The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

112 ウレア非生産性醸造用酵母の分子育種 ---異種遺伝子を持たない CAR1遺伝子破壊株の取得---

(醸試、*現所属関東信越国税局)
北本勝ひこ、○小田佳緒子*、五味勝也、熊谷知栄子

1) 目的 多くの酒類中に見いだされている微量有害成分エチルカーバメイト (ECA) の前駆物質ウレアは、酵母のアルギナーゼ遺伝子 (CAR1) の破壊により生産されなくなることは既に報告した[1),2)]。

しかし、近い将来酒類についての組換え体利用ガイドラインが制定され酒造場での実用化が可能となった時、食品の製造に大腸菌配列を含む酵母を使用することは望ましくない。そこで今回酵母以外の異種遺伝子を含まない CAR1 遺伝子破壊株の分子育種を試みた。

2) 方法 ⊿CAR1 を持つプラスミド pCAT-3 及び pCAT-4 を作製し、そのいずれかにより清酒酵母協会9号及びワイン酵母を形質転換し、CAR1 遺伝子破壊株のみが生育可能な CAO 培地[3)] (ｶﾅﾊﾞﾆﾝ 10 ppm、ｱﾙｷﾞﾆﾝ 0.21%、ｵﾙﾆﾁﾝ 0.84%、ｲｰｽﾄﾅｲﾄﾛｼﾞｪﾝﾍﾞｰｽ(窒素源ﾌﾘｰ) 1.7%、ｸﾞﾙｺｰｽ 2%、寒天 2%) を利用して CAR1 遺伝子破壊株を取得した。

3) 結果 清酒酵母協会9号及びワイン酵母からそれぞれ 0.9／μgDNA 及び 0.5～2.0／μg DNA の頻度でアルギナーゼ遺伝子破壊株を取得した。これらの株はアルギニン単一N源培地では生育できずオルニチン単一N源培地では生育可能でかつ細胞内アルギナーゼ活性も検出されなかった。さらにこれらの遺伝子破壊株のうち清酒酵母を用いて総米 200 g の小仕込試験を行ったところ、得られた清酒のウレア含量は 0 ppm であった。

1) 北本、小田、五味、高橋、平成元年度醸造学会要旨集、No12
2) 小田、北本、五味、高橋、平成元年度発酵工学大会要旨集、P 172
3) 北本、小田、五味、熊谷、平成2年度醸造学会要旨集、No6

Molecular breeding of sake and wine yeasts producing no urea.
----Isolation of *CAR1* gene disruptants without heterozygous gene----

Katsuhiko Kitamoto, Kaoko Oda, Katsuya Gomi and Chieko Kumagai
(National Research Institute of Brewing, Takinogawa, Kita-ku, Tokyo 114)

113 染色体依存キラー *KHR* 遺伝子の分泌ベクターとしての利用

(醸試) ○福田 央・後藤邦康・安河内重人・小幡孝之・西谷尚道

(1)目的 酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の染色体依存キラー遺伝子 *KHR* の産物であるトキシンは培地中に分泌されキラー性を示す。その性質及び遺伝子の構造については既に報告を行っている。[1)2)] この遺伝子の構造解析の結果、N-末部分に特徴的なシグナル配列を持ち、そのプロモータを含めた分泌ベクターとしての利用について、レポーター遺伝子として渋谷ら[3)] により分離された *Aspergillus shirousamii* のグルクアミラーゼ遺伝子の相補的DNA(以下cGA)を用い検討を行った。

(2)方法 pUCベクター上に存在する *KHR* 遺伝子を含む *Sal*I-*Bam*HI 断片(4.7kbp)を *Eco*R V分解し、*KHS* 遺伝子のプロモータ及びシグナル配列を含む1.7kbpを残し、cGAの *Ava* I 分解によりシグナル部分を除いた構造遺伝子と *A. shirousamii* のターミネーターを含む約2.3kbp断片をフレイム枠が合うようにklenow酵素で修復し、連結し、多コピーベクターYEp24 の *Eco*R I部位に挿入し、ベクター上の *URA3* 標識を利用し、酵母 *S. cerevisiae* CG378(*ade5 can1 leu2-3 leu2-112 trp1-289 ura3-52 gal*) を形質転換し、その発現を見た。さらに、この分泌ユニットをYCpまたはYRpベクターにつなぎ変え、それらの発現量の差について検討を加えた。GA活性は国税庁所定分析方に基づき測定した。

(3)結果 GAの発現量は YEpベクターに挿入した場合、0.54U/mlと渋谷らの報告する ADHプロモータとGA本来の分泌シグナルを利用した場合と同等の発現量を示し、分泌される蛋白質にはSDS-PAGEの結果から糖鎖が付加していることが予測された。また、コピー数の低下すると言われる YRp・YCpベクターの順に活性は低下した。

1) *Agric. Biol. Chem* 54, 505(1990) 2) ibid. 54, 979(1990) 3) ibid. 54, in printing(1990)

Secretion vector derived from *KHR* killer gene of *Saccharomyces cerevisiae*

○Hisashi Fukuda, Kuniyasu Goto, Shigeto Yasukouchi, Takaji Obata and Takamichi Nishiya (National Research Institute of Brewing)

NII-Electronic Library Service