

醸造用酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の育種に関する研究

第1章 醸造用酵母の歴史と分類

1.1 酵母の歴史	1
1.2 酵母の分類	5
1.3 醸造用酵母の種類	10
1.4 酵母の増殖と培養	15
1.5 酵母の遺伝子工学	20

第2章 醸造用酵母の育種と遺伝的変異

2.1 醸造用酵母の育種戦略とその重要性

2.1.1 育種戦略の種類	22
2.1.2 育種戦略の選択	25
2.1.3 育種戦略の評価	28
2.1.4 育種戦略の最適化	31
2.1.5 育種戦略の応用	34

第3章 醸造用酵母の育種と遺伝的変異

河村大造

3.1 育種戦略の種類	35
3.2 育種戦略の選択	38
3.3 育種戦略の評価	41
3.4 育種戦略の最適化	44
3.5 育種戦略の応用	47

目 次

目 次	・ ・ ・	1
序 論	・ ・ ・	3
第 1 章 低温清酒酵母の育種		
緒言	・ ・ ・	5
実験方法	・ ・ ・	5
結果	・ ・ ・	7
考察	・ ・ ・	10
要旨	・ ・ ・	10
第 2 章 低温増殖性酵母の遺伝的性質と 酵母に低温増殖能を付与する遺伝子のクローニング		
緒言	・ ・ ・	22
実験方法	・ ・ ・	22
結果	・ ・ ・	25
考察	・ ・ ・	34
要旨	・ ・ ・	36
第 3 章 凝集泡なし酵母の育種とその性質		
緒言	・ ・ ・	61
実験方法	・ ・ ・	61
結果	・ ・ ・	64
考察	・ ・ ・	67

要旨	68
----	----

第4章 高温下で発酵力・増殖力の強い酵母の育種

緒言	83
実験方法	83
結果	85
考察	89
要旨	90

要約	100
----	-----

参考文献	104
------	-----

謝辞	108
----	-----

関連公表論文	109
--------	-----

序 論

*Saccharomyces cerevisiae*は有史以前から酒類の醸造やパンの製造などを通して人間生活に深いかかわりを持っている。その *S. cerevisiae*は単細胞の真核生物であり、生活環も明確である。1個の細胞は1個の核を保持し、一倍体や二倍体の栄養細胞から高次倍数体まで容易に育種でき、突然変異体の誘導や分離も容易である。そのため、酒類醸造やパン製造における工程改善・製品品質の改良を目的とした酵母の育種が盛んに行われている。また、四分子解析など古典的な遺伝解析の手法が確立しているため、遺伝的性質についても検討が可能である。さらに、酵母細胞自身を宿主とすることにより、酵母遺伝子のクローニングが可能であり、1996年4月には *S. cerevisiae*の染色体の全塩基配列が決定された。そして、クローニングされた遺伝子を用いて育種した実用酵母については、外来遺伝子の除去が確認できれば使用してもよいという段階まできている。

このように酵母の育種・遺伝に関する研究がめざましく進展する状況の中、本研究ではこれらの手法を基に醸造用酵母の育種を行い、製造工程の改善と製品品質の改良を図った。清酒酵母とアルコール発酵酵母である *S. cerevisiae*の増殖限界温度の改善を主目的に研究を進めた。清酒酵母では低温増殖性・発酵性の向上とそれに付随して見いだした凝集泡なし性について、アルコール発酵酵母では高温発酵性・増殖性の向上について検討を行った。本論文は育種内容によって4章での構成とした。

第1章では低温清酒酵母の育種についてまとめた。清酒醸造は17, 18℃以下の低温下で発酵が行われる。これは並行複発酵の糖化とアルコール発酵のバランスをとることが一つの理由であり、もう一つは高温で発酵させると有機酸生成が多くなるなど酒質が悪化することが理由である。さらに、吟醸酒醸造ではより低い10℃以下で発酵が行われ、酸度が低く、香りの高い吟醸酒が

醸造されている。しかし、もろみ温度が低いと酵母の増殖速度が遅く、アルコール生成速度も遅いため、発酵日数が長くなる。これを改善するには低温下で増殖力・発酵力の大きい酵母を育種することが有効と考えられる。この酵母を育種することができれば、より低温下での清酒醸造が可能になり、その結果として清酒の品質向上も期待できる。このように清酒醸造にとって重要な性質である低温増殖性を改良することは清酒醸造工程の改善および製品品質の向上を図る上で重要と考えられる。そこで、低温増殖性酵母を分離選択してその酒造適性について検討した。

第2章では前章で育種した低温増殖性酵母の遺伝的性質を検討し、その低温増殖能を酵母に付与する遺伝子のクローニングを行った結果について記述した。

第3章では凝集泡なし性清酒酵母についてまとめた。本来、清酒酵母はもろみ期間の前半において高泡を形成する。この泡のため、仕込量を控えることを余儀なくされ、また、泡消し作業の労力も必要となる。泡なし性はこれらの問題を解消できるため清酒酵母にとっては有用な性質である。第1章での低温清酒酵母の育種の過程で見いだした凝集泡なし性を示す一倍体清酒酵母を基にしてその凝集泡なし性を有する二倍体酵母を育種し、その性質について検討を行った。

第4章ではアルコール発酵酵母の育種についてまとめた。アルコール発酵においては発酵が盛んになると発生する発酵熱により、もろみ温度が上昇する。効率良く発酵を続けるためには、もろみの冷却が必要となる。その冷却費用節減のため、高温下でも増殖・発酵が可能な酵母を育種することはアルコール発酵の工程改善における重要な課題の一つである。そこで、高温下でもアルコール発酵可能な酵母を育種し、その高温増殖性についても検討した。

第1章 低温清酒酵母の育種

緒言

清酒醸造において、もろみ温度は17, 18℃以下に保たれている。これは並行複発酵の糖化とアルコール発酵のバランスをとるという理由の他に、もう一つ、もろみ温度が高いと有機酸生成が多くなる¹⁾など酒質が悪くなるという理由が挙げられる。さらに、吟醸酒醸造ではより低い10℃以下で発酵が行われ、酸度が低く、香りの高い吟醸酒が醸造されている。しかし、もろみ温度が低いと酵母の増殖速度が遅く、アルコール生成速度も遅い^{2, 3, 4)}ため、発酵日数が長くなる。これを改善するには低温下で増殖力・発酵力の大きい酵母を育種することが最も有効と考えられる。この酵母の育種はより低温での清酒醸造を可能にし、低温発酵により生酸性を低く抑え吟醸香を生成・蓄積させる吟醸酒醸造にとって非常に有用と考えられる。以上のことから、低温下で増殖力・発酵力の強い酵母を育種すれば、清酒醸造工程の改善および製品品質の向上が期待できる。そこで、低温下で増殖能・アルコール生成能の強い酵母を育種し、その酒造特性を調べ、吟醸用酵母育種の原因株としての有用性を検討した。

実験方法

1. 菌株 清酒酵母日本醸造協会6, 7, 9, 10号(K6, K7, K9, K10)と広島2, 5, 6号(H2, H5, H6)からRandom-spore-plating法⁵⁾によって得られた一倍体57株およびその変異株を使用した。一倍体株の選択は、1)接合能を有すること、2)孢子形成能がないこと、3)芽そくを形成すること、4)細胞の大きさを基準にして行った。

2. 変異処理 対数増殖期の細胞を滅菌水に懸濁し、シャーレに入れ攪拌しながら紫外線（15 Wの殺菌灯）を30 cmの距離から30～120秒間照射した。そのときの生存率は0.1～2%であった。

3. 低温増殖能の検索 コロニー形成日数による一次検索と比増殖速度の測定による二次検索の2回で行った。まず、一次検索はYPD寒天培地（酵母エキス（オリエンタル酵母）1%，ペプトン（日本製薬）2%，グルコース2%，寒天2%）に酵母懸濁液をシャーレ1枚あたり100個前後のコロニーが出るように塗布して、5℃で静置してコロニー形成を肉眼で観察した。二次検索は次の要領で行った。まず、YPD液体培地に一定量の前培養液を接種し、3～20℃に静置した。620 nmの吸光度を測定することによって増殖を調べ、その結果から比増殖速度を求めた。

4. 低温発酵能の検索 発酵通気管を付けた1 l容エルレンマイヤーフラスコに480 mlのYPD（グルコース20%）液体培地を入れた。この培地に30℃で48時間前培養した培養液20 mlを接種した。これを5，10℃に静置して炭酸ガス発生による減少重量を測定した⁶⁾。

5. 麴汁での発酵試験 まず、麴汁培地（Bllg.10.4°）に一定量の前培養液を接種し、10℃で15日間静置培養した。その後、培養液の上澄液をとり、その成分を分析した。酸度は中和に要した1/10 N・NaOHの容量で示し、アミノ酸はホルモール滴定法⁷⁾によって分析した。アルコールはガスクロマトグラフィーによって測定した。

6. 仕込試験 清酒醸造特性を検討するため、総米200 g（仕込A）規模と総米156 kg（仕込B）規模の仕込試験を行った。これらの試験はいずれも酵母仕込、二段仕込で行った。仕込配合をTable 1に示した。仕込Aにおいては、水麴から留仕込前まで15℃に、留仕込後は試験終了まで所定のもろみ温度を保った。仕込容器に発酵通気管を取り付け、発酵経過に伴うもろみ重量の

減少を測定してアルコール生成量を推定した⁸⁾。発酵の終了は減少重量が1日あたり1g以下になった時点とした。仕込Bには、昭和62年広島県産中生新千本(精米歩合70%)を用いた。浸漬および水切り時間はそれぞれ18時間および2時間とし、蒸し時間は50分間とした。酒母は省略し、酵母を活性化して用いた。製成酒の目標日本酒度を±0とした。製成酒の一般成分(日本酒度, アルコール分, 酸度, アミノ酸度)の分析は国税庁所定分析法⁷⁾に準じて行った。

結 果

1. 清酒酵母からの低温増殖性一倍体株の分離

一倍体株の低温増殖能の検索の結果をTable 2に示した。供試した一倍体株のほとんどが、親株に比べてコロニー形成日数が長かった。しかし、H2-5株(a型)だけが親株のH2株よりもコロニー形成日数が短くなった(12日でコロニー形成)。この株と他の一倍体株の中でコロニー形成日数の比較的短かった2株と併せて計3株を選択した。その2株はK10株の一倍体であるK10-12株(α 型, 14日でコロニー形成)とK6株の一倍体であるK6-45株(a型, 12日でコロニー形成)である。次に、この一倍体3株を上述の方法で紫外線処理してYPD寒天培地に塗布した。5℃に静置してコロニー形成が元の一倍体株より速くなったコロニーを釣菌した。以上、一次検索で一倍体3株とその変異株188株(H2-5株から60株, K10-12株から59株, K6-45株から69株)を選択した。

次に、一次検索で選択した菌株を増殖能の二次検索と発酵能の検索に供した。その結果をTable 3,4に示した。このTableには変異株の中で増殖能・発酵能の優れていた2株と親株の値を記した。3, 5℃ではH2-5株がH2株よりも比増殖速度が大きかった。他の一倍体株は親株に比べて増殖能が劣っていた。発酵能につい

ても増殖能と同様の結果がみられた。すなわち，H2-5株が一倍体であるにもかかわらず，H2株と同等あるいはそれ以上の発酵能を示したが，K10-12株とK6-45株については親株より劣っていた。次に，変異株についてみてみると以下のことがわかる。H2-5株の変異株については比増殖速度は変化しないが，発酵能が上昇している株が認められた。K10-12株とK6-45株の変異株についてはその中に5，10℃において元の一倍体株や親株より大きい比増殖速度を示すものがあった。この現象は低温だけに限られているようで，20℃になるといずれも元の一倍体株や親株と差がなくなった。発酵能については元の親株と比較すると同等あるいは劣るものの，元の一倍体株と比べると変異株の能力が上昇していることがわかった。以上の結果から，低温増殖能の向上した菌株は発酵能も向上すること，紫外線処理によって低温増殖能・発酵能を向上させ得ることがわかった。

2. 麴汁培地・小仕込試験による一倍体低温清酒酵母の選択

麴汁培地で発酵試験を行い，選択した一倍体株が清酒酵母としての有用特性を備えているかどうかを検討した。Table 5にその結果を示した。各菌株ともアルコール・酸度・アミノ酸度の値は適的な範囲にあると思われた。香気も各菌株とも良好で，特に異臭は感じられなかった。

次に，小仕込試験（仕込A，もろみ温度15℃）を行い，留後20日目で試験を終了し，製成酒の日本酒度・アルコール分・酸度・アミノ酸度を測定した。その結果をTable 6に示した。K6-45株，K10-12株とそれらの変異株K6-45-36株，K10-12-42株による製成酒はH2-5株およびその変異株H2-5-62株による製成酒に比べ，いずれも日本酒度の切れが悪く，アルコール分も低い値となり，酸度およびアミノ酸度は高い値を示した。従って，これら一倍体株の中ではH2-5株およびH2-5-62株が清酒もろみ中において他の4株に比べ優れた性質を有することが認められた。

3. 選択した一倍体低温清酒酵母の小仕込試験による酒造適性の

検討

上記までの過程で選択した H2-5 株および H2-5-62 株を用いて、もろみ温度 9 ~ 18 °C の範囲で小仕込試験（仕込 A）を行い、その温度特性を検討した。対照仕込は H2-5 株の親株である H2 株（普通醸造用酵母）と K9 株（吟醸用酵母）を用いた。アルコールの生成を示すもろみ重量の変化を Fig. 1 に、製成酒の一般成分を Table 7 に示した。もろみ温度 15 °C および 18 °C では、もろみ重量の変化は 4 株ともほぼ同様の挙動を示し、製成酒の一般成分においても大きな差異は認められなかった。もろみ温度 9 °C および 12 °C の場合には、もろみ重量の変化はもろみ経過とともに 4 株間に差異が生じ、対照の H2 株、K9 株に比べ、H2-5 株と H2-5-62 株では減少重量が低い値となった。これを H2-5 株と H2-5-62 株の比較でみると、12 °C ではほぼ同程度の重量変化を示したが、9 °C ではもろみ後半で H2-5-62 株の減少重量は H2-5 株のそれより大きな値を示した。この結果は Table 7 の結果とも一致した。すなわち、12 °C では製成酒の一般成分の各値は H2-5 株と H2-5-62 株においてほとんど差異は認められず、9 °C では日本酒度・アルコール分に関して H2-5-62 株が H2-5 株より優れた値を示した。これは低温下で増殖能・発酵能の強い変異株を選択したことと一致する。また、清酒もろみ中でも変異株が低温下で強い発酵力を示すことが確認されたと考えられる。この H2-5-62 株は吟醸用酵母 K9 株と比較すると 9 °C および 12 °C でのアルコール生成量が少し低い値となった。

4. 一倍体低温清酒酵母の中間工業規模の仕込試験

以上の結果より、H2-5-62 株は吟醸用酵母として用いるにはまだ今後の育種が必要であるが、普通醸造用酵母としては一倍体のままでも清酒製造が十分可能であると推察された。そこで、H2 株を対照として中間工業規模の仕込試験（仕込 B）を行い、H2-5-62 株の酒造適性を検討した。Fig. 2 にもろみの日本酒度、アルコール分および品温の変化を示し、Table 8 に製成酒の一般成分と種々

の歩合を示した。Fig. 2で日本酒度・アルコール分の変化は2株間でほとんど差異は認められなかった。Table 8においてもH2-5-62株とH2株の各値に大きな差は認められなかった。すなわち、H2-5-62株による製成酒のアミノ酸度がH2株のそれより若干高い値を示した以外は、日本酒度・アルコール分・酸度および各歩合ともほとんど同様の値を示した。また、香気に関してH2-5-62株による製成酒がH2株によるものに比べて官能的に若干弱く感じられた。以上のことより、H2-5-62株は香気が若干弱い点を除けば、従来の清酒酵母と比べて遜色なく、一倍体のままで普通醸造用酵母として使用可能であり、普通醸造用酵母育種の原因株としても有用であることが確かめられた。

考 察

分離選択したH2-5-62株が小仕込試験で実用の吟醸酒醸造用酵母であるK9株と比較して9℃および12℃でアルコール生成量が少し低い値となったことについては、二倍体酵母を造成することによって解決されると思われる。しかし、同型接合的な二倍体化は酵母の生理的性質の大きな変化をもたらさないことが報告されている^{9, 10)}ので、H2-5-62株の相手株の選択には考慮しなければならない。香气生成の点と併せて、吟醸用酵母を育種する際の今後の課題と考える。また、原らは日本醸造協会10号酵母と9号酵母あるいは7号酵母から、発酵力・酸生成・香气が正常な一倍体株を分離・選択し、それらを交雑して吟醸用酵母を造成している¹¹⁾。このことはH2-5-62株の相手株の選択しだいで吟醸用酵母の育種が十分可能であることを示している。

要 旨

清酒酵母である日本醸造協会6, 7, 9, 10号酵母と広島2,

5, 6号酵母から一倍体株を分離した。広島2号酵母から取得したH2-5株以外は5℃において親株より速く増殖する一倍体株は認められなかった。H2-5株, K10-12株(日本醸造協会10号酵母から分離), K6-45株(日本醸造協会6号酵母から分離)を紫外線処理して, 5℃において速くコロニーを形成する株を分離した。変異株の中に低温(5℃, 10℃)での増殖能・発酵能が改善されたものがあった。

低温増殖性酵母として分離・選択した一倍体酵母の酒造適性を検討した。その中ではH2-5-62株(H2-5株の変異株)が優れた性質を有していた。もろみ温度9℃および12℃での仕込試験では従来の吟醸用酵母には劣るものの, 一倍体酵母としては低温下での発酵力が強く, 吟醸用酵母育種の原因株として有用であることが認められた。また, もろみ温度15℃および18℃での仕込試験の結果, 従来の普通醸造用酵母と同等の発酵力を示した。そして, 一倍体のままでも清酒製造が可能であり, 普通醸造用酵母育種の原因株としても有用であることが確かめられた。

Table 1. Feed program for preparation of sake mashes.

Feed program A.

	1st feed	2nd feed	Total
Total rice (g)	74	126	200
α -rice (g)	54	100	154
Dried rice <i>koji</i> (g)	20	26	46
Water (ml)	150	165	315
Yeast ^a (ml)	2		2
Lactic acid ^b (g)	0.31		0.31

^a Yeast were cultivated overnight in *koji* juice at 28°C on a shaker (120 rpm).

^b 75% solution

Feed program B

	1st feed	2nd feed	Total
Total rice (kg)	52	104	156
Rice for steaming ^a (kg)	35	86	121
Rice for <i>koji</i> ^a (kg)	17	18	35
Water (l)	78	125	203
Yeast ^b (l)	1		1
Lactic acid ^c (g)	218		218

^a Rice of 70% polishing yield was used.

^b Yeast were cultivated overnight in *koji* juice at 28°C on a shaker (120 rpm).

^c 75% solution

Table 2. Comparison of growth rate of haploid strains and their parent at 5°C.

Parent strain	No. of haploid strains isolated	Parent strain** (days)	Growth characteristics*			
			No. of haploid strains isolated			
			~0	+1~+2	+3~+4	+5~
K-6	10	10	0	1	2	7
K-7	7	11	0	0	2	5
K-9	11	12	0	1	1	9
K-10	12	14	1	4	1	6
H-2	11	16	1	1	7	2
H-5	2	15	0	0	1	1
H-6	4	16	0	2	1	1

* Incubation time (days) at 5°C which is needed for the appearance of visible colonies was expressed as the difference between that of haploid strains and their parents.

** Incubation time (days) at 5°C of parental strains.

Table 3. Specific growth rate shown by parental and mutant strains.

Strain	Specific growth rate (h^{-1})			
	3°C	5°C	10°C	20°C
H-2	N.G.*	0.014	0.055	0.26
H-2-5	0.012	0.021	0.055	0.23
H-2-5-62	0.012	0.025	0.066	0.25
H-2-5-131	0.012	0.022	0.060	0.22
K-10	0.009	0.018	0.053	0.29
K-10-12	N.G.	0.014	0.048	0.17
K-10-12-41	0.008	0.026	0.063	0.21
K-10-12-42	0.007	0.029	0.058	0.20
K-6	0.017	0.018	0.066	0.28
K-6-45	0.010	0.016	0.049	0.23
K-6-45-36	0.009	0.031	0.053	0.24
K-6-45-39	0.009	0.030	0.058	0.22

* N.G.: OD_{620} value increased gradually, but there was no log phase.

Table 4. Fermentation rate shown by parental, and mutant strains.

Strain	CO ₂ evolved (g) during :			
	at 5°C		at 10°C	
	0-290 h	290-550 h	0-90 h	90-180 h
H-2	0.1	1.2	0.1	4.0
H-2-5	1.1	4.1	0.3	4.8
H-2-5-62	1.9	5.1	0.7	5.9
H-2-5-131	0.4	4.1	0.2	4.8
K-10	0.1	1.8	0.5	7.2
K-10-12	0.1	0.4	0.3	4.1
K-10-12-41	0.3	2.3	0.6	8.4
K-10-12-42	0.3	3.1	0.6	8.3
K-6	0.5	3.0	1.2	8.6
K-6-45	0.1	0.9	0.2	5.7
K-6-45-36	0.5	3.0	0.3	9.1
K-6-45-39	0.3	2.0	0.3	9.0

Table 5. Components of *koji* juice fermented by parental and mutant strains.

Strain	Alcohol (v%)	Total acid (ml)	Amino acid (ml)
H-2	4.7	1.83	0.92
H-2-5	4.9	1.75	1.12
H-2-5-62	4.7	1.73	1.11
H-2-5-131	5.0	1.74	1.04
K-10	5.0	1.79	0.87
K-10-12	4.5	1.38	1.04
K-10-12-41	4.8	1.68	0.92
K-10-12-42	4.4	1.65	1.05
K-6	4.5	1.82	0.93
K-6-45	4.4	2.02	0.99
K-6-45-36	4.4	2.02	1.13
K-6-45-39	4.6	1.96	0.87

Table 6. Composition of sake produced by haploid strains in laboratory scale sake brewing.

Yeasts	Mating type	Sake meter	Alcohol (vol%)	Total acid (ml)*	Amino acid (ml)*
H-2-5	a	+4	20.6	3.7	3.9
H-2-5-62	a	+5	20.7	3.4	3.8
K-6-45	a	-5	19.4	4.2	4.5
K-6-45-36	a	-5	19.5	4.0	4.5
K-10-12	α	-4	19.4	3.8	4.5
K-10-12-42	α	-5	19.2	3.9	4.6

Sake was assayed by the standard method established by the National Tax Administration Agency.

Fermentation period and temperature after 2nd feed were 20 days and 15°C.

* 0.1N-NaOH/10 ml

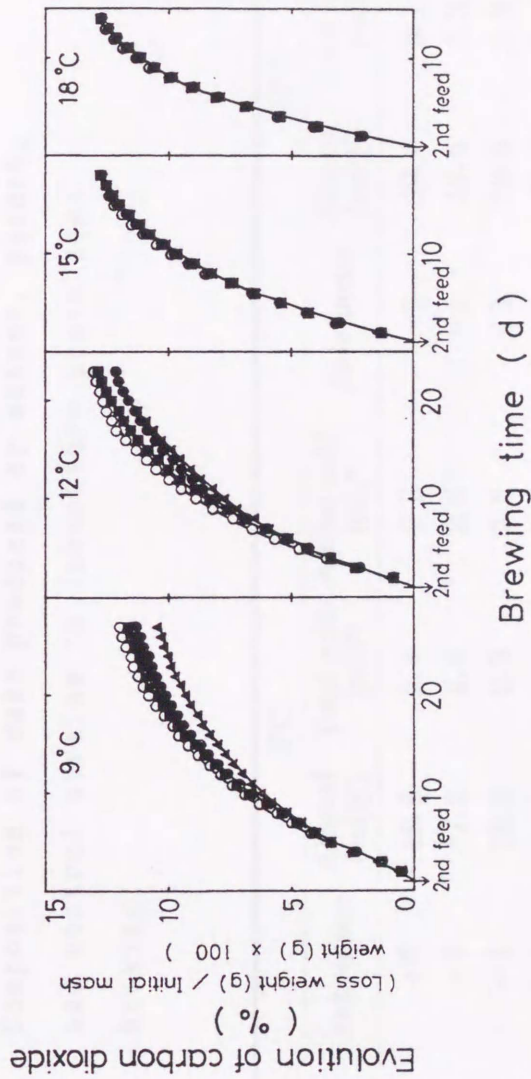


Fig. 1. Courses of sake fermentation by mutant, parent, and control strains.

Amount of feed was 200g. Fermentation temperature after 2nd feed was 9°C, 12°C, 15°C, and 18°C. Brewing time was days after 2nd feed.

●, H2-5-62; ▲, H2-5; ■, H2; ○, K9.

Table 7. Composition of sake produced by mutant, parent, and control strains in laboratory scale sake brewing.

Yeasts	9°C				12°C			
	Sake meter	Alcohol (vol%)	Total acid (ml)*	Amino acid (ml)*	Sake meter	Alcohol (vol%)	Total acid (ml)*	Amino acid (ml)*
H-2-5-62	+6	18.5	2.4	2.5	-1	19.4	3.1	2.9
H-2-5	-6	17.2	2.6	2.6	-1	19.5	3.3	3.0
H-2	-1	18.3	2.5	2.6	+1	19.6	3.3	3.0
K-9	+4	19.2	2.7	2.5	+2	20.2	3.1	3.5

Yeasts	15°C				18°C			
	Sake meter	Alcohol (vol%)	Total acid (ml)*	Amino acid (ml)*	Sake meter	Alcohol (vol%)	Total acid (ml)*	Amino acid (ml)*
H-2-5-62	+3	20.3	3.4	3.6	+4	20.3	3.8	4.1
H-2-5	+3	20.2	3.6	3.7	+3	20.0	3.8	4.0
H-2	+2	20.0	3.7	3.6	+1	20.1	3.9	4.1
K-9	0	20.0	3.6	4.3	+1	20.0	3.8	4.7

Sake was assayed by the standard method established by the National Tax Administration Agency. Fermentation period after 2nd feed was 27 days at 9°C, 23 days at 12°C, 18 days at 15°C and 14 days at 18°C.

* 0.1N-NaOH/10 ml

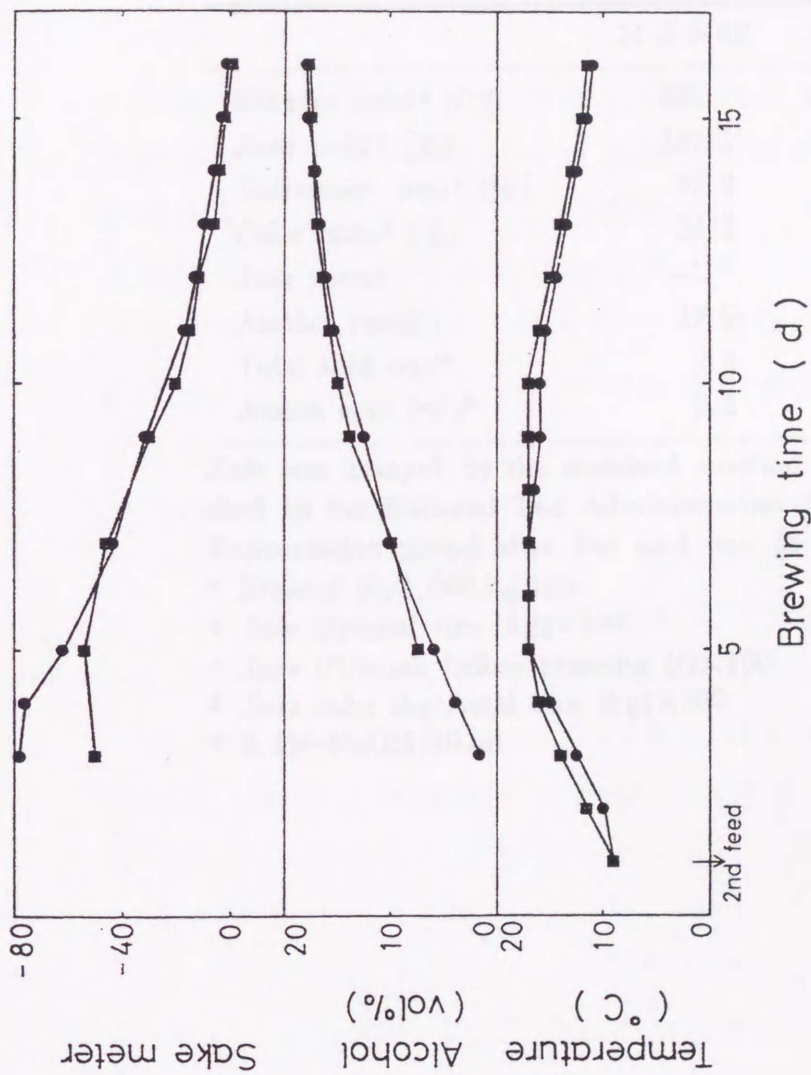


Fig. 2. Courses of sake fermentation by mutant and parent strains.

Amount of feed was 156kg. Brewing time was days after 2nd feed.

●, H2-5-62; ■, H2.

Table 8 Yields and composition of sake produced by mutant and parent strains in pilot scale sake brewing.

	H-2-5-62	H-2
Ethanol yield ^a (l/t)	324	319
Sake yield ^b (%)	187.2	187.8
Sake-mash ratio ^c (%)	87.2	87.7
Cake ratio ^d (%)	24.1	24.2
Sake meter	-1	+1
Alcohol (vol%)	17.9	17.6
Total acid (ml)*	2.4	2.1
Amino acid (ml)*	2.1	1.6

Sake was assayed by the standard method established by the National Tax Administration Agency. Fermentation period after 2nd feed was 16 days.

^a Ethanol (l)/1,000 kg rice

^b Sake (l)/total rice (kg)×100

^c Sake (l)/mash before pressing (l)×100

^d Sake cake (kg)/total rice (kg)×100

* 0.1N-NaOH/10 ml

緒言

吟醸酒は清酒の中の高級酒と位置づけられ、すっきりした味と吟醸香といわれる果実のような香気が特徴である。このような特徴は数多くの要因，例えば高度精白米・低温発酵・吟醸酒用の突き破精麴・吟醸酒用の酵母などが複雑にからまって醸し出されると考えられる。この中で最も大きな要因と考えられるのが吟醸酒醸造専用の酵母である。その吟醸酒醸造用酵母に望まれる性質とは低温下での強い増殖力と発酵力，エタノール耐性の強さ，高香氣生成能，低い酸生産性などである。これらの性質の中で，エタノール耐性^{1,2)}と高香氣生成^{1,3), 1,4)}については既に育種が行われており，本論文では酵母の低温下での増殖力・発酵力に着目して研究を行った。第1章において低温下で増殖力・発酵力の強い一倍体清酒酵母を育種し，その酒造適性を検討した。本章では低温増殖性酵母の遺伝的性質を調べ，酵母に低温増殖性を付与する遺伝子のクローニングを行った。

実験方法

1. 酵母菌株と培地 実際の清酒製造に使用されている清酒酵母では孢子形成能が低いため，子のう解剖による四分子の取得が困難であった。そこで，Table 9(A) に示した低温非増殖性の遺伝研究株を用いて低温増殖性の遺伝解析を行った。これらの株は研究室保存株 8A-2A(α *leu2 his3*)と YNN140(a *ura3 his3 ade2 trp1*)の交雑株より得た一倍体株でいずれも低温増殖能を示さない。これらの株を用いた場合においても四分子の取得率が低く，各四分

子解析における解析数が少なくなった。また，低温増殖性遺伝子が発酵力に及ぼす影響を調べるために清酒酵母日本醸造協会9号（K9）と広島2号（H2）から Random-spore-plating 法⁵⁾によって一倍体株を取得してこれに用いた。これらの株に変異処理・交雑・子のう解剖などを行い，目的の菌株を造成しておのこの試験に用いた。それら遺伝的性質の検討に用いた菌株を一括して Table 9 に示した。また，低温増殖性を付与する遺伝子のクローニングに用いた菌株を Table 10 に示した。通常の培養には YPAD 培地（酵母エキス（オリエンタル酵母）1%，ペプトン（日本製薬）2%，グルコース2%，硫酸アデニン0.04%）を用いた。子のう解剖は micromanipulator を用いて行い，交雑は集団接合法¹⁵⁾によって行った。胞子形成は酢酸カリウム1%，酵母エキス（オリエンタル酵母）0.1%，グルコース0.05%，寒天2%の組成の培地で行った。栄養要求性の検定は次に示す組成の合成培地を用いて行った。最小培地（イーストナイトロジェンベース（Yeast Nitrogen Base w/o amino acids; DIFCO）0.67%，グルコース2%，寒天2%）にアミノ酸等のオミッション混液（最終濃度がロイシン30 ppm，イソロイシン30 ppm，リジン30 ppm，バリン150 ppm，フェニルアラニン60 ppm，メチオニン20 ppm，トリプトファン20 ppm，ヒスチジン20 ppm，アルギニン20 ppm，チロシン30 ppm，ウラシル30 ppm，アデニン400 ppmでこのうちの一成分をぬいて調製した混合液）を加えて調製した。この栄養要求性の検定に用いる培地の中でウラシルをぬいた培地を，特に，H-uracil培地として形質転換株に関する試験に用いた。接合型は基準株として AH22(a)と NA87-11A(α)を用い，基準株と試験株とを混合し接合子形成の有無を観察して判定した。YPAD+AA培地は YPAD 培地に次に述べるアミノ酸のうちのひとつを補足したものである：0.4%グリシン，0.4%L-アラニン，1.5%L-バリン，0.3%L-ロイシン，0.3%L-イソロイシン，0.4%L-セリン，0.4%L-スレオニン，0.4%L-

システイン, 0.2% L-シスチン, 0.2% L-メチオニン, 0.2% L-アスパラギン酸, 0.4% L-アスパラギン, 0.2% L-グルタミン酸, 0.4% L-グルタミン, 0.3% L-リジン, 0.2% L-アルギニン, 0.6% L-フェニルアラニン, 0.3% L-チロシン, 0.2% L-ヒスチジン, 0.2% L-トリプトファン, 0.4% L-プロリン, 0.4% ヒドロキシ-L-プロリン。この補足した量は通常の栄養要求性を充たす量の50~100倍量である。必要な場合は2%の寒天を加えて寒天培地とした。

2. 大腸菌菌株と培地 *Escherichia coli* NM522 ($\Delta(lac-proAB)$, *thi*, *hsd* Δ 5, *supE*, [F', *proAB*, *lacI*^q, *lacZ* Δ M15])¹⁶⁾が組み換えプラスミドの構築とプラスミドの増幅に用いられた。培養にはLB培地(1%バクトトリプトン(Difco), 0.5%酵母エキス(オリエンタル酵母), 0.5%塩化ナトリウム)を用いた。必要に応じてアンピシリンナトリウム(50 μ g/ml)を添加した。必要な場合は1.5%寒天を加えて寒天培地とした。

3. 変異処理 対数増殖期の酵母細胞を滅菌水に懸濁し,シャーレに入れて攪拌しながら紫外線(15Wの殺菌灯)を30cmの距離から30-120秒間照射した。そのときの生存率は0.1-2%であった。

4. 低温増殖性の検定 変異処理した酵母に関する場合はYPAD寒天培地に15°Cで培養した酵母濃度 10^6 /ml程度の酵母培養液(YPAD液体培地)を植菌して所定の温度に静置した。肉眼で観察を続け,低温増殖性の検定を行った。

形質転換した酵母の場合はH-uracil培地を用いた液体培地と寒天培地の2種類で行った。液体培地の場合は15°Cで培養した前培養液を本培養液中の酵母濃度がおよそ 1.5×10^6 cells/mlになるように接種して所定の温度で培養した。酵母数を経時的にヘマチトメーターで測定した。寒天培地の場合は15°Cで培養した前培養液を寒天培地上に滴下した(約 1×10^6 cells/ml)。その接種した寒天培地を所定温度に保ち,増殖を肉眼で観察した。

15℃で増殖できない株については30℃で前培養を行い、以後の試験は同様に行った。

5. 小仕込試験 低温増殖性遺伝子の発酵力に及ぼす影響を調べるため、小仕込試験を行った。その仕込配合をTable 11に示した。仕込は麴汁培地で28℃、一晚しんとう培養した酵母培養液を用いた二段仕込で行った。発酵温度は水麴から試験終了までそれぞれ10℃と15℃一定の2種類で行った。また、仕込容器に発酵通気管を取り付け、発酵経過に伴うもろみ重量の減少を測定してアルコール生成量を推定した⁸⁾。

6. アルコール分の分析 製成酒のアルコール分の分析は国税庁所定分析法⁷⁾にて行った。

7. 形質転換 酵母の形質転換は伊藤らの方法¹⁷⁾に準じて行った。大腸菌の形質転換はManiatisらの方法¹⁸⁾に準じて行った。

8. DNAの取り扱い 酵母のゲノムDNAはCampbellらの方法¹⁹⁾に準じて調製した。プラスミドの構築、DNAの調製、電気泳動、酵素反応はManiatisらの方法¹⁸⁾に準じて行った。

9. DNA塩基配列の決定 M13mp18とM13mp19にサブクローニングし、Sangerらの方法²⁰⁾によってDNA塩基配列を決定した。

10. サザンハイブリダイゼーション²¹⁾ 所定の酵素で分解したゲノムDNAをアガロースゲルで分離し、Nytran Nylon膜にトランスファーした。ハイブリダイゼーションはDNA labeling and detection kit (Boehringer Mannheim) を用いて行った。

11. プラスミドの安定性 非選択条件下 (YPAD液体培地) で一晚増殖させた形質転換株を適当な濃度に希釈してYPAD寒天培地に塗布した。30℃で3日間培養後、コロニーを選択培地 (H-uracil) にレプリカした。選択マーカ (Ura⁺) を保持している細胞の割合でプラスミドの安定性を表した。

結 果

1. 低温増殖性変異株の分離

Table 9(A)中の低温非増殖性である 34A, 24A, 46A 株に変異処理を行い, 一つの YPAD 寒天培地に約 10^4 個の細胞を塗布して 5°C に静置した。増殖してコロニーを形成したものを釣菌して低温増殖性変異株とした (Table 9(B))。34A 株から 4 株, 24A 株から 1 株, 46A 株から 1 株の変異株が得られた。変異株の出現頻度は 10^{-5} 程度であった。これらの低温増殖性変異株とその元の野生型株の低温下における増殖の相違を検討した。その結果を Table 12 に示した。所定温度で静置した際の 30 日後における増殖の有無を示した。元の野生型株 3 株が 5°C では生育せず, 9°C あるいは 11°C 以上で増殖可能であるのに対して低温増殖性変異株はいずれも 5°C 以上で増殖可能であった。この結果, 低温増殖性変異株はそれぞれの元の野生型株に比べて低温側の増殖限界温度が約 5°C 低下したことが明らかになった (Table 12)。

次に, これら低温増殖性変異株 (Table 9(B)) と野生型株 (Table 9(A), 低温非増殖性) を交雑して交雑株を得, その四分子を取得した。そして, それらの低温増殖性 (5°C), 接合型と栄養要求性を調べた。その低温増殖性 (5°C) の結果を Table 13 に示した。また, そのときの四分子の低温増殖性の発現の様子を Fig. 3 に示した。雑種二倍体株はすべて低温増殖性を示したので, 低温増殖性は優性変異によることがわかった。各雑種二倍体株に由来する四分子は低温増殖性 (Fig. 3), 接合型, アデニン, ウラシルの要求性において 2 : 2 の分離を示した。このことから, 低温増殖性はそれぞれの株において単一の核性の優性変異によるものと結論された。

2. 低温増殖性遺伝子間のアレリズム試験

次にこれら低温増殖性変異株 6 株の持つ遺伝子がすべて同一の遺伝子座に由来するものかどうかをそれぞれの変異株由来の一倍体株 (Table 9(C)) を用いて検討した。その結果を Table 14 に示した。おのおのの変異株由来の一倍体株を Table 14(A) に示した

組み合わせで交雑し、子のう解剖してそれらの低温増殖性(5℃)を調べた(Table 14(A))。雑種二倍体株はすべて低温増殖性を示し、その四分子は[低温増殖性]:[低温非増殖性]=4:0が多数を占めるものと4:0, 3:1, 2:2の3種類を示すものに分かれた。これは前者では交雑した一倍体2株の持つ低温増殖性遺伝子が同一の遺伝子座に属するかあるいは互いに連鎖していること、後者では別の遺伝子座に属することを示すと考えられる。この結果をTable 14(B)にまとめた。3423B株(#2変異株由来)が他の株とは異なる遺伝子を持つことが明らかになった。ここで、#2変異株の持つ低温増殖性変異遺伝子を *LTG1-1*(low-temperature-growth)、他の5変異株の持つ低温増殖性変異遺伝子を *LTG2-1*~*5*と命名した。ただし、*LTG2*遺伝子は今後の解析によって複数の遺伝子に分割されることもあり得る。

3. 低温増殖性遺伝子の遺伝子量効果

これらの変異型 *LTG1*, *LTG2* 遺伝子の重複保持が低温増殖性(5℃, 3℃, 1℃)に及ぼす影響を検討した。それにはまず、*LTG1-1*, *LTG2-1* 遺伝子をまったく持たない一倍体株、それぞれを単独で持つ一倍体株あるいは *LTG1-1*, *LTG2-1* 遺伝子を重複して持つ一倍体株(Table 9(D))を造成し、さらにそれらから *LTG* 遺伝子を種々の組み合わせで持つ二倍体株を造成した。そしてそれらの造成株の低温増殖性を検討した。その結果をTable 15に示した。まず、一倍体株についてみてみると5℃と3℃において1遺伝子を持つ株(*LTG1-1*株あるいは *LTG2-1*株)より2遺伝子を持つ株(*LTG1-1 LTG2-1*株)がコロニー形成日数が短くなる傾向が認められた。1遺伝子を持つ株の中では、*LTG2-1*株が *LTG1-1*株よりコロニー形成日数が短くなる傾向が認められた。1℃で30日後までにコロニー形成する一倍体株は認められなかった。次に、二倍体株についてみる。一つの遺伝子座についてヘテロな株では、*LTG2-1*/+株が *LTG1-1*/+株より5℃での増殖が速いことが認められた。2遺伝子を持つ二倍体株については2遺伝子がヘテロな株よ

り一つの遺伝子についてホモな株 (*LTG1-1/LTG1-1* 株あるいは *LTG2-1/LTG2-1* 株) が 3℃, 5℃ でコロニー形成日数が短く, 特に, *LTG1-1/LTG1-1* 株は 1℃ での増殖も認められた。3 遺伝子を持つ二倍体株は 5℃, 3℃ におけるコロニー形成日数が *LTG1-1/LTG1-1* 株を除く 2 遺伝子保持二倍体株と同程度でほとんど差が認められなかった。保持する遺伝子の種類による差も 5℃, 3℃ においてはほとんど認められなかった。ただ, *LTG1-1/LTG2-1/LTG1-1* 株のうちの 3 株が 1℃ において増殖が認められた。4 遺伝子を持つ二倍体株は 5℃ において 2 遺伝子あるいは 3 遺伝子を持つ二倍体株と同程度のコロニー形成日数を示すことが認められた。3℃ では 4 遺伝子を持つ二倍体株が 2 遺伝子あるいは 3 遺伝子を持つ二倍体株よりコロニー形成日数が長くなる傾向を示した。以上のことから, 低温増殖に及ぼす 2 種類の遺伝子の重複保持の効果として次のことが明らかになった。一倍体株では遺伝子を 2 個保持する株が遺伝子を 1 個保持する株より強い低温増殖性を示す傾向のあること。二倍体株では 5℃ において遺伝子を 2 個, 3 個あるいは 4 個保持する株が強い低温増殖性を示し, 3℃ において遺伝子を 2 個あるいは 3 個保持する株が強い低温増殖性を示す傾向のあること。

4. 低温増殖変異体による発酵力試験

低温増殖性変異遺伝子が発酵力に及ぼす影響を検討した。そのために, まず, K9 酵母と H2 酵母から一倍体株を 68 株分離し, これらの中で低温増殖能 (5℃) のない株を 26 株選択した。それらを紫外線処理して低温増殖性変異株を 71 株取得した。これらの中で四分子解析が可能であった K9-58 株 (日本醸造協会 9 号酵母から得た一倍体株) とその変異株 (Table 9(E)) について *LTG1-1* 株あるいは *LTG2-1* 株と交雑を行い, その雑種二倍体株を子のう解剖して低温増殖性を調べた。その結果を Table 16 に示した。雑種二倍体株はすべて低温増殖性を示した。元の K9-58 株と 3426D 株 (*LTG1-1*) あるいは 3412C 株 (*LTG2-1*) との雑種二倍体

株からの四分子はほぼ[低温増殖性]:[低温非増殖性]=2:2の分離を示したと判断した。4株の低温増殖性変異株との雑種二倍体株からの四分子は3412C株(LTG2-1)との場合はほぼ4:0の分離を示し, 3426D株(LTG1-1)との場合が4:0, 3:1, 2:2の3種類の分離を示した。このことから, K9-58株から得た低温増殖性変異株4株はいずれも変異型LTG2遺伝子を持つ可能性が高いと考えられる。そこで, これらの中からK9-58-41株とK9-58-64株の低温増殖性変異株2株と元の野生型株であるK9-58株の計3株について清酒もろみ中での発酵力を調べた。清酒もろみにおいて3株とも細胞の凝集が激しく, 酵母数の測定はできなかった。アルコール生成量を表すもろみの減少重量をFig.4に, 製成酒のアルコール分をTable17に示した。10℃, 15℃いずれの場合においても元の野生型株に比べて変異株2株のもろみ減少重量が全期間を通じて大きく上回っており, 最終の減少重量すなわち製成酒のアルコール分にも大きな差が認められた。このことから, 清酒もろみ中での酵母の増殖を直接に観察することはできなかったが, 低温増殖性変異体酵母はLTG2遺伝子の変異によって低温下での増殖力が向上し, その結果としてもろみ中での発酵力が向上したと考えられる。

5. 酵母YNN140株に低温増殖能を付与する遺伝子のクローニング

低温増殖に関係する遺伝子の存在することが確認されたので, その遺伝子のクローニングを試みた。研究室保存の遺伝研究株の5℃での増殖能を調べた結果, YNN140株が5℃で増殖できないことがわかった。そこで, この株を5℃での増殖能を付与する遺伝子をスクリーニングするための宿主酵母として選択した。マルチコピープラスミドYEp24による*S. cerevisiae*のゲノムDNAライブラリー²²⁾をYNN140株に導入し, 4株のUra⁺形質転換体を分離した。これらUra⁺形質転換体のYPAD寒天培地5℃での増殖能を調べた。この結果, 1株だけが増殖能を示した。この形質転換体の5℃での増殖能がプラスミドに依存していることを確かめるた

めに, Ura^+ と 5°C での増殖の分離(安定性)を調べた。非選択条件下で一晩培養後に約90%の株が Ura^+ を示し, Ura^- 株はすべて 5°C での増殖能を失っていた。この結果から, YEp24-ltg と名付けたこのクローニングしたプラスミドが宿主の YNN140 株に 5°C での増殖能を付与する遺伝子を含んでいることが明らかになった。以後, YEp24-ltg プラスミドを *E. coli* で増幅して用いた。YEp24-ltg プラスミドの制限酵素地図を作製した (Fig. 5)。クローニングした DNA の 6.2 kb DNA 断片中の低温増殖に必要な領域がサブクローニングによって決定された (Fig. 5)。YNN140 株を低温下で増殖させるには *Pst*I-*Eco*RI 2.9 kb 断片が必要であることが明らかになった。

6. 塩基配列とアミノ酸配列

Fig. 5 に示したシーケンスの手法によって, クローニングした DNA の中の *Pst*I-*Eco*RI 断片の塩基配列を決定した (Fig. 6)。この断片には 1,779 bp からなるオープンリーディングフレーム (ORF) が含まれていた。この ORF をフレームシフトして読み枠が正しいかどうかを調べた。すなわち, pDK 9 プラスミド (Fig. 5) を *Bam*HI で切断し, *E. coli* DNA polymerase I の Klenow fragment でフィルインし, 連結した。こうして調製した pDK 12 プラスミドを YNN140 株に導入し, 得られた形質転換体の低温下での増殖を調べた。この形質転換体は H-uracil 寒天培地上で 5°C でも 10°C でも増殖しなかった。その結果, 読み枠は正しく, この ORF が低温増殖に必要であることが示された。この遺伝子を *LTG3* (*low temperature growth gene*) と名づけた。この ORF から推定されるアミノ酸配列は 592 アミノ酸 (Fig. 6) をコードしており, 分子量は 65.4 KD と計算された。このタンパク質のアミノ酸配列を SWISS PROT (European Molecular Biology Laboratory, release 22) と National Biomedical Research Foundation (release 33) 中のタンパク質のアミノ酸配列データバンクと比較した。*LTG3* から推定されるタンパク質は *S. cerevisiae* の 5 種類のアミノ酸バ

ーミアーゼ (histidine permease gene [*HIP1*²³⁾], general amino acid permease gene [*GAP1*²⁴⁾], hypothetical amino acid permease gene [*YCC5*²⁵⁾], arginine permease gene [*CAN1*²⁶⁾], proline permease gene [*PUT4*²⁷⁾]) とホモロジーのあることがわかった。ハイドロパシープロットを行った結果 (Fig. 7), *LTG3* タンパク質は 12 個の膜貫通領域を持つことが明らかとなった。*LTG3* タンパク質と 5 種類のアミノ酸パーミアーゼのアミノ酸配列を比較すると (Fig. 8), *LTG3* タンパク質のアミノ酸配列のうちおよそ 80 番目から 520 番目の配列 (疎水性領域と一致する) が 5 種類のアミノ酸パーミアーゼのアミノ酸配列とホモロジーの高いことがわかった。この *LTG3* タンパク質がどのアミノ酸のパーミアーゼ遺伝子なのかを調べるために, YPAD+AA 寒天培地上での YNN140 株の増殖を調べた (Table 18)。30°C では YPAD+0.6% L-フェニルアラニン培地以外の YPAD+AA 培地で YNN140 株の増殖は阻害されなかった。10°C と 5°C では, YPAD+0.2% L-トリプトファン寒天培地上で YNN140 株は最も良く増殖した。YNN140 株が低温下で増殖できないのはトリプトファンの取り込みがうまくいかないためであろうと考えられた。Fig. 6 で下線を引いた塩基配列は *SUP3* 遺伝子の塩基配列と一致するので, *LTG3* 遺伝子は第 XV 番染色体上に存在することが明らかになった。

7. *LTG3* 遺伝子の破壊

LTG3 遺伝子が破壊されるとどんな表現型を示すかを調べるために, *LTG3* 遺伝子中の *Bam*HI 部位に *URA3* 遺伝子を挿入した破壊変異を作製した (Fig. 9A)。すなわち, *LTG3* 遺伝子を含む *Bgl*II-*Xho*I の 5.3 kb 断片を pBR322 プラスミドの *Bam*HI-*Sal*I 部位にクローニングして pDK13 プラスミドを作った。YE_p24 プラスミドから *URA3* 遺伝子を含む 1.2 kb の *Hind*III 断片を切り出して平滑末端にし, pDK13 プラスミド中の *LTG3* 遺伝子中の平滑末端にした *Bam*HI 部位に挿入して pDK14 プラスミドを作製した。pDK14 プラスミド中の 4.6 kb *Nhe*I-*Eco*RI 断片を切り出し, Ura⁻株 (YNN140,

K12-2A, YPH500, 3426D, 3422C, 3412C, YDK7) を形質転換して Ura⁺とした。

うまく破壊されているかどうかを次のようにして確認した。組み込みの受容菌株として用いた野生型一倍体株 (YNN140) と野生型二倍体株 (YDK7: YNN140 株と K12-2A 株の交雑株), Ura⁺となった組み込み体 (YDK1 と YDK8), その四分子 (YDK8-1A, YDK8-1B, YDK8-1C, YDK8-1D) の染色体 DNA を *EcoRV* で分解し, クローニングした DNA の 1.7 kb *EcoRV* 断片をプローブとしてサザンブロットした (Fig. 9B)。Ura⁺二倍体組み込み体において 1.7 kb と 1.25 kb 断片を検出した (レーン 4); 野生型の一倍体株と二倍体株からは 1.7 kb 断片を検出している (レーン 1 と 2), 1.25 kb 断片は破壊されたアレルに特異的であり (Fig. 9A), 1.7 kb 断片は野生型株のアレルに由来すると考えられる。四分子の中の Ura⁺株において 1.25 kb 断片を検出した (レーン 6 と 8)。Ura⁻株からは, 野生型株と同じく, 1.7 kb 断片が検出された (レーン 5 と 7)。この結果から, *LTG3* 遺伝子がゲノム上の正しい位置に存在し, *LTG3* 遺伝子が必須遺伝子ではないことが明らかになった。

8. *LTG3* 遺伝子の性質

野生型株 (YE_p24 プラスミドを持つ YNN140 株), 形質転換株 (pDK9 プラスミド (YE_p24 プラスミドの *Bam*HI 部位に *LTG3* 遺伝子を挿入したマルチコピープラスミド) を持つ YNN140 株), YNN140 株の *LTG3* 遺伝子破壊株の種々温度における H-uracil 液体培地での増殖を調べた (Fig. 10)。37 °C では 3 株間に差はほとんど認められなかった。28 °C で 3 株間に差が生じた。遺伝子破壊株の増殖速度が形質転換株と野生型株のそれに比べて遅くなった。20 °C と 15 °C では 3 株の増殖速度はほとんど同じであったが, 20 °C と 15 °C で遺伝子破壊株に, 15 °C で野生型株に lag phase が生じた。10 °C では野生型株の増殖速度は形質転換株のそれとほとんど同じだったが, lag phase が認められた。遺伝子破壊株は 1

0℃ 25日後においても増殖が認められなかった。5℃では形質転換株が lag phase もなく対数的に増殖したのに対し、野生型株はわずかの増殖が認められ、遺伝子破壊株は28日後においても増殖は全く認められなかった。以上をまとめると、*LTG3* 遺伝子を破壊すると10℃以下での増殖ができなくなることが明らかになった。

野生型株、形質転換株、遺伝子破壊株の増殖の stationary phase における培養液中の酵母細胞濃度は37℃、28℃、20℃、15℃ではほとんど一定であった。10℃、5℃と温度が低くなるにつれて、野生型株と形質転換株の stationary phase での細胞濃度は減少した。遺伝子破壊株の場合は10℃、5℃では増殖は認められなかった。以上のことから、野生型株、形質転換株の増殖も、遺伝子破壊株の増殖と同様、10℃と5℃では制限されていると考えられた。

LTG3 遺伝子のマルチコピーでの存在が YNN140 株以外の株の増殖に及ぼす影響を H-uracil 寒天培地で調べた (Table 19A)。YPH500 株と KA31D 株では *LTG3* 遺伝子がマルチコピーで存在することにより、YNN140 株と同様、低温下での増殖が可能となった。しかし、RAY-3A 株と K12-2A 株では野生型株と形質転換株の間に差は認められなかった。マルチコピーでの *LTG3* 遺伝子の存在によって低温増殖が可能になる株とそうでない株とが存在することが明らかになった。

遺伝的背景の異なる株における *LTG3* 遺伝子の破壊の影響を調べた (Table 19 A,B)。YPH500 元株が15℃で増殖できるのに対し、YPH500 株由来の遺伝子破壊株は増殖できなかった (Table 19A)。K12-2A 元株とそれ由来の遺伝子破壊株は5℃で増殖できた (Table 19A)。先に分離した低温増殖性変異株 3426D (*LTG1-1*) 株、3422C (*LTG1-1*) 株、3412C (*LTG2-1*) 株 (Table 9) について *LTG3* 遺伝子をマルチコピーで持つ場合と遺伝子破壊した場合に低温増殖性がどう変化するかを調べた (Table 19B)。3426D 株、3422C 株、3412C

株の元株とそれぞれの *LTG3* 遺伝子をマルチコピーで持つ形質転換株は低温下で増殖したが、遺伝子破壊株はいずれも 5 °C, 10 °C で増殖できなかった。この結果は、*LTG1-1* と *LTG2-1* 変異遺伝子が *LTG3* 遺伝子を介してその機能を発現していることを示唆している。

考 察

低温増殖性遺伝子 (*LTG1* と *LTG2*) の遺伝子量効果の実験で一倍体株では 2 個の遺伝子を保持する株の低温増殖性が遺伝子を 1 個保持する株より強い傾向を示し、二倍体株では 5 °C において遺伝子を 2 個, 3 個あるいは 4 個保持する株の低温増殖性が強く, 3 °C において 2 個あるいは 3 個の遺伝子を保持する株の低温増殖性が強いという傾向を示した。本実験で用いた株は同質遺伝子背景のものではないので微妙な増殖の差の比較は困難である。しかし、この結果は実用菌株で低温増殖性遺伝子変異を分離し、それを重複保持させることで低温増殖性を高め、さらに、その中で醸造に適した菌株をスクリーニングするという操作を行うことにより、低温増殖性の強い優良酵母の育種が可能であることを示唆している。

遺伝子破壊による *ltg3* 株構築の過程で、*LTG3* 遺伝子の 3' 側領域の一部 (*SUP3* 遺伝子を含む) が除かれていた。しかし、遺伝子破壊株の表現型が YNN140 のような *ltg3* 株と本質的に同じ表現型を示したので、このプラスミドを用いた破壊の影響は主に *LTG3* 遺伝子の機能を失わせることに現れたと考えられる。このことから、破壊用プラスミドにおいて欠失した 3' 側領域の役割は、たとえあったとしても、生物学上のごく小さなものであろうと考えられる。

培地中の種々のアミノ酸が YNN140 株の増殖に及ぼす影響を調べた Table 18 の結果は *LTG3* 遺伝子が数種類のアミノ酸、特にト

トリプトファン，の取り込みに関係していることを示唆している。トリプトファン要求性株においてはトリプトファンの取り込みが低温増殖での律速になっていると考えられる。この仮定はトリプトファン非要求性株（例えば，*LTG3* 遺伝子を破壊した K12-2A 株）が 5℃で増殖できる（Table 19A）という事実とつじつまがあう。しかし，清酒酵母日本醸造協会 9 号から取得した一倍体 K9-58 株はこの仮定ではうまく説明できない。すなわち，K9-58 株はトリプトファン非要求性株であるけれども 5℃で増殖できない。けれども，その K9-58 株から取得した変異株は *LTG2-6~9* と推定された変異によって低温増殖が可能となった。また，*LTG1-1-Δltg3* 遺伝子あるいは *LTG2-1-Δltg3* 遺伝子を持つ株が 5℃で増殖しない（Table 19A）という事実は *LTG1-1*，*LTG2-1* 変異が *LTG3* 遺伝子と関連しており，*LTG3* 遺伝子を経由してその機能を発現していることを示している。すなわち，*LTG1-1* と *LTG2-1* 遺伝子の機能の発現には *LTG3* 遺伝子が必要であると考えられる。従って，より低温増殖力の強い酵母を育種するためには，実用酵母のようなトリプトファン非要求性株における *LTG3* 遺伝子の機能を検討し，*LTG1*，*LTG2* 遺伝子をクローニングしてその性質を調べ，*LTG3* 遺伝子との関係を明らかにすることが必要であると考えられる。

その *LTG1*，*LTG2* 遺伝子の機能についてはいろいろ考えられる。例えば，酵母の増殖に関する温度適応に細胞膜の脂肪酸組成が関係している^{29, 30)}との報告があり，この低温増殖性変異株も細胞膜中の脂肪酸組成の変化を起こす変異によるものかもしれない。また，出芽酵母の遺伝研究株では種々の低温感受性突然変異が知られており，清酒酵母にはこのような変異が蓄積されていて，低温増殖能を示さない可能性が十分に考えられる。この仮定が正しいとすれば，そのような変異遺伝子の復帰変異あるいはサプレッサー変異によって低温増殖性を獲得することが清酒酵母においても容易に起こりうると思われる。そして，既に，低温増殖に関係している遺伝子として *LTE1* 遺伝子³¹⁾ と *NSR1* 遺伝子^{32, 33,}

34) が知られている。*LTE1* 遺伝子は低温増殖に必須であり、温度感受性で同時に M_1 二重鎖 RNA の複製欠損を示す *mak16-1* 株を相補する遺伝子としてクローニングされた *MAK16* 遺伝子に隣接して存在する遺伝子として発見された。*NSR1* 遺伝子は低温ショックで誘導される遺伝子であることがわかっている。その *NSR1* タンパク質は酵母細胞が急激な温度低下にさらされたときに正常な pre-rRNA processing と細胞増殖のために必要とされるタンパク質である。他にも低温下での増殖能を示さないような性質を含んだ遺伝子が数多く存在するであろう。多くの株はこのような極端な温度で増殖試験をすることがないのでその性質が知られていないだけであり、こういった性質は実験室での保存中に蓄積されたのであろうと考えられる。それゆえに、クローニング実験に用いられる宿主酵母に依存して、酵母に低温増殖能を付与する種々の遺伝子がクローニングされうるであろうと考えられる。

要 旨

酵母の低温増殖性変異株を分離し、その遺伝的性質を検討した。2種類の優性低温増殖性変異遺伝子の存在が明らかとなった。それぞれ *LTG1*, *LTG2* (low temperature growth gene) と命名した。一倍体株では遺伝子を2個保持する株の低温増殖性が強く、二倍体株では遺伝子を2個あるいは3個保持する株の低温増殖性が強く、特に、*LTG1-1* 遺伝子のホモザイゴート株 (*LTG1-1/LTG1-1* 株, *LTG1-1 LTG2-1/LTG1-1* 株) の中に低温増殖性の強い株の存在することが認められた。また、清酒酵母から得た一倍体株より低温増殖性変異株 (*LTG2* 変異株の可能性が高い) を取得して、清酒もろみ中での発酵力を検討した。その結果、元の野生型株に比べて変異株の発酵力が大きく向上したことが認められた。

低温増殖性に関係する遺伝子の存在が確かめられたので、その遺伝子のクローニングを試みた。トリプトファン要求性の

Saccharomyces cerevisiae YNN140 株に低温増殖能を付与する遺伝子をクローニングし、*LTG3* (low temperature growth gene) と命名した。この遺伝子を破壊すると低温下での増殖が認められなくなるのが明らかになった。この遺伝子が低温増殖に及ぼす影響は菌株によって異なることがわかった。塩基配列の解析から、592のアミノ酸をコードするORFが含まれていること、ホモロジー検索から、そのタンパク質のアミノ酸配列は数種類のアミノ酸パーミアーゼとホモロジーのあることがわかった。培地にトリプトファンを大量に添加すると YNN140 株が低温増殖能を示すことから、培地からのトリプトファンの取り込みが YNN140 株の低温下での増殖を制限していると考えられた。*LTG3* 遺伝子を含むクローニングされた DNA の塩基配列の一部が *SUP3* 遺伝子のそれと一致したので、*LTG3* 遺伝子もまた第 XV 番染色体上に存在することが明らかになった。

Table 9. Strains used in the investigation of genetic properties.

Strain	Growth at 5°C		Genotype		Source
34A	—	α		<i>his3 trp1 ura3</i>	
(A) ^a 24A	—	a		<i>ade2 his3 trp1</i>	
46A	—	α		<i>his3 trp1 ura3 leu2</i>	
61C	—	a		<i>ade2 his3 trp1</i>	
#1	+	α	<i>LTG2-1</i>	<i>his3 trp1 ura3</i>	mutant from 34A
#2	+	α	<i>LTG1-1</i>	<i>his3 trp1 ura3</i>	mutant from 34A
(B) #3	+	α	<i>LTG2-2</i>	<i>his3 trp1 ura3</i>	mutant from 34A
#4	+	α	<i>LTG2-3</i>	<i>his3 trp1 ura3</i>	mutant from 34A
#5	+	a	<i>LTG2-4</i>	<i>ade2 his3 trp1</i>	mutant from 24A
#6	+	α	<i>LTG2-5</i>	<i>his3 trp1 ura3 leu2</i>	mutant from 46A
3412C	+	a	<i>LTG2-1</i>	<i>his3 trp1</i>	segregant from #1 × 61C
3423B	+	α	<i>LTG1-1</i>	<i>ade2 his3 trp1</i>	segregant from #2 × 61C
3431A	+	a	<i>LTG2-2</i>	<i>his3 trp1</i>	segregant from #3 × 61C
3431C	+	α	<i>LTG2-2</i>	<i>ade2 his3 trp1 ura3</i>	segregant from #3 × 61C
(C) 3441A	+	α	<i>LTG2-3</i>	<i>his3 trp1</i>	segregant from #4 × 61C
3441B	+	a	<i>LTG2-3</i>	<i>his3 trp1</i>	segregant from #4 × 61C
2414C	+	a	<i>LTG2-4</i>	<i>ade2 his3 trp1</i>	segregant from #5 × 34A
2419B	+	α	<i>LTG2-4</i>	<i>ade2 his3 trp1</i>	segregant from #5 × 34A
4617A	+	a	<i>LTG2-5</i>	<i>his3 trp1 ura3</i>	segregant from #6 × 61C
4618A	+	α	<i>LTG2-5</i>	<i>his3 trp1 leu2</i>	segregant from #6 × 61C
3441C	—	α		<i>ade2 his3 trp1 ura3</i>	segregant from #4 × 61C
3431B	—	α		<i>ade2 his3 trp1 ura3</i>	segregant from #3 × 61C
3422C	+	a	<i>LTG1-1</i>	<i>his3 trp1 ura3</i>	segregant from #2 × 61C
3426D	+	a	<i>LTG1-1</i>	<i>his3 trp1 ura3</i>	segregant from #2 × 61C
3411B	+	α	<i>LTG2-1</i>	<i>ade2 his3 trp1</i>	segregant from #1 × 61C
(D) 3412A	+	α	<i>LTG2-1</i>	<i>ade2 his3 trp1 ura3</i>	segregant from #1 × 61C
3415B	+	α	<i>LTG2-1</i>	<i>his3 trp1 ura3</i>	segregant from #1 × 61C
1204B	+	α	<i>LTG1-1</i> <i>LTG2-1</i>	<i>ade2 his3 trp1</i>	segregant from 3412C × 3423B
1204D	+	a	<i>LTG1-1</i> <i>LTG2-1</i>	<i>his3 trp1</i>	segregant from 3412C × 3423B
1206B	+	α	<i>LTG1-1</i> <i>LTG2-1</i>	<i>ade2 his3 trp1</i>	segregant from 3412C × 3423B
1207C	+	a	<i>LTG1-1</i> <i>LTG2-1</i>	<i>his3 trp1</i>	segregant from 3412C × 3423B
1212A	+	α	<i>LTG1-1</i> <i>LTG2-1</i>	<i>ade2 his3 trp1</i>	segregant from 3412C × 3423B
K9-58	—	α			haploid isolated from K9 ^b
K9-58-41	+	α	<i>LTG2-6</i>		mutant from K9-58
(E) K9-58-43	+	α	<i>LTG2-7</i>		mutant from K9-58
K9-58-62	+	α	<i>LTG2-8</i>		mutant from K9-58
K9-58-64	+	α	<i>LTG2-9</i>		mutant from K9-58

LTG1, *LTG2*: Low-temperature-growth genes.

^a Diploids obtained by crossing 61C × 34A or 46A were sporulated and dissected. Four and three complete tetrads recovered from the respective diploids showed the 0+ : 4- segregation with respect to the ability to grow at 5°C in every ascus.

^b Nihon Jōzō Kyokai No. 9

Table 10. The *S. cerevisiae* strains used in the investigation of cloning.

Strain	Growth at 5°C	Genotype	Source
YNN140	-	<i>ura3 his3 trp1 ade2</i>	Our stock
YDK1	-	<i>ura3 his3 trp1 ade2 ltr3 :: URA3</i>	Disruptant from YNN140
K12-2A	+	<i>ura3 leu2</i>	Our stock
YDK2	+	<i>ura3 leu2 ltr3 :: URA3</i>	Disruptant from K12-2A
RAY-3A	-	<i>ura3 his3 trp1 leu2</i>	Our stock
YPH500	-	<i>ura3 his3 trp1 ade2 leu2 lys2</i>	Our stock
YDK3	-	<i>ura3 his3 trp1 ade2 leu2 ltr3 :: URA3</i>	Disruptant from YPH500
KA31D	-	<i>ura3/ura3 his3 trp1/trp1 leu2/leu2</i>	Our stock
3426D	+	<i>ura3 his3 trp1 LTG1-1</i>	(3)
YDK4	-	<i>ura3 his3 trp1 LTG1-1 ltr3 :: URA3</i>	Disruptant from 3426D
3422C	+	<i>ura3 his3 trp1 LTG1-1</i>	(3)
YDK5	-	<i>ura3 his3 trp1 LTG1-1 ltr3 :: URA3</i>	Disruptant from 3422C
3412A	+	<i>ura3 his3 trp1 ade2 LTG2-1</i>	(3)
YDK6	-	<i>ura3 his3 trp1 ade2 LTG2-1 ltr3 :: URA3</i>	Disruptant from 3412A
YDK7	+	<i>ura3/ura3 his3/+ trp1/+ ade2/+ leu2/+</i>	Hybrid (YNN140/K12-2A)
YDK8	+	<i>ura3/ura3 his3/+ trp1/+ ade2/+ leu2/+ ltr3 :: URA3/+</i>	Disruptant from YDK7
YDK8-1A	-	<i>ura3 trp1 leu2</i>	Segregant from YDK8
YDK8-1B	+	<i>ura3 his3 ade2 ltr3 :: URA3</i>	Segregant from YDK8
YDK8-1C	-	<i>ura3 trp1 leu2</i>	Segregant from YDK8
YDK8-1D	+	<i>ura3 his3 ade2 ltr3 :: URA3</i>	Segregant from YDK8

Table 11. Feed program for preparation of sake mashes.

	1st feed	2nd feed	Total
Total rice (g)	74	126	200
α -rice (g)	54	100	154
Dried rice <i>koji</i> (g)	20	26	46
Water (ml)	150	165	315
Yeast ^a (ml)	2		2
Lactic acid ^b (ml)	0.31		0.31

^a Yeast was cultivated overnight in *koji* juice at 28°C on a shaker (120 rpm).

^b 75% solution.

Table 12. Growth of mutant and wild type strains at low temperatures.

Strain	Temperature (°C)				
	3	5	7	9	11
< wild type >					
34A	-	-	-	-	+
24A	-	-	-	+	+
46A	-	-	-	-	+
< mutant >					
#1	-	+	+	+	+
#2	-	+	+	+	+
#3	-	+	+	+	+
#4	-	+	+	+	+
#5	-	+	+	+	+
#6	-	+	+	+	+

+: Growth after 30 d.

-: Non-growth after 30 d.

Table 13. Tetrad analysis of hybrid strains constructed by crossing each mutant strain with the wild type strain.

Hybrid strain ^a	Number of tetrads with ratios				
	Growing : Non-growing at 5°C				
mutant × wild type	4:0	3:1	2:2	1:3	0:4
#1 × 61C	0	0	11	0	0
#2 × 61C	0	0	3	0	0
#3 × 61C	0	0	5	0	0
#4 × 61C	0	0	5	0	0
#5 × 34A	0	0	2	0	0
#6 × 61C	0	0	3	0	0

^a All the diploid hybrids tested grew at 5°C.

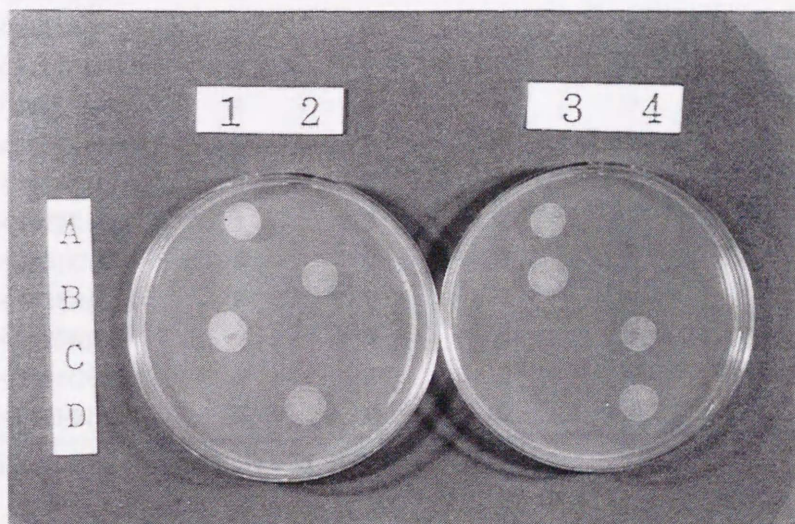


Fig. 3. Growth of tetrad segregants from hybrid (#1/61C) at 5°C.

Four sets (1~4) of tetrad segregants were inoculated on YPAD agar medium. These plates were incubated at 5°C for 30d.

Table 14. Allelism tests among mutant genes conferring ability to grow at 5°C on the wild type cells.

(A) Tetrad analysis

Hybrid strain ^a	Number of tetrads with ratios				
	Growing : Non-growing at 5°C				
	4:0	3:1	2:2	1:3	0:4
3412C(#1) × 3423B(#2)	2	3	1	0	0
3412C(#1) × 3431C(#3)	4	0	0	0	0
3412C(#1) × 3441A(#4)	6	0	0	0	0
3431A(#3) × 3423B(#2)	0	2	0	0	0
3431A(#3) × 3441A(#4)	4	0	0	0	0
3441B(#4) × 3423B(#2)	2	2	0	0	0
3441B(#4) × 3431C(#3)	3	0	0	0	0
2414C(#5) × 3423B(#2)	1	3	2	0	0
2414C(#5) × 3431C(#3)	5	0	0	0	0
2414C(#5) × 4618A(#6)	6	0	0	0	0
4617A(#6) × 3423B(#2)	2	5	2	0	0
4617A(#6) × 3431C(#3)	6	1	0	0	0
4617A(#6) × 2419B(#5)	7	0	0	0	0

^a All the diploid hybrids tested grew at 5°C.

(B) Summary of allelism tests

a-strain \ α-strain	Discrimination of genes of hybrid strains				
	3423B (#2)	3431C (#3)	3441A (#4)	2419B (#5)	4618A (#6)
3412C(#1)	D	I	I	—	—
3431A(#3)	D	—	I	—	—
3441B(#4)	D	I	—	—	—
2414C(#5)	D	I	—	—	I
4617A(#6)	D	I	—	I	—

D : Two genes were different.

I : Two genes were allelic or linked closely to each other.

— : Not tested.

Table 15. Dosage effect of *LTG1-1* and *LTG2-1* genes on growth at low temperatures.

No. of genes	Haploid strain					Diploid strain					
	Gene locus	Strain	Growth characteristics*			Gene locus	Strain	Growth characteristics*			
			5°C	3°C	1°C			5°C	3°C	1°C	
0	+	3431B	-	-	-	+/+	3431B/61C	-	-	-	
		3441C	-	-	-		3441C/61C	-	-	-	
		61C	-	-	-						
1	<i>LTG1-1</i>	3423B	2+	-	-	<i>LTG1-1</i> /+	3423B/61C	+	-	-	
		3426D	2+	+	-		3426D/3431B	+	-	-	
		3422C	2+	+	-		3426D/3441C	+	-	-	
							3422C/3431B	+	-	-	
							3422C/3441C	+	-	-	
	<i>LTG2-1</i>	3412C	4+	2+	-	<i>LTG2-1</i> /+	3412C/3431B	4+	+	-	
		3411B	2+	-	-		3412C/3441C	4+	+	-	
		3412A	3+	-	-		3411B/61C	3+	-	-	
	3415B	3+	-	-	3412A/61C	4+	-	-			
					3415B/61C	3+	-	-			
2	<i>LTG1-1 LTG2-1</i>	1204D	4+	+	-	<i>LTG1-1</i> + + <i>LTG2-1</i>	3423B/3412C	4+	3+	-	
		1204B	3+	2+	-		3426D/3411B	4+	3+	-	
		1206D	3+	+	-		3426D/3412A	3+	+	-	
		1207C	4+	2+	-		3426D/3415B	3+	+	-	
		1212A	4+	2+	-		3422C/3411B	4+	2+	-	
							3422C/3412A	3+	+	-	
							3422C/3415B	4+	+	-	
							<i>LTG1-1 LTG2-1</i>	1204D/3431B	4+	2+	-
							+ +	1204B/61C	2+	-	-
								1204D/3441C	3+	+	-
								1206B/61C	3+	-	-
						1207C/3431B	4+	3+	-		
						1212A/61C	4+	+	-		
					<i>LTG1-1</i>	3423B/3426D	5+	4+	+		
					<i>LTG1-1</i>	3423B/3422C	5+	4+	+		
					<i>LTG2-1</i>	3412C/3411B	4+	3+	-		
					<i>LTG2-1</i>	3412C/3412A	4+	3+	-		
						3412C/3415B	4+	3+	-		
	3	<i>LTG1-1 LTG2-1</i>	1204D	3+	3+	+	<i>LTG1-1</i> + <i>LTG2-1</i>	1204D/3423B	3+	3+	+
			1204B	4+	3+	+		1204B/3426D	4+	3+	+
			1204B	3+	3+	+		1204B/3422C	3+	3+	+
			1206B	3+	2+	-		1206B/3426D	3+	2+	-
1207C			3+	2+	-	1207C/3423B		3+	2+	-	
1212A			3+	2+	-	1212A/3426D		3+	2+	-	
						<i>LTG1-1 LTG2-1</i>		1204D/3411B	3+	2+	-
						+ <i>LTG2-1</i>		1204B/3412C	3+	2+	-
						1204D/3412A	2+	+	-		
						1204D/3415B	2+	+	-		
						1206B/3412C	4+	+	-		
						1207C/3411B	3+	+	-		
						1212A/3412C	3+	2+	-		
4		<i>LTG1-1 LTG2-1</i>	1204D	4+	+	-	<i>LTG1-1 LTG2-1</i>	1204D/1204B	4+	+	-
	1204D		3+	+	-	1204D/1206B		3+	+	-	
	1204D		3+	+	-	1204D/1212A		3+	+	-	
	1207C		3+	+	-	1207C/1204B		3+	+	-	
	1207C		4+	+	-	1207C/1206B		4+	+	-	
	1207C		3+	+	-	1207C/1212A		3+	+	-	

* The number of days needed for the appearance of visible colonies at the indicated temperature: less than 10 d (5+), 11-15 d (4+), 16-20 d (3+), 21-25 d (2+), and 26-30 d (+). A minus sign (-) indicates that no visible colonies appeared at the indicated temperature after 30 d.

Table 16. Allelism tests of the newly isolated *LTG* mutants from a *sake* brewing strain (K9-58).

Hybrid strain ^a	Number of tetrads with ratios				
	Growing : Non-growing at 5°C				
	4:0	3:1	2:2	1:3	0:4
K9-58 × 3426D (<i>LTG1-1</i>)	0	1	6	2	0
K9-58 × 3412C (<i>LTG2-1</i>)	0	0	8	0	0
K9-58-41 × 3426D	2	2	0	0	0
K9-58-41 × 3412C	6	0	0	0	0
K9-58-43 × 3426D	1	4	2	0	0
K9-58-43 × 3412C	5	0	0	0	0
K9-58-62 × 3426D	1	4	1	0	0
K9-58-62 × 3412C	4	1	0	0	0
K9-58-64 × 3426D	2	3	1	0	0
K9-58-64 × 3412C	8	2	0	0	0

^a All the diploid hybrids tested grew at 5°C.

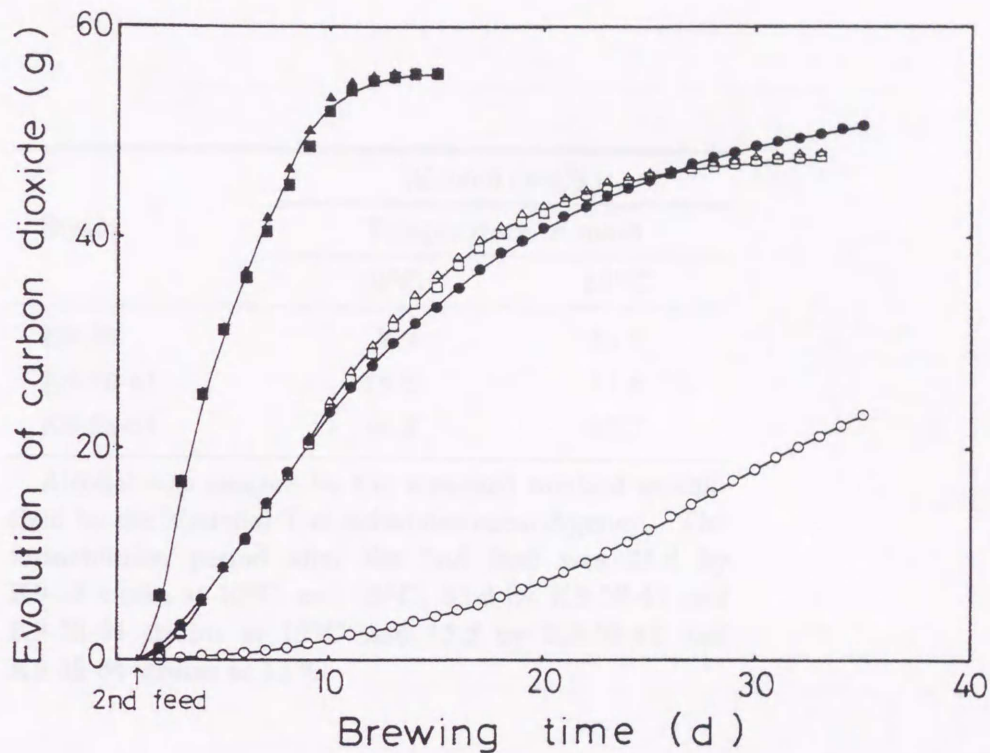


Fig. 4. Course of *sake* fermentation by mutant and wild type strains.

A *sake* mash composed of α -rice (154g), *koji* (46g), and water (315ml) was fermented with the indicated strain at 10°C or 15°C. Brewing time indicates days after the 2nd feed.

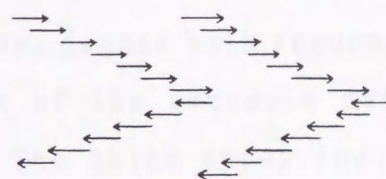
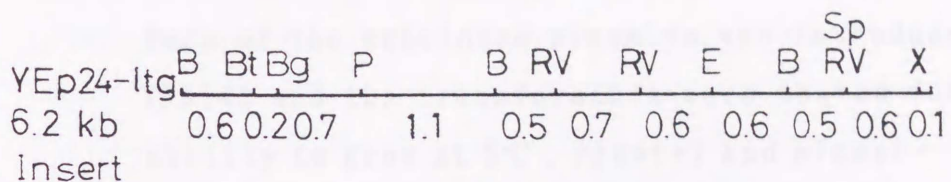
○, K9-58 strain at 10°C; △, K9-58-41 strain at 10°C;
 □, K9-58-64 strain at 10°C; ●, K9-58 strain at 15°C;
 ▲, K9-58-41 strain at 15°C; ■, K9-58-64 strain at 15°C.

Table 17. Alcohol concentration in *sake* produced by mutant and wild type strains in laboratory scale *sake* brewing.

Strain	Alcohol (vol%)	
	Temperature of mash	
	10°C	15°C
K9-58	9.9	15.2
K9-58-41	15.0	17.8
K9-58-64	14.9	17.7

Alcohol was assayed by the standard method established by the National Tax Administration Agency. The fermentation period after the 2nd feed was 35 d by K9-58 strain at 10°C and 15°C, 33 d by K9-58-41 and K9-58-64 strains at 10°C and 15 d by K9-58-41 and K9-58-64 strains at 15°C.

Fig. 5. Restriction map, scale from left to right, and
 restriction sites



		Growth at 5°C
pDK 1	←—————→	+
pDK 2	←—————→	+
pDK 3	←—————→	-
pDK 4	←—————→	-
pDK 5	←—————→	-
pDK 6	←—————→	-
pDK 7	←—————→	+
pDK 8	←—————→	+
pDK 9	←—————→	+
pDK10	←—————→	+
pDK11	←—————→	-

Fig. 5. Restriction map, subclones of the cloned DNA, and sequencing strategy.

Each of the subcloned plasmids was introduced into YNN140 and the transformants were tested for their ability to grow at 5°C. Plus(+) and minus(-) signs indicate whether the transformant carrying each plasmid could grow at 5°C on H-uracil agar medium or not. Arrows denote both sequencing directions and the lengths of the sequence data obtained from fragments. The thick arrow indicates the ORF. The restriction sites for *Bam*HI(B), *Bgl* II (Bg), *Bst*E II (Bt), *Eco*RI(E), *Eco*RV(EV), *Pst*I(P), *Sph*I(Sp), and *Xho*I(X) are indicated.

PstI
CTGCAGCACACATTAAAATTTTTCTGAGATGAGAGAAAATGCCTAAAAGAAAAGAAGGCAACAATTACCCGAAAATAGGCTTAAA -571

TCAAGAATAAACCCCTAATTAAGTTATTTTAGGTTTATTATGACCTAATAAAAATAAATACTAACCTAAACAAATACCCTAAGAAGCTACGG -476

CGCTAAAAATATTTCTTTTTACGGTTTTGCGCATGGTAAAAATCTTTTCTTTTTTCTTTTTTCCGTCATGTGTCACTGAATAGAAAACGGCATTAA -381

ATGACAAAATGACAGTGAATAATCGAACGCTCTTTTGTGCCATGATATTGCATCTACCTCTCCTATACTTAGCTGTAGTAGTCTAACCTTGTTTC -286

GGGTGGGGTGTATCGTTAATGGTACGTAGGCAGTTTTTCAAAAATTTTTCTCTTACTTTCAATATCTTGTGTGGTCTTATTTAGAAAATAT -191

TTGAGATTTCCCAACATTCACTCCAGTTCAAAGGATATATTCATATTTGTTGTATATACATCTGAGCATTGCGGATCTAATAGTGTGAAGTT -96

TTTGAGGTGACTGACTTTCTCAACAGTCGAGCAGCAGCATTTCACAAAATAGCTGAAGAACATAAGCTAAGCAAATTAACGCAACACTCTCAT -1

ATG ACC GAA GAC TTT ATT TCT TCT GTC AAG CGT TCA AAT GAG GAG CTG AAG GAG CGA AAA TCT AAC TTT GGA 72
(1) Met Thr Glu Asp Phe Ile Ser Ser Val Lys Arg Ser Asn Glu Glu Leu Lys Glu Arg Lys Ser Asn Phe Gly

TTT GTA GAA TAC AAA TCC AAG CAA TTA ACA TCA TCC TCA TCA CAC AAT TCA AAC TCA TCG CAT CAC GAT GAT 144
(25) Phe Val Glu Tyr Lys Ser Lys Gln Leu Thr Ser Ser Ser Ser His Asn Ser Asn Ser Ser His His Asp Asp

GAC AAC CAA CAC GGC AAG AGG AAT ATT TTC CAG CGA TGT GTT GAT TCT TTC AAG TCT CCT CTG GAC GGC TCG 216
(49) Asp Asn Gln His Gly Lys Arg Asn Ile Phe Gln Arg Cys Val Asp Ser Phe Lys Ser Pro Leu Asp Gly Ser

TTC GAC ACA AGT AAT TTG AAG AGG ACT CTG AAA CCA AGG CAC TTA ATC ATG ATT GCC ATT GGG GGC AGT ATA 288
(73) Phe Asp Thr Ser Asn Leu Lys Arg Thr Leu Lys Pro Arg His Leu Ile Met Ile Ala Ile Gly Gly Ser Ile

GGT ACT GGT TTG TTT GTC GGT AGT GGT AAG GCA ATC GCC GAA GGT GGT CCT CTT GGT GTC GTC ATT GGT TGG 360
(97) Gly Thr Gly Leu Phe Val Gly Ser Gly Lys Ala Ile Ala Glu Gly Gly Pro Leu Gly Val Val Ile Gly Trp

GCT ATT GCA GGC TCT CAA ATC ATC GGG ACG ATT CAT GGG CTA GGT GAA ATC ACG GTG CCG TTC CCC GTT GTC 432
(121) Ala Ile Ala Gly Ser Gln Ile Ile Gly Thr Ile His Gly Leu Gly Glu Ile Thr Val Arg Phe Pro Val Val
BamHI

GGG GCC TTT GCC AAT TAC GGC ACA AGG TTT TTG GAT CCA AGT ATA AGT TTT GTT GTT TCG ACC ATA TAC GTG 504
(145) Gly Ala Phe Ala Asn Tyr Gly Thr Arg Phe Leu Asp Pro Ser Ile Ser Phe Val Val Ser Thr Ile Tyr Val

CTA CAG TGG TTT TTT GTA TTA CCC TTA GAA ATC ATT GCG GCG GCA ATG ACC GTA ACG TAC TGG AAC TCG TCT 576
(169) Leu Gln Trp Phe Phe Val Leu Pro Leu Glu Ile Ile Ala Ala Ala Met Thr Val Thr Tyr Trp Asn Ser Ser

ATT GAC CCC GTA ATT TGG GTA GCC ATC TTT TAT GCT GTT ATT GTT TCC ATA AAT TTG TTT GGT GTA CGA GGT 648
(193) Ile Asp Pro Val Ile Trp Val Ala Ile Phe Tyr Ala Val Ile Val Ser Ile Asn Leu Phe Gly Val Arg Gly

TTT GGG GAA GCG GAA TTT GCA TTT TCC ACC ATA AAA GCA ATA ACA GTT TGC GGA TTC ATT ATA TTG TGC GTT 720
(217) Phe Gly Glu Ala Glu Phe Ala Phe Ser Thr Ile Lys Ala Ile Thr Val Cys Gly Phe Ile Ile Leu Cys Val

GTC CTC ATT TGC GGT GGA GGT CCC GAC CAC GAG TTC ATT GGC GCC AAA TAC TGG CAC GAC CCT GGT TGT TTG 792
(241) Val Leu Ile Cys Gly Gly Gly Pro Asp His Glu Phe Ile Gly Ala Lys Tyr Trp His Asp Pro Gly Cys Leu

GCC AAT GGG TTC CCG GGC GTT CTA TCT GTT CTT GTT GCT TCG TAT TCT CTC GGT GGT ATA GAA ATG ACG 864
(265) Ala Asn Gly Phe Pro Gly Val Leu Ser Val Leu Val Val Ala Ser Tyr Ser Leu Gly Gly Ile Glu Met Thr

TGC CTG GCA TCA GGT GAA ACG GAC CCC AAA GGC TTA CCA AGT GCT ATC AAG CAA GTG TTT TGG AGG ATC TTA 936
(289) Cys Leu Ala Ser Gly Glu Thr Asp Pro Lys Gly Leu Pro Ser Ala Ile Lys Gln Val Phe Trp Arg Ile Leu
EcoRV

TTT TTC TTT TTG ATA TCA CTG ACC CTG GTA GGA TTC CTG GTT CCA TAT ACA AAC CAA AAC TTA CTG GGT GGT 1008
(313) Phe Phe Phe Leu Ile Ser Leu Thr Leu Val Gly Phe Leu Val Pro Tyr Thr Asn Gln Asn Leu Leu Gly Gly

TCA TCT GTG GAC AAC TCA CCT TTT GTC ATT GCC ATA AAA TTG CAT CAC ATT AAA GCC TTG CCC TCC ATC GTC 1080
(337) Ser Ser Val Asp Asn Ser Pro Phe Val Ile Ala Ile Lys Leu His His Ile Lys Ala Leu Pro Ser Ile Val

AAT GCG GTC ATC CTT ATC AGT GTT TTG AGT GTA GGT AAC TCC TGC ATC TTC GCT TCA AGT AGA ACG TTG TGT 1152
(361) Asn Ala Val Ile Leu Ile Ser Val Leu Ser Val Gly Asn Ser Cys Ile Phe Ala Ser Ser Arg Thr Leu Cys

TCG ATG GCC CAC CAA GGC CTT ATT CCA TGG TGG TTT GGT TAT ATC GAC CGT GCT GGT AGG CCG CTG GTT GGC 1224
(385) Ser Met Ala His Gln Gly Leu Ile Pro Trp Trp Phe Gly Tyr Ile Asp Arg Ala Gly Arg Pro Leu Val Gly

ATT ATG GCA AAT TCA CTA TTT GGA TTA CTA GCA TTT CTG GTC AAA TCT GGC TCG ATG TCT GAA GTT TTC AAT 1296
(409) Ile Met Ala Asn Ser Leu Phe Gly Leu Leu Ala Phe Leu Val Lys Ser Gly Ser Met Ser Glu Val Phe Asn

TGG TTA ATG GCC ATT GCC GGC CTG GCC ACG TGC ATT GTC TGG TTG AGC ATC AAC CTG TCA CAT ATC AGA TTT 1368
 (433) Trp Leu Met Ala Ile Ala Gly Leu Ala Thr Cys Ile Val Trp Leu Ser Ile Asn Leu Ser His Ile Arg Phe
 AGA CTG GCG ATG AAG GCT CAA GGG AAG TCT CTG GAT GAA TTA GAA TTT GTT AGT GCT GTC GGG ATT TGG GGA 1440
 (457) Arg Leu Ala Met Lys Ala Gln Gly Lys Ser Leu Asp Glu Leu Glu Phe Val Ser Ala Val Gly Ile Trp Gly
 TCA GCG TAT TCC GCT TTA ATC AAC TGT CTA ATC TTG ATA GCT CAA TTC TAT TGT TCA CTA TGG CCC ATT GGT 1512
 (481) Ser Ala Tyr Ser Ala Leu Ile Asn Cys Leu Ile Leu Ile Ala Gln Phe Tyr Cys Ser Leu Trp Pro Ile Gly
 GGC TGG ACC AGC GGC AAA GAA AGG GCT AAA ATA TTT TTT CAA AAT TAT CTG TGT GCC TTA ATC ATG TTA TTT 1584
 (505) Gly Trp Thr Ser Gly Lys Glu Arg Ala Lys Ile Phe Phe Gln Asn Tyr Leu Cys Ala Leu Ile Met Leu Phe
 ATA TTC ATC GTC CAC AAA ATT TAT TAC AAG TGT CAA ACA GGC AAA TGG TGG GGG GTT AAG GCG TTA AAG GAC 1656
 (529) Ile Phe Ile Val His Lys Ile Tyr Tyr Lys Cys Gln Thr Gly Lys Trp Trp Gly Val Lys Ala Leu Lys Asp
 EcoRV
 ATA GAT TTG GAA ACC GAT CGT AAA GAT ATC GAC ATC GAA ATA GTC AAG CAA GAA ATT GCC GAA AAG AAA ATG 1728
 (553) Ile Asp Leu Glu Thr Asp Arg Lys Asp Ile Asp Ile Glu Ile Val Lys Gln Glu Ile Ala Glu Lys Lys Met
 TAC CTA GAT TCC CGT CCA TGG TAC GTG AGA CAG TTC CAT TTC TGG TGT TAA TACCGAAGAAACAAGTTCAATTTATTT 1806
 (577) Tyr Leu Asp Ser Arg Pro Trp Tyr Val Arg Gln Phe His Phe Trp Cys ***
TTGTAGAATATTTTTTTTCTCTCTCTAGTACTCATCCTTCATATTTAATTAATTCAGATCATTTAATGCATAACGACATGACAATAAAAAAAA 1901
ACCTGACATTTTGAAAAATTATCATTGGAATACGTGGATAAAGACTTCTTCGAGCCAGGCCAATAAAAAATTAATAATATATATAGACATTAATT 1996
CTTGACCTACACAAAAATAGCTTCTCTCGGTAGCCAAGTTGGTTTAAGGCGCAAGACTGTAAATTTATCACTACGAAATCTTGAGGATCGGGCGTT 2091
CGACTCGCCCCGGGAGATATTTTTTACTTTTGCACATCGCTGCTTAGCTTTTTTACTTGATTGCGATTGCAATCTATCTGCCAAGAATGAA 2186
 EcoRI
CAAGTATTTTTTCTCTGCATCTTCCCTGCGTAGGAATCAAATTTGCAACAAGTCTGCAATGTCTAACACCTTTGTTGCAGTGAATTC 2278

Fig. 6. Nucleotide and deduced amino acid sequences of the cloned DNA.

The numbers on the right indicate the number of nucleotides in each direction starting from the A in the translation initiating ATG; the numbers in *parentheses* denote the amino acid numbers, starting with 1 at the initiator methionine. The underline indicates the sequence of the *SUP3* gene. Restriction sites are shown *above* the sequence.

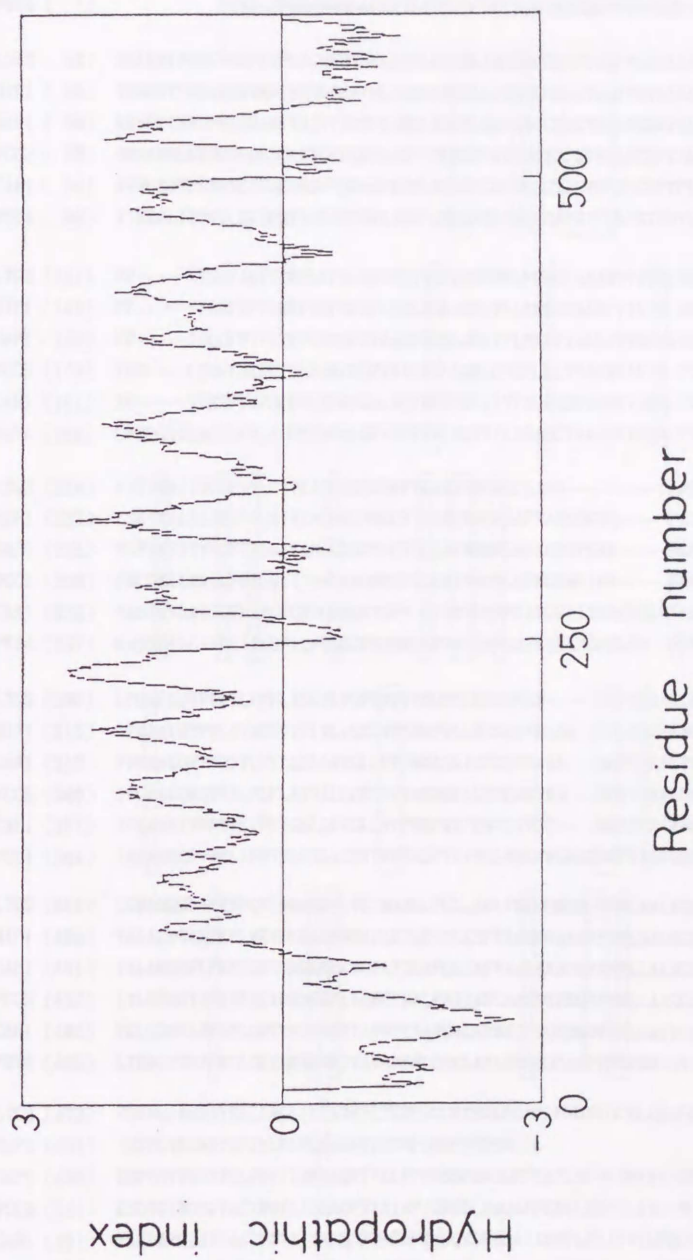


Fig. 7. Hydropathy plots of *LTG3* protein.

Hydrophobicity (above the line) and hydrophilicity (below the line) values were determined according to the method of Kyte and Doolittle¹⁸⁾ with a window size of 20.

LTG3 (1) MTEDFISSYKRSNEELKERKSNFGFVEYKSKQLTSSSSHNSSSHDDDNQ (51)
 HIP1 (1) MPRNPLKKEYWADVVDGFKPATSPAFENEKESTTFVTELTSKTDSAPPLSSKDSPGINQ (59)
 GAP1 (1) MSNTSSYEKNPNPNLKHNGITIDSEFLTQEPITIPSNGSAVSIDETGSGSKWQDFKDSF (59)
 YCC5 (1) MSSSKSLYELKDLKNSSTEIHATGQDNEIEYFETGSDNRPSQPHLGYEQHNTSAVRRFFDSFKRADQGPQDEVEATQNDLTSAISPS (89)
 CAN1 (1) MTNSKEDADIEEKHMYNEPYTTLFHDVEASQTHHRRGSIPLKDEKSKELYPLRSFPT (57)
 PUT4 (1) MVNILPFHKNNRHSAGVYTCADDVSGDGGGDTKKEENVVQVTESPSSCSRNNHRSNDEKDDAIRMEKISKNSQASSNG (79)

LTG3 (52) HGKRNIFQRCVDSFKSPLDGSFDTSNLKRLLKPHLIMIAIGGSI GTGLFVYSGKAI AEGGPLGVVIGWAIAGSQIIGTIHGLGBITVR (140)
 HIP1 (60) TTNDITSSDRFRNEDTEQEDINNTNLSGDLSVRHLLTLAVGGAI GTGLYVNTGAALSTGGPASLVIDWVVIISTCLFTVINSLGELSA (148)
 GAP1 (60) KRVKPIEYDPNLSEAEKYAIIITAQTPLKHHLKNRHLQIMIAIGGAI GTGLLVGSGTALRTGGP-SLLIGWGSTGTMIYAMVMALGELAVI (147)
 YCC5 (90) SRQAQELEKNESDNIGANTGHKSDLSKKTIQPRHVLIMIAIGGTIGTGLLVGNGTALYHAGPAGLLIGYAIMGSLICYIIQAQCGEMALY (178)
 CAN1 (58) RYNGEDTFSMEDGIDGEDEVEQNAEYKRELKQRHIGMIAIGGTIGTGLFVGLSTPLTNAGPVGALLISYLFMGSLAYSVTQSLGEMATF (146)
 PUT4 (80) TIREDLIMDVLEKSPSVVDGDESEPHKLKQLQSRHVQLIMIAIGGAI GTGLLVGTSSTLHTCGPAGLFIISYIIISAVIYIMCALGEMVCF (168)

LTG3 (141) FP----VVGAFANYGTRFLDPSISFVSTIYVLOVFFVLPLEIIAAAMTVTY--NSSIDPVIWVAIFRYAVIVSINLFGVYRFGBAEFA (223)
 HIP1 (149) FP----VVGGFNVYSMRFIEPSFAFANLNYLAQVLLVLPLELVAASITIKY--NDKINSDAWVAIFRYATIALANLMDVKSFGETIEFY (231)
 GAP1 (148) FP----ISCGFTTYATRFIDESFGYANFNFMQLVLLVLPLEIIVAASITVNFCTDPKYRDCGFVALFWLAIVIINMFGVKYGEAEFV (231)
 YCC5 (179) YSN----LTGGYNAYPVSLWMMVFGFAVAWVYCLQVLCVPLELVTASMTIKY--TTSVNPDPVFIIFVYLVITINIFGARGYAEAEFF (262)
 CAN1 (147) IP----VTSSTVFSQRFSPAFGAANCYMYWFSWAIITFAELSVVGVYIQF--TYKVPAAWISIFWVVIITIMNLPVYKYGEAEFV (229)
 PUT4 (169) LPGDGSDSAGSTANLYTRYVDPSPGAFATGMYVFCYVILVAECTAASGVVEY--TTAVPKGVWITIFLVCVVVILNFSAVKYVGEAEFV (256)

LTG3 (224) FSTIKAITVCGFIIILCVVLICGGGPDHEFIGAKYWHDPGCLANG-----FPGVLSVLVVASYSLG-GIEMTCLASGE-TDP-KG (299)
 HIP1 (232) LSMIKILSIIGFTIILGIVLSCGGPHGGYIGCKYWHDPGAFVAHSSGTQ----FKGLCSVFVTAFTYS-GIEMTAVSAAESKNPRET (314)
 GAP1 (232) FSFIKIVITVCGFIIILGIIILWGGGPTGGYIGCKYWHDPGAFAGDTPGAK----FKGVCSVFVTAAFSFA-CSELVGLAASESVEPRKS (314)
 YCC5 (263) FNCCILMWTGFFIILCIIIDVGGAGNDGFIGCKYWHDPGAFNGKHAIDR---FKGVVATLVTAAFAG-CSEFIAITTAQNSNPKA (345)
 CAN1 (230) VASIKVLAITIGFLIYCFVCGAGVYTCPV-CFRYWRNPPGATGGIISKDKNEGFLGWSLINAFTFQ-CTELVGITAGAAANPRKS (316)
 PUT4 (257) FASTIKILCVGLIILSFLIFWGGPNHDLGFRYWHDPGAFAHILTCOSLGN-FDTITTIKGAFAFIIQPELVCTSACADQRN (343)

LTG3 (300) LPSAIKQVFRILFFFLISLTLVGFVVPYTNQNTLGGSSVDN----SPFWIAIKLIIHIIKALPSIWNVAVILISVLSVGNNSCIFASSRIL (383)
 HIP1 (315) IPKAAKRTFWLITASYVTIITLIGCLVPSNDPRLNGSSVDAAAS-SPLVIAIENGKIGLPSLMAIILIAVVSVAANSVAYACSEB (401)
 GAP1 (315) VPKAAKQVFRITLFIYLSLLMVGLLVPYNDKSLIGASSVDAAS-SPFWIAIKTHGKIGLPSVWVILIAVLSVGNNSAIYACSEB (400)
 YCC5 (346) IPGAAKQMIYRILFLFLATIIILGFLVYPYNSDQLLGGTGGTKA--SPYVIAVASHGVVYVPHFINAVIILSVLSVGNNSFYSSARLF (431)
 CAN1 (317) VPKAIKKVFRILTFYIGSLLFGLLVPYNDPKLQSTSYST--SPFIIAIEENSGTKVLPHIFNAVILTTIISAANSIYVGSRIIL (401)
 PUT4 (344) IAKASRRFVWRILFFVYVGLTIAISVIVPYNDPTLVNALAQKPGAGSSPFWYVIGIQNAGIKVLPHIIINGCILTSAWAAAFWFASTKSL (432)

LTG3 (384) CSMAHQGLIIFWFGYIDRAGEPLVGI MANSLFGLLAFLVKSMSBVPNMLMAIAGLATCIWLSINLSHIRPRLAMKAQKSLDELPE (472)
 HIP1 (402) VAMAHIGNLPKFLNRVYDKRQPHNAILLTLFFGLLSFVAASDKQABVFTLISALSGLSTIFCMAINLSHIRPRQAMKQERSLDELPE (490)
 GAP1 (401) VALAEORFLPEIFSYDRKQKPLVGI AVTSAFGLIAFVAASKKEGEVFNMLLALSGLSSLFTWGGICICHTFRKALAAQGRGLDELPE (489)
 YCC5 (432) LTLSEQYAPKVFYSYIDRAGEPLIANGVSALFAVIAFCAASPKKEQVFTLLAISGLSGLFTWTAICLSHLRFRAMKYQGRSLGELGP (520)
 CAN1 (402) FGLSKNKLAPKFLSRRTTKGVFYIAVFYTAAGALAYMETSGGDKVHEMLNITGVAGFFAWLFISISBIRFQALKYRCSRDELPE (490)
 PUT4 (433) LTMAGTCQAPKCLGRINKGVFYVAVGVSLCSCLAYLNVSSSTADVFNFSNISTISGFLGMCCEIAYLRFRMA-IFYNGLYDRLEP (520)

LTG3 (473) VSAVGIWGSAYSALINCLIIIAQFYCSLWPIGGWTSGERAKIFFQNYICALIMLFIFIVHKIYYKQCTGKWWGVKALKDIDLETDRKD (561)
 HIP1 (491) ISQTGVKGSWYGFIVLVLVIAASFWTFSPVIRFRSQRRIIL (532)
 GAP1 (490) KSPTGVVGSYWGLFVVIIMIAQFYVALFPVGDSPSAEGFFEAYLSFPIVWVYIGHKIYKRNWVLFIPAEMDIDTGRREVLDLLKQ (578)
 YCC5 (521) KSQTGVVGSAYACIMMILIIIAQFVVAIAPICEGLDAQFAFFENYLAWPIILALVGYKVVHKDKLFRADKIDIDSIRQIFDEELIK (609)
 CAN1 (491) KAKLWPLAYLAATFTIILIIIGQFTAFAPKFCVSAFAAYISVFLFLAVVILPQCIFRCQFIWIKIGVDIDSDRRDIEAIVWEDHEPK (579)
 PUT4 (521) ----KTWQQPYTVWPSLIVIGIITITNGYAFIPKYWRVADFAAYITLPIISLVLWFGHKLYTRTRQWVLPVSEIDVTTGLVEIEEK (604)

LTG3 (562) IDIEIVKQEI AEKKMYLDSRPWYVYRQHFHC (592)
 GAP1 (579) EIAEEKAIMATKPRWYRIWVHC (601)
 YCC5 (610) QEDEEYRERLRNGPYWKRVAFC (633)
 CAN1 (580) TFWDKFWVVA (590)
 PUT4 (605) SREIEEMRLPPTCFKDKFLDALL (627)

Fig. 8. Amino acid sequence similarity between *LTG3* protein and known permeases.

From the top to the bottom: *S. cerevisiae LTG3*;
*S. cerevisiae HIP1*²³⁾; *S. cerevisiae GAP1*²⁴⁾;
*S. cerevisiae YCC5*²⁵⁾; *S. cerevisiae CAN1*²⁶⁾;
*S. cerevisiae PUT4*²⁷⁾.

Numbers in parenthesis indicate amino acid number.

Dashes indicate gaps introduced to optimize the alignment. Amino acid residues conserved among 6 sequences are enclosed with a box.

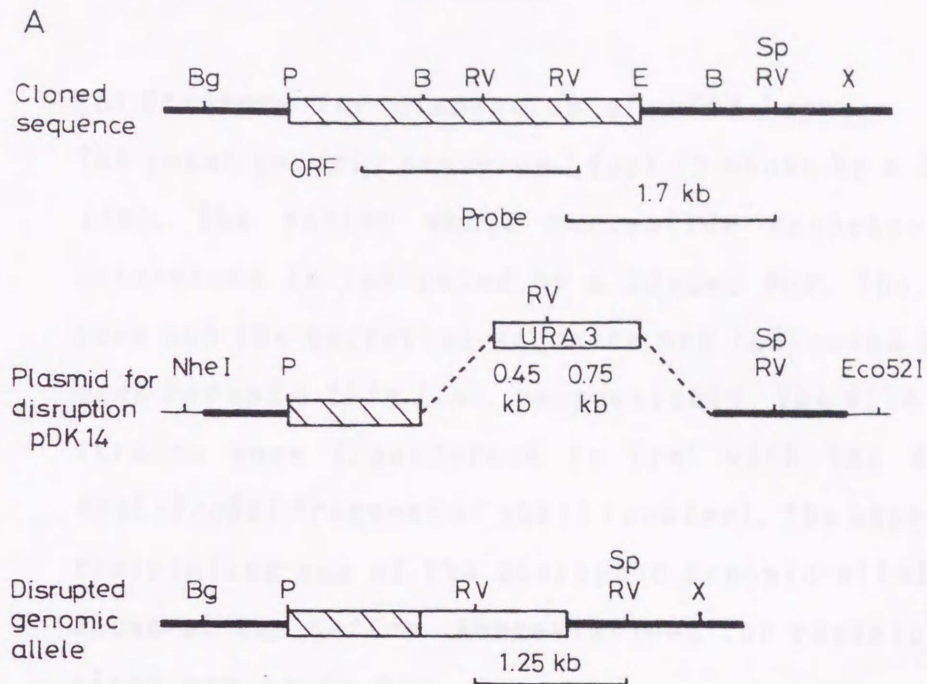


* Growth characteristics indicated are sufficient growth (+), poor growth (±), and no growth (-) on YPAD + AA medium at 5°C and 10°C after 24 h, and at 30°C after 24 h.

Table 18. Growth of YNN140 strain on YPAD medium supplemented with each amino acid at each temperature.

Amino acid	Growth characteristics ^a		
	Temperature		
	5°C	10°C	30°C
Non-addition	—	—	+
Glycine	—	—	+
L-Alanine	—	±	+
L-Valine	—	—	+
L-Leucine	—	±	+
L-Isoleucine	—	±	+
L-Serine	—	—	+
L-Threonine	—	—	+
L-Cysteine	—	—	+
L-Cystine	—	—	+
L-Methionine	—	—	+
L-Aspartic acid	—	—	+
L-Asparagine	—	—	+
L-Glutamic acid	—	—	+
L-Glutamine	—	—	+
L-Lysine	—	—	+
L-Arginine	—	—	+
L-Phenylalanine	—	—	±
L-Tyrosine	—	—	+
L-Histidine	—	—	+
L-Tryptophan	±	+	+
L-Proline	—	±	+
Hydroxy-L-proline	—	—	+

^a Growth characteristics indicated are sufficient growth (+), poor growth (±), and no growth (—) on YPAD+AA medium at 5°C and 10°C after 30 d, and at 30°C after 3 d.



B

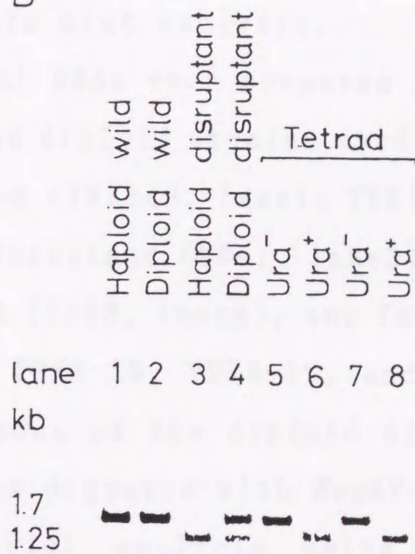


Fig. 9. Disruption of *LTG3* locus.

(A) Strategy for disruption of *LTG3* locus.

The yeast genomic sequence (*top*) is shown by a *thick line*. The region whose nucleotide sequence was determined is indicated by a *shaded box*. The *URA3* gene and the bacterial sequence are indicated by an *open box* and a *thin line*, respectively. The wild type strains were transformed to Ura⁺ with the 4.6kb *NheI-Eco52I* fragment of pDK14 (*center*). The expected restriction map of the disrupted genomic allele is shown at the *bottom*. Abbreviations for restriction sites are as in Fig. 5.

(B) Southern blot analysis.

Chromosomal DNAs were prepared from the wild type haploid and diploid strains used as a recipient for integration (YNN140, lane1; YDK7, lane2), the Ura⁺ haploid disruptant (YDK1, lane3), the Ura⁺ diploid disruptant (YDK8, lane4), and four spore progenies (YDK8-1A, YDK8-1B, YDK8-1C, and YDK8-1D) derived from an ascus of the diploid disruptant (lane5~8). DNA was digested with *EcoRV* and processed for Southern blot analysis using the 1.7kb *EcoRV* fragment as a probe.

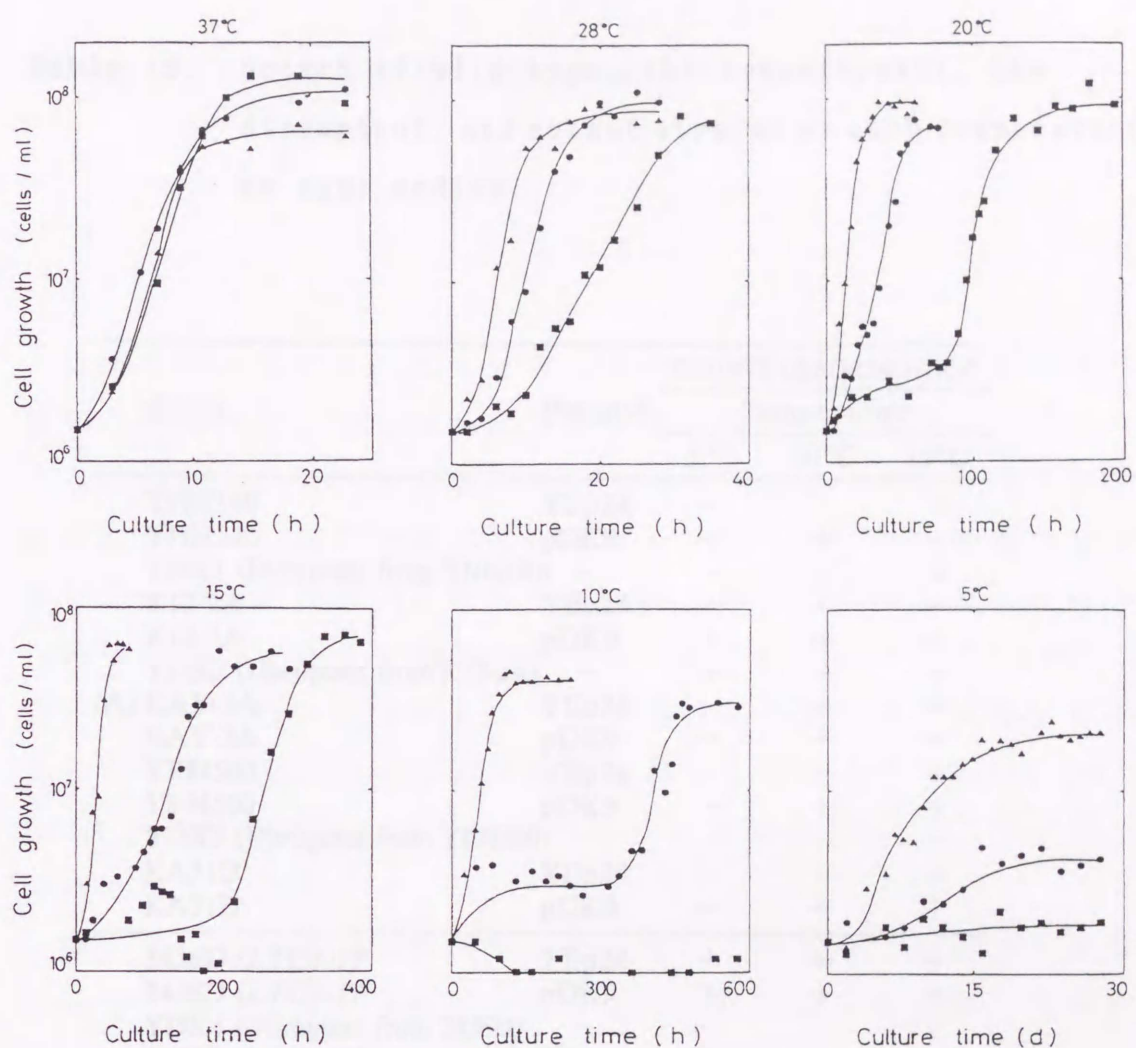


Fig. 10. Cell growth of the wild type, the transformant carrying pDK9, and the disruptant.

Pre-culture at 15°C was inoculated into H-uracil liquid medium. The inoculated cultures were maintained at the indicated temperature. Cell numbers were counted with a hemocytometer.

- , wild type (YNN140 strain carrying YEp24);
- ▲, transformant (YNN140 strain carrying pDK9);
- , disruptant (YDK1).

Table 19. Growth of wild type, the transformant, the disruptant, and mutant strains at each temperature on agar medium.

Strain	Plasmid	Growth characteristics ^a		
		Temperature		
		5°C	10°C	15°C
YNN140	YEp24	—	—	+
YNN140	pDK9	+	+	+
YDK1 (Disruptant from YNN140)	—	—	—	+
K12-2A	YEp24	+	+	+
K12-2A	pDK9	+	+	+
YDK2 (Disruptant from K12-2A)	—	+	+	+
(A) RAY-3A	YEp24	—	+	+
RAY-3A	pDK9	—	+	+
YPH500	YEp24	—	—	+
YPH500	pDK9	—	+	+
YDK3 (Disruptant from YPH500)	—	—	—	—
KA31D	YEp24	—	—	+
KA31D	pDK9	—	+	+
3426D (<i>LTG1-I</i>) ^b	YEp24	+	+	+
3426D (<i>LTG1-I</i>) ^b	pDK9	+	+	+
YDK4 (Disruptant from 3426D)	—	—	—	+
3422C (<i>LTG1-I</i>) ^b	YEp24	+	+	+
(B) 3422C (<i>LTG1-I</i>) ^b	pDK9	+	+	+
YDK5 (Disruptant from 3422C)	—	—	—	—
3412A (<i>LTG2-I</i>) ^b	YEp24	+	+	+
3412A (<i>LTG2-I</i>) ^b	pDK9	+	+	+
YDK6 (Disruptant from 3412A)	—	—	—	—

^a Growth characteristics indicated are growth (+) or no growth (—) at each temperature on H-uracil agar medium after 30 d.

^b *LTG*: low temperature growth gene.

第3章 凝集泡なし酵母の育種とその性質

緒言

清酒製造における仕込タンクの効率化およびもろみ工程管理の省力化を目的とした泡なし酵母の分離に関する研究は、主に、大内らにより行われ、日本醸造協会701号株をはじめとしたさまざまな実用泡なし株の分離が可能となった^{35, 36)}。その結果、現在では全国の酒造場でそれら泡なし株が通常的に用いられるに至った。泡なし変異株は泡あり株中に 10^{-8} 程度の頻度で自発的に出現し³⁵⁾、泡あり株中よりその変異株を分離する方法としてこれまでに酵母細胞の気泡親和性を利用したFroth-Flotation法³⁵⁾および酵母細胞の凝集性を利用した凝集法^{35, 36)}等が開発されてきた。

第1章において、清酒酵母広島2号から低温下で増殖力・発酵力の強い一倍体株を分離し、仕込試験を行った。その際、その分離株がもろみ中で凝集・吸着し、同時に泡なし性を有することを認めた。そこで、その一倍体低温清酒酵母H2-5-62株より、その凝集泡なし性を保持した二倍体酵母を育種し、従来の泡なし酵母等と比較することによってその性質を明らかにした。なお、もろみ中で凝集・吸着し、泡なし性を示すこの酵母を本論文中においては「凝集泡なし酵母」と仮称することとした。

実験方法

1. 菌株 第1章で育種した一倍体低温清酒酵母H2-5-62株とその親株である清酒酵母広島2号(H2)を原菌株としてFig. 11に示した過程で凝集泡なし二倍体酵母DH3株およびDH4株を育種し、試験株に用いた。Fig. 11において一倍体株の分離は

Random-spore-plating 法⁵⁾と micromanipulator による子のう解剖の 2 種類の方法で行った。交雑は集団接合法¹⁵⁾により行い、micromanipulator で接合子を単離し二倍体株を得た。孢子形成培地 (酢酸カリウム 1%, 酵母エキス (オリエンタル酵母) 0.1%, グルコース 0.05%, 寒天 2%) 上で孢子を形成させて二倍体である確認を行った。接合型は基準株として AH22(a)と NA87-11A(α)を用い、基準株と試験株とを混合し接合子形成の有無を観察して判定した。対照菌株には、清酒酵母日本醸造協会 6 号 (K6) とその泡なし酵母 (K601), 清酒酵母広島 2 号 (H2) とそれより Froth-Flotation 法³⁵⁾を用いて分離した泡なし酵母 (H21), 凝集性を保有するビール酵母 B-2018 株 (東京農業大学竹田研究室保存株), また、ろ紙繊維への吸着性を保有する地蓋形成酵母^{37, 38, 39)}として日本醸造協会 8 号酵母, IF02376 株を用いた。また、H21 酵母から Random-spore-plating 法⁵⁾によって一倍体 (H21-4) を分離し、交雑実験に用いた。

2. 気泡への酵母細胞の吸着 供試酵母を YPD (酵母エキス (オリエンタル酵母) 1%, ペプトン (日本製薬) 2%, グルコース 2%) 液体培地で 30°C, 2 日間培養した。その上澄みを除去した後、酵母区分 (5×10^8 / ml 程度の酵母密度) を用いて気泡の混入したプレパラートを作成し、酵母気泡への吸着の有無を観察した⁴⁰⁾。

3. 水-有機溶媒二相系での酵母細胞の分配 酵母細胞懸濁液 (約 5 mg 乾燥菌体 / ml) 3 ml と各有機溶媒 3 ml をそれぞれ混合し、数秒間激しく攪拌した後、30 分間程静置した。その後、酵母細胞の水相から各有機溶媒相への移動の有無を観察した⁴¹⁾。

4. 乳酸菌による酵母細胞の凝集 麴汁 (B11g.5°) - ペプトン (1%) pH 6.5 の培地を用いて、乳酸菌 (*Lactobacillus plantarum* IAM 1216) と供試酵母をそれぞれ 30°C で 72 時間培養した。その後、培養菌体を蒸留水で洗浄し、蒸留水に懸濁・混合後、pH を約 3 に調整し凝集の有無を観察した⁴²⁾。

5. 酵母細胞の自己凝集 供試酵母を麴汁 (Bllg. 10°) で 15°C, 10日間培養し, その菌体を蒸留水で洗浄し, 0.1%塩化カルシウム溶液に懸濁した。その酵母懸濁液を等分し, その一方に 0.05 Mフタル酸カリウム溶液 (pH 5) を懸濁液の 1/10量加え, また他方の酵母懸濁液を清酒に加えた。この両者の結果から凝集性を判定した³⁷⁾。

6. ろ紙繊維への酵母細胞の吸着 供試酵母を麴汁 (Bllg. 10°) を用いて 15°Cで 10日間培養した。その培養液にろ紙の繊維 (東洋ろ紙 No.5Cを水に懸濁し, ホモゲナイザーでほぐしたもの) を加え, 吸着の有無を顕微鏡で観察してろ紙繊維への吸着性を判定した³⁷⁾。

7. 胞子クローンの凝集泡なし性の検定 従来の泡なし酵母から得た一倍体と凝集泡なし酵母からの一倍体とを集団接合法¹⁵⁾によって交雑した。micromanipulatorを用いて子のう解剖を行い, 交雑株からの四分子を取得した。交雑株と四分子の凝集性と泡なし性の表現型を総米 100gの小仕込による発酵試験で調べた。

8. 小仕込試験 胞子クローンの凝集泡なし性の検定のための小仕込試験は次のように行った。まず, 乾燥麴 23g, 水 157ml, 酵母培養液 1ml, 75%乳酸 0.16gを仕込み, 水麴とした。その翌日, α 米 77gを加えた。発酵は 15°Cで行った。なお, 炭酸ガス発生による原料を経日的に測定して発酵しているかどうかを確認した。また, 試験株 DH3株および DH4株の酒造適性を検討するため, 対照株と共に小仕込試験を行った。その仕込配合を Table 20に示した。仕込は麴汁培地で 28°C, 一晚しんとう培養した酵母培養液を用いた二段仕込で行い, もろみ期間は 20日間とした。発酵温度は水麴から試験終了まで 15°Cとした。また, 仕込容器に発酵通気管を取り付け, 発酵経過に伴うもろみ重量の減少を測定してアルコール生成量を推定した⁸⁾。

9. 分析方法 製成酒の一般成分 (日本酒度, アルコール分, 酸度およびアミノ酸度) の分析は国税庁所定分析法⁷⁾に準じて行っ

た。

結 果

1. 凝集泡なし二倍体酵母の造成

凝集泡なし二倍体酵母は、Fig. 11 に示した過程によって造成した。FR0⁺/FR0⁻は野生型／凝集泡なしの表現型を示す。まず、H2株 (FR0⁺) からの一倍体 H2-97株 (FR0⁺) と H2-5-62株 (FR0⁻) を交雑した。次に、交雑株 DH1 (FR0⁺) から一倍体株を分離し、そのうちの8株のα型一倍体株について泡あり／泡なしの表現型を調べたところすべて泡あり性であった。その中で比較的泡の低かった DH1-7株 (FR0⁺) と H2-5-62株を交雑し DH2株 (FR0⁺) を得た。この DH2株から得た12組の四分子は泡あり性と凝集泡なし性の分離が2:2となった。これらの四分子において凝集性と泡なし性は凝集泡なし株として同一株で発現していることから、凝集性と泡なし性は一つの遺伝子に依存しているのではないかと推察された。この変異遺伝子を *afh1* (aggregated and froth head forming) と命名した。DH2株から得た四分子における *afh1* と接合型間の分布は PD:NPD:T=5:4:3 となったので、*afh1* と接合型に関する遺伝子とは連鎖していないと考えられた。なお、笠原らは清酒酵母における泡あり性が二つの重複した優性遺伝子によるとしている⁴³⁾。また、Thorntonはワイン酵母における泡あり性が少なくとも二つの優性遺伝子に支配されている⁴⁴⁾ としているなど、従来の泡なし性遺伝子としてこれまでに *fro1*, *fro2*, *fro3* が知られており⁴⁵⁾、H21-4株 (従来の泡なし酵母 H21株より分離した一倍体株) 中の泡なし性遺伝子が従来の泡なし性遺伝子のどれに相当するか不明なのでそれを *froX* として 以後の議論をすすめることにする。そして、この DH2株より分離された一倍体 DH2-3C株 (FR0⁻) と DH2-12A株 (FR0⁻)、DH2-12A株と H2-5-62株をそれぞれ交雑して二倍体酵母 DH3株と DH4株を得た。

2. 造成株を用いて醸成したもろみの状ぼうともろみ中の酵母細胞

造成した凝集泡なし二倍体酵母 DH3 株のもろみの状ぼうともろみ中の酵母細胞の状態を K6 株および K601 株に関する結果と共に Fig. 12 および Fig. 13 に示した。K6 株を用いたもろみでは高泡を形成したのに対し、DH3 株のもろみは K601 株の場合と同様、高泡を生じなかった (Fig. 12)。もろみ中の酵母細胞の状態は Fig. 13 に示したとおり、K6 株および K601 株ではほぼ均一に分散していたのに対し、DH3 株では凝集が認められ、あわせて固形物に吸着し塊状で存在することが観察された。また、DH4 株においても DH3 株と同様の挙動が認められた。

3. 凝集泡なし酵母の細胞表面的性質

凝集泡なし二倍体酵母 DH3 株および DH4 株と対照株を用いて凝集・吸着性等の比較を行った。その結果を Fig. 14 と Table 21 に示した。

まず、気泡への酵母細胞の吸着の検討を行った。泡なし酵母 K601 株および H21 株の細胞が気泡に吸着しないのに対して、DH3 株および DH4 株の細胞は泡あり酵母 K6 株および H2 株の場合と同じく気泡への吸着が観察された (Table 21, Fig. 14(a))。

次に、水-有機溶媒二相系での酵母細胞の分配を検討した。K601 株および H21 株の細胞の有機溶媒相への移動は認められなかったのに対し、DH3 株および DH4 株の細胞は K6 株と H2 株の場合と同じく有機溶媒相への移動が観察された (Table 21, Fig. 14(b))。これらの結果から、凝集泡なし酵母の細胞表層は泡あり酵母と同じく疎水的である⁴⁾¹⁾と推察され、従来の泡なし酵母のそれとは異なると考えられた。

次に、乳酸菌による酵母細胞の凝集試験を行った。K601 株および H21 株では凝集が認められなかったのに対し、DH3 株および DH4 株では K6 株・H2 株と同様、菌体の凝集・沈降が観察された (Table 21, Fig. 14(c))。この現象は酵母細胞表面のタンパク質的性質

の差異に依存して細胞表面の静電気の帯電によって起こり，その場合，酵母細胞表面は pH 3 付近でプラスに帯電している⁴⁶⁾と考えられる。したがって，この試験結果からも凝集泡なし酵母は泡あり酵母と同様の細胞表面を有していると考えられた。

次に，酵母細胞による自己凝集性を検討した。B2018株は pH 5 のフタル酸カリウム溶液との混合液においても，清酒との混合液においても凝集性を示したが，DH3株およびDH4株はK6株・K601株・H2株およびH21株と同様，凝集性は認められなかった (Table 21, Fig. 14(d))。従って，凝集泡なし酵母の凝集・吸着はビール酵母 B2018株に見られる酵母細胞による自己凝集³⁷⁾とは異なる現象であると考えられた。

さらに，ろ紙繊維への酵母細胞の吸着を検討した。K6株・K601株・H2株およびH21株ではろ紙繊維への吸着は認められなかった。しかし，DH3株およびDH4株ではIF0 2376株と同様，ろ紙繊維への吸着が観察された (Table 21, Fig. 14(e))。このように，凝集泡なし酵母がろ紙繊維に対して地蓋形成酵母と同じ挙動を示すことから，凝集泡なし酵母の凝集・吸着には地蓋形成酵母と同様，細胞表面のタンパク質のアミノ基が関与している⁴⁷⁾可能性が考えられる。以上のように，凝集泡なし酵母は従来の泡なし酵母とは異なる細胞表面的性質を有することが明らかとなった。従って，凝集泡なし酵母のもろみにおける泡なし現象は従来の泡なし酵母とは異なった性質によるものと考えられ，それについては今後の検討が必要と考えられた。さらに，もろみ末期に発酵力の鈍る³⁸⁾地蓋形成酵母の細胞表面的性質と似た一面を示すことも明らかになった。

4. 凝集泡なし性の遺伝的性質

従来の泡なし酵母 H21株 (*froX/froX*) の一倍体 H21-4株 (a, *froX*) と凝集泡なし一倍体酵母 DH4-3B株 (α , *afh1*) を交雑して，その表現型を調べ，その交雑株の四分子解析を行った。その結果を Table 22 に示した。二倍体株は泡あり性を示した。四分子のう

ちの一部の株は増殖力・発酵力が弱く，凝集・非凝集，泡あり・泡なしの判定が困難であったが，取得できた四分子中に泡あり株が存在することから凝集泡なし性遺伝子 (*afh1*) は H21 株中の泡なし性遺伝子 *froX* とは異なることが明らかになった。また，Table 22 の四分子解析において得られた泡なし株中にも泡あり株中にも凝集性と非凝集性の株が存在していた。

5. 小仕込試験

凝集泡なし二倍体酵母の小仕込試験を行って，酒造適性を検討した。対照仕込には K6 株・K601 株・H2 株および H21 株を用いた。アルコール生成量を表すもろみの減少重量の経時変化を Fig. 15 に，製成酒の一般成分を Table 23 に示した。もろみの減少重量は凝集泡なし酵母の DH3 株および DH4 株が従来の清酒酵母である K6 株・K601 株・H2 株および H21 株に比べて全期間を通じて少しずつ高く，最終減少重量も大きくなった。製成酒の一般成分についてみると，DH3 株および DH4 株による製成酒は K6 株・K601 株・H2 株および H21 株のそれらと比べて日本酒度の切れが良く，アルコール生成量も高くなった。酸度・アミノ酸度については DH3 株および DH4 株による製成酒の酸度が対照のものより若干低い値を示し，アミノ酸度が若干高い値を示した。香気については官能的に DH3 株および DH4 株いずれも良好であり異臭は感じられなかった。以上の結果から，凝集泡なし二倍体酵母は優れた酒造適性を持つことが明らかになった。

考 察

凝集泡なし二倍体酵母の造成過程 (Fig. 11) の中で，凝集泡なし二倍体酵母 DH2 株の四分子が泡なし性と凝集性を同一株で発現したことから，この二つの形質は一つの遺伝子に依存していると考えた。しかし，従来の泡なし性との関係を調べた Table 22 の四分子解析において得られた泡なし株中にも泡あり株中にも凝集性

と非凝集性の株が存在していたことから、凝集性の発現に関してはさらに検討を要すると考えられた。

凝集泡なし酵母の利用については泡なし清酒酵母としての利用の可能性はもちろん、その凝集・吸着という特徴を生かして凝集性酵母、吸着性酵母としてアルコール生産酵母への利用の可能性もあり、応用範囲が広いと考えられる。

要 旨

清酒もろみにおいてほとんど泡を形成せず、もろみ中で酵母細胞が凝集・吸着性を示す H2-5-62 株（清酒酵母広島 2 号から分離選択した一倍体低温清酒酵母）から造成した同様の性質を有する二倍体酵母の細胞表面的性質・遺伝的性質・酒造適性を検討した。この凝集泡なし酵母の細胞表面は高泡を形成しない従来の泡なし酵母とは異なり、泡あり酵母と同じであると考えられた。また、地蓋形成酵母と似た細胞表面的性質を示した。この凝集泡なし性は従来の泡なし性とは異なる遺伝子によるものであると推定された。小仕込試験の結果から凝集泡なし酵母は優れた酒造適性を持つことが明らかになった。

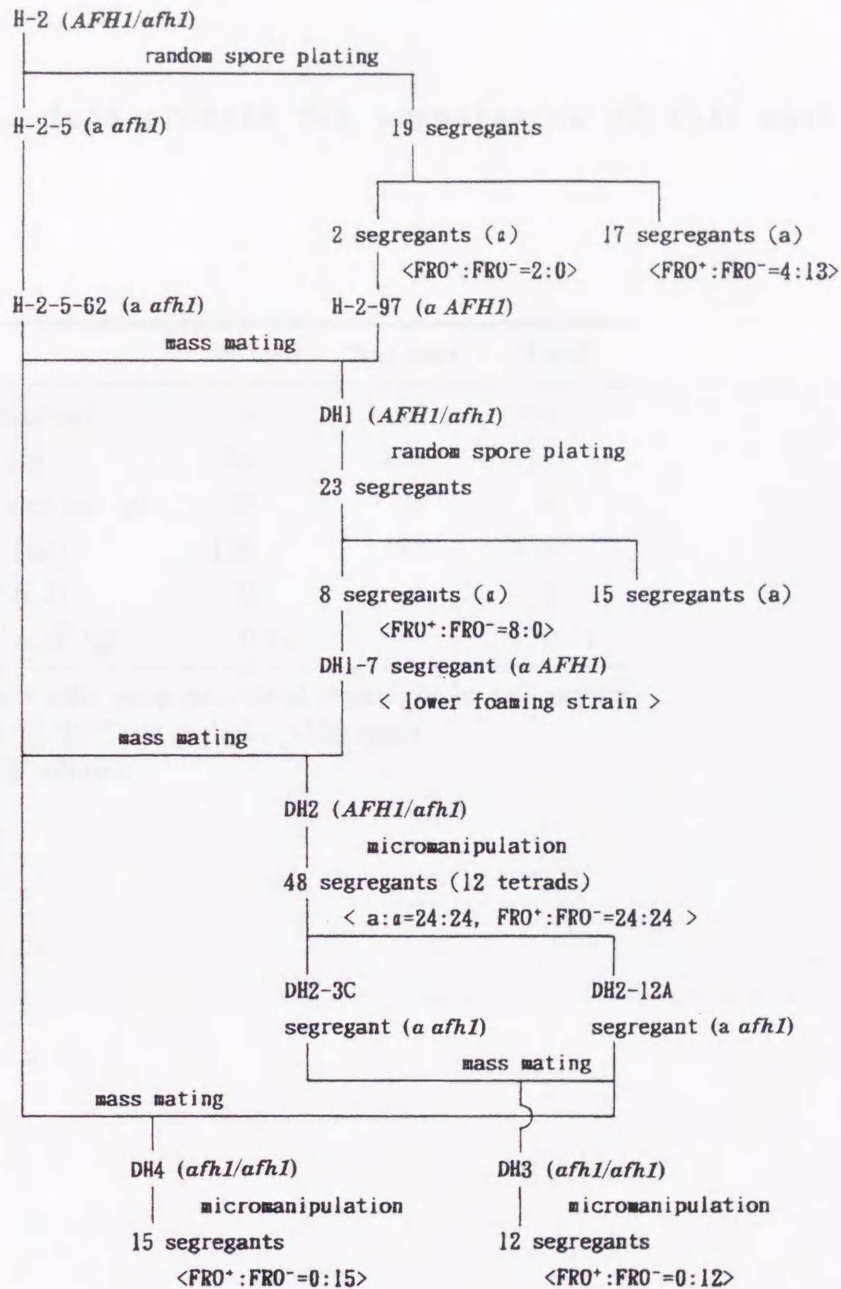


Fig. 11. Construction of the aggregated and non-foaming yeast strains.

FRO⁺ and FRO⁻ indicate ability and inability of froth head formation, respectively. I have tentatively called the gene responsible for the aggregated and non-foaming trait cosegregating in the cross DH2, *AFH1* (aggregation and froth head formation).

Table 20. Feed program for preparation of sake mash.

	1st feed	2nd feed	Total
Total rice (g)	74	126	200
α -rice (g)	54	100	154
Dried rice <i>koji</i> (g)	20	26	46
Water (ml)	150	165	315
Yeast ^a (ml)	2		2
Lactic acid ^b (g)	0.31		0.31

^a Yeast cells were cultivated overnight in *koji* extract medium at 28°C on a shaker (120 rpm).

^b 75% solution.

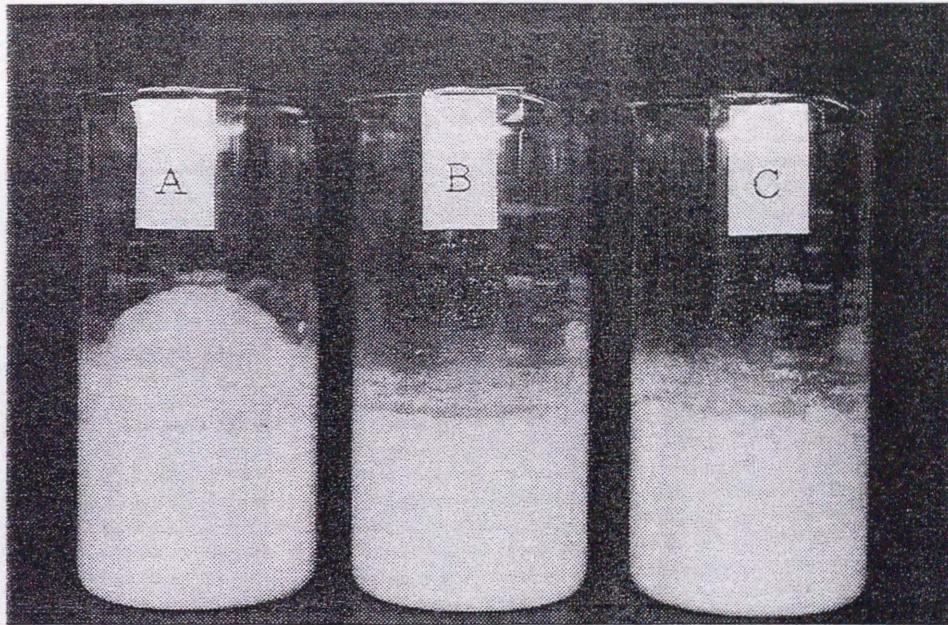


Fig. 12. Froth head formation by fermented *sake* mash.

A *sake* mash composed of α -rice (154g), *koji*(46g), and water (315ml) was fermented with the indicated strain; the photographs were taken 6 days after the 2nd feed (6d incubation at 15°C).

A, Kyokai no.6 (froth head forming strain);

B, Kyokai no.601 (conventional non-foaming strain);

C, DH3 strain.

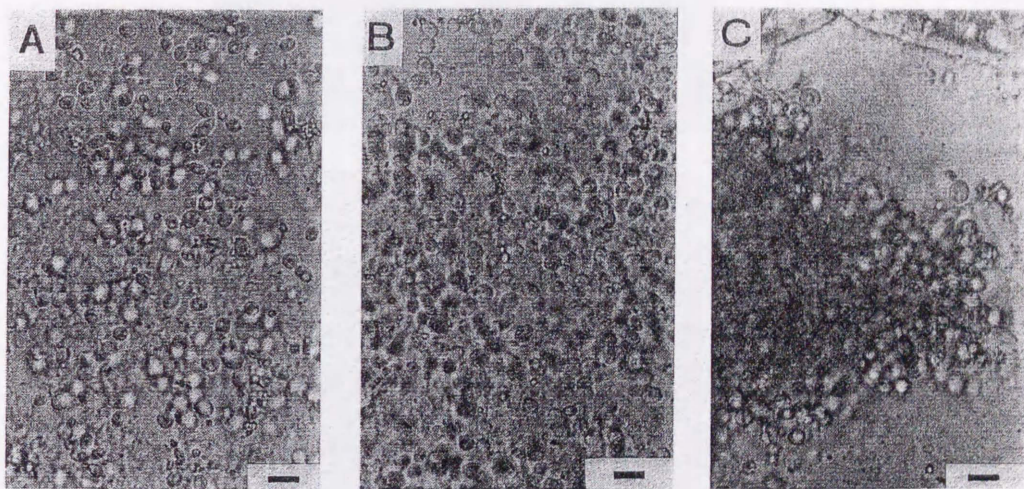
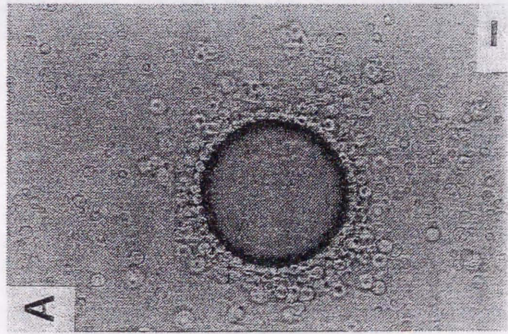
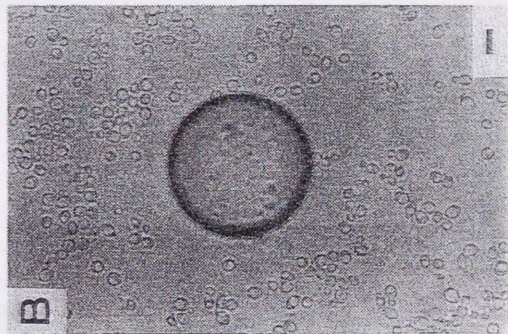
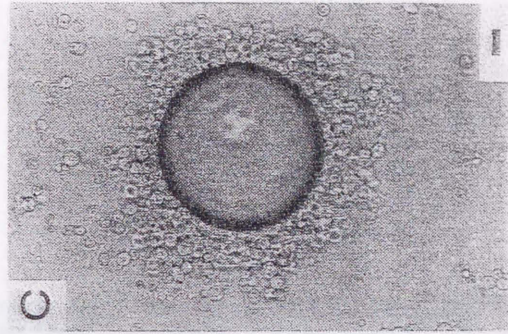


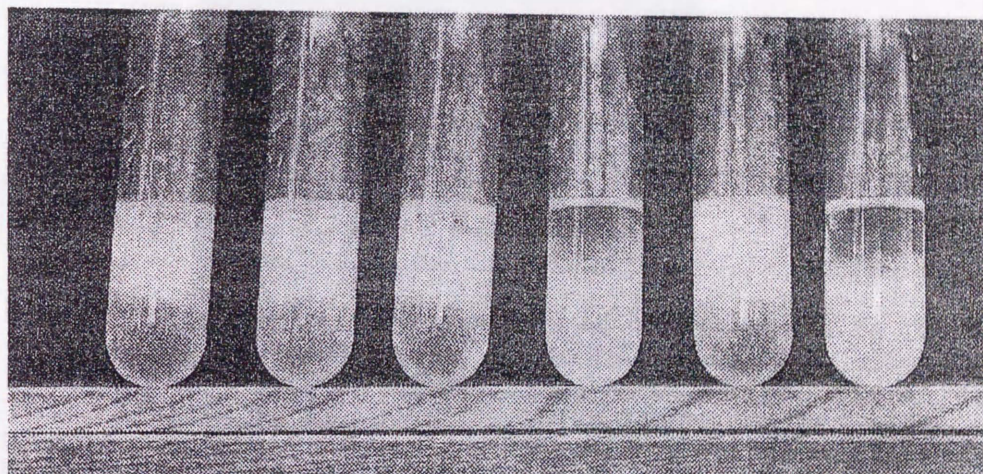
Fig. 13. Photomicrographs of yeast cells in *sake* mash.

A *sake* mash composed of α -rice (154g), *koji* (46g), and water (315ml) was fermented with the indicated strain for 10 days at 15°C.

A, Kyokai no.6; B, Kyokai no.601; C, DH3 strain.
Bars indicate 10 μ m.

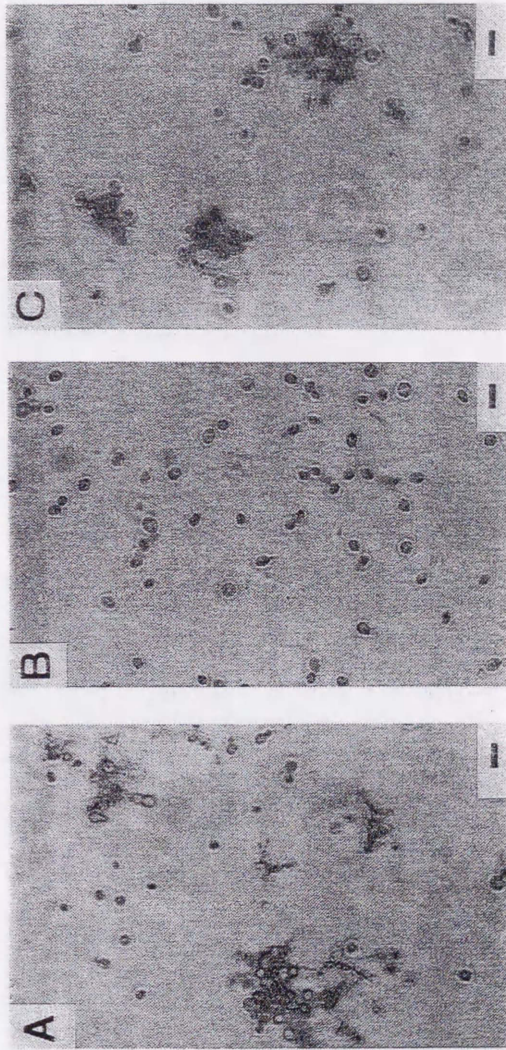


(a)

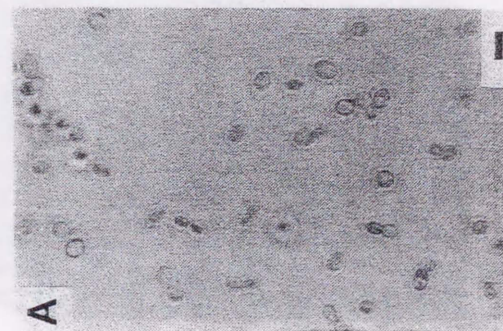
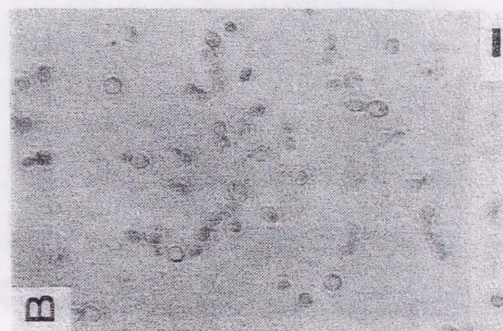
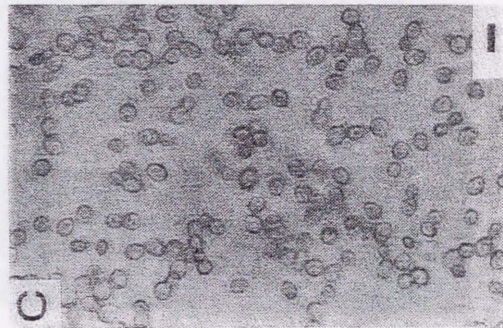
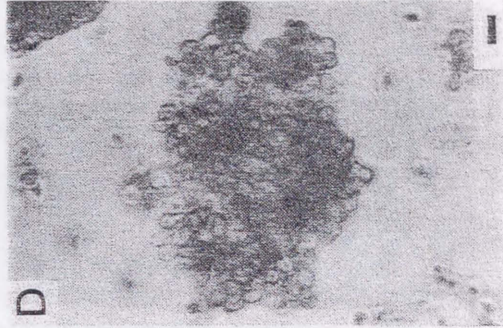


А-1 А-2 К-6 К-601 И-2 И-2А

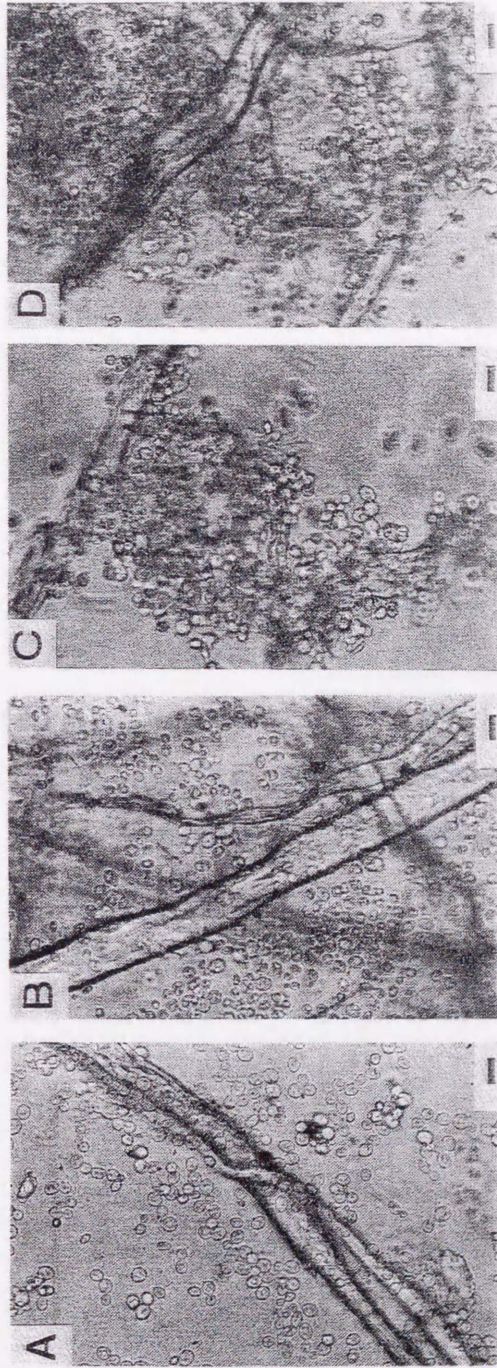
(b)



(c)



(d)



(e)

Fig. 14. Comparison of visual properties among the *afh1/afh1* strains and standard strains.

(a) Adhesion of yeast cells on the surface of air bubbles.

A, Kyokai no.6; B, Kyokai no.601; C, DH3 strain.
Bars indicate 10 μ m.

(b) Distribution of yeast cells in water-benzene (two-phase system).

A-1 and A-2 indicate DH3 and DH4, respectively.

(c) Aggregation of yeast cells with lactobacillus cells.

A, Kyokai no.6; B, Kyokai no.601; C, DH3 strain.
Bars indicate 10 μ m.

(d) Aggregation of yeast cells themselves in potassium phthalate solution (pH5).

A, Kyokai no.6; B, Kyokai no.601; C, DH3 strain;
D, B2018 strain.

Bars indicate 10 μ m.

(e) Aggregation of yeast cells with filter paper cellulose.

A, Kyokai no.6; B, Kyokai no.601; C, DH3 strain;
D, IFO 2376 strain.

Bars indicate 10 μ m.

Table 21. Properties of the *afh1/afh1* strains and standard strains.

	Strains							
	DH3	DH4	K-6	K-601	H-2	H-21	B-2018	IFO 2376
Adhesion to air bubbles ^a	+	+	+	-	+	-	NT	NT
n-Octane	+	+	+	-	+	-	NT	NT
n-Decane	+	+	+	-	+	-	NT	NT
Distribution in n-Heptanol	+	+	+	-	+	-	NT	NT
water-solvent ^b	+	+	+	-	+	-	NT	NT
Benzene	+	+	+	-	+	-	NT	NT
Toluene	+	+	+	-	+	-	NT	NT
Aggregation with lactobacillus ^c	+	+	+	-	+	-	NT	NT
Aggregation of yeast cells themselves ^d	-	-	-	-	-	-	+	NT
(KOOCC) ₂ C ₆ O ₄	-	-	-	-	-	-	+	NT
<i>Sake</i>	-	-	-	-	-	-	+	NT
Aggregation with filter paper cellulose ^e	+	+	-	-	-	-	NT	+

NT: Not tested.

^a Adhesion of yeast cells on the surface of air bubbles. +: adhered, -: not adhered.

^b Distribution of yeast cells in water-solvent (two-phase system). +: transferred, -: not transferred.

^c Aggregation of yeast cells with lactobacillus cells. +: aggregated, -: not aggregated.

^d Aggregation of yeast cells themselves. (KOOCC)₂C₆O₄: mixture of yeast-cell suspension with potassium phthalate soln (pH 5). *Sake*: mixture of yeast-cell suspension with *sake*. +: aggregated, -: not aggregated.

^e Aggregation of yeast cells with filter paper cellulose. +: aggregated, -: not aggregated.

Table 22. Allelism test between *afh1* and *froX*.

Hybrid	Genotype	Phenotype of hybrid	Segregation pattern of FRO phenotype				
			0:4	1:3	2:2	3:1	4:0
H-21-4 DH4-3B	$\frac{a.froX+}{a+afh1}$	FRO ⁺ FLO ⁻	1	7	2	0	0
Segregation pattern of FLO phenotype in each ascus type			FLO ⁺ : FLO ⁻				
2:2			1:3	2:2	1:3	2:2	—
1			4	3	1	1	

FRO⁺/FRO⁻: Froth head forming phenotype.

FLO⁺/FLO⁻: Flocculation phenotype.

afh1: aggregated and froth head forming.

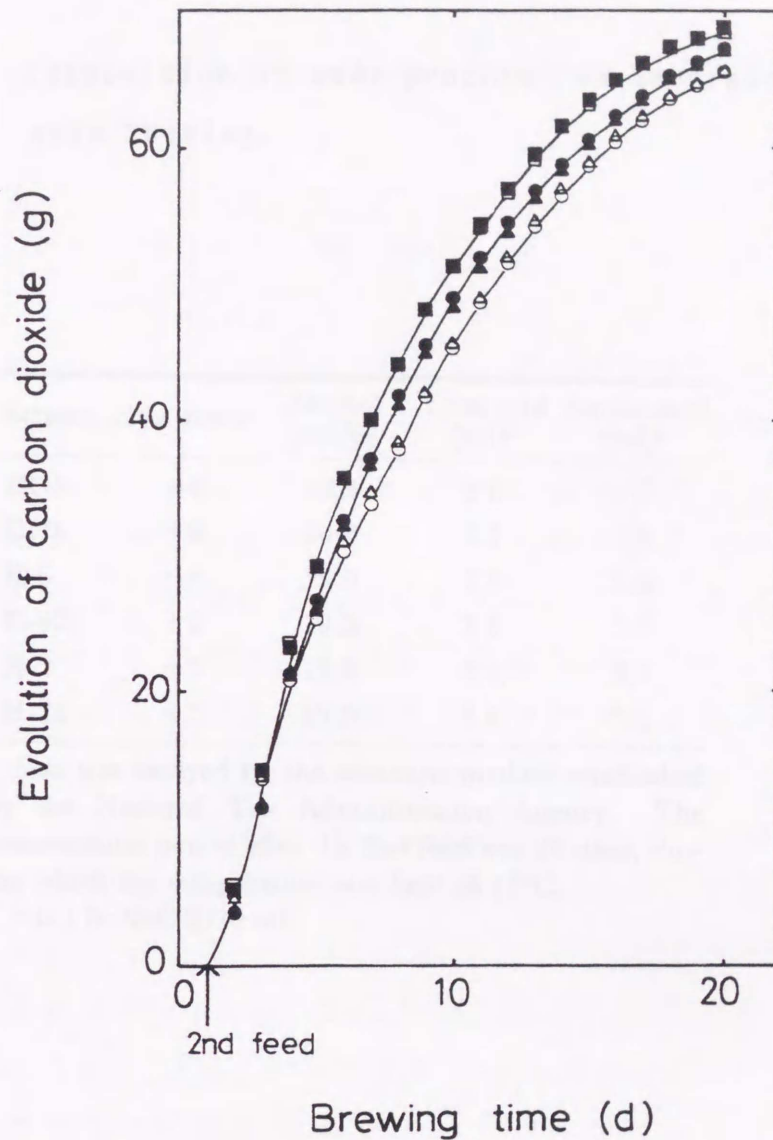


Fig. 15. Course of sake fermentation by the *afh1/afh1* strains and standard strains.

A sake mash composed of α -rice (154g), *koji*(46g), and water (315ml) was fermented with the indicated strain at 15°C. Brewing time was the indicated days after the 2nd feed.

○, Kyokai no.6; ●, Kyokai no.601;
 △, Hiroshima no.2; ▲, Hiroshima no.21;
 □, DH3 strain; ■, DH4 strain.

Table 23. Composition of *sake* produced in laboratory scale *sake* brewing.

Strains	<i>Sake</i> meter	Alcohol (vol%)	Total acid (ml) ^a	Amino acid (ml) ^a
DH3	+6	20.4	2.8	3.7
DH4	+6	20.3	2.7	3.9
K-6	-4	19.0	3.6	3.6
K-601	+2	19.5	3.1	3.3
H-2	-5	18.8	3.4	3.4
H-21	+1	19.5	3.4	3.1

Sake was assayed by the standard method established by the National Tax Administration Agency. The fermentation period after the 2nd feed was 20 days, during which the temperature was kept at 15°C.

^a 0.1 N-NaOH/10 ml.

第4章 高温下で発酵力・増殖力の強い酵母の育種

緒言

通常、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の増殖・発酵の最適温度は30℃前後であるが、アルコール発酵において発酵が盛んになると発酵熱を生じ、もろみ温度が上昇し、発酵が妨げられる。これを防ぐために、冷却が必要となり、大規模な生産ではその費用が大きな額となる。冷却費用節減のために、高温でも増殖・発酵にできるだけ支障をきたさない酵母を育種することはアルコール発酵の工程改善において重要な課題の一つである。これに関する研究は各方面でいろいろ試みられてきた^{48, 49, 50, 51, 52})。また、高温下における増殖の関係ではこれまで *S. cerevisiae* の Ts 変異株について数多くの研究がなされているが、増殖の上限温度についてはほとんど調べられていない。これまでのところ、エタノール高生産性酵母として造成された酵母の高温度における増殖が調べられた例⁴⁸)と42℃で増殖できる病原性 *S. cerevisiae*⁵³)が報告されているだけである。本章では交雑によって高温下で強い発酵力を持つ酵母の育種を行い、その酵母の高温増殖力を調べた。そして、本来高温増殖できない酵母を交雑して高温で増殖可能な酵母の育種を試みた。

実験方法

1. 菌株 高温下で強い発酵力を示す酵母の育種には次の菌株を用いた。かつて、“*Saccharomyces formosensis*” と呼ばれ、実際のアルコール発酵でも用いられてきた *S. cerevisiae* HUT 7107 株 (HUT 7107 株) (広島大学工学部発酵工学講座から分譲) と Fermento Fleischmann (FF 株) という名前でブラジルのピンガ

酒醸造に用いられている酵母 *Saccharomyces uvarum* IZ 1904 (IPT (Instituto de Pesquisas Tecnológicas, Brazil) から分譲) を使用した。これらから, Random spore plating 法⁵⁾ によって, 一倍体 126 株 (HUT 7107 株から 68 株 (すべて a 型), FF 株から 58 株 (a 型 25 株, α 型 33 株)) を取得した。

高温下での増殖力を調べるのに用いた菌株を Table 24 に示した。上記の HUT 7107 株と FF 株も併せて記した。

接合型は基準株として *S. cerevisiae* AH22 株 (a 型) と NA87-11A 株 (α 型) を用い, 基準株と試験株とを混合し, 接合子形成の有無を観察して判定した。一倍体の確認は以下に基づいて行った。①接合能を有すること, ②胞子を形成しないこと, ③細胞の大きさ, ④芽そくを形成すること。また, 二倍体であることは胞子形成用培地 (酢酸カリウム 1%, 酵母エキス (オリエンタル酵母) 0.1%, グルコース 0.05%, 寒天 2%) 上で胞子を形成することによって確認した。交雑は集団接合法⁵⁴⁾ によって行った。子の解剖は micromanipulator を用いて行った⁵⁵⁾。

2. 菌株の選択 菌株は以下の小規模発酵試験により選択を行い, 発酵力の優れた株について中規模発酵試験を行った。なお, 発酵力は増殖およびアルコール生成力をあわせた最終の発酵液中のアルコール蓄積と考えた。小規模発酵試験はアルミキャップを被せた 100 ml 容大型試験管に YPD (酵母エキス (オリエンタル酵母) 1%, ペプトン (日本製薬) 2%, グルコース 20%) 液体培地 50 ml を入れて行った。この試験では, 予め, 35°C で 2~7 日間 (菌株によって異なる) 静置培養した前培養液 (本培養液と同じ組成) を本培養液中の初発菌濃度が約 1.0×10^6 / ml になるように植菌し, その後, 30°C あるいは 40°C の恒温水槽内に静置して発酵を開始した。発酵力の強さは 30°C では 2 日後, 40°C では 4 日後の発酵液の減少重量で表した。

3. 発酵試験 中規模発酵試験は発酵通気管付き 1 l 容エルレンマイヤーフラスコを用い, これに 480 ml の YPD (グルコース

20%) 液体培地を入れ、小規模試験と同様の条件で植菌し、その後、30℃、35℃、40℃、42℃の恒温水槽内に静置して行った。経時的アルコール生成量は炭酸ガス発生による減少重量を測定して推定した⁶⁾。なお、発酵終了時のアルコール濃度は培養液を5,000 rpm, 15分間遠心分離し、その上澄液のアルコール分を国税庁所定分析法⁷⁾に準じて分析して求めた。中規模試験の場合は炭酸ガス発生による減少重量の経時変化と発酵終了液中のアルコール濃度によって発酵力を表した。

4. 高温増殖性試験

寒天培地での高温増殖性は次のようにして調べた。YPAD寒天培地(前述のYPAD培地の成分に硫酸アデニン0.04%と寒天2%を加えた培地)を用いた。YPAD寒天培地上で28℃で前培養した酵母をYPAD寒天培地にシングルコロニーになるように植え付けて、所定の温度に静置した。コロニー形成を肉眼で3日後まで観察して高温増殖性を判定した。

液体培地での42℃における増殖は酵母数の測定によって調べた。35℃での前培養液を酵母数が約 1.5×10^6 /mlになるようにYPAD液体培地に接種した。その培地を42℃で保ち、酵母数を適当な間隔でヘマチトメーターにより測定した。酵母細胞の生存率はメチレンブルー染色^{5,6)}によって調べた。

結 果

1. 一倍体株を用いた発酵試験

まず、FF株とHUT 7107株から分離した一倍体株の30℃と40℃での発酵力(小規模試験)を検討した。その結果をFig. 16に示した。なお、この試験の対照として親株の値を併せて示した。FF株由来の一倍体株(Fig.16A)の中には40℃での発酵力の強い株が多く存在し、30℃での発酵力が強い株ほど、40℃での発酵力も強い傾向が認められた。40℃では親株より発酵力が強

い位置にプロットされた一倍体株が存在した。しかし、これはこの発酵試験が小規模試験であるため、実験値に揺らぎが生じた結果とも考えられる。FF株の値も5回の繰り返し試験でFig. 16中に示すようにばらつきが生じており、その一倍体とFF株の発酵力の強さにほとんど差はないと解釈した。このことから、FF株から分離した一倍体には親株と同程度の発酵力を保有する株が存在することが明らかになった。HUT 7107株由来の一倍体株 (Fig. 16B) は30℃と40℃での発酵力の間には一定の傾向は認められなかった。また、40℃での発酵力は親株と同程度以下となった。

2. 造成二倍体株を用いた発酵試験

FF株とHUT 7107株由来の一倍体株のうち、40℃での発酵力の強い株を選択し、接合可能な組み合わせで、親株が異なる一倍体株間 (FF株由来の一倍体株/HUT 7107株由来の一倍体株) あるいは親株が同一株の一倍体株間 (FF株由来の一倍体株/FF株由来の一倍体株) で数組ずつ交雑を行った (Table 25)。得られた造成二倍体株について40℃と30℃で小規模発酵試験を行った (Fig. 17)。対照として、親株の結果を併せて示した。40℃ではFF株由来の一倍体株同士による交雑株 (3A/10A, 3A/15A) はFF株と同程度の発酵力であったが、FF株由来の一倍体とHUT 7107株由来の一倍体との交雑株 (②-39/10A, ②-23/10A, ②-39/15A, ③-5/15A) は一方の親株であるFF株と同程度か少し強い発酵力を示した。特に、②-39/10A株が優れていた。

上述の40℃での小規模発酵試験で結果の良かった②-39/10A株について中規模発酵試験を30℃, 35℃, 40℃, 42℃で行って高温下での発酵力を確認した。対照として、交雑に用いた一倍体株 (②-39株, 10A株) とその親の二倍体株 (HUT 7107株, FF株) についても同時に試験を行った (Table 26, Fig. 18)。②-39/10A株は30℃, 35℃では親株であるHUT 7107株, FF株と同等の発酵力しか示さなかったが、40℃以上でもHUT 7107株, FF株のように発酵力が衰えなかった。特に、42℃では発酵

経過も良好で最終アルコール濃度も40℃（アルコール8.3%）に比べて60%程度を保ち、親株（FF株，HUT7107株）より明らかに強い発酵力を示した。また，42℃では②-39株がその親の二倍体株よりアルコール生成量において優れていることがわかった。

3. 高温増殖性試験

上記で育種した高温下で発酵力の強い②-39/10A酵母の高温増殖性を検討した。比較のために，McCusker *et al.*らが報告している高温（42℃）で増殖可能な病原性酵母⁵³⁾と醸造用酵母あるいは遺伝研究用酵母についてもその高温増殖性を調べた（Table 24）。②-39/10A株とその元株（②-39株と10A株）は40℃で増殖した。このうち，②-39/10A株と10A株は42℃でも増殖が認められた。McCuskerより分与された人間から分離した病原性*Saccharomyces*酵母であるYJM128株とYJM273株も40℃で増殖が認められ，このうち，YJM273株は42℃でも増殖が認められた。42℃での増殖の様子をFig. 19に示した。いずれも43℃では増殖が認められなかった。②-39/10A株とYJM273株の間にはほとんど差のないことが認められた。それに対して，10A株は42℃で増殖したが，コロニーの大きさが上記の2株（②-39/10A株とYJM273株）より少し小さかった。以上のことから，先に育種した酵母②-39/10A株は42℃で病原性酵母YJM273株と同じように増殖できることがわかった。McCuskerらはこれらの病原性酵母の高温増殖性がpolygenicであることを報告している⁵³⁾。そこで，②-39/10A株もしくは10A株の高温増殖に関する遺伝的性質を調べることにした。②-39/10A株からは四つそろって生きている胞子を得ることができなかつたので，10A株の高温増殖に関する遺伝的性質を調べることにした。四つそろって生きている胞子を得ることができた交雑株SA13/10A株の子のう解剖を行い，37組の四分子（148分離株）の高温増殖性を調べた（Table 27(A)）。その結果，高温増殖性の発現には2個以上の遺伝子が関与している

ことが示唆された。これは McCusker *et al.*らの報告⁵³⁾と一致する。さて、醸造用酵母あるいは遺伝研究用酵母から造成された二倍体株の中で (Table 24), 40 °Cにおいて増殖が認められたのは RAY3A/YPH500 株だけであった。この RAY3A/YPH500 株について子のう解剖を行い, 30組の四分子 (120 分離株) の高温増殖性を調べた (Table 27(B))。その結果, SA13/10A 株の場合と同様に, 高温増殖性の発現には2個以上の遺伝子が関与していることが示唆された。また, この結果, 本来高温増殖できない酵母である RAY3A 株と YPH500 株から 40 °Cでの増殖能を持つ一倍体株を得ることができた。

4. 高温非増殖性酵母からの高温増殖性酵母の育種

次に, 42 °Cで増殖できない一倍体酵母間の交雑により 42 °Cで増殖可能な株を育種できるかどうかを調べた。このために, 40 °Cで増殖可能だが 42 °Cでは増殖できない RAY3A/YPH500 株由来の一倍体酵母 6 株 (a 型; 42C 株, 50B 株, 52A 株; α 型; 1D 株, 6D 株, 47D 株) と高温増殖とは無縁でしかも RAY3A 株あるいは YPH500 株と遺伝的背景の異なる他系統の遺伝研究用一倍体酵母 3 株 (a 型; YNN140 株, SA13 株, 8A-1B 株) あるいは清酒酵母由来の一倍体酵母 7 株 (a 型; H2-5 株, K6-45 株, K7-31 株, K9-23 株; α 型; K7-32 株, K9-21 株, K10-12 株) を交雑した。その結果, 26 株が造成され, それらの 42 °Cでの増殖が調べられた。その結果, 42 °Cで増殖する株が 2 株 (H2-5/47D 株と K6-45/47D 株) 得られた。このうち, 増殖の速かった H2-5/47D 株の増殖の様子を Fig.19 に示した。比較のために, H2-5/47D 株の元の一倍体株 (H2-5 株と 47D 株) も併せて示した。H2-5/47D 株と ②-39/10A 株と YJM273 株は 42 °Cで増殖した。3 株間にほとんど増殖の差は認められなかった。寒天培地上で 42 °Cで増殖した二倍体株 3 株の液体培地中での増殖を比較した (Fig. 20)。調べた 3 株の中で増殖速度は H2-5/47D 株 > ②-39/10A 株 > YJM273 株の順に大きかった。酵母濃度の最大値も同じ順であった。しかし, 意外なことに, 酵母濃度が

最大になったとき，H2-5/47D株と②-39/10A株では細胞の自己消化が観察された。それ以後，急に酵母濃度の減少が認められた。それに対してYJM273株では自己消化があまり認められなかった。寒天培地上において40℃で増殖できるが42℃では増殖できない47D株は42℃液体培地中で増殖しなかった。培養終了時（45時間）の酵母の生存率はH2-5/47D株が6.2%，②-39/10A株が4.6%，YJM273株が23.9%，47D株が14.7%であった。以上のことから，本来，高温で増殖できない酵母からそれらを交雑させることによって42℃で増殖可能な酵母を造成できることが明らかになった。

考 察

育種した②-39/10A株の高温下での発酵力をこれまでの育種例と比較してみる。培地など諸条件が同一ではないので一概には言えないが，これまで育種されてきた高温発酵性酵母の中で②-39/10A株は42℃というより高温で発酵可能で40℃，42℃での最終アルコール蓄積量が比較的多い（40℃でアルコール8.3%，42℃でアルコール5.1%）という特徴を有していた。また，実用の発酵あるいは醸造に用いられている酵母を親株として育種されたという点も特徴的である。

高温では本来増殖できない酵母同士の交雑により，42℃で増殖可能な酵母を育種することができたことから，高温増殖に関係する遺伝子が高温増殖とは無縁の酵母にも存在することが明らかになった。そして，高温増殖は一つあるいは二つの遺伝子の不足がその発現を妨げており，適当な株との交雑で遺伝子を補うことによって高温増殖性の発現が可能になると考えられた。

42℃での増殖を液体培地で調べたとき（Fig. 20），酵母細胞の自己消化が観察された。プロテインキナーゼCが介在する細胞保全経路は高温増殖に対して重要である⁵⁷⁾。また，この経路の

不備は増殖限界温度の低下を引き起こし、限界温度で細胞の自己消化が起こる^{5,7)}。すなわち、細胞保全経路が高温増殖における律速となっているため、増殖上限温度では細胞壁が不完全となり酵母細胞が自己消化する。この経路を遺伝的に補強すれば酵母の高温耐性をさらに高めることができるかもしれない。

要 旨

実用のアルコール発酵酵母とビンガ酒醸造用酵母から、一倍体を分離して発酵力の強い株を選択した。それらを交雑して、親株である実用酵母より高温下で発酵力の強い雑種二倍体酵母の育種を試みた。その結果、40℃、42℃において、元の一倍体株の両親株より強い発酵力を持つ交雑株が得られた。

育種した高温下で発酵力の強い酵母の高温増殖性を調べた。その株は42℃で増殖可能であり、その高温増殖性の発現は複数の遺伝子に支配されていた。また、40℃で増殖できない遺伝研究用の一倍体株同士の交雑株とそれ由来の一倍体株の中に40℃で増殖できる株が存在した。以上の知見を基にして、従来の高温増殖性酵母以外の酵母から、42℃で増殖できる酵母の育種を試みた。その結果、本来、高温増殖性とは無縁の酵母から42℃で増殖可能な酵母を育種することができた。

Table 24. Growth of strains at each temperature on agar medium.

Strains	Genotype	Source	Growth characteristics*				
			Temperature (°C)				
			35	38	40	42	43
②39/10A	a/α	Hybrid crossed ②39 with 10A ¹⁾	+	+	+	+	+
②39	a	Haploid from HUT 7107 strain ³⁾	+	+	+	+	+
10A	α	Haploid from FF strain ³⁾	+	+	+	+	+
HUT 7107	a/α	Dept. Ferment. Technol., Hiroshima Univ. ³⁾	+	+	+	+	+
FF ^{b)}	a/α	Instituto de Pesquisas Tecnológicas, Brazil ³⁾	+	+	+	+	+
YJM.128	HQ	JHMCuster ²⁾	+	+	+	+	+
YJM.273	HQ	JHMCuster ²⁾	+	+	+	+	+
YNN140	a	My stock, Laboratory strain	+	+	+	+	+
SA13	a	My stock, Laboratory strain	+	+	+	+	+
8A-1B	a	My stock, Laboratory strain	+	+	+	+	+
RAY3A	a	My stock, Laboratory strain	+	+	+	+	+
YPH500	α	My stock, Laboratory strain	+	+	+	+	+
YNN140/YPH500	a/α	My stock, Laboratory strain	+	+	+	+	+
SA13/YPH500	a/α	My stock, Laboratory strain	+	+	+	+	+
8A-1B/YPH500	a/α	My stock, Laboratory strain	+	+	+	+	+
RAY3A/YPH500	a/α	My stock, Laboratory strain	+	+	+	+	+
W3	HQ	Brewing Society of Japan, Wine yeast	+	+	+	+	+
L-2226	HQ	Brewing Society of Japan, Wine yeast	+	+	+	+	+
Hiroshima no.2	a/α	Hiroshima Pref. Food Technol. Research Center*, Sake yeast	+	+	+	+	+
Kyokai no.6	a/α	Brewing Society of Japan, Sake yeast	+	+	+	+	+
Kyokai no.7	a/α	Brewing Society of Japan, Sake yeast	+	+	+	+	+
Kyokai no.9	a/α	Brewing Society of Japan, Sake yeast	+	+	+	+	+
Kyokai no.10	a/α	Brewing Society of Japan, Sake yeast	+	+	+	+	+
H2.5	a	Haploid from Hiroshima no.2 strain	+	+	+	+	+
K6-45	a	Haploid from Kyokai no.6 strain	+	+	+	+	+
K7-31	a	Haploid from Kyokai no.7 strain	+	+	+	+	+
K7-32	α	Haploid from Kyokai no.7 strain	+	+	+	+	+
K9-21	α	Haploid from Kyokai no.9 strain	+	+	+	+	+
K9-23	a	Haploid from Kyokai no.9 strain	+	+	+	+	+
K10-12	α	Haploid from Kyokai no.10 strain	+	+	+	+	+
42C	a	Segregant from RAY3A/YPH500 strain	+	+	+	+	+
50B	a	Segregant from RAY3A/YPH500 strain	+	+	+	+	+
52A	a	Segregant from RAY3A/YPH500 strain	+	+	+	+	+
1D	α	Segregant from RAY3A/YPH500 strain	+	+	+	+	+
6D	α	Segregant from RAY3A/YPH500 strain	+	+	+	+	+
47D	α	Segregant from RAY3A/YPH500 strain	+	+	+	+	+

Growth at high temperatures was tested by streaking cultures of cells (from a YPAD plate grown at 28°C) with a sterile toothpick onto a fresh YPAD plate.

The inoculated plates were kept at the indicated temperature and colony formation was inspected visually after 3d.

* Growth characteristics indicated are growth (+) or no growth (-) at each temperature.

^{b)} Yeast for production of Brazilian rum *pinga-fim*; *Saccharomyces brasiliensis* IZ.1904, is named Fermento Fleischmann (FF).

^{c)} Hiroshima Prefectural Food Technological Research Center

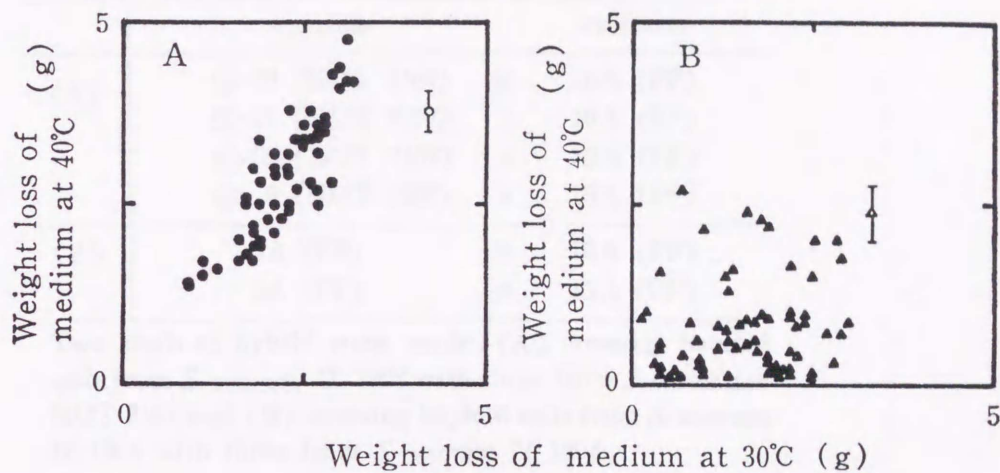


Fig. 16. Fermentabilities of haploid strains isolated from the ethanol fermentative yeasts.

Fifty ml each of the medium containing 1% yeast extract, 2% peptone, and 20% dextrose (YPD) was inoculated with a haploid strain and incubated at 30°C for 2 days or 40°C for 4 days. After the incubation, weight loss of each medium was measured.

(A) ●, Haploid strains from *S. uvarum* IZ 1904;

○, *S. uvarum* IZ 1904.

(B) ▲, Haploid strains from *S. cerevisiae* HUT 7107;

△, *S. cerevisiae* HUT 7107.

Values of ● and ▲ indicate means \pm standard deviations of 5 separate experiments.

Table 25. Crossing program for selected haploid strains.

	a-strain		α -strain
(A)	②-39 (HUT 7107)	×	10A (FF)
	②-23 (HUT 7107)	×	10A (FF)
	②-39 (HUT 7107)	×	15A (FF)
	③- 5 (HUT 7107)	×	15A (FF)
(B)	3A (FF)	×	10A (FF)
	3A (FF)	×	15A (FF)

Two kinds of hybrid were made : (A) crossing haploid cells from *S. uvarum* IZ 1904 with those from *S. cerevisiae* HUT 7107 and (B) crossing haploid cells from *S. uvarum* IZ 1904 with those from *S. uvarum* IZ 1904.

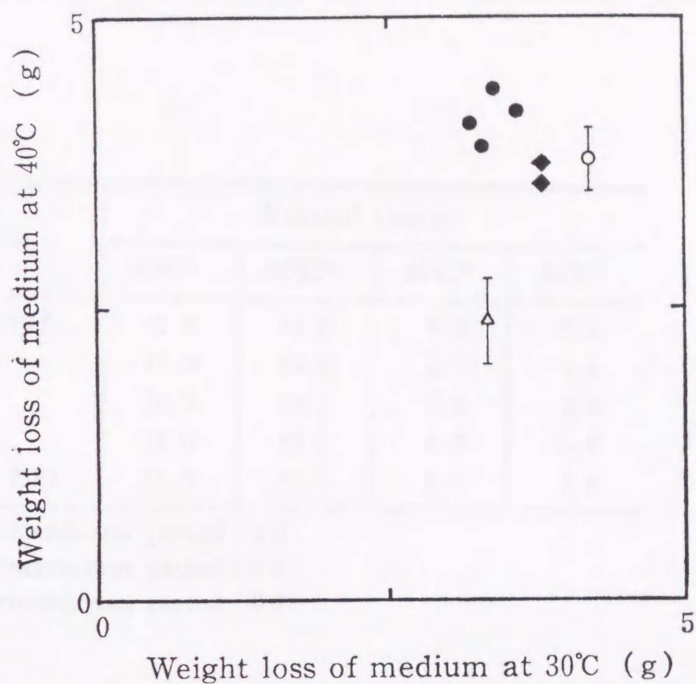


Fig. 17. Fermentabilities of the hybrid and the original diploid strains.

Experimental procedure to measure the fermentabilities is explained in Fig. 16 legend.

○, *S. uvarum* IZ 1904;

△, *S. cerevisiae* HUT 7107;

●, Hybrids made by crossing haploid cells from *S. uvarum* IZ 1904 with those from *S. cerevisiae* HUT 7107;

◆, Hybrids made by crossing haploids from *S. uvarum* IZ 1904 with those from *S. uvarum* IZ 1904.

Values of ○ and △ indicate means \pm standard deviations of 5 separate experiments.

Table 26. Comparison of final concentration of ethanol between the hybrid and its parental strains.

Strain	Ethanol (vol%)			
	30°C ¹⁾	35°C ²⁾	40°C ³⁾	42°C ³⁾
②-39/10A	11.9	11.8	8.3	5.1
10A	11.3	10.6	6.7	1.1
②-39	10.7	12.1	7.9	2.4
FF	12.0	12.2	6.9	0.7
HUT 7107	11.9	11.5	8.0	1.5

1) Fermentation period : 4 d

2) Fermentation period : 5 d

3) Fermentation period : 6 d

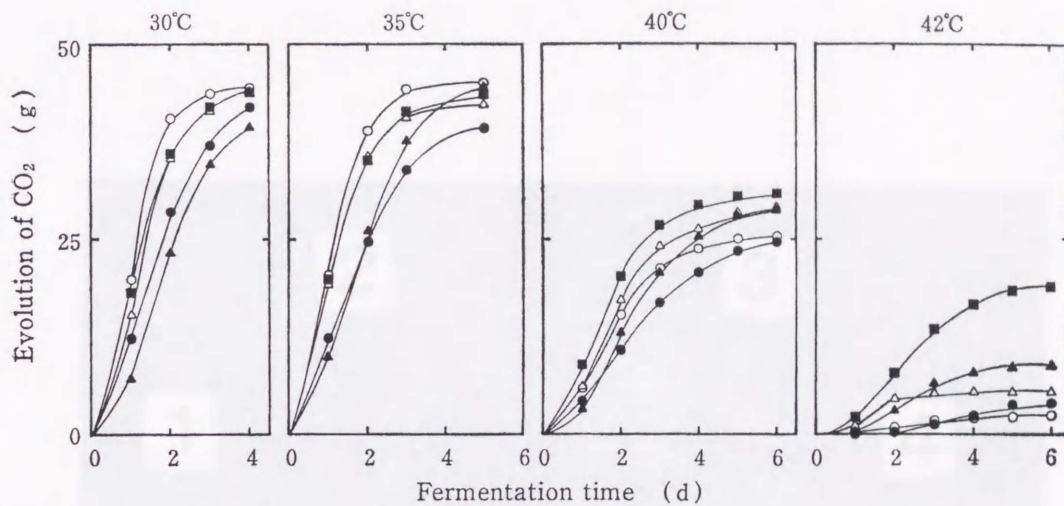


Fig. 18. Fermentabilities of the hybrid diploid, the haploid isolated from the original diploids and the original diploid strains.

YPD liquid medium of 480ml each was inoculated with the following strains and incubated at 30°C, 35°C, 40°C or 42°C. Fermentabilities were measured by weight loss and expressed as evolution of CO₂.

- , *S. uvarum* IZ 1904; △, *S. cerevisiae* HUT 7107;
- , 10A haploid strain from *S. uvarum* IZ 1904;
- ▲, ②-39 haploid strain from *S. cerevisiae* HUT 7107;
- , Hybrid made between ②-39 strain and 10A strain.

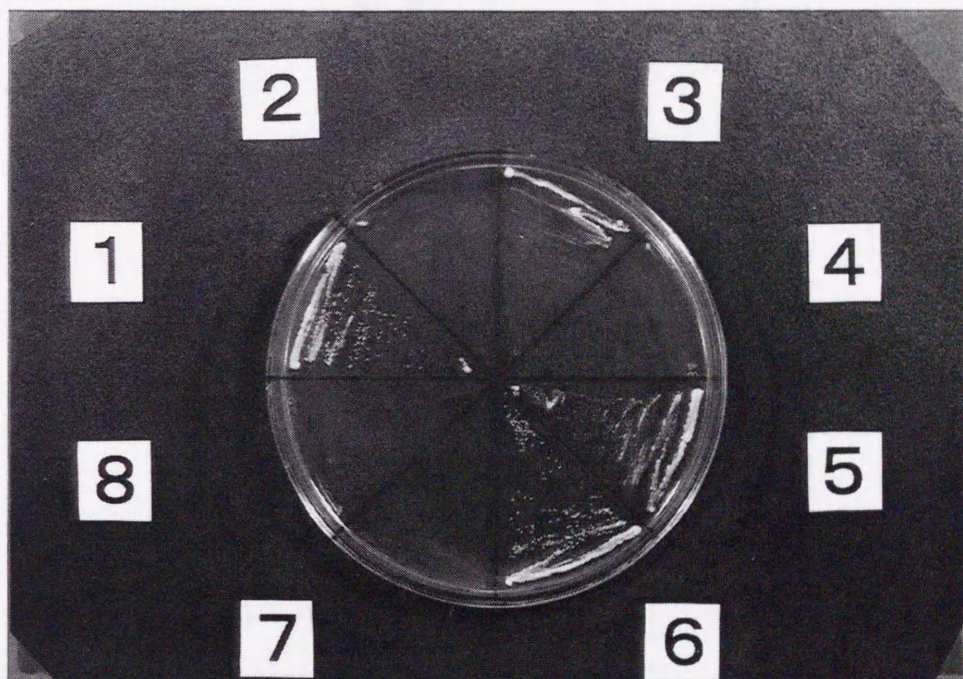


Fig. 19. Growth of various strains on a YPAD plate incubated at 42°C for 48h.

The identity of strains on a plate is as follows.
1, ②-39/10A; 2, ②-39; 3, 10A; 4, YJM128;
5, YJM273; 6, H2-5/47D; 7, H2-5; 8, 47D.

Table 27. Segregation of the growth at 40°C in hybrid strains.

Hybrid strains	Growth at 40°C	Number of tetrads with ratios				
		Growth : No-growth at 40°C	4:0	3:1	2:2	1:3
(A) SA13 / 10A	+	0	1	6	24	6
(B) RAY3A / YPH500	+	0	0	12	13	5

These hybrids were sporulated and asci were dissected. The segregants were tested for their ability to grow at 40°C. Growth at 40°C was tested in the same way as Table 1.

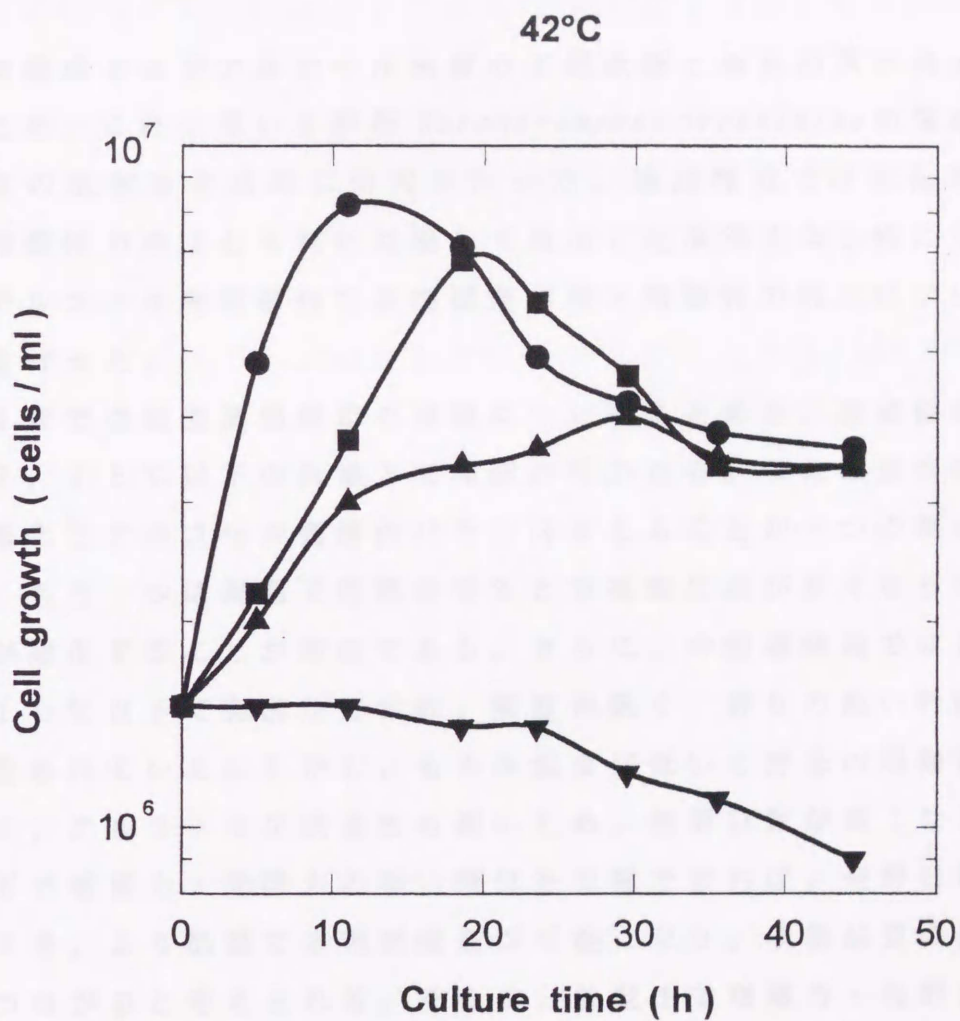


Fig. 20. Cell growth of various strains in liquid culture at 42°C.

Cells pre-cultured at 35°C was inoculated into YPAD liquid medium. The cultures were maintained at 42°C. Cell number was determined using a hemocytometer.

●, H2-5/47D; ■, ②-39/10A; ▲, YJM273; ▼, 47D.

要 約

清酒醸造およびアルコール発酵の工程改善と製品品質の向上を図るため、これに用いる酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の増殖限界温度の改善を主目的に研究を行った。清酒酵母では低温増殖性・発酵性の向上とそれに付随して見出した凝集泡なし性について、アルコール発酵酵母では高温発酵性・増殖性の向上について育種を行った。

第1章では低温清酒酵母の育種についてまとめた。清酒醸造では17, 18℃以下の低温下で発酵が行われる。これは並行複発酵の糖化とアルコール発酵のバランスをとることが一つの理由であり、もう一つは高温で発酵させると有機酸生成が多くなるなど酒質が悪化することが理由である。さらに、吟醸酒醸造ではより低い10℃以下で発酵が行われ、酸度が低く、香りの高い吟醸酒が醸造されている。しかし、もろみ温度が低いと酵母の増殖速度が遅く、アルコール生成速度も遅いため、発酵日数が長くなる。低温下で増殖力・発酵力の強い酵母を育種できれば、発酵日数が短縮でき、より低温での清酒醸造が可能になり、清酒品質の向上にもつながると考えられる。そこで、低温下で増殖力・発酵力の強い酵母の育種を試みた。清酒酵母広島2号から低温下で増殖力・発酵力の強い一倍体変異株(H2-5-62株)を分離・選択した。もろみ温度9℃および12℃での小仕込試験から、このH2-5-62株は従来の吟醸用酵母には劣るものの、一倍体酵母としては低温下での発酵力が強く、吟醸用酵母を育種する際の原因株として有用であることが認められた。もろみ温度15℃および18℃での小仕込試験の結果から、従来の普通醸造用酵母と同等の発酵力を示すことが明らかになった。また、中間工業規模の仕込試験によって、H2-5-62株は一倍体のままでも清酒醸造が可能であり、普通醸造用酵母を育種する際の原因株としても有用であることが確かめられた。

第2章では、第1章で清酒酵母から低温増殖性の向上した一倍体酵母を取得できたので、その低温増殖性酵母の遺伝的性質を検討した結果と低温増殖性を付与する遺伝子のクローニングを行った結果についてまとめた。酵母の低温増殖性変異株を分離し、その遺伝的性質を検討した。2種類の優性低温増殖性変異遺伝子の存在が明らかとなった。それぞれ *LTG1*, *LTG2* (low temperature growth gene) と命名した。一倍体株では遺伝子を2個保持する株の低温増殖性が強く、二倍体株では遺伝子を2個あるいは3個保持する株の低温増殖性が強く、特に、*LTG1-1* 遺伝子のホモサイゴート株 (*LTG1-1/LTG1-1* 株, *LTG1-1 LTG2-1/LTG1-1* 株) の中に低温増殖性の強い株の存在することが認められた。また、清酒酵母から得た一倍体株より低温増殖性変異株 (*LTG2* 変異株の可能性が高い) を取得して、清酒もろみ中での発酵力を検討した。その結果、元の野生型株に比べて変異株の発酵力が大きく向上したことが認められた。低温増殖性に関係する遺伝子の存在が確かめられたので、その遺伝子のクローニングを試みた。トリプトファン要求性の *S. cerevisiae* YNN140 株に低温増殖能を付与する遺伝子をクローニングし、*LTG3* (low temperature growth gene) と命名した。この遺伝子を破壊すると低温下での増殖が認められなくなることが明らかになった。この遺伝子が低温増殖に及ぼす影響は菌株によって異なることがわかった。塩基配列の解析から、592のアミノ酸をコードする ORF が含まれていること、ホモロジー検索から、そのタンパク質のアミノ酸配列は数種類のアミノ酸パーミターゼとホモロジーのあることがわかった。培地にトリプトファンを大量に添加すると YNN140 株が低温増殖能を示すことから、*LTG3* 遺伝子はトリプトファンの取り込みに関係しており、培地からのトリプトファンの取り込みが低温下での増殖を制限していると考えられた。*LTG3* 遺伝子を含むクローニングされた DNA の塩基配列の一部が *SUP3* 遺伝子のそれと一致したので、*LTG3* 遺伝子もまた第 XV 番染色体上に存在することが明らかになった。

第3章では凝集泡なし性清酒酵母についてまとめた。第1章において清酒酵母から低温下で増殖力の強い一倍体酵母を分離し、仕込試験を行った。その際、その分離株はもろみ中で凝集・吸着し、同時に泡なし性を有することを認めた。本来、清酒酵母はもろみ期間の前半において高泡を形成する。この泡のため、仕込量を控えることを余儀なくされ、泡消し作業の労力も必要となる。泡なし性はこれらの問題を解消できるため、清酒酵母にとっては非常に有用な性質である。泡なし酵母は既に実用化されているが、その従来の泡なし酵母の性質と今回第1章で分離した酵母の凝集泡なし性との違いを明らかにした。清酒もろみにおいてほとんど泡を形成せず、もろみ中で酵母細胞が凝集・吸着性を示す H2-5-62 株（清酒酵母広島2号から分離選択した一倍体低温清酒酵母）から同様の性質を有する二倍体酵母を造成し、その細胞表面的性質・遺伝的性質・酒造適性を検討した。酵母細胞の気泡への吸着・水-有機溶媒二相系での分配・乳酸菌による凝集・ろ紙繊維への吸着などを比較した結果、この凝集泡なし酵母の細胞表面は従来の泡なし酵母とは異なり、泡あり酵母と同じであると考えられた。また、もろみ末期に発酵力の鈍る地蓋形成酵母と似た細胞表面的性質を示した。この凝集泡なし性は従来の泡なし性とは異なる遺伝子によるものであると推定された。小仕込試験の結果から凝集泡なし酵母は優れた酒造適性を持つことも明らかになった。

第4章では高温下で発酵力・増殖力の強い酵母を育種した結果についてまとめた。酵母 *S. cerevisiae* の増殖・発酵の最適温度は30℃前後であるが、アルコール発酵において発酵が盛んになると発酵熱を生じ、もろみ温度が上昇する。発酵を効率良く継続するにはもろみの冷却が必要となり、大規模な発酵生産ではその冷却費用が多大となる。高温でも増殖・発酵にできるだけ支障をきたさない酵母を育種できれば、冷却費用の節減となり、アルコール発酵の工程改善にもつながる。そこで、まず、実用のアルコール発酵酵母とピंगा酒醸造用酵母から、それぞれ一倍体株を分

離して発酵力の強い株を選択した。それらを交雑して，40℃，42℃において，元の一倍体株の両親株より強い発酵力を持つ雑種二倍体株を取得した。取得した交雑株は42℃で増殖可能であり，その高温増殖性の発現は複数の遺伝子に支配されていた。また，本来，高温増殖性とは無縁の酵母から42℃で増殖可能な酵母を育種することができた。

1) 藤田 啓一，「酵母の生理と工業利用」，東京堂出版，1973。

2) 藤田 啓一，「酵母の生理と工業利用」，東京堂出版，1973。

3) 藤田 啓一，「酵母の生理と工業利用」，東京堂出版，1973。

4) 藤田 啓一，「酵母の生理と工業利用」，東京堂出版，1973。

5) 藤田 啓一，「酵母の生理と工業利用」，東京堂出版，1973。

6) 藤田 啓一，「酵母の生理と工業利用」，東京堂出版，1973。

7) 藤田 啓一，「酵母の生理と工業利用」，東京堂出版，1973。

8) 藤田 啓一，「酵母の生理と工業利用」，東京堂出版，1973。

9) 藤田 啓一，「酵母の生理と工業利用」，東京堂出版，1973。

10) Takagi, K., Terasaki, M., Sakai, Y., *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**, 1034-1040 (1983).

11) 藤田 啓一，「酵母の生理と工業利用」，東京堂出版，1973。

12) 藤田 啓一，「酵母の生理と工業利用」，東京堂出版，1973。

13) Ashino, S., Ishiyama, K., Sugiyama, E., and Igarashi, K., *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 2001-2005 (1987).

14) 藤田 啓一，「酵母の生理と工業利用」，東京堂出版，1973。

15) 藤田 啓一，「酵母の生理と工業利用」，東京堂出版，1973。

16) Gough, J. A. and Murray, Y. E., *J. Gen. Physiol.*, **18**, 1-18 (1953).

参考文献

- 1) 伊藤 康：醸協，60，908-909 (1965).
- 2) 鈴木昭紀，永谷正治，薄井敏明，菅間誠之助：醸協，67，362-366 (1972).
- 3) 原 昌道，大塚謙一，吉沢 淑，細矢慶二，橘田勝之，森永和男：醗酵工学，43，873-880 (1965).
- 4) 原 昌道，高木梅三，大塚謙一：醗酵工学，45，282-288 (1967).
- 5) Fink, G. R.: Method in Enzymology, X V II, part A, p.59, Academic Press, New York (1970).
- 6) 飯塚 廣，後藤昭二：酵母の分類同定法，p.40，東京大学出版会，東京 (1969).
- 7) 注解編集委員会編：第3回改正国税庁所定分析法注解(1981).
- 8) 布川弥太郎，佐藤 勝，合瀬健一：醸協，71，982-986 (1976).
- 9) 高木敦子：同質遺伝的背景をもつ *Saccharomyces cerevisiae* 倍数対系列株の育成とその利用，博士論文，大阪大学 (1985).
- 10) Takagi, A., Harashima, S., Oshima, Y., *Appl. Environ. Microbiol.*, 45, 1034-1040 (1983).
- 11) 原 昌道，若井芳則，嶋崎孝行，北野一好：醸協，78，449-452 (1983).
- 12) 原 昌道，佐々木雅晴，小幡孝之，野白喜久雄：醸協，71，301-304 (1976).
- 13) Ashida, S., Ichikawa, E., Suginami, K., and Imayasu, S.: *Agric. Biol. Chem.*, 51, 2061-2065 (1987).
- 14) 柳内敏靖，清川良文，若井芳則：醗酵工学，67，159-165 (1989).
- 15) 石川辰男：微生物遺伝学実験法，共立出版，東京 (1982).
- 16) Gough, J. A. and Murray, N. E.: *J. Mol. Biol.*, 166, 1-19 (1983).

- 17) Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., and Kimura, A.: *J. Bacteriol.*, **153**, 163-168 (1983).
- 18) Maniatis, T., Fritsch, E. F., and Sambrook, J.: *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1982).
- 19) Campbell, I. And Duffus, J. H.: *Yeast, a practical approach*, IRL Press, Oxford (1988).
- 20) Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5463-5467 (1977).
- 21) Southern, E. M.: *J. Mol. Biol.*, **98**, 503-517 (1975).
- 22) Carlson, M. and Botstein, D.: *Cell*, **28**, 145-154 (1982).
- 23) Tanaka, J. and Fink, G. R.: *Gene*, **38**, 205-241 (1985).
- 24) Jauniaux, J. C. and Grenson, M.: *Eur. J. Biochem.*, **190**, 39-44 (1990).
- 25) Hollenberg, C. P., Kleinhans, U., Luetzenkirchen, K., Rad, M. R., and Xu, G.: Submitted to EMBL/GENEBANK/DDBJ Data Banks.
- 26) Hoffmann, W.: *J. Biol. Chem.*, **260**, 11831-11837 (1985).
- 27) Vandebol, M., Jauniaux, J. C., and Grenson, M.: *Gene*, **83**, 153-159 (1989).
- 28) Kyte, J. and Doolittle, R. F.: *J. Mol. Biol.*, **157**, 105-132(1982).
- 29) Arthur, H. and Watson, K.: *J. Bacteriol.*, **128**, 56-68 (1976).
- 30) 上原 悌次郎, 山本みどり : 醸協, **87**, 773-779 (1992).
- 31) Wickner, R. B., Koh, T. J., Crowley, J. C., O' neil, J., and Kaback, D. B.: *Yeast*, **3**, 51-57 (1987).
- 32) Kondo, K. and Inouye, M.: *J. Biol. Chem.*, **266**, 17537-17544 (1991).
- 33) Kondo, K. and Inouye, M.: *J. Biol. Chem.*, **267**, 16252-16258

- (1992).
- 34) Kondo, K., Kowalski, L. R. Z., and Inouye, M.: *J. Biol. Chem.*, **267**, 16259-16265 (1992).
 - 35) Ouchi, K. and Akiyama, H.: *Agr. Biol. Chem.*, **35**, 1024-1032 (1971).
 - 36) 大内弘造, 布川弥太郎: 醸協, **67**, 54-57 (1972).
 - 37) 菅野信男, 塩田昌平, 秋山裕一: 醸協, **66**, 699-704 (1971).
 - 38) 菅野信男, 嘉屋勝海, 秋山裕一, 野白喜久雄: 醸協, **66**, 705-708 (1971).
 - 39) 菅野信男, 後藤祐吉, 嘉屋勝海, 秋山裕一, 野白喜久雄: 醸協, **67**, 49-53 (1972).
 - 40) 秋山裕一, 熊谷知栄子, 田中良彦, 大内弘造: 醸協, **66**, 516-522 (1971).
 - 41) Ouchi, K. and Nunokawa, Y.: *J. Ferment. Technol.*, **51**, 85-95 (1973).
 - 42) 百瀬洋夫, 岡崎直人, 外池良三: 醸協, **63**, 686-688 (1968).
 - 43) 笠原秀夫, 大内弘造, 倉田京子, 石戸輝雄, 布川弥太郎: 醗酵工学, **52**, 348-351 (1974).
 - 44) Thornton, R. J.: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **5**, 103-107 (1978).
 - 45) Mortimer, R. K., Schild, D., Contopoulou, C. R., and Kans, J.: *Yeast*, **5**, 321-403 (1989).
 - 46) Momose, H., Iwano, K., and Tonoike, R.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **15**, 19-26 (1969).
 - 47) Sugano, N., Akiyama, H., and Noshiro, K.: *Agr. Biol. Chem.*, **39**, 959-965 (1975).
 - 48) Seki, T., Myoga, S., Savitree, L., Uedono, S., Garoon, K., and Taguchi, H.: *Biotechnol. Lett.*, **5**, 351-356 (1983).
 - 49) 高橋康次郎, 緒方新一郎, 吉沢 淑, 中村欽一, Karuwanna,

- P., Kumunuenta, J.: 醸協, 81, 124-129 (1986).
- 50) 宮崎伸一, 北本勝ひこ, 高橋康次郎, 吉沢 淑: 醗酵工学, 65, 1-7 (1987).
- 51) 田邊幾之助, 須田雅一, 富宿昭人, Sanchez, P. C., Lebeault, J. M.: 鹿児島大学農学部学術報告, 37, 197-206 (1987).
- 52) 渡辺誠衛, 北本勝ひこ, 高橋康次郎, 吉沢 淑: 醸協, 83, 757-763 (1988).
- 53) McCusker, J.H., Clemons, K.V., Stevens, D.A., and Davis, R.W.: *Genetics*, 136, 1261-1269 (1994).
- 54) Spencer, J.F.T. and Spencer, D.M.: *Yeast*, eds. Campbell, I. and Duffus, J.H., IRL Press, Oxford, pp.76-78 (1988).
- 55) Sherman, F. and Hicks, J.: *Methods in Enzymology* Vol. 194, eds. Guthrie, C. and Fink, G.R., Academic Press, San Diego, pp.21-37 (1991).
- 56) European Brewing Convention, *Analytica Microbiologia. J. Inst. Brew.*, 83, 109 (1977).
- 57) Kamada, Y., Jung, U.S., Piotrowski, J., and Levin, D.E.: *Genes & Dev.*, 9, 1559-1571 (1995).

謝 辞

本研究は広島大学工学部宮川都吉教授の温かいご指導とご理解のもとに行われたものであります。ここに謹んでお礼を申し上げます。

また，酵母の取り扱い等酵母研究の基本から懇切丁寧にご教示いただき，さらに，本研究について一貫してご指導を賜りました東京大学理学部東江昭夫教授に厚くお礼申し上げます。

さらに，適切なるご助言と励ましの言葉を賜りました広島大学遺伝子実験施設山下一郎教授，広島文教女子大学新見治教授（広島大学工学部名誉教授）に深く感謝致します。

さらに，本研究を遂行するにあたって，共同研究者としてご助言をいただいた広島県立食品工業技術センター門隆興氏，土屋義信氏，末成和夫氏，手島義春氏，五反田晃氏に深謝致します。

最後に，本研究遂行にあたり，温かいご理解をいただいた広島県立食品工業技術センター平井幹久所長，川野一之主任研究員はじめ職員の皆様に深く感謝致します。

関連公表論文

1. 河村大造, 門 隆興, 東江昭夫: “低温清酒酵母の育種”, 醱酵工学, **64**, 25-27 (1986).
2. 河村大造, 土屋義信, 末成和夫, 手島義春, 門 隆興, 五反田晃, 東江昭夫: “一倍体低温清酒酵母の酒造適性”, 醱酵工学, **67**, 77-81 (1989).
3. 河村大造, 土屋義信, 東江昭夫: “凝集泡なし酵母の造成とその性質”, 醱酵工学, **70**, 169-176 (1992).
4. 河村大造, 東江昭夫: “低温清酒酵母の遺伝的性質”, 生物工学, **71**, 225-232 (1993).
5. Kawamura, D., Yamashita, I., Nimi, O., and Toh-e, A.: Cloning and nucleotide sequence of a gene conferring ability to grow at a low temperature on *Saccharomyces cerevisiae* tryptophan auxotrophs, *J. Ferment. Bioeng.*, **77**, 1-9 (1994).
6. 河村大造, 土屋義信: “アルコール醱酵酵母の育種”, 醸協, **91**, 753-756 (1996).
7. Kawamura, D.: Breeding of yeast strains able to grow at 42°C, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**, 560-562 (1999).