

Title	ラガービール酵母のα-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	https://doi.org/10.18910/72165
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

博士学位論文

ラガービール酵母の α-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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・
1.2 ビール醸造の概略と、他の醸造酒と違い・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・
1.3 ビール醸造に用いる酵母の特徴・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・
1.4 ビール酵母によるマルトース、α-グルコシドの資化・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・
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α-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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・
2.2 実験材料および方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・
2.2.1 使用菌株・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・
2.2.2 使用培地と培養・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・
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
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 ノザー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. eub</i> ayanus 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 ScAGT1 の取得とその構造・・・・・・・・・・・・25
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・・・・・・・27

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・・・・・・28
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・・・・・・・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
MTT1, MAL31, ScAGT1, SeAGT1の遺伝子発現パターン・・・・・・・・・・33
2.3.9 MTT1, MAL61, ScAGT1, SeAGT1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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・
3.1 緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・
3.2 実験材料および方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・
3.2.1 使用菌株・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・
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
3.2.3 使用培地と培養・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・
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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・
3.2.7 ウエスター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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・
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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・
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 SeAGT1 と AGT1、MTT1 と MAL61、MAL31、MAL21 のタン
パク発現と取り込み活性の比較・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・
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 α-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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・

	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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	$\cdots 65$
	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	5 4 章 実験室株およびビール酵母での α-グルコシドトランスポーターの高発現・・・	••• 7 3
	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	り作製
	•••••••••••••••••••••••••••••••••••••••	···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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	$\cdots 82$
	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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	$\cdots 82$
	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ソキナーゼ活性の測定・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	···83
	4.2.9 ベータ—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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	$\cdots 85$
	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	室杉	未考	と行	¥Ξ	È	F	U	た	α	-)	デ	ル	コ	シ	- 1	1	\vdash	ラ	ン	17	く;	ポ	_	-)	タ・		· 発	ξŦ	見材	朱	の	1/2	皆	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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・
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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・
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 α-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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・
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····································
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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・
海外会議・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・

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 α-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。粉砕した麦芽は副 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℃、ラガー酵母(下面酵母)を用いた場合は 5~15℃ 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℃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α-アミラ ーゼ、β-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α-アミラーゼ、α-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 ubarum, Saccharomyces bayanus, Saccharomyces kudriazevii $\Delta \mathcal{E} \mathcal{E}$ S. cerevisiae \mathcal{O} M 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℃ 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α-グルコシドを資化する能力である。α-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α-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、α-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~HXT1*7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、α-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。好気的に呼吸によっ 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、嫌気的な発酵に



図 1-3 酵母による糖の取り込みと糖トランスポーター

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 糖であることの理由は、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α-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、α-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α-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 はへキソキナーゼ 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。 α-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 α-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)。先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クエ



図 1-6 膜タンパク質の分解モデル

 $M: \alpha$ -グルコシドトランスポーター , M: 修飾された α -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、α-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クエンスの冗 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 てのシークエ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α-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(OD₆₆₀)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 一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), OD₆₆₀, 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 1.5×10⁷ cells/ml に なるようにピッチングして 15 ℃ 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が関係してい 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、α-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 α-グルコシドトランスポーター、および実験室株の α-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α・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α・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α・グルコシドトランスポーターの 欄 配 して ジェポーター高発現株が、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α・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 α-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クエ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)。α-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、ドラフトシークエ 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α-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 シークエ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 α -グルコシドトランスポーターの中でマルトトリ 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α-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、*hxt1-74, gal24*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、遺伝子クロー ニングなどの目的に用いた。

大腸菌 DH5a 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℃、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
S. pastrianus	
SUN49	prototroph
SUN84	prototroph
Weihenstephan 34/70(WS34/70)	prototroph
HH118	identical to WS34/70 except for ScAgt1 \varDelta
HH132	identical to WS34/70 except for ScAgt1 a SeAgt1 a
S. cerevisiae	
X2180-1A	MATalpha SUC2 mal mel gal2 CUP1
JH1032	MATa SUC2 mal mel gal2 CUP1 TPI1::TPI1pr-MAL32-G418R ura3
S288C	MATa SUC2 gal2 mal2 mel flo1 flo8-1 hap1 ho bio1 bio6
ATCC96955	MATa MAL61 MAL62 MAL63 mal64 mal11 MAL12 mal13 ura3-52
A10090933	leu2-3 leu2-112 trp1 his
ATCC20598	MATa suc MAL2 MEL1 his4 leu2
CB11	MATa ade1 MAL61 MAL62 MAL63 AGT1 MAL12 MAL31 MAL32
HH150	MATa ade1 MAL61 MAL62 MAL63 agt1
111100	MAL32
HH208	identical to JH1032 except for ura3::URA3
HH108	identical to JH1032 except for ura3::URA3-TPI1pr-MAL61
HH228	identical to JH1032 except for ura3::URA3-TPI1pr-AGT1
HH196	identical to JH1032 except for ura3::URA3-TPI1pr-MTT1
HH205	identical to JH1032 except for ura3::URA3-TPI1pr-SeAGT1
KY73	ura3 gal2 Δ hxt1 Δ hxt2 Δ hxt3 Δ hxt41 Δ hxt5 Δ hxt6 Δ hxt7 Δ
S. bayanus	
IF01127	
E. coli	
DH5a	F – , Φ80d lacZΔM15, Δ(lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(rK- mK+), phoA, supE44, λ – , thi-1, avrA96, relA1

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、ホモロガ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'-GGATCCTCATTTGTTCACAACAGATGAGG -3'	MAL61 cloning
3	5'-TCTAGAATGAAGGGATTATCCTCATTA-3'	MAL31 cloning
4	5'-GGATCCTCATTTGTTCACAACAGATGA-3'	MAL31 cloning
5	GAGCTCACATAGAAGAACATCAAACAACT	AGT1 cloning
6	GGATCCTTATTTCTTCCAAAAAAAAAAA	AGT1 cloning
7	5'-TCTAGAAGCGAGAGTTTAAGCGAGGTTG-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'-ATTATAATATTTTTTAGTTGTTTGATG-3'	ScAGT1p cloning
15	5'-TTGAGCTCAGTCTAGAGCTTATAGTTTTTTGTAGTTATAGATTT-3'	TPI1p cloning
16	5'-TTGCGGCCGCTCTAGGATCTACGTATGGTCATTTC-3'	TPI1p cloning
17	5'-CTGAGCTCAAGGATCCGATTAATATAATTATATAAAAAATATTATCT-3'	TPI1t cloning
18	5'-ATGCGGCCGCGTACGCGTCGACTTTCATAGACACAGTACTTACA-3'	TPI1t cloning
19	5'-GGATCCTCTGCAAGAGTGTATAGATAATCAGAAAGA-3'	pJHXSBSeAGT1
20	5'-GGATCCTTGTTTCGAATGGGTTCTCTTAAATACGCGT-3'	pJHXSBSeAGT1
21	5'-TCTAGAATTACATCCAAGACTATTAATTAACT-3'	pJHXSBMTT1
22	5'-GGATCCGTATCTACCTACTGGCAAAAAATCATT-3'	pJHXSBMTT1
23	5'-TCTAGAGATATCATGTCTGAAGAAGCTGCCTATCAA-3'	HXT5 cloning
24	5'-GGATCCGATATCTTATTTGGTGCTGAACATTCTCTTG-3'	HXT5 cloning
25	5'-TCTAGAGATATCATGTCTGAATTCGCTACTAGCAG-3'	HXT2 cloning
26	5'-GGATCCGATATCTTATTCCTCGGAAACTCTTTTTTCT-3'	HXT2 cloning
27	5'-TCTAGAGATATCATGTCACATGTTAACGCGTCGTATG-3'	ESY1 cloning
28	5'-GGATCCGATATCATAGCTCAATTGGCCCTTCTTCA-3'	FSY1 cloning
20	5'-ACTGATACTCTCATCAGCTAGCGAATCATGTTGAGTTTTTCCCTTTCCGAAT	i o i i cioning
20	GGATCAACCACAGTAGATGCAAATTTTCTGGCAGGAACCCCTTGGTTGCGCAC	ACT1 disruption (Nat)
29		AGTI distuption (Nat)
20		
30		AGI1 disruption (Nat)
	5'-ACTGATACTCTCATCAGCTAGCGAATCATGTTGAGTTTTTCCCTTTCCGAAT	
31	GGATCAACCACAGTAGATGCAAATTTTCTGGCAGGAACCCCTTGGTTGCGCAC	AGTCR-GR
	TTAACTTCGCATCTG-3'	
	5'-GAGCTAGACCACTTAGAGTTCACCACCAATCTAGAACAGTTAGGAGATTCA	
32	GACGAAGATAACGAGAATGTGATTAATGAGATGAACGCTACTGATGATGCATG	AGTNF-GR
	CCCGGGCTTAATTAAG-3'	
	5'-TCATAACGCCTGTTGACTCGCGCTTGAGAACCGGTCAATAATGTTATCAAC	
33	TTGCGGACGATTTTGTAGCCCTCTCTTTCCAAAGGGATCAACTACTGTACGCA	SeAGT1 disruption (Nat, Hyg)
	CTTAACTTCGCATCTG-3'	
	5'-ATGAAAAATATACTTTCGCTGGTAGGAAGAAAGGAAAATACCCCAGAAGAT	
34	GTGACGGCGAATCTTGCGGACACCTCAAGCACTACAGTTATGCAAGCAA	SeAGT1 disruption (Nat. Hvg)
	GGCAGTCTTGACGTGC-3'	

得した。*MAL21*の配列はデータバンクに登録した(GenBank: AB453253)。*MAL21* ORF (from -99 to 1871)を含む断片はホモロガスリコンビネーションで得られたプラスミドよ り *Sca*I で切り出し pUC19 の *Sma*I サイトに挿入した後、pJHXSB の *Sac*I と *Bam*HI 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クエンスデータ (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 Sacl 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。 $SeAGT1 \ge MTT1$ 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 2×10⁷ 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 のインキュベート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、OD₆₆₀=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 を調製するのには、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 のスクリューキャップ付きチューブに入れ、400 μ l 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 μ l 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 μ l の Buffer AP2 を加えよく混合した後、水中に 5 min

保持した。遠心 (8,000×g、5 min) し、上清を QIAshredder スピンカラムにのせ、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 スピンカラムにのせ、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 を調製するのには、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、1xTAE 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% ブ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

2.5g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 Na₂EDTA, 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 (OD₆₆₀×ml=15~20 にあたる細胞量を意味する。つまり OD₆₆₀=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 包理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理ゲル 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⁺ (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。 フィー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 プローブを作製した。標識した RNA プローブを 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 ノザー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+)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。フィー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 プローブを作製した。標 識した RNA プローブは 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1h おいた。ナイロンメンブレン (Hybond-N+) をそっと寒天面におき、 プレートとメンブレ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。

メンブレンを静かにはがし、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 づつメンブレン大きさ以上の間隔でおきスポットし、メンブレンを 一枚づ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。メンブレンを 120°C で 30 min ベーキングして DNA を固定した。メンブレンを洗浄液 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レン 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* のプロー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 *Sau*3AI 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 *Bam*HI サイトに挿入し、*E. coli* DH5 α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 αから調製したプラスミドはα-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 µg/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α-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 (Affimetrics)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 (Affimetrics) でインテンシティーを計測した。

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 *Hin*c II, *Sca* I, *Xba* I, *Eco*R I, *Eco*R 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×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 HincII 切断での 7 kbp, ScaI 切断での 8 kbp, EcoRI 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, EcoRV, 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×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. eubaynus 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ーを持つ 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ーがあったが、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係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)。

 $1 \ {\tt TAATATCAAATTCCGGGAGAAAAAAAGAAGGGTTAAAATCATGGAAAAAGAAACATTTTGCTATGTAAGGTAATGCACTTGCATAGTGGCAGCCTTTCGC$ 100 $101 \ {\tt ttctggtatttttatcgggataagtcctattgtcggcacaatttatccaacactctcaccgatacaatgttggcaacactgctcaacatagccatgat$ 200 201 GTATTTGTTCCGCAGAAGGTTGGGGAAAGCATGAGTTGGCGCGCATTTGTCTGCTGCGCGCGGGGGGAGAAATGGCCATTTATGAAAACATGCCATTCTAATCGTG 300 400 401 CACCCTCCATTTTACTACTTGAAAATAACTCCAAGTTTTTTGAGAAAAAATTGGGCTGCTTTTTTCATCATGTCTCGAAAAAGAACCACAGAAAAACTA 500 600 700 701 TTATAGAATGTGATCTCCATGCACTGCTTCAACTCCCCCAAGTCCCTGATATAGTCAAGCTTGGATGGCACAACTACTTTAAGTACTACTGGTGACGCTTA 800 $801 \ {\tt tgaatttggcgggattgaactgtcggactggactgactctttttacaacacgtcaagtgttctaggccaactgtttttgggccgactggagtgccgtcttca$ 900 901 AGTGCAATGGTGGTAACTCAGTGAGCAATTATTCAGAGGATAAAACTACACTCGAACAGGTTTGGATTAAGATTTTCATTTTATCAAGGCTCAGGGAAC 100 1101 CTTATTTCCCCGTATTTTTCTTTTTTTAGCATAATGACGCGCGGTGGTACGGCCGACTCCTCAGAACATCGCGTAGTAATATTTGTATTCAGGTACCAC 1200 1301 TTCCAGACGCTGCACCCTTGGTCCACCCCGTGGATTGTTACGCATTTTCTTGGTGTCTTCCTTGCCCCGCTTTCCCCACAAACGATCGC 1400 1501 ATGATTTTCTTTGTGAGGAGGGCCTTCAAGGGGCAGACTACAACGGTCATATCTAATCATGTCGCACAGATTAGAGGACATTCTTTTAGTTCAACACTGA 1600 1601 GACATTTGAGGACATATCGACCTCAAATCGAAAGGCGAACAAGTTTCCAGTCCTCTCATCGGAACGTGTTCTATGTATAAAAGCAATTGGAAATCAACCC 1700 1701 TTATTGAGTAACTCTACATCTTTTTACCGTTTCGTCCTCTGCAAGAGTGTATAGATAATCAGAAAGAGTTACGAAATATCAGAAATATGAAAAATATACTT 1800 ΜΚΝΙ 1801 TCGCTGGTAGGAAGAAAGGAAAATACCCCCAGAAGATGTGACGGCGAATCTTGCGGACACCTCAAGCACTACGGTTATGCAAGGAACTAGGTTATTG 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 1901 AGGACTTTGAAGAACGAAAGAAAAACGATGCATTTGAGTTGAATCACTTGGAGCTCACTAATGCAACAACGATTAAGCGATTCTGATGAAGAAAAAGA 2000 D F E E R K K N D A F E L N H L E L T T N A T Q L S D S D E D K E 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 2101 GCAGCGCTATGGTCTATTTTGGTATCTACGCCTTGTTATGGAAGGTTATGATACTGCACTTTTAAGTGCACTTTATGCATTGCCAGTTTTTCAGAGGA 2200 A A L W S I L V S T T L V M E G Y D T A L L S A L Y A L P V F Q R K 2201 AGTTTGGGACTATGAATGCGGAAGGCTCCTACGAAATCACTTCGCAGTGGCAAATTGGCTTGAACATGTGTGTCTTTGTGGTGAAATGATTGGTCTACA 2300 FGTMNAEGSYEITSQWQIGLNMCVLCGEMIGLQ 2301 GATAACCACTTACATGGTCGAGTTCATGGGTAATCGTTATACAATGATTACGGCGCTTTCTCTTTTGACTGCTTATATCTTTATCCTTTACCATTGCAAG 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 AGTTTGGCCATGATTGCTGTAGGACAAATTCTTTCGGCTATGCCATGGGGTTGCTTCCAGAGTCTGGCTGTTACCTATGCTTCTGAAGTTTGCCCCCTGG 2500 S L A M I A V G O I L S A M P W G C F O S L A V T Y A S E V C P L A 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 CTCCGACTTAGGTTACAAGTTACCATTCGCCTTACAATGGATCTGGCCTGCACCCTTAATTATTGGTATCTTTTTCGCTCCTGAGTCGCCTTGGTGGTTG 2700 S D L G Y K L P F A L O W I W P A P L I I G I F F A P E S P W W L 2701 GTAAGAAAGAATAAGATCGTGGAAGCCAAAAAGTCTTTGAACAGAATTCTGAGTGGCACTGTTACCGAGAAGGAGATACAAGTGGATATTACTTTGAAGC 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 O V D I T L K O I E M T 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 $2901 \ \texttt{GTGTTTGACTTGGGTTGCTCAGAACAGTAGTGGTGCAGTATTACTTGGTTATTCGACGTACTTCTTTGAAAGAGCAGGCATGGCCACTGACAAGGCCTTC \ 3000 \ \texttt{Superior}$ C L T W V A O 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 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 S F Q M V C L F I I G G M G F A S G S S A S N A A G G L L A L S 3201 TTTCTTCTATAACGCGGGTATCGGAGCTGTCGTTTACTGTATTGTTGCAGAAAATCCCATCCGCAGAATTAAGGACCAAGACCATTGTGCTGGCCCGTATT 3300 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 $\tt 3301 \ \tt TGCTACAATCTAATGGCCGTCTTCAATGCTATTCTAACGCCCTATATGCTTAACGTGAGCGACTGGGACTGGGGTGCCAAAACTGGTCTATATTGGGGTG \ \tt 3400$ L M A V F N A I L T P Y M L N V S D W N W G A K T G 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 F A R K F A S T V V D P F G K R G L O N R P O V D N I I D R F S S A 3601 AGTCAACAGGCGTTATGAAACTAACGCGTATTTAAGAGAAACCATTCGAAACAATGTTTTAATAATATATGCTTTAAAAGCGTTTTTTCACCTTTTTTTGA 3700 SQQAL 3801 GAACATAAAACCGTGAGCATATTTAAGT 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

	ig1-B - #M=1 - [289-278]	ig1-B - #M=1 (Revers) - [442-431]	ig1-B - #M=1 - [\$89-578] aIX3p-B - [647-633] ig1-B - [678-667] 0052Wp-B (Revers) - [728-714]	1052Wp-B (Revers) - [906-892] ig1-B - #M=1 (Revers) - [983-972]	ig1-B - #M=1 (Revers) - [1174-1163]	ig1-B - #M=1 (Revers) - [1340-1339] ig1-B - #M=1 (Revers) - [1341-1330] ig1-B - #M=1 - [1357-1346]	ig1-B - #M=1 (Revers) - [1677-1666] ig1-B - #M=1 (Revers) - [1678-1667]
SEAGII	×	× 		× × 	×	V/	×× V

図 2-4 SeAGT1 promoter の制御因子結合部位

Mig1p-B: Mig1p 結合部位(CCCCRNNWWWW)、

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
Agtlp	(1)	MKNIISLVSKKKAASKNEDKNISESSRDIVNQQEVFNTEDFEEGKKDSAFELDHLEFTTNSAQLGDSDED
SeAgtlp	(1)	MKNILSLVGRKENTPEDVTANLADTSSTTVMQAKDLVIEDFEERKKNDAFELNHLELTTNATQLSDSDED
		71 140
Agtlp	(71)	NENVINEMNATDDANEANSEEKSMTLKQALLKYPKAALWSILVSTTLVMEGYDTALLSALYALPVFQRKF
SeAgtlp	(71)	KENVIRVAEATDDANEANNEEKSMTLRQALRKYPKAALWSILVSTTLVMEGYDTALLSALYALPVFQRKF
		141 210
Agtlp	(141)	GTLNGEGSYEITSQWQIGLNMCVLCGEMIGLQITTYMVEFMGNRYTMITALGLLTAYIFILYYCKSLAMI
SeAgtlp	(141)	GTMNAEGSYEITSQWQIGLNMCVLCGEMIGLQITTYMVEFMGNRYTMITALSLLTAYIFILYYCKSLAMI
		211 280
Agtlp	(211)	AVGQILSAIPWGCFQSLAVTYASEVCPLALRYYMTSYSNICWLFGQIFASGIMKNSQENLGNSDLGYKLP
SeAgtlp	(211)	AVGQILSAMPWGCFQSLAVTYASEVCPLALRYYMTSYSNICWLFGQIFASGIMKNSQENLGNSDLGYKLP
		281 350
Agtlp	(281)	FALQWIWPAPLMIGIFFAPESPWWLVRKDRVAEARKSLSRILSGKGAEKDIQVDLTLKQIELTIEKERLL
SeAgtlp	(281)	FALQWIWPAPLIIGIFFAPESPWWLVRKNKIVEAKKSLNRILSGTVTEKEIQVDITLKQIEMTIEKERLR
		351 420
Agtlp	(351)	ASKSGSFFNCFKGVNGRRTRLACLTWVAQNSSGAVLLGYSTYFFERAGMATDKAFTFSLIQYCLGLAGTL
SeAgtlp	(351)	ASKSGSFFSCFKGVDGRRTRLACLTWVAQNSSGAVLLGYSTYFFERAGMATDKAFTFSLIQYCLGLAGTL
		421 490
Agtlp	(421)	CSWVISGRVGRWTILTYGLAFQMVCLFIIGGMGFGSGSSASNGAGGLLLALSFFYNAGIGAVVYCIVAEI
SeAgtlp	(421)	GSWVISGRVGRWTILTYGLSFQMVCLFIIGGMGFASGSSASNAAGGLLLALSFFYNAGIGAVVYCIVAEI
		491 560
Agtlp	(491)	PSAELRTKTIVLARICYNLMAVINAILTPYMLNVSDWNWGAKTGLYWGGFTAVTLAWVIIDLPETTGRTF
SeAgtlp	(491)	PSAELRTKTIVLARICYNLMAVFNAILTPYMLNVSDWNWGAKTGLYWGGFTALTLAWVIIDLPETTGRTF
		561 617
Agtlp	(561)	SEINELFNQGVPARKFASTVVDPFGKGKTQHDSLADESISQSSSIKQRELNAADKC-
SeAgtlp	(561)	SEINELFSQGVPARKFASTVVDPFGK <mark>RGLQNRPQVDNIIDRF</mark> SS <mark>ASQQAL</mark>

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 Yfl052Wp 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 CTTAAACCCCGT や TTAATTGTGTGGGGG 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 CCCCRNNWWWW 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、Yfl052Wp 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/) 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クエンスして 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 ークエンスでは、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クエ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クエンスを行い、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 ATGAAAAATATCATTTCATTGGTAAGCAAGAAGAAGACGCTGCCTCAAAAAATGAGGATAAAAACATTTCTG 70 71 AGTCTTCAAGAGATATTGTAAACCAACAGGAGGTTTTCAATACTGAAAATTTTGAAGAAGGGAAAAAGGA 140 141 TAGTGCCTTTGAGCTAGACCACTTAGAGTTCACCACCAATTCAGCCCAGTTAGGAGATTCTGACGAAGAT 210 211 AACGAGAATATGATTAATGAGATGAACGCTACTGATGAAGCAAATGAAGCTAACAGCGAGGAAAAAAGCA 280 281 TGACTTTAAAGCAGGCGTTGCTAAAATATCCAAAAGCAGCCCTGTGGTCCATATTAGTGTCTACTACCCT 350 351 GGTTATGGAAGGTTATGATACCGCACTGCACGCACTGTATGCCCTGCCAGTGTTTCAGAGAAAATTC 420 421 GGTACTTTGAACGGGGAGGGTTCTTACGAAATTACTTCCCAATGGCAGATTGGTTTAAACATGTGTGTCC 490 491 AATGTGGTGAGATGATTGGTTTGCAAATCACGACTTATATGGTTGAATTTATGGGGAATCGTTATACGAT 560 561 GATTACAGCACTTGGTTTGTTAACTGCTTATATCTTTATCCTCTACTGCTAAAAGTTTAGCTATGATT 630 631 GCTGTGGGACAAGTTCTCTCAGCTATGCCATGGGGTTGTTTCCAGGGTTTGACTGTTACTTATGCTTCGG 700 701 AAGTTTGCCCTTTAGCATTAAGATATTACATGACCAGTTACTCCAACATTTGTTGGTTATTTGGTCAAAT 770 771 CTTCGCCTCTGGTATTATGAAAAACTCACAAGAGAATTTAGGGAACTCTGACTTGGACTATAAATTGCCA 840 841 TTTGCTTTACAATGGATTTGGCCTGCTCCTTTAATGATCGGTATCTTTTTCGCTCCTGAGTCGCCCTGGT 910 911 GGTTGGTGAGAAAGGATAGGGTCGCTGAGGCAAGAAATCTTTAAGCAGAATTTTGAGTGGTAAAGGCGC 980 1051 GCATCTAAATCAGGATCATTCTTTGATTGTTTCAAGGGAGTTAATGGAAGAAGAACGAGACTTGCATGTT 1120 1191 CAGGTATGGCCACCGACAAGGCGTTTACTTTTTCTGTAATTCAGTACTGTCTTGGGTTAGCGGGTACACT 1260 1261 TTGCTCCTGGGTAATATCTGGCCGTGTTGGTAGATGGACAATACTGACCTATGGTCTTGCATTTCAAATG 1330 1331 GTCTGCTTATTGGTATTGGTGGAATGGGTTTTGGTTCTGGAAGCGGCGCTAGTAATGGTGCCGGTGGTT 1400 1401 TATTGCTGGCTTTATCATTCTTTTACAATGCTGGTATCGGTGCAGTTGTTTACTGTATCGTAGCTGAAAT 1470 1471 TCCATCAGCGGAGTTGAGAACTAAGACTATAGTGCTGGCCCGTATTTGCTACAATCTCATGGCCGTTATC 1540 1541 AACGCTATATTAACGCCCTATATGCTAAACGTGAGCGATTGGAACTGGGGTGCCCAAAACTGGTCTATACT 1610 1611 GGGGTGGTTTCACAGCAGTCACTTTAGCTTGGGTCATCATCGATCTGCCTGAGACAACTGGTAGAACCTT 1680 1681 CAGTGAAATTAATGAACTTTTCAACCAAGGGGTTCCTGCCAGAAAATTTGCATCTACTGTGGTTGATCCA 1750 1751 TTCGGAAAGGGAAAAACTCAACATGATTCGCTAGCTGATGAGGAGTATCAGTCCAGTCCTCAAGCATAAAAC 1820 1821 AGCGAGAATTAAATGCAGCTGATAAATGT**TAA** 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。 ーのうち-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 は見つけられなった。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)	TCATACCCCATATCTTGTTGAGGAGAGTCATAAAACGGACAAACCCAAATAGCATCAACGCCAAGATCTTTAAT-AT
ScAGT1p	(1)	TATTTCCCCGTAT-TTCCCCCATGTTTCCCCCCACTTCCTGCGTACGAATATA-CTGCAATGCAA
-		81 160
AGT1p	(77)	ACTGCAACTTGGAAGTGATACCTTTTAAATCACCCCAGCCATCGTTATTGGAGTCTTTAAAACTTGCTGGGTA-AATTTG
ScAGT1p	(79)	GATGCCAATGGGAAATTTAATTGTGTGCCTGAGCCCAGGTACATATCTGAATACCTGCCAGACGTCCGCCGAAGAAAGCG
-		161 240
AGT1p	(156)	ATAGATTGTGGCCTCTTTCCACCACTTTGGTTCTGGTTCTGGATGATCAGAAATAGTCATTTAGTAATTTAGTTACGCT
ScAGT1p	(159)	GTAGATCCTTGTCTGCTGCTTCCTCACTGACAAGCTGGCCTTTTTACCGAAAATAATTCCAGGTGCTGCGCGCATCCT
		241 320
AGT1p	(236)	TGACTGATGTACATTTGAGATTATCAAAAAAAACTGCTTAAGAGA-TGGATGATTTAATTTTTTAGAGACGTATTAATGGA
ScAGT1p	(237)	CTACAAAGACTTTATTTCATAAGGAGCTCTGCTGCATAAAGTTAATGAATTAAGCAAGTCAAGA-GAAGATGGA
		321 400
AGT1p	(315)	ACTTTTTATACCTTGCCCAGAGCGCCTCAAGAA-AATGATGCTGCAAGAAGAATTGAGGAAGGAACTATTCATCTTACGT
ScAGT1p	(310)	ACATCAGAACCATAGTACTTCTCCTCGAAAGAGCACTAATTGTGCTAAAAAAAA
		401 480
AGT1p	(394)	TGTTTGTATCATCCCACGATCCAAATCATGTTACCTACGTTAGGTACGCTAGGAACTAAAAAAAA
ScAGT1p	(378)	ACGTTGTGGCATAAGAAGAATCACGTTTACCTA-TTATGAGATAATTATGGTCATATTATGAGATAATTATGG
		481 560
AGT1p	(474)	GT-TATCACTCTTCGAGCCAAT-TCT-TAATTGTGTGGGGTCCGCGAAAATTTCCGGATAAATCCTGTAAACT
ScAGT1p	(450)	TCATATTATGCTACGAATCTGTGTCTATATTGGTGAATTTACCATGAAAAAGTGATATTTCCCGGTACATGCCATTGAACG
		561 640
AGT1p	(544)	TTAACTTAAACCC-CGTGTTTAGCGAAATTTTCAACGAAGCGCGCAATAAGGAGAAATATTATCTA
ScAGT1p	(530)	GCTTGGCTTACCTTCTCAATTATCGTGCTTGGTTTAAACGTTTCTTTTGTTCCGCTTCTATTTTGTTGTACTTTTCGCGC
		641 720
AGT1p	(609)	AAAGCGAGAG-TTTAAGCGAGTTGCAAGAATCTCTACGGTACAGATGCAACTTACTATAGCCAAGGTCTATTCGTATTAC
ScAGT1p	(610)	GAGGAACAAGGTTTTTTTCCTTTGCCTAAATATTTGCCTTTGGGTTTTGGTCCTCCAGAGAATATCACGTAC
		721 800
AGT1p	(688)	TATGGCAGCGAAAGGAGCTTTAAGGTTTTAATTACCCCATAGCCATAGATTCTACTCGGTCTATCTA
ScAGT1p	(682)	TATGGCAGCGAAAGGAGCTTTAAGGTTTTAATTACCCCCATAGCCATAGATTCTACTCGGTCTATCTA
		801 880
AGT1p	(768)	CGTTGATGCGTACTAGAAAAATGACAACGTACCGGGCTTGAGGGACATACAGAGACAATTACAGTAATCAAGAGTGTACCC
ScAGT1p	(762)	CGTTGATGCGTACTAGAAAATGACAACGTACCGGGCTTGAGGGACATACAGAGACAATTACAGTAATCAAGAGTGTACCC
		881 960
AGT1p	(848)	AACTTTAACGAACTCAGTAAAAAAAAAAGGAATGTCGACATCTTAATTTTTTATAAAAGCGGTTTGGTATTGATTG
ScAGT1p	(842)	AATTTTAACGAACTCAGTAAAAAAAAAAGGAATGTCGACATCTTAATTTTTTATAAAAGCGGTTTGGTATTGATTG
		961 1036
AGT1p	(928)	AAGAATTTTCGGGTTGGTGTTTCTTTCTGATGCTACATAGAAGAACATCAAACAACTAAAAAAATAGTATAA‡ATG
ScAGT1p	(922)	AAGAATTTTCGGGTTGGTGTTTCTTTCTGATGCTACATAGAAGAACATCAAACAACTAAAAAAATATTATAA‡ATG

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(CCCCRNNWWWW) 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(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 で一晩 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4h 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。そのシークエ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ー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 pJHXSB 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pJHXSB を実験室株 JH1032 に形質転換した。JH1032 は α-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, pJHXSB 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。pJHSeAGT1, pJHAGT1, pJHMAL61, pJHXSB 導入各株をアンチマイシン 3 µg/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



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 µg/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 a-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、シークエンスしたところ、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* とも 99%のアイデンティテ

		1 70
MAL31p	(1)	MKGLSSLINRKKDRNDSHLDEIENGVNATEFNSIEMEEQGKKSDFDLSHLEYGPGSLIPNDNNEEVPDLL
MTT1p	(1)	MKGLSSLINRKKDRNDSHLDEIENGVNATEFNSIEMEEQGKKSDFDLSHHEYGPGSLTPNDNNEEVPDLL
		71 140
MAL31p	(71)	DEAMQDAKEADESERGMPLMTALKTYPKAAAWSLLVSTTLIQEGYDTAILGAFYALPVFQKKYGSLNSNT
MTTlp	(71)	DEAMQDAKEADESERGMPLMTALKTYPKAAAWSLLVSTTLIQEGYDTAILGSFYALPVFQKKYGSLNSNT 141 210
MAL31p	(141)	GDYETSVSWOTGLCLCVMAGETVGLOMTGPSVDYMGNRYTLTMALFFLAAFTFTLYFCKSLGMTAVGOAL
MTTID	(141)	GDYETSASWOTGLSLCVTAGETVGLOMTGPFVDYMGNBYTLTLALTLAAFTFTLYFCKGLGMTAVGOVL
	(/	211 280
MAL31p	(211)	CGMPWGCFOCLTVSYASEICPLALRYYLTTYSNLCWAFGOLFAAGIMKNSONKYANSELGYKLPFALOWI
MTTIp	(211)	CGMPWGCFOCLTVSYASEICPMALRYYLTTYSNLCWTFGOLFAAGIMKNSONKYPNSELGYKLPFALOWI
-		281 350
MAL31p	(281)	WPLPLAVGIFFAPESPWWLVKKGRIDQARRSLERTLSGKGPEKELLVSMELDKIKTTIEKEQKMSD-EGT
MTT1p	(281)	WPAPLAIGIFFAPESPWWLVKKGRIDQARRSLERTLSGKGPEKELLVSMELDNIKVTIEKEKKLSDSEGS
		351 420
MAL31p	(350)	YWDCVKDGINRRRTRIACLCWIGQCSCGASLIGYSTYFYEKAGVSTDTAFTFSIIQYCLGIAATFISWWA
MTTlp	(351)	YWDCLKDSVNRRRTRIACLCWVGQTTCGTSLIGNSTYFYEKAGVGTDTAFTFSIIQYCLGIAATFLSWWA 421 490
MAL31p	(420)	SKYCGRFDLYAFGLAFQAIMFFIIGGLGCSDTHGAKMGSGALLMVVAFFYNLGIAPVVFCLVSEIPSSRL
MTT1p	(421)	SKYFGRFDLYAFGLAIQTVSLFIIGGLGCSDSHGAEMGSGSSLLMVLSFFYNLGIAPVVFCLVSEIPSSRL
_		491 560
MAL31p	(490)	RTKTIILARNAYNVIQVVVTVLIMYQLNSEKWNWGAKSGFFWGGFCLATLAWAVVDLPETAGRTFIEINE
MTTlp	(491)	RTKSIILARNAYNMASIVTTVLIMYQLNSEKWNWGAKSGFFWGGLCFATLVWAVIDLPETAGRTFIEINE
		561 616
MAL31p	(560)	LFRLGVPARKFKSTKVDPFAAAKAAAAEINVKDPKEDLETSVVDEGRNTSSVVNK-
MTTlp	(561)	LFRLGVPARKFKSTKVDPFAAAKAAAAEINVKDPKEDLETSVVDEGR <mark>STP</mark> SVVNK-

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

Mig1p-B (Revers) - [286-275] Mig1p-B - #Mismatch = 1 (Revers) - [295-25 Mig1p-B - #Mismatch = 1 - [295-25 - Mig1p-B - #Mismatch = 1 - [295-25 - Mig1p-B - #Mismatch = 1 - [537-55 Mig1p-B - #Mismatch = 1 (Revers) - [59 Mig1p-B - #Mismatch = 1 (Revers) - [59 - Mig1p-B - #Mismatch = 1 (Revers) - [50 - [753-74]	Mig1p-B (Revers) - [286-275] Mig1p-B - #Mismatch = 1 (Revers) - [288-277] Mig1p-B - #Mismatch = 1 - [293-284] Mig1p-B - #Mismatch = 1 - [295-284]	 MalX3p-B (Revers) - [479-465] Mig1p-B - #Mismatch = 1 - [537-526] Yff052Wp - [565-579] MalX3p-B - [578-564] MalX3p-B - [578-564] 	√ Mig.lp.B. #Mismatch = 1 (Rever) - [594-583] Mig.lp.B - #Mismatch = 1 (Rever) - [594-583]	
---	--	--	---	--

図 2-19 MTT1 promoter の制御因子結合部位

Mig1p-B: Mig1p 結合部位(CCCCRNNWWWW)

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(X)を示す。

ィーがあり、*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ものも含めて、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 OD₆₆₀ 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、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2%

a glucosido	Transporter				
a-glucoside	Mal61	Agt1	SeAgt1	Mtt1	no transporter
maltose	+++	+++	+	+	-
maltotriose	-	+++	+	+++	-
isomaltose	-	++	++	-	-
lpha-methylglucoside	-	+	-	-	-
turanose	+++	+++	++	++	-
melezitose	-	+	+	-	-
trehalose	-	-	+	+	-
melibiose	-	-	-	-	-

表 2-3 各トランスポーター発現株の発酵(基質)特異性

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、α-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α-D-グルコピラノシル-(1→3)-α-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α-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, pJHXSB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、pJHXSB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α-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 を持っていなかったり、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 シークエンスしたところ、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
40 - 17M3T V 133	(1)	I MUCT GGT TND MY DDN DGNT DP T PNCTM3 TP PNGT/PM P POCKYG DP DT GN UP VCDC GT T DN DN P PT/DDT T DP 3 MOD 3 V P
49-21MALX1AA	(1)	MKGLSSLING KARDAN DAN DELDELGA WAATE PASVEME DOG KAS DED LSHE VODG SLTENDAN EVVED LLDE AND DAKE S
MAL31p	(1)	MKGLSSLINRKK DENDSHLDE I ENGVINTE FNSIEME EOGKKSDFDLSHLEVGPGSLIPNDNNE EV PDLLDE AMODAKE A
49-27MALX1AA	(1)	MKGLSSLINRKKDRNDSHLDEIENGVNATE FNSIEME EOGKKSDFDLSHHEYGPGSLIPNDNNE EV PDLLDE AMODAKE A
MAL21p	(1)	MKGLSSLINRKKDRNDSHLDEIENGVNATE FNSIEMEEOGKKSDFGLSHHEYGPGSLIPNDNNE EV PDLLDE AMODAKEA
MAL61n		MKGLSSLINB KK DEN DSHLDE TENGUNATE PNSTEME ROCKK SDPDLSHLE Y GPGSLIPN DNNE EV PDLLDE AMODAKE A
121201p	(-)	81
49-17MALX1AA	(81)	DESERGMPLMTALKTYPKAAAWSLLVSTTLIOEGYDTATLGSFYALFVFOKKYGSLNSNTGDYEISVSWOIGLCLCYMAG
49-21MALX1AA	(81)	DESERGMPLMTALKTY PKAAAWSLLVSTTLIGEGYDTVILGSFYALPV POKKYGSLNSNTGDYE ISVSWOIGLCLCYMAG
MAL 31 p	(81)	DESERGMPLMTALKTY PKAAAWSLLVSTTLIGEGYDTAILGAFYAL PV POKKYGSLNSNTGDYE ISVSWOIGLCLCYMAG
49-27MALX1AA	(81)	DESERGMPLMTALKTYPKAAAWSLLVSTTLIOEGYDTAILGSFYALPVFOKKYGSLNSNTGDYEISASWOIGLSLCYMAG
MAL21p	(81)	DESERGMPLMTALKTY PKAAAWSLLVSTTLIOEGYDTAILGAFYALPV FOKKYGSLNSNTGDYE ISVSWOIGLCLCYMAG
MAL 61p	(81)	DESERGMPLMTALKTY PKAAAWSLLVSTTLIGEGYDTAILGAFYAL PV POKKYGSLNSNTGDYE ISVSWOIGLCLCYMAG
		161 240
49-17MALX1AA	(161)	E IVGLOMTG P SVD YMGNR YTL IMAL FFLAA F IF ILY FCKSLGM IAVGQALCGMPWGC FQCLAVS YASELC PMALR YYLT T
49-21MALX1AA	(161)	EIVGLONTG PSVD YMGNR YTLIMAL FFLAAFIFILYFCKSLGMIAVGOASCGMPWGCFOCLAVS YASELC PMALR YYLTT
MAL 31 p	(161)	EIVGLOMTG PSVD WIGNE YTLIMAL FFLAAFIFILY FCKSLGMIAVGOALCGMPWGCFOCLTVS YASELCPLALE YYLT
49-27MALX1AA	(161)	EIVGLQITG PSVD YMGNR YTLIMAL FFLAAFIFILY FCKSLGMIAAGQALCGMPWGC FOCL TVS YASEIC PLALRYYLTT
MAL21p	(161)	EIVGLQLTG PSVDLVGNR YTLIMAL FFLAAFIFILYFCKSLGMIAVGQALCGMPWGCFQCLTVS YASELC PLALRYYLTT
MAL 61p	(161)	EIVGLOVTG PSVD YMGNR YTLIMAL FFLAA FIFILY FCKSLGMIAVGQALCGMPWGC FQCLTVS YASELC PLALRYYLTT
•		241 320
49-17MALX1AA	(241)	Y SNL CWA PG OLFA AG IMKN SON KY ANSELGYKL PFALOW I WPL PLAVG I FFA PES PWW LVK KGR I DOARR SLERT LSG KG
49-21MALX1AA	(241)	Y SNLCW A FGQLFA AG IMKN SQNKY ANSELGYKLPFALQWIWPLPLAVGIFFA PESPWWLVKKGRIDQARRSLERTLSGKG
MAL31p	(241)	Y SN LCW A FGQLF A AG IMKN SQN KY AN SE LGYKLP FALOW I WPL PLAVG I FF A PE S PWW LVKKGR I DQARR SLERT LSGKG
49-27MALX1AA	(241)	YSNLCWTFGQLFAAGIMKNSQNKYVNSELGYKLPFALQWIWPLPLAVGIFFAPESPWWLVKKGRIDQARRSLERTLSGKG
MAL21p	(241)	Y SNL CWT FG OLFAAG IMKN SONKYANSELGYKL PFALOW I WPL PLAVG I FFA PES PWWLVKKGR IDOARR SLERT LSGKG
MAL 61p	(241)	Y SNLCWT FGQLFAAG IMKN SQNKYANSELGYKLPFALQWIWPLPLAVGIFLAPES PWWLVKKGRIDQARRSLERILSGKG
		321 400
49-17MALX1AA	(321)	PEKELLVTMELDKIKTTIEKEQKMSDEGTYWDCVKDGINRRTRIACLCWIGQCSCGASLIGYSTYFYEKAGVSTDTAFT
49-21MALX1AA	(321)	PEKELLVSMELDKIKTTIEKEQKMSDEGTYWDCVKDGINRRRTRIACLCWIGQTTCGASLIGYSTYFYEKAGVSTDTAFT
MAL31p	(321)	PEKELLVSMELDKIKTTIEKEQKMSDEGTYWDCVKDGINRRTRIACLCWIGQCSCGASLIGYSTYFYEKAGVSTDTAFT
49-27MALX1AA	(321)	PEKELLVTMELNKIKTTIEKEQKMSDEGTYWDCVKDGINRRRTRIACLCWIGQCSCGASLIGYSTYFYEKAGVSTDTAFT
MAL21p	(321)	PEKELLVTMELDKIKTTIEKEQKMSDEGTYWDCVKDGINRRRTRIACLCWIGQCSCGASLIGYSTYFYEKAGVSTDTAFT
MAL61p	(321)	PEKELLVSMELDKIKTTIEKEQKMSDEGTYWDCVKDGINRRRTRIACLCWIGQCSCGASLIGYSTYFYEKAGVSTDTAFT
		401 480
49-17MALX1AA	(401)	FSIIQYCLGIAATFISWWASKYCGRFDLYALGLAFQAIMFFIIGGLGCSDTHGAKMGSGALLMVVAFFYNLGIAPVVFCI
49-21MALX1AA	(401)	FSIIQYCLGIAATFVSWWASKYCGRFDLYAFGLAFQAIMFFIIGGLGCSDTHGAKMGSGALLMVVAFFYNLGIAPVVFCI
MAL31p	(401)	FSIIQYCLGIAATFISWWASKYCGRFDLYAFGLAFQAIMFFIIGGLGCSDTHGAKMGSGALLMVVAFFYNLGIAPVVFCI
49-27MALX1AA	(401)	PSIIQYCLGIAATFVSWWASKYCGRFDLYAFGLAFQAIMFFIIGGLGCSDTHGAKMGSGALLMVVAFFYNLGIAPVVFCI
MAL21p	(401)	FSIIQYCLGIAATFVSWWASKYCGRFDLYAFGLAFQAIMFFIIGGLGCSDTHGAKMGSGALLMVVAFFYNLGIAPVVFCL
MAL61p	(401)	FSIIQYCLGIAATFVSWWASKYCGRFDLYAFGLAFQAIMFFIIGGLGCSDTHGAKMGSGALLMVVAFFYNLGIAPVVFCI 481 560
49-17MALX1AA	(481)	VSE I PSSRLRTKT I I LARNAYNVI OVVVTVL IMYOLNSEKWNWGAKSG FFWGGFCLATLAWAVVDL PETAGRT FIE INE L
49-21MALX1AA	(481)	VSEMPS SRLRTKT II LARNAYNVI QVVVTVL IMYQLNSE KWNWGAKSG FFWGGFCLATLAWAVVDL PETAGRT FIE INE L
MAL31p	(481)	VSE I PSSRLRTKT I I LARNAYNVI QVVVTVL IMYQLNSEKWNWGAKSG FFWGGFCLATLAWAVVDL PETAGRT FIE INE L
49-27MALX1AA	(481)	VSEMPS SRLRTKT IILARNAYNVIO IVVTVLIMYOLNSEKWNWGAKSGFFWGGFCLATLAWAVVDLPETAGRTFIEINEL
MAL21p	(481)	VSEMPS SRLRTKT II LARNAYN VI OVVVTVL IMYOLN SEKWNWGAKSG FFWGGFCLATLAWAVVDL PETAGRT FIE INEL
MAL 61p	(481)	VSEMPS SRLRTKT II LARNAYNVIQ VVVTVL IMYQLN SEKWNWGAK SG FFWGGPC LAT LAWAVVDL PET AGRT FIE INE I
•		561 615
49-17MALX1AA	(561)	FRLGVPARKFKSTKVDPFAAAKAVAVEINVKDPKEDLETSVVDEGRSTPSVVNK-
49-21MALX1AA	(561)	FRLGVPARKFKSTKVDPFAAAKAVAVE INVKDPKEDLETSVVDEGRSTPSVVNK-
MAL31p	(561)	FRLGVPARKFKSTKVDPFAAAKAAAAE INVKDPKEDLETSVVDEGRNTSSVVNK-
49-27MALX1AA	(561)	FRLGVPARKFKSTKVDPFAAAKAAAAE INVKDPKEDLETSVVDEGRSTSSVVNK-
MAL21p	(561)	FRLGVPARKFKSTKVDPFAAAKAAAAE INVKDPKEDLETSVVDEGRNTSSVVNK-
MAL61p	(561)	FRLGVPARKFKSTKVDPFAAAKAAAAE INVKDPKEDLETSVVDEGRSTPSVVNK-

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汁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α-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ーがあった。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 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α-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トリオース非資化性株に導入し、マルト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ーがあった。*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ーがあった。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ーがあった。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ーがあり、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α-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見つかっている。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 ランスポーター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 イ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 identiity 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α-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、α-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、α-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
S. cerevisiae	
JH1032	MATa SUC2 mal mel gal2 CUP1 TPI1::TPI1pr-MAL32-G418R ura3
D152	identical to ATCC96955 except for mal61::TRP1
	F–, ompT, hsdSB(rB– mB–), gal(λcI 857, ind1, Sam7, nin5, lacUV5-
BL21(DE3)	T7gene1), dcm(DE3) (B株由来)
RH1602	MATa ura3 leu2 his4 bar1
RH1597	MATa ura3 leu2 his4 bar1end4-1
23346c	MATa ura3
27038a	MATa ura3 npi1
HH208	identical to JH1032 except for ura3::URA3-TPI1pr
HH108	identical to JH1032 except for ura3::URA3-TPI1pr-MAL61
HH206	identical to JH1032 except for ura3::URA3-TPI1pr-MAL21
HH228	identical to JH1032 except for ura3::URA3-TPI1pr-AGT1
HH196	identical to JH1032 except for ura3::URA3-TPI1pr-MTT1
HH205	identical to JH1032 except for ura3::URA3-TPI1pr-SeAGT1
HH227	identical to JH1032 except for ura3::URA3-TPI1pr-MAL31
HH209	identical to JH1032 except for ura3::URA3-TPI1pr-MAL61[L50H]
HH210	identical to JH1032 except for ura3::URA3-TPI1pr-MAL61[D46G]
HH207	identical to JH1032 except for ura3::URA3-TPI1pr-MAL61[D46G,L50H]
HH229	identical to JH1032 except for ura3::URA3-TPI1pr-MAL61[S43A]
HH230	identical to JH1032 except for ura3::URA3-TPI1pr-MAL61[S48A]
HH231	identical to JH1032 except for ura3::URA3-TPI1pr-MAL61[S43A,S48A]
HH109	identical to JH1032 except for ura3::URA3-TPI1pr-AGT1-2HA
HH042	identical to JH1032 except for ura3::URA3-TPI1pr-SeAGT1-2HA
HH043	identical to JH1032 except for ura3::URA3-TPI1pr-MAL61-2HA
HH044	identical to JH1032 except for ura3::URA3-TPI1pr-MAL21-2HA
HH081	identical to JH1032 except for ura3::URA3-TPI1pr-MAL61[E161A]
HH082	identical to JH1032 except for ura3::URA3-TPI1pr-AGT1-2HA [E167A]
HH623	identical to JH1032 except for ura3::URA3-TPI1pr-MAL21[E161A]
HH615	identical to JH1032 except for ura3::URA3-TPI1pr-AGT1-2HA[E51G. L55H]
HH616	identical to JH1032 except for ura3::URA3-TPI1pr-AGT1-2HA[E167A]
HH617	identical to JH1032 except for ura3::URA3-TPI1pr-AGT1-2HA[E51P]
HH618	identical to JH1032 except for ura3::URA3-TPI1pr-MAM
HH619	identical to JH1032 except for ura3::URA3-TPI1pr-AGT1-2HA[L55P]
HH621	identical to JH1032 except for ura3::URA3-TPI1pr-AGT1-2HA[L55P. E167A]
HH110	identical to JH1032 except for ura3::URA3-TPI1pr-AGT1R-2HA
HH083	identical to JH1032 except for ura3::URA3-TPI1pr-AGT1R-2HA [E167A]
HH043	identical to JH1032 except for ura3::URA3-TPI1pr-MAL61-2HA
HH044	identical to JH1032 except for ura3::URA3-TPI1pr-MAL21-2HA
HH211	identical to JH1032 except for ura3::URA3-TPI1pr-MTT1D46G
HH212	identical to JH1032 except for <i>ura3::URA3-TPI1pr-MN6C</i>
HH213	identical to 1H1032 except for ura3::URA3-TPI1pr-MNN6C
HH214	identical to 1H1032 except for ura3:://PA3-TPI1pr-6NMC
1111214	
HH215	Identical to JH1032 except for Ura3::UKA3-TP11pr-6NNMC
E. COII	
	E $\oplus 00d 2c7AM1E A 2c7VA are 1160 doop real 1 and 1 had 17/1/$
DH5a	$r = , \psi_{000} a_{CLDF13}, \Delta_{1a_{CLTA}} a_{1g_{F}} U_{109}, U_{200}, I_{CCA1}, e_{10A1}, n_{S0R1}/(r_{K-1})$
	$(1)(T+)$, prive, suplity, Λ^- , $(1)(-1$, $yy(A>0, 1C(A))$ E open bodSR(rB_ mB_) as $I(\lambda c1.957, ind 1.52m7, nin5, loc 1)/5$
BL21(DE3)	r —, ompr, noosb(rb— mb—), gai(ncr 657, mor, sam7, mins, ncc075- T7gene1), dcm(DE3) (B株由来)

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 Fsel 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 Sall 切断部位(MAL21では318 bp、AGT1では339 bp) と Kpnl 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 Sall と Kpnl 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 BamHI 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'-TGATTTTTTAGCCAGTAGGTAG-3'	creation of XhoI site in MAL61
3	5'-CTCGAGTTTGTTCACAACAGATGAGGTG-3'	creation of XhoI site in MAL21
4	5'-TGATT TTTTTAGCCAGTAGGTAG-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'-CTCGAGTAACGCCTGTTGACTCGCGC-3'	creation of XhoI site in SeAGT1
8	5'-TGAAACTAACGCGTATTTAAGAG-3'	creation of XhoI site in SeAGT1
	TCGATTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTAGCTT	
9	GGGTGGTGTCGATTACCCATACGATGTTCCAGATTA	2HA tag
	CGCTAGCTTGGGTGGTG	
	TCGACACCACCCAAGCTAGCGTAATCTGGAACATCG	
10	TATGGGTAATCGACACCACCCAAGCTAGCGTAATCT	2HA tag
	GGAACATCGTATGGGTAATCGACC	
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'-AGGTACCCCTTGGTTGAAAA-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'-GCTGATTTTGATCTTTCCCATCTTGAG-3'	MAL61[S43A]
24	5'-TTTCTTACCTTGCTCCTCCATCAC-3'	MAL61[S43A]
25	5'-GCCCATCTTGAGTACGGTCCAGG-3'	MAL61[S48A]
26	5'-AAGATCAAAATCACTTTTCTTACCTTG-3'	MAL61[S48A]
27	5'-GCTGATTTTGATCTTGCCCATCTTGAGT-3'	MAL61[S43A, S48A]
28	5'-TTTCTTACCTTGCTCCTCCATCAC-3'	MAL61[S43A, S48A]
29	5'-GCGTGAACGCTACCGAATTCAAC-3'	MAL61[E161A], MAL21[E161A],
30	5'-ATAGCACCTGCCATGTAGCATAG-3'	MAL61[E161A], MAL21[E161A],
31	5'-CATGGCAGGTGCTATTGTCGGT-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'-GCAAACCAATCATCGCACCAC-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 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。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 μg/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 µg/ml あるい は 20 µg/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 μg/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℃ で培養し、制限温度下での実験では 37℃ 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℃、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 OD₆₆₀=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 (OD₆₆₀×容量 ml= OD unit とする) の細胞を 450 µl の同バッファーに懸濁し、0.4 µCi の[¹⁴C]マルトース (Amersham) を 20 µl 加えたマルトース溶液、あるい 0.4 µCi の[¹⁴C]マルトトリオース(American Radiolabeled Chemicals) を 20 µl 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 µl 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 DH5a 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 β -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・bindTM 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 µl 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 µl 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 µl の TEMED (tetramethylethylenediamine) を混合しゲルサンドウィッチに流しいれ、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 µl 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) 用いて、20 mA の定電流で電気泳動を行った。

3.2.7 ウエスターンブロットアナライシス

3.2.8 で得た細胞破砕液 10 µl に 2 µl 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ティング装置で Hybond[™] ECL[™]=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/cm² 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、1h 室温で振とうした。PBST で 15 min づつ、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、1h 室温で振とうした。PBST で 15 min づつ、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、OD₆₆₀=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。OD₆₆₀ を測定し 60 OD unit の細胞 (OD₆₆₀×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 µg/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 づつサンプリングし、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。凍結した細胞は破砕用バッファー (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 µl 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 µm [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砕した。酵母破砕液は 37°C で 10 min 保温した後 9000×g で 5 min 遠心後、上澄みをウエスター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ー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 µl の細胞抽出液を 1350 µl 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 µg ml/1 DNase, 50 µg ml/1 RNase, protease inhibitor cocktail [Complete Mini®, Roche]) で希釈した。40 µl 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 µl の protein A-Sepharose 6MB 懸濁液 50% (v/v) (Pharmacia Biotech, Inc.) を加えてさらに4h インキュベートし、遠心 (8000×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 ターンブ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、 β -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 conforcal 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。

CTGATTACGC CAGCTTGGTA CCGAGCTCGG ATCCACTAGT AACGGCCGCC AGTGTGCTGG AATTCGCCCT TCTGGATGAT 1 CAGAAATAGT CATTTATGTA TTTTAGTTAC GCTTGACTGA TGTACATTTG AGATTATCAA AAAAACTGCT TAAGAGATAG 81 ATGGTTTAAT TTTTTAGAGA CGTATTAATG GAACTTTTTA TACCTTGCCC AGAGCGCCTC AAGAAAATGA TGCTGAAAGA 161 AGAATTGAGG AAGGAACTAC TCATCTTACG TTGTTTGTAT CATCCCACGA TCCAAATCAT GTTACCTACG TTAGGTACGC 241 321 TAGGAACTAA AAAAAGAAAA GAAAAGTATG CGTTATCACT CTTCGAGCCA ATTCTTAATT GTGTGGGGTC CGCGAAAACT TCCGGATAAA TCCTGTAAAC TTAAACTTAA ACCCCGTGTT TAGCGAAATT TTCAACGAAG CGCGCAATAA GGAGAAATAT 401 TATATAAAAG CGAGAGTTTA AGCGAGGTTG CAAGAATCTC TACGGTACAG ATGCAACTTA CTATAGCCAA GGTCTATTCG 481 561 TATTGGTATC CAAGCAGTGA AGCTACTCAG GGGAAAACAT ATTTTCAGAG ATCAAAGTTA TGTCAGTCTC TTTTTCATGT GTAACTTAAC GTTTGTGCAG GTATCATACC GGCCTCTACA TAATTTTTGT GGGGAAGACG TTGTTGTAGC AGTCTCCTTA 641 721 TACTCTCCAA CAGGTGTTTA AAGACTTCTT CAGGCCTCAT AGTCTACATC TGGAGACAAC ATTAGATAGA AGTTTCCACA GAGGCAGCTT TCAATATACT TTCGGCTGTG TACATTTCAT CCTGAGTGAG CGCATATTGC ATAAGTACTC AGTATATAAA 801 GAGACACAAT ATACTCCATA CTTGTTGTGA GTGGTTTTAG CGTATTCAGT ATAACAATAA GAATTACATC CAAGACTATT 881 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 AATTAACTAT GAAGGGATTA TCCTCATTAA TAAACAGAAA AAAAGACAGG AACGACTCAC ACTTAGATGA GATCGAGAAT G V N A T E F N S I E M E E O G K K S D F G L S H H 1041 GGCGTGAACG CTACCGAATT CAACTCGATA GAGATGGAGG AGCAAGGTAA GAAAAGTGAT TTTGGTCTTT CCCATCATGA YGPGSLIPNDNNEEVPD LLD EAM QDAK 1121 GTACGGTCCA GGTTCACTAA TACCAAACGA TAATAATGAA GAAGTCCCCG ACCTTCTCGA TGAAGCTATG CAGGACGCCA EAD E S E RGMP L М Т A L K ТҮРК WS A A A 1201 AAGAGGCAGA TGAAAGTGAG AGGGGAATGC CACTCATGAC AGCTTTGAAG ACATATCCAA AAGCTGCTGC TTGGTCACTA LVSTTLIOEGYDTAILGAFYALPVFOK 1281 TTAGTTTCCA CAACATTGAT TCAAGAGGGT TATGACACAG CCATTCTAGG AGCTTTCTAT GCCCTGCCTG TTTTTCAAAA SLNS NTG DYE ISVS WOIGLC KYG L C Y M AAAATATGGT TCTTTGAATA GCAATACAGG AGATTATGAA ATTTCAGTTT CTTGGCAAAT CGGTCTATGT CTATGCTACA 1361 A G E I V G L Q L T G P S V D L V G N R Y T L IMA TGGCAGGTGA AATTGTGGGG CTACAGCTAA CGGGGCCCTC CGTGGATCTT GTTGGAAATC GTTACACATT GATCATGGCG 1441 LFFLAAFIFI LYFC KSLGMI AVGO ALC 1521 TTGTTCTTTT TAGCGGCTTT CATTTCATT CTGTATTTTT GCAAGAGTTT GGGTATGATT GCCGTGGGAC AGGCATTGTG GMP WGCF O C L T V S Y A S E I C P LALRYYL TGGTATGCCA TGGGGTTGTT TCCAATGTTT GACCGTTTCT TATGCTTCTG AAATTTGTCC TTTGGCCCTA AGATACTATT 1601 т т ү S N L C W T F G Q L F A A G I M K N S Q N K Y 1681 TGACGACTTA TTCTAATTTA TGTTGGACGT TCGGTCAACT TTTCGCTGCT GGTATTATGA AAAATTCCCA GAACAAATAT WIW P L P K L P FALO ANSE LGY LAVG TFF 1761 · 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 · TGCACCAGAG TCTCCATGGT GGCTGGTTAA AAAAGGAAGG ATTGATCAAG CGAGGAGATC ACTTGAAAGA ACATTAAGTG 1841 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 CGAGAAAGAA TTACTAGTGA CTATGGAACT CGATAAAATC AAAACTACTA TAGAAAAGGA GCAGAAAATG TYW DCVKDGT NRR RTR TACI, CWT SDEG 2001 TCTGATGAAG GAACTTACTG GGATTGTGTG AAAGATGGTA TTAACAGGAG AAGAACGAGA ATAGCTTGTT TATGTTGGAT · G O 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 TGGTTATTCA ACTTACTTTT ATGAAAAAGC TGGTGTTAGC ACTGATACGG FTF SII Q Y C L G I A A T F VSWW A S K Y C G 2161 CTTTTACTTT CAGTATTATC CAATATTGTC TTGGTATTGC TGCAACGTTT GTATCCTGGT GGGCTTCAAA ATATTGTGGC G L A F Q A I M F F I I G Y A F GLGC S D T RFDL AGATTTGACC TTTATGCTTT TGGGCTGGCT TTTCAGGCTA TTATGTTCTT CATTATCGGT GGTTTAGGAT GTTCAGACAC 2241 ·HGAKMGSGALLMVVAFFYNLGIAPVVF· 2321 TCATGGCGCT AAAATGGGTA GTGGTGCTCT TCTAATGGTT GTCGCGTTCT TTTACAACCT CGGTATTGCA CCTGTTGTTT SEM PSSR LRTKTIILAR NAY NVI C L V 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 CAAGTTGTAG TTACAGTTTT GATTATGTAC CAATTGAACT CAGAGAAATG GAATTGGGGT GCTAAATCAG GCTTTTTCTG 2481 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 ELF RLG V P A R K F K S T K V D P F A A A K A A ATGAATTGTT TAGACTTGGT GTTCCAGCAA GAAAGTTCAA GTCGACTAAA GTCGACCCTT TTGCAGCTGC CAAAGCAGCA 2641 AAEINVK DPKEDLE TSV V D E G R N T SSV 2721 GCTGCAGAAA TTAATGTTAA AGATCCGAAG GAAGATTTGG AAACTTCTGT GGTAGATGAA GGGCGAAACA CCTCATCTGT V N K 2801 TGTGAACAAA TGA

図 3-2 MAL21 の DNA 配列

		1 70
MAL21p	(1)	MKGLSSLINRKKDRNDSHLDEIENGVNATEFNSIEMEEQGKKSDFGLSHHEYGPGSLIPNDNNEEVPDLL
MAL31p	(1)	MKGLSSLINR KKDRND SHLDE I ENGVNA TEFNSI EMEEQGKKSDFDLSHLEY GPGSLI PNDNNE EVPDLL
MAL61p	(1)	MKGLSSLINRKKDRNDSHLDEIENGVNATEFNSIEMEEQGKKSDFDLSHLEYGPGSLIPNDNNEEVPDLL
		71 140
MAL21p	(71)	DEAMQDAKEA DESERGMPLMTA LKTYPKAAAWSL LVSTTL IQEGYD TAILGA FYALPV FQKKYG SLNSNT
MAL31p	(71)	DEAMQDAKEA DESERGMPLMTA LKTYPKAAAWSL LVSTTL IQEGYD TAILGA FYALPV FQKKYG SLNSNT
MAL61p	(71)	DEAMQDAKEADESERGMPLMTALKTYPKAAAWSLLVSTTLIQEGYDTAILGAFYALPVFQKKYGSLNSNT
		141 210
MAL21p	(141)	GDYEISVSWQIGLCLCYMAGEIVGLQLTGPSVDLVGNRYTLIMALFFLAAFIFILYFCKSLGMIAVGQAL
MAL31p	(141)	GDYEISVSWQIGLCLCYMAGEIVGLQMTGPSVDYMGNRYTLIMALFFLAAFIFILYFCKSLGMIAVGQAL
MAL61p	(141)	GDYEISVSWQIGLCLCYMAGEIVGLQVTGPSVDYMGNRYTLIMALFFLAAFIFILYFCKSLGMIAVGQAL
		211 280
MAL21p	(211)	CGMPWGCFQCLTVSYASEICPLALRYYLTTYSNLCWTFGQLFAAGIMKNSQNKYANSELGYKLPFALQWI
MAL31p	(211)	CGMPWGCFQCLTVSYASEICPLALRYYLTTYSNLCWAFGQLFAAGIMKNSQNKYANSELGYKLPFALQWI
MAL61p	(211)	CGMPWGCFQCLTVSYASEICPLALRYYLTTYSNLCWTFGQLFAAGIMKNSQNKYANSELGYKLPFALQWI
		281 350
MAL21p	(281)	WPLPLAVGIF FAPESPWWLVKKGRIDQARRSLERTLSGKG PEKELLVTMELDKIKTTIEKEQKMSDEGTY
MAL31p	(281)	WPLPLAVGIF FAPESPWWLVKKGRIDQARRSLERTLSGKG PEKELLVSMELDKIKTTIEKEQKMSDEGTY
MAL61p	(281)	WPLPLAVGIFLAPESPWWLVKKGRIDQARRSLERILSGKGPEKELLVSMELDKIKTTIEKEQKMSDEGTY
		351 420
MAL21p	(351)	WDCVKDGINRRRTRIACLCWIGQCSCGASLIGYSTYFYEKAGVSTDTAFTFSIIQYCLGIAATFVSWWAS
MAL31p	(351)	WDCVKDGINRRRTRIACLCWIGQCSCGASLIGYSTYFYEKAGVSTDTAFTFSIIQYCLGIAATFISWWAS
MAL61p	(351)	WDCVKDGINRRRTRIACLCWIGQCSCGASLIGYSTYFYEKAGVSTDTAFTFSIIQYCLGIAATFVSWWAS
		421 490
MAL21p	(421)	KYCGRFDLYAFGLAFQAIMFFI IGGLGCSDTHGAKMGSGALLMVVAFFYNLGIAPVVFCLVSEMPSSRLR
MAL31p	(421)	KYCGRFDLYAFGLAFQAIMFFIIGGLGCSDTHGAKMGSGALLMVVAFFYNLGIAPVVFCLVSEIPSSRLR
MAL61p	(421)	KYCGRFDLYAFGLAFQAIMFFI IGGLGCSDTHGAKMGSGALLMVVAFFYNLGIAPVVFCLVSEMPSSRLR
		491 560
MAL21p	(491)	TKTIILARNAYNVIQVVVTVLIMYQLNSEKWNWGAKSGFFWGGFCLATLAWAVVDLPETAGRTFIEINEL
MAL31p	(491)	TKTIILARNAYNVIQVVVTVLIMYQLNSEKWNWGAKSGFFWGGFCLATLAWAVVDLPETAGRTFIEINEL
MAL61p	(491)	TKTIILARNAYNVIQVVVTVLIMYQLNSEKWNWGAKSGFFWGGFCLATLAWAVVDLPETAGRTFIEINEL
		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[¹⁴C]マルトースあるいは[¹⁴C]マルトトリオースを基 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。

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

表 3-3 各α-グルコシドトランスポーター発現株の取り込み活性

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α-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℃ 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pJHXSB, 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 OD₆₆₀=1.0 になるように植菌し、30°C,





probe

図 3-6 各 α-グルコシドトランスポータ 一発現株の 30℃ と 12℃ 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℃ での活性をそれぞれ 100%とした。

1234	
	1. pJHXSB
13 13 13 🖬	2. pJHMAL61
10.00	3. pJHAGT1
1.2 1. 1. 11	4. pJHSeAGT1
W W W W	

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ー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 ー次抗体として、ウエスター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α-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)

	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

表 3-4 各 α-トランスポーター発現株の比活性 (%)

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 ー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。ウエスター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 に比べ低いが、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 ク発現量比較(宿主: JH1032)

表 3-5 Mal61p と Mal21p の比活性

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ーンブロッティン 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

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 のウエスターンブロッティングのインテン シティを 100%とした。

Relative activity: Mal21p のタンパク質 (インテンシティ) 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 **3-10** 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, 10⁻¹, 10⁻²

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±6 min と 118±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±2 min と 113±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1h 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±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±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 α-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α-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α-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



2-DOG

図 **3-12** 各 a-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、pJHXSB 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α-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)

α-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 にウエスター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ーから半減期を計算したところ、Agt1p-2HA は 13.9±3.8 min、SeAgt1p-2HA は 16.5±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ーは 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ーはそれぞれ、38%、35%

	1 70
Agt1p (1)	MKNIISLVSKKKAASKNEDKNISESSRDIVNQQEVFNTEDFEEGKKDSAFELDHLEFTTNSAQLGDSDED
MAL21p (1)	MKGLSSLINRKKDRNDSHLDEIENGVNATEFNSIEMEEQGK-KSDFGLSHHEYGPGSLIPNDNNEE
	71 140
Agt1p (71)	NENVINEMNATDDANEANSEEKSMTLKQALLKYPKAALWSILVSTTLVMEGYDTALLSALYALPVFQRKF
MAL21p (66)	VPDLLDEAMQDAKEADESERGMPLMTALKTYPKAAAWSLLVSTTLIQEGYDTAILGAFYALPVFQKKY
	141 210
Agt1p (141)	GTLNG-EGSYEITSQWQIGLNMCVLCGEMIGLQITTYMVEFMGNRYTMITALGLLTAYIFILYYCKSLAM
MAL21p (134)	GSLNSNTGDYEISVSWQIGLCLCYMAGEIVGLQLTGPSVDLVGNRYTLIMALFFLAAFIFILYFCKSLGM
	211 280
Agt1p (210)	IAVGQILSAIPWGCFQSLAVTYASEVCPLALRYYMTSYSNICWLFGQIFASGIMKNSQENLGNSDLGYKL
MAL21p (204)	IAVG <u>QALCGMPWGCFQCLTVSYA</u> SEICPLALR <u>YYLTTYSNLCWTFGQLFAAGIM</u> KNSQ <u>NKY</u> ANSELGYK <u>L</u>
	281 350
Agt1p (280)	PFALQWIWPAPLMIGIFFAPESPWWLVRKDRVAEARKSLSRILSGKGAEKDIQVDLTLKQIELTIEKERL
MAL21p (274)	<u>PFALQWIWPLPLAVGIFFAP</u> ESPWWLVKKGRIDQARRSLERTLSGKGPEKELLVTMELDKIKTTIEKEQK
	351 420
Agt1p (350)	LA <mark>SKSGSFFNCFK</mark> GVNGRRTRLACLTWVAQNSSGAVLLGYSTYFFERAGMATDKAFTFSLIQYCLGLAGT
MAL21p (344)	MSDEGTYWDCVKDGINRRRTRIACLCWIGQCSCGASLIGYSTYFYEKAGVSTDTAFTFSIIQYCLGIAAT
	421 490
Agt1p (420)	LCSWVISGRVGRWTILTYGLAFQMVCLFIIGGMGFGSGSSASNGAGGLLLALSFFYNAGIGAVVYCIVAE
MAL21p (414)	<u>FVSWWASKYCGRFDLYAFGLAFQAIMFFIIGGLGCSDTHGAKMG</u> SG <u>ALLMVVAFFYNLGIAPVVFCL</u> VSE
	491 560
Agt1p (490)	IPSAELRTKTIVLARICYNLMAVINAILTPYMLNVSDWNWGAKTGLYWGGFTAVTLAWVIIDLPETTGRT
MAL21p (484)	MPSSRLRTKTIILARNAYNVIQVVVTVLIMYQLNSEKWNWGAKSGFFWGGFCLATLAWAVVDLPETAGRT
	561 622
Agt1p (560)	FSEINELFNQGVPARKFASTVVDPFGKGKTQHDSLADESISQSSSIKQRELNAADKC
MAL21p (554)	FIEINELFRLGVPARKFKSTKVDPFAAAKAAAAEINVKDPKEDLETSVVDEGRNTSSVVNK-

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 Xbal と BamHI 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, 10⁻¹, 10⁻²



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





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 こ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うるア



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 のユビキン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1h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、ウエスター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1h 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らないため、 Mal61p の分解も起こらない。ウエスターンブロッティングではグルコースに1h 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ーンブロッティン 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



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1h 晒した 後にも、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 に 体 fluorescein isothiocyanate-conjugated goat anti-rabbit IgG を 2 次抗体として、

図 3-25 グルコース存在下1h後のトランスポータ ーの細胞局在

間接蛍光顕微鏡で局在を調べた(図

3-25)。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。



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%のアイデンテイテイーがある。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 Mal61[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%のアイデンテイテイーがあるが、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

Mal21p	40	GKK-SDFGLSHHEYGPGSLI	58
Mal61p	40	GKK-SDFDLSHLEYGPGSLI	58
Agt1p	44	GKKDSAFELDHLEFTTNSAQ	63
Agt1p[Gly51,His55]	44	GKKDSAF <u>G</u> LDH <u>H</u> EFTTNSAQ	63
Agt1p[Pro51]	44	GKKDSAF <u>P</u> LDHLEFTTNSAQ	63
Agt1p[Pro55]	44	GKKDSAFELDHPEFTTNSAQ	63

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 α -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 α -ヘリックスと予測された。それに対し て Mal21p では His18-Lys42 が α -ヘリックスと予測された。Agt1p の場合、Glu51→Gly, Leu55→His の置換では、 α -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±0.3 min、Agt1-2HA[Pro51]p は 25.9±1.8 min、 Agt1-2HA[Pro55]p は 104.3±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α-グルコシドトランスポーターAgt1Rp は Glu56 →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±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→Gly56 であり、Gly は α -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α-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

MKGLSSLINRKKDRNDSHLDEIENGVNATEFNSIEMEEQGKKSDFDLSHL50EYGPGSLIPNDNNEEVPDLLDEAMQDAKEADESERGMPLMTALKTYPKAA100AWSLLVSTTLIOEGYDTAILGAFYALPVFQKKYGSLNSNTGDYEISVSWQ150IGLCLCYMAGEIVGLQVTGPSVDYMGNRYTLIMALFFLAAFIFILYFCKS200LGMIAVGQALCGMPWGCFQCLTVSYASEICPLALRYYLTTYSNLCWTFGQ250LFAAGIMKNSQNKYANSELGYKLPFALQWIWPLPLAVGIFLAPESPWWLV300KKGRIDQARRSLERILSGKGPEKELLVSMELDKIKTTIEKEQKMSDEGTY400FSIIQYCLGIAATFVSWWASKYCGRFDLYAFGLAFQAIMFFIIGGLGCSD450THGAKMGSGALLMVVAFFYNLGIAPVVFCLVSEMPSSRLRTKTILARNA500VNVIQVVTVLIMYQLNSEKWNWGAKSGFFWGGFCLATLAWAVVDLPETA550GRTFIEINELFRLGVPARKFKSTKVDPFAAAKAAAAEINVKDPKEDLETS600VVDEGRSTPSVVNK*500

図 3-30 Mal61p の予測される膜貫通領域

- : Predicted a-helix structure
- : Predicted transmembrane regions
- : Acidic amino acid residues in the transmenbrane 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。



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 Km 値は 3~4 mM (51,52)、Agt1p の Km 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ラ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 (pJHXSB) 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, 10⁻¹, 10⁻²

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 Ncol, Bg/II 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、基質特異性に関係する 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, 10⁻¹, 10⁻²

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 α-グルコシドトランスポーターも、major facillitated 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 よって液胞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 のウエスターンブロ 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%のアイデンテイテイー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α-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 Predection 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α-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α-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ラクションをしており、このインターラクションに 対して、N末の細胞質ドメインのα-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 は半減期が延びたが、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ると考えられる。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ラ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、α-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、[C¹⁴]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 α-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°C ~60°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°C ~15°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°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.)温度を上げても、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たらし、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α-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α-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、α-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 Pacl 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 Pmel あるいは Fsel 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

S. pastrianus Sun49 prototroph Sun42 prototroph H11500 identical to SUN49 except for GAL1pr::PDR4::TDH3pr::AGT1 HH1501 identical to SUN49 except for GAL1pr::PDR4::TDH3pr::MAL21 hybrid of S. cerevisiae and S. kudriavzevit KF09 KF09 Apad1/Apad1/Apad1 H11502 identical to KF09 except for GAL1pr::PDR4::TDH3pr::MAL21 H11503 identical to KF09 except for GAL1pr::PDR4::TDH3pr::MAL21 H11503 identical to KF09 except for GAL1pr::PDR4::TDH3pr::MAL21 H11503 identical to KF09 except for PCGPT S. cerevisiae MATa mal61::TRP1 MAL62 MAL63 mal64 mal11MAL12 mal13 ura3- D152U S2::URA3 leu2-3 leu2-112 his MATa mal61::TRP1 MAL62 MAL63 mal64 mal11MAL12 mal13 ura3- S2::URA3:IPM3pr:MAL52 leu2-3 leu2-112 his HD1 identical to D152U except for pYCGPYAGT1-2HA HD1 identical to D152U except for pYCGPYAGT1-2HA HD1 identical to D152U except for pYCGPYAGT1-2HA HD19 identical to D152W except for pYCGPYAGT1-2HA[E157A] HD3 identical to D152W except for pYCGPYAGT1-2HA[E157A] HD3 identical to D152W except for pYCGPYAGT1-2HA[E157A] HD3 identi	Strain Name	Genotype
Sun49 prototroph Sun42 prototroph HH1500 identical to SUM49 except for GAL1pr::PDR4::TDH3pr::AGT1 HH1501 identical to SUM49 except for GAL1pr::PDR4::TDH3pr::MAL21 hybrid of S. cerevisiae and S. kudriavzewii KF09 KF09 Apad1/ Apad1 HH1501 identical to KF09 except for GAL1pr::PDR4::TDH3pr::MAL21 HH1502 identical to KF09 except for GAL1pr::PDR4::TDH3pr::MAL21 HH1503 identical to KF09 except for GAL1pr::PDR4::TDH3pr::MAL21 H1520 identical to KF09 except for GAL1pr::PDR4::TDH3pr::MAL21 D1520 MATa mal61::TRP1 MAL62 MAL63 mal64 mal11MAL12 mal13 ura3- 52::URA3::TDH3pr:MAL32 leu2-3 leu2-112 his D1520 MATa mal61::TRP1 MAL62 MAL63 mal64 mal11MAL12 mal13 ura3- 52::URA3::TDH3pr:MAL32 leu2-3 leu2-112 his HD1 identical to D152U except for pYCGPYMAL61 HD3 identical to D152W except for pYCGPYMAL61 <th>S. pastrianus</th> <th></th>	S. pastrianus	
Sun49 prototroph Sun42 prototroph HH1500 <i>identical to SUM99 except for GAL1pr::PDR4::TDH3pr::AGT1</i> HH1501 <i>identical to SUM99 except for GAL1pr::PDR4::TDH3pr::MAL21</i> hybrid of S. cerevisiae and S. kudriavzevi KF09 Apad1/ Apad1/ Apad1 HH1502 <i>identical to KF09 except for GAL1pr::PDR4::TDH3pr::MAL21</i> HH1503 <i>identical to KF09 except for GAL1pr::PDR4::TDH3pr::MAL21</i> HH1503 <i>identical to KF09 except for GAL1pr::PDR4::TDH3pr::MAL21</i> HH1503 <i>identical to KF09 except for GAL1pr::PDR4::TDH3pr::MAL21</i> D152U S2::URA3 leu2-3 leu2-112 his D152MS MATa mal61::TRP1 MAL62 MAL63 mal64 mal11MAL12 mal13 ura3- S2::URA3::TDH3pr-MAL23 leu2-3 leu2-112 his HD1 <i>identical to D152U except for pYCGPYAGT1-2HA</i> HD3 <i>identical to D152W except for pYCGPYAGT1-2HA</i> HD3 <i>identical to D152W except for pYCGPYAGT1-2HA</i> HD3		
Sun42 prototroph HH1500 identical to SUN49 except for GAL1pr::PDR4::TDH3pr::AGT1 HH1501 identical to SUN49 except for GAL1pr::PDR4::TDH3pr::MAL21 hybrid of S. cerevisiae and S. kudriavzevi identical to KF09 except for GAL1pr::PDR4::TDH3pr::MAL21 HH1502 identical to KF09 except for GAL1pr::PDR4::TDH3pr::MAL21 HH1503 identical to KF09 except for GAL1pr::PDR4::TDH3pr::AGT1R S. cerevisiae Signa D152U MATa mal61::TRP1 MAL62 MAL63 mal64 mal11MAL12 mal13 ura3- 52::URA3::TDH3pr:MAL22 lau2-3 lau2-112 his D152MS Siz:URA3::TDH3pr:MAL22 lau2-3 lau2-112 his HD1 identical to D152U except for pYCGPY4GT1-2HA HD1 identical to D152U except for pYCGPY4GT1-2HA HD1 identical to D152U except for pYCGPY4AL61 HD17 identical to D152U except for pYCGPY4AL61 HD18 identical to D152W except for pYCGPY4AL61 HD19 identical to D152W except for pYCGPY4AL61 HD17 identical to D152W except for pYCGPY4AL61 HD33 identical to D152W except for pYCGPY4AL61 HD34 identical to D152W except for pYCGPY4AL61 HD35 identical to D152W except for pYCGPY4AL61	Sun49	prototroph
Description Description HH1500 identical to SUN49 except for GAL1pr::PDR4::TDH3pr::AGT1 HH1501 identical to SUN49 except for GAL1pr::PDR4::TDH3pr::MAL21 hybrid of S. cerewisiae and S. kudriavzevii identical to KF09 except for GAL1pr::PDR4::TDH3pr::MAL21 HH1502 identical to KF09 except for GAL1pr::PDR4::TDH3pr::MAL21 HH1503 identical to KF09 except for GAL1pr::PDR4::TDH3pr::MAL21 HH1504 identical to KF09 except for GAL1pr::PDR4::TDH3pr::MAL21 HH1505 identical to KF09 except for GAL1pr::PDR4::TDH3pr::MAL21 HH1506 identical to KF09 except for GAL1pr::PDR4::TDH3pr::MAL21 HH1507 identical to KF09 except for PYGP4: D1520 MATa mal61::TRP1 MAL62 MAL63 mal64 mal11MAL12 mal13 ura3- S2::URA3:ICH3pr.MAL23 leu2-3 leu2-112 his S2:URA3::TCH3pr.MAL23 leu2-3 leu2-112 HD1 identical to D152U except for PYCGPYAGT1-2HA HD1 identical to D152U except for PYCGPYAGT1-2HA HD1 identical to D152U except for PYCGPYAGT1-2HA HD3 identical to D152W except for PYCGPYAGT1-2HA HD3 identical to D152W except for PYCGPYAGT1-2HA HD3 identical to D152W except for PYCGPYAGT1-2HA HD3	Sun42	prototroph
Initial Identical to SUM-9 except for GALIpr::PDR4::TDH3pr::MAL1 hybrid of S. cerewisiae and S. kudriavzevii Identical to SUM-9 except for GALIpr::PDR4::TDH3pr::MAL21 hybrid of S. cerewisiae and S. kudriavzevii Identical to KF09 except for GALIpr::PDR4::TDH3pr::MAL21 H11500 identical to KF09 except for GALIpr::PDR4::TDH3pr::MAL21 H11501 identical to KF09 except for GALIpr::PDR4::TDH3pr::MAL21 H11502 identical to KF09 except for GALIpr::PDR4::TDH3pr::AGT1R S. cerewisiae Silver Sil	HH1500	identical to SUNAR except for GAL IncurDDRAUTDH3pruAGT1
Initial Initial isolution hybrid of S. cerevisiae and S. kudriavevii KF09 ApadI/ ApadI/ ApadI HH1502 identical to KF09 except for GALIpr::PDR4::TDH3pr::MAL21 HH1503 identical to KF09 except for GALIpr::PDR4::TDH3pr::AGT1R S. cerevisiae S. cerevisiae D152U MATa mal61::TRP1 MAL62 MAL63 mal64 mal11MAL12 mal13 ura3- 52::URA3 leu2-3 leu2-112 his D152MS S2::URA3::TDH3pr:MAL32 leu2-3 leu2-112 his HD1 identical to D152U except for pYCGPYAGT1-2HA HD3 identical to D152W except for pYCGPYAGT1-2HA HD3 identical to D152M except for pYCGPYAGT1-2HA <td< td=""><td></td><td>identical to SUN49 except for GALIPIPDR4TDH3piAGT1</td></td<>		identical to SUN49 except for GALIPIPDR4TDH3piAGT1
Input of S. Edevisade and S. Kudiraktevi KF09 Apadi/ Apadi/ Apadi HH1502 identical to KF09 except for GALIpr::PDR4::TDH3pr::MAL21 HH1503 identical to KF09 except for GALIpr::PDR4::TDH3pr::AGTIR S. cerevisiae Signal S	hubrid of C corovicion and C lu	drinuanii
KF09A pad1/ A pad1/ A pad1HH1502identical to KF09 except for GAL1pr::PDR4::TDH3pr::MAL21HH1503identical to KF09 except for GAL1pr::PDR4::TDH3pr::AGT1RS. cerevisiaeD152UD152UMATa mal61::TRP1 MAL62 MAL63 mal64 mal11MAL12 mal13 ura3- 52::URA3 leu2-3 leu2-112 hisD152MSMATa mal61::TRP1 MAL62 MAL63 mal64 mal11MAL12 mal13 ura3- 52::URA3::TDH3pr:MAL22 leu2-3 leu2-112 hisHD1identical to D152U except for pYCGPYHD5identical to D152U except for pYCGPYAGT1-2HAHD11identical to D152U except for pYCGPYAGT1-2HAHD13identical to D152U except for pYCGPYAGT1-2HAHD14identical to D152U except for pYCGPYAGT1-2HAHD15identical to D152U except for pYCGPYAGT1-2HAHD16identical to D152W except for pYCGPYAGT1-2HAHD17identical to D152MS except for pYCGPYAGT1-2HAHD33identical to D152MS except for pYCGPYAGT1-2HAHD43identical to D152MS except for pYCGPYAGT1-2HAHD47identical to D152MS except for pYCGPYAGT1-2HA[E167A]HD51identical to D152MS except for pYCGPYAGT1-2HA[E167A]HD52identical to D152MS except for pYCGPYAGT1-2HA[L55P]HD82identical to D152MS except for pYCGPYAGT1-2HA[L55P]HD83identical to D152MS except for pYCGPYAGT1-2HA[L55P]HD84identical to D152W except for pYCGPYAGT1-2HA[L55P]HD85identical to D152W except for pYCGPYAGT1-2HA[L55P]HD84identical to D152W except for pYCGPYAGT1-2HA[L55P]HD85identical to D152W except for ACT1pr::R5N4HD94identical t	Tybrid of S. Cerevisiae and S. Ku	unavzevn
NV9 Japadi / Japadi	KEOO	
HH1502 identical to KF09 except for GAL1pr::PDR4::TDH3pr::MAL21 HH1503 identical to KF09 except for GAL1pr::PDR4::TDH3pr::AGT1R S. cerevisiae Status D152U MATa mal61::TRP1 MAL62 MAL63 mal64 mal11MAL12 mal13 ura3- S2::URA3::TDH3pr:MAL22 leu2-3 leu2-112 his D152MS MATa mal61::TRP1 MAL62 MAL63 mal64 mal11MAL12 mal13 ura3- S2::URA3::TDH3pr:MAL22 leu2-3 leu2-112 his HD1 identical to D152U except for pYCGPYA HD5 identical to D152U except for pYCGPYAGT1-2HA HD11 identical to D152U except for pYCGPYAGT1-2HA HD15 identical to D152U except for pYCGPYAGT1-2HA HD17 identical to D152U except for pYCGPYMAL61 HD18 identical to D152U except for pYCGPYMAL61 HD33 identical to D152M except for pYCGPYMAL61 HD47 identical to D152M except for pYCGPYMAL61 HD48 identical to D152M except for pYCGPYMAL61 HD49 identical to D152M except for pYCGPYMAL61 HD49 identical to D152M except for pYCGPYMAL61 HD44 identical to D152M except for pYCGPYMAL61 HD45 identical to D152M except for pYCGPYMAL61 HD46 identical to D152M except for pYCGPYMAL61[E161A] HD51 identical to D152M except for pY		
HH1503 identical to KP09 except for GAL1pr:/PDK4://DH3pr::AG11R S. cerevisiae MATa mal61:::TRP1 MAL62 MAL63 mal64 mal11MAL12 mal13 ura3- 52::URA3 leu2-3 leu2-112 his D152W MATa mal61:::TRP1 MAL62 MAL63 mal64 mal11MAL12 mal13 ura3- 52::URA3::DH3pr-MAL32 leu2-3 leu2-112 his HD1 identical to D152U except for pYCGPYAGT1-2HA HD5 identical to D152U except for pYCGPYAGT1-2HA[E167A] HD1 identical to D152U except for pYCGPYMAL61 HD3 identical to D152M except for pYCGPYMAL61 HD3 identical to D152MS except for pYCGPYMAL61 HD3 identical to D152MS except for pYCGPYMAL61 HD43 identical to D152MS except for pYCGPYMAL61 HD44 identical to D152MS except for pYCGPYMAL61 HD55 identical to D152MS except for pYCGPYMAL61 HD45 identical to D152MS except for pYCGPYMAL61 HD45 identical to D152MS except for pYCGPYMAL61 HD46 identical to D152W except for pYCGPYMAL61 HD51 identical to D152W except for pYCGPYAGT1-2HA[E55P]	HH1502	Identical to KFU9 except for GAL1pr::PDR4::TDH3pr::MAL21
S. Cerevisiae 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 HD1 identical to D152U except for pYCGPYAGT1-2HA HD1 identical to D152U except for pYCGPYMAL21 HD1 identical to D152U except for pYCGPYMAL21 HD1 identical to D152U except for pYCGPYMAL21 HD3 identical to D152W except for pYCGPYMAL21 HD3 identical to D152MS except for pYCGPYMAL21 HD3 identical to D152MS except for pYCGPYMAL21 HD43 identical to D152MS except for pYCGPYMAL21 HD44 identical to D152MS except for pYCGPYMAL21 HD51 identical to D152MS except for pYCGPYMAL21 HD52 identical to D152MS except for pYCGPYMAL21 HD53 identical to D152MS except for pYCGPYMAL21 HD54 identical to D152MS except for pYCGPYMAL21[E161A] HD55 identical to D152MS except for pYCGPYMAL21[E161A] HD54 identical to D152MS except for pYCGPYMAL21[E161A] HD55	HH1503	Identical to KFU9 except for GAL1pr::PDR4::TDH3pr::AGT1R
D152UMATa mal61:::TRP1 MAL62 MAL63 mal64 mal11MAL12 mal13 ura3- 52::URA3 leu2-3 leu2-112 hisD152MSMATa mal61::TRP1 MAL62 MAL63 mal64 mal11MAL12 mal13 ura3- S2::URA3:::DD15PrMAL32 leu2-112 hisHD1identical to D152U except for pYCGPYHD5identical to D152U except for pYCGPYAGT1-2HAHD11identical to D152U except for pYCGPYAGT1-2HAHD13identical to D152U except for pYCGPYMAL61HD14identical to D152U except for pYCGPYMAL61HD15identical to D152U except for pYCGPYMAL61HD17identical to D152U except for pYCGPYMAL61HD33identical to D152W secept for pYCGPYMAL61[E167A]HD33identical to D152MS except for pYCGPYMAL61HD47identical to D152MS except for pYCGPYMAL61HD48identical to D152MS except for pYCGPYMAL61HD51identical to D152MS except for pYCGPYMAL61[E161A]HD52identical to D152W except for pYCGPYMAL21[E161A]HD53identical to D152W except for pYCGPYMAL21[E161A]HD54identical to D152W except for pYCGPYMAL21[E161A]HD55identical to D152W except for pYCGPYMAL21[E161A]HD84identical to D152W except for pYCGPYMAL21[E161A]HD85identical to D152W except for pYCGPYMAL21[E161A]HD86identical to D152W except for ACT1pr::R5N4HD91identical to D152W except for ACT1pr::R5N4HD92identical to D152W except for ACT1pr::R5N4 </td <td>S. cerevisiae</td> <td></td>	S. cerevisiae	
D152UMA1a malb1://H21 MAL62 MAL63 malb4 mal11MAL12 mal13 ura3- S2::URA3::TDH3p:-MAL32 leu2-112 hisD152MSMATa mal61::TRP1 MAL62 MAL63 mal64 mal11MAL12 mal13 ura3- S2::URA3::TDH3p:-MAL32 leu2-3 leu2-112 hisHD1identical to D152U except for pYCGPYAGT1-2HAHD5identical to D152U except for pYCGPYAGT1-2HAHD11identical to D152U except for pYCGPYAGT1-2HAHD13identical to D152U except for pYCGPYAGT1-2HAHD14identical to D152U except for pYCGPYAGT1-2HAHD15identical to D152U except for pYCGPYAGT1-2HAHD31identical to D152W except for pYCGPYAGT1-2HAHD33identical to D152MS except for pYCGPYAGT1-2HAHD43identical to D152MS except for pYCGPYAML61HD43identical to D152MS except for pYCGPYMAL61HD44identical to D152MS except for pYCGPYMAL61HD51identical to D152MS except for pYCGPYMAL61HD52identical to D152MS except for pYCGPYMAL61HD53identical to D152MS except for pYCGPYMAL61HD54identical to D152W except for pYCGPYMAL21[E161A]HD55identical to D152W except for pYCGPYMAL21[E161A]HD56identical to D152W except for pYCGPYMAL21[E161A]HD57identical to D152W except for pYCGPYMAL21[E161A]HD58identical to D152W except for pYCGPYMAL21[E161A]HD59identical to D152W except for pYCGPYMAL21[E161A]HD51identical to D152W except for pYCGPYMAL21[E161A]HD53identical to D152W except for ACT1pr::HAT1HD54identical to D152W except for PYCGPYMAL21[E161A]HD55 <tdidentical< td=""><td></td><td></td></tdidentical<>		
52::URA3Jeu2-3Jeu2-112hisD152MS52::URA3::TDH3pr-MAL32Jeu2-12hisHD1identical toD152Uexcept for pYCGPYHD5identical toD152Uexcept for pYCGPYAGT1-2HAHD11identical toD152Uexcept for pYCGPYAGT1-2HAHD11identical toD152Uexcept for pYCGPYAGT1-2HAHD15identical toD152Uexcept for pYCGPYMAL51HD17identical toD152Uexcept for pYCGPYMAL51HD33identical toD152MSexcept for pYCGPYGPT-2HAHD47identical toD152MSexcept for pYCGPYAGT1-2HAHD47identical toD152MSexcept for pYCGPYMAL51HD51identical toD152MSexcept for pYCGPYMAL51HD47identical toD152MSexcept for pYCGPYMAL51HD51identical toD152MSexcept for pYCGPYMAL51HD53identical toD152MSexcept for pYCGPYMAL51HD54identical toD152MSexcept for pYCGPYMAL51HD55identical toD152MSexcept for pYCGPYMAL51HD65 <td>D152U</td> <td>MATa mal61::TRP1 MAL62 MAL63 mal64 mal11MAL12 mal13 ura3-</td>	D152U	MATa mal61::TRP1 MAL62 MAL63 mal64 mal11MAL12 mal13 ura3-
D152MSMATa mal61::TRP1 MAL62 MAL63 mal64 mal11MAL12 mal13 ura3- 52::URA3::TDH3pr-MAL32 leu2-3 leu2-112 hisHD1identical to D152U except for pYCGPYHD5identical to D152U except for pYCGPYAGT1-2HAHD11identical to D152U except for pYCGPYMAL61HD13identical to D152U except for pYCGPYMAL61HD14identical to D152U except for pYCGPYMAL61HD15identical to D152U except for pYCGPYMAL61HD17identical to D152U except for pYCGPYMAL61[E161A]HD18identical to D152MS except for pYCGPYMAL61[E161A]HD33identical to D152MS except for pYCGPYMAL61HD43identical to D152MS except for pYCGPYMAL61HD49identical to D152MS except for pYCGPYMAL61HD49identical to D152MS except for pYCGPYMAL61[E161A]HD51identical to D152MS except for pYCGPYMAL61[E161A]HD52identical to D152M except for pYCGPYMAL61[E161A]HD53identical to D152M except for pYCGPYMAL61[E161A]HD54identical to D152W except for pYCGPYMAL61[E161A]HD55identical to D152W except for pYCGPYMAL21[E161A]HD56identical to D152W except for pYCGPYMAL21[E161A]HD85identical to D152W except for pYCGPYMAL21[E161A]HD86identical to D152W except for pYCGPYMAL21[E161A]HD87identical to D152W except for pYCGPYMAL21[E161A]HD88identical to D152W except for pYCGPYMAL21[E161A]HD89identical to D152W except for ACT1pr::HA1[L55P,E167A]HD91identical to D152W except for ACT1pr::HA1[L55P,E167A]HD93identical to D152W except for ACT1p	21020	52::URA3 leu2-3 leu2-112 his
Section52::URA3::TDH3pr:MAL32 leu2-112 hisHD1identical to D152U except for pYCGPYAGT1-2HAHD5identical to D152U except for pYCGPYAGT1-2HAHD11identical to D152U except for pYCGPYAGT1-2HA[E167A]HD15identical to D152U except for pYCGPYMAL21HD19identical to D152U except for pYCGPYMAL21HD19identical to D152W except for pYCGPYMAL61[E161A]HD33identical to D152Ms except for pYCGPYMAL61[E167A]HD43identical to D152Ms except for pYCGPYMAL21HD43identical to D152Ms except for pYCGPYMAL21HD44identical to D152Ms except for pYCGPYMAL21HD51identical to D152Ms except for pYCGPYMAL21HD51identical to D152Ms except for pYCGPYMAL21HD51identical to D152Ms except for pYCGPYMAL21[E161A]HD52identical to D152W except for pYCGPYMAL21[E161A]HD53identical to D152U except for pYCGPYMAL21[E161A]HD76identical to D152U except for pYCGPYMAL21[E161A]HD81identical to D152U except for pYCGPYMAL21[E161A]HD82identical to D152U except for pYCGPYMAL21[E161A]HD84identical to D152U except for pYCGPYMAL21[E161A]HD85identical to D152U except for pYCGPYMAL21[E161A]HD81identical to D152U except for PYCGPYMAL21[E161A]HD82identical to D152U except for PYCGPYMAL21HD84identical to D152U except for PYCGPYMAL21HD85identical to D152U except for ACT1pr::HA1(L55P,E167A]HD91identical to D152U except for ACT1pr::HA1(L55P,E167A]HD92identical to D152U except	D152MS	MATa mal61::TRP1 MAL62 MAL63 mal64 mal11MAL12 mal13 ura3-
HD1identical to D152U except for pYCGPYHD5identical to D152U except for pYCGPYAGT1-2HAHD11identical to D152U except for pYCGPYAGT1-2HA[E167A]HD15identical to D152U except for pYCGPYMAL61HD17identical to D152U except for pYCGPYMAL61HD19identical to D152U except for pYCGPYMAL61[E161A]HD33identical to D152MS except for pYCGPYMAL61[E167A]HD33identical to D152MS except for pYCGPYAGT1-2HAHD43identical to D152MS except for pYCGPYAGT1-2HA[E167A]HD47identical to D152MS except for pYCGPYMAL61HD49identical to D152MS except for pYCGPYMAL61HD51identical to D152MS except for pYCGPYMAL61[E161A]HD52identical to D152U except for pYCGPYMAL61[E161A]HD54identical to D152U except for pYCGPYMAL61[E161A]HD55identical to D152U except for pYCGPYMAL61[E161A]HD54identical to D152U except for pYCGPYMAL1[E161A]HD55identical to D152U except for pYCGPYMAL1[E161A]HD84identical to D152U except for pYCGPYMAL1[E161A]HD85identical to D152U except for pYCGPYMAL1[E161A]HD87identical to D152U except for pYCGPYMAL1[E161A]HD83identical to D152U except for pYCGPYMAL1[E161A]HD93identical to D152U except for PCGPYMAL1[E161A]HD94identical to D152U except for PCGPYMAL1[E161A]HD93identical to D152U except for ACT1pr::HO11HD94identical to D152U except for ACT1pr::HO31HD104identical to D152U except for ACT1pr::HO31HD105identical to D152U except f	0132113	52::URA3::TDH3pr-MAL32 leu2-3 leu2-112 his
HDSidentical to D152U except for pYCGPYAGT1-2HAHD11identical to D152U except for pYCGPYMAL61HD15identical to D152U except for pYCGPYMAL61HD17identical to D152U except for pYCGPYMAL61HD19identical to D152W except for pYCGPYMAL61HD33identical to D152MS except for pYCGPYAGT1-2HAHD43identical to D152MS except for pYCGPYAGT1-2HAHD43identical to D152MS except for pYCGPYAGT1-2HAHD47identical to D152MS except for pYCGPYMAL61HD47identical to D152MS except for pYCGPYMAL61HD51identical to D152MS except for pYCGPYMAL61HD52identical to D152MS except for pYCGPYMAL61HD53identical to D152MS except for pYCGPYMAL61HD54identical to D152MS except for pYCGPYAGT1-2HA[L55P]HD85identical to D152MS except for pYCGPYAGT1-2HA[L55P]HD86identical to D152W except for pYCGPYAGT1-2HA[L55P,E167A]HD86identical to D152W except for pYCGPYAGT1-2HA[L55P,E167A]HD91identical to D152W except for pYCGPYAGT1-2HA[L55P,E167A]HD92identical to D152W except for pYCGPYAGT1-2HA[L55P,E167A]HD93identical to D152W except for pYCGPYMAT121HD94identical to D152W except for ACT1pr::HOG1HD101identical to D152W except for ACT1pr::HOG1HD102identical to D152W except for ACT1pr::HOG1HD103identical to D152W except for ACT1pr::SKN7HD104identical to D152W except for ACT1pr::SKN7HD105identical to D152W except for ACT1pr::SKN7HD106identical to D152W except for TPT	HD1	identical to D152U except for pYCGPY
HD11identical to D152U except for pYCGPYAGT1-2HA[E167A]HD15identical to D152U except for pYCGPYMAL61HD17identical to D152U except for pYCGPYMAL61HD19identical to D152U except for pYCGPYMAL61[E161A]HD33identical to D152MS except for pYCGPYAGT1-2HAHD47identical to D152MS except for pYCGPYMAL61[E161A]HD43identical to D152MS except for pYCGPYMAL61HD47identical to D152MS except for pYCGPYMAL61HD51identical to D152MS except for pYCGPYMAL61[E161A]HD56identical to D152MS except for pYCGPYMAL61[E161A]HD57identical to D152W except for pYCGPYMAL21[E161A]HD88identical to D152W except for pYCGPYMAL21[E161A]HD84identical to D152W except for pYCGPYMAL21[E161A]HD85identical to D152W except for pYCGPYMAL21[E161A]HD86identical to D152W except for pYCGPYMAL21[E161A]HD87identical to D152W except for pYCGPYMAL21[E161A]HD91identical to D152W except for PYCGPYMAL21[E161A]HD92identical to D152W except for ACT1pr::H0[51]HD93identical to D152W except for ACT1pr::H0[51]HD94identical to D152W except for ACT1pr::H0[51]HD93identical to D152W except for ACT1pr::H0[51]HD101identical to D152W except for ACT1pr::H0[51]HD102identical to D152W except for ACT1pr::H0[51]HD103identical to D152W except	HD5	identical to D152U except for pYCGPYAGT1-2HA
HD15identical to D152U except for pYCGPYMAL61HD17identical to D152U except for pYCGPYMAL61[E161A]HD19identical to D152M except for pYCGPYMAL61[E161A]HD33identical to D152MS except for pYCGPYAGT1-2HAHD43identical to D152MS except for pYCGPYAGT1-2HA[E167A]HD47identical to D152MS except for pYCGPYMAL61HD49identical to D152MS except for pYCGPYMAL61HD47identical to D152MS except for pYCGPYMAL61HD49identical to D152MS except for pYCGPYMAL61[E161A]HD51identical to D152W except for pYCGPYMAL61[E161A]HD56identical to D152W except for pYCGPYMAL7[E161A]HD87identical to D152W except for pYCGPYMAL21[E161A]HD88identical to D152W except for pYCGPYMAL21[E161A]HD85identical to D152W except for pYCGPYMAL21[E161A]HD86identical to D152W except for pYCGPYMAL21[E161A]HD87identical to D152W except for pYCGPYMAL21[E161A]HD91identical to D152W except for pYCGPYMAL21[E161A]HD92identical to D152W except for pYCGPYMAL21[E161A]HD93identical to D152W except for pYCGPYMAL21HD94identical to D152W except for TP11pr-lacZ, with pYCGPYMAL21HD93identical to D152W except for ACT1pr::MOG1HD104identical to D152U except for ACT1pr::SKN1HD105identical to D152U except for ACT1pr::SKN1HD106identical to D152U except for ACT1pr::SKN1HD107identical to D152U except for TP11pr::ISO1HD108identical to D152U except for TP11pr::SKN1HD109 <tdidentical d<="" td="" to=""><td>HD11</td><td>identical to D152U except for pYCGPYAGT1-2HA[E167A]</td></tdidentical>	HD11	identical to D152U except for pYCGPYAGT1-2HA[E167A]
HD17identical to D152U except for pYCGPYMAl21HD19identical to D152U except for pYCGPYMAl51[E161A]HD33identical to D152MS except for pYCGPYAGT1-2HAHD43identical to D152MS except for pYCGPYAGT1-2HA[E167A]HD47identical to D152MS except for pYCGPYMAL61HD47identical to D152MS except for pYCGPYMAL61HD51identical to D152MS except for pYCGPYMAL61HD51identical to D152MS except for pYCGPYMAL61HD51identical to D152W except for pYCGPYMAL61HD52identical to D152W except for pYCGPYMAL61[E161A]HD76identical to D152W except for pYCGPYMAL21[E161A]HD82identical to D152W except for pYCGPYMAL21[E161A]HD84identical to D152W except for pYCGPYMAL21[E161A]HD85identical to D152W except for pYCGPYMAL21[E161A]HD86identical to D152W except for pYCGPYMAL21[E161A]HD87identical to D152W except for pYCGPYMAL21[E161A]HD91identical to D152W except for pYCGPYMAL21[E161A]HD93identical to D152W except for pYCGPYMAL21HD94identical to D152W except for ACT1pr::HOT1HD93identical to D152W except for ACT1pr::HOG1HD101identical to D152W except for ACT1pr::HOG1HD12identical to D152W except for ACT1pr::HOG1HD13identical to D152W except for ACT1pr::HOG1HD14identical to D152W except for ACT1pr::HOG1HD15identical to D152W except for ACT1pr::HOT1HD104identical to D152W except for ACT1pr::HOT1HD105identical to D152W except for TP11pr::HOT1	HD15	identical to D152U except for pYCGPYMAL61
HD19identical to D152U except for pYCGPYMAL61[E161A]HD33identical to D152MS except for pYCGPYAGT1-2HAHD37identical to D152MS except for pYCGPYAGT1-2HAHD43identical to D152MS except for pYCGPYMAL61HD47identical to D152MS except for pYCGPYMAL61HD49identical to D152MS except for pYCGPYMAL61HD51identical to D152WS except for pYCGPYMAL21HD52identical to D152W except for pYCGPYMAL21[E161A]HD53identical to D152U except for pYCGPYAGT1-2HA[L55P]HD82identical to D152U except for pYCGPYAGT1-2HA[L55P]HD84identical to D152W except for pYCGPYAGT1-2HA[L55P,E167A]HD85identical to D152W except for pYCGPYAGT1-2HA[L55P,E167A]HD86identical to D152W except for pYCGPYAGT1-2HA[L55P,E167A]HD87identical to D152W except for pYCGPYAGT1-2HA[L55P,E167A]HD91identical to D152W except for pYCGPYMAL21[E161A]HD93identical to D152W except for pYCGPYMAL21[E161A]HD94identical to D152W except for pYCGPYMAL21[E161A]HD93identical to D152W except for pYCGPYMAL21[E161A]HD94identical to D152W except for pYCGPYMAL21HD93identical to D152W except for ACT1pr::MOG1HD94identical to D152W except for ACT1pr::MOG1HD95identical to D152W except for ACT1pr::MOG1HD104identical to D152W except for ACT1pr::SKN7HD105identical to D152W except for ACT1pr::SKN7HD106identical to D152W except for TP11pr::RM101HD107identical to D152W except for TP11pr::SKN1HD108	HD17	identical to D152U except for pYCGPYMAl21
HD33identical to D152MS except for pYCGPYAGT1-2HAHD43identical to D152MS except for pYCGPYAGT1-2HAHD43identical to D152MS except for pYCGPYAGT1-2HA[E167A]HD47identical to D152MS except for pYCGPYMAL61HD49identical to D152MS except for pYCGPYMAL61[E161A]HD51identical to D152W except for pYCGPYAGT1-2HA[E55P]HD82identical to D152U except for pYCGPYAGT1-2HA[L55P]HD83identical to D152U except for pYCGPYAGT1-2HA[L55P]HD84identical to D152U except for pYCGPYAGT1-2HA[L55P]HD85identical to D152W except for pYCGPYAGT1-2HA[L55P,E167A]HD86identical to D152MS except for pYCGPYAGT1-2HA[L55P,E167A]HD91identical to D152W except for pYCGPYAGT1-2HA[L55P,E167A]HD92identical to D152W except for pYCGPYAGT1-2HA[L55P,E167A]HD93identical to D152W except for pYCGPYAGT1-2HA[L55P,E167A]HD94identical to D152W except for pYCGPYMAL21HD94identical to D152W except for ACT1pr::HOG1HD101identical to D152W except for ACT1pr::HOG1HD102identical to D152W except for ACT1pr::HOG1HD103identical to D152W except for ACT1pr::HOG1HD104identical to D152W except for ACT1pr::HOT1HD155identical to D152W except for ACT1pr::HOT1HD16identical to D152W except for ACT1pr::HOT1HD17identical to D152W except for ACT1pr::HOT1HD18identical to D152W except for ACT1pr::HOT1HD19identical to D152W except for ACT1pr::HOT1HD104identical to D152W except for TP11pr::HOT3H	HD19	identical to D152U except for pYCGPYMAL61[E161A]
HD37identical to D152MS except for pYCGPYAGT1-2HAHD43identical to D152MS except for pYCGPYAGT1-2HA[E167A]HD47identical to D152MS except for pYCGPYMAL61HD49identical to D152MS except for pYCGPYMAL61HD51identical to D152MS except for pYCGPYMAL61HD51identical to D152MS except for pYCGPYAGT1-2HA[L55P]HD82identical to D152W except for pYCGPYAGT1-2HA[L55P]HD84identical to D152U except for pYCGPYAGT1-2HA[L55P,E167A]HD85identical to D152W except for pYCGPYAGT1-2HA[L55P,E167A]HD86identical to D152W except for pYCGPYAGT1-2HA[L55P,E167A]HD87identical to D152W except for pYCGPYAGT1-2HA[L55P,E167A]HD91identical to D152W except for pYCGPYAGT1-2HA[L55P,E167A]HD92identical to D152W except for pYCGPYAGT1-2HA[L55P,E167A]HD93identical to D152U except for pYCGPYAGT1-2HA[L55P,E167A]HD94identical to D152W except for PYCGPYMAL21HD101identical to D152W except for TPI1pr-lac2, with pYCGPYMAL21HD102identical to D152W except for ACT1pr:::MSN4HD103identical to D152W except for ACT1pr:::MSN4HD104identical to D152W except for ACT1pr:::SKN7HD105identical to D152W except for ACT1pr:::SKN7HD106identical to D152W except for TPI1pr:::RIM101HD107identical to D152W except for TPI1pr:::RM15HD108identical to D152W except for TPI1pr:::SKN7HD109identical to D152W except for TPI1pr:::RM15HD110identical to D152W except for TPI1pr:::RM15HD111identical to D152W except	HD33	identical to D152MS except for pYCGPY
HD43identical to D152MS except for pYCGPYAGT1-2HA[E167A]HD47identical to D152MS except for pYCGPYMAL61HD49identical to D152MS except for pYCGPYMAL61HD51identical to D152MS except for pYCGPYMAL61[E161A]HD52identical to D152U except for pYCGPYMAL61[E161A]HD76identical to D152U except for pYCGPYMAL71[E161A]HD82identical to D152U except for pYCGPYMAL71[E161A]HD83identical to D152U except for pYCGPYMAL71[E161A]HD84identical to D152MS except for pYCGPYMAL71[E161A]HD85identical to D152MS except for pYCGPYMAL71[E161A]HD86identical to D152MS except for pYCGPYMAL71[E161A]HD87identical to D152MS except for pYCGPYMAL71[E161A]HD88identical to D152W except for pYCGPYMAL71[E161A]HD91identical to D152W except for pYCGPYMAL71HD92identical to D152W except for PYCGPYMAL71HD93identical to D152W except for ACT1pr::AXWth pYCGPYMAL21HD101identical to D152W except for ACT1pr::MSN4HD102identical to D152U except for ACT1pr::MSN4HD103identical to D152U except for ACT1pr::SKN7HD104identical to D152U except for ACT1pr::SKN7HD105identical to D152U except for ACT1pr::SKN7HD106identical to D152U except for ACT1pr::SKN7HD107identical to D152U except for ACT1pr::SKN1HD108identical to D152U except for TPI1pr::RM101HD109identical to D152U except for TPI1pr::SKN1HD110identical to D152U except for TPI1pr::SKN1HD111identical to D152U ex	HD37	identical to D152MS except for pYCGPYAGT1-2HA
HD47identical to D152MS except for pYCGPYMAL61HD49identical to D152MS except for pYCGPYMAL61[E161A]HD51identical to D152WS except for pYCGPYAGT1-2HA[L55P]HD52identical to D152W except for pYCGPYAGT1-2HA[L55P]HD82identical to D152W except for pYCGPYAGT1-2HA[L55P]HD84identical to D152W except for pYCGPYAGT1-2HA[L55P]HD85identical to D152W except for pYCGPYAGT1-2HA[L55P,E167A]HD86identical to D152W except for pYCGPYAGT1-2HA[L55P,E167A]HD87identical to D152W except for pYCGPYAGT1-2HA[L55P,E167A]HD91identical to D152W except for pYCGPYAGT1-2HA[L55P,E167A]HD92identical to D152W except for pYCGPYAGT1-2HA[L55P,E167A]HD93identical to D152W except for pYCGPYAGT1-2HA[L55P,E167A]HD94identical to D152W except for pYCGPYMAL21HD93identical to D152W except for PCGPYMAL21HD94identical to D152W except for ACT1pr::HOT1HD101identical to D152W except for ACT1pr::HOT1HD102identical to D152W except for ACT1pr::HOT1HD103identical to D152W except for ACT1pr::SKN7HD104identical to D152W except for ACT1pr::SKN7HD105identical to D152W except for ACT1pr::SKN1HD106identical to D152W except for TPI1pr::RIM101HD107identical to D152W except for TPI1pr::SK2HD108identical to D152W except for TPI1pr::SK2HD109identical to D152W except for TPI1pr::SK2HD101identical to D152W except for TPI1pr::SK2HD102identical to D152W except for TPI1pr::SK2HD1	HD43	identical to D152MS except for pYCGPYAGT1-2HA[F167A]
HD49identical to D152MS except for pVCGPYMAL21HD51identical to D152MS except for pVCGPYAGT1-2HA[L55P]HD76identical to D152W except for pVCGPYAGT1-2HA[L55P]HD82identical to D152W except for pVCGPYAGT1-2HA[L55P]HD84identical to D152W except for pVCGPYAGT1-2HA[L55P,E167A]HD85identical to D152W except for pVCGPYAGT1-2HA[L55P,E167A]HD86identical to D152W except for pVCGPYAGT1-2HA[L55P,E167A]HD87identical to D152W except for pVCGPYAGT1-2HA[L55P,E167A]HD91identical to D152W except for pVCGPYAGT1-2HA[L55P,E167A]HD92identical to D152W except for pVCGPYMAL21[E161A]HD93identical to D152W except for PVCGPYMTT1HD94identical to D152W except for ACT1pr::MOG1HD101identical to D152W except for ACT1pr::MOG1HD102identical to D152W except for ACT1pr::MOG1HD103identical to D152W except for ACT1pr::SKN7HD104identical to D152W except for ACT1pr::SKN7HD105identical to D152W except for ACT1pr::SKN7HD106identical to D152W except for ACT1pr::SKN7HD107identical to D152W except for ACT1pr::SKN7HD108identical to D152W except for TPI1pr::RM101HD109identical to D152W except for TPI1pr::RM15HD110identical to D152W except for TPI1pr::RM15HD111identical to D152W except for TPI1pr::RM15HD112identical to D152W except for TPI1pr::RM15HD113identical to D152W except for TPI1pr::RM511HD114identical to D152W except for TPI1pr::RM511HD115id	HD47	identical to D152MS except for pYCGPYMAL61
HD51identical to D152/MS except for pYCGPYMAL61[E161A]HD51identical to D152/MS except for pYCGPYAGT1-2HA[L55P]HD82identical to D152/U except for pYCGPYAGT1-2HA[L55P]HD84identical to D152/U except for pYCGPYAGT1-2HA[L55P,E167A]HD85identical to D152/U except for pYCGPYAGT1-2HA[L55P,E167A]HD86identical to D152/MS except for pYCGPYMAL21[E161A]HD87identical to D152/MS except for pYCGPYMAL21[E161A]HD88identical to D152/U except for pYCGPYMAL21[E161A]HD91identical to D152/U except for pYCGPYMAL21[E161A]HD92identical to D152/U except for pYCGPYMAL21HD93identical to D152/U except for TP11pr-lac2, with pYCGPYMAL21HD94identical to D152/U except for ACT1pr::HOG1HD102identical to D152/U except for ACT1pr::HOG1HD103identical to D152/U except for ACT1pr::SNN4HD104identical to D152/U except for ACT1pr::SKN7HD105identical to D152/U except for ACT1pr::SKO1HD106identical to D152/U except for ACT1pr::SKO1HD107identical to D152/U except for ACT1pr::SKO1HD108identical to D152/U except for ACT1pr::SKO1HD109identical to D152/U except for TP11pr::RM101HD101identical to D152/U except for TP11pr::SK2HD103identical to D152/U except for TP11pr::SK2HD104identical to D152/U except for TP11pr::SK2HD105identical to D152/U except for TP11pr::SK2HD106identical to D152/U except for TP11pr::SK2HD107identical to D152/U except for TP11pr::SK2HD1	HD49	identical to D152MS except for pYCGPYMAI21
HD51Identical to D152H3 Except for pYCGPYAGT1-2HA[L55P]HD76identical to D152U except for pYCGPYAGT1-2HA[L55P]HD82identical to D152U except for pYCGPYAGT1-2HA[L55P]HD84identical to D152U except for pYCGPYAGT1-2HA[L55P,E167A]HD85identical to D152U except for pYCGPYAGT1-2HA[L55P,E167A]HD86identical to D152U except for pYCGPYAGT1-2HA[L55P,E167A]HD87identical to D152U except for pYCGPYAGT1-2HA[L55P,E167A]HD91identical to D152U except for pYCGPYAGT1-2HA[L55P,E167A]HD92identical to D152U except for pYCGPYAGT1-2HA[L55P,E167A]HD93identical to D152U except for pYCGPYAGT1-2HA[L55P,E167A]HD94identical to D152U except for TPI1pr-lacZ, with pYCGPYMAL21HD101identical to D152U except for ACT1pr::HOG1HD102identical to D152U except for ACT1pr::HOG1HD103identical to D152U except for ACT1pr::SKN7HD104identical to D152U except for ACT1pr::SKN7HD105identical to D152U except for ACT1pr::SK01HD106identical to D152U except for ACT1pr::SK01HD107identical to D152U except for TP11pr::RM101HD108identical to D152U except for TP11pr::RM15HD109identical to D152U except for TP11pr::RM15HD110identical to D152U except for TP11pr::RM15HD111identical to D152U except for TP11pr::RM15HD112identical to D152U except for TP11pr::RM15HD113identical to D152U except for TP11pr::RM51HD14identical to D152U except for TP11pr::RM51HD15identical to D152U except for TP11pr::		identical to D152MS except for pYCCPYMAL61[E161A]
HD70Identical to D1520 Except for pYCGPYAGT1-2HA[L557]HD82identical to D152U except for pYCGPYAGT1-2HA[L557]HD84identical to D152U except for pYCGPYAGT1-2HA[L557,E167A]HD85identical to D152MS except for pYCGPYAGT1-2HA[L557,E167A]HD86identical to D152MS except for pYCGPYAGT1-2HA[L557,E167A]HD87identical to D152U except for pYCGPYAGT1-2HA[L557,E167A]HD91identical to D152U except for pYCGPYAGT1-2HA[L557,E167A]HD92identical to D152U except for pYCGPYAGT1-2HA[L557,E167A]HD93identical to D152U except for pYCGPYMTT1HD94identical to D152U except for TPIIpr-lacz, with pYCGPYMAL21HD94identical to D152U except for ACT1pr::HOG1HD101identical to D152U except for ACT1pr::HOG1HD102identical to D152U except for ACT1pr::HOG1HD103identical to D152U except for ACT1pr::SKN7HD104identical to D152U except for ACT1pr::SKN7HD105identical to D152U except for ACT1pr::SKN7HD106identical to D152U except for ACT1pr::SK01HD107identical to D152U except for ACT1pr::SK01HD108identical to D152U except for TPIIpr::HSN101HD109identical to D152U except for TPIIpr::HSN2HD110identical to D152U except for TPIIpr::HSN2HD111identical to D152U except for TPIIpr::HSN15HD112identical to D152U except for TPIIpr::HSN2HD113identical to D152U except for TPIIpr::HSN31HD14identical to D152U except for TPIIpr::HSN31HD15identical to D152U except for TPIIpr::HSN31	HD76	identical to D152116 except for predit mixEd[[1017]
HD82Identical to D152/H3 Except for pYCGPYMAL21[E161A]HD84identical to D152U except for pYCGPYMAL21[E161A]HD85identical to D152U except for pYCGPYMAL21[E161A]HD86identical to D152MS except for pYCGPYAGT1-2HA[L55P,E167A]HD87identical to D152U except for pYCGPYAGT1-2HA[L55P,E167A]HD91identical to D152U except for pYCGPYAGT1-2HA[L55P,E167A]HD92identical to D152U except for pYCGPYMAL21HD93identical to D152U except for pYCGPYMTT1HD94identical to D152U except for TP11pr-lacZ, with pYCGPYMAL21HD101identical to D152U except for ACT1pr::HOG1HD102identical to D152U except for ACT1pr::HOG1HD103identical to D152U except for ACT1pr::HOT1HD104identical to D152U except for ACT1pr::SKN7HD105identical to D152U except for ACT1pr::SKN7HD106identical to D152U except for ACT1pr::SK01HD107identical to D152U except for ACT1pr::SK01HD108identical to D152U except for ACT1pr::SK01HD109identical to D152U except for TP11pr::RIM101HD101identical to D152U except for TP11pr::SK01HD102identical to D152U except for TP11pr::SK01HD103identical to D152U except for TP11pr::SK01HD104identical to D152U except for TP11pr::SK01HD105identical to D152U except for TP11pr::SK01HD106identical to D152U except for TP11pr::SK01HD110identical to D152U except for TP11pr::SK01HD111identical to D152U except for TP11pr::SK03HD112identical to D152U exc	1070 9701	identical to D1520 except for predicted TAGT1-2HA[155P]
H084Identical to D1520 except for pYCGPYAGT1-2HA[L55P,E167A]H085identical to D152W except for pYCGPYAGT1-2HA[L55P,E167A]H086identical to D152MS except for pYCGPYAGT1-2HA[L55P,E167A]H091identical to D152U except for pYCGPYAGT1-2HA[L55P,E167A]H092identical to D152U except for pYCGPYAGT1-2HA[L55P,E167A]H093identical to D152U except for pYCGPYMTT1H094identical to D152U except for TP11pr-lacZ, with pYCGPYMAL21HD101identical to D152W except for ACT1pr::HOG1HD102identical to D152U except for ACT1pr::HOG1HD103identical to D152U except for ACT1pr::SKN7HD104identical to D152U except for ACT1pr::SKN7HD105identical to D152U except for ACT1pr::SKN7HD106identical to D152U except for ACT1pr::SK01HD107identical to D152U except for ACT1pr::SK01HD108identical to D152U except for ACT1pr::SK01HD109identical to D152U except for ACT1pr::SK01HD101identical to D152U except for TP11pr::RIM101HD103identical to D152U except for TP11pr::SK01HD104identical to D152U except for TP11pr::SK01HD105identical to D152U except for TP11pr::SK01HD106identical to D152U except for TP11pr::RIM101HD19identical to D152U except for TP11pr::SK01HD110identical to D152U except for TP11pr::SK2HD111identical to D152U except for TP11pr::SK2HD112identical to D152U except for TP11pr::HSP31HD113identical to D152U except for TP11pr::HSP31HD14identical t		identical to D1521/15 except for pVCGPVMAL21[E161A]
HD85Identical to D1520 except for pYCGPYMAL21[E161A]HD86identical to D152MS except for pYCGPYMAL21[E161A]HD87identical to D152M except for pYCGPYSeAGT1HD91identical to D152U except for pYCGPYSeAGT1HD92identical to D152U except for pYCGPYMAL21HD93identical to D152U except for TP11pr-lacZ, with pYCGPYMAL21HD94identical to D152U except for ACT1pr::HOG1HD101identical to D152U except for ACT1pr::HOG1HD102identical to D152U except for ACT1pr::SN4HD103identical to D152U except for ACT1pr::SN7HD104identical to D152U except for ACT1pr::SK01HD105identical to D152U except for ACT1pr::SK01HD106identical to D152U except for ACT1pr::SK01HD107identical to D152U except for ACT1pr::SK2HD108identical to D152U except for TP11pr::RIM101HD109identical to D152U except for TP11pr::RIM101HD101identical to D152U except for ACT1pr::SK2HD103identical to D152U except for TP11pr::RIM101HD104identical to D152U except for ACT1pr::SK2HD105identical to D152U except for TP11pr::RIM101HD107identical to D152U except for TP11pr::RIM15HD110identical to D152U except for TP11pr::RIM15HD111identical to D152U except for TP11pr::ST11HD112identical to D152U except for TP11pr::ST11HD113identical to D152U except for TP11pr::ST11HD114identical to D152U except for TP11pr::ST11HD115identical to D152U except for TP11pr::ST11HD116		identical to D1520 except for pTCGFTMAL21[L101A]
HD86Identical to D152MS except for pYCGPYMAL21[E16JA]HD87identical to D152MS except for pYCGPYGGT1-2HA[L55P,E167A]HD91identical to D152U except for pYCGPYSeAGT1HD92identical to D152U except for pYCGPYMTT1HD93identical to D152U except for TPI1pr-lacZ, with pYCGPYMAL21HD94identical to D152U except for ACT1pr::HOG1HD101identical to D152U except for ACT1pr::HOG1HD102identical to D152U except for ACT1pr::SN4HD103identical to D152U except for ACT1pr::SN7HD104identical to D152U except for ACT1pr::SKN7HD105identical to D152U except for ACT1pr::SK01HD106identical to D152U except for ACT1pr::SK01HD107identical to D152U except for ACT1pr::SK01HD108identical to D152U except for TPI1pr::RIM101HD109identical to D152U except for TPI1pr::SK2HD108identical to D152U except for TPI1pr::RIM101HD109identical to D152U except for TPI1pr::RIM15HD110identical to D152U except for TPI1pr::RIM15HD111identical to D152U except for TPI1pr::RIM15HD112identical to D152U except for TPI1pr::RIM15HD113identical to D152U except for TPI1pr::HSP31HD144identical to D152U except for TPI1pr::ST11HD155identical to D152U except for TPI1pr::ST11HD166identical to D152U except for TPI1pr::ST11HD115identical to D152U except for TPI1pr::ST11HD116identical to D152U except for TPI1pr::ST11HD116identical to D152U except for TPI1pr::ST11 <td></td> <td>identical to DIS20 except for prCGPTAGTI-2HA[LSSF,E10/A]</td>		identical to DIS20 except for prCGPTAGTI-2HA[LSSF,E10/A]
HD87Identical to D152/MS except for pYCGPYAG11-2HA[L5SP,E16/A]HD91identical to D152U except for pYCGPYSeAGT1HD92identical to D152U except for pYCGPYSeAGT1HD93identical to D152U except for TPI1pr-lacZ, with pYCGPYMAL21HD94identical to D152U except for TPI1pr-lacZ, with pYCGPYMAL21HD101identical to D152U except for ACT1pr::HOG1HD102identical to D152U except for ACT1pr::MSN4HD103identical to D152U except for ACT1pr::SKN7HD104identical to D152U except for ACT1pr::SKN7HD105identical to D152U except for ACT1pr::SK01HD106identical to D152U except for ACT1pr::SK01HD107identical to D152U except for ACT1pr::SK2HD108identical to D152U except for ACT1pr::SK2HD109identical to D152U except for TPI1pr::RIM101HD101identical to D152U except for TPI1pr::SK2HD110identical to D152U except for TPI1pr::RIM101HD110identical to D152U except for TPI1pr::RIM15HD111identical to D152U except for TPI1pr::RIM15HD112identical to D152U except for TPI1pr::HSP82HD113identical to D152U except for TPI1pr::HSP31HD14identical to D152U except for TPI1pr::ST11HD15identical to D152U except for ACT1pr::ST11HD16identical to D152U except for ACT1pr::ST11HD16identical to D152U except for ACT1pr::ST11HD16identical to D152U except for TPI1pr::ST11HD16identical to D152U except for TPI1pr::ST11HD16identical to D152U except for ACT1pr::ST11 </td <td></td> <td>identical to DIS2MS except for programALZI[EI0IA]</td>		identical to DIS2MS except for programALZI[EI0IA]
HD91identical to D1520 except for pYCGPYSeAG11HD92identical to D1520 except for pYCGPYMTT1HD93identical to D1520 except for TPI1pr-lacZ, with pYCGPYMAL21HD94identical to D152MS except for TPI1pr-lacZ, with pYCGPYMAL21HD101identical to D1520 except for ACT1pr::HOG1HD102identical to D152U except for ACT1pr::HOG1HD103identical to D152U except for ACT1pr::KNN4HD104identical to D152U except for ACT1pr::KN7HD105identical to D152U except for ACT1pr::SKN7HD106identical to D152U except for ACT1pr::SK01HD107identical to D152U except for ACT1pr::SK01HD108identical to D152U except for ACT1pr::RIM101HD109identical to D152U except for TPI1pr::RIM101HD110identical to D152U except for TPI1pr::RIM15HD111identical to D152U except for TPI1pr::RIM15HD112identical to D152U except for TPI1pr::RIM15HD113identical to D152U except for TPI1pr::B711HD14identical to D152U except for TPI1pr::HSF1HD15identical to D152U except for TPI1pr::HSF1	HD87	identical to D152MS except for pYCGPYAGT1-2HA[L55P,E167A]
HD92Identical to D1520 except for pPCGPYMTT1HD93identical to D1520 except for TP11pr-lacZ, with pYCGPYMAL21HD94identical to D152MS except for TP11pr-lacZ, with pYCGPYMAL21HD101identical to D152U except for ACT1pr::HOG1HD102identical to D152U except for ACT1pr::HOG1HD103identical to D152U except for ACT1pr::KNV4HD103identical to D152U except for ACT1pr::KN7HD104identical to D152U except for ACT1pr::SKN7HD105identical to D152U except for ACT1pr::SK01HD106identical to D152U except for ACT1pr::SK01HD107identical to D152U except for ACT1pr::SK01HD108identical to D152U except for ACT1pr::RIM101HD109identical to D152U except for TP11pr::IG01HD110identical to D152U except for TP11pr::RIM15HD111identical to D152U except for TP11pr::BS82HD112identical to D152U except for TP11pr::HSP82HD113identical to D152U except for TP11pr::HSP31HD114identical to D152U except for TP11pr::ST11HD115identical to D152U except for ACT1pr::ST11HD116identical to D152U except for ACT1pr::HSF1	HD91	identical to D152U except for pYCGPYSeAG11
HD93Identical to D152U except for TPI1pr-lacZ, with pYCGPYMAL21HD94identical to D152MS except for TPI1pr-lacZ, with pYCGPYMAL21HD101identical to D152U except for ACT1pr::HOG1HD102identical to D152U except for ACT1pr::MSN4HD103identical to D152U except for ACT1pr::KN7HD104identical to D152U except for ACT1pr::SKN7HD105identical to D152U except for ACT1pr::SK01HD106identical to D152U except for ACT1pr::SK01HD107identical to D152U except for ACT1pr::SK2HD108identical to D152U except for ACT1pr::RIM101HD109identical to D152U except for TPI1pr::RIM101HD101identical to D152U except for TPI1pr::RIM15HD110identical to D152U except for TPI1pr::RIM15HD111identical to D152U except for TPI1pr::RIM15HD112identical to D152U except for TPI1pr::HSP82HD113identical to D152U except for TPI1pr::HSP31HD14identical to D152U except for TPI1pr::ST11HD15identical to D152U except for TPI1pr::HSP31HD114identical to D152U except for TPI1pr::HSP31HD115identical to D152U except for TPI1pr::HSP31HD116identical to D152U except for TPI1pr::HSF1	HD92	identical to D152U except for pYCGPYMT1
HD94identical to D152MS except for TP11pr-lac2, with pYCGPYMAL21HD101identical to D152U except for ACT1pr::HOG1HD102identical to D152U except for ACT1pr::MSN4HD103identical to D152U except for ACT1pr::HOT1HD104identical to D152U except for ACT1pr::SKN7HD105identical to D152U except for ACT1pr::SK01HD106identical to D152U except for ACT1pr::SK01HD107identical to D152U except for ACT1pr::RIM101HD108identical to D152U except for ACT1pr::RIM101HD109identical to D152U except for TP11pr::RIM15HD110identical to D152U except for TP11pr::RIM15HD111identical to D152U except for TP11pr::RIM15HD112identical to D152U except for TP11pr::HSP82HD113identical to D152U except for TP11pr::HSP31HD14identical to D152U except for TP11pr::ST11HD16identical to D152U except for TP11pr::ST11	HD93	identical to D152U except for TPI1pr-IacZ, with pYCGPYMAL21
HD101identical to D152U except for ACT1pr::HOG1HD102identical to D152U except for ACT1pr::MSN4HD103identical to D152U except for ACT1pr::HOT1HD104identical to D152U except for ACT1pr::SKN7HD105identical to D152U except for ACT1pr::CR21HD106identical to D152U except for ACT1pr::SK01HD107identical to D152U except for ACT1pr::PSK2HD108identical to D152U except for ACT1pr::RIM101HD109identical to D152U except for TPI1pr::RIM15HD110identical to D152U except for TPI1pr::RIM15HD111identical to D152U except for TPI1pr::HSP82HD112identical to D152U except for TPI1pr::HSP31HD113identical to D152U except for TPI1pr::HSP31HD115identical to D152U except for TPI1pr::ST11HD116identical to D152U except for TPI1pr::ST11	HD94	identical to D152MS except for TPI1pr-lacZ, with pYCGPYMAL21
HD102identical to D152U except for ACT1pr::MSN4HD103identical to D152U except for ACT1pr::HOT1HD104identical to D152U except for ACT1pr::SKN7HD105identical to D152U except for ACT1pr::CRZ1HD106identical to D152U except for ACT1pr::SK01HD107identical to D152U except for ACT1pr::PSK2HD108identical to D152U except for ACT1pr::RIM101HD109identical to D152U except for TPI1pr::RIM15HD110identical to D152U except for TPI1pr::RIM15HD111identical to D152U except for TPI1pr::HSP82HD112identical to D152U except for TPI1pr::HSP31HD113identical to D152U except for TPI1pr::HSP31HD115identical to D152U except for TPI1pr::ST11HD116identical to D152U except for TPI1pr::ST11	HD101	identical to D152U except for ACT1pr::HOG1
HD103identical to D152U except for ACT1pr::HOT1HD104identical to D152U except for ACT1pr::SKN7HD105identical to D152U except for ACT1pr::CR21HD106identical to D152U except for ACT1pr::SK01HD107identical to D152U except for ACT1pr::PSK2HD108identical to D152U except for ACT1pr::RIM101HD109identical to D152U except for TPI1pr::RIM15HD110identical to D152U except for TPI1pr::RIM15HD111identical to D152U except for TPI1pr::HSP82HD112identical to D152U except for TPI1pr::HSP82HD113identical to D152U except for TPI1pr::HSP31HD14identical to D152U except for TPI1pr::ST11HD16identical to D152U except for TPI1pr::ST11	HD102	identical to D152U except for ACT1pr::MSN4
HD104identical to D152U except for ACT1pr::SKN7HD105identical to D152U except for ACT1pr::CRZ1HD106identical to D152U except for ACT1pr::SKO1HD107identical to D152U except for ACT1pr::PSK2HD108identical to D152U except for ACT1pr::RIM101HD109identical to D152U except for TPI1pr::IGO1HD110identical to D152U except for TPI1pr::RIM15HD111identical to D152U except for TPI1pr::HSP82HD112identical to D152U except for TPI1pr::HSP82HD113identical to D152U except for TPI1pr::HSP31HD14identical to D152U except for TPI1pr::HSP31HD15identical to D152U except for TPI1pr::STI1HD16identical to D152U except for TPI1pr::HSF1	HD103	identical to D152U except for ACT1pr::HOT1
HD105identical to D152U except for ACT1pr::CRZ1HD106identical to D152U except for ACT1pr::SK01HD107identical to D152U except for ACT1pr::PSK2HD108identical to D152U except for ACT1pr::RIM101HD109identical to D152U except for TPI1pr::IG01HD110identical to D152U except for TPI1pr::RIM15HD111identical to D152U except for TPI1pr::HSP82HD112identical to D152U except for TPI1pr::HSP82HD113identical to D152U except for TPI1pr::HSP31HD14identical to D152U except for TPI1pr::HSP31HD15identical to D152U except for TPI1pr::STI1HD16identical to D152U except for ACT1pr::HSF1	HD104	identical to D152U except for ACT1pr::SKN7
HD106identical to D152U except for ACT1pr::SK01HD107identical to D152U except for ACT1pr::PSK2HD108identical to D152U except for ACT1pr::RIM101HD109identical to D152U except for TPI1pr::IGO1HD110identical to D152U except for TPI1pr::RIM15HD111identical to D152U except for TPI1pr::HSP82HD112identical to D152U except for TPI1pr::MDJ1HD113identical to D152U except for TPI1pr::HSP31HD114identical to D152U except for TPI1pr::HSP31HD115identical to D152U except for TPI1pr::STI1HD116identical to D152U except for ACT1pr::HSF1	HD105	identical to D152U except for ACT1pr::CRZ1
HD107identical to D152U except for ACT1pr::PSK2HD108identical to D152U except for ACT1pr::RIM101HD109identical to D152U except for TPI1pr::IGO1HD110identical to D152U except for TPI1pr::RIM15HD111identical to D152U except for TPI1pr::HSP82HD112identical to D152U except for TPI1pr::UBI4HD113identical to D152U except for TPI1pr::MDJ1HD114identical to D152U except for TPI1pr::HSP31HD115identical to D152U except for TPI1pr::STI1HD116identical to D152U except for ACT1pr::HSF1	HD106	identical to D152U except for ACT1pr::SKO1
HD108identical to D152U except for ACT1pr::RIM101HD109identical to D152U except for TPI1pr::IGO1HD110identical to D152U except for TPI1pr::RIM15HD111identical to D152U except for TPI1pr::HSP82HD112identical to D152U except for TPI1pr::UBI4HD113identical to D152U except for TPI1pr::MDJ1HD114identical to D152U except for TPI1pr::HSP31HD115identical to D152U except for TPI1pr::STI1HD116identical to D152U except for ACT1pr::HSF1	HD107	identical to D152U except for ACT1pr::PSK2
HD109identical to D152U except for TPI1pr::IGO1HD110identical to D152U except for TPI1pr::RIM15HD111identical to D152U except for TPI1pr::HSP82HD112identical to D152U except for TPI1pr::UBI4HD113identical to D152U except for TPI1pr::MDJ1HD114identical to D152U except for TPI1pr::HSP31HD15identical to D152U except for TPI1pr::STI1HD16identical to D152U except for ACT1pr::HSF1	HD108	identical to D152U except for ACT1pr::RIM101
HD110identical to D152U except for TPI1pr::RIM15HD111identical to D152U except for TPI1pr::HSP82HD112identical to D152U except for TPI1pr::UBI4HD113identical to D152U except for TPI1pr::MDJ1HD114identical to D152U except for TPI1pr::HSP31HD115identical to D152U except for TPI1pr::STI1HD116identical to D152U except for ACT1pr::HSF1HD117identical to D152U except for TPI1pr::SCT1	HD109	identical to D152U except for TPI1pr::IGO1
HD111identical to D152U except for TPI1pr::HSP82HD112identical to D152U except for TPI1pr::UBI4HD113identical to D152U except for TPI1pr::MDJ1HD114identical to D152U except for TPI1pr::HSP31HD115identical to D152U except for TPI1pr::STI1HD116identical to D152U except for ACT1pr::HSF1HD117identical to D152U except for ACT1pr::HSF1	HD110	identical to D152U except for TPI1pr::RIM15
HD112identical to D152U except for TPI1pr::UBI4HD113identical to D152U except for TPI1pr::MDJ1HD114identical to D152U except for TPI1pr::HSP31HD115identical to D152U except for TPI1pr::STI1HD116identical to D152U except for ACT1pr::HSF1HD117identical to D152U except for TPI1pr::SCT1	HD111	identical to D152U except for TPI1pr::HSP82
HD113identical to D152U except for TPI1pr::MDJ1HD114identical to D152U except for TPI1pr::HSP31HD115identical to D152U except for TPI1pr::STI1HD116identical to D152U except for ACT1pr::HSF1HD117identical to D152U except for TPI1pr::SCT1	HD112	identical to D152U except for TPI1pr::UBI4
HD114identical to D152U except for TPI1pr::HSP31HD115identical to D152U except for TPI1pr::STI1HD116identical to D152U except for ACT1pr::HSF1HD117identical to D152U except for TPI1pr::SCT1	HD113	identical to D152U except for TPI1nr::MD11
HD115 identical to D1520 except for TPI1pr::STI1 HD116 identical to D152U except for ACT1pr::HSF1 identical to D152U except for TPI1pr::SCT1	HD114	identical to D152U except for TPI1pr+HSP31
HD116 identical to D152U except for ACT1pr::HSF1 identical to D152U except for ACT1pr::HSF1	HD115	identical to D152U except for TPI1pr. STI1
HD117 identical to D1520 Except for TDI1pr::SCT1	HD116	identical to D152U except for ACT1pr::HSE1
	HD117	identical to D152U except for TPI1nr+SGT1

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 ∆gpr1
HD152	identical to D152MS except for ∆gpr1
HH1152	X2180-1A except for ura3 ∆
HH1153	X2180-1A except for ura3D TDH3pr::MAL62
E.coli	
	F-, Φ80d lacZΔM15, Δ(lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1,
UTUU	hsdR17(rK- mK+), phoA, supE44, λ–, thi-1, gyrA96, relA1

表 4-1 第4章で用いた株(続き)

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 *PAD1*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 *Eco*RV で消化した断片を用いて、染色体の *URA3*にトランスポータ 一発現ユニットと *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 µg/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, pJHGMTT1[D46G]MAL62, pJHGMT11MAL62, pJHGMAL21MAL62MTT1[D46G], pJHGMAL61MAL62MTT1 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。

No.	Sequence	Note
1	-TAGAGGATCCAGATCTGGATCCGGTACCGAGTTATTTGACGAGGTAGATTCT-	MAL62 cloning
2	5'-TAAACAGAATTCGAGATGACTATTTCTGATCATCCAG-3'	MAL62 cloning
3	5'-GTTTAAACGTCGGATGGCAATCCATTA-3'	Inter ORF near HXT12
4	5'-GTTTAAACTATGACCGCGTGTTTTCG-3'	Inter ORF near HXT12
5	5'-CGGCCGTTTAAACGCGTCGGATGGCAATCCATTA-3'	Inter ORF near YIL169C
6	5'-CGTTTAAACGCGGCCTATGACCGCGTGTTTTCG-3'	Inter ORF near YIL169C
7	5'-CGGCCGTTTAAACGCGATAACTGAGGGATTTCCCC-3'	GPR1 disruption
, 8	5'-CCCGGCGCGCGGGCCCATTATGGCCATGTCTGCAC-3'	GPR1 disruption
9	5'-CCCGGCGCGCGCGCGCGCATTATGGCGATGTCTGCAG 5'	GPR1 disruption
10	5'-CGGCCGTTTAAACGCATTATCGTTCTGCGCCTC-3'	GPR1 disruption
11	5'-GTTTAAACCAAGGGGGAAGAATGCAA-3'	Inter ORF near MGA1
12	5'-GTTTAAACTTCGGCTCTTCTGCAGCTA-3'	Inter ORF near MGA1
13	5'-CGGCCGTTTAAACGCATTATTTTCAACAGAACACA-3'	Inter ORF near YGR250C
14	5'-CGTTTAAACGCGGCCATTGCATCAGGTCCATAAAAT-3'	Inter ORF near YGR250C
15	5'-AGCAGGCTCCGCAGGCCTATTTAATGACCACTAACGAGGAA-3'	pI6S_ACT1p-HOG1-05
16	5'-AAGCTGGGTCGGAGGCCTTACTGTTGGAACTCATTAG-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 CTATATTCCAGCAAGGCTCTC-3'	pI6S_ACT1p-HOT1-05
21	5'-AGCAGGCTCCGCAGGCCTATGAGCTTTTCCACCATA-3'	pI6S_ACT1p-SKN7-05
22	5'-AAGCTGGGTCGGAGGCCTTATGATAGCTGGTTTTC-3'	pI6S ACT1p-SKN7-05
23	5'-AGGCCTATGTCATTCAGCAACGGA-3'	pI6S ACT1p-CRZ1-05
24	5'-AGGCCTTAACTCTCTTGTCCCGA-3'	pI6S ACT1p-CRZ1-05
25	5'-AGCAGGCTCCGCAGGCCTATGTCAAGCGAGGAACGCTC-3'	pI6S_ACT1p-SKO1-05
26	5'-AAGCTGGGTCGGAGGCCTCAATTATTGTGAGGTAGAG-3'	pI6S_ACT1p-SKO1-05
27	5'-AAAAGCAGGCTCCGCGATATCATGGTGCCATTGGAAGATC-3'	pI6S_ACT1p-RIM101-05
28	5'-AGAAAGCTGGGTCG GATA TCATACCAAAATTTTGGG-3'	pI6S_ACT1p-RIM101-05
29	5'-AGCAGGCTCCGCAGGCCTATTTAATGTCGAATGAAAACTTATC-3'	pI6S_TPI1p-IGO1-05
30	5'-AAGCTGGGTCGGAGGCC TTATCTAATGGGTGATTCAG-3'	pI6S_TPI1p-IGO1-05
31	5'-AGCAGGCTCCGCAGGCCTATTTAATGTTCAATAGAAGTAACACCG-3'	pI6S_TPI1p-RIM15-05
32	5'-AAGCTGGGTCGGAGGCCTCAGTGCGTTTCATCAGAATC-3'	pI6S_TPI1p-RIM15-05
33	5'-AAAAGCAGGCTCCGCGACGCGCGTCATGGCTAGTGAAACTTTTG-3'	pI6S_TPI1p-HSP82-05
34	5'-AGAAAGCTGGGTCG GACGCGCGTCTAATCTACCTCTTCCATTTCGG-3'	pI6S_TPI1p-HSP82-05
35	5'-AGCAGGCTCCGCAGGCCTATTTAATGCAGATTTTCGTCAAGAC-3'	pI6S_TPI1p-UBI4-05
36	5'-AAGCTGGGTCGGAGGCC TCAGTTACCACCCCTCAAC-3'	pI6S_TPI1p-UBI4-05
37	5'-AGCAGGCTCCGCAGGCCTATTTAATGGCTTTCCAACAAGGTG-3'	pI6S_TPI1p-MDJ1-05
38	5'-AAGCTGGGTCGGAGGCCTTAATTTTTTTGTCACC-3'	pI6S_TPI1p-MDJ1-05
39	5'-AGCAGGCTCCGCAGGCCTATTTAATGGCCCCAAAAAAAGTT-3'	pI6S_TPI1p-HSP31-05
40	5'-AAGCTGGGTCGGAGGCCTCAGTTTTTTAAAGCGTCG-3'	pI6S_TPI1p-HSP31-05
41	5'-AGCAGGCTCCGCAGGCCTATTTAATGTCATTGACAGCCGATG-3'	pI6S_TPI1p-STI1-05
42	5'-AAGCTGGGTCGGAGGCCTTAGCGGCCAGTCCGGATGATA-3'	pI6S_TPI1p-STI1-05
43	5'-CAGGCTCCGCGACGCGCGTCATTTAATGAATAATGCTGCAAATAC-3'	pI6S_ACT1p-HSF1-05
44	5'-AGCTGGGTCGGACGCGCGTCTATTTCTTAGCTCGTTTG-3'	pI6S_ACT1p-HSF1-05
45	5'-AGCAGGCTCCGCAGGCCTATTTAATGCCTGTTGAAAAAGAT-3'	pl6S_IPI1p-SGT1-05
46	5'-AAGCTGGGTCGGAGGCCTTACCAATGTTTAGGTTCC-3'	pl6S_IPI1p-SGT1-05
47	5'-AGCAGGCTCCGCAGGCCTATTAAAGAAACTAAG-3'	pl6S_IPI1p-YDJ1-05
48	5'-AAGCTGGGTCGGAGGCCTCATTGAGATGCACATTGAAC-3'	pl6S_IPI1p-YDJ1-05
49	5'- I I CUGA I GLI GAAAAGACG-3'	PI65_IPI1p-SSE1-05
50		pl6S_IPI1p-SSE1-05
51		PI65_ACT 1P-SCH9-05
52	5'-GAUGUGUGILATATITUGAATUTUUAU-3'	P165_AC1 1P-SCH9-05

表 4-2 第4章で用いたプライマー

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'-ATTAATCGGATCAGGCCTTAATCAACTTCTTCGAC-3'	pI6S_TPI1p-SSA1-05
57	5'-AGCAGGCTCCGCAGGCCTATTTAATGTTAAGACAAGCTACAAAAGC-3'	pI6S_TPI1p-HSP78-05
58	5'-AAGCTGGGTCGGAGGCCTTACTTTTCAGCTTCCTC-3'	pI6S_TPI1p-HSP78-05
59	5'-TTTACTGAATTAACAGGCCTATGGTAATACAAACTGCTAC-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'	verivfication Expression unit (YGR250)
64	5'-TGAACGTAGGGAAGAACG-3'	verivfication Expression unit (MGA1)
65	5'-ATTACGCTCCCGTTAGGAAC-3'	verivfication Expression unit (TPI1p)
66	5'-CGTCATTTTCGCGTTGAG-3'	verivfication Expression unit (TPI1t)
67	5'-GGTTTGAGTAGAAAGGGGAAGG-3'	verivfication Expression unit (ACT1p)
68	5'-TAAGCACTGACTTTATCTAC-3'	verivfication Expression unit ACT1t)
69	5'-GAAATATGGAGGGTGGCTTG-3'	verification of GPR1 disruption
70	5'-CCCTCTGAAGCGTATACTGTGG-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'-TTACTTGGTTCTGGCGAGGT-3'	verification of Ex. unit to URA3
74	5'-CCCAGCCTACTGCAAAGC-3'	verification of Ex. unit to URA3
75	5'-GGGCCCACTAGATCGGCCGCAAGCTTACCAGTTCTCACA-3'	TDH3pF1 (pUP3GLP)
76	5'-CGGGCATTTAAATGCGGCCGCAAGCTTTCAATCAATGAATCGA-3'	TDH3tR1 (pUP3GLP)
77	5'-TGACGAGGTAGATTCTACCTTC-3'	Quantitative PCR for MAL32
78	5'-GCAAGGAATCAATGTTGAGCAG-3'	Quantitative PCR for MAL32
79	5'-CGCAAGAAAACTATCCCGACC-3'	Quantitative PCR for lacZ
80	5'-CGGTATTTTTGACACCAGACCA-3'	Quantitative PCR for lacZ
81	5'-TTCACTTTGTATGGTGATGGTGC-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-BamHI あるいは BamHI 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 *Not*I で *LacZ* 遺伝子を切り出し平滑化して、pJHXSBP (pJHXSB の *Bam*HI サイトの後ろに *Pme*I サイトを導入したプラスミド) の *Pme*I サイ トに挿入した。そのプラスミドより、*Not*I で *TPI1p::LacZ::TPI1t*を切り出し、pI19-05 (図 4-1D) の *Eco*RV 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 *Not* I 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 *Apa*I サイトに、プラスミ ドpBGIN11-05 (図4・1F) (57) から *Fse*I で切り出した *FRT::NatR::GAL1::GIN11::FRT*ユ ニットを導入し、pBGIN11-05Δgpr1 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、*Sacl-Bam*HI 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 *Psp*OMI と *Not*I 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 *Asc*I サイトで組み換え、さらに *Not*1 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。

79



A. pUP3GLPMAL62







G. pJHACT1pt



B. pUP3GLP



E. pMCS1



H. pl6S-05



C. pl19_TPl1p-LacZ-05



F. pBGIN11-05



I. pI6S_ACT1p-XXX05



J. pI6S_TPI1p-XXX05



K. pYR-HFLPG





L. pJHGMAL62



M. pJHGMAL21MAL62

図 4-14 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ティシン (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

		高濃度麦汁		標準麦汁		中麦芽麦汁		低麦芽麦汁		
	項目	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 ₂ (g)	4.8	14.3	4.8	14.3	7.6	11.4	7.6	11.4	
4	$CaSO_4 \cdot 2H_2O(g)$	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		E	3	E	3	
	煮沸前 液量 (kg)	71.0		110.0		65	5.5	22	2.0	
	煮沸前 エキス (w/w %)	17.0		11	.0	14.0		14.0		
6	水あめ(75%) (kg)	-	-	-		12	12.7		13.0	
7	水 (L)	-		-		31.8		75.0		
8	ホップ (g)	6	65		97		97		97	
	最終狙いエキス (w/w %)	2	0	13		17		14		

表 4-3 麦汁原料配合、	煮沸前・	最終狙いエキス
---------------	------	---------

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、一晩振とう前培養し、YP5D, YP4D1M あるいは YP5M 培 地に OD₆₆₀=1.0 となるように植菌した。30°C で振とう培養し、2,4,6h に酵母細胞を集菌 し、細胞は破砕用バッファー (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 μ 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砕した。これを遠心 (4°C, 9000×*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-α-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/μM/cm としてタンパク質あたりの マルターゼ比活性 (μmol/min/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℃、一晩振とう前培養し、YP5D, YP4D1M, YP5M に OD₆₆₀ = 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 (OD₆₆₀×ml=10 にあたる細胞量を意味する。[39])の 細胞を 450 μl の同バッファーに懸濁し、基質として、0.4 μCi [¹⁴C]マルトース (Amersham) あるいは 0.4 μCi [¹⁴C]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=0.05×0.05×0.1×100=2.5×10⁻² mm³)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×D×0.04×10⁶ 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 MgCl2、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 µl, 300 µl 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℃でインキュベートした。10 µl の glucose-6P dehydrogenase (500 IU/ml,) と 20 µl 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 dehydrogenase によって glucono-γ-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。

 $(IU/ml) = \Delta A340/min \cdot V \cdot D/(6.2 \cdot d \cdot v) = \Delta A340/min \cdot 3.0 \cdot l/(6.2 \cdot l \cdot 0.02)$

△A340/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 (±0.3 µg/ml シクロヘキシミド) に OD₆₆₀=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 β-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 (OD₆₆₀×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、ベータ–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-β-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 µl 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 (OD₆₆₀×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 μm 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 = $2 \div 5 \div 2$, 8.9 µl 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 µl の上澄みを取り、400 µl の水と混合した。さらに遠心後上澄みを 400 µl づつ 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 μl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 µl 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) & 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 µm 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℃, 2 min 保った後、80℃ から 330℃ に 15℃/min で昇温さ せ、その後 330 ℃ で 6 min 保持した。transfer line 温度は 250℃ 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 Aloutput (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 µl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 H₂O、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 (OD₆₆₀×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+や K+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 =目的ピークの面積値 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 ^注とした。

注) 質量誤差 (ppm) = (実測值-理論値) / 実測値×106

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 (OD₆₆₀=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℃)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ーの 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 (℃)	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 21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、OD₆₆₀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, pJHGMTT1[D46G]MAL62, pJHGMTT1MAL62, pJHGMAL21MAL62MTT1[D46G], pJHGMAL61MAL62MTT1)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 μl のサンプリングを行い、デジタル糖度計 (ATAGO PR-101α) 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 (GlDH) と NADH の存在下で、ア ンモニアを 2・オキソ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 volataile 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、10.0g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 2.1gを35.0gのエタノールで溶解した後、純水で1L 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℃

オーブン温度: $40^{\circ}C(5 \text{ min}) \rightarrow 昇温 20^{\circ}C/\text{min}(5 \text{ min}) \rightarrow 140^{\circ}C(1 \text{ min})$

検出器 (FID) : 温度 200°C、H₂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2×10⁵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)。

(1) エタノール + NAD+ \rightarrow アセトアルデヒド + NADH + H+

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。

(2) アセトアルデヒド + NAD+ + H₂O→酢酸 + NADH + H+

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 (Agillent technologies) によって、 PCA 解析、フォー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α-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α-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 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 α-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 α-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: 1,10⁻¹, 10⁻²

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: 1,10⁻¹, 10⁻²

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。

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 *Eco*RV 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





Dilution rate: 1, 10⁻¹, 10⁻²

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、2h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 (2h) 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	MAL61p::MAL61	MAL62p::MAL62	YP5D
AM	ATCC96955	MAL61p::MAL61	MAL62p::MAL62	YP5M
AMD	ATCC96955	MAL61p::MAL61	MAL62p::MAL62	YP4D1M
UD	HD17	PYK1p::MAL21	MAL62p::MAL62	YP5D
UM	HD17	PYK1p::MAL21	MAL62p::MAL62	YP5M
UMD	HD17	PYK1p::MAL21	MAL62p::MAL62	YP4D1M
MSD	HD49	PYK1p::MAL21	TDH3p::MAL62	YP5D
MSM	HD49	PYK1p::MAL21	TDH3p::MAL62	YP5M
MSMD	HD49	PYK1p::MAL21	TDH3p::MAL62	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。

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	р3	Compound_Name	р3
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

っまり 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。

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。



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。

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	e -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-Bisphophoglycerate	-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	a-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-Bisphophoglycerate	-0.0428
β-Glycerophosphate	0.0539	Inositol	-0.0023	Fructose-2,6P	0.0657	a-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

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]	MAL62p::MAL62	YP5D
UM	HD76	<i>PYK1p::AGT1-2HA</i> [L55P]	MAL62p::MAL62	YP5M
US	HD76	<i>PYK1p::AGT1-2HA</i> [L55P]	MAL62p::MAL62	YP5S
UDM	HD76	<i>PYK1p::AGT1-2HA</i> [L55P]	MAL62p::MAL62	YP4D1M
UDS	HD76	<i>PYK1p::AGT1-2HA</i> [L55P]	MAL62p::MAL62	YP4D1S
MSD	HD82	<i>PYK1p::AGT1-2HA</i> [L55P]	TDH3p::MAL62	YP5D
MSM	HD82	<i>PYK1p::AGT1-2HA</i> [L55P]	TDH3p::MAL62	YP5M
MSS	HD82	<i>PYK1p::AGT1-2HA</i> [L55P]	TDH3p::MAL62	YP5S
MSDM	HD82	<i>PYK1p::AGT1-2HA</i> [L55P]	TDH3p::MAL62	YP4D1M
MSDS	HD82	<i>PYK1p::AGT1-2HA</i> [L55P]	TDH3p::MAL62	YP4D1S

表 4-9 実験 2 条件

因子負荷量を表 4-10 に示した。

GC/MS 分析(2h)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、細胞増殖に関係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。

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

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

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





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 主成分解析 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- $(2 \rightarrow 1)$ - α -D-glucopyranoside) の他にツ ラノー ス $(\alpha$ -D-glucopyranosyl- $(1 \rightarrow 3)$ - α -D-fructofuranose) ケ ス F P ス (1-O-B-D-Fructofuranosyl-B-D-fructofuranosyl a-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。

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
a-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	a-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

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

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、 Glc: Glucose, Mal: Maltose 160 min 後でも十分な取り込み





HD17: MAL21, HD49: MAL21, 構成性マルターゼ

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

			-21 <u>6</u>
Medium	Glucose	Maltose	Vect MAL MAL
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%	

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, 10⁻¹, 10⁻²

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

ではマルトースが多いが1h後には減少し始め、2h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30min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。

101


図 4-14 精濃度の異なる培地で培養した細胞の細胞抽出液精濃度

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 ³
HD17	1.67×10^{7}	5.18	72.7
HD49	1.68×10^{7}	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2h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)、phophofructokinase 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 ともほぼ同じ 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+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 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

はないと考えられる。YP 4 D1M 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ニ リン酸と IMP を除く全てのヌクレオチドーリン酸は、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



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ソ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へ



キソキナーゼの反応を、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ソキナー ゼ活性に与える影響

グルコースが 15 mM, maltose が 0 mM でのヘキソキナーゼ活性を 100%とした た (図 4-21)。その結果、マルトースが 70 mM あってもヘキソキ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、細胞周辺部に関係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) に関係する遺 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 に関係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 のインテンシティーを示した。

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 μ M (77)、またウサギの筋肉の同酵素では 4.41 μ M (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, CWP1, 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

110

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

表 4-13 UMD で MSMD よりも 3 倍以上発現量の高い遺伝子

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中間代謝物の一つ 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、酸化的ストレス、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 (Agillent 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, SK01, PSK2, RIM101, IG01, 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, 10⁻¹, 10⁻²
 Strain
 D152U
 D152MS

 MAL21
 +
 +

 GAC1
 A
 OE
 A
 OE
 A
 OE
 A
 OE

 YP5D
 Image: Constraint of the state of th

Dilution

Δ: 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

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

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β-ガラクトシダーゼ遺伝子 (*lac2*) を 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* 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±シクロへキシミドの 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±シクロへキ シミドで活性に差があり、シクロへ 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

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±シクロへ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





HD94: HD49 (TPI1p::lacZ)

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であるように思われる。

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 α-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、α-グルコシドトランスポーター を発現する際には、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





測定した細胞抽出液のマルターゼ活性 (μmol/min/ml) をタンパク質濃度 (mg/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、α-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 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 α-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), OD₆₆₀, 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: OD₆₆₀、
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、左: 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 α-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 能がへ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、左: 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, *r*-butanol, amylalcohol (*n*-amylalcohol +*r*-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。

	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-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
1 1 1 1.	1	1 1 1.		1 1					nnm

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

amylalcohol: *n*-amylalcohol+*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:
 OD₆₆₀、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



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 *m*-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が、マルトーストランスポータ





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) ーに比ベ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 α⁻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、α-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 α-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 のどちらもが 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+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)、 phophofructokinase 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4h 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%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2h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4hの停止の後、合成を開始した。YP5Mで培養した HD17では培養1h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αサブユニット (eIF2α) 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_{Met}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、これを構成的に発 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α-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、α-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 α-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 α-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て、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 α-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α-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・α-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ヘ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 α-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・α-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 α-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 ティーを持ち、マルトース、マルト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の実験室株に形質 転換し、 マルト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ーがあり、マルトースとマ ルト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、α-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 a-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 α-ヘリックスと 予測された。それに対して Mal21p では His18-Lys42 がα-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 α-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ョ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ーを 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た。 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 α-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ョンが律速と 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・α-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・α-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、α-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1h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[C14]・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へ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 後にもシクロへ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に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 α-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、 α-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、a・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、a・

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に、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、α-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、a-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ーニング 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α-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 heterogenity 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。

α-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) Wolfgung 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 *Sacchar omyces 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., Haguenauer-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, EK., 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., Haguenauer-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?
 生物工学 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 α 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) <u>Haruyo Hatanaka</u>, 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) <u>Haruyo Hatanaka</u>, 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α-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 iactivation/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α-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α-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α-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

- 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
- 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
- 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.