

学 位 論 文 要 旨

氏 名	小橋 有輝
題 目	焼酎酵母を用いた <i>THI3</i> 機能解析および新規対立遺伝子破壊法の開発 (Functional analysis of <i>THI3</i> and development of a novel gene disruption method using shochu yeast)

酵母の生成する香り成分は、酒類の重要な香り成分である。この中でも、酵母が生成する高級アルコールは、フルーティーな香りを呈する酢酸エステルの前駆体となる重要な成分であり、酵母の高級アルコール生合成メカニズムに注目した育種や研究が多く行われている。これまでの研究で明らかとなった生合成関連遺伝子の中でも *THI3* は高級アルコール生合成における役割が曖昧なままとなっている。また、これらの育種や研究に用いられる遺伝子組換えは、一度の形質転換で二倍体酵母の標的遺伝子を完全には破壊できないため、焼酎酵母や清酒酵母といった二倍体産業利用株に適用しづらいというデメリットがある。

そこで本研究では、*THI3* の高級アルコール生成への役割を解明することと、産業利用株を用いた遺伝子機能解析に有用な新規対立遺伝子破壊手法を開発することを目的とした。高級アルコール高生産株である焼酎酵母 C4 を親株として *THI3* 破壊株 ($\Delta thi3$) を構築して培養試験を行い、高級アルコールの中でも *THI3* が主に生成に関与するとされていた Isoamyl alcohol 生成量を測定した。その結果、 $\Delta thi3$ の Isoamyl alcohol 生成量は生育環境の Thiamine 濃度に左右された。これは、 $\Delta thi3$ は細胞内で Thiamine を生合成できず、細胞外からの取り込みに依存しており、Isoamyl alcohol 生合成における α -ketoisocaproic acid の脱炭酸に必要な補酵素である Thiamine diphosphate (TPP) の細胞内濃度が細胞外 Thiamine 量に依存するためであることが明らかとなった。

また、遺伝子組換えを二倍体の産業利用株にも適用することを目的に、鹿児島県の焼酎製造に最も多く使われている焼酎酵母 K2 を親株に二倍体酵母の対立遺伝子破壊法の開発を行った。機能性 *LYS5* を、非機能性 *ura3* で挟み、カセットの内側と外側に繰り返し配列を付与した破壊カセットを構築した。この破壊カセットは、ループアウト組換えによって、機能性 *LYS5* の除去と機能性 *URA3* の復帰、そして *URA3* の完全除去と段階的にカセットを染色体から除去することが可能であった。本カセットで形質転換し、自身での相同組み換えによってヘテロ型の遺伝子がホモ型へ変換されるヘテロ接合性の消失という現象を利用することで、一回の形質転換で標的遺伝子を完全に破壊できた。さらに、ループアウト組換えとカウンターセクションによって、標的遺伝子の破壊後にカセットを完全に除去することができた。また、本手法で導入した遺伝子は全て K2 のゲノム DNA 由来であり外来遺伝子を用いていないため、得られた変異株は産業利用可能なセルフクロニング株とみなせる。

本研究より、高級アルコール生成における *THI3* の役割は、Thiamine 生合成の維持を通じた補酵素 TPP の安定供給であることが明らかとなった。また、外来の遺伝子を用いず、一回の形質転換で二倍体焼酎酵母の標的遺伝子を完全に破壊し、カウンターセクションによってマーカーリサイクルまで完了する、新たな対立遺伝子破壊手法を開発し、その有用性を実証した。以上の結果は、酵母の高級アルコール生合成メカニズムへの正確な理解と、今後の産業株を用いた酵母の育種や遺伝子解析に貢献するものと考えられる。