

マルトース発酵関連遺伝子のクローニングと染色体位置の決定 (第2報) †

尾形智夫*, 齊藤和仁**, 中村建介***

Cloning of gene related maltose fermentation and determination of chromosomal location (the second edition)†

Tomoo Ogata*, Kazuto Saito** and Kensuke Nakamura***

Maltose fermentation activator protein, *MAL63* homologue, *MAL63 (NCYC1006)*, was cloned from *S. cerevisiae* NCYC1006. This yeast strain is top-fermenting yeast, and ferments maltose very well. Laboratory yeast *S. cerevisiae* YNN27 ferments maltose very poorly, however, the transformant with *MAL63 (NCYC1006)* could ferment maltose very well. Genome sequencing by a next generation sequencer revealed the chromosomal location of *MAL63 (NCYC1006)*. These typical chromosomal structures are conserved among top-fermenting yeast strains and bottom-fermenting yeast strain.

Key words: yeast, maltose fermentation, chromosomal structure, next generation sequencer

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。昨年度、当研究室では、マルトース発酵性の強い上面ビール酵母株 *Saccharomyces cerevisiae* NCYC1006 から、マルトース発酵関連遺伝子群の転写活性化因子 *MAL63* ホモログ遺伝子と *MAL33* 遺伝子をクローニングし、マルトース発酵性の弱い実験室酵母 *S. cerevisiae* YNN27 に導入したところ、*MAL33* 遺伝子導入形質転換体では、マルトース発酵性には変化がなかったが、*MAL63* ホモログ遺伝子導入形質転換体では、マルトース発酵性が強力に増大したことを見出した¹⁾。従って、マルトース発酵関連遺伝子群には、機能するタンパク質をコードする領域と機能していないタンパク質あるいは、転写されない遺伝子等がともに存在している可能性があることがわかった。そこで、今回は、機能しているタンパク質をコードしている上面ビール酵母株 *S. cerevisiae*

NCYC1006 の *MAL63* ホモログ遺伝子の染色体上の位置を調べることにした。*MAL63* ホモログ遺伝子は、全ゲノム配列が完全解読されている実験室酵母 *S. cerevisiae* S288C には存在していないので、マルトース遺伝子群の酵母菌株間での遺伝子存在位置の多様性についても興味深い知見が得られることが期待された。

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。

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。

2.3 次世代シーケンサーによるゲノム配列解読

上面ビール酵母 *S. cerevisiae* NCYC1006 のゲノム配列解読は、次世代シーケンサー HiSeq2500 を用いておこなった。アセンブリソフトウェア Platanus を用いて配列アセンブリをおこない、scaffold を作成した²⁾。

2.4 サザンハイブリダイゼーション及びパルスフィールド電気泳動

† 原稿受理 平成29年2月24日 Received February 24, 2017

* 生物工学科 (Department of Biotechnology)

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

*** 生命情報学科 (Department of Life Science and Informatics)

サザンハイブリダイゼーションは、PCR DIG Probe Synthesis Kit (SIGMA-ALDLICH 社製)を用いて、プロトコールに従っておこなった。パルスフィールド電気泳動は、CHEF DRII (バイオ・ラッド製)を用いておこなった。

3 実験結果

3・1 次世代シーケンサーのよるゲノム配列解読

上面ビール酵母 *S. cerevisiae* NCYC1006 のゲノム配列解読は、次世代シーケンサーHiSeq2500 を用いておこない、アセンブリソフトウェア Platanus を用いて配列アセンブリをし、scaffold を作成した。作成された scaffold の相同性解析及び後に示すハイブリダイゼーションの結果及び他のゲノム解読結果等と照合したところ、上面ビール酵母 *S. cerevisiae* NCYC1006 の第VII染色体の右腕は、Fig. 1 のようになっていると想定された。上面ビール酵母 *S. cerevisiae* NCYC1006 の第VII染色体の右腕は、ゲノム配列が完全解読された実験室酵母 *S. cerevisiae* の第 VII 染色体右腕とは異なり、マルターゼをコードしている *MAL12* 遺伝子は存在せず、*INA1* ホモログ遺伝子と *MAL63* ホモログ遺伝子が存在していると推察している。第 VII 染色体の右腕末端にマルトース発酵関連遺伝子の転写因子である *MAL63* ホモログが存在することで、その酵母菌株のマルトース発酵能力が上昇したと推察される。

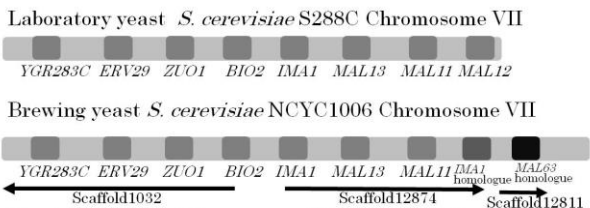


Fig. 1 The deduced chromosome VII structure of brewing yeast

3・2 他のゲノム配列と比較

この特徴的な第 VII 染色体の右腕末端構造は、他の上面ビール酵母株 Fosters B 株あるいは、FostersO 株の第 VII 染色体の右腕末端とも共通であった²⁾ (Fig. 2)。さらに、下面ビール酵母 *Saccharomyces pastorianus* Weihenstephan34/70 (W34/70) の *S. cerevisiae* 型第 VII 染色体右腕末端とも共通であった。加えて、Fosters B 株の *MAL11* 遺伝子 (マルトース透過タンパク質) の ORF (オープンリーディング配列) には欠失 (deleted sequence) があり、フレームシフト変異があると推察された。この *MAL11* 遺伝子のフレームシフト変異は、下面ビール酵母 W34/70 の *MAL11* 遺伝子にもみられた。下面ビール酵母 *S. pastorianus* は、*S. cerevisiae* と類縁菌である *S. eubayanus* の自然交雑体 (natural hybrid) であると考えられている^{3), 4)}。従って、下面ビール酵母は、上面ビール酵母の祖先株の *MAL11* 遺伝子がフレームシフトした後に、自然交雑したと推察された (Fig. 3)。

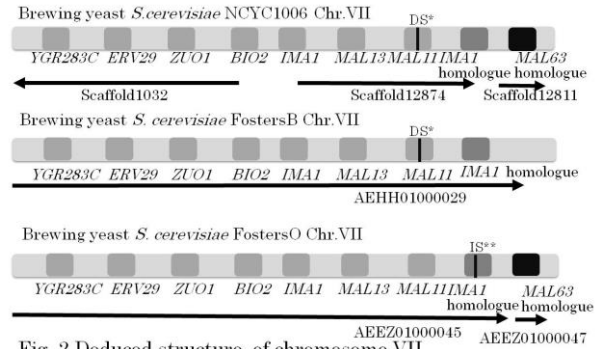


Fig. 2 Deduced structure of chromosome VII

*DS means deleted sequence. **IS means inserted sequence.

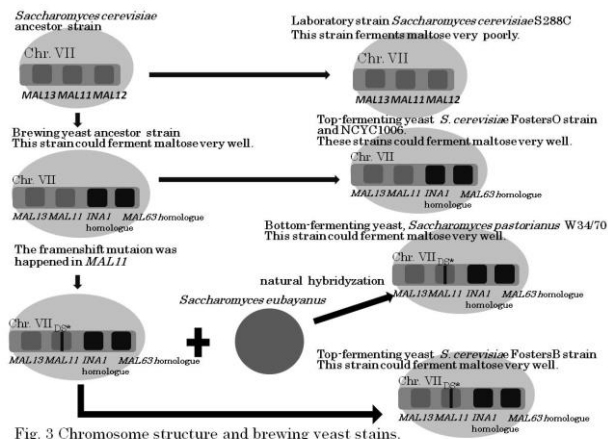


Fig. 3 Chromosome structure and brewing yeast stains.

*DS means deletion sequences causes frameshift mutation.

3・3 ハイブリダイゼーションによる *MAL63* ホモログ遺伝子のコピー数の想定

次に、ゲノムサザンハイブリダイゼーションを行うことで、想定している上面ビール酵母 *S. cerevisiae* NCYC1006 のゲノム配列を確認することとした。想定している配列であると、Fig. 4(b)のようなハイブリダイズするバンドが得られると考えられた。サザンハイブリダイゼーションの結果は、Fig. 4(a)に示した。上面ビール酵母 *S. cerevisiae* NCYC1006 のゲノム上には、転写活性化因子 *MAL63* ホモログ遺伝子が複数存在する、あるいは、*MAL63* ホモログ遺伝子と相同性がある、他の転写因子 *MAL13*, *MAL33* 遺伝子も同時にハイブリダイズされている可能性が示された。

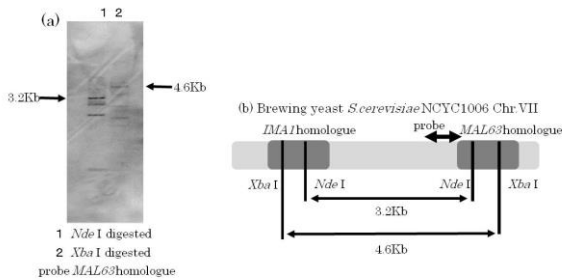


Fig. 4 Southern hybridization of genomic DNA and deduced chromosomal structure of brewing yeast *S. cerevisiae* NCYC1006
 (a) Southern hybridization of genomic DNA of brewing yeast *S. cerevisiae* NCYC1006.
 (b) Deduced chromosomal structure of brewing yeast *S. cerevisiae* NCYC1006.

次に、酵母染色体を電気泳動により分離できるパルスフィールド電気泳動をおこない、サザンハイブリダイゼーションで、*MAL63* ホモログ遺伝子の染色体上の位置を求めた。その結果は、Fig. 5 に示した。この結果も、*MAL63* ホモログ遺伝子と相同性がある、他の転写因子 *MAL13*, *MAL33* 遺伝子も同時にハイブリダイズされている可能性があると考えられた。

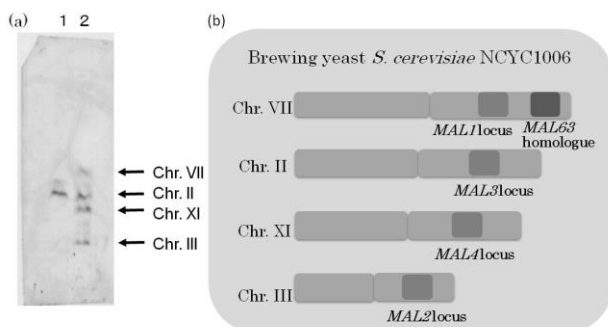


Fig. 5 Pulsed field gel electrophoresis and Southern hybridization and deduced chromosomal structure of brewing yeast *S. cerevisiae* NCYC1006.
 (a) Pulsed field gel electrophoresis and Southern hybridization. 1. laboratory yeast *S. cerevisiae* S288C. 2. brewing yeast *S. cerevisiae* NCYC1006. *MAL63* was used as a probe.
 (b) deduced chromosomal structure of brewing yeast *S. cerevisiae* NCYC1006.

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、強力なマルトース発酵を誘導する転写因子 *MAL63* ホモログ遺伝子をクローニングすることができた。次世代シーケンサーによるゲノム解読、サザンハイブリダイゼーション等より、*MAL63* ホモログ遺伝子の染色体上の位置を求めたところ、第 VII 染色体右腕末端にあることが推定されたが、

複数の染色体上にも存在することも予想された。第 VII 染色体右腕末端のこの特徴的な染色体構造は、他の上面ビール酵母や下面ビール酵母の染色体構造でも維持されていて、マルトース発酵性の強い酵母の進化上の関係とマルトース発酵性の関係性を考えるに興味深い結果が得られたと考えている。

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 28 年度研究助成、JSPS 科研費 JP26430199 の助成を受けて、及び、前橋工科大学平成 28 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) 尾形智夫、平沼花乃子 前橋工科大学研究紀要 第 19 号 27-30 (2016).
- 2) R. Kajitani et al. Genome Res 24, 1384 (2014).
- 3) A. R. Borneman et al. PLoS Genetics 7, e1001287 (2011).
- 4) T. Ogata and Y. Yamagishi, System Appl Microbiol 22, 341 (1999).
- 5) Y. Nakao et al. DNA Research 16, 115 (2009).