

細胞融合法によって育種した凝集性酵母 (KZ6f) はEDTAの添加により分散し、カルシウムイオンの添加により再凝集することから、凝集に関与する遺伝子としてFLO1及びFLO5が考えられた。そこで、熱処理及び α -キモトリプシン処理の凝集性に対する影響を検討した。その結果、KZ6fは熱処理では凝集性に影響がみられなかったものの、 α -キモトリプシン処理では凝集性が消失するため、凝集性に関与する遺伝子はFLO1であると考えられた。

そこでFLO1の塩基配列をインターネット上で検索し、そのプライマーの設計・合成を行い、PCR法によって各種酵母のFLO1のスクリーニングを行った。その結果、親株として用いた清酒酵母及び非凝集性株 (KZ6n) にはPCR増幅産物を認めなかったが、醤油主発酵酵母及び凝集性株 (KZ6f) にはPCR増幅産物が明らかに認められた。また、PCR産物の制限酵素による解析から、このPCR産物がFLO1であることが確認された。そのため、融合株の凝集性は醤油主発酵酵母由来の遺伝子FLO1の発現によるものであり、これは融合時の染色体DNAの融合と分配等によりその制御遺伝子が影響を受けたために発現していることが示唆された。

また、PCR産物からFLO1をpUC18及びYEp13にサブクローニングを試みたが、FLO1の欠損及び形質転換株の生育不良が認められた。そのため、FLO1遺伝子を他の酵母種に導入するためには、他の大腸菌宿主やベクターを用いて酵母ベクターを構築する必要があると考えられた。

1. はじめに

細胞融合法による発酵微生物の育種・改良は清酒醸造、醤油醸造などの伝統的発酵食品産業においても応用されはじめている。これら伝統的発酵食品産業での発酵微生物の育種・改良においては、その醸造で使用する麹菌や酵母を対象としており、とりわけ酵母の改良は製品の生産効率の向上、香り成分や呈味成分の改良に大きく関与するため、その育種目標は多岐にわたっている。

酵母等の発酵微生物の育種・改良は従来から行なわれてきた突然変異誘導法をはじめ、細胞融合法(プロトプラスト融合法)、遺伝子組換え技術等によって様々なニーズに対応可能となってきた。また、これらバイオテクノロジーを応用した発酵微生物の育種・改良技術では、発酵微生物が従来持っていなかった形質を付与できるため、より広範囲な発酵微生物の改良が可能である。

一方、酵母の凝集性はビール醸造において重要なキーポイントとなっており、その凝集、沈降の度合いがビールの品質に大きく影響している(下面発酵)こ

とから、これまで多くの研究がなされてきた。また、酵母の凝集性はビール醸造のみならず、アルコール生産などの発酵工業や廃水処理での利用が期待されており、その凝集機構の解明や発酵プロセスの設計分野等の研究も盛んである。さらに、凝集性酵母の利用は清酒醸造時などの醪のろ過性の向上やバイオリアクターでの固定化担体の吸着能の向上が見込まれ、この酵母の利用は産業的に見て有益であると考えられる。

当センターでは、平成5年度に凝集性酵母の育種を清酒酵母と醤油主発酵酵母とのプロトプラスト融合法により行ない、強い凝集性を有する酵母(融合株)を得た²⁾。また、この凝集性酵母はこれまでの研究において多孔質セラミック担体への吸着能の向上が認められ、バイオリアクターでの発酵速度を向上させることが明らかとなった。しかしながら、この融合株は香り成分生成能や呈味成分、生育速度、発酵速度において親株の有用な形質を欠損している可能性が示唆された。これは、融合株を得る際に遺伝子マーカーとして栄養要求性を付与するために行った変異処理により、有用な形質を与えている遺伝子を傷つ

けたためだと考えられた。

そこで本研究では、親株の有する有用な遺伝子を傷つけることなく、新たな形質を付与できる遺伝子組換え技術を応用し、凝集性を有する酵母の育種法について検討を行うことを目的として、その凝集遺伝子のクローニングを行った。

2. 実験方法

2-1. 使用菌株、培地及びベクター

融合株は平成5年度に育種した凝集性を有するKZ6fと凝集性を有さないKZ6nを用いた。また、親株のK-9-27及び*Zygosaccharomyces rouxii* SS, さらに、*Saccharomyces cerevisiae* A, *S. cerevisiae* B, *S. cerevisiae* AH22, ビール酵母のEDME, 清酒酵母の協会7号, 9号酵母を用いた。これら菌株の培養にはYPD培地(1%酵母エキス, 2%ペプトン, 2%グルコース)を用い、30℃で振盪培養を行った。

また、大腸菌株(*Escherichia coli* JM109)はFLO1のクローニングの際に用い、これを50 μ g/mlのアンピシリンを含むLB培地(0.8%トリプトン, 0.5%酵母エキス, 0.5% NaCl)で生育させた。

凝集遺伝子のクローニングにはpUC18(宝酒造)及びYEp13(東京大学幸野先生より分与)を用いた。

2-2. 酵母凝集活性の測定

酵母を定常期までYPD培地にて一晩前培養を行い、これを新たなYPD培地に1/50量添加し、30℃で18時間振とう培養を行った。得られた培養液をボルテックスミキサーで10秒間攪拌し、ただちにそのOD₆₆₀を測定した。さらに、この培養液を5分間静置した後測定して得られた測定値で先の測定値を除いたものを凝集活性とした。

2-3. 凝集性酵母の熱処理及び α -キモトリプシン処理

熱処理及び α -キモトリプシン処理は、Hodgsonらの方法³⁾に従った。すなわち、酵母を定常期までYPD培地にて一晩前培養を行い、これを新たなYPD培地に1/50量添加し、30℃で18時間振とう培養を行った。得られた培養液を殺菌した脱イオン水で2回洗浄し、これに3 mM 硫酸カルシウムを含む50mM 酢酸ナトリウム緩衝液、pH4.5(テスト緩衝液)に懸濁した。この懸濁液を70℃のウォーターバス中で2時間熱処理を行い、そのまま凝集活性を測定した。また、 α -キ

モトリプシン処理は洗浄した菌体を50mM EDTAを含む50mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH7.5に懸濁し、これに α -キモトリプシンを100 μ g/mlとなるよう添加し、37℃で2時間処理を行った。その後、再び菌体を洗浄し、これをテスト緩衝液に懸濁して凝集活性を測定した。

2-4. 凝集遺伝子FLO1のクローニング

酵母の全DNAの抽出はカレントプロトコール⁴⁾に従って行い、得られたDNAを鋳型としてPCR反応を行った。PCR反応は宝酒造(株)のPCR Amplification Kitを用い、Perkin-Elmer 480 thermalcyclerでDNAの二本鎖解離を94℃、1分間、アニールを55℃、2分間、相補鎖合成を62℃、5分間とし、30サイクルで行った。また、プライマーはABI DNA synthesizer mod1 392によって合成し、未精製のまま反応に用いた。プライマーの配列はそれぞれ5'-GGTACTACCG-TGACGGAGAATACGTAGGCT-3'(FLO1LOFOR)と5'-TCAAGTACTGCGTGTGGCATGTGCAGCAGA-3'(FLO1LOREV)で、これらをそれぞれ50pmol反応に用いた。

得られたPCR産物は0.7%アガロースゲル電気泳動法により確認した。また、増幅が認められたものについてはEcoRIにより消化し、T4リガーゼ反応によってFLO1断片をpUC18に連結した。このプラスミドをCaCl₂法によって*E. coli* JM109に形質転換し、構築したプラスミドを増幅した。さらに、得られたプラスミドをBamHIで消化し、その消化断片をYEp13に連結し、これを*E. coli* JM109に形質転換した。

3. 結果及び考察

3-1. KZ6fの凝集遺伝子

KZ6fの凝集遺伝子を同定するために、Tween80, SDS, 2-メルカプトエタノール及びEDTAに対する、凝集活性の変化について検討を行った。その結果、Tween80, SDS及び2-メルカプトエタノールでは全く凝集活性に変化がなかったのに対し、10mMのEDTA処理では凝集性が消失し菌体が完全に分散することがわかった(表-1)。また、この凝集性はCa²⁺イオンの再添加により回復したことから、KZ6fの凝集に関与する遺伝子としてFLO1及びFLO5の関与が考えられた³⁾。FLO1とFLO5による凝集性の相違はHodgsonらが報告しており³⁾、両者遺伝子での凝集性には熱安

表-1 薬剤処理による凝集活性の変化

処 理	凝集活性
無 処 理	3.24
1.0% SDS	3.16
1.0% Tween 80	3.33
1.0% 2-Mercaptoethanol	3.08
10mM EDTA	1.00

定性と α -キモトリプシン安定性に差が認められる。

そこで、KZ6fの凝集遺伝子を決定するために、熱処理及び α -キモトリプシン処理した後の凝集活性を測定した(図-1)。KZ6fの凝集性は熱処理によってはほとんど消失しないものの、 α -キモトリプシン処理では消失することがわかった。このような性質はFLO1由来の性質であり、KZ6fの凝集性はFLO1の発現によるものだと考えられた。

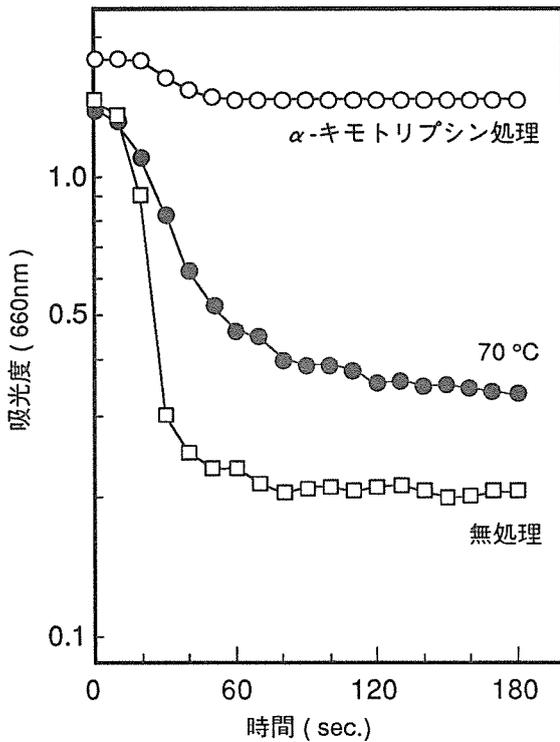


図-1 処理細胞と無処理細胞の凝集活性の変化

3-2.FLO1のPCR法によるスクリーニング

KZ6fに凝集性を付与している遺伝子はFLO1であると考えられたが、融合に用いた両親株はどちらも非凝集性株である。このことは、両親株ではFLO1の発現がないことを示しており、遺伝子の解析を行う以外に凝集性の獲得要因は解明できない。しかしながら、当研究室の遺伝子解析ソフトのデータベースにはFLO1の塩基配列は掲載されていなかったため、

インターネットを利用しSGD (Saccharomyces Genome Database)よりFLO1の塩基配列を検索し、この結果を基にプライマーの合成を行った。

当研究室保存の酵母菌株を含め、PCR法によりFLO1のスクリーニングを行った結果が写真-1である。

S. cerevisiae B, AH22, KZ6f及びKZ6fの片方の親株であるZ. rouxii SSにはおよそ5 kbの増幅産物が認められ、これら菌株がFLO1を有することが確認された。また、非凝集性となったKZ6nには増幅産物は認められず、この遺伝子の有無が凝集性と非凝集性との違いに寄与していることが認められた。したがって、融合株KZ6fの凝集性の発現は融合によるFLO1の獲得と核融合・再分配によるFLO1制御遺伝子の獲得(FLO1の発現を行う遺伝子の場合)または欠損(FLO1の発現を抑制する遺伝子の場合)によるものであると考えられた。

また、ビール酵母のEDMEではFLO1よりも若干小さいところに増幅産物のバンドが認められ、FLO1と相同性のある遺伝子の存在が示唆された。

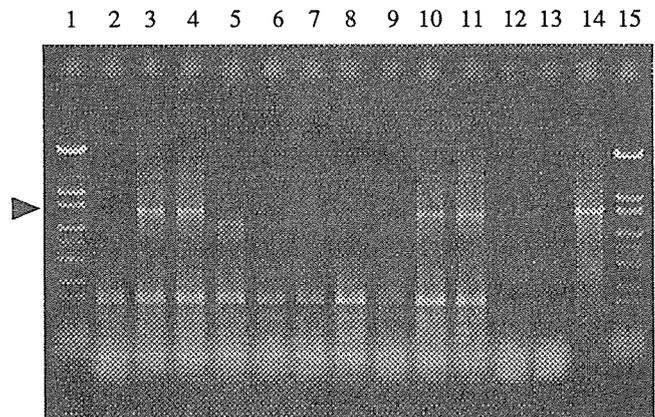


写真-1 FLO1遺伝子のPCR法によるスクリーニング
 レーン1,15;分子量マーカー,レーン2; Saccharomyces cerevisiae A, レーン3; S. cerevisiae B, レーン4; S. cerevisiae AH22, レーン5; EDME, レーン6; K-7, レーン7; K-9, レーン8; K-9-27, レーン9; KZ6n, レーン10; KZ6f, レーン11; Zygosaccharomyces rouxii SS, レーン12; Z. rouxii STI, レーン13; Z. rouxii KS, レーン14; control

三角で示したバンドがFLO1の増幅産物

3-3.FLO1のクローニング

凝集遺伝子FLO1の分子育種への応用から、この遺伝子のクローニングについての検討を行った。図-2にその過程を示した。PCR増幅産物にはFLO1領域の両端にEcoRI切断位置があり、この切断位置を利用す

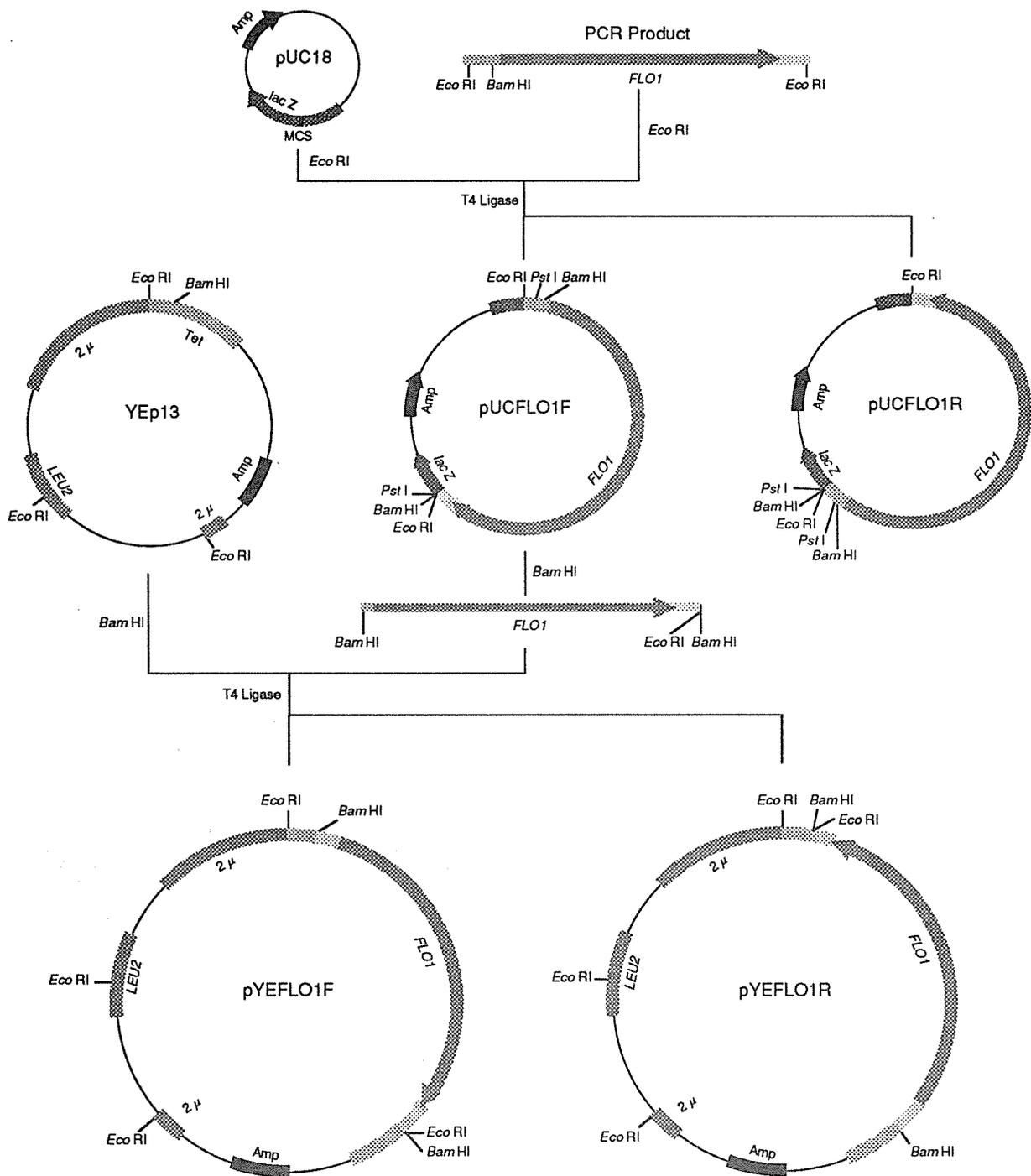


図-2 *FLO1* 遺伝子のクローニング

ることにより容易に*FLO1*をクローニングできると考えられた。そこで、pUC18のマルチクローニングサイト(MCS)に*FLO1*を挿入し、*E. coli* JM109に形質転換を行った。

得られた形質転換株を任意に36株選択し、*FLO1*挿入断片を有するプラスミドを検索したところ1株に目的のプラスミドが導入されていることがわかった(写真-2)。しかしながら、このプラスミドは*FLO1*にデリージョンが起きているものが約半数存在してお

り、サッポロビールのワタリが報告⁹⁾しているように*FLO1*の安定性が悪いことがわかった。また、このデリージョンは培養時間を長くすると、ほとんどのすべてのプラスミドで起きることがわかった(データ示さず)。

そこで、得られたプラスミド(約半数がデリージョンを起こしている)で*E. coli* JM109を再び形質転換し、安定性の増したコロニーの検出を行った。形質転換した*E. coli* JM109は大きいコロニーと小さいコロ

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17

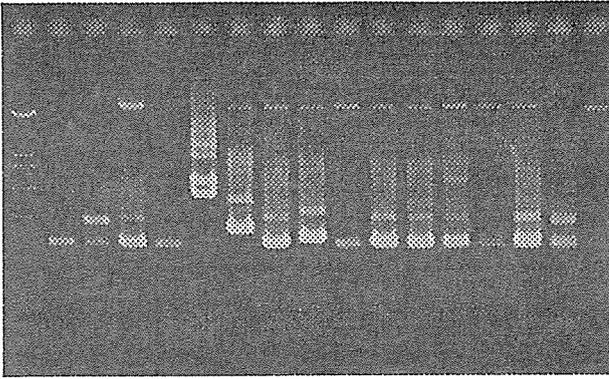


写真-2 構築プラスミドのスクリーニング

レーン1；分子量マーカー、レーン2～17；*E. coli* JM109 形質転換株、三角で示したレーン6のバンドが*FLO1*が挿入されたpUC18 (pUCFLO1R) DNAのバンド。その下方にあるのがデリベーションを起こしたプラスミドDNAのバンド。

ニーが出現し、小さいコロニーにデリベーションを起こしていないプラスミドが存在することがわかった。この得られたプラスミドの制限地図を作成したところ*FLO1*遺伝子の向きが逆向き (pUCFLO1R) であったため、このプラスミドを再び*EcoRI*で切断し、そのままT4リガーゼ反応を行い*E. coli* JM109に形質転換した。得られた形質転換株よりプラスミドを抽出し、*FLO1*遺伝子の向きが正向きになったプラスミドを得、これをpUCFLO1Fと命名した。

得られたプラスミドは大腸菌ベクターを使用しておりこのままでは酵母に形質転換できないため、*FLO1*遺伝子を酵母ベクターのYEp13へサブクロニングすることとした。構築したpUCFLO1Fを*Bam*HI消化し、その*FLO1*断片を回収した。これをYEp13に連結し*E. coli* JM109に形質転換したが、出現した形質転換株は少なく、*FLO1*断片が挿入されたプラスミドを得ることは出来なかった。これは*FLO1*遺伝子が挿入されたプラスミドと宿主との相性が悪く、*FLO1*遺伝子が挿入されることによって、宿主細胞の生育

が阻害されるためであると考えられた。そのため、pYEFLO1F及びpYEFLO1Rの構築には、他の大腸菌宿主を用いるか、*FLO1*遺伝子の挿入部位を変更する必要があると考えられた。

4. おわりに

平成5年度に細胞融合法によって育種した凝集性酵母KZ6fは片方の親株である醤油主発酵酵母*Zygosaccharomyces rouxii* SS由来の*FLO1*の発現により凝集性を示していることが、遺伝子の解析から明らかとなった。また、非凝集性融合株KZ6nにこの遺伝子が存在しないことや両親株に凝集性がないことから、KZ6fでは融合による*FLO1*の獲得とその制御遺伝子の獲得または欠損がおり*FLO1*遺伝子の発現が引き起こされたものだと考えられた。この*FLO1*は大腸菌*E. coli* JM109での安定性が悪く、酵母ベクターへの導入には遺伝子の導入位置や宿主大腸菌の選択が重要になるものと考えられた。

最後に、本研究でご助言を賜りました工業技術院生命工学工業技術研究所の小山芳典主任研究官及び藤田篤主任研究官に深く感謝いたします。

5. 参考文献

- 1) 秋山裕一 (監修) "酵母のニューバイオテクノロジー" 医学出版センター (1990)
- 2) 江口良寿, 小金丸和義, 増田照雄, 坂田宗章, 加藤富民雄 "研究報告書" 佐賀県工業技術センター (1994)
- 3) J. A. Hodgson, D. R. Berry and J. R. Johnston, *J. Gen. Microbiol.*, 131, 3219 (1985)
- 4) JOHN WILEY & SONS "CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY" UNIT 13.11.1 (1989)
- 5) J. Watari, Y. Takata, M. Ogawa, N. Nishikawa and M. Kamimura, *Agric. Biol. Chem.*, 53, 901 (1989)