

1P-180 Rapamycin を用いた産業用酵母株のフローサイトメーターによる倍数性調査方法について

○三木 健夫, 村松 昇
(山梨大・生命環境)
takemiki@yamanashi.ac.jp

これまで、産業用酵母の倍数性については、アルギニン要求性および芽胞形成能と発芽率の調査ならびに四分子解析を並行して行う等により調査する方法が用いられてきた。しかし、これらの方法は経験値あるいは顕微鏡およびマニピュレーター等の高い操作技術を必要とされることや、いずれの方法も直接、染色体 DNA 量を測定するプロセスを含まないため二倍以上の細胞を測定することは難しいとされてきた。

本研究では、フローサイトメーターを用いて酵母の倍数性をより明確に解析する方法について検討した。研究室酵母を G1 期に停滞させる化合物である Rapamycin を用い、2 倍体であることが報告されている *Saccharomyces cerevisiae* OC-2 および W-3 株、さらに、野生酵母株 (3 株) を処理し、フローサイトメーターによる解析を行った。結果、ラパマイシン処理により産業用および野生酵母においても G1 期での停滞が観察されることがわかった。また、フローサイトメーターによる解析結果から、従来の方法と比較して、ラパマイシン処理により倍数 (2n,4n) を示すピークが明確に検出されるようになったことから、酵母の倍数性を従来よりも正確に推定できると考えられた。

Estimation in several industrial yeast strains ploidy by flow cytometer with rapamycin.

○Takeo Miki, Noboru Muramatsu
(Facul. Life and Environ. Sci., Yamanashi Univ.)

Key words yeast, flow cytometry, ploidy, rapamycin

1P-182 麹から分離した細菌と酵母によるフェルラ酸 /p- クマル酸の揮発性フェノール類への変換

○金桶 光起, 渡邊 健一
(新潟県醸試)
kaneoke.mitsuoki@pref.niigata.lg.jp

【目的】酒類の香は品質を決める重要な要素であり、異臭があると品質を下げる。ワイン等で問題となる 4- ビニルグアイアコール、4- エチルグアイアコール等の揮発性フェノール類 (POF) に由来する異臭が清酒においても発生するが、発生原因について我々の報告 1,2) 以外、詳細な研究はない。清酒中での POF 発生の原因を解明することを目的とし検討を行い若干の知見を得たので報告する。

【方法】麹を県内酒造会社から採取した。フェルラ酸 (FA) /p- クマル酸 (CA) および POF の分析を HPLC を用いて行った。麹および分離した細菌 / 酵母の POF 生成活性を FA/CA 含有緩衝液中で行った。

【結果】麹の細菌数と POF 生成活性、清酒中の FA 濃度と POF 量に高い相関があった。分離した *Pichia* 属は、高い POF 生成活性があり、FA/CA をそれぞれ 4- エチルグアイアコール /4- エチルフェノールに分解した。POF 生成活性の高い麹での小仕込試験により製成酒中に高い 4-VG 生成を確認したことより、POF は麹中の細菌 / 酵母により生産されることが明らかとなった。

- 1) 日本生物工学会大会講演要旨集 平成 21 年度, 91, 2009-08-25
- 2) 日本生物工学会大会講演要旨集 平成 22 年度, 96, 2010-09-25

Bioconversion to volatile phenols of Ferulic acid/p-Coumaric acid by Bacteria and Yeast isolated from Koji

○Mitsuoki Kaneoke, Ken-ichi Watanabe
(Niigata Pref. Sake Res. Inst.)

Key words Ferulic acid, p-Coumaric acid, 4-Vinylguaiaicol, 4-Ethylguaiaicol

1P-181 LOH を利用した 2 倍体焼酎酵母遺伝子破壊システム構築

○迎 麻菜美¹, 吉崎 由美子², 奥津 果優², 高峯 和則², 二神 泰基², 玉置 尚徳²
(¹鹿大院・農, ²鹿大・農)
noritama@ms.kagoshima-u.ac.jp

【背景と目的】焼酎製造に用いられる酵母は 2 倍体であり、1 倍体である胞子を形成しにくいという特徴をもつ。そのため、形質転換によって 2 つある相同染色体上の片方の遺伝子に変異を導入しても、もう片方の相同染色体上の遺伝子は正常なまま残っているため表現型としては現れにくい。そのため焼酎酵母の形質を変化させるためには相同染色体上の両方の対立遺伝子に変異を導入しなければならない。本研究では、破壊カセットと LOH という現象に着目し、繰り返し利用可能な焼酎酵母の遺伝子破壊システムを構築することを目的とした。LOH とは Loss of Heterozygosity (ヘテロ接合性消失) の略称で、相同染色体間での組換えによりヘテロな遺伝子座位がホモとなる現象である。

【方法】焼酎酵母のゲノムを鋳型とし、PCR によって破壊カセットを作成した。この破壊カセットには、リジン生成に関与する遺伝子 *LYS5* の両側にウラシル生成遺伝子 *URA3* をオーバーラップする領域を持たせて二分割したものを付加し、さらに分割した *URA3* の両方の外側に相同な配列をもたせた。本破壊カセットを用いて焼酎酵母 (*ura3Δ/ura3Δ lys5Δ/lys5Δ* 株) を形質転換し *LEU2* を破壊した。

【結果と考察】本破壊カセットによる *LEU2* の 2 重破壊株を取得した。また破壊カセット内の相同な配列間での組み換えにより相同領域の内側が抜け落ちるループアウトという現象を利用することで、*LEU2* ダブルループアウト株を取得することができた。現在はこの株を用いて *ADE2* など他の遺伝子破壊を進めている。

Construction of the gene disruption system in shochu yeast using LOH

○Manami Mukae¹, Yumiko Yoshizaki², Kayu Okutsu², Kazunori Takamine², Taiki Futagami², Hisanori Tamaki²
(¹Grad. Sch. Agric., Kagoshima Univ., ²Fac. Agric., Kagoshima Univ.)

Key words shochu yeast, LOH

1P-183 醤油酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* の不快臭生成メカニズム

○渡部 潤, 上原 健二, 茂木 喜信
(ヤマサ醤油)
j_watanabe@yamasa.com

【目的】*Zygosaccharomyces rouxii* は醤油醸造においてアルコールや様々な香気成分を生成する重要な微生物である。しかし、一部の株は産膜形成に伴い不快臭成分 (イソ酪酸やイソ吉草酸) を生成することで醤油の品質を著しく損う。そこで本研究では、この不快臭生成機構を明らかにし、不快臭制御のための知見を蓄積することを目的とした。

【結果】様々な培養条件を検討した結果、産膜形成株は分岐鎖アミノ酸を含む培地での好気培養において、産膜形成に必須な *FLO11D* 非依存的に、不快臭成分を生成した。*Z. rouxii* の *BAT1* (分岐鎖アミノ酸と α - ケト酸との相互変換を触媒する酵素遺伝子) 破壊株はバリン・イソロイシンを要求したが、興味深いことに *Saccharomyces cerevisiae* のそれとは異なり、ロイシン非要求性であった。そこで、*BAT1* と共にロイシン代謝に関与する遺伝子を探した結果、*BAT1 ARO8* の 2 重破壊によりロイシン要求性が付与されることを見出した。この 2 重破壊株は親株と同様に産膜を形成したが、不快臭成分の生成は著しく減少していた。以上の結果から、産膜形成株が生成する不快臭成分は、エーリッヒ経路を介して醤油中の分岐鎖アミノ酸から生成されると推定された。また、産膜形成は細胞を好気条件に置くことで間接的に不快臭生成に寄与していると考えられた。

Mechanism of unpleasant odor generation in *Zygosaccharomyces rouxii*

○Jun Watanabe, Kenji Uehara, Yoshinobu Mogi
(Yamasa Corp.)

Key words *Zygosaccharomyces rouxii*, flor, unpleasant odor, soy sauce