

## 論文内容の要旨

論文題目 ラガービール酵母 *Saccharomyces pastorianus* のゲノム解析

氏名 中尾 嘉宏

ビールは世界で最も飲まれているアルコール飲料であり、世界で年間約1億7,937万 kL 生産されている。またビールは、現在、日本だけでなく、中国、ロシアでも大量生産が行なわれており、世界中で飲用に供されている飲み物である。

ビールは、使用する酵母と醸造条件によって大きくエールビールとラガービールに分けられる。現在世界のビール生産量のうち、90%以上がラガータイプのビールであるため、ラガービールの醸造に使用されるラガービール酵母 (*Saccharomyces pastorianus*) は世界で最も重要な工業用酵母であると考えられる。ラガービール酵母は、ラガービール醸造にとって好ましいいくつかの生物学的特徴、例えば醸造中の適度かつ適切な時期の凝集能、低温での優れたマルトース、マルトトリオース資化能、香味安定作用を有する亜硫酸の高生成能などを有している。これらはラガービール醸造にとって重要な特性であるにも関わらず、ゲノムが明らかになっていないため、分子生物学的にほとんど解明されていなかった。

ラガービール酵母は、*Saccharomyces cerevisiae* と *S. cerevisiae* 近縁種の異質倍数体であることが示唆されている。現在、多倍体化は遺伝子の重複を許し、しばしば遺伝子の副次機能化、新機能化を引き起こすため進化的に有利であり、かつ多様な系統繁栄の基礎になっていると考えられており、多くの真核生物で

過去ゲノムの倍加が生じていたことが近年のゲノム解析によって明らかになっている。ゲノム倍加後の多倍体は、一定期間で大規模な遺伝子欠失、染色体乗り換えによってゲノムの冗長度が減少し2倍体化すると考えられている。異質倍数体のゲノム解読は、生命の進化を解明する上で、非常に重要な情報となると考えられているが、そのゲノム構造の複雑さによってこれまで解読されていない。

そこで、本研究では、ラガービール酵母の特性解明、産業利用、およびゲノム倍加後の進化メカニズムを解明するためにラガービール醸造に最も使用されている実用株 *S. pastorianus* Weihenstephan 34/70 (W34/70) 株のゲノムを世界で初めて解読し、その系統分類学的解析、および開発した DNA マイクロアレイを用いた逆遺伝学的アプローチによる高亜硫酸生成の分子生物学的解明、について検討した。

第1章「ラガービール酵母 *Saccharomyces pastorianus* Weihenstephan 34/70 株 (W34/70 株)のゲノム解読」では、W34/70 株のゲノム塩基配列決定を行い、別途作製した Optical mapping による染色体地図と比較検証することによって W34/70 株のゲノム構造を決定した。その結果、W34/70 株はゲノムサイズが約 26.1 Mb、36本の染色体から構成されていることが明らかとなり、そのうち約96%のゲノム塩基配列を決定することが出来た。W34/70 株は、一部染色体の欠失は存在するもの、ほぼ全ての *S. cerevisiae* (Sc) と *Saccharomyces bayanus* (Sb)のゲノムを有しており、2種の交雑体であることが証明された。しかしながら、Sc型 ORF と *S. cerevisiae* S288C 株 ORF との DNA 相同性は平均 99.2%と極めて高かったのに対し、Sb型 ORF と *S. bayanus* CBS 7001 株 ORF との相同性は平均 92.7%と明確に低かった。このことは、Sb型サブゲノムが CBS7001 株と進化的に離れていることを示している。一方ラガービール酵母のミトコンドリアゲノムは Sb由来でありゲノムシャッフリングが生じていないことも明らかとなった。

ゲノム倍加後に同じ機能を有する二つの ORF を持つ酵母が進化的圧力から開放され一つの遺伝子になることを示す、不完全化 ORF が W34/70 株の Sc および Sb 型サブゲノムからそれぞれ 28、33個同定された。また、Sc、Sb型染色体でそれぞれ1、5箇所大規模な領域での乗り換え欠失が生じており、対応するもう一方の染色体領域が非相互転座によって増加していた。更に SbXII 番染色体のリボソーム DNA 領域が大規模に減少していた。これらのことは、異質倍数体である W34/70 株がゲノム倍加後の倍数性減少プロセスに従うことを示している。

Sc と Sb サブゲノム間には、交雑後の出来事を示す8つのキメラ染色体が見つかり、この染色体乗り換えによって、亜硫酸生成経路上の遺伝子(Sc *MET3*、Sb *MET3*、

Sc *MET14*、Sb *MET14* そして Sb *MET16*)や優れたマルトース・マルトトリオース取り込み遺伝子 (LBYG03039 ; Sb-*MAL31*) のコピー数が倍加していることが明らかになった。興味深いことに、発現させるとマルトース・マルトトリオース資化能が低下するトランスポーター(Sc *AGT1*)が不完全化していた。これらのことは、W34/70 株では優れたマルトース・マルトトリオース取り込み遺伝子のコピー数は増加し、糖取り込み能の低いトランスポーター遺伝子は不活化したことを示している。また、これまで *Saccharomyces* ホモログとして同定されていないラガービール酵母特異的遺伝子としてモノカルボキシレートトランスポーターをコードする遺伝子を同定した。

第2章「ラガービール酵母および *S. bayanus* の系統分類学的解析」では、ラガービール酵母の Sb サブゲノムの由来系統株を明らかにすることを最終目的とした。しかしながら、現在の *S. bayanus* 種は、正確には種が複数含まれているとみなされている。また、多くの *S. bayanus* で多様性があることは、*S. bayanus* と *S. pastorianus* とを分類することを難しくしている。これら二つの種を明確に区別することは通常困難であり、いくつかの主要な菌株保存機関での株は、“*S. bayanus* or *S. pastorianus*”と表記されている。そこでまず我々は、現在単離分類されている *S. bayanus* と *S. pastorianus* 遺伝学的多様性を評価・系統分類すること、ラガー酵母の Sb サブゲノムの親株を同定することを目的として PCR/RFLP 解析を行った。その結果、*S. bayanus* 種は一つの交雑株と二つの純系、すなわち(1) CBS 7001 に代表される *S. uvarum* 株群、(2) NBRC 1948 に代表され、今回の系統分類で初めて単一のゲノムを有するグループとして見出された *S. bayanus* 株群、そして(3) *S. bayanus* と *S. uvarum* ゲノムの一部を含むが、*S. cerevisiae* ゲノムを含まない *S. bayanus* 交雑株群に分けられることを見出した。また、*S. pastorianus* にはラガービール酵母を含む *S. cerevisiae*/*S. bayanus*/Lager 交雑系統および、サイダー発酵に使用される酵母を含む *S. cerevisiae*/*S. bayanus*/*S. uvarum*/Lager 交雑系統が存在することが明らかとなった。更にラガービール酵母の Sb サブゲノムの親株として最も好適な種は、ビール醸造環境下からの単離された *S. bayanus* NBRC1948 株であることを見出した

第3章「ラガービール酵母の亜硫酸生成機構の分子生物学的解析」では、ラガービール醸造にとって重要な特性の一つである高亜硫酸生成能のメカニズム解明、および通気醸造条件下では亜硫酸生成量が減少することの原因を明らかにするために、異なる通気条件下でラガービール醸造を行い、定期的にサンプリングした酵母から mRNA を取得し、開発した DNA マイクロアレイを用いて網羅的な遺伝子発現解析を実施した。ラガービール酵母は発酵期間中、亜硫酸

生成経路上のラガービールしか有しない **Sb** 遺伝子群が対応する **Sc** 遺伝子群と比較して高い発現量を示した。また異なる通気条件下では、**Sb** 型の亜硫酸トランスポーター (*SbSSUI*) の発現量に差異が見られ、亜硫酸生成量と相関を示した。そこで、*SbSSUI* の高発現株、破壊株を作製、発酵試験を実施することによって通気条件での亜硫酸生成量の低下の原因は、*SbSSUI* の発現量低下に起因することを明らかにした。また *SbSSUI* の上流配列の転写因子結合サイトを解析することによって、細胞壁タンパク質の発現量を制御する転写因子 Mot3p および Upc2p の結合サイトを見出し、通気による **Sb SSUI** の発現量制御機構は、通気による細胞壁タンパク質の発現制御と同じであることが示唆された。