

焼酎酵母のアルコール耐性に関する遺伝子の解析 (第3報)

江藤 勸
食品工業部

Analysis of Relation Between Alcohol-Tolerance and *Shochu* Yeast Gene (3rd. report)

Susumu ETO
Food Science and Technology Division

要旨

焼酎酵母のアルコール耐性に関する遺伝子を見出しその機構を解明する目的で、清酒酵母や実験室酵母で報告されている種々の遺伝子の発現を増減させた鹿児島焼酎酵母株を作成し、アルコール耐性との関連を検討した。このうち ERG6 遺伝子について、アルコール耐性が高くなった株では発現が増加しており、耐性が低くなった株では、発現が減少していたことから、ERG6 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. はじめに

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、PCR法を応用した Subtraction を行い、アルコール耐性の獲得に関与すると思われる Enolase 1 (ENO1) 及び Cytochrome C1 (CY1) の遺伝子を検出した。さらに遺伝子組換えにより、これらの発現量を通常の鹿児島焼酎酵母で変化させると遺伝子の増減に伴ってアルコール耐性の強さが変化したことから、これらの遺伝子が実際に焼酎酵母のアルコール耐性に関与していると推測されたが、その耐性獲得機構については不明なままであった。本研究では、この獲得機構を明らかにする目的で、清酒酵母や実験室酵母においてアルコール耐性との関与が示唆されている遺伝子^{2, 3)}について、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するとともに ENO1 や CY1 遺伝子との関連について検討した。

2. 実験方法

2.1 プライマーの設計と合成

S.cerevisiae の遺伝子データより、目的とする遺伝子配列を挟むように各々プライマーを設計し、合成を行った (合成はサワディー・テクノロジー (株) による)。

2.2 目的遺伝子配列の作成

前報¹⁾に従い、2.1で合成したプライマーを使用して、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 (TaKaRa) 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 $1\mu\text{g/ml}$ 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 $1\mu\text{g/ml}$ 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

精製した目的遺伝子を含む 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 プロブを結合させて、DIG 核酸検出キットによりプロブを検出した。

3. 実験結果及び考察

3.1 目的遺伝子を増減させた酵母株の作成

清酒酵母では、ERG6 遺伝子のアルコール耐性への関与²⁾や耐性株で MDH2 が高発現していることが示唆されており、実験室株では PDE2 や ILV2 の関連が報告されている³⁾。これらの 4 遺伝子を増減させるための遺伝子配列を前報¹⁾のとおり作成し、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。

3.2 目的遺伝子を増減させた酵母株のアルコール耐性

ERG6 の遺伝子を sense 配列により増加させた株 ERG6 (+) と antisense 配列により発現を減少させた株 ERG6 (-) の 2 株および対照として 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 (Fig.1)。

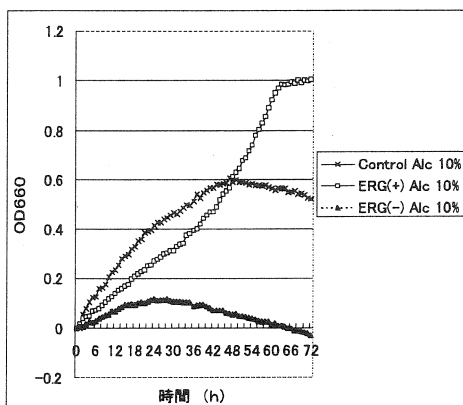


Fig.1 ERG6の発現調節によるアルコール耐性の変化

通常の YPD 培地中での増殖は 3 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、ERG6(+) 株で増加しており、ERG6(-) 株で減少していた。

また MDH2, PDH2 および ILV2 の遺伝子についてもアルコール耐性の検討を行った結果、PDH2(-) と ILV2(-) 株で耐性の上昇が認められ、PDH2(+) と ILV2(+) 株で耐性が低下した。また MDH2(+) 及び MDH2(-) 株では顕著な変化は見られなかった。

3.3 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を行った。前報でアルコール耐性が上昇した株で CY1 遺伝子が減少しており、耐性が低下した株で遺伝子の増加が認められたことから、本実験で作成した各酵母株についても CY1 遺伝子の発現量を検討した (Fig.2)。

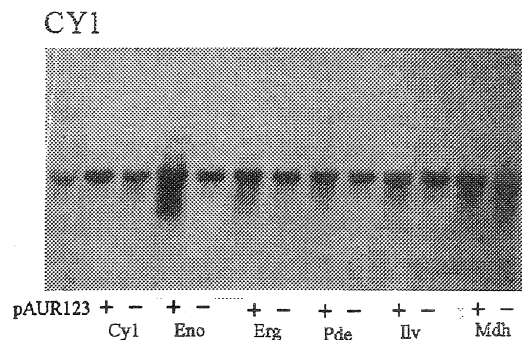


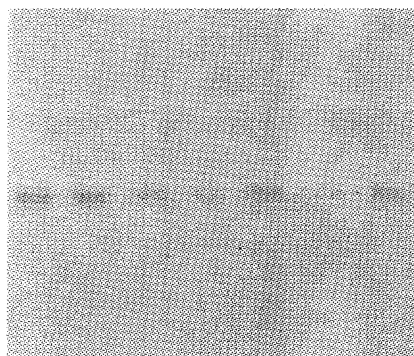
Fig.2 各株におけるCY1遺伝子の発現量

ENO1(+), (-) 及び CY1(+), (-) 各株については前報と同じ結果が得られたが、3.2でアルコール耐性の増加が認められた PDH2(-) と ILV2(-) 株では CY1 遺伝子の量に変化は認められず、CY1 遺伝子の変化だけではアルコール耐性の獲得との相関を説明できなかった。また、PDH2 遺伝子と ILV2 遺伝子の発現量の変化も検討したが、耐性獲得との相関性は認められなかった。これに対して、ERG6 遺伝子の発現量を検討したところアルコール耐性の増加している ENO1(-), CY1(-) 及び ERG6(+) 株で発現量が増加しており、アルコール耐性の低下した ENO1(+), CY1(+), ERG6(-) 株で発現の減少が認められた (Fig.3)。ERG6 はエルゴステロール合成系上で働く Sterol c-methyltransferase をコードする遺伝子であり、エルゴステロールは細胞膜脂質の構成成分で、膜の流動性や透過性を調整している。清酒酵母においては、仕込み末期のろみ中の酵母において ERG6 遺伝子の発現が増加していることなどからも、アルコール耐性との関連が示唆されている³⁾。

本研究結果より、焼酎酵母でもアルコールに対して耐性を獲得する場合、様々な遺伝子の発現調節の経路を経る可能性があるが、最終的な段階で ERG6 遺伝子の増加

が必要であると考えられた。今後さらに ERG6 遺伝子とアルコール耐性の関係を詳細に検討する予定である。

ERG6



pAUR123 + - + - + -
Erg Eno Cyl

Fig.3 各株におけるERG6遺伝子の発現量

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、通常の鹿児島酵母において種々の遺伝子の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). ERG6, MDH2, PDE2 及び ILV2 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む事によりそれぞれの遺伝子を増減した酵母株を作成した。
- (2). 作成した株の内 ERG6(-) 株, PDE2(+) 株, ILV2(+) 株でアルコール耐性は低下しており, ERG6(+) 株, PDE2(-) 株, ILV2(-) 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 CY1 の遺伝子の発現量を検討したところ、CY1(+) 株, ENO1(+) 株及び CY1(-) 株, ENO1(-) 株でアルコール耐性との相関が認められたものの、他の株では認められなかった。
- (4). これに対して ERG6 の遺伝子の発現量とアルコール耐性との間に正の相関が認められたことから焼酎酵母のアルコール耐性の獲得には ERG6 遺伝子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 10 年度研究報告, 171(1999)
- 2) 井上等：1998 年度日本生物工学会要旨集, 23(1998)
- 3) 高橋等：1998 年度日本農芸化学会要旨集, 261-263 (1998)