

上面、下面ビール酵母のフェノール臭非産生機構と *PAD1*, *FDC1* 遺伝子の変異, 欠失の関係†

尾形智夫*

Mutation and Deletion of *PAD1* and/or *FDC1* and Absence of Phenolic Off-Flavor Production in Top- and Bottom-Fermenting Yeasts†

Tomoo Ogata*

To convert ferulic acid into 4-vinylguaiacol (4-VG), *Saccharomyces cerevisiae* must have intact *PAD1* and *FDC1* genes. British-type top-fermenting yeast strains have nonsense mutations in both of these genes; whereas, bottom-fermenting yeast strains have a nonsense mutation in their *S. cerevisiae*-type *FDC1*, and have lost their *S. eubayanus*-type *FDC1* and *PAD1* genes. Here, top-fermenting yeast transformants in which wild-type *PAD1* and *FDC1* derived from the laboratory yeast *S. cerevisiae* S288C were inserted in the genome, exhibited ferulic acid decarboxylation activity. Similarly, bottom-fermenting yeast transformants expressing wild-type *S. cerevisiae*-type *FDC1* or *S. eubayanus*-type *FDC1* also exhibited ferulic acid decarboxylation activity. Thus, the lack of ferulic acid decarboxylation activity in bottom-fermenting yeast is due to mutation of the *S. cerevisiae*-type *FDC1* gene, coupled with absence of the *S. eubayanus*-type *FDC1* gene.

Key words : 4-Vinylguaiacol (4-VG), *FDC1*, *PAD1*, Phenolic Off-flavor

1 はじめに

4-ビニルグアコール(4-VG)等のフェノール臭は、煙のような臭い、手袋のような臭いがあり、ほとんどのビール、ワイン、清酒でオフフレーバー（好ましくない臭い）と認識されている^{1, 2)}。4-VGは、フェルラ酸が酵母によって変換されて産生される。フェルラ酸は植物の細胞壁に存在し、多糖類と結合している。酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、フェルラ酸を脱炭酸して 4-VG を産生するには、*FDC1*, *PAD1* 遺伝子が野生型である必要がある^{3, 4)}。

ほとんどの上面ビール酵母は、*PAD1*, *FDC1* 遺伝子にノンセンス変異（DNA 塩基の変異で、タンパク質翻訳が停止するコドンに変化する変異）があり、また、下面ビール酵母には、*FDC1* 遺伝子にフレームシフト変異（DNA 塩基の挿入あるいは、欠失によって本来の遺伝子のアミノ酸のコドンの読み枠にずれが生じる変異）があり、その結果タンパク質の翻訳が停止し、機能あるタンパク質が合成できず、フェルラ酸を脱炭酸する能力を有していない⁵⁾。Gallone らは、ビール酵母株 102 株のゲノム配列を調べて、British-type に属する 26 株、

United States-type に属する 10 株は、Mukai らが報告した上面ビール酵母の *PAD1*, *FDC1* 遺伝子の変異⁵⁾と全く同じであることを見出している³⁾。このことは、産業用酵母株のフェルラ酸脱炭酸酵素活性と *PAD1*, *FDC1* 遺伝子の変異が相関していることを示している。また、このことは、上面ビール酵母に野生型 *PAD1*, *FDC1* 遺伝子を挿入すること、下面ビール酵母に野生型 *FDC1* 遺伝子を挿入することで得られた形質転換株は、フェルラ酸脱炭酸酵素活性があることを示している。

下面ビール酵母は、*S. cerevisiae* と *S. eubayanus* の自然交雑体で、*S. pastorianus* に分類される⁶⁾。下面ビール酵母中の *S. eubayanus* 由来の *PAD1*, *FDC1* 遺伝子がフェルラ酸脱炭酸酵素活性に影響するかは興味もたれる。下面ビール酵母のウラシル要求性株を構築するためには、*S. cerevisiae* 由来の *URA3* 遺伝子と、*S. eubayanus* 由来の *URA3* 遺伝子の両方を遺伝子破壊する必要があった⁷⁾。一方、抗酸化活性に影響を与える亜硫酸の産生では、*S. cerevisiae* 由来の遺伝子と *S. eubayanus* 由来の遺伝子とでは、その寄与は異なっていた⁸⁻¹⁰⁾。*S. cerevisiae* 由来の遺伝子と *S. eubayanus* 由

† 原稿受理 令和2年2月28日 Received February 28, 2020

* 生物工学科 (Department of Biotechnology)

来の遺伝子が、下面ビール酵母の生物学的機能への寄与が異なっていることは、他にも見出されている。下面ビール酵母の4-VG産生に、*S. cerevisiae*由来の遺伝子と*S. eubayanus*由来の遺伝子がどのように影響しているかは未だ不明である。

本稿では、著者らがおこなった上面及び下面ビール酵母の4-VG産生に関して、*S. cerevisiae*由来の遺伝子と*S. eubayanus*由来の遺伝子がどのように影響しているかの研究¹¹⁾を中心に解説する。

2 上面及び下面ビール酵母のフェノール臭非産生に関する*S. cerevisiae*由来の遺伝子と*S. eubayanus*由来の遺伝子の関与

2・1 野生型 *PAD1*, *FDC1* 遺伝子で形質転換された上面ビール酵母は、4-VG を産生する

Saccharomyces cerevisiae Y7 株を上面ビール酵母株として使用した。*S. cerevisiae* Y7 株は、ビール醸造場で実際に使用されている上面ビール酵母 *S. cerevisiae* Y6 株の孢子分離体である。他の上面ビール酵母と同様に、*S. cerevisiae* Y7 株もフェルラ酸脱炭酸酵素活性を有しない (Fig. 1)。一方、野生型の実験室酵母 *S. cerevisiae* S288C 株は、フェルラ酸脱炭酸酵素活性を有する (Fig. 1)。フェルラ酸脱炭酸酵素活性は、YPD 培地 (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose) に、酵母 2.0×10^7 cells/ml, 50mg/ml フェルラ酸を添加し、24 時間浸透培養した後、培養上清中に産生された 4-VG 量を逆相 HPLC で測定することでおこなった。

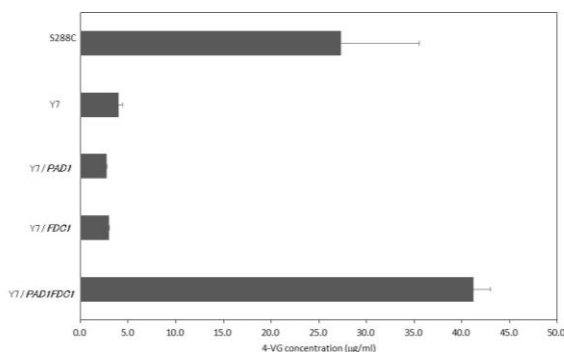


Fig. 1 Ferulic acid decarboxylation activity of yeast strains and transformants of top-fermenting yeast. Yeast cells were cultured in 100 mL of YPD medium containing 50 µg/mL of ferulic acid. Solid bars represent the average 4-vinylguaiacol (4-VG) concentration and error bars represent the standard deviation of three replicate experiments for each strain.

上面ビール酵母 *S. cerevisiae* Y7 株の全ゲノム配列解析は、イルミナ社の次世代シーケンサー HiSeq2500 を使用しておこなった。125b の pair-end シーケンスをおこない、アセンブリソフトウェア Platanus を用いて¹²⁾、シーケンスの塊である scaffold を作製した。

125b の pair-end シーケンスは、DDBJ (DNA Database of Japan) に登録し、Bioproject では、PRJDB8667, Biosample では、SAM00182595 の登録番号を得ている。上面ビール酵母 *S. cerevisiae* Y7 の *PAD1*, *FDC1* 遺伝子を含む scaffold の登録番号は、LC493900 であり、他の上面ビール酵母のゲノム配列と同じであり、*PAD1* 遺伝子の 305 番目の塩基が A に置換され、ノンセンス変異になっていた。さらに、*FDC1* 遺伝子の 460 番目の塩基が A に置換され、ノンセンス変異になっていた。以上のデータより、上面ビール酵母 *S. cerevisiae* Y7 株は、機能ある Pad1, Fdc1 タンパク質を合成できないと判断された。この考えを基に、野生型の *PAD1*, *FDC1* 遺伝子をクローニングし、ハイグロマイシン耐性遺伝子を選択マーカーとしたプラスミド pTA2-PAD1-hygro と、G-418 耐性遺伝子を選択マーカーとしたプラスミド pTA2-FDC1-kanMX6 を作製した。各プラスミドを、上面ビール酵母 *S. cerevisiae* Y7 株に挿入し、形質転換体 Y7/*PAD1*, Y7/*FDC1*, Y7/*PAD1FDC1* を作製した。各形質転換体酵母のフェルラ酸脱炭酸酵素活性は、Fig. 1 に示した。野生型 *PAD1*, *FDC1* 遺伝子が共に挿入された形質転換体 Y7/*PAD1FDC1* のみが、フェルラ酸脱炭酸酵素活性を有していた。

2・2 野生型 *FDC1* 遺伝子で形質転換された下面ビール酵母は、4-VG を産生する

下面ビール酵母として、*Saccharomyces pastorianus* Weihenstephan34/70 株を使用した。このビール酵母株は、全世界的に使用されている¹³⁾。下面ビール酵母は、分類的には、*S. pastorianus* に属し、*S. cerevisiae* と *S. eubayanus* の自然交雑体である。これまでの報告と同様に¹⁴⁾、*Saccharomyces pastorianus* Weihenstephan34/70 株は、フェルラ酸脱炭酸酵素活性を有しない (Fig. 2)。*Saccharomyces pastorianus* Weihenstephan34/70 株の *S. cerevisiae*-type *FDC1* 遺伝子の 500 番目の塩基には、A の挿入によって、6 回繰り返しの A が続き、508 番目の塩基で翻訳終了コドンになる。この結果は、*Saccharomyces pastorianus* Weihenstephan34/70 株では、機能ある Fdc1 タンパク質が合成されていないことを示している。この考えを基に、野生型の *S. cerevisiae*-type *FDC1* 遺伝子が挿入されているプラスミド pTA2-FDC1-kanMX6 を、下面ビール酵母 *Saccharomyces pastorianus* Weihenstephan34/70 株に形質転換し、形質転換体 *S. pastorianus* Weihenstephan 34/70/*FDC1* を得た。形質転換体 *S. pastorianus* Weihenstephan 34/70/*FDC1* のフェルラ酸脱炭酸酵素活性は、Fig. 2 に示した。野生型の *S. cerevisiae*-type *FDC1* 遺伝子が挿入された下面ビール酵母の形質転換体は、フェルラ酸脱炭酸酵素活性を有していた。フェルラ酸脱炭酸酵素活性は、Fig. 1 の場合と同様の方法で測定した。

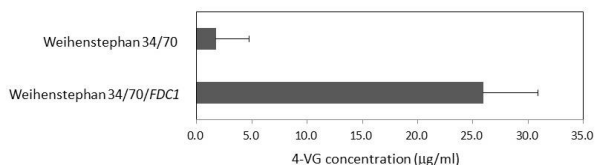


Fig. 2 Ferulic acid decarboxylation activity of bottom-fermenting yeast and its transformant. Yeast cells were cultured in 100 mL of YPD medium containing 50 μg/mL of ferulic acid. Solid bars represent the average 4-vinylguaiacol (4-VG) concentration and error bars represent the standard deviation of three replicate experiments for each strain.

2・3 *S. cerevisiae*-type *FDC1* 遺伝子の変異と *S. eubayanus*-type *FDC1* 遺伝子の欠損が下面ビール酵母を、4-VG を非産生した

これまでに下面ビール酵母 *Saccharomyces pastorianus* は、*S. cerevisiae* と *S. eubaynus* の自然交雑体であると示されてきた⁶⁾。また、*S. eubaynus* CBS12357 は、フェルラ酸脱炭酸酵素活性を有していることが報告されており¹⁵⁾、このことは、我々も確認している(Fig. 3)。*S. eubayanus* CBS12357 のゲノム配列解析より、登録番号 NC_030972 の塩基番号 934704–935432 に、*PAD1* 遺伝子のオーソログが、塩基番号 935885–937396 に、*FDC1* 遺伝子のオーソログが存在すると予想された。これら二つの遺伝子を、*Se-PAD1*、*Se-FDC1* 遺伝子とそれぞれ命名した。これらの遺伝子は、下面ビール酵母 *S. pastorianus* Weihenstephan 34/70 のゲノム配列には見いだされなかった。Frohberg-type の下面ビール酵母では、第 IV 染色体、第 XIII 染色体には、構造変化があったことが示されている。下面ビール酵母で、この二つの遺伝子が欠失していることは、染色体構造変化が関係していると考えられた。

この考えを基に、*Se-FDC1* 遺伝子をクローニングし、実験室酵母 *S. cerevisiae* BY4741 $\Delta pad1$ 株、*S. cerevisiae* BY4741 $\Delta fdc1$ 株、*S. pastorianus* Weihenstephan 34/70-ura3 (RAK6174) 株に導入した。*S. pastorianus* Weihenstephan 34/70-ura3 (RAK6174) 株は、下面ビール酵母 *S. pastorianus* Weihenstephan 34/70 株のウラシル要求性株である⁷⁾。YE24 は、*S. cerevisiae* の *URA3* 遺伝子を選択マーカーにし、*S. cerevisiae* の 2μm DNA の複製開始点を有するプラスミドである。*S. cerevisiae* BY4741 $\Delta pad1$ 株に、*Se-FDC1* 遺伝子を導入した形質転換体 *S. cerevisiae* BY4741 $\Delta pad1$ /YE24-*SeFDC1* では、フェルラ酸脱炭酸酵素活性は示さなかったが、*S. cerevisiae* BY4741 $\Delta fdc1$ 株に、*Se-FDC1* 遺伝子を導入した形質転換体 *S. cerevisiae* BY4741 $\Delta fdc1$ /YE24-*SeFDC1* では、フェルラ酸脱炭酸酵素活性

を示した(Fig. 3)。フェルラ酸脱炭酸酵素活性の測定は、概ね Fig. 1 及び Fig. 2 の方法と同じであるが、酵母の培養は、SD 培地(2% glucose, 0.67% Yeast nitrogen base w/o amino acids)を用いた。形質転換体 *S. cerevisiae* BY4741 $\Delta fdc1$ /YE24-*SeFDC1* でフェルラ酸脱炭酸酵素活性を有していたことは、*S. eubayanus* 由来の *Se-Fdc1* タンパク質は機能しており、形質転換体 *S. cerevisiae* BY4741 $\Delta fdc1$ /YE24-*SeFDC1* の菌体内では、*S. eubayanus* 由来の *Se-Fdc1* タンパク質と *S. cerevisiae* 由来の *Pad1* タンパク質が協同して、フェルラ酸脱炭酸酵素活性を示していると考えられた。

下面ビール酵母の形質転換体である *S. pastorianus* Weihenstephan 34/70-ura3 (RAK6174) /YE24-*SeFDC1* でも、フェルラ酸脱炭酸酵素活性を示した(Fig. 3)。このことも、下面ビール酵母の形質転換体 *S. pastorianus* Weihenstephan 34/70-ura3 (RAK6174) /YE24-*SeFDC1* の菌体内で、*S. eubayanus* 由来の *Se-Fdc1* タンパク質と *S. cerevisiae* 由来の *Pad1* タンパク質が協同して、フェルラ酸脱炭酸酵素活性を示していると考えられた。従って、下面ビール酵母 *S. pastorianus* では、*S. cerevisiae*-type *FDC1* 遺伝子のフレームシフト変異と、*S. eubaynus*-type *FDC1* 遺伝子の消失により、フェルラ酸脱炭酸酵素活性が消失したと考えられた。

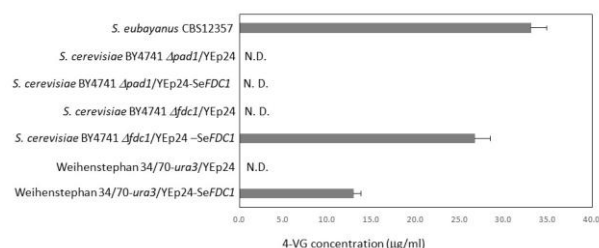


Fig. 3 Ferulic acid decarboxylation activity of yeast strains and transformants of laboratory yeast and bottom-fermenting yeast. Yeast cells were cultured in SD medium (2% glucose, 0.67% yeast nitrogen base w/o amino acids) with required supplements containing 50 μg/mL of ferulic acid. Solid bars represent the average 4-vinylguaiacol concentration (4-VG) and error bars represent the standard deviation of three replicate experiments for each strain. N.D. means the value was below the detection limit (<1.0 μg/mL).

2・4 上面、下面ビール酵母のフェノール臭非産生機構と *PAD1*、*FDC1* 遺伝子の変異、欠失の関係の研究のまとめ

4-ビニルグアコール(4-VG)等のフェノール臭は、薬品臭、グローブ臭として、様々な酒類の好ましくない臭いとされてきた。この研究では、上面ビール酵母及び下面ビール酵母に、実験室酵母 *S. cerevisiae* 由来の野生型 *PAD1*、*FDC1* 遺伝子を挿入することで、4-VG 産生能の

回復がみられるかを調べたものである。その結果、上面ビール酵母では、野生型 *PAD1*, *FDC1* 遺伝子を挿入することで、4-VG 産生能の回復がみられ、上面ビール酵母の *PAD1*, *FDC1* 遺伝子のフレームシフト変異が、上面ビール酵母のフェノール臭非産生に関与していることがあきらかになった。また、下面ビール酵母には、*S. cerevisiae* 由来の *FDC1* 遺伝子あるいは、*S. eubayanus* 由来の *FDC1* 遺伝子を挿入することで、4-VG 産生能の回復がみられたことから、下面ビール酵母の *S. cerevisiae* 由来の *FDC1* 遺伝子のフレームシフト変異と *S. eubayanus* 由来の *FDC1* 遺伝子の消失が、下面ビール酵母のフェノール臭非産生に関与していることがあきらかになった。なお、下面ビール酵母でみられた *S. cerevisiae* 由来の *FDC1* 遺伝子のフレームシフト変異は、上面ビール酵母の *FDC1* 遺伝子の配列にもみられるので、下面ビール酵母の自然交雑の一方の親株は、上面ビール酵母であると推察された。

謝辞

本解説は、Journal of the American Society of Brewing Chemists 誌に投稿、審査受理された研究を一部変更して掲載している¹¹⁾。この研究は、前橋工科大学大学院生物工学専攻博士課程前期修了生である鮎澤涼君、前橋工科大学生物工学科卒業研究生である山田龍典君、前橋工科大学生命情報工学科中村建介教授との共同研究である。この研究の一部は、前橋工科大学平成 31 年度分野横断型研究事業としておこなったものである。

参考文献

- 1) K. C. Fugelsang and C. G. Edwards, Chapter 11 Wine Spoilage. "Wine Microbiology", (2007), Springer p.162–179, DOI, 10.1007/978-0-387-33349-6_11.
- 2) C. D. Powell and D. W. M. Kerruish, 11 Beer-Spoiling Yeasts: Genomics, Detection, and Control. "Brewing Microbiology Current Research, Omics and Microbial Ecology", (N. A. Bokulich and C. W. Bamforth) (2017) Caister Academic Press, p.289–327, DOI, 10.21775/9781910190616.11.
- 3) B. Gallone et al., *Domestication and Divergence of Saccharomyces cerevisiae Beer Yeasts*. Cell **66**, 1397–1410. e10. (2016) DOI, 10.1016/j.cell.2016.08.020.
- 4) N. Mukai et al., *PAD1 and FDC1 Are Essential for the Decarboxylation of Phenylacrylic Acids in Saccharomyces cerevisiae*. J. Biosci. Bioeng. **109**, 564–569 (2010) DOI, 10.1016/j.jbiosc.2009.11.011.
- 5) N. Mukai et al., *Single Nucleotide Polymorphisms of PAD1 and FDC1 Show a Positive Relationship with Ferulic Acid Decarboxylation Ability among Industrial Yeasts Used in Alcoholic Beverage Production*. J. Biosci. Bioeng. **118**, 50–55. (2014) DOI, 10.1016/j.jbiosc.2013.12.017.
- 6) D. Libkind et al., *Microbe Domestication and the Identification of the Wild Genetic Stock of Lager-Brewing Yeast*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **108**, 14539–14544 (2011) DOI, 10.1073/pnas.1105430108.
- 7) N. Murakami et al., *Construction of a URA3 Deletion Strain from the Allotetraploid Bottom-Fermenting Yeast Saccharomyces pastorianus*. Yeast **29**, 155–165 (2012) DOI, 10.1002/yea.2897.
- 8) J. Hansen and M. C. Kielland-Brandt, *Inactivation of MET2 in Brewer's Yeast Increases the Level of Sulfite in Beer*. J. Biotechnol. **50**, 75–87 (1996) DOI, 10.1016/0168-1656(96)01551-9.
- 9) J. Hansen and M. C. Kielland-Brandt, *Inactivation of MET10 in Brewer's Yeast Specifically Increases SO2 Formation during Beer Production*. Nat. Biotechnol. **14**, 1587–1591 (1996).
- 10) K. Iijima and T. Ogata, *Construction and Evaluation of Self-Cloning Bottom-Fermenting Yeast with High SSU1 Expression*. J. Appl. Microbiol. **109**, 1906–1913 (2010) DOI, 10.1111/j.1365-2672.2010.04819.x.
- 11) T. Ogata et al., *Mutation and deletion of PAD1 and/or FDC1 and absence of phenolic off-flavor production in top- and bottom-fermenting yeasts*. J. Am. Soc. Brew. Chem. **78**, 74–79 (2020) DOI, 10.1080/03610470.2019.1678911.
- 12) R. Kajitani et al., *Efficient de Novo Assembly of Highly Heterozygous Genomes from Whole-Genome Shotgun Short Reads*. Genome Res. **24**, 1384–1395 (2014) DOI, 10.1101/gr.170720.113.
- 13) M. Hutzler et al., 5. Yeast Identification and Characterization. "Brewing Microbiology Managing Microbes, Ensuring Quality and Valorizing Waste" Hill, A. E., Ed., (2015) Elsevier, p.65–104.
- 14) S. Mertens et al., *Rapid Screening Method for Phenolic off-Flavor (POF) Production in Yeast*. J. Am. Soc. Brew. Chem. **75**, 318–323 (2017) DOI, 10.1094/ASBC-J-2017-4142-01.
- 15) J. A. Diderich et al., *Selection of Pof⁻ Saccharomyces eubayanus Variants for the Construction of S. cerevisiae × S. eubayanus Hybrids with Reduced 4-Vinyl Guaiacol Formation*. Front. Microbiol. **9**, 1640 (2018) DOI, 10.3389/fmicb.2018.01640.