第二節

プロトプラストの保存

前節で得られた条件を用いてプロトプラストを調製し細胞融合を行うことにした。但し、プロトプラスト調製には、3 時間程度のリフレッシュ培養も含めて全体で 6-7 時間必要であり、当日中に細胞融合実験を行うことが時間的に難しかった。そこで、調製したプロトプラストをやむを得ず保存せざるをえないことになった。一般に、細胞融合実験に用いるプロトプラストは、再生率や融合効率の点から、できるだけ調製直後のものがよいとされている。Solingen *et al.*⁹⁾ は、酵母 *S. cerevisiae* のプロトプラストを調製後 24 時間 4℃ で保存しても融合頻度に影響はなかったと報告している。しかし、それ以外保存に関する報告は見当たらない。我々は、実験の効率化を考えて、まずその点について検討した。

結果

まず、実験室酵母 *S. cerevisiae* のプロトプラストを調製し、それをプロトプラスト化緩衝液中で保存し経日的な再生数の変化を調べた (図 2-3)。この結果から、プロトプラストは高張緩衝液中で 3~4 日保存しても再生数は調製当日の 50% 以上あり、また株間による差はあるものの、プロトプラストは保存に対して比較的安定なものであることがわかった。

次に、保存条件について調べた。まず、保存緩衝液の pH を変えてプロトプラストの再生数の経日的変化を検討した (図 2-4)。この結果から、実験室酵母 *S. cerevisiae* でもビール酵母でも、弱酸性での保存がよいことがわかった。さらに、保存において比較的 pH に敏感であったビール酵母のプロトプラストを用いて保存の至適 pH を検討した (図 2-5)。高張トリス-マレイン酸緩衝液および高張クエン酸-リン酸緩衝液を用いて、pH3.6 から pH 8.6 の範囲で調べたところ pH5 付近が最適であることがわかった。また、保存温度については、図 2-6 に示すように低温ほど保存性がよく、20℃ 以上の高温ではプロトプラストは急速にその再生数を減少させた。

以上のことから、プロトプラストの保存条件として、1.0 M 塩化カリウムで浸透圧を調節した 5 mM トリス-マレイン酸 (pH 5.5) 中で 5℃ という最適条件を設定した。

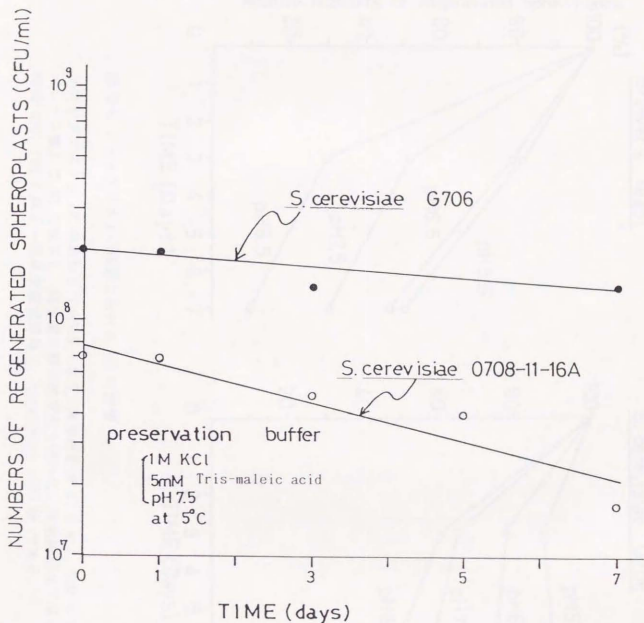


図 2-3 プロトプラストの保存による再生率への影響

プロトプラストを高張緩衝液で保存し経日的にサンプリングし、正常細胞への再生体数の変化を調べた。使用酵母は、一倍体実験室酵母 *S. cerevisiae* G706 株と *S. cerevisiae* 0708-11-16A 株。

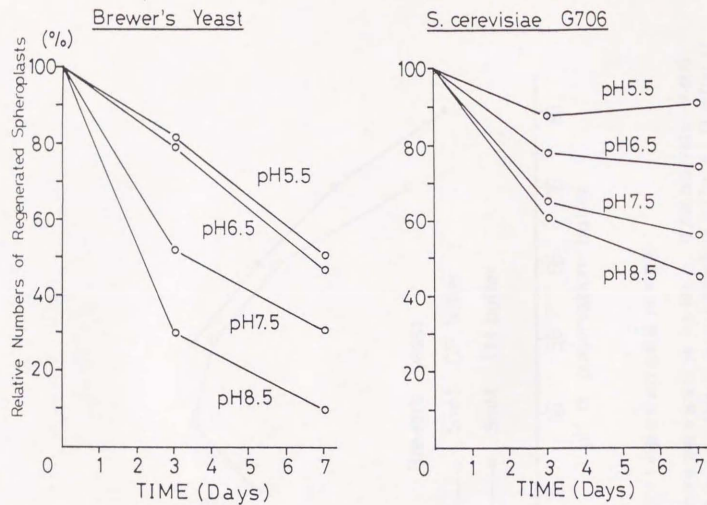


図 2-4 プロトプラストの保存における pH の影響

プロトプラストを pH の異なる (pH5.5 ~ 8.5) 高張緩衝液 (1 M KCl, 5mM トリスマレイン酸) で 5°C で保存し、再生率の経日的変化を調べた。使用酵母は下面ビール酵母 BSR1 YB4-1 株と一倍体実験室酵母 *S. cerevisiae* G706 株 である。

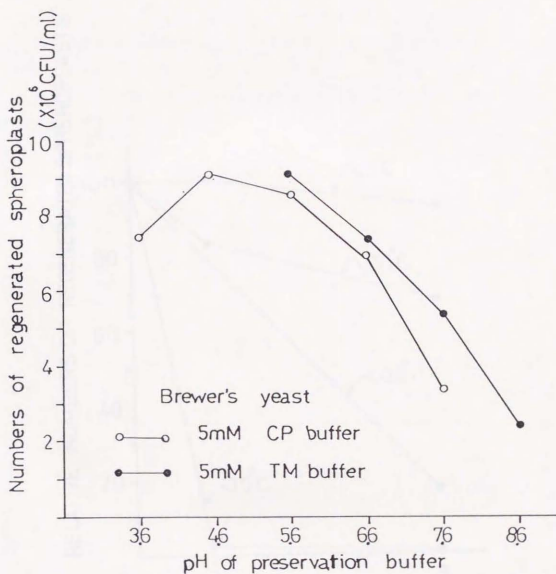


図 2-5 プロトプラストの保存における最適 pH の検討

50 で5 日保存後の再生体数を各保存 pH で比較した。使用酵母は下面ビール酵母 BSRI YB4-1 株である。CP Buffer は citrate-phosphate buffer を、TM buffer は tris-maleic acid buffer を表す。

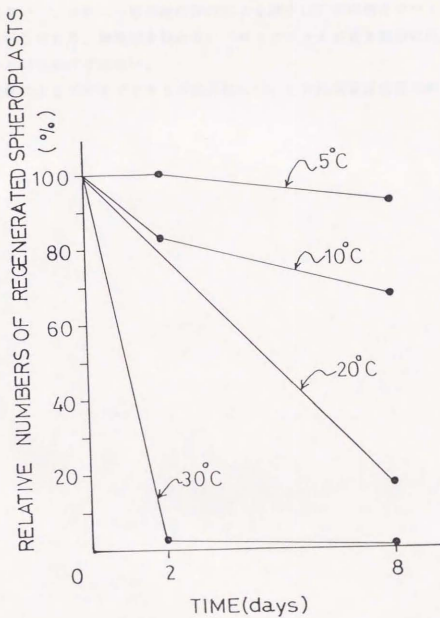


図 2-6 プロトプラストの保存における温度の影響

一倍体実験室酵母 *S. cerevisiae* G706 のプロトプラストを各種温度で保存し (1 M KCl, 5mM トリスマレイン酸緩衝液中で)、経日的な再生率の変化を調べた。

ここで、この条件において、正常細胞 (intact cell) とプロトプラストについてその保存性を比較した。図 2-7 に示すように、実験室酵母 *S. cerevisiae* およびビール酵母の両方において、コロニー形成能の保存による減少は正常細胞とプロトプラスト間において並行しており、細胞壁を持たないプロトプラストが正常細胞に比べてその保存性が悪いというわけではない。

今後、凍結等によるプロトプラストの保存性についても長期安定保存の面から興味もたれる。



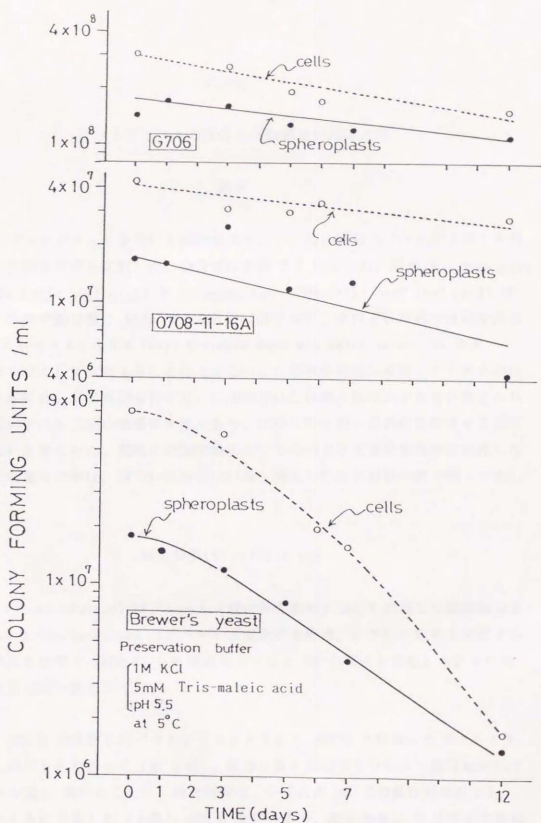


図 2-7 正常細胞およびそのプロトプラストの保存性の比較

各酵母において正常細胞とそのプロトプラストの保存による viability の変化を調べた。上段は一倍体実験室酵母 *S. cerevisiae* G706 株、中段は同 *S. cerevisiae* 0708-11-16A 株、下段は下面ビール酵母 BSR1 YB4-1 株である。

第三節

プロトプラストの保存と細胞融合の効率上昇

結果

保存したプロトプラストを用いて細胞融合を行い、当日調製のプロトプラストを用いた場合との融合効率を比較した。融合操作を図 2-8 に示した。親株 *S. cerevisiae* 0708-11-16A (MATa ade1 ural) と *S. cerevisiae* G706 (MATa his4 leu2 thr4) はいずれも一倍体で接合型は MATa であり互いに接合せず、それぞれ単独では最少再生培地 (2% グルコース、0.67% Yeast Nitrogen Base w/o amino acids、3% 寒天、1 M 塩化カリウム) で成育することはできない。この再生培地に成育してくるものは、親株どうしが融合して栄養要求性が互いに相補された核融合体のみであると考えられる。親株はいずれも二重の栄養要求性をもち、同時に野生型へ自然復帰変異する頻度は極めて低いと考えられ、実際に対照実験においてそのような復帰変異株は出現しなかった。また融合効率は、得られた融合体の数を再生した全両親株の数で割って表した。

$$\text{融合効率(\%)} = F/A \times 100$$

ここで、F (cells/plate) はプレート (最少再生培地) 当たり出現した細胞融合体数を表し、A (cells/plate) はプレート (完全再生培地、いずれの親株も成育することのできる培地で YEPD に 1 M 塩化カリウムと 3% の寒天を含む) 当たり出現した全再生体の数を示す。

融合は、pH5.5 で保存したプロトプラストどうしと pH7.5 で保存したプロトプラストどうしの二とおり行った (図 2-9)。保存日数と共に再生コロニー数は減少していったが (中段)、驚いたことに、融合効率は、いずれの pH での保存の場合でも、保存日数とともに上昇した (上段)。pH5.5 保存の場合、融合効率は 5 日目まで最初と変わらないが、7 日目から上昇し 12 日目には最初の約 4 倍上昇した。また、実際に取得した融合体数も 12 日目では最初の約 3 倍上昇した (下段)。pH7.5 の場合では、融合効率は 1 日目に約 3 倍、12 日目には約 7 倍上昇し (上段)、実際に取

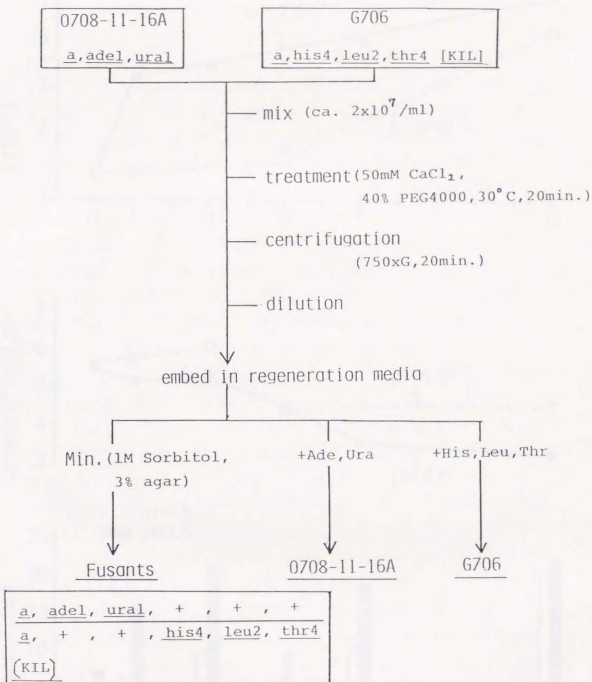


图 2-8 細胞融合操作

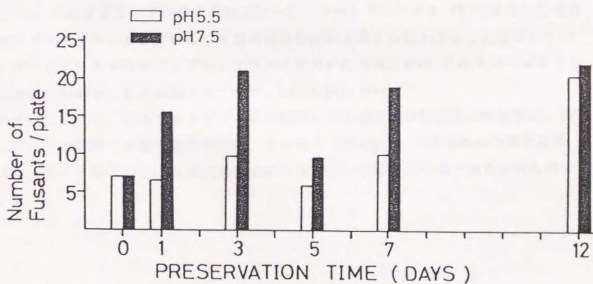
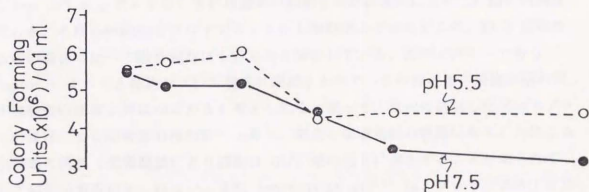
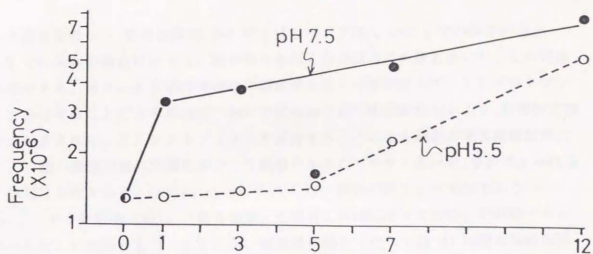


図 2-9 プロトプラストの保存と細胞融合体取得効率の上昇

一倍体実験室酵母 *S. cerevisiae* G706 と 0708-11-16A のプロトプラストを 5℃ で pH5.5 または pH7.5 でそれぞれ保存し(1M KCl, 5 mM トリスマレイン酸緩衝液中)、再生体数の変化と細胞融合体取得数の変化を経日的に調べた。

得した融合体数も 1 日目以降約 3-4 倍上昇した (下段)。pH7.5 での保存の方が pH5.5 での保存の場合に比べて、融合効率も高く取得融合体の数も多いが、この理由は不明である。保存により融合体取得の頻度が上昇する原因として、1) プロトプラストを保存することにより細胞膜において何らかの成分的な変化がおり、結果的に膜融合が促進された、2) プロトプラストを保存することにより細胞が栄養飢餓状態になり、一種の細胞周期の同調化がおり核融合がおりやすくなった、等が考えられるが、詳細は不明である。Curran *et al.*^{31, 32)} は、酵母の性フェロモンである α -factor で予め細胞 (MATa 一倍体細胞) を処理し同調化させておき、その後プロトプラスト化し細胞融合を行ったところ、無処理の場合に比べて約 20 倍融合体の取得頻度が上昇したと報告した。さらに、最近彼らは³³⁾、 α -factor を用いずに、細胞を G1 期と S 期の境目に、cdc36 変異株を用いるか (温度感受性である cdc36 変異株を 24°C から 37°C にシフトする) または通常の細胞を同調培養法により G1 期に同調させておき、それらの細胞をプロトプラスト化し細胞融合させたところ、約 5 倍程度無処理の場合に比べて融合頻度は上昇したと報告している。性フェロモンである α -factor によっても細胞は G1/S 境界に同調するので、この付近での細胞周期の同調が核融合の頻度上昇につながると考えられる。従って、我々の発見したプロトプラストの保存による融合体取得頻度の上昇は、細胞を栄養飢餓の状態におくことによる細胞周期の同調 (栄養飢餓により細胞は G1/S 期の境目に停止することが知られている) と関係があるかもしれない。また Johnston *et al.*³⁴⁾ は、プロトプラストを用いた YRp 系のプラスミドの形質転換実験中に、プロトプラストを 4°C で保存した場合直後のプロトプラストを用いるより形質転換頻度が上昇する株があることを示している。プロトプラストの融合とプロトプラストを用いた形質転換は、そのメカニズムとして共通な点があることが指摘されており、非常に興味深い。³⁵⁾

いずれにしても、このプロトプラストの保存による融合体取得頻度の向上策は、性フェロモンで同調できない倍数体酵母、すなわち MATa/MAT α : 二倍体酵母や接合能を示さないビール酵母のような高次倍数体酵母等を用いる場合に有効であるかもしれない。

細胞融合による抗汚染菌性ビール酵母の育種

序

近年日本のビール業界において、一般消費者の生ビール嗜好とあいまって、流通機構の整備により料飲店における生ビール使用の割合が増加し、また酒販店で販売する罐詰めビールや缶ビールにおいても生ビールが主体となってきた。ここで、生ビールとは熱処理（低温殺菌）をしない、いわゆる火入れをしないビールのことである。この生ビールを製造するには、ビール製造工場全体における徹底的な微生物管理が重要である。つまり、製造工程において麦汁製造および発酵からパッケージングに至るまでのトータルな微生物管理が、最終製品での雑菌汚染防止に必要な不可欠な条件である。また、発酵工程における使用酵母の純粋性、すなわちこれらの培養酵母中にビール酵母以外の野生酵母やバクテリア等の汚染菌の混入がないことはビールの香味の純粋性から最も重要なことである。現在の日本の工場の技術水準では、日常のきめ細かな対応によってこれらの微生物管理は一応完成の域に達していると考えられる。

しかし、ビール製造の新しい方向性を考えた場合、微生物管理はより厳しさを増すことになる。例えばバイオリアクターを用いた固定化酵母によるビールの速醸（前発酵期間の短縮）や熟成工程（後発酵）期間の短縮化、凝集性酵母を用いたビールの連続発酵生産等では、一度雑菌汚染がおけると通常のバッチ式の場合と異なり、そのシステム全体を正常化するのに非常に大変なことになる。このような場合、ビール酵母自体がそのようなビール汚染菌の増殖を許さない性質を有していれば、もし汚染があってもその汚染は拡大されることなく防ぐことができると考えられる。また、現在行われている通常のビール醸造工程においても、抗汚染菌性酵母の使用は、微生物管理が楽になり工程ビールや製品ビールの微生物的安定性も非常に高いものになる。

このような観点から、我々はビール酵母育種の最初のテーマとして、ビール汚染菌に対して抗菌作用を示すビール酵母の育種に取り組んだ。まず、野生酵母対策として、キラー因子を細胞融合法によりビール酵母に導入したキラー性ビール酵母を造成した。次に、バクテリア対策として、抗バクテリア性を示す酵母を醸造酵母の中からスクリーニングし、細胞融合法によりこの性質をビール酵母に導入した。

さらに、近年開発されたパルスフィールド電気泳動法を用い、細胞融合株の染色体DNAの構造解析を行なった。

第一節

キラー性ビール酵母の育種

酵母 *S. cerevisiae* の中には、線状二重鎖 RNA (dsRNA) プラスミドをもち、このプラスミド (キラープラスミドと呼ぶ) をもたない同種の酵母を死滅させる毒素 (キラー毒素という) を分泌する菌株がある (図 3-1)。この毒素生産株をキラー、またこの毒素によって死滅する株を感受性株と呼び、1963 年に Bevan と Makover³⁶⁾ により初めて報告された。また、この発見はアルコール工場で生じた異常発酵の原因を探求中のことといわれている。現在、*S. cerevisiae* におけるキラー現象は毒素生産性因子および毒素に対する抵抗性因子がともにプラスミド上にあるとして説明されている^{37) 38) 39)} (近年核性のキラーについても報告されている)。キラー酵母に存在する 2 種の dsRNA のうち、分子量の小さい方を M-dsRNA と呼びこれがキラープラスミドであり、分子量が大きい方を L-dsRNA と呼び、これはキラー株・感受性株を問わずほとんどの株に存在している。

我々は、予備的な実験から、当社ビール工場で分離された野生酵母の多くは *Saccharomyces* 属のものであり、これらはほとんどが我々が有しているキラー酵母 (K₁ タイプ) に対して感受性を示したという結果を得ている。従って、このようなキラー因子をビール酵母に導入し、その酵母をビール醸造に用いれば、野生酵母の混入があってもそのほとんどは殺されて、汚染は拡大することなく醸造工程の微生物管理に大きく寄与すると考えられる。すでに、清酒酵母⁴⁰⁾、ビール酵母⁴¹⁾、ワイン酵母⁴²⁾ 等の醸造酵母において、そのようなキラー化の試みが報告されている。

結果

キラー性ビール酵母の細胞融合法による造成法を図 3-2 に示した。融合体取得の方法は Gunge and Nakatomi⁴³⁾ の RD-auxotroph 法を利用した。ビール酵母には遺伝学的に扱いやすいマーカーがついていないので、アクリフラビン処理によりミトコンドリア DNA の変異株 (いわゆる細胞質性の呼吸欠損株、[*r*'] 株) を誘導した。本変異処理は核性の変異をほとんど誘発せずミトコンドリアの変異を選択的に誘発するとされており、ビール酵母の核性の遺伝子に損傷を与えることが少ないと考えられる。また、融合相手のキラー酵母としては実験室酵母 *S. cerevisiae* G706 (MATa thr4

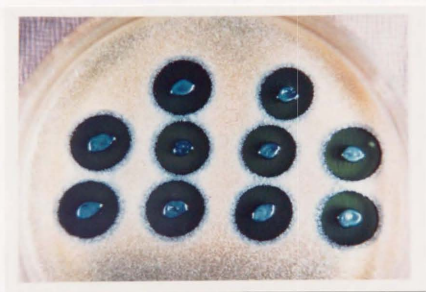


図 3-1 キラー酵母の致死作用

栄養寒天培地上に感受性酵母を塗布し、その上に白金耳でキラー酵母の菌体をスポットした。写真は、それを 28°C で 2 日間培養した後の様子を示した。キラー酵母はキラー毒素を生産して感受性細胞を殺すので、キラー酵母の周りにはハロ（感受性酵母の成育阻止領域）が見られる。キラー酵母：一倍体実験室酵母 *S. cerevisiae* G706 株、感受性酵母：下面ビール酵母 BSR1 YB4-1 株。

Brewer's yeast

Killer yeast

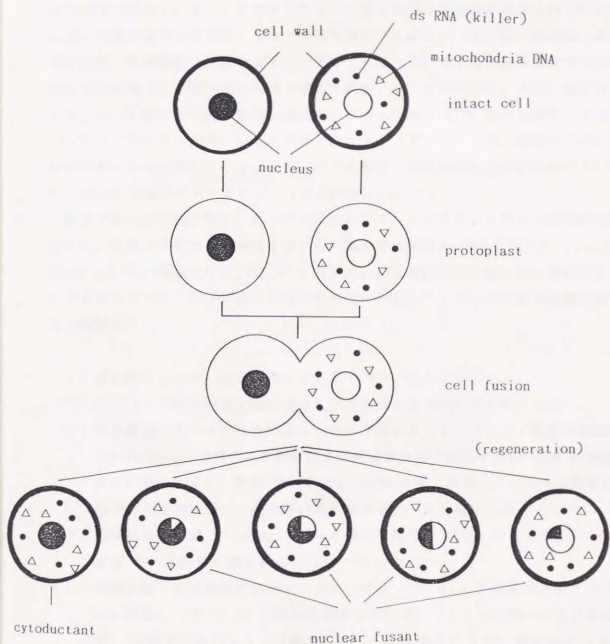


図 3-2 キラー性ビール酵母の細胞融合による造成法

細胞質性呼吸欠損性ビール酵母 (BSRI YB4-1 株よりアクリフラビン処理して得られた株) と一倍体実験室キラー性酵母 *S. cerevisiae* G706 株の RD-auxotroph 法による細胞融合体取得法。親株どうしの核融合の程度により様々な融合体を得られると考えられる (図中の融合体で、最も左側にあるものはビール酵母へのサイトダクタントで、また右側に行くにつれて染色体の組成はより G706 株に近づいていく)。

his4 leu2 [KIL-k])を用いた。呼吸欠損株 (RD 株、Respiratory deficient) は呼吸基質であるグリセリンや乳酸等を炭素源として利用できないため、最少グリセリン培地で成育できない。また、栄養要求性を示す株は必要な栄養素が添加されていないければ最少培地に成育できない。もし、呼吸欠損ビール酵母と G706 株の細胞融合体が出現すれば、呼吸機能 (正常なミトコンドリア) は G706 株から、栄養要求性はビール酵母から相補され、最少グリセリン培地に成育することができる。また、細胞融合体でも、ビール酵母と G706 株の核融合体とビール酵母に G706 株の細胞質因子 (ミトコンドリアやキラー因子) のみが導入されたサイトダクタントの二種類が、この融合体選抜条件では成育してくる。但し、ビール酵母の遺伝的組成を変化させたくないという観点からはサイトダクタントの方が好ましい。

前章で述べた方法に従い、各々の株についてプロトプラストを作成し細胞融合実験を行った。呼吸正常で栄養要求性を示さない融合体候補株が、頻度は低い (2 x 10⁻⁷)、得られた。その時点では (1981 年 8 月) これ以上遺伝学的に融合体を解析することはできなかったが、以下に述べる様に総合的に判断して、得られた株が核融合体であると判断した。

- 1) 遺伝的マーカー：融合株は呼吸正常でキラー性を示す。
- 2) 巨大コロニーの形状：融合体はビール酵母とも G706 と異なる。
- 3) 抗原構造：ヤトロン社製のキャンディダ同定キット (スライド凝集反応試験) の抗体 No.18 ではビール酵母および融合体は強く凝集するが G706 の凝集は非常に弱い。また、抗体 No.10 では G706 は強く凝集するがビール酵母および融合体の凝集は弱い。融合体の抗原構造はビール酵母に近い。
- 4) 増殖曲線：10℃での成育はビール酵母 > 融合株 > G706 であるが、37℃での成育はビール酵母 < 融合株 << G706 であった。
- 5) 発酵試験：工場調製の加ホップ麦汁 (糖度 10.7%) に圧搾酵母として 0.5% w/w 植菌し 10℃で 10 日間静置発酵させた (1 リットル三角フラスコを使用)。発酵終了後のエキス (糖度) は、ビール酵母で 3.14、融合体で 5.44、G706 で 9.68 であった。G706 はマルトースを利用できない株であり、またグルコースの発酵性は低温で劣る。
- 6) ビールの香味：G706 は論外 (発酵が進んでいずビールになっていない)。融合体は残糖感があつたが、香りはビール酵母に近い。

次に、この融合株のキラースペクトルについて調べた。表 3-1 に示すように、ビールに混入するとビールを混濁させる危険性の大きい野生酵母（工場分離株）のほとんどを殺すことができた。また、発酵開始時に人為的に野生酵母を混入させる実験を行った。麦汁にビール酵母若しくは融合株を圧搾で 0.5% w/w 接種し、そのとき同時に代表的野生酵母である *S. pastorianus* を約 1×10^7 cells/ml 混入させた。発酵は 10℃ で行い、1 週間にわたって経日的にサンプリングし野生酵母の数の消長を見た。尚、本野生酵母と融合株とは TTC 染色で明らかに区別されたので（本野生酵母は赤色に、融合株はうすいピンク色）、発酵試験液を希釈して TTC 染色用培地に塗布し、コロニー形成後（30℃ で約 3 日）TTC を含むトップアガーを重ねし野生酵母の数を調べた。図 3-3 に示すように、ビール酵母に野生酵母を混入させても発酵期間中その数にはほとんど変化はなかったが、融合体に混入させた場合は 2 日目以降検出されなくなった。

次に、融合体の示すキラー性について、発酵期間中におけるその活性の変化を調べた（図 3-4）。活性の測定は抗生物質のカップ法による力価測定方法に準じた。⁴⁴⁾ 前発酵中は高いキラー活性を示したが、前発酵終了時以降キラー活性は激減した。これは酵母の増殖に伴いキラー毒素が大量に生産されていたのが、増殖の終了と共にキラー毒素が生産されなくなった事を意味している。但し、後発酵の進行と共にキラー活性がなくならないのは、0℃ でも酵母はゆっくりとはあるが増殖しキラー毒素を生産し続けているためと考えられる。キラー毒素（K₁ タイプ）は熱に不安定なことが知られており、30℃ での活性の半減期は 30 分といわれている。⁴⁵⁾ 我々の調べたところでは、ビール中において 0℃ では 18 時間、10℃ では 12 時間、15℃ では 10 時間、20℃ では 10 時間、25℃ では 3 時間以下の活性の半減期であった（図 3-5）。

野生酵母		MGKのキラー効果	ビール混濁危険度	血清型
工場分離株	Se 8	++	++++	D
	Ye 15	++	++++	D
	St	++	++++	D
	Ye 3	+	++++	D
	Ye 13	++	++++	D
	N 9	-	+++	D
	M 8	-	+++	D
	Ye 2	++	++	D
	M 10	-	+	B
	Ye 10	-	+	A
典型株	<i>S.pastorianus</i>	++	+++	D
	<i>S.ellipsoideus</i>	++	+++	D
	<i>S.diacosticus</i>	++	+++	D

表 3-1 キラー性ビール酵母 (MGK 株) の野生酵母に対する致死作用

工場分離の野生酵母はすべて *Saccharomyces* 属に属する。MGK 株のキラー効果は図 3-1 で示した方法で調べた。野生酵母のビール混濁危険度は、製品ビール中に約 300 cells/ml 接種し 25℃ で 4 週間放置して増殖しうるか否かを目視にて判定した。1 週間以内に濁れば ++++, 1~2 で濁れば +++, 2~3 週間で濁れば ++, 3~4 週間で濁れば + と評価する。また、血清型は市販の (ヤトロン社のキャンディダチェック) 酵母同定用の因子血清 (No. 1, 4, 8, 10, 18) を用いてスライド凝集反応を行い、No.1 のみと反応するものを A 型、No.1 と No.4 に反応するものを B 型、No.1 と No.18 に反応するものを D 型とした (西川等、酵母研究における方法論、学会出版センター、1982 年、p 80-89 参照)。D 型に属する酵母はビール有害性 (ビール中で混濁をおこさせる) が強いと言われている。

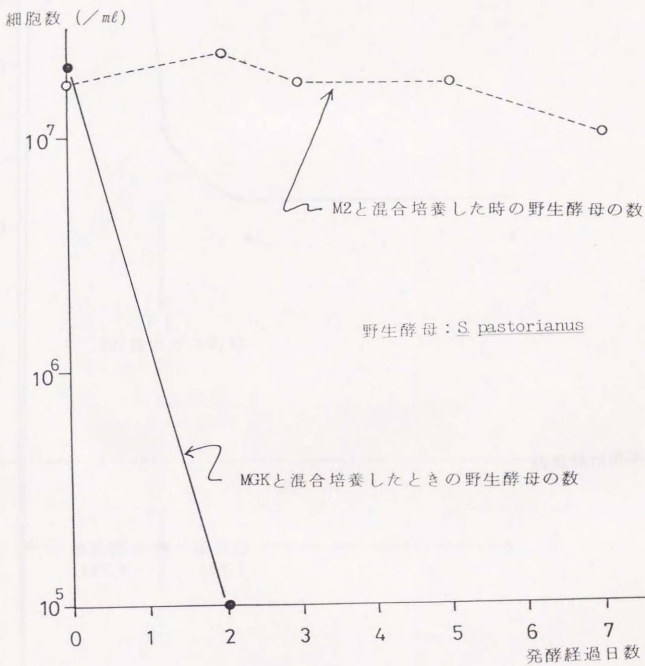


図 3-3 麦汁発酵時におけるキラー性ビール酵母の野生酵母への致死作用

キラー性ビール酵母 MGK 株または通常の下面ビール酵母 BSRI YB4-1 (M2 株) と野生酵母の混合培養における、野生酵母の消長。

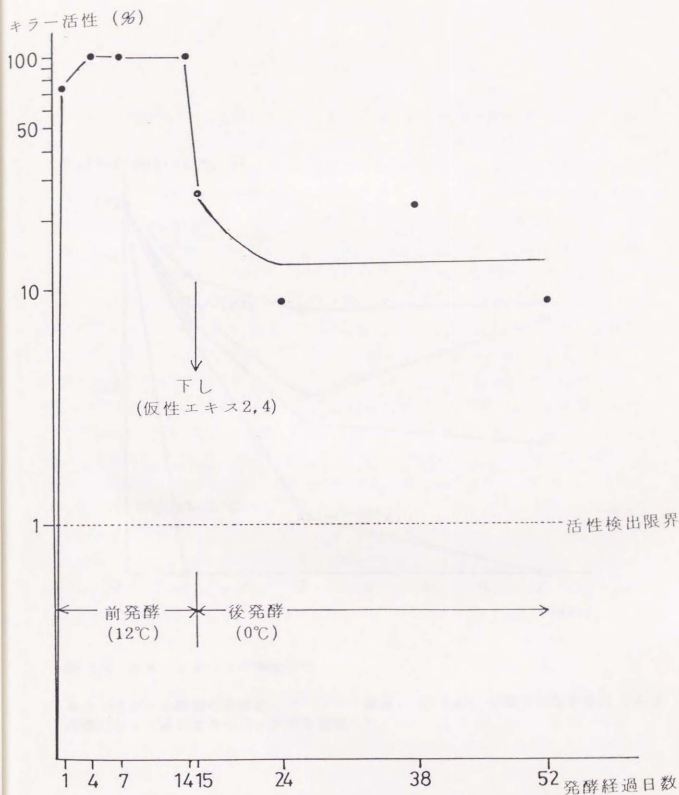


図 3-4 キラー性ビール酵母の発酵期間中におけるキラー活性の変化

各時点での培養液をサンプリングし、 0.45μ のメンブレン濾過後一定量を、図 3-1 に示したような感受性株を表面に塗布したプレートの上においた抗生物質の力価検定用の金属製のカップに入れ、 4°C で半日液を浸透させる。その後 28°C で 2 日間培養し、出現したハロ (増殖阻止円) の大きさをキラー活性を評価する。

(Killer activity, %)

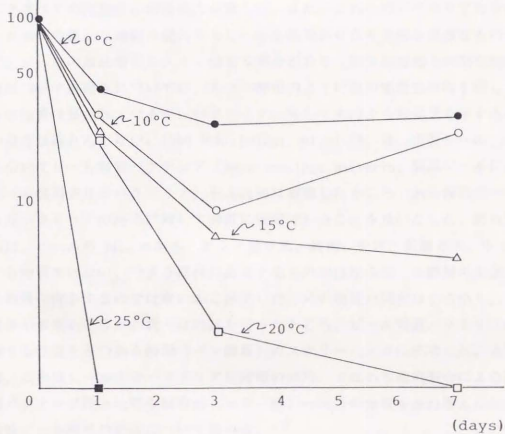


図 3-5 キラートキシンの熱安定性

キラー性ビール酵母の発酵液をメンブラン濾過し (0.45 μ)、各温度で保持後図 3-6 と同様にカップ法によりキラー活性を測定した。

第二節

抗バクテリア性ビール酵母の造成

ビール製造時における汚染菌の種類としては野生酵母の他に種々のバクテリア、特に *Lactobacillus* spp. や *Pediococcus* spp. などの乳酸菌系のバクテリアが知られている。⁴⁷⁾ 一般的に、実際のビール製造工程においては、野生酵母の汚染防止管理よりバクテリアの汚染防止管理の方が難しい。また、これらのバクテリアの中には製品ビール中への僅かな菌数の混入でもビールを混濁させたり香味を異質なものにしたりにして、ビールの商品価値を大きく損なう場合があり、微生物管理上深刻な問題である。酵母の示す抗菌性については、キラー酵母のように他の感受性酵母を殺してしまうような性質は知られているが、バクテリアに対してそのような効果を示すものについての報告はほとんどない。1980年に Dolezil *et al.*⁴⁸⁾ は、市販ビール 30 種類ほどについてビール有害バクテリア (beer-spoilage bacteria, 製品ビールに植菌するとビール混濁させるバクテリア) を人為的に植菌したところ、ある種のビールはこのようなバクテリアの汚染に対して非常に安定であることを見いだした。彼らは、その原因は、ビールの pH、エキス、アミノ態窒素、残糖、色度、炭酸ガス、ホップ等に由来する物質ではない、つまり原料に由来するものではなくビール酵母の生産する何らかの物質に由来するのではないかと推定した。その物質の同定はともかく、そのような現象が事実かどうか、我々は追試を行ったところ、ビール有害バクテリアの成育を阻害する性質をもつある酵母 (パン酵母) のスクリーニングに成功した。本章においては、この抗ビール有害バクテリア性酵母の利用、すなわち細胞融合による抗ビール有害バクテリア性と抗野生酵母性 (キラー性) の両方の性質を兼ね備えた抗ビール汚染菌性ビール酵母の造成について述べる。⁴⁹⁾

結果

我々は、研究室保存の各種醸造用酵母 (ビール酵母、ワイン酵母、日本酒酵母、パン酵母、ウイスキー酵母等) の内代表的な 150 株について、その抗ビール有害バクテリア性について調べた。方法は、100 ml の麦汁に酵母を植菌し 20℃ で 10 日間発酵させ、発酵終了後発酵液をメンブレンフィルターで濾過し (0.45 μ)、5 ml づつ 12 本の無菌試験管に分注する。11 種類のビール有害バクテリアを各々約 10^6 cells づつ植菌し、25℃ で 10 日間インキュベートし、バクテリアの増殖による濁度

の増加を観察する。尚、ビール有害バクテリアとしては当研究室保有の

Lactobacillus spp., *Pediococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Hafnia* spp., *Acinetobacter* spp., *Bacillus* spp. 等の 11 株を用いた。またこれらのバクテリアは、ビール中での成育阻害の原因になりうる低 pH (4.0 付近)、アルコール (4.0-5.0 % v/v)、通常のホップの 5 倍の濃度等によっては成育阻害を受けないことがわかっている。以上のスクリーニングの結果、最終的にパン酵母由来の YB2-2 株 (以下 A2 と略称) を得た。A2 の発酵液では 11 種類すべてのビール有害菌の増殖が強く阻止された (表 3-2 参照)。この発酵液を熱処理 (100 °C で 20 分間) しても抗バクテリア性は失われず、また透析により抗バクテリア活性は外液に拡散してしまうことから、比較的安定な低分子性の物質がこの抗バクテリア性に関与していると考えられる。

次に、この抗バクテリア活性について、ビール醸造工程の中で追ってみた (図 3-6)。前発酵開始時にビール有害バクテリアを約 50 cells/ml 接種し、発酵の進行と共にこのバクテリアの増殖を追っていったところ、A2 を用いて発酵を行った場合は 3 日目にこのバクテリアは検出されなくなったが、通常のビール酵母を用いた場合は発酵の進行と共にこのバクテリアは著しく増殖していった。

この A2 の示す抗バクテリア性を交配や細胞融合等で利用するために、接合子の分離を試みた。A2 は幸いに胞子形成培地で胞子を高頻度で作ることができたので、ランダムスポア法により単胞子由来株を分離した。分離した 20 株について、その接合型と抗バクテリア性について調べたところ、抗バクテリア性の遺伝的分離比についてはあまり規則性はないように思われ、また抗バクテリア活性の強さは親株と同じではなく分散した。分離株の中には抗バクテリア性を示さない株が出現することから、本活性の遺伝様式は細胞質性ではないであろう。いずれにしても、遺伝的な問題については今後の追及が必要である。これらの得られた単胞子分離株のうち、接合型を示し抗バクテリア活性が強くかつ麦汁中での発酵性が良いもの (e 型の接合型を示す) 1 株を選抜した。

以下、抗バクテリア性とキラー性の両方の性質を示すビール酵母の造成について述べる (図 3-7)。上記 A2 由来の単胞子分離株をアクリフラビン処理し呼吸欠損株を誘導し、キラーの一倍体実験室株 *S. cerevisiae* G706 (MATa thr4 his4 leu2 [KIL-k]) と交配した。A2 由来の単胞子分離株の呼吸欠損化の意味は、G706 との雑種の取得効率を上げる為である (雑種株は最少グリセロール培地で選抜できる)。その雑種

Yeast	Bacteria*										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<i>S. cerevisiae</i> A2 YB2-2	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	++	---
<i>S. carlsbergensis</i> YB5-1	++	++	+++	+	+++	+	+	+	+++	++	---
<i>S. cerevisiae</i> YB3-1	+	+++	+	+	+++	+++	+	++	+	--	--
<i>S. carlsbergensis</i> YB6-12	+	++	+	+	++	+++	+	++	+	++	--

*Bacterial growth in beer inhibited for +++ = 14 days, ++ = 10 days, and + = seven days of incubation at 25°C under a large inoculum.

表 3-2 A2 株 (パン酵母由来株) の抗バクテリア性

各種醸造用酵母 150 株について、抗バクテリア活性の一次スクリーニングの結果 11 株の候補株が得られた。二次スクリーニングの結果その中で活性の強いもの 4 株を選抜し、最終的にパン酵母由来株 A2 を以後の実験に用いた。一次スクリーニングは、*Lactobacillus brevis* (B04-2) と *Enterobacter* sp. (B07-3) の 2 種のバクテリアを用いて行い、二次スクリーニングはこの 2 種と *Pediococcus cerevisiae* (B04-12), *Corynebacterium* sp. (B11-2 と B11-3), *Enterobacter* sp. (B07-4), *Klebsiella* sp. (B06-2 と B06-3), *Hafnia* sp. (B07-2), *Acinetobacter* sp. (B11-1), *Bacillus* sp. (nonspore variant c-3 B05-11) の 9 種、計 11 種のバクテリアを用いておこなった。尚、これらのバクテリアはいずれも工場より分離されたビール有害バクテリアである。

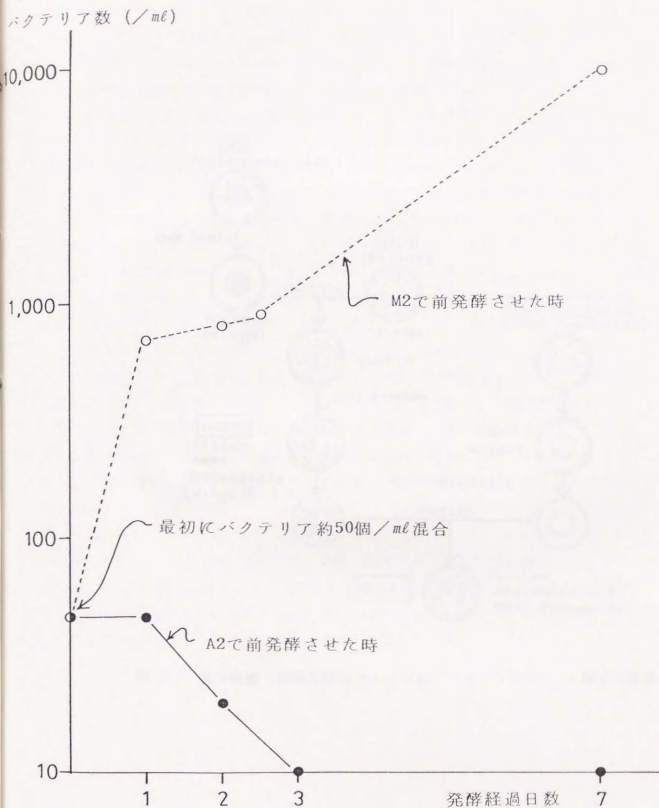


図 3-6 A2 および下面ビール酵母 M2 とビール有害バクテリア (*Lactobacillus brevis* B04-12) の混合培養時におけるビール有害バクテリアの消長

麦汁に A2 または M2 (いずれも圧搾酵母で 0.5% w/w) とビール有害バクテリア *Lactobacillus brevis* B04-12 を植菌し (50 cells/ml) 10℃ で発酵させ、経時的にバクテリアの菌数を追跡した。

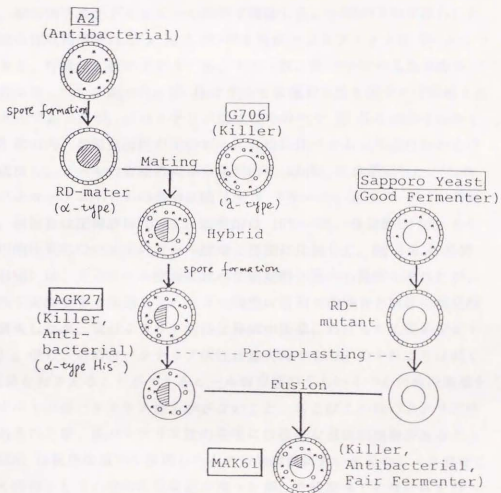


図 3-7 抗汚染菌 (抗野生酵母性および抗バクテリア性)ビール酵母の育種法

を胞子形成させ分割後、キラーで抗バクテリア活性が強くしかも発酵性の良い株 AGK27 (α 型の接合型を示し、ヒスチジン要求性のマーカーを有する)を得た。これら AGK27 株を得るための一連の操作は、抗バクテリア活性とキラー性を同時にもち、しかも細胞融合を行うために必要な遺伝的マーカーを導入する為である。次に、前節で述べたように、RD-auxotroph 法⁴³⁾を用いてビール酵母の呼吸欠損株と AGK27 の細胞融合を行い、融合体を最少グリセロール培地で選抜した。一回の実験で得られた 250 クローン (融合体取得頻度は 2×10^{-6} 個/再生体数) よりランダムに 55 クローン取り、栄養要求性、呼吸能、抗バクテリア性、キラー性、麦汁中での低温発酵性、できたビールの香味等について調べた。55 株はすべて栄養要求性を示さず呼吸能も正常でありまたキラーであったが、抗バクテリア活性は其中で 32 株しか示さなかった。これらの 32 株の内、低温発酵性が元のビール酵母に比べてあまり遜色ないものとして 17 株を選抜し、ビールの香味の点から最終的に MAK61 株を選定した。この MAK61 を用いてパイロットスケールの発酵試験 (20 L スケール、エキス 10.7% の加ホップ麦汁使用、植菌量は圧搾酵母 0.4%、前発酵は 10℃ 一定、後発酵は 0℃) を行い、その株の実用的性質について元のビール酵母と詳細に比較した。図 3-8 に発酵経過を示した。MAK61 は、元のビール酵母に比べて前発酵初期から発酵が遅れたが、最終的にはほぼ同じ発酵度まで到達した。キラー活性は前節での場合と同様に前発酵終了後は急速に消失したが、抗バクテリア活性は発酵中後期にわたって比較的安定であった (図 3-9)。但し、この抗バクテリア活性は最大時でも A2 のそれよりは弱く、A2 では完全に増殖をおさえることができるビール有害菌のうちいくつかの菌の増殖を許した。融合体すべてが抗バクテリア性を示さないこと、およびこの抗バクテリア性の強さにも差があること等、抗バクテリア性の発現には複雑な遺伝的制御があるように思われる。MAK61 は抗汚染菌性を獲得したものの発酵性において元のビール酵母に劣り、実用ビール酵母としての使用には問題が残ったが、今後数多くの融合体を調べていけば実用に足る株も見いだすことができると考えられる。

最後に、酵母 A2 の生産する抗バクテリア性物質についてコメントする。前述のように、現在のところ、この抗バクテリア性物質は熱安定性の高い低分子化合物であることが示唆されている。ビール中には酵母の代謝産物として各種有機酸が含まれており、これらが抗バクテリア性の原因ではないかと推察される。例えば、酢酸は非解離型の分子が多く存在する低 pH 域において抗菌性を示し各種バクテリアの成育を阻止し (pH の低下そのものも抗菌性を示すが、酢酸自身の抗菌力は細胞膜透過性を有する非解離型分子の濃度による)、食品工業における安全な殺菌剤のひとつとして注目されている。^{7,8)} そこで、A2 の発酵液における酢酸の量を調べたが (~500 mg/l)、通常のビール (~100 mg/l) よりは多いものの、通常のビールに酢酸を添加して A2 の発酵液のレベルまで上昇させてもそれだけで試験したすべてのビール汚染細菌の増殖を抑えることはできなかった。しかし、酢酸添加により一部の汚染細菌の増殖阻止がみられたことから、A2 の示す抗バクテリア性には酢酸も関与しているがそれ以外の何らかの物質の寄与があるのではないかと考えられる。また、予備的にはあるが、A2 の発酵液について他の有機酸や脂肪酸組成等について調べてみたが、通常のビール酵母の発酵液に比べて顕著に量的に多いものは見られなかった。現在のところ、この抗バクテリア性物質の精製・同定についての見通しはたっていないが、酵母の生産するこのような抗バクテリア性物質についての報告はほとんどなく、今後究明の価値があると思われる。

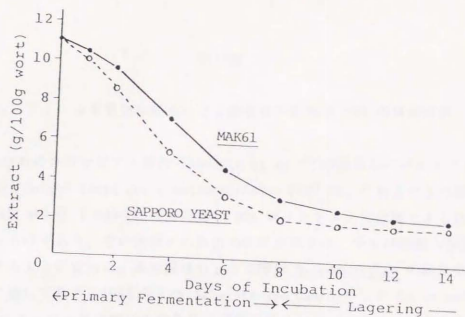


図 3-8 抗汚染菌性ビール酵母の発酵試験

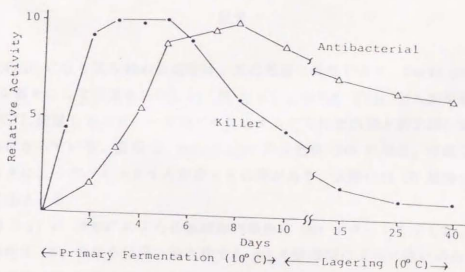


図 3-9 抗汚染菌性ビール酵母の発酵中における抗汚染菌活性の変化

キラー活性はカップ法により測定した（最大活性時を 10 とし、て相対評価した）。抗バクテリア活性は、11 種のビール有害バクテリアを用いて表 3-2 と同様に調べ、+ を 1 点として数値化し、最大活性を 10 とし、て相対評価した。

第三節

パルスフィールド電気泳動法による融合株の染色体 DNA の構造解析

1980 年代初めにコロンビア大学の Schwartz *et al.*⁵⁰⁾ の開発したパルスフィールド電気泳動法 (Pulsed-field gel electrophoresis: PFG) は、それまで不可能であった数 100-kb から数 1,000-kb 程度の長い DNA 断片をゲル上で分離できる技術として画期的なものであり、その後種々の技術的改良が施され、今では市販の装置を容易に入手できるようになった。本装置はちょうど酵母 *S. cerevisiae* の線状染色体 DNA の分離に適しており、1984 年には Schwartz and Cantor⁵¹⁾ や Carle and Olson¹⁹⁾ らによって一倍体酵母の染色体 (遺伝学的リンケージでは 17 本の染色体の存在が示唆されている) を 15-16 のバンドとしてゲル上で分離したという報告がされた。我々は、ビール酵母の染色体の数とその長さについて実験室酵母とは異なる特徴的なことがあるかどうか、また前章で得られた細胞融合体では両親株と比べて染色体レベルでのどのような変化が起きているのを知る目的で、上記電気泳動法のひとつである OFAGE (Orthogonal-field-alternation gel electrophoresis, 直交交替電場ゲル電気泳動法)^{19) 52)} を利用して解析を行った。

結果

我々が OFAGE に取り組み始めた当時は、まだ市販の装置がなく、Carle and Olson⁵²⁾ の論文を参考にして装置を自作した (図 3-10)。OFAGE では、ゲルが電極に対しておよそ 45° に配置しており、一定のパルスタイムごとに東西間と南北間に電流が流れる仕組みになっている。酵母 *S. cerevisiae* の染色体 DNA の場合、分離したい DNA の大きさによってパルスタイムを変える必要があり、実際には 10 数秒から 150 秒位まで変化させる。

まず、図 3-11 に OFAGE による各種酵母の染色体 DNA パターンを示した。この写真から、染色体 DNA の長さは同一染色体であっても酵母間によって違いがあること、すなわち染色体 DNA の長さには一種の polymorphism (多様性) があることがわかる。^{53) 54)} このことを利用すれば、細胞融合体と両親株の識別が可能になると考えられる。^{55) 56)} 一例として、図 3-12 に実験室酵母どうしの細胞融合体 (第二章で得られた 0708-11-16A と G706 の融合体) の OFAGE による解析例について示した。

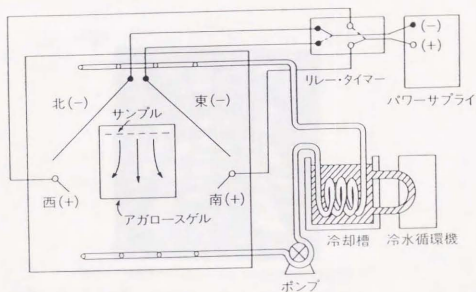


図 3-10 OFAGE を行うための電気泳動槽の概略

文献³²⁾に従って自作した。泳動槽内の緩衝液はクールポンプによって冷却され(約 13℃ 付近に調節)循環される。標準的な泳動条件は、

緩衝液: TBE (90 mM Tris-base, 90 mM boric acid, 2.5 mM EDTA, pH8.2) を半分に蒸留水で希釈したもの

ゲル: 1.5% agarose (Bio-Rad Co.)

泳動条件: 370V/190mA → 300V/240mA (約 40W 一定)

パルスタイム: 70 sec

時間: 24 hr

である。また、泳動後ゲルは 0.5 μg/ml の染色液で 10 分間染色し、上記 TBE にて半日間脱色する。(エチジウムブロムド)

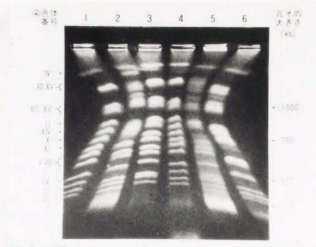


図 3-11 OFAGE による各種酵母の染色体 DNA パターン

泳動条件は図 3-10 に示した一般的な条件である。

- レーン 1, 4: *S. cerevisiae* G706
 2: 下面ビール酵母 (BSR1 YB4-1)
 3: 清酒酵母協会 7 号
 5: ウイスキー酵母 (AHU 3200)

染色体番号

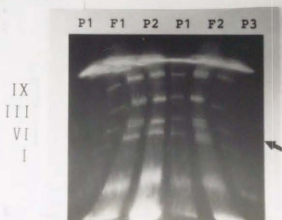


図 3-12 OFAGE による融合体酵母の解析例

- P1: *S. cerevisiae* G706 (MATa his4 leu2 thr4)
 P2: *S. cerevisiae* 0708-11-8A (MAT~~a~~ ade1 ura1)
 P3: *S. cerevisiae* 0708-11-16A (MATa ade1 ura1)
 F1: P1 x P2 (mating)
 F2: P1 x P3 (cell fusion)

バルスタイムは 20 秒である。他の泳動条件は図 3-10 と同じ。接合および細胞融合のいずれの場合でも、図中の矢印の部分は明らかに両親の染色体 DNA がそのまま交じりあったように観察される。

次に、第一節で述べた、キラー性ビール酵母の染色体 DNA の構造について解析した。図 3-13 に両親株、すなわちビール酵母（写真中のレーン P1）とキラー酵母（実験室一倍体酵母 *S. cerevisiae* G706、写真中のレーン P2）とそれらの融合体 2 株（写真中のレーン F1 と F2）について OFAGE の結果を示した。融合体 F1 と F2 に存在する B の位置のバンドは P2 の恐らく第 III 染色体由来のものであろうと推定され（P1 の相当の位置には染色体 DNA はない）、また F1 と F2 の A の位置のバンドは P1 由来の染色体（P2 の相当の位置には染色体 DNA はない）であろうと推定される。また、F1 と F2 はほとんど同じ染色体 DNA パターンを示しているが、C の位置のバンドの有無で両者を区別できる。これらの融合体は第一節で述べたように、その生理的な性質（増殖性、発酵性、形態）は両親株の中間的な性質を示し、ビール酵母に実験室酵母の細胞質（キラー因子とミトコンドリア）が導入されたサイトダクタントではなく、ビール酵母と実験室酵母の核融合体であろうと推定していたが、以上の OFAGE 解析の結果から F1 と F2 はビール酵母と実験室酵母の染色体 DNA が混合した核融合体であることが明らかにされた。今後数多くの融合体を取得して OFAGE による解析をしていけば、同じ融合体でも両親株の融合の程度が異なった株、すなわちビール酵母により近い株または実験室酵母により近い株等、各種融合体が得られ、OFAGE 解析と生理的性質との関係がわかれば、どの染色体上にビール酵母としての性質があるのか想像がつくだろう。

さて、次に第二節で述べた細胞融合で造成した抗汚染菌性ビール酵母について、その OFAGE 解析を融合の親株と共に調べた。図 3-14 に結果の写真を示した。この結果から、上記のキラー性ビール酵母の場合と同様に、抗汚染菌性ビール酵母 MAK 株はビール酵母 M2 と AGK27（抗バクテリア性とキラー性を示す酵母）の核融合体であることがわかった。

以上、パルスフィールド電気泳動法が開発されるまで、細胞融合体であるという判断は、得られた融合体候補株の遺伝的マーカーや生理的性質・形態等を総合して考えようだったが、今や染色体 DNA の構造を調べることによりより確実にその判断ができるようになった。今後は、染色体パターンだけでなく、それに DNA フィンガープリンティングの技術を組み合わせた手法を開発していけば、OFAGE 的に非常に似た染色体パターンを示す株どうしても正確に識別できるようになるだろう。

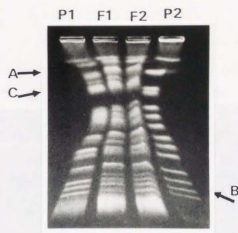


図 3-13 OFAge による細胞融合体酵母 (キラー性ビール酵母) の解析

P1: ビール酵母 (呼吸欠損性下面ビール酵母 BSR1 YB4-1)

P2: *S. cerevisiae* G706 (MATa his4 leu2 thr4 [KIL-k])

F1 & F2: P1 と P2 の細胞融合体 (独立な 2 クローン)

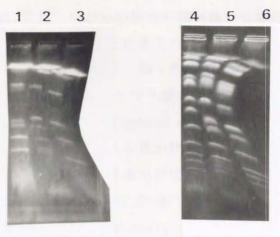


図 3-14 OFAGE による細胞融合体酵母 (抗汚染菌性ビール酵母) の解析

- レーン 1: 下面ビール酵母 BSRI YB4-1
 2: 融合体酵母 MAK
 3 & 4: AGK 27 (killer and antibacterial)
 5: 融合体酵母 MAK
 6: 下面ビール酵母 BSRI YB4-1

レーン 1 ~ 3 はパルスタイム 20 秒、レーン 4 ~ 6 はパルスタイム 50 秒で泳動を行った。AGK 27 と MAK については図 3-7 を参照のこと。

第四章

酵母 *S. cerevisiae* の凝集性を支配する遺伝子 *FLO1*, *FLO5* の遺伝学的研究

序

微生物の凝集現象 (cell aggregation) は 100 年以上前から知られており、酵母においては 1876 年バスターによってビール酵母について最初に報告された。²⁵⁾ 現在通常のビール醸造 (下面発酵) プラントにおいて、発酵槽での主発酵終了時の適度な酵母の凝集沈降性は、若ビールからの酵母の効率良い分離回収のために重要な性質であり、ビールの品質や工程の合理化に多大の影響を与える。^{57 58)} 尚、ここで言う酵母の凝集性 (flocculation) とは、個々の細胞が非性的 (non-sexual) に相互作用し凝集塊 (flocs または clumps) を作り液底に沈降 (sedimentation) することを意味し (図 4-1)、性的な凝集反応 (sexual agglutination) や分裂した娘細胞が親細胞から分離できないために観察される見かけ上の凝集性 (clumpy growth または chain former) は除外する。微生物の凝集現象は酵母以外にもバクテリア、粘菌、糸状菌、原生動物等でも知られており、また酵母においてもビール酵母の属する *Saccharomyces cerevisiae* 以外に、*Hansenula wingei* や *Schizosaccharomyces pombe* についても多く研究されている。しかし、これらは性的接合に伴う凝集現象に関与したものが多く、本論文で扱う非性的な細胞の凝集現象とは本質的に異なるものである。

酵母の凝集性の研究の多くは、ビール酵母の凝集性の解明やビール醸造工程における凝集性の制御、さらに優良凝集性ビール酵母の育種をめざした実用的な研究が中心である。^{57 58)} また、酵母による燃料用アルコール生産のような大量生産工程を考えた場合、凝集性酵母を用いる発酵法は発酵槽で高濃度に菌体を維持できる、培養液と菌体の分離に遠心分離操作を必要とせずコストが低減できる、固定化菌体と同様連続発酵が可能でしかもリアクター等の装置が不要である等などの理由から、近年発酵工業における凝集性酵母の有用性が認識されている。^{59 60 61 62)}

このように、酵母の凝集性は産業上有用な性質であるにもかかわらず、現在に至るまでその生化学的メカニズム、遺伝的支配、環境要因による影響等について未だ十分に解明されていない (図 4-2)。⁶²⁾ 実際の産業上での凝集性酵母の利用にあたっては現実的には経験によるところが大きい。これは、一口に凝集性とは言っても様々なタ

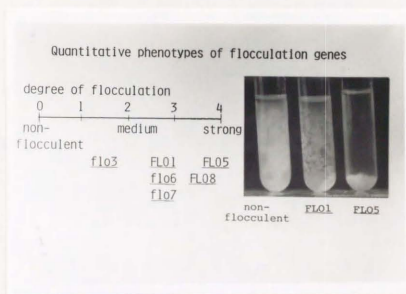


図 4-1 凝集性の強さの比較

試験管で菌体を培養後 Vortex ミキサーで激しく攪拌し約 30 秒後に観察した。凝集力の強さの評価は主観的なスケールによる。以前は凝集性の強さは、それを支配する遺伝子によるものであると考えられていたが、現在はそうでないことが分かっている。²⁸⁾ 写真の FL01 株は *S. cerevisiae* ABXL-1D (MATa FL01) で FL05 株は *S. cerevisiae* ABXR-11B (MATa FL05) である (いずれも California 大学の authentic strain)。

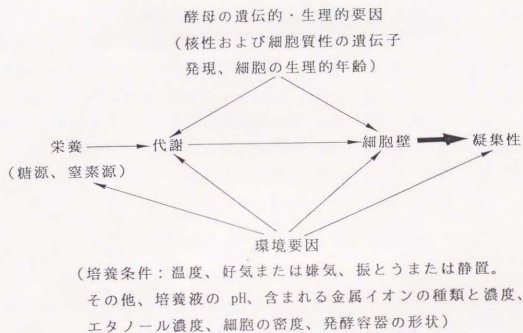


図 4-2 酵母 *S. cerevisiae* の凝集性に直接的あるいは間接的に影響を及ぼす諸要因⁶²⁾

イブが存在し、また凝集現象には多くの要因が複雑に関与して統一した解析が困難なためである。例えば、ビール酵母の凝集原因については遺伝的研究、上面酵母と下面酵母の比較対照、培地条件や培地成分等、細胞表面の酵素処理や化学修飾による影響の検討、荷電説、カルシウムイオン説、ゼータ電位説等、種々の見地から研究されてきたが、いずれの仮説も決め手となる実験を欠き推測の域に止まっている。^{6,7)}

本章においては、このような現状を踏まえ、産業上最も重要な酵母 *S. cerevisiae* の凝集性に関する遺伝学的研究と、その知見を基にして行った細胞融合による凝集性実用酵母の育種について述べる。

第一節

凝集性を支配する遺伝子 FLO1 と FLO5 の研究

現在、酵母 *S. cerevisiae* の凝集性に関与する遺伝子として知られているものについて表 4-1 にまとめた。しかし、これらの遺伝子は中間的な表現型を示す場合が多く（強い凝集性を示すものから弱い凝集性を示すものまで表現型がばらつく）、培地の組成や菌の育成状態によって表現型の変化がしばしば生じ、正しい遺伝子型の判定が困難である。これは、凝集性に影響を与える遺伝子には表に挙げた以外にも数多くの遺伝子が関与しているためであると推定される。従って、4 分子解析による遺伝解析や遺伝子のクローン化による分子遺伝学的研究が進んでいるものはほとんどなく、また凝集性についての生化学的データもほとんどないため、これらの凝集性に関与する遺伝子の機能についても想像の域を出ない。このような状況のもと、我々は、優性の凝集性遺伝子の発現を利用すれば交配や細胞融合により簡単に凝集性酵母を育種できるかもしれないと考えて、まず凝集性遺伝子 FLO1 と FLO5 に注目して研究を開始した。

結果

優性凝集性遺伝子 FLO1 と FLO5 遺伝子の利用にあたり、カリフォルニア大学 YGSC (Yeast Genetic Stock Center)⁶⁴⁾ 所有の authentic な凝集性酵母を入手し、まず手もとにあるいくつかの酵母と交雑を行った (表 4-2)。⁶⁵⁾ その結果、FLO1 遺伝子の示す凝集性は MATa または MAT_e 一倍体での場合に比べて MATa/MAT_e 二倍体では大幅に抑制された。FLO1 遺伝子座のある第 1 染色体についてのみ disomic な株 (但し、FLO1 遺伝子座についてはヘテロザイガス) を造成したところ強い凝集性を示したので、FLO1 遺伝子は優性であるがその発現は接合型遺伝子に支配されることを予想した。尚、この disomic 株は karl 株 (核融合変異遺伝株) を用いる single chromosome transfer 法⁶⁾ を利用して造成した (図 4-3、表 4-3)。細胞融合により接合型遺伝子がホモザイガスである MATa/MATa および MAT_e/MAT_e 二倍体を造成したところ、FLO1 遺伝子がホモザイガスでもヘテロザイガスでも凝集性の発現抑制は見られなかった。さらに、FLO1 遺伝子をヘテロザイガスにもつ matal/MAT_e 二倍体 (MAT_el 遺伝子や一倍体特異的遺伝子の発現を抑制する al-_e2 レプレッサータンバ

表 4-1 酵母の凝集性に関する遺伝子

遺伝子	優性/劣性	存在位置、その他
<u>FL01</u> (<u>FL02</u> , <u>FL04</u>)	dominant	第 I 染色体上、 <u>adel</u> とリンク
<u>FL05</u>	dominant	?
<u>FL08</u>	dominant	第 VIII 染色体上、 <u>arg4</u> とリンク
<u>flo3</u>	recessive	?
<u>flo6</u>	recessive	?
<u>flo7</u>	recessive	?
<u>fsu1</u>	recessive	<u>FL01</u> のサブレッサー
<u>fsu2</u>	recessive	<u>FL01</u> のサブレッサー
<u>tup1</u> (<u>flk1</u> , <u>cyc9</u> , <u>umr7</u>)	recessive	第 III 染色体上、pleiotropic
<u>amy2</u> (<u>gam1</u>)	recessive	<u>FL08</u> , <u>STA1</u> の発現に必要
<u>sfl1</u>	recessive	凝集性抑制遺伝子
<u>FMC1</u>	(dominant)	第 VII または XV 染色体上、 マルチコピーで凝集性を発現
mitochondria DNA		rho ⁻ で凝集性に影響を与える

表 4-2 接合型遺伝子の凝集性遺伝子 FLO1 発現への影響

Genotype		Strain	Flocculation Grade
<u>FLO1</u>	<u>MATa</u>	ABXL-1D	3
		ABXL-1DR [ρ^-]	3
		YFL2	3
<u>FLO1</u>	<u>MATα</u>	BX24-2B	3
		BX24-2BR [ρ^-]	3
		YFL23	3
		YFL43	4
<u>FLO1/FLO1</u>	<u>MATa/MATα</u>	ABXL-1D x BX24-2B	1
		ABXL-1D x YFL43	2
<u>FLO1/flo^o</u>	<u>MATa/MATα</u>	ABXL-1D x 0708-11-8A	1
		ABXL-1D x YJW6	0
		BX24-2B x AH22	0
		BX24-2B x 0708-11-16A	0
		YFL2 x 0708-11-8A	0
<u>FLO1/flo^o</u>	<u>MATα</u>	YFL23 x 0708-11-16A	0
		YJW6 (disomic for chr. 1)	3
<u>FLO1/flo^o</u>	<u>MATa/MATa</u>	ABXL-1DR [ρ^-] x 0708-11-16A	3
		YFL2 x 0708-11-16A	3
<u>FLO1/flo^o</u>	<u>MATα/MATα</u>	BX24-2BR [ρ^-] x 0708-11-8A	3
		YFL23 x 0708-11-8A	3

* Flocculation grade was expressed by the rating of Johnston *et al.*²⁸⁾
 0 means non-flocculent and 4 means extremely flocculent.

SINGLE CHROMOSOME TRANSFER

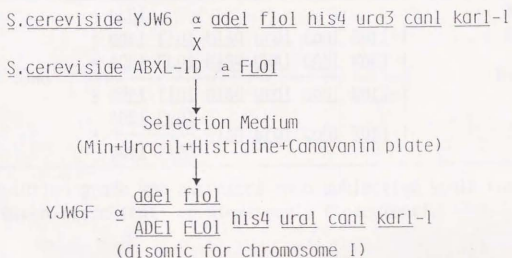


図 4-3 シングル クロモソーム トランスファーの方法

kar1-1 株 (核融合変異遺伝子) を用いて通常の性的交配を行った場合、両親株の核融合がうまくいかず、低頻度ではあるが特定の染色体のみが相手株に渡される現象がおこることが知られており、これをシングル クロモソーム トランスファーと呼ぶ。⁴⁾ ここで、適当な選抜系を用いてある特定の染色体のみがトランスファーされた株を選ぶことができる。

表 4-3 シングル クロモソーム トランスファーの結果

strain	genotype	flocculation grade
ABXL-1D	<u>a</u> <u>FLO1</u>	3
YJW6	<u>α</u> <u>ade1</u> <u>flo1</u> <u>his4</u> <u>ura1</u> <u>can1</u> <u>kar1-1</u>	0
ABXL-1D X YJW6	<u>a</u> <u>ADE1</u> <u>FLO1</u> <u>HIS4</u> <u>URA1</u> <u>CAN1</u> <u>KAR1-1</u>	0-1
	<u>α</u> <u>ade1</u> <u>flo1</u> <u>his4</u> <u>ura1</u> <u>can1</u> <u>kar1-1</u>	
YJW6F	<u>ADE1</u> <u>FLO1</u>	3
	<u>α</u> <u>ade1</u> <u>flo1</u>	

cf. Flocculation grade was expressed on a subjective scale ranging from 0(non-flocculent) to 4(extremely flocculent).

クが作られない)を造成したところ FLO1 遺伝子の発現は抑制されなかった(データ未掲載)。以上のことから、FLO1 遺伝子の発現は接合型遺伝子の情報、おそらく $al-2$ タンパクによって抑制される一倍体特異的遺伝子であることが示唆された。Yamashita et al.⁶⁶⁾ は凝集性遺伝子 FLO8 において同様な接合型遺伝子による発現抑制を報告しているが、FLO8 遺伝子は、MATa/MAT α 二倍体において、ヘテロサイガスな場合のみ抑制されるという点で FLO1 遺伝子とは異なる。

次に、FLO5 遺伝子について種々の交配を行ったところ、FLO1 遺伝子の場合とは異なり、FLO5 遺伝子は二倍体細胞においてその接合型にかかわらず強い凝集性を示した(表 4-4)。従って、一般に高次倍数体である実用酵母において、接合や細胞融合による凝集性酵母の育種では FLO5 遺伝子を利用することが有効と考えられる。

表 4-4 接合型遺伝子の凝集性遺伝子 FLO5 発現への影響

Genotype		Strain	Flocculation Grade
<u>FLO5</u>	<u>MATa</u>	ABXR-11B	4
		ABXR-11BR [rho ⁻]	4
		B2	4
<u>FLO5</u>	<u>MATα</u>	ABXR-11A	4
		ABXR-11AR [rho ⁻]	4
<u>FLO5/FLO5</u>	<u>MATa/MATα</u>	ABXR-11B x ABXR-11A	4
		B2 x ABXR-11A	4
<u>FLO5/flo^o</u> *	<u>MATa/MATα</u>	ABXR-11B x 0708-11-8A	3
		B2 x 0708-11-8A	3
		B2 x YJW6	3
		ABXR-11A x AH22	3
<u>FLO5/flo^o</u> *	<u>MATa/MATa</u>	ABXR-11A x 0708-11-16A	3
		ABXR-11BR [rho ⁻] x 0708-11-16A	3
<u>FLO5/flo^o</u> *	<u>MATα/MATα</u>	B2 x AH22	4
		ABXR-11AR [rho ⁻] x 0708-11-8A	4

* Flocculation grade was expressed by the rating of Johnston *et al.*²⁸⁾

0 means non-flocculent and 4 means extremely flocculent.

第二節

細胞融合による凝集性実用酵母の育種

結果

実験室酵母を用いて得られた結果を利用して、ビール酵母やワイン酵母等の実用酵母の凝集性の改良を試みた。まず、一倍体取得が容易である実用ワイン酵母協会 1 号 (heterothallic diploid) より接合型を示す一倍体 (非凝集性株) を取得し、実験室一倍体凝集性酵母 (FLO1 または FLO5 遺伝子をもつ) と交配したところ、FLO5 遺伝子を有する株との二倍体のみ凝集性を示し、実用ワイン酵母の場合でも実験室酵母の場合と同様の結果が得られた (表 4-5)。⁶⁷⁾ 次に、代表的ワイン酵母 OC-2 (IAM 4175, 非凝集性酵母) と FLO5 遺伝子をもつ実験室一倍体酵母凝集性酵母との細胞融合を行った。ワイン酵母はアクリフラビン処理によって誘導した細胞質性の呼吸欠損株を、また凝集性一倍体酵母は栄養要求性をもつ株を用い、Gunge and Nakatomi の RD-auxotroph 法⁴³⁾ を利用して融合体を選抜した (選抜原理は第三章での呼吸欠損ビール酵母とキラ性一倍体酵母の細胞融合体取得の場合と同じ)。取得した融合体 (呼吸正常で栄養要求性を示さない株) のうち、凝集性を示す株はすべて両親株の染色体を有している核融合体であり、非凝集性株はサイトダクタント (ワイン酵母へのミトコンドリア導入株) と思われた (パルスフィールド電気泳動法により確認、データ未掲載)。⁶⁷⁾ また、同様の方法で、当研究所所有の実用下面ビール酵母 (凝集性は弱い株) と FLO5 遺伝子をもつ一倍体凝集性酵母との細胞融合を試みたところ、上記ワイン酵母の場合と同様に凝集性が向上したビール酵母を造成することができた。⁶⁸⁾

以上、交配や細胞融合を利用した育種において FLO5 遺伝子を利用することにより、容易に凝集性酵母を造成することができることを示した。しかし、交配や細胞融合の場合、その原理上、凝集性以外の好ましくない性質が持ち込まれることになる。実際に細胞融合で育種した凝集性ワイン酵母やビール酵母を用いて発酵試験を行ってみると、いずれも発酵性やできた酒質においてもとのワイン酵母やビール酵母より劣るものがほとんどであった。今後、FLO5 遺伝子をもつ一倍体凝集性酵母を適当な醸造用酵母とかけあわせて戻し交配を繰り返し、改善された FLO5 株とワイン酵母やビール酵母と細胞融合を行うなどすれば、もっと良い融合体を得られるかもしれない。

表 4-5 凝集性実用酵母の細胞融合による育種

Construction of Flocculent Industrial Strains

K1-39 (a cell-type, spore segregant of wine yeast Kyokai No.1)	x	BX24-2B (<u>MAT</u> α <u>FL05</u>)
K1-8 (α cell-type, spore segregant of wine yeast Kyokai No.1)	x	B2 (<u>MATa</u> <u>adel</u> <u>ural</u> <u>FL05</u>)
Wine yeast OC-2 [ρ ⁻]	x	B2 (<u>MATa</u> <u>adel</u> <u>ural</u> <u>FL05</u>)
Wine yeast W-3 [ρ ⁻]	x	B2 (<u>MATa</u> <u>adel</u> <u>ural</u> <u>FL05</u>)
Bottom fermenting brewing yeast BSRI YB4-1 [ρ ⁻]	x	B2 (<u>MATa</u> <u>adel</u> <u>ural</u> <u>FL05</u>)

第五章

凝集性を支配する遺伝子のクローン化と組換え DNA 技術を用いた 実用凝集性酵母の育種

序

酵母 *S. cerevisiae* においては、前章の表 4-1 に示したようにいくつかの凝集性に関与する遺伝子の存在が知られている。しかし、現在これらのうち遺伝解析がある程度進んでいてマッピングされているものは FLO1 (第 I 染色体) と tup1 (第 III 染色体) の二つであり、後の遺伝子については以後の研究がなされずその存在すらうやむやになっているものも多い (f1o3, f1o6, f1o7, fsu1, fsu2 等)。我々は、前章で述べてきたように凝集性酵母の育種において優性の凝集性遺伝子 FLO1 と FLO5 の利用を図ってきたことから、当然これらの遺伝子のクローン化を考えた。また、凝集性の分子レベルでの理解を深めるためにも、凝集性に関与する遺伝子のクローン化は必須である。

本章においては、凝集性遺伝子 FLO1 のクローン化の試みと、得られた FLO1 遺伝子を利用した実用凝集性酵母の育種について述べる。

第一節

凝集性を支配する遺伝子 FMC1 のクローン化

結果

まず、我々は FLO1 および FLO5 のクローン化を行うに当たり、それぞれの遺伝子について確認の意味で若干の遺伝解析を行った(表 5-1)。FLO1 一倍体株と非凝集性実験室一倍体株との雑種の遺伝解析の結果から、FLO1 株の示す凝集性は 1 遺伝子関与であることがわかり、しかも FLO1 遺伝子は知られているように酵母第 1 染色体上 ade1 と約 38 cM リンクしていることが確認できた(表 5-2)。ところが FLO5 一倍体株と非凝集性実験室一倍体株の雑種の遺伝解析結果からは、FLO5 株の示す凝集性は 1 遺伝子関与ではなく、むしろ元の FLO5 株には凝集性を支配する複数の同義遺伝子(polymeric genes)の存在が示唆された。また、この FLO5 株の分離者である Johnston からも同様に遺伝解析がうまくいかず 1 遺伝子として分離しないという情報を得た(私信)。そこで、我々は遺伝学的に多少問題のある FLO5 遺伝子のクローン化をこの時点であきらめ、FLO1 のクローン化の方に集中することにした。^{6,9)}

図 5-1 に FLO1 遺伝子のクローン化のストラテジーを示した。酵母 *S. cerevisiae* ABXL-1D (MATa FLO1) の YEp13 (2 μ ori をもつマルチコピーベクター)によるジーンライブラリーを用いて非凝集性酵母 *S. cerevisiae* AH22 (MATa his4 leu2 can1) を形質転換し、ロイシン欠失最少培地で形質転換体をプレート上で選択後、出現したコロニーを 1 個づつマイクロプレートに植え、3 日間培養した(ロイシン欠失最少液体培地)。培養後マイクロプレートをそのままマイクロプレートミキサーで振とうし、凝集性クローンのスクリーニングを行った(図 5-2)。約 1 万個のクローンを調べたところ、8 個の凝集性株が得られその内 1 個がプラスミド依存性の凝集性を示した。この株よりプラスミドを単離しサブクローン化を行い、凝集性の発現に必要な DNA 領域は 1.7-kb の PvuII-HindIII 断片上に存在することがわかった(図 5-3)。この遺伝子の物理的マッピングを行ったところ第 VII あるいは XV 染色体上にマップされ、少なくとも FLO1 遺伝子(第 1 染色体上に存在する)とは異なるものであることが判明した(図 5-4)。但し、本遺伝子(FMC1 と名付けた)の示す凝集性のタイプは、凝集性の熱処理に対する耐性やプロテアーゼ処理に対する耐性の

表 5-1 FL01 及び FL05 の遺伝解析

Strain	4F/0f	3F/1f	2F/2f	1F/3f	0F/4f
<u>(FL01/fl⁰)</u>					
ABXL-1D x 0708-11-8A	0	3	40	4	1
YFL43 x AH22	0	1	44	2	0
<u>(FL05/fl⁰)</u>					
ABXR-11A x N349-3B	6	15	8	1	0
B2 x YNN27	0	17	32	0	0

1) 各菌株の遺伝子型は次のとおり :

ABXL-1D (MATa FL01); 0708-11-8A (MAT α adel ural fl⁰);

YFL43 (MAT α adel ural FL01); AH22 (MATa his4 leu2 fl⁰);

ABXR-11A (MAT α FL05); N439-3B (MATa cdc6 his4 ural MAL2 gall SUC fl⁰). fl⁰ は非凝集性の形質を示す。

2) 各菌株を孢子形成後マイクロマンピュレーターで分割しテトラッドアナリシスを行った。F は凝集性を、f は非凝集性を示す。

表 5-2 FLO1 遺伝子のマッピング

Interval	Parental ditype (PD)	Nonparental ditype (NPD)	Tetratype (T)
<u>FLO1</u> - <u>ADE1</u>	14	1	25
<u>FLO1</u> - <u>URA1</u>	10	3	26
<u>ADE1</u> - <u>URA1</u>	8	6	27

- 1) ABXL-1D (MATa FLO1) x 0708-11-8A (MATα adel ural flo^{*}) 株を孢子形成後テトラッドアナリシスを行った。
- 2) FLO1 と ADE1 にリンケージが見られ、その距離は $100 \times (T + 6 \times \text{NPD}) / 2 \times (\text{PD} + \text{NPD} + T) = 38.8 \text{ cM}$ と計算され、Stewart *et al.*²⁷⁾ のデータと一致する。

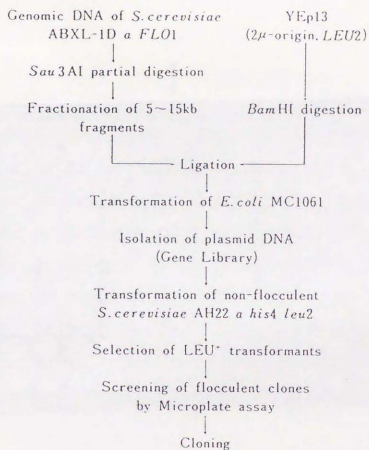


図 5-1 擬集性遺伝子クローン化のストラテジー

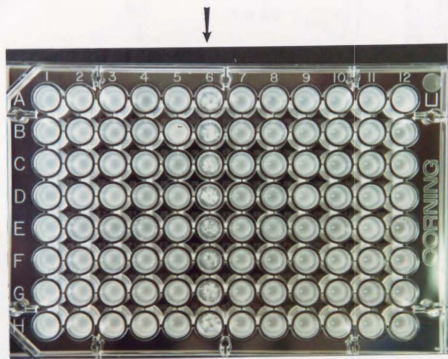
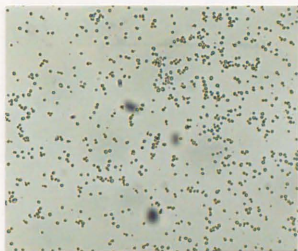
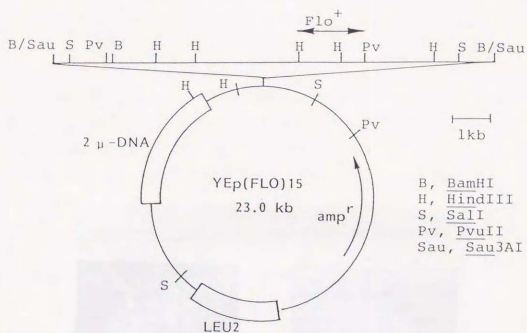
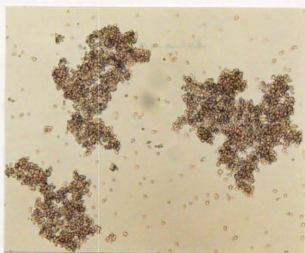


図 5-2 マイクロプレートによる凝集性株のスクリーニング (モデル実験)

矢印の列には凝集性酵母を、他の列には非凝集性酵母を予め植菌しておき、培養後マイクロプレートミキサー (タイテック製) を用いて max で約 30 秒しんとう後観察した。



S. cerevisiae AH22 transformed with YEp13



S. cerevisiae AH22 transformed with YEp(FLO)15

図 5-3 クローン化した凝集性遺伝子の制限酵素地図およびサブクローニング
凝集性を示す DNA 断片は HindIII と PvuII 間の 1.7-kb にある。

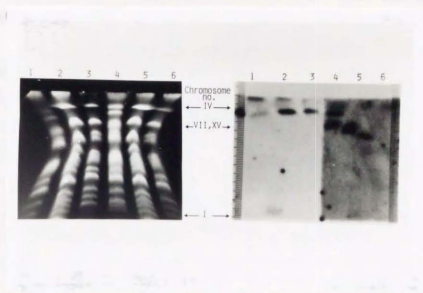


図 5-4 クローン化した凝集性遺伝子の物理的マッピング

OFAGE による染色体 DNA の分離 (左側) とその DNA-blot を用いたサザンハイブリダイゼーション (右側)。プローブは図 5-3 の 2.7-kb の *Hind*III 断片 (6.6-kb の *Pvu*II 領域中の真中の *Hind*II 断片) を Nick-translation Kit (Nippon Gene, Toyama, Japan) を用いて [ϵ - 32 P]dATP でラベルした。

- レーン 1, 4: 下面ビール酵母 BSR1 YB4-1
 2, 5: *S. cerevisiae* ABXL-1D (MATa *ELO1*)
 3, 6: *S. cerevisiae* AH22 (MATa *his4 leu2 can1*, クローニング宿主株)

パターン⁷⁰⁾から FLO1 遺伝子の示す凝集性と同一タイプであったが (表 5-3)、最少培地中でのみ凝集性を示し YEPD 中では凝集性を示さない点が FLO1 による凝集性と異なった。さらに、本遺伝子は一倍体の宿主株に YEp や YRp (データ未掲載)等の多コピー数のベクターで導入した時のみ宿主を凝集性にする事がわかり (図 5-5、図 5-6)、何らかの遺伝子産物の過剰生産が細胞表層の構造変化をもたらしたものと推察された。我々は、予備的であるが、EMC1 を導入することによって凝集性になった株は、ベクターが導入された対照株に比べて、 β -mercaptoethanol 処理により抽出される細胞表層のポリペプチドの中で、分子量が約 13 kDa のものの量が数倍増加していることを SDS-PAGE の結果から示唆した (図 5-7)。希アルカリによって同様に抽出される分子量約 13 kDa のポリペプチドが FLO1 の凝集性に関与しているという報告があり⁷¹⁾、我々が指摘しているものと同一タンパクなのかどうか興味もたれる。今後、EMC1 と本ポリペプチドの関係についての究明が必要である。

表 5-3 凝集性の熱処理耐性およびプロテアーゼ耐性パターンによる表現型の
タイピング

EFFECT OF HEAT TREATMENT AND PROTEASE TREATMENT ON FLOCCULATION

STRAIN (<i>S. cerevisiae</i>)	INITIAL DEGREE OF FLOCCULENCE	FLOCCULATION GRADE AFTER TREATMENT		
		70°C (3 hr)	α-CHYMOTRYPSIN (2 hr)	PROTEINASE K (2 hr)
ABXL-1D (FLO1)	3	3	0	0
ABXR-11B (FLO5)	4	0	4	0
AH22/YEp(FLO)15-1	2	2	0	0
YAH9B/YEp(FLO)15-1	3	3	0	0

cf. Flocculation grade was expressed on a subjective scale ranging from
0 (non-flocculent) to 4 (extremely flocculent),

Heat and protease treatments were performed according to Hodgson *et al.*⁷⁰⁾
For heat treatment, cells were suspended in 50 mM sodium acetate, 3 mM CaSO₄,
pH4.5, and then immersed in a 70°C water-bath for 2 hr. Protease treatment
was performed in 50 mM sodium phosphate, 50 mM EDTA, pH7.5, with 100 μg/ml of
α-chymotrypsin (Sigma, type I-S) or 200 μg/ml of proteinase K (Boeringer) for
2 hr. After each treatment, cells were collected and re-suspended in the
flocculation test buffer (50 mM sodium acetate, 3 mM CaSO₄, pH4.5) and the
flocculation grade was assessed with the naked eye.

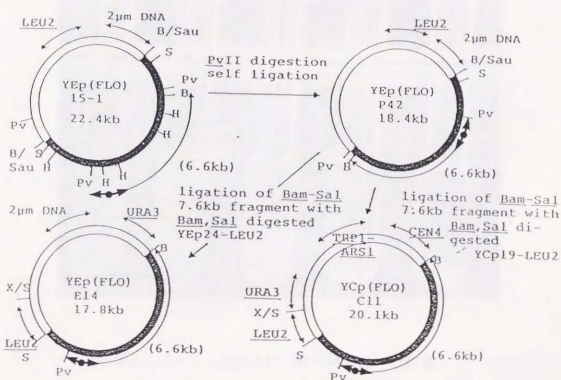


図 5-5 シングルコピープラスミド YCp(FLO)C11 の誘導

YEp(FLO)15-1 は元プラスミド。凝集性を支配する DNA 断片は図中 \longleftrightarrow 領域の *PvuII*-*HindIII* の 1.7-kb 内にある。

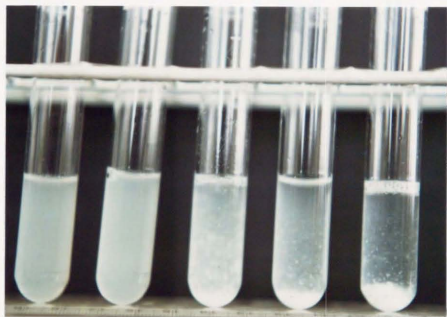


図 5-6 プラスミドのコピー数の凝集性への影響

- (写真) 1: *S. cerevisiae* AH22 (cloning host strain)
2: *S. cerevisiae* AH22 transformed with YEp(FLO)C11
3: *S. cerevisiae* AH22 transformed with YEp(FLO)E14
4: *S. cerevisiae* ABXL-1D (authentic FLO1 strain)
5: *S. cerevisiae* ABXR-11B (authentic FLO5 strain)

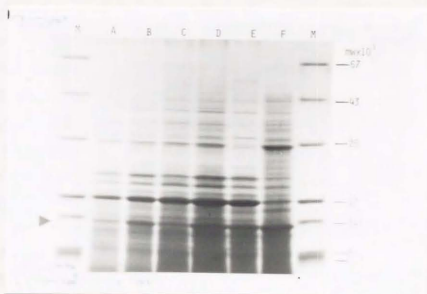


图 5-7 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析用巯基乙醇提取的细胞表面蛋白。

Extraction of cell surface protein of yeasts by β -mercaptoethanol was according to Miki *et al.* (B. L. A. Miki, N. H. Poon, and V. L. Seligy, *J. Bacteriol.*, 150, 890, 1982).

M: molecular weight markers, A: *S. cerevisiae* YAH9B transformed with YEp13 (non-flocculent), B: *S. cerevisiae* YAH9B transformed with YEp(FLO)P42 (flocculent), C: three-fold concentration of A, D: three-fold concentration of B, E: *S. cerevisiae* ABXL-1D (authentic FLO1 strain, flocculent), F: *S. cerevisiae* ABXR-11B (authentic FLO5 strain, flocculent).

第二節

凝集性を支配する遺伝子 FLO1 のクローン化

結果

我々は、当初 FLO1 遺伝子のクローン化をめざしたが、前節で述べたように、たまたま FLO1 とは異なる FMC1 をクローン化した。再度 FLO1 のクローン化を行うべく若干のストラテジーの変更を行った。⁷²⁾ 今回は、ジーンライブラリーとしてシングルコピーのベクター YCp 系 (YCpH4) を用いた。これは、gene dose の影響で凝集性を示す FMC1 のような遺伝子のクローン化を防ぐためである。また、クローン化のための宿主には先の *S. cerevisiae* AH22 ではなく、*S. cerevisiae* YJW6 (MAT⁺ adel ural his4 can1 kar1) を用いた。これは、single chromosome transfer 法⁴⁾ を用いて YJW6 に *S. cerevisiae* ABXL-1D (MATa FLO1) の第 1 染色体のみを移した株が強い凝集性を示した (第四章 図 4-3、表 4-3) ことから、YJW6 に YCp タイプのベクターで FLO1 遺伝子が導入されれば確実に凝集性を示すと予想できるからである。この系で、前節と同様なスクリーニングを行い、約 6,000 個の形質転換体から凝集性を示すクローン 1 個を得た。解析の結果、この株の示す凝集性はプラスミド由来のものであり (図 5-8)、またサブクローニング実験から凝集性に必要な DNA 断片は図中の矢印内 4.1-kb 中に存在することがわかった。また、物理的マッピングおよび integration mapping の結果から、本 DNA 断片は第 1 染色体上に存在することがわかった。図 5-9 に物理的マッピングの結果を示した (プローブとしては 2.6-kb の EcoRV 断片を用いた)。第 1 染色体上だけでなく第 V and/or VIII 染色体上へも弱いハイブリダイゼーションシグナルが得られ、これらの染色体上にクローン化した本 DNA 断片のホモログ (類似配列) が存在することを示唆している。また、integration mapping の結果を表 5-4 に示した。クローン化した DNA 断片を有する Y1p 系の組み込み型プラスミド (Y1pHF26、第三節の図 5-10 を参照) を作成し、形質転換後得られたクローン (integrant) を適当な株と交配し遺伝解析を行ったところ、この Y1p 系のプラスミドは第 1 染色体上に integrate していることがわかった。第 1 染色体上には今の所 FLO1 以外の凝集性遺伝子の存在は知られていないことから、得られた凝集性を支配する DNA 断片は FLO1 遺伝子であることが確実である。

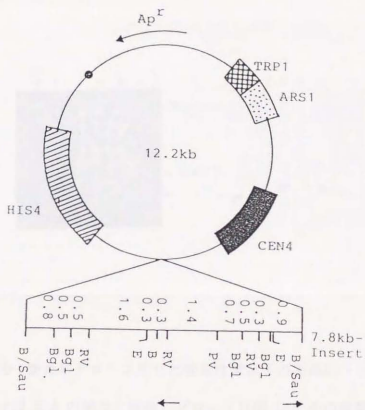


図 5-8 YCp-type のプラスミドで凝集性を示す遺伝子のクローン化

Structure of Plasmid YCpHF19.

Details of the construction of vector plasmid YCpH4 (12.2 kb) will be given elsewhere. The closed circle indicates the bacterial replication origin. Restriction sites in 7.8 kb insert are denoted as follows: *Bam*HI(B), *Sau*3AI(Sau), *Bgl*II(Bgl), *Eco*RV(RV), *Eco*RI(E) and *Pvu*II(Pv). B/SauI indicates the joint between the vector DNA and yeast DNA insert. The inverted arrows indicate the DNA sequence of the *Flo⁺* determinant.

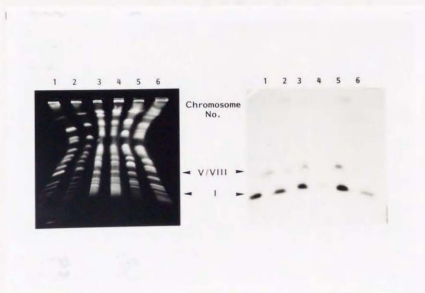


図 5-9 新たにクローン化した凝集性遺伝子の物理的マッピング

方法は図 5-4 の場合と同様。プローブは図 5-8 中の凝集性を示す領域 (図中の矢印内) の *EcoRV* 2.6-kb 断片。

- レーン 1: *S. cerevisiae* YJW6 (laboratory haploid strain, cloning host)
 2: *S. cerevisiae* ABXL-1D (authentic *FLO1* strain)
 3: 下面ビール酵母 BSRI YB4-1
 4: 下面ビール酵母 BSRI YB3-8
 5: 下面ビール酵母 BSRI YB2-6
 6: 下面ビール酵母 BSRI YB10-9

表 5-4 Mapping Data on Integrated Plasmid

Interval	Parental ditype	Nonparental ditype	Tetrapype
YIpHF26-INT ^a ——— <u>ADE1</u>	22	0	7
YIpHF26-INT ^a ——— <u>URA1</u>	3	5	21
<u>ADE1</u> ——— <u>URA1</u>	6	3	20

a. YIpHF26 plasmid was integrated into the genome of YJW2A(a FLO1 his4).
The integrant was crossed to YJW6(a ade1 his4 ura1) and the hybrid
was dissected.

第四章において、凝集性遺伝子 FLO1 の発現は接合型遺伝子の支配を受けることを接合型の異なる各種一倍体および二倍体細胞を造成し示した。表 5-5 にクローン化した FLO1 遺伝子と考えられる DNA 断片を接合型の異なる各種二倍体に導入してその発現を調べたところ、本遺伝子発現は接合型遺伝子の支配を受け一倍体特異的遺伝子のように制御されることが示された。⁷³⁾ 今後、接合型遺伝子による発現抑制、すなわち $al-12$ リプレッサータンパクの作用部位（オペレーター部位）がこの FLO1 遺伝子のプロモーター領域に存在するかどうか興味もたれる。

表 5-5 接合型遺伝子のクローン化した FLO1 遺伝子発現への影響

Strains transformed ^a	Mating-type	Flocculation grade ^b
YJW6	<u>MAT</u> α	3
AH22	<u>MAT</u> a	3
YJW6 x AH22	<u>MAT</u> a/ <u>MAT</u> α	1
23a20 x YJW6	<u>mata1</u> / <u>MAT</u> α	3
2055-19C	<u>MAT</u> a/ <u>MAT</u> α	0
M1-7C	<u>MAT</u> α/ <u>MAT</u> α	3

- a. Each strain was transformed with YCpHF26 containing FLO1.
 b. Flocculation grade was expressed on a subjective scale ranging from 0 to 4, 0 means non-flocculent and 4 means extremely flocculent.

第三節

FLOI 遺伝子の各種産業用実用酵母への導入による凝集性実用酵母の育種

結果

クローン化した凝集性遺伝子が実用酵母中で発現するかどうか、凝集性酵母の育種上最も興味あるところである。先にクローン化した凝集性遺伝子のうち FLOI を各種実用酵母に導入しその発現を調べた (FMC1 は最少培地でのみしか凝集性を示さないもので実用上の意味がない)。73) FLOI 遺伝子を野生型の実用酵母に導入するために直接選抜可能なベクター YRpGLF14 (図 5-10) および YE_pGF27 (図 5-11) を作成した。これらのプラスミドは FLOI 遺伝子と Tn903 由来の G418 耐性遺伝子をもつ YRp タイプまたは YE_p タイプのプラスミドである。表 5-6 に各種実用酵母への YRpGLF14 の導入結果を示した。先に、FLOI 遺伝子は実験室酵母において接合型遺伝子 MAT_a/MAT_e による発現抑制を受けることを示した。実用酵母は一般に高次倍数体であり接合能を示さないことから、これらの実用酵母においては実験室酵母と同様に FLOI 遺伝子の発現は接合型遺伝子により抑制を受けると予想された。しかし、驚くべきことに、本プラスミドの導入により、凝集性の程度に差はあるが、非凝集性の下面ビール酵母・上面ビール酵母・ウイスキー酵母・ワイン酵母・日本酒酵母・焼酎酵母のすべてを凝集性にした (図 5-12)。これら実用酵母の形質転換体においては FLOI 遺伝子のコピー数でこの抑制を乗り越えたのかもしれない。あるいは、これらの実用酵母においては実験室酵母に比べて、接合型遺伝子による発現抑制が厳密ではないのかもしれない。例えば、酵母 *S. cerevisiae* の菌体外分泌性グルコアミラーゼ遺伝子 STAI は実験室酵母において、一倍体細胞の場合に比べて MAT_a/MAT_e 二倍体細胞においてはその発現が大幅に抑制を受けることが知られているが⁶⁴⁾、ビール酵母に YCp タイプのシングルコピーのベクターで導入した場合でも発現がみられるという例も知られている。74)

また、凝集性をその熱処理やプロテアーゼ処理に対する耐性パターンにより FLOI タイプと FLO5 タイプに分けられていることを本章第一節で述べた。このことを、FLOI 遺伝子を導入した実用酵母について調べてみたところ (表 5-7)、FLOI タイプの凝集性 (熱処理に対して安定であるが、キモトリプシン処理で凝集性を失う) を示さず、また FLOI 遺伝子を導入した実験室酵母の中でも FLO5 タイプの凝集性を示すものもあり (YNN27 の形質転換体の場合)、凝集性の phenotype によって FLOI と

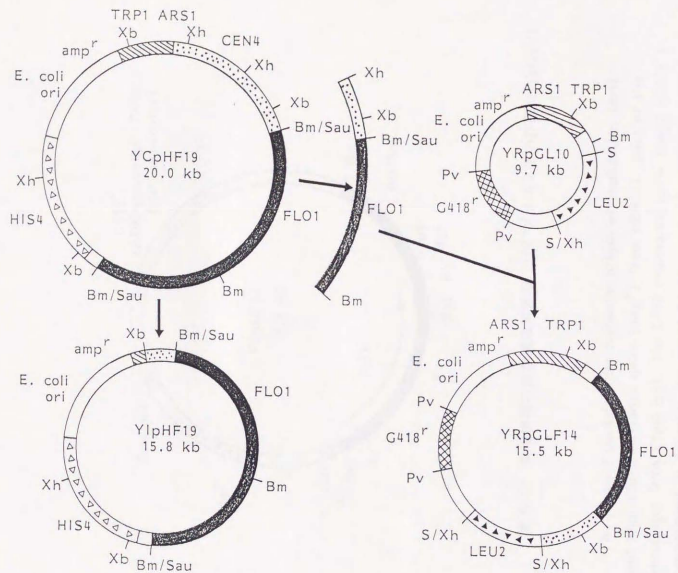


図 5-10 実用酵母の直接選抜可能な *FLO1* プラスミドの作成 (YRpGLF14)

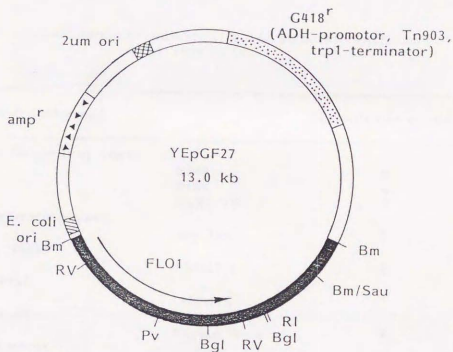


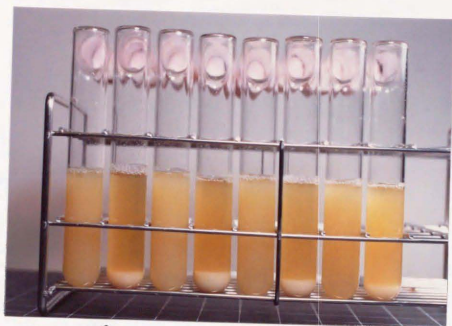
図 5-11 実用酵母の直接選抜可能な FLO1 プラスミドの作成 (YE pGF27)

The plasmid contains the bacterial origin of replication (ori) and ampicillin resistance gene (amp^r) from pBR322, part of the yeast 2μm DNA (2μm ori), the G418 resistance gene Tn903 (G418^r) sandwiched in between the yeast adcl promoter and the trp1 terminator for selection of transformants, and the flocculation gene FLO1. FLO1 contains the putative 2,586-bp open reading frame. Restriction sites are denoted as follows: BglIII (Bgl); BamHI (Bm); EcoRI (RI); EcoRV (RV); Sau3AI (Sau). Bm/Sau indicates the joint between BamHI and Sau3AI.

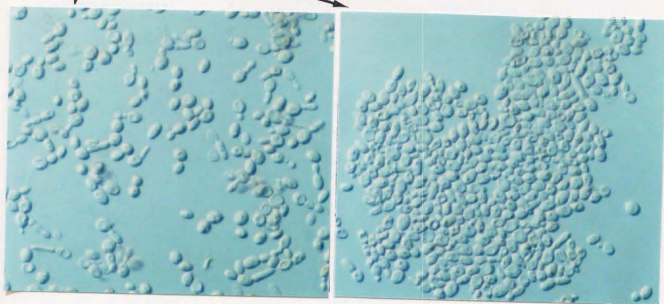
表 5-6 Flocculence of industrial yeast strains transformed with YRpGLF14

Strains transformed	Flocculation grade ^a
Bottom fermenting yeast	
W204	4
W164	4
BSRI YB4-1	3
Top fermenting yeast	
obg.160	2
Whisky yeast	
AHU3200	4
Wine yeast	
IAM4175	1
Sake yeast	
Kyokai No.6	4
Shochu yeast	
IFO 0282	2

a. Flocculation grade was expressed on a subjective scale ranging from 0 to 4, 0 means non-flocculent and 4 means extremely flocculent.



AHU3200
 AHU3200/YRpGLF1^H
 W204
 W204/YRpGLF1^H
 W164
 W164/YRpGLF1^H
 BSRI YB4-1
 BSRI YB4-1/YRpGLF1^H



MICROSCOPY

図 5-12 YRpGLF1^H の形質転換体の示す凝集性

上段は YEPD (G418 を 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 含む) 中で 3 日間 28 $^{\circ}\text{C}$ でしんとう培養し (10 ml 用のモノー管を用いる)、静置後約 1 分後の写真。下は、顕微鏡写真。

表 5-7 YRpGLF14 で形質転換後の凝集性菌株の凝集性の熱処理耐性およびプロテアーゼ処理耐性

Strains	Flocculation grade ^a	heat ^b treatment	chymotrypsin ^c treatment
ABXL-1D(a FLO1)	3	r	s
ABXR-11A(a FLO5)	4	s	r
YJW6/YCpHF26	4	r	s
YNN27/YCpHF26	3	s	r
W204/YRpGLF14 (bottom yeast)	4	r	r
W164/YRpGLF14 (bottom yeast)	4	r	r
AHU3200/YRpGLF14 (whisky yeast)	4	r	r
Kyokai No.6/YRpGLF14 (sake yeast)	4	r	r

- a. Flocculation grade was expressed in a subjective scale ranging from 0 to 4, 0 means non-flocculent and 4 means extremely flocculent.
- b. in 50mM sodium acetate, 3mM CaSO₄, pH 4.5 at 70°C for 2hr.
- c. in 50mM sodium phosphate, 50mM EDTA, pH 7.5 with 100ug/ml of α-chymotrypsin for 2 hr.

FLO5 の遺伝子発現を区別することは必ずしもあてはまらないと思われる。

いずれにしても、遺伝的に近縁関係にないと思われるこれらの実用酵母のすべてを

FLO1 遺伝子を用いて凝集性酵母にすることができ、実用凝集性酵母の育種における

FLO1 遺伝子の有用性が示された。

第四節

実用凝集性下面酵母の凝集性と FLO1 遺伝子発現の関係

結果

現在、日本においてビール醸造に用いられている酵母のほとんどは下面ビール酵母であり、前発酵中後期から終了時にかけて酵母が凝集性を示し、液層（若ビール）から沈降分離することで特徴づけられる性質をもつ。この凝集性と FLO1 遺伝子発現に関係があるかどうかノーザン解析により調べた（図 5-13）。⁷⁵ ³FLO1 遺伝子のプローブとしては 2.6-kb EcoRV DNA 断片を用いた。非凝集性実験室酵母 YJW6 および非凝集性下面酵母 W164 と W204 からはこのプローブに対応するメッセンジャーは検出されなかったが、これらの FLO1 プラスミドによる形質転換体（いずれも凝集性を示す）には約 3.5-kb に相当するメッセンジャーが検出された（図 5-13 A）。次に、実用凝集性下面酵母の 2 株についてノーザン解析を行ったところ、いずれも 2 本ずつでしかも FLO1 プラスミドの示すメッセンジャーより大きいメッセンジャーが検出された（図 5-13 B）。今のところ、このことが何を意味しているのか不明であるが、少なくとも非凝集性酵母からは FLO1 遺伝子に対応するメッセンジャーが検出されず、凝集性酵母のみからメッセンジャーが検出されたことから、実用凝集性下面酵母の凝集性には FLO1 遺伝子あるいは FLO1 類似遺伝子の発現が関係していると考えられる。メッセンジャーの大きさが FLO1 プラスミドのそれと異なるのは、一種の塩基配列の多様性（RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism）によるのかもしれない。また、メッセンジャーが 2 本出現するのは、実用酵母の倍数性のためかもしれない（FLO1 遺伝子について RFLP を示す第 1 染色体が複数存在する可能性がある）、あるいは小さい方のメッセンジャーは大きい方のメッセンジャーがスプライシングされた結果かもしれない。今後、これらの実用株の第 1 染色体の FLO1 座の塩基配列が決定されれば、以上の疑問点は解明されるだろうと考えられる。

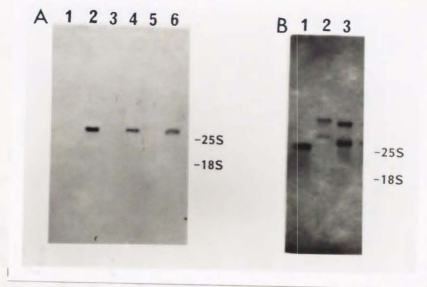


图 5-13

Northern Hybridization Analysis.

Poly(A)⁺RNA (1 ug) prepared from yeast cells was separated by electrophoresis in agarose gel (1%) containing formamide, transferred to nylon membrane (Hybond-N, obtained from Amersham), and probed with the (α -³²P)dCTP-labelled 2.6-kb EcoRV fragment of FLO1. The migration positions of ribosomal 25S and 18S RNA markers (3.5-kb and 1.8-kb, respectively) are indicated in the margin.

(A) Lane 1: *S. cerevisiae* YJW6 (laboratory haploid strain, non-flocculent), lane 2: YJW6 transformed with the FLO1 plasmid YCpHF19 (flocculent), lane 3: W164 (bottom strain, non-flocculent), lane 4: W164 transformed with the FLO1 plasmid YEpGF27 (flocculent), lane 5: W204 (bottom strain, non-flocculent), and lane 6: W204 transformed with YEpGF27 (flocculent).

(B) Lane 1: W204 transformed with YEpGF27 (flocculent), lane 2: BSRI YB 3-8 (bottom strain, flocculent), and lane 3: BSRI YB 4-1 (bottom strain, flocculent).

(A) A 3.5-kb transcript was observed in the genetically-engineered flocculent strains, while no hybridization signal was observed in the parent non-flocculent strains.

(B) In the case of the flocculent bottom strains in practical brewery use, two hybridization signals were observed (center and right); they varied in size between strains, and all were larger than the FLO1 transcript.

第五節

FLO1 遺伝子の導入により育種した凝集性酵母を用いた発酵試験

結果

FLO1 遺伝子を導入して育種した凝集性酵母を用いて発酵試験を行った。まず、蔗糖密からのエタノール生産の発酵試験を試みた。⁷³⁾ 酵母は非凝集性ウイスキー酵母 *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus* AHU3200 を YRpGLF14 (図 5-10) で形質転換した株を用い、培地は 24% (w/w) の蔗糖密液を使用した。発酵 24 時間後のエタノール生成速度も、最終エタノール濃度も対照の元株と差はなかった (表 5-8)。また、発酵終了後発酵液の振とうを止めると形質転換ウイスキー酵母は速やかに液底に凝集沈降し (本酵母は蔗糖密培地でも凝集性を示した)、液層と菌体の分離が効率良く行われた (図 5-14)。次に、麦汁を用いたビール醸造試験を行った。⁷⁵⁾ 酵母は非凝集性ビール酵母 W204 を YEpGF27 (図 5-11) で形質転換した株を用いた。発酵試験は、繰り返し二度行った (一度めの発酵終了後回収した酵母を用いて二度めを行った)。発酵速度は、一度めも二度目も対照の元株 (非凝集性株) の方が形質転換株 (凝集性株) より速やかであった (図 5-15)。これは、元株の方が形質転換株より、発酵中における液中での浮遊酵母数が多いことに起因すると考えられる。しかし、若ビールの分析値は対照株と形質転換株の間で差はなく、元株を凝集性株にすることによるビールの一般分析値 (原麦汁濃度、生成アルコール濃度、エキス、発酵度、pH) や香り成分 (高級アルコール、エステル) への影響は見られなかった (表 5-9)。また、酵母の回収率は凝集性になることによって上昇し、回収率が悪いために現場での使用が不可であった本酵母は、その凝集性が改善されることにより実用化が可能になったと考えられる。

従って、今後、上記の方法により、香味については良いビールを造るが凝集性が弱い回収率が悪く実用性に欠けていた酵母の凝集性の向上を図り、実用株に改良していくことが可能になった。実際にビール会社の酵母バンクには、そのような欠点をもった株は多数存在しているので、FLO1 遺伝子を用いてこのようなビール酵母を救済していけば、ますます工場での使用酵母の枠は広がっていくと思われる。

表 5-8 形質転換体凝集性ウイスキー酵母を用いた廃糖蜜からのアルコール生産

菌株	発酵終了後の凝集性 ¹⁾	エタノール濃度 (g/l)		発酵速度 ²⁾ (g/l h)
		24 時間後	48 時間後	
ウイスキー酵母 (元株 AHU3200)	0	65.9	67.4	2.75
形質転換体ウイスキー 酵母 (AH3200/YRpGLF14)	4	64.9	67.2	2.70

エタノール生産は 24 w/w% の廃糖蜜培地を用い、30°C で振とう培養した。

1) 凝集性の評価方法は表 2 と同じ

2) 発酵速度は最初の 24 時間におけるエタノールの生成速度で示した



図 5-14 蜜糖蜜での発酵終了後の凝集性

蜜糖蜜での発酵終了後全液をメスシリンダーに投入し、3分後に写真撮影した。

(左) ウイスキー酵母 (AHU 3200)

(右) 形質転換体凝集性ウイスキー酵母 (AHU 3200 transformed with YRpGLF14)

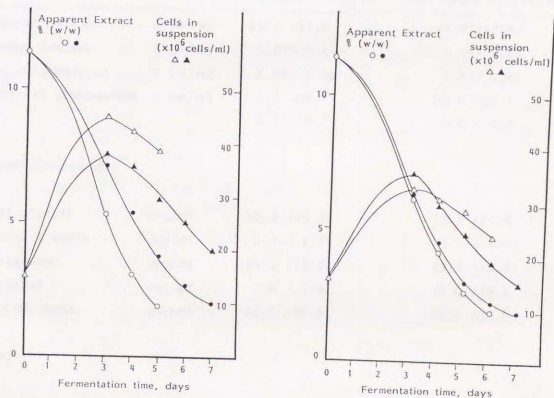


図 5-15 YE pGF27 で形質転換したビール酵母を用いたビール発酵試験

Fermentation Curves of the Genetically-Engineered Flocculent Yeast Strain (W204 Transformed with YE pGF27, ●- and ▲-) and its Parent Non-Flocculent Strain (W204, ○- and △-) in 2-L scale EBC-tube.

Fermentation conditions: pitching, 10 g centrifuged yeast/2-L EBC-tube; temperature, 10°C; medium, brewery wort. (Left) 1st cycle fermentation. (Right) 2nd cycle fermentation.

Fermentation was slightly slower in the genetically-engineered flocculent strain than in the parent non-flocculent strain during the primary fermentation.

表 5-9 若ビールの一般分析値

Analysis		W204/YEpGF27	W204
		(1st cycle/2nd cycle)	(1st cycle/2nd cycle)
Original extract	% (w/w)	11.5 / 11.4	11.4 / 11.4
Alcohol content	% (w/w)	5.07 / 4.99	5.10 / 5.08
Apparent extract	% (w/w)	1.93 / 2.00	1.77 / 1.81
Apparent attenuation	% (w/w)	83.2 / 82.5	84.5 / 84.1
pH		4.1 / 4.3	4.0 / 4.2
Flavor compounds:			
Ethyl acetate	mg/ml	16.9 / 15.4	15.1 / 15.0
Isoamyl acetate	mg/ml	1.3 / 1.1	1.1 / 0.94
n-Propanol	mg/ml	14.3 / 13.8	13.4 / 14.1
i-Butanol	mg/ml	7.9 / 7.4	10.6 / 10.2
Amyl alcohols	mg/ml	56.0 / 56.0	58.0 / 56.0
Yeast:			
Cropping rate	%	230 / 210	130 / 110
Plasmid stability	%	50 / 37	- / -

さて、最後に FLO1 および FMC1 遺伝子産物の機能について考える。いずれの遺伝子についても、現在ほぼ DNA のシーケンシングは完了しつつあり、この結果からこれらの遺伝子の機能について、タンパクレベルでのホモロジーリサーチ等によりある程度明らかになるものと思われる。現在、凝集性に関与する遺伝子の中でクローン化されてシーケンシングが完了しているものとして Fujita *et al.* の SFL1⁷⁹⁾ と SFL2⁸⁰⁾ 遺伝子がある。これらはいずれも凝集性の抑制遺伝子として分離されたものである。シーケンスのホモロジーリサーチの結果、SFL1 遺伝子産物は酵母の細胞表層のアッセムブリーに関与する遺伝子の転写因子であると予想されている。また、SFL2 遺伝子は酵母第III染色体上の TUP1 遺伝子 (FLK1, CYC9, UMR7 とも呼ばれる pleiotropic な遺伝子) と同一であり、転写調節因子 (転写因子ではない) であると予想されている。いずれも細胞表層の凝集性に直接関与する遺伝子ではなく、その遺伝子の発現の転写レベルでの制御に関係しているタンパクと考えられている。現在、凝集性酵母に特有な細胞表層の構造についての有益な知見はあまりないが、今のところ Miki *et al.*⁸¹⁾ が提唱した FLO1 遺伝子の関与する凝集性のモデル (図 5-16) が有名である。それは、FLO1 遺伝子は凝集性酵母において細胞表層のレクチン様のタンパク質の生産を支配し、そのタンパク質が凝集性酵母にも非凝集性酵母にも存在する細胞表層の α -マンナン鎖を認識し (これはコンカナバリン A によっても認識される)、培地中のカルシウムイオンを介して隣接した細胞どうしが接着し凝集塊を形成するというモデルである。残念ながら、Miki *et al.* は実際に凝集性酵母の細胞表層のレクチン様のタンパク質の存在を証明した訳ではなく、彼らのモデルは実体を欠いた単なる仮説に止まっている。我々がクローン化した FLO1 遺伝子のシーケンスの予備的な検討では、FLO1 遺伝子産物は、上述の SFL1 や SFL2 遺伝子と異なり転写関係に関与するものではなく、Miki *et al.* の主張する細胞表層に存在する凝集性に直接関与するタンパク質である可能性が示唆されている (データ未発表)。FMC1 遺伝子についてはまだ不明である。今後、FLO1 や FMC1 遺伝子産物の抗体を何らかの方法で作成し、それらの産物の細胞での局在性について調べることができれば、これらの凝集性に関与する遺伝子の機能について明らかになることと考えられる。

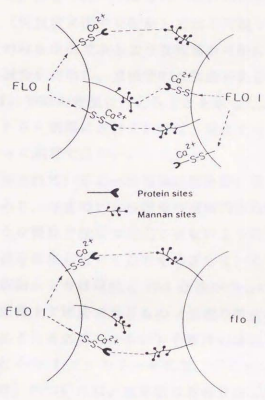


図 5-16 FLO I 遺伝子による凝集性のモデル⁸⁾¹⁾

第六章

ビール酵母の育種の今後の展望

我々は、細胞融合や組換え DNA 技法という新しい手法を用いて数々のビール酵母の育種改良実験を行ってきた。序章で述べたように、これらの新しい技法を利用することにより、従来の育種法（突然変異法や交配法）では不可能であった、非常に効率が高くまた目的とした性質のみを改良できるような育種が可能になった。遺伝学的な知識が充分でなければ細胞融合を利用し、遺伝学的な知識がある程度明らかであれば組換え DNA 技法を用いれば、実際の育種は行えることを示した。いずれにしても、育種すべき遺伝的なターゲットさえ明確にされておれば、現在ビール酵母の育種はあらゆる意味で可能であると言って過言ではない。

ただ、実際に工場で使用されているビール酵母は歴史的に長年にわたる選抜に耐えてきた一応の“完成品”であり、今後のビール酵母の育種の方向性としては、なるだけビール酵母の持つこのような優良な性質は変化させないように注意を払いながら、まだ充分ではない特定の性質を改良していくことをめざしていくことになると思われる。従って、手段としては細胞融合よりは組換え DNA 技法が中心になろう。また、従来の醸造工程の充分な管理の延長上で解決できるもの（工程の微生物管理の徹底によりビール酵母の抗汚染菌性は必ずしも必要ではない）や麦汁の酵素処理により対応できるもの（ビール混濁防止のための β -グルカナーゼ処理、ダイエットビール製造のためのグルコアミラーゼ処理等）については、現実的な育種目標にはならないであろう（注、日本においてもビールにおいて現在では仕込み時における酵素剤の使用は許可されている）。それは、ビールというものは典型的な伝統的嗜好品であるがゆえに、化学工業製品とは異なり生産効率や産物の純度だけを追及するわけにいかず、なるだけ昔のままに、より自然に造るべきだというメーカーおよび消費者の心理が働いているからである。従って、ビール酵母の育種目標も実際はこの辺の微妙なバランス感覚に則って決定されることになり、現状の製造システムではなかなか効率的な方法の見当たらないものに対するの解決の手段として酵母の育種を考えて行くという方向のように思われる。現在では未熟臭（ジアセチル）を速やかに除去できるビール酵母あるいは未熟臭非生成ビール酵母の造成が世界的に現実的な育種目標になっており、また凝集性の改良も長年の懸案の一つである。

ビール酵母の育種はオーソドックスに考えていくなら上述のように組換え DNA 技法が中心になっていくであろうが、特殊な醸造法に対応するものや一部の新製品に対しては細胞融合の利用も現実的であると思われる。現実、日本において数年前、細胞融合により造成した酵母を用いて製造したと銘打って発売されているワイン・日本酒などが知られている。^{82, 83)} これらはいずれも香や味に特徴を持ち、従来の通常株にはない性質を有しているとしている（例えば日本酒の良好な吟醸香を持つワイン酵母）。

最後に、酒類産業分野における組換え体の実際の利用についての展望を述べる。各種産業分野における組換え体の利用に当たっては、現在関係官庁の組換え DNA 産業化指針が策定されており、医薬品製造や試薬・酵素生産等が実際に厚生省や通産省の指針に従って行われている。酒類産業分野においては、最終製品が食品であり、食品の安全性評価を確立する必要があるという観点から、厚生省の食品分野における組換え DNA 技術応用のための指針策定を待っていたが、ようやく平成 3 年 5 月に最終的に完了の運びとなり、今後組換え DNA 技術の酒類産業分野への実際の応用もその指針に沿って進められることになる。今後、最も大きな問題はこれらの組換え体を用いて造られた醸造製品が一般消費者に抵抗なく受け入れられるかどうかである。世界的にもこの問題は今のところ微妙な面があり、今すぐ実用化ということにはならないだろう。しかし、遺伝学的によく理解されている DNA 断片を用いて、初めから狙った箇所を改良するという組換え DNA 技術は、科学的にみて、むしろ従来から認められているランダムな突然変異法（この技術は結果として酵母自身に何が起っているか全く予期できない）に比べて危険性が高いとは言えないと思われる。むしろ、最近では、種々の酒類で検出されて問題になったカルバミン酸エテル（発がん性物質と言われている）の前駆体である尿素を生成しない清酒酵母を、アルギナーゼ遺伝子 (CARL) の遺伝子破壊法により造成した例も知られ、食品の安全性の面から極めて意義深い育種例である。⁸³⁾ 今後の醸造酵母の育種において、組換え DNA 技術は醸造工程の効率化・醸造産物の品質の規格化・新製品開発関係等への寄与だけでなく、このような品質安全保証の面への寄与も充分考えられ、より安全で効率的な醸造を行うための重要な手法の一つとして位置付けられることになるだろう。

材料と方法

本論文で用いた使用菌株、実験材料、方法についてまとめて記す。本論文の理解のために必要と思われることについては、すでに本文中に述べてある。尚、実験方法については、特に記載がない限り下記の一般的実験書(以下実験書と略称)によった。

- (1) 微生物遺伝実験法
編者 石川 辰夫
共立出版株式会社 1982年
- (2) 分子遺伝学実験法
編者 小関 治男 1983年
- (3) Advanced Bacterial Genetics,
ed. by R. W. Davis, D. Botstein, and J. R. Roth,
Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1980.
- (4) Molecular Cloning,
ed. by T. Maniatis, E. F. Fritsch, and J. Sambrook,
Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1982.
- (5) Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics,
by F. Sherman, G. R. Fink, and J. B. Hicks, Cold Spring Harbor
Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1986.
- (6) Yeast, a Practical Approach,
ed. by I. Campbell and J. H. Duffus,
IRL Press, Oxford, 1988.
- (7) Methods in Cell Biology, Vol. XI and XII,
ed. D. M. Prescott, Academic Press, New York, 1975.
- (8) A Practical Guide to Molecular Cloning,
by B. Perbal, John Wiley & Sons, New York, 1984.

菌株

大腸菌の菌株を示す。

菌名	遺伝子型	由来
JA221	<u>recA1</u> <u>lacY</u> <u>leuB6</u> <u>trpΔE5</u> <u>thr</u> <u>thi</u> <u>hsdR</u> <u>hsdM</u>	M. Takagi
MC1061	<u>araD139</u> <u>Δ(ara-leu)7697</u> <u>ΔlacX74</u> <u>galU</u> <u>galK</u> <u>hsr</u> <u>rpsL</u>	M. Takagi

プラスミドの調製のための宿主には JA221 株を用いた。ジーンライブラリーの作成のためには、形質転換頻度の非常に高い MC1061 株を用いた。

酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の菌株を示す。

菌名	遺伝子型	由来
(実験室酵母)		
0708-11-16A	<u>MATa</u> <u>adel</u> <u>ura1</u>	N. Gunge
0708-11-8A	<u>MATϵ</u> <u>adel</u> <u>ura1</u>	N. Gunge
G706	<u>MATa</u> <u>thr4</u> <u>his4</u> <u>leu2</u> [KIL-k]	N. Gunge
YJW6	<u>MATϵ</u> <u>adel</u> <u>ura1</u> <u>his4</u> <u>can1</u> <u>kar1-1</u>	BSRI
AH22	<u>MATa</u> <u>leu2</u> <u>his4</u> <u>can1</u>	M. Takagi
YNN27	<u>MATϵ</u> <u>trp1</u> <u>ura3</u> <u>gal2</u>	M. Takagi
23a20	<u>MATa1</u> <u>trp1</u> <u>leu2</u> <u>ura3</u> <u>his4</u>	I. Yamashita
2055-19C	<u>MATa/MATϵ</u> <u>adel/adel</u> <u>his4/his4</u> <u>leu2/leu2</u> <u>thr4/thr4</u>	N. Gunge
M1-7C	<u>MATϵ/MATϵ</u> <u>adel/ADE1</u> <u>trp1/trp1</u>	N. Gunge
ABXL-1D	<u>MATa</u> <u>FLO1</u>	YGSC
BX24-2B	<u>MATϵ</u> <u>FLO1</u>	YGSC
ABXR-11B	<u>MATa</u> <u>FLO5</u>	YGSC
ABXR-11A	<u>MATϵ</u> <u>FLO5</u>	YGSC
(実用酵母)		
M2 (BSRI YB4-1)	bottom brewing yeast (flocculent)	BSRI
BSRI YB3-8	bottom brewing yeast (flocculent)	BSRI

A2	baker's yeast (anti-bacterial)	BSRI
OC-2	wine yeast	BSRI
IAM4175	wine yeast	IAM
Kyokai No.1	wine yeast	Nihon Jōzō Kyokai
K1-39	a cell-type, spore segregant of wine yeast Kyokai No.1	BSRI
K1-8	a cell-type, spore segregant of wine yeast Kyokai No.1	BSRI
W3	wine yeast	Nihon Jōzō Kyokai
W204	bottom brewing yeast(non-flocculent)	TU München
W164	bottom brewing yeast(non-flocculent)	TU München
obg.160	top brewing yeast (non-flocculent)	VLB
AHU 3200	whisky yeast	AHU
Kyokai No.6	Japanese sake yeast	Nihon Jōzō Kyokai
IFO 0280	Japanese shochu yeast	IFO

尚、由来の略称は以下のとおり。

BSRI: Brewing Science Research Institute, 旧(財)醸造科学研究所、現サッポロ
ビール株式会社醸造技術研究所

YGSC: Yeast Genetic Stock Center, University of California, U. S. A.

IAM: Institute of Applied Microbiology, University of Tokyo, Tokyo, Japan

TU München: Technische Universität München, Freising, Germany

VLB: Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei, Berlin, Germany

AHU: Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo, Japan

IFO: Institute for Fermentation, Osaka, Japan

また、本論文において特に由来を示していない実験室酵母は、上記に示してある実験室酵母間の交配・胞子分割によって造成した株である。

培地

L 培地 (大腸菌の培養用)

Bacto-tryptone (Difco 社)	10 g
Bacto-yeast extract (Difco 社)	5 g
NaCl	5 g
	pH7.5 per liter

YEPD 培地 (酵母の培養用)

Bacto-peptone (Difco 社)	20 g
Bacto-yeast extract (Difco 社)	10 g
glucose	20 g
	per liter

グルコース最少培地 (酵母の培養用)

Yeast Nitrogen Base without amino acids (Difco 社)	6.7 g
glucose	20 g

グリセロール最少培地 (酵母の培養用)

Yeast Nitrogen Base without amino acids (Difco 社)	6.7 g
glycerol	40 g

培地の固形化には通常 1.5% (大腸菌) または 2.0% (酵母) の寒天 (Bacto-agar, Difco 社) を加えてプレートを作成した。プロトプラストの再生培地では、1 M KCl または 1 M Sorbitol を浸透圧安定剤に加え、またこの時の寒天濃度は 3% である。

上記培地にアミノ酸、核酸塩基、抗生物質を加える場合は適当な濃度 (100 倍から 1000 倍の濃度) の原液 (無菌) を作成しておき、上記培地をオートクレーブ後 60-70℃ に冷えたところでその原液を必要量加える。最終濃度は、アミノ酸・核酸塩基で 20 µg/ml、抗生物質 (Ampicillin, Kanamycin) で 40 µg/ml である。

方法

大腸菌の形質転換法

Maniatis *et al.* (実験書 4)の $\text{CaCl}_2/\text{RbCl}$ 法によった。

大腸菌からのプラスミドの調製法

Maniatis *et al.* の Alkali lysis (実験書 4)法によりプラスミドの調製を行った。但し、大量調製の場合は、 CsCl-EtBr 密度勾配平衡遠心にかけて精製した。

酵母の形質転換法

Itoh *et al.*⁷⁶⁾ の Li-acetate 法を用いた。但し、実用産業用酵母の G418 耐性による形質転換体の直接選抜法については、Sakai *et al.*¹³⁾ の方法に準じたが、菌体のヒートショック後の液体 YEPD 中でのポストインキュベーション時間を 3 時間から約 18 時間に変更した。⁷³⁾

酵母形質転換体からのプラスミドの回収法

実験書 5 の全 DNA 抽出法(小スケール)によって抽出した DNA を用いて、大腸菌 MC1061 を形質転換し、プラスミドを回収した。

酵母からの全 DNA の抽出法

ジーンライブラリー作成用の高分子 DNA の調製は Cryer *et al.* (実験書 7)の方法に従った。

ジーンライブラリー作成法

上記の方法によって調製した染色体 DNA を制限酵素 *Sau3A1* で適当に切断後、ショ糖密度勾配 (10%-40%) にかけて遠心後フラクショネートし、各画分の一部を電気泳動して 10-kb 程度の DNA 断片を含むものをライゲーションに用いた (実験書 8)。また、ベクタープラスミドは、制限酵素で切断後必ずアルカリフォスファターゼ (CIP, Boeringer 社) 処理をしたものを用いること。

DNA の切断、連結、および修飾

制限酵素、DNA リガーゼ、Klenow fragment、アルカリフォスファターゼ (CIP) 等の使用は、すべてそれらの酵素の製造元の指示に従った。

サザンブロットィング

ブロットィング操作は Maniatis *et al.* (実験書 4) の方法に従った。但し、ブロットィングメンブランはアマーシャム社製の Hybond-N を用いた。

酵母からの mRNA の調製

酵母形質転換体を最少培地、YEPD、G418 含有 YEPD 等で培養する。菌体濃度が 2×10^7 から 4×10^7 cells/ml になった時点で培養を終了し、集菌後 Ausbel *et al.*⁷⁷⁾ の方法に従って全 RNA を調製した。poly(A)⁺RNA の精製は Oligotex-dT30 (ラテックスビーズに oligo-dt が結合しているもの、発売元は宝酒造社) を用いた。尚、mRNA 調製関係の試薬にはすべて 0.2% の diethylpyrocarbonate を含ませておき、また器具の類いは乾熱殺菌またはオートクレーブ殺菌を充分行っておく。

酵母 mRNA の電気泳動とノーザンブロットィング

RNA の電気泳動はホルムアルデヒドを含む 1% agarose (Seakem GTG Agarose、発売元は宝造社) を用いて行った。各レーンには mRNA を約 1 μ g チャージした。また、ブロットィングメンブランはアマーシャム社の Hybond-N を用いた。電気泳動およびブロットィング操作はすべてアマーシャム社のプロトコールに従った。

ハイブリダイゼーション

サザンハイブリダイゼーション、ノーザンハイブリダイゼーションともにアマーシャム社のプロトコールに従った。サザンハイブリダイゼーションは 68°C overnight で、ノーザンハイブリダイゼーションは 42°C overnight で行った。プローブ DNA は Nicktranslation-kit (宝酒造社) を用いて [e^{-32} P]dCTP (3,000 Ci/mmol, Amersham) でラベルした。

アガロースゲルからの DNA の回収

通常の電気泳動後、ゲルをエチジウムブロミドで染色してバンドの位置を確認し、適当な大きさにゲルを切り出した後 DNACELL (発売元は宝酒造社)を用いてエレクトロエリユーション法にて回収した。詳細は、添付マニュアルに従った。

パルスフィールド電気泳動法

OFAGE (Orthogonal-field-alternation gel electrophoresis) は、使用装置サンプル調製ともほぼ Carle and Olson^{19, 22)}の方法に従った。泳動槽は原報に従って自作した。サンプル調製法において異なるのは、原法はゲル中で細胞のプロトプラスト化を行ういその後培養するが、我々は酵母のプロトプラストの作成と同じように液層でプロトプラスト化を行い、それをゲルに埋め込み培養した。その方がプロトプラスト化に要する時間を短縮でき(原報より 1 日短縮)、またプロトプラスト化も安定して行うことができる。^{20, 24)}

文献

- 1) J. K. C. Knowles, *Proc. Eur. Brew. Conv. Congr.*, Madrid, p. 123 (1987).
- 2) S. W. Molzahn, *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 35, 54 (1977)
- 3) J. F. T. Spencer and D. M. Spencer, *Ann. Rev. Microbiol.*, 37, 121 (1983).
- 4) M. C. Kielland-Brandt, T. Nilsson-Tillgren, J. G. L. Petersen, S. Holmberg, and C. Gjermansen, "Yeast Genetics: Fundamental and Applied Aspects," ed. by J. F. T. Spencer, D. M. Spencer, and A. R. W. Smith, Springer-Verlag, New York, p. 421 (1983).
- 5) G. G. Stewart, C. J. Panchall, and I. Russell, *J. Inst. Brew.*, 89, 170 (1983).
- 6) S. W. Molzahn, *Proc. Eur. Brew. Conv. Congr.*, Madrid, p. 197 (1987).
- 7) 高橋 俊明、醸造協会誌、80 巻、第 7 号、444 (1985).
- 8) 荻内 精三、バイオインダストリー、第 4 巻、22 (1987).
- 9) P. van Solingen and J. B. van der Plaats, *J. Bacteriol.*, 130, 946 (1977).
- 10) I. Russell and G. G. Stewart, *J. Inst. Brew.*, 85, 95 (1979).
- 11) A. Hinnen, J. B. Hicks, and G. R. Fink, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 75, 1929 (1978).
- 12) A. Jimenez and J. Davis, *Nature*, 287, 869 (1980).
- 13) K. Sakai and M. Yamamoto, *Agric. Biol. Chem.*, 50, 1177 (1986).
- 14) R. C. S. Henderson, B. S. Cox, and R. S. Tubb, *Curr. Genet.*, 9, 133 (1985).
- 15) G. P. Casey, W. Xiao, and G. H. Rank, *J. Inst. Brew.*, 94, 93 (1988).
- 16) J. K. C. Knowles and R. S. Tubb, "E. B. C. -Symposium on Brewer's, Vuoranta (Helsinki), Finland, November 1986," Verlag Hans Carl, Nürnberg, p. 169 (1987).
- 17) E. H. Blackburn, *Trends in Genetics*, 1, 8 (1985).
- 18) K. Goto, T. Motoyoshi, G. Tamura, T. Obata, and S. Hara, *Agric. Biol. Chem.*, 54, 1499 (1990).
- 19) G. F. Carle and M. V. Olson, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 82, 3756 (1985).
- 20) Y. Takata, J. Watari, N. Nishikawa, and K. Kamada, *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 47, 109 (1989).

- 21) M. B. Pedersen, "Beer Analysis," ed. by H. F. Linskens and J. F. Jackson, Springer Verlag, Berlin, p. 180 (1988).
- 22) S. Y. Lee and F. B. Knudsen, *J. Inst. Brew.*, 91, 169 (1985).
- 23) 高田 善浩、渡 淳二、西川 紀男、鎌田 耕造、日本発酵工学会大会講演要旨集(昭和61年度)、p. 17 (1986).
- 24) 渡 淳二、高田 善浩、高木 正道、"電気泳動最前線、クロマトグラフィー最前線、"アトー社(東京)、第3号、p.6 (1988).
- 24) L. Pasteur, "Études sur la Bière," Gauthier-Villars, Paris, p. 196 (1876).
- 26) C. W. Lewis, J. R. Johnston, and P. A. Martin, *J. Inst. Brew.*, 82, 158 (1976).
- 27) G. G. Stewart and I. Russell, *Can. J. Microbiol.*, 23, 441 (1977).
- 28) J. R. Johnston and H. P. Reader, "Yeast Genetics: Fundamental and Applied Aspects," ed. by J. F. T. Spencer, D. M. Spencer, and A. R. W. Smith, Springer Verlag, New York, p. 205 (1983).
- 29) N. Gunge and A. Tamaru, *Jap. J. Genet.*, 53, 41 (1978).
- 30) T. Kaneko, K. Kitamura, and Y. Yamamoto, *Agric. Biol. Chem.*, 37, 2295 (1973).
- 31) B. P. G. Curran and B. L. A. Carter, *J. Gen. Microbiol.*, 129, 1589 (1983).
- 32) B. P. G. Curran and B. L. A. Carter, *Curr. Genet.*, 10, 943 (1986).
- 33) B. P. G. Curran and B. L. A. Carter, *Curr. Genet.*, 15, 303 (1989).
- 34) J. Johnston, F. Hilger, and R. Mortimer, *Gene*, 16, 325 (1981).
- 35) 原島 俊、高木 敦子、須田 幹夫、大嶋 泰治、酵母の細胞工学と育種、学会出版センター、p. 55 (1986).
- 36) E. A. Bevan and M. Makower, *Proc. Xlth Int. Congr. Genet.*, 1, 202 (1963).
- 37) E. A. Bevan, A. J. Herring, and D. J. Mitchell, *Nature*, 245, 81 (1973).
- 38) M. Vodkin, F. Katterman, and G. R. Fink, *J. Bacteriol.*, 117, 681 (1974).
- 39) T. K. Sweeney, A. Tate, and G. R. Fink, *Genetics*, 84, 27 (1976).
- 40) 大内 弘造、発酵と工業、39 巻、190 (1981).
- 41) T. W. Young, *J. Inst. Brew.*, 87, 292 (1981).
- 42) S. Hara, Y. Iinuma, and K. Otsuka, *Am. J. Enol. Vitic.*, 31, 28 (1980).
- 43) N. Gunge and Y. Nakatomi, *Genetics*, 70, 41 (1972).

- 44) D. R. Woods and E. A. Bevan, J. Gen. Microbiol., 51, 115 (1968).
- 45) T. W. Young and M. Yagi, Antonie van Leeuwenhoek, 44, 59 (1978).
- 46) H. Bussey, Nature New Biol., 235, 73 (1972).
- 47) "Brewing Microbiology," ed. by F. G. Priest and I. Campbell, Elsevier Applied Science Publishers Ltd., London (1987).
- 48) L. Dolezil and B. H. Kirsop, J. Inst. Brew., 86, 122 (1980).
- 49) T. Sasaki, J. Watari, M. Kohgo, N. Nishikawa, and Y. Matui, J. Am. Soc. Brew. Chem., 42, 164 (1984).
- 50) D. C. Schwarz, W. Saffran, J. Welsh, R. Haas, M. Goldenberg, and C. R. Cantor, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 47, 189 (1982).
- 51) D. C. Schwarz and C. R. Cantor, Cell, 37, 67 (1984).
- 52) G. F. Carle and M. V. Olson, Nuc. Acids Res., 12, 5647 (1984).
- 53) J. R. Johnston and R. K. Mortimer, Int. J. Syst. Bacteriol., 36, 569 (1986).
- 54) B. Ono and Y. Ishino-Arao, Curr. Genet., 14, 413 (1988).
- 55) M. Hoffmann, M. Zimmermann, and C. -C. Emeis, Curr. Genet., 11, 599 (1987).
- 56) M. Hansen, W. Röcken, and C. -C. Emeis, J. Inst. Brew., 96, 125 (1990).
- 57) G. G. Stewart and I. Russell, "Brewing Science," Vol. 2, ed. by J. R. J. Pollock, Academic Press, London, p. 61 (1981).
- 58) G. G. Stewart and I. Russell, "E. B. C. -Symposium on Brewer's Yeast, Vuoranta (Helsinki), Finland, November 1986," Verlag Hans Carl, Nürnberg, p. 53 (1987).
- 59) K. Esser and U. Kues, Process Biochem., 18, 21 (1983).
- 60) U. Wiesman and H. Bender, "Advances in Biochemical Engineering," Vol. 24, ed. by A. Fiechter, Springer Verlag, Berlin, p. 119 (1982).
- 61) S. Limtong, M. Nakata, H. Funahashi, T. Yoshida, T. Seki, J. Kumnuanta, and H. Taguchi, J. Ferment. Technol., 62, 55 (1984).
- 62) K. Esser, J. Hinrichs, and U. Kues, "Flocculation in Biotechnology and Separation Systems," ed. by Y. A. Attia, Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, 383 (1987).
- 63) K. Kamada and M. Murata, Nippon Nögeikagaku Kaishi, 58, 977 (1984).

- 64) "Yeast Genetic Stock Center, Catalogue Sixth Edition 10/01/87,"
Department of Biophysics and Medical Physics, University of California,
Berkeley CA 94720, USA.
- 65) J. Watari, M. Kudo, N. Nishikawa, and M. Kamimura, Agric. Biol. Chem.,
54, 1677 (1990).
- 66) I. Yamashita and S. Fukui, Agric. Biol. Chem., 47, 2889 (1983).
- 67) 工藤 雅義、渡 淳二、浦野 直人、西川 紀男、上村 稔、日本発酵工学会大会要旨集、
p. 50 (1989).
- 68) N. Urano, N. Nishikawa, and M. Kamimura, Proc. 21st Conv. Inst. Brew.
(Australia and New Zealand Section), p. 154 (1990).
- 69) J. Watari, Y. Takata, N. Nishikawa, and K. Kamada, Proc. Eur. Brew.
Conv. Congr. Madrid, p. 537 (1987).
- 70) J. A. Hodgson, D. R. Berry, and J. R. Johnston, J. Gen. Microbiol.,
131, 3219 (1985).
- 71) S. Holmberg, Carlsberg Res. Commun., 43, 401 (1978).
- 72) J. Watari, Y. Takata, M. Ogawa, N. Nishikawa, and M. Kamimura, Agric.
Biol. Chem., 53, 901 (1989).
- 73) J. Watari, Y. Takata, J. Murakami, and S. Koshino, Agric. Biol. Chem.,
55, 1547 (1991).
- 74) K. Sakai, S. Fukui, S. Yabuuchi, S. Aoyagi, and Y. Tsumura, J. Am. Soc.
Brew. Chem., 47, 87 (1989).
- 75) J. Watari, Y. Takata, J. Murakami, and S. Koshino, Proc. Eur. Brew.
Conv. Congr., Lisbon, in press (1991).
- 76) H. Ito, Y. Fukuda, K. Murata, and A. Kimura, J. Bacteriol., 153, 163
(1983).
- 77) "Current Protocols in Molecular Biology," ed. by F. M. Ausbel, R. Brent,
R. E. Kingston, D. D. Moor, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl,
Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York, Chapter 13
(1987).
- 78) Y. Yamamoto, K. Higashi, and H. Yoshi, Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi,
31, 525 (1984).

- 79) A. Fujita, Y. Kikuchi, S. Kuhara, Y. Misui, S. Matsumoto, and H. Kobayashi, *Gene*, 85, 321 (1989).
- 80) A. Fujita, S. Matsumoto, S. Kuhara, Y. Misui, and H. Kobayashi, *Gene*, 89, 93 (1990).
- 81) B. L. A. Miki, N. H. Poon, A. P. James, and V. L. Seligy, *J. Bacteriol.*, 150, 878 (1982).
- 82) 清水 健一、バイオサイエンスとバイオインダストリー、Vol. 46, No. 7, 101 (1988).
- 83) 清水 健一、化学と生物、Vol. 28, No. 12, 800 (1990).

謝辞

本研究をまとめることをお認めいただき、かつ長年にわたる懇切丁寧な指導をいただきました東京大学農学部教授高木正道博士、並びに長岡技術科学大学教授（東京大学名誉教授）矢野圭司博士に厚く感謝致します。

さらに、本研究に絶えざるご指導ご鞭撻を頂き、常に暖かい励ましのことばを頂きましたサッポロビール株式会社取締役醸造技術研究所長越野昌平氏、同理事前所長上村稔氏、同理事元所長鎌田耕造博士、同研究所部長村上淳氏に心より感謝の意を表します。また、特に故西川紀男博士（元サッポロビール株式会社醸造技術研究所部長）には、入社以来直接ご指導を受け常にそばで叱咤激励していただき、くじけることなく長年にわたって研究を遂行できたのもまさに故西川博士のおかげと感謝しております。佐々木隆博士（現明治乳業）には酵母の扱い方の最初の手ほどきをしていただき、この道に入るきっかけをつくっていただきました。

また、サッポロビール株式会社醸造技術研究所微生物研究部の皆様には全面的に本研究を支援していただき厚く御礼申し上げます。特に、向後正明氏、高田善浩氏、小川雅裕氏には直接実験上お世話になり感謝しております。さらに、サッポロビール醸造技術研究所におきましては、微生物研究部以外の数多くの方々にも他方面にわたりご指導を仰ぎ、まさに「我以外皆我が師」といった感じであり、この場をかりまして、ひとこと御礼申し上げさせていただきます。

論文要旨

細胞融合及び組換え DNA 技法を用いたビール酵母の育種

Breeding of brewer's yeast by use of protoplast fusion and recombinant DNA technology

サッポロビール株式会社 醸造技術研究所

渡 淳二

第一章 序論

酵母はビール製造工程において中心的な役割を果し、製品ビールの香味に最も大きな影響を与える。望ましい性質を持つ酵母を選抜していくことと、それを常に最良の状態で維持していくことは、ビール醸造技術者にとって最大の関心事のひとつである。また近年、ビールの種類の多様化や生産の合理化に伴う設備の改変が急速に進み、それらに対応した優良酵母菌株の生産現場への供給が、各ビール会社にとって重要な問題になってきた。通常は各社それぞれ独自の酵母バンク（数多くの実用ビール酵母のコレクション）の中から要求する性質を持つ菌株を求めることができるが、近年の急速な流れから見ると、もはや既存の酵母バンクの利用だけでは必ずしも要求に合致した菌株の供給は難しいと想像される。ここに、望ましい性質を持つ菌株を積極的に造る、即ち育種によるビール酵母の造成が必要になってくる理由がある。

従来より、細々とはあるが古典的な遺伝学の方法を駆使してビール酵母の育種は試みられて来た。しかし、ビール酵母は通常胞子形成を行わず、また仮に低頻度で胞子を形成してもその発芽率は低く、事実上接合子を得ることが不可能であり交配による育種はできなかった。また、突然変異法も、ビール酵母は通常高次倍数体であるので効率よく変異株を取得することができず、仮に望む変異が得られても他の優良な形質が損なわれてしまっていることが多く、これもまた有効な育種法ではなかった。

しかし、1970年代後半より急速に進展してきた分子生物学的手法と知識が、1980年代前半にはビール酵母の育種に応用され始めて、現在では細胞融合や組換え DNA 技法等の手法が有力な育種技術として定着している。これらの新しい方法は、酵母の性や倍数性に関係なく行うことができ、また同種の酵母からだけでなく異種異属の酵母や、さらに酵母以外の異種生物の有用な遺伝子をも利用できる画期的なものである。

ここに、従来現実的に不可能であったビール酵母の育種の道が開けてきた。

本章においては、まず具体的なビール酵母の育種ターゲットについて解説し、さらに近年のビール酵母の育種に用いられている新しい手法の紹介を行い、ビール酵母の育種の現状についてレビューした。

第二章 酵母 *S. cerevisiae* 実験室株及び実用ビール酵母の高頻度細胞融合体取得のための諸条件の検討

細胞融合法によりビール酵母を育種していくためには、効率よく細胞融合体を得る技術の確立が必要である。そのためには細胞融合に適した状態のプロトプラストの調製が必須である。筆者等は、まず遺伝的に取り扱いやすい実験室株を用いて、プロトプラスト化率が高くかつ正常細胞への再生率が高いプロトプラストを常に安定して得られる条件の検討を行った。その結果、プロトプラスト化する菌の培養法（リフレッシュ培養）とプロトプラスト化反応時に用いる浸透圧安定剤（塩化カリウム）の選択がキーポイントであることを示した。また、この条件は実用ビール酵母のプロトプラスト化の際にもあてはまった。

次に、プロトプラストの保存について検討した。これは、細胞融合実験はリフレッシュ培養・プロトプラストの調製・融合操作・再生培地への重層と実験上のステップが多く、一日で実験を終わらせるのが時間的に難しいからである。実験室株及び実用ビール酵母のいずれも適当な高張緩衝液中で保存することにより 2-3 日は再生数を大幅に減少させることなく保存可能であった。保存条件は、pH5.5 付近・5V 付近が最適であった。

この保存したプロトプラストを用いて細胞融合を行った。実験室酵母の場合、驚くべきことに、保存したプロトプラストを用いた場合、当日調製のプロトプラストを用いるよりも細胞融合頻度（再生数当たりの融合体出現頻度）だけではなく実際に取得される融合体の数も上昇した。2 週間程度の保存期間で調べたところ、細胞融合頻度は最大で 7 倍上昇した。このプロトプラストの保存による細胞融合頻度の上昇の原因は不明であるが、栄養飢餓状態に細胞をおくことによる一種の細胞周期の同調化が関係しているのではないかと推察された。

第三章 細胞融合による抗汚染菌性ビール酵母の育種

実用ビール酵母の育種の手初めとして、まずビール酵母と実験室キラー酵母の細胞融合を行い、キラー性ビール酵母の造成を試みた。取得した融合体は、実際にビール

工場で分離された数々の野生酵母（培養酵母以外の汚染酵母）に対して効果的に致死作用を発現し、また本酵母を用いた小スケール試験醸造において外来から混入した野生酵母の増殖を防ぎ抗野生酵母性を示した。しかし、本融合体は発酵性や香味において元株のビール酵母に劣り、改良の余地が残った。

次に、実際のビール製造時において野生酵母の汚染より問題になる、ビール有害バクテリア（ビールの香味を悪くしたりビールの混濁の原因となる）の汚染に対して抵抗性をもつ酵母の育種を考えた。まず、これらのバクテリアに対して成育を阻害する性質を示す酵母を各種保存の醸造用酵母の中からスクリーニングし、得られた株（パン酵母由来株）とビール酵母の細胞融合を行うことにより抗バクテリア活性を有するビール酵母の造成に成功した。本融合体を用いて造ったビールに代表的なビール有害バクテリア 11 種を接種してもそれらは増殖せず、ビールの混濁を引き起こさなかった。現在のところ、この抗バクテリア性物質の実体については不明であるが、比較的熱安定性の強い低分子の化合物であることが示唆されている。

最後に、近年開発されたパルスフィールド電気泳動法により染色体 DNA の電気泳動を行い、上記で得られた融合体の染色体 DNA の構造を調べた。その結果、キラー性ビール酵母も抗バクテリア性ビール酵母もいずれも、両親株の染色体 DNA が一部交ざりあった核融合体であることが証明された。

第四章 酵母 *S. cerevisiae* の凝集性を支配する遺伝子 *FLO1*, *FLO5* の遺伝学的研究

現在通常のビール醸造（下面発酵）プラントにおいて、発酵槽での主発酵終了時の適度な酵母の凝集沈降性は、若ビールからの酵母の効率の良い分離回収のために重要な性質であり、ビールの品質や工程の合理化に多大の影響を与える。ここで言う酵母の凝集性（flocculation）とは、個々の細胞が非性的に相互作用し凝集塊を作り液底に沈降することである。この酵母の凝集現象には酵母の遺伝的・生理的及び培養条件等の環境要因が複雑に関与しており、現在に至るまでそのメカニズムについて統一的な説明がなされていない。

現在までに、酵母 *S. cerevisiae* において凝集性を支配する遺伝子としていくつかのものが知られている。筆者らは、優性の凝集性遺伝子の発現を利用すれば交配や細胞融合により簡単に凝集性酵母を育種できるかもしれないと考えて、まず凝集性遺伝子 *FLO1* と *FLO5* に注目して研究を始めた。

酵母 *S. cerevisiae* の実験室株を用いた種々の交配や細胞融合実験の結果から、*FLO1* 遺伝子の発現は接合型遺伝子の情報によって制御される一倍体特異的遺伝子であ

ることが示唆されたが、FLO5 遺伝子の発現は二倍体細胞においてその接合型にかかわらず凝集性を示した。このことから、一般に接合型を示さない高次倍数体である実用酵母において、交配や細胞融合による凝集性酵母の育種では FLO5 遺伝子を利用することが有効と考えられた。また、実際にワイン酵母やビール酵母を用いてその実例を示した。

第五章 凝集性を支配する遺伝子のクローン化と組換え DNA 技術を用いた実用凝集性酵母の育種

酵母の凝集性のメカニズムを分子レベルで理解するために、また効率のよい実用凝集性酵母の育種のために、凝集性遺伝子のクローン化は不可欠である。筆者らは当初 FLO5 遺伝子のクローン化をめざしたが、FLO5 株の遺伝解析の結果 FLO5 株の示す凝集性は必ずしも 1 遺伝子関与ではない結果を得て FLO5 遺伝子に多少遺伝学的な問題が生じたので、遺伝学的に問題のない FLO1 についてのクローン化を行うことにした。

まず、酵母 *S. cerevisiae* ABXL-1D (MATa FLO1) のジーンライブラリーを、酵母内でマルチコピーで存在するベクター YEp13 を用いて作成し、スクリーニングの結果凝集性を示すプラスミド YEp(FLO)15-1 を得た。物理的マッピングを行ったところ、このプラスミド中に含まれる凝集性を示す DNA 断片は第 1 染色体上にある FLO1 ではなく、第 VII または XV 染色体上にある別の遺伝子であることがわかった。この遺伝子 (FMC1 と命名) は、細胞内に多コピー数で存在する場合にのみその宿主を凝集性にし、しかも β -メルカプトエタノール処理により抽出される細胞表層のポリペプチドの中で分子量が 13 kDa のものの量が対照の非凝集性株に比べて数倍増加しているという、興味ある事実がわかった。しかし、FMC1 遺伝子は最少培地中でだけしか凝集性を示さないで (YEPD 中では示さない)、実用上問題がある。

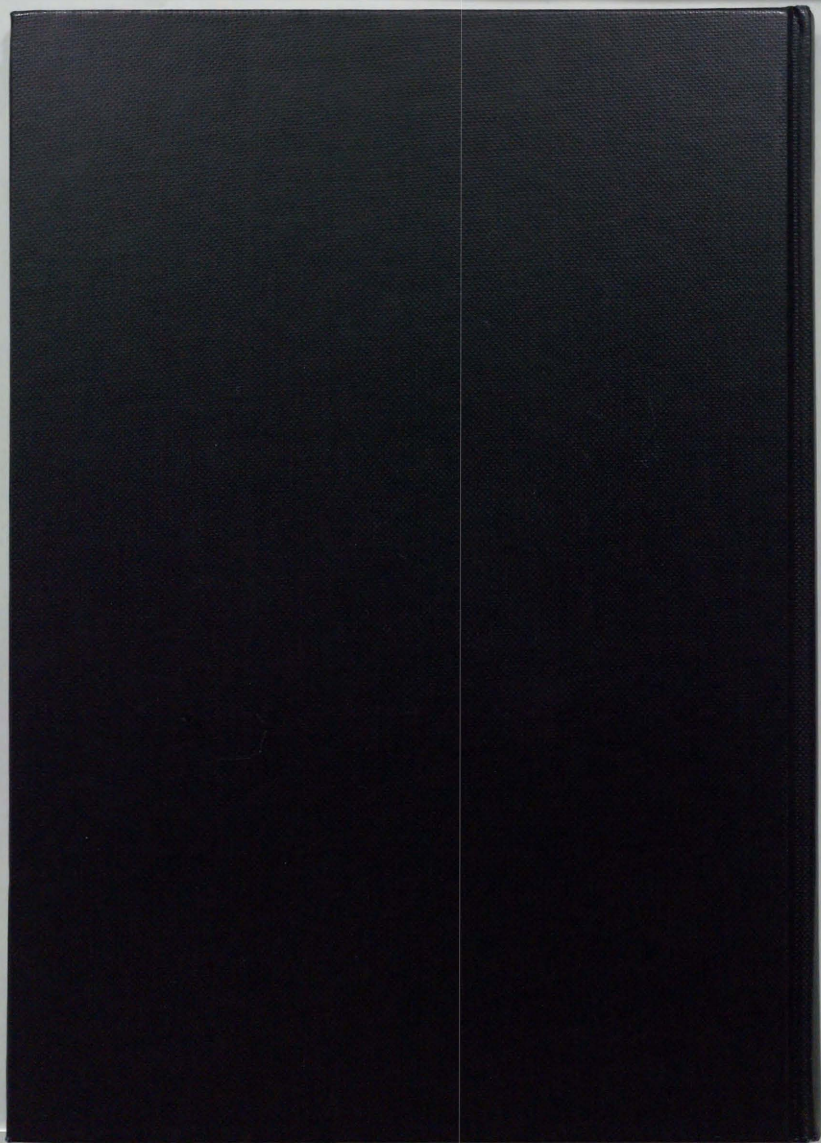
次に、同様のジーンライブラリーを YCp 系のシングルコピーのベクターで作成し再びチャレンジしたところ、第 1 染色体上にある FLO1 と考えられる遺伝子をクローン化することに成功した。本遺伝子を YRp 系または YEp 系のマルチコピーのベクターについで各種非凝集性実用酵母 (ビール酵母、ウイスキー酵母、ワイン酵母、日本酒酵母、焼酎酵母等) に導入したところ、株間の凝集力に差はあるものの、いずれの株も凝集性を示すようになった。FLO1 遺伝子は接合型遺伝子の発現抑制を受けることを前に示したが、これらの実用酵母においてはこのような抑制が実験室株ほど厳密ではないのか、あるいはコピー数でこの抑制を乗り越えたのかもしれない。いずれにしても、実用凝集性酵母の育種における FLO1 遺伝子の有用性が示された。

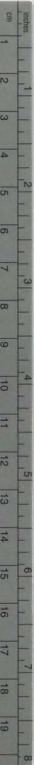
さらに、凝集性を示す下面ビール酵母の凝集性と FLO1 遺伝子の発現の関係を知らするためにノーザン解析を行ったところ、FLO1 プロンプにハイブリダイズするメッセージ RNA を検出することができた。凝集性を示さない下面ビール酵母からはメッセージ RNA を検出できなかったことから、下面ビール酵母の凝集性には FLO1 遺伝子発現が関与していることが示唆された。

最後に、FLO1 遺伝子を導入して育種した凝集性ウイスキー酵母や凝集性ビール酵母を用いて、それぞれ産糖密からのアルコール生産実験やビール発酵試験を実際に行い、発酵終了後酵母菌体が、対照の非凝集性株に比べて、非常に効率的に回収されたことを確認した。

第六章 ビール酵母の育種の今後の展望

組換え DNA 技術を利用して育種したビール酵母の実用化についての今後の展望を述べた。





Kodak Color Control Patches

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM, Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

