

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	下面発酵ビール酵母の発酵性に寄与する因子の解明
Title(English)	
著者(和文)	大室繭
Author(English)	Mayu Ohmuro
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:乙第4200号, 授与年月日:2019年9月30日, 学位の種別:論文博士, 審査員:小畠 英理,山本 直之,和地 正明,平沢 敬,三重 正和
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:乙第4200号, Conferred date:2019/9/30, Degree Type:Thesis doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

下面発酵ビール酵母の発酵性に寄与する因子の解明

アサヒビール株式会社

大室 繭

目次

第1章 序論.....	1
1.1 緒言.....	2
1.2 下面発酵ビール酵母の分類と遺伝学的特性.....	4
1.2.1 下面発酵ビール酵母の分類.....	4
1.2.2 下面発酵ビール酵母の醸造特性と関連遺伝子.....	5
1.3 ビール醸造における酵母発酵の役割.....	8
1.3.1 ビール酵母発酵とキレ.....	9
1.3.2 高濃度醸造.....	9
1.4 本研究の目的と意義.....	11
第2章 下面発酵ビール酵母における高発酵寄与遺伝子の解明.....	16
2.1 緒言.....	17
2.2 実験方法.....	19
2.2.1 菌株、プラスミド.....	19
2.2.2 培養条件.....	19
2.2.3 プライマー、プローブ.....	19
2.2.4 発酵試験.....	19
2.2.5 外観エキス測定.....	20
2.2.6 全糖濃度測定.....	21
2.2.7 発酵性糖分析.....	21
2.2.8 次世代シーケンサによるゲノムシーケンスおよび染色体コピー数解析.....	21
2.2.9 定量PCRによる遺伝子コピー数解析.....	22
2.2.10 定量PCRによる遺伝子発現解析.....	23
2.2.11 下面発酵ビール酵母の <i>SeYCK1</i> 遺伝子過剰発現株の作製.....	24
2.2.12 PCR法による下面発酵ビール酵母へのDNAフラグメント挿入確認.....	25
2.3 実験結果.....	26
2.3.1 下面発酵ビール酵母高発酵性株の発酵挙動評価.....	26
2.3.2 次世代シーケンサを用いた下面発酵ビール酵母の染色体倍数性評価.....	26
2.3.3 下面発酵ビール酵母の <i>SeYCK1</i> 遺伝子コピー数及び遺伝子発現解析.....	27
2.3.4 下面発酵ビール酵母 <i>SeYCK1</i> 遺伝子過剰発現株の作製.....	27
2.3.5 下面発酵ビール酵母 <i>SeYCK1</i> 遺伝子過剰発現株の発酵挙動評価.....	28
2.4 考察.....	31
2.5 結言.....	33
第3章 下面発酵ビール酵母における高濃度醸造下での高発酵寄与因子の解明.....	41
3.1 緒言.....	42

3.2	実験方法	44
3.2.1	菌株、プラスミド	44
3.2.2	培養条件	44
3.2.3	プライマー	44
3.2.4	下面発酵ビール酵母の <i>ScRIM15</i> 遺伝子破壊株の作製	44
3.2.5	下面発酵ビール酵母の <i>ScCLN3 ΔPEST</i> 変異導入株の作製	45
3.2.6	PCR 法反応条件	46
3.2.7	細胞周期 G ₁ 期停止薬剤ラパマイシン添加試験	46
3.2.8	フローサイトメーターによる細胞周期解析	46
3.2.9	発酵試験	47
3.2.10	二酸化炭素排出量測定	48
3.2.11	外観エキス測定	48
3.3	実験結果	49
3.3.1	下面発酵ビール酵母 <i>ScRIM15</i> 遺伝子破壊株の作製	49
3.3.2	下面発酵ビール酵母 <i>ScCLN3 ΔPEST</i> 変異導入株の作製	49
3.3.3	細胞周期停止薬剤添加による遺伝子組換え体株の細胞周期解析	49
3.3.4	遺伝子組換え体株の発酵中の細胞周期解析	50
3.3.5	遺伝子組換え体株の高糖度合成培地における発酵挙動評価	50
3.3.6	遺伝子組換え体株の高濃度麦汁培地における発酵挙動評価	51
3.4	考察	52
3.5	結言	54
第4章	高発酵寄与因子をターゲットとした高発酵ビール酵母の育種技術開発	66
4.1	緒言	67
4.2	実験方法	69
4.2.1	菌株、プラスミド	69
4.2.2	培養条件	69
4.2.3	プライマー	69
4.2.4	発酵試験	69
4.2.5	酵母菌体内代謝産物の網羅解析	70
4.2.6	酵母菌体内 S-アデノシルメチオニン含量測定	71
4.2.7	化学突然変異導入によるコルディセピン耐性下面発酵ビール酵母取得	71
4.2.8	コルディセピン含有培地スポットアッセイ試験	72
4.2.9	定量 PCR による遺伝子発現解析	72
4.3	実験結果及び考察	74
4.3.1	発酵中酵母菌体内代謝産物の網羅解析	74
4.3.2	S-アデノシルメチオニン添加による下面発酵ビール酵母発酵挙動評価	74

4.3.3	実験室酵母 <i>AD01</i> 遺伝子破壊株の発酵挙動評価	75
4.3.4	コルディセピン耐性下面発酵ビール酵母の取得	75
4.3.5	コルディセピン耐性下面発酵ビール酵母の発酵挙動評価	76
4.4	考察	77
4.5	結言	80
第5章	結論	93
References		98
原著論文		105
謝辞		106

第 1 章

序論

1.1 緒言

酵母によるアルコール発酵は酒類製造方法として人類に古くから慣れ親しまれている現象である。ビールの歴史は古く、諸説あるが紀元前 8000～4000 年のメソポタミア文明まで遡ると言われている他、紀元前 2300 年頃のエジプトの壁画には、麦で作ったパンを自然発酵させ、ビールとして飲用していたとされる記録が残っている¹⁾。紀元前から利用されてきた酵母による発酵であるが、酵母の発見はそれから 5000 年以上の時を経た 1680 年、レーヴェンフックが手作りの顕微鏡で観察した発酵ビール中の楕円形のものであると言われている²⁾。レーヴェンフックによる酵母の発見は 100 年以上注目されることはなかったが、1857 年のパスツールによる生物発酵説の提唱³⁾や、1873 年ラ・トゥール、シュワン、キューティングによる酵母が出芽増殖する単細胞生物であることの立証⁴⁾、1883 年ハンセンによる酵母純粋培養法の確立⁵⁾等によりビール醸造・発酵技術は飛躍的に発展を遂げた。

酵母純粋培養法を確立したハンセンは、当時所属していたデンマークのカールスバーグ醸造所の研究機関にてビール醸造に使用される酵母の単離を行い、上面発酵ビール酵母を *Sacchromyces cerevisiae*、下面発酵ビール酵母を *Sacchromyces carlsbergensis* と命名して報告し、酵母の体系的分類の礎を築いた⁶⁾。ビール酵母はその性質により、大きく上面発酵ビール酵母と下面発酵ビール酵母の 2 種類に分けられる。上面発酵ビール酵母は、比較的高温（20℃前後）、短時間で発酵させるエールタイプのビール醸造に使用される。発酵後期には、発酵中に発生する炭酸ガスとともに液上層に浮き上がることからその名が付いた。一方、下面発酵ビール酵母は、低温（10℃前後）で比較的時間をかけて発酵させる。発酵後期において酵母は凝集し、タンク底に沈殿するという特徴的な性質を持つ。下面発酵ビール酵母の凝集沈降能はビール醸造において極めて重要な性質であり、沈殿した酵母はタンク底より回収されて次のビール醸造に繰り返し用いられる。発酵終了時に下面発酵ビール酵母が自然に沈むという性質を利用することで、遠心分離などをせずに酵母回収が可能であ

り、また繰り返し使うことで培養の手間も省けることから、効率的なビールの醸造が可能となっている。古くより使用されてきた上面発酵ビール酵母と比べ下面発酵ビール酵母によるビール醸造は歴史が浅く、広まったのは19世紀になってからであるが、上述した生産効率の良さや低温発酵による微生物汚染抑止効果に加え、酵母研究や冷蔵技術の発展による貢献もあり世界で主流となっており、今日の日本のビールの多くは下面発酵ビール酵母によってつくられるラガータイプのビールである。

ビール醸造において、酵母は麦汁と呼ばれる大麦やその他副原料を煮てつくられるビールの元となる液に含まれる糖を栄養源として、発酵によりアルコールと炭酸ガスを生成する。加えて、アルコール発酵中に麦汁中の成分を代謝してビールの香味に関わる様々な成分を生成する。発酵工程はビール醸造における重要な工程の一つであり、その挙動はアルコール生産力やビール中の香味成分の生成等、ビール品質に大きく影響する。発酵力が強く発酵が速く進めば、アルコール収得量向上や発酵期間の短縮が望める。反対に、発酵力が弱い場合、発酵期間延長による製造効率低下に加え、ビール中の残糖増加やアルコール量低下により好ましくない品質のビールとなる恐れがある。従って、目標とするつくりたいビールに合った高い発酵力を持った酵母の選択・使用が望まれる。しかしながら発酵は複雑な現象であり、ビール酵母の発酵については未だ分かっていないことが多くその解明が望まれている。

本研究では、世界で最も飲まれるお酒の一つであるラガータイプのビールづくりに使用される下面発酵ビール酵母について、その発酵性に寄与する因子の解明を目的とした。今回新たに得られた知見を新規酵母の育種や発酵制御技術へと活用することで、狙った品質のビールをより効率的に製造すること等が期待できる。

本章では以降、下面発酵ビール酵母の分類や遺伝学的特徴について現在明らかとなっていることを述べる。次いで、ビール醸造における発酵工程の役割と香味品質に与える影響、および近年着目されるより高いアルコール生成が可能な高濃度醸造について概説することによって高発酵力を有したビール酵母の有用性について示し、本研究の目的と意義を明確にする。

1.2 下面発酵ビール酵母の分類と遺伝学的特性

下面発酵ビール酵母は、日本で製造されるビールの大半を占めるラガータイプのビール醸造に使用されており、その特性や由来についても大きな関心が寄せられてきた。後述するが、下面発酵ビール酵母は高次倍数体であり複雑な遺伝的背景を有していることから、その分類学上の位置付けや由来についても幾多の変遷を経て現在の説に至っている。次世代シーケンサの登場等による近年の DNA 解析技術の発展により、下面発酵ビール酵母の遺伝学的研究も大きく進展した。本節では、下面発酵ビール酵母の分類と醸造特性およびその遺伝学的裏付けについて明らかとなっている知見を示す。

1.2.1 下面発酵ビール酵母の分類

下面発酵ビール酵母の分類の変遷について Table 1-1 に示した。1883 年にハンセンによって下面発酵ビール酵母の単離が成し遂げられた後⁵、1908 年に同じくハンセンによって *S. carlsbergensis* と命名され正式に報告された⁶。しかし 1985 年マルティニーニとカーツマンによって *S. cerevisiae* と *S. cerevisiae* の近縁種 (*S. bayanus*) との異質融合体である可能性が報告され⁷、その後マルティニーニにより 1987 年に *S. cerevisiae* と *S. bayanus* の両方に対して中間的な DNA 相同性を示す *S. pastorianus* としてまとめられ⁸、1998 年に分類学書においても *S. pastorianus* に分類された⁹。当初、*S. pastorianus* は *S. cerevisiae* と *S. bayanus* の融合体であると考えられていた^{8,10}が、2011 年に南米パタゴニアの森に生育するブナの葉より野生酵母 *S. eubayanus* が発見され、その全ゲノム配列解読結果より *S. pastorianus* は *S. cerevisiae* と *S. eubayanus* との融合体であると提唱¹¹されて以来、現在はその説で落ち着いている。

下面発酵ビール酵母は *S. cerevisiae* 型 (*Sc*型) と *S. eubayanus* 型 (*Se*型) のゲノムを有する異種高次倍数体であり、近年の遺伝子解析の結果より *Sc*型のゲノム約 1 セット

と *Se* 型のゲノム約 2 セットを有するおよそ 3 倍体の酵母が属する Group I (Saaz 型) と、*Sc* 型と *Se* 型のゲノムを約 2 セットずつ有するおよそ 4 倍体の酵母が属する Group II (Frohberg 型) に分類されている^{12,13}。ハンセンが初めて単離した *S. carlsbergensis* は Group I に分けられる¹⁴。Group II には一般的な下面発酵ビール酵母として世界中で知られる Weihenstephan 34/70 (W34/70) 株が該当する¹⁴など、実用酵母として産業で広く用いられている多くのビール酵母が含まれる。*S. pastorianus* の由来については諸説あり、2 倍体の *S. cerevisiae* と 2 倍体の *S. eubayanus* の融合が 1 度起こった後、染色体転位により *Sc* 型染色体を 1 本欠失して現在の Group I に属する酵母が、染色体のヘテロ接合性の喪失 (Loss of Heterozygosity; LOH) 等による染色体の再編成により現在の Group II に属する酵母が生まれたとする説や、1 倍体の *S. cerevisiae* と 2 倍体の *S. eubayanus* が融合して現在の Group I に属する酵母が、その融合体にさらに 1 倍体の *S. cerevisiae* が掛け合わさったことにより現在の Group II に属する酵母が生じた説等が唱えられており¹⁵ (Fig. 1-1)、今後の研究により明らかとなることが期待される。

1. 2. 2 下面発酵ビール酵母の醸造特性と関連遺伝子

緒言で述べた通りビール酵母は大きく上面発酵ビール酵母と下面発酵ビール酵母に大別される。分類学上、上面発酵ビール酵母は実験室酵母や清酒酵母と同じ *S. cerevisiae*、下面発酵ビール酵母は *S. cerevisiae* と *S. eubayanus* の交雑体である *S. pastorianus* に分類される。名称は発酵中の挙動の違いにより名付けられたものであり、上面発酵ビール酵母は発酵により発生する炭酸ガスとともに液表面に浮かび上がり、下面発酵ビール酵母は発酵後期に凝集沈降する特性を持つ。沈降した酵母をタンク底から引き抜いて再度発酵に使用することにより短期間でビール大量製造が可能となったことは、ラガービールの世界中への拡大にも大きく貢献した。下面発酵ビール酵母の凝集に関わる遺伝子の一つは *Lg-FLO1* と呼ばれており、研究用として広く使用されている実験室酵母 (*S. cerevisiae*) の

凝集に関与する *FLO1* 遺伝子と似た配列を持っている^{16,17}。両遺伝子がコードする Lg-Flo1 及び Flo1 タンパク質は酵母細胞表層に存在し、別の酵母細胞表層のマノースと結合することで凝集が起こると考えられている¹⁸。Lg-Flo1 と Flo1 タンパク質の違いは、グルコースやマルトースを認識するかどうかにある¹⁶。Flo1 タンパク質はこれらの糖を認識しないが、Lg-Flo1 タンパク質はこれらの糖を認識して結合するためマノースとの結合が阻害されて酵母同士の凝集も阻害される。ビールの元である麦汁中にはグルコースやマルトースが多く含まれており、それらが存在する発酵初期では Lg-Flo1 タンパク質を発現する下面発酵ビール酵母は凝集阻害により拡散して活発に発酵し、それらがなくなると凝集してタンク底に沈む。一方、実験室酵母のように Flo1 タンパク質を発現する酵母は麦汁中に添加した場合でも凝集したまま酵母が拡散しないため、活発な発酵を進めることができない。

下面発酵ビール酵母のもう一つの大きな特徴は低温発酵能である。上面発酵ビール酵母は 10℃程度になると発酵が緩慢になるのに対し、下面発酵ビール酵母は低温下での発酵が可能である。低温発酵では微生物汚染抑止効果もあり、このこともラガービール製造の拡大に寄与している。過去に低温増殖に影響する遺伝子として *Se* 型 *KEX2* (*SeKEX2*) 遺伝子が同定されており、*SeKEX2* 遺伝子を破壊した酵母菌株では低温増殖不良を示すことが明らかとされている¹⁹。

上述したように、下面発酵ビール酵母では *S. cerevisiae* が保有していない *Se* 型遺伝子や *Sc* 型、*Se* 型両方との相同性を示す新規ホモログ遺伝子が機能してその醸造特性を示していることがある。その複雑さゆえ下面発酵ビール酵母の遺伝子とその機能に関しては未知な部分も多く、さらなる研究が必要である。

高次倍数体の染色体およびゲノムは不安定であると言われており、酵母がストレス条件下で染色体の部分欠失や重複といった変化を起こすことが知られている²⁰。この不安定さにより、人類はビール醸造の歴史の中でビール環境に適応した酵母を獲得していったと言えるだろう。例えば、W34/70株は麦汁中に多く含まれる糖であるマルトース・マルトリオースの取り込み遺伝子 *Se* 型 *MAL31* やビールの酸化耐久性に有用な亜硫酸の生成経路上の数種の遺伝子のコピー数が倍加していることが明らかとなっている²¹。先に述べた下面発酵ビール酵母の特徴の一つである発酵後期に凝集する性質を利用したビール醸造における酵母の繰り返し発酵は、時に染色体のダイナミックな変化を引き起こし、産業上有利な酵母への進化の一助となっている。

ビール酵母の高次倍数体という特徴は、ビール醸造に適した酵母へと進化を果たした意味で非常に有効であるが、一方、その複雑な遺伝的背景のため研究が困難であり、ビール酵母の特徴を裏付ける遺伝子情報について不明な部分も多く、さらなる解明が望まれている。

1.3 ビール醸造における酵母発酵の役割

ビール醸造は、「仕込工程」「発酵工程」「熟成・貯蔵工程」といった工程に分けられる (Fig. 1-2)。仕込工程では、原料である大麦を煮ることで、麦に含まれるデンプンをアミラーゼ等の酵素を利用してグルコースやマルトースに、タンパク質はプロテアーゼによりペプチドやアミノ酸にまで分解する。得られた液は麦汁と呼ばれる。発酵工程では、仕込工程で得られた麦汁にビール酵母を接種することで、グルコースやマルトースといった糖が発酵されてアルコールや炭酸ガスが生成する。ビール酵母によるアルコール発酵は以下の化学式により表される²²。



また麦汁中のアミノ酸はビール酵母の増殖にて消費される他、エステル等ビールの香味に寄与する成分の生成に利用される。熟成・貯蔵工程では、発酵後のビールを一般的にマイナス1°C～発酵温度程度で貯蔵し、硫化水素やジアセチルといったビールの不快臭に関わる成分をビール酵母によって還元させる他、低温でおくことで発酵により生じた炭酸ガスを融解させる。

発酵工程はビール酵母がアルコールやその他ビールの香味に寄与する成分を生成する重要な工程であり、ビール酵母の発酵性はビールの品質を決定付ける極めて重要な要素である。本節では、日本市場で重要なビールの特性の一つであるキレと、近年注目されている醸造技術の一つである高濃度醸造に焦点を当てて、ビール酵母の発酵性との関わりを示す。

1.3.1 ビール酵母発酵とキレ

日本のビール市場において、キレは重要な官能特性の一つであり、キレの良さを謳ったビール類商品は当社主力商品をはじめ、これまでに多くの商品が生み出されてきた。キレは一般に飲んだ際に感じる風味（味・香り）がすぐに消え、突出した風味が残らず後味がすっきりしていることを言う。食事との相性の良さや飽きることなく飲めるその嗜好性から日本ではキレの良いビールが特に好まれ飲用されている。キレと発酵との関わりは深く、発酵により消費・生成される様々な成分が寄与すると考えられているが、未だ分かっていないことが多い。一方で、ビール酵母の発酵力は糖の取り込み速度に影響し、取り込み残しはキレの良し悪しに関わることが知られている。残糖量が多ければそれは後味に寄与し、結果として後味の残る、キレ評価としては好ましくないビールとなる。

上述の通り、キレの良いビールをつくるためには糖の消費能力に優れた発酵力の高いビール酵母の使用が望ましい。当社の酵母ストックにはキレの良いビールをつくる際に使用する酵母の候補として、発酵速度が速く、発酵終了までに資化性糖を消費しきうる高い発酵力を持つ酵母が保管されている。本酵母の発酵力の高さについては麦汁中に含まれる糖分等エキス分の消費速度が速いことがこれまでの経験で分かっているが、その要因については未だ明らかとされておらず、その解明が求められている。

1.3.2 高濃度醸造

近年、高濃度醸造と呼ばれる、通常よりも糖分等のエキス分含量の高い麦汁中でも健全に発酵可能なさらに高い発酵力を持つビール酵母が望まれている。一般的にビールは、エキス分 10-12%程度の麦汁から発酵によりアルコール 5% (v/v) 程度を生成させて製造している。エキスとは麦汁の濃さを表す値であり、麦など原料由来の糖等の成分濃度のことを指し、一般に比重計を用いて測定されるビールの管理指標の一つである。通常よりも高いエキス濃度の麦汁を発酵させ、より高いアルコール濃度のビールを製造することが出来れば、それを希釈して使用することでコスト削減や製造効率向上が見込める他、高アルコ

ールビールといった新価値を持つビールをつくることも可能となる。発酵を促進する因子については、高温で発酵させることで麦汁中の N 源取り込み能力を上げる²³、亜鉛等の金属イオン添加により酵母増殖やアルコール発酵力を増進させる²⁴⁻²⁷、酸素供給量を上げる²⁸等の方法で発酵速度を増大させる例が報告されている。しかしながら、これらは発酵条件や麦汁組成に関するものであり、ビール酵母自身に関する遺伝子や代謝産物で高発酵に寄与する因子についてはあまり報告されていない。また、ビール酵母は一般に高浸透圧下や高アルコールといった高濃度醸造によるストレス条件下では発酵を停止してしまう他、高濃度醸造下では多量のグルコースの存在によりマルトース資化関連遺伝子の発現抑制によっても発酵遅延が生じてしまうため²⁸、結果として糖の取り込み残しの多い、キレの良くないビールとなってしまう。現状、発酵条件を変更しただけでは高濃度醸造の達成は厳しく、発酵力が向上した酵母を使用した短期間での高濃度醸造が実現できる技術の開発が期待されている。

以上に述べたように、ビール醸造においてビール酵母による発酵はキレといったビールの香味や製造効率を決定付ける重要な要素である。ビール酵母の発酵を理解しコントロールすることは、ビール醸造技術のさらなる発展に貢献しうる。しかし、発酵という現象、および下面発酵ビール酵母のゲノム構造は複雑であり、ビール酵母の発酵の制御は未だ完全には実現出来ていない。下面発酵ビール酵母の発酵に寄与する因子を明らかとすることは、新機能を持ったビール酵母の育種や発酵工程の管理等、ビール醸造にとって有効な技術を提案できる可能性を秘めている。

1.4 本研究の目的と意義

本章においては、世界で広く飲用されているラガータイプのビールづくりに使用される酵母である下面発酵ビール酵母 *S. pastorianus* が、*S. cerevisiae* と *S. eubayanus* とが融合した高次倍数体であることを概説した。また、ビール醸造において発酵は重要な工程の一つであり、ビール酵母の発酵性がビールの香味品質や製造効率に影響すること、そのためつくりたいビールに合った発酵力の高い酵母の選択・使用が好ましいことを示した。しかしながら、下面発酵ビール酵母の発酵という現象は複雑なため不明な部分も多く、高発酵力を有する酵母の育種や酵母発酵促進による発酵工程の効率化は現状困難である。そこで本研究では、アルコール発酵の一端を明らかとすべく、下面発酵ビール酵母の発酵性に寄与する、発酵促進を可能とする因子の解明を目的とした。

第2章では、下面発酵ビール酵母の発酵に寄与する遺伝子の抽出を目的として、当社が馴化培養により選抜した発酵力に優れた酵母とその親株とで次世代シーケンサを用いたゲノム比較解析を行った。本酵母は発酵力が速く発酵終了後の残糖が少ないためキレの良いビールをつくりうる有用な酵母として当社主力商品の製造に使用されており、その特性の解明が望まれている。ゲノム比較解析結果をもとに抽出した選抜酵母に特徴的な遺伝子について、下面発酵ビール酵母の発酵性との関わりを示す。

第3章では、近年着目される醸造技術である高濃度醸造に焦点を当てた。発酵遅延・停止により糖の取り込み抑制が生じるため、キレの良いビールの実現がより困難である高濃度醸造における下面発酵ビール酵母の発酵力向上に寄与する因子の解明を目的として、清酒もろみ中において高い発酵力を示す清酒酵母に着目した。清酒は伝統的な日本の酒であり米を麹菌と清酒酵母 *S. cerevisiae* で発酵させることによりつくられる。清酒酵母は発酵中にアルコール 20% (v/v) 程度産生可能という高い発酵性を示すことが知られている。近年、その高発酵性の一因として、ストレス環境下においても細胞周期の休止期へ移行せ

ず発酵し続けることが報告されている³¹⁻³⁵。ビール酵母においても本知見が適応可能か検討するため、モデル下面発酵ビール酵母を用いて遺伝子工学的に休止期移行欠損株を作製した。作製した株についてその特性を評価した結果を示す。高濃度醸造下でも発酵速度が速く、結果として糖の取り込み残しが少ないような特性を有する酵母を取得出来れば、余分な後味が残らないキレのある嗜好性が高いビールの効率的な製造が期待できる。

第3章の研究にて、細胞周期関連遺伝子を改変することで高濃度醸造下において発酵速度の向上した下面発酵ビール酵母の作製に成功しているが、日本では食品への遺伝子組換え体使用は倫理的なハードルが高く、遺伝子組換えすることなく高い発酵力を有する酵母を育種することが望まれる。第4章では、遺伝子組換えによらないビール酵母の発酵力向上を目的とし、発酵中の代謝産物に着目して研究を行った。本研究では高濃度醸造下で下面発酵ビール酵母において発酵中に *S*-アデノシルメチオニン (SAM) の酵母菌体内蓄積量が増加していたことに着目し、SAM と下面発酵ビール酵母の発酵力との関連について SAM の高濃度麦汁中への添加や酵母菌体内への SAM 高蓄積による発酵速度への影響を調査した結果を示す。さらに、実験室酵母にて SAM を高蓄積することで知られるコルディセピン耐性³⁶を持つ株をモデル下面発酵ビール酵母より取得し、その発酵特性を評価した。本手法により遺伝子組換えによらない高濃度醸造用の下面発酵ビール酵母の育種が可能であることを示す。

最後に、第5章では本研究で得られた結果を総括するとともに今後の展望について述べ、結論とする。

Table 1-1 下面発酵ビール酵母分類の変遷

下面発酵ビール酵母の分類研究	
1883 年	純粋分離 (Hansen)
1908 年	<i>S. carlsbergensis</i> として正式に報告 (Hansen)
1952 年	<i>S. carlsbergensis</i> に分類 (The Yeasts: a taxonomic study 第 1 版)
1970 年	<i>S. uvarum</i> に分類 (糖メルビオースの資化性により ; The Yeasts: a taxonomic study 第 2 版)
1984 年	<i>S. cerevisiae</i> に分類 (DNA 相同性および接合能により ; The Yeasts: a taxonomic study 第 3 版)
1985 年	<i>S. cerevisiae</i> と <i>S. cerevisiae</i> の近縁種との異質融合体であるとの報告 (Martini and Kurtzman)
1987 年	<i>S. pastorianus</i> として報告 (Martini)
1998 年	<i>S. pastorianus</i> に分類 (DNA 相同性および胞子発芽性により ; The Yeasts: a taxonomic study 第 4 版)
2011 年	<i>S. cerevisiae</i> と <i>S. eubayanus</i> との融合体であるとの報告 (Lidkind et. al.)
2011 年	<i>S. pastorianus</i> に分類 (The Yeasts: a taxonomic study 第 5 版)

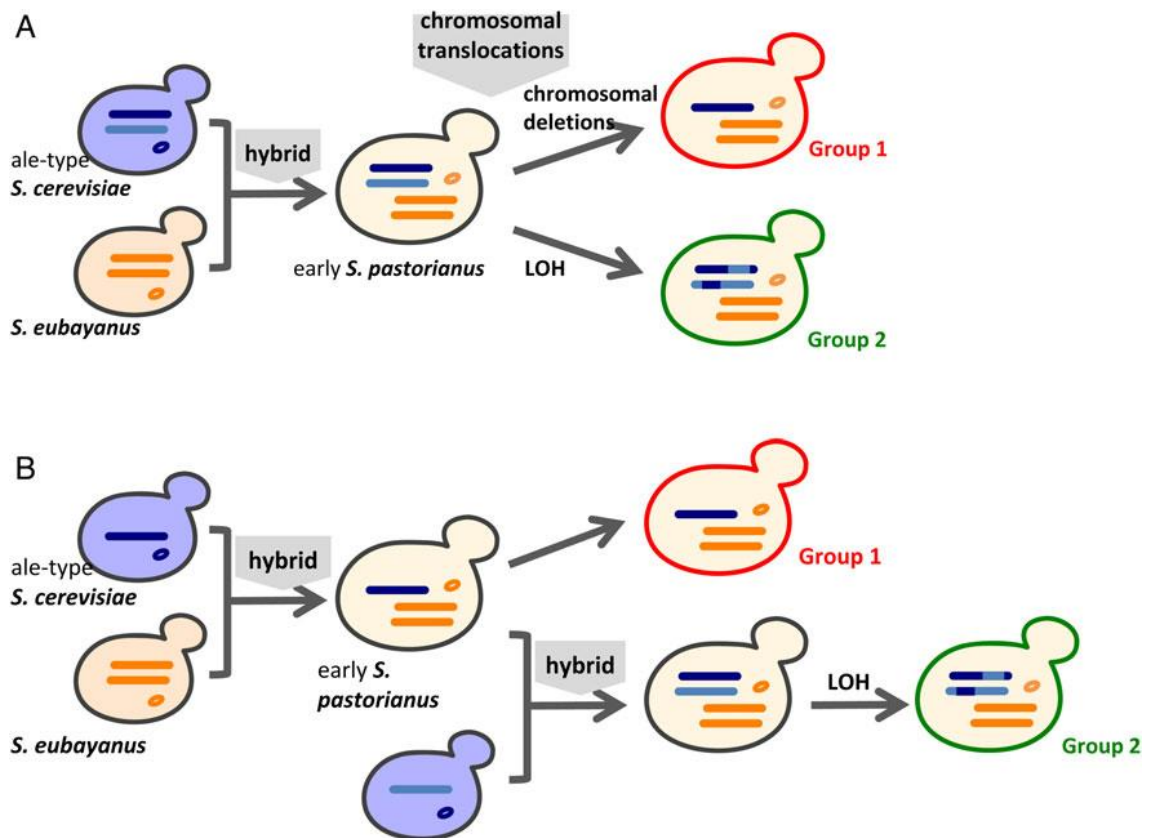


Fig. 1-1 *S. pastorianus* Group I および Group II の起源仮説

下面発酵ビール酵母は Group I と Group II 系統に分類され、Group I では Group II よりも *Sc* 型 DNA 含量が低い。由来については判明しておらず、諸説唱えられている。

A : 2 倍体 *Sc* 型、*Se* 型との融合が染色体転座の前に生じ、染色体欠失が Group I の祖先においてのみ生じた説

B : 1 倍体 *Sc* 型、2 倍体 *Se* 型との融合の後、Group II の祖先は別の 1 倍体 *Sc* 型と融合した説

Okuno, *et. al. DNA Res.* 2016

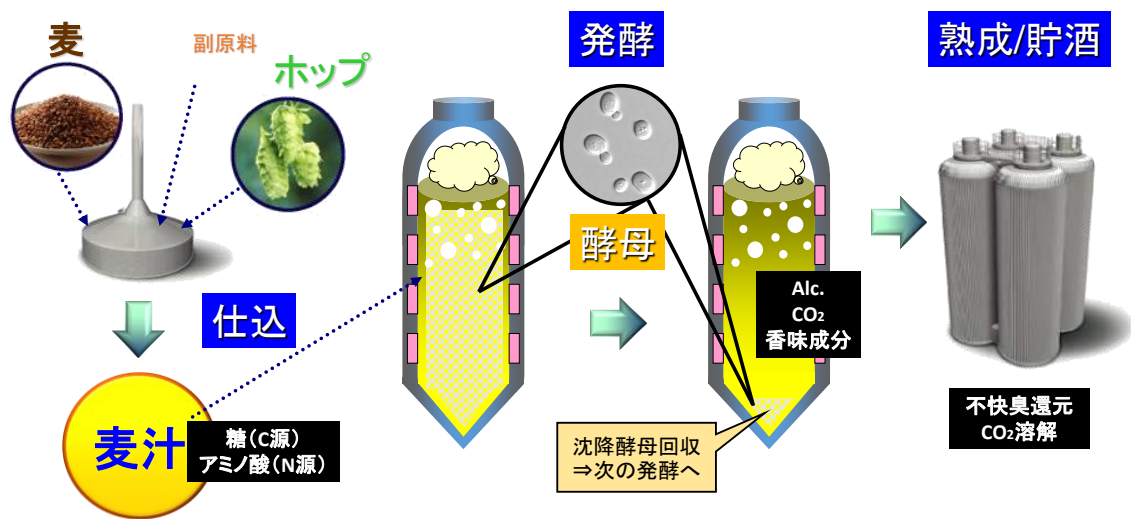


Fig. 1-2 ビール製造工程

仕込：原料を煮て酵母の栄養源を多く含む麦汁をつくる

発酵：麦汁にビール酵母を播種し、アルコールや炭酸ガスを生成させる

熟成/貯酒：発酵液に含まれる不快臭成分をビール酵母によって還元させる

また、低温でおくことにより炭酸ガスを溶解させる

上述の工程を経てつくられたビールは、必要に応じてろ過後、缶や瓶等に入れられて出荷される。

第2章

下面発酵ビール酵母における
高発酵寄与遺伝子の解明

2.1 緒言

第一章で述べたように、ラガータイプのビールは世界で広く飲用されており、下面発酵ビール酵母の特性について以前より注目されている。特に、ビール酵母の発酵力は糖の取り込み速度に影響し、取り込み残しはビール製品の香味に関わる。ビール中の残糖は、日本市場において重要なビール特性の一つとされる“キレ”に影響を及ぼすことが知られており、つくりたい製品に合った高い発酵力を持つビール酵母の選択が必要となる。当社では過去に、ビールの繰り返し発酵による馴化培養によって親株 (WTY) よりも発酵速度の速い高発酵性株 (HFY) の選抜を行っているが、その要因については明らかとなっていなかった。

近年では、遺伝子解析技術を用いてビール酵母の性質を明らかにしようとする研究が試みられ、下面発酵ビール酵母は *S. cerevisiae* と *S. eubayanus* との融合体である *S. pastorianus* に分類されること¹¹、また、低温増殖能¹⁹、凝集能^{17, 37}、マルトース資化能^{38, 39}や硫黄代謝物質生成能^{21, 40}に関わる遺伝子等が明らかとされ、遺伝子情報把握による醸造、発酵現象の理解が可能となってきている。さらに近年では、次世代シーケンサによるDNA解析技術の向上により融合回数や染色体、遺伝子コピー数解析、SNV箇所等の解明が進められており、下面発酵ビール酵母の進化の歴史も明らかとされつつある¹⁵。しかしながら、下面発酵ビール酵母は高次倍数体で複雑な遺伝的背景を有しており、*Sc*型、*Se*型のどちらの相同遺伝子が機能しているか等、発酵性に寄与する因子について未だ解明されていない点も多い。そこで本研究では、次世代シーケンサを用いてHFY株、WTY株のゲノム比較解析を行い、得られた染色体情報より、発酵力の高さに寄与する遺伝子の同定を試みた。ゲノム解析よりWTY株、HFY株間で差異が見られた染色体に座乗する遺伝子の中で、グルコースを感知して下流のグルコース取り込み遺伝子の発現を上昇させる役割を持つ*Se*型 *YCK1* (*SeYCK1*) 遺伝子に着目して検証を行った。

アルコール発酵においていくつかの重要な因子が特定されており、その一つは解糖系の律速段階である糖の取り込みである⁴¹⁻⁴⁶。麦汁中に含まれる主な発酵性糖は、一般的にマルトース（約 50~60%）、グルコース（約 20%）、およびマルトトリオース（約 20%）である。これらの糖の中で、酵母は取り込みやすいグルコースを優先して消費し、増殖・発酵を開始する。またグルコース同化の遅延は、グルコースの存在によるカタボライト抑制を介して麦汁中に多く含まれるマルトースやマルトトリオースの取り込み速度にも影響する⁴⁷⁻⁵⁰。これらのことから、発酵初期のグルコースの取り込み能力は発酵の良し悪しを決める鍵を握っていると考えられる。したがって、本研究ではビール醸造中の発酵速度に大きく影響するグルコース取り込みの調節機構に焦点を当てた。*S. cerevisiae* において、グルコースを含むヘキソースの輸送は、ヘキソーストランスポーター (*HXT*) 遺伝子産物によって媒介され⁵¹、その遺伝子発現レベルは、細胞膜結合カゼインキナーゼ I (*Yck1*) タンパク質とグルコースセンサ (*Rgt2* タンパク質) によって誘発されるグルコースシグナル伝達経路によって調節される^{30, 52}。*YCK1* 遺伝子の過剰発現は *HXT1* 遺伝子の構成的発現をもたらし、*Yck1* タンパク質は *HXT1* 遺伝子のグルコース誘発発現に必要である³⁰。しかしながら、*S. pastorianus* の発酵性に対する *YCK1* 遺伝子の影響は依然として不明である。

本研究では、下面発酵ビール酵母の発酵性に寄与する遺伝子の解明のため、WTY 株と HFY 株のゲノム比較解析を行った。その結果をもとに、HFY 株に特徴的な発酵に寄与する遺伝子の同定を試みたので報告する。

2.2 実験方法

2.2.1 菌株、プラスミド

当社の酵母コレクションに保存されている酵母菌株および当社保有のプラスミド pST106 を用いた (Table 2-1)。なお、WTY 株は過去に醸造過程で得られてストック化した株であり、WTY 株も HFY 株もシングル株ではなくそれぞれ似た酵母菌株の集団であると考えられている。

2.2.2 培養条件

酵母菌株の培養は特筆しない限り YPM 培地 (1% yeast extract, 2% Bactopeptone [Difco, Sparks, MD, USA], 2% maltose [ナカライテスク]) を用いて、25°Cで行った。寒天培地の場合には 2% 寒天 (Agar [Difco, Sparks, MD, USA]) を添加した。

2.2.3 プライマー、プローブ

定量 PCR、遺伝子組換えに用いたプライマーおよびプローブを Table 2-2 に示した。

2.2.4 発酵試験

① 5-L スケール発酵試験

寒天培地上の酵母菌株を 100 mL の原麦汁エキス (発酵前の麦汁に含まれる糖分等のエキス分の麦汁に対する割合) 12.5%の麦汁に接種して 90 rpm 振とう条件で 25°C、1 日間前培養を行った。前培養液を同麦汁 500 mL に添加して 90 rpm 振とう条件で 25°C、3 日間前培養を行った。得られた培養液をエアレーションした同麦汁 2-L に添加して振とうせずに 15°C、7 日間の条件で前発酵を行った。前発酵液を遠心により上清を除去して酵母を回収後、 1.5×10^7 cells/mL となるよう同麦汁 4-L に添加して本発酵を開始し、振とうせずに 12°C、7 日間の条件で本発酵を行った。

② 20-L スケール発酵試験

寒天培地上の酵母を 100 mL の原麦汁エキス 12.5%の麦汁に接種して 90 rpm 振とう条件で 25°C、1 日間前培養を行った。前培養液を同麦汁 1-L に添加して 60 rpm 振とう条件で 25°C、3 日間前培養を行った。得られた培養液をエアレーションした同麦汁 10-L に添加して振とうせずに 15°C、7 日間の条件で前発酵を行った。前発酵液を遠心により上清を除去して酵母を回収後、 1.5×10^7 cells/mL となるよう同麦汁 16-L に添加して本発酵を開始し、振とうせずに 10.5°C、7 日間の条件で本発酵を行った。

③ 300-kL (パイロット) スケール発酵試験

寒天培地上の酵母を 100 mL×8 容器の原麦汁エキス 12.5%の麦汁に接種して 90 rpm 振とう条件で 25°C、1 日間前培養を行った。前培養液を同麦汁 1-L×8 容器に添加して 60 rpm 振とう条件で 25°C、7 日間前培養を行った。得られた 8-L の培養液をエアレーションした同麦汁 100-L に添加して振とうせずに 12°C、7 日間の条件で前発酵を行った。前培養液をエアレーションした同麦汁 600-L に添加して振とうせずに 12°C、7 日間の条件で前発酵を行った。さらに前培養液をエアレーションした同麦汁 300-kL に添加して振とうせずに 12°C、7 日間の条件で前発酵を行った。前発酵にてタンクに凝集沈降した酵母を回収後、 1.5×10^7 cells/mL となるよう同麦汁 300-kL に添加して本発酵を開始し、振とうせずに 10.5°C、7 日間の条件で本発酵を行った。

2.2.5 外観エキス測定

発酵速度は、ビール分析法として一般的に知られている方法である、密度比重計 density/specific gravity meter (DA-510, Kyoto Electronics Manufacturing) を用いた外観エキス測定により評価した。

2.2.6 全糖濃度測定

ビール中の全糖濃度の測定はフェノール硫酸法により行った⁵³。500 μ L の試料液および 500 μ L の 5%フェノールを試験管中でボルテックスした後、2.5 mL の濃硫酸と混合、10 秒間ボルテックスを行い、室温で 20 分間インキュベートした。spectrophotometer U-2900 (Hitachi High-Tech Science) を用いて 490 nm の吸光度を測定し、グルコース濃度が既知の溶液を用いて作成した検量線に基づいて全糖濃度を算出した。

2.2.7 発酵性糖分析

ビール中の発酵性糖含量の測定は HPLC により行った⁵⁴。発酵終了後の試料液を Milli Q 水 (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) にて 10 倍希釈した後、フィルターバイアル (PVDF 膜、0.45 μ m ; GL サイエンス) を用いてろ過し、得られたろ液を HPLC サンプルとした。HPLC 測定は、コミュニケーションバスモジュール CMB-20A、インジェクター SIL-20AC HT、カラムオープン CTO-20AC、ポンプ LC-20AD、RI 検出器 RID-20A (島津製作所) を用いて実施した。カラムは Aminex HPX-42A carbohydrate Colum (BIO-RAD 社) を用いた。移動相として脱気した Milli Q 水を用い、カラム温度 80°C、流量 0.5 ml/min、分析時間 35 min の条件で分析を行った。

2.2.8 次世代シーケンサによるゲノムシーケンスおよび染色体コピー数解析

「2.2.4 ①5-L スケール発酵試験」に記載した発酵試験実施の際に使用した WTY、HFY 酵母菌株 (発酵 0 日目) を回収し、 2×10^7 cells の酵母菌株を酵母 DNA 抽出キット Dr. GenTLE (Takara) を用いてゲノム DNA の抽出を行った後、Qubit dsDNA HS Assay Kit (ThermoFisher Scientific) を用いて定量を行った。Ion XpressTM Plus Fragment Library Kit (ThermoFisher Scientific) にて DNA ライブラリーを調整後、High Sensitivity DNA Kit (Agilent Technologies) と Agilent 2100 BioAnalyzer (Agilent Technologies) を用いて DNA ライブラリーの品質確認を行った。ゲノム配列決定のため

のテンプレートは、Ion Chef™ System (ThermoFisher Scientific) を用いて調整した。DNA シーケンシングは Ion S5™ XL System (ThermoFisher Scientific) を用いて行った。 *S. cerevisiae* 型として UCSC sacCer3 (Saccharomyces Genome Database) と *S. eubayanus* 型として SEUB3.0⁵⁵ を参照配列として Torrent Suite™ Software v5.0.5 (ThermoFisher Scientific) を用いて得られたリード配列のマッピングを行った。マッピングされたシーケンスリードの厚み (シーケンスカバレッジ) を bedtools software, v2.17.0 (オープンソース) を用いて算出し¹⁵、WTY 株と HFY 株の比により HFY 株の染色体倍数性を推定した。DNA 抽出以降の全ての解析はライフテクノロジーズジャパン社に依頼した。

2.2.9 定量 PCR による遺伝子コピー数解析

2×10^7 cells の酵母菌株を酵母 DNA 抽出キット Dr. GenTLE (Takara) を用いてゲノム DNA の抽出を行い、NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (ThermoFisher Scientific) を用いて定量した。PCR は 20 ng の DNA を使用し、Probe qPCR Mix (Takara Bio) を用いて行った。使用したプローブとプライマーの配列は Table 2-1 の①~⑥に示した。プライマーおよびプローブは、*SeYCK1* 遺伝子配列における特異性の高い箇所設計した。定量 PCR は Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific) を用いて行った。PCR 反応は以下の条件にて行った。

95°C	30 秒	} 40 cycle
95°C	5 秒	
60°C	34 秒	

得られたデータは Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System software v2.0.6. (ThermoFisher Scientific) を用いて $\Delta \Delta Ct$ 法により解析を行った。内部標準遺伝子としてマンノシルトランスフェラーゼをコードする *Sc* 型 *ALG9* 遺伝子を用いた⁵⁶。

2.2.10 定量 PCR による遺伝子発現解析

2.5×10^7 cells の酵母を集菌し、Yeast Processing Reagent (Takara) を用いて酵母細胞壁を破壊した。得られた抽出液より、total RNA 抽出キット NucleoSpin RNA Kit (Takara) を用いて total RNA の抽出を行った。total RNA の定量は Agilent RNA 6000 Pico Kit (Agilent Technologies) を用いて行った。cDNA 合成および逆転写反応は 2 ng の RNA を使用し、1 ステップリアルタイム RT-PCR 専用のキット One Step SYBR PrimeScript RT-PCR Kit (Takara) を用いた。リアルタイム PCR 反応に用いたプライマーの配列を Table 2-2 の①、②、④、⑤に示した。プライマーは、*ScYCK1* 遺伝子配列における特異性の高い箇所設計した。リアルタイム PCR 用検出装置は Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific) を用いた。内部標準遺伝子としてマンノシルトランスフェラーゼをコードする *Sc* 型 *ALG9* 遺伝子を用いた⁵⁶。PCR 反応は以下の条件にて行った。

42°C 5分

95°C 10秒

95°C 5秒
60°C 34秒

} 40 cycle

95°C 15秒

60°C 1分

95°C 15秒

2.2.11 下面発酵ビール酵母の *SeYCK1* 遺伝子過剰発現株の作製

当社で以前作成したウラシル要求性下面発酵ビール酵母 W34/70 Δ *ura3*⁵⁷ 株を宿主として、*SeYCK1* 遺伝子の過剰発現株を作製した。過剰発現株作製方法は過去の報告⁵⁷に倣い、*SeYCK1* 遺伝子のプロモーター領域に、高発現タンパクであるグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素をコードする *TDH3* 遺伝子のプロモーター領域を挿入した(Fig. 2-1)。下面発酵ビール酵母 W34/70 株のゲノム配列情報 (DDBJ/EMBL/GenBank accession number BBYY01000167.1 (nucleotides 275586-277235, complementary sequence)) を参考にして、各種プライマーを設計した。当社保有の pST106 プラスミド (*URA3* 遺伝子と *TDH3* プロモーターが隣接した DNA 配列を有する) を鋳型として、*SeYCK1* 遺伝子から設計したプライマー⑦ Se YCK1 F と⑧ Se YCK1 R を用いて PCR を行った。得られた DNA フラグメントは CEQ8000 DNA analysis system (Beckman Coulter) を用いて配列を確認した。増幅した各 PCR 断片と W34/70 Δ *ura3* 株を用いて酢酸リチウム法⁵⁸により形質転換を実施した。形質転換体は最少寒天培地 (0.67% Yeast Nitrogen Base (w/o

amino acids) + 2% glucose + 2% Agar) を用いてウラシル要求性を指標として選択した。得られた株の確認は、プライマー⑨ Se YCK1 check F と⑩ Se YCK1 check R を用いた PCR および CEQ8000 DNA analysis system (Beckman Coulter) を用いたシーケンス配列確認により行った。

2.2.12 PCR 法による下面発酵ビール酵母への DNA フラグメント挿入確認

PCR は PerfectShot Ex Taq (Takara Bio 社) を用いて行った。Dr. GenTLE (Takara) により抽出したゲノム DNA を使用した。PCR 反応はサーマルサイクラー GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems 社) を用い、PCR 反応条件は次の通り行った。

98°C	10 秒	} 30 cycle
55°C	30 秒	
72°C	1 分	

PCR 反応液 5 μ L を 2% アガロースゲル (Sigma 社) で TAE 緩衝液を用いた電気泳動を行った。電気泳動後の染色は、SYBR Green I (Invitrogen 社) を用いて PCR 産物の検出を行った。DNA のサイズマーカーには λ /Hind III digest DNA Size Marker (TOYOBO 社) を用いた。

2.3 実験結果

2.3.1 下面発酵ビール酵母高発酵性株の発酵挙動評価

過去に選抜した高発酵性酵母 HFY 株の発酵特性を確認するため、麦汁を用いた 20-L スケール発酵試験を実施した。発酵速度はビール分析法として一般的な外観エキス消費を 1 日おきに測定して評価した。本試験において、HFY 株の方が WTY 株よりも麦汁の外観エキス消費が速く、発酵 7 日目の外観エキスは HFY 株、WTY 株でそれぞれ $1.67 \pm 0.18\%$ 、 $3.16 \pm 0.014\%$ であった (Fig. 2-2 A)。続いて、より実製造に近い 300-kL スケールでの発酵試験を実施した。20-L スケールでの試験と同様に HFY 株の方が WTY 株よりも外観エキス消費が速く、発酵 7 日目の外観エキスは HFY 株、WTY 株でそれぞれ $1.65 \pm 0.010\%$ 、 $2.44 \pm 0.18\%$ であった (Fig. 2-2 B)。また、300-kL スケール発酵試験における発酵 7 日後の発酵液中の全糖濃度は HFY の方が WTY よりも 30%程度低く、より糖を消費していた (Fig. 2-3 A)。麦汁中に含まれる糖の中で下面発酵ビール酵母が資化可能な糖について発酵後の残糖は、WTY 株は HFY 株と比べてグルコースが約 2 倍、マルトースが約 4.5 倍、マルトトリオースが約 1.5 倍程度と、HFY 株の方がより多くの糖を資化していた (Fig. 2-3 B)。

以上より、HFY 株は WTY 株よりも発酵速度が速く、また発酵終了時の残糖が少なく HFY 株の発酵力が高いことを確認した。

2.3.2 次世代シーケンサを用いた下面発酵ビール酵母の染色体倍数性評価

WTY 株と HFY 株が高発酵性を示す要因を遺伝学的に明らかにするため、次世代シーケンサを用いて染色体ごとのコピー数比較解析を行った。両株のコピー数の比較は、得られたシーケンスカバレッジデータより HFY 株を WTY 株のカバレッジ深度で割って算出した。結果、WTY 株と比較して HFY 株は *Sc* 型 VI 番染色体、*Sc* 型 XII 番染色体、および *Se* 型 XV-VIII 番染色体が倍加し、*Se* 型 XI 番染色体が減少していた (Fig. 2-4)。

これら変化が見られた染色体の中で、両株間のコピー数解析において最もカバレッジ深度の差異が大きかった *Se* 型 XV-VIII 番染色体に座乗しており、かつ高発酵力に寄与すると考えられる炭素源消費に関連する遺伝子に着目した。*Se* 型 XV-VIII 番染色体上に座乗している *SeYCK1* 遺伝子は、細胞膜結合カゼインキナーゼ I をコードし、グルコースを感知してヘキソーストランスポーター遺伝子の発現を誘導することに関連している^{30, 52}。本研究では、*SeYCK1* 遺伝子に焦点を当て、以降の研究を行うこととした。

2.3.3 下面発酵ビール酵母の *SeYCK1* 遺伝子コピー数及び遺伝子発現解析

HFY 株の *SeYCK1* 遺伝子のコピー数を推定するため、定量 PCR 法により調査した。結果、WTY 株と比較して HFY 株の *SeYCK1* 遺伝子のコピー数は約 2.5 倍であった (Fig. 2-5 A)。WTY 株は *SeYCK1* 遺伝子を平均して 1 コピー保有しているのに対して、HFY 株は 2~数コピー保有していることが示唆された。

さらに、300-kL スケール発酵期間中における *SeYCK1* 遺伝子の発現量を定量 PCR 法により調べたところ、HFY 株において *SeYCK1* 遺伝子の mRNA 発現レベルが発酵期間を通じて WTY 株よりも優位に高く、コピー数解析結果と相関があることが確認された (Fig. 2-5 B)。本結果は、遺伝子コピー数の増加に伴い遺伝子発現レベルも上昇することを示している。

2.3.4 下面発酵ビール酵母 *SeYCK1* 遺伝子過剰発現株の作製

SeYCK1 遺伝子の過剰発現が発酵性の向上に寄与しているか確認するため、当社が過去の研究にて作製した下面発酵ビール酵母 Weihenstephan 34/70 (W34/70) のウラシル要求性株⁵⁷ (W34/70 Δ ura3株) を用いて *SeYCK1* 遺伝子過剰発現株の作製を行った。

SeYCK1 遺伝子のプロモーター領域に、高発現タンパクであるグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素をコードする *TDH3* 遺伝子のプロモーター領域、および組換え体選択用に *URA3* 遺伝子を挿入した (Fig. 2-1)。DNA フラグメントの挿入の確認は PCR およびシー

ケンス確認により行った。親株は *S. cerevisiae* と *S. eubayanus* の異質融合体であり、*SeYCK1* 遺伝子を複数コピー持っていると考えられるが、PCR の結果、得られた形質転換体では親株と同一箇所にバンドが検出されなかったことから、親株が持つ全ての *SeYCK1* 遺伝子上流に目的の配列が挿入されていることを確認した (Fig. 2-6)。

2.3.5 下面発酵ビール酵母 *SeYCK1* 遺伝子過剰発現株の発酵挙動評価

作製した *SeYCK1* 過剰発現株と対照株として W34/70 株を用いて 5-L スケールの発酵試験を行った。発酵速度はビール分析法として一般的な外観エキスを 1 日おきに測定して評価した。本試験において、過剰発現株の方が対照株よりも麦汁の外観エキス消費が速く、発酵 7 日目の外観エキスは過剰発現株、対照株でそれぞれ $1.36 \pm 0.06\%$ 、 $2.05 \pm 0.09\%$ であり、*SeYCK1* 遺伝子の過剰発現は発酵速度向上効果があることを明らかとした (Fig. 2-7)。

2.4 考察

本章では、当社が過去に選抜した、麦汁発酵において発酵速度が速く高発酵性を示す酵母 HFY 株についてその特性評価を行った。HFY 株は、糖取り込み能力が高いために迅速な発酵速度を示し (Fig. 2-2)、親株である WTY 株と比較して発酵終了時の残糖量が低下していた (Fig. 2-3)。また次世代シーケンサを用いた解析を行い、両株間で染色体コピー数が増加していたこと、具体的には *Sc* 型 VI 番染色体、*Sc* 型 XII 番染色体および *Se* 型 XV-VIII 番染色体のコピー数が増加し、*Se* 型 XI 番染色体が減少していることが確認された (Fig. 2-4)。これら変化が見られた染色体の中で、高発酵力に寄与すると考えられる炭素源消費に関連する遺伝子に焦点を当てた。例えば *ScHXX1* 遺伝子は、*Sc* 型 VI 番染色体上に座乗している。*HXX1* 遺伝子は、グルコース代謝中の解糖経路の最初の不可逆的段階であるグルコース 6-リン酸へのグルコースリン酸化を触媒するヘキソキナーゼをコードする⁵⁹。また *SeYCK1* 遺伝子は、*Se* 型 XV-VIII 番染色体上に座乗している。*SeYCK1* 遺伝子は、細胞膜結合カゼインキナーゼ I をコードし、グルコースを感知してヘキソーストランスporter 遺伝子の発現を誘導することに関連している^{30, 52}。上記のように、*ScHXX1* および *SeYCK1* 遺伝子は、グルコース感知、取り込みおよび代謝に関連する。*ScHXX1* および *SeYCK1* 遺伝子のコピー数および発現レベルが高いことは、HFY 株の高発酵性に寄与していると考えられる。実際、本研究にて作製した *SeYCK1* 遺伝子を過剰発現させた下面発酵ビール酵母は対照株よりも速い発酵速度を示した (Fig. 2-7)。

本研究では、両株間のコピー数解析においてカバレッジ深度の差異が最も大きかった *Se* 型 XV-VIII 番染色体に座乗する *SeYCK1* 遺伝子に焦点を当てた。*Yck1* タンパク質は細胞膜上に発現してグルコースを感知し、解糖の主要な律速段階であるグルコース取り込みにおいて重要な役割を果たすヘキソース輸送体遺伝子の発現を誘導する^{30, 52}。HFY 株のグルコース取り込み能力は、*SeYCK1* 遺伝子発現レベルが高いため WTY 株よりも高いと考

えられ、その結果、麦汁への酵母添加後の増殖段階から発酵段階への移行がより迅速であり、速い発酵速度を示したと考えられる。HFY および WTY 株は、単一の酵母シングル株ではなく、良く似た酵母細胞の混合集団であると考えられている。染色体コピー数解析により、WTY 酵母集団のほとんどの酵母細胞は *SeYCK1* 遺伝子 1 コピーを有するが、HFY 酵母集団の多くの酵母細胞は *SeYCK1* 遺伝子の 2 つ（またはそれ以上）のコピーを有していることが示唆された。WTY 株を繰り返し馴化培養することにより、発酵力の高い *SeYCK1* 遺伝子を多コピー持つ酵母の生存が優先的となり、HFY 株の集団を形成していたと考えられる。

本研究ではグルコース取り込みに焦点を当てたが、マルトース取り込みでも両株間に差がみられた。WTY 株および HFY 株を用いたパイロットスケールの発酵試験では、WTY 株のグルコース残存量は HFY 株の約 2 倍、マルトース残存量は約 4.5 倍であった。マルトース/マルトトリオース透過酵素をコードする *SeAGT1* 遺伝子は、*Se* 型 XV-VIII 番染色体上にあることが知られている³⁹。*SeAGT1* 遺伝子のコピー数増加によるマルトース取り込みの促進も、HFY 株の発酵速度の向上に寄与すると考えられる。*SeAGT1* 遺伝子のコピー数の増加が発酵に及ぼす影響は、今後の研究で検討すべき課題である。同じ仮説が、糖取り込みに寄与する *ScHXK1* 遺伝子等が座乗する *Sc* 型 VI 番染色体および酵母増殖やタンパク質合成に関わるリボソーム RNA 遺伝子等が座乗している *Sc* 型 XII 番染色体上の遺伝子についても当てはまり、下面発酵ビール酵母の発酵性に寄与する遺伝子のさらなる解明の鍵となると考察する。

2.5 結言

本章では、下面発酵ビール酵母の発酵性に寄与する遺伝子の抽出を目的として研究を行った。当社が現在主力商品のビール醸造に使用している酵母 HFY 株 (*S. pastorianus*) は、発酵速度が速く、かつ官能評価においてキレ評価の高い酵母を馴化培養により選抜した経緯がある。当選抜酵母は発酵力に優れ、かつキレのあるビールをつくりだせる酵母として産業上有用であるが、その特性を裏付けるゲノム情報について明らかとなっていなかった背景がある。

そこで本章ではまず、次世代シーケンサを用いて HFY 株とその親株である WTY 株でのゲノム比較解析を行った。カバレッジ解析により HFY 株では WTY 株と比較していくつかの染色体のコピー数が変化していることを明らかとした。本手法は、酵母細胞の集団が馴化培養によりどのように変化したかを調べるのに有用であった。さらに本研究では両株間でコピー数に差が見られた染色体に座乗する遺伝子の中から、下面発酵ビール酵母の発酵力への関与が示唆される遺伝子としてグルコース感知、取り込みに関わる *SeYCK1* 遺伝子に着目した。本遺伝子をモデル下面発酵ビール酵母にて過剰発現させ、発酵が促進されることを見出した。

以上、本章では下面発酵ビール酵母の発酵性に寄与する遺伝子として *SeYCK1* 遺伝子を同定した。今後、ビール醸造における繰り返し発酵後の *SeYCK1* 遺伝子のコピー数増減を評価することで、実製造における繰り返し酵母の使用可否判断等、酵母発酵性の判断指標の一つとして展開したいと考えている。

一方、アルコール発酵のさらなる解明には、*SeYCK1* 遺伝子以外の遺伝子も見出すことが必要である。同様の研究により酵母の発酵性に寄与する遺伝子の多くを明らかとすることで、その遺伝子をターゲットとした酵母発酵制御への応用や酵母育種技術への発展が期待される。

Table 2-1 酵母菌株、プラスミド

菌株名	種	分譲元
WTY	<i>S. pastorianus</i>	当社ストック
HFY	<i>S. pastorianus</i>	当社ストック
Weihenstephan 34/70	<i>S. pastorianus</i>	当社ストック
Weihenstephan 34/70 Δ <i>ura3</i>	<i>S. pastorianus</i>	当社ストック
pST106	-	当社ストック

Table 2-2 プライマー、プローブ

NAME	SEQUENCE
① Sc ALG9 Fw	5'-GCCCCAATAAATTTAACAAAAGA-3'
② Sc ALG9 Rv	5'-CGATGAATGCAGCACATG-3'
③ Sc ALG9 Probe	FAM-5'-CCCTCTACATCTGATGGATAACTGGA-3'-TAMRA
④ Se YCK1 Fw	5'-CAGCAGCAACAACAGCAACC-3'
⑤ Se YCK1 Rv	5'-CCGAATTGTTGGGATTGGGGT-3'
⑥ Se YCK1 Probe	FAM-5'-CCGTGTTCCAGGCCAACCTCAACCTC-3'-TAMRA
⑦ Se YCK1 F	5'- GATGCCATAATAGTGAACACTAACAAAAGACTTTTCGCGCA AGCTTTTCAATTCAATTCATC-3'
⑧ Se YCK1 R	5'- TGCTTACCATGGGCCTAGACATGGATAAGAGGGGAGGGGA TTTATTCGAAACTAAGTTCTTGG-3'
⑨ Se YCK1 check F	5'- GATGCCATAATAGTGAACACTAACAAAAGACTTTTCGCGCA- 3'
⑩ Se YCK1 check R	5'-TAGCCGACCAAGTAGATGCAA -3'

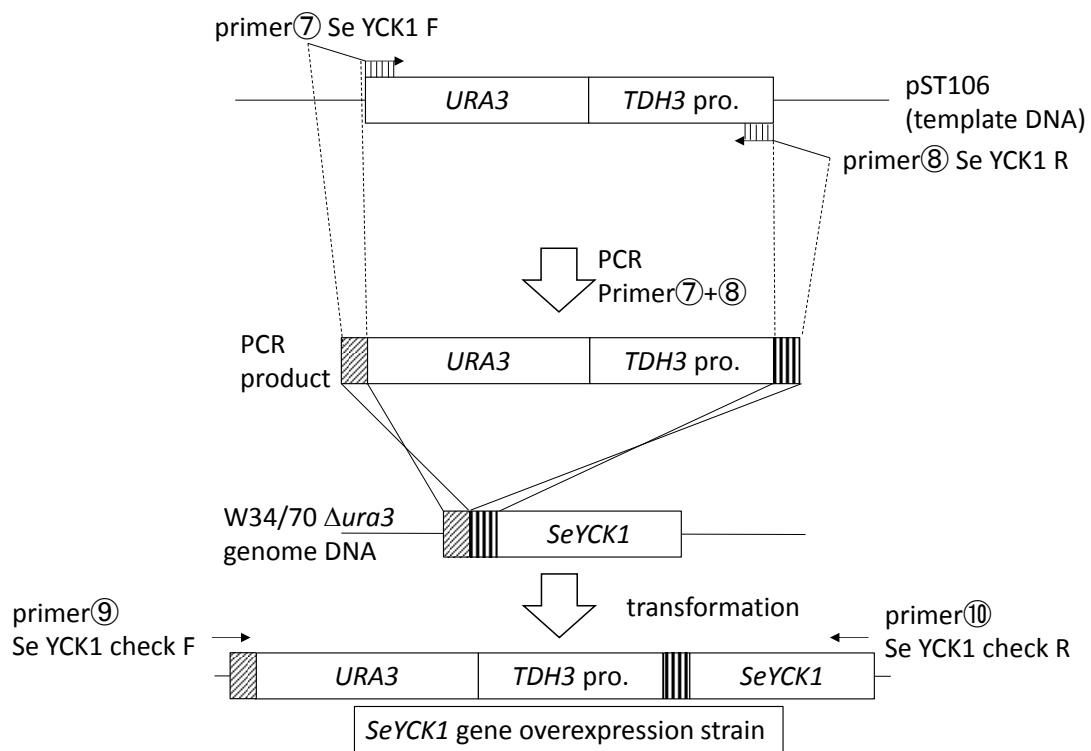


Fig. 2-1 *SeYCK1* 遺伝子過剰発現株構築スキーム

酵母相同組み換えを利用して *URA3* 遺伝子および高発現プロモーターをコードする *TDH3* 遺伝子を W34/70 $\Delta ura3$ 株の *SeYCK1* 遺伝子の上流に組み込んだ。

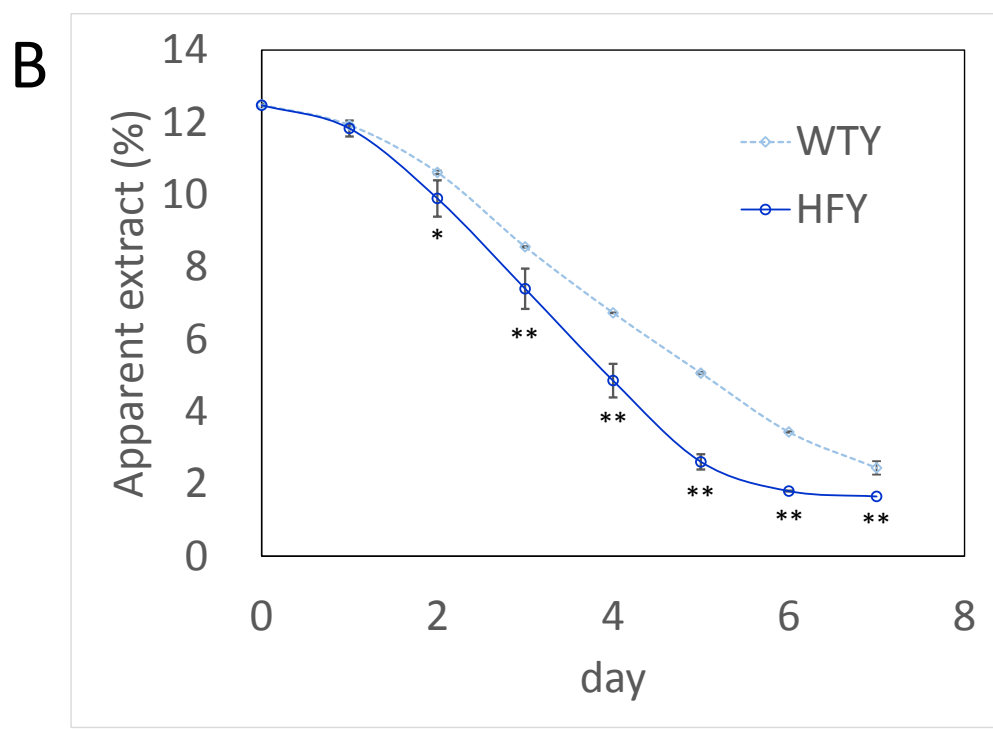
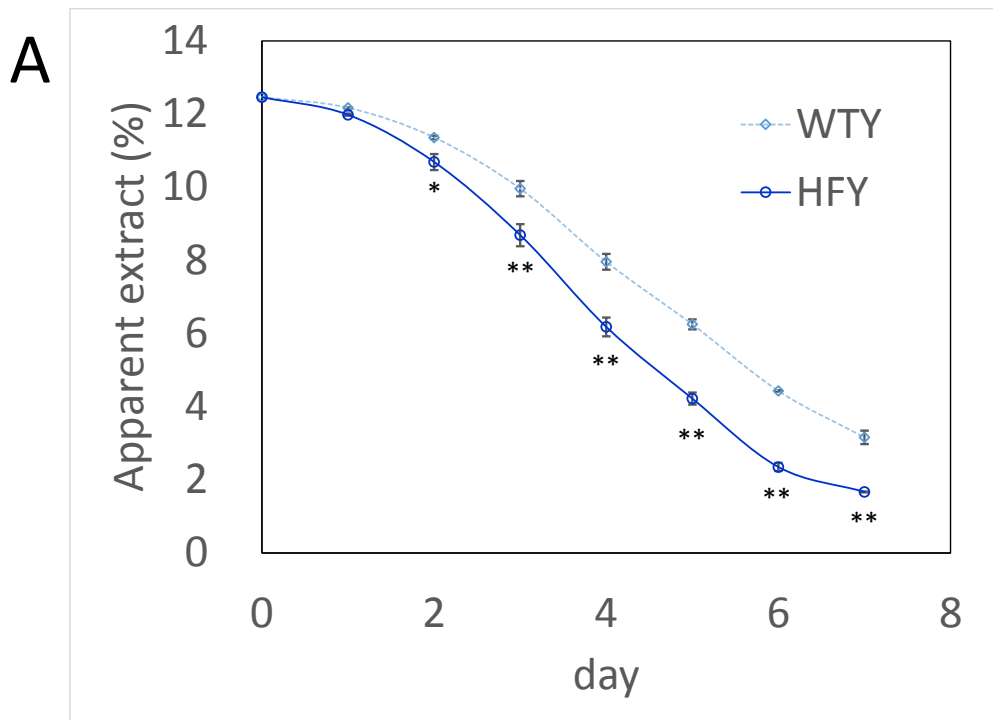


Fig. 2-2 麦汁発酵試験外観エキス測定結果

(N = 3) (t test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

(A) 20-L スケール発酵試験 (B) 300-kL スケール発酵試験

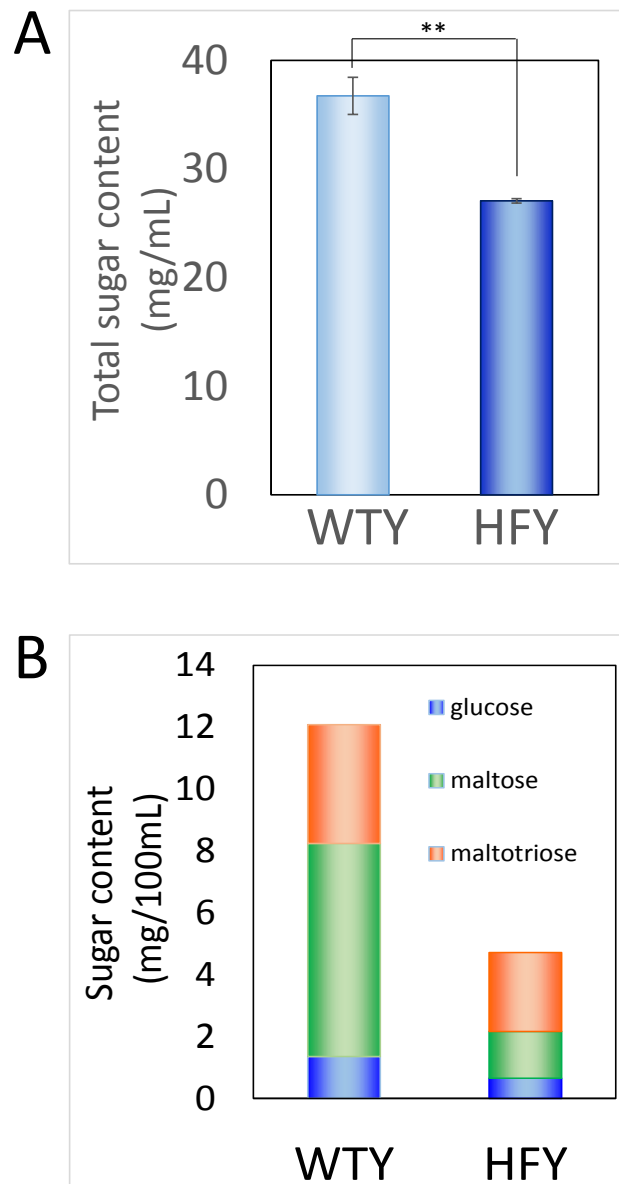


Fig. 2-3 麦汁発酵試験糖分析結果 (N = 3) (*t* test, ** $p < 0.01$)
 (A) 全糖残量 (B) 発酵性糖残量

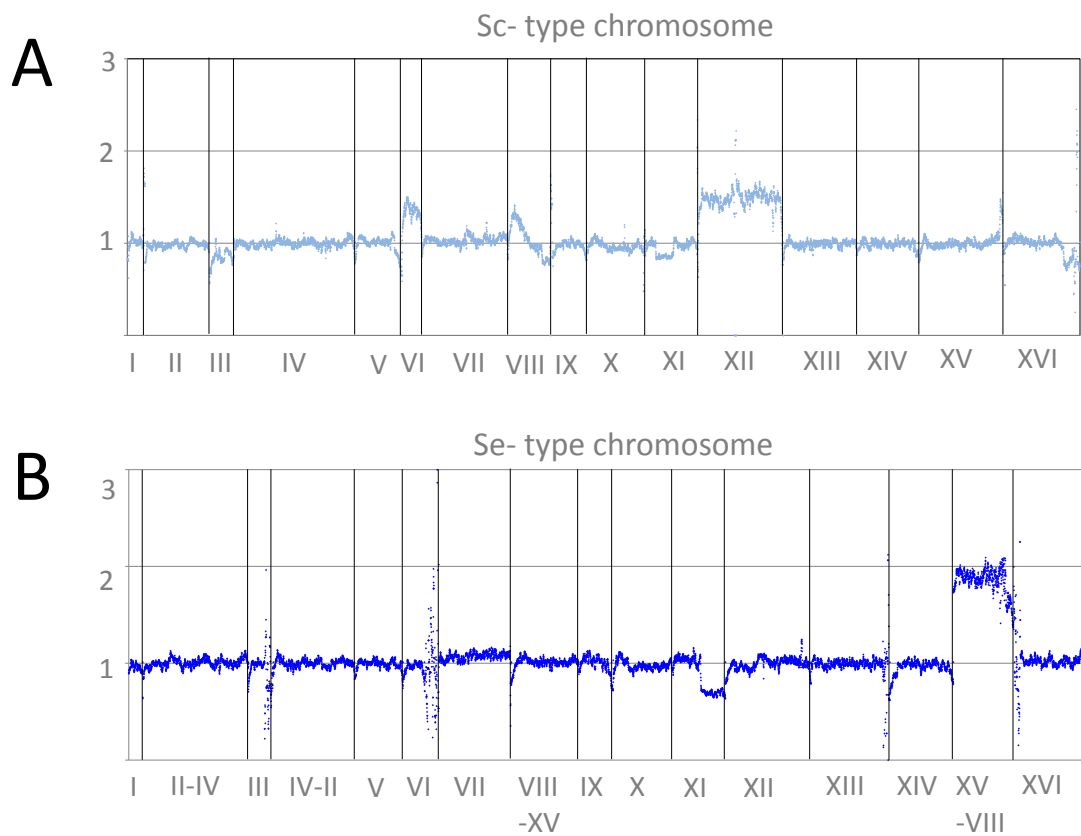


Fig. 2-4 染色体コピー数解析

縦軸は WTY 株のカバレッジ深度を 1 としたときの HFY 株におけるカバレッジ深度 (1000bp ごとに算出)、横軸は染色体番号

(A) *Sc*型染色体 (B) *Se*型染色体

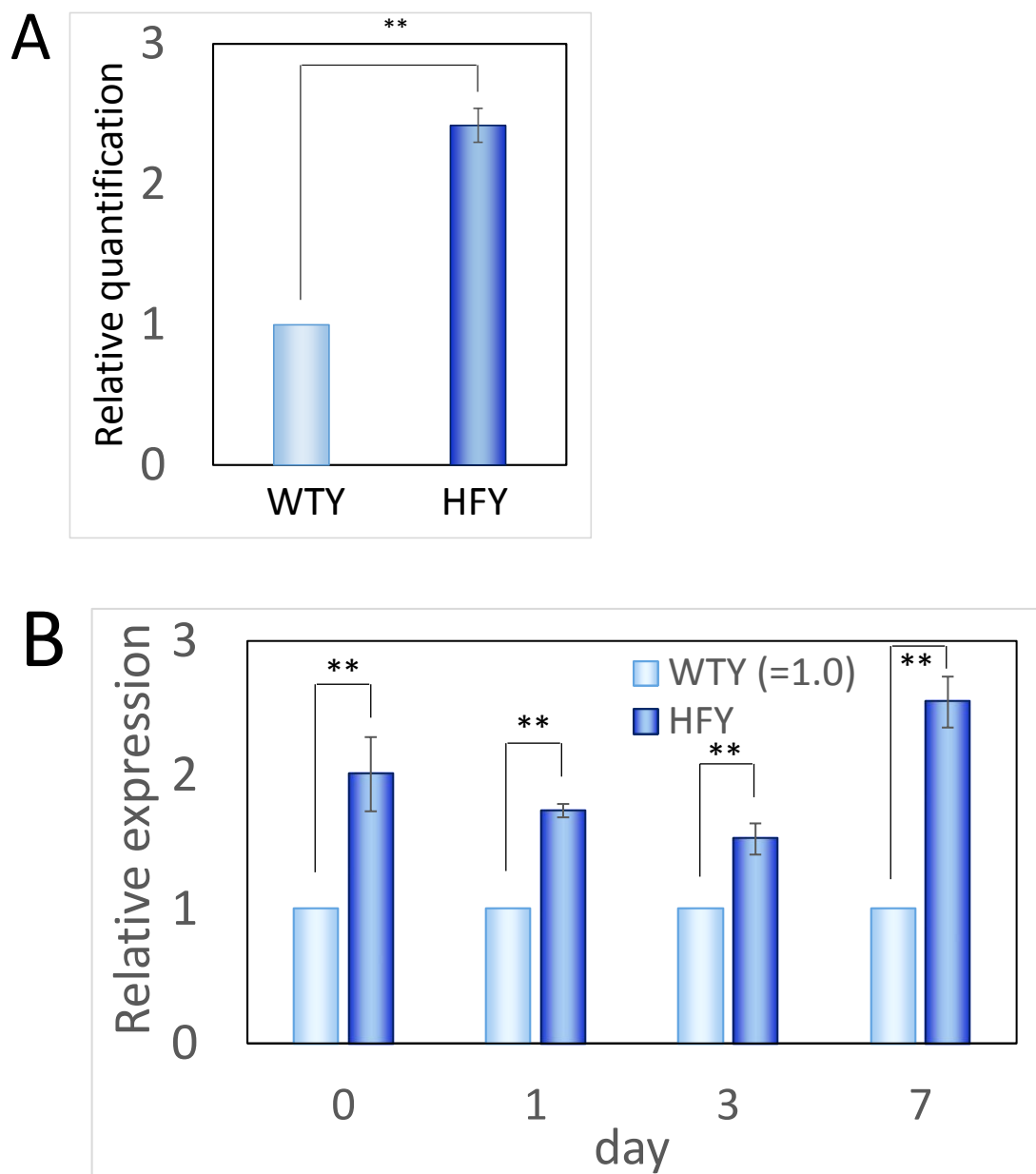


Fig. 2-5 *SeYCK1* 遺伝子コピー数および発現解析結果 (N = 3) (*t* test, ** $p < 0.01$)

(A) 定量 PCR による *SeYCK1* 遺伝子コピー数解析

(B) 定量 PCR による発酵期間中の *SeYCK1* 遺伝子発現解析結果

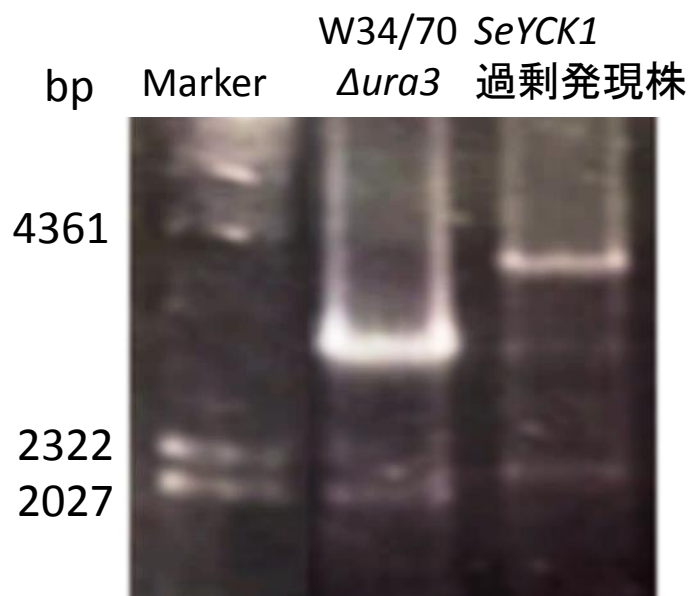


Fig. 2-6 *SeYCK1* 遺伝子過剰発現株確認 PCR 電気泳動結果
 遺伝子サイズ
 W34/70 $\Delta ura3$: 2552 bp
SeYCK1 遺伝子過剰発現株 : 4334 bp

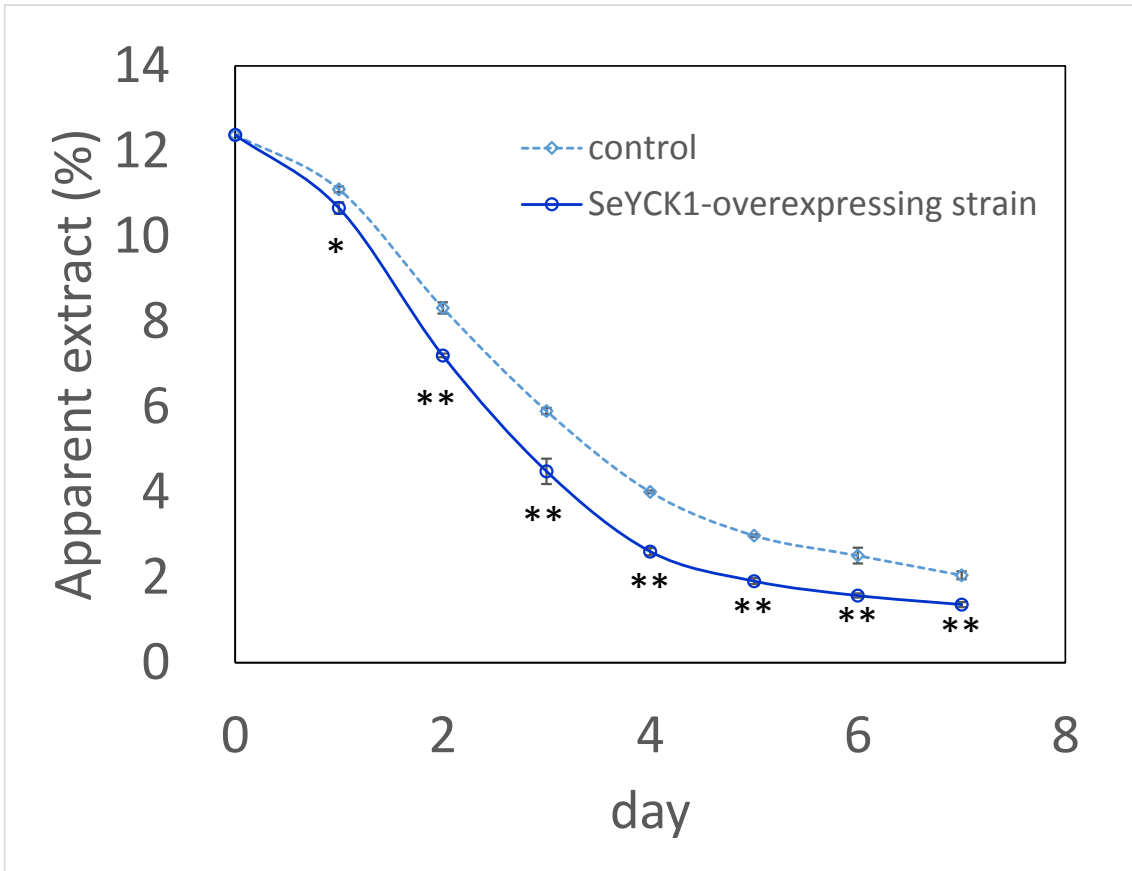


Fig. 2-7 *SeYCK1* 遺伝子過剰発現株発酵試験外観エキス測定結果
(N = 3) (*t* test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

第3章

下面発酵ビール酵母における
高濃度醸造下での
高発酵寄与因子の解明

3.1 緒言

近年、製造効率向上やコスト削減または新しいタイプのビール製造のため、高濃度のエキース分含有の麦汁で発酵させる高濃度醸造と呼ばれる醸造技術が求められている。これまでも酸素供給量を増やしたり発酵温度を上げたりといった方法が試みられているが^{23, 28}、高浸透圧や高アルコールといったストレス条件下では増殖阻害による発酵遅延、さらには発酵を停止してしまうため健全な発酵が出来ず²⁸、ビールの嗜好性に関わるキレにも影響する発酵性糖を取り込み残してしまうといった問題があり、高濃度醸造の実現は困難な現状である。そこで、高濃度醸造に適したビール酵母の選択、または発酵力向上に寄与する因子の解明が望まれている。

第2章にて通常の麦汁での高発酵性に寄与する因子として遺伝子の抽出を行ったが、本章では高濃度醸造下における下面発酵ビール酵母の発酵性に寄与する因子の解明を目的とし、清酒もろみ発酵中にアルコール20% (v/v) 程度を産生することが知られる清酒酵母の特性に着目した。近年、その高発酵性の一因として、清酒酵母はアルコール濃度の上昇を含む多様な外界ストレスを感知しても増殖を停止せず、休止期 (G₀ 期) 移行に欠損を示すこと、即ち細胞周期と関係があることが報告されている³¹⁻³⁵。多くの酵母は、ストレスを感知すると Rim15 タンパク質の活性化によって休止期移行が引き起こされるが、一部の近代清酒酵母においては、*RIM15* 遺伝子上の機能欠失変異によって休止期移行に欠損が生じる³¹。実験室酵母 *S.cerevisiae* において、Rim15 タンパク質は Msn2 / 4 タンパク質および Gis1 タンパク質などの G₀ 転写因子を刺激することによって G₀ プログラムを誘発する際のマスターレギュレーターを果たす⁶⁰⁻⁶²。一部の近代清酒酵母は、*RIM15* 遺伝子において共通の機能欠失フレームシフト突然変異を有しており、その結果 G₀ 期への移行欠損の表現型を示し、細胞周期の進行および高い発酵速度の維持に寄与し得ることが分かってきている^{31, 32}。また、実験室酵母と比較して、清酒酵母菌株 Kyokai no.7 (K7) における G₁ サイ

クリン CLN3 mRNA の発現は発酵中に上昇することが報告されている³³。実験室酵母において、Cln3 タンパク質は Cdc28 タンパク質サイクリン依存性キナーゼ (CDK) と共に、G₁/S 期移行に関与する遺伝子の最も上流の調節因子である⁶³⁻⁶⁶。過去の研究にて、リン酸および窒素欠乏条件下では、Cln3p が PEST-rich C 末端配列依存的に非常に不安定で分解されやすいことが明らかとなっている^{67,68}。対照的に、酵母菌株 *WHI1-1* 株 (*S. cerevisiae*) 中の突然変異した *CLN3* 遺伝子によってコードされ、C 末端の PEST-rich 領域を欠く Cln3-1 タンパク質は安定であり G₁/S 転移を促進する⁶⁵。注目すべきことに、*WHI1-1* 変異体の表現型は、清酒酵母 K7 株の表現型に類似していることが分かっている他、*WHI1-1* (*CLN3* 遺伝子の PEST-rich 領域破壊 (*CLN3-1*; *CLN3ΔPEST*)) 変異は実験室酵母菌株 BY4743 株の発酵速度を改善することが示されている³³。しかしながら、上述した G₀/G₁ 遷移が、下面発酵ビール酵母の発酵速度に影響を及ぼすかどうかは明らかとなっていない。

本研究では、休止期移行欠損が下面発酵ビール酵母の発酵性に影響を与えるかどうか検討するため、W34/70 株を用いて、*S. cerevisiae* 型 *RIM15* 遺伝子破壊株及び、*S. cerevisiae* 型 *CLN3ΔPEST* 変異導入株を作製した。作製した株の発酵挙動を評価し、細胞周期と下面発酵ビール酵母の発酵性との関連について調査したので報告する。

3.2 実験方法

3.2.1 菌株、プラスミド

実験室酵母 BY4743 株および BY4743 $\Delta rim15::kanMX$ (*RIM15* 遺伝子破壊) 株は Euroscarf 社より購入した。実験室酵母 X2180-1A は the American Type Culture Collection より購入した。実験室酵母 BY4743 *CLN3* Δ *PEST::kanMX* (*CLN3* 遺伝子の PEST-rich 領域破壊) 株は独立大学法人酒類総合研究所より分譲頂いた。W34/70 株は当社の酵母コレクションに保存されている菌株を用いた (Table 3-1)。

3.2.2 培養条件

実験室酵母菌株の培養は特筆しない限り YPD 培地 (1% yeast extract, 2% Bactopectone [Difco, Sparks, MD, USA], 2% glucose) を用いて、25°Cで行った。下面発酵ビール酵母の培養は特筆しない限り YPM 培地 (1% yeast extract, 2% Bactopectone [Difco, Sparks, MD, USA], 2% maltose [ナカライテスク]) を用いて、25°Cで行った。寒天培地の場合には 2% 寒天 (Agar [Difco, Sparks, MD, USA]) を添加した。

3.2.3 プライマー

遺伝子組換え体作製に用いたプライマーを Table 3-2 に示した。

3.2.4 下面発酵ビール酵母の *ScRIM15* 遺伝子破壊株の作製

下面発酵ビール酵母 W34/70 株 の *ScRIM15* 遺伝子 破壊株は、酒類総合研究所にて作製して頂いた。各種プライマー配列は、下面発酵ビール酵母 W34/70 株のゲノム配列情報 (DDBJ/EMBL/GenBank accession number BBYY01000167.1 (nucleotides 275586-277235, complementary sequence)) を参考にした。Table 3-2 に示した① RIM15-DF、② RIM15-DR とプラスミド pAG25 をもとに *natMX* 配列を持つ DNA フラグメントを作製

し、X2180-1A 株を形質転換することにより X2180-1A 株の *RIM15* 遺伝子破壊株 (X2180-1A $\Delta rim15::natMX$ 株) を作製した。その後、BY4743 $\Delta rim15::kanMX$ 株および X2180-1A $\Delta rim15::natMX$ 株から、*ScRIM15* 遺伝子の ORF 領域の前後 1 kb を含むカセットを Table 3-2 に示したプライマー③ SC RIM15-F、④ SC RIM15-R を用いた PCR により作製し (Fig. 3-1)、W34/70 株の形質転換に用いた。*kanMX* および *natMX* 配列を挿入することで、それぞれ選択マーカーである G-418 および nourseothricin への耐性付与が可能である。形質転換は酢酸リチウム法により実施した⁵⁸。形質転換体は G-418 (500 $\mu\text{g/ml}$) または nourseothricin (X2180-1A 株 : 100 $\mu\text{g/ml}$ 、W34/70 株 : 200 $\mu\text{g/ml}$) 耐性を指標として選択した。作製した株の確認は Table 3-2 に示したプライマー③ SC RIM15-F、④ SC RIM15-R を用いた PCR により行った。

3.2.5 下面発酵ビール酵母の *ScCLN3* $\Delta PEST$ 変異導入株の作製

ScCLN3 遺伝子の C 末端 PEST 領域を欠損させた株の作製のため、W34/70 株の PEST-rich 領域にストップコドンおよび変異株選択用の *kanMX* 配列を挿入した。各種プライマー配列は、下面発酵ビール酵母 W34/70 株のゲノム配列情報 (DDBJ/EMBL/GenBank accession number BBYY01000167.1 (nucleotides 275586 - 277235, complementary sequence)) を参考にした。BY4743 *CLN3* $\Delta PEST::kanMX$ 株をもとに Table 3-2 に示したプライマー⑤ SC CLN3-F、⑥ SC CLN3-R を用いた PCR により得た DNA フラグメントを用いて W34/70 株の形質転換に用いた (Fig. 3-2)。形質転換は酢酸リチウム法により実施した⁵⁸。形質転換体は G-418 (500 $\mu\text{g/ml}$) 耐性を指標として選択した。作製した株の確認は Table 3-2 に示したプライマー⑥ SC CLN3-R、⑦ SC CLN3 Check-F を用いた PCR、および CEQ8000 DNA analysis system (Beckman Coulter) を用いたシーケンス配列確認により行った。

3.2.6 PCR 法反応条件

PCR は PerfectShot Ex Taq (Takara Bio 社) を用いて行った。酵母からのゲノム DNA 抽出は Dr. GenTLE (Takara) を用いて行った。PCR 反応はサーマルサイクラー GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems 社) を用い、PCR 反応条件は次の通り行った。

98°C	10 秒	} 30 cycle
55°C	30 秒	
72°C	1 分	

PCR 反応液 5 μ L を 2% アガロースゲル (Sigma 社) で TAE 緩衝液を用いた電気泳動を行った。電気泳動後の染色は、SYBR Green I (Invitrogen 社) を用いて PCR 産物の検出を行った。DNA のサイズマーカーには HighRanger 1 kb DNA Ladder (コスモ・バイオ社) λ /Hind III digest DNA Size Marker (TOYOBO 社) を用いた。

3.2.7 細胞周期 G₁ 期停止薬剤ラパマイシン添加試験

寒天培地上の酵母を YPD 培地 5 mL で 25°C、200 rpm の振とう条件で一晩培養した後、YPD 培地 50 mL に 2.5×10^8 cells/mL となるよう酵母を添加し、25°C、200 rpm の振とう条件で 4 時間培養した。対数増殖期にある酵母を回収し、200 ng/mL Rapamycin (Calbiochem) 含有 YPD 培地に接種した。

3.2.8 フローサイトメーターによる細胞周期解析

1×10^7 cells の酵母を 70% エタノール 1 mL で固定化した後、50 mM Tris-HCl (pH7.6) 1 mL で洗浄した。遠心回収した酵母を 1 mg/mL RNase A 溶液 400 μ L に懸濁した後、50 mM Tris-HCl (pH7.6) 1 mL に再懸濁して 37°C、120 分インキュベートした。50 mM Tris-HCl (pH7.6) 1 mL で再度洗浄した後、0.5 mg/mL プロテアーゼ K 溶液に再懸濁して 4°C

で一晩インキュベートした。遠心により酵母を回収後、50 mM Tris-HCl (pH7.6) 1 mL に再懸濁した。懸濁液を Handy Sonic UR-20P (トミー精工) を用いて超音波処理した後、懸濁液 500 μ L と 200 μ g/mL のよう化プロピジウム液 500 μ L をボルテックスにより混合して核染色を行った。得られた試料を FACS Calibur instrument (BD Biosciences) を用いて細胞周期の解析を行った。

3.2.9 発酵試験

① 50 mL スケール発酵試験

寒天培地上の酵母を 5 mL の YPD 培地で 25°C、一晩培養した。前培養液を水で洗浄した後、20%マルトース培地(0.67% yeast nitrogen base without amino acids, 1% yeast extract, and 20% maltose) に OD660 = 2.0 の酵母濃度となるよう接種し、90 rpm 振とう条件で 15°C、7 日間本発酵を行った。

② 1-L スケール合成培地発酵試験

寒天培地上の酵母を 10 mL の原麦汁エキス 12.5%の麦汁に接種して 90 rpm 振とう条件で 25°C、1 日間前培養を行った。前培養液をエアレーションした同麦汁 500 mL に添加して振とうせずに 15°C、7 日間の条件で前発酵を行った。前発酵液を遠心により上清を除去して酵母を回収後、 2.0×10^7 cells/mL となるよう 1-L のエアレーションした合成培地 (0.17% yeast nitrogen base without amino acids and ammonium sulfate, 0.25% yeast extract, 20% maltose) に添加して本発酵を開始し、振とうせずに 15°C、18 日間の条件で本発酵を行った。

③ 1-L スケール麦汁発酵試験

寒天培地上の酵母を 10 mL の原麦汁エキス 12.5%の麦汁に接種して 90 rpm 振とう条件

で 25℃、1 日間前培養を行った。前培養液をエアレーションした同麦汁 500 mL に添加して振とうせずに 15℃、7 日間の条件で前発酵を行った。前発酵液を遠心により上清を除去して酵母を回収後、 2.0×10^7 cells/mL となるよう 1-L のエアレーションした原麦汁エキス 20%の麦汁（原麦汁エキス 12.5%の麦汁にマルトースを添加して原麦汁エキス 20%となるよう調整）に添加して本発酵を開始し、振とうせずに 15℃、11 日間の条件で本発酵を行った。

3.2.10 二酸化炭素排出量測定

発酵中の二酸化炭素排出量は Fermoograph II instrument (Atto) を用い、酒類総合研究所にて測定頂いた。

3.2.11 外観エキス測定

発酵速度は、ビール分析法として一般的に知られている方法である、density/specific gravity meter (DA-510, Kyoto Electronics Manufacturing) を用いた外観エキス測定により評価した。

3.3 実験結果

3.3.1 下面発酵ビール酵母 *ScRIM15* 遺伝子破壊株の作製

休止期移行機能欠損が下面発酵ビール酵母においても発酵力の向上に寄与するか確認するため、モデル下面発酵ビール酵母 W34/70 株を用いて *ScRIM15* 遺伝子破壊株の作製を行った。得られた形質転換体の *ScRIM15* 遺伝子の破壊については PCR にて確認した。PCR は *ScRIM15* 遺伝子特異的な配列から設計したプライマー③ RIM15-F と④ RIM15-R を用いて実施した。その結果、*ScRIM15* 遺伝子サイズのコピー数が検出されなかったため、この株が W34/70 株の *ScRIM15* 遺伝子破壊株であると結論付けた (Fig. 3-3)。

3.3.2 下面発酵ビール酵母 *ScCLN3* Δ *PEST* 変異導入株の作製

3.3.1 同様、休止期移行機能欠損が下面発酵ビール酵母においても発酵力の向上に寄与するか確認するため、続いてモデル下面発酵ビール酵母 W34/70 株を用いて *CLN3* 遺伝子下流の PEST-rich 領域破壊株の作製を行った。得られた形質転換体の変異導入の有無については PCR 及びシーケンス解析にて確認した。PCR は *ScCLN3* 遺伝子特異的な配列から設計したプライマー⑥ SC CLN3-R と⑦ SC CLN3 Check-F を用いて実施した。PCR の結果、得られた形質転換体は 2 コピー存在する *ScCLN3* 遺伝子のうち、片方のみに *CLN3* Δ *PEST* 変異が導入されていることが確認された (Fig. 3-4)。また、シーケンス解析を実施して変異が正確に導入されていることを確認した。

3.3.3 細胞周期停止薬剤添加による遺伝子組換え体株の細胞周期解析

作製した *ScRIM15* 遺伝子破壊株および *ScCLN3* Δ *PEST* 変異導入株が休止期移行に欠損を示すか確認するため、細胞周期 G₁ 期停止薬剤ラパマイシンにて処理を行い、フローサイトメーターによる細胞周期の解析を実施した。ラパマイシンは TORC1 キナーゼの不活性化により G₀/G₁ 転位を誘導することが知られている薬剤である⁶⁹。ラパマイシン処理条件

下において、作製した両株では親株 W34/70 株と比較してより多くの G₂/M 期の酵母細胞が残存おり、作製した 2 株が休止期移行機能欠損を示すことを確認した (Table 3-3)。

3.3.4 遺伝子組換え体株の発酵中の細胞周期解析

作製した *ScRIM15* 遺伝子破壊株および *ScCLN3ΔPEST* 変異導入株の発酵中における細胞周期状態を評価するため、高マルトース (20%) 合成培地を用いた 1-L スケール発酵試験を実施して発酵中の酵母菌株についてフローサイトメーターによる細胞周期の解析を実施した。高マルトース合成培地は高濃度麦汁のモデル培地として使用した。親株 W34/70 株では、G₂/M 期に当たる DNA 含量を有する酵母の割合は発酵の進行中に著しく減少した (Fig. 3-5)。これは細胞周期が G₁ 期で停止し、発酵が進行するにつれて G₀ 状態に徐々に進入することを示唆している。対照的に *ScRIM15* 遺伝子破壊株および *ScCLN3ΔPEST* 変異導入株では、G₂/M 期にいる酵母の割合は発酵中を通して親株よりも高いままであり、「実験結果及び考察 3.3.3」でのラパマイシン処理実験でみられた結果同様、休止期移行に欠損を示すことが確認された (Fig. 3-5)。

3.3.5 遺伝子組換え体株の高糖度合成培地における発酵挙動評価

作製した *ScRIM15* 遺伝子破壊株および *ScCLN3ΔPEST* 変異導入株の発酵能を評価するため、高マルトース (20%) 合成培地を用いた小スケール (50mL) の発酵試験を行い、CO₂ 排出量をモニタリングした。*ScRIM15* 遺伝子破壊株および *ScCLN3ΔPEST* 変異導入株の CO₂ 排出ピークおよび総 CO₂ 排出量は、親株 W34/70 株と比較して有意に増加した (Fig. 3-6)。次に、高マルトース (20%) 培地を用いた 1-L スケールの発酵試験を実施した。高マルトース合成培地は高濃度麦汁のモデル培地として使用した。50 mL 発酵試験で使用した培地と比較して、窒素含量は、麦汁にさらに近づけるためにより少ない条件とした。外観エキスの速い減少により判断されるように、作製した 2 株の発酵速度は親株 W34/70 株よりも速かった (Fig. 3-7)。試験終了時の親株 W34/70 株、*ScRIM15* 遺伝子破壊株および

ScCLN3ΔPEST 変異導入株の外観エキスは、それぞれ $0.33 \pm 0.04\%$ 、 $-1.08 \pm 0.02\%$ および $-0.47 \pm 0.02\%$ であり、本研究にて作製した休止期移行に欠損を示す株は高糖度合成培地条件下で発酵速度が向上することを明らかとした。

3.3.6 遺伝子組換え体株の高濃度麦汁培地における発酵挙動評価

作製した 2 株の高濃度醸造下における発酵挙動を評価するため、マルトースを添加して原麦汁エキス濃度 20% に調整した麦汁を用いて 1-L スケール発酵試験を実施した。合成培地での発酵試験と同様に、作成した 2 株の発酵速度は親株 W34/70 株の発酵速度よりも速かった (Fig. 3-8)。発酵試験終了時の親株 W34/70 株、*ScRIM15* 遺伝子破壊株および *ScCLN3ΔPEST* 変異導入株の外観エキスはそれぞれ $3.61 \pm 0.07\%$ 、 $1.88 \pm 0.03\%$ および $1.89 \pm 0.04\%$ であり、本研究にて作製した休止期移行に欠損を示す株は高濃度醸造条件下においても発酵速度が向上することを明らかとした。

3.4 考察

本研究では、高濃度醸造下において細胞周期が下面発酵ビール酵母の発酵性に寄与する因子の一つであることを明らかとした。清酒もろみ中にてアルコール 20% (v/v) 程度生成可能である清酒酵母の知見にもとづき、*ScRIM15* 遺伝子破壊株や *ScCLN3ΔPEST* 変異導入株といった細胞周期の休止期移行に機能欠損を示す株をモデル下面発酵ビール酵母にて作製した。作製した株は高濃度醸造下での発酵速度が速く、発酵力が向上することを示した (Fig. 3-6、Fig. 3-7、Fig. 3-8)。

本研究で作製した遺伝子改変株は親株と比較して発酵後期においても G₂/M 期の割合が高く、休止期移行欠損が示唆される表現型を示した (Fig. 3-5)。高濃度醸造時の高浸透圧や高エタノール、栄養源枯渇等のストレス環境下においては、通常酵母は細胞周期を停止し、ストレス耐性を高めるために休止期へ移行して発酵を停止させると考えられている^{28, 31}。発酵試験において、親株では発酵中後期において発酵遅延・停止したのに対し、今回作製した 2 株はストレス条件下でも細胞周期進行を維持し、その結果作製株では発酵が継続したと推察される。本文でデータは示していないが、一般的なビール麦汁のエキス分である 12% 程度の麦汁では、今回作製した 2 株と親株で発酵速度に大きな差は見られなかった。今回試みた遺伝子改変は、より細胞周期の休止期に移行しやすい高ストレス条件下においてその効果を発揮しやすいことが示唆された。

過去の研究にて、近代清酒酵母である K6,K7,K701,K9~K15 株は *RIM15* 遺伝子に機能欠損を持つ一方、ビール酵母や焼酎酵母、ワイン酵母や実験室酵母は当機能欠損を持っていないことが確認されている^{31, 35}。この違いは、清酒酵母やビール酵母がグルコースまたはマルトースといった異なる炭素源、また異なるアルコール濃度 (20% (v/v) または 5% (v/v)) という環境で自然選択される際にそれぞれの環境に適した特性を獲得していったためと考えられる。

序論でも述べたように、*S. pastorianus* に分類される下面発酵ビール酵母は *Sc* 型と *Se* 型の両方の遺伝子を持っていると考えられている^{11, 15}。今回は *RIM15* 遺伝子、*CLN3* 遺伝子ともに *Sc* 型の遺伝子について改変を行い発酵速度向上効果があることを示したが、*Se* 型遺伝子を改変した場合の発酵への影響は不明である。今後の研究で *Se* 型遺伝子の機能も明らかにすることが望まれる。また、今回使用した W34/70 株の *RIM15* 遺伝子を詳細に解析すると、*Sc* 型、*Se* 型に加えて *Sc* 型と 48%、*Se* 型と 46% の塩基配列の相同性を示す遺伝子も保有していることが明らかとなった（データは示していない）。本結果は W34/70 株が *RIM15* 遺伝子 の新規ホモログを有する可能性を示唆しており、本遺伝子の機能解明も今後の課題である。

3.5 結言

本章ではビール酵母の発酵力向上による高濃度醸造の実現を狙い、下面発酵ビール酵母の発酵性に寄与する因子の解明を目的として研究を行った。ここでは、高発酵性を示す清酒酵母がストレス条件下において休止期移行欠損を示すという知見に着目した。休止期移行に欠損を示すよう遺伝子改変した下面発酵ビール酵母を作製し、その特性を評価した。まず、作製した株を G₁ 期停止薬剤ラパマイシンで処理し、親株と比較して休止期へ移行しにくい表現型を有することを確認した。次いで高糖度培地、高濃度麦汁を用いた発酵試験を行い、作製した株は親株よりも発酵速度が速く発酵力が向上していることを明らかとした。

以上、本章では高濃度醸造下において細胞周期および休止期移行に関連する遺伝子が下面発酵ビール酵母の発酵性に寄与していると結論付ける。本研究で得られた知見は細胞周期をターゲットとして高発酵性を示す酵母の育種に応用して高濃度醸造に利用すること、また酵母の状態把握のために発酵中の細胞周期をモニタリングして酵母活性の判断指標とすること等への利用が期待できる。

Table 3-1 酵母菌株、プラスミド

菌株名	種	分譲元
BY4743	<i>S. cerevisiae</i>	Euroscarf
BY4743 <i>Δrim15::kanMX</i>	<i>S. cerevisiae</i>	Euroscarf
BY4743 <i>CLN3ΔPEST::kanMX</i>	<i>S. cerevisiae</i>	酒類総合研究所
X2180-1A	<i>S. cerevisiae</i>	American Type Culture Collection
Weihenstephan 34/70	<i>S. pastorianus</i>	当社ストック
pAG25	-	酒類総合研究所

Table 3-2 プライマー

NAME	SEQUENCE
① RIM15-DF	5'- CTCTTGCCTCATTGATAGAATAGATAAGCCCAGTAGAGG AAGACCGTACGCTGCAGGTCGAC-3'
② RIM15-DR	5'- TTTTTATTCAGTTATTTTTTTTAAATTATCTTTATCTTAAAAT TTAATCGATGAATTCGAGCTCG -3'
③ SC RIM15-F	5'-AAGTTGTTGTTTCGTATCACAGC -3'
④ SC RIM15-R	5'-CTCTAACAAAGGAGAATATATATACG -3'
⑤ SC CLN3-F	5'-TCAACCTCGACTTTGTTCT-3'
⑥ SC CLN3-R	5'-GTAATTCTATGCAAATGTAATATAA-3'
⑦ SC CLN3 Check-F	5'-GTCTCTCCCACACAGAAAGG-3'

Table 3-3 ラパマイシン処理後の G₂/M 期の割合 (N = 3)

Rapamycin Induction Time (h)	G ₂ /M 期割合 (%)		
	Wild type	<i>RIM15</i> disruptant	<i>CLN3ΔPEST</i> mutant
0	75.23 ± 1.90	77.30 ± 1.80	*80.80 ± 1.91
4	32.18 ± 1.96	*44.51 ± 1.31	*62.05 ± 2.54
24	2.41 ± 0.67	*6.82 ± 1.57	*11.20 ± 0.85

(*t* test, * *p* < 0.05)

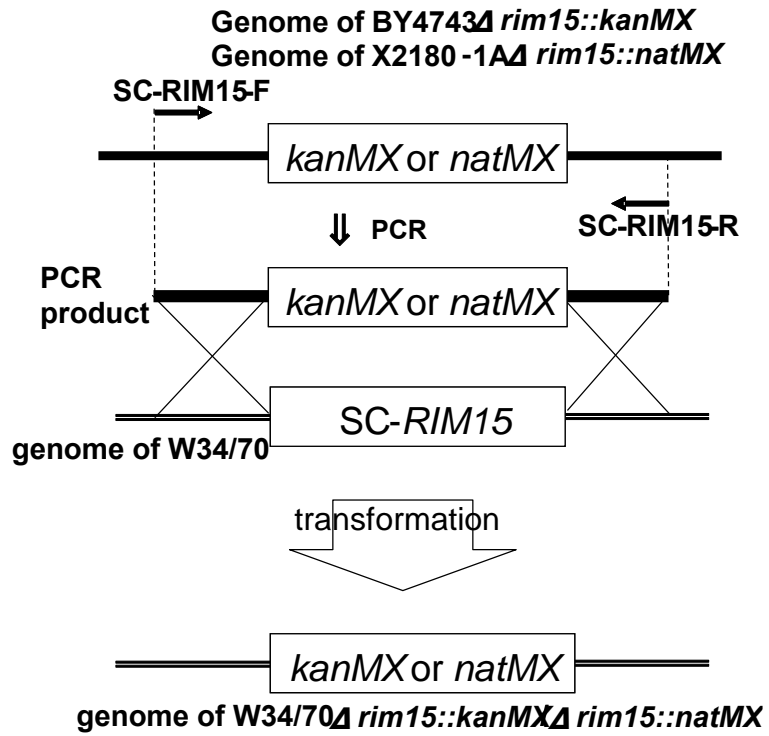


Fig. 3-1 W34/70 *ScRIM15* 遺伝子破壊株構築スキーム

酵母相同組み換えを利用して *ScRIM15* 遺伝子領域に G-418 または nourseothricin 薬剤マーカーカセット遺伝子 *kanMX* 配列または *natMX* 配列を組み込むことで *ScRIM15* 遺伝子の破壊を行った。

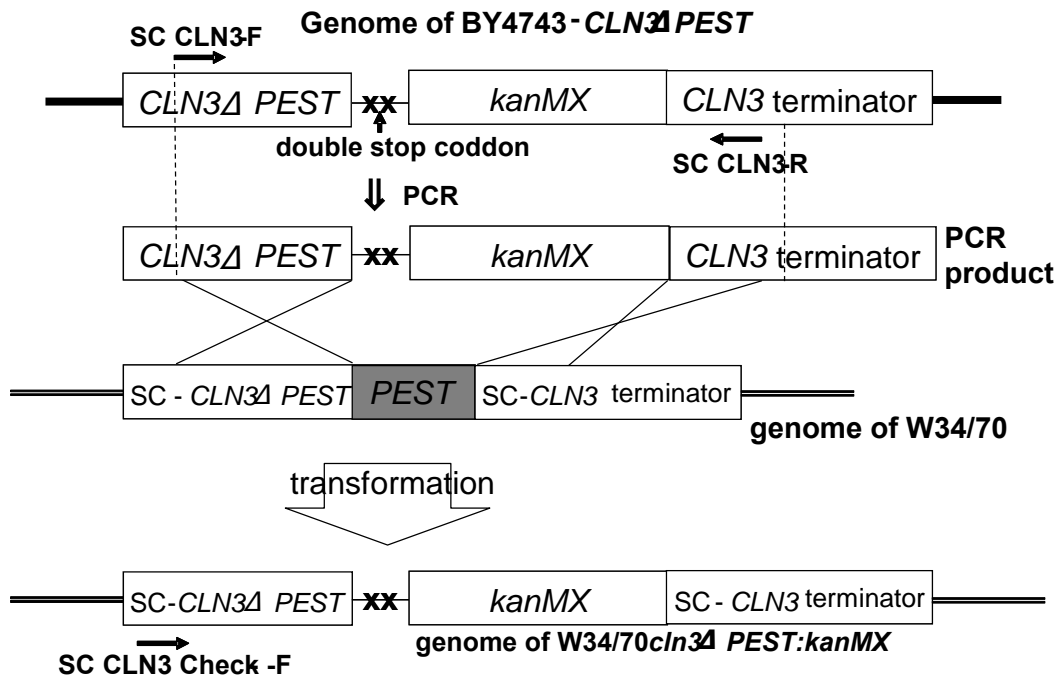


Fig. 3-2 W34/70 *ScCLN3* Δ *PEST*株構築スキーム

酵母相同組み換えを利用して *ScCLN3* 遺伝子の PEST-rich 領域上流にストップコドン、及び G-418 薬剤マーカーカセット遺伝子 *kanMX* 配列を組み込むことで *ScCLN3* 遺伝子の PEST-rich 領域の破壊を行った。

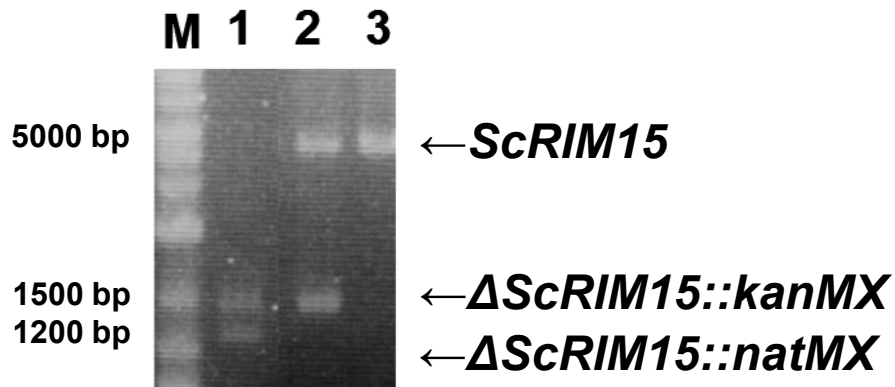


Fig. 3-3 *ScRIM15* 遺伝子破壊確認 PCR 電気泳動結果

M : marker

Lane 1 : W34/70 $\Delta ScRIM15$

Lane 2 : W34/70 $\Delta ScRIM15::kanMX$

Lane 3 : W34/70

遺伝子サイズ

ScRIM15 : 5,762 bp

$\Delta ScRIM15::kanMX$: 1,506 bp

$\Delta ScRIM15::natMX$: 1,232 bp

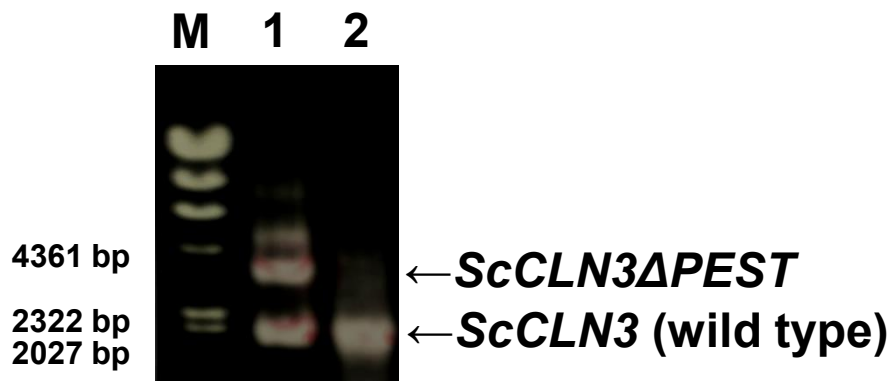


Fig. 3-4 *ScCLN3ΔPEST*株確認 PCR 電気泳動結果

M : marker

Lane 1 : W34/70 *ScCLN3ΔPEST*

Lane 2 : W34/70

遺伝子サイズ

CLN3ΔPEST : 2,615 bp

CLN3 : 1,892 bp

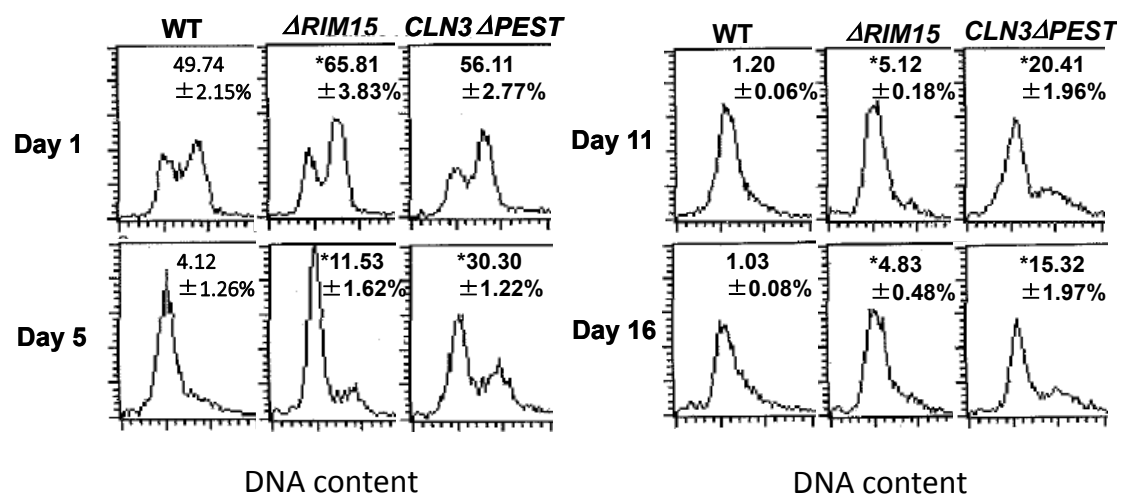


Fig. 3-5 高マルトース合成培地発酵試験細胞周期解析結果 (N=3) (*t* test, * *p* < 0.05)

WT : W34/70

$\Delta RIM15$: W34/70 $\Delta RIM15$

$CLN3\Delta PEST$: W34/70 $CLN3\Delta PEST$

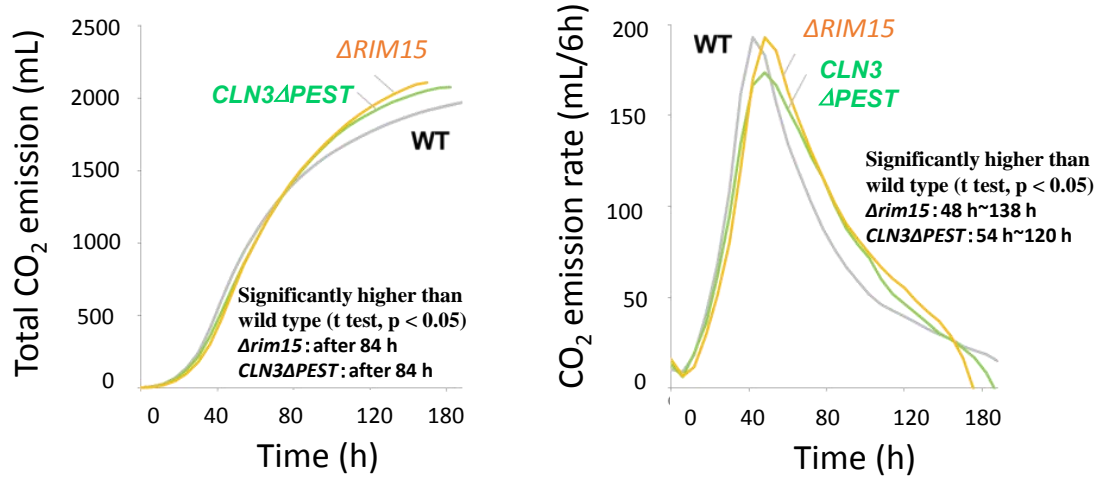


Fig. 3-6 高マルトース合成培地発酵試験 CO₂量測定結果 (N = 3)
 左図：CO₂ 総排出量、右図：6時間あたりのCO₂ 排出量
 WT：W34/70
 $\Delta RIM15$ ：W34/70 $\Delta RIM15$
 $CLN3\Delta PEST$ ：W34/70 $CLN3\Delta PEST$

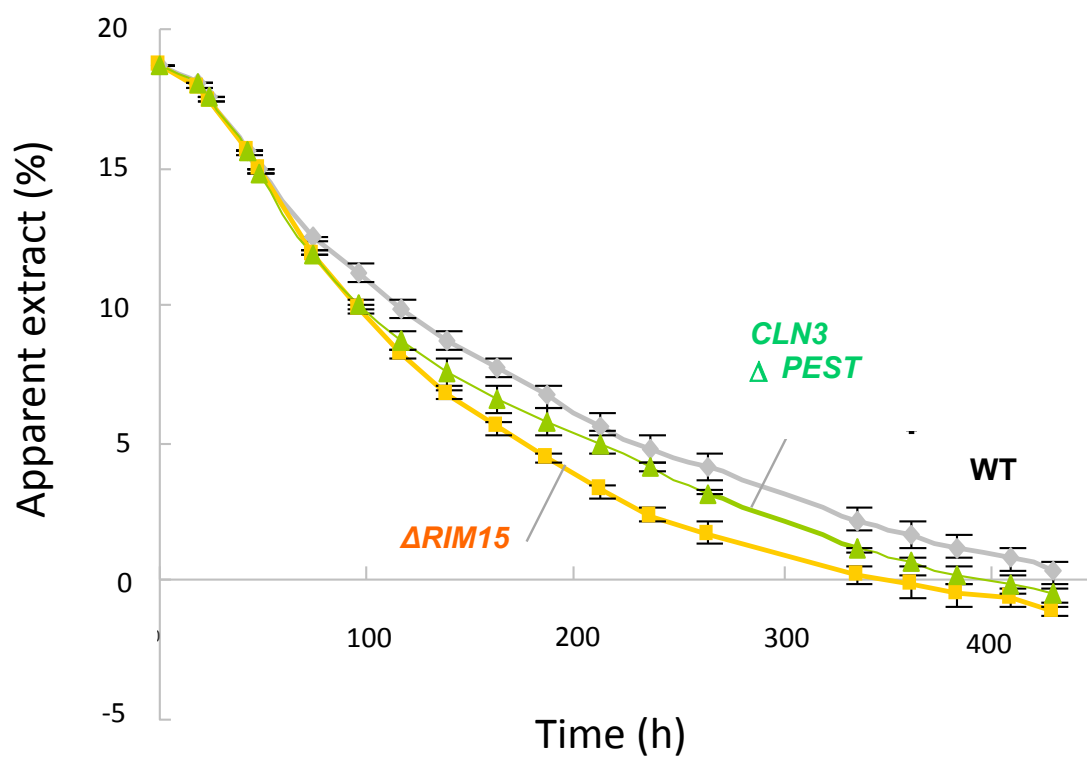


Fig. 3-7 高マルトース合成培地発酵試験 外観エキス測定結果 (N = 3)

WT : W34/70

$\Delta RIM15$: W34/70 $\Delta RIM15$

$CLN3 \Delta PEST$: W34/70 $CLN3 \Delta PEST$

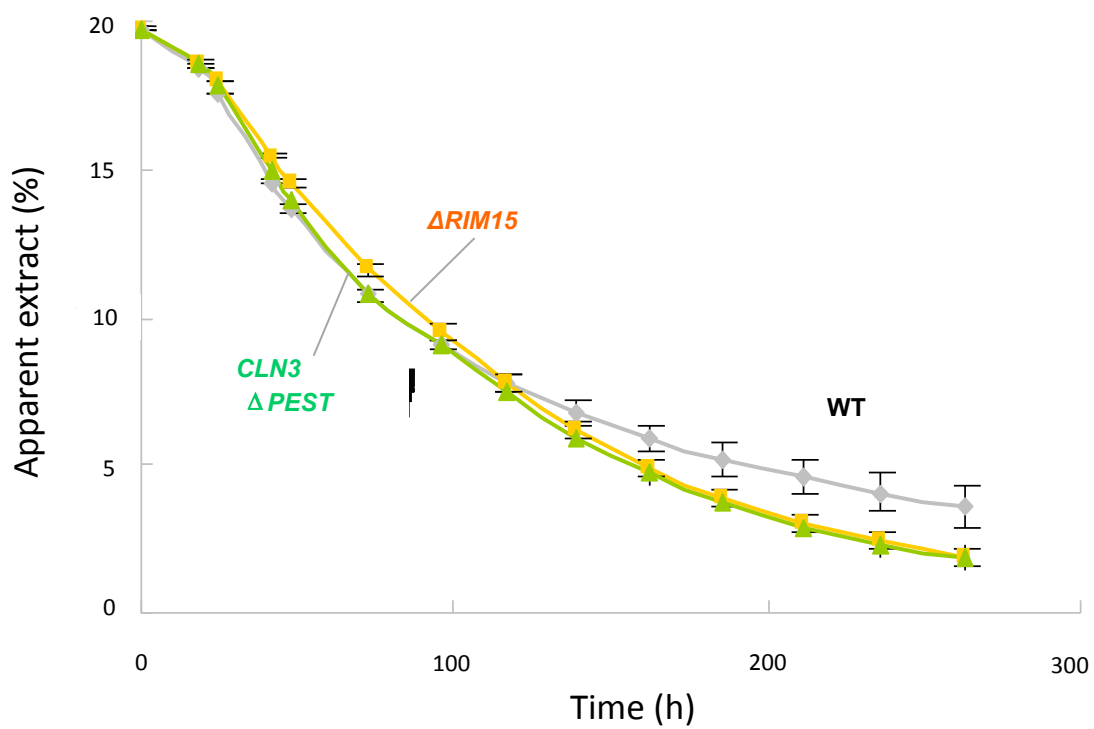


Fig. 3-8 高濃度麦汁発酵試験 外観エキス測定結果 (N = 3)

WT : W34/70

$\Delta RIM15$: W34/70 $\Delta RIM15$

$CLN3 \Delta PEST$: W34/70 $CLN3 \Delta PEST$

第4章

高発酵寄与因子を
ターゲットとした

高発酵ビール酵母の育種技術開発

4.1 緒言

第 3 章にて、遺伝子組換えにより休止期移行欠損を示すよう改変を行うことで高濃度醸造下での下面発酵ビール酵母の発酵性の向上に成功しているが、日本市場において遺伝子組換え体酵母の使用は倫理的ハードルが高く、遺伝子組換え技術によらず育種することが好ましい。本研究ではまず、高濃度醸造における重要な代謝経路を同定するために、下面発酵ビール酵母を用いて高濃度醸造下で発酵中に高蓄積された代謝産物を調べた。発酵中に *S*-アデノシルメチオニン (SAM) の酵母菌体内蓄積量が増加していること、またアルコール 20% (v/v) 程度まで生成可能な清酒酵母が SAM を高蓄積すること⁷⁰⁻⁷³、および解糖系調節に SAM が関与しているという知見⁷⁴に基づき、SAM に焦点を当てた。これまでの研究では、解糖および発酵の制御において、多数のメチル化反応のための主要なメチル供与体である SAM の関与を示唆している。セリン応答性 SAM 含有代謝酵素 (SESAME) 複合体による SAM 合成は、解糖系遺伝子 *PYK1* 発現を制御するヒストン H3 の修飾を媒介することが知られている⁷⁴。また下面発酵ビール酵母の近縁種である *S. cerevisiae* において SAM は、相同性の高い SAM 合成酵素 Sam1 タンパク質および Sam2 タンパク質によってメチオニンおよび ATP から合成される (Fig. 4-1)⁷⁵。SAM ホメオスタシスの制御メカニズムはまだ正確に解明されていないが、酵母菌体内への SAM 蓄積に関与するいくつかの遺伝子が同定されている。メチオニンの構造アナログであるエチオニンに対する耐性を獲得する遺伝子 (*ERCI*) は、SAM の蓄積に必要であることが報告されている^{73, 76}。また、アデノシンリン酸化の役割を持つアデノシンキナーゼ活性が欠損した実験室酵母 *S. cerevisiae* の *ADO1* 遺伝子破壊株は酵母菌体内に SAM を高蓄積することが明らかとなっている^{77, 78}。本研究では、麦汁中への SAM 添加もしくは実験室酵母 *S. cerevisiae* における *ADO1* 遺伝子欠損が高濃度醸造下で発酵に与える影響を評価した。また、*ADO1* 欠損 (*ado1Δ*) 細胞は、毒性アデノシン類似体コルディセピンに対する高い耐性を示し、酵母菌

体内への SAM レベルを増加させることが知られている³⁶。本章では、下面発酵ビール酵母より遺伝子組換えを行わずにコルディセピン耐性を持つ株を取得し、その発酵挙動を評価した。高濃度醸造下における酵母菌体内 SAM 蓄積と下面発酵ビール酵母の発酵性との関連、および遺伝子組換えによらない酵母菌体内 SAM 高蓄積株の取得とその発酵性を評価した結果について報告する。

4.2 実験方法

4.2.1 菌株、プラスミド

実験室酵母 BY4741 および BY4741 *ado1Δ::kanMX* 株は Euroscarf より購入した。下面発酵ビール酵母 W34/70 株は当社の酵母コレクションに保存されている菌株を用い、W34/70 *CLN3ΔPEST* 株は第3章にて作製した株を用いた (Table 4-1)。

4.2.2 培養条件

実験室酵母菌株の培養は特筆しない限り YPD 培地 (1% yeast extract, 2% Bactopectone [Difco, Sparks, MD, USA], 2% glucose) を用いて、25°Cで行った。下面発酵ビール酵母の培養は特筆しない限り YPM 培地 (1% yeast extract, 2% Bactopectone [Difco, Sparks, MD, USA], 2% maltose [ナカライテスク]) を用いて、25°Cで行った。寒天培地の場合には 2% 寒天 (Agar [Difco, Sparks, MD, USA]) を添加した。

4.2.3 プライマー

本研究で用いたプライマーを Table 4-2 に示した。

4.2.4 発酵試験

① 50 mL スケール発酵試験

寒天培地上の酵母を 2 mL の 20%マルトースまたはグルコース合成培地 (0.67% yeast nitrogen base without amino acids (Difco) , 1% yeast extract (Difco) , and 20% maltose or glucose) に接種して 25°C、2-3 日間振とう培養を行った。前培養液を遠心により上清を除去して酵母を回収後、 1.5×10^7 cells/mL となるよう同合成培地 5 mL に添加して 15°C (または 25°C、35°C)、12 日間の振とう条件で本発酵を行った。

② 1-L スケール発酵試験

寒天培地上の酵母を 10 mL の YPD 培地に接種して 90 rpm 振とう条件で 25°C、1 日間前培養を行った。前培養液を YPD 培地 100 mL に添加して 90 rpm 振とう条件で 25°C、3 日間前培養を行った。得られた培養液をエアレーションした YPD 培地 500 mL に添加して振とうせずに 15°C、7 日間の条件で前発酵を行った。前発酵液を遠心により上清を除去して酵母を回収後、 2.0×10^7 cells/mL となるよう 20% グルコース合成培地 (1% yeast extract, 2% Bactopeptone [Difco, Sparks, MD, USA], 20% glucose) 1-L に添加して本発酵を開始し、振とうせずに 15°C、14 日間の条件で本発酵を行った。

③ 5-L スケール発酵試験

寒天培地上の酵母を 100 mL の原麦汁エキス 12.5%の麦汁に接種して 90 rpm 振とう条件で 25°C、1 日間前培養を行った。前培養液を同麦汁 500 mL に添加して 90 rpm 振とう条件で 25°C、3 日間前培養を行った。得られた培養液をエアレーションした同麦汁 2-L に添加して振とうせずに 15°C、7 日間の条件で前発酵を行った。前発酵液を遠心により上清を除去して酵母を回収後、 2.0×10^7 cells/mL となるよう 4-L の 20% マルトース合成培地 (1% yeast extract, 2% Bactopeptone [Difco, Sparks, MD, USA], 20% maltose)、または 4-L のエアレーションした原麦汁エキス 20%の麦汁 (原麦汁エキス 12.5%の麦汁にマルトースを添加して原麦汁エキス 20%となるよう調整) に *S*-アデノシルメチオニンを各 0, 0.1, 1 mM 添加したものに添加して本発酵を開始し、振とうせずに 13°C、14 日間の条件で本発酵を行った。

4.2.5 酵母菌体内代謝産物の網羅解析

4.2.4 「発酵試験」③「5-L スケール発酵試験」に示した通り 20%マルトース合成培地に発酵試験を行い、発酵 3 日目および 14 日目の酵母菌体 5×10^8 cells を回収した。10 mL

の MilliQ 水 (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) で 2 回洗浄した後、菌体を 1.6 ml のメタノールに懸濁して Branson 2510 ultrasonic cleaner (Yamato Scientific Co. Ltd., Tokyo, Japan) を用いて 30 秒間超音波破碎を行った。超音波破碎後の懸濁液に 1.1 mL の 5 μ M の内部標準液を加えて遠心した。得られた上清 350 μ L \times 4 を UltrafreeMC-PLHCC centrifugal filter units (Millipore) にアプライした。得られたろ液を乾燥後、50 μ L の MilliQ に再懸濁した。網羅解析には Agilent CE-TOFMS system (Agilent Technologies) を用いた。データ解析は MasterHands software ver. 2.16.0.15 (Human Metabolism Technologies) を用いて行った。全ての解析は Human Metabolism Technologies 社に依頼した。

4.2.6 酵母菌体内 *S*-アデノシルメチオニン含量測定

1 g の酵母を PBS 溶液にて 2 回洗浄後、菌体を遠心により回収し、湿重量 50 mg の酵母を 10 mL の 10% 過塩素酸に懸濁して 25°C、1 時間インキュベートした。懸濁液を遠心後、得られた上清 5 mL に 7 mL の 1% NaOH 水溶液と 8 mL の蒸留水を添加した。得られたサンプルを Alliance HPLC system (Waters Corporation, Milford, MA, USA) を用いて分析を行った。カラムは Gemini C18 column (Phenomenex Inc., Torrance, CA, USA, 5 μ m, 150 \times 4.6 mm) を使い、移動相は 50 mM のリン酸二水素アンモニウム、5 mM の 1-ヘキサンスルホン酸ナトリウム、4% のアセトニトリルを用いた。254 nm の UV で検出した。

4.2.7 化学突然変異導入によるコルディセピン耐性下面発酵ビール酵母取得

YPD 寒天培地上の W34/70 株を 2 ml の YPD 液体培地に播種し、25°C、90 rpm で一晩前培養を行った。YPD 100 mL へ前培養液 50 μ L を植え継ぎ、25°C、90 rpm で一晩培養を行った後、培養液を 10 mL ずつ 4 本の 50 mL 遠沈管に分注した。遠心して上清を除去、滅菌水で洗浄した後、0.1 mM リン酸ナトリウム溶液 (pH 7.0) を 2 mL 添加して VORTEX で懸濁した。懸濁液に 5% エチルメタンサルホン酸 (ethyl methanesulfonate; EMS) 100 μ L を添加して VORTEX で懸濁した。懸濁液を 25°C、200 rpm、60 分の条件で振とうし、5%

チオ硫酸ナトリウム 2 mL を添加して VORTEX にて懸濁した。懸濁液を遠心、上清を除去し、2 mL の滅菌水で 2 度洗浄した後、再度 2 mL の滅菌水に懸濁した。懸濁液を SD 寒天培地 (0.17% Yeast Nitrogen Base (w/o amino acids, w/o ammonium sulfate, w/o thiamine) + 0.5% ammonium sulfate + 2% glucose + 2% Agar + 25 µg/ml cordycepin) に播種して 25°C、5 日間培養し、コルディセピン耐性を指標として単離した。

4.2.8 コルディセピン含有培地スポットアッセイ試験

4.2.7「EMS 変異導入によるコルディセピン耐性下面発酵ビール酵母の取得」により得た株を YPD 液体培地 1 ml に植菌し、25°C、90 rpm の条件で一晩前培養を行った。前培養液 40 µl を YPD 液体培地 2 ml に植菌して 25°C、90 rpm の条件で 4 時間培養を行い、酵母が対数増殖期にあることを確認した。培養した培養液を遠心 (3,000 rpm、5 分) して上清を除去し、滅菌水で菌体を洗浄した。次いで、 1×10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 cells/ml となるよう滅菌水を用いて酵母懸濁液を調製した後、SD 寒天培地 (0.17% Yeast Nitrogen Base (w/o amino acids, w/o ammonium sulfate, w/o thiamine) + 0.5% ammonium sulfate + 2% glucose + 2% Agar + 25 µg/ml cordycepin) に各濃度の酵母懸濁液を 5 µl ずつスポットして 25°C で 5 日間培養した。コントロールとしてコルディセピンを添加していない寒天培地を用いた。

4.2.9 定量 PCR による遺伝子発現解析

4.2.4 「発酵試験」①「50 mL スケール発酵試験」での酵母を回収し、RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて total RNA の抽出を行った。total RNA の定量は BioSpec Nano spectrophotometer (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) を用いて行った。cDNA 合成は 1 µg の total RNA より High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Foster City, CA, USA) を用いて行った。cDNA 2 µL、0.1 µM プライマー、Power SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems)

の 12.5 μ L PCR Master Mix (2 \times) を用いて PCR 反応を行った。リアルタイム PCR に用いたプライマーの配列を Table 4-2 に示した。リアルタイム PCR 用検出装置は LightCycler 96 System (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) を用いた。内部標準遺伝子として悪珍をコードする *ACT1* 遺伝子を用いた⁷⁹。PCR 反応は以下の条件にて行った。

42°C 5分

95°C 10秒

95°C 5秒	} 40 cycle
60°C 34秒	

95°C 15秒

60°C 1分

95°C 15秒

4.3 実験結果

4.3.1 発酵中酵母菌体内代謝産物の網羅解析

高濃度醸造下における下面発酵ビール酵母の発酵性に寄与する代謝産物の同定を目的とし、高濃度麦汁を模した高マルトース（20%）合成培地での発酵中の酵母菌体内代謝産物の網羅解析を実施した。第2章での研究にて、細胞周期関連遺伝子に改変を行った株はアルコール発酵の後期にて特に発酵速度に差が見られたため、主要な代謝産物がアルコール発酵進行に伴い蓄積すると仮定して解析を行った。Fig. 4-2 に各代謝成分について発酵速度が最大となる発酵3日目と発酵終了14日目を比較した酵母菌体内蓄積量の割合を示した。発酵中に蓄積された割合の多い上位5種の代謝産物（コリン、アミノ酪酸（GABA）、SAM、b-ヒドロキシ酪酸（BHBA）、オルニチン）のうち、SAMのみが下面発酵ビール酵母のモデル酵母である親株 W34/70 株よりも第2章にて発酵速度の向上が見られた W34/70 *CLN3* Δ *PEST* 変異導入株においてより高い酵母菌体内蓄積率を示した。本結果を踏まえ、以降は SAM に着目して各実験を行った。

4.3.2 S-アデノシルメチオニン添加による下面発酵ビール酵母発酵挙動評価

高濃度醸造下における SAM の効果を評価するため、高マルトース（20%）合成培地または高濃度麦汁に SAM を添加した発酵試験を行った。小スケール（50 mL）発酵試験において、高マルトース合成培地への 0.1 mM および 1.0 mM 濃度の SAM の添加により、W34/70 株のアルコール発酵中の CO₂ 排出量が増加することを確認した（Fig. 4-3 A）。CO₂ 排出量は発酵の初期段階ではほとんど同じであったが、発酵後期にて差が大きくなった。SAM 添加による大きな差は見られなかった。一方、SAM 代謝経路の中間体であるメチオニンまたはアデノシンの添加では発酵速度に差は見られなかった（Fig. 4-3 B, C）。

同様に、高濃度麦汁に 0.1 mM または 1.0 mM 濃度の SAM を添加した 5-L スケールの発酵試験では、外観エキスの速い減少により判断されるように、SAM を添加した試験区では

発酵速度が向上することを確認した。試験終了時の SAM 無添加、0.1 mM、1.0 mM 添加での外観エキスは、それぞれ $3.96 \pm 0.09\%$ 、 $3.23 \pm 0.04\%$ および $2.38 \pm 0.04\%$ であった (Fig. 4-4 A)。また、5-L スケール高濃度麦汁発酵試験における発酵開始時と発酵終了時の酵母菌体内 SAM 含量は、麦汁中への 0.1 mM と 1.0 mM 濃度の SAM 添加によってそれぞれ SAM 無添加時よりも 67%、90% 程度増加していることを確認した (Fig. 4-4 B)。

4.3.3 実験室酵母 *ADO1* 遺伝子破壊株の発酵挙動評価

下面発酵ビール酵母の近縁種である実験室酵母 (*S. cerevisiae*) において、アデノシンキナーゼ Ado1 タンパク質機能欠損は酵母菌体内 SAM 含量を増加させることが知られている^{77, 78}。高濃度醸造における *ADO1* 遺伝子破壊株の発酵への影響を調査するため、実験室酵母 BY4741 株の *ADO1* 遺伝子破壊株を用いて高グルコース (20%) 合成培地を用いた発酵試験を実施した。炭素源としてグルコースを用いたのは、実験室酵母 BY4741 株がマルトースを資化出来ないためである。ビール醸造での一般的な発酵温度である 15°C での小スケール (50 mL) 発酵試験において、*ADO1* 遺伝子破壊株は親株よりも高い CO₂ 排出量を示した (Fig. 4-5 A)。一方、発酵温度を 15°C より上昇させた際には、発酵速度に有意な差は見られなかった (Fig. 4-5 B, C)。

同様に 1-L スケールの条件で発酵試験を実施し、1 日おきに外観エキスを測定した結果、*ADO1* 遺伝子破壊株の外観エキス消費は親株よりも速く、発酵速度が向上していることを確認した。試験終了時の外観エキスは、親株と *ADO1* 遺伝子破壊株でそれぞれ $4.47 \pm 0.04\%$ 、 $2.14 \pm 0.05\%$ であった (Fig. 4-6 A)。またその際の発酵開始時と発酵終了時における酵母菌体内 SAM 含量は、親株よりも 10 倍程度増加していることを確認した (Fig. 4-6 B)。

4.3.4 コルディセピン耐性下面発酵ビール酵母の取得

遺伝子組換え手法を用いずに、酵母菌体内に SAM を高蓄積する下面発酵ビール酵母を取得するため、アデノシンのアナログであるコルディセピンに着目した。コルディセピンに耐

性を持つ *S. cerevisiae* は SAM を菌体内に高蓄積することが知られている³⁶。DNA 塩基配列の主に G→A の点変異を誘発することで知られるアルキル化剤 EMS80 により W34/70 株に変異を導入し、コルディセピン耐性株として CRHF 株を取得した。コルディセピン含有培地へのスポットアッセイにおいて、親株は生育出来ないのに対して CRHF 株は生育しており、CRHF 株がコルディセピン耐性を持つことを確認した (Fig. 4-7)。

4.3.5 コルディセピン耐性下面発酵ビール酵母の発酵挙動評価

コルディセピンに耐性を示す下面発酵ビール酵母 CRHF 株の発酵特性を評価するため、高マルトース (20%) 合成培地を用いて小スケール (50 mL) 発酵試験を行った。CRHF 株のアルコール発酵中の CO₂ 排出量は発酵後期において親株と比較して増加した (Fig. 4-8)。また、発酵中の *ScADO1* 遺伝子および *SeADO1* 遺伝子の発現解析を実施した結果、*ScADO1* 遺伝子の発現レベルは親株と CRHF 株間で差が見られなかったのに対し、*SeADO1* 遺伝子の発現レベルは親株より優位に低かった (Fig. 4-9)。

同様に、高濃度麦汁を用いた 5-L スケールの発酵試験では、外観エキスの速い減少により判断されるように、CRHF 株の発酵速度の向上が確認された。試験終了時の外観エキスは、親株と CRHF 株それぞれ $3.24 \pm 0.3\%$ 、 $1.42 \pm 0.1\%$ であった (Fig. 4-10 A)。また、5-L スケール高濃度麦汁発酵試験における発酵開始時と発酵終了 14 時の酵母菌体内 SAM 含量は、親株よりも約 75% 高いことを確認した (Fig. 4-10 B)。

4.4 考察

本研究では、ビール酵母の発酵中の代謝産物網羅解析に基づき、高濃度醸造下において SAM の酵母菌体内への高蓄積が下面発酵ビール酵母の発酵性に寄与することを明らかとした。SAM はモデル下面発酵ビール酵母である W34/70 株でアルコール発酵中に蓄積し、また、より高い発酵力を示す *CLN3* 遺伝子における PEST-rich 配列破壊によりさらに高蓄積した (Fig. 4-2)。SAM はメチオニンと ATP から合成されることが知られており⁷²、SAM の酵母菌体内への高蓄積は解糖促進による過剰な ATP により引き起こされる可能性が考えられる。一方、本研究のデータにより SAM 自体が高濃度醸造においてアルコール発酵を強化する効果があることが示唆された。SAM の添加、*ADO1* 遺伝子欠損、またはコルディセピン耐性の付与は発酵速度の向上および酵母菌体内への SAM 蓄積量の増加をもたらした (Fig. 4-4, Fig. 4-5)。SAM 添加試験において、0.1 mM と 1.0 mM の添加では発酵速度向上効果に大きな差異がなかったこと、また酵母菌体内の SAM 含量が 10 倍とはなっていたことから、SAM の外からの取り込みによる酵母菌体内への SAM 蓄積には限界があると考えられる。また、15°C において *ADO1* 遺伝子破壊株の発酵速度が有意に上昇し、それ以上の温度では差が見られなかったという知見は (Fig. 4-5)、SAM が低温下でのアルコール発酵に大きく寄与することを示唆しており、SAM の酵母菌体内への高蓄積は低温で発酵させる下面発酵ビール酵母を用いたビール醸造に特に適している可能性が考えられる。いずれにせよ本研究の結果は、SAM 産生およびアルコール発酵は正のフィードバック調節因子として互いに増強し得ることを示唆し、そのため酵母菌体内 SAM 蓄積のモニタリングは酵母発酵活性状態を把握する一つの有効手段となり得ると考えられる。

また本研究では、コルディセピン耐性に基づくスクリーニングが高発酵性を有する下面発酵ビール酵母の選抜に適用可能であることを示した。コルディセピンは、アデノシンの 3' 位からヒドロキシル基が失われた構造を持つ。RNA 合成の際、*ADO1* 遺伝子がコードする

アデノシンキナーゼにより触媒されアデノシンより合成される AMP が利用されるが、コルディセピン存在下ではコルディセピンがアデノシンキナーゼによりコルディセピン 5'- リン酸となり、誤って RNA 合成に使用される。その際、コルディセピン 5'- リン酸は 3' 位のヒドロキシル基を欠損しているため塩基鎖を伸長できず、RNA の合成が阻害されるため酵母の生育を阻害する⁷⁷。一方、*ADO1* 遺伝子を破壊するとその経路は働かず、酵母が生育可能となり結果としてコルディセピン耐性を示すと考えられる。*ADO1* 遺伝子破壊による酵母菌体内 SAM 高蓄積の機構は明らかとなっていないが、以下の仮説が唱えられている。*ADO1* 遺伝子欠損によりアデノシンが蓄積されるため細胞外へ放出されるとともに、*SAH1* 遺伝子の発現が上昇してホモシステイン蓄積量が上昇する。結果、*MET6* 遺伝子の発現が上昇してメチオニン蓄積量が上昇する。メチオニンの過剰な蓄積を解消するために *SAM2* 遺伝子の発現が向上、SAM が合成され蓄積量が上昇する (Fig. 4-1)⁷⁸。本研究で取得したコルディセピン耐性株 (CRHF 株) は、高濃度醸造下において親株よりも高い発酵力を示し、また発酵終了時の酵母菌体内 SAM 蓄積量は親株よりも高かった (Fig. 4-10)。本結果も、SAM の酵母菌体内への高蓄積が高濃度醸造下において酵母のアルコール発酵性向上に効果があることを示唆している。Ado1 タンパク質機能欠損を示すコルディセピン耐性と同様に、*ERC1* 遺伝子機能を有する株を選択可能なエチオニン耐性株についても *S. cerevisiae* において酵母菌体内への SAM 高蓄積が報告されており^{73,76}、下面発酵ビール酵母のエチオニン耐性株での効果についても今後検討する必要がある。

序章で述べた通り、下面発酵ビール酵母 *S. pastorianus* は *S. cerevisiae* と *S. eubayanus* との交雑体であり¹⁵、*Sc* 型の *ADO1* 遺伝子および *Se* 型の *ADO1* 遺伝子を複数コピー保有している。モデル下面発酵ビール酵母 W34/70 株の *ScADO1* 遺伝子破壊株を作製したが、本株では発酵速度の向上は見られなかった (データは示していない)。一方、*SeADO1* 遺伝子破壊も試みており、1 コピー破壊には成功したが、完全な破壊株の作製は成功しなかった。このことは、下面発酵ビール酵母において *SeADO1* 遺伝子産物がアデノシンキナーゼとし

て主に機能しており、細胞生育に必須である可能性を示唆している。W34/70 株および CRHF 株を用いた遺伝子発現解析において、*SeADO1* 遺伝子の発現は CRHF 株にて特異的に損なわれていたが、*SeADO1* 遺伝子発現レベルは両株間で差異がなかった (Fig. 4-9)。本結果も *SeADO1* 遺伝子産物が機能的であることを示唆している。

酵母菌体内への SAM の蓄積が発酵速度にどのように影響するかは今後のさらなる研究が必要である。近年の研究にて、SAM 合成酵素 Sam1 タンパク質および Sam2 タンパク質を含む SESAME 代謝酵素複合体が、ヒストン H3Lys4 (H3K4me3) のトリメチル化を介してピルビン酸キナーゼ遺伝子 *PYK1* の転写を調節することが報告されている⁷⁴。Pyk1 タンパク質はホスホエノールピルビン酸のピルビン酸への不可逆変換を触媒し、解糖系において調節的役割を果たしている⁸¹。さらに、SEAME 複合体活性は解糖系酵素および代謝産物の制御下にある。これらの知見は SAM の酵母菌体内への高蓄積が解糖経路の活性を高めるといふ仮説を支持すると考えられる。

4.5 結言

本章では、高濃度醸造下における下面発酵ビール酵母の発酵性に寄与する因子の解明、および遺伝子組換えによらない高発酵性酵母の育種技術の開発を目的として研究を行った。ここでは、下面発酵ビール酵母の発酵代謝産物に焦点を当て、高濃度醸造下で発酵中に酵母菌体内への蓄積が見られた SAM に着目した。

まず、高濃度麦汁中への SAM の添加や SAM を酵母菌体内に高蓄積することで知られる *ADO1* 遺伝子破壊が発酵速度を向上させる効果があることを明らかとした。さらに、SAM を高蓄積することで知られる薬剤コルディセピンに耐性を示す株をモデル下面発酵ビール酵母より取得し、当株が親株よりも高濃度醸造下で発酵速度が速いことを示した。また、その際の発酵終了時の酵母菌体内 SAM 含量はコルディセピン耐性株で親株よりも上昇していることを確認した。以上、本章では、高濃度醸造下における下面発酵ビール酵母の発酵性に酵母菌体内への SAM の蓄積が関与していることを見出した。また本知見を活用して、遺伝子組換え技術に寄らない、コルディセピンを指標とした高発酵力を持つ下面発酵ビール酵母の新規育種技術を開発した。

これまでに SAM が発酵に影響するという報告はなく、本研究をもとに解糖およびアルコール発酵調節の新規メカニズム解明への貢献が望まれる。また、本研究で得られた知見は、効率的な高濃度醸造のための SAM を指標とした発酵制御技術、酵母育種技術の発展に寄与し得る。

Table 4-1 酵母菌株

菌株名	種	分譲元
Weihenstephan 34/70	<i>S. pastorianus</i>	当社ストック
Weihenstephan 34/70 <i>CLN3ΔPEST</i>	<i>S. pastorianus</i>	当社ストック(第 3 章で作製)
BY4741	<i>S. cerevisiae</i>	Euroscarf
BY4741 <i>ado1 Δ:kanMX</i>	<i>S. cerevisiae</i>	Euroscarf

Table 4-2 プライマー

NAME	SEQUENCE
① Sc ADO1-RT-F	5'-CCA GCA CAT ATC CAG TCA AAC C-3'
② Sc ADO1-RT-R	5'-TCC AAA TCT TCA CCT TTA GTC AAC C-3'
③ Se ADO1-RT-F	5'-CCC AAG GAA AGG ACT TGG AAA C-3'
④ Se ADO1-RT-R	5'-TTT TGG GAG GGG TAA GAA GGA-3'
⑤ ACT1-RT-F	5'-GGT TGC TGC TTT GGT TAT TGA-3'
⑥ ACT1-RT-R	5'- TTT TGA CCC ATA CCG ACC AT-3'

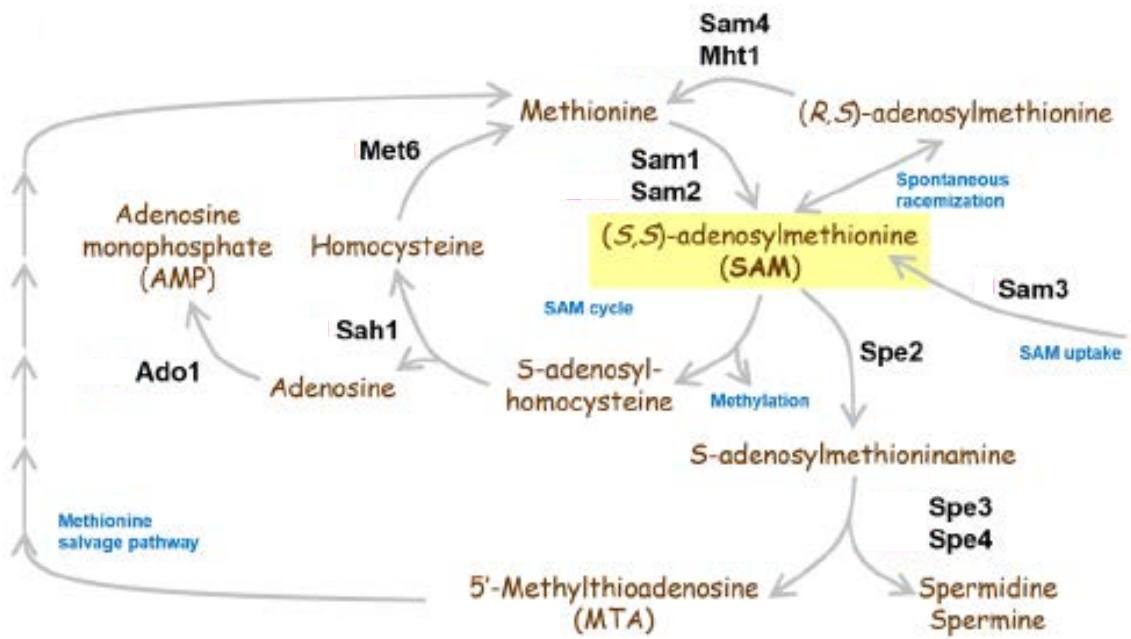


Fig. 4-1 SAM 合成・代謝経路

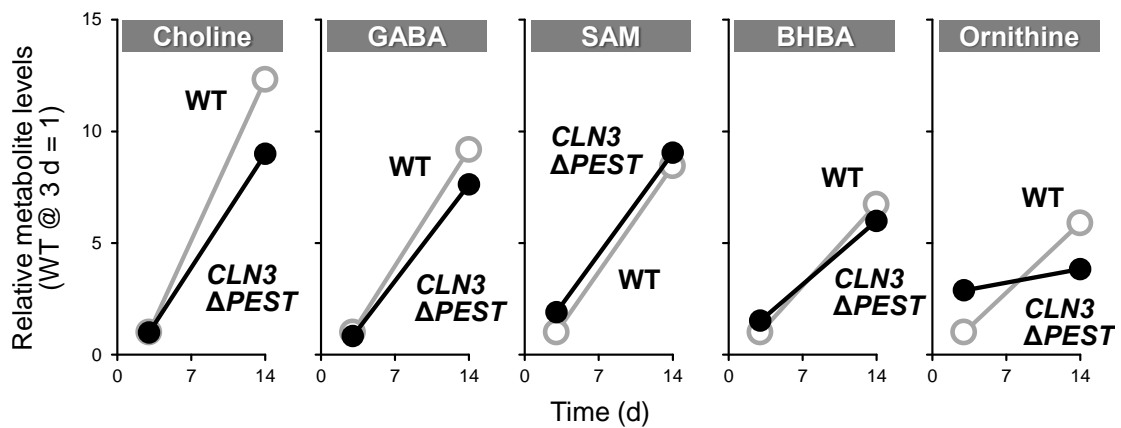


Fig. 4-2 酵母菌体内代謝産物網羅解析

発酵3日目（発酵が最も旺盛）を1としたときの発酵14日目（発酵終了）時の割合
 発酵中に蓄積した代謝産物のうち、3日目から14日目の変化量の大きい5成分を示した

WT : W34/70

CLN3 Δ PEST : W34/70 CLN3 Δ PEST

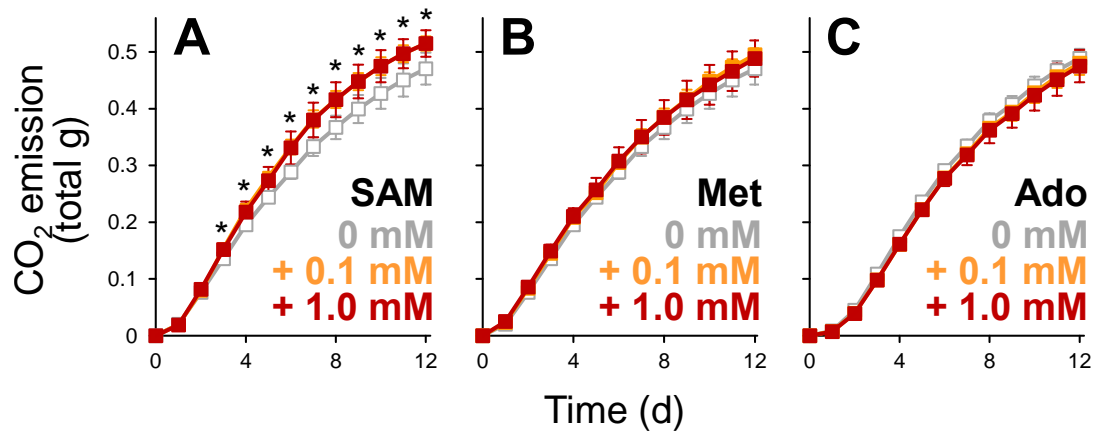


Fig. 4-3 SAM 代謝周辺物質添加試験 CO₂ 量測定結果 (N = 3) (*t* test, * *p* < 0.05)

A : SAM 添加、B : Methionine 添加、C : Adenosine 添加

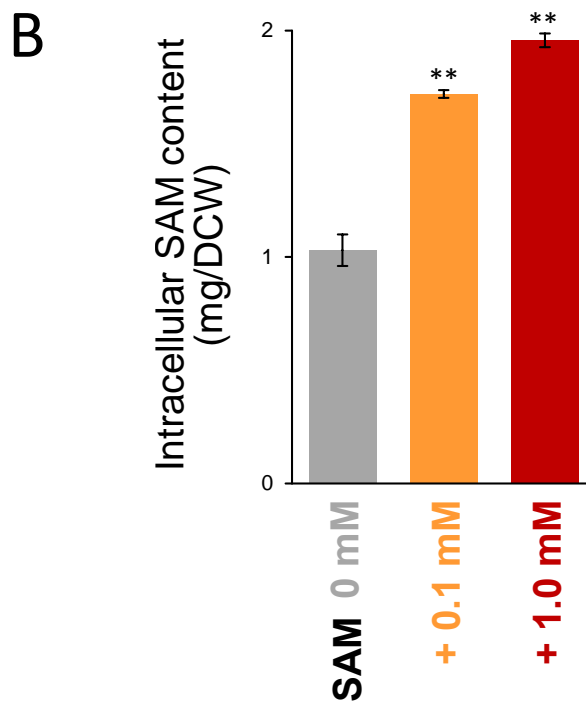
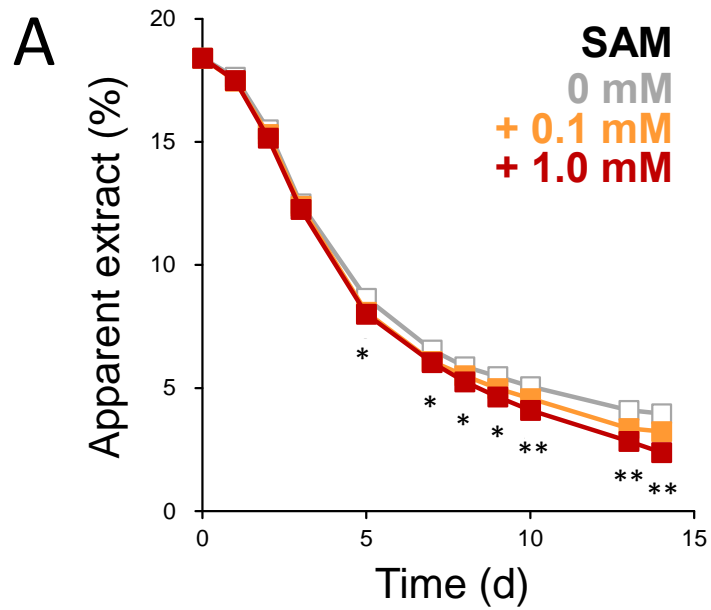


Fig. 4-4 SAM 添加 高濃度麦汁発酵試験 (N = 3) (t test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

A : 外観エキス測定結果

B : 発酵初日と発酵終了時の酵母内 SAM 含量割合

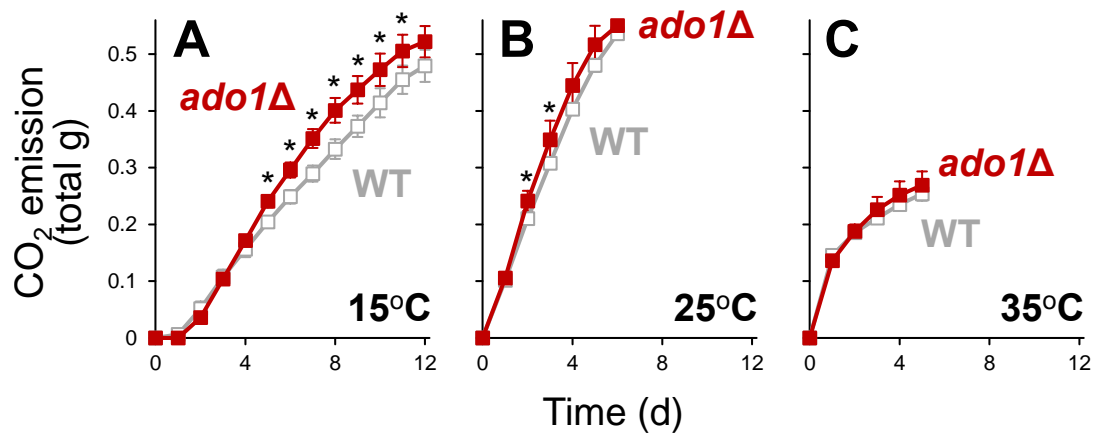


Fig. 4-5 *ADO1* 遺伝子破壊株発酵試験 CO₂ 量測定結果 (N = 3) (t test, * $p < 0.05$)

A : 発酵温度 15°C 一定、B : 発酵温度 25°C 一定、C : 発酵温度 35°C 一定

WT : BY4741

ado1Δ : BY4741 *ADO1* 遺伝子破壊株

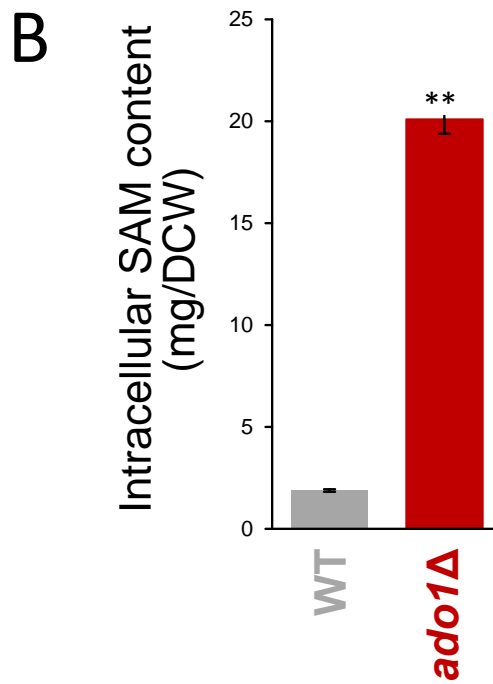
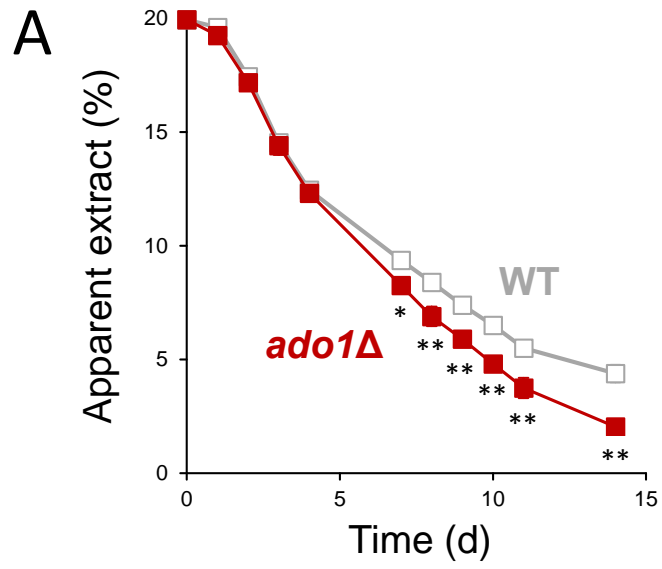


Fig. 4-6 *ADO1* 遺伝子破壊株 1-L スケール発酵試験 (*t* test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

A : 外観エキス測定結果

B : 発酵初日と発酵終了時の酵母内 SAM 含量割合

WT : BY4741

ado1Δ : BY4741 *ADO1* 遺伝子破壊株

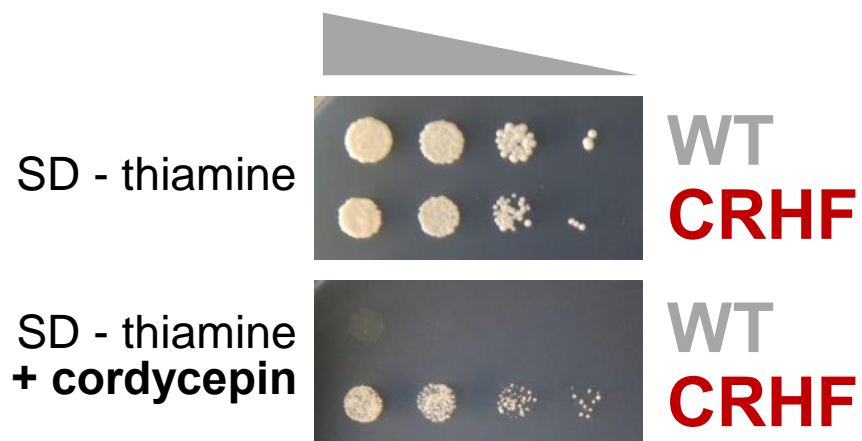


Fig. 4-7 コルディセピン耐性スポットアッセイ試験結果

WT : W34/70

CRHF : W34/70 コルディセピン耐性株

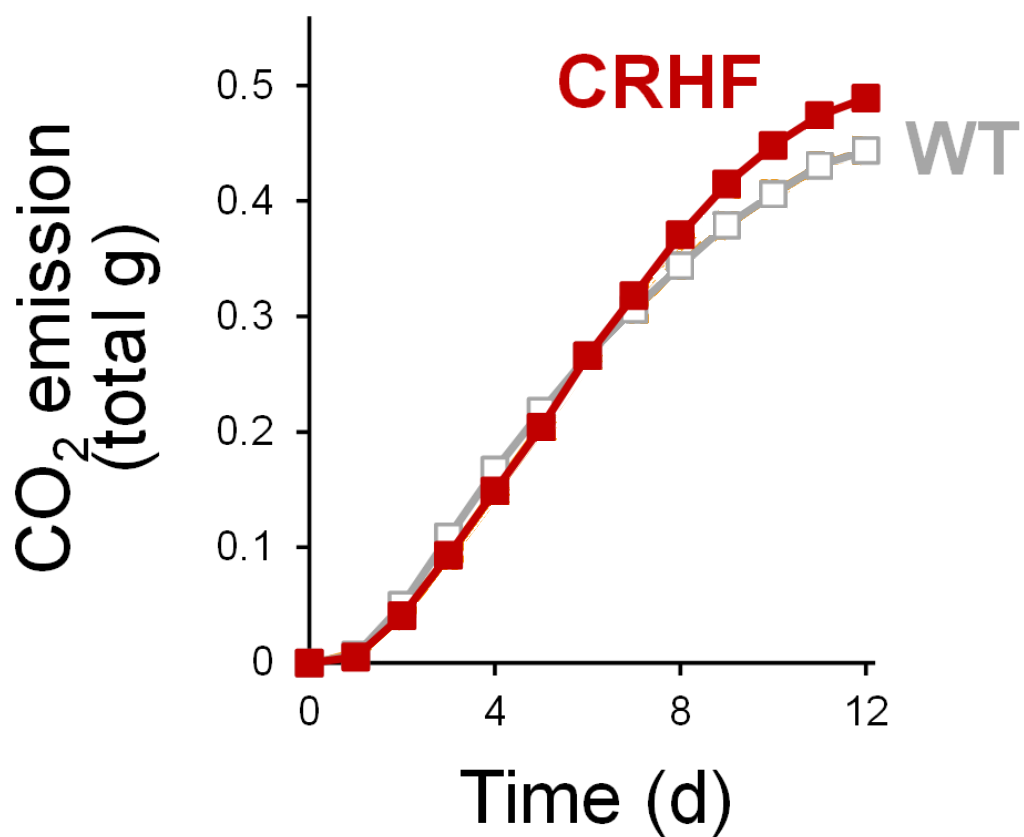


Fig. 4-8 コルディセピン耐性株小スケール発酵試験 CO₂量測定結果

WT : W34/70

CRHF : W34/70 コルディセピン耐性株

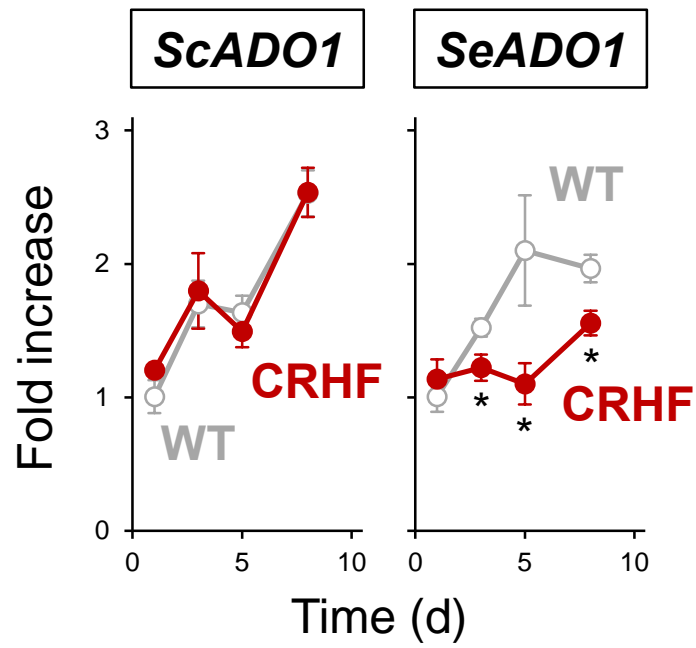


Fig. 4-9 コルディセピン耐性株小スケール発酵試験 *ADO1* 遺伝子発現解析結果
(*t* test, * $p < 0.05$)

W34/70 株の発酵初日の発現量を 1 としたときの発現量の比

WT : W34/70

CRHF : W34/70 コルディセピン耐性株

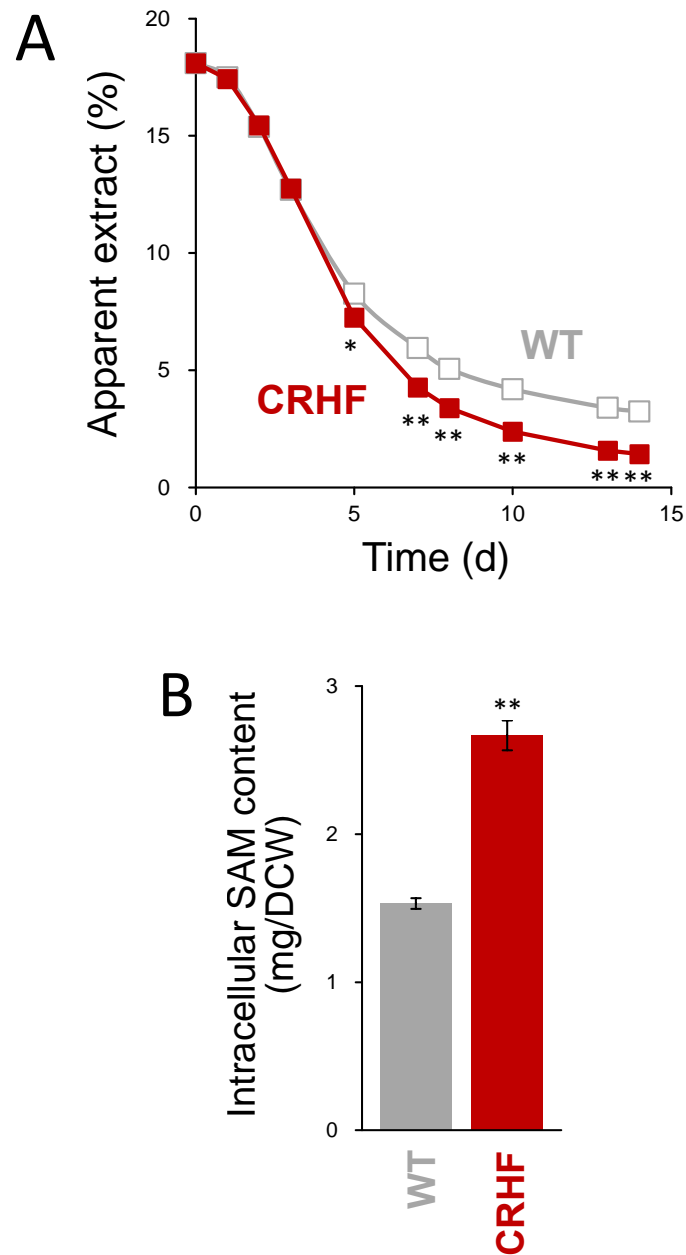


Fig. 4-10 コルディセピン耐性株 5-L スケール発酵試験

(N = 3) (*t* test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

A : 外観エキス測定結果

B : 発酵初日と発酵終了時の酵母内 SAM 含量割合

WT : W34/70

CRHF : W34/70 コルディセピン耐性株

第 5 章

結論

5. 結論

下面発酵ビール酵母が有する低温発酵能、凝集沈降能といった特性はビールづくりに適しており、ゆえに世界中で使用され、つくられたビールは人々に親しまれている。ラガータイプのビールが広まってくると、自然にまかせて発酵させるのではなく、発酵を制御して狙った品質のビールをつくるため下面発酵ビール酵母の特性を解明しようと試みる研究がなされるようになってきた。2000年に入って以降、下面発酵ビール酵母 *S. pastorianus* の分類が盛んに行われ、*S. cerevisiae* と *S. eubayanus* との交雑体であることが明らかとされた¹¹。当研究成果により、*S. cerevisiae* で解明されてきた特性とは異なった *S. pastorianus* 特有の性質の解明が飛躍的に進むと考えられる。一方、ビール酵母は麦汁中に含まれる糖やアミノ酸を資化してアルコールや炭酸ガス、その他種々の香味に寄与する成分を生成するため、ビール酵母の発酵性はビールの中味品質に大きな影響を与える。ビール酵母のアルコール発酵能はエタノール生産性^{82,83}、泡立ち⁸⁴、またビールの品質を左右する多くの香味成分の生成⁸⁵⁻⁸⁹に関与している他、醸造期間の短縮や製造効率にも影響する。例えば、ビール酵母の発酵力は糖の取り込みに影響し、取り込み残しはキレの良し悪しに関わる。また、製造効率向上のため近年実用化に向けて期待が寄せられる高濃度醸造条件においては、発酵初期の高浸透圧や発酵後期の高アルコールといったストレス環境が発酵を阻害する可能性がある。したがって発酵力の高い酵母の選択・使用が好ましいが、発酵は多数の代謝反応に関わる複雑な現象であり、また下面発酵ビール酵母は高次倍数体でその遺伝子等の機能も不明な部分が多く、発酵力向上の実現には至っていない。以上の背景をふまえ、本研究では下面発酵ビール酵母の発酵力の向上に焦点を当て、発酵性に寄与する因子の解明を目的とした。発酵性の向上に効果のある因子を抽出することで、そこをターゲットとした酵母の育種・選抜、また酵母発酵活性の判断指標として生産現場

等への展開が期待できる。本論文は、第2章「下面発酵ビール酵母における高発酵寄与遺伝子の解明」、第3章「下面発酵ビール酵母における高濃度醸造下での高発酵寄与因子の解明」、第4章「高発酵寄与因子をターゲットとした高発酵ビール酵母の育種技術開発」の3部から構成される。

第2章では、下面発酵ビール酵母の発酵性に寄与する遺伝子の解明を目的とし、当社が保有している、発酵速度が速く発酵後の糖の取り込み残しが少ない性質を有する酵母のゲノム解析を行った。当株ではグルコース取り込み、タンパク質合成、解糖系等、発酵促進に関わる遺伝子が座乗するいくつかの染色体のコピー数が倍加していることを明らかとした。違いがみられた染色体に座乗する遺伝子のうち、グルコース取り込みに関わる *SeYCK1* 遺伝子に着目した。*SeYCK1* 遺伝子を過剰発現させたモデル下面発酵ビール酵母について発酵力が向上することを確認し、高発酵力の一因であることを示した。以上により、*SeYCK1* 遺伝子のコピー数倍加による発酵力向上が、糖の取り込み残しを最小限にしてビール中の余分な後味を減らしてキレの良さを実現していることが示唆された。本研究では高発酵力という要素に加えて、日本市場における重要なビール特性の一つであるキレへの関与が示唆される遺伝子を抽出した。今後は、染色体の構造変化や遺伝子コピー数変化をモニタリングすることで、繰り返し発酵等が影響して不安定とされる下面発酵ビール酵母の遺伝学的特性の変化を観察することにより、発酵工程やさらにはビール品質安定化への取り組みへと展開していきたいと考えている。

一方近年では、高濃度醸造と呼ばれる、通常よりも糖分等のエキス分含量の高い麦汁中でも健全に発酵可能な、さらに高い発酵力を持つビール酵母が望まれている。第3章では、高濃度醸造下において下面発酵ビール酵母の発酵性に寄与する因子の抽出を目的に、発酵中にアルコール20% (v/v) 程度産生可能な清酒酵母に着目した。近年の研究により、清酒酵母の高い発酵力の一因が高浸透圧、高アルコールといった高ストレス条件下においても休止期に移行せず発酵を続けることであることが明らかとされている³¹⁻³⁵。本研

究ではモデル下面発酵ビール酵母を用いて清酒酵母と同様の休止期移行欠損を示す株を遺伝子工学的に作製し、作製株が高濃度醸造下において親株よりも発酵速度が向上していることを確認した。本結果により、細胞周期と下面発酵ビール酵母の発酵力との関連が明らかとされ、高濃度醸造実現へ向けて、ストレス環境下での酵母発酵の改善に寄与する重要な知見を与えた。本知見を活用し、発酵中の細胞周期状態を酵母発酵力の判断指標の一つとしたいと考えている。

第4章では、高濃度醸造下でも発酵可能な下面発酵ビール酵母を遺伝子組換え技術を用いずに育種することを目的として、発酵中の代謝産物に焦点を当てて発酵性に寄与する因子の抽出を行った。第3章にて作製した、高発酵性を示す休止期移行欠損株における高濃度醸造下での発酵時の代謝産物について網羅解析を行い、発酵中に *S*-アデノシルメチオニン (SAM) の酵母菌体内蓄積量が増加することを見出した。また、麦汁中への SAM の添加や酵母菌体内に SAM を高蓄積することが知られる *ADO1* 遺伝子破壊^{77,78} が酵母の発酵速度を向上させることを示し、酵母菌体内への SAM 高蓄積はアルコール発酵向上効果があると結論付けた。さらに、酵母菌体内へ SAM を高蓄積することで知られるコルディセピン耐性を持つ株をモデル下面発酵ビール酵母より取得して、当該酵母が高濃度醸造下にて親株よりも発酵速度が向上することを示した。このことは、遺伝子組換え技術を使わずに下面発酵ビール酵母の発酵力を高めるための新たな育種技術の確立に成功したと言える。本章で確立したコルディセピン耐性による酵母育種方法は遺伝子組換えの必要がなく、食品製造に当たり遺伝子組換え体使用のハードルが高い日本市場において意義深いと考えている。しかし、酵母菌体内への SAM 高蓄積による発酵促進の機構は未だ不明瞭であり、今後の解明により新たな発酵メカニズム知見の獲得が望まれる。

以上、本研究では、ビール酵母の発酵性に寄与する因子の一端を明らかとした。醸造酵母によるアルコール発酵は古くから親しまれており人類にとって身近な現象である。醸造酵母は、ビールにはビール酵母、清酒には清酒酵母、ワインにはワイン酵母といったよう

に、それぞれの原料を発酵させるのに適した酵母が用いられている。下面発酵ビール酵母は、その低温発酵能や凝集沈降能等、ビールづくりに合った特徴を持つ酵母が自然に選択されて得られてきた歴史がある。ビールづくりという特殊な環境に合うようビール酵母が進化していったともいえる。本研究では下面発酵ビール酵母の発酵性の一端を明らかとし、その知見をもとに高濃度醸造や酵母育種技術への応用を試みた。これからは自然選択を待つのではなく、酵母の特徴を研究によって裏付け、その結果を活用して狙い通りに新酵母を育種する技術や品質を安定的かつ効率的に醸造する技術を獲得していくことが必要とされる。昨今の嗜好性の多様化や酒税法の改正によるビール類の定義変更により高濃度醸造以外にも様々な液種への対応が予想され、今後さらなる酵母発酵技術の発展が望まれると予測される。先人たちによる下面発酵ビール酵母の分類や特徴的な遺伝子同定の研究を礎に、本研究のような知見を蓄積していきヒトがビール酵母を進化させていくことに期待したい。

References

1. 橋本 直樹 (1998) ビールのはなし Part 2 —おいしさの科学, 技報堂出版
2. 大内 弘造 (1997) 酒と酵母のはなし, 技報堂出版
3. 春山 行夫 (1972) ビール文化史<下>, 東京書房社
4. Barnett, JA., A history of research on yeasts. 1: Work by chemists and biologists. *Yeast*, **14**, 1439-1451 (1996)
5. 小泉 武夫 (1989) 発酵, 中央公論新社
6. Børsting, C., Hummel, R., Schultz, ER., Rose, TM., Pedersen, MB., Knudsen, J. and Kristiansen, K., *Saccharomyces carlsbergensis* contains two functional genes encoding the acyl-CoA binding protein, one similar to the ACB1 gene from *S. cerevisiae* and one identical to the *ACB1* gene from *S. monacensis*. *Yeast*, **13**, 1409-1421 (1997)
7. Martini, AV. and Martini, M., Deoxyribonucleic Acid Relatedness among Species of the Genus *Saccharomyces Sensu Stricto*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **35**, 508-511 (1985)
8. Martini, AV., and Martini, M., Three newly delimited species of *Saccharomyces sensu stricto*. *Antonie van Leeuwenhoek*, **53**, 77-84 (1987)
9. Kurtzman, CP., and Fell, JW. (1998) The Yeasts: a taxonomic study. Fourth edition, Elsevier Science Publishers.
10. Yamagishi, H. and Ogata, T., Chromosomal structure of bottom fermenting yeast. *System. Appl. Microbiol.* **22**, 341-353 (1999)
11. Libkind, D., Hittinger, CT., Valério, E., Gonçalves, C., Dover, J., Johnston, M., Gonçalves, P. and Sampaio, JP., Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 14539-14544 (2011)
12. Bokulich, NA. and Bamforth, CW., (2017) *Brewing Microbiology*, Caister Academic Press
13. Wendland, J., Lager yeast comes of age. *Eukaryot. Cell.* **13**, 1256-1265 (2014)
14. Walther, A., Hesselbart, A. and Wendland, J., Genome sequence of *Saccharomyces carlsbergensis*, the world's first pure culture lager yeast. *G3 (Bethesda)*, **4**, 783-793 (2014)
15. Okuno, M., Kajitani, R., Ryusui, R., Morimoto, H., Kodama, Y., and Itoh, T., Next-generation sequencing analysis of lager brewing yeast strains reveals the evolutionary history of interspecies hybridization. *DNA Res.*, **23**, 67-80 (2016)
16. Kobayashi, O., Hayashi, N., Kuroki, R. and Sone, H., The region of FLO1 proteins responsible for sugar recognition. *J. Bacteriol.*, **180**, 6503-6510 (1998)

17. Van Mulders, SE., Ghequire, M., Daenen, L., Verbelen, PJ., Verstrepen, KJ. and Delvaux, FR., Flocculation gene variability in industrial brewer's yeast strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **88**, 1321-1331 (2010)
18. Watari, J., Takata, Y., Ogawa, M., Sahara, H., Koshino, S., Onnela, ML., Airaksinen, U., Jaatinen, R., Penttilä, M. and Keränen, S., Molecular cloning and analysis of the yeast flocculation gene *FLO1*. *Yeast*, **10**, 211-225 (1994)
19. Yamagishi, H., Ohnuki, S., Nogami, S., Ogata, T. and Ohya, Y. Role of bottom-fermenting brewer's yeast *KEX2* in high temperature resistance and poor proliferation at low temperatures. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **56**, 297-312 (2010)
20. Sheltzer, JM., Blank, HM., Pfau, SJ., Tange, Y., George, BM., Humpton, TJ., Brito, IL., Hiraoka, Y., Niwa, O. and Amon, A., Aneuploidy drives genomic instability in yeast. *Science*, **333**, 1026-1030 (2011)
21. Nakao, Y., Kanamori, T., Itoh, T., Kodama, Y., Rainieri, S., Nakamura, N., Shimonaga, T., Hattori, M. and Ashikari, T., Genome Sequence of the Lager Brewing Yeast, an Interspecies Hybrid. *DNA Res.*, **16**, 115-129 (2009)
22. 大内 弘造 (1997) 酒と酵母のはなし, 技報堂出版
23. Beltran, G., Rozès, N., Mas, A., and Guillamón, J. M., Effect of low-temperature fermentation on yeast nitrogen metabolism. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **23**, 809-815 (2007)
24. Bromberg, S. K., Bower, P. A., Duncombe, G. R., Fehring, J., Gerber, L., Lau, V. K., and Tata, M., Requirements for zinc, manganese, calcium and magnesium in wort. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **55**, 123-128 (1997)
25. Maddox, I. S. and Hough, J. S., Effect of zinc and cobalt on yeast growth and fermentation. *J. Inst. Brew.*, **76**, 262-264 (1970)
26. Jacobsen, T., Hagk, T., and Lie, S., A fermentation assay for wort element availability. *J. Inst. Brew.*, **88**, 387-389 (1982)
27. Rees, E. M. R. and Stewart, G. G., The effects of increased magnesium and calcium concentrations on yeast fermentation performance in high gravity worts. *J. Inst. Brew.*, **103**, 287-291 (1997)
28. Gibson, B. R., Lawrence, S. J., Leclaire, J. P., Powell, C. D., and Smart, K. A., Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. *FEMS Microbiol. Rev.*, **31**, 535-569 (2007)
29. Puligundla, P., Smogrovicova, D., Obulam, VS. and Ko, S., Very high gravity (VHG) ethanolic brewing and fermentation: a research update. *J Ind Microbiol Biotechnol.*, **38**, 1133-1144 (2011)
30. Moriya, H., and Johnston, M., Glucose sensing and signaling in *Saccharomyces*

- cerevisiae* through the Rgt2 glucose sensor and casein kinase I. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **101**, 1572–1577 (2004)
31. Watanabe, D., Araki, Y., Zhou, Y., Maeya, N., Akao, T., and Shimoi, H., A loss-of-function mutation in the PAS kinase Rim15p is related to defective quiescence entry and high fermentation rates of *Saccharomyces cerevisiae* sake yeast strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, **78**, 4008-4016 (2012)
 32. Watanabe, D., Zhou, Y., Hirata, A., Sugimoto, Y., Takagi, K., Akao, T., Ohya, Y., Takagi, H. and Shimoi, H., Inhibitory Role of Greatwall-Like Protein Kinase Rim15p in Alcoholic Fermentation via Upregulating the UDP-Glucose Synthesis Pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **82**, 340-351 (2015)
 33. Watanabe, D., Nogami, S., Ohya, Y., Kanno, Y., Zhou, Y., Akao, T., and Shimoi, H., Ethanol fermentation driven by elevated expression of the G₁ cyclin gene *CLN3* in sake yeast. *J. Biosci. Bioeng.*, **112**, 577-582 (2011).
 34. Urbanczyk, H., Noguchi, C., Wu, H., Watanabe, D., Akao, T., Takagi, H., and Shimoi, H., Sake yeast strains have difficulty in entering a quiescent state after cell growth cessation. *J. Biosci. Bioeng.*, **112**, 44-48 (2011)
 35. Watanabe, D., Wu, H., Noguchi, C., Zhou, Y., Akao, T., and Shimoi, H., Enhancement of the initial rate of ethanol fermentation due to dysfunction of yeast stress response components Msn2p and/or Msn4p. *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**, 934-941 (2011)
 36. Lecoq, K., Belloc, I., Desgranges, C. and Daignan-Fornier, B., Role of adenosine kinase in *Saccharomyces cerevisiae*: identification of the *ADO1* gene and study of the mutant phenotypes. *Yeast*, **15**, 335-342 (2001)
 37. van den Broek, M., Bolat, I., Nijkamp, J. F., Ramos, E., Luttik, M. A., Koopman, F., Geertman, J. M., de Ridder, D., Pronk, J. T., and Daran, J. M., Chromosomal copy number variation in *Saccharomyces pastorianus* is evidence for extensive genome dynamics in industrial lager brewing strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, **81**, 6253–6267 (2015)
 38. Salema-Oom, M., Valadão Pinto, V., Gonçalves, P., and Spencer-Martins, I., Maltotriose utilization by industrial *Saccharomyces* strains. Characterization of a new member of the alpha-glucoside transporter family. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 5044–5049 (2005)
 39. Magalhães, F., Vidgren, V., Ruohonen, L., and Gibson, B., Maltose and maltotriose utilisation by group I strains of the hybrid lager yeast *Saccharomyces pastorianus*. *FEMS Yeast Res.*, **16** (2016)
 40. Iijima, K. and Ogata, T., Construction and evaluation of self-cloning bottom-fermenting yeast with high SSU1 expression. *J. Appl. Microbiol.*, **109**, 1906-1913

(2010)

41. Becker, J. U., and Betz, A., Membrane transport as controlling pacemaker of glycolysis in *Saccharomyces carlsbergensis*. *Biochem. Biophys. Acta.*, **274**, 584–597 (1972)
42. Kotyk, A., and Kleinzeller, A. Affinity of the yeast membrane carrier for glucose and its role in the Pasteur effect. *Biochem. Biophys. Acta.*, **135**, 106–111 (1967)
43. Does, A. L., and Bisson, L. F., Comparison of glucose uptake kinetics in different yeasts. *J. Bacteriol.*, **171**, 1303–1308 (1989)
44. Oehlen, L. J., Scholte, M. E., de Koning, W., and van Dam, K., Decrease in glycolytic flux in *Saccharomyces cerevisiae* cdc35-1 cells at restrictive temperature correlates with a decrease in glucose transport. *Microbiology*, **140**, 1891–1898 (1994)
45. Pedler, S. M., Wallace, P. G., Wallace, J. C., and Berry, M. N., The fate of glucose in strains S288C and S173-6B of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**, 119–125 (1997)
46. Huberts, D. H., Niebel, B., and Heinemann, M., A flux-sensing mechanism could regulate the switch between respiration and fermentation. *FEMS Yeast Res.*, **12**, 118–128 (2012)
47. Federoff, H. J., Eccleshall, T. R., and Marmur, J., Carbon catabolite repression of maltase synthesis in *Saccharomyces carlsbergensis*. *J. Bacteriol.*, **156**, 301–307. (1983)
48. D'Amore, T., Russell, I., and Stewart, G. G., Sugar utilization by yeast during fermentation. *J. Ind. Microbiol.*, **4**, 315–324 (1989)
49. Medintz, I., Jiang, H., Han, E. K., Cui, W., and Michels, C. A. Characterization of the glucose-induced inactivation of maltose permease in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, **178**, 2245–2254 (1996)
50. Gancedo, J. M., Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **62**, 334–361 (1998)
51. Özcan, S., and Johnston, M., Function and regulation of yeast hexose transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **63**, 554–569 (1999)
52. Snowdon, C., and Johnston, M., A novel role for yeast casein kinases in glucose sensing and signaling. *Mol. Biol. Cell*, **27**, 3369–3375 (2016)
53. Nielsen, S. S. (2010) Phenol–sulfuric acid method for total carbohydrates, in *Food Analysis Laboratory Manual*, Springer
54. ビール酒造組合 国際技術委員会 (分析委員) (2004年) 改訂 BCOJ ビール分析法, 日本醸造協会
55. Baker, E., Wang, B., Bellora, N., Peris, D., Hulfachor, A. B., Koshalek, J. A., Adams,

- M., Libkind, D., and Hittinger, C. T., The genome sequence of *Saccharomyces eubayanus* and the domestication of lager-brewing yeasts, *Mol. Biol. Evol.* **32**, 2818–2831 (2015)
56. Nadai, C., Campanaro, S., Giacomini, A., and Corich, V., Selection and validation of reference genes for quantitative real-time PCR studies during *Saccharomyces cerevisiae* alcoholic fermentation in the presence of sulfite, *Int. J. Food Microbiol.* **215**, 49–56 (2015)
57. Murakami, N., Miyoshi, S., Yokoyama, R., Hoshida, H., Akada, R., and Ogata, T., Construction of a *URA3* deletion strain from the allotetraploid bottom-fermenting yeast *Saccharomyces pastorianus*, *Yeast*, **29**, 155–165 (2012)
58. Gietz, R. D., and Woods, R. A., Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method, *Meth. Enzymol.* **350**, 87–96. (2002)
59. Bisson, L. F., and Fraenkel, D. G., Expression of kinase-dependent glucose uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **159**, 1013–1017 (1984)
60. Cameroni, E., Hulo, N., Roosen, J., Winderickx, J., and De Virgilio, C., The novel yeast PAS kinase Rim15 orchestrates G0-associated antioxidant defense mechanisms. *Cell Cycle*, **3**, 462-468 (2004).
61. Roosen, J., Engelen, K., Marchal, K., Mathys, J., Griffioen, G., Cameroni, E., Thevelein, J. M., De Virgilio, C., De Moor, B., and Winderickx, J., PKA and Sch9 control a molecular switch important for the proper adaptation to nutrient availability. *Mol. Microbiol.*, **55**, 862-880 (2005)
62. Zhang, N., Wu, J., and Oliver, S. G., Gis1 is required for transcriptional reprogramming of carbon metabolism and the stress response during transition into stationary phase in yeast. *Microbiology*, **155**, 1690-1698 (2009)
63. Tyers, M., Tokiwa, G., and Futcher, B., Comparison of the *Saccharomyces cerevisiae* G1 cyclins: Cln3 may be an upstream activator of Cln1, Cln2 and other cyclins. *EMBO J.*, **12**, 1955-1968 (1993)
64. Dirick, L., Böhm, T., and Nasmyth, K., Roles and regulation of Cln-Cdc28 kinases at the start of the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*, *EMBO J.*, **14**, 4803-4813 (1995)
65. Nash, R., Tokiwa, G., Anand, S., Erickson, K., and Futcher, A. B., The WHI1p gene of *Saccharomyces cerevisiae* tethers cell division to cell size and is a cyclin homolog. *EMBO J.*, **7**, 4335-4346 (1988)
66. Mendenhall, M. D. and Hodge, A. E., Regulation of Cdc28 cyclin-dependent protein kinase activity during the cell cycle of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **62**, 1191-1243 (1998)
67. Truman, A. W., Kristjansdottir, K., Wolfgeher, D., Hasin, N., Polier, S., Zhang, H.,

- Perrett, S., Prodromou, C., Jones, G. W., and Kron, S. J., CDK-dependent Hsp70 phosphorylation controls G1 cyclin abundance and cell-cycle progression. *Cell*, **151**, 1308-1318 (2012)
68. Valk, E. and Loog, M., Multiple Pho85-dependent mechanisms control G1 cyclin abundance in response to nutrient stress. *Mol. Cell Biol.*, **33**, 1270-1272 (2013)
69. Zaragoza, D., Ghavidel, A., Heitman, J., and Schultz, M. C., Rapamycin induces the G0 program of transcriptional repression in yeast by interfering with the TOR signaling pathway. *Mol. Cell Biol.*, **18**, 4463-4470 (1998)
70. Shiozaki, S., Shimizu, S., and Yamada, H., Unusual intracellular accumulation of *S*-adenosyl-L-methionine by microorganisms. *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 2293-2300 (1984)
71. Shobayashi, M., Mukai, N., Iwashita, K., Hiraga, Y., and Iefuji, H., A new method for isolation of *S*-adenosylmethionine (SAM)-accumulating yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **69**, 704-710 (2006)
72. Hayakawa, K., Kajihata, S., Matsuda, F., and Shimizu, H.: ¹³C-metabolic flux analysis in *S*-adenosyl-L-methionine production by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biosci. Bioeng.*, **120**, 532-538 (2015)
73. Kanai, M., Kawata, T., Yoshida, Y., Kita, Y., Ogawa, T., Mizunuma, M., Watanabe, D., Shimoi, H., Mizuno, A., Yamada, O., Fujii, T. and Iefuji, H., Sake yeast *YHR032W/ERC1* haplotype contributes to high *S*-adenosylmethionine accumulation in sake yeast strains. *J. Biosci. Bioeng.*, **123**, 8-14 (2017)
74. Li, S., Swanson, SK., Gogol, M., Florens, L., Washburn, MP., Workman, JL. and Sukanuma, T., Serine and SAM Responsive Complex SESAME Regulates Histone Modification Crosstalk by Sensing Cellular Metabolism. *Mol. Cell*, **60**, 408-421 (2015)
75. Thomas, D. and Surdin-Kerjan, Y., The synthesis of the two *S*-adenosylmethionine synthetases is differently regulated in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.*, **226**, 224-232 (1991)
76. Shiomi, N., Fukuda, H., Fukuda, Y., Murata, K., and Kimura, A., Nucleotide sequence and characterization of a gene conferring resistance to ethionine in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ferment. Bioeng.*, **71**, 211-215 (1991)
77. Iwashima, A., Ogata, M., Nosaka, K., Nishimura, H., and Hasegawa, T., Adenosine kinase-deficient mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **127**, 23-28 (1995)
78. Kanai, M., Masuda, M., Takaoka, Y., Ikeda, H., Masaki, K., Fujii, T., and Iefuji, H., Adenosine kinase-deficient mutant of *Saccharomyces cerevisiae* accumulates *S*-adenosylmethionine because of an enhanced methionine biosynthesis pathway. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **97**, 1183-1190 (2013)

79. Teste, MA., Duquenne, M., François, JM. and Parrou, JL., Validation of reference genes for quantitative expression analysis by real-time RT-PCR in *Saccharomyces cerevisiae*, *BMC Mol. Biol.*, **10**, 1-15 (2009)
80. Nešvera J., Nuclear and extranuclear mutations in yeast induced by ethyl methanesulfonate. *Folia Microbiol.*, **18**, 353-360 (1973)
81. Yu, Q., Tong, C., Luo, M., Xue, X., Mei, Q., Ma, L., Yu, X., Mao, W., Kong, L., Yu, X., and Li, S., Regulation of SESAME-mediated H3T11 phosphorylation by glycolytic enzymes and metabolites. *PLoS One*, **12**, e0175576 (2017).
82. Blieck, L., Toye, G., Dumortier, F., Verstrepen, K. J., Delvaux, F. R., Thevelein, J. M., and Van Dijck, P., Isolation and characterization of brewer's yeast variants with improved fermentation performance under high-gravity conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 815-824 (2007)
83. Yu, Z., Zhao, H., Li, H., Zhang, Q., Lei, H., and Zhao, M., Selection of *Saccharomyces pastorianus* variants with improved fermentation performance under very high gravity wort conditions. *Biotechnol. Lett.*, **34**, 365-370 (2012)
84. Ekberg, J., Rautio, J., Mattinen, L., Vidgren, V., Londesborough, J., and Gibson, B. R., Adaptive evolution of the lager brewing yeast *Saccharomyces pastorianus* for improved growth under hyperosmotic conditions and its influence on fermentation performance. *FEMS Yeast Res.*, **13**, 335-349 (2013)
85. Pires, E. J., Teixeira, J. A., Brányik, T., and Vicente, A. A., Yeast: the soul of beer's aroma e a review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **98**, 1937-1949 (2014)
86. Brányik, T., Vicente, A. A., Dostálek, P., and Teixeira, J. A., A review of flavor formation in continuous beer fermentations. *J. Inst. Brew.*, **114**, 3-13 (2008)
87. Saerens, S. M., Delvaux, F., Verstrepen, K. J., Van Dijck, P., Thevelein, J. M., and Delvaux, F. R., Parameters affecting ethyl ester production by *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 454-461 (2008)
88. Soares da Costa, M., Goncalves, C., Ferreira, A., Ibsen, C., Guedes de Pinho, P., and Silva Ferreira, A. C., Further insights into the role of methional and phenylacetaldehyde in lager beer flavor stability. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 7911-7917 (2004)
89. Peppard, T. L. and Halsey, S. A., Malt flavor - transformation of carbonyl compounds by yeast during fermentation. *J. Inst. Brew.*, **87**, 386-390 (1981)

原著論文

Oomuro, M., Kato, T., Zhou, Y., Watanabe, D., Motoyama, Y., Yamagishi, H., Akao, T. and Aizawa, M., Defective quiescence entry promotes the fermentation performance of bottom-fermenting brewer's yeast. *J. Biosci. Bioeng.*, **122**, 577-582 (2016)

Oomuro, M., Watanabe, D., Sugimoto, Y., Kato, T., Motoyama, Y., Watanabe, T., Takagi, H., Accumulation of intracellular *S*-adenosylmethionine increases the fermentation rate of bottom-fermenting brewer's yeast during high-gravity brewing. *J. Biosci. Bioeng.*, **126**, 736-741 (2018)

Oomuro, M., Motoyama, Y. and Watanabe, T., Isolation of a lager yeast with an increased copy number of the *YCK1* gene and high fermentation performance. *J. Inst. Brew.*, **125**, 47-52 (2019)

謝辞

本研究を行うにあたり御指導と御高配を賜りました東京工業大学・小島英理教授ならびに三重正和准教授に深甚なる謝意を表します。

研究を遂行する上で共同研究者として貴重な御助言と暖かい激励を頂きました独立大学法人酒類総合研究所・赤尾健醸造微生物研究副部門長、奈良先端科学技術大学院大学・高木博史教授、渡辺大輔助教、に深謝致します。

本研究の遂行に格別の御理解と御高配を賜りましたアサヒビール株式会社・塩澤賢一代表取締役社長、伊藤義訓常務取締役兼常務執行役員兼イノベーション本部長、渡邊哲也執行役員兼生産第一部長、山岸裕美執行役員兼製品保証センター長、相澤正幸執行役員兼博多工場長、佐藤博俊酒類開発研究所長、安原貴臣イノベーション戦略部長、水谷正憲酒類開発第一部長に深く感謝致します。

研究を遂行する上で御助言と暖かい激励を頂きましたアサヒビール株式会社 OB・福田和郎博士、アサヒクオリティードイノベーションズ株式会社・鈴木康司食の安全研究所長、アサヒビールグループ食品株式会社・本山靖朗博士、アサヒビール株式会社・舛田晋製品保証センター次長、飯島和丸名古屋工場品質管理部長、砂川忠弘博士、浅野静博士、三好美穂博士、加藤拓博士、竹末信親博士、楠慧三氏、藤本瞳氏に深く感謝致します。

研究を遂行する上で貴重な実験データを提供頂きました坂本明子氏、山本良子氏に御礼申し上げます。

研究の遂行において多くの御支援を頂きましたアサヒビール株式会社・研究開発センタ

一、本店、工場の皆様に厚く御礼を申し上げます。

最後に、論文執筆に多大な理解を示し、サポートしてくれた家族に深く感謝します。