

焼酎酵母のアルコール耐性に関与する遺伝子の解析 (第2報)

江藤 勸
食品工業部

Analysis of Relation Between Alcohol-Tolerance and *Shochu* Yeast Gene (2nd. report)

Susumu ETO

Food Science and Technology Division

要旨

PCR法を応用した Subtraction により検出されたアルコール耐性の獲得に関与すると思われる遺伝子について、これらの発現量を通常の鹿児島焼酎酵母で変化させた株を作成した。このうち Enolase 1 及び Cytochrome C1 の遺伝子では、発現を増加させるとアルコール耐性は低くなり、発現を減少させると耐性が高くなったことから、これらの遺伝子が実際に酵母のアルコール耐性に関与していると推測された。

1. 緒言

本センターでは、より麦焼酎の醸造に適した大分酵母の開発を目指して、有用酵母の造成の研究を行っており、特に、蒸留粕の減量が期待される、高いアルコール耐性を持つ酵母の開発研究をしている。

前報¹⁾では、将来的に実用可能になるとと思われる遺伝子組換えによる有用酵母開発の前段階として、アルコール耐性を獲得した酵母と通常の酵母を比較することにより、アルコール耐性に関与すると思われる遺伝子を検出した。本研究では、この検出された遺伝子について、通常の焼酎酵母での発現を増減させることによるアルコール耐性の変化を検討した。

2. 実験方法

2.1 アルコール耐性株の作成とcDNAのSubtraction

前報¹⁾に従い、自己消化によるアルコール耐性株を作成し、Subtractionにより、アルコール耐性に関与すると思われる遺伝子の検出を行った。

2.2 目的遺伝子配列の作成

目的とする遺伝子配列を挟むように各々プライマーを作成し、Genomic DNA/*S.cerevisiae* (生化学工業) をテンプレートとし、エキスパンドハイファイ PCR システム (Boehringer Mannheim 社) を用いて下表 (Table 1) の条件でステップダウン PCR を行い、目的の配列を増幅した。

Table 1 ステップダウン PCR の反応条件

変性 95℃:1' 95℃:1' 95℃:1' 95℃:1' 95℃:1' 95℃:1'
アニール 70℃:2' 66℃:2' 62℃:2' 58℃:2' 54℃:2' 50℃:2'
伸長 70℃:3' 70℃:3' 70℃:3' 70℃:3' 70℃:3' 70℃:3'

3Cycles → 3Cycles → 3Cycles → 3Cycles → 3Cycles → 20Cycles

PCR で増幅したサンプルを 1% アガロースゲルで電気泳動し、目的の大きさのバンドを切り出して抽出した後、pCR II ベクター (Invitrogen 社) につなぎ、*E.coli* JM109 を形質転換させて、cDNA と結合したベクターを増幅後、抽出し、精製した。

2.3 の方法で塩基配列を確認した後、制限酵素で切断し、同じ酵素で切断した酵母発現型ベクター pAUR123 にその遺伝子の発現を増やす方向 (sense) と減らす方向 (antisense) にそれぞれ接続した。これを *E.coli* JM109 を用いて増幅した後、抽出・精製して、それぞれ正しく接続されているか塩基配列を確認した。

2.3 塩基配列の決定

pCR II ベクターの場合、Cy5 AutoRead Sequencing Kit (AmershamPharmacia Biotech 社) 中の蛍光プライマーを用い、pAUR123 ベクターの場合は、ADH1 プロモーターまたはターミネーターの一部に相補性を持つ Cy5 標識蛍光プライマーを合成して使用した。ThermoSequenase cycle sequencing kit (AmershamPharmacia Biotech 社) を用いて、ALF express シーケンサーでベクターと結合した cDNA の塩基配列の決定を行った。

2.4 鹿児島焼酎酵母の形質転換

目的の遺伝子を鹿児島焼酎酵母で増減させるために、Aureobasidin A (AbA) 耐性酵母形質転換システム (TaKaRa) を用いて形質転換を行った。2μg/ml の AbA を含む YPD 寒天培地状で選抜された株を形質転換体として取得した。

2.5 アルコール耐性試験

試験株を 1μg/ml の AbA を含む YPD 液体培地中で前培養した後、各濃度のエタノールを 1μg/ml の AbA を含む YPD 液体培地に接種して、振盪培養装置で増殖能を測定した。

2.6 RNAの調製

YPD 液体培地で前培養した細胞をさらに6時間培養して、E.Z.N.A.Yeast RNA Kit (Omega Biotek) を使用してRNAを調製した。

2.7 ノーザンハイブリダイゼーション

精製したcDNAを含むpCR IIベクターからDIG RNA Labeling Kit(Boehringer Mannheim社)を用いてそれぞれRNAプローブを作成した。

各細胞より調製したRNAをホルムアルデヒド法により、1%のアガロースゲル電気泳動にかけた後、ナイロン膜にブロッティングした。この膜に、各RNAプローブを結合させて、DIG核酸検出キットによりプローブを検出した。

3. 実験結果及び考察

3.1 アルコール耐性に関与する遺伝子の検出

前報¹⁾のとおりストレスタンパク質に関連した遺伝子は、鹿児島酵母とアルコール耐性株の両方でエタノール処理により増加していた。また、Cytochrome C1(CY1)とEnolase 1(ENO1)の遺伝子は鹿児島酵母でのみ検出され、Alcohol dehydrogenase 1 (ADH1)及び60S Ribosomal protein L21(RL21E)の遺伝子はアルコール耐性株でのみ検出された。

3.2 目的遺伝子を増減させた酵母株の作成

検出された遺伝子の内、鹿児島酵母でのみ検出されたENO1とCY1の遺伝子を増減させるための遺伝子配列を作成し、pAUR123ベクターに接続して鹿児島酵母への組み込みを行ない、AbA選択培地により目的の株を得た。

3.3 目的遺伝子を増減させた酵母株のアルコール耐性

ENO1とCY1の遺伝子をsense配列により増加させた株ENO1(+), CY1(+)およびantisense配列により発現を減少させた株ENO1(-), CY1(-)の4株と対照としてpAUR123ベクターのみを組み込んだ株についてアルコール耐性を検討した。通常のYPD培地中での増殖は5株とも大差なかったが10%エタノールを含む培地中での増殖能は、ENO1(+)株とCY1(+)株で低下しており、ENO1(-)株とCY1(-)株で増加していた(Fig.1)。

3.4 ノーザンハイブリダイゼーション

各酵母株から調製したRNAを用いて、ノーザンハイブリダイゼーションにより、各株の目的遺伝子の発現量を検討した(Fig.2,3)。ENO1遺伝子については、元々の鹿児島酵母(Ko)でも発現量が多いため、今回の検出方法では、遺伝子配列の組み込みによる顕著な変化は認められなかった(Fig.2)。これに対して、CY1のプローブを用いて検出したところ、CY1(+)株での発現量の増加とCY1(-)株での発現量の減少が認められた。また、

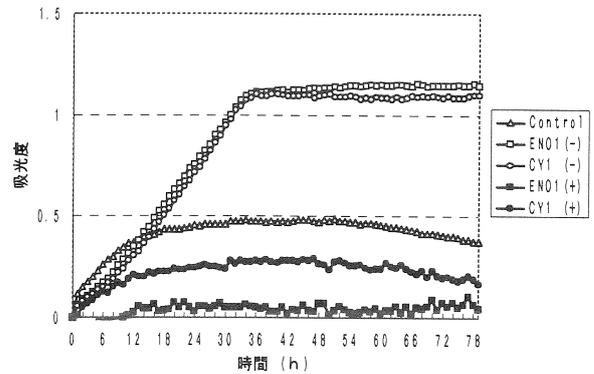
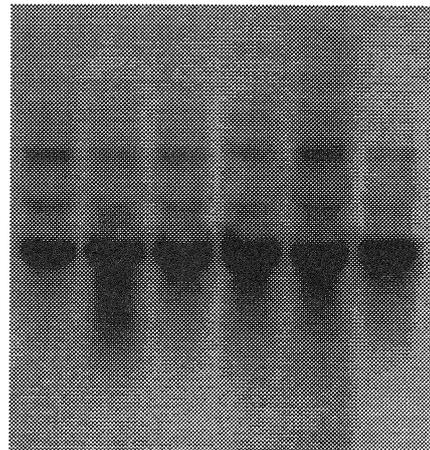
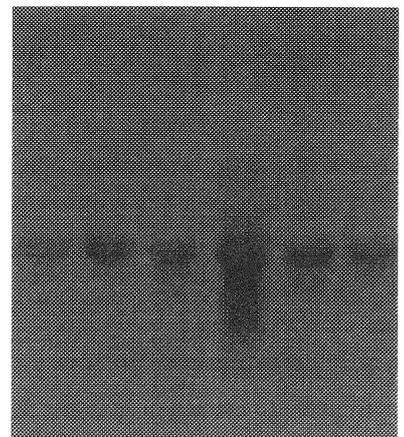


Fig.1 遺伝子の発現調節によるアルコール耐性の獲得



Ko + - + - pAUR123
Eno Cyl

Fig.2 各株におけるENO1遺伝子の発現量



Ko + - + - pAUR123
Cyl Eno

Fig.3 各株におけるCY1遺伝子の発現量

興味深いことにENO1(+)株でもCY1遺伝子が増加しており、ENO1(-)株で減少していた(Fig.3)。このことより、Fig.1に見られたアルコール耐性の変化は、各株ともCY1遺伝子の発現量の変化を介して起きている

可能性が考えられた。しかし、現時点では CY1 遺伝子とアルコール耐性に関する報告はなく、その機構の解明は今後の課題である。また、Subtractionにより検出された他の遺伝子についても発現量とアルコール耐性の関係を検討する予定である。

4. まとめ

焼酎酵母のアルコール耐性に関与する遺伝子を解明する目的で、PCRを応用したSubtractionにより検出した遺伝子を通常の鹿児島酵母において発現量を増減させた株を作成し、そのアルコール耐性を検討したところ、次の結果を得た。

- (1). ENO1 と CY1 の遺伝子を酵母発現型ベクターである pAUR123 に sense 配列あるいは antisense 配列で接続して鹿児島酵母に組み込んだ ENO1(+) 株, CY1(+) 株および ENO1(-) 株, CY1(-) 株を作成した。
- (2). 作成した株のうち ENO1(+) 株, CY1(+) 株でアルコール耐性は低下しており, ENO1(-) 株, CY1(-) 株では逆に高いアルコール耐性を示した。
- (3). ノーザンハイブリダイゼーションにより, 各株の ENO1 の遺伝子の発現量を検討したところ, すべての株において ENO1 遺伝子は高い発現をしており, 顕著な差は認められなかった。
- (4). これに対して CY1 の遺伝子の発現量は, CY1(+) 株, ENO1(+) 株で高くなっており, CY1(-) 株, ENO1(-) 株で低くなっていたことから焼酎酵母のアルコール耐性の獲得には CY1 の遺伝子の増減を介していることが考えられた。

参考文献

- 1) 江藤 勲：大分県産業科学技術センター平成9年度研究報告,57(1998)