

Title	ラガービール酵母の $\alpha$ -グルコシドトランスポーターの機能解明と変異型トランスポーター高発現による発酵速度改善
Author(s)	畠中, 治代
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/72165">https://doi.org/10.18910/72165</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

博士学位論文

ラガービール酵母の  $\alpha$ -グルコシドトランスポーター  
の機能解明と変異型トランスポーター高発現による  
発酵速度改善

畠中 治代

2018年 8月

大阪大学大学院工学研究科



## 目次

第 1 章 緒論	1
1.1 はじめに	1
1.2 ビール醸造の概略と、他の醸造酒と違い	1
1.3 ビール醸造に用いる酵母の特徴	2
1.4 ビール酵母によるマルトース、 $\alpha$ -グルコシドの資化	4
1.5 本研究の目的	7
第 2 章 ラガー酵母の持つマルトーストランスポーターと $\alpha$ -グルコシドトランスポーターのクローニングとその構造	10
2.1 緒言	10
2.2 実験材料および方法	10
2.2.1 使用菌株	10
2.2.2 使用培地と培養	11
2.2.3 使用プラスミドの構築と各種トランスポーター遺伝子、および変異型遺伝子の取得	12
2.2.4 ラガー酵母ゲノム遺伝子の破壊	14
2.2.5 麦汁の調製方法	15
2.2.6 酵母への形質転換	15
2.2.7 Water suspension assay	15
2.2.8 ゲノム DNA, プラスミド DNA の調製	15
2.2.9 RNA の調製	16
2.2.10 DNA 電気泳動	16
2.2.11 RNA 電気泳動	16
2.2.12 パルスフィールド電気泳動による酵母染色体 DNA の分離 (CHEF)	17
2.2.13 サザンハイブリダイゼーション	17
2.2.14 ノザンハイブリダイゼーション	18
2.2.15 コロニーハイブリダイゼーション	19
2.2.16 DNA シークエンス	19
2.2.17 ラガー酵母ゲノムライブラリーの構築	20
2.2.18 マイクロアレイアナライシス	20
2.3 結果	20
2.3.1 ラガー酵母の <i>S. eubayanus</i> 型の <i>AGT1</i> 遺伝子 ( <i>SeAGT1</i> ) のクローニング	20
2.3.2 ラガー酵母の <i>SeAGT1</i> の構造	21
2.3.3 ラガー酵母の <i>SeAGT1</i> の取得とその構造	25
2.3.4 ラガー酵母の <i>SeAGT1</i> と <i>ScAGT1</i> のラガー酵母での遺伝子発現量	27

2.3.5	ラガー酵母の <i>SeAGT1</i> と <i>ScAGT1</i> のマルトース、マルトトリオース資化性	28
2.3.6	<i>SeAGT1</i> と <i>ScAGT1</i> を破壊したラガー酵母を用いての麦汁発酵	29
2.3.7	ラガー酵母におけるマルトトリオース資化に関与するメインのトランスポーターのクローニング	30
2.3.8	LBYG アレイを用いたラガー酵母 Weihenstephan34/70 の麦汁発酵中の <i>MTT1</i> , <i>MAL31</i> , <i>ScAGT1</i> , <i>SeAGT1</i> の遺伝子発現パターン	33
2.3.9	<i>MTT1</i> , <i>MAL61</i> , <i>ScAGT1</i> , <i>SeAGT1</i> の基質特異性	34
2.3.10	ラガー酵母の Sc 型マルトーストランスポーター	36
2.4	考察	37

第 3 章	実験室酵母の Mal31p, Mal61p, Mal21p と Agt1p、およびラガー酵母の SeAgt1p と Mtt1p の詳細な特性解析、および改変	40
3.1	緒言	40
3.2	実験材料および方法	40
3.2.1	使用菌株	40
3.2.2	使用プラスミドの構築と各種トランスポーター遺伝子、および変異型遺伝子の取得	42
3.2.3	使用培地と培養	44
3.2.4	マルトースあるいはマルトトリオース取り込み速度の測定	44
3.2.5	部分タンパク質の大腸菌での発現とその精製	45
3.2.6	タンパク質電気泳動	45
3.2.7	ウェスタンブロットアナライシス	45
3.2.8	トランスポータータンパク質の分解速度の測定	46
3.2.9	免疫沈降	46
3.2.10	間接的蛍光顕微鏡観察	47
3.3	結果	47
3.3.1	マルトーストランスポーター、Mal21p, Mal31p, Mal61p の比較	47
3.3.2	ラガー酵母の <i>SeAGT1</i> と <i>AGT1</i> , <i>MTT1</i> と <i>MAL61</i> , <i>MAL31</i> , <i>MAL21</i> のタンパク発現と取り込み活性の比較	49
3.3.3	Mal21p と Mal61p マルトース取り込み比活性の比較	53
3.3.4	マルトーストランスポーターのグルコース存在下での分解速度	54
3.3.5	$\alpha$ -グルコシドトランスポーターのグルコース存在下での分解速度	55
3.3.6	Agt1p と Mal21p のハイブリッドトランスポーターの作製とその性質	56
3.3.7	Mal21p のグルコース誘導性分解耐性に関わるアミノ酸残基の決定	60
3.3.8	グルコース存在下での Mal61p と Mal21p のユビキチン化の違い	62
3.3.9	Mal61p と Mal21p の細胞内局在	64

3.3.10 Mtt1p のグルコース誘導性分解耐性の改善	64
3.3.11 Agt1p のグルコース誘導性分解耐性の改善	65
3.3.12 Mal61p, Mal21p, Agt1p の活性に必須なアミノ酸の同定	67
3.3.13 Mtt1p の基質特異性を決める領域の同定	69
3.4 考察	70
第 4 章 実験室株およびビール酵母での $\alpha$ -グルコシドトランスポーターの高発現	73
4.1 緒言	73
4.2 実験材料および方法	74
4.2.1 使用菌株	74
4.2.2 使用プラスミドの構築と各種トランスポーター遺伝子、および変異型遺伝子の作製	78
4.2.3 使用培地と培養	81
4.2.4 麦汁の調製方法	81
4.2.5 マルターゼ活性の測定	82
4.2.6 マルトースあるいはグルコースの取り込み速度の測定	82
4.2.7 酵母細胞サイズの測定と細胞数の測定	83
4.2.8 マルトース存在下でのヘキシキナーゼ活性の測定	83
4.2.9 ベーターガラクトシダーゼ活性の測定	83
4.2.10 定量 PCR	84
4.2.11 GC/MS による細胞内代謝物の分析と糖濃度の定量	84
4.2.12 CE-TOFMS による代謝物の定量	85
4.2.13 細胞内 pH の定量	86
4.2.14 酵母のプロパゲーション(発酵に供する酵母の培養)	87
4.2.15 マルチファームチューブを用いた発酵試験	87
4.2.16 シリンダーを用いた発酵試験	88
4.2.17 糖分析	88
4.2.18 遊離アミノ態窒素の測定	88
4.2.19 アンモニアの定量	88
4.2.20 有機酸分析	89
4.2.21 LVC (low volatile compound) 分析	89
4.2.22 エタノール分析	90
4.2.23 遺伝子発現解析	90
4.3 結果	90
4.3.1 実験室株を宿主とした $\alpha$ -グルコシドトランスポーター発現株の性質	90

4.3.1.1	混合糖培地での Mal21p および Agt1p-2HA [Pro55] 発現株の生育阻害	90
4.3.1.2	他の実験室株での増殖阻害	93
4.3.1.3	増殖阻害を起こした細胞の細胞内代謝物の分析	93
4.3.1.4	HD17 と HD49 のグルコースとマルトース取り込み速度	100
4.3.1.5	HD17 の生育阻害はマルトース濃度に依存する	101
4.3.1.6	HD17 の細胞内糖濃度の定量	102
4.3.1.7	HD17 と HD49 のマルターゼ遺伝子の発現とマルターゼ活性	103
4.3.1.8	HD17 と HD49 細胞内 pH の影響	104
4.3.1.9	HD17 の細胞内浸透圧の上昇と増殖阻害	105
4.3.1.10	増殖阻害を起こした HD17 の細胞内代謝物解析	105
4.3.1.11	マルトースのヘキソキナーゼ活性へ影響	107
4.3.1.12	増殖阻害を起こした HD17 細胞の遺伝子発現解析	108
4.3.1.13	ストレス応答遺伝子の高発現と破壊が HD17 株に及ぼす影響	112
4.3.1.14	増殖阻害を起こした HD17 細胞でのタンパク質合成停止	114
4.3.2	ビール醸造酵母を宿主とした $\alpha$ -グルコシドトランスポーター発現株の性質	116
4.3.2.1	ビール酵母のマルターゼ活性	116
4.3.2.2	発酵試験 1 エキス・糖・窒素源消費	117
4.3.2.3	発酵試験 1 発酵物の low volatile compounds	120
4.3.2.4	発酵試験 2 エキス・糖・窒素源消費	120
4.3.2.5	発酵試験 2 発酵物の有機酸、low volatile compound	122
4.3.2.6	発酵試験 3 エキス消費	123
4.4	考察	124
第 5 章 総括と展望		129
5.1	本研究の総括	129
5.2	今後の展望	134
謝辞		137
引用論文		138
発表論文		148
本学位に関与する論文		148
本学位に関与する特許		148
本学位に関与する学会発表		148
国内会議		148
海外会議		149

## 第1章 緒論

### 1.1 はじめに

本章では、本研究の背景と目的について説明する。1.2 ではビール醸造の概略と他の醸造酒との違いについて述べ、1.3 ではビール醸造に用いる酵母、特に下面ビール酵母である *Saccharomyces pastrianus* の特徴について説明する。続いて、1.4 でビール酵母の大きな特徴であるマルトース、マルトリオースの資化に必要なタンパク質、特に最初のステップである細胞への糖の取り込みを担う、マルトーストランスポーターと  $\alpha$ -グルコシドトランスポーターの制御について述べる。最後に 1.5 でビール醸造において、起こりうる大きな問題の一つであるエキス消費遅延について触れ、この研究の目的を述べる。

### 1.2 ビール醸造の概略と、他の醸造酒との違い

ビールの起源は紀元前 8000~4000 年に遡る。ビール製造に関わる最古の記録はメソポタミア文明のシュメール人により作られていたというものである。当時のビールがどのようなものであったかは定かではないが、今日のビール製造には大麦麦芽、ホップ、水の主原料に加え、副原料として、コーングリッツ、コーンスターチ、米などが用いられている。大麦麦芽、コーンスターチ、米などからは、炭素源である糖、窒素源であるアミノ酸、オリゴペプチド、アンモニア、核酸、そして微量のビタミンや金属イオンが供給される。ホップは苦み・香りを与える。図 1-1 にビール製造の工程図を示す。大麦にはビール大麦と言われる二条大麦が用いられる。二条大麦が用いられるのは、穀粒の大きさが均一であること、穀皮が薄いこと、デンプン量が多く、タンパク質量がビールにとって適正であること、

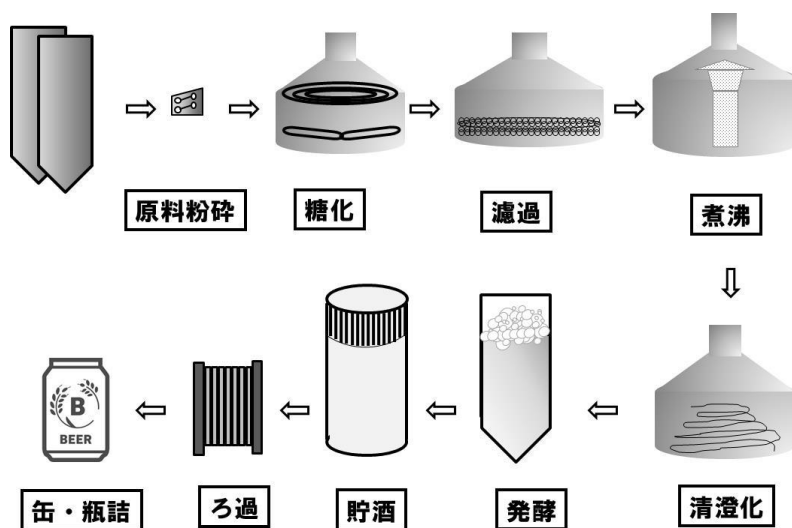


図 1-1 ビール醸造工程

発芽力が均一かつ旺盛で含有する酵素力が強いこと、すなわち麦芽の糖化が容易であることなどが理由である。麦芽を製造するために、大麦は浸麦槽で水分を含ませ、適度な温度



に保ち発芽させたのち、乾燥室で熱風で培燥する。この培燥の過程で酵素の働きを一時止めると共に、ビールに必要な成分、色、芳しい香りなどが付与される。粉碎した麦芽は副原料と共に温水と混ぜ合わせ、適当な温度で適当な時間、麦芽由来の酵素を働かせることにより、デンプンは糖へ、タンパク質はアミノ酸へと分解する。この糖化液は濾過され、ホップと共に煮沸される。ホップは苦みと香りを付与すると共に、泡立ちをよくしたり、防腐の意味合いもある。また、ホップは糖化液中のタンパク質の凝固も助ける。糖化液はワールプールと呼ばれる沈殿槽で凝固物と分離した後、発酵温度まで冷却し、少量の無菌空気と酵母を加えて発酵タンクへ送る。発酵温度はエール酵母（上面発酵酵母）を用いた場合は、15~25°C、ラガー酵母（下面酵母）を用いた場合は5~15°C程度である。4~10日かけて麦汁中のほとんどの糖がエタノールと炭酸ガスに分解されると、出来上がったビールは若ビールと呼ばれ、0°C付近で数週から一か月間の貯酒を行う。この貯酒の間にゆっくりと代謝が進み、香味が安定化して混濁物と酵母が沈降して清澄化が進み、さらに炭酸ガスは飽和状態となる。最後にろ過をして酵母を取り除いた後ビールを瓶詰する。以上がビール醸造の概略である(1, 2)。直近25年ほどの間には酒税法上のビールだけではなく、麦芽比率25%未満である発泡酒を含む、様々なビール風飲料が開発されてきた。ビール風飲料においては、先般上げた原料以外にも様々な原料が使われており、もろみの栄養成分やその濃度はより多様になっている。

ビール製造では、麦芽や副原料である米等に含まれるデンプンを、麦芽の持つ $\alpha$ -アミラーゼ、 $\beta$ -アミラーゼ等の酵素の働きを利用してグルコース、マルトース、マルトトリオースを主とした糖に分解する。そしてビール酵母はグルコース、マルトース、マルトトリオースをエタノールや様々な香味成分に変換する(3)。つまり醸造とは糖を酵母の力でエタノールと二酸化炭素に変換することである。ビールと他の醸造酒である日本酒やワインでは、原料・酵母・製造法、いずれも大きな差があるが、その中でも酵母が資化する糖の種類が異なることは代表的な違いである。日本酒の場合は、原料である米のデンプンを麹菌の持つ $\alpha$ -アミラーゼ、 $\alpha$ -グルコシダーゼ、グルコアミラーゼなどで分解しながら並行複式発酵を行う。麹菌による分解の過程では、オリゴ糖なども一時的に存在するが、清酒酵母の資化する糖は単糖であるグルコースである。ワインにおいてはブドウの果汁に含まれる糖は、単糖であるグルコース、フラクトースであり、糖化という工程を経ることなく、ブドウ果汁をそのまま発酵する。つまり、ビールにおいてのみ、酵母は二糖であるマルトースと三糖であるマルトトリオースを資化しなければならない(2)。

### 1.3 ビール醸造に用いる酵母の特徴

微生物はエタノール発酵を行うと1分子のグルコースから2分子のATPを得る。一方呼吸でエネルギーを得る場合には、1分子のグルコースから36分子のATPが得られるので、はるかに効率が良い。しかし、醸造に用いられる酵母、*Saccharomyces cerevisiae*はクラブトリー効果（呼吸を行なっている細胞にグルコースを与えると呼吸が押えられる現象）

陽性の酵母であり、基本的に発酵でエネルギーを得ようとするため、糖濃度を制限し、かつ大量の酸素を通気しない限り、発酵でエネルギーを獲得しようとする。つまり逆に言えば、糖濃度を高くして嫌気状態を保てば容易にエタノールを生成することができるため、*S. cerevisiae* はエタノール生産に大変適した微生物であると言える。ビール醸造に用いられる酵母は、エール酵母（上面発酵酵母）とラガー酵母（下面発酵酵母）に大きく分かれる。エール酵母の多くは、2倍体あるいは3倍体の *S. cerevisiae* である（まれに *Saccharomyces uvarum*, *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces kudriazevii* などと *S. cerevisiae* のハイブリッドも存在する）。エール酵母は、発酵中に液面に浮く性質があり、エール、アルト、スタウトなどの種類のビールに用いられる。発酵温度は 15~25°C である。それに対して、ラガー酵母は *Saccharomyces pastrianus* に属する 4 倍体の高次倍数体酵母であり、長い間 *S. cerevisiae* と *S. bayanus* のナチュラルハイブリッドであると考えられてきた。しかし type strain を含め、*S. bayanus* に属する酵母は全て二種類以上のゲノムを持っており、その二種類のゲノムのうち *S. pastrianus* の持つ非 *S. cerevisiae* 型のゲノムを単独で持っている酵母はなかなか発見することができなかった。しかし 2012 年に南米パタゴニアのオレンジゴールから、*S. pastrianus* が持つ非 *S. cerevisiae* 型のゲノムのみを単独で持つ酵母が発見され、*S. eubayanus* と名付けられた (4)。その後チベット、北アメリカからも同酵母が発見され、現在ではこれが *S. pastrianus* の祖先種の一つであると考えられている。ラガー酵母は 2 倍体の *S. cerevisiae* と 2 倍体の *S. eubayanus* が交配後、染色体間の組換え、重複、脱落などを経て、現在の *S. pastrianus* になったと考えられている (図 1-2) (5,6)。複数のラガー酵母を調べると、それぞれの染色体、あるいは領域ごとに *S. cerevisiae* 型と *S.*

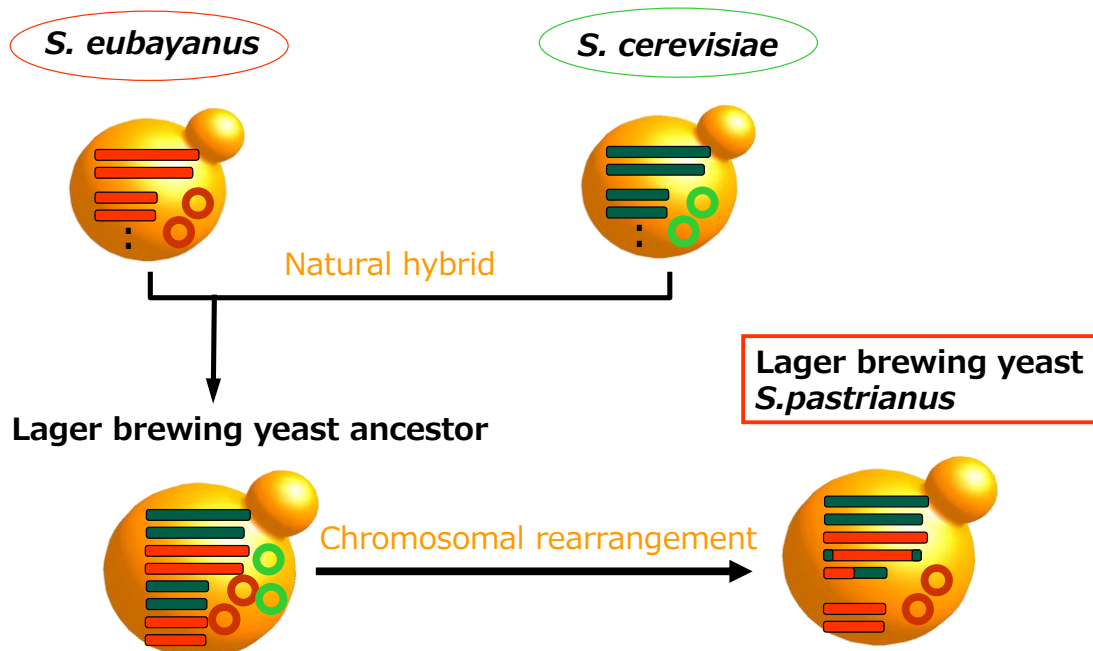


図 1-2 ラガー酵母のゲノム構造

*eubayanus* 型のコピー数に違いが見られることが報告されている (7)。ラガー酵母はチェコのピルゼン地方で生まれたピルスナータイプのビール発酵に用いられ、ピルスナーは現在世界で製造されるビールの 90% を占めている。ビールの製造量は他の酒と比べても突出して高い。従って、その製造に用いられるラガー酵母は産業上極めて重要な酵母だと言える。麦汁に含まれる糖のうち、グルコースは 10~15%、マルトースが 70~80%、マルトトリオースが 10~15% であるため、ビール酵母に要求される性質のうち、最も重要で特徴的なのはマルトースとマルトトリオースという  $\alpha$ -グルコシドを資化する能力である。 $\alpha$ -グルコシドを資化する能力はグルコースを資化する能力と異なり、すべての醸造用酵母、実験室酵母が持っているものではなく、一般的にビール酵母は特に強い  $\alpha$ -グルコシド資化能力を持っている。

#### 1.4 ビール酵母によるマルトース、 $\alpha$ -グルコシドの資化

図 1-3 に酵母による糖の取り込みの模式図を示した。*S. cerevisiae* は糖によって異なるトランスポーターを持っている。ヘキソーストランスポーターとしては *HXT1*~*HXT17* の 17 つのトランスポーターがある。そのうち、通常機能しているのは *HXT1*~*HXT7* だと考えられており、これらと *GAL2* を破壊するとグルコースで生育できなくなる (8)。ヘキソーストランスポーターの取り込み様式は促進拡散である。それに対して、 $\alpha$ -グルコシドトランスポーターは、プロトンシンポーターであり、基質 1 分子とプロトン 1 分子が同時に取り込まれる (9)。従って、酵母は細胞膜上にあるプロトン ATPase の働きでプロトンを汲み出すことで細胞内 pH の低下を防ぎ、この時 1 分子の ATP が消費される。好氣的に呼吸によってマルトースやマルトトリオースからエネルギーを産生する場合、この 1 分子の ATP の消費はグルコースを炭素源とする場合と比べて大きな差にはなりえないが、嫌氣的な発酵に

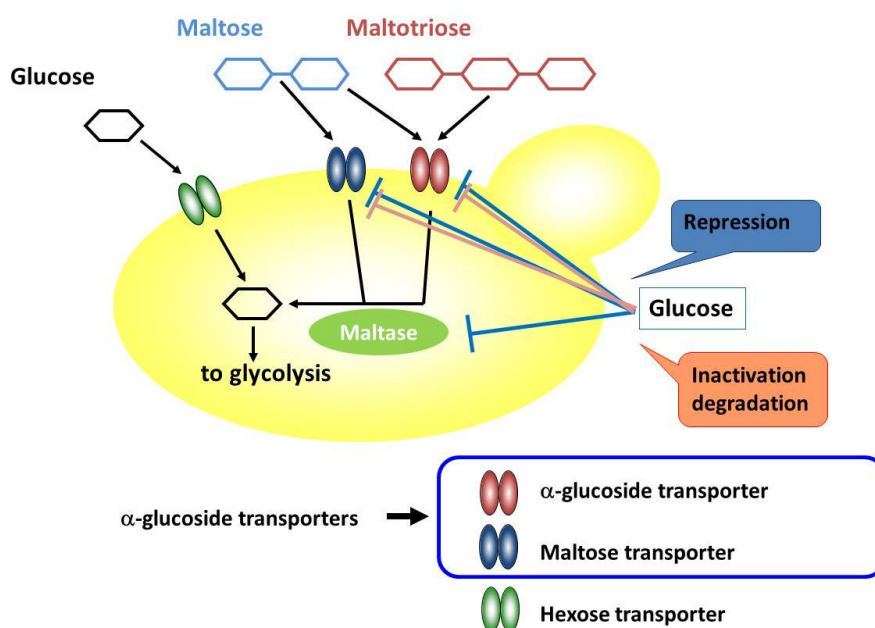


図 1-3 酵母による糖の取り込みと糖トランスポーター

においてはこの差は大きい。炭素源としてマルトース 1 分子は 2 分子のグルコースに相当し、発酵においては解糖系を経て 4 分子の ATP が生み出される。しかしそのうち 1 分子をプロトン排出に使用しなければならないとすると、グルコースに比べ 25% も対糖エネルギー生産率が低いこととなる。*S. cerevisiae* が最も好むのがグルコースやフラクトースなどの単糖であること理由は、このエネルギー効率の差にあると考えると合理的である。

*S. cerevisiae* の持つ  $\alpha$ -グルコシドの資化を担う 3 つの遺伝子は *MAL* locus に 3 つ並んでコードされている (図 1-4)。*MAL* locus には *MAL1* (VII 番染色体)、*MAL2* (III 番染色体)、*MAL3* (II 番染色体)、*MAL4* (X 番染色体)、*MAL6* (VIII 番染色体) の 5 つが知られている (10,11)。糖の取り込みを行うトランスポーター (*MALX1*)、マルトースとマルトトリオースをグルコースに分解するマルターゼ (*MALX2*)、そしてその二つの遺伝子の転写活性因子 (*MALX3*) の 3 つの遺伝子がコードされている (X=1, 2, 3, 4, 6)。これら転写活性因子 (MalX3p) はマルトース存在下で自身の遺伝子発現を活性化する (12)。トランスポーター (MalX1p) とマルターゼ (MalX2p) は、bidirectional なプロモーターを挟んで、逆向きに位置する (13)。両者ともグルコース存在下では転写抑制因子である Mig1p の働きで発現が抑制され、マルトース存在下で転写活性因子 (MalX3p) の働きで発現が活性化する。

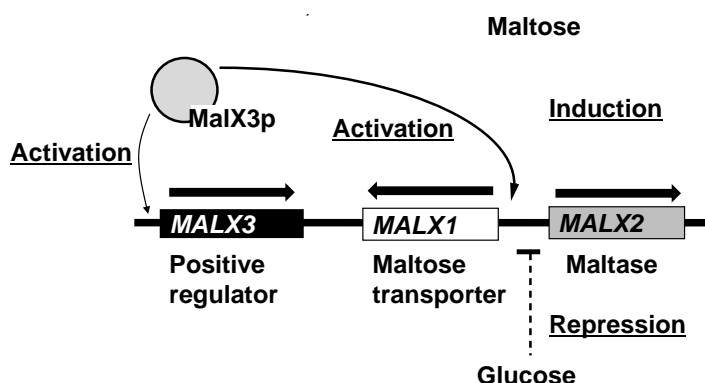


図 1-4 *MAL* locus 構造

この 5 つの *MAL* locus のうち、*MAL2*, *MAL3*, *MAL4*, *MAL6* にコードされるトランスポーターは、マルトーストランスポーター、MalX1p (X=2, 3, 4, 6) と呼ばれ、マルトースを取り込むことができる。一方 *MAL1* にコードされるトランスポーターは、 $\alpha$ -グルコシドトランスポーター、Mal11p=Agt1p と呼ばれ、マルトースだけでなくマルトトリオースも取り込める。分解酵素としてはマルターゼの他に *IMA1*~*5* にコードされるイソマルターゼも存在する (14)。イソマルターゼは  $\alpha$ -1,6-グルコシドを分解することができる。Gancedo *et.al* は Mig1p による制御について、次のようなモデルを報告している (15)。グルコース存在下ではリン酸化されていた転写抑制因子 Mig1p が、フォスファターゼである Glc7-Reg1p 複合体によって脱リン酸化される。脱リン酸化された Mig1p はヘキソキナーゼ

である Hxk2p と一緒に核に移行し、Cyc8p, Tup1p と共にプロモーターに結合し転写を阻害する。逆にグルコースがない時には Mig1p と Hxk2p は核外に移行し、Snf1 キナーゼによってリン酸化される。リン酸化された Mig1p は核内には移行できない。

Bali *et.al.*は天然型 MalX3p と構成的あるいは非誘導性の変異型 MalX3p を有する株を用いた研究によって、MalX3p は分子シャペロン Ssa1p, Hsp82p, Sti1p と状況に応じて異なる複合体を形成することを報告している (図 1-5) (16)。誘導性の天然型 MalX3p には Ssa1p, Hsp82p, Sti1p が結合するが、マルトース存在下ではそれらは解離する。非誘導性の変異型 MalX3p には Ssa1p が強く結合しており、構成的 MalX1p には Hsp82p は結合するが、Ssa1p と Sti1p はほとんど結合しない。従って MalX3p はこれらの分子シャペロンと複合体を形成し、状況に応じて解離して *MALX1* と *MALX2* の転写を誘導するものと予想される。これらの転写制御に加えて、マルトーストランスポーター、Mal31p と Mal61p

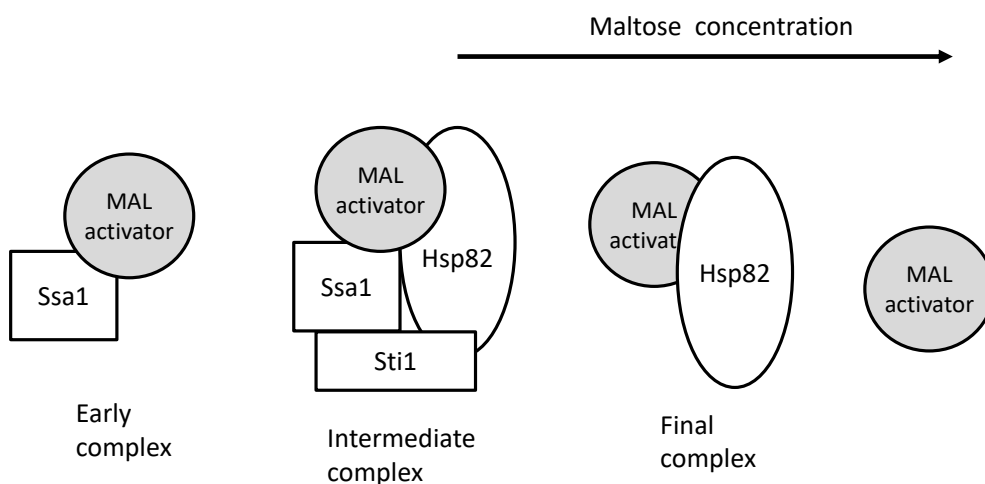


図 1-5 Mal-activator の活性化モデル

Mal-activator はマルトースの有無によって、Hsp70(Ssa1)/Hsp90(Hsp82) シャペロンとの結合形態に変化が生じ、転写活性が制御される。

は翻訳後制御も受けることが知られている。グルコースが培地に添加されると、細胞膜上のマルトーストランスポーターはリン酸化された後、Npi1p/Rsp5p によってユビキチン化される。修飾されたトランスポーターは、エンドサイトーシスによって細胞内部に取り込まれ、液胞へと運ばれて速やかに分解される (図 1-6) (17,18)。トランスポーターに対して、このような転写段階と翻訳後の制御システムを持っているため、*S. cerevisiae* は複数の糖がある時もグルコースを優先に資化し、その後他の糖の資化へと移行する。

$\alpha$ -グルコシドの資化に関わる遺伝子の存在は株によってまちまちであり、まったく持たない株から複数種類持つ株、またそれぞれのコピー数の異なる株が存在する。ビール酵母は高い  $\alpha$ -グルコシド資化能力を持つので、複数のこれらの資化遺伝子を持つものが多い(19)。前述したようにラガー酵母では *S. cerevisiae* 型の遺伝子の他に *S. eubayanus* 型の遺伝子が存在する。*S. pastrianus* に属する Weihenstephan 34/70 のドラフトゲノムシーケ

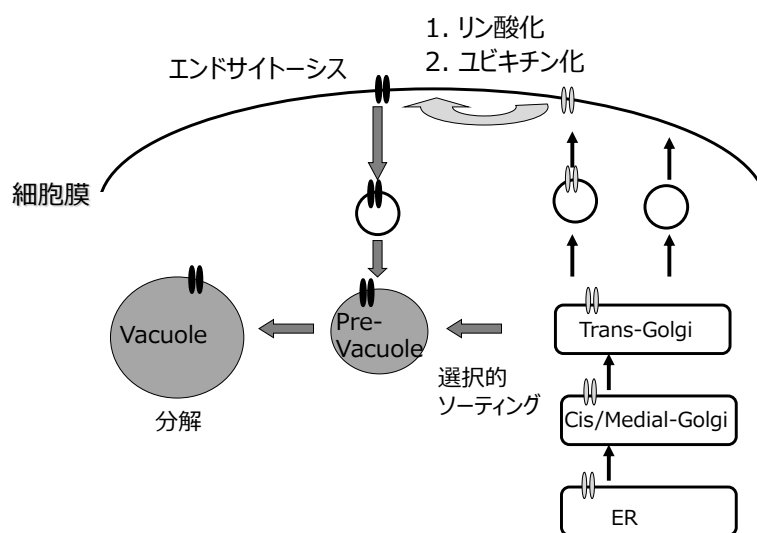


図 1-6 膜タンパク質の分解モデル

○:  $\alpha$ -グルコシドトランスポーター, ○○: 修飾された $\alpha$ -グルコシドトランスポーター

ンスはサントリー株式会社 (現サントリーホールディングス株式会社) によって 2008 年に公開された (5)。しかし、 $\alpha$ -グルコシドトランスポーター、あるいはマルトーストランスポーターは極めてテロメアに近い領域に位置しており、テロメア近傍はシーケンスの冗長性が低いこと、さらに遺伝子の重複、転移、変異が他の領域より多く起こっていることなどから、十分な長さのコンティグを得ることが難しく、プロモーター領域も含めてすべてのシーケンスが確定したとは言い難い状態である。さらに複数存在する $\alpha$ -グルコシドトランスポーターについて、その性質についても十分調べられたとは言えない。

### 1.5 本研究の目的

1.4 で述べた通り、麦汁はグルコース、マルトース、マルトトリオースの 3 種類の糖を含んでおり、これらの糖はそれぞれ異なるトランスポーターで細胞内に取り込まれる。グルコースの存在下ではマルトース、マルトトリオースの資化に必要な遺伝子は発現が抑制される。ビール発酵では、まずグルコースが発酵開始後 1~2 日以内に消費され、遅れてマルトースが資化されはじめる。マルトトリオースは消費速度がマルトースより遅く、発酵の最後まで残る (20)。ラガー酵母による麦汁発酵時のエキス消費、アミノ態窒素の消費、酵母増殖の典型的な経過を図 1-7A に、3 種類の糖の消費経過を図 1-7B に示した。

増殖量 (OD<sub>660</sub>) の変化から酵母は発酵初期に 2 回程度の出芽をした以降は増殖しないことがわかる。ビール発酵ではピッチング時に 10 ppm 前後の酸素を通気する。この酸素は数時間以内に消費されるが、酸素の有無は増殖に大きな影響をもたらす。それは酸素があって呼吸を行うと対糖エネルギー収支が高くて有利であるということよりも、クラブツリー効果陽性の酵母にとっては、エルゴステロール、ヘム、不飽和脂肪酸、CoA などの、酸

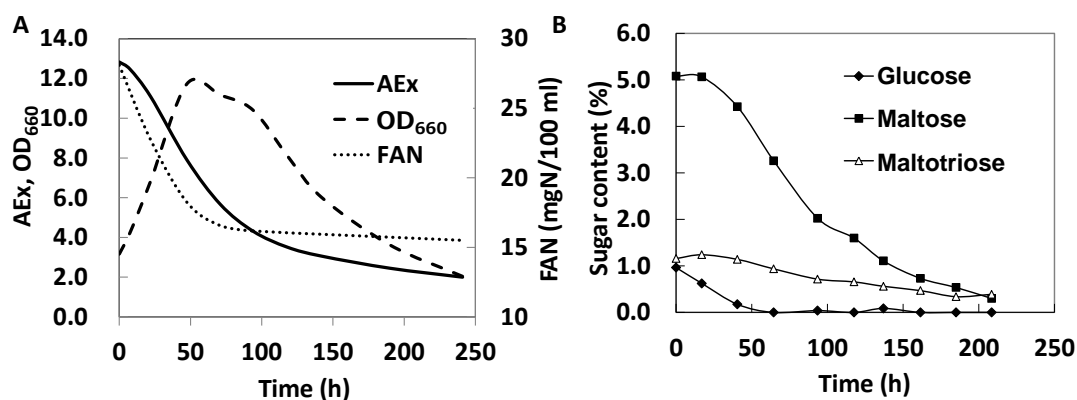


図 1-7 ラガー酵母によるビール醗酵

A: エキス(AEx: U 字振動管により測定した密度より、糖濃度に換算したもの), OD<sub>660</sub>, 遊離アミノ態窒素 (FAN)、 B: 糖の資化経過

麦芽 100%原料の麦汁に、ラガー酵母 Weihenstephan34/70 を  $1.5 \times 10^7$  cells/ml になるようにピッチングして 15 °C で発酵した。

素が基質として必要となる、細胞に必須な成分の合成が可能であるかどうかに関係していると予想される。基本的にグルコース存在下ではマルトース、マルトトリオースの資化関連遺伝子群は発現しないとされているが、タンパク質合成が活発である増殖期に、グルコースからマルトース、マルトトリオースの資化へいかにスムーズに移行できるかが、遅延のない糖の消費・エタノール発酵の継続に大事である。特にビール醸造ではマルトトリオースの資化遅延が度々問題になる (21)。特に昨今は麦芽以外の原料が用いられることもあり、糖の種類や濃度が多様化している。また、生産効率の面から高濃度麦汁での生産も行われるが、麦汁濃度に依存してグルコース濃度も上昇するため、マルトース・マルトトリオースの資化の遅れが問題になりやすい。従ってマルトースとマルトトリオースの資化の第一段階を担う、 $\alpha$ -グルコシドトランスポーターの性質を把握し、それらをビール発酵中に十分に機能させることは、ビール醸造において極めて重要である。本研究では、ラガー酵母で機能する  $\alpha$ -グルコシドトランスポーター、および実験室株の  $\alpha$ -グルコシドトランスポーターの諸性質を明らかにし、それらトランスポーターの改変、および高発現によるビール発酵速度の改善を試みた。本研究の構成を図 1-8 に示した。

第二章では、世界でのビール生産の 90%に使用されているラガー酵母において、マルト

トリオースを取り込むことができるトランスポーターを取得し、発酵でメインに機能するトランスポーターを特定した。またトランスポーター遺伝子発現、基質特異性などを調べた。第三章では、ラガー酵母と実験室酵母から取得した様々な $\alpha$ -グルコシドトランスポーターについて、詳しく諸性質を明らかにした。特にグルコース誘導性のトランスポータータンパク質分解速度に注目し、各トランスポーターの分解速度を決定した。またその分解速度を左右するアミノ酸残基を突き止め、分解しにくい $\alpha$ -グルコシドトランスポーターの構築を行った。第四章では、まず実験室酵母を宿主として、様々な $\alpha$ -グルコシドトランスポーターの高発現株の増殖を調べた。そしてグルコース誘導性のトランスポータータンパク質分解耐性を持つトランスポーター高発現株が、グルコースとマルトースの両糖を含む培地では、増殖阻害を起こすことを明らかにした。その高発現株細胞についてメタボローム解析、遺伝子発現解析をはじめとした様々な手法を用いて、増殖停止の原因を明らかにした。次にビール酵母において、各種 $\alpha$ -グルコシドトランスポーターの高発現を試み、糖濃度の異なる麦汁や、低麦芽麦汁など、様々な培地で発酵のパフォーマンスを調べ、発酵速度を向上させるためにどのようなトランスポーターを発現させるのが良いのか検討した。

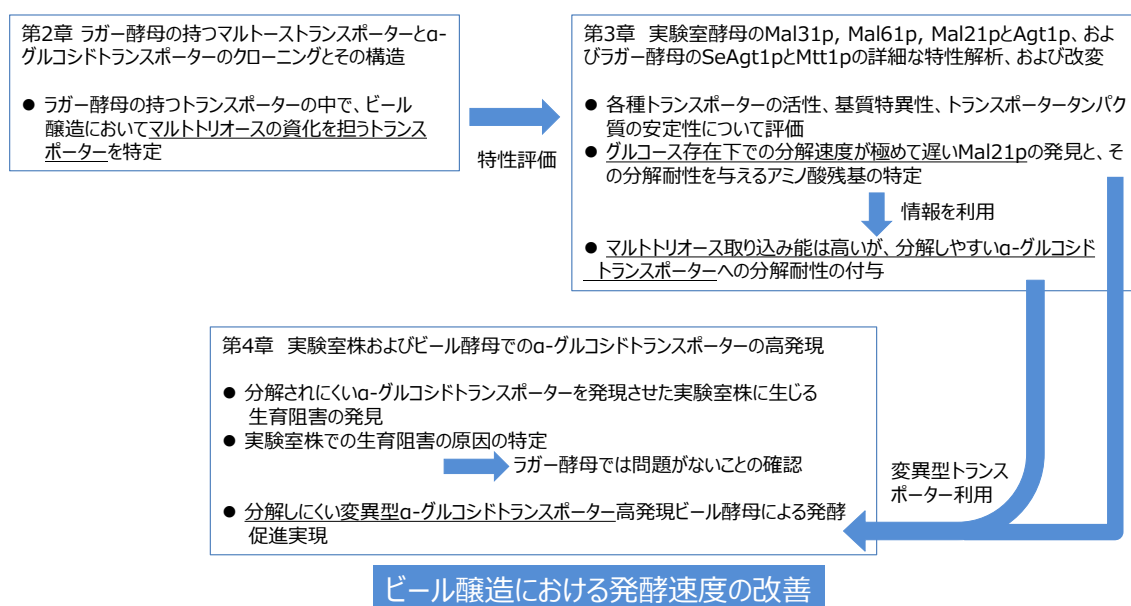


図 1-8 本研究の構成



## 第二章 ラガー酵母の持つマルトーストランスポーターと $\alpha$ -グルコシドトランスポーターの解析

### 2.1 緒言

ビール、ワイン、ウィスキー、各種スピリッツ、日本酒、そしてパン、菓子など、酵母は世界中で最も多く使われている産業微生物である。ピルスナータイプのビールは、チェコのピルゼン地方を発祥とする淡色の黄金色のビールであり、下面発酵酵母（ラガー酵母）と呼ばれるビール酵母で発酵され、現在世界で製造されるビールの 90%を占めている。ビールの製造量は他の酒と比べても突出して高い。従って、その製造に用いられるラガー酵母は産業上極めて重要な酵母だと言える。*S. pastrianus*に属する Weihenstephan 34/70 のドラフトゲノムシーケンスはサントリー株式会社（現サントリーホールディングス株式会社）によって 2008 年に公開された (5)。 $\alpha$ -グルコシドトランスポーター、あるいはマルトーストランスポーターは極めてテロメアに近い領域に位置しており、ドラフトシーケンスでは冗長性が低い部分であった。Nakao *et.al*によって報告されている、6種類の $\alpha$ -グルコシドトランスポーターのうち、2種は ORF の途中で truncate されていた (5)。残りの4種のうち、*MAL31*と annotate されたものが2種、*AGT1*と annotate されたものが1種、*MPH2*と annotate されたものが1種であった。これらのうちどのトランスポーターが *S. pastrianus* の中で主にマルトリオースの取り込みを担っているのか、あるいはドラフトシーケンスでは見つからなかったトランスポーターがあるのかはわかっていない。また、これらのトランスポーターのプロモーター部分の配列も明らかになっていない。そこで、*S. cerevisiae*と *S. eubayanus*に存在する $\alpha$ -グルコシドトランスポーターの中でマルトリオースを取り込む事ができるトランスポーターをクローニングし、プロモーターの配列・構造や、基質特異性、遺伝子発現量を *S. cerevisiae* 実験室株の持つ $\alpha$ -グルコシドトランスポーターとの比較のもとに明らかにして、ラガー酵母の中でマルトリオースの取り込みの主な役割を演じているトランスポーターを特定することを目的とした。遺伝子名については、Scがついている場合、*S. pastrianus*の *S. cerevisiae*型のゲノムの遺伝子を表し、Seがついている場合、同じく *S. pastrianus*の *S. eubayanus*型のゲノムの遺伝子を表すこととする。また、どちらもついていない場合には、S288C株などを含む *S. cerevisiae* 実験室株の遺伝子を表す。

### 2.2 実験材料および方法

#### 2.2.1 使用菌株

本章で用いた酵母菌株と大腸菌株を表 2-1 に示す。JH1032 は X2180-1A に *TPI1p::MAL32* (マルターゼ) 発現ユニットを *TPI1* プロモーター領域に G418 (ジェネティシン) 耐性遺伝子と共に導入した株である (22)。JH1032 はその *URA3* プロモーター部位にトラン

スポーター発現ユニットを導入するか、あるいはトランスポーター発現ユニットを持つ YCp 型プラスミドを導入して、トランスポーターの機能を調べるために使用した。ATCC96955, S288C, ATCC20598 はそれぞれ、*MAL61*, *MAL31*, *MAL21* を取得するために用いた。CB11 株は *MAL6* locus と *AGT1* を持つ 1 倍体株である。HH150 株は CB11 株の *AGT1* 株を破壊した株である。酵母株 KY73 株は、*hxt1-7Δ*, *gal2Δ* であり、グルコース、フラクトース、ガラクトースなどの単糖で生育できない株であり、各トランスポーターの単糖に対する基質特異性を調べるために用いた(8)。SUN49, SUN84, Weihenstephan34/70 はラガー酵母、*S. pastrianus* であり、遺伝子の有無を調べるためのサザンハイブリダイゼーションや、遺伝子発現量を調べるためのノザンハイブリダイゼーション、遺伝子クロニングなどの目的に用いた。

大腸菌 DH5α はすべてのプラスミドの調製、ゲノムライブラリーの構築に用いた。

### 2.2.2 使用培地と培養

酵母細胞は YPD 培地 (1% yeast extract, 2% yeast peptone, 2% グルコース) あるいは YPM 培地 (1% yeast extract, 2% yeast peptone, 0.5% マルトース) で培養した。YNBM 培地あるいは YNBMt 培地 (6.7 g/l yeast nitrogen base medium without amino acids [Difco], 0.5% マルトース or 0.5% マルトトリオース) はマルトースあるいはマルトトリオースの資化性を確認するために使用した。YNBM 培地あるいは YNBMt 培地に呼吸阻害剤アンチマイシンを 0.3 μg/ml 添加した培地も同目的に使用した。SCM 培地と SCMt 培地は 2% グルコース の代わりに 2% マルトースあるいは 2% マルトトリオースを添加することを除いて、(23) の通り調製した。糖発酵試験には SFT 培地 (0.3% yeast extract, 0.5% polypeptone, 2% 各糖) を試験管にダーラム管と共にに入れて用いた。糖には、グルコース、マルトース、マルトトリオース、イソマルトース、α-メチルグルコシド、ツラノース、メレジトース、トレハロース、メリビオースを用いた。ジェネチシン薬剤耐性遺伝子を持つプラスミドを導入した実験室株の培養には、各培地に 300 μg/ml のジェネチシンを添加して用いた。ラガー酵母にジェネチシン、nourseothricin、ハイグロマイシン薬剤耐性遺伝子を導入した株の培養には、各々、20 μg/ml, 10 μg/ml, 20 μg/ml になるように各薬剤を培地に添加して用いた。全ての株は 30°C、120 rpm で振とう培養を行った。大腸菌の培養には LB 培地にアンピシリン、あるいはカナマイシンを 50 μg/ml を加えたものを使用した。

表 2-1 第 2 章で用いた株

Strain Name	Genotype
<i>S. pastrianus</i>	
SUN49	prototroph
SUN84	prototroph
Weihenstephan 34/70(WS34/70)	prototroph
HH118	identical to WS34/70 except for <i>ScAgt1</i> Δ
HH132	identical to WS34/70 except for <i>ScAgt1</i> Δ <i>SeAgt1</i> Δ
<i>S. cerevisiae</i>	
X2180-1A	<i>MATalpha SUC2 mal mel gal2 CUP1</i>
JH1032	<i>MATa SUC2 mal mel gal2 CUP1 TPI1::TPI1pr-MAL32-G418R ura3</i>
S288C	<i>MATa SUC2 gal2 mal2 mel flo1 flo8-1 hap1 ho bio1 bio6</i>
ATCC96955	<i>MATa MAL61 MAL62 MAL63 mal64 mal11 MAL12 mal13 ura3-52 leu2-3 leu2-112 trp1 his</i>
ATCC20598	<i>MATa suc MAL2 MEL1 his4 leu2</i>
CB11	<i>MATa ade1 MAL61 MAL62 MAL63 AGT1 MAL12 MAL31 MAL32</i>
HH150	<i>MATa ade1 MAL61 MAL62 MAL63 agt1 Δ::G418R MAL12 MAL31 MAL32</i>
HH208	identical to JH1032 except for <i>ura3::URA3</i>
HH108	identical to JH1032 except for <i>ura3::URA3-TPI1pr-MAL61</i>
HH228	identical to JH1032 except for <i>ura3::URA3-TPI1pr-AGT1</i>
HH196	identical to JH1032 except for <i>ura3::URA3-TPI1pr-MTT1</i>
HH205	identical to JH1032 except for <i>ura3::URA3-TPI1pr-SeAGT1</i>
KY73	<i>ura3 gal2 Δhxt1 Δhxt2 Δhxt3 Δhxt41 Δhxt5 Δhxt6 Δhxt7 Δ</i>
<i>S. bayanus</i>	
IFO1127	
<i>E. coli</i>	
DH5a	<i>F- , Φ80d lacZΔM15, Δ(lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(rk- mk+), phoA, supE44, λ-, thi-1, gyrA96, relA1</i>

### 2.2.3 使用プラスミドの構築と各種トランスポーター遺伝子、および変異型遺伝子の取得

PCR に用いた全てのプライマーは表 2-2 に示した。*MAL61* と *MAL31* は酵母株 ATCC96955 あるいは S288C (ATCC204508) のゲノム DNA をそれぞれ鋳型として、オリゴヌクレオチド 1+2、あるいは 3 + 4 を用いた PCR で取得した。*AGT1* は酵母株 S288C のゲノム DNA を鋳型として、オリゴヌクレオチド 5 + 6 を用いた PCR で得た。PCR で得た断片は pCR2.1- TOPO TA Vector (Thermo Fisher Scientific) にクローニングした。クローニングした断片は シークエンスをして *MAL61*, *MAL31*, *AGT1* は GenBank (*MAL31*: NC001134, *MAL61*: X17391, *AGT1*: Z73074) と完全に同じことを確認した。*MAL21* は *MAL31* の上流領域 (開始コドンから-480 から-39 塩基にあたる領域) と下流領域 (開始コドンより 1,852 to 2,307 塩基にあたる領域) を用いて、ホモログスリコンビネーション法 (24) により、ATCC20598 のゲノム DNA から取得した。*MAL31* の上流・下流領域はオリゴヌクレオチド 7+8 と 9 + 10 を用いて S288C のゲノム DNA を鋳型として PCR より獲

表 2-2 第 2 章で用いたプライマー

No.	Sequence	Note
1	5'-TCTAGAGCTCATGAAGGGATTATCCTCATTAAT-3'	MAL61 cloning
2	5'-GGATCCTCATTTGTTACAACAGATGAGG -3'	MAL61 cloning
3	5'-TCTAGAATGAAGGGATTATCCTCATTA-3'	MAL31 cloning
4	5'-GGATCCTCATTTGTTACAACAGATGA-3'	MAL31 cloning
5	GAGCTCACATAGAAGAACATCAAACAACT	AGT1 cloning
6	GGATCCTTATTTCTTCCAAAAA	AGT1 cloning
7	5'-TCTAGAAGCGAGAGTTTAAAGCGAGGTTG-3'	MAL21 cloning
8	5'-GCGGCCGCACTGAATACGCTAAAACCACTC-3'	MAL21 cloning
9	5'-GCGGCCGCTAGCCAGTAGGTAGATACGGCG-3'	MAL21 cloning
10	5'-GGATCCGGGATATGAGAATCATGTATCG-3'	MAL21 cloning
11	5'-CTGGATGATCAGAAATAGTCA-3'	MAL21p cloning
12	5'-TTCACGCCATTCTCGATCTC-3'	MAL21p cloning
13	5'-AGATATTGCTTTGGATGGCG-3'	ScAGT1p cloning
14	5'-ATTATAATATTTTTTGTAGTTTGTATG-3'	ScAGT1p cloning
15	5'-TTGAGCTCAGTCTAGAGCTTATAGTTTTTGTAGTTATAGATTT-3'	TPI1p cloning
16	5'-TTGCGGCCGCTCTAGGATCTACGTATGGTCATTTTC-3'	TPI1p cloning
17	5'-CTGAGCTCAAGGATCCGATTAATATAAATATATAAAAAATATTATCT-3'	TPI1t cloning
18	5'-ATGCGGCCGCTACGCGTCGATTTTATAGACACAGTACTTACA-3'	TPI1t cloning
19	5'-GGATCCTCTGCAAGAGTGTATAGATAATCAGAAAGA-3'	pJHXSBSseAGT1
20	5'-GGATCCTTGTTCGAATGGTCTCTTAAATACGCGT-3'	pJHXSBSseAGT1
21	5'-TCTAGAATTACATCCAAGACTATTAATTAAC-3'	pJHXSBSMTT1
22	5'-GGATCCGTATCTACCTACTGGCAAAAAATCATT-3'	pJHXSBSMTT1
23	5'-TCTAGAGATATCATGTCTGAAGAAGCTGCCTATCAA-3'	HXT5 cloning
24	5'-GGATCCGATATCTTATTTGGTGTGAACATTCTCTTG-3'	HXT5 cloning
25	5'-TCTAGAGATATCATGTCTGAATTCGCTACTAGCAG-3'	HXT2 cloning
26	5'-GGATCCGATATCTTATTCCTCGAAACTCTTTTTTCT-3'	HXT2 cloning
27	5'-TCTAGAGATATCATGTACATGTTAACGCGTCGTATG-3'	FSY1 cloning
28	5'-GGATCCGATATCATAGCTCAATTGGCCCTTCTTCA-3'	FSY1 cloning
29	5'-ACTGATACTCTCATCAGCTAGCGAATCATGTTGAGTTTTTCCCTTTCCGAAT GGATCAACCACAGTAGATGCAAATTTTCTGGCAGGAACCCCTTGGTTGCGCAC TTAACTTCGCATCTG-3'	AGT1 disruption (Nat)
30	5'-GAGCTAGACCACTTAGAGTTCACCACCAATCTAGAACAGTTAGGAGATTCA GACGAAGATAACGAGAATGTGATTAATGAGATGAACGCTACTGATGATGCCTT GACAGTCTTGACGTGC-3'	AGT1 disruption (Nat)
31	5'-ACTGATACTCTCATCAGCTAGCGAATCATGTTGAGTTTTTCCCTTTCCGAAT GGATCAACCACAGTAGATGCAAATTTTCTGGCAGGAACCCCTTGGTTGCGCAC TTAACTTCGCATCTG-3'	AGTCR-GR
32	5'-GAGCTAGACCACTTAGAGTTCACCACCAATCTAGAACAGTTAGGAGATTCA GACGAAGATAACGAGAATGTGATTAATGAGATGAACGCTACTGATGATGCATG CCCGGGCTTAATTAAG-3'	AGTNF-GR
33	5'-TCATAACGCCTGTTGACTCGGCTTGAGAACCCTCAATAATGTTATCAAC TTGCGGACGATTTTGTAGCCCTCTTTTCCAAAGGGATCAACTACTGTACGCA CTTAACTTCGCATCTG-3'	SeAGT1 disruption (Nat, Hyg)
34	5'-ATGAAAAATACTTTGCTGGTAGGAAGAAAGGAAAAATACCCAGAAGAT GTGACGGCGAATCTTGCGGACACCTCAAGCACTACAGTTATGCAAGCAACCTT GGCAGTCTTGACGTGC-3'	SeAGT1 disruption (Nat, Hyg)

得した。*MAL21* の配列はデータベースに登録した (GenBank: AB453253)。*MAL21* ORF (from -99 to 1871) を含む断片はホモログスリコンビネーションで得られたプラスミドより *ScaI* で切り出し pUC19 の *SmaI* サイトに挿入した後、pJHXSBS の *SacI* と *BamHI* の間に挿入した。*MAL21* のプロモーター配列は ATCC20598 のゲノム DNA を鋳型として、オリゴヌクレオチド 11+12 を用いた PCR で得た。プロモーター配列領域を含む *SeAGT1* はラガー酵母 Sun49 株のパーシャルゲノムライブラリー (ベクターは pUC19 を使用) からコ

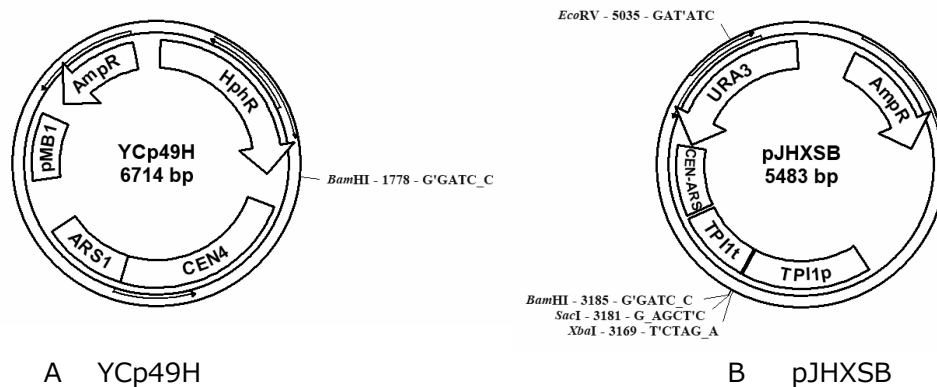


図 2-1 第2章で用いたプラスミド

ロニーハイブリダイゼーションで取得した。プロモーター配列領域を含む *ScAGT1* はラガー酵母 *Weihenstephan34/70* のドラフトゲノムシーケンスデータ (5) を参考に、オリゴヌクレオチド 13+14 をプライマーとして PCR により得た。詳しくは結果 2.3.1~2.3.3 に述べる。*MTT1* は *Weihenstephan34/70* のゲノムライブラリー (ベクターは YCp49H、図 2-1A) を HH150 に導入し、マルトリオースを単独炭素源とする完全培地 SCMt にて生育したコロニーより、プラスミド DNA を回収して取得した。詳しくは結果 2.3.7 に述べる。セントロメア型発現ベクター、pJHXSb (図 2-1B) は次に述べる断片を結合して構築した。

replication origin (ori) と ampicillin 耐性遺伝子 (AmpR) は pGEM13Zf (Promega Corporation) から得た。*URA3* 遺伝子は YCp50 (25) から、CEN6 (CEN-ARS) を含む断片は pRS317 (ATCC77157) から得た。*TPI1* プロモーター (*TPI1p*) とターミネーター (*TPI1t*) は S288C のゲノム DNA を鋳型として、オリゴヌクレオチド 15 + 16 と 17 + 18 を用いた PCR で得た (22)。*MAL21*, *MAL31*, *MAL61*, *AGT1*, *ScAGT1*, *SeAGT1*, *MTT1* はそれぞれ pJHXSb の *TPI1* プロモーターの下流にある *SacI* と *BamHI* サイトの間、あるいは *BamHI* サイトに挿入し pJHMAL21, pJHMAL31, pJHMAL61, pJHAGT1, pJHScAGT1, pJHSeAGT1, pJHMTT1 を得た。*SeAGT1* と *MTT1* はそれぞれスクリーニングした遺伝子をプライマー 19+20, 21+22 を用いて PCR を行い、pJHXSb に挿入した。各トランスポーターを挿入した pJHXSb プラスミドは制限酵素 *FseI* で CEN6 (CEN-ARS) を取り除くことにより、YIp 型プラスミド (pJHIMAL21, pJHIMAL31, pJHIMAL61, pJHIAGT1, pJHISeAGT1, pJHIMTT1) に変換した。作製した YIp 型プラスミドは *URA3* 内にある *EcoRV* で切断し、ゲノム上の *URA3* に組み込むのに用いた。

#### 2.2.4 ラガー酵母ゲノム遺伝子の破壊

pYC030, pYC040, pYC050 (26) を鋳型にして、ハイグロマイシン, ジェネチシン, Nourseothricin の薬剤耐性遺伝子を、*ScAGT1* あるいは *SeAGT1* の N 末、あるいは C 末の 90 bp の DNA 配列を含むのオリゴヌクレオチド (表 2-2) を用いて PCR を行い、その断片を直接

ラガー酵母に形質転換した。*ScAGT1* および *SeAGT1* とその断片が組み変わったものを薬剤耐性で選択した。*ScAGT1* および *SeAGT1* 遺伝子が破壊されたことは、サザンハイブリダイゼーションで確かめた。

### 2.2.5 麦汁の調製方法

表 4-3 の標準麦汁の配合で調製した。調製方法は 4.2.4 を参照のこと。

### 2.2.6 酵母への形質転換

酵母菌株を 10 ml の YPD 液体培地に植菌し、30°C で一晩振盪培養した。その培養液 1 ml を 50 ml の YPD 培地を入れた 300 ml 容坂口フラスコに接種し、30°C、120 rpm で振盪培養した。細胞濃度が少なくとも  $2 \times 10^7$  cells/ml 以上に増殖した菌体を遠心 (2000×g, 4°C, 5 min) により回収し、得られた菌体を 25 ml の滅菌水で洗浄した後、1 ml の滅菌水に再懸濁し、マイクロチューブに移した。遠心分離 (2000×g, 4°C, 1 min) により菌体を沈殿させ、上清を完全に取り除いた後、細胞は再び 1 ml の滅菌水に懸濁した。100 μl の細胞懸濁液を別のチューブに移し、遠心して上澄みを捨てた。その細胞にプラスミド、制限酵素で切断したプラスミド、あるいは PCR 断片の溶液 34 μl を加えた。このエッペンドルフチューブに 240 μl の 50% (w/v) polyethylene glycol 3,500 (Sigma), 36 μl の 1.0 M 酢酸リチウム溶液、50 μl の 2 mg/ml boiled salmon sperm-carrier DNA を加え、激しく攪拌して菌体を懸濁した。得られた懸濁液を 15 min から 60 min、42°C でインキュベートした後、遠心 (2000×g, 4°C, 1 min) して上清を捨て、100 μl の滅菌水に懸濁した。42°C のインキュベーションの時間は酵母によって最適時間が異なるため、それぞれの酵母での最適時間を調べてから形質転換を行った。選択培地に懸濁液を塗布した後 3~5 日間、30°C で静置培養し、目的とする形質転換体のコロニーを得た。

### 2.2.7 Water suspension assay

各種プレート培地上での酵母の生育を調べるのには、各酵母を YPD 培地で 30°C で前培養して細胞を集菌した。細胞は滅菌水で二回洗浄した後、OD<sub>660</sub>=1.0 となるように滅菌水に懸濁した。さらに細胞懸濁液の 10 倍あるいは 100 倍希釈液を調製し、細胞懸濁液を各培地に 2 μl ずつスポットした。30°C で 1~2 日インキュベートした後、生育を写真撮影した。

### 2.2.8 ゲノム DNA, プラスミド DNA の調製

ゲノム DNA を調製するには、Qiagen 社の DNeasy Plant Mini Kit を使用して調製した。集菌後、滅菌水で洗浄した酵母菌体約 60 mg を 1.5 ml のスクリーキャップ付きチューブに入れ、400 μl の Buffer AP1 とガラスビーズ 0.3 g を加えた。ビーズビーターで 5 min 処理し、菌体を完全に破砕した。20 μl の 20 mg/ml の RNase 溶液を加えよく混合した後、65°C で 10 min 反応させた。130 μl の Buffer AP2 を加えよく混合した後、氷中に 5 min

保持した。遠心 (8,000×g、5 min) し、上清を QIAshredder スピんカラムにのせ、遠心 (8,000×g、2 min) した。溶出された画分を新しいエッペンチューブに移し、その 0.5 倍量の Buffer AP3 と一倍量のエタノールを加え、ピペッティングにより混合した。これを DNeasy mini スピんカラムにのせ、遠心 (8,000×g、2 min) した。0.5 ml の Buffer AW でカラムを 2 回洗浄した。カラムを新しいエッペンチューブにつけ、50 µl のあらかじめ 65°C に保温しておいた Buffer AE で 2 回溶出した。適当に希釈して 260 nm の吸光度を測定し、DNA 試料とした。

### 2.2.9 RNA の調製

RNA を調製するには、Qiagen 社の RNeasy Mini Kit を使用して調製した。集菌後、滅菌水で洗浄した酵母菌体約 60 mg を 1.5 ml のスクリューキャップ付きチューブに入れ、350 の Buffer RLT と 3.5 µl のβ-メルカプトエタノールと滅菌ガラスビーズ 0.3 g を加えた。ビーズビーターで 5 min 処理し、菌体を完全に破砕した。8,000×g で 5 min 遠心し、上澄み 300 µl を別のチューブに移した。300 µl の 70% のエタノールを加え混合し、2 ml のマイクロチューブにセットした RNeasy Mini spin column に全量をのせた。8000×g で 15 sec 遠心後ろ液を捨て、700 µl の Buffer RW1 をのせて再び 8,000×g で 15 sec 遠心後ろ液を捨てた。500 µl の Buffer RPE を RNeasy spin column にのせ、8,000×g で 15 sec 遠心後ろ液を捨てた。もう一度 500 µl の Buffer RPE を RNeasy spin column にのせ、8,000×g で 2 min 遠心後、カラムを別のマイクロチューブにセットした。30~50 µl RNase-free water を直接 spin column membrane にのせ、8,000×g で 1 min 遠心して RNA を抽出した。適当に希釈して 260 nm の吸光度を測定し、RNA 試料とした。

### 2.2.10 DNA 電気泳動

0.8% (w/v) アガロース (ナカライテスク社製アガロース LE)、または 2% (w/v) アガロース (ナカライテスク社製アガロース for 50-800 bp) を使用し、1×TAE 緩衝液 (40 mM Tris-HCl, pH7.4, 20 mM 酢酸ナトリウム、1 mM EDTA) を用いた。試料は、10 µl の DNA 溶液に 2 µl の泳動用色素 (30% グリセロール、0.25% プロモフェノールブルー [BPB]、0.25% キシレンシアノール) を加えて調製した。定電圧 100 V で泳動後、10000 倍に希釈した GelRed™ (Biotium) 溶液で染色し、UV-トランスイルミネーターで DNA バンドを検出した。DNA バンドのパターンは赤色フィルターを使用し、FOTODYNE FOTO (Analyst) を用いて CCD カメラで撮影した。ゲルから DNA バンドを切り出す時は染色は 10000 倍希釈した GelGreen™ (Biotium) を用いて行い、500 nm 波長の LED トランスイルミネーターで DNA バンドを検出した。

### 2.2.11 RNA 電気泳動

2.5 g アガロース (ナカライテスク社製アガロース LE) を 182.5 ml の水に入れ、温度を

上げて溶かした。これを 65°C まで温度を下げて、25 ml の MOPS 緩衝液 (0.2 M MOPS、0.05 M 酢酸ナトリウム、0.01 M Na<sub>2</sub>EDTA, pH7.0)、45 ml の 37% のフォルムアミドを混ぜ、電気泳動用の枠に入れてゲルを固めた。RNA サンプル 13.5 µl に 4 µl のフォルムアミドと 2.5 µl の 10×MOPS を加え、60 °C で 15 min 保温した後、5 µl の BPB (0.03%) を添加した。MOPS ゲルが浸かるまでランニング緩衝液 (200 ml の 10×MOPS、324 ml の 37% のフォルムアミド、1476 ml の水を混合したもの) を泳動槽に入れ、前処理したサンプルをウェルにロードし、定電圧 100 V をかけて BPB がゲルの端 1~2 cm にまで来るまで泳動した。

### 2.2.12 パルスフィールド電気泳動による酵母染色体 DNA の分離 (CHEF)

15~20 OD unit (OD<sub>660</sub>×ml=15~20 にあたる細胞量を意味する。つまり OD<sub>660</sub>=3 の細胞懸濁液が 5 ml であれば、15 OD unit である [27]) の酵母細胞を 5 ml の 10 mM Tris-HCl, pH7.5, 0.05 mM EDTA で 2 回洗浄した。1.5 ml の同バッファーに懸濁し、5 µl の β-メルカプトエタノールと 2 µl の zymolyase 100T (キリン協和フーズ株式会社、20 mg/ml 10 mM リン酸ナトリウム, pH7.5) を混合し、37°C でインキュベートした。0.25 ml の 1% 低融点アガロース液 (37°C に保温したもの) を混合し、サンプル容器に移して氷上でゲル化した。

ゲルを滅菌小試験管に移し、1.0 ml の 10 mM Tris-HCl, pH7.5, 0.5 mM EDTA と 75 µl の β-メルカプトエタノールを加えて、37°C で一晩インキュベートした。外液を 1.0 ml の 10 mM Tris-HCl, pH9.5, 0.5 mM EDTA、1% Na-lauroylsarcosine, 20 mg/ml pronaseE (Sigma-Aldrich) と交換し、50°C で 45 h インキュベートしてタンパク質を分解した。細胞包埋ゲルが壊れないよう注意しながら、外液を 2 ml の 10 mM Tris-HCl, pH7.5, 0.05 mM EDTA に交換し、1 h 毎に液を交換して 50°C で 4 回洗浄した。1% のアガロースゲルを 0.5×TBE 緩衝液 (45 mM Tris-borate, pH8.3, 1.25 mM EDTA) で作製し、Bio-Rad 社の CHEF-DRII 電気泳動装置の泳動チャンバーにセットした。サンプルウェルに細胞包埋ゲルをスパチュラで気泡が入らないようにはめ込み、電圧 200 V、パルスタイム 80 sec、14°C で 24 h の泳動条件で電気泳動を行った。ゲルは 5 mg/ml の臭化エチジウム溶液で染色し、UV イルミネーター上で撮影した。また、2.2.13 に従って、その後サザンハイブリダイゼーションを行った。

### 2.2.13 サザンハイブリダイゼーション

サザンハイブリダイゼーションによる解析には、Roche 社の DIG ラベリング・検出システムを使用して行った。

電気泳動を行ったアガロースゲルを 0.25 M 塩酸に浸し、室温で 10 min ゆっくりと振とうして DNA を脱プリン化した後、脱イオン水で 2 回洗浄した。ゲルを変性溶液 (0.5 M 水酸化ナトリウム、1.5 M 塩化ナトリウム) に浸し、室温で 25 min ゆっくりと振とうして DNA のアルカリ変性を行い、脱イオン水で 2 回洗浄した。つづいてゲルを中和溶液 (1.5 M



塩化ナトリウム、0.5 M Tris-HCl, pH7.5) で中和した。10×SSC 溶液 (1×SSC : 0.15 M 塩化ナトリウム、0.015 M クエン酸ナトリウム) を入れたバットの上にガラス板を渡し、10×SSC 溶液で湿らせたろ紙をガラス板の上に置いて両端が 10×SSC 溶液に浸かるようにした。その上にゲルを置き、メンブランフィルター Hybond-N<sup>+</sup> (Amersham) を載せた。さらにフィルター上に、3 枚のろ紙とペーパータオルを重ね、重石を置いて一晩放置した。フィルターをゲルから剥がし、80°C で 2 h 処理して DNA をフィルター上に固定した。

メンブランフィルターを 50°C のハイブリダイゼーションバッファー (5×SSC、1.0 w/v 核酸ハイブリダイゼーション用ブロッキング試薬、0.1% Na-lauroylsarcosine、0.02% SDS、50% フォルマミド) 30 ml に浸し、60°C 一定で 30 min ゆっくり振とうさせながらプレハイブリダイゼーションを行った。DIG ラベリングシステム (Roche) の使用方法に従って、SP6/T7 RNA ポリメラーゼを用いて *in vitro* transcription を行い、*MAL61*, *AGT1*, *SeAGT1*, *PDA1* の RNA プロブを作製した。標識した RNA プロブを 100 ng/ml になるように、ハイブリダイゼーションバッファーに加え一晩 50°C でゆっくりと振とうさせてインキュベーションした。ハイブリダイゼーションバッファーを取り除いた後、メンブランフィルターを 500 ml の洗浄液 1 (2×SSC、0.1% SDS) で計 2 回洗浄 (室温、15 min) し、さらに 500 ml の洗浄液 2 (0.1×SSC、0.1% SSC) で計 3 回洗浄 (68°C、15 min) した。500 ml の緩衝液 A (0.1 M マレイン酸、150 mM 塩化ナトリウム、pH 7.5) で軽くすすいだ (室温)。

180 ml のブロッキング溶液 (核酸ハイブリダイゼーション用ブロッキング試薬を緩衝液 A で 10% (w/v) に溶解したもの) で室温 1 h 反応させた後、緩衝液 A でリンスし、30 ml の抗体溶液 (アルカリフォスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体を緩衝液 A で 10000 倍希釈したもの) と室温で 1 h 反応させた。500 ml の洗浄液 3 (0.3% Tween-20 を含んだ緩衝液 A) での洗浄 (室温、10 min) を 3 回行った。緩衝液 B (0.1 M Tris-HCl, pH 9.5、100 mM 塩化ナトリウム) で 2 min 平衡化した後、検出試薬 CDP-star を塗布しフィルム (Hyperfilm-MP) に露光して検出した。あるいは、蛍光強度を Chemi Doc XRS+ with Image Lab Software v.3.0 (BioRad) で定量した。

#### 2.2.14 ノザンハイブリダイゼーション

ノザンハイブリダイゼーションによる解析は、DIG ラベリング・検出システム (Roche) を使用して行った。

ホルマリンゲル電気泳動を行ったアガロースゲルは脱イオン水で数回リンスしてフォルムアミドを除いた。10×SSC 溶液 (1×SSC : 0.15M 塩化ナトリウム、0.015M クエン酸ナトリウム) を入れたバットの上にガラス板を渡し、10×SSC 溶液で湿らせたろ紙をガラス板の上に置いて両端が 10×SSC 溶液に浸かるようにした。その上にゲルを置き、メンブランフィルター (Hybond-N<sup>+</sup>) を載せた。さらにフィルター上に、3 枚のろ紙とペーパータオルを重ね、重石を置いて一晩放置した。フィルターをゲルから剥がし、80°C で 2 h 処理して RNA をフィルター上に固定した。メンブランフィルターを 50°C のハイブリダイゼーシ

ョンバッファー (5×SSC、2.0% (w/v) 核酸ハイブリダイゼーション用ブロッキング試薬、0.1% Na-lauroylsarcosine、0.02% SDS、50% フォルマミド) 30 ml に浸し、68°C で 1 h ゆっくり振とうさせながらプレハイブリダイゼーションを行った。Roche 社の DIG ラベリングシステムの使用方法に従って、SP6/T7 RNA ポリメラーゼを用いて *in vitro* transcription を行い、*MAL61*、*AGT1*、*SeAGT1*、*PDA1* の RNA プロブを作製した。標識した RNA プロブは 100°C で 10 min 加熱した後 100 ng/ml になるように、プレハイブリダイゼーションバッファーに加え一晩 68°C でゆっくりと振とうさせてインキュベーションした。ハイブリダイゼーションバッファーを取り除いた後、メンブランフィルターを 500 ml の洗浄液 1 (2×SSC、0.1% SDS) で計 2 回洗浄 (室温、5 min) し、さらに 500 ml の洗浄液 2 (0.1×SSC、0.1% SSC) で計 3 回洗浄 (68°C、15 min) した。検出は 2.2.13 章のサザンハイブリダイゼーションと同様に行いフィルム (Hyperfilm-MP) に露光して検出した。

#### 2.2.15 コロニーハイブリダイゼーション

コロニーハイブリダイゼーションによる解析は、DIG ラベリング・検出システム (Roche) を使用して行った。

LB 寒天培地に試験しようとする大腸菌を 1 プレートに 100~200 コロニー程度生育するようにまく。コロニーが 1~2 mm 程度になるまで 37°C でインキュベートした。その後プレートを 4°C に移し 1 h おいた。ナイロンメンブラン (Hybond-N+) をそっと寒天面におき、プレートとメンブランの相互の位置関係がわかるように、3 か所針で非対称に印を付けた。

メンブランを静かにはがし、濾紙上に 5~10 min おいて乾燥させた。プラスチックラップをシワのないように伸ばして机に固定し、変性溶液 (0.5 M 水酸化ナトリウム、1.5 M 塩化ナトリウム) を 2 ml ずつメンブラン大きさ以上の間隔でおきスポットし、メンブランを一枚ずつコロニー面を上にして置き、15 min 放置する。次に同様に中和液 5 min 放置し、最後に洗浄液 1 (2×SSC、0.1% SDS) に 15 min 放置した。メンブランを 120°C で 30 min ベーキングして DNA を固定した。メンブランを洗浄液 4 (3×SSC、0.1% SDS) につけ、68°C で 2 h インキュベートすることにより、大腸菌の細胞破片を取り除いた。次に 20 µg/ml proteinaseK 溶液につけて 1 h、37°C でインキュベートした後、40 µl/ml の APMSF 溶液で 5 min インキュベートして、proteinaseK を不活性化した。処理の終わったメンブランは 2.2.13 章のサザンハイブリダイゼーションと同様に、*AGT1* のプロブを用いてハイブリダイゼーションを行った。

#### 2.2.16 DNA シークエンス

DNA シークエンスは Thermo Fisher Scientific 社の BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit を用いた PCR 産物を、ABI シークエンサー 3700 にアプライし解析した。

### 2.2.17 ラガー酵母ゲノムライブラリーの構築

ゲノム DNA は *Sau3AI* で部分分解し、0.8%のアガロースゲルで分離した。分子量マーカーを流したレーンのみを切り分け、エチジウムブロマイドで染色し、10~12 kbp に相当する泳動位置を決定した。残りのゲルから 10~12 kbp に相当する部分を切り出し、アガロースゲルより抽出した。調製した DNA 断片はセントロメア型プラスミド YCp49H の *BamHI* サイトに挿入し、*E. coli* DH5  $\alpha$  に形質転換してゲノムライブラリーを構築し、総計 45,000 のクローンを得た。クローンの挿入断片含有率は 100%で、平均挿入断片長は 12 kbp だった。大腸菌 *E. coli* DH5  $\alpha$  から調製したプラスミドは  $\alpha$ -グルコシドトランスポーターを持たない酵母、HH150 株に 形質転換し マルトトリオース 0.5%を単独炭素源とする、ハイグロマイシン 20  $\mu\text{g/ml}$  を含む最少培地で生育し赤い色を呈することを指標に  $\alpha$ -グルコシドトランスポーター遺伝子をスクリーニングした。

### 2.2.18 マイクロアレイアナライシス

調製した RNA は、GeneChip™ 3' IVT PLUS Reagent Kit (Applied Biosystem) を用いて、プロトコールに従い、ビオチンラベル化した相補鎖 DNA を作製した。Gene Chip Fluidics Station 450 と Gene Chip Hybridization Oven 640 (Affimetrix) を用いて、作製したフラグメントをカスタムアレイである LBYG アレイにハイブリダイゼーションした後、GeneChip Scanner (Affimetrix) でインテンシティを計測した。

## 2.3 結果

### 2.3.1 ラガー酵母の *S. eubayanus* 型の *AGT1* 遺伝子 (*SeAGT1*) のクローニング

*S. pastrianus* Sun49, *S. cerevisiae* X2180-1A, *S. bayanus* IFO1127 の 3 種類の酵母のゲノム DNA を *Hinc* II, *Sca* I, *Xba* I, *EcoR* I, *EcoR* I-*Pst* I で切断してアガロースゲル電気泳動を行い、*S. cerevisiae* の *AGT1* 遺伝子の全配列をプローブとして緩い洗浄条件 (2 $\times$ SSC, 0.1% SDS, 60°C) でサザンハイブリダイゼーションを行った。その結果を図 2-2A に示す。

3つの株間でのハイブリダイズした断片を比較すると Sun49 と *S. bayanus* IFO1127 には *S. cerevisiae* X2180-1A にはない *Hinc*II 切断での 7 kbp, *Sca*I 切断での 8 kbp, *Eco*RI 切断での 1.5 kbp, 1.2 kbp など共通するいくつかの断片が存在した。次に *S. bayanus* IFO1127 のゲノムを *Pst* I, *Bam* HI, *Xba* I, *Xho* I, *Bgl* II, *Hind* III, *Spe* I, *Sac* I, *Sph* I, *Kpn* I, *Sal* I, *Eco*RV, *Hinc* II で切断してアガロースゲル電気泳動を行い、厳しい条件(0.1 $\times$ SSC, 0.1% SDS, 60°C)でサザンハイブリダイゼーションを行った (図 2-2B)。4.2 kbp の *Eco* RV で消化した断片はおそらく Sun49 の *S. eubayanus* 型の全長の *AGT1* 遺伝子 (*SeAGT1*) を含んでいると考え、Sun49 と *S. bayanus* IFO1127 ゲノム DNA の *Eco* RV 分解物のアガロース電気泳動から、4.2 kbp 付近の断片を切り出して DNA を抽出し、*Eco* RV で切断した pUC19 とライゲーションし、*E. coli* JM109 へ形質転換した。

このライブラリーから全長の *AGT1* 遺伝子をプローブとして、厳しい洗浄条件 (0.1×SSC, 0.1% SDS, 68°C) にてコロニーハイブリダイゼーションを行った。いくつかのポジティブクローンよりプラスミドを調製して DNA シークエンスを行ったところ、Sun49 のクローン EV1-1-1 より *AGT1* 遺伝子と 78% のアイデンティティを持つ 1833 bp からなる ORF が見つかった。また *S. bayanus* IFO1127 からのポジティブクローン EV1-2-3 にも 1833 bp からなる ORF が見つかり、EV1-2-3 と EV1-1-1 は ORF 上流配列も含め、完全に同じ配列であることがわかった。

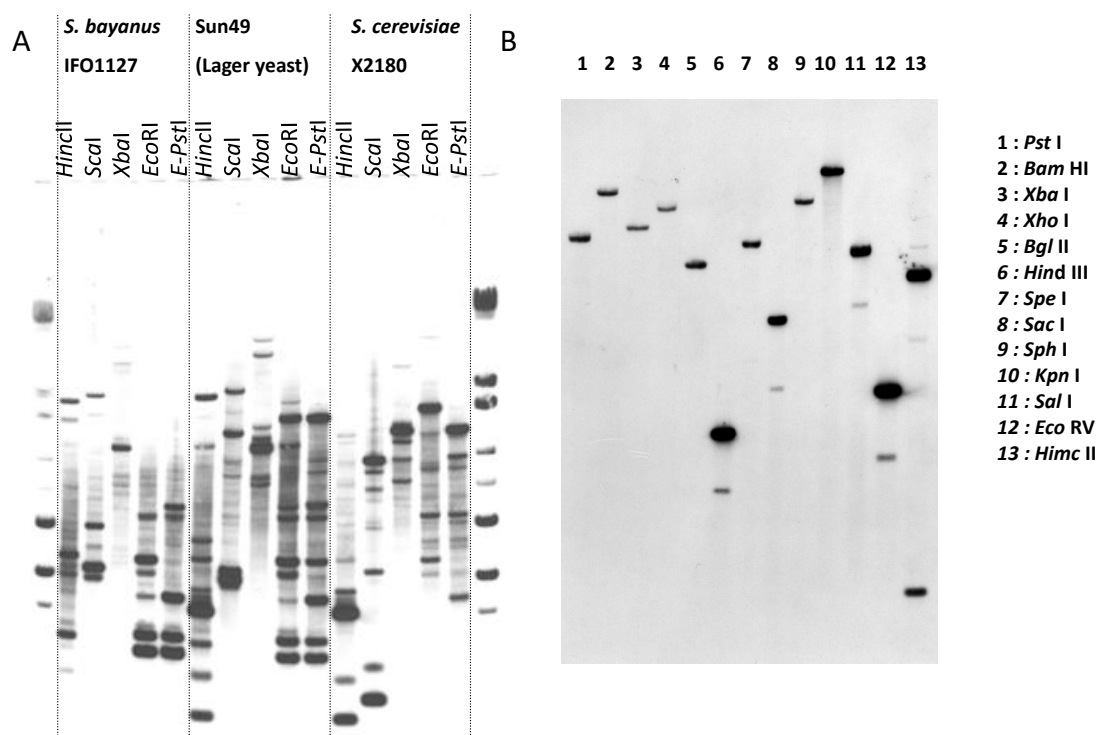


図 2-2 A *S. cerevisiae* の *AGT1* をプローブとした 3 つの株のゲノミックサザンハイブリダイゼーション

図 2-2 B *S. cerevisiae* の *AGT1* をプローブとした *S. bayanus* IFO1127 のゲノミックサザンハイブリダイゼーション

### 2.3.2 ラガー酵母の *SeAGT1* の構造

EV1-1-1 から得られた *S. eubayanus* 型の *AGT1* (*SeAGT1*) の DNA 配列を図 2-3 に示した。ORF は *S. cerevisiae* S288C の *AGT1* と 78% のアイデンティティがあったが、プロモーター部分には特にホモロジーがなかった。図 1-3 に示したように *S. cerevisiae* でマルトースの資化に関する遺伝子が並ぶ領域、*MAL* locus はマルトース転写活性化因子をコードする *MALX3* とマルトーストランスポーターをコードする *MALX1* およびマルター

ゼをコードする *MALX2* が並んで存在している。*MALX1* と *MALX2* は反対方向にコードされており、プロモーターをシェアしている。いずれもグルコース存在下で転写が抑制され、マルトース存在下では転写活性化因子 MalX3p が *MAL* upstream activating sequence に結合することで転写が誘導されることが知られている。S288C の *AGT1* と *MAL31* のプロモーターにはホモロジーがあり、*AGT1* も *MAL31* もグルコースなどの単糖が培地になく、マルトースが存在した時に遺伝子発現が誘導されることがわかっている (15,16)。

```

1 TAATATCAAATTCGGGAGAAAAAAGAGGGTTAAAAATCATGAAAAAGAAACATTTTGTATGTAAGGTAATGCACCTTGCATAGTGGCAGCCTTTTCGC 100
101 TTCGTGGTATTTTATCGGGATAAGTCCATATGTCGGCACAAATTTATCCAACACACTCTCACCGATACAATTTGGCAACACTGCTCAACATAGCCATGAT 200
201 GTATTTGTTCGCCAGAAGTTGGGAAAGCATGAGTTGGCCGATTTGTCTGCTGCGCTGGTGGAGTAAATGGCCATTTATGAAAACATGCCATTCTAATCGTG 300
301 CCAGGGTACGTTTGGATCTGAGTGGAGATATCTAGTAAGCCTTAAATTTTAAACACAGTACTATCTATGCCACTTCAGAACCCATAAATAGACTCCAGG 400
401 CACCCTCCATTTACTACTTGAAAAAATACTCCAAGTTTTTTGAGAAAAAATTTGGGCTGCTTTTTTCATCATGTCTCGAAAAAGAACACAGAAAAACTA 500
501 TCAGCAGCTATCTGGACAGTTAGAGTAACTTTTTTCGTTAAAGTCCATAGGCACCTCTCTGAAAGAAATCGGCCGACCTTTGGATTTCGAAGACCCGTTCTT 600
601 CTTGAACCACTTAATATTTGTCGGCACAAATTTAAACAATCAATTAACAATGACGCTGGTCAATCTCAGCACATGGCCGCTCATACGCCCTTTGTAAAGGTT 700
701 TTATAGAATGTGATCTCCATGCACCTTCAACTCCCCAAGTCCCTGGATATAGTCAAGCTTGGATGGCAACAACACTTTAAGTACTACTGGTGACCTTA 800
801 TGAATTTGGCGGGATTGAACCTGTCGGACAGTGACCTCTTTCACAACACGCTCAAGTGTCTTAGGCCAAGCTTTCTGGGCCGACTGGAGTCCGCTCTCA 900
901 AGTGCATATGGTGAACCTCAGTGAGCAATTTATCAGAGGATAAACTACACTCGAACAGGTTGGATTAAGATTTTCAATTTTATCAAGGCTCAGGGAAC 100
1001 TGGAAATCGAAATGCACCTAAAATGACGCATCACTCTTTTTTTTTTATATTTTCCCGAAAGATGCTCCGAGATACTCCCTGGCGGAAGACAGAAAAAC 1100
1101 CTTATTTCCCGTATTTTTCTTTTTTTAGCATAATGACGCGCGGTGGTACGCGCGACTCCTCAGAACATCGCGTAGTAATATTTGTATTACAGGTACCAC 1200
1201 AATTTTTTTTGTGCTTACTGGTACAGACAAAAAGAAAATGATAAATCACTATGATCAGTGGTGGTCTTACCAAGAACAGCCCTTTTCGCCGAAAAATTG 1300
1301 TTCCAGACGCTGCACCTTTGGTCCACCCCGTGGATTGTTACGCATTTTCTTGGTGTCTTCTTGGCCCGCTTTCCCAACAAACGATCGCAAAACGATTCG 1400
1401 AAACGCCGACGTTCTGGCTCTTCGATTTTTTCAATGCCCCCTTACTGTGTTTCAAGCTCTATGGTCTTCTTCTTACTAGAGATTGAATTCGATTTTACC 1500
1501 ATGATTTTCTTTGTGAGGAGGCGCTTCAAGGGGCGAGACTACAACGCTCATATCTAATCATGTCCGACAGATTAGAGGACATCTTTTGTAGTCAACACTGA 1600
1601 GACATTTGAGGACATATCGACCTCAATTCAAAAGGCGAACAAAGTTCCAGTCTCTCATCGGAACGTTTCTATGTATAAAGCAATTTGGAATCAACCC 1700
1701 TTATTGAGTAACCTACATCTTTTTACCGTTTCGCTCTCTGCAAGAGTGTATAGATAATCAGAAAGAGTTACGAAATATCAGAAATAGAAAAATATACTT 1800
M K N I L
1801 TCGTGGTAGGAAGAAGAAAAATACCCAGAAAGATGTGACGGCAATCTTGGGACACCTCAAGCACTACAGTTATGCAAGAAAGGACTTGGTTATTG 1900
S L V G R K E N T P E D V T A N L A D T S S T T V M Q A K D L V I E
1901 AGGACTTTGAAGAACGAAAGAAAAACGATGCATTTGAGTTGAATCACTTGGAGTCACTACTACTAATGCAACACAGTTAAGCGATTCTGATGAAGACAAGA 2000
D F E E R K K N D A L E N H L E L T T N A T Q L S D S D E D K
2001 AAATGTAATCAGAGTGGCAGAAGCTACTGATGATGCGAACGAAGCTAAATACGAAAGAGAAGAGCATGACTTTAAGACAAGCTTTGCGAAAAATATCCAAG 2100
N V I R V A E A T D D A N E A N N E E K S M T L R Q A L R K Y P K
2101 CGACGCTATGGCTATTTTGGTATCTACTACGCTTGTATGGAAGGTTATGATACGCACTTTTAAGTGCACCTTTATGCATTTGCCAGTTTTTCAGAGGA 2200
A A L W S I E L V S T T L V M E D T A L L S A L Y A L P V F Q R K
2201 AGTTTGGGACTATGAATCGGGAAGGCTCCTACGAATCACTTCGACAGTGGCAAAATGGCTTGAACATGTGTGTTCTTTTGGTGAATGATTGGTCTACA 2300
F G T M N A E G S Y E I T S Q W Q I G L N M C V L C G E M I G L Q
2301 GATAACCACTTACATGGTTCAGTTCATGGGTAATCGTTATACAAATGATACGGCGCTTCTCTTTTACTGCTTATATCTTTTACTCTTACTTATGCAAG 2400
I T T Y M V E F M G N R Y T M I T A L S L L T A Y I F I L Y Y C K
2401 AGTTTGGCCATGATGCTGTAGGACAATTTCTTGGCTATGCCATGGGGTGTCTCCAGAGTCTGGCTGTACCTATGCTTCTGAAGTTTGGCCCTGG 2500
S L A M I A V G Q I L S A M P W G C F Q S S A S N A A G L L A L S
2501 CATTGAGATATTACATGACCACTTCAACATTTGTTGGTGTGTTGGTCAAAATTTTGGTCTGGAATCATGAAAAATCCCAAGGAAATTTGGGAAA 2600
L R Y Y M T S Y S N I C W L F G Q I F A S G I M K N S Q E N L G N
2601 CTCCGACTTAGTTAACAAGTTACCATTCGCCTTACAATGGATCTGGCTGCACCCCTTAATTTATGGTATCTTTTTTCGCTCCTGAGTCGCCTTGGTGGTTG 2700
S D L G Y K L P F A L Q W I W P A P L I I G I F F A P E S P W W L
2701 GTAAGAAAGAATAAGACTCGTGAAGCCAAAAAGTCTTTGAACAGAATTCGAGTGGCAGCTTACCAGAGAAGGAGATACAAGTGGATATTACTTTGAAGC 2800
V R K N K I V E A K K S L N R I L S G T V T E K E I Q V D I T L K Q
2801 AAATGAAATGACCAATTGGAAGGAAGACTTCGGGCATCCAATCGGGTCAATTTTCAGCTGTTTCAAGGAGTTGATGGAAGAAGAACAGGCTTGC 2900
I E M T S I E K E R L R A S K S G S F F S C F K G V D G R R T R L A
2901 GTGTTTGCATTTGGTGTGCTCAGAACAGTGTGGTGCAGTATTACTTGGTTATTCGACGACTTCTTTGAAAGAGCAGGCATGGCCACTGACAAGGCCCTTC 3000
C L T W V A Q N S S G A V L L G Y S T Y F F E R A G M A T D K A F
3001 ACTTTCCTCGTAATCAATACTGTCTTGGTTTGGCAGGCACGCTTGGTTCCCTGGGTAATATCTGGCCGTGTTGGTAGATGGACTATACTGACATATGCTC 3100
T F S L I Q Y C L G L A G T L G S W V I S G R V G R W T I L T Y G L
3101 TTTCAATCCAAATGGTTTGTCTATTTATCATTTGGCGGAATGGGTTTGCATCGGAAGCAGTGTAGTAACGCTGCTGGTGGCCACTGCTTGTCTTATC 3200
S F Q M V C L F I I G M G F A S G S S A S N A A G L L A L S
3201 TTTCTTATAACGCGGGTATCGGAGCTGCTGTTTACTGTATTTGTCGAGAAATCCCATCCGAGAAATTAAGGACCAAGACCATTTGCTGGCCGCTATT 3300
F F Y N A G I G A V V Y C I V A E I P S A E L R T K T I V L A R I
3301 TGCTACAATCTAATGGCCGCTTCAATGCTATTCTAACGCCCTATATGCTTAAAGTGGAGCAGTGGAACTGGGGTCCAAAACTGGTCTATATTGGGGG 3400
C Y N L M A V F P N A I L T P Y M L N V S D W N W G A K T G L L A L S
3401 GCTTTCACGCACTCACTCTGGCTTGGGTCATTATTGATTTGCCCGAGACACTGGCAGAACCTTTAGCGAAATCAATGAATTTTCAAGTCAAGGTGCC 3500
F T A L T L A W V I I D L P E T T G R T F S E I N E L F S Q G V P
3501 TGCTAGAAAAATTTGATCTACAGTAGTTGATCCCTTTGGAAAGAGAGGGCTACAATAATCGTCCGCAAGTTGATAACATTTATGACCGGTTCTCAAGCGC 3600
A R K F A S T V V D P F G K R G L Q N R P Q V D N I I D R F S S A
3601 AGTCAAGAGCGCTTATGAACTAACGCGTATTAAAGAGAACCATTCGAAACAATGTTTTAATAATATATGCTTTAAAGCGTTTTTTCACCTTTTTTTGA 3700
S Q Q A L *
3701 ATATTTGATCCGTTTTTTTTTTTTTCAAAATGATTCGTACGTATTATGACTTATAAAAAATCCATTAACAGTTATTTCTTGTATCGACATAGTGTATTAGCAA 3800
3801 GAACATAAACCCGTGACATATTTAAGT 3828

```

図 2-3 *SeAGT1* の DNA 配列

Teixeira *et.al.*は MGC(9N)MGS が *MAL* upstream activating sequence であり、*AGT1* の-375~-488 の配列に *MAL* upstream activating sequence があると報告している (28,29)。Pougach *et.al.*は、MalX3p の結合部位は CGC(9N)CGN なのに対し、イソマルターゼをコードする *IMA3*, *IMA5* には転写因子 Yfl052Wp が結合し、その結合部位は CGG(9N)CGG であることを報告している。Yfl052Wp による誘導はマルトースではなくパラチノースで起こる (12)。*SeAGT1* のプロモーターには 1 つの MalX3p の結合部位と 2 つ

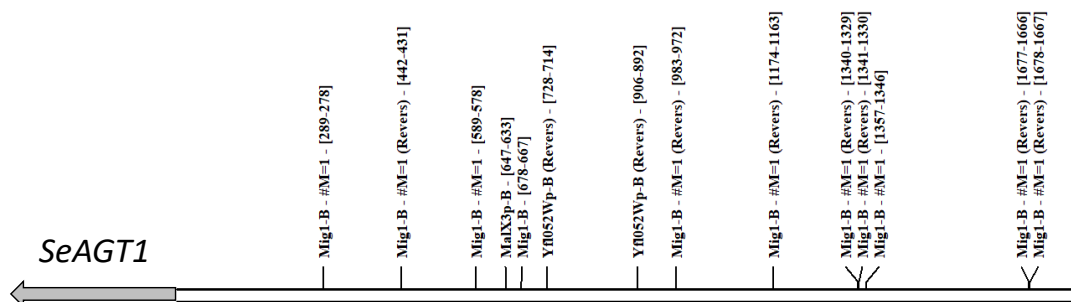


図 2-4 *SeAGT1* promoter の制御因子結合部位

Mig1p-B: Mig1p 結合部位(CCCCRNNWWWWW)、

MalX3p-B:MalX3p 結合部位(CGC(9N)CGN)

Yfl052Wp-B:MalX3p 結合部位(CGG(9N)CGG)

Reverse : 相補鎖側の配列を示す。

#M=X: コンセンサス配列とのミスマッチの数を示す。

数字は開始コドンから上流への塩基数を示す。

		1		70
Agt1p	(1)	MKNIIISLVSKKKAASKNEDKNISESSRDIVNQEVFNTEDFEEGKKDSAFELDHLEFTTNSAQLGDSDED		
SeAgt1p	(1)	MKNILSLVGRKENTPEDVTANLADTSSTTVMQAKDLVIEDFEEKKNDAFELNHLELITNATQLSDSDED		
		71		140
Agt1p	(71)	NENVINEMNATDDANEANSEEKSMILKQALLKYPKAALWSILVSTTLVMEGYDTALLSALYALPVFQRKF		
SeAgt1p	(71)	KENVIRVAEATDDANEANNEEKSMILKQALRKYPKAALWSILVSTTLVMEGYDTALLSALYALPVFQRKF		
		141		210
Agt1p	(141)	GTLNGEGSYEITSQWQIGLNMVCLGEMIGLQITTYMVEFMGNRYMTITALGLLTAYIFILYCKSLAMI		
SeAgt1p	(141)	GTMNAEGSYEITSQWQIGLNMVCLGEMIGLQITTYMVEFMGNRYMTITALSLLTAYIFILYCKSLAMI		
		211		280
Agt1p	(211)	AVGQILSAIPWGCFOQLAVTYASEVCPALRLRYMTSYSNICWLFQGFIFASGIMKNSQENLGNSDLGYKLP		
SeAgt1p	(211)	AVGQILSAMPWGCFOQLAVTYASEVCPALRLRYMTSYSNICWLFQGFIFASGIMKNSQENLGNSDLGYKLP		
		281		350
Agt1p	(281)	FALQWIWPAPLMIGIFFAPESPWVLRKDRVAEARKSLSRILSGKGAEKDIQVDLTLKQIELTIEKERLL		
SeAgt1p	(281)	FALQWIWPAPLIIGIFFAPESPWVLRKNKIVEAKKSLNRILSGTIVTEKEIQVDITLKQIEMTIEKERLR		
		351		420
Agt1p	(351)	ASKSGSFFNCFKGVNGRRTRLACLWVAQNSSGAVLLGYSTYFFERAGMATDKAFTFSLIQYCLGLAGTL		
SeAgt1p	(351)	ASKSGSFFSCFKGVDRRRTRLACLWVAQNSSGAVLLGYSTYFFERAGMATDKAFTFSLIQYCLGLAGTL		
		421		490
Agt1p	(421)	CSWVISGRVGRWTILTYGLAFQMVCLFIIGMGFGSGSSASNGAGLLLALSFFYNAGIGAVVYICVAEI		
SeAgt1p	(421)	GSWVISGRVGRWTILTYGLSFQMVCLFIIGMGFASGSSASNAAGLLLALSFFYNAGIGAVVYICVAEI		
		491		560
Agt1p	(491)	PSAELRTKTIIVLARICYNLMAVINAILTPYMLNVSDWNWGAKTGLYWGGFTAVTLAWVIIDLPETTGRTF		
SeAgt1p	(491)	PSAELRTKTIIVLARICYNLMAVFNAILTPYMLNVSDWNWGAKTGLYWGGFTALTLAWVIIDLPETTGRTF		
		561		617
Agt1p	(561)	SEINELFNQGVPPARKFASTVVDPFKGKGTQHDSLADESISQSSSIKQRELNAADKC-		
SeAgt1p	(561)	SEINELFSQGVPPARKFASTVVDPFKGRGLQNRPQVDNIIDRFSSASQAL-----		

図 2-5 SeAgt1p と Agt1p のアミノ酸配列アライメント

黒 : 同一のアミノ酸、緑 : 類似なアミノ酸、赤 : 異なるアミノ酸

の Yf1052Wp 結合部位があった (図 2-4)。またグルコース存在下で、抑制因子 Mig1p が結合する配列としては、Vidgren *et.al.*は *AGT1* の Mig1p 結合部位として GGAAATACGGGG を報告している (30)。また Wang *et.al.*は、*MAL61* の Mig1p 結合部位は CTAAACCCCGT や TTAATTGTGTGGGG であると報告している (31)。SCPD (The Promoter Database of *S. cerevisiae*) (32,33) によれば、Mig1p 結合部位のコンセンサス配列は CCCRNNWWWW である。*SeAGT1* の上流 1785 bp には 1 塩基のミスマッチがあるものの、10 か所の Mig1p 結合配列が存在した。MalX3p の結合部位は 1 か所、Yf1052Wp の結合部位は 2 か所存在した。図 2-5 に *SeAGT1* と *AGT1* のアミノ酸配列のアラインメント

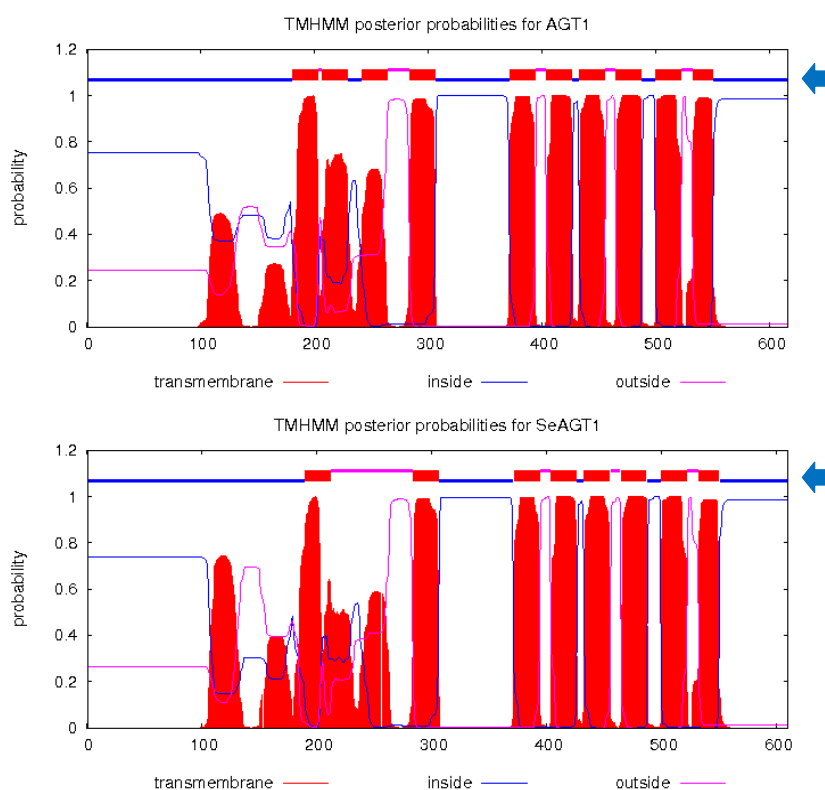


図 2-6 Agt1p と SeAgt1p の膜貫通ドメイン予測

TMHMM Server v. 2.0 ([www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/](http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/)) によって予測した。

←: 膜貫通領域と、間の配列の細胞内外の位置予測

を示した。アイデンティティーは 86%であった。Agt1p は Major Facilitated Sugar Transporter family (MFS family) に属しており、12 の膜貫通領域を持つと推測されている (9)。TMHMM Server v. 2.0 によって、SeAgt1p と Agt1p の膜貫通ドメインを予測したところ (図 2-6)、両者はよく似ており、SeAgt1p も同じく 12 の疎水性領域を持つものと予想されたが、このうちの全てが膜貫通ドメインとは予想されなかった。

### 2.3.3 ラガー酵母の *ScAGT1* の取得とその構造

*S. cerevisiae* S288C の *AGT1* の配列を基にしたプライマー 5+6 を用いて Sun49 のゲノム DNA を鋳型として PCR を行い、Sun49 の *S. cerevisiae* 型の *AGT1* (*ScAGT1*) ORF をクローニングした。複数のクローンをシーケンスして DNA 配列を確定した。その結果を図 2-7 に示す。Sun49 の *ScAGT1* は 1182 bp の位置に 1 つの T の挿入があり、その結果 395 番目のアミノ酸コドンは TAA 終始コドンとなっていた。その他のラガー酵母 Weihenstephan34/70, Sun49, Sun25 についても同様に *ScAGT1* の DNA 配列を調べたがいずれも同じ位置に T の挿入があり、調べた限りのすべての *S. pastrianus* 株の *ScAGT1* の ORF は S288C の *AGT1* より短くなっていた。Weihenstephan 34/70 のドラフトゲノムシーケンスでは、*ScAGT1* の上流領域は開始コドンより上流約 600 bp までしか配列が決定されていなかった。そこでドラフトゲノムシーケンスで得られたいくつかのコンティグ情報 (5) から、さらに上流にあると推測されるプライマー13 を作製し、開始コドンのすぐ上流の配列をプライマー14 とで PCR を行い、約 3 kbp の断片を TATOPOPCR2.1 にクローニングした。複数のコロニーからシーケンスを行い、*ScAGT1* プロモーター配列 2990 bp を確定した。図 2-8 に S288C の *AGT1* のプロモーターと Weihenstephan 34/70 の *ScAGT1* プロモーターのアライメントを示す。Weihenstephan 34/70 の *AGT1* プロモータ

```

1 ATGAAAAATATCATTTCATTTGGTAAGCAAGAAGAAGGCTGCCTCAAAAAATGAGGATAAAAAACATTTCTG 70
71 AGTCTTCAAGAGATATTGTAAACCAACAGGAGGTTTTCAATACTGAAAAATTTGAAGAAGGGAAAAAGGA 140
141 TAGTGCCTTTGAGCTAGACCACCTTAGAGTTCACCACCAATTCAGCCCAGTTAGGAGATTCTGACGAAGAT 210
211 AACGAGAATATGATTAATGAGATGAACGCTACTGATGAAGCAAAATGAAGCTAACAGCGAGGAAAAAGCA 280
281 TGACTTTAAAGCAGGCGTTGCTAAAATATCCAAAAGCAGCCCTGTGGTCCATATTAGTGTCTACTACCCT 350
351 GGTATGGAAAGTTATGATAACCGCACTACTGAACGCACTGTATGCCCTGCCAGTGTTCAGAGAAAATTC 420
421 GGTACTTTGAACGGGGAGGTTCTTACGAAATTACTTCCCAATGGCAGATTGGTTTAAACATGTGTGTCC 490
491 AATGTGGTGAGATGATTTGGTTTGCAAATCAGCACTTATATGGTTGAATTTATGGGGAATCGTTATACGAT 560
561 GATTACAGCACTTGGTTTGTAACTGCTTATATCTTTATCCTCTACTACTGTAAAAGTTTAGCTATGATT 630
631 GCTGTGGGACAAGTCTCTCAGCTATGCCATGGGGTGTGTTCCAGGGTTTGACTGTACTTATGCTTCGG 700
701 AAGTTTGCCTTTAGCATTAAAGATATTACATGACCAGTTACTCCAACATTTGTTGGTTATTTGGTCAAAT 770
771 CTTCGCCTCTGGTATTATGAAAACTCACAAAGAGAAATTTAGGGAACTCTGACTTGGACTATAAATTGCCA 840
841 TTTGCTTTACAATGGATTGGCCCTGCTCCTTTAATGATCGGTATCTTTTTCGCTCCTGAGTCGCCCTGGT 910
911 GGTGGTGAGAAAGGATAGGGTCGCTGAGGCAAGAAAATCTTTAAGCAGAATTTTGAGTGGTAAAGGCGC 980
981 CAGAGAAGGACATTCAGTTGATCTTACTTTAAAGCAGATTGAATTGACTATTGAAAAAGAAAGACTTTTA 1050
1051 GCATCTAAATCAGGATCATTCCTTTGATTGTTTCAAGGGAGTTAATGGAAGAAGAACGAGACTTGCATGTT 1120
1121 TAGCTTGGGTAGCTCAAAATACTAGCGGTGCCTGTTTACTTGGTTACTCGACATATTTTTTTTG2AAGAG 1190
1191 CAGGTATGGCCACCAGACAAGGCGTTTACTTTTTCTGTAATTCAGTACTGTCTTGGGTTAGCGGGTACACT 1260
1261 TTGCTCCTGGGTAATATCTGGCCGTGTTGGTAGATGGACAATACTGACCTATGGTCTTGCATTTCAAATG 1330
1331 GTCTGCTTATTTGTTATTGGTGGAAATGGGTTTTGGTTCTGGAAGCGGCGCTAGTAATGGTGCCGGTGGTT 1400
1401 TATTGCTGGCTTTATCATTCCTTTTACAATGCTGGTATCGGTGCAGTTGTTTACTGTATCGTAGCTGAAAT 1470
1471 TCCATCAGCGGAGTTGAGAACTAAGACTATAGTGCTGGCCCGTATTTGCTACAATCTCATGGCCGTTATC 1540
1541 AACGCTATATTAACGCCCTATATGCTAAACGTGAGCGATTGGAACTGGGGTGCCAAAACGGTCTATACT 1610
1611 GGGTGGTTTCACAGCAGTCACCTTAGCTTGGGTCATCATCGATCTGCCCTGAGACAACCTGGTAGAACCTT 1680
1681 CAGTGAAATTAATGAACCTTTTCAACCAAGGGGTTCTGCCAGAAAATTTGCATCTACTGTGGTTGATCCA 1750
1751 TTCGGAAAGGGAAAAACTCAACATGATTCGCTAGCTGATGAGAGTATCAGTCAGTCCCTCAAGCATAAAAC 1820
1821 AGCGAGAATTAATGCAGCTGATAAATGTTAA 1852

```

図 2-7 ラガー酵母の *S. cerevisiae* 型 *AGT1* (*ScAGT1*) の DNA 配列

開始コドン ATG、1182 bp に挿入された T、終止コドン TAA は太字で示した。  
T の挿入により生成した終止コドンは Box で記した。



一のうち-1~-317 bp の配列は 2 塩基を除いて S288C の *AGT1* 5'上流と一致した。しかし、-317 bp より上流の配列には特にホモロジーがなかった。S288C の *AGT1* の上流には、マルターゼ遺伝子である *MAL12* 遺伝子が逆向きに存在するが、Weihenstephan 34/70 の *AGT1* プロモーターには-3000 bp まで ORF は見つけれなかった。MalX3p や Mig1p の結合配列を検索したところ、図 2-9 に示した通り、MalX3p の結合配列が 8 つ (うち、4 つが逆向き)、Mig1p の結合配列が 7 つ見つかった。Yfl052Wp の結合部位は存在しなかった。

Vidgren *et.al.*の報告したラガー酵母、A15 あるいは A24 の *AGT1* promoter (30) と Weihenstephan 34/70 とを比較すると、Weihenstephan 34/70 の *AGT1* promoter には 565 bp 上流に 22 bp の塩基挿入があった。ただし、その位置には制御因子の結合部位はなかった。

		1			80
AGT1p	(1)	TCATACCCCATATCTTGTGAGGAGAGT	CATAAAACGGACAAACCCAAATAGCATCAACGCCAA	---GATCTTTAAT-AT	
ScAGT1p	(1)	TATTTCCCCGTAT-ITCCCCATGTTTCCCCCACTTCTCTGCTACGAATATA-CTGCAATGCAAGAAATGATCGTGGCGCAG			
		81			160
AGT1p	(77)	ACTGCCAAGTGGAAAGTATACCTTTTAAATCACCCAGCCATCGTTATIGGAGTCTTTAAACTTGCTGGGTA-AAATTTG			
ScAGT1p	(79)	GATGCCAATGGGAATTTAATGTGTGCTGAGCCAGGTACATATCTGAATACCTGCCAGACGTCGCGCGAAGAAGCG			
		161			240
AGT1p	(156)	ATAGATTGTGGCCTCTTCCACCCTTTGGTTCTGTTTCTGGATGATCAGAAATAGTCATTTATGTAATTTAGTTACGCT			
ScAGT1p	(159)	GTAGATCCTTGTCTGCTGCTTCTCTGCTGACCAAGTGGCCTTTTACCAGAAATAAT--TCCAGTGTGCGCGCATCT			
		241			320
AGT1p	(236)	TGACTGATGTACATTTGAGATTATCAAAAAAAGCTGCTTAAGAGA-TGGATGATTTAATTTTTAGAGACGTATTAAATGGA			
ScAGT1p	(237)	CTACAAAG----ACTTTATTTTCATAAGGAGCTCTGCTGCATAAAGTTAATGAAATTAAGCAAGTCAAGA-GAAG--ATGGA			
		321			400
AGT1p	(315)	ACTTTTTATACCTTGGCCAGAGCGCTCAAGAA-AATGATGCTGCAAGAAATGAGGAAGAACTATTCACTTACGT			
ScAGT1p	(310)	ACATCAGAACCATAGTACTTCTCCTCGAAAGAGCACTAATTGTGCTAAAAAATAATGAAAG-----TCTT--GG			
		401			480
AGT1p	(394)	TGTTTGTATCATCCCAAGTCCAAATCATGTTACCTACGTTAGGTACGCTAGGAAGTAAAAAAGAAAAGAAAAGTATGC			
ScAGT1p	(378)	ACGTTGTGGCATAAAGAAGATCAAGT----TTACCTA--TTATGA--GATAATTATGGTCAATATTAGGATAAATATGG			
		481			560
AGT1p	(474)	GT-TATCACTCTTCGAGCCAAAT-TCT-TAATTGTGTGGGGTCCGCGAAA-----ATTTCCGGATAAATCCTGTAAACT			
ScAGT1p	(450)	TCAATATTGCTACGAATCTGTCTATAATTGGTGAATTTACCATGAAAAAGTGATATTTCCGGTACATGCCATTGAACG			
		561			640
AGT1p	(544)	-----TTAACTT--AAACCC-CGTGTTTAGCGAAA---TTTTCAACGAAGCGCG--CAATAAGGAGAATATTATCTA			
ScAGT1p	(530)	GCTTGGCTTACCTTCTCAATATCGTCTTGGTTTAAACGTTTCTTTTGTCCGCTTCTATTTTGTGTACTTTTCCGCG			
		641			720
AGT1p	(609)	AAAGCGAGAG-TTTAAGCGAGTTGCAAGAACTCTACGGTACAGATGCAACTTACTATAGCCAAGGTCTATTCGTATTAC			
ScAGT1p	(610)	GAGGAACAAGTTTTTTTCCCTTTCCTTAAATATTGCGCTTTGGGTTTTGG--TCCTCCAGAGAATATCA---CGTA---C			
		721			800
AGT1p	(688)	TATGGCAGCGAAAGGAGCTTTAAGGTTTTAATTACCCCATAGCCATAGATTCTACTCGGTCTATCTATCATGTAACACTC			
ScAGT1p	(682)	TATGGCAGCGAAAGGAGCTTTAAGGTTTTAATTACCCCATAGCCATAGATTCTACTCGGTCTATCTATCATGTAACACTC			
		801			880
AGT1p	(768)	CGTTGATCGCTACTAGAAAAAGACAACGTACCGGGCTTGAGGGACATACAGAGACAATTACAGTAAATCAAGAGTGTACCC			
ScAGT1p	(762)	CGTTGATCGCTACTAGAAAAAGACAACGTACCGGGCTTGAGGGACATACAGAGACAATTACAGTAAATCAAGAGTGTACCC			
		881			960
AGT1p	(848)	AACTTTAAACGAACCTCAGTAAAAAATAAGGAATGTCGACATCTTAATTTTTTATATAAAGCGGTTTGGTATTGATTGTTG			
ScAGT1p	(842)	AATTTTAAACGAACCTCAGTAAAAAATAAGGAATGTCGACATCTTAATTTTTTATATAAAGCGGTTTGGTATTGATTGTTG			
		961			1036
AGT1p	(928)	AAGAATTTTCCGGTTGGTGTCTTTCTGATGCTACATAGAAGAACATCAAACTAAAAAATAATATAATATG			
ScAGT1p	(922)	AAGAATTTTCCGGTTGGTGTCTTTCTGATGCTACATAGAAGAACATCAAACTAAAAAATAATATAATATG			

図 2-8 ラガー酵母の *ScAGT1* と実験室株の *AGT1* のプロモーター配列アライメント  
Box は開始コドンを示す。赤字は両者で異なる塩基を表す。

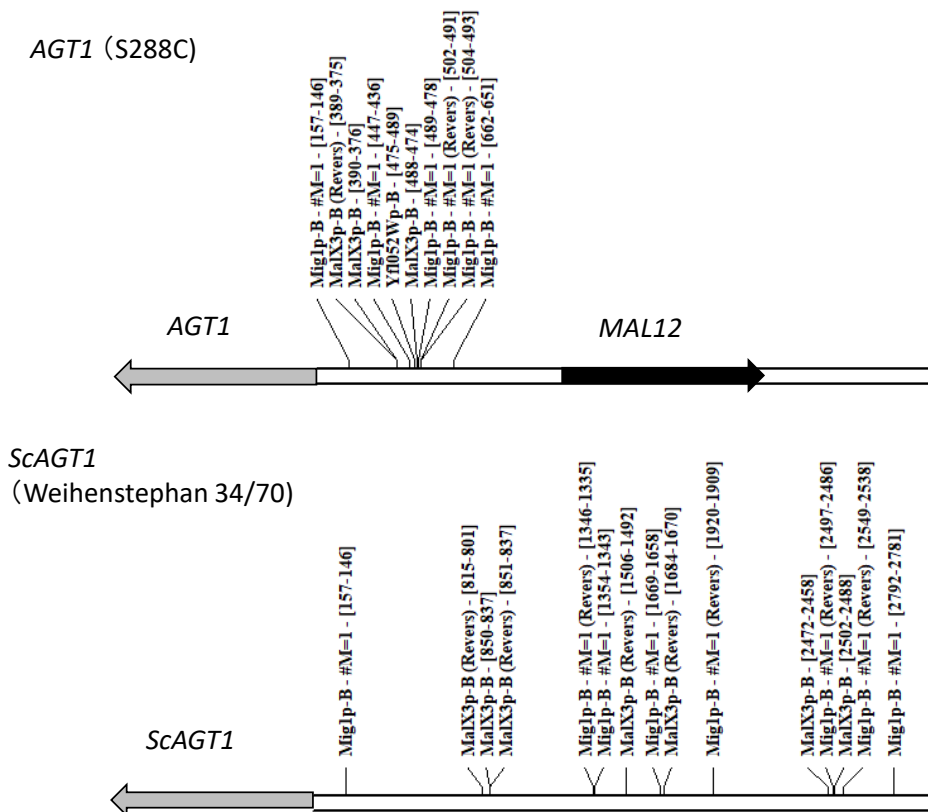


図 2-9 *AGT1* と *ScAGT1* promoter の制御因子結合部位の比較

Mig1p-B: Mig1p 結合部位(CCCCRNNWWWWW)

MalX3p-B:MalX3p 結合部位(CGC(9N)CGN)

Yf1052Wp-B:MalX3p 結合部位(CGG(9N)CGG)

Reverse : 相補鎖側の配列を示す。

#M=X:コンセンサス配列とのミスマッチの数(X)を示す。

数字は開始コドンから上流への塩基数を示す。

### 2.3.4 ラガー酵母の *SeAGT1* と *ScAGT1* のラガー酵母での遺伝子発現量

ラガー酵母での *SeAGT1*, *ScAGT1*, *MAL31* の遺伝子発現量を *S. cerevisiae* の実験室株と *S. bayanus* IFO1127 と比較するため、ラガー酵母 Sun25, Sun49 と実験室株 CB11, IFO1127 の 4 株を YPD で一晚 30°C、120 rpm で振とう前培養し、YPD と YPM に 1% 植菌した。30°C、120 rpm で 4 h 振とう培養した後集菌し、RNA を調製した。実験室株 CB11 は *mal+* 株であり、*AGT1* 遺伝子を有する。そのシーケンスを確認したところ、その ORF とプロモーターの塩基配列は S288C のものと完全に一致していた。*SeAGT1*, *AGT1*, *MAL31* の部分配列をプローブにしてノザンブロッティングを行った結果を図 2-10 に示す。すべての遺伝子はグルコース存在下では抑制されており発現していなかった。一方マ

ルトース存在下では、マルトーストランスポーター (*MAL31*) はすべての株で発現が見られた。それに対し、*AGT1* は実験室株 CB11 では発現していたが、ラガー酵母ではわずかな発現しか見られなかった。また *SeAGT1* についても、ラガー酵母での発現量は *S. bayanus* IFO1127 よりも低かった。

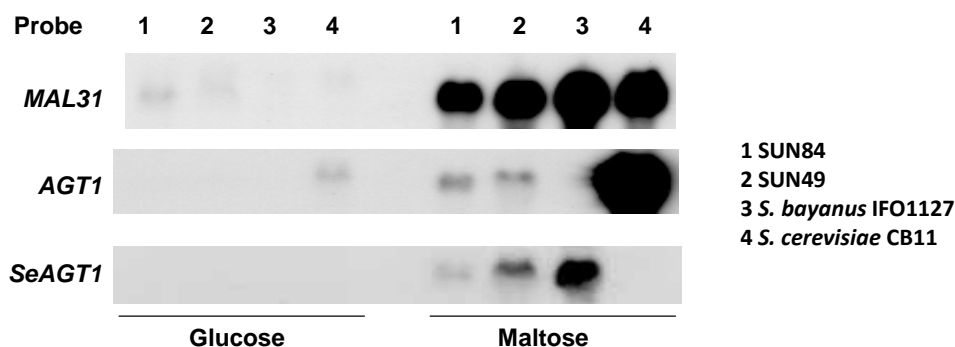


図 2-10 ラガー酵母での *ScAGT1* と *SeAGT1* の発現比較

### 2.3.5 ラガー酵母の *SeAGT1* と *ScAGT1* のマルトース、マルトトリオース資化性

ラガー酵母 *ScAGT1* と *SeAGT1* のコードするトランスポーターの活性を確認するため、両 ORF、および *AGT1* と *MAL61* をプラスミド pJHXS B の *TPI1* プロモーターの下流に挿入した。構築したプラスミド pJHSeAGT1, pJHScAGT1, pJHAGT1, pJHMAL61 および、空ベクター pJHXS B を実験室株 JH1032 に形質転換した。JH1032 は  $\alpha$ -グルコシドトランスポーターは発現しないが、*TPI1p::MAL32* が *URA3* site に挿入された株であり、構成的にマルターゼが発現している。pJHScAGT1, pJHAGT1, pJHXS B の形質転換株をマルトトリオース最少培地にスポットし、生育を確認した (図 2-11)。 *ScAGT1* 発現株 は少し生育し

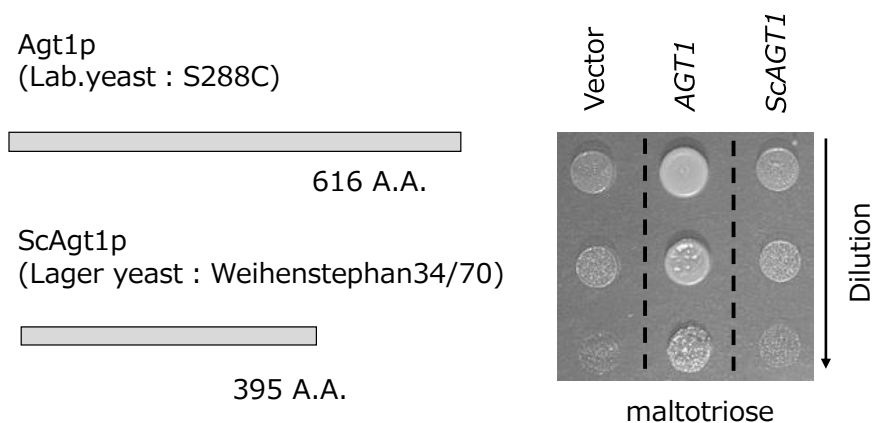


図 2-11 ラガー酵母由来の *ScAgt1p* の取り込み活性の検証

Dilution rate: 1,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$

たが、トランスポーターを持たない空ベクター株と同程度であり、395番目のコドンが終始コドンとなっている *ScAgt1p* は取り込み活性持たないと考えられた。pJH*SeAGT1*, pJH*AGT1*, pJH*MAL61*, pJH*XSB* 導入各株をアンチマイシン 3  $\mu\text{g/ml}$  を添加したマルトース、およびマルトトリオース最少培地 (YNBM, YNBMt) にストリークし生育を確認した (図 2-12)。 *SeAGT1* 発現株は *AGT1* 発現株と同じくマルトースとマルトトリオースのどちらの最少培地 (+アンチマイシン) にも生育し、両糖を取り込み能が確認された。

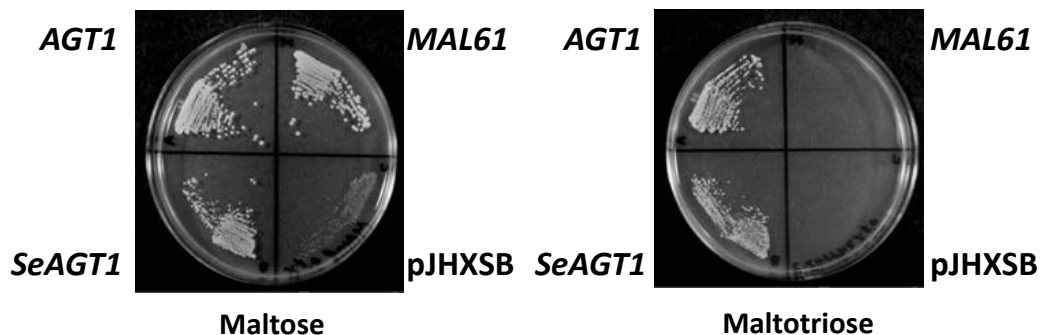


図 2-12 *SeAgt1p* の基質特異性

### 2.3.6 *SeAGT1* と *ScAGT1* を破壊したラガー酵母を用いての麦汁発酵

2.3.5 で述べたように、ラガー酵母の *ScAGT1* は 392 番目のコドンが終始コドンで、取り込み活性はないと思われた。また、*SeAgt1p* はマルトトリオース取り込み活性があるが、2.3.4 で述べたように *SeAGT1* 遺伝子の発現はマルトースでほとんど誘導されなかった。麦

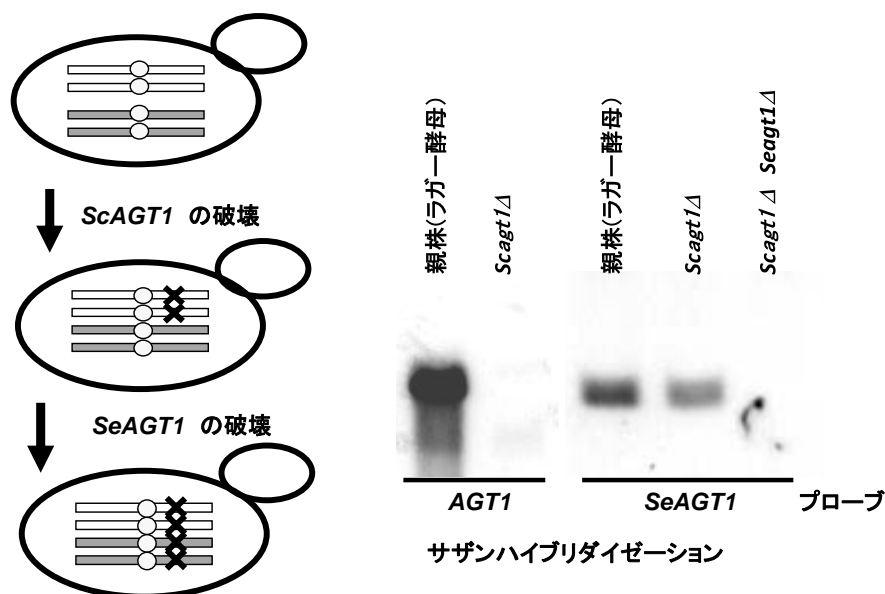


図 2-13 ラガー酵母の *ScAGT1* と *SeAGT1* 遺伝子の破壊

汁を発酵するラガー酵母は高いマルトトリオース取り込み能を有するはずであるが、これら二つのトランスポーターは麦汁発酵においてその役を果たしているとは考えにくい。これを確認するためにラガー酵母 *Weihenstephan 34/70* の *ScAGT1* と *SeAGT1* 遺伝子の破壊を行った。両遺伝子すべてが破壊されたことを、それぞれの遺伝子の部分配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションで確認した (図 2-13)。 *Scagt1Δ* 株 (HH118)、 *Scagt1Δ Seagt1Δ* 株 (HH132) と親株を用いて、麦汁発酵を行い、糖の消費経過を調べたところ、図 2-14 に示すように、 *Scagt1Δ Seagt1Δ* 株は、マルトースの資化において、若干の遅れが見られたものの、マルトトリオースに関してはほとんど消費速度は変わらなかった。

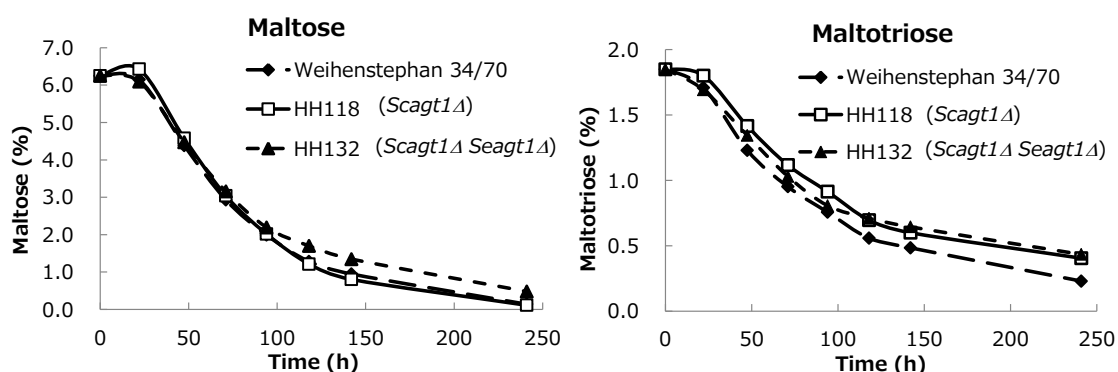


図 2-14 *ScAGT1*, *SeAGT1* 破壊株の麦汁発酵での糖資化経過

### 2.3.7 ラガー酵母においてマルトトリオース資化に関与するメインのトランスポーターのクローニング

マルトトリオースの取り込みに関わる他のトランスポーターを取得するために、ラガー酵母ゲノムよりライブラリーを構築し、HH150 株に導入した。HH150 株は CB11 の *AGT1* 遺伝子を破壊した株で、遺伝子型は *ade1* で、表現型はアデニン要求性であり、アデニン代謝中間産物である phosphoribosyl-carboxy-aminoimidazole を蓄積してコロニーは赤くなる。HH150 株はグルコースやマルトース完全培地では赤い色を呈するが、マルトトリオース

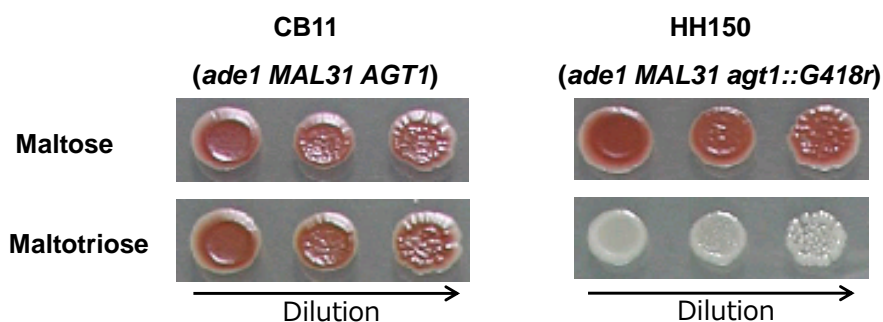


図 2-15 マルトトリオース培地とマルトース培地での HH150 株の色の違い

Dilution rate: 1,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$

ス完全培地 (SCMt 培地) では非常に遅い生育でかつコロニーの色は白い (図 2-15)。従って、HH150 はマルトトリオースを十分取り込めるトランスポーターが発現した際に赤色を呈し判別しやすい。Weihenstephan34/70 のゲノムライブラリーを HH150 株に導入して、ハイグロマイシン 300  $\mu\text{g}/\text{ml}$  を含む SCMt 培地に広げ、プレートを三日間 30°C で培養した。生育したコロニーのうち赤い色のコロニーを 16 個選択した (図 2-16)。コロニーから



図 2-16 ラガー酵母ゲノムからの  $\alpha$ -グルコシドトランスポーターのクローニング (2nd screening on SCMt)

赤丸は宿主 HH150、マルトトリオースを取り込める株は赤色を呈す

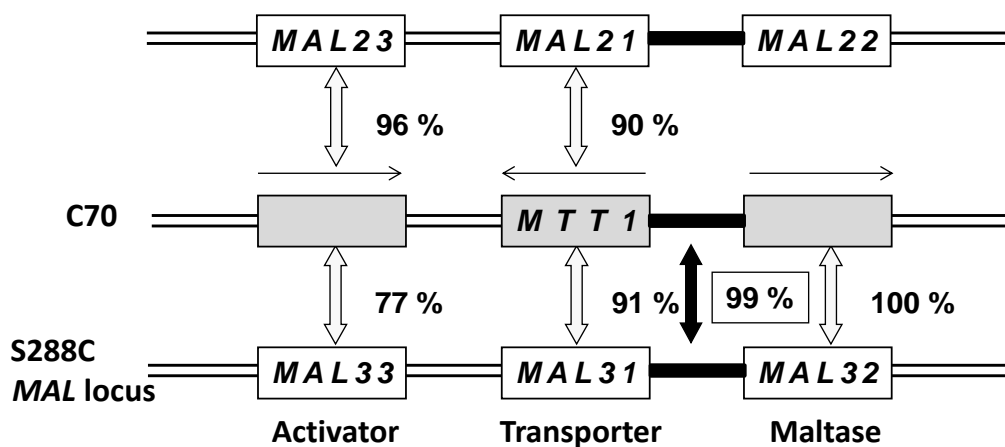


図 2-17 *MTT1* locus の遺伝子構造

数字は白い矢印間の遺伝子の同一性を示す。Box で囲んだ数字はプロモーター間の同一性を示す。

プラスミドを抽出し、シーケンスしたところ、すべてのプラスミドに 1848 bp の ORF が存在した。代表的クローンとして C70 の塩基配列を決定した。C70 と S288C の *MAL* locus との構造の比較を図 2-17 に示した。C70 にはトランスポーター、マルターゼ、マルトースアクティベーターと思われる ORF があり、*MAL* locus を形成していたが、S288C の *MAL3* locus と比べるとアイデンティティーはそれぞれ 90, 100, 77%であった。ORF のアミノ酸

列を Mal31p と比較したところ、91%のアイデンティティーがあった (図 2-18)。アクティベーターは Mal33p とアイデンティティーが 74%と低かったが、Baker's yeast ATCC 18824 の持つ Mal23p (AAB67707.1) と 96%のアイデンティティーがあった。また、プロモーター塩基配列は *MAL31* と 99%、ATCC20598 の *MAL21* と 99%のアイデンティティ

		1		70
MAL31p	(1)	MKGLSSLINRKKDRNDSHLDEIENGVNATEFNSIEMEEQGGKSDFDLSHLEYGPGSLI	PNDNNEEVPDLL	
MTT1p	(1)	MKGLSSLINRKKDRNDSHLDEIENGVNATEFNSIEMEEQGGKSDFDLSHHEYGPGSLI	PNDNNEEVPDLL	
		71		140
MAL31p	(71)	DEAMQDAKEADESERGMPLMTALKTYPKAAAWSLLVSTTLIQEGYDTAILGAFYALPVFQKKYGLNSNT		
MTT1p	(71)	DEAMQDAKEADESERGMPLMTALKTYPKAAAWSLLVSTTLIQEGYDTAILGSFYALPVFQKKYGLNSNT		
		141		210
MAL31p	(141)	GDYEISVSWQIGLCLCYMAGEIVGLQMTGSPVDYMGNRYTLIMALFFLAAFIFILYFCKSLGMIAVGQAL		
MTT1p	(141)	GDYEISASWQIGLSLCVTAGEIVGLQMTGPFVDYMGNRYTLILALLLAFTIFILYFCKSLGMIAVGVQL		
		211		280
MAL31p	(211)	CGMPWGCFCQCLTVSYASEICPLALRYLLTYSNLCWAFGQLFAAGIMKNSQNKYANSELGYKLPFALQWI		
MTT1p	(211)	CGMPWGCFCQCLTVSYASEICPMALRYLLTYSNLCWTFGQLFAAGIMKNSQNKYPNSELGYKLPFALQWI		
		281		350
MAL31p	(281)	WPLPLAVGIFFAPESPWWLVKKGRIQARRSLERTLSGKGPEKELLVSMELDKIKTTIEKEQKMSD-EGT		
MTT1p	(281)	WPAPLAIGIFFAPESPWWLVKKGRIQARRSLERTLSGKGPEKELLVSMELDNIKVTIEKEKKLSDSEGS		
		351		420
MAL31p	(350)	YWDCKVDGINRRRTRIACLCWIGQCSCGASLIGYSTYFYEKAGVSTDTAFTFSIIQYCLGIAATFISWWA		
MTT1p	(351)	YWDCLKDSVNRRTRIACLCWVGQITTCGTSLIGNSTYFYEKAGVSTDTAFTFSIIQYCLGIAATFLSWWA		
		421		490
MAL31p	(420)	SKYCGRFDLYAFGLAQAIMFFIIGGLGCS DTHGAKMGSGALLMVAVFFYNLGIAPVVVFLVSEIPSSRL		
MTT1p	(421)	SKYFGRFDLYAFGLAIQTVSFLIIGGLGCS DSHGAE MGSGLLMVLSFFYNLGIAPVVVFLVSEIPSSRL		
		491		560
MAL31p	(490)	RTKTIILARNAYNVIQVVTVLIMYQLNSEKWNWGA KSGFFWGGFCLATLAWAVVDLPETAGRTFIEINE		
MTT1p	(491)	RTKSIILARNAYNMA SIVITV LIMYQLNSEKWNWGA KSGFFWGGFCFATLVWAVVDLPETAGRTFIEINE		
		561		616
MAL31p	(560)	LFRLGVPARKFKSTKVDPF AAAAAAAAE INVKDPKEDLET SVVDEGRNTSSVNVK-		
MTT1p	(561)	LFRLGVPARKFKSTKVDPF AAAAAAAAE INVKDPKEDLET SVVDEGRSTIPSVNVK-		

図 2-18 Mal31p と Mtt1p のアミノ酸配列アライメント

黒：同一のアミノ酸、緑：類似なアミノ酸、赤：異なるアミノ酸

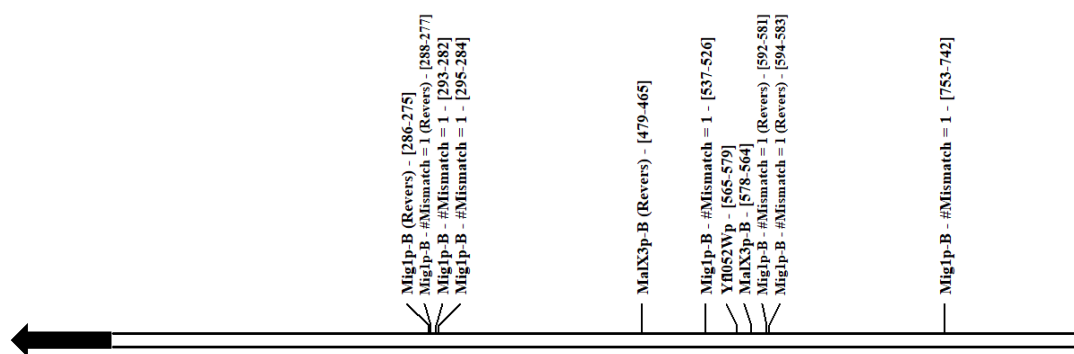


図 2-19 *MTT1* promoter の制御因子結合部位

Mig1p-B: Mig1p 結合部位(CCCCRNNWWWWW)

MalX3p-B:MalX3p 結合部位(CGC(9N)CGN)

Yf1052Wp-B:MalX3p 結合部位(CGG(9N)CGG)

Reverse : 相補鎖側の配列を示す。

#M=X:コンセンサス配列とのミスマッチの数(X)を示す。

イーターがあり、*MAL31* と同様にグルコースによる抑制を受け、マルトースによる誘導を受けると考えられる。プロモーター配列にある Mig1p と MalX3p の結合部位を図 2-19 に示した。オーバーラップしたのもも含めて、8つの Mig1p 結合部位、2つの MalX3p 結合部位

があった。後に、得られた ORF の配列は Dietvorst らによって発表された *MTT1* 遺伝子と完全に同じであることがわかった (35)。マルトトリオースの資化性によるスクリーニングで得られたクローンすべてが *MTT1* を持っていたことより、ラガー酵母のマルトトリオースの取り込みを担うのは *MTT1* だけである可能性が高い。

### 2.3.8 LBYG アレイを用いたラガー酵母 *Weihenstephan34/70* の麦汁発酵中の *MTT1*

ラガー酵母 *Weihenstephan 34/70* で、100% 麦芽麦汁を用いて発酵試験を行い、1日1点エキスと OD<sub>660</sub> を測定した。また、10~20 ml の発酵モロミをから酵母を集菌した。酵母より RNA を調製し、アフィメトリクス社のラガー酵母ゲノムのカスタムマイクロアレイである LBYG アレイを用いて、発酵中の *MTT1*, *MAL31*, *ScAGT1*, *SeAGT1* 遺伝子の発現を調べた (図 2-20)。*MTT1* と *MAL31* はグルコースの枯渇と共に発現量が上昇し、その発現パターンは酷似していた。2.3.7 で述べたように両遺伝子のプロモーターは 99% のアイデンティティーがあったため、当然と考えられる。対する *ScAGT1* と *SeAGT1* は発酵後期に向けてわずかな発現上昇が見られたのみで、マルトースによる誘導はなかった。この結果は、2.3.4 の結果と一致した。

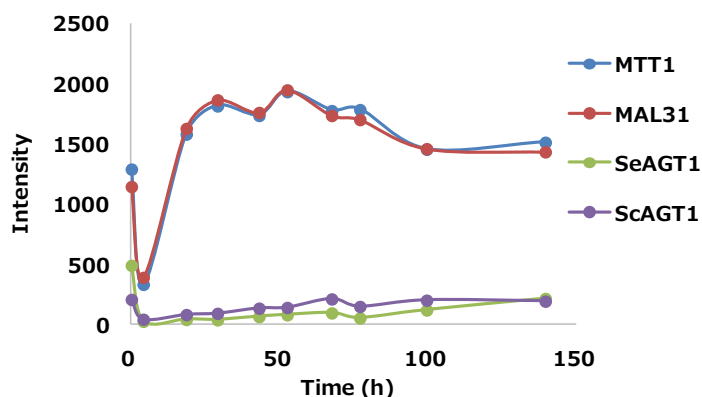


図 2-20 麦汁発酵における糖トランスポーターの遺伝子発現経過  
Affimetrix LBYG custom array を使って分析した



### 2.3.9 MAL61, AGT1, SeAGT1, MTT1の基質特異性

Mal61p, Agt1p, SeAgt1p, Mtt1p の基質特異性を調べるために、YIp 型プラスミド pJHIMAL61, pJHIAGT1, pJHISeAGT1, pJHIMTT1, pJHIXSB を JH1032 株の *URA3* 部位に導入し、HH108 (*MAL61*), HH228 (*AGT1*), HH205 (*SeAGT1*), HH196 (*MTT1*), HH208 (no transporter) を得た。これらをマルトース、マルトトリオース、イソマルトース、 $\alpha$ -メチルグルコシド、ツラノース、メレジットース、トレハロース、メリビオースを 2%

表 2-3 各トランスポーター発現株の発酵 (基質) 特異性

$\alpha$ -glucoside	Transporter				
	Mal61	Agt1	SeAgt1	Mtt1	no transporter
maltose	+++	+++	+	+	-
maltotriose	-	+++	+	+++	-
isomaltose	-	++	++	-	-
$\alpha$ -methylglucoside	-	+	-	-	-
turanose	+++	+++	++	++	-
melezitose	-	+	+	-	-
trehalose	-	-	+	+	-
melibiose	-	-	-	-	-

含む FP 培地でダーラム管を用いた発酵テストを行った。その結果を表 2-3 に示す。HH205 (*SeAGT1*) と HH228 (*AGT1*) はマルトース、マルトトリオース、ツラノース、イソマルトトリオースを発酵してダーラム管に二酸化炭素が溜まっているのが確認された。さらに、HH205 (*SeAGT1*) はトレハロースを発酵したが、HH228 (*AGT1*) は発酵せず、 $\alpha$ -メチルグルコシドについてはその逆であった。HH196 (*MTT1*) は、マルトース、マルトトリオース、ツラノース、トレハロースを発酵した。それに対し、HH108 (*MAL61*) はマルトースとツラノースのみで二酸化炭素を確認した。また、HH196 (*MTT1*), HH205 (*SeAGT1*), HH228 (*AGT1*), HH108 (*MAL61*) のいずれもがツラノースで最も活発に二酸化炭素を発生した。ツラノースは $\alpha$ -D-グルコピラノシル-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-フルクトフラノースで、スクロースのアナログである。自然界に大量に存在するものではない。しかし、どの $\alpha$ -グルコシドトランスポーターでも旺盛にツラノースを発酵する様子が見られ、もっとも良い基質であると考えられた。

また、各種トランスポーターがグルコースあるいはフラクトースなどのヘキソースを取り込む事ができるかどうか調べるために、pJHMTT1, pJHAGT1, pJHSeAGT1, pJHMAL31, pJHMAL21, pJHHXT2, pJHHXT5, pJHFSY1, pJHXSBBにより KY73 株を形質転換した。KY73 株は *HXT1*~*HXT7*, *GAL2* が破壊されているので、グルコースではほぼ生育しない。一方 *MAL21* を持っているので、マルトースでは生育する。pJHHXT2, pJHHXT5 を導入した株をポジティブ、pJHXSBB を導入した株をネガティブコントロール

とした。これらの株をグルコースあるいはフラクトースを単独炭素源とする最少培地にスポットし、30°Cで2日間インキュベートした。その結果、ヘキソーストランスポーターである Hxt2p や Hxt5p を除くと、Agt1p は最もよくグルコースやフラクトースプレートに生育し、これらを取り込むことがわかった (図 2-21)。SeAgt1p もわずかにグルコースとフラクトースプレートに生育した。これに対し、Mtt1p は Mal61p と同じようにどちらにもほぼ生育できず、グルコースとフラクトースを取り込めないことがわかった。

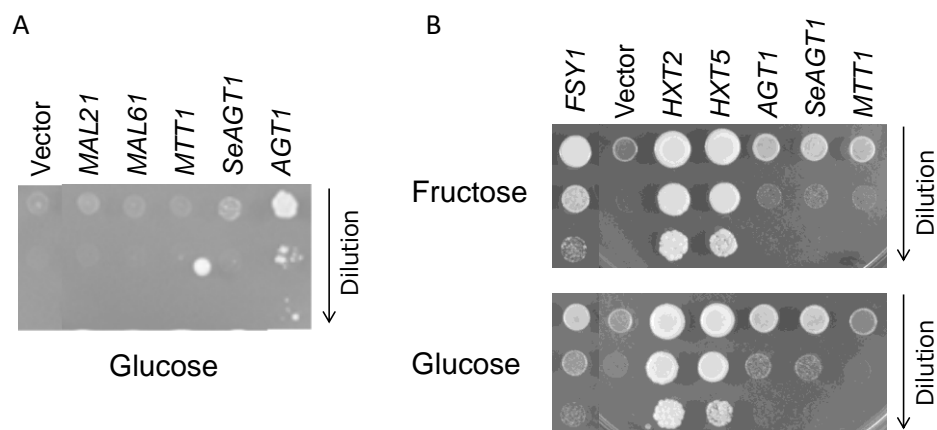


図 2-21 各 $\alpha$ -グルコシドトランスポーター発現株の単糖資化能力

Dilution rate: 1,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$

### 2.3.10 ラガー酵母のマルトーストランスポーター

*S. cerevisiae* には 5 つのマルトーストランスポーターの存在が報告されている。マルトーストランスポーターは *MALX1* にコードされており (X=1 [*AGT1*], 2,3,4,6), それぞれ、染色体 VII, III, II, XI, VIII に位置している。*S. cerevisiae* は株によってこれら 5 種類の *MALX1* を持っていないか、複数持っていたりする。一般的に言ってラガー酵母は多くのマルトーストランスポーターを持っている (19)。CHEF で染色体を分けた後 *MAL61* の部分配列を用いてサザンハイブリダイゼーションをするとラガー酵母 SUN49 と SUN84 は *MAL11* (*AGT1*), *MAL21*, *MAL31*, *MAL41* を持つことが予想された (図 2-22)。S288C の *MAL31* の配列の上流、下流約 100 bp の位置にプライマーを用いて、ラガー酵母 SUN49 のゲノムを鋳型として PCR にてマルトーストランスポーターをクローニングし、20 本以上シーケンスしたところ、うち半分から *MTT1* の配列が得られた。残りは *MALX1* であったが、少なくとも 3 種類の若干の塩基配列に違いのあるマルトーストランスポーターがあることがわかった。それぞれ S288C の Mal31p と比べると、12, 16, 16 個のアミノ酸残基の違いがあった (図 2-23)。なお、Nakao *et.al.* (5) によれば、ラガー酵母

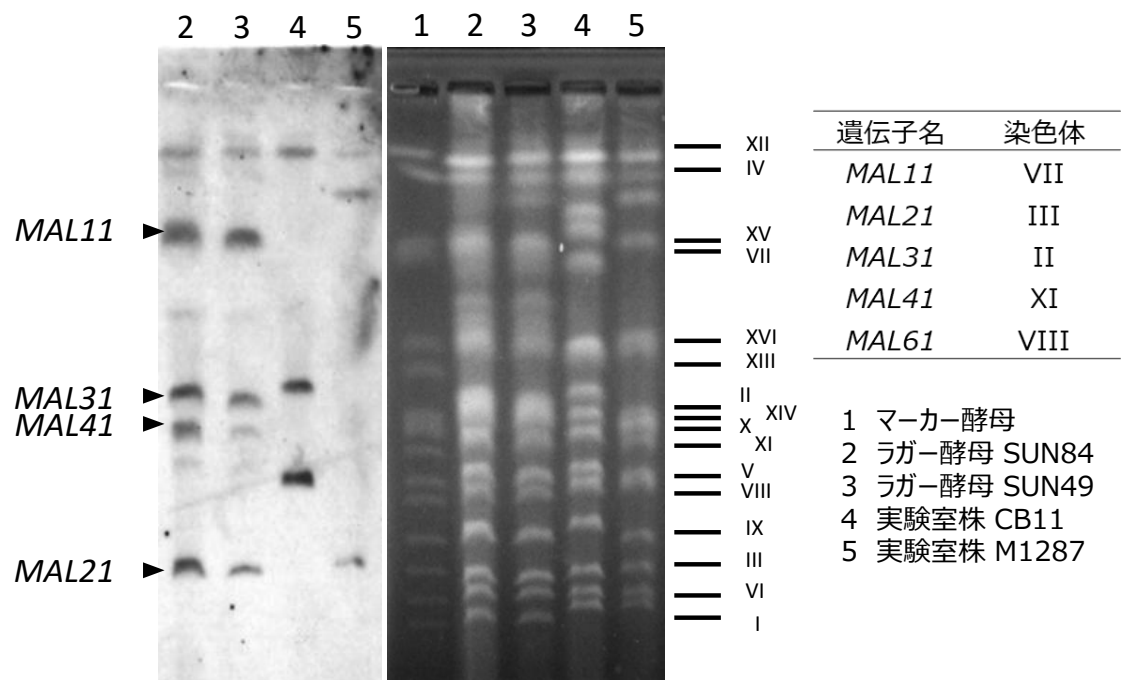


図 2-22 ラガー酵母の複数のマルトーストランスポーター遺伝子

Weihenstephan34/70 の Se 型と思われる MalX1p はトランケートされており、231 アミノ酸の長さしかない。従って Sc 型 Agt1p と同じく活性はないと予想される。

		1	80
49-17MALX1AA	(1)	MKGLSSLINRKKDRNDSHLDEIENGVNATEFNSVEMEEQGKKSDFDLSHHEYGPGSLIPNDNNEEVPDLLDEAMQDAKEA	
49-21MALX1AA	(1)	MKGLSSLINRKKDRNDSHLDEIENGVNATEFNSVEMEEQGKKSDFDLSHHEYGPGSLIPNDNNEEVPDLLDEAMQDAKEA	
MAL31p	(1)	MKGLSSLINRKKDRNDSHLDEIENGVNATEFNSIEMEEQGKKSDFDLSHLEYGPGSLIPNDNNEEVPDLLDEAMQDAKEA	
49-27MALX1AA	(1)	MKGLSSLINRKKDRNDSHLDEIENGVNATEFNSIEMEEQGKKSDFDLSHHEYGPGSLIPNDNNEEVPDLLDEAMQDAKEA	
MAL21p	(1)	MKGLSSLINRKKDRNDSHLDEIENGVNATEFNSIEMEEQGKKSDFGLSHHEYGPGSLIPNDNNEEVPDLLDEAMQDAKEA	
MAL61p	(1)	MKGLSSLINRKKDRNDSHLDEIENGVNATEFNSIEMEEQGKKSDFDLSHLEYGPGSLIPNDNNEEVPDLLDEAMQDAKEA	
		81	160
49-17MALX1AA	(81)	DESERGMPLMTALHTYPKAAAWSLVSTTLIQEGYDTAILGSPYALFVPQKKYGSLNSNTGDYEISVSWQIGLCLCYMAG	
49-21MALX1AA	(81)	DESERGMPLMTALHTYPKAAAWSLVSTTLIQEGYDTVILGSPYALFVPQKKYGSLNSNTGDYEISVSWQIGLCLCYMAG	
MAL31p	(81)	DESERGMPLMTALHTYPKAAAWSLVSTTLIQEGYDTAILGAPYALFVPQKKYGSLNSNTGDYEISVSWQIGLCLCYMAG	
49-27MALX1AA	(81)	DESERGMPLMTALHTYPKAAAWSLVSTTLIQEGYDTAILGSPYALFVPQKKYGSLNSNTGDYEISVSWQIGLCLCYMAG	
MAL21p	(81)	DESERGMPLMTALHTYPKAAAWSLVSTTLIQEGYDTAILGAPYALFVPQKKYGSLNSNTGDYEISVSWQIGLCLCYMAG	
MAL61p	(81)	DESERGMPLMTALHTYPKAAAWSLVSTTLIQEGYDTAILGAPYALFVPQKKYGSLNSNTGDYEISVSWQIGLCLCYMAG	
		161	240
49-17MALX1AA	(161)	EIVGLQMTGPPSVDYMGNRYTILMALFPLAAPPFIPILYFCKSLGMIAVGQALCGMPWGCPCQLAVSYASEICPMALRYLTT	
49-21MALX1AA	(161)	EIVGLQMTGPPSVDYMGNRYTILMALFPLAAPPFIPILYFCKSLGMIAVGQALCGMPWGCPCQLAVSYASEICPMALRYLTT	
MAL31p	(161)	EIVGLQMTGPPSVDYMGNRYTILMALFPLAAPPFIPILYFCKSLGMIAVGQALCGMPWGCPCQLTVSYASEICPLALRYLTT	
49-27MALX1AA	(161)	EIVGLQITGPPSVDYMGNRYTILMALFPLAAPPFIPILYFCKSLGMIAAGQALCGMPWGCPCQLTVSYASEICPLALRYLTT	
MAL21p	(161)	EIVGLQITGPPSVDLVGNRYTILMALFPLAAPPFIPILYFCKSLGMIAVGQALCGMPWGCPCQLTVSYASEICPLALRYLTT	
MAL61p	(161)	EIVGLQVTGPPSVDYMGNRYTILMALFPLAAPPFIPILYFCKSLGMIAVGQALCGMPWGCPCQLTVSYASEICPLALRYLTT	
		241	320
49-17MALX1AA	(241)	YSNLCWAFGQLFAAGIMKNSQNKYANSELGYKLPFALQWIPWPLAVGIFFAFESFWWLVKNGRIDQARRSLERTLSGKG	
49-21MALX1AA	(241)	YSNLCWAFGQLFAAGIMKNSQNKYANSELGYKLPFALQWIPWPLAVGIFFAFESFWWLVKNGRIDQARRSLERTLSGKG	
MAL31p	(241)	YSNLCWAFGQLFAAGIMKNSQNKYANSELGYKLPFALQWIPWPLAVGIFFAFESFWWLVKNGRIDQARRSLERTLSGKG	
49-27MALX1AA	(241)	YSNLCWTFGQLFAAGIMKNSQNKYVNSELGKLPFALQWIPWPLAVGIFFAFESFWWLVKNGRIDQARRSLERTLSGKG	
MAL21p	(241)	YSNLCWTFGQLFAAGIMKNSQNKYANSELGYKLPFALQWIPWPLAVGIFFAFESFWWLVKNGRIDQARRSLERTLSGKG	
MAL61p	(241)	YSNLCWTFGQLFAAGIMKNSQNKYANSELGYKLPFALQWIPWPLAVGIFFAFESFWWLVKNGRIDQARRSLERTLSGKG	
		321	400
49-17MALX1AA	(321)	PEKELLVTMELDKIKTTIEKEQKMSDEGTYWDCVHDGINRRRTRIACLWIGQCSGASLIGYSTYFYEKAGVSTDTAFT	
49-21MALX1AA	(321)	PEKELLVSMELDKIKTTIEKEQKMSDEGTYWDCVHDGINRRRTRIACLWIGQTTCGASLIGYSTYFYEKAGVSTDTAFT	
MAL31p	(321)	PEKELLVSMELDKIKTTIEKEQKMSDEGTYWDCVHDGINRRRTRIACLWIGQCSGASLIGYSTYFYEKAGVSTDTAFT	
49-27MALX1AA	(321)	PEKELLVTMELDKIKTTIEKEQKMSDEGTYWDCVHDGINRRRTRIACLWIGQCSGASLIGYSTYFYEKAGVSTDTAFT	
MAL21p	(321)	PEKELLVTMELDKIKTTIEKEQKMSDEGTYWDCVHDGINRRRTRIACLWIGQCSGASLIGYSTYFYEKAGVSTDTAFT	
MAL61p	(321)	PEKELLVSMELDKIKTTIEKEQKMSDEGTYWDCVHDGINRRRTRIACLWIGQCSGASLIGYSTYFYEKAGVSTDTAFT	
		401	480
49-17MALX1AA	(401)	FSIIQYCLGIAATFVSWWASKYCGRFDLYAFGLAPQAIMFFPIIGGLGCSDTHGAKMGSALLMVVAFFYNLGIAPVVFCL	
49-21MALX1AA	(401)	FSIIQYCLGIAATFVSWWASKYCGRFDLYAFGLAPQAIMFFPIIGGLGCSDTHGAKMGSALLMVVAFFYNLGIAPVVFCL	
MAL31p	(401)	FSIIQYCLGIAATFVSWWASKYCGRFDLYAFGLAPQAIMFFPIIGGLGCSDTHGAKMGSALLMVVAFFYNLGIAPVVFCL	
49-27MALX1AA	(401)	FSIIQYCLGIAATFVSWWASKYCGRFDLYAFGLAPQAIMFFPIIGGLGCSDTHGAKMGSALLMVVAFFYNLGIAPVVFCL	
MAL21p	(401)	FSIIQYCLGIAATFVSWWASKYCGRFDLYAFGLAPQAIMFFPIIGGLGCSDTHGAKMGSALLMVVAFFYNLGIAPVVFCL	
MAL61p	(401)	FSIIQYCLGIAATFVSWWASKYCGRFDLYAFGLAPQAIMFFPIIGGLGCSDTHGAKMGSALLMVVAFFYNLGIAPVVFCL	
		481	560
49-17MALX1AA	(481)	VSEIPSSRLRTHKTIILARNAYNVIQVVVTVLIMYQLNSEKWNWGAKSGPFWGGFCLATLAWAVVDLPETAGRTPIEINEL	
49-21MALX1AA	(481)	VSEMPSSRLRTHKTIILARNAYNVIQVVVTVLIMYQLNSEKWNWGAKSGPFWGGFCLATLAWAVVDLPETAGRTPIEINEL	
MAL31p	(481)	VSEIPSSRLRTHKTIILARNAYNVIQVVVTVLIMYQLNSEKWNWGAKSGPFWGGFCLATLAWAVVDLPETAGRTPIEINEL	
49-27MALX1AA	(481)	VSEMPSSRLRTHKTIILARNAYNVIQVVVTVLIMYQLNSEKWNWGAKSGPFWGGFCLATLAWAVVDLPETAGRTPIEINEL	
MAL21p	(481)	VSEMPSSRLRTHKTIILARNAYNVIQVVVTVLIMYQLNSEKWNWGAKSGPFWGGFCLATLAWAVVDLPETAGRTPIEINEL	
MAL61p	(481)	VSEMPSSRLRTHKTIILARNAYNVIQVVVTVLIMYQLNSEKWNWGAKSGPFWGGFCLATLAWAVVDLPETAGRTPIEINEL	
		561	615
49-17MALX1AA	(561)	FRLGVPARKFKSTKVDFFAAAKAVAVEINVKDPKEDLET SVVDEGRSTPSVVNK-	
49-21MALX1AA	(561)	FRLGVPARKFKSTKVDFFAAAKAVAVEINVKDPKEDLET SVVDEGRSTPSVVNK-	
MAL31p	(561)	FRLGVPARKFKSTKVDFFAAAKAAAEINVKDPKEDLET SVVDEGRNTSSVVNK-	
49-27MALX1AA	(561)	FRLGVPARKFKSTKVDFFAAAKAAAEINVKDPKEDLET SVVDEGRSTSSVVNK-	
MAL21p	(561)	FRLGVPARKFKSTKVDFFAAAKAAAEINVKDPKEDLET SVVDEGRNTSSVVNK-	
MAL61p	(561)	FRLGVPARKFKSTKVDFFAAAKAAAEINVKDPKEDLET SVVDEGRSTPSVVNK-	

図 2-23 ラガー酵母と実験室株の MalX1p アミノ酸配列アライメント

黒：同一のアミノ酸、緑：類似なアミノ酸、赤：異なるアミノ酸、青：ブロックで類似なアミノ酸

## 2.4 考察

ラガー酵母は *S. cerevisiae* と *S. eubayanus* の自然交配株と考えられており、グルコース、マルトース、マルトトリオースを含む麦芽を発酵する高い能力を持っている。本章では、*S. cerevisiae* の実験室酵母で発見されていた $\alpha$ -グルコシドトランスポーター、*AGT1* の *S. eubayanus* 側のゲノムに存在するオーソログである *SeAGT1* をクローニングした。

SeAgt1p は Agt1p と 78%のアイデンティティがあった。*SeAGT1* のプロモーターには *S. cerevisiae* 実験室株の *AGT1* プロモーターとはホモロジーがないが、マルトース転写活性因子 MalX3p の結合部位が 2 か所、Yfl052Wp の結合部位が 1 か所存在した。しかしラガー酵母での発現を調べたところ、マルトース存在下であってもほとんど発現はしなかった。また、ラガー酵母の *S. cerevisiae* 側ゲノムに存在する *ScAGT1* は、1182 bp の位置に T の挿入があった。そのためフレームシフトを起こし、395 番目のコドンが終始コドンになっていた。この短くなった *ScAgt1p* に活性がないことを確認した。また、*ScAGT1* のプロモーターは開始コドンから上流 317 bp までは実験室株 *AGT1* のプロモーターと一致したがそれ以上の上流にはホモロジーがなかった。*ScAGT1* プロモーターには MalX3p の結合部位があったが、*SeAGT1* と同じくマルトースが存在してもほとんど発現されず、麦汁の発酵中においてもほぼ発現は見られなかった。実験室酵母の *AGT1* のプロモーターには、*ScAGT1* プロモーターとホモロジーがない開始コドンより 317bp 以上の上流に MalX3p の結合部位があり、マルトースによって誘導される。MalX3p の結合部位の数や開始コドンからの距離、方向性などによって、差が出ていると思われる。ラガー酵母 SUN49 株の *ScAGT1* と *SeAGT1* をすべて破壊した株を構築し麦汁の発酵試験を行ったところ、破壊株のマルトリオース資化速度には全く影響がなく、*ScAGT1* と *SeAGT1* は共にラガー酵母では  $\alpha$ -グルコシドトランスポーターとして全く機能していないことが確認された。ラガー酵母ゲノムライブラリーをマルトリオース非資化性株に導入し、マルトリオース単独炭素源の最少培地で生育できた数十のコロニーを調べたところ、全てに同じ遺伝子 *MTT1* が含まれていた。Mtt1p は Mal61p と 90%、Mal31p と 91%のアイデンティティがあった。*MTT1* 遺伝子の両隣りにはマルターゼとマルトースアクチベーターと考えられる遺伝子があり、*MAL* locus を構成していた。*MTT1* の隣のマルトースアクチベーターのアミノ酸配列は Mal23p と 96%のアイデンティティがあった。一方、反対側に位置するマルターゼのアミノ酸配列は Mal32p と 100%のアイデンティティがあった。*MTT1* とマルターゼ遺伝子の間にあるプロモーターは、*MAL31* のプロモーターと 99%のアイデンティティがあり、麦汁発酵中の *MTT1* の遺伝子発現量と発現経過は *MAL31* の発現とほとんど同じで高い発現量を示した。これらのデータから、ラガー酵母において  $\alpha$ -グルコシドトランスポーターとして機能しているのは、Mtt1p だけだと推測された。Mtt1p はラガー酵母だけではなく、エール酵母からも類似のものがみついている。すなわち、ラガー酵母の祖先種が *S. cerevisiae* と *S. eubaynus* との自然交配株として誕生する以前に、エール酵母は *MTT1* 様の遺伝子を持っていたと考えられる。*S. cerevisiae* 実験室株の Agt1p については、スクロースやヘキソースであるグルコース、フラクトースなども取り込むことが知られている。ヘキソーストランスポーターをすべて破壊した株を用いて SeAgt1p と Mtt1p の基質特異性を調べたところ、SeAgt1p はわずかにグルコースやフラクトースのプレートでも生育した。一方 Mtt1p はほとんど生育することはできず、SeAgt1p や Agt1p は Mtt1p よりも基質特異性が広いことが明らかになった。基質特異性が広い Agt1p と SeAgt1p は、グルコース

などの良い炭素源が枯渇した場合に複数の糖を取り込めるようにするための、緊急時のトランスporterとして進化してきたのかもしれない。ラガー酵母では *ScAGT1* はトランケートされていて機能せず、しかも発酵中にはほとんど発現していない。低温での麦汁発酵という目的にとっては、*ScAgt1p* と *SeAgt1p* は機能せず、*Mtt1p* が機能するものが最も優れた酵母としてビール醸造の場で選択されてきたのだと思われる。*MAL61* の部分配列をプローブとした CHEF による分析では、ラガー酵母 SUN49, SUN84 共に *MAL11*, *MAL21*, *MAL31*, *MAL41* を持つことが予想された。このうちの 1 つは *MTT1* である可能性があるが、どの染色体であるかは特定されていない。

## 第3章 実験室酵母の Mal31p, Mal61p, Mal21p と Agt1p、およびラガー酵母の SeAgt1p と Mtt1p の詳細な特性解析、および改変

### 3.1 緒言

*S. cerevisiae* には Mal11p (Agt1p), Mal21p, Mal31p, Mal41p, Mal61p の 5 つのマルトーストランスポーターが存在する事が明らかになっている (10,11)。このうち、Mal11p (Agt1p) は Mal31p や Mal61p とは基質特異性が異なる。そのアミノ酸配列は Mal21p, Mal31p, Mal61p と比べると 54%の identity しかない。一方、Mal21p, Mal31p, Mal61p の三者は互いに 98%あるいは 99%の identity がある。これらは異なる染色体に位置しているが、性質に大きな差があるのかどうかはわかっていなかった。本章では、各トランスポーターの取り込み活性、比活性、活性への温度の影響などの諸性質を調べた。また、Mal61p や Mal31p は、グルコースリプレッションによってその発現が抑制されると共に、細胞膜に発現した後も、グルコース存在下では速やかに分解されることが知られている (14,15)。

しかし、Agt1p や Mal21p、2章で取得した SeAgt1p や Mtt1p については、どのように翻訳後の制御を受けるか知られていない。グルコース存在下での $\alpha$ -グルコシドトランスポーターの分解されにくさは、グルコースとマルトース、マルトトリオースが含まれる麦汁の発酵速度に影響を与えると想像される。そこで、グルコース存在下でのトランスポータータンパク質の半減期を測定した。さらに、 $\alpha$ -グルコシドトランスポーターのグルコース誘導性分解耐性を決定するアミノ酸残基を決定した。またその情報を基に、半減期の短かったトランスポーターについて、分解耐性を与える試みを行った。最後にプロトンシンポーターであると考えられている、 $\alpha$ -グルコシドトランスポーターの活性に関与するアミノ酸残基を同定した。

### 3.2 実験材料および方法

第2章での実験方法は第1章で記載したものと多くが重複している。以下には第2章で用いたが、第1章にないものについて記載した。

#### 3.2.1 使用菌株

本章で用いた酵母菌株と大腸菌株を表 3-1 に示す。D152 は ATCC96955 の *MAL61* を *TRP1* 遺伝子を挿入して破壊した株であり、同じくトランスポーター発現ユニットを持つ YCp 型プラスミドを導入して、その機能を調べるために使用した。酵母株 RH1602 と RH1597 (36) は、*END4* あるいは *end4* の株、23346c と 27038a (37) は *NPI1* あるいは *npi1* の株で、どちらもトランスポータータンパク質の翻訳後修飾状態を調べるために用いた。

表 3-1 第 3 章で用いた株

Strain Name	Genotype
<i>S. cerevisiae</i>	
JH1032	<i>MATa SUC2 mal mel gal2 CUP1 TPI1::TPI1pr-MAL32-G418R ura3</i>
D152	<i>identical to ATCC96955 except for mal61::TRP1</i>
BL21(DE3)	<i>F<sup>-</sup>, ompT, hsdSB(rB<sup>-</sup> mB<sup>-</sup>), gal(λcI 857, ind1, Sam7, nin5, lacUV5-T7gene1), dcm(DE3) (B株由来)</i>
RH1602	<i>MATa ura3 leu2 his4 bar1</i>
RH1597	<i>MATa ura3 leu2 his4 bar1end4-1</i>
23346c	<i>MATa ura3</i>
27038a	<i>MATa ura3 npi1</i>
HH208	<i>identical to JH1032 except for ura3::URA3-TPI1pr</i>
HH108	<i>identical to JH1032 except for ura3::URA3-TPI1pr-MAL61</i>
HH206	<i>identical to JH1032 except for ura3::URA3-TPI1pr-MAL21</i>
HH228	<i>identical to JH1032 except for ura3::URA3-TPI1pr-AGT1</i>
HH196	<i>identical to JH1032 except for ura3::URA3-TPI1pr-MTT1</i>
HH205	<i>identical to JH1032 except for ura3::URA3-TPI1pr-SeAGT1</i>
HH227	<i>identical to JH1032 except for ura3::URA3-TPI1pr-MAL31</i>
HH209	<i>identical to JH1032 except for ura3::URA3-TPI1pr-MAL61[L50H]</i>
HH210	<i>identical to JH1032 except for ura3::URA3-TPI1pr-MAL61[D46G]</i>
HH207	<i>identical to JH1032 except for ura3::URA3-TPI1pr-MAL61[D46G,L50H]</i>
HH229	<i>identical to JH1032 except for ura3::URA3-TPI1pr-MAL61[S43A]</i>
HH230	<i>identical to JH1032 except for ura3::URA3-TPI1pr-MAL61[S48A]</i>
HH231	<i>identical to JH1032 except for ura3::URA3-TPI1pr-MAL61[S43A,S48A]</i>
HH109	<i>identical to JH1032 except for ura3::URA3-TPI1pr-AGT1-2HA</i>
HH042	<i>identical to JH1032 except for ura3::URA3-TPI1pr-SeAGT1-2HA</i>
HH043	<i>identical to JH1032 except for ura3::URA3-TPI1pr-MAL61-2HA</i>
HH044	<i>identical to JH1032 except for ura3::URA3-TPI1pr-MAL21-2HA</i>
HH081	<i>identical to JH1032 except for ura3::URA3-TPI1pr-MAL61[E161A]</i>
HH082	<i>identical to JH1032 except for ura3::URA3-TPI1pr-AGT1-2HA [E167A]</i>
HH623	<i>identical to JH1032 except for ura3::URA3-TPI1pr-MAL21[E161A]</i>
HH615	<i>identical to JH1032 except for ura3::URA3-TPI1pr-AGT1-2HA[E51G, L55H]</i>
HH616	<i>identical to JH1032 except for ura3::URA3-TPI1pr-AGT1-2HA[E167A]</i>
HH617	<i>identical to JH1032 except for ura3::URA3-TPI1pr-AGT1-2HA[E51P]</i>
HH618	<i>identical to JH1032 except for ura3::URA3-TPI1pr-MAM</i>
HH619	<i>identical to JH1032 except for ura3::URA3-TPI1pr-AGT1-2HA[L55P]</i>
HH621	<i>identical to JH1032 except for ura3::URA3-TPI1pr-AGT1-2HA[L55P, E167A]</i>
HH110	<i>identical to JH1032 except for ura3::URA3-TPI1pr-AGT1R-2HA</i>
HH083	<i>identical to JH1032 except for ura3::URA3-TPI1pr-AGT1R-2HA [E167A]</i>
HH043	<i>identical to JH1032 except for ura3::URA3-TPI1pr-MAL61-2HA</i>
HH044	<i>identical to JH1032 except for ura3::URA3-TPI1pr-MAL21-2HA</i>
HH211	<i>identical to JH1032 except for ura3::URA3-TPI1pr-MTT1D46G</i>
HH212	<i>identical to JH1032 except for ura3::URA3-TPI1pr-MN6C</i>
HH213	<i>identical to JH1032 except for ura3::URA3-TPI1pr-MNN6C</i>
HH214	<i>identical to JH1032 except for ura3::URA3-TPI1pr-6NMC</i>
HH215	<i>identical to JH1032 except for ura3::URA3-TPI1pr-6NNMC</i>
<i>E. coli</i>	
DH5α	<i>F<sup>-</sup>, Φ80d lacZΔM15, Δ(lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(rK-mK+), phoA, supE44, λ<sup>-</sup>, thi-1, gyrA96, relA1</i>
BL21(DE3)	<i>F<sup>-</sup>, ompT, hsdSB(rB<sup>-</sup> mB<sup>-</sup>), gal(λcI 857, ind1, Sam7, nin5, lacUV5-T7gene1), dcm(DE3) (B株由来)</i>



### 3.2.2 使用プラスミドの構築と各種トランスポーター遺伝子、および変異型遺伝子の取得

PCR に用いた全てのプライマーは表 3-2 に示した。各トランスポーターの YCp 型発現ベクター、pJHMAL21, pJHMAL31, pJHMAL61, pJHAGT1, pJHSeAGT1, pJHMTT1 は 2.2.2 と同様に調製した。pJHAGT1R は Dr. Jorgen Hansen から提供を受けた。これらから *FseI* によって CEN-ARS を取り除くことによって、YIp 型の発現ベクター pJHIMAL21, pJHIMAL31, pJHIMAL61, pJHIAGT1, pJHISeAGT1, pJHIMTT1, pJHIAGT1R を構築した。オリゴヌクレオチド 1+2 (for *MAL61*)、3+4 (for *MAL21*)、5+6 (for *AGT1*)、7+8 (for *SeAGT1*) を用い、ExSite™ PCR-based site-directed mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA) を使って、pJHMAL21, pJHMAL61, pJHAGT1, pJHSeAGT1, pJHAGT1R のストップコドン直前に *XhoI* 部位を作った。作出した *XhoI* 部位にはヘマトアグルチニンをタンデムに 2 つ並べたタンパク質をコードするオリゴヌクレオチド 9+10 を挿入した。*AGT1* と *MAL21* のハイブリッドトランスポーター (AAM, AMM, AMA, MAA, MMA, MAM) 遺伝子は次のように作製した。オリゴヌクレオチド 11+12, 15+16 (*MAL21*)、13+14, 17+18 (*AGT1*) を用いて、pJHMAL21 と pJHAGT1 のトランスポーター遺伝子 ORF 中に *SaI* 切断部位 (*MAL21* では 318 bp、*AGT1* では 339 bp) と *KpnI* 切断部位 (*MAL21* では 1696 bp、*AGT1* では 1714 bp) を作製した。続いて pJHAGT1 と pJHMAL21 とを *SaI* と *KpnI* で組換えることで、N 末部分、中央部分、C 末部分がそれぞれ *AGT1* あるいは *MAL21* 由来のハイブリッドトランスポーター遺伝子全 6 種 (MMA, MAA, MAM, AMM, AAM, AMA) を構築した。ハイブリッドトランスポーター遺伝子の表記は N 末部分、中央部分、C 末部分がどちらから来たかを表している。例えば、MAM とは N 末と C 末が *MAL21* 由来で中央部が *AGT1* 由来であることを示す。変異型トランスポーター遺伝子 *MAL61*[D46G], *MAL61*[L50H], *MAL61*[S43A], *MAL61*[S48A], *MAL61*[S43A, S48A], *MAL61*[E161A], *MAL21*[E161A], *AGT1*-2HA[E167A], *AGT1*-2HA[E51P], *AGT1*-2HA[L55P], *AGT1*-2HA[L55P,E167A], *AGT1*-2HA[E51G,L55H], *AGT1*-2HA[L55P], *MTT1* [D46G] の発現プラスミドを作るためには、pJHMAL21, pJHMAL61, pJHAGT1, pJHMTT1 と表 3-2 に示した 19~45 のオリゴヌクレオチドをそれぞれ用い、ExSite™ PCR-based site-directed mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA) あるいは、GeneArt mutagenesis kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて構築した。変異体 *MAL61*[D4650H] は *MAL21* の N-末側の断片と *MAL61* の C-末側の断片を *Bgl* I で組換えて構築した。pYCGPY (図 3-1) は G418 耐性遺伝子と *PYK1p-t* を持つ、発現用セントロメア型プラスミドである (38)。

pYCGPY には pJHMAL61, pJHMAL21 から *MAL61* と *MAL21* を *SacI* と *Bam*HI で切り出して組換え、pYCGPYMAL61 と pYCGPYMAL21 を構築した。

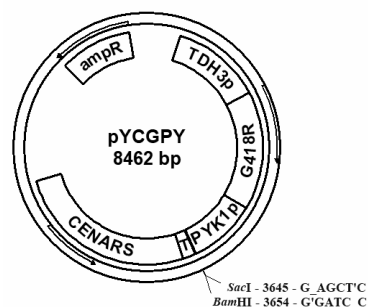


図 3-1 プラスミド pYCGPY

表 3-2 第 3 章で用いたプライマー

No.	Sequence	Note
1	5'-CTCGAGTTTGTTCACAACAGATGGGGTG-3'	creation of XhoI site in MAL61
2	5'-TGATTTTTTTAGCCAGTAGGTAG-3'	creation of XhoI site in MAL61
3	5'-CTCGAGTTTGTTCACAACAGATGAGGTG-3'	creation of XhoI site in MAL21
4	5'-TGATT TTTTAGCCAGTAGGTAG-3'	creation of XhoI site in MAL21
5	5'-CTCGAGACATTTATCAGCTGCATTTAATTC-3'	creation of XhoI site in AGT1
6	5'-TAAGTAAAAGGGTTGTTTTTTTTT-3'	creation of XhoI site in AGT1
7	5'-CTCGAGTAACGCCTGTGACTCGCGC-3'	creation of XhoI site in SeAGT1
8	5'-TGAACTAACGCGTATTTAAGAG-3'	creation of XhoI site in SeAGT1
9	TCGATTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTAGCTT GGGTGGTGTGATTACCCATACGATGTTCCAGATTA CGCTAGCTTGGGTGGTG	2HA tag
10	TCGACACCACCAAGCTAGCGTAATCTGGAACATCG TATGGGTAATCGACACCACCAAGCTAGCGTAATCT GGAACATCGTATGGGTAATCGACC	2HA tag
11	5'-TGTCGACACTAATAGTGACCAAG-3'	creation of SalI site in MAL21
12	5'-CTAATAGTGACCAAGCAGCAG-3'	creation of SalI site in MAL21
13	5'-TGTCGACTACCCTGGTTATG-3'	creation of SalI site in AGT1
14	5'-AGTCGACACTAATATGGACCA-3'	creation of SalI site in AGT1
15	5'-GGGTACCAGCAAGAAAGTTCAA-3'	creation of KpnI site in MAL21
16	5'-TGGTACCCCAAGTCTAAACAATT-3'	creation of KpnI site in MAL21
17	5'-GGGTACCTGCCAGAAAATTT-3'	creation of KpnI site in AGT1
18	5'-AGGTACCCCTTGTTGAAAA-3'	creation of KpnI site in AGT1
19	5'-GTCTTTCCCATCTTGAGTACGGTCC-3'	MAL61[D46G]
20	5'-CAAAATCACTTTTCTTACCTTGCTCCT-3'	MAL61[D46G], MTT1[D46G]
21	5'-ATGAGTACGGTCCAGGTTCACTAA-3'	MAL61[L50H]
22	5'-GATGGGAAAGATCAAAATCACTTTTC-3'	MAL61[L50H]
23	5'-GCTGATTTTGTATCTTTCCCATCTTGAG-3'	MAL61[S43A]
24	5'-TTTCTTACCTTGCTCCTCCATCAC-3'	MAL61[S43A]
25	5'-GCCCATCTTGAGTACGGTCCAGG-3'	MAL61[S48A]
26	5'-AAGATCAAAATCACTTTTCTTACCTTG-3'	MAL61[S48A]
27	5'-GCTGATTTTGTATCTTGCCCATCTTGAGT-3'	MAL61[S43A, S48A]
28	5'-TTTCTTACCTTGCTCCTCCATCAC-3'	MAL61[S43A, S48A]
29	5'-GCGTGAACGCTACCGAATTC AAC-3'	MAL61[E161A], MAL21[E161A],
30	5'-ATAGCACCTGCCATGTAGCATAG-3'	MAL61[E161A], MAL21[E161A],
31	5'-CATGGCAGGTGCTATTGTGCGGT-3'	MAL61[E161A]
32	5'-TTCCATACTCACTAGTAATTCTTT-3'	MAL61[E161A]
33	5'-CATGGCAGGTGCTATTGTGGGG-3'	MAL21[E161A]
34	5'-TTCCATAGTCACTAGTAATTCTTT-3'	MAL21[E161A]
35	5'-CGATGATTGGTTTGCAAATCAC-3'	AGT1-2HA[E165A]
36	5'-GCAAACCAATCATCGACCAC-3'	AGT1-2HA[E165A]
37	5'-GCTCTAGACTGAGCTCACATAG-3'	AGT1-2HA[E51P], AGT1-2HA[L55P], AGT1-2HA[E51G, L55H]
38	5'-TGGGTGGTCTAGCTCAAAGGC-3'	AGT1-2HA[L55P]
39	5'-TAAGTGGTCTAGTGGAAAGGCA-3'	AGT1-2HA[E51P]
40	5'-GAGCTAGACCACCCAGAGTTC-3'	AGT1-2HA[L55P],
41	5'-CCACTAGACCACTTAGAGTTCA-3'	AGT1-2HA[E51P]
42	5'-GGTCTAGACCACCATGAGTTCA-3'	AGT1-2HA[E51G, L55H]
43	5'-ATGGTGGTCTAGACCAAAGGCA-3'	AGT1-2HA[E51G, L55H]
44	5'-CATCATCACAGAGCTCTAGACT-3'	AGT1-2HA[E51P], AGT1-2HA[L55P], AGT1-2HA[E51G, L55H]
45	5'-GTCTTTCCCATCATGAGTACGG-3'	MTT1[D46G]

### 3.2.3 使用培地と培養

酵母細胞は YPD 培地 (1% yeast extract, 2% yeast peptone, 2% グルコース) あるいは YP0.5M 培地 (1% yeast extract, 2% yeast peptone, 0.5% マルトース) で培養した。

YNBM 培地あるいは YNBMt 培地 (6.7 g/l yeast nitrogen base medium without amino acids [Difco], 0.5% マルトース あるいは 0.5% マルトトリオース) はマルトースあるいは マルトトリオースの資化性を確認するために使用した。YNBM 培地あるいは YNBMt 培地に呼吸阻害剤アンチマイシンを 0.3  $\mu\text{g/ml}$  添加した培地も同目的に使用した。SCM 培地と SCMt 培地は 2% グルコース の代わりに 2% マルトースあるいは 2% マルトトリオースを添加することを除いて、(23) の通り調製した。YNBMH 培地は 0.5% マルトース の代わりに 2% マルトースを添加することを除いて、YNBM と同様に調製した。0~2 mM の 2-deoxyglucose (2-DOG) を添加した YNBMH 培地あるいは SCM 培地は 2-DOG に対する耐性を調べるために用いた。YNBDS 培地 (1.7 g/l yeast nitrogen base medium without amino acids and ammonia sulfate [Difco], 2% グルコース, 25  $\mu\text{g/ml}$  シクロヘキシミド [39]) はトランスポーター分解速度を調べるために用いた。G418 薬剤耐性遺伝子を持つプラスミドを導入した実験室株およびラガー酵母株の培養には、各培地に 300  $\mu\text{g/ml}$  あるいは 20  $\mu\text{g/ml}$  のジェネチシンをそれぞれ添加して用いた。Nat (nourseothricin) 薬剤耐性遺伝子を持つプラスミドを導入したラガー株の培養には、各培地に 10  $\mu\text{g/ml}$  の Nat を添加して用いた。いずれの培地もプレートにする時は 2%の寒天を加えた。温度感受性株 RH1597 は 25°C で培養し、制限温度下での実験では 37°C で、いずれも 120 rpm で振とう培養した。その他の全ての株は 30°C、120 rpm で振とう培養を行った。

大腸菌については、2,2,2 に示した培地を使用した。

### 3.2.4 マルトースあるいはマルトトリオース取り込み速度の測定

酵母細胞は YPD 培地で 30°C で一晩振とう培養し、その前培養液を YPM 培地に  $\text{OD}_{660}=1.0$  になるように植菌した。30°C で 2.5 h 振とう培養した後、細胞を集菌し 100 mM の酒石酸バッファー、pH4.5 で一度洗浄した。10 OD unit ( $\text{OD}_{660} \times \text{容量 ml} = \text{OD unit}$  とする) の細胞を 450  $\mu\text{l}$  の同バッファーに懸濁し、0.4  $\mu\text{Ci}$  の $^{14}\text{C}$ マルトース (Amersham) を 20  $\mu\text{l}$  加えたマルトース溶液、あるいは 0.4  $\mu\text{Ci}$  の $^{14}\text{C}$ マルトトリオース(American Radiolabeled Chemicals) を 20  $\mu\text{l}$  加えたマルトトリオース溶液を、細胞液に添加することで活性測定のスタートとした。マルトースとマルトトリオースの最終濃度は、共に 0.1, 1.0, 2.0, 10 mM になるようにした。スタートから 30 秒間隔で 150  $\mu\text{l}$  ずつサンプリングし、直ちに氷水 10 ml を加え、ガラスファイバーフィルターCG-50 (アドバンテック) でろ過し、氷水 10 ml で 3 回ろ過洗浄した。ガラスフィルターを Aquasol II (New England Nuclear) 3 ml に浸して、放射能活性を液体シンチレーションカウンター (Packard Tri-Carb 2000CA) で測定した。測定は  $n=2$  で行った。

### 3.2.5 部分タンパク質の大腸菌での発現とその精製

大腸菌を宿主として、GST-tag (グルタチオン S-トランスフェラーゼ) と Mal61p の N 末側の部分ペプチドが結合したタンパク質の高発現を試みた。Mal61p の Met1-Leu181 をコードする DNA フラグメントをプラスミド pET-41b (+) (Novagen) に導入した。目的の発現ベクターを大腸菌 DH5 $\alpha$  に導入して取得した後、発現用の大腸菌 BL21 (DE3) に導入した。形質転換体は、カナマイシンを加えた LB 培地にて、isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) の誘導によって部分トランスポーターペプチドを発現させた。培養した菌体を集菌し、50 mM Tris-HCl, pH8.0 に懸濁し、ソニケーションにより溶菌させた。遠心後細胞抽出液を GST・bind<sup>TM</sup> 樹脂カラムにかけて、結合タンパク質を精製した。Mal61p 部分タンパク質は、これを抗原タンパク質としてウサギに免疫して抗 Mal61p 血清を得た。

### 3.2.6 タンパク質電気泳動

3.3 ml (10% SDS-PAGE) あるいは 2.7 ml (8% SDS-PAGE) のモノマーストック溶液 (アクリルアミド 60.0 g と N,N'メチレンビスアクリルアミド 1.6 g を 200 ml の超純水に溶かしたもの) に 2.5 ml の分離ゲルバッファー (1.5 M Tris-HCl, pH8.8)、0.1 ml の 10% SDS、50  $\mu$ l の 10% 過硫酸アンモニウム溶液を加え、10 ml になるよう水を足して分離ゲルを調製する。続いて 0.8 ml のモノマーストック溶液に 1.25 ml の濃縮ゲルバッファー (0.5 M Tris-HCl, pH6.8)、0.05 ml の 10% SDS、25  $\mu$ l の 10% 過硫酸アンモニウム溶液、2.875 ml の超純水を混合して濃縮ゲルを調製する。ガラス版とスペーサーでゲルサンドウィッチを組み立て、分離ゲルに 5  $\mu$ l の TEMED (tetramethylethylenediamine) を混合しゲルサンドウィッチに流し入れ、続いて素早く超純水を重層した。1 h 以上固めた後、重層した水を取り除いた。濃縮ゲルに 2  $\mu$ l の TEMED を混合し、分離ゲルの上に重層し、コームを差し込んだ。1 h 後コームを取り除き、スラブ型泳動装置にゲルを取りつけた。サンプル (調製は 3.2.8 を参照) をロード後、泳動用バッファー (0.25 M Tris, 1.92 M グリシン, 1% SDS) を用いて、20 mA の定電流で電気泳動を行った。

### 3.2.7 ウェスタンブロットアナライシス

3.2.8 で得た細胞破砕液 10  $\mu$ l に 2  $\mu$ l のサンプルバッファー (0.35 M Tris-HCl pH6.8, 10% SDS, 30% グリセロール, 9.3% dithiothreitol) を加え、8% あるいは 10% SDS-PAGE (3.2.6 参照) にかけた。分離したタンパク質はセミドライタイプの電気ブロットティング装置で Hybond<sup>TM</sup> ECL<sup>TM</sup> ニトロセルロースフィルターにバッファー (25 mM Tris pH8.3, 192 mM グリシン, 20% v/v メタノール) を用いて、0.8 mA/cm<sup>2</sup> で 30 min トランスファーした。メンブレンを 5% のスキムミルクを含む PBS バッファー (50 mM Tris-HCl pH7.6, 150 mM NaCl) に 1 h 浸し、室温でブロッキングした。PBST (0.1% v/v Tween20 を含む PBS バッファー) で洗浄した後、PBST で 500 倍希釈したウサギ Mal61p 抗体、マウス抗 HA (ヘマトアグルチニン抗体 [MMS-101P, BAbCO])、

あるいはマウス抗 ユビキチン抗体 (MMS-258R, BAbCO) に浸し、1 h 室温で振とうした。PBST で 15 min ずつ、3 回洗浄した後、PBST で 3000 倍希釈した HRP 標識抗ウサギ抗体、あるいは HRP 標識抗マウス抗体に浸し、1 h 室温で振とうした。PBST で 15 min ずつ、3 回洗浄した後、ECL™ Western blotting analysis system (GE ヘスルケア) を用いて、一次抗体が結合したタンパク質を化学蛍光で検出した。タンパク質バンドの蛍光強度は、Chemi Doc XRS+ with Image Lab Software v.3.0 (BioRad) で定量した。

### 3.2.8 トランスポータータンパク質の分解速度の測定

各トランスポーター発現株を YPD で前培養した後、 $OD_{660}=1.0$  になるように YP0.5M に植菌して 30°C で 2.5 h 振とう培養した。 $OD_{660}$  を測定し 60 OD unit の細胞 ( $OD_{660} \times ml = 60$  にあたる細胞 [27]) を遠心で回収した。細胞を YNBDS 培地 (2% グルコース、25  $\mu g/ml$  シクロヘキシミド、1.7 g/l yeast nitrogen base w/o amino acids, ammonia) 6 ml に懸濁し 30°C でインキュベートした。各々のタンパク質に対して適当な時間 (0, 10, 20, 30, 40 あるいは 0, 30, 60, 90, 120 min など) に 1 ml ずつサンプリングし、直ちに遠心で集菌して上澄みを除き、液体窒素で凍結した。凍結した細胞は破碎用バッファー (40 mM Tris-HCl, pH 7.2, 8 M urea, 0.1 mM EDTA, 1% 2-メルカプトエタノール, 5% SDS) 300  $\mu l$  に懸濁してねじ口のマイクロチューブに移し、0.5 g のガラスビーズ (425-600  $\mu m$  [30-40 U.S. sieve] [Sigma]) を加えた後、ビーズビーダーにて振とう (3000 rpm, 1 min)、氷上にて 1 min 冷やすを 5 回繰り返すことで酵母細胞を破碎した。酵母破碎液は 37°C で 10 min 保温した後 9000 $\times g$  で 5 min 遠心後、上澄みをウエスタンブロッティングに供し、検出したバンドのインテンシティを相対的タンパク質量として半減期を計算した。半減期を決定するためには測定を 3 回繰り返した。

### 3.2.9 免疫沈降

3.2.8 章に記載した通り調製した 150  $\mu l$  の細胞抽出液を 1350  $\mu l$  の bovine serum albumin (BSA)-HS 溶液 (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, pH 7.6, 1% Nonidet® P-40, 0.1% BSA, 100  $\mu g/ml$  DNase, 50  $\mu g/ml$  RNase, protease inhibitor cocktail [Complete Mini®, Roche]) で希釈した。40  $\mu l$  の抗 Mal61p 抗体を加え、4°C で 2 h ゆっくりと攪拌した。免疫沈降した画分は、80  $\mu l$  の protein A-Sepharose 6MB 懸濁液 50% (v/v) (Pharmacia Biotech, Inc.) を加えてさらに 4 h インキュベートし、遠心 (8000 $\times g$ , 4°C, 2 min) した。集めた Sepharose beads は BSA-HS 溶液で 3 回、PBS (10 mM リン酸ナトリウムバッファー pH 7.2, 0.9% NaCl) で 3 回洗浄した。吸着したタンパク質はサンプルバッファー (0.1 M Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 12% 2-メルカプトエタノール, 20% グリセロール, 0.02% BPB) と室温で 10 min インキュベートすることによりビーズより外した。そのサンプルを SDS-PAGE (8%) で分離し、マウス抗 HA 抗体 (MMS-101P, BAbCO) あるいはマウス抗ユビキチン抗体 (MMS-258R, BAbCO) を用いて、3.2.7 章の通りウエス

ターンプロッティングを行った。

### 3.2.10 間接的蛍光顕微鏡観察

培養した細胞を半分に分け、YNBDS 培地にて 30°C、1 h 処理した細胞としない細胞を調製した。細胞はホルムアルデヒドを終濃度 3.7%に添加して固定した。次に細胞をソルビトール緩衝液 (1.2 M ソルビトール、100 mM リン酸カリウムバッファー、pH 6.5) に再懸濁し、 $\beta$ -メルカプトエタノールを 20 mM に、zymolyase 20T (キリン協和フーズ株式会社) を 12.5 mg/ml になるように加え、30°C で 30 min インキュベートして細胞壁を分解した。スフェロプラストは poly-L-lysine でコートしたガラススライドに固定し、PBT (53 mM リン酸ナトリウム, 4.3 mM リン酸ナトリウム, 75 mM NaCl, 1% BSA, 0.1% Triton X-100) で透過状態にした。1% BSA を添加した PBS (53 mM リン酸ナトリウム, 4.3 mM リン酸ナトリウム, 75 mM NaCl, 1% BSA) で 100 倍に希釈したウサギ抗 Mal61p 抗体と 2 h インキュベートした後、PBS で 500 倍に希釈した fluorescein isothiocyanate-conjugated goat anti-rabbit IgG (Southern Biotechnology Associates, Inc.) と 1 h インキュベートした。細胞はコンフォーカルスキャナーユニット (CSU-10 confocal scanner unit, Yokogawa) のついた顕微鏡 (Eclipse Ci, Nikon) で観察し、color chilled 3CCD カメラで撮影した。

## 3.3 結果

### 3.3.1 マルトーストランスポーター、Mal21p, Mal31p, Mal61p の比較

*S. cerevisiae* のマルトーストランスポーター、Mal31p, Mal61p は、アミノ酸レベルで 99%の identity があり、マルトースは取り込むがマルトリオースは取り込めないことがわかっている。Mal21p については Mal31p, Mal61p と基本的な性質が同じかどうか知られていない。図 3-2 に ATCC20598 より取得した *MAL21* の DNA 配列を示した。*MAL21* のプロモーターは、*MAL31* のプロモーター配列と完全に一致した。また *MAL61* のプロモーターと比べると 12 塩基の違いがあり、さらに 1 塩基の挿入があったが、MalX3p の結合領域は *MAL31*, *MAL61* と完全に一致しており、それらと同様にグルコースより抑制され、マルトースにより誘導されると考えられる。ORF の DNA 配列は *MAL61* と 98%の identity があった。異なる塩基は 31 bp あり、そのうち 21 bp は 483–541 bp の領域に集中していた。図 3-3 に Mal21p, Mal31p, Mal61p のアミノ酸配列を示した。Mal21p は Mal61p, Mal31p と 98%の identity があり、Mal61p とは 10 アミノ酸、Mal31p とは 9 アミノ酸の違いがあった。Mal31p と Mal61p とが共通で Mal21p と異なっていたのは、Gly46, His50, Leu167, Leu174, Val175, Thr328 の 6 つのアミノ酸だった。

```

1   CTGATTACGC CAGCTTGGTA CCGAGCTCGG ATCCACTAGT AACGGCCGCC AGTGTGCTGG AATTCGCCCT TCTGGATGAT
81  CAGAAATAGT CATTATGTA TTTTAGTTAC GCTTGACTGA TGTACATTTG AGATTATCAA AAAAACTGCT TAAGAGATAG
161 ATGTTTAAAT TTTTAGAGA CGTATTAATG GAACTTTTAA TACCTTGCCC AGAGCGCCTC AAGAAAATGA TGCTGAAAGA
241 AGAATTGAGG AAGGAACTAC TCATCTTACG TTGTTTGTAT CATCCCACGA TCCAAATCAT GTTACCTACG TTAGGTACGC
321 TAGGAACTAA AAAAAGAAAA GAAAAGTATG CGTTATCACT CTTCGAGCCA ATTCTTAATT GTGTGGGGTC CGCGAAAACT
401 TCCGGATAAA TCCTGTAAC TTAACCTTAA ACCCCGTGTT TAGCGAAATT TTCACGAAG CGCGCAATAA GGAGAAATAT
481 TATATAAAG CGAGAGTTTA AGCGAGGTTG CAAGAATCTC TACGGTACAG ATGCAACTTA CTATAGCCAA GGTCTATTTCG
561 TATTGGTATC CAAGCAGTGA AGCTACTCAG GGGAAAAAAT ATTTTCAGAG ATCAAAGTTA TGTCAGTCTC TTTTTCATGT
641 GTAACCTAAC GTTGTGTCAG GTATCATACC GGCCCTCTACA TAATTTTGTG GGGGAAGACG TTGTTGTAGC AGTCTCCTTA
721 TACTCTCCAA CAGGTGTTTA AAGACTTCTT CAGGCCTCAT AGTCTACATC TGGAGACAAC ATTAGATAGA AGTTTCCACA
801 GAGGCAGTT TCAATATACT TTCGGCTGTG TACATTTTAT CCTGAGTGAG CGCATATTGC ATAAGTACTC AGTATATAAA
881 GAGACACAAT ATACTCCATA CTTGTTGTGA GTGGTTTTAG CGTATTCAGT ATAACAATAA GAATTACATC CAAGACTATT
      M K G L S S L I N R K K D R N D S H L D E I E N
961 AATTAACAT GAAGGGATTA TCCTCATTAA TAAACAGAAA AAAAGACAGG AACGACTCAC ACTTAGATGA GATCGAGAAT
      G V N A T E F N S I E M E E Q G K K S D F G L S H H
1041 GGCCTGAACG CTACCGAATT CAACTCGATA GAGATGGAGG AGCAAGGTAA GAAAAGTGAT TTTGGTCTTT CCCATCATGA
      Y G P G S L I P N D N N E E V P D L L D E A M Q D A K
1121 GTACGGTCCA GGTTCACTAA TACCAAACGA TAATAATGAA GAAGTCCCGG ACCTTCTCGA TGAAGCTATG CAGGACGCCA
      E A D E S E R G M P L M T A L K T Y P K A A A W S L
1201 AAGAGGCAGA TGAAGTGAG AGGGGAATGC CACTCATGAC AGCTTTGAAG ACATATCCAA AAGCTGTGTC TTGGTCACTA
      L V S T T L I Q E G Y D T A I L G A F Y A L P V F Q K
1281 TTAGTTTCCA CAACATTGAT TCAAGAGGGT TATGACACAG CCATTCTAGG AGCTTTCTAT GCCCTGCCTG TTTTTCAAAA
      K Y G S L N S N T G D Y E I S V S W Q I G L C L C Y M
1361 AAAATAGGT TCTTTGAATA GCAATACAGG AGATTATGAA ATTTTCAGTTT CTTGGCAAAT CGGTCTATGT CTATGCTACA
      A G E I V G L Q L T G P S V D L V G N R Y T L I M A
1441 TGGCAGGTGA AATTGTGGGG CTACAGCTAA CGGGGCCCTC CGTGGATCTT GTTGGAATC GTTACACATT GATCATGGCG
      L F F L A A F I F I L Y F C K S L G M I A V G Q A L C
1521 TTGTTCTTTT TAGCGCTTTT CATTTTCATT CTGATTTTTT GCAAGAGTTT GGGTATGATT GCCGTGGGAC AGGCATTGTG
      G M P W G C F Q C L T V S Y A S E I C P L L L R Y L
1601 TGGTATGCCA TGGGGTTGTT TCCAATGTTT GACCGTTTCT TATGCTTCTG AAATTGTGCC TTTGGCCCTA AGATACTATT
      T T Y S N L C W T F G G Q L F A A G I M K N S Q N K Y
1681 TGACACTATA TTCTAATTTA TGTTGGAGCT TCGGTAACQ TTTTCGTGCT GGTATTATGA AAAATCCCA GAACAATAT
      A N S E L G Y K L P F A L Q W I W P L P L A V G I F F
1761 GCCAACTCAG AACTAGGATA TAAGTACCT TTTGCTTTCG AGTGGATCTG GCCCCTCCTT TTGGGGTAG GTATTTTTTT
      A P E S P W W L V K K G R I D Q A R R S L E R T L S G
1841 TGCACCAGAG TCTCCATGGT GGCTGGTTAA AAAAGGAAGG ATTGATCAAG CGAGGAGATC ACTTGAAAGA ACATTAAGTG
      K G P E K E L L V T M E L D K I K T T I E K E Q K M
1921 GTAAAGGACC CGAAGAAAGAA FTACTAGTGA CTATGGAAC TCGATAAAATC AAAACTACTA TAGAAAAGGA GCAGAAAATG
      S D E A G T Y W D C V K D G I N R R R R T R I A C L C W I
2001 TCTGATGAAG GAACTTACTG GGATTGTGTG AAAGATGGTA TTAACAGGAG AAGAACGAGA ATAGCTTGTG TATGTTGGAT
      G Q C S C G A S L I G Y S T Y F Y E K A G V S T D T A
2081 CGGTCAATGC TCCTGTGGTG CATCATTAAT TGTTTATTCA ACTTACTTTT ATGAAAAAGC TGGTGTAGC ACTGATACGG
      F T F S I I Q Y C L G I A A T F V S W W A S K Y C G
2161 CTTTTACTTT CAGTATTATC CAATATTGTC TTGGTATTGC TGCAACGTTT GTATCCTGGT GGGCTTCAAA ATATTGTGGC
      R F D L Y A F G L A F Q A I M F F I I G G L G C S D T
2241 AGATTTGACC TTTATGCTTT TGGGCTGGCT TTTCCAGGCTA TTATGTTCTT CATTATCGGT GGTTTAGGAT GTTCAGACAC
      H G A K M G S G A L L M V V A F F Y N L G I A P V V F
2321 TCATGGCGCT AAAATGGGTA GTGGTGTCT TCTAATGGTT GTCGCGTTCT TTTACAACCT CGGTATTGCA CCTGTGTTTT
      C L V S E M P S S R L R T K T I I L A R N A Y N V I
2401 TTTGCTTAGT GTCTGAAATG CCGTCTTCAA GGCTAAGAAC CAAAACAATT ATTTTGGCTC GTAATGCTTA CAATGTGATC
      Q V V V T V L I M Y Q L N S E K W N W G A K S G F F W
2481 CAAGTTGTAG TTACAGTTTT GATTATGTAC CAATTGAACT CAGAGAAATG GAATTGGGGT GCTAAATCAG GCTTTTTCTG
      G G F C L A T L A W A V V D L P E T A G R T F I E I N
2561 GGGAGGATTT TGTCTGGCCA CTTTAGCTTG GGCTGTTGTC GATTTACCAG AAACCGCTGG CAGGACTTTT ATTGAGATAA
      E L F R L G V P A R K F K S T K V D P F A A A K A A
2641 ATGAATTGTT TAGACTTGGT GTTCCAGCAA GAAAGTTCAA GTCGACTAAA GTCGACCCTT TTGCAGCTGC CAAAGCAGCA
      A A E I N V K D P K E D L E T S V V D E G R N T S S V
2721 GCTGCAGAAA TTAATGTTAA AGATCCGAAG GAAGATTGG AAACCTCTGT GGTAGATGAA GGGCGAAACA CCTCATCTGT
      V N K *
2801 TGTGAACAAA TGA

```

図 3-2 *MAL21* の DNA 配列

		1		70
MAL21p	(1)	MKGLSSLINRKKDRNDSHLDEIENGVNATEFNSIEMEEQGKKSDFDLSHHEYGPGSLIPNDNNEEVPDLL		
MAL31p	(1)	MKGLSSLINRKKDRNDSHLDEIENGVNATEFNSIEMEEQGKKSDFDLSHLEYGPGSLIPNDNNEEVPDLL		
MAL61p	(1)	MKGLSSLINRKKDRNDSHLDEIENGVNATEFNSIEMEEQGKKSDFDLSHLEYGPGSLIPNDNNEEVPDLL		
		71		140
MAL21p	(71)	DEAMQDAKEADESERGMPLMTALKTYPKAAAWSLLVSTTLIQEGYDTAILGAFYALPVFQKKYGSLSNSNT		
MAL31p	(71)	DEAMQDAKEADESERGMPLMTALKTYPKAAAWSLLVSTTLIQEGYDTAILGAFYALPVFQKKYGSLSNSNT		
MAL61p	(71)	DEAMQDAKEADESERGMPLMTALKTYPKAAAWSLLVSTTLIQEGYDTAILGAFYALPVFQKKYGSLSNSNT		
		141		210
MAL21p	(141)	GDYISVSWQIGLCLCYMAGEIVGLQITGPSVDLVGNRYTLIMALFFLAAFI FIFYFC KSLGMI AVGQAL		
MAL31p	(141)	GDYISVSWQIGLCLCYMAGEIVGLQITGPSVDLVGNRYTLIMALFFLAAFI FIFYFC KSLGMI AVGQAL		
MAL61p	(141)	GDYISVSWQIGLCLCYMAGEIVGLQITGPSVDLVGNRYTLIMALFFLAAFI FIFYFC KSLGMI AVGQAL		
		211		280
MAL21p	(211)	CGMPWGCFCQLTVSYASEICPLALRYLLTYSNLCWTFGQLFAAGIMKNSQNKYANSELGYKLPFALQWI		
MAL31p	(211)	CGMPWGCFCQLTVSYASEICPLALRYLLTYSNLCWTFGQLFAAGIMKNSQNKYANSELGYKLPFALQWI		
MAL61p	(211)	CGMPWGCFCQLTVSYASEICPLALRYLLTYSNLCWTFGQLFAAGIMKNSQNKYANSELGYKLPFALQWI		
		281		350
MAL21p	(281)	WPLPLAVGIF FAPESPWWLVKKGRIDQARRSLERILSGKYPEKELLVSMELDKIKITIEKEQMSDEGTY		
MAL31p	(281)	WPLPLAVGIF FAPESPWWLVKKGRIDQARRSLERILSGKYPEKELLVSMELDKIKITIEKEQMSDEGTY		
MAL61p	(281)	WPLPLAVGIF FAPESPWWLVKKGRIDQARRSLERILSGKYPEKELLVSMELDKIKITIEKEQMSDEGTY		
		351		420
MAL21p	(351)	WDCVKDGINRRRTRIACLCWIGQCSCGASLIGYSTYFYEKAGVSTDTAFTFSIIQYCLGIAATFVSWWAS		
MAL31p	(351)	WDCVKDGINRRRTRIACLCWIGQCSCGASLIGYSTYFYEKAGVSTDTAFTFSIIQYCLGIAATFVSWWAS		
MAL61p	(351)	WDCVKDGINRRRTRIACLCWIGQCSCGASLIGYSTYFYEKAGVSTDTAFTFSIIQYCLGIAATFVSWWAS		
		421		490
MAL21p	(421)	KYCGRFDLYAFGLAFQAIMFFIIGGLGCS DTHGARMSGALLMVVAFYFYNLGIAPVVFCLVSEMPSSRLR		
MAL31p	(421)	KYCGRFDLYAFGLAFQAIMFFIIGGLGCS DTHGARMSGALLMVVAFYFYNLGIAPVVFCLVSEMPSSRLR		
MAL61p	(421)	KYCGRFDLYAFGLAFQAIMFFIIGGLGCS DTHGARMSGALLMVVAFYFYNLGIAPVVFCLVSEMPSSRLR		
		491		560
MAL21p	(491)	TKTIILARNAYNVIQVVTVLIMYQLNSEKWNWGA KSGFFWGGFCLATLAWAVVDLPE TAGRTFIEINEL		
MAL31p	(491)	TKTIILARNAYNVIQVVTVLIMYQLNSEKWNWGA KSGFFWGGFCLATLAWAVVDLPE TAGRTFIEINEL		
MAL61p	(491)	TKTIILARNAYNVIQVVTVLIMYQLNSEKWNWGA KSGFFWGGFCLATLAWAVVDLPE TAGRTFIEINEL		
		561		615
MAL21p	(561)	FRLGVPARKFKSTKVDPFAAAKAAAAEINVKDPKEDLETSVVDEGRNTSSVVNK-		
MAL31p	(561)	FRLGVPARKFKSTKVDPFAAAKAAAAEINVKDPKEDLETSVVDEGRNTSSVVNK-		
MAL61p	(561)	FRLGVPARKFKSTKVDPFAAAKAAAAEINVKDPKEDLETSVVDEGRSTPSVVNK-		

図 3-3 Mal21p, Mal31p, Mal61p アミノ酸アライメント

黒：同一のアミノ酸、緑：類似なアミノ酸、赤：異なるアミノ酸、青：ブロックで類似なアミノ酸

### 3.3.2 ラガー酵母の SeAgt1p, Mtt1p と実験室酵母の Agt1p, Mal61p, Mal31p, Mal21p の取り込み活性の比較

YP0.5M で 2.5 h 培養した HH208 (pJHIXSB), HH205 (*SeAGT1*), HH228 (*AGT1*), HH196 (*MTT1*), HH108 (*MAL61*), HH227 (*MAL31*), HH206 (*MAL21*) の細胞、10 OD unit を用いて、0.1 mM と 1.0 mM の<sup>14</sup>C-マルトースあるいは<sup>14</sup>C-マルトリオースを基質とした時の取り込み活性を測定した。その結果を表 3-3 に示した。いずれのトランスポーターについても基質 1.0 mM での活性は 0.1 mM の場合の 7~8 倍であったので、各々 Vm 値は基質 1.0 mM での取り込み速度より高いと予想される。Agt1p のマルトース取り込み速度は Mal61p の約 1/5、SeAgt1p は約 1/10 と低いことが分かった。また、Agt1p と SeAgt1p のマルトリオースの取り込み速度はマルトース取り込み速度の約 1/3~1/2 であることがわかった。



表 3-3 各 $\alpha$ -グルコシドトランスポーター発現株の取り込み活性

$\alpha$ -glucoside transporters	Sugar uptake rate (nmol/min/10 OD unit)			
	0.1 mM Maltose	1.0 mM Maltose	0.1 mM Maltotriose	1.0 mM Maltotriose
Mal61p	3.74 $\pm$ 0.09	33.3 $\pm$ 3.5	n.d.	n.d.
Mal21p	7.51 $\pm$ 0.40	66.0 $\pm$ 7.0	n.d.	n.d.
Mal31p	3.79 $\pm$ 0.04	33.3 $\pm$ 3.5	n.d.	n.d.
Agt1p	0.66 $\pm$ 0.01	6.30 $\pm$ 0.1	0.20 $\pm$ 0.01	1.89 $\pm$ 0.03
SeAgt1p	0.33 $\pm$ 0.05	2.62 $\pm$ 0.19	0.08 $\pm$ 0.01	0.99 $\pm$ 0.01
Mtt1p	0.84 $\pm$ 0.04	7.51 $\pm$ 0.50	1.40 $\pm$ 0.06	13.2 $\pm$ 0.44

次に *MTT1* 発現株 HH196 と HH227 (*MAL31*), HH228 (*AGT1*) を YPM で 2.5 h 培養後、0.1 mM, 1.0 mM, 10 mM のマルトース、マルトトリオースを基質として、取り込み活性を測定した。図 3-4 に結果を示す。Mtt1p は Agt1p と比べるとどちらの基質に対して $\alpha$ -も活性が高かった。また Agt1p はマルトースの方がマルトトリオースよりも活性が高いのに対し、Mtt1p はマルトトリオースの方が活性が高かった。ラガー酵母は通常 10~15°C の

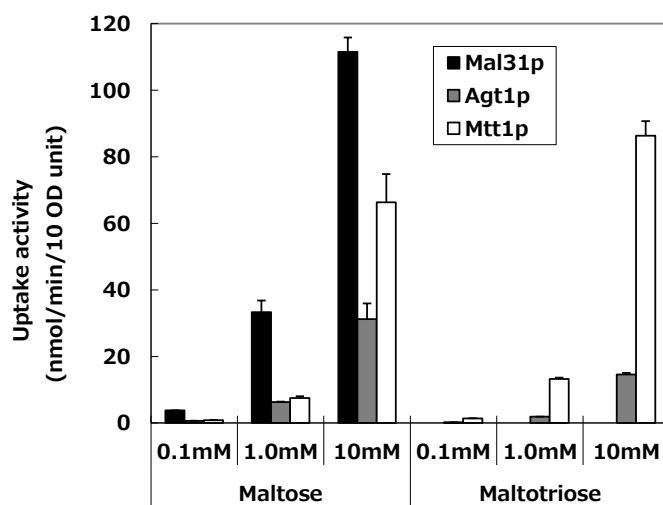


図 3-4 Mal31p, Agt1p, Mtt1p 発現株の取り込み活性

低温で発酵を行う。Mtt1p は Agt1p に比べて、低温でも活性が高い可能性があると考え、各糖を単独炭素源とする培地での生育を温度を変えて調べた。その結果、28°C では HH228 (*AGT1*) と HH196 (*MTT1*) はマルトトリオースに同じように生育したが、15°C では、HH196 (*MTT1*) の方が明らかに良く増殖した (図 3-5)。また、30°C と 12°C とで取り込み活性を測定したところ、Agt1p や、Mal31p よりも Mtt1p は 12°C での活性の低下が小さかった (図 3-6)。Mtt1p は Agt1p より取り込み活性が高く、低温でも活性が下がりにくいこ

とから、ラガービールの醸造条件では *Mtt1p* を持つ方が *Agt1p* を持つよりも有利である。そのため *Agt1p* に変異が入り機能を失った株が選択されてきた可能性がある。

次に *pJHXS*B, *pJHSeAGT1*, *pJHAGT1*, *pJHMAL61* により JH1032 株を形質転換した。各株を YPD で前培養した後、YP0.5M 培地に OD<sub>660</sub>=1.0 になるように植菌し、30°C,

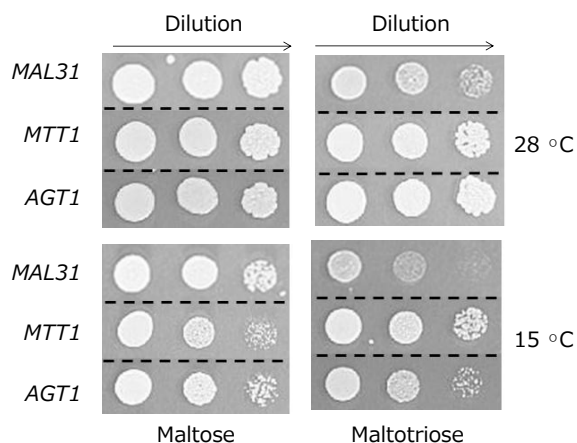


図 3-5 *MTT1* 発現株の低温での生育  
Dilution rate: 1, 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>

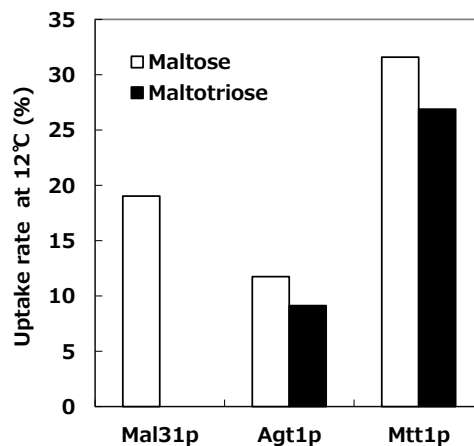


図 3-6 各 α-グルコシドトランスポーター発現株の 30°C と 12°C での取り込み活性の比較

各々の発現株の各々の基質での 30°C での活性をそれぞれ 100%とした。

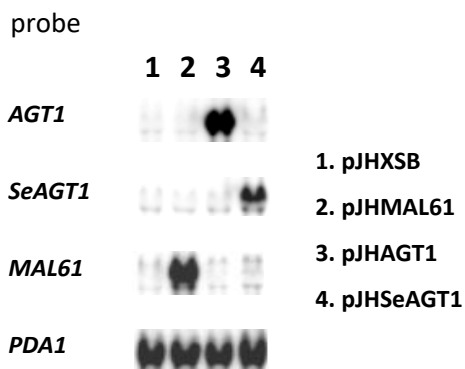


図 3-7 各 α-グルコシドトランスポーター発現株の遺伝子発現 (宿主: JH1032)

120 rpm で 2.5 h 振とう培養した後、各トランスポーター遺伝子発現量を、各トランスポーター遺伝子と *PDA1* 遺伝子のプローブを用いてノザンハイブリダイゼーションで確認した (図 3-7)。*PDA1* の発現量との比較して、*SeAGT1* は若干低めだが、各トランスポーター遺伝子は同程度発現していることを確認した。次に各タンパク質の発現量を調べるため、タンデムに 2 つのヘマトアグルチニンタグを各トランスポーター遺伝子の 3' 末側にインフレームで導入したベクター、*pJHSeAGT1-2HA*, *pJHAGT1-2HA*, *pJHMAL61-2HA* を構築し、JH1032 に導入した。これらの株を遺伝子発現解析と同様の条件で培養した。10 OD unit の培養細胞よりタンパク質抽出液を調製し、マウス抗 HA 抗体 (MMS-101P, BAbCO) を

一次抗体として、ウェスタンブロッティングを行った (図 3-8)。トランスポーター分子量は、それぞれ SeAgt1-2HAp: 71354 Agt1-2HAp: 71676 Mal61-2HAp: 71922 であり、矢印で示した最も濃く検出されたバンドがそれぞれ全長のトランスポータータンパク質の

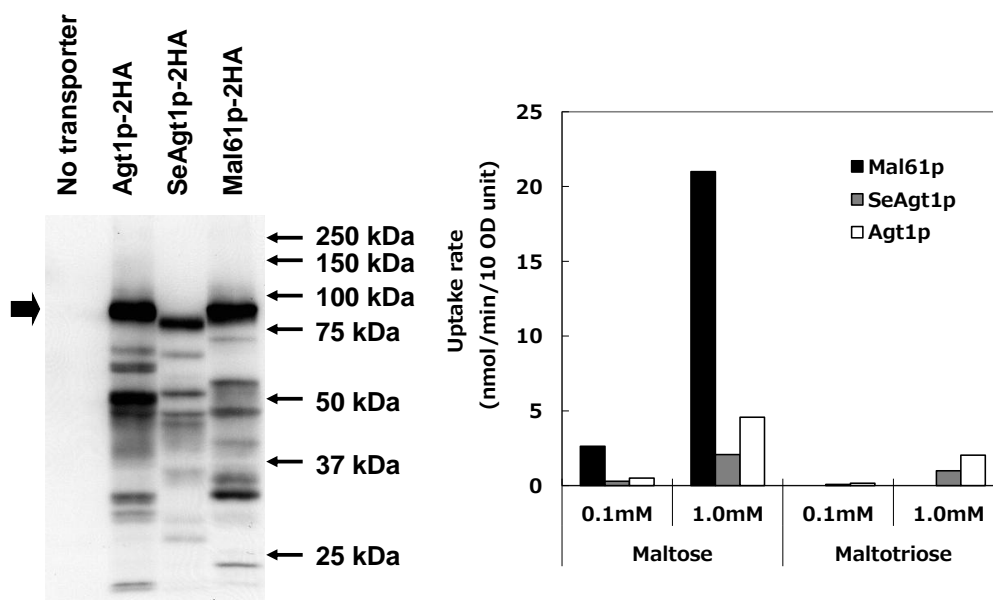


図 3-8 各 $\alpha$ -グルコシドトランスポーター発現株のタンパク質発現量と取り込み活性の比較 (宿主: JH1032)

表 3-4 各 $\alpha$ -トランスポーター発現株の比活性 (%)

	Maltose		Maltotriose	
	0.1 mM	1.0 mM	0.1 mM	1.0 mM
Mal61p	100.0	100.0	0.0	0.0
SeAgt1p	21.8	19.6	6.0	9.3
Agt1p	23.7	26.7	7.4	11.9

Mal61p 発現株の各濃度でのマルトース取り込み活性とタンパク質発現量 (インテンシティー) から計算した比活性を 100% とした。

分子量と一致した。各トランスポーターのレーンには数本のみより分子量の小さいバンドが検出された。negative control である空ベクターの形質転換株には何のバンドも検出されなかったことから、これらの低分子のバンドは各トランスポーターの HA タグを含んだ分解物であると考えられた。細胞膜上に発現したトランスポータータンパク質 (Mal61p や Mal31p) は外環境に応じて、特にグルコース存在下においてはエンドサイトーシスによって取り込まれ、液胞に運ばれた後、速やかに分解されることが知られている (40)。検出された分解物のパターンは各々のトランスポーターによって異なっており、液胞のプロテア

一ゼによって切断される部位は各々のトランスポータータンパク質によって異なる事が予想された。ウエスタンブロッティングで検出された全長のトランスポータータンパク質のインテンシティーを Image Lab ソフトウェアにより測定した。その値をタンパク質量の相対値として、タンパク質当たりの比活性を計算した (表 3-4)。その結果 SeAgt1p は実験室株ではタンパク質発現量が Agt1p に比べ低い、SeAgt1p のタンパク質当たりの取り込み活性は Agt1p とほぼ同じであった。

### 3.3.3 Mal21p と Mal61p マルトース取り込み比活性の比較

表 3-3 に示したように Mal21p は Mal31p や Mal61p よりも活性が高い。Mal21p は非活性が高いのかどうかを知らべるために、マルトーストランスポーターのタンパク質発現

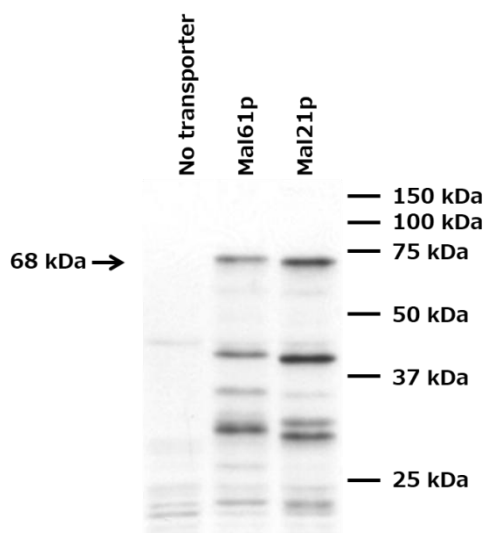


図 3-9 Mal61p と Mal21p のタンパク質発現量比較 (宿主: JH1032)

量を調べる事にした。そのために Mal61p の Met1-Leu181 からなる部分ペプチドを抗原として取得した抗体を用いて、Mal21p と Mal61p のタンパク質発現量をウエスタンブロッティングで調べた (図 3-9)。HH206 (*MAL21*) と HH108 (*MAL61*) とどちらのレーンにも全長の 68 kDa のバンドが検出され、それが最も分子量の大きなバンドであった。加えて数本の低分子のバンドも検出された。これらはマルトーストランスポーターの N 末端部分を含む分解物だと考えられた。一方 HH208 (pJHIXSB) のレーンには、マイナーな低分子のバンドが数本見られるが、68 kDa のバンドは見られなかったことから、取得した血清を用いて Mal61p を特異的に検出できることが確かめられた。バンドのインテンシティーより相対的なタンパク質量を決定し、表 3-3 に示し

表 3-5 Mal61p と Mal21p の比活性

Transporter	Maltose uptake rate (nmol/min/10 OD unit)	Relative protein expression (%)	Relative activity (%)
Mal21p	7.51 ± 0.28	100	100
Mal61p	3.74 ± 0.06	67.5 ± 3.15	73.8

Relative protein expression: Mal21p のウエスタンブロッティングのインテンシティーを 100%とした。

Relative activity: Mal21p のタンパク質 (インテンシティー) 当たりの取り込み活性を 100%とした。

た取り込み活性を元に非活性を計算した (表 3-5)。Mal61p の比活性は Mal21p の 73.8%で、タンパク質量の比とほぼ一致した。従って Mal21p 発現株が高活性なのは、おもに細胞膜に局在しているタンパク質量が多いためだと考えられた。

### 3.3.4 マルトーストランスポーターのグルコース存在下での分解速度

マルトーストランスポーターは遺伝子発現レベルの制御だけでなく、翻訳後制御を受けることが知られている (17)。すなわち、細胞膜に局在した後でも、外界にグルコースが添加されるとリン酸化に続くユビキチン化の修飾を受けた後、エンドサイトーシスによって細胞質内へ取り込まれ、液胞に運ばれて分解される (18)。Mal21p のタンパク質発現量が Mal61p よりも多い理由として、グルコース存在下、あるいはグルコース非存在下でのトランスポーター分解速度が遅い可能性が考えられる。グルコースアナログである 2-デオキシグルコース (2-DOG) は 2-デオキシグルコース-6-リン酸以上には代謝されないため、炭素源とはなりえないが、グルコースと同様にグルコース誘導性のマルトーストランスポータータンパク質の分解を起こすことが知られている (41)。そこで、異なる濃度の 2-DOG を含むマルトースを炭素源とする培地、YNBMH (2% マルトース, 6.7 g/l イーストニトロゲ

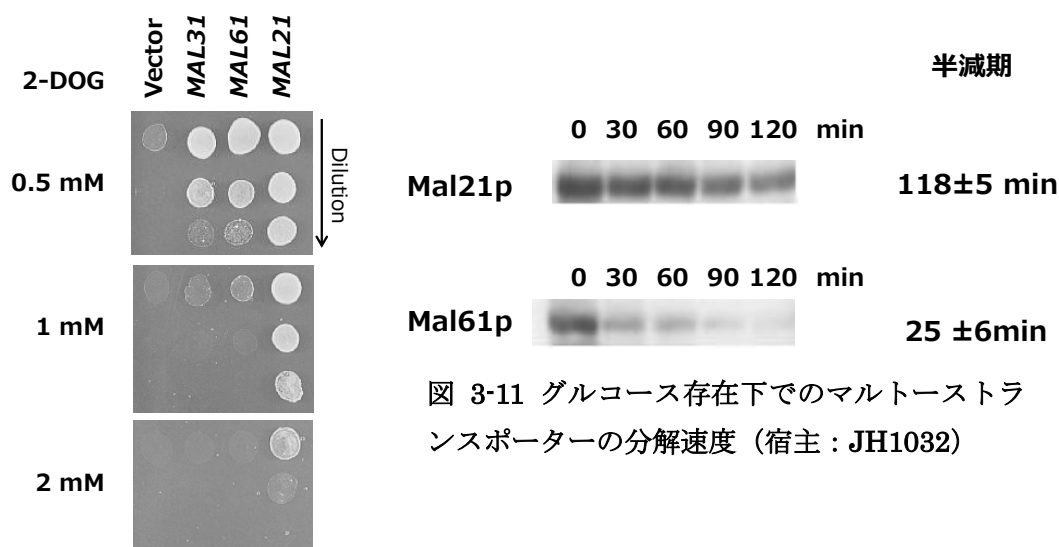


図 3-11 グルコース存在下でのマルトーストランスポーターの分解速度 (宿主: JH1032)

図 3-10 マルトーストランスポーター発現株の 2-DOG プレートでの生育

Dilution rate: 1, 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>

ンベース) 培地で、HH208 (pJHIXSB), HH206 (pJHIMAL21), HH227 (pJHIMAL31), HH108 (pJHIMAL61) の生育を調べた (図 3-10)。HH227 (pJHIMAL31) と HH108 (pJHIMAL61) は 0.5 mM の 2-DOG までしか生育できなかったが、HH206 (pJHIMAL21) は 2 mM でも生育し、グルコース誘導性分解を受けにくいことが推測された。YP0.5M で培養した HH206 (pJHIMAL21) と HH108 (pJHIMAL61) を用いて、グルコース存在下で

のマルトーストランスポーターの分解速度を調べた (図 3-11)。Mal61p と Mal21p の半減期はそれぞれ  $25 \pm 6$  min と  $118 \pm 5$  min で、Mal21p は Mal61p に比べはるかに分解しにくいことがわかった。次に *MAL21* と *MAL61* を YCp 型ベクターである pYCGPY の *PYK1p* の下流に挿入し pYCGPYMAL21 と pYCGPYMAL61 を得た。これらのプラスミドを D152 株に形質転換した。これらの株を用いて、同様にマルトーストランスポーターの分解速度を調べたところ、Mal61p と Mal21p の半減期はそれぞれ  $35 \pm 2$  min と  $113 \pm 3$  min で、JH1032 株での結果とほぼ一緒であった。D152 を宿主とするこれらの株を用いて、グルコースで 1 h 処理する前後で、マルトースの取り込み活性を調べたところ、Mal61p は  $12 \pm 3\%$  までグルコースでの処理後に活性が落ちたのに対し、Mal21p は  $57 \pm 2\%$  までしか活性は落ちなかった。Medintz *et.al* は Mal61p はタンパク質の分解速度よりも、失活速度の方が早いと報告しており、タンパク質が全長で残っているとしても、取り込み活性が低下している可能性があった (42)。しかし、Mal21p は全長のタンパク質として残っているだけでなく、Mal61p に比べて活性もはるかに保持した状態であることがわかった。

### 3.3.5 $\alpha$ -グルコシドトランスポーターのグルコース存在下での分解速度

3.3.4 に示したように Mal21p は Mal31p や Mal61 と異なり、グルコース存在下での半減期が非常に長いことがわかった。これまで  $\alpha$ -グルコシドトランスポーターについては、グルコース誘導性分解についての報告がない。そこで  $\alpha$ -グルコシドトランスポーターのグルコース存在下での分解速度を Mal61p と比較することにした。3.4.2 章で用いた 2-DOG を含む YNBMH (2% マルトース, 6.7 g/l イーストニトロゲンベース) 培地に、JH1032 を宿主

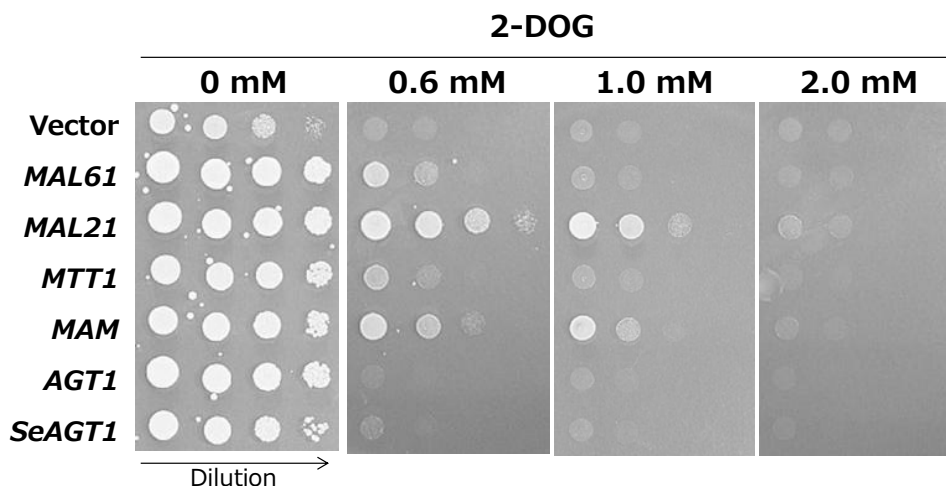


図 3-12 各  $\alpha$ -グルコシドトランスポーター発現株の 2-DOG 耐性(宿主:JH1032)

Dilution rate: 1,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$

とし、pJHXSBB をベクターとした各トランスポーター (SeAgt1p, Agt1p, Mtt1p, Mal21p, Mal61p) 発現株をスポットして生育を調べた (図 3-12)。その結果 Mal61p は 0.6 mM の 2-デオキシグルコースに生育したが、SeAgt1p と Agt1p は生育できなかった。一方、Mtt1p

は Mal61p と同程度に 0.6 mM の 2-デオキシグルコースに生育した。従って、SeAgt1p と Agt1p はグルコース存在下で非常に分解されやすく Mtt1p は両者に比べると分解されにくいと推測された。

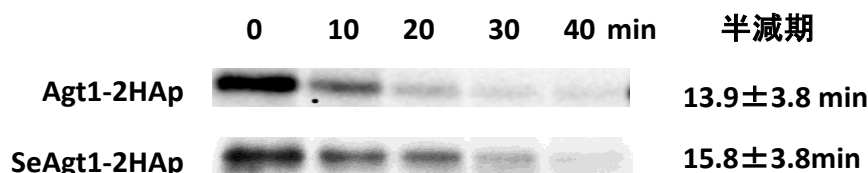


図 3-13 各  $\alpha$ -グルコシドトランスポーターのグルコース存在下での半減期  
(宿主 : JH1032)

$\alpha$ -グルコシドトランスポーターを検出するために、各トランスポーターC 末に HA-tag を付加した Agt1p と SeAgt1p の発現株を構築した。Mtt1p についても同様に HA-tag を付加した Mtt1-2HAp の発現株を構築したが、その発現株はマルトースあるいはマルトトリオースを単独炭素源とする最少培地で生育せず、HA-tag の付加によって Mtt1p は機能を失うことがわかった。そのため Mtt1p-2HA は天然型の性質と異なると考え、分解速度の測定をしなかった。Agt1p-2HA, SeAgt1p-2HA の発現株、HH109 と HH042 を用いて、前章同様にウエスタンブロッティングに供した (図 3-13)。得られた全長のトランスポータータンパク質のバンドのインテンシティから半減期を計算したところ、Agt1p-2HA は  $13.9 \pm 3.8$  min、SeAgt1p-2HA は  $16.5 \pm 1.1$  min で、マルトーストランスポーター Mal31p, Mal61p に比べて分解されやすいことがわかった。Mtt1p については分解速度は測定できなかったが、2-DOG に対する耐性から判断すると、Mal31p や Mal61p と同程度と考えられた。

### 3.3.6 Agt1p と Mal21p のハイブリッドトランスポーターの作製とその性質

酵母がマルトースとマルトトリオースを両方を取り込めるトランスポーターを持つ事は、ビール醸造において重要である。また麦汁はグルコースも含むことから、グルコースが存在しても分解されにくいことは、ビール醸造において有利な性質ではないかと期待される。Mal21p はグルコース存在下でも分解されにくい性質を持つが、マルトトリオースは取り込めない。一方、Agt1p はマルトトリオースを取り込めるが、グルコース存在下での半減期は Mal21 に比べて極めて短い。そこで、グルコース存在下でも分解されにくく、マルトースとマルトトリオースの両糖を取り込めるトランスポーターを得るために、Mal21p と Agt1p のハイブリッドトランスポーターの作製を試みた。図 3-14 に Mal21p と Agt1p のアミノ酸アラインメントを示す。下線は Gadura *et al.* (9) と Han *et al.* (43) が Mal61p で予測した膜貫通領域である。TMHMM Server v. 2.0 による予測においても、Mal21p と Agt1p 共に 12 膜貫通領域があった。この膜貫通領域の Mal21p と Agt1p のアイデンティティは 60% であるが、細胞質側に位置する N 末と C 末のアイデンティティはそれぞれ、38%、35%

```

1 70
Agt1p (1) MKNIIISLVSKKKAASKNEDKNISESSRDIIVNQEVFNTEDFEEGKKSAPFLDHLEFTTNSAQLGDSDED
MAL21p (1) MKGLSSLINRK----KDRNDSHLEDEIENGVNATEFNSEIEMEEQGK-KSDFGLSHHEYGPGSLIPDNNEE
71 140
Agt1p (71) NENVINEMNATDDANEANSEKSMTLKQALLKYPKAAALWSILVSTTLVMEGYDTALLSALYALPVFQRFK
MAL21p (66) VPDLLDEA--MQDAKBADESERGMPLMTALKTYPKAAAWSLLVSTTLIQEGYDTAILGAFYALPVFQKKY
141 210
Agt1p (141) GTLNG-EGSYEITSQWQIGLNMCVLCGEMIGLQITTYMVEFMGNRYTMITALGLLTAYIFILYCKSLAM
MAL21p (134) GSLNSNTGDYEISVSQWQIGLCLCYMAGEIVGLQLTGPSVDLVGNRYTLIMALEFLAAAFIFILYFCKSLGM
211 280
Agt1p (210) IAVGQILSAIPWGCFOQLAVTYASEVCPLALRYMTSYSNICWLFQQIFASGIMKNSQENLGNSDLGYKL
MAL21p (204) IAVGQALCGMPWGCFOCLTVSYASEICPLALRYLTTYSNLCWTFGQLFAAGIMKNSQNKYANSELGYKL
281 350
Agt1p (280) PFALQWIWAPLMIGIFFAPESPWWLVKDRVAEARKSLSRILSGKGAEKDIQVDLTLKQIELTIEKERL
MAL21p (274) PFALQWIWPLPLAVGIFFFAPESPWWLVKGRIDQARRSLERTLSGKGPKEKELVVTMELDKIKTTIEKEQK
351 420
Agt1p (350) LASKSGSFNCFKGVNRRRLACLWVAQNSSGAVLLGYSTYFFERAGMATDKAFTFSLIQYCLGLAGT
MAL21p (344) MSDEGTYWDCVKDGINRRRTRIACLCWIGCCGASLIGYSTYFYEKAGVSTDTAFTFSIIQYCLGIAAT
421 490
Agt1p (420) LCSWVISGRVGRWTILTYGLAFQMVCLFIIGGMFGSGSSASNGAGLLLALSFFYNAGIHAVVYCVIAE
MAL21p (414) FVSWWASKYCGRFDLYAFGLAFQAIMFFIIGGLGCSDTHGAKMGSGLMVAFFYNLGIAPVVFCLVSE
491 560
Agt1p (490) IPSAELRRTKTIVLARICYNLMAVINAILTPLYMLNVSDWNWGAKTGLYWGGF TAVTLAWVIIDLPEPTGRT
MAL21p (484) MPSSRLRRTKTIILARNAYNVIQVVTVLIMYQLNSEKWNWGAKSGFFWGGFCLATLAWAVVDLPEPTAGRT
561 622
Agt1p (560) FSEINELFNQGVPAKFASTVVDVDFGKGG--TQHDSLADESISQSSSIKQRELNAADKC---
MAL21p (554) FIEINELFRLGVPARKFKSTKVDPFAAAKAAAAEINVKDPKEDLETSSVDEGRNTSSVVNK-

```

図 3-14 Mal21p と Agt1p のアミノ酸配列アライメント

黒: 同一のアミノ酸、緑: 類似なアミノ酸、赤: 異なるアミノ酸

と低かった。いくつかのアミノ酸トランスポーターの分解について、N 末や C 末の配列が影響を及ぼすことが報告されている (44,45)。そこで両者の N 末 (Mal21p の 1-107aa、あるいは Agt1p の 1-114aa)、C 末 (Mal21p の 565-614aa、あるいは Agt1p の 570-616aa) の細胞質ドメインを入れ替えた 6 つのハイブリッドトランスポーターを構築した (図 3-15)。これらのハイブリッドトランスポーターを YCp 型ベクター pJHXSb の *TPI1p*

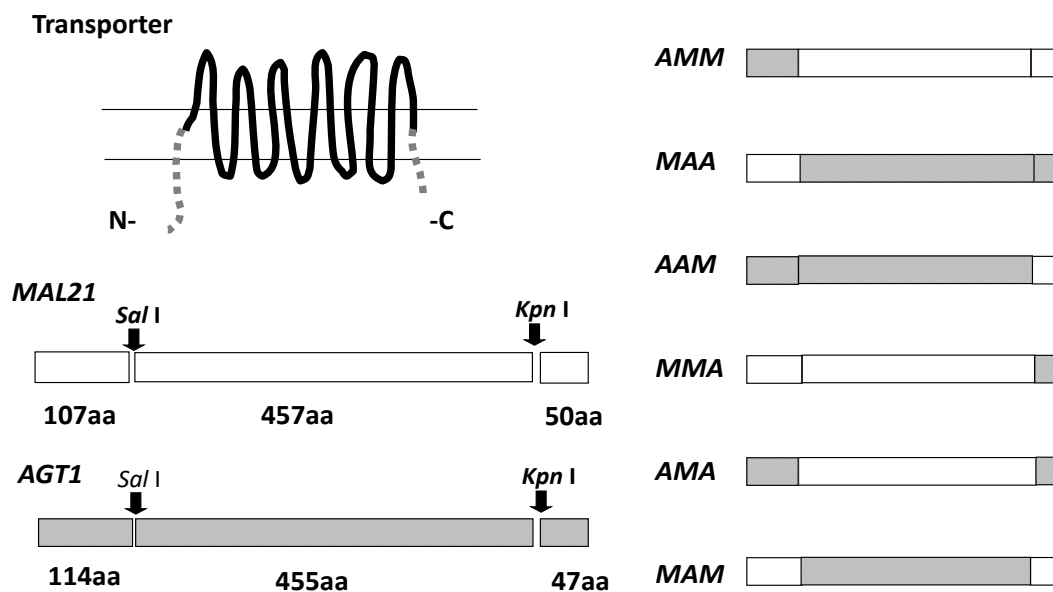


図 3-15 ハイブリッドトランスポーターの構築



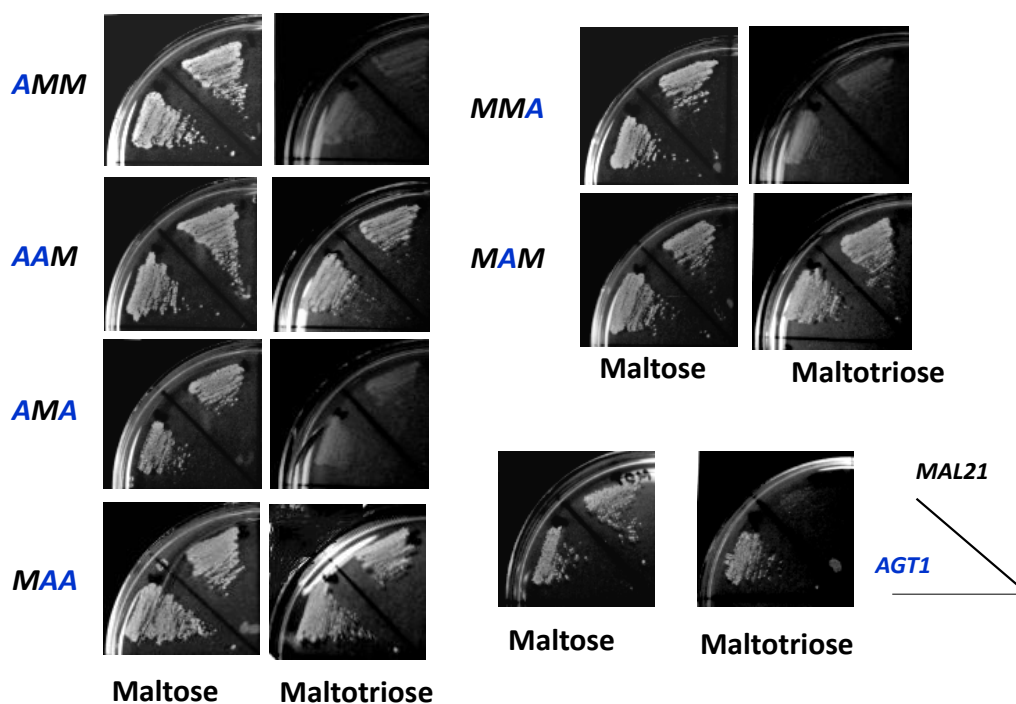


図 3-16 ハイブリッドトランスポーター発現株のマルトースとマルトトリオースでの生育

下流にある *Xba*I と *Bam*HI サイトに導入し pJHAAM, pJHAMM, pJHAMA, pJHMMA, pJHMAA, pJHMAM の 6 種を構築した。各プラスミドは JH1032 株に導入し、各形質転換株をマルトース、およびマルトトリオースを単独炭素源とする最少培地にストリークし生育を確認した (図 3-16)。その結果、12 膜貫通領域が *Agt1p* 由来であるハイブリッドトランスポーターはマルトトリオースとマルトースの両培地に生育したが、12 膜貫通領域が *Mal21p* 由来であるものは生育しなかった。次に各ハイブリッドトランスポーター発現株の 2DOG 耐性を調べたところ、N 末のドメインが *Mal21p* 由来の 3 つのハイブリッド *MMAp*, *MAAp*, *MAMp* は耐性が高く、特に *MAMp* の耐性が高いことがわかった (図 3-17)。マルトーストランスポーターの抗体は *Mal61p* の N 末 (*Met1* から *Leu181*) を抗原として得たものなので、N 末のドメインが *Mal21p* 由来の 3 つのハイブリッドについては検出できると考え、これら 3 つのハイブリッドトランスポーターについて、グルコース存在下での分解速度を調べた。その結果を図 3-18 に示した。*MAMp* の半減期は 119 min で *Mal21p* とほぼ同じであった。また、*MMAp* と *MAAp* もそれぞれ 53 min と 59 min で *Agt1p* よりも長く、*Mal21p* の N 末の細胞質ドメインが分解耐性に重要な働きを示す事がわかった。また、*MAMp* が *MMAp* と *MAAp* よりも半減期が長いことから、*Mal21p* の C 末の細胞質ドメインも分解耐性にポジティブな働きをするのか、あるいは *Agt1p* の C 末の細胞質ドメインが分解を早める働きをする可能性がある。

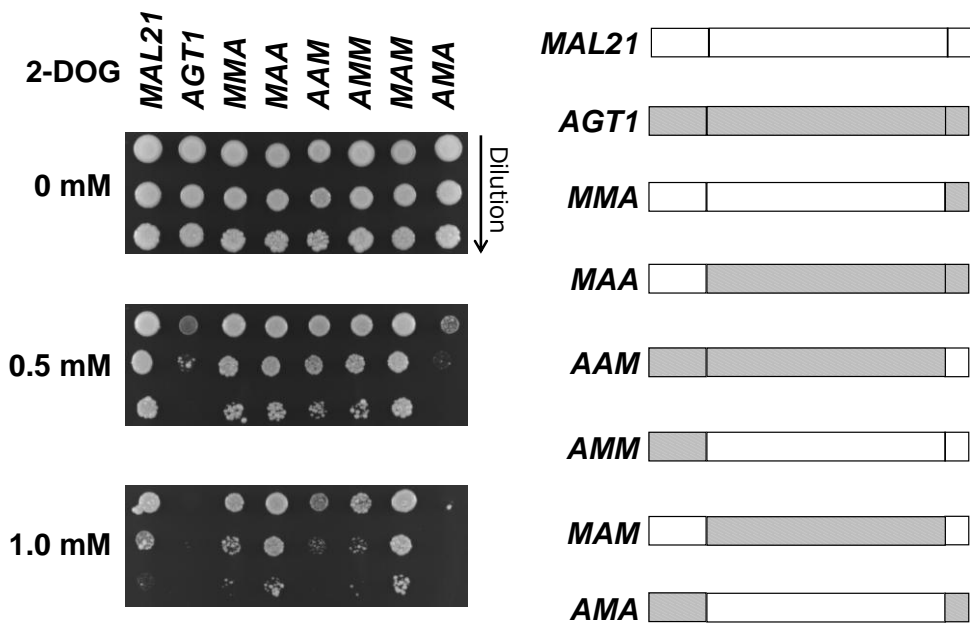


図 3-17 ハイブリッドトランスポーター発現株の 2-DOG 耐性

Dilution rate: 1,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$

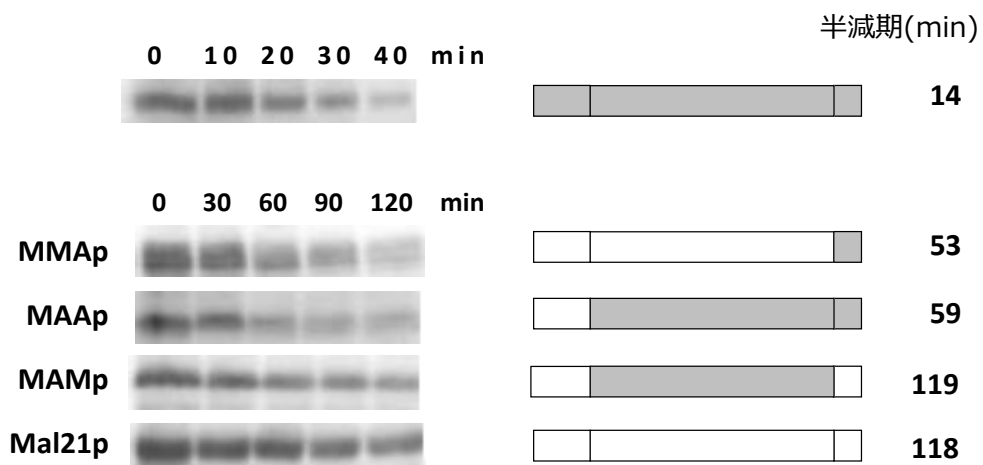


図 3-18 ハイブリッドトランスポーターのグルコース存在下での半減期

### 3.3.7 Mal21p のグルコース誘導性分解耐性に関わるアミノ酸残基の決定

3.3.6 で Mal21p の N 末の細胞質ドメインが耐性に大きな役割を果たしていることがわかった。Mal31p と Mal61p は共に分解されやすいトランスポーターである。これら 2 つの

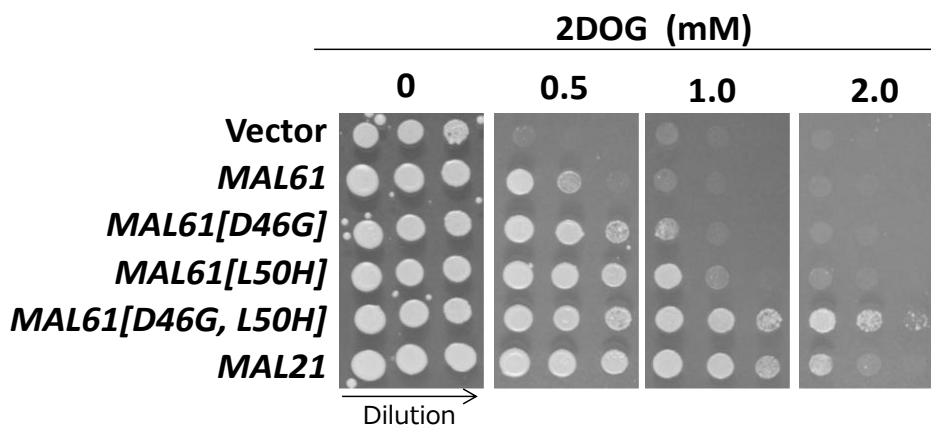


図 3-19 変異 Mal61p 発現株の 2-DOG 耐性

Dilution rate: 1, 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>

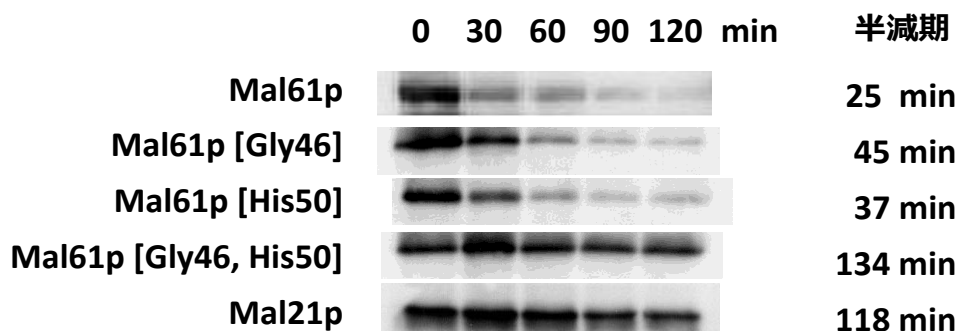


図 3-20 変異 Mal61p のグルコース存在下での半減期

トランスポーターから見て、Mal21p には 6 つの共通なアミノ酸置換、D46G, L50H, V167L, Y174L, M175V, S328T がある (図 3-3)。このうち、N 末の細胞質ドメインに位置しているアミノ酸は Gly46 と His50 の 2 つなので、Mal61p の N 末部分を Mal21p に交換したハイブリッドトランスポーターの発現ベクター pJHIMAL61[D46G,L50H] を構築し、JH1032 に導入した。このハイブリッドトランスポーター発現株の 2-DOG 耐性を調べたところ、Mal21p と同じであった。そこで Gly46 と His50 のどちらが決定因子であるのか調べるために、Mal61p の Asp46 を Gly46 に置換した pJHIMAL61[D46G] と、Leu50 を His50 に置換した pJHIMAL61[L50H] を構築した。同じく 2-DOG 耐性を調べたところ、どちらも Mal61p より耐性が上がったが、Mal21p と同レベルまでには上がらなかった (図 3-19)。次にこれら変異型トランスポーターのグルコース誘導性分解速度を調べた (図 3-20)。分解速度は 2-DOG に対する耐性が示す通り、Mal61[Gly46]p と Mal61[His50]p は Mal61p より

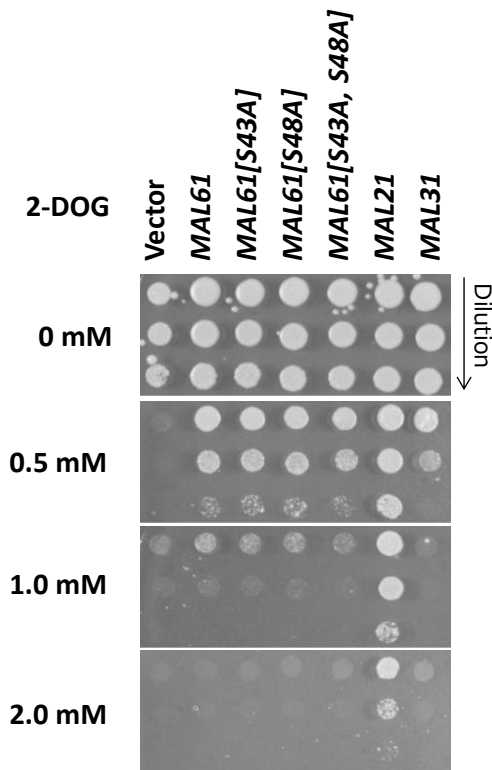


図 3-21 リン酸化サイトの変異 Mal61p 発現株の 2-DOG 耐性  
Dilution rate: 1, 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>

は分解しにくかったが、Mal21p には及ばなかった。一方 Mal61[Gly46,His50]p は半減期が 134 ± 18 min で Mal21p と同レベルであることがわかった。従って、Gly46 と His50 の両アミノ酸が共に耐性にとって必須である。

一般的にアミノ酸トランスポーターをはじめ、様々な栄養源のトランスポーターの分解にはリン酸化が引き金となり、それに続くユビキチン化によってエンドサイトーシスが起る事が知られている (17, 18)。Mal61p の Asp46 と Leu50 の近傍でリン酸化されるア

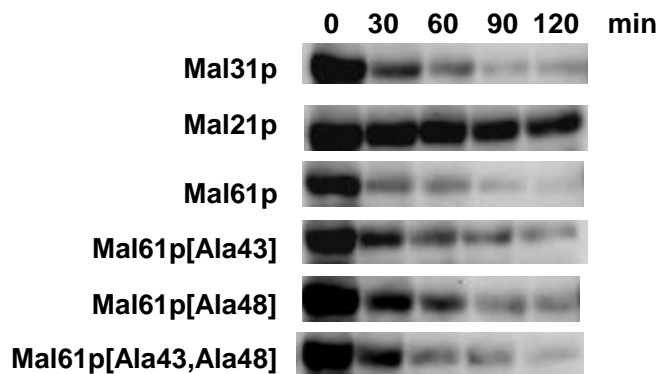


図 3-22 リン酸化サイトの変異 Mal61p のグルコース存在下での分解速度

ミノ酸残基を探した時、Ser43 と Ser48 が候補に挙げられる。これら 2 つのセリン残基は casein kinase II のリン酸化サイトの最小のコンセンサス配列 S/T-X-X-D/E を満たす位置にある。Asp46→Gly46, Leu50→His50 の 2 つの置換はこのコンセンサス配列を壊す。casein kinase II は、酵母においてはトランスポーターをリン酸化するという報告はないが、マウスにおいて水チャネルである aquaporin 4 をリン酸化すること (46)、ヒトのヌクレオシドトランスポーター hENT1 のリン酸化に関わること (47) が報告されている。これらのことより、Mal61p の Ser43 と Ser48 がリン酸化のターゲットである可能性を調べるため、Mal61[Ala43]p, Mal61[Ala48]p, Mal61[Ala43, Ala48]p の 3 つの変異体を構築した。これらの 2-DOG 耐性とグルコース誘導性分解速度を調べたところ、若干の分解速度の遅延が見られたが (図 3-21,22)、いずれも Mal21p のレベルには達しなかった。従って、Ser43 と Ser48 がリン酸化しているかどうかに関わらず、Ser43 と Ser48 は Mal61p の分解速度にほとんど影響しないと考えられた。

### 3.3.8 Mal61p と Mal21p のユビキチン化の違い

先に述べた通り、マルトーストランスポーターはユビキチン化されなければ、エンドサイトーシスは起こらない (17)。Mal61p と Mal21p のユビキチン化の効率を比較するために、両者を *end4* 株 (および *END4* 株) と *npi1* 株 (および *NPI1* 株) で発現させた。*end4* 株はエンドサイトーシスプロセスの早期ステージでの変異株であり、*npi1* 株は E3 ubiquitin ligase の変異株である (36,37)。これらの発現株をグルコースに 1 h 晒した後、マルトーストランスポーターの抗体をもちいて、ウエスタンブロッティングを行った (図 3-23)。その結果、グルコース非存在下でも *END4* 株では Mal61p の量は Mal21p よりも少

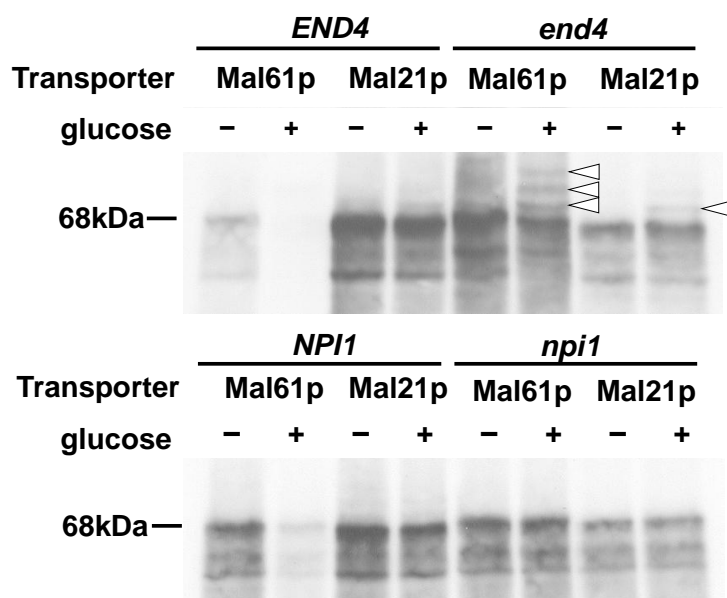


図 3-23 グルコース存在下で Mal61p と Mal21p が受ける修飾の違い

なく、グルコース存在下では完全になくなった。それに対し、Mal21p はグルコース存在下で 1 h おいた後も 70%が残っていた。*end4*株では、エンドサイトーシスが起これないため、Mal61p の分解も起これない。ウエスタンブロッティングではグルコースに 1 h 晒したレーンでは完全長の Mal61p の他に、より分子量の大きいいくつかのタンパク質が検出された。そしてこれらのバンドは約 9 kDa のギャップで並んでおり、そのギャップの大きさはユビキチン分子のサイズと等しい。

一方、Mal21p では完全長のバンドより分子量の大きいバンドが 1 本見られたが、Mal61p で見られた、さらに分子量の大きいバンドはなかった。*npi1*株においても、やはり Mal61p と Mal21p の分解は阻止されたが、*end4*株とは違って、完全長のタンパク質より分子量の大きいバンドはなかった。*end4*株で見られた分子量の高いバンドがユビキチン化された Mal61p であるのかどうか確認するために、Mal61-2HAp を *end4*株で発現させた。細胞抽出液を調製し、抗 Mal61p 抗体で免疫沈降させた後、沈降させたタンパク質を SDS-PAGE で分離した。そして、抗 HA 抗体と抗ユビキチン抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った (図 3-24)。抗 HA 抗体で検出したレーンには全長の Mal61p より分子量の高い 3 本のバンドが見られた。一方、抗ユビキチン抗体での検出では、矢印で示した上の 2 本のバンドは見られたが、一番分子量の低い、白い矢印を付けたバンドだけが検出されなかった。従って、全長の 68 kDa に最も近いバンドはリン酸化されているがユビキチン化はされていないバンドだと推測され、それより分子量の大きい上の二本のバンドはユビキチン化されたバンドであることがわかった。*end4*株で Mal21p のレーンには全長の 68 kDa に最も近いバンドははっきりと検出されている (図 3-23)。すなわち、Mal21p では Mal61p と同様にリン酸化は起こるにもかかわらず、何らかの理由でユビキチン化の効率が非常に悪いために、分解されにくいのだと推測される。

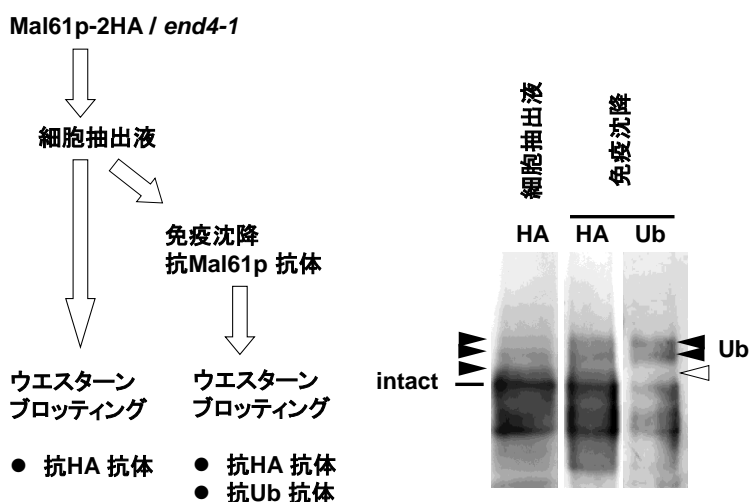


図 3-24 グルコース存在下でのユビキチン化された Mal61p の検出

### 3.3.9 Mal61p と Mal21p の細胞内局在

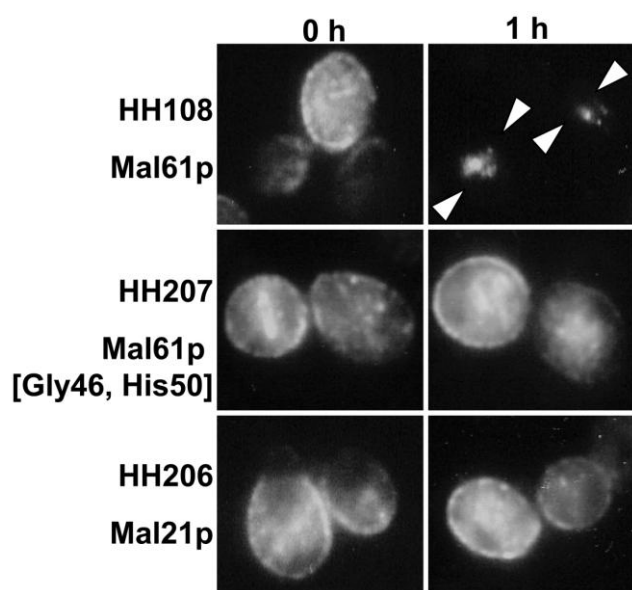


図 3-25 グルコース存在下 1 h 後のトランスポーターの細胞局在

Mal61p はグルコースに 1 h 晒した後、細胞膜には局在していなかったが、Mal61p[Gly46,His50] と Mal21p は細胞膜に局在しているのが観察され、これらがエンドサイトーシスされにくく細胞膜により多く残っていることが確認された。

Mal61p[Gly46,His50] と Mal21p のグルコース存在下での半減期は Mal61p に比べずっと長い (図 3-20)。また 3.3.4 で述べたようにグルコースに 1 h 晒した後も Mal21p 発現株は Mal61p 発現株に比べ高いマルトース取り込み活性を持っていた。グルコースの存在下で Mal61p[Gly46,His50] と Mal21p をグルコースに 1 h 晒した後も、これらのタンパクの細胞膜からの内在化が止まっているかどうか確かめるため、抗 Mal61p 抗体を 1 次抗体に、fluorescein isothiocyanate-conjugated goat anti-rabbit IgG を 2 次抗体として、間接蛍光顕微鏡で局在を調べた (図

### 3.3.10 Mtt1p のグルコース誘導性分解耐性の改善

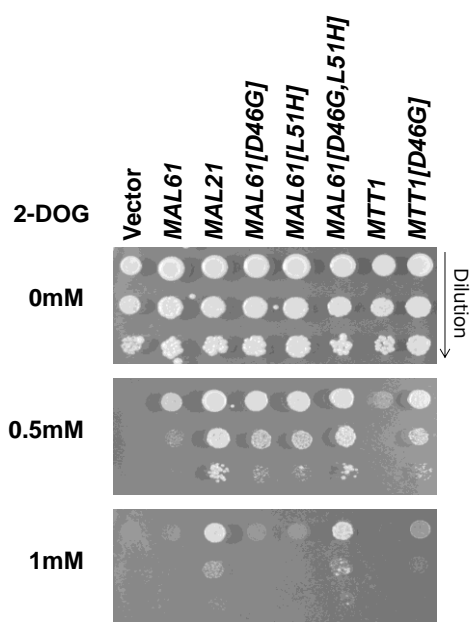


図 2-20 に示したように Mtt1p と Mal31p は 90% のアイデンティティがある。Mtt1p の 46 番目の残基は Asp であり、50 番目の残基は His であった。Mal21p のグルコース誘導性分解耐性の決定因子は Gly46 と His50 であるので、Mtt1p は 2 つの決定因子のうち 1 つだけ持っていることになる。Mtt1p の 2-DOG に対する耐性は Mal61p とほぼ同じであった (図 3-26)。

また、Mtt1p の 46 番目の残基は Asp を Gly に置換した変異体 Mtt1p[Gly46] を構築し 2-DOG 耐性を調べたところ、明らかに天然型よ

図 3-26 *MTT1* 発現株の 2-DOG 耐性

Dilution rate: 1,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$

り耐性が上がったが、Mtt1p[Gly46]は Mal61p[Gly46,His50]に比べると耐性は低かった。表 3-3 に示したように Mtt1p のマルトースの取り込み速度が Mal61p に比べると低い。

Mtt1p[Gly46]の耐性が低く見えるのは取り込み活性が低いせいである可能性もある。

Mtt1p は Mal61p と 90%のアイデンティティーがあるが、抗 Mal61p 抗体で検出できなかった。また、C 末に 2 つのタンデムにつなげた HA-tag を持つ Mtt1-2HAp を構築したがこれを発現する株はマルトトリオース単独炭素源培地に生育できなかった。そのため、Mtt1p と Mtt1p[Gly46]の分解速度の測定は断念した。

### 3.3.11 Agt1p のグルコース誘導性分解耐性の改善

3.3.6 で示した通り、Agt1p の N 末細胞質ドメインを Mal21p と交換したハイブリッドトランスポーターMAMp は Mal21p なみにグルコース誘導性分解耐性となった。Agt1p も Mal61 の Asp46, Leu50 に相当するアミノ酸の置換で、分解耐性を付与できる可能性がある。

図 3-27 に Agt1p と Mal61p の第 2 番目の膜貫通領域のアミノ酸配列アライメントを示した。Agt1p では Mal61 の Asp46 は Glu51 に相当し、Leu50 は Leu55 に相当する。そこで変異体 Agt1-2HA[Gly51,His55]p を構築し、2-DOG 耐性を調べた。耐性は天然型 Agt1-2HAp より高くなったが、Mal21p よりは低かった。Mal61p、Mal21p の N 末細胞

<b>Mal21p</b>	<b>40</b>	<b>GKK-SDFGLSHHEYGPGSLI</b>	<b>58</b>
<b>Mal61p</b>	<b>40</b>	<b>GKK-SDFDLSHLEYGPGSLI</b>	<b>58</b>
<b>Agt1p</b>	<b>44</b>	<b>GKKDSAFELDHLEFTTNSAQ</b>	<b>63</b>
<b>Agt1p [Gly51, His55]</b>	<b>44</b>	<b>GKKDSAFGLDHHEFTTNSAQ</b>	<b>63</b>
<b>Agt1p [Pro51]</b>	<b>44</b>	<b>GKKDSAFPLDHLEFTTNSAQ</b>	<b>63</b>
<b>Agt1p [Pro55]</b>	<b>44</b>	<b>GKKDSAFELDHPEFTTNSAQ</b>	<b>63</b>

図 3-27 Agt1p と Mal61p の N 末細胞質領域のアミノ酸配列アライメント

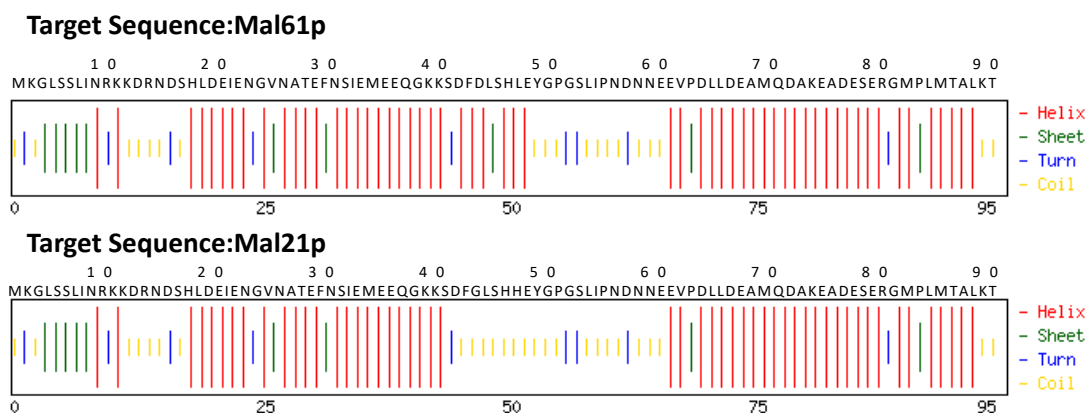


図 3-28 Mal21p と Mal61p の N 末細胞質領域の二次構造予測



質側ドメインがどのような二次、三次構造をとっているか予測することは難しいが、GlyもHisも $\alpha$ -ヘリックス壊す傾向にあるアミノ酸である。CFSSP:Chou & Fasman Secondary Structure Prediction Server (<http://www.biogem.org/tool/chou-fasman/index.php>) (48)を用いて、Mal61p と Mal21p の N 末側細胞質ドメインの 2 次構造を予測した。その結果を図 3-28 に示した。Mal61p では His18-Leu50 は $\alpha$ -ヘリックスと予測された。それに対して Mal21p では His18-Lys42 が $\alpha$ -ヘリックスと予測された。Agt1p の場合、Glu51 $\rightarrow$ Gly, Leu55 $\rightarrow$ His の置換では、 $\alpha$ -ヘリックス構造を壊すことが十分できなかった可能性があると考え、この付近の領域の二次構造を変化させることを目的に、Glu51 あるいは Leu55 を Pro に置き換えた変異体を構築した。その結果、Agt1-2HA[Pro51]p は Agt1-2HA[Gly51,His55]p と同程度に 2-DOG 耐性が上がり、また Agt1-2HA[Pro55]p は Mal21p と同レベルにまで 2-DOG 耐性が上がった (図 3-29A)。グルコース存在下での半減期を調べたところ、

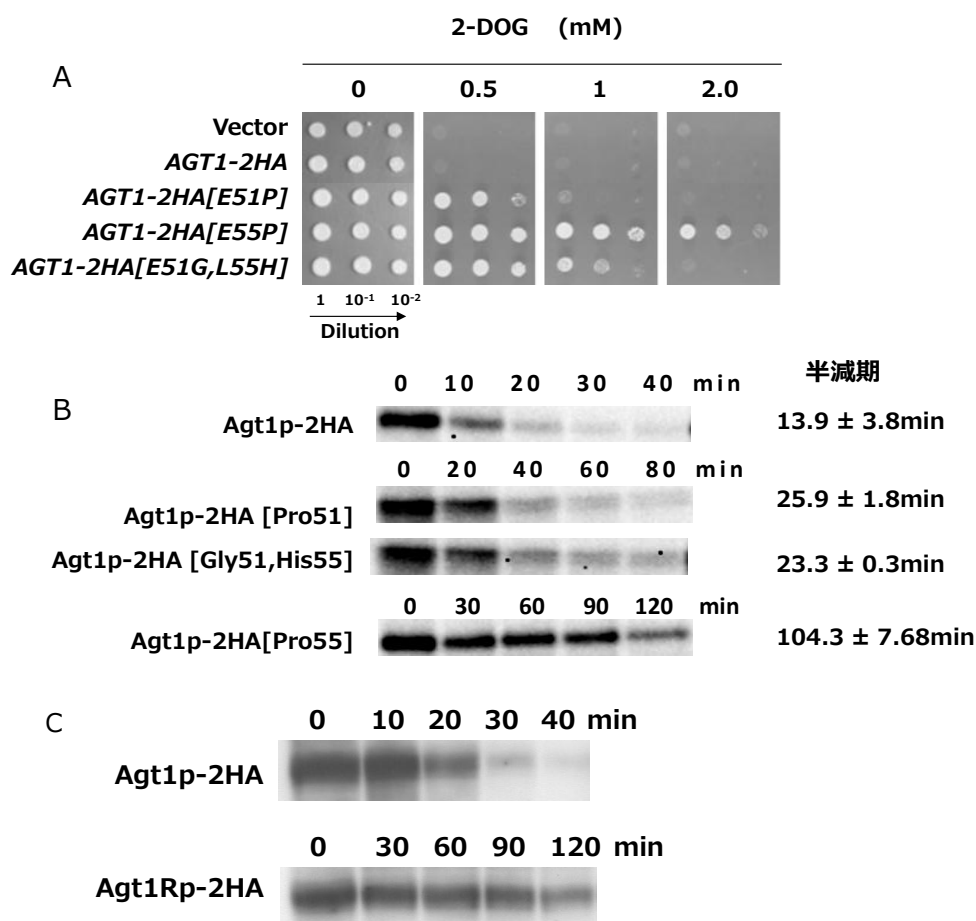


図 3-29 変異型 Agt1p の性質

A: 変異型 Agt1p 発現株の 2-DOG 耐性

B: 変異型 Agt1p のグルコース存在下での分解速度-1

C: 変異型 Agt1p のグルコース存在下での分解速度-2

Agt1-2HA[Gly51,His55]p は  $23.3 \pm 0.3$  min、Agt1-2HA[Pro51]p は  $25.9 \pm 1.8$  min、Agt1-2HA[Pro55]p は  $104.3 \pm 7.6$  min で、Agt1-2HA[Pro55]p は Mal21p に近い半減期になった (図 3-29B)。従って、Agt1p では Glu51 から Leu55、Mal61 では Asp46 から Leu50 の二次構造を破壊することが、グルコース誘導性分解耐性アップするために必要なのかもしれない。また、UV で変異をかけた *AGT1* 遺伝子を発現しているライブラリーよりスクリーニングした、2-DOG 耐性のある変異トランスポーターの提供を受け調べたところ (Joergen Hansen 博士から提供)、変異型 $\alpha$ -グルコシドトランスポーターAgt1Rp は Glu56  $\rightarrow$  Gly56 の変異を持っていた。Agt1R-2HAp のグルコース誘導性分解速度を調べたところ、Agt1R-2HAp の半減期は  $143.1 \pm 6.3$  min で非常に分解されにくくなっていた (図 3-29C)。

Agt1Rp の変異が Glu56  $\rightarrow$  Gly56 であり、Gly は $\alpha$ -ヘリックス構造を壊す傾向にあるアミノ酸であることから、やはりこの領域の構造が変わることが重要であると推測される。

### 3.3.12 Mal61p, Mal21p, Agt1p の活性に必須なアミノ酸の同定

マルトーストランスポーターと $\alpha$ -グルコシドトランスポーターはプロトンシンポーターであるので、基質と共に 1 分子のプロトンを取り込むことがわかっている (44)。プロトンシンポーターにおいては、負電荷をもつ酸性アミノ酸がプロトンリレーに関わって、基質が通りやすくなると考えられている (49,50)。図 3-30 中の下線のある領域は Mal61p の予

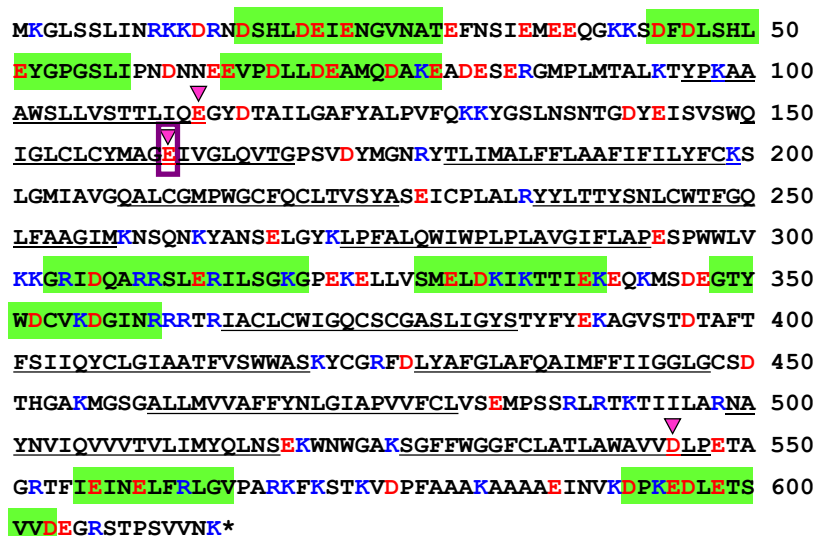


図 3-30 Mal61p の予測される膜貫通領域

- : Predicted  $\alpha$ -helix structure
- : Predicted transmembrane regions
- ▼ : Acidic amino acid residues in the transmembrane region
- : プロトンリレーに必要なグルタミン酸
- 赤字 : 酸性アミノ酸
- 青字 : 塩基性アミノ酸

想される膜貫通ドメインを示している。膜貫通ドメインにある酸性アミノ酸は Glu133, Glu161 の2つだけである。Glu113は膜貫通ドメインの端に位置しているが、Glu161は膜貫通ドメインの中央部に位置していることを考えると、Glu161の方がプロトンリレーの役割に適していると考えられた。Agt1pにおいては、Mal61pとのアラインメントから Glu167がそれに相当する。これらの Glu が取り込み活性に必要であるのかどうか確認するため、Mal61pの Glu161を Ala あるいは Gln へ、Agt1pの Glu167を Ala へ置換した変異遺伝子高発現株を構築した。0.1 mM あるいは 2.0 mM マルトースを基質として、天然型とこれらの変異型高発現株、HH108 (*MAL61*), HH081 (*MAL61[E161A]*), HH062 (*MAL61[E161Q]*), HH109 (*AGT1-2HA*), HH082 (*AGT1-2HA[E167A]*) の取り込み速度を測定した。結果を図 3-31 に示す。

**2<sup>nd</sup> transmembrane**

<b>Mal61p</b>	150	<b>QIGLCCLCYMAGEIVGLQVTG</b>	169
<b>Mal61p[Ala161]</b>	150	<b>QIGLCCLCYMAGAIVGLQVTG</b>	169
<b>Agt1p</b>	156	<b>QIGLNMCVLCGEMIGLQITT</b>	175
<b>Agt1p[Ala167]</b>	156	<b>QIGLNMCVLCGAMIGLQITT</b>	175

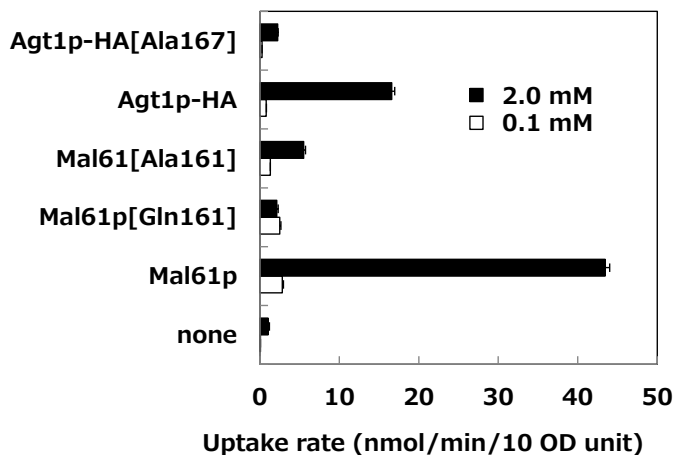


図 3-31 変異型 Mal61p と変異型 Agt1p-2HA のマルトース取り込み速度

基質濃度 0.1 mM では活性は天然型の 1/3 程度に低下しただけであったが、基質濃度 2.0 mM では 5~3.3%まで低下した。Mal61p の  $K_m$  値は 3~4 mM (51,52)、Agt1p の  $K_m$  値は ~18 mM (51)、~20 to 35 mM (52) なので、基質濃度 0.1 mM では基質とのインターアクションが律速となっているために Glu→Ala 置換の効果が低く、基質濃度を 2.0 mM にすると、より効果が見られたのだと考えられる。Mal21p と Agt1[Pro55]についてもそれぞれを Glu161 あるいは Glu167 を Ala に置換した変異型トランスポーター高発現株を構築した。

これらの天然型と変異型トランスポーター高発現株、HH108 (*MAL61*), HH081 (*MAL61[E161A]*), HH206 (*MAL21*), HH623 (*MAL21[E161A]*), HH109 (*AGT1-2HA*),

HH082 (*AGT1-2HA[E167A]*), HH619 (*AGT1-2HA[L55P]*), HH621 (*AGT1-2HA[L55P,E167A]*) をマルトースを炭素源とする最少培地にスポットしたところ、いずれも天然型より生育が遅れ、ネガティブコントロールである HH208 (pJHXS B) を持つ株と同程度に、わずかに生育したのみであった。また、それぞれの株をアンチマイシン入りの 0.5%マルトースを炭素源とする最少培地にスポットすると、Glu→Ala に変えたトランスポーターを持つ株は、すべて生育できなくなった (図 3-32)。従って、Mal61p, Mal21p の Glu161、Agt1-2HAp, Agt1[Pro55]-2HAp の Glu167 はプロトンリレーの役割を果たすアミノ酸残基であると断定した。

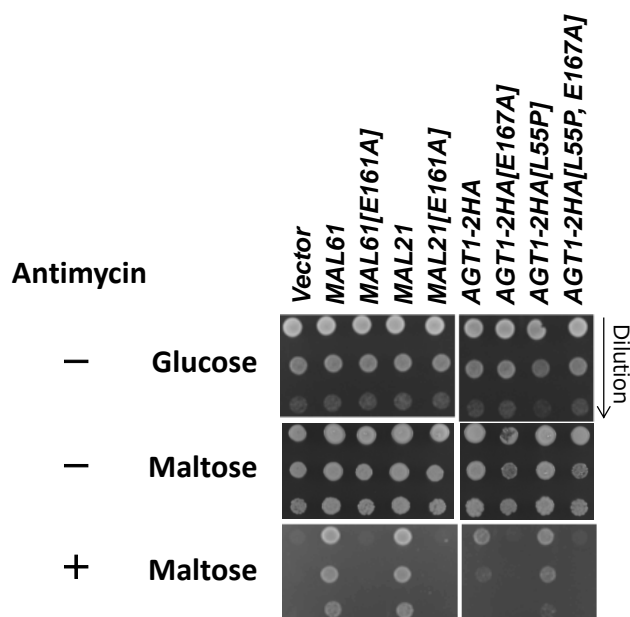


図 3-32 変異型 Mal61p と変異型 Agt1p-2HA 発現株のマルトース培地での生育  
Dilution rate: 1, 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>

### 3.3.13 Mtt1p の基質特異性を決める領域の絞り込み

図 2-20 に示したように Mtt1p はマルトーストランスポーター、Mal31p あるいは Mal61p と 90% のアイデンティティーがあり、Mal31p と異なるアミノ酸残基は 59 ある。Mtt1p はマルトトリオースを取り込めるが Mal31p も Mal61p もマルトトリオースは取り込めない。そこでこれらトランスポーターの基質特異性はどの領域で決まるのかを調べるため、*MTT1* と *MAL61* を制限酵素 *NcoI*, *BglII* で 3 つの領域に分け、組換えたハイブリッドトランスポーターを構築した (図 3-33A)。それぞれを JH1032 株で発現させ、マルトースあるいはマルトトリオースを単独炭素源とする最少培地にスポットした (図 3-33B)。C 末の領域が Mtt1p であるハイブリッドトランスポーターだけがマルトトリオースプレートで生育した。

従って Trp286 から C 末の領域の中に基質特異性に関わる領域があると考えられる。この部分に存在する異なるアミノ酸は 39 個存在するが、このうち膜貫通ドメインと予測され

る領域に存在するアミノ酸は 23 個である。これらアミノ酸の中に、基質特異性に関する残基があるものと考えられる。

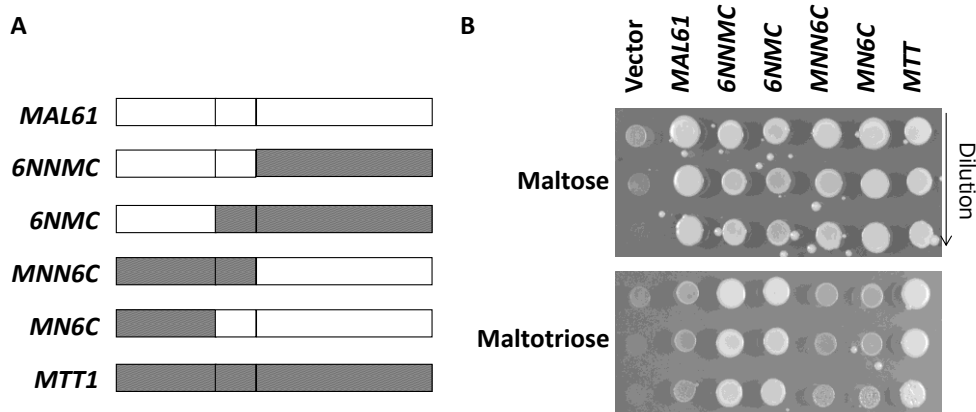


図 3-33 Mtt1p と Mal61p のハイブリッドトランスポーターの基質特異性

A: ハイブリッドトランスポーターの構造、B: 基質特異性

Dilution rate: 1, 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>

### 3.4 考察

実験室株のマルトーストランスポーター Mal31p, Mal61p, Mal21p は互いに 98% 以上のアイデンティティーがあり非常に似ているが、MAL21 発現株は他の 2 つのトランスポーターの発現株の約二倍のマルトース取り込み活性を持っていた。Mal21p と Mal61p の比活性を求めたところ、両者にそれほどの差はなく、Mal21p の活性が高いのは細胞膜により多くのタンパク質が発現しているためだと考えられた。マルトースとマルトトリオースの取り込み活性を実験室酵母の Agt1p と Mal61p と共に測定したところ、0.1 mM の基質の時 SeAgt1p の活性は Agt1p の約半分、Mal61p の 1 割程度の活性であった。0.1 mM の基質の時、Mtt1p のマルトース取り込み活性は Mal61p や Mal31p の 2 割程度、Agt1p とほぼ同程度であったが、マルトトリオースの取り込み活性は Agt1p の 6 倍あり、Mtt1p はマルトースよりもマルトトリオースの取り込み能が特に高いことがわかった。

マルトーストランスポーターはグルコース存在下ではすみやかに分解されることが報告されている。しかし Mal31p, Mal61p, Mal21p のグルコース存在下での分解速度を調べたところ、Mal21p だけがグルコース誘導性分解耐性を持ち、グルコース存在下で Mal31p, Mal61p の約 5 倍の長い半減期 118 min を持つことを見出した。α-グルコシドトランスポーターの半減期については今まで報告がなかったが、Agt1p と SeAgt1p については Mal31p, Mal61p と比べてさらに短く、半分程度の半減期であることがわかった。Mtt1p については調べる事ができなかったが、各トランスポーター発現株の 2-DOG 耐性のレベルから考えて、Mtt1p は Mal31p や Mal61p と同程度の半減期を持つものと考えられた。従って基質特異性の広いトランスポーターの方が半減期が短いと言える。マルトーストランスポーターも

$\alpha$ -グルコシドトランスポーターも、major facilitated sugar transporter family に属し、12 回の膜貫通ドメインを持つと予想されている (9)。グルコース誘導性分解耐性の Mal21p と分解速度の速い Agt1p について、両者の N 末と C 末の細胞質側にあるドメインを入れ替えたハイブリッドを作製して性質を調べたところ、N 末細胞質側ドメインを Mal21p に入れ替えたハイブリッド Agt1p は、マルトトリオースを取り込む能力があり、かつ Mal21p と同程度のグルコース誘導性分解耐性を持っていた。従って Mal21p のグルコース誘導性分解耐性の決定因子は N 末細胞質側ドメインにあるとわかった。さらに Mal21p と比較して、Mal61p と Mal31p の両トランスポーターと共通に異なるアミノ酸残基を Mal21p のアミノ酸に置換した変異型トランスポーターの性質を調べる事で、グルコース誘導性分解耐性の決定因子は Gly46 と His50 の二残基であることを突き止めた。様々な多くのトランスポーターは細胞膜上でリン酸化とそれに続くユビキチン化を受けた後、エンドサイトーシスによって液泡に運ばれ分解されることが知られている。リン酸化を受けるアミノ酸残基、Ser, Thr, Tyr の他のアミノ酸への置換や、リン酸化のコンセンサス配列を壊すようなアミノ酸置換、あるいはユビキチンの修飾を受ける Lys のアミノ酸置換によって、トランスポータータンパク質の分解速度が変わる例は今までに多くの報告がある (53,54)。当初 Asp46→Gly も Leu50→His の置換によって、これらのアミノ酸の近傍にある Ser43 と Ser48 のリン酸化が妨げられると考えた。これら 2 つのセリン残基は casein kinase II のリン酸化サイトの最小のコンセンサス配列 S/T-X-X-D/E を満たす位置にあるからである (55)。しかし、Ser43→Ala, Ser48→Ala の置換は大きな影響を及ぼさなかった。そして、エンドサイトーシスの変異株を用いて調べたところ、Mal21p はリン酸化はされるがユビキチンによる修飾を受けにくいために分解されにくいことがわかった。リン酸化に影響がなく、Lys 残基の置換もないのに、ユビキチン化に影響がもたらされ、トランスポーターの分解速度に影響が出た例はこれが初めてと思われる。Mal61p と Mal21p のウェスタンブロッティングでは全長の 68 kDa のタンパク質以外にも低分子のバンドが数本検出されている。その低分子のバンドのパターンは Mal61p と Mal21p では異なっていた。両トランスポーターは 98% のアイデンティティがある事を考えると、1 次配列の違いではなく、その違いから両者の立体構造に違いがあるために、プロテアーゼで切断される位置が変わったのかもしれない。Gly も His も  $\alpha$ -ヘリックス構造を壊す傾向にあるアミノ酸である。二次構造の予測ソフト (CFSSP:Chou&Fasman Secondary Structure Prediction Server <http://www.biogem.org/tool/chou-fasman/index.php>) で計算すると、Mal61p の 18-50 番目のアミノ酸は  $\alpha$ -ヘリックスと予測された。それに対して Mal21p では 18-42 番目のアミノ酸残基が  $\alpha$ -ヘリックスと予測された。6 番目と 7 番目の膜貫通領域の間には、比較的長い細胞質側のループがある。このループは比較的塩基性アミノ酸がリッチである。それに対し、N 末、C 末の細胞質ドメインは比較的酸性アミノ酸がリッチである。この 3 つの細胞質ドメインの間には何らかのインターアクションをしており、このインターアクションに対して、N 末の細胞質ドメインの  $\alpha$ -ヘリックス構造の変化は影響を与えるのかもしれない。

Agt1pについても Mal21p の Gly46, His50 に相当するアミノ酸を置換した変異型 Agt1p、Agt1-2HA[Gly51,His56]p は半減期が伸びたが、Mal21p と同レベルまで半減期は伸びなかった。一方 Agt1-2HA[Pro55]p と Agt1R-2HAp (=Agt1-2HA[Gly56]p) は Mal21p と同レベルの半減期を示した。また、Mtt1p は Mal21p と 90%のアイデンティティーがある。Mtt1p は Mal21p のグルコース誘導性分解耐性決定因子のうちの一つ、His50 は持っているが、46 番目のアミノ酸残基は Asp で、Mtt1p は Mal61p と同程度の 2-DOG 耐性であった。Mtt1[Gly46]p 発現株は、Mal61[Gly46]p や Mal61[His50]p と同程度に 2-DOG 耐性が上昇した。Mtt1[Gly46]p は Gly46 と His50 という、Mal21p の分解耐性の 2 つの決定因子を持ち、N 末の細胞質側ドメインである Met1 から Thr95 の領域は完全に Mal21p と同じ配列であるにもかかわらず、Mal21p レベルには半減期が長くない。従って N 末の細胞質ドメインの構造はグルコース誘導性分解耐性に大きな影響をもたらすのは間違いないが、N 末以外の構造も半減期に影響を与えられられる。N 末、中央部および C 末の細胞質側のドメインのインターアクションが分解耐性に関係しているのかもしれない。

トランスポーターの活性に関与するアミノ酸は膜貫通ドメインの中央部にある唯一の酸性アミノ酸であることが確認された。そのアミノ酸残基は Mal21p と Mal61p では Glu161、Agt1-2HAp では Glu155 であった。マルトース、 $\alpha$ -グルコシドトランスポーターは共にプロトンシンポーターであることが知られており (45)、このグルタミン酸が外から内へプロトンを受け渡している可能性がある。これらのグルタミン酸をアラニンに置換した変異体の発現株は、アンチマイシンを添加したマルトースを唯一の炭素源とする培地に生育できなかった。しかし、[C<sup>14</sup>]マルトースを基質とした取り込み活性測定では、基質濃度の低い時には天然型の 10%以上の活性があった。プロトンリレーは取り込み速度を上げるために必要だが、なくなっても完全に活性を失うわけではないことが判明した。

## 第4章 $\alpha$ -グルコシドトランスポーターの実験室株とビール酵母での高発現

### 4.1 緒言

ビール醸造には多くのエネルギーが必要である。最初の工程、麦芽のマッシングは、 $50^{\circ}\text{C}$ ~ $60^{\circ}\text{C}$  から始まって徐々に温度を上げ、その後ホップを入れて煮沸しなければならない。その後麦汁は  $10^{\circ}\text{C}$ ~ $15^{\circ}\text{C}$  にまで冷やした後、酵母をピッチングして発酵を開始する。その後も発酵熱により温度が上がらないよう、低温に保って発酵を続ける。また発酵後は  $0^{\circ}\text{C}$  付近で数十日貯酒を行う。このようにマッシング・発酵・貯酒すべての工程に多くのエネルギーを消費する。従って生産性を向上させる事は、環境上の意味からのエネルギー節約、コスト削減の両面から重要である。発酵の観点からこの問題を考えると、いくつか生産性を向上させる方策が考えられる。一つには酵母による発酵速度を上げる事である。これには 1.) 温度を上げて、香味に影響しない酵母を育種する、2.) ピッチング酵母量を増やしても、香味に影響しない酵母を育種する、3.) 酵母の糖資化・発酵能力を上げる、などが考えられる。もう一つには、麦汁の濃度を上げる事である。濃度の高い麦汁を発酵期間を延ばすことなく発酵できれば、同じ液量の発酵タンクで最終製品の数を増やせることになる。

しかしこれまで述べてきたように、麦汁濃度を高めるとグルコース・マルトース・マルトトリオースの 3 種類すべての糖の濃度が高くなり、必然的にグルコースリプレッションの期間が長くなる。それはつまりマルトース・マルトトリオースの資化開始が遅れることを意味するが、開始時期が遅れるだけにはとどまらず、マルトース・マルトトリオースの資化速度も低下する。何故ならば、1 章で述べたように、ビール醸造において酵母は 2 回程度の出芽をした後は増殖を停止するので、タンパク質合成が特に旺盛な期間は 2 日程度であるからである。このタンパク質合成が活発な間に十分なマルトース、マルトトリオースのトランスポーターが発現できなければ発酵期間の長期化が予想される。さらに、麦芽比率の低い発泡酒の麦汁の場合はアミノ酸含量が低く、その結果緩衝力の不足から pH が低くなりやすい。pH の低下は酵母増殖量や酵母の発酵能力に影響をもち、糖資化遅延が起こりやすい。そこで高濃度麦汁や麦芽比率の低い発泡酒麦汁での糖資化遅延を解決するために、グルコース存在下でのマルトース・マルトトリオースの資化開始を早め、かつ高速化することが有効ではないかと考えた。そしてそれを実現するために、第 3 章で発見・構築したグルコース誘導性分解耐性を持つ  $\alpha$ -グルコシドトランスポーターを利用した酵母育種を試みることにした。しかし、酵母は元来グルコースやフラクトースと言った単糖を先に資化し、二糖を取り込まない仕組みを持っている。そういうシステムを持っているのは、単糖と二糖を同時に取り込むことで、酵母の生育に何らかの不都合を生じるからかもしれない。そこでグルコース誘導性分解耐性を持つ  $\alpha$ -グルコシドトランスポーターをビール醸造株へ用いるにあたり、グルコースと他の種類の糖を同時に取り込むことが、何らかの不都合をもたらすのか、まずは実験室株で様々なトランスポーターの高発現株を構築し、異なる糖を含有する培地でどのように生育するかを調べた。そうしたところ、最もグルコース



誘導性分解耐性の高いトランスポーターの発現株は、グルコースとマルトース、あるいはスクロースを含むような培地で生育阻害を示した。そこでその生育阻害について、メタボローム解析、遺伝子発現解析の手法を中心にその原因を解明した (4.3.1)。次にビール醸造酵母での様々なトランスポーター発現株を作製し、糖濃度の異なる麦汁、低麦芽麦汁、高濃度麦汁など様々な種類の麦汁を用いて発酵試験を試み、その効果を確認した (4.3.2)。

## 4.2 実験材料および方法

### 4.2.1 使用菌株

使用した酵母菌株と大腸菌株を表 4-1 に示した。トランスポーターの発現に用いた実験室株は、D152U あるいは D152MS を用いた。D152U は 3.2.1 に示した D152 に *URA3* を導入した株であり、 $\alpha$ -グルコシドトランスポーターは持たないが、マルターゼはマルトースによって誘導される株である。D152MS は、pUP3GLPMAL62 を *URA3* 内にある *EcoRV* で切断後導入し、*URA3* に *TDH3p::MAL62* を導入した株で、D152MS と D152U との違いは *TDH3p::MAL62* の有無だけである。HD1 から HD92 までの株は D152U と D152MS に様々なトランスポーター発現プラスミド (ベクターは pYCGPY) を導入した株である。

HD93 と HD94 は pI19\_TPI1p-LacZ から *PacI* で切り出した *TPI1p::lacZ* 発現ユニットを D152U あるいは D152MS の IX 番染色体の *YIL170W* と *YIL169C* の間に導入した株で、導入株は Nat 耐性で選択した後、さらに pYR-HFLPG を導入しハイグロマイシン耐性で選択した。その後 YPG 培地にストリークして *GIN11* の発現を促すことによって、*FRT::NatR::GAL1p::GIN11::FRT* がループアウトした株を選択した。どちらもさらに pYCGPYMAL21 を導入した。HD101~HD150 は、D152U あるいは D152MS に表 4-1 に示した各遺伝子の高発現ユニットを、VII 染色体の *MGA1* と *YGR250C* 遺伝子の間に挿入した株で、次のようにして取得した。pI6S\_ACT1p-XXX05 あるいは pI6S\_TPI1p-XXX05 (XXX は各々の高発現する遺伝子) より *PmeI* あるいは *FseI* で発現ユニットを含む断片を切り出し、D152U あるいは D152MS に導入した。導入株は Nat 耐性で選択した後、HD93 と HD94 と同様にマーカー遺伝子がループアウトした株を選択した。HD101~HD150 に目的の発現ユニットが導入されたことは、表 4-2 に示したプライマー 63~68 を用いて PCR で確認した。HD151 は *GPR1* 遺伝子を破壊株で、次のようにして得た。D152U にプラスミド pBGIN11-05Dgpr1 から *PmeI* で切り出した断片を組み込むことによって、*GPR1* 遺伝子を破壊し、Nat 耐性で選択した。さらに HD93 と HD94 と同様にマーカー遺伝子がループアウトした株を選択した。*GPR1* 遺伝子の破壊は表 4-2 に示したオリゴヌクレオチド 11+12 を用いた PCR で確認した。HD152 は D152MS に対して同様の操作を行い、*GPR1* 遺伝子を破壊した株である。HD101~HD152 には、pYCGPY あるいは pYCGPYMAL21 を導入し実験に供した。HH1152 は実験室株 X2180-1A の *URA3* 破壊株である。HH1153 は pUP3GLPMAL62 を *URA3* 内にある *EcoRV* で切断後導入し、HH1152 の *ura3* に

表 4-1 第 4 章で用いた株

Strain Name	Genotype
<i>S. pastrianus</i>	
Sun49	prototroph
Sun42	prototroph
HH1500	identical to SUN49 except for GAL1pr::PDR4::TDH3pr::AGT1
HH1501	identical to SUN49 except for GAL1pr::PDR4::TDH3pr::MAL21
<i>hybrid of S. cerevisiae and S. kudriavzevii</i>	
KF09	$\Delta pad1 / \Delta pad1 / \Delta pad1$
HH1502	identical to KF09 except for GAL1pr::PDR4::TDH3pr::MAL21
HH1503	identical to KF09 except for GAL1pr::PDR4::TDH3pr::AGT1R
<i>S. cerevisiae</i>	
D152U	MATa mal61::TRP1 MAL62 MAL63 mal64 mal11MAL12 mal13 ura3-52::URA3 leu2-3 leu2-112 his
D152MS	MATa mal61::TRP1 MAL62 MAL63 mal64 mal11MAL12 mal13 ura3-52::URA3::TDH3pr-MAL32 leu2-3 leu2-112 his
HD1	identical to D152U except for pYCGPY
HD5	identical to D152U except for pYCGPYAGT1-2HA
HD11	identical to D152U except for pYCGPYAGT1-2HA[E167A]
HD15	identical to D152U except for pYCGPYMAL61
HD17	identical to D152U except for pYCGPYMAL21
HD19	identical to D152U except for pYCGPYMAL61[E161A]
HD33	identical to D152MS except for pYCGPY
HD37	identical to D152MS except for pYCGPYAGT1-2HA
HD43	identical to D152MS except for pYCGPYAGT1-2HA[E167A]
HD47	identical to D152MS except for pYCGPYMAL61
HD49	identical to D152MS except for pYCGPYMAL21
HD51	identical to D152MS except for pYCGPYMAL61[E161A]
HD76	identical to D152U except for pYCGPYAGT1-2HA[L55P]
HD82	identical to D152MS except for pYCGPYAGT1-2HA[L55P]
HD84	identical to D152U except for pYCGPYMAL21[E161A]
HD85	identical to D152U except for pYCGPYAGT1-2HA[L55P,E167A]
HD86	identical to D152MS except for pYCGPYMAL21[E161A]
HD87	identical to D152MS except for pYCGPYAGT1-2HA[L55P,E167A]
HD91	identical to D152U except for pYCGPYSeAGT1
HD92	identical to D152U except for pYCGPYMTT1
HD93	identical to D152U except for TPI1pr-lacZ, with pYCGPYMAL21
HD94	identical to D152MS except for TPI1pr-lacZ, with pYCGPYMAL21
HD101	identical to D152U except for ACT1pr::HOG1
HD102	identical to D152U except for ACT1pr::MSN4
HD103	identical to D152U except for ACT1pr::HOT1
HD104	identical to D152U except for ACT1pr::SKN7
HD105	identical to D152U except for ACT1pr::CRZ1
HD106	identical to D152U except for ACT1pr::SKO1
HD107	identical to D152U except for ACT1pr::PSK2
HD108	identical to D152U except for ACT1pr::RIM101
HD109	identical to D152U except for TPI1pr::IGO1
HD110	identical to D152U except for TPI1pr::RIM15
HD111	identical to D152U except for TPI1pr::HSP82
HD112	identical to D152U except for TPI1pr::UBI4
HD113	identical to D152U except for TPI1pr::MDJ1
HD114	identical to D152U except for TPI1pr::HSP31
HD115	identical to D152U except for TPI1pr::STI1
HD116	identical to D152U except for ACT1pr::HSF1
HD117	identical to D152U except for TPI1pr::SGT1

表 4-1 第 4 章で用いた株(続き)

Strain Name	Genotype
HD118	identical to D152U except for TPI1pr::YDJ1
HD119	identical to D152U except for TPI1pr::SSE1
HD120	identical to D152U except for ACT1pr::SCH9
HD121	identical to D152U except for leu2::LEU2
HD122	identical to D152U except for TPI1pr::RPN1
HD123	identical to D152U except for TPI1pr::SSA1
HD124	identical to D152U except for TPI1pr::HSP78
HD125	identical to D152U except for ACT1pr::GAC1
HD126	identical to D152MS except for ACT1pr::HOG1
HD127	identical to D152MS except for ACT1pr::MSN4
HD128	identical to D152MS except for ACT1pr::HOT1
HD129	identical to D152MS except for ACT1pr::SKN7
HD130	identical to D152MS except for ACT1pr::CRZ1
HD131	identical to D152MS except for ACT1pr::SKO1
HD132	identical to D152MS except for ACT1pr::PSK2
HD133	identical to D152MS except for ACT1pr::RIM101
HD134	identical to D152MS except for TPI1pr::IGO1
HD135	identical to D152MS except for TPI1pr::RIM15
HD136	identical to D152MS except for TPI1pr::HSP82
HD137	identical to D152MS except for TPI1pr::UBI4
HD138	identical to D152MS except for TPI1pr::MDJ1
HD139	identical to D152MS except for TPI1pr::HSP31
HD140	identical to D152MS except for TPI1pr::STI1
HD141	identical to D152MS except for ACT1pr::HSF1
HD142	identical to D152MS except for TPI1pr::SGT1
HD143	identical to D152MS except for TPI1pr::YDJ1
HD144	identical to D152MS except for TPI1pr::SSE1
HD145	identical to D152MS except for ACT1pr::SCH9
HD146	identical to D152MS except for leu2::LEU2
HD147	identical to D152MS except for TPI1pr::RPN1
HD148	identical to D152MS except for TPI1pr::SSA1
HD149	identical to D152MS except for ACT1pr::HSP78
HD150	identical to D152MS except for ACT1pr::GAC1
HD151	identical to D152U except for $\Delta$ gpr1
HD152	identical to D152MS except for $\Delta$ gpr1
HH1152	X2180-1A except for <i>ura3</i> $\Delta$
HH1153	X2180-1A except for <i>ura3D TDH3pr::MAL62</i>
<i>E.coli</i>	
DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> , $\Phi$ 80d <i>lacZ</i> $\Delta$ M15, $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> )U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> ( <i>rK- mK+</i> ), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , $\lambda$ <sup>-</sup> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>

*TDH3p::MAL62*を導入した株である。

KN09 はエール酵母 A35 (A35 は、*S. cerevisiae* と *S. kudriavzevii* のハイブリッドで 3 倍体である) の *PADI* 遺伝子を破壊した株である。SUN49 と SUN42 はラガー酵母である。KN09 と SUN49 には、YIp 型プラスミドである pUP3GLPMAL21, pUP3GLPAGT1, pUP3GLPAGT1R を *EcoRV* で消化した断片を用いて、染色体の *URA3* にトランスポーター発現ユニットと *PDR4* 遺伝子 (マーカー遺伝子) を導入した。形質転換体は YPG 0.3  $\mu$ g/ml シクロヘキシミド培地で選択した後、表 4-2 に示したプライマーを使って、PCR で発現ユニットの挿入を確認した。SUN42 には 6 種類のプラスミド pJHGMAL21MAL62, pJHGMAL61MAL62, pJHGTT1[D46G]MAL62, pJHGTT1MAL62,

pJHG<sub>MAL21MAL62</sub>MTT1[D46G], pJHG<sub>MAL61MAL62</sub>MTT1 を形質転換した。形質転換体はジェネチシン耐性で選択した。大腸菌 DH5α はすべてのプラスミドの調製に利用した。

表 4-2 第 4 章で用いたプライマー

No.	Sequence	Note
1	-TAGAGGATCCAGATCTGGATCCGGTACCGAGTTATTTGACGAGGTAGATTCT-	MAL62 cloning
2	5'-TAAACAGAATTCGAGATGACTATTTCTGATCATCCAG-3'	MAL62 cloning
3	5'-GTTTAAACGTCGGATGGCAATCCATTA-3'	Inter ORF near HXT12
4	5'-GTTTAAACTATGACCCGCGTGTTCG-3'	Inter ORF near HXT12
5	5'-CGGCCGTTTAAACGCGTCGGATGGCAATCCATTA-3'	Inter ORF near YIL169C
6	5'-CGTTTAAACGCGGCTATGACCCGCGTGTTCG-3'	Inter ORF near YIL169C
7	5'-CGGCCGTTTAAACGCGATAACTGAGGGATTTCCCC-3'	GPR1 disruption
8	5'-CCCGCGCGCCGGGCCATTATGGCCATGTCTGCAC-3'	GPR1 disruption
9	5'-CCCGCGCGCCGGGCCGAAGTGCCTTGTTCGGAG-3'	GPR1 disruption
10	5'-CGGCCGTTTAAACGCGATTATCGTTCTGCGCCTC-3'	GPR1 disruption
11	5'-GTTTAAACCAAGGGGGAAGAATGCAA-3'	Inter ORF near MGA1
12	5'-GTTTAAACTTCGGCTCTTCTGCAGCTA-3'	Inter ORF near MGA1
13	5'-CGGCCGTTTAAACGCGATTATTTCAACAGAACACA-3'	Inter ORF near YGR250C
14	5'-CGTTTAAACGCGGCCATTGCATCAGGTCCATAAAAT-3'	Inter ORF near YGR250C
15	5'-AGCAGGCTCCGCAGGCCTATTTAATGACCACTAACGAGGAA-3'	pI6S_ACT1p-HOG1-05
16	5'-AAGCTGGGTCGGAGGCCTACTGTTGGAACCTATTAG-3'	pI6S_ACT1p-HOG1-05
17	5'-AGCAGGCTCCGCAGGCCTATTTAATGCTAGTCTTCGGACCT-3'	pI6S_ACT1p-MSN4-05
18	5'-AAGCTGGGTCGGAGGCCTCAAAAATCACCGTGCTT-3'	pI6S_ACT1p-MSN4-05
19	5'-AGGCCTATGTCTGGAATGGGTATTGCG-3'	pI6S_ACT1p-HOT1-05
20	5'-AGGC CTATATCCAGCAAGGCTCTC-3'	pI6S_ACT1p-HOT1-05
21	5'-AGCAGGCTCCGCAGGCCTATGAGCTTTCCACCATA-3'	pI6S_ACT1p-SKN7-05
22	5'-AAGCTGGGTCGGAGGCCTATGATAGCTGGTTTTTC-3'	pI6S_ACT1p-SKN7-05
23	5'-AGGCCTATGTCATTAGCAACGGA-3'	pI6S_ACT1p-CRZ1-05
24	5'-AGGCCTTAACTCTTTGTCCCGA-3'	pI6S_ACT1p-CRZ1-05
25	5'-AGCAGGCTCCGCAGGCCTATGTCAAGCGAGGAACGCTC-3'	pI6S_ACT1p-SK01-05
26	5'-AAGCTGGGTCGGAGGCCTCAATTATTGTGAGGTAGAG-3'	pI6S_ACT1p-SK01-05
27	5'-AAAAGCAGGCTCCGCAGATATCATGGTGCCATTGGAAGATC-3'	pI6S_ACT1p-RIM101-05
28	5'-AGAAAGCTGGGTGCG GATA TCATACCAAAATTTTGGG-3'	pI6S_ACT1p-RIM101-05
29	5'-AGCAGGCTCCGCAGGCCTATTTAATGTCGAATGAAAATTATC-3'	pI6S_TPI1p-IGO1-05
30	5'-AAGCTGGGTCGGAGGCC TTATCTAATGGGTGATTAG-3'	pI6S_TPI1p-IGO1-05
31	5'-AGCAGGCTCCGCAGGCCTATTTAATGTTCAATAGAAGTAACACCG-3'	pI6S_TPI1p-RIM15-05
32	5'-AAGCTGGGTCGGAGGCCTCAGTGCCTTTCATCAGAATC-3'	pI6S_TPI1p-RIM15-05
33	5'-AAAAGCAGGCTCCGCAGCGCGCTCATGGCTAGTGAACTTTTG-3'	pI6S_TPI1p-HSP82-05
34	5'-AGAAAGCTGGGTGCG GACGCGCTAATCTACCTCTCCATTTTCGG-3'	pI6S_TPI1p-HSP82-05
35	5'-AGCAGGCTCCGCAGGCCTATTTAATGCAGATTTTCGTCGAAGAC-3'	pI6S_TPI1p-UBI4-05
36	5'-AAGCTGGGTCGGAGGCC TCAGTTACCACCCCTCAAC-3'	pI6S_TPI1p-UBI4-05
37	5'-AGCAGGCTCCGCAGGCCTATTTAATGGCTTTCCAACAAGGTG-3'	pI6S_TPI1p-MDJ1-05
38	5'-AAGCTGGGTCGGAGGCCTAATTTTTTTTGTACC-3'	pI6S_TPI1p-MDJ1-05
39	5'-AGCAGGCTCCGCAGGCCTATTTAATGGCCCCAAAAAAGTT-3'	pI6S_TPI1p-HSP31-05
40	5'-AAGCTGGGTCGGAGGCCTCAGTTTTTTAAAGCGTCG-3'	pI6S_TPI1p-HSP31-05
41	5'-AGCAGGCTCCGCAGGCCTATTTAATGTCATTGACAGCCGATG-3'	pI6S_TPI1p-STI1-05
42	5'-AAGCTGGGTCGGAGGCCTTAGCGCCAGTCCGGATGATA-3'	pI6S_TPI1p-STI1-05
43	5'-CAGGCTCCGCAGCGCGCTATTTAATGAATAATGCTGCAAATAC-3'	pI6S_ACT1p-HSF1-05
44	5'-AGCTGGGTCGGACGCGCTATTTCTTAGCTCGTTTG-3'	pI6S_ACT1p-HSF1-05
45	5'-AGCAGGCTCCGCAGGCCTATTTAATGCCTGTTGAAAAAGAT-3'	pI6S_TPI1p-SGT1-05
46	5'-AAGCTGGGTCGGAGGCCTTACCAATGTTTAGGTTCC-3'	pI6S_TPI1p-SGT1-05
47	5'-AGCAGGCTCCGCAGGCCTATTTAATGGTTAAAGAACTAAG-3'	pI6S_TPI1p-YDJ1-05
48	5'-AAGCTGGGTCGGAGGCCTATTGAGATGCACATTGAAC-3'	pI6S_TPI1p-YDJ1-05
49	5'-TTCCGATGCTGAAAAGACG-3'	pI6S_TPI1p-SSE1-05
50	5'-TGACGGTGTCTTGACTTTG-3'	pI6S_TPI1p-SSE1-05
51	5'-GACGCGCTCATGATGAATTTTTTACATC-3'	pI6S_ACT1p-SCH9-05
52	5'-GACGCGCTCATATTTTCAATCTTCCAC-3'	pI6S_ACT1p-SCH9-05

表 4-2 第 4 章で用いたプライマー(続き)

No.	Sequence	Note
53	5'-AGCAGGCTCCGCAGGCCTATGGTAGACGAAAGTGATAAG-3'	pI6S_TPI1p-RPN1-05
54	5'-AAGCTGGGTCGGAGGCCTTACTCCTCTTCACGATAG-3'	pI6S_TPI1p-RPN1-05
55	5'-ACTATAAGCTCTAGGCCTATGTCTAAAGCTGTCGG-3'	pI6S_TPI1p-SSA1-05
56	5'-ATTAATCGGATCAGGCCTAATCAACTTCTTCGAC-3'	pI6S_TPI1p-SSA1-05
57	5'-AGCAGGCTCCGCAGGCCTATTTAATGTTAAGACAAGCTACAAAAGC-3'	pI6S_TPI1p-HSP78-05
58	5'-AAGCTGGGTCGGAGGCCTTACTTTTCAGCTTCCTC-3'	pI6S_TPI1p-HSP78-05
59	5'-TTTACTGAATTAACAGGCCTATGGTAATACAACTGCTAC-3'	pI6S_ACT1p-GAC1-05
60	5'-GCACAAAAGCAGAGAGGCCTCAAAGTCGCCATCGATCAAC-3'	pI6S_ACT1p-GAC1-05
61	5'-AAGGCCATTGAAGATGCAG-3'	LEU2 F
62	5'-TGCGTCATCTTCTAACACCG-3'	LEU2 R
63	5'-CTAGATTGCATCAGGTCC-3'	verification Expression unit (YGR250)
64	5'-TGAACGTAGGAAGAACG-3'	verification Expression unit (MGA1)
65	5'-ATTACGCTCCCGTTAGGAAC-3'	verification Expression unit (TPI1p)
66	5'-CGTCATTTTCGCGTTGAG-3'	verification Expression unit (TPI1t)
67	5'-GGTTTGAGTAGAAAGGGGAAGG-3'	verification Expression unit (ACT1p)
68	5'-TAAGCACTGACTTTATCTAC-3'	verification Expression unit (ACT1t)
69	5'-GAAATATGGAGGGTGGCTTG-3'	verification of GPR1 disruption
70	5'-CCCTCTGAAGGTATACTGTGG-3'	verification of GPR1 disruption
71	5'-AATGTGGCTGTGGTTTCAGG-3'	verification of Ex. unit to URA3
72	5'-TCGCGTCTGAACCTGTTAAG-3'	verification of Ex. unit to URA3
73	5'-TTACTTGGTTCTGGCAGGT-3'	verification of Ex. unit to URA3
74	5'-CCCAGCCTACTGCAAAGC-3'	verification of Ex. unit to URA3
75	5'-GGGCCACTAGATCGGCCGCAAGCTTACCAGTTCTCACA-3'	TDH3pF1 (pUP3GLP)
76	5'-CGGGCATTAAATGCGGCCGCAAGCTTCAATCAATGAATCGA-3'	TDH3tR1 (pUP3GLP)
77	5'-TGACGAGGTAGATTCTACCTTC-3'	Quantitative PCR for MAL32
78	5'-GCAAGGAATCAATGTTGAGCAG-3'	Quantitative PCR for MAL32
79	5'-CGCAAGAAAACATCCCGACC-3'	Quantitative PCR for lacZ
80	5'-CGGTATTTTTGACACCAGACCA-3'	Quantitative PCR for lacZ
81	5'-TTCACCTTGTATGGTGATGGTGC-3'	Quantitative PCR forPDA1
82	5'-GGGATCAGACATAGAATGGCCA-3'	Quantitative PCR forPDA1

#### 4.2.2 使用プラスミドの構築と各種トランスポーター遺伝子、および変異型遺伝子の作製

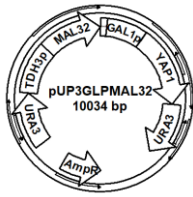
3.2.2 で構築した pJHIXSB をベクターとする各トランスポーター発現プラスミドより、*SacI*-*Bam*HI あるいは *Bam*HI で切り出し、トランスポーター遺伝子を pYCGPY (図 3-1) の *PYK1p* 下流に導入し、発現プラスミド (pYCGPYMAL21, pYCGPYMAL21[E161A], pYCGPYMAL61, pYCGPYMAL61[E161A], pYCGPYAGT1-2HA, pYCGPYSeAGT1, pYCGPYMTT1, pYCGPYAGT1-2HA[L55P], pYCGPYAGT1-2HA[L55P, E167A],) を構築した。pUP3GLPMAL62 (図 4-1A) は、ATCC96955 ゲノムを鋳型としてプライマー1+2 で増幅した *MAL62* を pUP3GLP (56, 図 4-1B) の *TDH3p* の下流に導入して構築した。

pUP3GLP は *GAL1* プロモーターで制御される *YAP1* 遺伝子を持ち、ガラクトース存在下でシクロヘキミド耐性を付与する。pI19\_TPI1p-LacZ-05 (図 4-1C) は、次のようにして作製した。pYC-Z230 (26) より *NotI* で *LacZ* 遺伝子を切り出し平滑化して、pJHXSBP (pJHXSBB の *Bam*HI サイトの後ろに *PmeI* サイトを導入したプラスミド) の *PmeI* サイトに挿入した。そのプラスミドより、*NotI* で *TPI1p::LacZ::TPI1t* を切り出し、pI19-05 (図 4-1D) の *EcoRV* サイト挿入して構築した。pI19-05 は、*FRT::NatR::GAL1p::GIN11::FRT* (57) の両端に、プライマー3+4 と 5+6 を用いて PCR で取得した、*YIL170W* あるいは *YIL169C* に接した ORF 間の部分配列を持つプラスミドであり、*FRT::NatR::GAL1p::GIN11::FRT* と *YIL170W* の間に *NotI* サイトを持つ。*GPR1* 遺伝子

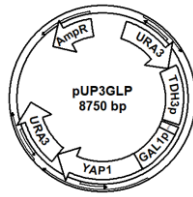
の破壊用プラスミドは次のように構築した。表 4-2 に示したオリゴヌクレオチド 7+8, 9+10 を用いて、*GPR1* 遺伝子の N 末側と C 末側の部分断片を PCR で増幅し、GeneArt mutagenesis kit (Thermo Fisher Scientific) を用いてプラスミド pMCS1 (図 4-1E) のマルチ制限酵素サイトに導入した。N 末側と C 末側の間に挿入した *ApaI* サイトに、プラスミド pBGIN11-05 (図 4-1F) (57) から *FseI* で切り出した *FRT::NatR::GAL1::GIN11::FRT* ユニットを導入し、pBGIN11-05Δ*gpr1* を構築した。

高発現したい遺伝子 (*HOG1*, *MSN4*, *HOT1*, *SKN7*, *CRZ1*, *SKO1*, *PSK2*, *RIM101*, *IGO1*, *RIM15*, *HSP82*, *UBI4*, *MDJ1*, *HSP31*, *STI1*, *HSF1*, *SGT1*, *YDJ1*, *SSE1*, *SCH9*, *LEU2*, *RPN1*, *SSA1*, *HSP78*, *GAC1*) は表 4-2 に示したオリゴヌクレオチド 15~62 を用いて、S288C ゲノムを鋳型として PCR を行い、プラスミド pJHXSb (図 2-1) あるいは pJHACT1pt (図 4-1G) に GeneArt mutagenesis kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて各々のプロモーター、*TPI1p* あるいは *ACT1p* 下流に挿入した。それぞれのプラスミドから発現ユニット *TPI1p::XXX::TPI1t* あるいは *ACT1p::XXX::ACT1t* を *Not I* で切り出し、pI6S-05 (図 4-1H) の *Not I* サイトに導入して、pI6S\_ACT1p-XXX05 (図 4-1I) あるいは pI6S\_TPI1p-XXX05 (図 4-1J) を構築した。pI6S-05 は、プライマー 11+12 と 13+14 を用いて PCR で取得した *MGA1* と *YGR250C* の間の部分配列を、*FRT::NatR::GAL1p::GIN11::FRT* の両端に持つプラスミドであり、*FRT::NatR::GAL1p::GIN11::FRT* と *YGR250C* 近傍の部分配列の間に *Not I* サイトを持つ。pYR-HFLPG (図 4-1K) は *hphMX* (ハイグロマイシン耐性遺伝子) と *GAL1p::FLP* (酵母のリコンビナーゼ) と *ARS1* を持つ YRp 型プラスミドで、Hasunuma *et.al.* の通り構築した (57)。

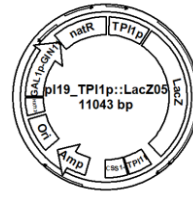
*MAL21* あるいは *AGT1* あるいは *AGT1R* 遺伝子を YIp 型プラスミド pUP3GLP の *TDH3* プロモーター制御下、*SacI*-*BamHI* サイトに挿入して、pUP3GLPMAL21, pUP3GLPAGT1, pUP3GLPAGT1R を構築した。pUP3GLPMAL62 を鋳型として、プライマー 75+76 を用いて PCR で *TDH3p::MAL62::TDH3t* 断片を増幅した。それを *PspOMI* と *NotI* で切り出し、YCp 型プラスミド pJHG に挿入して pJHGMAL62 (図 4-1L) を構築した。pJHMAL21, pJHMAL61, pJHMTT1, pJHMTT1[D46G] から発現ユニット *TPI1p::XXX::TPI1t* を *Not I* で切り出し、pJHGMAL62 に組み合わせて挿入し、次の 6 種類のプラスミド、pJHGMAL21MAL62, pJHGMAL61MAL62, pJHGMTT1[D46G]MAL62, pJHGMTT1MAL62, pJHGMAL21MAL62MTT1[D46G], pJHGMAL61MAL62MTT1 を構築した。代表して pJHGMAL21MAL62 を図 4-1M に示した。pJHG は pJHXSb の *URA3* を pYC040 (26) の *G418R* に *AseI* サイトで組み換え、さらに *NotI* で *TPI1p::TPI1t* を切り出してセルフライゲーションをして構築した。



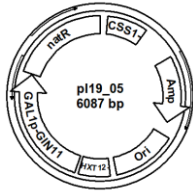
A. pUP3GLPMAL62



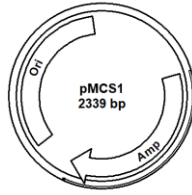
B. pUP3GLP



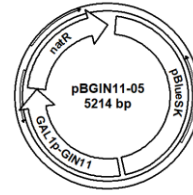
C. pI19\_TPI1p-LacZ-05



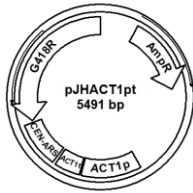
D. pI19-05



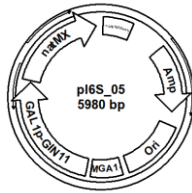
E. pMCS1



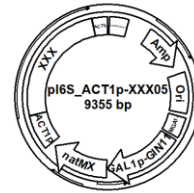
F. pBGIN11-05



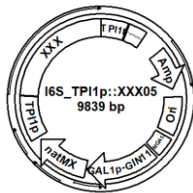
G. pJHACT1pt



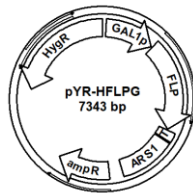
H. pI6S-05



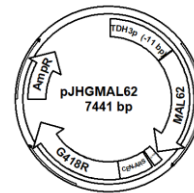
I. pI6S\_ACT1p-XXX05



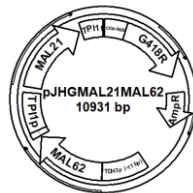
J. pI6S\_TPI1p-XXX05



K. pYR-HFLPG



L. pJHGMAL62



M. pJHGMAL21MAL62

図 4-1 4 章で用いたプラスミド

#### 4.2.3 使用培地と培養

YP5D, YP0.5M, YP5M, YP5S, YP5F, YP4D0.01M, YP4D0.05M, YP4D0.1M, YP4D0.25M, YP4D0.5M, YP4D0.75M, YP4D1M, YP4D1S, YP4D, YP4M, YP2D2M, YPD, YPG は 1% yeast extract と 2% yeast peptone をベースとした、糖の種類と濃度が異なる培地を示している。D, M, S, F, G はそれぞれ、グルコース、マルトース、スクロース、フラクトース、ガラクトースを表しており、D, M, S, F の前の数字はそれぞれの糖が何%含まれているかを示している。例えば、YP4D1M とは、グルコースが 4%、マルトースが 1%含まれていることを示す。数字のついていない YPD, YPG はそれぞれ 2% のグルコースあるいは 2% のガラクトースを含んでいる。D152U あるいは D152MS を親株とする各株の形質転換体の選択には、ジェネチシンの場合は 300 µg/ml, Nat (nourseothricin) の場合は 50 µg/ml, ハイグロマイシンの場合は 300 µg/ml をそれぞれ添加した YPD を用いた。pYCGPY から始まるプラスミドを持つ HD1~HD152 株を培養する時には各培地にジェネチシン (300 µg/mL) を培地に加えた。KN09, Sun49 あるいは Sun42 の形質転換体の選択には、シクロヘキシミド耐性の場合にはシクロヘキシミド 0.3 µg/ml を加えた YPG を用いた。ジェネチシンの場合は 20 µg/ml, Nat (nourseothricin) の場合は 10 µg/ml をそれぞれ添加した YPD を用いた。実験室株はすべて 30°C, 120 rpm で振とう培養を行った。ビール酵母を発酵に用いる場合は、プロパゲーションあるいは発酵の項にそれぞれ培養温度・条件を示した。

#### 4.2.4 麦汁の調製方法

高濃度麦汁、標準濃度麦汁、中麦芽麦汁、低麦芽麦汁は、表 4-3 に示した原料 1 から 5 をそれぞれ仕込釜 (MK) と仕込槽 (MT) に投入し、図 4-2 に示した条件でマッシングを行

表 4-3 麦汁原料配合、煮沸前・最終狙いエキス

	項目	高濃度麦汁		標準麦汁		中麦芽麦汁		低麦芽麦汁	
		MK (kg)	MT (kg)	MK	MT	MK (kg)	MT (kg)	MK (kg)	MT (kg)
1	麦芽 (kg)	6	18	6	18	9.6	14.4	9.6	14.4
2	水 (L)	24	72	24	72	38.4	57.6	38.4	57.6
3	CaCl <sub>2</sub> (g)	4.8	14.3	4.8	14.3	7.6	11.4	7.6	11.4
4	CaSO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O (g)	4.3	12.9	4.3	12.9	6.9	10.3	6.9	10.3
5	乳酸添加狙い pH	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5
	マッシングパターン	A		A		B		B	
	煮沸前 液量 (kg)	71.0		110.0		65.5		22.0	
	煮沸前 エキス (w/w %)	17.0		11.0		14.0		14.0	
6	水あめ (75%) (kg)	-		-		12.7		13.0	
7	水 (L)	-		-		31.8		75.0	
8	ホップ (g)	65		97		97		97	
	最終狙いエキス (w/w %)	20		13		17		14	

って調製した。マッシング後、麦汁はロイターろ過をして、ろ過麦汁のエキス濃度を表に示したように調製し、ホップ、ホップエキス、水あめ、水を加えて 90 min 煮沸した。煮沸後の麦汁をサンプリングし、Density Meter DMA4500 M (アントンパール社) にてエキス



濃度 (AEx) を測定し、必要であれば滅菌水を加えて最終エキスを表のとおりを合わせた。

高濃度麦汁はエキス濃度約 20、普通濃度麦汁はエキス濃度約 13、中麦芽麦汁はエキス濃度約 17、低麦芽麦汁はエキス濃度約 11 になるよう加水し調節した。麦汁は発酵温度にまで冷却した後発酵に使用した。低麦芽麦汁には、それぞれ以下の糖を添加して、LMG 麦汁 (グルコース 40 g/l 添加)、LMHA 麦汁 (マルトース 20 g/l、マルトトリオース 20 g/l 添加)、LM 麦汁 (マルトース 15 g/l、マルトトリオース 5 g/l、グルコース 5 g/l 添加) を調製した。

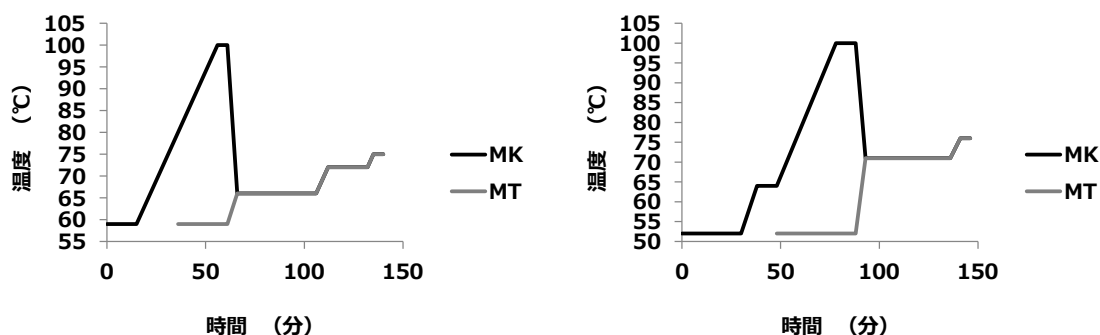


図 4-2 麦汁製造のためのマッシングパターン

MK: マッシュケトル (仕込釜)、MT: マッシュタン (仕込槽)

#### 4.2.5 マルターゼ活性の測定

酵母細胞は YPD で 30°C、一晚振とう前培養し、YP5D, YP4D1M あるいは YP5M 培地に  $OD_{660}=1.0$  となるように植菌した。30°C で振とう培養し、2, 4, 6 h に酵母細胞を集菌し、細胞は破碎用バッファー (0.1 M リン酸カリウムバッファー pH6.8 に protease inhibitor cocktail, Complete Mini EDTA-free [Roche] を 1 錠/10 ml になるように溶解したもの) に懸濁してねじ口のマイクロチューブに移し、0.5 g のガラスビーズ (sigma acid-washed 425-600  $\mu\text{m}$ ) を加えた後、3000 rpm ビーズビーダーにて 1 min 振とう、氷上にて 1 min 冷やすを 5 回繰り返すことで酵母細胞を破碎した。これを遠心 (4°C, 9000 $\times$ g, 10 min) 後上澄みを粗酵素液とした。マルターゼ活性はあらかじめ 30°C にインキュベートしておいた 2.8 ml の 0.1 M リン酸カリウムバッファー pH6.8 と 0.1 ml の 10 mM 4-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside をキュベットに入れ、0.1 ml の適宜希釈した粗酵素液を加え反応のスタートとし、400 nm の吸収を追う。粗酵素液のタンパク質濃度は BCA protein kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて、メーカーの説明書に従って測定した。

4-nitrophenol のモル分子吸光係数を 400 nm で 17.6/ $\mu\text{M}/\text{cm}$  としてタンパク質あたりのマルターゼ比活性 ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg protein}$ ) を算出した。

#### 4.2.6 マルトースあるいはグルコースの取り込み速度の測定

酵母細胞は YPD で 30°C、一晚振とう前培養し、YP5D, YP4D1M, YP5M に  $OD_{660} = 1.0$  となるように植菌し、30, 160 min 振とう培養した。細胞を集菌し 100 mM の酒石酸バッファー、

pH 4.5 で一度洗浄した。10 OD unit ( $OD_{660} \times ml = 10$  にあたる細胞量を意味する。[39]) の細胞を 450  $\mu$ l の同バッファーに懸濁し、基質として、0.4  $\mu$ Ci [ $^{14}$ C]マルトース (Amersham) あるいは 0.4  $\mu$ Ci [ $^{14}$ C]グルコース (American Radiolabeled Chemicals) を用いることを除いて、1.2.7 と同様に測定した。基質濃度は、0.1 mM になるように調製した。

#### 4.2.7 酵母細胞サイズの測定と細胞数の測定

酵母細胞はセルパック液 (Sysmex Corporation) に懸濁し、Electrical Sensing Zone method に基づいた粒度分布測定装置 CDA-500 (Sysmex Corporation) によって直径を測定した。酵母細胞数は適当に希釈 (D) した酵母懸濁液を血球盤 (Thoma) にのせ、顕微鏡にて 100 マス中 (100 マスの容量 =  $0.05 \times 0.05 \times 0.1 \times 100 = 2.5 \times 10^{-2} \text{ mm}^3$ ) の細胞数 (N) をカウントした。酵母数は次の式により計算した。酵母細胞数 =  $N \times D \times 0.04 \times 10^6 \text{ cells/ml}$

#### 4.2.8 マルトース存在下でのヘキソキナーゼ活性の測定

1.5 ml の 0.2 M triethanolamine buffer, pH7.5、0.3 ml の 10 mM  $MgCl_2$ 、0.15 ml の 10 mM NADP、0.25 ml の 6 mM ATP、0.3 ml の 150 mM グルコース、0.17~0.47 ml の水 (水の量は最終容量が 3 ml になるように調製) と、700 mM マルトースを 0, 64.3  $\mu$ l, 300  $\mu$ l をキュベットに入れ、マグネティックスターラーで混ぜながら 30°C でインキュベートした。10  $\mu$ l の glucose-6P dehydrogenase (500 IU/ml,) と 20  $\mu$ l の hexokinase (60 IU/ml,) を加えて反応をスタートさせた。hexokinase によってグルコースから生じた glucose -6P は glucose -6P dehydrogenase によって glucono- $\gamma$ -lactone-6P になる。その際 NADP と反応して生じる NADPH の 340 nm の吸光度を測定した。hexokinase は適宜希釈して用いた。活性は以下の式で求めた。

$$(IU/ml) = \Delta A_{340}/\text{min} \cdot V \cdot D / (6.2 \cdot d \cdot v) = \Delta A_{340}/\text{min} \cdot 3.0 \cdot l / (6.2 \cdot 1 \cdot 0.02)$$

$\Delta A_{340}/\text{min}$  = 340 nm における 1 min 間当りの吸光度変化量

V = 最終液量 (3 ml)

D = 酵素希釈率

6.2 = NADPH のモル分子吸光係数 (l/mmol/cm)

d = 光路長 (1 cm)

v = 酵素液量 (0.02 ml)

#### 4.2.9 ベーターガラクトシダーゼ活性の測定

酵母細胞は YPD で 30°C、一晩振とう前培養し、YP5D, YP4D1M あるいは YP5M 培地 ( $\pm 0.3 \mu\text{g/ml}$  シクロヘキシミド) に  $OD_{660} = 1.0$  となるように植菌した。30°C で振とう培養し、2, 4, 6 h に酵母細胞を集菌した。ベーターガラクトシダーゼ活性は Yeast  $\beta$ -Galactosidase Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて、メーカーの説明書に基づいて測定を行った。すなわち、1 OD unit ( $OD_{660} \times ml = 1$  にあたる細胞量を意味する) の細

胞に弱いアルカリ溶液を加え抽出し、ペーターガラクトシダーゼによる加水分解によって基質である 2-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (2NPG) から生じる 2-nitrophenol の 420 nm での吸光度を測定した。

#### 4.2.10 定量 PCR

RNA サンプルは RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて、メーカーの説明書に基づいて調製した。cDNA は PrimeScript™ RT Master Mix (TaKaRa) を用いて RNA サンプルよりメーカーの説明書に基づいて合成した。合成した cDNA は 80 倍希釈して 2  $\mu$ l を用いて定量 PCR に使用した。定量 PCR SYBR® premix Ex Taq™ kit (TaKaRa) を用いて、StepOnePlus™ system (Thermo Fisher Scientific) で測定した。プライマーにはそれぞれ、MAL32 には 25+26、*lacZ* には 27+28、*PDA1* には 29+30 を用いた。

#### 4.2.11 GC/MS と LC/MS による細胞内代謝物の分析と糖濃度の定量

5 OD unit (OD<sub>660</sub>×ml=5 に相当する細胞量) の酵母細胞をフィルターろ過 (0.2  $\mu$ m pore-size isopore membrane filters [Millipore Corporation]) にて集菌し、氷冷水で二回洗浄した。酵母細胞はフィルターごと凍結乾燥し、1 ml の混合溶媒 (chloroform:methanol:water = 2 : 5 : 2, 8.9  $\mu$ l g/ml Ribitol, 0.09 g/ml D-10-campher sulfonic acid) を加え激しく攪拌した。サンプルは遠心後、900  $\mu$ l の上澄みを取り、400  $\mu$ l の水と混合した。さらに遠心後上澄みを 400  $\mu$ l ずつ 2 つに分け、遠心乾燥後、凍結乾燥した。次に 1 つのサンプルを誘導体化した。oximation のためには 40  $\mu$ l のピリジンに溶解した methoxyamine hydrochloride (20 mg/ml) をサンプルに加え、30°C, 90 min インキュベートした。続いて trimethyl silylation のために、40  $\mu$ l の MSTFA(N-methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide) を加え、37°C, 30 min インキュベートした。GC/MS 分析には GC-2010 Plus gas chromatograph (Shimadzu) と AOC-20 injector/autosampler (Shimadzu) と GCMS-QP2010 Ultra mass spectrometer (Shimadzu) を用いた。カラムには内径 0.25 mm, 長さ 30 m の fused silica capillary column coated with 0.25  $\mu$ m CP-SIL 8 CB low bleed/MS (Agilent Technologies, CA, USA) を用いた。front inlet temperature は 230°C、ヘリウムガス流速は 1.12 ml/min に設定した。カラム温度は 80°C, 2 min 保った後、80°C から 330°C に 15°C/min で昇温させ、その後 330°C で 6 min 保持した。transfer line 温度は 250°C に、ion-source 温度は 200°C に設定した。MS は 85~500 m/z の範囲を 20 Hz でデータ取得した。ピークの自動同定は、サンプルデータを MetAlign (58) と AOutput (59) に供して行った。同定されたピークは、それぞれライブラリとスペクトルを目視にて比べることで確認した。凍結乾燥したもう 1 つのサンプルは 50  $\mu$ l の水に溶解し、LC/MS 分析にかけた。LC/MS 分析には LCMS-8040 (SHIMADZU) を用いた。カラムには内径 3 mm, 長さ 150 mm の L-column2 ODS 2.1 (一般財団法人化学物質評価研究機構[CERI]) を用いた。流量は 0.3 ml/min、カ

表 4-4 グラディエント  
条件

Time (min)	B (%)
0.5	0
7.5	25
11	90
12	90
12.1	0
15	0

ラム温度は 40°C、注入量は 3 µl に設定した。移動相には、A: 15 mM TBA 10 mM 酢酸 in H<sub>2</sub>O、B: MeOH を用い、グラディエント条件は表 4-4 に示した。MS は MRM ESI ネガティブモード、プローブ位置は+1.5 mm、DL temperature は 250°C、Nebulizer gas flow は 2 l/min、Heat block temperature は 400°C、に設定し、その他の条件はオートチューニングによって決定した。

グルコース、マルトース、マルトトリオースは外部標準曲線を用いて定量した。細胞内の糖濃度は、分析に用いた酵母数と、酵母を球として直径から求めた体積から計算した。

#### 4.2.12 CE-TOFMS による代謝物の定量

10 OD unit (OD<sub>660</sub>×ml=10 に相当する細胞)のサンプルを 0.2 µm pore-size isopore membrane filters (Millipore Corporation) を用いてろ過で集菌し、冷水で二回洗浄した。

フィルターを 1.6 ml のメタノールに浸し、細胞内酵素を失活させるために 30 sec 超音波処理した。次に細胞抽出液に内部標準 (H4.304-1002, Human Metabolome Technologies, Inc.) を加えた 1.1 ml のミリ Q 水を加え、さらに 30 sec の超音波処理した。

細胞抽出液は遠心 (4.300 ×g, 4°C, 5 min) した後、タンパク質を除くために 1.6 ml の上澄み液を 5 kDa 分子量カットフィルター (Millipore) を用いて遠心ろ過 (9,100 ×g, 4°C, 120 min) した。ろ液は遠心濃縮した後、50 µl の ミリ Q 水に再溶解し、CE-TOFMS で分析した。分析は Human Metabolome Technologies, Inc に依頼した。CE-TOFMS には Agilent 6210 Time of Flight mass spectrometer, Agilent 1100 isocratic HPLC pump, Agilent G1603A CE-MS adapter kit, Agilent G1607A CE-ESI-MS sprayer kit (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) を用いた。システムは Agilent G4.201AA ChemStation software version B.03.01 でコントロールした。キャピラリーには fused silica capillary (50 µm *i.d.* × 80 cm total length) を用いた。分析条件は次に示す通りでヒューマンメタボロームテクノロジー株式会社 (鶴岡、日本) によって行われた。カチオンモードでの測定には 5 倍、アニオンモードでの測定 には 2 倍に希釈した試料を用いた。

○陽イオン性代謝物質 (カチオンモード)

<測定条件>

Run buffer : Cation Buffer Solution (p/n : H4.301-1001)

Rinse buffer : Cation Buffer Solution (p/n : H4.301-1001)

Sample injection : Pressure injection 50 mbar, 10 sec

CE voltage : Positive, 27 kV

MS ionization : ESI Positive

MS capillary voltage : 4,000 V

MS scan range : m/z 50-1,000

Sheath liquid : HMT Sheath Liquid (p/n : H4.301-1020)

○陰イオン性代謝物質 (アニオンモード)

<測定条件>

Run buffer : Anion Buffer Solution (p/n : I4.302-104.3)

Rinse buffer : Anion Buffer Solution (p/n : I4.302-104.3)

Sample injection : Pressure injection 50 mbar, 25 sec

CE voltage : Positive, 30 kV

MS ionization : ESI Negative

MS capillary voltage : 3,500 V

MS scan range : m/z 50-1,000

Sheath liquid : HMT Sheath Liquid (p/n : H4.301-1020)

CE-TOFMS で検出されたピークは、自動積分ソフトウェアの MasterHands ver.4.3.3.0.8.h (慶應義塾大学開発) を用いて、シグナル/ノイズ (S/N) 比が 3 以上のピークを自動抽出し、質量 電荷比 (m/z)、ピーク面積値、泳動時間 (Migration time: MT) を得た。得られたピーク面積値 は下記の式(1)を用いて相対面積値に変換した。また、これらのデータには Na<sup>+</sup>や K<sup>+</sup>などのアダクトイオン及び、脱水、脱アンモニウムなどのフラグメントイオンが含まれているので、これらの分子量関連イオンを削除した。しかし、物質特異的なアダクトやフラグメントも存在するため、すべてを精査することはできなかった。

精査したピークについて、m/z と MT の値をもとに、各試料間のピークの照合・整列化を行った。

相対面積値 = 目的ピーク的面積値 / 内部標準物質の面積値 × 菌体数 式(1)

検出されたピークに対して m/z と MT の値をもとに、HMT で通常、主要な代謝物質として 選択し、定量を行っているアミノ酸、有機酸、糖リン酸及び核酸を含む 110 物質及び 2-isopropylmalic acid との照合、検索を行った。検索のための許容誤差は MT で ± 0.5 min、m/z では ± 10 ppm<sup>注)</sup>とした。

注) 質量誤差 (ppm) = (実測値 - 理論値) / 実測値 × 10<sup>6</sup>

検量線は内部標準物質により補正したピーク面積を用い、各物質について 100 μM の一点検量 (内部標準物質 200 μM) として濃度を算出した。

#### 4.2.13 細胞内 pH の定量

細胞内 pH は Valli *et.al.*の方法 (60) に基づき、pH 感受性蛍光色素、carboxy SNARF-4FAM (Molecular Probe Inc.) を用いたフローサイトメトリーによって決定した。

2.0 OD unit (OD<sub>660</sub>=1.0 の細胞懸濁液 2 ml に相当する細胞量)の細胞は McIlvaine buffer, pH6.0 に溶解した carboxy SNARF-4F AM に懸濁して染色 (15 min, 30°C) した。染色し

た細胞は8つに分け、そのうちの1つは集菌して McIlvaine buffer, pH6.0 に再懸濁した。

残りの7つは集菌して、250 µl の McIlvaine buffer, pH4.0, 4.6, 5.2, 5.8, 6.4, 7.0, 7.6, にそれぞれ懸濁し、amphotericin B を最終濃度 30 µM になるように加え細胞を透過した。

30°C で 15 min インキュベートした後、励起波長 488 nm でフローサイトメトリーを用いて FL2 (emission signal at 585 nm) と FL3 (emission signal at 670 nm) を測定した。X 軸に細胞をインキュベートしたバッファの pH、Y 軸に FL2/FL3 の値をプロットし、二次の近似曲線を算出して検量線とした。amphotericin B を加えていない細胞の FL2/FL3 値から細胞内 pH を計算した。

#### 4.2.14 酵母のプロパゲーション(ビール醸造のための酵母培養)

各酵母は表 4-5 に示した培地・条件で培養することでスケールアップをした。それぞれの培養から次の培養へは、培養液全量を投入した。最後の静置培養が終了した後は、遠心により全量酵母を回収して発酵試験に供した。

表 4-5 プロパゲーションスケジュール

	1次培養	2次培養	3次培養	4次培養	5次培養	6次培養
容量	10 ml	20 ml	60 ml	300 ml	1.5 L	1.8 L
容器	100 ml マイヤー	100 ml マイヤー	300 ml マイヤー	1 L マイヤー	2 L ボトル	2 L ボトル
液量	-	2 ml	6 ml	60 ml	300ml	SY測定
温度 (°C)	27	25	23	21	15(20)	15(20)
回転数	60 rpm	60 rpm (8 h) → 0 rpm	60 rpm (8 h) → 0 rpm	60 rpm (8 h) → 0 rpm	0 rpm	0 rpm
日数	1 day	1 day	1 day	1 day	5 days	4 days

#### 4.2.15 マルチファームチューブを用いた発酵試験

< 発酵試験 1 > 発酵温度：15°C

供試株：SUN49, HH1500, HH1501

< 発酵試験 2 > 発酵温度：20°C

供試株：KN09, HH065, HH066

麦汁は発酵温度に調整し、純酸素を通気して溶存酸素濃度を 9-10 ppm に調製した。酸素濃度は DO meter OM-71 (HORIBA) で測定した。プロパゲーションした酵母を 2 l の麦汁に 8 g/l となるようにピッチングした。マルチファーム管に発酵もろみを入れ、それぞれ温度を保って発酵を行った。一日一回 40 ml のサンプリングを行い、OD<sub>660</sub> を測定した後、遠心して上澄みを用いてエキス (AEx), pH を測定した。残った上澄みを用いて、糖分析 (発酵試験 1,2)、遊離アミノ態窒素濃度定量 (発酵試験 1,2)、アンモニア定量 (発酵試験 1) を行った。発酵エンドのサンプルについては、上記に加えて、有機酸 (発酵試験 2)、low volatile

compound (発酵試験 1,2)、エタノール (発酵試験 2) の測定を行った。

#### 4.2.16 シリンダーを用いた発酵試験

<発酵試験 3>発酵温度：15°C

供試株：SUN42 に 7 種類のプラスミド (pJHG, pJHGMAL21MAL62, pJHGMAL61MAL62, pJHGTT1[D46G]MAL62, pJHGTT1MAL62, pJHGMAL21MAL62TT1[D46G], pJHGMAL61MAL62TT1) を導入した株

300 ml のシリンダーに 20 mg の珪藻土を入れて、乾熱滅菌した。麦汁は純酸素を通気して溶存酸素濃度を 9~10 ppm に調製した 200 ml の麦汁をシリンダーに入れて、15°C で発酵試験 3 を行った。一日一回 200  $\mu$ l のサンプリングを行い、デジタル糖度計 (ATAGO PR-101 $\alpha$ ) で糖度 (Brix) を測定した。

#### 4.2.17 糖分析

発酵もろみは遠心して酵母やオリを取り除いた後、上澄みをフィルターろ過し、5~100 倍に希釈して定量に用いた。グルコース、マルトース、マルトトリオース濃度はフェニルヒドラジンによるポストカラムラベリング法を用いた HPLC により分離、定量した。移動相には、A: アセトニトリル 900 ml+水 95 ml+ リン酸 5 ml, B: アセトニトリル 750 ml+水 245 ml+ リン酸 5 ml、反応液には酢酸 360 ml+フェニルヒドラジン 12 ml+リン酸 440 ml を用いた。HPLC には Hitachi HPLC LaChrom Elite sugar analysis system (Hitachi High Technologies, Inc.), オートサンプラー (L-4200), カラムオーブン (L-4300), ポンプ (L-4330), FL 検出器 (L-2485) と、カラム Shodex Asahipak NH2P-50 4E を用いた (61)。

#### 4.2.18 遊離アミノ態窒素の測定

発酵もろみは遠心して酵母やオリを取り除いた後、25~100 倍に希釈した。2.0 ml の希釈サンプルと、リン酸緩衝溶液 (pH 8.2) 2.0 ml、TNBS 溶液 (0.1% 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-Na) を混ぜ合わせ、45°C で 90 min インキュベートした後、340 nm の吸光度を測定した。ブランクはサンプルの代わりに水を 2.0 ml を用いて作製した。同時にグリシン溶液 (100 mg/l グリシン) を作製し、サンプルと同様の処理をして検量線を作製した。

遊離アミノ態窒素 (FAN)は mgN/100 ml として表した。

#### 4.2.19 アンモニアの定量

発酵もろみは遠心して酵母やオリを取り除いた後、5~10 倍に希釈した。アンモニアは F kit アンモニア (JK インターナショナル) を用いて製造者のマニュアルに従って酵素的に測定した。測定原理はグルタミン酸デヒドロゲナーゼ (GIDH) と NADH の存在下で、ア

ンモニアを 2-オキシグルタル酸と反応させ、グルタミン酸を生じる反応において、酸化により NADH の減少量を 340 nm の吸光度の減少で測定するものである。NADH の分子吸光係数 6.3 l/mmol/cm を用いて、サンプルのアンモニア濃度を計算した。なお、サンプルは 0.02-0.08 mg/l になるように希釈してから測定を行った。

#### 4.2.20 有機酸分析

発酵もろみは遠心して酵母やオリを取り除いた後、水で 2 倍に希釈してサンプルとした。分析は HPLC を用いて行った。HPLC には Prominence (島津高速液体クロマトグラフ 有機酸分析システム)、オートサンプラー (SIL-20AC)、カラムオーブン (CTO-20AC)、ポンプ (LC-20AD)、FL 検出器 (CDD-10A)、コントローラー (SCL-10A) と、カラム Shim-Pack SCR-102H 300 mmL×8 mmID (2 本使用 直列つなぎ)、ガードカラム SCR-102H を用いた。

移動相には A: *p*-トルエンスルホン酸 0.951 g/l, B: *p*-トルエンスルホン酸 0.951 g/l, エチレンジアミン四酢酸 0.029 g/l, Bis-Tris 4.185 g/l、を用いた。リン酸、クエン酸、ピルビン酸、リンゴ酸、コハク酸、乳酸、ギ酸、酢酸、ピログルタミン酸の 100 ppm の標準液のピークエリア面積より、一点検量により値を求めた。

#### 4.2.21 LVC (low volatile compound) 分析

発酵もろみは遠心して酵母やオリを取り除いた後、10.0 g を LVC 用バイアル瓶サンプルに内部標準液 0.5 ml (*n*-ブタノール 2.1 g を 35.0 g のエタノールで溶解した後、純水で 1 L にメスアップしたもの) と一緒に入れ封印し、分析サンプルとした。以下、機器・条件でガスクロマトグラフィーによるヘッドスペース分析を行った。

GC (島津 GC2010)

カラム： DB-WAX 125-7032 (0.53 mm、30 m、0.001 mm) 極性カラム

キャリアガス：ヘリウム 25 psi

気化室温度： 180°C

オーブン温度： 40°C (5 min) → 昇温 20°C /min (5 min) → 140°C (1 min)

検出器 (FID)：温度 200°C、H<sub>2</sub> ガス 47.0 ml/min、Air 400 ml/min

ヘッドスペースサンプラー (パーキンエルマー TurboMatrix HS)

温度：ニードル 180°C、トランスファー 180°C、オーブン 180°C

タイミング：加圧 1.0 min、注入 0.08 min、引き抜き 0.2 min、オーブン 36 min、PII 18.0 min、サイクルタイム 18.0 min

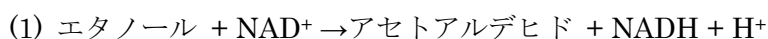
キャリア：25.0 psi

注入方法：全量注入

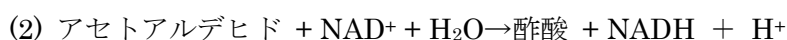


#### 4.2.22 エタノール分析

発酵試験 1 においては、F kit エタノール (JK インターナショナル) を用いて、製造者のマニュアルに従ってエタノールを測定した。発酵もろみは遠心して酵母やオリを取り除いた後、エタノール濃度が 0.10~0.50 mg/l になるように、水で  $2 \times 10^5$  倍に希釈して 0.5 ml を分析に供した。分析原理は次のとおりである。サンプルはアルコール脱水素酵素 (ADH) の存在下 NAD と反応させ、エタノールからアセトアルデヒドを生成する (反応 1)。



反応 1 は左側によっているので、生成したアセトアルデヒドを NAD とアルデヒド脱水素酵素 (Al-DH) の存在下でさらに酢酸に酸化し (反応 2)、その際に生成した NADH を 340 nm の波長で吸光度を測定することにより定量した。



実際の定量では先にサンプル中のアセトアルデヒドを Al-DH を加えて (2) の反応で酢酸にして 340 nm の吸光度を測定した後に、ADH を加えて (1)→(2) の反応でエタノールを酢酸に変え、340 nm の吸光度の増加からエタノール濃度を計算した。エタノール濃度は w/v から換算表 (<http://www.pmda.go.jp/files/000163417.pdf>) を用いて、w/w に換算した。

#### 4.2.23 遺伝子発現解析

遺伝子発現解析は 2.2.17 マイクロアレイアナライシスに述べた通りに行い、発現量を測定した後、Agilent 社の Gene Spring software 14.9.1 (Agilent technologies) によって、PCA 解析、フォルドチェンジ解析を行った。

### 4.3 結果

#### 4.3.1 実験室株を宿主とした $\alpha$ -グルコシドトランスポーター発現株の性質

グルコース誘導性分解耐性を持つ $\alpha$ -グルコシドトランスポーターをビール醸造株へ用いるにあたり、グルコースと他の種類の糖を同時に取り込むことが、何らかの不都合をもたらすのか、まずは実験室株 (D152U: 誘導性マルターゼを持つ株、あるいは D152MS : D152U に構成性マルターゼを導入した株) を宿主として様々なトランスポーターの高発現株を構築し、異なる糖を含有する培地でどのように生育するかを調べた。

##### 4.3.1.1 混合糖培地での Mal21p および Agt1-2HAp[Pro55]発現株の生育阻害

Mal21p はグルコース存在下でも分解されにくいので (図 3-11)、その発現株は他のトランスポーターと比べて、効率よくグルコースと同時にマルトースを取り込む事ができると予想される。麦汁にはグルコースの他にマルトース、マルトトリオースが入っているため、グルコースと一緒にマルトース・マルトトリオースを資化できれば、発酵期間の短縮につながる可能性がある。しかし、通常酵母はグルコースがあるうちは他の糖を資化しないシ

システムを持っている。そこで、酵母がこのシステムを持つことによりどのような意味があるのか、マルトースと同時に他の糖を取り込む事は、酵母に不都合をもたらすのかを実験室株を宿主として調べた。

各  $\alpha$ -グルコシドトランスポーター遺伝子をプラスミド pYCGPY の構成的な *PYK1* プロモーター制御下に挿入し、宿主 D152U に導入した。D152U 株は  $\alpha$ -グルコシドトランスポーターは持たないが、マルトースアクチベーターとマルターゼを持つ株である。構築した株 HD15 (*MAL61*), HD17 (*MAL21*), HD5(*AGT1-2HA*), HD92 (*MTT1*), HD91 (*SeAGT1*), HD1(Vector) を 5%のグルコース、フラクトース、スクロース、マルトースを単独炭素源として含む培地 (YP5D, YP5F, YP5S, YP5M) と、1%のマルトースと 4%の他の糖を炭素源として含む培地 (YP4D1M, YP4F1M, YP4S1M) で生育を調べた。空ベクターを持つ HD1 も含めて、HD17(*MAL21*)を除くすべての株は各種糖を炭素源として含む培地には生育できたが、HD17(*MAL21*)だけは三種類の培地 YP4D1M, YP4F1M, YP4S1M に生育できなかった (図 4-3)。さらに、HD17(*MAL21*) は YP3D2M, YP2D3M, YP1D4M にも生育できなかった (data not shown)。

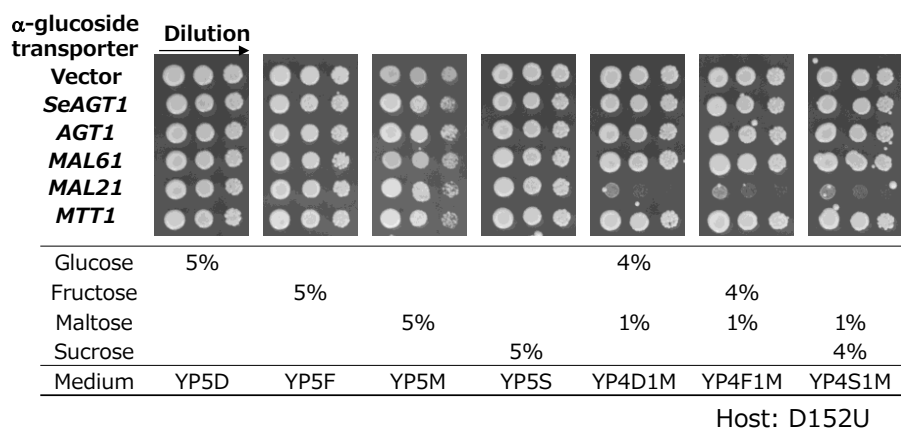


図 4-3 各種トランスポーター発現株の糖による生育の違い-1

Dilution rate: 1, 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>

細胞膜には各種トランスポーターを含め、様々な膜タンパク質が発現している。分解されにくい Mal21p タンパク質を細胞膜に過剰に発現させた時、二種類以上の糖を資化する時に何らかの形で関与する膜タンパク質が細胞膜に適当量局在できなくなる可能性がある。

そこで、過剰な Mal21p タンパク質が細胞膜に存在していることではなく、マルトースの取り込みが原因であることを確かめるために、活性のない Mal21p 変異体である Mal21[Ala161]の発現ベクターを D152U 株に形質転換した。この HD84 (*MAL21[E161A]*) 株は、YP5D や YP5M と同様に YP4D1M 培地で生育することができた (図 4-4)。またマルターゼを構成的に高発現している株 D152MS に *MAL21* 高発現ベクターを導入した株 (HD49) を構築したところ、HD49 (*MAL21*, 構成性マルターゼ) も YP4D1M 培地に増殖可

能であった (図 4-4)。従って、取り込んだマルトースが十分に分解できない状態にあると、グルコースを炭素源として利用できるにもかかわらず、増殖できなくなるものと予想された。

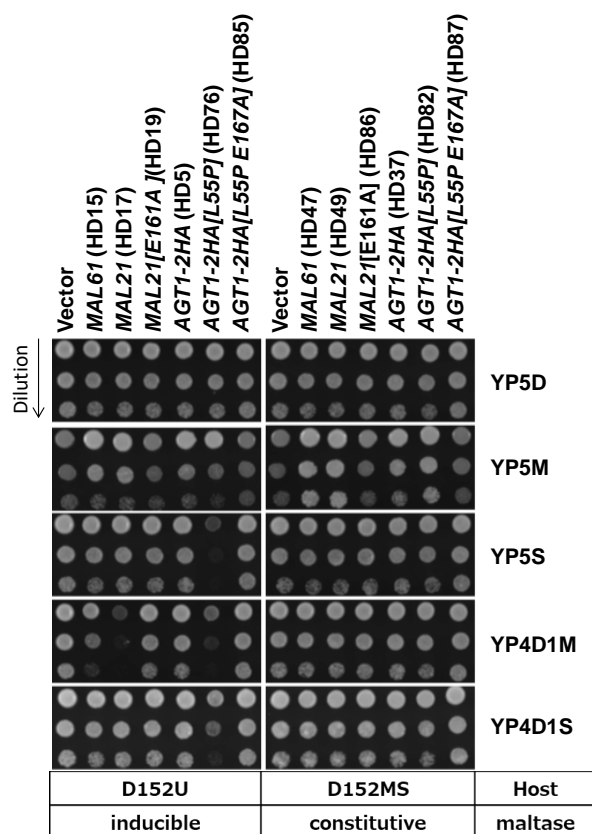


図 4-4 各種トランスポーター発現株の糖による生育の違い-2

Dilution rate: 1, 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>

通常スクロースを分解するインベルターゼを分泌発現し、スクロースは細胞外で分解してグルコースとフラクトースにしてから取り込むことが知られている。従って、Agt1p の高発現によって、スクロースを取り込む能力のある HD76 (*AGT1-2HA[L55P]*)は、スクロースを取り込んで、細胞内で分解できない状態にあると考えられる。一方マルターゼも構成的に高発現する株 HD82 (*AGT1-2HA[L55P]*, 構成性マルターゼ) では増殖阻害が起こっていない。マルターゼはマルトースの他にスクロースも分解することを考慮すると (62)、これら増殖阻害はマルトースに限定したものではなく、スクロースが蓄積した場合にも起こるものと考えられた。HD76 (*AGT1-2HA[L55P]*)が YP4D1M, YP4D1S, YP5S で増殖停止ではなく遅延であったのは、Agt1p は Mal21p と比べて取り込み活性がずっと低いので (図 3-4)、影響が小さかったのだと推測される。

Agt1p はマルトース以外にスクロースやグルコース・フラクトースも取り込むことができるトランスポーターである。二種類の糖のうちの 1 つがマルトース以外でも生育不良が起こるのかどうかを調べるために、グルコース誘導性分解が起こらない変異体 Agt1p-2HA [Pro55]の発現ベクターを D152U 株に形質転換し、HD76 (*AGT1-2HA[L55P]*) を構築した。

HD76 の生育を YP5D, YP5M, YP5S, YP4D1M, YP4D1S で調べたところ、HD76 は増殖停止はしなかったが、YP4D1M, YP4D1S, YP5S で非常に遅い生育を示した (図 4-4)。この増殖遅延は取り込み活性を持たない Agt1p-2HA [Pro55, Ala167]を高発現した株 HD78 では見られなかった。さらにこの増殖遅延は Agt1-2HAp[Pro55]とマルターゼの両方を高発現する株 HD82 でも見られなかった (図 4-4)。 *S. cerevisiae* は通常

#### 4.3.1.2 実験室株 X2180-1A での増殖阻害

HD17 (*MAL21*) で見られた増殖阻害が他の株でも見られるかどうか調べるために X2180-1A の *URA3* 破壊株である HH1152 と、HH1152 に *TDH3p::MAL62* を導入した HH1153 に、pJHIXSB と pJHIMAL21 を *EcoRV* で切断し、ゲノムの *URA3* に導入した。

各培地での構築した株の生育を調べた (図 4-5)。*MAL21* を導入した HH1152 は YP4D1M で全く生育しなかった。HH1152 はマルターゼ遺伝子を持つが、転写活性因子が

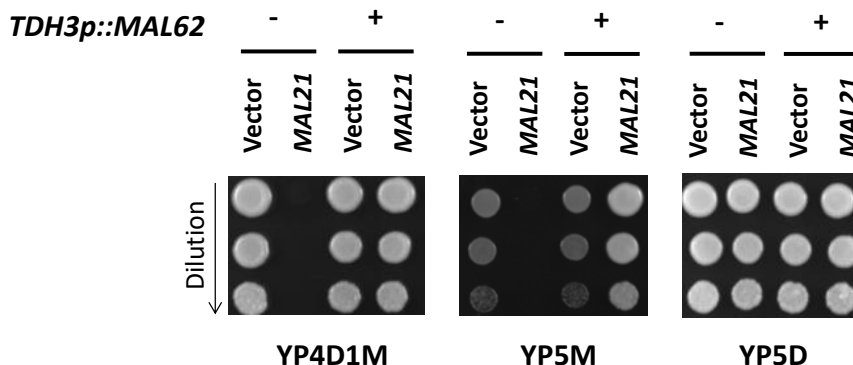


図 4-5 X2180-1A を親株とした *MAL21* 高発現による生育阻害

Dilution rate: 1, 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>

機能しないため、マルターゼが発現しない。従ってマルトースを単独炭素源として生育できないはずである。しかし YP5M ではベクターを導入した HH1152 はわずかに生育した。

これは、図 4-4 でも見られ、好気下ではポリペプトンなどにわずかに含まれる炭水化物を炭素源として酵母がゆっくりと生育できるためだと考えられる (63)。しかし、*MAL21* を導入した HH1152 は、YP4D1M と同様、YP5M では全く生育しない。これらの生育阻害は *MAL62* を導入されている HH1153 では見られないことより、やはりこの株でもマルトースを取り込み、マルターゼで分解できない状態であると、グルコースや他の栄養分が十分あっても生育出来ない事が確認された。

#### 4.3.1.3 増殖阻害を起こした細胞の細胞内代謝物の分析

HD17 (*MAL21*) や HD76 (*AGT1-2HA[L55P]*) が増殖阻害・遅延を起こした時に、細胞内にマルトースやスクロースが蓄積しているのかどうか、また仮にそれらの糖を分解できないとしても、炭素源となりうるグルコースは細胞内に存在しているのかどうか、あるいはまた他の代謝物に大きな変化が起こっているのかどうかを調べるために、表 4-6 に示した条件で各株を培養し、2 h 後の代謝物を GC/MS および LC/MS にて分析した。ATCC96955 は HD17 (*MAL21*) と HD49 (*MAL21*, 構成性マルターゼ) 株の親株で、*MAL61* locus (*MAL61, MAL62, MAL63*) を持っているマルトース資化酵母である。GC/MS 分析 (2 h) の主成分分析結果を図 4-6 に、成分 1、成分 3 の因子負荷量を表 4-7 に示した。

表 4-6 実験 1 条件

水準	株名	トランスポーター	マルターゼ	培地
AD	ATCC96955	<i>MAL61p::MAL61</i>	<i>MAL62p::MAL62</i>	YP5D
AM	ATCC96955	<i>MAL61p::MAL61</i>	<i>MAL62p::MAL62</i>	YP5M
AMD	ATCC96955	<i>MAL61p::MAL61</i>	<i>MAL62p::MAL62</i>	YP4D1M
UD	HD17	<i>PYK1p::MAL21</i>	<i>MAL62p::MAL62</i>	YP5D
UM	HD17	<i>PYK1p::MAL21</i>	<i>MAL62p::MAL62</i>	YP5M
UMD	HD17	<i>PYK1p::MAL21</i>	<i>MAL62p::MAL62</i>	YP4D1M
MSD	HD49	<i>PYK1p::MAL21</i>	<i>TDH3p::MAL62</i>	YP5D
MSM	HD49	<i>PYK1p::MAL21</i>	<i>TDH3p::MAL62</i>	YP5M
MSMD	HD49	<i>PYK1p::MAL21</i>	<i>TDH3p::MAL62</i>	YP4D1M

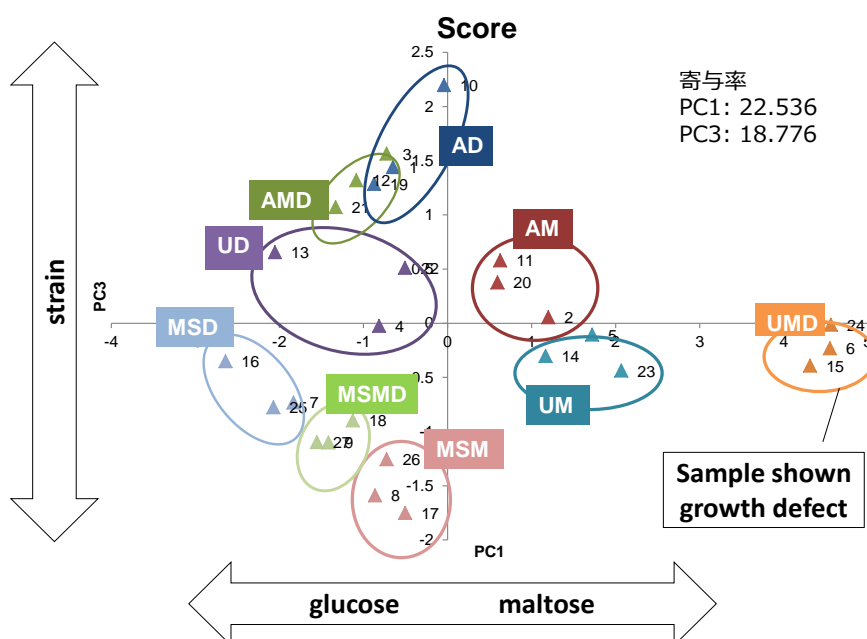


図 4-6 GC/MS 主成分分析 Score plot (Pareto scale) 実験条件 1 2 h-sample

HD49 (*MAL21*, 構成性マルターゼ) 株については成分 1 の軸の負から正の方向へ MSD (YP5D) → MSMD (YP4D1M) → MSM (YP5M) の水準が並んだ。それに対し、HD17(*MAL21*) 株では、UMD (YP4D1M) は、UM (YP5M) よりも、さらに PC1 軸の正方向へプロットが移動した。また、PC3 軸では負から正の方向に HD49→HD17→ATCC96955 の水準が並んだ。PC1 の負の化合物成分には、各種アミノ酸とグリセロールが含まれる。グルコースを含む培地で正常に細胞が増殖している場合には、酵母は培地から資化しやすいアミノ酸を取り込みながら、不足しているアミノ酸についてはその生合成が活発になる。アミノ酸の生合成経路において、ほぼ全ての酸化反応に NAD が用いられる。それに伴う NADH 再酸化のために、NAD-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase によるグリセロールの合成が亢進された結果、グリセロールが多くなったと考えられる。逆に正の化合物成分には、マルトース、マルトトリオースと 2-isopropyl malate があつた。

表 4-7 GC/MS 主成分分析 因子負荷量 (Pareto scale) 実験条件 1

Compound_Name	p1	Compound_Name	p1	Compound_Name	p3	Compound_Name	p3
Maltose_1_Major	0.6786	Glycerol	-0.4349	Phosphate	-0.3615	Glucose_1_Major	0.2022
Unknown_2039	0.1635	Lysine_4TMS_Major	-0.1869	Pyroglutamic acid	-0.3495	Histidine	0.1649
Trehalose	0.0850	Glutamic acid	-0.1402	Alanine_2TMS_Major	-0.2781	Urea	0.1392
Maltotriose_1_Major	0.0845	Aspartic acid	-0.1349	Serine_3TMS_Major	-0.2692	Glycerol	0.0744
Glutamine_3TMS	0.0797	Pyroglutamic acid	-0.1196	Glycine_3TMS_Major	-0.2373	N-Carbamoyl-L-Aspartate	0.0637
2-Isopropyl malate	0.0585	Glycine_3TMS_Major	-0.1181	Threonine_3TMS	-0.2207	Trehalose	0.0545
Unknown_2467	0.0564	Phosphate	-0.1113	Valine_2TMS_Major	-0.2152	Orotic acid	0.0501
Unknown_2218	0.0507	Histidine	-0.1069	Maltose_1_Major	-0.2138	Lactic acid	0.0451
Proline	0.0369	Threonine_3TMS	-0.0996	Ornithine	-0.1856	Succinic acid(or aldehyde)	0.0403
Valine_2TMS_Major	0.0284	Isoleucine_2TMS	-0.0925	Leucine_2TMS	-0.1794	Adenine	0.0268
Tyrosine	0.0211	Serine_3TMS_Major	-0.0780	Aspartic acid	-0.1737	Unknown_1007	0.0261
Asparagine	0.0184	Citric acid + Isocitric acid	-0.0726	Isoleucine_2TMS	-0.1418	Methionine	0.0200
Glucose_1_Major	0.0167	5-Methylthioadenosine	-0.0617	Citric acid + Isocitric acid	-0.1381	Unknown_573_Amine like	0.0168
Maleic acid	0.0114	Alanine_2TMS_Major	-0.0377	Lysine_4TMS_Major	-0.1250	Uridine_1_Major	0.0163
Unknown_142	0.0113	Succinic acid(or aldehyde)	-0.0368	Asparagine	-0.1084	Citrulline	0.0158
ructose 6-Phosphate_	0.0088	Pyruvate+Oxalacetic acid	-0.0355	Glutamic acid	-0.1082	Oxalate	0.0136
Melibiose_1_Major	0.0070	homoserine	-0.0340	Serine_2TMS_Minor	-0.1053	5-Methylthioadenosine	0.0124
Unknown_2267	0.0068	Adenine	-0.0328	Glutamine_3TMS	-0.0944	Unknown_387	0.0117
Unknown_184	0.0060	Methionine	-0.0326	Tyrosine	-0.0937	Anthranilic acid	0.0114
Unknown_156	0.0053	Urea	-0.0325	Phenylalanine	-0.0737	Unknown_546	0.0097

細胞内インテンシティーのグラフを図 4-7 に示した。YP4D1M で HD17 は取り込んだマルトースを十分な速度で分解できずに蓄積している事が確認された。培地作製に用いたマルトースは GC/MS で分析した限り、マルトトリオースのコンタミがないことを確認した。

従って細胞内のマルトトリオースは、マルトースから合成された可能性がある。また、UD と UMD ではグルコースは細胞内に同程度存在した。酵母はグルコースを促進拡散で取り込むが、蓄積したマルトースはこのグルコースの取り込みを阻害しないと考えられた。

つまり HD17 が YP4D1M 培地で生育できないのは、資化できる炭素源が欠乏したわけではない。

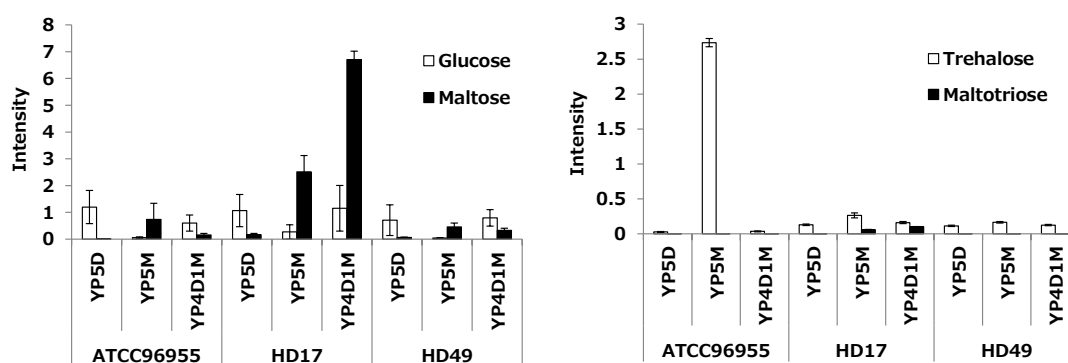


図 4-7 トランスポーター高発現株の細胞内糖濃度 (実験条件 1)

ATCC96955: 親株、HD17: MAL21、HD49: MAL21 構成的マルターゼ

LC/MS 分析の主成分分析結果 (図 4-8) において、水準 UMD は PC1 軸で最も負の位置にプロットされた。PC1 の因子負荷量 (表 4-8) を見ると、glucose-6P (G6P), fructose-6P (F6P), sedoheptulose-7P (S7P), などの糖リン酸に加えて、貯蔵糖合成の基質である UDP-glucose などが高い正の値を示した。また TCA に属する有機酸、クエン酸、リンゴ酸、コハク酸などが高かった。炭素源がマルトースである時、これらの値が高くなるものと思

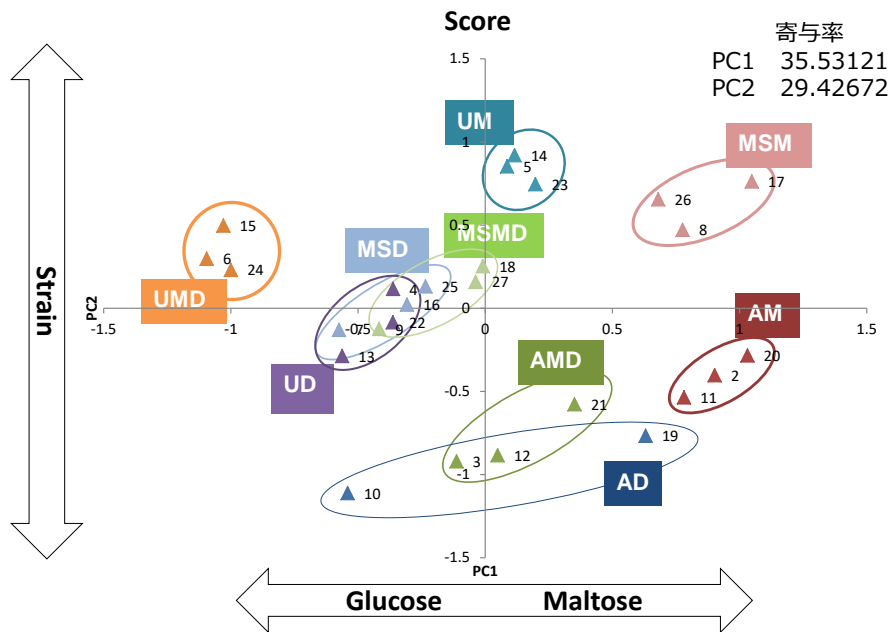


図 4-8 LC/MS 主成分分析 Score plot (Auto scale) 実験条件 1 2 h-sample

われる。負の値を示すものは 2-isopropyl malate が突出して値が高かった。2-isopropyl malate は分枝アミノ酸の生合成経路における調節物質であり、その濃度が高い時、細胞は、分枝アミノ酸が不足しており、分枝アミノ酸の生合成遺伝子の発現・活性が上昇すると言われている。しかし、UMD の水準で分枝アミノ酸が特に少ないわけではなかった。

表 4-8 LC/MS 主成分分析 因子負荷量 (Auto scale) 実験条件 1

Compound_Name	p1	Compound_Name	p1	Compound_Name	p2	Compound_Name	p2
Citrate	0.4564	2-Isopropyl malate	-0.3393	2-Isopropyl malate	0.4990	Orotate	-0.3054
Malate	0.4286	DHAP	-0.0675	Citrate	0.3012	Isocitrate	-0.2543
Glutamate	0.3830	Serine	-0.0265	AMP	0.2908	3-Phosphoglyceraldehyde	-0.1978
Glutathione	0.3017	Hexose	-0.0235	Glucose-6P	0.2407	Succinate	-0.1741
PIPES	0.2358	Ribose-5P	-0.0185	Fructose-6P	0.1800	Phosphoenolpyruvate	-0.1227
Succinate	0.1890	Uridine	-0.0170	Fructose-1,6P	0.1655	ATP	-0.1201
Glucose-6P	0.1648	3-Phosphoglyceraldehyde	-0.0155	UMP	0.1620	Arginine	-0.1170
Sedoheptulose-7P	0.1396	Fructose-1,6P	-0.0150	DHAP	0.1273	UTP	-0.0999
Orotate	0.1345	Pantothenate	-0.0148	GMP	0.1235	Lysine	-0.0921
Isocitrate	0.1314	1,3-Bisphosphoglycerate	-0.0124	UDP	0.0945	Inosine	-0.0755
Arginine	0.1314	Acetyl CoA	-0.0107	Glutathione	0.0910	2-Oxoglutarate	-0.0655
UDP-Glu	0.0986	Methionine	-0.0103	Fructose-1P	0.0896	Histidine	-0.0644
Fructose-6P	0.0937	TMP	-0.0076	NAD	0.0852	GTP	-0.0610
Nicotinate	0.0781	α-Glycerophosphate	-0.0070	Nicotinate	0.0808	Lactate	-0.0604
2-Oxoglutarate	0.0731	Fructose-1P	-0.0039	Sedoheptulose-7P	0.0779	β-Glycerophosphate	-0.0438
Aspartate	0.0557	UMP	-0.0033	Malate	0.0769	1,3-Bisphosphoglycerate	-0.0428
β-Glycerophosphate	0.0539	Inositol	-0.0023	Fructose-2,6P	0.0657	α-Glycerophosphate	-0.0404
ATP	0.0459	Pyruvate	-0.0014	Glucose-1P	0.0560	Ribose-5P	-0.0371
Glutamine	0.0447	Lactate	-0.0014	UDP-Glucose	0.0553	Pantothenate	-0.0365
Asparagine	0.0435	CMP	-0.0011	Ribulose-5P	0.0443	Myo-inositol	-0.0332

次に表 4-9 の水準 2 に示した条件で HD76 と HD82 を培養し、2 h 後の代謝物を GC/MS および LC/MS にて分析した。GC/MS 分析 (2 h) の主成分分析結果を図 4-9 に、PC1, 2 の

表 4-9 実験 2 条件

水準	株名	トランスポーター	マルターゼ	培地
UD	HD76	<i>PYK1p::AGT1-2HA</i> [L55P]	<i>MAL62p::MAL62</i>	YP5D
UM	HD76	<i>PYK1p::AGT1-2HA</i> [L55P]	<i>MAL62p::MAL62</i>	YP5M
US	HD76	<i>PYK1p::AGT1-2HA</i> [L55P]	<i>MAL62p::MAL62</i>	YP5S
UDM	HD76	<i>PYK1p::AGT1-2HA</i> [L55P]	<i>MAL62p::MAL62</i>	YP4D1M
UDS	HD76	<i>PYK1p::AGT1-2HA</i> [L55P]	<i>MAL62p::MAL62</i>	YP4D1S
MSD	HD82	<i>PYK1p::AGT1-2HA</i> [L55P]	<i>TDH3p::MAL62</i>	YP5D
MSM	HD82	<i>PYK1p::AGT1-2HA</i> [L55P]	<i>TDH3p::MAL62</i>	YP5M
MSS	HD82	<i>PYK1p::AGT1-2HA</i> [L55P]	<i>TDH3p::MAL62</i>	YP5S
MSDM	HD82	<i>PYK1p::AGT1-2HA</i> [L55P]	<i>TDH3p::MAL62</i>	YP4D1M
MSDS	HD82	<i>PYK1p::AGT1-2HA</i> [L55P]	<i>TDH3p::MAL62</i>	YP4D1S

因子負荷量を表 4-10 に示した。

GC/MS 分析 (2 h) の主成分分析結果を見ると、マルターゼが発現している HD82 株の水準

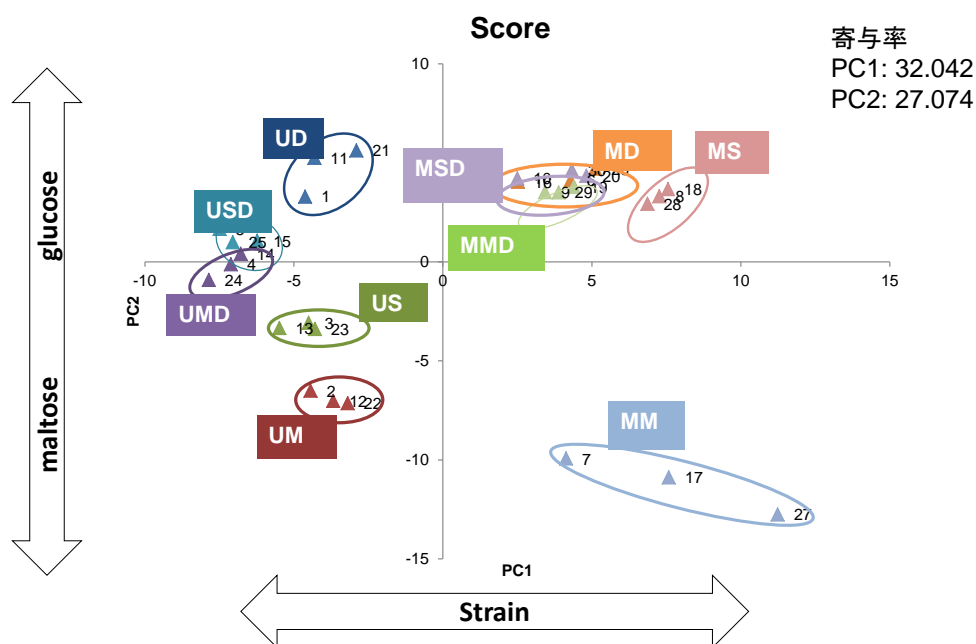


図 4-9 GC/MS 主成分解析 Score plot (Auto scale) 実験条件 2 2 h-sample

MD, MS, MSD, MMD は近いところにプロットされた。グルコースとスクロースは、G protein coupled receptor (GPCR) である膜タンパク質、Gpr1p に結合し、その後 Gpa2p という G タンパク質を介して、PKA pathway が活性化され、細胞増殖に関する様々なプロセスを活性化することが知られている (15, 64)。そういう観点から Gpr1p には結合しないマルトースのみが炭素源である水準 MM だけが、異なる位置になるのは妥当性がある。



表 4-10 GC/MS 主成分分析 因子負荷量 (Auto scale) 実験条件 2

Compound_Name	p1	Compound_Name	p1	Compound_Name	p2	Compound_Name
Pyroglutamic acid	0.1697	2-Isopropyl malate	-0.1370	Allothreonine_3TMS	0.1575	Valine_2TMS_Major
Phenylalanine	0.1639	Unknown_363	-0.1153	N-a-Acetyl-L-Ornithine_2_Same	0.1563	Unknown_172
Aspartic acid	0.1615	Unknown_491_Organic	-0.1059	Ribose	0.1516	Cystathionine
2-Aminobutyric acid	0.1519	Inositol	-0.1040	Glycine_3TMS_Major	0.1514	Alanine_2TMS_Major
Lysine_4TMS_Major	0.1495	Melibiose_1_Major	-0.0941	Glycine_2TMS_Minor	0.1439	Asparagine
Isoleucine_2TMS	0.1468	Turanose	-0.0903	Anthranilic acid	0.1429	Proline
n-Propylamine	0.1456	1-Kestose	-0.0890	Adenine	0.1428	Unknown_8
2-Hydroxypyridine	0.1407	Maltotriose_1_Major	-0.0859	threo-3-Hydroxy-L-aspartic acid	0.1402	4-Aminobutyric acid
Tryptophan	0.1386	Maltose_2_Minor	-0.0803	Unknown_640	0.1391	Unknown_231
Citric acid + Isocitric acid	0.1385	Unknown_364	-0.0798	5-Methylthioadenosine	0.1385	Unknown_127
Phosphate	0.1385	Sucrose	-0.0778	Pyruvate+Oxalacetic	0.1323	Unknown_77
Unknown_657	0.1372	Unknown_399	-0.0749	Glucose_2_Minor	0.1307	Unknown_182
Threonine_2TMS	0.1367	Maltose_1_Major	-0.0733	Unknown_163	0.1302	Glutamine_3TMS
Unknown_44	0.1345	Unknown_400_Sugar like	-0.0689	Serine_3TMS_Major	0.1280	Glutamic acid
Threonine_3TMS	0.1338	Lactitol	-0.0633	Unknown_401	0.1277	Urea
Ornithine	0.1318	Unknown_531	-0.0431	Histidine	0.1264	Unknown_126
Oxalate	0.1315	Glutamine_3TMS	-0.0421	Methionine	0.1261	Unknown_189_Amine
Serine_2TMS_Minor	0.1311	trans-4-Hydroxy-L-proline	-0.0332	Homoserine	0.1199	Ribitol
Succinic acid(or aldehyde)	0.1299	N-Methylethanolamine	-0.0158	Unknown_278	0.1124	Unknown_85
5-Amino-Levulinate_2_Minor	0.1299	Unknown_401	-0.0152	Threonine_3TMS	0.1117	Unknown_43

一方、HD76 株の水準 UD, US, USD, UMD の 4 つは、HD82 株の 4 水準 MD, MS, MSD, MMD に比べると互いに離れた位置となった。HD82 株では構成的に発現しているマルターゼの働きによって、スクロースもマルトースも速やかに分解されるため、実質グルコースを唯一の炭素源としているような代謝に近づくことを示しているのだろう。PC1 軸で負の大きな値を持つ化合物は、2-isopropyl malate と inositol の他、メリビオース、ツラノース、ケストース、マルトース、マルトトリオースなどの糖であった。図 4-10 に細胞内糖のイン

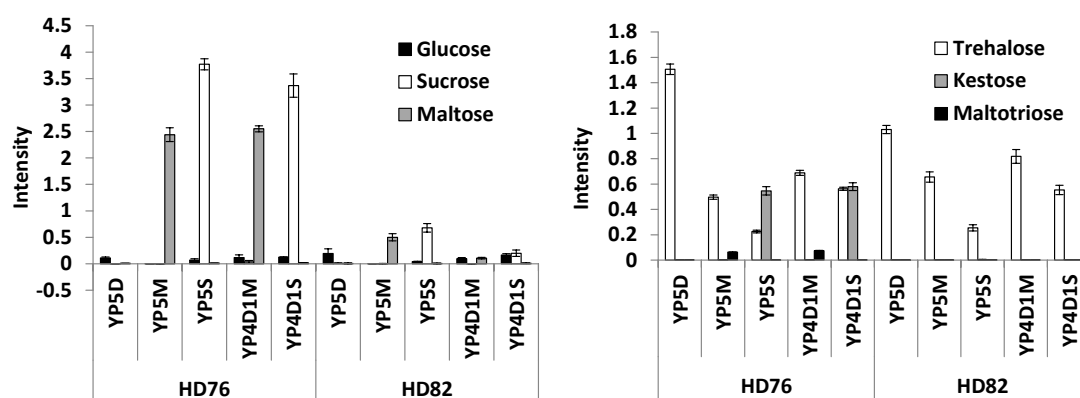


図 4-10 トランスポーター高発現株の細胞内糖濃度 (実験条件 2)

2 h- sample の細胞内糖濃度

HD76: *AGT1[E155P]*、HD82: *AGT1[E155P]* 構成性マルターゼ

テンシティーのグラフを示した。HD76 の水準 UDM (YP4D1M) や UM (YP5M) ではマル

トースやマルトトリオース、UDS (YP4D1S) や US (YP5S) ではスクロースが蓄積しているのが観察された。また、水準 UM 以外ではグルコースも細胞内にある事が確認され、HD76 も HD17 と同じく炭素源としてグルコースを取り込んでいるにもかかわらず、増殖が非常に遅いことが確認された。HD76 の増殖遅延が見られた US, USD, UMD などの水準では、

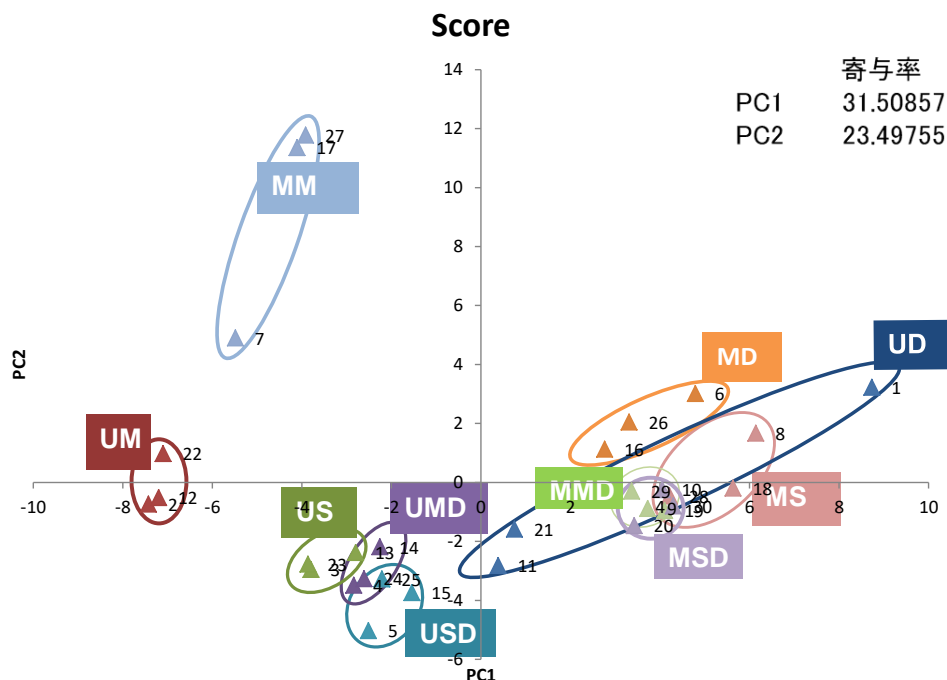


図 4-11 LC/MS 主成分分析 Score plot (Auto scale) 実験条件 2 2h-sample

実験条件 1 と同じく、取り込んだスクロースやマルトースが代謝されずに蓄積し、さらに別の糖へと変換している可能性がある。US, USD の水準にはスクロース ( $\beta$ -D-fructofuranosyl-(2  $\rightarrow$  1)- $\alpha$ -D-glucopyranoside) の他にツラノース ( $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-fructofuranose) や、ケストース (1-O- $\beta$ -D-Fructofuranosyl- $\beta$ -D-fructofuranosyl  $\alpha$ -D-glucopyranoside) が検出された。また、マルトースが培地に含まれている水準、UM, UMD においてのみ、マルトース とマルトトリオースが検出されている。図 4-11 に LC/MS 分析 (2 h) の主成分分析結果を示した。増殖遅延の見られる US, USD, UMD の水準は第 4 象限に位置した。PC1,2 の因子負荷量を示した。PC2 の負の大きな値を持つ代謝物は、2-isopropyl malate, uridine, ribose-5P, NADPH, NADH の他、CTP, ATP, UTP などのヌクレオチドであった。表 4-11 に実験 2 においても増殖遅延の起こる水準で 2-isopropyl malate が高い事が確認された。また、UDP-glucose は PC1 の負の大きな値を持っていた。UDP-glucose は実験 1,2 共に YP5M で最も多いが、増殖阻害・遅延をしている水準でも多い。栄養としては不足がない培地であるにもかかわらず、細胞は増殖をやめて糖を貯蔵に回そうとしていると考えられる。

表 4-11 LC/MS 主成分分析因子負荷量(Auto scale) 実験条件 2

Compound Name	p1	Compound Name	p1	Compound Name	p2	Compound Name	p2
Pantothenate	0.2053	Arginine	-0.1849	Nicotinate	0.2434	2-Isopropyl malate	-0.1366
Pyruvate	0.2048	Glucose-6P	-0.1584	Ribulose-5P	0.2397	Uridine	-0.1119
Acetyl CoA	0.2021	Myo-inositol	-0.1498	NAD	0.2311	Ribose-5P	-0.1031
$\alpha$ -Glycerophosphate	0.1948	Glutathione	-0.1416	Sedoheptulose-7P	0.2234	CTP	-0.0852
3-Phosphoglyceraldehyde	0.1923	Isocitrate	-0.1355	ADP-Ribose	0.2132	ATP	-0.0821
DHAP	0.1844	Fructose-6P	-0.1194	UDP-Glucose	0.2008	UTP	-0.0764
Pyroglutamate	0.1741	Tryptophan	-0.1169	PIPES	0.1947	NADPH	-0.0761
Succinate	0.1734	2-Isopropyl malate	-0.1141	AMP	0.1871	Fructose-1P	-0.0733
NADPH	0.1675	Lysine	-0.1117	GMP	0.1801	NADH	-0.0730
Fructose-1,6P	0.1670	UDP-Glucose	-0.1088	ADP	0.1775	Inosine	-0.0499
UMP	0.1619	Lactate	-0.1049	UDP	0.1772	DHAP	-0.0408
CMP	0.1614	Sedoheptulose-7P	-0.0846	FAD	0.1761	Acetyl CoA	-0.0389
Citrate	0.1558	Inositol	-0.0571	Malate	0.1726	Fructose-1,6P	-0.0354
Orotate	0.1537	Hexose	-0.0517	Glycerate	0.1722	GTP	-0.0163
Uridine	0.1492	PIPES	-0.0419	Lactate	0.1689	$\alpha$ -Glycerophosphate	-0.0048
Inosine	0.1482	Oxalacetate	-0.0355	Glutathione	0.1636	Oxalacetate	0.0019
TMP	0.1428	Malate	-0.0274	Hexose	0.1599	Fructose-2,6P	0.0042
2-Oxoglutarate	0.1423	ATP	-0.0188	CDP	0.1567	NADP	0.0135
NADH	0.1398	Ribulose-5P	-0.0164	FMN	0.1559	Guanosine	0.0162
Fructose-2,6P	0.1388	ADP	-0.0074	Inositol	0.1533	TMP	0.0245

#### 4.3.1.4 HD17 と HD49 のグルコースとマルトース取り込み速度

細胞内代謝物の分析より HD17 は YP4D1M 培地でマルトースとグルコースを取り込んでいると考えられた。これを確認するために HD17 を YP5D, YP4D1M, YP5M で、HD49 を YP4D1M で培養し、30 min, 160 min 後に細胞を集菌して、実際のグルコースとマルトースの取り込み速度を測定した。その結果を図 4-12 に示す。YP4D1M 培地で培養した HD17 は YP5D, YP5M で培養した細胞よりもグルコース、マルトースどちらの取り込み速度も低かったものの、160 min 後でも十分な取り込み

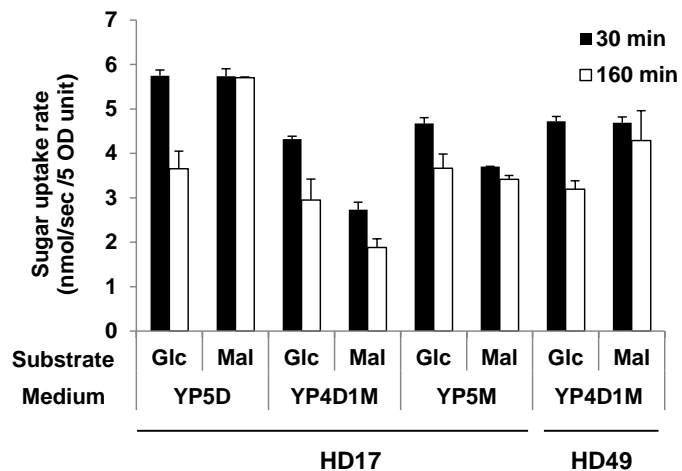


図 4-12 HD17,HD49 株のマルトースとグルコースの取り込み速度

HD17: *MAL21*, HD49: *MAL21*, 構成性マルターゼ  
Glc: Glucose, Mal: Maltose

活性が残っていた。YP4D1M 培地で培養した HD49 の取り込み活性は、両基質共に HD17 に比べると高く推移した。取り込み活性はトランスポーターの合成と分解のバランスで決まると考えられる。HD17 は YP4D1M 培地では合成よりも分解速度が速いのかもしれない。

#### 4.3.1.5 HD17 の生育阻害はマルトース濃度に依存する

Medium	Glucose	Maltose	Vector	MAL61	MAL21
YP4D1M	4%	1%	●	●	●
YP4D0.75M	4%	0.75%	●	●	●
YP4D0.5M	4%	0.50%	●	●	●
YP4D0.25M	4%	0.25%	●	●	●
YP4D0.1M	4%	0.10%	●	●	●
YP4D0.05M	4%	0.05%	●	●	●
YP4D0.01M	4%	0.01%	●	●	●

Dilution ↓

図 4-13 マルトース濃度による HD17 株の生育の違い

HD17: *MAL21*, HD15: *MAL61*

Dilution rate: 1, 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>

ではマルトースが多いが 1 h 後には減少し始め、2 h 後には YP4D0.05M で培養した HD17 の細胞内マルトースとほぼ同じになった。HD17 は YP5M (図 4-4) と YP4D0.05M (図 4-13) には生育可能であることから、細胞内のマルトース濃度がある一定の濃度を超えると HD17 は生育できなくなるのだと考えられる。一方 YP4D1M で培養した HD17 と HD49 の細胞内のグルコースは培養 30 min では高いが以降急速に減少した。YP5M で培養した HD17 には、まったくグルコースが検出されず、マルターゼで分解され生じたグルコースは速やかに代謝されていると思われた。

HD17 の生育阻害がどのくらいのマルトース濃度で生じるのか調べるために、マルトース濃度が 0.01~1% の混合糖培地 (YP4D0.01M, YP4D0.05M, YP4D0.1M, YP4D0.25M, YP4D0.5M, YP4D0.75M, YP4D1M) において HD17 の生育を調べた。HD17 は 0.05% 以下のマルトースには増殖できたが、0.1% 以上のマルトースには生育できなかった (図 4-13)。

YP4D0.05M, YP4D0.1M, YP4D0.25M, YP4D1M で培養した HD17 と YP4D1M で培養した HD49 の細胞内の糖を調べたところ、マルターゼを高発現している HD49 にはほとんどマルトースが検出されず、取り込まれたマル

トースは速やかに分解されていた (図 4-14)。

一方、HD17 の細胞内のマルトースは、培地のマルトース濃度と培養時間に依存して増加していた。YP5M で培養した HD17 では、YP4D0.25M で培養した HD17 より 30 min 後

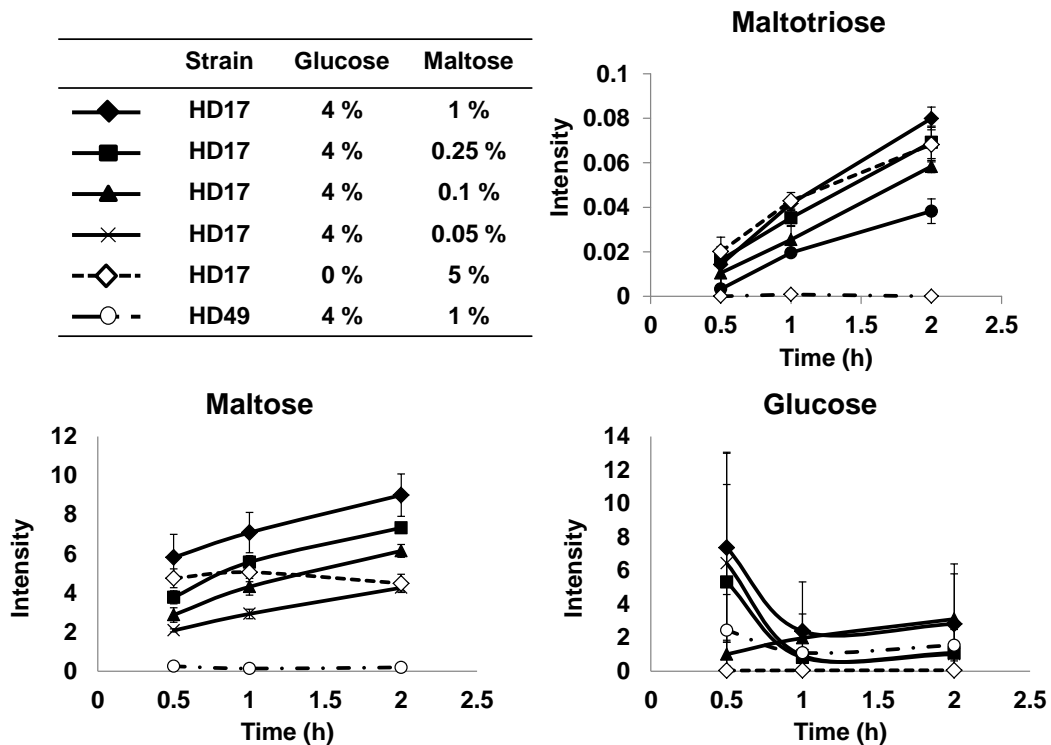


図 4-14 糖濃度の異なる培地で培養した細胞の細胞抽出液糖濃度

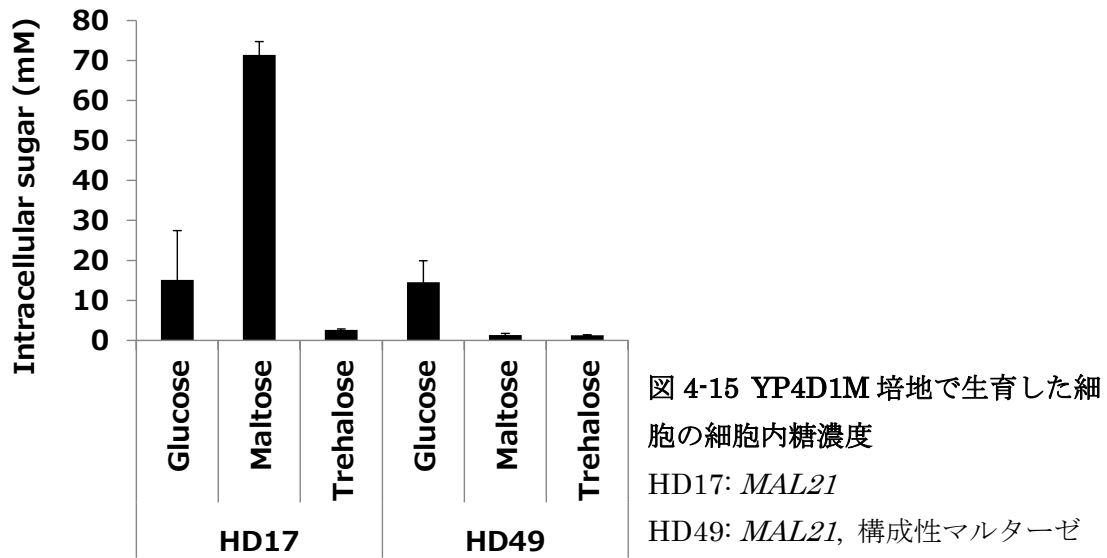
#### 4.3.1.6 HD17 の細胞内糖濃度の定量

YP4D1M で培養した HD17 と HD49 の抽出液の糖濃度を GC/MS で外部検量線を用いて定量分析した。抽出に用いた酵母の細胞数と細胞直径から酵母が球形であるとして計算した体積 (表 4-12) から、細胞内の糖濃度を算出した (図 4-15)。HD17 では細胞内のマルトースは 2 h 後 71.4 mM (2.4%) に達しており、培地のマルトース濃度よりもはるかに高かったのに対し、HD49 では 1.3 mM (0.045%) にすぎなかった。一方、グルコースはどちらの株でも 15 mM (0.27%) 程度で、培地のグルコース濃度 (4%=222 mM) よりもはるかに

表 4-12 細胞内糖濃度測定に供した培養細胞の総細胞容量

Strain	Cell number cells/ml/OD	Cell diameter μm	Cell volume μM <sup>3</sup>
HD17	1.67×10 <sup>7</sup>	5.18	72.7
HD49	1.68×10 <sup>7</sup>	4.98	64.6

低いことがわかった。細胞内は実際にはタンパク質などで非常に混み合った状態にあり、溶質は 30%にも達する (65)。それを考慮して計算すると、細胞内での実際のマルトース濃度は 102 mM (3.67%)にも達していると予想される。



#### 4.3.1.7 HD17 と HD49 のマルターゼ遺伝子の発現とマルターゼ活性

YP5D, YP4D1M, YP5M で培養した HD17 と YP4D1M で培養した HD49 のマルターゼ活性およびマルターゼ遺伝子発現量を測定した。マルターゼを構成的に発現している HD49 の 2 h 後のマルターゼ遺伝子の発現を 100% とした時、YP5M で培養している HD17 では 100%、YP4D1M で培養している HD17 でも 15% のマルターゼ遺伝子の発現が見られた (図

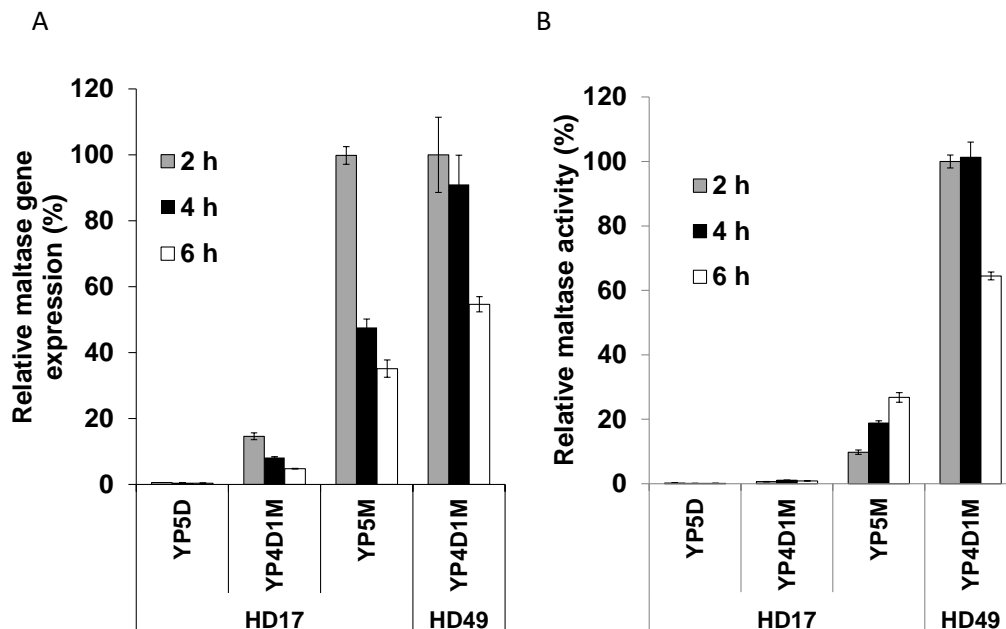


図 4-16 HD17 株のマルターゼ遺伝子発現量とマルターゼ活性

A: マルターゼ遺伝子発現量、B: マルターゼ比活性

HD17: *MAL21*, HD49: *MAL21*、構成性マルターゼ

4-16A)。しかし、その時の HD49 でのマルターゼ活性を 100%とすると、YP5M で培養している HD17 では 9.8%, YP4D1M で培養している HD17 では 0.6%の活性しかなく、両者共に遺伝子発現量と比較して酵素活性が低いことがわかった (図 4-16B)。YP5M で培養している HD17 では時間と共にマルターゼ活性は上昇したが、YP4D1M で培養している HD17 では活性は変わらなかった。YP4D1M 培地では HD17 はグルコースを利用できるので、炭素源という観点からはマルトースを資化する必要はない。しかし細胞内マルトースを減少させるためにはマルターゼの発現が必須である。YP5M ではマルターゼを合成することができるので、細胞内マルトースを減少させられるが、YP4D1M では遺伝子は発現しているが、マルターゼがほとんど合成されないので細胞内マルトースを減らせないことがわかった。

#### 4.3.1.8 HD17 と HD49 細胞内 pH の影響

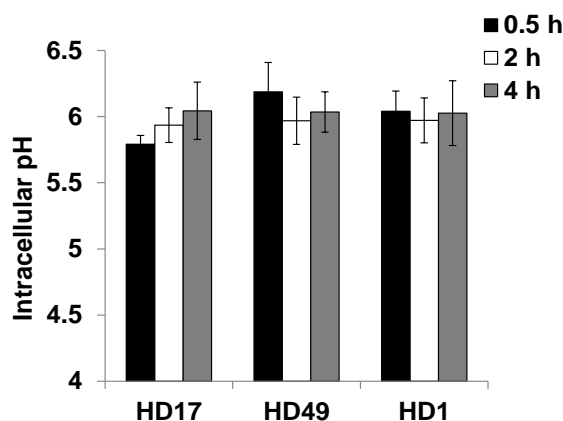


図 4-17 YPDM 培地で培養した HD17 株の細胞内 pH

HD1: Vector, HD17: *MAL21*,  
HD49: *MAL21*、構成性マルターゼ

Mal21p はプロトンシンポーターであるので、マルトースを取り込む時プロトンも一緒に取り込む。従ってプロトンの排出が十分でなければ細胞内の酸性化が起こる可能性がある。解糖系の多くの酵素は中性付近に至適 pH がある。例えば解糖系の酵素であるヘキソキナーゼの至適 pH は 7.5 (66)、phosphofructokinase の至適 pH は 7.8 (67)、triose isomerase の至適 pH は 7.5 (68) であるため、酸性化が進むと解糖系代謝速度は低下すると予想される。

YP4D1M で培養した HD17 と HD49 の pH は 30 min 後にはそれぞれ 5.79、6.19 であった (図 4-17)。両株とも 2 h 後には、5.9 付近、4 h 後には 6.0 付近でほ

ぼ同じ pH となり、両株の親株である ATCC96955 とほぼ同じ pH であった。従って細胞内 pH の低下は一時的に生育阻害の原因となったとしても、恒久的な増殖停止の原因になるとは考えられない。YP4D1M では、HD17 よりも HD49 の方がマルトース取り込み速度は高い (図 4-12) ため、より多くのプロトンが流入したはずだが、HD49 の pH は HD17 より高く、プロトンの排出能が高い状態にあると考えられた。それは、H<sup>+</sup>ATPase タンパク質発現量の差や、ATP 生産能 (解糖系代謝の活性化状態)の差を意味する可能性がある。(4.3.1.10 にて述べる)

#### 4.3.1.9 HD17の細胞内浸透圧の上昇と増殖阻害

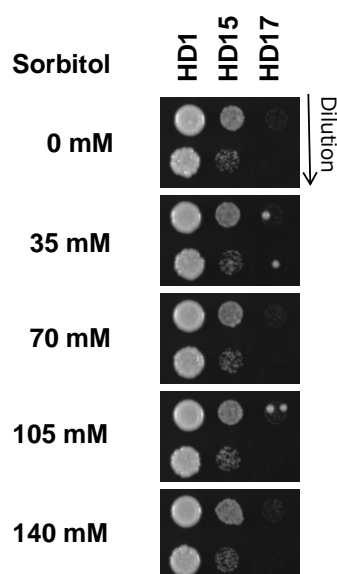


図 4-18 YP4D1M 培地での HD17 の生育へのソルビトール添加の影響

HD1: Vector, HD15: *MAL61*

HD17: *MAL21*

Dilution rate: 1,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$

はないと考えられる。YP4D1M で培養した HD17 細胞は顕微鏡観察しても特に HD49 の細胞と違いはなく、メチレンブルーによる死菌染色においても大きな差は見られなかった (data not shown)。

#### 4.3.1.10 増殖阻害を起こした HD17 の細胞内代謝物解析

マルトース取り込みに伴って流入したプロトンの排出は、 $H^+$ ATPase によって行うため ATP が消費される。細胞内のエネルギー状態を調べるため、混合糖培地で培養した HD17 と HD49 のヌクレオチド種を CE-TOFMS で調べた (図 4-19)。すべてのヌクレオチド三リン酸が、HD17 では減少したのに対し、HD49 では増加した。一方すべてのヌクレオチド二リン酸と IMP を除く全てのヌクレオチド一リン酸は、HD17 と HD49 のどちらでも時間と共に増加したが、HD17 の方が HD49 よりも濃度が高かった。HD17 は低いエネルギー状態にあり、ATP の産生と消費のアンバランスが起こっていると思われた。IMP は *de novo* のプリンヌクレオチド生合成において、中心にある物質であり、GTP 合成における律速段階は IMP から XMP への反応である (72)。HD49 では IMP が増加するのが見られたのに対し、HD17 では IMP は減少傾向であった。従って HD17 は GTP 合成を含むプリン生合成を抑制している可能性がある。cAMP はどちらの株でも減少したが、HD17 では HD49 よ

酵母細胞は細胞外よりも細胞内浸透圧が高い状態を維持し、水が流入しようとする膨圧によって細胞の形態を保っている。また逆に膨圧によって細胞が破裂しないように固い細胞壁で細胞を守っている。外環境の浸透圧の変化に対して、酵母は浸透圧調節物質であるグリセロールの蓄積と放出、あるいは水の流入と流出によって対応すると考えられている (69, 70)。しかし細胞内浸透圧の上昇によって必要以上に膨圧が上昇した際には、細胞膜・細胞壁が損傷する危険が生じる (70, 71)。YP4D1M で培養した HD17 には、71.4 mM のマルトースが蓄積しているため、水の流入が起こり細胞は膨圧によって細胞膜、細胞壁等に損傷を受けるかもしれない。

そこで混合糖培地にソルビトールを 0 から 140 mM 添加した培地にて HD17 の生育を観察した。

しかしどの濃度でも HD17 は生育しなかった (図 4-18)。ソルビトールは 1 M までの添加をしても生育しなかった (data not shown)。従って、マルトースの蓄積による膨圧の上昇が増殖阻害の原因で



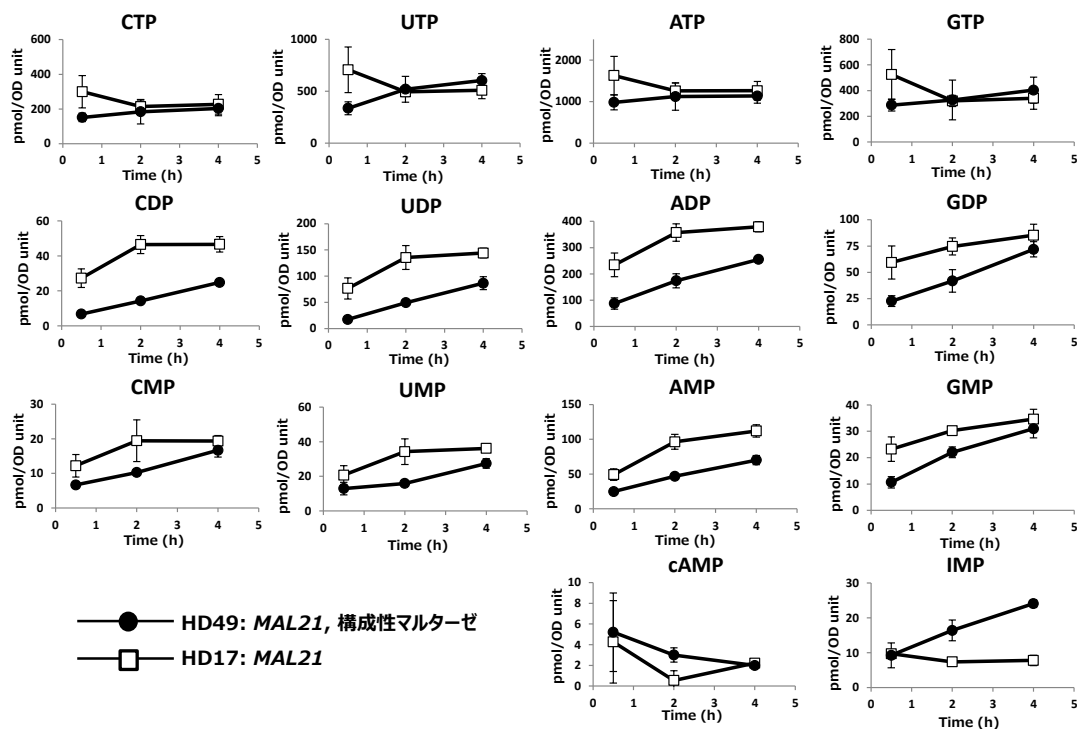


図 4-19 YP4D1M 培地で培養した HD17 株の各種ヌクレオチド濃度

りさらに低かった。

図 4-20 に HD17 と HD49 の解糖系の中間代謝物を示した。解糖系の前半の代謝物量は HD17 ではすべて低かった。Phosphofructokinase は解糖系のキーとなるアロステリック酵素で、解糖系の律速段階である。Phosphofructokinase は fructose 2,6-bisphosphate と AMP によって活性化され、ATP によって阻害される (73, 74)。YP4D1M 培養後 0.5 h で、Phosphofructokinase の生成物 fructose 1,6-bisphosphate は HD17 では HD49 の 35% だった。また解糖系の初めの反応の生成物である glucose-6P も HD49 より HD17 の方が低い。HD17 は YP4D1M で培養した時、解糖系代謝は最初のステップから減速していると思われた。低い energy ratio ( $[ATP]+0.5[ADP] / ([ATP]+[ADP]+[AMP])$ ) は、解糖系代謝速度を上げるシグナルとなるはずであるが (75, 76)、YP4D1M という N 源、C 源共にリッチな環境であるにもかかわらず、HD17 は ATP 生成につながる解糖系代謝を活性化していない。

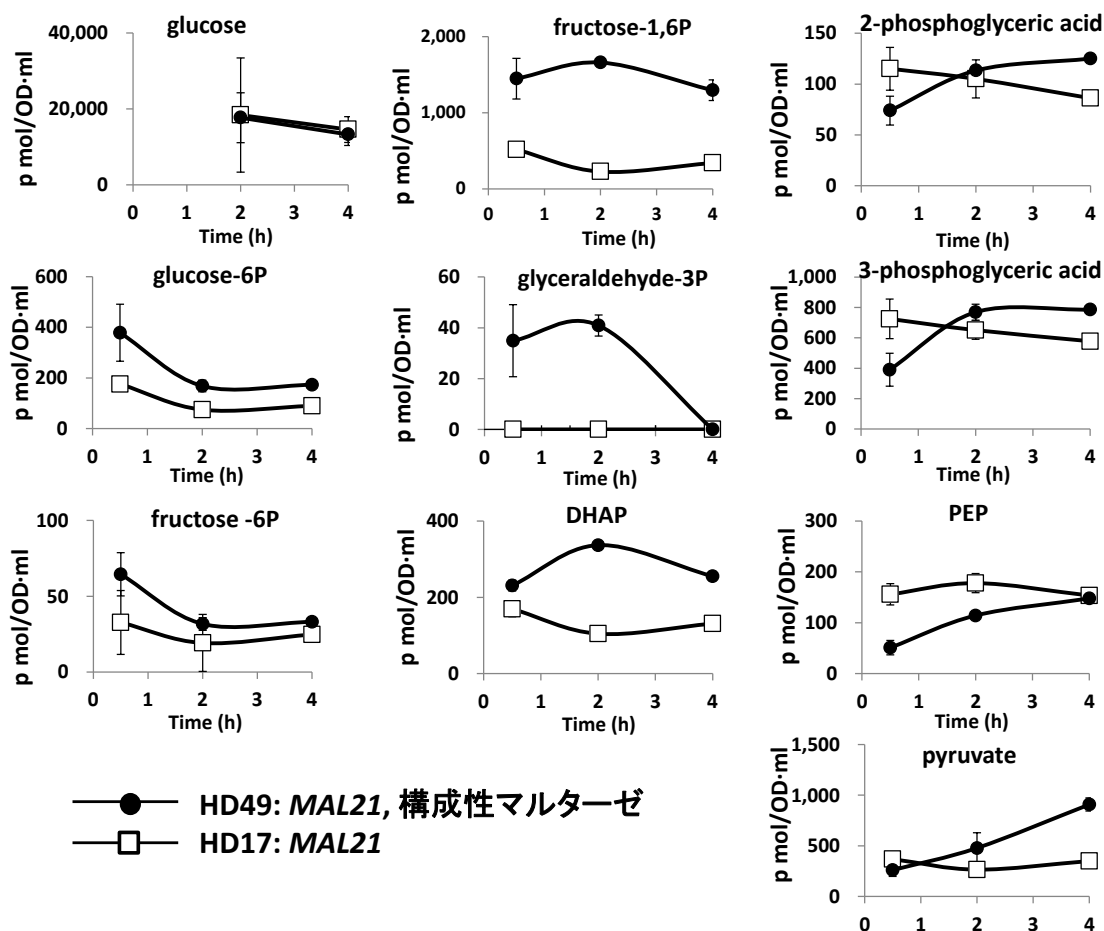


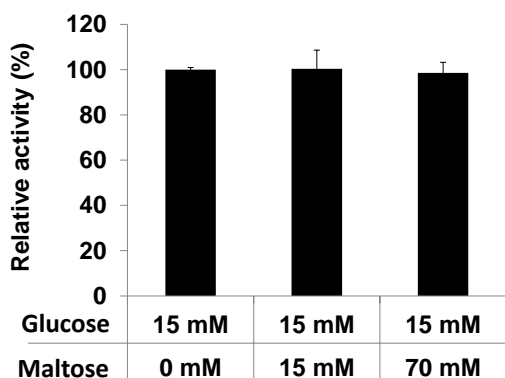
図 4-20 YP4D1M 培地で培養した HD17 株の解糖系中間代謝物

DHAP: dihydroxy acetone, PEP: phosphoenolpyruvate, fructose-1,6P: fructose-1,6-bisphosphate,

#### 4.3.1.11 細胞内マルトースのヘキシキナーゼ活性へ影響

YP4D1M で培養した HD17 株では細胞内に 71 mM ものマルトースが溜まっている。

4.3.1. 10 に述べたように、YP4D1M で培養した HD17 では解糖系の最初の反応の生成物である glucose-6P の濃度も低くなっている (図 4-20)。そこで、最初の反応を触媒するヘ



キシキナーゼの反応を、HD17 株の細胞内の濃度である 15 mM のグルコースを基質として、15 mM あるいは 70 mM のマルトースが阻害しないかどうか調べ

図 4-21 マルトース添加がヘキシキナーゼ活性に与える影響

グルコースが 15 mM, maltose が 0 mM でのヘキシキナーゼ活性を 100%とした

た (図 4-21)。その結果、マルトースが 70 mM あってもヘキシナーゼ活性はほとんど変わらなかった。

#### 4.3.1.12 増殖阻害を起こした HD17 細胞の遺伝子発現解析

HD17 を YP5D, YP4D1M, YP5M で、HD49 を YP4D1M で 2 h 培養した後、細胞を集め RNA を調製した。遺伝子発現は Yeast Genome 2.0 (アフィメトリクス社) マイクロアレイで調べた。4 つの条件(UD,UM,UMD,MSMD 表 4-6 参照)の遺伝子発現の主成分解析の結果を図 4-22 に示す。YP4D1M で培養した HD17 は、成分 2 の正の方向に位置した。因子

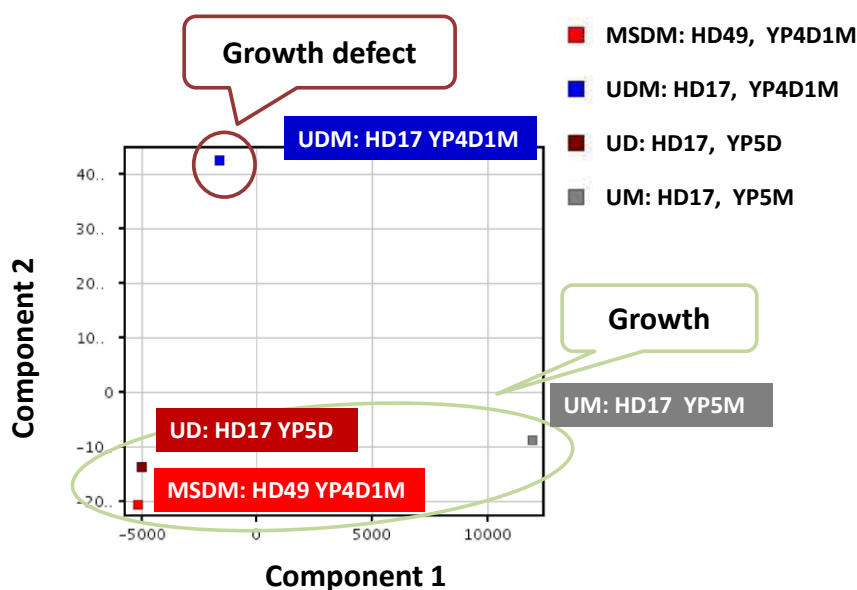


図 4-22 4 つの条件 (UD,UM,UMD,MSMD) で培養した細胞の遺伝子発現 主成分解析  
 寄与率 X: component1 69.87, Y: component2 25.04  
 HD17: MAL21, HD49: MAL21 構成性マルターゼ

負荷量 のトップ 250 の遺伝子について、Gene Ontology Term で分類すると、16.2%が plasma membrane (GO:0005886|GO:0005904)、13.7%が cell wall organization or biogenesis (GO:0071554|GO:0070882)で、細胞周辺部に関する遺伝子が多く含まれていた。また、12.2%が炭水化物代謝 (GO:0005975 carbohydrate metabolic process)、4.6% が硫黄含有アミノ酸代謝 (GO:0000096 sulfur amino acid metabolic process) に関する遺伝子グループに属していた (図 4-23)。また、ボトム 250 の遺伝子は、98%が GO:0005515|GO:0045308 protein binding、8%が GO:0070897 DNA-templated transcriptional preinitiation complex assembly に関する遺伝子グループであった。

YP4D1M で培養した HD17 の遺伝子発現量が YP4D1M で培養した HD49 のそれより 3 倍以上増減した遺伝子を表 4-12 にまとめた。グリコーゲン合成に関わる *GAC1*, *GSY1* は 3 倍以上の増加が見られた。*GAC1*, *GSY1* については、YP5M で培養した HD17 ではもっと

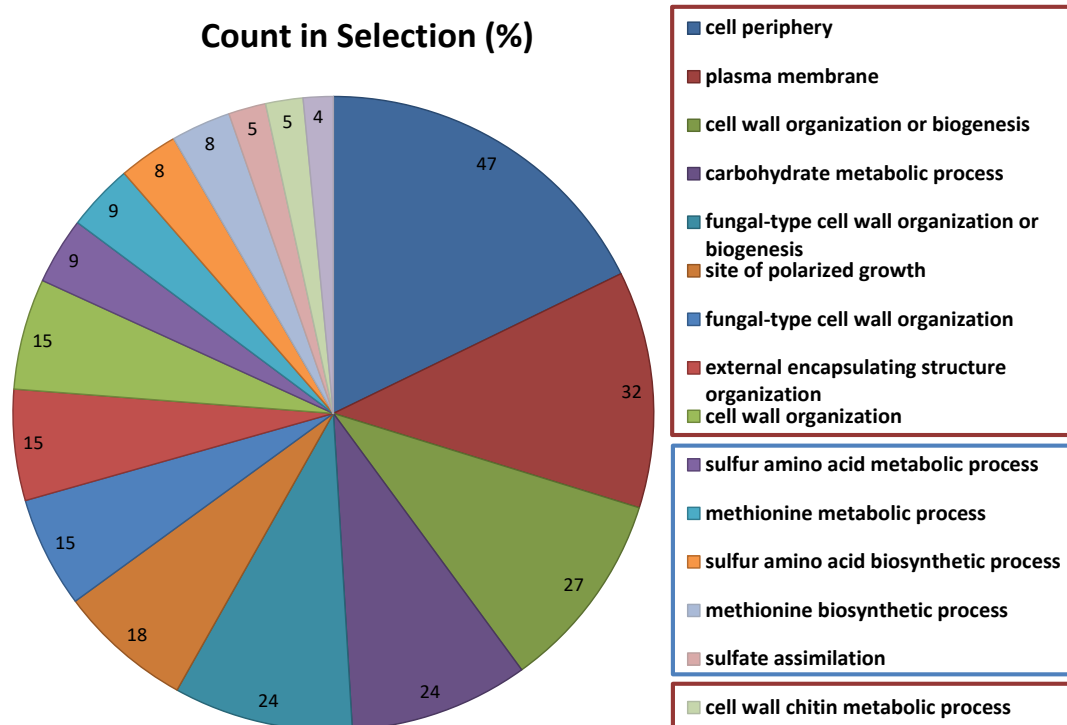


図 4-23 遺伝子発現量 主成分分析 component 2 のトップ 250 遺伝子の gene ontology term

- : cell wall, membrane などに関連する遺伝子群
- : 硫黄代謝に関連する遺伝子群

高い。図 4-24 A にグリコーゲンの生合成経路、図 4-24 B にグリコーゲンの合成とその制御に関わる遺伝子の発現量、図 4-24 C にグリコーゲン合成制御機構、図 4-24 D に 4.3.1.3 で述べた実験条件 1 で分析した glucose-1P, UDP-glucose のインテンシティを示した。

YP5M と YP4D1M 培地ではグリコーゲン合成・制御に関わる遺伝子の発現量が増加していた。また、グリコーゲン合成の中間産物である glucose-1P や UDP-glucose も増加していた。UDP-glucose に対する Km 値の報告がないが、*Neurospora crassa* の同酵素の UDP-glucose に対する Km 値は 2 μM (77)、またウサギの筋肉の同酵素では 4.41 μM (78) と報告されている。それに対して酵母のマルターゼのマルトースに対する Km 値は 14.3 mM であり大変高い。また、Glg2 は glycogenin だけでなく、マルトースも基質になりマルトトリオースを生成することが報告されている (79)。従って YP5M や YP4D1M で培養した HD17 で検出されたマルトトリオースは、グリコーゲン合成における副産物である可能性がある。細胞は解糖系で糖を代謝するよりも、まずは糖が蓄積することを避けるためにグリコーゲンを合成しているようである。表 4-13 には他に細胞壁合成酵素や、細胞壁タンパク質をコードする *PIR3*, *GAS2*, *CWPI1*, *PST1* が含まれていた。これらのタンパク質はすべて

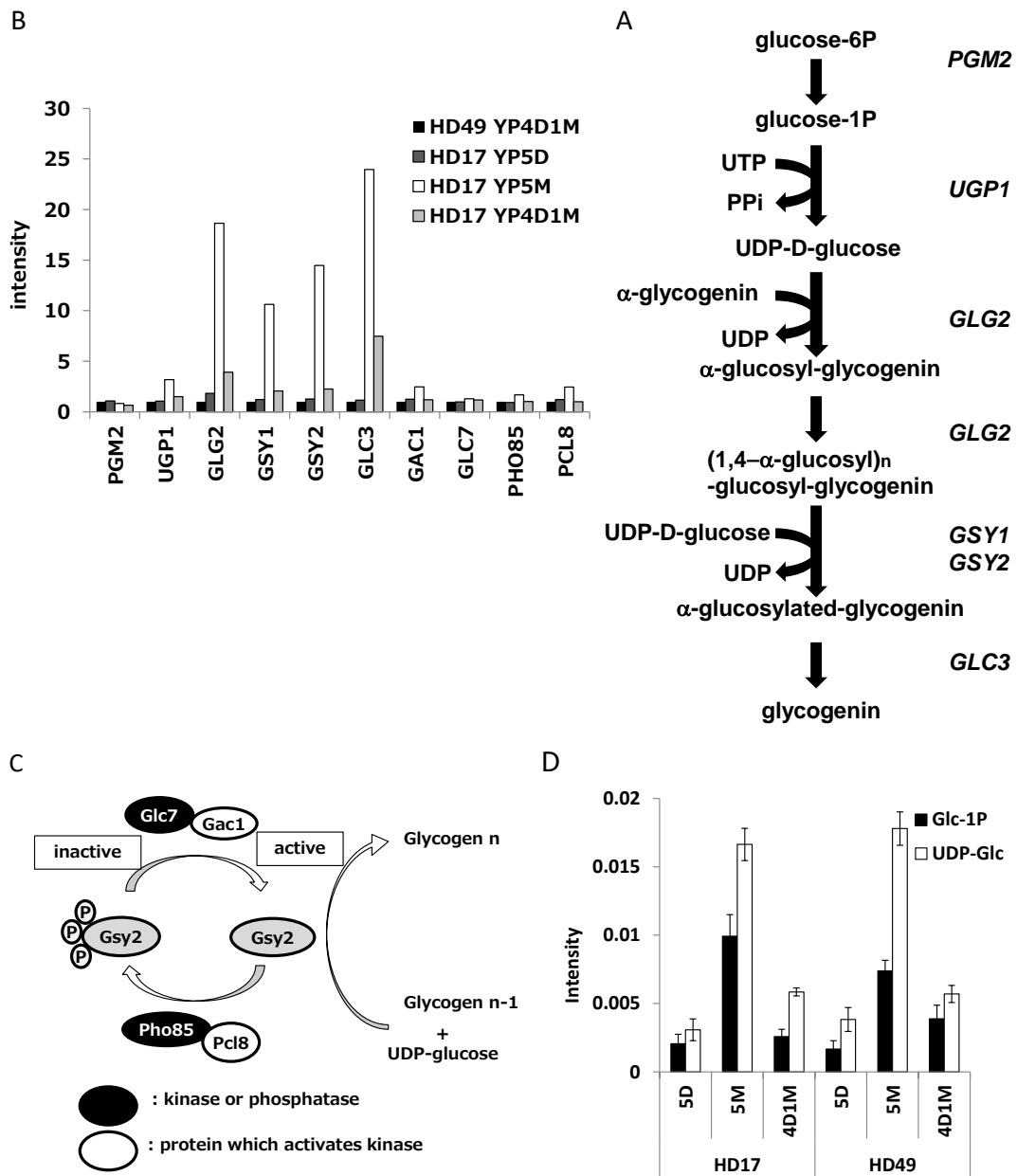


図 4-24 HD17 と HD49 でのグリコーゲン代謝

A: グリコーゲン合成経路、B: グリコーゲン合成に関わる遺伝子の発現

C: glycogen 合成の制御機構、D: 細胞中の glucose-1P と UDP-glucose

HD49 の発現量を 1 とした

Glc-1P: glucose-1P, UDP-Glc: UDP-glucose

HD17: *MAL21*, HD49: *MAL21* 構成性マルターゼ

表 4-13 UMD で MSMD よりも 3 倍以上発現量の高い遺伝子

Gene Symbol (Systematic Name)				
<i>XBP1</i>	<i>MSN4</i>	<i>GAP1</i>	<i>SUE1</i>	<i>AGP2</i>
<i>YAR068W</i>	<i>HXT6///HXT7</i>	<i>IMA5</i>	<i>GSY1</i>	<i>RTN2</i>
<i>YKR075C</i>	<i>RGI2</i>	<i>PDC6</i>	<i>YMR247W-A</i>	<i>YDR034W-B</i>
<i>ANS1</i>	<i>APT2</i>	<i>YTP1</i>	<i>TSA2</i>	<i>PRX1</i>
<i>POT1</i>	<i>JEN1</i>	<i>OM14</i>	<i>UGX2</i>	<i>SSP2</i>
<i>ECM23</i>	<i>CRG1</i>	<i>SUC2</i>	<i>ICL1</i>	<i>PCK1</i>
<i>PIR3</i>	<i>SPG4</i>	<i>YCR108C</i>	<i>HPA2</i>	<i>DAK2</i>
<i>HXK1</i>	<i>PRM5</i>	<i>YJR115W</i>	<i>SFC1</i>	<i>YLR108C</i>
<i>YLR312C</i>	<i>KDX1</i>	<i>DDR2</i>	<i>FAA1</i>	<i>NDI1</i>
<i>GAS2</i>	<i>YLR031W</i>	<i>YNL144C</i>	<i>KTR2</i>	<i>MET5</i>
<i>CYC7</i>	<i>DSF1///YNR073C</i>	<i>RRT12</i>	<i>YLR342W-A</i>	<i>GDE1</i>
<i>TMA10</i>	<i>MET6</i>	<i>ECM4</i>	<i>ZWF1</i>	<i>ASK10</i>
<i>POX1</i>	<i>YMR206W</i>	<i>YGR273C</i>	<i>UBP11</i>	<i>MET16</i>
<i>AYT1</i>	<i>ALD4</i>	<i>STR3</i>	<i>YAT2</i>	<i>SHC1</i>
<i>MTH1</i>	<i>EDS1</i>	<i>SGA1</i>	<i>YLR012C</i>	<i>YSP3</i>
<i>MET2</i>	<i>CSR2</i>	<i>YOR161C-C</i>	<i>YCR100C</i>	<i>YAR035C-A</i>
<i>YOL047C</i>	<i>YPL088W</i>	<i>GAL7</i>	<i>SPO77</i>	<i>YOR062C</i>
<i>LEE1</i>	<i>ADH2</i>	<i>PFK26</i>	<i>IME2</i>	<i>YHR213W</i>
<i>RCK1</i>	<i>YFL052W</i>	<i>MET13</i>	<i>STF1</i>	<i>FMP33</i>
<i>MEK1</i>	<i>SHH3</i>	<i>FRE7</i>	<i>MAL33</i>	<i>PRM10</i>
<i>GAC1</i>	<i>DAL80</i>	<i>HXT5</i>	<i>ADR1</i>	<i>HXT4</i>
<i>HMX1</i>	<i>YLR149C</i>	<i>SUL2</i>	<i>ERG5</i>	<i>MRK1</i>
<i>YLR307C-A</i>	<i>RRT6</i>	<i>GRE1</i>	<i>ARI1</i>	
<i>CAT8</i>	<i>GUT2</i>	<i>AFR1</i>	<i>PMA2</i>	
<i>SMA2</i>	<i>CYB2</i>	<i>REG2</i>	<i>AZR1</i>	
<i>USV1</i>	<i>HXT13</i>	<i>MLS1</i>	<i>GPG1</i>	
<i>COS111</i>	<i>CIN5</i>	<i>SIP4</i>	<i>PET10</i>	
<i>YNR065C</i>	<i>CTA1</i>	<i>DDI2///DDI3</i>	<i>VAM10</i>	
<i>CRC1</i>	<i>YDR182W-A</i>	<i>YGR067C</i>	<i>ZRG8</i>	
<i>SRX1</i>	<i>PRM6</i>	<i>IDP2</i>	<i>PST1</i>	
<i>YHR210C</i>	<i>ATO2</i>	<i>CAR2</i>	<i>REE1</i>	
<i>YAL065C</i>	<i>YLR042C</i>	<i>YHL015W-A</i>	<i>YKL107W</i>	
<i>GPH1</i>	<i>NCA3</i>	<i>YMR230W-A</i>	<i>SEO1</i>	
<i>SUL1</i>	<i>CWP1</i>	<i>BOP2</i>	<i>PDH1</i>	

糖修飾されたタンパク質である。もしかすると糖修飾に必要な基質 GDP-mannose や UDP-glucose などと比較して、細胞内の他の糖濃度が上昇してしまうと糖タンパク質を正常に合成する事に支障が出るため、これらの遺伝子の発現が上昇したのかもしれない。また、表 4-13 には PCA で抽出されたのと同じく、含硫アミノ酸合成に関わる遺伝子も多く含まれていた。酵母はセルサイクルと連動して含硫アミノ酸硫化水素を発生する事が知られている (80)。硫化水素は硫化イオンから含硫アミノ酸を合成する際の間代謝物の一つである。YP4D1M で培養した HD17 は増殖しないが、アミノ酸を合成しようとしているように思われる。

#### 4.3.1.13 ストレス応答遺伝子の高発現、あるいは *GPR1* の破壊は HD17 株の生育をレスキューしない。

表 4-13 にある *MSN4* は HD17 では HD49 の 3 倍以上の発現をしている。*MSN4* は浸透圧ストレスをはじめ、ヒートショック、酸化ストレス、低 pH、グルコース飢餓、ソルビン酸・高エタノールなどの条件下で発現量が上昇することが知られている 200 以上ものタンパク質の転写因子である。また、主成分分析においては、*HSP70* ヒートショックタンパク質ファミリーの一つである *SSA1* が因子負荷量の高い遺伝子の一つであった。主成分分析の成分 2 のトップスコア 250 の遺伝子について、Gene Spring 14.9.1 (Agilent technologies) で direct interaction を調べたところ、106 の遺伝子が *SSA1* と関係のある遺伝子であった。*SSA1* は molecular chaperon であり新しく合成されたタンパク質のフォールディングを助けると共に、ミスフォールディングしたタンパク質、凝集したタンパク質を分解して、ミトコンドリアや ER に局在させたり、異常なタンパク質の分解を促進したり様々な役割を負う (81,82)。また 1.4 で述べたように *Ssa1p* はマルトースアクチベーターである *Mal63p* とグルコース存在下では強く結合し、*MAL* locus からの転写が促進されないようにする。YP4D1M で培養した HD17 において *SSA1* の発現量が上昇したのは、*MAL* locus からの転写を抑えるためか、あるいは細胞内にマルトースが蓄積した状態では異常タンパク質が増加するので、それを解消するためなのかもしれない (16)。他にも *HSP78*, *ROT1*, *LHS1* の 3 つの分子シャペロンが主成分解析の成分 2 のトップスコア 250 に入っており、このことも異常タンパク質が増加している事を示しているのかもしれない。主成分分析やフォールドチェンジ解析から抽出されてきたストレス応答に関係する遺伝子や、糖の資化に関係する遺伝子 (*SSA1*, *HSP78*, *RPN1*, *HOG1*, *MSN4*, *HOT1*, *SKN7*, *CRZ1*, *SKO1*, *PSK2*, *RIM101*, *IGO1*, *RIM15*, *HSP82*, *UBI4*, *MDJ1*, *HSP31*, *STI1*, *HSF1*, *SGT1*, *YDJ1*, *SSE1*, *SCH9*, *LEU2*) について高発現ベクターを作製し、HD17 (pYCGPYMAL21) と HD1 (pYCGPY) のゲノムに導入して、各株の YP4D1M プレート培地での生育を調べた。しかし、どの株も生育可能にならなかった (図 4-25 A,B)。HD17 も HD49 も YP5M と YP4D1M でグリコーゲン合成・制御に関連する遺伝子が高発現していた (図 4-24 B)。

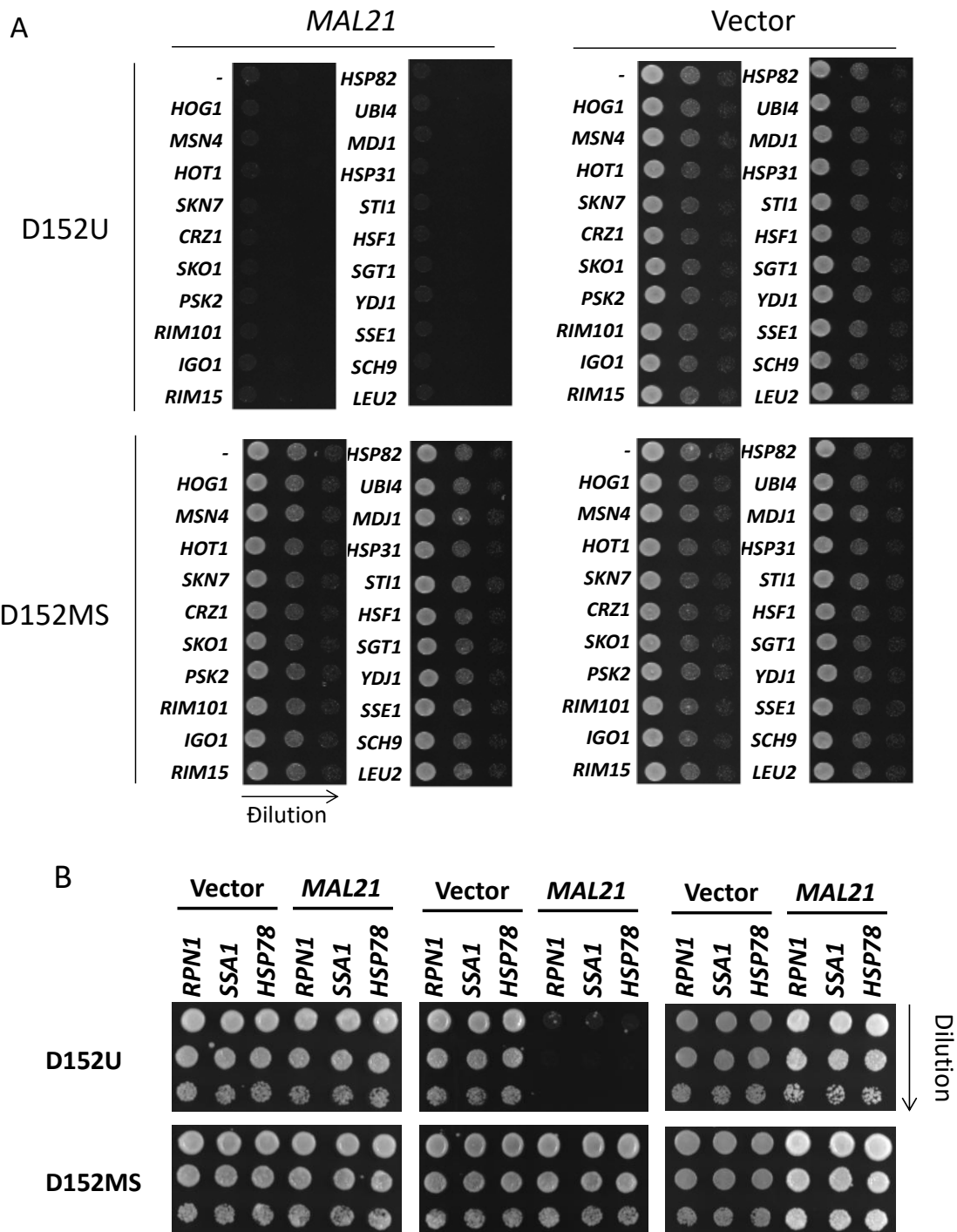
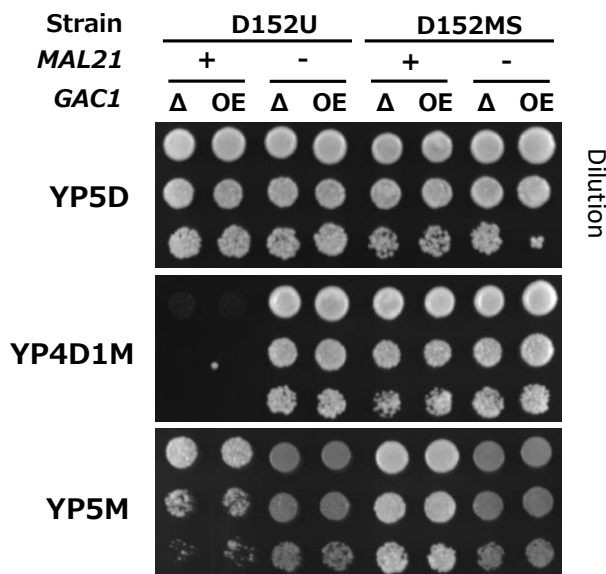


図 4-25 A, B 各種ストレス関連遺伝子の高発現が HD17 の YP4D1M での生育に与える影響

HD17: *MAL21*, HD49: *MAL21*, 構成性マルターゼ, HD1: Vector, HD33: Vector, 構成性マルターゼ の 4 株に対して、各々のストレス関連遺伝子の高発現ユニットを導入した株 (HD101~HD150) を YP4D1M にスポットした。Dilution rate: 1, 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>





$\Delta$ : deletion  
OE: overexpression

図 4-26 *GAC1* (Regulatory subunit for Glc7p type-1 protein phosphatase) を高発現した HD17 の YP4D1M での生育

HD17: *MAL21*, HD49: *MAL21*, 構成性マルターゼ, HD1: Vector, HD33: Vector, 構成性マルターゼ の 4 株に対して、*GAC1* を破壊、あるいは高発現した株をスポットした。

Dilution rate: 1,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$



図 4-27 *GPR1* 遺伝子を破壊した HD17 の YP4D1M での生育

HD17: *MAL21* と HD1: Vector の *GPR1* を破壊した株をスポットした。

Dilution rate: 1,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$

は HD17 でタンパク質合成が抑制されているからかもしれない。そこで HD17 における合成能を調べるために、HD17 と HD49 (*MAL21* 構成性マルターゼ) に解糖系のトリオースイソメラーゼ遺伝子、*TPI1* のプロモーターにつないだ  $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子 (*lacZ*) を

そこで、グリコーゲン合成代謝の活性化が HD17 の YP4D1M で生育を助けるかもしれないと考え、Glc7p type-1 protein phosphatase の制御因子である *GAC1* を HD17 で高発現した。しかし、HD17 株は YP4D1M で生育するようにならなかった。また逆に HD49 株の *GAC1* の破壊は YP4D1M と YP5M での生育に影響しなかった (図 4-26)。従って、グリコーゲン合成は HD49 株にとっても生育に必須ではないことがわかった。炭素源がグルコースの場合、グルコースセンサーである *Gpr1* がグルコースをセンシングし PKA pathway が活性化する (83)。マルトースを取り込んだ時はプロトンを排出する必要性から、エネルギー的には不利な状態となるので、YP4D1M 培地で PKA pathway が活性化した状態は何らかの不都合を生じるかもしれないと考え、*GPR1* の破壊株を作製し、YP4D1M プレート培地での生育を調べた。しかし生育可能とはならなかった (図 4-27)。

#### 4.3.1.14 増殖阻害を起こした HD17 細胞でのタンパク質合成停止

YP4D1M で培養している HD17 (*MAL21* 誘導性マルターゼ) はマルトースの取り込み活性が YP5D で培養したよりも低かった。またマルターゼ遺伝子発現量と比較して、マルターゼ活性が非常に低かった (図 4-16)。これ

導入した株、HD93 と HD94 を構築した。HD93 については YP5D, YP4D1M と YP5M で、HD94 については YP4D1M で培養し、*lacZ* 遺伝子の発現量を定量 PCR で調べた (図 4-28)。

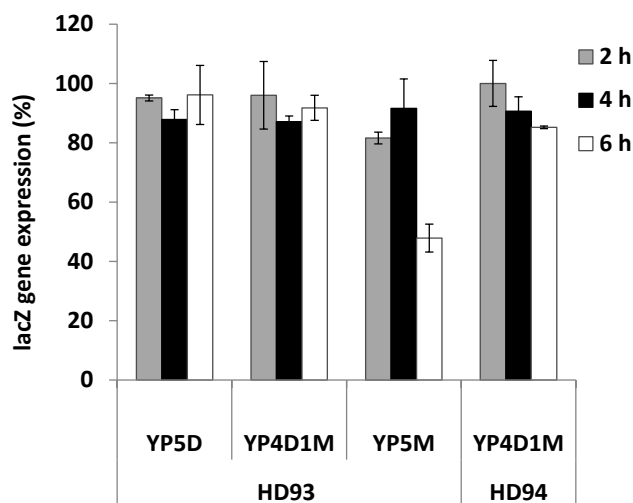


図 4-28 HD17 株での *lacZ* 遺伝子発現

YP4D1M で培養した HD94 の 2 h 後の発現量を 100%とした。

HD93: identical to HD17 except for *TPI1p::lacZ*

HD94: identical to HD49 except for *TPI1p::lacZ*

いなかった。YP5M で培養した HD93 では、4 h 後まではわずかしか合成されていないが、6 h 後には±シクロヘキシミドで活性に差が見られ、タンパク質合成が始まった。すなわち

HD93 を YP5M で培養した場合、6 h 後発現量の低下が見られたが、その他の条件では遺伝子発現量は株間、培地間で大きな差が見られなかった。次に±シクロヘキシミドの各培地にて HD93 と HD94 を培養し、β-ガラクトシダーゼ活性を測定した (図 4-29)。YP5D で培養した HD93 と HD94 では±シクロヘキシミドで活性に差があり、シクロヘキシミドがない時には活性が培養時間と共に上昇しβ-ガラクトシダーゼが合成されているのが観察された。

それに対し YP4D1M において、HD94 では±シクロヘキシミドで活性に差があるが、HD93 では差がなくβ-ガラクトシダーゼは合成されて

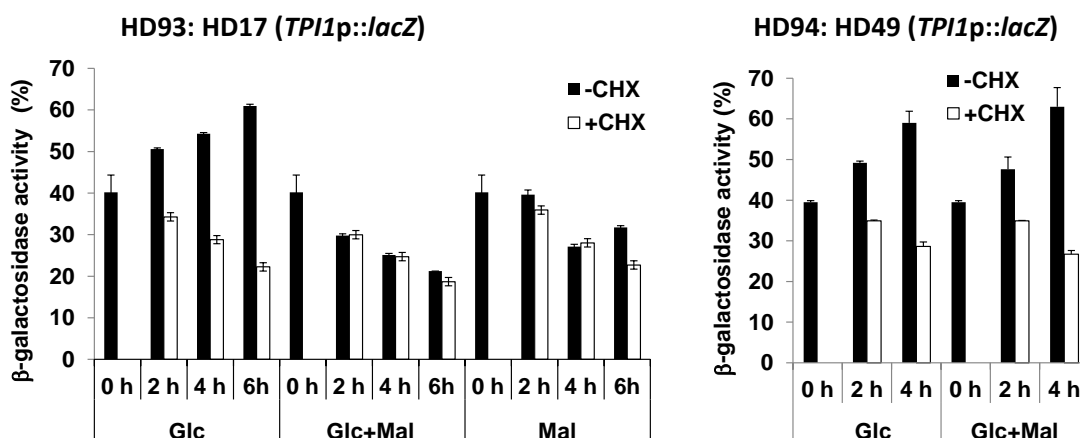


図 4-29 *lacZ* 発現ユニットを導入した HD17 と HD49 株の各培地でのタンパク合成能力の比較

CHX: シクロヘキシミド, Glc: Glucose, Mal: Maltose

HD93: identical to HD17 except for *TPI1p::lacZ*

HD94: identical to HD49 except for *TPI1p::lacZ*

YP5Mで培養したHD93のタンパク質合成の増減は、遺伝子発現の増減と逆になっている。

YP5Mで培養したHD17では、1h以降細胞内マルトースは減少に転じている(図4-14)ことから、細胞内マルトースの減少がタンパク質合成開始に必要なように思われる。

タンパク質合成は細胞が増殖するためには当然必須である。細胞内マルトースの減少にはタンパク質合成、すなわちマルターゼ合成が必要であるのに、タンパク質合成が停止しているので、細胞内マルトースを減少させられないことが、HD17が増殖できない大きな原因の一つだと思われる。

#### 4.3.2 ビール醸造酵母を宿主とした $\alpha$ -グルコシドトランスポーター発現株の性質

実験室株を宿主とした実験(4.3.1.1~4.3.1.14)により、 $\alpha$ -グルコシドトランスポーターを発現するには、宿主に十分なマルターゼ活性がある事が必要であることがわかった。

続いて、マルトースの資化能力が実験室株に比べると高いビール醸造酵母を宿主として、様々なトランスポーター発現株を作製し、糖濃度の異なる麦汁、低麦芽麦汁、高濃度麦汁など様々な種類の麦汁を用いて発酵試験を試み、その効果を確認した(4.3.2.1~4.3.2.6)。

##### 4.3.2.1 ビール酵母のマルターゼ活性

ここまで述べてきたように、実験室株ではマルターゼが十分誘導される前にグルコースと共にマルトースを細胞に取り込んだ時、マルトースが細胞に蓄積してしまい、タンパク

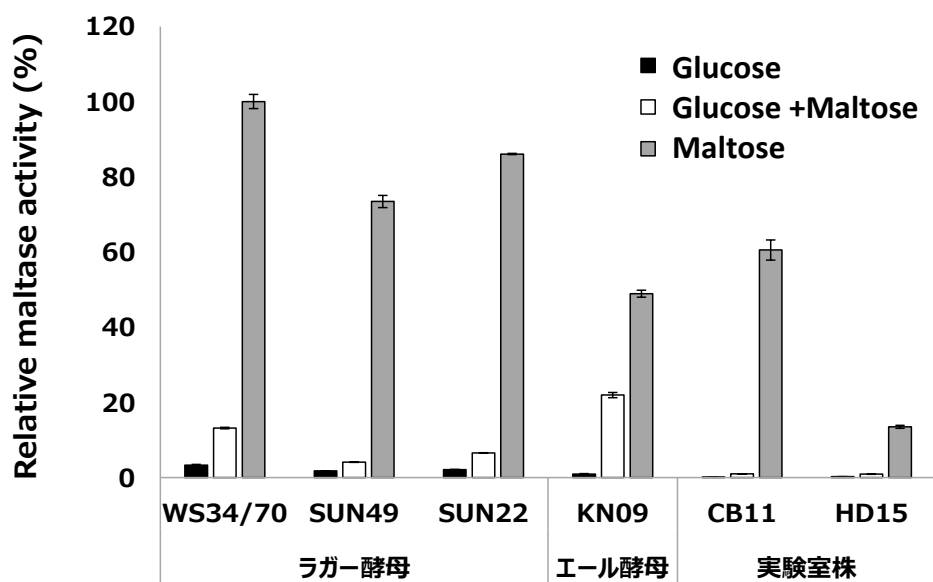


図 4-30 醸造用酵母と実験室酵母のマルターゼ比活性の比較

測定した細胞抽出液のマルターゼ活性 ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ ) をタンパク質濃度 ( $\text{mg}/\text{ml}$ ) で割り返して比活性を算出し、WS34/70の比活性を100%として表した。

質合成を停止して増殖を止めてしまう。この増殖停止はマルトースが代謝されない限り解除されないと考えられるが、タンパク質合成停止によってマルターゼ活性が上昇せず、マルトースが代謝されないので酵母は増殖できない。従って、 $\alpha$ -グルコシドトランスポーターの発現によって発酵速度の改善をしようとする場合、マルターゼ活性が鍵となる。そこでビール酵母のマルターゼ活性を調べた。ラガー酵母である Weihenstephan34/70, SUN49, SUN22 と、エール酵母である KN09、および実験室株 CB11, HD15 について、YP4D, YP4M および YP2D2M で 4 h 培養しマルターゼ活性を測定した (図 4-30)。活性は細胞抽出液を用いて測定し、細胞抽出液のタンパク質濃度で割り返してマルターゼ比活性とした。その結果、SUN49, SUN22, Weihenstephan34/70 は YP4M で培養した時の比活性が他株より高かった。また発現が抑制される YP4D や YP2D2M で培養した場合にも、実験室株に比べるとその比活性は数倍高かった。エール酵母 KN09 は YP4M で培養した時、実験室株 CB11 よりもマルターゼ比活性は低かったが、YP4D や YP2D2M のグルコースを含む培地では CB11 よりもはるかに高かった。グルコース存在下であってもマルターゼ活性がある事は、麦汁発酵において  $\alpha$ -グルコシドトランスポーターを高発現させる時には重要な性質である。

#### 4.3.2.2 発酵試験 1 エキス・糖・窒素源消費

ラガー酵母 SUN49 と SUN49 を親株とする HH1501 (*MAL21*), HH1500 (*AGT1*) の 3 株を用いて、低麦芽麦汁を元に各糖濃度を変えるように調製した 3 種類の麦汁、LMG 麦汁 (グルコース 4 g/l 添加)、LMHA 麦汁 (マルトース 2 g/l、マルトトリオース 2 g/l 添加)、LM 麦汁 (マルトース 1 g/l、マルトトリオース 0.5 g/l、グルコース 0.25 g/l 添加) を 15°C で発酵した。発酵には 2 L のマルチファーム管を用いた。各発酵のエキス (AEx: U 字振動管により測定した密度より、糖濃度に換算したもの)、OD<sub>660</sub>, pH, FAN (遊離アミノ態窒素) とアンモニアの経過を図 4-31 A,B,C,D,E に示した。LM 麦汁と LMHA 麦汁では、HH1501 (*MAL21*) は発酵中期までエキス消費が親株 SUN49 よりも早かったが、その後遅くなった。

それに対し、HH1500 (*AGT1*) は、親株とほとんど差がなかった。しかし LMG 麦汁では、HH1501 (*MAL21*) は非常にエキス消費が早く、HH1500 (*AGT1*) も親株よりも早くエキスを消費した。各麦汁発酵中の発酵もろみの糖消費経過を図 4-32 に示した。HH1501 (*MAL21*) はすべての麦汁でマルトースを早く消費し、特に LMG 麦汁では他の 2 株がマルトースを資化しきれないのに対し、HH1501 はマルトースを完全に資化することができた。

しかし、逆に全ての麦汁でマルトトリオースの消費が他の 2 株よりも遅くなった。グルコース誘導性分解を受けにくい *MAL21* を高発現することによって、マルトトリオースを取り込むトランスポーター *MTT1* のタンパク質発現、あるいは翻訳後の膜への局在効率が低下したと考えられる。すなわち、膜に発現できる全トランスポータータンパク質量には制限があって、1つのトランスポーターを発現が多すぎると、他のトランスポータータンパク質の活性は低下すると考えられる。HH1501 はグルコースの消費速度もどの麦汁でも低下

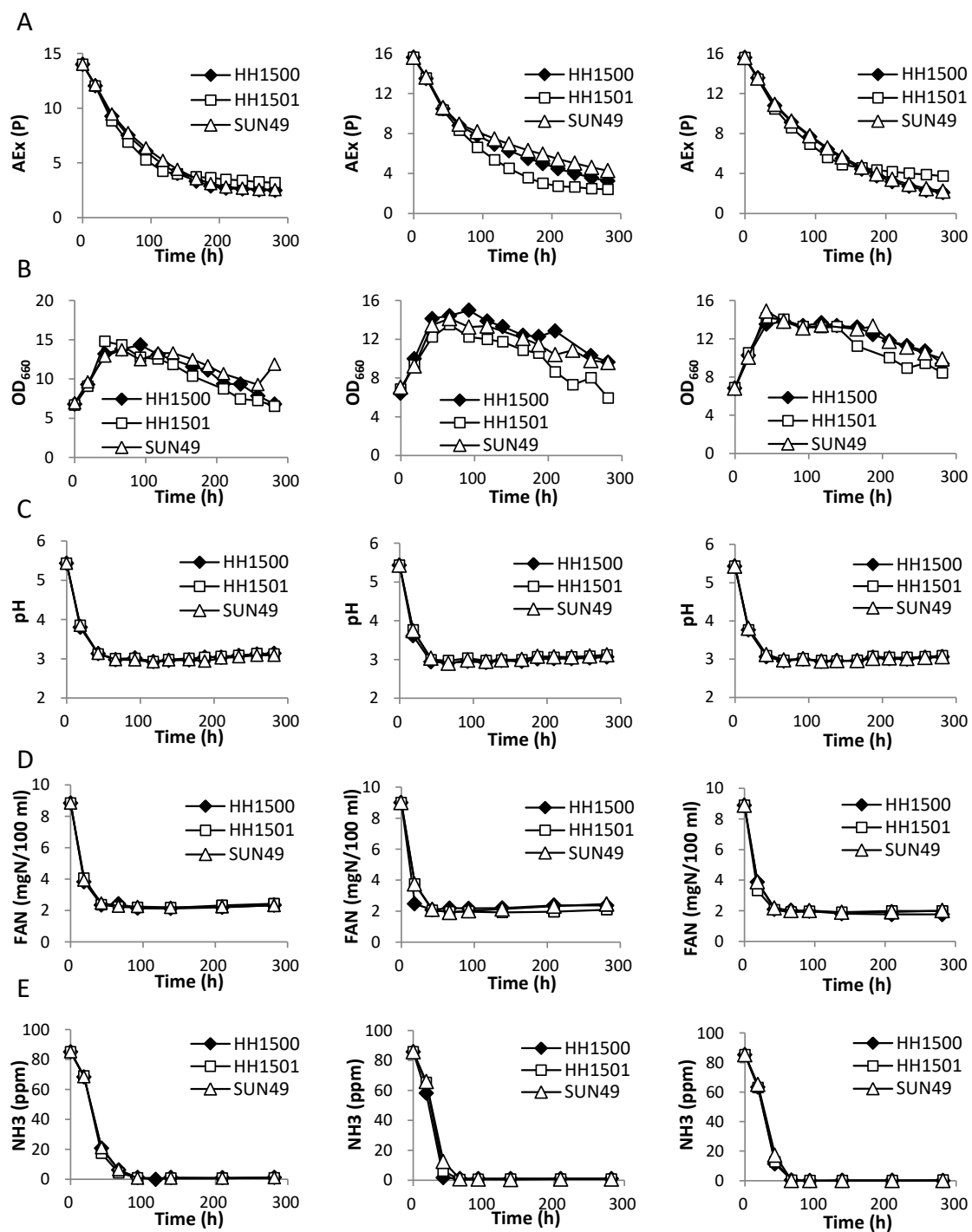


図 4-31 発酵試験 1-

A: エキス (AEx: U 字振動管により測定した密度より、糖濃度に換算したもの、B: OD<sub>660</sub>、  
 C: pH、D: 遊離アミノ態窒素 (FAN)、E: アンモニア  
 左: LM 麦汁発酵、中央: LMG 麦汁発酵、右: LMHA 麦汁発酵  
 SUN49: 親株, HH1500: *AGT1*, HH1501: *MAL21*

している。HH1500 は LMG 麦汁では明らかに親株よりマルトースを早く資化したが、他の2つの麦汁では、わずかに早い程度であった。またマルトリオースも LMG 麦汁では親株より早かったものの、他の2つの麦汁では、かえって若干遅くなった。Agt1p は Mal21p よりもマルトースの取り込み速度が遅いことと、Agt1p がグルコース誘導性分解を受けやすいため、効果が出なかったものと考えられる。すなわち、Agt1p の高発現のために元々親株の持っている MalX1p や Mtt1p の膜での発現量が減少し、トータルとしては $\alpha$ -グルコシドの資化速度は早くならなかったのだと考えられた。Agt1p はグルコースも取り込む能力があるが、グルコースの資化は早くなっていない。これも Agt1p のグルコース取り込み能がヘキソーストランスポーター（主に *HXT1~4* が発酵中は働いている）に比べて低いためと考えられる。FAN とアンモニアの資化経過については、HH1500 が LMG 麦汁で他の株より少し早かったが、総じてどの水準でもほとんど差は見られなかった。

#### 4.3.2.3 発酵試験 1 発酵エンドでの low volatile compounds

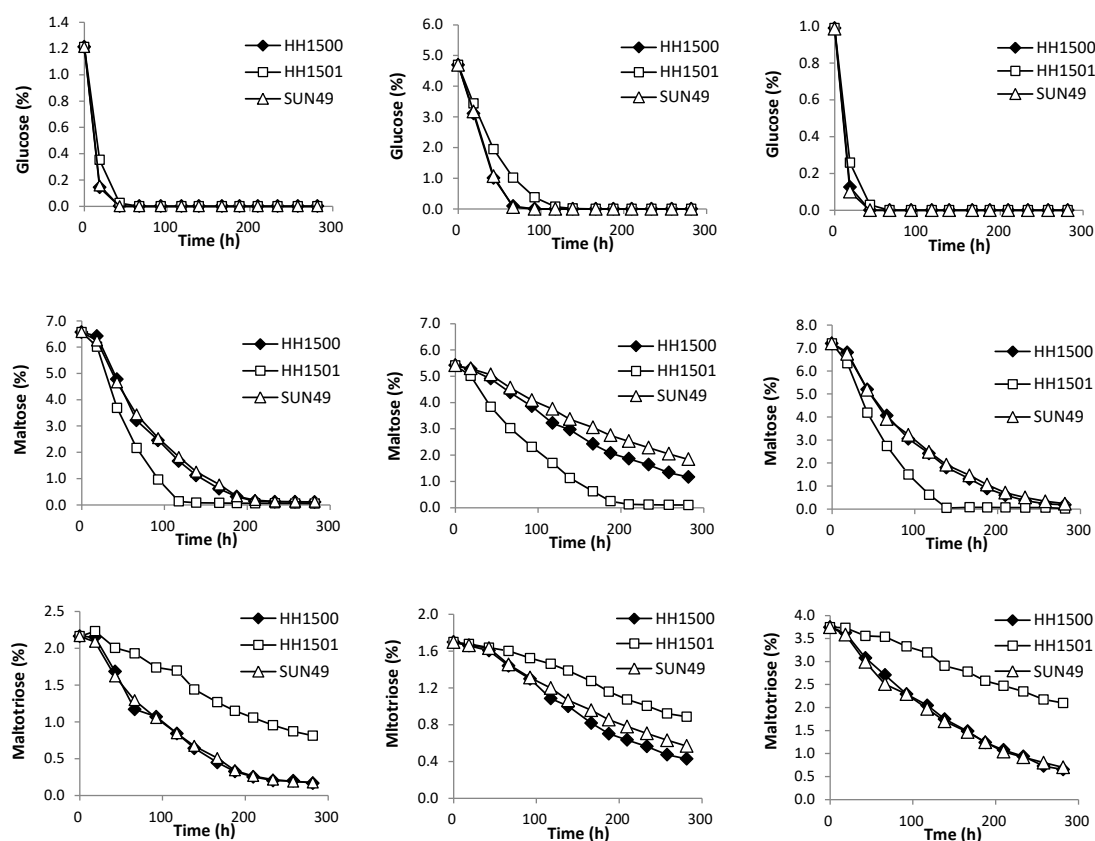


図 4-32 発酵試験 1 糖資化経過

左: LM 麦汁発酵、中央: LMG 麦汁発酵、右: LMHA 麦汁発酵  
 SUN49: 親株, HH1500: *AGT1*, HH1501: *MAL21*

発酵エンドでの low volatile compounds の濃度を表 4-14 に示した。HH1501 は *n*-propanol, *i*-butanol, amylalcohol (*n*-amylalcohol + *i*-amylalcohol) などのアルコールが低い傾向にあった。これらのアルコールはそれぞれ、分枝アミノ酸の生合成、あるいは分解からの生じると考えられる。

表 4-14 発酵試験 1 の発酵エンドでの low volatile compound

	LM			LMG			LMHA		
	HH1500	HH1501	SUN49	HH1500	HH1501	SUN49	HH1500	HH1501	SUN49
acetaldehyde	6.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
ethyl acetate	28.4	27.8	31.4	34.6	34.9	28.3	37.4	32.0	33.4
<i>n</i> -propanol	16.9	4.6	16.0	17.0	15.0	15.9	9.8	8.9	9.8
<i>i</i> -butanol	18.4	14.9	20.3	20.7	17.8	17.0	24.5	18.5	21.7
<i>i</i> -Amylacetate	1.8	1.7	1.9	2.2	2.3	1.7	2.2	2.0	1.9
amylalcohol	94.5	86.0	100.7	101.7	105.2	87.6	119.9	100.2	112.9
amylalcohol: <i>n</i> -amylalcohol+ <i>i</i> -amylalcohol	ppm								

#### 4.3.2.4 発酵試験 2 エキス・糖・窒素源消費

エール酵母 KN09 と、KN09 を親株とする HH066 (*MAL21*), HH065 (*AGT1R*) の 3 株を用いて、2 種類の 100% 麦芽麦汁（高濃度麦汁：エキス濃度約 20、普通濃度麦汁：エキス濃度約 13）を 15°C で発酵した。発酵には 2L のマルチファーム管を用いた。各発酵のエキス (AEx), OD660, pH, と遊離アミノ態窒素 (FAN) の経過を図 4-33 A-D に示した。その結果、高濃度麦汁、低濃度麦汁共に、HH066 (*MAL21*) は前半エキス消費が早いが発酵後半に親株と HH065 (*AGT1R*) に追いつかれる結果となった。HH065 (*AGT1R*) は低濃度麦汁では親株とほぼ同じ経過であったが、高濃度麦汁では親株より発酵が早く進んだ。各麦汁発酵での糖分析の結果を図 4-34 A-B に示した。HH066 (*MAL21*) も HH065 (*AGT1R*) もグルコースの資化が明らかに遅れ、マルトースの資化が促進した。特に HH066 (*MAL21*) は高濃度麦汁において発酵後期のマルトース資化速度が減速せず、完全に資化した。一方、発酵試験 1 と同じく、マルトトリオースの取り込みは大きく遅れ、Mal21p の高発現によってマルトトリオースを取り込むトランスポーターの発現が減少していると思われた。

HH065 (*AGT1R*) もマルトトリオースの資化が HH066 (*MAL21*) ほどではないが親株よりも遅くなった。しかし HH066 (*MAL21*) と違って、HH065 (*AGT1R*) は親株と同じレベルまでマルトトリオースを資化した。しかし、マルトトリオースについては親株より早くなっている訳ではない。KN09 は *MTT1* 遺伝子を持つことが明らかとなっている。

KN09 では Mtt1p が主にマルトトリオースを取り込むのに働いていて Agt1Rp よりもその能力が高いため、Agt1Rp 高発現により Mtt1p の発現量が相対的に減少しマルトトリオースの資化はかえって少し遅れたのかもしれない。

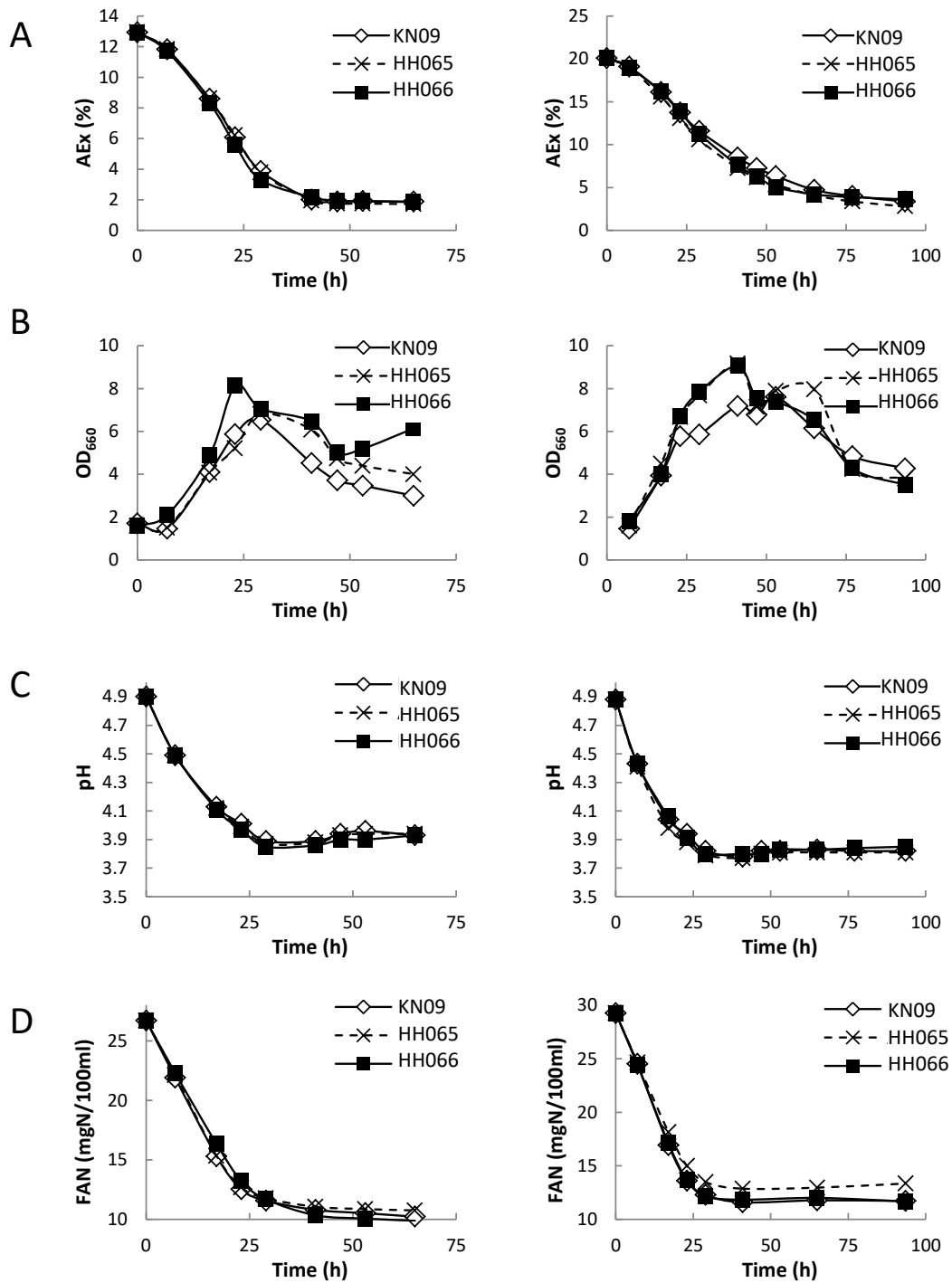
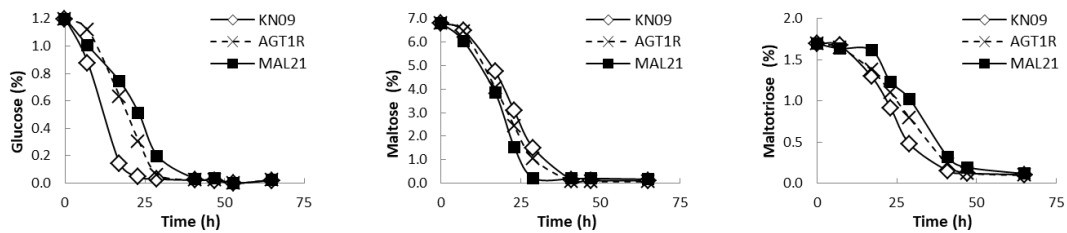


図 4-33 発酵試験 2

A: エキス (AEx: U 字振動管により測定した密度より、糖濃度に換算したもの)、B: OD<sub>660</sub>、C: pH、D: 遊離アミノ態窒素 (FAN)  
 KN09: 親株、HH065: *AGT1R* HH066: *MAL21*



A: 普通濃度麦汁



B: 高濃度麦汁

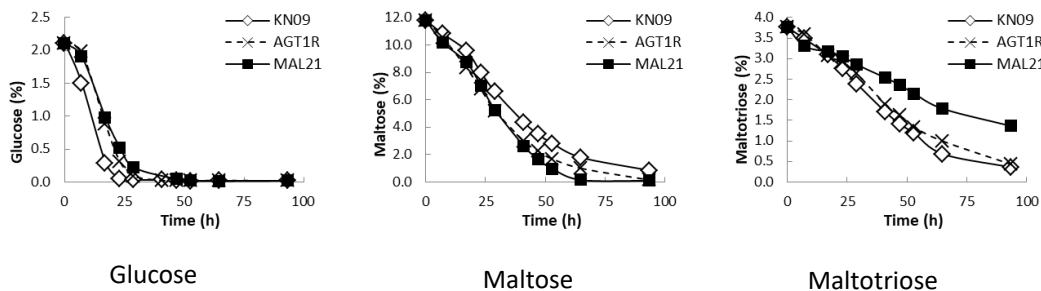


図 4-34 発酵試験 2 糖資化経過

A: 低濃度麦汁 B: 高濃度麦汁

4.3.2.5 発酵試験 2 発酵物の有機酸、low volatile compound

発酵物の有機酸、low volatile compound、エタノール、グリセロールを測定した。結果を表 4-15 の示した。AGT1R, MAL21 の高発現株は普通濃度麦汁において、ethyl acetate が高め、逆に高濃度麦汁において *i*-amylacetate と *n*-amylalcohol が低めの値となった。こ

表 4-15 発酵試験 2 有機酸、low volatile compound、エタノール

	普通濃度麦汁			高濃度麦汁		
	KN09	AGT1R	MAL21	KN09	AGT1R	MAL21
ethanol (w/w%)	4.63	4.72	4.65	7.76	7.88	7.49
glycerol (%)	0.2782	0.2541	0.2627	0.4171	0.4610	0.4695
acetaldehyde (ppm)	7.8	8.4	4.6	7.5	5.3	5.1
ethyl acetate (ppm)	55	59.4	61.7	116.1	102.1	116.7
<i>n</i> -propanol (ppm)	18.8	18.9	19.1	23.6	24.2	23.6
<i>i</i> -butanol (ppm)	8.9	8.3	9.2	16.4	16.7	16.6
<i>i</i> -amylacetate (ppm)	3	2.9	3	5.5	4	4.6
amylalcohol (ppm)	55.8	48	51.9	73.7	60.6	61.9
phosphate (ppm)	459	515	488	482	477	491
citrate (ppm)	239	251	268	242	243	241
pyruvate (ppm)	152	149	146	109	124	115
malate (ppm)	104	98	105	136	155	124
succinate (ppm)	104	115	118	210	231	194
lactate (ppm)	335	330	355	377	358	350
acetate (ppm)	130	121	97	209	359	194
pyroglutamate (ppm)	241	229	242	209	228	226

amylalcohol: *n*-amylalcohol+*i*-amylalcohol

れらは香味への影響が比較的大きい。また、有機酸については *MAL21* 発現株が酢酸が低めであった。しかしながら全般的に言えば、*AGT1R*, *MAL21* の高発現が親株 KN09 と比較して、大きな香味の変化を及ぼさなかった。*Agt1p* はマルトース、マルトトリオース以外にグルコースも取り込むことができる (2.3.9)。*AGT1R* 高発現株では、若干エタノール濃度が高いのは、*Agt1Rp* によってプロトンシンポートでグルコースの一部を取り込むために生じる ATP のロス分だけ、エタノールを多く生成しているからかもしれない。

#### 4.3.2.6 発酵試験 3 エキス消費

糖トランスポーターとマルターゼを同時に発現させて、発酵での効果を調べた。YCp タイプの発現ベクター、pJHG にマルターゼ遺伝子 (*MAL62*) と各種トランスポーター遺伝子を導入した。用いたトランスポーター遺伝子は、*MAL21*, *MAL61*, *MTT1*, *MTT1[D46G]*, *MAL21+MTT1[D46G]*, *MAL61+MTT1* の 6 種類である。これら 6 種類のプラスミドとネガティブコントロールとして pJHG をラガー酵母 SUN42 に導入した。構築した株を用いて、ジェネチシン 20 µg/ml を加えた中麦芽麦汁を 15°C で発酵した。発酵は各株 n=2 で行い 300 ml のシリンダーを用いて 200 ml 容量で行った。各株につき平均の Brix (糖度: 屈折計で測定した可溶性固形分濃度) の経過を図 4-35 に示した。*MAL61* を発現させた株、*MAL61*, *MAL61+MTT1* は空ベクター株と違いがなかった。*MTT1[D46G]* は少し発酵が遅れた。*Mtt1[Gly46]p* はグルコース存在下で分解されにくい、マルトーストランスポータ

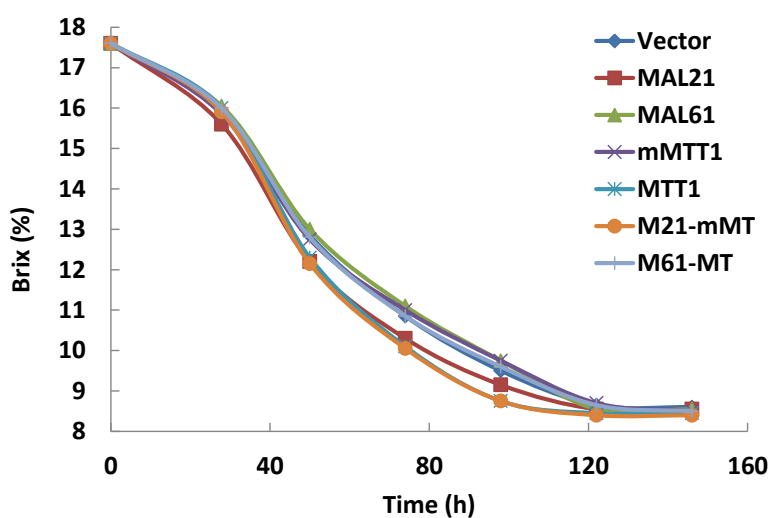


図 4-35 発酵試験 3 (中麦芽麦汁) 糖度 (Brix) 資化経過

Vector: Vector 導入 SUN42, MAL21: *MAL21* 発現株、MAL61: *MAL61* 発現株、  
 mMTT1: *MTT1[D46G]* 発現株、MTT1: *MTT1* 発現株、  
 M21-mMT: *MAL21*, *MTT1[D46G]* 共発現株、M61-MT: *MAL61*, *MTT1* 共発現株  
 Brix: 糖度 (屈折計で測定した可溶性固形分濃度)

一に比べマルトース取り込み活性は顕著に低い。Mtt1[Gly46]p の発現により SUN42 が持つマルトーストランスポーターの発現が妨げられたと考えられる。MAL21 株は、発酵試験 1,2 で見られたのと同じく、発酵初期は早かったが失速していった。しかし、空ベクター株に抜かれることはなかった。マルターゼの高発現していることが、プラスの効果となった可能性がある。MTT1 株と MAL21+MTT1[D46G]株は約 1 日発酵が早まった。分解されにくいマルトーストランスポーターと  $\alpha$ -グルコシドトランスポーターの両方を発現させた MAL21+MTT1[D46G]株は、マルトースとマルトトリオースの両者の資化能力をバランスよく向上させられたと考えられる。MTT1 株が早くなったのは意外であったが、SUN42 のマルトーストランスポーターの発現は妨げられず、ほどよくマルトースとマルトトリオースの資化能力を向上させられたのだと考えられる。

#### 4.4 考察

第 2 章で述べたようにマルトース、 $\alpha$ -グルコシドトランスポーターの取り込み活性、およびグルコース誘導性分解耐性は各々のトランスポーターによって異なった。基質特異性の広い  $\alpha$ -グルコシドトランスポーターは、活性がマルトーストランスポーターに比べて低く、グルコース存在下では発現レベルでも翻訳レベルでも下方制御されるため、通常グルコースと一緒にマルトースを取りこむ能力はない。それに対して、マルトーストランスポーターは活性が高い。また Mal21p は我々の知る限り例外的に非常にグルコース誘導性のタンパク質分解を受けにくいトランスポーターであり、それを構成的に発現させた株はマルトースとグルコースを同時に取り込む活性を持つ事が確認された。Mal21p の高発現株 HD17 は YP5D と YP5M には生育したが、予想外に YP4D1M には生育できなかった。活性のない Mal21p[Ala161]をの代わりに発現させた HD84 と、Mal21p と共にマルターゼを高発現させた HD49 のどちらも YP4D1M で生育できる事、および HD17 の生育が混合糖培地でのマルトース濃度に依存する事より、代謝されずに細胞内に蓄積するマルトース濃度が生育を左右すると予想された。この増殖阻害はグルコース 4%+マルトース 0.1%という低濃度のマルトースでも観察され、YP4D1M で培養した HD17 ではマルトース濃度は 71.4 mM (=2.44%) に達していた。マルトーストランスポーターはプロトンシンポーターなので、H<sup>+</sup>ATPase によってプロトンを汲み出さなければ細胞内の酸性化を招き、細胞内の反応に影響する。例えば解糖系の酵素であるヘキソキナーゼの至適 pH は 7.5 (66)、phosphofructokinase の至適 pH は 7.8 (67)、triose isomerase の至適 pH は 7.8 (68) であるため、酸性化が進むと解糖系代謝速度は低下すると予想される。マルトース取り込み活性から考えると、YP4D1M において HD17 は HD49 よりもマルトース取り込みに伴うプロトンの流入は少ないにもかかわらず、細胞内 pH は HD49 に比べて一時低下した。しかし 4 h 後には HD49 と同レベルまで細胞内 pH は上昇し、少なくとも細胞内 pH の低下だけが増殖停止の原因とは考えられなかった。また、HD49 の方が多くの ATP をプロトン排出に消費していると考えられたが、HD17 の方が energy ratio

$([ATP]+0.5[ADP])/([ATP]+[ADP]+[AMP])$ が低く、ATPの合成能力が低下していると考えられた。YP4D1Mはグルコースを含んでいるため、炭素源の必要性という観点からはマルトースを分解する必要はないが、細胞内マルトースを減少させるためにはマルターゼ活性は必須である。YP4D1Mでは2 h後HD17のマルターゼ遺伝子の発現はHD49の24%であった。しかしマルターゼ活性はHD49の1%以下で、そのまま増加しなかった。一方YP5Mで培養したHD17では2 h後、HD49の82%マルターゼ遺伝子の発現に対し、マルターゼ活性は10%と低かったが、その後マルターゼ活性は培養時間と共に上昇した。これはYP5Mで培養したHD17では細胞内マルトースを分解できるが、YP4D1Mでは分解できないことを意味する。またYP4D1M培地でHD17はタンパク質合成が停止しているのに対し、YP5Mでは4 hの停止の後、合成を開始した。YP5Mで培養したHD17では培養1 h以降、細胞内マルトース濃度は減少に転じていることより、マルトースの細胞内濃度の低下がタンパク質合成再開のキーであるよう思われた。酵母は様々なストレス下で増殖を停止し、必要なもの以外のタンパク質合成を停止するシステムを持っており、細胞内外の浸透圧差は代表的なストレスの一つである。細胞は細胞外よりも細胞内浸透圧が高い状態を維持し、水が流入しようとする膨圧によって細胞の形態を保っている。同時に細胞は膨圧によって破裂することがないように伸縮性のある丈夫な細胞壁で自らを守っている(64, 65)。細胞内の物質濃度の上昇によって必要以上に膨圧が上昇すると、細胞膜・細胞壁が損傷する危険が生じる。細胞壁が不完全な状態で増殖を続けると細胞はバーストする危険があるので、遺伝子の発現制御、あるいは翻訳停止が起こることが知られている。例えば、**processing bodies (P-bodies)** や **stress granules** と呼ばれるパーティクルは mRNA と様々なタンパク質が凝集したもので、翻訳を抑制するために生成すると考えられている(84,85)。また eIF2 の  $\alpha$  サブユニット (eIF2 $\alpha$ ) は、ストレス存在下では **Gcn2 protein kinase** によってリン酸化を受けることによって再活性化が阻害されるので、タンパク質合成開始に必要な eIF2-GTP-tRNA<sub>Met</sub> 複合体の供給量が減少し、細胞全体の翻訳開始が抑制されることが知られている(86,87)。マルトースの蓄積によって生じる膨圧上昇をストレスと感知してタンパク質合成を停止しているのであれば、ソルビトールの添加によってHD17は増殖を再開できるはずだが復帰しなかった。ストレス応答性遺伝子の発現を誘導する **MSN4** の高発現もHD17の生育をレスキュー出来なかった。**MAL21** 高発現酵母は膨圧上昇以外に、マルトースの蓄積自体をストレスと感知してタンパク質合成を停止しているのかもしれない。あるいはマルトースの蓄積はタンパク質合成の過程に直接影響するのかもしれない。YP4D1Mで培養したHD17には、プロトン流入による pH の一時低下、エネルギーレベルの低下、膨圧による細胞壁損傷の可能性、など複数の **negative** な要因がある。特にタンパク質翻訳は生体内で最もエネルギーを消費する反応で、ATP と GTP を要するため、エネルギーレベルの低下もタンパク質合成に影響をもたらしているのかもしれない。しかしそもそもタンパク質合成が停止してしまうことがエネルギーレベルの低下を含め増殖できない決定的な理由なのではないだろうか。細胞内のマルトース濃度を下げるためにはマルターゼの発現が

必須であるのに、マルトースを蓄積している限りタンパク質合成ができないことが増殖停止の主原因と考えられる。従って細胞内に糖が蓄積する事態を避けることが、酵母が糖トランスポーターの厳格な発現調節と翻訳後制御を持っている事の大きな理由だと考えられる。

ビール醸造において原料である麦汁にはグルコースの4~5倍にあたるマルトースが含まれている。従ってビール醸造においてマルトースをいかに早く資化できるかが発酵速度を左右する。当初 *Mal21p* のような性質を持つトランスポーターを持つ株はビール醸造に有利ではないかと考えられたが、ビール醸造現場において選択を繰り返されてきたビール酵母には *MAL21* を持たない株も存在する (19)。さらに、我々が調べた限りラガービール酵母の *MAL21* はグルコースに対する耐性の決定因子の1つ *His50* は持っていたが、46番目の残基は *Gly* ではなく *Asp* だった。すなわちラガービール酵母の *Mal21p* は容易に分解する。また、ラガービール酵母は *AGT1* 遺伝子を持っているが、遺伝子中央部に終始コドンが入っており機能しない。増殖遅延・停止のリスクを避けるためには、グルコースとマルトースの両方を取り込む事の出来る *Agt1p* は機能しない方が麦汁発酵においては有利なため、ラガービール酵母の *AGT1* は変異したのではないだろうか。我々は *Agt1p* についてもグルコース誘導性分解を受けない変異体 *Agt1-2HAp[Pro55]* を構築し、これを構造的に発現する株が *YP4D1M* と *YP4D1S* で生育が遅延することを確認した。このことはスクロースも細胞内に蓄積すると、マルトースと同じようにタンパク質合成停止が起こり増殖に影響することを意味する。スクロースを分解するインベルターゼは2つの翻訳開始点を持つことが知られている (88)。メジャータイプは分泌されるが、マイナータイプはシグナルペプチドがなく細胞質に局在する。マルトースとは違ってスクロースは通常細胞外で分解されてから取り込まれるが、*Agt1p* が発現している時にスクロースが添加されると細胞内に取り込まれてしまう。そのようなリスクに備えて、酵母はマイナータイプを発現しているのかもしれない。スクロースはマルトースに比べるとはるかに自然界に豊富な糖であるため、リスクを避けるために *Agt1p* が翻訳後非常に分解されやすい事も酵母にとっては重要なのだろう。実験室株では通常グルコース存在下でのマルターゼ活性はほぼないが、我々が知らべたところ、グルコース存在下でもいくらかのマルターゼ活性を持つビール酵母が多い。このこともマルトースを蓄積するリスクを避けるため、ビール酵母が獲得した形質なのかもしれない。

ビール醸造では、10 ppm ほどの溶存酸素となるように通気した冷麦汁に酵母をピッチングし、その後は一切の通気はなく嫌気下で発酵を行う。ピッチング後約二日の間に、酵母は約2回の出芽をした後は増殖を停止し、アルコールを生成していく。細胞増殖している間はバイオマスを作るためにタンパク質合成が旺盛だが、その後はタンパク質合成は低下していく。通常の麦汁ではグルコースは1日で枯渇する。従ってグルコースがなくなった後、タンパク質合成が旺盛な間にマルトース、マルトトリオースを資化するためのタンパク質が合成され、スムーズに糖の資化が続くことがビール醸造においては重要である。

そういう観点からすれば、グルコースの存在下であってもマルトースあるいは $\alpha$ -グルコシドトランスポーターを発現することは、ビール発酵においては有利だと想像される。一方 4.3.1.1、4.3.1.2 で述べたように実験室株では、グルコース誘導性分解耐性のあるマルトーストランスポーター、 $\alpha$ -グルコシドトランスポーターを高発現した株は、グルコースとマルトースの両方を含む培地で増殖阻害が起きた。この増殖阻害時にはマルトースが細胞内に蓄積しており、その状態では細胞がタンパク質合成を止めてしまうことが明らかになった。

4.3.2.1 で述べたようにビール酵母は実験室酵母に比べるとグルコース存在下でもマルターゼの活性がある程度あり、マルトースとグルコースの共存下でも、マルトース誘導下でもマルターゼ比活性も実験室株よりも高かった。従ってマルトースあるいは $\alpha$ -グルコシドトランスポーターを高発現しても、ビール酵母では増殖阻害が起きにくいと予想されたため、トランスポーター高発現ビール酵母を構築し、発酵試験を行った。

発酵試験 1 ではラガー酵母 SUN49 を親株とした。グルコース、マルトース、マルトトリオースを適宜添加することで、糖組成の異なる、麦芽比率が 25%以下の麦汁を作製し発酵に供した。グルコースを増した麦汁 (LMG) では、親株はグルコースを消費するのに 2 日以上かかってしまい、マルトース、および $\alpha$ -グルコシドトランスポーターが十分発現できずに、マルトース、マルトトリオースを資化しきることができなかった。一方、グルコース誘導性分解を受けにくいトランスポーターである *MAL21* の高発現株はマルトースを十分資化しきることができたが、マルトトリオースの資化が遅れた。グルコース誘導性分解の早い *AGT1* の高発現株では、親株よりもマルトースとマルトトリオースの両方を早く資化したが、効果は小さかった。また糖組成比が通常の麦汁と同じ LM 麦汁では、*AGT1* 高発現株と親株との差は見られなかった。発酵試験 2 ではエール酵母 K09 を親株にして、*MAL21* あるいはグルコース誘導性分解を受けにくい変異型 *AGT1* である *AGT1R* の高発現株 (HH1502, HH1503) を用いて、エキス濃度が 12.9 と 20.1 の二種類の麦汁(標準麦汁、高濃度麦汁)の発酵を行った。これらの麦汁は麦芽のみを用いているのでアミノ酸が多い。

またこれらの麦汁の糖組成比は同じである。発酵試験 2 では *MAL21* 高発現株 (HH1502)、*AGT1R* 発現株 (HH1503)、両株ともマルトースについては資化が早くなったが、マルトトリオースの資化はどちらの麦汁でも親株の方が早く、トータルのエキスの消費では親株と大差が見られなかった。KN09 は *MTT1* 遺伝子を持っており、*MAL21*、*AGT1R* 両発現株は *MTT1* の発現を妨げてしまったと考えられる。またこの麦汁ではアミノ酸濃度が高い事がタンパク質合成を旺盛にしている、グルコース枯渇後のトランスポーターの発現は親株でも十分なのかもしれない。発酵試験 3 では 49%麦芽を含む中麦芽麦汁を用いて、グルコース誘導性分解耐性のあるトランスポーターである *MAL21*、*MTT1*[D46G]、あるいはグルコース誘導性分解の早いトランスポーターである *MAL61*、*MTT1* と、マルターゼの共発現株の発酵を行った。*MAL61* の高発現は効果が見られなかった。また *MTT1*[D46G] の高発現株も逆に少しエキス消費が遅延した。*MAL61* あるいは *MTT1*[D46G] の発現によって、

これらより活性の高い親株の持つトランスポーター発現が減少して、トータルではマイナスの効果となったと考えられる。一方、*MAL21* と *MTT1[D46G]*との共発現株や、*MTT1*の高発現株は1日発酵を早めることができた。近年、様々な麦芽量・原料のビール風飲料が生産されており、その麦汁（もろみ）に含まれる窒素源の濃度は種類によって大きく異なる。窒素源の量は酵母細胞内でのタンパク質生産活性に大きな影響を及ぼす。また、生産性を考えるとエキス濃度の高い麦汁からの生産が求められ、その際には麦汁に含まれるグルコース濃度の高さがマルトース、あるいは $\alpha$ -グルコシドトランスポーターの発現を遅延させる。発酵試験1~3の結果より、トランスポーターの中でも特にグルコース誘導性分解耐性の持つ *MAL21*, *MTT1[D46G]*, *AGT1R*はマルトース、あるいはマルトトリオースの資化を早める効果があるが、これらの高発現は元々親株の持つトランスポーターのタンパク質発現量に影響を及ぼすことがわかった。すなわち、麦汁（もろみ）に含まれている糖組成と、麦汁に含まれるアミノ酸などの栄養成分に考慮して、必要なマルトース、マルトトリオース取り込み能をバランスよく増加させるように調節すれば、グルコース誘導性分解耐性を持つトランスポーターの高発現によって、発酵速度を改善させられることが明らかになった。

## 第5章 総括と展望

### 5.1 本研究の総括

第1章ではビール醸造とラガー酵母についての知見を詳述し、実験室酵母において報告されている糖の資化の制御とビール醸造における問題について述べた。他の酒類の醸造とビール醸造との間の大きな違いの一つとして、もろみに含まれる糖の種類が複数であることと、その中にグルコースのような単糖とマルトース、マルトトリオースと言ったオリゴ糖の両方が含まれていることがあげられる。*Saccharomyces cerevisiae* は単糖を優先に資化するための、糖トランスポーターの制御システムを持っている。マルトース、あるいは $\alpha$ -グルコシドトランスポーターはグルコース存在下では遺伝子発現が抑制され、マルトースによって誘導される。さらにトランスポーターは細胞膜に移行後も、グルコース存在下では速やかにリン酸化、ユビキチン化による翻訳後修飾を受け、速やかに分解されてしまうことが知られている。ビール醸造では、その発酵初期 2~3 日の間に酵母は 2~3 回の出芽をするが、その後は増殖をしない。つまり細胞内でのタンパク質合成は 2~3 日の間旺盛だがその後は減少していく。従って、ビール醸造ではグルコースを資化している間、抑制されていたマルトース・ $\alpha$ -グルコシドトランスポーターが、その後いかに素早く合成されて、マルトース・マルトトリオースの資化へスムーズに移行できるかが大事であると考えられる。実際の生産においてマルトース、とりわけマルトトリオースの資化遅延は度々生じる。生産性を向上させる方策として、高濃度麦汁仕込は有効であるが、この遅延は高濃度麦汁発酵においては特に顕著にみられ問題となる。

チェコのピルゼン地方で生まれたピルスナータイプのビールは、ラガー酵母によって発酵される。ピルスナーは現在世界で製造されるビールの 90%を占めており、ビールの製造量は他の酒と比べても突出して高い。ラガー酵母は *Saccharomyces cerevisiae* と *Saccharomyces eubayanus* のハイブリッドで約 4 倍体の非常に複雑なゲノム構造を持つ。本研究ではラガー酵母のビール発酵における  $\alpha$ -グルコシドトランスポーターの性質と役割を明らかにし、通常麦汁および高濃度麦汁の発酵における糖資化遅延を解決することを目的とした。

第2章ではラガービール酵母の持つマルトース・ $\alpha$ -グルコシドトランスポーターの遺伝子をクローニングし、特性を調べた。

ラガービール酵母の  $\alpha$ -グルコシドトランスポーターとして、*S. cerevisiae* 型ゲノムの *ScAGT1* と、その *S. eubayanus* 型オーソログである *SeAGT1* をクローニングした。*ScAGT1* は 1182 bp に T の挿入があり、そのために 392 番目のコドンが終始コドンとなっていた。

この短くなった *ScAgt1p* は活性を残していないことを確認した。また *ScAGT1* の発現を調べると、実験室株の *AGT1* と異なりマルトース存在下でもほぼ発現しなかった。

*ScAGT1* のプロモーターは 1~317 bp の配列は 2 塩基を除いて実験室株の *AGT1* プロ



モーターと一致したが、マルトース転写活性因子の結合配列のある、それより上流の配列は実験室株の *AGT1* と一致しなかった。*SeAgt1p* は実験室株 *Agt1p* と 78% のアイデンティティを持ち、マルトース、マルトリオース両者を取り込む活性があることが確認された。しかし、実験室株の *Agt1p* と比べて活性は低かった上に、マルトース存在下での遺伝子発現量もマルトーストランスポーターに比べると微々たるものだった。ラガー酵母 *Weihenstephan 34/70* 株の *ScAGT1* と *SeAGT1* の両遺伝子を完全に破壊した株で麦汁の発酵試験を行ったところ、破壊株は親株と遜色なく糖資化できたことから、*ScAGT1* と *SeAGT1* 以外にラガー酵母はマルトリオースを取り込むことのできるトランスポーターを持つことが明らかになった。ラガー酵母のゲノムライブラリーを *mal<sup>-</sup>* の実験室株に形質転換し、マルトリオース単独炭素源培地で生育可能なクローンを 20 株取得しシークエンスしたところ、全ての株から同じ遺伝子である *MTT1* が見つかった。*Mtt1p* は実験室株のマルトーストランスポーター *Mal31p* と 91% のアイデンティティがあり、マルトースとマルトリオースの両糖を取り込む能力があることがわかった。また、*Agt1p* はマルトースを取り込む能力が高いのに対し、*Mtt1p* はマルトリオースを取り込む能力の方が高かった。また遺伝子発現量もマルトーストランスポーターと遜色ないことがわかった。従って、*Mtt1p* がラガー酵母でマルトリオースを取り込むメインで、おそらく唯一のトランスポーターであると結論付けた。各トランスポーターの基質特異性を発酵試験、およびプレートでの生育で調べたところ、*Agt1p* と *SeAgt1p* はイソマルトース、メレジトース、グルコース、フラクトースを取り込むのに対し、*Mtt1p* はこれらは取り込めなかった。また、*SeAgt1p* と *Mtt1p* はトレハロースを取り込めたが、*Agt1p* は取り込めなかった。逆に *Agt1p* だけが、 $\alpha$ -メチルグルコシドを取り込めた。また、*Mal61p*, *Agt1p*, *SeAgt1p* と *Mtt1p* 全てのトランスポーターがツラノースを取り込む強い活性があった。

第 3 章では実験室株のトランスポーターも含め、それぞれのトランスポーターの詳細な性質、特にグルコース誘導性分解耐性と活性に関与するアミノ酸などについて調べ、改変したトランスポーターを取得した。

実験室株のマルトーストランスポーターとして知られている *Mal31p*, *Mal61p*, *Mal21p* の中で *Mal21p* だけがグルコース誘導性分解耐性を持っており、グルコース存在下での半減期は *Mal31p*, *Mal61p* の約 5 倍で、高い活性を保持していることを見出した。また、そのグルコース誘導性分解耐性の決定因子は *Gly46* と *His50* の二残基であることを突き止めた。様々な多くのトランスポーターは細胞膜上でリン酸化とそれに続くユビキチン化を受けた後、エンドサイトーシスによって液胞に運ばれ分解されることが知られている。エンドサイトーシスの変異株を用いて調べたところ、*Mal21p* はリン酸化の修飾は受けるが、ユビキチンによる修飾を受けにくいために分解されにくいことがわかった。リン酸化コンセンサス配列の破壊や、ユビキチンの修飾が起こる *Lys* 残基の置換によって半減期に変化が見られた報告はたくさんあるが、*Mal21p* はリン酸化に関係するアミノ酸残基とユビキチン

の修飾が起こる Lys 残基に置換がないにも関わらず、トランスポーターの分解速度に差が出た珍しい例である。Gly と His は共に  $\alpha$ -ヘリックスを壊す傾向のあるアミノ酸である。

Chou&Fasman の二次構造予測ソフトでは Mal61p の His18-Leu50 は  $\alpha$ -ヘリックスと予測された。それに対して Mal21p では His18-Lys42 が  $\alpha$ -ヘリックスであり、短くなると予測された。Mal21p の N 末細胞質ドメインにある  $\alpha$ -ヘリックス構造の変化が、Mal21p の他の細胞質ドメインとのインターラクシオンに変化をもたらし、ユビキチン修飾を受けにくくなったと現時点では予測している。Agt1p は Mal31p, Mal61p と比べて、グルコース誘導性分解を受けやすいことが確かめられた。Agt1p においても N 末細胞質ドメイン部分に変異を導入した Agt1p[Pro55]-2HA と Agt1Rp-2HA (=Agt1 p [Gly56]-2HA) は Mal21p と同様の長い半減期を示した。Mtt1p は Mal21p と 90%のアイデンティティを持ち、His50 を持っているが、46 番目の残基は Gly ではなく Asp で、Mtt1p の 2-DOG 耐性は Mal61p や Mal31p と同程度であった。変異体 Mtt1p[Gly46]は、Mal21p のグルコース誘導性分解耐性の 2 つの決定因子 Gly46 と His50 の両方を持つが、その 2-DOG 耐性は Mal61p[Gly46]や Mal61p[His50]と同程度であった。Mtt1p では N 末の細胞質ドメインの構造だけではなく、その他の領域もグルコース誘導性分解耐性に関与していると思われる。N 末の細胞質ドメインだけが Mal21p 型のハイブリッド MAAp が、N 末と C 末が共に Mal21p 型のハイブリッド MAMp よりも分解耐性が低かったことも、N 末の細胞質ドメインの構造のみでなく、C 末の配列・構造も分解耐性に影響することを示していると思われる。

2 章で述べたように基質特異性は Agt1p と SeAgt1p が最も広く、Mtt1p はその次、Mal61p は最も狭かった。従って基質特異性の広いトランスポーターほど半減期が短い傾向にあると言える。ラガー酵母 SUN49 のゲノムを鋳型にして PCR でマルトーストランスポーターを増やしてシークエンスをしたところ、数か所の SNP がある、少なくとも 3 つの Sc 型の MalX1p と思われるトランスポーターが見つかった。しかしそれらは、Mtt1p と同じように His50 を持っていたが Gly46 は持っていなかった。従って、ラガー酵母の ScMalX1p のグルコース誘導性分解耐性は Mal61 p[His50]と同程度だと予想された。

マルトーストランスポーターと  $\alpha$ -グルコシドトランスポーターはプロトンシンポーターであることが知られている。プロトンシンポーターでは膜貫通ドメインに存在する酸性アミノ酸によってプロトンが外から内へ受け渡される際、チャネルの構造が変化して基質がチャネルを通りやすくなると言われている。膜貫通ドメインの中央部にある酸性アミノ酸は Mal21p と Mal61p では Glu161、Agt1p では Glu167 である。これらのグルタミン酸をアラニンに置換した Mal21p[Ala161], Mal61p[Ala161], Agt1p[Ala167]-2HA, Agt1p[Pro55, Ala167]-2HA は、アンチマイシン添加のマルトース最少培地プレートに生育できなかった。従ってこれらのグルタミン酸がプロトンリレーに関与していると考えられた。しかしながら 0,1 mM と 2.0 mM 濃度のマルトースで取り込み活性を測定すると、天然型の 10%程度の活性を示した。これらの濃度では基質とのインターラクシオンが律速となっており、各トランスポーターはグルタミン酸がなくても、極めて遅い速度ではあるも

の、取り込み活性があることがわかった。

第4章ではマルトース・ $\alpha$ -グルコシドトランスポーターの高発現株を実験室株を親株として作製した。グルコース誘導性分解耐性を持つトランスポーターの高発現株が、グルコースとマルトースの両糖を含む培地では増殖阻害を起こす事を発見し、その細胞で何か起こっているかを調べた。さらに、マルトース・ $\alpha$ -グルコシドトランスポーターの高発現株をビール酵母を親株として作製し、発酵試験を行った。

実験室株を親株として様々なマルトース、 $\alpha$ -グルコシドトランスポーターの高発現株を作製し、その表現型を調べた。グルコース誘導性分解耐性の低いトランスポーターを高発現した場合には炭素源がグルコース (YP5D)、マルトース (YP5M)、グルコースとマルトース (YP4D1M) のどの培地にも生育できた。ところが、グルコース誘導性分解耐性の高いトランスポーター、*MAL21*あるいは*AGT1[L55P]-2HA*の高発現株では、YP4D1Mにおいて、明らかな生育阻害・遅延が見られた。この生育阻害は *MAL21[E161A]*の高発現株では見られなかったので、分解されにくいトランスポータータンパク質が細胞膜に沢山局在することで、他の膜タンパク質が正常に発現できないとか、細胞膜に何らかのダメージを与えるといったようなことが原因ではなく、マルトースの取り込み自体が原因だと確認された。

*MAL21* 高発現株 (HD17) のグルコースとマルトースの両糖を含む培地での生育阻害はマルトース濃度に依存し、グルコース 4%に対しマルトース濃度を 0.05%にまで下げると増殖可能になり、マルトース濃度が 0.1%を超えると増殖できなかった。細胞内の糖濃度を調べると、どのマルトース濃度の培地においてもグルコースに関しては植菌後 30 min がピークですぐに減少したが、マルトースは培地中のマルトース濃度に応じて濃度が高くなり、さらに時間が経つにつれて増加した。一方、HD17 株は YP5M 培地では細胞内のマルトースが 1 h 後には減少に転じるのが観察された。また *MAL21* と共にマルターゼを高発現した株 (HD49) では YP4D1M 培地で増殖阻害は見られなかった。YP4D1M と YP5M で培養した HD17 株のマルターゼ遺伝子の発現とマルターゼ活性とを測定すると、YP5M では遺伝子発現量と比較して、初めマルターゼ活性が低かったが、時間と共にマルターゼ活性は上昇した。しかし YP4D1M ではマルターゼ遺伝子はある程度発現していたが、マルターゼ活性は時間が経っても増加しなかった。HD17 株と HD49 株の細胞内糖濃度の定量では、YP4D1M 培地で HD17 株内でのマルトースは 71.4 mM (2.44%) に達しており、培地のマルトース濃度よりもはるかに高かったのに対し、HD49 では 1.3 mM (0.045%) にすぎなかった。一方、グルコースはどちらの株でも 15 mM 程度で、培地のグルコース濃度 (4%=222 mM) よりもはるかに低かった。マルトースを蓄積していても HD17 がグルコースを取り込む能力を失っていないことは<sup>14</sup>C-グルコースを用いたグルコース取り込み活性の測定によっても確認された。これらの結果より、HD17 株はマルトースをある程度以上に蓄積した時、グルコースが細胞内にあっても増殖を停止することがわかった。Agt1p はマルトースの他にスクロースを取り込む。分解されにくい *AGT1[E55P]-2HA* の高発現株はグルコースとマ

ルトース培地 (YP4D1M) の他にグルコースとスクロース培地 (YP4D1S) でも生育遅延が見られ、マルトースだけでなく、スクロースも細胞内に蓄積すると生育阻害が起こることがわかった。マルトーストランスポーターはプロトンシンポーターなため、原因として細胞内 pH の低下が疑われたが、HD17 の細胞内 pH は YP4D1M 培地で一時的に低下したものの、その後徐々に上昇した。従って pH 低下が増殖停止の原因ではない事が確かめられた。

また、蓄積したマルトースによって細胞内の浸透圧が上昇し、細胞外よりから水が流入して膨圧のために細胞膜や細胞壁にダメージが起こる可能性を疑ったが、細胞内マルトースと同濃度のソルビトールを添加しても細胞増殖は回復しなかった。HD17 の細胞内代謝物のメタボローム解析からは、HD17 では YP4D1M 培地では解糖系代謝が低下していることが確認された。そして全てのトリヌクレオチドリン酸は減少し、ジヌクレオチドリン酸、モノヌクレオチドリン酸は増加しているのが見られた。これはエネルギー合成と消費のアンバランスの結果と思われる。HD17 に *TPI1pr::lacZ* を導入してベーターガラクトシダーゼ活性を調べたところ、YP5M 培地では初め培地中のシクロヘキシミドの有無で活性に違いがなく、タンパク質合成が停止していたが、6 h には合成が開始された。それに対し、YP4D1M では 6 h 後にもシクロヘキシミドの有無で活性に違いが見られず、タンパク質合成は停止したままだった。このようなタンパク質合成の停止は HD49 では見られなかった。

このデータから、細胞はマルトースがある程度蓄積すると、遺伝子発現に大きな差はなくとも、何らかの理由でタンパク質合成ができなくなり、増殖が停止する事がわかった。また、マルトースの蓄積が解除されれば、再びタンパク質合成は開始されるが、蓄積が解除されなければタンパク質合成は開始しない。YP4D1M に植菌した時点、あるいは植菌後マルトース蓄積によりタンパク質合成が停止するまでにマルターゼがどれだけ発現するかによって、その後タンパク質合成が再開できるかどうかの違いが出るものと考えられた。タンパク質合成が停止する理由については、現時点ではわかっていない。多くのマルトースや  $\alpha$ -グルコシドトランスポーターがグルコース存在下で速やかに分解する特性はグルコースを優先的に利用するためであると共に、外界の糖の種類に突然変化があった場合、起きる可能性のある増殖阻害を避けるために酵母が獲得した性質かもしれない。

さらに第 4 章ではラガー酵母、あるいはエール酵母株を親株として様々なマルトース、 $\alpha$ -グルコシドトランスポーターの高発現株を作製し、糖組成・糖濃度の異なる様々な麦汁での発酵試験を行った。上述したようにマルターゼが発現しないうちに多くのマルトースを取り込んでしまうと、実験室酵母は増殖阻害が起こす。しかしその増殖阻害は、マルターゼの発現がマルトースの取り込みよりも先行していれば回避できることが明らかになった。

ラガー酵母、エール酵母のマルターゼ活性を測定した結果、両酵母とも実験室株に比べるとグルコース培地でもマルターゼ活性が幾分あり、マルトース培地での活性も実験室株に比べて高かった。すなわち、トランスポーターを高発現させても生育阻害が起こらないと予想された。そこでマルトース、 $\alpha$ -グルコシドトランスポーターを高発現したラガー酵母、あるいはエール酵母株を育種し、発酵試験を行った。その結果、導入したマルトース、 $\alpha$ -

グルコシドトランスポーターの特性と、麦汁の糖組成に応じて、高発現株の糖の資化が変化した。発酵試験 1 でグルコースの組成比が高い麦汁では、糖トランスポーターの高発現株の効果が大きかった。グルコースリプレッションが長引くことから、元々のトランスポーターの発現が遅れるためだと思われる。*MAL21* の高発現株ではマルトースの資化は早くなったが、マルトトリオースの資化は却って遅くなり、糖を残してしまった。*AGT1* の高発現株では、マルトースとマルトトリオースの資化が両方早くなったが、その効果は小さかった。これは *Agt1p* がグルコース誘導性分解耐性が低い事と、取り込み能力が低いためだと思われる。発酵試験 2 において、高濃度麦汁を *MAL21* あるいは *AGT1R* を高発現したエール酵母で発酵した例では、*MAL21* は上述したのと同様に、マルトトリオースを残してしまった。*AGT1R* は発酵試験 1 よりも特にマルトトリオースの資化について効果があった。

これは *Agt1Rp* のグルコース誘導性分解耐性が高いことが効果を持ったのだと考えられる。また発酵試験 3 では、ラガー酵母を親株として *MAL21* に加え、*MTT1[D46G]* も共発現した株と *MTT1* を発現した株の両者が発酵期間を 1 日短縮した。逆に *MTT1[D46G]* の発現株は効果がなかった。これは *Mtt1p[Gly46]* がマルトーストランスポーター *Mal21p*, *Mal31p*, *Mal61p* のどれと比較しても、マルトースの取り込み速度がずっと低いにもかかわらず分解されにくいため、親株の持つマルトーストランスポーターの発現が減って、マルトース取り込み速度に悪影響が出たためと予想される。発酵試験 1,2,3 の結果から、マルトース、 $\alpha$ -グルコシドトランスポーターを高発現すると、親株が元来持っているトランスポーターの発現と競合することがわかった。発酵を早めるためには、元来持っているトランスポーターの能力と合わせて、麦汁に含まれる糖をバランスよく資化できるように、高発現させるトランスポーターの種類、組み合わせを考えなければならない。グルコースの組成比が高い時、あるいは全体的に糖濃度が高い時には、グルコース誘導性分解耐性のあるトランスポーターの高発現は特に発酵促進に効果がある。また麦芽含量が低くて、タンパク質合成に制限がある場合にも、マルトース、 $\alpha$ -グルコシドトランスポーターが発酵開始時点で発現していることには効果があると予想される。また、ラガー、エール酵母共にマルターゼの高発現をさせなくとも、増殖阻害は起こらなかったが、株によってはマルターゼの発現も検討した方が良い場合もあるかもしれない。近年、様々な原料からビール風飲料が製造されており、発酵させるもろみの炭素源と窒素源の種類・量は変化に富む。本研究で明らかになった各種トランスポーターの性質情報は、ビール醸造株の能力を引き出すうえで有用である。本研究で作製した組換え体は薬剤マーカーを除けばセルフクロニング株として利用できる株であり、実用へのハードルも低いと考えられる。

## 5.2 今後の展望

本研究では、ラガー酵母においてメインの役割を果たすマルトトリオースを取り込むトランスポーターが *MTT1* であることを突き止め、その発現、活性、基質特異性などの性質を他のトランスポーターと比べた。また実験室酵母の持つマルトーストランスポーターの

うち Mal21p が、他のトランスポーターとは異なり、グルコース誘導性分解耐性を持つことを見出した。そしてその決定因子を決定し、その情報から他のトランスポーターもグルコース誘導性分解耐性を与えることに成功した。

現在日本では、酒税法第 3 条第 12 号によって、ビールの定義を次のように定められている。

(イ) 麦芽、ホップ及び水を原料として発酵させたもの。

(アルコール分が 20 度未満のもの)

(ロ) 麦芽、ホップ、水、及び麦その他の政令で定める物品を原料として発酵させたもの。

(アルコール分が 20 度未満のもの)

但し、その原料中当該政令で定める物品の重量の合計が麦芽の重量の十分の五をこえないものに限る。

当該政令で定める物品とは、麦、米、とうもろこし、こうりやん、ばれいしよ、でんぷん、糖類などである。これらの原料を麦芽の半分を超えて使うと、ビールではなく発泡酒となる。現時点ではビールと呼ばれる酒の原料は非常に限られているが、近々この原料規制について大幅変更が行われる予定である。また、ビール・発泡酒以外にも酒税法上ではリキュール、雑酒に属する、他の原料を含むビール風飲料も今後ますますの開発が見込まれる。原料の幅が広がれば、含まれる糖の種類、比率の幅も広がる。酵母は糖によって取り込みのトランスポーターが異なるため、糖の種類が増えれば、マルトース、マルトトリオースの資化はますます遅延する可能性がある。また、糖だけではなく原料の窒素源も多岐にわたった場合、そのアミノ酸・アンモニア含量、組成比によって、発酵中のタンパク質合成が制限されるケースが出てくる。炭素源の種類が今までにない場合や、タンパク質合成が制限されるようなもろみでは、MAL21 や MTT1[D46G]の高発現は大きな効果を発揮するだろう。本研究では、ラガー酵母の  $\alpha$ -グルコシドトランスポーターについて調べた。

エール酵母は *S. cerevisiae* だが、実験室酵母と違って株によって AGT1 と MTT1 の両方を持つもの、AGT1 しか持たないものなど多様である (81)。また、機能する遺伝子があってもプロモーター活性が非常に弱く、AGT1 あるいは逆に MTT1 がほとんど発現しない株もある事、また 3 倍体のエール酵母において、AGT1 も MTT1 も MALX1 もプロモーター配列を含めてほとんどの場合 SNP が存在しヘテロである事がわかってきた。例えば、3 つ (3 倍体なので、一つのトランスポーターについて 3 つのアレルがある) のうち 1 つには AGT1 ORF 中にラガー酵母と同じ位置にストップコドンがあり、残りの 2 つは機能する AGT1 が存在する株がある (manuscript in preparation)。清酒酵母などでは、アレルのヘテロな塩基はアレル間で組換えが起こることにより、だんだんホモになっていく loss of heterogeneity と言われる現象が知られているが、エール酵母の AGT1 については、ヘテロな状態で安定しているように思われる (90)。また数個のアミノ酸残基の違いで活性も基質特異性もプロモーター活性も異なる場合があることなど、様々なことがわかってきた (91)。

また、そのヘテロなトランスポーター遺伝子の中には、本研究で特定したグルコース誘導性分解耐性の決定因子のアミノ酸を持つトランスポーターも見つかり、そのトランスポーターがグルコース誘導性分解耐性を持つことも確認された(**manuscript in preparation**)。

エール酵母もそのビール醸造をうまく行うには、基本的なトランスポーターの性質を株ごとに見極める必要があり、本研究で得られたトランスポーターの基本的な情報が大いに役立つと思われる。また、エール酵母の中にはラガー酵母に比べてマルトース・マルトリオースの資化能力がかなり弱い株が存在することも明らかになってきており (89)、*MAL21* や *MTT1[D46G]*の高発現は、そのようなエール酵母においても大きな効果を発揮するだろう。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始格別なるご指導とご鞭撻を賜りました大阪大学大学院工学研究科・福崎英一郎教授に謹んで感謝の意を表します。また、本論文の審査において、貴重なご指導とご助言を賜りました大阪大学生物工学国際交流センター・藤山和仁教授、大阪大学大学院工学研究科 大政健史教授に心から厚く感謝申し上げます。

本研究を進めるにあたり貴重なご助言と励ましの言葉をいただき、また多岐にわたってサポートいただいた、馬場健史 九州大学生体防御医学研究所教授(元大阪大学大学院工学研究科准教授)と、小野比佐好元助教に深く感謝いたします。

$\alpha$ -グルコシドトランスポーターの構造につきましては、新潟薬科大学 石黒正路教授に多大なるご助言をいただきました。ここに深く感謝いたします。

本研究のメタボロミクス分析実験につきましては、光永均博士(現キッコーマン株式会社)に多大なる協力をいただきました。ここに深くお礼申し上げます。

また本研究を行うに際し、事務手続きを含め、全てにおいてお世話になった新間秀一准教授、福崎研究室の諸先輩、学生諸氏、スタッフの皆様に感謝いたします。

本研究を進めるに当たり、実験データ議論や、論文投稿におけるご助言を含め、多岐にわたってご協力いただいたサントリーグローバルイノベーションセンターの児玉由紀子博士と大村文彦博士に深く感謝いたします。

最後にこれまで応援してくださいました友人、常に支えてくれた家族に深い感謝の意を表して謝辞と致します。



## 引用論文

- 1) 日本醸造学会 ビール酒造組合編：ビールの基本技術, 日本醸造学会
- 2) **Wolfgang Kunze**: Technology Brewing & Malting, 4th completely updated edition, VLB Berlin
- 3) 谷川 篤史: ビール造りの研究とは? 生物工学 第90巻, 第5号, 242-245, 2012年
- 4) **Libkind, D., Hittinger, C.T., Valério, E., Gonçalves, C., Dover, J., Johnston, M., Gonçalves, P., and Sampaio, J.P.**: Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 108, 14539-14544, 2011
- 5) **Nakao, Y., Kanamori, T., Itoh, T., Kodama, Y., Rainieri, S., Nakamura, N., Shimonaga, T., Hattori, M., and Ashikari, T.**: Genome sequence of the lager brewing yeast, an interspecies hybrid. *DNA Res.*, 16, 115-129, 2009
- 6) **Gibson, B., and Liti, G.**: *Saccharomyces pastorianus*: genomic insights inspiring innovation for industry. *Yeast*, 32, 17-27, 2015
- 7) **Monerawela, C., and Bond, U.**: The hybrid genomes of *Saccharomyces pastorianus*: A current perspective. *Yeast*, 35, 39-50, 2018
- 8) **Ye, L., Kruckeberg, A.L., Berden, J.A. and VanDam, K.**: Growth and glucose repression are controlled by glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae* cells containing only one glucose transporter. *J. Bacteriol.*, 181, 4673-4675, 1999
- 9) **Gadura, N., and Michels, C. A.**: Sequences in the N-terminal cytoplasmic domain of *Saccharomyces cerevisiae* maltose permease are required for vacuolar degradation but not glucose-induced internalization, *Curr Genet.*, 50, 101-114, 2006
- 10) **Naumov, G.I., Naumova, E.S., and Michels, C.A.**: Genetic variation of the repeated *MAL* loci in natural populations of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus*, *Genetics*, 136, 803-812, 1994
- 11) **Chow, T.H., Sollitti, and P., Marmur, J.**: Structure of the multigene family of *MAL* loci in *Saccharomyces*., *Mol. Gen. Genet.*, 217, 60-69, 1989

- 12) Pougach, K., Voet, A., Kondrashov, F.A., Voordeckers, K., Christiaens, J.F., Baying, B., Benes, V., Sakai, R., Aerts, J., Zhu, B., Van Dijck, P., and Verstrepen, K.J.: Duplication of a promiscuous transcription factor drives the emergence of a new regulatory network. *Nat. Commun.*, 5, 4868, 2014
- 13) Goldenthal, M.J., and Vanoni, M.: Genetic mapping and biochemical analysis of mutants in the maltose regulatory gene of the *MAL1* locus of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.*, 154, 544-549, 1990
- 14) Teste, M.A., François, J.M., and Parrou, J.L.: Characterization of a new multigene family encoding isomaltases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the *IMA* family. *J. Biol. Chem.*, 285, 26815-26824, 2010
- 15) Gancedo, J.M.: The early steps of glucose signalling in yeast. *FEMS Microbiol. Rev.*, 32, 673-704, 2008
- 16) Ran, F., Bali, M., and Michels, C.A.: Hsp90/Hsp70 chaperone machine regulation of the *Saccharomyces MAL*-Activator as determined in vivo using noninducible and constitutive mutant alleles, *Genetics*, 179, 331-343, 2008
- 17) Lucero, P., and Lagunas, R.: Catabolite inactivation of the yeast maltose transporter requires ubiquitin-ligase *npi1/rsp5* and ubiquitin-hydrolase *npi2/doa4*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 147, 273-277, 1997
- 18) Medintz, I., Wang, X., Hradek, T., and Michels, C.A.: A PEST-like sequence in the N-terminal cytoplasmic domain of *Saccharomyces* maltose permease is required for glucose-induced proteolysis and rapid inactivation of transport activity, *Biochemistry*, 39, 4518-4526, 2000
- 19) Jespersen, L., Cesar, L.B., Meaden, P.G., and Jakobsen, M.: Multiple alpha-glucoside transporter genes in brewer's yeast. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 450-456, 1999
- 20) Gibson, B., Boulton, C., Box, W., Graham, N., Lawrence, S., Linforth, R., and Smart, K.: Carbohydrate utilization and the lager yeast transcriptome during brewery

fermentation. *Yeast*. 25, 549-562. 2008

21) **Rautio, J.J., Huuskonen, A., Vuokko, H., Vidgren, V., and Londesborough, J.:** Monitoring yeast physiology during very high gravity wort fermentations by frequent analysis of gene expression, *Yeast*, 24, 741-760, 2007

22) **Hatanaka, H., Omura, F., Kodama, Y., and Ashikari, T.:** Gly46 and His50 of yeast maltose transporter Mal21p are essential for its resistance against glucose-induced degradation, *J. Biol. Chem.*, 284, 15448-15457, 2009

23) **Rose, M. D., Winston, F., and Hieter, P.:** *Methods in Yeast genetics: A Laboratory Course Manual*, Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1990

24) **Degryse, E., Dumas, B., Dietrich, M., Laruelle, L., and Achstetter, T.:** In vivo cloning by homologous recombination in yeast using a two-plasmid-based system., *Yeast*, 11, 629-640, 1995

25) **Rose, M.D., Novick, P., Thomas, J.H., Botstein, D. and Fink, G.R.:** A *Saccharomyces cerevisiae* genomic plasmid bank based on a centromere-containing shuttle vector. *Gene*, 60, 237-243, 1987

26) **Hansen, J., Felding, T., Johannesen, P.F., Piskur, J., Christensen, C.L., and Olesen, K.:** Further development of the cassette-based pYC plasmid system by incorporation of the dominant hph, nat and AUR1-C gene markers and the lacZ reporter system. *J.FEMS Yeast Res.*, 4, 323-327, 2003

27) 片倉啓雄、大政健史、長沼孝文、小野比佐好 監修: 実践 有用微生物培養のイロハ 実践 試験管から工業スケールまで, 株式会社 エヌ・ティー・エス

28) **Teixeira, M.C., Monteiro, P., Jain, P., Tenreiro, S., Fernandes, A.R., Mira, N.P., Alenquer, M., Freitas, A.T., Oliveira, A.L., and Sá-Correia, I.:** The YEASTRACT database: a tool for the analysis of transcription regulatory associations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.*, 34, D446-D451, 2006

29) **Teixeira, M.C., Monteiro, P.T., Palma, M., Costa, C., Godinho, C.P., Pais, P., Cavalheiro, M., Antunes, M., Lemos, A., Pedreira, T., and Sá-Correia, I.:** YEASTRACT:

an upgraded database for the analysis of transcription regulatory networks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.*, 46, D348-D353, 2018

30) **Vidgren, V., Kankainen, M., Londesborough, J. and Ruohonen, L.**: Identification of regulatory elements in the *AGT1* promoter of ale and lager strains of brewer's yeast. *Yeast*, 28, 579–594, 2011

31) **Wang, J., Sirenko, O., and Needleman, R.**: Genomic footprinting of Mig1p in the *MAL62* promoter. Binding is dependent upon carbon source and competitive with the Mal63p activator. *J. Biol. Chem.*, 272, 4613-4622, 1997

32) **Zhu, J., and Zhang, M.Q.**: SCPD: a promoter database of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioinformatics*, 15, 607–611, 1999

33) **Hu, Z., Nehlin, J.O., and Michels, C.A.**: *MIG1*-dependent and *MIG1*-independent glucose regulation of *MAL* gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.*, 28, 258–266, 1995

34) **Saier, M.H. Jr.**: Families of transmembrane transporters selective for amino acids and their derivatives, *Microbiology*, 146, 1775-1795, 2000

35) **Dietvorst, J., Londesborough, J., and Steensma, H.Y.**: Maltotriose utilization in lager yeast strains: *MTT1* encodes a maltotriose transporter. *Yeast*, 22, 775-788, 2005

36) **Raths, S., Rohrer, J., Crausaz, F., and Riezman, H.**: *end3* and *end4* two mutants defective in receptor-mediated and fluid-phase endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.*, 120, 55-65, 1993

37) **Hein, C., Springael, J. Y., Volland, C., Haguenaer-Tsapis, R., and Andre, B.**: *NPI1*, an essential yeast gene involved in induced degradation of Gap1 and Fur4 permeases, encodes the Rsp5 ubiquitin-protein ligase. *Mol. Microbiol.*, 18, 77-87, 1995

38) **Kodama, Y., Omura, F., and Ashikari, T.** : Isolation and Characterization of a Gene Specific to Lager Brewing Yeast That Encodes a Branched-Chain Amino Acid Permease. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 3455-3462, 2001

- 39) **Brondijk, T. H., van der Rest, M. E., Pluim, D., de Vries, Y. de., Stingl, K., Poolman, B., and Konings, W. N.**: Catabolite inactivation of wild-type and mutant maltose transport proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 273, 15352-15357, 1998
- 40) **Riballo, E., Herweijer, M., Wolf, D. H., and Lagunas, R.**: Catabolite inactivation of the yeast maltose transporter occurs in the vacuole after internalization by endocytosis. *J. Bacteriol.*, 177, 5622-5627, 1995
- 41) **Brondijk, T. H., Konings, W. N., and Poolman, B.** : Regulation of maltose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.*, 176, 96-105, 2001
- 42) **Medintz, I., Jiang, H., Han, E.K., Cui, W., and Michels, C. A.**: Characterization of the Glucose-Induced Inactivation of Maltose Permease in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriology*, 178, 2245–2254, 1996
- 43) **Han, E.K., Cotty, F., Sottas, C., Jiang, H., and Michels, C.A.**: Characterization of *AGT1* encoding a general alpha-glucoside transporter from *Saccharomyces*. *Mol. Microbiol.*, 17, 1093-1107, 1995
- 44) **Marchal, C., Haguenaer-Tsapis, R., and Urban-Grimal, D.** : A PEST-like sequence mediates phosphorylation and efficient ubiquitination of yeast uracil permease. *Mol. Cell Biol.*, 18, 314-321, 1998
- 45) **Omura, F., Kodama, K., and Ashikari, T.**: The N-Terminal Domain of the Yeast Permease Bap2p Plays a Role in Its Degradation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 287, 1045-1050, 2001
- 46) **Madrid, R., Maout, S. L., Barrault, M.B., Janvier, K., Benichou, S., and Merot, J.**: Polarized trafficking and surface expression of the *AQP4* water channel are coordinated by serial and regulated interactions with different clathrin-adaptor complexes. *EMBO J.*, 20, 7008-7021, 2001
- 47) **Stolk, M., Cooper, E., Vilk, G., Litchfield, D. W., and Hammond, R.** : Subtype-specific regulation of equilibrative nucleoside transporters by protein kinase CK2. *Biochem. J.*, 386, 281-289, 2005

- 48) **Ashok Kumar, T.** : CFSSP: Chou and Fasman Secondary Structure Prediction server. WIDE SPECTRUM. Research Journal., 1, 15-19, 2013
- 49) **Jensen, J.M., Ernst, H., Wang, X., Hald, H., Ditta, A.C., Ismat, F., Rahman, M., and Mirza, O.**: Functional investigation of conserved membrane-embedded glutamate residues in the proton-coupled peptide transporter YjdL, Protein Pept. Lett., 19, 282-287, 2012
- 50) **Liu, Z., Madej, M.G., and Kaback, H.R.**: Helix dynamics in LacY: helices II and IV, J. Mol. Biol., 396, 617-626, 2010
- 51) **Salema-Oom, M., Valadão Pinto, V., Gonçalves, P., and Spencer-Martins, I.**: Maltotriose utilization by industrial *Saccharomyces* strains: characterization of a new member of the alpha-glucoside transporter family, Appl. Environ. Microbiol., 71, 5044–5049, 2005
- 52) **Alves, S.L.Jr., Herberts, R.A., Hollatz, C., Trichez, D., Miletti, L.C., de Araujo, P.S., and Stambuk, B.U.**: Molecular analysis of maltotriose active transport and fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* reveals a determinant role for the *AGT1* permease, Appl. Environ. Microbiol., 74, 1494–1501, 2008
- 53) **Nijland, J.G., Vos, E., Shin, H.Y., de Waal, P.P., Klaassen, P., and Driessen, A.J.**: Improving pentose fermentation by preventing ubiquitination of hexose transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnol. Biofuels, 9:158, 2016
- 54) **Crapeau, M., Merhi, A., and André, B.**: Stress conditions promote yeast Gap1 permease ubiquitylation and down-regulation via the arrestin-like Bul and Aly proteins. J. Biol. Chem., 289, 22103-22116, 2014
- 55) **Rekha, N., and Srinivasan, N.**: Structural basis of regulation and substrate specificity of protein kinase CK2 deduced from the modeling of protein-protein interactions. BMC Struct. Biol., 3:4. 2003
- 56) **Omura, F., Kodama, K., and Ashikari, T.**: The basal turnover of yeast branched-chain amino acid permease Bap2p requires its C-terminal tail. FEMS Microbiology Letters 194, 207-214, 2001

- 57) **Hasunuma T., Hori Y., Sakamoto T., Ochiai M., Hatanaka H. and Kondo A.:** Development of a GIN11/FRT-based multiple-gene integration technique affording inhibitor-tolerant, hemicellulolytic, xylose-utilizing abilities to industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains for ethanol production from undetoxified lignocellulosic hemicelluloses. *Microbial Cell Factories*, 13:145, 2014
- 58) **Lommen, A.:** MetAlign: interface-driven, versatile metabolomics tool for hyphenated full-scan mass spectrometry data preprocessing. *Anal. Chem.*, 81, 3079–3086, 2009
- 59) **Tsugawa H, Tsujimoto Y, Arita M, Bamba T, and Fukusaki E. :** GC/MS based metabolomics: development of a data mining system for metabolite identification by using soft independent modeling of class analogy (SIMCA). *BMC Bioinformatics*, 12:131, 2011
- 60) **Valli, M., Sauer, M., Branduardi, P., Borth, N., Porro, D., and Mattanovich, D.:** Intracellular pH distribution in *Saccharomyces cerevisiae* cell populations, analyzed by flow cytometry. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 1515-1521, 2005
- 61) **Suzuki, H., Kato, E., Matsuzaki, A., Ishikawa, M., Harada, Y., Tanikawa, K., and Nakagawa, H.** Analysis of saccharides possessing post-translational protein modifications by phenylhydrazine labeling using high-performance liquid chromatography. *Anal. Sci.*, 25, 1039-1042, 2009
- 62) **Matsusaka, K., Chiba, S., and Shimomura, T.:** Purification and substrate specificity of brewer's yeast alpha-glucosidase. *Agric. Biol. Chem.*, 41, 1917-1923, 1977
- 63) 駒 大輔\*・山中 勇人・森芳 邦彦・大本 貴士: 培地の成分知っていますか?  
生物学 第4号 195-199, 2011年
- 64) **Kim, J.H., Roy, A., Jouandot, D. II, Cho, K.H.:** The glucose signaling network in yeast. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1830, 5204-5210, 2013
- 65) **Miklos, A.C., Sarkar, M., Wang, Y., and Pielak, G.J.:** Protein Crowding Tunes Protein Stability. *J. Am. Chem. Soc.*, 133, 7116–7120, 2011

- 66) **Olmo, R., Teijón, C., Blanco, M.D., Teijón, J.M., and Romero, A.:** Structural and functional implications of the hexokinase-nickel interaction, *J. Inorg. Biochem.*, 99, 2395-2402, 2005
- 67) **Hofmann, E., and Kopperschläger, G.:** Phosphofructokinase from yeast. *Methods Enzymol.*, 90, 49-60, 1982
- 68) **Wierenga, R.K., Kapetaniou, E.G., and Venkatesan, R.:** Triosephosphate isomerase: a highly evolved biocatalyst. *Cell Mol. Life Sci.*, 67, 3961-3982, 2010
- 69) **Hohmann, S., Krantz, M., and Nordlander, B.:** Yeast osmoregulation, *Methods Enzymol.*, 428, 29-45, 2007
- 70) **Hohmann, S.:** Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 66, 300-372, 2002
- 71) **Mager, W. H., and Siderius, M.:** Novel insights into the osmotic stress response of yeast. *FEMS Yeast Research*, 2, 251-257, 2002
- 72) **Park, J.H., and Ahn, S.H.:** IMP dehydrogenase is recruited to the transcription complex through serine 2 phosphorylation of RNA polymerase II. *Biochem Biophys Res Commun.* 392, 588-592, 2010
- 73) **Pilkis, S.J., Claus, T.H., Kurland, I.J., and Lange, A.J.:** 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: a metabolic signaling enzyme. *Annu. Rev. Biochem.*, 64, 799-835, 1995
- 74) **Dihazi, H., Kessler, R., and Eschrich, K.:** Glucose-induced stimulation of the Ras-cAMP pathway in yeast leads to multiple phosphorylations and activation of 6-phosphofructo-2-kinase. *Biochemistry*, 42, 6275-6282, 2003
- 75) **Tripodi, F., Nicastro, R., Reghellin, V., and Coccetti, P.:** Post-translational modifications on yeast carbon metabolism: Regulatory mechanisms beyond transcriptional control. *Biochim Biophys Acta.*, 1850, 620-627, 2015
- 76) **van den Brink, J., Canelas, A.B., van Gulik, W.M., Pronk, J.T., Heijnen, J.J., de**



**Winde, J.H., and Daran-Lapujade, P.:** Dynamics of glycolytic regulation during adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to fermentative metabolism, *Appl. Environ. Microbiol.*, 74, 5710-5723, 2008

77) **de Paula, R.M., Wilson, W.A., Roach, P.J., Terenzi, H.F., and Bertolini, M.C.:** Biochemical characterization of *Neurospora crassa* glycogenin (GNN), the self-glucosylating initiator of glycogen synthesis. *FEBS Lett.*, 579, 2208-2214, 2005

78) **Pitcher, J, Smythe, C., and Cohen, P.:** Glycogenin is the priming glucosyltransferase required for the initiation of glycogen biogenesis in rabbit skeletal muscle. *Eur. J. Biochem.*, 176, 391-395, 1988

79) **Mu, J., Cheng, C., and Roach, P.J.:** Initiation of glycogen synthesis in yeast. *J. Biol. Chem.*, 271, 26554–26560, 1996

80) **Richard, P. :** The rhythm of yeast. *FEMS Microbiology Reviews*, 27, 547-557, 2003

81) **Roy, J., Mitra, S., Sengupta, K., and Mandal, A.K.:** Hsp70 clears misfolded kinases that partitioned into distinct quality-control compartments. *Mol Biol Cell.*, 26, 1583-1600, 2015

82) **Jarnuczak, A.F., Eyers, C.E., Schwartz, J.M., Grant, C.M., and Hubbard, S.J.:** Quantitative proteomics and network analysis of *SSA1* and *SSB1* deletion mutants reveals robustness of chaperone *HSP70* network in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proteomics*, 15, 3126-3139, 2015

83) **Rolland, F., Winderickx, J., and Thevelein, J. M.:** Glucose-sensing and -signalling mechanisms in yeast. *FEMS Yeast Research*, 2, 183-201, 2002

84) **Shah, K.H., Varia, S.N., Cook, L.A., and Herman, P. K.:** A hybrid-body containing constituents of both P-bodies and stress granules forms in response to hypoosmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLOS ONE*, 11(6): e0158776, 2016

85) **Stoecklin, G., and Kedersha, N.:** Relationship of GW/P-bodies with stress granules. *Adv. Exp. Med. Biol.* 768, 197–211, 2013

- 86) **Castilho, B.A., Shanmugam, R., Silva, R.C., Ramesh, R., Himme, B. M., and Sattlegger, E.:** Keeping the eIF2 alpha kinase Gcn2 in check. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1843, 1948–1968, 2014
- 87) **Majumdera, M., Mitchella, D., Merkulovb, S., Wua, J., Guana, B.J., Sniderc, M.D., Krokowskia, D., Yeec, V.C., and Hatzogloua, M.:** Residues required for phosphorylation of translation initiation factor eIF2 $\alpha$  under diverse stress conditions are divergent between yeast and human. *Int J Biochem Cell Biol.*, 59, 135–141., 2015
- 88) **Carlson, M., Taussig, R., Kustu, S., and Botstein, D.:** The secreted form of invertase in *Saccharomyces cerevisiae* is synthesized from mRNA encoding a signal sequence. *Mol Cell Biol.*, 3, 439-447, 1983
- 89) **Vidgren, V., Multanen, JP., Ruohonen, L., and Londesborough, J.:** The temperature dependence of maltose transport in ale and lager strains of brewer's yeast. *FEMS Yeast Res.*, 10, 402–411, 2010
- 90) **Okuno, M., Kajitani, R., Ryusui, R., Morimoto, H., Kodama, Y., and Itoh, T.:** Next-generation sequencing analysis of lager brewing yeast strains reveals the evolutionary history of interspecies hybridization. *DNA Research*, 23, 67–80, 2016
- 91) **Smit, A., Moses, S., Pretorius, I.S., and Cordero-Otero R.:** The Thr505 and Ser557 residues of the *AGT1*-encoded alpha-glucoside transporter are critical for maltotriose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Appl. Microbiol.*, 104, 1103-1111. 2008

## 発表論文

### 本学位に関与する論文

1) Haruyo Hatanaka, Fumihiko Omura, Yukiko Kodama, and Toshihiko Ashikari: Gly46 and His50 of yeast maltose transporter Mal21p are essential for its resistance against glucose-induced degradation, J. Biol. Chem., 284, 15448-15457, 2009

2) Haruyo Hatanaka, Hitoshi Mitsunaga, and Eiichiro Fukusaki: Inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* growth by simultaneous uptake of glucose and maltose. J Biosci Bioeng. 125, 52-58, 2018

### 特許

発明の名称：ハイブリッド $\alpha$ -グルコシドトランスポーター

発明者：畠中治代、大村文彦

登録日：2009.12.25 登録番号：特許第 4430132 号

発明の名称：グルコース誘導性不活化/分解耐性トランスポーター遺伝子及びその用途

発明者：畠中治代、大村文彦

登録日：2009.12.25 登録番号：特許第 4430133 号

発明の名称：グルコース誘導性不活化/分解耐性トランスポーター遺伝子及びその用途

発明者：畠中治代、大村文彦

登録日：2013.4.12 登録番号：特許第 5241771 号

発明の名称：Hybrid alpha-glucoside transporter

発明者：Haruyo Hatanaka, Fumihiko Omura

登録日：Nov. 1. 2011. 登録番号：US8,048,667B2

発明の名称：Glucose-induced inactivation/degradation-resistant transporter and use thereof

発明者：Haruyo Hatanaka, Fumihiko Omura

登録日：Nov. 8. 2011. 登録番号：US8,053,224B2

### 学会発表

#### 国内会議

1) 畠中治代

下面ビール酵母の持つ $\alpha$ -グルコシドトランスポーターの性質とその役割

第19回酵母合同シンポジウム 2010年6月

2) 畠中 治代、大村 文彦、石黒 正路

*S.cerevisiae* の持つ $\alpha$ -グルコシドトランスポーターの諸性質に関する研究

日本農芸化学会大会, 仙台, 2013年3月

3) 畠中 治代、光永 均、大村 文彦、石黒 正路、馬場 健史、福崎 英一郎

二種類の糖の同時資化が酵母にもたらす増殖阻害

日本農芸化学会大会, 東京, 2014年3月

4) 畠中 治代、光永 均、大村 文彦、石黒 正路、馬場 健史、福崎 英一郎

グルコース誘導性の分解を受けにくい $\alpha$ -グルコシドトランスポーターの発現が, 酵母にもたらす増殖阻害

日本生物工学会大会, 広島, 2014年9月

#### 海外会議

1) Haruyo Hatanaka, and Toshihiko Ashikari

Cloning and characterization of the novel alpha-glucoside transporter from bottom fermenting yeast

20th International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology 2001, July

2) Haruyo Hatanaka, Fumihiko Omura, Nobuyuki Fukui and Hiroto Kondo

Studies on maltotriose assimilation by lager yeast

American Society of Brewing Chemist annual meeting 2006, June

3) Haruyo Hatanaka, Hitoshi Mitsunaga, Shouji Ishiguro, Takeshi Baba, and Eiichiro Fukusaki

Growth inhibition which an alpha-glucoside transporter tolerant to glucose-induced degradation brings to *Saccharomyces cerevisiae*

26th International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology 2013, Sep.