

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：14603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25850065

研究課題名(和文) 清酒酵母の高アルコール発酵性メカニズムの解析とその応用

研究課題名(英文) Analysis and application of the mechanism for the high alcoholic fermentation performance of sake yeast

研究代表者

渡辺 大輔 (Daisuke, Watanabe)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号：30527148

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：清酒酵母の高いアルコール発酵力を生み出す原因として同定されたRIM15プロテインキナーゼ遺伝子上の機能欠失変異が細胞内代謝プロファイルと遺伝子発現に及ぼす影響を解析した結果、UDP-グルコース合成経路を抑制することで解糖/アルコール発酵を促進していることを明らかにし、清酒酵母の高発酵メカニズムの解明に至った。さらに、RIM15遺伝子の機能欠損は、清酒酵母以外の実用酵母菌株の発酵速度改善においても有効であることを実証し、酵母のアルコール発酵力を自在に調節するための新規育種技術の確立に資する知見を得た。

研究成果の概要(英文)：High alcoholic fermentation performance of sake yeast strains is attributed to a loss-of-function mutation in the RIM15 protein kinase gene. In this study, we examined its effects on the intracellular metabolic profile and the gene expression, and found that impairment of the synthetic pathway of UDP-glucose leads to enhanced glycolysis/alcoholic fermentation. Thus, we first discovered a sake yeast-specific high fermentation mechanism. Furthermore, dysfunction of the RIM15 gene effectively improved the fermentation rates of the other industrial yeast strains. Our finding will aid in establishing a novel breeding technology for the artificial control of alcoholic fermentation performance by yeast cells.

研究分野：応用微生物学

キーワード：清酒酵母 アルコール発酵 RIM15 メタボローム UDP-グルコース

1. 研究開始当初の背景

清酒酵母は、分類学上は出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* に属する菌株群であるが、清酒もろみにおいて同種の他の菌株には見られない顕著なアルコール発酵力を示す。研究代表者らは、この原因を探るために、代表的な清酒酵母として知られるきょうかい7号(K7)株のゲノム・トランスクリプトーム解析(引用文献 1, 2)を行った結果、出芽酵母のストレス応答において中心的な役割を果たすプロテインキナーゼ Rim15p と、その下流で働く転写因子 Msn2/4p から成る経路が欠損していることを見出し、清酒酵母に特異的な *RIM15* 遺伝子上の機能欠失変異を同定した(引用文献 2, 3)。

2. 研究の目的

そこで本研究課題では、実験室酵母の *RIM15* 遺伝子破壊株をモデルとして用い、発酵過程における細胞内代謝プロファイルと遺伝子発現に着目して解析を行うことにより、Rim15p の機能欠損が高発酵力をもたらすメカニズムを明らかにすることを目的とする。さらに、その知見を応用して、清酒酵母以外の実用酵母菌株の発酵力を人為的に改善することを目指す。

3. 研究の方法

発酵試験については、特筆しない限り、20%グルコース含有 YPD 培地を用いた実験室条件でのモデル系を用いた。発酵温度は 30°C 一定として静置培養を行い、アルコール発酵に伴い生じる二酸化炭素発生量をファームグラフ II (Atto) により測定した。清酒もろみでの発酵を解析する場合には、 α 化米 40 g、乾燥麹 10 g、90%乳酸 20 μ L、仕込水 80 mL の一段仕込を実施し、15°C 一定で静置培養(糶入れなし)を行った。糖蜜発酵試験は、Brix 25 に調製したサトウキビ由来糖蜜を使用し、35°C 一定でスターラーバーで攪拌しながら培養を行った。ビール醸造試験では、十分に通気を行った 20° Plato の高密度麦汁を用い、15°C 一定で静置培養を行った。

メタボローム解析のための試料調製については、Human Metabolome Technologies 社のプロトコールに従って実施し、CE-TOFMS による解析を同社に委託した。細胞内のトレハロース・グリコーゲン含量の測定は、細胞破砕液のトレハラゼ処理またはアミログルコシダーゼ処理により生成するグルコースの定量により行った。細胞壁 1,3- β -グルカンについては、透過型電子顕微鏡観察により細胞壁のグルカン層の厚さを

定量した。トランスクリプトーム解析については、ホットフェノール法により抽出した全 RNA を蛍光ラベル後、GeneChip yeast genome S98 array (Affymetrix) 上にハイブリダイズさせ、GeneChip scanner 2500 (Affymetrix) で蛍光強度を測定することにより行った。個別遺伝子の発現レベルの解析は qRT-PCR 法により実施した。

4. 研究成果

(1) Rim15p の機能欠損を介した高発酵力メカニズムの解明

発酵過程の酵母細胞を用いたメタボローム解析の結果、*RIM15* 遺伝子破壊株は野生株と比べて、炭素代謝経路のうち、解糖系の中間代謝産物であるグルコース-6-リン酸 (G6P) から枝分かれした代謝経路におけるグルコース-1-リン酸 (G1P) の含量が高く、UDP-グルコース (UDPG) の含量が低い傾向を示した。このことから、Rim15p は、G1P と UTP から UDPG を合成する UDPG ピロフォスホリラーゼ Ugp1p の活性を正に制御していることが示唆された。UDPG は、貯蔵性糖質(トレハロース、グリコーゲン)や構造的糖質(細胞壁 1,3- β -グルカン)の合成のための基質として用いられ、ストレス環境下における生存率維持に重要な役割を果たしている。実際に、Rim15p の機能が欠損している清酒酵母 K7 株では、清酒もろみにおける貯蔵性・構造的糖質の蓄積量が低いことを明らかにした。

Rim15p の機能欠損が Ugp1p を阻害する原因として、Rim15p が *UGP1* 遺伝子の発現誘導に関与する可能性について検討を行った。興味深いことに、*UGP1* 遺伝子のプロモーター領域には、Rim15p の下流で働く転写因子 Msn2/4p による既知の結合配列が複数存在していた。発酵過程の酵母細胞を用いた qRT-PCR 解析の結果、*RIM15* 遺伝子破壊株は野生株と比べて、特に発酵初期における *UGP1* 遺伝子の発現レベルが有意に低下していた。この結果と矛盾することなく、Rim15p の機能が欠損している清酒酵母 K7 株においても、清酒もろみ発酵初期における *UGP1* 遺伝子の発現誘導は抑制されていた。

RIM15 遺伝子破壊により引き起こされる *UGP1* 遺伝子の発現レベルの低下がアルコール発酵に及ぼす影響を明らかにするために、実験室酵母の *UGP1* 遺伝子発現抑制株(必須遺伝子のため、遺伝子破壊株は作製できない)を発酵試験に供した結果、発現抑制の程度に応じた発酵速度の上昇を示した。以上の結果を考え合わせることで、Rim15p の機能欠損は、Msn2/4p の阻害を介して *UGP1* 遺伝子の発現誘導を抑制することによ

り貯蔵性・構造的糖質の蓄積量を低下させ、使われなくなった分のグルコースを解糖系にリダイレクトすることによって、結果的にアルコール発酵を促進する、という清酒酵母独自の高発酵メカニズムの解明に至った。以上の内容を、次章〔雑誌論文〕の にて報告した。

本研究は、実用酵母菌株における高発酵力の原因を代謝レベルと遺伝子レベルの両面から解明した世界初の成果であり、真核生物における解糖系の *in vivo* における新規調節経路を解明したという点で学術的な意義も有している。

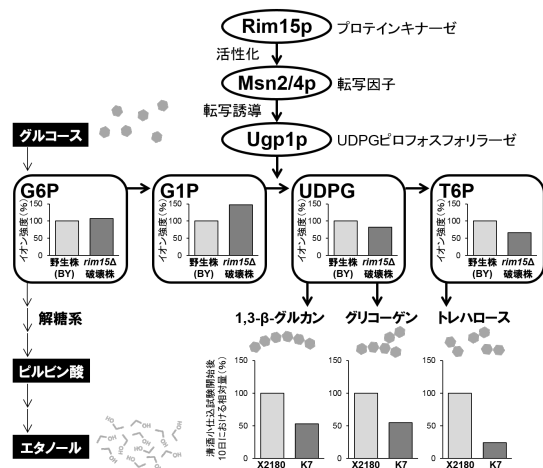


図1 本研究により明らかにされた Rim15p を介したアルコール発酵調節メカニズム

(2) RIM15 遺伝子破壊による他の実用酵母菌株の発酵力改良

Rim15p の機能欠損による発酵力の上昇が清酒酵母以外の実用酵母菌株においても成り立つかどうかを調べるために、バイオエタノール製造に用いられる PE-2 株における効果を解析した。PE-2 株は高度にヘテロサイガスな二倍体であるため、孢子形成を経て得られた一倍体の中から優れた発酵速度を示す株を選抜し、RIM15 遺伝子を破壊した。その結果、元々高い発酵速度を有するにも関わらず、RIM15 遺伝子の破壊によりサトウキビ由来の廃糖蜜における発酵速度がさらに上昇し、発酵終了までに要する時間を短縮することができた。本研究において用いたバイオエタノールの発酵生産環境は、高温でスクロースを多く含んでおり、低温で主にグルコースを発酵させる清酒もろみとは大きく異なるにも関わらず、発酵力上昇が認められたことから、発酵条件や菌株に依存しない汎用的な発酵力改善方法の確立につながることを期待される。以上の内容を、次章〔雑誌論文〕の にて報告した。

一方、ラガータイプのビールの醸造では、*S. cerevisiae* と *S. eubayanus* の交雑により生じた高次倍数体の下面発酵酵母 *S. pastorianus* が広く用いられるが、その代表的な菌株の一つである Weihenstephan 34/70 株において、*S. cerevisiae* 型の RIM15 遺伝子を破壊することによって、高密度麦汁中のアルコール発酵を促進できることも明らかにした。ビール醸造におけるアルコール発酵の主な基質はマルトースであり、また用いられる菌株も分類学上 *S. cerevisiae* とは異なるにも関わらず、Rim15p の機能欠損が発酵力の上昇を引き起こした点は特筆に値する。以上の内容を、次章〔雑誌論文〕の にて報告した。

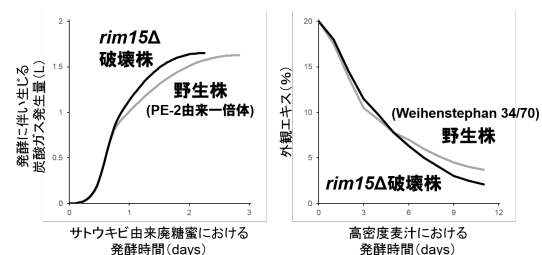


図2 RIM15 遺伝子破壊がバイオエタノール酵母(左)および下面発酵ビール酵母(右)の発酵速度に及ぼす影響

このような研究のさらなる進展により、将来的には、目的とする菌株・発酵条件における発酵力を最適化するための技術、言わば「オーダーメイド型発酵力改変育種技術」が確立され、醸造やバイオエタノール生産をはじめとする発酵産業に貢献することが可能になるのではないかと期待される。

(3) トランスクリプトーム解析による清酒酵母の新規高発酵メカニズムの発見

以前の研究において、研究代表者らは、酵母のアルコール発酵における定常期の関与を明らかにした(引用文献 3, 4)。従来、アルコール発酵は酵母の増殖と関連が深いと考えられてきた。しかし実際には、発酵環境における酵母の対数増殖は初期のうちに完了しており、その後の定常期と呼ばれる時期の細胞の生理状態が発酵力に大きく関わることがわかってきた。実際に、Rim15p も定常期への移行の鍵因子であることが報告されている(引用文献 5)。

そこで、YPD 培地で 1 週間培養した定常期の実験室酵母・清酒酵母(K7)細胞を用いたトランスクリプトーム解析を新たに実施した結果、清酒酵母において、グルコース脱抑制に参与する転写因子 Adr1p および Cat8p を介した遺伝子発現レベルが顕著に低

いことを明らかにした。このことがアルコール発酵に及ぼす影響を明らかにするために、実験室酵母を用いて *ADR1* および *CAT8* 遺伝子の二重破壊株を作製したところ、発酵速度が有意に上昇した。さらに、K7 株における *ADR1* 遺伝子上のナンセンス変異を同定した。以上の結果から、グルコース脱抑制の欠損が清酒酵母の新たな高発酵メカニズムであることを解明した。

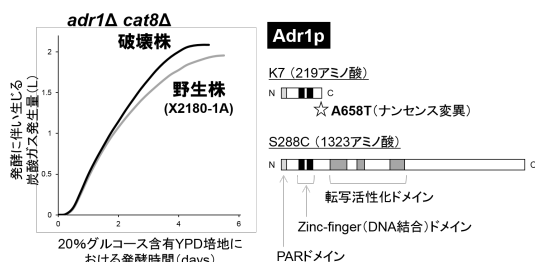


図3 実験室酵母の *ADR1* *CAT8* 遺伝子二重変異株の発酵速度 (左) および清酒酵母 K7 株において見出された *ADR1* 遺伝子上の機能欠失変異 (右)

グルコース脱抑制とは、グルコースの枯渇によってグルコース以外の炭素源の資化に関わる遺伝子の発現が誘導される現象であり、グルコースが豊富に存在する清酒もろみにおいては生存に必須ではないと考えられる。清酒酵母では、この経路の欠損により、グルコースを資化することに特化してアルコール発酵の効率を向上させたのだろうと推測される。以上の内容を、次章〔雑誌論文〕のにて報告した。

(4) *RIM15* 機能欠失変異の簡易識別法の開発

食品トレーサビリティの観点から、K7 株に近縁な清酒酵母に特異的に存在する機能欠失変異 (*rim15^{5055insA}*) (引用文献 3) を簡便に識別することを目的として、当該変異部位とハイブリダイズするプライマーを設計し、高解像度融解曲線分析 (HRM) 法を用いた解析が可能であることを明らかにした。研究代表者らは以前に、醸造酒に含まれる微生物由来の DNA を簡便に検出するための手法を開発しており (引用文献 6) 両者を組み合わせることにより、ある醸造酒が K7 株に近縁な菌株を用いて製造されたか否かを判断することが技術的に可能となった。

(5) 総括

本研究では、K7 株に近縁な清酒酵母において特異的に見出された、*RIM15* 遺伝子上の機能欠失変異を介した高発酵メカニズムを、代謝レベルと遺伝子レベルの両面から解明し、当初の研究計画を達成することができた。

さらに、清酒酵母の新たなトランスクリプトーム解析を端緒として、当初想定していた以上に研究が進展し、グルコース脱抑制経路を介した新規な高発酵メカニズムの発見に至った。今後は、これらの知見に基づいてさらに研究を進展させ、出芽酵母 *S. cerevisiae* におけるアルコール発酵調節の全体像を明らかにしていく必要がある。そのことにより、真核生物における炭素代謝、特に解糖系の制御メカニズムに関する理解が深まると期待される。また、その応用研究により酵母の発酵力を自在に改変する育種技術 (発酵デザイン技術) が確立されれば、アルコール発酵を基盤とする食品・醸造・バイオ燃料などの各種発酵産業に新たなイノベーションをもたらすことができるだろう。

< 引用文献 >

- Akao, T. *et al.*: *DNA Res.*, Vol.18, No.6, pp.423-434 (2011).
 Watanabe, D. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol.77, No.3, pp.934-941 (2011).
 Watanabe, D. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol.78, No.11, pp.4008-4016 (2012).
 Urbanczyk, H. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, Vol.112, No.1, pp.44-48 (2011).
 Reinders, A. *et al.*: *Genes Dev.*, Vol.12, No.18, pp.2943-2955 (1998).
 下飯 仁ら: 特許第 5574221 号

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Oomuro, M., Kato, T., Zhou, Y., **Watanabe, D.**, Motoyama, Y., Yamagishi, H., Akao, T., Aizawa, M.: *J. Biosci. Bioeng.*, 査読有, 印刷中
 DOI: 10.1016/j.jbiosc.2016.04.007

Watanabe, D., Zhou, Y., Hirata, A., Sugimoto, Y., Takagi, K., Akao, T., Ohya, Y., Takagi, H., Shimoi, H.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 査読有, Vol.82, No.1, pp.340-351 (2016)
 DOI: 10.1128/AEM.02977-15

渡辺 大輔, 高木 博史: 生物工学会誌, 査読無, Vol.93, No.8, pp.460-463 (2015)
http://www.sbj.or.jp/sbj/sbj_vol93_no08.html

Watanabe, D., Hashimoto, N., Mizuno, M., Zhou, Y., Akao, T., Shimoi, H.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 査読有, Vol.77, No.11, pp.2255-2262 (2013)
 DOI: 10.1271/bbb.130519

Inai, T.*, **Watanabe, D.***, Zhou, Y., Fukada, R., Akao, T., Shima, J., Takagi, H., Shimoi, H. (*equally contributed): *J. Biosci. Bioeng.*, 査読有, Vol.116, No.5, pp.591-594 (2013)
DOI: 10.1016/j.jbiosc.2013.05.015

〔学会発表〕(計 5 件)

渡辺 大輔: 酵母における環境応答と代謝調節に関する分子遺伝学的研究とその応用, 日本農芸化学会大会受賞講演, 平成 28 年 3 月 27 日, 札幌市教育文化会館(北海道札幌市) 招待講演

Watanabe, D.: How has sake yeast acquired high alcohol fermentation ability?, 日本生物工学会関西支部国際ワークショップ ”Workshop on Asian Brewery Technology”, 平成 26 年 10 月 30 日, 月桂冠株式会社昭和蔵(京都府京都市) 招待講演

渡辺 大輔: なぜ清酒酵母はアルコール発酵力が高いのか?, 酵母研究会講演会, 平成 26 年 8 月 7 日, アサヒビール株式会社吹田工場(大阪府吹田市) 招待講演

Watanabe, D., Zhou, Y., Hirata, A., Ohya, Y., Akao, T., Shimoi, H., Takagi, H.: Identification of yeast Greatwall kinase Rim15p as a novel negative regulator for alcoholic fermentation, Yeast Genetics Meeting, 平成 26 年 8 月 1 日, ワシントン大学(アメリカ合衆国シアトル市)

渡辺 大輔: なぜ清酒酵母はアルコール発酵力が高いのか?, 日本ゲノム微生物学会年会, 平成 26 年 3 月 7 日, 東京農業大学(東京都世田谷区) 招待講演

〔図書〕(計 3 件)

渡辺 大輔: 朝倉書店『食と微生物の事典(北本 勝ひこ 他 編)』, 印刷中
総ページ数不明

Watanabe, D., Takagi, H., Shimoi, H.: Springer “Stress Biology of Yeasts and Fungi: Application for Industrial Brewing and Fermentation (Takagi, H., Kitagaki, H. (eds.))”(2015)
総ページ数 389, pp.59-76

渡辺 大輔, 高木 博史, 下飯 仁: シーエムシー出版『醗酵・醸造食品の最前線(北本 勝ひこ 監修)』(2015)
総ページ数 282, pp.101-108

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: 酵母の液胞トランスポーターシャペロン複合体の機能欠損による発酵促進方法
発明者: **渡辺 大輔**, 高木 健一, 高木 博史
権利者: 国立大学法人 奈良先端科学技術大学院大学
種類: 特許
番号: 特願 2016-25324
出願年月日: 平成 28 年 2 月 12 日
国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

渡辺 大輔 (WATANABE, Daisuke)
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教
研究者番号: 30527148

以上