

焼酎酵母を用いた *THI3* 機能解析および
新規対立遺伝子破壊法の開発
(Functional analysis of *THI3* and development of a novel gene
disruption method using shochu yeast)

小橋 有輝

2024 年

目次

	頁
第 1 章 緒論	
第 1 節 酒類	1
第 2 節 酒類の香気	1
第 3 節 酒類における酵母が生成する香気成分	2
第 4 節 酵母の高級アルコール生合成	3
第 5 節 酵母の高級アルコール生成に注目した育種開発	9
第 6 節 酵母の育種や研究に用いられる遺伝子工学技術	10
第 7 節 本論文の研究目的とその内容	13
参考文献	15
第 2 章 Isoamyl alcohol 生合成における <i>THI3</i> の役割	
第 1 節 緒言	20
第 2 節 実験方法	22
2-2-1. 使用菌株と <i>THI3</i> 破壊株の作成	22
2-2-2. 培地の調製	23
2-2-3. 培養方法	24
2-2-4. 酵母数の測定	24
2-2-5. GC/MS 分析	24
2-2-6. 細胞内 Thiamine 量および Thiamine diphosphate (TPP) 量の測定	25
2-2-7. α -ketoisocaproic acid 脱炭酸酵素活性の測定	27
2-2-8. 統計解析	27

第 3 節 結果および考察	28
2-3-1. 培地中の YNB 濃度が $\Delta thi3$ の Isoamyl alcohol 生成へ与える影響	28
2-3-2. $\Delta thi3$ の Isoamyl alcohol 生成に影響を与える YNB 構成成分の探索	31
2-3-3. 培地 Thiamine 濃度が $\Delta thi3$ に与える影響	34
2-3-4. α -ketoisocaproic acid 脱炭酸酵素活性の測定	39
第 4 節 小括	42
参考文献	43

第 3 章 二倍体焼酎酵母の対立遺伝子破壊法

第 1 節 緒言	47
第 2 節 実験方法	50
3-2-1. 使用菌株および培地	50
3-2-2. <i>ura3::kanMX/URA3</i> ヘテロ破壊株の構築	52
3-2-3. LOH 頻度の測定	55
3-2-4. 破壊カセットの構築	55
3-2-5. 統計解析	56
第 3 節 結果および考察	58
3-3-1. 焼酎酵母 K2 における LOH 頻度	58
3-3-2. セルフクローニングによる K2 の <i>URA3</i> および <i>LYS5</i> の 二重破壊株の構築	62
3-3-3. 一度の形質転換による二倍体焼酎酵母の対立遺伝子破壊手法	65
3-3-4. 第一の遺伝子破壊	68
3-3-5. 第二の遺伝子破壊	72

第 4 節 小括 77

参考文献 79

第 4 章 総括 83

謝辞

本論文に関する報文

第 1 章 緒論

第 1 節 酒類

酒類とは、アルコール分 1 度以上の飲料であると酒税法で定められている。酒類は、その製造方法で醸造酒、蒸留酒および混成酒の 3 つに分類される。

醸造酒は、原料をそのまま、もしくは糖化して酵母により発酵させ製造した酒類のことである。また、発酵方法には、果実など原料中に含まれる糖をそのままアルコール発酵に利用する単発酵と、穀物などのデンプン質原料を糖化してからアルコール発酵を行う単行複発酵、デンプン質原料の糖化とアルコール発酵が同時並行的に進行する並行複発酵の 3 つが存在する。代表的な醸造酒として、単発酵酒のワインやシードル、単行複発酵酒のビール、並行複発酵酒の清酒や中国の黄酒がある。

蒸留酒は、醸造してできたアルコール含有物を蒸留することで製造した酒類である。概括的に言えば、蒸留酒は醸造酒を蒸留したものと捉えることができ、例としてブランデーはワインを蒸留したもの、ウイスキーはビールを蒸留したものと考えることができる。日本の代表的な蒸留酒である焼酎は、麴、酵母および穀物などの原料を混合したもろみを発酵させ蒸留することで製造される。酒税法に基づけば、発芽した穀類、果実および含糖質物以外のものを原料とすることができ、その中でも主原料にサツマイモを用いた焼酎が芋焼酎となる。

混成酒は、醸造酒や蒸留酒に植物の花、葉、根、果実や甘味料などを混ぜ合わせて製造した酒類のことで、みりんやリキュール類などがこれに当たる。

第 2 節 酒類の香気

酒類の香りは様々な香気成分によって形成される。その成分は、原料や、蒸留や熟成といった製造過程、酵母や麴菌などに由来する。鹿児島県の特産品である芋焼

酎を例にすると、原料のサツマイモに由来する香気成分として Linalool, Nerol, α -terpineol, Citronellol および Geraniol といったモノテルペンアルコール (Ohta *et al.*, 1990) や濃厚な甘い香りを呈する β -damascenone (神渡ら, 2011) などが挙げられる。また、製造過程で生じる香気成分として、蒸留過程でのアミノ酸のメイラード反応やストレッカー分解で生じるアルデヒド類 (奥村, 1991) や Furfural (白石ら, 2017) などが挙げられる。これら原料由来の香気成分や製造過程で生じる香気成分は、焼酎や清酒、ビール、ワイン等、酒類ごとに特徴的な香りの形成に寄与している。一方、酵母が生成する香気成分は, Isoamyl alcohol, n-propyl alcohol, Isobutyl alcohol, Active amyl alcohol および β -phenethyl alcohol といった高級アルコール類とこれらを基質として生成する酢酸エステル類, さらに脂肪酸エステル類が挙げられ, これらはほとんどの酒類に含まれる成分である。

第 3 節 酒類における酵母が生成する香気成分

酵母が生成する香気成分のうち、バナナ様の香りを呈する Isoamyl acetate や、リンゴ様の香りを呈する Ethyl caproate などのエステル類は、その多くが果実香を示し、酒類のフルーティーな香りの形成に寄与する。これら酵母が生成するエステルに由来するフルーティーな香りは、清酒では吟醸香、ビールではファーメンテーションブーケ、ワインでは第二アロマと呼ばれ、酒類の重要な香りとしてされている。同様に、酵母が生成する香気成分のうち、油性インキ様の香りを示す Isoamyl alcohol, n-propyl alcohol および Isobutyl alcohol や、バラ様の香りを示す β -phenethyl alcohol などの高級アルコール類も酒類において重要な香気成分である。高級アルコールは、3 個以上の炭素原子を有し、エタノールと比べて高い分子量と沸点を示すアルコールであり、酒類に含まれる香気成分のなかで最も含有量が多い化合物群の一つである。高級アルコー

ルが酒質に与える影響は様々であり、低濃度であれば華やかな香気の形成に寄与するが、高濃度に含まれると異臭となり、特に *Isoamyl alcohol* は原料の香りをマスキングすることが知られている (Cameleyre *et al.*, 2015)。さらに焼酎では、蒸留によって高級アルコールを主成分としたフーゼル油が生じる。フーゼル油に由来する油臭や香水様のフーゼル臭は焼酎の不快臭となるが、少量であれば焼酎に旨みや複雑な香りをもたらす、味わい深さに寄与する。さらに、高級アルコールはフルーティーな香りを示す酢酸エステルの前駆体であり、高級アルコールと *Acetyl-CoA* を基質として酵母細胞膜上のアルコールアセチルトランスフェラーゼによって *Isoamyl acetate* などの酢酸エステルが生成される (Yoshioka and Hashimoto, 1981)。このように、高級アルコールは、低濃度であれば酒類に良い影響を与え、高濃度では異臭や原料香のマスキングといった悪影響を与え、さらにフルーティーな香りを呈する酢酸エステルの前駆体にもなるといった様々な特徴を有する。そのため、酵母の高級アルコール生成量をコントロールすることは酒質の制御において重要である。

第 4 節 酵母の高級アルコール生合成

酵母が生成する高級アルコールの中で酒類の香味上重要とされる *Isoamyl alcohol*, *Isobuthyl alcohol*, *Active amyl alcohol* および *n-propyl alcohol* は、それぞれ分岐鎖アミノ酸である *Leucine*, *Valine*, *Isoleucine* および *Threonine* の代謝によって生じ、バラ様の香りを示す β -phenethyl alcohol は芳香族アミノ酸である *Phenylalanine* の代謝によって生じる。酵母による高級アルコールの生合成は、菌体に取り込んだアミノ酸を脱アミノすることで生じる α -ケト酸をアルデヒドに脱炭酸し、それを還元する Ehrlich 経路 (Ehrlich, 1907) と、アミノ酸生合成の中間代謝産物として生じた α -ケト酸について、同様に脱炭酸と還元を行うアミノ酸生合成経路 (Chen, 1978) の 2 つの経路

で主に行われる (Fig. 1-1)。

高級アルコールが酒類の主要香気成分であることに加えて、バイオエタノール燃料としても注目された (Liang *et al.*, 2020) ことで、Ehrlich 経路への関心も高まり、関連遺伝子も数多く明らかとなった。Ehrlich 経路の最初の反応ステップであるアミノ酸から α -ケト酸への脱アミノには、ミトコンドリアに局在する分岐差アミノ酸アミノトランスフェラーゼをコードする *BAT1*, *Bat1p* の細胞質局在性アイソザイムをコードする *BAT2*, さらに芳香族アミノ酸アミノトランスフェラーゼをコードする *ARO8* および *ARO9* の 4 つの遺伝子が関与している (Eden *et al.*, 1996; Kispal *et al.*, 1996; Iraqui *et al.*, 1998)。 *BAT1* 変異株のミトコンドリアでは、Leucine および Valine の脱アミノ活性が親株の約 1/10 まで、Isoleucine の脱アミノ活性は約 1/2 まで低下した。また、*BAT2* 変異株の細胞質では、Leucine および Valine の脱アミノ活性が親株の約 1/2 まで低下することが報告された (Kispal *et al.*, 1996)。しかし同報告内で、*BAT1* および *BAT2* の二重破壊株は分岐鎖アミノ酸の脱アミノ活性を保持しており、他の関連遺伝子の存在が示唆された。Aro8p, Aro9p は芳香族アミノ酸アミノトランスフェラーゼであるとされていたが、Aro8p は Phenylpyruvate をアミノアクセプターとすれば、Methionine, α -amino adipic acid および Leucine を脱アミノすることができ、Aro9p はさらに広い基質特異性を示すことが明らかとなり (Urrestarazu *et al.*, 1998), *ARO8* や *ARO9* も高級アルコール生合成に関与していることが示唆された。

Ehrlich 経路およびアミノ酸生合成経路において、 α -ケト酸は不可逆的に脱炭酸される。この α -ケト酸の脱炭酸には、ピルビン酸デカルボキシラーゼをコードしアルコール発酵に関与する *PDC1*, *PDC5* および *PDC6* が関与すると考えられた (Watson and Hough, 1969)。また、これらピルビン酸デカルボキシラーゼをコードする遺伝子との配列類似性から、 α -ケト酸脱炭酸酵素をコードする遺伝子として *ARO10* と *THI3* が

新たな候補遺伝子とされた (Dickinson *et al.*, 1997; Dickinson *et al.*, 2003; Vuralhan *et al.*, 2005)。しかし, Isoamyl alcohol 生成では α -ketoisocaproic acid, Isobuthyl alcohol 生成では α -ketoisovaleric acid と, 生成される高級アルコールが変われば中間代謝産物である α -ケト酸も変わる。そのため, *PDC1*, *PDC5*, *PDC6*, *ARO10* および *THI3* にコードされる脱炭酸酵素がそれぞれ, いずれの α -ケト酸を主に基質とするのかについて研究されてきた。Dickinson らは *PDC1*, *PDC5*, *PDC6*, *ARO10* および *THI3* について, 様々な組み合わせで多重破壊株を構築し, Leucine のみをアミノ酸源とした培地で取得した破壊株を培養した。その結果, *THI3* を破壊することで Isoamyl alcohol 生成量が顕著に低下することを明らかにし, *THI3* は α -ketoisocaproic acid の主要脱炭酸酵素をコードすると報告された (Dickinson *et al.*, 1997)。同様の研究により, Isobuthyl alcohol 生成の中間代謝産物である α -ketoisovaleric acid の主要脱炭酸酵素は *PDC1*, *PDC5*, *PDC6* のいずれかがコードすると考えられ (Dickinson *et al.*, 1998), Acive amyl alcohol の中間代謝産物である α -keto- β -methylvaleric acid の脱炭酸には *PDC1*, *PDC5*, *PDC6*, *ARO10* および *THI3* がコードする脱炭酸酵素のいずれかが存在すれば十分であると考えられた (Dickinson *et al.*, 2000)。

Ehrlich 経路およびアミノ酸生合成経路において, α -ケト酸の脱炭酸を経て生成されたアルデヒドは還元され高級アルコールとなる。Dickinson らは, アリルアルコールデヒドロゲナーゼをコードすると予想された 7 つの *AAD* 遺伝子 (*AAD3*, *AAD4*, *AAD6*, *AAD10*, *AAD14*, *AAD15* および *AAD16*), アルコールデヒドロゲナーゼをコードする 5 つの *ADH* 遺伝子 (*ADH1*, *ADH2*, *ADH3*, *ADH4* および *ADH5*), そしてホルムアルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする *SFA1* について, 様々な組み合わせの変異株を作製し, *ADH1*, *ADH2*, *ADH3*, *ADH4*, *ADH5* および *SFA1* が高級アルコール生成におけるアルデヒドの還元に関与することを示した (Dickinson *et al.*, 2003)。ま

た、これら以外にも、NADPH 依存性アルドケトレダクターゼをコードする *YPR1* が α -keto- β -methylvalerate から Active amyl alcohol への還元に関与し、*GRE2* が Isovaleraldehyde から Isoamyl alcohol への還元酵素をコードすることが報告されている (Ford and Ellis, 2002; Hauser *et al.*, 2007)。

このように、多くの高級アルコール生成関連遺伝子が明らかとなったが、炭素の安定同位体である ^{13}C でラベルした Leucine を用いて代謝を追跡すると、Leucine を出発点として Isoamyl alcohol が生合成されるまでに複数の代謝ルートが予想された (Fig. 1-2) (Dickinson *et al.*, 1997)。そのため、高級アルコール生成にはいまだに多くの未知の関連遺伝子が存在すると予想される。

さらに、既知の生成関連遺伝子の中で α -ketoisocaproic acid の主要脱炭酸酵素をコードするとされた *THI3* に関しては、様々な矛盾する報告が存在する。Dickinson らによって *THI3* 破壊によって実験室株の Isoamyl alcohol 生成量が低下することが報告されたが (Dickinson *et al.*, 1997), Hao らは、一倍体産業利用株における *THI3* の破壊は高級アルコール生成量に影響を与えなかったことを報告している (Hao *et al.*, 2010)。また、*PDC1*, *PDC5*, *PDC6* および *ARO10* を全て破壊した上で *THI3* のみ過剰発現させた株に脱炭酸酵素活性が確認されなかったことも報告されており (Romagnoli *et al.*, 2012), *THI3* の高級アルコール生合成における役割は不明瞭なままとなっている。

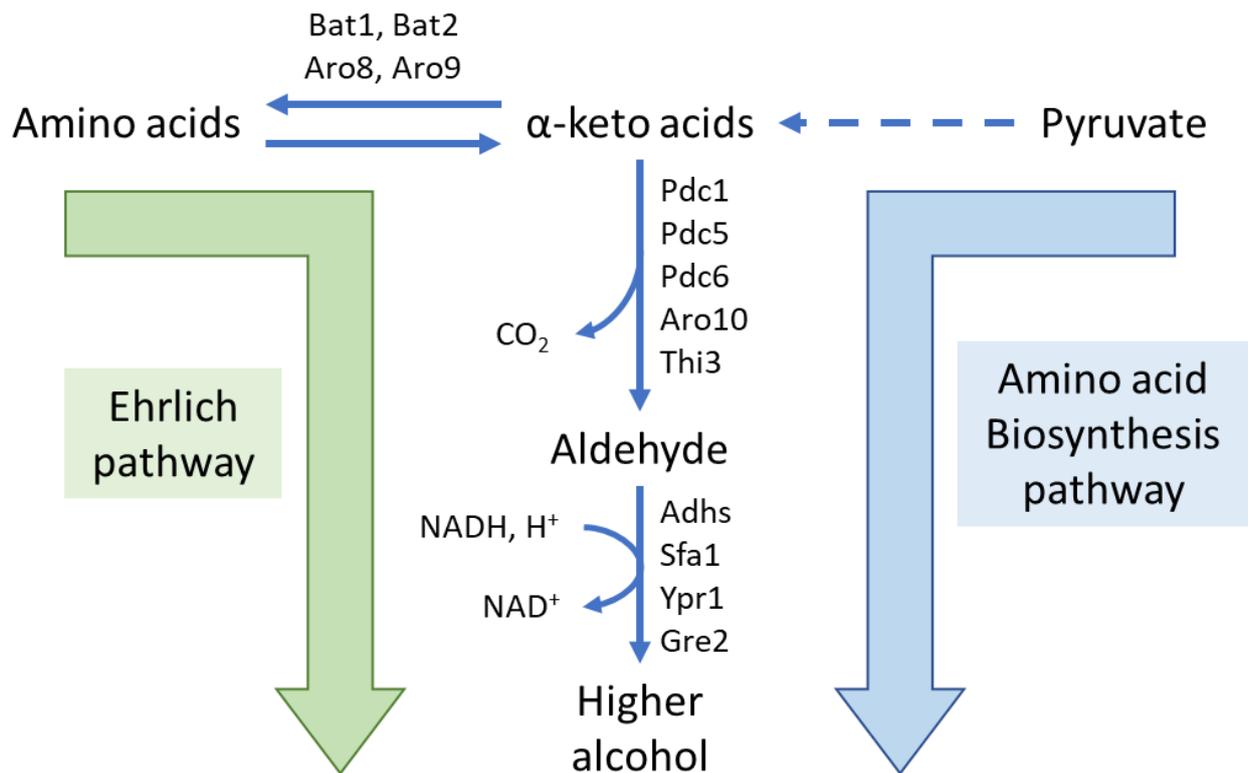


Fig. 1-1 Higher alcohol biosynthesis in yeast.

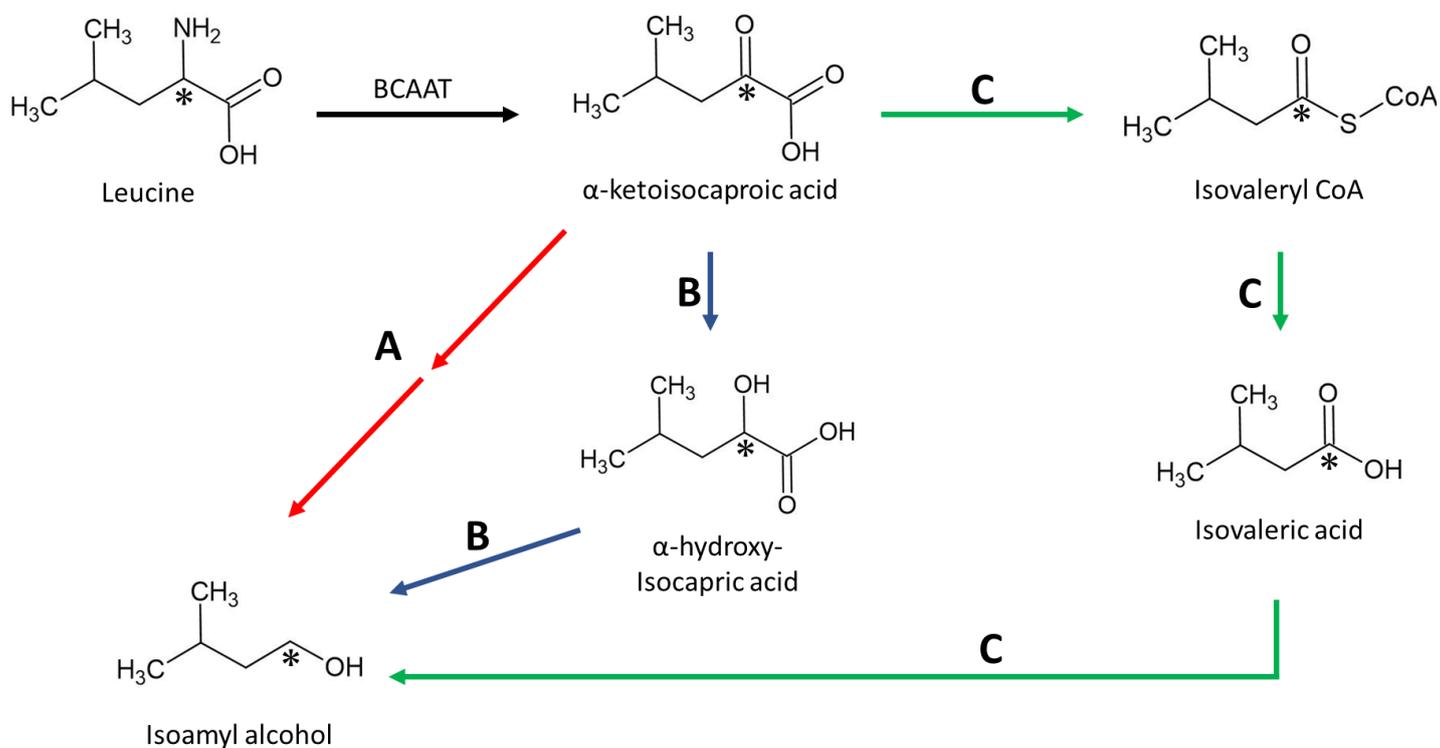


Fig. 1-2 Possible Isoamyl alcohol biosynthetic pathways (referenced from Dickinson *et al.*, 1997). The asterisks indicate carbon atoms in intermediates that were labeled with ^{13}C . BCAAT is a branched-chain amino acid aminotransferase. Pathway A (indicated by red arrow): decarboxylation of α -ketoisocaproic acid to Isovaleraldehyde and subsequent reduction to synthesize Isoamyl alcohol. Pathway A is a well-established biosynthetic route for isopentyl alcohol. Pathway B (indicated by blue arrows): a pathway in which α -hydroxy-Isocaproic acid is produced by α -ketoisocaproic acid reductase, followed by decarboxylation to synthesize Isoamyl alcohol. Pathway C (indicated by green arrows): the pathway where Isovaleryl CoA is produced by α -keto acid dehydrogenase and then converted to Isovaleric acid by acyl-CoA hydrolase, which is reduced to synthesize Isoamyl alcohol.

第 5 節 酵母の高級アルコール生成に注目した育種開発

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付与する酢酸エステル類の前駆体になるため、エステル高生産を目指して高級アルコール生成能の高い酵母の育種が行われている。Ehrlich 経路やアミノ酸生合成経路は、アミノ酸代謝経路を経るため、アミノ酸代謝におけるフィードバック阻害や抑制の影響を受ける。そのため、これら阻害や抑制の引き金となる成分のアナログ耐性株から、高級アルコール高生産株が分離され、Leucine のアナログである 5,5,5-Trifluoro-DL-leucine 耐性株は Isoamyl alcohol 生成量が約 3-4 倍増加し (Ashida *et al.*, 1987), Valine や Leucine の代謝拮抗物質である β -(2-thiazoryl)-DL-alanine 耐性株は Isoamyl alcohol および Isobutyl alcohol 生成量が約 10 倍増加している (Fukuda *et al.*, 1990)。

また、高級アルコール生成関連遺伝子をターゲットとした育種や研究も行われている。その中で、実験室株において *PDC1*, *PDC5*, *PDC6* の三重破壊によって Isobutyl alcohol 生成量が低下することや (Dickinson *et al.*, 1998), 一倍体産業利用株で、*BAT2* を破壊することで Isoamyl alcohol および Active amyl alcohol 生成量が減少することが報告されている (Zhang *et al.*, 2015)。また、一倍体産業利用酵母での *THI3* と *ADH2* の二重破壊や、*THI3* と *BAT2* の二重破壊による Isoamyl alcohol 生成量の低下も報告されている (Wu *et al.*, 2021; Chen *et al.*, 2022)。前述の報告は全て *Saccharomyces cerevisiae* におけるものであったが、醤油酵母である *Zygosaccharomyces rouxii* においても同様の研究が行われ、*BAT1* および *ARO8* の二重破壊によって Isoamyl alcohol 生成量が大きく低下することが報告されている (渡部, 2018)。

第 6 節 酵母の育種や研究に用いられる遺伝子工学技術

第 5 節で述べた酵母の育種や研究は、突然変異を利用した変異株の取得や、遺伝子組換え技術による変異株の取得によって行われた。

突然変異を利用した変異株の取得は、UV や EMS (Ethyl methanesulfonate) といった変異原を用いて人為的に突然変異を起こさせ、目的の形質を示す株を選抜するという手法である。この手法は比較的操作が簡便であり、取得した株は自然発生的な突然変異株とみなせるため産業株として利用されている。清酒醸造用のきょうかい酵母である 1701 号や 1901 号はこの手法によって取得された株である (稲橋, 2001; 蓮田, 2014)。しかし、この手法で誘発される突然変異はランダムなものであるため、目的の形質を持つ株の取得効率が悪いうえ、予期せぬ変異が導入されてしまう可能性がある。

遺伝子組換え技術では、遺伝子をピンポイントにターゲティングして変異株を取得できる。一般に遺伝子組換えでは、「カセット」と呼ばれる、標的遺伝子に対して相同な配列を付与したマーカー遺伝子を用いて、標的遺伝子を破壊する。酢酸リチウム法 (Ito *et al.*, 1983) やエレクトロポレーション法 (Delorme, 1989) といった遺伝子導入手法でカセットを酵母菌体内に導入し、標的遺伝子をマーカー遺伝子で置換する形質転換によって標的遺伝子の破壊株を取得する。この手法では標的遺伝子をピンポイントに破壊できるため、効率よく目的の破壊株を取得することができる。

しかし、遺伝子組換え技術にはいくつかの問題点が存在する。一つは二倍体生物では、一回の形質転換によって標的遺伝子を完全に破壊するのは困難という点である。一般に産業利用されている酵母は二倍体であり、一度の形質転換で両対立遺伝子上の標的遺伝子を破壊することができず、ヘテロな形で標的遺伝子が残る。そのため、標的遺伝子を完全に破壊するためには、別のマーカー遺伝子を用いて残った標

的遺伝子に対して再度形質転換を行う必要があり (Fig. 1-3A), 手間と時間が要求される。また, ヘテロに遺伝子が破壊された株に胞子を形成させ, 減数分裂時の染色体の分配を利用して標的遺伝子が完全破壊された一倍体酵母を取得する手法もある (Fig. 1-3B)。しかし, 清酒酵母のように胞子形成能が低い酵母 (Nakazawa *et al.*, 1992) には本手法を適応できない。二つ目の問題点として, マーカー遺伝子の種類に限りがあるため破壊できる遺伝子数が限られてしまう点が挙げられる。そのため, マーカー遺伝子数を超えて遺伝子を破壊するためにはマーカーリサイクルが必要となる。バクテリオファージ P1 の *loxP* 配列に挟まれたマーカー遺伝子を形質転換に用いた上で, Cre リコンビナーゼを発現させ, *loxP* 配列間での組換えによってマーカー遺伝子を除去する手法が報告された (Güldener *et al.*, 1996) が, 除去後に *loxP* の反復配列が染色体上に残ってしまうというデメリットがある。三つ目の問題点として, マーカー遺伝子に外来の遺伝子を用いた場合, 遺伝子組換え株となり産業利用が困難となる点がある。そのため, 産業利用を前提とする場合, 外来遺伝子を使わずに標的遺伝子を破壊するか, 導入した外来遺伝子を除去する必要がある。このように, 遺伝子組換え技術はピンポイントに遺伝子をターゲットにできるため, 効率の良い育種や遺伝子解析に有用であるが, 未だに課題も多い。

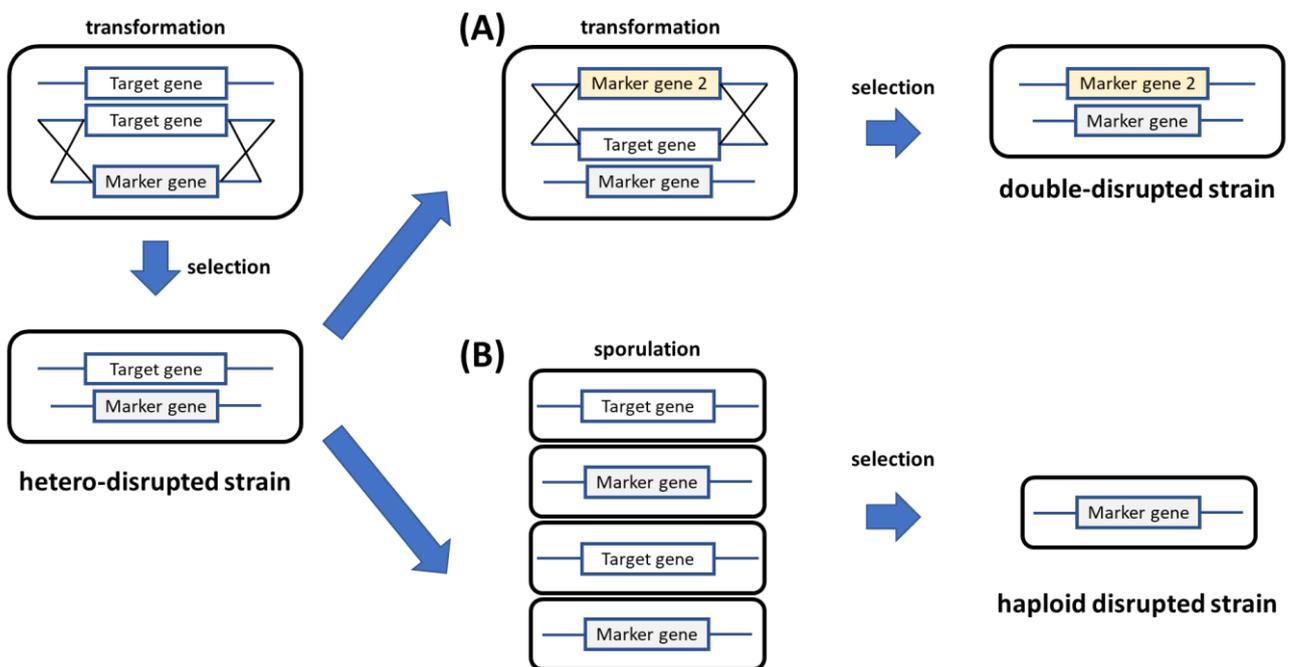


Fig. 1-3 Gene disruption strategies in diploid yeasts. (A) Method of transforming the remaining target genes with a different type of marker gene in order to completely destroy the target gene. (B) Method to obtain haploid yeasts with complete disruption of target genes by inducing spore formation in heterogeneously disrupted strains and utilising chromosome partitioning during meiosis.

第 7 節 本論文の研究目的とその内容

これまでの研究で、高級アルコール生成関連遺伝子が数多く報告されているが、*THI3* はその機能が不明瞭である。実験室株や産業利用株を用いた *THI3* の破壊による高級アルコール生成量への影響が多数報告されているが、(Dickinson *et al.*, 1997; Hao *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2021; Chen *et al.*, 2022), それが *THI3* のいかなる機能によってもたらされたものであるのかは曖昧なままとなっており、高級アルコールをターゲットとした酵母育種や研究で誤った解釈を引き起こす可能性がある。また、酵母の高級アルコール生合成には、未知の関連遺伝子の存在が示唆される。これらについて、産業利用株を用いた機能解析や育種を行い、実際に酒類製造に与える影響を直接的に確認することは有用であり、そのためには二倍体産業利用酵母にも適用できる遺伝子破壊技術が求められる。さらに産業利用を考える上では、外来の遺伝子を用いない遺伝子破壊技術が必要である。

そこで本研究では、*THI3* が生合成の主要関連遺伝子と報告された Isoamyl alcohol をモデルとして、*THI3* の生合成における役割を明らかにすることと、二倍体焼酎酵母を親株としてこれまでの遺伝子組換え技術の問題点を克服し、産業利用株に適用できる遺伝子破壊技術を構築することを目的とした。

具体的には、本論文は 4 章で構成されており、第 1 章では酒類香気成分の中でも酵母が生成する高級アルコールに注目して、酵母の高級アルコール生成機構や生成関連遺伝子についてこれまでの研究と不明点、さらに高級アルコール生成に関連した酵母育種や用いられた遺伝子工学技術の概略と問題点を示した。

第 2 章では、焼酎酵母を親株として *THI3* 破壊株を用いた培養試験を行い、Isoamyl alcohol 生成量を測定することで、焼酎酵母における *THI3* 破壊による影響を確認するとともに、*THI3* 破壊による Isoamyl alcohol 生成量に影響を与える因子を

明らかにし、酵母の Isoamyl alcohol 生合成における *THI3* の役割を明らかにした。

第 3 章では、ループアウト組換えによってマーカー遺伝子が除去される破壊カセットを外来の遺伝子を用いずにデザインし、このカセットとヘテロ接合性の消失を利用することで、二倍体酵母の両対立遺伝子上の標的遺伝子を破壊できる、新たな遺伝子破壊手法について検討した。

第 4 章では、上記各論の結果を総括し、本研究の内容をまとめた。

参考文献

- 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).
- Cameleyre, M., Lytra, G., Tempere, S., and Barbe, J.-C.:** Olfactory impact of higher alcohols on red wine fruity ester aroma expression in model solution, *J. Agric. Food Chem.* **63**, 9777–9788 (2015).
- Chen, W., Zhou, S., Yan, T., and Liang, S.:** Construction of *THI3/BAT2* Gene-deleted *Saccharomyces cerevisiae* and its application in preparing chinese rice wine, *Mod. Food Sci. Technol.*, **38**, 5562 (2022).
- Chen, E. C.-H.:** The relative contribution of Ehrlich and biosynthetic pathways to the formation of fusel alcohols footnote, *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **36**, 39–43 (1978).
- Delorme, E.:** Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* by electroporation, *Appl Environ Microbiol.*, **55**, 2242–2246 (1989).
- Dickinson, J. R., Lanterman, M. M., Danner, D. J., Pearson, B. M., Sanz, P., Harrison, S. J., and Hewlins, M. J.:** A ¹³C nuclear magnetic resonance investigation of the metabolism of leucine to isoamyl alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.*, **272**, 26871–26878 (1997).
- Dickinson, J. R., Harrison, S. J., and Hewlins, M. J.:** An investigation of the metabolism of valine to isobutyl alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.*, **273**, 25751–25756 (1998).
- Dickinson, J. R., Harrison, S. J., Dickinson, J. A., and Hewlins, M. J.:** An investigation of the metabolism of isoleucine to active amyl alcohol in

- Saccharomyces cerevisiae*, J. Biol. Chem., **275**, 10937–10942 (2000).
- Dickinson, J. R., Salgado, L. E., and Hewlins, M. J.:** The catabolism of amino acids to long chain and complex alcohols in *Saccharomyces cerevisiae*, J. Biol. Chem., **278**, 8028–34 (2003).
- Eden, A., Simchen, G., and Benvenisty, N.:** Two yeast homologs of *ECA39*, a target for c-Myc regulation, code for cytosolic and mitochondrial branched-chain amino acid aminotransferases, J. Biol. Chem., **271**, 20242–20245 (1996).
- Ehrlich, F.:** Über die Bedingungen der Fuselölbildung und über ihren Zusammenhang mit dem Eiweißaufbau der Hefe, Ber. Dtsch. Chem. Ges. **40**, 1027–1047 (1907).
- Ford, G. and Ellis, E. M.:** Characterization of Ypr1p from *Saccharomyces cerevisiae* as a 2-methylbutyraldehyde reductase, Yeast, **15**, 1087–1096 (2002).
- Fukuda, K., Watanabe, M., Asano, K., and Ohta, S.:** Mutants of yeast *Saccharomyces cerevisiae* producing large amounts of the flavor components isobutyl alcohol and isoamyl alcohol, Agric. Biol. Chem., **54**, 2445–2446 (1990).
- 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 Res., **24**, 2519–2524 (1996).
- Hao, X., Xiao, D., and Zhang, C.:** Effect of YDL080C gene deletion on higher alcohols production in *Saccharomyces cerevisiae* haploids, Wei Sheng Wu Xue Bao, **50**, 1030–1035 (2010).
- Hauser, M., Horn, P., Tournu, H., Hauser, N. C., Hoheisel, J. D., Brown, A. J., and Dickinson, J. R.:** A transcriptome analysis of isoamyl alcohol-induced filamentation in yeast reveals a novel role for Gre2p as isovaleraldehyde reductase,

FEMS Yeast Res., **7**, 84–92 (2007).

Iraqui, I., Vissers, S., Cartiaux, M., and Urrestarazu, A.: Characterisation of *Saccharomyces cerevisiae* *ARO8* and *ARO9* genes encoding aromatic aminotransferases I and II reveals a new aminotransferase subfamily, Mol. Gen. Genet., **257**, 238–248 (1998).

Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., and Kimura, A.: Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations, J. Bacteriol., **153**, 163–168 (1983).

Kispal, G., Steiner, H., Court D. A., Rolinski, B., and Lill, R.: Mitochondrial and cytosolic branched-chain amino acid transaminases from yeast, homologs of the myc oncogene-regulated Eca39 protein, J. Biol. Chem., **271**, 24458–24464 (1996).

Liang, L., Liu, R., Freed, E. F., and Eckert, C. A.: Synthetic biology and metabolic engineering employing *Escherichia coli* for C2-C6 bioalcohol production, Front Bioeng Biotechnol., **8**, PMC7347752 (2020).

Nakazawa, N., Ashikari, T., Goto, N., Amachi, T., Nakajima, R., Harashima, S., and Oshima, Y.: Partial restoration of sporulation defect in sake yeasts, kyokai no. 7 and no. 9, by increased dosage of the *IME1* gene, J. Ferment. Bioeng., **73**, 265–270 (1992).

Ohta, T., Ikuta, R., Nakashima, M., Morimitsu, Y., Samuta, T., and Saiki, H.: Characteristic flavor of *Kansho-shochu* (sweet potato spirit), Agric. Biol. Chem., **54**, 1353–1357 (1990).

Romagnoli, G., Luttk, M. A. H., Kötter, P., Pronk, J. T., and Daran J.-M.: Substrate specificity of thiamine pyrophosphate-dependent 2-oxo-acid decarboxylases in *Saccharomyces cerevisiae*, Appl Environ Microbiol., **78**, 7538–7548 (2012).

- Urrestarazu, A., Vissers, S., Iraqui, I., and Grenson, M.:** Phenylalanine- and tyrosine-auxotrophic mutants of *Saccharomyces cerevisiae* impaired in transamination, *Mol. Gen. Genet.*, **257**, 230–237 (1998).
- Vuralhan, Z., Luttik, M. A., Tai, S. L., Boer, V. M., Morais, M. A., Schipper, D., Almering, M. J., Kötter, P., Dickinson, J. R., Daran, J. M., and Pronk, J. T.:** Physiological characterization of the *ARO10*-dependent, broad-substrate-specificity 2-oxo acid decarboxylase activity of *Saccharomyces cerevisiae*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 3276–3284 (2005).
- Watson, T. G. and Hough, J. S.:** Conversion of α -keto-isocaproic acid to iso-amyl alcohol by yeast pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase, *J. Inst. Brew.*, **75**, 359–363 (1969).
- Wu, L., Wen, Y., Chen, W., Yan, T., Tian, X., and Zhou, S.:** Simultaneously deleting *ADH2* and *THI3* genes of *Saccharomyces cerevisiae* for reducing the yield of acetaldehyde and fusel alcohols, *FEMS Microbiol. Lett.*, **368**, fnab094 (2021).
- Yoshioka, K. and Hashimoto, N.:** Ester formation by alcohol acetyltransferase from brewers' yeast, *Appl. Biol. Chem.*, **45**, 2183–2190 (1981).
- Zhang, C.-Y., Qi Y.-N., Ma H.-X., Li, W., Dai, L.-H., and Xiao, D.-G.:** Decreased production of higher alcohols by *Saccharomyces cerevisiae* for Chinese rice wine fermentation by deletion of Bat aminotransferases, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **42**, 617–625 (2015).
- 稲橋正明: きょうかい酵母清酒用 1701 号, 日本醸造協会誌, **96**, 679–687 (2001).
- 奥村蒸司: メイラード反応とフレーバーの生成, 日本醸造協会誌, **88**, 178–187 (1993).
- 神渡巧, 瀬戸口智子: 芋焼酎の香りに及ぼすサツマイモ品種の影響, 生物工程, **89**,

724–727 (2011).

白石洋平, 安藤有加, 奥津果優, 吉崎由美子, 二神泰基, 玉置尚徳, 和久豊, 高峯和則: 芋焼酎の香気形成に及ぼすアミノ酸の影響, 日本醸造協会誌, **112**, 563–568 (2017).

蓮田寛和: きょうかい酵母清酒用尿素非生産性高エステル酵母 1901 号(KArg1901) について, 日本醸造協会誌, **109**, 576–581 (2001).

渡部潤: 醤油酵母における香気成分生成機構に関する研究, 生物工学会誌, **96**, 106–112 (2018).

第 2 章 Isoamyl alcohol 生合成における *THI3* の役割

第 1 節 緒言

Isoamyl alcohol は、酵母の Leucine 代謝により生成され、バナナ様の香りを呈する酢酸イソアミルの前駆体でもある。Isoamyl acetate は、酒類の製造における発酵中に、Isoamyl alcohol と Acetyl-CoA を基質とし、酵母菌体表面に存在するアルコールアセチルトランスフェラーゼによって生成され (Fujii *et al.*, 1994; Fujiwara *et al.*, 1999), その生成量は Isoamyl alcohol 濃度に強く依存することが報告されている (Ashida *et al.*, 1987)。一方で、Isoamyl alcohol 自体は油性インク様の香りを示し、ワインのフルーティーな香りをマスキングすることが報告されていることから (Cameleyre *et al.*, 2015), Isoamyl alcohol 生成量を適切に制御することは酒質の制御を行う上で重要である。

酵母による Isoamyl alcohol の生成は、菌体内に取り込んだ Leucine の脱アミノによって生じた α -ketoisocaproic acid を脱炭酸によって Isovaleraldehyde に変換した後、それを還元する Ehrlich 経路 (Ehrlich, 1907) と、Leucine 生合成の中間代謝産物として生じた α -ketoisocaproic acid について、同様に脱炭酸と還元を行うアミノ酸生合成経路 (Chen, 1978) の 2 つの経路で主に行われる。

Ehrlich 経路とアミノ酸生合成経路に共通する α -ケト酸からアルデヒドへの脱炭酸反応には、ピルビン酸脱炭酸酵素をコードする *PDC1*, *PDC5*, *PDC6* (Kellermann *et al.*, 1986; Seeboth *et al.*, 1990; Hohmann, 1991) と、 α -ケト酸脱炭酸酵素として *ARO10*, *THI3* の関与が報告されている (Schure *et al.*, 1998; Dickinson *et al.*, 2003; Vuralhan *et al.*, 2003)。これらの遺伝子の中で、*THI3* は Isoamyl alcohol 生成に関与する主要脱炭酸酵素をコードすると報告されており (Dickinson *et al.*, 1997), *THI3* を破壊した実験室株は Isoamyl alcohol の生成量が低下することが報告された (Styger *et al.*,

2012; Wu *et al.*, 2021)。しかし、一倍体産業利用株では *THI3* を破壊しても Isoamyl alcohol 生成量に変化しなかったことも報告されており (Hao *et al.*, 2010), *THI3* 破壊による Isoamyl alcohol 生成量の低下は普遍的なものではないと考えられる。さらに, *PDC1*, *PDC5*, *PDC6*, *ARO10* および *THI3* を単独で発現させ, それ以外の4つの遺伝子を破壊した酵母の無細胞抽出液について脱炭酸酵素活性を評価すると, *THI3* の単独発現時においてのみ脱炭酸酵素活性が認められなかったという報告もある (Vuralhan *et al.*, 2003; Romagnoli *et al.*, 2012)。このことから, *THI3* が脱炭酸酵素遺伝子として Isoamyl alcohol 生成に関与していると断定することはできない。

一方, *THI3* について脱炭酸酵素遺伝子としての機能が提唱される以前は, チアミン生合成を促進する機能が報告されている (Nishimura *et al.*, 1992)。このように *THI3* の機能には複数の報告があるなか, 現在においても *THI3* を脱炭酸酵素をコードする遺伝子として扱っている報告 (Wu *et al.*, 2021) も存在しており, *THI3* の破壊によって Isoamyl alcohol 生成量が低下する理由や, *THI3* の Isoamyl alcohol 生成における役割は不明なままとなっている。

そこで, 産業利用株の一種である焼酎酵母を親株に *THI3* 破壊株を構築し, 焼酎酵母における *THI3* 破壊による Isoamyl alcohol 生合成への影響を確認し, 酵母の Isoamyl alcohol 生合成における *THI3* の役割を解明した。

第 2 節 実験方法

2-2-1. 使用菌株と *THI3* 破壊株の作成

鹿児島工業技術センターから分与された焼酎酵母である鹿児島 4 号 (C4) を親株に使用した。

THI3 破壊株 ($\Delta thi3$) の取得は, *KanMX* を選択マーカーとした破壊カセットを酢酸リチウム法 (Ito *et al.*, 1983) にて C4 に導入し, 一方の *THI3* が破壊カセットに置き換わった株に孢子形成させた後, 単離した孢子由来のコロニーを調べることで取得した。破壊カセットは, pUG6 (Güldener *et al.*, 1996) をテンプレートとして, 5'側 50 塩基に *THI3* の上流と下流の遺伝子配列と相補的な配列を付加したプライマー (F : 5'-GGTTTGAAAGAACATAAGTACTACAACGCACCGTCGTCATTCTGAAA
ATGCAGCTGAAGCTTCGTACGC-3' , R : 5'-CGAGCGGTAATCATGAGGGTCC
CTGGTAGTAGGGCGGAGAGATCAGATCAGCATAGGCCACTAGTGGATCTG-3') を用いて PCR により増幅して調製した (プライマー配列の二重下線部は, *THI3* との相同領域を示す)。

破壊カセットを導入した C4 を G418 入り YPD プレート (Glucose 2% [w/v], HY POLYPEPTONE 2% [w/v], Yeast Extract 2% [w/v], Agar 2% [w/v], G418 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) にて, 30°C で 3 日間インキュベートした。生育したコロニーについて PCR を行い, *THI3* のヘテロな破壊が確認されたものを *THI3* ヘテロ破壊株として選抜した。遺伝子破壊の確認用プライマーは, *THI3* の組換え領域より上流と下流に (F : 5'-CTGCTTTTCTAGGCAGCGGT-3' , R : 5'-CAGACATAGATGAGGCTACAGG G-3') 設置した。

THI3 ヘテロ破壊株を孢子形成培地 (Glucose 2% [w/v], Yeast Extract 0.1 % [w/v], Potassium acetate 1% [w/v], Agar 2% [w/v]) に塗布し, 30°C で 5 日間インキュベート

した。形成した胞子についてマイクロマニピュレーターを用いて四分子解析を行い、G418 入り YPD プレート上で 30°C で 3 日間インキュベート後に形成されたコロニーについてコロニー PCR によって *THI3* のホモ破壊を確認できるものを $\Delta thi3$ とした。

2-2-2. 培地の調製

Leucine のみをアミノ酸源とした ロイシン培地は、Glucose 20 g と Leucine 20 g に約 800 mL の脱塩水を加え、Leucine が完全に溶解するまで 25% HCl を添加し、溶解後は 10% NaOH 水溶液 で pH 4 に調整して、Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids (YNB) を終濃度 0.67% (メーカー推奨の使用濃度)、0.167% (メーカー推奨濃度の約 1/4 濃度) or 0.0334% (メーカー推奨の約 1/20 濃度) になるよう加え、脱塩水で 1 L にメスアップしたものをを用いた。

栄養制限培地は、Glucose, Leucine および pH はロイシン培地と同様に調製した。YNB の構成成分は、メーカーより Ammonium Sulfate, Vitamins, Trace Elements および Salts の 4 つにカテゴリー分けされている。これら 4 つのカテゴリーについて 3 つは 0.167% の YNB 相当とし、残り 1 つのカテゴリーについてはその 1/5 量の 0.0334% YNB 相当になるよう個別添加したものを栄養制限培地として用いた。

ビタミン制限培地は、栄養制限培地と同様にして、YNB に含まれるビタミンのいずれか 1 つ以外の構成成分を 0.167% YNB と同濃度になるよう添加し、残る 1 つのビタミン成分はその 1/5 量の 0.0334% YNB と同濃度になるよう添加したものをを用いた。

チアミン培地は、ロイシン培地調製時と同様の操作で Glucose 2% (w/v), Leucine 2% (w/v), pH 4 の水溶液を調製した後、Thiamine Hydrochloride 以外のビタミンやミネ

ラルについては 0.167% YNB と同濃度になるよう調製し, Thiamine Hydrochloride を 0, 20, 40, 60, 80, 100 $\mu\text{g/L}$ のいずれかの濃度になるよう添加して調製した。

全ての培地は 50 mL を, 乾熱滅菌した 100 mL 容三角フラスコに, 孔径 0.45 μm のシリンジフィルター (ADVANTEC[□]) でろ過滅菌しながら分注した。

2-2-3. 培養方法

培地に C4 および $\Delta thi3$ を 1.0×10^5 cells/mL になるよう懸濁し, 30°C, 120 rpm で振とう培養し, 培養液 100 μL を脱塩水で 10 倍に希釈した液の濁度 (600 nm) を経時的に測定することで培養経過を観察した。

2-2-4. 酵母数の測定

酵母数は, 培養液 を脱塩水で 10 倍に希釈してよく混合した後, ヘマトメーターを用いて顕微鏡観察下で計測した。

2-2-5. GC/MS 分析

培養終了後の培養液を遠心分離 ($9900 \times g$, 10 min, 4°C) して得られた上清 1 mL, 25% エタノール溶液 4 mL および Polydimethylsiloxane (PDMS) をコーティングした攪拌子 (Twister, GERSTEL K.K. Japan) をサンプルバイアルに入れ, 1200 rpm, 1 時間攪拌し揮発成分を PDMS に吸着させた。攪拌子を取り出して脱塩水で軽く洗浄した後, キムワイプで水分を除去し, ガラスインサート内に挿入した。PDMS に吸着した揮発成分は, 熱脱離装置 (Gerstel TDS3, Gerstel K.K.) を用いて脱離させた (温度条件: 20°C 1 min 保持, 60°C/min で 260°C まで昇温, 260°C 1 min 保持)。脱離した揮発成分は クライオトラップ (Gerstel CIS4 thermal desorption system, Gerstel K.K.)

を -100°C に設定しクライオフォーカスを行った。加熱脱着操作の後、クライオトラップを加熱し、揮発成分をガスクロマトグラフ (GC) に注入した (温度条件 : -100°C 1min 保持, $12^{\circ}\text{C}/\text{sec}$ で 270°C まで昇温, 270°C 2 min 保持)。

注入された揮発成分の分析は, GC 6890N (Agilent Technologies) および 5977B (Agilent Technologies) で構成されるガスクロマトグラフ質量分析システムで行った。カラムは, $0.25\text{ nm I.D.} \times 60\text{ m}$, Film 厚 $0.25\text{ }\mu\text{m}$ の Pure-Wax column (GL Sciences Inc., Tokyo, Japan) を使用した。分析は, Helium をキャリアガスとし, 流速 $2\text{ mL}/\text{min}$ で行った (温度条件: 50°C 5 min 保持, $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で 240°C まで昇温)。

GC/MS 揮発成分の同定は, マススペクトルのライブラリー検索 (NIST 05) と Aroma Office を用いたリテンションインデックス検索から行った (Takamine *et al.*, 2011)。

2-2-6. 細胞内 Thiamine 量および Thiamine diphosphate (TPP) 量の測定

集菌した酵母を冷水および氷冷した PBS で洗浄し, 洗浄した菌体に直径 0.5 mm のガラスビーズと PBS を加え, FastPrep FP120 (Bio 101, Savant Instruments Inc., Holbrook, NY, USA) を用いて細胞をビーズ破碎し細胞破碎液を得た。

細胞破碎液 $150\text{ }\mu\text{L}$ に $450\text{ }\mu\text{L}$ の Methanol を加えてミキサーで混合後, 室温遮光条件下で 5 min 静置した。静置後の溶液を $2000 \times g$, 5 min, 15°C で遠心分離して得られた上清 $150\text{ }\mu\text{L}$ と MilliQ 水 $150\text{ }\mu\text{L}$ を混合し, 7.5% NaOH $\cdot 0.3\text{ mM}$ $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ $600\text{ }\mu\text{L}$ を加え, 孔径 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ のメンブレンフィルターでろ過したものをサンプルとした (Li *et al.*, 2010)。

Thiamine または TPP が, それぞれ $10\text{ }\mu\text{g}/\text{L}$, $100\text{ }\mu\text{g}/\text{L}$, $500\text{ }\mu\text{g}/\text{L}$ および $1000\text{ }\mu\text{g}/\text{L}$ になるように調製した水溶液を細胞破碎液と同様に処理したものを標品とした。

Thiamine 量および TPP 量の測定は、Prominence HPLC システム (Shimadzu Corp.) と蛍光検出器 (RF-10AXL, Shimadzu Corp.) を用いて行った。4.6 I.D. × 150 mm の COSMOSIL Packed Column 5C18-MS-II (nakalai tesque) を使用し、オーブン温度 40°C でカラム分離を行った。移動相 A は、25 mM Disodium hydrogenphosphate : Methanol (90 : 10 v/v) とし、移動相 B は 25 mM Disodium hydrogenphosphate : Methanol (30 : 70 v/v) とした。グラジエントステップは移動相 B の割合として、1 min 10% 保持、8 min で 75% まで上昇、0.1 min で 100%、まで上昇、4.9 min 100% 保持、0.1 min で 10% まで低下、6.9 min 10% 保持とした。分析は、流速 1.2 mL/min で行い、注入量は 20 μL とした。化合物は、励起波長 375 nm, 発光波長 435 nm で検出した (Lu and Frank, 2008)。

2-2-7. α -ketoisocaproic acid 脱炭酸酵素活性の測定

Vuralhan らの手法に従って、細胞抽出液の調製と、5 mM の α -ketoisocaproic acid を基質とした脱炭酸酵素活性の測定を行った (Vuralhan *et al.*, 2003)。反応液の組成は、15 mM Pyrazole, 2 mM MgCl₂, 2 mM NAD⁺, 100 mM Potassium phosphate buffer (pH 7.0), 1.75 U Aldehyde dehydrogenase (Sigma Aldrich), 5 mM α -ketoisocaproic acid, 無細胞抽出液および 0, 1 or 5 mM TPP とした。 α -ketoisocaproic acid の添加を反応開始時点として 30°C で 15 min 反応させ、340 nm の吸光度を測ることで生成 NADH 量を測定した。

細胞抽出液のタンパク質の濃度は Bradford 法によって測定した (Bradford, 1976)。

2-2-8. 統計解析

全ての統計解析は EZR (Kanda, 2013) を使用した。EZR は R (The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) および R コマンダーの機能を拡張した統計ソフトウェアである。本ソフトウェアを用いて Student's *t*-test で有意差検定を行った。

第 3 節 結果および考察

2-3-1. 培地中の YNB 濃度が $\Delta thi3$ の Isoamyl alcohol 生成へ与える影響

Isoamyl alcohol 生合成系において、推定 α -ケト酸脱炭酸酵素遺伝子として、*PDC1*, *PDC5*, *PDC6*, *ARO10*, *THI3* が報告された。*THI3* を破壊した株では、ロイシン培地において Isoamyl alcohol 生成量が顕著に減少することから、強い関与が示唆された (Dickinson *et al.*, 1997)。本研究においても、焼酎酵母 C4 株 (WT) において *THI3* 破壊株 ($\Delta thi3$) を構築し、再現実験を行った結果、当初は Dickinson *et al.* の報告と同様に Isoamyl alcohol 生成量の減少が認められた。しかし、培地に用いる YNB を新しいロットに変えることで、再現性が認められなかった。このことから、YNB の古いロットに含まれる成分の劣化により、Isoamyl alcohol 生成量の減少が生じた可能性が考えられた。

そこで、異なる YNB 濃度 (0.67%, 0.167%, or 0.0334%) のロイシン培地で WT と $\Delta thi3$ を培養し、Isoamyl alcohol 生成量を測定した。なお、酵母の Isoamyl alcohol 生成は、増殖と共に行われることが報告されている (Vidal *et al.*, 2015) ため Isoamyl alcohol 生成量測定は定常期で行った。また、YNB 濃度の違いによって酵母の増殖量が異なることから、Isoamyl alcohol 生成量は酵母濃度で除することで、単位酵母当たりの Isoamyl alcohol 生成量として求めた (Fig. 2-1)。新しいロットの YNB を用いた場合、一般的な使用濃度である YNB 0.67% のロイシン培地での培養では、WT と $\Delta thi3$ の Isoamyl alcohol 生成量に有意差はなかった。また、Dickinson らが用いた濃度である YNB 0.167% のロイシン培地での培養においても同様であり、*THI3* の破壊による Isoamyl alcohol 生成量の低下は確認できなかった。しかし、YNB 濃度が 0.0334% に低下したロイシン培地で培養した結果、 $\Delta thi3$ の Isoamyl alcohol 生成量は WT と比べて約 42% 有意に低下し、*THI3* の破壊による Isoamyl alcohol 生成

量の低下を確認できた。YNB は酵母の生育に必要なビタミンやミネラルの混合物であるため、ビタミンやミネラルの不足が $\Delta thi3$ の Isoamyl alcohol 生成量を低下させたと考えられる。

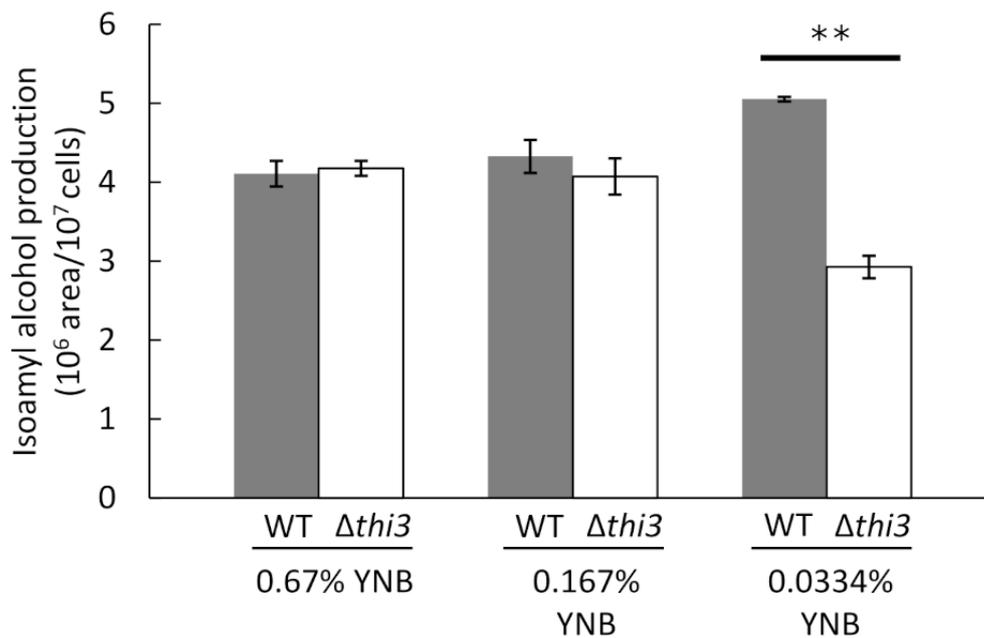


Fig. 2-1. Effect of Yeast Nitrogen Base without amino acids (YNB) concentration in the medium on isoamyl alcohol production by WT and Δ thi3 strains. WT and Δ thi3 strains were cultured in a medium with varying YNB concentrations till the stationary phase. The amount of isoamyl alcohol produced was determined by dividing the isoamyl alcohol concentration in the culture supernatant by the number of cells in the stationary phase. Error bars represent the standard deviation ($n = 3$). Statistical significance of the data was evaluated by Student's t -test (**; $p < 0.01$).

2-3-2. $\Delta thi3$ の Isoamyl alcohol 生成に影響を与える YNB 構成成分の探索

ロイシン培地の YNB 濃度を 0.0334% とすることで、 $\Delta thi3$ の Isoamyl alcohol 生成量が低下したことから、YNB に含まれるビタミンやミネラルは $\Delta thi3$ の Isoamyl alcohol 生成に影響を与えることが示唆された。

YNB 構成成分は、Ammonium Sulfate, Vitamins, Trace Elements および Salts の 4 つのカテゴリーに分類されている。そこで、栄養制限培地を用いて WT と $\Delta thi3$ を培養し、 $\Delta thi3$ の Isoamyl alcohol 生成量を低下させる成分の特定を試みた。定常期における WT および $\Delta thi3$ の単位菌体当たりの Isoamyl alcohol 生成量を Fig. 2-2A に示す。Ammonium Sulfate, Trace Elements および Salts の濃度を 0.0334% YNB 相当の濃度まで低下させた栄養制限培地では、WT と比べて $\Delta thi3$ の Isoamyl alcohol 生成量は低下しなかった。しかし、Vitamins の濃度を低下させた栄養制限培地では、YNB 0.0334% のロイシン培地と同様に $\Delta thi3$ の Isoamyl alcohol 生成量が WT の生成量より低下した。このことから、YNB に含まれるビタミンの不足が $\Delta thi3$ の Isoamyl alcohol 生成量低下を引き起こすと考えられた。

YNB に含まれるビタミンのなかで、 $\Delta thi3$ の Isoamyl alcohol 生成に影響を与える成分を特定するため、ビタミン制限培地で WT と $\Delta thi3$ を培養した。その結果について、定常期における WT および $\Delta thi3$ の単位菌体当たりの Isoamyl alcohol 生成量を Fig. 2-2B に示す。Biotin, Calcium Pantothenate, Folic acid, Inositol, Niacin, *p*-aminobenzoic acid, Pyridoxine hydrochlorid および Riboflavin は、添加量を 0.167% YNB のロイシン培地に含まれる濃度の 1/5 まで減らしても WT と $\Delta thi3$ の Isoamyl alcohol 生成量に顕著な差は生じなかった。しかし、Thiamine hydrochlorid の添加量を 1/5 相当まで減らすと、 $\Delta thi3$ Isoamyl alcohol 生成量が WT の生成量と比べて有意に低下した。

以上の結果より, チアミンの不足が $\Delta thi3$ の Isoamyl alcohol 生成量低下を引き起こす因子であることが確認された。

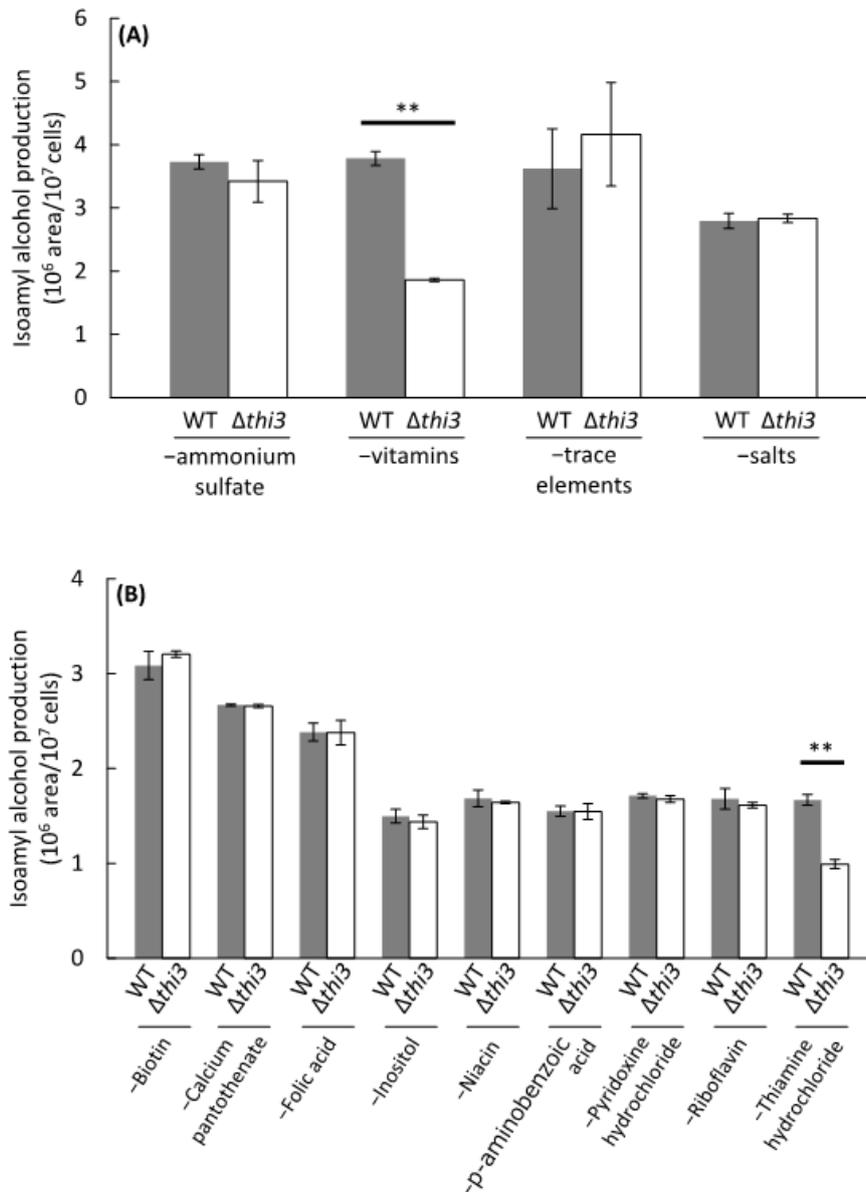


Fig. 2-2. Impact of Yeast Nitrogen Base without amino acids (YNB) components on isoamyl alcohol production. The amount of isoamyl alcohol produced was determined by dividing its concentration in the culture supernatant by the number of cells in the stationary phase. Error bars represent the standard deviation ($n = 3$). Statistical significance of the data was evaluated by Student's *t*-test (**; $p < 0.01$). (A) The effect of reduction in ammonium sulfate, vitamins, trace elements, and salts on isoamyl alcohol production. WT and $\Delta thi3$ strains were cultured to a stationary state in a medium containing one of the four categories mentioned above equivalent to 0.0334% YNB, while 0.167% YNB was used for the other categories. (B) Effect of reduction in vitamin levels on isoamyl alcohol production. WT and $\Delta thi3$ strains were cultured in a medium where one of the vitamins constituting YNB was adjusted to 0.0334% YNB while the other components remained at 0.167% YNB.

2-3-3. 培地 Thiamine 濃度が $\Delta thi3$ に与える影響

Thiamine の不足が $\Delta thi3$ の Isoamyl alcohol 生成量低下を引き起こす因子であることが確認されたことから、培地中の Thiamine 濃度の影響について検討した。

Thiamine 濃度の異なる培地で培養した WT および $\Delta thi3$ の増殖経過を Fig. 2-3 に示す。WT の増殖は Thiamine 濃度の影響をほとんど受けなかったが、 $\Delta thi3$ は培地中に Thiamine が含まれないときは生育できなかった。酵母の *THI3* 破壊株は、Glucose を炭素源とした Thiamine 非添加培地において生育できないことが報告されており (Mojzita and Hohmann, 2006), 本研究においても同様の結果が得られた。培地中の Thiamine 濃度が 40 $\mu\text{g/L}$ 以上の場合、 $\Delta thi3$ の増殖速度は WT と同程度まで増加し、定常期における濁度は Thiamine 濃度に比例して増加する傾向にあった。

各 Thiamine 濃度の培地で培養した WT および $\Delta thi3$ の定常期における酵母数を Fig. 2-4A に示す。WT では培地中の Thiamine 濃度に関わらず定常期における酵母数は同程度となったが、 $\Delta thi3$ では培地中の Thiamine 濃度が 60 $\mu\text{g/L}$ までは Thiamine 濃度依存的に酵母数が増加し、60 $\mu\text{g/L}$ 以上で WT と有意差が認められなかった。

各チアミン濃度で培養した WT および $\Delta thi3$ の定常期における単位菌体当たりの Isoamyl alcohol 生成量を Fig. 2-4B に示す。WT の Isoamyl alcohol 生成量は、チアミン濃度の影響を受けずほぼ一定であったが、 $\Delta thi3$ の Isoamyl alcohol 生成量は、培地中のチアミン濃度 40 $\mu\text{g/L}$ まではチアミン濃度依存的に増加したが、60 $\mu\text{g/L}$ 以降でほぼ一定となった。

酵母の Isoamyl alcohol 生成経路である Ehrlich 経路およびアミノ酸生合成経路は、どちらも α -ketoisocaproic acid から Isovaleraldehyde への脱炭酸を必要とする。

さらに、この脱炭酸に関与する脱炭酸酵素は、Thiamine diphosphate (TPP) 依存性であることが報告されている (Hohmann and Meacock, 1998)。TPP は細胞内の Thiamine を基質として生合成されるため、培地に含まれる Thiamine 濃度に対する細胞内 Thiamine および TPP の蓄積量と Isoamyl alcohol 生成の関連について調べた。

各 Thiamine 濃度の培地で定常期まで培養した WT および $\Delta thi3$ の細胞内 Thiamine および TPP 量を Fig. 2-4C および 2-4D に示す。WT の細胞内 Thiamine 量は、培地中の Thiamine 濃度が 40 $\mu\text{g/L}$ の場合低下が見られたものの、培地中の Thiamine 濃度の影響を受けずほぼ一定であった。一方、 $\Delta thi3$ の細胞内 Thiamine 量は、培地中の Thiamine 濃度依存的に増加し、培地中の Thiamine 濃度が 60 $\mu\text{g/L}$ 以上の場合にはほぼ一定の値となった。このことから、 $\Delta thi3$ の細胞内 Thiamine は細胞外からの取り込みに依存していることが示唆された。また、WT と $\Delta thi3$ の細胞内 Thiamine 量を比較すると、培地中の Thiamine 濃度が 40 $\mu\text{g/L}$ 以上の場合有意差が認められなかった。また、 $\Delta thi3$ の細胞内 Thiamine 量の推移は、酵母数の推移と類似したことから、 $\Delta thi3$ の増殖は細胞外から取り込んだ Thiamine 量に影響されることが示唆された (Fig. 2-4A and 2-4C)。

WT の細胞内 TPP 量の変化は、培地中の Thiamine 濃度が 40 $\mu\text{g/L}$ 時のみ低下するものの、培地 Thiamine 濃度の影響を受けずほぼ一定であり、この変化は細胞内 Thiamine 量の変化と同様であった (Fig. 2-4C and 2-4D)。一方、 $\Delta thi3$ の細胞内 TPP 量は、培地中の Thiamine 濃度が 40 $\mu\text{g/L}$ までは細胞内 Thiamine 量と同様に培地中の Thiamine 濃度依存的な増加が見られた (Fig. 2-4C and 2-4D)。しかし、培地中の Thiamine 濃度 60 $\mu\text{g/L}$ 以上の場合には、 $\Delta thi3$ の細胞内 Thiamine 量は WT と同程度で有意差は無かったが、TPP 量は WT と比べて半分

未満まで有意に低下した (Fig. 2-4C and 2-4D)。以前に, Thiamine から TPP へのリン酸化を触媒するチアミンピロホスホキナーゼ (TPK) 活性が, *THI3* の破壊によって低下することが報告されていることから (Nosaka *et al.*, 1993), $\Delta thi3$ は TPP 生成能が低下すると考えられる。よって, 培地中の Thiamine 濃度 60 $\mu\text{g/L}$ 以上においては $\Delta thi3$ の TPK 活性の低下が, 細胞内 TPP 量の有意な低下を引き起こしたと考えられた。

TPP は Isoamyl alcohol 生成に不可欠な α -ketoisocaproic acid から Isovaleraldehyde への脱炭酸を担う脱炭酸酵素の補酵素である (Hohmann and Meacock, 1998) ことから, 細胞内 TPP 量と Isoamyl alcohol 生成量には関連があると考えられる。 $\Delta thi3$ の Isoamyl alcohol 生成量が有意に減少もしくは減少傾向にあるのは, 培地 Thiamine 濃度が 0-20 $\mu\text{g/L}$ もしくは 60-100 $\mu\text{g/L}$ のときであり, このとき, $\Delta thi3$ の細胞内 TPP 量も WT より有意に低下した (Fig. 2-4B and 2-4D)。このことから, 細胞内 TPP の不足による α -ketoisocaproic acid 脱炭酸酵素活性の低下が $\Delta thi3$ での Isoamyl alcohol 生成量の低下を引き起こしている可能性が考えられる。

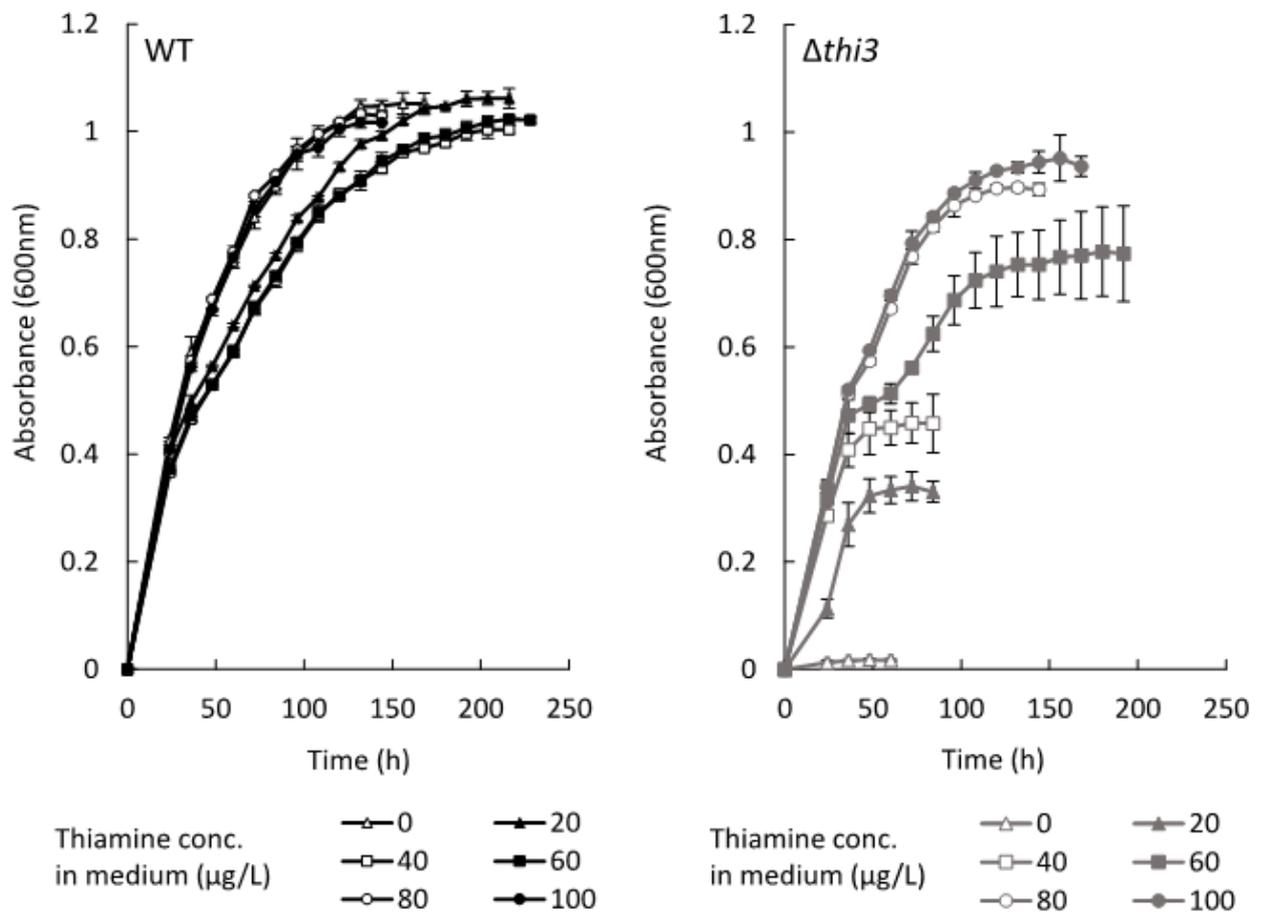


Fig. 2-3. Growth progress of WT and $\Delta thi3$ cultured in medium with varying thiamine concentrations. WT and $\Delta thi3$ strains were cultured in media containing different thiamine concentrations. The absorbance of the culture medium at 600 nm was measured every 12 hours, starting from 24 hours after the incubation was initiated. Error bars represent standard deviations ($n = 3$).

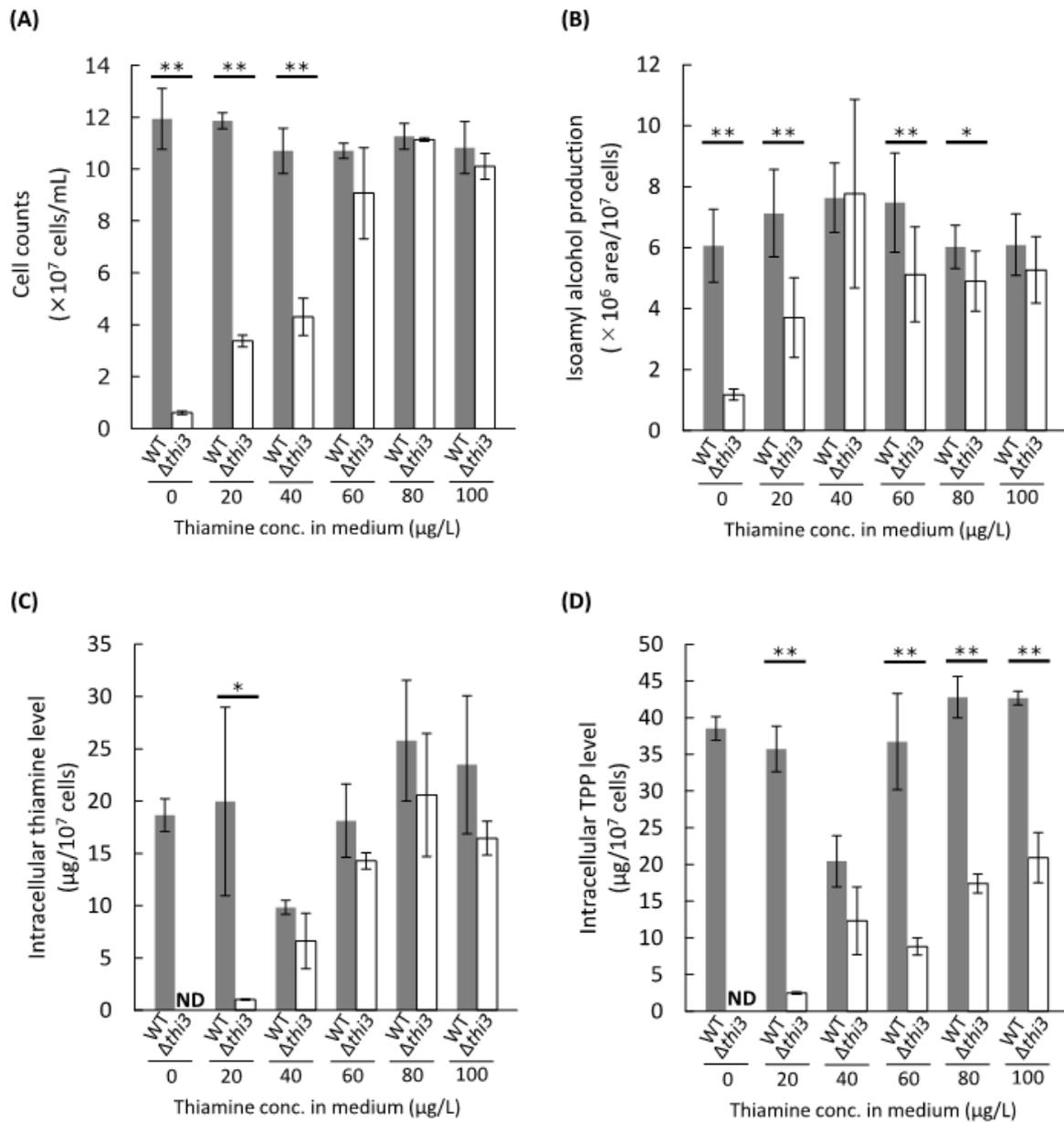


Fig. 2-4. The effect of thiamine concentration in the medium on WT and Δthi3 . (A) The cell counts of WT and Δthi3 strains were determined during the stationary state using a hemocytometer. (B) The amount of isoamyl alcohol produced by WT and Δthi3 was determined by dividing the amount of isoamyl alcohol in the supernatant by the cell counts at the stationary state. (C) The intracellular thiamine content in the cell extracts of WT and Δthi3 cultured to the stationary state was determined by measuring the amount of thiamine and normalizing it to the number of yeast cells. (D) Intracellular thiamine diphosphate (TPP) content in the cell extract of WT and Δthi3 cultured to the stationary state was determined by measuring the amount of TPP and normalizing it to the number of bacteria used for cell extraction. Error bars represent the standard deviation ($n = 3$). Statistical significance of the data was evaluated by Student's t-test (*; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$).

2-3-4. α -ketoisocaproic acid 脱炭酸酵素活性の測定

細胞内 TPP の不足が α -ketoisocaproic acid 脱炭酸酵素活性の低下を引き起こした可能性が考えられたことから、WT および $\Delta thi3$ の α -ketoisocaproic acid 脱炭酸活性を比較した。培地中のチアミン濃度 20 $\mu\text{g/L}$ で培養した WT と $\Delta thi3$ より細胞抽出液を調製し酵素活性を測定した。反応系に TPP を添加せず活性を評価したとき、 $\Delta thi3$ の α -ketoisocaproic acid 脱炭酸活性は WT の活性に比べて有意に低下した (Fig. 2-5A)。しかしながら、反応系に終濃度 1 mM の TPP を添加すると、WT では活性はほとんど変化しなかったが、 $\Delta thi3$ の活性は 5 倍以上に上昇し WT の活性と同程度となった。終濃度 5 mM の TPP 添加時の WT および $\Delta thi3$ の活性は 1 mM 添加時の活性とほとんど変化しなかった。培地中の Thiamine 濃度 20 $\mu\text{g/L}$ で培養した $\Delta thi3$ の α -ketoisocaproic acid 脱炭酸活性について、反応系への TPP の添加によって活性が WT と同程度まで上昇したことから、*THI3* の破壊によって活性自体が低下したのではなく、補酵素 TPP の不足が反応の律速になっていたものと考えられた。また、培地中の Thiamine 濃度を 100 $\mu\text{g/L}$ として培養した WT と $\Delta thi3$ の細胞抽出液の α -ketoisocaproic acid 脱炭酸活性について比較したところ、TPP 無添加条件では $\Delta thi3$ の活性は WT の活性と比べて減少傾向は見られたものの両者に有意差は認められず (Fig. 2-5B)、両者における Isoamyl alcohol 生成量での傾向と一致 (Fig. 2-4B) する結果であった。

Thiamine 生合成遺伝子の発現は、Thiamine 欠乏時に Thi3p と転写因子である Thi2p および Pdc2p が結合し複合体を形成することで誘導され、逆に Thiamine が過剰に存在するときは、Thi3p が Thiamine 代謝の最終代謝産物である TPP と結合し複合体形成が阻害されることで抑制される。すなわち、Thi3p は細胞内で TPP センサーとして、Thiamine 生合成遺伝子の発現調節に関与することが報告されている

(Nosaka *et al.*, 2005; Nosaka *et al.*, 2011)。 *THI3* を破壊しても WT と同程度の α -ketoisocaproic acid 脱炭酸酵素活性を示したことから、 α -ケト酸脱炭酸酵素をコードする遺伝子をすべて破壊し *THI3* のみ単独過剰発現した株に α -ケト酸脱炭酸酵素活性が認められなかったという報告 (Vuralhan *et al.*, 2003; Romagnoli *et al.*, 2012) を合わせると *THI3* が脱炭酸酵素をコードする遺伝子として Isoamyl alcohol 生成に関与するとは考えにくい。以上より *THI3* の破壊による Isoamyl alcohol 生成量の低下は、生育環境の Thiamine 量が少ないために細胞内 TPP が不足することによる α -ketoisocaproic acid 脱炭酸活性の低下が原因であり、Isoamyl alcohol 生合成における *THI3* の役割は、補酵素 TPP の供給を通じた脱炭酸活性の維持という間接的なものであると考えられた。

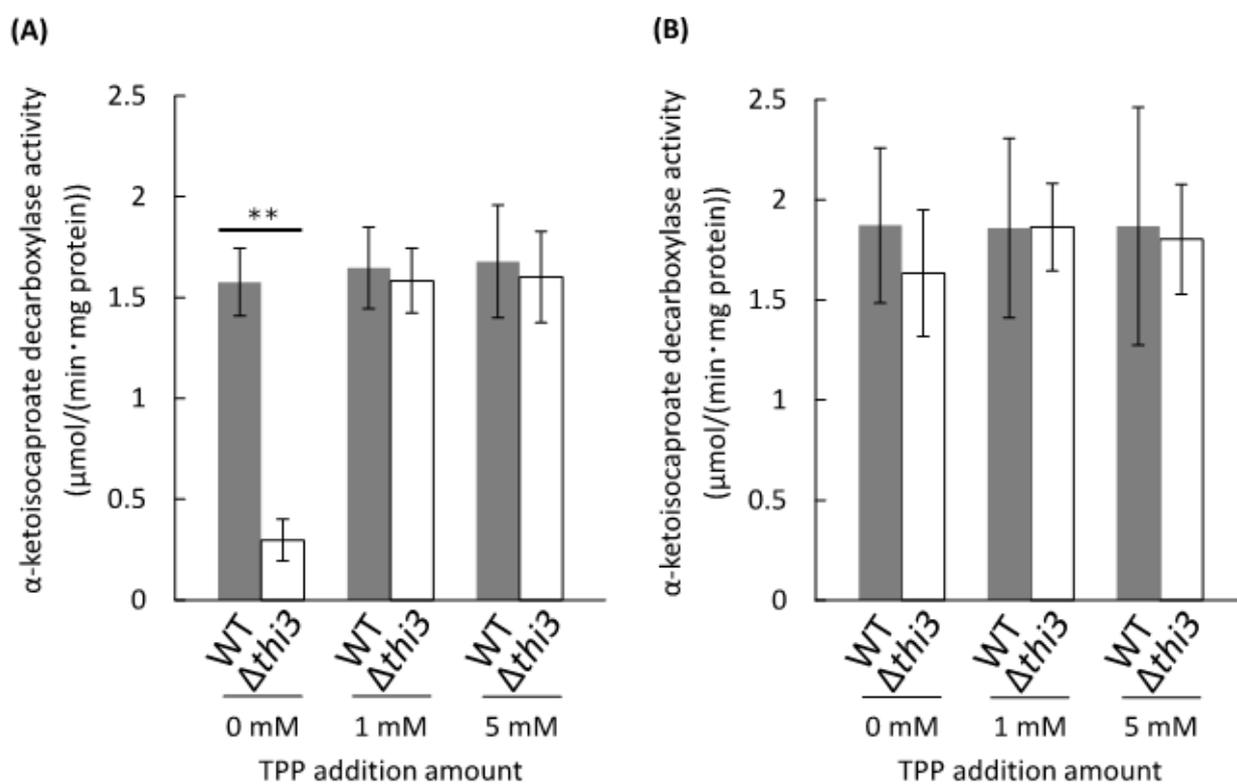


Fig. 2-5. Evaluation of the α -ketoglutaric acid decarboxylase activity in WT and Δ thi3 at (A) 20 μ g/L and (B) 100 μ g/L thiamine concentrations. The α -ketoglutaric acid decarboxylase activity of WT and Δ thi3 was evaluated when cultured to a stationary state in a medium containing 20 μ g/L to 100 μ g/L of thiamine. The activity was determined using the cell-free extracts and normalizing it to the amount of protein used in the reaction. Error bars represent the standard deviation ($n = 3$). Statistical significance of the data was evaluated by Student's t-test (**; $p < 0.01$).

第 4 節 小括

焼酎酵母 C4 株 (WT) とその *THI3* 破壊株 ($\Delta thi3$) を用いて, *THI3* の Isoamyl alcohol 生合成に対する役割を検討した。

ロイシン培地における $\Delta thi3$ の Isoamyl alcohol 生成量低下は, 培地 YNB 濃度の低下によって引き起こされることが確認され, YNB 構成成分の影響を個別に調査した結果, $\Delta thi3$ の Isoamyl alcohol 生成量に影響を与えていた因子は Thiamine であったことが明らかとなった。すなわち, *THI3* 破壊株の Isoamyl alcohol 生成量低下は生育環境のチアミン濃度が低いことで生じる現象であり, 過去に報告された *THI3* 破壊による Isoamyl alcohol 生成量への影響が一定でなかったのは, 生育環境のチアミン量が異なっていたからと考えられた。

低チアミン濃度の培地を用いて培養すると, $\Delta thi3$ の Isoamyl alcohol 生成量, 細胞内 Thiamine 量および細胞内 TPP 量が C4 と比べて低下した。また, このときの $\Delta thi3$ の細胞抽出液の α -ketoisocaproic acid 脱炭酸酵素活性も C4 の活性と比べて低下したが, 反応系に TPP を添加することで C4 と同程度まで回復することを確認した。

以上の結果より *THI3* は, Thiamine 生合成の調節や Thiamine から TPP を生成する TPK 活性の維持を通じて, 細胞内 Thiamine 量や TPP 量の恒常性を保ち, Isoamyl alcohol 生成に必要な脱炭酸反応の補酵素を安定供給するという間接的な関与によって, 生成量の維持に寄与すると考えられた。

参考文献

- 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).
- Bradford, M. M.:** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, **72**, 248–254 (1976).
- Cameleyre, M., Lytra, G., Tempere, S., and Barbe, J.-C.:** Olfactory impact of higher alcohols on red wine fruity ester aroma expression in model solution, *J. Agric. Food Chem.*, **63**, 9777–9788 (2015).
- Chen, E. C.-H.:** The relative contribution of Ehrlich and biosynthetic pathways to the formation of fusel alcohols footnote, *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **36**, 39–43 (1978).
- Dickinson, J. R., Eshantha, L., Salgado, J., and Hewlins, M. J. E.:** The catabolism of amino acids to long chain and complex alcohols in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.*, **278**, 8028–8034 (2003).
- Dickinson, J. R., Lanterman, M. M., Danner, D. J., Pearson, B. M., Sanz, P., Harrison, S. J., and Hewlins, M. J.:** A ¹³C nuclear magnetic resonance investigation of the metabolism of leucine to isoamyl alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.*, **272**, 26871–26878 (1997).
- Ehrlich, F.:** Über die Bedingungen der Fuselölbildung und über ihren Zusammenhang mit dem Eiweißaufbau der Hefe, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **40**, 1027–1047 (1907).
- Fujii, T., Nagasawa, N., Iwamatsu, A., Bogaki, T., Tamai, Y., and Hamachi, M.:** Molecular cloning, sequence analysis, and expression of the yeast alcohol

- acetyltransferase gene, *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 2786–2792 (1994).
- Fujiwara, D., Kobayashi, O., Yoshimoto, H., Harashima, S., and Tamai, Y.:** Molecular mechanism of the multiple regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* *ATF1* gene encoding alcohol acetyltransferase, *Yeast*, **15**, 1183–1197 (1999).
- 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 Res.*, **24**, 2519–2524 (1996).
- Hao, X., Xiao, D., and Zhang, C.:** Effect of YDL080C gene deletion on higher alcohols production in *Saccharomyces cerevisiae* haploids, *Wei Sheng Wu Xue Bao*, **50**, 1030–1035 (2010).
- Hohmann, S.:** Characterization of *PDC6*, a third structural gene for pyruvate decarboxylase in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Bacteriol.*, **173**, 7963–7969 (1991).
- Hohmann, S. and Meacock, P. A.:** Thiamin metabolism and thiamin diphosphate-dependent enzymes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: genetic regulation, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1385**, 201–219, (1998).
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., and Kimura, A.:** Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations, *J. Bacteriol.*, **153**, 163–168 (1983).
- Kanda, Y.:** Investigation of the freely available easy-to-use software ‘EZR’ for medical statistics, *Bone Marrow Transplant.*, **48**, 452–458 (2013).
- Kellermann, E., Seeboth, P. G., and Hollenberg, C. P.:** Analysis of the primary structure and promoter function of a pyruvate decarboxylase gene (*PDC1*) from *Saccharomyces cerevisiae*, *Nucleic Acids Res.*, **14**, 8963–8977 (1986).
- Li, M., Petteys, B. J., McClure, J. M., Valsakumar, V., Bekiranov, S., Frank, E. L.,**

- and Smith, J. S.:** Thiamine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* is regulated by the NAD⁺-dependent histone deacetylase Hst1, *Mol. Cell. Biol.*, **30**, 3329–3341 (2010).
- Lu, J. and Frank, E. L.:** Rapid HPLC measurement of thiamine and its phosphate esters in whole blood, *Clin. Chem.*, **54**, 901–906 (2008).
- Mojzita, D. and Hohmann, S.:** Pdc2 coordinates expression of the *THI* regulon in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Genet. Genomics.*, **276**, 147–61 (2006).
- Nishimura, H., Kawasaki, Y., Kaneko, Y., Nosaka, K., and Iwashima, A.:** A positive regulatory gene, *THI3*, is required for thiamine metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Bacteriol.*, **174**, 4701–4706 (1992).
- Nosaka, K., Esaki, H., Onozuka, M., Konno, H., Hattori, Y., and Akaji, K.:** Thiamin-dependent transcriptional induction by Pdc2 in *Saccharomyces cerevisiae*, *Vitamins (Japan)*, **85**, 538–546 (2011).
- Nosaka, K., Kaneko, Y., Nishimura, H., and Iwashima, A.:** Isolation and characterization of a thiamin pyrophosphokinase gene, *THI80*, from *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.*, **268**, 17440–17447 (1993).
- Nosaka, K., Onozuka, M., Konno, H., Kawasaki, Y., Nishimura, H., Sano, M., and Akaji, K.:** Genetic regulation mediated by thiamin pyrophosphate-binding motif in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Microbiol.*, **58**, 467–479 (2005).
- Romagnoli, G., Luttkik, M. A. H., Kötter, P., Pronk, J. T., and Daran, J.-M.:** Substrate specificity of thiamine pyrophosphate-dependent 2-oxo-acid decarboxylases in *Saccharomyces cerevisiae*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **78**, 7538–7548 (2012).
- Seeboth, P. G., Bohnsack, K., and Hollenberg, C. P.:** *pdc1*⁰ mutants of *Saccharomyces*

cerevisiae give evidence for an additional structural *PDC* gene: Cloning of *PDC5*, a gene homologous to *PDC1*, J. Bacteriol., **172**, 678–685 (1990).

Styger, G., Jacobson, D., Prior, B. A., and Bauer, F. F.: Genetic analysis of the metabolic pathways responsible for aroma metabolite production by *Saccharomyces cerevisiae*, Appl. Microbiol. Biotechnol., **1385**, 201–219 (2013).

Takamine, K., Yoshizaki, Y., Shimada, S., Takaya, S., Tamaki, H., Ito, K., and Sameshima, Y.: Estimation of the mechanism for cis and trans rose oxides formation in sweet potato shochu, J. Brew. Soc. Japan, **106**, 50–57 (2011).

ter Schure, E. G., Flikweert, M. T., van Dijken, J. P., Pronk, J. T., and Verrips, C. T.: Pyruvate decarboxylase catalyzes decarboxylation of branched-chain 2-Oxo acids but is not essential for fusel alcohol production by *Saccharomyces cerevisiae*, Appl. Environ. Microbiol., **64**, 1303–1307 (1998).

Vidal, E. E., de Morais Jr, M. A., François, J. M., and de Billerbeck, G. M.: Biosynthesis of higher alcohol flavour compounds by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: impact of oxygen availability and responses to glucose pulse in minimal growth medium with leucine as sole nitrogen source, Yeast, **32**, 47–56 (2015).

Vuralhan, Z., Morais, M. A., Tai, S.-L., Piper, M. D. W., and Pronk, J. T.: Identification and characterization of phenylpyruvate decarboxylase genes in *Saccharomyces cerevisiae*, Appl. Environ. Microbiol., **69**, 4534–4541 (2003).

Wu, L., Wen, Y., Chen, W., Yan, T., Tian, X., and Zhou, S.: Simultaneously deleting *ADH2* and *THI3* genes of *Saccharomyces cerevisiae* for reducing the yield of acetaldehyde and fusel alcohols, FEMS Microbiol. Lett., **368**, fnab094 (2021).

第 3 章 二倍体焼酎酵母の対立遺伝子破壊法

第 1 節 緒言

焼酎や清酒製造において、酵母はアルコールや香気成分の生産を担う重要な存在である。そのため、より高いアルコール度数や吟醸香などの特徴的な風味を生み出すために、酵母の育種が試みられてきた (Hashimoto *et al.*, 2005; Ohdate *et al.*, 2018)。清酒酵母の育種では、UV 照射や変異原処理によって得られた変異株から目的の性質を持つ酵母を選抜している。しかし、これらの変異株を得る方法は膨大なスクリーニングを必要とし、好ましくない変異が生じる可能性もある。一方、特定の遺伝子をターゲットにした遺伝子組換え法は、より確実な変異株取得法であるが、清酒酵母や焼酎酵母を含む多くの産業利用酵母は 2 倍体であり、両対立遺伝子に破壊を導入するには手間と時間がかかる。第 2 章で実践した通り、2 倍体焼酎酵母の遺伝子破壊では、形質転換に加えて、得られたヘテロ破壊株からの孢子形成、孢子の単離、さらに単離した孢子由来の自己二倍体化破壊株の選抜と複数のプロセスを経る必要があった。しかし、これは焼酎酵母がホモタリック株であり孢子形成能を有しているから行えた手法であり、全ての産業利用株に適用できる手法ではない。実際に、清酒酵母は孢子形成能が低いため (Nakazawa *et al.*, 1992) 本手法を適用できない。

橋本らは、2 倍体の清酒酵母から UV 照射により栄養要求性株を単離したことを報告した (Hashimoto *et al.*, 2005)。彼らは、約 3000 のコロニーをスクリーニングすることにより、5 つの清酒酵母株から His, Met, Lys, Trp, Leu, Arg および Ura の栄養要求性株を単離した。この二倍体清酒酵母で観察された高い変異株取得率は、DNA の組換えと修復の過程でヘテロ接合性の変異座位がホモ接合性になるヘテロ接合性の消失 (LOH: loss of heterozygosity) に起因すると考えられた。また、小高らは、二倍体清酒酵母において、二段階の形質転換と LOH を用いた遺伝子破壊手法を報告

した (Kotaka *et al.*, 2009)。

酵母では, PCR を利用した遺伝子ターゲティングが確立されており, PCR で増幅したマーカー遺伝子を 30–45 bp の標的遺伝子配列で挟んで形質転換に用いることができる (Baudin *et al.*, 1993)。しかし, マーカー遺伝子の数が限られているため, 遺伝子ターゲティングを繰り返すためには, 用いたマーカーを除去するマーカーリサイクルが必要である。その試みの一つとして, 細菌の *hisG* 配列に挟まれた *URA3* のような逆選択性マーカーが, マーカーリサイクルに用いられた例がある (Alani *et al.*, 1987)。この方法では, *URA3* は 2 つの *hisG* 部位間の組換えによって除去することができ, 結果として生じた株を 5-Fluoroorotic acid (5-FOA) プレートで選抜することができる。また, *loxP* 配列に挟まれたマーカー遺伝子をマーカーリサイクルに用い, Cre リコンビナーゼの存在下, 2 つの *loxP* 部位で組換えを行うことでマーカー遺伝子を除去することもできる (Güldener *et al.*, 1996)。*hisG* や *loxP* のような 2 つの反復配列に挟まれたマーカー遺伝子を含むカセットをマーカーリサイクルに用いると, マーカー遺伝子を除去した後も反復配列が染色体上に残る。このため, リピート配列のゲノムコピーが増加し, マーカー遺伝子のミスターゲットや予期せぬ染色体再配列を引き起こす可能性がある。この問題を解決するために, 赤田らは PCR を介したシームレスな遺伝子破壊とマーカーリサイクル法を開発している (Akada *et al.*, 2006)。しかし, これら遺伝子操作法は主に実験室株で開発, 使用されているが, 産業利用株ではあまり使用されていない (Takahashi *et al.*, 2017a; Takahashi *et al.*, 2017b; Fukuda and Takeuchi, 2022)。

第 1 章 第 3 節で示した高級アルコールの例のように, 酵母の香気成分生成には, 未だ明らかにされていない関連遺伝子の存在や, 正しく機能を理解されていない遺伝子が存在する。これらについて, 実際に利用される産業利用株を用いて機能を解明し, 酒類を代表とする製品へ与える効果を直接的に確認することは非常に有用

である。そのためには、上述した、マーカーリサイクルといった遺伝子工学的手法を産業利用株にも適応可能にすることが求められる。

本章では、一回の形質転換で 2 つの対立遺伝子を破壊する方法を用いて、形質転換後に選択培地で培養することにより、2 つの対立遺伝子が破壊された株を得た。本方法で使用した遺伝子破壊カセットは、焼酎酵母の遺伝子から PCR によって構築したものであるため、得られた菌株はセルフクローニング株であり、工業的焼酎生産に使用可能である。

第 2 節 実験方法

3-2-1. 使用菌株および培地

鹿児島工業技術センターから分与された焼酎酵母である鹿児島 2 号 (K2) を培養および破壊株の構築に使用した。本研究で使用および構築した株を Table 3-1 に示す。

YPD 培地は, Glucose 2% (w/v), HYPOLYPEPTONE 2% (w/v) および Yeast Extract 1% (w/v) を含む水溶液をオートクレーブ滅菌したものとした。SD プレートは, Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids 0.67% (w/v) を含む水溶液および Glucose 2% (w/v), 2% (w/v) Agar を含む水溶液をそれぞれオートクレーブ滅菌し, 約 60°C で混合したものを用いた。また, SD 培地には必要に応じて, 3 g/L Lysine 1mL, 2 g/L Uracil 1 mL, 10 g/L Leucine 0.6 mL および 10 g/L Histidine 0.2 mL を培地 100 mL に対して加えた。*kanMX* を含む遺伝子破壊カセットで形質転換した株の選抜は, 200 µg/mL G418 を含む YPD プレート上で行った。*ura3* または *lys5* 株のカウンターセレクションには, 5-FOA プレート (Glucose 2% [w/v], Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids 0.67% [w/v], -Ura Do supplement (Clontech) 0.077% [w/v], 5-Fluoroorotic acid (5-FOA) 0.1% [w/v], Uridine 0.01% [w/v], Agar 2% [w/v]), または α -AA プレート (Glucose 2% [w/v], Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids and Ammonium Sulfate 0.17% [w/v], lysine 1 mM, inositol 0.4 mM, dl- α -amino adipic acid (α -AA) 0.2% [w/v]) を用いた。5-FOA プレートは, Agar 以外の試薬を半量の脱塩水に溶解し濾過滅菌した後, 同量のオートクレーブした Agar 溶液と約 80°C で混合し調製した。 α -AA プレートは, 4% α -AA 溶液 (1 M KOH で pH 6.0 に調整) をフィルター滅菌し, Agar およびその他の試薬を含むオートクレーブ処理した溶液と約 60°C で混合し調製した。

Table 3-1. Yeast strains.

Strain	Genotype	Reference
K2	<i>URA3/URA3 LYS5/LYS5 LEU2/LEU2 HIS3/HIS3</i>	Mori <i>et al.</i> , 2017
ura3sΔkanMX	<i>URA3/ura3::kanMX</i>	This study
ura3dΔ	<i>ura3/ura3</i>	This study
ura3lys5dΔ	<i>ura3/ura3 lys5/lys5</i>	This study
leu2sΔ	<i>ura3/ura3 lys5/lys5 LEU2/leu2::ura3^{5'}-LYS5-ura3^{3'}</i>	This study
leu2dΔ	<i>ura3/ura3 lys5/lys5 leu2::rURA3r/leu2::ura3^{5'}-LYS5-ura3^{3'}</i>	This study
leu2sL1	<i>ura3/ura3 lys5/lys5 leu2::ura3r/leu2::ura3^{5'}-LYS5-ura3^{3'}</i>	This study
leu2sL2	<i>ura3/ura3 lys5/lys5 leu2::ura3r/leu2::rURA3r HIS3/HIS3</i>	This study
leu2dL	<i>ura3/ura3 lys5/lys5 leu2::ura3r/leu2::ura3r</i>	This study
his3sΔleu2dL	<i>ura3/ura3 lys5/lys5 leu2::ura3r/leu2::ura3r HIS3/his3::ura3^{5'}-LYS5-ura3^{3'}</i>	This study
his3dΔleu2dL	<i>ura3/ura3 lys5/lys5 leu2::ura3r/leu2::ura3r his3::rURA3r/his3::ura3^{5'}-LYS5-ura3^{3'}</i>	This study
his3sL1leu2dL	<i>ura3/ura3 lys5/lys5 leu2::ura3r/leu2::ura3r his3::ura3r/his3::ura3^{5'}-LYS5-ura3^{3'}</i>	This study
his3sL2leu2dL	<i>ura3/ura3 lys5/lys5 leu2::ura3r/leu2::ura3r his3::ura3r/his3::rURA3r</i>	This study
his3dLleu2dL	<i>ura3/ura3 lys5/lys5 leu2::ura3r/leu2::ura3r his3::ura3r/his3::ura3r</i>	This study

3-2-2. *ura3::kanMX/URA3* ヘテロ破壊株の構築

K2 で *ura3::kanMX/ura3* ヘテロ接合対立遺伝子を構築するために, *URA3* 対立遺伝子の一方をカナマイシン耐性遺伝子を含む *kanMX* カセットで置換した。45 bp の K2*URA3* 配列で挟まれた *kanMX* カセットは, pUG6 (Güldener *et al.*, 1996) をテンプレートとして, プライマー K2*URA3*-D3+ および K2*URA3*-D3- を用いた PCR で増幅した。増幅された *kanMX* カセットを, 酢酸リチウム法 (Ito *et al.*, 1983) にて K2 に導入し, 形質転換体を G418 を含む YPD プレート上で選抜し, *ura3::kanMX/ura3* ヘテロ接合対立遺伝子を持つ株をプライマー K2*URA3*-5'2+ および K2*URA3*-3'- を用いた PCR で確認した (Fig. 3-2B)。用いたプライマーは Table 3-2 に示す。

Table 3-2. Primers used in this study.

Primer	Sequence
K2URA3-D3+	GATATTCATAAATAATGTAATTCTATATATGTTAATTACCTTTTC AGCTGAAGCTTCGTACGC
K2URA3-D3-	CTAATTTGTGAGTTTAGTATACATGCATTTACTTATAATACAGTT GCATAGGCCACTAGTGGATCTG
K2URA3-5'2+	TTTCATTGACCGAATCAGAG
K2URA3-3'-	GTTGAGTGCAATCGTAGGAC
K2URA3-5'-3+	CAATGCATCAATCCGTGTAA
K2URA3-5'-3-	TATTTATGAAATATCATCATTATCTCTTAGCATCTTTAATCCTTT TCTACATCAG
K2URA3-3'-3+	CTAAGAGATAATGATGATATTCATAAATATGCATGTATACTAA ACTCAC
K2URA3-3'-3-	AAACATCTTTCTACCAGATT
K2URA3-O+	AGTAATATTGCCGCCTCTGT
K2URA3-O-	CAGAAGGATCCCCACCTATG
K2LYS5-5'-4+	CTTCGATCTTTTCCCTGCTT
K2LYS5-5'-4(3) -	GTCTATCGATTACATAAATGTGAGCAAGCGGCGGTTTTAATAA GCGCCCG
K2LYS5-3'-4+	CGCTTGCTCACATTTATGTAATCGATAGACTCTTATTACTGTTT GAACTT
K2LYS5-3'-4-	TGTTTCTAAGTGCCAACGAC
K2LYS5-O+	TATTAGCATCGCTGCCGTTT
K2LYS5-O-	GCTTCCCTCTTCACATCAGG
c-ura3-5'+	GTAATTCTATATATGTTAATTACC
c-ura3-5'-	GCAATGTCAACAGTACCCTT
c-LYS5+	AGAATATACTAAGGGTACTGTTGACATTGCACTAAAATGAGA ATGAGGAG
c-LYS5-	CAGTTGGGTAAAGAATACTGGGCAATTTACATTATAAACCAT CATTTTCG
c-ura3-r+	ATGCGGCCAGCAAAACTAAAGCGAGGCATATTTATGGTGAAG
c-ura3-3'-	CCAATCTAAGTCTGTGCTCC
c-ura3-3'+	CCCAGTATTCTTAACCCAACTG
c-ura3-3'-	TTTAGTTTTGCTGGCCGCATCTTCTCAAATATGCTTCCCAGCC
K2LEU2D+	CAAGGATATAACCATTCTAATGTCTGCCCTAAGAAGATCGTCG TTGTAATTCTATATATGTTAATTACC
K2LEU2D-	CCCTATGAACATATTCCATTTTGTAATTCGTGTCGTTTCTATTA CAGTTTTTTAGTTTTGCTGGCCG
K2LEU2-1+	GGAATACTCAGGTATCGTAAG
K2LEU2-1-	GAACTTTCACCATTATGGGA
K2ADE2D+	CAAGTATGGATTCTAGAACAGTTGGTATATTAGGAGGGGGAC AATGTAATTCTATATATGTTAATTACC
K2ADE2D-	TTCGTAACCGACAGTTTCTAACTTTTGTGCTTTGACAAGAACT TCCAGTTTTTTAGTTTTGCTGGCCG
K2ADE2+	AACAAGAAAATCGGACAAAA

K2ADE2-	GGACACCTGTAAGCGTTGAT
K2HIS3D+	GCAGGCAAGATAAACGAAGGCAAAGATGACAGAGCAAAAA GCCGTAATTCTATATATGTTAATTACC
K2HIS3D-	CGTATGCTGCAGCTTTAAATAATCGGTGTCATTACATAAGAAC ACCAGTTTTTTAGTTTTGCTGGCCG
K2HIS3+	GCGATTGGCATTATCACATA
K2HIS3-	CGCCTCGTTCAGAATGACAC

3-2-3. LOH 頻度の測定

LOH 頻度は、*ura3::kanMX/URA3* ヘテロ対立遺伝子を持つ株を用いて調べた。この株を 10 mL の YPD 培地で 30°C, 24 時間振とう培養した後、21000×g, 5 s, 室温で遠心分離して上清を除き、細胞を滅菌水に懸濁して 1.0×10^3 - 1.0×10^7 cells/mL の細胞懸濁液を調製した。細胞懸濁液より、 1.0×10^2 cells および 1.0×10^6 cells をそれぞれ YPD プレートおよび 5-FOA プレートにプレーティングし、30°C で 2 日間培養した。プレーティング後の細胞にクリーンベンチ中で UV を 0 s, 45 s, もしくは 3 min 照射し、LOH に対する UV の影響も調べた。30°C で 2 日間培養後、YPD プレート上のコロニー数から細胞生存率を算出し、細胞生存率と 5-FOA プレート上のコロニー数から LOH 頻度を算出した。

3-2-4. 破壊カセットの構築

遺伝子破壊カセット構築の概要を Fig. 3-1 に示し、使用したプライマーを Table 3-2 に示す。*URA3* の 5'-領域 (*ura3-5'*; -328-515 bp) および 3'-領域 (*ura3-3'*; -58-782 bp) を、それぞれプライマー *c-ura3-5'+/c-ura3-5'-* および *c-ura3-3'+/c-ura3-3'-* を用いて、K2 のゲノム DNA を鋳型として増幅した。さらに、プライマー *c-ura3-r+* および *c-ura3-r-* を用いて増幅した *URA3* の 5'-領域 (*ura3r*; -298--99 bp) 断片を、プライマー *c-ura3-3'+* および *c-ura3-r-* を用いたフュージョン PCR により *ura3-3'* 断片の 3' 末端に連結し、*ura3-3'(r)* とした。*LYS5* は、プライマー *c-LYS5+* および *c-LYS5-* を用い、K2 のゲノム DNA を鋳型として増幅した。*ura3-5'* 断片と *LYS5* 断片、さらに *LYS5* 断片と *ura3-3'(r)* 断片を、プライマー *c-ura3-5'+/c-LYS5-* および *c-LYS5+/c-ura3r-* をそれぞれ用いて PCR により連結し、それぞれ *ura3-5'-LYS5* 断片および *LYS5-ura3-3'(r)* 断片を形成した。最後に、*ura3-5'-LYS5* および

LYS5-ura3-3'(r) を鋳型としてフュージョン PCR を行い、破壊カセットのベースとなる disruption base fragment を構築した。この disruption base fragment を鋳型として、*c-ura3-5'+* および *c-ura3-r-* の 5'領域に標的遺伝子配列に相同な 45 塩基の配列を付加したプライマーで増幅し破壊カセットを構築した。

3-2-5. 統計解析

統計解析は、第 2 章 第 2 節の 2-2-8 に記載したものと同様の方法で行った。

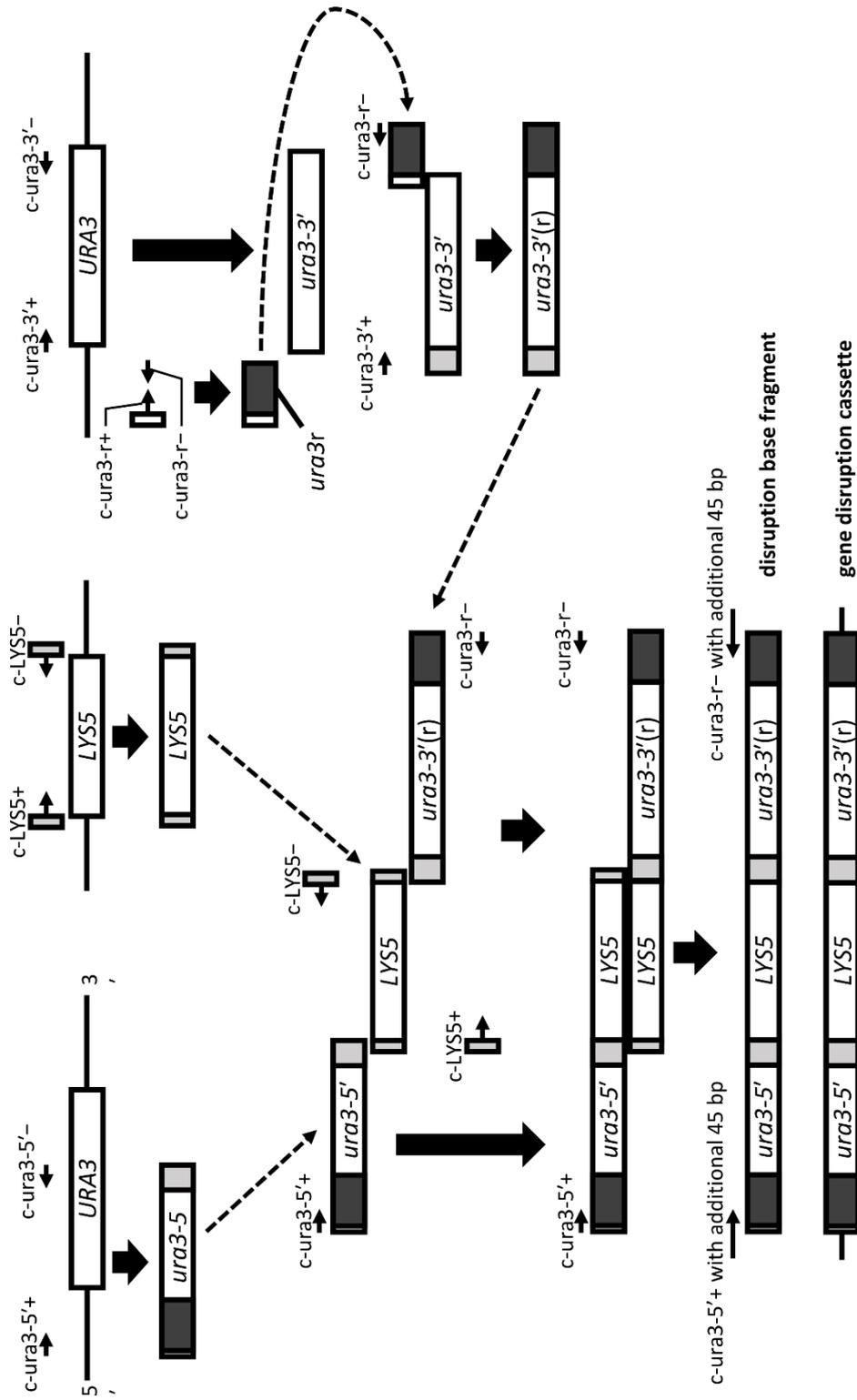


Fig. 3-1. Construction of disruption cassette. The disruption cassette consists of a functional *LYS5* flanked by nonfunctional *URA3* gene fragments truncated at the 3'- or 5'-region. Each nonfunctional *URA3* fragment contains a 573 bp (-58 to 515) overlapping region, which forms a tandem repeat within the cassette (inner tandem repeat). The disruption cassette also contains additional tandem repeats (outer tandem repeats located at both ends of the cassette). The disruption cassette was constructed by fusion PCR of *ura3-5'*, *LYS5*, *ura3-3'*, and *ura3r* DNA fragments.

第 3 節 結果および考察

3-3-1. 焼酎酵母 K2 における LOH 頻度

K2 における LOH 頻度を調べるために、*URA3* のヘテロ接合対立遺伝子 (*ura3::kanMX/URA3*) を保有する K2 を構築した。この株を YPD 培地で 24 時間振とう培養した後、ホモ接合対立遺伝子 (*ura3::kanMX/ura3::kanMX*) を持つ株を 5-FOA プレート上で選択し、LOH 頻度を算出した (Fig. 3-2A, 3-2B)。*URA3* は orotidine-5'-phosphate (OMP) 脱炭酸酵素をコードし、Ura3p は 5-FOA を毒性化合物である 5-fluorouracil に変換するため、5-FOA による *URA3* 対立遺伝子欠損の選択が可能である (Boeke *et al.*, 1987)。以前、UV 照射が *Candida albicans* の LOH 頻度を増加させることが報告された (Takagi *et al.*, 2008)。そこで、UV 照射による K2 の生存率および LOH 頻度に対する影響を調べた。その結果、UV 照射の有無にかかわらず、5-FOA プレート上で多数のコロニーが得られた。45 秒間の UV 照射では生存率に有意差は認められなかったが、3 分間照射すると、生存率は照射しない場合の 30% まで低下した (Fig. 3-2C)。*Candida albicans* で観測された結果と異なり、K2 の LOH 頻度は UV 照射によって増加しなかった (Fig. 3-2D)。さらに、UV 非照射条件下での K2 の LOH 頻度 (約 4.5×10^{-5}) は、清酒酵母における UV 非照射条件下の LOH 頻度 (1.1×10^{-5} - 1.1×10^{-4}) (Kotaka *et al.*, 2009) の範囲内であり、*Saccharomyces cerevisiae* では UV 照射無しでも一定頻度で LOH が起きると考えられた。

また、5-FOA プレート上に形成されたコロニーの標的遺伝子についてホモ型に破壊されているかをコロニー PCR で調べた。アガロースゲル電気泳動の結果、UV 照射あるいは非照射のプレートから得られた 10 コロニーすべてが約 2 kb の単一バンドを示し、これは *kanMX* カセットのサイズと一致した (Fig. 3-3)。このことは、5-FOA

耐性の表現型が LOH による *URA3* の欠損によって獲得されたことを示している。また, UV 照射したプレート上では非常に小さなコロニーが多数見られ, これは UV 照射が不要な変異を導入することを示唆している。従って, K2 においては, LOH 頻度を高めるための UV 照射は行わないこととした。

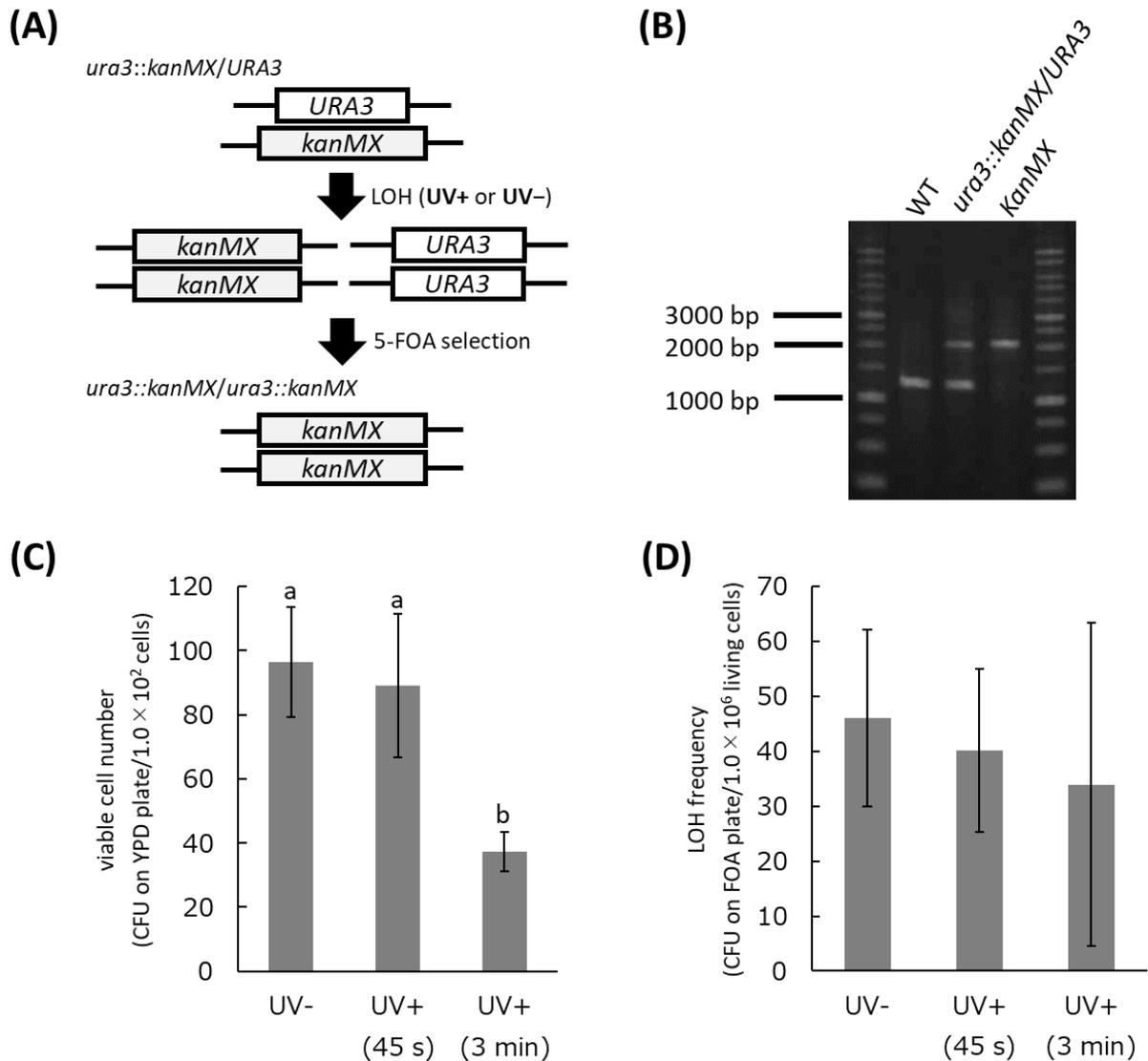


Fig. 3-2. LOH frequencies after UV irradiation in shochu yeast. (A) Detection of LOH frequencies using shochu yeast with the *ura3::kanMX/URA3*. (B) Confirmation of *URA3* loci by colony PCR. The *URA3* locus of WT (*URA3/URA3*), heterozygous (*ura3::kanMX/URA3*), and *URA3* null (*ura3::kanMX/ura3::kanMX*) strains was amplified by PCR and confirmed by agarose gel electrophoresis. (C) The number of living cells with/without UV irradiation. Shochu yeast was cultured in YPD liquid medium at 30°C for 24 h and plated on YPD plates, followed by UV irradiation or non-irradiation. The number of living cells was obtained from the number of colonies formed after incubation at 30°C. Error bars indicate standard deviations. Significant differences by one-way ANOVA and Bonferroni's multiple comparisons are indicated by different letters ($p < 0.05$). (D) LOH frequency in shochu yeast with/without UV irradiation. Shochu yeast was cultured in YPD liquid medium at 30°C for 24 h and plated on a 5-FOA plate, followed by UV irradiation or non-irradiation. LOH frequency was calculated from the number of colonies formed on a 5-FOA plate per living cells. Error bars indicate standard deviations. Statistical analysis by one-way ANOVA at a significance level of 0.05 showed no significant differences among the groups.

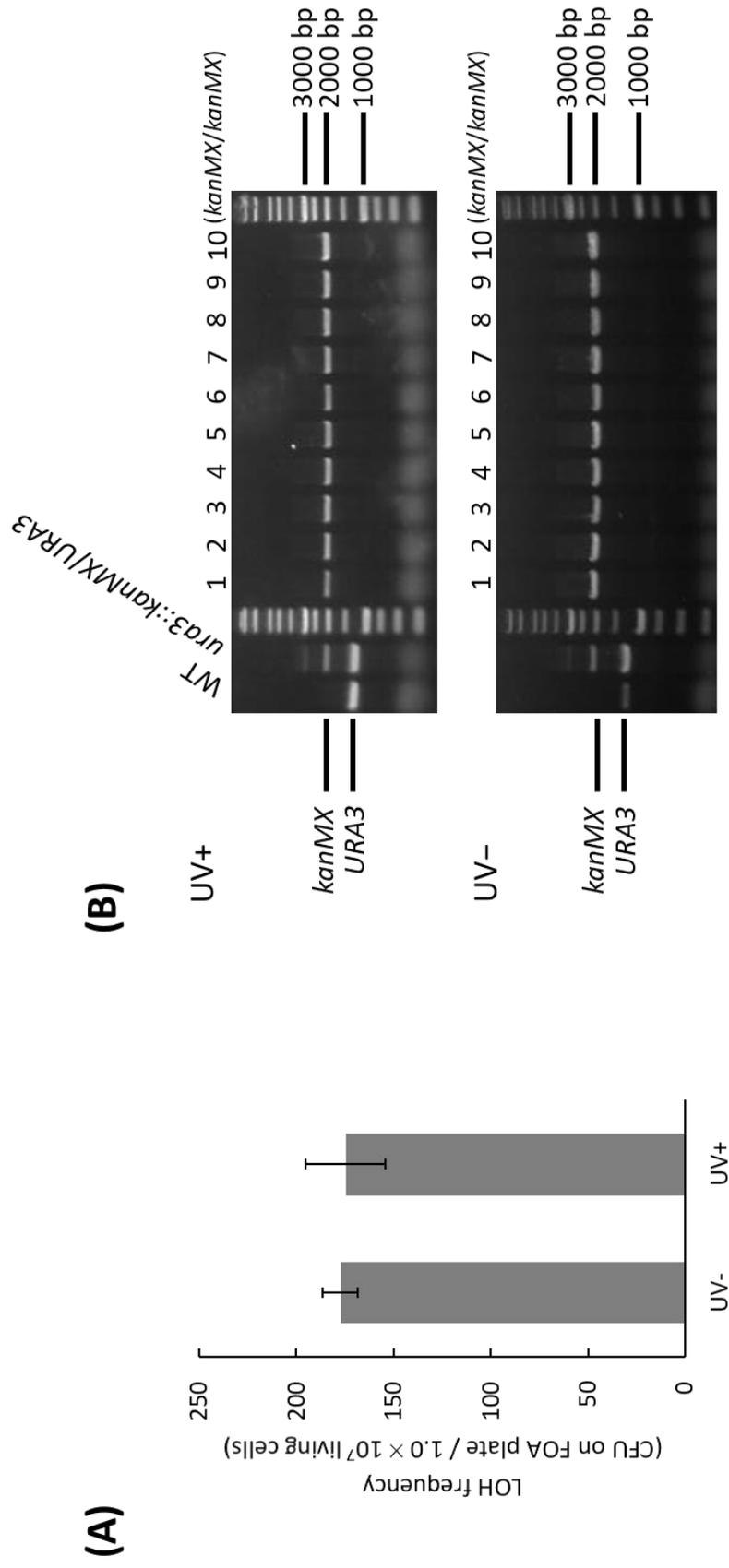


Fig. 3-3 Confirmation of LOH in shochu yeast. (A) LOH frequency in the shochu yeast K2 strain with/without UV irradiation. Shochu yeast harboring the *ura3::kanMX/URA3* heterozygous allele was cultured in YPD liquid medium at 30°C for 24 h and plated on a YPD or 5-FOA plate, followed by UV irradiation (45 s) or non-irradiation. The LOH frequency was calculated from the number of colonies on the 5-FOA plate with respect to the number of viable cells that grew on the YPD plate. (B) Confirmation of LOH by colony PCR. The *URA3* locus of each colony formed on a 5-FOA plate with/without UV irradiation was examined by colony PCR and compared with WT and the *ura3::kanMX/URA3* heterozygous strain.

3-3-2. セルフクローニングによる K2 の *URA3* および *LYS5* 二重破壊株の構築

K2 のゲノム DNA を鋳型として *URA3* の 5'-および 3'-フランキンク領域を PCR で増幅した。*URA3* 破壊カセットを構築するために、これらの増幅断片をプライマー K2URA3-5'-3+ および K2URA3-3'-3- を用いたフュージョン PCR によって連結した。K2 を *URA3* 破壊カセットで形質転換し、YPD プレート上で 30°C, 3 日間培養後、5-FOA プレート上でレプリカプレーティングを行い、形質転換体を得た (Fig. 3-4A)。*URA3* 破壊株 (*ura3Δ:ura3/ura3*) は、プライマー K2URA3-O+ および K2URA3-O- を用いたコロニー PCR と、Uracil 要求性の両方によって確認された (Fig. 3-4B, 3-4C)。同様に、*LYS5* の 5'-および 3'-フランキンク領域は、プライマー K2LYS5-5'-4+/K2LYS5-5'-4(3)- および K2LYS5-3'-4+/K2LYS5-3'-4- を用いた PCR によってそれぞれ増幅され、増幅された断片をプライマー K2LYS5-5'-4+ および K2LYS5-3'-4- を用いたフュージョン PCR によって連結することで *LYS5* 破壊カセットを構築した。*ura3Δ* を *LYS5* 破壊カセットで形質転換し、YPD プレート上で 30°C, 3 日間インキュベートした後、 α -AA プレート上にレプリカプレーティングして形質転換体を得た (Fig. 3-4)。5-FOA プレートを用いた *URA3* のカウンターセレクションと同様に、*LYS5* 欠損株は α -AA プレートでカウンターセレクションできることが報告されている (Ito-Harashima and McCusker, 2004)。*URA3-LYS5* 二重破壊株 (*ura3Δlys5Δ:ura3/ura3 lys5/lys5*) は、プライマー K2LYS5-O+ および K2LYS5-O- を用いたコロニーPCR および Uracil-Lysine 要求性により確認された (Fig. 3-4B, 3-4C)。用いたプライマーを Table 3-2 に示し、各ステップの選択プレート上でのコロニー形成頻度と求めるコロニーの割合を Table 3-3 に示した。10⁷ cells 当りに求める株がほぼ確実に取得できるため、実用的な頻度で破壊株を取得できると考える。

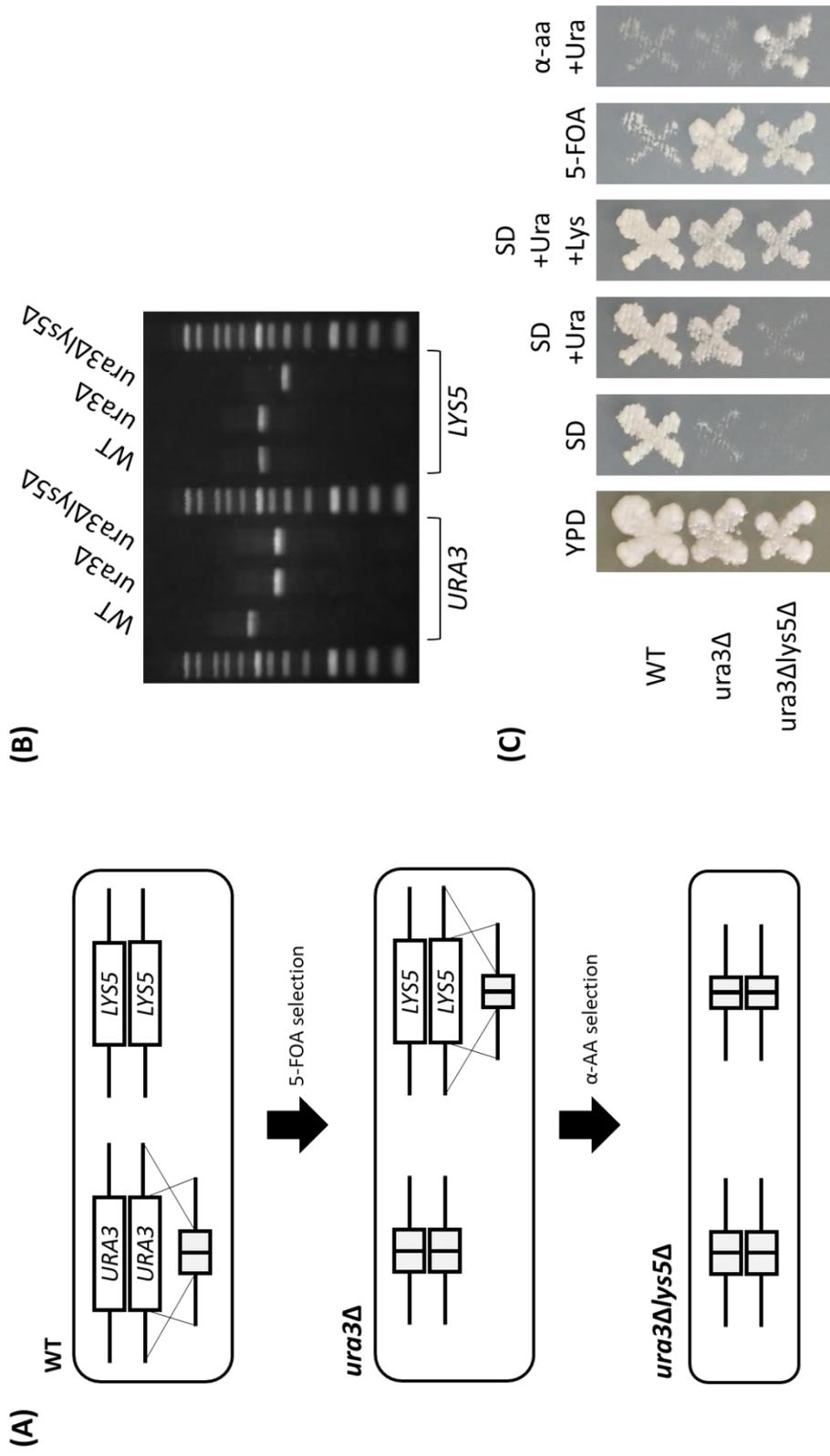


Fig. 3-4 Construction of uracil and lysine auxotroph mutant shochu yeast strains. (A) Strategy of construction of uracil and lysine auxotroph mutant strains. (B) Confirmation of *URA3* and *LYS5* loci in *ura3Δ*, and *ura3Δlys5Δ* strains. The *URA3* and *LYS5* loci of WT, *ura3Δ* and *ura3Δlys5Δ* strains were amplified by PCR and confirmed by agarose gel electrophoresis. (C) Confirmation of the auxotrophic phenotype of *ura3Δ* and *ura3Δlys5Δ* strains. WT, *ura3Δ* and *ura3Δlys5Δ* strains were grown on YPD plates and replica plated on SD, SD (+Ura), SD (+Ura and +Lys), 5-FOA and α-aa (+Ura) plates, followed by incubation at 30°C for 24 h.

Table 3-3. Frequency of *ura3* Δ and *ura3* Δ *lys5* Δ construction

Parental strain	Obtained strain	Selection plate	Colony formation frequency* (CFU/ 10 ⁷ living cells)	Correct colony rate* (%)
K2	<i>ura3</i> Δ	FOA plate	7.8 \pm 2.5	100.0 \pm 0
<i>ura3</i> Δ	<i>ura3</i> Δ <i>lys5</i> Δ	α -AA plate	8.3 \pm 4.4	100.0 \pm 0

* *n*=3, average \pm standard deviation

3-3-3. 一度の形質転換による二倍体焼酎酵母の対立遺伝子破壊手法

清酒酵母では、UV 照射を伴わない LOH を用いた遺伝子破壊法 (Kotaka *et al.*, 2009) が報告されており、まず片方の標的対立遺伝子を *URA3* で置換し、ループアウトにより *URA3* を除去することでヘテロなヌル対立遺伝子を持つ株を得る。次に、もう一方の標的対立遺伝子を *URA3* で置換し 5-FOA 培地上で LOH により二重のヌル対立遺伝子を持つ株を選抜する。しかし、この方法は、二重の形質転換手順と、5-FOA プレート上に形成されたコロニーがループアウトによるものか LOH によるものかの判別が必要であるため、手間と時間を要する。

本研究で構築した破壊カセットは、機能性 *LYS5* が、3'- または 5'-領域で切断した非機能性 *URA3* 断片で挟まれた構造をしている (Fig. 3-5A)。各非機能性 *URA3* 断片は 573bp (-58-515 bp) の重複配列を含み、カセット内に繰り返し配列 (inner tandem repeat) を形成していた。さらに、カセット内の *LYS5* は、この inner tandem repeat のループアウト組換えによって失われるように設計され、これにより機能性 *URA3* が復元される。この原理によって、一度の形質転換で両方の標的対立遺伝子を破壊することが可能となった。

片方の標的対立遺伝子が形質転換によって破壊カセット (*ura3^{5'}-LYS5-ura3^{3'}*) で置換されることで single-disrupted strain (target gene/*ura3^{5'}-LYS5-ura3^{3'}*) が形成され、そこから LOH によりホモ接合性の破壊株 (*ura3^{5'}-LYS5-ura3^{3'}/ura3^{5'}-LYS5-ura3^{3'}*) を得ることができる。しかし、このホモ接合性の破壊株は、栄養要求性の違いによって single-disrupted strain と区別することはできない。本手法で用いた破壊カセットは、inner tandem repeat でのループアウト組換えによって *LYS5* が除去と同時に *URA3* が復帰するよう設計されているため、片方の対立遺伝子上の破壊カセットでループアウト組換えが起こり、標的遺伝子が *URA3* および *LYS5* の遺伝子セットに置き換わっ

た double-disrupted strain (*URA3/ura3^{5'}-LYS5-ura3^{3'}*) を栄養要求性から選抜した (Fig. 3-5A)。また、破壊カセットには内側の inner tandem repeat だけでなく、外側にも繰り返し配列 (outer tandem repeat) が付与されているため、*LYS5* の除去と共に復帰した *URA3* も outer tandem repeat でのループアウト組換えによって除去することができた。*LYS5* または *URA3* のいずれかを失った株は、それぞれ α -AA または 5-FOA プレートで選抜され (Fig. 3-5B), *LYS5* と *URA3* の両方を失った double loop-out strain は、第二の遺伝子破壊に用いることができる。

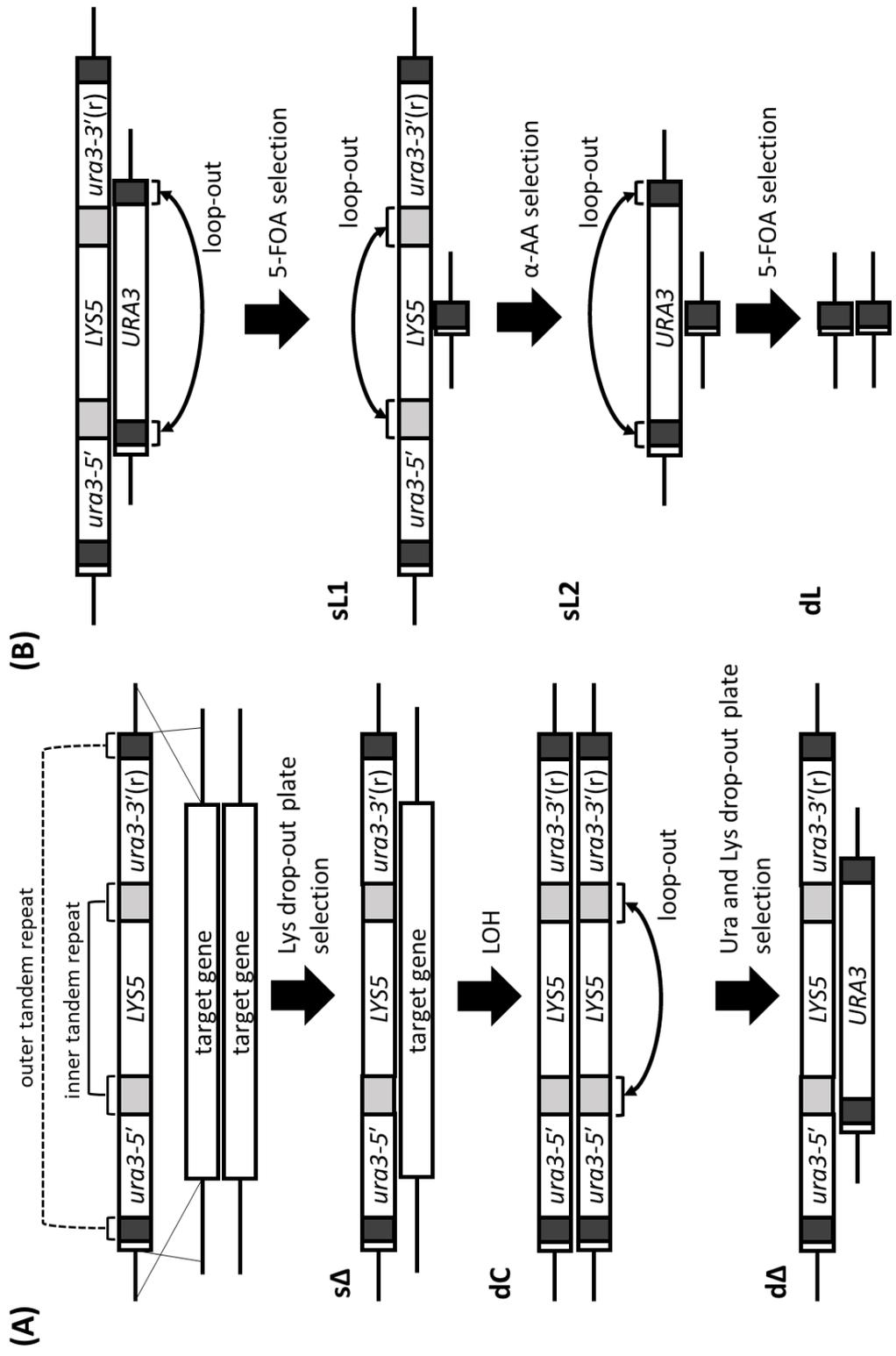


Fig. 3-5 Strategy of gene disruption and marker recycling. (A) Strategy to obtain a double-gene disrupted strain (dΔ). The *ura3Δlys5Δ* strain was transformed with a disruption cassette flanked by each 45 bp of target gene sequence. Transformant strains in which one of the target genes was replaced by a disruption cassette were selected on a Lys drop-out SC plate (sΔ). The strain was incubated in YPD liquid medium to induce LOH (dC), followed by *LYS5* removal and *URA3* restoration by loop-out at one allele. The resultant strain was selected on an Ura and Lys drop-out SC plate as a double-disrupted strain (dΔ). (B) Strategy to remove the marker gene from dΔ strains. The dΔ strains were incubated in YPD liquid medium; strains in which *URA3* was removed by loop-out were selected on 5-FOA plates (sL1). The resultant strains were incubated in YPD liquid medium, and the strains in which *LYS5* was removed and *URA3* was restored were selected on α -AA plates (sL2). Finally, strains in which *URA3* was removed by loop-out were selected on 5-FOA plates (dL).

3-3-4. 第一の遺伝子破壊

LEU2 を最初の遺伝子破壊の標的遺伝子として選択した。*LEU2* をターゲットとした破壊カセットを, disruption base fragment を鋳型としてプライマー K2LEU2D+ および K2LEU2D- を用いた PCR で増幅し, 増幅して得られたカセットで *ura3Δlys5Δ* を形質転換した。*LEU2* の一方を破壊カセットで置換した *LEU2* single-disrupted strain (*leu2sΔ:LEU2/leu2::ura3^{5'}-LYS5-ura3^{3'}*) を Lysine ドロップアウトプレートで選抜し, プライマー K2LEU2-1+ および K2LEU2-1- を用いたコロニー PCR で確認した。次に, *LEU2* single-disrupted strain を YPD 培地で 30°C, 24 時間振とう培養し, *LEU2* double-disrupted strain (*leu2dΔ:leu2::ura3/leu2::ura3^{5'}-LYS5-ura3^{3'}*) を Uracil および Lysine ドロップアウトプレート上で選抜した。Uracil および Lysine ドロップアウトプレート上で増殖したコロニーを, プライマー K2LEU2-1+ および K2LEU2-1- を用いたコロニー PCR に供し, *LEU2* の二重破壊を確認した (Fig. 3-6A)。

第二の遺伝子破壊の前に, 破壊カセットを染色体から除去する必要があるため, *leu2dΔ* を YPD 培地中で培養し, ループアウト組換えによって破壊カセットの全部または一部が除去された株を 5-FOA プレート, α -AA プレート, そして 5-FOA プレートの順で順次選抜した。この方法により, *leu2dΔ* (*leu2::ura3/leu2::ura3^{5'}-LYS5-ura3^{3'}*) から, *LEU2* single loop-out strain 1 (*leu2sL1:leu2::ura3r/leu2::ura3^{5'}-LYS5-ura3^{3'}*), *LEU2* single loop-out strain 2 (*leu2sL2:leu2::ura3r/leu2::URA3*), *LEU2* double loop-out strain (*leu2dL:leu2::ura3r/leu2::ura3r*) を取得した。理論的には, *leu2dΔ* から α -AA プレート, そして 5-FOA プレートと選抜することで *LEU2* double loop-out strain を選抜することが可能であるが, *leu2dΔ* を YPD 培地で培養した後に α -AA プレート上で長時間培養しても正常なサイズのコロニーを得ることはできなかった。各段階の株は, プライマー K2LEU2-1+ および K2LEU2-1- を用いたコロニー PCR と, その栄養要

求性に基づいて確認した (Fig. 3-6A, 3-6B)。また, 各ステップの選択プレート上でのコロニー形成頻度と求めるコロニーの割合を Table 3-4 に示した。

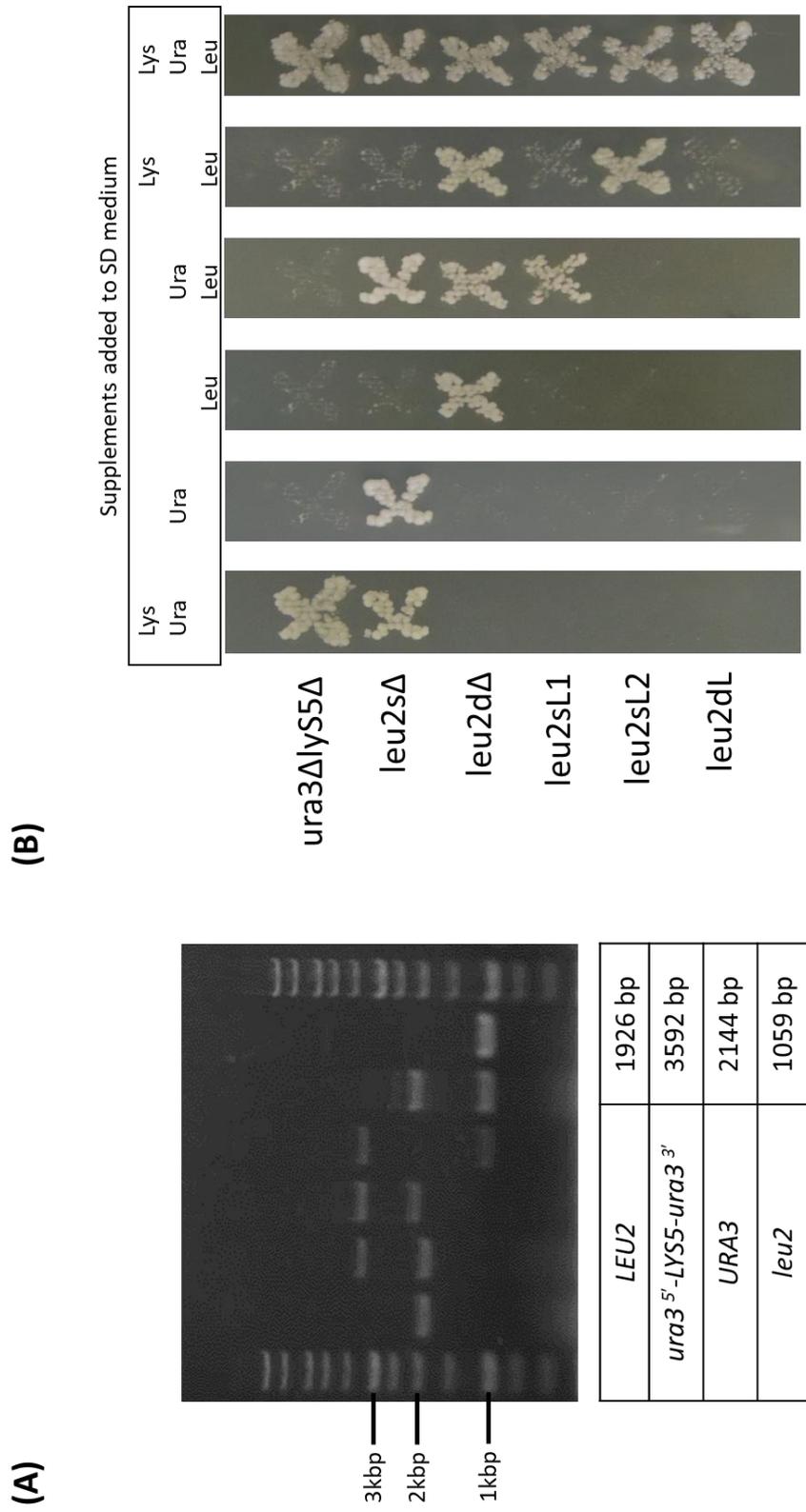


Fig. 3-6 Confirmation of genotype and phenotype in each strain obtained by LEU2 gene disruption. (A) The LEU2 locus of each strain was amplified by colony PCR and confirmed by agarose gel electrophoresis. (B) Confirmation of the auxotrophic phenotype. Each strain was grown on a YPD plate and replica plated on an SD plate supplemented with lysine, uracil, and/or leucine, followed by incubation.

Table 3-4. Frequency of strain construction at each stage from leu2sΔ to leu2dL

Parental strain	Obtained strain	Selection plate	Colony formation frequency* (CFU/ 10 ⁶ living cells)	Correct colony rate* (%)
ura3Δlys5Δ	leu2sΔ	Ura drop-out SC plate	13.9 ± 3.9	23.3 ± 11.5
leu2sΔ	leu2dΔ	Ura and Lys drop-out SC plate	16.1 ± 1.6	80.0 ± 26.5
leu2dΔ	leu2sL1	5-FOA plate	18.1 ± 6.9	53.3 ± 20.8
leu2sL1	leu2sL2	α-AA plate	8.9 ± 1.2	36.7 ± 20.8
leu2sL2	leu2dL	5-FOA plate	6.1 ± 1.1	100.0 ± 0

* n=3, average ± standard deviation

3-3-5. 第二の遺伝子破壊

第二の遺伝子破壊の標的遺伝子として *HIS3* を選択した。*HIS3* 破壊カセットはプライマー K2HIS3D+/K2HIS3D- を用いて PCR で増幅した。leu2dL を *HIS3* 破壊カセットで形質転換し, *HIS3* single-disrupted strain (*his3sΔleu2dL:HIS3/his3::ura3^{5'}-LYS5-ura3^{3'}*) を Uracil および Lysine ドロップアウトプレートで選択し、プライマー K2HIS3+/K2HIS3- を用いたコロニー PCR で確認した。*HIS3* double-disrupted strain (*his3dΔleu2dL*) および *HIS3* ループアウト株 (*his3sL1leu2dL*, *his3sL2leu2dL* および *his3dLleu2dL*) は、第一の遺伝子破壊において記載したように取得した。また、*LEU2* 破壊時と同様に、*his3dΔleu2dL* から α-AA プレート、そして 5-FOA プレートと選抜した際、長時間の培養を行っても正常なサイズのコロニーは取得できなかった。各菌株は、プライマー K2HIS3+/K2HIS3- を用いたコロニー PCR、および栄養要求性に基づいて確認した (Fig. 3-7A, 3-7B)。また、各ステップの選択プレート上のコロニー形成頻度と求めるコロニーの割合を測定した (Table 3-5)。

double-disrupted strain (dΔ) から最初の 5-FOA 選抜を行う際、目的とする single loop-out strain 1 (sL1) 以外に、LOH により二重破壊カセットを持つ株 (dC) を得る可能性がある。そこで、コロニー PCR を用いて各株の割合を調べた。その結果、*LEU2* 破壊においては、30 株中 16 株の sL1, 13 株の dC, 1 株の double loop-out strain (dL) が得られ、*HIS3* 破壊においては、30 株中 6 株の sL1, 17 株の dC が得られた。これらの結果から、最初の 5-FOA プレートでの選択時に、sL1 は容易に得られ、dL も低い頻度で得られることが示された。

LEU2 に次いで *HIS3* も同じ手法で破壊、さらにカセットの除去ができたことから、本遺伝子破壊手法は、一度の形質転換で 2 倍体酵母の両対立遺伝子上の標的遺伝子を破壊できるとともに、カセットの除去によって繰り返し遺伝子破壊が可能である

ことが実証された。過去に、2 倍体 *Candida albicans* において、一回の形質転換で両方の対立遺伝子を破壊する方法が報告された (Enloe *et al.*, 2000)。その方法では、機能性 *ARG4* と非機能性 *ura3* を破壊カセットとして用い、本手法と同様の議論で Arginine と Uracil のドロップアウトプレートで両対立遺伝子上の標的遺伝子が破壊された株を選抜することができた。この方法は有用であったが、*ARG4* と *URA3* が残ってしまうため遺伝子破壊は一度しかできなかった。本方法では、カセットの両端に *outer tandem repeat* を導入し、*URA3* と *LYS5* をカウンターセクションすることで、導入したマーカー遺伝子を完全に除去し、繰り返し遺伝子破壊を行うことを可能とした。

近年、ゲノム編集ツールである CRISPR/Cas9 システムが相同組換えを用いた遺伝子破壊が困難であった生物にも容易に適応できることが証明された (Zhang *et al.*, 2018)。このシステムは酵母研究にも導入された (Giersch and Finnigan, 2017)。例として、清酒酵母の高泡形成に関与する *AWA1* の破壊株が CRISPR/Cas9 システムを用いて得られた (Ohnuki *et al.*, 2019)。さらに、このシステムを用いて、酒造りに有用な 8 つの遺伝子が単一株で改変された (Chadani *et al.*, 2021)。しかし、CRISPR/Cas9 システムは、外来生物由来の Cas9 遺伝子を一過性に導入する必要がある。そのため、産業応用の前に、外来 DNA が染色体に組み込まれていないことを確認する必要がある。

本手法において、破壊カセットは焼酎酵母由来の DNA 配列のみからなり、その両端に標的遺伝子の配列を有する。本法で使用する破壊カセットは、焼酎酵母 K2 のゲノム DNA を鋳型とした PCR のみで構築した。この方法は、外来 DNA を含むプラスミドを使用しないため、プラスミドの構築や増幅に大腸菌の形質転換を必要としない。すなわち、これらのプラスミドや大腸菌由来の DNA の一部が酵母を汚染する機会がないため、セルフクローニング株を構築することが可能である。本手法は、二倍

体酵母の遺伝子破壊の新たなアプローチとなると考える。

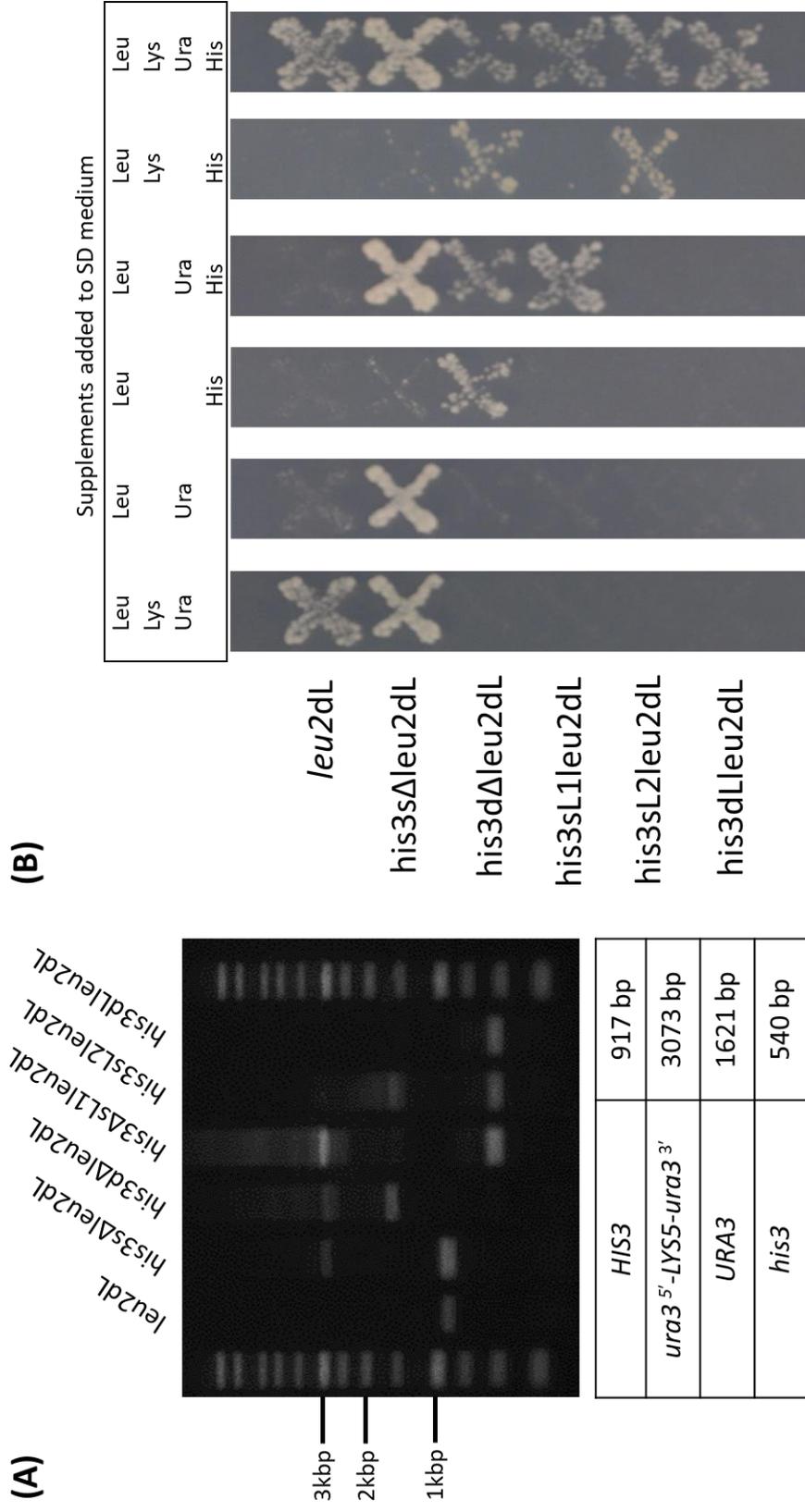


Fig. 3-7 Confirmation of genotype and phenotype in each strain obtained by *HIS3* gene disruption of *leu2dL* strains (*ura3/ura3 lys5/lys5 leu2/leu2*). (A) The *HIS3* locus of each strain was amplified by colony PCR and confirmed by agarose gel electrophoresis. (B) Confirmation of the auxotrophic phenotype. Each strain was grown on a YPD plate and replica plated on an SD plate supplemented with lysine, uracil, leucine and/or histidine, followed by incubation.

Table 3-5. Frequency of strain construction at each stage from his3sΔleu2dL to his3dLleu2dL

Parental strain	Obtained strain	Selection plate	Colony formation frequency* (CFU/ 10 ⁶ living cells)	Correct colony rate* (%)
leu2sL2	his3sΔleu2dL	Ura drop-out SC plate	8.0 ± 2.4	13.3 ± 5.8
his3sΔleu2dL	his3dΔleu2dL	Ura and Lys drop-out SC plate	4.2 ± 0.7	36.7 ± 5.8
his3dΔleu2dL	his3sL1leu2dL	5-FOA plate	18.6 ± 2.2	20.0 ± 17.3
his3sL1leu2dL	his3sL2leu2dL	α-AA plate	10.2 ± 3.7	46.7 ± 5.8
his3sL2leu2dL	his3dL2leu2dL	5-FOA plate	12.2 ± 1.2	100.0 ± 0

* n=3, average ± standard deviation

第 4 節 小括

遺伝子破壊は遺伝子機能の研究を行う上で重要な技術であり、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* では相同組換えを利用したマーカー遺伝子破壊手法が開発され (Länge-Rouault and Jacobs, 1995; Goldstein and McCusker, 1999; Takahashi *et al.*, 2017a; Takahashi *et al.*, 2017b; Fukuda and Takeuchi, 2022) 一般的に利用されている。しかし、これら手法は主に 1 倍体として生育できる異種性の実験室株に用いられている。しかし、産業利用酵母は一般に 2 倍体であることが多く、2 倍体酵母の対立遺伝子の両方に変異を持つ株を得ることは困難と考えられていた。そこで、一回の形質転換で両対立遺伝子上の標的遺伝子を破壊する方法を検討した。

焼酎酵母 K2 のゲノム DNA を鋳型として、機能性 *LYS5* を、5'-領域と 3'-領域に分かれた非機能性 *ura3* 断片で挟むように破壊カセットのベースとなるフラグメントを設計した。このベースフラグメントは内部に繰り返し配列を持ち、ループアウト組換えによる *LYS5* の除去と *URA3* の機能復帰を可能になるものとして設計した。さらに、フラグメントの外側にも、ループアウト組換えによるカセットの除去を可能にする追加の繰り返し配列が付加されており、これによって機能復帰した *URA3* もループアウト組換えによって最終的に除去され、カセット由来のマーカー遺伝子は染色体上から完全に取り除かれる。このベースフラグメントの両端に PCR を用いて標的遺伝子配列の 5'-および 3'-領域に対して相同な 45 塩基をプライマーに付加することで PCR により破壊カセットを構築した。得られた破壊カセットを焼酎酵母 K2 (*ura3/ura3 lys5/lys5*) に導入した後、片方の対立遺伝子が破壊カセットに置換された *single-disrupted strain* を Lysine ドロップアウトプレート上で選択した。*single-disrupted strain* を YPD 培地で培養後、Uracil および Lysine ドロップアウトプレートで選抜することにより、LOH により破壊カセットでもう片方の対立遺伝子を置換し、ループアウト組換えにより一方のカセ

ットが *URA3* となった **double-disrupted strain** を得た。破壊カセットは、カセット内の繰り返し配列間のループアウト組換えによって **double-disrupted strain** から除去された。*URA3* または *LYS5* のいずれかを失った株は、それぞれ 5-FOA プレートまたは α -AA プレートで逆選抜した。この方法により、焼酎酵母において *leu2/leu2* 株および *leu2/leu2 his3/his3* 株が得られ、二倍体酵母 *Saccharomyces cerevisiae* におけるこの遺伝子破壊技術の有効性と再現性が示された。また、その取得頻度も 10^6 cells 当たりに 10 コロニー程度が選択培地上に生じ、そのうちの少なくとも 10% 以上が求める株であったことから、実用的にも十分な破壊株の取得効率である。

参考文献

- Akada, R., Kitagawa, T., Kaneko, S., Toyonaga, D., Ito, S., Kakihara, Y., Hoshida, H., Morimura, S., Kondo, A., and Kida, K.:** PCR-mediated seamless gene deletion and marker recycling in *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast*, **23**, 399–405 (2006).
- Alani, E., Cao, L., and Kleckner, N.:** A method for gene disruption that allows repeated use of *USR3* selection in the construction of multiply disrupted yeast strains, *Genetics*, **116**, 541–545 (1987).
- Baudin, A., Ozier-Kalogeropoulos, O., Denouel, A., Lacroute, F., and Cullin, C.:** A simple and efficient method for direct gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae*, *Nucleic Acids Res.*, **21**, 3329–3330 (1993).
- Boeke, J. D., Trueheart, J., Natsoulis, G., and Fink, G. R.:** 5-Fluoroorotic acid as a selective agent in yeast molecular genetics, *Methods Enzymol.*, **154**, 164–175 (1987).
- 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 (2021).
- Enloe, B., Diamond A., and Mitchell, A. P.:** A single-transformation gene function test in diploid *Candida albicans*, *J. Bacteriol.*, **182**, 5730–5736 (2000).
- Fukuda, N. and Takeuchi, M.:** Complete dominant inheritance of intracellular leucine accumulation traits in polyploid yeasts, *Yeast*, **39**, 272–282 (2022).
- Giersch, R. M. and Finnigan, G. C.:** Yeast still a beast: diverse applications of

- CRISPR/Cas editing technology in *S. cerevisiae*, *Yale J. Biol. Med.*, **90**, 643–651 (2017).
- Goldstein, A. L. and McCusker, J. H.:** Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast*, **15**, 1541–1553 (1999).
- 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 Res.*, **24**, 2519–2524 (1996).
- Hashimoto, S., Ogura, M., Aritomi, K., Hoshida, Nishizawa, 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).
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., and Kimura, A.:** Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations, *J. Bacteriol.*, **153**, 163–168 (1983).
- Ito-Harashima, S. and McCusker, J. H.:** Positive and negative selection LYS5MX gene replacement cassettes for use in *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast*, **21**, 53–61 (2004).
- Kotaka, A., Sahara, H., Kondo, A., Ueda, M., and Hata, Y.:** Efficient generation of recessive traits in diploid sake yeast by targeted gene disruption and loss of heterozygosity, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **82**, 387–395 (2009).
- Längle-Rouault, F. and Jacobs, E.:** A method for performing precise alterations in the yeast genome using a recyclable selectable marker, *Nucleic Acids Res.*, **23**, 3079–3081 (1995).
- Mori, K., Kadooka, C., Masuda, C., Muto, A., Okutsu, K., Yoshizaki, Y., Takamine, K., Futagami, T., and Tamaki, H.:** Genome Sequence of *Saccharomyces*

cerevisiae Strain Kagoshima No. 2, used for brewing the Japanese distilled spirit Shōchū, *Genome Announc.*, **5**, e01126-17 (2017).

Nakazawa, N., Ashikari, T., Goto, N., Amachi, T., Nakajima, R., Harashima, S., and Oshima, Y.: Partial restoration of sporulation defect in sake yeasts, kyokai no. 7 and no. 9, by increased dosage of the *IME1* gene, *J. Ferment. Bioeng.*, **73**, 265–270 (1992).

Ohdate, T., Omura, F., Hatanaka, H., Zhou, Y., Takagi, M., Goshima, T., Akao, T., and Ono, E.: *MAL73*, a novel regulator of maltose fermentation, is functionally impaired by single nucleotide polymorphism in sake brewing yeast, *PLoS One*, **13**, e0198744 (2018).

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).

Takagi, Y., Akada, R., Kumagai, H., Yamamoto, K., and Tamaki, H.: Loss of heterozygosity is induced in *Candida albicans* by ultraviolet irradiation, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **77**, 1073–1082 (2008).

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 (2017a).

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 (2017b).

Zhang, C., He, X., Kwok, K. Y., Wang, F., Xue, J., Zhao, H., Suen, W. K., Wang, C., Ren, J., Chen, G. G., Lai, S. B. P., Li, J., Xia, Y., Chan, M. A., Chan, W., and Feng, B.: Homology-independent multiallelic disruption via CRISPR/Cas9-based knock-in yields distinct functional outcomes in human cells, *BMC Biol.*, **16**, 151 (2018).

第 4 章 総括

酵母の生成する香気成分は、酒類の重要な香気成分である。この中でも、高級アルコールは、酒類香気成分の中で最も含量が多く、フルーティーな香りを呈する酢酸エステルの前駆体でもあるため、酒類の香りに与える影響が高い。高級アルコール自体は、低濃度であれば酒類に華やかさ、旨みおよび複雑さといった良い影響を与えるが、高濃度に含まれることで異臭や原料由来の香りのマスキングの原因となるため、その生成量を適切に制御することが求められる。

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、関連遺伝子も数多く明らかとされてきた。しかし、既知の関連遺伝子の中でも *THI3* は、当初の脱炭酸酵素遺伝子という機能に疑問が呈されてから、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。

これらの育種や研究には、変異原を用いた突然変異の誘発やピンポイントに遺伝子をターゲティングした遺伝子組換えといった、遺伝子工学的手法が用いられている。特に、標的遺伝子をピンポイントにターゲットにすることが出来る遺伝子組換え技術は、今後の遺伝子機能の解析や効率的な育種には有用であると考えられる。しかし、この遺伝子組換え技術は、二倍体酵母への適用に手間や時間を要求するという点や、破壊できる遺伝子数がマーカー遺伝子の数によって制限されてしまう点、さらにマーカー遺伝子に薬剤耐性遺伝子といった外来の遺伝子を用いると遺伝子組換え株になってしまうという点といった、様々なハードルが存在する。

そこで、本研究では既知の高級アルコール関連遺伝子の中でも機能が不明な *THI3* の高級アルコール生成への役割を解明し、今後の育種開発や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。

第 1 章では、酒類の香気を形成する成分の中でも、酵母が生成する高級アルコ

ールに注目し、既知の生合成メカニズムや高級アルコール生成能に関わる育種、さらにこれら育種や研究に用いられた遺伝子工学的手法について概略し、高級アルコール生合成メカニズムにおける不明点や遺伝子組換え技術の問題点を明確化した。

第 2 章では、*THI3* の高級アルコール生成における役割を解明するため、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。培養試験の結果、 $\Delta thi3$ の Isoamyl alcohol 生成量は生育環境の Thiamine 濃度に左右されることが明らかとなった。これは、 $\Delta thi3$ が細胞内で Thiamine を作れず、細胞外からの取り込みに依存していることが原因であった。これによって、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) の細胞内濃度が低下し、Isoamyl alcohol 生成量が低下したことが明らかとなった。すなわち、*THI3* は細胞内の Thiamine 生合成を維持し、Isoamyl alcohol 生合成に必要な補酵素 TPP の恒常性を維持することで、間接的に Isoamyl alcohol 生合成に関与していたことが明らかとなった。

第 3 章では、遺伝子組換え技術の問題点を解決し、遺伝子組換えを二倍体の産業利用株にも適応することを目的に、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

(LOH) 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る。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る。実際に本手法で、K2 (*ura3/ura3 lys5/lys5*) の *LEU2* および *HIS3* を連続的に破壊することで、本手法が二倍体焼酎酵母に適応可能で、さらに繰り返し利用可能であることを実証した。また、本手法で用いた導入した遺伝子は全て K2 のゲノム DNA 由来のものであるため、得られた変異株は産業利用可能なセルフクローニング株とみなせる。

第 4 章では、上記各章の結果を総括し、内容をまとめた。

本論文では、酵母が生成する重要な香り成分である高級アルコールの生合成関連遺伝子の中で、その機能が不明瞭なままであった *THI3* と、これまで酵母の遺伝子研究や育種に用いられていた遺伝子工学技術の問題点に着目し、大きく 2 つのテーマで研究を行った。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、繰り返し利用可能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。

謝辞

研究を遂行並びに論文をまとめるにあたり、終始御指導御鞭撻を賜りました、国立大学法人 鹿児島大学 農学部附属 焼酎・発酵学教育研究センター 焼酎製造学部門 高峯 和則 教授に深く感謝の意を表します。また、本論文の審査及び御指導御助言賜りました、鹿児島大学 農学部 玉置 尚徳 教授、吉崎 由美子 准教授、二神 泰基 准教授、琉球大学 農学部 水谷 治 准教授に厚く感謝致します。

研究遂行にあたり、御助言御指導賜りました鹿児島大学 農学部附属 焼酎・発酵学教育研究センター 焼酎製造学部門 奥津 果優 元特任助教に深謝致します。

研究を行うにあたって一緒に実験を遂行してくれた、鹿児島大学大学院 農林水産学研究科 先間 晴紀 氏に感謝致します。また、日々の研究生活の中で苦楽を共にした、焼酎製造学及び醸造微生物学研究室の卒業生及び所属学生に御礼申し上げます。

遠方より陰ながら支えてくれた家族、友人、鹿児島にて支えてくれた方々に感謝申し上げます。

最後に、鹿児島大学および本研究との御縁を賜りました東京農業大学 小泉 武夫 名誉教授に厚く御礼申し上げます。

本論文に関する報文

1. **Yuki Kobashi, Yumiko Yoshizaki, Kayu Okutsu, Taiki Futagami, Hisanori Tamaki, Kazunori Takamine:** *THI3* contributes to isoamyl alcohol biosynthesis through thiamine diphosphate homeostasis, *J. Biosci. Bioeng.*, **137**, 108–114 (2024).
2. **Yuki Kobashi, Eri Nakayama, Naoki Fukumori, Ayane Shimojima, Manami Tabira, Yuki Nishimura, Manami Mukae, Ai Muto, Naoto Nakashima, Kayu Okutsu, Yumiko Yoshizaki, Taiki Futagami, Kazunori Takamine, Hisanori Tamaki:** Homozygous gene disruption in diploid yeast through a single transformation, *J. Biosci. Bioeng.*, **137**, 31–37 (2024).