

凝集性酵母リアクターによる発酵食品の連続生産に関する研究

—凝集性遺伝子のクローニングと他種酵母での発現—

化学食品部 食品技術研究室
江口良寿, 小金丸和義
増田照雄, 坂田宗章

細胞融合法によって育種した凝集性融合株 (KZ6f) からその凝集性に関与している遺伝子 *FLO1* のクローニングを行い, 得られた遺伝子を酵母実験室株 *Saccharomyces cerevisiae* AH22 株, 清酒酵母の協会 7 号, 9 号酵母及び醤油主発酵酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* に形質転換を行った。酵母実験室株の形質転換株では *FLO1* の発現が認められ, 強い凝集性を示したことから育種した融合株の凝集性は単一遺伝子 *FLO1* の発現によることが証明された。しかしながら, 清酒酵母の形質転換株は弱い凝集性しか示さず, 遺伝子発現が抑制されていることが示唆された。したがって, 平成 5 年度に育種した KZ6f の凝集性は醤油主発酵酵母由来の *FLO1* の導入によるものであり, KZ6f が強い凝集性を有するのは, 融合時の染色体 DNA の融合と再分配等により, 協会 9 号酵母由来の *FLO1* 抑制遺伝子が欠損したためであることが強く示唆された。

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, 香気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), 遺伝子組換え技術などによって行われている。とくに, 細胞融合法や遺伝子組換え技術を応用した発酵微生物の育種・改良は, 発酵微生物が従来持っていなかった形質を新たに付与できるため, より広範囲な発酵微生物の改良が可能となる。

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ことから, これまで多くの研究がなされてきた²⁾。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^{もろ}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³⁾。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⁴⁾。しかしながら, 一方ではこの融合株は香気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ことが示唆された。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に起きたものと考えられた⁵⁾。

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い, 他の酵母へ導入して凝集性酵母の育種を試みたので報告する。

2. 実験方法

2.1 使用菌株, 培地及びベクター

凝集性株は平成 5 年度に育種した KZ6f を用いた。また, 形質転換の宿主として酵母実験室株 (*Saccharomyces cerevisiae* AH22), 協会 7 号, 9 号酵母及び醤油主発酵酵母 (*Zygosaccharomyces rouxii*) 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°C で振とう培養を行った。また, 酵母実験室株の形質転換体の

選択には SD-his 培地 (0.67% Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acid, 50µg/ml ヒスチジン, 2 % グルコース) を用いた。

また, 大腸菌株 (*Escherichia coli* JM109, JM83, DH5, HB101) は *FLO1* のクローニング及びサブクローニングの際に用い, これを 50µg/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及びサブクローニングには pUC18 (宝酒造), pUC4K (ファルマシアバイオテック) 及び YEp13 (東京大学幸野先生より分与) を用いた。

2.2 酵母染色体組込み型ベクターの構築

塩化セシウム平行密度勾配遠心法により精製した YEp13 及び pUC4K を制限酵素 *Sal*I で完全消化後, pUC4K はアガロースゲル電気泳動法により DNA 断片を分離し, 約 1.3kbp の DNA 断片 (G418 耐性遺伝子) のみを回収した。これらを, フェノール・クロロホルムによって除タンパクした後等モルになるよう混合し, DNA Ligation Kit Ver.1 (宝酒造) の操作方法に従い 16°C, 16 時間連結反応を行った。この反応液をフェノール・クロロホルム抽出して精製後, 大腸菌 (*E. coli* JM109) に形質転換し, アンピシリン及びカナマイシン耐性となった形質転換株よりプラスミド DNA を回収した。このプラスミドの制限酵素解析を行い, YEp13 の 2 µm plasmid replicon が除去され G418

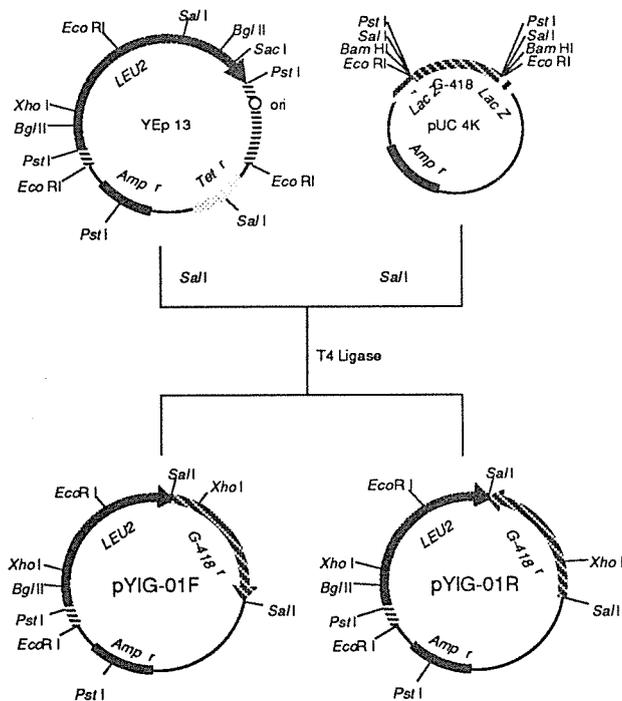


図1 染色体組込み型ベクターの構築

耐性遺伝子が *LEU2* 遺伝子と同じ向きに挿入されたプラスミドを pYIG-01F, 逆向きに挿入されたプラスミドを pYIG-01R と命名し, 以下の実験に用いた (図1)。

2.3 凝集遺伝子 *FLO1* のクローニング

凝集遺伝子 *FLO1* のクローニングは平成7年度研究報告書³⁾に記載した方法に従って行った。

2.4 酵母ベクターと凝集遺伝子 *FLO1* の連結

塩化セシウム平行密度勾配遠心法により精製した pUCFLO1F⁴⁾ を制限酵素 *Bam*HI で完全消化後, アガロースゲル電気泳動法により DNA 断片 (*FLO1* 遺伝子) を分離し, 約 5kbp の DNA 断片のみを回収した。YEp13 (プラスミド型) をベクターとした場合は, これを制限酵素 *Bam*HI で消化後, フェノール・クロロホルムで精製し, 先の *FLO1* と等モルずつ混合し, DNA Ligation Kit Ver.1 (宝酒造) の操作方法に従い 16°C, 16 時間連結反応を行った。また, 染色体組込み型の pYIG-01F と pYIG-01R の場合は, これらを制限酵素 *Bgl*II で消化後, YEp13 と同様に連結反応を行った。これらの反応液を大腸菌に形質転換し, アンピシリン耐性になった形質転換株よりプラスミド DNA を回収した (図2, 3)。

2.5 構築プラスミドの酵母菌体への導入

酵母菌体への構築プラスミドの導入は CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY に記載している方法⁶⁾で行った。すなわち, 酵母実験室株, 協会7号, 9号酵母及び醤油主発酵酵母を YPD 培地で一晚振とう培養し, これを新たな YPD 培地に 1/100 容添加し, 吸光度 (OD₆₆₀) が 0.25 になるまで 30°C で振とう培養を行った。培養後その 1.5ml をエッペンドルフチューブにとり, これを 2,000rpm, 2 分間の遠心分離を行い菌体を集菌し, これを 0.2M 酢酸リチウム溶液にて 2 回洗浄した。洗浄した菌体に連結反応後フェノール・クロロホルム処理して精製したプラスミド溶液と 1.0M 酢酸リチウム溶液を添加し, 30°C で 10 分間 DNA の吸着を行った。これに, 70% PEG 溶液を添加し, 30°C, 1 時間の反応を行った。反応後, この反応液全量を SD-his 培地 (実験室株) または YPD 培地 (清酒酵母) に添加し, 30°C で振とう培養を行った。菌体生育後, 培養液を 5 分間静置し, 浮遊している菌体を除去後新たな培地を添加し, さらに 30°C で振とう培養を行った。この操作を 5 回 (実験室株) から 9 回 (清酒酵母) 繰り返し, 凝集性になった酵母を観察した。

2.6 凝集活性の測定

形質転換株の凝集活性は, 平成5年度研究報告書³⁾

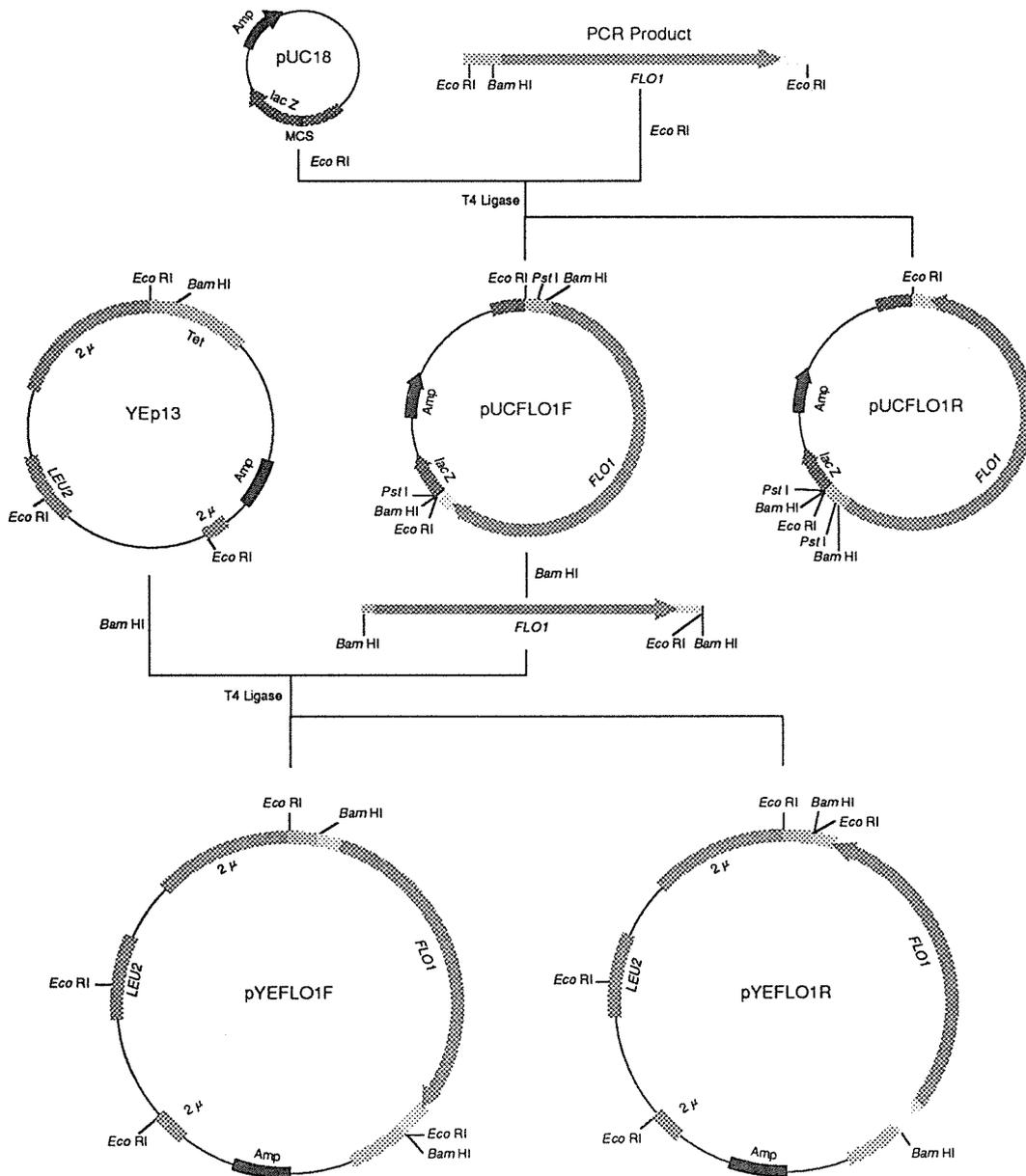


図2 FLO1のクローニングとキメラプラスミド (プラスミド型) の構築

に記載した方法に従った。また、目視法による凝集活性の測定はHodgson *et al.*⁷⁾の方法に従い、0から4までの5段階評価とした。これは、0が非凝集性、4が強い凝集性を有することを意味している。

3. 結果及び考察

3.1 FLO1のサブクローニング

前年度にYEpl3へのFLO1のサブクローニングについて検討したが、大腸菌を宿主とした場合にはFLO1に欠損が起き、完全長のFLO1を有するキメラプラスミドは得られなかった^{5b)}。そこで今年度は、大腸菌宿主を変えて検討を行ったが、検討したすべての大腸菌 (*E. coli* JM109, JM83, DH5, HB101) でキ

メラプラスミドは得られなかった。これは、FLO1の繰返し配列が大腸菌体内での複製を阻害しているか、生産されたFLO1タンパク質が菌体表面の膜組成に変化を与え、その生育を阻害している可能性が考えられた。したがって、FLO1遺伝子を有するキメラプラスミドの構築は、大腸菌を宿主として出来ないことがわかった。

3.2 酵母実験室株へのFLO1の形質転換

FLO1と酵母ベクターとの連結反応後のキメラプラスミドを直接酵母実験室株へ形質転換することにより、プラスミド型、染色体組込み型の両方で凝集性を有する形質転換体が得られた。これらの形質転換株のうちプラスミド型で得られた形質転換体は、ほぼ

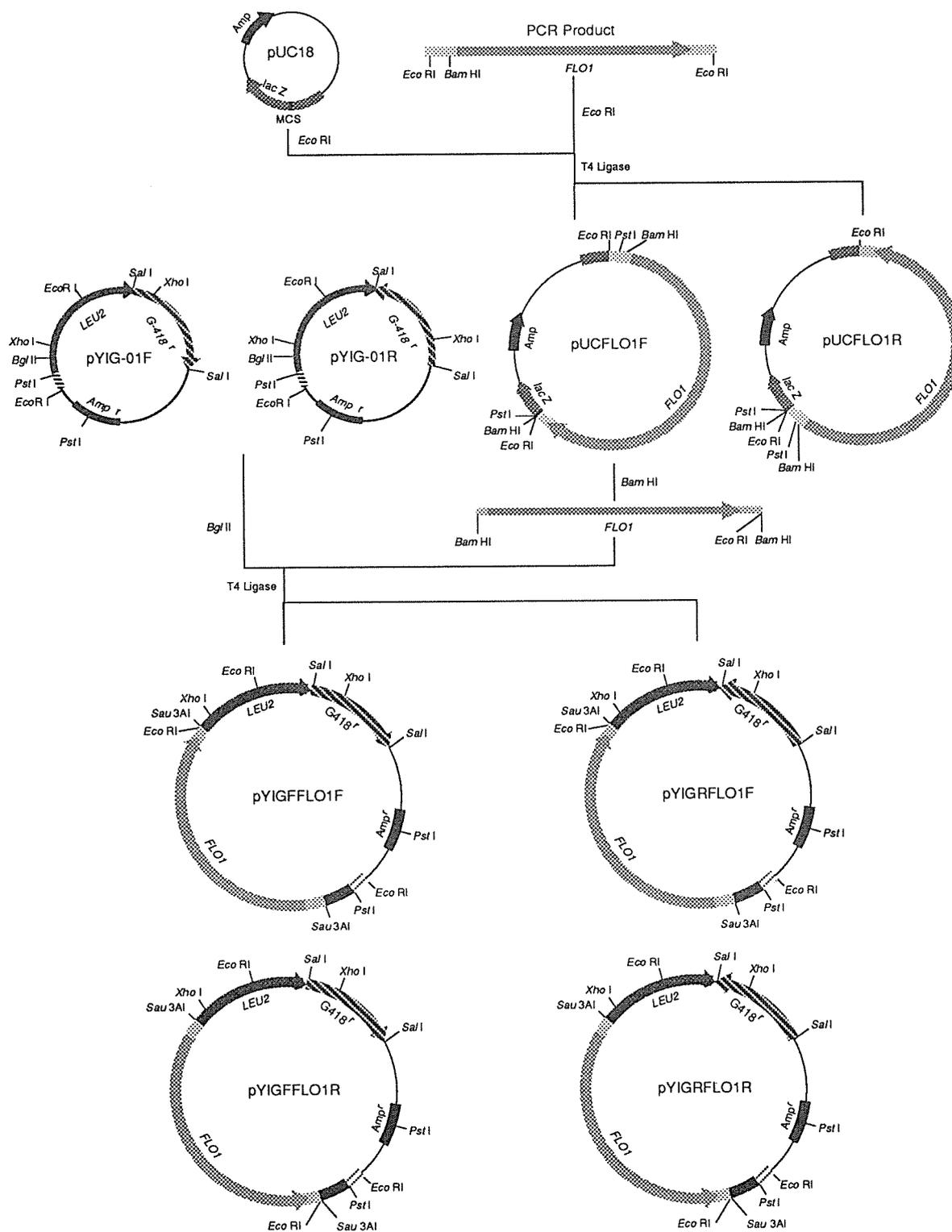


図3 *FLO1* のクローニングとキメラプラスミド（染色体組込み型）の構築

KZ6fと同程度の凝集活性を示したが、染色体組込み型で得られた形質転換体は若干その凝集活性が弱くなっていた(図4)。これは、宿主の*S. cerevisiae* AH22が*FLO1*を有しているにもかかわらず凝集性を示さないことから、*S. cerevisiae* AH22には*FLO1*の発現を抑

制している遺伝子が存在し、これが新たに導入した*FLO1*の発現をも抑制していることが考えられた。そのため、1コピーしか遺伝子を導入できない染色体組込み型では多コピーのプラスミド型より*FLO1*の発現量が少なく、結果として凝集活性に変化がみられ

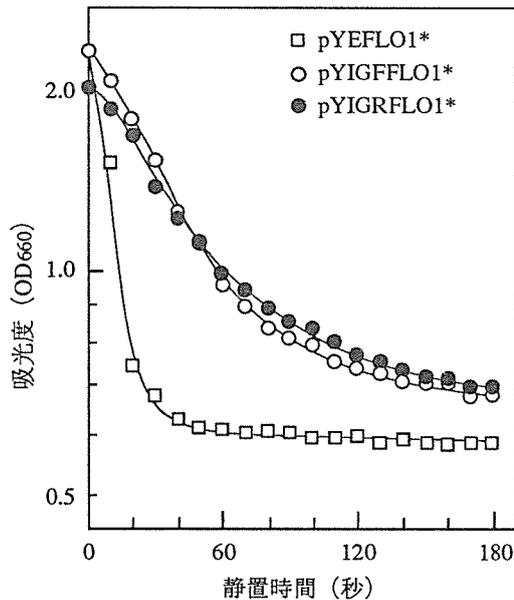


図4 *Saccharomyces cerevisiae* AH22 株
形質転換体の凝集速度

* プラスミドの *FLO1* の向きは不明

たものと考えられる。しかしながら、構築したすべてのキメラプラスミドの導入で凝集性となった形質転換株が得られたことから、凝集性が単一遺伝子の *FLO1* のみで発現していることが証明された。また、染色体組込み型でG418耐性遺伝子の向きのみが互いに異なるベクター (pYIG-01F と pYIG-01R) を使用しても、これらの形質転換体の凝集活性には変化がなく (図4, 表1), 凝集活性にはG418耐性遺伝子の向きは影響しないことがわかった。

3.3 清酒酵母への *FLO1* の形質転換

構築したキメラプラスミドは実用酵母で機能できる遺伝子マーカーを持たないため、協会7号及び9号酵母での形質転換は染色体組込み型のみを行い、凝集性をその指標として形質転換体の選抜を行った。協会7号、9号酵母の形質転換体はどちらも、双方の構築プラスミドで凝集性を示し、*FLO1* の発現が確認された。しかしながら、これらの形質転換体の凝集活性は実験室株酵母と比較して非常に弱く (表1), 凝集塊を形成することは出来なかった。また、凝集性が非常に不安定であり、凝集性を欠損した形質転換体も高頻度に出現することがわかった。これは、実験室酵母が1倍体なのに対して、清酒酵母は2倍体以上の高次倍数体であるため、相同染色体の一方にのみ *FLO1* が挿入され、細胞分裂の際に付加された遺伝子群が分配されずに脱落していることが考えられる。また、KZ6fの親株の協会9号酵母を宿主とした形質転換株で凝集活性がKZ6fより小さいのは、清酒酵母

表1 形質転換体の凝集活性

宿主	プラスミド*	凝集活性**
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> AH22	pYEFLO1	4
〃	pYIGFFLO1	3
〃	pYIGRFLO1	3
協会7号酵母	pYIGFFLO1	1
〃	pYIGRFLO1	1
協会9号酵母	pYIGFFLO1	1
〃	pYIGRFLO1	1

* プラスミドの *FLO1* の向きは不明

** 凝集活性は目視による5段階評価
(KZ6fは4, 協会9号酵母は0)

に *FLO1* の発現を抑制している遺伝子が存在し、この遺伝子が *FLO1* の充分量の発現を抑制したために生じていることが考えられた。

したがって、平成5年度に育種したKZ6fは親株である *Zygosaccharomyces rouxii* SS由来の *FLO1* が細胞融合により付加されたことと、協会9号酵母由来の *FLO1* の発現を抑制している遺伝子が核融合、再分配の過程で欠損したために、*FLO1* が充分量発現したことによって凝集性を示すようになったことが強く示唆された。

3.4 醤油主発酵酵母への *FLO1* の形質転換

構築したキメラプラスミドは醤油主発酵酵母で機能できる遺伝子マーカーを持っていないため、これも染色体組込み型のみを形質転換した。しかしながら、醤油主発酵酵母では凝集性となった株は得ることが出来なかった。これは、清酒酵母と同じ条件で形質転換処理を行っており、強い耐塩性を有する醤油主発酵酵母の細胞外膜構造が清酒酵母とは大きく異なっているために、遺伝子そのものが入らなかったことが予測された。そのため、醤油主発酵酵母への形質転換には新たに条件を設定する必要があると考えられる。

4. おわりに

平成5年度に細胞融合法によって育種したKZ6fは親株である醤油主発酵酵母 *Z. rouxii* SS由来の *FLO1* の発現及び協会9号酵母由来の *FLO1* 制御遺伝子の欠損によって凝集性を獲得したことが遺伝子解析により明らかとなった。この *FLO1* は多くの大腸菌株内での安定性が悪く、酵母菌体内への *FLO1* の導入には、大腸菌での構築プラスミドの増幅を行わず、遺伝子の連結後直接形質転換することが有効であった。

得られた酵母形質転換体はいずれも凝集性を示し、

凝集能が*FLO1*単一遺伝子で発現することが証明された。しかしながら、これら形質転換株の凝集性の安定性や強度は親株に比較して弱く、この解決が今後の検討課題となった。また、醤油主発酵酵母においては遺伝子導入が出来ず、導入条件の再検討が必要であると考えられた。

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先生及び藤田先生に感謝します。

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) A.H.Rose & J.S.Harrison, *The Yeasts* 2, 165 (1987)
- 3) 江口良寿, 小金丸和義, 増田照雄, 坂田宗章, 加藤富民雄 ” 佐賀県工業技術センター平成5年度研究報告書 ” p.27 (1994)
- 4) 江口良寿, 小金丸和義, 増田照雄, 坂田宗章 ” 佐賀県工業技術センター平成6年度研究報告書 ” p.19 (1995)
- 5) 江口良寿, 小金丸和義, 増田照雄, 坂田宗章 ” 佐賀県工業技術センター平成7年度研究報告書 ” p.31 (1996)
- 6) JOHN WILEY & SONS ” CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY ” UNIT 13.11.1 (1989)
- 7) J. A. Hodgson, D. R. Berry and J. R. Johnston, *J. Gen. Microbiol.*, 131, 3219 (1985)
- 8) J. Watari, Y. Takata, M. Ogawa, N. Nishikawa and M. Kamimura, *Agric. Biol. Chem.*, 53, 901 (1989)