

清酒酵母の高泡形成遺伝子について

酒類総合研究所 遺伝子工学研究室 下飯 仁

1. はじめに

ほとんどの清酒酵母は、もろみにおいて高泡を形成する。高泡形成は、かつては発酵管理の指標となっていたが、現在では優良な高泡形成酵母から泡なし酵母が育種され、広く使用されている。泡あり酵母とその変異株である泡なし酵母の比較研究の結果、泡あり酵母には気泡吸着性があり、泡なし酵母にはそれが無いことが知られていたが、高泡形成のくわしいメカニズムについては不明であり、気泡吸着性に直接関与している因子も不明であった。我々の研究室では、清酒酵母の高泡形成機構の解明を目指して、協会701号酵母の泡なし性を相補する協会7号酵母の遺伝子のクローニングを行い、くわしく解析した。

2. 高泡形成遺伝子のクローニング

協会7号酵母から得られた半数体は高泡形成能があり、これを泡なしである実験室酵母とかけ合わせても高泡形成能があることから、協会7号酵母の高泡形成能は優性であると考えられた。そこで、協会7号酵母の単コピー型ゲノムライブラリーを作成し、泡なし酵母協会701号酵母を形質転換し、得られた形質転換体の中から高泡形成能を獲得した株のスクリーニングを行った。その結果、小仕込で高泡を形成する形質転換体を1株取得した。形質転換体から取得したプラスミドを解析した結果、このプラスミドにはタンパク質をコードしているORFがひとつ含まれており、我々はこの遺伝子が高泡形成に関与していることから *AWA1* と命名した。塩基配列から予想される *Awa1* タンパク質は、1713 アミノ酸からなる分子量 166,873 のタンパク質であった。また、N 末端及び C 末端の両方に疎水性の領域があることから、GPI アンカータンパク質として合成される細胞壁タンパク質の一種であることが予想された。*Awa1* タンパク質は実験室酵母の XV 番染色体に存在する *YOL155C* と一致する配列を多く含んでいるが、*YOL155C* は 967 アミノ酸にすぎず、*Awa1* タンパク質は *YOL155C* と一致しない配列も含んでいるので、*Awa1* タンパク質は実験室酵母には存在しない新規なタンパク質であると考えられる。

3. *AWA1* 遺伝子の機能

AWA1 遺伝子が実際に高泡形成に関与しているのかどうかを確認するために、*AWA1* 遺伝子の遺伝子破壊を行った。協会7号酵母の半数体も高泡を形成することがわかっていたので、半数体の *AWA1* 遺伝子の破壊を行い、得られた遺伝子破壊株の小仕込を行った結果、高泡形成能を示さないことがわかった。したがって、*AWA1* 遺伝子は、協会7号酵母の高泡形成能に必須な遺伝子であると結論した。また、*Awa1* タンパク質の様々な部分を欠失させた変異体を作成し、高泡形成への影響を解析した結果、N 末端付近の部分及び GPI アンカー部分が高泡形成に関与していることがわかった。N 末端部分を欠失した株では、*Awa1* タンパク質自体は細胞表層に存在しているにもかかわらず高泡形成能を示さなかったことから、この部分が気泡吸着に関与しているものと考えられる。また、GPI アンカー部分は、*Awa1* タンパク質が細胞表層に固定されるために必要であった。

4. 高泡形成の機構

酵母細胞表層の疎水性を測定すると、高泡形成を示す株は疎水性であるが、泡なし酵母や *AWA1* 遺伝子破壊株など高泡形成を示さない株は親水性であった。*AWA1* 遺伝子をもっている、N 末端付近の部分及び GPI アンカー部分が欠失した株は泡なしかつ親水性であった。以上の結果から、*Awa1* タンパク質には N 末端付近に

疎水性の気泡吸着ドメインが存在しており、C末端側の GPI アンカー部分を介して細胞表層に結合しているものと考えられた(図1)。このため、酵母細胞が発酵で生じた二酸化炭素の気泡に吸着し、気泡を安定化して高泡形成をするものと考えられた。泡なし酵母協会 701 号の *AWA1* 遺伝子についても遺伝子の解析を行なった結果、協会 701 号では染色体間の組換えによって *AWA1* 遺伝子が変化して、Awa1 タンパク質の GPI アンカー部分が欠失していることが分かった。そのため、Awa1 タンパク質が細胞表層に結合できずに細胞表層の疎水性及び高泡形成能を失ったものと推定された(図2)。

5. *AWA1* 遺伝子の多様性

清酒酵母は互いに類縁であり、それらを遺伝子レベルで分別することはかなり困難である。*AWA1* 遺伝子は実験室酵母には存在しない清酒酵母に特有な遺伝子であることから、様々な清酒酵母について PCR を用いて *AWA1* 遺伝子の検出を行った。その結果、*AWA1* 遺伝子の大きさには清酒酵母の間でかなりの多様性を示すことがわかった。これは、*AWA1* に多くの繰返し配列が含まれているためにこれらの部分の長さが変化しやすいためであると考えられる。特に現在良く使用されている代表的な協会酵母の識別が可能であることがわかった。したがって、この *AWA1* の多様性は清酒酵母の分別に使用できるものと考えられる。

6. おわりに

AWA1 遺伝子のクローニングと解析により、酵母の細胞表層に存在するタンパク質が細胞を疎水性にして高泡形成を引き起こすことが明らかとなった。今後は、*AWA1* の構造と機能についてさらに解析を進めるとともに、これらの成果を生かして、新規な清酒酵母の育種にも取り組みたい。

参考文献

- 1) H. Shioi, K. Sakamoto, M. Okuda, R. Atthi, K. Iwashita and K. Ito, The *AWA1* gene is required for the foam-forming phenotype and cell surface hydrophobicity of sake yeast, *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 1932-1937(2002)
- 2) 下飯仁, 清酒酵母の高泡形成遺伝子, *バイオサイエンスとバイオインダストリー*, 61, 465-468(2003)

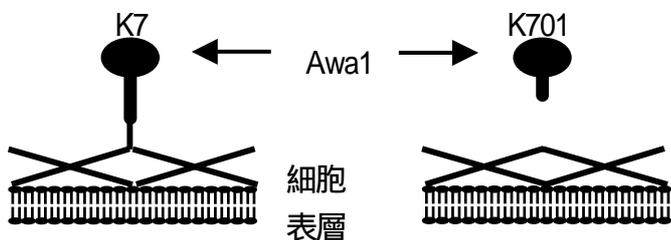


図1 . 泡あり酵母 (K7) と泡なし酵母 (K701) の Awa1 タンパク質

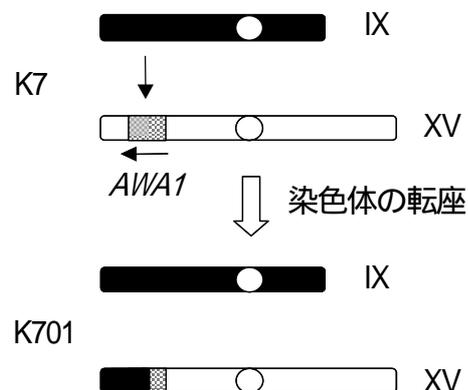


図2 . 染色体の転座による泡なし酵母の生成