低温清酒酵母の育種

清酒もろみは酵母の増殖に最適な温度範囲より低い温度に制御される。特に微妙なバランスの香味の生成が要求される吟醸もろみでは、10°C以下の低温に保つことが必要とされている。このような低温環境で清酒酵母が増殖し発酵を継続できるのは、どのような遺伝的要因を備えているからなのか。

低温清酒酵母の育種という研究を通じて、この課題の解明の糸口が見いだされつつある。

河村大造・東江昭夫*

1. はじめに

一般に、清酒醸造は低温下で行われるが、特に、吟醸酒では高度精白米を用い、10°C前後の低温で発酵が行われる。その結果、雑味が少なく、酸度も低く、香りの高い高品質の吟醸酒が醸造される。その吟醸酒醸造における酵母の重要な性質は強いアルコール耐性、弱い酸生成能、強い香気生成能などであると考えられる。また、低温で発酵を行うことによって酵母中の香気生成酵素の活性が安定に保たれること^{1,2)}、温度が低いほど、もろみ中に生成した香気成分の分解酵素の活性も低いこと²⁾が明らかにされている。従って、低温下での増殖力が高いという性質も吟醸酒醸造用酵母の重要な性質の一つであると考えられる。そこで、吟醸酒醸造用酵母育種の一助として、我々は、低温清酒酵母の育種を行い、さらに、その低温増殖性に関与する遺伝子の遺伝解析を行った。そして、酵母に低温増殖性を付与する遺伝子のクローニングを行った。本稿では、それらの結果について紹介する。

2. 低温清酒酵母の育種^{3,4)}

まず、清酒酵母から一倍体株を分離し、それらの中で低温増殖性が優れていた3株を選択した。これら3株に紫外線照射して、低温増殖能が向上した株を多数取得した。さらに、これらの変異株について低温増殖能・低温発酵能を詳しくしらべ、より優良な株を選抜した。

次に、その選択した変異株を用いてもろみ温度15°Cで清酒小仕込試験(総米200g)を行った。その結果、H-2-5-62株(広島2号酵母(H-2)からの一倍体H-2-5株より得た変異株)による製成酒が他の変異株による製成酒に比べて日本酒度の切れ、生成アルコール分、酸

度およびアミノ酸度の点で優れていることがわかった。そこで、もろみ温度9~18°Cで総米200gの小仕込試験を行ってH-2-5-62変異株の温度特性を検討した。その時の製成酒の一般成分を第1表に示す。もろみ温度12°C、15°Cおよび18°Cでは対照仕込み(H-2酵母、日本醸造協会9号酵母(K-9)、H-2-5酵母)の製成酒の成分と大きな差異は認められなかった。しかし、もろみ温度9°CにおいてH-2-5-62株による製成酒は、K-9酵母による製成酒の生成アルコール量には劣るものの、他の対照酵母(H-2酵母、H-2-5酵母)による製成酒と比べて日本酒度、アルコール分の点で優れた値を示した。これは低温下で増殖能・発酵能の強い変異株を

第1表 製成酒の一般成分

温 度		菌 株			
		H-2-5-62	H-2-5	H-2	K-9
9°C	日本酒度	+6	-6	-1	+4
	アルコール(容量%)	18.5	17.2	18.3	19.2
	酸 度(ml)	2.4	2.6	2.5	2.7
	アミノ酸度(ml)	2.5	2.6	2.6	2.5
12°C	日本酒度	-1	-1	+1	+2
	アルコール(容量%)	19.4	19.5	19.6	20.2
	酸 度(ml)	3.1	3.3	3.3	3.1
	アミノ酸度(ml)	2.9	3.0	3.0	3.5
15°C	日本酒度	+3	+3	+2	0
	アルコール(容量%)	20.3	20.2	20.0	20.0
	酸 度(ml)	3.4	3.6	3.7	3.6
	アミノ酸度(ml)	3.6	3.7	3.6	4.3
18°C	日本酒度	+4	+3	+1	+1
	アルコール(容量%)	20.3	20.0	20.1	20.0
	酸 度(ml)	3.8	3.8	3.9	3.8
	アミノ酸度(ml)	4.1	4.0	4.1	4.7

Breeding of Sake Yeasts Tolerant to Low Temperature

Daizo KAWAMURA and Akio TOH-E* (Hiroshima Prefectural Food Technological Research Center, *University of Tokyo)

選択した結果と考えられる。また、この低温増殖性変異株が清酒ろろみ中でも低温下で強い発酵力を示すことが確認されたことになる。

3. 低温増殖性酵母の遺伝的性質⁵⁾

次に、低温増殖性の遺伝的性質の検討を行った。当初、H-2-5-62 株等の実用酵母由来の変異株を用いて遺伝解析を試みたが、胞子形成能が低いため、子のう解剖による四分子解析が困難であった。そこで、低温非増殖性の遺伝研究株を用いて遺伝解析を行った。まず、低温非増殖性株から変異処理によって低温増殖性変異株（#1～#8）を分離した。これらの低温増殖性変異株はそれぞれ元の野生型株に比べて低温側の増殖限界温度が約 5℃低下したことが明らかになった。四分子解析の結果、低温増殖性はそれぞれの株において単一の核性の優性変異であることがわかった。

次に、低温増殖性遺伝子間のアレリズム試験を行った。各々の変異株（#1～#6）由来の一倍体株を第2表（A）に示す組み合わせで交雑し、子のう解剖してそれらの低温増殖性をしらべた（第2表（A））。雑種二倍体株はすべて低温増殖性を示し、その四分子は「低温増殖性」：「低温非増殖性」＝4：0が多数を占めるものと、4：0、3：1、2：2の三種類を示すものとに分かれた。これは、前者では交雑した一倍体2株の持つ低温増殖性遺伝子が、同一の遺伝子座に属するかあるいは互いに連鎖していること、後者では別の遺伝子座に属することを示すと考えられる。この結果をまとめたのが第2表（B）である。低温増殖性変異遺伝子は二種類に分けられること、すなわち、3423 B 株（#2 変異株由来）が他の株とは異なる遺伝子を持つことが明らかになった。この #2 変異株の持つ低温増殖性変異遺伝子を *LTG 1-1* (low-temperature-growth)、他の 5 変異株の持つ低温増殖性変異遺伝子を *LTG 2-1*～5 と命名した。

次に、低温増殖性遺伝子の遺伝子量効果を検討した。すなわち、*LTG 1*、*LTG 2* 遺伝子を種々の組み合わせで持つ一倍体株、二倍体株を造成して、これら変異遺伝子の重複保持が低温増殖性に及ぼす影響についてしらべた。その結果、次のことが明らかになった。一倍体株では2個の遺伝子を保持する株の低温増殖性が遺伝子を1個保持する株より強い傾向を示す。二倍体株では遺伝子を2個あるいは3個保持する株の低温増殖性が強く、特に、*LTG 1-1* 遺伝子のホモサイゴート株（*LTG 1-1/LTG 1-1* 株、*LTG 1-1 LTG 2-1/LTG 1-1* 株）の中に低温増殖性の強い株が存在することが認められた。この遺伝子量効果の実験から、実用菌株で低温増殖性遺伝子変異を分離し、それを重複保持させることによって低温

第2表 アレリズム試験
(A) 四分子解析

交 雑 株 ^{a)}	四分子数				
	5℃ で増殖する：増殖しない				
	4：0	3：1	2：2	1：3	0：4
3412 C (#1) × 3423 B (#2)	2	3	1	0	0
3412 C (#1) × 3431 C (#3)	4	0	0	0	0
3412 C (#1) × 3441 A (#4)	6	0	0	0	0
3431 A (#3) × 3423 B (#2)	0	2	0	0	0
3431 A (#3) × 3441 A (#4)	4	0	0	0	0
3441 B (#4) × 3423 B (#2)	2	2	0	0	0
3441 B (#4) × 3431 C (#3)	3	0	0	0	0
2414 C (#5) × 3423 B (#2)	1	3	2	0	0
2414 C (#5) × 3431 C (#3)	5	0	0	0	0
2414 C (#5) × 4618 A (#6)	6	0	0	0	0
4617 A (#6) × 3423 B (#2)	2	5	2	0	0
4617 A (#6) × 3431 C (#3)	6	1	0	0	0
4617 A (#6) × 2419 B (#5)	7	0	0	0	0

a) 交雑株はすべて 5℃ で増殖した。

(B) アレリズム試験のまとめ

a-株/α-株	交雑株の遺伝子の区別				
	3423 B (#2)	3431 C (#3)	3441 A (#4)	2419 B (#5)	4618 A (#6)
3412 C (#1)	D	I	I	—	—
3431 A (#3)	D	—	I	—	—
3441 B (#4)	D	I	—	—	—
2414 C (#5)	D	I	—	—	I
4617 A (#6)	D	I	—	I	—

D：異なる遺伝子座に属する。

I：同一の遺伝子座に属するかあるいは互いに連鎖している。

—：試験していない。

増殖性を高め、さらに、その中で醸造に適した菌株をスクリーニングするという操作により、低温増殖能の高い優良菌株の育種が可能であることが強く示唆された。

また、清酒酵母から得た一倍体株（低温非増殖性）より低温増殖性変異株（*LTG 2* 変異株の可能性が高い）を取得して、清酒ろろみ中での発酵力を検討した。その結果、元の野生型株に比べて変異株の発酵力が大きく向上したことが認められた。

4. 低温増殖性に関与する遺伝子のクローニング⁶⁾

低温増殖性に関与する遺伝子の存在することが明らかになったので、その遺伝子をクローニングすることを試みた。まず、低温下（5℃）で増殖しない YNN 140 株を *Saccharomyces cerevisiae* のゲノムライブラリー⁷⁾により形質転換して低温増殖性を付与する遺伝子のスクリーニングを行った。その結果得られた YNN 140 株の 5℃ での増殖を可能にするプラスミドを YEp 24-1 tg

第1図 制限酵素地図とサブクローニング

+, -はサブクローニングされたプラスミドを持つ YNN 140 株の形質転換体が, 5°C で増殖するかどうかを示す。矢印は ORF を示す。Bam H I (B), Bgl II (Bg), Bst E II (Bt), Eco R I (E), Eco RV (RV), Pst I (P), Sph I (Sp), Xho I(X)。

と名付けた。このクローニングした DNA の制限酵素地図を作成し, サブクローニングを行って必須領域を決定した (第1図)。YNN 140 株を 5°C で増殖させるには *Pst* I-*Eco* RI 2.9 kbp 断片で十分であることが明らかになった。

次に, この *Pst* I-*Eco* RI 2.9 kbp 断片の塩基配列を決定し, アミノ酸配列を推定した。この断片中には 1,779bp かなるオープンリーディングフレーム (ORF) が存在した。この ORF のフレームをシフトさせたプラスミドを持つ形質転換体が低温下で増殖しなかったことから, この ORF が低温増殖に必要であることが明らかとなった。この遺伝子を *LTG 3* (low temperature growth) 遺伝子と名付けた。この ORF には 592 アミノ酸が含まれており, その推定分子量は 65.4 KD であった。ホモロジー検索の結果, この *LTG 3* タンパク質のアミノ酸配列は *S. cerevisiae* の5つのアミノ酸パーミアーゼ (Hiplp⁹, Gaplp⁹, Ycc5p¹⁰, Canlp¹¹, Put 4 p¹²) のアミノ酸配列と¹⁾ホモロジーのあることが明らかとなった。また, ハイドロパシー・プロット¹³⁾から, *LTG 3* タンパク質は12個の膜貫通領域を持つことが示唆された。ホモロジーがあるとされた5つのアミノ酸パーミアーゼと *LTG 3* タンパク質のアミノ酸配列を比較すると, *LTG 3* タンパク質のおよそ 80 番目から 520 番目のアミノ酸配列 (疎水性領域と一致する) と5つのアミノ酸パーミアーゼのアミノ酸配列にホモロジーが認められた (第2図)。YPAD 培地にアミノ酸 (栄養要求

性の検定の際に使用する濃度の 50~100 倍濃度) を一種類ずつ添加した 22 種類の培地のうち, 0.4%アラニン, 0.3% ロイシン, 0.3% イソロイシン, 0.2% トリプトファン, 0.4% プロリンを添加した5種類の培地において 10°C で YNN 140 株の増殖が認められた。同様に, 5°C では YPAD+0.2% トリプトファン培地においてのみ YNN 140 株の増殖が認められた。これらのことから, 低温下での YNN 140 株の増殖にはいくつかのアミノ酸, 特に, トリプトファンの取り込みが制限因子となっていると推測され, この *LTG 3* 遺伝子はトリプトファンパーミアーゼである可能性が高いと考えられた。また, *Pst* I-*Eco* RI 2.9 kbp 断片の塩基配列の一部が *SUP 3* 遺伝子のそれと一致したので, *LTG 3* 遺伝子もまた, 第XV 番染色体上に存在することが明らかになった。

次に, この *LTG 3* 遺伝子が YNN 140 株の種々の温度での増殖にどのような影響を及ぼすかを検討した。*LTG 3* 遺伝子を破壊することによって, 37°C と 28°C では存在しなかった誘導期が 20°C と 15°C においては発生し, 10°C 以下では増殖能を失った。また, *LTG 3* 遺伝子が多コピーで存在すると, 15°C と 10°C における誘導期間が短縮した。

次に, *LTG 3* 遺伝子が YNN 140 株以外の酵母の低温下での増殖にどのような影響を及ぼすかを検討した。その結果を第3表に示す。YNN 140 株の結果も併せて記した。*LTG 3* 遺伝子が多コピーで存在することによって低温下での増殖が可能になった株 (YNN 140 株, YPH 500 株, KA 31 D 株) とそうでない株 (RAY-3 A 株) が存在した。*LTG 3* 遺伝子を破壊することによって低温下での増殖能を失った株 (YPH 500 株, 3426 D 株, 3422 C 株, 3412 A 株) と *LTG 3* 遺伝子を破壊しても低温下での増殖に変化の認められなかった株 (YNN 140 株, K 12-2 A 株) とが存在した。これらのことから, *LTG 3* 遺伝子の必要性については次のように考えられた。第2表において明らかになった二種類の低温増殖性変異遺伝子 *LTG 1-1* と *LTG 2-1* をそれぞれ持つ株の *LTG 3* 遺伝子を破壊すると, *LTG 1-1* 株, *LTG 2-1* 株ともに 5°C, 10°C での増殖ができなくなった (第3表 (B))。よって, *LTG 1-1*, *LTG 2-1* 変異は *LTG 3* 遺伝子と関連しており, これを経由してその機能を発現していると考えられ, *LTG 1*, *LTG 2* 遺伝子の機能の発現には *LTG 3* 遺伝子が必要であることが示唆された。

また, 酵母の低温下での増殖に関係する遺伝子として *LTE 1*¹⁴⁾ と *NSR 1*^{15~17)} とが知られており, *LTE 1* 遺伝子は低温増殖に必須の遺伝子であり, *NSR 1* 遺伝子は低温ショックにより誘導される遺伝子である。他にも低温下での増殖を不能にする低温感受性変異遺伝子が

LTG3 (1)	MTEDFISSVKRSNEELKERRKSNFGFVEYKSKQLTSSSSSHNSSSSHDDDNQ	(51)
HIP1 (1)	MPRNPLKKEYWADVVDGFKPATSPAFENEKESTTFVTELSTKTSAPFLSSKDSPGINQ	(59)
GAP1 (1)	MSNTSSYEKNPNLKHNGITIDSEFLTQEPITITPSNGSAVSIDETGSGSKWQDFKDSF	(59)
YCC5 (1)	MSSSKSLVELKDLKNSSTEIHAATGQDNEIEYFETGCSNDRPSSQPHLGYEQHNTSAVRFFDSEFKRADGQDQVEATQNDLTSASPS	(89)
CAN1 (1)	MTNSKEDADIEEKIMYNPEVPTLTHDVEASQTHIRGRSIPLKDEKSKELYPLRSPT	(57)
PUT4 (1)	MVNLFPFHKNRHSAGVVTCAVDVSGDGGDTKKEENVVQVTESPSSGSRNHRSDNEKDDAIRMEKISKNGQASSNG	(79)
LTG3 (52)	HGKRNIFQRCDVDSKPLDGSFDTNLRKTLKPRHLIAIAKCAIGTGLFVSGKAIABGGLGVVHGAIAAGSQITGTHIGLGRITVR	(140)
HIP1 (60)	TTNDITSSDRFRNEDTEQEDINNTNLSGDLVSRHLLTLAWGCAIGTGLYVNTGAALSTGPHASLVLDVVIISTCLFTVINSIGRLSAA	(148)
GAP1 (60)	KRVKPIEVDPNLSAEKVAIITAQTPLKHHLKNRHLIAIAKCAIGTGLLVGSGTALRTGCP SLLAGWGSTGTWIAVAVMAIGLAVI	(147)
YCC5 (90)	SRQAQELEKNESDNIGANTGHKSDSLKKTIQPRHYLMIAKCTIGTGLLVGNLTALVHAGPAGLLGYAIVGSLLYCI IQAGGMAVLY	(178)
CAN1 (58)	RVNGEDTFSMEDGIGDEDEGEVQNAEVKRELKQRILGMAKAGTIGTGLFISGLTPLTNAGVWGLISYLVFMSGLAYSVTQSLGRMATF	(146)
PUT4 (80)	TIREDLIDVDLEKSPVYDGDSEPHKLKQGLQSRHYQLIAKCAIGTGLLVGTSTLITGPHAGLRSYIIISAVIYPIKALGEMVCF	(168)
LTG3 (141)	FP ---- VVGAFANYGRFLDPSISFVYSTIVLQVFFVLPLEIAAAITVTVY NSSIDPVIIVAVIYAVISINLFGVRGFCQMEFA	(223)
HIP1 (149)	FP ---- VVGGENYSGRFLIEPSFAFVNLVYLAQWLVLLPLELVAASITIKY NDKINSDAVIAIYATIALANLVDKSFGRDEEV	(231)
GAP1 (148)	FP ---- ISGGTTYATRFIDSEFGYANNFVNLQWLVVLPLELVAASITVNF GTPKYRDCGFVALFILAIVIIINMFGKYGQAEV	(231)
YCC5 (179)	YSN ---- LTGGYNAYPSLSLWVFGFAVAWYCLQWLCVCPLELVTASMTIKY TTSVNPVDFVILHYVIVITINIFGARYARAEFF	(262)
CAN1 (147)	IP ---- VTSSTFVSQRFSLPAFGAANGYMWPSAITFALELSVVGQVIQF TYKVPAAASISFVITITINLFPVYKYGAEFF	(229)
PUT4 (169)	LPGDGSASGASTANVTRYVDPSLGFATGNNVFCYVILVAARCTAASGVVEY TTAIVPKGVITITLHVVVILNFSVAVKYGRSEF	(256)
LTG3 (224)	FSTIAKITVGRFLLCVVLIQGGPDHIEFGAKYWDHNGCLANG ----- PKGLSVLVVASYSLG GHEMTCLASGE TDP KG	(299)
HIP1 (232)	LSMILKLSITIGFTHLGIVLSGGGPIGGYIGCKYWDHNGCAFVAHSSGTQ ----- PKGLCSVFVTAFTYS GHEMTAVSAASGNPRET	(314)
GAP1 (232)	FSPIKVITVGRFLLGLIILNCGGPTGGYIGCKYWDHNGCAFAGDTGAK ----- PKGVCSVFVTAASFSA GHEMTVGLAASFSVEPRKS	(314)
YCC5 (263)	FNCKILLMWTQFLLGLIITDWCAGNDGFGCKYWDHNGAFNGKHAI DR ----- PKGVVATLVTAAPFG GHEMTAITTAQSNPRKA	(345)
CAN1 (230)	VASIKVLAITIGFTFCFVCGAGVTGPV GERYWRNPGAGGGISKDKNEGRFLGVSSSLINAAFTFQ GHEMTVGTAGRAANPRKS	(316)
PUT4 (257)	FASDGLICIVGLIILSFLIFGCGPNHIDRIGERYQHICAFAHILTGGSLGN ----- FTDITTGIIKGAFAIILHGLVCMTSAECADQRN	(343)
LTG3 (300)	LISAIAKQVFIRILFFFLISLTLVGLFVHYTNQNTLGGSSVDN ---- SPFVIAIKLHIHKALISTVNAVILISVISVGNCSIFASSRIL	(383)
HIP1 (315)	IPKAARKTFRILTASYVTILTLIGCLVPSNDPRLNGSSSVDAAS ---- SPLVIAIENGGITGLISLNAIILIAVISVANSAYVACSRL	(401)
GAP1 (315)	VPKAAQVFIRILTFYILSLLVGLIIVYNDKSLIGASSYDAA ---- SPFVIAIKTHGIGKLSVVNVVILIAVISVGNSAIYACSRL	(400)
YCC5 (346)	IPKAARQVIYRILFLPLATILLLGLFVHYNSDQLIGSTGGCTKA ---- SPYVIAVASIGVRVWHIFINAVILISVISVANSFSYSSARLP	(431)
CAN1 (317)	VPRAIKVFIRILTFYIGSLFICGLIIVYNDPKLTQSTSYVST ---- SPFIIAIENSGTVLHIFINAVILITTIISAANSNIYVGSRL	(401)
PUT4 (344)	IAKASRRFVIRILFFVYLGTLISVIVHYNDPTLVNALAQGPGAGSSPFVIGIQNAGIKVLIHILNGCLITSASAAANAFMASTQSL	(432)
LTG3 (384)	CSMAHQGLIHWFGYIDKAGRIIVGIMANSFLGLLAFLVKSGMSHVFNWMAIAGLATCIYVLSINLSHIFRILAMKAQKSLDDEIF	(472)
HIP1 (401)	VAMAHIGNLIPKFLNRVDKRIWMAILLTLFFGLLSFYAASDKQAEVPTLSALSGLSTIFCWMANILSHIRPRQMAVQERSLDELIF	(490)
GAP1 (401)	VPKAAQVFIRILTFYILSLLVGLIIVYNDKSLIGASSYDAA ---- SPFVIAIKTHGIGKLSVVNVVILIAVISVGNSAIYACSRL	(489)
YCC5 (432)	LTLESEQYAPKFSYIDKAGRIIVAGYSALFAYIAFCAASPKEEQVPTLLAISGLSQLFTWTAICLSHIFRIRAKMAVQERSLDELIF	(520)
CAN1 (402)	FGLSKNLAKPLSRTIKQWVYIAVFYTAAPGALAYMETSTGGDKVFEMLNITGVAGFAWLFISISISHIFRQALRYGIRSRDELIF	(490)
PUT4 (433)	LTMAQTGQAPKCLGRINKWVYVAVGVSFLCCLAYLVNVSSTADVFNPSNISTISGLFGWCGGTATVLRPKKA IFYNGLYDRILIF	(520)
LTG3 (473)	VSAVGWGSAYSALINCLILIAQFYCSLWPIGGWTSGERAKIFPQNYLCALILFIFIVHKIYYKQCTGKVGWKALEDILETDRKD	(561)
HIP1 (491)	ISQTGVKGSWYGFIVLFLVLIASEWTFESVPIRRFRSQRRITL	(532)
GAP1 (490)	KSPTGVWGSYGLFWVILMIAQFYVALFVPGDSFAEGFPEAYLSFPLVWVYIGHKIYKRNWLFIPAERKDIDTGRREVDLDELKQ	(578)
YCC5 (521)	KSQTGVWGSAYACIMLILILIAQFVVAIAPIGEGKDAQAFFENYLAMPILIALYVGKYVHKDKLFIADKIDIDSHRQIFDEELIK	(609)
CAN1 (491)	KAKLMLGLAYAAFTITIIILIQGTAFAPKPNVGSFAAAYISVFLFVAVILFQCIFRCQPIWKIGDVIDDSRDRIDEAIVWEDHEPK	(579)
PUT4 (521)	---- KTWGQPTVWFSLIVGIIITITNGYAIIPKYWRVADFAAYITLPIFLVWFGHKLYTRTRQWVLPVSEIDVTTLVGEIEEK	(604)
LTG3 (562)	IDIEIVKQEIAEKKMYLDSRPVYVRQFIHFC	(592)
GAP1 (579)	ELAEKAIWATKPRVRIWVFC	(601)
YCC5 (610)	QEDEEYRERLRNGPYWKRVAVFC	(633)
CAN1 (580)	TFWDFWVVA	(590)
PUT4 (605)	SREIEEMRLPPTGFKDKFLDALL	(627)

第2図 LTG3 タンパク質と既知のアミノ酸パーミアーゼのアミノ酸配列の類似性
上から順に, *S. cerevisiae* Ltg3p⁹; *S. cerevisiae* Hip1p⁹; *S. cerevisiae* Gap1p⁹; *S. cerevisiae* Ycc5p¹⁰; *S. cerevisiae* Can1p¹¹; *S. cerevisiae* Put4p¹²). 括弧内の数字はアミノ酸残基数を示す。ギャップ(ー)はホモロジーを最大にするために挿入した空白を示す。枠内は6種のアミノ酸配列間での同一のアミノ酸残基を示す。

第3表 *LTG 3* 遺伝子が低温増殖に及ぼす影響

菌 株	プラスミド	低温度での増殖		
		5°C	10°C	15°C
YNN 140	YE _p 24	—	—	+
YNN 140	pDK 9	+	+	+
YDK 1 (YNN 140 からの遺伝子破壊株)	—	—	—	+
K 12-2 A	YE _p 24	+	+	+
K 12-2 A	pDK 9	+	+	+
YDK 2 (K 12-2 Aからの遺伝子破壊株)	—	+	+	+
(A) RAY-3 A	YE _p 24	—	+	+
RAY-3 A	pDK 9	—	+	+
YPH 500	YE _p 24	—	—	+
YPH 500	pDK 9	—	+	+
YDK 3 (YPH 500 からの遺伝子破壊株)	—	—	—	—
KA 31 D	YE _p 24	—	—	+
KA 31 D	pDK 9	—	+	+
3426 D (<i>LTG 1-1</i>)	YE _p 24	+	+	+
3426 D (<i>LTG 1-1</i>)	pDK 9	+	+	+
YDK 4 (3426 D からの遺伝子破壊株)	—	—	—	+
3422 C (<i>LTG 1-1</i>)	YE _p 24	+	+	+
(B) 3422 C (<i>LTG 1-1</i>)	pDK 9	+	+	+
YDK 5 (3422 C からの遺伝子破壊株)	—	—	—	—
3412 A (<i>LTG 2-1</i>)	YE _p 24	+	+	+
3412 A (<i>LTG 2-1</i>)	pDK 9	+	+	+
YDK 6 (3412 A からの遺伝子破壊株)	—	—	—	—

+: 各温度で 30 日後までに増殖した。

—: 各温度で 30 日後でも増殖しなかった。

プラスミド YE_p24: *LTG 3* 遺伝子を含まないプラスミド。
 プラスミド pDK 9: YE_p24 に *LTG 3* 遺伝子を組み込んだ
 プラスミド。酵母の中で多コピーで存在
 する。

多く存在する¹⁸⁾。こうした低温下での増殖不能という現象は、多くの株の場合、試験されたことがないので明らかではないが、研究室での保存中にその性質が蓄積されている可能性が十分に考えられる。それゆえに、クローニング実験に用いられる宿主酵母に依存してその酵母に低温増殖能を付与する上記のような種々の遺伝子がクローニングされ得たと考えられる。

5. お わ り に

酵母に低温増殖性を付与する遺伝子としてクローニングされた *LTG 3* はいくつかのアミノ酸、特にトリプトファンの取り込みに関係しており、トリプトファン要求性株においてトリプトファンの取り込みが低温下での増殖の制限因子になっていると推察された。また、先に述べたように清酒酵母由来のトリプトファン要求性ではな

い一倍体株から低温増殖性変異株 (*LTG 2* 変異株の可能性が高い) が取得された。これは *LTG 2* 変異遺伝子がトリプトファン非要求性株において低温増殖性の発現に関係していることを示唆していると考えられる。そして、先程考察したように、その *LTG 2* 遺伝子の機能の発現には *LTG 3* 遺伝子が必要であると考えられる。従って、より低温増殖力の強い酵母を育種するためには、こうした実用酵母のようなトリプトファン非要求性株における *LTG 3* 遺伝子の機能を検討し、*LTG 1*, *LTG 3* 遺伝子をクローニングしてその性質をしらべ、*LTG 3* 遺伝子との関係を明らかにすることが必要であると考えられる。これらについては今後の課題と考えている。

<広島県立食品工業技術センター・

*東京大学大学院理学研究科>

文 献

- 1) 栗山一秀, 芦田晋三, 斎藤義幸, 杉並孝二, 今安聡: 醸酵工学, **64**, 169 (1986)
- 2) 柳内敏靖, 清川良文, 岩井芳則: 醸酵工学, **67**, 419 (1989)
- 3) 河村大造, 門 隆興, 東江昭夫: 醸酵工学, **64**, 25 (1986)
- 4) 河村大造, 土屋義信, 末成和夫, 手島義春, 門隆興, 五反田晃, 東江昭夫: 醸酵工学, **67**, 77 (1989)
- 5) 河村大造, 東江昭夫: 生物工学, **71**, 225 (1993)
- 6) D. KAWAMURA, I. YAMASHITA, O. NIMI and A. TOH-E: *J. Ferment. Bioeng.*, **77**, 1 (1994)
- 7) M. CARLSON and D. BOTSTEIN: *J. Mol. Biol.*, **157**, 105 (1982)
- 8) J. TANAKA and G. R. FINK: *Gene*, **38**, 205 (1985)
- 9) J. C. JAUNIAUX and M. GRENSON: *Eur. J. Biochem.*, **190**, 39 (1990)
- 10) C. P. HOLLENBERG, U. KLEINHANS, K. LUETZENKIRCHEN, M. R. RAD and G. XU: Submitted to EMBL/GENBANK/DBJ Data Banks.
- 11) W. HOFFMANN: *J. Biol. Chem.*, **260**, 11831 (1985)
- 12) M. VANDEBOL, J. C. JAUNIAUX and M. GRENSON: *Gene*, **83**, 153 (1989)
- 13) J. KYTE and R. F. DOOLITTLE: *J. Mol. Biol.*, **157**, 105 (1982)
- 14) R. B. WICKNER, T. J. KOH, J. C. CROWLEY, J. O'NEIL and D. B. KABACK: *Yeast*, **3**, 51 (1987)
- 15) K. KONDO and M. INOUE: *J. Biol. Chem.*, **266**, 17537 (1991)
- 16) K. KONDO and M. INOUE: *J. Biol. Chem.*, **267**, 16252 (1992)
- 17) K. KONDO, L. R. Z. KOWALSKI and M. INOUE: *J. Biol. Chem.*, **267**, 16259 (1992)
- 18) A. SINGH and T. R. MANNEY: *Genetics*, **77**, 651 (1974)