

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2014-128262

(P2014-128262A)

(43) 公開日 平成26年7月10日(2014.7.10)

(51) Int.Cl.			F I			テーマコード (参考)		
C 1 2 Q	1/04	(2006.01)	C 1 2 Q	1/04		4 B 0 6 3		
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/19		4 B 0 6 5		
C 1 2 N	1/16	(2006.01)	C 1 2 N	1/16	G			
C 1 2 G	3/02	(2006.01)	C 1 2 G	3/02	1 1 9			

審査請求 未請求 請求項の数 13 O L (全 14 頁)

(21) 出願番号	特願2013-243174 (P2013-243174)	(71) 出願人	307027577 麒麟麦酒株式会社
(22) 出願日	平成25年11月25日 (2013.11.25)		東京都中野区中野四丁目10番2号 中野 セントラルパークサウス
(31) 優先権主張番号	特願2012-258135 (P2012-258135)	(74) 代理人	100107984 弁理士 廣田 雅紀
(32) 優先日	平成24年11月27日 (2012.11.27)	(74) 代理人	100102255 弁理士 小澤 誠次
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(74) 代理人	100096482 弁理士 東海 裕作
		(74) 代理人	100131093 弁理士 堀内 真
		(72) 発明者	太田 拓 東京都中野区中野四丁目10番2号 キリ ン株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 接合能を持つ酵母細胞株のスクリーニング方法

(57) 【要約】

【課題】 胞子を形成し、発芽させることにより、交雑育種のために必要な接合能を持つ酵母細胞株の取得の困難な醸造用酵母や、パン酵母のような実用酵母にも適用することができ、該酵母細胞集団から酵母細胞集団に混在する接合能を持つ酵母細胞株をスクリーニングし、効果的に酵母細胞集団から接合能を持つ酵母細胞株を単離する方法を提供すること。

【解決手段】 接合能を持たない酵母細胞集団に混在する接合能を持つ酵母細胞株を、該接合能を持つ酵母細胞株の性フェロモンの放出を、性フェロモン感受性酵母を用いて検出して、接合能を持つ酵母細胞株をスクリーニングし、単離する。本発明の方法によって取得した接合能を持つ細胞株は、交雑育種の親株に利用することができ、従来、交雑育種の方法を採ることが困難であった実用酵母の場合において、該方法により、優良特性を持つ酵母の育種が可能となる。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

接合能を持たない酵母細胞集団に混在する接合能を持つ酵母細胞株をスクリーニングし、酵母細胞集団から接合能を持つ酵母細胞株を単離する方法において、接合能を持つ酵母細胞株が放出する性フェロモンを検出して、接合能を持つ酵母細胞株を識別、分離することを特徴とする酵母細胞集団からの接合能を持つ酵母細胞株の単離方法。

【請求項 2】

接合能を持つ酵母細胞株が、a 型酵母細胞株又は 型酵母細胞株であり、該酵母細胞株が放出する性フェロモンが、性フェロモン a ファクター又は性フェロモン ファクターであることを特徴とする請求項 1 に記載の酵母細胞集団からの接合能を持つ酵母細胞株の単離方法。

10

【請求項 3】

接合能を持つ酵母細胞株が放出する性フェロモンの検出が、性フェロモン感受性酵母を用い、該酵母の、接合能を持つ酵母細胞株が放出する性フェロモンによる増殖抑制を検出するものであることを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の酵母細胞集団からの接合能を持つ酵母細胞株の単離方法。

【請求項 4】

性フェロモン感受性酵母が、a ファクター感受性酵母又は ファクター感受性酵母であることを特徴とする請求項 3 に記載の酵母細胞集団からの接合能を持つ酵母細胞株の単離方法。

20

【請求項 5】

性フェロモン感受性酵母が、B A R 1、及び、S S T 2 からなる性フェロモンシグナルを負に制御する遺伝子を少なくとも 1 つ以上変異した酵母であることを特徴とする請求項 3 又は 4 に記載の酵母細胞集団からの接合能を持つ酵母細胞株の単離方法。

【請求項 6】

a ファクター感受性酵母が、S S T 2 遺伝子に変異した 型酵母であることを特徴とする請求項 4 又は 5 に記載の酵母細胞集団からの接合能を持つ酵母細胞株の単離方法。

【請求項 7】

ファクター感受性酵母が、B A R 1 遺伝子に変異した a 型酵母であることを特徴とする請求項 4 又は 5 に記載の酵母細胞集団からの接合能を持つ酵母細胞株の単離方法。

30

【請求項 8】

ファクター感受性酵母が、S S T 2 遺伝子に変異した a 型酵母であることを特徴とする請求項 4 又は 5 に記載の酵母細胞集団からの接合能を持つ酵母細胞株の単離方法。

【請求項 9】

酵母培養寒天プレート上に、接合能を持つ酵母細胞株が混在する酵母細胞集団の懸濁液を撒き、培養してコロニーを形成させ、該シングルコロニーが形成された、寒天プレート上に性フェロモン感受性酵母を懸濁したアガロース溶液を流し込んだ後培養し、接合能を持つ酵母細胞株が放出する性フェロモンにより該酵母細胞株コロニーの周囲に形成されるハ口を検知することにより、接合可能株を識別、分離することを特徴とする請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の酵母細胞集団からの接合能を持つ酵母細胞株の単離方法。

40

【請求項 10】

酵母細胞集団からの接合能を持つ酵母細胞株の単離が、醸造用酵母又はパン酵母からなる実用酵母からの接合能を持つ酵母細胞株の単離であることを特徴とする請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の酵母細胞集団からの接合能を持つ酵母細胞株の単離方法。

【請求項 11】

請求項 1 ~ 10 のいずれかに記載の酵母細胞集団からの接合能を持つ酵母細胞株の単離方法によって単離された接合能を持つ酵母細胞株を用いて交雑を行い、酵母の形質を変換することを特徴とする酵母の交雑育種方法。

【請求項 12】

請求項 11 に記載の酵母の交雑育種方法で取得した酵母の交雑株。

50

【請求項 13】

請求項 12 に記載の酵母の交雑株を用いて発酵することにより製造することを特徴とする醸造酒の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、接合能を持たない酵母細胞集団に混在する接合能を持つ酵母細胞株をスクリーニングし、酵母細胞集団から接合能を持つ酵母細胞株を単離する方法、特に、交雑育種のために必要な接合能を持つ酵母細胞株の取得の困難な醸造用酵母や、パン酵母のような実用酵母にも適用することができ、該酵母細胞集団から酵母細胞集団に混在する接合能を持つ酵母細胞株をスクリーニングし、有効に酵母細胞集団から接合能を持つ酵母細胞株を単離する方法に関する。

10

【背景技術】

【0002】

酵母は、酒類等の醸造や、パン類のような食品の製造に実用されており、これらの実用酵母は、その使用菌株の特性が、製造される飲食品の香味特性に大きな影響を与える。そのため、旧来より、優良特性を有する酵母菌株の選択や、新しい特性の酵母の創成が試みられ、そのための育種が行われてきた。菌類の育種法としては、紫外線や放射線等を用いた人為的な突然変異を誘発する突然変異育種法が古くから用いられてきたが、しかし、実用酵母の多くは二倍体或いは四倍体といった二倍体以上の倍数性を持つことから、突然変異の出現する頻度が低く、実際的な育種法としては使用することが難しいという問題があった。また、菌類の様々な育種方法が知られている中で、実用酵母株の育種法として、交雑育種法は古くから用いられている手法であり、両親の優良な形質をあわせ持つ株を育種したい場合に有効な技術であった。

20

【0003】

酵母には、性別に相当する a 型、 型、及び a / 型の 3 種類の接合型が知られている。このうち、a / 型の酵母菌株は接合能を持たない酵母菌株であるが、a 型、 型の酵母菌株は、接合能を持つ酵母細胞株であり、この a 型及び 型の酵母菌株が近くにいと接合（交配）して 1 つの細胞になる。したがって、酵母のこの性質を利用して、特性の異なる酵母菌株を接合することにより、交雑して、親株の優良な形質をあわせ持つ株を育種することが可能となる。

30

【0004】

しかしながら、醸造酵母、特にビール酵母においては、該交雑育種法を用いて、酵母の育種を行うことは容易ではない。その理由は、以下のとおりである。酵母を交雑させるには、上記のように接合能を持つ酵母細胞株である a 型及び 型の酵母菌株を取得することが必要である。通常、該接合能を持つ酵母菌株の取得には、一度孢子形成を経て、上記接合能を持つ酵母細胞株を生み出す必要がある。そして、孢子形成により生じる a 型細胞と 型細胞が隣接する環境を生み出す必要があるが、しかし、ビール酵母である下面発酵酵母や上面発酵酵母は、孢子形成能及び孢子発芽能が低いものが多く、またホモタリックな性質を持つなどの理由から、孢子形成を経て、上記接合能を持つ酵母細胞株を生み出すことが難しい。

40

【0005】

酵母の交雑育種法には、例えばマイクロマニピュレーターを用いた孢子対孢子法がある。しかしながら、上記のように孢子形成能及び孢子発芽能が低い醸造酵母のような酵母に対しては、該交雑の方法は実用的でない。また、ランダムスポア法で得た孢子同士を混ぜて交雑させる方法がある。しかし醸造酵母のような酵母は、下面発酵酵母のように四倍体であったり、或いは、二倍体酵母でも孢子発芽率が非常に低い場合が多く、したがって、そのような場合は、a 型細胞と 型細胞が隣接する確率は非常に低く、栄養要求性など適当なマーカーを付与しない限り、交雑体を選抜することもできない。例えば、特許文献 1 のように、上面発酵酵母とワイン酵母よりランダムスポア法で得た孢子同士を交雑させる

50

方法が開示されている。該方法では、孢子形成率・孢子発芽率の高いワイン酵母を一方の親株に選んでおり、そして、糖資化性と温度による生育速度の違いを利用して、交雑体を効率的に選抜している。しかし、孢子形成率や孢子発芽率の低い醸造酵母において、このような方法が利用できる親株の組み合わせはごく限られる。

【0006】

一方、孢子形成を経ずに、酵母細胞が接合能を獲得する場合があります。このような接合能を持つ細胞同士を混ぜて交雑させる方法もある。しかし、ビール酵母のようなホモタリックな株では、接合型変換が起きるため、接合能を安定的に持つ株を取得すること自体難しい。もしも二倍体のまま、接合能を持つ細胞を取得することができれば、清酒酵母、ワイン酵母、上面発酵酵母などの二倍体実用酵母は、孢子形成を経ずにそれらを自由に交雑させ、両親の形質を合わせ持つ新規酵母を簡単に取得することができる。また異質四倍体である下面発酵酵母においては、孢子形成により減数分裂分離体（減数体）を取得して、そこから接合能を持つ型やa型の酵母を単離すれば、下面発酵酵母減数体間や下面発酵酵母減数体×上面発酵酵母などで自由に交雑でき、新規下面発酵酵母を取得できる。このように、高次倍数性を保持しつつ、接合能を持つ株を取得する技術は、実用性が高く魅力的な交雑育種技術となる。しかし、現状では、醸造用酵母のような実用酵母において、接合能を安定的に持つ株を取得する有効な方法は見出されていない。

10

【0007】

接合能を持つ酵母菌株を取得する方法において、接合能を持たない二倍体酵母から孢子形成を経ずに、接合能を持つ株を取得する方法も開示されている。該開示の方法は、高次倍数体の実用酵母での栄養要求性変異株と一倍体のa型又は型のテスター株を利用して、実用酵母のa型株や型株を取得する方法であり、協会7号酵母からa型及び型酵母をスクリーニングして単離した例が示されている（特許文献2）。また、同様の手法でa型下面発酵酵母減数体を取得した報告もある（非特許文献1）。しかしながら、このスクリーニング法は多数のコロニーの接合能を直接評価できるというメリットはあるものの、手法が煩雑で接合可能株を単離するには多大な労力が必要となる。また、非特許文献1の報告では取得できたのはa型のみで、型下面発酵酵母減数体は取得できていない。

20

【0008】

孢子形成を経ずに、接合能を持つ株を取得する方法として、他に、下面発酵酵母減数体に接合型変換遺伝子を導入して接合能を持つ酵母を製造する方法が開示されている（特許文献3）。この方法では、酵母細胞内にプラスミドを導入する必要があるが、その後プラスミドを抜く操作を行うことによって、カルタヘナ法（「生物多様性条約」カタルヘナ議定書に基づき、2003年6月に成立した「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性確保に関する法律」）の定義では遺伝子組換え実験に該当しないで、接合能を持つ下面発酵酵母減数体を効率良く取得することができる。しかし一方では、パブリックアクセプタンスの観点から、プラスミド導入等の遺伝子操作技術を一過的にも使用せずに実用株の育種を行う社会的ニーズもある。

30

【0009】

以上のように、酒類等の醸造や、パン類のような食品の製造において、用いる実用酵母の優良特性を有する酵母菌株の確保は何よりも重要なことで有るが、その育種の有力な手段である交雑育種には、該飲食品の製造に使用されている実用酵母について、接合能を持つ酵母細胞株の取得が何よりも必要なことである。しかし、孢子形成能及び孢子発芽能が低く、接合能を持つ酵母細胞株の取得が困難な実用酵母については、接合能を持つ酵母細胞株の有効な取得方法が技術課題として残されたままであり、したがって、実用酵母について、そのいずれの酵母にも適用できる、接合能を持つ酵母細胞株の有効な取得方法の開発が何よりも望まれている。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0010】

【特許文献1】特許第3946279号公報。

50

【特許文献2】特開2004-16028号公報。

【特許文献3】特開2010-220481号公報。

【非特許文献】

【0011】

【非特許文献1】「日本農芸化学2012年度大会要旨集」p679、(2012)。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

本発明の課題は、接合能を持たない酵母細胞集団に混在する接合能を持つ酵母細胞株をスクリーニングし、酵母細胞集団から接合能を持つ酵母細胞株を単離する方法、特に、交雑育種のために必要な接合能を持つ酵母細胞株の取得の困難な醸造用酵母や、パン酵母のような実用酵母にも適用することができ、該酵母細胞集団から酵母細胞集団に混在する接合能を持つ酵母細胞株をスクリーニングし、効果的に酵母細胞集団から接合能を持つ酵母細胞株を単離する方法を提供することにある。

10

【課題を解決するための手段】

【0013】

本発明らは、上記課題を解決すべく、醸造用酵母や、パン酵母のような実用酵母において、接合能を持たない任意の実用酵母株の中に、極めてまれに存在する接合能を持つ細胞を、遺伝子組換え技術のような方法によるのではなく、効果的にスクリーニングして単離する方法について、鋭意検討する中で、接合能を持つ酵母細胞株が放出する性フェロモンに注目し、該酵母細胞株が放出する性フェロモンを検出することにより、接合能を持たない酵母細胞集団にわずかに混在する接合能を持つ酵母細胞株をスクリーニングし、単離することができることを見出し、本発明を完成するに至った。

20

【0014】

すなわち本発明は、接合能を持たない酵母細胞集団に混在する接合能を持つ酵母細胞株をスクリーニングし、酵母細胞集団から接合能を持つ酵母細胞株を単離する方法において、接合能を持つ酵母細胞株が放出する性フェロモンを検出して、接合能を持つ酵母細胞株を識別、分離することにより、酵母細胞集団から、接合能を持つ酵母細胞株を単離する方法からなる。この方法により、実用酵母においても、極めてまれに存在する接合能を持つ細胞を効果的にスクリーニングし、単離することができ、該方法によって取得した接合能を持つ細胞株を、交雑育種の親株に利用することにより、従来、交雑育種の方法を採ることが困難であった実用酵母の場合においても、該方法により、優良特性を持つ酵母の育種が可能となった。

30

【0015】

本発明では、醸造用酵母や、パン酵母のような実用酵母において、接合能を持つ細胞株の単離について、鋭意検討する中で、ホモタリクな株を含む接合能を持たない実用酵母株の中にも、H O 遺伝子やM A T 座遺伝子などの変異により、安定的に接合能を持つ細胞が極めてまれに存在することに着目した。そして、接合能を有する下面発酵酵母減数体や醸造酵母が、性フェロモンを放出することを確認し、該接合能を有する酵母による性フェロモンの放出を検出すれば、接合能を持たない実用酵母株の中から、接合能を持つ細胞株を効果的にスクリーニングし、単離することが可能であることを見出した。更に、性フェロモン感受性酵母は、接合能を有する酵母のコロニーの周りでは増殖できないという性質を利用することにより、接合能を持つ細胞からなるコロニーを効率的にスクリーニングすることも見出し、本発明を完成するに至った。

40

【0016】

本発明の、接合能を持つ酵母細胞株が放出する性フェロモンを検出して、接合能を持つ酵母細胞株を識別、分離することからなる酵母細胞集団からの接合能を持つ酵母細胞株の単離方法において、該接合能を持つ酵母細胞株は、a型酵母細胞株又は型酵母細胞株であり、該酵母細胞株が放出する性フェロモンは、性フェロモンaファクター又は性フェロモンファクターである。a型酵母細胞株は、性フェロモンaファクターを放出し、型

50

酵母細胞株の増殖を抑制する。また、 α 型酵母細胞株は、性フェロモンファクターを放出し、a型酵母細胞株の増殖を抑制する。

【0017】

本発明の酵母細胞集団からの接合能を持つ酵母細胞株の単離方法において、接合能を持つ酵母細胞株が放出する性フェロモンの検出は、上記のように、性フェロモン感受性酵母を用い、該酵母の、接合能を持つ酵母細胞株が放出する性フェロモンによる増殖抑制を検出することによって行うことができる。該性フェロモン感受性酵母としては、aファクター感受性酵母又は α ファクター感受性酵母を挙げることができる。

【0018】

本発明の酵母細胞集団からの接合能を持つ酵母細胞株の単離方法において、性フェロモン感受性酵母としては、BAR1、及び、SST2からなる性フェロモンシグナルを負に制御する遺伝子を少なくとも1つ以上変異した酵母であることが好ましく、aファクター感受性酵母としては、SST2遺伝子の変異した α 型酵母を、 α ファクター感受性酵母としては、BAR1遺伝子の変異したa型酵母及びSST2遺伝子の変異したa型酵母を挙げることができる。

10

【0019】

本発明の酵母細胞集団からの接合能を持つ酵母細胞株の単離方法は、酵母培養寒天プレート上に、接合能を持つ酵母細胞株が混在する酵母細胞集団の懸濁液を撒き、培養してコロニーを形成させ、該シングルコロニーが形成された寒天プレート上に性フェロモン感受性酵母を懸濁したアガロース溶液を流し込んだ後培養し、接合能を持つ酵母細胞株が放出する性フェロモンにより該酵母細胞株コロニーの周囲に形成されるハロを検知することにより、接合可能株を識別、分離することにより行うことができる。

20

【0020】

本発明の酵母細胞集団からの接合能を持つ酵母細胞株の単離方法は、醸造用酵母又はパン酵母のような実用酵母における接合能を持つ酵母細胞株の単離に有効に適用することができる。

【0021】

本発明は、本発明の酵母細胞集団からの接合能を持つ酵母細胞株の単離方法によって単離された接合能を持つ酵母細胞株を用いて、交雑を行い、酵母の形質を変換する酵母の交雑育種の方法を包含する。また、本発明は、本発明の酵母の交雑育種方法で取得した酵母の交雑株の発明、及び、該酵母の交雑株を用いて発酵することにより製造することを特徴とする醸造酒の製造方法の発明を包含する。

30

【0022】

すなわち具体的には本発明は、(1)接合能を持たない酵母細胞集団に混在する接合能を持つ酵母細胞株をスクリーニングし、酵母細胞集団から接合能を持つ酵母細胞株を単離する方法において、接合能を持つ酵母細胞株が放出する性フェロモンを検出して、接合能を持つ酵母細胞株を識別、分離することを特徴とする酵母細胞集団からの接合能を持つ酵母細胞株の単離方法や、(2)接合能を持つ酵母細胞株が、a型酵母細胞株又は α 型酵母細胞株であり、該酵母細胞株が放出する性フェロモンが、性フェロモンaファクター又は性フェロモン α ファクターであることを特徴とする上記(1)に記載の酵母細胞集団からの接合能を持つ酵母細胞株の単離方法や、(3)接合能を持つ酵母細胞株が放出する性フェロモンの検出が、性フェロモン感受性酵母を用い、該酵母の、接合能を持つ酵母細胞株が放出する性フェロモンによる増殖抑制を検出するものであることを特徴とする上記(1)又は(2)に記載の酵母細胞集団からの接合能を持つ酵母細胞株の単離方法からなる。

40

【0023】

また、本発明は、(4)性フェロモン感受性酵母が、aファクター感受性酵母又は α ファクター感受性酵母であることを特徴とする上記(3)に記載の酵母細胞集団からの接合能を持つ酵母細胞株の単離方法や、(5)性フェロモン感受性酵母が、BAR1、及び、SST2からなる性フェロモンシグナルを負に制御する遺伝子を少なくとも1つ以上変異した酵母であることを特徴とする上記(3)又は(4)に記載の酵母細胞集団からの接合

50

能を持つ酵母細胞株の単離方法や、(6) aファクター感受性酵母が、SST2遺伝子
 が変異した型酵母であることを特徴とする上記(4)又は(5)に記載の酵母細胞集団か
 らの接合能を持つ酵母細胞株の単離方法や、(7) ファクター感受性酵母が、BAR1
 遺伝子の変異したa型酵母であることを特徴とする上記(4)又は(5)に記載の酵母細胞
 集団からの接合能を持つ酵母細胞株の単離方法や、(8) ファクター感受性酵母が、
 SST2遺伝子の変異したa型酵母であることを特徴とする上記(4)又は(5)に記載
 の酵母細胞集団からの接合能を持つ酵母細胞株の単離方法や、(9) 酵母培養寒天プレ
 ート上に、接合能を持つ酵母細胞株が混在する酵母細胞集団の懸濁液を撒き、培養してコロ
 ニーを形成させ、該シングルコロニーが形成された寒天プレート上に性フェロモン感受性
 酵母を懸濁したアガロース溶液を流し込んだ後培養し、接合能を持つ酵母細胞株が放出す
 る性フェロモンにより該酵母細胞株コロニーの周囲に形成されるハ口を検知することによ
 り、接合可能株を識別、分離することを特徴とする上記(1)～(8)のいずれかに記載
 の酵母細胞集団からの接合能を持つ酵母細胞株の単離方法や、(10) 酵母細胞集団から
 の接合能を持つ酵母細胞株の単離が、醸造用酵母又はパン酵母からなる実用酵母からの接
 合能を持つ酵母細胞株の単離であることを特徴とする上記(1)～(9)のいずれかに記
 載の酵母細胞集団からの接合能を持つ酵母細胞株の単離方法からなる。

10

【0024】

更に、本発明は、(11) 上記(1)～(10)のいずれかに記載の酵母細胞集団から
 の接合能を持つ酵母細胞株の単離方法によって単離された接合能を持つ酵母細胞株を用い
 て交雑を行い、酵母の形質を変換することを特徴とする酵母の交雑育種方法や、(12)
 上記(11)に記載の酵母の交雑育種方法で取得した酵母の交雑株や、(13) 上記(1
 2)に記載の酵母の交雑株を用いて発酵することにより製造することを特徴とする醸造酒
 の製造方法からなる。

20

【発明の効果】

【0025】

本発明は、接合能を持たない酵母細胞集団に混在する接合能を持つ酵母細胞株をスクリ
 ーニングし、酵母細胞集団から接合能を持つ酵母細胞株を単離する方法、特に、交雑育種
 のために必要な接合能を持つ酵母細胞株の取得の困難な醸造用酵母や、パン酵母のような
 実用酵母にも適用することができ、該酵母細胞集団からHO遺伝子やMAT座などの変異
 によって極めてまれに生じ、酵母細胞集団に混在する接合能を持つ酵母細胞株をスクリー
 ーニングし、効果的に酵母細胞集団から接合能を持つ酵母細胞株単離する方法を提供する。
 本発明の方法によって取得した接合能を持つ細胞株を、交雑育種の親株に利用することに
 より、従来、交雑育種の方法を採ることが困難であった実用酵母の場合における交雑育種
 を可能とし、本発明は、該実用酵母の優良特性を持つ酵母の育種に有力な手段を提供する
 。

30

【図面の簡単な説明】

【0026】

【図1】 図1は、本発明の実施例における「醸造酵母の性フェロモン分泌能調査」につい
 ての試験において、各醸造酵母の性フェロモン分泌能調査の結果を示す写真である。

【図2】 図2は、本発明の実施例における「接合可能株のスクリーニング法の検討」につ
 いての試験において、型およびa型酵母のスクリーニング法について検討した結果を示
 す図である。

40

【図3】 図3は、本発明の実施例における「清酒酵母協会7号酵母からの型酵母のスク
 リーニング」についての試験において、協会7号酵母からの型酵母の単離の結果を示す
 図である。

【発明を実施するための形態】

【0027】

本発明は、接合能を持たない酵母細胞集団に混在する接合能を持つ酵母細胞株をスクリ
 ーニングし、酵母細胞集団から接合能を持つ酵母細胞株を単離する方法において、接合能
 を持つ酵母細胞株が放出する性フェロモンを検出して、接合能を持つ酵母細胞株を識別、

50

分離することによる、酵母細胞集団からの接合能を持つ酵母細胞株の単離方法からなる。本発明の接合能を持つ酵母細胞株の単離方法において、接合能を持つ酵母細胞株が放出する性フェロモンの検出は、性フェロモン感受性酵母を用い、該酵母の、接合能を持つ酵母細胞株が放出する性フェロモン a ファクター又は性フェロモン ファクターからなる性フェロモンによる増殖抑制を検出することからなる。

【0028】

本発明は、接合能を持たない酵母細胞集団に混在する接合能を持つ酵母細胞株をスクリーニングし、酵母細胞集団から接合能を持つ酵母細胞株を単離する方法からなるが、該接合能を持たない酵母細胞集団における「酵母」としては、飲料、食品等の製品の製造などの産業上有用な用途に用い得る酵母（実用酵母）を対象とすることができる。特に、本発明は、飲料、食品等の製品の製造に用いる醸造酵母やパン酵母のような実用酵母に対して、有効に実施することができる。該実用酵母の例を挙げれば、Saccharomyces属に属する酵母を特に好適な対象とすることができ、「飲料や食品の製造に用い得る酵母」の例としては、下面発酵酵母又は上面発酵酵母のようなビール酵母、ワイン酵母、清酒酵母、焼酎酵母、ウイスキー酵母などの醸造用酵母や、パン酵母などを挙げる事ができる。

10

【0029】

醸造酵母等の「接合能を持たない酵母」の倍数性について説明すると、該酵母としては、二倍体以上の倍数性を持ち、かつ、MAT座に少なくとも1つのMAT a 遺伝子と少なくとも1つのMAT 遺伝子とを有するために接合能を持たない酵母を意味し、例えば、MAT座に1つのMAT a 遺伝子と1つのMAT 遺伝子とを有する酵母（a / 型の接合型を持つ酵母；二倍体）や、MAT座に2つのMAT a 遺伝子と1つのMAT 遺伝子とを有する酵母（a a / 型の接合型を持つ酵母；三倍体）や、MAT座に1つのMAT a 遺伝子と2つのMAT 遺伝子とを有する酵母（a / 型の接合型を持つ酵母；三倍体）や、MAT座に2つのMAT a 遺伝子と2つのMAT 遺伝子とを有する酵母（a a / 型の接合型を持つ酵母；四倍体）を例示することができ、中でもa / 型の接合型を持つ酵母を好適に例示することができる。また、上記の「接合能を持たない酵母」には、親株だけでなく、かかる親株から孢子形成を経て得られる減数分裂分離体（以降、「減数体」とも表示する）も含む。

20

【0030】

本発明において、醸造用酵母や、パン酵母のような実用酵母において、ホモトリックな株を含む接合能を持たない実用酵母株の中にも、HO遺伝子やMAT座遺伝子の変異により、安定的に接合能を持つ細胞が極めてまれに存在することを見出した。したがって、本発明は、上記のような実用酵母において、接合能を持たない酵母細胞集団に通常的に混在する接合能を持つ酵母細胞株を対象として、実施することができる。また、接合能を持たない実用酵母株に、紫外線（UV）照射やエチルメタンサルホン酸（EMS）或いはニトロソグアニジン（MNNG）のような変異源性物質により、変異を誘発して、接合能を持つ細胞（a型株、型株）の取得を促進することができる。

30

【0031】

上記のように、本発明においては、醸造用酵母や、パン酵母のような実用酵母において、ホモトリックな株を含む接合能を持たない実用酵母株の中にも、HO遺伝子やMAT座遺伝子の変異により、安定的に接合能を持つ細胞が極めてまれに存在することを見出し、そして、該接合能を持たない酵母に混在する接合能を持つ株をスクリーニングするにあたり、接合能を持つ株は性フェロモンを周囲に分泌するという性質に着目した。a型細胞は性フェロモン a ファクターを、型細胞は性フェロモン ファクターを分泌する。この性フェロモンは、自身と接合型が異なる細胞の増殖を抑制するという作用を持つ。すなわち、a型細胞が分泌するaファクターは型細胞の増殖を抑制し、型細胞が分泌するファクターは、a型細胞の増殖を抑制する。

40

【0032】

該性フェロモンに対する細胞の増殖抑制は、BAR 1 遺伝子やSST 2 遺伝子などに変異が入ると、性フェロモンに対して非常に強い感受性を示すことが報告されている（Russ

50

ell K. Chan. Et. Al., Mol. Cell Biol., Vol. 2, No.1, p. 11-20, Jan. 1982.)。これらの遺伝子に変異した酵母では、性フェロモン存在下では増殖することができないため、性フェロモンをスポットした領域や接合能を持つ酵母周辺では、ハ口が観察される (Thomas R. Manney, Journal of Bacteriology, Vol. 155, No. 1, p. 291-301, July 1983. ; Karl Kuchler, et. Al., The EMBO Journal vol. 8 No. 13 pp. 3973-3984, 1989.)。このハ口を指標にすることで、接合能を持つ株を効率的にスクリーニング可能であることを見出した。

【0033】

本発明においては、a型細胞や 型細胞のような接合能を持つ株が周囲に分泌する性フェロモンの放出を、性フェロモン感受性酵母を用い、該酵母の増殖抑制により観察されるハ口を指標にすることで、接合能を持つ株をスクリーニング、単離する。そこで、本発明において、性フェロモン感受性酵母とは、「性フェロモンシグナルを受け取ると増殖が抑制される酵母」、と定義することができる。性フェロモン感受性株を取得するには、いくつかの報告があるように、性フェロモンシグナルを負に制御する遺伝子を変異した株を取得すればよい (Russell K. Chan. Et. Al., Mol. Cell Biol., Vol. 2, No.1, p. 11-20, Jan. 1982.)。例えば、ファクター感受性株としては、BAR1 遺伝子を変異したa型実験室酵母および SST2 遺伝子を変異した a 型実験室酵母、a ファクター感受性株としては、SST2 遺伝子を変異した 型実験室酵母などが挙げられる (Thomas R. Manney, Journal of Bacteriology, Vol. 155, No. 1, p. 291-301, July 1983. ; Karl Kuchler, et. Al., The EMBO Journal vol. 8 No. 13 pp. 3973-3984, 1989.)。その他にも、性フェロモンのシグナルを受け取ると、増殖抑制となるレポーター遺伝子を発現させる酵母を作製すれば、本発明で定義する「性フェロモン感受性酵母」となりうる。

【0034】

本発明において、酵母細胞集団からの接合能を持つ酵母細胞株をスクリーニングし、単離する方法を実施するには、例えばスクリーニングしたい酵母のシングルコロニーを YPD (yeast extract peptone dextrose) プレート上に形成させ、その上から性フェロモン感受性酵母を懸濁した 0.7% アガロース YPD を流し込んで培養するという方法が挙げられる。コロニー密度は、9 cm シャーレあたり、100 ~ 200 細胞が好ましい。接合可能株のコロニー周囲には、性フェロモンが分泌されているため、その周囲にいる性フェロモン感受性酵母は増殖できずにハ口を形成する。このコロニーをシングル化することで、接合可能株を得ることができる。その他には、1 ウェルあたり 10 細胞程度を含むように希釈した 96 ウェルプレートを培養し、その培養液を、性フェロモン感受性酵母がトップアガーで重層されたプレート上にスタンプして培養する、といった手法でスクリーニングしてもよい。ハ口が形成されたコロニーに由来するウェルから、シングルコロニーを取得し接合能を調査することで、接合可能株が取得できる。

【0035】

以下、本発明を実施例により詳細に説明するが、本発明の技術的範囲は以下の実施例によって限定されるものではない。

【実施例 1】

【0036】

[醸造酵母の性フェロモン分泌能の調査]

【0037】

ファクター分解酵素をコードする BAR1 遺伝子に欠損した酵母株、及び性フェロモン応答経路の脱感作に関与する SST2 遺伝子を変異した酵母株は、性フェロモン存在下では、増殖できないことが知られている (Thomas R. Manney, Journal of Bacteriology, Vol. 155, No. 1, p. 291-301, July 1983. ; Karl Kuchler, et. Al., The EMBO Journal vol. 8 No. 13 pp. 3973-3984, 1989.)。本発明のスクリーニングに適用可能な株は、性フェロモン分泌能を欠失していないことが必要条件であるため、まず様々な醸造酵母の接合可能株における性フェロモン分泌能を、ファクター感受性株 (a 型 bar1 欠損実験室酵母及び a 型 s s t 2 欠損実験室酵母) 及び a ファクター感受性株 (型 s s t 2 欠

10

20

30

40

50

損実験室酵母)の増殖抑制効果を利用して検証した。なお、醸造酵母の接合可能株は、特開2010-220481号公報に記載される方法で取得した。

【0038】

YPD (yeast extract peptone dextrose) 培地で一晚培養したファクター感受性株、及びaファクター感受性株を回収し、滅菌水で洗浄し、 $OD_{600} = 0.5$ に希釈した。その酵母懸濁液0.4mlを、45℃に保温したYPDアガロース(0.7%アガロース)3mlに加えて混合後、直ちにYPDプレートに流し込み、各性フェロモン感受性株が上層に重層された寒天プレートを作製した。さらにYPDで一晩培養し、滅菌水で洗浄した各醸造酵母株の懸濁液をそれぞれ 10^5 cell/ μ lに希釈し、その懸濁液をファクター感受性株及びaファクター感受性株が重層されたプレートに、それぞれ1 μ lずつスポットした。その後、25℃で2日間培養した。

10

【0039】

ファクター分泌能のある型実験室酵母周囲では、ファクター感受性酵母であるa型bar1遺伝子欠損酵母及びa型sst2遺伝子欠損実験室酵母は生育することができず、ハ口が観察された(図1a:醸造酵母のファクター分泌能、no.2)。一方、ファクター分泌能のないa型実験室酵母、a/型実験室酵母ではそのようなハ口は観察されなかった(図1a: no.1、3)。同様に、醸造酵母は接合能のないa/型のため、ファクターを分泌せず、これらのコロニー周辺ではファクター感受性酵母は増殖できた(図1a: no.8-11, 16-19)。一方、今回調査した型接合能を持つワイン酵母、清酒酵母、ウイスキー酵母、下面発酵酵母減数体コロニー周辺では、ファクター感受性酵母は増殖できず、ハ口が観察された(図1a: no.4-7, 12-15)。これは、これらの株が性フェロモンファクターを分泌したことを意味する。また、同様の結果が、aファクター感受性株である型sst2遺伝子欠損株でも確認された(図1b)。以上の結果より、各種醸造酵母は性フェロモンファクター及びaファクター分泌能を失っていないことが示唆され、本発明による接合可能株のスクリーニング法が様々な醸造酵母に広く適用可能ということが明らかとなった。

20

【実施例2】

【0040】

[接合可能株のスクリーニング法の検討]

【0041】

本発明により、多数のコロニーの中から接合可能株を検出可能かどうかを、以下の方法により検討した。a型細胞(実験室酵母BY4741株)と型細胞(同BY4742株)を図2に示すように様々な比率になるようにそれぞれ混合し、9cmシャーレで培養した。「a型細胞99%、型細胞1%」、「a型細胞2%、型細胞98%」の試験区では、9cmシャーレに合計約100個のコロニーが形成されるように酵母懸濁液を希釈し、1枚のプレートに撒いて2日間培養した。その後、 $OD_{600} = 0.5$ に希釈したbar1欠損酵母懸濁液若しくはsst2欠損酵母懸濁液0.4mlを、45℃に保温したYPDアガロース(0.7%アガロース)3mlに加えて混合後、その懸濁液をコロニーが形成されたプレート上に静かに流し込んだ。更に、2日間培養し、ハ口の形成を観察した(図2:接合可能株のスクリーニング法の検討)。

40

【0042】

図2上側の写真が示すように、ファクター感受性酵母(a型bar1遺伝子欠損株)の試験区において、型細胞の周辺にはファクター感受性酵母が生育できないためにハ口が観察されたのに対し、a型細胞にはそのようなハ口は観察されなかった。また、「a型細胞:型細胞=99:1」の試験区では、混合比率に相応した比率でハ口が形成されるコロニーが出現した(図2上側写真、矢頭)。同様に、aファクター感受性株である型sst2遺伝子欠損株を用いた場合、a型細胞を検出できることが明らかとなった(図2下側)。このことから、9cmシャーレあたり100個のコロニーを出現させた場合、1%程度の頻度で存在する型細胞が検出可能であることが示された。以上より、本発明を用いることで、多数のコロニーの中から効率的に接合可能株を探索できることが明らか

50

となった。

【実施例3】

【0043】

[清酒酵母協会7号酵母からの型酵母のスクリーニング]

【0044】

本発明のスクリーニング法を用いて、実用株である清酒酵母協会7号酵母(K7)から型酵母が単離できるか検討した(図3:協会7号酵母からの型酵母の単離)。K7を9cmシャーレあたり約200個のコロニーが出現するように酵母懸濁液を塗り、接合型変換を誘導するため紫外線を照射した(0~100秒)。2日間の培養でコロニーを形成させた後、45℃に保温した5mlのYPDアガロース(0.7%アガロース)にOD₆₀₀=0.5に希釈したファクター感受性酵母(a型bar1遺伝子欠損株)懸濁液を0.4ml加えて混合後、その懸濁液をプレート上に静かに流し込んだ。更に、2日間培養し、ハ口の形成を観察した(図3a)。図3bの写真は紫外線を40秒照射したプレートであるが、中央にハ口が観察される(図3写真矢頭)。このようなハ口が形成されたコロニーは、各処理区合計で5つであった(図3bの表)。

10

【0045】

次に、ハ口を形成したコロニーが期待どおり型酵母かどうかを確認するために、接合能を持つ実験室酵母との接合試験を実施した。まず、ハ口が観察されたコロニーをシングルクローン化し、それぞれのシングルクローンがハ口を形成することを確認した。その後、実験室酵母a株と株を、K7及び選抜したハ口K7とそれぞれ混合した後、YPDプレート上で一晚培養した。その混合菌体を、それぞれ滅菌水に懸濁した後、0.2mMの硫酸銅を含むSD培地上にスポットし、2晩培養した。実験室酵母は栄養要求性を持つためSD培地上で生育できないが、銅耐性を持つために硫酸銅含有培地で生育できる。一方K7は、栄養要求性は持たないが、銅に感受性である。両者の接合株のみが、硫酸銅を含むSD培地で生育可能である。これを指標に接合の有無を調査したところ、ハ口形成コロニーに由来する細胞は、a型実験室酵母とのみ接合し、期待どおりに型接合能を有することが確認できた。ハ口を形成しないK7には、このような接合能は観察されなかった。このように、本発明を用いれば、一般的に接合能を持たない醸造酵母から、型酵母を簡便に取得することができ、この酵母を交雑の親株として利用することができる。

20

【産業上の利用可能性】

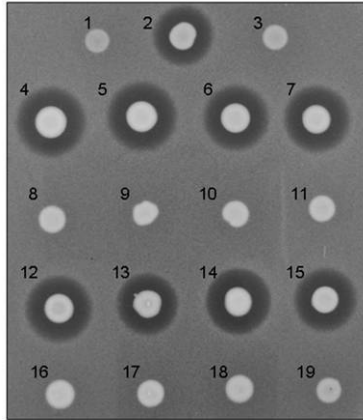
30

【0046】

本発明は、接合能を持たない酵母細胞集団に混在する接合能を持つ酵母細胞株をスクリーニングし、酵母細胞集団から接合能を持つ酵母細胞株を単離する方法を提供する。本発明は、胞子を形成し、発芽させることにより、交雑育種のために必要な接合能を持つ酵母細胞株の取得の困難な醸造用酵母や、パン酵母のような実用酵母にも適用することができ、本発明の方法によって取得した接合能を持つ細胞株を、交雑育種の親株に利用することにより、従来、交雑育種の方法を採ることが困難であった実用酵母の場合における交雑育種を可能とし、本発明は、該実用酵母の優良特性を持つ酵母の育種に有力な手段を提供する。

【 図 1 】

(a) α ファクター分泌能の調査
 α ファクター感受性酵母 (a型 b a r 1 欠損株)

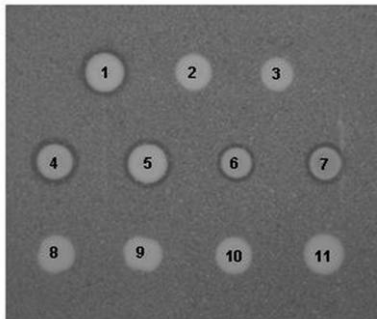


no.	株名	備考
1	BY4741	a型実験室酵母、コントロール
2	BY4742	a型実験室酵母、コントロール
3	BY4743	a/a型実験室酵母、コントロール
4	KT72	協会2号由来のa型株
5	KT80	協会7号由来のa型株
6	KT182	協会9号由来のa型株
7	KT186	協会13号由来のa型株
8	協会2号	ワイン酵母、コントロール
9	協会7号	清酒酵母、コントロール
10	協会9号	清酒酵母、コントロール
11	協会13号	清酒酵母、コントロール
12	KT212	KY626由来のa型株
13	KT38	KY627由来のa型株
14	KT44	KY625由来のa型株
15	KT234	KY392減数体由来のa型株
16	KY626	ウイスキー酵母、コントロール
17	KY627	ウイスキー酵母、コントロール
18	KY625	ウイスキー酵母、コントロール
19	KY392	下面発酵酵母、コントロール

α ファクター感受性酵母 (a型 s s t 2 欠損株)

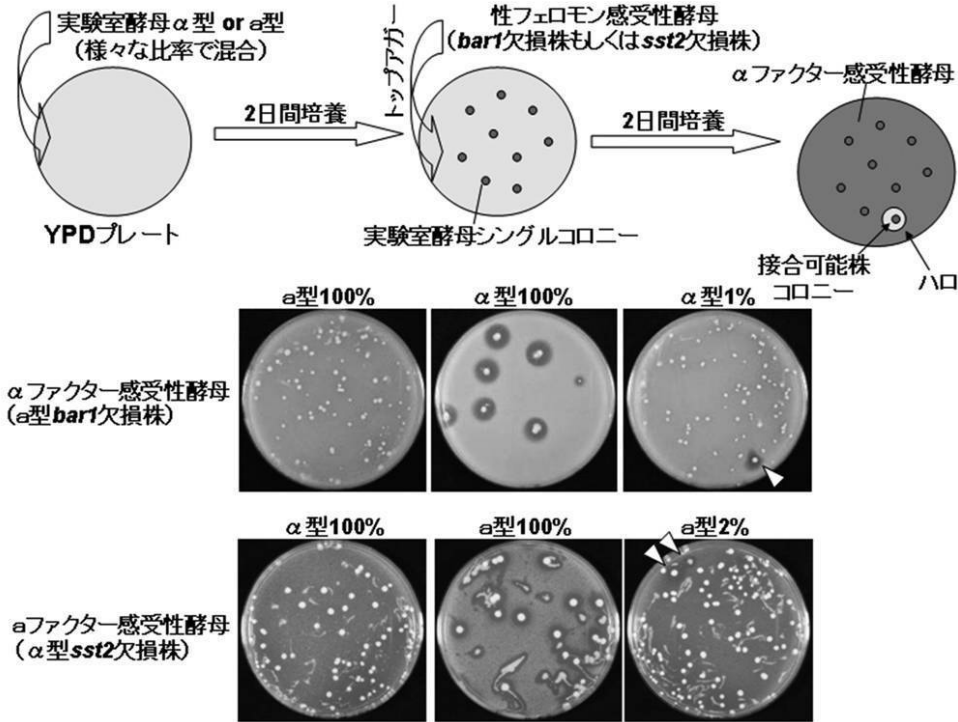


(b) aファクター分泌能の調査
aファクター感受性酵母 (α 型 s s t 2 欠損株)

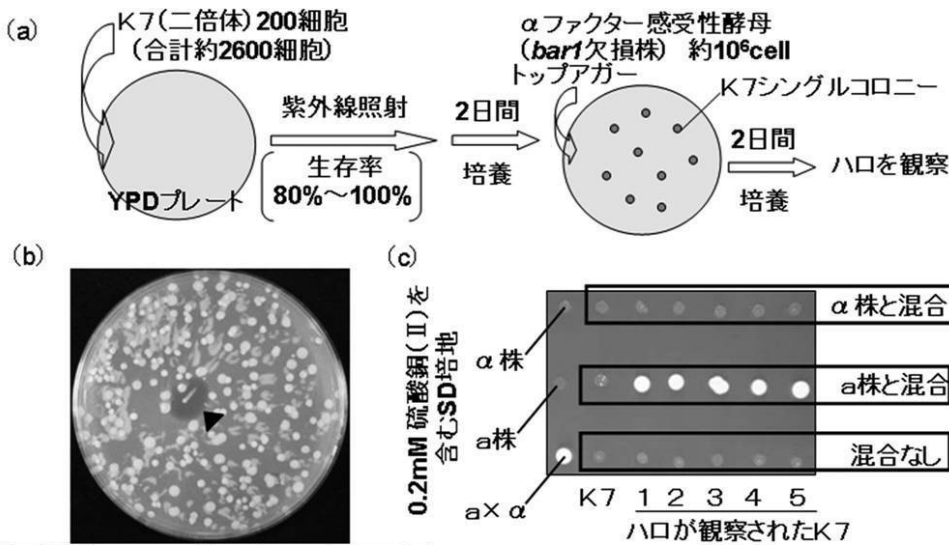


	株名	備考
1	BY4741	a型実験室酵母、コントロール
2	BY4742	a型実験室酵母、コントロール
3	BY4743	a/a型実験室酵母、コントロール
4	KT435	KY2657減数体由来のa型株
5	KT36	KY392減数体由来のa型株
6	KT30	KY1250減数体由来のa型株
7	KT46	KY625減数体由来のa型株
8	KY2657	下面発酵酵母、コントロール
9	KY392	下面発酵酵母、コントロール
10	KY1250	下面発酵酵母、コントロール
11	KY625	ウイスキー酵母、コントロール

【 図 2 】



【 図 3 】



UV照射時間 (sec)	コロニー数		生存率 (%)	ハ口が観察されたコロニー数
	プレート 1	プレート 2		
0	222	248	100	0
20	220	228	95	0
40	212	219	92	1
60	239	203	94	0
80	214	212	91	1
100	200	187	82	3

	0.2 mM CuSO_4	SD培地
実験室酵母	○	×
協会7号酵母	×	○
交雑株	○	○

フロントページの続き

(72)発明者 金井 圭子

東京都中野区中野四丁目10番2号 キリン株式会社内

(72)発明者 小林 統

東京都中野区中野四丁目10番2号 キリン株式会社内

Fターム(参考) 4B063 QA18 QQ07 QR76 QX01

4B065 AA80X AA80Y AB10 AC20 BA23 BA30 BB40 CA41