

[生物工学会誌 第72巻 第2号 87-94. 1994]

焼酎酵母の第IV染色体の MAL 配列

山下 伸雄^{1*}・後藤 邦康²・中村 稔彦²
西谷 尚道²・田村 學造¹(株)醸造資源研究所,¹ 国税庁醸造試験所²
^{1,2}〒114 東京都北区滝野川2-6-30

(平成5年5月17日受付 平成5年12月24日受理)

MAL sequence on chromosome IV of *shochu* yeast. NOBUO YAMASHITA,^{1*} KUNIYASU GOTO,² NARUHIKO NAKAMURA,² TAKAMICHI NISHIYA,² and GAKUZO TAMURA¹ (*Research Institute of Brewing Resource*¹ and *National Research Institute of Brewing*,² 2-6-30 Takinogawa, Kita, Tokyo 114) *Seibutsu-kogaku* 72: 87-94, 1994.

In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, five unlinked *MAL* (maltose fermentation gene) loci, *MAL1*, *MAL2*, *MAL3*, *MAL4*, and *MAL6* have been identified. We surveyed the chromosomal location of the *MAL* homologous sequence for some industrial yeasts, and found that *shochu* yeasts, *sake* yeasts and wine yeasts isolated in Japan have a *MAL* homologous sequence on their chromosome IV, identified by hybridization analysis with a *TRP1* gene probe. By pulse field gel electrophoresis (PFGE)-Southern hybridization analysis of segregants isolated from a hybrid between a haploid spore from *shochu* yeast SH-4 and a *mal*⁻ laboratory strain, this homologous sequence originating in SH-4 could express maltose fermentability. Therefore, we named this sequence *MAL7*. These *MAL*⁺ segregants induced maltase activity more slowly than the *MAL6* segregants did. We cloned this sequence of *shochu* yeast SH-4 by polymerase chain reaction and found it had high homology to *MAL6*.

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* においてマルトースの発酵性を付与する *MAL* 遺伝子は *MAL1* (VII), *MAL2* (III), *MAL3* (II), *MAL4* (XI), *MAL6* (VIII) の5つの重複遺伝子が同定されている。^{1,2)} これらの遺伝子ファミリーは染色体上のマッピング、クローン化による構造解析がなされ、各 *MAL* 間で相同性が非常に高いことや遺伝子座がいずれもテロメア近傍にあることからインペルターゼ遺伝子 *SUC3* やメリビアーゼ遺伝子 *MEL4* に類似した進化過程が示唆されている。*MAL* 遺伝子はマルトース透過酵素、マルターゼおよび両遺伝子の発現を正に制御する調節タンパクをそれぞれコードする *GENE1*, *GENE2*, *GENE3* の三遺伝子から構成されることが明らかになっており、たとえば *MAL6* 座の各構成遺伝子は *MAL61*, *MAL62*, *MAL63* と表記される。⁵⁻⁷⁾ 最近、高田らはビール酵母を中心

とする醸造用酵母が *MAL* 相同配列を重複して保有し、今まで *MAL* の遺伝子座が確認されていない第IV染色体(約1600 Kb)にも *MAL* 相同配列を持つ株が存在することを報告している。⁸⁾ この相同配列を持つ株は焼酎酵母を中心として、一部の清酒酵母やワイン酵母などいずれも日本を分離源とするものであったことから、我々はこの相同配列を地域性の強い新規な *MAL* 遺伝子ではないかと考え、その配列の発現性について検討を加えたので報告する。

実験方法

使用菌株および培地 今回の実験に用いた菌株を Table 1 に示した。第IV染色体上の *MAL* 相同配列保有菌株には醸造試験所保存の協会焼酎酵母 SH-4,⁹⁾ 協会ワイン酵母 172 KW-1 ('86)¹⁰⁾ (以下 KW-1 と略す) を用いた。SH-4 はマルターゼ遺伝子 (*GENE2*) 領域の相同配列を第IV, VII, VIII染色体に、KW-1 は同配列を第IV, VII染色体に保有していた。⁸⁾ これら2株はいず

* 連絡先, Corresponding author.

現在, 白鶴酒造(株)研究室

658 神戸市東灘区住吉南町4-5-5

Table 1. *S. cerevisiae* strains used in this study.

Strain	Mal phenotype	Genotype or characteristics	Source ^a
SH-4	+	A wild type diploid strain used for <i>shochu</i> making	N.R.I.B.
172 KW-1 ('86)	+	A wild type diploid strain used for wine making	N.R.I.B.
2080-8C	—	α <i>mal SUC5 MEL ade6</i>	Y.G.S.C.
C9	+	α <i>MAL6 SUC MEL ade6</i>	Y.G.S.C.
S-2080	+	A hybrid between SH-4 and 2080-8C	This study
S-2080-1A	—	A segregant from S-2080	"
-1C	+	"	"
-6A	+	"	"
-7B	+	"	"
KW-2080	+	A hybrid between KW-1 and 2080-8C	"

^a N.R.I.B.: National Research Institute of Brewing.

Y.G.S.C.: Yeast Genetic Stock Center, University of California, Berkeley.

れも比較的強いマルトース発酵性をもつことから遺伝子重複による酵素活性の強化が示唆されたが、相同配列を複数保有する状態では未報告である第IV染色体のMAL相同配列の発現性を判定することは困難であった。このため第IV染色体の相同配列を単独に保有する株を分離するために行った戻し交雑の相手株にはマルトース非発酵性の実験室株 *S. cerevisiae* 2080-8C を用いた。SH-4 はホモタリズム株であることから交雑は spore to cell 法で行った。^{11,12)} また PCR 法によるプローブ DNA のクローニングには MAL6 標準株である *S. cerevisiae* C9 を用いた。菌体の培養には YPAD 培地 (1% yeast extract, 2% peptone, 0.04% adenine sulfate, 2% glucose) を用い、マルターゼ誘導培地には YPAD の炭素源を 2% マルトースに置き換えた YPAM 培地を使用した。胞子形成には Sherman らの平板培地 (1% potassium acetate, 0.1% yeast extract, 0.05% glucose, 2% agar)¹³⁾ を用いた。

パルスフィールド電気泳動 (PFG) — サザン解析 PFG のサンプル調製は Schwartz と Cantor の方法¹⁴⁾ に基づいて行った。泳動緩衝液は 0.5×TBE (TBE=90 mM Tris-Borate, 2.5 mM EDTA), 泳動ゲルは 1.0% アガロース (Seakem GTG Agarose, FMC Bio Products 社) を使用した。電気泳動装置は通常 CHEF DR II (バイオラッド社) を使用し、定電圧 150 V, パルスタイム 180 秒 12 時間, 120 秒 12 時間, 60 秒 12 時間の計 36 時間で行った。また、約 1600 Kb の第 IV 染色体 DNA 回収用の分離に際してはパルスフォーシステム・ヘキサゴナル電極型 (ファルマシア社 LKB2015) を使用し、定電圧 180 V, パルスタイム 180 秒 10 時間,

90 秒 15 時間で行った。両泳動とも泳動槽中は 12~15°C に保った。泳動ゲルからのサザンプロットングにはナイロン膜 Hybond-N+ (Amersham 社) を使用し、Reed らのアルカリプロットング法¹⁵⁾ により行った。プローブ (Fig. 5A) はニックトランスレーション法¹⁶⁾ により、[α -³²P] dCTP で放射能ラベルして作製した。ハイブリダイゼーションは常法¹⁷⁾ に基づき行い、洗浄は 2×SSC 65°C 15 分, 2×SSC 0.1% SDS 65°C 30 分, 0.1×SSC 65°C 10 分で行った。

マルトース発酵性およびマルターゼ活性の測定 5 ml YPAD 液体培地で 30°C 一夜振とう培養した定常期の菌体を集菌、洗浄後、ダーラム管を入れた 5 ml YPAM 液体培地に約 10⁶ cells/ml になるよう植菌した。30°C 5 日間静置培養後、ダーラム管中の炭酸ガス蓄積の有無によりマルトース発酵性の判定を行った。

活性測定は 40 ml の YPAD 液体培地で一晩振とう培養した定常期の菌体を 2 回洗浄後、40 ml YPAM 液体培地に 1×10⁸ cells/ml になるよう植菌し、一定時間振とう培養後、1×10⁸ cells 分の培養液を経時的にサンプリングした。サンプリングした菌体を滅菌水で 2 回洗浄後、1 ml の 0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.0) に懸濁し、0.8 ml 容のガラスビーズ (0.5 mm 径) を加えて BEAD-BEATER (和研薬社) で 30 秒間の強振とうを氷冷しながら 5 回繰り返して菌体を破碎した。破碎懸濁液を 15,000 rpm 10 分間、遠心分離して得られた上清を粗酵素液標品とした。この粗酵素液 0.2 ml (2×10⁷ cells 分) に 0.2 ml の上記緩衝液と 0.2 ml の 10 mM *p*-ニトロフェニルグルコピラノシドを加え、25°C で 3 分間反応後 0.6 ml の 0.5 M Na₂CO₃ を加え

Table 2. Primer for PCR used in this study.

Gene ^a	Primer	Nucleotide sequence	Location ^b
<i>MAL63</i>	P1	5'-GTACCTGCAGACGAATCCGGGTCAT-3'	-203→ -179
	P2	5'-TGCGACTGCTGTCGCGTTCGTCGAGTAAAGTG-3'	+22→ +53
	PR2	5'-AAATTAAGGAATTATGTCGTCTTCATCTTTGGAGTT-3'	+1416→+1381
<i>MAL61</i>	P3	5'-TTTGTTTACACAACAGATGGGGTGCT-3'	+1839→+1816
	PR3	5'-ATAAACAGAAAAAAGACAGGAACGACTCACA-3'	+22→ +53
<i>MAL62</i>	P4	5'-GATCATCCAGAAACAGAACCAAAGTGGTGG-3'	+13→ +42
	PR4	5'-GACGAGGTAGATTCTACCTTCCC-3'	+1749→+1727

^a *MAL63*: *MAL6* positive regulator gene.*MAL61*: *MAL6* maltose permease gene.*MAL62*: *MAL6* maltase gene.^b References 14), 15), 16).

て反応を停止発色させた。発色液の OD₄₀₅ を測定し、*p*-ニトロフェノールの発色曲線よりユニット数に換算した。1 分間に 1 μmol の *p*-ニトロフェノールを遊離生成する酵素量を 1 ユニットとした。¹⁸⁾

PCR (Polymerase Chain Reaction) 法 PCR 法による第 IV 染色体 *MAL* 相同配列のクローニングに鋳型として用いる第 IV 染色体 DNA は後藤らの方法¹⁹⁾に基づき電気泳動的に回収した。回収した DNA をフェノール・クロロホルム (1:1) で精製後、常法通りエタノール沈殿を行い TE (10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA pH 8.0) 緩衝液に溶解して調製した。またハイブリダイゼーションに用いた調節タンパク遺伝子領域のプロンプ R (Fig. 5A) のクローニングには *MAL6* 標準株である C9 より Hereford の方法²⁰⁾ で抽出、調製した全 DNA を鋳型として使用した。プライマーは *MAL6* 全塩基配列を参照して遺伝子内の各位置から 25~35 mer のオリゴヌクレオチド²¹⁻²³⁾ を PCR MATE391 (ABI 社) により合成した (Table 2)。PCR 反応²⁴⁾ は Seatus 社の Gene Amplification Kit を使用した。鋳型 DNA は 50 μl 反応液あたり 50~100 ng 使用し、プライマー濃度は 1~2 μM とした。サーマルサイクラー PC-700 (ASTEC 社) の条件は通常、94°C 1 分、55°C 2 分、72°C 3 分、35 サイクルで行い、増幅した DNA 断片はアガロース電気泳動により分離精製した。精製後の DNA 断片を制限酵素切断部位および部分塩基配列の決定に供した。

部分塩基配列の決定 Taq DyedeoxyTM Terminator Cycle Sequencing Kit (ABI 社) を使用し、PCR で増幅した二本鎖 DNA を鋳型とするダイレクトシーケンサー 373A (ABI 社) を使用した。

実験結果

戻し交雑と胞子クローンのマルトース発酵性 焼酎酵母 SH-4 は第 IV, VII, VIII の 3 本の異なる染色体上に、ワイン酵母 KW-1 は第 IV, VII の 2 本の染色体上にマルターゼ遺伝子領域の相同配列の存在が認められており、⁸⁾ 第 IV 染色体の *MAL* 相同配列が実際にマルトース発酵性を単独で発現しているかを判定することは困難であった。そこで、これらの株とマルトース非発酵 (*mal*⁻) 株を交雑し胞子クローンを取得することによって第 IV 染色体のみに *MAL* 相同配列を保有する株の分離を行い、マルトースの発酵性を調べることにした。焼酎酵母 SH-4 の半数体胞子と *mal*⁻ 株である 2080-8C を spore to cell 法で交雑し、接合体 S-2080 を得た。S-2080 より形成させた 7 個の子囊より胞子分離を行ったが、いずれの子囊からも 3 胞子しか発芽しなかった (Fig. 1)。発芽した胞子クローンについてマ

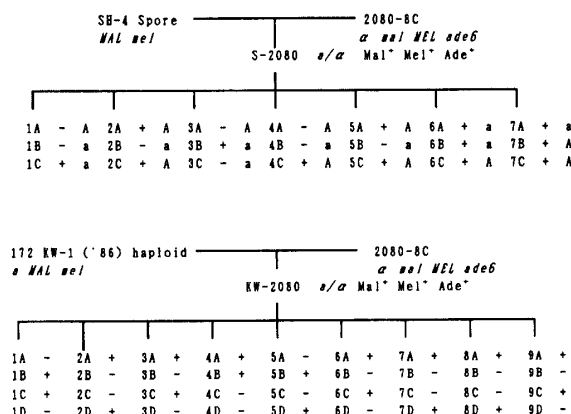


Fig. 1. Distribution of segregants and their maltose fermentability. +, Fermentable; -, non-fermentable; A, Ade⁺; a, ade⁻.

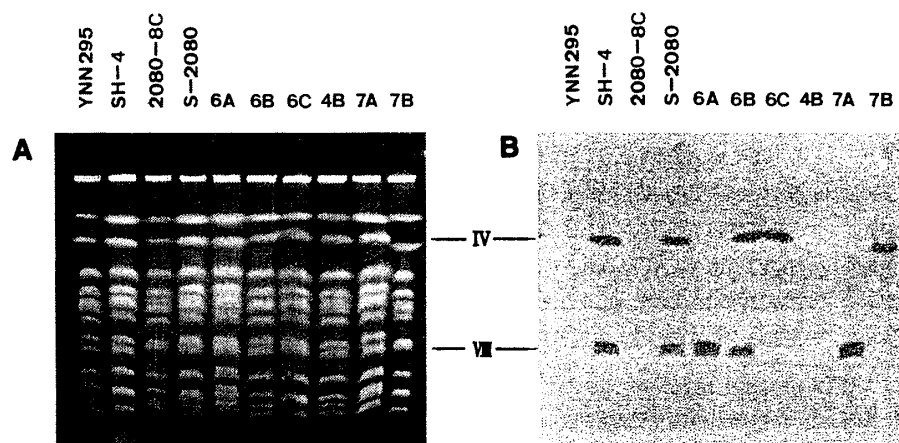


Fig. 2. Analysis of chromosomal DNA from hybrid strain S-2080 and its segregants. A, Electrophoretic karyotype by contour-clamped homogeneous electric field (CHEF) gel electrophoresis. B, Autoradiograph showing the hybridization pattern with the probe R (Fig. 5A).

ルトース発酵性を調べた結果、S-2080-6 および 7 群のように同一子囊内の 3 つの胞子クローンが発酵性を示す例があった。一方、2080-8C の *ade6* と *MEL* に由来するアデニン要求性およびメリビオース発酵性は 1 遺伝子支配が示唆される分離のみであった。したがって、SH-4 については 2 つ以上の *MAL* 遺伝子がマルトース発酵性に関与していると結論した。一方、同じく第 IV 染色体に相同配列を保有しているワイン酵母 KW-1 についても 2080-8C と交雑し得られた接合体 KW-2080 より胞子分離を行った。こちらからは正常な四分子が得られ、胞子クローンのマルトース発酵性はすべて 2+:2- に分離した。以上の結果から KW-1 のマルトース発酵性は 1 遺伝子支配であることが分かり、第 IV あるいは第 VII 染色体の一方のみが発現していることが示唆された。

胞子クローンにおける *MAL* 配列の染色体上分布次に S-2080 より分離した胞子クローンについて PFG-サザンハイブリダイゼーションを行い *MAL* 相同配列の染色体上分布を調べた。単独で発現性を示さない配列のハイブリダイズを除くため、プローブは *MAL* 遺伝子の発現を正に制御している約 1.6 Kb の調節タンパクコード領域 (Fig. 5A プローブ R) を用いた。このプローブを用いてハイブリダイゼーションを行った結果、Fig. 2 で示したように *mal⁻* 株である YNN295 (染色体サイズマーカー) および 2080-8C にはシグナルは認められず、SH-4 および接合体 S-2080 には第 VII 染色体 (約 600 Kb) と第 IV 染色体 (約 1600 Kb) の位置にシグナルが認められた。しかしマルターゼ遺伝子相同配列の存在が認められていた第 VII

染色体 (約 1000 Kb) にはシグナルが認められなかったことから、この配列は調節タンパク遺伝子の欠損した不完全な構造をとるものと考えられる。接合体 S-2080 から分離した胞子クローンについては *MAL* 配列の分離が見られ、6B のように親株同様、第 VII と第 IV 染色体に、6A や 7A のように第 VII 染色体のみに、6C や 7B のように第 IV 染色体のみにハイブリダイズする株、また 4B のようにまったくハイブリダイズしない株の 4 つのパターンが見られた。分離した全胞子クローン 21 株についてハイブリダイズのパターンとマルトース発酵性との関係を調べたが、第 IV か第 VII のいずれかの染色体にハイブリダイズする株は例外なくマルトースの発酵性を示し、ハイブリダイズしない株はすべて発酵性を示さなかった (Table 3)。この結果より SH-4 のマルトース発酵性は 2 遺伝子支配であり第 IV 染色体上の *MAL* 相同配列はマルトース発酵性を発現していることが分かった。一方、Fig. 3A-D で示したように、ワイン酵母 KW-1 および接合体 KW-2080 は第 VII 染色体のみにシグナルが認められ第 IV 染色体はこ

Table 3. Distribution of *MAL* on S-2080 segregants.

<i>MAL</i> signal pattern ^a	Maltose fermentability	Number of segregants
IV, VIII	+	6
IV	+	4
VIII	+	3
No signal	-	8

^a Chromosome No. that hybridized to probe R (Fig. 5A).

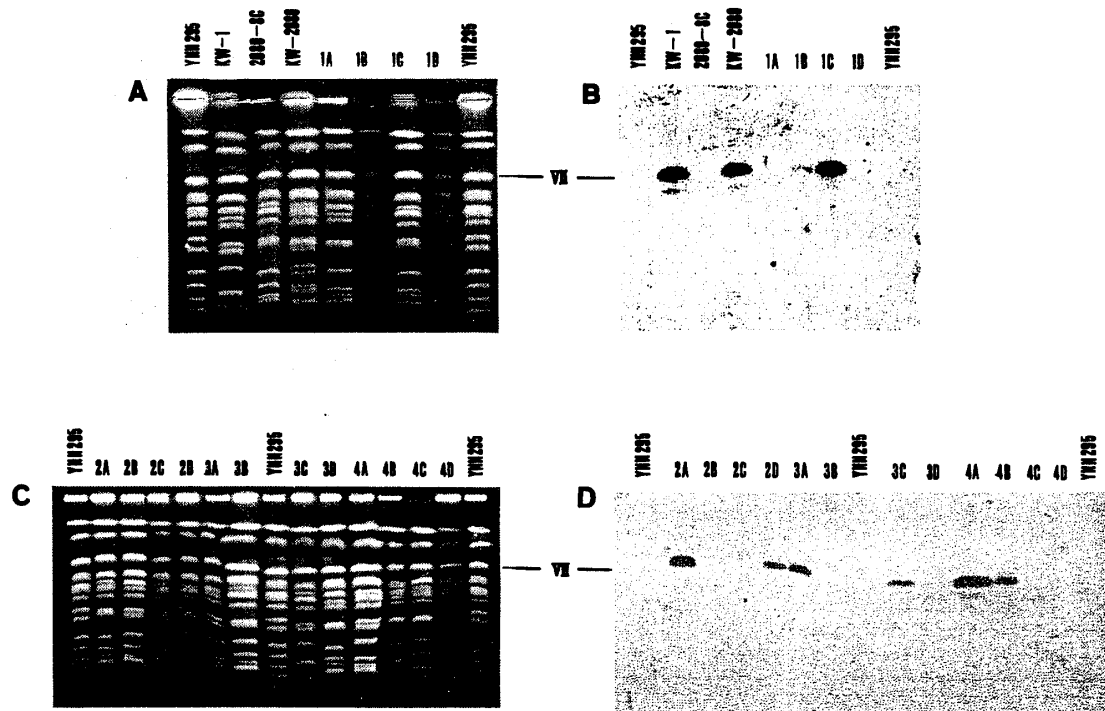


Fig. 3. Analysis of chromosomal DNA from hybrid strain KW-2080 and its segregants. A, C, Electrophoretic karyotype by CHEF gel electrophoresis. B, D, Autoradiograph showing the hybridization pattern with the probe R (Fig. 5A).

のプローブとハイブリダイズしなかった。したがって、この配列はSH-4の第Ⅶ染色体と同様、調節タンパク遺伝子を欠損した構造をとるものと考えられる。KW-2080から分離した胞子クローンにおいてもマルトース発酵性を示した株はすべて第Ⅶ染色体(約1200 Kb)の位置にシグナルが認められ、第Ⅳ染色体は親株同様、このプローブとハイブリダイズしなかった。したがって、KW-1の第Ⅳ染色体の*MAL*相同配列は単独ではマルトース発酵性を発現しないと考えられた。

S-2080 胞子クローンのマルターゼ誘導試験
SH-4と*mal*⁻株の交雑により取得した第Ⅳ染色体のみに*MAL*配列を持つ株のマルターゼ活性の誘導性について検討した。供試菌としては、S-2080-7B (*MALX*)、同6A (*MAL6*)、1C (*MAL6 MALX*)、1A (*mal*⁻)の4株を使用した。(上記のサザン解析により発現性の確認されたSH-4の第Ⅳ染色体の*MAL*配列を便宜上、*MALX*と表記した。以下これに準ずる)。YPAD培地で集菌後、YPAM培地でマルターゼの誘導を開始させた菌体を2日間経時的にサンプリングし、菌体を破碎して活性測定を行った。10⁸ cellsあたりのマルターゼ活性の経時変化をFig. 4に示した。*MAL6*

(Ⅷ)を保有する6A、1Cの各株は培養開始後、まもなく活性が誘導され6~12時間で活性のピークに達した。一方、*MALX*のみ単独で保有する7B株は上記の株に比べて活性の誘導が約1日遅れ、誘導後、約36時間でピークに達した。*MAL*配列を保持しない1A株では2日間、誘導培養してもマルターゼ活性はまったく誘導されなかった。

PCR法による*MALX*の増幅 上記のサザン解析およびマルターゼ活性誘導試験の結果より、発現性が

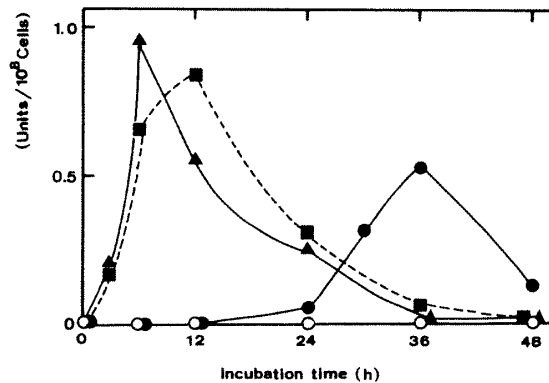


Fig. 4. Induction of maltase activity of S-2080 segregants. Symbols: ●, S-2080-7B (*MALX*); ▲, 6A (*MAL6*); ■, 1C (*MALX MAL6*); ○, 1A (*mal*⁻).

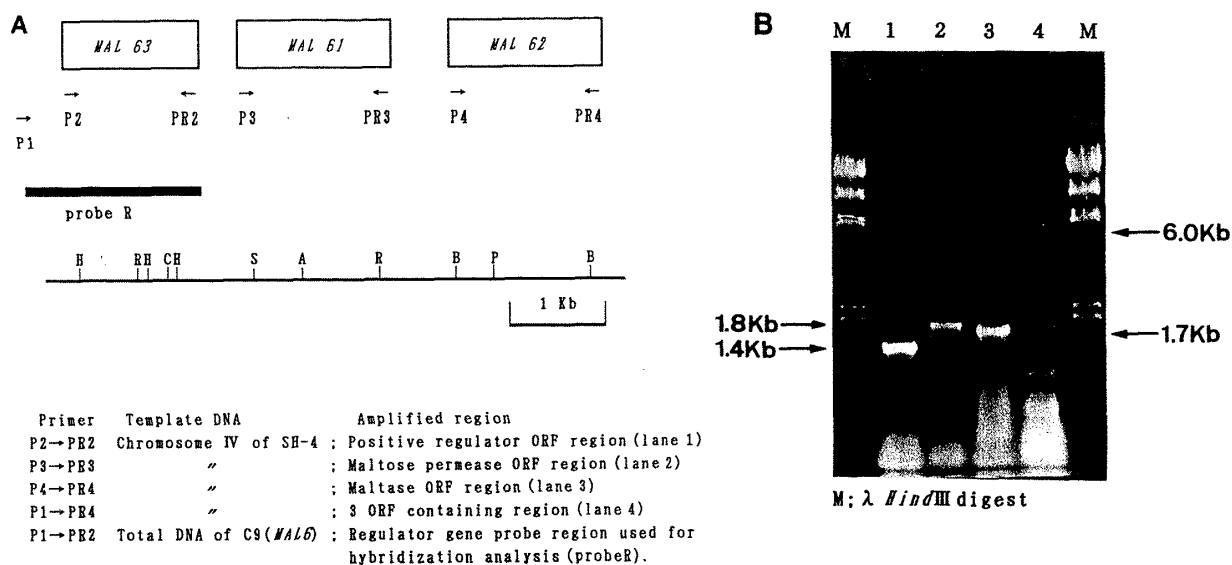


Fig. 5. Amplification of *MAL* sequence on chromosome IV (*MALX*) by polymerase chain reaction. Restriction enzymes are abbreviated as follows: A, *Aba*I; B, *Bgl*II; C, *Cla*I; H, *Hind*III; P, *Pst*I; R, *Eco*RI; S, *Sal*I; →, forward primer; ←, reverse primer; black bar, probe region for PFG-Southern hybridization.

認められた SH-4 の *MALX* を PCR 法で増幅，クローン化し，遺伝子の構造を調べることにした．SH-4 の第 IV 染色体 DNA を鋳型とし Table 3 に示した *MAL6* 遺伝子内の各位置に相当する合成プライマーを用いて

PCR を行った結果，Fig. 5 に示したように *MAL* を構成する遺伝子である調節タンパク，透過酵素，マルターゼの各 open reading frame (ORF) 領域に対応する約 1.4 Kb (Fig. 5B lane 1), 1.8 Kb (lane 2), 1.7 Kb (lane 3)

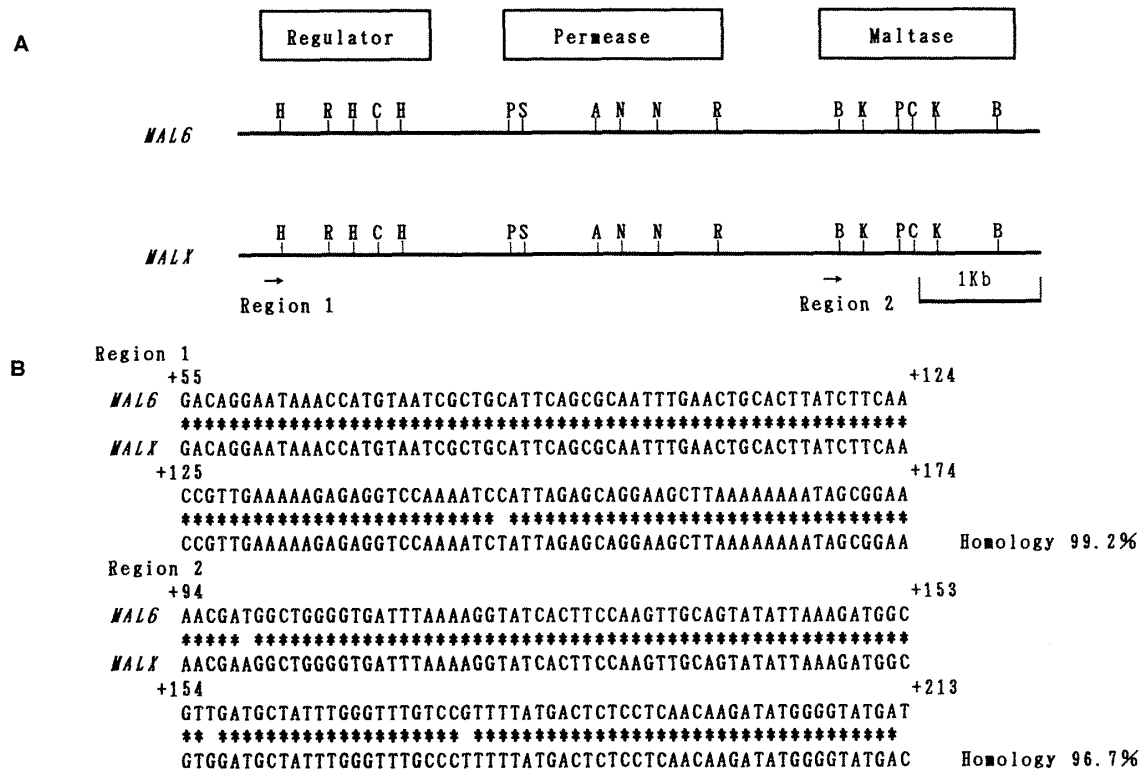


Fig. 6. Restriction map and partial nucleotide sequence of *MAL* sequence on chromosome IV (*MALX*). Restriction enzymes are abbreviated as in Fig. 5 with the following additions: K, *Kpn*I; N, *Nco*I.

の特異的な DNA 断片の増幅が認められた。また増幅効率は低いが生産子を含む約 6 Kb の領域に相当するバンドも検出された (lane 4)。

MALX の構造 PCR 法で増幅した SH-4 の第 IV 染色体 *MAL* 相同配列 *MALX* 内の ORF 部分をいくつかの制限酵素で切断し *MAL6* と切断部位を比較した。Fig. 6A で示したように調節タンパク遺伝子の *HindIII*, *EcoRI*, *ClaI* 部位, 透過酵素遺伝子の *PstI*, *SaI*, *AvaI*, *NcoI*, *EcoRI* 部位, マルターゼ遺伝子の *BglII*, *KpnI*, *PstI*, *ClaI* 部位については *MAL6* と同一位置に認められた。次に PCR 法で増幅した *MALX* についてダイレクトシーケンスを行い, マルターゼ遺伝子と調節タンパク遺伝子の ORF 内 5'-末端領域の約 120 bp の塩基配列を調べて *MAL6* と比較した結果, Fig. 6B で示したように両領域とも 96% 以上の高いホモロジーがあり, この領域に関してアミノ酸レベルでの置換は認められなかった。

考 察

第 IV 染色体の *MAL* 相同配列 (*MALX*) を保有した焼酎酵母 SH-4 と *mal⁻* 株の接合体より胞子クローンを分離した結果, S-2080-6 群および 7 群のように同一子嚢にマルトース発酵性を示す胞子クローンが 3 株含まれ, 2 つ以上の *MAL* 遺伝子が発現していることが分かったが, 調節タンパクコード領域のプロープ R を用いた PFG-サザン解析により第 VIII 染色体 (*MAL6*) とともに第 IV 染色体上の *MAL* 相同配列が活性なアレールであることが判明した。

一方, ワイン酵母 KW-1 についても同様な解析を行った結果, 四分子解析によりマルトースの発酵性は 1 遺伝子支配であることが分かったが, 発酵性を示した胞子クローンはプロープ R と第 VII 染色体のみでハイブリダイズしたことから第 IV 染色体の相同配列は調節タンパクコード領域を欠損し, 単独では発現性を保たないと考えられた。このように SH-4 と KW-1 では活性を有する配列の存在する遺伝子座は異なっていたが, 活性の喪失は調節タンパク遺伝子である *GENE3* の欠損に起因する例が多いことが示唆された。*MALX* を単独で保有する株のマルターゼ活性の誘導性を調べたところ, *MAL6* (VIII) を保有する胞子クローンに比べ, 約 1 日誘導が遅れる傾向が見られた。原因としては遺伝子の変異による発現調節機構の機能低下が考えられるが, この点については胞子クローン間の生理的性質の差異についての十分な検討も必要と考えられる。

第 IV 染色体上の *MAL* 相同配列は焼酎酵母を中心に一部の清酒酵母, ワイン酵母など日本に分離源を持つ株に特異的に見いだされたことからその分布に地域性が示唆された。これらの株はいずれも比較的強いマルターゼ資化能を持ち, 一方, 清酒酵母の中でも現在, 広く使用されている協会系の 7 号, 9 号, 10 号などはこの配列を持たない。⁹⁾ これらの優良清酒酵母は上記の株に比べマルトース資化能が弱い傾向にあった。この原因として清酒醪という麴由来の糖化酵素が供給されることからマルターゼ活性を必要としない人為的環境での遺伝子の淘汰が長く続いたことが考えられる。一方, 焼酎酵母の場合も同様な環境にあるが, 第 IV 染色体上の *MAL* 配列の存在は環境的な淘汰が上記の清酒酵母ほど進んでいないことを示すものと推察される。以前, *Saccharomyces* 属において *MAL5* が第 IV 染色体にマッピングされたが, この遺伝子はグルコアミラーゼ遺伝子 *STA1* と同一であった。²⁶⁾ しかし, 今回報告した焼酎酵母 SH-4 の第 IV 染色体上の配列は既報の *MAL* 遺伝子と高い相同性を保ち, マルターゼ活性を発現したことから *Saccharomyces* 属において第 6 番目の *MAL* 遺伝子すなわち *MAL7* に相当するものと考えられる。

要 約

(1) 焼酎酵母 SH-4 と *mal⁻* 実験室株との戻し交雑により分離した胞子クローンのサザン解析から焼酎酵母 SH-4 株の第 IV 染色体 *MAL* 相同配列がマルターゼ活性を発現していることが明らかになり, *Saccharomyces* 属において今までマッピングされていない第 IV 染色体の *MAL* 遺伝子の存在が明らかとなった。よってこの遺伝子を *MAL7* と命名した。この *MAL7* を単独で保持する株のマルターゼ活性の誘導は *MAL6* を持つ株に比べ遅延する傾向が見られた。一方, ワイン酵母 KW-1 の第 IV 染色体 *MAL* 相同配列は単独では発現性を示さず, その原因は調節タンパク遺伝子の欠損によるものと考えられた。

(2) 発現性の認められた SH-4 の保有する第 IV 染色体の *MAL* 相同配列を PCR 法で増幅後, クローン化して制限酵素部位, 部分塩基配列を調べた結果, *MAL* 遺伝子として完全な構造を持ち, 制限酵素部位, 塩基配列レベルで *MAL6* と高いホモロジーを持つことが分かった。

本研究に対して御指導、ご助言を賜りましたサッポロビール(株)高田善浩氏、元国税庁醸造試験所所長原昌道氏に厚く御礼申し上げます。

本報告の概要は平成3年度日本農芸化学会大会(京都)にて発表した。

文 献

- 1) Charron, M. J., Read, E., Haut, S. H., and Michels, C. A.: *Genetics*, **122**, 307 (1989).
- 2) Needleman, R. B.: *Mol. Microbiol.*, **5**(9), 2079 (1991).
- 3) Hohman, S. and Zimmermann, F. K.: *Curr. Genet.*, **11**, 217 (1986).
- 4) Naumov, G., Turakainen, H., Naumova, E., Aho, S., and Korhola, M.: *Mol. Gen. Genet.*, **224**, 119 (1990).
- 5) Needleman, R. B., Kaback, D. B., Dubin, R. A., Perkins, E. L., Rosenberg, N. G., Sutherland, K. A., Forrest, D. B., and Michels, C. A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 2811 (1984).
- 6) Cohen, J. D., Goldenthal, M. J., Chow, T., Buchferer, B., and Marmur, J.: *Mol. Gen. Genet.*, **200**, 1 (1985).
- 7) Dubin, R. A., Needleman, R. B., Gossett, D., and Michels, C. A.: *J. Bacteriol.*, **164**, 605 (1985).
- 8) 高田善浩, 後藤邦康, 田村學造, 原 昌道: 日本農芸化学会大会講演要旨集, p. 417 (1990).
- 9) 菅間誠之助: 醸協, **67**, 672 (1972).
- 10) 山本奈美, 山本信城, 雨森秀仁, 横森洋一, 清水健一, 戸塚 昭: 醸協, **85**, 573 (1990).
- 11) 西谷尚道: 醸協, **78**(3), 193 (1983).
- 12) 高野 勇: 「酵母の利用と開発」秋山裕一編, 学会出版センター, p. 17 (1979).
- 13) Sherman, F., Fink, G. R., Hicks, J. B.: *Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics*, p. 163, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1986).
- 14) Schwartz, D. C. and Cantor, C. R.: *Cell*, **37**, 67 (1984).
- 15) Reed, K. C. and Mann, D. A.: *Nuc. Acid. Res.*, **3**, 7207 (1985).
- 16) Rigby, P. W. J., Dickmann, M., Rhodes, C., and Berg, P.: *J. Mol. Biol.*, **113**, 237 (1977).
- 17) Southern, E. M.: *J. Mol. Biol.*, **98**, 503 (1975).
- 18) Wijk, R. V.: *Proc. Koninkl. Ned. Acad. Wetenschap., Ser. C*, **71**, 60 (1968).
- 19) Goto, K., Motoyoshi, T., Tamura, G., Obata, T., and Hara, S.: *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 1499 (1990).
- 20) Hereford, L., Fahner, K., Woolford, J. Jr., Rosbash, M., and Kaback, D. B.: *Cell*, **18**, 1261 (1979).
- 21) Hong, S. H. and Marmur, J.: *Gene*, **41**, 75 (1986).
- 22) Sollitti, P. and Marmur, J.: *Mol. Gen. Genet.*, **213**, 56 (1988).
- 23) Cheng Qi and Michaels, C. A.: *Genetics*, **123**, 477 (1989).
- 24) Saiki, R. K.: *Science*, **239**, 487 (1988).
- 25) Innis, M. A., Myambo, K. B., Gelfand, D. H., and Brow, M. A. D.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 9436 (1988).
- 26) Pretorius, I. S., Chow, T., Modena, D., and Marmur, J.: *Mol. Gen. Genet.*, **203**, 29 (1986).