

	ミモダイ
<b>氏 名</b>	<b>三雲 大</b>
本籍（国籍）	新潟県
学位の種類	博士（農学）
学位記番号	連研第 660 号
学位授与年月日	平成 28 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当課程博士
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物資源科学
<b>学位論文題目</b>	<b>製パン用「とがち野酵母 R」の菌株改良に関する研究（Study on the improved leavening ability of a baker's yeast "Tokachino-koubo"）</b>
学位審査委員	主査 帯広畜産大学 教授 大和田 琢二 副査 折笠 善丈(帯広 助教)、小関 卓也(山形 教授)、下飯 仁(岩手 教授)

## 論文の内容の要旨

*Saccharomyces cerevisiae* AK46 は、イーストを含む全ての製パン原料が北海道産であり地域特産品となるパンを作ることによる地域活性化をコンセプトとして、北海道十勝地方に自生するエゾヤマザクラから分離された野生酵母であり、平成 22 年から日本甜菜製糖株式会社より「とがち野酵母®」として製パン用活性ドライイースト製品が商品化されている。本研究では、AK46 は市販パン酵母と比較すると製パン性能に関わるマルトース発酵力に劣るため、2-デオキシグルコース（2-DOG）耐性変異により、マルトース発酵力が向上した変異株を取得し、製パン性能を改善することを目的とした。AK46 を元株とした 2-DOG 耐性変異株（MCD1, MCD2, MCD3, MCD4, MCD5）を単離し、AK46 と同等の菌体収量を有し、マルトース発酵力が求められる糖無添加生地のパン生地発酵力が AK46 から 4 割程度強化された MCD4 を AK46 由来 2-DOG 耐性変異株として選抜した。マルトースとグルコースを糖源とする GM 培地で培養した際の糖消費の経時変化を調べた結果、AK46 と市販パン酵母分離株 HP216 はグルコースを消費した後にマルトースの消費が始まり、カタボライト抑制が誘起されてマルトース代謝が抑制されることが示された。一方、2-DOG 耐性変異株 MCD4 は、グルコース存在下においてもマルトースを同時に消費していたことから、2-DOG 耐性が付与されたことにより、カタボライト抑制に対して非感受性になることが明らかになった。

2-DOG 耐性変異株 MCD4 の製パンに関係する各種機能（酵素活性、液体・生地発酵力、製パン性能）を調べた結果、マルトースを糖源とする M8 液体発酵力と  $\alpha$ -グルコシダーゼ活性が AK46 よりも顕著に高まっていたことから、2-DOG 耐性の付与によるマルトース発

酵力の向上は、 $\alpha$ -グルコシダーゼ活性の向上に起因している可能性が示された。また、糖を添加しない無糖生地で発酵力を調べた結果、MCD4 の発酵開始 1 時間目までのトータルガス発生量が AK46 の約 1.7 倍に高まっていたことから、顕著なマルトース発酵力の向上が確認された。更に、各種製パン試験を行った結果、ストレート法、ノータイム法では、2-DOG 耐性の付与による明確な製パン性能の向上は見られなかったが、中種法では、MCD4 を用いて焼成したパンの比容積は AK46 よりも優れ、市販パン酵母分離株 HP216 と同水準にまで向上したことから、2-DOG 耐性の付与により製パン性能が有意に向上したことが明らかになった。

MCD4 の製パン性能の向上はマルトース発酵力の強化に起因すると考えられたことから、MCD4 一倍体を用いた 2-DOG 耐性とマルトース発酵力との相関を調べるとともに、マルトース代謝に関わる *MAL* 遺伝子とカタボライト抑制に関与する遺伝子の塩基配列の比較、及びリアルタイム PCR による関連遺伝子の発現量を調べ、マルトース発酵力向上に関わる機構を調べた。その結果、同一子囊由来 MCD4 一倍体四分子における 2-DOG 耐性の形質は、「2-DOG 耐性有り：無し=2:2」となる組み合わせが最も多く、2-DOG 耐性を有する MCD4 一倍体の M8 液体発酵力が高い傾向を示し、2-DOG 耐性とマルトース発酵力の間には高い相関がみられた。また、塩基配列の比較解析を行った結果、DNA の片一方にのみ変異を生じる混合塩基での変異ではあるものの、MCD4 はマルトースパーミアーゼをコードする *MAL11* と *MAL31*、*MAL* 遺伝子のアクチベーターとして働く *MAL13* と *MAL33* にアミノ酸置換・翻訳停止を生じていた。中でも、*MAL13* には翻訳停止による構造の一部欠失が見られたことから、構造の著しい変化が生じ、MCD4 のマルトース代謝能が高まった可能性が示唆された。また、マルトースパーミアーゼをコードする *MAL11* と *MAL31* に生じた変異により、パーミアーゼの活性が変化し、マルトース代謝能が向上した可能性も示唆された。更に、リアルタイム PCR により関連遺伝子の発現量を調べた結果、マルトースを糖源とする培地では、MCD4 の *MAL11*、*MAL12* と *MAL31* の発現量が AK46 よりも高まっていたことから、マルトース発酵力向上との関連が示唆された。一方で、MCD4 のカタボライト抑制に関わる遺伝子群には顕著な変異は見られず、遺伝子の発現量も AK46 と大きな差異はなく、MCD4 に特徴的な発現量を示した遺伝子は見られなかった。

グルコース存在下でのマルトースの消費を調査した結果より、MCD4 はグルコースとマルトースを同時期に消費できることから、MCD4 は 2-DOG 耐性が付与されることでカタボライト抑制に非感受性となっていることが示唆されている。MCD4 は複数の *MAL* 遺伝子には顕著な変異を生じている一方で、カタボライト抑制に関する遺伝子には明確な変異を生じていないことから、MCD4 のマルトース発酵力の高まりは、2-DOG 耐性およびカタボライト抑制非感受性にのみ依存したものではなく、変異により  $\alpha$ -グルコシダーゼ活性を含めたマルトース代謝能のベースが高まったことに加えて、2-DOG 耐性およびカタボライト抑制非感受性の付与がグルコースとマルトースが共存するパン生地などの環境下においてマルトース発酵力向上に相加的に影響を与え、製パン性能が改善している可能性が示唆さ

れた。

## 論文審査の結果の要旨

*Saccharomyces cerevisiae* AK46 は、市販パン酵母と比較すると製パン性能に関わるマルトース発酵力が劣るため、マルトース発酵力向上による製パン性能改善を目的として、AK46 を元株とした 2-デオキシグルコース（以下 2-DOG）耐性株が 5 株取得された。本研究では、これらの 2-DOG 耐性変異株のうち、AK46 と同等の菌体収量を有し、マルトース発酵力が求められる糖無添加生地のパン生地発酵力が AK46 から 4 割程度強化された MCD4 を AK46 由来 2-DOG 耐性変異株として選抜し、(1)製パン適性、発酵時における各種酵素活性において優れた特徴を示すことを明らかにした。更に、(2)ゲノム配列および各遺伝子の発現プロファイルから、マルトース発酵能の向上は、MAL 遺伝子の変異に起因することを示した。

1. 2-DOG 耐性変異株 MCD4 のマルトースを糖源とする M8 液体発酵力と  $\alpha$ -グルコシダーゼ活性を AK46 と比較したところ、それぞれ顕著に高まっており、2-DOG 耐性付与によるマルトース発酵力の向上は  $\alpha$ -グルコシダーゼ活性の高まりに起因していることを示した。また、MCD4 の無糖生地発酵力は、発酵開始 1 時間目までの総 CO<sub>2</sub> 発生量が AK46 の約 1.7 倍に高まっており、顕著なマルトース発酵力向上を確認した。製パン試験では、ストレート法、ノータイム法においては共に MCD4 の明確な製パン性能向上は見られなかったが、中種法では MCD4 を用いて焼成したパンの比容積は AK46 よりも優れており、市販パン酵母分離株 HP216 と同水準にまで向上したことから、2-DOG 耐性の付与により製パン性能が顕著に向上することを明らかにした。

2. MCD4 の製パン性能が向上した要因としてマルトース発酵力の強化に着目した。その機構を解明するため、MCD4 一倍体を用いた 2-DOG 耐性とマルトース発酵力との相関、及びマルトース代謝に関わる遺伝子の解析を行った。その結果、2-DOG 耐性を有する MCD4 一倍体において M8 液体発酵力が高い傾向を示したことから、2-DOG 耐性とマルトース発酵力の間には高い相関があることを示した。また、各遺伝子のゲノム配列を比較した結果、MCD4 は、マルトースパーミアーズをコードする MAL11 と MAL31、MAL 遺伝子のアクチベーターとして働く MAL13 と MAL33 にアミノ酸置換・翻訳停止コドンを有していること、特に、MAL13 は翻訳停止によってタンパク構造が大きく変化している可能性が推定され、MCD4 のマルトース代謝に影響を与えている可能性を示した。また、マルトースパーミアーズをコードする MAL11 と MAL31 に生じたアミノ酸変異により部位特異的变化が生じ、マルトース代謝能が向上した可能性を示した。更に、MAL 遺伝子群の発現量から、マルトースを糖源とする培地では、MCD4 の MAL12 と MAL31 の発現量が高まっていたことから、マルトース発酵力向上との関連を示した。

これらの結果は、2-DOG 耐性の付与により  $\alpha$ -グルコシダーゼ活性が高まり、製パン性能

が顕著に向上することを明らかにするとともに、MAL13 などの MAL タンパク質の変異箇所を特定し、マルトース発酵能の向上が MAL 遺伝子の変異に起因する新たな知見を加えた。以上により、本審査委員会は、「岩手大学大学院連合農学研究科博士学位論文審査基準」に則り審査した結果、本論文を博士（農学）の学位論文として十分価値のあるものと認めた。

学位論文の基礎となる学術論文

主論文

Mikumo, D., Takaya, M., Orikasa, Y., and Ohwada, T. (2015). Improved leavening ability of a wild yeast, *Saccharomyces cerevisiae* AK46 2-deoxyglucose resistant mutant. *Food Science and Technology Research*, 21(4):623-630.

参考論文

Sujaya, I. N., Mikumo, D., Orikasa, Y., Urashima, T., and Oda, Y. (2011). Baking properties of *Saccharomyces cerevisiae* strains derived from Brem, a traditional rice wine from Bali. *Food Science and Technology Research*, 17(4):369-373.

Oda, Y., Mikumo, D., Tajima, K., and Yamauchi, H. (2010). Characterization of an alternative baking strain of *Saccharomyces cerevisiae* isolated from fermented cherry fruits by the analysis of SUC2 gene. *Food Science and Technology Research*, 16(1):45-50.