

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 山岸 裕美

下面発酵ビール酵母 (*Saccharomyces pastorianus*) の遺伝子に関する研究は、主として近縁種である *S. cerevisiae* 実験室酵母の知見を参考にして行われてきた。しかし、ビール製造における諸性質に関しては、下面発酵ビール酵母特有の性質を研究する必要性が指摘されてきた。本論文は、下面発酵ビール酵母の染色体構造の解析を行うとともに、低温増殖不良株に関する詳細な解析を行ったもので、6章からなる。

第1章の序論に続き、第2章では、パルスフィールド電気泳動及び多数の遺伝子をプローブとして用いたサザンハイブリダイゼーションを行うことにより、下面発酵ビール酵母の染色体の同定を行い、下面発酵ビール酵母の染色体の構造を明らかにした。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。下面発酵ビール酵母の染色体には、*S. cerevisiae* 実験室酵母に由来する染色体がすべて含まれ、更に *S. bayanus* に由来する染色体も含まれており、下面発酵ビール酵母は *S. cerevisiae* と *S. bayanus* の交雑体であることが染色体構造から明らかとなった。

第3章では、下面発酵ビール酵母低温増殖不良株の単離と表現型解析について検討した。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、低頻度ではあるが性状が変化した酵母が出現することが問題となっている。特に、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 (25℃) での発酵能不良株の出現があるが、発酵能を評価する方法はフラスコスケールでの発酵試験を行うという煩雑な方法が主要な方法であった。そこで、低温発酵能の低下した株を単離し、その表現型の詳細な解析から、これらの株は、高温 (34-35℃) での生育が可能となっていることを見だし、発酵タンク中の低温増殖不良株を簡便に検出する方法を確立した。

続いて、第4章では、この低温増殖不良原因遺伝子に関しての解析を行った。下面発酵ビール酵母では、使用できる選択マーカーが限られてい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 YPH500 の高温耐性株を単離し、これらの中で低温増殖不良株を調べたところ、一部の株は接合能を失っていた。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をクローニングし、その塩基配列から *KEX2* が原因遺伝子であることを明らかにした。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/接合不能を示した。このことから、低温増殖不良の原因遺伝子の

一つは *KEX2* であると考えられた。*S. cerevisiae* 実験室酵母 BY4741 及び BY4741- Δ *kex2* の形態を、酵母の画像解析システムである Calmorph を用いて比較したところ、 Δ *kex2* 株の方が細胞が大きく、形が丸く、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。

第5章では、下面発酵ビール酵母の *KEX2* 遺伝子を破壊することにより、低温増殖性への影響を調べた。下面発酵ビール酵母は、*S. cerevisiae* と *S. bayanus* の交雑体であり、*S. cerevisiae* 由来染色体と *S. bayanus* 由来染色体を併せ持っている。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、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、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。以上のように、*S. cerevisiae* 実験室酵母とは完全な表現型の一致は観察されなかったが、*Sb-KEX2* が下面発酵ビール酵母の低温増殖能に関係していることが示唆された。第6章では、総括と展望が述べられている。

以上、本研究は、下面発酵ビール酵母の染色体構造の解析を行うとともに、低温増殖不良株の簡易な判別法を確立するなど、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。