

焼酎酵母のアルコール耐性に関与する遺伝子の解析

江藤 勸

食品工業部

Analysis of Relation Between Alcohol-Tolerance and *Shochu* Yeast Gene

Susumu ETO

Food Science and Technology Division

要旨

鹿児島焼酎酵母をエタノール溶液中で自己消化させてアルコール耐性株を得た。このアルコール耐性株と通常の鹿児島酵母から、それぞれ cDNA を調製し、PCR 法を応用した Subtraction をかけてアルコール耐性の獲得に関与する遺伝子の検出を試みた。その結果、アルコール耐性が高くなった状態の細胞では、Alcohol dehydrogenase I 等の遺伝子が多く発現しており、これらがアルコール耐性に関与していると思われた。

1. 緒言

本センターでは、より麦焼酎の醸造に適した大分酵母の開発を目指して、細胞融合を中心とした有用酵母の造成の研究を行ってきた^{1, 2)}。特に、蒸留粕自体の減量とそれに伴う製造工程の改善が期待される、高いアルコール耐性を持つ融合酵母を開発し、焼酎の試醸をする段階に至っている²⁾。

本研究では、将来的に実用可能となると思われる遺伝子組換えによる有用酵母開発の前段階として、アルコール耐性を獲得した酵母と通常の酵母を比較することにより、アルコール耐性に関与する遺伝子の解析を試みた。

2. 実験方法

2.1 自己消化

渡辺らの方法³⁾に従い、YPD 培地中で前培養した酵母を集菌し、20% エタノールと 1% グルコースを含む 0.1M 酢酸緩衝液 (pH4.2) 中で 15℃、7 日間自己消化を起こさせた。この液を YPD 寒天培地上で培養し、生存率の高い株を選抜して同様の操作を 3 回繰り返す事により、アルコール耐性株を分離した。

2.2 アルコール耐性試験

試験株を YPD 液体培地中で前培養した後、各濃度のエタノールを含む YPD 液体培地に接種して、振盪培養装置で増殖能を測定した。

2.3 RNA の調製

培養した細胞を 0.5M NaCl、10mM EDTA を含む 0.2M Tris-HCl (pH7.5) 緩衝液で洗浄後、-80℃で凍結させた。この細胞に緩衝液とガラスビーズを加えた後、65℃のフェノールを加えて激しく攪拌し、遠心分離して上清を回収した。この上清をフェノール、フェノール:クロロ

ホルム (1:1)、クロロホルムで順次洗浄して、酢酸ナトリウム溶液とエタノールを加え、-20℃で静置した後、遠心分離により沈殿を得た。

また調製した RNA より、Pharmacia biotech 社のキットを用いて mRNA を精製した。

2.4 cDNA の Subtraction

CLONTECH 社の PCR-Select キットを用いて、mRNA からの cDNA の合成及び Subtraction を行った。このサンプルを 5% のポリアクリルアミドゲル (PA) 電気泳動にかけて SYBR Green I で染色してバンドを検出した。

Subtraction により変化したバンドをゲルから切り出し、水を加えて細断したものをテンプレートとして PCR を行い、目的の cDNA を増幅した。この cDNA を pCR II ベクター (Invitrogen 社) につなぎ、*E. coli* JM109 を形質転換させて、cDNA と結合したベクターを増幅後、精製した。

2.5 塩基配列の決定

Cy5 AutoRead Sequencing Kit (Pharmacia biotech 社) 中の蛍光プライマーと ThermoSequenase cycle sequencing kit (Amersham 社) を用いて、ALF express シーケンサーでベクターと結合した cDNA の塩基配列の決定を行った。

2.6 ノーザンハイブリダイゼーション

精製した cDNA を含む pCR II ベクターから DIG RNA Labeling Kit (Boehringer Mannheim 社) を用いてそれぞれ RNA プローブを作成した。

各細胞より調製した RNA をホルムアルデヒド法により、1% のアガロースゲル電気泳動にかけた後、ナイロン膜にプロットした。この膜に、各 RNA プローブを結合させて、DIG 核酸検出キットによりプローブを検出した。

3. 実験結果及び考察

3.1 自己消化によるアルコール耐性株の作成

自己消化と選抜を繰り返すことにより鹿児島酵母からアルコール耐性株を分離した。10%エタノール存在下での増殖能を見ると、元の鹿児島酵母よりかなり高いアルコール耐性が認められた (Fig.1)。しかし、通常のYPD寒天培地上で数週間保存しておくこと、この株のアルコール耐性は通常の鹿児島酵母程度に低下した。

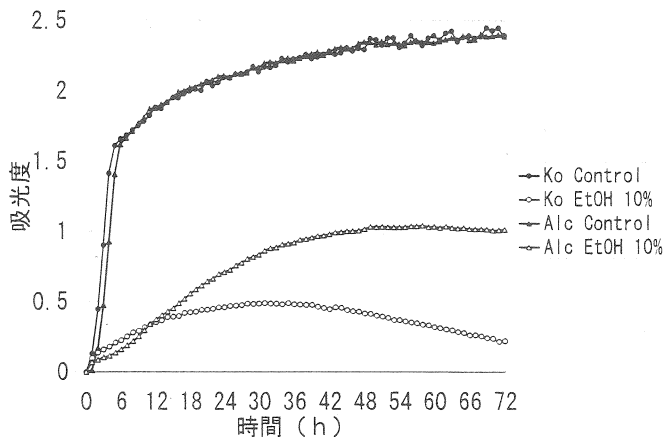


Fig.1 自己消化によるアルコール耐性の変化

3.2 エタノール前処理によるアルコール耐性の回復

アルコール耐性が低下した株を10%エタノールを含むYPD培地中で2時間振盪する前処理を行った。このエタノール前処理した株について、改めて増殖試験を行ったところ、YPD培地中では変化は認められなかったが、10%エタノール存在下での増殖は耐性株分離直後と同程度であり、アルコール耐性の回復が認められた (Fig.2)。また、元の鹿児島酵母では、エタノール前処理によるアルコール耐性の向上は認められなかった。

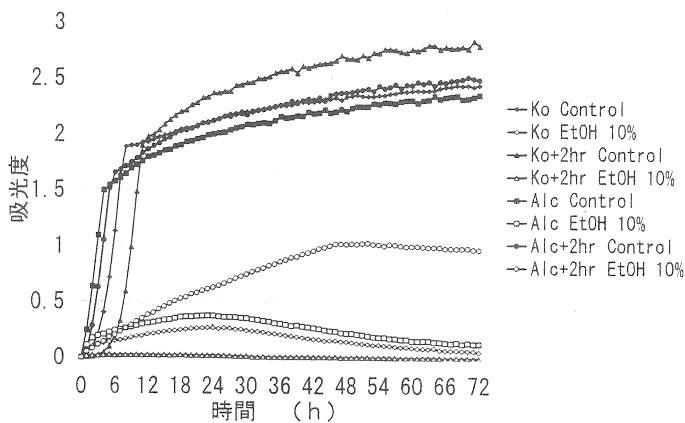


Fig.2 エタノール前処理によるアルコール耐性の回復

3.3 アルコール耐性回復時の遺伝子の変化

鹿児島酵母とアルコール耐性株を、それぞれエタノール処理をする前と処理直後の状態で、速やかに -80°C で凍結させた。それぞれの凍結細胞からRNAを調製し、その一部を用いてmRNAを精製して、さらにcDNAを合成した。エタノール処理をした後のcDNAから処理前のcDNAを差し引くように、PCR-Selectキットを用いて鹿児島酵母とアルコール耐性株のサンプルを、それぞれSubtractionさせた。5%のPA電気泳動にかけてバンドを分離した結果、0.4kbpから1.0kbpの間で各10本程度のバンドに変化が認められた (Fig.3)。

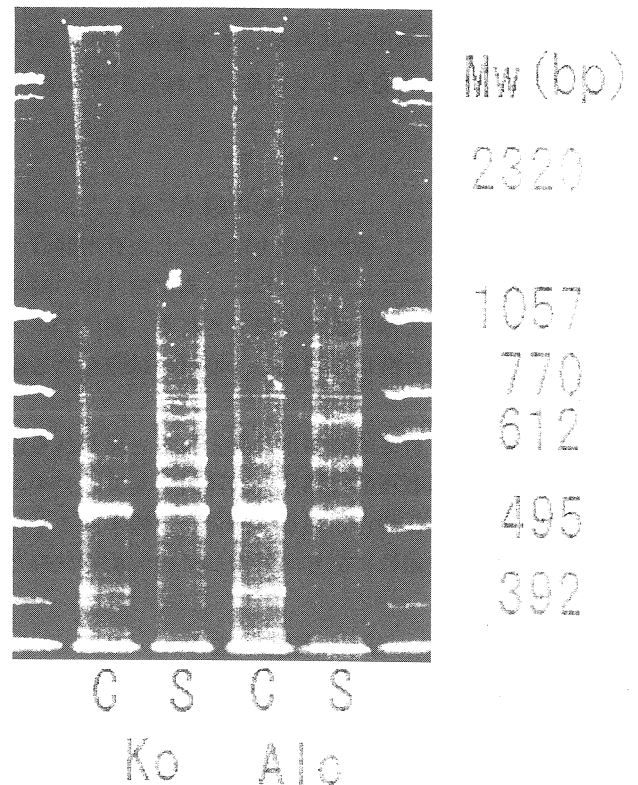


Fig.3 SubtractionによるcDNAの変化の検出

これらのバンドをゲルから切り出して抽出し、増幅、精製した後、塩基配列を決定したところ、いわゆるストレス蛋白質に関連した遺伝子が多く検出されたほか、糖やアルコール代謝系の酵素の遺伝子も検出された (Table 1)。この内、Heat shock proteinやPIR3 protein等の遺伝子は鹿児島酵母とアルコール耐性株の両方で検出された。また、Enolase 1(ENO1)とCytochrome C1(CY1)の遺伝子は鹿児島酵母でのみ検出され、Alcohol dehydrogenase1 (ADH1)及び60S Ribosomal protein L21(RL21E)の遺伝子はアルコール耐性株でのみ検出された。

Table1 検出された cDNA

Ko-Subtracted			Alc-Subtracted		
	Mw	Result		Mw	Result
Ko-1	1.0kbp	ACETYL-COA CARBOXYLASE (EC 6.4.1.2)	Alc-1	1.2kbp	ALCOHOL DEHYDROGENASE I (EC 1.1.1.1).
Ko-2	0.95kbp	PUTATIVE ATP-DEPENDENT RNA HELICASE	Alc-2	0.95kbp	PUTATIVE ATP-DEPENDENT RNA HELICASE
Ko-3	0.9kbp	HEAT SHOCK PROTEIN SSA2.	Alc-3	0.9kbp	HEAT SHOCK PROTEIN SSA2.
Ko-4	0.85kbp	ENOLASE I (EC 4.2.1.11)	Alc-4	0.8kbp	MAK31 PROTEIN.
Ko-5	0.8kbp	HYPOTHETICAL 56.6 KD PROTEIN IN RAD51-UBP9	Alc-5	0.8kbp	60S RIBOSOMAL PROTEIN L21E.
Ko-6	0.75kbp	PROBABLE ALPHA-GLUCOSIDASE YIL172C/YJL221C	Alc-6	0.75kbp	HYPOTHETICAL 56.6 KD PROTEIN IN RAD51-UBP9
Ko-7	0.7kbp	40S RIBOSOMAL PROTEIN S6 (S10) (YS4) (RP9).	Alc-7	0.7kbp	40S RIBOSOMAL PROTEIN S6 (S10) (YS4) (RP9).
Ko-8	0.7kbp	PIR3 PROTEIN PRECURSOR.	Alc-8	0.7kbp	PIR3 PROTEIN PRECURSOR.
Ko-9	0.6kbp	CYTOCHROME C1, HEME PROTEIN PRECURSOR.	Alc-9	0.6kbp	ACETYL-COENZYME A SYNTHETASE I (EC 6.2.1.1)
Ko-10	0.5kbp	VERY HYPOTHETICAL 13.3 KD PROTEIN	Alc-10	0.5kbp	HEAT SHOCK PROTEIN 26.

3.4 ノーザンハイブリダイゼーション

Table1 で検出された cDNA についてそれぞれ RNA プローブを作成し、ノーザンハイブリダイゼーションを行うことにより、各細胞の RNA レベルの変化を検討した。Subtraction により鹿児島酵母とアルコール耐性株の両方で検出されたストレス蛋白質をコードする遺伝子等は、エタノール処理により顕著に増加していた。また、鹿児島酵母でのみ検出された ENO1 と CY1 はエタノール処理により若干増加していた。アルコール耐性株でのみ検出された遺伝子の内 ADH1 は、エタノール処理後の鹿児島酵母では減少傾向にあったが、アルコール耐性株ではむしろ増加していた。RL21E は両方の細胞で減少していたが、アルコール耐性株での減少率の方が小さいため検出されたと考えられた (Fig.4)。

4. まとめ

酵母の遺伝子と細胞機能の関連を解明する目的で、自己消化により、高いアルコール耐性を持つ酵母を作成し、この酵母と通常の鹿児島酵母から調製した cDNA を比較して、アルコール耐性に関与する遺伝子の検出を試みるところ、次の結果を得た。

- (1) 自己消化と選抜を繰り返すことにより鹿児島酵母からアルコール耐性株を分離できた。
- (2) 数週間経過すると、この株のアルコール耐性は通常の鹿児島酵母程度に低下したが、エタノール前処理によりアルコール耐性の回復が認められた。
- (3) それぞれの細胞より cDNA を調製して、Subtraction を行い、エタノール処理により変化した cDNA を検出したところ 10 前後の遺伝子が検出された。
- (4) Subtraction により ADH1 と RL21E の遺伝子の変化がアルコール耐性株でのみ検出された。
- (5) これらの遺伝子の変化は、ノーザンハイブリダイゼーションでも確認され、アルコール耐性に関与している可能性があると思われた。

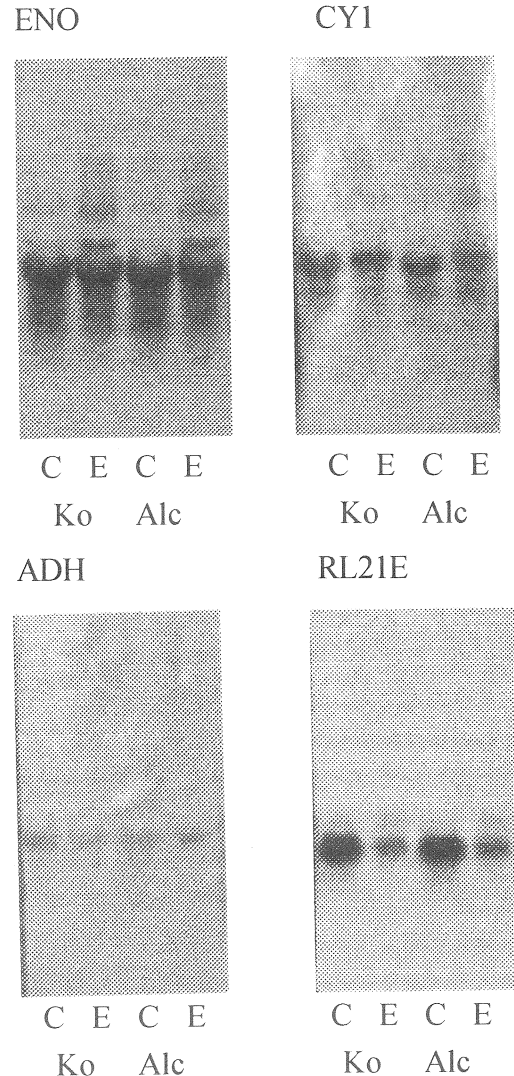


Fig.4 ノーザンハイブリダイゼーションによる鹿児島酵母 (Ko) とアルコール耐性株 (Alc) の RNA 変化の検出
C : エタノール処理前, E : エタノール処理後

参考文献

- 1) 江藤 勲 : 大分県産業科学技術センター平成7年度研究報告,72(1995)
- 2) 江藤 勲 : 大分県産業科学技術センター平成8年度研究報告,36(1996)