

**1Jp13 清酒酵母の胞子形成能に関する研究**

○鈴木 太郎<sup>1,2</sup>, 井内 智美<sup>1</sup>, 前家 直樹<sup>1,2</sup>, 赤尾 健<sup>1</sup>, 渡辺 大輔<sup>1</sup>, 下飯 仁<sup>1,2</sup>  
 (酒類研,<sup>2</sup>広島大院・先端・生命機能)  
 simoi@nrib.go.jp

## &lt;背景及び目的&gt;

清酒醸造に用いられている清酒酵母は胞子形成能が非常に低く、1倍体の取得に多大な手間を要する。本研究では、代表的な清酒酵母であるきょうかい7号(以下K7)を用い、その原因を検討した。

## &lt;方法及び結果&gt;

ノーザン解析の結果、K7では減数分裂初期遺伝子 *IME1* および *IME2* が発現していない事が分かったが、これらの遺伝子の発現に関与すると考えられている。 *RIM15* は K7でも発現していた。しかし、ゲノム解析の結果から K7型の *RIM15* はフレームシフトにより C 末端が欠失していることが明らかにされており、機能不全が疑われた。そこで、K7において実験室酵母に由来する正常な *RIM15* を発現させ、*RIM15* と K7 の低胞子形成能との関係について解析を行った。その結果、正常な *RIM15* を発現させた K7 ではわずかながら胞子形成能が回復した。また、K7 の 1 倍体と実験室酵母 BY4742 の交配株が高い胞子形成率を有することから、K7 の低胞子形成能は実験室酵母の遺伝子で補補可能な劣性変異に起因することが示唆された。そこで、251 個の胞子形成関連遺伝子の破壊株と K7 1 倍体とを交配させて胞子形成能を調べることで、原因遺伝子のスクリーニングを行なった。その結果、K7において、*RTF1* の機能不全が疑われた。そこで、正常な *RIM15* 及び正常な *RTF1* を K7 に導入し胞子形成率を測定したところ、胞子形成率が 7.6%まで回復した。しかし、形成された胞子を分離してもほとんどコロニーを形成しなかったことから、K7では導入した 2 遺伝子の他にも正常な胞子形成に必要な遺伝子が欠損していることが示唆された。

**Identification of genes involved in defective sporulation in sake yeast K7**

○Taro Suzuki<sup>1,2</sup>, Tomomi Inai<sup>1</sup>, Naoki Maeya<sup>1,2</sup>, ken Akao<sup>1</sup>, Daisuke Watanabe<sup>1</sup>, Hitoshi Simoi<sup>1,2</sup>  
 (Natl. Res. Inst. Brewing,<sup>2</sup>Dept. Mol. Biotech., Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)

**Key words** sake yeast, sporulation, RIM15, RTF1

**1Jp16 清酒もろみから分離したリンゴ酸高生産清酒酵母の特性**

○大場 孝宏<sup>1</sup>, 末永 光<sup>1</sup>, 中山 俊一<sup>2</sup>, 満生 慎二<sup>3</sup>, 北垣 浩志<sup>4</sup>  
 (福岡県工技セ・生物食品研,<sup>2</sup>東農大・応生科・醸造,<sup>3</sup>九産大・工,<sup>4</sup>佐賀大)  
 ooba@fitc.pref.fukuoka.jp

**【目的】**我々は酒質の多様化を目指し、清酒もろみから爽やかな酸味を示すリンゴ酸の生産性が増大した酵母の取得を行ってきた<sup>1)</sup>。さらに、取得したリンゴ酸高生産酵母についてその特性解明やリンゴ酸高生産性の原因を探るために、DNAマイクロアレイを用いた遺伝子発現解析を行っている<sup>2)</sup>。今回、リンゴ酸及びピルビン酸代謝に関わる酵素活性について比較検討したので報告する。

**【方法・結果】**我々が保有する清酒もろみから分離したリンゴ酸高生産酵母 10 株のうち、16BY7-6 株と親株である K901 を使用した。供試菌株について YM-10 液体培地で静置培養を行い、菌体の酵素活性の測定を行った。リンゴ酸高生産酵母 16BY7-6 株と親株である K901 についてリンゴ酸またはピルビン酸代謝に関わる酵素活性の比較を行なったところ、16BY7-6 株において pyruvate carboxylase 及び malate dehydrogenase 活性が上昇していた。また、pyruvate decarboxylase 活性が低下していた。pyruvate carboxylase はピルビン酸からオギザロ酢酸への変換に、malate dehydrogenase はオギザロ酢酸からリンゴ酸への変換に関わる。以上のことから、16BY7-6 株ではピルビン酸からオギザロ酢酸を経てリンゴ酸が作られる経路が活性化されることでより多くリンゴ酸が生成されるのではないかと推察した。

1)大場ら：醸造協会誌, 103, 949-953(2008)

2)田中ら：日本農芸化学会2009年度大会要旨集P104

**Property of high malic acid-producing *Saccharomyces cerevisiae* isolated from sake mash**

○Takahiro Oba<sup>1</sup>, Hikaru Suenaga<sup>1</sup>, Shunichi Nakayama<sup>2</sup>, Shinji Mitsuiki<sup>3</sup>, Hiroshi Kitagaki<sup>4</sup>  
 (Biotech. and Food Research Institute, Fukuoka Industrial Tech. Center,<sup>2</sup>Dept. Ferment. Sci., Tokyo Univ. Agric.,<sup>3</sup>Fac. Eng., Kyushu Sangyo Univ.,<sup>4</sup>Saga Univ.)

**Key words** *Saccharomyces cerevisiae*, malic acid, enzyme activity

**1Jp15 ストレス応答遺伝子の改変を利用したバイオエタノール高生産株の作製と機能解析**

○井内 智美<sup>1</sup>, 周延<sup>1</sup>, 渡辺 大輔<sup>1</sup>, 赤尾 健<sup>1</sup>, 高木 博史<sup>2</sup>, 下飯 仁<sup>1</sup>  
 (酒類研,<sup>2</sup>奈良先端大・バイオ)  
 simoi@nrib.go.jp

**【目的】**近年、バイオマスを利用したバイオエタノール生産が、化石燃料にかかる次世代型エネルギーとして注目されている。バイオエタノールの発酵生産過程において、酵母は様々な環境ストレスにより増殖や有用機能が制限される。従って、ストレスへの適応が、効率良いバイオエタノール生産に重要であると考えられる。本研究では、ストレス応答に関与する遺伝子を改変した実用酵母を作製し、廃糖蜜でバイオエタノールを高生産する株の同定とそのメカニズムの解析を行なった。

**【方法と結果】**バイオエタノール実用酵母(NCYC3233)から取得した一倍体株を用いて、ストレス応答に関与する遺伝子をセルフクローニング法により破壊し、廃糖蜜中の発酵が良くなる株の探索を行なった。その結果、破壊により発酵速度が上昇する遺伝子の一つとして、定常期への移行に必要なプロテインキナーゼをコードする *RIM15* を取得した。この発酵速度の上昇は、高温および高濃度廃糖蜜条件下では検出できなかった。廃糖蜜培地における発酵時の増殖を調べたところ、*rim15* 破壊株では増殖停止時の細胞数が親株より多く、定常期への移行が遅延していると考えられた。また、廃糖蜜内の糖の消費速度を調べたところ、Glucose の消費は、親株と *rim15* 破壊株ではほぼ同様に生じていたが、Sucrose の消費速度が *rim15* 破壊株で早まった。以上より、*rim15* 破壊株では定常期への移行の欠損に起因する細胞増殖停止時期の遅れにより、発酵が良くなると考えられた。

**Identification and functional analysis of stress response genes that enhance bioethanol production in *Saccharomyces cerevisiae***

○Tomomi Inai<sup>1</sup>, yan Zhou<sup>1</sup>, Daisuke Watanabe<sup>1</sup>, Takeshi Akao<sup>1</sup>, Hiroshi Takagi<sup>2</sup>, Hitoshi Shimoi<sup>1</sup>  
 (Natl.Res.Inst.Brewing,<sup>2</sup>Grad.Sch.Biol.Sci.,NAIST)

**Key words** bioethanol, stress response

**1Jp17 清酒の老香主要成分 Dimethyl Trisulfide (DMTS) の前駆物質生成に関与する出芽酵母メチオニン再生経路遺伝子の解析**

○若林 興<sup>1,2</sup>, 磯谷 敦子<sup>1</sup>, 渡辺 大輔<sup>1</sup>, 藤田 晃子<sup>1</sup>, 須藤 茂俊<sup>1,2</sup>  
 (酒類研,<sup>2</sup>広島大院・先端・生命機能)  
 m105178@hiroshima-u.ac.jp

**【目的】** DMTS は清酒の貯蔵劣化臭である老香に大きく寄与している。DMTS の生成を抑制することが出来れば、清酒の品質安定性の向上が期待できる。これまでに清酒の DMTS の主な前駆物質として 1,2-dihydroxy-5-(methylsulfinyl) pentan-3-one (DMTS-P1) が同定された。DMTS-P1 は発酵中に増加することや、メチオニン再生経路の代謝中間体と構造が類似していることから、酵母メチオニン再生経路が DMTS-P1 生成に関与する可能性が推察された。そこで本研究では、出芽酵母非必須遺伝子破壊株セットを用いて DMTS-P1 の生成に関与する遺伝子について検討した。

**【方法・結果】**実験室酵母 BY4743 株におけるメチオニン再生経路遺伝子の破壊株 13 株を用いて総米 83g の清酒小仕込試験を行なった。19 日後に上槽し、LC/MS 解析により製成酒中の DMTS-P1 濃度を測定した。また、製成酒を 70℃ 1 週間貯蔵した後に生じる DMTS 量(DMTS 生成ポテンシャル)を GC/MS 解析により測定した。その結果 *Amr1*, *Amd1*, *Ame1* 遺伝子破壊株で DMTS-P1 の顕著な減少がみられた。このうち、*Amr1*, *Amd1* 破壊株では DMTS 生成ポテンシャルも親株に比べて大きく減少したことから、老香低減のための酵母育種のターゲットとして有効であると考えられた。現在、清酒酵母でも同様の現象がみられるか確認するため、きょうかい7号酵母を用いて、*Amr1*, *Amd1* 遺伝子破壊株の構築を行なっている。

**Analysis of the methionine salvage pathway genes of *Saccharomyces cerevisiae* responsible for dimethyl trisulfide (DMTS) precursor formation**

○Kou Wakabayashi<sup>1,2</sup>, Atsuko Isogai<sup>1</sup>, Daisuke Watanabe<sup>1</sup>, Akiko Fujita<sup>1</sup>, Shigetoshi Sudō<sup>1,2</sup>  
 (Natl. Res. Inst. Brewing,<sup>2</sup>Dept. Mol. Biotech., Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)

**Key words** dimethyl trisulfide, yeast, methionine salvage pathway