

〔生物工学会誌 第74巻 第2号 115-123. 1996〕

---

 総合論文
 

---

## 清酒酵母の胞子形成に関する研究

(平成7年度 日本生物工学会江田賞受賞)

水 津 哲 義

月桂冠株式会社総合研究所  
〒612 京都市伏見区下鳥羽小柳町24

## Studies on the Sporulation of Sake Yeast —Monograph—

TETSUYOSHI SUIZU (*Gekkeikan Research Institute, Gekkeikan Sake Co., Ltd., Fushimi, Kyoto 612*) *Seibutsukogaku* 74: 115-123, 1996.

Defective sporulation of industrially used sake yeasts (*Saccharomyces cerevisiae*) such as Kyokai no. 7 and no. 9 is one of the most troublesome problems inhibiting the breeding—by hybridization and/or genetic analysis—of yeast strains with improved characteristics for sake making. In order to clarify the cause of defective sporulation in industrially used sake yeasts, and thereby facilitate their molecular breeding, the sporulation-defective properties of Kyokai no. 7 were analyzed in nutrition-controlled media and compared with a wild-type diploid yeast (strain 4011) as a control. An analysis of the sporulation process of strain 4011 in a nutrient-starved medium indicated that  $\text{Ca}^{2+}$ , glutathione (GSH) and some other biomolecules were able to enhance sporulation. Of these,  $\text{Ca}^{2+}$  and GSH were prerequisites for sporulation. The basic amino acid D-, L-lysine was found to induce sporulation in cells growing in a nutrient-rich medium. An analysis of the sporulation of strain 4011 and Kyokai no. 7 in a lysine-dependent system showed no significant increase in *IME1* transcript and a decrease in cAMP levels throughout the sporulation, thus suggesting that at least a decreased level of cAMP is not required for entry into meiosis. Although the formation of 4-spored asci and spore viability were low, the addition of GSH, its analogues, and other biomolecules to the nutrition-starved medium apparently improved the sporulation of Kyokai no. 7. This result indicated that the defective sporulation of Kyokai no. 7 was mainly due to metabolic imbalance, and not to any serious genetic disorder upstream of the signal transduction pathway. The effects on sporulation of metabolic properties such as ethionine-resistance, inability to utilize  $\beta$ -alanine at 35°C, and loss of acid phosphatase activity, all of which are inherent characteristics of Kyokai no. 7, were thus investigated. The elimination of any one of these properties was found to restore the sporulation of Kyokai no. 7. For example, a mutation with ethionine-sensitivity showed a marked increase in the formation of 4-spored asci (80%) and in the viability of the spores (over 25%). These findings were applicable to other Kyokai strains apart from no. 7, and will be utilized as a general method for the molecular breeding and genetic analysis of industrially important brewery yeasts.

**[Key words:** sake yeast, sporulation, L-lysine, calcium, glutathione, ethionine,  $\beta$ -alanine, S-adenosylmethionine, acid phosphatase]

## はじめに

インターネットの情報によると、出芽酵母の染色体16本のうち9本までは塩基配列の調査が終了しており、全塩基配列が決定される日も近いことが予想され

る。また、その過程で新たに見いだされた新規遺伝子についても機能調査が進められており、酵母の設計図は着々と明らかになりつつある。このような研究成果は、筆者ら発酵に関わる技術者にとっても喜ばしいことで、酵母という微生物の清酒醸造における役割がよ

り深く理解できるようになるものと期待している。

しかしながら目を実用酵母に転じると、すぐれた菌株を育種するには、酵母の持つ醸造特性に関する多くの特徴を遺伝レベルで明らかにし、それらを有効に組み合わせることが重要であるにもかかわらず、清酒酵母のような実用二倍体菌株は、孢子形成率および孢子の生存率がきわめて低いため、一倍体を解析することにより可能となるこのような育種計画の遂行は困難な状況にある。

筆者らは、清酒酵母のこのような孢子形成欠損性は、清酒酵母において遺伝的に受け継がれている代謝上の特徴（代謝不均衡）に由来すると考え、これを明らかにする目的で一連の研究を行った結果、協会7号の孢子形成能および孢子の生存率が回復した変異株の選択法を開発した。

本稿では、酵母の孢子形成の基礎研究面の成果と上記清酒酵母の変異株選択法を、以下の項目でまとめた。

1. 栄養培地における孢子形成
2. 孢子形成におけるカルシウムの重要性
3. 孢子形成とグルタチオン
4. エチオン感受性変異と孢子形成

### 1. 栄養培地における孢子形成 —新規な孢子形成系の開発—

本節では表題の清酒酵母の話から少し離れて、筆者らが開発した栄養培地を用いる孢子形成実験系について紹介する。*Saccharomyces cerevisiae* の二倍体栄養細胞は、酢酸カリウムを含む栄養飢餓培地で培養すると減数分裂を開始し孢子形成する。この飢餓培地は酵母の減数分裂や孢子形成過程を解析するのによく用いられているが、細胞を栄養培地から飢餓培地へと移す操作が必要であり、この過程における栄養条件の急激な変化は、減数分裂や孢子形成に特異的な変化のみならず、さまざまなストレスによる変化をも酵母に引き起こす

と想像される。また、飢餓培地における孢子形成は移植する細胞の濃度に依存し、 $10^5$  cells/ml 以下の時には孢子は形成されないことが報告<sup>2)</sup>されており、この実験系が栄養飢餓情報以外のファクターによっても調節されることが示唆されている。

これに対して、二倍体細胞は十分な栄養条件下においても孢子形成することが報告されており、<sup>3-4)</sup> 筆者らも、栄養培地にリジンを添加することにより二倍体の  $a/\alpha$  細胞が孢子形成することを報告した。<sup>5)</sup> 栄養培地を用いる実験系は、同一の培地で栄養増殖と減数分裂・孢子形成が追跡できるため、酵母の分化プロセスを連続的に解析することが可能であり、また前述のような孢子形成頻度が細胞濃度に依存する現象も認められない。

筆者らの実験系と従来の栄養飢餓培地を用いる方法との違いで重要な点は、酢酸カリウムを含む栄養飢餓培地では孢子形成過程において、培地の pH が初発の7から9へと上昇する現象である (Table 1)。この理由は酢酸が特異的に代謝され炭酸イオンや炭酸水素イオンに置き換わるためと解釈されている<sup>6)</sup>が、酵母は pH 8 以上では栄養増殖できないので、この培地でみられる G1 アレストが栄養飢餓のためなのかあるいは pH が高いためなのかを判別することはできない。他方、リジンを含む栄養培地を用いた場合 (Fig. 1(b)) はこのような極端な pH 変化は観察されず、酵母は生育可能な生理的 pH で孢子形成する。

pH 7.0 において栄養培地中のリジン濃度を 0 mM から 300 mM まで変化させると、リジン濃度が 100 mM の時に孢子形成率は最大となり、この培地における孢子形成はリジン濃度に完全に依存した。また、この系を用いて検討したところ、孢子形成過程に入る前後において *IME1* 遺伝子の転写量<sup>7)</sup> や細胞内 cAMP レベル<sup>8)</sup> には顕著な変化は認められず、減数分裂の開

Table 1. Effect of potassium acetate and L-lysine on induction of sporulation.

Constituents in ND medium	Final pH	Sporulation (%)	Type of ascus (%)			
			1-spored	2-spored	3-spored	4-spored
None	6.55	0	—	—	—	—
AcK	9.14	82.6	0	0	5.4	94.5
L-Lysine	7.27	0	—	—	—	—
AcK+L-Lysine	8.01	18.6	0	0	10.4	89.6

Cells were incubated at 30°C for 5 d in nutrient-deprived ND medium (pH 7.0) supplemented with potassium acetate (AcK, 1.5%) and/or L-lysine (0.1 M). The initial cell concentration was adjusted to approximately  $10^7$  cells ml<sup>-1</sup>. Final pH, sporulation and types of ascus were determined.

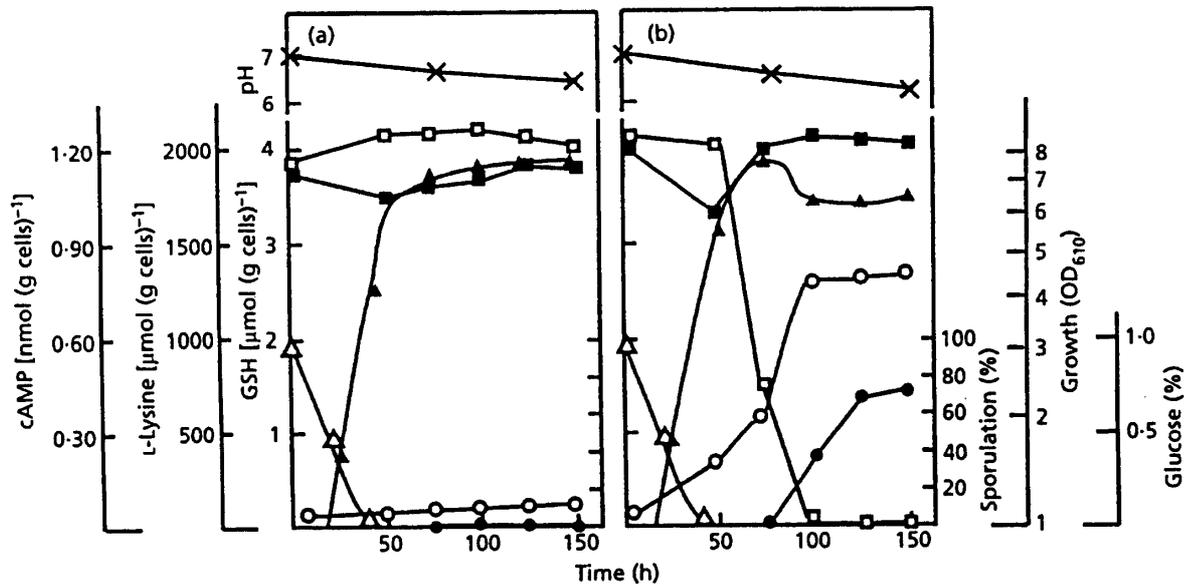


Fig. 1. Changes in cellular glutathione, L-lysine and cAMP level during sporulation in nutrient rich medium with 0.1 M L-lysine. Cells of *S. cerevisiae* 4011 (*a/a*, wild type diploid) were incubated in nutrient rich medium (1.0% glucose, 0.3% yeast nitrogen base w/o amino acids (Difco), 0.001% yeast extract and 100 mM PIPES, pH 7.0) with (b) and without (a) 0.1 M L-lysine. Growth ( $OD_{610}$ ) ( $\blacktriangle$ ), glucose ( $\Delta$ ), pH(+), sporulation ( $\bullet$ ) and intracellular concentration of glutathione ( $\square$ ), lysine ( $\circ$ ) and cAMP ( $\blacksquare$ ) were determined periodically.

始に cAMP レベルの低下あるいは cAMP 依存のプロテインキナーゼが不活化されることが必須であるという従来の仮説を支持しなかった (Fig. 1, 2). Olempska-Beer と Freese は栄養条件下では細胞内 cAMP レベルは減数分裂や孢子形成には関係なく、グアニンヌクレオチドが分化シグナルとして重要な役割を果たしてい

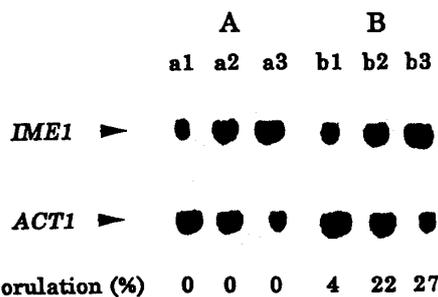


Fig. 2. Transcript analysis of *IME1*. Cells of *S. cerevisiae* 4011 were grown in liquid medium as those described in Fig. 1 in the absence (A) and presence (B) of 0.1 M D-lysine. The cells were collected at the mid-logarithmic (a1, b1), early stationary (a2, b2) and late stationary (a3, b3) phases. RNA was extracted from the collected cells, fractionated by electrophoresis, and transferred to nitrocellulose membrane. The membranes were hybridized with  $^{32}P$ -labelled DNA probes prepared from *IME1* and *ACT1* DNA fragments.

ると提唱しており、<sup>9)</sup> Cameron らもまた、cAMP 依存のプロテインキナーゼの触媒ドメインをコードする *TPK1*~*TPK3* 遺伝子の破壊株の孢子形成が栄養条件によってコントロールされることから、cAMP 非依存型の機構が孢子形成過程に存在することを報告している。<sup>10)</sup>

したがって筆者らが得たデータは、孢子形成に関連する情報伝達機構が栄養飢餓培地と栄養培地では異なるという可能性を示唆するものと考えられる。この伝達機構を明らかにすることが今後の検討課題であるが、筆者らはすでにこの系において、リジン以外にも孢子形成を誘導できる化合物として 2-アミノアジピン酸<sup>7)</sup> やある種のヌクレオチド、<sup>11)</sup> イノシトール-3-リン酸を見だしているし、また、15 Kd のタンパク分子が孢子形成時に特異的に誘導されることも明らかにしており、これらの現象について解析することがその近道ではないかと考えている。

## 2. 孢子形成におけるカルシウムの重要性

酵母の孢子形成は一般には、*a/a* 二倍体株が栄養飢餓状態に陥ると誘導されると言われているが、前節で述べた酢酸カリウムを含む飢餓培地について若干の検討を行ったところ、この培地の支持体である寒天に非

Table 2. Yeast sporulation on nutrient-deprived medium with various gelling agent and calcium contents of agar- or agarose-extracts.

Gelling agent	Sporulation (%) <sup>a</sup>		Calcium content of extract <sup>b</sup>
	4011	Kyokai no. 7	
Agar			
First grade	49.7	8.3	2.4
Bacto agar	53.8	14.8	16.6
Agar noble	28.4	10.5	0.32
Agarose			
SeaKem GTG agarose	<0.1	<0.1	nd
Type II agarose	<0.1	<0.1	nd
SeaPlaque agarose	<0.1	<0.1	nd

<sup>a</sup> Cells were incubated for 3 d on a nutrient-deprived medium (2% potassium acetate and 2% agar or agarose) and percentage of sporulated cells in the total cell population was calculated.

<sup>b</sup> For the preparation of agar- or agarose-extracts, 2 g of sample was suspended in 100 ml of distilled and deionized water and stirred for 15 min at room temperature. The mixture was centrifuged at 15,000 rpm for 10 min and the resulting solution was passed through a membrane filter with a pore size of 0.45  $\mu\text{m}$ . Calcium content was determined by HPLC using Sim-pack IC-C2 column and conductivity detector (CDD-6A, Shimadzu Corporation). nd, Not detected.

常に重要な成分が含まれていることを見いだした。すなわち、Table 2 に示すように栄養飢餓培地の支持体の違いによって孢子形成率が異なることと、その理由が培地中のカルシウム濃度の違いによるものであることをつきとめたのである。<sup>12)</sup>

培地中の遊離カルシウムを EGTA によってキレートすると孢子形成は抑制されるが、遊離のカルシウムが 65 nM 以上存在すると孢子形成が誘導される。また、培地中のカルシウムは孢子形成時に特異的に酵母

に取り込まれることも明らかになった<sup>13)</sup> (Table 3, Fig. 3).

カルシウムは酵母細胞において多くの生体反応に関

Table 3. Effect of free calcium concentration on sporulation of yeast.

Free calcium concentration of medium <sup>a</sup> (nM)	Sporulation (%)	
	4011	Kyokai no. 7
$2.5 \times 10^5$	6.1	<0.1
$2.7 \times 10^4$	6.7	<0.1
$2.0 \times 10^3$	3.2	<0.1
65	4.5	<0.1
4	<0.1	<0.1
<1	<0.1	<0.1

<sup>a</sup> Free calcium ion concentrations in nutrient-deprived liquid medium (2% potassium acetate) were controlled by adding  $\text{CaCl}_2$  or ethylene glycol bis( $\beta$ -amino-ethyl ether)- $N,N,N',N'$ -tetraacetic acid and were determined fluorescent-spectrophotometrically using fluo-2.

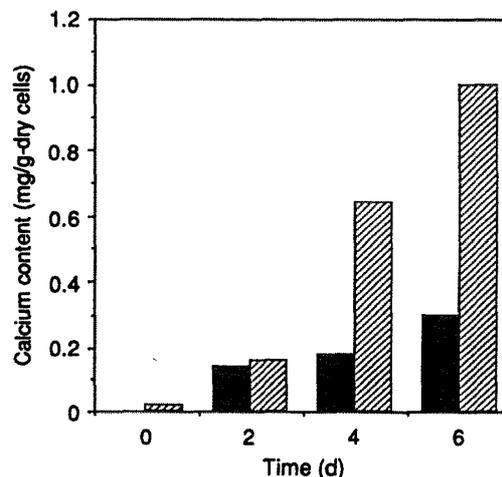


Fig. 3. Changes in internal calcium concentration during sporulation. Cells of strain 4011 and Kyokai no. 7 grown on YPD plates were incubated in nutrient-deprived medium for 6 d. Periodically collected cells were washed, lyophilized, and then ashed. The ashed materials were dissolved in 1N HCl and calcium content in the HCl solution was determined by atomic absorption (atomic absorption/flame emission spectrophotometer AA470, Shimadzu Co.). Symbols: ▨, 4011; ■, K-7.

与している。<sup>14)</sup>たとえばカルシウムは、カルモジュリンと結合し染色体の分配に機能しているし、核膜上に存在する Spindle pole body の複製や、出芽もカルシウムが関与しており、また一倍体 a 型酵母を  $\alpha$  フクターで処理した時にも一過性のカルシウムの取り込みがあることが示されているように、この二価カチオンが関与する生体反応は酵母においてきわめて多い。したがって、胞子形成時にも当然重要な役割を果たすことは容易に推測できるが、これまでカルシウムが胞子形成に関与するという報告はない。さらに酵母内にある程度のカルシウムプールがあるにも関わらず、培地から取り込むことが必須であるという筆者らのデータは、このカチオンの流入が酵母の胞子形成にきわめて重要な役割を果たすことを示唆するものと考えられる。

胞子形成培地より特異的に細胞内に取り込まれるカルシウムが、どのような生体反応に寄与して、減数分裂・胞子形成の過程を正常に進行させているのかについては不明であり、今後の検討を待たなければならないが、少なくとも培地中のカルシウム濃度を厳密に調整することは、再現性の高い実験を行うために不可欠であることが示されたと同時に、清酒酵母の協会7号はカルシウムの取り込み系が正常に働いていないことが示唆された。

### 3. 胞子形成とグルタチオン

生体内において多くの機能を果たすグルタチオン<sup>15)</sup>は、解糖系バイパスで生成するメチルグリオキサールを無毒化することが知られている。解糖系中間体のジヒドロキシアセトンリン酸はメチルグリオキサールシ

ンターゼによって、酵母の生育を抑制するメチルグリオキサールを生成するが、このアルデヒドはグルタチオン存在下でグリオキサラーゼ I によって S-ラクトイルグルタチオンというアダクトとなり、さらにグリオキサラーゼ II によって乳酸へと代謝される。

Shigematsu らは酵母の栄養増殖時と胞子形成時の細胞に含まれるさまざまな酵素の活性を測定した。その結果、解糖系バイパスの酵素群・ホスフターゼ・アミノ酸オキシダーゼなどの酵素群が胞子形成時に特異的に誘導されることを明らかにした。これらの酵素群のうち解糖系バイパスを構成する酵素であるメチルグリオキサールシンターゼとグリオキサラーゼ I の誘導は特に著しく、これらの酵素が胞子形成に何らかの役割をはたすことが示唆された。<sup>16)</sup>

そこで、これら解糖系バイパスの酵素誘導について、4011株と協会7号を比較した結果、4011株ではメチルグリオキサールシンターゼとグリオキサラーゼ I がそれぞれ17倍、5倍と強く誘導されるのに対し、協会7号ではそれぞれ3倍、1倍程度とあまり誘導されていないことが明らかになった<sup>17)</sup>(Table 4)。他方、S-ラクトイルグルタチオンの代謝を担うグリオキサラーゼ II 活性については、協会7号、4011株ともほとんど誘導されなかった。これらの結果から解糖系バイパスの流れを考えると、胞子形成の良好な4011株では胞子を形成する時にはS-ラクトイルグルタチオンの蓄積に有利な酵素バランスになっていることが想像される。

そこで、この過程に関与するグルタチオン(GSH+GSSG)の胞子形成時の挙動について調べたところ、酵母の細胞内グルタチオン含量は胞子形成の開始に伴い減少し、子囊中にはグルタチオンはほとんど含まれ

Table 4. Enzyme activities in glycolytic bypass of vegetative cells and spores of the strain 4011 and Kyokai no. 7.

Enzyme	Activity (nmol/min/mg-protein) <sup>a</sup>			
	Kyokai no. 7		4011	
	Vegetative cells	Spores	Vegetative cells	Spores
Methylglyoxal synthase	480	1,700	984	16,700
Glyoxalase I	365	421	720	3,640
Glyoxalase II	183	225	64.5	83.5
Methylglyoxal reductase	43.5	66.2	14.5	20.7
Methylglyoxal dehydrogenase	trace	trace	trace	trace

<sup>a</sup> Spores and vegetative cells were homogenized by treating on a Braun Homogenizer at 4°C for 1 min. Homogenates were centrifuged at 25,000 g for 30 min and resulting supernatants were used for enzyme assay.

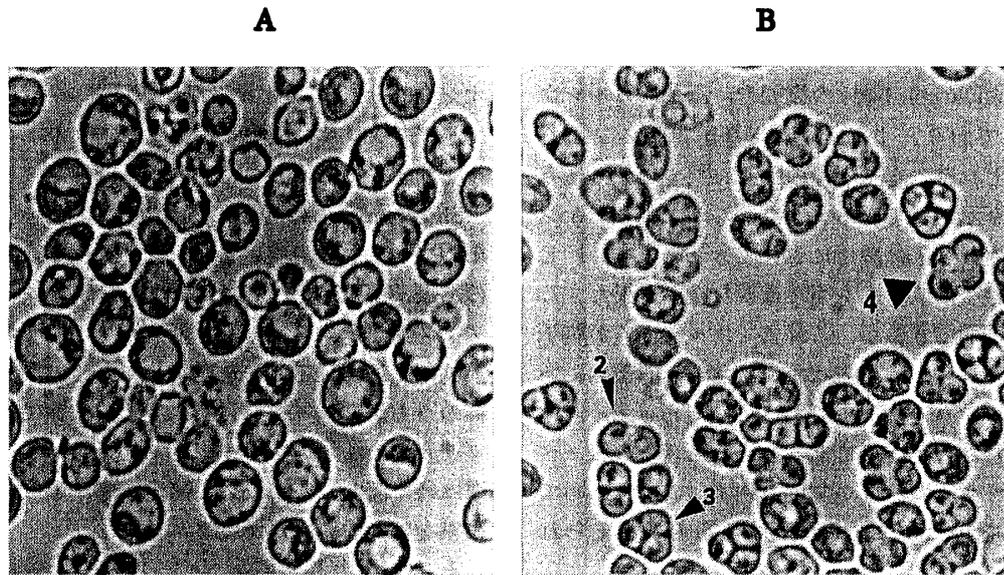


Fig. 4. Sporulation of Kyokai no. 7. YPD-grown cells of Kyokai no. 7 were incubated for 4 d on agar plates of nutrient-deprived medium supplemented with (B) and without (A) 10 mM GSH.

ていないことが明らかとなった。また、栄養飢餓培地だけでなく、前節で示したリジンを含む栄養培地においても孢子形成開始に伴い細胞内グルタチオン含量の低下が認められている (Fig. 1)。このグルタチオン減少の意味については不明であるが、グルタチオン合成系酵素の阻害剤で前処理したグルタチオン含量の低い栄養細胞やグルタチオン合成酵素が欠損した二倍体株 (*gsh1/gsh1*) が孢子形成せず、<sup>18)</sup> 培地にグルタチオンを添加することにより、これらの株の孢子形成能が回復することから、このトリペプチドが酵母の孢子形成に必須であり、何らかの役割を果たしていることは間違いないと思われる。

そこで、協会7号酵母の孢子形成欠損に対してグルタチオンの効果を調べた結果、Fig. 4に示すように有意な孢子形成率の上昇が認められた。形成した子嚢のほとんどが2~3孢子で孢子の生存率も3%程度と低かったが、グルタチオンの添加で孢子形成が改善されたことにより、協会7号酵母の孢子形成欠損性の理由が、孢子形成の誘導に関わる重大な遺伝的欠陥によるのではなく、代謝上の不均衡に由来することが示唆された。

#### 4. エチオニン感受性変異と孢子形成

協会7号酵母と4011株を比較することにより、孢子形成時のカルシウムの取り込み能の違いやある種の酵素群の誘導レベルが違うことが示され、またグルタチ

オン添加試験の結果、協会7号の孢子欠損性は代謝レベルの問題であることが明らかになってきた。そこで、協会清酒酵母に特有でしかも代謝に関わるような形質について調査した。その結果、協会酵母のうち7号・9号・10号は高いS-アデノシルメチオニン (S-Ado-Met) 蓄積能を有し、<sup>19)</sup> メチオニンのアナログであるエチオニンに耐性を示し、構成型の酸性ホスファターゼ活性を示さないことが明らかになった。<sup>20)</sup> また、協会7号固有の表現型として、35°Cにおいてβ-アラニンを利用できない<sup>21)</sup> ことが報告されている。他方、孢子形成の良好な4011株について調査した結果、この株が上記の表現型をいずれも示さないことも判明した。清酒酵母がこのような特徴的な表現型を持つ理由については明らかにされていないが、最近焼酎酵母の構成型酸性ホスファターゼが醗において不安定であるとの報告がなされており、<sup>22)</sup> 清酒酵母にみられる上記の表現型も、清酒醗という限られた環境に適応するため自然変異により獲得した形質かもしれない。

清酒酵母の表現型が獲得形質であることを検証するために、孢子形成の良好な4011株からエチルメタンサルホン酸 (EMS) を用いる定法で1 mM エチオニンに耐性を示す変異株 (Ethionine Resistant; ETR) を取得し、<sup>23)</sup> 孢子形成ならびに表現型を調べた。その結果、4011株から取得したエチオニン耐性変異株の中から、協会7号と非常によく似た孢子を形成する株が分離され、さらにその変異株は前述したような清酒酵母の表

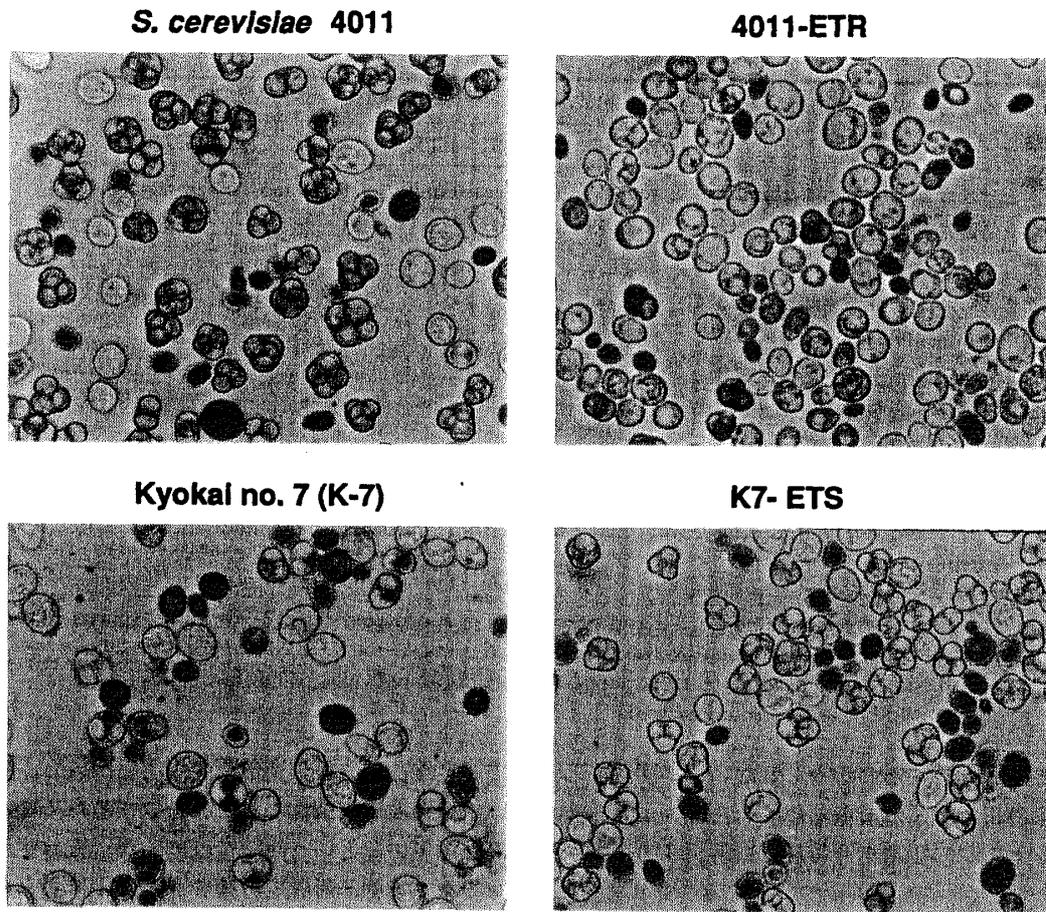


Fig. 5. Sporulation of strain 4011, Kyokai no. 7 and their mutants. YPD-grown yeast cells were incubated for 4 d on agar plates of nutrient-deprived medium.

現型 (*S*-AdoMet 蓄積能, 構成型酸性ホスファターゼ活性欠損および  $\beta$ -アラニン非利用性) をすべて獲得していた (Fig. 5, Table 5). 多くの形質が協会7号に酷似した株が比較的高い頻度で取得されたことにより, 清酒酵母の表現型は獲得されたものであるという仮説は支持され, 同時に, これらの形質が孢子形成に密接に関連していることが示唆された.

そこで, 清酒酵母が獲得した形質を復帰させることができれば, 失われた協会7号の孢子形成能も復活するはずであると考え, EMS で変異処理した協会7号酵母から, 0.1 mM エチオニン存在下で生育できないエチオニン感受性変異株 (Ethionine Sensitive; ETS) を取得した. その結果, きわめて低頻度ではあるが期待どおり孢子形成率・四孢子形成率とも著的に上昇した株が見いだされた (Fig. 5). この株 (K7-ETS 変異株) の他の表現型について調べたところ, 4011株のエチオニン耐性変異の時とは逆に, 細胞内の *S*-AdoMet 含量は4011株と同程度まで低下し, 協会7号の表現型であ

る構成型の酸性ホスファターゼ活性欠損と 35°C における  $\beta$ -アラニン非利用性を, いずれも失っていることが明らかになった (Table 5).

このように, エチオニンに対する感受性を指標にすることにより, 実用清酒酵母から孢子形成が回復した変異株を選択することが可能となったが, この変異は同時に細胞内の *S*-AdoMet 含量やその他の表現型など多面的に影響を及ぼすという非常に興味深い特徴を持っている. Andreev らはエンテロバクターの走化性阻害剤であるエチオニンが *Bacillus sphaericus* の孢子形成と走化性をいずれも阻害することを報告し,<sup>24)</sup> これらの行動の背景にある栄養飢餓認識にはメチル基の転移が関連することを推測している. したがって, 酵母において見いだされたこのようなエチオニン耐性に関連する表現型の変化も, *S*-AdoMet のような生体内の低分子がメチル転移を介して孢子形成やその他の表現型をコントロールするのかもしれないし, あるいはこれらの表現型を支配するようなある種の遺伝子の変異が

Table 5. Properties of each type of mutants derived from strain 4011 or Kyokai no. 7.

Properties	Strains			
	4011	4011-ETR	K-7	K7-ETS
Susceptibility to ethionine	sensitive	resistant	resistant	sensitive
S-AdoMet content <sup>a</sup>	0.45	2.7	2.0	0.51
Acid phosphatase <sup>b</sup>	+	-	-	+
Growth on $\beta$ -alanine (35°C)	Yes	No	No	Yes
Sporulation (%) <sup>c</sup>	75	29	8	35
Type of ascus (%) <sup>d</sup>				
2-spored	16	56	58	8
3-spored	25	54	42	15
4-spored	59	<0.1	<0.1	77

<sup>a</sup> S-AdoMet content (mg/g-wet cells) was determined just before the incubation in SPO medium.

<sup>b</sup> -, Negative; +, positive.

<sup>c</sup> Cells were incubated for 3 d and percentage of sporulated cells (2-, 3- and 4-spored asci) in the total cell population was calculated.

<sup>d</sup> Ratio of type of ascus in total population of sporulated cells. One-spored asci were few in number and were not scored.

存在することを示唆するのかもしれない。いずれにしても、清酒酵母の孢子形成機構については、これら表現型のリンケージの現象を今後詳細に解析する必要がある。

協会7号酵母のエチオニン感受性変異株の孢子的生存率を調べると、四分子分離した孢子的25%が生育可能であることが明らかになった。また興味深いことに、生育した一倍体株の表現型は親株のK7-ETSと完全に一致し、エチオニン感受性で酸性ホスファターゼを発現し、S-AdoMet含量が高く、そして $\beta$ -アラニン培地に35°Cで生育した。エチオニン感受性変異株の表現型をもつ一倍体株のみが出現する理由については不明であるが、このような表現型を示す変異を獲得することが孢子的出芽や生育に必須である可能性が示唆された。

#### おわりに

協会7号酵母は、昭和21年大蔵省主税局醸造試験所(現;国税庁醸造研究所)の山田らにより真澄の新酒より分離され、50年経った今でも実用菌株として多くの酒造メーカーで使用されているし、またこの間に実施された酵母の育種研究の多くがこの酵母を親株としていることから、この酵母のすばらしさは実証済みであると考えられる。

筆者らがこの酵母を実験材料とした理由も、きわめ

て優良なこの酵母の遺伝背景を明らかにし、現在あるいは将来の実用菌株の育種に役立てるためであり、変異株を用いるという手法ではあるが、充分実用可能なレベルまで孢子形成を改善できたことにより今後の醸造業界に寄与するものと考えている。しかしながら同時に、孢子形成に関連してさらに解明すべき課題も多く得られ、今後も孢子形成の謎解きを続けていきたいと考えている。本文では触れなかったが、エチオニン感受性の付与による孢子形成能の回復は協会7号に限らないというデータも得ており、他の実用株への応用も検討している。

本研究の遂行に、終始適切な指導を頂きました京都大学食糧科学研究所の村田幸作教授、研究の機会と御協力を頂きました月桂冠代表取締役社長大倉敬一氏を始め、共同研究者の方々に感謝いたします。

#### 文 献

- 1) 清酒酵母研究会編：改訂清酒酵母の研究，p. 27-47 (1980).
- 2) 山下一郎：日本農芸化学大会講演要旨 p. 144 (1994).
- 3) Freese, E. B., Chu, M. I., and Freese, E.: *J. Bacteriol.*, **149**, 840-851 (1982).
- 4) Freese, E. B., Olempska-Beer, Z., Hartig, A., and Freese, E.: *Dev. Biol.*, **102**, 438-451 (1984).
- 5) Kawado, A., Suizu, T., Imayasu, S., Kimura, A., and Murata, K.: *J. Ferment. Bioeng.*, **76**, 391-394 (1993).

- 6) Fowell, R. P.: *The Yeasts*, p. 311-338, Academic Press, London (1969).
- 7) Suizu, T., Tsutsumi, H., Kawado, A., Imayasu, S., Inose, T., Kimura, A., and Murata, K.: *J. Ferment. Bioeng.*, **77**, 568-571 (1994).
- 8) Suizu, T., Tsutsumi, H., Kawado, A., Inose, T., Suginami, K., and Murata, K.: *Microbiol.*, **141**, 2463-2469 (1995).
- 9) Olempska-Bier, Z. and Freese, E.: *Mol. Cell Biol.*, **7**, 2141-2147 (1987).
- 10) Cameron, S., Levin, L., Zoller, M., and Wigler, M.: *Cell*, **53**, 555-566 (1988).
- 11) 堤 浩子, 水津哲義, 川戸章嗣, 今安 聡, 木村 光, 村田幸作: 日本生物工学会大会講演要旨集, p. 64 (1993).
- 12) Suizu, T., Tsutsumi, H., Kawado, A., Murata, K., and Imayasu, S.: *J. Ferment. Bioeng.*, **77**, 274-276 (1994).
- 13) Suizu, T., Tsutsumi, H., Kawado, A., Murata, K., Suginami, K., and Imayasu, S.: *Can. J. Microbiol.*, **41**, 1035-1037 (1995).
- 14) 飯田秀利, 小野智子, 奥村万樹子: 蛋核酵, **39**, 412-419 (1994).
- 15) 坂本幸哉, 谷口直之, 東 胤昭: 蛋核酵, **33**, 1358-1362 (1988).
- 16) Shigematsu, T., Matsunami, K., Fukuda, Y., Kimura, A., and Murata, K.: *J. Ferment. Bioeng.*, **75**, 187-190 (1993).
- 17) Kawado, A., Suizu, T., Imayasu, S., Shigematsu, T., Kimura, A., and Murata, K.: *J. Ferment. Bioeng.*, **74**, 363-367 (1992).
- 18) Suizu, T., Tsutsumi, H., Ohtake, Y., Kawado, A., Imayasu, S., Kimura, A., and Murata, K.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **205**, 1151-1155 (1994).
- 19) Shiozaki, S., Shimizu, S., and Yamada, H.: *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 2293-2300 (1984).
- 20) 溝口晴彦, 藤田栄信: 醸酵工学, **59**, 185-188 (1981).
- 21) 菅間誠之助, 山川浩一郎, 瀧岡敏一, 山村紘司, 野白喜久雄: 醸協, **60**, 453-456 (1965).
- 22) 高下秀春, 大森俊郎, 下田雅彦, 松岡正佳, 小川隆平: 日本生物工学会大会講演要旨集, p. 39 (1995).
- 23) Suizu, T., Tsutsumi, H., Kawado, A., Murata, K., and Imayasu, T.: *J. Ferment. Bioeng.*, **81**, 93-97 (1996).
- 24) Andreev, J., Dibrov, P. A., Klein, D., and Braun, S.: *FEBS Lett.*, **349**, 416-419 (1994).