



Title	実用酵母における分子育種技術の開発
Author(s)	中沢, 伸重
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3081513
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名	中 沢 伸 重
博士の専攻分野の名称	博 士 (工 学)
学 位 記 番 号	第 1 1 6 1 7 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 6 年 1 2 月 2 2 日
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学 位 論 文 名	実 用 酵 母 に お け る 分 子 育 種 技 術 の 開 発
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 大 嶋 泰 治 教 授 山 田 靖 宙 教 授 今 中 忠 行 教 授 吉 田 敏 臣

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、実用酵母に対し接合能を付与すること、優性遺伝子符号の導入による新しい分子育種技術を開発し、実際に酒造現場で使用されている *Saccharomyces cerevisiae* 株に対して応用可能であることを示した研究をとりまとめたものであり、序章、本文4章および総合考察からなっている。

序章では、実用酵母の分子育種に関する既往の研究を紹介し、本研究の目的と意義および本論文の概略を述べている。

第1章では、遺伝学研究株を用いて接合型改変を目的にその制御に関わる新しい遺伝子の検索を試み、酵母の接合型支配における $\alpha 2$ 抑制は正常であるが $a1 - \alpha 2$ 抑制能を欠損した *aar2* 変異を分離している。さらに *AAR2* 遺伝子がイントロンを持つ *MATa1* 転写産物のスプライシングに関与することを明らかにしている。

第2章では、*S. cerevisiae* の遺伝子研究株について、真核生物において脂肪酸合成を阻害する抗生物質であるセルレニンに対する耐性形質を付与する DNA 断片を *S. cerevisiae* よりクローニングしている。さらにこの DNA 断片が多薬剤耐性を付与する既知の *PDR4* 遺伝子を担うことを明らかにし、実用株を含む酵母において、*PDR4* 遺伝子の重複投与がセルレニンに対して耐性を与え、原栄養体酵母の交雑および形質転換体選択のために優性選択符号として使用できることを示している。またこの知見を応用して、原栄養体酵母に対するクロスストリーク法における接合型判定系を構築している。

第3章では、*PDR4* 遺伝子を優性選択符号とした形質転換系および第2章で開発した接合型判定系を利用して、清酒醸造酵母の協会7号が構造的また機能的に正常な二倍体と同じく a / α 接合型を持つことを明らかにしている。また、この解析システムを応用して、協会7号および2株の吟醸酒醸造酵母から実際に接合能を有する株を分離し、それらの間で交雑体を造成し、新しい吟醸酒酵母育種の可能性を示している。

第4章では、胞子形成開始を誘導する *IME1* 遺伝子を多コピーで協会7号に導入すれば、胞子形成能が若干回復することを観察し、協会7号の胞子非形成性は *IME1* 遺伝子の発現性および細胞外の栄養情報の *IME1* 遺伝子への伝達系に異常があることを示している。

総合考察では本研究を要約し、その意義と酵母育種についての将来の展望を述べている。

論文審査の結果の要旨

醸造およびアルコールの製造などに用いられている *Saccharomyces cerevisiae* の実用株は工業的に優れた特性をもっている。しかし、これら実用株は孢子形成能を失っており、接合型株が得られず、有用形質の遺伝学的解析はもとより、これらの株を材料とした育種もほとんど不可能である。本論文はこれら実用酵母株に対し、最近の分子生物学的方法を応用することにより、育種の道を開くことを目的とした研究をとりまとめたもので、その成果は以下の如く要約される。

- (1) *S. cerevisiae* においては、一倍体細胞でも非発現性の *HML* および *HMR* 遺伝子を *SIR* 遺伝子を破壊することにより発現させ、 a/α 型の非接合型細胞とすることができる。この非接合型細胞より接合型変異株を直接分離することを試み、 α 接合能を示す株が得られることを示している。さらにこれがイントロンをもつ *a1* シストロン転写産物のスプライシング不能変異であることを明らかにし、*aar2* 変異と命名している。
- (2) 真核生物の脂肪酸合成を阻害するセルレニンが、低濃度で *S. cerevisiae* の細胞増殖を阻害することに着目し、それに耐性を付与する DNA 断片を *S. cerevisiae* よりクローニングし、この DNA 断片が、*S. cerevisiae* に対し多剤耐性形質を与える既知の *PDR4* 遺伝子であることを明らかにしている。さらにこのセルレニンと *PDR4* 遺伝子を組み合わせた系が、原栄養体酵母における選択符号として有効であることを示し、この選択系を利用して原栄養体酵母にも応用できる簡便な接合型判定系を考案している。
- (3) 清酒酵母協会7号が、接合型支配遺伝子については正常な a/α 型二倍体であることを明らかにし、本株より直接接合型変異株を選択するため、 a 接合型に特異的な遺伝子である *STE6* あるいは α 型接合型特異的遺伝子である *MF α 1* 遺伝子のプロモーター部に、酸性ホスファターゼ遺伝子の構造部を結合した融合遺伝子を構築し、それが細胞の接合型に対応して酸性ホスファターゼを生産することを利用して、 a または α 接合型変異株を的確に分離することに成功している。
- (4) 協会7号酵母において、その細胞に孢子形成を誘導する *IME1* 遺伝子の多コピー導入することにより、孢子形成能が若干回復することを見だし、この方法で孢子非形成性の実用酵母に孢子形成能を付与する可能性を示している。

以上のように、本論文はこれまで遺伝学的操作が不可能であった実用酵母株に対し、優性選択符号を導入するとともに、遺伝子工学的的方法により接合型株の直接分離あるいは孢子形成性回復の可能性を示し、その育種と遺伝学的解析にむけて寄与するところが大きい。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。