

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610153904.3

[51] Int. Cl.

C12N 15/09 (2006.01)

C12N 15/54 (2006.01)

C12N 9/10 (2006.01)

C12N 1/19 (2006.01)

C12C 11/00 (2006.01)

C12G 1/00 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 3 月 21 日

[11] 公开号 CN 1932014A

[22] 申请日 2006.9.12

[21] 申请号 200610153904.3

[30] 优先权

[32] 2005. 9. 13 [33] JP [31] 2005 - 266068

[32] 2006. 7. 24 [33] JP [31] 2006 - 200892

[71] 申请人 三得利株式会社

地址 日本大阪府大阪市

[72] 发明人 中尾嘉宏 儿玉由纪子 下永朋子

[74] 专利代理机构 隆天国际知识产权代理有限公司
代理人 高龙鑫

权利要求书 3 页 说明书 28 页 附图 3 页

[54] 发明名称

醇乙酰转移酶基因及其用途

[57] 摘要

本发明涉及醇乙酰转移酶基因及其用途，特别是涉及制造香味优异的酒类的酿造酵母、使用该酵母制造的酒类及其制造方法等。进一步具体地说，本发明涉及通过降低编码酿造酵母的醇乙酰转移酶 Atf2p 的基因 ATF2、特别是啤酒酵母中特征性的 non - ScATF2 基因的表达量，控制对产品香味起作用的酯的生成能力的酵母及使用该酵母的酒类制造方法等。

1. 从以下 (a) ~ (f) 组成的组中选择的多核苷酸:

(a) 含有由序列号: 1 的碱基序列组成的多核苷酸的多核苷酸;

(b) 含有编码由序列号: 2 的氨基酸序列组成的蛋白质的多核苷酸的多核苷酸;

(c) 含有编码由序列号: 2 的氨基酸序列中 1 个或多个氨基酸缺失、取代、插入及 / 或附加了的氨基酸序列组成的, 且具有醇乙酰转移酶活性的蛋白质的多核苷酸的多核苷酸;

(d) 含有编码具有与序列号: 2 的氨基酸序列有等于或大于 60% 同一性的氨基酸序列的, 且具有醇乙酰转移酶活性的蛋白质的多核苷酸的多核苷酸;

(e) 含有与序列号: 1 的碱基序列的互补碱基序列组成的多核苷酸, 在严格条件下杂交, 且编码具有醇乙酰转移酶活性的蛋白质的多核苷酸的多核苷酸; 以及

(f) 含有与编码序列号: 2 的氨基酸序列组成的蛋白质的多核苷酸碱基序列的互补碱基序列组成的多核苷酸, 在严格条件下杂交, 且编码具有醇乙酰转移酶活性的蛋白质的多核苷酸的多核苷酸。

2. 按照权利要求 1 中所述的多核苷酸, 其从以下 (g) ~ (i) 组成的组中选择:

(g) 含有编码由序列号: 2 的氨基酸序列或序列号: 2 的氨基酸序列中 1~10 个氨基酸缺失、取代、插入及 / 或附加了的氨基酸序列组成的, 且具有醇乙酰转移酶活性的蛋白质的多核苷酸的多核苷酸;

(h) 含有编码具有与序列号: 2 的氨基酸序列有等于或大于 90% 同一性的氨基酸序列的, 且具有醇乙酰转移酶活性的蛋白质的多核苷酸的多核苷酸; 及

(i) 含有与序列号: 1 的碱基序列组成的多核苷酸、或序列号: 1 的碱基序列的互补碱基序列组成的多核苷酸, 在十分严格条件下杂交, 且编码具有醇乙酰转移酶活性的蛋白质的多核苷酸的多核苷酸。

3. 按照权利要求 1 中所述的多核苷酸, 其含有由序列号: 1 的碱基序列

组成的多核苷酸。

4. 按照权利要求 1 中所述的多核苷酸，其含有编码由序列号：2 的氨基酸序列组成的蛋白质的多核苷酸。

5. 按照权利要求 1~4 中任一项所述的多核苷酸，其是 DNA。

6. 从以下 (j) ~ (m) 组成的组中选择的多核苷酸：

(j) 编码具有权利要求 5 中所述的多核苷酸 (DNA) 转录产物的互补碱基序列的 RNA 的多核苷酸，；

(k) 编码通过 RNAi 作用抑制权利要求 5 中所述多核苷酸 (DNA) 表达的 RNA 的多核苷酸；

(l) 编码具有特异性切割权利要求 5 中所述多核苷酸 (DNA) 转录产物活性的 RNA 的多核苷酸；及

(m) 编码通过共抑制作用抑制权利要求 5 中所述多核苷酸 (DNA) 表达的 RNA 的多核苷酸。

7. 一种蛋白质，其由权利要求 1~5 中任一项所述的多核苷酸编码。

8. 一种载体，其含有权利要求 1~5 中任一项所述的多核苷酸。

9. 一种载体，其含有权利要求 6 中所述的多核苷酸。

10. 一种 酵母，其中导入了权利要求 8 或 9 中所述的载体。

11. 按照权利要求 10 中所述的酵母，其通过导入权利要求 8 中所述的载体，增强了酯的生成能力。

12. 一种酵母，其通过导入权利要求 9 中所述的载体，或通过破坏与权利要求 5 中所述多核苷酸 (DNA) 有关的基因，抑制权利要求 5 中所述的多核苷酸 (DNA) 的表达。

13. 按照权利要求 11 中所述的酵母，其通过使权利要求 7 中所述蛋白质的表达量增加，提高酯的生成能力。

14. 一种酒类的制造方法，其使用权利要求 10~13 中任一项所述的酵母。

15. 按照权利要求 14 中所述的酒类的制造方法，其酿造的酒类是麦芽饮料。

16. 按照权利要求 14 中所述的酒类的制造方法，其酿造的酒类是葡萄酒。

17. 一种酒类，其用权利要求 14~16 中任一项所述的方法制造。
18. 一种评价方法，其是使用根据具有序列号：1 碱基序列的醇乙酰转移酶基因的碱基序列设计的引物或探针，评价被检酵母的酯生成能力的方法。
19. 一种评价方法，其是通过培养被检酵母，测定具有序列号：1 碱基序列的醇乙酰转移酶基因的表达量，评价被检酵母的酯生成能力的方法。
20. 一种酵母的选择方法，其为培养被检酵母，对权利要求 7 中所述的蛋白质定量或测定具有序列号：1 碱基序列的醇乙酰转移酶基因的表达量，选择与目标酯生成能力相应的前述蛋白质量或前述基因表达量的被检酵母。
21. 按照权利要求 20 中所述的酵母的选择方法，其为培养标准酵母及被检酵母，测定具有序列号：1 碱基序列的醇乙酰转移酶基因在各酵母中的表达量，选择该基因比标准酵母高表达或低表达的被检酵母。
22. 按照权利要求 20 中所述的酵母的选择方法，其为培养标准酵母及被检酵母，对各酵母中的权利要求 7 中所述的蛋白质定量，选择该蛋白质量比标准酵母多或少的被检酵母。
23. 一种酒类的制造方法，其特征在于，使用权利要求 10~13 中所述的酵母及通过权利要求 20~22 中所述的方法选择的酵母中的任一种酵母，进行用于酒类制造的发酵，调节酯生成量。

醇乙酰转移酶基因及其用途

技术领域

本发明涉及醇乙酰转移酶基因及其用途，特别是涉及制造香味优异的酒类的酿造酵母、使用该酵母制造的酒类及其制造方法等。进一步具体地说，本发明涉及通过控制编码酿造酵母醇乙酰转移酶 Atf2p 的基因 ATF2，特别是通过控制啤酒酵母中特征性的 non-ScATF2 基因的表达量，控制对产品香味起作用的酯生成能力的酵母及使用该酵母的酒类的制造方法等。

背景技术

酒类中酯是重要的香味成份之一。已知清酒、葡萄酒、威士忌等中酯的增加可带给酒馥郁的香味、和感官上的高度评价效果。另一方面，啤酒中酯虽是重要的香气成分，但过剩的酯也会形成酯臭。因此，根据酒的种类适度控制酯的生成量非常重要。

至今为止，一直以提高酒中的酯含量为目的进行酯生产量高的酵母的育种。为对酵母施以突变处理（或不进行突变处理），高效分离酯生产量高的酵母，已有关于获得对阻碍浅蓝菌素等脂肪酸合成酶的药剂有抗性，并能够大量生产己酸的菌株、及对 5, 5, 5-三氟-DL-亮氨酸等的亮氨酸类似物有抗性，并能够大量生产异戊醇、乙酸异戊酯的菌株的方法（日本特开 2002-253211 号公报），及获得采用含有具有 3 位羟基化的孕烷骨架的类固醇的培养基而生长发育的菌株的方法（日本特开 2002-191355 号公报）的报道。

另外，还有关于在利用基因操作技术的酵母育种的方法中，使酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）的醇乙酰转移酶基因 ATF 1 在酿造用酵母中高表达的实例（日本特开平 06-062849 号公报）、抑制 ATF1 表达的实例（日本特开平 06-253826 号公报）、破坏酿造用酵母的酯酶基因 EST2 使酯量增加的实例（日本特开平 09-234077 号公报）的报道。

发明内容

如上所述,为使产品中酯含量增大,获取突变株,但其结果显示了未曾预期的发酵延迟和不受欢迎的香味成分的增加等,所以,作为实用性酵母还存在着问题。由此,非常期望有既不影响发酵速度、不损害产品品质,又能生产希望量的酯酵母的育种方法。

本发明者等为了解决上述课题不断锐意研究的结果,从啤酒酵母中成功地鉴定·分离出了编码已知蛋白质中起有益作用的醇乙酰转移酶的基因。另外,制备将所得基因导入酵母并使其表达的转化酵母,确认了酯生成量的增加,从而完成了本发明。

即,本发明涉及啤酒酵母中特征性存在的新型醇乙酰转移酶基因、该基因编码的蛋白质、调节了该基因表达的转化酵母、通过使用调节了该基因表达的酵母以控制产品中酯生成量的方法等。具体地说,本发明提供如下所示的多核苷酸、含有该多核苷酸的载体、导入了该载体的转化酵母、使用该转化酵母的酒类的制造方法等。

(1) 从以下(a)~(f)组成的组中选择的多核苷酸:

(a) 含有由序列号:1的碱基序列组成的多核苷酸的多核苷酸;

(b) 含有编码由序列号:2的氨基酸序列组成的蛋白质的多核苷酸的多核苷酸;

(c) 含有编码由序列号:2的氨基酸序列中1个或多个氨基酸缺失、取代、插入及/或附加了的氨基酸序列组成的,且具有醇乙酰转移酶活性的蛋白质的多核苷酸的多核苷酸;

(d) 含有编码具有与序列号:2的氨基酸序列有等于或大于60%同一性的氨基酸序列的,且具有醇乙酰转移酶活性的蛋白质的多核苷酸的多核苷酸;

(e) 含有与序列号:1中的碱基序列的互补碱基序列组成的多核苷酸,在严格条件下杂交,且编码具有醇乙酰转移酶活性的蛋白质的多核苷酸的多核苷酸;以及

(f) 含有与编码序列号:2的氨基酸序列组成的蛋白质的多核苷酸碱基序列的互补碱基序列组成的多核苷酸,在严格条件下杂交,且编码具有醇乙酰转移酶活性的蛋白质的多核苷酸的多核苷酸。

(2) 上述 (1) 中所述的多核苷酸, 其从以下 (g) ~ (i) 组成的组中选择:

(g) 含有编码由序列号: 2 的氨基酸序列或序列号: 2 的氨基酸序列中 1~10 个氨基酸缺失、取代、插入及 / 或附加了的氨基酸序列组成的, 且具有醇乙酰转移酶活性的蛋白质的多核苷酸的多核苷酸;

(h) 含有编码具有与序列号: 2 的氨基酸序列有等于或大于 90% 同一性的氨基酸序列的, 且具有醇乙酰转移酶活性的蛋白质的多核苷酸的多核苷酸; 及

(i) 含有与序列号: 1 的碱基序列组成的多核苷酸、或序列号: 1 的碱基序列的互补碱基序列组成的多核苷酸, 在十分严格条件下杂交, 且编码具有醇乙酰转移酶活性的蛋白质的多核苷酸的多核苷酸。

(3) 上述 (1) 中所述的多核苷酸, 其含有由序列号: 1 的碱基序列组成的多核苷酸。

(4) 上述 (1) 中所述的多核苷酸, 其含有编码由序列号: 2 的氨基酸序列组成的蛋白质的多核苷酸。

(5) 上述 (1) ~ (4) 中任一项所述的多核苷酸, 其是 DNA。

(6) 从以下 (j) ~ (m) 组成的组中选择的的多核苷酸:

(j) 编码具有上述 (5) 中所述的多核苷酸 (DNA) 转录产物的互补碱基序列的 RNA 的多核苷酸, ;

(k) 编码通过 RNAi 作用抑制上述 (5) 中所述多核苷酸 (DNA) 表达的 RNA 的多核苷酸;

(l) 编码具有特异性切割上述 (5) 中所述多核苷酸 (DNA) 转录产物活性的 RNA 的多核苷酸; 及

(m) 编码通过共抑制作用抑制上述 (5) 中所述多核苷酸 (DNA) 表达的 RNA 的多核苷酸。

(7) 一种蛋白质, 其由上述 (1) ~ (5) 中任一项所述的多核苷酸编码。

(8) 一种载体, 其含有上述 (1) ~ (5) 中任一项所述的多核苷酸。

(8a) 上述 (8) 中所述的载体, 其含有具有以下 (x) ~ (z) 组成要素的表达框架:

(x) 在酵母细胞内可转录的启动子;

(y) 上述(1)~(5)中所述的多核苷酸, 其与该启动子以正向或反向结合; 以及

(z) 与 RNA 分子的转录终止及聚腺苷酸化有关的、在酵母中起作用的信号。

(9) 一种载体, 其含有上述(6)中所述的多核苷酸。

(10) 一种酵母, 其中导入了上述(8)或(9)中所述的载体。

(11) 上述(10)中所述的酵母, 其通过导入上述(8)中所述的载体, 增强了酯的生成能力。

(12) 一种酵母, 其通过导入上述(9)中所述的载体, 或通过破坏与上述(5)中所述多核苷酸(DNA)有关的基因, 抑制上述(5)中所述的多核苷酸(DNA)的表达。

(13) 上述(11)中所述的酵母, 其通过使上述(7)中所述的蛋白质的表达量增加, 提高了酯的生成能力。

(14) 一种酒类的制造方法, 其使用上述(10)~(13)中任一项所述的酵母。

(15) 上述(14)中所述的酒类的制造方法, 其酿造的酒类是麦芽饮料。

(16) 上述(14)中所述的酒类的制造方法, 其酿造的酒类是葡萄酒。

(17) 一种酒类, 其用上述(14)~(16)中任一项所述的方法制造。

(18) 一种评价方法, 其是使用根据具有序列号: 1 碱基序列的醇乙酰转移酶基因的碱基序列设计的引物或探针, 评价被检酵母的酯生成能力的方法。

(18a) 根据上述(18)中所述的方法, 选别酯生成能力高或低的酵母的方法。

(18b) 使用通过上述(18a)中所述方法选别的酵母制造酒类(例如啤酒)的方法。

(19) 一种评价方法, 其通过培养被检酵母, 测定具有序列号: 1 碱基序列的醇乙酰转移酶基因的表达量, 评价被检酵母的酯生成能力。

(20) 一种酵母的选择方法, 其为培养被检酵母, 对上述(7)中所述的蛋白质定量或测定具有序列号: 1 碱基序列的醇乙酰转移酶基因的表达量,

选择与目标酯生成能力相应的前述蛋白质量或前述基因表达量的被检酵母。

(20a) 一种酵母的选择方法, 其为培养被检酵母, 测定上述 (7) 中所述蛋白质的醇乙酰转移酶活性, 选择具有与目标酯生成能力相应的前述醇乙酰转移酶活性的被检酵母。

(21) 上述 (20) 中所述的酵母的选择方法, 其为培养标准酵母及被检酵母, 测定具有序列号: 1 碱基序列的醇乙酰转移酶基因在各酵母中的表达量, 选择该基因比标准酵母高表达或低表达的被检酵母。

(22) 上述 (20) 中所述的酵母的选择方法, 其为培养标准酵母及被检酵母, 对各酵母中上述 (7) 中所述的蛋白质定量, 选择该蛋白质量比标准酵母多的被检酵母的酵母选择方法。即, 上述 (20) 中所述的酵母的选择方法, 其为培养多种酵母, 对各酵母中上述 (7) 中所述的蛋白质定量, 选择其中该蛋白质量多的被检酵母。即, 上述 (20) 中所述的酵母的选择方法, 其为培养多种酵母, 对各酵母中上述 (7) 中所述的蛋白质定量, 选择其中该蛋白质的产生量多或少的被检酵母。

(23) 一种酒类的制造方法, 其特征在于, 使用上述 (10) ~ (13) 中所述的酵母及通过上述 (20) ~ (22) 中所述的方法选择的酵母中的任一种酵母, 进行用于酒类制造的发酵, 调节酯的生成能力。

因根据使用本发明的转化酵母的酒类制造法可控制酯含量, 所以, 可制造香味优良的酒类。

附图说明

图 1 是啤酒试验酿造中酵母增殖量经时变化的示意图。横坐标表示发酵时间, 纵坐标表示 OD660 的值。

图 2 是啤酒试验酿造中浸出物消耗量经时变化的示意图。横坐标表示发酵时间, 纵坐标表示表观浸出物浓度 (w/w%)。

图 3 是啤酒试验酿造中酵母的 nonScATF2 基因表达变动的示意图。横坐标表示发酵时间, 纵坐标表示检测出的信号辉度。

图 4 是啤酒试验酿造中酵母增殖量经时变化的示意图。横坐标表示发酵时间, 纵坐标表示 OD660 的值。

图 5 是啤酒试验酿造中浸出物消耗量经时变化的示意图。横坐标表示

发酵时间，纵坐标表示表观浸出物浓度（w/w%）。

具体实施方式

本发明者等认为，通过使酵母的醇乙酰转移酶活性增大或减少，可控制酯的量。基于此设想反复进行了研究，以用日本特开 2004-283169 号公报中公开的方法解读的啤酒酵母基因组信息为基础，分离·鉴定了编码啤酒酵母特有的醇乙酰转移酶的 nonScATF2 基因。此碱基序列如序列号：1 所示。另外，由此基因编码的蛋白质的氨基酸序列如序列号：2 所示。

1. 本发明的多核苷酸

首先，本发明提供 (a) 含有由序列号：1 的碱基序列组成的多核苷酸的多核苷酸；及 (b) 含有编码由序列号：2 的氨基酸序列组成的蛋白质的多核苷酸的多核苷酸。多核苷酸可以是 DNA 也可以是 RNA。

作为本发明对象的多核苷酸，不只限于编码来自上述啤酒酵母的醇乙酰转移酶基因的多核苷酸，还包含编码与此蛋白质具同等功能的蛋白质的其他多核苷酸。作为功能相同的蛋白质，例如，可例举为 (c) 由序列号：2 的氨基酸序列中 1 个或多个的氨基酸缺失、取代、插入及 / 或附加了的氨基酸序列组成的，且具有醇乙酰转移酶活性的蛋白质。

此种蛋白质，在序列号 2 的氨基酸序列中，例如，可为由 1~100 个、1~90 个、1~80 个、1~70 个、1~60 个、1~50 个、1~40 个、1~39 个、1~38 个、1~37 个、1~36 个、1~35 个、1~34 个、1~33 个、1~32 个、1~31 个、1~30 个、1~29 个、1~28 个、1~27 个、1~26 个、1~25 个、1~24 个、1~23 个、1~22 个、1~21 个、1~20 个、1~19 个、1~18 个、1~17 个、1~16 个、1~15 个、1~14 个、1~13 个、1~12 个、1~11 个、1~10 个、1~9 个、1~8 个、1~7 个、1~6 个（1~数个）、1~5 个、1~4 个、1~3 个、1~2 个、1 个的氨基酸残基缺失、取代、插入及 / 或附加了的氨基酸序列组成的，且具有醇乙酰转移酶活性的蛋白质。上述氨基酸残基缺失、取代、插入及 / 或付加的数量，一般优选较小的数量。此种蛋白质可例举为具有 (d) 与序列号：2 的氨基酸序列有等于或大于约 60%、等于或大于约 70%、等于或大于 71%、等于或大于 72%、等于或大于 73%、等于或大于 74%、等于或大于 75%、等于或大于 76%、等于或大于 77%、等于或大于 78%、

等于或大于 79%、等于或大于 80%、等于或大于 81%、等于或大于 82%、等于或大于 83%、等于或大于 84%、等于或大于 85%、等于或大于 86%、等于或大于 87%、等于或大于 88%、等于或大于 89%、等于或大于 90%、等于或大于 91%、等于或大于 92%、等于或大于 93%、等于或大于 94%、等于或大于 95%、等于或大于 96%、等于或大于 97%、等于或大于 98%、等于或大于 99%、等于或大于 99.1%、等于或大于 99.2%、等于或大于 99.3%、等于或大于 99.4%、等于或大于 99.5%、等于或大于 99.6%、等于或大于 99.7%、等于或大于 99.8%、等于或大于 99.9%同一性的氨基酸序列，且具有醇乙酰转移酶活性的蛋白质。上述同源性的数值一般越大越好。

醇乙酰转移酶活性，例如可根据（日本特开平 6-253826）中所述的方法测定。

另外，本发明也包含（e）含有与序列号：1 碱基序列的互补碱基序列组成的多核苷酸，在严格条件下杂交、且编码具有醇乙酰转移酶活性的蛋白质的多核苷酸的多核苷酸；以及（f）含有与编码由序列号：2 的氨基酸序列组成的蛋白质的多核苷酸碱基序列的互补碱基序列组成的多核苷酸，在严格条件下杂交、且编码具有醇乙酰转移酶活性的蛋白质的多核苷酸的多核苷酸。

此处的“在严格条件下杂交的多核苷酸”，是指以序列号：1 的碱基序列的互补碱基序列组成的多核苷酸、或编码序列号：2 的氨基酸序列的多核苷酸的全部或一部分为探针，通过使用菌落杂交法、噬菌斑杂交法或 Southern 杂交法等得到的多核苷酸（例如 DNA）。杂交方法，例如可利用 Molecular Cloning 3rd Ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons 1987-1997 等中所述的方法。

本说明书中所述的“严格条件”可为低严格条件、中严格条件、十分严格条件中的任一种。“低严格条件”，例如，为 5×SSC、5×Denhardt 溶液、0.5%SDS、50%甲酰胺、32℃的条件。“中严格条件”，例如，为 5×SSC、5×Denhardt 溶液、0.5%SDS、50%甲酰胺、42℃的条件。“十分严格条件”，例如，为 5×SSC、5×Denhardt 溶液、0.5%SDS、50%甲酰胺、50℃的条件。在上述条件中，越提高温度，越能期待高效地获得具有高同源性的多核苷酸（例如 DNA）。影响杂交严格性的因素可为温度、探针浓度、探针长度、离子强度、时间、盐浓度等多种因素，本领域技术人员通过适宜选择这些因素，

均可实现同样的严格条件。

还有,杂交中使用市售的试剂盒时,例如,可使用 Alkphos Direct Labelling Reagents (Amersham Pharmacia 公司制)。此时,根据试剂盒中附带的说明方案,与标记了的探针进行一夜培养后,将膜在 55℃ 的条件下,用含有 0.1% (w/v) SDS 的洗涤缓冲液 1 次洗涤,之后可检测杂交后的多核苷酸(例如 DNA)。

此外,可杂交的多核苷酸,通过 FASTA、BLAST 等同源性搜索软件,使用默认值(default)计算时,可为与编码序列号:2 的氨基酸序列的多核苷酸有等于或大于约 60%、等于或大于约 70%、等于或大于 71%、等于或大于 72%、等于或大于 73%、等于或大于 74%、等于或大于 75%、等于或大于 76%、等于或大于 77%、等于或大于 78%、等于或大于 79%、等于或大于 80%、等于或大于 81%、等于或大于 82%、等于或大于 83%、等于或大于 84%、等于或大于 85%、等于或大于 86%、等于或大于 87%、等于或大于 88%、等于或大于 89%、等于或大于 90%、等于或大于 91%、等于或大于 92%、等于或大于 93%、等于或大于 94%、等于或大于 95%、等于或大于 96%、等于或大于 97%、等于或大于 98%、等于或大于 99%、等于或大于 99.1%、等于或大于 99.2%、等于或大于 99.3%、等于或大于 99.4%、等于或大于 99.5%、等于或大于 99.6%、等于或大于 99.7%、等于或大于 99.8%、等于或大于 99.9% 同一性的多核苷酸。

还有,氨基酸序列、碱基序列的同一性,可使用根据 Karlin 及 Altschul 的 BLAST 算法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 2264-2268, 1990; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 5873, 1993)决定。开发了基于 BLAST 算法、被称为 BLASTN、BLASTX 的程序(Altschul SF, et al : J. Mol. Biol. 215 : 403, 1990)。使用 BLASTN 分析碱基序列时,参数例如为 score=100、wordlength=12。使用 BLASTX 分析氨基酸序列时,参数例如为 score=50、wordlength=3。使用 BLAST 和 Gapped BLAST 程序时,使用各程序的默认值(default)参数。

另外,本发明的多核苷酸包含(j) 编码具有上述(5)中所述多核苷酸(DNA)转录产物的互补碱基序列的 RNA 的多核苷酸;(k) 编码通过 RNAi 作用抑制上述(5)中所述多核苷酸(DNA)表达的 RNA 的多核苷酸;(l)

编码具有特异性切割上述(5)中所述多核苷酸(DNA)转录产物活性的RNA的多核苷酸;及(m)编码通过共抑制作用抑制上述(5)中所述多核苷酸(DNA)表达的RNA的多核苷酸。这些多核苷酸整合进载体,而且可在导入了其载体的转化细胞中抑制上述(a)~(i)的多核苷酸(DNA)的表达。因此,可优选利用于适合抑制上述多核苷酸(DNA)表达的场合。

本说明书中,“编码具有DNA转录产物的互补碱基序列的RNA的多核苷酸”,是指所谓的反义DNA。反义技术作为抑制特定的内源性基因表达的方法已经公知,且在种种文献中均有记载[例如,参照平岛及井上:新生物化学实验讲座2核酸IV基因的复制和表达(日本生化学会编,东京化学同人)pp.319-347,1993等]。反义DNA的序列,优选与内源性基因或其一部分互补的序列,但只要能有效地抑制基因的表达,即使不完全互补也可。被转录的RNA与靶基因的转录产物,优选具有等于或大于90%,更优选具有等于或大于95%的互补性。反义DNA的长度,至少为等于或大于15个碱基,优选等于或大于100个碱基,更优选等于或大于500个碱基。

本说明书中,“编码通过RNAi作用抑制DNA表达的RNA的多核苷酸”,是指用于通过RNA干扰(RNAi)抑制内源性基因表达的多核苷酸。“RNAi”是指将具有与靶基因序列同一或类似的序列的双链RNA导入细胞内时,导入的外源基因及内源性靶基因的表达均被抑制的现象。此处使用的RNA,例如可为产生了21~25碱基长度的RNA干涉的双链RNA,例如,dsRNA(双链RNA)、siRNA(小分子干扰RNA)或shRNA(短发夹结构RNA)。此种RNA可通过脂质体等的释放系统向所需位点局部释放,且使用生成上述双链RNA的载体使其局部表达。此种双链RNA(dsRNA、siRNA或shRNA)的制备方法、使用方法等已由许多文献公开(参照特表2002-516062号公报;美国公开专利第2002/086356A号;Nature Genetics, 24(2), 180-183, 2000 Feb.; Genesis, 26(4), 240-244, 2000 April; Nature, 407:6802, 319-20, 2002 Sep. 21; Genes & Dev., Vol.16, (8), 948-958, 2002 Apr. 15; Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 99(8), 5515-5520, 2002 Apr. 16; Science, 296(5567), 550-553, 2002 Apr. 19; Proc Natl. Acad. Sci. USA, 99:9, 6047-6052, 2002 Apr. 30; Nature Biotechnology, Vol.20(5), 497-500, 2002 May; Nature Biotechnology, Vol. 20(5), 500-508, 2002 May; Nucleic Acids Res., 30:10, e46, 2002 May 15等)。

本说明书中，“编码具有特异性切割 DNA 转录产物活性的 RNA 的多核苷酸”一般是指酸性核酸。酸性核酸是指具有催化活性的 RNA 分子，通过切割靶 DNA 的转录产物，阻断其基因的功能。酸性核酸的设计可参照各种公知文献（例如参照 FEBS Lett. 228: 228, 1988; FEBS Lett. 239: 285, 1988; Nucl. Acids. Res. 17: 7059, 1989; Nature 323: 349, 1986; Nucl. Acids. Res. 19: 6751, 1991; Protein Eng 3: 733, 1990; Nucl. Acids Res. 19: 3875, 1991; Nucl. Acids Res. 19: 5125, 1991; Biochem Biophys Res Commun 186: 1271, 1992 等）。另外，“编码由共抑制作用抑制 DNA 表达的 RNA 的多核苷酸”，是指通过“共抑制”，阻断靶 DNA 功能的核苷酸。

本说明书中，“共抑制”是指细胞中通过由转化导入与内源性靶基因具有同一或类似序列的基因，导入的外源基因及内源性靶基因的表达均被抑制的现象。具有共抑制作用的多核苷酸的设计，可参照种种公知文献（例如，参照 Smyth DR: Curr. Biol. 7: R793, 1997、Martienssen R: Curr. Biol. 6: 810, 1996 等）。

2. 本发明的蛋白质

本发明也提供由上述多核苷酸 (a) ~ (i) 中任一个编码的蛋白质。本发明的优选蛋白质，是由序列号：2 中的氨基酸序列中 1 个或多个氨基酸缺失、取代、插入及 / 或附加了的氨基酸序列组成的，且具有醇乙酰转移酶活性的蛋白质。

此种蛋白质，例如，可例举为由序列号 2 的氨基酸序列中上述数量的氨基酸残基缺失、取代、插入及 / 或附加了的氨基酸序列组成的，且具有醇乙酰转移酶活性的蛋白质。且此种蛋白质，可例举为含有与序列号：2 的氨基酸序列具有如上述同源性的氨基酸序列、且具有醇乙酰转移酶活性的蛋白质。

此种蛋白质，可使用《分子克隆》第 3 版、《Current Protocols in Molecular Biology》、“Nuc. Acids. Res., 10, 6487 (1982)”、“Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6409 (1982)”、“Gene, 34, 315 (1985)”、“Nuc. Acids. Res., 13, 4431 (1985)”、“Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488 (1985)”等中所述的定点诱变法获得。

本发明的蛋白质氨基酸序列中等于或大于 1 个的氨基酸残基被缺失、取

代、插入及 / 或附加，是指在同一序列中任意的、且 1 个或多个氨基酸序列的位置上，有 1 个或多个氨基酸残基缺失、取代、插入及 / 或附加之意，缺失、取代、插入及附加中的 2 种或大于 2 种也可同时发生。

以下，举例表示可相互取代的氨基酸残基。同一组中包含的氨基酸残基可相互取代。A 组：亮氨酸、异亮氨酸、正亮氨酸、缬氨酸、正缬氨酸、丙氨酸、2-氨基丁酸、蛋氨酸、邻-甲基丝氨酸 (o-methylserine)、叔丁基甘氨酸 (t-butyl glycine)、叔丁基丙氨酸 (t-butyl alanine)、环己基丙氨酸 (cyclohexyl alanine)；B 组：天冬氨酸、谷氨酸、异天冬氨酸、异谷氨酸 (isoglutamic acid)、2-氨基己二酸、2-氨基辛二酸 (2-aminosuberic acid)；C 组：天冬酰胺、谷氨酰胺；D 组：赖氨酸、精氨酸、鸟氨酸、2, 4-二氨基丁酸、2, 3-二氨基丙酸；E 组：脯氨酸、3-羟基脯氨酸、4-羟基脯氨酸；F 组：丝氨酸、苏氨酸、高丝氨酸；G 组：苯丙氨酸、酪氨酸。

本发明的蛋白质可通过 Fmoc 法 (苄基甲氧基羰基法)、tBoc 法 (叔丁氧基羰基法) 等的化学合成法制造。也可利用 Advanced Chem Tech 公司制、珀金埃尔默 (Perkin Elmer) 公司制、Farumashia 公司制、Protein Technologies Instruments 公司制、Synthecell-Vega 公司制、Perceptive 公司制、岛津制作所公司制等的肽合成机进行化学合成。

3. 本发明的载体及导入了该载体的转化酵母

其次，本发明提供含有上述多核苷酸的载体。本发明的载体含有上述 (a) ~ (i) 中任一项所述的多核苷酸 (DNA) 或上述 (j) ~ (m) 中任一项所述的多核苷酸。本发明的载体通常如下构成，其含有 (x) 在酵母细胞内可转录的启动子；(y) 与该启动子以正向或反向结合的、上述 (a) ~ (i) 中任一项所述的多核苷酸 (DNA)；以及 (z) 含有与 RNA 分子的转录终止及聚腺苷酸化有关的、在酵母中起作用的信号作为构成因子的表达框架。本发明中，后述的酒类 (例如啤酒) 的酿造中，使上述本发明的蛋白质高表达时，为促进上述 (a) ~ (i) 中任一项所述的多核苷酸 (DNA) 的表达，将这些多核苷酸针对该启动子正向导入。后述的酒类 (例如啤酒) 的酿造中，抑制上述本发明的蛋白质表达时，为抑制上述 (a) ~ (i) 中任一项所述的多核苷酸 (DNA) 的表达，将这些多核苷酸针对该启动子反向导入。抑制上述本发明的蛋白质表达时，也可在载体中导入上述 (j) ~ (m) 中任一项所

述的多核苷酸，使其能表达。另外，本发明中，通过破坏上述靶基因（例如DNA），可抑制上述多核苷酸（DNA）的表达或上述蛋白质的表达。基因的破坏，可通过参与靶基因中基因产物表达的区域，例如向编码区域、启动子区域等的内部附加或缺失单一或多个碱基，或使这些区域的全体缺失来进行。此种基因破坏的手法，可参照公知的文献（例如，参照 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 4951（1979）、Methods in Enzymology, 101, 202（1983）、日本特开平 6-253826 号公报等）。

导入酵母时使用的载体，可利用多拷贝型（YEp 型）、单拷贝型（YCp 型）、染色体整合型（YIp 型）中的任一种。例如，YEp 型载体中的 YEp24（J. R. Broach et al., Experimental Manipulation of Gene Expression, Academic Press, New York, 83, 1983）、YCp 型载体中的 YCp50（M. D. Rose et al., gene, 60, 237, 1987）、YIp 型载体中的 YIp5（K. Struhl et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 1035, 1979）均已为人所知，且易获得。

用于调节酵母中基因表达的启动子 / 终止子，如能在酿造用酵母中起作用，同时又不受醪液中成分的影响，可任意组合。例如可利用 3-磷酸甘油醛脱氢酶基因（TDH3）的启动子、3-磷酸甘油酸激酶（PGK1）的启动子等。这些基因已被克隆，例如可通过 M. F. Tuite et al., EMBO J., 1, 603（1982）中详细记载的已知方法很容易地获得。

因酿造用酵母不能利用营养缺陷型标记，所以，转化时使用的选择性标记可利用耐氨基糖苷类抗生素（geneticin）基因（G418r）、耐铜基因（CUP1）（Marin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 337 1984）、耐浅蓝菌素基因（fas2m, PDR4）（分别为猪腰淳嗣等，生化学, 64, 660, 1992; Hussain et al., gene, 101, 149, 1991）等。

如上所述构建的载体被导入宿主酵母。宿主酵母，为可用于酿造的任意的酵母，例如可为啤酒、葡萄酒、清酒等的酿造用酵母等。具体地说，虽可例举为酵母属（*Saccharomyces*）等的酵母，但在本发明中，可使用啤酒酵母例如巴氏酵母（*Saccharomyces pastorianus*）W34/70 等，卡氏酵母（*Saccharomyces carlsbergensis*）NCYC453、NCYC456 等，酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）NBRC1951、NBRC1952、NBRC1953、NBRC1954 等。而且，可使用威士忌酵母，例如酒酵母（*Saccharomyces*

cerevisiae) NCYC90 等;还可使用例如协会葡萄酒用 1 号、同 3 号、同 4 号等的葡萄酒酵母;例如协会酵母、清酒用 7 号、同 9 号等的清酒酵母,但不限于此。本发明中,啤酒酵母例如可优选使用巴氏酵母 (*Saccharomyces pastorianus*)。

酵母的转化方法,可利用一般可使用的公知的方法。例如,可使用电穿孔法“Meth. Enzym., 194, p182 (1990)”、原生质球法(Spheroplast 法)“Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, p1929 (1978)”、醋酸锂法“J.Bacteriology, 153, p163 (1983)”、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, p1929 (1978)、Methods in yeast genetics, 2000 Edition : A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual 等中所述的方法实施,但不限于此。

更具体地说,将宿主酵母置于标准酵母营养培养基(例如 YEPD 培养基“Genetic Engineering. Vol.1, Plenum Press, New York, 117 (1979)”等)中培养,使 OD600nm 时的值为 1~6。将此培养酵母离心分离后收集、洗涤,用浓度约为 1~2M 的碱金属离子、优选锂离子进行预处理。将此细胞在约 30℃ 条件、静置约 60 分钟后,与导入的 DNA (约 1~20μg) 同时在约 30℃ 条件、静置约 60 分钟。加入聚乙二醇,优选加入约 4,000 道尔顿(Dalton)的聚乙二醇,使最终浓度约为 20%~50%。在约 30℃、静置约 30 分钟后,将此细胞在约 42℃ 条件、加热处理约 5 分钟。优选将此细胞悬浮液用标准酵母营养培养基洗涤后,放入所定量的新鲜标准酵母营养培养基中,约 30℃、静置约 60 分钟。之后,移植到含有作为选择性标记使用的抗生素等的标准琼脂培养基中,获得转化体。

其他有关一般性的克隆技术,可参照(《分子克隆》第 3 版)、“Methods in Yeast Genetics, A laboratory manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY)”等。

4. 本发明的酒类制造方法及根据该制法获得的酒类

将上述本发明的载体导入适合酿造需制造酒类的酵母中,并可通过使用该酵母,制造所需要的、且增加了酯含量、增加了香味的酒类。另外,通过下述本发明的酵母评价方法选择的酵母也可同样使用。作为制造对象酒类并不限于此,例如可列举为啤酒、发泡酒等的啤酒味饮料,葡萄酒、威士忌、清酒等。本发明中,根据需要可通过使用抑制靶基因表达的酿造用酵母,制

造使所需酒类的酯含量降低了的酒类。即使用导入了上述本发明的载体的酵母、抑制了上述本发明多核苷酸（DNA）表达的酵母或根据下述本发明的酵母的评价方法选择的酵母，进行用于酒类制造的发酵，可通过调节（增加或减低）酯生成量，制造所需的、且调节（增加或减低）了酯含量的酒类。

制造上述酒类时，除使用本发明中所得到的酿造酵母代替亲株以外，可利用公知的手法。因此，原料、制造设备、制造管理等可与以往完全相同，不会为制造控制了酯含量的酒类而增加成本。即，根据本发明，可在使用已有设施、不增加成本的情况下，制造出香味优异的酒类。

5. 本发明的酵母的评价方法

本发明涉及使用根据具有序列号：1 碱基序列的醇乙酰转移酶基因碱基序列设计的引物或探针，评价被检酵母的酯生成能力的方法。此种评价方法的一般手法为公知，例如，如W O 01 / 040514 号公报、日本特开平 8—205900 号公报等的记载。以下，就此评价方法进行简单说明。

首先，制备被检酵母的基因组。制备方法可使用 Hereford 法、醋酸钾法等公知的任何方法 [例如，Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press, p130 (1990)]。以所得到的基因组为对象，使用根据醇乙酰转移酶基因的碱基序列（优选 ORF 序列）设计的引物或探针，测定被检酵母的基因组中是否存在其基因或其基因的特异性序列。引物或探针的设计可使用公知的手法进行。

基因或特异性序列的检测，可使用公知的手法进行。例如，将含有包含特异性序列的一部分或全部的多核苷酸或其碱基序列的互补碱基序列的多核苷酸作为一个引物使用，另一个引物使用含有包含此序列的上游或下游序列的一部分或全部的多核苷酸或其碱基序列的互补碱基序列的多核苷酸，通过 PCR 法扩增酵母的核酸，并测定扩增物的有无、扩增物分子量的大小等。用于引物的多核苷酸的碱基数通常为等于或大于 10bp，优选为 15~25bp。另外，夹在两引物间的碱基数，通常为 300 ~2000bp 较适当。

PCR 法的反应条件无特别限定，例如，可使用变性温度：90~95℃、退火温度：40~60℃、延伸温度：60~75℃、循环数：等于或大于 10 次等的条件。所得到的反应生成物可使用琼脂糖凝胶等的电泳法等分离，测定扩增产物的分子量。根据此方法，通过扩增产物的分子量是否含有特异部分的

DNA 分子的大小,来预测·评价其酵母的酯生成能力。另外,通过分析扩增物的碱基序列,可进一步更正确地预测·评价上述性能。

本发明中,可通过培养被检酵母,测定具有序列号:1 碱基序列的醇乙酰转移酶基因的表达量,评价被检酵母的酯的生成能力。此时,可通过培养被检酵母,对醇乙酰转移酶基因的产物 mRNA 或蛋白质定量进行。mRNA 或蛋白质的定量,可使用公知的手法。mRNA 的定量例如可通过 Northern 杂交法、定量 RT-PCR 等,蛋白质的定量例如可通过 Western 印迹法进行 (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons 1994-2003)。

另外,通过培养被检酵母,测定具有序列号:1 碱基序列的醇乙酰转移酶基因的表达量,选择与目标酯生成能力相应的前述基因表达量的被检酵母,可选择适合所需酒类酿造的酵母。也可培养标准酵母及被检酵母,测定各酵母中前述基因的表达量,比较标准酵母和被检酵母的前述基因的表达量,以选择所需的酵母。具体地说,例如,可通过培养标准酵母及被检酵母,测定具有序列号:1 碱基序列的醇乙酰转移酶基因的各酵母中的表达量,选择该基因比标准酵母高表达或低表达的被检酵母,来选择适合所需酒类酿造的酵母。

或者,可通过培养被检酵母,选择酯生成能力高或低的、或醇乙酰转移酶活性高或低的酵母,以选择适合所需酒类酿造的被检酵母。此时,被检酵母或标准酵母,例如可使用上述导入了本发明载体的酵母、抑制了上述本发明的多核苷酸 (DNA) 表达的酵母、实施了突变处理的酵母、自发突变的酵母等。酯生成能力,可使用 (J. Am. Soc. Brew. Chem.49:152-157,1991) 中所述的方法测定,醇乙酰转移酶活性,可使用 (日本特开平 6-253826) 中所述的方法测定。突变处理,例如可使用紫外线照射、放射线照射等的物理方法,通过甲磺酸乙酯 (EMS: Ethylmethanesulfonate)、甲基硝基亚硝基胍 (N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine) 等药剂处理的化学方法等的任何方法进行 (例如,参照大岛泰治编著、生物化学实验法 39 酵母分子遗传学实验法、p 67-75、学会出版中心等)。

另外,可作为标准酵母、被检酵母使用的酵母,可例举为酿造时可使用的任意的酵母,例如啤酒、葡萄酒、清酒等的酿造用酵母等。具体地说,可例举为酵母属 (*Saccharomyces*) 等的酵母,在本发明中,可使用啤酒酵母例

如巴氏酵母 (*Saccharomyces pastorianus*) W34/70 等, 卡氏酵母 (*Saccharomyces carlsbergensis*) NCYC453、NCYC456 等, 酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) NBRC1951、NBRC1952、NBRC1953、NBRC1954 等。而且还可使用例如协会葡萄酒用 1 号、同 3 号、同 4 号等的葡萄酒酵母; 例如协会酵母、清酒用 7 号、同 9 号等的清酒酵母, 但不限于此。本发明中, 啤酒酵母例如可优选使用巴氏酵母 (*Saccharomyces pastorianus*)。标准酵母、被检酵母可从上述酵母中以任意组合选择。

实施例

以下, 通过实施例详细叙述本发明, 但本发明不限于以下实施例。

实施例 1: 新型醇乙酰转移酶基因 (nonScATF2) 的克隆

使用日本特开 2004-283169 号公报中记载的比较数据库检索的结果, 发现了啤酒酵母中特有的新型醇乙酰转移酶基因 nonScATF2 (序列号: 1)。以所得到的碱基序列信息为基础, 设计用于扩增各自全长基因的引物 nonScATF2_for (序列号: 3) / nonScATF2_rv (序列号: 4), 以基因组解读株 巴氏酵母 (*Saccharomyces pastorianus* Weihenstephaner) 34/70 株 (可简称为“W34/70 株”) 的染色体 DNA 为模板, 通过 PCR, 获得了含有 nonScATF2 基因片段 (约 1.6kb)。

将如上所述得到的 nonScATF2 基因片段通过 TA 克隆插入到 pCR2.1-TOPO 载体 (Invitrogen 公司制)。将 nonScATF2 基因的碱基序列用 Sanger 方法 (F. Sanger, Science, 214, 1215, 1981) 进行分析, 以确认碱基序列。

实施例 2: 啤酒试验酿造中 nonScATF2 基因表达分析

使用啤酒酵母巴氏酵母 (*Saccharomyces pastorianus*) W34/70 株进行啤酒试验酿造, 将从发酵中的啤酒酵母菌体中提取的 mRNA 用啤酒酵母 DNA 微阵列检测。

麦汁浸出物浓度	12.69%
麦汁容量	70L
麦汁溶解氧浓度	8.6ppm

发酵温度	15℃
酵母投入量	12.8×10^6 cells/mL

对发酵液经时抽样，观察酵母增殖量（图1）、表观浸出物浓度（图2）的经时变化。与此同时对酵母菌体抽样，对制备后的 mRNA 进行生物素标记，使其在啤酒酵母 DNA 微阵列杂交。信号检测使用 GCOS;GeneChip Operating Software 1.0（AFFYMETRIX 公司制）进行。nonScATF2 基因表达模式如图3所示。由此结果，可确认通常的啤酒发酵中 nonScATF2 基因进行了表达。

实施例 3: nonScATF2 基因高表达株的制备

将实施例 1 中所述的 nonScATF2/pCR2.1-TOPO 用限制性内切酶 SacI 及 NotI 进行酶切，制备包含蛋白质编码区域全长的 DNA 片段。使此片段与用限制性内切酶 SacI 及 NotI 处理的 pYCGPYNot 连接，构建了 nonScATF2 高表达载体 nonScATF2/pYCGPYNot。pYCGPYNot 是 YCp 型的酵母表达载体，导入的基因通过丙酮酸激酶基因 PYK1 的启动子高表达。酵母中的选择性标记包含耐氨基糖苷类抗生素（Geneticin）基因 G418^r，大肠杆菌中的选择性标记包含氨苄青霉素抗性基因 Amp^r。

使用由上述方法制备的高表达载体，用日本特开平 07-303475 中所述的方法，转化 巴氏酵母（*Saccharomyces pastorianus* Weihenstephaner）W34/70-2Δe 株。用含有氨基糖苷类抗生素 300mg/L 的 YPD 平板培养基（1% 酵母浸出物、2% 聚蛋白胨、2% 葡萄糖、2% 琼脂）选择转化体。

还有，W34/70-2Δe 株是破坏编码巴氏酵母（*Saccharomyces pastorianus* Weihenstephaner）W34/70 孢子克隆 W34/70-2 株在啤酒酵母中特征性的酯酶 non-ScEht1p 的基因 non-ScEHT1 的菌株。nonScEHT1 基因的破坏，按照文献（Goldstein et al., yeast. 15 1541（1999））的方法，以含有抗药性标记的质粒（pFA6a（G418^r）, pAG25（nat1）, pAG32（hph））为模板，通过 PCR，制备了基因破坏用片段。作为 PCR 用的引物，使用 nonScEHT1_delta_for（序列号：7）、nonScEHT1_delta_rv（序列号：8）。用上述方法制备的基因破坏用片段，转化从啤酒酵母巴氏酵母（*Saccharomyces pastorianus*）W34/70 株分离的孢子克隆株（W34/70-2）。用日本特开平 07-303475 号公报中所述的方法进行转化，用含有氨基糖苷类

抗生素（Geneticin）300mg/L 或诺尔丝菌素 50mg/L 或潮霉素 B（Hygromycin B）200mg/L 的 YPD 平板培养基（1%酵母浸出物、2%聚蛋白胨、2%葡萄糖、2%琼脂）选择转化体。

实施例 4：啤酒试验酿造中酯生成量的解析

使用亲株及用实施例 3 得到的 nonScATF2 高表达株，通过以下条件进行了发酵试验。

麦汁浸出物浓度	12%
麦汁容量	1L
麦汁溶解氧浓度	9.5ppm
发酵温度	15℃
酵母投入量	5g / L

对发酵醪液经时抽样，观察酵母增殖量（OD660）（图 4）、浸出物消耗量（图 5）的经时变化。对发酵终止时高级醇及酯浓度的定量使用顶空气相色谱法（J. Am. Soc. Brew. Chem.49:152-157,1991）进行。

根据表 1，发酵结束时乙酸乙酯的生成量对于亲株的 33.0ppm，nonScATF2 高表达株为 37.0ppm。乙酸异戊酯生成量对于亲株的 2.9ppm，nonScATF2 高表达株为 3.8ppm。由上述结果可知，由于 nonScATF2 高表达，乙酸乙酯及乙酸异戊酯的生成量约增加了 12-31%。

表 1

	亲株	nonSc ATF2 高表达株	
乙酸乙酯	33.0	37.0	(112%)
乙酸异戊酯	2.9	3.8	(131%)
单位 : ppm			
() 内的值表示与亲株的相对值			

实施例 5：nonScATF2 基因的破坏

按照文献（Goldstein et al., yeast.15 1541（1999））的方法，以含有抗药性标记的质粒 [pFA6a（G418r）, pAG25（nat1）, pAG32（hph）] 为

模板，通过 PCR，制备了基因破坏用片段。作为 PCR 用的引物，使用 nonScATF2_delta_for（序列号：5）、nonScATF2_delta_rv（序列号：6）。

用上述方法制备的基因破坏用片段，转化啤酒酵母巴氏酵母（*Saccharomyces pastorianus*）W34/70 株、或转化从 W34/70 分离的孢子克隆株（W34/70-2）。转化是用日本特开平 07-303475 中所述的方法进行的，用含有氨基糖苷类抗生素（Geneticin）300mg/L 或诺尔丝菌素 50mg/L 或潮霉素 B（Hygromycin B）200mg/L 的 YPD 平板培养基（1%酵母浸出物、2%聚蛋白胨、2%葡萄糖、2%琼脂）选择转化体。

实施例 6：啤酒试验酿造中酯生成量的解析

使用亲株及用实施例 5 得到的 nonScATF2 破坏株按以下条件进行发酵试验。

麦汁浸出物浓度	12%
麦汁容量	1L
麦汁溶解氧浓度	10ppm
发酵温度	15℃
酵母投入量	5g / L

对发酵醪液经时抽样，观察酵母增殖量（OD660）、浸出物消耗量的经时变化。对发酵终止时酯浓度的定量，使用顶空气相色谱法，按照 J. Am. Soc. Brew. Chem.49:152-157,1991 中所述的方法进行。

因根据本发明的酒类制造法可增大赋予产品馥郁香味的酯含量，所以，可制造出香味优异的酒类。另外，因可在不喜好过量酯的啤酒等的麦芽饮料中减少酯含量，所以，可制造出香味更优异的酒类。

本申请主张日本专利申请第 2005-266068（2005 年 9 月 13 日申请）及日本专利申请第 2006-200892 号（2006 年 7 月 24 日申请）的优先权，其申请的记载全部纳入本申请。另外，其他全部引用的文献中记载的也全部纳入本申请。

序列表 (SEQUENCE LISTING)

<110> 三得利株式会社 (Suntory Limited)

<120> 醇乙酰转移酶基因及其用途

Alcohol acetyl transferase gene and use thereof

<130> G06-0065CN

<150> JP2005-266068

<151> 2005-09-13

<150> JP2006-200892

<151> 2006-07-24

<160> 8

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 1638

<212> DNA

<213> 酵母 (Yeast)

<400> 1

atggatagtt tagaggaata cgaaccgcac gttacgcaag agctgatcga tcgtggccat 60

gcaaggcgca tgggccatit ggaaaactat tttgctgttt tgcgtaggca aaacatgtat 120

tcgaatttcg ctgtttatgg ggaactgaat aaggccgtta gcaagagaca actgagactt 180

gccttgaggt tattgcttct aaagtatcca attctttcgc atacaattgt tccccaaaaa 240

taccctaacc acgaagcgta ttatctcagt caggaatatc tgaataagcc gtttcctcag 300

catgatttta tcaaggttat acctcaccta gaactggagg atttaatcat gaacagtcaa	360
tcagaatata gggaagtcac cggcaaaatt tcggaacaat ataagaatga taattttaaa	420
gtcacgagta gcttaatcga attagtcgct cctataatcg taccggcatg tgacccggaa	480
aggccaatt ggaggcttat ttgtttacct agtagggata ctagcgcggg cgaggcgtgg	540
accaacttcg tttatgtcag taaccattgc ggctccgatg gtattagtgg aacgaatfff	600
tttcaggatt tgactgcttt actctctacg atcgaggaga acgggttcga ctatgaggag	660
gagatcgtgg ataacaacgt catcatcgac tataacgaag atcacaaga aatctcgaag	720
cttcgatct ccatcacaga ccgtattgac tataagccta gattgacgtc gctacctaaa	780
ttctttctga agaacatcgt gtctgagtat tgtgagttca gaacttcaa tgagtcgaca	840
gtcacttcca ggtactctcc ctctctaat gcaaatgcag gtttcaacca tctgttgcac	900
ttcagtgcg aagatacaca acaaattagg tcggaaatta aaaaaaagt tcatgctgga	960
tgtaccataa cgcccttcat tcaagcctgc tttttcgtag ctttatatag acacgataaa	1020
gttttcacca agtccttct tgaatatggg ttcgacgtgg cctcccaag tagcacaaga	1080
agattcttac caaacgacga agagctaaga gactcctaca aatacggcgc aaacgttggt	1140
ggttcacatt acacctatff gatctcctct tttaacgtcc ccgagggcga cgccaacaag	1200
ttctggcgtc tcgtcgagta ctaccacgac tgctttctaa agtcgtacga taacggagac	1260
cacttgatcg gcttgggcac actacaacta gacttcatcg ttcaaaaca gaacgtggac	1320

caaattatattt ccaccaccta cttggaccac caaagaggcg gtgcatcat cagcaacaca 1380

gggtttgtca ggcaagatac gaccaagccg tactacgcc gcgacctaatt attctcacag 1440

tctgcaggcg ccttgagatt tgcgtttggc ctaaactgt gctccacaaa cgttggtggt 1500

atgaacatgg acatgagcgt agttcagggc actctacgga atcggggcga atgggagtcg 1560

ttctgcgacg ttttctacca cgccatcggc gaatttgcgt cgcttgatg cgatactgcc 1620

gtcgcgggtc tcgtatag 1638

<210> 2

<211> 545

<212> PRT

<213> 酵母 (Yeast)

<400> 2

Met Asp Ser Leu Glu Glu Tyr Glu Pro His Val Thr Gln Glu Leu Ile

1 5 10 15

Asp Arg Gly His Ala Arg Arg Met Gly His Leu Glu Asn Tyr Phe Ala

20 25 30

Val Leu Arg Arg Gln Asn Met Tyr Ser Asn Phe Ala Val Tyr Gly Glu

35 40 45

Leu Asn Lys Ala Val Ser Lys Arg Gln Leu Arg Leu Ala Leu Arg Leu

50 55 60

Leu Leu Leu Lys Tyr Pro Ile Leu Ser His Thr Ile Val Pro Lys Lys
65 70 75 80

Tyr Pro Asn His Glu Ala Tyr Tyr Leu Ser Gln Glu Tyr Leu Asn Lys
85 90 95

Pro Phe Pro Gln His Asp Phe Ile Lys Val Ile Pro His Leu Glu Leu
100 105 110

Glu Asp Leu Ile Met Asn Ser Gln Ser Glu Tyr Arg Glu Val Ile Gly
115 120 125

Lys Ile Ser Glu Gln Tyr Lys Asn Asp Asn Phe Lys Val Thr Ser Ser
130 135 140

Leu Ile Glu Leu Val Ala Pro Ile Ile Val Pro Ala Cys Asp Pro Glu
145 150 155 160

Arg Pro Asn Trp Arg Leu Ile Cys Leu Pro Ser Arg Asp Thr Ser Ala
165 170 175

Gly Glu Ala Trp Thr Asn Phe Val Tyr Val Ser Asn His Cys Gly Ser
180 185 190

Asp Gly Ile Ser Gly Thr Asn Phe Phe Gln Asp Leu Thr Ala Leu Leu
195 200 205

Ser Thr Ile Glu Glu Asn Gly Phe Asp Tyr Glu Glu Glu Ile Val Asp
210 215 220

Asn Asn Val Ile Ile Asp Tyr Asn Glu Asp His Lys Glu Ile Ser Lys
225 230 235 240

Leu Pro Ile Ser Ile Thr Asp Arg Ile Asp Tyr Lys Pro Arg Leu Thr
245 250 255

Ser Leu Pro Lys Phe Phe Leu Lys Asn Ile Val Ser Glu Tyr Cys Glu
260 265 270

Phe Arg Thr Ser Asn Glu Ser Thr Val Thr Ser Arg Tyr Ser Pro Ser
275 280 285

Ser Asn Ala Asn Ala Gly Phe Asn His Leu Leu His Phe Ser Ala Glu
290 295 300

Asp Thr Gln Gln Ile Arg Ser Glu Ile Lys Lys Lys Val His Ala Gly
305 310 315 320

Cys Thr Ile Thr Pro Phe Ile Gln Ala Cys Phe Phe Val Ala Leu Tyr
325 330 335

Arg His Asp Lys Val Phe Thr Lys Ser Phe Leu Glu Tyr Gly Phe Asp
340 345 350

Val Ala Leu Pro Ser Ser Thr Arg Arg Phe Leu Pro Asn Asp Glu Glu
355 360 365

Leu Arg Asp Ser Tyr Lys Tyr Gly Ala Asn Val Gly Gly Ser His Tyr
370 375 380

Thr Tyr Leu Ile Ser Ser Phe Asn Val Pro Glu Gly Asp Ala Asn Lys
385 390 395 400

Phe Trp Arg Leu Val Glu Tyr Tyr His Asp Cys Phe Leu Lys Ser Tyr
405 410 415

Asp Asn Gly Asp His Leu Ile Gly Leu Gly Thr Leu Gln Leu Asp Phe
420 425 430

Ile Val Gln Asn Lys Asn Val Asp Gln Ile Ile Ser Thr Thr Tyr Leu
435 440 445

Asp His Gln Arg Gly Gly Ala Ile Ile Ser Asn Thr Gly Phe Val Arg
450 455 460

Gln Asp Thr Thr Lys Pro Tyr Tyr Ala Arg Asp Leu Ile Phe Ser Gln
465 470 475 480

Ser Ala Gly Ala Leu Arg Phe Ala Phe Gly Leu Asn Val Cys Ser Thr
485 490 495

Asn Val Gly Gly Met Asn Met Asp Met Ser Val Val Gln Gly Thr Leu
500 505 510

Arg Asn Arg Gly Glu Trp Glu Ser Phe Cys Asp Val Phe Tyr His Ala
515 520 525

Ile Gly Glu Phe Ala Ser Leu Gly Cys Asp Thr Ala Val Ala Gly Leu
530 535 540

Val
545

<210> 3
<211> 40
<212> DNA
<213>人工序列 (Artificial)

<220>
<223> nonScATF2_for

<400> 3
gagctcatag cggccatgga tagtttagag gaatacgaac

<210> 4

<211> 42

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial)

<220>

<223> nonScATF2_rv

<400> 4

ggatcctatg cggccgcacc gaccgagagc agccacggca tg

42

<210> 5

<211> 70

<212> DNA

<213>人工序列 (Artificial)

<220>

<223> nonScATF2_delta_for

<400> 5

ttaagatcta caaacgaaca ataggatcaa gaacagaaaa ctgcagtga cttgacagt 60

cttgacgtgc

70

<210> 6

<211> 70

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial)

<220>

<223> nonScATF2_delta_rv

<400> 6

tatcagctct gtcgatata ccgcctatct gctgtacgag ccggtccgag cgcacttaac 60

ttcgcatctg 70

<210> 7

<211> 70

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial)

<220>

<223> nonScEHT1_delta_for

<400> 7

ggccggggaa gtaatagtc cttcgaagat ttcccttact atttaacagt ccttgacagt 60

cttgacgtgc 70

<210> 8

<211> 70

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial)

<220>

<223> nonScEHT1_delta _rv

<400> 8

cttctgttgt atacatacat aagaatggct aggaaaagaa ccatataaca cgcacttaac 60

ttcgcatctg 70

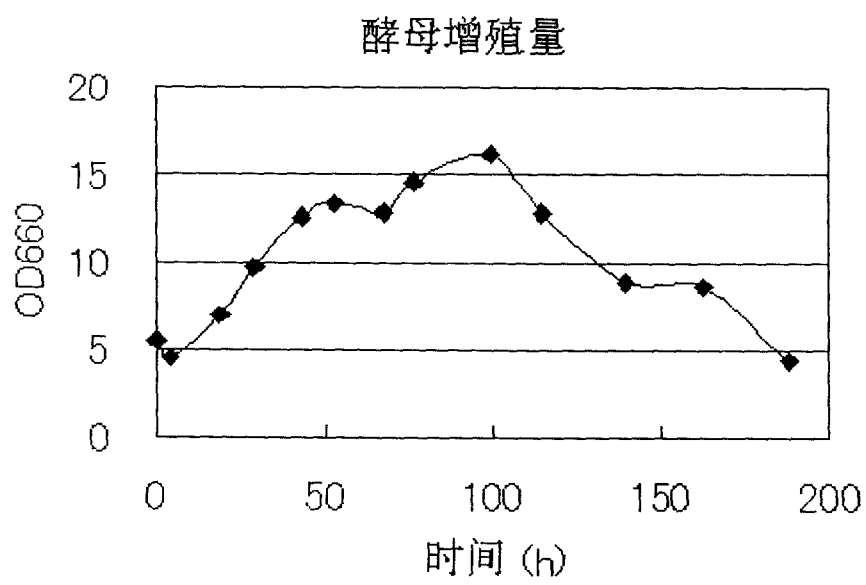


图 1

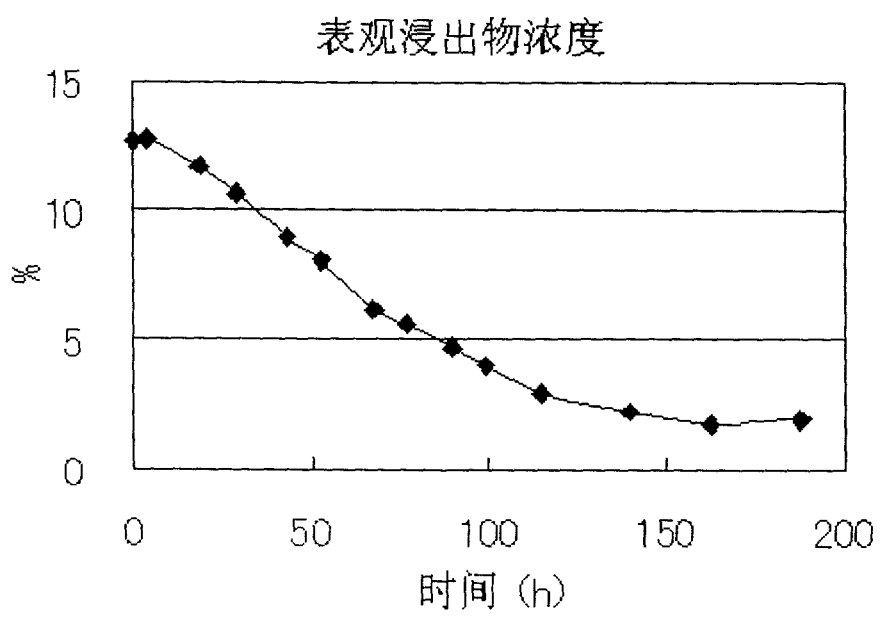


图 2

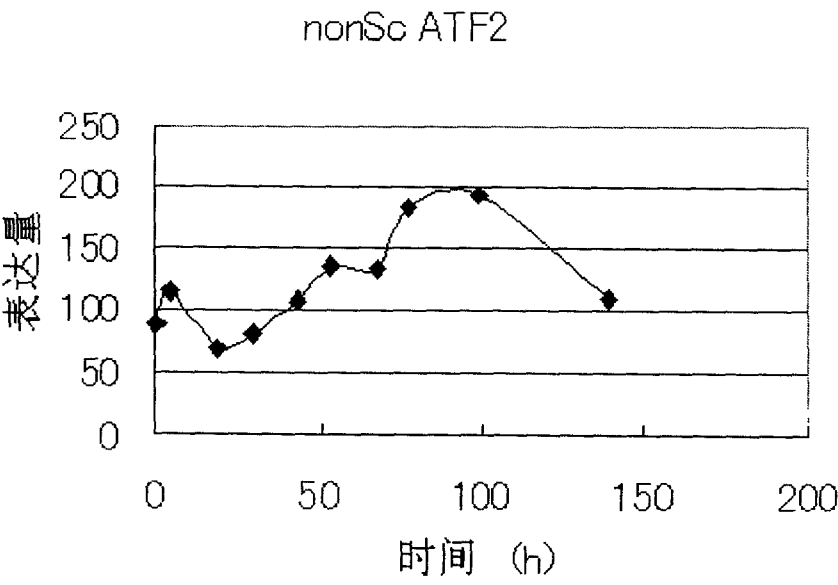


图 3

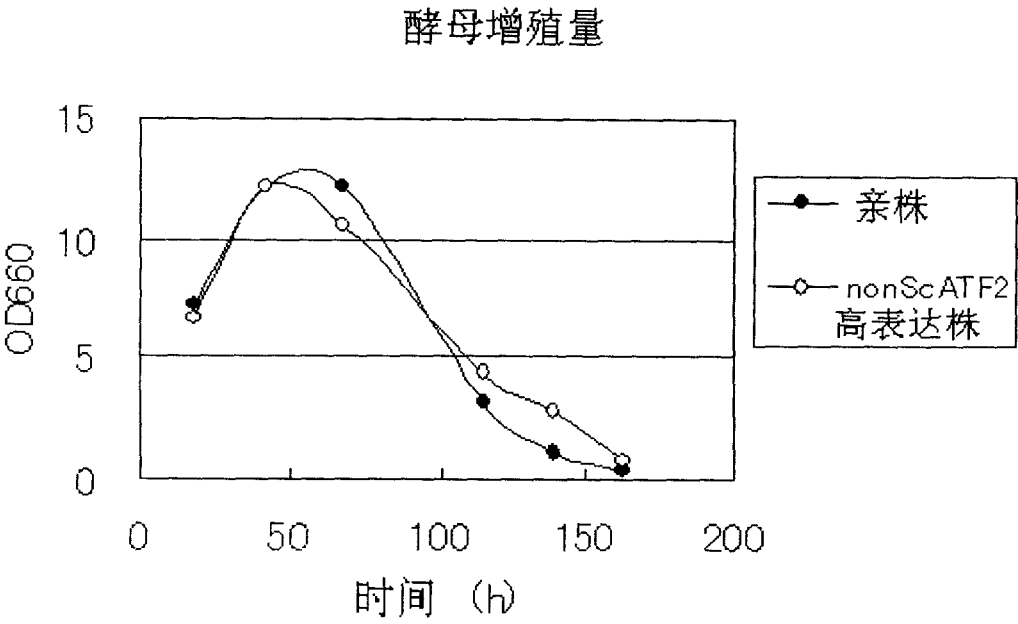


图 4

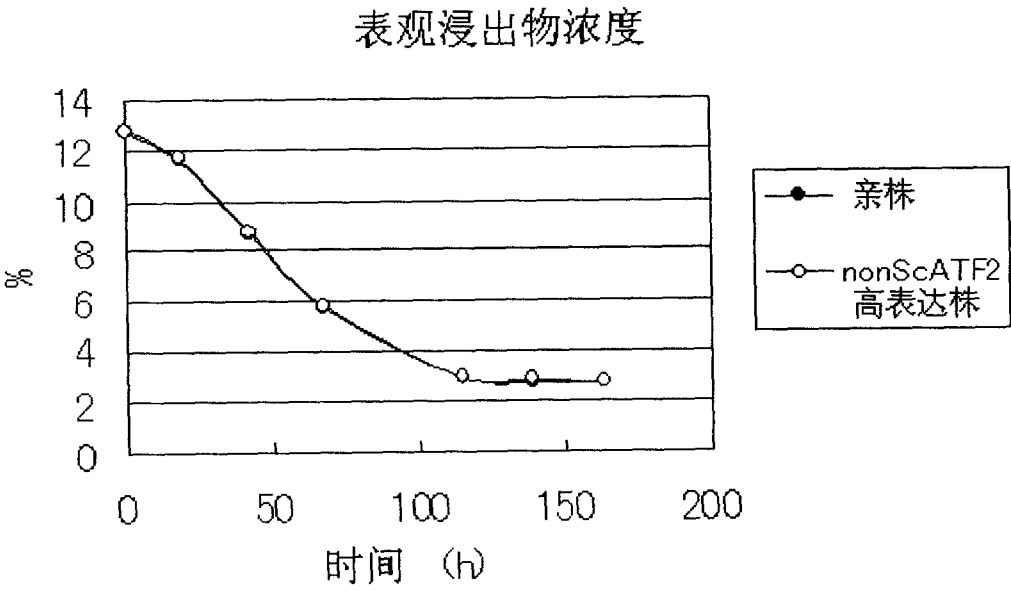


图 5