

接合によりグルコアミラーゼ遺伝子 *STA1* が発現したビール酵母の育種†

尾形智夫*

Construction of a brewing yeast expressing the glucoamylase gene *STA1* by mating†

Tomoo Ogata*

Standard brewing yeast cannot utilize larger oligomers or dextrans, which represent about 25% of wort sugars. A brewing yeast strain that could ferment these additional sugars to ethanol would be useful for producing low-carbohydrate diabetic or low-calorie beers. In this study, a brewing yeast strain that secretes glucoamylase was constructed by mating. The resulting *Saccharomyces cerevisiae* 278/113371 yeast was *MATa/α* diploid, but expressed the glucoamylase gene *STA1*. At the early phase of the fermentation test in malt extract medium, the fermentation rate of the diploid *STA1* strain was slower than those of both the parent strain *S. cerevisiae* MAFF113371 and the reference strain bottom-fermenting yeast Weihenstephan 34/70. At the later phase of the fermentation test, however, the fermentation rate of the *STA1* yeast strain was faster than those of the other strains. The concentration of ethanol in the culture supernatant of the *STA1* yeast strain after the fermentation test was higher than those of the others. The concentration of all maltooligosaccharides in the culture supernatant of the *STA1* yeast strain after the fermentation test was lower than those of the parent and reference strains, whereas the concentrations of flavor compounds in the culture supernatant were higher. These effects are due to the glucoamylase secreted by the constructed *STA1* yeast strain. In summary, a glucoamylase-secreting diploid yeast has been constructed by mating that will be useful for producing novel types of beer owing to its different fermentation pattern and concentrations of ethanol and flavor compounds.

Key words : glucoamylase, brewing yeast, mating, maltooligosaccharide, flavor compound

1 はじめに

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、太古より、酒類製造、パン製造等の食品製造に利用されている酵母である。食品製造に利用されている *S. cerevisiae* の酵母株のほとんどは、グルコース、マルトース、マルトトリオースまでは利用できるが、グルコースが3分子以上重合したデキストリンは、利用することができない。一方、*S. cerevisiae* の synonym (亜種) である、*S. cerevisiae ver. diastaticus* は、グルコアミラーゼ遺伝子をコードする *STA1* 遺伝子を有し、グルコアミラーゼを細胞外に分泌し、デキストリンを利用することができる。

酒類のうち、特にビールの原料である麦汁には、デキストリンが相当量存在するので、デキストリンを利用できるビール酵母が育種できると、低カロリービール等、新しいタイプのビールを造ることができると期待される。

S. cerevisiae ver. diastaticus 自体は、麦汁発酵能や造られるビールの香味が適切ではないと考えられるので、*STA1* 遺伝子を有し、グルコアミラーゼ活性のあるビール酵母の育種が望まれていた。

この目的を達成するために、遺伝子組み換え技術を用いた *STA1* 遺伝子を有するビール酵母の育種等が試みられてきた。しかし、遺伝子組み換え技術によって育種されたビール酵母は、「遺伝子組み換え体(GMO)」であり、実用には行政上の手続きが必要であり、また、現状、消費者の理解や支持が得られているとは言えない。

そこで、本稿では、著者らがおこなった接合によるグルコアミラーゼ遺伝子 *STA1* が発現したビール酵母の育種を中心に解説する¹⁾。

† 原稿受理 平成30年2月28日 Received February 28, 2018

* 生物工学科 (Department of Biotechnology)

2 グルコアミラーゼ(STA1)遺伝子が発現したビール酵母の育種

2・1 遺伝子組換え手法による育種

グルコアミラーゼ(STA1)遺伝子をビール酵母で発現させた例は、Perryら²⁾と Sakaiら³⁾の報告がある。1970年代後半に、始めて実験室酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の形質転換法が報告された⁴⁾。この場合、ロイシン等の栄養を要求する変異株に対し、導入するプラスミド DNA に、その栄養要求変異を相補する遺伝子を有するものを使って、栄養要求性が相補されたコロニーを選択する方法で、酵母の形質転換がおこなわれていた。また、形質転換に用いるプラスミド DNA を酵母菌体に導入するためには、酵母の細胞壁を除去する酵素処理をして、裸の細胞(プロトプラスト)化する必要があった。ビール酵母は、通常、栄養要求性変異は有していないので、実験室酵母の形質転換法をそのまま利用することはできない。Perryらは、プロトプラスト化したビール酵母に、STA1 遺伝子を有するプラスミドを導入する際に、そのプラスミドには、銅耐性となる CUP1 遺伝子を有しているものを利用した。形質転換株は、銅含有培地で生育してきたコロニーで、グルコアミラーゼ活性があるものを選択することでおこなった²⁾。Sakaiらは、ビール酵母の形質転換株の選択のために、薬剤 G-418 耐性遺伝子を利用した³⁾。薬剤耐性の形質転換株を分離するには、先述のプロトプラスト法では、再生培地の利用等で方法が煩雑かつ困難になるので、プロトプラスト化しないで、リチウム塩による酵母細胞処理で、プラスミド DNA 等を酵母細胞に取り込ませることで、酵母の形質転換をおこなう、いわゆるリチウム法を⁵⁾、ビール酵母の形質転換に用いた³⁾。STA1 遺伝子を有する形質転換体ビール酵母は、いずれの実験であっても、発酵の初期は、親株よりもむしろ遅い発酵の進行であったが、発酵後期に親株よりも発酵の進行が進み、産生されるエタノール量も多く、発酵液のデキストリンが利用されたことによると考察していた^{3), 4)}。

2・2 接合による育種

以上のように、先駆的な研究がおこなわれたが、その後、実業に直接結び付くグルコアミラーゼ活性を有するビール酵母の育種の研究例の報告はなかった。これは、先進諸国では、ビール産業が急速に成熟してきたことや遺伝子組換え体を好まない消費者の動向等が影響したものと考えられた。そこで、著者らは、接合による育種を考えた。接合とは、接合遺伝子座に Ya 配列が挿入され、接合性 a を示す 1 倍体細胞と、接合遺伝子座に Yalpha 配列が挿入され、接合性 alpha を示す 1 倍体細胞が互いに接触し、融合し、接合性を示さない(接合遺伝子座が a/alpha になる) 2 倍体細胞となる生命現象である。双方の 1 倍体細胞の遺伝情報が、原則すべて移行されることになる。接合による酵母育種は、酵母の自然現象であり、表示義務等はなく、実用への障害はほとんどないといえる。

ビール酵母等の産業用酵母の多くの酵母菌株は、胞子

形成能が低い等により、長い間、接合性を示す 1 倍体酵母母が分離されておらず、接合育種は困難であると考えられていた。しかし、近年の実験技術の進歩等により、清酒酵母等の胞子形成能の低い酵母株からも、接合性を示す 1 倍体酵母母が分離されたことが報告され⁶⁾、ビール酵母を含めた産業用酵母での接合育種の可能性が見いだされてきた。

著者らは、STA1 遺伝子を有し、接合性 alpha である *S. cerevisiae* 278 と、接合性 a であるパン酵母 *S. cerevisiae* MAFF113371 とを接合させ、a/alpha である *S. cerevisiae* 278/113371 を育種した。パン酵母 *S. cerevisiae* MAFF113371 は、マルトース利用能が高いため、ビール酵母としても利用できると考えた。接合育種された酵母株 *S. cerevisiae* 278/113371 と、親株 *S. cerevisiae* MAFF113371、代表的な下面ビール酵母 *S. pastorianus* W34/70 を用いた、12%麦芽エキスでの発酵試験経過を産生した二酸化炭素量で、Fig.1 に示した。

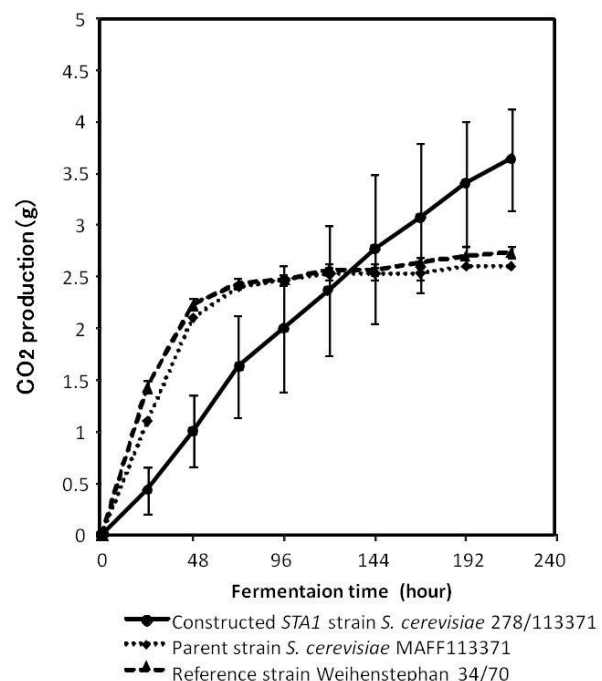


Fig. 1 Fermentation test of constructed yeast strain in malt extract medium

STA1 遺伝子を形質転換によって、ビール酵母に導入した先駆的研究^{2), 3)}での結果と同様に、発酵初期では、STA1 遺伝子を有する酵母株では、むしろ発酵の進行は遅く、発酵後期で、STA1 遺伝子を有親株や代表的な下面ビール酵母よりも発酵が進行していることがみられた。

発酵初期では、STA1 遺伝子を有する酵母株では、むしろ発酵の進行は遅いことは、分泌されたグルコアミラーゼによって、デキストリンが分解され、生じたグルコースによって、マルトース等のグルコース以外の糖の利用が阻害された、いわゆる catabolite repression によるものであるかを検討した。接合育種された酵母株 *S. cerevisiae* 278/113371 と、親株 *S. cerevisiae* MAFF

113371 を、グルコース 10%の培地で、12%麦芽エキスでの発酵試験と同様に、経過をみた(Fig. 2). 12%麦芽エキスでの発酵試験の時とは異なり、グルコース培地の場合は、双方の酵母株の発酵経過に差異はなかった. この結果より、12%麦芽エキスでの発酵試験の発酵初期で見られた親株等と比較して、接合育種されたグルコアミラーゼ発現酵母株 *S. cerevisiae* 278/113371 の発酵速度の遅いことは、グルコアミラーゼ発現による catabolite repression によると考えられた.

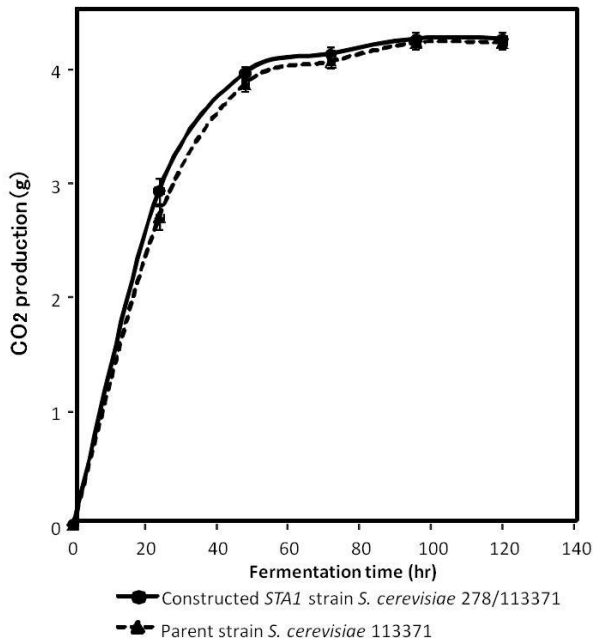


Fig. 2 Fermentation profile of the constructed yeast strain in glucose medium

12%麦芽エキス培地の発酵試験前の HPLC プロフィールは、Fig.3 に示した. グルコース、マルトース、マルトトリオース等の糖以外に、マルトテトラオース等のデキストリンも検出することができた.

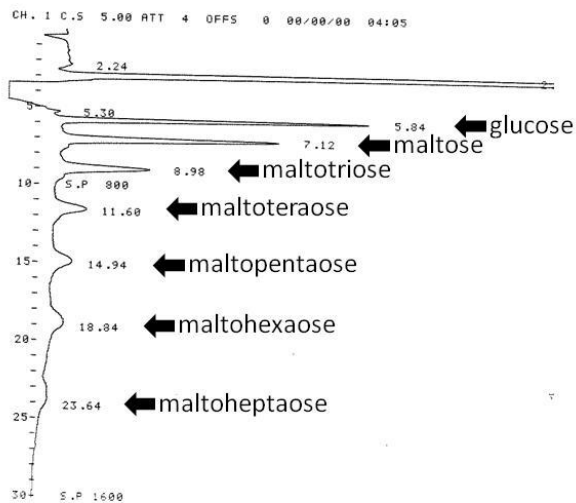


Fig. 3 HPLC profile of malt extract before fermentation trial

12%麦芽エキス培地の代表的な下面ビール酵母 *S. pastorianus* W34/70 による発酵試験結果後の HPLC プロフィールは、Fig. 4 に示した. 予想したように、グルコース、マルトース、マルトトリオースは、利用されて、ほとんど消費されていたが、マルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオース等のデキストリンは、下面ビール酵母に利用されず、発酵液中に残存していた.

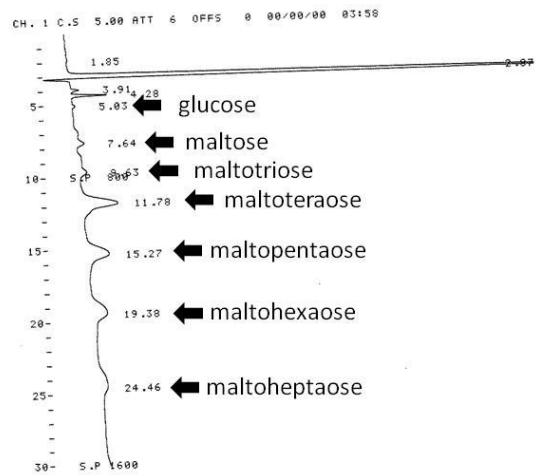


Fig. 4 HPLC profile of malt extract after fermentation trial by bottom-fermenting yeast *S. pastorianus* W34/70

一方、接合育種されたグルコアミラーゼ発現酵母株 *S. cerevisiae* 278/113371 の 12%麦芽エキス培地での発酵試験結果後の HPLC プロフィールは、Fig. 5 に示した. グルコース、マルトース、マルトトリオースのみならず、下面ビール酵母 *S. pastorianus* W34/70 が利用することができなかったマルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオースも利用され、消費されていることが確認された.

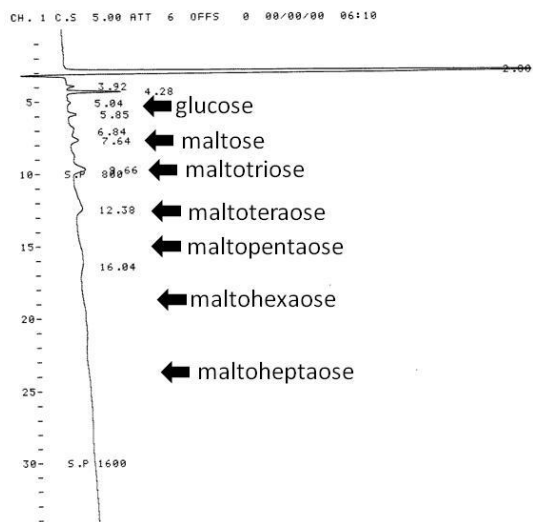


Fig. 5 HPLC profile of malt extract after fermentation trial by constructed *STA1* yeast *S. cerevisiae* 278/113371

接合育種されたグルコアミラーゼ発現酵母株 *S. cerevisiae* 278/113371 で利用されたデキストリンの一部は、エタノールや高級アルコール、酢酸エステル等の香り成分になったと考えられた (Table 1). 従って、グルコアミラーゼが発現されたビール酵母を利用すると、ダイエットビールのみならず、全く新しいタイプのビールを造ることができるかと期待された。

Table 1 Concentrations of ethanol and flavor compounds in culture supernatants derived from the fermentation trial in malt extract medium.

	Ethanol ^a	Isoamy alcohol ^b	Ethyl acetate ^b
<i>S. cerevisiae</i> 278/113371	3.8 ± 0.2*	279 ± 7*	20.0 ± 1.7*
<i>S. cerevisiae</i> MAFF113371	3.2 ± 0.1	101 ± 3	6.3 ± 0.6
<i>S. pastorianus</i> W34/70	3.2 ± 0.1	114 ± 4	8.0 ± 1.0

^a Values (%) are means ± standard deviation.

^b Values (mg/ml) are means ± standard deviation.

* Statistically significant difference (1%) from the results of *S. cerevisiae* MAFF113371 and W34/70.

2.3 グルコアミラーゼ (*STA1*) 遺伝子の発現制御機構について

Yamashita ら⁶⁾ や Dranginis は⁷⁾、*STA1* 遺伝子を有する酵母株は、接合遺伝子座 *MAT* が、a/alpha である場合、グルコアミラーゼ活性がみられないことを報告している。接合育種では、接合性 a の酵母株と接合性 alpha の酵母株が接合することで、接合性 a/alpha の酵母株作製される。グルコアミラーゼをコードする *STA1* 遺伝子が、接合遺伝子座 *MAT* が a/alpha である場合、遺伝子発現が抑制されるとなると、接合育種では、グルコアミ

ラーゼ発現酵母株を育種できないこととなる。今回、育種されたグルコアミラーゼ発現酵母株 *S. cerevisiae* 278/113371 は、接合遺伝子座 *MAT* は a/alpha であることは確認されている。一方、接合遺伝子座 *MAT* が a/alpha であるとみられる各遺伝子発現制御については、未だ確認できていない。このグルコアミラーゼ発現酵母株が、接合遺伝子座 *MAT* の遺伝子発現制御が正常に行われているのか、あるいは、グルコアミラーゼ遺伝子発現について、接合遺伝子座による制御はあるのかについては、今後の研究課題といえる。

謝辞

本解説は、Journal of the Institute of Brewing Vol.123, p66-69 (2017) に掲載された研究を一部変更して掲載している。この研究は、前橋工科大学生物工学科卒業研究生である、岩下祐子さん、川田貴代さんとの共同研究である。この研究は、公益社団法人食生活研究会の平成 27 年度研究助成の助成を受けて、及び、前橋工科大学平成 29 年度重点研究費を受けておこなったものである。

参考文献

- 1) T. Ogata, et al. Construction of a brewing yeast expressing the glucoamylase gene *STA1* by mating, J. Inst. Brew. **123**, 66-69 (2017).
- 2) C. Perry, et al. Properties of a genetically-engineered dextrin-fermenting strain of brewers' yeast, J. Inst. Brew. **94**, 64-67 (1988).
- 3) K. Sakai, et al. Expression of the *Saccharomyces diastaticus STA1* gene in brewing yeasts. J. Am. Soc. Brew. Chem. **47**, 87-91 (1989).
- 4) A. Hinnen, et al. Transformation of yeast. Proc. Natl Acsd. Sci. USA **75**, 1929-1933 (1978).
- 5) H. Ito, et al. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. J. Bacteriol. **153**, 163-168 (1983).
- 6) I. Yamashita, et al. Control of *STA1* gene expression by the mating-type locus in yeasts. J. Bacteriol. **164**, 769-773 (1985).
- 7) A. M. Dranginis. Regulation of *STA1* gene expression by *MAT* during the life cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. **9**, 3992-3998 (1989).