

# マルトース発酵関連遺伝子のクローニング†

尾形智夫\*, 平沼花乃子\*\*

## Cloning of gene related to maltose fermentation†

Tomoo Ogata\* and Kanoko Hiranuma\*\*

Maltose fermentation activator protein, *MAL63* homologue, *MAL63 (NCYC1006)*, was clone from *S. cerevisiae* NCYC1006. This yeast strain is top-fermenting yeast, and ferments maltose very well. Laboratory yeast *S. cerevisiae* YNN27 could not ferment maltose very well, however, the transformant with *MAL63 (NCYC1006)* could ferment maltose very well. *MAL63 (NCYC1006)* has zinc-finger motif, which is transcriptional activation motif. It is inferred that *MAL63 (NCYC1006)* is located on chromosome VII. There are variations of maltose fermenting gene family among inter-*Saccharomyces* strains and intra-*Saccharomyces* strain genomes.

**Key words** : yeast, maltose fermentation, activator protein, gene variations

### 1 はじめに

現在, 地域の特性を生かして, 自然界から酵母を分離し, 産業育成に利用している例が数多く見られている。しかし, これらの例の多くは, 清酒醸造への応用であり, 地域のビール, パン製造には, これら地域の酵母は活用しにくかった。これは, 分離された酵母の多くは, マルトース発酵性が必ずしも強くなかったからである。本研究は, マルトース発酵性が強い酵母菌株のマルトース発酵性機構を研究して, その成果を利用して, 接合育種により, 地域の特色ある酵母にマルトース発酵性を付与し, 地域産業への貢献の幅を広げることをめざしたものである。

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* では, 実験室酵母株 S288C の全ゲノム配列が, 1996 年に完全解読された。その後, *S. cerevisiae* のいくつかの菌株のゲノム配列が明らかとなっていた。その結果, 多くの遺伝子, 特に, 染色体の内部にある遺伝子の DNA 配列は, ほとんど同一であることが明らかとなった。一方, マルトース発酵性に関与する遺伝子群は, 染色体末端に存在することで, 遺伝子重複 (gene duplication), 染色体転座 (translocation) 等の染色体の構造変化の影響を受けやすく, DNA 塩基配列の変化が他の遺伝子と比較すると大きいと考えられる。その結果, *S. cerevisiae* の多くの菌株では, マルトース発酵性に多様性が生じていると考えられる。そこで, 本研究では, マルトース発酵能力が大きく, 現在, パン酵母やビール酵母として使用されている酵母菌株のマルトース遺伝子群の調査をおこない, その後, パン酵母やビール酵母の品質維持, 向上に寄与す

ることをめざした。

### 2 実験材料と実験方法

#### 2.1 実験材料

試薬は, 通常, 和光純薬の特級あるいは 1 級のものを使用した。但し, 酵母培養用の酵母エキス, ペプトン等は, Difco 社製のものを使用した。制限酵素等は, タカラバイオ, 東洋紡製のものを使用した。使用した酵母菌株, プラスミドは, Table 1 に示した。

#### 2.2 培地

実験室での通常の酵母培養は, YPD 培地(1% 酵母エキス, 2% ペプトン, 2% グルコース)でおこなった。寒天培地は, 通常は 2% で使用した。接合株の分離は, 最少培地, SD 培地(2% グルコース, 0.67% yeast nitrogenbase w/o amino acids)に, 必要なアミノ酸等を添加したもので選択した。

#### 2.3 マルトース発酵関連遺伝子群の調査

マルトース関連遺伝子群の調査は, 次の配列の DNA プライマー, MAL63F (5'-CGGGCGCTTTTATCCCGCC CCGGCTTTTATTGTC-3'), および, MAL63R (5'-AATCATTGTGATGAGGGTCCTAGATTTAAATATC)を用いて, PCR をすることによっておこなった。

† 原稿受理 平成 28 年 2 月 26 日 Received February 26, 2016

\* 生物工学科 (Department of Biotechnology)

\*\* 生物工学科学生 (Department of Biotechnology)

Table 1. Yeast strains and plasmid used in this study.

Yeast strain	Remarks
<i>S. cerevisiae</i> NCYC1006	Top fermenting yeast
<i>S. cerevisiae</i> NCYC1320	Top fermenting yeast
<i>S. cerevisiae</i> NBRC1953	Top fermenting yeast
<i>S. cerevisiae</i> NBRC1954	Top fermenting yeast
<i>S. pastorianus</i> NBRC1953	Bottom fermenting yeast
<i>S. cerevisiae</i> YNN27	Laboratory yeast <i>Mata</i> <i>trp1, ura3</i>
<i>S. cerevisiae</i> YPH500	Laboratory yeast <i>Mata</i> <i>ade2, his3, leu2, lys2,</i> <i>trp1, ura3</i>
Plasmid	
pTA2	Plasmid for TA-cloning
YEp24	Plasmid, <i>E. coli</i> – yeast shuttle vector, <i>URA3</i>

#### 2.4 マルトース培地での酵母生育性の調査

酵母のマルトース生育性は、次のように調べた。SD培地で生育させた酵母を、SD培地あるいは、SMal培地(2%マルトース, 0.67% yeast nitrogenbase w/o amino acids)に移し、経時的に、600nmの吸光度(濁度)を測定することでおこなった。

### 3 実験結果

#### 3・1 マルトース発酵関連遺伝子群の調査

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のマルトース発酵性遺伝子群は、Fig. 1に記載したように、転写活性化因子(*MALx3*), マルトース透過タンパク質(*MALx1*), マルターゼ(*MALx2*)が、隣接して染色体末端に存在している。マルトース発酵能の強い上面ビール酵母、下面ビール酵母計5株について、転写活性化因子周辺のDNA領域について、PCRをおこなったところ、各酵母菌株で、異なるPCR増幅断片が得られ(Fig. 2), これまでに報告があったように、染色体末端にあるマルトース発酵関連遺伝子群には、酵母菌株によって多様性があることが確認された。そこで、予備的試験より、最もマルトース発酵能が強かった上面ビール酵母 *S. cerevisiae* NCYC1006 のPCR増幅断片の一部のDNA塩基配列を決定したところ、分子量の大きなPCR増幅断片は、これまでに報告があった<sup>1)</sup>、マルトース発酵関連遺伝子群の転写活性化因子 *MAL63* と同一性があった。但し、そのDNA塩基配列は、これまでの報告とは完全には一致していなかった。分子量が小さいPCR増幅断片は、同じ転写活性化因子であるが、*MAL33* とほぼ同一であることがあったことがわかった。染色体末端にあるマルトース発酵関連遺伝子群には、多様性があることが裏付けられた。

#### 3・2 *S. cerevisiae* NCYC1006 由来 *MAL63* ホモログの機能性検討

*S. cerevisiae* NCYC1006 由来の *MAL63* ホモログを、

大腸菌-酵母シャトルベクターである YEp24 に挿入したプラスミド YEp24-MAL63(NCYC1006)を構築した。このプラスミドを、実験室酵母 *S. cerevisiae* YNN27 に導入し、マルトース培地での生育性を調べた(Fig. 3)。空のプラスミドである YEp24 を導入された形質転換体酵母 *S. cerevisiae* YNN27 (YEp24)は、マルトース培地での生育は阻害されたのに対し、プラスミド YEp24-MAL63(NCYC1006)を導入された形質転換体酵母 *S. cerevisiae* YNN27 (YEp24-MAL63(NCYC1006))は、マルトース培地での生育が促進された(Fig. 3)。このことから、強力なマルトース発酵力を有する上面ビール酵母 *S. cerevisiae* NCYC1006 のマルトース発酵関連遺伝子群の一つの遺伝子 *MAL63* ホモログは、マルトース発酵関連遺伝子群の強力な転写活性化因子であることと推察された。

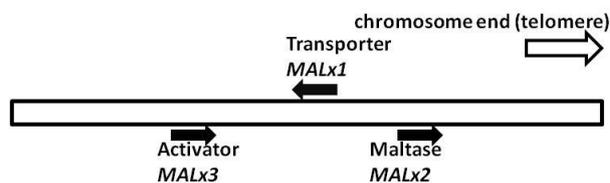


Fig. 1 Location of genes related to maltose fermentation.

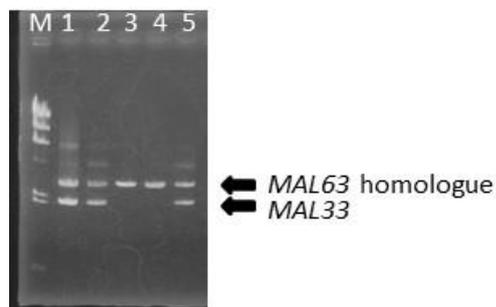


Fig.2 PCR amplification fragment from *S. cerevisiae* strains. M: DNA size marker  $\lambda$  DNA-*Hind* III digested. Template DNA, 1. *S. cerevisiae* NCYC1006, 2. *S. cerevisiae* NCYC1320, 3. *S. cerevisiae* NBRC1953, 4. *S. cerevisiae* NBRC1954, 5. *S. pastorianus* NBRC2003.

#### 3・3 *S. cerevisiae* NCYC1006 由来 *MAL33* の機能性検討

*S. cerevisiae* NCYC1006 由来の *MAL33* を、大腸菌-酵母シャトルベクターである YEp24 に挿入したプラスミド YEp24-MAL63(NCYC1006)を構築した。このプラスミドを、実験室酵母 *S. cerevisiae* YNN27 に導入し、マルトース培地での生育性を調べた(Fig. 4)。その結果、*S. cerevisiae* NCYC1006 由来の *MAL33* を導入しても、形質転換株のマルトース生育性には変化がなかった。

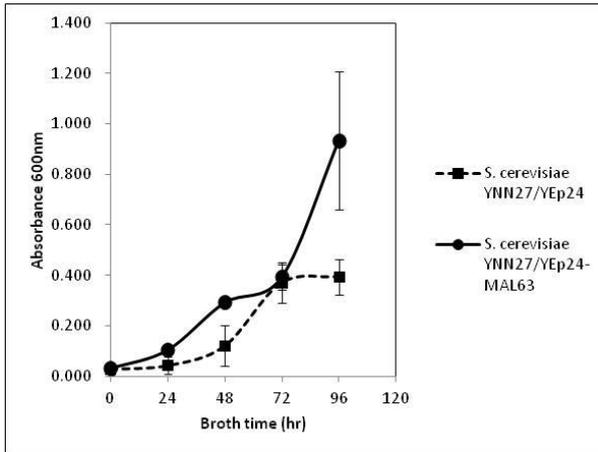


Fig. 3 Growth curve introduced with *MAL63* homologue.

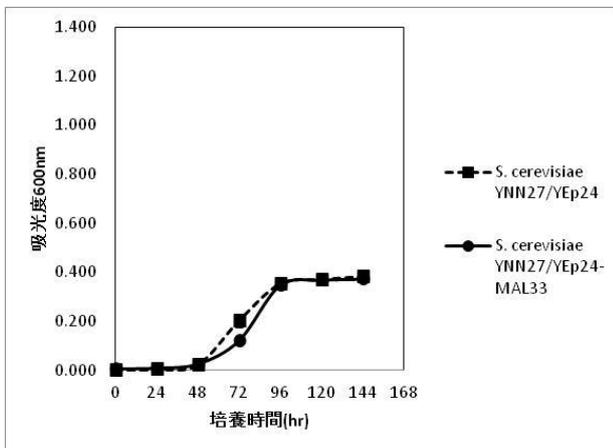


Fig. 4 Growth curve introduced with *MAL33*.

### 3・4 強力なマルトース発酵力を有する上面ビール酵母 *S. cerevisiae* NCYC1006 のマルトース発酵関連遺伝子群の *MAL63* ホモログの調査

マルトース発酵性の弱い実験室酵母 *S. cerevisiae* YNN27 に、強力なマルトース発酵能を与えた遺伝子 *S. cerevisiae* NCYC1006 の *MAL63* ホモログの DNA 塩基配列を決定した。その結果、強力なマルトース発酵性酵母 *S. cerevisiae* 332-5A の転写活性化因子 *MAL63* 遺伝子<sup>1)</sup> と 470 アミノ酸中 442 アミノ酸が一致しており、一致率 94% の強い相同性を有していたが、明らかに新規なタンパク質であり、遺伝子名として *MAL63* (NCYC1006) とした (Fig. 5)。 *S. cerevisiae* 332-5A の *MAL63* 遺伝子は、転写活性化因子であり、N 末端領域が DNA 結合領域になっており、システイン残基 6 つが亜鉛イオンを囲んだモチーフで、特定の DNA 塩基配列を認識する C6 ジンクフィンガータンパク質に属している。この転写活性化因子は、マルトース発酵関連遺伝子のプロモータにある MGC-N<sub>9</sub>-MGC の配列に結合して、下流のマルトース発酵関連遺伝子の転写を促進する<sup>2, 3)</sup>。

一方、*S. cerevisiae* NCYC1006 の *MAL63* ホモログの N 末端アミノ酸配列も、C6 ジンクフィンガータンパク質の DNA 結合モチーフを有している (Fig. 6)。

*S. cerevisiae* YNN27 は、マルトース関連遺伝子群の転写活性化因子が機能していないので、マルトース透過タンパク質 *MAL11* やマルターゼ *MAL12* 等のマルトース発酵関連遺伝子の転写がされず、マルトース発酵をおこなうことができなかった。しかし、上面ビール酵母 *S. cerevisiae* NCYC1006 の *MAL63* ホモログ遺伝子が導入されたことで、*S. cerevisiae* YNN27 の *MAL11*-*MAL12* 共通プロモーター上にある Mal63p の結合配列 MGC-N<sub>9</sub>-MGC の配列に結合して、*MAL11*-*MAL12* 遺伝子の転写を促進し、形質転換酵母 *S. cerevisiae* YNN27 (YEp24-*MAL63*(NCYC1006)) のマルトース発酵性が強化されたと考えられた (Fig. 7, Fig. 8)。

また、今回クローニングされた上面ビール酵母 *S. cerevisiae* NCYC1006 の *MAL63* ホモログ遺伝子の DNA 塩基配列を、他のビール酵母のゲノムデータと比較したところ<sup>4)</sup>、オーストラリアのビール会社フォスターズ社の上面ビール酵母 Fosters B 株の染色体 XI の配列 (accession No. AEHH01000048, 129,220bp) と 96% の相同性がみられた。さらに、同じフォスターズ社の上面ビール酵母 Fosters O 株の染色体 VII の一部配列 (accession No. AEHH01000047, 5493bp) とは、99% の相同性がみられた。これらの結果から、今回クローニングした上面ビール酵母 NCYC1006 の *MAL63* ホモログ遺伝子は、染色体 VII に存在すると推察された (Fig. 9)。

MAL63	1	MGLAKGSDGDCQVREVECDNRFPCNRCIQNLNCTYLOFLAKRGPESIRAGSLAKLAEVQ	60
MAL63(NCYC1006)	1	MGLAKGSDGDCQVREVECDNRFPCNRCIQNLNCTYLOFLAKRGPESIRAGSLAKLAEVQ	60
MAL63	61	MVSMNINMIAFVVCXKVFPHLIDQGLRLHDNLVIVFMLSVDLHLLEEKYDDRCAY	120
MAL63(NCYC1006)	61	MVSMNINMIAFVVCXKVFPHLIDQGLRLHDNLVIVFMLSVDLHLLEEKYDDRCAY	120
MAL63	121	WFVLSLSAATLSDLQIEIEVEEGVFTFGBGLCTQLMLSRQFPDLSNSGDFRINTIYCLH	180
MAL63(NCYC1006)	121	WFVLSLSAATLSDLQIEIEVEEGVFTFGBGLCTQLMLSRQFPDLSNSGDFRINTIYCLH	180
MAL63	181	ROYAGFADTRISVRLSCEAIGLIRIAGFHREETVEFLPFGEQLRRVYLLMLTERFYA	240
MAL63(NCYC1006)	181	ROYAGFADTRISVRLSCEAIGLIRIAGFHREETVEFLPFGEQLRRVYLLMLTERFYA	240
MAL63	241	VYIKVTSLDATIAPFLPEVWIDPRLSLESFLEVIRVFTVPGKQFYDALAINCVDDSCTE	300
MAL63(NCYC1006)	241	VYIKVTSLDATIAPFLPEVWIDPRLSLESFLEVIRVFTVPGKQFYDALAINCVDDSCTE	300
MAL63	301	DSLKRINWELHTSLDIEPWSYGYIDFLFRSHVRLAVKLVLMHGQGMNPLSSASSTH	360
MAL63(NCYC1006)	301	DSLKRINWELHTSLDIEPWSYGYIDFLFRSHVRLAVKLVLMHGQGMNPLSNTINHTH	360
MAL63	361	IPVLIARDMLDIFLIFENLVDVHGPGIRMALEIAKALVDVVKYTHNKELEAVNVLVD	420
MAL63(NCYC1006)	361	IPVLIARDMLDIFLIFENLVDVHGPGIRMALEIAKALVDVVKYTHNKELEAVNVLVD	420
MAL63	421	VSEKVFSLKHQWDMDFRFSIKQCGALITLPLSKPLQMNNSHEDDDIIF	470
MAL63(NCYC1006)	421	VSEKVFSLKHQWDMDFRFSIKQCGALITLPLSKPLQMNNSHEDDDIIF	470

Fig. 5 Amino acid sequence identity between Mal63p and Mal63p(NCYC1006).

1 MGI AKQSCDCRVRVKCDRNKPCNRCTQRNLNCTYLQPL 40  
 Fig. 6 Zinc finger motif (DNA binding motif) of  
 Mal63p(NCYC1006).

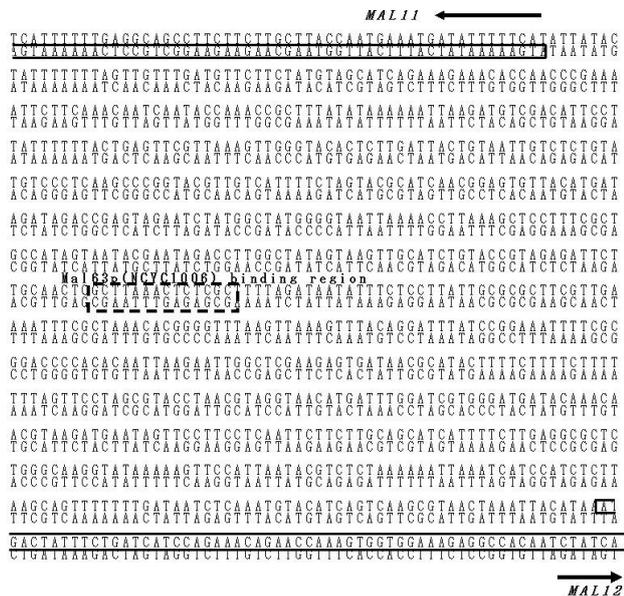
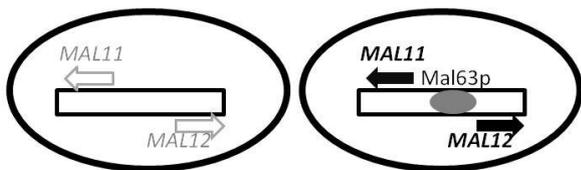


Fig. 7 DNA sequence of MAL11-MAL12 promoter



*S. cerevisiae* YNN27 can not ferment maltose well, because MAL-activator is not functioned, and MAL11 and MAL12 are not transcribed.

*S. cerevisiae* YNN27/YEp24-MAL63(NCYC1006) can ferment maltose well, because MAL-activator can be functioned, and MAL11 and MAL12 are transcribed.

Fig.8 The deduced mechanism of maltose fermentation of transformed yeast.

#### 4 考察

地域の産業にその地域で分離された酵母を使用して、地域産業育成に利用することは、有望な試みである。しかし、地域で分離される酵母菌株の多くは、マルトース発酵性が弱い場合が多く、地域のビール、パン製造に用いることには問題があった。そこで、マルトース発酵性が強い酵母菌株のマルトース発酵性の機構を研究することで、マルトース発酵性の弱い地域の酵母菌株の育種に役立てることをめざした。

強力なマルトース発酵性を有する上面ビール酵母 *S. cerevisiae* NCYC1006 のマルトースによる転写活性化因子のクローニングを試みたところ、マルトース生育性の低い実験室酵母 *S. cerevisiae* YNN27 のマルトース生育性の改善がみられる遺伝子 MAL63 (NCYC1006) 遺伝子をクローニングすることができた。この

MAL63(NCYC1006) 遺伝子は、これまでマルトース発酵について研究されていた酵母菌株 *S. cerevisiae* 332-5A のマルトース発酵の転写活性化因子 MAL63 とアミノ酸配列で 94% の高い一致を示していた。クローニングの際の PCR 実験 (Fig. 1) で、同時に増幅された産物の DNA 塩基配列は、ゲノムが完全解読されている実験室酵母 *S. cerevisiae* S288C のゲノムデータ中の MAL31 と一致していた。この遺伝子の導入では、マルトース発酵性の活性化はみられず、下面ビール酵母 *S. cerevisiae* NCYC1006 のマルトース発酵性遺伝子群には、多様性があることが見出された。また、今回クローニングした MAL63(NCYC1006) 遺伝子は、オーストラリアのビール会社フォスターズ社の上面ビール酵母 Fosters O 株の染色体 VII の一部配列 (accession No. AEHH01000047, 5493bp) と、99% の相同性がみられたが、この配列では、MAL63(NCYC1006) 遺伝子では、471 アミノ酸からなる ORF とされる領域内に塩基の挿入があり、382 アミノ酸で ORF が終了しており、転写活性化因子として機能しないと考えられる。染色体末端にあるマルトース遺伝子群には、菌株内にも菌株間にも多様性があり、この多様性が、実用酵母の多様性を生み出していると考えられる (Fig. 9)。

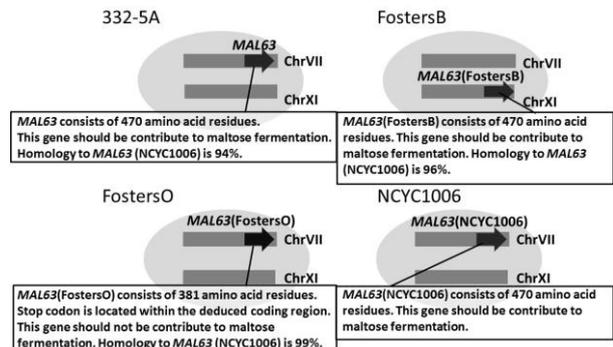


Fig. 9 Variations of maltose fermentation gene families among industrial yeast strains.

#### 謝辞

本研究の一部は、エリザベス・アーノルド富士財団の平成 27 年度研究助成でおこなったものである。

#### 参考文献

- 1) A. W. Gibson et al. Genetics 146, 1287 (1997).
- 2) O. I. Sirenko, B. Ni and R. B. Needleman Curr Genet 27, 509 (1995).
- 3) S. MacPherson, M. Larochelle and B. Turcotte Microbiol Mol Biol Rev 70, 583 (2006).
- 4) A. R. Borneman et al. PLoS Genetics 7, e1001287 (2011).