β -フェネチルアルコール高生産酵母の分子育種

遺伝子組換えによる酵母の分子育種は、従来の突然変異法による育種と比較して、目的とする形質のみを変化させられるという点で優れた方法である。なかでも、香気生成酵母の分子育種については、最近、多くの研究が報告されている。本稿では、 β -フェネチルアルコール高生産酵母の分子育種を精力的に展開している筆者に具体的に解説していただいた。

福田 和 郎

1. はじめに

酵母は発酵過程でエタノールと共に様々な香気物質を生産するが、これら物質は酵母にとっては必ずしも生育に必須ではない。一方で、香りは人間にとって非常に嗜好性の強い物質であり、我々の生活を豊かにしてくれる。近年の吟醸酒人気にもみられるように、清酒をはじめとする醸造飲料や食品では、いっそうの高品質化や差別化あるいは個性化が望まれている。そのなかでも香気成分が注目され、特別な酵母を使用してこれらの目的を達成しようとする研究が活発になってきている。

酵母が生産する β -フェネチルアルコール (β -Phe-OH) と酢酸 β -フェネチルは、それぞれバラ、モモの花に類似の香りを示す物質である。第1図のように、フェニルアラニン (Phe) 生合成経路のフェニルピルビン酸が脱炭酸されて β -PheOH が生成され¹⁾、さらにアセチル CoA とのエステル化反応で酢酸 β -フェネチルが生成されることが知られている²⁾。したがって、酵母の Phe 生合成経路を強化することによりこれらの香気物質を高生産できるものと予想される。ここでは、 β -PheOH とその酢酸エステルを高生産する清酒酵母の分子育種を目的として筆者らが行った研究^{3~8)}について解説する。

2. Phe アナログ耐性株の取得と香気生成能³⁾

アミノ酸生合成経路を強化する方法としては、アミノ酸アナログに対する耐性変異株の取得が有効である。そこで、まず初めに清酒酵母協会9号 (K-9) の Phe アナログに対する感受性試験を行った。その結果、メタフルオロフェニルアラニン (MFP, 5 mg/ml)、オルトフル

オロフェニルアラニン (OFP, 2 mg/ml)、ハラフルオロフェニルアラニン (PFP, 1 mg/ml) でそれぞれ生育が阻止された。これら生育阻止は Phe の添加により解除された。この結果は、これらのアナログが、*in vivo* で

第1図 芳香族アミノ酸と β -フェネチルアルコール、酢酸 β -フェネチルの生成経路
DAHP: 3-デオキシ-D-アラビノヘプツロソニン酸-7-リン酸

Molecular Breeding of a Sake Yeast for Increased Production of β -Phenethyl Alcohol
Kazuro FUKUDA (Foods and Liquors Research Laboratories, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.)

第2図 清酒酵母 K-9 由来の各フェニルアラニンアナログ耐性変異株の β -フェネチルアルコール生成能

Phe と拮抗していることを示している。次に、K-9 をエチルメタンサルホン酸で処理した後、各アナログ含有培地上に塗布し生育してくる株を耐性株として取得した。Phe アナログ耐性株各々 40 株を最少培地中で 30°C 、2 日間振盪培養し、生成した β -PheOH を PEG-20 M を用いたキャピラリー GC 法で定量した。第2図に示すように、OFP および PFP 耐性株の中に親株に比べて β -PheOH を 10 倍以上生産する株が認められた。一方、MFP 耐性株からは高生産株は出現しなかった。アミノ酸を含まない最少培地中での β -PheOH 生成は、酵母がグルコースから Phe 合成経路を介して β -PheOH を生成していることを示している。

β -PheOH を高生産した OFP 耐性株 OFP-3 および PFP 耐性株 PFP-26 を用いて清酒小仕込試験を行った結果、変異株による醪の発酵経過および清酒一般分析結果は親株と比べて大差なかったが、 β -PheOH とその酢酸エステル含量は約 3 倍増加し、官能的にも対照と明らかに異なる含み香が感じられ良好であった。

3. β -PheOH 高生産機構の解析⁴⁾

Phe アナログ耐性株の中から β -PheOH とその酢酸エステルを高生産する株を取得することができた。そこで、次にその高生産機構を知るための解析を行った。

(1) 芳香族アミノ酸とそのアナログ存在下での生育 K-9, OFP-3 および PFP-26 について、芳香族アミノ酸とそのアナログ存在下での生育を調べた(第1表)。

第1表 芳香族アミノ酸とそのアナログ存在下での生育

アナログ (5 mM) アミノ酸 (1 mM)	酵母の生育		
	K-9	OFP-3	PFP-26
OFP	—	+	+
PFP	—	—	+
OFP+Phe	+	+	+
PFP+Phe	+	+	+
PFP+Tyr	—	+	—
PFP+Trp	—	—	+
PFP+Phe+Tyr	+	+	+
3 AT	+	+	—
3 AT+Tyr	+	+	+

OFP: オルトフルオロフェニルアラニン, PFP: パラフルオロフェニルアラニン, 3 AT: 3-アミノチロシン

第2表 菌体内外の芳香族アミノ酸含量

アミノ酸	菌体内含量 (mg/g)			菌体外含量 ($\mu\text{g/ml}$)		
	K-9	OFP-3	PFP-26	K-9	OFP-3	PFP-26
Phe	0.5	0.9	4.0	1.5	6.0	5.6
Tyr	0.5	1.5	0.2	0.4	6.2	0.0
Trp	0.3	0.4	1.5	6.6	8.0	41.6

酵母は最少培地で培養した。

OFP-3 は PFP に非生育であったが、さらにチロシン (Tyr) を添加すると生育が回復した。一方、PFP-26 は OFP に生育を示したが、Tyr 存在下で PFP に非生育となり、さらに Tyr アナログである 3-アミノチロシンにも非生育であった。両株が異なったアナログ感受性を示すことは、耐性機構が互いに異なっていることを示唆している。

(2) 菌体内外の芳香族アミノ酸の蓄積

第2表に示すように、OFP-3 は、親株に比べ菌体内外に Phe と Tyr を高蓄積した。一方、PFP-26 は、Phe とトリプトファン (Trp) を高蓄積したが、Tyr は菌体内で 1/2 に減少し菌体外には検出されなかった。また、PFP-26 の β -PheOH と Trp 高生産能は、培地中に Tyr を添加することにより失われた。これに対して、OFP-3 の β -PheOH 高生産能は、Tyr 添加によっても失われなかった。

(3) 芳香族アミノ酸合成経路の酵素活性

芳香族アミノ酸である Trp, Phe, Tyr は共通の経路から生成される(第1図)。この経路はフィードバック阻害と酵素生成の抑制によって、過剰にアミノ酸が生成しないように調節されている^{9,10)}。すなわち、Trp はアントラニル酸シンターゼを阻害と抑制する。Phe は、DAHP シンターゼを阻害し、プリフェン酸デヒドラターゼを阻害と抑制する。Tyr は DAHP シンターゼ、コ

第3表 DAHP シンターゼ活性の比較

酵 母	DAHP 活性 (nM/分/mg タンパク)			
	無添加	Phe (1mM)	Tyr (1mM)	Phe(1mM) Tyr(1mM)
K-9	18.2	9.1	10.9	0.9
OFP-3	18.8	10.5	19.0	11.3
PFP-26	71.0	31.6	32.8	2.5

最少培地で培養した酵母の無細胞抽出液を使用して活性を測定した。酵素活性の阻害試験は反応液中に Phe, Tyr を添加した。

第4表 芳香族アミノ酸生成経路の各酵素活性

酵 母	酵素活性 (nM/分/mg タンパク)			
	コリスミン酸ムターゼ	アントラニル酸シンターゼ	プリフェン酸デヒドロゲナーゼ	プリフェン酸デヒドロゲナーゼ
K-9	4.8	4.2	10.6	0.82
OFP-3	5.0	3.6	12.1	0.94
PFP-26	7.2	4.4	8.5	0.04

最少培地で培養した酵母の無細胞抽出液を使用して活性を測定した。

リスミン酸ムターゼ、プリフェン酸デヒドロゲナーゼをそれぞれ阻害する。

β -PheOH 高生産株について酵素レベルで解析した結果、OFP 耐性で取得した株と PFP 耐性で取得した株とでは機構が異なっていた。DAHP シンターゼは、Phe 感受性と Tyr 感受性の2つのアイソザイムが存在する(第1図)。第3表に示すように、PFP-26 の DAHP シンターゼ活性は、親株に比べ4倍に上昇していたが、Phe と Tyr によりフィードバック阻害された。一方、OFP-3 の DAHP シンターゼ活性は、Phe によりフィードバック阻害されたが、Tyr によるフィードバック阻害が解除されていた。他の芳香族アミノ酸生成系の酵素活性については、Tyr に分岐する鍵酵素であるプリフェン酸デヒドロゲナーゼの活性が PFP-26 で著しく減少しており、その他の酵素活性に差は見られなかった(第4表)。以上のことから、両耐性株とも Phe 生成系の変異により Phe の生合成経路が強化された結果、Phe アナログに耐性となり、同時に β -PheOH を高生産するに至ったことが明らかになった。しかし、その生成機構は互いに異なるために、OFP-3 では Tyr 生成が、PFP-26 では Trp 生成がそれぞれ増加している。

PFP-26 はプリフェン酸デヒドロゲナーゼ活性の減少によりプリフェン酸が蓄積し、その結果 Phe, Trp の生合成経路が強化されたと考えられる。しかし、DAHP シンターゼの Tyr によるフィードバック阻害は解除されていないため、Tyr 添加により β -PheOH と Trp の高生成能が失われた。また、プリフェン酸デヒドロゲナ

ーゼ活性の減少が菌体内 Tyr レベルの低下を引き起こし、ジェネラルコントロールの支配下にある DAHP シンターゼ¹¹⁾を脱抑制すると共に、親株が生育可能な濃度の Tyr アナログに対して非生育を示すようになったと考えられる。一方、OFP-3 の DAHP シンターゼは Tyr によるフィードバック阻害が解除されているために、Tyr 添加によっても β -PheOH 高生成能は失われていない。

なお、Phe アナログ耐性株が β -PheOH と同時に苦み成分であるチロソールやトリプトフォールも高生産することが報告されている^{12,13)}。筆者らの取得したアナログ耐性株も、OFP-3 ではチロソールが、PFP-26 ではトリプトフォールがそれぞれ高生産されていることが認められた。チロソール、トリプトフォール高生産は、それぞれ Tyr, Trp 生成の増加に伴って生じたものと考えられる。

4. β -PheOH 高生産変異の遺伝解析^{5,6)}

β -PheOH 高生産変異には酵素レベルで2つの互いに異なる機構が存在することが判明した。そこで、次に β -PheOH 高生産の遺伝子レベルでの解明を試みた。

清酒酵母は孢子形成能や発芽能が貧困なため遺伝解析が容易ではない。そこで、実験室酵母 *S. cerevisiae* X 2180-1 B (*MAT α*) を親株として Phe アナログ耐性株を取得した。OFP 耐性株 X 1 B-O-1 および PFP 耐性株 X 1 B-P-27 は親株に比べて最少培地中に β -PheOH を20倍以上生産した。さらに、芳香族アミノ酸とそのアナログ存在下での生育、菌体内外の芳香族アミノ酸の蓄積、芳香族アミノ酸生成経路の酵素活性について検討を行い、X 1 B-O-1 が清酒酵母由来の OFP-3 と類似の性質を示すことを確かめた。X 1 B-P-27 についても同様に清酒酵母由来の PFP-26 と類似の性質を示すことを確認した。これより、実験室酵母でも清酒酵母の変異株と類似の変異が生じているものと推定された。そこで、以下これら実験室酵母の変異株を用いて遺伝解析を行った。

野生型株との交雑による優性劣性試験の結果、X 1 B-O-1 については OFP 耐性と β -PheOH 高生産能は優性であり、X 1 B-P-27 については PFP 耐性と β -PheOH 高生産能は劣性であった。交雑株について四孢子解析を行った結果、OFP 耐性、PFP 耐性、 β -PheOH 高生産はすべて2:2分離を示し、同時に、耐性と高生産に連鎖がみられた。これより、OFP 耐性と PFP 耐性の両変異は核性単一遺伝子支配(それぞれ、*OFP1*, *pfp1*)であることが明らかとなり、耐性遺伝子の β -PheOH 高生産への関与が推定された。

第5表 形質転換酵母の性質

酵 母	生 育			生 産*	DAHP シンターゼ活性**の阻害			
	-Ura	-Phe	OFP	β -PheOH (ppm)	無添加	Phe (1mM)	Tyr (1mM)	Phe(1mM) Tyr(1mM)
PU-2	-	-	-	-	-	-	-	-
PU-2/YCp 50	+	-	-	-	-	-	-	-
PU-2/pKF 401	+	+	-	15	12.0	11.8	0.8	0.6
PU-2/pKF 101	+	+	+	168	10.7	11.1	11.4	11.5

* 最少培地で 30°C, 2 日間振盪培養 ** nM/分/mg タンパク

続いて, 変異遺伝子座の決定試験を行った。X1B-O-1 は Tyr 感受性の DAHP シンターゼ (*ARO4*) が脱惑作されていることより *OFP1* と *aro4* の連鎖を調べた。その結果, テトラッドがすべて両親 2 型を示したことより, *OFP1* が *ARO4* 上か極近傍に位置することが判明した。一方, X1B-P-27 はプリフェン酸デヒドロゲナーゼ (*TYR1*) の活性が著しく低下していることより *tyr1* との相補試験を行った。その結果, *tyr1* は *pfp1* を相補しなかったことより, *pfp1* が *tyr1* の対立遺伝子であることが判明した。しかし, *tyr1* と *pfp1* は, 前者が Tyr 要求性を示すのに対し, *pfp1* は Tyr 非要求性である点で異なっていた。

5. Phe アナログ耐性遺伝子のクローニング^{5,6)}

次に, 両耐性遺伝子のクローニングを行い β -PheOH 高生産との関係を調べた。*ARO4* 遺伝子については, 報告されている *ARO4* 全塩基配列¹⁴⁾をもとにプライマーを作製し, X2180-1B および X1B-O-1 の染色体 DNA を鋳型として PCR 法でクローニング後, 酵母ベクター YCp 50 (*URA3 CEN4*) に連結した (それぞれ pKF 401, pKF 101)。DAHP シンターゼ欠損株 PU-2 (*MATa aro3 aro4 ura3*) を pKF 401 および pKF 101 で形質転換した結果, pKF 101 で形質転換した株は OFP 耐性かつ β -PheOH 高生産性を示し, 酵素レベルでも Tyr によるフィードバック阻害の解除された DAHP シンターゼ活性が発現した (第5表)。

TYR1 遺伝子についても同様, *TYR1* の塩基配列¹⁵⁾をもとに, X2180-1B および X1B-P-27 の染色体 DNA を鋳型として PCR でクローニング後, YCp 50 に連結した (それぞれ pKF 301, pKF 201)。Tyr 要求性株 FD-8 (*MATa tyr1 ura3 his3 lys2*) を pKF 301 および pKF 201 で形質転換した結果, pKF 201 で形質転換した株は PFP 耐性かつ β -PheOH 高生産性を示した (第6表)。

以上の結果より, Phe アナログ耐性と β -PheOH 高生産の両形質は, 変異型 *ARO4* 遺伝子および変異型 *TYR1* 遺伝子に支配されていることが判明した。

第6表 形質転換酵母の性質

酵 母	生 育			生 産*
	-Ura	-Tyr	PFP	β -PheOH(ppm)
FD-8	-	-	-	80
FD-8/YCp 50	+	-	-	72
FD-8/pKF 301	+	+	-	61
FD-8/pKF 201	+	+	+	190

* YEPD 培地で 30°C, 2 日間振盪培養

6. β -PheOH 高生産清酒酵母の分子育種⁷⁾

変異型 *ARO4* (*ARO4*-OFP) は優性遺伝子であるため, 実用酵母の β -PheOH 高生産を目的とした分子育種が期待できる。そこで, 清酒酵母 K-9 の 1 倍体株 K-9 H 14 (*MATa*) からウラシル要求性株 K-9 H 14-U 7 (*MATa ura3*) を分離し, pKF 101 で形質転換した。形質転換体はウラシル相補により取得した。第7表に示すように, pKF 101 で形質転換した株は OFP 耐性と β -PheOH 高生産能を獲得し, Tyr によるフィードバック

第3図 清酒醪中の β -フェネチルアルコールと酢酸 β -フェネチル生成経過

○: K-9 H 14; ■: K-9 H 14-U 7;
□: K-9 H 14-U 7/YCp 50; ●: K-9 H 14-U 7/pKF 101

第7表 形質転換酵母の性質

酵 母	生 育		生 産*	DAHP シンターゼ活性**の阻害			
	-Ura	OFP		無添加	Phe(1mM)	Tyr(1mM)	The(1mM) Tyr(1mM)
K-9 H 14	+	-	9.1	18.8	11.0	10.3	0.8
K-9 H 14-U 7	-	-	—	—	—	—	—
K-9 H 14-U 7/YCp 50	+	-	10.2	20.1	11.7	9.1	1.0
K-9 H 14-U 7/pKF 101	+	+	165.8	29.8	21.3	18.1	10.1

* 最少培地, 30°C, 48 時間振盪培養

** nM/分/mg タンパク

第8表 形質転換酵母による生成酒の成分

成 分	酵 母			
	K-9 H 14	K-9 H 14-U 7	K-9 H 14-U 7/YCp 50	K-9 H 14-U 7/pKF 101
日本酒度	-1.1	-15.8	-0.9	-0.4
エタノール (%)	17.7	14.7	18.3	17.9
総 酸 (mL)	2.3	5.5	2.3	2.4
総アミノ酸 (mL)	2.3	2.7	2.2	2.4
イソブチルアルコール (ppm)	161.6	122.8	165.1	166.2
酢酸イソブチル (ppm)	0.6	0.4	0.6	0.5
イソアミルアルコール (ppm)	330.5	302.0	336.8	313.7
酢酸イソアミル (ppm)	3.7	1.7	3.2	3.7
β -フェネチルアルコール (ppm)	363.1	249.0	336.9	1025.2
酢酸 β -フェネチル (ppm)	10.1	3.2	11.3	23.0

ク阻害の解除された DAHP シンターゼ活性が発現していた。また、形質転換株の DAHP シンターゼの比活性が対照の約 1.5 倍を示したことより、宿主染色体上の *ARO 3* (Phe 感受性 DAHP シンターゼ) と *ARO 4* (Tyr 感受性 DAHP シンターゼ) に加えて、導入したプラスミド上の *ARO 4-OFP* がシングルコピーで DAHP シンターゼを発現したと推定された。

次に、形質転換株を用いて総米 600 g の清酒小仕込試験を行った。第3図に示すように、*ARO 4-OFP* が導入された清酒酵母は、醗酵期間中、 β -PheOH と酢酸 β -フェネチルを対照に比べて2~3倍生産した。生成した清酒は β -PheOH とその酢酸エステルを高濃度含有し(第8表)、官能的にも特徴のある濃醇な香味を示した。プラスミドの安定性を調べたところ、発酵終了時で約 90% の保持率であった。プラスミドが安定に保持された理由として、YCp 型ベクターの使用および清酒醗中のウラシル不足¹⁶⁾による選択圧が考えられる。

7. *ARO 4-OFP* 遺伝子の選択マーカーとしての利用

一般に実用酵母は栄養要求性等を持たないために、形質転換の選択マーカーとして耐性遺伝子が望まれている。そこで、*ARO 4-OFP* 遺伝子の選択マーカーとしての利用の可能性を検討した。K-9 H 14-U 7 を pKF 101

で形質転換しウラシルを含む OFP プレート上に塗布後、生育した株についてウラシル要求性を調べた。その結果、生育株すべてについてウラシル要求性が相補され、さらにプラスミドの脱落を調べた結果、OFP 耐性とウラシル要求性の相補は連鎖していた⁷⁾。他の実用株についても同様の実験を行った結果、*ARO 4-OFP* 遺伝子の選択マーカーとしての利用の可能性が示唆された¹⁷⁾。

シングルコピーで効果のある優性の耐性遺伝子で酵母 *S. cerevisiae* 起源のものはあまり知られていないことから¹⁸⁾、*ARO 4-OFP* をポジティブセレクションのマーカー遺伝子として使用することにより、実用酵母の形質転換の応用の範囲が広がるものと期待される。

8. *ARO 4-OFP* 遺伝子の変異点の解析⁶⁾

ARO 4 遺伝子のどの位置に変異が生じているかについては興味深い。そこで、*ARO 4* と *ARO 4-OFP* の全塩基配列を決定し両者を比較した。その結果を第4図に示す。*ARO 4-OFP* は *ARO 4* 構造遺伝子内の 496 番目の C が A に置換されていた。一方、構造遺伝子上流の調節遺伝子を含むと推定される領域内には変異は生じていなかった。これより、DAHP シンターゼ内の 166 番目のグルタミンがリジンに置換された1アミノ酸変異が原因で、DAHP シンターゼの Tyr によるフィードバック

GTGATGGA TCGGCGATC AACGCAAA TATGACTGC TATATGCA AGCGATTC -503	ATT GGT GCC AGA ACC ACC GAA TCT CAA CTG CAC AGA GAA TTG GCC TCC 576
TTATATTGAC ACCTTTTAT TGCGCATGAG GCTGTGAAA CATAGCTGT AACGCTCTCA -443	Ile Gly Ala Arg Thr Thr Glu Ser Gln Leu His Arg Glu Leu Ala Ser
CGSACAGTG TGTATTTGCA TTACTGTCAG CGAGTTATGT TGCTTAATAT AAGGCAAG -583	GGT TIG TCT TTC CCA GTT GGT TTC AAG AAC GGT ACC GAT GGT ACC TTA 624
GGAGGAGAG TACCTTTTAA AAGTGCGCC CACCGCTGC ACCCTGTGCA TTTTGTACGT -323	Gly Leu Ser Phe Pro Val Gly Phe Lys Asn Gly Thr Asp Gly Thr Leu
TACTGCGAAA TGACTCAAGC ATGAAATGAA AAAATTTTGC TTGAAATTTT GAAAAAAGA -263	AAT GTT GCT GTG GAT GCT TGT CAA GCC GCT GCT CAT TCT CAC CAT TTC 672
TCGCGGAGC GCCTTTGTAG CTCATTGAAT ACATCGTGAT CGAATCCAAT CAATGTTTAA -203	Asn Val Ala Val Asp Ala Cys Gln Ala Ala Ala His Ser His His Phe
TTTCATATTA ATACAGAAAC TTTTTCGAT ACITTTCTTT TCTTTTCATT GGTATATTAT -143	ATG GGT GTT ACT AAG CAT GGT GTT GCT GCT ATC ACC ACT ACT AAG GGT 720
CTATATATCG TGTAAATTCG TCTTTCTGCA TTTTATGCAT CGTATAAGA GATATTAAGA -83	Met Gly Val Thr Lys His Gly Val Ala Ala Ile Thr Thr Thr Lys Gly
ATACATGAA GAGTCTCTCT TTATATTGCT TTTATTTATA TATTAAACG CTAATTTTAT -23	AAC GAA CAC TGC TTC GTT ATT CTA AGA GGT GGT AAA AAG GGT ACC AAC 768
TAACGAAAG AATCTATGAG AA -1	Asn Glu His Cys Phe Val Ile Leu Arg Gly Gly Lys Lys Gly Thr Asn
ATG AGT GAA TCT CCA ATG TTC GCT GCC AAC GGC ATG CCA AAG GTA AAT 48	TAC GAC GCT AAG TCC GTT GCA GAA GCT AAG GCT CAA TTG CCT GCC GGT 816
Met Ser Glu Ser Pro MET Phe Ala Ala Asn Gly MET Pro Lys Val Asn	Tyr Asp Ala Lys Ser Val Ala Glu Ala Lys Ala Gln Leu Pro Ala Gly
CAA GGT GCT GAA GAA GAT GTC AGA ATT TTA GGT TAC GAC CCA TTA GCT 96	TCC AAC GGT CTA ATG ATT GAC TAC TCT CAC GGT AAC TCC AAT AAG GAT 864
Gln Gly Ala Glu Glu Asp Val Arg Ile Leu Gly Tyr Asp Pro Leu Ala	Ser Asn Gly Leu MET Ile Asp Tyr Ser His Gly Asn Ser Asn Lys Asp
TCT CCA GCT CTC CIT CAA GTG CAA ATC CCA GCC ACA CCA ACT TCT TTG 144	TTC AGA AAC CAA CCA AAG GTC AAT GAC GTT GTT TGT GAG CAA ATC GCT 912
Ser Pro Ala Leu Leu Gln Val Gln Ile Pro Ala Thr Pro Thr Ser Leu	Phe Arg Asn Gln Pro Lys Val Asn Asp Val Val Cys Glu Gln Ile Ala
GAA ACT GCC AAG AGA GGT AGA AGA GAA GCT ATA GAT ATT ATT ACC GGT 192	AAC GGT GAA AAC GCC ATT ACC GGT GTC ATG ATT GAA TCA AAC ATC AAC 960
Glu Thr Ala Lys Arg Gly Arg Arg Glu Ala Ile Asp Ile Ile Thr Gly	Asn Gly Glu Asn Ala Ile Thr Gly Val MET Ile Glu Ser Asn Ile Asn
AAG GAC GAC AGA GTT CTT GTC ATT GTC GGT CCT TGT TCC ATC CAT GAT 240	GAA GGT AAC CAA GGC ATC CCA GCC GAA GGT AAA GCC GGT TTG AAA TAT 1008
Lys Asp Asp Arg Val Leu Val Ile Val Gly Pro Cys Ser Ile His Asp	Glu Gly Asn Gln Gly Ile Pro Ala Glu Gly Lys Ala Gly Leu Lys Tyr
CTA CAA GCC GCT CAA GAA TAC GCT TTG AGA TTA AAG AAA TTG TCA GAT 268	GGT GTT TCC ATC ACT GAT GCT TGT ATA GGT TGG GAA ACT ACT GAA GAC 1056
Leu Glu Ala Ala Gln Glu Tyr Ala Leu Arg Leu Lys Lys Leu Ser Asp	Gly Val Ser Ile Thr Asp Ala Cys Ile Gly Trp Glu Thr Thr Glu Asp
GAA TTA AAA GGT GAT TTA TCC ATG AIT ATG AGA GCA TAC TTG GAG AAG 336	GTC TTG AGG AAA TTG GCT GCT GCT AGA CAA AGA AGA GAA GTT AAC 1104
Glu Leu Lys Gly Asp Leu Ser Ile Ile MET Arg Ala Tyr Leu Glu Lys	Val Leu Arg Lys Leu Ala Ala Ala Val Arg Gln Arg Arg Glu Val Asn
CCA AGA ACA ACC GTC GGC TGG AAA GGT CTA ATT AAT GAC CCT GAT GTT 384	AAG AAA 1110
Pro Arg Thr Thr Val Gly Trp Lys Gly Leu Ile Asn Asp Pro Asp Val	Lys Lys
AAC AAC ACT TTC AAC ATC AAC AAG GGT TTG CAA TCC GCT AGA CAA TTG 432	TAGATGTTTT TTATATGATA TATGTAAGT ACATTCTTTC CTCTACCACT GCCAATTCGG 1170
Asn Asn Thr Phe Asn Ile Asn Lys Gly Leu Gln Ser Ala Arg Gln Leu	TATATTTTAA TTGTGTTTAT CGCATTTTAC TAATTAACCTA GAAACTCAAT TTTTAAAGGC 1230
TTT GTC AAC TTG ACA AAT ATC GGT TTG CCA ATT GGT TCT GAA ATG CTT 480	AAAGCTCGCT GACCTTTTAC TGATTTCGTG GATGTTATAC TATCAGTTAC TCTCTGCAA 1290
Phe Val Asn Leu Thr Asn Ile Gly Leu Pro Ile Gly Ser Glu MET Leu	AAAAAATTG AGTCATATCG TAGCTTTGGG ATTATTTTTC TCTCTCTCCA CGGCTAATTA 1350
	GGTGATCATG GATCC 1365
<div style="text-align: center;"> ↑ GAT ACC ATT TCT CCT CAA TAC TTG GCT GAT GTT GTC TCC TTC GGT GCC 528 Asp Thr Ile Ser Pro Gln Tyr Leu Ala Asp Leu Val Ser Phe Gly Ala ↓ Lys </div>	

第4図 野生型および変異型の *ARO4* 遺伝子塩基配列と *ARO4* 酵素のアミノ酸配列

阻害が解除されたことが判明した。1塩基置換による酵母のアミノ酸生合成酵素の阻害の解除は幾つか報告されており¹⁹⁻²¹⁾、タンパク工学の観点からも興味深い。DAHP シンターゼの Tyr による阻害様式がアロステリック阻害が拮抗阻害かどうかは不明であるが、第4図に示したアミノ酸置換の位置が野生型 DAHP シンターゼの Tyr 結合部位に相当するものと推定される。

9. おわりに

ここで述べた芳香族アミノ酸生合成系の他にも、分岐鎖アミノ酸生合成系の調節変異を利用してイソロイシン生合成経路から活性アミルアルコールと *n*-プロパノールを²²⁾、バリン生合成経路からイソブチルアルコールと酢酸イソブチル^{23,24)}を、ロイシン生合成経路からイソアミルアルコールと酢酸イソアミル²³⁻²⁵⁾をそれぞれ高生産する酵母の育種が行われている。アミノ酸生合成系調節変異により香気物質を高生産する機構として、酵母においては過剰なケト酸をアミノ酸に変えるよりも高級アルコールに転換して菌体外に排出する機構が推定されるが、バクテリアにおけるアミノ酸生産と異なる機能を酵母が備えていると示唆され興味深い。また、アミノ酸生合成系以外では、脂肪酸生合成系の改変によるカブロン酸エチル高生産酵母の育種が報告されている²⁶⁾。香気は複数の成分が総合的に感じられるものであるから、種々

の香気物質の組み合わせによる様々な香りの演出が期待され楽しみである。

特定の遺伝子を実用株に導入する方法は変異処理による育種と異なり、醸造に関与する他の有用遺伝子を損傷する心配がない点で有効である。しかし、DNA 組み替え体の食品産業への利用は、現時点では安全性やパブリックアクセプタンス等の問題があり、たとえ法的に製造承認基準が設定されたとしても実現には相当の時間をかけ慎重に行う必要があると思われる。

＜協和発酵工業(株)食品酒類研究所＞

文 献

- 1) K. YOSHIKAWA : *Agri. Biol. Chem.*, **30**, 634 (1966)
- 2) K. YOSHIOKA and N. HASHIMOTO : *Agri. Biol. Chem.*, **45**, 2183 (1981)
- 3) K. FUKUDA, M. WATANABE, K. ASANO, H. UEDA and S. OHTA : *Agri. Biol. Chem.*, **54**, 269 (1990)
- 4) K. FUKUDA, M. WATANABE and K. ASANO : *Agri. Biol. Chem.*, **54**, 3151 (1990)
- 5) K. FUKUDA, M. WATANABE, K. ASANO, K. OUCHI and S. TAKASAWA : *Current Genetics*, **20**, 449 (1991)
- 6) K. FUKUDA, M. WATANABE, K. ASANO, K. OUCHI and S. TAKASAWA : *Current Genetics*, **20**, 453 (1991)

- 7) K. FUKUDA, M. WATANABE, K. ASANO, K. OUCHI and S. TAKASAWA : *J. Ferment. Bioeng.*, **73**, 366 (1992)
- 8) K. FUKUDA, K. ASANO, K. OUCHI and S. TAKASAWA : *J. Ferment. Bioeng.*, **74**, 117 (1992)
- 9) F. LINGENS, W. GOEBEL and H. UESSELER : *Biochem. Z.*, **346**, 357 (1966)
- 10) F. LINGENS, W. GOEBEL and H. UESSELER : *Eur. J. Biochem.*, **1**, 363 (1967)
- 11) S. TESHIBA, R. FURTHER, P. NIEDERBERGER, G. BRAUS, G. PARAVICINI and R. HUTTER : *Mol. Gen. Genet.*, **205**, 353 (1986)
- 12) O. AKITA, T. IDA, T. OBATA and S. HARA : *J. Ferment. Bioeng.*, **69**, 125 (1990)
- 13) 蟻川幸彦, 馬場 茂, 近藤君夫, 桑原秀明, 吉川茂利, 小栗 勇, 醸協, **86**, (8) 616 (1991)
- 14) M. KUNZLER, G. PARAVICINI, C. M. EGLI, S. IRNIGER and G. H. BRAUS : *Gene*, **113**, 67 (1992)
- 15) G. MANNHAUPT, R. STUCKA, U. PILZ, C. SCHWARZLOSE and H. FELDMANN : *Gene*, **85**, 303 (1989)
- 16) 小田佳緒子, 北本勝ひこ, 五味勝也, 高橋康次郎 : 醸酵工学, **68**, 399 (1990)
- 17) K. SHIMURA, K. FUKUDA and K. OUCHI : *Znzymes and Microbial Technology*, 投稿中
- 18) G. P. CASEY, W. XIAO and G. H. RANK : *J. Inst. Brew.*, **94**, 93 (1988)
- 19) N. YADAV, R. E. McDEVITT, S. BENARD and S. CIFALCO : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 4418 (1986)
- 20) T. SCHMIDHEINI, P. SPERISEN, G. PARAVICINI, R. HUTTER and G. BRAUS : *J. Bacteriol.*, **171**, 1245 (1989)
- 21) T. SCHMIDHEINI, H. U. MOSCH, J. N. S. EVANS and G. BRAUS : *Biochemistry*, **29**, 3660 (1990)
- 22) K. FUKUDA, A. MUROMACHI, M. WATANABE, K. ASANO and S. TAKASAWA : *J. Ferment. Bioeng.*, 投稿中
- 23) K. FUKUDA, M. WATANABE, K. ASANO and S. OHTA : *Agri. Biol. Chem.*, **54**, 2445 (1990)
- 24) M. WATANABE, K. FUKUDA, K. ASANO and S. OHTA : *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **34**, 154 (1990)
- 25) S. ASHIDA, E. ICHIKAWA, K. SUGINAMI and S. IMAYASU : *Agri. Biol. Chem.*, **51**, 2061 (1987)
- 26) E. ICHIKAWA, N. HOSOKAWA, Y. HATA, Y. ABE, K. SUGINAMI and S. IMAYASU : *Agri. Biol. Chem.*, **55**, 2153 (1991)