

博 士 論 文

清酒酵母の栄養特性及び  
醸造特性に関する研究

平成 19 年 6 月

庄 林 愛

<略号>

本論文に用いた略号を以下に記載する

ATP; adenosine triphosphate

bp; base pair

cDNA; complementary deoxyribonucleic acid

COSY; correlation spectroscopy

CTP; cytidine triphosphate

DEPC; diethyl pyrocarbonate

DMSO; dimethyl sulfoxide

DNA; deoxyribonucleic acid

DTT; dithiothreitol

EDTA; ethylenediaminetetraacetic acid

GC-MS; gas chromatograph-mass spectrometry

GTP; guanosine triphosphate

h; hour(s)

HMBC; heteronuclear multiple bond correlation

HMP; hydroxymethylpyrimidine

HMQC; heteronuclear multiple-quantum coherence

HPLC; high-pressure liquid chromatography

Hz; hertz

KD; kiro dalton

m/z; mass to charge ratio

min; minute(s)

MIPS; The Munich Information Center for Protein Sequences

MTA; methylthioadenosine

NAD; nicotinamide adenine dinucleotide

NADH; reduced nicotinamide adenine dinucleotide

NMR; nuclear magnetic resonance

OD; optical density

ORF; open reading frame

PCR; polymerase chain reaction

rDNA; ribosomal deoxyribonucleic acid

RNA; ribonucleic acid

rpm; revolutions per minute

Rt; retention time

SAH; S-adenosyl homocystein

SAM; S-adenosylmethionine

SGF; Simulated Gastric Fluid

TTP; tymisine triphosphate

UDP; uridine diphosphate

UTP; uridine triphosphate

UV; ultra violet

## 目 次

目次	1
序論	5
第 1 章 清酒酵母のエルゴステロール生合成に及ぼす培養条件の影響	8
第 1 節 緒言	8
第 2 節 実験方法	10
第 1 項 供試菌株と培養条件	10
第 2 項 酵母のエタノール耐性評価方法	10
第 3 項 酵母の総エルゴステロールおよびフリーエルゴ ステロールの定量方法	10
第 4 項 DNA マイクロアレイによるエルゴステロール合成遺伝子の 発現の解析	11
第 3 節 実験結果	13
第 1 項 清酒酵母及び実験室酵母のエタノール耐性	13
第 2 項 種々の培養条件下での清酒酵母及び実験室酵母の 総エルゴステロール量	14
第 3 項 酸素及びエタノールが酵母の総エルゴステロール量に 及ぼす影響	16
第 4 項 酸素及びエタノールが酵母のフリーエルゴステロール量に 及ぼす影響	17
第 5 項 清酒酵母のエルゴステロール合成遺伝子の発現解析	20
第 4 節 考察	22
第 5 節 小括	26

第 2 章	新規 S-アデノシルメチオニン高蓄積変異株の取得方法の開発と 解析	27
第 1 節	緒言	27
第 2 節	実験方法	29
第 1 項	供試菌株・遺伝子破壊株の構築及び培養条件	29
第 2 項	ナイスタチン耐性変異株の取得方法	30
第 3 項	酵母に含まれる S-アデノシルメチオニンの定量方法	31
第 4 項	S-アデノシルメチオニン高蓄積株の増殖特性の評価	31
第 5 項	酵母に含まれる総エルゴステロール量の定量と ステロールの精製方法	31
第 6 項	ステロールの同定方法	32
第 7 項	凍結乾燥酵母に含まれる S-アデノシルメチオニンの 安定性	34
第 8 項	凍結乾燥酵母に含まれる S-アデノシルメチオニンの 消化性	34
第 3 節	実験結果	35
第 1 項	清酒酵母及びエタノール感受性株の S-アデノシルメチオニン 及びエルゴステロール量	35
第 2 項	ナイスタチン変異株の取得及び S-アデノシルメチオニン 量	35
第 3 項	S-アデノシルメチオニン高蓄積株のエルゴステロール 量	37
第 4 項	S-アデノシルメチオニン高蓄積株の増殖特性	37
第 5 項	S-アデノシルメチオニン高蓄積株で増加するステロールの 同定	38
第 6 項	<i>erg4</i> 破壊株の S-アデノシルメチオニン及びエルゴステロール 含量	41
第 7 項	凍結乾燥酵母に含まれる S-アデノシルメチオニンの	

	安定性	4 2
第 8 項	凍結乾燥酵母に含まれる S-アデノシルメチオニンの 消化性	4 3
第 4 節	考察	4 5
第 5 節	小括	4 7
第 3 章	酵母細胞中に蓄積された S-アデノシルメチオニンの挙動	4 9
第 1 節	緒言	4 9
第 2 節	実験方法	5 0
第 3 節	実験結果及び考察	5 0
第 4 節	小括	5 4
第 4 章	清酒酵母の遺伝子発現プロファイルの解析	5 5
第 1 節	緒言	5 5
第 2 節	実験方法	5 6
第 1 項	供試菌株及び培養方法	5 6
第 2 項	DNA マイクロアレイ	5 6
第 3 項	データ解析	5 7
第 3 節	実験結果	5 8
第 1 項	代謝	5 8
第 2 項	エネルギー	6 2
第 3 項	細胞輸送、輸送促進および輸送系	6 4
第 4 項	転写	6 7
第 5 項	タンパク質合成	6 7
第 6 項	タンパク質のクオリティコントロール (フォールディング、修飾および輸送)	6 7
第 7 項	細胞周期および DNA プロセッシング	6 9
第 8 項	細胞構造、発達、細胞生成	7 0

第 9 項	細胞環境との相互作用および細胞情報伝達機構	70
第 10 項	セルレスキュー、防御および病原性	70
第 11 項	転位因子、ウイルス性およびプラスミドタンパク質	72
第 12 項	未分類タンパク質	72
第 4 節	考察	73
第 5 節	小括	78
結言		80
参考文献		83
謝辞		94
公表論文		95

## 序論

清酒醸造は、麴の酵素による米でんぷんの溶解糖化と、酵母によるアルコール発酵を同時に行う並行複発酵と呼ばれる独自の醸造法により、世界の醸造酒の中で最も高いアルコール濃度を達成している醸造法である。またすぐれた清酒の香味を実現するために、高度に精白された米を原料として使用し、低温で長期間にわたって醸造を行うなど様々な特徴を持つ醸造法である。清酒醸造で用いられる酵母（清酒酵母）は *Saccharomyces cerevisiae* 属に分類されているが、高いアルコール生産性および耐性、低温での良好な増殖性、高エステル生成能など優れた特徴を持ち、これまでも酵母におけるアルコール耐性機構の研究対象にされてきた。また一方で、清酒酵母の醸造中に増殖した菌体は、未溶解の米や麴など他の成分とともに、酒粕という伝統的な食品として日本人に親しまれてきた。最近の健康に関する意識の高まりの中で酵母菌体そのものをサプリメントとして利用する健康食品も多く見られるようになったが、日本では、酒粕という酵母菌体を多く含む食品として、古くから酵母の摂取が行われていたことになる。ここには貴重な原材料である米を余すことなく利用するというだけでなく、酵母菌体や醸造成分の健康への寄与が経験的に認められていたと考えられるが、現在も清酒酵母の持つ栄養特性について十分な研究が行われているとは言いがたい。私は、これら清酒酵母のもつ優れた栄養特性及び醸造特性、またこれらの関連性について研究を行った。

近年の環境問題・エネルギー問題への関心の高まりから、微生物によるバイオマスを用いたエタノール発酵の研究がなされており、清酒酵母の持つアルコール耐性機構の解析は広い応用が期待され、注目を集めている。*Saccharomyces cerevisiae* のアルコール耐性に細胞膜の構成成分であるエルゴステロールが重要な役割を果たしていることを Inoue らは明

らかにしている(Inoue 2005)。そこで筆者らは清酒酵母のアルコール耐性についてエルゴステロールの挙動の解析を試み、さらにエルゴステロール合成遺伝子の発現解析を行った。清酒醸造条件はエルゴステロール合成には厳しい条件であるが、清酒酵母は総エルゴステロール合成量が高いだけでなく、細胞膜において機能を有するフリーのエルゴステロールのホメオスタシスが強く保たれていることを示した。その結果を第1章に記す。

清酒酵母の高いエタノール耐性に大きな役割を果たしているエルゴステロールであるが、栄養特性の観点からみると別名「プロビタミンD」とも呼ばれカルシウム吸収の補酵素として有用である。筆者らは、清酒酵母の高いエルゴステロール合成能を維持するためにはその合成に必要な他の成分も多く合成されているのではないかと考え、エルゴステロール合成系でメチル基供与体としての役割を果たす S-アデノシルメチオニン (SAM) に着目した。SAM は生体内の様々な反応に関与している物質であり、アルコール性肝障害(Martínez-Chantar et al. 2002, Purohit and Russo 2002; Lieber 2002)、うつ病(Mischoulon and Fava 2002, Saletu et al. 2002, Nguyen and Gregan 2002)、関節炎(Padova 1987, Bradley et al 1994)、アルツハイマー病(Morrison 1996, Newman 2000)などの疾病に効果があることが報告され、生体内に存在する物質であり副作用も少ないことから医学的な研究も盛んに行われており、アメリカではサプリメントとして、ヨーロッパでは処方箋薬として利用されている。SAM の生産は酵母を用いて行われているが、清酒酵母は他の微生物に比較して SAM を多量に蓄積するという報告がなされている(Shiozaki 1984)。そこで、清酒酵母の高い SAM 合成能をさらに高めた株を遺伝子操作を行うことなく効率的に取得する方法の開発を試みた。エルゴステロール合成に使用される SAM 量を減少させることにより酵母細胞内に蓄積する SAM 量を増加させるのではないかと発想に基づき、SAM 高蓄積株の効率的取得方法を開発したので、その結果を第2章に記す。



我々利用する側にとっては、清酒酵母の蓄積する SAM は非常に有用な物質であるが、酵母にとって SAM を蓄積することはどのような意味があるのだろうか。SAM は、先にも述べたとおり生体内の様々な反応に関与しており、メチオニン、システイン、グルタチオンなど含硫アミノ酸代謝のホメオスタシスを維持するための鍵となる物質であり(Thomas and Surdin-Kerjan 1997)、細胞内の SAM 濃度を調節するために余剰の SAM は液胞内に蓄積されるといわれている(Nakamura and Schlenk 1974)。筆者は液胞内に蓄積された SAM は必要に応じて細胞の活動に利用されているのではないかと考え、貧栄養条件下での細胞内の SAM の挙動を解析し、SAM は貧栄養状態において N 源・S 源となることを示したので、その結果を第 3 章に記す。

これまで述べた特徴のほかにも、清酒酵母には様々な特徴がある。清酒醸造に関する特性としては、高い炭水化物資化能、エタノール生成能、エタノール耐性能などが挙げられる。また、低い銅耐性や酸性フォスファターゼ活性は、清酒醸造の際に混入する野生酵母の検出にも利用されている。これらの特徴を DNA マイクロアレイの手法を用いて清酒酵母の遺伝子発現を実験室酵母と比較することで解析を行った。今回解析を行った結果から、遺伝子の発現の違いが清酒酵母の優れた特性を裏打ちしていることが示されたが、遺伝子の発現制御系に実験室酵母との違いが示唆されたものや、染色体の構造の違いが示唆されたものがあった。これらの結果について第 4 章に記す。

## 第 1 章 清酒酵母のエルゴステロール生合成に及ぼす 培養条件の影響

### 第 1 節 緒言

ステロールは全ての真核細胞にとって必須の細胞膜構成成分である。酵母 *Saccharomyces cerevisiae* における主たるステロールはエルゴステロールであり、これは哺乳類のコレステロールにあたるものである。他の真核細胞と同様に *S. cerevisiae* の細胞中でステロールはフリーのステロールとステロールエステルという二つの形態をとっている。フリーのステロールは主に細胞膜に存在しており、膜に結合している様々なタンパク質の活性に影響を及ぼし、膜の流動性・透過性に非常に大きな役割を果たしている (Bloch, K.E., 1983)。一方、ステロールエステルは細胞質内にあるステロールのホメオスタシスに重要な脂質顆粒 (Lipid particle) に貯蔵されている (Zinser et al. 1993; Zweytick et al. 2000)。近年、エルゴステロールは膜に存在し、膜輸送や細胞におけるシグナル伝達に関与するラフトと呼ばれるマイクロドメインの形成に重要であることが分かり、その重要性に注目が集まっている (Bagnat et al. 2000; Eisenkolb et al. 2002)。エルゴステロール合成系において、アセチル Co-A からチモステロールにいたるまでの経路が遮断されると致死の表現形が現れることからステロールは酵母の細胞機能にとって必須であることがわかる。

清酒醸造に用いられる清酒酵母は 20 % もの高いエタノール濃度を達成しており、他の産業用酵母よりも高いエタノール耐性を持つことが知られている (Casey and Ingledew 1986)。Inoue らは清酒酵母より、デルタ(24)-ステロール C-メチルトランスフェラーゼをコードする *ERG6* によって相補されるエタノール感受性株を

取得している (Inoue et al. 2000)。この酵素は、エルゴステロール合成系においてチモステロールの C-24 をメチル化しフェコステロールへの変換を触媒している。また、エルゴステロール合成能は酵母におけるエタノール耐性の重要な要因であると考えられている (Alexandre et al. 1994; Swan et al. 1998; Inoue et al. 2000)。このようにエルゴステロールは酵母のエタノール耐性を高めると考えられるが、既に低酸素 (Osumi et al. 1978; Jahnke and Klein 1983) あるいは高濃度のエタノール (Walker-Caprioglio et al. 1990; Koukkou et al. 1993) が酵母のエルゴステロール合成を減少させることが報告されており、清酒醸造の低酸素かつ高濃度エタノール条件を考慮すると、醸造中の酵母のエルゴステロール含量は低くなっていることが予想される。

そこで清酒酵母および実験室酵母の清酒醸造条件下での細胞内エルゴステロールの挙動を解析するために、清酒醸造に関連するいくつかの条件下での、これら二つの酵母のエルゴステロール合成について分析を行った。これまでの清酒酵母のエルゴステロールに関しては、フリーのステロールとステロールエステルの和である総エルゴステロール量についてのみ研究が行われてきた (Swan et al. 1998; Inoue et al. 2000)。今回我々は、清酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* K-9 と実験室酵母 *S. cerevisiae* X2180-1A を用いて清酒醸造環境で予想されるいくつかの条件下で総エルゴステロール量を分析してエルゴステロールの合成に影響を持つ要因の絞りこみを行った。次に清酒醸造の特徴である低酸素条件下、高アルコール条件下での総エルゴステロール量とフリーのエルゴステロールの分析を行った。さらに、これらの酵母の細胞内のエルゴステロールの挙動の違いとエルゴステロール合成遺伝子の発現の関連性について DNA マイクロアレイを用いて清酒酵母と実験室酵母の遺伝子の発現の違いを比較し解析した。

## 第 2 節 実験方法

### 第 1 項 供試菌株と培養条件

本研究では、清酒酵母として *Saccharomyces cerevisiae* K-9 (以下、清酒酵母 K-9)、実験室酵母として *Saccharomyces cerevisiae* X21801-A を用いた。基本となる培地は、SD 培地( 0.67 % Difco yeast nitrogen base without amino acids、1.0 % D-グルコース)を用い、寒天培地には SD 培地に 1.8 %の寒天を添加して用いた。

### 第 2 項 酵母のエタノール耐性評価方法

清酒酵母と実験室酵母のエタノール耐性は、エタノールを添加した培地での増殖性で評価を行った。酵母は、SD 液体培地に白金耳植菌し、30℃で 24 時間振盪培養を行い、遠心分離により集菌後、滅菌水で二回洗浄し、それぞれの培地に OD<sub>660</sub> が 1.0 となるように調整し、さらにこの酵母懸濁液の 10 倍ごとの希釈系列を 10<sup>4</sup>まで作成した。これら各 3 μl の酵母懸濁液をエタノール 0、5、7 %添加した SD 寒天培地上にスポットし、30℃で 2 日間培養して、増殖を観察した。さらに、同様に準備した酵母懸濁液をエタノール 0、5、7 %添加した SD 液体培地に、OD<sub>660</sub> が 0.1 となるように植菌し、30℃における振盪培養での増殖をバイオフォトレコーダー TN1506 (アドバンテック) で経時的に測定した。

### 第 3 項 酵母の総エルゴステロール量およびフリーエルゴステロール量の定量方法

酵母の総エルゴステロール量は、Inoue らの方法に従って行った(2000)。前培養した酵母は、各培養条件で培養した後、得られた菌体を氷冷滅菌水で二回洗浄し、ねじ口つき褐色試験管に入れて凍結乾燥し、重量を測定後、3 ml のメタノール、0.6 g 水酸化

カリウム、酸化防止剤として少量のピロガロールを加えて、N<sub>2</sub>置換を行い、85°Cで2時間加水分解を行った。室温まで冷却した後、2 ml 石油エーテルを加えて激しく攪拌して2回抽出した。得られたステロールを含む石油エーテル画分は減圧乾固した後、1 ml のクロロホルムに溶解し HPLC(TSK Gel ODS-80Ts 4.6 mm x 250 mm)で分析を行った。

酵母のフリーエルゴステロール量は、Bailey および Parks らの方法に従って測定した(1975)。前培養した酵母は各培養条件で培養した後、得られた菌体を氷冷滅菌水で2回洗浄し、ねじ口つき褐色試験管に入れて凍結乾燥し重量を測定した。400 µl のジメチルスルホキシド (DMSO) に懸濁し、100°Cで1時間加熱した。室温まで冷却した後、3 ml の蒸留水を加えて攪拌した後、2 ml の石油エーテルを加えて激しく攪拌し2回抽出した。得られた石油エーテル層は減圧乾固したのち、500 µl のクロロホルムに溶解し、HPLC で分析を行った。

#### 第 4 項 DNA マイクロアレイによるエルゴステロール合成遺伝子の発現の解析

DNA マイクロアレイに用いる清酒酵母及び実験室酵母は、SD 液体培地で24時間前培養した菌体をSD液体培地にOD<sub>660</sub>が0.1となるように植菌し、30°CでOD<sub>660</sub>が5.0になるまで振盪培養を行った。得られた菌体は遠心分離により回収し、氷冷した滅菌蒸留水で二回洗浄を行った。酵母からのトータル RNA の抽出はホットフェノール法で行った(Kohrer and Domdey 1991)。得られたトータル RNA は適量の DEPC 処理水に溶解し、DNA マイクロアレイに供した。

cDNA の蛍光標識の作業は全て氷浴上で行った。トータル RNA 25 µg は 5x First-Strand Buffer (Invitrogen-Life Technologies,

Carlsbad, CA) 8  $\mu$ l、yeast-specific primer mix (Eurogentech, Seraing, Belgium) 1  $\mu$ l、20 mM dCTP を除く dNTP (それぞれ 6.67 mM の dATP, dGTP, dTTP を含む) 3  $\mu$ l、1 mM dCTP 1  $\mu$ l、1mM Cy3- または Cy5-結合 dCTP (Amersham Pharmacia Bioscience、Piscataway、NJ) 1.5  $\mu$ l、0.1 M DTT 4  $\mu$ l、RNasin (Promega、Madison、WI) 1 ml とよく混合した後、DEPC 処理水を用いて最終容量を 40  $\mu$ l に調整した。調整した反応溶液は 65 °C で 5 分間、さらに 42 °C で 5 分間保持した後、RNasin 1  $\mu$ l と Superscript II RT (Invitrogen-Life Technologies) 1  $\mu$ l を加えてよく混合し、42°C で 2 時間逆転写反応を行った。1 時間反応を行った時点で更に Superscript II RT を 1  $\mu$ l 追加した。

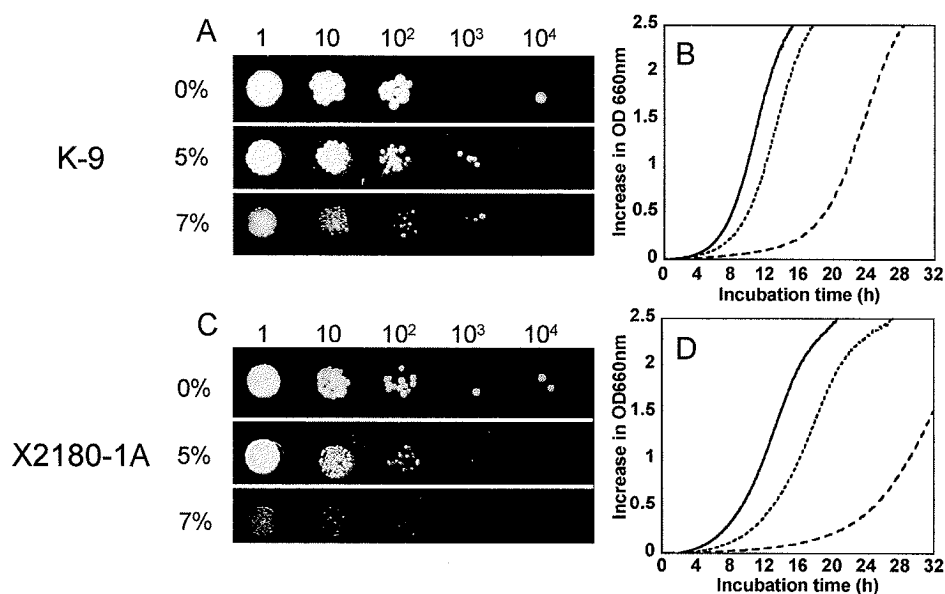
逆転写反応終了後、50 mM EDTA 5  $\mu$ l、10 N NaOH 2  $\mu$ l を反応溶液に添加し、65 °C で 20 分間保持し逆転写反応を停止した。5 M 酢酸 4  $\mu$ l を加えて反応溶液の pH を中性に調整した。反応溶液から標識された cDNA プローブを精製するために QIA-quick PCR purification kit (Qiagen, Hilden, Germany)を用いた。精製した Cy3- および Cy5 標識 cDNA プローブは、Microcon-30 ultrafiltration device (Millipore, Bedford, MA)を用いて 24.5  $\mu$ l に濃縮した。

本実験では Yeast chip ver. 2.0 (DNA Chip Research, Yokohama, Japan) をマイクロアレイとして使用し、マイクロアレイのマニュアルに従ってハイブリダイゼーション及び洗浄の操作を行った。洗浄後、乾燥したマイクロアレイは FLA-8000 Fluorescent Image Analyzer (Fuji Film, Tokyo)を用いて蛍光強度を読み取り、GeneSpring 6.0 software (Silicon Genetics, Redwood City, CA)を用いてデータの解析を行った。

### 第 3 節 実験結果

#### 第 1 項 清酒酵母及び実験室酵母のエタノール耐性

エタノール耐性は醸造用酵母にとって最も重要な性質のひとつである。発酵終期にはエタノール濃度が 20 %に達する清酒醸造に用いられる清酒酵母は、高いエタノール耐性を持つことで知られている (Casey and Ingledew 1986)。清酒酵母 K-9 と実験室酵母 X2180-1 のエタノール耐性を 5 %および 7 %となるようにエタノールを添加した培地を用いて評価した結果を Fig.1 に示す。



**Fig. 1. Ethanol Tolerances of *S. cerevisiae* K-9 and X2180-1A.**

The growth of K-9 (A) and X2180-1A (C) on solid SD medium containing 0, 5, or 7 % ethanol. The series of spots was made by dilution of the yeast cell suspensions of their cell density at OD<sub>660</sub> at 1.0 by 10 times. Yeast cells spotted on the medium were cultured at 30°C for 48 h. The growth of K-9 (B) and X2180-1A (D) in liquid SD medium containing ethanol at a concentration of 0%, solid lines (—); 5%, dotted lines (····); 7%, broken lines (---). The yeast cells were inoculated at OD<sub>660</sub> 0.1. The growth of the two yeast strains was measured by OD<sub>660</sub> every 30 min at 30°C aerobically.

エタノールを含む SD 寒天培地上での実験室酵母 X2180-1A の増殖は、清酒酵母 K-9 のものと比較すると少ないことがわかる。また、エタノールを含む SD 液体培地での実験室酵母 X2180-1A の増殖は、エタノールを含まない培地での増殖に比較して著しく遅れており、清酒酵母 K-9 に見られる増殖の遅れよりも顕著に大きいことが分かる。この結果から、清酒酵母 K-9 は実験室酵母 X2180-1A に比べてエタノール耐性が高いことが示された。

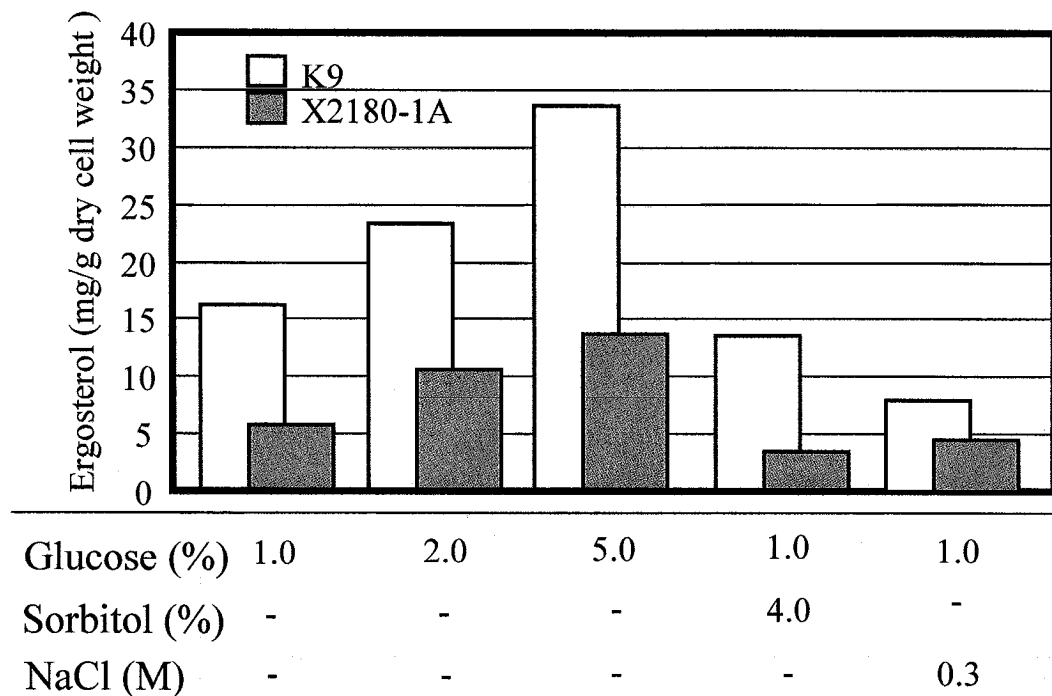
エルゴステロール合成量が低下した *erg6* 変異がエタノール感受性を引き起こすという研究結果から (Inoue et al. 2000)、エタノール耐性にエルゴステロール合成が重要な役割を果たしていることが報告されていることを踏まえ、種々の増殖条件下での清酒酵母 K-9 及び実験室酵母 X2180-1A のエルゴステロール合成量の分析を行った。

## 第 2 項 種々の培養条件下での清酒酵母及び実験室酵母の総エルゴステロール量

SD 液体培地で 25℃、96 時間培養したときの清酒酵母 K-9 と実験室酵母 X2180-X の総エルゴステロール量は、それぞれ 16.5、5.8 mg/g dry cell weight であり、清酒酵母 K-9 の総エルゴステロール量は実験室酵母 X2180-1A の約 3 倍多くなっていた (Fig. 2)。次に、清酒醸造初期にはグルコース濃度が高くなり、浸透圧が高くなることが酵母のエルゴステロール合成に影響しているのではないかと考え、グルコース濃度と浸透圧の総エルゴステロール量への影響を解析した。グルコース添加を行ったときの清酒酵母 K-9 と実験室酵母 X2180-1A の総エルゴステロール量を Fig. 2 に示した。培地中のグルコース濃度を高くすると、清酒酵母 K-9、実験室酵母 X2180-1A とともに総エルゴステロール量は増加していた。グルコースの代わりに、D-ソルビトールまたは NaCl で 5 %



グルコースと同じになるように培地の浸透圧を調整し、浸透圧が総エルゴステロール量に及ぼす影響を解析したが、これらの条件下では1%グルコースを含む培地よりもむしろ総エルゴステロール量は少なくなっていた。



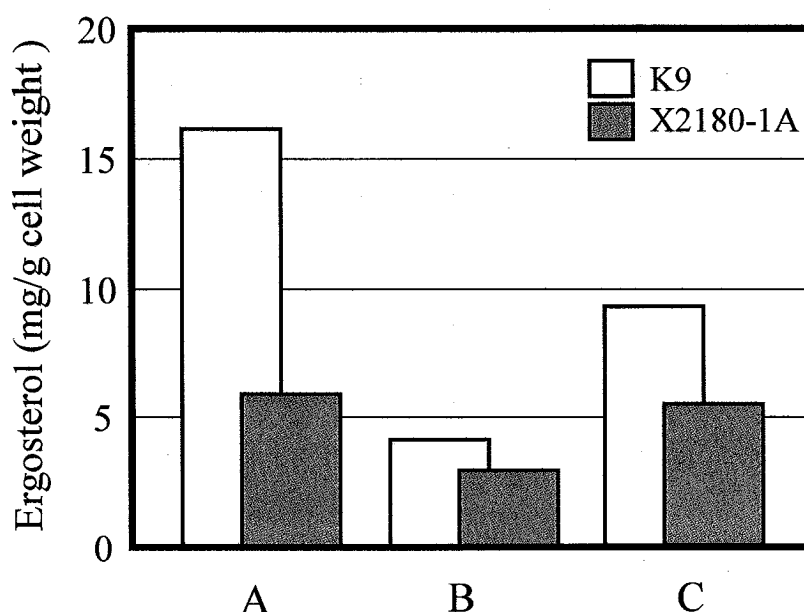
**Fig. 2. Ergosterol Contents of *S. cerevisiae* K-9 and X2180-1A.**

Each type of yeast cells was cultured at 25°C for 96 h aerobically in SD medium containing glucose and an osmotic adjuster respectively.

これらの結果から、グルコースは酵母の総エルゴステロール量を増加させる効果があるが、その効果は浸透圧によるものではないことが分かった。また、検討した全ての条件下で清酒酵母 K-9 の総エルゴステロール量は実験室酵母 X2180-1A よりも多くなっていた。

### 第 3 項 酸素及びエタノールが酵母の総エルゴステロール量に及ぼす影響

清酒醸造は低酸素状態であり、またそのアルコール濃度は 20% にも達する。エルゴステロール合成には分子状酸素が必要であるにも関わらず、清酒酵母は低酸素状態の清酒もろみの中で細胞膜の機能を正常に維持しなければならない。そこで清酒酵母のエルゴステロール合成に与える酸素の影響を解析した。



**Fig. 3. Influences of Oxygen and Ethanol on Ergosterol Contents of Yeast Cells of *S. cerevisiae* K-9 and X2180-1A.**

Yeast cells were cultured at 25°C for 96 h in SD medium containing 0% (A and B) or 5% ethanol (C) with shaking (aerobic, A and C) and without shaking (hypoxic, B).

清酒酵母 K-9 及び実験室酵母 X2180-1A を SD 液体培地で振盪及び静置で 25°C、96 時間培養し、総エルゴステロール量を測定した。静置培養では振盪培養に比較して清酒酵母 K-9 で 1/4 に、

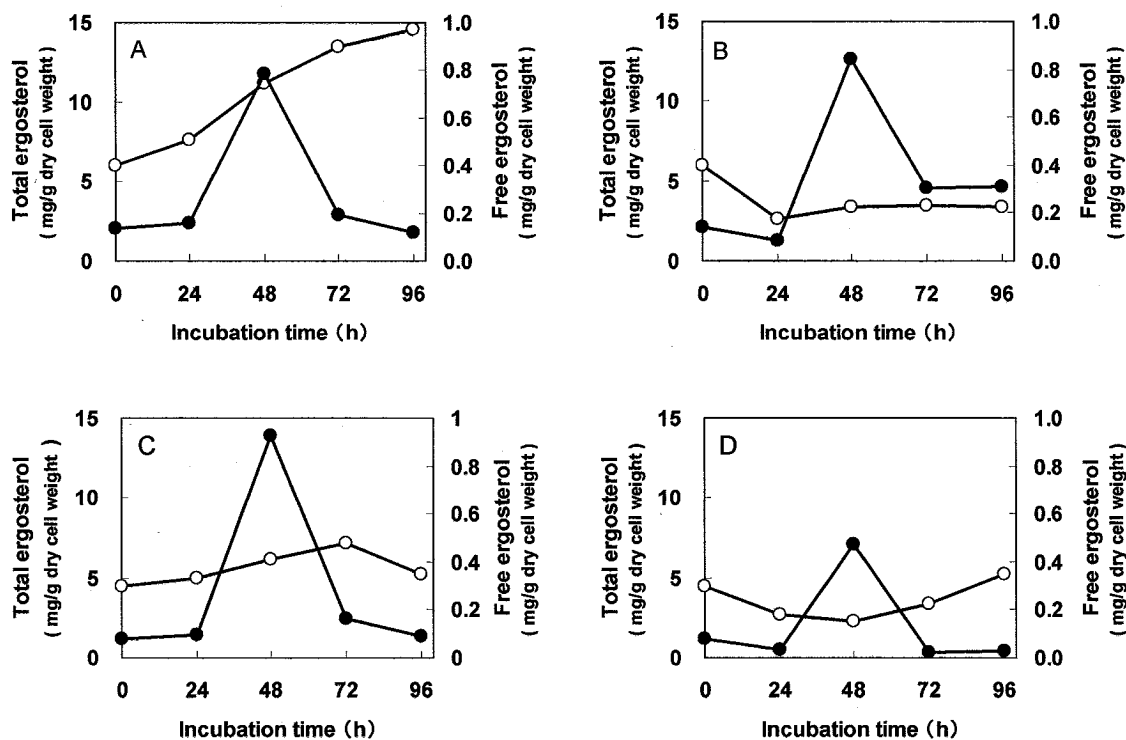
実験室酵母 X2180-1A では 1/2 に減少していた (Fig. 3-A, B)。清酒酵母 K-9 の総エルゴステロール量は静置培養を行うことによって実験室酵母 X2180-1A に比較して大きく減少していたが、それでもなお実験室酵母 X2180-1A の総エルゴステロール量よりも多くなっていた。このように、清酒酵母 K-9 は振盪、静置のどちらの条件でも実験室酵母よりも高いエルゴステロール合成能を有していることが分かった。

次に清酒醸造において高濃度に存在しているエタノールが、エルゴステロール合成に及ぼす影響を解析した。エルゴステロールは酵母のエタノール耐性に関与していることから、エタノールの存在は酵母のエルゴステロール含量を増加させるのではないかと考えられたが、エタノールは清酒酵母 K-9 の総エルゴステロール量を減少させていた (Fig. 3-C)。実験室酵母 X2180-1A の総エルゴステロール量は増加していたが、やはり清酒酵母の総エルゴステロール量は実験室酵母のものよりも多くなっていた。

#### 第 4 項 酸素及びエタノールが酵母のフリーエルゴステロール量に及ぼす影響

これまで述べてきたように、低酸素状態とエタノールは酵母のエルゴステロール合成を減少する効果がある。これらは醸造工程に共通する要因であり、醸造中のエルゴステロール合成に影響を与えている可能性がある。そこでエタノールと低酸素の相乗効果を詳細に解析することとした。先にも述べたように、エルゴステロールは細胞膜上で機能しているフリーのエルゴステロールと脂質顆粒内に貯蔵されているステロールエステルの二つの形態で存在している。フリーのエルゴステロールはラフトや膜の流動性に影響し、エタノール発酵に重要な Pma1p を始め Gas1p、Tat2p など膜に存在するいくつかのタンパク質の機能維持に関与して

いると考えられ、フリーのエルゴステロールの挙動が発酵中のエタノール耐性に重要ではないかと考え、フリーのエルゴステロールとステロールエステルを分別して測定した。フリーのエルゴステロールと総エルゴステロールの経時変化を Fig. 4 に示した。

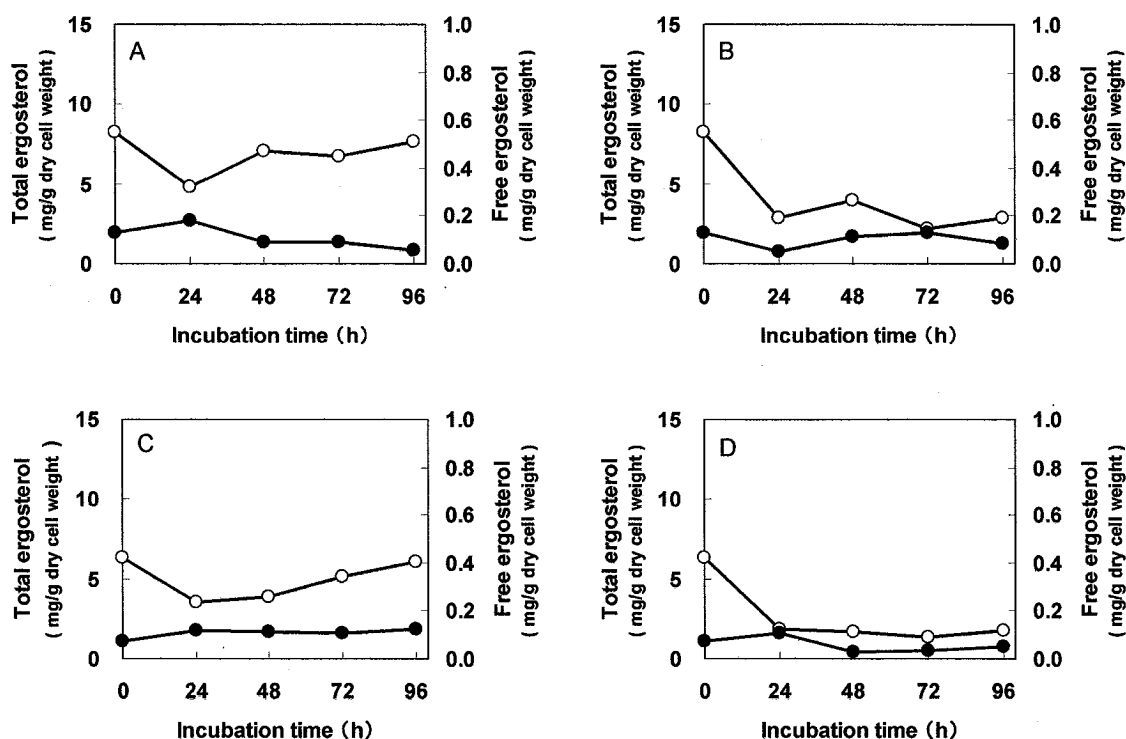


**Fig. 4. Time Courses of Free and Total Ergosterol Contents of Yeast Cells under Aerobic and Hypoxic Conditions without Ethanol.**

A, K-9 cultured under aerobic conditions; B, K-9 cultured under hypoxic conditions; C, X2180-1A under aerobic conditions; D, X2180-1A under hypoxic conditions. Yeast cells cultured in liquid SD medium without ethanol at 25°C. Open circles, total ergosterol contents; closed circles, free ergosterol contents.

振盪条件下では、清酒酵母 K-9 の総エルゴステロール量は培養時間の経過に応じて増加し 15 mg/g dry cell weight に達したが、静置条件下ではやや減少していた (Fig. 4-A, B)。実験室酵母 X2180-1A の総エルゴステロール量は振盪、静置培養ともに培養時間の経過に関わらず大きな変化は見られなかった (Fig. 4-C, D)。清酒酵母 K-9、実験室酵母 X2180-1A 共に、振盪、静置培養でフリーのエルゴステロールは培養時間 48 時間で一時的に増加していた。清酒酵母 K-9 ではフリーのエルゴステロールは、振盪、静置の両培養条件下でほぼ同じであるが、実験室酵母 X2180-1A では振盪培養に比較して静置培養ではフリーのエルゴステロール量は減少しており、培養 48 時間のフリーエルゴステロール量は約 1/2 であった。

エタノールの存在は総エルゴステロール量に影響していることが確認されたので、低酸素とエタノールが総エルゴステロール量とフリーのエルゴステロール量に相乗的な影響を与えているか検討を加えた (Fig.5)。エタノールは清酒酵母 K-9、実験室酵母 X2180-1A 共に総エルゴステロール量、フリーのエルゴステロール量に影響を与えていた。エタノールの添加により、総エルゴステロール量は減少していた。振盪培養での清酒酵母 K-9 と静置培養での実験室酵母 X2180-1A で総エルゴステロール量が大きく減少していたが、検討した全ての培養条件下で清酒酵母 K-9 の総エルゴステロール量は実験室酵母 X2180-1A よりも多いことが確認された。エタノールはフリーのエルゴステロールに大きな影響を示し、5%のエタノール添加では、培養 48 時間に見られていた一時的なフリーのエルゴステロールの上昇が振盪・静置培養ともにみられなくなっていた。フリーのエルゴステロールの量は K-9 では振盪条件下と静置条件下でほぼ同じであったが、実験室酵母 X2180-1A では静置条件下で減少していることが分かった。



**Fig. 5. Time Courses of Free and Total Ergosterol Contents of Yeast Cells under Aerobic and Hypoxic Conditions with Ethanol.**

A, K-9 cultured under aerobic conditions; B, K-9 cultured under hypoxic conditions; C, X2180-1A under aerobic conditions; D, X2180-1A under hypoxic conditions. Yeast cells were cultured in liquid SD medium containing 5% ethanol under aerobic and hypoxic conditions at 25°C. Open circles, total ergosterol contents; closed circles, free ergosterol contents.

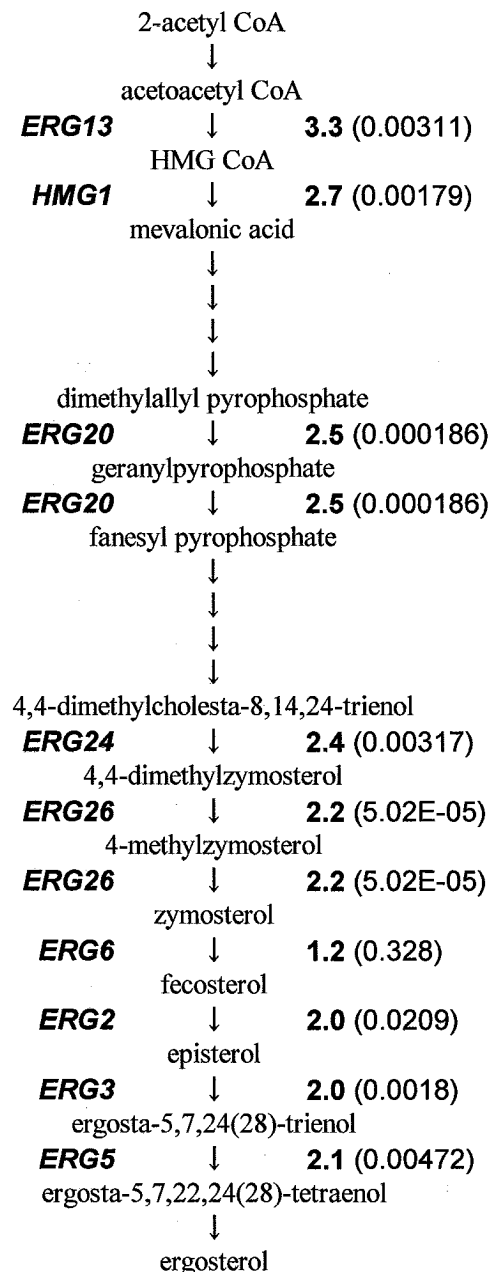
## 第 5 項 清酒酵母のエルゴステロール合成遺伝子の発現解析

清酒酵母 K-9 は実験室酵母 X2180-1A に比較してエルゴステロール合成能、蓄積能ともに高いことが分かった。清酒酵母 K-9 のこのような特徴がエルゴステロール合成遺伝子の発現の違いに

よるものかどうか、DNA マイクロアレイを用いて解析を行った。清酒酵母 K-9、実験室酵母 X2180-1A とともに SD 液体培地で独立した 2 回の培養を行い、トータル RNA を抽出して蛍光標識操作を行い、2 回の独立したマイクロアレイへのハイブリダイズを蛍光標識の入れ替えを行い発現解析した。

マイクロアレイで解析を行った 19 のエルゴステロール合成遺伝子のうち、清酒酵母 K-9 において 9 遺伝子が実験室酵母 X2180-1A に比較して 2 倍以上発現しており (Fig. 6 および Table 1)、実験室酵母 X2180-1A において清酒酵母 K-9 よりも高発現している遺伝子は見られなかった。

清酒酵母 K-9 に見られるエルゴステロール合成遺伝子の高発現は清酒酵母の高いエルゴステロール合成能の一因と考えられる。



**Fig. 6. Overexpressed Genes Involved in Ergosterol Biosynthesis in K-9.**

From DNA microarray analysis ( $n = 4$ ), overexpressed genes involved in ergosterol biosynthesis in K-9, its expression ratio compared with that of X2180-1A, and  $p$ -value of t-test.

**Table 1.** Overexpressed Ergosterol Biosynthesis Genes in K-9

Gene	Gene product	Ratio	p-value
<i>ERG13</i>	CoA synthetase	3.3	0.00311
<i>HMG1</i>	HMG CoA reductase	2.7	0.00179
<i>ERG20</i>	farnesyldiphosphate synthetase	2.5	0.000186
<i>ERG24</i>	C-14 sterol reductase	2.4	0.00317
<i>ERG26</i>	C-3 sterol dehydrogenase	2.2	5.02E-05
<i>ERG6*</i>	C-24 sterol methyltransferase	1.2	0.328
<i>ERG2</i>	C-8 sterol isomerase	2.0	0.0209
<i>ERG3</i>	C-5 sterol desaturase	2.0	0.0018
<i>ERG5</i>	C-22 sterol desaturase	2.1	0.00472
<i>ERG28</i>	unknown	2.1	0.0251

\**ERG6* was not overexpressed in K-9, shown as control gene

#### 第 4 節 考察

低酸素、高エタノール濃度、高浸透圧、低温、高グルコース濃度など酵母にとって清酒醸造条件は過酷なものと考えられる。清酒酵母は他の産業用酵母に比較して高いエタノール耐性を持っていることが知られていたが (Casey and Ingledew 1986)、本研究においても清酒酵母 *S. cerevisiae* K-9 は、実験室酵母 *S. cerevisiae* X2180-1A と比べて、液体培地でも寒天培地でもエタノールを 5% 添加した条件で、高い増殖能を示した (Fig. 1)。またエルゴステロールは酵母の細胞膜の機能維持やエタノール耐性に重要な役割を果たしていることが知られている (Bloch 1983; Alexandre et al. 1994; Swan and Watson 1998; Inoue et al. 2000)。本研究の中で清酒酵母 K-9 は実験室酵母 X2180-1A に比較して約 3 倍の総エルゴステロール量を持つことが示された。清酒酵母が約 20% ものエタノール濃度を達成することができる一因はその高いエタノール耐性であると考え、グルコース濃度、浸透圧、低酸素、エタノー



ルなど清酒醸造に関連すると思われる環境要因がエルゴステロールの細胞内の挙動にどのような影響を与えているか解析するために、清酒酵母 K-9 と実験室酵母 X2180-1A の細胞内エルゴステロールの分析を行った。

高濃度のグルコースはエルゴステロール合成を促進するが、浸透圧は影響がなく、グルコースのエルゴステロール合成に対する促進効果は浸透圧によるものではないことが分かった。エルゴステロール合成には多くの ATP をエネルギーとして要し(Parks and Casey 1995)、またエルゴステロール合成のスタートとなるアセチル Co-A も解糖系から供給されていることから、培地中のグルコース濃度が高くなることによって、エネルギー供給及び合成系の促進が起こり、総エルゴステロール量の増加が観察されたものと考えられるが、更に詳細な解析が必要であると思われる。

エルゴステロール合成には分子状酸素が必要であるため(Parks and Casey 1995; Daum et al. 1998)、清酒醸造における低酸素状態は酵母の総エルゴステロール量を低下させると予想される。さらにエタノールは酵母の膜の弾性(Tierney et al. 2005)やエルゴステロール合成に影響を与えるとされており(Walker-Caprioglio et al. 1990; Koukkou et al. 1993)、これら二つの要因は清酒酵母 K-9 および実験室酵母 X2180-1A の総エルゴステロール量を低下させる効果が見られた。しかし、本研究で検討を加えた全ての条件下で、清酒酵母 K-9 の総エルゴステロール量は実験室酵母 X2180-1A よりも多く、清酒酵母 K-9 が清酒醸造に関連する条件下でも高いエルゴステロール合成能を維持しているといえる。

エルゴステロールは酵母細胞中で、細胞膜上で機能しているフリーのエルゴステロールと脂質顆粒に貯蔵されているステロールエステルという二つの形態で存在しているが、膜に存在しラフトの形成を通して膜タンパク質の機能維持や膜の流動性に関与

しているフリーのエルゴステロールの方が、酵母細胞の機能維持に関しては重要であると思われる。低酸素条件下で、清酒酵母 K-9 の総エルゴステロール量は大きく減少したが、フリーのエルゴステロール量の減少は小さい。これと比較すると実験室酵母 X2180-A では低酸素条件下では総エルゴステロール量の減少は小さいが、フリーのエルゴステロール量は大きく減少していた。この結果から清酒酵母 K-9 は実験室酵母に比較して低酸素条件下でもフリーのエルゴステロールのホメオスタシスが維持されていると考えられる。

さらに、エタノールの存在は酵母細胞のエルゴステロールのホメオスタシスに大きい影響を持っていることがわかった。エタノールを培地中に添加することにより、培養 48 時間に見られた一時的なフリーのエルゴステロール量の上昇が見られなくなった。実験室酵母 X2180-1A では総エルゴステロール量の減少は小さいことから、フリーのエルゴステロール量の一時的な上昇が見られなくなったのは、エルゴステロール合成の抑制が原因とは考えられない。また、一時的なフリーのエルゴステロール量の上昇は見られても、ベースとなるフリーのエルゴステロール量はどちらの酵母でも安定していた。これらの結果から、フリーのエルゴステロールのホメオスタシスはエルゴステロール合成量には大きく影響されず、低酸素条件下やエタノール存在下でも膜の機能維持に必要なフリーエルゴステロールの量を保っていると考えられる。

清酒酵母・実験室酵母ともに、正常な細胞の機能を維持するためにフリーのエルゴステロール量をコントロールすることは重要であるが、フリーのエルゴステロールのリザーバーと考えられるステロールエステルは総エルゴステロール量の約 65~99 %と推算され、検討を加えた全ての条件下で清酒酵母 K-9 は実験室酵

母 X2180-1A よりも総エルゴステロール量が多かった。これらの結果から清酒酵母では高いエルゴステロール合成能により貯蔵したステロールエステルを利用し、低酸素やエタノール存在下というエルゴステロール合成が低下する環境の中でも細胞膜上に存在するフリーのエルゴステロール量を維持することで醸造環境下でも正常な細胞の機能を保っていると考えられる。

これらの結果は、DNA マイクロアレイを用いた清酒酵母 K-9 と実験室酵母 X2180-1A のエルゴステロール合成遺伝子の発現量の比較結果とも一致していた。エルゴステロール合成遺伝子のうち、9 つが清酒酵母 K-9 で実験室酵母 X2180-1A よりも高発現していた。特にエルゴステロール合成の上流での律速段階となっている HMG-CoA レダクターゼをコードしている *HMG1* とステロール合成酵素複合体の鍵となるタンパク質をコードしている *ERG28* (Veen et al. 2003; Mo and Bard 2005) の高発現が清酒酵母の高いエルゴステロール合成能、さらに清酒酵母の高いエタノール耐性と関連していると思われる。清酒醸造では低酸素、高エタノール濃度とエルゴステロール合成を低下させる条件が重なっているが、清酒酵母の高いエルゴステロール合成能がこのような環境下でのエタノール耐性の維持につながっているのではないだろうか。

清酒酵母と実験室酵母のエルゴステロール合成遺伝子の発現の違いは、*S. cerevisiae* S288c 由来の実験室酵母 X2180-1A に見られる *HAP1* の変異が原因と考えられる (Gaisne et al. 1999)。*HAP1* は *HMG1* を初めとして複数のエルゴステロール合成遺伝子の転写調節因子複合体に含まれるタンパク質をコードしている。さらに清酒酵母由来の *HAP1* を実験室酵母 X2180-1A に導入した株のエルゴステロール合成遺伝子の発現とエルゴステロール合成量が親株に比較して高くなるという研究もなされているが (Tamura

et al. 2004)、清酒酵母のエルゴステロール合成の制御についてはさらに詳細な研究を進める必要があると思われる。

これまで、酵母のエタノール耐性については酵母細胞の総エルゴステロール量についてのみ検討が加えられてきたが、本研究の中で、清酒酵母 K-9 は低酸素や高エタノール存在下条件下でも総エルゴステロール量とフリーのエルゴステロール量を高く維持することが示され、このような清酒酵母の能力が高いエタノール耐性につながっていると考えられた。

## 第 5 節 小括

酵母の細胞膜の状態を維持するためにエルゴステロールは必要な構成成分であり、これまでも酵母のエタノール耐性に重要な要素であることが知られていた。我々は、清酒醸造時に 20%もの高エタノール濃度を達成する清酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* K-9 と実験室酵母 X2180-1A の細胞中のエルゴステロール量に対して醸造条件がどのような影響を与えるか検討を加えた。清酒酵母 K-9 は実験を行った全ての培養条件下で、実験室酵母 X2180-1A よりも多い総エルゴステロール量を持つことが分かった。エタノールと低酸素は両方の株の総エルゴステロール量に対して相乗的な抑制効果を示したが、特に実験室酵母 X2180-1A のフリーエルゴステロール量に大きな抑制効果を示した。一方、清酒酵母 K-9 のフリーエルゴステロール量に対する影響は小さかった。醸造条件下でのフリーのエルゴステロール量の高いホメオスタシス維持能力が清酒酵母の重要な特徴となっているのかもしれない。DNA マイクロアレイによるエルゴステロール合成遺伝子の発現量の比較においても清酒酵母 K-9 では実験室酵母 X2180-1A に比べて高発現している遺伝子が多く見られた。

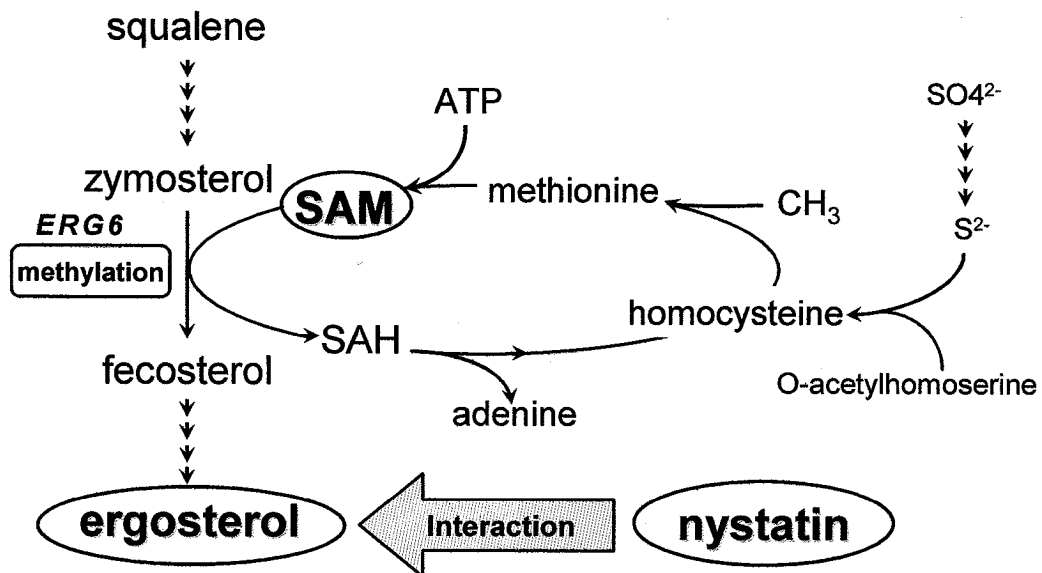
## 第 2 章 新規 S-アデノシルメチオニン高蓄積変異株の取得方法の開発と解析

### 第 1 節 緒言

S-アデノシルメチオニン(SAM)はタンパク質、核酸、多糖類、リン脂質、脂肪酸の主たるメチル基供与体であり、全ての生物において必要欠くべからざる代謝物である(Tabor and Tabor 1984)とともに、含硫アミノ酸生合成経路の代謝調節に関与する化合物として関心を集めている(Thomas and Surdin-Kerjan 1997)。一方、医学的な研究では SAM はアルコール性肝障害(Martínez-Chantar et al. 2002, Purohit and Russo 2002; Lieber 2002)、うつ病(Mischoulon and Fava 2002, Saletu et al. 2002, Nguyen and Gregan 2002)、関節炎(Padova 1987, Bradley et al 1994)、アルツハイマー病(Morrison 1996, Newman 2000)など様々な病気に効果がある化合物であることが示され、医薬品としての大きな可能性が見出されており、アメリカでは 1998 年からドラッグストアなどで購入できるサプリメントとして、ヨーロッパでは 1979 年から処方箋薬として利用されている。このように SAM の需要増加が見込まれているにも関わらず、非常に高価であることから効率の良い生産方法が望まれており、これまでにいくつか *Saccharomyces cerevisiae* を用いた SAM の効率的生産の試みがなされている。Shiozaki らは、酵母、細菌、カビ、放線菌など様々な微生物の SAM 生産性を広く調べ、*S. cerevisiae* が、しかも清酒酵母の一群が非常に高濃度の SAM を細胞内に蓄積することを見出した(1984; 1989)。また Shiomi らはエチオニン耐性遺伝子を酵母の染色体に導入することで SAM の生産を増加させることができると報告している(1995)。これらの試みにも関わらず、これまでサプリメントなどへの実用化が可能

な遺伝子操作を伴わない SAM 高蓄積酵母の効率的な選択方法は報告されていない。

SAMが関与している生体反応のひとつに *S. cerevisiae* におけるエルゴステロール生合成経路がある。この経路では、チモステロールが *ERG6* にコードされる  $\Delta$ -24-ステロール-C-メチルトランスフェラーゼ (EC 2.1.1.41) によってフェコステロールに変換される (Parks 1958)。この反応で、SAMはメチル基供与体として働き、消費される (Fig.7) (Dickinson and Schweizer 1999)。



**Fig. 7. Principle of the Nystatin Selection Method for the Isolation of SAM-Accumulating Yeasts.**

SAM is consumed at the transmethylation step as a methyl group donor in the biosynthesis of ergosterol. Nystatin, an antifungal reagent, interacts with ergosterol in the yeast cell membrane. Some of the nystatin-resistant mutants will have deficiencies in ergosterol biosynthesis, and will consume less SAM than their parental strains. Thus, SAM-accumulating mutants can be isolated efficiently by nystatin-resistant selection.

一方、ナイスタチンはこれまでにエルゴステロール合成系変異株の選択に利用されてきた(Trocha et al. 1977; Molzahn and Woods 1972; Barton 1974)。ナイスタチンは膜のエルゴステロールに結合し、膜の透過性を上昇させることにより抗真菌作用を示す化合物であり(Kobayashi and Medoff 1977)、増殖中の酵母にのみ抗菌作用を示すことから、栄養要求性株等の濃縮操作によく用いられており、Inoue らはこのナイスタチン濃縮法を用いてエタノール感受性株の取得に成功している。得られた変異株 5 株とも全て *erg6* に変異のある株であり、この株のエルゴステロール量は親株に比べて少ないことが示された(Inoue et al. 2000)。本研究で我々は、エルゴステロールの合成ができなくなった株では、消費される SAM の量が少なくなることにより、親株に比べて SAM を高蓄積するのではないかという仮説を立て、ナイスタチン耐性によりエルゴステロール合成変異株を選択することによる *S. cerevisiae* からの SAM 高蓄積株の選択方法の開発を試みた。また、得られた SAM 蓄積酵母のサプリメントとしての利用の可能性を探るために凍結乾燥酵母中の SAM の安定性と消化性についても解析を行った。

## 第 2 節 実験方法

### 第 1 項 供試菌株・遺伝子破壊株の構築及び培養条件

本研究で使用された菌株を Table 2 に示した。エタノール感受性変異株 es-5 は清酒酵母 K-9 の一倍体株 SY-32 より Inoue らによって取得された(2000)。*Xerg4* は実験室酵母 *S. cerevisiae* X2180-1A から、 $\Delta$ *erg4* と  $\Delta$ *erg6* は *S. cerevisiae* BY4742 から、*kanMX4* の両端に *ERG4* ORF または *ERG6* ORF のそれぞれ上流・下流の 500bp をつないだ PCR 産物を用いて作製した株である。

YPD 培地 (2 % 酵母エキス、1 % ペプトン、2 % D-グルコース) および SD 培地 (0.67 % Difco yeast nitrogen base w/o amino acids、2 % D-グルコース) に栄養要求性を補完するアミノ酸を適宜添加して使用した。ナイスタチン耐性変異株の選択には、YPD 培地に 50  $\mu\text{g/ml}$  となるようにナイスタチンを加えた寒天培地を用いた。酵母の SAM 蓄積量の測定には、SAM の蓄積を促進するために、O 培地 (5 % D-グルコース、1 % peptone、0.5 % yeast extract、0.4 %  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.2 %  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 、0.05 %  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.15 % L-methionine、pH 6) を用いて培養を行った (Shiozaki et al. 1984)。

Table 2. Strains Used in This Study

Strain	Genotype	Source
K-9		sake yeast
es5	<i>MAT <math>\alpha</math> lys2 erg6</i>	Inoue et al. (2000)
X2180-1A	<i>MAT <math>\alpha</math></i>	laboratory yeast
<i>Xerg4</i>	<i>MAT <math>\alpha</math> erg4::kanMX4</i>	In this study
BY4742	<i>MAT <math>\alpha</math> his3 <math>\Delta</math>1 leu2 <math>\Delta</math>0 lys2 <math>\Delta</math>0 ura3 <math>\Delta</math>0</i>	Invitrogen
<i><math>\Delta</math>erg4</i>	<i>MAT <math>\alpha</math> his3 <math>\Delta</math>1 leu2 <math>\Delta</math>0 lys2 <math>\Delta</math>0 ura3 <math>\Delta</math>0 erg4 <math>\Delta</math>::kanMX4</i>	Invitrogen
<i><math>\Delta</math>erg6</i>	<i>MAT <math>\alpha</math> his3 <math>\Delta</math>1 leu2 <math>\Delta</math>0 lys2 <math>\Delta</math>0 ura3 <math>\Delta</math>0 erg6 <math>\Delta</math>::kanMX4</i>	Invitrogen

## 第 2 項 ナイスタチン耐性変異株の取得方法

*S. cerevisiae* K-9 及び X2180-1A を YPD 培地にて 30 °C で一晩、振盪で前培養を行い、遠心分離にて集菌した後、滅菌水で洗浄した菌体を少量の滅菌水に  $2.5 \times 10^7$  cells/ml となるように懸濁し、選択培地に塗布した。生存率 10~20 % となるように UV 照射を行い、30 °C で 4 日間培養した後に生育してきたコロニーを単離し、ナイスタチン耐性変異株として取得した。



### 第 3 項 酵母に含まれる S-アデノシルメチオニンの定量方法

酵母は、4 ml の O 培地に一白金耳植菌し、30 °C にて 48 時間振盪培養を行った。得られた菌体は氷冷滅菌水で 2 回洗浄し、1 ml の 10 % 過塩素酸水溶液に懸濁し、室温で 1 時間、緩やかに攪拌しながら抽出を行ったのち(Shiozaki et al. 1984)、遠心分離にて得られた上清を 0.45  $\mu\text{m}$  のフィルターで濾過し、Accusep fused silica 75  $\mu\text{m}$  x 60 cm (Waters Chromatography Division, Milford, MA, USA) を使用し、キャピラリー電気泳動装置 Waters Ion Analyzer (Waters) を用いて測定した(Panak et al. 1997)。

### 第 4 項 S-アデノシルメチオニン高蓄積株の増殖特性の評価

ナイスタチン耐性変異株として取得された SAM 高蓄積株のエタノール存在下での増殖特性は、YPD 液体培地で 30 °C で一晩振盪培養した菌体を 5% エタノール添加の YPD 液体培地に OD<sub>660</sub> が 0.1 となるように植菌し、30 °C で振盪培養しながら 30 分おきに OD<sub>660</sub> を測定し、エタノール無添加での増殖特性と比較した。

### 第 5 項 酵母に含まれる総エルゴステロール量の定量とステロールの精製方法

酵母は、5 ml の SD 培地に一白金耳植菌し、30 °C で 48 時間振盪培養を行った。得られた菌体の総エルゴステロール量は第 1 章第 2 節 第 3 項に示した方法で測定した。また酵母から抽出されたステロールの精製はエルゴステロールの定量と同じ条件の HPLC 条件で、各ステロール画分が単一ピークとなるまで分取・精製を行った。また、各画分の精製および保存に関しては、N<sub>2</sub> 置換を行った密閉容器で行った。

## 第 6 項 ステロールの同定方法

酵母から抽出・精製されたステロールは  $^1\text{H}$  NMR および  $^{13}\text{C}$  NMR 及び GC-MS によって同定を行った。 $^1\text{H}$  及び  $^{13}\text{C}$  NMR の測定は  $\text{CDCl}_3$  溶媒中で JEOL ECP-500 spectrometer を用いて測定した。 $\text{CDCl}_3$  の  $\delta_{\text{H}}$  7.24 ppm および  $\delta_{\text{C}}$  77.0 ppm のシグナルを NMR スペクトルの内部標準として使用した。ステロールの NMR シグナルは  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY, HMQC および HMBC スペクトルにより取得した。GC-MS スペクトルは Shimadzu QP-5050A spectrometer を用いて測定した。

ステロール 1 のシグナルは、 $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.93 (d, 1H,  $J = 15.8$  Hz, H-23), 5.57 (dd, 1H,  $J = 8.9, 15.8$  Hz, H-22), 5.55 (m, 1H, H-6), 5.37 (m, 1H, H-7), 4.82 (d, 2H,  $J = 15.8$  Hz, H-28), 3.60 (m, 1H, H-3), 2.53 (m, 1H, H-25), 2.45 (m, 1H, H-4), 2.26 (m, 1H, H-4), 2.13 (m, 1H, H-20), 2.06 (m, 1H, H-12), 1.96 (m, 1H, H-9), 1.90-1.84 (3H, H-1, H-2, H-14), 1.76-1.62 (3H, H-11, H-15, H-16), 1.59 (m, 1H, H-11), 1.46 (m, 1H, H-2), 1.41-1.22 (5H, H-1, H-12, H-15, H-16, H-17), 1.06 (d, 3H,  $J = 6.6$  Hz, H-21), 1.06 (d, 3H,  $J = 6.6$  Hz, H-27), 1.05 (d, 3H,  $J = 6.6$  Hz, H-26), 0.93 (s, 3H, H-19), 0.63 (s, 3H, H-18)であった。 $^{13}\text{C}$  NMR (125MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) のデータは Table 3 に示した。GC-MS によって分子イオンピークは  $m/z$  394 に観測された。

ステロール 2 (zymosterol) のシグナルは、 $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.07 (t, 1H,  $J = 7.1$  Hz, H-24), 3.60 (m, 1H, H-3), 2.10-1.92 (6H, H-7, H-11, H-12, H-12, H-14, H-23), 1.90-1.78 (2H, H-2, H-23), 1.73 (1H, m, H-1), 1.70-1.47 (6H, H-4, H-6, H-7, H-15, H-15, H-16), 1.66 (s, 3H, H-27), 1.58 (s, 3H, H-26), 1.47-1.01 (11H, H-1, H-2, H-4, H-5, H-6, H-11, H-16, H-17, H-20, H-22, H-22), 0.93 (s, 3H, H-19), 0.92 (d, 3H,  $J = 6.6$  Hz, H-21), 0.59 (s, 3H, H-18)であった。 $^{13}\text{C}$  NMR

(125MHz, CDCl<sub>3</sub>)のデータは Table 3 に示した。GC-MS において分子イオンピークは m/z 384 に観測された。

Table 3 <sup>13</sup>C Chemical Shifts<sup>a</sup> (ppm) of Isolated Sterols.

Carbon Atom	Sterol 1, Rt=21min	Sterol 2, Rt=24min	Sterol 4, Rt=30min	ステロール 4 (ergosta-5,7-dien-3-ol) のシグナルは、 <sup>1</sup> H NMR (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ
1	38.4	35.1	38.4	5.55 (m, 1H, H-6),
2	32.0	31.7	32.0	5.37 (m, 1H, H-7),
3	70.5	71.2	70.5	3.62 (m, 1H, H-3),
4	40.8	38.4	40.8	2.45 (1H, m, H-4),
5	139.9	40.8	139.8	2.26 (1H, m, H-4),
6	119.6	25.5	119.6	2.07 (1H, m, H-12),
7	116.4	27.2	116.3	1.94-1.83 (4H, H-1, H-2, H-14, H-23),
8	141.2	128.3	141.5	1.85 (1H, m, H-9),
9	46.2	135.0	46.2	1.75-1.64 (4H, H-11, H-16, H-22, H-23),
10	37.0	35.7	37.0	1.60-1.47 (5H, H-2, H-11, H-15, H-15, H-25),
11	21.1	23.0	21.1	
12	39.1	36.9	39.2	
13	43.0	42.1	42.9	
14	54.5	51.9	54.5	
15	23.0	23.8	23.6	
16	28.2	28.8	28.0	
17	55.8	54.8	55.7	
18	12.1	11.2	11.8	
19	16.3	17.8	16.3	
20	40.6	36.1	36.5	
21	20.6	18.7	19.0	
22	135.8	36.0	33.7	
23	129.4	24.8	30.6	
24	153.0	125.2	39.1	
25	29.4	130.9	31.5	
26	22.4 <sup>b</sup>	17.9	17.6 <sup>b</sup>	
27	22.1 <sup>b</sup>	25.7	20.5 <sup>b</sup>	
28	109.7		15.4	

a d 77.0 was used as the internal standard.

b Assignments may be reversed.

1.42-1.15 (7H, H-1, H-12, H-16, H-17, H-20, H-22, H-24), 0.92 (s, 3H, H-19), 0.92 (d, 3H,  $J = 6.4$  Hz, H-21), 0.84 (d, 3H,  $J = 6.6$  Hz, H-27), 0.77 (d, 3H,  $J = 6.9$  Hz, H-28), 0.76 (d, 3H,  $J = 6.6$  Hz, H-26), 0.63 (s, 3H, H-18)であった。 $^{13}\text{C}$  NMR (125MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) のデータは Table 3 に示した。GC-MS において分子イオンピークは  $m/z$  398 に観測された。

#### 第 7 項 凍結乾燥酵母に含まれる S-アデノシルメチオニンの安定性

SAM を高蓄積させた後、凍結乾燥した酵母中の SAM の安定性を  $-20$ 、 $4$ 、 $25$  °C の各温度で保存し、第 2 章 第 2 節 第 3 項に述べた方法で SAM およびメチルチオアデノシン(MTA)の分析を行った。凍結乾燥直後の菌体に含まれる SAM 量を 100 %として保存中の SAM の安定性を評価した。

#### 第 8 項 凍結乾燥酵母に含まれる S-アデノシルメチオニンの消化性

生菌及び凍結乾燥した SAM 蓄積酵母から、消化管滞留中の SAM の消化性を調べるために、擬似消化液中での SAM 抽出実験を行った。HCl で pH 1.2 に調整した milliQ に 3.2 mg/ml ペプシンを添加、または無添加の溶液を擬似消化液(SGF)として用意し、生菌または凍結乾燥した SAM 蓄積酵母を懸濁後、 $37$  °C でゆるやかに攪拌しながら消化を行った(Astwood et al. 1996)。0, 5, 15, 30, 60, 120 ごとに反応を停止し、菌体を遠心分離により除いた後の上清画分に含まれる SAM を直接、第 2 章 第 2 節 第 3 項に述べた方法で分析した。本実験に用いた酵母の集菌時、または凍結乾燥調整時の酵母を第 2 章 第 2 節 第 3 項で示したように、10%過塩素酸溶液で 1 時間抽出したときの SAM 量を 100 %として、各

反応時間における SAM の消化性を評価した。

### 第 3 節 実験結果

#### 第 1 項 清酒酵母及びエタノール感受性株 es5 の S-アデノシルメチオニン及びエルゴステロール量

ナイスタチン耐性変異株として取得された *S. cerevisiae* es5 株は *erg6* 変異を持っておりエルゴステロール合成量は非常に少ないものであった(Inoue et al. 2000)。エルゴステロール合成系に変異のある株は、SAM を高蓄積しているという仮説通りであれば、この es5 株は SAM を蓄積していると考えられる。そこで、この *S. cerevisiae* es5 と親株である K-9 の SAM とエルゴステロールを測定した。K-9 のエルゴステロールは 9.30 mg/g dry cell weight であったが、es5 ではわずか 1.04 mg/g dry cell weight であった。この結果は、Inoue らの報告と一致した(Inoue et al. 2000)。一方、es5 の SAM は 45.7 mg/g dry cell weight であり、K-9 の 3.5 倍蓄積していた。この結果からも、エルゴステロール合成変異が es5 の SAM 蓄積を引き起こしたと考えられる。

K-9 は他の酵母よりも高いレベルの SAM を蓄積することが報告されており(Shiozaki et al. 1984)、我々はナイスタチン耐性変異株の選択による SAM 高蓄積株の取得に K-9 を親株として使用することとした。

#### 第 2 項 ナイスタチン耐性変異株の取得及び S-アデノシルメチオニン量

まず、10~20%の生存率となるように UV 照射による変異処理を行った後、選択培地を用いてナイスタチン耐性変異株を単離した。二次スクリーニングとして選択培地によって取得されたナイ

スタチン耐性変異株の SAM およびエルゴステロール量を測定した。

K-9 からは 34 株、X2180-1A からは 100 株のナイスタチン耐性変異株を単離し、ナイスタチン耐性変異株の頻度はそれぞれ  $3 \times 10^{-6}$  と  $1.0 \times 10^{-5}$  であった。

次に、得られたナイスタチン耐性変異株の SAM 蓄積量を測定した。K-9 から得られた 34 株のナイスタチン耐性変異株のうち 3 株が親株に比較して 1.7~3 倍の SAM を蓄積していた (Fig. 8)。これらの株をそれぞれ KUN14、KUN18、KUN22 と命名した。X2180-1A 株から得られた 100 株のナイスタチン耐性変異株のうち、8 株で親株に比較して 4.2~5.5 倍の SAM を蓄積していた。これら 8 株のうち SAM 蓄積量の多い 5 株をそれぞれ XUN2、XUN12、XUN15、XUN49、XUN89 株と命名した。親株である清酒酵母 K-9 は、実験室酵母 X2180-1A よりも約 4 倍の SAM を蓄積しており、この結果は Shiozaki らの報告とも一致した (1984)。

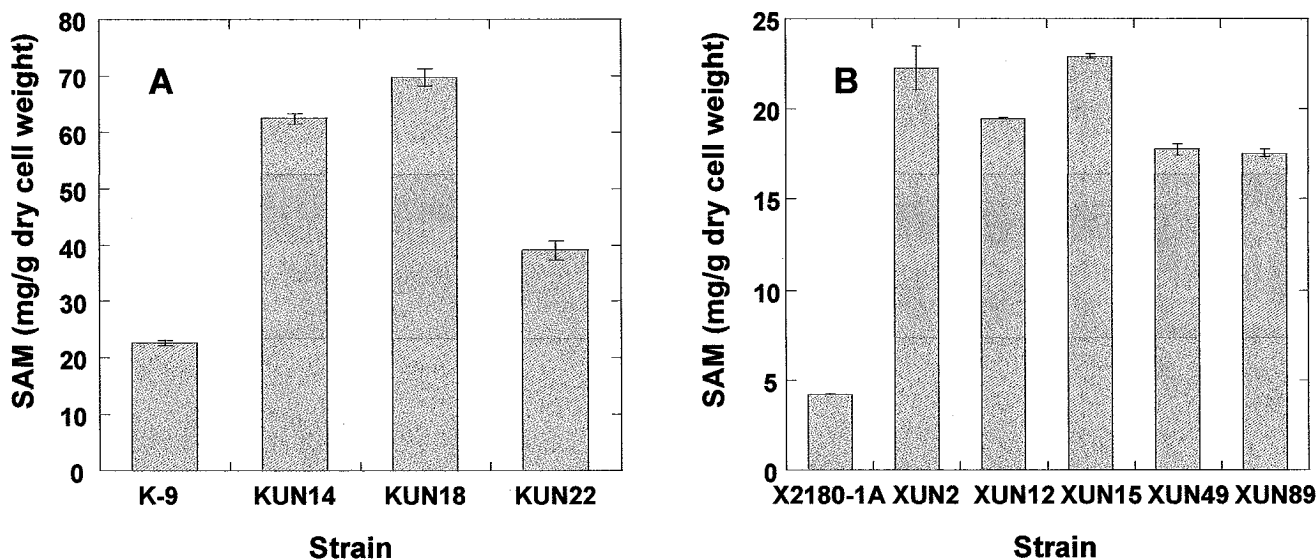


Fig.8. SAM Contents of SAM-Accumulating Mutants Isolated from *S. cerevisiae* K-9 (A), and X2180-1A (B).

The yeast strains, cultured in SD medium for 48 h at 30°C.

### 第 3 項 S-アデノシルメチオニン高蓄積株のエルゴステロール量

清酒酵母から得られた SAM 高蓄積変異株 KUN14、KUN18、KUN22 のエルゴステロール量は親株に比較して、おおよそ 50%、50%、20%であった。実験室酵母から得られた SAM 高蓄積変異株 XUN 株のエルゴステロール量は HPLC による分析では検出できないほど減少していた (Fig. 9)。

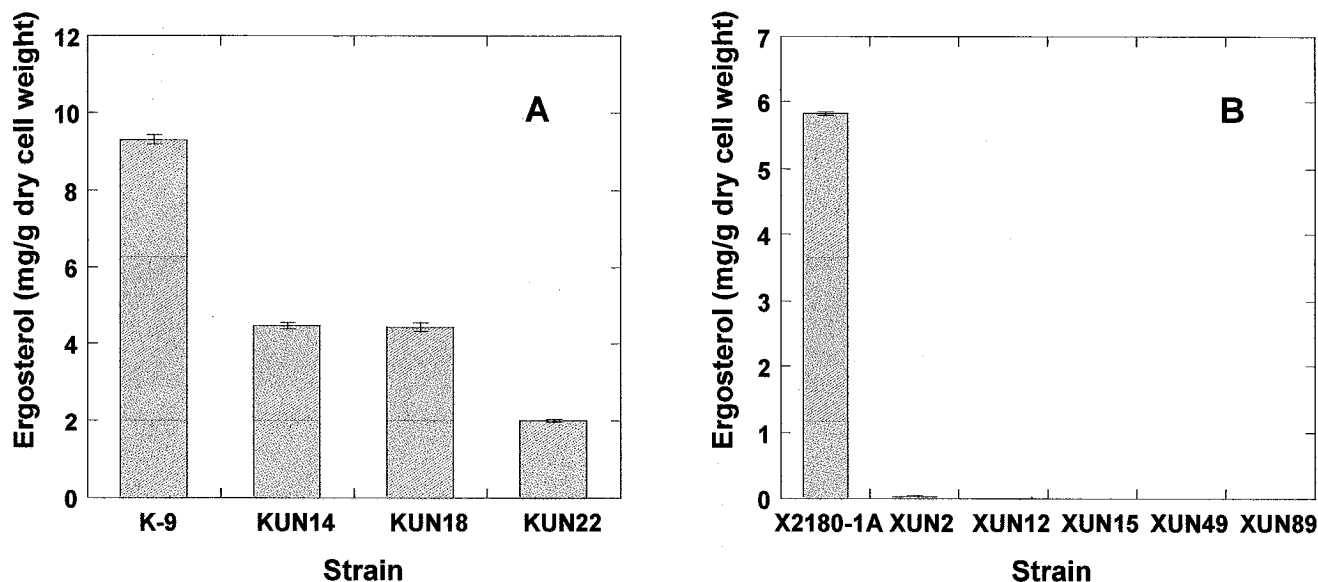


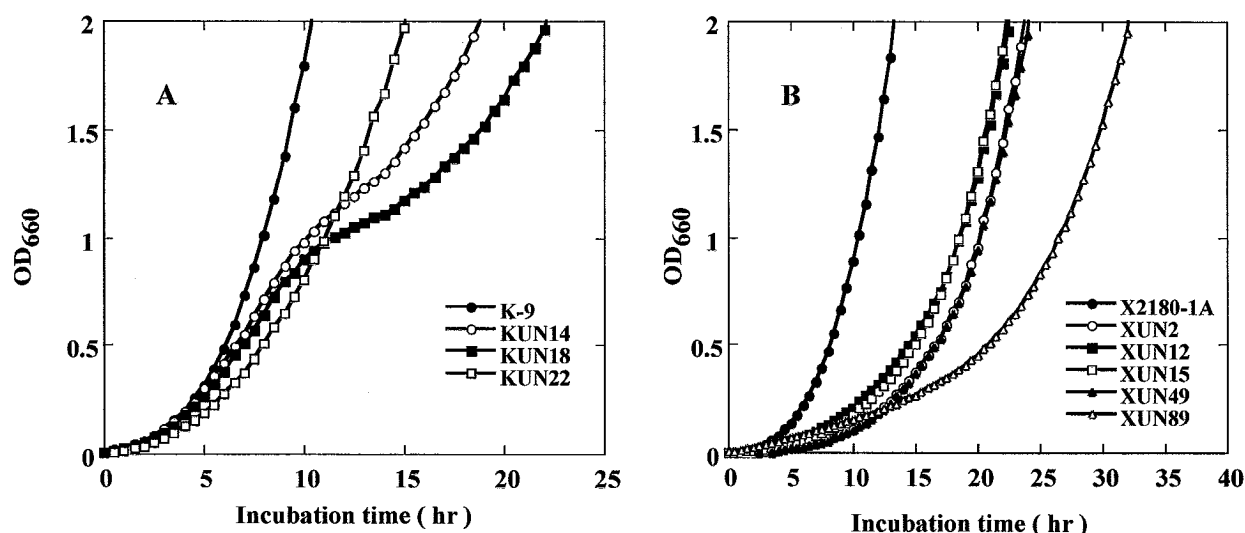
Fig. 9. Ergosterol Contents of SAM-Accumulating Mutants Isolated from *S. cerevisiae* K-9 (A), and X2180-1A (B).

The yeast strains, cultured in SD medium for 48 h at 30°C.

### 第 4 項 S-アデノシルメチオニン高蓄積株の増殖特性

ナイスタチン耐性変異株として取得された SAM 高蓄積株は親株に比べてエルゴステロール量が減少していたことから、エルゴステロール合成系に変異があると考えられる。エルゴステロールは酵母のエタノール耐性に重要な役割を果たしていることが報告されているため、得られた SAM 高蓄積株のエタノール耐性を

5%エタノール存在下での増殖特性として評価した。結果を Fig. 10 に示した。清酒酵母 K-9 から取得した変異株は、増殖初期の遅延は見られなかったが、対数増殖期での増殖速度は親株と比較すると遅くなっていた。実験室酵母 X2180-1A から取得された変異株は、増殖初期から親株よりも増殖が遅くなっていた。



**Fig. 10. Growth Profiles of SAM-Accumulating Mutants Isolated from *S. cerevisiae* K-9 (A), and X2180-1A (B).**

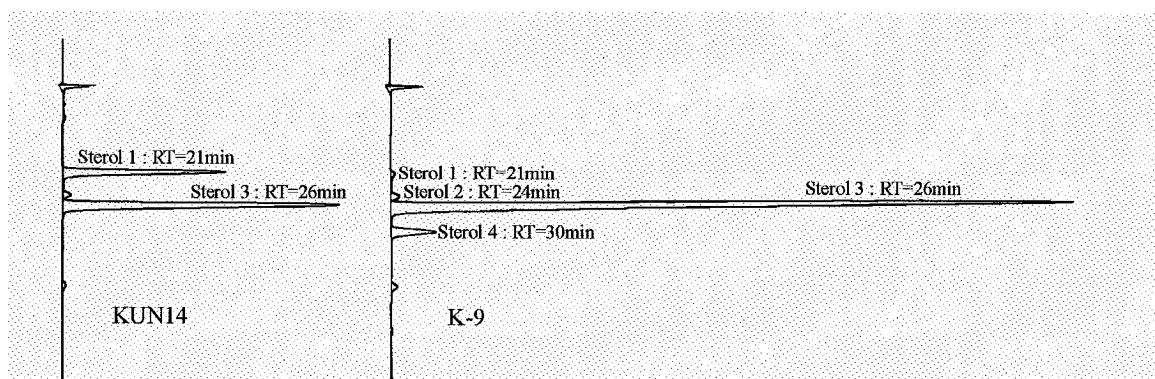
The yeast strains were pre-cultured in YPD medium for 24 h at 30°C, and were inoculated in YPD medium containing 5 % ethanol.

#### 第 5 項 S-アデノシルメチオニン高蓄積株で増加するステロールの同定

K-9 から得られた SAM 高蓄積株のステロール組成は、親株のステロール組成とは異なっていた (Fig. 11)。このことは、SAM 高蓄積株のエルゴステロール合成系には何らかの変異が生じていることを示唆している。そこで SAM 高蓄積株のエルゴステロール合成系の変異を詳細に調べるために、KUN14 および KUN18 で蓄積が認められたステロールに焦点を当て解析を行った。KUN14



と KUN18 の二つの株は SAM 及びエルゴステロール量、エタノール 5%存在下での増殖特性、ステロール組成がほぼ同じであることからエルゴステロール合成系に同じ変異が生じていることが予想された。KUN14 及び KUN18 では親株ではわずかしこ検出されないステロール (Sterol 1: RT=21min) が蓄積し、親株で多く見られるステロール (Sterol 3: RT=24min) が減少していた (Fig.11)。このことから KUN14 で特異的に蓄積しているステロールの解析を行い、KUN14 のエルゴステロール合成系の変異について解析を行った。



**Fig.11. HPLC Chromatograms of Sterols Extracted from *S. cerevisiae* K-9 and SAM-Accumulating Mutant KUN14.**

親株である清酒酵母 K-9 および SAM 高蓄積株 KUN14 より調整したステロール画分は、HPLC でエルゴステロールの定量と各ステロールの精製を行い、得られた精製ステロールの同定を GC-MS および NMR で行った。

*S. cerevisiae* K-9 から HPLC により検出されるステロールは 4 種類あり、エルゴステロールの定量を行う分析条件と同じ条件でステロールの精製を行った。Sterol 1 は HPLC 分析では 21 分のリテンションタイムを示しており、GC-MS の分子イオンピークは  $m/z$  394 であったことから  $C_{28}H_{42}O$  の分子式であることが分かった。Sterol 1 の構造は  $^1H$ ,  $^{13}C$  NMR および 2D NMR により決定し、

$^{13}\text{C}$  NMR のデータは Table 3 に示した。 $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY および HMBC を解析することによって Sterol 1 は ergosta-5,7,22,24(28)-tetraen-3-ol であると決定した。

Sterol 2 は HPLC 分析では 24 分にリテンションタイムを示しており、GC-MS での分子イオンピークは  $m/z$  384 であり分子式  $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}$  と決定した。Sterol 2 の構造は  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR および 2D NMR を解析することによって決定した。 $^{13}\text{C}$  NMR のデータは Table 3 に示した。 $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY および HMBC を解析することによって Sterol 2 はチモステロールであると決定した。また、NMR データは既に報告されているスペクトルデータ (Taylor et al. 1981) と一致した。

Sterol 3 は HPLC 分析では 26 分のリテンションタイムを示した。Sterol 3 の  $^1\text{H}$  および  $^{13}\text{C}$  NMR データは標品エルゴステロールのデータと一致しており、エルゴステロールと決定した。

Sterol 4 は HPLC 分析では 30 分のリテンションタイムを示し、GC-MS での分子イオンピークは  $m/z$  398 であったことから分子式  $\text{C}_{28}\text{H}_{46}\text{O}$  と一致した。Sterol 4 の構造は  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR および 2D NMR を解析することによって決定した。 $^{13}\text{C}$  NMR のデータは Table 3 に示した。 $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY および HMBC を解析することによって Sterol 4 は ergosta-5,7-dien-3-ol と決定した。

KUN14 から得られるステロールは主に二種類あり、HPLC クロマトグラム、GC-MS スペクトル、 $^1\text{H}$  および  $^{13}\text{C}$  NMR データと HPLC での Sterol 1 と Sterol 3 の標品のデータとの比較によりそれぞれ ergosta-5,7,22,24(28)-tetraen-3-ol (Fig.12) とエルゴステロールと決定した。Ergosta-5,7,22,24(28)-tetraen-3-ol はエルゴステロールの直接の前駆体であり、*ERG4* にコードされる C-24(28)ステロールレダクターゼによってエルゴステロールに変換される (Zweytick et al. 2000)。

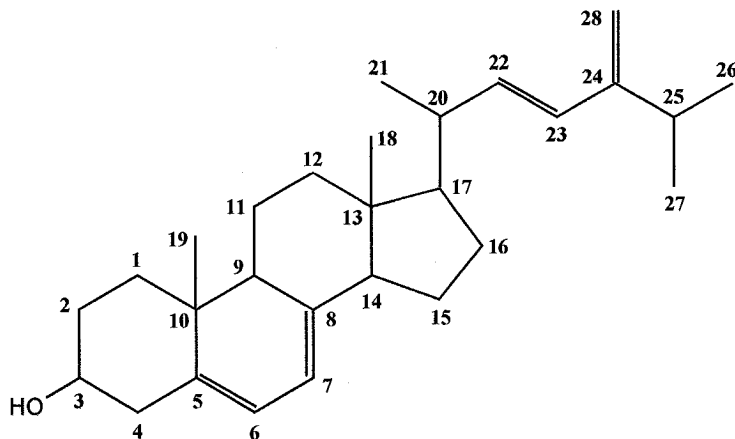


Fig.12. Proposed Structure of the Sterol Accumulated Specifically by KUN14 (sterol 1).

Sterol 1 was identified as ergosta-5,7,22,24(28)-tetraen-3-ol, and as the direct precursor of ergosterol. The numbers in this figure correspond to carbon numbers in Table 3.

第 6 項 *erg4* 破壊株の S-アデノシルメチオニン及びエルゴステロール含量

*erg4* 変異が SAM 蓄積を引き起こしていることを確認するため、実験室酵母 BY4742 及び X2180-A の *erg4* 破壊株の SAM およびエルゴステロール量を分析した (Table 4)。二つの *erg4* 破壊株は親株に比較して SAM を高蓄積していた。これら *erg4* 破壊株ではエルゴステロールは検出されなかったが、KUN14 および KUN18 で蓄積が見られた *erg4* 変異株に蓄積するエルゴステロール合成中間体 ergosta-5,7,22,24(28)-tetraen-3-ol が検出された (data not shown)。

Table 4. SAM Contents of *erg* Genes Disruptants and Their Parental Strains

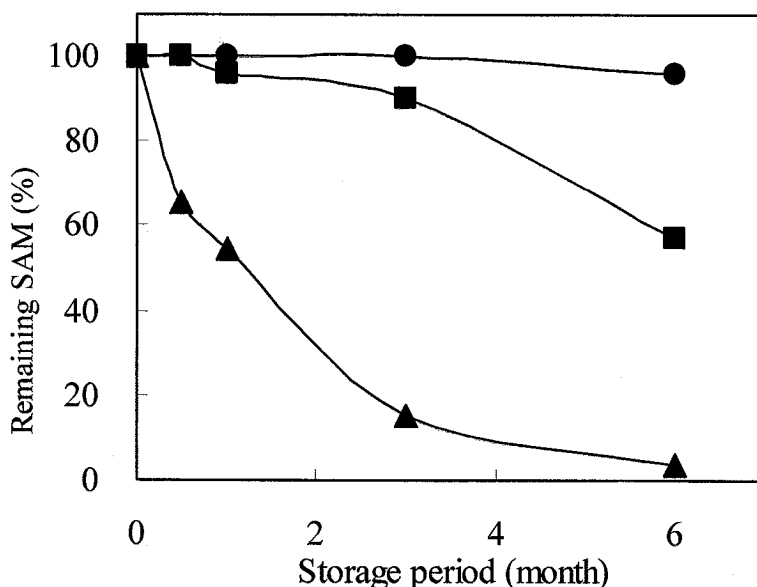
Strain	SAM (mg/g dry cell weight)
X2180-1A	3.77
<i>Xerg4</i>	7.43
BY4742	11.1
$\Delta$ <i>erg4</i>	16.3
$\Delta$ <i>erg6</i>	18

Yeast strains were cultivated in O-medium for the determination of SAM at 30°C for 48 h aerobically.

## 第 7 項 凍結乾燥酵母に含まれる S-アデノシルメチオニンの安定性

これまでに述べた方法により、SAM 高蓄積株の効率的な選択方法が確立された。しかしながら SAM 高蓄積株を酵母のもつ豊富なビタミンやタンパク質などの有効成分と共に利用するための課題は、酵母に含まれる SAM の安定性と消化性であると考え、まず凍結乾燥酵母中の SAM の安定性を評価した。

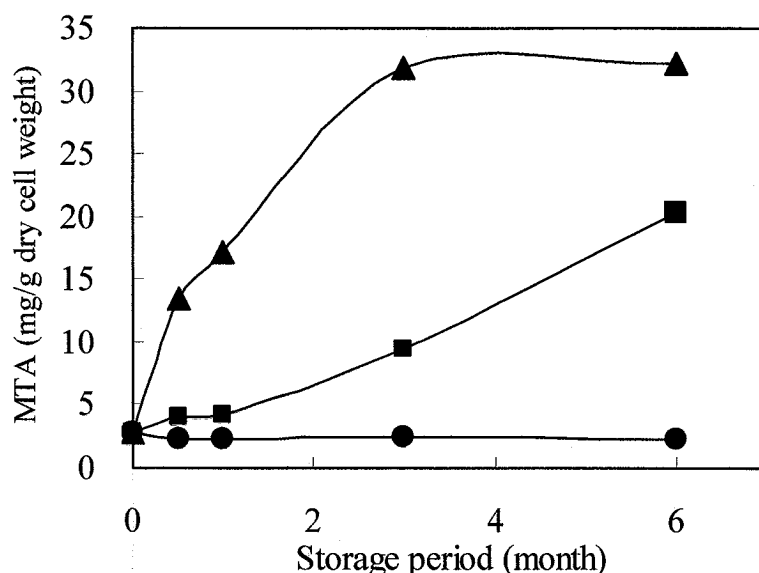
-20、4、25 °C の各温度で凍結乾燥酵母を 6 ヶ月間保存し、各保存期間での SAM 量を定量し、凍結乾燥酵母調整時の SAM 量を 100% とした時の残存量として評価した。結果を Fig. 13 に示す。凍結乾燥酵母中の SAM は -20 °C では 6 ヶ月間保存後もほとんど減少していなかったが、4 °C では 6 ヶ月後には 57.0 % にまで減少していた。ところが 25 °C では 2 週間で 65.7 % まで、さらに 6 ヶ月後には 3.6% にまで減少していた。



**Fig. 13. Stability of SAM in Lyophilized SAM Yeast Cells during Storage.**

Lyophilized SAM yeast cells were stocked at -20°C (filled circle), 4°C (filled square) and 25°C (filled triangle) for 6 months.

SAM は熱に対して不安定な物質であり、室温程度の熱によっても徐々に分解してメチルチオアデノシン(MTA)に分解されることが知られている(Zappia et al. 1969)。そこで凍結乾燥酵母中のMTAについても分析を行った (Fig.14)。SAMの経時的な減少に伴い、MTAの増加が見られ、保存温度に依存してSAMのMTAへの分解が促進されていることが示された。



**Fig. 14. MTA in Lyophilized SAM Yeast Cells during Storage.**

Lyophilized SAM yeast cells were stocked at  $-20^{\circ}\text{C}$  (filled circle),  $4^{\circ}\text{C}$  (filled square) and  $25^{\circ}\text{C}$  (filled triangle) for 6 months.

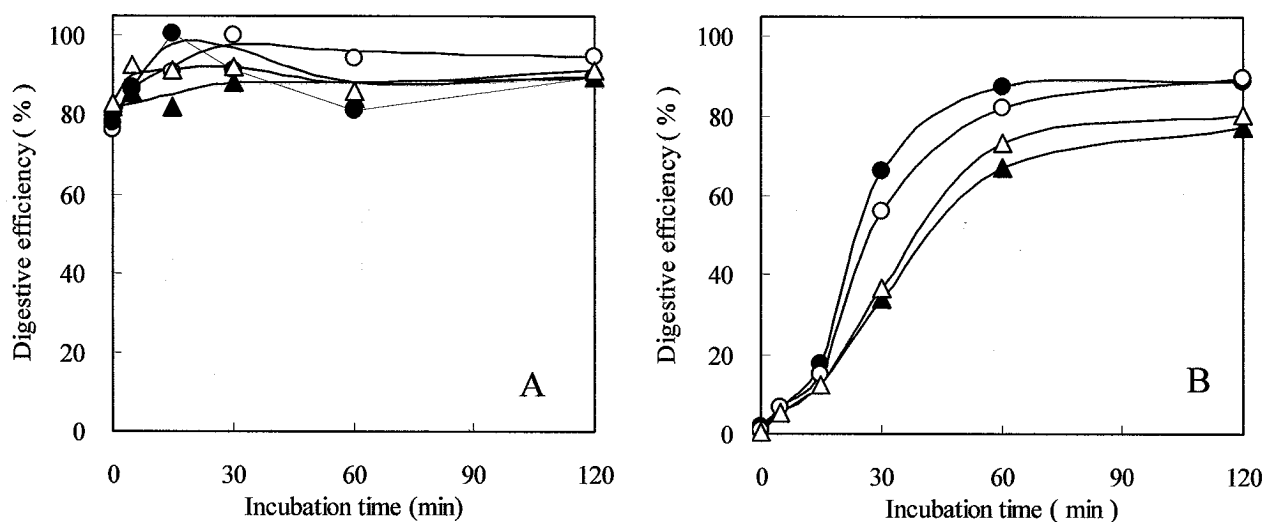
#### 第 8 項 凍結乾燥酵母および生菌に含まれる S-アデノシルメチオニンの消化性

SAM は酵母の液胞中に蓄積されており、これが消化管で吸収されなければ SAM 高蓄積株をそのまま利用することはできない。そこで、擬似的な条件下で SAM の酵母からの抽出を検証した。

SAM 蓄積酵母を凍結乾燥処理したものと清酒粕などに含まれる場合を想定した生菌の擬似消化液 SGF 中での SAM 消化率を測定した (Fig. 15)。凍結乾燥酵母では、SGF 消化開始時において

81.8 %の SAM が抽出されていた (Fig.15 A)。30 分後には消化率は平衡に達していた。生菌では SGF 消化開始時には、0.23 %しか SAM は抽出されていないが、経時的に SAM 消化率は上昇し約 60 分で平衡に達した。凍結乾燥した SAM 蓄積酵母では、ペプシンの有無や酵母の量に関わらず高い消化率を示した。生菌では、酵母の量が多くなると消化率がやや低下しているが 60 分でほぼ 80%の消化率となっており (Fig.15 B)、凍結乾燥酵母、生菌共に消化管での消化吸収に問題はないと思われる。

また、SAM は SGF 中で 37 °C、120 分間安定であることも分かった。



**Fig. 15. Digestive Efficiency of Lyophilized and Viable SAM Yeast cells in SGF.**

SGF consists of sterilized water adjusted to pH1.2 with hydrochloric acid with pepsin (open symbols) and without pepsin (closed symbols). Lyophilized (A) and viable (B) SAM yeast cells 2 mg/ml (circles) and 10mg/ml (triangles) of SGF were incubated at 37°C for 120 min.

## 第 4 節 考察

私は、酵母のエルゴステロール合成系に変異を生じることで SAM 高蓄積を引き起こすと仮定し、ナイスタチン耐性変異株選択による新規 SAM 高蓄積株取得方法を開発した。清酒酵母 K-9 および実験室酵母 X2180-1A から UV 照射による変異とナイスタチン耐性変異株の選択により SAM 高蓄積株の取得に成功した。X2180-1A から取得された変異株ではエルゴステロール量は検出できないほど減少しており、SAM 蓄積量は親株に比較して 4.2~5.5 倍も高蓄積していた。K-9 から取得された変異株では、SAM 蓄積量およびエルゴステロール量の変化は、実験室酵母 X2180-1A から取得された変異株で見られた SAM 蓄積量の増加量と比べて少なく、エルゴステロール量の減少は小さかった。この違いは、K-9 は二倍体であり X2180-1A は一倍体であることに起因していると考えられる。つまり X2180-1A から得られた変異株では、エルゴステロール合成系に生じた変異によりエルゴステロールの合成がほぼ完全に遮断されているが、二倍体である K-9 から得られた変異株では一方の遺伝子が野生型であるため、エルゴステロールの合成は部分的に減少するに過ぎないためと考えられる。

KUN14 および KUN18 で蓄積していた Sterol 1 がエルゴステロールの直接の前駆体であり、Erg4p の基質であることが同定され、KUN14 および KUN18 に生じた変異は *erg4* であることが示唆された。さらに、X2180-1A および BY4742 から *kanMX4* ORF により *ERG4* ORF を破壊することにより作成した二つの *erg4* 破壊株でも親株に比べて SAM を高蓄積していることが示された。清酒酵母 K-9 および二つの実験室酵母から取得された *erg4* 変異株がすべて SAM 高蓄積株となったことから、Erg4p が触媒する生合成反応は

エルゴステロール合成系において SAM を消費する Erg6p が触媒する生合成反応よりも下流であるにも関わらず、SAM 高蓄積を引き起こすことが示された。エルゴステロール合成系の代謝中間体である ergosta-5,7,22,24(28)-tetraen-3-ol の蓄積がエルゴステロール合成を抑制し結果的に SAM の蓄積を引き起こしているのかもしれない。これらの結果から *erg6* 変異以外でもエルゴステロール合成系の変異が SAM の蓄積を引き起こすことが示された。

このようにして取得された SAM 高蓄積酵母の菌体をサプリメントなどの形で利用するための検討も行った。SAM の凍結乾燥菌体中での安定性は、温度の影響を大きく受け、6ヶ月の安定性を維持するためには-20℃での保存が必要であった。SAM はメチル基供与反応に関与するメチルスルホニウムイオンを分子内に有しているため、熱やアルカリに対して不安定であることが知られている。今回の結果でも、温度に依存して SAM の安定性は低下しており、SAM の減少に伴い SAM の熱分解により生成することが報告されている MTA の生成が確認され、SAM の分解が熱に大きく影響されることが示された。

次に、サプリメントとして利用が想定される凍結乾燥菌体および、日本で古くから食されてきた酒粕に含まれる生菌体について擬似消化液 SGF 中での SAM の抽出性を検討した。凍結乾燥菌体では処理開始直後にほとんどの SAM が抽出されており、高い消化性が示された。また生菌体からの抽出では、経時的に消化率は上昇し、60分で約80%の SAM が抽出されており、通常の消化管の滞留時間内に良好に抽出されることが示された。凍結乾燥酵母では細胞の膜のバリア性が失われることで生菌に比べて消化性が高くなったと考えられる。また、SAM はアルカリに対しては不安定であることが知られているが、消化管内部のような酸性条件下では比較的安定であり、本研究でも pH 1.2 の SGF 中では 37



°C、120 分間は安定であることが確認された。このように SAM 高蓄積酵母は SAM 安定性に課題は残るものの、消化管における消化性には問題がなく保存に留意すれば有効なサプリメントとして利用可能であると考えられる。

本研究において、ナイスタチン耐性となるエルゴステロール合成系の変異が SAM 高蓄積を引き起こすことを示した。清酒酵母 K-9 および実験室酵母 X2180-1A からナイスタチン耐性変異株を選択することで、高頻度で SAM 高蓄積株を取得することに成功した。このようにナイスタチン耐性による選択方法は SAM 高蓄積株の非常に有効な選択方法といえる。さらに本方法を用いることにより遺伝子操作なしに SAM 高蓄積株を取得できることから SAM の産業用生産株の取得にも有効であるといえる。既に、清酒酵母が様々な微生物の中でももっとも多くの SAM を蓄積することが報告されていることから(Shiozaki et al. 1984)、清酒酵母からさらに SAM を高蓄積する株が取得できたことは産業利用の点からも注目すべき点であろう。今後も、SAM 高蓄積株を利用した SAM 生産方法の検討や SAM の安定性の向上についての研究が望まれる。

## 第 5 節 小括

S-アデノシルメチオニン(SAM)は全ての生物において多くの生体反応にメチル基供与体として関与している重要な物質であるとともに、うつ病・肝機能障害・関節炎などの多くの疾病に有効であることから医学的研究においても非常に大きな関心が持たれている。医学や産業利用への期待から、より効率的な SAM 生産方法の開発が望まれている。*S. cerevisiae* の多くの SAM を消費する生体反応の中にエルゴステロール合成系の Erg6p が触媒する

メチル基転移反応がある。そこで我々はエルゴステロール合成系の変異株はエルゴステロール合成で消費される SAM の量が減少することにより、SAM が蓄積するのではないかと考え、SAM 高蓄積株の取得にこれまでエルゴステロール変異株の取得に用いられてきたナイスタチン耐性変異株選択方法の応用を試みた。本選択方法を用いることにより清酒酵母 *S. cerevisiae* K-9 および実験室酵母 *S. cerevisiae* X2180-1A から効率的に SAM 蓄積株を取得することができた。これらの株は親株に比較して 1.7~5.5 倍の SAM を蓄積していた。NMR および GC-MS による解析で K-9 から得られた二つの SAM 高蓄積株は *erg4* 変異であることが示唆され、さらに二つの実験室酵母 X2180-1A および BY4742 から作成した *erg4* 破壊株でも親株に比べて SAM を高蓄積していることが確認された。これらの結果から、エルゴステロール合成系で SAM を消費する Erg6p よりも下流の酵素をコードする遺伝子に起こる変異でも SAM 蓄積を引き起こすことが示された。また SAM 蓄積酵母菌体中の SAM を安定的に保存するためには -20 °C での保存が必要であるが、菌体からの消化性には問題がなくサプリメントとしての利用の可能性が示された。

### 第 3 章 酵母細胞中に蓄積された S-アデノシルメチオニンの挙動

#### 第 1 節 緒言

S-アデノシルメチオニン(SAM)は多くの生体反応にメチル基供与体として関与しているだけでなく、含硫アミノ酸代謝のホメオスタシスにおいても重要な役割を果たしており、細胞にとっては重要な化合物である(Thomas and Surdin-Kerjan 1997)。酵母細胞では、細胞質内の SAM 濃度を制御し、含硫アミノ酸のホメオスタシスを維持するため過剰な SAM は液胞中に蓄積されている(Nakamura and Schlenk 1974)。細胞質の SAM 濃度が高くなると、SCF<sup>Met3</sup> 複合体を介した転写活性化因子 Met4p の分解により *MET* 遺伝子の転写が抑制される(Rouillon et al. 2000)。また、正常な液胞を形成することのできないクラス C の *vps* 変異株では、余剰の SAM を液胞中に蓄積することができないため細胞質内の SAM 濃度を制御できず、メチオニン要求性の表現型となるものがある(Jacquemin-Faur et al. 1994, Chan and Appling 2003)。液胞への SAM の蓄積機構について解析を行った研究は多く見られるが、一旦細胞内に蓄積された SAM が再び利用されているかどうかについての研究は見られない。筆者らは、酵母細胞中に蓄積された SAM は S 源や N 源の枯渇した条件下では再び細胞増殖に利用されるのではないかと考えた。SAM は ATP とメチオニンから合成され、様々な生体反応に使われる高エネルギー化した硫黄イオンがあることから、酵母は含硫アミノ酸のホメオスタシスを保つためだけに SAM を蓄積するのではなく、生体反応に再利用可能な S 源あるいはエネルギー源の貯蔵として蓄積しているのではないかと考えた。筆者らは、この仮説を検証するために、様々な N 源、S 源を含む条件下での酵母細胞内の SAM 消費速度、増殖速度や最終菌体収率について解析を行った。

## 第 2 節 実験方法

SAM 高蓄積酵母および低蓄積酵母は表 5 に示した培地 A および B を用いて、30°C、24 時間振盪にて前培養を行い作製した。これら二つの条件下で培養を行った酵母を新鮮な A および B 培地に OD<sub>660</sub> が 0.1 となるように植菌し、30 °C で振盪培養を行った。さらに、SD 培地に N 源および S 源として含まれる硫酸アンモニウムの代わりに尿素を用いた C 培地と、YNB without amino acids and ammonium sulfate のみを含む D 培地を用いた。酵母中の SAM は既に報告した方法（第 2 章 第 2 節 第 3 項）により分析を行い、酵母の増殖は OD<sub>660</sub> で測定した。

Table 5 Compositions of Media Used in This Study \*1

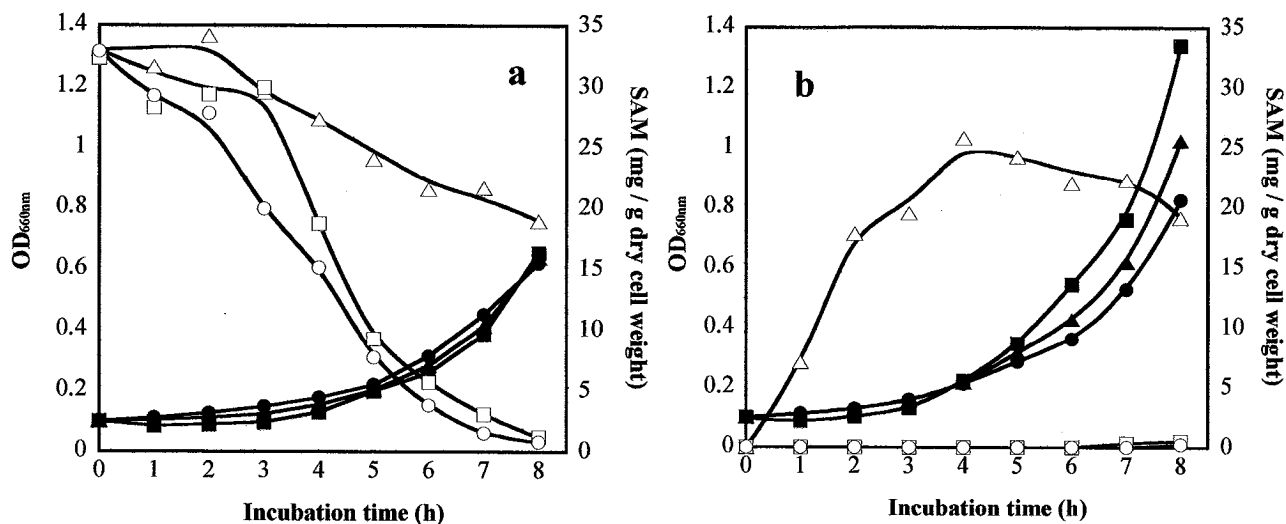
Medium	A	B	C	D
YNB w/o a.a. and (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.17	0.17	0.17	0.17
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.5	0.5		
L-Methionine	0.15			
Urea			0.23	
D-Glucose	2	2	2	2

\*1: Compositions are expressed as by percentages

## 第 3 節 実験結果及び考察

*Saccharomyces cerevisiae* K-9 を SD 培地に 0.15 %メチオニンを添加した A 培地で培養を行うことにより、酵母の細胞中には SAM が蓄積する(以下、high-SAM 酵母とする)が、メチオニンや他のアミノ酸を添加せず、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> のみを含む通常の SD 培地である B 培地で培養を行うと SAM の蓄積はほとんど認められなかった(以下 low-SAM 酵母とする)。これら二つの条件下で前培養を行った酵母の様々な N 源、S 源を含んだ培地での SAM の消費速度と菌体増殖速度を解析し、菌体内の SAM が培地中の

N 源、S 源にどのような影響を受けているのか解析を行った。high-SAM 酵母をそれぞれ A、B、C 培地に植菌した場合、これらの酵母の増殖速度はほぼ同じであった(Fig. 16 a)。



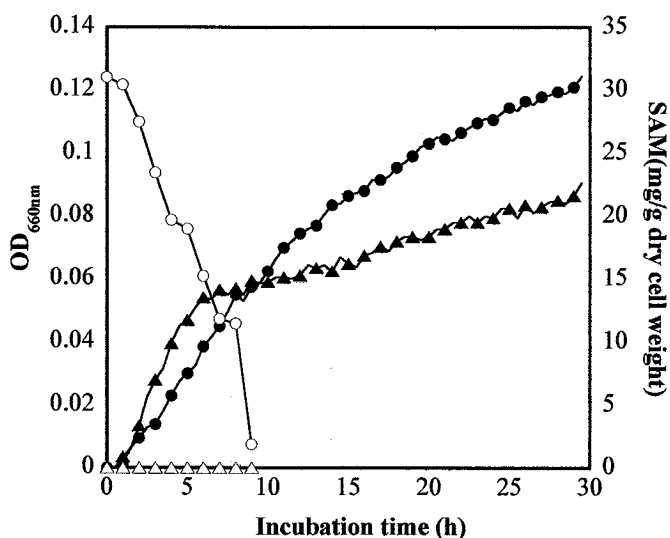
**Fig. 16. SAM Contents and Growth Rates of High- and Low-SAM Containing yeasts.**

SAM consumptions and growth rates of high-SAM-containing yeast (a), low-SAM-containing yeast (b), in A medium (open triangles: SAM contents, closed triangles: growth), B medium (open squares: SAM contents, closed squares: growth), C medium (open circles: SAM contents, closed circles: growth), compositions of media are shown in Table 5. Yeast cells were inoculated at OD<sub>660</sub>=0.1, and cultured at 30 °C aerobically.

このとき、植菌された high-SAM 酵母中に蓄積されていた SAM は、N 源として尿素のみを添加しており S 源の少ない C 培地では速やかに消費されているが、メチオニンを含む A 培地では緩やかに、そして、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を含む B 培地では A 培地と C 培地の間の速さで SAM が減少していた。このように、酵母の細胞中に蓄積された SAM の消費速度は、培地に含まれる N 源や S 源の量や種類に関係していることが示された。

これとは逆に、培地中の N 源、S 源が酵母細胞中の SAM の蓄積にどのような影響を与えるのかを解析するために、low-SAM 酵母を A 培地、B 培地、C 培地に植菌した。このとき、メチオニンを含む A 培地のみで細胞中に SAM の蓄積が見られた(Fig. 16 b)。A 培地に植菌した直後から細胞中に SAM の蓄積が観察されることから、A 培地中に含まれるメチオニンは酵母細胞に取り込まれた後、速やかに SAM に変換されていることが分かった。Low-SAM 酵母の増殖速度は培地によって異なっており、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  を含む B 培地で最も早く、次にメチオニンを含む A 培地、N 源として尿素のみを添加しており S 源の少ない C 培地でもっとも遅くなっていた。C 培地における low-SAM 酵母の増殖の遅れは、菌体中にも培地中にも S 源が少ないためと考えられる。high-SAM 酵母を植菌した場合には、S 源の少ない C 培地での増殖速度は N 源や S 源が十分に含まれる A 培地や B 培地と同じ増殖速度を示したことから、菌体内の SAM は S 源の制限された条件下では酵母の増殖に利用されていると考えられる。また、high-SAM 酵母をメチオニンを含む A 培地に植菌した酵母の増殖速度は、S 源が A 培地に比べて少ない B 培地、C 培地に植菌された high-SAM 酵母と比較するとほぼ同じであった。これは培地中の S 源が不足していても菌体内の SAM を S 源として利用することができるため、high-SAM 酵母を N 源として尿素しか含まず S 源が少ない C 培地に植菌した場合でも、S 源を多く含む A 培地や B 培地とほぼ同じ増殖速度を維持できたのではないかと考えられる。ところが A、B、C の各培地での、high-SAM 酵母と low-SAM 酵母の増殖速度を比較してみると、むしろ low-SAM 酵母の増殖速度の方が速くなっていることが分かった。この結果は、細胞内の SAM の蓄積は増殖を促進するのではなく、むしろ増殖の遅れを引き起こしていると考えられる。これは *vps* 変異株における SAM の異常蓄積が増殖阻害を引き起こすという報告(Jacquemin-Faur et al. 1994, Chan and Appling 2003)と一致している。これらの結果から、細胞内に蓄積された SAM には酵母の増殖に対して二つの相反する効果

—ひとつは増殖に利用可能な S 源として、もうひとつは増殖抑制因子として—を持っていると考えられる。しかしながら、これまでの実験結果では、high-SAM 酵母と low-SAM 酵母の各培地での増殖速度の違いは酵母細胞中に蓄積された SAM の増殖抑制効果だけが原因となっている可能性が残っている。そこで、SAM が細胞の増殖に利用されるのであれば、酵母細胞に蓄積されている SAM の量が菌体増殖量に違いをもたらすと考え、high-SAM 酵母と low-SAM 酵母を N 源、S 源ともに制限された D 培地 (Table 5) に OD<sub>660</sub> が 0.05 となるように植菌し増殖量を調べた。D 培地に植菌された low-SAM 酵母は先に述べた結果と同じく、増殖初期には high-SAM 酵母よりも早い増殖速度を示し、細胞内の SAM の増殖抑制効果の再現性が確認できた。しかし、low-SAM 酵母は増殖初期には high-SAM 酵母よりも速い増殖速度を示しながらも、増殖量は high-SAM 酵母の増殖量の約 3/4にとどまった(Fig.17)。



**Fig. 17. SAM Contents and Growth Profiles of High- and Low-SAM-Accumulating Yeasts in D medium**

High- (open circles: SAM contents, closed circles: growth) and low-SAM (open triangles: SAM contents, closed triangles: growth) accumulating yeasts were inoculated in D medium, whose composition was shown in Table 1, at OD<sub>660</sub>=0.05, and cultured at 30 °C aerobically.

N 源、S 源が制限された環境下での low-SAM 酵母と high-SAM 酵母の増殖量の違いは、細胞内に蓄積された SAM が N 源あるいは S 源として増殖に利用されており、その細胞内 SAM 蓄積量の違いが利用可能な N 源、S 源の差となり、ひいては細胞増殖量の違いとなって現れたと考えられる。

以上の結果から、含硫アミノ酸のホメオスタシスのため酵母の液胞内に蓄積され、細胞質中の濃度の調節が行われていると考えられる SAM は、培地中に含まれる N 源、S 源の種類や量に応じて酵母の増殖に利用されていることが示された。

#### 第 4 節 小括

培養中に酵母細胞に蓄積される S-アデノシルメチオニン (SAM) は、酵母の増殖に対して二つの効果を持っている。酵母細胞中の高濃度の SAM は、増殖初期には増殖を抑制するが、N 源や S 源の制限された培地では増殖量を増加させる効果がある。細胞質中の SAM 濃度のコントロールのために液胞中に蓄積される SAM は培地中の N 源や S 源の種類や量に応じて再利用されていることが示された。



## 第 4 章 清酒酵母の遺伝子発現プロファイルの解析

### 第 1 節 緒言

清酒は、米を原料として作られる伝統的なアルコール飲料である。米に含まれるでんぷんは蒸し米の表面に *Aspergillus oryzae* を生育させた麴の生産するアミラーゼによってグルコースへと変換される。でんぷんからグルコースへの糖化と酵母によるグルコースのエタノールへの変換はもろみ中で同時に進行する。ビール醸造では糖化と発酵は別々の工程で行われるが、清酒醸造ではこれら二つの工程が同時に行われることが大きな違いとなっている。この糖化と発酵が平行して行われる清酒の醸造方法は並行複発酵と呼ばれている。清酒酵母は 10~15°C で 15~20 日間に及ぶ清酒醸造において他に類を見ない約 20%ものエタノール濃度を達成することができる。

清酒酵母は何百年もの歴史の中で、高アルコール耐性、高エタノール生産性、低温における高い発酵能や高浸透圧耐性などの清酒醸造に適した特徴を有する酵母が選択されてきた。より良い品質の清酒を醸造するために、高エステル生産能、低有機酸生成、低アミノ酸生成など清酒の香味に影響を与える酵母の性質についても優良清酒酵母の選択の要件とされてきた。

清酒酵母は実験室酵母 *Saccharomyces cerevisiae* X2180-1A などと同じ属に分類されているが、この二つの酵母の性質は大きく異なっており、特に醸造特性に関しては大きな違いが見られる。清酒酵母のトランスクリプトーム解析データをもとにストレス耐性のある酵母の育種を行う試みでは (Hirasawa et al. 2006)、DNA マクロアレイが清酒酵母の特徴の違いを解析するためのツールとして用いられてきた。我々は、清酒酵母 *S. cerevisiae* K-9 と実験室酵母 *S. cerevisiae* X2180-1A の特性の違いを、通常の培養と醸造の大きな違いのひとつである振盪と静置という二つの培養

条件下で DNA マイクロアレイによる解析を行い、これら二つの酵母の醸造特性に関する違いを解析した。

## 第 2 節 実験方法

### 第 1 項 供試菌株及び培養方法

DNA マイクロアレイによる解析に用いた酵母は、*S. cerevisiae* K-9 (協会 9 号、清酒酵母) および *S. cerevisiae* X2180-1A (*MAT* a、実験室酵母) である。これら二つの株は、YPD 培地で 30°C、24 時間、振盪にて前培養を行い、100ml の YPD 培地に OD<sub>660</sub> が 0.1 となるように植菌を行った。培養は 30°C で振盪あるいは静置培養で OD<sub>660</sub> が 1.0 になるまで行った。菌体を回収するまでに要した培養時間は、振盪培養では K-9 で 6.5 時間、X2180-1A で 7.5 時間であり、静置培養ではどちらの株も 9.8 時間であった。

### 第 2 項 DNA マイクロアレイ

OD<sub>660</sub> が 1.0 に達した酵母細胞は、遠心により回収し、冷滅菌水で二回洗浄を行う。回収菌体からのトータル RNA の抽出はホットフェノール法にて行った (Kohrer and Domdey 1991)。DNA マイクロアレイに用いるプローブの調整、ハイブリダイゼーション、マイクロアレイデータの取得および解析は第 1 章第 2 節第 4 項に示した方法で行った。25μg のトータル RNA から Cy3 または Cy5 修飾の dCTP (Amersham Pharmacia Bioscience) を用い、yeast-specific primer mix (Eurogentech) をプライマーとした逆転写反応によりラベリングを行いプローブとした。合成されたプローブは Qia-quick PCR purification kit (Qiagen) を用いて精製と濃縮を行い、それぞれ Cy3 および Cy5 でラベルされた cDNA プローブを Yeast Chip ver. 2.0 (DNA チップ研究所) にハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーションは、65°C で一晩、湿度を保った密閉容器内で行い、洗浄・乾燥の

後、FLA-8000 Fluorescent Image Analyzer (フジフィルム)により蛍光強度を測定した。

DNA マイクロアレイデータは、各培養条件下で二回の独立した培養を行い、それぞれの培養で蛍光標識のスワッピングを行ったプローブを作成してハイブリダイゼーションを行った。つまり、各培養条件下で4回のハイブリダイゼーションから得られたデータの解析を行った。

### 第 3 項 データ解析

マイクロアレイのデータはソフトウェア GeneSpring 6.0 を用いて統計的に解析を行った。蛍光強度は GeneSpring 6.0 により Lowess 法によりノーマライゼーションを行った。K-9 での発現変動の見られた遺伝子は、それぞれの培養条件下で行った4回の実験のうち3回以上の実験において K-9 で X2180-1A よりも2倍以上発現が多いものあるいは少ないものとして選択を行った。さらにこれらの遺伝子から Student's t-test により危険率  $p < 0.05$  であるものを選択し、以下の解析を行った。遺伝子の分類は The Search for Functional Distribution of Gene Lists of MIPS Functional Catalogue ([http://mips.gsf.de/proj/funcatDB/search\\_main\\_frame.html](http://mips.gsf.de/proj/funcatDB/search_main_frame.html))により行い、遺伝子情報は The Munich Information Center for Protein Sequences (MIPS)に従った。K-9 において振盪あるいは静置培養条件下で X2180-1A に比べて発現が異なっていた遺伝子を機能による分類を行った後、アベレジリンケージクラスタリングアルゴリズムによるクラスターで示している。X2180-1A の遺伝子発現と比較した K-9 の遺伝子の発現レベルはそれぞれカラーインジケータで示した色で表現し、類似度はそれぞれの距離で示した。

### 第 3 節 実験結果

#### 第 1 項 代謝

代謝に分類された遺伝子の発現プロファイルを Fig.18 に示した。代謝に分類された遺伝子を MIPS の The Functional Distribution of Genes で解析したところ、K-9 で高発現している遺伝子ではアミノ酸代謝 ( $p$ -value,  $1.44e-07$ )、C 化合物および炭水化物代謝 ( $p$ -value,  $4.71e-10$ )、脂質、脂肪酸およびイソプレノイド代謝 ( $p$ -value,  $1.22e-05$ )、ビタミン、補酵素および prosthetic グループの代謝 ( $p$ -value,  $1.42e-07$ )が顕著なサブカテゴリとして挙げられた。



Fig. 18. Alteration Expression Profiles of the Genes in the Category “Metabolism” in K-9.

The expression profiles of the genes in K-9 are shown in two columns, indicating culture conditions: a, shaking conditions, and b, static conditions, and with colors indicating their expression levels in K-9 as compared with those in 2180-1A., as shown in the indicator bar: red, overexpressed, and green, underexpressed in K-9. The reliability of the data is shown as the density of the color. The method of the clustering is described in “Materials and Methods”.

産業用醸造酵母にとっては、高エタノール生産性は重要な特徴のひとつであり、高い炭素源の利用能があると考えられている。C 化合物および炭水化物利用のカテゴリに含まれている遺伝子は、*GLK1* (aldohexose specific glucokinase)、*LSC2* (succinate-CoA ligase beta subunit)、*MNN1* ( $\alpha$ -1,3-mannosyltransferase)が両培養条件下で高発現していた。解糖系および糖新生経路に関与する遺伝子は *ACSI* (acetyl-CoA synthetase)、*SFA1* (long-chain alcohol dehydrogenase)、*PGM2* (phosphoglucomutase, major isoform)が、でんぷんおよびショ糖代謝に関与する遺伝子では *GLC3* (1,4-glucan branching enzyme)、*GSY1* (UDP glucose-starch glucosyltransferase, isoform 1)、*GSY2* (UDP-glucose-starch glucosyltransferase, isoform 2)、*MUC1* (extracellular  $\alpha$ -1,4-glucan glucosidase)、*TPS1* ( $\alpha$ ,  $\alpha$ -trehalosephosphate synthase, 56KD subunit)、*TPS2* ( $\alpha$ ,  $\alpha$ -trehalosephosphate synthase, 102KD subunit)、*TSL1* ( $\alpha$ ,  $\alpha$ -trehalose-phosphate synthase, 123 KD subunit)、フラクトースおよびガラクトース代謝に関与する遺伝子では *GRE3* (aldose reductase)、*GCY1* (galactose-induced protein of aldo/keto reductase family)、*UGP1* (UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase)が振盪培養条件下で高発現していた。更に、TCA サイクルに関与する遺伝子では *ACO1* (aconitate hydratase)、*CIT1* (citrate (*si*)-synthase, mitochondrial)、*KGD1* (2-oxoglutarate dehydrogenase complex E1 component)、*MDH1* (malate dehydrogenase precursor, mitochondrial)、*MDH2* (malate dehydrogenase, cytoplasmic)、*SDH1* (succinate dehydrogenase flavoprotein precursor)、*SDH2* (succinate dehydrogenase ironsulfur protein subunit)、*SDH3* (cytochrome b560 subunit of respiratory complex II)、*SDH4* (succinate dehydrogenase membrane anchor subunit for *sdh2p*)もまた振盪培養条件下で高発現していた。

アミノ酸代謝のカテゴリに含まれている遺伝子では、*ADH1* (aci-reductone dioxygenase, involved in methionine salvage pathway)、*ALT1* (strong similarity to alanine transaminases)、*BNA5* (strong similarity to rat kynureninase)、*CAR2* (ornithine aminotransferase)、*GCV1* (glycine

decarboxylase, subunit T)、*GCV3* (glycine decarboxylase, subunit H)、*SAM1* (S-adenosylmethionine synthetase 1)、*SAM2* (S-adenosylmethionine synthetase 2)、および *SHM2* (serine hydroxymethyltransferase, cytoplasmic) が静置培養条件下で高発現していた。逆に、*BNA1* (3-hydroxyanthranilic acid dioxygenase)、*YJR078W* (tryptophan 2,3-dioxygenase)、*HIS4* (histidinol dehydrogenase)、*HIS5* (histidinolphosphate aminotransferase)、*HIS7* (glutamine amidotransferase)、*ILV5* (ketolacid reducto-isomerase)、*LYS9* (saccharopine dehydrogenase)、*MET6* (5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine methyltransferase)、*MUP3* (low-affinity methionine permease)、*PRO1* (glutamate 5-kinase)、*SER2* (phosphoserine phosphatase) および *SER33* (3-phosphoglycerate dehydrogenase) は振盪培養条件下で低発現であった。また *CPA2* (arginine-specific carbamoylphosphate synthase, large chain)、*LEU4* (2-isopropylmalalate synthase)、*LEU9* (strong similarity to Leu4)、*MET17* (*O*-acetylhomoserine sulfhydrylase)、*SUL1* (sulfate permease I) および *YHR033W* (strong similarity to glutamate 5-kinase) は静置培養条件下において低発現であった。更に、アスパラギン・アスパラギン酸代謝に関与する *ASN1* (asparagine synthetase)、*ASP3-1*、*ASP3-2*、*ASP3-3* および *ASP3-4* (L-asparaginase II) や、*LYS2*、*LYS21* (homocitrate synthase)、*YFR055W* (strong similarity to beta-cystathionases)、*CBF1* (centromere binding factor 1, which is present at several sites, including *MET* gene promoters, and centromere DNA I encoded by *CDE1*)、*ARO10* (similarity to Pdc6p、Thi3p、pyruvate decarboxylase) および *ARO9* (aromatic amino acid aminotransferase II) は両培養条件下で低発現であった。

脂質、脂肪酸およびイソプレノイド代謝に関与する多くの遺伝子が K-9 では高発現していた。*ACH1* (acetyl-CoA hydrolase)、*ACPI* (mitochondrial acylcarrier protein)、*COQ1* (hexaprenyl pyrophosphate synthetase precursor)、*CSG2* (which is required for mannosylation of inositolphosphorylceramide and for growth at high calcium concentrations)、

*ERG25* (C-4 sterol methyl oxidase)、*IPT1* (mannosyl diphosphorylinositol ceramide synthase)、*OPI3* (methylene-fattyacyl-phospholipid synthase)、*OSH2* (member of an oxysterol binding protein family)、*SUR1* (which is required for mannosylation of sphingolipids)、*TSC10* (3-ketosphinganine reductase) および *YDC1* (alkaline dihydroceramidase) が振盪培養条件下で高発現していた。脂質、脂肪酸およびイソプレノイド代謝に関与する遺伝子のうち、*ARE2* (acyl-CoA sterol acyltransferase)、*CYB5* (cytochrome b5)、*ERG5* (C-22 sterol desaturase)、*ERG7* (lanosterol synthase)、*ERG8* (phosphomevalonate kinase)、*ERG10* (acetyl-CoA C-acetyltransferase, cytosolic)、*ERG13* (3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase)、*ERG20* (farnesylpyrophosphate synthetase)、*ERG2* (C-3 sterol dehydrogenase, C-4 decarboxylase)、*ERG28* (involved in the synthesis of ergosterol)、*IDII* (isopentenyl diphosphate delta-isomerase)、*MVD1* (mevalonate pyrophosphate decarboxylase)、*YEHI* (similarity to triacylglycerol lipases) および *YPC1* (alkaline ceramidase) は静置培養条件下で高発現していた。脂質、脂肪酸およびイソプレノイド代謝に関与している遺伝子の中で *HMG1* (3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase 1)、*OLE1* (stearoyl-CoA desaturase)、*PLB1* (phospholipase B)、*SCS7* (which is required for hydroxylation of ceramide)、および *YNL045W* (which encodes protein hydralyse leukotriene-like substrate) は、両培養条件下で高発現していた。脂質、脂肪酸およびイソプレノイド代謝に関与している遺伝子の多くは、どちらかの培養条件下で高発現しているだけでなく、もう一方の培養条件下でも X2180-1A と同程度か、またはやや強く発現していた。

ビタミン、補酵素および prosthetic グループの代謝に関与している遺伝子では、*THI2* (regulator of thiamine biosynthetic genes)、*THI3* (positive regulation factor of thiamin metabolism)、*THI4* (involved in thiamine biosynthesis and DNA repair)、*THI5* (pyrimidine biosynthesis protein)、*THI11* (thiamine regulated gene)、*THI12* (protein involved in the synthesis of the

thiamine precursor hydroxymethylpyrimidine, HMP)、*THI20* (hydroxymethylpyrimidine phosphate, HMP-P, kinase)、*THI21* (hydroxymethylpyrimidine phosphate kinase, involved in the last steps of thiamine biosynthesis)を含む遺伝子が静置培養条件下で高発現していた。

サブカテゴリでは、ヌクレオチド代謝に関与する遺伝子 *MTD1* (methylenetetrahydrofolate dehydrogenase,  $\text{NAD}^+$ )、*ADE1* (phosphoribosyl-amidoimidazolesuccinocarboxamide synthase)、*ADE2* (phosphoribosyl-aminoimidazole carboxylase)、*ADE4* (amidophosphoribosyltransferase) および *ADE17* (5-aminoimidazole-4-carboxamide ribotide transformylase)などの遺伝子が静置培養条件下で高発現していた。リン酸代謝に関与する遺伝子では *PHO3* (constitutive acid phosphatase precursor)、*PHO5* (repressible acid phosphatase precursor)、*PHO8* (repressible alkaline phosphatase vacuolar)、*PHO11* (secreted acid phosphatase)、*PHO12* (secreted acid phosphatase) および *PHO81* (cyclindependent kinase inhibitor)が両培養条件下で低発現していた。

## 第 2 項 エネルギー

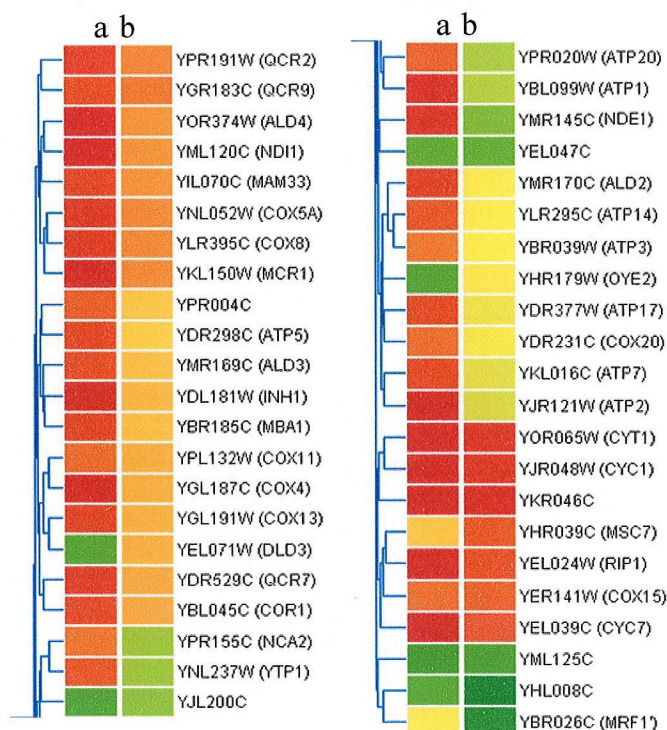
Fig.19 にエネルギーのカテゴリに分類された遺伝子の発現プロファイルを示した。このカテゴリで顕著なサブカテゴリは、電子輸送および膜結合型エネルギー変換 ( $p$ -value,  $1.53\text{e-}16$ )、呼吸 ( $p$ -value,  $1.45\text{e-}19$ )、発酵 ( $p$ -value, 0.00196)、エネルギー貯蔵代謝 ( $p$ -value, 0.000852) およびエネルギー変換および再生 ( $p$ -value, 0.000852)であった。

電子輸送および膜結合型エネルギー変換に関与する遺伝子には、8 つの *ATP* 遺伝子と、*COR1* (ubiquinol-cytochrome-c reductase 44K core protein)、6 つの *COX* 遺伝子、*YMR145C* (mitochondrial cytosolically directed NADH dehydrogenase)、*ND11* (NADH-ubiquinone-6 oxidoreductase)、*MCR1* (cytochrome-b5 reductase)、*QCR2* (ubiquinol-cytochrome-c reductase 40KD chain II) および *QCR7* (ubiquinol-cytochrome-c reductase subunit 7)が振盪培



養条件下で高発現していた。加えて *COX15* (cytochrome oxidase assembly factor)、*CYC1* (cytochrome-c isoform 1)、*CYC7* (cytochrome-c isoform 2)、*CYT1* (cytochrome-c1)、*QCR9* (ubiquinol-cytochrome-c reductase subunit 9) および *RIP1* (ubiquinol-cytochrome-c reductase iron-sulfur protein precursor) は両培養条件下で高発現していた。

発酵に関与する遺伝子では、*ALD2* (aldehyde dehydrogenase 2, NAD<sup>+</sup>)、*ALD3* (stress-inducible aldehyde dehydrogenase) および *ALD4* (aldehyde dehydrogenase, mitochondrial) が振盪培養条件下で高発現していた。



**Fig. 19. Alteration Expression Profiles of the Genes in the Category “Energy” in K-9.**

The expression profiles of the genes in K-9 are shown in two columns, indicating culture conditions: a, shaking conditions, and b, static conditions, in the same way as in Fig.18.

### 第 3 項 細胞輸送、輸送促進および輸送系

細胞輸送、輸送促進および輸送系のカテゴリに分類された遺伝子の発現は Fig.20 に示した。このカテゴリの中で顕著なサブカテゴリは、イオン輸送、C 化合物および炭水化物輸送、アミノ酸輸送、電子/水素輸送および薬剤輸送を含めた輸送化合物（基質）( $p$ -value,  $9.10e-17$ )と ATPase 輸送 ( $p$ -value,  $1.77e-06$ )であった。イオン輸送に関与する遺伝子では、重金属イオン輸送 (Cu, Fe, etc.)に関与する遺伝子が X2180-1A における発現と異なっていた。CCC2 (P-type ATPase involved in the export of  $\text{Cu}^{2+}$  from the cytosol into intracellular, secretory compartments)、FTH1 (with a similarity to Iron permease Ftr1p, YER145c)、ARN1 (a transporter of ferrirubin, ferrirhodin, and other ferrichromes)および SIT1 (transporter of the bacterial siderophore ferrioxamine B)は振盪培養条件下で高発現していた。

CTR3 (intracellular, cysteine-rich protein involved in high-affinity copper uptake)は両培養条件下で高発現していたが、ARR3 (probable arsenite extrusion protein)、COT1 (vacuolar zinc and possibly other metal transporter)、FET4 (low affinity iron and copper transporter)、FRE7 (similarity to Fre1p and Fre2p)および ZRT1 (zinc transporter I)は両培養条件下で低発現していた。FET3 (cell surface ferroxidase with high affinity)は振盪培養条件下で高発現していたが、静置培養条件下で低発現していた。

このサブカテゴリでは、リン酸輸送に関与する遺伝子で PHO84 (inorganic phosphate permease)と PHO89 ( $\text{Na}^+$ /phosphate co-transporter)が両培養条件下で低発現していたが、PHO87 (low affinity phosphate transporter)は両培養条件下で高発現していた。

C 化合物および炭水化物輸送に含まれる遺伝子では、GAL2 (galactose permease)、7つの HXT 遺伝子、JEN1 (lactate and pyruvate permease)、VPS73 (similarity to glucose transport proteins)および YDL199C (similarity to sugar transporter proteins)が振盪培養条件下で高発現しており、HXT4 (hexose facilitator of moderately low affinity)は両培養条件下で高発現していた。

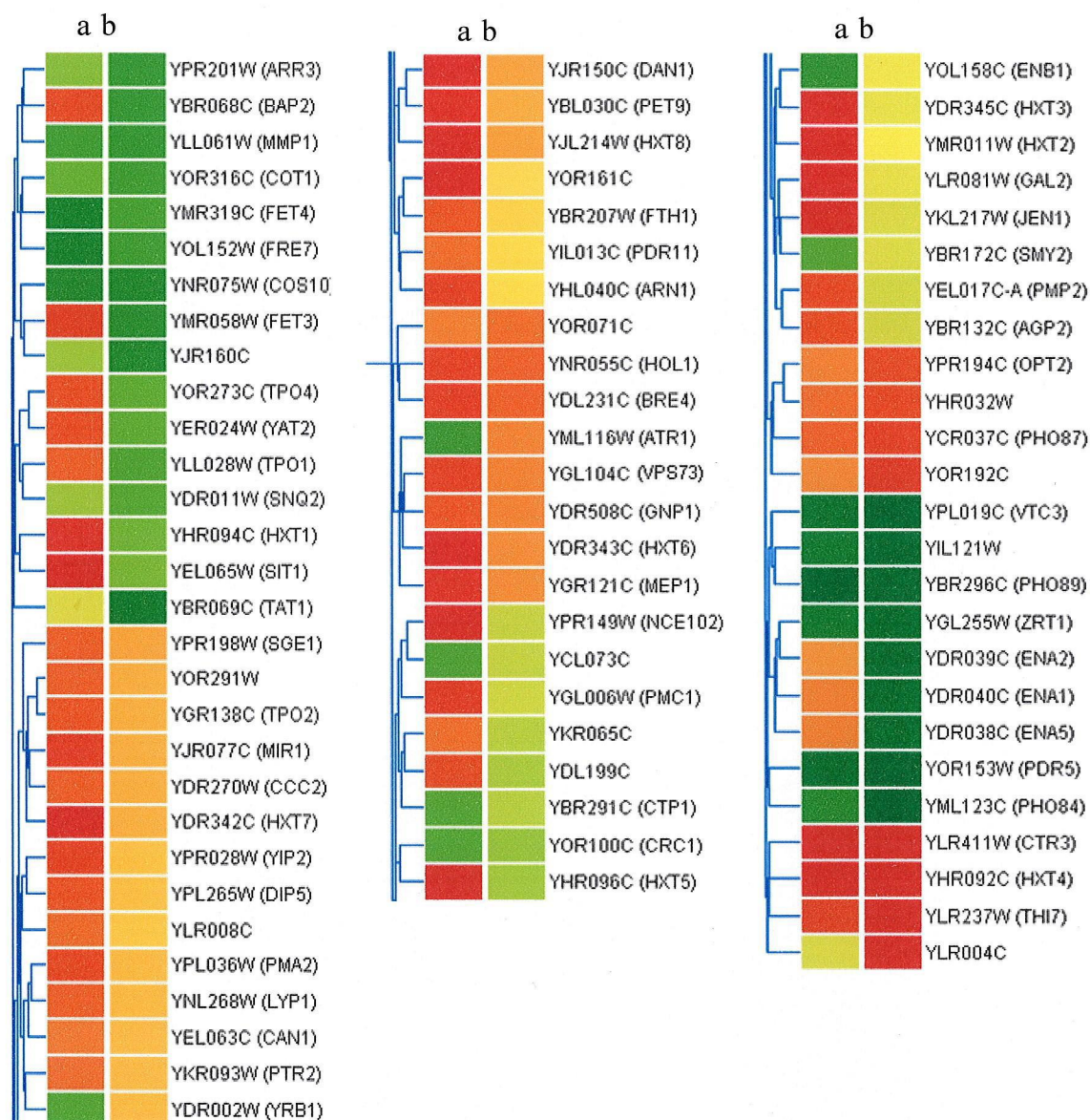
アミノ酸輸送に関与する遺伝子では、*AGP2* (carnitine permease)、*CAN1* (arginine permease)、*DIP5* (glutamate and aspartate permease able to mediate the transport of other amino acids)、*GNP1* (broad-specificity amino-acid permease)、*LYP1* (lysine permease)および*PTR2* (di- and tripeptide permease)が振盪培養条件下で高発現していた。*TAT1* (broad-specificity amino-acid permease)は両培養条件下で低発現していた。*BAP2* (broad-specificity amino-acid permease inducible by most neutral amino acids)は振盪培養条件下で高発現していたが、静置培養条件下では低発現していた。*MMP1* (S-methylmethionine permease, which has similarity to S-adenosylmethionine permease Sam3p)は、両培養条件下で低発現していた。

電子/水素輸送のカテゴリに含まれる遺伝子では、*THI7* (thiamine permease)が両培養条件下で高発現しており、*YOR071C* (strong similarity to Thi7p)、*YOR192C* (strong similarity to Thi7p)および*YLR004C* (similarity to allantoin transport protein)は静置培養条件下で高発現していた。

薬剤輸送に含まれる遺伝子では、*PDR11* (full-size ABC transporter involved in sterol uptake)、*SGE1* (putative substrate- $H^+$  antiporter conferring resistance to crystal violet and to 10-N-nonyl acridine orange, NAO)、*TPO1* (vacuolar polyamine- $H^+$  antiporter)、*TPO2* (proposed vacuolar polyamine transporter)および*TPO4* (proposed vacuolar polyamine transporter)が振盪培養条件下で高発現していた。*HOL1* (putative substrate- $H^+$  antiporter of unknown biological function)および*YHR032W* (ethionine resistance protein)は両培養条件下で高発現していた。multi-drug transporter をコードしている遺伝子では、*SNQ2*、*PDR5* および *YIL121W* が両培養条件下で低発現していた。

ATPase に関与する遺伝子では、*PMA2* (poorly expressed,  $H^+$ -transporting P-type ATPase)、*PMCI* (vacuolar P-type ATPase transporting  $Ca^{2+}$  into the vacuole)、*PMP2* ( $H^+$ -ATPase subunit in the plasma membrane)、*ENA1*、*ENA2* および *ENA5* (which encode plasma membrane P-type ATPase, involved in

Na<sup>+</sup> and Li<sup>+</sup> efflux)は振盪培養条件下で高発現していた。



**Fig. 20. Alteration of the Expression Profiles of the Genes in the Category “Cellular Transport, Transport Facilitation, and Transport Routes” in K-9.**

The expression profiles of the genes in K-9 are shown in two columns, indicating culture conditions: a, shaking conditions, and b, static conditions, in same way as in Fig.18.

#### 第 4 項 転写

転写に分類される遺伝子の発現プロファイルを Fig. 21.A に示した。このカテゴリに含まれる遺伝子では、*CUP9* (involved in copper homeostasis repression of protein import)、*MBR1* (required for optimal growth on glycerol) および *STP4* (involved in pre-tRNA splicing and in uptake of branched-chain amino acids)が振盪培養条件下で高発現しており、*MGAI* (similarity to heatshock transcription factors)は両培養条件下で高発現していた。*SMP1* (MADS-box transcription factor, which is involved in regulating the response to osmotic stress)、および *ROX1* (heme-dependent transcriptional repressor of hypoxic genes)は静置培養条件下で高発現していた。*NET1* (required for rDNA silencing and nucleolar integrity)、*ESC4* (which establishes silent chromatin)および *SAS10* (involved in silencing)は振盪培養条件下で低発現していた。*FLO5* (member of the Flo1p family of flocculation proteins)は両培養条件下で低発現していた。

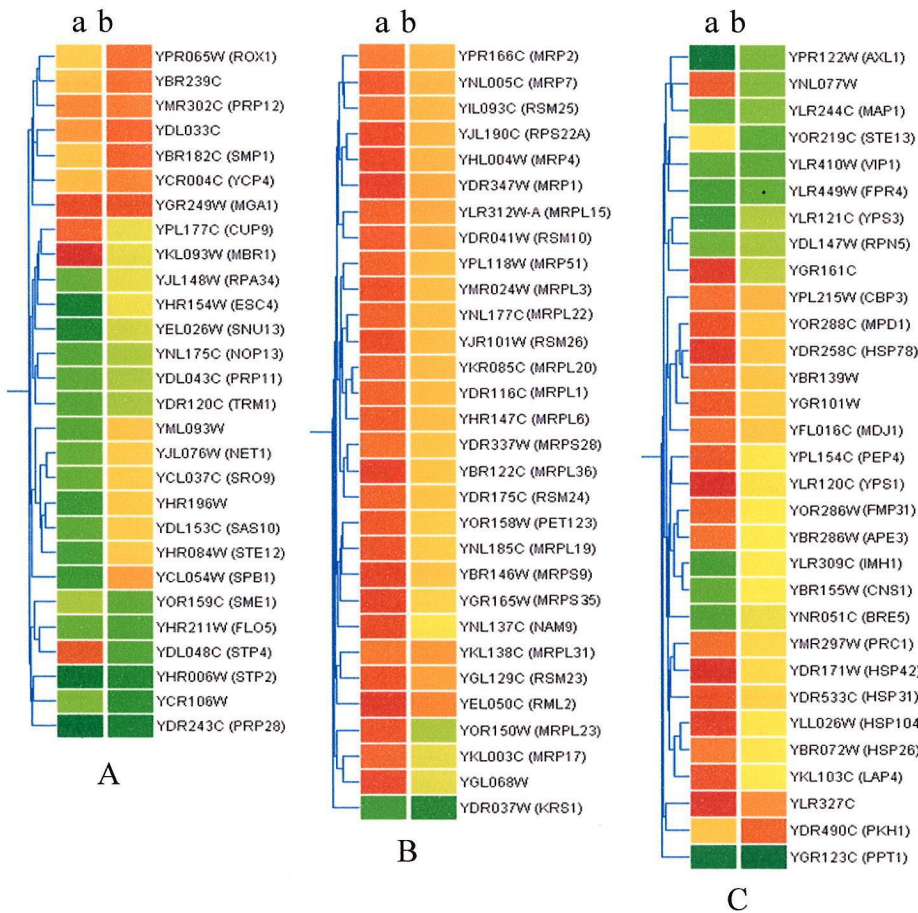
#### 第 5 項 タンパク質合成

タンパク質合成のカテゴリに含まれる遺伝子の発現プロファイルを Fig.21.B に示した。このカテゴリで、多くの遺伝子が含まれていたサブカテゴリはリボソーム生合成であり、*MNP1* (strong similarity to cricetus mitochondrial ribosomal L12 protein)、19 の *MRP* 遺伝子、*NAM9*、*PET123*、*RML2*、*RPS22A* および 5 つの *RSM* 遺伝子が振盪培養条件下で高発現していた。*KRS1* (lysyl-tRNA synthetase, cytosolic)は、両培養条件下で低発現していた。

#### 第 6 項 タンパク質の品質管理 (フォールディング、修飾および輸送)

タンパク質の品質管理のカテゴリに分類される遺伝子の発現プロファイルを、Fig.21.C に示した。タンパク質分解酵素をコードする *AXL1*

(haploid specific endoprotease)、*MAPI* (methionine aminopeptidase, isoform 1)、*YPS3* (GPI-anchored aspartyl protease 3, yapsin 3)、*RPN5* (subunit of the regulatory particle of the proteasome)、*STE13* (type-IV dipeptidyl aminopeptidase)および *FPR4* (nucleolar peptidylprolyl cis-trans isomerase, PPIase) は振盪培養条件下で低発現していたが、*YBR139W* (strong similarity to carboxypeptidase)、*PEP4* (aspartyl protease)、*YPS1* (aspergillopepsin)、*APE3*



**Fig.21. Alteration of the Expression Profiles of the Genes in the Categories “Transcription,” “Protein Synthesis,” and “Protein fate” in K-9.**

The expression profiles of the genes in K-9 are shown in two columns, indicating culture conditions: a, shaking conditions, and b, static conditions, in same way as in Fig.18. The expression profiles of the genes in each category are shown at to A, transcription, B, protein synthesis, and C, protein fate.

(vacuolar aminopeptidase Y)、*PRC1* (carboxypeptidase Y, serine-type protease)および*LAP4* (aminopeptidase yscI precursor, vacuolar)は振盪培養条件下で高発現していた。

ヒートショックタンパク質ファミリーに属するタンパク質をコードしている遺伝子のうち *HSP26*、*HSP31*、*HSP42*、*HSP78*、*HSP104*、*MDJ1* (heat-shock protein chaperone)および *FMP31* (similarity to *D. melanogaster* heat-shock protein 67B2)は振盪培養条件下で高発現していた。

#### 第 7 項 細胞周期および DNA プロセッシング

細胞周期および DNA プロセッシングのカテゴリに含まれる遺伝子の発現プロファイルを Fig.22.A に示した。これらの遺伝子は、DNA プロセッシングおよび体細胞分裂周期および細胞周期コントロールのサブカテゴリに分類されたが統計的に顕著なサブカテゴリは見られなかった。DNA プロセッシングに関与する遺伝子では、*CLN2* (cyclin, G1/S-specific)、*MLP1* (myosin-like protein related to Uso1p)、*RAD6* (E2 ubiquitin-conjugating enzyme)、*RAD9* (DNA repair checkpoint protein)、*RDH54* (required for mitotic diploid-specific recombination and repair and meiosis)、*YRF1-1* および *YRF1-2* (Y-helicase protein 1)、*YRF1-4* (protein with similarity to other subtelomerically-coded Y-helicase proteins)が振盪培養条件下で低発現していた。体細胞分裂周期および細胞周期コントロールに関与する遺伝子では、*CBF5* (putative rRNA pseuduridine synthase)、*FAR1* (cyclin-dependent kinase inhibitor, CKI)、*MYO4* (myosin heavy-chain, unconventional, class V, isoform)、*NDJ1* (meiotic telomere protein)、*PIN4* (similarity to *S. pombe* Z66568\_C protein)、*REX4* (strong similarity to *X. laevis* *XPMC2* protein and *YGR276c*)、*SLK19* (involved in the control of spindle dynamics together with kar3p)、*SMC1* (chromosome segregation protein)、*NUF1* (spindle pole body component)、*UTH1* (involved in the aging process)、*ZDS1* (involved in negative regulation of cell polarity)および *YLR179C* (with a similarity to

Tfs1p)が振盪培養条件下で低発現していた。*SNZ1* (stationary phase protein)および*SCM4* (*cdc4* suppressor)は両培養条件下で高発現していた。

#### 第 8 項 細胞構造、発達、細胞生成

このカテゴリに分類される遺伝子の発現プロファイルを示した。出芽に関する遺伝子 *AXL2* (required for axial pattern of budding)、*RAX2* (weak similarity to *Pst1p*)、*BUD3* (budding protein)および *UTR2* (cell-wall protein)は振盪培養条件下で低発現していた。

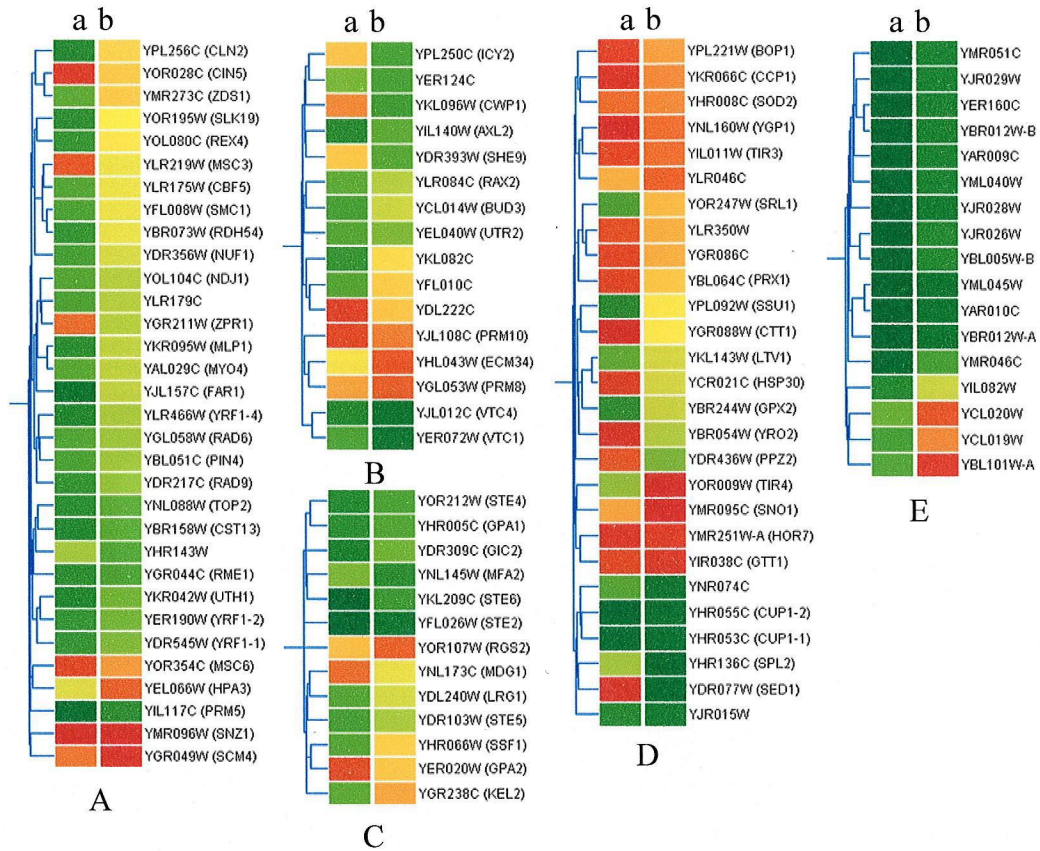
#### 第 9 項 細胞環境との相互作用および細胞情報伝達機構

これら二つのカテゴリに分類される遺伝子の発現プロファイルを示した。フェロモン反応、接合型決定および性特異的タンパク質に関する遺伝子 *GIC2* (*cdc42* GTPase-binding protein)、*GPA1* (GTP-binding protein  $\alpha$  subunit of the pheromone pathway)、*KEL2* (involved in cell fusion and morphogenesis)、*STE2* (pheromone  $\alpha$ -factor receptor)、*STE4* (GTP-binding protein beta subunit of the pheromone pathway)、*STE5* (pheromone signal transduction pathway protein)、*STE6* (full-size ABC transporter responsible for export of the a factor mating pheromone)、*MFA2* (mating pheromone a-factor 2)、*LRG1* (GTPase-activating protein of the rho/rac family)は両条件下で低発現していた。

#### 第 10 項 セルレスキュー、防御および病原性

セルレスキュー、防御および病原性のカテゴリに分類される遺伝子の発現プロファイルを示した。このカテゴリで統計的に顕著なサブカテゴリは、酸化ストレス応答、ヒートショック応答、栄養枯渇応答を含むストレス応答( $p$ -value,  $1.74e-07$ )および解毒( $p$ -value,  $2.60e-09$ )である。ストレス応答に関する遺伝子では *CTT1* (catalase T, cytosolic)、*HSP30* (heat shock protein)、*PPZ2* (protein ser/thr phosphatase of the PP-1





**Fig. 22. Alteration of the Expression Profiles of the Genes in the Categories “Cell Cycle and DNA Processing,” “Biogenesis of Cellular Components,” “Development (Systemic),” “Cell Type Differentiation,” “Cell Fate”, “Cell Rescue, Defense and Virulence,” “Interaction with the Cellular Environment and Cellular Communication Signal Transduction Mechanism,” and “Transposable Elements, Viral and Plasmid Proteins” in K-9.**

The expression profiles of the genes in K-9 are shown in two columns, indicating culture conditions: a, shaking conditions, and b, static conditions, in same way as in Fig.18. The expression profiles of the genes in each category are shown as to A, cell cycle and DNA processing, B, biogenesis of cellular components, development (systemic) and cell type differentiation, C, cell fate, D, cell rescue, defense and virulence, and E, transposable elements, viral and plasmid proteins.

family)および *YRO2* (strong similarity to *HSP30* heat-shock protein Yro1p)が、また解毒に関与する遺伝子では *CCP1* (cytochrome-c peroxidase precursor)、*PRX1* (mitochondrial isoform of thioredoxin peroxidase)および *SOD2* (superoxide dismutase, Mn, precursor, mitochondrial)が振盪培養条件下で高発現していた。ストレス応答に含まれる遺伝子のうち、*GTT1* (glutathione S-transferase)、*HOR7* (hyperosmolarity-responsive protein)および *YGPI* (secreted glycoprotein)は両培養条件下で高発現していた。*SUL1* (a protein mediating excretion of sulfite)、*LTV1* (a low-temperature viability protein)、*GPX2* (glutathione peroxidases)および *SRL1* (with a similarity to vanadate sensitive suppressor Svs1p)は振盪培養条件下で低発現していた。嫌氣的増殖に必要であるといわれている遺伝子 *TIR3* (cell wall mannoprotein)は両培養条件下で高発現しており、*TIR4* (cell wall mannoprotein involved in cell-wall maintenance)は静置培養条件下でのみ高発現していた。解毒に関与する遺伝子では *CUP1-1*・*CUP1-2* (metallothionein)は両培養条件下で低発現していた。*SEDI* (abundant cell-surface glycoprotein)は振盪培養条件下で高発現していたが、静置培養条件下では低発現していた。

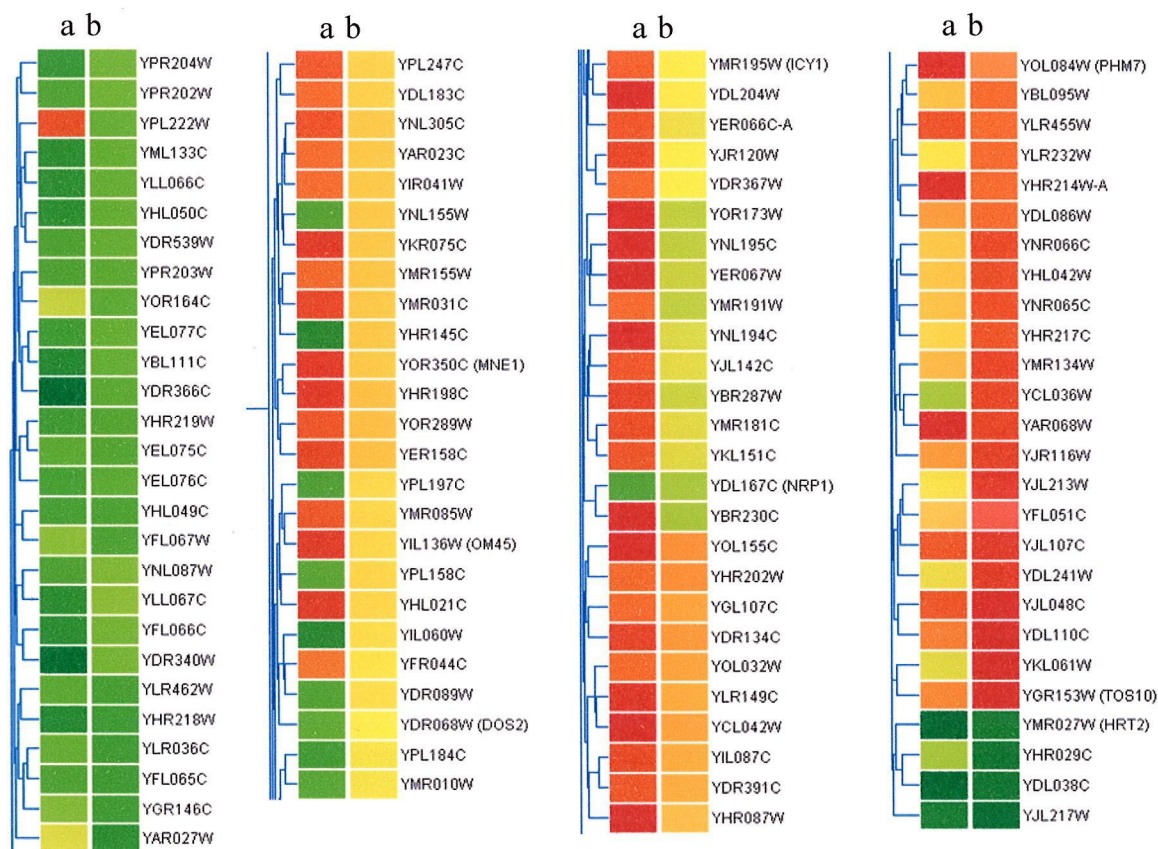
#### 第 1 1 項 転位因子、ウイルス性およびプラスミドタンパク質

転位因子に関連した遺伝子の発現プロファイルを Fig.22.E に示した。13 の TY1 elements は両培養条件下で低発現していたが、TY2 elements、*YCL020W*、*YCL019w* および *YBL101W-A* は静置培養条件下で高発現していた。

#### 第 1 2 項 未分類タンパク質

未分類タンパク質に分類される遺伝子の発現プロファイルを Fig.23 に示した。振盪培養あるいは静置培養条件下で高発現あるいは低発現していた遺伝子は、105 にのぼる。これらの遺伝子のうち染色体末端付近にコードされているタンパク質に強い相同性をもつ 13 の遺伝子が振盪培

養条件下で低発現していた。



**Fig. 23. Alteration of the Expression Profiles of the Genes in the Category “Unclassified Protein” in K-9.**

The expression profiles of the genes in K-9 are shown in two columns, indicating culture conditions: a, shaking conditions, and b, static conditions, in same way as in Fig.18.

#### 第 4 節 考察

*S.cerevisiae* に属する酵母である清酒酵母は、高エタノール耐性、高発酵能、低温下での高い増殖能、低アミノ酸生産性、高エステル生産性な

どの清酒醸造に適した特性を有している。これら清酒酵母は長い清酒醸造の歴史のなかで選択され、現在では純粋培養されたものが使用されている。本研究では、振盪及び静置培養条件下での DNA マイクロアレイにより、清酒酵母が持つ特性について遺伝子の発現プロファイルから解析を行った。

清酒酵母は他の酵母よりも高いエタノール耐性を示す。(Shobayashi et al. 2005, Casey and Ingledew 1986) 酵母のエタノール耐性に影響を与える要因については、酵母のトレハロース含量 (Mansure et al. 1994) や細胞膜の脂質の不飽和度 (Mishra and Prasad 1989, Alexandre et al. 1994, You et al. 2003)、酵母細胞のエルゴステロール含量 (Inoue et al. 2000) などの観点から研究がなされてきた。清酒酵母から取得されたエタノール感受性酵母はエルゴステロール合成系の *erg6* 変異によるものであることが示され、酵母のエタノール耐性にエルゴステロール含量が重要な役割を果たしていることが明らかになった (Inoue et al. 2000)。

酵母のエタノール耐性に関連する遺伝子としては、先に述べたように、トレハロース合成に関与する *TPS1*、*TPS2* および *TSL1* は K-9 で振盪培養条件下で高発現しており、不飽和脂肪酸の合成に関与する *OLE1* (Stukey et al. 1990) は両培養条件下で高発現していた。エルゴステロール合成に関与する遺伝子は振盪または静置培養、あるいは両培養条件下で高発現していた。さらに、ステロールエステルのホメオスタシスに関与する二つの遺伝子 *ARE2* (Zweytick et al. 2000, Jansen-Pergakes et al. 2001) および *YEHI* (Koffel et al. 2005) が静置培養条件下で高発現していた。酵母細胞では合成されたエルゴステロールの大部分がステロールエステルに変換され細胞膜で利用されるまで脂質顆粒に貯蔵されている (Shobayashi et al. 2005, Zweytick et al. 2000)。ステロールエステルのホメオスタシスは酵母細胞で機能を有するフリーのエルゴステロールのホメオスタシスにも重要である。加えてエルゴステロール合成系でチモステロールのメチル化反応においてメチル基供与体となる SAM の合成に関与する二つの遺伝

子(Parks 1958, Daum et al. 1998)も静置培養条件下で高発現していた。この結果は、静置培養条件下で K-9 の SAM およびエルゴステロール含量が X2180-1A に比べて高いという結果とも一致している(Shobayashi et al. 2006)。ステロール合成には分子状酸素が必要であるために静置培養条件下では振盪培養条件下よりも酵母の総ステロール含量は低くなる。しかしながら、K-9 におけるステロール合成やステロールエステルホメオスタシスに関与する遺伝子の高発現は、静置培養条での K-9 の総エルゴステロールおよびフリーエルゴステロールの含量が X2180-1A に比べて高いことと一致している(Shobayashi et al. 2005)。エタノール耐性に関与する多くの遺伝子が報告されているが、K-9 におけるこれらの遺伝子の高発現は、K-9 の高いエタノール耐性に寄与していると考えられる。

C 化合物および炭水化物代謝に関与している遺伝子では、いくつかのものが静置培養条件下で、多くの遺伝子が振盪培養条件下で高発現していた。これらの遺伝子の中で、ヘキソース輸送および他の糖類の輸送に関わる遺伝子が振盪培養条件下で高発現していた。しかしこれらの遺伝子の発現調節に関与する遺伝子(*SNF3*, *RGT1*, and *GRR1*) (Ozcan and Johnston 1999)は、今回実験を行ったどちらの条件下でも発現に変動は見られなかった。更に TCA サイクル、呼吸、酸化的リン酸化、ATP 合成および発酵などエネルギーに関与する遺伝子が振盪培養条件下で高発現していた。これらの C 化合物および炭水化物取り込み、代謝、呼吸およびエネルギーに関与する遺伝子の高発現が増殖初期の高い増殖特性と産業用酵母としての K-9 の高い発酵能、糖資化性に重要であると考えられる。

タンパク質合成とタンパク質の品質管理（フォールディング、修飾および輸送）に関与する遺伝子で振盪培養条件下で高発現していたものでは、MRPs (mitochondrial ribosomal proteins)(Chacinska and Boguta 2000)があり、これは酵母のミトコンドリアに存在する呼吸と酸化的リン酸化に関与する遺伝子の高発現とも一致している。タンパク質の品質管理に関与する遺伝子の高発現は清酒酵母の高い増殖能やそれを支えるタンパク

質合成に関連していると考えられる。

*THI7* をはじめとするサイアミン取り込みおよび代謝に関与する遺伝子が両培養条件下で高発現していた。サイアミンは酵母細胞においてはエタノール生成におけるピルビン酸脱炭酸酵素の重要な補酵素である。細胞内のサイアミン濃度によって発現調節がなされるサイアミン合成に関与する遺伝子(Praekelt et al. 1994, Hohmann and Meacock 1998)が高発現しているという結果は、エタノール発酵の補酵素としてサイアミンが消費されることにより K-9 の細胞内のサイアミン濃度が低くなっているため、これらサイアミン合成に関与する遺伝子が高発現しているとも考えられる。しかしながらサイアミン取り込みに関与する遺伝子 *PHO3* (Nosaka et al. 1989)は、*THI* 遺伝子と同じ発現調節を受けているので、サイアミン合成に関与する遺伝子が高発現している条件下では高発現することが予想されるが *PHO3* は他の *PHO* 遺伝子と同じく両培養条件下で非常に発現が低く抑えられている。さらに、*PHO3* の発現が低いということは、*PHO5* が *PHO3* の発現を抑制する(Tait-Kamradt et al. 1986)というこれまでに報告されている事実とも異なっている。

一方リン酸代謝に関与する遺伝子は、K-9 では両培養条件下で低発現していた。加えてポリリン酸合成酵素である *VTC1*、*VTC2*、*VTC3* および *VTC4* も発現が低くなっていた。*PHO* 遺伝子の発現調節系に関する知見によると、サイクリン依存性キナーゼをコードする *PHO81* の発現が低くなると他の *PHO* 遺伝子も発現が抑えられ、酵母では高リン酸濃度の条件下では抑制性酸性フォスファターゼが発現することが知られている(Ogawa et al. 2000)が、清酒酵母ではこの現象が見られない。この違いを用いて酸性フォスファターゼを検出する寒天培地を用いた清酒酵母と汚染した野生酵母の検出法が考案されている(Mizoguchi and Fujita 1982)。我々の今回の結果はこれまでに清酒酵母に関してなされた報告と一致していた。これまで述べたように、*THI* 遺伝子および *PHO* 遺伝子の発現プロファイルより、K-9 では *PHO* 遺伝子の発現調節系に X2180-1A とは違

いがあることが示唆された。

アミノ酸代謝に関与する遺伝子では、アスパラギン合成に関与する遺伝子 *ASN1*、*ASP3-1*、*ASP3-2*、*ASP3-3* および *ASP3-4* とホモクエン酸合成酵素 *LYS20*、*LYS21* が両培養条件下で低発現していた。特に L-asparaginase II をコードする *ASP3-1*、*ASP3-2*、*ASP3-3* および *ASP3-4* は非常に発現が低くなっており、染色体上のこれらの ORF に何らかの違いが生じている可能性も考えられる。

金属イオンホメオスタシスに関与する遺伝子では、メタロチオネインをコードする *CUP1-1* と *CUP1-2* (Butt et al. 1984) が低発現していたが、 $\text{Cu}^{2+}$  に反応して転写活性を行う *CUP2* の発現は低くなっていなかった。清酒酵母は他の酵母に比べて銅耐性が低いことが知られており (Watanabe et al. 1984)、実験室酵母が増殖可能な 5 mM  $\text{Cu}^{2+}$  の寒天培地上で K-9 は増殖不可能であった (data not shown)。酵母の銅耐性は遺伝子のタンデムリピートによるものであるという報告 (Seymour and Juliet 1982) や、*S.cerevisiae* X2180-1A が *CUP1-1* と *CUP1-2* をタンデムに 20 コピー有していることが報告されていることから (Karin et al. 1984)、K-9 では *CUP* 遺伝子のコピー数が少ないために発現量が低く、そのために銅耐性も低くなっていると考えられる。

TY1 element をコードする遺伝子についても K-9 では両培養条件下で発現が低くなっていた。*S.cerevisiae* の Ty element の多型性については、実験室酵母 *S.cerevisiae* S288c と産業用酵母では Ty element にいくつかのバリエーションがあることが報告されている (Wicksteed et al. 1994)。S288c とその派生株では *HAP1* ORF の 3' 末端付近に Ty1 element の挿入による変異が生じている (Gaisne et al. 1999)。S288c の派生株である X2180 にはこの変異があるが、清酒酵母の K-7 は野生型の *HAP1* を有しており、K-7 と X2180 のエルゴステロール関連遺伝子の発現量とエルゴステロール含量の違いは主に X2180 の *hap1* 変異によることが報告されている (Tamura et al. 2004)。

Hap1p はまた、酸素量に応じて転写を調節する重要な転写調節因子である (Kwast et al. 1998)。*HAP1* の発現量は二つの培養条件下で違いは見られなかったが、X2180-1A の *hap1* 変異が K-9 と X2180-1A の酸素の量によって制御されている遺伝子の発現プロファイルの違いを引き起こしているのかもしれない。本研究では、K-9 における振盪培養条件下での低酸素で発現する遺伝子 *CYC7*、*ATH1*、*TPS1*、*TPS2*、*OLE1*、*ERG25* および *ERG26*(Kwast et al. 2002)の高発現や、逆に好氣的条件で発現する遺伝子 *CYC1*、*CYT1*、*ERG13*、*HMG1* および *MVD1*(Kwast et al. 2002)の静置培養条件下での高発現が見られた。これら酸素量に応じて発現する遺伝子の発現プロファイルの違いを全て X2180-1A の *hap1* 変異によるものとすることはできないが、K-9 における Ty element の違いをはじめとする染色体上の違いがいくつかの遺伝子の発現の違いに関与している可能性が考えられる。

これまで述べてきたように、清酒酵母の厳しい醸造条件に適応するための様々な能力は、対応する遺伝子発現によるものである。また清酒酵母では染色体の構造や遺伝子発現調節系にもいくつかの違いがあることが示唆されたが、清酒酵母のもつ類まれなる特性について解析するためには更なる解析が望まれる。

## 第 5 節 小括

清酒酵母と実験室酵母の特性の違いを引き起こしている遺伝子について、DNA マイクロアレイを用いて清酒酵母 *S. cerevisiae* K-9 (協会 9 号) と実験室酵母 X2180-1A の振盪培養および静置培養条件下での遺伝子発現プロファイルの違いを解析した。

K-9 で高発現していた遺伝子には、炭素代謝に関与する *HXT*、*ATP* 及び *COX* 遺伝子、エルゴステロール合成に関与する *ERG* 遺伝子群およびサイアミン代謝に関与する *THI* 遺伝子群があった。これらの遺伝子の高発現は、清酒酵母の高い増殖能・発酵能やエタノール耐性に寄与している



と考えられる。

K-9 で発現が低い遺伝子には、*CUP1-1*、*CUP1-2* や *PHO* 遺伝子があり、これらは清酒酵母で知られている特性である低い銅耐性、酸性フォスファターゼ活性と一致している。これらの遺伝子の低発現は清酒酵母の染色体構造の違いに関係しているのかも知れない。

## 結 言

清酒酵母は、清酒醸造において他に類を見ない高アルコール濃度の中でも活性を失わず、その品質を達成するための能力を維持することができる。このような特性を持つ清酒酵母は分類学上、*Saccharomyces cerevisiae* に属するとされているが、清酒醸造に適した株を長い歴史の中で選択されたことにより、一般的な実験室酵母の性質とは異なる特徴を有している。筆者は、清酒酵母は、そのもっとも大きな特徴である高いエタノール耐性を維持するため、膜の構成成分であるエルゴステロールの高い合成能とエルゴステロール合成にとって不利な条件下であっても、膜で機能するフリーのエルゴステロール量のホメオスタシスを高く維持していることを示した。今後は清酒酵母のエタノール耐性機構を解明し、バイオマスエタノール生産など醸造以外の分野に適用することができれば、応用範囲は大きく広がると考えられる。

高エタノール耐性を維持するための高いエルゴステロール合成能と関連し、清酒酵母は他の微生物と比較して著量の SAM を液胞内に蓄積することが知られている。SAM は、アルコール性肝障害やうつ病などに効果があることが知られている物質であり、その効率的生産方法の開発が望まれている。そこで、エルゴステロール合成系の変異株では、エルゴステロール合成で消費される SAM の量が減少することにより、SAM がより多く蓄積すると考え SAM 高蓄積株の取得にこれまでエルゴステロール変異株の取得に用いられてきたナイスタチン耐性株選択方法の応用を試みた。この選択方法により清酒酵母などから効率的な SAM 高蓄積株の選択が可能であることを示した。本法により、清酒酵母からは親株の 2 倍、実験室酵母からは親株の 5 倍の SAM を蓄積する株を取得することに成功した。この SAM を高蓄積した清酒酵母の安定性および消化管での消化性を確認し、SAM 高蓄積清酒酵母がサプリメントとして利用可能であることを示した。この方法によって作製された SAM 高蓄積清

酒酵母を用いてマウスにおける活動量の増加(Manabe et al. 2004)やアルコール性肝障害の抑制効果(Izu et al. 2006)が共同研究者らによって示された。清酒酵母には SAM 以外にもビタミン B 群やプロビタミン D とも言われるエルゴステロール、良質のタンパク質も多く含まれており、酒粕など清酒酵母を多く含む食品の栄養特性を再評価することで、その価値を見直すことができた。今後、日本でもサプリメントや医薬品として SAM が認可された場合には、SAM 高蓄積清酒酵母を用いた SAM の効率的生産の実用化が期待される。

SAM は、酵母細胞内では含硫アミノ酸のホメオスタシスの鍵を握る物質である。酵母において、SAM は液胞に蓄積することが知られているが、蓄積された SAM が、貧栄養条件下では酵母の N 源、S 源として再利用されることを示した。この結果により、液胞に蓄積された SAM は環境に応じて再び細胞内で利用され、細胞の増殖などに利用されていることを示したものである。SAM の液胞への輸送系やその制御系は未だ解明されていないが、本研究により SAM の液胞への輸送が細胞の置かれた状況に応じた蓄積と再利用の双方向性であることを示した。今後、SAM の液胞への輸送機構が解明されれば、より効率的な SAM の生産への応用が可能になるであろう。

清酒酵母のもつ優れた醸造特性やエルゴステロール合成能・SAM 蓄積能などの特性を、DNA マイクロアレイを用いて実験室酵母の遺伝子発現と比較を行うことにより解析を行った。清酒酵母の高い増殖能や炭水化物資化能などは、エネルギー生産に関する遺伝子やタンパク合成に関する遺伝子の発現量の違いとして示された。清酒酵母を他の酵母から検出する際に、経験的に用いられていた特性である低い酸性フォスファターゼ活性や低い銅耐性は、遺伝子発現の低さだけではなく染色体構造の違いに起因するものであることが示唆された。清酒酵母の様々な特性を裏付ける遺伝子発現の違いの中から、他の酵母にも導入可能なものを見出すことができれば、清酒酵母の優れた特性を更に広く活用できると考え

られる。現在、独立行政法人 酒類総合研究所を中心としたプロジェクトで清酒酵母のゲノム解読が進められており、この結果から更に興味ある情報が期待される。

## 参考文献

- Alexandre, H., Rousseaux, I. and Charpentier, C., Relationship between ethanol tolerance, lipid composition and plasma membrane fluidity in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **124**, 17-22 (1994).
- Astwood, J.D., Leach, J.L., and Fuchs, R.L., Stability of food allergens to digestion in vitro. *Nature Biotechnol.*, **14**, 1269-1273 (1996).
- Bagnat, M., Keranen, S., Shevchenko, A., and Simons, K., Lipid rafts function in biosynthetic delivery of proteins to the cell surface in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**, 3254-3259 (2000).
- Bailey, R.B., and Parks, L.W., Yeast sterol esters and their relationship to the growth of yeast. *J. Bacteriol.*, **124**, 606-612 (1975)
- Barton, D.H.R., Corrie, J.E.T., Widdowson, D.A., Bard, M., and Woods, R.A., Biosynthesis of terpenes and steroids. Part IX. The sterols of some mutant yeasts and their relationship to the biosynthesis of ergosterol. *J.C.S. Perkin I*, **148**, 1326-1333 (1974).
- Bloch, K.E., Sterol structure and membrane function. *CRC Crit. Rev. Biochem.*, **14**, 47-92 (1983).
- Bradley, J.D., Flusser, D., Katz, B.P., Schumacher, H.R. Jr, Brandt, K.D., Chambers, M.A., and Zonay, L.J., A randomized, double blind, placebo controlled trial of intravenous loading with S-adenosylmethionine (SAM) followed by oral SAM

- therapy in patients with knee osteoarthritis. *J. Rheumatol.*, **21**, 905-911 (1994)
- Butt, T. R., Sternberg, E. J., Herd, J., and Crooke, S. T., Cloning and expression of a yeast copper metallothionein gene. *Gene*, **27**, 23-33 (1984).
- Casey, G.P. and Ingledew, W.M., Ethanol tolerance in yeasts. *Crit. Rev. Microbiol.*, **13**, 219-280 (1986).
- Chacinska, A., and Boguta, M., Coupling of mitochondrial translation with the formation of respiratory complexes in yeast mitochondria. *Acta Biochim. Pol.*, **47**, 973-991 (2000).
- Chan, S. Y., and Appling, D.R., Regulation of S-adenosylmethionine levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **278**, 43051-43059 (2003)
- Daum, G., Lees, N.D., Bard, M., and Dickson, R., Biochemistry, cell biology and molecular biology of lipids of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **14**, 1471-1510 (1998).
- Dickinson, J.R., and Schweizer, M., The metabolism and molecular physiology of *Saccharomyces cerevisiae*. *Taylor & Francis Ltd.*, 79-135 (1999)
- Eisenkolb, M., Zenzmaier C., Leitner E., and Schneiter R., A specific structural requirement for ergosterol in long-chain fatty acid synthesis mutants important for maintaining raft domains in yeast. *Mol. Biol. Cell.*, **13**, 4414-4428 (2002).
- Gaisne, M., Becam, A.M., Verdiere, J., and Herbert, C.J., A 'natural' mutation in *Saccharomyces cerevisiae* strains derived from S288c affects the complex regulatory gene *HAP1 (CY1)*. *Curr. Genet.*, **36**, 195-200 (1999).
- Hirasawa, T., Nakamura, Y., Yoshikawa, K., Ashitani, K., Nagahisa,

- K., Furusawa, C., Katakura, Y., Shimizu, H., and Shioya, S., Comparative analysis of transcriptional responses to saline stress in the laboratory and brewing strains of *Saccharomyces cerevisiae* with DNA microarray. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **70**, 346-357 (2006).
- Hohmann, S., and Meacock, P. A., Thiamine metabolism and thiamine diphosphate-dependent enzymes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: genetic regulation. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1385**, 201-219 (1998).
- Inoue, T., Iefuji H., Fujii T., Soga H., and Satoh K., Cloning and characterization of a gene complementing the mutation of an ethanol-sensitive mutant of sake yeast. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**, 229-236 (2000).
- Izu, H., Shobayashi, M., Manabe, Y., Goto, K., and Iefuji, H., S-Adenosylmethionine (SAM)-accumulating sake yeast suppresses acute alcohol-induced liver injury in mice. *Biosci Biotechnol Biochem.*, **12**, 2982-2989 (2006)
- Jacquemin-Faure, I., Thomas, D., Laporte, J., Cibert, C., and Surdin-Kerjan, Y., The vacuolar compartment is required for sulfur amino acid homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet.*, **244**, 519-529 (1994)
- Jahnke, L., and Klein, H.P., Oxygen requirements for formation and activity of the squalene epoxidase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, **155**, 488-492 (1983).
- Jansen-Pergakes, K., Guo, Z., Giattina, M., Sturley, S. L., and Bard, M., Transcriptional regulation of the two sterol esterification genes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, **183**, 4950-4957 (2001).

- Karin, M., Najarian, R., Haslinger, A., Valenzuela, P., Welch, J., and Fogel, S., Primary structure and transcription of an amplified genetic locus: the *CUP1* locus of yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 337-341 (1984).
- Kobayashi, G.S., and Medoff, G., Antifungal agents: recent developments. *Ann. Rev. Microbiol.*, **31**, 291-308 (1977).
- Koffel, R., Tiwari, R., Falquet, L. and Schneiter, R., The *Saccharomyces cerevisiae* YLL012/YEH1, YLR020/YEH2, and *TGL1* genes encode a novel family of membrane-anchored lipases that are required for steryl ester hydrolysis. *Mol. Cell. Biol.*, **25**, 1655-1668 (2005).
- Kohrer, K., and Domdey, H., Preparation of high molecular weight RNA. *Methods Enzymol.*, **194**, 398-405 (1991).
- Koukkou A.I., Tsoukatos, D., and Drainas, C., Effect of ethanol on the sterols of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **111**, 171-175 (1993).
- Kwast, K. E., Burke, P. V., and Poyton, R. O., Oxygen sensing and the transcriptional regulation of oxygen-responsive genes in yeast. *J. Exp. Biol.*, **201**, 1177-1195 (1998).
- Kwast, K. E., Lai, L. C., Menda, N., James, D. T., 3rd, Aref, S., and Burke, P. V., Genomic analyses of anaerobically induced genes in *Saccharomyces cerevisiae*: functional roles of *ROX1* and other factors in mediating the anoxic response. *J. Bacteriol.*, **184**, 250-265 (2002).
- Lieber, C.S., S-adenosyl-L-methionine: its role in the treatment of liver disorders. *Am. J. Clin. Nutr.*, **76**, 1183S-1187S (2002).
- Manabe, Y., Shobayashi, M., Kurosu, T., Sakata, S., Fushiki, T., and Iefuji, H., Increase in spontaneous locomotive activity



- in rats fed diets containing sake lees or sake yeast. *Food Sci. Technol. Res.*, **10**, 300–302 (2004).
- Mansure, J. J. C., Panek, A. D., Crowe, L. M., and Crowe, J. H., Trehalose inhibits ethanol effects on intact cells and liposomes. *Biochem. Biophys. Acta.*, **1191**, 309-316 (1994).
- Martínez-Chantar, M.L., Garcia-Trevijano, E.R., Latasa, M.U., Pérez-Mato, I., Sánchez, del Pino, M.M., Corrales, F.J., Avila, M.A., and Mato, J.M., Importance of a deficiency in S-adenosyl-L-methionine synthesis in the pathogenesis of liver injury. *Am. J. Clin. Nutr.*, **76**, 1177-1182 (2002).
- Mischoulon, D., and Fava, M., Role of S-adenosyl-L-methionine in the treatment of depression: a review of the evidence. *Am. J. Clin. Nutr.*, **76**, 1158-1161 (2002).
- Mishra, P., and Prasad, R., Relationship between ethanol tolerance and fatty acyl composition of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **30**, 294-298 (1989).
- Mizoguchi, H., and Fujita, E., 酸性ホスファターゼ活性の検出による協会酵母の判別法 *J. Brew. Soc. Japan* (日本醸造協会誌), **77**, 361-364 (1982).
- Mo, C., and Bard, M., Erg28p is a key protein in the yeast sterol biosynthetic enzyme complex. *J. Lipid Res.*, **46**, 1991-1998 (2005).
- Molzahn, S.W., and Woods, R.A., Polyene resistance the isolation of sterol mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.*, **72**, 339-348 (1972).
- Morrison, L.D., Smith, D.D., and Kish, S.J., Brain S-adenosylmethionine levels are severely decreased in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.*, **67**, 1328-1331 (1996).

- Nakamura, K.D., and Schlenk, F., Active transport of exogenous S-adenosylmethionine and related compound into cells and vacuoles of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, **120**, 482-487 (1974)
- Newman, P.E., Alzheimer's disease revisited. *Med. Hypotheses*, **54**, 774-776 (2000).
- Nosaka, K., Kanako, Y., Nishimura, H., and Iwashima, A., A possible role for acid phosphatase with thiamine-binding activity encoded by *PHO3* gene in yeast. *FEMS Microbiol. Lett.*, **51**, 55-59 (1989).
- Nguyen, M., and Gregan, A., S-adenosylmethionine and depression. *Aust. Fam. Physician.*, **31**, 339-343 (2002)
- Ogawa, N., DeRisi, J., and Brown, P. O., New components of a system for phosphate accumulation and polyphosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* revealed by genomic expression analysis. *Mol. Biol. Cell.*, **11**, 4309-4321 (2000).
- Osumi, T., Taketani, S., Katsuki, H., Kuhara, T., and Matsumoto, I., Ergosterol biosynthesis in yeast: pathways in the late stages and their variation under various conditions. *J. Biochem. (Tokyo)*, **83**, 681-691 (1978).
- Ozcan, S., and Johnston, M., Function and regulation of yeast hexose transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **63**, 554-569 (1999).
- Padova, C., S-adenosylmethionine in the treatment of osteoarthritis. *Review of the clinical studies. Am. J. Med.* **83**, 60-65 (1987)
- Panak, C.K., Giorgieri, S.A., Díaz, L.E., and Ruiz, O.A., Simultaneous determination of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocystein by capillary zone electrophoresis.

- Electrophoresis*, **18**, 2047-2049 (1997)
- Parks, L.W., S-adenosylmethionine and ergosterol biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 2023-2024 (1958).
- Parks, L.W., and Casey, W.M., Physiological implications of sterol biosynthesis in yeast. *Annu. Rev. Microbiol.*, **49**, 95-116 (1995).
- Praekelt, U. M., Byrne, K. L., and Meacock, P. A., Regulation of *THI4 (MOL1)*, a thiamine-biosynthetic gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **10**, 481-490 (1994).
- Purohit, V., and Russo, D., Role of S-adenosyl-L-methionine in the treatment of alcoholic liver disease: *introduction and summary of the symposium*. *Alcohol*, **27**, 151-154 (2002).
- Rouillon, A., Barbey, R., Patton, E.,E., Tyers, M. and Thomas, D., Feedback-regulated degradation of the transcriptional activator *Met4* is triggered by the SCF<sup>Met30</sup> complex. *EMBO J.*, **19**, 282-294 (2000)
- Saletu, B., Anderere, P., Padova, C.D., Assandri, A., and Saletu-Zyhlarz, G.M., Electrophysiological neuroimaging of the central effects of S-adenosyl-L-methionine by mapping of electroencephalograms and event-related potentials and low-resolution brain electromagnetic tomography. *Am. J. Clin. Nutr.*, **76**, 1162-1171 (2002)
- Seymour F., and Juliet W. W., Tandem gene amplification mediates copper resistance in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **79**, 5342-5346 (1982).
- Shiomi, N., Fukuda, H., Murata, K., and Kimura, A., Improvement of S-adenosylmethionine production by integration of the ethionine-resistance gene into chromosomes of the yeast

- Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **42**, 730-733 (1995).
- Shiozaki, S., Shimizu, S., and Yamada, H., Unusual intracellular accumulation of S-adenosyl-L-methionine by microorganisms. *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 2293-2300 (1984).
- Shiozaki, S., Shimizu, S., and Yamada, H., S-adenosyl-L-methionine production by *Saccharomyces sake*: optimization of the culture conditions for the production of cells with a high S-adenosyl-L-methionine content. *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 3269-3274 (1989).
- Shobayashi, M., Mitsueda, S., Ago, M., Fujii, T., Iwashita, K., and Iefuji, H., Effects of culture conditions on ergosterol biosynthesis by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **69**, 2381-2388 (2005).
- Shobayashi, M., Mukai, N., Iwashita, K., Hiraga, Y., and Iefuji, H., A new method for isolation of S-adenosylmethionine (SAM)-accumulating yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **69**, 704-710 (2006).
- Stukey, J. E., McDonough, V. M., and Martin, C. E., The *OLE1* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes the delta 9 fatty acid desaturase and can be functionally replaced by the rat stearoyl-CoA desaturase gene. *J. Biol. Chem.*, **265**, 20144-20149 (1990).
- Swan, T.M., and Watson K., Stress tolerance in a yeast sterol auxotroph: role of ergosterol, heat shock proteins and trehalose. *FEMS Microbiol. Lett.*, **169**, 191-197 (1998).
- Tabor, C.W., and Tabor, H., Methionine adenosyltransferase (S-adenosylmethionine synthetase) and

- S-adenosylmethionine decarboxylase. *Adv. Enzymol.*, **56**, 251-282 (1984).
- Tait-Kamradt, A. G., Turner, K. J., Kramer, R. A., Elliott, Q. D., Bostian, S. J., Thill, G. P., Rogers, D. T., and Bostian, K. A., Reciprocal regulation of the tandemly duplicated *PHO5/PHO3* gene cluster within the acid phosphatase multigene family of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **6**, 1855-1865 (1986).
- Tamura, K., Gu, Y., Wang, Q., Yamada, T., Ito, K., and Shimoi, H., A *hap1* mutation in a laboratory strain of *Saccharomyces cerevisiae* results in decreased expression of ergosterol-related genes and cellular ergosterol content compared to *sake* yeast. *J. Biosci. Bioeng.*, **98**, 159-166 (2004).
- Taylor, U.F., Kistic, A., Pascal, R.A., Izumi, A., Tsuda, M., and Schoepfer, G.J., Sterol synthesis: a simple method for the isolation of zymosterol (5 $\alpha$ -cholasta- 8,24-dien-3 $\beta$ -ol) from yeast and spectral properties of zymosterol. *J. Lipid Res.*, **22**, 171-177 (1981).
- Thomas, D., and Surdin-Kerjan, Y., Metabolism of sulfur amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **61**, 503-532 (1997).
- Tierney, K.J., Block, D.E., and Longo, M.L., Elasticity and phase behavior of DPPC membrane modulated by cholesterol, ergosterol, and ethanol. *Biophys. J.*, **89**, 2481-2493 (2005).
- Trocha, P.J., Jasne, S.J., and Sprinson, D.B., Yeast mutants blocked in removing the methyl group of lanosterol at C-14. Separation of sterols by high-pressure liquid

- chromatography. *Biochemistry*, **16**, 4721-4726 (1977).
- Veen, M., Stahl, U., and Lang, C., Combined overexpression of genes of the ergosterol biosynthetic pathway leads to accumulation of sterols in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.*, **4**, 87-95 (2003).
- Walker-Caprioglio, H.M., Casey, W.M., and Parks, L.W., *Saccharomyces cerevisiae* membrane sterol modifications in response to growth in the presence of ethanol. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 2853-2857 (1990).
- Watanabe, S., Iino, S., and Goto, S., Cupric sulphate medium for isolating the copper-resistant wild yeasts from the fermentating sake mash. *J. Brew. Soc. Japan*, **79**, 137-141 (1984).
- Wicksteed, B. L., Collins, I., Dershowitz, A., Stateva, L. I., Green, R. P., Oliver, S. G., Brown, A. J. and Newlon, C. S., A physical comparison of chromosome III in six strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **10**, 39-57 (1994).
- You, K. M., Rosenfield, C. L., and Knipple, D. C., Ethanol tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on cellular oleic acid content. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 1499-1503 (2003).
- Zappia, V., Zydek-Cwick, C. R. and Schlenk, F., The Specificity of S-adenosylmethionine derivatives in methyl transfer reactions. *J. Biol. Chem.*, **244**, 4499-4509 (1969).
- Zinser, E., Paltauf F., and Daum G., Sterol composition of yeast organelle membranes and subcellular distribution of enzymes involved in sterol metabolism. *J. Bacteriol.*, **175**, 2853-2858 (1993).

- Zweytick, D., Athenstaedt, K., and Daum, G., Intracellular lipid particles of eukaryotic cells. *Biochem. Biophys. Acta*, **1469**, 101-120 (2000).
- Zweytick, D., Hrastnik, C., Kohlwein, S.D., and Daum, G., Biochemical characterization and subcellular localization of the sterol C-24(28) reductase, Erg4p, from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.*, **470**, 83-87 (2000).
- Zweytick, D., Leitner E., Kohlwein S.D., Yu C., Rothblatt J., and Daum G., Contribution of Are1p and Are2p to steryl ester synthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.*, **267**, 1075-1082 (2000).

## 謝 辞

本論文をまとめるにあたり、ご指導、ご高配を賜りました広島大学大学院生物圏科学研究科水田啓子教授、江坂宗春教授、船戸耕一准教授、広島大学大学院先端物質科学研究科 宮川都吉教授に心より深く感謝申し上げます。

本研究の実施にあたり終始丁寧なるご指導、ご助言を賜りました独立行政法人酒類総合研究所醸造技術応用研究部門兼広島大学大学院生物圏科学研究科 家藤治幸教授、独立行政法人酒類総合研究所醸造技術応用研究部門主任研究員 藤井力博士、向井伸彦主任研究員、醸造技術基盤研究部門主任研究員 岩下和裕博士をはじめとする所員の皆様に厚くお礼申し上げます。

本研究におけるエルゴステロール合成系中間体の NMR および GC-MS による構造決定について、多くのご指導とご協力を頂きました広島大学大学院理学研究科助教 平賀良知博士に厚くお礼申し上げます。

さらに本研究は独立行政法人酒類総合研究所環境保全研究室（現醸造技術応用研究部門）において三枝慎一郎氏、吾郷万里子氏、浮穴栄子博士をはじめとする多くの所員の皆様のご協力とご助言により行われたものです。今日に至る日々を見守り、励ましてくださった多くの皆様に深く感謝いたします。



## 公表論文

- ( 1 ) Effects of culture conditions on ergosterol biosynthesis by *Saccharomyces cerevisiae*.  
Megumi Shobayashi, Shinichiro Mitsueda, Mariko Ago, Tsutomu Fujii, Kazuhiro Iwashita, and Haruyuki Iefuji  
*Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **69**, 2381-2388 (2005).
- ( 2 ) A new method for isolation of S-adenosylmethionine (SAM)-accumulating yeast.  
Megumi Shobayashi, Nobuhiko Mukai, Kazuhiro Iwashita, Yoshikazu Hiraga, and Haruyuki Iefuji  
*Applied Microbiology and Biotechnology*, **69**, 704-710 (2006).
- ( 3 ) Effects of accumulated S-adenosylmethionine on growth of yeast cells.  
Megumi Shobayashi, Tsutomu Fujii, and Haruyuki Iefuji  
*Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, (2007/03/9 Accepted)
- ( 4 ) Genome-wide expression profile of sake brewing yeast under shaking and static conditions.  
Megumi Shobayashi, Eiko Ukena, Tsutomu Fujii, and Haruyuki Iefuji  
*Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **71**, 323-335 (2007)