

(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2010-183887

(P2010-183887A)

(43) 公開日 平成22年8月26日(2010.8.26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N</b> 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19 Z N A	4 B O 2 4
<b>A 2 1 D</b> 8/04 (2006.01)	A 2 1 D 8/04	4 B O 3 2
<b>C 1 2 N</b> 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 6 5

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願2009-31277 (P2009-31277)	(71) 出願人	504143441 国立大学法人 奈良先端科学技術大学院大学 奈良県生駒市高山町8916-5
(22) 出願日	平成21年2月13日 (2009.2.13)	(74) 代理人	100081422 弁理士 田中 光雄
		(74) 代理人	100084146 弁理士 山崎 宏
		(74) 代理人	100106518 弁理士 松谷 道子
		(74) 代理人	100127638 弁理士 志賀 美苗
		(74) 代理人	100138911 弁理士 櫻井 陽子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ドライイースト製造用組成物

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】ドライイーストの製造に適した、高温・乾燥ストレスに対してより耐性の強いパン酵母を含む組成物、および該パン酵母を用いた耐久性の高いドライイーストの製造方法を提供。

【解決手段】特定配列に示される野生型M p r 1アセチルトランスフェラーゼ、あるいは、該配列に示される野生型M p r 1アセチルトランスフェラーゼのアミノ酸配列の、L y s 6 3がA r gに置換された、または、P h e 6 5がL e uに置換された、変異型アセチルトランスフェラーゼM p r 1のいずれかをコードする遺伝子を含むパン酵母を含む、ドライイースト製造用組成物。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

配列番号 1 に示される野生型 M p r 1 アセチルトランスフェラーゼ、あるいは、配列番号 1 に示される野生型 M p r 1 アセチルトランスフェラーゼのアミノ酸配列の、L y s 6 3 が A r g に置換された、または、P h e 6 5 が L e u に置換された、変異型アセチルトランスフェラーゼ M p r 1 のいずれかをコードする遺伝子を含むパン酵母を含む、ドライイースト製造用組成物。

## 【請求項 2】

配列番号 1 に示される野生型 M p r 1 アセチルトランスフェラーゼのアミノ酸配列の、L y s 6 3 が A r g に置換された、または、P h e 6 5 が L e u に置換された、変異型アセチルトランスフェラーゼ M p r 1 のいずれかをコードする遺伝子を含むパン酵母を含む、ドライイースト製造用組成物。

10

## 【請求項 3】

パン酵母が二倍体である請求項 1 または 2 に記載のドライイースト製造用組成物。

## 【請求項 4】

パン酵母が、野生型 グルタミン酸リン酸化酵素遺伝子の A s p 1 5 4 位が A s n で置換されてなるプロリン多産性型酵母である、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載のドライイースト製造用組成物。

## 【請求項 5】

請求項 1 ~ 4 のいずれかのドライイースト製造用組成物を用いることを含む、ドライイーストの製造方法。

20

## 【請求項 6】

請求項 5 の方法により製造されたドライイースト。

## 【請求項 7】

請求項 6 のドライイーストを用いることを含む、パン生地の製造方法。

## 【請求項 8】

パン生地が冷凍パン生地である。請求項 7 の製造方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

30

本発明は、乾燥ストレスに対する耐性の高いパン酵母を含む、ドライイースト製造用組成物に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

パン酵母、サッカロミセス・セレビスエ(Saccharomyces cerevisiae)は、パン製造の際に、乾燥、高温、高浸透圧および凍結乾燥などの多くの環境ストレスに曝されている(非特許文献 1)。近年、ドライイーストが、生イーストよりも長い貯蔵期間および低い輸送コストのために、パン製造に用いられるようになってきている。ドライイーストはその製造の際に特に風乾ストレスに曝される。風乾ストレスは、例えば、誤って折りたたまれたタンパク質の蓄積(非特許文献 2)、ミトコンドリアの機能不全および液胞の酸性化(非特許文献 3)などの多くの有害な影響を及ぼし、酵母の発酵能を低下させる。それゆえ、高い風乾ストレス耐性を示す酵母株が求められている。

40

## 【0003】

ドライイースト製造に際して、熱風の流れが風乾ストレスをもたらす。酵母細胞の温度はおよそ 37 となる。風乾ストレスは高温ストレスと乾燥ストレスとの組合せであると考えられる。

## 【0004】

本発明者らは以前に N-アセチルトランスフェラーゼ M p r 1 が、酵母を、熱ショック、過酸化水素処理、エタノール、および低温などの酸化ストレスから防御していることを見いだした(非特許文献 4、5、6)。

50

## 【0005】

本発明者が先に酵母サッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 1278b系統株に見いだしたMpr1 (非特許文献7) はアミノ酸プロリンの毒性アナログであるアゼチジン - 2 - カルボン酸 (AZC) をアセチル化して解毒する、N - アセチルトランスフェラーゼ (Mpr1) をコードしている (図1) (非特許文献8)。

## 【0006】

AZCはプロリンのパーミアーゼによって細胞内に入り、タンパク質合成の際にプロリンと競合して取り込まれる。その結果、構造が異常になり、機能を失ったタンパク質が蓄積し、生育が阻害される。Mpr1を発現する細胞ではAZCは細胞質でNアセチル化され、新生タンパク質に取り込まれないため、AZC耐性を獲得すると考えられる (非特許文献9)。

10

## 【0007】

一方、本発明者らはアミノ酸の1つであるプロリンが、冷凍や乾燥・酸化等のストレスから酵母を防御する性質を有することを見出している (特許文献1)。さらに本発明者らは遺伝子工学的手法によって、プロリン分解酵素をコードする遺伝子を破壊した酵母株が細胞にプロリンを蓄積することでエタノール耐性となることを見出している (特許文献2)。

## 【0008】

また、本発明者らは、酵素機能や熱安定性が野生型酵素よりも向上し、酸化ストレスに対する耐性が上昇した2つの変異型Mpr1 (K63RおよびF65L) を単離している (特許文献3)。

20

## 【0009】

実験室用のサッカロミセス (*Saccharomyces*) 株である、1278b株はMPR遺伝子を2コピー有しているが (MPR1およびMPR2、MPR1とMPR2の唯一の塩基の相違により、Mpr1およびMpr2タンパク質のアミノ酸85位が相違している)、全ゲノムが最初に配列決定された株であるS288C株はMPR遺伝子を有していない。工業用株においては、パン酵母はMPR1遺伝子に相同的な配列を有することがPCR分析によって示されているが、正確なコピー数は決定されていない。

## 【0010】

ドライイーストの製造を行なうには優れた乾燥耐性を備えた実用パン酵母株が必要である。しかし、従来の乾燥耐性パン酵母については、多種類のパン生地に対応でき、かつ優れた発酵特性を有する菌株がなかった。また、特許文献3の酵母では、変異株の生存率が10倍に増加しているが、実際の生存率は0.1%から1%への変化であり非常に低い。また、乾燥ストレスが実験室レベルでの試験であり、実際のドライイースト製造条件とは乖離しており、現実的ではない。

30

## 【先行技術文献】

## 【特許文献】

## 【0011】

【特許文献1】特開平9 - 234058号公報

【特許文献2】特開2006 - 67806号公報

40

【特許文献3】国際公開2008 / 007475号公報

## 【非特許文献】

## 【0012】

【非特許文献1】*Nat. Biotechnol.* 15:1351-1357 (1997)

【非特許文献2】*J. Biosci. Bioeng.* 106:405-408 (2008)

【非特許文献3】*Yeast* 25:179-190 (2008)

【非特許文献4】*Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75:1343-1351 (2007)

【非特許文献5】*J. Biochem.* 138:391-397 (2005)

【非特許文献6】*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101:12616-12621 (2004)

【非特許文献7】*J. Bacteriol.* 182:4249-4256 (2000)

50

【非特許文献 8】J. Biol. Chem. 276:1998-42002 (2001)

【非特許文献 9】Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100:11505-11510 (2003)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

したがって、本発明はドライイーストの製造に適した、高温・乾燥ストレスに対してより耐性の強いパン酵母を含む組成物、および該パン酵母を用いた耐久性の高いドライイーストの製造方法を提供することを目的とする。より具体的には、本発明は、遺伝子組換え（セルフクロニング）により、変異型 M p r 1 を効率良く発現させた形質転換パン酵母、特に乾燥、高温に対する優れた耐性を有するパン酵母を含む組成物、および該組成物を用いた耐久性の改善されたドライイーストの製造方法を提供する。

10

【課題を解決するための手段】

【0014】

本発明者らは、このたび、実用パン酵母二倍体において変異型 M p r 1 を発現させ、各種ストレス処理後の CO<sub>2</sub> 発生量を測定し、ストレス耐性を評価した。ゲノム上の野生型 M p r 1 遺伝子を変異型遺伝子（K 6 3 R、F 6 5 L）に置換した二倍体株を作製した。作製した変異型 M p r 1 発現株は、乾燥ストレス処理後の CO<sub>2</sub> 発生量が野生型と比較して約 1.5-1.8 倍増加していた。さらに、細胞保護作用を示すプロリンを蓄積するパン酵母においても、変異型 M p r 1 の発現により乾燥ストレス耐性の向上を確認した。さらに、本発明者らは、パン酵母において M p r 1 破壊株を作成することにより、M p r 1 が発酵能に寄与していることも明らかにした。

20

【0015】

即ち、本発明は、配列番号 1 に示される野生型 M p r 1 アセチルトランスフェラーゼ、あるいは、配列番号 1 に示される野生型 M p r 1 アセチルトランスフェラーゼのアミノ酸配列の、L y s 6 3 が A r g に置換された、または、P h e 6 5 が L e u に置換された、変異型アセチルトランスフェラーゼ M p r 1 のいずれかをコードする遺伝子を含むパン酵母を含む、ドライイースト製造用組成物を提供する。

【0016】

好ましくは、本発明のドライイースト製造用組成物は、配列番号 1 に示される野生型 M p r 1 アセチルトランスフェラーゼのアミノ酸配列の、L y s 6 3 が A r g に置換された、または、P h e 6 5 が L e u に置換された、変異型アセチルトランスフェラーゼ M p r 1 のいずれかをコードする遺伝子を含むパン酵母を含む。

30

【0017】

本発明のドライイースト製造用組成物において、好ましくはパン酵母は二倍体のものである。二倍体の酵母は一倍体と比較して発酵速度が速い。

【0018】

本発明はまた、パン酵母が、野生型 グルタミン酸リン酸化酵素遺伝子の A s p 1 5 4 位が A s n で置換されてなるプロリン多産性型酵母である、上記のドライイースト製造用組成物を提供する。

【0019】

本発明はさらに、上記のドライイースト製造用組成物を用いることを含む、ドライイーストの製造方法、該方法により製造されたドライイースト、ならびに該ドライイーストを用いることを含む、パン生地の製造方法を提供する。好ましくは、パン生地は冷凍パン生地である。

40

【発明の効果】

【0020】

本発明によるドライイースト製造用組成物は、優れた乾燥耐性を備えた実用パン酵母株を含むため、高温・乾燥条件に曝されるドライイーストの製造に好適である。さらに、本発明によるドライイースト製造用組成物に含まれるパン酵母は、低温耐性も示すため、本発明のドライイースト製造用組成物は、長期保存可能な冷凍パン生地などの各種パン生地

50

の製造に好適である。

【0021】

また、本発明によるドライイースト製造用組成物に含まれるパン酵母は、すべて酵母の遺伝子からなり、外来遺伝子を一切含まないセルフクロニング技術で作成されたものであるため、通常の食品微生物と同様に扱うことが出来るものである。

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図1】M p r 1によるアゼチジン - 2 - カルボン酸 ( A Z C ) のアセチル化機構を示す。

【図2】パン酵母におけるM P R 1遺伝子の染色体位置。(A) *S. cerevisiae* 一倍体株からのゲノムDNAのパルスフィールドゲル電気泳動。(B) サザンハイブリダイゼーション。電気泳動後、各ゲノムDNAをナイロンメンブレンにプロットし、M P R 1遺伝子についてのおよそ1.6 kb DNA断片をプローブとして用いてハイブリダイズさせた。レーン1、S288 C; レーン2、1278b; レーン3、MB329-17C; レーン4、LD1014; レーン5、3346; レーン6、3347。

【図3】パン酵母におけるM P R 1遺伝子の乾燥ストレス下での効果。(A) 酵母細胞を24時間30 で廃密糖培地で培養した。回収した細胞を洗浄し、膜フィルターに回収した。フィルター上の細胞を4時間乾燥ストレスに供した。各株およそ $2.5 \times 10^8$ 細胞の $10^{-1}$ から $10^{-4}$ の段階希釈(左から右)をYPD寒天プレートに播き、プレートを30 で2日間インキュベートした。(B)乾燥ストレス処理後、細胞内R O Sレベルを測定した。乾燥ストレス前のW T株の蛍光強度(ストレス無し)を100%とした。値は3回の独立した実験からの平均 $\pm$ 標準偏差である。

【図4】生地における二倍体パン酵母株の乾燥ストレス耐性。等量の圧搾イーストを乾燥ストレスで4時間37 で処理した。ストレス処理したイーストを含む生地を3時間発酵させ、残りのCO<sub>2</sub>ガス生産を測定した。(A)野生型パン酵母および m p r 1の乾燥ストレス処理前後の相対発酵能。乾燥ストレス処理前のW T株のCO<sub>2</sub>生産量を100%とした。(B)M p r 1および変異型M p r 1を発現するパン酵母の乾燥ストレス処理の後の相対発酵能。乾燥ストレス処理前のW T株のCO<sub>2</sub>生産量を100%とした。値は3回の独立した実験からの平均 $\pm$ 標準偏差である。

【発明を実施するための形態】

【0023】

本明細書および請求の範囲において「ドライイースト」とは、生イーストを乾燥させ顆粒状にしたもの、およびかかる顆粒状のドライイーストをさらに特殊処理して得られる細粒状のインスタントドライイーストの両方を含む。

【0024】

本発明の組成物に含まれるパン酵母は、配列番号1に示される野生型M p r 1アセチルトランスフェラーゼあるいは、配列番号1に示される野生型M p r 1アセチルトランスフェラーゼのアミノ酸配列の、L y s 6 3がA r gに置換された、または、P h e 6 5がL e uに置換された、変異型アセチルトランスフェラーゼM p r 1のいずれかをコードする遺伝子が含まれる実用パン酵母であれば特に限定されない。本発明により、野生型M p r 1アセチルトランスフェラーゼは、パン酵母の発酵力に重要であることが示された。

【0025】

好ましくは、本発明の組成物に含まれるパン酵母は、配列番号1に示される野生型M p r 1アセチルトランスフェラーゼのアミノ酸配列の、L y s 6 3がA r gに置換された(本明細書中、単にK 6 3 Rとも称する)、または、P h e 6 5がL e uに置換された(本明細書中単にF 6 5 Lとも称する)、変異型アセチルトランスフェラーゼM p r 1のいずれかをコードする遺伝子が導入されてなるものである。本発明により、かかる変異型M p r 1アセチルトランスフェラーゼは、野生型M p r 1と比較して乾燥耐性が上昇していることが見いだされた。

【0026】

10

20

30

40

50

本発明の組成物は、上記の野生型または変異型 M p r 1 の他に、酸化剤、還元剤、酵素、乳化剤および脂肪物質を含むパン改良材などの成分を含んでいてもよい。

【0027】

本発明の組成物に含まれるパン酵母が、野生型 M p r 1 をコードする遺伝子を含むものである場合、内在性の野生型 M p r 1 をコードする遺伝子を有するパン酵母をそのまま用いてもよいし、内在性の野生型 M p r 1 をコードする遺伝子を有さないパン酵母に、野生型 M p r 1 をコードする遺伝子を導入したものをを用いてもよい。

【0028】

以下、特に、変異型 M p r 1 をコードする遺伝子を含むパン酵母について詳細に説明する。

【0029】

変異型 M p r 1 をコードする遺伝子が導入される酵母としては、実用パン酵母であれば、特に限定的ではなく、例えば、一般用、冷凍用、冷蔵用、高糖生地用、低糖生地用パン酵母などが挙げられる。また、変異型変異型 M p r 1 をコードする遺伝子を導入する場合、宿主となるパン酵母は内在性の M p r 1 もしくは同等の機能を有するそのホモログ遺伝子を有しているものであっても有していないものであってもよい。

【0030】

変異型 M p r 1 遺伝子が導入される酵母としては、他の有益な性質を有するよう、別途遺伝子操作やその他の方法によって改変された酵母も挙げられる。有益な性質を有するよう改変された酵母としては、例えば本願発明者による特開 2006-67806 に記載のプロリン分解酵素遺伝子が破壊された酵母が例示される。この酵母は細胞内にプロリンを蓄積し、その結果高いエタノール耐性を有するものである。

【0031】

酵母への遺伝子の導入は、対象となる酵母に応じて従来公知の方法のいずれを用いてもよく、特に限定されない。酵母へ遺伝子を導入する方法は例えば「バイオマニュアルシリーズ 10 酵母による遺伝子実験法」(羊土社)、及び「生物化学実験法 39 酵母分子遺伝子実験法」(学会出版センター)等の教科書の記載に順じて行えばよい。

【0032】

具体的には、変異型 M p r 1 遺伝子のオープンリーディングフレーム(ORF)を PCR 法等の公知の方法によって調製し、これを酵母で発現可能なプロモーターの下流に接続して遺伝子カセットを作成し、酵母発現のためのベクターとすればよい。

【0033】

かかるベクターは、例えば PCR により調製された遺伝子の両端に適切な制限酵素サイトを付加し、当該制限酵素で切断し、これを別途適切な制限酵素で切断したプラスミドベクターへ DNA ライゲースを用いて導入することによって構築することができる。プラスミドに導入された DNA は大腸菌を用いることによって容易に増幅、単離、精製が可能である。

【0034】

酵母プロモーターとしては、酵母における発現に用いることが知られているものであれば、いずれのプロモーターを用いてもよく、例えば GAL1、GAL10、PHO5、P  
GK1、ADH1、AOX1 等のプロモーターが例示される。特に好適には、GAL1 および ADH1 が例示される。

【0035】

かかるベクターは、複製開始点、例えば 2 μm DNA 由来のもの、選択マーカー、例えば LEU2、URA3、TRP1 等を含んでいることが好適であり、さらに必要に応じてエンハンサー、ターミネーター、リボソーム結合部位、ポリアデニル化シグナル配列等を含んでいてもよい。酵母用ベクターとして、種々の市販品があり、宿主となる酵母に応じて適宜選択すればよい。

【0036】

酵母が内在性の M P R 1 遺伝子あるいはそのホモログを有している場合には、内在性の

10

20

30

40

50

M P R 1あるいはそのホモログ遺伝子と変異型M p r 1遺伝子を置き換えても、あるいは内在性遺伝子と変異型M p r 1遺伝子とを共存させてもよい。

【0037】

内在性のM P R 1あるいはそのホモログと本発明の変異型M p r 1遺伝子を共存させる場合、もしくは酵母がM P R 1あるいはそのホモログを有していない場合には、自律複製するプラスミドベクターを用いて形質転換を行えばよい。自律複製するプラスミドベクターとしては、例えば実施例で用いたp A D 4 (L E U 2マーカー)やp Y E S 2 (U R A 3マーカー)等の2 μmプラスミド由来の複製開始点を有しているベクターが例示される。

【0038】

酵母染色体の内在性M P R 1を、変異型M p r 1をコードする遺伝子で置き換える場合には、酵母における選択マーカー遺伝子を含むが、自律複製配列を持たないプラスミドベクターを用いればよい。かかるベクターを用いると、染色体上のM P R 1もしくはそのホモログ配列とプラスミドの配列が相同組み換えを起こし、プラスミドが染色体DNAに挿入されたものが形質転換体として得られる。かかるプラスミドベクターとしては市販のものが知られており、S t r a t a g e n e社のp R S 4 0 5 (L E U 2マーカー)、p R S 4 0 6 (U R A 3マーカー)などが例示される。かかるプラスミドベクターを用いる場合には、予めM P R 1の内部をユニークな制限酵素で1箇所切断し、直鎖状にしたプラスミドを用いて形質転換すればよい。

【実施例】

【0039】

実施例において、本発明者らは、パン酵母が1つのM P R 遺伝子(M P R 1)を有すること、および該遺伝子がパン酵母に乾燥ストレス耐性を与え、最適の発酵能に必須であることを示す。本発明者らはまた、変異型M p r 1の発現により、乾燥ストレス耐性および生地における発酵能が上昇することを示す。

【0040】

パン酵母の染色体におけるM P R 遺伝子のコピー数の判定

一倍体パン酵母である3346株および3347株におけるM P R 遺伝子のコピー数を判定するために、パルスフィールドゲル電気泳動を行い、次いでM P R 1 遺伝子をプローブとして用いてサザン分析を行った(図2)。パルスフィールドゲル電気泳動は以前に記載されたようにして、いくらか改変を加えて行った(J. Bacteriol. 182:4249-4256)。最初の切り替え時間間隔を50秒とし、最後の切り替え時間間隔を75秒とした。総泳動時間は30時間であった。サザンプロット分析のために用いたプローブは、以前に記載されているM P R 1 遺伝子のコード領域を含む1.6 kb Bgl II-Mlu I 断片とした(J. Bacteriol. 182:4249-4256)。結果は明らかに、両方の株 3346 および3347がX染色体に1つのM P R 遺伝子を有していることを示した。一方、1278b株およびMB329-17C株は2コピーのM P R 遺伝子を有し(XIV染色体上にM P R 1 およびX染色体上にM P R 2)、S288C株はM P R 遺伝子を有さない。LD1014株はM P R 1 およびM P R 2 遺伝子の両方の遺伝子破壊株であり、これをネガティブコントロールとして用いた。パン酵母におけるM P R 遺伝子をM P R 1 と命名した。パン酵母におけるM P R 遺伝子のヌクレオチド配列を配列決定したところ、推定アミノ酸配列(配列番号1)は、1278b株のM p r 2 と全く同一であった(データ示さず)。

【0041】

変異型M p r 1を発現する二倍体パン酵母またはM p r 1を欠損する二倍体パン酵母の構築

本実施例で用いたすべての酵母株はS. cerevisiae一倍体株、3346-ura3および3347-ura3由来のものであった。本実施例にて用いたすべての株の関連する遺伝子型を表1に列挙する。変異型M p r 1を発現するパン酵母株を構築するために、変異型M p r 1の発現のためのプラスミド、p R S 4 0 6 - K 6 3 R および p R S 4 0 6 - F 6 5 L を構築した。pRS406-K63Rは、URA3マーカーをもつYIp型のプラスミドpRS406のマル

10

20

30

40

50

チクローニングサイト内に含まれるKpnIサイトに、変異型MPR1遺伝子上流、コーディング領域、下流領域を含む約5.5 kbのKpnI断片を挿入して作製した。pRS406-F65Lは変異型MPR1遺伝子のORFを開始コドン側にHindIIIサイト、終止コドン側にSac Iサイトを付加した下記プライマーでPCRにて増幅し、pRS406のマルチクローニングサイト内のhindIIIとSac Iに挿入した。

開始コドン側 5'-GGCCAAGCTTAGATGGATGCGGAATC-3' (配列番号2)

終止コドン側 5'-CCCCGAGCTCTGTCTATGATTATTCCATGG-3' (配列番号3)

【0042】

表1: 本発明に用いた *S. cerevisiae* 株

【表1】

株	遺伝子型	背景および/または説明
S288C	MAT $\alpha$ wild-type <i>mal1 gal2</i>	一倍体
Sigma1278b	MAT $\alpha$ wild-type	一倍体
MB329-17C	MAT $\alpha$ wild-type <i>ura3-52 trp1 put1-54</i>	一倍体 S288C およびSigma1278b
LD1014	MAT $\alpha$ <i>ura3-52 trp1 mpr1::URA3 mpr2::TRP1</i>	一倍体
3346	MAT $\alpha$	一倍体
3347	MAT $\alpha$	一倍体
3346-ura3	MAT $\alpha$ <i>ura3</i>	一倍体
3347-ura3	MAT $\alpha$ <i>ura3</i>	一倍体
PRO-3346	MAT $\alpha$ <i>pro1-I150T put1::URA3</i>	3346-I150T-ura3; put1 破壊株
PRO-3347	MAT $\alpha$ <i>pro1-I150T put1::URA3</i>	3347-I150T-ura3; put1 破壊株
PRO-3346-ura3	MAT $\alpha$ <i>pro1-I150T put1::URA3 ura3</i>	3346-I150T-ura3; put1 破壊株
PRO-3347-ura3	MAT $\alpha$ <i>pro1-I150T put1::URA3 ura3</i>	3347-I150T-ura3; put1 破壊株
WT	MAT $\alpha$ /MAT $\alpha$	3346 および3347由来の二倍体
WT-K63R	MAT $\alpha$ /MAT $\alpha$ <i>mpr1 (K63R)/mpr1 (K63R)</i>	3346および3347由来の二倍体
WT-F65L	MAT $\alpha$ /MAT $\alpha$ <i>mpr1 (F65L)/mpr1 (F65L)</i>	3346-ura3および3347-ura3由来の二倍体
$\Delta$ mpr1	MAT $\alpha$ /MAT $\alpha$ <i>mpr1/mpr1</i>	3346-I150T-ura3および3347-I150T-ura3由来の二倍体
PRO-WT	MAT $\alpha$ /MAT $\alpha$	3346および3347由来の二倍体
PRO-K63R	MAT $\alpha$ /MAT $\alpha$ <i>mpr1 (K63R)/mpr1 (K63R)</i>	3346および3347由来の二倍体
PRO-F65L	MAT $\alpha$ /MAT $\alpha$ <i>mpr1 (F65L)/mpr1 (F65L)</i>	3346-ura3および3347-ura3由来の二倍体

【0043】

線状化したプラスミドを相同組換えにより3346-ura3および3347-ura3株の両方のMPR1遺伝子座に組み込んだ。SD培地(0.67% アミノ酸を含まない酵母窒素塩基 [Difco Laboratories, Detroit, MI]、2% グルコース)で培養したUra<sup>+</sup>形質転換体をYPD培地(2% グルコース、2% バクトペプトン、1% バクトイーストエクストラクト)で30℃で24時間攪拌しながら培養し、同じ培地で希釈し、数日間インキュベートして、プラスミドが切り出され相同組換えにより重複領域の2コピーの1つが失われた株、3346-K63R-ura3、3346-F65L-ura3、3347-K63R-ura3、および3347-F65L-ura3を、5-フルオロオロト酸を含有するプレートから得た。染色体中に残っているMPR1遺伝子が変異型mpr1であることを確認するために、MPR1遺伝子領域をPCRで増幅し、直接配列決定した。

【0044】

3346-ura3、3347-ura3、3346-K63R-ura3、3346-F65L-ura3、3347-K63R-ura3、および3347-F65L-ura3株のウラシル栄養要求性を補完するために、線状化したpRS406をこれら株のURA3座に組み込み、その結果得られたウラシル原栄養株をそれぞれ、3346、3347、3346-K63R、3346-F65L、3347-K63R、および3347-F65Lと命名した。生地の発酵に用いるために、3つの二倍体株、WT、K63R、およびF65Lを、3346と3347、3346-K63Rと3347-K63R、および3346-F65Lと3347-F65Lとをそれぞれ接合させることにより作成した。

【0045】

接合体形成が顕微鏡下で観察されると、培養物をYPDプレートに播いた。より大きいコロニーを選択し、細胞を、胞子形成培地(1.0% 酢酸カリウム、0.1% バクトイーストエク

10

20

30

40

50



ストラクト、0.05% グルコース および2.0% 寒天)で25 °C で1週間培養して孢子形成能を確認した。

【0046】

プロリン蓄積型酵母での変異型 *Mpr1* の発現のために、PRO-3346-*ura3* および PRO-3347-*ura3* (Appl. Environ. Microbiol. 74:5845-5849)を、5-フルオロオロト酸選択から自然突然変異によって得た。プロリン蓄積型二倍体パン酵母株を3346-*ura3* および3347-*ura3* と同じ手順によってこれら2つの株から構築した。

【0047】

パン酵母における *MPR1* 遺伝子の破壊のために、*pMPR1U* (J. Bacteriol. 182: 4249-4256)の3.3 kb *SacI-SacI* 断片を3346-*ura3* 株および3347-*ura3* 株の *MPR1* 座に組み込んだ。*MPR1* 遺伝子の欠損はPCRにより確認した(データ示さず)。これら2つの一倍体株を接合させることにより、二倍体株 *mpr1* を構築した。

*pMPR1U*は以下のとおり作製したプラスミドである。*MPR1*遺伝子の上流、下流域を含む約5.4 kbの*Sau3AI*断片を*pYES2* (インビトロジェン)ベクターの*BamHI*サイトに挿入したプラスミド*pMH1*を作製した。*pMH1*の1.6 kbの*BglIII-MluI*断片を取り除き、そこに*URA3*遺伝子、プロモーター、ターミネーターを含む1.2 kbの*HindIII*断片をベクター、インサートとも平滑化したのちライゲーションして作製した。

【0048】

*Mpr1* を欠損するパン酵母の乾燥ストレス感受性

ストレス条件下でのパン酵母における *MPR1* 遺伝子の寄与を評価するために、乾燥ストレス下での *mpr1* -破壊二倍体パン酵母の細胞生存率および細胞内ROSレベルを試験した。

【0049】

まず、酵母細胞を攪拌しながら対数増殖期まで5 mlのYPD 培地中30 °C で培養し、すべての培養細胞を廃密糖(cane molasses)培地 (30 g/リットルの糖 (スクロース換算)、1.93 g/リットルの尿素、および0.46 g/リットルの  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )に接種し、30 °C で24時間培養した。回収した細胞を0.9% NaClで洗浄し、およそ  $2.5 \times 10^8$  細胞を滅菌膜フィルターに回収した。フィルターを4 °C で1時間放置し、次いで、ハイブリダイゼーションインキュベーター (HB80、TAITEC、Saitama、Japan)を用いて37 °C で4時間の乾燥ストレスに供した。ストレス処理の後、フィルター上の細胞を水に再懸濁し、乾燥ストレス有りまたは無しにて処理した細胞アリコートにYPD プレートに播き、プレートを30 °C で2日間インキュベートした。図3Aに示すように、*mpr1* 株はWT株よりも乾燥ストレスに対して感受性であった。

【0050】

次いで、細胞内ROSレベルを乾燥ストレス処理の前後に、酸化体感受性プローブである2',7'-ジクロロフルオレセインジアセテート(DCFDA) (Molecular Probes、Eugene、OR)を用いて測定した。このプローブは細胞内エステラーゼによりジアセテートの切断の後に細胞内にトラップされる(Arch. Biochem. Biophys. 302:348-355)。それは次いでラジカル種により酸化され、より蛍光の化合物が生じる(Methods Enzymol. 233:128-140)。

【0051】

乾燥ストレス処理の後、酵母細胞を10  $\mu\text{M}$  DCFDA を含む100 mM リン酸カリウムバッファー (pH 7.4)に再懸濁し、30 °C で30分間インキュベートした。次いで細胞を洗浄し、200  $\mu\text{l}$ の蒸留水に再懸濁し、Multi-Beads Shocker (MB601U、Yasui Kikai、Osaka、Japan)中で5分間ガラスビーズにより破碎した。

【0052】

細胞抽出液(50  $\mu\text{l}$ )を450  $\mu\text{l}$ の蒸留水と混合し、蛍光を EX = 490 nm および EM = 524 nmにて蛍光分光光度計(F-7000; Hitachi、Tokyo、Japan)を用いて測定した。EM = 524 nmの値を混合物中のタンパク質により標準化した。図3Bに示すように、乾燥ストレス処理後の細胞内ROSレベルはWT株と比較して *mpr1* 株において上昇していた

10

20

30

40

50

。

【0053】

この結果から、パン酵母においてMPR1遺伝子は、乾燥ストレス中の細胞内ROS蓄積の阻害に寄与し、高い細胞生存率を導くことが示された。

【0054】

Mpr1を欠損するパン酵母の発酵能

パン製造中の発酵プロセスにおけるMPR1遺伝子の関与を調べるために、生地中のmpr1株の乾燥ストレス耐性をアッセイした。

【0055】

まず、市販のパン酵母製造プロセスを模倣する廃密糖培地において培養した定常期細胞を蒸留水で2回洗浄し、過剰の水を濾紙を用いて除いた。濾紙を4で1時間放置し、細胞を空気循環乾燥機(PV-210、Tabai、Osaka、Japan)を用いて37で4時間風乾し、生地と混合した。生地の処方は以下の通りであった：50gのパン製造粉、2.5gのスクロース、1gのNaCl、2gのイースト、および32.5mlの水。

【0056】

成分を3分間スワンソン型ミキサー(National Mfg. Co., Ltd., Sterling, IL)により混合した。混合した生地をそれぞれ40gの片に分け、ねじ口びんに維持し、発酵能をFermograph II (Atto, Tokyo, Japan)を用いてCO<sub>2</sub>ガス生産量を測定することによりアッセイした。発酵能は、Nishida et al. (Biosci. Biotechnol. Biochem. 68:1442-1448)の方法にしたがって生地中の酵母細胞によって生産されるCO<sub>2</sub>量により評価した。

【0057】

図4Aに示すように、乾燥ストレス処理されたmpr1細胞は、WT細胞と比較して発酵能が低下していた。一方、乾燥ストレス処理前にはWTおよびmpr1株の間に差はなかった。これらの結果は、パン酵母中のMPR1遺伝子が、パン製造における最適の発酵のために不可欠であることを示す。

【0058】

酵素機能が増強したMpr1を発現するパン酵母の発酵能

以前の研究により、本発明者らは酵素機能が改良された変異型Mpr1を単離し、K63RまたはF65L突然変異がそれぞれMpr1の抗酸化活性または熱安定性の上昇を示すことを見いだしている(国際公開2008/007475公報)。それゆえ、パン酵母における元のMpr1の代わりに変異型Mpr1を発現させることを試み、WT、K63R、F65L株の発酵能を評価した。

【0059】

図4Bは、K63RおよびF65L株が、WT株と比較して発酵能が上昇していることを示す。特に、F65Lはほぼ1.8-倍の上昇を示した。すなわち、変異型Mpr1のパン酵母における発現は、細胞を乾燥ストレスに耐性のものとし、発酵能を上昇させた。

【0060】

また、本発明者らは、プロリン蓄積型パン酵母における変異型Mpr1の効果を評価した。プロリンは凍結保護活性を有することが知られている。実験室用*S. cerevisiae*株において、細胞内プロリン蓄積は、乾燥および凍結ストレスに対する耐性を向上させる(EMS Microbiol. Lett. 184:103-108)。最近の研究ではまた、プロリンを蓄積するパン酵母細胞は生地において増強した凍結耐性を示すことが示されている(Appl. Environ. Microbiol. 74:5845-5849)。

【0061】

それゆえ、本発明者らは、パン酵母における乾燥ストレス耐性に対するプロリン蓄積の効果を調べ、変異型Mpr1の発現が、プロリン蓄積型パン酵母の場合に相加効果を示すかを調べた。

【0062】

結果として、PRO-WTはWTと比較して高い発酵能を示し(図4B)、プロリン蓄積はパン酵母における発酵能を向上させることが示唆された。さらに、変異型Mpr1の発現

10

20

30

40

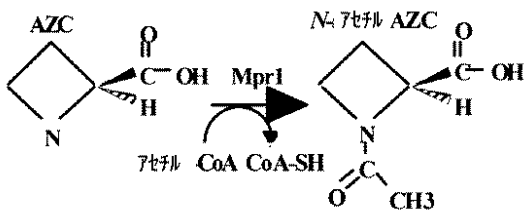
50

はプロリン蓄積型パン酵母において相加効果を示した。

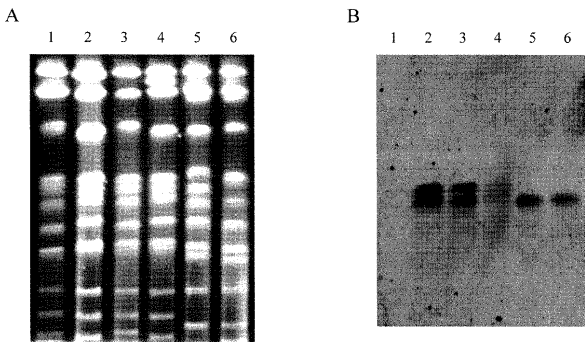
【 0 0 6 3 】

本実施例において、本発明者らは、変異型 M p r 1 を発現するパン酵母株は、野生型株よりも高い発酵能を示すことを見いだした。変異型 M p r 1 のプロリン蓄積型株での発現はまた、発酵能を増強した。パン酵母における M P R 1 遺伝子の破壊は R O S の蓄積および低い発酵能をもたらした。この結果から、パン酵母において M p r 1 はパン製造の最適の発酵に不可欠であることが示された。

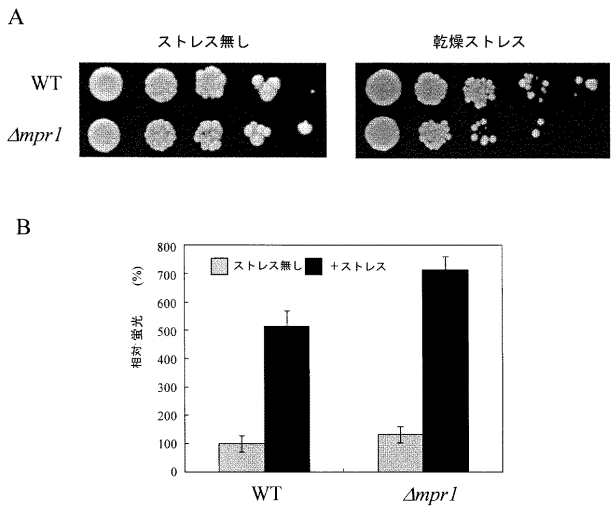
【 図 1 】



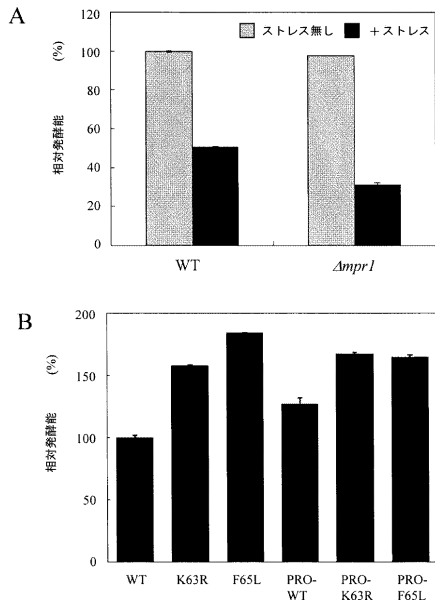
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



【 配列表 】

2010183887000001.app

---

フロントページの続き

(74)代理人 100146259

弁理士 橋本 諭志

(72)発明者 高木 博史

奈良県生駒市高山町 8 9 1 6 - 5 国立大学法人 奈良先端科学技術大学院大学内

(72)発明者 笹野 佑

奈良県生駒市高山町 8 9 1 6 - 5 国立大学法人 奈良先端科学技術大学院大学内

Fターム(参考) 4B024 AA05 BA10 CA06 DA12 GA11 GA25

4B032 DB01 DB36 DK55

4B065 AA80X AA80Y AB01 AC20 BA02 CA29 CA42