

清酒酵母の育種と醸造特性評価

馬場嵩一郎

2022年

目次

第1章 緒言	4
第2章 清酒酵母 Y52 株の泡なし 変異株の取得	10
第1節 緒言	11
第2節 実験材料と方法	12
第1項 使用菌株と培地	12
第2項 高泡形成能の判別試験	13
第3項 清酒酵母 Y52 株の泡なし変異株の取得	13
第4項 小仕込試験	14
第5項 製成酒サンプルの成分分析	15
第6項 取得株の実製造利用	15
第3節 実験結果及び考察	16
第1項 Y52 株の泡なし変異株の取得	16
第2項 小仕込試験	18
第3項 悠々知酔の製造	21
第3章 シンクロトロン照射法による香気成分高生産株の取得	23
第1節 緒言	24
第2節 実験材料と方法	25
第1項 使用菌株と培地	25
第2項 シンクロトロン照射法による変異誘発実験	26
第3項 カプロン酸エチルおよび酢酸イソアミル高生産株のスクリーニング	27
第4項 麹エキス培地による選抜株の発酵試験	28
第5項 小仕込試験	28
第6項 製成酒サンプルの成分分析	28
第7項 主成分分析とクラスター解析	29
第8項 Whole genome sequencing と比較ゲノム解析	29
第9項 塩基配列のアクセッションナンバー	30
第3節 実験結果及び考察	30
第1項 シンクロトロン照射法による変異誘発処理	30
第2項 カプロン酸エチルおよび酢酸イソアミル高生産株のスクリーニング	31
第3項 変異株の醸造特性	34
第4項 シンクロトロン照射により導入される変異パターン	42
第4章 有明海からの酵母の分離と 醸造適性評価	47
第1節 緒言	48
第2節 実験材料と方法	50

第1項	使用菌株と培地.....	50
第2項	有明海干潟泥からの酵母の分離.....	50
第3項	塩基配列解析による分離酵母の同定.....	51
第4項	染色体DNAの抽出およびパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE)	52
第5項	分離酵母のキラール性試験	53
第6項	小仕込試験.....	53
第7項	製成酒サンプルの成分分析	53
第8項	主成分分析および統計解析	53
第3節	実験結果及び考察	54
第1項	有明海からのエタノール高生産性を有る酵母菌の分離.....	54
第2項	塩基配列解析による分離酵母の同定.....	55
第3項	パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) による分離酵母の核型解析	58
第4項	分離酵母のキラール性試験	60
第5項	小仕込試験による分離した <i>S. cerevisiae</i> 5株の醸造特性評価.....	60
第5章	リンゴ酸高生産株の育種	70
第1節	緒言	71
第2節	実験材料と方法.....	73
第1項	使用菌株と培地.....	73
第2項	変異誘発処理とコハク酸ジメチル感受性株のスクリーニング	73
第3項	麴エキス培地による発酵試験	74
第4項	総米 80 g 三段小仕込試験.....	74
第5項	製成酒サンプルの成分分析	74
第6項	主成分分析および統計解析	74
第7項	総米 1 kg 三段小仕込試験.....	74
第8項	清酒醸造での実製造利用	75
第3節	実験結果及び考察	76
第1項	リンゴ酸高生産変異株のスクリーニング	76
第2項	総米 80 g 小仕込試験でのリンゴ酸高生産変異株の醸造特性評価.....	77
第3項	総米 1 kg 小仕込試験でのリンゴ酸高生産変異株の醸造特性評価.....	82
第4項	リンゴ酸高生産酵母の実製造利用	86
第6章	リンゴ酸高生産性に関与する変異遺伝子の推定	87
第1節	緒言	88
第2節	実験材料と方法.....	90
第1項	使用菌株とプラスミド	90
第2項	Whole genome sequencing と比較ゲノム解析.....	93
第3項	YM10 試験.....	94

第 4 項	酵母菌の形質転換.....	95
第 5 項	H3-1 株および DMSS233 株の遺伝子破壊株の構築.....	95
第 6 項	酵母細胞からのトータル RNA の抽出.....	96
第 7 項	Realtime RT-qPCR による発現量解析.....	96
第 8 項	H3-1 株および DMSS233 株のウラシル要求性株の構築.....	97
第 9 項	プラスミド URA3/YEGAp の構築.....	97
第 10 項	DAL7 過剰発現株の構築.....	98
第 11 項	KanMX-GFP-MDH3 および HphMX-GFP-MDH3 挿入株の構築.....	98
第 12 項	GFP 融合型 Mdh3p の局在観察.....	100
第 3 節	実験結果及び考察.....	112
第 1 項	H3-1 株と DMSS233 株の比較ゲノム解析.....	112
第 2 項	ナンセンス変異遺伝子のリンゴ酸高生産性への関係.....	112
第 3 項	リンゴ酸高生産性に関与するリンゴ酸生合成遺伝子の推定.....	114
第 4 項	ミスセンス変異遺伝子のリンゴ酸高生産性への関係.....	120
第 5 項	DAL7 過剰発現株のリンゴ酸生産能の評価.....	124
第 6 項	H3-1 株および DMSS233 株における GFP 融合型 Mdh3p の局在解析.....	126
第 7 章	総括.....	135
	謝辞.....	139
	参考文献.....	140

第 1 章 緒言

清酒は米を原料とする我が国が誇る醸造酒であり、日本人になじみ深い酒類である。しかし、清酒の製成数量は、1973年の1,421千kLをピークに平成25年度は444千kLとピーク時の約1/3まで減少したり。一方、2013年に和食がユネスコの無形文化遺産に登録され、世界的に和食が認知されたことを追い風とし、海外への清酒の輸出数量は年々増加傾向にあり、清酒メーカーは海外に市場の拡大を図っており、国内市場は清酒を含む様々な酒類と差別化を図るために自社の商品開発に取り組んでいる。

清酒醸造は、黄麹菌 *Aspergillus oryzae* による米デンプンの糖化と 清酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* によるアルコール発酵が同一のタンク内で並行して行われる。この製造法は並行複式発酵と呼ばれ²⁾、単発酵で行われるワイン醸造や単行複式発酵で行われるビール醸造など、他の醸造酒製造との大きな違いである。

清酒醸造において、酵母菌は麹菌が生成する酵素により米デンプンから分解されたグルコースをエタノールに変換するだけでなく、吟醸香成分や有機酸など製成酒の香味に寄与する成分を生産する働きを担う。このことから、清酒メーカーの酵母の選択は商品の品質に直結するとともに、新商品開発の大きなポイントである。

清酒酵母は、1895年に古在と矢部が清酒モロミから酵母を分離し³⁾、1897年に矢部が分離酵母に *Saccharomyces sake* と命名して発表した⁴⁾ことが始まりである。その後、1931年に Steling-Dekker により、上記の *S. sake* (Yabe) は *S. cerevisiae* に分類されたが⁵⁾、清酒酵母は、日本独特のものでありビール酵母とは異なっているとの考えから清酒酵母の特性を明らかにする研究が始まったとされている⁶⁾。

ところで、酒造税は国税収入の税収の上位であったことから、国策として醸造業の支援を図るため、大蔵省管轄下において1904年に醸造試験所が設立された。醸造試験所は、近代以前の偶然性に頼った酒造りに「科学的再現性」をもたらし、生産性及び品質の向上を目的とした試験研究を行い、1909年に山卸廃止酏を、1910年に速醸酏を考案した。さらに、酒造技術の向上を目的とし、1911年には第1回全国新酒鑑評会を開催し、そこで客

観的に優秀と評価された清酒造りに用いられた酵母を醸造協会（後の日本醸造協会）が分離・純粋培養し、清酒酵母の実用化へとつながった⁷⁾。

協会1号酵母は、灘の櫻正宗より分離・頒布されたのが始まりであり、以来優良な清酒酵母は協会番号が順次付され、現在では泡なし酵母である協会酵母1901号まで至り、全国各地の清酒醸造に使用されている。

微生物の育種や改良は、物理的処理⁸⁾や化学的処理⁹⁾による突然変異を起こさせる方法または性的交雑¹⁰⁾を行い、目的とした形質を有した株を選抜する方法によって行われてきた。その他に遺伝子組換え¹¹⁾やプロトプラスト細胞融合¹²⁾など遺伝子工学的手法を用いた育種改良が行われているが、遺伝子組換え食品に対する消費者の理解などの問題からこれらの手法で育種された株の普及はされていない。

清酒業界においても、実用酵母の育種は盛んに行われ、醸造工程の高効率化を目的とした泡なし酵母の分離¹³⁾、優良酵母の純度をあげ、安全醸造を目的としたキラ酵母の開発¹⁴⁾、清酒中のアミノ酸の減少とエタノール収量の向上を目的としたエタノール耐性酵母の育種が行われた。現在、泡なし株は協会601号、701号、901号、1001号、1401号、1501号、1601号、1701号、1801号及び1901号酵母が、エタノール耐性酵母は協会11号が頒布されている。また、海外輸出の際に規制値が設けられているカルバミン酸エチルの低減を目的とし、カルバミン酸エチルの前駆物質である尿素の清酒中含有量を低減させるための尿素低生産性酵母の開発¹⁵⁾、木香様臭やつわり香などピルビン酸を前駆物質とするオフフレーバーの低減を目的としたピルビン酸低生産性酵母の育種¹⁶⁾などが行われてきた。尿素低生産性酵母は、KArg9、KArg901及びK1901号が、ピルビン酸低減性酵母は『協会酵母低ピルビン酸低生産性酵母7号』が、それぞれ日本醸造協会より頒布されている。

一方、協会酵母と全く異なるタイプの清酒酵母を探索するために、地方公設試験場や大学や企業は自然にある花や果実に付着している菌を集積培養し、そこから醸造適性の高い

酵母を選抜する試み¹⁷⁾が行われており、産学官で清酒の多様化・差別化に取り組んでいる。

上述のように、清酒酵母の育種改良は日本醸造協会ならびに全国の産学官で活発に行われてきた。この清酒酵母の育種改良の歴史の上で、泡なし酵母の開発と実用化は最も輝かしい成果のひとつである。清酒酵母は清酒醪の高泡形成能の有無により、泡あり酵母と泡なし酵母に分類できる。高泡とは清酒醪に特有な現象で、醪の初期から中期にかけて醪上部に泡の層が形成されることである。これは細胞表層が疎水性である泡あり酵母と炭酸ガスの気泡が疎水結合することにより、気泡表面に酵母細胞が付着することが原因である¹⁸⁾。元来の清酒醸造において、清酒醪上部の高泡の外観の変化は発酵管理の最大の指標とされてきた¹⁹⁾。また、清酒の伝統的な酒母製法である生酏づくりの製造過程において、蔵付きの乳酸菌と清酒酵母が共存し、最終的には清酒酵母が優占化することが知られている^{20, 21)}。生酏づくりで泡なし酵母を使用した場合、その細胞表層の性質により、乳酸菌とバイオフィーム形成が生じやすくなることで²²⁻²⁴⁾、乳酸菌の死滅が抑制され、腐造につながることを考えられる²⁵⁾。このような背景から、清酒醸造の歴史では長年、優良酵母として泡あり酵母を選定してきた背景があった。しかしながら、科学技術の発達や分析機器の普及により、醪ろ液の成分分析値が醪管理の最大の指標と変遷したこと、1910年に速醸酏が開発されて以来、簡便で短期間で製造可能な速醸酏が酒母製法の主流となったことから、泡あり酵母を使用するデメリットが浮き彫りになった。

泡あり酵母を使用した製造では高泡層が生じることを想定して、泡消し機の設置や発酵タンクへの仕込み容量を減らす必要がある。また、泡あり酵母は泡の層での菌密度が大きくなるため、こまめ攪入れにより、栄養源の豊富な醪内部へ酵母を押し込む必要がある。さらに、高泡形成時に激しい気温の低下が生じると、泡の層が冷え込み、酵母にストレスがかかることで発酵経過が鈍化する恐れもある。このような背景から、現在、酒造会社で

使用される清酒酵母の多くは泡なし酵母であり、日本醸造協会が頒布する酵母のうち全体の80%以上が泡なし酵母となっている¹⁸⁾。

泡なし酵母の育種改良の他にも、清酒の官能的多様性を広げるべく、様々な育種改良がされてきた。香氣成分に関する研究では、吟醸香の主要成分である酢酸イソアミルやカプロン酸エチルなどの香氣成分高生産酵母の育種が行われている。市川は脂肪酸合成酵素の阻害剤であるセルレニン耐性株からカプロン酸エチル高生産酵母を分離した²⁶⁾。また、芦田らはロイシンアナログを使用し、ロイシンによるフィードバック阻害が解除された変異株から酢酸イソアミル高生産株を取得した²⁷⁾。また、最近の消費者嗜好の多様化に伴い、味に関する有機酸の研究が多数報告されるようになり、有機酸生成組成の異なる酵母の育種が行われている。相川らはコハク酸デヒドロゲナーゼの阻害剤であるコハク酸ジメチル感受性株から爽やかな酸味を呈するリンゴ酸を高生産する酵母を分離している²⁸⁾。また、吉田らはシクロヘキシミド耐性株より²⁹⁾、水野らは2-デオキシグルコース耐性株からリンゴ酸高生産酵母の分離を行っている³⁰⁾。さらに月桂冠の根来らはコハク酸ジメチル感受性株よりリンゴ酸高生産酵母の取得を行ったことに加え、次世代ゲノムシーケンサーによる全ゲノムシーケンスおよび比較ゲノム解析により変異遺伝子を同定し、分子生物学的手法を用いて、リンゴ酸高生産能を付与する遺伝子変異の特定に成功している³¹⁻³³⁾。これらの成果は、リンゴ酸高生産能獲得機構に関する新知見を提供できるだけでなく、マーカー遺伝子の開発等による迅速なリンゴ酸高生産酵母の育種改良に繋がることが期待できる。また、近年のゲノム編集技術の発展により³⁴⁾、様々な生物が育種改良されている。実際に日本においても、肉厚マダイ³⁵⁾や高GABAトマト³⁶⁾などの開発が行われている。既に、清酒酵母においてもゲノム編集技術が利用された報告がなされている^{37, 38)}。依然として、ゲノム編集技術により開発された農作物・魚介類あるいは加工品の市場流通は、消費者の懸念等で困難を極めている。しかしながら、育種改良のターゲット遺伝子を特定することは、来る将来に向けての有意義な知見となり得る。

佐賀大学では佐賀県内の酒造メーカーと共に、大学オリジナル清酒『悠々知酔』の製造を行っている。この製造には、当時 加藤富民雄 佐賀大学農学部教授らが清酒醪から分離した清酒酵母 *S. cerevisiae* Y52 株を使用している。大学清酒のブランディングを高めるうえでも、オリジナリティのある清酒酵母は重要と考える。しかしながら、この Y52 株は泡あり酵母であるため、醪管理の簡便化、製造の効率化を図るうえで泡なし酵母の育種は必要である。また、消費者の嗜好性やニーズが多様化した現代において、清酒の官能的多様性を広げるうえでも Y52 株以外の清酒酵母の開発は必須である。

本論文では、悠々知酔製造を基盤とした酒質の向上および多様化を図るため、育種改良による泡なし酵母の取得、および変異誘発処理による香气成分高生産酵母およびリンゴ酸高生産酵母の取得を行った。また、次世代ゲノムシーケンサーによる比較ゲノム解析を行うことで、変異株に導入された変異点を同定し、シンクロトロン光を変異原として利用する意義とリンゴ酸高生産性獲得機構の新しい知見についてまとめた。

第 2 章では、清酒酵母 Y52 株の泡なし変異株の取得と育種酵母の実製造利用についてまとめた。第 3 章では、生物育種の知見が乏しいシンクロトロン光照射法による香气成分高生産酵母の育種改良およびゲノム解析によるシンクロトロン光が誘発する変異パターンについての新知見についてまとめた。第 4 章では、Y52 株以外の清酒酵母の取得と大学清酒のオリジナリティとブランディング強化のため、佐賀県の代表的自然である有明海からの清酒酵母の分離と醸造特性評価についてまとめた。第 5 章では、酒質の多様化を図るために実施したリンゴ酸高生産酵母の育種と醸造特性評価および実製造利用についてまとめた。第 6 章では、リンゴ酸高生産酵母について比較ゲノム解析、遺伝子組換え実験、発現量解析等を実施し、変異株がリンゴ酸高生産能を獲得したメカニズムの解明に関してまとめた。

第 2 章 清酒酵母 Y52 株の泡なし 変異株の取得

第1節 緒言

清酒酵母は、清酒醪における高泡形成の有無により泡あり酵母と泡なし酵母に大別される。製造量の効率化や発酵管理の簡便化などを理由に、現代の清酒醸造に使用されている清酒酵母はそのほとんどが泡なし酵母である¹⁸⁾。

悠々知酔製造に利用している清酒酵母 Y52 株は泡あり酵母である。泡あり酵母を使用すると上述のように高泡が発生する。泡あり酵母は細胞表層の性質により泡との親和性が高いため、醪上部の菌密度が高くなる。そのため、醪内部へ酵母を押し込むには、こまめな權入れが必要である。また、この高泡形成時に激しい室温の低下が生じると、醪上部の泡の層は室温の低下を顕著に受け、清酒酵母へのストレスにつながる。実際に、2017 年度の悠々知酔製造において、高泡形成時に気温が低下したことにより発酵経過の鈍化が実際に生じた。これらの問題は Y52 株の泡なし変異株の取得により改善が期待できる。

泡あり酵母の細胞表層は疎水性、泡なし酵母の細胞表層は親水性であり、この細胞表層の極性の違いは *AWA1* 遺伝子がコードする *Awa1* タンパク質によることが明らかとなっている^{19, 39, 40)}。*Awa1* タンパク質は 1713 アミノ酸からなる分子量 166,873 のタンパク質である¹⁹⁾。*Awa1* タンパク質の一次構造は N 末端と C 末端の両方に疎水性の領域があり、これらの配列は糖脂質の 1 種であるグリコシルホスファチジルイノシトール (glycosylphosphatidylinositol : GPI) が結合したタンパク質に特徴的なシグナルである。このようなタンパク質は GPI を介して細胞膜上に係留しているので、GPI アンカータンパク質と呼ばれる。N 末端の疎水性領域は、通常分泌タンパク質に見られるシグナルペプチドと同じであり、タンパク質合成後、この配列によって小胞体に入った後、N 末端と C 末端の疎水性領域が切り離され、新しくできた C 末端に GPI が結合する^{19, 41)}。細胞膜に達した後、細胞壁グルカンに転移すると考えられている。*Awa1* タンパク質の C 末端側は GPI 構造によって細胞壁に固定されており、N 末端側は細胞表層に突き出した構造をしている。この N 末端側

が何らかの立体構造をとり、タンパク質表面の一部が疎水性となることで気泡吸着性をもつと考えられている¹⁹⁾。

泡あり酵母である協会清酒酵母7号(K7)とK7株の泡なし変異株である協会清酒酵母701号(K701)の例では、*AWA1*遺伝子のN末端側から中央付近までは両株とも同一の配列であるが、それ以降のC末端側は全く異なる配列であることが分かっている。*AWA1*遺伝子は第XV番染色体のテロメア付近に存在しており変化が生じやすいこと、また*AWA1*遺伝子のC末端側の配列が第IX番染色体にも存在することから、C末端側の大規模な変異が生じる原因として染色体の転座が考えられている^{19, 42)}。上記の知見から、*AWA1*遺伝子には変異が導入されやすいため、自然突然変異により親株の特徴を維持した泡なし変異酵母の取得に関する報告がされている⁴³⁻⁴⁵⁾。

本章では、泡あり清酒酵母Y52株を自然変異により育種を行い、泡なし変異株の取得を試みた。さらに、小仕込試験により醸造適性が保持されていることを確認し、悠々知酔の実製造への利用を試みた。

第2節 実験材料と方法

第1項 使用菌株と培地

本章で使用した *Saccharomyces cerevisiae* 協会清酒酵母7号(K7)、協会清酒酵母701号(K701)は、独立行政法人酒類総合研究所(広島県東広島市)から分譲いただいた。尚、清酒酵母Y52株は、加藤富民雄博士らによって有薫酒造株式会社(福岡県久留米市)の清酒醪中より分離された。

YPD 培地（酵母エキス [10 g/L]、ポリペプトン [20 g/L]、グルコース [20 g/L]）は通常の酵母培養に用いた。YPD 寒天培地は、YPD 培地に寒天 [20 g/L] を加えて作成した。

第 2 項 高泡形成能の判別試験

泡あり酵母と泡なし酵母の判別試験は布川らの方法に従い、リン酸緩衝液とヘキサンを用いた⁴⁶⁾。酵母菌株を 3 mL の YPD 液体培地に接種し、30°C で一晩振とう培養を行った。遠心分離（6,000 ×g、1 min、4°C）により菌体を回収した後、0.1 M のリン酸緩衝液（pH 6.8）で 2 度洗浄し、OD₆₀₀=2.0 になるように 3 mL のリン酸緩衝液に懸濁した。菌懸濁液全量と 3 mL のヘキサン（和光純薬）を混合し、ボルテックスにより激しく攪拌した後、水相（リン酸緩衝液相）とヘキサン相が十分に分配するまで 30 分間放置した。

第 3 項 清酒酵母 Y52 株の泡なし変異株の取得

第 2 章第 2 項の方法に従い、清酒酵母 Y52 株について泡あり酵母と泡なし酵母の分配実験を行った。水相とヘキサン相に分配後、水相から細胞懸濁液 1 mL を採取し、3 mL の YPD 液体培地に接種し、30°C で一晩振とう培養を行った。培養後、同様の手技で分配実験を行い、水相から細胞懸濁液を採取した。このように培養と分配操作を 5 度繰り返した後、YPD 寒天培地に画線塗布し、30°C で培養を行った。得られたコロニーに関して、PCR による *AWA1* 遺伝子の増幅と高泡形成能の判別試験を行い、泡なし変異株のスクリーニングを行った。Colony direct PCR による *AWA1* 遺伝子の増幅は以下の方法で行った。単一コロニーを釣菌し、0.02 N 水酸化ナトリウム水溶液に懸濁し、95°C で 10 分間の熱処理後、室温で冷却した。この細胞懸濁液を鋳型 DNA とし、プライマーには、*AWA1F* (5'- ATG TTC AAT CGC TTT AAT AAA CTT CAA GCC -3') および *AWA1R* (5'- TTA GTT AA A GAA AGC AAG AAC GAA AAT ACC -3') を用いた⁴⁷⁾。DNA ポリメラーゼは KOD

FX Neo（東洋紡績）を用い、以下の反応条件で *AWA1* 遺伝子の増幅を行った。①初期変性（94°C、2分）、②変性（94°C、1分）、③アニーリング（60°C、1分）、④伸長（68°C、5分）とし、②-④を30サイクル行った。PCR産物を1%アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色した。

第4項 小仕込試験

小仕込試験は難波ら⁴⁸⁾の方法に従った。原料米には乾燥米麴 精米歩合60%（徳島製麴株、徳島）と α 化米 精米歩合60%（徳島製麴株、徳島）を使用し、仕込みは三段仕込で行った。例として、総米200gの三段小仕込試験の仕込配合表を示した(Table 2-1)。初期菌数は 4.0×10^6 cells/mLに調整した。エタノール発酵の副産物である二酸化炭素排出量を指標とし、発酵容器の重量測定を経時的に行うことで、醪の発酵経過をモニタリングした。発酵温度は11°Cで一定とした。醪の上槽は遠心分離（3,000 \times g、20 min、4°C）により行った。

Table 2-1. Recipe of small-brewing test (Total rice 200 g).

	<i>Mizukoji / Soe</i>	<i>Naka</i>	<i>Tome</i>	Total
Total rice	40	60	100	200
Rice koji	15	10	15	40
α-Rice	25	50	85	160
Water	50	70	150	270
Lactic acid	0.25			0.25

第5項 製成酒サンプルの成分分析

製成酒のアルコール分の分析は国税庁所定分析法⁴⁹⁾に準じた。製成酒サンプルの有機酸組成分析は High Performance Liquid Chromatography (HPLC) を用いた pH 緩衝化ポストカラム電気伝導度法により測定した。有機酸分析システムには NexeraXR (島津製作所製、京都) を使用し、カラムは Shim-pack SCR-102H (300 mmL×8.0 mmI.D ; 島津製作所製) を2本直列で用いた。移動相は 5 mM *p*-トルエンスルホン酸 (和光純薬) 水溶液を、緩衝相は 5 mM *p*-トルエンスルホン酸及び 100 µM EDTA (同仁化学研究所) を含む 20 mM Bis-tris (同仁化学研究所) 水溶液を使用した。移動相と緩衝相ともに流速を 0.8 mL/min とし、カラム温度は 40°C とした。検出器は電気伝導度検出器 CDD-10 (島津製作所製) を用いた。

製成酒サンプルの香気成分はガスクロマトグラフ直結型質量分析計 GCMS-QP2010 (島津製作所製) を用いて測定した。分析カラムは、DB-WAX (60 m×0.25 mm×0.5 µm ; アジレント・テクノロジー) を用いた。分析条件は以下のとおりである。カラム温度は 40°C を5分間保持し、5 °C/min で 200°C まで上昇させ、200°C で、5分間保持した。MS 部はインターフェイス温度を 230°C、イオン源温度を 200°C とした。試料の加温と注入は、AOC-5000 オートインジェクター (島津製作所製) を用い、試料 0.9 mL に 0.1 mL の内部標準 (カプロン酸メチル 50 ppm、*n*-アミルアルコール 2000 ppm) を加え、50°C、10分間攪拌しながら加温した後、ヘッドスペースガスを 1 mL 注入した。キャリアガスはヘリウムガスを用い、流速は 1.12 mL/min とした。

第6項 取得株の実製造利用

2016年度と2017年度の悠々知酔製造は佐賀県鹿島市の矢野酒造株式会社にご協力いただいた。2016年度は Y52 株を 2017年度は Y52 株の泡なし変異株を製造に使用した。

第3節 実験結果及び考察

第1項 Y52株の泡なし変異株の取得

清酒酵母 Y52 株に対して、リン酸緩衝液とヘキサンを使用した分配操作を 5 回繰り返した。その後、YPD 寒天培地上にコロニーを形成させ、合計 30 株を釣菌した。これらの 30 株について、colony direct PCR により *AWA1* 遺伝子を増幅させ、電気泳動を行った結果、Y52-14 株と Y52-30 株の 2 株は親株 Y52 株よりも *AWA1* 遺伝子の DNA 断片の長さが小さかった(Fig 2-1A)。この 2 株について、高泡形成能判別試験を行った結果、Y52-14 株は水相が濁った(Fig 2-1B)。これは、泡なし酵母のコントロール株である K701 と同様の結果であることから、Y52-14 株の細胞表層は親水性であると言える。また、アガロースゲルのウェルを細くした電気泳動を行った結果、Y52-14 株の *AWA1* 遺伝子の大きさは親株 Y52 株よりも確かに小さかった(Fig 2-1C)。この結果は、試験対象株の K7 株と K701 株と同様の結果となった。

K7 株と比較して、K701 株の *AWA1* 遺伝子の大きさは、C 末端側の GPI アンカー結合領域の欠落により、小さいことが明らかとなっている^{39, 47)}。これは、第 XV 番染色体のテロメア領域に位置する *AWA1* 遺伝子の C 末端領域とその配列と相同な配列を有する第 IX 染色体との転座によるものと考えられている^{19, 42)}。このことから、Y52-14 株においても転座により *AWA1* 遺伝子の GPI アンカー結合領域が欠落し、Awa1 タンパク質が細胞表層に局在できなくなったことが考えられる。

Y52-14 株は遺伝型と表現型の両方で泡なし酵母の性質を示す結果となったため、この Y52-14 株を Y52 株の泡なし変異株とした。以後この株を Y5201 株と称した。

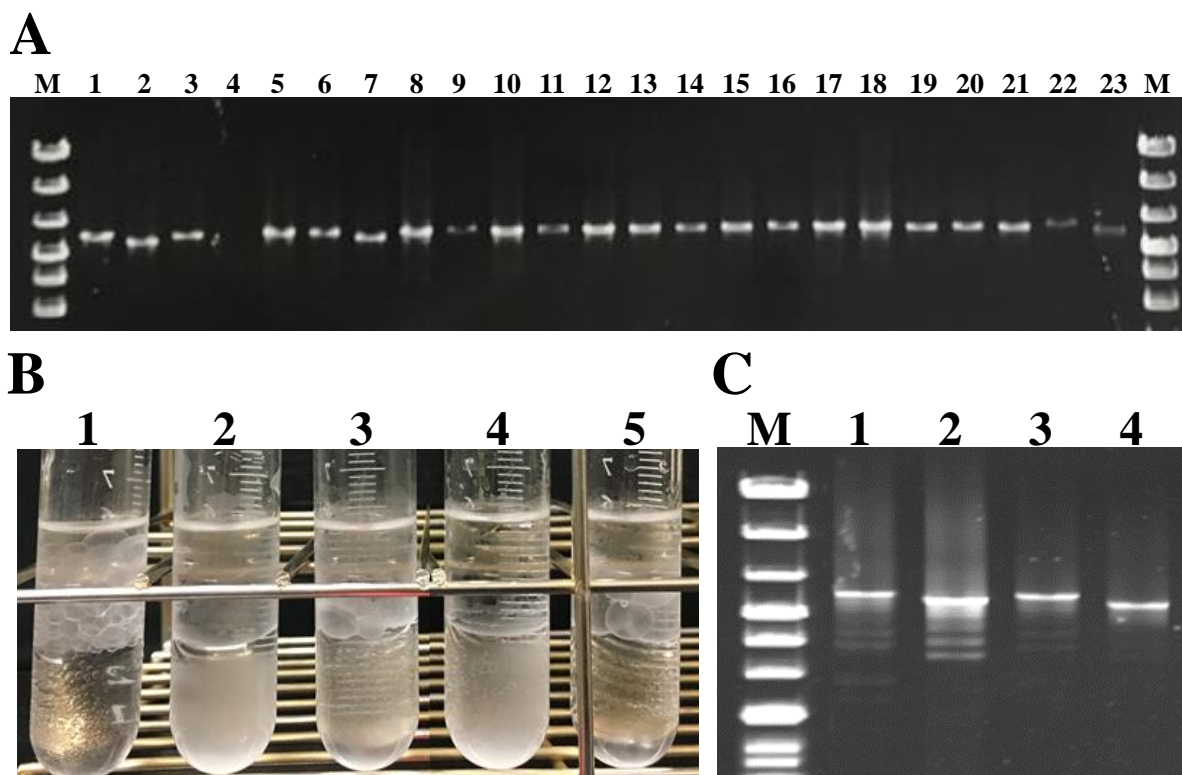


Fig. 2-1. Discrimination between foaming sake yeast and non-foaming sake yeast by hexane-water partitioning test and PCR for *AWA1* gene.

PCR fragment length of the *AWA1* gene of various sake yeast strains. Genomic DNA was prepared from each sake yeast strain and PCR was carried out as described in the text. Lane M shows DNA size markers (Gene Ladder Wide1; NIPPON GENE, Japan). Lane 1: K7; Lane 2: K701; Lane 3: Y52; Lane 4: No template; Lane 7: Y52-14; Lane 23: Y52-30; Lane 5-6, and 8-22: Other isolated strains (A). Hexane-water partitioning test. No. 1: K7 (foaming); No.2: K701 (non-foaming); No.3: Y52 (foaming); No.4 Y52-14: No.5 Y52-30 (B). PCR fragment length of the *AWA1* gene of various sake yeast strains. Genomic DNA was prepared from each sake yeast strain and PCR was carried out as described in the text. Lane M shows DNA size markers (Gene Ladder Wide 1; NIPPON GENE, Japan). Lane 1: K7; Lane 2: K701; Lane 3: Y52; Lane 7: Y52-14 (C).

第 2 項 小仕込試験

K701 株、Y52 株、Y5201 株の 3 株について、総米 200 g の小仕込試験を行った。

炭酸ガス減量を指標とした発酵経過を示した(Fig 2-2)。親株 Y52 株の総炭酸ガス減量は 99.73 g、泡なし変異株 Y5201 株の総炭酸ガス減量は 116.47 g であった。泡なし酵母は泡あり酵母と比較して、2 日ほど醪経過が早い傾向にあると言われている⁵⁰⁾。本実験においても Y5201 株は Y52 株よりも醪経過が 2 日ほど早いため、Y5201 株は Y52 株よりもエタノール発酵能が高いことが示唆された。また、一般的な醸造用酵母である協会清酒酵母 K701 株と比較しても、Y5201 株は同等の発酵経過を示した。

製成酒サンプルの成分分析の結果、Y5201 株のアルコールの生産量は Y52 株と同等であった(Table 2-2)。また、Y52 株による製成酒のピルビン酸の残量は 138 mg/L、Y5201 株では製成酒のピルビン酸残量は検出されなかった。残存したピルビン酸は貯蔵期間中で、つわり香などの製成酒の劣化の原因のひとつとなる¹⁶⁾。そのため、ピルビン酸の残量が少ない点は酒質の向上につながることを期待できる。また、ピルビン酸は解糖系と TCA 回路の中間物質、さらにエタノール発酵の中間物質でもあるため、ピルビン酸の残量が少ないことはエタノール発酵を含む細胞中の代謝反応の活性が高いことが考えられる。吟醸香成分の酢酸イソアミルやカプロン酸エチルの生産量については、Y52 株と Y5201 株で差はほとんどみられなかった。

実製造に利用されている清酒酵母 Y52 株と比較して、泡なし変異株 Y5201 株のアルコール発酵能は保持されており、有機酸や香気成分等の主要な代謝物組成には大きな変化はないことが確認された。

よって、この泡なし変異株 Y5201 を 2017 年度の悠々知酔の製造に採用することにした。

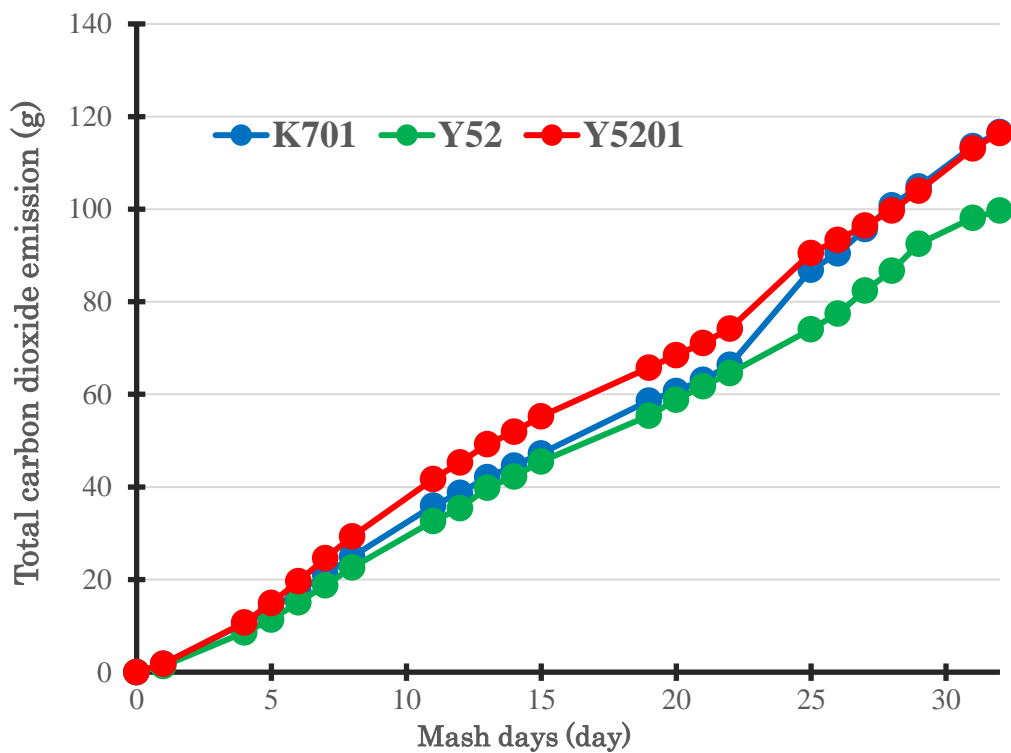


Fig. 2-2. Total carbon dioxide (CO₂) emission of each yeast strain in the small-scale sake brewing test in triplicate.

Each strain was tested in triplicate; error bars indicate standard deviation. Strains are shown by color: K701 (blue), Y52 (green), Y5201 (red).

Table 2-2. Analysis of supernatant on small-scale brewing test.

Strain	K701	Y52	Y5201
Alc	13.1	13.9	13.7
SMV	-18.3	-19.8	-13.7
EtOAc	39.23	30.54	32.68
iAmOAc	2.0	1.1	1.2
EtOCap	1.8	0.9	1.0
Cit	120	125	102
Pyr	85	138	0
Mal	302	284	286
Suc	1091	1125	927
Lac	814	745	760
Ace	503	554	553

Components name abbreviations are as follows.

Alc, alcohol concentration (%); SMV, sake meter value.

Aroma compounds (EtOAc, ethyl acetate; iAmOAc, isoamyl acetate; EtOCap, ethyl caproate). Organic acids (Cit, citric acid; Pyr, pyruvic acid; Mal, malic acid; Suc, succinic acid; Lac, lactic acid; Ace, acetic acid). Unit is mg/L.

第3項 悠々知酔の製造

2017年度は泡あり酵母である Y52 株を、2018年度は泡なし変異株 Y5201 株を悠々知酔の製造に使用した。醪日数 8 日目の醪の写真を図 2-3 に示した。2018年度の醪の写真から分かるように、高泡は全く形成されなかった。また、2017年度の Y52 株を使用した製造では発酵経過が悪く、醪のキレの鈍化が生じたが、2018年度の製造では醪のキレがスムーズであり、発酵経過は改善された。製清酒のピルビン酸の量は 2017年度（Y52 株使用）が 346 mg/L、2018年度（Y5201 株使用）は 333 mg/L であり、双方に大きな差はなかった。しかし、2017年度はアルコール発酵促進剤を添加したが、2018年度は促進剤の必要はなかったため、Y5201 株のアルコール発酵能は増強したと言える。また、Y5201 株の醪では高泡形成が生じなかったことで、搾入れ等の手間を省くことができた。

また、一般的に泡なし酵母育種改良法では、Froth Flotation 法⁵¹⁾、Cell Agglutination 法⁵²⁾、シュガーエステル凝集法やセライト凝集法⁵³⁾が利用されているが、本章で行った方法においても、泡なし酵母が取得できることが明らかとなった。

泡なし変異株 Y5201 株は実製造においても高泡形成を生じないことが証明できたため、Y52 株の泡なし変異株の取得および実製造への利用を達成した。

A**B**

Fig. 2-3. Pictures of yuyuchisui eight day's mash.

Mash using foaming sake yeast strain Y52 (A), Mash using non-foaming sake yeast strain Y5201 (B).

第3章 シンクロトロン光照射法による 香気成分高生産株の取得

第1節 緒言

近年の清酒業界では、消費者のニーズに応えることや、飽きを懸念することから多種多様な清酒の開発が活発化している。泡なし変異株の取得により、製造の安定性や製造効率の向上、ハンドリングの簡便化に成功した。しかしながら、Y5201株は自然変異により取得しているため、官能的に差を感じられる程の代謝物組成の変化は少ないことが考えられる。

カプロン酸エチルや酢酸イソアミルは清酒の代表的な香気成分であり、それぞれリンゴ様、バナナ様の香りとして知られている⁵⁴⁾。Y52株およびY5201株は、カプロン酸エチルや酢酸イソアミルの生成能が低いため(Table 2-2)、香りが求められる酒質設計には適していない。そこでY5201株をさらに育種し、カプロン酸エチルや酢酸イソアミルの生成能を増強することで改善が期待できる。

酵母の育種改良法には、突然変異誘発法^{8, 9)}、性的交雑法^{10, 55)}、プロトプラスト細胞融合^{12, 56)}などがある。突然変異誘発法については、紫外線(UV)照射や化学的変異原であるエチルメタンスルホン酸(EMS)による処理など、多くの報告がなされている^{57, 58)}。一般に、EMSやUVで誘発される変異は、ほとんどが一塩基置換である。UVによる変異誘発は、シトシン塩基を含むジピリミジン部位で、CからTへの塩基置換であるトランジション変異の頻度が高いのが特徴である⁵⁹⁻⁶¹⁾。EMSは一塩基置換を誘発することが明らかにされており、その変異の約98%~99%はGからAへの置換である^{62, 63)}。このことは、ゲノムワイドな解析結果からも明らかである⁶³⁾。このように、EMSやUVは一般的にGからA、またはCからTへの突然変異を誘発する。

近年、シンクロトロン光が新たな変異誘発原として注目されている⁶⁴⁻⁶⁷⁾。シンクロトロン光とは、真空中で光速に近い速度で直進する電子が、その進行方向をかえられた際に放出される電磁放射線のことである。シンクロトロン光の特徴は、従来の線源に比べて何桁も上回る高輝度・高強度の光であること、偏光レベルが高く、エネルギーや波長の調整が

可能であること、数十ピコ秒のパルス発光が可能であることなどが挙げられる⁶⁸⁻⁷⁰⁾。このため、シンクロトロン光は物質科学、物性物理学、生物学、医学などの分野で幅広く応用されているが⁶⁸⁾、微生物育種に関する知見は乏しく、清酒酵母においては尿素非生産性変異株を取得した1例しかない^{71, 72)}。シンクロトロン光照射法による生物育種の先行研究において、全ゲノムシーケンシングを用いたゲノムレベルの研究成果は報告されておらず、新たな知見が得られることが期待できる。

本章では、泡なし清酒酵母 Y5201 株にシンクロトロン光照射による変異誘発処理を行い、Y5201 株よりもカプロン酸エチルまたは酢酸イソアミルの生産能が高い変異株の取得を行った。加えて、Y5201 株と変異株の比較ゲノム解析により、シンクロトロン光照射によって導入される変異点パターンを明らかにした。

第2節 実験材料と方法

第1項 使用菌株と培地

本章で使用した *Saccharomyces cerevisiae* 協会清酒酵母 701 号 (K701)、協会清酒酵母 901 号 (K901) は、独立行政法人酒類総合研究所 (広島県東広島市) から分譲いただいた。清酒酵母 Y52 株は有薫酒造株式会社 (福岡県久留米市) の清酒醪中より分離された。清酒酵母 Y5201 株は (第2章) 変異誘発実験の親株として用いた。佐賀県内の酒造会社に頒布されている清酒酵母 F401 株⁷³⁾、SAWA1 株⁷³⁾、SGH 株⁷⁴⁾は佐賀県工業技術センターの澤田和敬博士よりご提供いただいた。

YPD 培地 (酵母エキス [10 g/L]、ポリペプトン [20 g/L]、グルコース [20 g/L]) は通常の酵母培養に用いた。YPD 寒天培地は、YPD 培地に寒天 [20 g/L] を加えて調製し

た。セルレニン寒天培地（グルコース [20 g/L]、yeast nitrogen w/o amino acid (YNB ; Difco™) [6.7 g/L]、セルレニン（和光純薬） [25 μM-50 μM]、寒天 [20 g/L]）はカプロン酸エチル高生産株のスクリーニングに用いた²⁶⁾。tert-Butyl hydroperoxide (TBHP) 寒天培地（グルコース [20 g/L]、YNB (Difco™) [6.7 g/L]、TBHP（和光純薬） [4 mM-6 mM]、寒天 [20 g/L]）は酢酸イソアミル高生産株のスクリーニングに用いた⁷。麴エキス培地の調製は以下のようにして行った。乾燥米麴 精米歩合 60%（徳島製麴株、徳島）1 kg に蒸留水を 1 L 加え、55°Cで一晩、糖化反応を行った。その後、遠心分離（3,000 ×g、15 min、4°C）を行い、上清をろ過した。

第2項 シンクロトロン照射法による変異誘発実験

清酒酵母 Y5201 株を 200 mL の YPD 培地に接種し、30°Cで 15 時間、前培養を行った。50 mL のプラスチックチューブに分注し、遠心分離（6,000 ×g、10 min、4°C）により菌体を回収し、0.9%の生理食塩水に懸濁した。菌数が 1.0×10^8 cells/mL になるように希釈し、この菌懸濁液を 5 mL ずつ、5 mL 容ポリスチレン製の容器（ザルスタット株式会社）に分注し、アイスボックス内で保存した。シンクロトロン光照射による変異誘発実験は、九州シンクロトロン光研究センター（佐賀県鳥栖市）において、0 Gy(非照射)、5 Gy、20 Gy、50 Gy、100 Gy、300 Gy の 6 つの吸収線量条件で行った。吸収線量はアルミニウム板の厚さを変えて調整した(Fig. 3-1)。シンクロトロン光照射後のサンプルは再びアイスボックスで保存した。変異誘発処理後のサンプルを生理食塩水で段階希釈を行い、YPD 寒天培地に 100 μL ずつ塗布し、30°Cで 2 日間培養した。生育したコロニーをカウントし、各吸収線量条件でのコロニー数を 0 Gy 条件でのコロニー数で除することで死滅率を算出した。

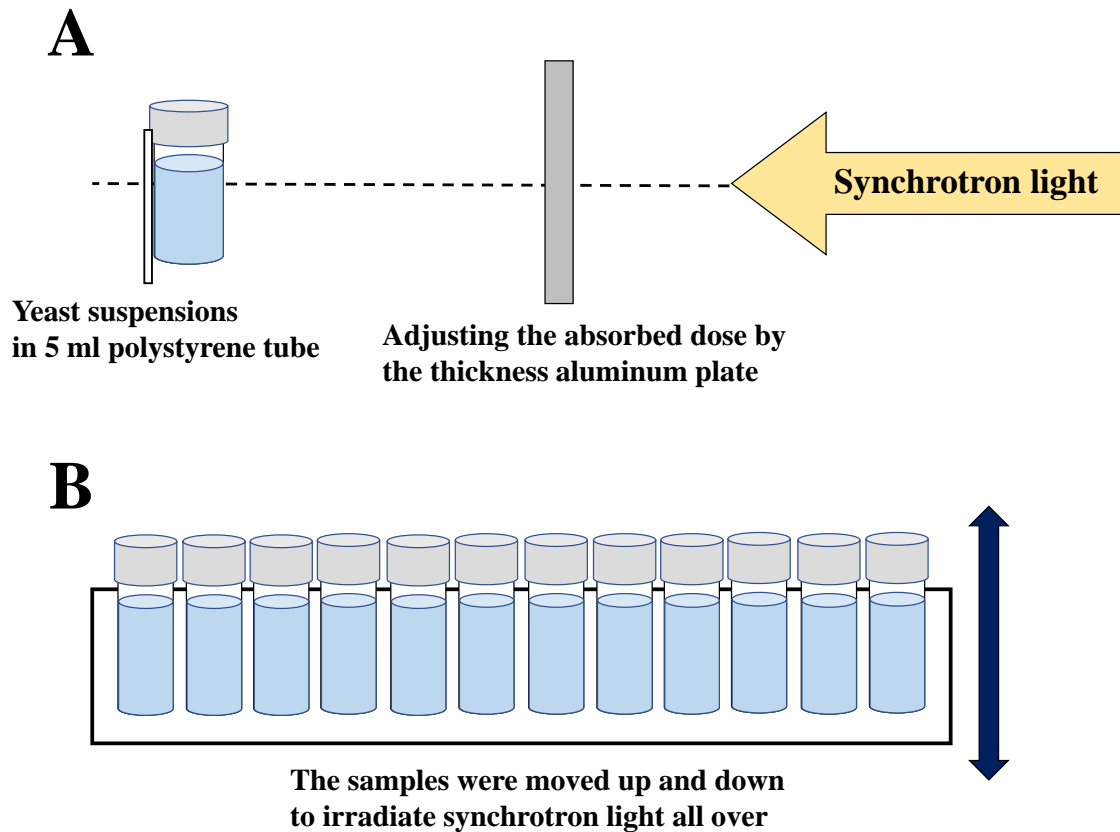


Fig. 3-1. Scheme of synchrotron light irradiation experiment at Kyushu Synchrotron Light Research Center, Saga, Japan.

Side view (A), Front view(B).

第3項 カプロン酸エチルおよび酢酸イソアミル高生産株のスクリーニング

シンクロトロン光照射による変異誘発処理後の酵母細胞について、5 mLの細胞懸濁液を遠心分離（6,000 ×g、10 min、4°C）し、1 mLの生理食塩水で再懸濁することで菌体を濃縮した。その後、セルレニン寒天培地²⁶⁾（25 μM）もしくはTBHP寒天培地⁷⁵⁾（4 mM）に濃縮した細胞懸濁液を塗布し、30°Cで3–5日間培養を行った。セルレニン寒天培地

上で生育したコロニーを釣菌し、セルレニン寒天培地（50 μM ）に接種した。また、TBHP 寒天培地上に生育したコロニーを釣菌し、TBHP 寒天培地（5 mM）に接種した。再度、同様の手技で TBHP 寒天培地（6 mM）に接種した。セルレニンもしくは TBHP の濃度が最も高い培地で生育したコロニーをカプロン酸エチルおよび酢酸イソアミル高生産候補株として選抜した。

第 4 項 麴エキス培地による選抜株の発酵試験

酵母菌株を 5 mL の麴エキス培地（ボーメ 7.0）に接種し、25°C で 3 日間静置培養を行った。10 g の乾燥米麴 精米歩合 60%（徳島製麴糴、徳島）、29 mL の麴エキス培地、45 mg の乳酸の混合物に、1 mL の前培養液を接種した。発酵温度を 12°C 一定とし、発酵期間を 14 日間とした。発酵終了後、遠心分離（3,000 $\times g$ 、15 min、4°C）を行い、得られた上清をろ過し、ろ液を前述と同様の方法で分析を行った（第 2 章第 2 節第 5 項）。

第 5 項 小仕込試験

一般的な清酒酵母である K701 株、K901 株および清酒酵母 Y52 株、Y5201 株に加えて、佐賀県内の酒造会社に頒布されている清酒酵母 F401 株、SAWA1 株、SGH 株の 7 株を試験対象株とした。小仕込試験は前述と同様にして行った（第 2 章第 2 節第 4 項）。総米 80 g の三段で仕込みを行い、発酵温度を 11°C 一定、醗日数を 25 日とした。すべての仕込みは $n = 3$ で行った。

第 6 項 製成酒サンプルの成分分析

製成酒サンプルの成分分析は前述と同様にして行った（第 2 章第 2 節第 5 項）。

第7項 主成分分析とクラスター解析

変異株の醸造特性を評価するために、小仕込試験で得られた製成酒サンプルの成分分析値を用いて主成分分析を行った。パラメータとして、6種類の香気成分（酢酸エチル、イソamilアルコール、酢酸イソamil、カプロン酸エチル、イソブタノール、n-プロパノール）と7種類の有機酸（リン酸、クエン酸、リンゴ酸、ピルビン酸、コハク酸、乳酸、酢酸）を用いた。生データは標準化（平均0、分散1）し、相関係数行列の固有値を用いて主成分軸を算出した。主成分分析はRのprincomp関数（R v.4.0.1）を用いて行った。クラスター分析は、Rのvegan関数（R v.4.0.1）を用いて行った。生データは標準化（平均0、分散1）し、サンプル間の距離はユークリッド距離で計算し、コーフェン行列はウォード法により求め、デンドログラムを作成した。また、すべての統計解析はDunnnett's検定で行った。

第8項 Whole genome sequencing と比較ゲノム解析

酵母菌株からのゲノムDNAの抽出はISOPLANT II（NIPPON GENE）を用い、プロトコルに従って行った。抽出したDNAサンプルの純度はNanoDropND-1000（NanoDrop Technologies）により測定した。DNAサンプルの濃度はQubit™ dsDNA BR Assay Kit（Thermo Fisher Scientific）を使用し、Qubit™ 3 Fluorometer（Thermo Fisher Scientific）により測定した。得られたゲノムDNAサンプルのライブラリー調製およびWhole genome sequencingはNovogene社（北京、中国）に委託した。ライブラリーはPCR-freeのペアエンドで調製され、Whole genome sequencing（150 bp×2）はNovoSeq 6000（Illumina Inc., San Diego, CA, USA）により、1検体あたり1 Gbpのシーケンシングを行った。比較ゲノム解析は以下の方法で行った。Trimmomatic⁷⁶⁾（v.0.39）により、得られた生リードからアダプター配列の除去およびリード中の低クオリティ塩基のトリミングを行った。参照ゲノムに使用する協会清酒酵母7号（K7）のゲノム情報はEnsembleFungi（<https://fungi.ensembl->

org) から獲得した。Burrows-Wheeler Aligner⁷⁷⁾ (BWA ; v.0.7.17) により、参照ゲノムに対するリードのマッピングを行った。Sam ファイルのソートおよび Bam ファイルへの変換は SAMtools⁷⁸⁾ (v.1.10) を用いた。変異点の抽出は DeepVariant⁷⁹⁾ (v.0.10.0) を、変異点のフィルタリングには VCFtools⁸⁰⁾ (v.0.1.16) をそれぞれ用いた。最後に、SnpEff⁸¹⁾ (v. 5.0) により変異パターンおよび変異が導入された遺伝子の同定を行った。

第 9 項 塩基配列のアクセッションナンバー

本章で使用された Whole genome sequencing データは DNA Data Bank of Japan に登録し、SAMD00259952–SAMD00259961 のアクセッションナンバーが付与された。

第 3 節 実験結果及び考察

第 1 項 シンクロトロン光照射法による変異誘発処理

清酒酵母 Y5201 株に対し、シンクロトロン光照射による突然変異誘発実験を 6 段階の吸収線量で行った。各吸収線量における死滅率は、5 Gy で 59.8%、20 Gy で 62.6%、50 Gy で 73.8%、100 Gy で 90.3%、300 Gy で 96.5%であった(Fig. 3-2)。本実験により酵母菌の死滅が確認できたため、シンクロトロン光照射法は、酵母菌に変異誘発させる変異原として利用できることが示唆された。

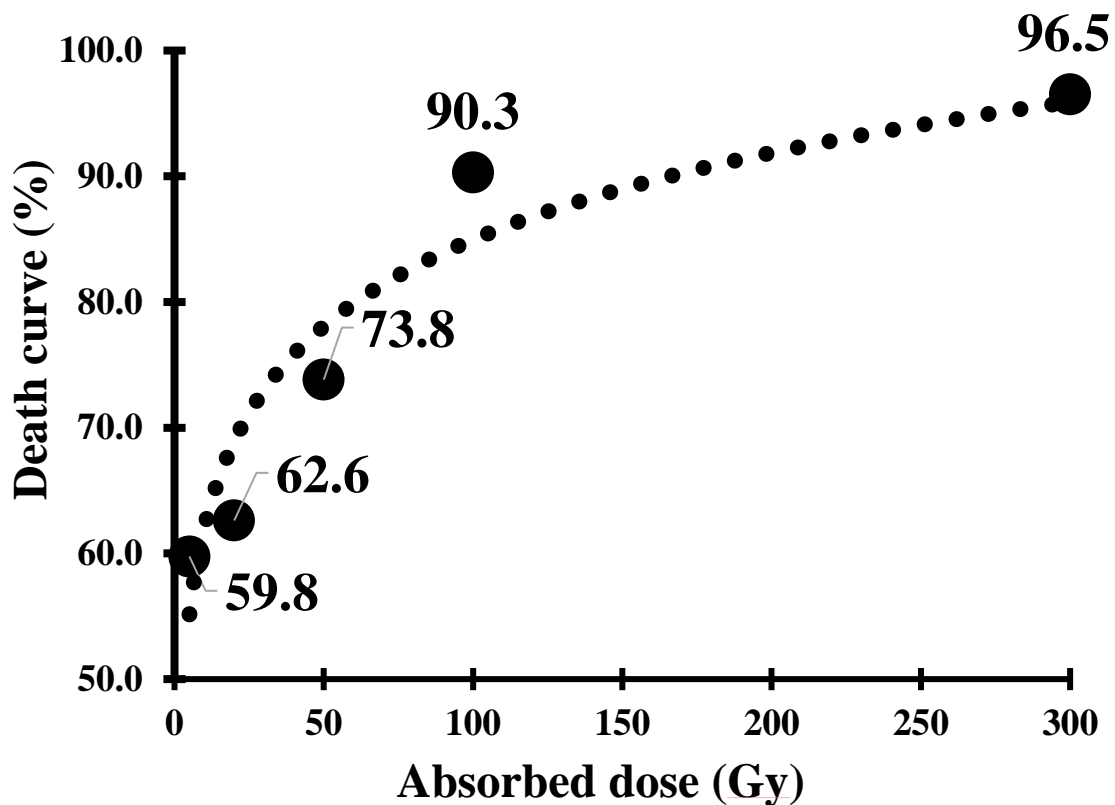


Fig. 3-2. Death curve consisting of the death rate at each absorbed dose.
 Death rates are 59.8% at 5 Gy, 62.6% at 20 Gy, 73.8% at 50 Gy, 90.3% at 100 Gy, and 96.5% at 300 Gy.

第2項 カプロン酸エチルおよび酢酸イソアミル高生産株のスクリーニング

カプロン酸エチルおよび酢酸イソアミル高生産株変異株のスクリーニングは、吸収線量 300 Gy のシンクロトロン光照射により変異誘発処理をした Y5201 株から行った。カプロン酸エチル高生産株はセルレニン寒天培地で、酢酸イソアミル高生産株は TBHP 寒天培地でスクリーニングを行った結果、50 μ M のセルレニンに耐性のある変異株を 55 株、6 mM の TBHP に耐性のある変異株を 65 株取得した。これら 120 株について麴エキスと乾燥米

麹による発酵試験を行い、カプロン酸エチルおよび酢酸イソアミルの生産量が増大した9株を選抜した(Table 3-1)。

清酒醪中でのカプロン酸エチルの合成は酵母によって行われる。カプロン酸エチル合成に関与する酵素には、アルコールアシルトランスフェラーゼとエステラーゼの2種類があり、アルコールアシルトランスフェラーゼはカプロイル-CoA とエタノールを基質として、エステラーゼはカプロン酸とエタノールを基質としてカプロン酸エチルを合成する⁸²⁾。

酵母における脂肪酸合成は、アセチル-CoA カルボキシラーゼが触媒するアセチル-CoA からマロニル-CoA を生成する反応と、脂肪酸合成酵素によるアセチル-CoA とマロニル-CoA から脂肪酸を合成していく反応の2種類の酵素触媒作用によって行われる。特に脂肪酸合成酵素はアシル転移、マロニル転移、縮合、 β -ケトアシル還元、脱水、エノイル還元、パルミチル転移という一連の7種類の反応触媒する多機能酵素である⁸³⁾。通常、この脂肪酸合成反応により生成する脂肪酸はパルミチン酸やステアリン酸が主体であるが、脂肪酸合成酵素の有する7種類の活性のうち、縮合活性とパルミチル転移活性の比が変化すると生成する脂肪酸組成が変化することが報告されている⁸⁴⁾。

セルレニンは *Cephalosporium caerulens* によって生産される脂肪酸合成酵素の阻害剤であり、特に縮合活性を阻害する⁸⁵⁾。セルレニン耐性を有する酵母は、生成される脂肪酸組成が変化し、カプロン酸(C6)、カプリル酸(C8)、カプリン酸(C10)といった中鎖脂肪酸組成が大きくなることで、カプロン酸エチルの生産能が増強する株の取得が可能となる。この方法は非常によく利用されており⁸⁶⁻⁸⁸⁾、本実験においてセルレニン寒天培地でセレクトジョンした C18 株、C19 株、C29 株、C50 株、C51 株、C52 株、C54 株の7株は、親株 Y5201 株よりも高いカプロン酸エチル生産性を示した(Table 3-1)。

酢酸イソアミル高生産酵母のスクリーニング法には、エコナゾール耐性⁸⁹⁾、ハイグロマイシン B 耐性⁹⁰⁾、5-5-5-トリフルオロオイシン (5-5-5-TFL) 耐性^{27, 91, 92)}、プレグネノロン耐性⁹²⁾、オーレオバシジン A 耐性⁹³⁾など様々な手法が報告されており、特に 5-5-5-TFL

耐性株取得はよく利用されている。しかしながら、5-5-5-TFL 耐性株は酢酸イソアミルの生産量の増加をもたらすが、同時にイソアミルアルコールを多量に生産する⁹¹⁾。イソアミルアルコールを多く含む清酒は、溶媒様臭やイソアミルアルコールの酸化により生じるイソバレルアルデヒドによるオフフレーバーが問題となる⁵⁴⁾。

酢酸イソアミルはイソアミルアルコールとアセチル-CoA からアルコールアセチルトランスフェラーゼによって生合成される⁹⁴⁾。高下らは TBHP 耐性株を取得することで、アルコールアセチルトランスフェラーゼの活性を増加させることにより、イソアミルアルコールの生産量を増加させることなく、酢酸イソアミルの生産量を増加できるスクリーニング系を開発した⁷⁵⁾。TBHP は過酸化脂質の一種であり、TBHP から発生したフリーラジカルによるラジカル連鎖反応により細胞膜に存在する不飽和脂肪酸に障害を与えることで酵母の生育を阻害する。TBHP 耐性獲得機構の一つとして、酵母細胞膜の不飽和度（不飽和脂肪酸／飽和脂肪酸）が減少することが考えられる。酵母細胞膜に存在する不飽和脂肪酸はアルコールアセチルトランスフェラーゼ活性を抑制するとともに、生成したエステルの膜透過も抑制するため、菌体外にエステルが排出されにくいことが報告されている⁹⁵⁾。従って、酵母の細胞膜の不飽和度が減少すれば、不飽和脂肪酸によるアルコールアセチルトランスフェラーゼ活性の抑制が解除されて酢酸イソアミルの生成量が増加することが期待できることから、本実験では酢酸イソアミル高生産株の取得に TBHP を用いた。

本実験において、TBHP 寒天培地でセレクションした T25 株および T49 株は、親株 Y5201 よりも高い酢酸イソアミル生産性を示したことに加え、イソアミルアルコールの生産量は Y5201 株とほぼ同等であり、特に T25 株はイソアミルアルコールの生産量を抑えつつ、酢酸イソアミルの生産能を増強できた変異株であった(Table 3-1)。また、セルレニンでセレクションした C18 株、C29 株も T25 株と同様の特徴も示した。

Table 3-1.**Analysis of supernatant on fermentation test using with koji extract.**

Strain	iAmOH	iAmOAc	EtOCap	Cit	Pyr	Mal	Suc	Ace
Y5201	127.82	1.22	1.70	331	340	353	476	195
C18	130.91	1.80	1.86	340	254	202	474	261
C19	102.79	1.14	2.13	302	438	396	501	56
C29	135.44	1.90	2.17	332	264	188	488	273
C50	119.58	1.55	2.16	337	354	410	472	152
C51	128.86	1.58	2.14	330	319	418	497	217
C52	141.73	2.34	2.31	332	314	321	467	211
C54	137.31	2.04	2.35	328	244	191	474	272
T25	132.92	1.90	2.38	334	286	299	439	202
T49	143.21	1.53	2.44	330	329	328	488	207

Components name abbreviations are as follows.

Aroma compounds (iAmOH, isoamyl alcohol; iAmOAc, isoamyl acetate;

EtOCap, ethyl caproate). Organic acids (Cit, citric acid; Mal, malic acid;

Pyr, pyruvic acid; Suc, succinic acid; Ace, acetic acid). Unit is mg/L.

第3項 変異株の醸造特性

小仕込試験で得られた製成酒サンプルの成分分析値をもとに、主成分分析(PCA)を行った。6種の香気成分に関するPCAの結果において、変異株9株は3つのグループに分けられた(Fig 3-3A)。青色の円で示した変異株C50株、C51株、C52株、T25株、T49株の5株は、親株Y5201株の近くに位置した。このグループは、イソアミルアルコールおよびn-プロパノールと正の相関を示した。黄色の円で示した変異株C18株、C29株、C54株は、K901株の近くに位置しており、酢酸エチルと負の相関を示した。赤色の円で示した変異株C

19株はどの試験株とも全く異なる座標に位置しており、吟醸香成分のカプロン酸エチルや酢酸イソアミルと正の相関を示した。主成分分析と同様な成分値を用いて行ったクラスター解析においても、変異株9株はPCAと同様の3つのグループに分けられた。したがって、このグルーピングは妥当であると言える(Fig 3-3B)。

変異株C19株で醸成した製清酒のカプロン酸エチルおよび酢酸イソアミル生産量は、親株Y5201株と比較して、それぞれ約1.4倍、約1.6倍であった(Table 3-2)。このことから、C19株は吟醸酒のような香り要求される清酒の醸造に利用できることが期待される⁹³⁾。⁹⁶⁾また、C19株の香りの特徴は、協会清酒酵母K701株、K901株や佐賀県清酒酵母F401株、SAWA1株、SGH株の香りの特徴とは異なるため(Fig 3-3A)、C19株で醸成した清酒は良好で特徴的な香りを付与することが期待できる。

また、7種の有機酸に関するPCAの結果においても、C19株は他のどの試験株とも異なる座標に位置付けられた(Fig 3-4)。C19株はリンゴ酸、ピルビン酸、クエン酸と正の相関を示し、酢酸とは負の相関を示した。実際、Y5201株と比較してC19株は、リンゴ酸、ピルビン酸、クエン酸の生産量が高く、酢酸の生産量が低かった(Table 3-2)。一般に、リンゴ酸は爽やかな酸味を、酢酸は好ましくない酸味を⁹⁷⁾、クエン酸はリンゴ酸とは異なる爽やかな酸味を呈する⁹⁸⁾。したがって、C19株は香りだけでなく、味わいにも良好となることが期待できる。

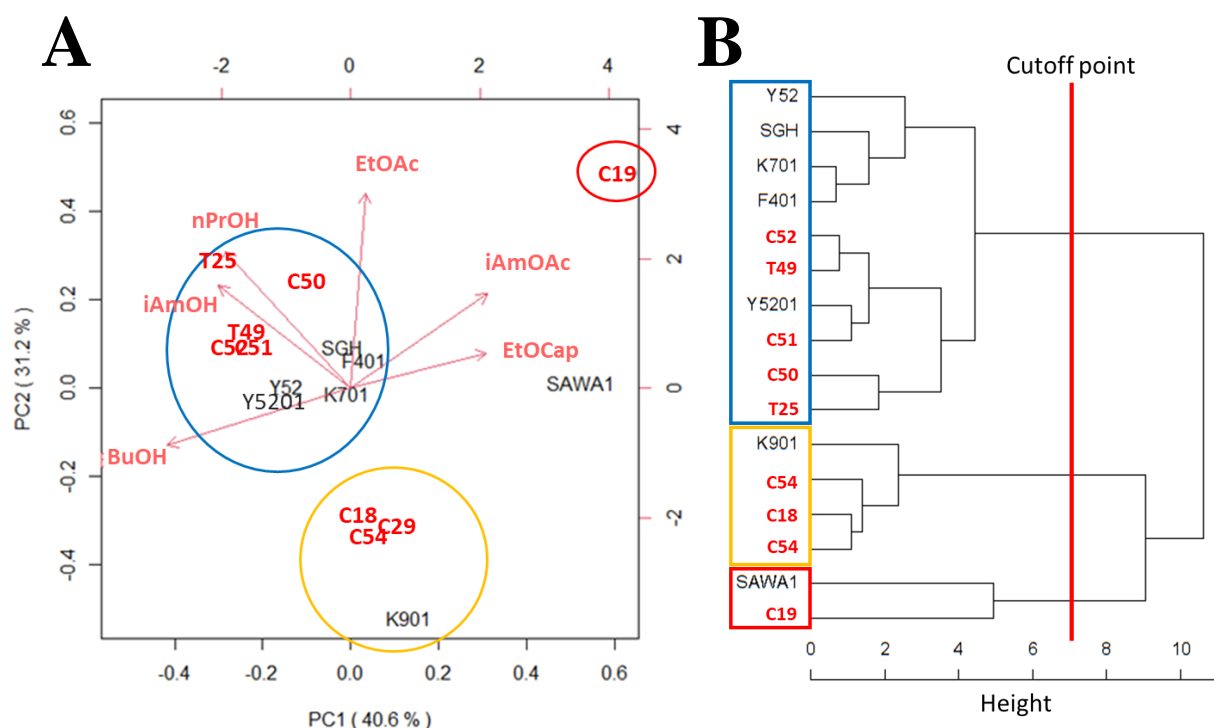


Fig. 3-3. Results of PCA and cluster analysis using only aroma compounds values of the supernatant with brewing test.

PCA was performed using only the aroma compounds components in the sake samples from the small-scale sake brewing test in triplicate. The parameters indicated as red letters are six aroma compounds: EtOAc, ethyl acetate; iAmOH, isoamyl alcohol; iAmOAc, isoamyl acetate; EtOCap, ethyl caproate; iBuOH, isobutanol; and nPrOH, n-propanol. Mean values were standardized used for PCA (mean is 0 and variance is 1). The eigenvalue of the correlation coefficient matrix was used to calculate the principal components axis. The direction of the arrow indicates a positive correlation. The horizontal axis is the first principal component axis (PC1), and the vertical axis is the second principal component axis (PC2). The value of PC1 or PC2 represents the contribution rate (A). Cluster analysis was performed using only aroma compounds as same as PCA. Mean values were standardized used for cluster analysis (mean is 0 and variance is 1). The distances between samples were calculated in Euclidean, and the Ward's method was used to obtain the Cofen matrix and create the dendrogram. Red color letters indicate nine mutant strains (B).

Table 3-2. Analysis of supernatant on small-scale brewing test.

Strain	iAmOAc	EtOCap	Cit	Pyr	Mal	Suc	Ace
Y5201	4.05 ± 0.07	1.35 ± 0.06	77 ± 0	18 ± 3	220 ± 7	543 ± 3	261 ± 5
C18	4.00 ± 0.18	1.37 ± 0.04	79 ± 1	22 ± 6	119 ± 1 ^a	503 ± 5 ^a	335 ± 8 ^b
C19	6.29 ± 0.28 ^b	1.90 ± 0.02 ^b	80 ± 1 ^b	32 ± 7 ^b	368 ± 6 ^b	559 ± 2 ^b	42 ± 2 ^a
C29	4.45 ± 0.26	1.48 ± 0.02 ^b	76 ± 1	17 ± 5	126 ± 4 ^a	482 ± 3 ^a	319 ± 10 ^b
C50	4.09 ± 0.19	1.43 ± 0.04	78 ± 1	7 ± 2	226 ± 7	562 ± 7 ^b	230 ± 7
C51	3.78 ± 0.18	1.45 ± 0.03	79 ± 1	9 ± 1	260 ± 15 ^b	577 ± 2 ^b	282 ± 23
C52	3.45 ± 0.27 ^a	1.40 ± 0.01	77 ± 1	12 ± 2	194 ± 2 ^a	560 ± 4 ^b	293 ± 7
C54	3.54 ± 0.24	1.53 ± 0.05 ^b	74 ± 1	21 ± 2	117 ± 5 ^a	502 ± 5 ^a	369 ± 21 ^b
T25	4.23 ± 0.05	1.38 ± 0.04	73 ± 1 ^a	12 ± 6	220 ± 4	517 ± 4 ^a	233 ± 8
T49	3.49 ± 0.16	1.50 ± 0.04 ^b	77 ± 1	14 ± 2	187 ± 2 ^a	558 ± 4 ^b	320 ± 7 ^b

Components name abbreviations are as follows.

Aroma compounds (iAmOAc, isoamyl acetate; EtOCap, ethyl caproate). Organic acids (Cit, citric acid; Mal, malic acid; Pyr, pyruvic acid; Suc, succinic acid; Ace, acetic acid). Unit is mg/L.

The small-scale brewing test was performed in triplicate. Plus or minus represents standard deviations.

^a significantly lower than Y5201 (Dunnett's test: $p < 0.05$)

^b significantly higher than Y5201 (Dunnett's test: $p < 0.05$)

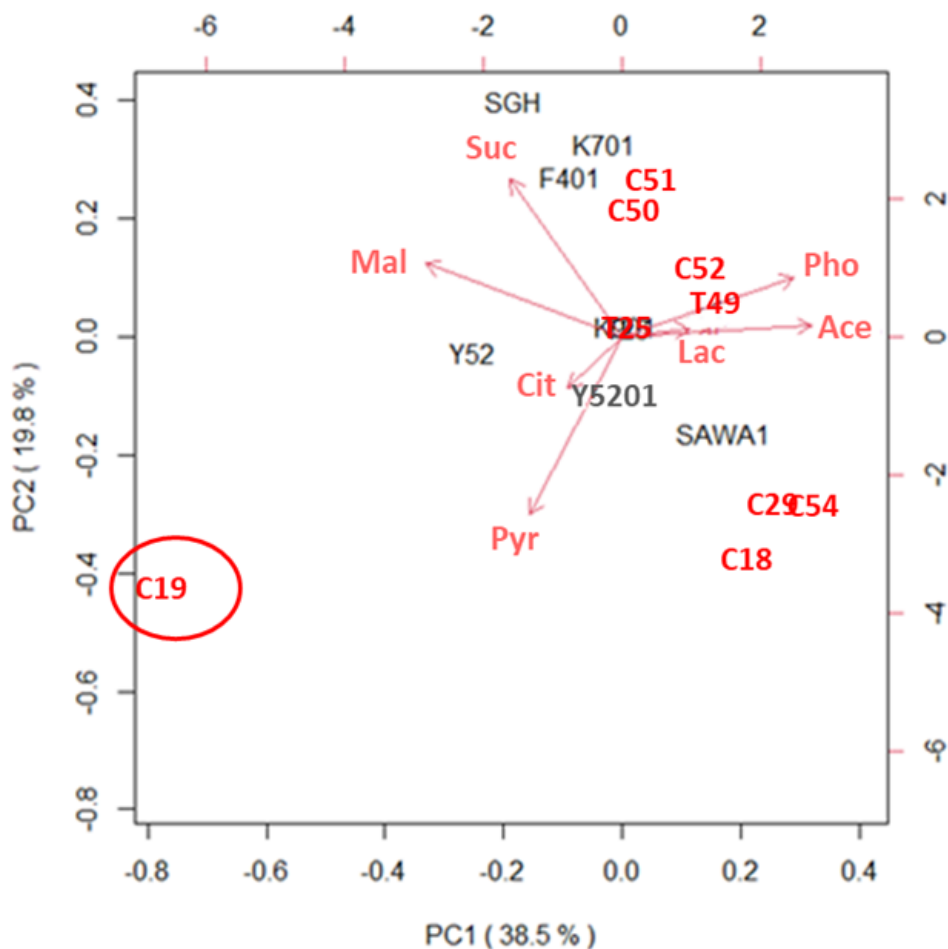


Fig. 3-4. Results of PCA using only organic acids values of the supernatant with brewing test.

PCA was performed using only the organic acid components in the sake samples from the small-scale sake brewing test in triplicate. The parameters indicated as red letters are seven organic acids: Pho, phosphoric acid; Cit, citric acid; Mal, malic acid; Pyr, pyruvic acid; Suc, succinic acid; Lac, lactic acid; and Ace, acetic acid. Mean values were standardized and used for PCA (mean is 0 and variance is 1). The eigenvalue of the correlation coefficient matrix was used to calculate the principal components axis. The direction of the arrow indicates a positive correlation. The horizontal axis is the first principal component axis (PC1), and the vertical axis is the second principal component axis (PC2). The value of PC1 or PC2 represents the contribution rate.

6種の香気成分と7種の有機酸の成分分析値を用いたPCAの結果では、変異株9株は青色の円で示すC50株、C51株、C52株、T25株、T49株、黄色の円で示すC18株、C29株、C54株、赤色の円で示すC19株の3つのグループに分けられた(Fig. 3-5)。このグルーピングはFig. 3-3Aと同様であったため、変異株のグルーピングは、有機酸よりも香気成分が大きく影響していることが示唆された。

小杉らは、リンゴ酸、ピルビン酸の生産量が増加し、酢酸の生産量が減少した清酒酵母変異株を取得したことを報告している⁹⁹⁾。これは変異株のミトコンドリア活性の低下が考えられる。ミトコンドリアの活性が低下すると、ピルビン酸が細胞質に蓄積され、過剰なピルビン酸が細胞質内でリンゴ酸に変換される¹⁰⁰⁾。また、ミトコンドリア活性の低下は、細胞質のNADH/NAD⁺比の増加をもたらし、NADH依存性のリンゴ酸デヒドロゲナーゼによるリンゴ酸の生産量が多くなり、NAD⁺依存性のアセトアルデヒドデヒドロゲナーゼによる酢酸の生産量が少なくなる⁹⁹⁾。本実験で取得した変異株C19株は、リンゴ酸とピルビン酸の生産量が高く、酢酸の生産量が低く(Table 3-2)、中山ら¹⁰⁰⁾が取得した清酒酵母変異株の性質と類似していることから、C19株はミトコンドリアの活性が低下している可能性がある。

最後に、C19株は約14%のエタノールを生産したことから(Table 3-3)、清酒醸造に必要な最低限のエタノール生産能を有していたと考えられる。C19株で醸成した製成酒サンプルの日本酒度(SMV)は他の株に比べて小さかったことから、C19株の発酵速度は他の株に比べて若干遅いと考えられる。これは酒母製造の際、初期の酵母細胞数を増やし、汲水歩合を上げること等、発酵条件を検討することで改善が期待できる。

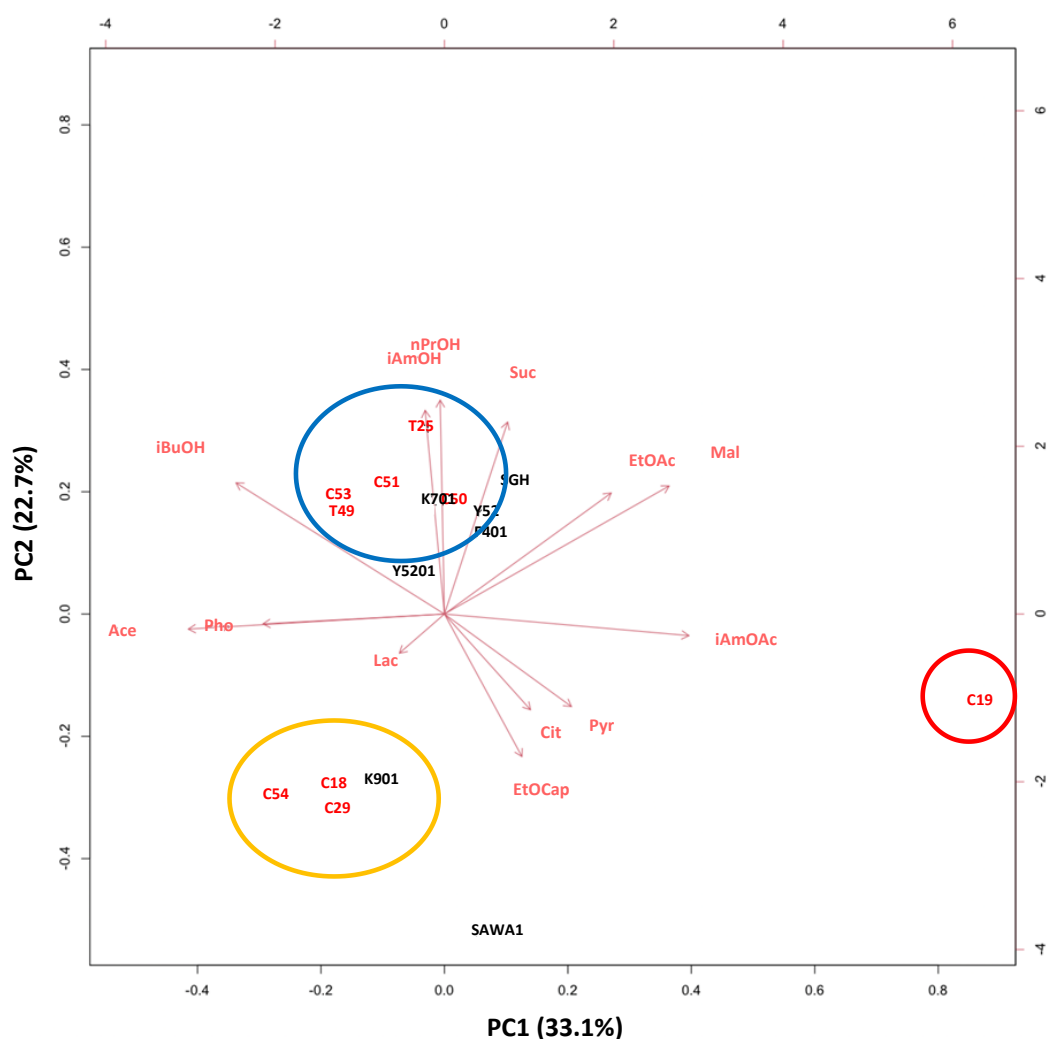


Fig. 3-5. Results of PCA using aroma compounds and organic acids values of the supernatant with brewing test.

PCA was performed using aroma compounds and organic acids components in the sake samples from the small-scale sake brewing test in triplicate. The parameters indicated as red letters are six aroma compounds (EtOAc, ethyl acetate; iAmOH, isoamyl alcohol; iAmOAc, isoamyl acetate; EtOCap, ethyl caproate; iBuOH, isobutanol; and nPrOH, n-propanol), and seven organic acids (Pho, phosphoric acid; Cit, citric acid; Mal, malic acid; Pyr, pyruvic acid; Suc, succinic acid; Lac, lactic acid; and Ace, acetic acid). Mean values were standardized and used for PCA (mean is 0 and variance is 1). The eigenvalue of the correlation coefficient matrix was used to calculate the principal components axis. The direction of the arrow indicates a positive correlation. The horizontal axis is the first principal component axis (PC1), and the vertical axis is the second principal component axis (PC2). The value of PC1 or PC2 represents the contribution rate. Red color letters indicate nine mutant strains.

Table 3-3.

Ethanol concentration and sake meter value (SMV) of the sake samples from the small-scale brewing test.

Parameter	Y5201	C18	C19	C29	C50	C51	C52	C54	T25	T49
Ethanol (%)	16.52 ± 0.22	14.71 ± 0.13	13.74 ± 0.02	14.65 ± 0.08	16.90 ± 0.11	16.94 ± 0.08	17.04 ± 0.22	14.85 ± 0.04	17.38 ± 0.16	16.86 ± 0.13
Sake meter value	-15.95 ± 1.01	-32.36 ± 0.28	-39.73 ± 0.23	-33.01 ± 0.30	-15.34 ± 0.31	-17.18 ± 0.49	-14.76 ± 1.45	-32.49 ± 0.83	-12.88 ± 0.58	-16.47 ± 0.72

The small-scale brewing test was performed in triplicate.

Plus or minus represents standard deviations.

第4項 シンクロトロン光照射により導入される変異パターン

シンクロトロン光照射により導入される変異パターンを明らかにするため、親株 Y5201 株と変異株 9 株の Whole genome sequencing および比較ゲノム解析を行った。Table 3-4 にその結果を示した。シンクロトロン光照射により導入される変異のうち、約 80~90%が一塩基置換、約 10~20%が挿入/欠失 (Indel) 変異であることが明らかとなった。

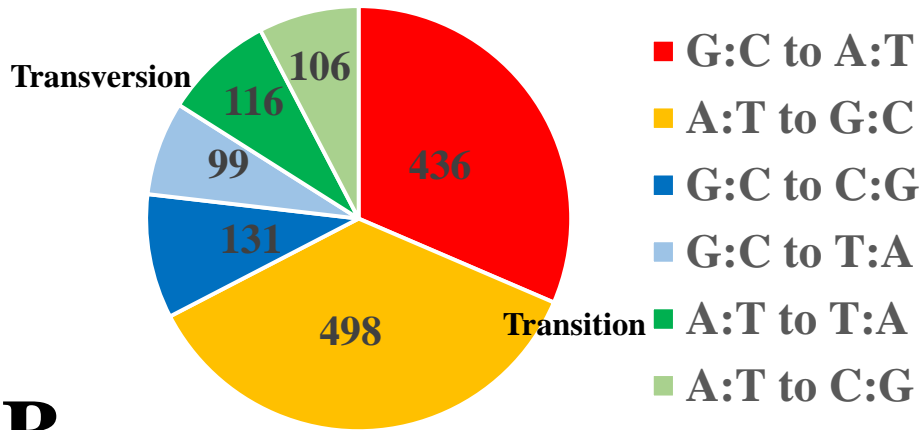
Table 3-4. Pattern of mutation points.

Mutants	Number of mutation points	Single nucleotide substitutions	Transition	Transversion	Indels	Insertion	Deletion	Rate of single	Rate
								nucleotide substitutions (%)	of Indels (%)
C18	84	67	41	23	17	7	10	79.76	20.24
C19	233	209	138	71	24	14	10	89.70	10.30
C29	273	251	177	74	22	15	7	91.94	8.06
C50	80	65	43	22	15	9	6	81.25	18.75
C51	244	218	148	70	26	14	12	89.34	10.66
C52	78	62	41	21	16	9	7	79.49	20.51
C54	221	194	130	64	27	17	10	87.78	12.22
T25	289	257	172	85	32	16	16	88.93	11.07
T49	75	63	41	22	12	7	5	84.00	16.00

一塩基置換の詳細なパターンについて Fig. 3-6A に示した。シンクロトロン光照射により、G:C から A:T への変異を A:T から G:C への変異と同じ頻度で誘発した。トランスバージョンは全一塩基置換の約 30% を占めた。また、シンクロトロン光照射によって導入された Indel 変異は、1~2 bp の塩基サイズが高頻度で生じた (Fig. 3-6B)。先行研究で、UV 照射によって誘発される変異のほとんどは、シトシンを含むジピリミジン部位での G:C から A:T へのヌクレオチド置換であり⁶⁰⁾、EMS によって誘発される突然変異の 98% 以上は、G:C から A:T への一塩基置換であることが明らかとなっている⁶³⁾。EMS や UV 照射と比較して、本実験の結果はシンクロトロン光照射が多様な変異を誘発し得ることを示唆している。UV においても、その波長の違いで誘発される変異が異なることが報告されている。例えば、UVB (280-320 nm) や UVC (200-280 nm) の短波長の紫外線は、シトシンを含むジピリミジン配列で G:A から C:T への突然変異を高頻度で誘発するが、UVA (320-400 nm) のような長波長の紫外線は主に G から T へのトランスバージョンを誘発する割合が増加することが明らかとされている⁶⁰⁾。また、紫外線よりも短波長の X 線による変異誘発では、DNA 鎖切断、脱塩基等様々な要因から塩基置換だけでなく、塩基欠失も生じることが報告されている¹⁰¹⁾。これらの知見を考慮すると、赤外線から X 線まで広い波長範囲を取り出すことを可能とするシンクロトロン光の特徴が、誘発される変異パターンの多様性をもたらしたと考えられる。また、EMS や UV 照射に比べて Indel 変異の発生頻度が高いことは、フレームシフト変異による遺伝子機能および形質の変化を引き起こしやすいと考えられる。本実験の結果から、酵母菌をはじめとする微生物育種に対して、シンクロトロン光は有効な変異誘発原であることが示唆された。

A

Substitutions patterns

**B**

Base size of Indel

The number of Indel mutations in the genome of nine mutants

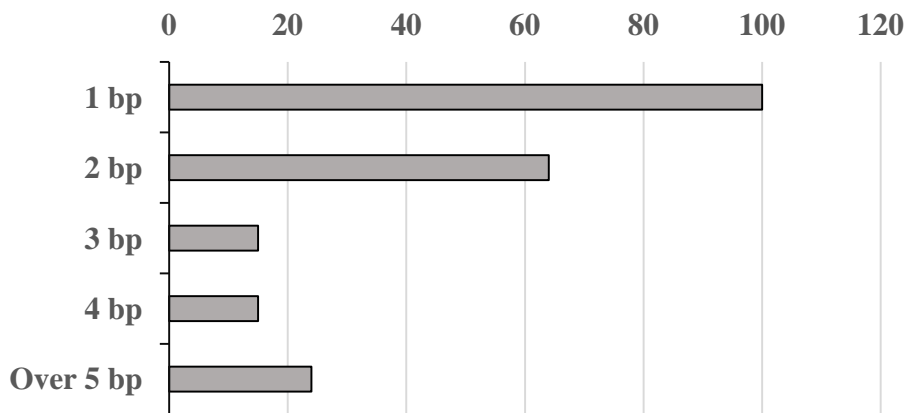


Fig. 3-6. Substitutions and Indel base size patterns by whole-genome sequencing analysis. Whole-genome sequencing analysis of the mutants was performed to identify mutation points and patterns. Patterns of single nucleotide substitutions (A). Patterns of base size and number of occurrences induced insertion/deletion (Indel) mutation in the nine mutant strains (B).

親株 Y5201 株と変異株 C19 株の比較ゲノム解析の結果、ナンセンス変異遺伝子を 1 つ、ミスセンス変異遺伝子を 48 つ、フレームシフト変異遺伝子を 1 つ同定した(Table 3-5)。先行研究で、*FAS2* 遺伝子の変異によりカプロン酸エチルの生産性が高くなること^{102, 103}、*MGA2* 遺伝子や *LEU4* 遺伝子の変異により酢酸イソアミルの生産性が高くなること^{93, 104}が明らかになっている。C19 株の *FAS2* 遺伝子、*MGA2* 遺伝子、*LEU4* 遺伝子に変異は存在しなかった。また、Table 3-5 に示した遺伝子の中には、カプロン酸エチルや酢酸イソアミルの高生産性に直接関与していると思われる遺伝子はなかったことから、これらの遺伝子が間接的に関与している、あるいは転写因子結合部位などの遺伝子上流領域の変異がカプロン酸エチルや酢酸イソアミルの高生産性につながったと推察される。ミスセンス変異が導入された 48 の遺伝子のうち、*YNL144C*、*YNL115C*、*AIM24*、*NAM9*、*YJR079W* の 5 つの遺伝子はミトコンドリアに関連する遺伝子であった。*Aim24p* は、ミトコンドリアの内膜に局在し、*MICOS* 複合体と相互作用するタンパク質であり、このタンパク質は正常な呼吸成長とミトコンドリアの構造形成に必須であることが明らかになっている¹⁰⁵。*YJR079W* は機能未知のタンパク質であるが、変異が導入されるとミトコンドリアの呼吸障害を引き起こす¹⁰⁶。これらの遺伝子に導入された変異は、C19 株においてミトコンドリア活性の低下が生じているという上述の仮説（本章第 3 節第 3 項）と関連性があることが推察される。

先行研究においても、イネ⁶⁴、イチゴ⁶⁵、キク⁶⁶、カーネーション⁶⁷等でシンクロトロン光を利用した植物育種が行われている。また、清酒酵母においてもシンクロトロン光を利用した育種例が報告されている^{71, 72}。しかしながら、これらの報告は吸収線量の条件や表現型の解析のみで、ゲノム解析の結果は得られていない。本研究の成果はシンクロトロン光照射により導入される変異パターンについて、ゲノムレベルで報告した初めての例である。

Table 3-5.**Genes that mutations were introduced in strain C19 genome.**

Gene name	
Frameshift mutation	<i>YNL146C-A</i>
Nonsense mutation	<i>RPO21</i>
	<i>AIM24</i> <i>FAR11</i> <i>NAM9</i> <i>YJR079W</i>
	<i>APC1</i> <i>FUN12</i> <i>NOPI3</i> <i>YLL054C</i>
	<i>BIR1</i> <i>HOC1</i> <i>RNR1</i> <i>YNL108C</i>
	<i>BUD4</i> <i>IMD2</i> <i>RPA34</i> <i>YNL115C</i>
	<i>CDC11</i> <i>INP52</i> <i>RPC19</i> <i>YNL144C</i>
Missense mutation	<i>DCP2</i> <i>KRE33</i> <i>RPL1B</i> <i>YNL146C-A</i>
	<i>DMA2</i> <i>LHP1</i> <i>SPC98</i> <i>YOR389W</i>
	<i>DSE4</i> <i>MEP2</i> <i>TCB2</i> <i>YPL158C</i>
	<i>EAF7</i> <i>MET3</i> <i>TCB3</i>
	<i>EMC2</i> <i>NAF1</i> <i>YGP1</i>

第4章 有明海からの酵母の分離と 醸造適性評価

第1節 緒言

清酒の酒質は原料米品種や水などの原料的な因子、精米歩合や仕込配合などの製造的な因子、種麴や清酒酵母などの微生物的な因子など多数の因子により特徴づけられる。これら多数の因子の中でも、清酒酵母が発酵過程で生産する香気成分や有機酸などは酒質の特徴づけに大きく影響するため¹⁰⁷⁾、代謝物組成の異なる新規清酒酵母株の取得は酒質のバリエーションを大きく広げることにつながる。現在、協会7号酵母、協会9号酵母およびその派生株など日本醸造協会の頒布する協会清酒酵母が多くの酒造メーカーで使用されている¹⁰⁸⁾。協会清酒酵母はエタノール生産能が高いため、安全で安定した清酒醸造が期待できる一方で、遺伝的なルーツの多様性は乏しい。

第2章では協会7号酵母をルーツとする清酒酵母 Y52 株の自然変異による育種を、第3章では Y52 株の派生株 Y5201 株をシンクロトン光により変異誘発する手法で育種を行った。これらの育種株と遺伝的に異なるルーツを持つ株の取得法として、自然界からの新規有用清酒酵母の分離は有望な方法であると考えられる。また、清酒酵母を地域特有のものから分離することで、清酒に地域的なオリジナリティを付与することができ、ブランディングの面でも有益である。そのために、分離源の選定は非常に重要と考える。

有明海は九州の西側に位置する半閉鎖型の海である。この海は、最奥部では6メートル以上に達する日本最大の干満の差があり、干潮時には砂や泥の堆積物からなる広大な干潟が出現する¹⁰⁹⁾。この特異な干潟には、多種多様な生物が生息しているため¹¹⁰⁾、微生物の分離源としても大いに期待できる。実際に、有明海干潟からは多くの乳酸菌^{111, 112)}や *Pseudomonas* sp.¹¹³⁾が分離されている。自然界から清酒酵母を分離した報告例の多くは、花^{108, 114, 115)}や樹木¹¹⁶⁾を分離源としており、海洋酵母を分離した報告はいくつかあるが^{117, 118)}、清酒酵母を分離した例は非常に少ない¹¹⁹⁾。

また、佐賀県は有明海に面し、清酒醸造が盛んな県であるため、有明海から清酒酵母を分離することは学術的にも、清酒のブランディングの面でも非常に意義があることであると考える。

本章では、有明海の干潟から清酒醸造に応用可能なエタノール生産性を有する *S. cerevisiae* のスクリーニングを試みた。次に、既存の清酒酵母株と分離株の染色体 DNA サイズを比較するために、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) による核型分析を行った。さらに、分離株の醸造特性を小仕込試験および製成酒サンプルの分析により評価した。

第2節 実験材料と方法

第1項 使用菌株と培地

本章で使用した *Saccharomyces cerevisiae* 協会清酒酵母7号 (K7)、協会清酒酵母9号 (K9)、協会清酒酵母701号 (K701)、協会清酒酵母901号 (K901) は独立行政法人酒類総合研究所 (広島県東広島市) から分譲いただいた。清酒酵母 Y52 株は有薫酒造株式会社 (福岡県久留米市) の清酒醪中より分離された。イチゴから分離された清酒酵母 SGH 株⁷³⁾は佐賀県工業技術センターの澤田和敬博士よりご提供いただいた。

麴エキス培地は前述の方法で調製し (第3章第2節第1項)、集積培養に用いた。YPD 培地 (酵母エキス [10 g/L]、ポリペプトン [20 g/L]、グルコース [20 g/L]) は通常の酵母培養に用いた。YPD 寒天培地は、YPD 培地に寒天 [20 g/L] を加えて調製した。YPD15 培地 (酵母エキス [10 g/L]、ポリペプトン [20 g/L]、グルコース [15 g/L]) は 10°C 下でのエタノール生産性試験に用いた。

第2項 有明海干潟泥からの酵母の分離

干潟底泥サンプルは佐賀県有明水産振興センター (佐賀県小城市) よりご提供いただき、分離源には 2016 年 5 月に六角川河口の干潟 (33°11.766'N、130°12.494'E) から採取された泥を用いた。この干潟泥サンプルを、乳酸で pH 4.5 に調整した 100 mL の麴エキス培地 (100 µg/mL クロラムフェニコール含有) に添加し、30°C で 2-3 日間、静置培養を行った。激しく発泡が確認されたサンプルについて、培養液を YPD 寒天培地プレートに画線塗布し、30°C で 3 日間培養した。YPD 寒天培地上に生育が確認された酵母様のコロニーに関して、colony direct PCR を以下の手順で行った。酵母様のコロニーを釣菌し、0.02 N 水酸化ナトリウム水溶液に懸濁し、95°C で 10 分間の熱処理後、室温で冷却した。この細胞懸濁液を鋳型 DNA とし、プライマーとして、ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')および

び ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATGC-3')、DNA ポリメラーゼ KOD FX Neo (東洋紡績) を用いて、18S rDNA および 26S rDNA の内部転写スペーサー (ITS) 領域 (ITS1-5.8S rDNA-ITS2 領域) を増幅した¹²⁰⁾。反応条件は①初期変性 (94°C、2分)、②変性 (94°C、1分)、③アニーリング (60°C、1分)、④伸長 (68°C、1分) とし、②-④を 30 サイクル行った。PCR 産物を 1%アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色した。次に、グルコース濃度を 15%に調製した YPD15 液体培地により、低温下でのエタノール生産性を確認する試験を行った。分離した株を YPD15 液体培地に接種し、10°Cで 20 日間、静置培養した。培養液を採取し、遠心分離 (13,000 ×g、5 min、4°C) 後、培養上清をセルロースアセテート膜フィルター (0.45 μm ; ADVANTEC) により濾過した。その後、高速液体クロマトグラフィー (HPLC ; 日本ジャスコ株式会社) に供し、エタノール生産量を分析した。カラムには Shodex SUGAR SH1011 (8.0 mm I.D.×300 mm ; 昭和電気株式会社) を用い、移動相には 3 mM 過塩素酸水溶液、流速 1 mL/min、カラム温度 50°C で分析を行った。検出器には示差屈折率検出器 (RI-2031 Plus ; 日本分光株式会社) を用いた。

第 3 項 塩基配列解析による分離酵母の同定

分離株は、ITS 領域の塩基配列解析により同定した。前述のように colony direct PCR により ITS 領域を増幅した後 (第 4 章第 2 項)、ISOSPIN PCR Product (ニッポンジーン株式会社) を用いて PCR 産物を精製した。サイクルシーケンス反応は、プロトコルに従い、BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) を用いて行った¹²¹⁾。シーケンシングプライマーには、上述のプライマー ITS1、ITS4、およびプライマー ITS2(5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3')、ITS3(5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3') を使用した¹²²⁾。DNA シーケンシングは Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) で実行した。塩基配列の相同性解析は、BLAST¹²¹⁾を用いて National

Center for Biotechnology Information (NCBI) のデータベースで検索した。清酒酵母 K7 (Accession no.AB180471) および K9 (Accession no.AB180472)、焼酎酵母 S2 (Accession no.AB279742)および焼酎酵母 Kagoshima (Accession no.AB280538)、ワイン酵母 OC-2 (Accession no.279746)、ビール酵母 NCYC 1245 (Accession no.280540)、ウイスキー酵母 IFO 2112 (Accession no.AB212259)およびウイスキー酵母 IFO 2106 (Accession no.AB279750)、パン酵母 JP (Accession no.AB280542)の ITS 領域塩基配列は NCBI データベース (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) で取得した。

第 4 項 染色体 DNA の抽出およびパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE)

酵母細胞からの染色体ゲノム DNA の抽出は CHEF Yeast Genomic DNA Plug Kits (Bio-Rad, Richmond, CA)を用いて行った。各酵母菌株を YPD 液体培地 10 mL に接種し、160 rpm で攪拌しながら 30°Cで一晩培養した。OD₆₀₀換算で 6×10^7 細胞分の培養液を採取し、遠心分離 (5,000 ×g, 10 min, 4°C) により細胞を回収した後、62.5 μL の Cell Suspension Buffer (上記 Kit 内包) に再懸濁した。9 μL の lyticase (上記 Kit 内包) を加えた後、直ちに 37.5 μL の 2% CleanCut agarose を添加し、ピペッティングにより優しく十分に混和した。この混合液 90 μL を使い捨てプラグの型に添加し、4°C、15 分間のインキュベートでプラグを固めた。固まったプラグを Lyticase 溶液 (上記 Kit 内包) に添加し、37°Cで 2 時間インキュベートした。溶液を除去した後、Proteinase K 溶液を添加し、50°Cで一晩インキュベートした。プラグを 1×Wash Buffer (3 回目の Wash Buffer のみ 10 mM Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF ; 和光純薬) を含む) に添加し、20°C、1 時間、300 rpm で穏やかに攪拌しながら洗浄した。4 回洗浄した後、プラグは 1×Wash Buffer に浸し、4°Cで保存した。

PFGE は以下のように行った。サンプルプラグは、1.0% Pulsed Field Certified Agarose (Ultra Pure DNA Grade Agarose ; Bio-Rad) ゲルに包埋させ、CHEF-DR III (Bio-Rad) 電

電気泳動装置を用いて、0.5×Tris-borate EDTA buffer (0.5×TBE) 内で電気泳動を行うことで染色体 DNA を分離した。泳動相は 11.5°C¹⁴⁾に保持し、電圧 6.0 V/cm、角度 120°、スイッチタイムを 60 秒から 120 秒、および泳動時間を 24 時間で行った。分子量マーカーは *S. cerevisiae* strain YNN295 (Bio-Rad) を用いた。電気泳動後の染色体 DNA は GelRed™ Nucleic Acid Stain 10,000X in DMSO (Biotium, Inc., USA) で染色後、ChemiDoc XRS (Bio-Rad) を用いて UV 照射下で撮影した。

第 5 項 分離酵母のキラ－性試験

分離酵母のキラ－性の試験は竹田らの方法論¹²³⁾に従い、キラ－酵母に感受性の酵母を重層する方法で行った。本実験では、キラ－性酵母の感受性酵母として、清酒酵母 K7 株を用いた。

第 6 項 小仕込試験

一般的な清酒酵母である K701 株、K901 株および清酒酵母 Y52 株を試験対象株とした。小仕込試験は前述の方法に準じて行った (第 2 章第 2 節第 4 項)。総米 80 g の三段で仕込みを行い、発酵温度を 11°C 一定とした。すべての仕込は $n = 3$ で行った。

第 7 項 製成酒サンプルの成分分析

製成酒サンプルの成分分析は前述の方法に準じて行った (第 2 章第 2 節第 5 項)。

第 8 項 主成分分析および統計解析

分離株の醸造特性を評価するために、小仕込試験で得られた製成酒サンプルの成分分析値を用いて主成分分析を行った。パラメータとして、6 種類の香気成分 (酢酸エチル、イソアミルアルコール、酢酸イソアミル、カプロン酸エチル、イソブタノール、n-プロパノ

ール) と、7種類の有機酸(リン酸、クエン酸、リンゴ酸、ピルビン酸、コハク酸、乳酸、酢酸)を用いた。生データは標準化(平均0、分散1)し、相関係数行列の固有値を用いて主成分軸を算出した。主成分分析はRのprincomp関数(R v.4.0.1)を用いて行った。グループ間の醸造特性の違いは、パラメトリックデータではWelchのt検定、ノンパラメトリックデータではWilcoxonの順位和検定を用いて検定した。すべての統計解析はR(R v.4.0.1)を用いて行った。

第3節 実験結果及び考察

第1項 有明海からのエタノール高生産性を有する酵母菌の分離

本実験では、有明海干潟の泥から高エタノール生産性を有する酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を分離することを目的とした。干潟の泥サンプルを麴エキス培地(クロラムフェニコール含有)に添加し、30°Cで発泡が確認されるまで静置培養した。激しい発泡が確認された培養液をYPD寒天培地に画線塗布し、培養した結果、丸く滑らかな白色クリーム色のコロニー形態を有する99株が得られた。これらのコロニー形態は *S. cerevisiae* の形態的特徴と一致していた¹²⁴⁾。これら99株から *S. cerevisiae* の候補株を絞り込むために、18S rDNAと26S rDNAのITS領域をcolony direct PCRにより増幅し、アガロースゲル電気泳動を行った。真菌類では、この領域のDNA断片の長さや塩基配列は種によって異なる¹²⁵⁾、¹²⁶⁾。 *S. cerevisiae*、*S. paradoxus*、*S. mikatae* の3種の *Saccharomyces* 属においては、ITS領域の大きさに明確な違いはないが、*S. cerevisiae* 候補株を選択することが可能である¹¹⁶⁾。H1-1株、H1-2株、H1-3株、H3-1株、H3-2株の分離株5株について、そのITS領域DNA断片サイズは *S. cerevisiae* Y52株と同等であった(Fig. 4-1)。この結果から、分離株5株は *S.*

cerevisiae、*S. paradoxus*、*S. mikatae* のいずれかであることが示唆された。分離株 5 株について、YPD15 培地での培養試験を行なった。分離株 5 株のエタノール生産量は、清酒酵母 Y52 株と同程度であった。本実験において、有明海干潟の泥から低温条件下(10°C)、清酒酵母 Y52 株と同等のエタノール生産性を有する 5 株の酵母菌を分離することに成功した。

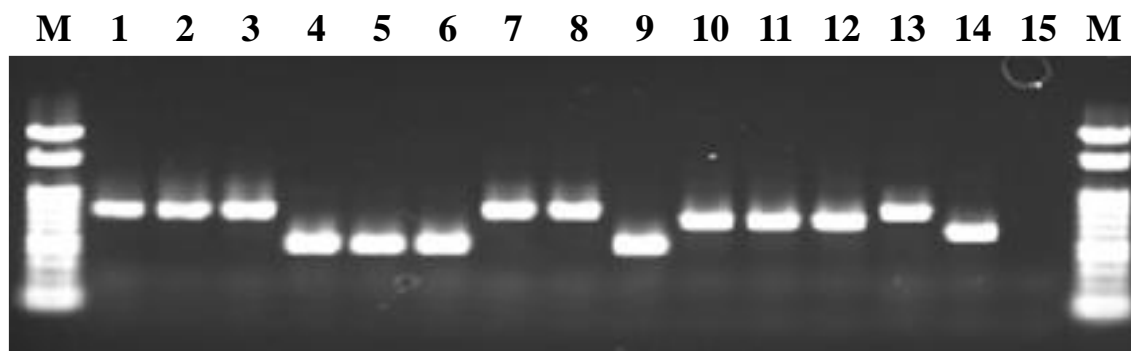


Fig. 4-1. PCR fragment length of the ITS region (ITS1-5.8S rDNA-ITS2 region) of yeast strains isolated from Ariake Sea tidal flats.

Colony-direct PCR was performed from each strain as described in the text. Lane M shows DNA size markers (Gene Ladder 100; NIPPON GENE, Japan). Lane 1: H1-1; Lane 2: H1-2; Lane 3: H1-3; Lane 7: H3-1; Lane 8: H3-2; Lane 13: *S. cerevisiae* Y52; Lane 14: *Candida albicans*; Lane 15: no template. Lanes 4–6, 9, and 10–12 show results from other isolated strains not characterized in this study.

第 2 項 塩基配列解析による分離酵母の同定

分離株 5 株を同定するために、DNA シークエンシングによる ITS 領域塩基配列の決定および BLAST による相同性検索を行った。その結果、分離株 5 株はすべて *S. cerevisiae* と同定された。また、NCBI に登録されている清酒、焼酎、パン、ビール、ウイスキー、ワイン酵母の ITS 領域塩基配列を用い、分離株との相同性比較を行った。分離株 5 株の ITS 領

域塩基配列は、清酒酵母 K7、清酒酵母 K9、焼酎酵母 S2、焼酎酵母 Kagoshima と 100%の相同性が確認された(Fig. 4-2)。清酒、焼酎、ワイン、ビール、ウイスキー、パンなどの産業利用に関わる酵母の研究において、ITS1 の 4 か所のヌクレオチドと ITS2 の 2 か所のヌクレオチドに多型性が認められ、3 つのグループに分類できることが報告されている¹²⁷⁾。この知見によると、分離株 5 株の *S. cerevisiae* は、清酒酵母グループに分類することができ、遺伝的に清酒酵母と近縁であることが示唆された。

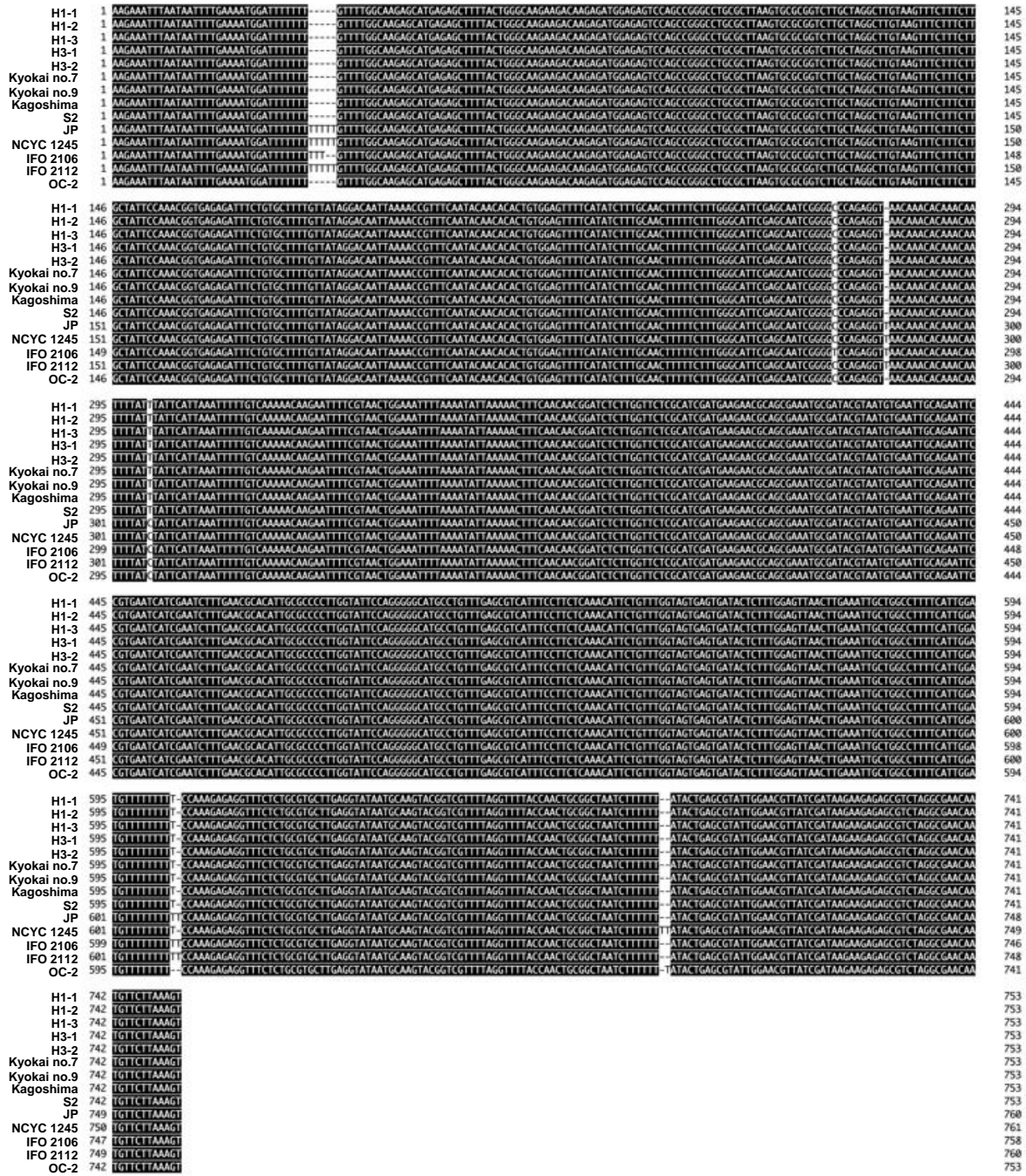


Fig. 4-2. Alignment analysis of the nucleotide sequence of ITS region in each yeast strains.

From the top, H1-1, H1-2, H1-3, H3-1, H3-2, sake yeast kyokai no.7, sake yeast kyokai no.9, shochu yeast kagoshima, shochu yeast S2, bakery yeast JP, beer yeast NCYC 1245, whisky yeast IFO 2106, whisky yeast IFO 2112, and wine yeast OC-2. Black shading indicates that the sequences are identical in all yeast strains, whereas white shading indicates that the sequences are different from each yeast strains.

第3項 パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) による分離酵母の核型解析

分離株 5 株 (H1-1 株、H1-2 株、H1-3 株、H3-1 株、H3-2 株) と清酒酵母 6 株 (K7 株、K701 株、K9 株、K901 株、Y52 株、SGH 株) の染色体 DNA の大きさを PFGE により比較した。分離株 5 株の染色体 DNA の電気泳動パターンは、清酒酵母 K7、K701 株、K9 株、K901 株、Y52 株、SGH 株の電気泳動パターンと類似していたが、染色体 DNA マーカーとして使用した実験室酵母 *S. cerevisiae* YNN295 株の電気泳動パターンとは異なっていた (Fig. 4-3)。清酒酵母の電気泳動パターンは、III 番染色体と VI 番染色体が近接していることが特徴である¹¹⁵⁾。この特徴は、清酒酵母の VI 番染色体末端が他の酵母株に比べて長いことであることが明らかとなっている^{128, 129)}。分離株 5 株の電気泳動パターンは、III 番染色体と VI 番染色体のバンドが近接しており、清酒酵母の特徴と一致していた。したがって、*S. cerevisiae* と同定された分離株 5 株は、清酒酵母と近縁である可能性が高いことが示唆された。このことは、前述の ITS 領域の塩基配列解析の結果と一致している。

S. cerevisiae のゲノム解析に関する研究において、染色体末端付近の配列に高い頻度で変異が生じるとされている¹³⁰⁾。染色体末端は組換えによる欠失が生じやすく、染色体末端が酵母の多様性の源であることが示唆されている¹³¹⁾。しかしながら、PFGE の結果において、分離株 5 株 (Fig.4-3、Lanes 6-10) と清酒酵母の 5 株 (Fig.4-3、Lanes 1-5) の間で III 番染色体に顕著な差は見られなかった。この結果は、本研究の分離株と同様に自然界から分離された清酒酵母 SGH 株 (Fig.4-3、Lanes 11) についても同様であった。また、花から分離された酵母に関して、本実験と同様に PFGE による核型解析を行った報告においても、清酒酵母 K9 株と分離株の電気泳動パターンに差はみられていないため¹¹⁵⁾、PFGE では自然界から分離した清酒酵母と協会清酒酵母の違いを見出すことが難しいと思われる。

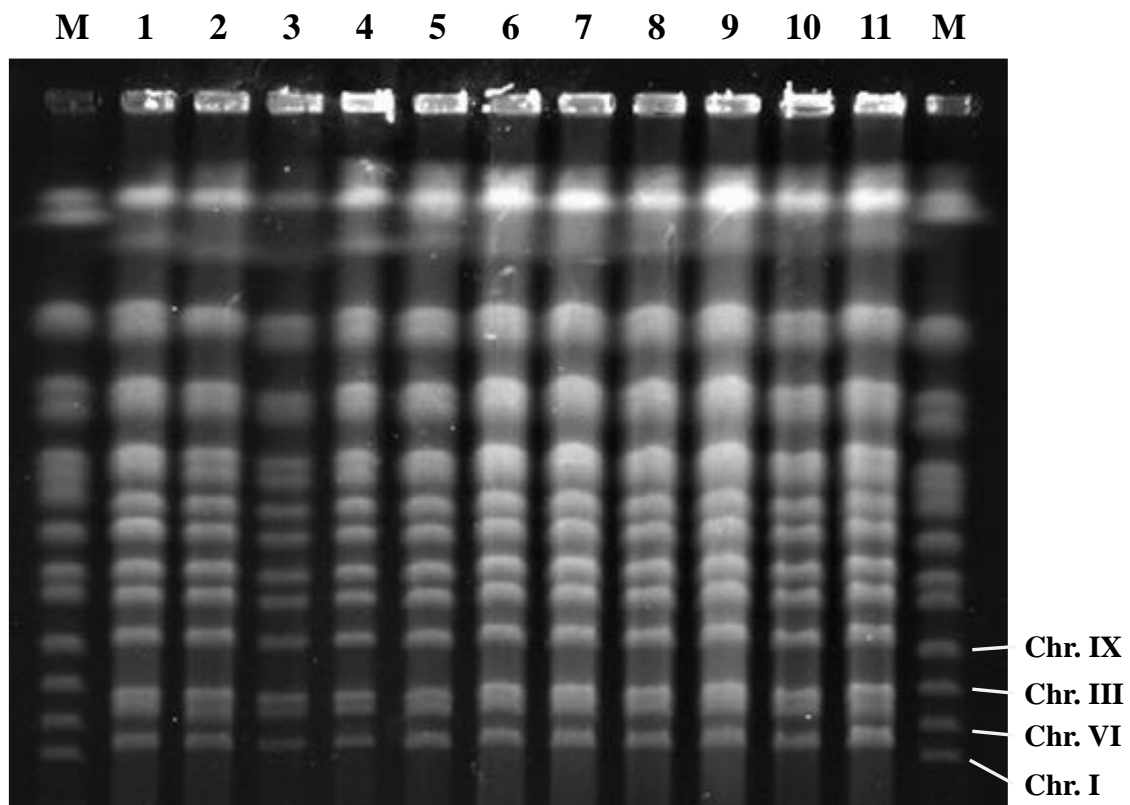


Fig. 4-3. PFGE analysis of chromosomal DNAs of each *S. cerevisiae* strains.

Chromosomal DNA was extracted from each yeast strains and PFGE was performed as described in the text. Lane M shows a commercial chromosome marker preparation from *S. cerevisiae* strain YNN295. Lane 1: K7; Lane 2: K701; Lane 3: K9; Lane 4: K901; Lane 5: Y52; Lane 6: H1-1; Lane 7: H1-2; Lane 8: H1-3; Lane 9: H3-1; Lane 10: H3-2; Lane 11: SGH.

第4項 分離酵母のキラ－性試験

Saccharomyces cerevisiae の中には、同一の種に対して致死作用を有する killer factor と呼ばれる物質を生産するキラ－酵母が存在する¹³²⁾。清酒酵母はこの killer factor に対して感受性を示すため、開放系で製造される清酒醸造においてキラ－酵母による汚染は致命的となる¹³²⁾。そのため、野生酵母に対してはキラ－性の有無を確かめる必要がある。本研究で分離した5株の *S. cerevisiae* は試験の結果、全てキラ－性がないことが明らかとなった。

第5項 小仕込試験による分離した *S. cerevisiae* 5株の醸造特性評価

分離株 H1-1 株、H1-2 株、H1-3 株、H3-1 株、H3-2 株の醸造特性を評価するために、小仕込試験を行った。小仕込試験期間の総炭酸ガス (CO₂) 減量を指標として、各酵母菌の発酵能力を評価した(Fig. 4-4)。発酵初期の5日目までは、各酵母株間で CO₂ 排出量に差はなく、分離株5株は清酒酵母 K701 株、K901 株、Y52 株と同様の発酵能力を示した。酵母の増殖に伴い、醪中のアルコール濃度が上昇する発酵中期、発酵後期においても、分離株は清酒酵母とほぼ同等の発酵力を示した。また、分離株 H3-1 株の CO₂ 排出量が分離株の中で最も多く、清酒酵母 K901 株の排出量に匹敵した。エタノール分析の結果、分離株5株はいずれも約15%のエタノールを生成した(Table 4-1)。これらの結果から、有明海から分離した5株の *S. cerevisiae* は、清酒醸造に利用可能なエタノール発酵能を有していることが示唆された。

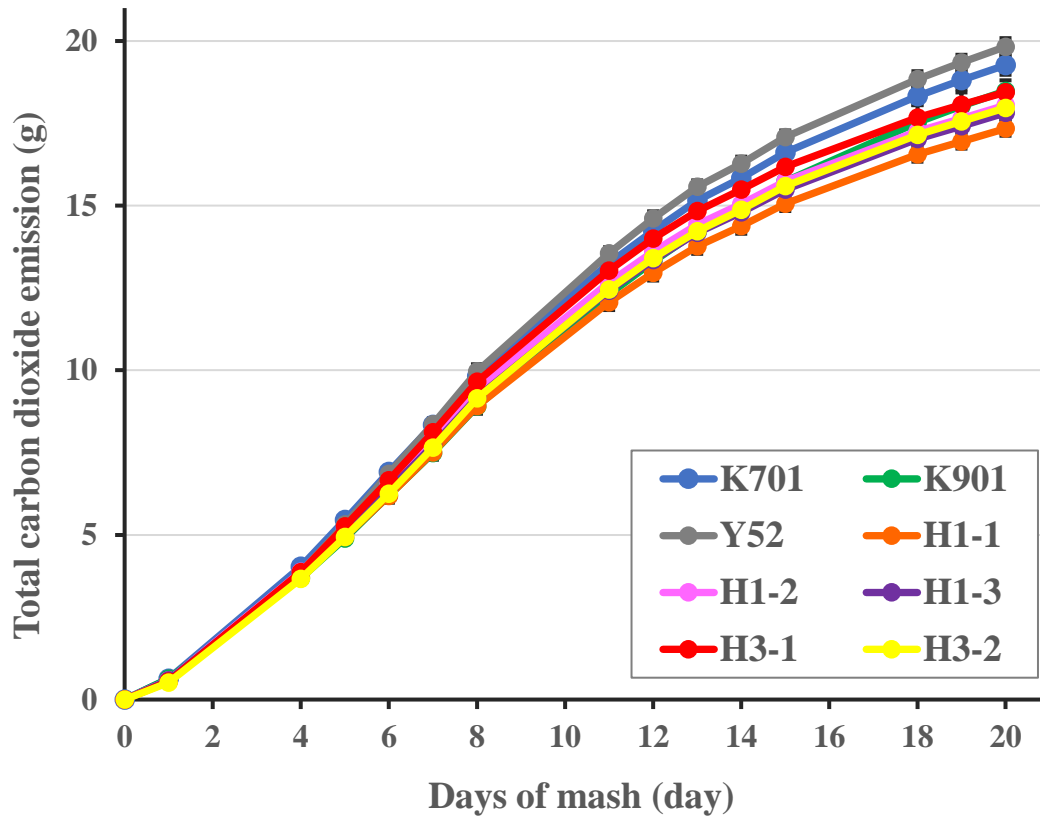


Fig. 4-4. Total carbon dioxide (CO₂) emission of each yeast strain in the small-scale sake brewing test in triplicate.

Each strain was tested in triplicate; error bars indicate standard deviation. Strains are shown by color: K701 (blue), K901 (green), Y52 (gray), H1-1 (orange), H1-2 (pink), H1-3 (purple), H3-1 (red), and H3-2 (yellow).

Table 4-1. Analysis of sake samples on small-scale brewing test using various yeast strains.

Strain	EtOAc	iAmOAc	iAmOH	EtOCap	Cit	Pyr	Mal	Suc	Lac	Ace	Alc
K701	125.7 ± 4.3	7.59 ± 0.3	240.3 ± 14.9	5.98 ± 0.1	82 ± 1	50 ± 5	201 ± 14	661 ± 6	767 ± 0	362 ± 22	16.4 ± 0.2
K901	128.3 ± 5.3	7.47 ± 0.3	210.9 ± 4.9	5.63 ± 0.0	81 ± 0	55 ± 2	158 ± 4	603 ± 2	752 ± 7	387 ± 24	15.6 ± 0.2
Y52	150.0 ± 10.8	8.41 ± 0.3	252.3 ± 6.3	6.26 ± 0.4	87 ± 1	51 ± 1	214 ± 1	658 ± 3	737 ± 6	300 ± 6	16.6 ± 0.0
H1-1	108.3 ± 2.3	6.81 ± 0.2	229.4 ± 1.9	7.44 ± 0.3	83 ± 1	61 ± 5	122 ± 2	594 ± 3	737 ± 7	398 ± 7	14.6 ± 0.2
H1-2	122.1 ± 11.5	7.49 ± 0.6	236.4 ± 6.4	7.32 ± 0.3	85 ± 2	61 ± 3	125 ± 5	592 ± 8	745 ± 9	358 ± 37	15.0 ± 0.3
H1-3	131.2 ± 5.5	8.01 ± 0.2	201.8 ± 21.8	7.81 ± 0.1	84 ± 0	59 ± 4	123 ± 2	591 ± 2	745 ± 5	343 ± 11	15.0 ± 0.0
H3-1	134.2 ± 10.4	9.11 ± 0.5	234.2 ± 11.2	8.41 ± 0.4	85 ± 1	58 ± 1	124 ± 2	568 ± 5	739 ± 8	311 ± 8	15.3 ± 0.2
H3-2	131.1 ± 7.3	8.66 ± 0.5	246.6 ± 5.9	8.64 ± 0.5	85 ± 1	61 ± 1	128 ± 2	581 ± 3	751 ± 2	327 ± 26	15.0 ± 0.3

K701, K901, and Y52 are established sake yeasts strains; H1-1, H1-2, H1-3, H3-1, H3-2 are newly-isolated strains in this study.

Compounds are abbreviated as shown below.

Of the components analysed, the particular important components are shown in this table.

Aromatic compounds (EtOAc: ethyl acetate; iAmOAc: isoamyl acetate; iAmOH: isoamyl alcohol; EtOCap: ethyl caproate).

Organic acids (Cit: citric acid; Mal: malic acid; Pyr: pyruvic acid; Suc: succinic acid; Lac: lactic acid; Ace: acetic acid).

Alc is ethanol concentration (%).

The small-scale brewing test was performed in triplicate; results are shown as means ± standard deviations in units of mg/L.

6種の香気成分と7種の有機酸の成分分析値を用いてPCAを行った。38.1%の寄与率を有する第一主成分軸を基準として、全8株の試験株は、青字で示す3株の既存清酒酵母群（K701株、K901株、Y52株）と赤字で示す5株の分離株群（H1-1株、H1-2株、H1-3株、H3-1株、H3-2株）の2つのグループに明確に分かれた(Fig. 4-5)。第一主成分の固有ベクトル値が大きい上位5成分は、カプロン酸エチル、リン酸、ピルビン酸、リンゴ酸、コハク酸であった(Fig. 4-6、Table 4-2)。これら5つの成分分析値は、清酒酵母群（Aグループ）と分離株群（Bグループ）で有意に異なっていた(Fig. 4-6)。カプロン酸エチルはリンゴ様の香りが特徴的な、清酒の香りとして好まれる成分の一つである⁵⁴⁾。分離株群は清酒酵母群よりもカプロン酸エチルの生成量が多いため(Fig. 4-6a)、分離株は清酒酵母3株よりも、香りの面で好ましい醸造特性を持っていることが示唆された。酵母の中間代謝物であるピルビン酸は、バター様のジアセチルなど¹³³⁾、貯蔵中に清酒のオフフレーバー成分を生成する原因となる¹⁶⁾。製成酒サンプルに残存するピルビン酸の量は清酒酵母群と分離株群の2グループ間で統計的な差があったが(Fig. 4-6c)、発酵期間を延ばすことで残存するピルビン酸が減少することが期待される。清酒に含まれる有機酸のうち、リンゴ酸、コハク酸、乳酸、酢酸が全体の約80%を占める¹³⁴⁾。特にリンゴ酸とコハク酸は清酒に好ましい酸味を与えるとされ、それぞれ爽やかな酸味^{135, 99)}、塩味と苦味がアクセントのまろやかな酸味を呈する⁹⁸⁾。分離菌株群は、清酒酵母群に比べてリンゴ酸とコハク酸の生成量が少なく(Fig. 4-6d、Fig. 4-6e)、酸度も低かった(Table 4-3)。しかしながら、この特徴は酸度が抑えられた、クリアな味わいの清酒設計にとっては良い特徴ともなり得る。

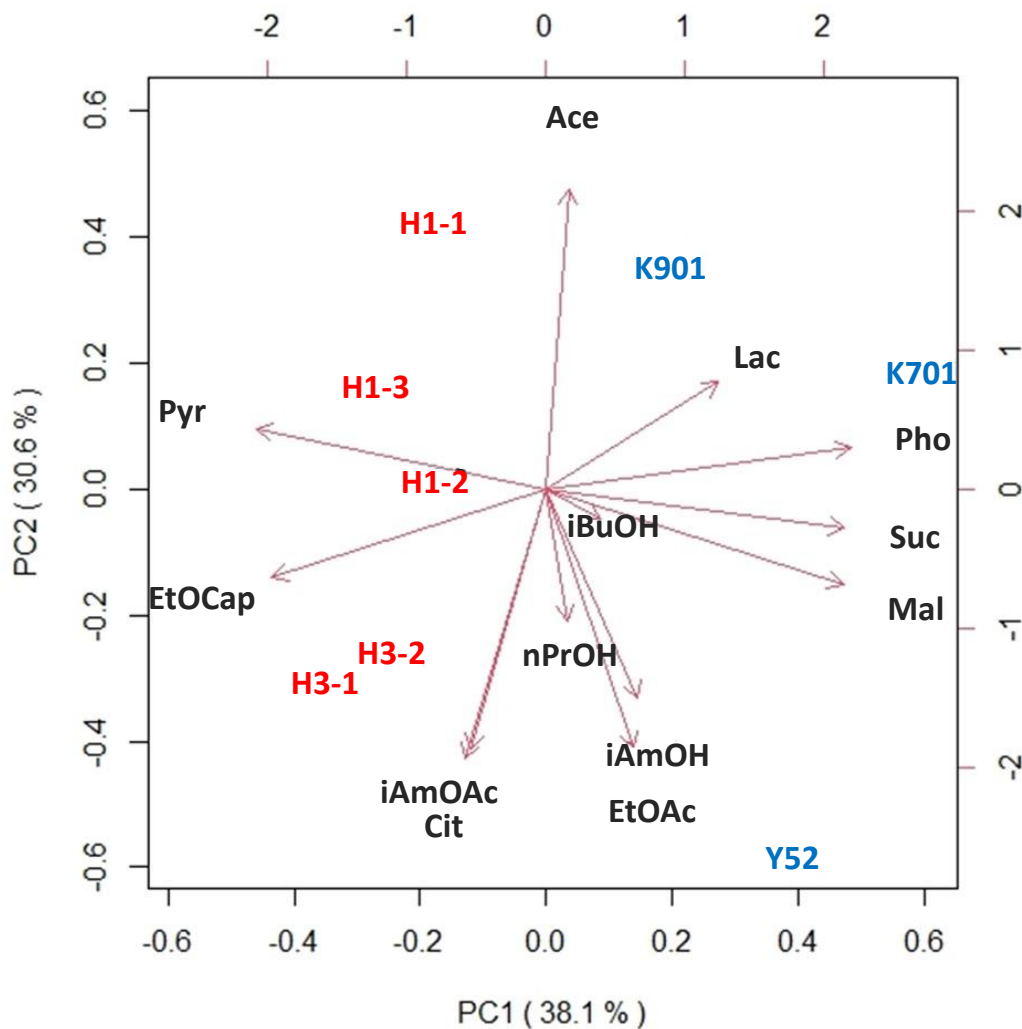


Fig. 4-5. PCA using values of aromatic compounds and organic acids in supernatant from brewing test.

PCA was performed using the measurements of aromatic compounds and organic acids in the sake samples from the small-scale sake brewing test in triplicate. The parameters indicated as black letters are the six aromatic compounds (EtOAc: ethyl acetate; iAmOAc: isoamyl acetate; iAmOH: isoamyl alcohol; EtOCap: ethyl caproate; iBuOH: isobutanol; and nPrOH: *n*-propanol), and seven organic acids (Cit: citric acid; Pyr: pyruvic acid; Mal: malic acid; Suc: succinic acid; Lac, lactic acid; Ace: acetic acid; and Pho: phosphoric acid). Mean values were standardized and used for PCA (mean = 0 and variance = 1). The eigenvalue of the correlation coefficient matrix was used to calculate the principal components axis. The direction of the arrow indicates a positive correlation. The horizontal axis is the first principal component axis (PC1), and the vertical axis is the second principal component axis (PC2). The value of PC1 or PC2 represents the contribution rate.

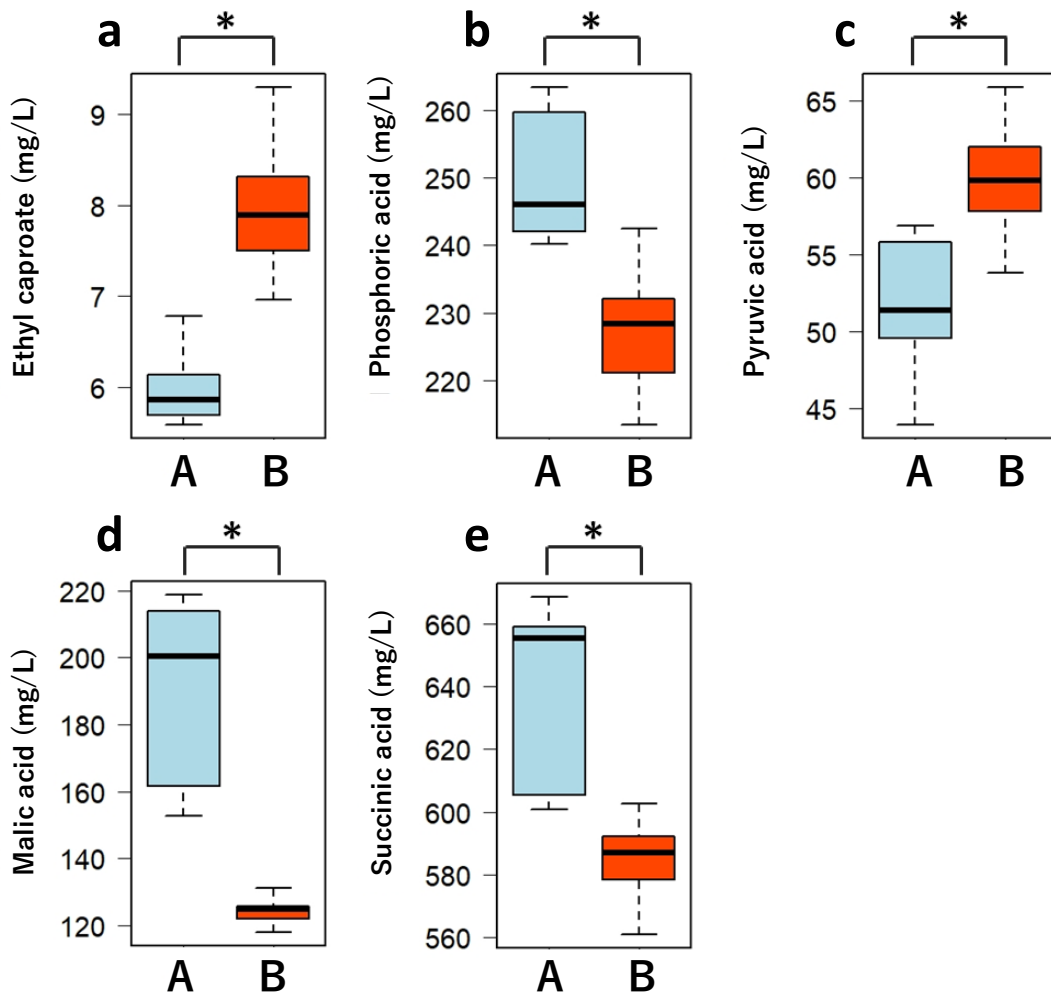


Fig. 4-6. Comparison of brewing characteristics between groups divided by the first principal component of the principal component analysis.

Group A (blue) consisted of sake yeast strains K701, K901, and Y52; Group B (red) consisted of isolated yeast strains H1-1, H1-2, H1-3, H3-1, and H3-2. Data are shown for the top five components with the largest eigenvector values in the first principal: ethyl caproate (a), phosphoric acid (b), pyruvic acid (c), malic acid (d), and succinic acid (e). An asterisk indicates a significant difference (p -value < 0.05) between the two groups as determined by Welch's t-test (a, b, c, d) or Wilcoxon rank sum test (e).

Table 4-2.

Eigenvector values for each component on each principal component axis.

Component	PC1	PC2
EtOAc	0.125	-0.412
nPrOH	0.031	-0.209
iBuOH	0.078	-0.047
iAmOAc	-0.108	-0.414
iAmOH	0.131	-0.333
EtOCap	-0.391	-0.141
Pho	0.435	0.066
Cit	-0.114	-0.429
Pyr	-0.413	0.095
Mal	0.424	-0.151
Suc	0.426	-0.062
Lac	0.246	0.171
Ace	0.032	0.478

Components are abbreviated as shown below.

PC1: first principal component; PC2: second principal component.

Aromatic compounds (EtOAc: ethyl acetate; nPrOH: *n*-propanol; iBuOH: isobutanol; iAmOAc: isoamyl acetate; iAmOH: isoamyl alcohol; EtOCap: ethyl caproate).

Organic acids (Pho: phosphoric acid; Cit: citric acid; Mal: malic acid; Pyr: pyruvic acid; Suc: succinic acid; Lac: lactic acid; Ace: acetic acid).

The components with high absolute eigenvector values represent the characteristic components in each principal component axis.

Table 4-3.**Acidity, amino acid content, and sake meter value (SMV) of sake samples on small-scale brewing test.**

Strain	Acid level			Amino acid level			Sake meter value		
K701	3.32	±	0.04	2.67	±	0.04	-31.7	±	3.0
K901	2.97	±	0.03	2.75	±	0.01	-35.9	±	1.5
Y52	3.03	±	0.03	2.54	±	0.01	-30.5	±	0.5
H1-1	2.87	±	0.05	2.94	±	0.04	-44.3	±	0.9
H1-2	2.93	±	0.08	2.95	±	0.06	-40.6	±	3.0
H1-3	2.80	±	0.02	2.88	±	0.02	-41.1	±	0.9
H3-1	2.71	±	0.04	2.88	±	0.02	-37.6	±	0.1
H3-2	2.76	±	0.07	2.86	±	0.09	-40.7	±	2.7

第一主成分で分類した 2 グループのうち、分離株群内の醸造特性を評価するために、第二主成分 (30.6%) でのグループ分けを行った。第二主成分によって、第 2 象限に位置する H1-1 株、H1-2 株、H1-3 株の 3 株で構成されるサブグループ C、第 3 象限に位置する H3-1 株、H3-2 株の 2 株で構成されるサブグループ D の 2 つのグループに細分化された(Fig. 4-5)。第二主成分の固有ベクトル値が大きい上位 5 成分は、酢酸エチル、酢酸イソアミル、イソアミルアルコール、クエン酸、酢酸であった(Fig. 4-7、Table 4-2)。これら 5 つの成分のうち、酢酸イソアミルと酢酸の成分分析値は分離株グループ間で有意に異なり、サブグループ D はサブグループ C よりも酢酸イソアミルの生産性が高く、酢酸の生産性が低かった(Fig. 4-7)。上述したカプロン酸エチルと共に、バナナのような香りが特徴的な酢酸イソアミルは清酒で好まれる香気成分である⁵⁴⁾。一方、酢酸は好ましくない酸味をもたらす⁹⁹⁾。このことから、分離株 5 株の中でもサブグループ D に属する分離株 H3-1 株および H3-2 株は、香りと酸味の両面で最も好ましい醸造特性を有していることが示唆された。

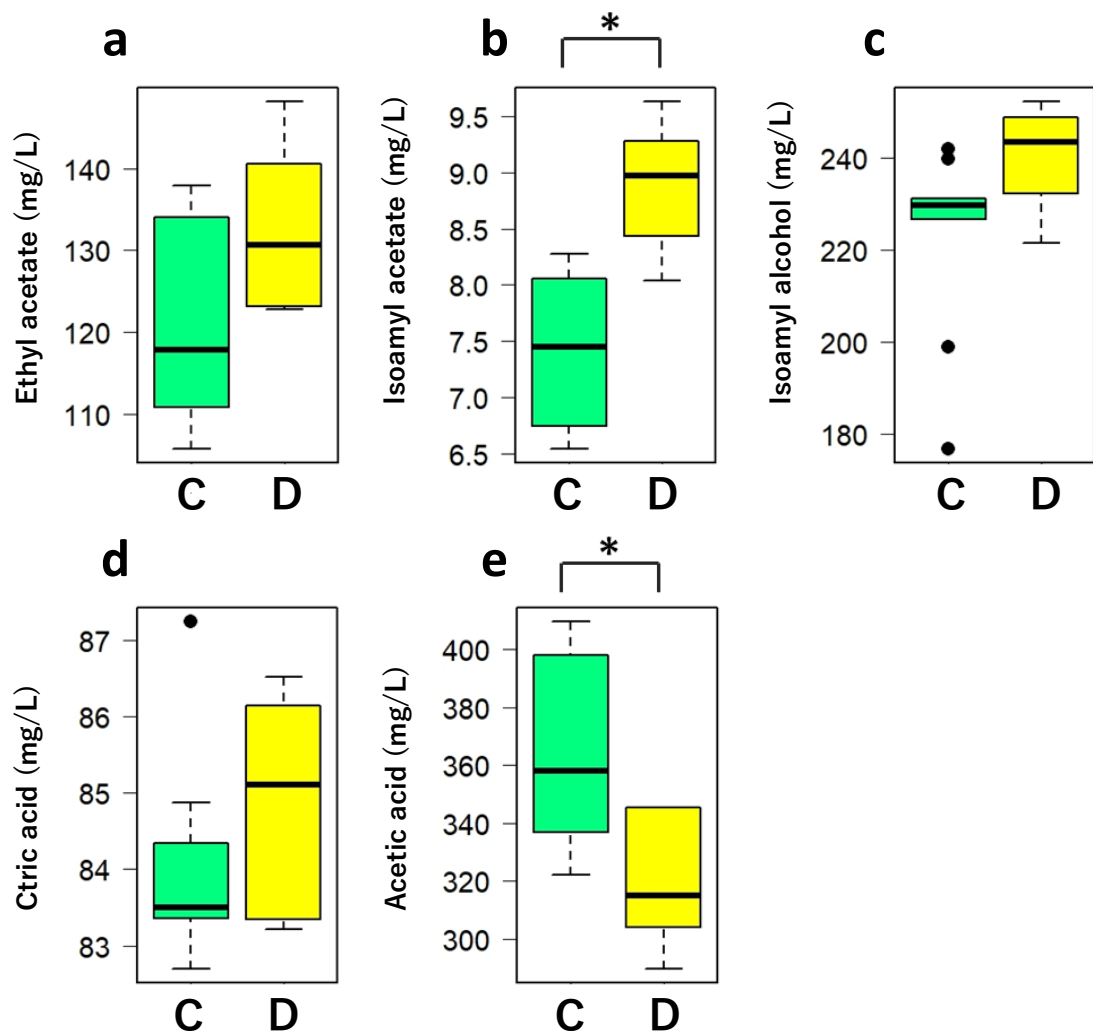


Fig. 4-7. Comparison of brewing characteristics between isolated strains subgroups divided by the second principal component of the principal component analysis. Subgroup C (green) consisted of three isolated strains H1-1, H1-2, and H1-3; Subgroup D (yellow) consisted of two isolated strains H3-1 and H3-2. Data are shown for the top five components with the largest eigenvector values in the second principal: ethyl acetate (a), isoamyl acetate (b), isoamyl alcohol (c), citric acid (d), and acetic acid (e). An asterisk indicates a significant difference (p-value < 0.05) between the two subgroups as determined by Welch's t-test (a, b, d, e) or Wilcoxon rank sum test (c).

第5章 リンゴ酸高生産株の育種

第1節 緒言

有明海干潟の泥から醸造適性のある *Saccharomyces cerevisiae* の分離に成功した。小仕込み試験と製成酒の成分分析の結果より、分離株 5 株の中でサブグループ D に属した H3-1 株と H3-2 株は香气成分と有機酸の両方の成分において、酒質を良好とし得ることが示唆された。また、分離株 5 株のなかでも H3-1 株が小仕込み試験中での炭酸ガス総排出量が最も多く (Fig. 4-4)、アルコール生産量も最も多かった (Table 4-1)。

分離株 H3-1 株を使用して実製造を目指すことも可能であるが、育種改良により特徴的な代謝物組成を有する株を開発し、清酒の官能的多様性を広げることも重要と考える。第 3 章では Y52 株をルーツとする Y5201 株を育種改良することにより、吟醸香成分のカプロン酸エチルおよび酢酸イソアミル⁵⁴⁾ 高生産株の取得を行った。そのため、本章では Y52 株とはルーツが異なる有明海からの分離株 H3-1 株を育種改良することにより、有機酸組成の異なる清酒酵母の開発を試みた。

清酒に含まれる有機酸のうち、リンゴ酸、コハク酸、乳酸、酢酸が全体の約 80% を占める¹³⁴⁾。特にリンゴ酸とコハク酸は清酒に好ましい酸味を与えるとされ、それぞれ爽やかな酸味^{135, 99)}、塩味と苦味がアクセントのまろやかな酸味を呈する⁹⁸⁾。分離株 H3-1 株は爽やかな酸味を呈するリンゴ酸の生産量が微弱であったため、リンゴ酸生産能の高い株の育種を行うこととした。

先行研究でリンゴ酸高生産能を有する清酒酵母の育種開発法は、いくつかの報告事例がある。2,4-ジニトロフェノール (2,4-DNP) はミトコンドリア内部の電子伝達系において、内膜のプロトン濃度勾配を打ち消す呼吸阻害剤であり、この耐性株はミトコンドリアの呼吸活性が低下し細胞質で還元的にリンゴ酸を生産することが分かっている⁹⁹⁾。また、2-デオキシグルコース (2-DG) はグルコースのアナログであり、酵母によって代謝されない物質である。通常、TCA 回路のクエン酸シンターゼ、アコニターゼ、 α -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ、グリオキシル回路のイソクエン酸リアーゼ、リンゴ酸シンターゼはいずれ

もグルコースリプレッションを受ける酵素であるが、2-DG耐性株はグルコースリプレッションが解除されることで、有機酸生成能が変化すると考えられている³⁰⁾。他にも、真核生物のリボソームに作用してタンパク質合成を阻害するシクロヘキシミド耐性株²⁹⁾や、TCA回路中の酵素であるコハク酸デヒドロゲナーゼの阻害剤であるコハク酸ジメチル (DMS) 感受性株において、リンゴ酸の高生産能を獲得した報告がある³¹⁻³³⁾。

本章では、分離株H3-1を親株とし、変異剤EMSにより変異誘発させることで、リンゴ酸高生産変異株の取得を試みた。さらに取得したリンゴ酸高生産変異株について小仕込試験により醸造特性評価を行った。

第2節 実験材料と方法

第1項 使用菌株と培地

本章で使用した *Saccharomyces cerevisiae* 協会清酒酵母 701 号 (K701)、協会清酒酵母 901 号 (K901) は、独立行政法人酒類総合研究所 (広島県東広島市) から分譲いただいた。清酒酵母 Y52 株は有薫酒造株式会社 (福岡県久留米市) の清酒醪中より分離された。有明海から分離された *S. cerevisiae* H3-1 株は育種改良の親株として用いた。佐賀県内の酒造会社に頒布されている清酒酵母 F4 株、F401 株、F7 株、SAWA1 株、SGH 株は佐賀県工業技術センターの澤田和敬博士より提供いただいた。

YPD 培地 (酵母エキス [10 g/L]、ポリペプトン [20 g/L]、グルコース [20 g/L]) は通常の酵母培養に用いた。YPD 寒天培地は、YPD 培地に寒天 [20 g/L] を加えて調整した。DOB 寒天培地 (グルコース [20 g/L]、YNB (Difco™) [6.7 g/L]、寒天 [20 g/L]) と DMS 寒天培地 (グルコース [20 g/L]、YNB (Difco™) [6.7 g/L]、コハクジメチル [15 g/L]、寒天 [20 g/L]) はコハク酸ジメチル感受性試験に用いた³¹⁻³³⁾。麴エキス培地は上述の方法で調製し (第3章第2節第1項)、発酵試験に用いた。

第2項 変異誘発処理とコハク酸ジメチル感受性株のスクリーニング

H3-1 株を 5 mL の YPD 液体培地に接種し、30°C で一晩振とう培養した。菌体を遠心分離 (6,000 ×g、1 min、4°C) で回収後、0.9% 生理食塩水で菌体を 2 度洗浄した。上清を完全に除去した後、EMS の終濃度が 4% となるように滅菌水 0.05 mL、0.2 M リン酸バッファー (pH 8.0) 4.5 mL、40% グルコース水溶液 0.25 mL、EMS (Sigma-Aldrich) 0.2 mL を混合した。30°C で 60 分間、振盪条件で変異誘発処理をした後、5% チオ硫酸ナトリウム水溶液で EMS を不活化した³³⁾。0.9% 生理食塩水で菌体を 2 度洗浄後、YPD 寒天培地に塗布し、30°C で 2-3 日間培養した。生育が確認されたコロニーをカウントし、EMS 0% の反応溶液で生育したコロニーをもとに死滅率を算出した。DMS 感受性試験は次のように行

った。YPD 寒天培地上に生育が確認された変異処理後のコロニーを釣菌し、DOB 寒天培地と DMS 培地の両方に接種し、30°Cで培養した。DOB 寒天培地での生育度合いと比較して、DMS 寒天培地で生育が遅れた株を DMS 感受性株として選抜した。

第 3 項 麴エキス培地による発酵試験

乾燥米麴と麴エキス培地による発酵試験および成分分析は前述の方法で行った（第 3 章第 2 節第 4 項）。本実験で用いた麴エキス培地のボーメは 6.0 とし、培養は 15°Cで 10 日間行った。

第 4 項 総米 80 g 三段小仕込試験

親株 H3-1 株と一般的な清酒酵母である K701 株、K901 株および清酒酵母 Y52 株に加えて、佐賀県内の酒造会社に頒布されている清酒酵母 F4 株、F401 株、F7 株、SAWA1 株、SGH 株の 9 株を試験対象株とした。小仕込試験は前述の方法と同様にして行った（第 2 章第 2 節第 4 項）。総米 80 g の三段で仕込みを行い、発酵温度を 11°C一定、醗日数を 25 日とした。すべての仕込は $n = 3$ で行った。

第 5 項 製成酒サンプルの成分分析

製成酒サンプルの成分分析は前述の方法と同様にして行った（第 2 章第 2 節第 5 項）。

第 6 項 主成分分析および統計解析

主成分分析および統計解析は前述の方法と同様にして行った（第 3 章第 2 節第 7 項）。

第 7 項 総米 1 kg 三段小仕込試験

清酒酵母 K701 株、Y52 株およびリンゴ酸高生産変異株について、総米を 1 kg にスケールアップした三段小仕込み試験を行った。仕込み配合は上述の組成に従った（第 2 章第 2

節第4項)。仕込みの温度経過は恒温恒湿器でプログラムし、品温は温度計で測定した。水麴と添仕込みは同じ日に行い、仕込み温度は11°Cとした。踊を11°C、仲仕込を8°C、留仕込を6°Cで行った。最高温度を12°Cとし、醪2日目からは1日1°Cずつ9°Cまで昇温、その後は1日0.5°Cずつ12°Cまで昇温し、2日間維持した。その後、2日で1°C、3日で1°C降温し、9.5°Cで維持し、醪22日目からはさらに降温した。醪5日目から1日2回攪入れを行い、醪6日目からボーメを、醪13日目からはボーメとアルコールを測定した。ボーメとアルコールの測定は国税庁所定分析法⁴⁹⁾に準じた。BMD曲線(醪日数とボーメの積をプロットした曲線)とアルコール分の分析値で醪経過をモニタリングし、K701株のBMD曲線に近づけるように適宜水を添加した。目標の醪日数を28日とし、酒度は±0とした。発酵終了後、上槽は遠心分離(4,000 ×g、25 min、4°C)によって行った。

第8項 清酒醸造での実製造利用

2020年度の悠々知酔製造は佐賀県基山町の合資会社基山商店にご協力いただき、実施した。純米吟醸規格と純米酒規格の2種類を製造し、それぞれリンゴ酸高生産清酒酵母とY5201株を使用した。商品設計をTable 5-1に示した。

Table 5-1. Product designs for “yuyuchisui” production in 2020.

	<i>Junmai</i>	<i>Junmai-ginjo</i>
<i>shubo</i> (stater)	<i>yamaoroshi-haishimoto</i> (added lactic acid bacteria)	<i>chuon-sokujo</i>
sake yeast	Y5201	Malic acid high-producing sake yeast strain
raw rice	<i>sagabiyori</i>	<i>sagabiyori</i>
polishing ratio (%)	55% (<i>koji</i> rice) 70% (<i>kake</i> rice)	55% (<i>koji</i> rice) 60% (<i>kake</i> rice)

第3節 実験結果及び考察

第1項 リンゴ酸高生産変異株のスクリーニング

親株 H3-1 株に対し、EMS による変異誘発処理を行った。本実験での変異誘発処理条件、4% EMS での死滅率は 78.5%であった。YPD 寒天培地培地上で得られた変異株 6000 株に対し、DMS 感受性試験を行った結果、236 株の DMS 感受性株 (DMSS) を取得した。

取得した 236 株の DMSS に対してリンゴ酸生産能を評価するために、乾燥米麹と麴エキス培地による簡易的な発酵試験を行った。その結果、親株 H3-1 株および清酒酵母比較対象株の K701 株、Y52 株よりもリンゴ酸生産量が多かった株を 31 株獲得した。これら 31 株のうち、リンゴ酸生産量が多い上位 5 株の変異株 DMSS97 株、DMSS167 株、DMSS227 株、DMSS233 株、DMSS235 株について(Table 5-2)、小仕込試験により詳細な醸造特性を評価することとした。

Table 5-2.

Analysis of supernatant on fermentation test using with koji extract.

Strain	Pho	Cit	Pyr	Mal	Suc	Lac	Ace
K701	223	319	609	335	624	1624	508
Y52	201	337	682	338	676	1620	628
H3-1	237	342	529	172	665	1593	659
DMSS97	260	364	664	535	437	1831	469
DMSS167	258	362	587	550	317	1711	411
DMSS227	258	354	751	476	560	1682	176
DMSS233	190	369	1213	1743	427	1924	279
DMSS235	245	349	715	491	466	1816	641

Components name abbreviations are as follows.

Organic acids (Pho, phosphoric acid; Cit, citric acid; Pyr, pyruvic acid; Mal, malic acid; Suc, succinic acid; Lac, lactic acid; Ace, acetic acid). Unit is mg/L.

第2項 総米 80 g 小仕込試験でのリンゴ酸高生産変異株の醸造特性評価

リンゴ酸高生産変異株 DMSS97 株、DMSS167 株、DMSS227 株、DMSS233 株、DMSS235 株の醸造特性を評価するために、総米 80 g の小仕込試験を行った。製成酒サンプルの成分分析結果を Table 5-3 に示した。小仕込試験においても、変異株 5 株のリンゴ酸生産量は親株 H3-1 株のリンゴ酸生産量を有意に上回っていた(Table 5-3)。特に、変異株 DMSS233 株は最もリンゴ酸生産量が向上した株であり、親株と比較して約 6.2 倍のリンゴ酸を生産した。また、清酒醸造に利用されている K701 株と Y52 株のリンゴ酸生産量は、それぞれ 375 mg/L、491 mg/L であった。変異株 5 株は、K701 株、Y52 株と比較してもリンゴ酸を多く生産したため、一般的な清酒酵母を含めてもリンゴ酸生産能の高い株と言える。

変異株 5 株のアルコール生産量は 15.1% - 16.2% であった(Table 5-3)。親株 H3-1 株と比較するとアルコール生産能が低下していたが、一般的な清酒のアルコール分は 15% - 16% 程度であるため、変異株のアルコール生産能は実製造利用が可能な範疇と言える。

続いて、佐賀県内で酒造メーカーに頒布されている清酒酵母も含めた変異株の醸造特性評価を行った。7 種の有機酸の成分分析値を用いて PCA を行った結果、赤字で示す変異株 5 株は一つのグループを形成しており、どの清酒酵母とも異なる第 4 象限に位置した(Fig. 5-1)。これらリンゴ酸高生産変異株群はリンゴ酸、ピルビン酸、クエン酸、乳酸と正の相関を示し、酢酸と負の相関を示した。第 2 章でも述べたように、リンゴ酸やクエン酸は爽やかな酸味を^{97, 98)}、酢酸は好ましくない酸味を⁹⁷⁾を呈する。実際に、親株 H3-1 株と比較して、変異株の 5 株のクエン酸生産量は有意に増加しており、酢酸生産量は有意に減少していた(Table 5-3)。これらの結果から、リンゴ酸高生産変異株の有機酸組成は他の清酒酵母とは異なることを表しており、清酒の官能的多様性と良好な味わいをもたらすことが示唆された。変異株 5 株はピルビン酸とも正の相関を示しており(Fig. 5-1)、親株 H3-1 株で醸成した製清酒のピルビン酸残量と比較して、変異株で醸成した製清酒のピルビン酸残量は多かった(Table 5-3)。清酒中のピルビン酸はオフフレーバーの原因となるため^{16, 133)}、こ

の点は懸念される。しかしながら、品温のコントロールや水の添加など発酵条件を検討することにより、ピルビン酸を低減することで、オフフレーバーの懸念を緩和することは可能と考える。

有機酸 7 種に、香気成分 6 種の成分分析値を加えた PCA も行った(Fig. 5-2)。香気成分も含めた全 13 成分の PCA においても、赤字で示すリンゴ酸高生産変異株 5 株は有機酸のみの PCA と同様に一つのグループを形成し、他のどの清酒酵母とも異なる第 3 象限に位置した。以上の結果より、リンゴ酸高生産変異株 5 株が清酒の官能的多様性をもたらす得ることが強く示唆された。

Table 5-3. Analysis of sake samples on total rice 80 g small-scale brewing test using various yeast strains.

Strain	iAmOAc	EtOCap	Cit	Pyr	Mal	Suc	Lac	Ace	Alc
H3-1	4.07 ± 0.2	1.12 ± 0.1	141 ± 4.9	33 ± 2.0	245 ± 9.0	955 ± 40	1341 ± 51	487 ± 32	17.0 ± 0.7
DMSSS97	6.57 ± 0.6 ^b	0.75 ± 0.0 ^a	198 ± 20 ^b	192 ± 93 ^b	709 ± 30 ^b	724 ± 26 ^a	1938 ± 70 ^b	330 ± 41 ^a	15.7 ± 0.2 ^a
DMSS167	6.55 ± 0.4 ^b	1.49 ± 0.0 ^b	170 ± 6.8 ^b	46 ± 3.8	885 ± 46 ^b	563 ± 20 ^a	1474 ± 51	226 ± 17 ^a	16.2 ± 0.1
DMSS227	5.99 ± 0.2 ^b	2.38 ± 0.0 ^b	193 ± 3.6 ^b	564 ± 34 ^b	789 ± 13 ^b	723 ± 8.0 ^a	1476 ± 26	215 ± 8.0 ^a	15.8 ± 0.3 ^a
DMSS233	5.59 ± 0.3 ^b	1.53 ± 0.0 ^b	197 ± 8.0 ^b	709 ± 39 ^b	1516 ± 50 ^b	812 ± 47 ^a	1693 ± 76 ^b	139 ± 2.0 ^a	15.1 ± 0.1 ^a
DMSS235	5.47 ± 0.3 ^b	1.43 ± 0.1 ^b	188 ± 0.7 ^b	456 ± 29 ^b	818 ± 14 ^b	708 ± 2.0 ^a	1835 ± 36 ^b	373 ± 18 ^a	15.8 ± 0.1 ^a

Components name abbreviations are as follows.

Aroma compounds (iAmOAc, isoamyl acetate; EtOCap, ethyl caproate). Organic acids (Cit, citric acid; Pyr, pyruvic acid; Mal, malic acid; Suc, succinic acid; Lac, lactic acid; Ace, acetic acid). Unit is mg/L.

Alc means ethyl alcohol concentration. Unit is %.

The small-scale brewing test was performed in triplicate. Plus or minus represents standard deviations.

^a significantly lower than H3-1 (Dunnett's test: $p < 0.05$)

^b significantly higher than H3-1 (Dunnett's test: $p < 0.05$)

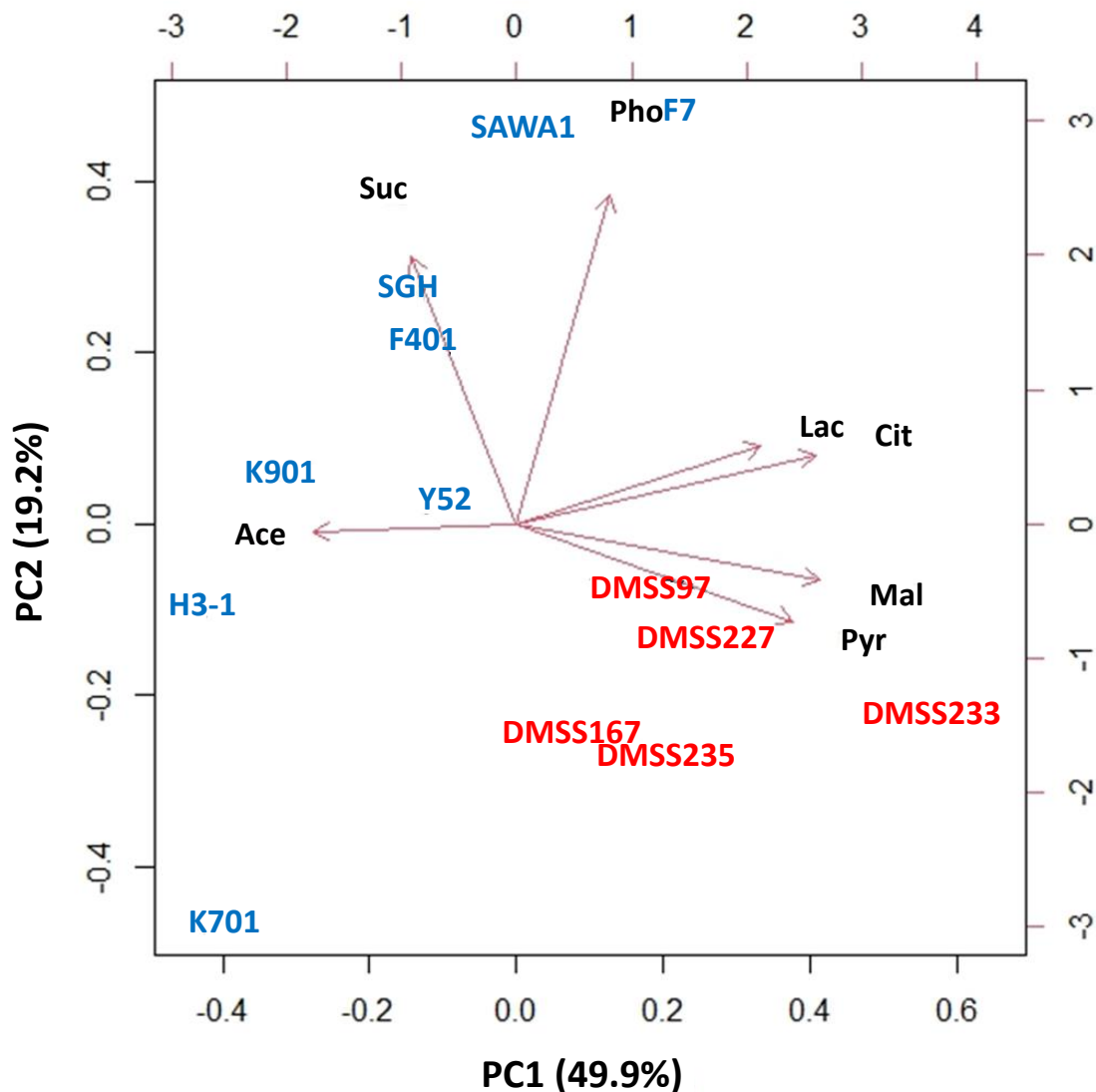


Fig. 5-1. Results of PCA using only organic acids values of the supernatant with brewing test.

PCA was performed using only the organic acid components in the sake samples from the small-scale sake brewing test in triplicate. The parameters indicated as red letters are seven organic acids: Pho, phosphoric acid; Cit, citric acid; Mal, malic acid; Pyr, pyruvic acid; Suc, succinic acid; Lac, lactic acid; and Ace, acetic acid. Mean values were standardized and used for PCA (mean is 0 and variance is 1). The eigenvalue of the correlation coefficient matrix was used to calculate the principal components axis. The direction of the arrow indicates a positive correlation. The horizontal axis is the first principal component axis (PC1), and the vertical axis is the second principal component axis (PC2). The value of PC1 or PC2 represents the contribution rate.

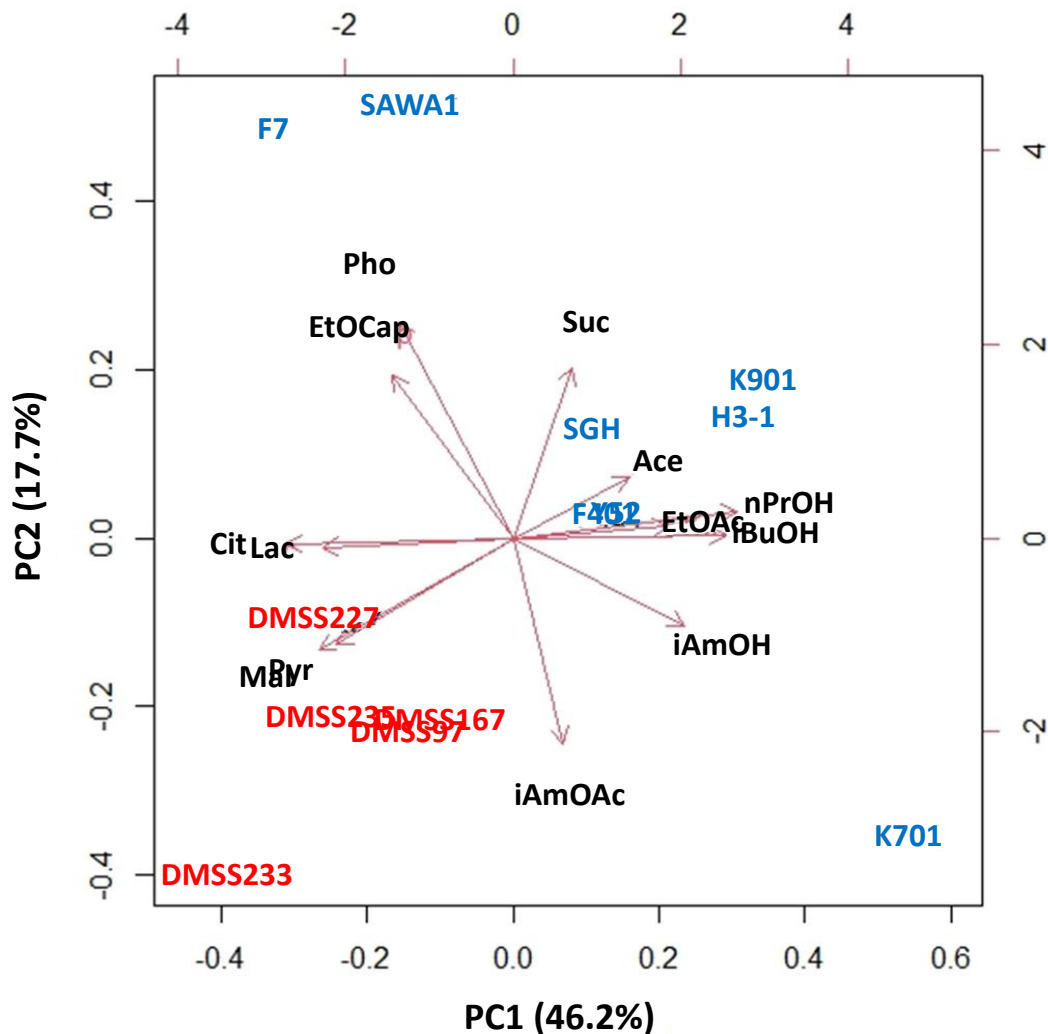


Fig. 5-2. Results of PCA using aroma compounds and organic acids values of the supernatant with brewing test.

PCA was performed using aroma compounds and organic acids components in the sake samples from the small-scale sake brewing test in triplicate. The parameters indicated as red letters are six aroma compounds (EtOAc, ethyl acetate; iAmOH, isoamyl alcohol; iAmOAc, isoamyl acetate; EtOCap, ethyl caproate; iBuOH, isobutanol; and nPrOH, n-propanol), and seven organic acids (Pho, phosphoric acid; Cit, citric acid; Mal, malic acid; Pyr, pyruvic acid; Suc, succinic acid; Lac, lactic acid; and Ace, acetic acid). Mean values were standardized and used for PCA (mean is 0 and variance is 1). The eigenvalue of the correlation coefficient matrix was used to calculate the principal components axis. The direction of the arrow indicates a positive correlation. The horizontal axis is the first principal component axis (PC1), and the vertical axis is the second principal component axis (PC2). The value of PC1 or PC2 represents the contribution rate.

第3項 総米1 kg 小仕込試験でのリンゴ酸高生産変異株の醸造特性評価

総米1 kgの小仕込み試験中の各醪の品温経過を Fig. 5-3 に、BMD 曲線を Fig. 5-4 に示した。試験対象株 K701 株の BMD 曲線に近づけるように適宜水を添加した。変異株の発酵経過は K701 株よりもやや遅れる傾向にあったが、水の添加により、醪日数 28 日～29 日で、日本酒度 (SMV) をおよそ±0 にまで醪の発酵を促すことが可能であった (Table 5-4)。本実験は、すべての試験株を同一の恒温恒湿器内で仕込んだため、各株に合わせた醪の品温コントロールまではできなかった。実際の製造では、水の添加だけでなく、醪の品温コントロールも可能であるため、リンゴ酸高生産変異株を使用した実製造は充分可能と考える。

リンゴ酸高生産変異株で醸成した製成酒サンプルのアルコール度数は一般的な日本酒と同等の 15% - 16% に達した (Table 5-4)。リンゴ酸生産量に関しては、DMSS167 株、DMSS233 株、DMSS235 株の 3 株は、清酒酵母 K701 株、Y52 株よりもリンゴ酸を多く生産した。特に、DMSS233 株と DMSS167 株は清酒酵母と比較して、リンゴ酸の生産量が多かったため、酸味に特徴のある酒質設計には適した清酒酵母と考えられる。

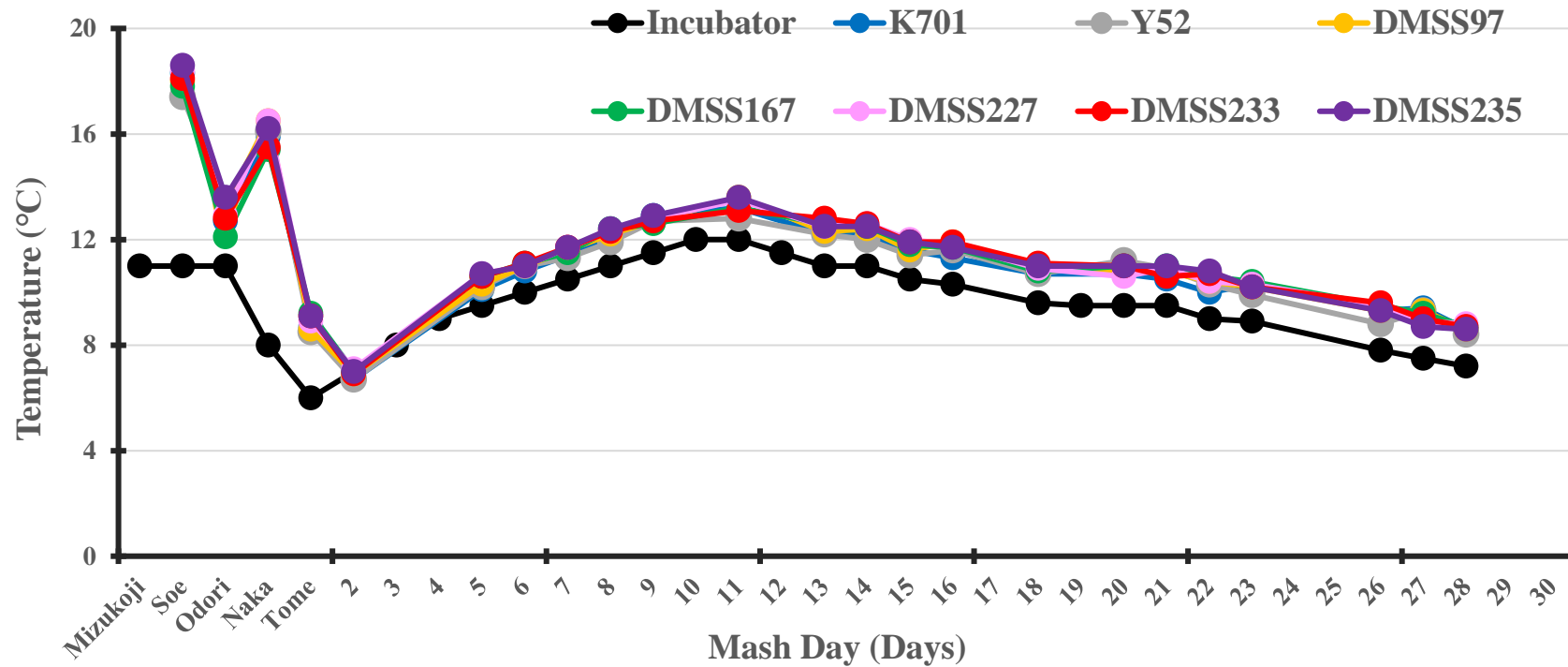


Fig. 5-3. Temperature passage of each mash in the small-scale sake brewing test with 1 kg of total rice.

Each mash is shown by color: K701 (blue), Y52 (gray), DMSS97 (yellow), DMSS167 (green), DMSS227 (pink), DMSS233 (red), DMSS235 (purple), and set value of incubator (black).

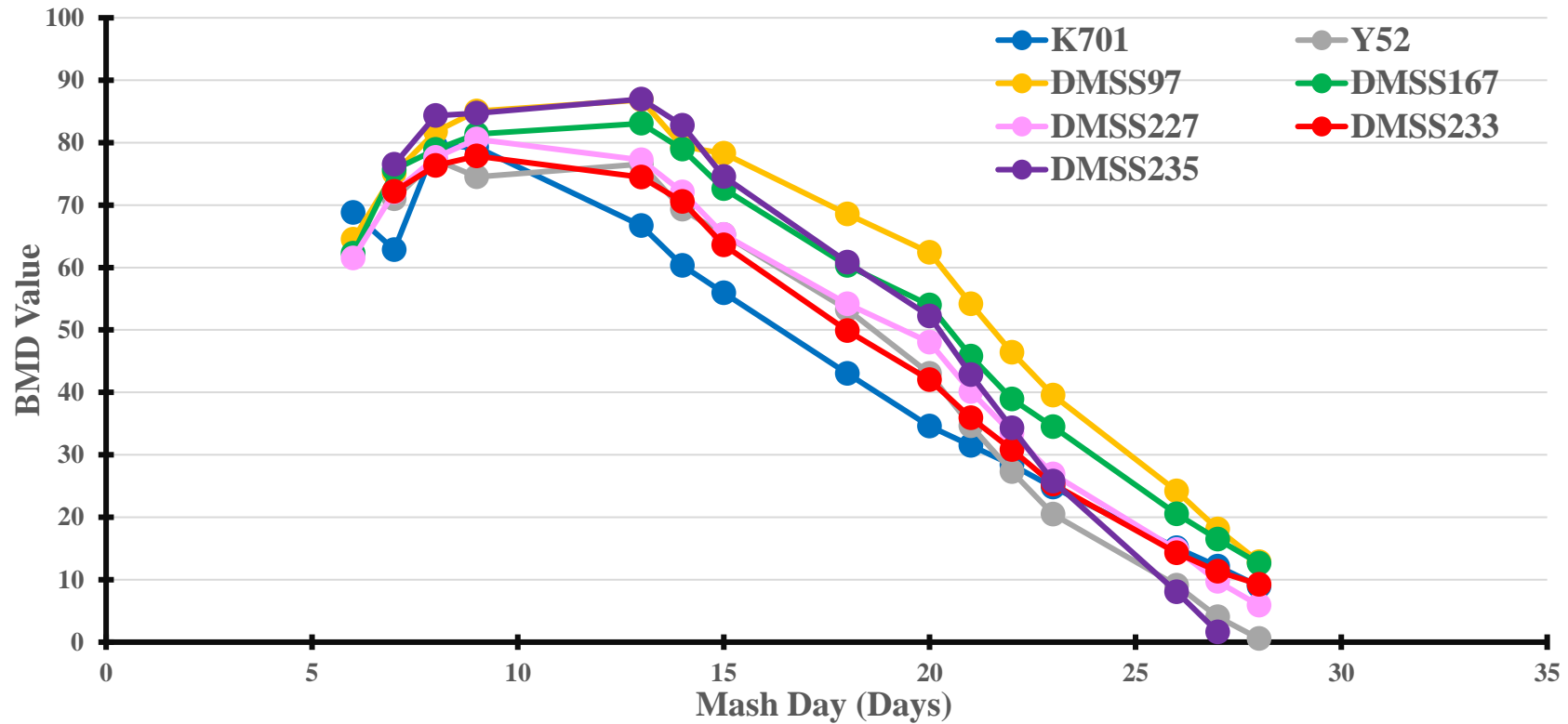


Fig. 5-4. BMD values passage of each mash in the small-scale sake brewing test with 1 kg of total rice.

Each mash is shown by color: K701 (blue), Y52 (gray), DMSS97 (yellow), DMSS167 (green), DMSS227 (pink), DMSS233 (red), and DMSS235 (purple).

Table 5-4. Analysis of sake samples on total rice 1 kg small-scale brewing test using various yeast strains.

	K701	Y52	DMSS97	DMSS167	DMSS227	DMSS233	DMSS235
Alcohol (%)	17.02	16.87	14.8	15.62	16.1	15.58	16.23
SMV	-2.67	0.5	-2.76	-3.22	-1.13	-2.65	2.68
Acid level	2.8	3.1	2.9	2.6	2.8	3.3	3
Amino acid level	1.4	1.4	1.3	1.5	1.4	1.3	2.3
Pyruvic acid (mg/L)	294	551	696	447	509	696	709
Citric acid (mg/L)	114	133	122	137	139	139	137
Malic acid (mg/L)	535	445	439	768	529	1294	599
Succinic acid (mg/L)	669	814	470	359	693	604	549
Lactic acid (mg/L)	1160	1231	1271	1160	1243	1386	1381
Acetic acid (mg/L)	141	448	293	199	373	206	549
Ethyl acetate (ppm)	68.6	42.3	40.4	41.1	30.3	37.5	34.4
Isoamyl alcohol (ppm)	188.16	204.34	209.23	183.52	194.21	213.59	192.20
Isoamyl acetate (ppm)	3.6	1.9	3	4	1.9	2.3	1.7
Ethyl caproate (ppm)	2.2	1.5	0.6	1.3	1.4	1.3	0.9
Add water after <i>Tome</i> (mL)	215	250	430	368	335	335	330
Total water ratio (%)	156.5	160	178	171.8	168.5	168.5	168

第4項 リンゴ酸高生産酵母の実製造利用

2020年度の悠々知酔において、純米酒規格と純米吟醸規格の2種類の製造を実施し、それぞれ Y5201 株とリンゴ酸高生産株 DMSS233 株を使用した。完成した清酒の分析結果を Table 5-5 に示した。DMSS233 株を使用して醸成した清酒は、アルコール分 15% に達しており、ピルビン酸も検出下限値を下回った。このことから、DMSS233 株のエタノール発酵能は清酒醸造に利用可能であることが明らかとなった。また、DMSS233 株は Y5201 株と比較して、酸度が 0.4 高く、リンゴ酸は約 1.5 倍生産した。よって、実製造においても、DMSS233 株はリンゴ酸を主とした酸に特徴的な清酒を醸成することが明らかとなり、清酒の官能的多様性を広げる清酒酵母と言える。本研究の成果が、実製造への利用につながることを期待される。

Table 5-5. Analysis of “yuyuchisui” made in 2020.

	<i>Junmai</i> (Y5201)	<i>Junmai-ginjo</i> (DMSS233)
Alcohol	15%	15%
Acid level	2.0	2.4
Amino acid level	1.4	1.2
Pyruvic acid (mg/L)	Not detect	Not detect
Citric acid (mg/L)	185	255
Malic acid (mg/L)	388	577
Succinic acid (mg/L)	380	358
Lactic acid (mg/L)	361	392
Acetic acid (mg/L)	6	38
Isoamyl acetate (ppm)	2.5	2.33
Ethyl caproate (ppm)	0.62	0.89

第 6 章 リンゴ酸高生産性に関与する 変異遺伝子の推定

第1節 緒言

第4章、第5章で述べたように、有明海から清酒醸造適性のある *Saccharomyces cerevisiae* H3-1 株を分離し、育種改良することで清酒醸造に利用可能なリンゴ酸高生産変異株を取得することに成功した。

月桂冠の根来らはコハク酸ジメチル感受性試験により、リンゴ酸高生産酵母の取得を行った。さらに、次世代ゲノムシーケンサーを駆使した比較ゲノム解析による変異遺伝子の同定、および分子生物学的手法によるリンゴ酸高生産能を付与する遺伝子変異の特定に成功している³¹⁻³³)。リンゴ酸以外にも清酒の香味に関係するカプロン酸エチルや酢酸イソアミルなどの生産性にそれぞれ *FAS2* 遺伝子や^{102, 103})、*MGA2* 遺伝子、*LEU4* 遺伝子^{93, 104, 136})が関与するといった遺伝子レベルでの物質生産能に関する知見が集まっている。

ゲノムレベルの研究および分子生物学的手法を駆使し、物質高生産のメカニズムを遺伝子レベルで明らかにすることは、スクリーニング手法およびマーカー遺伝子の開発など、迅速な育種改良法の開発に繋がることが期待できる。

リンゴ酸高生産能獲得のメカニズムについて、根来らは、*VID24* 遺伝子のような糖新生で機能する酵素の分解に関与する遺伝子や、*PEX22* 遺伝子のようなペルオキシソーム内のグリオキシル酸回路で機能する酵素の輸送体に関与する遺伝子に機能不全を引き起こすような変異が導入されるとリンゴ酸高生産能を獲得することを明らかにしている³¹⁻³³)。また、原因となる変異遺伝子の特定には至っていないが、大場らはさわやかな酸味を与えるリンゴ酸を高生産する酵母を清酒もろみから単離し、ピルビン酸カルボキシラーゼ及びリンゴ酸デヒドロゲナーゼ活性が上昇していることを示し、ミトコンドリア膜電位の変化がリンゴ酸生成と相関することを示した¹³⁷)。更に松田らはリンゴ酸を高生産させる酵母の培養方法、特に酸素供給の異なる方法について検討し、嫌気条件下でミトコンドリアでのリンゴ酸合成酵素の活性が高いことを示した¹³⁸)。

本章では、親株 H3-1 株と取得したリンゴ酸高生産株の中でも特にリンゴ酸高生産能が高かった DMSS233 株を対象とし、次世代ゲノムシーケンサーを用いた比較ゲノム解析により、変異が導入された遺伝子を同定した。さらに、分子生物学的手法により、リンゴ酸高生産能をもたらした原因変異遺伝子の特定を試みた。

第2節 実験材料と方法

第1項 使用菌株とプラスミド

本章で使用したすべての *Saccharomyces cerevisiae* 株を Table 6-1 に示した。本章で使用した *S. cerevisiae* BY4743 株の遺伝子二重破壊株コレクション Yeast Deletion Clones Homozygous Diploid Complete Set (Invitrogen) はすべて鹿児島大学農学部 玉置尚徳 教授より提供いただいた。本章で使用した G418 耐性を付与する *KanMX* 含有プラスミド pUG6¹³、ハイグロマイシン B 体制を付与する *HphMX* 含有プラスミド pAG32¹⁴⁰、酵母自立複製型プラスミド YEGAp¹⁴¹、*URA3* 遺伝子 ORF 含有プラスミド *URA3/pUC119* の4つのプラスミドは鹿児島大学農学部 玉置尚徳 教授より提供いただいた。

Table 6-1. Genotypes of *S. cerevisiae* strains used in this study.

Strain	Genotype	Source
H3-1	<i>MATα/MATα</i>	This study
DMSS233	<i>MATα/MATα</i>	This study
BY4743	<i>MATα/MATα his3Δ1/his3Δ1 leu2Δ0/leu2Δ0 LYS2/lys2Δ0 met15Δ0/MET15 ura3Δ0/ura3Δ0</i>	Invitrogen
BY4743 <i>aim3Δ</i>	BY4743 <i>aim3::kanMX4/ aim3::kanMX4</i>	Invitrogen
BY4743 <i>dnf1Δ</i>	BY4743 <i>dnf1::kanMX4/ dnf1::kanMX4</i>	Invitrogen
BY4743 <i>dyn1Δ</i>	BY4743 <i>dyn1::kanMX4/ dyn1::kanMX4</i>	Invitrogen
BY4743 <i>gcv3Δ</i>	BY4743 <i>gcv3::kanMX4/ gcv3::kanMX4</i>	Invitrogen
BY4743 <i>gpb1Δ</i>	BY4743 <i>gpb1::kanMX4/ gpb1::kanMX4</i>	Invitrogen
BY4743 <i>spt21Δ</i>	BY4743 <i>spt21::kanMX4/ spt21::kanMX4</i>	Invitrogen
BY4743 <i>ubp16Δ</i>	BY4743 <i>ubp16::kanMX4/ ubp16::kanMX4</i>	Invitrogen
BY4743 <i>vps34Δ</i>	BY4743 <i>vps34::kanMX4/ vps34::kanMX4</i>	Invitrogen
BY4743 <i>ynl092wΔ</i>	BY4743 <i>ynl092w::kanMX4/ ynl092w::kanMX4</i>	Invitrogen
BY4743 <i>aro80Δ</i>	BY4743 <i>aro80::kanMX4/ aro80::kanMX4</i>	Invitrogen
BY4743 <i>car2Δ</i>	BY4743 <i>car2::kanMX4/ car2::kanMX4</i>	Invitrogen
BY4743 <i>ccc2Δ</i>	BY4743 <i>pex1::ccc2/ ccc2::kanMX4</i>	Invitrogen
BY4743 <i>eug1Δ</i>	BY4743 <i>eug1::kanMX4/ eug1::kanMX4</i>	Invitrogen
BY4743 <i>fmp27Δ</i>	BY4743 <i>fmp27::kanMX4/ fmp27::kanMX4</i>	Invitrogen

Table 6-1. (continued)

Strain	Genotype	Source
BY4743 <i>mcm21</i> Δ	BY4743 <i>mcm21::kanMX4/ mcm21::kanMX4</i>	Invitrogen
BY4743 <i>mga2</i> Δ	BY4743 <i>mga2::kanMX4/ mga2::kanMX4</i>	Invitrogen
BY4743 <i>mus81</i> Δ	BY4743 <i>mus81::kanMX4/ mus81::kanMX4</i>	Invitrogen
BY4743 <i>nit3</i> Δ	BY4743 <i>nit3::kanMX4/ nit3::kanMX4</i>	Invitrogen
BY4743 <i>ppz2</i> Δ	BY4743 <i>ppz2::kanMX4/ ppz2::kanMX4</i>	Invitrogen
BY4743 <i>rmt2</i> Δ	BY4743 <i>rmt2::kanMX4/ rmt2::kanMX4</i>	Invitrogen
BY4743 <i>skg3</i> Δ	BY4743 <i>skg3::kanMX4/ skg3::kanMX4</i>	Invitrogen
BY4743 <i>sph1</i> Δ	BY4743 <i>sph1::kanMX4/ sph1::kanMX4</i>	Invitrogen
BY4743 <i>thi4</i> Δ	BY4743 <i>thi4::kanMX4/ thi4::kanMX4</i>	Invitrogen
BY4743 <i>tus1</i> Δ	BY4743 <i>tus1::kanMX4/ tus1::kanMX4</i>	Invitrogen
BY4743 <i>ubx5</i> Δ	BY4743 <i>ubx5::kanMX4/ ubx5::kanMX4</i>	Invitrogen
BY4743 <i>vtc5</i> Δ	BY4743 <i>vtc5::kanMX4/ vtc5::kanMX4</i>	Invitrogen
BY4743 <i>pex21</i> Δ	BY4743 <i>pex21::kanMX4/ pex21::kanMX4</i>	Invitrogen
BY4743 <i>pex25</i> Δ	BY4743 <i>pex25::kanMX4/ pex25::kanMX4</i>	Invitrogen
BY4743 <i>pex27</i> Δ	BY4743 <i>pex27::kanMX4/ pex27::kanMX4</i>	Invitrogen
BY4743 <i>pex28</i> Δ	BY4743 <i>pex28::kanMX4/ pex28::kanMX4</i>	Invitrogen
BY4743 <i>pex29</i> Δ	BY4743 <i>pex29::kanMX4/ pex29::kanMX4</i>	Invitrogen
BY4743 <i>pex30</i> Δ	BY4743 <i>pex30::kanMX4/ pex30::kanMX4</i>	Invitrogen
BY4743 <i>pex31</i> Δ	BY4743 <i>pex31::kanMX4/ pex31::kanMX4</i>	Invitrogen
BY4743 <i>pex32</i> Δ	BY4743 <i>pex32::kanMX4/ pex32::kanMX4</i>	Invitrogen
BY4743 <i>pex33</i> Δ	BY4743 <i>pex33::kanMX4/ pex33::kanMX4</i>	Invitrogen
BY4743 <i>pex35</i> Δ	BY4743 <i>pex35::kanMX4/ pex35::kanMX4</i>	Invitrogen
DMSS233 <i>mdh1</i> Δ	DMSS233 <i>mdh1::kanMX/ mdh1::hphMX</i>	This study
DMSS233 <i>mdh2</i> Δ	DMSS233 <i>mdh2::kanMX/ mdh2::hphMX</i>	This study
DMSS233 <i>mdh3</i> Δ	DMSS233 <i>mdh3::kanMX/ mdh3::hphMX</i>	This study
DMSS233 <i>mdh3</i> Δhetero	DMSS233 <i>mdh3::kanMX/ MDH3</i>	This study
DMSS233 <i>mls1</i> Δ	DMSS233 <i>mls1::kanMX/ mls1::hphMX</i>	This study
DMSS233 <i>dal7</i> Δ	DMSS233 <i>dal7::kanMX/ dal7::hphMX</i>	This study
H3-1 <i>mdh3</i> Δ	H3-1 <i>mdh3::kanMX/ mdh3::hphMX</i>	This study
H3-1 <i>ade17</i> Δ	H3-1 <i>ade17::kanMX/ ADE17</i>	This study
H3-1 <i>amd1</i> Δ	H3-1 <i>amd1::kanMX/ AMD1</i>	This study

Table 6-1. (continued)

Strain	Genotype	Source
H3-1 <i>asi3</i> Δ	H3-1 <i>asi3::kanMX/ ASI3</i>	This study
H3-1 <i>atg16</i> Δ	H3-1 <i>asi3::kanMX/ ASI3</i>	This study
H3-1 <i>blm10</i> Δ	H3-1 <i>blm10::kanMX/ BLM10</i>	This study
H3-1 <i>bph1</i> Δ	H3-1 <i>bph1::kanMX/ BPH1</i>	This study
H3-1 <i>bre1</i> Δ	H3-1 <i>bre1::kanMX/ BRE1</i>	This study
H3-1 <i>bul2</i> Δ	H3-1 <i>bul2::kanMX/ BUL2</i>	This study
H3-1 <i>cmr1</i> Δ	H3-1 <i>cmr1::kanMX/ CMR1</i>	This study
H3-1 <i>cog1</i> Δ	H3-1 <i>cog1::kanMX/ COG1</i>	This study
H3-1 <i>cog3</i> Δ	H3-1 <i>cog3::kanMX/ COG3</i>	This study
H3-1 <i>doa1</i> Δ	H3-1 <i>doa1::kanMX/ DOA1</i>	This study
H3-1 <i>dsc3</i> Δ	H3-1 <i>dsc3::kanMX/ DSC3</i>	This study
H3-1 <i>gat1</i> Δ	H3-1 <i>gat1::kanMX/ GAT1</i>	This study
H3-1 <i>gea2</i> Δ	H3-1 <i>gea2::kanMX/ GEA2</i>	This study
H3-1 <i>gid8</i> Δ	H3-1 <i>gid8::kanMX/ GID8</i>	This study
H3-1 <i>gyp1</i> Δ	H3-1 <i>gyp1::kanMX/ GYP1</i>	This study
H3-1 <i>hsp82</i> Δ	H3-1 <i>hsp82::kanMX/ HSP82</i>	This study
H3-1 <i>inp2</i> Δ	H3-1 <i>inp2::kanMX/ INP2</i>	This study
H3-1 <i>lag2</i> Δ	H3-1 <i>lag2::kanMX/ LAG2</i>	This study
H3-1 <i>lys14</i> Δ	H3-1 <i>lys14::kanMX/ LYS14</i>	This study
H3-1 <i>mga1</i> Δ	H3-1 <i>mga1::kanMX/ MGA1</i>	This study
H3-1 <i>mks1</i> Δ	H3-1 <i>mks1::kanMX/ MKS1</i>	This study
H3-1 <i>pep5</i> Δ	H3-1 <i>pep5::kanMX/ PEP5</i>	This study
H3-1 <i>pet112</i> Δ	H3-1 <i>pet112::kanMX/ PET112</i>	This study
H3-1 <i>pex1</i> Δ	H3-1 <i>pex1::kanMX/ PEX1</i>	This study
H3-1 <i>pex4</i> Δ	H3-1 <i>pex4::kanMX/ PEX4</i>	This study
H3-1 <i>pip2</i> Δ	H3-1 <i>pip2::kanMX/ PIP2</i>	This study
H3-1 <i>put4</i> Δ	H3-1 <i>put4::kanMX/ PUT4</i>	This study
H3-1 <i>rds2</i> Δ	H3-1 <i>rds2::kanMX/ RDS2</i>	This study
H3-1 <i>ris1</i> Δ	H3-1 <i>ris1::kanMX/ RIS1</i>	This study
H3-1 <i>rkr1</i> Δ	H3-1 <i>rkr1::kanMX/ RKR1</i>	This study
H3-1 <i>rpc19</i> Δ	H3-1 <i>rpc19::kanMX/ RPC19</i>	This study
H3-1 <i>rpl40a</i> Δ	H3-1 <i>rpl40a::kanMX/ RPL40A</i>	This study

Table 6-1. (continued)

Strain	Genotype	Source
H3-1 <i>rpt6</i> Δ	H3-1 <i>rpt6::kanMX/ RPT6</i>	This study
H3-1 <i>ser1</i> Δ	H3-1 <i>ser1::kanMX/ SER1</i>	This study
H3-1 <i>snt1</i> Δ	H3-1 <i>snt1::kanMX/ SNT1</i>	This study
H3-1 <i>trp1</i> Δ	H3-1 <i>trp1::kanMX/ TRP1</i>	This study
H3-1 <i>uba2</i> Δ	H3-1 <i>uba2::kanMX/ UBA2</i>	This study
H3-1 <i>ubp11</i> Δ	H3-1 <i>ubp11::kanMX/ UBP11</i>	This study
H3-1 <i>ula1</i> Δ	H3-1 <i>ula1::kanMX/ ULA1</i>	This study
H3-1 <i>uth1</i> Δ	H3-1 <i>uth1::kanMX/ UTH1</i>	This study
H3-1 <i>vps16</i> Δ	H3-1 <i>vps16::kanMX/ VPS16</i>	This study
H3-1 <i>yta12</i> Δ	H3-1 <i>yta12::kanMX/ YTA12</i>	This study
H3-1 <i>ura⁻</i>	H3-1 <i>ura3::kanMX/ ura3::kanMX</i>	This study
DMSS233 <i>ura⁻</i>	DMSS233 <i>ura3::kanMX/ ura3::kanMX</i>	This study
H3-1-vector	H3-1 <i>ura⁻ URA3/YEGAp</i>	This study
DMSS233-vector	DMSS233 <i>ura⁻ URA3/YEGAp</i>	This study
H3-1-OE	H3-1 <i>ura⁻ URA3/YEGAp-dal7</i>	This study
DMSS233-OE	DMSS233 <i>ura⁻ URA3/YEGAp-dal7</i>	This study
H3-1 GFP-MDH3	H3-1 <i>mdh3::kanMX-GFP-mdh3/ mdh3::hphMX-GFP-mdh3</i>	This study
DMSS233 GFP-MDH3	DMSS233 <i>mdh3::kanMX-GFP-mdh3/ mdh3::hphMX-GFP-mdh3</i>	This study

第2項 Whole genome sequencing と比較ゲノム解析

酵母菌株からのゲノム DNA の抽出は ISOPLANT II (NIPPON GENE) を用い、プロトコルに従い行った。抽出した DNA サンプルの純度は NanoDropND-1000 (NanoDrop Technologies) により測定した。DNA サンプルの濃度は Qubit™ dsDNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) を使用し、Qubit™ 3 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific) により測定した。得られたゲノム DNA サンプルのライブラリー調整および Whole genome sequencing は Novogene (北京、中国) に委託した。ライブラリーは PCR-free のペアエンドで調

製され、Whole genome sequencing (150 bp×2) は Hiseq 2500 (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) により、1 検体あたり 1 Gbp のシーケンシングを行った。比較ゲノム解析は以下の方法で行った。Trimmomatic⁷⁶⁾ (v.0.39) により、得られた生リードからアダプター配列の除去およびリード中の低クオリティ塩基のトリミングを行った。参照ゲノムに使用する協会清酒酵母 7 号 (K7) のゲノム情報は EnsembleFungi (<https://fungi.ensembl.org>) から獲得した。Burrows-Wheeler Aligner⁷⁷⁾ (BWA ; v.0.7.17) 参照ゲノムに対するリードのマッピングを行った。Sam ファイルのソートおよび Bam ファイルへの変換は SAMtools⁷⁸⁾ (v.1.10) を用いた。変異点の抽出は DeepVariant⁷⁹⁾ (v.0.10.0) を、変異点のフィルタリングには VCFtools⁸⁰⁾ (v.0.1.16) をそれぞれ用いた。最後に、SnPEff⁸¹⁾ (v. 5.0) により変異パターンおよび変異が導入された遺伝子の同定を行った。

第 3 項 YM10 試験

リンゴ酸生産量の確認は YM10 試験により行った。酵母菌株を YM10 培地 (グルコース [100 g/L]、ポリペプトン [5 g/L]、酵母エキス [3 g/L]、麦芽エキス [3 g/L])³⁴⁾ に接種し、30°C、静置条件で 2 日間、前培養を行った。新しい 20 mL の YM10 培地に初期 OD600 = 0.1 になるように前培養を接種し、30°C で 3 日間、静置条件下で培養を行った。培養終了後、培養液を採取し、遠心分離 (13,000 ×g、10 min、4°C) により培養液上清を回収した。培養液上清をセルロースアセテート膜フィルター (0.45 μm ; ADVANTEC) 濾過後、HPLC によりリンゴ酸生産量を分析した。

過剰発現株の YM10 試験全培養には、SDC-ura 液体培地 (グルコース [20 g/L]、YNB [6.7 g/L]、CSM-Ura (MP Biomemedicals) [0.77 g/L]、カザミノ酸 [20 g/L])³⁴⁾ を使用した。

第4項 酵母菌の形質転換

出芽酵母の形質転換はエレクトロポレーション法により行った¹⁴²⁾。YPD 液体培地に酵母菌を接種し、30°C、一晚、振盪条件で前培養を行った。50 mL YPD 液体培地に OD₆₀₀ = 0.25 -0.35 になるように前培養液を接種し、30°C、180 rpm (rotary)で3時間半から4時間培養した。OD₆₀₀ = 0.5-0.7 になった時点で、培養を停止し、15 分間氷水中に保持した。遠心分離 (6,000 ×g、1 min、0°C) により集菌し、培養液上清を除去した。滅菌超純水で1度、1M ソルビトール水溶液で2度洗菌した後、再度 1M ソルビトール水溶液に細胞を懸濁した。2 mm ギャップエレクトロポレーションキュベット (BTX Harvard Apparatus、USA) に 200 μl の細胞懸濁液と 5-10 μl の DNA (約 1.5 μg - 2 μg) を添加、混釈し、5 分間、氷中で保持した。エレクトロポレーション装置は ECM 630 Exponential Decay Wave Electroporation System (BTX Harvard Apparatus, USA) を使用し、1500 V、200 Ω、25 μF の条件でエレクトロポレーションを行った。エレクトロポレーション後、キュベット内の細胞懸濁液を速やかに回収し、氷中に保持しておいた 1 M ソルビトール水溶液に添加し、30°Cで1時間、保持した。その後、遠心分離 (6,000 ×g、1 min、4°C) により、細胞を濃縮し、適当なセレクション培地に塗布後、30°Cで培養した。

第5項 H3-1 株および DMSS233 株の遺伝子破壊株の構築

二倍体 H3-1 株および DMSS233 株を宿主とする遺伝子破壊株の構築は *KanMX* および *HphMX* の挿入によって行った。相同領域として破壊対象遺伝子の 5'-UTR および 3'-UTR をそれぞれ 50-60 bp 付加したプライマーセットを設計し、*KanMX* の場合はプラスミド pUG6 を、*HphMX* の場合はプラスミド pAG32 を鋳型として破壊カセットを増幅した。形質転換はエレクトロポレーションによって行い、形質転換体は G418 培地 (酵母エキス [10 g/L]、ポリペプトン [20 g/L]、グルコース [20 g/L]、G418 (和光純薬 [500 μg/mL]、寒天 [20 g/L]) および、ハイグロマイシン B 培地 (酵母エキス [10 g/L]、ポリペプト

ン [20 g/L]、グルコース [20 g/L]、ハイグロマイシン B (和光純薬 [500 µg/mL]、寒天 [20 g/L]) によって選択した。遺伝子破壊の確認は目的遺伝子座の PCR、もしくは PCR と制限酵素処理により行った。本項で使用したプライマーは (Table 6-2. 1-108) に示した。

第 6 項 酵母細胞からのトータル RNA の抽出

YM10 試験での培養液を採取し、遠心分離 (13,000 ×g、10 min、4°C) により完全に菌体を沈降させたあと、培養液上清を完全に除去した。回収した菌体をエッペンチューブのまま液体窒素で瞬間凍結させ、RNA 抽出までは -80°C で保存した。

酵母細胞からのトータル RNA の抽出は RNeasy Mini kit (QIAGEN) を使用し、酵母からのトータル RNA 精製のプロトコルに従って行った。抽出した RNA サンプルの純度は NanoDropND-1000 (NanoDrop Technologies) により測定した。RNA サンプルの濃度は Qubit™ RNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) を使用し、Qubit™ 3 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific) により測定した。

第 7 項 Realtime RT-qPCR による発現量解析

抽出した RNA サンプルを用いて、RT-qPCR による発現量解析を行った。RNA サンプルからの cDNA は PrimeScript™ RT Master Mix (Perfect Real Time ; TaKaRa Bio) を用いて調整し、300 ng 相当の RNA を逆転写した。Real time RT-qPCR は TB Green Premix EX Taq™ II (TaKaRa Bio) を使用し、MX3000P (STRATAGENE) により行った。各遺伝子の発現量解析に使用したプライマーは (Table 6-2. 109-120) に示した。

第 8 項 H3-1 株および DMSS233 株のウラシル要求性株の構築

二倍体 H3-1 株および DMSS233 株を宿主とするウラシル要求性株は *KanMX* の挿入および loss of heterozygosity (LOH) ¹⁴³⁾による *URA3* 遺伝子の喪失によって構築した。相同領域として *URA3* 遺伝子の 5'-UTR および 3'-UTR を含むプライマーセット URA3_pUG6-F / URA3_pUG6-R (Table 6-2. 121、122) を設計し、プラスミド pUG6 を鋳型として破壊カセットを増幅した。形質転換はエレクトロポレーションによって行い、形質転換体は G418 培地によって選択した。PCR により *URA3* 遺伝子の片方が欠失したことを確認した後、破壊株を 5-FOA 培地 (グルコース [20 g/L]、YNB [6.7 g/L]、ウラシル [20 mg/L]、5-フルオロオロチン酸 (5-FOA ; 和光純薬)、寒天 [20 g/L]) 上で培養することで、ウラシル要求性株 H3-1 *ura-* 株および DMSS233 *ura-* 株を選抜した。

第 9 項 プラスミド URA3/YEGAp の構築

プラスミド URA3/pUC119 を制限酵素 *Sma* I で処理し、*URA3* 遺伝子 ORF 断片 1.55 kbp の切り出しを行った。フェノール・クロロホルム処理により *Sma* I を失活させた後、エタノール沈殿により DNA 断片を回収した。アガロースゲル電気泳動により、回収した DNA 断片を分離し、*URA3* 遺伝子 ORF 断片を ISOSPIN Agarose Gel (NIPPON GENE) を使用して、回収した。プラスミド YEGAp を制限酵素 *EcoR* V で処理し、*TRP1* 遺伝子領域を切断し、SAP (Promega) によるアルカリホスファターゼ処理を行った。SAP 処理後のプラスミド YEGAp と *URA3* 遺伝子 ORF 断片を T4 リガーゼ (NIPPON GENE) によりライゲーションすることでプラスミド URA3/YEGAp を構築した。

第 10 項 *DAL7* 過剰発現株の構築

プラスミド URA3/YEGAp を *DAL7* 過剰発現用ベクターとして用いた。*DAL7* 遺伝子 ORF 領域 約 2.2 kb を *S. cerevisiae* H3-1 株のゲノム DNA を鋳型とし、プライマーセット DAL7+SalI-F / DAL7+NotI-R (Table 6-2. 123、124) により増幅した。増幅した DNA 断片とプラスミド URA3/YEGAp をそれぞれ制限酵素 *Not* I で処理し、70°C、15 分の熱処理による酵素失活後、エタノール沈殿により DNA 断片を回収した。続いて、*Not* I 処理後の *DAL7* 遺伝子 ORF 断片とプラスミド URA3/YEGAp をそれぞれ制限酵素 *Sal* I で処理し、フェノール・クロロホルム処理による酵素失活後、再度エタノール沈殿により DNA 断片を回収した。回収したそれぞれの DNA 断片を T4 リガーゼ (NIPPON GENE) によりライゲーションすることで *DAL7* 過剰発現ベクターを構築した。構築した過剰発現ベクターを宿主 H3-1 *ura-* 株および DMSS233 *ura-* 株にエレクトロポレーションによって導入し、SD 培地 (グルコース [20 g/L]、YNB [6.7 g/L]、寒天 [20 g/L]) により選択した。

第 11 項 KanMX-GFP-MDH3 および HphMX-GFP-MDH3 挿入株の構築

H3-1 株と DMSS233 株の *Mdh3p* の局在解析を行うために *KanMX-GFP-MDH3* および *HphMX-GFP-MDH3* 挿入株の構築を行った(Fig. 6-1)。まず、プライマーセット MDH3_ORF-F / MDH3_ORF -R (Table 6-2. 125、126)、および H3-1 株のゲノム DNA を鋳型として各カセット断片を増幅するための鋳型 DNA を作成した。得られた *MDH3* 遺伝子 ORF 断片を鋳型として、カセット① (*MDH3* 5'-UTR -1000 ~ -501)、カセット③ (*MDH3* 5'-UTR -500 ~ -1)、およびカセット⑤ (*MDH3* CDS 1-500) をそれぞれプライマーセット 1-MDH3_Upstream-F / 2-MDH3_Upstream+KanMX-R (Table 6-2. 129、130)、5-KanMX+MDH3_Prom-F / 6-MDH3_Prom+GFP-R (Table 6-2. 135、136)、9-GFP+5GA+MDH3-F / 10-MDH3_CDS-R (Table 6-2. 139、140) を用いて増幅した。カセット②-KanMX およびカセット②-HphMX は、プラスミド pUG6 およびプラスミド pAG32 を鋳型として、それぞれプライマーセット

3-MDH3_Upstream+KanMX-F / 4-KanMX+MDH3_Prom-R (Table 6-2. 131、132)、3-MDH3_Upstream+HphMX-F / 4-HphMX+MDH3_Prom-R (Table 6-2. 133、134) を用いて増幅した。プラスミド pFNO3¹⁴⁴)を鋳型として、プライマーセット pFNO3_GFP-F / pFNO3_GFP-R (Table 6-2. 127、128) により GFP 断片を増幅した。得られた GFP 断片を鋳型として、カセット④をプライマーセット 7-MDH3_Prom+GFP-F / 8-GFP+5GA+MDH3-R (Table 6-2. 137、138) を用いて増幅した。各 DNA 断片の連結は2回に分けて行った。まず、2つの DNA 断片 (カセット①、カセット②) および3つの DNA 断片 (カセット③、カセット④、カセット⑤) をそれぞれ Fusion PCR (アニーリング温度から伸長反応温度までは 1°C/10秒に設定) により連結した後、それぞれの連結カセットをプライマーセット 1-MDH3_Upstream-F / 4-KanMX+MDH3_Prom-R (Table 6-2. 129、132)、5-KanMX+MDH3_Prom-F / 10-MDH3_CDS-R (Table 6-2. 135、140) を用いて増幅した。得られた2つの DNA 断片を再度、Fusion PCR (アニーリング温度から伸長反応温度までは 1°C/10秒に設定) により連結した後、連結した DNA 断片をプライマーセット 1-MDH3_Upstream-F / 10-MDH3_CDS-R (Table 6-2. 129、140) を用いて増幅することで、*KanMX-GFP-MDH3* および *HphMX-GFP-MDH3* カセットを構築した。構築したカセットを形質転換により、H3-1株およびDMSS233株の染色体に挿入し、形質転換体はG418培地もしくはハイグロマイシンB培地により選択した。形質転換体はPCRおよび制限酵素処理により確認した。

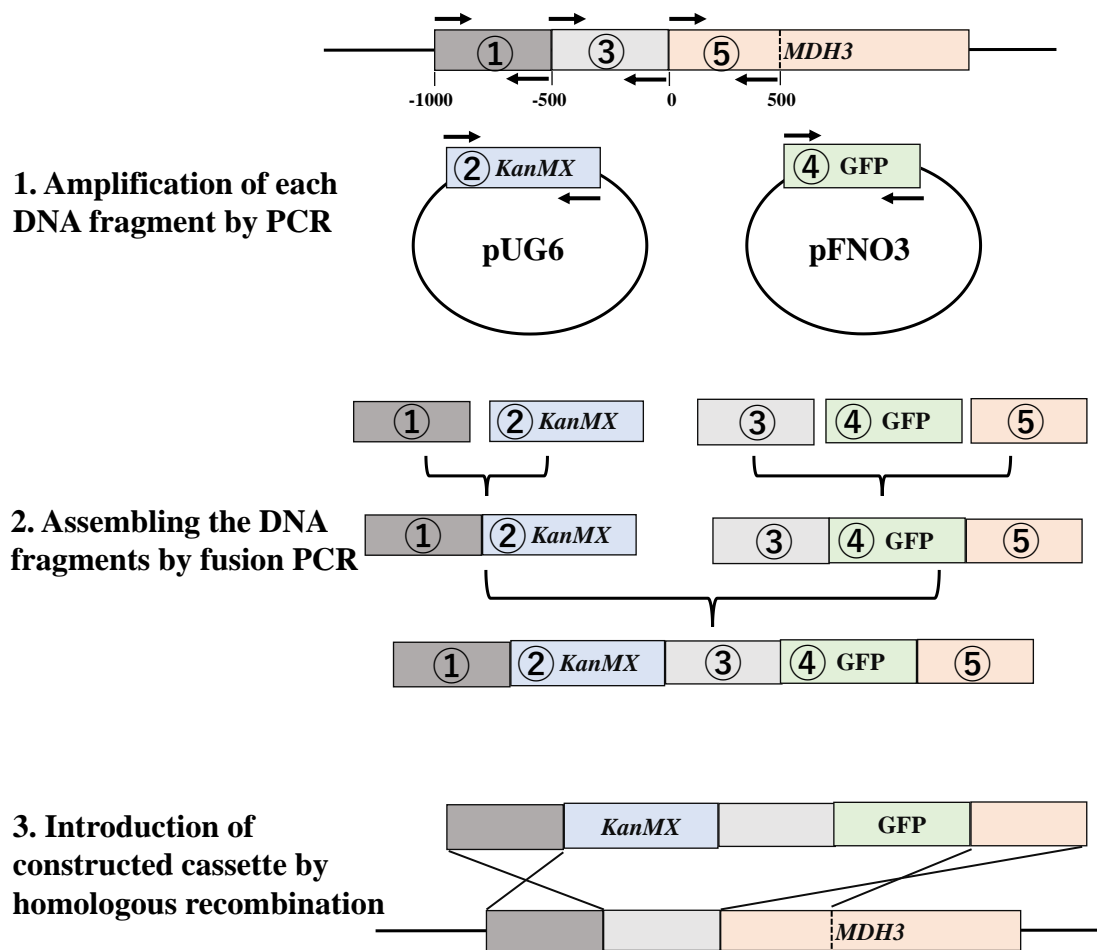


Fig. 6-1. Scheme of constructing GFP-*MDH3* DNA cassette.

As an example, the construction of an *KanMX*-containing cassette was shown. *HphMX*-containing cassette was also constructed as the same fusion.

第 12 項 GFP 融合型 Mdh3p の局在観察

GFP が融合した *MDH3* 遺伝子を挿入した H3-1 GFP-MDH3 株および DMSS233 GFP-MD H3 株を YM10 培地で培養した。培養開始から、12 時間後、24 時間後、48 時間後、72 時間後の培養液を採取し、リン酸緩衝液で 2 度洗浄した後、蛍光顕微鏡 (Nikon) とホログラフィック顕微鏡 (Tomocube Label-Free 3D Live Cell Imager, Tomocube, Inc.) を用いて観察した。

Table 6-2. Primers used in this study.

No.	Primer name	Sequence (5'-3')	Source
1	MDH1_pUG 6-F	TACGGAAAGGAAGAAAAAAACAAAAGGAAAAG GAAGGATACCATATACACAGCTGAAGCTTCGTACG C	This study
2	MDH1_pUG 6-R	TTTTTTTTTTTTTTCCCTATTTTCACTCTATTTCTG ATCTTGAACAATGCATAGGCCACTAGTGGATCTG	This study
3	MDH1_pAG 32-F	TACGGAAAGGAAGAAAAAAACAAAAGGAAAAG GAAGGATACCATATACACACATACGATTTAGGTGA CAC	This study
4	MDH1_pAG 32-R	TTTTTTTTTTTTTTCCCTATTTTCACTCTATTTCTG ATCTTGAACAATAATACGACTCACTATAGGGAG	This study
5	MDH2_pUG 6-F	CTGCAGACTATTACAAAAGTTCAATACAATATCAT AAAAGTTATAGTAACCAGCTGAAGCTTCGTACGC ACGGGAATATTATCAATTTGCTGCATTCTTATGCTT	This study
6	MDH2_pUG 6-R	CGGTCCGATGCTCAGCATAGGCCACTAGTGGATCT G	This study
7	MDH2_pAG 32-F	CTGCAGACTATTACAAAAGTTCAATACAATATCAT AAAAGTTATAGTAACCACATACGATTTAGGTGACA C	This study
8	MDH2_pAG 32-R	ACGGGAATATTATCAATTTGCTGCATTCTTATGCTT CGGTCCGATGCTCAAATACGACTCACTATAGGGAG	This study
9	MDH3_pUG 6-F	AAACACTTGTCAGTGCAAAGAAAATAAAAAGAG ACAAACAATCATAAACCAGCTGAAGCTTCGTACGC CAAGATACAAAGGAGTATAGAGTTAAGAAAATA	This study
10	MDH3_pUG 6-R	TAAAATTGAAGTAGCGCATAGGCCACTAGTGGAT CTG	This study
11	MDH3_pAG 32-F	AAACACTTGTCAGTGCAAAGAAAATAAAAAGAG ACAAACAATCATAAACCACATACGATTTAGGTGAC AC	This study
12	MDH3_pAG 32-R	CAAGATACAAAGGAGTATAGAGTTAAGAAAATA TAAAATTGAAGTAGCAATACGACTCACTATAGGG AG	This study
13	MLS1_pUG6 -F	ATTGTTTTGAACTAAACAAAGTAGTAAAAGCACAT AAAAGAATTAAGAAACAGCTGAAGCTTCGTACGC	This study

Table 6-2. (continued)

No.	Primer name	Sequence (5'-3')	Source
14	MLS1_pUG6 -R	ATATAGGCATGAATATATTTTTATATATGTGTACAC TGGGGCAAGGGAGAGCATAGGCCACTAGTGGATC TG	This study
15	MLS1_pAG3 2-F	ATTGTTTTGAACTAAACAAAGTAGTAAAAGCACAT AAAAGAATTAAGAAACACATACGATTTAGGTGAC AC	This study
16	MLS1_pAG3 2-R	ATATAGGCATGAATATATTTTTATATATGTGTACAC TGGGGCAAGGGAGAAATACGACTCACTATAGGGA G	This study
17	DAL7_pUG6 -F	TTGATATCACTTAGAGTATGTGTCATAGGCACGGT AAAGAGCACTGAACACAGCTGAAGCTTCGTACGC ACAGCGCCTAAAATTCTTCGAATATTCGTCAGGTT	This study
18	DAL7_pUG6 -R	ATGTACGTATAACATTGCATAGGCCACTAGTGGATC TG	This study
19	DAL7_pAG3 2-F	TTGATATCACTTAGAGTATGTGTCATAGGCACGGT AAAGAGCACTGAACACACATACGATTTAGGTGACA C	This study
20	DAL7_pAG3 2-R	ACAGCGCCTAAAATTCTTCGAATATTCGTCAGGTT ATGTACGTATAACATTAATACGACTCACTATAGGGA G	This study
21	ADE17_pUG 6-F	TTGAAGTAGTTTTGCTAGCTTGGACACCAAAGCAC ATATCACCATCAAATCAGCTGAAGCTTCGTACGC TTTGCCGTCATTTCTGTATTTATGGCATATTGACTC	This study
22	ADE17_pUG 6-R	TGAACTCATGCCATGCATAGGCCACTAGTGGATCT G	This study
23	AMD1_pUG 6-F	GATTAATAAATTATATAACAAATAAAAAGGGGGC ATTCTAAAAAAAATTTCAGCTGAAGCTTCGTACGC TGTATCGAACTGCCAAAAGTTCTCCTTATATACATG	This study
24	AMD1_pUG 6-R	TGCGCGTATAACCAGCATAGGCCACTAGTGGATCT G	This study
25	ASI3_pUG6- F	ACAATTTGTCAGGAACAGTCATTACGTAGGGATTT TCAAAAGTTTGACTGCAGCTGAAGCTTCGTACGC	This study

Table 6-2. (continued)

No.	Primer name	Sequence (5'-3')	Source
26	ASI3_pUG6-R	AAAAAGAAAATCCTATGATGCTTAAATACGTATA CCTAATAAAATAATTGCATAGGCCACTAGTGGATC TG	This study
27	ATG16_pUG6-F	TTGATTTTTGTTATTAACCTGCGCGAATCTGTATTA AGGGCGCATATTCCCAGCTGAAGCTTCGTACGC	This study
28	ATG16_pUG6-R	GATTTTATTTTCTTTTGTATGCATTTTGTGACGATTT GACAACCTGATGCAGCATAGGCCACTAGTGGATCTG	This study
29	BLM10_pUG6-F	AAACTTTATCATTGTTTCGTTAGCTAGCTTTGCACAT TAATTTTTTCGATTTGTTACCGCCACAGCTGAAGCTT CGTACGC	This study
30	BLM10_pUG6-R	GATGTACATATATGTCTAGATATGTGCTTAATATCC TATACTAATATGAAGCATAGGCCACTAGTGGATCT G	This study
31	BPH1_pUG6-F	GCCAATTGGTTCTTTCTCCTTTCTGCCAAAAAAAAA AACACAATACGGATCAGCTGAAGCTTCGTACGC	This study
32	BPH1_pUG6-R	ATAAACTACAAAATTGAATCATTTAAAGAAAGGC GTTACGATGTCATGCGCATAGGCCACTAGTGGATC TG	This study
33	BRE1_pUG6-F	AGAGATAGAAAGGGCTTTCACCGTTTTTATGCTAA TCGTGCTAGCTGATAATAATCAGATCAGCTGAAGC TTCGTACGC	This study
34	BRE1_pUG6-R	TATGTGGAGGATATAACACAAACAGTGGAAAAGT GGTAGAATAATTAGTAGCATAGGCCACTAGTGGAT CTG	This study
35	BUL2_pUG6-F	AGGACTTTGCAACTGAAGCAGCAGATTTGAGATAT ATTCTGGGGAACAAAAGAAGTATTACAGCTGAAGC TTCGTACGC	This study
36	BUL2_pUG6-R	TTTTATCAATTATTTGTAAAACCTGCGAGATTACTGT TAGTGTTGTATGGTGCATAGGCCACTAGTGGATCT G	This study
37	CMR1_pUG6-F	TACACAATAGGCGATCTATTTTAGTACGGCAATTA AAAGAAAGCTGCTTTTCAGTCAAGACAGCTGAAGC TTCGTACGC	This study

Table 6-2. (continued)

No.	Primer name	Sequence (5'-3')	Source
38	CMR1_pUG 6-R	CTGCTGAAAAGCGGGAGAGAAAAAAGGCAGTGCG GGTAACTGAGATGTTTGCATAGGCCACTAGTGGAT CTG	This study
39	COG1_pUG 6-F	AACACATTCGTACAACAAATCTTGTGGTAGAAAAC CTAAAAAAACCAATACGATAGAAACAGCTGAAG CTTCGTACGC	This study
40	COG1_pUG 6-R	ATCATTATCAATAAGTTTTCGAGGCGGGTACCCTC CCTCGTGCTATTATAGCATAGGCCACTAGTGGATC TG	This study
41	COG3_pUG 6-F	AAATACTCCCAGCATGAATTGTTTTACCCAATATTG CACGAATTATCGACACATCCAAAGCAGCTGAAGCT TCGTACGC	This study
42	COG3_pUG 6-R	TATCAGATTTATGTATGCATGAAAATTATAGAAAA AGTTGAAATTACACATAAGTGCATAGGCCACTAGT GGATCTG	This study
43	DOA1_pUG 6-F	CTTATTTTATATATATATATATTCATGTGTGATAGTAA GGTGTAGAGCAGCAGATTTGGAGTCAGCTGAAGCT TCGTACGC	This study
44	DOA1_pUG 6-R	TTATTTGCTATCTAGACATTATGTGTTTTATATGAT TGCTGTAAAAGTAGCATAGGCCACTAGTGGATCTG ACGCTTGTGATATAAACCAAGCAAAGAGAGAGGT	This study
45	DSC3_pUG6 -F	GAAAGGCAGCATAATTGATAAAATTCAGCTGAAG CTTCGTACGC	This study
46	DSC3_pUG6 -R	AAAAATAATATCATTATTGTACATGAAAACGACAT CTAATCGCCTCACTAGCATAGGCCACTAGTGGATC TG	This study
47	GAT1_pUG6 -F	CACGTTTTCTTTCTTTGCTTTTCCGCCCTTCCCCTG TTCTGTTCATCGCCAGCTGAAGCTTCGTACGC ATATGAAGCGGACATGGAAAGAAGCGAGTACTTTT	This study
48	GAT1_pUG6 -R	TTTTTTTTGGGGGATGCATAGGCCACTAGTGGATCT G	This study
49	GEA2_pUG6 -F	TAATTTAGTATCTAAAAAATCTTTTAAAGGGAAAG AGAAGAGGCGGAAAGCAGCTGAAGCTTCGTACGC	This study

Table 6-2. (continued)

No.	Primer name	Sequence (5'-3')	Source
50	GEA2_pUG6 -R	TATATAGAATTACATTATTTATGAAATATCATCACT ATCTCTTAGCATCTGCATAGGCCACTAGTGGATCT G	This study
51	GID8_pUG6 -F	GACAAATATCAGCCGGATGAAGATATATTTGTGTG TGGTAACAAATAGAACAGCTGAAGCTTCGTACGC	This study
52	GID8_pUG6 -R	ACACATGCACACGCACACACACATATATAAATATA TACGTACTATGTATGGCATAGGCCACTAGTGGATC TG	This study
53	GYP1_pUG6 -F	ATAACAACAACAACCACCAATACCGACCACTTAAT AAAAGTAACCATATACAGCTGAAGCTTCGTACGC TTGTTTTATATTATTACATACTATACAGTAAGTAAA	This study
54	GYP1_pUG6 -R	ATGAATAGGTCCGTGCATAGGCCACTAGTGGATCT G	This study
55	HSP82_pUG 6-F	AATCATACCTGATAGAAAATAGAGTCCTATAAACA AAAGCACAAACAAACACGCAAAGATCAGCTGAAG CTTCGTACGC	This study
56	HSP82_pUG 6-R	CCTATACGTTATATTATGTTTTGTTTATAACCTATT CAAGGCCATGATGTTCTACGCATAGGCCACTAGTG GATCTG	This study
57	INP2_pUG6- F	CGCTTATTGCAACAAGTTTGTTTTTACTTACTTGTG AAACGTTTGTGATTAACCTAATACAGCTGAAGCT TCGTACGC	This study
58	INP2_pUG6- R	TATGATTAAAGTGTAATTAGTTATTTCAAAGTACAT ATTAATAATATATTAGCATAGGCCACTAGTGGATCT G	This study
59	LAG2_pUG6 -F	TAGCAAAATCGTTTACATTGCACTCAGCTATATCA ACATCACGTTCTACCGCAACTAGTACAGCTGAAGC TTCGTACGC	This study
60	LAG2_pUG6 -R	AAACTATAAGGAAAAAAAAAAGATGCATGATGTA TTTGGTATAAACTATGCATAGGCCACTAGTGGAT CTG	This study
61	LYS14_pUG 6-F	GTTTCTTCCTTCTCTCATCATTTTGGTATAAGATCT GTTTCTGGCAATACAGCTGAAGCTTCGTACGC	This study

Table 6-2. (continued)

No.	Primer name	Sequence (5'-3')	Source
62	LYS14_pUG 6-R	TACACAATTTTATATCAATCTACAGGCAAATTATT ACGTAAACAGACAAGCATAGGCCACTAGTGGATCT G	This study
63	MGA1_pUG 6-F	CCCTATATTGAATTTTCACCCACGCCATAAAATAC AATAGCTCAGAGAACCGGTGGCCACCAGCTGAAG CTTCGTACGC	This study
64	MGA1_pUG 6-R	TCAACAGCGGTAACAGTTTGTTCAGTTGGATGCGA TGTGTTCTGTTGAAAATAATGCATAGGCCACTAGT GGATCTG	This study
65	MKS1_pUG 6-F	TAAGCAACACTTCCTAATTATTCTCTAATCCTAATA AAAAAAAAAGAAGCTGCAGCTGAAGCTTCGTACGC TTTTTTTCAAAGAAGCTTTAAATACTGTATCTGATTT	This study
66	MKS1_pUG 6-R	ATTTAACTTAGTAAGCATAGGCCACTAGTGGATCT G	This study
67	PEP5_pUG6- F	AGTTAAACCTTCCAAAAATCATAGCGTTTCATCTAT AGGCACAGCAAATCCAGCTGAAGCTTCGTACGC CGGGGCGCATTGTGACGCGGCGGCGACAATAGAT	This study
68	PEP5_pUG6- R	CGTTATGATCCATCAGCATAGGCCACTAGTGGATC TG	This study
69	PET112_pU G6-F	AGTGTTATTGTTAGCATTCTGTCCAAAAAGATCA GAGTAGGAACTAGATCAGCTGAAGCTTCGTACGC TTATTGTTATTATTTATGCACGGTTCCTATTTACAC	This study
70	PET112_pU G6-R	GCGGCGTTTATATTGCATAGGCCACTAGTGGATCT G	This study
71	PEX1_pUG6 -F	TCTGGAAGGGACGGCAGTAACAAGAAACACCTGA GGAAGCTGCTCTTTCAACAGCTGAAGCTTCGTACGC	This study
72	PEX1_pUG6 -R	ATTTTTTGGCCCTTTAAAGGGAAACGCGCTTTGTTCT TTTCTTCTTCTTTGCATAGGCCACTAGTGGATCTG	This study
73	PEX4_pUG6 -F	CTTACTGGAGACAACATAAAATATACATAATCATC GCCTTTATACATAATCAGCTGAAGCTTCGTACGC	This study
74	PEX4_pUG6 -R	AAAGTGAGGGCCCATTGTTTGCCATTCGAACACAT CCATCCTACGTGGTAGCATAGGCCACTAGTGGATC TG	This study

Table 6-2. (continued)

No.	Primer name	Sequence (5'-3')	Source
75	PIP2_pUG6- F	ATGAAATATCACTTTCTGATCTTGCTGAACAAAATT TCTTCGATAAAAAGCCAGCTGAAGCTTCGTACGC AGGCGCCATGAAGTGGCCGCATACATCTCAGGAAA	This study
76	PIP2_pUG6- R	ATTGGAAAAGACTTCGCATAGGCCACTAGTGGATC TG	This study
77	PUT4_pUG6 -F	TTCTTTTATTCTTTGCTGTTTCGAAGAATCACACCA TCAATGAATAAATCCAGCTGAAGCTTCGTACGC TTTTCGAATATTAGTATCGTGAGAGATATCGGAAT	This study
78	PUT4_pUG6 -R	ATGTTCATAAAAAGCGGCATAGGCCACTAGTGGATC TG	This study
79	RDS2_pUG6 -F	TTAATTTTAATCAACACAGAATACACATATTTATAT AAACTGACAAAATACAGCTGAAGCTTCGTACGC CTTTTAAATGACGCTGGAAATACCAATTACCTACTA	This study
80	RDS2_pUG6 -R	TGTATTACTTATGCGCATAGGCCACTAGTGGATCT G	This study
81	RIS1_pUG6- F	TATCTTTTGAGTGCTTGAAAGGAGACGCTGGACTA TATCTTTAGGTTAAACATCTGTCAACAGCTGAAGC TTCGTACGC	This study
82	RIS1_pUG6- R	AACATATACATATGTGTATCGCAATAATGCTTCAA AATTCACCAAGTTCTGCATAGGCCACTAGTGGATC TG	This study
83	RKR1_pUG6 -F	TTCTTAATAGTTCAAATCTGCTAAGCCATCAAAAA AAGTTCAAGCAATAGTTGGTTCTTACAGCTGAAGC TTCGTACGC	This study
84	RKR1_pUG6 -R	ACTTTGTTTAAAAAATGTAGTACATTTATATGAAAT TTATATGCGATAGTGCATAGGCCACTAGTGGATCT G	This study
85	RPC19_pUG 6-F	TGGGGAAAGGCCATCAATCCAAAGTCGGAAAAAT TGAACTTCACATAAAGTACCAGGCAACAGCTGAAG CTTCGTACGC	This study
86	RPC19_pUG 6-R	CATAATTATTAGAAATTTTCAGAGTGACAGAGGGTC TTTGAGTCGATCCGTAACATGCATAGGCCACTAGT GGATCTG	This study

Table 6-2. (continued)

No.	Primer name	Sequence (5'-3')	Source
87	RPL40A_pU G6-F	TCTATTTGTTGTTGTTATTACCGCTTATTATCCCATA GTTGAGACGACCAAGATTCAAACCAGCTGAAGCTT CGTACGC	This study
88	RPL40A_pU G6-R	ACATTAAAGTATACAGTAAATAAATGTATAGATTG ATTGGGCGAAACAGAGCATAGGCCACTAGTGGATC TG	This study
89	RPT6_pUG6 -F	AACAGTTAGGTTAGGTTTTATGTAAACGGAACAAC AGTATAGTGGGATACTATCACGACACAGCTGAAGC TTCGTACGC	This study
90	RPT6_pUG6 -R	ATACACATACTAAGTAACATATACAATGAGCCA AGTGAAACGAATACAGCATAGGCCACTAGTGGATC TG	This study
91	SER1_pUG6 -F	AGGTCTAATTAGTTGATCAATCATCGATTAACCATT AGTGATAAGAAACACAGCTGAAGCTTCGTACGC ACTTGAAAAAGTTTTTCTTTGAACCAAATTACAGG	This study
92	SER1_pUG6 -R	CATATTCCGCTGATAGCATAGGCCACTAGTGGATC TG	This study
93	SNT1_pUG6 -F	TTAATAATTTGCCTACTAACTTGTGCATAGAACAG CAAACAGAAACAAAGCGTAAGAAACCAGCTGAAG CTTCGTACGC	This study
94	SNT1_pUG6 -R	AACCATTGGATGGAAAAGAAGTAGAGCATATGTAT TGCCCGTCTCAGCCGTTTGTGCATAGGCCACTAGT GGATCTG	This study
95	TRP1_pUG6 -F	TATTGAGCACGTGAGTATACGTGATTAAGCACACA AAGGCAGCTTGGAGTCAGCTGAAGCTTCGTACGC TGCAGGCAAGTGCACAAACAATACTTAAATAAATA	This study
96	TRP1_pUG6 -R	CTACTCAGTAATAACGCATAGGCCACTAGTGGATC TG	This study
97	UBA2_pUG 6-F	CTTCAACAGACACACAAGATCTGGAGCGCTACGCC AAACAAGAAAAGAAACAGCTGAAGCTTCGTACGC TACACTGCGAACCACGATTAATAAATATATAGAT	This study
98	UBA2_pUG 6-R	ACCTTTTTTTATTTAGCATAGGCCACTAGTGGATCT G	This study

Table 6-2. (continued)

No.	Primer name	Sequence (5'-3')	Source
99	UBP11_pUG 6-F	AACCGTGGCATTGATCTTACTTTCCGTTTTCTTTTC GCTAAATCGGAAGTCATAAAGACACAGCTGAAGCT TCGTACGC	This study
100	UBP11_pUG 6-R	TCAAACATATTTATGTATATACATAAGGAAAATTC AAAAATCCGATGCAAGCATAGGCCACTAGTGGATC TG	This study
101	ULA1_pUG6 -F	AGTCGCCTCTCTTTCTTTCTTAGGCCAACTAGACAG CCGTAGATGAAAATCAGCTGAAGCTTCGTACGC AGTGCAATAAAAATAAGCATTCTATGAACTCGGAGA	This study
102	ULA1_pUG6 -R	GCTGACGAAAAATTTGCATAGGCCACTAGTGGATC TG	This study
103	UTH1_pUG6 -F	CTACTAGTCCTTCCTTTAAACAAAAATTTACCCTCC CTTAATTTTTCAAGAAATTCAGTCAGCTGAAGCTT CGTACGC	This study
104	UTH1_pUG6 -R	CGGAGTAAAAAAAGTACTAGCAAAAGCTTATTTGC AATATTCAAGGAAAAAAGGCGCATAGGCCACTAG TGGATCTG	This study
105	VPS16_pUG 6-F	AAGGAATAGTACAGACGGATAGGCCTCCCTTTTGT TTCGCACTAATAAAACAGCTGAAGCTTCGTACGC AATTATTTGATATGCGGCTAGATATCCACAACGTC	This study
106	VPS16_pUG 6-R	TATAAATTATGAGTTGCATAGGCCACTAGTGGATC TG	This study
107	YTA12_pUG 6-F	AATACAATATAGCACACTCAAGAGTCTTGGCAAGC AACTTTAAAGTTAGAAAGAGTACTACAGCTGAAGC TTCGTACGC	This study
108	YTA12_pUG 6-R	TAAGCAAGATATGTAGAACAGTCTTCCTCCATTTCT TTGTATTGTGAAATATCAAGCATAGGCCACTAGTG GATCTG	This study
109	RT-ACT1-S	GGTTGCTGCTTTGGTTATTGA	(145)
110	RT-ACT1- AS	TTTTGACCCATACCGACCAT	(145)
111	RT-MDH1-F	GCTCTGCTACGTTGTCAATG	This study

Table 6-2. (continued)

No.	Primer name	Sequence (5'-3')	Source
112	RT-MDH1-R	CGATGCCTTCGGATTTGAAC	This study
113	RT-MDH2-F	AGTCCAATACGGTGGTGATG	This study
114	RT-MDH2-R	GGATCTGCTCAATGTTACCC	This study
115	RT-MDH3-F	GGCCAAGTTTGCTGAAGAAG	This study
116	RT-MDH3-R	GAGTTGTCGCCAACTAATTGC	This study
117	RT-MLS1-F	GTAGCTCAAGATTACATTGGG	This study
118	RT-MLS1-R	GTCCGCAATTCAACCCACTA	This study
119	RT-DAL7-F	ATTGAAACTTTGCCAGCGGC	This study
120	RT-DAL7-R	GTGTTTCAGGCAAGTTTCTCAG	This study
121	URA3_pUG 6-F	ACCCAAGTGCACAGAACAACCTGCAGGAAAC GAAGATAAATCCAGCTGAAGCTTCGTACGC	This study
122	URA3_pUG 6-R	AATTTGTGAGTTTAGTATAACATGCATTTACTTATAA TACAGTTTTGCATAGGCCACTAGTGGATCTG	This study
123	DAL7+Sal1- F	ATGCCTGAATGCCTGAGTCGACGAGCACTGAACAA TGGTGAAG	This study
124	DAL7+Not1- R	CAGGCATTATGCCTAGGCGGCCGCGTAATATACCG ACTCCTGGTC	This study
125	MDH3_ORF -F	AGGAACTCCAAGCTGATTCTG	This study
126	MDH3_ORF -R	GGAGGATATGGTTTCCTTTCC	This study
127	pFNO3_GFP -F	ATGAGTAAAGGAGAAGAAGACTTTTC	This study

Table 6-2. (continued)

No.	Primer name	Sequence (5'-3')	Source
128	pFNO3_GFP -R	TTTGTATAGTTCATCCATGCC	This study
129	1-MDH3_Up stream-F	TGGTTCAAAATTGAATTCAGCGG	This study
130	2-MDH3_Up stream+Kan MX-R	GCGTACGAAGCTTCAGCTGAACAATTCACGGAAAA TCAACTG	This study
131	3-MDH3_Up stream+Kan MX-F	CAGTTGATTTTCCGTGAATTGTTTCAGCTGAAGCTTC GTACGC	This study
132	4-KanMX+ MDH3_Prom -R	GTATAATTTTAAATTTTGTTCCTTTTCCTAGCATAGG CCACTAGTGGATC	This study
133	3-MDH3_Up stream+Hph MX-F	CAGTTGATTTTCCGTGAATTGTTTCACATACGATTTA GGTGACAC	This study
134	4-HphMX+ MDH3_Prom -R	GTATAATTTTAAATTTTGTTCCTTTTCCTAAATACGA CTCACTATAGGGAG	This study
135	5-KanMX+ MDH3_Prom -F	GATCCACTAGTGGCCTATGCTAGGAAAAGAACAAA ATTTAAAATTATAC	This study
136	6-MDH3_Pr om+GFP-R	GAAAAGTTCTTCTCCTTTACTCATATTTATGATTGT TTGTCTCTTTTTATTTTC	This study
137	7-MDH3_Pr om+GFP-F	GAAAATAAAAAGAGACAAACAATCATAAATATGA GTAAAGGAGAAGAACTTTTC	This study
138	8-GFP+5GA +MDH3-R	GGCACCGGCTCCAGCGCCTGCACCAGCTCCTTTGT ATAGTTCATCCATGCC	This study
139	9-GFP+5GA +MDH3-F	GGAGCTGGTGCAGGCGCTGGAGCCGGTGCCATGGT CAAAGTCGCAATTCTTG	This study
140	10-MDH3_C DS-R	ATGGTTTCCCCTGAATGACC	This study

第3節 実験結果及び考察

第1項 H3-1株とDMSS233株の比較ゲノム解析

リンゴ酸高生産変異株 DMSS233 株に導入された変異点を同定するために、親株 H3-1 株との比較ゲノム解析を行った。その結果、861 か所の変異点が同定され、そのうち 822 か所が一塩基置換変異、39 か所が挿入・欠失変異であることが明らかとなった (Table 6-3)。また、同定された変異点の中から、CDS 領域に変異が導入された遺伝子を抽出し、遺伝子機能の変化が生じやすい変異導入遺伝子に着目した結果、13 のナンセンス変異導入遺伝子、2 つのフレームシフト変異導入遺伝子、325 のミスセンス変異導入遺伝子を同定した (Table 6-3)。リンゴ酸高生産変異株 DMSS233 株は、親株の約 6.2 倍のリンゴ酸生産能を有していたことから、遺伝子機能が大きく変化したことが原因と考えられる。よって、ナンセンス変異、フレームシフト変異、ミスセンス変異導入遺伝子をターゲットとし、リンゴ酸高生産能を付与した変異遺伝子の特定を目指した。

Table 6-3.

Result of comparative genome analysis between H3-1 and DMSS233.

Total variant call	Single nucleotide substitution	Indel
861	822	39
Nonsense mutation	Frameshift mutation	Missense mutation
13	2	325

第2項 ナンセンス変異遺伝子のリンゴ酸高生産性への関係

前項で同定した変異導入遺伝子のなかでも、ナンセンス変異およびフレームシフト変異は特に遺伝子機能の変化を生じやすいと考えられる。DMSS233 株に導入された 13 のナンセンス変異遺伝子と 2 つのフレームシフト変異遺伝子について、Yeast Deletion Clones H-

omozygous Diploid Complete Set のライブラリーから遺伝子破壊株を探索した結果、9つの遺伝子がライブラリーに含まれていた。その他の6つの遺伝子は出芽酵母における必須遺伝子のためライブラリーに含まれていなかった。ライブラリーに含まれていた9つの遺伝子について、比較ゲノム解析の結果を Table 6-4 に示した。Table 6-4 に示す9つの遺伝子の破壊株9株について、YM10 試験によるリンゴ酸生産量を確認した。BY4743 *spt21Δ* 株は対象株 BY4743 株よりも約 70 mg/L リンゴ酸の生産量が多かったが、著しくリンゴ酸生産能が増強されたとはいえない程度である (Fig. 6-2)。その他の破壊株は対象株のリンゴ酸生産量と同程度であるため、9つの遺伝子のナンセンス変異はリンゴ酸高生産能への寄与が小さいことが示唆された。ライブラリーに含まれていなかった6つの必須遺伝子については、H3-1 株を宿主として同一遺伝子座の片方の遺伝子を破壊したヘテロ遺伝子破壊株を構築し、リンゴ酸生産量を定量することで DMSS233 株のリンゴ酸高生産性に関与する変異遺伝子か否かを明らかにできると考える。次に、ミスセンス変異導入遺伝子の中からリンゴ酸高生産性を付与する遺伝子を探索することとした。

Table. 6-4. Gene containing nonsense mutations within the strain DMSS233.

Gene name	Base substitution	Amino acid change	Zygoty	
			DMSS233	H3-1
<i>AIM3</i>	C > T	Gln > TER	Hetero	Wild type
<i>DNF1</i>	G > A	Trp > TER	Hetero	Wild type
<i>DYN1</i>	G > A	Trp > TER	Hetero	Wild type
<i>GCV3</i>	G > A	Trp > TER	Hetero	Wild type
<i>GPB1</i>	G > A	Trp > TER	Hetero	Wild type
<i>SPT21</i>	C > T	Gln > TER	Hetero	Wild type
<i>UBP16</i>	C > T	Gln > TER	Hetero	Wild type
<i>VPS34</i>	G > A	Trp > TER	Hetero	Wild type
<i>YNL092W</i>	C > T	Gln > TER	Hetero	Wild type

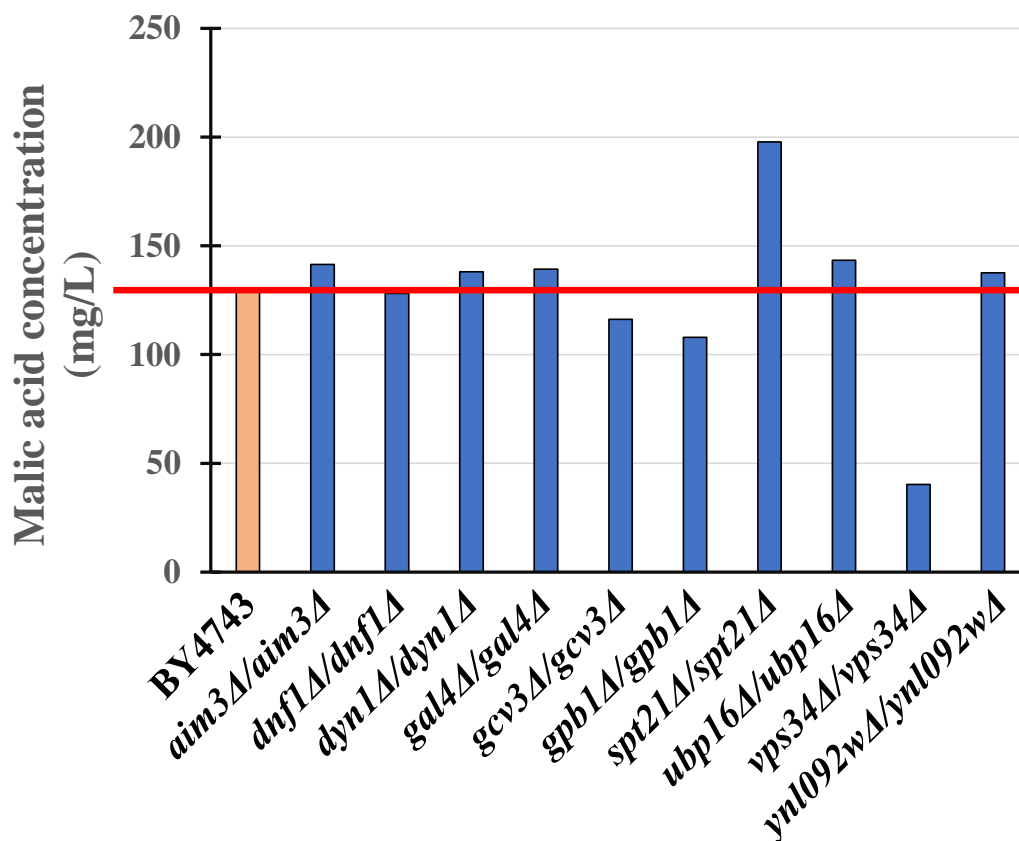


Fig. 6-2. Malic acid production of gene-disrupted strains.

A yeast deletion clones homozygous diploid complete set was used as disrupt strains and malic acid production was evaluated with YM10 test.

第3項 リンゴ酸高生産性に関与するリンゴ酸合成遺伝子の推定

リンゴ酸高生産変異株 DMSS233 株には、ミスセンス変異が 325 の遺伝子に導入されていることが明らかとなった (Table 6-3)。これら 325 の遺伝子すべてについて、破壊株の構築やリンゴ酸生産能の評価を行うことは現実的に難しい。そのため、まずは出芽酵母が有する 5 つのリンゴ酸合成に直接関与する遺伝子 *MDH1*、*MDH2*、*MDH3*、*MLS1*、*DAL7* に着目した。DMSS233 株において、これら 5 つの遺伝子にミスセンス変異が導入されているわけではないが、リンゴ酸高生産性に関与するリンゴ酸合成遺伝子の特定が期待できる。*MDH1*¹⁴⁶、*MDH2*¹⁴⁷、*MDH3*¹⁴⁸ はリンゴ酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子であ

り、それぞれミトコンドリア、細胞質、ペルオキシソームに局在し、機能する (Fig. 6-3 A)。 *MLS1*¹⁴⁹⁾と *DAL7*^{149), 150)}はどちらもリンゴ酸シンターゼをコードする遺伝子であり、どちらもペルオキシソーム内のグリオキシル酸回路で機能する (Fig. 6-3A、B)。

これらの知見を踏まえ、二倍体 DMSS233 株を宿主とするリンゴ酸生合成遺伝子のホモザイガス二重破壊株を構築し、YM10 試験におけるリンゴ酸生産量を分析した結果、*MDH3* 遺伝子二重破壊株のリンゴ酸生産量は DMSS233 野生株の約半分にまで低下した (Fig. 6-4A)。 *MDH2*、*MLS1*、*DAL7* それぞれのホモ二重破壊株は野生株と比較して、著しい低下は見られなかった。*MDH1* 遺伝子ホモ二重破壊株のリンゴ酸生産量は野生株よりも増加したが、*MDH1* ホモ二重破壊株の別の形質転換体について同様の試験をしたところ、野生株と同等のリンゴ酸生産量であった (data not shown)。これらの結果から、DMSS233 株のリンゴ酸高生産性には *Mdh3p* が関係している可能性が示唆された。

また、*MDH3* 遺伝子のヘテロ破壊株 (*MDH3* / *mdh3*) とホモ破壊株 (*mdh3* / *mdh3*) について、同様の試験を行った結果、野生型 *MDH3* 遺伝子の数に依存してリンゴ酸の生産量が低下したことから、DMSS233 株のリンゴ酸高生産性には *Mdh3p* が関与していることが考えられる (Fig. 6-4B)。この結果は、DMSS233 株の親株である H3-1 株を宿主とした *MDH3* ホモ二重破壊株では見られなかったことから、DMSS233 株特有の現象と言える (Fig. 6-4C)。すなわち、DMSS233 株のリンゴ酸高生産性が *MDH3* に相互作用する変異遺伝子に起因することが推察される。

Mdh3p はペルオキシソームに局在するリンゴ酸デヒドロゲナーゼであり、グリオキシル酸回路で機能する酵素である¹⁵¹⁾。先行研究において、*Mdh3p* のペルオキシソーム内への輸送が機能しなくなり、細胞質に *Mdh3p* が蓄積することでリンゴ酸高生産性を獲得した報告がされている³³⁾。そのため、DMSS233 株においても、*Mdh3p* が細胞質に蓄積していることが考えられる。

次に、リンゴ酸生合成に直接関与する 5 つの遺伝子について、親株 H3-1 株と変異株 DMSS233 株について、RT-qPCR による発現量解析を行った。DMSS233 株において、*MDH1*、*MDH3* 遺伝子の発現量は H3-1 株と比較してともに有意に減少していた (Fig. 6-5)。親株と比較して、DMSS233 株は必要以上にリンゴ酸の生産性量が増強された株であるため、リンゴ酸生合成に関与する *MDH1*、*MDH3* の発現量が減少したと考えられる。一方、リンゴ酸シンターゼをコードする *DAL7* の発現量は親株の 2 倍以上に増加していた (Fig. 6-5)。DMSS233 株を宿主とした *DAL7* の二重破壊株のリンゴ酸生産量は減少していなかったが、発現量解析の結果から *DAL7* 遺伝子も DMSS233 株のリンゴ酸高生産性獲得に関係する因子である可能性が示唆された。

リンゴ酸シンターゼ *Mls1p* と *Dal7p* は互いにアイソザイムとして知られており、どちらもアセチル-CoA とグリオキシル酸を基質にリンゴ酸の補酵素 A を生成する¹⁴⁹⁾。これら 2 つの遺伝子には生理的役割に違いがあり、*MLS1* が炭素源カタボライト抑制を受けるのに対し、*DAL7* は窒素源カタボライト抑制を受ける^{149, 152)}。元々、*Dal7p* はアラントインの分解経路で機能する酵素として発見されており、複数の *DAL* 遺伝子とクラスターを形成している¹⁵³⁾ (Fig. 6-3B)。この *DAL* 遺伝子クラスターはグルタミン酸やアンモニアなど資化しやすい窒素源の存在化では発現抑制を受けているが、プロリンのような資化しにくい窒素源存在下においては抑制が解除される¹⁴⁹⁾。

DMSS233 株の *DAL7* の発現量が増加していたことから、DMSS233 株がグルタミン酸等のアミノ酸の細胞内への取り込み能が低下したことにより、*DAL* クラスターの発現が誘導され、リンゴ酸高生産性を獲得したことが推察される。

よって、以後の実験ではミスセンス変異導入遺伝子の中から、*MDH3* に関連する遺伝子および *DAL7* の発現誘導をもたらし得る遺伝子を対象に遺伝破壊株の構築を行うこととした。

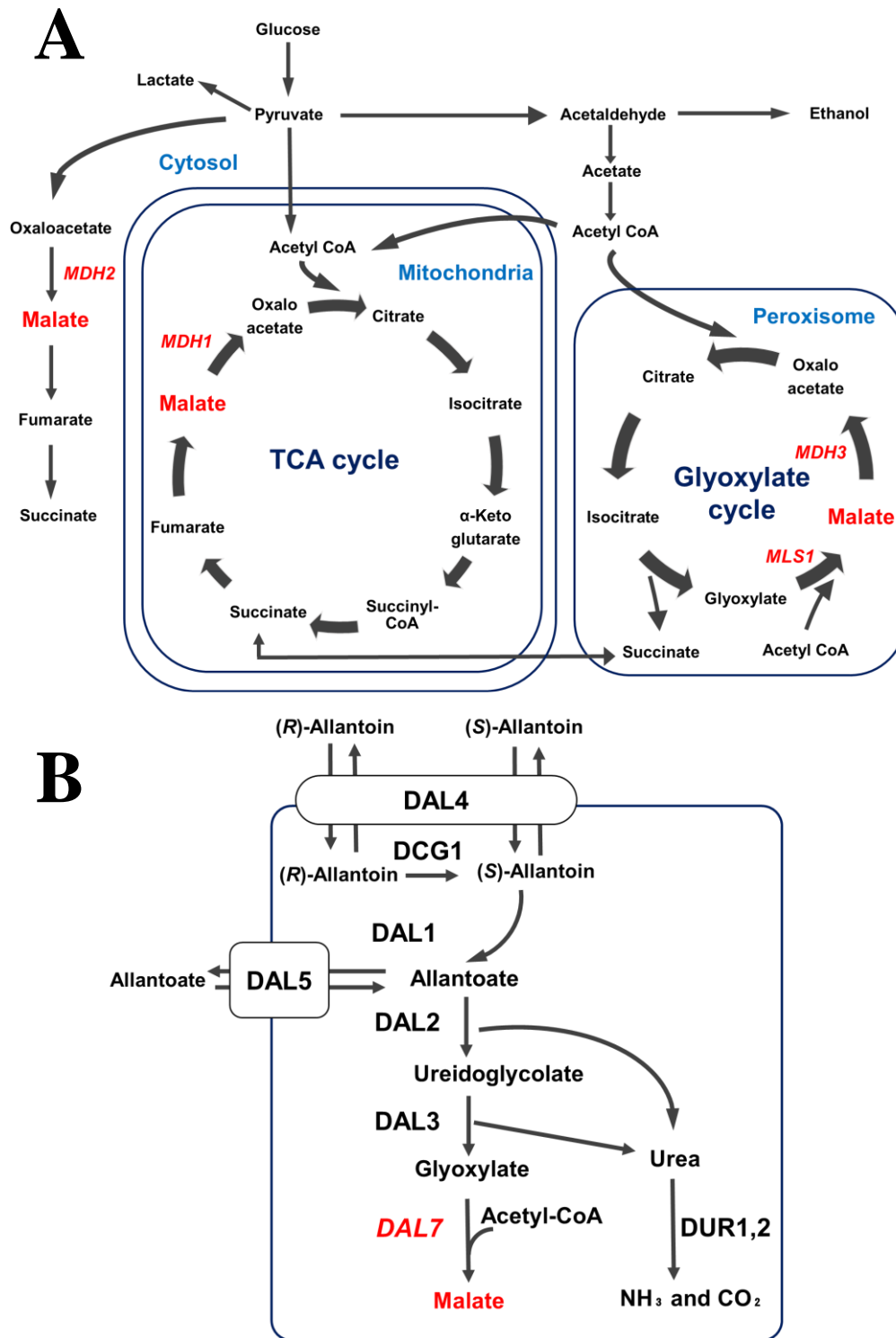


Fig. 6-3. Metabolic pathway for malic acid biosynthesis genes in *S. cerevisiae*. Malic acid synthesis involved in malate dehydrogenase encoding *MDH1*, *MDH2*, and *MDH3*, malic acid synthase encoding *MLS1* (A). DAL cluster map (B).

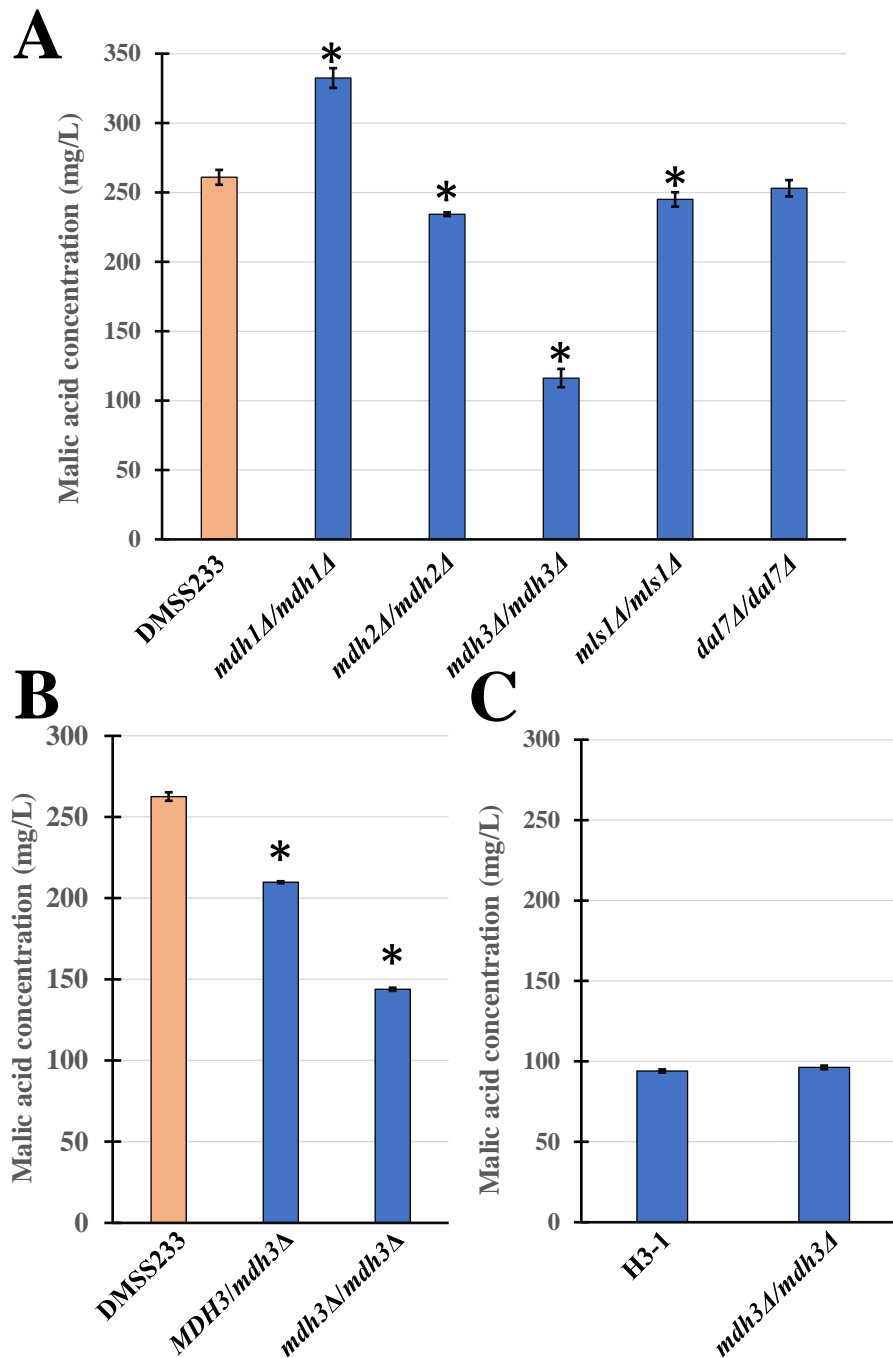


Fig. 6-4. Malic acid production of each disruptants which the genes involving malic acid synthesis were disrupted.

Malic acid production was evaluated by YM10 test in triplicate. An asterisk indicates a significant difference (p -value < 0.05). Five homozygous disruptants of malic acid biosynthesis gene, Dunnett's test (A). *MDH3* gene disruptants, Dunnett's test (B). *MDH3* gene disruptants of H3-1 as host, Student's t -test (C).

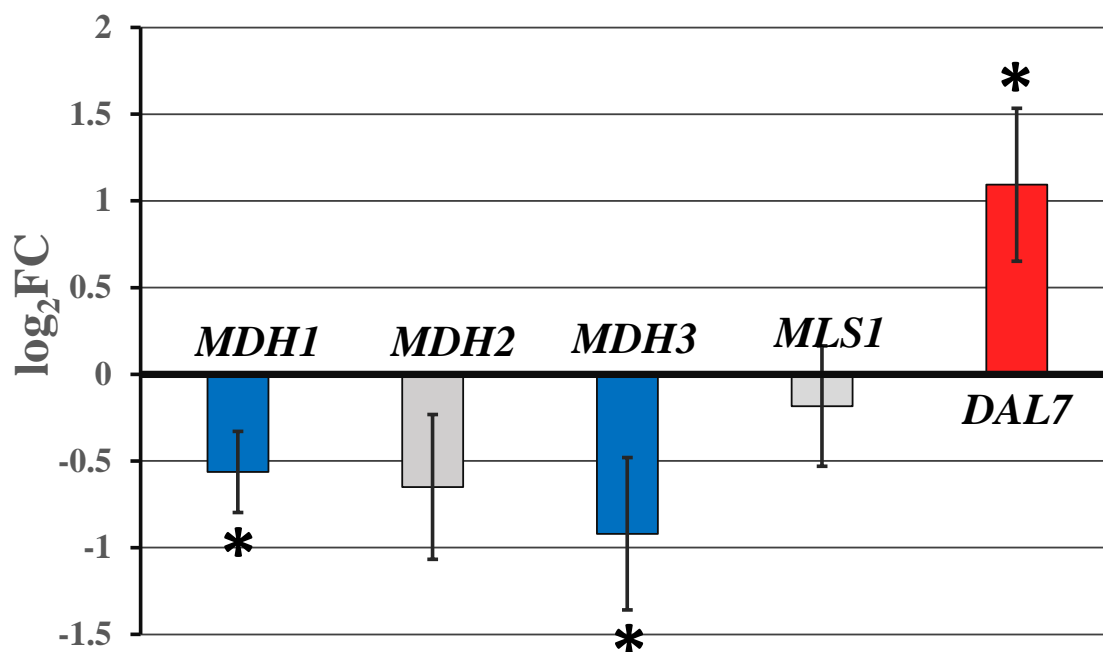


Fig. 6-5. Comparative analysis of expression level of malic acid biosynthesis gene between strains H3-1 and DMSS233.

Expression level of malic acid biosynthesis gene was evaluated by YM10 test in triplicate. The bars show the change in the expression level of the genes in strain DMSS233 relative to those of strain H3-1. An asterisk indicates a significant difference (p -value < 0.05). Statistical analysis was performed by Student's t -test.

第4項 ミスセンス変異遺伝子のリンゴ酸高生産性への関係

リンゴ酸高生産変異株 DMSS233 株に導入された 325 のミスセンス変異遺伝子の中から、リンゴ酸高生産性をもたらした遺伝子の特定を目指し、H3-1 株を宿主とした遺伝子破壊株の構築を行った。前項の結果より、ミスセンス変異導入遺伝子の中から、*MDH3* に関連する遺伝子および *DAL7* の発現誘導をもたらし得る遺伝子を選抜した。Table 6-5 にはホモザイガスの点変異が導入された遺伝子を、Table 6-6 にはヘテロザイガスの点変異導入された遺伝子を示した。

Table 6-5.
Gene containing missense mutations within the strain DMSS233.

Gene name	Base substitution	Amino acid change	Zygotity	
			DMSS233	H3-1
<i>ARO80</i>	C > T	Ser > Phe	Homo	Wild type
<i>CAR2</i>	G > A	Ala > Thr	Homo	Wild type
<i>CCC2</i>	G > A	Ala > Thr	Homo	Wild type
<i>EUG1</i>	C > T	Thr > Ile	Homo	Wild type
<i>FMP27</i>	G > A	Ser > Asn	Homo	Wild type
	G > A	Gly > Asp	Homo	Wild type
<i>MCM21</i>	G > A	Asp > Asn	Homo	Wild type
<i>MGA2</i>	A > G	Asn > Ser	Homo	Wild type
<i>MUS81</i>	C > T	Ala > Val	Homo	Wild type
	C > T	Ser > Leu	Homo	Wild type
<i>NIT3</i>	C > T	Ala > Val	Homo	Wild type
<i>PPZ2</i>	C > T	Arg > Cys	Homo	Wild type
<i>RMT2</i>	G > A	Met > Ile	Homo	Wild type
<i>SKG3</i>	C > T	Pro > Ser	Homo	Wild type
<i>SPH1</i>	C > T	Pro > Ser	Homo	Wild type
<i>THI4</i>	G > A	Gly > Asp	Homo	Wild type
<i>TUS1</i>	G > A	Val > Met	Homo	Wild type
<i>UBX5</i>	G > A	Asp > Asn	Homo	Wild type
<i>VTC5</i>	G > A	Gly > Asp	Homo	Wild type

Table 6-6.

Gene containing missense mutations within the strain DMSS233.

Gene name	Base substitution	Amino acid change	Zygosity	
			DMSS233	H3-1
<i>COG3</i>	G > A	Asp > Asn	Hetero	Wild type
	G > A	Glu > Lys	Hetero	Wild type
<i>LAG2</i>	G > A	Asp > Asn	Hetero	Wild type
<i>MGA1</i>	C > T	Pro > Ser	Hetero	Wild type
<i>RPT6</i>	G > A	Glu > Lys	Hetero	Wild type
<i>SNT1</i>	G > A	Asp > Asn	Hetero	Wild type
<i>UTH1</i>	G > T	Val > Phe	Hetero	Wild type
<i>YTA12</i>	G > A	Glu > Lys	Hetero	Wild type
<i>HSP82</i>	C > T	Pro > Leu	Hetero	Wild type
<i>RPC19</i>	G > A	Asp > Asn	Hetero	Wild type
<i>BUL2</i>	C > T	Thr > Ile	Hetero	Wild type
<i>INP2</i>	G > A	Arg > Lys	Hetero	Wild type
<i>RKR1</i>	C > T	Ser > Leu	Hetero	Wild type
	G > A	Met > Ile	Hetero	Wild type
<i>UBP11</i>	G > A	Glu > Lys	Hetero	Wild type
<i>BLM10</i>	G > A	Val > Ile	Hetero	Wild type
<i>BRE1</i>	G > A	Asp > Asn	Hetero	Wild type
<i>CMR1</i>	C > T	Pro > Leu	Hetero	Wild type
<i>DOA1</i>	G > A	Ser > Asn	Hetero	Wild type
<i>DSC3</i>	G > A	Gly > Ser	Hetero	Wild type
<i>COG1</i>	C > T	Ser > Phe	Hetero	Wild type
	G > A	Val > Ile	Hetero	Wild type
<i>RIS1</i>	G > A	Cys > Tyr	Hetero	Wild type
<i>RPL40A</i>	C > T	Arg > Cys	Hetero	Wild type
<i>GID8</i>	G > A	Gly > Asp	Hetero	Wild type
<i>PEX1</i>	G > A	Arg > Lys	Hetero	Wild type
<i>PEX4</i>	G > A	Gly > Glu	Hetero	Wild type
<i>ADE17</i>	G > A	Ala > Thr	Hetero	Wild type
<i>AMD1</i>	G > A	Gly > Ser	Hetero	Wild type
<i>ASI3</i>	G > A	Asp > Asn	Hetero	Wild type

Table 6-6. (continued)

Gene name	Base substitution	Amino acid change	Zygoty	
			DMSS233	H3-1
<i>ATG16</i>	G > A	Ser > Asn	Hetero	Wild type
<i>BPH1</i>	G > A	Cys > Tyr	Hetero	Wild type
<i>GAT1</i>	G > A	Asp > Asn	Hetero	Wild type
<i>GAT1</i>	C > T	Pro > Ser	Hetero	Wild type
<i>GEA2</i>	C > T	Ser > Leu	Hetero	Wild type
<i>GYP1</i>	G > A	Asp > Asn	Hetero	Wild type
<i>LYS14</i>	G > A	Met > Ile	Hetero	Wild type
<i>MKS1</i>	C > T	Pro > Ser	Hetero	Wild type
<i>PEP5</i>	G > A	Gly > Arg	Hetero	Wild type
<i>PET112</i>	G > A	Gly > Arg	Hetero	Wild type
<i>PIP2</i>	C > T	Thr > Ile	Hetero	Wild type
<i>PUT4</i>	C > T	Thr > Ile	Hetero	Wild type
<i>RDS2</i>	G > A	Ala > Thr	Homo	Hetero
<i>RDS2</i>	G > A	Asp > Asn	Homo	Hetero
<i>SER1</i>	G > A	Asp > Asn	Hetero	Wild type
<i>TRP1</i>	G > A	Gly > Asp	Hetero	Wild type
<i>UBA2</i>	G > A	Glu > Lys	Homo	Wild type
<i>ULAI</i>	G > A	Glu > Lys	Hetero	Wild type
<i>VPS16</i>	G > A	Ser > Asn	Hetero	Wild type

これら選抜した遺伝子について、Table 6-5 に示す遺伝子は Yeast Deletion Clones Homozygous Diploid Complete Set を使用し、Table 6-6 に示す遺伝子は H3-1 株を宿主とし、*KanMX* 挿入によるヘテロザイガス遺伝子破壊株を構築した。YM10 試験後の各破壊株のリンゴ酸生産量を Table 6-7 に示した。同一の列に記載の破壊株は同じロットの YM10 試験に供されたことを表している。全ての破壊株の中で、BY4743 株を宿主とする *EUG1* 破壊株のリンゴ酸生産量の増加率が最も大きく、約 1.3 倍のリンゴ酸生産量を示しが、(Table 6-7)。大幅なリンゴ酸生産能の増加は見られなかった。よって、本項で選抜したミスセンス変異導入遺伝子はリンゴ酸高生産性の獲得への関連は小さいことが示唆された。

Table. 6-7.**Malic acid production of gene disrupted strain BY4743.**

Strain	Malic acid	Strain	Malic acid	Strain	Malic acid
BY4743	155	H3-1	60	H3-1	99
<i>aro80</i> Δ	143	<i>cog3</i> Δ	60	<i>ade17</i> Δ	101
<i>car2</i> Δ	155	<i>lag2</i> Δ	60	<i>amd1</i> Δ	91
<i>ccc2</i> Δ	144	<i>mga1</i> Δ	61	<i>asi3</i> Δ	102
<i>eug1</i> Δ	201	<i>rpt6</i> Δ	62	<i>atg16</i> Δ	100
<i>fmp27</i> Δ	153	<i>snt1</i> Δ	70	<i>bph1</i> Δ	101
<i>mcm21</i> Δ	121	<i>uth1</i> Δ	60	<i>gat1</i> Δ	100
<i>mga2</i> Δ	150	<i>yta12</i> Δ	60	<i>gea2</i> Δ	100
<i>mus81</i> Δ	132	<i>hsp82</i> Δ	61	<i>gyp1</i> Δ	99
<i>nit3</i> Δ	154	<i>rpc19</i> Δ	60	<i>lys14</i> Δ	102
<i>ppz2</i> Δ	136	<i>bul2</i> Δ	61	<i>mks1</i> Δ	98
<i>rmt2</i> Δ	153	<i>inp2</i> Δ	60	<i>pep5</i> Δ	98
<i>skg3</i> Δ	158	<i>rkr1</i> Δ	59	<i>pet112</i> Δ	97
<i>sph1</i> Δ	146	<i>ubp11</i> Δ	59	<i>pip2</i> Δ	94
<i>thi4</i> Δ	148	<i>blm10</i> Δ	63	<i>put4</i> Δ	97
<i>tus1</i> Δ	90	<i>bre1</i> Δ	60	<i>rds2</i> Δ	82
<i>ubx5</i> Δ	157	<i>cmp1</i> Δ	60	<i>ser1</i> Δ	95
<i>vtc5</i> Δ	171	<i>doa1</i> Δ	58	<i>trp1</i> Δ	97
		<i>dcs3</i> Δ	59	<i>uba2</i> Δ	96
		<i>cog1</i> Δ	62	<i>ula1</i> Δ	96
		<i>ris1</i> Δ	60	<i>vps16</i> Δ	99
		<i>rpl40a</i> Δ	57		
		<i>gid8</i> Δ	68		
		<i>pex1</i> Δ	67		
		<i>pex4</i> Δ	66		

Each disruptants in the same row were tested in the same lot YM10 test.

Unit of malic acid is mg/L.

第 5 項 *DAL7* 過剰発現株のリンゴ酸生産能の評価

前述したように RT-qPCR による発現量解析の結果、DMSS233 株の *DAL7* 遺伝子の発現量は H3-1 株の 2 倍以上に増加していた (Fig. 6-5)。*DAL7* はリンゴ酸シンターゼをコードする遺伝子であるため、DMSS233 株のリンゴ酸高生産性に関与することが推察されるが、DMSS233 株を宿主とした *DAL7* 二重破壊株のリンゴ酸生産量は、野生型のリンゴ酸生産量と同等であった (Fig. 6-4A)。よって本項では、*DAL7* 遺伝子とリンゴ酸高生産性との因果関係を明らかにするために、*DAL7* 過剰発現株を構築した。

構築した過剰発現株 H3-1-OE 株および DMSS233-OE 株の *DAL7* 遺伝子発現量は対象株の H3-1-vector および DMSS233-vector 株と比較して、有意に増加しており、*DAL7* 遺伝子過剰発現株は正しく構築できていた (Fig. 6-6A、B)。次に、過剰発現株のリンゴ酸生産量を分析した結果、H3-1-OE 株のリンゴ酸生産量は対象株 H3-1-vector 株と同等であり (Fig. 6-6C)、DMSS233-OE 株のリンゴ酸生産量は対象株 DMSS233-vector 株と比較して、減少した (Fig. 6-6D)。

DAL7 はリンゴ酸シンターゼをコードする遺伝子であり、アセチル-CoA とグリオキシル酸を基質として、リンゴ酸と補酵素 A を生成する¹⁴⁹⁾。そのため、発現量の増加に伴い、リンゴ酸の生産量が向上すると推察したが、本実験の結果ではリンゴ酸の生産量の増加は見られなかった。*DAL7* は *DAL* クラスターの構成遺伝子であり、プロリンのような資化しにくい窒素源存在下において発現が誘導される¹⁴⁹⁾。*DAL7* は *DAL* クラスターの最終ステップの反応を触媒するため、*DAL7* のみの高発現ではリンゴ酸生産量の増加に繋がらなかったことが推察される。前述したように、DMSS233 株を宿主とする *DAL7* 遺伝子二重破壊株のリンゴ酸生産量が減少しなかったことも考慮すると (Fig. 6-4A)、DMSS233 株の *DAL7* 遺伝子の発現量の増加とリンゴ酸生産高生産性には因果関係がないことが示唆された。

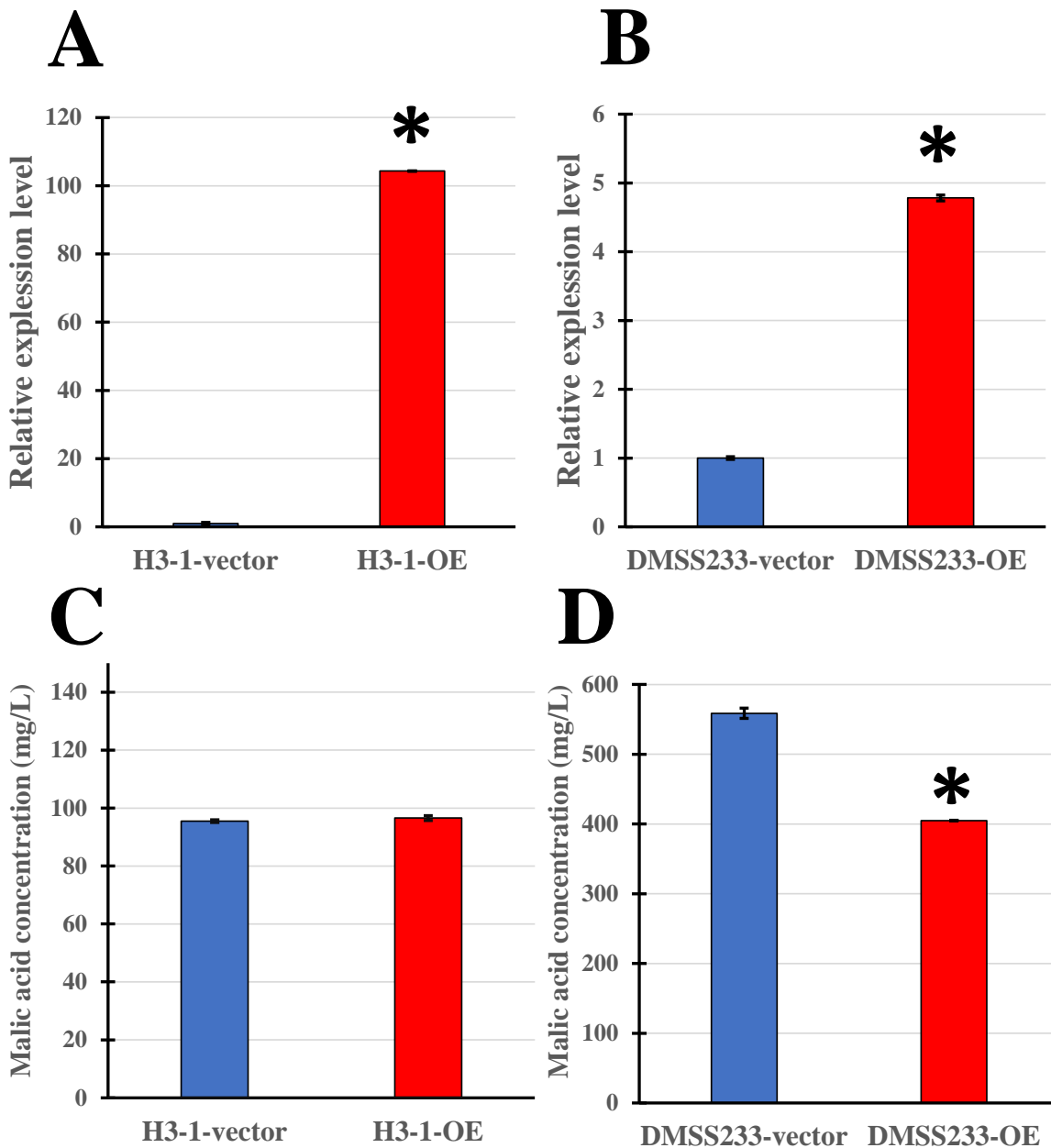


Fig. 6-6. *DAL7* gene expression levels and malic acid production of *DAL7* overexpression strains.

DAL7 gene expression levels and malic acid production were evaluated by YM10 test in triplicate. *DAL7* gene expression levels of each overexpression strain (A)(B). Malic acid production of each overexpression strain (C)(D). An asterisk indicates a significant difference (p -value < 0.05). Statistical analysis was performed by Student's t -test (A)(B)(C), Welch's t -test (D).

第 6 項 H3-1 株および DMSS233 株における GFP 融合型 Mdh3p の局在解析

MDH3 二重破壊株のリンゴ酸生産量 (Fig. 6-4A) および *DAL7* 過剰発現株のリンゴ酸生産量の結果 (Fig. 6-6)、DMSS233 株のリンゴ酸高生産性には Mdh3p が関係していることが示唆された。本節第 4 項で述べた破壊株のリンゴ酸生産量の分析において、リンゴ酸高生産性と関連のあるミスセンス変異遺伝子の特定には至らなかった。そこで、DMSS233 株における Mdh3p とリンゴ酸高生産性との関連を考察するために Mdh3p の局在解析を行った。

通常、グリオキシル酸で機能するリンゴ酸デヒドロゲナーゼ Mdh3p はペルオキシソームに局在する。ペルオキシソームで機能するタンパク質はペルオキシソーム輸送配列 (PTS; peroxisome targeting signal) を有しており、この PTS にはタンパク質 C 末端側に存在する PTS1 と N 末端側に存在する PTS2 の 2 種類がある¹⁵⁴⁾。Mdh3p は C 末端側に 3 つのアミノ酸配列 SKL 配列からなる PTS1 に分類される輸送シグナルを有しており¹⁵⁵⁾、ペルオキシソーム (ペルオキシソーム形成や維持に関わるタンパク質因子の総称) の一つである Pex5p によって認識され、ペルオキシソーム近くに輸送される¹⁵⁶⁾ (Fig. 6-7A)。根来らは、PTS を有するタンパク質の輸送を担うペルオキシソームの一つである *PEX22* 遺伝子にナンセンス変異が導入されることで、輸送機能に障害が生じ、Mdh3p が細胞質に蓄積することでリンゴ酸高生産性を獲得することを明らかにした³³⁾ (Fig. 6-7B)。

また、根来らは、Mdh2p が関与するリンゴ酸高生産性獲得機構についても報告している^{31), 32)}。GID (Glucose induced degradation deficient) 複合体はグルコースの存在に応答して糖新生酵素を分解に導く E3 ユビキチンリガーゼであり¹⁵⁷⁾、この GID 複合体の構成因子である Vid24p へのミスセンス変異により、糖新生酵素の一つである細胞質リンゴ酸デヒドロゲナーゼ Mdh2p を分解できず、細胞質に蓄積することでリンゴ酸高生産性をもたらすことを明らかにしている^{31), 32)}。そこで、これらの知見から DMSS233 株においても、Mdh3p

が細胞質に蓄積するような現象が生じ、オキサロ酢酸からリンゴ酸への還元的な反応が亢進されてリンゴ酸高生産になったと仮説を立てた。

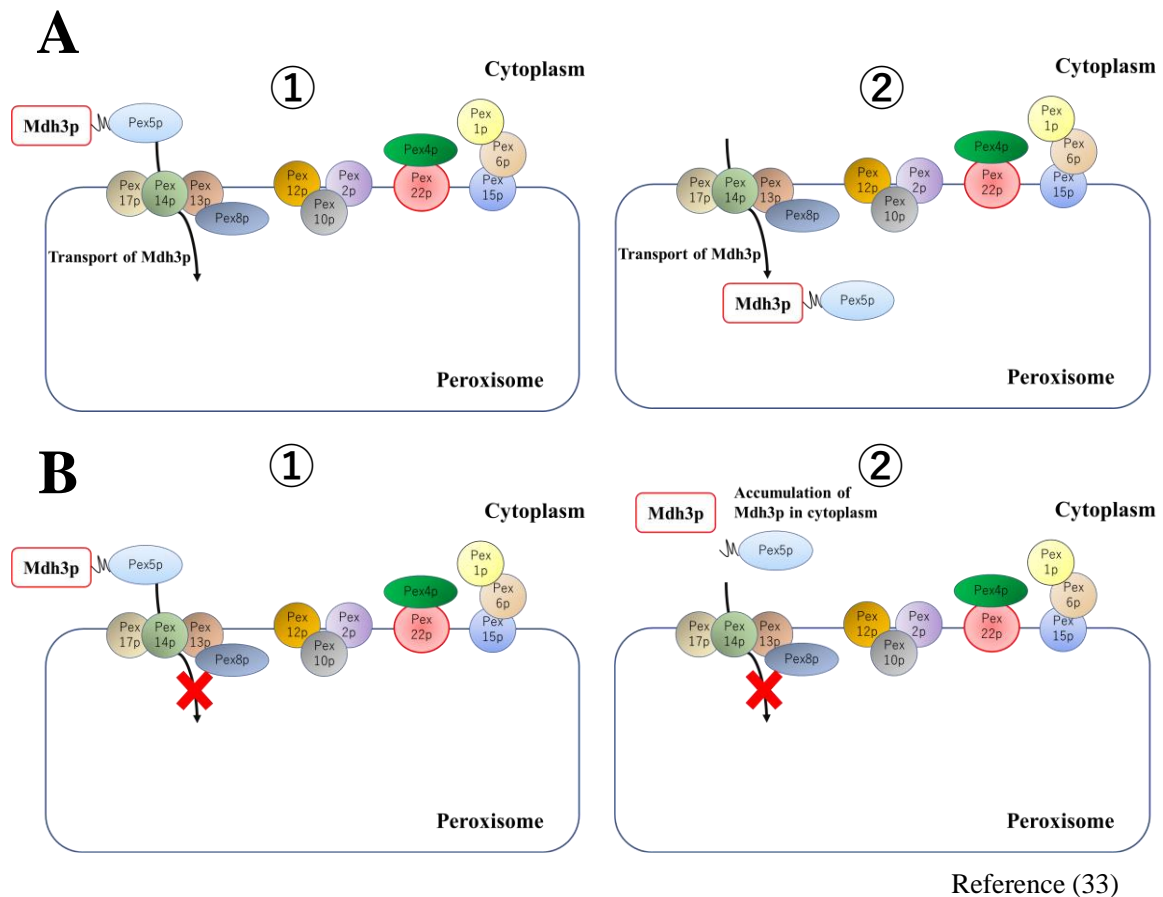


Fig. 6-7. Transporting Mdh3p into peroxisome and an example of a mechanism for obtaining malic acid high productivity.

Mdh3p is transported to the peroxisome by Pex5p, which recognizes PTS1 (A①). Mdh3p is transported into the peroxisome by Pex13p, Pex14p, and Pex17p (A②). A mutation introduced into the Pex gene impairs the transport of Mdh3p by peroxin (B①). As a result, Mdh3p accumulates in the cytoplasm and a reductive reaction from oxaloacetate to malate occurs in the cytoplasm (B②).

GFP を Mdh3p の N 末端側に融合した GFP-Mdh3p を発現する H3-1 GFP-MDH3 株と DMSS233 GFP-MDH3 株を構築した (Fig. 6-1)。これらの GFP-MDH3 発現株は *MDH3* のプロモーター支配下にあり、GFP-MDH3 カセット挿入株 DMSS233 GFP-MDH3 株においてもリンゴ酸高生産能は保持されている (Fig. 6-8Aa)。培養 12 時間後では、H3-1 GFP-MDH3 株 DMSS233 GFP-MDH3 株の両株において、GFP による蛍光が細胞内に点在していることが観察された (Fig. 6-8Ba、Fig. 6-8Ca)。このことから、ペルオキシソーム内部への Mdh3p の輸送は、両株とも正常に機能していることが明らかとなった。培養 24 時間後においても同様な結果が得られた (Fig. 6-8Bb、Fig. 6-8Cb)。しかしながら、培養 48 時間後以降の結果では、両株間で Mdh3p の局在に違いが見られた。H3-1 GFP-MDH3 株では、ペルオキシソームでの蛍光だけでなく、液胞での蛍光が観察された一方、DMSS233 GFP-MDH3 株では、細胞全体で蛍光が観察された (Fig. 6-8Bc、Fig. 6-8Cc)。この結果は、培養 72 時間後でも同様に見られた (Fig. 6-7Bd、Fig. 6-7Cd)。ホログラフィック顕微鏡を用いて 3 次元での GFP 融合型 Mdh3p の局在観察をした結果においても、H3-1 GFP-MDH3 株ではペルオキシソームでの GFP の蛍光と液胞での蛍光が観察された一方、DMSS233 GFP-MDH3 株では細胞全体で GFP の傾向が観察された (Fig. 6-9)。これらの結果から、H3-1 GFP-MDH3 株と DMSS233 GFP-MDH3 株の両株において、Mdh3p のペルオキシソーム内部への輸送が正常に行われた後、H3-1 GFP-MDH3 株では Mdh3p がペルオキシソームから細胞質に排出後に分解される一方、DMSS233 GFP-MDH3 株ではペルオキシソームから細胞質に Mdh3p が正常に排出された後、細胞質に蓄積していることが示唆された。実際、培養 12 時間後のリンゴ酸生産量は両株で差は見られないが、培養 24 時間後から DMSS233 GFP-MDH3 株のリンゴ酸生産量は増加しており、Mdh3p が細胞質で観察された培養 48 時間後、72 時間後のリンゴ酸生産量は、H3-1 GFP-MDH3 株と比較して顕著に多いことが明らかとなった (Fig. 6-8A)。

これらの結果から、DMSS233株のリンゴ酸高生産性獲得機構について推察した。DMSS 233株のMdh3pはPTS1カーゴ因子であるPex5pに認識され、正常にペルオキシソーム内部へ輸送される。その後Mdh3pを分解するために細胞質へと排出された後、分解機構に機能障害が生じたことからMdh3pが細胞質に蓄積し、細胞質でオキサロ酢酸からリンゴ酸への還元的な反応が促進されることでリンゴ酸の生産量が増加したと考えた (Fig. 6-10)。このメカニズムは根来らの知見とは異なる新たなリンゴ酸高生産性獲得機構についての提唱である。

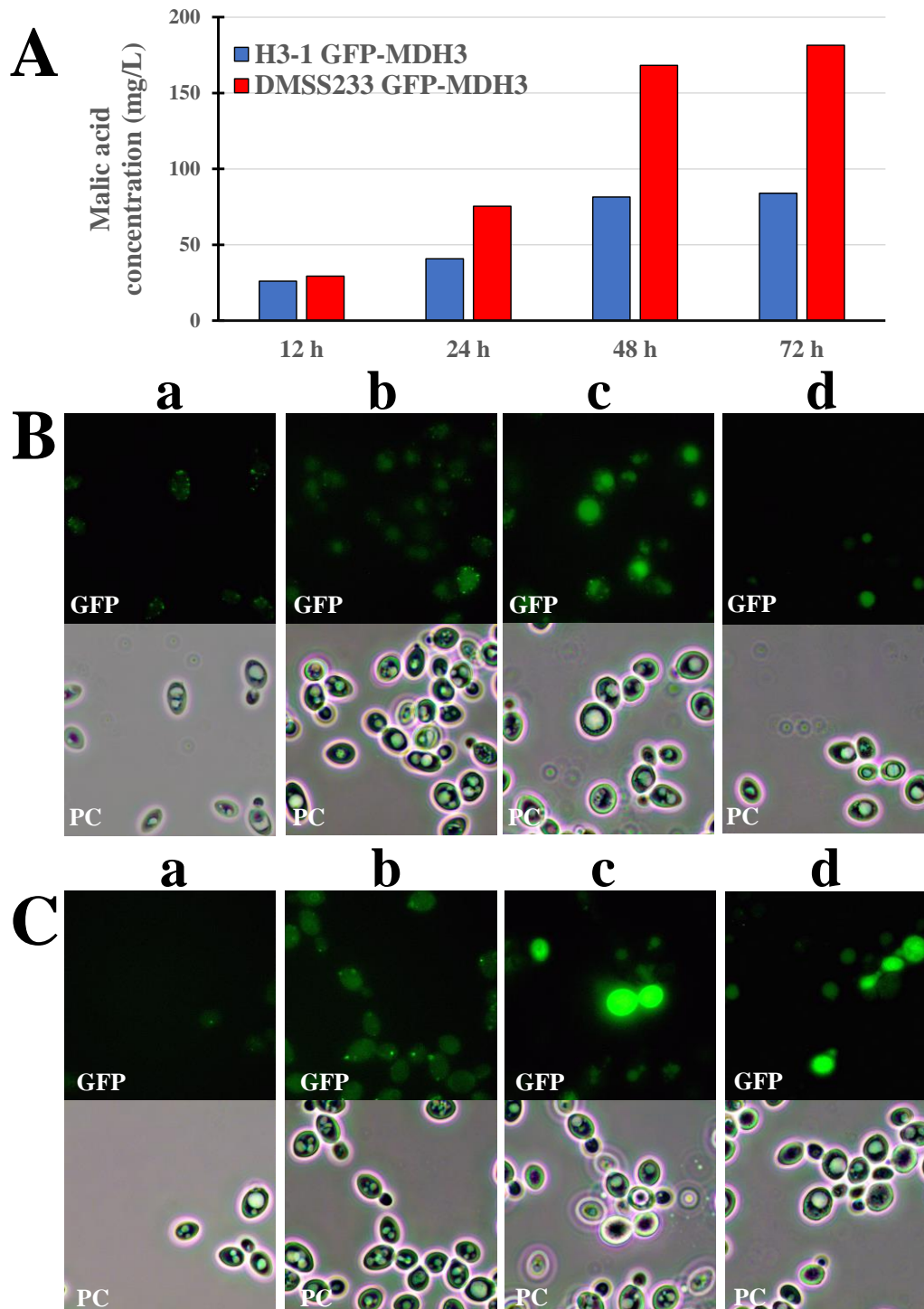


Fig. 6-8. Localization analysis of GFP-fused Mdh3p in strains H3-1 and DMSS233. Malic acid production of H3-1 GFP-MDH3 and DMSS233 GFP-MDH3 was evaluated by YM10 (A). Localization of Mdh3p in H3-1 GFP-MDH3. PC mean phase contrast microscopy. 12 h (a), 24 h (b), 48 h (c), 72 h (d) (B). Localization of Mdh3p in DMSS233 GFP-MDH3. PC mean phase contrast microscopy. 12 h (a), 24 h (b), 48 h (c), 72 h (d) (C).

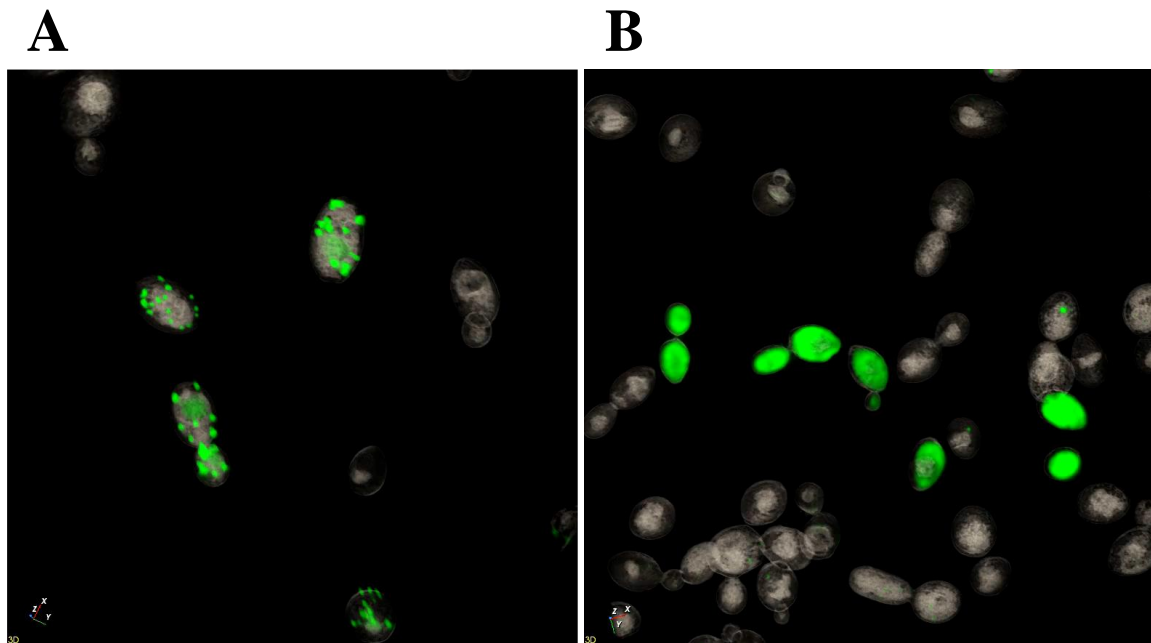


Fig. 6-9. Localization analysis of GFP-fused Mdh3p in strains H3-1 and DMSS233 using holographic microscope.

Localization of GFP-fused Mdh3p using holographic microscopy at 72 hours of incubation. Localization of Mdh3p in H3-1 GFP-MDH3 (A). Localization of Mdh3p in DMSS233 GFP-MDH3 (B).

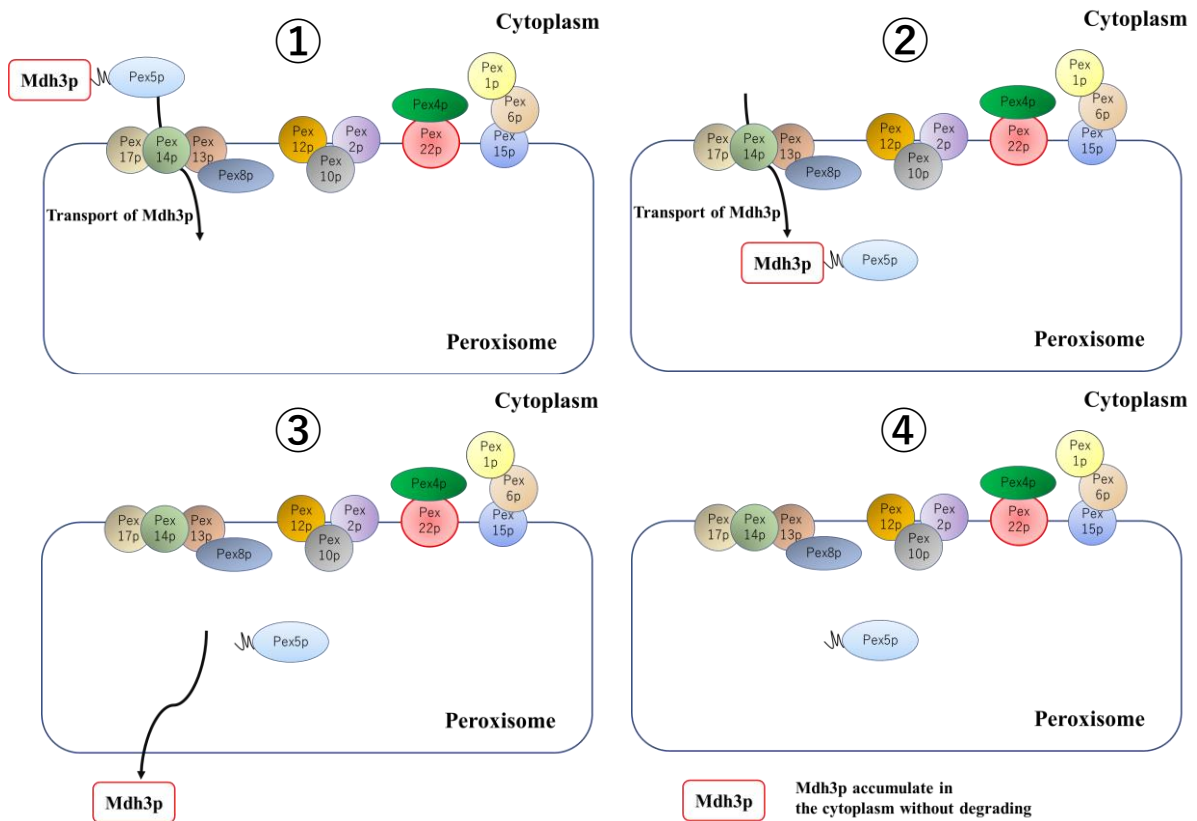


Fig. 6-10. Proposed model for the mechanism for acquiring of malic acid high productivity in strain DMSS233.

Mdh3p is normally transported to the peroxisome by Pex5p, which recognizes PTS1 (①). Mdh3p is normally transported into the peroxisome by Pex13p, Pex14p, and Pex17p (②). Mdh3p is then transported out of the peroxisome to be degraded. (③). The degradation mechanism of Mdh3p is impaired and Mdh3p accumulates in the cytoplasm (④). As a result, malic acid production of strain DMSS233 is increased.

最後に、DMSS233株のリンゴ酸高生産能を獲得したメカニズムについて、Mdh3pの分解機構障害が原因となるひとつの仮説を推察する。一般に、代謝経路においては代謝酵素遺伝子の転写や翻訳など酵素の合成段階における制御がよく知られており、上流あるいは下流の代謝産物によるフィードバック制御やフィードフォワード制御についても古くから研究されている¹⁵⁵⁾。さらに、代謝経路は酵素の分解によっても制御されることが明らかとされつつあり、中でもユビキチン-プロテアソーム系はタンパク質の代表的な分解系であり、様々な細胞機能の制御に関わっている¹⁵⁸⁾。たとえば、解糖系と糖新生のスイッチング、グリオキシル酸回路の活性、ステロール合成経路の活性などは、鍵となる代謝酵素がプロテアソームによって分解されることで調節される¹⁵⁹⁾。

ユビキチンは、ユビキチン活性化酵素 (E1)、ユビキチン結合酵素 (E2)、ユビキチンリガーゼ (E3) と呼ばれる3種類の酵素の連続的な反応により、基質となるタンパク質に付加される¹⁶⁰⁾。とくに、Lys48を介して形成されるポリユビキチン鎖はプロテアソームにより分解されるシグナルになることが知られている¹⁶¹⁾。これら3種類の酵素の中で、基質を認識する役割を担うのがユビキチンリガーゼである。ユビキチンリガーゼは他の2種類の酵素に比べ種類が多く、出芽酵母では約100種類が知られている¹⁶¹⁾。さらに、ユビキチンリガーゼには単量体で機能するものと複合体を形成して機能するものがある。複合体型のユビキチンリガーゼとしてよく知られているのがSCF複合体である。SCF複合体は、Skp1、Cdc53、Rbx1、Fボックスタンパク質から構成される¹⁶²⁾。これらの中で、Fボックスタンパク質には複数が存在し、出芽酵母では約20種類あるといわれている。それぞれのユビキチンリガーゼおよびFボックスタンパク質が特異的な基質を認識することによって、代謝酵素を調節しているといわれている。

**Table 6-8. Mutated genes related to ubiquitin ligase and F-box proteins
Within the strain DMSS233.**

	Gene name			
Missense mutation	<i>ASI3</i>	<i>BRE1</i>	<i>BUL2</i>	<i>DSC3</i>
	<i>RAD16</i>	<i>RKR1</i>		
Point mutation in upstream region	<i>DBP9</i>	<i>HRT3</i>	<i>SSM4</i>	<i>ERG3</i>
	<i>GRR1</i>	<i>SGT1</i>	<i>RAD28</i>	<i>UBR1</i>
	<i>MFB1</i>	<i>MMS1</i>	<i>APC2</i>	<i>DER1</i>
	<i>RCY1</i>	<i>MMS22</i>	<i>CDC27</i>	<i>SLX8</i>
	<i>PRP19</i>	<i>CUL3</i>	<i>DMA2</i>	<i>TCB3</i>
	<i>RRI2</i>	<i>UBX3</i>	<i>NRM1</i>	<i>YGP1</i>
	<i>PEX2</i>	<i>HRD3</i>	<i>FKH2</i>	
	<i>PEX12</i>	<i>SKP1</i>	<i>TCB2</i>	

先行研究において、グリオキシル酸回路の酵素であるクエン酸合成酵素 Cit2p は F ボックスタンパク質 Ucc1 を含む、ユビキチンリガーゼ複合体 SCF^{Ucc1} により制御され分解される基質であることが明らかとされている¹⁶³⁾。

Cit2p と同様にグリオキシル酸回路で機能する Mdh3p についても未同定のユビキチンリガーゼおよび F ボックスタンパク質が存在することが推察される。DMSS233 株に導入された変異点のうち、ユビキチンリガーゼおよび F ボックスタンパク質に関係する遺伝子について Table 6-8 にまとめた。ミスセンス変異遺伝子について、*RAD16* 遺伝子以外の 5 つの遺伝子においては破壊株の構築およびリンゴ酸生産量を分析したが、リンゴ酸の生産量に変化は見られなかった (Table 6-6)。本研究では、遺伝子 CDS 領域間の変異について注目してきたが、遺伝子上流領域の点変異導入により発現量の変動が生じたことも推察されるため、Table 6-8 に示した遺伝子にリンゴ酸高生産性の獲得に関係している可能性がある。以上の結果より、ユビキチンリガーゼおよび F ボックスタンパク質をコードする遺伝子の ORF 内に導入された変異が原因で Mdh3p の分解機構障害が生じ、DMSS233 株はリンゴ酸高生産性を獲得したと推察した。

第 7 章 総括

本研究では、製造工程の効率化や清酒に官能的多様性をもたらすために、清酒酵母を育種改良し、悠々知酔製造への利用と学術的新知見の提供を大きな目的とした。

第2章では、泡あり酵母である清酒酵母 Y52 株を自然変異により育種することで、Y52 株の泡なし変異株 Y5201 株を取得することに成功した。さらに本研究成果で取得した Y5201 株は、21017 年度悠々知酔の製造に利用することが実現し、高泡形成が生じることなく、泡なし酵母の特徴が実地スケールの清酒醪においても確認ができた。また、健全に清酒もろみの発酵が進んだことにより、酒質の安定性および製造ハンドリングも簡便となり、2017 年度以降の 4 年間の悠々知酔製造において安定した酒質をもたらしている。

第3章では清酒に官能的多様性をもたらすために Y5201 株を育種改良し、清酒の良好な香氣成分であるカプロン酸エチルおよび酢酸イソアミル高生産変異株の取得を試みた。また、変異誘発原には清酒酵母での育種事例が乏しいシンクロトロン光を用いることで、シンクロトロン光によって誘発される変異パターンを比較ゲノム解析により同定した。赤外線から X 線まで広い波長範囲を取り出すことを可能とするシンクロトロン光の特徴により、多様性のある変異パターンを誘発可能であることが本研究によって示唆された。これらの結果は、シンクロトロン光を変異原として利用する価値が高いことを意味している。また、シンクロトロン光により誘発される変異パターンをゲノムレベルの研究で報告した事例はなく、本研究によって初めて報告した。

第4章では、Y52 株および Y5201 株とは異なるルーツを持ち、なおかつ清酒のブランディング強化を目的とし、佐賀県の代表的自然環境である有明海から醸造適性のある *Saccharomyces cerevisiae* 株の分離に成功した。自然環境から効率的に醸造適性を有する出芽酵母の分離方法論に加え、多変量解析による醸造特性評価法の知見を提供したことは本研究の成果といえる。

第5章では、有明海から分離した H3-1 株を育種改良し、リンゴ酸高生産変異株の取得を試みた。EMS により変異誘発した 6000 の変異株からリンゴ酸高生産変異株を 5 株取得

することに成功した。このうち最も高いリンゴ酸生産能を有した変異株 DMSS233 株は親株 H3-1 株の約 6.2 倍のリンゴ酸を生産した。清酒醸造に使用されている協会清酒酵母 K70 1 株や悠々知酔酵母 Y52 株と比較しても、変異株は高いリンゴ酸生産能を有しており、リンゴ酸特有の爽やかな酸味をもたらす清酒酵母の育種改良に成功した。また、佐賀県内の酒造メーカーに頒布されている清酒酵母を含めた醸造特性評価を PCA によって行った。PCA の結果から、本研究で取得した 5 株のリンゴ酸高生産株は他のどの清酒酵母とも異なる特徴を有していることが示唆されたため、清酒に官能的多様性をもたらすことが期待できる。2019 年度の悠々知酔製造には DMSS167 株を、2020 年度の悠々知酔製造には DMSS 233 株の利用が実現した。特に、最もリンゴ酸生産能が高い DMSS233 株で醸成した悠々知酔は官能的にも酸味に特徴のある味わいであった。

第 6 章では、リンゴ酸高生産変異株 DMSS233 株について、比較ゲノム解析と分子生物学的手法を駆使して、変異導入遺伝子の同定とリンゴ酸高生産性の付与に関与する遺伝子の特定を試みた。親株 H3-1 株と DMSS233 株の比較ゲノム解析結果、13 のナンセンス変異導入遺伝子、2 つのフレームシフト変異導入遺伝子、325 のミスセンス変異導入遺伝子を同定した。また、リンゴ酸高生産株 DMSS233 株を宿主として、5 つのリンゴ酸生合成遺伝子 *MDH1*、*MDH2*、*MDH3*、*MLS1*、*DAL7* を二重破壊した株のリンゴ酸生産量を測定した結果、*MDH3* 二重破壊破壊株のリンゴ酸生産量が約半分に低下した。また、H3-1 株と DMSS233 株について、これらの 5 つの遺伝子の発現量解析を行った結果、リンゴ酸シンターゼをコードする *DAL7* の発現量が 2 倍以上に増加していた。よって、*MDH3* と *DAL7* について詳細な実験を行った。

根来らは、Mdh3p を含むペルオキシソーム輸送タンパク質のペルオキシソームへの輸送に障害が生じ、細胞質に蓄積した Mdh3p によりオキサロ酢酸からリンゴ酸への還元的反応が促進されることで、リンゴ酸高生産性を獲得することを報告した³³⁾。しかしながら、本研究では、根来らとは異なる新しいリンゴ酸高生産性獲得機構に関する知見が得られた。リ

リンゴ酸高生産株 DMSS233 株の GFP-Mdh3p は正常にペルオキシソームに輸送されているが、その後、細胞質に Mdh3p が蓄積していることが明らかとなった (Fig. 6-8)。この細胞質に蓄積したリンゴ酸デヒドロゲナーゼにより、オキサロ酢酸からリンゴ酸への還元的反応が促進されたのが原因と示唆された。この Mdh3p の細胞質での蓄積については、明らかにできていないが、その理由の一つとしてユビキチン・プロテアソーム系が関与する Mdh3p の分解機構に障害が生じていると推察した。

本研究では、リンゴ酸高生産性の獲得を付与する原因変異遺伝子の特定までは至らなかったが、DMSS233 株のリンゴ酸高生産性には Mdh3p が関係しており、根来らの報告したメカニズムとは異なることを明らかとした。今後、原因遺伝子の特定が達成されればリンゴ酸を含む有機酸の生成に関する新知見の提供と育種開発への貢献が期待できる。

謝辞

本研究の遂行にあたり、ご指導、ご鞭撻をご教授賜りました佐賀大学農学部 小林元太 教授に深甚なる誠意を表します。

また、本論文の審査並びにご指導、ご助言を賜りました佐賀大学農学部 後藤正利 教授、鹿児島大学農学部 玉置尚徳 教授、佐賀大学農学部 木村圭 准教授、鹿児島大学農学部 二神泰基 准教授に厚く感謝いたします。

本研究の遂行にあたり、ご指導、ご助言を賜りました佐賀県工業技術センター 澤田和敬 博士、佐賀大学総合分析実験センター 永野幸生 准教授、佐賀大学農学部 川村嘉応 特任教授、折田亮 助教に厚く感謝いたします。

有明海から清酒酵母の分離を行うにあたり、分離源の有明海干潟底泥サンプルを提供いただいた佐賀県有明水産振興センターの皆様にも厚く御礼申し上げます。

本研究で育種開発した清酒酵母を使用した悠々知酔製造にご協力いただきました矢野酒造株式会社の皆様、合資会社基山商店の皆様にも厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、研究生生活を支えていただいた応用微生物学研究室並びに、藻類・ベントス学研究室の卒業生、在校生諸氏にも厚く感謝いたします。

最後に、長い学生生活を支えていただいた家族、親族、友人に心からの謝意を表します。

参考文献

1. 国税庁課税部酒税課. 「酒のしおり」国税庁 <https://www.nta.go.jp/taxes/sake/shiori-gaikyo/shiori/2015/pdf/100.pdf>, 平成 27 年 5 月 26 日
2. Kitamoto, K., Gomi, K., Goto, K., and Hara, S.: Genetic Transfer Applied to Traditional Sake Brewing, *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, **9**, 89-126 (1991).
3. Kozai, Y and Yabe, K.: Ueber die bei der Sakebereitung beteiligten Pilze, *Central. F. Bakt. Abt.*, **II**, **1**, 619-620 (1895).
4. Yabe, K.: On the Origin of Sake Yeast (*Saccharomyces sake*). *Coll. Of Agric. Tokyo, Bull.* **3**, 211-224 (1897).
5. Stelling-DEKKER, N.M.: “Die sporogenen Hefen,” *Verhandel, Koninkl. Akad. wetenschap, Afd. Natuurkum, sect, II*, **28**, 1-547 (1931).
6. 竹田 正久.: “清酒酵母(*Saccharomyces sake*)は日本酒の文化” 清酒酵母が分離できるのは日本だけである, *Jour. Agri. Sci. Tokyo Univ. of Agric.*, **48(4)**, 143-163 (2004).
7. 数岡 孝幸.: 清酒製造用酵母の分離および実用化, *日本醸造協会誌*, **110**, 298-305 (2015).
8. 里見 弘司, 佐藤 和幸, 佐藤 幸富, 筒井 謙之, 土井 清太郎, 大内 弘造.: 赤色色素生産, キラー性および泡なし性を兼備する清酒酵母の育種, *日本醸造協会誌*, **82**, 285-288 (1987).
9. 福田 潔, 北本 勝ひこ, 五味 勝也, 熊谷 知栄子.: 協会 7 号清酒酵母からウレア非生産性酵母の取得とそれを用いた清酒醸造試験, *日本醸造協会誌*, **88**, 633-638 (1993).
10. 吉田 清.: きょうかい酵母清酒用 1801 号, *日本醸造協会誌*, **101**, 910-922 (2006).
11. Hirata, D., and Hiroi, T.: Genes That Cause Overproduction of Isoamyl Alcohol by Increased Gene-Dosage Effect in *Saccharomyces cerevisiae*, *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 919-924 (1991).

12. 岩瀬 利徳, 高田 明, 渡邊 妙子, 福田 秀雄, 佐々木 清祐, 吉武 正文.: 清酒酵母とワイン酵母とのプロトプラスト融合による清酒酵母の育種, 日本醸造協会誌, **90**, 137-142 (1995).
13. 中田 久保, 香坂 暁彦, 石橋 直樹, 前田 政彦, 坂井 劭.: 清酒もろみ中の清酒酵母群について (第2報), 日本醸造協会誌, **73**, 562-566 (1978).
14. 原 昌道.: キラーワイン酵母の育種と利用, 日本農芸化学会誌, **63**, 1888-1892 (1989).
15. Kitamoto, K., Oda, K., Gomi, K., and Takahashi, K.: Genetic engineering of a sake yeast producing no urea by successive disruption of arginase gene, *Applied and environmental microbiology*, **57**, 301-306 (1991).
16. Horie, K., Oba, T., Motomura, S., Isogai, A., Yoshimura, T., Tsuge, K., Koganemaru, K., Kobayashi, G., and Kitagaki H.: Breeding of a low pyruvate-producing sake yeast by isolation of a mutant resistant to ethyl α -transcyanocinnamate, an inhibitor of mitochondrial pyruvate transport, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 843-847 (2010).
17. 穂坂 賢, 角本 琢磨, 大竹 聡, 中田 久保, 坂井 劭.: 麹菌の生産する抗菌物質・Yeastcidin を用いた集積培養液からの清酒酵母の分離, 日本農芸化学会誌, **94**, 998-1005 (1999).
18. 佐藤 和夫.: 日本酒と微生物, モダンメディア, **61**, 7-12 (2015)
19. 下飯 仁.: 清酒酵母の高泡形成に関与する遺伝子 *AWA1*, 日本醸造協会誌, **97**, 474-480 (2002).
20. 古川 壮一, 片倉 啓雄.: 乳酸菌と酵母の共存と共生, 生物工学会誌, **90**, 188-191 (2012).
21. Furukawa, S., Watanabe, T., Toyama, H., Morinaga, Y.: Significance of microbial symbiotic coexistence in traditional fermentation, *J. Biosci. Bioeng.*, **116**, 533-539 (2013).

22. Furukawa, S., Yoshida, K., Ogihara, H., Yamasaki, M., and Morinaga, Y.: Mixed-Species Biofilm Formation by Direct Cell-Cell Contact between Brewing Yeasts and Lactic Acid Bacteria, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 2316-2320 (2010).
23. Furukawa, S., Nojima, N., Yoshida, K., Hirayama, S., Ogihara, H., and Morinaga, Y.: The Importance of Inter-Species Cell-Cell Co-Aggregation between *Lactobacillus plantarum* ML11-11 and *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 in Mixed-Species Biofilm Formation, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**, 1430-1434 (2011).
24. Abe, A., Furukawa, S., Watanabe, S., and Morinaga, Y.: Yeasts and Lactic Acid Bacteria Mixed-Species Biofilm Formation is a Promising Cell Immobilization Technology for Ethanol Fermentation. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **171**, 72-79 (2013).
25. 森永 康, 平山 悟, 古川 壮一.: 伝統発酵にみる微生物の共生と進化, 日本乳酸菌学会誌, **26**, 101-108 (2015).
26. Ichikawa, E., Hosokawa, N., Hata, Y., Abe, Y., Suginami, K., and Imayasu, S.: Breeding of a Sake Yeast with Improved Ethyl Caproate Productivity, *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 2153-2154 (1991).
27. Ashida, S., Ichikawa, E., Suginami, K., and Imayasu, S.: Isolation and Application of Mutants Producing Sufficient Isoamyl Acetate, a Sake Flavor Component, *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 2061-2065 (1987).
28. 相川 元庸, 水津 哲義, 市川 英治, 川戸 章嗣, 安部 康久, 今安 聡.: りんご酸生成能の高い清酒酵母の育種, 醗酵工学会誌, **70**, 473-477 (1992).
29. 吉田 清, 稲橋 正明, 中村 欽一, 野白 喜久雄.: Cycloheximide 耐性株から得られたリンゴ酸高生産性酵母, 日本醸造協会誌, **88**, 645-647 (1993).
30. 水野 昭博, 岩渕 正文, 木曾 邦明, 佐藤 和夫, 高橋 利郎.: 2-デオキシグルコース耐性株からのリンゴ酸高生産清酒酵母の分離, 日本醸造協会誌, **97**, 228-233 (2002).

31. Negoro, H., Kotaka, A., Matsumaru, K., Tsutsumi, H., and Hata, Y.: Enhancement of malate-production and increase in sensitivity to dimethyl succinate by mutation of the *VID24* gene in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biosci. Bioeng.*, **121**, 665-671 (2016).
32. Negoro, H., Kotaka, A., Matsumaru, K., Tsutsumi, H., Sahara, H., and Hata, Y.: Breeding of high malate-producing diploid sake yeast with a homozygous mutation in the *VID24* gene, *J. Inst. Brew.*, **122**, 605-611 (2016).
33. Negoro, H., Sakamoto, M., Kotaka, A., Matsumaru, K., and Hata, Y.: Mutation in the peroxin-coding gene *PEX22* contributing to high malate production in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biosci. Bioeng.*, **125**, 211-217 (2018).
34. Bak, R. O., Gomez-Ospina, N., and Porteus, M. H., Gene Editing on Center Stage, *Trends in Genetics*, **34**, 600-611 (2018).
35. 木下 政人. : 水産生物へのゲノム編集技術活用に向けて, *化学と生物*, **53**, 449-454 (2015).
36. 江面 浩, 野中 聡子. : トマトのゲノム編集技術による育種と社会実装に向けて, *化学と生物*, **56**, 503-507 (2018).
37. Ohnuki, S., Kashima, M., Yamada, T., Ghanegolmohammadi, F., Zhou, Y., Goshima, T., Maruyama, J., Kitamoto, K., Hirata, D., Akao, T., and Ohya, Y.: Genome editing to generate nonfoam-forming sake yeast strains, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **83**, 1583-1593 (2019).
38. Chadani, T., Ohnuki, S., Isogai, A., Goshima, T., Kashima, M., Ghanegolmohammadi, F., Nishi, T., Hirata, D., Watanabe, D., Kitamoto, K., Akao, T., and Ohya, Y.: Genome Editing to Generate Sake Yeast Strains with Eight Mutations That Confer Excellent Brewing Characteristics, *Cells*, **10**, 1299-1316 (2021).

39. Hirayama, S., Shimizu, M., Tsuchiya, N., Furukawa, S., Watanabe, D., Shimoi, H., Takagi, H., Ogihara, H., and Motinaga, Y.: Awa1p on the cell surface of sake yeast inhibits biofilm formation and the co-aggregation between sake yeast and *Lactobacillus plantarum* ML11-11. *J. Biosci. Bioeng.*, **119**, 532-537 (2015).
40. 大内 弘造.: 泡なし酵母の歴史, 日本醸造協会誌, **105**, 184-187 (2010).
41. Shimoi, H., Sakamoto, K., Okuda, M., Atthi, R., Iwashita, K., and Ito, K.: The *AWA1* gene is required for the foam-forming phenotype and cell surface hydrophobicity of sake yeast, *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 2018-2025 (2002).
42. Miyashita, K., Sakamoto, K., Kitagaki, H., Iwashita, K., Ito, K., and Shimoi, H.: Cloning and analysis of the *AWA1* gene of a nonfoaming mutant of a sake yeast.: *J. Biosci. Bioeng.*, **97**, 14-18 (2004).
43. 小山 誠司, 橋本 建哉, 関東 宣道, 伊藤 謙治.: 清酒酵母・宮城マイ酵母の高泡非形成化, 東北農業研究, **57**, 263-264 (2004).
44. 増渕 隆, 和田 智史.: オール群馬清酒に適した新規清酒酵母の実用化, 群馬県立産業技術センター研究報告, 38-41 (2012).
45. 澤田 和敬.: 佐賀県オリジナル醸造微生物の育種及び佐賀県産酒類の品質向上に関する研究, 佐賀県工業技術センター研究報告書, 29-33 (2013).
46. 布川 弥太郎, 大内 弘造.: 清酒泡なし酵母, 化学と生物, **11**, 216-224 (1973).
47. Shimizu, M., Miyashita, K., Kitagaki, H., Ito, K., and Shimoi, H.: Amplified fragment length polymorphism of the *AWA1* gene of sake yeasts for identification of sake yeast strains, *J. Biosci. Bioeng.*, **100**, 678-680 (2005).
48. 難波 康之祐, 小幡 孝之, 萱島 進, 山崎 与四良, 村上 光彦, 下田 高久.: 小仕込試験法の設定, 日本醸造協会誌, **73**, 295-300 (1978).

49. 松丸 克己.: 公益財団法人 日本醸造協会 酒類総合研究所標準分析法注解, 下飯 仁., p 15-19 (2017).
50. 布川 弥太郎, 大内 弘造.: 協会7号泡なし酵母による清酒醸造, 日本醸造協会誌, **66**, 940-945 (1971).
51. 布川 弥太郎, 堀越 直樹, 大内 弘造.: *Saccharomyces* 属酵母細胞の Froth Floatation と実用的分類の関係について, 日本醸造協会誌, **67**, 54-57 (1972).
52. Ouchi, K., and Akiyama, H.: Non-foaming Mutants of Sake Yeasts Selection by Cell Agglutination Method and by Froth Flotation Method, *Agr. Biol. Chem.*, **35**, 1024-1032 (1971).
53. 大内 弘造, 布川 弥太郎.: 清酒酵母泡なし変異株の新選択法, 日本醸造協会誌, **67**, 54-57 (1972).
54. 堤 浩子.: 清酒酵母の香気生成機構, におい・かおり環境学会誌, **46**, 346-349 (2015).
55. Yamasaki, R., Goshima, T., Oga, K., Kanai, M., Ohdoi, R., et al.: Development of sake yeast haploid set with diverse brewing properties using sake yeast strain Hiroshima no. 6 exhibiting sexual reproduction. *J. Biosci. Bioeng.*, **129**, 706-714 (2020).
56. 布宮 雅昭, 須貝 智, 小島 弥之祐, 鈴木 弥兵衛, 佐藤 昭仁, 和田 多聞, 石垣 浩佳, 松田 義弘, 小関 敏彦.: 高香気生産性酵母の分離と仕込方法の検討, 日本醸造協会誌, **90**, 217-221 (1995).
57. Hashimoto, S., Ogura, M., Aritomi, K., Hoshida, H., Nishizawa, Y., and Akada, R.: Isolation of Auxotrophic Mutants of Diploid Industrial Yeast Strains after UV Mutagenesis, *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 312-319 (2005).
58. Arikawa, Y., Yamada, M., Shimosaka, M., Okazaki, M., and Fukazawa, M.: Isolation of sake yeast mutants producing a high level of ethyl caproate and/or isoamyl acetate. *J. Biosci. Bioeng.*, **90**, 675-677 (2000).

59. Pfeifer, G. P.: Formation and Processing of UV Photoproducts: Effects of DNA Sequence and Chromatin Environment, *Photochemistry and Photobiology*, **65**, 270-283 (1997).
60. Pfeifer, G. P., You, Y. H., and Besaratinia, A.: Mutations induced by ultraviolet light, *Mutation Research*, **571**, 19-31 (2005).
61. Ikehata, H. and Ono, T.: The Mechanisms of UV Mutagenesis, *J. Radiat. Res*, **52**, 115-125 (2011).
62. Christine, C. and Jeffrey, H. M.: Genetic Studies of the *lac* Repressor: IV. Mutagenic Specificity in the *lacI* Gene of *Escherichia coli*, *J. Mol. Biol.*, **117**, 577-606 (1977).
63. Charles, A. Q., Mitch, T., Nicola, C., Clifford, W., and Brian, P. D.: Whole-Genome Sequence Accuracy Is Improved by Replication in a Population of Mutagenized Sorghum, *Genes. Genomes. Genetics*, **8**, 1079-1094 (2018).
64. 吉田 桂一郎, 西 美友紀, 石地 耕太郎, 松本 和夫, 広田 雄二.: シンクロトロン光も用いた水稲における突然変異育種法の検討, 日本作物学会九州支部会報, **78**, 8-9 (2012).
65. 阿部 知子, 風間 裕介, 西 美友紀, 永吉 実孝.: 九州ブランドを世界に! -突然変異育種の挑戦-, 育種学研究, **16**, 67-71 (2014).
66. Sakamoto, K., Nishi, M., Ishiji, K., Takatori, Y., and Chiwata, R.: Induction of flower-colour mutation by synchrotron-light irradiation in spray chrysanthemum, *Acta Horticulturae*, **1237**, 73-78 (2019).
67. 松野 純子, 戸田 浩子, 山元 俊輝, 山口 徳之, 新井 和俊.: カーネーションの突然変異育種に有効なシンクロトロン光の吸収線量及び波長, 愛知県農総試研報, **52**, 73-79 (2020).
68. Chunhai, F., Jun, H., and Zhentang, Z.: Synchrotron Light for Materials Science, *Adv. Mater.*, **26**, 7685-7687 (2014).

69. Meuli, R., Hwu, Y., Je, J. H., and Margaritondo, G.: Synchrotron radiation in radiology: radiology techniques based on synchrotron sources, *Eur Radiol*, **14**, 1550-1560 (2004).
70. Margaritondo, G., Hwu, Y., and Je, J. H.: Synchrotron light in medical and materials science radiology, *La Rivista del Nuovo Cimento*, **27**, 1-40 (2004).
71. 三井 俊, 伊藤 彰敏, 杉山 信之, 榊原 康彰, 船井 秀哉, 水野 善文, 木村 伸一, 小栗 宏次, 山本 晃司.: シンクロトロン光の微生物育種の利用, あいち産業科学技術総合センター研究報告, 44-47 (2018).
72. 三井 俊, 山本 晃司, 伊藤 彰敏, 家田 明音, 近藤 徹弥, 杉山 信之, 赤尾 健, 吉村 明浩, 榊原 康彰, 船井 秀哉, 原本 直幸, 志水 元亨, 加藤 雅士.: シンクロトロン光を利用した尿素非生産性の愛知県酵母育種, 日本醸造協会誌, **116**, 703-712 (2021).
73. 澤田 和敬.: 佐賀県オリジナル醸造微生物の育種及び佐賀県産酒類の品質向上に関する研究, 佐賀県工業技術センター研究報告書, 27-31 (2014).
74. 澤田 和敬.: 新“佐賀酵母”の育種とその醸造適性評価, 佐賀県工業技術センター研究報告書, 47-50 (2017).
75. 高下 秀春, 梶原 康博, 大森 敏郎, 下田 雅彦, 和田 久継.: 酢酸イソアミル高生産酵母の取得方法, 特許公開番号 1998-276767 (1998).
76. Bolger, A. M., Lohse, M., and Usadel, B.: Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data, *Bioinformatics*, **30**, 2114-2120 (2014).
77. Li, H., and Durbin, R.: Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform, *Bioinformatics*, **26**, 589-595 (2010).

78. Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R., and 1000 Genome Project Data Processing Subgroup.: The Sequence Alignment/Map format and SAMtools, *Bioinformatics*, **25**, 2078-2079 (2009).
79. Kumaran, M., Subramanian, U., and Devarajan, B.: Performance assessment of variant calling pipelines using human whole exome sequencing and simulated data, *BMC Bioinformatics*, **20**, 342 (2019).
80. Danecek, P., Auton, A., Abecasis, G., Albers, C. A., Banks, E., DePristo, M. A., Handsaker, R. E., Lunter, G., Marth, G. T., Sherry, S. T., and other 3 authors.: The variant call format and VCFtools, *Bioinformatics*, **27**, 2156-2158 (2011).
81. Pablo, C., Adrian, P., Le, L. W., Melissa, C., Tung, N., Luan, W., Susan, J. L., Xiangyi, L., and Douglas, M. R.: A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain *w*¹¹¹⁸; *iso-2*; *iso-3*, *Fly*, **6**, 80-92 (2012).
82. 栗山一秀, 芦田晋三, 斉藤義幸, 秦洋二, 杉並孝二, 今安聡.: 醪におけるカプロン酸エチル生成に対する酵母と麹菌の役割, *醸酵工学会誌*, **64**, 253-259 (1986).
83. Lynen, F., Engeser, H., Foerster, E. C., Fox, J. L., Hess, S., Kresze, G. B., Schmitt, T., Schreckenbach, T., Siess, E., Wieland, F., and Winnewisser, W.: On the Structure of Fatty Acid Synthetase of Yeast, *Eur. J. Biochem.*, **112**, 431-442 (1980).
84. Sumper, M., Oesterhelt, D., Riepertinger, C., and Lynen, F.: Synthesis of various carboxylic acids by the fatty acid synthetase multienzyme complex of yeast and the explanation for their structure, *Eur. J. Biochem.*, **10**, 377-387 (1969).
85. Funabashi, H., Kawaguchi, A., Tomoda, H., Omura, S., Okuda, S., and Iwasaki, S.: Binding Site of Cerulenin in Fatty Acid Synthetase, *J. Biochem.*, **105**, 751-755 (1989).

86. 大土井 律之, 松本 英之, 藤井 一嘉, 谷本 昌太, 末成 和夫.: カプロン酸エチル高生産酵母の開発, 広島県立食品工業技術センター研究報告, **23**, 15-18 (2004).
87. 長 俊広, 工藤 晋平, 村岡 義之, 石垣 浩佳.: 山形県高香気性酵母の開発, 山形県工業技術センター報告, **48**, 98-101 (2017).
88. 甫木 嘉朗, 上東 治彦, 加藤 麗奈, 内山 貴雄, 高橋 朋, 渡邊 宗平.: 酢酸イソアミルとカプロン酸エチルを高生産するセルレニン耐性酵母のスクリーニング, 高知県工業技術センター研究報告, **48**, 1-5 (2017).
89. Asano, T., Inoue, T., Kurose, N., Hiraoka, N., and Kawakita, S.: Improvement of isoamyl acetate productivity in sake yeast by isolating mutants resistant to econazole, *J. Biosci. Bioeng.*, **87**, 697-699 (1999).
90. Inoue, T., Iefuji, H., and Katsumata, H.: Characterization and Isolation of Mutants Producing Increased Amounts of Isoamyl Acetate Derived from Hygromycin B-Resistant Sake Yeast, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **76**, 60-66 (2012).
91. 市川 英治.: 酢酸イソアミル高生産酵母の取得法, 日本醸造協会誌, 84, 166-170 (1989).
92. 堤 浩子, 浪瀬 政宏, 尾嶋 岳彦, 水津 哲義, 川戸 章嗣, 安部 康久.: 酢酸イソアミル高生産株の育種及びその利用, 特許公開番号 2002-191355 (2002).
93. Takahashi, T., Ohara, Y., Sawatari, M., and Sueno, K.: Isolation and characterization of sake yeast mutants with enhanced isoamyl acetate productivity, *J. Biosci. Bioeng.*, **123**, 71-77 (2017).
94. Yoshioka, K., and Hashimoto, N.: Ester Formation by Alcohol Acetyltransferase from Brewers' Yeast, *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 2183-2190 (1981).
95. Ishikawa, T., and Yoshizawa, K.: Effects of Cellular Fatty Acids on the Formation of Flavor Esters by Saké Yeast, *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 45-53 (1979).

96. Takahashi, T., Ohara, Y., and Sueno, K.: Breeding of a sake yeast mutant with enhanced ethyl caproate productivity in sake brewing using rice milled at a high polishing ratio, *J. Biosci. Bioeng.*, **123**, 707-713 (2017).
97. 佐藤 信, 大場 俊輝, 高橋 康次郎, 国分 伸二, 小林 幹男, 小林 宏治.: 清酒の味覚に関する研究 (第7報) , **72**, 801-805 (1977).
98. Yoshida, S., and Yokoyama, A.: Identification and characterization of genes related to the production of organic acids in yeast, *J. Biosci. Bioeng.*, **113**, 556-561 (2012).
99. Kosugi, S., Kiyoshi, K., Oba, T., Kusumoto, K., Kadokura, T., Nakazato, A., and Nakayama, S.: Isolation of a high malic acid and low acetic acid-producing sake yeast *Saccharomyces cerevisiae* strain screened from respiratory inhibitor 2,4-dinitrophenol (DNP)-resistant strains, *J. Biosci. Bioeng.*, **117**, 39-44 (2014).
100. Nakayama, S., Tabata, K., Oba, T., Kusumoto, K., Mitsui, S., Kadokura, T., and Nakazato, A.: Characteristics of the high malic acid production mechanism in *Saccharomyces cerevisiae* sake yeast strain no. 28, *J. Biosci. Bioeng.*, **114**, 281-285 (2012).
101. 加藤 武司.: 突然変異の分子機構, *RADIOISOTOPES*, **34**, 334-343 (1985).
102. Akada, R., Matsuo, K., Aritomi, K., and Nishizawa, Y.: Construction of Recombinant Sake Yeast Containing a Dominant *FAS2* Mutation without Extraneous Sequences by a Two-Step Gene Replacement Protocol, *J. Biosci. Bioeng.*, **87**, 43-48 (1999).
103. Akada, R., Hirosawa, I., Hoshida, H., and Nishizawa, Y.: Detection of a Point Mutation in *FAS2* Gene of Sake Yeast Strains by Allele-Specific PCR Amplification, *J. Biosci. Bioeng.*, **92**, 189-192 (2001).
104. Oba, T., Nomiya, S., Hirakawa, H., Tashiro, K., and Kuhara, S.: Asp578 in LEU4p Is One of the Key Residues for Leucine Feedback Inhibition Release in Sake Yeast, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **69**, 1270-1273 (2005).

105. Max, E. H., Ann, K. U., Toshiaki, I., Dirk, M. W., Cagakan, Ö., Stefan, G., Fulvio, R., Britta, B., Matthias, M., Benedikt, W., and Walter, N.: Aim24 and MICOS modulate respiratory function, tafazzin-related cardiolipin modification and mitochondrial architecture, *eLife*, <http://dx.doi.org/10.7554/eLife.01684.001> (available online 8 April 2014).
106. Lars M. S., Curt, S., Adam M. D., Dejana, M., Zelek S. H., Ted, J., Angela M. C., Guri, G., Holger, P., Peter J. O., and Ronald W. D.: Systematic screen for human disease genes in yeast, *Nature genetics*, **31**, 400-404 (2002).
107. 穂坂 賢, 小室 友香里, 山中 万理, 山浦 敬人, 中田 久保, 坂井 劭.: 各種醸造酵母による清酒の仕込み試験, *日本醸造協会誌*, **93**, 833-840 (1998).
108. Kuda, T., Matsuda, A., Yasynaka, H., and Yano, T.: Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* isolated from flower and Algal Beach Casts in Ishikawa, Japan, using the one-step small *moromi* model. *Jpn. J. Food Microbiol.*, **28**, 114-122 (2011).
109. Sato, M.: Anthropogenic decline of the peculiar fauna of estuarine mudflats in Japan. *Plankton Benthos Res*, **5** (Suppl.), 202-213 (2010).
110. 田中 重光, 田代 幸寛, 光武 奈緒子, 中園 唯, 小林 元太, 加藤 富民雄, 神田 康三.: 有明海底泥中の細菌群集構造解析, *生物工学会誌*, **89**, 161-169 (2011).
111. Kobayashi, G., Nakagawa, Y., Tashiro, Y., Kanda, K., and Kato, F.: A Novel Type II Restriction Endonuclease from *Leuconostoc mesenteroides* in the Ariake Sea. *Jpn. J. Lactic Acid Bact.*, **19**, 96-99 (2008).
112. 小林 元太, 岡 宏圭, 田代 幸寛, 加藤 富民雄, 神田 康三, 林 信行.: 有明海由来のキシロース資化性乳酸菌の分離, *生物工学会誌*, **86**, 217-220 (2008).
113. Hamedani, K., HR., Kanda, K., and Kato, F.: Denitrification Activity of the Bacterium *Pseudomonas* sp. ASM-2-3 Isolated from the Ariake Sea Tideland. *J. Biosci. Bioeng.*, **97**, 39-44 (2004).

114. 数岡 孝幸, 中田 久保.: 花から分離した TP1 株の同定とその清酒醸造特性, 日本醸造協会誌, **108**, 52-58 (2013).
115. 木下 友香里, 門倉 利守, 数岡 孝幸, 穂坂 賢, 中田 久保.: 花から分離した酵母の性質と清酒醸造における特長, 東京農大農学集報, **53**, 100-106 (2008).
116. 殿内 暁夫, 森山 裕理子, 青山 嘉宏, 土岐 春歌.: 白神山地から分離した酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の利用, 日本醸造協会誌, **111**, 437-444 (2016).
117. Fukumaki, T., Inoue, A., Moriya, K., and Horikoshi, K.: isolation of a marine yeast that degrades hydrocarbon in the presence of organic solvent. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **58**, 1784-1788 (1994).
118. Urano, N., Hirai, H., Ishida, M., and Kimura, S.: Characterization of ethanol-producing marine yeasts isolated from coastal water. *Fisheries science.*, **64**, 633-637 (1998).
119. 小玉 健太郎.: 海洋酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の分離と利用, 日本醸造協会誌, **94**, 879-883 (1999).
120. Mirhendi, H., Diba, K., Rezaei, A., Jalalizand, N., Hosseinpour, L., et al.: Colony-PCR is a Rapid and Sensitive Method for DNA Amplification in Yeasts. *Iranian J Publ Health.*, **36**, 40-44 (2007).
121. Maillard, J., Regard, C., and Holliger, C.: Isolation and characterization of Tn-Dha1, a transposon containing the tetrachloroethene reductive dehalogenase of *Desulfitobacterium hafniense* strain TCE1. *Environmental Microbiology.*, **7**, 107-117 (2005).
122. Cheng, T., Xu, C., Lei, L., Li, C., Zhang, Y., et al.: Barcoding the kingdom Plantae: new PCR primers for ITS regions of plants with improved universality and specificity. *Molecular Ecology Resources.*, **16**, 138-149 (2016).
123. 竹田 正久, 渡辺 光一郎, 奥山 雅男, 中里 厚実, 塚原 寅次.: sensitive 酵母の重層法による killer 酵母の検出法, 日本醸造協会誌, **72**, 822-823 (1977).

124. Ali, M. N., and Khan, M. M.: Screening, identification and characterization of alcohol tolerant potential bioethanol producing yeasts. *Current Research in Microbiology and Biotechnology.*, **2**, 316-324 (2014).
125. Gardes, M., White, T. J., Fortin, J. A., Bruns, T. D., and Taylor, J. W.: Identification of indigenous and introduced symbiotic fungi in ectomycorrhizae by amplification of nuclear and mitochondrial ribosomal DNA. *Can. J. Bot.*, **69**, 180–190 (1991).
126. Henry, T., Iwen, P. C., and Hinrichs, S. H.: Identification of *Aspergillus* species using internal transcribed spacer regions 1 and 2. *J. Clin. Microbiol.*, **38**, 1510–1515 (2000).
127. Kawahata, M., Fujii, T., and Iefuji, H.: Intraspecies diversity of the industrial yeast strains *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces pastorianus* based on analysis of the sequences of the internal transcribed spacer (ITS) regions and the D1/D2 region of 26S rDNA. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 1616-1620 (2007).
128. Nakazato, A., Kadokura, T., Amano, M., Harayama, T., Murakami, Y., et al.: Comparison of the structural characteristics of chromosome VI in *Saccharomyces sensu stricto*: The divergence, species-dependent features and uniqueness of saké yeasts. *Yeast.*, **14**, 723-731 (1998).
129. 門倉 利守, 天野 誠, 原山 格, 大熊 盛也, 中里 厚美, 竹田 正久, 工藤 俊章, 金子 太吉.: 清酒酵母における VI 番染色体左腕の末端, 生物工学会誌, **77**, 263-269 (1999).
130. Kellis, M., Patterson, N., Endrizzi, M., Birren, B., and Lander, ES.: Sequencing and comparison of yeast species to identify genes and regulatory elements. *Nature.*, **423**, 241-254 (2003).
131. 下飯 仁, 藤田 信之.: 清酒酵母ゲノム解析の現状と今後の応用, 化学と生物, **45**, 539-543 (2007).

132. 高岡 祥夫.: キラー酵母につて, 日本醸造協会誌, **71**, 156-160 (1976).
133. 坪井 宏和, 脇坂 靖, 広常 正人, 赤尾 健, 山田 修, 秋田 修.: 2-デオキシグルコース耐性変異株から分離したグルコース脱抑制株のピルビン酸透過系遺伝子(JEN1)の解析と清酒醸造への応用, 日本農芸化学会誌, **78**, 994-995 (2004).
134. 林田 正典, 上田 隆蔵, 寺本 四郎.: 清酒醸造における有機酸の研究, 日本醗酵工学会, **46**, 85-91 (1968).
135. Kitagaki, H., Kato, T., Isogai, A., Mikami, S., and Shimoi, H.: Inhibition of mitochondrial fragmentation during sake brewing causes high malate production in sake yeast. *J. Biosci. Bioeng.*, **105**, 675-678 (2008).
136. Takagi, H., Hashida, K., Watanabe, D., Nasuno, R., Ohashi, M., Iha, T., Nezu, M., and Tsukahara, M.: Isolation and characterization of awamori yeast mutants with l-leucine accumulation that overproduce isoamyl alcohol, *J. Biosci. Bioeng.*, **119**, 140-147 (2015).
137. Oba, T., Kusumoto, K., Kichise, Y., Izumoto, E., Nakayama, S., Tashiro, K., Kuhara, S., and Kitagaki, H.: Variations in mitochondrial membrane potential correlate with malic acid production by natural isolates of *Saccharomyces cerevisiae* sake strains, *FEMS yeast research*, **14**, 789-796 (2014).
138. 松田 章, 中村 静夫, 澤野 礼奈, 矢野 俊博.: 酵母のリンゴ酸生成に関連する酵素の活性に及ぼす培養条件の影響, 日本醸造協会誌, **109**, 745-755 (2014).
139. Güldener, U., Heck, S., Fiedler, T., Beinhauer, J., and Hegemann, J. H.: A New Efficient Gene Disruption Cassette for Repeated Use in Budding Yeast, *Nucleic Acids Research*, **24**, 2519-2524 (1996).
140. Goldstein, A. L., and McCusker, J.H.: Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast*, **15**, 1541-1553 (1999).

141. Hong, J., Tamaki, H., Akiba, S., Yamamoto, K., and Kumagai, H.: Cloning of a gene encoding a highly stable endo- β -1,4-glucanase from *Aspergillus niger* and its expression in yeast, *J. Biosci. Bioeng.*, **92**, 434-441 (2001).
142. Thompson, J. R., Register, E., Curotto, J., Kurtz, M., and Kelly, R.: An improved protocol for the preparation of yeast cells for transformation by electroporation, *Yeast*, **14**, 565-571 (1998).
143. Hiraoka, M., Watanabe, K., Umezu, K., and Maki, H.: Spontaneous Loss of Heterozygosity in Diploid *Saccharomyces cerevisiae* Cells, *Genetics*, **156**, 1531-1548 (2000).
144. Yang, L., Ukil, L., Osmani, A., Nahm, F., Davies, J., De Souza, C. P., Dou, X., Perez-Balaguer, A., and Oamani, S. A.: Rapid Production of Gene Replacement Constructs and Generation of a Green Fluorescent Protein-Tagged Centromeric Marker in *Aspergillus nidulans*, *Eukaryotic Cell*, **3**, 1359-1362 (2004).
145. Watanabe, D., Wu, H., Noguchi, C., Zhou, Y., Akao, T., and Shimoi, H.: Enhancement of the Initial Rate of Ethanol Fermentation Due to Dysfunction of Yeast Stress Response Components Msn2p and/or Msn4p, *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**, 934-941 (2011).
146. McAlister-Henn, L., and Thompson, L. M.: Isolation and expression of the gene encoding yeast mitochondrial malate dehydrogenase, *J. Bacteriol.*, **169**, 5157-5166 (1987).
147. Minard, K. I., and McAlister-Henn, L.: Isolation, nucleotide sequence analysis, and disruption of the *MDH2* gene from *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for three isozymes of yeast malate dehydrogenase, *Mol. Cell. Biol.*, **11**, 370-380 (1991).
148. Steffan, J. S., and McAlister-Henn, L.: Isolation and characterization of the yeast gene encoding the *MDH3* isozyme of malate dehydrogenase, *J. Biol. Chem.*, **267**, 24708-24715 (1992).

149. Hartig, A., Simon, M. M., Schuster, T., Daugherty, J. R., Yoo, H. S., and Cooper, T. G.: Differentially regulated malate synthase genes participate in carbon and nitrogen metabolism of *S. cerevisiae*, *Nucleic. Acids. Res.*, **20**, 5677-5686 (1992).
150. Fernandez, E., Fernandez, M., and Rodicio, R.: Two structural genes are encoding malate synthase isoenzymes in *Saccharomyces cerevisiae*, *FEBS Lett*, **320**, 271-275 (1993).
151. McAlister-Henn, L., Steffan, J. S., Minard, K. I., and Anderson, S. L.: Thompson, L. M.: Expression and Function of a Mislocalized Form of Peroxisomal Malate Dehydrogenase (MDH3) in Yeast, *J. Bacteriol.*, **270**, 21220-21225 (1995).
152. Branduardi, P., Longo, V., Berterame, N. M., Rossi, G., and Porro, D.: A novel pathway to produce butanol and isobutanol in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotechnology for Biofuels*, **6**, Article number: 68 (2013).
153. Wong, S., and Wolfe, K. H.: Birth of a metabolic gene cluster in yeast by adaptive gene relocation, *Nature Genetics*, **37**, 777-782 (2005).
154. Mukai, S., and Fujiki, Y.: Molecular Mechanisms of Import of Peroxisome-targeting Signal Type 2 (PTS2) Proteins by PTS2 Receptor Pex7p and PTS1 Receptor Pex5pL, *J. Biol. Chem.*, **281**, 37311-37320 (2006).
155. Elgersma, Y., Vos, A., Berg, M., Roermund, C., Sluijs, P., Distel, B., and Tabak, H. F.: Analysis of the Carboxyl-terminal Peroxisomal Targeting Signal 1 in a Homologous Context in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.*, **271**, 26375-26382 (1996).
156. Ma, C., Agrawal, G., and Subramani, S.: Peroxisome assembly: matrix and membrane protein biogenesis, *J Cell Biol*, **193**, 7-16 (2011).
157. Santt, O., Pfirrmann, T., Braun, B., Juretschke, J., Kimming, P., Scheel, H., Hofmann, K., Thumm, M., and Wolf, D. H.: The Yeast GID Complex, a Novel Ubiquitin Ligase

- (E3) Involved in the Regulation of Carbohydrate Metabolism, *Molecular Biology of the Cell*, **19**, 3323-3333 (2008).
158. 中務 邦雄. : タンパク質分解による代謝制御機構の解明, 上原記念生命科学財団研究報告集, **31** (2017).
159. Nakatsukasa, K., Okumura, F., and Kamura, T.: Proteolytic regulation of metabolic enzymes by E3 ubiquitin ligase complexes: lessons from yeast, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **50**, 489-502 (2015).
160. Scheffner, M., Nuber, U., and Huibregtse, L. M.: Protein ubiquitination involving an E1–E2–E3 enzyme ubiquitin thioester cascade, *Nature*, **373**, 81-83 (1995).
161. Finley, D., Ulrich, H. D., Sommer, T., and Kaiser, P.: The Ubiquitin–Proteasome System of *Saccharomyces cerevisiae*, *Genetics*, **192**, 319-360 (2012).
162. Zhou, P., and Howley, P. M.: Ubiquitination and Degradation of the Substrate Recognition Subunits of SCF Ubiquitin–Protein Ligases, *Mol. Cell.*, **2**, 571-580 (1998).
163. Nakatsukasa, K., Nishimura, T., Byrne, S. D., Okamoto, M., Takahashi-Nakaguchi, A., Chibana, H., Okumura, F., and Kamura, T.: The Ubiquitin Ligase SCF(Ucc1) Acts as a Metabolic Switch for the Glyoxylate Cycle, *Mol. Cell.*, **59**, 22-34 (2015).