

## 論文の内容の要旨

論文題目 下面発酵ビール酵母の不安定性と低温増殖不良原因遺伝子に関する研究

氏名 山岸 裕美

下面発酵ビール酵母の遺伝子に関する研究は、近縁種である *S. cerevisiae* 実験室酵母の知見を参考に行われてきたが、下面発酵ビール酵母特有の性質に関する研究はそれでは不十分であった。その原因としては、*S. cerevisiae* 実験室酵母に比べて下面発酵ビール酵母の染色体数が多く、染色体が完全に同定されていないことが考えられた。下面発酵ビール酵母の遺伝子に関する研究を行うためには、保有するすべての遺伝子を対象とする必要があった。そこで、本研究ではまず、下面発酵ビール酵母の染色体を *S. cerevisiae* 及び *S. bayanus* の染色体と比較することにより同定した。*S. bayanus* の染色体のうち、8、9、12、14 番染色体は、*S. cerevisiae* の染色体が組み換わったキメラ構造をとっているため、サザンハイブリダイゼーションにより *S. cerevisiae* 染色体と区別することができる。サザンハイブリダイゼーションの結果から、下面発酵ビール酵母は、*S. cerevisiae* と *S. bayanus* 由来の双方の染色体を併せ持つことが確認された。一方、上面発酵ビール酵母は *S. cerevisiae* 由来の染色体のみを有することが確認された。

ビール醸造において、酵母は長期間繰り返し使用されるため、性状が変化した酵母が出現することがある。安定なビール品質を得るためには、性状が変化した酵母を簡単に検出

する必要がある。下面発酵ビール酵母の重要かつ変化しやすい特性として、低温での発酵能が上げられる。発酵能を評価する方法としては、フラスコスケールで発酵させたときのエキスの低下や炭酸ガス放出による重量減少を測定する方法があるが、時間がかかる上に実際にビール工場で起きている現象を再現できているとはいえない。発酵能の正確で簡易で迅速な評価方法の確立が強く望まれていた。そこで、本研究では下面発酵ビール酵母から発酵優良株と発酵不良株を単離し性状の比較を行うことにより、発酵不良株の検出方法を開発することを試みた。下面発酵ビール酵母 NBRC2003 の繰り返し培養した培養液から発酵優良株と発酵不良株を単離した。発酵不良株の表現型を解析したところ、低温増殖不良/高温耐性を示した。すなわち、高温耐性株は低温増殖不良であり、低温増殖不良の結果として発酵不良であることが明らかとなった。その他の下面発酵ビール酵母の高温耐性株についても同様の表現型が確認された。この高温耐性を利用することにより、工場で使用している酵母の発酵能を簡易で迅速に評価することができるようになった。

次に、この低温増殖不良原因遺伝子についての解析を行った。下面発酵ビール酵母では、使用できる選択マーカーが限定されること及び形質転換頻度が低いことから、*S. cerevisiae* 実験室酵母を用いて低温増殖不良原因遺伝子をクローニングし、その結果を下面発酵ビール酵母に応用しようと考えた。*S. cerevisiae* 実験室酵母 YPH500 の高温耐性株を単離し表現型を調べたところ、高温耐性株は低温増殖不良であり、一部の単離株は接合能を失っていた。*S. cerevisiae* 実験室酵母 YPH500 の高温耐性/低温増殖不良/接合不能株に *S. cerevisiae* 遺伝子ライブラリーを形質転換することにより、これらの性質を相補する遺伝子として *KEX2* をクローニングした。*KEX2* 遺伝子は  $\alpha$  ファクターのプロセッシングを行う蛋白質 kexin をコードする遺伝子であることから、本遺伝子が接合不能の形質を相補したのではないかと考えられた。そこで、YPH500 *KEX2* 破壊株を造成し、表現型を調べたところ、高温耐性/低温増殖不良/接合不能であった。このことから、低温増殖不良の原因遺伝子の 1 つは *KEX2* であると考えられた。*S. cerevisiae* 実験室酵母 BY4741 及び BY4741- $\Delta$  *kex2* の形態を、Calmorph を用いて比較したところ、BY4741 に比べて BY4741- $\Delta$  *kex2* の方が細胞の大きさが大きく、細胞の形が丸く、細胞のアクチン領域が大きく、芽のない細胞におけるアクチン脱局在細胞の割合が大きかった。

下面発酵ビール酵母は、*S. cerevisiae* と *S. bayanus* の交雑体であり、*S. cerevisiae* 由来染色体 2 セットと *S. bayanus* 由来染色体 2 セットを併せ持っている。そこで、下面発酵ビール酵母の低温増殖不良に *KEX2* 遺伝子が関与しているかを調べるため、下面発酵ビー

ル酵母 BF1 の *Sc-KEX2* 破壊株及び *Sb-KEX2* 破壊株を造成した。得られた *Sc-KEX2* 破壊株は *Sc-KEX2* の 1 本だけが破壊され 1 本は残っていた。この *Sc-KEX2* 破壊株は、BF1 に比べて高温耐性があったが、低温増殖能は変わらなかった。*Sb-KEX2* 破壊株は *Sb-KEX2* の 1 本だけが破壊され 1 本は残っていた。この *Sb-KEX2* 破壊株は、BF1 に比べて高温耐性があり、低温増殖能は不良であった。下面発酵ビール酵母 BF1 及び BF1-*Sb-kex2* 破壊株の形態を比較したところ、*S. cerevisiae* で観察されたような細胞の形態、アクチン領域、アクチン脱局在細胞の割合などに有意な差は検出されなかった。完全な表現型の一致は観察されなかったが一部の結果から、*Sb-KEX2* は下面発酵ビール酵母の低温増殖能に関係していると考えられた。