

1H15-5 出芽酵母における染色体からのセントロメア配列の切り出しによる細胞死の誘導

○松崎 浩明, 杉江 奈緒子, 石井 仁, 牛島 世里子, 秦野 琢之
(福山大・生物工)

遺伝子組換え生物が野外で拡散すると、環境へ及ぼす影響が危惧される。遺伝子組換え生物の野外での拡散を防ぐために遺伝子組換え生物に条件致死性質や不稔性質を付与することが重要である。条件致死性質や不稔性質の付与に部位特異的組換えを利用して特定の条件下や時期に染色体からセントロメア配列を切り出し、細胞死を誘導することが有効であると考えられる。そこで、酵母 *S. cerevisiae* をモデル生物として pSR1 プラスミドの部位特異的組換えを利用したセントロメア配列の切り出しにより細胞死を誘導することを検討した。まず、一倍体細胞において第 IV 番染色体のセントロメア配列の両側に組換え部位配列 (RS) を同じ方向に挿入した後、この細胞に *GALI* プロモーター制御下で組換え酵素遺伝子 *R* が発現するプラスミドを導入し、ガラクトースによりセントロメア配列の切り出しが誘導される酵母を作製した。次に、この細胞のガラクトースおよびグルコースプレートにおける増殖を調べた結果、グルコースプレートでは多数のコロニーが出現したが、ガラクトースプレートではほとんど出現しなかった。さらに、ガラクトース液体培養での増殖はグルコース液体培養よりも顕著に遅く、生存率は低下した。これらの結果から、セントロメア配列の切り出しにより細胞死が誘導されることが分かった。また、二倍体細胞において第 IV 番相同染色体の両方からセントロメア配列を切り出すことで細胞死を誘導できた。

Cell death by excision of centromere sequence from a chromosome in *Saccharomyces cerevisiae*

○Hiroaki MATSUZAKI, Naoko SUGIE, Hitoshi ISHII, Yoriko USHIIJIMA, Takashi HATANO
(Dept. Biotech., Fac. Life Sci. Biotech. Fukuyama Univ.)

Key words cell death, centromere, site-specific recombination, *Saccharomyces cerevisiae*

1H16-2 出芽酵母における *SEDI* 遺伝子を介した高糖濃度耐性機構の解析

○中川 洋史, 千葉 寛志, 早川 正幸, 飯村 稔
(山梨大院・医工総合・生命)

【目的】酵母に高糖濃度耐性を付与する技術は産業上非常に有用であるが、未だ確立されていない。演者らは、糖タンパク質 Sed1p を高発現させることで出芽酵母の高糖濃度耐性能が向上すること、*SEDI* が定常期における高糖濃度耐性に必要であること、ワイン酵母や清酒酵母等の *SEDI* 遺伝子コード領域の長さが醸造環境特異的に異なること、を既に明らかにしている。しかし、高糖濃度耐性における *SEDI* の役割や、*SEDI* 遺伝子多型の生理的意義については不明である。そこで本研究では、*SEDI* による高糖濃度耐性メカニズムの解明、及び *SEDI* の多型が高糖濃度耐性に与える影響について解析することを目的とした。【方法及び結果】Sed1p については最近、細胞壁だけでなくリボソームやミトコンドリアにおける役割も報告されている。そこで、Sed1p が細胞壁を介して高糖濃度耐性を付与しているか否かを調べるために、Sed1p の細胞壁への局在に必要な *KRE6* 遺伝子の破壊株を構築し、*SEDI* 高発現の効果調べた。その結果、*Δkre6* 株においては、*SEDI* を高発現しても高糖濃度耐性とならなかった。従って、Sed1p は細胞壁に局在することで高糖濃度耐性に重要な役割を果たすことが明らかになった。一方、各種酵母における *SEDI* の構造を解析したところ、顕著な高糖濃度耐性を示すワイン酵母 OC2 株の Sed1p は実験室酵母の Sed1p よりも、3 個のシステイン残基を含む 51 アミノ酸のリピード構造が 1 つ多いことが示唆された。現在、このような *SEDI* の多型が高糖濃度耐性に与える影響を様々な方法で検討している。

Analysis of high sugar tolerance mediated by *SEDI* in *Saccharomyces cerevisiae*

○Youji NAKAGAWA, Hiroshi CHIBA, Masayuki HAYAKAWA, Yuzuru IIMURA
(Dept. Biotech., Grad. Sch. Med. Eng., Univ. Yamanashi)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, *SEDI*, high sugar tolerance, polymorphism

1H16-1 出芽酵母の嫌気的な増殖に関わる遺伝子の探索

○末廣 大輔, 星田 尚司, 赤田 倫治
(山口大・工・応化工)

酒類の醸造や燃料用エタノールの生産に使われている酵母のアルコール発酵は嫌気的に行われる。我々は、この酵母の嫌気的な増殖に必要な遺伝子を探索することを目的に、遺伝子破壊株セットを用いてゲノムワイドスクリーニングを行った。方法は生存に必須な遺伝子を除く、約 4800 の遺伝子がそれぞれ破壊された株を YPD プレート上にスポットし、嫌気バックを用いて嫌気状態にした後、培養温度 28℃ で 5 日間、静置培養した。そして、嫌気的増殖に対して感受性を示した株について解析した。その結果、*DRS2* や *ATP1* を含む、8 つの遺伝子を取得した。その中でも特にパントテン酸の運搬に関わる *FEN2* 遺伝子が強い感受性を示した。実際に嫌気的な増殖にはパントテン酸を弱いながら要求することが分かった。さらに他のビタミン類についても同様に検討した結果、前述したパントテン酸の以外にピオチン、ナイアシン、及びチアミンが酵母の嫌気的な増殖に必要であり、なかでも、チアミンは特に強い要求性を示した。

Screening of genes required for anaerobic growth in yeast

○Daisuke SUEHIRO, Hisashi HOSHIDA, Rinji AKADA
(Dept. Appl. Chem. & Chem. Eng., Fac. Eng., Yamaguchi Univ.)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, anaerobic growth, *FEN2*, vitamins

1H16-3 多重遺伝子破壊による乳酸耐性出芽酵母の育種

○杉山 峰崇¹, 石田 亘広², 阪本 貴俊¹, 金 連姫¹, 神戸 浩美³, 小畑 充生³, 金子 嘉信¹, 高橋 治雄², 原島 俊¹
(¹阪大院・工・生命先端, ²豊田中研, ³トヨタ自動車・パイオラボ)

本研究では、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* による L-乳酸発酵¹⁾ の更なる生産収率向上を期待して、乳酸に耐性となる *SEDI*、*DSE2*、*SCW11*、及び *EAF3* 単一遺伝子破壊変異を組み合わせ、L-乳酸に対して超耐性を示す酵母の育種を目的とした。このため、*DSE2* と *SCW11* を *kanMX* と *CgLEU2* マーカーで破壊した α 型株を作製した。一方、*a* 型株においては *SEDI* と *EAF3* を *zeocine^r* と *CgHIS3* マーカーで破壊した。次に、これら 2 つの二重破壊株を交雑して四分子分析を行い、15 種の全ての組み合わせの破壊株を構築した。乳酸耐性を調べたところ、幾つかの多重破壊株では、これまで野生型株では生育が見られなかった 8% 乳酸添加培地においても生育が見られた。更に、6% 乳酸添加培地での増殖を調べた結果、4 重破壊株が最も短い誘導期を示すことが明らかとなり、これまでにない乳酸耐性酵母を育種できたことがわかった。1) Ishida, N. et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, p1964 (2005)

Breeding of L-lactic acid tolerant strains of *Saccharomyces cerevisiae* by multiple gene disruptions

○Minetaka SUGIYAMA¹, Nobuhiro ISHIDA², Takatoshi SAKAMOTO¹, Yeon-Hee KIM¹, Hiromi KANBE³, Shusei OBATA³, Yoshinobu KANEKO¹, Haruo TAKAHASHI², Satoshi HARASHIMA¹
(¹Dept. Mat. Life Sci., Osaka Univ., ²Toyota Cent. R&D Labs. Inc., ³Bio Res. Lab., Toyota Motor Corp.)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, L-lactic acid production