

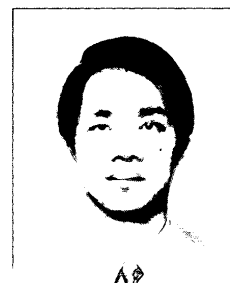
[生物工学会誌 第80号 第2号 57-63. 2002]

総 合 論 文

清酒酵母高発酵性変異株の開発と
その機作の解明

(平成13年度 日本生物工学会江田賞受賞)

渡辺 睦

Sake Yeast Mutants with Improved Fermentative Activity:
Isolation, Application, and a Novel Mechanism —Monograph—MUTSUMI WATANABE (*Research and Development Department, Hakutsuru Sake Brewing Co., Ltd., 4-5-5 Sumiyoshiminami-machi, Higashinada-ku, Kobe 658-0041*) Seibutsu-kogaku **80**: 57-63, 2002.

High ethanol concentrations in sake mash, which characteristically reach over 20%, occasionally cause stuck fermentation resulting in low-quality sake. Adequate fermentative activity is thus one of the most important features required of a sake yeast. Mutants resistant to clotrimazole (CTZ) were isolated from the sake yeasts Kyokai no. 701 and no. 1001. More than half of them fermented sake mash faster and produced higher amounts of alcohol than their parental strains. In industrial-scale sake fermentation, a CTZ-resistant mutant could reduce the fermentation period by 1-2 days. CTZ-resistant mutants from a non-urea forming sake yeast and a high isoamyl acetate producing strain showed improved fermentative activity while retaining their parental advantages for sake making. CTZ-resistant mutants also exhibit pleiotropic drug resistance (PDR); they are resistant to a wide range of cytotoxic compounds unrelated to CTZ. Series of gain-of-function missense mutations in *PDR1* and *PDR3*, which encode transcription factors, are known to increase the expression of ABC transporters that extrude various kinds of drugs out of the cell, leading to PDR. In this study, two *PDR1* and three *PDR3* mutant alleles were cloned from five independent CTZ-resistant mutants. These alleles contain different missense mutations —*PDR1-H176* (L309S), *PDR1-2* (M308I), *PDR3-C21* (L950S), *PDR3-C231* (G948D), and *PDR3-11* (G957D)— that are sufficient to improve fermentative activity, in addition to conferring PDR. In a CTZ-resistant mutant, CTZ21, isolated from the haploid sake yeast HL69, the levels of mRNA for three major ABC transporter genes, *PDR5*, *SNQ2*, and *YOR1*, markedly increased, while the cellular ATP contents drastically decreased. Disruption of *PDR5* or *SNQ2* but not *YOR1* in CTZ21 lowered the fermentative activity to that of HL69 and restored the cellular ATP contents to a medium level between those of CTZ21 and HL69. These results demonstrated that the ATP level reduced by overexpression of *PDR5* and *SNQ2* in CTZ21 contributes to a certain extent to its improved fermentative activity.

[Key words: clotrimazole, fermentative activity, pleiotropic drug resistance, sake yeast]

は じ め に

清酒醸造は15℃程度の低温で行われ、並行複式発酵によって醪中のアルコール濃度は20%にも達する。そのため、清酒醪の発酵には少なくとも2週間程度の長期間が必要であり、さらに低温で発酵を行う吟醸造りでは発酵期間が1ヶ月にも及ぶ。また、醪末期には発酵がしばし

ば遅滞し、発酵の長期化と酒質の低下を招いていた。これらの問題を解決するために、発酵力の強い酵母菌株が従来から望まれており、さまざまな方法で酵母変異株が育種されてきた。原らは高濃度のエタノール存在下での生菌率が顕著に高くなったアルコール耐性株を分離し、酒質の低下が回避されるようになった。秋田らはイソアミルアルコール耐性を指標にして同様のアルコール耐性

著者紹介 白鶴酒造(株)研究開発室(課長代理) 〒658-0041 神戸市東灘区住吉南町4-5-5

TEL. 078-822-8910 FAX. 078-822-7426 E-mail: watanabe@hakutsuru.co.jp http: www.hakutsuru.co.jp/

1985年九州大学農学部卒業, 農学博士 専門分野: 応用微生物学

株の分離を行った。²⁾ また近年では新田らが K1 キラー耐性を利用して、さらにアルコール耐性の強い変異株を分離した。³⁾ しかし、これらの変異株の発酵力は、特に醗初期から中期において親株よりもやや劣っており、発酵期間の短縮には必ずしも繋がっていなかった。また、ほとんどのアルコール耐性株で生成酒の酸度が高くなった。¹⁻³⁾

ところで、酵母の増殖や発酵には、細胞膜中のステロールや脂肪酸組成が影響することが知られている。⁴⁻⁸⁾ また、クロトリマゾール (CTZ) に代表されるアゾール系抗真菌剤は、エルゴステロールの生合成阻害、および細胞膜中の不飽和脂肪酸との直接的な結合による膜構造の破壊によって酵母の生育を阻害するものである。⁹⁻¹¹⁾ 本研究では、CTZに耐性を示す変異株の分離を試み、醗期間全体を通して高発酵性を示し、酒質を犠牲にすることなく発酵期間の短縮が可能な変異株を初めて取得した。¹²⁾ この手法は、種々の有用変異酵母の発酵力改善に応用することができた。¹³⁾ さらに、CTZ 耐性株が ATP binding cassette (ABC) トランスポーターの高発現による多剤耐性変異であることを見だし、¹³⁾ その変異部位を明らかにして、高発酵性への関与を証明した。¹⁴⁾ これは清酒酵母に高発酵性を付与できる変異型遺伝子をクローニングした最初の例である。また、高発酵性のメカニズムのひとつとして、ABC トランスポーターの高発現による細胞内 ATP レベルの低下が、解糖系フラックスの増大をもたらしていることを考察した。¹⁵⁾

1. CTZ 耐性による高発酵性株の分離

1.1. 協会泡なし酵母からの高発酵性株の取得 協会泡なし酵母 K701 と K1001 から、20 mg/l の CTZ を含む最少平板培地上に出現したコロニーを分離し、小スケールでの仕込試験を行ったところ、分離した株の半数以上が親株よりも高濃度のアルコールを生成した。つまり、CTZ 耐性を指標にすることで、高発酵性の変異株が容易に得られることが分かった。¹²⁾

仕込試験を繰り返して、発酵性が大きく向上し、酒質が優れていた CTZ239 株を最優良株として選抜した。この株の実用的な有用性を確認するために、総米 2.3 t の実生産規模での仕込試験を行った。¹²⁾ CTZ239 は醗初期からアルコールの生成、ボーメのキレ(糖の消費とアルコールの生成による比重の低下) がともに速く、対照として用いた親株の K1001 よりも、2 日程度速い発酵経過となった。Table 1 に示すように、CTZ239 では K1001 よりもアルコール濃度が 0.8%, 日本酒度 $[(1/\text{比重}-1) \times 1443]$

Table 1. Analysis of fresh sake brewed with CTZ239 and K1001 in an industrial-scale fermentation.

	CTZ239	K1001
Sake meter	+3.9	+0.8
Alcohol (% v/v)	19.6	18.8
Acidity (ml)	2.0	2.0
Amino acidity (ml)	2.0	2.1
Sensory evaluation*	2.2	2.1

* 1, Good-5, poor (n = 17).

が 3.1 高くなっていた。これは、CTZ239 の優れた高発酵性を示している。その一方、酸度とアミノ酸度には差がなく、官能的にも K1001 と比べて何ら遜色のない酒質であった。

1.2. CTZ 耐性の付与による有用変異株の発酵力改善

清酒醸造において、酵母の育種は酒質の向上や商品の差別化を図る上で重要であり、活発な研究が行われてきた。尿素の低減を目的としたアルギナーゼ欠損株¹⁶⁾ やメチルアミン耐性株¹⁷⁾ カプロン酸エチルや酢酸イソアミル、および β -フェネチルアルコールなどの香気成分高生産性株¹⁸⁻²⁰⁾ ならびに寡酸性株²¹⁾ やリンゴ酸高生産性株^{22,23)} などが分離されており、さまざまな目的で個性豊かな清酒酵母が多数開発されている。

このような変異株を選抜する際には、育種の目的となる有用な形質に加えて、十分な発酵力を持つことが必要である。しかし、実際に分離された有用変異株は、その親株よりも発酵力が劣ることが少なくない。^{2,23,24)} このような変異株を実用に供するために、その株の発酵力を高めるような変異を付加することが考えられ、これまでも泡なし性の付与による方法が報告されている。^{25,26)} 我々は、CTZ 耐性の付与による高発酵性酵母の育種方法を、尿素非生産性株と酢酸イソアミル高生産性株の発酵力改善に応用した。¹³⁾

K1001 から Kitamoto らの方法¹⁶⁾ を用いて分離した尿素非生産性アルギナーゼ欠損株 HL163、および K7 号系の当社保存菌株 HL155 よりフルアジホップ耐性を指標として取得した酢酸イソアミル高生産性株 Ffe13²⁷⁾ を親株として使用した。CTZ 20 mg/l を含む最少平板培地上に出現したコロニーを約 50 株ずつ鈎菌し、総米 100 g の発酵試験を行った。¹³⁾ HL163 由来株の 62%, Ffe13 由来株の 85% が親株よりも炭酸ガス減量の経過が速く、生成酒の日本酒度が高かった。

最も発酵力の向上が顕著であった分離株について、各親株を対照とした総米 1 kg の仕込試験を行った。¹³⁾

Table 2. Analysis of fresh sake brewed with HL176 and HL163.

	HL176	HL163
Sake meter	+3.9	-0.5
Alcohol (% v/v)	19.9	19.4
Acidity (ml)	2.1	2.0
Amino acidity (ml)	2.1	2.4
Urea (mg/l)	ND*	ND*

* ND, not detected.

Table 3. Analysis of fresh sake brewed with Ffe13-9, Ffe13 and HL155.

	Ffe13-9	Ffe13	HL155
Sake meter	+4.5	+1.0	+4.5
Alcohol (% v/v)	19.3	18.9	19.2
Acidity (ml)	2.3	2.2	2.2
Amino acidity (ml)	2.5	2.6	2.2
OD ₄₃₀	0.138	0.148	0.078
Isoamyl acetate (mg/l)	18.1	20.6	10.4

HL163は日本酒度が-0.2になった時点で発酵が停止したが、CTZ耐性株のHL176は醪初期から発酵が旺盛であり、醪末期になっても日本酒度が順調にキレていった。Table 2に示すように、HL176の生成酒はHL163よりもアルコール濃度と日本酒度が高く、酸度はほぼ同じでアミノ酸度が低かった。また、HL163と同様に尿素の生成は認められなかった。

Ffe13は醪後期の発酵が緩慢で、生成酒はアミノ酸度が高く着色していたが、CTZ耐性株のFfe13-9は醪後期にも順調に発酵し、日本酒度がよくキレてアルコール濃度が高かった (Table 3)。また、Ffe13-9は生成酒中に18.1 mg/lの酢酸イソアミルを蓄積し、Ffe13の酢酸イソアミル高生産性²⁷⁾を保っていた。

以上のように、CTZ耐性の付与によって、HL163の尿素非生産性およびFfe13の酢酸イソアミル高生産性を維持したまま、発酵力が向上した変異株を分離することができた。

2. CTZ耐性株の高発酵性メカニズムの解析

2.1. CTZ耐性株のアルコール耐性 CTZ耐性と高発酵性との関連については、細胞膜中のステロールや脂肪酸などの組成変化によるアルコール耐性であると予想されたので、原らによって分離された高濃度エタノール存在下でも死滅しにくいアルコール耐性泡なし酵母AA6株²⁵⁾と

の比較を行った。17.5%エタノール存在下での生菌率を測定したところ、AA6が約60%の高い生菌率であったが、CTZ耐性株は親株と同程度の3~12%の低い生菌率であり、アルコール耐性を示さなかった。¹²⁾

2.2. CTZ耐性株の多剤耐性 CTZを含むアゾール系抗真菌剤は臨床でも広く用いられているが、これを長期間投与されたエイズ患者からABCトランスポーターと呼ばれる薬剤排出ポンプが高発現した*Candida albicans*の耐性変異株が分離された。²⁸⁾ ABCトランスポーターの高発現は、投与された薬剤のみならず、それとは構造や作用機作の異なる多くの薬剤に対して同時に耐性を示す多剤耐性を引き起こすことが知られており、²⁹⁾ 同様の現象は*Saccharomyces cerevisiae*でも古くから観察されていた。³⁰⁻³²⁾ 清酒酵母の多剤耐性変異株としては、曲淵らがシクロヘキシミドとセルレニンの両方に対する耐性を指標として分離を行い、有機酸やグリセロールなどの香味成分が変化した清酒が醸造できたことを報告していた。³³⁾ また、福田らはトリコセシン耐性酵母を分離し、生成酒のアルコール濃度が高かったこと、およびトリコセシン以外の薬剤にも耐性を示したことを報告していた。^{34,35)}

そこで、我々が取得したCTZ耐性株の各種薬剤に対する耐性を調べた。その結果、試験に供したすべてのCTZ耐性株は、シクロヘキシミド、4-ニトロキノリン1-オキシド (4-NQO)、オリゴマイシンなどのCTZとは構造や作用機作の異なる複数の薬剤に耐性であり (Fig. 1)、多剤耐性を示すことが分かった。^{13,15,36)}

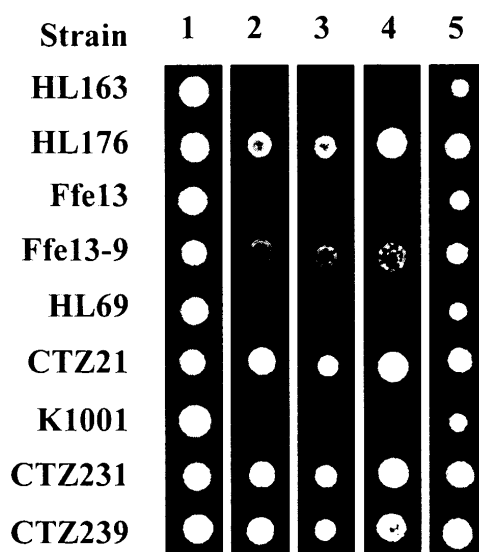


Fig. 1. Comparison of drug resistance among various CTZ-resistant mutants and their parental strains. Lanes: 1, blank with no drug; 2, 0.4 mg/l cycloheximide; 3, 0.5 mg/l 4-NQO; 4, 0.5 mg/l oligomycin; 5, 10 mg/l CTZ.

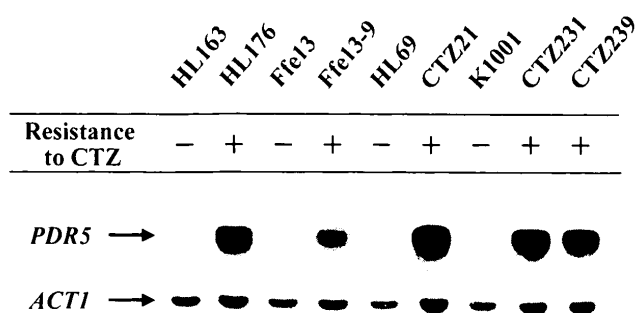


Fig. 2. Northern blot analysis of *PDR5* in various CTZ-resistant mutants and their parental strains. Resistance index: +, resistant; -, sensitive.

CTZ 耐性株の多剤耐性が、ABC トランスポーターの働きを介したものかどうかを調べるために、ABC トランスポーターをコードする代表的な遺伝子 *PDR5*/*YDR1*/*STS1*³⁷⁻³⁹ のノザン解析を行った (Fig. 2).¹³⁾ 各親株では *PDR5* の mRNA は不検出であったが、CTZ 耐性株では *PDR5* の強いシグナルを検出した。このことから、CTZ 耐性株の多剤耐性も、ABC トランスポーターの高発現によることが強く示唆された。

2.3. CTZ耐性株からの*PDR1*および*PDR3*変異型対立遺伝子のクローニング

S.cerevisiae の全ゲノムが解析され、29 個の ABC トランスポーターの存在が推定されており、⁴⁰⁾ それらは *PDR5* や *YOR1*/*YRS1*,^{41,42)} *SNQ2*⁴³⁾ などにコードされている。各 ABC トランスポーターにはある程度の基質特異性が存在するが、転写調節因子をコードする *PDR1* や *PDR3* の一アミノ酸置換変異⁴⁴⁻⁴⁶⁾ によって転写が活性化され細胞膜上で同時に高発現するために、各種薬剤を細胞外へ排出できるようになり、多剤耐性を獲得することが明らかにされている。

そこで、CTZ 耐性株 5 菌株から *PDR1* と *PDR3* を PCR 増幅してクローニングしたところ、^{14,36)} 各 CTZ 耐性株は多剤耐性を付与し得る *PDR1*、もしくは *PDR3* の優性変異を有していることが分かった。各対立遺伝子は、各々異なる一アミノ酸置換変異 (*PDR1*-H176, L309S; *PDR1*-2, M308I; *PDR3*-C21, L950S; *PDR3*-C231, G948D; *PDR3*-11, G957D) を含んでいた。これらの変異は、*PDR5* の転写を活性化することができた。また、*PDR1*-H176, *PDR3*-C21, および *PDR3*-C231 は、新規の変異であった。

Pdr1p と Pdr3p は互いにホモロジーが高く、GAL4 ファミリーに属する転写調節因子であり、このファミリーに共通する 3 つのドメイン構造を有している (Fig. 3).^{47,48)} 実験室株で報告されている変異部位は、Pdr1p と Pdr3p のほぼ全長にわたって存在しているが、⁴⁴⁻⁴⁶⁾ CTZ 耐性株の変異部位は、Pdr1p 上では Inhibitory ドメインのモチー

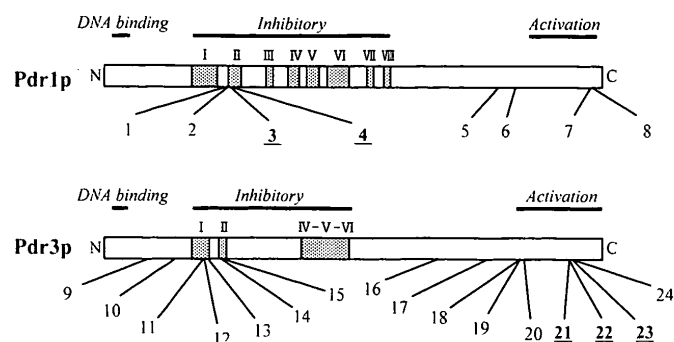


Fig. 3. Locations of various PDR missense mutations on Pdr1p and Pdr3p. Mutation sites are indicated by figures: 1, *PDR1*-7 (P298A); 2, *PDR1*-6 (K302Q); 3, *PDR1*-2 (M308I); 4, *PDR1*-H176 (L309S); 5, *PDR1*-3 (F815S); 6, *PDR1*-101 (T879M); 7, *PDR1*-8 (L1036W); 8, *PDR1*-12 (L1039Q); 9, *PDR3*-4 (T119I); 10, *PDR3*-5 (K205N); 11, *PDR3*-6 (I252M); 12, *PDR3*-7 (G253M); 13, *PDR3*-8 (K257E); 14, *PDR3*-9/*PDR3*-33 (Y276H); 15, *PDR3*-10 (R280K); 16, *PDR3*-15 (E725K); 17, *PDR3*-16 (R794K); 18, *PDR3*-17 (G834D); 19, *PDR3*-18 (G834S); 20, *PDR3*-19 (L837S); 21, *PDR3*-C231 (G948D); 22, *PDR3*-C21 (L950S); 23, *PDR3*-11 (G957D); 24, *PDR3*-20 (G957N). Figures underlined indicate mutations found in CTZ-resistant mutants. The structural domains and motifs common among the GAL4 transcription family are shown above each of the proteins.

フ II に、また、Pdr3p 上では Activation ドメインの狭い領域に集中していた。そこで、実験室株の代表的な変異型対立遺伝子で強い多剤耐性を付与すると報告されている *PDR1*-3,⁴⁴⁾ および *PDR3*-7⁴⁵⁾ との比較検討を行った。この 2 つの対立遺伝子を二倍体株の一对の染色体にヘテロに導入した場合には、CTZ 耐性株由来の変異型対立遺伝子に比べて薬剤耐性が弱く、*PDR5* の転写量も少なかった。また、YPD 液体培養実験における単位細胞あたりのエタノール生成速度の増加もわずかであった。⁴⁹⁾

2.4. *PDR1*および*PDR3*変異型対立遺伝子による高発酵性の付与

先に述べた CTZ 耐性株の *PDR1* および *PDR3* 上の一アミノ酸置換変異が清酒醪中での高発酵性に直接関与しているかどうかを検証するために、各変異型対立遺伝子を染色体に導入した安定な組換え体を形質転換によって構築し、小仕込試験を行った。^{14,36)} 形質転換には変異部位を含む ORF の一部分の DNA 断片を用い、相同組換えによって染色体上に形成される完全な変異型対立遺伝子の多剤耐性を直接指標にして組換え体を選抜した。なお、宿主には二倍体株の K1001 を使用し、組換え体の確認はサザン解析と PCR ダイレクトシーケンスを用いて行った。そして、元の CTZ 耐性株と同様に変異がヘテロに導入されたものを選んで小仕込試験を実施した。

PDR1-H176 を除いて、K1001 に各変異型対立遺伝子を導入した組換え体は発酵が速やかであり、生成酒の日

Table 4. Analysis of sake brewed with recombinants of K1001 into which various *PDR1* and *PDR3* mutations were introduced.

PDR mutation	Sake meter	Alcohol (% v/v)	Acidity (ml)	Amino acidity (ml)
Wild (K1001)	8.4 ± 0.0	20.9 ± 0.0	2.0 ± 0.0	3.4 ± 0.0
<i>PDR1-H176</i>	8.1 ± 0.1	21.1 ± 0.1	2.0 ± 0.0	3.4 ± 0.0
<i>PDR1-2</i>	12.4 ± 0.5	21.4 ± 0.1	2.1 ± 0.1	3.2 ± 0.0
<i>PDR3-C21</i>	12.0 ± 0.1	21.6 ± 0.0	2.4 ± 0.0	3.1 ± 0.1
<i>PDR3-C231</i>	13.3 ± 0.2	21.6 ± 0.0	2.2 ± 0.0	3.0 ± 0.0
<i>PDR3-11</i>	11.6 ± 0.4	21.5 ± 0.1	2.2 ± 0.0	3.0 ± 0.0

Values are means with ranges of duplicate experiments.

Table 5. Analysis of sake brewed with transformants generated by substituting *PDR1-H176* for a *PDR1* wild allele of HL163.

Strain ^a	<i>PDR1</i> alleles	Sake meter	Alcohol (% v/v)	Acidity (ml)	Amino acidity (ml)
TF-2	<i>PDR1, PDR1-H176</i>	+5.5	19.9	2.3	3.1
TF-7	<i>PDR1, PDR1-H176</i>	+5.2	19.6	2.3	3.2
TF-17	<i>PDR1, PDR1-H176</i>	+5.2	19.7	2.2	3.2
TF-23	<i>PDR1, PDR1-H176</i>	+4.6	19.7	2.4	3.4
HL163	<i>PDR1, PDR1</i>	-2.4	18.9	2.4	3.7
HL176	<i>PDR1, PDR1-H176</i>	+5.5	19.7	2.4	3.2

^aTF-2, TF-7, TF-17, and TF-23 are the transformants, while HL163 (*car1/car1*) is the transformation host. HL176 is the CTZ-resistant mutant derived from HL163.

本酒度とアルコール濃度が K1001 よりも高くなった (Table 4). つまり, 各変異型対立遺伝子の一アミノ酸置換変異は, 多剤耐性と同時に高発酵性を付与できることが明らかとなった.

*PDR1-H176*は, 尿素非生産性株 HL163 由来の CTZ 耐性株 HL176 から見いだされたものであり,^{13,14)} これを形質転換によって HL163 に導入した場合には, 発酵性が HL176 と同程度まで改善された (Table 5).¹⁴⁾ したがって, *PDR1-H176* 導入の発酵性への効果は宿主によって異なっており, アルギナーゼ遺伝子 *CAR1* 欠損による尿素非生産性¹⁶⁾ に依存していると推定できるが, 今後さらに検討の必要がある.

2.5. ABC トランスポーター遺伝子の破壊による CTZ21 株の高発酵性への影響 CTZ 耐性株は, *PDR1* もしくは *PDR3* の一アミノ酸置換変異によって多剤耐性と高発酵性を同時に獲得していることが分かったので, これらの変異によって転写が活性化される ABC トランスポーターの主要な 3 つの遺伝子, *PDR5*, *SNQ2*, および *YOR1* の破壊株を作製して, 高発酵性への影響を調べた.¹⁵⁾ なお, 遺伝子破壊は清酒酵母一倍体株 HL69 (*MATα*)⁵⁰⁾ 由来の CTZ 耐性株 CTZ21 (*MATα PDR3-C21*)¹⁵⁾ を用いて行った.

遺伝子破壊株の小仕込試験の結果を Fig. 4 に示した. CTZ21 の *PDR5* 破壊株, および *SNQ2* 破壊株は, 醪初期から CTZ21 よりも発酵が遅れ, 留後 14 日目までは HL69 とほとんど同じ日本酒度の経過となった. しかし, これ以降の日本酒度のキレは, HL69 よりも良好であった. 一方, CTZ21 の *YOR1* 破壊株は, 留後 14 日目まで CTZ21 と同様の日本酒度の経過となったが, それ以降は発酵が遅れた. これらのことから, CTZ21 の醪初期から中期の高発酵性には *PDR5* と *SNQ2* の関与が明らかとなった. なお, *YOR1* についても, 発酵後期の高発酵性への関与が考えられるが, 対照として構築した HL69 の *YOR1* 破壊株の発酵が HL69 よりも顕著に遅れたので, 結論には至らなかった.

2.6. ABC トランスポーター遺伝子の破壊による CTZ21 の細胞内 ATP レベルの変化と高発酵性との関連

ABC トランスポーターは ATP 加水分解エネルギーを用いて薬剤を排出するので, 各遺伝子破壊株の細胞内 ATP を測定した.¹⁵⁾ なお, 宿主の一倍体株は細胞塊 (芽簇) の形成が著しく細胞数の計測が不可能であったので, 醪重量あたりの ATP 含量として Fig. 5 に示した.

CTZ21 は, 醪期間全体を通して HL69 よりも顕著に低

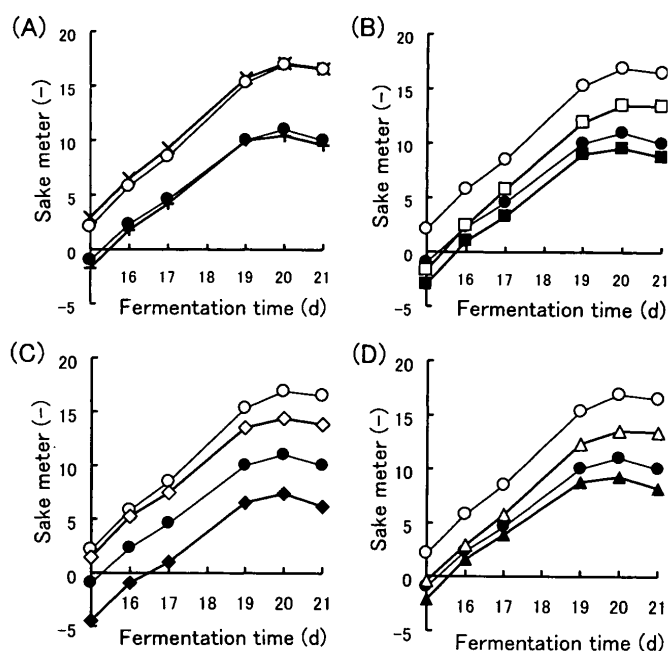


Fig. 4. Fermentation profiles of the gene disruptants: (A) control strains, (B) *PDR5* disruptants, (C) *YOR1* disruptants, and (D) *SNQ2* disruptants. Symbols: ○, CTZ21-U/YIp5; ●, HL69-U/YIp5; ×, CTZ21; +, HL69; □, CTZ21Δ*pdr5*; ■, HL69Δ*pdr5*; ◇, CTZ21Δ*yor1*; ◆, HL69Δ*yor1*; △, CTZ21Δ*snq2*; ▲, HL69Δ*snq2*.

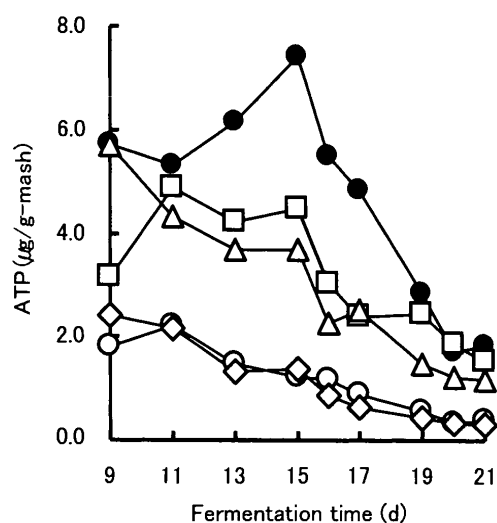


Fig. 5. ATP levels in sake mash brewed with the gene disruptants. Symbols: ○, CTZ21-U/YIp5; ●, HL69-U/YIp5; □, CTZ21Δ*pdr5*; ◇, CTZ21Δ*yor1*; △, CTZ21Δ*snq2*.

いATPレベルを示した。そして、*PDR5*や*SNQ2*の破壊によって、ATPレベルがCTZ21とHL69の間のレベルまで回復した。一方、*YOR1*破壊株では、ATPレベルに変化が認められなかった。細胞内のATPレベルは、解糖系の律速段階と考えられているホスホフルクトキナーゼやピルビン酸キナーゼを制御することが知られている。また、大腸菌のF1-ATPase欠損株や、⁵¹⁾酵母の外来アシルホスファターゼ遺伝子発現株では、⁵²⁾ATPの枯渇によ

て解糖系フラックスが増大し、ピルビン酸やエタノールの生産性が向上したと報告されている。これらのことから、CTZ21の醗初期から中期の高発酵性は、*PDR5*や*SNQ2*の高発現による細胞内ATPレベルの低下によってある程度説明できるものと考えられた。

おわりに

本研究では、CTZ耐性株の*PDR1*および*PDR3*のアーミノ酸置換変異が、酵母に多剤耐性と高発酵性を同時に付与できることを明らかにした。また、CTZ21では醗初期から中期の高発酵性をABCトランスポーター遺伝子の破壊によって抑制することができた。しかし、CTZ耐性株の最も優れた実用的特長である醗末期の高発酵性(持続する良好な日本酒度のキレ)のメカニズムについては、未だほとんど分かっていない。

ヒトのガン細胞の多剤耐性現象は、ガンの化学療法上の最も主要な障害となっている。そのモデルとして酵母多剤耐性に関する研究も、世界各国の研究室できわめて精力的に行われている。本稿では詳しく触れなかったが、*PDR1*と*PDR3*は、ABCトランスポーター以外にも、細胞膜透過や、脂質代謝、細胞壁合成、およびストレス応答などに関わる広範囲のさまざまな遺伝子を制御することが報告されている。⁵³⁾ また、ミトコンドリアの機能不全によって多剤耐性ネットワークが活性化されることが分かってきており、⁵⁴⁾ YPD培地で振とう培養した場合と高度に嫌気的な清酒醗中では、その活性化パターンが大きく異なっている可能性も考えられる。今後、これらを手掛かりとして高発酵性メカニズムの詳細な解析を進めていき、高発酵性の酵母のさらなる育種改良に繋がることを期待している。

本研究のためにプラスミドを御供与いただいた広島大学の宮川都吉教授、ならびに大阪大学の原島 俊教授に厚く御礼を申し上げます。また、本研究の機会を賜りました白鶴酒造株式会社常務取締役木下善郎生産本部長、ならびに多大のご支援をいただきました同研究開発室、生産管理部、および製造部の関係の皆様に深く感謝いたします。

文 献

- 1) 原 昌道, 佐々木雅道, 小幡孝之, 野白喜久雄: 醸協, **71**, 301-304, 564-573 (1976).
- 2) 秋田 修, 渡辺隆幸, 蓮尾徹夫, 小幡孝之, 原 昌道: 醸酵工学, **68**, 95-100 (1990).
- 3) 新田朝子, 内山博文, 今村武司: 生物工学, **78**, 77-81 (2000).
- 4) Walker, G. M.: *Yeast — Physiology and Biotechnology*, p. 163-

- 167, John Wiley & Sons, Chichester, England (1998).
- 5) Mishra, P. and Kaur, S.: *Appl. Micro. Biotech.*, **34**, 697–702 (1991).
- 6) Parks, L. W., Bottema, C. D. K., Rodriguez, R. J., and Lewis, T. A.: *Methods Enzymol.*, **111**, 333–346, Academic Press, N.Y. and London (1985).
- 7) 溝口晴彦：生物工学，**76**，122–130 (1998).
- 8) Kajiwara, S., Aritomi, T., Suga, K., Ohtaguchi, K., and Kobayashi, O.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **53**, 568–574 (2000).
- 9) Yamaguchi, H.: *Antimicrob. Agents Chemother.*, **12**, 16–25 (1977).
- 10) Yamaguchi, H. and Iwata, K.: *Antimicrob. Agents Chemother.*, **15**, 706–711 (1979).
- 11) Bossche, H. V. D., Willemsens, G., Cools, W., Lauwers, W. F. J., and Le Jeune, L.: *Chem. Biol. Interactions*, **21**, 59–78 (1978).
- 12) 広畑修二，渡辺 睦，西村 顕，近藤恭一：生物工学，**72**，283–289 (1994).
- 13) 溝口弘子，渡辺 睦，西村 顕，近藤恭一：生物工学，**76**，194–199 (1998).
- 14) Mizoguchi, H., Watanabe, M., and Nishimura, A.: *J. Biosci. Bioeng.*, **88**, 20–25 (1999).
- 15) Watanabe, M., Mizoguchi, H., and Nishimura, A.: *J. Biosci. Bioeng.*, **89**, 569–576 (2000).
- 16) Kitamoto, K., Oda-Miyazaki, K., Gomi, K., and Kumagai, C.: *J. Ferment. Bioeng.*, **75**, 359–363 (1993).
- 17) 田中準浩，永井英雄，中沢英五郎，三島秀夫，竹村成三：醸協，**84**，413–417 (1989).
- 18) Ichikawa, E., Hosokawa, N., Hata, Y., Abe, Y., Suginami, K., and Imayasu, S.: *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 2153–2154 (1991).
- 19) Ashida, S., Ichikawa, E., Suginami, K., and Imayasu, S.: *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 2061–2065 (1987).
- 20) 福田和郎：生物工学，**75**，111–124 (1997).
- 21) 吉田 清，稲橋正明，野呂二三，中村欽一，野白喜久雄：醸協，**88**，565–569 (1993).
- 22) 相川元庸，水津哲義，市川英治，川戸章嗣，阿部康久，今安 聡：醸酵工学，**70**，473–477 (1992).
- 23) 吉田 清，稲橋正明，中村欽一，秋山裕一，野白喜久雄：醸協，**89**，647–651 (1994).
- 24) 北本勝ひこ，宮崎佳緒子，山岡 洋，五味勝也，熊谷知栄子：醸協，**87**，602–607 (1992).
- 25) 原 昌道，梅津正敏，戸塚 昭，飯村 穰，野白喜久雄：醸協，**74**，624–631 (1979).
- 26) 斎藤久一，渡邊誠衛，田口隆信，高橋 仁，中田健美，岩野君夫，石川雄章：醸協，**87**，915–921 (1992).
- 27) 溝口（藤城）弘子，渡辺 睦，永井英雄，西村 顕，近藤恭一：醸協，**93**，665–670 (1998).
- 28) Sanglard, D., Kuchler, K., Ischer, F., Pagani, J. L., Monod, M., and Bille, J.: *Antimicrob. Agents Chemother.*, **39**, 2378–2386 (1995).
- 29) 植田和光：蛋白質 核酸 酵素，**42**，1263–1272 (1997).
- 30) Balzi, E. and Goffeau, A.: *Biochim. Biophys. Acta*, **1073**, 241–252 (1991).
- 31) Balzi, E. and Goffeau, A.: *Biochim. Biophys. Acta*, **1187**, 152–162 (1994).
- 32) Balzi, E. and Goffeau, A.: *J. Bioenerg. Biomembr.*, **27**, 71–76 (1995).
- 33) 曲淵哲朗，森川貴子，岩瀬利徳，福田秀雄，佐々木清祐：醸協，**92**，143–150 (1997).
- 34) 福田 央，朴 相培，木崎康造，高橋康次郎：日本農芸化学会大会講演要旨集，p. 346 (1997).
- 35) Fukuda, H., Park, S. B., Kizaki, Y., and Takahashi, K.: *World J. Microb. Biot.*, **15**, 629–630 (1999).
- 36) Mizoguchi, H., Yamauchi, T., Watanabe, M., Yamanaka, H., Nishimura, A., and Hanamoto, H.: *J. Biosci. Bioeng.*, **93**, 221–227 (2002).
- 37) Balzi, E., Wang, M., Leterme, S., Van Dyck, L., and Goffeau A.: *J. Biol. Chem.*, **269**, 2206–2214 (1994).
- 38) Bissinger, P. H. and Kuchler, K.: *J. Biol. Chem.*, **269**, 4180–4186 (1994).
- 39) Hirata, D., Yano, K., Miyahara, K., and Miyakawa, T.: *Curr. Genet.*, **26**, 285–294 (1994).
- 40) Decottignies, A. and Goffeau, A.: *Nat. Genet.*, **15**, 137–145 (1997).
- 41) Katzmman, D. J., Hallstrom, T. C., Voet, M., Wysock, W., Golin, J., Volckaert, G., and Moye-Rowley, W. S.: *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 6875–6883 (1995).
- 42) Cui, Z., Hirata, D., Tsuchiya, E., Osada, H., and Miyakawa, T.: *J. Biol. Chem.*, **271**, 14712–14716 (1996).
- 43) Servos, J., Haase, E., and Brendel, M.: *Mol. Gen. Genet.*, **236**, 214–218 (1993).
- 44) Carvajal, E., van den Hazel, H. B., Cybularz-Kolaczowska, A., Balzi, E., and Goffeau, A.: *Mol. Gen. Genet.*, **256**, 406–415 (1997).
- 45) Nourani, A., Papajova, D., Delahodde, A., Jacq, C., and Subik, J.: *Mol. Gen. Genet.*, **256**, 397–405 (1997).
- 46) Simonics, T., Kozovska, Z., Michalkova-Papajova, D., Delahodde, A., Jacq, C., and Subik, J.: *Curr. Genet.*, **38**, 248–255 (2000).
- 47) Schjerling, P. and Holmberg, S.: *Nucleic Acids Res.*, **24**, 4599–4607 (1996).
- 48) Poch, O.: *Gene*, **184**, 229–235 (1997).
- 49) 山内隆寛，渡辺 睦，西村 顕：日本農芸化学会大会講演要旨集，p. 342 (2001).
- 50) Watanabe, M., Tanaka, N., Mishima, H., and Takemura, S.: *J. Ferment. Bioeng.*, **76**, 229–231 (1993).
- 51) Yokota, A., Terasawa, Y., Takaoka, N., Shimizu, H., and Tomita, F.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 2164–2167 (1994).
- 52) Raugei, G., Modesti, A., Magherini, F., Marzocchi, R., Vecchi, M., and Ramponi G.: *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **23**, 273–278 (1996).
- 53) DeRisi, J., van den Hazel, B., Marc, P., Balzi, E., Brown, P., Jacq, C., and Goffeau, A.: *FEBS Lett.*, **470**, 156–160 (2000).
- 54) Hallstrom, T. C., and Moye-Rowley, W. S.: *J. Biol. Chem.*, **275**, 37347–37356 (2000).