

博士論文

アミノ酸代謝制御機構に着目した  
酵母の育種と清酒醸造への応用

大橋 正孝

奈良県産業振興総合センター

主指導教員： 高木 博史 教授

ストレス微生物科学研究室（バイオサイエンス領域）

令和 4 年 11 月 24 日提出

## 目次

序論	3
第1章 プロリン・オルニチン高生産清酒酵母の育種及びそのアミノ酸高生産メカニズムの解明	7
1-1. 緒言	7
1-2. 材料と方法	9
1-2-1. 菌株、プラスミド及び材料	9
1-2-2. AZC 耐性変異株の分離	10
1-2-3. 細胞内アミノ酸含量の測定	10
1-2-4. AZC 耐性変異株の AZC 及びエタノールストレス耐性の評価	10
1-2-5. 清酒小仕込み試験	10
1-2-6. 全ゲノム解析	11
1-2-7. ARG5,6 遺伝子発現プラスミドの構築	11
1-2-8. NAGK 発現プラスミドの構築	11
1-2-9. 組換え NAGK の発現	14
1-2-10. 組換え NAGK の精製	14
1-2-11. 組換え NAGK の活性測定	15
1-2-12. 構造解析	15
1-3. 結果	16
1-3-1. プロリン高生産清酒酵母の分離	16
1-3-2. AZC 耐性変異株の AZC 及びエタノール耐性	17
1-3-3. 清酒小仕込み試験	18
1-3-4. 全ゲノム解析	20
1-3-5. 変異型 ARG5,6 <sup>T340I</sup> 遺伝子が細胞内アミノ酸含量に及ぼす影響	27
1-3-6. NAGK のアミノ酸置換が NAGK 活性に与える影響	28
1-3-7. NAGK の構造解析	29
1-3-8. A902-4 株以外の変異株の ARG5,6 遺伝子解析	30
1-3-9. 変異型 ARG5,6 遺伝子が細胞内アミノ酸含量に及ぼす影響	31
1-3-10. NAGK のアミノ酸置換がアルギニンによるフィードバック阻害に与える影響	34
1-4. 考察	35
第2章 N-アセチルトランスフェラーゼ Mpr1 の過剰発現によるエタノール生産性の向上	47
2-1. 緒言	47
2-2. 材料と方法	49
2-2-1. 菌株、プラスミド及び培地	49
2-2-2. Mpr1 発現導入株の Mpr1 発現の確認	50
2-2-3. Mpr1 発現における酸化ストレス評価	50

2-2-4. 細胞内アミノ酸含量の測定 .....	50
2-2-5. Mpr1 を過剰発現させた清酒酵母の発酵試験 .....	51
2-2-6. Mpr1 を過剰発現させた清酒酵母の清酒小仕込み試験 .....	51
2-2-7. 清酒酵母の香気成分分析 .....	51
2-2-8. 清酒中の有機酸分析 .....	51
2-3. 結果 .....	53
2-3-1. Mpr1 発現の確認試験 .....	53
2-3-2. Mpr1 発現株における酸化ストレス耐性評価 .....	54
2-3-3. Mpr1 を SC-ura 液体培地で発現させた時の細胞内アミノ酸含量 .....	55
2-3-4. Mpr1 を発現させた清酒酵母の発酵試験 .....	56
2-3-5. Mpr1 を発現させた清酒酵母の清酒小仕込み試験 .....	57
2-3-6. 清酒の成分分析 .....	57
2-3-7. 清酒の香気成分分析 .....	58
2-3-8. 清酒の有機酸分析 .....	58
2-4. 考察 .....	60
総括 .....	65
謝辞 .....	66
参考文献 .....	67

## 序論

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* には、S288C や  $\Sigma$ 1278b に代表されるような実験室酵母と、清酒酵母やワイン酵母などに代表されるような産業用酵母の 2 種類ある。前者は、高等生物のモデル生物として基礎研究に使われるが、発酵力が弱い。一方、後者は、発酵力や生育速度に優れていて、清酒、ワインやビール等の酒類等の発酵食品やパン、バイオエタノールの製造で使用される重要な産業微生物である(1, 2)。その中でも、日本の伝統的なアルコール飲料である清酒の醸造には、エタノール生産性の高い清酒酵母が使用され、醸造過程で 20%程度のエタノールを生産する(3)。清酒の原料は、基本的に米、蒸した白米に *Aspergillus oryzae* などのカビを生育させた米麴と水である。米麴には、カビが生産するアミラーゼが含まれ、その酵素により、米に含まれるデンプンがグルコースに分解されると、速やかに清酒酵母がグルコースからエタノールを生産する。この糖化と発酵が並行して行われる並行複発酵により、醸造過程の清酒もろみ中の糖濃度は 8%未満に保たれるために、清酒酵母の生育及び発酵は阻害されず、清酒以外のワインやビールに比べて、20%という高濃度のエタノール生産が可能となる(3)。また、清酒酵母は有機酸や香気成分などの代謝物を生産し(3)、清酒の酒質に影響を与える。

全国の清酒の消費量は、1975 年(1,675 千 kL)をピークに、令和 2 年度(417 千 kL)でその約 25%まで減少している(4)。清酒の酒質が消費者のニーズに対応できておらず、そのことが清酒消費量減少の原因の一つかもしれない。そこで、消費者のニーズに対応するために、清酒の差別化、高付加価値化が可能な清酒酵母の育種が必要であると考えた。本研究では、1)「既存の清酒酵母よりもエタノール生産性の高い清酒酵母の取得」と、味、香りあるいはそれ以外のことで差別化できるように、2)「清酒・酒粕の付加価値を高める清酒酵母の取得」の 2 つを目的とした。

清酒酵母は、醸造過程において、低温、低 pH ストレスだけでなく、エタノールストレスを受ける。エタノールは、酵母の細胞膜の流動性を高めて、膜タンパク質構造を乱す(5)。また、エタノールは、容易に細胞内に浸透し、解糖系の酵素であるピルビン酸キナーゼやヘキソキナーゼの変性(6)、ミトコンドリア DNA への損傷(7)、mRNA の核外輸送の抑制(8)を引き起こす。さらに、エタノール存在下で、活性酸素種(ROS)が増加する。ROS は、一重項酸素  $^1\text{O}_2$ 、スーパーオキシド  $\text{O}_2^-$ 、過酸化水素  $\text{H}_2\text{O}_2$ 、ヒドロキシラジカル  $\text{HO}\cdot$  を指し、タンパク質、脂質や DNA にダメージを与える(9)。酵母では、エタノールストレスに応答して、ミトコンドリアに存在する酵素マンガンスーパーオキシドジスムターゼ(MnSOD)活性が増大し(10)、発生したスーパーオキシドは MnSOD によって過酸化水素に変換される。生成した過酸化水素はカタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼやその他のペルオキシダーゼで水に分解され無害化される(9, 10)。また、酵母は、エタノールストレスに対応して、細胞膜中のオレイン酸量やエルゴステロール

量を増加(11, 12)させ、膜を安定化させる。さらに、細胞内にトレハロース(13)を蓄積することによって、エタノールによるタンパク質の変性・凝集を防ぐ。それ以外にも、遊離アミノ酸であるプロリンを細胞内に蓄積するとその酵母はエタノールストレスに耐性をもつ(14)。このように酵母はエタノールストレスに対して様々な方法で対応する。清酒酵母のエタノール生産性を向上させるためには、まずエタノールストレスに高い耐性を有する清酒酵母を分離する必要がある。

一方、清酒酵母は、アルコール飲料に不可欠なエタノールを生産するだけでなく、清酒に吟醸香を与えるカプロン酸エチル(リンゴ様の香り)や酢酸イソアミル(バナナ様の香り)などの香気成分や、さわやかな酸味を呈するリンゴ酸やコクのある酸味を呈するコハク酸などの有機酸を生産するきわめて重要な微生物である(3, 15)。これまでに、吟醸香を高生産する清酒酵母を育種するために、脂肪酸生合成阻害剤であるセルレニンに対する耐性を指標としたカプロン酸エチル高生産変異株(16, 17)の取得や、5'-5'-5'-DL-トリフルオロロイシン、L-カナバニン、ファルネシルピリジニウム、ハイグロマイシン B に対する耐性を指標とした酢酸イソアミル高生産変異株(18)の取得が行われてきた。また、酸味を強調した清酒酵母を育種するために、シクロヘキシミドやジメチルコハク酸に対する耐性を指標としたリンゴ酸高生産変異株の取得(19)や  $\alpha$ -ケトグルタミン酸に対する耐性を指標としたコハク酸高生産変異株の取得(20, 21)に関する研究が行われてきた。これらの育種は、清酒の付加価値を高める清酒酵母を取得するための試みである。酢酸イソアミルの前駆体であるイソアミルアルコールは、ロイシン生合成経路から分岐して生合成されるため、酢酸イソアミル高生産変異株取得の過程で、アミノ酸のロイシンを高生産する清酒酵母の育種に関する研究(22)はあるが、アミノ酸自体の組成や生成量に特徴のある清酒酵母の育種に関する研究はあまり見られない。

そこで、本研究の1つ目の目的である「エタノール生産性の高い清酒酵母の取得」のために、エタノールストレス耐性の高い酵母の分離を検討した。また、2つ目の目的である「清酒・酒粕の付加価値を高める清酒酵母の取得」のために、アミノ酸の組成や生成量に特徴のある清酒酵母の分離を検討した。

まず、エタノールストレス耐性の高い酵母を分離するために、エタノールストレスからの細胞保護効果を有する遊離アミノ酸であるプロリンに着目して、細胞内にプロリンを高生産する清酒酵母の分離を試みた。その過程で、プロリンだけでなくオルニチンも高生産する清酒酵母を分離した。オルニチンは、アンモニアを解毒する尿素回路で機能し、肝臓の働きを促進するアミノ酸として知られている。オルニチン高生産清酒酵母を用いてオルニチン高含有清酒・酒粕を製造できれば、肝臓に優しいイメージを清酒に付与し、酒粕に機能性表示食品としての付加価値をつけることができる。その結果、本研究の2つ目の目的である清酒・酒粕の付加価値を高める清酒酵母の取得を実現できる。得られたプロリン・オルニチン高生産清酒酵母を用いた清酒小仕込み試験により、エタノール生産性が向上するとともに、オルニチン高含有清酒・酒粕の醸造が可能となった。また、プロリン・オルニチン高生産メカニズムを解析する中で、遺伝学的・生化学

的解析により、アルギニン生合成経路 (Fig. 1) 中の *N*-アセチルグルタミン酸をリン酸化する酵素 *N*-アセチルグルタミン酸キナーゼ (NAGK) に導入されたアミノ酸置換がアルギニンによるフィードバック阻害感受性を低下させることによって、プロリン・オルニチンが高生産されることを明らかにした。また、NAGK のアミノ酸置換がアルギニンによるフィードバック阻害感受性に与える影響を解析した。第 1 章でこれらについて述べる。

さらに、酵母のエタノール生産性を向上させる別のアプローチとして、高木研で見出された *N*-アセチル化酵素である *N*-アセチルトランスフェラーゼ *Mpr1* に着目した (Fig. 1)。*Mpr1* は元々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 *N*-アセチル化により無毒化する酵素として実験室酵母 *S. cerevisiae*  $\Sigma$ 1278b 株に見出された (23) が、その後の研究によって細胞内の ROS レベルを制御し、エタノールをはじめ冷凍や乾燥などの酸化ストレスから細胞を保護することが示された (24)。また、*Mpr1* は、細胞内でプロリンの前駆物質である  $\Delta^1$ -ピロリン-5-カルボン酸を *N*-アセチルグルタミルセミアルデヒドに変換し、アルギニンの合成を亢進に寄与することが報告されている (25, 26)。そこで本研究では、エタノールストレスからの細胞保護効果やアルギニン合成への寄与が示唆される *Mpr1* に着目して、*MPR1* 遺伝子を有していない清酒酵母において *Mpr1* の発現を試みた。その結果、熱安定性の向上した変異型 *Mpr1* を発現させるとエタノール生産性が向上することを明らかにした。第 2 章でこれについて述べる。

本研究は、アミノ酸であるプロリン・アルギニンの代謝制御機構に着目して、清酒酵母の高機能開発を行うことで、清酒・酒粕の高付加価値化を試みた研究である。

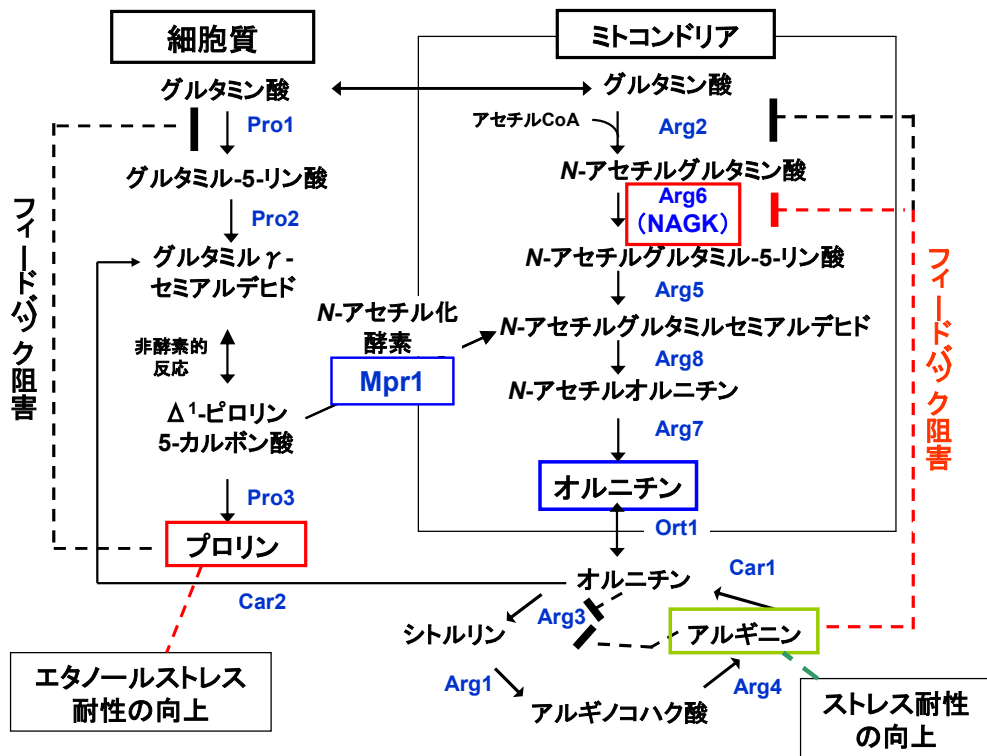


Fig. 1 *S. cerevisiae* におけるプロリン・アルギニン生合成経路

Pro1:  $\gamma$ -グルタミルキナーゼ; Pro2:  $\gamma$ -グルタミルリン酸レダクターゼ;  
 Pro3: L- $\Delta^1$ -ピロリン-5-カルボン酸 (P5C) リダクターゼ; Arg2: N-アセチルグルタミン酸シンターゼ;  
 Arg6: N-アセチルグルタミン酸キナーゼ; Arg5: N-アセチルグルタミルリン酸リダクターゼ; Arg8: N-アセチルオルニチンアミノトランスフェラーゼ;  
 Arg7: N-アセチルオルニチントランスフェラーゼ; Arg3: オルニチントランスカルバミラーゼ; Arg1: アルギノコハク酸シンターゼ;  
 Arg4: アルギノコハク酸リアーゼ; Car1: アルギナーゼ; Mpr1: N-アセチルトランスフェラーゼ

# 第1章 プロリン・オルニチン高生産清酒酵母の育種及びそのアミノ酸高生産メカニズムの解明

## 1-1. 緒言

プロリン (Fig. 2a) は、タンパク質を構成する環状の二級アミノ酸で、 $\alpha$  位に水素を有するカルボニル化合物とアルデヒドあるいはケトンと反応するアルドール反応の不斉触媒活性 (27) や、生体内において表皮細胞増殖作用、角質保湿作用、コラーゲン合成促進活性などの生理機能を有する (28)。酵母において、細胞内プロリンは、浸透圧の調節、冷凍、乾燥や酸化ストレスからの細胞保護効果 (29-34) や低水分や高温環境下でのタンパク質や細胞膜の安定化 (35) といった生理機能を有することが報告されている。酵母では、プロリンは細胞質でグルタミン酸から主に 3 つの酵素 ( $\gamma$ -グルタミルキナーゼ Pro1、グルタミル-5-リン酸レダクターゼ Pro2、P5C レダクターゼ Pro3) により、グルタミル- $\gamma$ -セミアルデヒド (GSA) /  $\Delta^1$ -ピロリン-5-カルボン酸 (P5C) を経て生合成される (Fig. 3)。一方、ミトコンドリアで 2 つの酵素 (プロリンオキシダーゼ Put1、P5C デヒドロゲナーゼ Put2) により、グルタミン酸に変換される。初発の酵素 Pro1 は、最終生成物であるプロリンによるフィードバック阻害を受けるため、プロリンは必要以上には合成されない (36)。これまでに、高木研究室では、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、Fig. 2b) に耐性を示す実験室酵母の変異株から、細胞内にプロリンを高生産する変異株を分離し、その遺伝子解析から Pro1 をコードする *PRO1* 遺伝子に Asp154Asn、Ile150Thr などのアミノ酸置換を伴う変異が導入され、プロリンによ

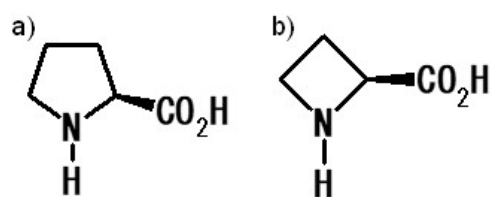


Fig. 2 a) プロリン及び b) アゼチジン-2-カルボン酸 (AZC) の構造式

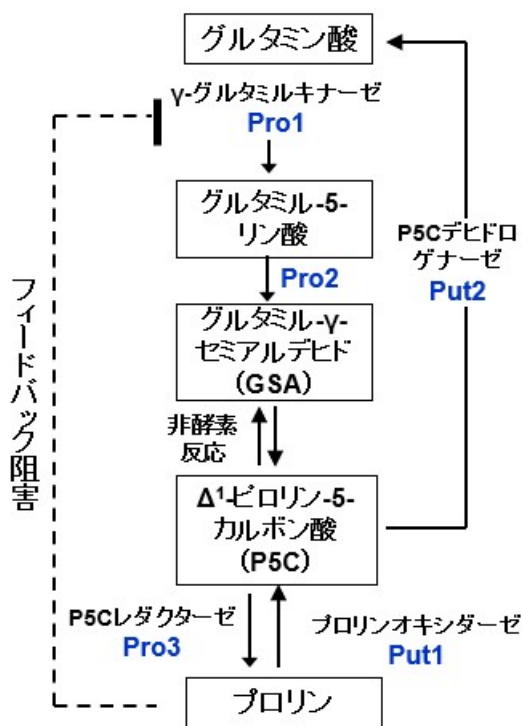


Fig. 3 プロリン代謝制御機構



るフィードバック阻害感受性が低下し、プロリンが高生産されることを見出している(31, 32, 37)。AZCは、プロリンと競合して新生ポリペプチド鎖に取り込まれると、そのタンパク質は正しいフォールディングを形成できずに変性・凝集し、細胞毒性を引き起こすと考えられる(38, 39)。得られた変異株は、細胞内にプロリンを高含有することによって、AZCが新生ポリペプチド鎖に取り込まれにくくなり、AZC耐性を示すと考えられる。また、清酒酵母 K14 由来の一倍体の野生型 *PRO1* 遺伝子を変異型 *PRO1*<sup>D154N</sup> に置換し、さらにプロリン分解酵素をコードする *PUT1* 遺伝子を破壊 ( $\Delta put1$ ) した変異株は、プロリンを細胞内に高生産し、エタノールで処理した後の生存率が向上した(40)ことから、プロリンには、エタノールストレスに対して、細胞保護効果があることが示されている。また、*PUT1* 遺伝子が破壊され、かつ変異型 Pro1 (Asp154Asn, Ile150Thr) を発現する清酒酵母をセルフクロニングで作製し、清酒小仕込み試験を行うと、エタノール生産性が向上した(41)。プロリンの細胞保護効果により、エタノールストレス耐性が向上したことから、エタノール生産性が向上したと考えられる。

しかし、現在セルフクロニング法で作製した酵母は、食品産業界や消費者に受け入れられる状況にない。従って、清酒酵母のエタノール生産性を向上させるために、プロリンを高生産する産業用清酒酵母を取得するには、遺伝子組換え技術を用いずに突然変異処理を行い、AZC などの薬剤耐性を指標として変異株を分離することが必要となる。そこで、エタノールストレス耐性及びエタノール生産性の高い清酒酵母を分離するために、既存の清酒酵母を親株として、メタンスルホン酸エチル(EMS)で突然変異処理後、AZC 及びエタノール耐性を指標として、細胞内にプロリンを高生産する変異株を4株分離した。それらの中の3株は、プロリンだけでなく、肝機能改善などの機能性を有するアミノ酸であるオルニチンを細胞内に高生産する変異株であった。

オルニチンは、タンパク質を構成しないアミノ酸の一つで、タンパク質分解で生じるアンモニアを肝臓で解毒する尿素回路で機能することで、肝臓の働きを促進する生理機能を有する。オルニチンは、キノコ(42)、しじみ(43)、チーズ(44)などの食品に多く含まれていて、アルコール摂取後の疲労低減(45)、運動後の血漿中アンモニアの減少や疲れの回復(46)、睡眠改善(47, 48)、成長ホルモンの増加(49)などの機能性を有することが知られている。

Fig. 1 に示すように、オルニチンは、ミトコンドリア中で、グルタミン酸から *N*-アセチルグルタミン酸(NAG)、*N*-アセチルグルタミル-5-リン酸、*N*-アセチルグルタミルセミアルデヒドを経て生合成される。その NAG を *N*-アセチルグルタミルセミアルデヒドまで変換する酵素群をコードする *ARG5,6* 遺伝子は、ミトコンドリア移行シグナル(MTS)配列(1-57 残基)と、アミノ末端の *ARG6* 遺伝子産物である、NAG をリン酸化する酵素 *N*-アセチルグルタミン酸キナーゼ(NAGK)(58-513 残基)と、カルボキシル末端の *ARG5* 遺伝子産物である *N*-アセチルグルタミルリン酸レダクターゼ(NAG5PR)を含む前駆体タンパク質をコードする(50)。NAGK は、アルギニン生合成経路の律速酵素の一つであり、アルギニンによるフィードバック阻害を受ける(51)。遺伝子組換えプラスミドが導入された実験室酵母

(51)や *Corynebacterium glutamicum* (52)や *C. crenatum* (53)由来のアミノ酸置換された NAGK において、NAGK のアミノ酸置換によって、アルギニンによるフィードバック阻害感受性が低下した報告はあるが、清酒酵母を含めた産業用酵母で実現した報告はない。本研究で、取得したオルニチン高生産変異株の NAGK にアミノ酸置換が導入され、その結果、アルギニンによるフィードバック阻害感受性が低下し、プロリン・オルニチンが高生産されることを見出した。また、それら変異株を用いた清酒小仕込み試験で、最も多く細胞内にオルニチンを高生産した変異株では、親株よりもエタノール生産性が向上したことを確認した。さらに、部位特異的変異導入により、NAGK にアミノ酸置換を導入し、アルギニンによるフィードバック阻害感受性に与える影響について解析した。

## 1-2. 材料と方法

### 1-2-1. 菌株、プラスミド及び材料

本研究では、実験室酵母 (*S. cerevisiae*) の BY4741 株 (*MATa his3 Δ1 leu2 Δ0 met15 Δ0 ura3 Δ0*)、BY4741 *arg5,6 Δ* 株 (BY4741 *arg5,6::kanMX6*)、二倍体清酒酵母 K901 (*S. cerevisiae*) を使用した (Table 1)。また、プラスミドのクローニングやプラスミドの導入には、*Escherichia coli* の DH5α 株 ( $F^-$ ,  $\phi 80dlacZ\Delta M15$ ,  $\Delta(lacZYA-argF)$  U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17* ( $r^-_k$ ,  $m_k^+$ ), *phoA*, *supE44*,  $\lambda^-$ , *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*) を使用した (Table 1)。NAGK の発現及び精製には、*E. coli* の BL21 (DE3) 株 [ $F^- ompT hsdS_B$  ( $r^-_B m^-_B$ ) *gal dcm* (DE3)] を使用した (Table 1)。

**Table 1** 使用菌株

Strain	Genotype
<i>E. coli</i>	
DH5a	$F^-$ , $\phi 80dlacZ\Delta M15$ , $\Delta(lacZYA-argF)$ U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> ( $r^-_k$ , $m_k^+$ ), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , $\lambda^-$ , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>
BL21(DE3)	$F^- ompT hsdS_B$ ( $r^-_B m^-_B$ ) <i>gal dcm</i> (DE3)
<i>S. cerevisiae</i>	
BY4741	<i>MATa his3 Δ1 leu2 Δ0 met15 Δ0 ura3 Δ0</i>
BY4741 <i>arg5,6 Δ</i>	BY4741 <i>arg5,6::kanMX6</i>
K901	a diploid sake strain Kyokai No. 901

酵母の増殖には、YPD 培地 (10 g/L yeast extract, 20 g/L peptone, 20 g/L glucose)、最少合成培地 (SD) (1.7 g/L yeast nitrogen base without amino acid and ammonium sulfate, 5 g/L ammonium sulfate, 20 g/L glucose), 0.04% L-leucine, 0.008% L histidine, L-methionine 含有 SD 培地 (SD +

Leu + His + Met)を使用した。プロリン高生産株のスクリーニングには、SD培地に AZC を 1 mg/mL 添加した培地を使用した。清酒小仕込み試験を行うための酵母の培養には、麴汁液体培地を使用した。麴汁液体培地は、米麴 1 kg に水 3 L を加えて 55°C で一晩加温後ろ過搾汁して得られた麴汁を Brix10 程度になるように水で希釈した後、乳酸で pH3 程度に調整してオートクレーブで滅菌して作製した。*E. coli* 形質転換体は、100 µg/mL ampicillin 含有 Luria-Bertani (LB) 培地 (5 g/L yeast extract, 10 g/L tryptone, 10 g/L NaCl) を用いて培養した。必要に応じて、2 %寒天を培地に添加して固化させて、平板培地とした。

#### 1-2-2. AZC 耐性変異株の分離

二倍体清酒酵母 K901 株を 4% EMS 含有 100 mM リン酸緩衝液 (pH7.0) 中で、30°C、1 時間インキュベート後 (変異処理)、10%チオ硫酸ナトリウム及び滅菌水で洗浄した。変異処理を行った酵母細胞約  $2\sim 4 \times 10^6$  を 1 枚の AZC 1 mg/L 含有 SD 平板培地に塗布し、30°C で培養後に生育したコロニーを AZC 耐性変異株として分離した。上記作業を 2 回行った。

#### 1-2-3. 細胞内アミノ酸含量の測定

AZC 耐性変異株を SD 液体培地あるいは麴汁液体培地で 30°C、48 時間振とう培養し、集菌後、滅菌水で洗浄した。OD<sub>600</sub>=10 量の菌体を 500 µL の滅菌水に懸濁後、99°C で 20 分間熱水抽出を行った。遠心分離後の上清を 0.45 µm メンブレンフィルターでろ過し、UF-Amino Station (島津製作所製) により、細胞内のアミノ酸含量を測定した。

#### 1-2-4. AZC 耐性変異株の AZC 及びエタノールストレス耐性の評価

AZC 耐性変異株を SD 液体培地で 30°C、48 時間振とう培養し、OD<sub>600</sub>=1 となる菌量に希釈後、10 倍ずつの希釈系列液を作製し、AZC 1 mg/mL 含有 SD あるいは、15 %含有 YPD 平板培地にスポットして 30°C、2~8 日間培養した。

#### 1-2-5. 清酒小仕込み試験

親株 (K901) 及びプロリン高生産変異株を用いて、総米 46g の清酒小仕込み試験 (一段仕込み) を行った。36.4 g の α 化米に、9.6 g の乾燥麴米 (精米した米に *Aspergillus oryzae* を増殖させたもの)、90%乳酸 50 µL、汲み水 87 mL、OD<sub>600</sub>=60 菌量を含む酵母培養液を加えて、15°C、25 日間培養した。もろみを遠心分離し、上清を清酒、残渣を酒粕とした。清酒を 5 倍希釈し、0.45 µm メンブレンフィルターでろ過して、アミノ酸分析用サンプルとした。酒粕 5g を採取し、99°C で 30 分間の熱水抽出を行い、15,000×g で 5 分間遠心分離し、上清を集めて、イオン交換水で 25 mL に定容後、0.45 µm メンブレンフィルターでろ過して、アミノ酸分析用サンプルとした。それらのサンプルを用いて、UF-Amino Station (島津製作所製) により、清酒・酒粕中のアミノ酸含量を測定した。振動

密度計（アントンパール製）を用いて、日本酒度とエタノール濃度を測定した。国税庁所定分析法注解（54）に記載の方法で、酸度・アミノ酸度を測定した。

#### 1-2-6. 全ゲノム解析

Qubit（Thermo Fisher Scientific 製）を用いて、AZC 耐性変異株（A901-8 及び A902-4）と親株（K901）から抽出した DNA 量を定量した。Nextera DNA Library Preparation Kit（Illumina）を用いて、次世代シーケンスライブラリーを作製した。MiSeq Reagent Kit v2 or v3（Illumina）及び MiSeq（Illumina 製）を用いて、全ゲノムの DNA 配列情報を取得した。それらの DNA 配列情報について、CLC Genomics Workbench v 10.1.1（Quiagen）を用いて、トリミングやリファレンス *S.cerevisiae* S288C（GCA\_000146045）ゲノムへのマッピングなどのデータ処理を行った。

#### 1-2-7. ARG5,6 遺伝子発現プラスミドの構築

野生型 ARG5,6 遺伝子を発現する pRS416-ARG5,6<sup>WT</sup> プラスミドを構築するために、BY4741 から抽出した DNA を鋳型として、ARG5,6 の上流・下流 1,000 bp を含む領域を、KOD plus DNA polymerase を用いて、Table 2 に示すプライマーで増幅した。得られた DNA 断片を、In-fusion HD Cloning Kit を用いて、pRS416 の HindIII-BamHI 認識部位に挿入し、DpnI 処理により鋳型プラスミドを消化後、*E. coli* DH5 $\alpha$  株に導入した。得られた形質転換体からプラスミドを抽出し、pRS416-ARG5,6<sup>WT</sup> を得た。次に、pRS416-ARG5,6<sup>WT</sup> を鋳型として、Table 2 に示す変異導入プライマーを用いて、NAGK におけるアミノ酸置換（T340A, T340L, T340R, T340E, T340N, T340S, T340I, C119Y, C119S, C119L, C119F, V267A, V267G, V267L）を伴う部位特異的変異導入を行った。PCR 産物を DpnI 処理し、鋳型プラスミドを消化後、*E. coli* DH5 $\alpha$  株に導入した。得られた形質転換体から、プラスミドを抽出して、pRS416-ARG5,6<sup>mut</sup>（mut : T340A, T340L, T340R, T340E, T340N, T340S, T340I, C119Y, C119S, C119L, C119F, V267A, V267G, V267L）を得た。ARG5,6 遺伝子領域の塩基配列は、BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit を用いて、DNA シーケンスで確認した。

次に、野生型及び変異型 ARG5,6 遺伝子を含む pRS416 を酢酸リチウム法（55）で、BY4741 *arg5,6*  $\Delta$  株に導入し、SD + Leu + His + Met 平板培地に植菌後、30℃で3日間培養して形質転換体を得た（Table 3）。

#### 1-2-8. NAGK 発現プラスミドの構築

組換え NAGK 発現プラスミドを下記のように構築した。ARG5,6 遺伝子は、ミトコンドリア移行シグナル（MTS）配列（1-57 残基）とアミノ末端の NAGK（58-513 残基）とカルボキシル末端の NAG5PR を含む前駆体タンパク質をコードする（50）。前駆体タンパク質はミトコンドリア内で2種類の酵素に分離した後、MTS が除去され、成熟型 NAGK に変換される（56）。MTS 配列を欠損した

NAGK を作製するために、酵素の 58-513 番目残基をコードする DNA 配列について、pRS416-*ARG5,6*<sup>WT</sup> あるいは pRS416-*ARG5,6*<sup>mut</sup> を鋳型として、Table 2 に示すプライマー (pQE-2 NdHi Fw (*Nde*I) 及び pQE-2 NdHi Rv (*Hind*III)) と KOD plus DNA polymerase を用いて、PCR で増幅した。In-Fusion HD Cloning Kit を用いて、得られた DNA 断片を pQE-2 の *Nde*I – *Hind*III 認識部位に挿入し、*Dpn*I 処理後、*E. coli* DH5 $\alpha$  株に導入した。得られた形質転換体からプラスミドを抽出し、pQE-2-NAGK-WT、pQE-2-NAGK-variants (T340A, T340L, T340R, T340E, T340N, T340S, T340I, C119Y, C119S, C119L, C119F, V267A, V267G, V267L) を得た。NAGK 領域の塩基配列は、DNA シーケンスで確認した。得られたプラスミドを BL21 (DE3) [*F*<sup>-</sup> *ompT hsdS*<sub>B</sub> (*r*<sub>B</sub><sup>-</sup>*m*<sub>B</sub><sup>-</sup>) *gal dcm* (DE3)] 株に導入した。

Table 2 使用プライマー

Primer	Sequence (5' → 3') <sup>a</sup>
<i>ARG5,6</i> FW ( <i>Hind</i> III)	CGG TAT CGA <u>TAA</u> GCT <u>TAA</u> GAA ACT TAT AAA AAG TAT CCG
<i>ARG5,6</i> RV ( <i>Bam</i> HI)	TAG AAC TAG <u>TGG</u> ATC <u>CTC</u> TTA TCG AAT TGG ACA GGT
Mutagenic primers	
<i>ARG5,6</i> (T340A) FW	AAA GAA CTG TTC <u>G*CT</u> GAT TCT GGT GCG
<i>ARG5,6</i> (T340A) RV	CGC ACC AGA ATC <u>AGC*</u> GAA CAG TTC TTT
<i>ARG5,6</i> (T340L) FW	AAA GAA CTG TTC <u>T*T*A*</u> GAT TCT GGT GCG
<i>ARG5,6</i> (T340L) RV	CGC ACC AGA ATC <u>T*A*A</u> GAA CAG TTC TTT
<i>ARG5,6</i> (T340R) FW	AAA GAA CTG TTC <u>AG*G*</u> GAT TCT GGT GCG
<i>ARG5,6</i> (T340R) RV	CGC ACC AGA ATC <u>C*C*T</u> GAA CAG TTC TTT
<i>ARG5,6</i> (T340E) FW	AAA GAA CTG TTC <u>G*A*A*</u> GAT TCT GGT GCG
<i>ARG5,6</i> (T340E) RV	CGC ACC AGA ATC <u>T*T*C*</u> GAA CAG TTC TTT
<i>ARG5,6</i> (T340N) FW	AAA GAA CTG TTC <u>AA*T</u> GAT TCT GGT GCG
<i>ARG5,6</i> (T340N) RV	CGC ACC AGA ATC <u>AT*T</u> GAA CAG TTC TTT
<i>ARG5,6</i> (T340S) FW	AAA GAA CTG TTC <u>T*CT</u> GAT TCT GGT GCG
<i>ARG5,6</i> (T340S) RV	CGC ACC AGA ATC <u>AGA*</u> GAA CAG TTC TTT
<i>ARG5,6</i> (T340I) FW	AAG AAC TGT TCA <u>T*TG</u> ATT CTG GTG C
<i>ARG5,6</i> (T340I) RV	GCA CCA GAA TCA <u>A*TG</u> AAC AGT TCT T
<i>ARG5,6</i> (C119Y) FW	GAA CTC GCT TCC <u>TA*C</u> TTG GCA TTT TTG
<i>ARG5,6</i> (C119Y) RV	CAA AAA TGC CAA <u>GT*A</u> GGA AGC GAG TTC
<i>ARG5,6</i> (C119S) FW	GAA CTC GCT TCC <u>TC*A*</u> TTG GCA TTT TTG
<i>ARG5,6</i> (C119S) RV	CAA AAA TGC CAA <u>T*G*A</u> GGA AGC GAG TTC
<i>ARG5,6</i> (C119F) FW	GAA CTC GCT TCC <u>TT*C</u> TTG GCA TTT TTG
<i>ARG5,6</i> (C119F) RV	CAA AAA TGC CAA <u>GA*A</u> GGA AGC GAG TTC
<i>ARG5,6</i> (C119L) FW	GAA CTC GCT TCC <u>TT*A*</u> TTG GCA TTT TTG
<i>ARG5,6</i> (C119L) RV	CAA AAA TGC CAA <u>T*A*A</u> GGA AGC GAG TTC
<i>ARG5,6</i> (V267A) FW	CCT TTG AAG ATC <u>GC*T</u> TAC CTG AAT GAG
<i>ARG5,6</i> (V267A) RV	CTC ATT CAG GTA <u>AG*C</u> GAT CTT CAA AGG
<i>ARG5,6</i> (V267G) FW	CCT TTG AAG ATC <u>GG*T</u> TAC CTG AAT GAG
<i>ARG5,6</i> (V267G) RV	CTC ATT CAG GTA <u>AC*C</u> GAT CTT CAA AGG
<i>ARG5,6</i> (V267L) FW	CCT TTG AAG ATC <u>C*TT</u> TAC CTG AAT GAG
<i>ARG5,6</i> (V267L) RV	CTC ATT CAG GTA <u>AAG*</u> GAT CTT CAA AGG
pQE-2 NdHi Fw ( <i>Nde</i> I)	ATC ACC ATC ACC <u>ATA</u> <u>TGG</u> TTT CAT CTA CTA ACG GCT T
pQE-2 NdHi Rv ( <i>Hind</i> III)	TCA GCT AAT <u>TAA</u> GCT <u>TTC</u> AAC TAC TTG CTG ATG AGT

一重線：*Hind*III、*Bam*HI、*Nde*I、*Hind*III 制限酵素認識部位を示す。

\*:変異塩基を示す。

二重線:アミノ酸置換に相当する塩基を示す。

**Table 3 形質転換体**

BY4741 <i>arg5,6Δ</i> (pRS416- <i>ARG5,6</i> <sup>T340A</sup> )
BY4741 <i>arg5,6Δ</i> (pRS416- <i>ARG5,6</i> <sup>T340L</sup> )
BY4741 <i>arg5,6Δ</i> (pRS416- <i>ARG5,6</i> <sup>T340R</sup> )
BY4741 <i>arg5,6Δ</i> (pRS416- <i>ARG5,6</i> <sup>T340E</sup> )
BY4741 <i>arg5,6Δ</i> (pRS416- <i>ARG5,6</i> <sup>T340N</sup> )
BY4741 <i>arg5,6Δ</i> (pRS416- <i>ARG5,6</i> <sup>T340S</sup> )
BY4741 <i>arg5,6Δ</i> (pRS416- <i>ARG5,6</i> <sup>T340I</sup> )
BY4741 <i>arg5,6Δ</i> (pRS416- <i>ARG5,6</i> <sup>C119Y</sup> )
BY4741 <i>arg5,6Δ</i> (pRS416- <i>ARG5,6</i> <sup>C119S</sup> )
BY4741 <i>arg5,6Δ</i> (pRS416- <i>ARG5,6</i> <sup>C119L</sup> )
BY4741 <i>arg5,6Δ</i> (pRS416- <i>ARG5,6</i> <sup>C119F</sup> )
BY4741 <i>arg5,6Δ</i> (pRS416- <i>ARG5,6</i> <sup>V267A</sup> )
BY4741 <i>arg5,6Δ</i> (pRS416- <i>ARG5,6</i> <sup>V267G</sup> )
BY4741 <i>arg5,6Δ</i> (pRS416- <i>ARG5,6</i> <sup>V267L</sup> )

### 1-2-9. 組換え NAGK の発現

野生型及び変異型 NAGK 発現用プラスミド pQE-2-NAGK-WT、pQE-2-NAGK-variants を導入した BL21 (DE3) 株の形質転換体をアンピシリン含有 LB 培地にて 37°C で OD<sub>600</sub> = 0.6~0.8 まで培養した。培養液を 18°C まで冷却し、isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) を終濃度 0.1 mM となるように添加し、18°C で 18 時間タンパク質の発現誘導を行った。集菌後、氷で冷却した sonication buffer (10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5)) で洗浄後、すぐに使用しない場合、-80°C で保存した。

### 1-2-10. 組換え NAGK の精製

BL21 (DE3) 株の形質転換体を冷却した sonication buffer で懸濁させ、超音波破碎機 (Ultrasonic generator US-150T, 日本精機製) を用いて、細胞を破碎した。破碎液を 15,000 rpm で 20 分間遠心した後、上清を 0.45 μm メンブレンフィルターでろ過し、粗酵素液とした。粗酵素液を sonication buffer で平衡化した Ni アフィニティーカラム (Ni Sepharose 6 Fast Flow resin) に負荷して、His-tag 付き NAGK を吸着させ、20 mM あるいは 70 mM イミダゾールを含む sonication buffer により、夾雑タンパク質を洗い流した後、500 mM イミダゾールを含む sonication buffer で、His-tag 付き NAGK を溶出させた。NAGK 精製タンパク質の純度は、SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS - PAGE) で分離後、Coomassie Brilliant Blue (CBB) 染色により、純度を評価した。NAGK 精製タンパク質の濃度は、Bio-Rad Protein Assay で定量した。

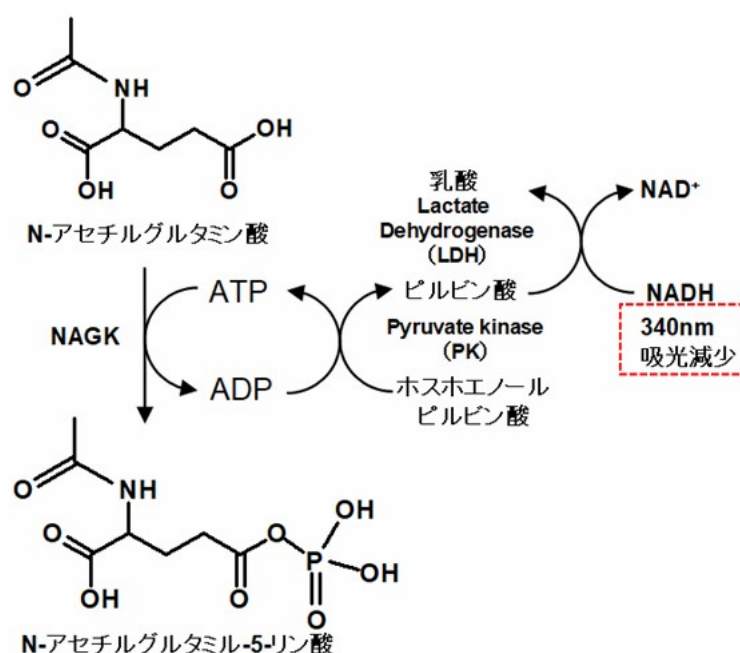


Fig. 4 PK/LDH-coupled enzyme system

#### 1-2-11. 組換え NAGK の活性測定

NAGK 活性は、ホスホエノールピルビン酸 (PEP) 及び pyruvate kinase (PK) 存在下で、NAG のリン酸化で生成される ADP を、lactate dehydrogenase (LDH) 依存的にピルビン酸が乳酸に還元される際に消費する nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) の減少量として、Synergy HTX microplate reader (Bio-Tek Instruments 製) で 340 nm をモニターすることにより測定した (Fig. 4)。NAGK 反応は、終濃度が ATP 5 mM、PEP 1 mM、HEPES (pH 7.5) 100 mM、MgCl<sub>2</sub> 10 mM、NADH 0.25 mM、アルギニン 0-100 mM となる溶液をマイクロプレートに加えた後、PK / LDH (20 U / 30U)、5 μg NAGK を添加し、30°C で予備加温した後、NAG (終濃度 25 mM) を添加して、30°C で 10 分間行った。NAGK 比活性 (U / mg) は反応の初速度を NADH の減衰係数 ( $\epsilon_{340\text{nm}} = 6.22\text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) から求めて算出した。NAGK 活性の 50% 阻害濃度 ( $\text{IC}_{50}^{\text{Arg}}$ ) を測定するために、インヒビターであるアルギニンを添加して NAGK 活性を測定した。 $\text{IC}_{50}^{\text{Arg}}$  の算出は、アルギニン添加濃度を変えて NAGK 活性を独立して 3 回測定し、GraphPad Prism version 9 (GraphPad software 製) を使って非線形回帰分析でカーブフィッティングして行った。

#### 1-2-12. 構造解析

NAGK のアミノ酸置換が構造に与える影響を解析するために、Thr340 を Ala340、Leu340、Arg340、Glu340、Asn340、Ser340、Ile340 に置換した変異型 NAGK におけるアルギニン結合部位の構造を、*S.cerevisiae* (PDB ID code: 3ZZH) を鋳型として Pymol (<http://www.pymol.org>) を用いて予測した。また、Cys119 を Tyr119 に、Val267 を Ala267 に置換した変異型 NAGK におけるア

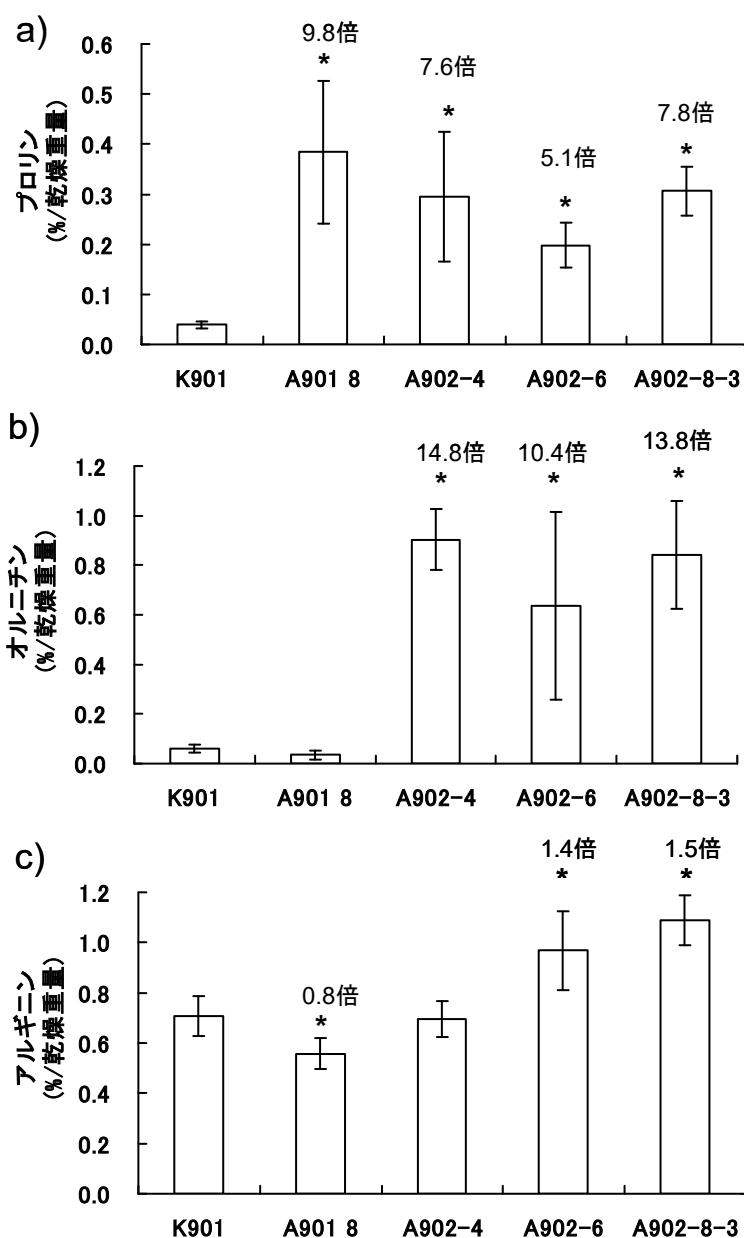


ルギニン結合部位の構造も同様に予測した。変異型 NAGK のアルギニン結合部位の構造は、Pymol で描画した。

### 1-3. 結果

#### 1-3-1. プロリン高生産清酒酵母の分離

エタノール高生産清酒酵母を分離する目的で、K901 株を親株として、EMS 処理後、AZC 含有 SD 平板培地に塗布し、20 個の AZC 耐性変異株を取得し



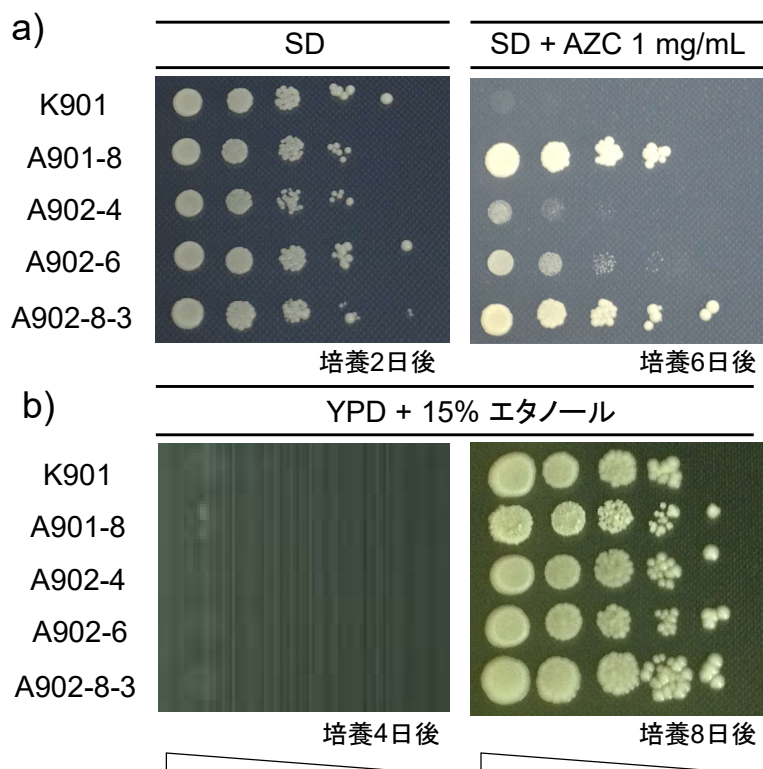
**Fig. 5** 細胞内 (a) プロリン, (b) オルニチン, (c) アルギニン含量 SD 液体培地で 30℃、48 時間培養後の AZC 耐性変異株の細胞内アミノ酸含量を示す。独立して 3 回の測定を行い、平均および標準偏差を算出した。\*は、親株に対して *t* 検定で有意な差 ( $p < 0.05$ ) を示す。

た。各変異株の細胞内プロリン含量を測定した結果、15株で親株よりも細胞内にプロリンを2倍以上高生産していた。それらの中から、親株よりも細胞内にプロリンを5倍以上蓄積し、かつスポット試験によりエタノール耐性が親株よりも高い株を4株(A901-8, A902-4, A902-6, A902-8-3株)取得した。

各変異株の細胞内プロリン、オルニチン及びアルギニン含量を Fig. 5 に示す。いずれの変異株も親株よりも5倍以上プロリンを高生産していた。また、3株(A902-4, A902-6及びA902-8-3株)では、オルニチンを親株よりも10倍以上高生産し、特にA902-4株は、親株の14.8倍と最も多くのオルニチンを細胞内に高生産していた。細胞内アルギニン含量は、親株よりもA901-8株で若干減少し、A906及びA902-8-3株では、若干増加していた。

### 1-3-2. AZC 耐性変異株の AZC 及びエタノール耐性

得られた AZC 耐性変異株の AZC 及びエタノール耐性をスポット試験で評価した。Fig. 6a に示すように、親株(K901株)は、AZC 含有 SD 平板培地で生育できないが、いずれの AZC 耐性変異株も AZC 含有 SD 平板培地で良好に生育しており、AZC 耐性を有していた。また、Fig. 6b に示すように、15%エタノール含有 YPD 培地で培養した場合、培養後4日目では親株及び AZC 耐性変異

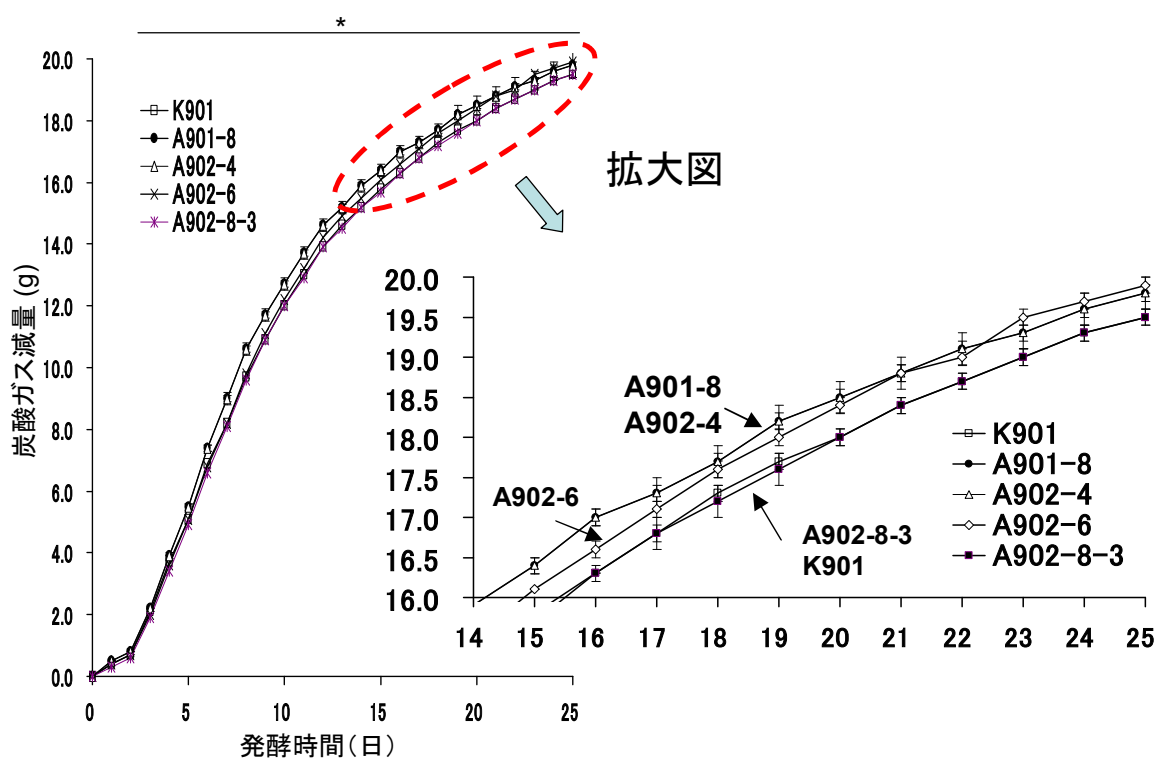


**Fig. 6 AZC 耐性変異株の a) AZC 及び b) エタノール耐性の評価**  
 AZC 耐性変異株を SD あるいは YPD 液体培地で 30°C48 時間培養後、OD=1 の菌液を作製し、その菌液から 10 倍希釈系列を作製し、SD、AZC 1 mg/mL 含有 SD、15%エタノール含有 YPD 平板培地にスポットし、30°C、2~8 日間培養した。

株は生育していなかったが、培養後 8 日目で、AZC 耐性変異株は、親株と比較してわずかに生育が良かった。以上の結果から、AZC 耐性変異株は、親株よりエタノール耐性が向上した。

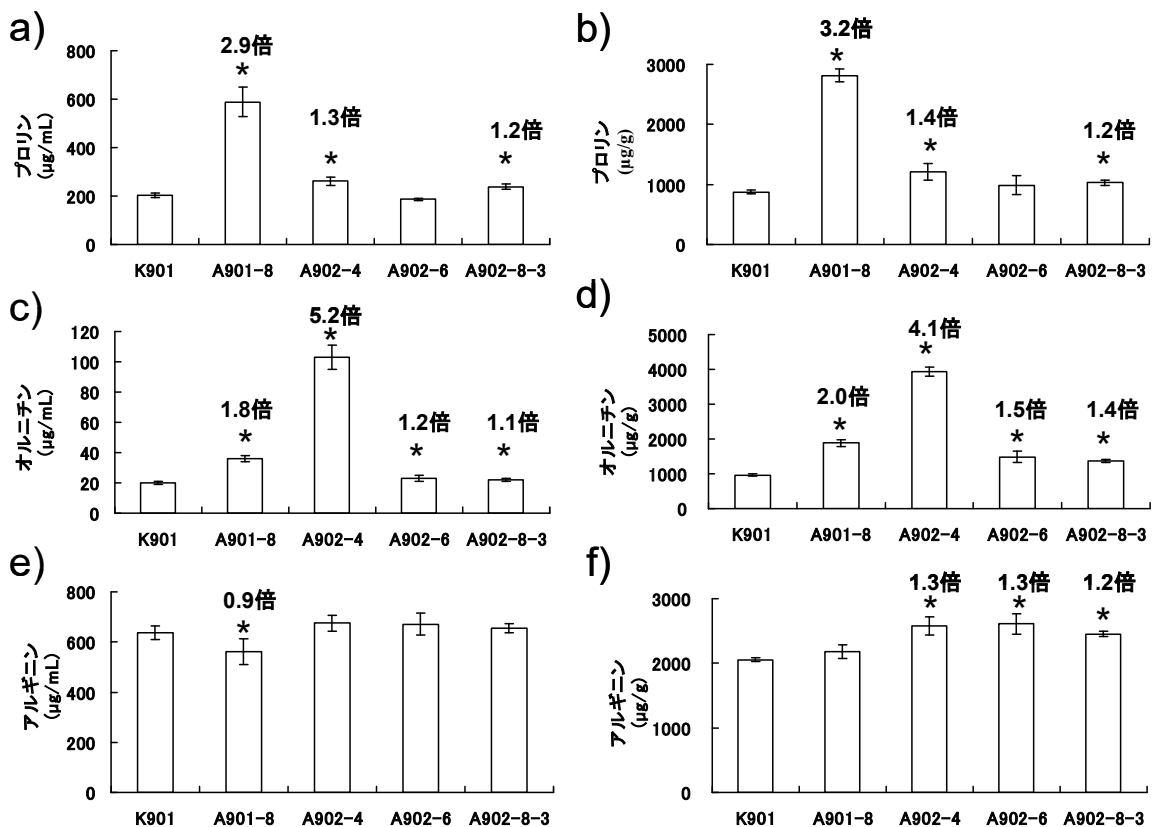
### 1-3-3. 清酒小仕込み試験

得られた AZC 耐性変異株 (A901-8, A902-4, A902-6, A902-8-3 株) を用いて、総米 46g の清酒小仕込み試験を行った。清酒もろみの重量変化を炭酸ガス減量として計測し、その炭酸ガス減量をモニターすることによって、エタノール生産性を評価した (Fig. 7)。炭酸ガス減量とエタノール生産には相関性があることが知られている (57)。A902-8-3 株のエタノール生産性は、親株 (K901) とほ



**Fig. 7 清酒小仕込み試験における炭酸ガス減量**

AZC 耐性変異株を用いた総米 46g での清酒小仕込み試験の 1 日ごとの炭酸ガス減量を示す。独立して 3 回の測定を行い、平均及び標準偏差を算出した。\*は、A902-4 株と親株と比較して  $t$  検定で有意な差 ( $p < 0.05$ ) を示す。



**Fig. 8** 清酒及び酒粕中の(a), (b)プロリン、(c), (d)オルニチン及び(e), (f)アルギニン含量

親株と変異株で醸造した清酒・酒粕中のプロリン、オルニチン及びアルギニン含量を示す。独立して3回の測定を行い、平均及び標準偏差を算出した。\*は、親株と比較して *t* 検定で有意な差 ( $p < 0.05$ ) を示す。

ほぼ同程度だったが、A901-8、A902-4、A902-6株のエタノール生産性は、親株よりも増加した。特に細胞内にオルニチンを最も高生産したA902-4株は、醸造2日目から最終日まで親株よりも有意にエタノール生産性が向上した。

親株あるいは変異株を用いて醸造した清酒・酒粕中のプロリン、オルニチン及びアルギニン含量をFig. 8に示す。細胞内にオルニチンを最も高生産したA902-4株で醸造した清酒・酒粕中には、親株よりもオルニチンがそれぞれ5.2倍、4.1倍多く含まれていた。細胞内にオルニチンを高生産したA902-6及びA902-8-3株で醸造した清酒・酒粕中のオルニチン量は、親株と同程度であった。また、細胞内にプロリンを最も高生産したA901-8株で醸造した清酒・酒粕中には、親株よりもプロリンがそれぞれ2.9倍、3.2倍多く含まれていた。清酒中のアルギニン含量は、親株と同程度であり、酒粕中のアルギニン含量は、A902-4、A902-6、A902-8-3株で若干増加した。

上槽後の清酒の成分分析結果をTable 4に示す。日本酒度は、糖の残存量の指標となる値で、その値が大きいと、辛口の清酒を意味する。親株で醸造した清酒と比較して、A901-8株以外の株で醸造した清酒の日本酒度にほとん

**Table 4** 清酒の成分分析

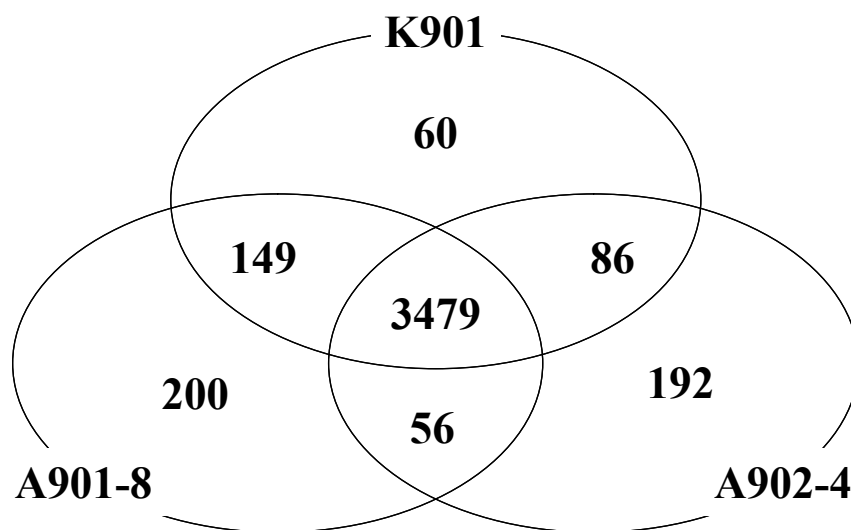
株	日本酒度	酸度 (mL)	アミノ酸度 (mL)	アルコール (%)
K901	13.2 ± 0.3	2.9 ± 0.0	2.0 ± 0.1	18.5 ± 0.2
A901-8	13.9 ± 0.4 <sup>a</sup>	2.4 ± 0.1 <sup>a</sup>	2.1 ± 0.1	18.6 ± 0.1
A902-4	13.4 ± 0.3	2.3 ± 0.1 <sup>a</sup>	2.2 ± 0.2	18.8 ± 0.1 <sup>a</sup>
A902-6	13.2 ± 0.3	2.8 ± 0.1	2.0 ± 0.0	18.8 ± 0.1 <sup>a</sup>
A902-8-3	13.0 ± 0.4	2.9 ± 0.1	2.0 ± 0.0	18.5 ± 0.2

a は、親株に対して *t* 検定で有意な差 ( $p < 0.05$ ) を示す。

ど差が見られなかった。すべての株で醸造した清酒のアミノ酸度にほとんど差が見られなかったが、A901-8 及び A902-4 株で醸造した清酒の酸度は、親株よりも減少していた。A902-4 及び A902-6 株で醸造した清酒のアルコール濃度は親株よりも増加していた。

#### 1-3-4. 全ゲノム解析

プロリン・オルニチン高生産に関与する遺伝子変異を探索するために、A901-8 株 (プロリン高生産酵母)、A902-4 株 (プロリン・オルニチン高生産酵母) 及び K901 株 (親株) の全ゲノム解析を行った。いずれの株も 12,157,105 bp のシーケンスを解読し、K901 株、A901-8 株及び A902-4 株において、S288C にマッピングされた塩基数はそれぞれ、1,465,223,773 bp、1,501,210,871 bp、1,222,659,606 bp で、depth 値は、それぞれ、120.52、123.48、100.57 であった。また、Fig. 9 に示すように、全ての株の約 3500 遺伝子に共通のアミノ酸置換を伴う変異が見られた。一方、親株と比較して、A901-8 株と A902-4 株には open reading frame 内にアミノ酸置換を伴う変異を有する遺伝子がそれぞれ 256、248 個存在していた (Fig. 9, Table 5, Table 6)。それらの遺伝子の中に、プロリン・オルニチン生合成に関与する遺伝子 (*PRO1*, *PRO2*, *PRO3*, *ARG1*, *ARG2*, *ARG3*, *ARG4*, *ARG5,6*, *ARG7*, *ARG8*, *ORT1*, *CAR1*, *CAR2*) が含まれているかどうかを探索した。その結果、A901-8 株では、 $\gamma$ -グルタミルキナーゼをコードする *PRO1* 遺伝子に、Pro247 が Ser に置換されるホモ変異 (*PRO1*<sup>P247S</sup>) が見られた (Table 5)。また、オルニチントランスアミナーゼをコードする *CAR2* 遺伝子に、Ala82 が Val に置換されるヘテロ変異 (*CAR2*<sup>A82V</sup>) が見られた (Table 5)。一方、A902-4 株には、*PRO1* 遺伝子に *PRO1*<sup>Thr259Ile</sup> の変異が見られた (Table 6)。また、A902-4 株では、NAGK をコードする *ARG5,6* 遺伝子に、Thr340 が Ile に置換されるホモ変異 (*ARG5,6*<sup>T340I</sup>) が見られた (Table 6)。A901-8 株には、*ARG5,6* 遺伝子に変異が見られなかった (Table 5)。



**Fig. 9** アミノ酸置換を伴う変異をもつ遺伝子数を示すベン図

数字は、実験室酵母 *S. cerevisiae* S288C と比較してアミノ酸置換を伴う変異を持つ遺伝子数を示す。A901-8 及び A902-4 株には、親株 (K901) と比較して、open reading frame にアミノ酸置換を伴う変異をもつ遺伝子数は、それぞれ、256 (200 + 56)、248 (192 + 56) であった。文献 (71) より改変転載

**Table 5 A901-8 株におけるアミノ酸置換を伴う変異**

遺伝子	アミノ酸置換	遺伝子	アミノ酸置換	遺伝子	アミノ酸置換
<i>ABD1</i>	Arg105Lys	<i>COS7</i>	Lys7Glu	<i>FLO9</i>	Val792Ile
<i>AGA1</i>	Pro228Ser	<i>COS7</i>	Ser16Pro	<i>FLO9</i>	Phe287Ser
<i>AGP1</i>	Ala171Thr	<i>COS7</i>	Ser34Asn	<i>FLO9</i>	Gly1152Glu
<i>AIM44</i>	Glu683 del	<i>COS7</i>	Ser35Glu	<i>FLO9</i>	Ala366Ile
<i>AIM44</i>	Asp681Glu	<i>COS7</i>	Phe36Leu	<i>FLO9</i>	Thr364Ser
<i>AIM44</i>	Asp671Glu	<i>COS8</i>	Phe85Ile	<i>FLO9</i>	Ala227Ser
<i>AIM44</i>	Asn670Lys	<i>COS8</i>	Phe85Leu	<i>FMP49</i>	[Val242Ala]; [Thr11Ala]
<i>AIM44</i>	Asn670Asp	<i>CPD1</i>	Pro10Leu	<i>FMT1</i>	Gly344Asp
<i>AKR1</i>	Gly247Glu	<i>CSF1</i>	Glu1583Lys	<i>FOL3</i>	Glu167Lys
<i>ALD5</i>	Trp189*	<i>CSS1</i>	Glu822Lys	<i>FUN30</i>	Gly1128Glu
<i>ALR2</i>	Ala542Thr	<i>CTM1</i>	Cys62Tyr	<i>FUS1</i>	Pro106Thr
<i>ALR2</i>	Gly80Asp	<i>CTR1</i>	Gly104Asp	<i>FUS2</i>	Val439Ile
<i>ARE1</i>	Glu61fs	<i>CTS1</i>	Ser335Thr	<i>GAT2</i>	Asp79Asn
<i>ARN2</i>	Pro581Leu	<i>CYR1</i>	Val401Met	<i>GAT4</i>	Ala72Val
<i>ARO80</i>	Gly84Asp	<i>DAN4</i>	Phe405Ile	<i>GCG1</i>	Trp40*
<i>ARR1</i>	Lys12Glu	<i>DCC1</i>	Ala188Gly	<i>GDB1</i>	Leu33Pro
<i>ARR3</i>	Ile42Met	<i>DCI1</i>	Val220Ile	<i>GEM1</i>	Gly618Arg
<i>ASG1</i>	Asn887_Asp888insAsn	<i>DCV1</i>	Leu153fs	<i>GEX1</i>	Thr466Ile
<i>ASG1</i>	Pro962Leu	<i>DDC1</i>	Arg316Lys	<i>GEX2</i>	Thr466Ile
<i>ATG26</i>	Ser70Asn	<i>DDR48</i>	Ser210Asn	<i>GMCI</i>	Asp194fs
<i>ATR1</i>	Trp380*	<i>DFG5</i>	Asp165Asn	<i>GPII7</i>	Gly434Asp
<i>AUA1</i>	[Tyr44His]; [Ser209Gly]	<i>DIP2</i>	Asp643Asn	<i>GSF2</i>	Leu399Glu
<i>BAP3</i>	Ser315Phe	<i>DPL1</i>	Gly555Ser	<i>GTS1</i>	Gln338fs
<i>BBC1</i>	Pro720Ser	<i>DTR1</i>	Ala286Val	<i>GTS1</i>	Ala339fs
<i>BBC1</i>	Val715Ala	<i>DUS1</i>	Gly366Asp	<i>GUD1</i>	Thr149Met
<i>BBC1</i>	Val709Ala	<i>DUS1</i>	Ser401Asn	<i>HAA1</i>	Thr349Ile
<i>BBC1</i>	Ser708Pro	<i>ECM29</i>	Ser1289Asn	<i>HAA1</i>	Pro525Leu
<i>BFR2</i>	Asp99Glu	<i>ECM34</i>	Arg73Gly	<i>HDA2</i>	Arg102Lys
<i>BNA2</i>	Pro21Ser	<i>EMW1</i>	Val787Ile	<i>HEM14</i>	[Glu110Gly]; [Leu422Pro]
<i>BOR1</i>	Val183Ala	<i>ENA1</i>	Ala214Thr	<i>HIR3</i>	Ala965Thr
<i>BSC6</i>	Pro251Leu	<i>ENA1</i>	Asn191Asp	<i>HKR1</i>	Pro581Ser
<i>BUD3</i>	Gly1338Asp	<i>ENO1</i>	Thr369Ser	<i>HKR1</i>	Thr587Ala
<i>BUD7</i>	Trp409*	<i>ENP1</i>	Asp408Asn	<i>HKR1</i>	Thr589Ala
<i>CAC2</i>	Glu128Lys	<i>ERR2</i>	Tyr299fs	<i>HPF1</i>	Val788Ala
<i>CAR2</i>	Ala82Val	<i>ESF1</i>	Cys310Tyr	<i>HPF1</i>	Ala777fs
<i>CHS3</i>	Gly667Ser	<i>EXO84</i>	Ser574Phe	<i>HPF1</i>	Ser776Thr
<i>CLU1</i>	Gly526Asp	<i>FAU1</i>	Gln211Arg	<i>HRK1</i>	Gln652Xaa
<i>COG4</i>	Ala173Thr	<i>FDH1</i>	Lys256fs	<i>HRK1</i>	His649Xaa
<i>COS5</i>	Glu370Lys	<i>FHL1</i>	Ala720Thr	<i>HSP33</i>	Thr11Ile
<i>COS5</i>	Leu246Phe	<i>FIP1</i>	Glu54Lys	<i>HST1</i>	Lys495Xaa
<i>COS5</i>	Leu243Pro	<i>FIR1</i>	*877Xaa	<i>HXT11</i>	Val374Ile
<i>COS5</i>	Trp242Cys	<i>FIT1</i>	Gln158fs	<i>IES1</i>	Asp66Asn
<i>COS5</i>	Ser238Phe	<i>FIT1</i>	Thr155Ala	<i>IMO32</i>	[Thr24Ile]; [Val264Ile]
<i>COS5</i>	Lys231Gly	<i>FLO1</i>	Ala272Thr	<i>IMP4</i>	Tyr289Xaa
<i>COS5</i>	Phe229Leu	<i>FLO1</i>	Val843Gln	<i>IPI1</i>	Gly179Asp
<i>COS5</i>	Leu226Phe	<i>FLO1</i>	Ser862Thr	<i>IRC25</i>	Ala152Thr
<i>COS5</i>	Asp220_Ile221 del ins GluAla	<i>FLO10</i>	Thr468Ile	<i>IRC4</i>	Tyr18Xaa
<i>COS5</i>	Gln216Lys	<i>FLO11</i>	Leu119Trp	<i>IRC4</i>	Glu9Xaa
<i>COS5</i>	Val215Ala	<i>FLO11</i>	Glu890Lys	<i>KAP123</i>	Arg561Lys
<i>COS5</i>	Gln197His	<i>FLO11</i>	Thr888Ser	<i>KCC4</i>	Pro309Leu
<i>COS5</i>	Arg192Thr	<i>FLO11</i>	Ala611Val	<i>KEL2</i>	Val115Ile
<i>COS5</i>	Gly188Glu	<i>FLO11</i>	Tyr118Asp	<i>KGD2</i>	Pro230Ser
<i>COS5</i>	Arg156Lys	<i>FLO11</i>	Asn116Asp	<i>KRE2</i>	Arg342Lys
<i>COS5</i>	Gly150Ser	<i>FLO5</i>	Thr308Xaa	<i>KRII</i>	Asp399Asn
<i>COS5</i>	Asn147Ser	<i>FLO5</i>	Asp82Asn	<i>LAA1</i>	Gly1770Arg
<i>COS5</i>	Arg142Lys			<i>LAM6</i>	Gly528Asp

**Table 5 A901-8 株におけるアミノ酸置換を伴う変異**

遺伝子	アミノ酸置換	遺伝子	アミノ酸置換	遺伝子	アミノ酸置換
<i>LAS21</i>	Gly430Arg	<i>PIF1</i>	Pro713Leu	<i>SPA2</i>	Gln457*
<i>LDB16</i>	Lys159Arg	<i>PIR1</i>	Lys123fs	<i>SPA2</i>	Lys889Gln
<i>LDS1</i>	Leu151Phe	<i>PIR3</i>	Thr117Ser	<i>SPC110</i>	Ser853Asn
<i>LHP1</i>	Glu261Lys	<i>POF1</i>	Ala188Val	<i>SPC98</i>	Leu304Phe
<i>LHS1</i>	Ser284Asn	<i>POM152</i>	Ala519Thr	<i>SPO1</i>	Gln398*
<i>LRG1</i>	Gly275Ser	<i>POP2</i>	Gln122_Gln126 del	<i>SPP41</i>	Ser950Asn
<i>LSB5</i>	Tyr116Cys	<i>PPM1</i>	Arg303Lys	<i>SRP40</i>	Ser58Phe
<i>LYS20</i>	Arg31Lys	<i>PRM8</i>	Ile62Val	<i>SRP40</i>	Ser52fs
<i>MAL11</i>	Ala289Thr	<i>PRM8</i>	Ser63Leu	<i>SRS2</i>	Ala400Thr
<i>MDN1</i>	Pro3807Leu	<i>PRM8</i>	Ile64Leu	<i>SSA4</i>	Gly134Glu
<i>MDN1</i>	Ala1659Val	<i>PRM8</i>	Gln2His	<i>SWH1</i>	Tyr468Asp
<i>MEC1</i>	His1371Tyr	<i>PRM8</i>	Thr3_Pro4 del ins IleSer	<i>SWI1</i>	Glu1314Lys
<i>METS</i>	Gly1411Glu	<i>PRM8</i>	Ser5Leu	<i>SXM1</i>	Glu76Lys
<i>MGM1</i>	Met600Ile	<i>PRO1</i>	Pro247Ser	<i>TAM41</i>	Gly72Asp
<i>MKK2</i>	Met66Ile	<i>PRP39</i>	Trp442*	<i>TAP42</i>	Gly358Arg
<i>MLH3</i>	Gly265Arg	<i>PRP46</i>	Gly243Asp	<i>TAT2</i>	Gly477Arg
<i>MNE1</i>	Glu291Lys	<i>PRP6</i>	Glu427Lys	<i>TDH3</i>	Gly98Ser
<i>MON2</i>	Ala1120Thr	<i>PRY3</i>	Pro585Leu	<i>TEC1</i>	Pro298Leu
<i>MOT3</i>	Gln15fs	<i>PSP2</i>	Thr459Asn	<i>TFC4</i>	Arg608Cys
<i>MPS1</i>	His204Tyr	<i>PSP2</i>	Asn460Asp	<i>TOG1</i>	Arg546Lys
<i>MRN1</i>	Asn19_Ile20 ins Asn	<i>PSP2</i>	Asp461Asn	<i>TOM1</i>	Leu3127Phe
<i>MRN1</i>	Asn8 fs	<i>PSP2</i>	Asn474Tyr	<i>TOM70</i>	Glu249Lys
<i>MRPS5</i>	Asn85Asp	<i>PXR1</i>	Glu168Lys	<i>TOM70</i>	Arg172Lys
<i>MRX10</i>	Pro320Ser	<i>RGD2</i>	Thr209Met	<i>TOR1</i>	Arg25Lys
<i>MSA1</i>	Ala27Thr	<i>RGP1</i>	Glu421Lys	<i>TRM3</i>	Trp206*
<i>MSN1</i>	Ser41Asn	<i>RIM101</i>	Gln308_Arg309 ins GlnGlnGlnGln	<i>TRP2</i>	Ser255Leu
<i>MSS11</i>	Gln299Xaa	<i>RNQ1</i>	Asp55Glu	<i>TRS33</i>	His261Tyr
<i>MSS51</i>	Ala181Thr	<i>ROD1</i>	Arg408Lys	<i>UBR2</i>	Gly671Arg
<i>NAB3</i>	Gln784_Pro785 ins Gln	<i>RPA34</i>	Asp176Asn	<i>UIP4</i>	Asp240Asn
<i>NOPI</i>	Gly32Asp	<i>RPD3</i>	Cys323Tyr	<i>UTP14</i>	Gly796Asp
<i>NSA1</i>	Glu210Lys	<i>RP11</i>	Ala340Val	<i>UTP5</i>	Gly30Asp
<i>NUM1</i>	Glu651Gln	<i>RP11</i>	Ile261Asn	<i>UTR1</i>	Arg250Lys
<i>NUM1</i>	Asn670Asp	<i>RP11</i>	Asn257_Ser258insAsn	<i>VMA5</i>	Glu67Lys
<i>NUM1</i>	Asp741Asn	<i>RP11</i>	Asn256Ser	<i>VPS41</i>	Ile765Leu
<i>NUM1</i>	Met627Val	<i>RP11</i>	Ser253Asn	<i>VTH2</i>	Ser1366Pro
<i>NUP120</i>	Glu459Lys	<i>RPL20B</i>	Glu6Lys	<i>VTH2</i>	Val1386Ala
<i>NUP157</i>	Arg1130Lys	<i>RPL3</i>	Gly271Asp	<i>WSC4</i>	Thr196Ser
<i>NUP2</i>	Pro393Ser	<i>RPL36A</i>	Ala83Thr	<i>YAP1801</i>	Gln572fs
<i>OM14</i>	Gly100Arg	<i>RRB1</i>	Pro219Ser	<i>YCK2</i>	Ala439Thr
<i>OPT2</i>	Val191Ile	<i>RRG7</i>	*243Xaa	<i>YEH2</i>	Gly300Ser
<i>PAF1</i>	Asp382Asn	<i>RRT15</i>	Ile58Met	<i>ZIMI7</i>	Pro147Leu
<i>PAU12</i>	Ser108Lys	<i>RSC4</i>	Ala336Thr	<i>ZIP2</i>	Gly198Arg
<i>PAU13</i>	Thr119Ala	<i>RSF2</i>	Arg228Trp		
<i>PDII</i>	Val446Leu	<i>RSP5</i>	Val678Met		
<i>PDR16</i>	Ser329Asn	<i>RTC5</i>	Glu13Lys		
<i>PEF1</i>	Asn279Tyr	<i>SAM3</i>	Gly92Glu		
<i>PEP1</i>	Cys856Tyr	<i>SCC4</i>	Glu352Lys		
<i>PET127</i>	Ala782Thr	<i>SDH7</i>	Glu122Lys		
<i>PET8</i>	Met98Ile	<i>SDS24</i>	Gly523Asp		
<i>PEX27</i>	Tyr293His	<i>SEC31</i>	Gly399Asp		
<i>PEX32</i>	Val313Ile	<i>SED4</i>	Tyr829Pro		
<i>PEX6</i>	Gly272Asp	<i>SEY1</i>	Asp117Asn		
<i>PHM7</i>	Leu112Phe	<i>SGE1</i>	Asn94Lys		
<i>PHO11</i>	Asp231Asn	<i>SIMI</i>	Ser193Phe		
<i>PHO91</i>	Gly819Asp	<i>SIMI</i>	Ser194fs		
<i>PIB2</i>	Pro167Ser	<i>SOK2</i>	Ser80Pro		

del は欠失、ins は挿入を示す。一つのアミノ酸置換が表記されている場合、ホモ変異、二つのアミノ酸置換が表記されている場合、それぞれがヘテロ変異であることを表す。



**Table 6 A902-4 株におけるアミノ酸置換を伴う変異**

遺伝子	アミノ酸置換	遺伝子	アミノ酸置換	遺伝子	アミノ酸置換
<i>ADO1</i>	Pro210Leu	<i>DAN4</i>	Thr275fs	<i>FLO9</i>	Thr1137Ile
<i>AGAI</i>	Ser235Pro	<i>DAN4</i>	Thr275fs	<i>FLO9</i>	Ser772Thr
<i>AIM44</i>	Asn670Lys	<i>DAN4</i>	Thr274 del ins SerSer	<i>FLO9</i>	Gly1152Glu
<i>AIM44</i>	Asn670Asp	<i>DAN4</i>	Pro273_Thr274 ins Ser	<i>FLO9</i>	Ala366Ile
<i>ALOI</i>	Asp526Asn	<i>DAN4</i>	Ala272Pro	<i>FLO9</i>	Thr364Ser
<i>ALT2</i>	Glu123Lys	<i>DAN4</i>	Phe405Ile	<i>FLO9</i>	Ala227Ser
<i>APC1</i>	Arg626Gln	<i>DBP6</i>	Leu470His	<i>FMP49</i>	[Val242Ala]; [Thr11Ala]
<i>APE3</i>	Glu36Lys	<i>DCC1</i>	Ala188Gly	<i>FPR4</i>	Asp200fs
<i>ARE1</i>	Glu61fs	<i>DCP2</i>	Gly434Ser	<i>FRE6</i>	Val179Ala
<i>ARG5,6</i>	Thr340Ile	<i>DCP2</i>	Pro387Ser	<i>FRE6</i>	Arg147His
<i>ARG82</i>	Asp297Asn	<i>DCP2</i>	Leu301His	<i>FRS2</i>	Arg477Lys
<i>ARP2</i>	Gln140Glu	<i>DDR48</i>	Asp168Asn	<i>FRS2</i>	Asp388Gly
<i>ARR1</i>	Lys12Glu	<i>DDR48</i>	Ser174fs	<i>FUS1</i>	Pro106Thr
<i>ARR3</i>	Ile42Met	<i>DIN7</i>	Asn114Lys	<i>GAL11</i>	Lys339Asn
<i>ASG1</i>	Pro962Leu	<i>DMA2</i>	Pro360Leu	<i>GAL11</i>	Gln480_Ala481 del
<i>ATG15</i>	Lys315Arg	<i>DNA2</i>	Ala1290Thr	<i>GAL11</i>	Gln696_His697 ins GlnGln
<i>AUAI</i>	[Tyr44His]; [Ser209Gly]	<i>DNA2</i>	Val862Met	<i>GAT2</i>	Asp79Asn
<i>AZFI</i>	Asn909Xaa	<i>DNA2</i>	Lys571Arg	<i>GCN1</i>	Phe176Cys
<i>BBC1</i>	Ser726Pro	<i>DON1</i>	Leu90Phe	<i>GCN1</i>	His240Asn
<i>BIO3</i>	Glu281Asp	<i>DUS4</i>	Ala283Val	<i>GCN1</i>	Leu1686Ser
<i>BNI4</i>	Lys631Glu	<i>ECM30</i>	Arg925Trp	<i>GEA1</i>	Glu1056Lys
<i>BSC6</i>	Gly179Asp	<i>ECM34</i>	Arg73Gly	<i>GEX1</i>	Thr466Ile
<i>BUD5</i>	His286Leu	<i>EHD3</i>	Leu11Ser	<i>GEX2</i>	Ile600Xaa
<i>CBP1</i>	Phe2Leu	<i>ENA1</i>	Ala214Thr	<i>GEX2</i>	Thr466Ile
<i>CBP1</i>	Arg31Gly	<i>ENA1</i>	Asn191Asp	<i>GLE1</i>	Ala114Val
<i>CBP1</i>	Asp32Val	<i>ENP2</i>	Lys275Glu	<i>GLK1</i>	Glu475*
<i>CBP1</i>	Arg501Gly	<i>FAR11</i>	Ile336Val	<i>GNP1</i>	Leu659Xaa
<i>CDC55</i>	Met365fs	<i>FAU1</i>	Gln211Arg	<i>GRR1</i>	His207Tyr
<i>CDC55</i>	Val364Ala	<i>FIN1</i>	Ser163Leu	<i>GSF2</i>	Leu399Glu
<i>CDC55</i>	Asp141Ala	<i>FIT1</i>	Thr155Ala	<i>GTS1</i>	Glu87Gly
<i>COM2</i>	Pro155Leu	<i>FLO1</i>	Met789Val	<i>GTS1</i>	Ala200Val
<i>COS5</i>	His120Arg	<i>FLO1</i>	Met789Ile	<i>GTS1</i>	Gly208Arg
<i>COS5</i>	Arg142Lys	<i>FLO1</i>	Glu968Gly	<i>GTS1</i>	Ala357Val
<i>COS7</i>	Lys7Glu	<i>FLO1</i>	Ala272Thr	<i>GTS1</i>	Ala359fs
<i>COS7</i>	Ser16Pro	<i>FLO1</i>	Val843Gln	<i>GTS1</i>	Ala359fs
<i>COS7</i>	Ser34Asn	<i>FLO1</i>	Ser862Thr	<i>HDA2</i>	Asp257Asn
<i>COS7</i>	Ser35Glu	<i>FLO10</i>	Thr468Ile	<i>HFMI</i>	Pro408Ser
<i>COS7</i>	Phe36Leu	<i>FLO11</i>	Glu890Lys	<i>HIR3</i>	Ala965Thr
<i>COS8</i>	Phe85Ile	<i>FLO11</i>	Thr888Ser	<i>HKR1</i>	Pro721Ser
<i>COS8</i>	Phe85Leu	<i>FLO11</i>	Ala611Val	<i>HKR1</i>	Ala722Val
<i>CPT1</i>	Val203Ile	<i>FLO11</i>	Tyr118Asp	<i>HKR1</i>	Ala723Val
<i>CSE1</i>	Ser130Phe	<i>FLO11</i>	Asn116Asp	<i>HKR1</i>	Ile724Val
<i>CSSI</i>	Ser847Lys	<i>FLO5</i>	Ala25Ser	<i>HKR1</i>	Ser725Pro
<i>CSSI</i>	Gln840His	<i>FLO5</i>	Thr26Met	<i>HKR1</i>	Thr727Ala
<i>CSSI</i>	Thr832Ser	<i>FLO5</i>	Ala32Asp	<i>HKR1</i>	Thr729Ala
<i>CSSI</i>	Lys831Gln	<i>FLO5</i>	Gln34Glu	<i>HOS4</i>	Ser23Gly
<i>CSSI</i>	Pro830Ser	<i>FLO5</i>	Arg35Lys	<i>HOS4</i>	Glu180Lys
<i>CSSI</i>	Thr827_Val828 ins Thr	<i>FLO5</i>	Ser37Asn	<i>HPF1</i>	Val213Ala
<i>CSSI</i>	Ser166Thr	<i>FLO5</i>	Ser47Thr	<i>HPF1</i>	Ser204Thr
<i>CSSI</i>	Glu822Lys	<i>FLO5</i>	Lys49Met	<i>HPF1</i>	Ser178Thr
<i>CTOI</i>	Cys185Tyr	<i>FLO5</i>	Ser51Leu	<i>HPF1</i>	Ala174Val
<i>CTOI</i>	Gln104Arg	<i>FLO5</i>	Ile522Val	<i>HPF1</i>	Ser144Leu
<i>CTOI</i>	Pro67Ser	<i>FLO5</i>	Asp82Asn	<i>HPF1</i>	Ser143Thr
<i>CTS1</i>	Ser480fs			<i>HPF1</i>	Val140fs
<i>CUE3</i>	Lys400Arg			<i>HPF1</i>	Ser139fs
<i>CYR1</i>	Arg681His			<i>HPF1</i>	Glu135Ala

**Table 6 A902-4 株におけるアミノ酸置換を伴う変異**

遺伝子	アミノ酸置換	遺伝子	アミノ酸置換	遺伝子	アミノ酸置換
<i>HSP30</i>	Glu307Asp	<i>NPP2</i>	Val407Ile	<i>RMRI</i>	Glu55Asp
<i>HSP78</i>	Ala809Pro	<i>NPR2</i>	Tyr603Xaa	<i>RNQ1</i>	Asp55Glu
<i>HXT9</i>	Ala398Thr	<i>NSA2</i>	Leu260Xaa	<i>ROK1</i>	Ala11Thr
<i>IME4</i>	Asp131Asn	<i>NSP1</i>	Thr497Ala	<i>ROM1</i>	Gly604Ser
<i>IME4</i>	Arg290Cys	<i>NST1</i>	Glu493Gly	<i>RPA135</i>	Arg1023Lys
<i>INN1</i>	His324Leu	<i>NST1</i>	Ser1034Arg	<i>RPC19</i>	Thr12Pro
<i>INO80</i>	Glu225Asp	<i>NUM1</i>	Glu1143Asp	<i>RPII</i>	Asn248Xaa
<i>INO80</i>	Glu225Lys	<i>NUM1</i>	Met627Val	<i>RPII</i>	Ser253Asn
<i>INO80</i>	Thr166Ser	<i>NUP170</i>	Ala379Thr	<i>RPL33A</i>	Leu7Xaa
<i>INP52</i>	Ala1026Thr	<i>NUP49</i>	Leu242Met	<i>RPT4</i>	Val135Ile
<i>IRA2</i>	Leu182Phe	<i>OPT2</i>	Ala253Thr	<i>RRG7</i>	Tyr233Xaa
<i>IVY1</i>	Ser85Asn	<i>OPT2</i>	Ser187Ala	<i>RRP5</i>	Gln1542His
<i>IVY1</i>	Lys433Arg	<i>OPT2</i>	Val191Ile	<i>RRT15</i>	Ile58Met
<i>JEM1</i>	Phe471Ile	<i>ORC1</i>	Glu285Asp	<i>RTT109</i>	Gly331Asp
<i>JLP1</i>	Val322Ile	<i>OSM1</i>	Gly466Ser	<i>SAP4</i>	Pro708Leu
<i>KAP120</i>	Pro896Leu	<i>OYE2</i>	Ala324Thr	<i>SAP4</i>	Lys486Asn
<i>KCC4</i>	Pro309Leu	<i>PAU10</i>	Val113Asp	<i>SAP4</i>	His411del
<i>KEX1</i>	Glu576Asp	<i>PAU12</i>	Ser111Phe	<i>SAP4</i>	Ile332Arg
<i>KEX1</i>	Ile48Asn	<i>PAU12</i>	Ser108Lys	<i>SAT4</i>	Gln261His
<i>KIP3</i>	Val711Ile	<i>PDI1</i>	Val446Leu	<i>SCC2</i>	Pro310Leu
<i>KIP3</i>	Glu771Lys	<i>PDR18</i>	Val1212Ile	<i>SCC2</i>	Asn312fs
<i>KOG1</i>	Asn194Lys	<i>PDS1</i>	Asp7Asn	<i>SCC2</i>	Asn312Lys
<i>KRE33</i>	Val875Ile	<i>PEF1</i>	Asn279Tyr	<i>SCC2</i>	Ser320Phe
<i>KTR3</i>	Arg303Lys	<i>PET18</i>	Ala63Ser	<i>SEC15</i>	Gln15His
<i>LAS21</i>	Gly430Arg	<i>PET309</i>	Pro305Ser	<i>SEC15</i>	Gly330Glu
<i>LDB16</i>	Lys159Arg	<i>PEX27</i>	Tyr293His	<i>SED1</i>	Ala110Gly
<i>LHS1</i>	Ser284Asn	<i>PEX32</i>	Val313Ile	<i>SED4</i>	Thr254Ile
<i>LSB5</i>	Tyr116Cys	<i>PFK26</i>	Met820Xaa	<i>SED4</i>	Tyr829Pro
<i>LYS4</i>	Val63Ile	<i>PFK26</i>	Ala817Xaa	<i>SEH1</i>	Trp227Cys
<i>MCH2</i>	Cys210Phe	<i>PFK26</i>	Ile815Xaa	<i>SIS1</i>	Ala144Gly
<i>MCM6</i>	Asn989Ile	<i>PHO23</i>	Arg248Gly	<i>SMC3</i>	Met1?
<i>MEP2</i>	Val277Phe	<i>PIR1</i>	Lys123fs	<i>SMY2</i>	Thr622Asn
<i>MMR1</i>	Met6Xaa	<i>PIR3</i>	Thr153Ser	<i>SNF2</i>	Val34Met
<i>MOT1</i>	Arg48Lys	<i>PIR3</i>	Thr117Ser	<i>SNN1</i>	Thr72Ala
<i>MOT3</i>	Gln18fs	<i>PMR1</i>	Arg157Lys	<i>SNT1</i>	Pro634Leu
<i>MOT3</i>	Gln15fs	<i>POF1</i>	Ala188Val	<i>SPA2</i>	Lys889Gln
<i>MRPL22</i>	Gly129Ser	<i>POP4</i>	Val229Ile	<i>SPC98</i>	Asn673Lys
<i>MRX3</i>	Lys32Thr	<i>PPN1</i>	Asp161Asn	<i>SPC98</i>	Leu304Phe
<i>MSN4</i>	Ala255Thr	<i>PPN1</i>	Ser318Gly	<i>SRP40</i>	Ser57Ile
<i>MSO1</i>	Gln135*	<i>PPN1</i>	Thr474Pro	<i>SRP40</i>	Ser56Arg
<i>MSS11</i>	Gln314Xaa	<i>PRM8</i>	Gln2His	<i>SRP40</i>	Ser56fs
<i>MSS2</i>	Ser134Asn	<i>PRM8</i>	Thr3_Pro4delinsIleSer	<i>SRP40</i>	Gly50fs
<i>MTG1</i>	Met149Ile	<i>PRM8</i>	Ser5Leu	<i>SRP40</i>	Ser58Phe
<i>MTM1</i>	Trp231Arg	<i>PRM9</i>	Phe282Ser	<i>SRP40</i>	Ser52fs
<i>NAB2</i>	Pro136Gln	<i>PRO1</i>	Thr259Ile	<i>SRV2</i>	Thr7Ile
<i>NAB2</i>	Pro132Gln	<i>PRP28</i>	Thr166Ala	<i>SSK22</i>	Glu1141Gln
<i>NEM1</i>	Pro148Leu	<i>PRP8</i>	Gln2394Arg	<i>STR3</i>	Val429Met
<i>NHX1</i>	Gln520Pro	<i>PRP8</i>	Arg207Ser	<i>SUT1</i>	Lys246Arg
<i>NHX1</i>	Asn550Ser	<i>PRR2</i>	Gly609Arg	<i>SWE1</i>	His603Tyr
<i>NIF3</i>	Val175Phe	<i>RAD17</i>	Pro208Ser	<i>SWH1</i>	Asn463_Asp464 ins AsnAsn
<i>NMD2</i>	Glu189Asp	<i>RAD6</i>	Thr3Ile	<i>SWH1</i>	Tyr468Asp
<i>NOG2</i>	Arg110Ser	<i>RCY1</i>	Ala107Thr	<i>SWI1</i>	Glu1314Lys
<i>NOP13</i>	Gly315Asp	<i>RHO2</i>	Phe91Cys	<i>SYP1</i>	Ser760Asn
<i>NOP13</i>	Met270Arg	<i>RIM101</i>	Gln308_Arg309 ins GlnGlnGlnGln	<i>TAF2</i>	Thr94Ile
<i>NOP15</i>	Thr13Ile	<i>RKM3</i>	Glu422fs	<i>TCB2</i>	Glu545Gln
		<i>RKM3</i>	Glu421_Glu422 ins Gly	<i>TDA7</i>	Ala560Thr

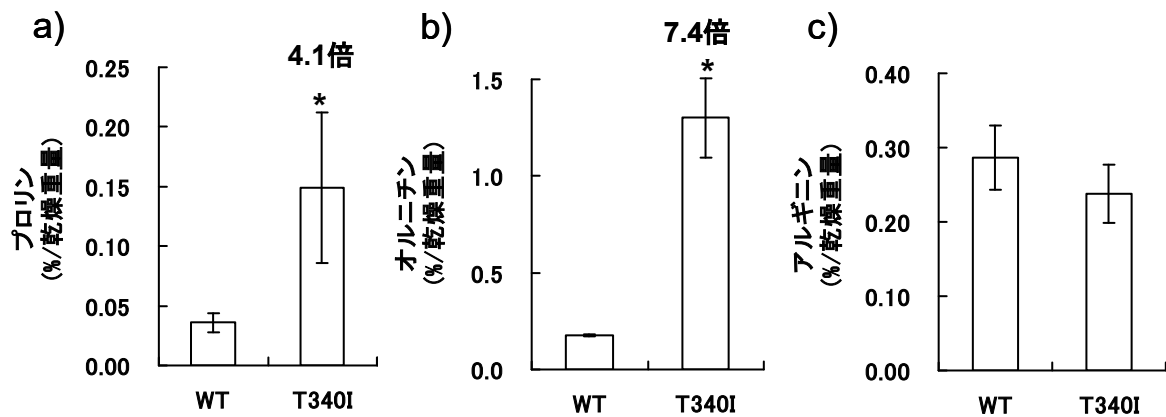
**Table 6 A902-4 株におけるアミノ酸置換を伴う変異**

遺伝子	アミノ酸置換
<i>TDA8</i>	Lys19Thr
<i>TDA8</i>	Arg16Ser
<i>THP3</i>	Ala129Thr
<i>THR4</i>	Asn235Lys
<i>TIM54</i>	Asp233His
<i>TOM1</i>	His92Gln
<i>TPS1</i>	Ser482Asn
<i>TRS20</i>	Gly74Arg
<i>TRS85</i>	Val305Ile
<i>TRS85</i>	Pro512Arg
<i>TYW1</i>	Asp787His
<i>UBP5</i>	Ala405Gly
<i>VAM7</i>	Val226Ala
<i>VID30</i>	Val817Met
<i>VMA5</i>	Ile390Xaa
<i>VPS5</i>	[Ser106Phe]; [Asp44Asn]
<i>VPS63</i>	[Ala77Thr]; [Ser186Asn]
<i>VTH2</i>	Val1386Ala
<i>YAP1801</i>	Thr586Ile
<i>YCK2</i>	Ala513Thr
<i>YGP1</i>	Thr174Ala
<i>YHP1</i>	Gln157Arg
<i>YND1</i>	Ala203Ser
<i>YSP2</i>	*1439Xaa

**del** は欠失、**ins** は挿入を示す。一つのアミノ酸置換が表記されている場合、ホモ変異、二つのアミノ酸置換が表記されている場合、それぞれがヘテロ変異であることを表す。

### 1-3-5. 変異型 $ARG5,6^{T340I}$ 遺伝子が細胞内アミノ酸含量に及ぼす影響

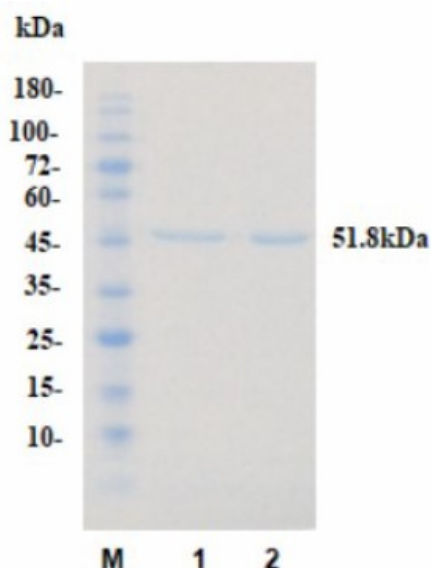
A902-4 株で見出された  $ARG5,6$  遺伝子の変異が細胞内アミノ酸含量に及ぼす影響を調べるために、野生型  $ARG5,6^{WT}$  遺伝子と変異型  $ARG5,6^{T340I}$  遺伝子の発現プラスミドを構築した。その発現プラスミドを導入した BY4741  $arg5,6\Delta$  pRS416- $ARG5,6^{WT}$  株と BY4741  $arg5,6\Delta$  pRS416- $ARG5,6^{T340I}$  株を SD + Leu + His + Met 培地で培養し、細胞内アミノ酸含量を測定した。その結果、Fig. 10 に示すように変異型の遺伝子導入株では、野生型に比較してプロリン含量が 4.1 倍、オルニチン含量が 7.4 倍それぞれ増加していた。変異型遺伝子導入株では、ゲノム由来の  $ARG5,6$  遺伝子は破壊されているため、プラスミド由来の  $ARG5,6^{T340I}$  が発現し、プロリン・オルニチンが細胞内で高生産されていることが示唆された。一方、 $ARG5,6^{T340I}$  遺伝子導入株の細胞内アルギニン含量は、減少傾向にあった。



**Fig. 10** 細胞内 (a) プロリン、(b) オルニチン及び(c)アルギニン含量  
BY4741  $arg5,6\Delta$  pRS416- $ARG5,6^{WT}$  (WT) 株と BY4741  $arg5,6\Delta$   
pRS416- $ARG5,6^{T340I}$  (T340I) 株を SD + Leu + His + Met 培地で培養し  
た時の細胞内アミノ酸含量を示す。独立して3回の測定を行い、平均及び  
標準偏差を算出した。\*は、野生型に対して  $t$  検定で有意な差 ( $p < 0.05$ ) を  
示す。

### 1-3-6. NAGK のアミノ酸置換が NAGK 活性に与える影響

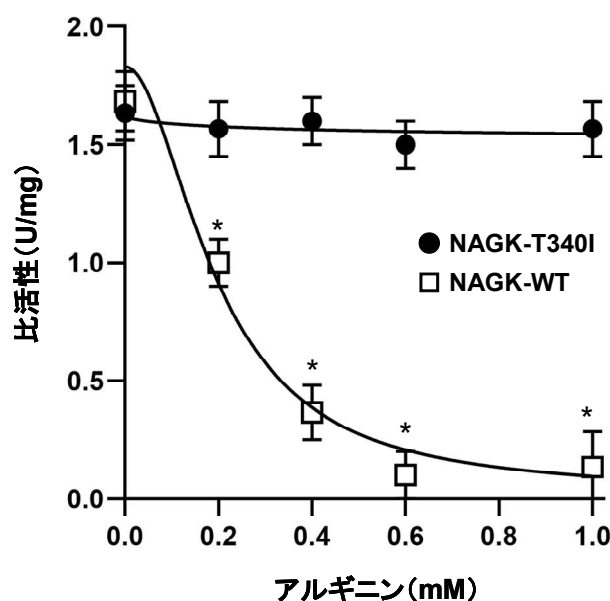
*ARG5,6* 遺伝子にコードされた前駆体タンパク質は、アミノ酸残基 510 番目から 540 番目の間で NAGK と NAG5PR に分離されるため (50)、今回の Thr340 のアミノ酸置換は、NAGK の活性に影響を与える可能性がある。NAGK 活性は、アルギニンによってフィードバック阻害を受ける (51)。従って、Thr340 のアミノ酸置換により NAGK のアルギニン結合部位が構造変化を起こすことでアルギニンによるフィードバック阻害感受性が低下し、オルニチンが高生産される可能性を考えた。そこで、T5 プロモーターの下流に His タグ配列を有するプラスミド pQE-2 に野生型 NAGK 及び変異型 NAGK-T340I をコードする配列を挿入し、得られたプラスミドを導入した大腸菌 BL21 (DE3) で NAGK を発現後、Ni アフィニティーカラムで精製して組換え NAGK を得た。組換え NAGK の SDS-PAGE (Fig. 11) により、目的とするバンドを検出し、かつそれ以外の夾雑タンパク質を検出しないことを確認した。



**Fig. 11 組換え NAGK の純度の確認**

組換え NAGK サンプルを SDS-PAGE で分離後、CBB 染色した。M は分子量マーカー、Lane 1 及び 2 は、それぞれ NAGK-WT、NAGK-T340I を示す。

得られた野生型及び変異型 NAGK を用いて、アルギニン存在下での NAGK 活性を測定した。その結果、Fig. 12 に示すように、アルギニンを添加しない場合、変異型 NAGK-T340I の活性 ( $1.57 \pm 0.10$  U/mg) は、野生型 ( $1.73 \pm 0.06$  U/mg) より若干低下したが、野生型 NAGK の活性は、アルギニンを、 $0.4$  mM を添加すると、ほぼ消失するのに対して、変異型 NAGK-T340I では、ほとんど活性が低下しなかった。従って、T340I のアミノ酸置換によって、NAGK におけるアルギニンによるフィードバック阻害感受性が低下した可能性が強く示唆された。



**Fig. 12** アルギニン添加による NAGK 比活性への影響

野生型 NAGK-WT と変異型 NAGK-T340I のアルギニン添加時の比活性を示す。1 U は、1 分間に  $1 \mu\text{mol}$  の  $\text{NAD}^+$  を生成するのに必要な酵素量を示す。独立して 3 回の測定を行い、平均及び標準偏差を算出した。\* は、変異型に対して  $t$  検定で有意な差 ( $p < 0.05$ ) を示す。

### 1-3-7. NAGK の構造解析

*S. cerevisiae* 由来の NAGK (ScNAGK) は、X 線構造解析により三次元構造が決定されている (56)。Fig. 13a に ScNAGK のアルギニン結合部位の構造を示す。Lys265、Ser285、Glu337、Thr340、Gly345 がアルギニンと相互作用している。Thr340 は、その主鎖のカルボニル基とアルギニンのアミノ基の水素結合を介してアルギニンと結合している。一方、Thr340 は、Lys336 の主鎖のカルボニル基と Thr340 の側鎖の水酸基の水素結合により相互作用している。この 340 番目残基は、アルギニンによるフィードバック阻害に感受性を示す微生物の NAGK において、Thr あるいは Ser として、高度に保存されている (Fig. 13b) ため、340 番目残基の水酸基がアルギニンとの結合に極めて重要で、アルギニン結合領域の形成に関与することが示唆された。

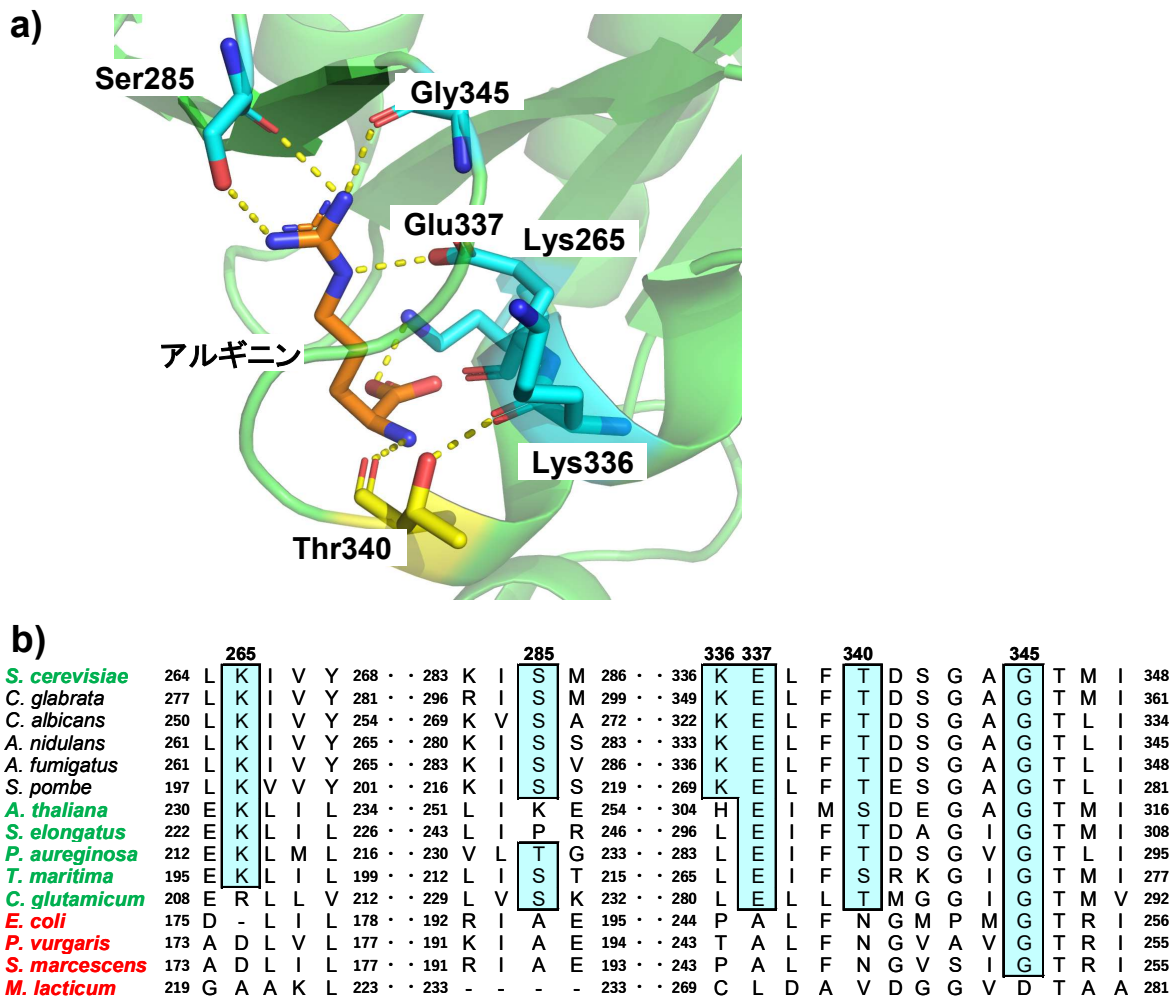


Fig. 13 微生物における NAGK の構造比較

a) *S. cerevisiae* NAGK (ScNAGK) (PDB ID code:3ZZH) におけるアルギニン結合部位の構造を示す。全体の構造は cartoon モデルで、アルギニンと相互作用している残基は stick モデルで、Thr340 は黄色、それ以外はシアン色で示す。b) 様々な微生物における NAGK の ClustalW によるマルチアラインメントを示す。一番上の番号は、ScNAGK におけるアミノ酸残基番号で、a) で示した残基のうち、保存されている残基をシアン色で囲んでいる。緑の微生物の NAGK は、アルギニンによるフィードバック感受性を示し、赤の微生物の NAGK は、非感受性を示す。文献 (71, 96) より改変転載

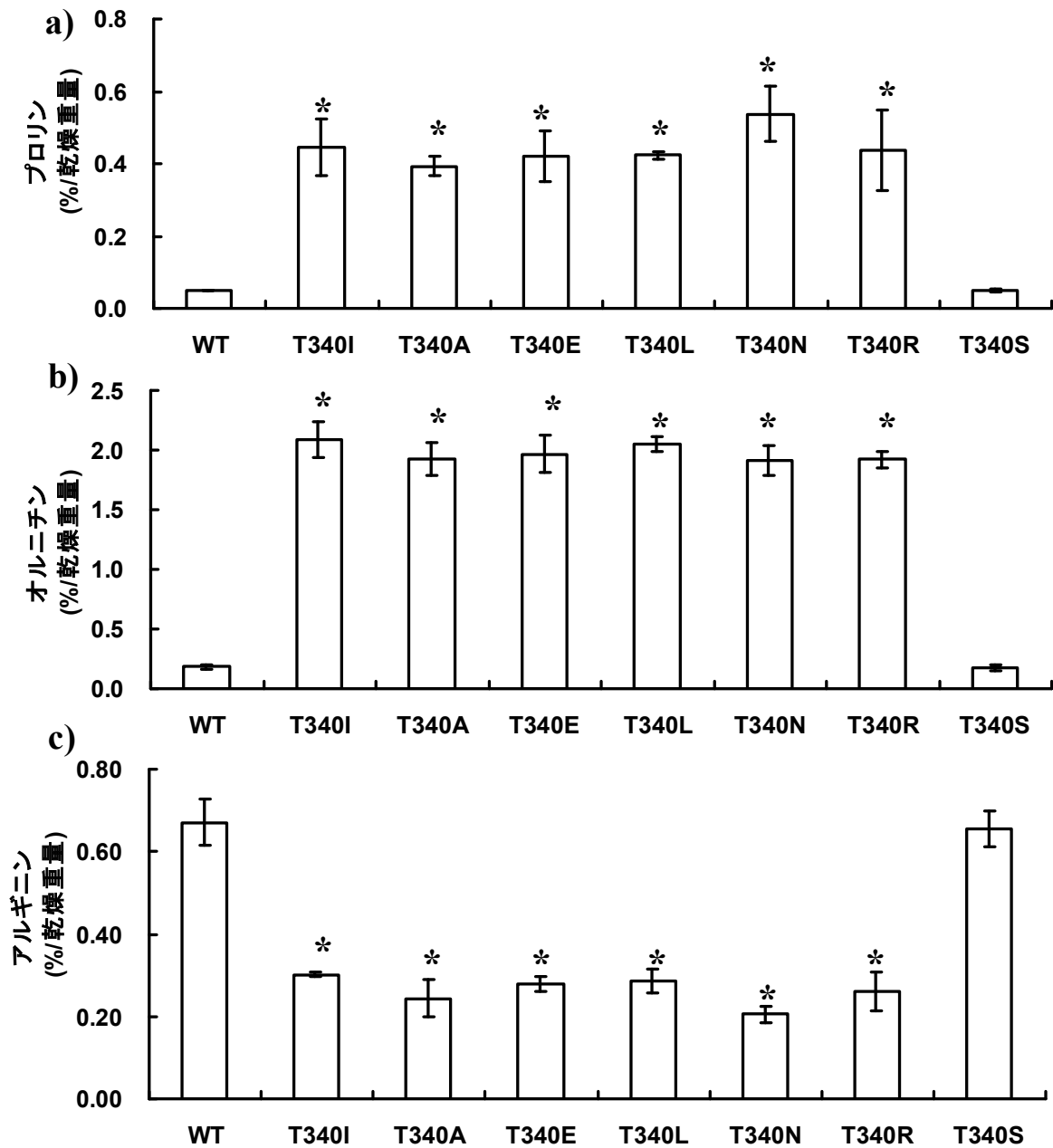
### 1-3-8. A902-4 株以外の変異株の ARG5,6 遺伝子解析

A902-4 株以外の A902-6 及び A902-8-3 株において、ARG5,6 遺伝子のアミノ酸置換を伴う変異の有無を DNA シーケンスで解析した。その結果、A902-6 株あるいは A902-8-3 株において、ARG5,6 遺伝子にアミノ酸置換 (Cys119Tyr、Val267Ala) を伴うそれぞれホモ、ヘテロ変異を見出した。

### 1-3-9. 変異型 *ARG5,6* 遺伝子が細胞内アミノ酸含量に及ぼす影響

NAGK の Thr340 がアルギニン結合領域の形成に関与することが示唆されたので、Thr340 を側鎖の大きさや電荷を考慮して Ala、Glu、Leu、Asn、Arg、Ser に置換して、アミノ酸生産に与える影響及びアルギニンによるフィードバック阻害に与える影響を解析した。また、プロリン・オルニチン高生産変異株である A902-6 及び A902-8-3 株で見出した Cys119 及び Val267 についても、側鎖の大きさを考慮して、Cys119 を Tyr、Phe、Leu、Ser、Val267 を Ala、Gly、Leu に置換して、アミノ酸生産に与える影響及びアルギニンによるフィードバック阻害に与える影響を解析した。そこで、変異型 *ARG5,6*<sup>T340X1</sup>、*ARG5,6*<sup>C119X2</sup>、*ARG5,6*<sup>V267X3</sup> 遺伝子の発現プラスミドを構築した (X1: I, A, E, L, N, R, S; X2: Y, F, L, S; X3: A, G, L)。その発現プラスミドを導入した BY4741 *arg5,6Δ* pRS416-*ARG5,6*<sup>WT</sup> 株と BY4741 *arg5,6Δ* pRS416-*ARG5,6*<sup>T340X1</sup>、BY4741 *arg5,6Δ* pRS416-*ARG5,6*<sup>C119X2</sup>、BY4741 *arg5,6Δ* pRS416-*ARG5,6*<sup>V267X3</sup> 株を SD + Leu + His + Met 培地で培養し、細胞内アミノ酸含量を測定した。T340 をアミノ酸置換した導入株において、T340S 導入株では、野生型導入株と比較して、プロリン、オルニチン及びアルギニン含量は同程度であったが、それ以外の変異型導入株では、プロリン・オルニチン含量はそれぞれ 6.6-10.6 倍、9.2-11.5 倍に増加したが、アルギニン含量は顕著に減少した (Fig. 14)。また、C119 あるいは V267 をアミノ酸置換した導入株において、C119S、V267L 導入株のプロリン・オルニチン含量は野生型と同程度であったが、それ以外の C119Y、C119F、C119 L、V267A、V267G 導入株のプロリン・オルニチン含量は野生型と比較してそれぞれ 3.0-7.0 倍、6.1-13.0 倍に増加した (Fig. 15)。一方、アルギニン含量は、いずれの導入株も野生型と比較して減少した。





**Fig. 14** 細胞内 (a) プロリン, (b) オルニチン, (c) アルギニン含量  
 BY4741 *arg5,6*  $\Delta$  pRS416-*ARG5,6*<sup>WT</sup> 株と BY4741 *arg5,6*  $\Delta$   
 pRS416-*ARG5,6*<sup>T340X1</sup> 株を SD + Leu + His + Met 培地で培養した時の細胞内アミノ酸含量を示す。独立して3回の測定を行い、平均及び標準偏差を算出した。\*は、野生型に対して *t* 検定で有意な差 ( $p < 0.05$ ) を示す。

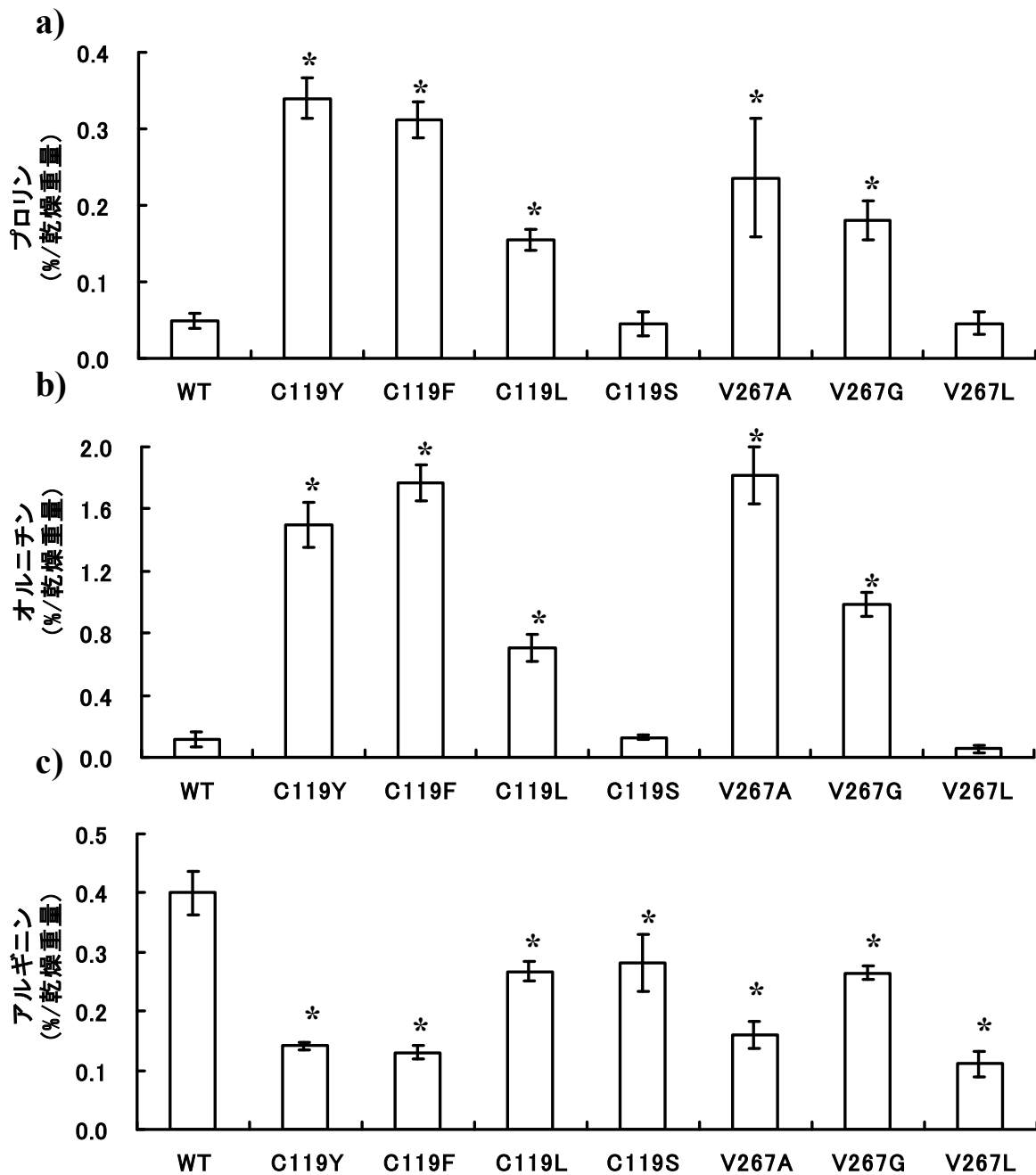
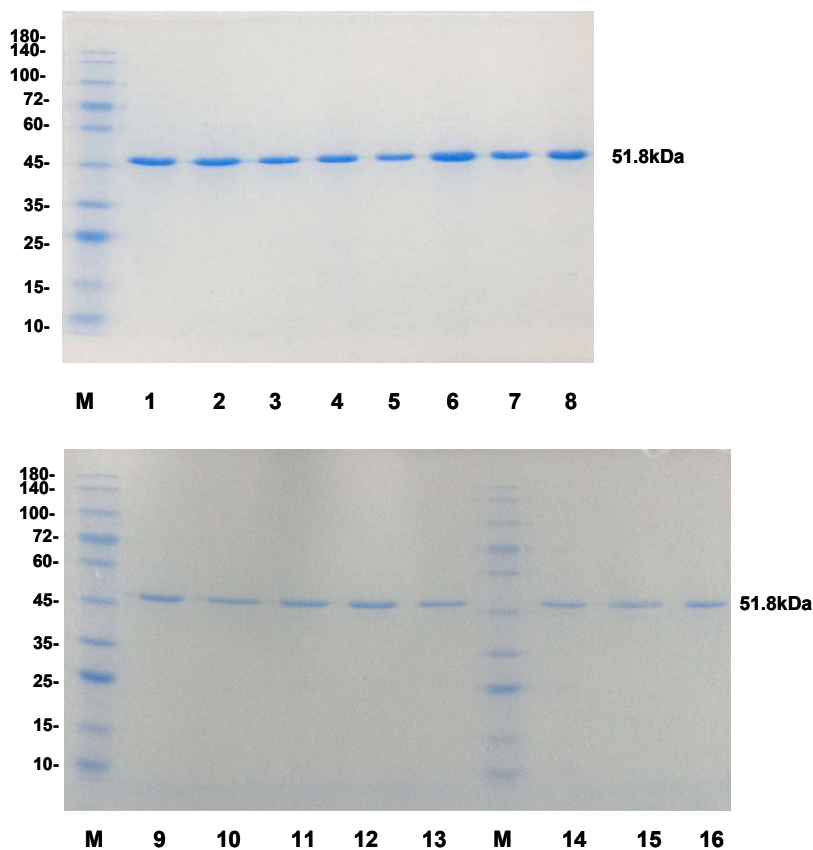


Fig. 15 細胞内 (a) プロリン, (b) オルニチン, (c) アルギニン含量

BY4741 *arg5,6*  $\Delta$  pRS416-*ARG5,6*<sup>WT</sup> 株、BY4741 *arg5,6*  $\Delta$  pRS416-*ARG5,6*<sup>C119X2</sup> 株及び BY4741 *arg5,6*  $\Delta$  pRS416-*ARG5,6*<sup>V267X3</sup> 株を SD + Leu + His + Met 培地で培養した時の細胞内アミノ酸含量を示す。独立して 3 回の測定を行い、平均及び標準偏差を算出した。\*は、野生型に対して *t* 検定で有意な差 ( $p < 0.05$ ) を示す。

### 1-3-10. NAGK のアミノ酸置換がアルギニンによるフィードバック阻害に与える影響

変異型  $ARG5,6^{T340X1}$ 、 $ARG5,6^{C119X2}$ 、 $ARG5,6^{V267X3}$  遺伝子 (X1: I, A, E, L, N, R, S; X2: Y, S, F, L; X3: A, G, L) の発現がプロリン・オルニチン生産に影響を与えることが判明したので、NAGK のアミノ酸置換がアルギニンによるフィードバック阻害にどのような影響を与えるかを解析した。T5 プロモーターの下流に His タグ配列を有するプラスミド pQE-2 に野生型 NAGK 及び変異型 NAGK-T340X1, NAGK-C119X2, NAGK-V267X3 (X1: I, A, E, L, N, R, S; X2: Y, S, F, L; X3: A, G, L) をコードする配列を挿入し、得られたプラスミドを導入した大腸菌 BL21(DE3) で NAGK を発現後、Ni アフィニティーカラムで精製して組換え NAGK を得た。組換え NAGK の SDS-PAGE (Fig. 16) により、目的とするバンドを検出し、かつそれ以外の夾雑タンパク質を検出しないことを確認した。



**Fig. 16 組換え NAGK の純度の確認**

組換え NAGK サンプルを SDS-PAGE で分離後、CBB 染色した。M: 分子量マーカー, Lane 1: T340A, Lane 2: T340L, Lane 3: T340R, Lane 4: T340E, Lane 5: T340N, Lane 6: T340S, Lane 7: T340I, Lane 8: WT, Lane 9: WT, Lane 10: C119Y, Lane 11: C119S, Lane 12: C119F, Lane 13: C119L, Lane 14: V267A, Lane 15: V267G, Lane 16: V267L

得られた野生型及び変異型 NAGK を用いて、アルギニン存在下での NAGK

活性を測定した。Table 7 にアルギニン未添加時の NAGK 活性と活性を 50% 阻害する時のアルギニン濃度  $IC_{50}^{Arg}$  を示す。変異型 NAGK-T340I、NAGK-T340A、NAGK-T340E、NAGK-T340L、NAGK-T340N、NAGK-T340R、NAGK-C119Y、NAGK-C119F、NAGK-C119L、NAGK-V267A、NAGK-V267G の  $IC_{50}^{Arg}$  は、0.52-100 mM 以上と野生型 (0.09、0.15 mM) と比較して大きかった。一方、野生型 NAGK 及び変異型 NAGK-T340S、NAGK-C119S、NAGK-V267L の  $IC_{50}^{Arg}$  は、0.02-0.17 mM と同程度に小さかった。以上の結果から、変異型 NAGK-T340I、NAGK-T340A、NAGK-T340E、NAGK-T340L、NAGK-T340N、NAGK-T340R、NAGK-C119Y、NAGK-C119F、NAGK-C119L、NAGK-V267A、NAGK-V267G は、アルギニンによるフィードバック阻害感受性が低下し、変異型 NAGK-T340S、NAGK-C119S、NAGK-V267L は、アルギニンによるフィードバック阻害感受性を示していることが示唆された。特に変異型 NAGK-T340I の  $IC_{50}^{Arg}$  は、100 mM と顕著に大きく、アルギニンによるフィードバック阻害が解除されていることが強く示唆された。

**Table 7 NAGK 比活性及びアルギニン阻害動力学**

	比活性 <sup>1)</sup> (U / mg)	$IC_{50}^{Arg}$ <sup>2)</sup> (mM)		比活性 <sup>1)</sup> (U / mg)	$IC_{50}^{Arg}$ <sup>2)</sup> (mM)
WT	1.57 ± 0.03	0.09 ± 0.38	WT	2.19 ± 0.02	0.15 ± 0.08
T340I	1.27 ± 0.07	>100	C119Y	0.96 ± 0.01	0.78 ± 0.05
T340A	1.27 ± 0.09	2.25 ± 0.20	C119F	1.16 ± 0.09	0.78 ± 0.06
T340E	0.98 ± 0.04	6.87 ± 1.00	C119L	1.63 ± 0.01	0.65 ± 0.05
T340L	1.35 ± 0.06	10.46 ± 0.80	C119S	1.91 ± 0.05	0.11 ± 0.28
T340N	1.20 ± 0.04	23.98 ± 5.36	V267A	1.39 ± 0.01	2.83 ± 0.16
T340R	1.16 ± 0.09	2.48 ± 0.67	V267G	0.61 ± 0.01	0.52 ± 0.07
T340S	1.25 ± 0.02	0.17 ± 0.12	V267L	1.71 ± 0.05	0.02 ± 0.00

1) アルギニン未添加時の比活性

2)  $IC_{50}^{Arg}$  値は、活性を 50% 阻害するアルギニン濃度を示す。  
独立して 3 回の測定を行い、平均及び標準偏差を算出した。

#### 1-4. 考察

本研究では、エタノール生産性の高い清酒酵母を分離する目的で、AZC 及びエタノール耐性を指標として細胞内にプロリンを高生産する清酒酵母の分離を検討した。その結果、親株よりも細胞内に 5 倍以上プロリンを高生産し、かつ親株よりも若干ストレス耐性の向上した 4 株 (A908-1、A902-4、A902-6 及び A902-8-3 株) を取得した (Fig. 5, Fig. 6)。さらに興味深いことに、それらの変異株の中で、A902-4、A902-6 及び A902-8-3 株は、プロリンだけでなくオルニチンを親株よりも 10 倍以上細胞内に高生産する変異株であった。(Fig. 5)。各

変異株を用いて、清酒小仕込み試験を行ったところ、A902-8-3 株以外の変異株を用いた醸造で、親株よりもエタノール生産性が向上していた (Fig. 7)。A902-4、A902-6 株で醸造した清酒のアルコール濃度は親株よりもわずかであるが有意に増加していた (Table 4)。A901-8 株で醸造した清酒中のプロリン含量は親株よりも顕著に多く、A902-4 株も親株よりも若干多い (1.3 倍) 傾向にあった (Fig. 8)。清酒醸造環境でプロリン高生産酵母を用いた清酒小仕込み試験でエタノール生産性が向上した報告例 (41) がある。本研究で、清酒醸造環境におけるプロリンの高生産が、A901-8 株と A902-4 株での清酒醸造でのエタノール生産性向上の原因の一つと推測される。ただ、A902-6 株は、清酒中のプロリン含量は、親株と同程度であったが、エタノール生産性が向上していた。この株のエタノール生産性向上の原因は別にあると考えられる。一方、A902-4 株で醸造した清酒・酒粕中のオルニチン含量は、親株よりも顕著に増加した (Fig. 8c, d)。以上の結果から、A902-4 株は、エタノール生産性を向上させ、オルニチン高含有清酒・酒粕を製造可能な酵母であることを確認した。清酒に肝臓に優しいイメージを付与し、また機能性表示食品としての酒粕の開発が可能となる。本研究の目的であるエタノール生産性の向上した酵母、清酒・酒粕の付加価値を高める酵母を取得できた。

$\gamma$ -グルタミルキナーゼ Pro1 は、*S. cerevisiae* においてプロリン生合成の鍵となる酵素で、最終生成物であるプロリンによってフィードバック阻害を受ける (36)。しかし、高木研究室での知見により、Pro1 の Ile150Thr (37) や Pro247Ser (58) といったアミノ酸置換で、プロリンによるフィードバック阻害感受性が低下することが明らかとなっている。本研究で、プロリン高生産変異株 A901-8 株の PRO1 遺伝子に、PRO1<sup>P247S</sup> のホモ変異を見出している (Table 5) ことから、この変異によって、プロリンによるフィードバック阻害感受性が低下し、プロリンを高生産することが示唆される。またオルニチンをグルタミル- $\gamma$ -セミアルデヒドに変換するオルニチントランスアミナーゼをコードする CAR2 遺伝子に CAR2<sup>Ala82Val</sup> のヘテロ変異を見出している (Table 5) が、この変異がプロリン高生産に寄与しているかどうかは不明である。

A902-4 株のプロリン・オルニチン高生産メカニズム解明のために、全ゲノム解析を行った結果、NAG を N-アセチルグルタミルセミアルデヒドまで変換する酵素群をコードする ARG5,6 遺伝子に、NAGK の 340 番目のスレオニンをイソロイシンに置換する ARG5,6<sup>T340I</sup> の変異を見出した (Table 6)。ARG5,6 遺伝子が破壊された BY4741 *arg5,6* $\Delta$  で変異型 ARG5,6<sup>T340I</sup> 遺伝子を発現させると細胞内プロリン・オルニチン含量が野生型よりも顕著に増加した (Fig. 10) ことから、ARG5,6<sup>T340I</sup> 遺伝子の発現が細胞内プロリン・オルニチン高生産に寄与することが強く示唆された。また、変異型 NAGK-T340I におけるアルギニンによるフィードバック阻害感受性が解除された (Fig. 12, Table 7) ことから、A902-4 株においても、このアミノ酸置換を伴う変異によって、アルギニンによるフィードバック阻害感受性が解除されたと考えられる。

*S. cerevisiae* (51)、*Synechococcus elongatus* (59)、*Pseudomonas*

*aeruginosa* (60)、*Thermotoga maritima* (61) 及び *C. glutamicum* (62) を含む多くの微生物の NAGK 活性は、アルギニンによるフィードバック阻害感受性を示すが、*E. coli*、*Proteus vulgaris*、*Serratia marcescens*、*Microbacterium lacticum* (63, 64) といった微生物の NAGK 活性は、アルギニンによるフィードバック阻害非感受性を示す。ScNAGK の構造解析により、Lys265、Ser285、Glu337、Thr340、Gly345 がアルギニンと相互作用し、Thr340 の側鎖の水酸基は、Lys336 の主鎖のカルボニル基と水素結合により相互作用していることから、これらのアミノ酸残基がアルギニン結合ポケットを形成していることが示唆される (Fig. 13a)。今回見出された NAGK のアミノ酸置換 (Thr340Ile) では、Thr が側鎖に水酸基のない Ile に置換されることによって、Lys336 との相互作用が消失することが予想され、その結果、アルギニン結合領域の構造変化が生じ、アルギニンによるフィードバック阻害感受性が低下したと考えられる。Thr340 と Lys336 の間の相互作用は、アルギニンの認識に重要であることが示唆された。

酵母 *S. cerevisiae* では、ARG2 遺伝子でコードされる N-アセチルグルタミン酸シンターゼ NAGS (Fig. 17) は、グルタミン酸をアセチル化する鍵酵素であるが、その活性もアルギニンによって、フィードバック阻害を受ける (51) ため、細胞内の N-アセチルグルタミン酸量は、NAGS によって制御されていると考えられる。

*E. coli* (63) や *Sulfolobus solfataricus* (65) などのバクテリアやアーキアでは、オルニチンは linear 経路で N-アセチルオルニチンが加水分解されて合成される。一方、*Bacillus stearothermophilus* (66)、*Streptomyces coelicolor* (67) などの原核生物だけでなく、*Candida utilis* (68)、*Neurospora crassa* (69)、*S. cerevisiae* (51) などの真核生物では、cyclic 経路で、オルニチンアセチルトランスフェラーゼ Arg7 により、N-アセチルオルニチンのアセチル基がグルタミン酸に転移してオルニチンが生成されるとともに、N-アセチルグルタミン酸が再生される (Fig. 17)。NAGK のアミノ酸置換 (NAGK-T340) によって、アルギニンによるフィードバック阻害感受性が解除され、その以降の酵素反応が進み、オルニチンが生産される。その際、cyclic 経路で、N-アセチルオルニチンからアセチル基がグルタミン酸に転移することで、N-アセチルグルタミン酸が再生され、その結果、グルタミン酸が供給される限り、オルニチンが生産されるため、オルニチン高生産になることが示唆される。*S. cerevisiae* では、プロリン生合成の初発の酵素 Pro1 は、プロリンによってフィードバック阻害を受ける (36)。しかし、*S. cerevisiae* では、オルニチンからオルニチントランスアミナーゼ Car2 によりグルタミル- $\gamma$ -セミアルデヒド/ $\Delta^1$ -ピロリン-5-カルボン酸を介してプロリンを生合成することができる (70) ことが示唆されているため、過剰に生産されたオルニチンからプロリンが高生産されると考えられる。

以上の結果から、プロリン・オルニチン高生産変異株 A902-4 株では、NAGK に見出された置換 (NAGK-T340I) により、アルギニンによるフィードバック阻害感受性が解除されることによって、オルニチンが高生産されたと考えられる。今回見出された産業用酵母での NAGK-T340I によるアルギニンによるフィードバック阻害感受性の解除がオルニチン高生産に寄与する知見は初めての事例で

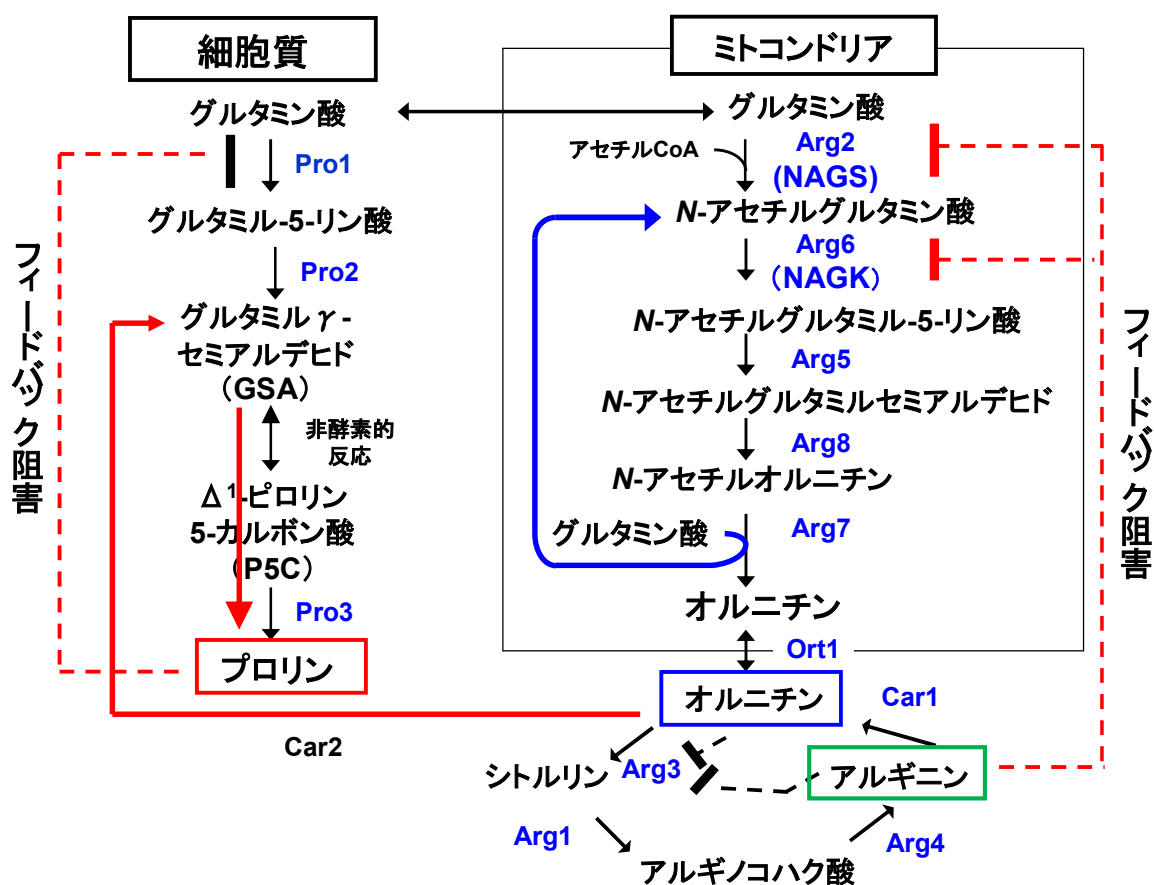


Fig. 17 プロリン・オルニチン・アルギニン生合成経路

ある(71)。一方、A902-4株のPRO1遺伝子にPRO1<sup>Thr259Ile</sup>の変異が見られた(Table 6)が、この変異は協会清酒酵母K7株で見られる変異と同じであった。K7株の細胞内プロリン含量(0.03±0.02%)は、K901株(0.04±0.01%)とほぼ同程度であり、K7株は細胞内にプロリンを高生産しない株である。従って、A902-4株のPRO1<sup>Thr259Ile</sup>の変異はプロリン高生産に寄与しないことが示唆されるため、Pro1はプロリンによるフィードバック阻害を受けると予想される。ところが、*S. cerevisiae*では、Car2経由でプロリンを生合成することができる(70)ことが示唆されているため、過剰に生産されたオルニチンからプロリンが高生産されると考えられる。本研究で得られた結果から、A902-4株において、NAGKのThr340Ileのアミノ酸置換を伴う変異が、プロリン・オルニチン高生産に寄与していることが示唆される。

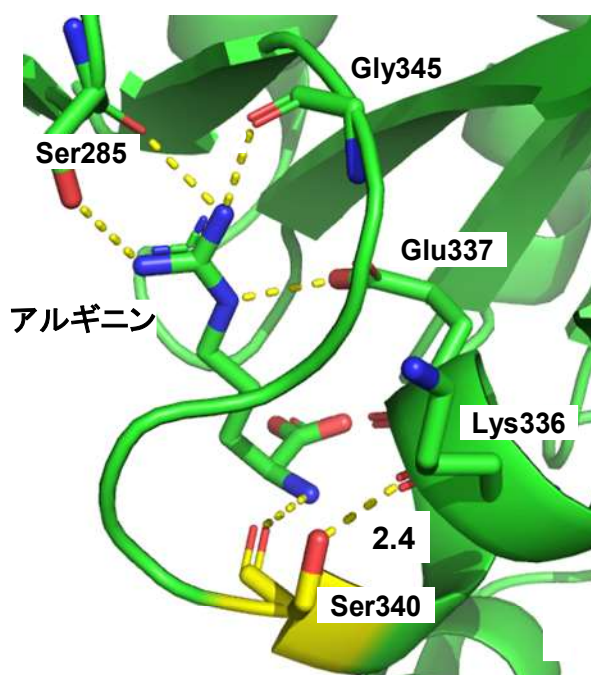
NAGKの340番目のアミノ酸残基は、アルギニンによるフィードバック阻害に感受性を示す微生物のNAGKにおいて、ThrあるいはSerとして、高度に保存されていること(Fig. 13b)、またThr340Ileのアミノ酸置換によって、アルギニンによるフィードバック阻害が解除されたことから、Thr340とLys336との相互作用が非常に重要と推測された。そこで、Thr340とLys336との相互作用の重要性を確認するために、Thr340を側鎖の大きさや電荷を考慮して、Ala、Glu、Leu、Asn、Arg、Serに置換して、その置換がプロリンやオルニチン生産に与え

る影響及びNAGKのアルギニンによるフィードバック阻害に与える影響を解析した。

また、本研究でプロリン・オルニチン高生産株として取得したA902-6株及びA902-8-3株において、NAGKをコードするARG5,6遺伝子のアミノ酸置換を伴う変異を探索した結果、ARG5,6<sup>C119Y</sup> ARG5,6<sup>V267A</sup>の変異を見出した。そこで、側鎖の大きさを考慮して、Cys119をTyr、Phe、Leu、Serに、Val267をAla、Gly、Leuに置換して、その置換がプロリンやオルニチン生産に与える影響及びNAGKのアルギニンによるフィードバック阻害に与える影響を解析した。その結果、ARG5,6<sup>T340S</sup>を除くARG5,6<sup>T340I, T340A, T340E, T340L, T340N, T340R</sup>の置換が細胞内プロリン・オルニチン含量を顕著に増加させた(Fig. 14a及びb)ことから、これらの置換がプロリン・オルニチン高生産に寄与することが示唆された。このことから、Thr340の側鎖の重要性を確認でき、さらにアミノ酸の大きさや塩基性あるいは酸性といった電荷よりも、側鎖に水酸基を有しているかどうかプロリン・オルニチンの生産性に影響を及ぼすことが示唆された。また、Cys119をTyr、Phe、Leu、Serに、Val267をAla、Gly、Leuに置換する変異型ARG5,6遺伝子(ARG5,6<sup>C119Y, C119F, C119L, C119S, V267A, V267G, V267L</sup>)を発現させた時の細胞内プロリン・オルニチン含量は、ARG5,6<sup>C119S, V267L</sup>を除くARG5,6<sup>C119Y, C119F, C119L, V267A, V267G</sup>発現株で、顕著に増加した(Fig. 14 a及びb)。これらの結果から、その置換がプロリン・オルニチン高生産に寄与することが示唆された。Cysから大きいアミノ酸(Tyr, Phe, Leu)への置換や、Val267から小さいアミノ酸(Ala, Gly)への置換がプロリンやオルニチンの高生産に寄与していることが示唆された。プロリンの高生産は、変異型ARG5,6<sup>T340I</sup>遺伝子発現によるプロリン高生産の要因を考察した時と同様に、過剰生産されたオルニチンがCar2経路でプロリンが生合成されることに起因すると考えられる。

NAGK活性試験の結果(Table 7)から、T340S、C119S、V267L以外の置換(T340I、T340A、T340E、T340L、T340N、T340R、C119F、C119L、V267G)は、NAGKのアルギニンによるフィードバック阻害感受性を低下させることが示唆されるため、これらのアミノ酸置換がプロリン・オルニチン高生産に寄与すると考えられる。一方、T340S、C119S、V267Lの置換によって、NAGKはアルギニンによるフィードバック阻害感受性を示し、プロリン・オルニチンを高生産しないと考えられる。プロリン・オルニチンを高生産するNAGKアミノ酸置換体(T340I、T340A、T340E、T340L、T340N、T340R)の中で、細胞内プロリン・オルニチン含量の差はあまり見られなかった(Fig. 14 a、Fig. 14b)。これらのアミノ酸置換体では、NAGKのフィードバック阻害感受性が低下し、グルタミン酸がミトコンドリアに供給される限り、N-アセチルグルタミン酸が再生されるので、オルニチンが高生産されると考えられる。一方、プロリン・オルニチンを高生産するNAGKアミノ酸置換体(C119Y、C119F、C119L、V267A、V267G)の中で、C119L及びV267G置換体で、細胞内プロリン・オルニチン含量がC119Y、C119F、V267Aと比較して減少した(Fig. 15 a、Fig. 15b)。V267G置換体については、アルギニン未添加時でのNAGK比活性(0.61 U/mg)が、他の置換体(1.16 – 1.39



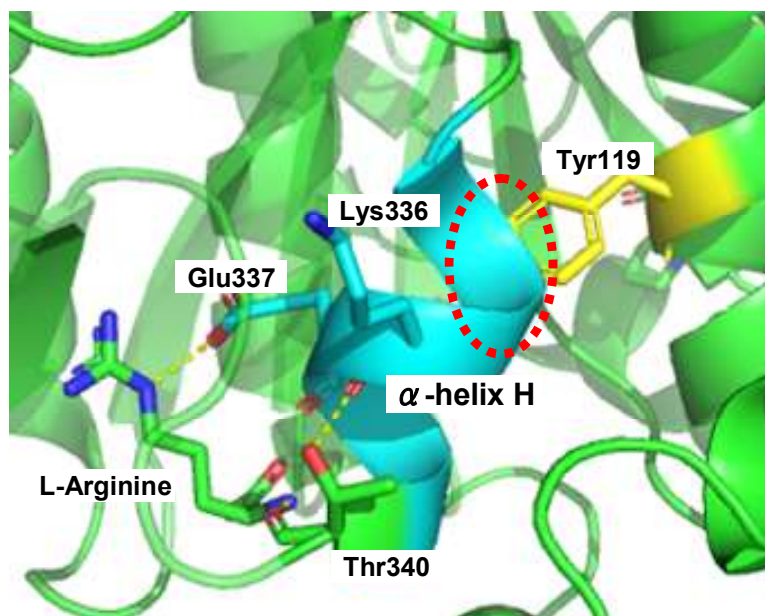


**Fig. 18 ScNAGK-T340S 変異体のアルギニン結合部位の推定構造**

ScNAGK (PDB ID 3ZZH) から推測された Thr340Ser を、cartoon モデルで示す。NAGK にインヒビターとして結合しているアルギニンを stick モデルで、置換残基 Ser340 を黄色で示す。推測される水素結合を黄色のドットで、推定距離値はオングストロームで示す。文献 (96) より改変転載

U/mg) と比較して低いことが原因と考えられる (Table 5)。C119L 置換体については理由が不明である。

NAGK の T340、C119 及び V267 における様々なアミノ酸置換が細胞内プロリン・オルニチン含量やアルギニンによる NAGK のフィードバック阻害に影響を与えることを遺伝学的及び生化学的に明らかにした。その仮説を確認するために、ScNAGK (PDB ID 3ZZH) の結晶構造に基づいて、Thr340、C119 及び V267 をアミノ酸置換した NAGK 変異体のアルギニン結合領域における構造を予測した。その結果、T340 でのアミノ酸置換では、T340S の NAGK 変異体で、Ser340 の側鎖の水酸基と Lys336 の主鎖のカルボニル基との推定距離は 2.4 Å と算出され近傍に位置する (Fig. 18) ことから、野生型 NAGK と同様、Lys336 と水素結合を形成するために、アルギニンによるフィードバック阻害感受性が示す可能性が示された。一方、T340A、T340L、T340I の NAGK 変異体では、側鎖に水酸基を有していないため、Lys336 と水素結合を形成することができない。また、T340R 変異体の側鎖のイミノ基、T340E 変異体の側鎖のカルボキシル基、T340N の側鎖のアミノ基と Lys336 の主鎖のカルボニル基との推定距離は、それぞれ、4.4 Å、5.9 Å、5.0 Å で、水素結合を形成できない可能性が示唆された。また、電荷を持たずかつ比較的大きなアミノ酸残基 (Ile、Asn、Leu) の  $IC_{50}^{Arg}$  は、酸性 (Glu)、塩基性 (Arg) あるいは小さいアミノ酸 (Ala) 残基の  $IC_{50}^{Arg}$  よりも大きく、NAGK とアルギニンとの親和性が小さいことが示唆さ

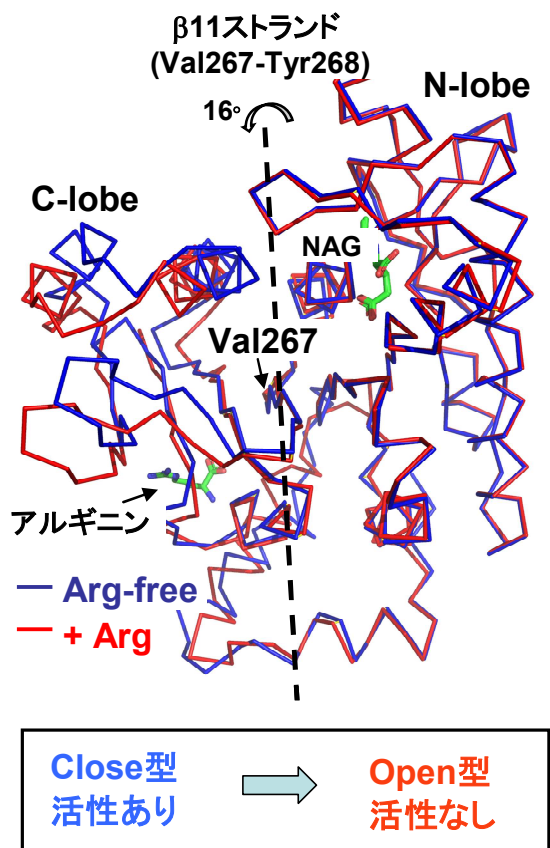


**Fig. 19 ScNAGK-C119Y 変異体のアルギニン結合部位の推定構造**

ScNAGK (PDB ID 3ZZH) から推測された Cys119Tyr を、cartoon モデルで示す。NAGK にインヒビターとして結合しているアルギニンを stick モデルで、置換残基 Tyr119 を黄色で示す。Lys336 を含む  $\alpha$ -H-helix (Asp333-Phe339) を cyan 色で示す。  $\alpha$ -helix H と Tyr119 のフェニル基との立体障害を赤色のドット楕円で示す。文献 (96) より改変転載

れる。以上の結果から、T340 の側鎖の水酸基と Lys336 の主鎖のカルボニル基との水素結合が ScNAGK のアルギニン結合ポケットの形成に非常に重要であることが、NAGK の構造予測解析からも示唆された。

C119 及び V267 は、アルギニン結合領域から離れた位置にあることから、いずれもアルギニンの認識に直接関わっていないと考えられる。C119Y 変異体のアルギニン結合領域の構造予測 (Fig. 19) では、アルギニンと相互作用している Glu337 と、Thr340 と相互作用している Lys336 を含む  $\alpha$ -ヘリックス H と、Tyr119 のフェニル基との間で立体障害を引き起こすことが可能性として考えられる。Cys119 から Tyr への置換が、NAGK のアルギニン結合領域の構造変化をもたらし、その結果、NAGK がアルギニンによるフィードバック阻害感受性低下を示すかもしれない。



**Fig. 20** アルギニン結合型とアルギニン非結合型 ScNAGK の構造

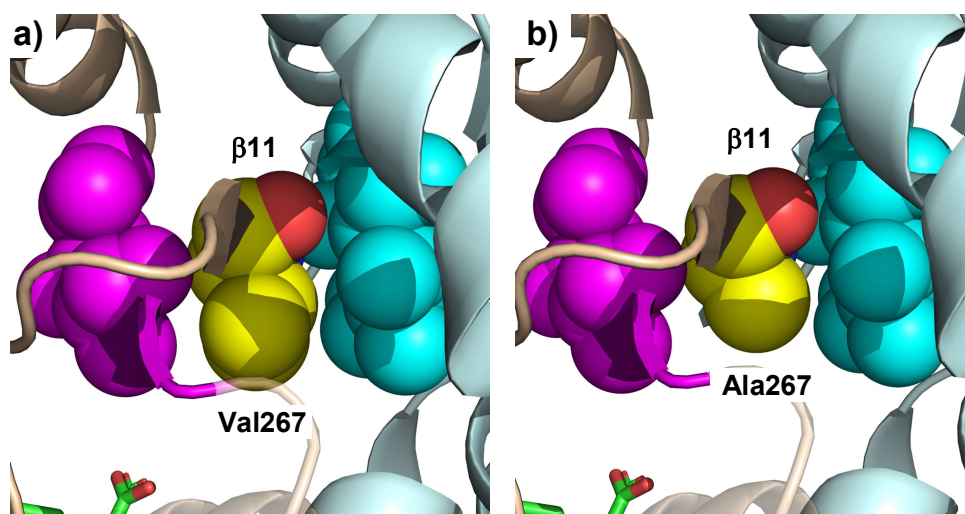
同一四量体 (ScNAGK PDB ID

3ZZH) のサブユニット C のアルギニン結合型 (赤色) とサブユニット A のアルギニン非結合型 (青色) の重ね合わせを示す。文献 (56) 参照

アルギニン結合型サブユニットは、アルギニン非結合型サブユニットと比較して、Val267-Tyr268 アミノ酸残基を含む β11 ストランドを軸 (黒い点線) として約 16° 回転している。阻害物質であるアルギニンと基質である N-アセチルグルタミン酸 (NAG) を stick モデルで示す。アルギニン非結合型からアルギニン結合型に移行することによって、closed 型 (活性あり) から open 型 (活性なし) へ移行することが示唆されている。文献 (96) より改変転載

一方、過去の ScNAGK の構造解析から、阻害物質であるアルギニンと NAGK との結合が、Val267-Tyr268 を含む中心の β11 ストランドを中心とした 16° の回転をもたらし、その結果、構造が変化することによって closed 型 (活性あり) から open 型 (活性なし) に移行する (Fig. 20) ことが示唆される (56)。

大きいアミノ酸である Val から小さいアミノ酸である Ala にアミノ酸置換されることによって、β11 ストランド付近の構造変化をもたらし、open 型 (活性なし) から closed 型 (活性あり) へと移行することによって、アルギニンによるフィードバック阻害感受性低下を示すことが一つの可能性として考えられる (Fig. 21)。しかし、C119 から Tyr119 あるいは Val267 から Ala267 へのアミノ酸置換によるフィードバック阻害感受性低下のメカニズムを解明するために、今後の解析が必要である。



**Fig. 21 ScNAGK のアミノ酸残基 267 付近の構造**

a) ScNAGK (PDB ID 3ZZH) の Val267 付近の拡大図と、b) 推測された Ala267 付近の拡大図を示す。全体は、cartoon モデルで、Val326 と Ala327 (magenta)、Ala100、Val101 及び Ile102 (cyan)、a) V267 (yellow)、b) Ala267 (yellow) を sphere モデルで示す。文献 (96) より改変転載

プロリン・オルニチン高生産に寄与した変異型 *ARG5,6* 遺伝子 (*ARG5,6*<sup>T340I, T340A, T340E, T340L, T340N, T340R</sup>) 発現株の細胞内アルギニン含量は、野生型 *ARG5,6*<sup>WT</sup> 発現株よりも 0.3-0.5 倍に減少した (Fig. 14c)。また、変異型 *ARG5,6* 遺伝子発現株 (*ARG5,6*<sup>C119Y, C119F, V267A</sup>) の細胞内アルギニン含量は、野生型 *ARG5,6*<sup>WT</sup> 発現株よりも 0.3-0.4 倍に、*ARG5,6*<sup>C119L, V267G</sup> 発現株の細胞内アルギニン含量は、0.7 倍に減少した (Fig. 15c)。*S. cerevisiae* は、オルニチンから酵素 Arg3, Arg1, Arg4 による触媒反応により、シトルリン、アルギノコハク酸を経てアルギニンを生合成する (Fig. 17)。それらの酵素の中で、*ARG3* 遺伝子でコードされたオルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ (Arg3) は、オルニチンをシトルリンに変換するが、その活性は、過剰のオルニチンと結合することによって阻害される (72, 73)。従って、細胞内にオルニチンを 1.5-2.1 % まで高生産する *ARG5,6*<sup>T340I, T340A, T340E, T340L, T340N, T340R, C119Y, C119F, V267A</sup> 発現株 (Fig. 14b, Fig. 15b) では、オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ活性が低下することによって、アルギニンの前駆体であるシトルリンの生合成が抑えられ、アルギニンの生成量が減少する可能性が考えられる。また、細胞内オルニチン含量が 0.7-1.0% 程度である *ARG5,6*<sup>C119L, V267G</sup> 発現株では、細胞内オルニチン量の減少に伴い、オルニチンによるオルニチンカルバモイルトランスフェラーゼへの阻害が緩和され、アルギニンの減少が少し抑制されているかもしれない。アルギニンの前駆物質であるオルニチンが高生産されれば、アルギニンも高生産されることが予想されるが、酵母ではアルギニン生成量を制御する仕組みを持っていることが示唆される。

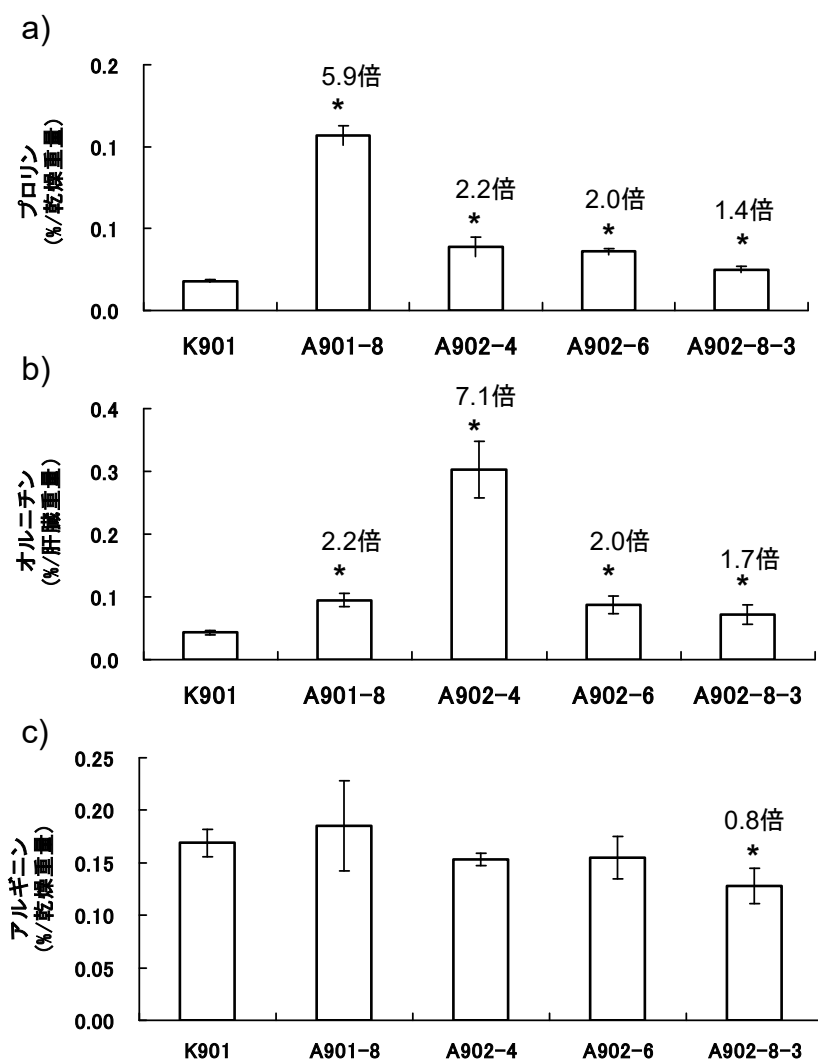
本研究の結果から、細胞内プロリン・オルニチン高生産変異株として取得さ

れた A902-4、A902-6 及び A902-8-3 株において、NAGK に T340I、C119Y 及び V267A のアミノ酸置換が導入されることによって、NAGK のアルギニンによるフィードバック阻害感受性が低下し、オルニチンが高生産されることが示唆された。A902-6 及び A902-8-3 株においても、プロリン生合成経路の初発酵素 Pro1 にプロリン高生産に寄与する変異が見られなかったことから、A902-4 株と同様、過剰に生産されたオルニチンが Car2 経由でプロリンが高生産されると示唆される。

一方、SD 培地で培養した場合、A902-4、A902-6 及び A902-8-3 株は、細胞内にプロリン・オルニチンを高生産した (Fig. 5) にもかかわらず、清酒小仕込み試験における培養条件では、A902-4 株ではオルニチンを高生産したが、それ以外の A902-6 及び A902-8-3 株では清酒・酒粕中にオルニチンを高生産しなかった (Fig. 8)。その原因を探るために、清酒小仕込み試験での酵母培養に使用する麴汁液体培地を用いて変異株を培養し、細胞内のプロリン・オルニチン含量を測定した (Fig. 22)。A902-4 株では、麴汁液体培地で培養しても、細胞内プロリン・オルニチン含量は、親株よりもそれぞれ 2.2 倍、7.1 倍増加した。一方、A902-6 及び A902-8-3 株では、親株よりも 1.4-2.0 倍程度しか増加しなかった。変異株で醸造した清酒・酒粕中のプロリン・オルニチン含量 (Fig. 8) と比較すると、グラフ形状が非常によく似ている。清酒の醸造過程において麴に含まれる *Aspergillus oryzae* などのカビが作り出す様々な成分が清酒中に存在すると考えられる。従って、麴汁に含まれる成分に酵母のオルニチン生産を制御する成分が含まれている可能性が考えられる。

*S. cerevisiae* のアルギニン生合成に関与する *ARG1*、*ARG3*、*ARG5,6*、*ARG8* 遺伝子の転写は、ArgR/Mcm1 リプレッサーによって制御されている (74)。ArgR は *ARG80*、*ARG81*、*ARG82* 遺伝子産物である Arg80、Arg81、Arg82 の複合体であり、Mcm1 は MCM1, AGAMOUS, DEFICIENS, and serum response factor (MADS) box タンパク質で、多様な配列特異的転写因子である。Zincフィンガー構造を有する Arg81 (76) が Mcm1、Arg80 と協調してそれぞれのアルギニン生合成に関与する遺伝子のプロモーター領域に結合して転写を制御していると考えられている (74)。また Arg82 はイノシトールポリリン酸をリン酸化する別の機能も有しているが、そのカルボキシル末端の連続した 17 のアスパラギン酸残基が Arg80 や Mcm1 を安定化させ、アルギニン制御に不可欠であることが示唆されている (74, 75, 76)。

A902-4 株には、*ARG82* 遺伝子に *ARG82*<sup>Asp297Asn</sup> の変異が見られた (Table 6)。このアミノ酸置換は、*ARG82* 遺伝子産物である Arg82 のカルボキシル末端での連続した 17 のアスパラギン酸残基に含まれる。この変異が ArgR/Mcm1 による *ARG5,6* 遺伝子の転写抑制に与える影響に関する解析が今後必要である。もし、*ARG5,6* 遺伝子の転写抑制を緩和していれば、オルニチンの生合成に影響を与えるかもしれない。また、A902-6 及び A902-8-3 株における *ARG82* 遺伝子の変異の有無も調べる必要がある。



**Fig. 22 細胞内 (a) プロリン, (b) オルニチン, (c) アルギニン含量**

麹汁液体培地で 30℃、48 時間培養後の AZC 耐性変異株の細胞内アミノ酸含量を示す。独立して 3 回の測定を行い、平均および標準偏差を算出した。\*は、親株に対して *t* 検定で有意な差 ( $p < 0.05$ ) を示す。

また、A902-4、A902-6 及び A902-8-3 株で見出された変異型 *ARG5,6* 遺伝子 (*ARG5,6*<sup>T340I, C119Y, V267A</sup>) 発現株では、細胞内アルギニン含量は野生型 *ARG5,6* 遺伝子発現株よりも減少した (Fig. 14c, Fig. 15c) が、変異株 A902-4、A902-6 及び A902-8-3 株の細胞内アルギニン含量は、親株 (K901 株) と比較して、同等 (A902-4 株) かあるいは若干増加 (A902-6 及び A902-8-3 株) した (Fig. 5 c)。得られた変異株は、突然変異処理の際に、様々な遺伝子に変異が入っている可能性がある。オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼによるオルニチンからシトルリンへの変換は、細胞質で行われる。過剰生産されたオルニチンが液胞に移行し、そのまま保存されれば、細胞内オルニチン含量は変化しないが、細胞質のオルニチン濃度が減少するため、オルニチンを介したオルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ活性への阻害が緩和されて、細胞内アルギニ

ン含量が減少しない、あるいは増加する可能性が考えられる。液胞へのアミノ酸トランスポーターをコードする遺伝子は、*AVT1*、*AVT2*、*AVT3*、*AVT4*、*AVT6*、*AVT7*、*VBA1*、*VBA2*、*VBA3*、*VBA4*、*VBA5*、*AZR1*、*SGE1*、*ATG22*、*UGA4*、*ERS1* が報告されている(77)。A902-4 株には上記の遺伝子にアミノ酸置換を伴う変異は見出されなかった(Table 6)。A902-6 株及び A902-8-3 株については、上記の遺伝子変異の解析を行っていない。また、上記以外の未知の液胞へのオルニチントランスポーターをコードする遺伝子への変異やオルニチントランスポーターの発現を制御する遺伝子への変異が関与していることも可能性として考えられる。また、A902-4 株では、先に述べた *ARG82* 遺伝子の変異が *ARG1* 遺伝子や *ARG3* 遺伝子の転写抑制に影響を与えて、アルギニン合成を制御している可能性もある。今後の解析が必要である。

本研究で、オルニチンを酵母細胞内に高生産する変異株を、プロリンアナログである AZC 耐性株として取得した。その変異株では、アルギニンによるフィードバック阻害を受ける *NAGK* にアミノ酸置換が導入され、フィードバック阻害感受性が低下することによって、オルニチンが高生産されたことが示唆される。オルニチンは、タンパク質を構成するアミノ酸ではないため、酵母にとって、オルニチンを本来高生産する必要がない。ところが、AZC 耐性がないと、AZC 含有培地では酵母は生育できないことから、結果的に、オルニチンを細胞内に高生産し、*Car2* 経路でプロリンも高生産する変異株として取得できたと考えられる。ただ、得られた変異株は、AZC を含有しない培地でも、プロリン・オルニチンを高生産する。細胞内のプロリンには、緒言で述べたように、細胞を保護する効果が報告されている。清酒酵母は、その高いエタノール生産性から、エタノールストレスを受ける。得られた変異株は、プロリンを高生産することが可能なため、エタノールストレスから細胞が保護されることが期待できることから、変異株にとって、プロリン高生産は酵母にとって生存上有利に働くと考えられる。

## 第 2 章 *N*-アセチルトランスフェラーゼ Mpr1 の過剰発現

### によるエタノール生産性の向上

#### 2-1. 緒言

*S. cerevisiae*  $\Sigma$ 1278b に見出された *N*-アセチルトランスフェラーゼ Mpr1 (*sigma*1278b gene for L-proline analogue resistance) は、プロリンの毒性アナログである L-アゼチジン-2-カルボン酸 (AZC) をアセチル化する (Fig.23) ことによって、AZC を無害化する酵素として同定された (23)。

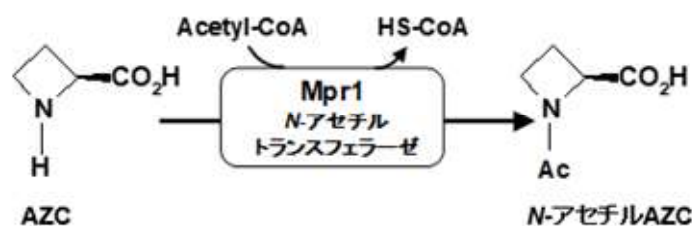
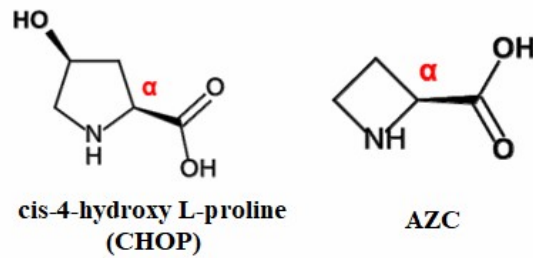


Fig. 23 Mpr1 による AZC のアセチル化

Mpr1 は、*MPR1* 遺伝子でコードされ、細胞に AZC 耐性を付与する。AZC は、プロリンと競合して新生ポリペプチド鎖に取り込まれると、そのタンパク質は正しいフォールディングを形成できずに変性・凝集し、細胞毒性を引き起こすと考えられる (38, 39)。AZC 耐性を取得するメカニズムには、細胞内にプロリンを高含有することによって AZC が新生ポリペプチド鎖に取り込まれにくくする、あるいは AZC を無毒化することが考えられる。*MPR1* の発現は、細胞内のプロリン含量に影響を及ぼさなかった (23)。また、Mpr1 は、推定されるアミノ酸配列から、*N*-アセチルトランスフェラーゼをコードしていると考えられる。そこで、Mpr1 を精製し AZC を基質として Mpr1 の活性を測定したところ、アセチル化活性が見られた (78)。これらのことから、Mpr1 は AZC のアミノ基にアセチル基を転移し、タンパク質への取り込みを防ぐことによって、AZC を無毒化し、細胞に AZC 耐性を付与すると考えられている (23)。

Mpr1 は、実験室酵母 *S. cerevisiae* において、過酸化水素水、熱ショック、冷凍やエタノールなどの処理による酸化ストレスから発生する ROS レベルを制御し、細胞を保護することが報告されている (24, 26, 79)。産業用酵母であるパン酵母 (*S. cerevisiae*) は、*MPR1* 遺伝子と相同性の高い *MPR2* 遺伝子を有していて、細胞内の ROS を減少させることによって、乾燥ストレス耐性を付与し、乾燥後の発酵能に関与している (80)。また、*MPR1* 遺伝子をゲノム上に有していない清酒酵母 K14 由来の一倍体酵母で Mpr1 を発現させると、9%エタノールに 24 時間さらした後の生存率が向上し、ROS レベルが減少した (81)。上記のような Mpr1 を介した抗酸化メカニズムとして、Mpr1 が  $\Delta^1$ -ピロリン-5-カルボン酸などの ROS 生成に関与する代謝物を制御しているのではないかと推測される





**Fig. 24 Mpr1 の基質**

が、詳細は不明である(25)。

アルギニン生合成経路では、酵母のミトコンドリア中でグルタミン酸を出発原料として、酵素 Arg2、Arg6、Arg5、Arg8、Arg7 が関与してオルニチンが生合成され、オルニチントランスポーターOrt1 を介してオルニチンが細胞質に出てから酵素 Arg3、Arg1、Arg4 が関与してアルギニンが生合成される(Fig. 1)。

グルタミン酸をアセチル化する *N*-アセチルグルタミン酸シンターゼ Arg2 をコードする ARG2 遺伝子や *N*-アセチルグルタミルセミアルデヒドを *N*-アセチルオルニチンに変換する Arg8 をコードする ARG8 遺伝子が破壊された酵母で、Mpr1 を過剰発現させると、アルギニンを含まない培地で ARG8 遺伝子破壊株は生育できないが、ARG2 遺伝子破壊株は生育できることから、Mpr1 はプロリン代謝中間体である L- $\Delta^1$ -ピロリン-5-カルボン酸をアセチル化し、アルギニン合成中間体である *N*-アセチルグルタミルセミアルデヒドを供給する(Fig. 1)ことでアルギニン合成を促進することが示唆されている(25, 26)。細胞内アルギニンは、冷凍ストレス耐性を向上させることが報告されていて(32)、それはアルギニンによるタンパク質変性を抑制する効果のためと考えられる(82)。また、培地に唯一の窒素源としてアルギニンを添加すると小麦もろみや合成果汁の発酵が促進し、エタノール生産性が向上した事例もある(83, 84)。これらのことから、Mpr1 が発現することによって、細胞内の ROS レベルが制御され、アルギニン合成が亢進し、そのアルギニンによるタンパク質変性抑制効果により、エタノールストレス耐性の向上、さらにエタノール生産性の向上が期待できる。

Mpr1 は、プロリン以外にもプロリンのアナログである *cis*-4-hydroxy-L-proline (CHOP) (Fig. 24)を基質としてアセチル化することが報告されていて(85)、さらに Mpr1 と CHOP との複合体の構造が決定されている(86)。その構造解析により、Asn203 の側鎖のアミノ基が  $\alpha$ -helix 2 にある Glu70 の主鎖のカルボニル基及び Ser71 の主鎖のカルボニル基と相互作用することによって、両カルボニル基の双極子が中和され、 $\alpha$ -helix 2 が安定化することが示唆された(86, 87)。その構造に基づく分子設計に基づいて取得された Mpr1 変異体 (Mpr1-Asn203Lys (Mpr1-N203K)) の熱安定性が著しく向上したことが報告されている(87)。また、ARG2 遺伝子が破壊された酵母において、アルギニンを含まない培地で野生型 Mpr1 を過剰発現させた場合、Mpr1 を発現させない場合と比較して、生育がよくなる。さらに、熱安定性の向上した変異型 Mpr1-N203K を過剰発現させた場合、著しく生育が向上する(87)ことから、Mpr1 の安定性

がアルギニン生合成に重要であると考えられる。

以上のように、Mpr1 は、エタノールストレスから生じる ROS レベルを抑制することによって細胞を保護し、エタノール耐性を向上させ、アルギニン合成を亢進させることが示唆され、さらに、熱安定性の高い Mpr1 は、その構造の堅牢性から、野生型 Mpr1 よりもエタノールストレス耐性を向上させ、アルギニン合成を亢進させることが期待できる。そこで、本研究では、清酒酵母のエタノール生産性を向上させる別のアプローチとして、エタノールストレス耐性の向上やアルギニン合成の亢進に寄与することが示唆されている Mpr1 に着目した。MPRI 遺伝子を有していない清酒酵母 (23) で野生型 Mpr1 及び熱安定性の向上した変異型 Mpr1-N203K を発現させ、エタノール生産性が向上するかを検討した。その結果、清酒酵母で野生型 Mpr1 及び変異型 Mpr1-N203K を発現させると、エタノール生産性が向上することを見出した。

## 2-2. 材料と方法

### 2-2-1. 菌株、プラスミド及び培地

本研究では、*S. cerevisiae* 二倍体清酒酵母 K701-UT-1T (*MATa/MATa TRP1/trp1 ura3/ura3*) を用いた。また、プラスミドを構築するために、*E. coli* の DH5 $\alpha$  株 ( $F^{-}\lambda^{-}\Phi 80lacZ\Delta M15 \Delta(lacZYA argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(r_k^{-}m_k^{+}) supE44 thi-1 gyrA96$ ) を使用した。GPD1 プロモーター制御下で Mpr1 を過剰発現させるために、*S. cerevisiae* 用の *URA3* 遺伝子を含む、多コピープラスミド pAG426 GPD-*ccdB* (Novagen 社) を使用した。PCR で増幅した野生型 *MPRI* 遺伝子断片を Gateway システム (Invitrogen 社) の BP 反応により、プラスミド pDONR221 (Invitrogen 社) に導入し、pDONR221 *MPRI*<sup>WT</sup> を作製した。その後、LR 反応により、pDONR221 *MPRI*<sup>WT</sup> の *MPRI* 遺伝子断片を pAG426 GPD-*ccdB* に移すことによって、野生型 Mpr1 発現用のプラスミドとして、pAG426 GPD-*MPRI*<sup>WT</sup> を構築した。変異型 *MPRI*<sup>N203K</sup> 遺伝子を発現するプラスミドを構築するために、pAG426 GPD-*MPRI*<sup>WT</sup> を鋳型として、Table 8 に示すプライマーを用いて、QuikChange Site-Direct Mutagenesis Kit (Stratagene 社) に準ずる方法により、変異型 *MPRI*<sup>N203K</sup> 遺伝子を含む DNA 断片を作製し、*DpnI* 処理後、*E. coli* DH5 $\alpha$  株に導入した。得られた形質転換体からプラスミドを抽出し、pAG426 GPD-*MPRI*<sup>N203K</sup> を得た。得られたプラスミドを酢酸リチウム法に準ずる方法 (55) で K701-UT-1T に導入し、K701-UT-1T pAG426 GPD-*ccdB* 株、K701-UT-1T pAG426 GPD-*MPRI*<sup>WT</sup> 株、K701-UT-1T pAG426 GPD-*MPRI*<sup>N203K</sup> 株を得た。

**Table 8** 使用プライマー

Primer	Sequence (5' → 3')
Asn203Lys-Fw	CGGAATTTTGA <u>AA</u> AGGTTTCAGTG
Asn203Lys-Rv	CACTGAAACCTTTCAA <u>AA</u> ATTCCG

下線塩基配列が変異導入部分を示す。

酵母の生育培地として、完全培地 YPD (2% glucose, 1% yeast extract, and 2% peptone)、合成最少培地 SD (2% glucose and 0.67% yeast nitrogen base without amino acids (Difco))、合成完全培地 SC20-ura (20% glucose, 0.67% yeast nitrogen base without amino acids (Difco), and 0.2% drop-out mix lacking uracil) を使用した。drop-out mix には、0.002% adenine, 0.0008% p-aminobenzoic acid, 0.04% l-leucine, 0.008% inositol, l-alanine, l-arginine, l-asparagine, l-aspartic acid, l-cysteine hydrochloride, l-glutamine, l-glutamic acid, glycine, l-histidine, l-isoleucine, l-lysine, l-methionine, l-phenylalanine, l-proline, l-serine, l-threonine, l-tryptophan, l-tyrosine, and l-valine が含まれている。固体培地の作製には、2% agar を用いた。

### 2-2-2. Mpr1 発現導入株の Mpr1 発現の確認

K701-UT-1T pAG426 GPD-ccdB 株 (空ベクター)、K701-UT-1T pAG426 GPD-*MPRI*<sup>WT</sup> 株 (WT)、K701-UT-1T pAG426 GPD-*MPRI*<sup>N203K</sup> 株 (N203K) を SD 液体培地で 30°C、48 時間振とう培養し、OD<sub>600</sub>=1 となる菌量に希釈後、10 倍ずつの希釈系列液を作製し、AZC 100 µg/mL 含有 SD 平板培地にスポットして 30°C、2 日間培養した。

### 2-2-3. Mpr1 発現株における酸化ストレス評価

K701-UT-1T pAG426 GPD-ccdB 株 (空ベクター)、K701-UT-1T pAG426 GPD-*MPRI*<sup>WT</sup> 株 (WT)、K701-UT-1T pAG426 GPD-*MPRI*<sup>N203K</sup> 株 (N203K) を SD 液体培地で 30°C、48 時間振とう培養し、OD<sub>600</sub>=1 となる菌量に希釈後、10 倍ずつの希釈系列液を作製し、4 mM 過酸化水素水あるいは 10% エタノール含有 SD 平板培地に植菌し、30°C、2 日間培養した。

### 2-2-4. 細胞内アミノ酸含量の測定

K701-UT-1T pAG426 GPD-ccdB 株 (空ベクター)、K701-UT-1T pAG426 GPD-*MPRI*<sup>WT</sup> 株 (WT)、K701-UT-1T pAG426 GPD-*MPRI*<sup>N203K</sup> 株 (N203K) を SC-ura 液体培地で 30°C、48 時間振とう培養し、集菌後、滅菌水で洗浄した。OD<sub>600</sub>=10 量の菌体を 500 µL の滅菌水に懸濁後、99°C で 20 分間の熱水抽出を行った。遠心分離後の上清を 0.45 µm メンブレンフィルターでろ過し、UF-Amino Station (島津製作所製) により、細胞内のアミノ酸含量を測定した。

### 2-2-5. Mpr1 を過剰発現させた清酒酵母の発酵試験

K701-UT-1T pAG426 GPD-ccdB株(空ベクター)、K701-UT-1T pAG426 GPD-MPR1<sup>WT</sup>株(WT)、K701-UT-1T pAG426 GPD-MPR1<sup>N203K</sup>株(N203K)を、SC-ura20液体培地で一晩振とう培養後、OD<sub>600</sub>=0.1になるようにSC-ura20液体培地に植菌し、25°Cで3~5日間静置培養を行った。発酵経過は、ファーマグラフII(Atto社製)を用いて、炭酸ガス減量を連続で計測することによって、モニタリングした。

### 2-2-6. Mpr1 を過剰発現させた清酒酵母の清酒小仕込み試験

K701-UT-1T pAG426 GPD-ccdB株(空ベクター)、K701-UT-1T pAG426 GPD-MPR1<sup>WT</sup>株(WT)、K701-UT-1T pAG426 GPD-MPR1<sup>N203K</sup>株(N203K)を用いて、清酒小仕込み試験(一段仕込み)を行った。36.4 gの $\alpha$ 化米と9.6 gの乾燥麴米を混合し、50  $\mu$ Lの90%乳酸、87 mLの酵母培養液を最終OD<sub>600</sub>=0.1となるように加えて、15°C、26日間静置培養した。発酵経過は、重量減少を測定することによって、炭酸ガス減量をモニタリングした。清酒もろみを遠心分離し、上清を清酒とした。国税庁所定分析法(54)に従って、清酒の酸度、アミノ酸度を測定した。あまからメイト DA-120(京都電子製)とアルコメイト AL-2(理研計器製)を用いて、それぞれ日本酒度及びエタノール濃度を測定した。

### 2-2-7. 清酒酵母の香気成分分析

AOC5000PLUS オートサンプラー付属の GCMS-QP2010SE (島津製作所製)を用いた GC/MS ヘッドスペース法により、香気成分である酢酸イソアミル、イソアミルアルコール、カプロン酸エチルを含む標準溶液と、n-アミルアルコール(2 mg/mL)とカプロン酸メチル(50  $\mu$ g/mL)の混合溶液を内部標準溶液として用いて検量線を作成し、清酒中の香気成分を定量した。

清酒中の香気成分を定量した GC 及び MS 条件を Table 9 に示す。

バイアルビンに標準溶液あるいは清酒を 1.8 mL 入れ、さらに内部標準溶液 0.2 mL を加えてフタをして、70°C、30 分間加温した。そのバイアルビンの気相ガス 2 mL を GC の注入口に注入した。カラムで分離された香気成分が、MS 部でイオン化され、そのイオンの中から Table 9 に記載の選択イオン(m/z)をモニターすることによって、それぞれの香気成分を定量した。

### 2-2-8. 清酒中の有機酸分析

キャピラリー電気泳動装置(Agilent 社製)を用いて、清酒中の有機酸含量を定量した。溶融シリカキャピラリーカラム(内径 75  $\mu$ m; 有効長 72 cm; 全長, 80.5 cm, Agilent 社製)に、有機酸測定用の organic acid buffer for CE (Agilent 社製)を満たし、キャピラリー温度を 20°C とし、-27kV の電圧をかけて

分離される清酒中の有機酸含量を、参照波長 200 nm に対する 350 nm の吸光度をモニターすることによって、定量した。リンゴ酸、コハク酸、ピルビン酸を含有する標準溶液や清酒サンプルの注入前にキャピラリーを泳動液で 4 分間洗浄し、定圧 (50 mbar、2 秒) モードでサンプルをキャピラリー中に注入した。清酒サンプルは水で 50 倍希釈後、0.45  $\mu\text{m}$  メンブレンフィルターでろ過し、サンプル溶液とした。

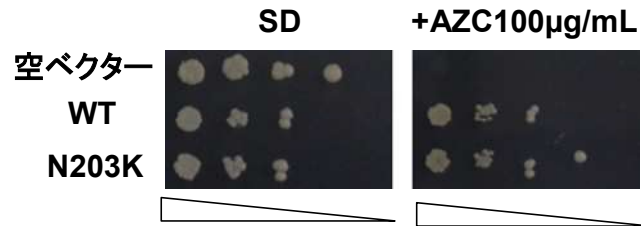
**Table 9 GC/MS 条件**

Column	HP-INNOWAX 60 m $\times$ 0.25 mm i.d., film thickness 0.25 mm
Carrier gas	He 0.61 mL/min
Injector temperature	250 $^{\circ}\text{C}$
Split ratio	1:5
Oven temperature	40 (5) - @1 - 70 - @10 -120 - 240 (5)
Injection volume	1000 $\mu\text{L}$
ionization energy	70 eV
ion souce temperature	200 $^{\circ}\text{C}$
interface temperature	250 $^{\circ}\text{C}$
Monitor ion	
Isoamyl acetate	m/z: 70, 55
Isoamyl alcohol	m/z: 70, 55
ethylcaproate	m/z: 88 99
n-amyl alcohol	m/z: 55, 70
methl caproate	m/z: 74, 87

## 2-3. 結果

### 2-3-1. Mpr1 発現の確認試験

ccdB(空ベクター)、野生型 Mpr1 (WT)、変異型 Mpr1-N203K (N203K) 発現プラスミドを清酒酵母 K701-UT-1T に導入した形質転換体を 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  AZC 含有 SD 平板培地に植菌し、生育を評価した (Fig. 25)。



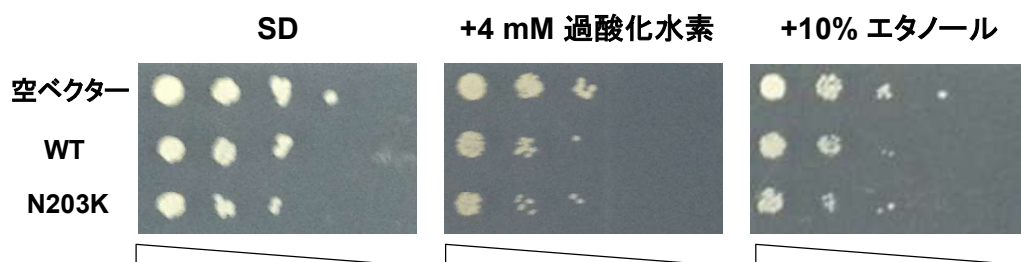
**Fig. 25** 清酒酵母における Mpr1 の発現確認

ccdB(空ベクター)、野生型 Mpr1 (WT)、変異型 Mpr1-N203K (N203K) 発現プラスミドを K701-UT-1T に導入した形質転換体を SD 液体培地で 30°C、2 日間培養後、10 倍希釈系列を作製し、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  AZC 含有 SD 平板培地に植菌し、30°C、2 日間培養しその生育を観察した。文献 (97) より改変転載

空ベクターを導入した K701-UT-1T 株は、AZC 含有 SD 培地で生育できなかったが、野生型 Mpr1、変異型 Mpr1-N203K 発現プラスミドを導入した K701-UT-1T 株は、いずれも AZC 含有 SD 培地で良好に生育した。さらに、変異型 Mpr1-N203K 発現プラスミド導入株では、野生型導入株よりも AZC 含有 SD 培地で生育が向上していた。

### 2-3-2. Mpr1 発現株における酸化ストレス耐性評価

ccdB(空ベクター)、野生型 Mpr1(WT)、変異型 Mpr1-N203K(N203K)を清酒酵母 K701 UT-1T 株で発現させた時の過酸化水素やエタノールに対する耐性をスポット試験で評価した(Fig. 26)。その結果、スポット試験では、野生型 Mpr1 と変異型 Mpr1-N203K とで、酸化ストレス耐性やエタノール耐性に差はほとんど見られなかった。

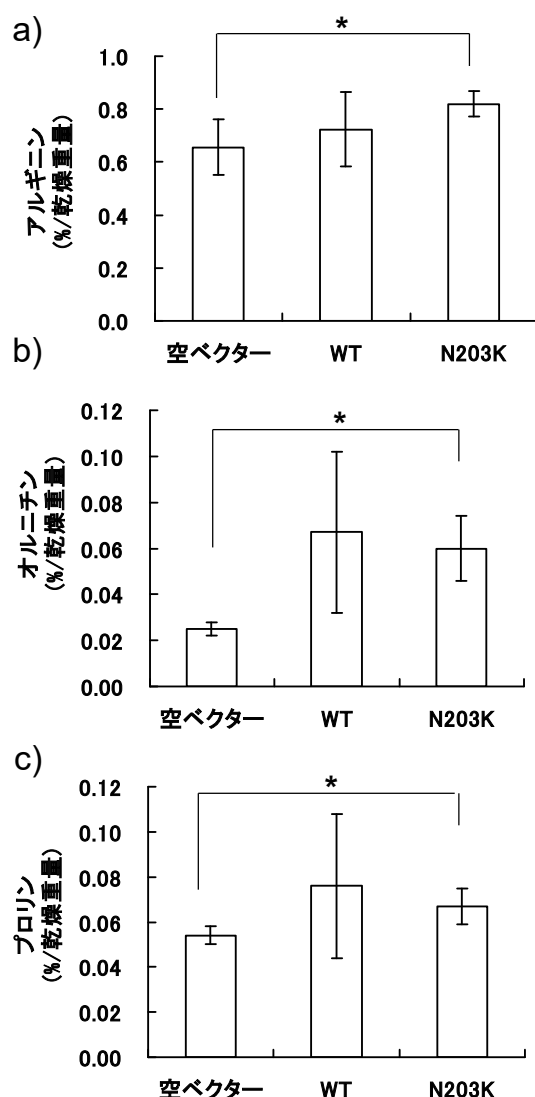


**Fig. 26 Mpr1 を発現させた清酒酵母の酸化ストレス耐性評価**

ccdB(空ベクター)、野生型 Mpr1(WT)、変異型 Mpr1-N203K(N203K) 発現プラスミドを K701-UT-1T に導入した形質転換体を SD 液体培地で 30℃、2 日間培養後、10 倍希釈系列を作製し、4 mM 過酸化水素水あるいは 10% エタノール含有 SD 平板培地に植菌し、30℃、2 日間培養しその生育を観察した。

### 2-3-3. Mpr1 を SC-ura 液体培地で発現させた時の細胞内アミノ酸含量

ccdB(空ベクター)、野生型 Mpr1(WT)、変異型 Mpr1-N203K(N203K)発現プラスミドを清酒酵母 K701-UT-1T に導入した形質転換体を SC-ura 液体培地で培養し、細胞内アミノ酸含量を測定した(Fig. 27)。その結果、変異型 Mpr1-N203K を発現させると、空ベクターよりも有意にプロリン、オルニチン及びアルギニンを生産した。空ベクターと野生型 Mpr1、野生型 Mpr1 と変異型 Mpr1-N203K との比較では、有意差は見られなかったが、増加傾向にあった。



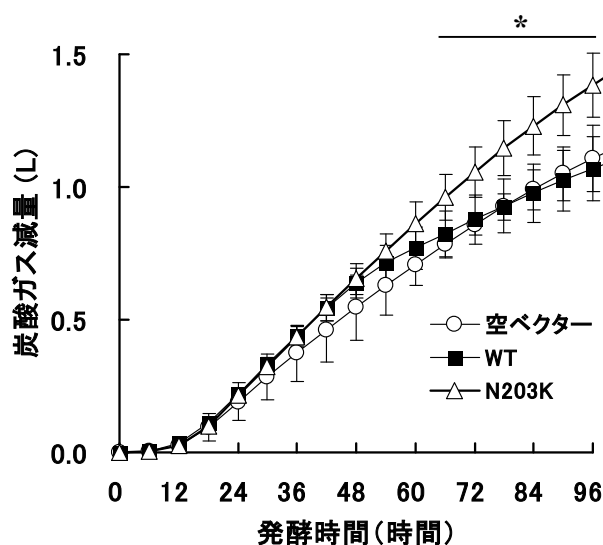
**Fig. 27 Mpr1 を SC-ura 液体培地で発現させた時の細胞内アミノ酸含量**

ccdB(空ベクター)、野生型 Mpr1(WT)、変異型 Mpr1-N203K(N203K)発現プラスミドを K701-UT-1T に導入した形質転換体を SC-ura 液体培地で 30℃、48 時間培養後の細胞内アミノ酸含量を示す。独立して 3 回の測定を行い、平均及び標準偏差を算出した。\*は、空ベクターと比較して *t* 検定で有意な差 ( $p < 0.05$ ) を示す。



#### 2-3-4. Mpr1 を発現させた清酒酵母の発酵試験

ccdB(空ベクター)、野生型 Mpr1(WT)、変異型 Mpr1-N203K(N203K)発現プラスミドを清酒酵母 K701-UT-1T に導入した形質転換体を SC-ura20 液体培地中、25°C で培養し、炭酸ガス減量をモニターした(Fig. 28)。変異型 Mpr1-N203K を発現させると、48 時間までは野生型 Mpr1 を発現させた場合と比較して、炭酸ガス減量はほぼ同程度であったが、48 時間を過ぎると、炭酸ガス減量が野生型 Mpr1 よりも増加しはじめ、66 時間以降有意に増加し、エタノール生産性が向上した。



**Fig. 28** 清酒酵母における野生型及び変異型 Mpr1 が発酵に与える影響

ccdB(空ベクター:○)、野生型 Mpr1(WT:■)、変異型 Mpr1-N203K

(N203K:△)発現プラスミドを K701-UT-1T に導入した形質転換体を用いて、SC20-ura 液体培地中、25°C で発酵試験を行った時の炭酸ガス減量を示す。

独立した 3 回の測定を行い、平均及び標準偏差を算出した。\*は、N203K と空ベクターあるいは WT と比較して *t* 検定で有意な差 ( $p < 0.05$ ) を示す。文献(97)より改変転載

### 2-3-5. Mpr1 を発現させた清酒酵母の清酒小仕込み試験

発酵試験で、変異型 Mpr1-N203K を発現させると、顕著にエタノール生産性が上がったので、次に ccdB(空ベクター)、野生型 Mpr1(WT)あるいは変異型 Mpr1-N203K(N203K)発現プラスミドを K701-UT-1T に導入した形質転換体を用いて、清酒小仕込み試験を行った。清酒小仕込み試験における炭酸ガス減量を Fig. 29 に示す。野生型 Mpr1 及び変異型 Mpr1-N203K を発現させると空ベクターよりも若干ではあるが、炭酸ガス減量が有意に増加した。変異型 Mpr1-N203K を発現させると野生型 Mpr1 よりも、6 日目から炭酸ガス減量が増加しはじめて、8 日目から有意に増加した。

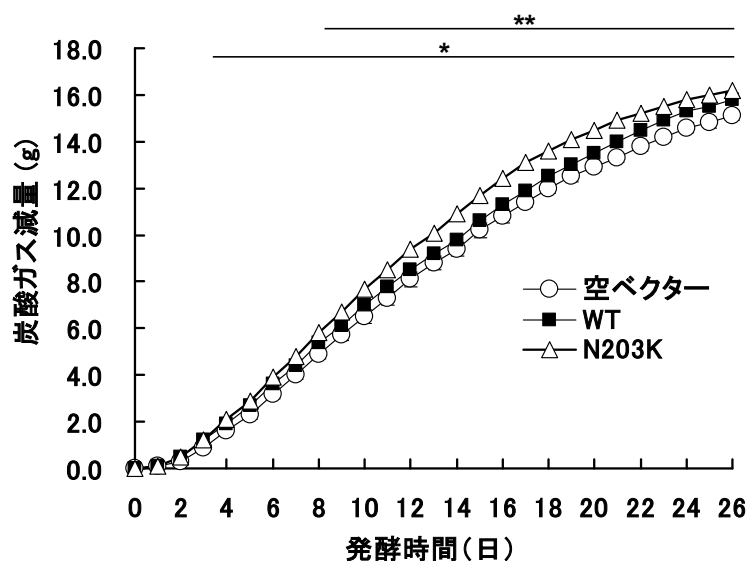


Fig. 29 清酒小仕込み試験における炭酸ガス減量

ccdB(空ベクター:○)、野生型 Mpr1(WT:■)、変異型 Mpr1-N203K(N203K:△)発現プラスミドを K701-UT-1T に導入した形質転換体を用いて 15°C で清酒小仕込み試験を行った時の 1 日ごとの炭酸ガス減量を示す。独立して 3 回の測定を行い、平均及び標準偏差を算出した。\*は、WT あるいは N203K と空ベクターと比較して *t* 検定で有意な差 ( $p < 0.05$ ) を示す。\*\*は、N203K と WT と比較して *t* 検定で有意な差 ( $p < 0.05$ ) を示す。文献(97)より改変転載

### 2-3-6. 清酒の成分分析

ccdB(空ベクター)、野生型(WT)あるいは変異型 Mpr1-N203K(N203K)発現プラスミドを K701-UT-1T に導入した形質転換体を用いて行った清酒小仕込み試験で得られた清酒の成分分析結果を Table 10 に示す。日本酒度は、清酒の比重をもとにして算出された値で、日本酒度が高ければ、糖類が少ないことを意味するため、辛口の清酒となる。酸度及びアミノ酸度は、清酒中に含まれる有機酸総量及びアミノ酸総量をそれぞれ表している。野生型 Mpr1 発現株で醸造した清酒の日本酒度(1.7)と比較して、変異型 Mpr1-N203K 発現株で醸造した清酒の日本酒度(6.5)は、顕著に高かった。変異型 Mpr1-N203K 発

現株で醸造した清酒では、糖類の消費（発酵）が進んだことが示唆された。アルコール濃度も日本酒度と同様の傾向が見られ、野生型 Mpr1 発現株で醸造した清酒のアルコール濃度は、空ベクター発現株で醸造した清酒よりも若干ではあるが有意に高く、変異型 Mpr1-N203K 発現株で醸造した清酒のアルコール濃度は空ベクター発現株で醸造した清酒よりも顕著に高かった。また、変異型 Mpr1-N203K 発現株で醸造した清酒の酸度（6.4）は空ベクター（8.0）及び野生型 Mpr1（7.1）発現株で醸造した清酒よりも顕著に低かった。アミノ酸度はすべての清酒で同程度であった。

### 2-3-7 清酒の香気成分分析

ccdB（空ベクター）、野生型（WT）、変異型 Mpr1-N203K（N203K）発現プラスミドを K701-UT-1T に導入した形質転換体を用いて醸造した清酒中の香気成分含量を Table 11 に示す。カプロン酸エチル含量は、野生型 Mpr1 及び変異型 Mpr1-N203K 発現株で醸造した清酒で、空ベクター発現株で醸造した清酒よりも有意に増加していたが少量であった。イソアミルアルコール含量は、野生型 Mpr1 発現株で醸造した清酒で減少していた。一方、変異型 Mpr1-N203K 発現株で醸造した清酒では、野生型 Mpr1 発現株で醸造した清酒よりも、酢酸イソアミルと酢酸エチル含量が増加していた。

### 2-3-8. 清酒の有機酸分析

ccdB（空ベクター）、野生型（WT）あるいは変異型 Mpr1-N203K（N203K）発現プラスミドを K701-UT-1T に導入した形質転換体を用いて醸造した清酒中の有機酸含量を Table 12 に示す。

野生型 Mpr1 発現株で醸造した清酒と比較して、有意に差があったのは、変異型 Mpr1-N203K 発現株で醸造した清酒中のリンゴ酸含量とピルビン酸含量で、いずれも 20-40%減少していた。

**Table 10** 清酒の成分分析

株	日本酒度	酸度 (mL)	アミノ酸度 (mL)	アルコール濃度 (%)
空ベクター	-3.5 ± 1.9	8.0 ± 0.1	1.6 ± 0.0	15.7 ± 0.2
WT	1.7 ± 0.2 <sup>a</sup>	7.1 ± 0.1 <sup>a</sup>	1.7 ± 0.1	16.1 ± 0.2 <sup>a</sup>
N203K	6.5 ± 0.5 <sup>a, b</sup>	6.4 ± 0.1 <sup>a, b</sup>	1.7 ± 0.1	17.1 ± 0.1 <sup>a, b</sup>

独立して3回の測定を行い、平均及び標準偏差を算出した。  
 a は、空ベクターと比較して *t* 検定で有意な差 ( $p < 0.05$ ) を示す。  
 b は、WT と比較して *t* 検定で有意な差 ( $p < 0.05$ ) を示す。

**Table 11** 清酒の香気成分分析

(単位: µg/mL)

株	酢酸 イソアミル	イソアミル アルコール	カプロン酸 エチル	酢酸エチル
空ベクター	2.2 ± 0.3	140 ± 4	0.7 ± 0.0	40.3 ± 5.7
WT	2.3 ± 0.1	131 ± 4 <sup>a</sup>	1.1 ± 0.1 <sup>a</sup>	38.8 ± 4.6
N203K	3.9 ± 0.8 <sup>a, b</sup>	151 ± 19	1.3 ± 0.3 <sup>a, b</sup>	53.9 ± 9.7 <sup>b</sup>

独立して3回の測定を行い、平均及び標準偏差を算出した。  
 a は、空ベクターと比較して *t* 検定で有意な差 ( $p < 0.05$ ) を示す。  
 b は、WT と比較して *t* 検定で有意な差 ( $p < 0.05$ ) を示す。

**Table 12** 清酒の有機酸組成

(単位: µg/mL)

株	リンゴ酸	コハク酸	ピルビン酸	酢酸
空ベクター	887 ± 29	342 ± 36	318 ± 23	6.9 ± 2.1
WT	884 ± 20	313 ± 13	279 ± 10	8.1 ± 2.9
N203K	703 ± 11 <sup>a, b</sup>	349 ± 44	178 ± 23 <sup>a, b</sup>	10.5 ± 6.6

独立して3回の測定を行い、平均及び標準偏差を算出した。  
 a は、空ベクターと比較して *t* 検定で有意な差 ( $p < 0.05$ ) を示す。  
 b は、WT と比較して *t* 検定で有意な差 ( $p < 0.05$ ) を示す。

## 2-4. 考察

本研究では、エタノールストレスからの細胞保護効果やアルギニン合成への寄与が示唆される *Mpr1* に着目して、*MPR1* 遺伝子を有していない清酒酵母で野生型 *Mpr1* 及び変異型 *Mpr1-N203K* を発現させることによって、エタノール生産性が向上するかを検討した。まず、野生型 *Mpr1* 及び変異型 *Mpr1-N203K* を発現するプラスミドを清酒酵母 K701 UT-1T に導入した形質転換体で *Mpr1* が発現しているかを確認するために、AZC 含有 SD 培地での生育を評価した (Fig. 25)。その結果、空ベクター導入株は、AZC 含有 SD 培地で生育できなかったが、野生型 *Mpr1* 及び変異型 *Mpr1-N203K* 導入株は、良好に生育したことから、AZC を無毒化する *Mpr1* の発現を確認できた。また、熱安定性の向上した変異型 *Mpr1-N203K* 導入株は、野生型よりも生育が向上したことから、野生型よりも AZC 耐性が向上したと考えられる。

*Mpr1* は、これまでの高木研での知見より、エタノールストレスを含む冷凍、低温ストレスで生じる ROS レベルを抑制し、実験室酵母の細胞を保護する (24, 26, 79, 81)。本研究で、清酒酵母で *Mpr1* を発現させた場合、酸化ストレス耐性に与える影響をスポット試験で評価した (Fig. 26)。その結果、4 mM 過酸化水素や 10% エタノール含有培地での生育では、空ベクター、野生型 *Mpr1*、変異型 *Mpr1-N203K* 導入株でいずれもほとんど差が見られなかった。過去の実験室酵母を用いた報告では、細胞生存率で生育を評価している (24, 26, 81)。スポット試験では、10 倍希釈系列液をスポットして生育を見ているため、微妙な差が見られなかったかもしれない。

これまでの知見で、*Mpr1* はアルギニン代謝中間体の *N*-アセチルグルタミルセミアルデヒドを供給することによって、アルギニン合成を亢進し、アルギニン合成経路に関与している可能性が示唆された (25, 26)。清酒酵母で *Mpr1* を発現させた時の細胞内におけるアルギニン及びアルギニンの前駆物質であるオルニチン含量を測定した結果 (Fig. 27)、空ベクター、野生型 *Mpr1*、変異型 *Mpr1-N203K* 発現株の順で、オルニチン、アルギニン含量の上昇傾向が見られた。特に、*Mpr1-N203K* 発現株は、空ベクターと比較してオルニチン、アルギニン含量が有意に増加した。以上の結果から、K701 UT-1T での *Mpr1-N203K* の発現で、アルギニン合成が亢進していることが示唆された。

清酒酵母における *Mpr1* の発現がエタノール生産性に与える影響を調べるために、20% グルコース含有 SC-ura 液体培地で培養し、エタノール生産性を炭酸ガス減量で評価した。その結果、野生型 *Mpr1* を発現させても、あまりエタノール生産性には影響を及ぼさなかった (Fig. 28)。しかし、興味深いことに変異型 *Mpr1-N203K* を発現させると、発酵中期以降野生型 *Mpr1* を発現させた時よりも顕著にエタノール生産性が向上した。また、清酒小仕込み試験では、炭酸ガス減量測定の結果から、野生型 *Mpr1* を発現させると清酒酵母のエタノール生産性が向上し、熱安定性の高い変異型 *Mpr1-N203K* を発現させると、さ

らにエタノール生産性が向上した (Fig. 30)。また、変異型 Mpr1-N203K 発現株で醸造した清酒のアルコール濃度 (17.1%) は、野生型 Mpr1 発現株で醸造した清酒 (16.1%) よりも顕著に増加した (Table 10)。この結果は、炭酸ガス減量の結果と矛盾しない。

変異型 Mpr1-N203K は、熱処理 (50°C) 後の酵素活性の安定性が確認された Mpr1 である (87)。しかし、ARG2 遺伝子が破壊された実験室酵母 L5685 で変異型 Mpr1-N203K を 30°C で過剰発現させると、野生型 Mpr1 と比較してアルギニン欠損培地で顕著に生育が向上する (87) ことから、30°C という温和な条件でさえも、ダイマーを形成する Mpr1 の変異型 Mpr1-N203K は、その分子間水素結合による相互作用が野生型 Mpr1 よりも強化され、その結果、低 pH やエタノールといった水素結合を切断する様々な要因に対して変異型 Mpr1-N203K は耐性を有することが示唆される。変異型 Mpr1-N203K 発現株で醸造した清酒のアルコール濃度の増加は、安定性の高い Mpr1 のエタノールストレス耐性の向上や、安定性の高い Mpr1 が介した新規なアルギニン合成促進によりアルギニンが増加し、そのアルギニンのもつタンパク質変性抑制効果に由来する細胞保護効果 (82) に起因しているかもしれない。

清酒中の酢酸イソアミルはバナナ様の香りを呈し、吟醸香として知られる鍵となる成分の一つである。その酢酸イソアミルは、*S. cerevisiae* では、アルコール O-アセチルトランスフェラーゼ (AATs; EC 2.3.1.84) Atf1 と Atf2 によって、イソアミルアルコールとアセチル CoA から生合成される。おそらく、Atf1 が酢酸エステル合成で主要な役割を有している (88)。一方、酢酸イソアミルは、酢酸イソアミル加水分解エステラーゼ遺伝子 (*IAH1*) でコードされるエステラーゼによってイソアミルアルコールと酢酸に加水分解される (89)。Atf1 は、イソアミルアルコールやエタノールをアセチル化してそれぞれ酢酸イソアミルや酢酸エチルを生成する。Atf1 のアセチルトランスフェラーゼ活性は、基質とするアルコールに対して比較的的非特異的であるが、アセチル基の供給にはアセチル CoA を利用する (88)。本研究で、変異型 Mpr1-N203K 発現株で醸造した清酒では、野生型 Mpr1 発現株での清酒よりも、酢酸イソアミル含量だけでなく、酢酸エチル含量も増加していた (Table 11) が、酢酸含量はほとんど差が見られなかった (Table 12)。以上の結果から、変異型 Mpr1-N203K 発現株では、野生型 Mpr1 の発現株と比較して、*Iah1* よりも *Aft1* の活性が向上していたかもしれない。しかし、Mpr1 が *Aft1* 活性をどのように制御しているかは不明である。

一方、変異型 Mpr1-N203K 発現株で醸造した清酒のピルビン酸及びリンゴ酸含量が野生型 Mpr1 発現株で醸造した清酒よりも顕著に低下した (Table 12)。清酒醸造のような嫌氣的条件下では、リンゴ酸は細胞質でオキサロ酢酸からリンゴ酸デヒドロゲナーゼを触媒として還元的経路で合成される (90)。解糖系の最終生成物であるピルビン酸は、嫌氣条件下でエタノールに還元される。さらに、ピルビン酸は、ピルビン酸デヒドロゲナーゼを触媒として脱炭酸されてアセチル CoA に変換される。その際、補酵素である NAD<sup>+</sup> が消費される。また、ピルビン酸はピルビン酸カルボキシラーゼを触媒としてオキサロ酢酸に変換される

(Fig. 30)。変異型 Mpr1-N203K 発現株で醸造した清酒のピルビン酸及びリンゴ酸含量が野生型 Mpr1 発現株で醸造した清酒よりも減少した原因について、可能性の一つとして、以下のように考察する。

Mpr1 とアルコールアセチルトランスフェラーゼは、触媒反応の基質としてアセチル CoA を必要とする。その結果、アセチル CoA の前駆体であるピルビン酸やピルビン酸の代謝物であるオキサロ酢酸から生合成されるリンゴ酸の生成量が減少する。さらに、ピルビン酸の代謝物であるアセトアルデヒドは、エタノールに変換され、ピルビン酸からアセチル CoA への生合成に必要な  $NAD^+$  が再生される。その結果、エタノール生産性が向上する (Fig. 30)。しかし、解糖系、TCA 回路、エタノール生合成系は様々な代謝成分が関与する反応であり、Mpr1 がエタノール生産性を向上させるメカニズムは不明で、メタボローム解析などの今後の解析が必要である。

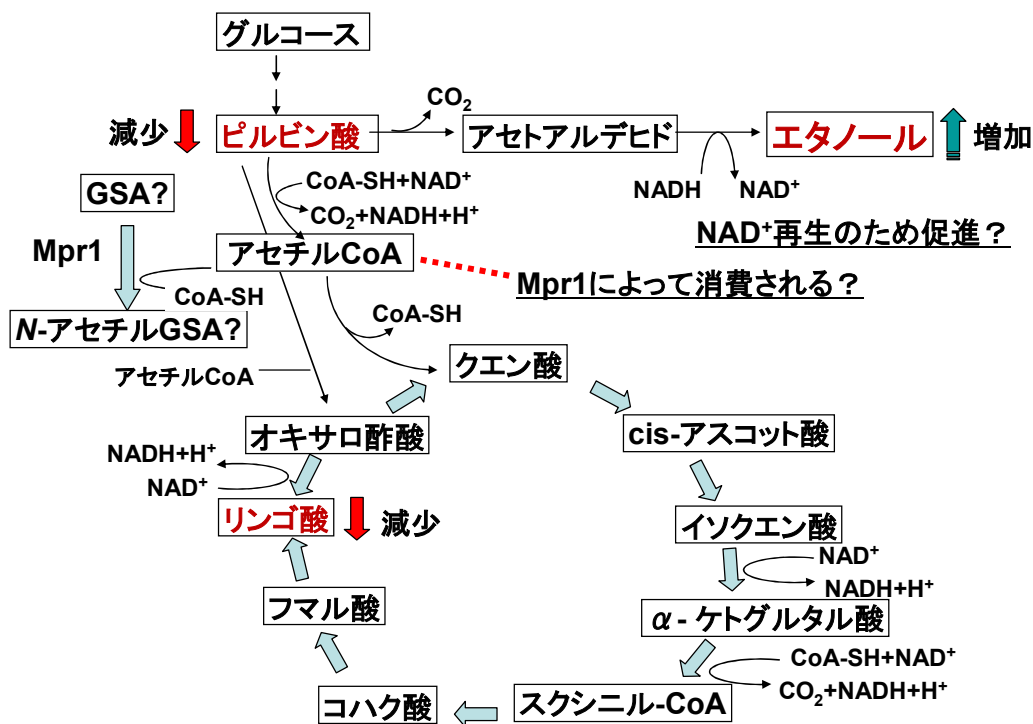


Fig. 30 ピルビン酸・リンゴ酸・エタノール生合成経路

第 1 章での研究で得られたプロリン・オルニチン高生産清酒酵母では、プロリンが高生産されるため、Mpr1 の基質として示唆されている  $\Delta^1$ -ピロリン-5-カルボン酸も高生産されることが予想される。そこで、プロリン・オルニチン高生産清酒酵母で Mpr1 を発現させた場合、オルニチン・アルギニン合成が亢進されることが期待できる。プロリン・オルニチン高生産清酒酵母では、オルニチンが高生産されても細胞内アルギニン含量は減少しない (Fig. 5) ことから、Mpr1 が発現しても細胞内アルギニン含量は増加することが期待でき、Mpr1 の ROS レベル制御機能やアルギニンによるタンパク質変性抑制効果などから、さらにエタノールストレス耐性が向上し、エタノール生産性が向上するかもしれない。

MPR1 遺伝子は、実験室酵母  $\Sigma$ 1278b の 14 番染色体のサブテロメア付近に存在するが、10 番染色体のサブテロメア付近にも 1 コピー存在する (MPR2)。両者の DNA 配列は、254 番目の塩基が異なることによって、Mpr1 では 85 番目残基が Gly で、Mpr2 では 85 番目残基が Glu とアミノ酸が置換しているだけで、その他は全く同じアミノ酸配列であり、AZC 耐性に関する機能的な差異は観察されていない (23)。一方、主要な実験室酵母である *S. cerevisiae* S288C や清酒酵母には、MPR1 遺伝子のオルソログ遺伝子は存在しない (23) が、*S. paradoxus* (91) や *Schizosaccharomyces pombe* (92) には、ホモログ遺伝子 *SpaMpr1*、*ppr1*<sup>+</sup> が存在する。さらに、BLAST 検索を行うと、*Kluyveromyces lactis*、*Debaryomyces hansenii*、*Yarrowia lipolytica*、*Neurospora crassa*、*Gibberella zeae*、*Chaetomium globosum*、*Neosartorya fischeri*、*C. albicans*、*Magnaporthe grisea*、*Aspergillus terreus*、*A. fumigatus*、*A. nidulans*、*A. oryzae* に MPR1 と相同性の高い DNA 配列が見出された (24)。また、*C. saitoana*、*Wickerhamia fluorescens* にも、AZC のアセチル化活性を有し、AZC アセチルトランスフェラーゼをコードする MPR1 遺伝子のホモログが存在することが強く示唆されている (93)。これらのことから、MPR1 遺伝子は真菌や酵母に幅広く存在することが示唆される。しかしながら、Mpr1 が基質とする AZC はスズラン (*Convallaria majalis*) などの一部の植物にしか見出されておらず (94, 95)、酵母の細胞内からは検出されていない。実験室酵母  $\Sigma$ 1278b が MPR1 遺伝子を持っているのは、AZC 以外に Mpr1 の基質となる成分が酵母の細胞内に存在するからと考えるのが合理的である。プロリン生合成系の中間体である  $\Delta^1$ -ピロリン-5-カルボン酸が Mpr1 の基質となり、Mpr1 はアルギニン合成を亢進する可能性が示唆されている (25, 26)。また、Mpr1 が冷凍、乾燥、エタノールといった様々な酸化ストレスで発生する ROS レベルを制御し、酵母の生存率を向上させ、細胞を保護する効果も示唆されている (24, 26, 79, 81)。以上のことから、Mpr1 は酵母において、アルギニン合成の亢進や新たな抗酸化システムとしての生理的意義を有していることが示唆される。一方、清酒酵母は MPR1 遺伝子を持っていない。しかし本研究で、清酒酵母において Mpr1 を発現させるとエタノール生産性が向上することを見出した。本研究では遺伝子組換え技術で Mpr1 を発現させたが、現在、遺伝子組換え技術は発酵業界や消費者に受け入れられる状況にない。そこで、Mpr1 と相同性が高く、活性も同等である Mpr2



をコードする *MPR2* 遺伝子を有するパン酵母などを突然変異処理後、AZC 及びエタノール耐性の高い株を選抜することによって、*Mpr1* を発現しながら、エタノール生産性の高い酵母を構築する新たな方法を開発することが期待できる。また、AZC 及びエタノール耐性を指標にして、自然界に存在する酵母 *S. cerevisiae* から *MPR1* 遺伝子を有する菌株を取得できれば、エタノール生産性の向上した産業用酵母を取得することが期待でき、発酵産業界に貢献できると考えられる。

## 総括

第 1 章では、清酒酵母を親株として突然変異処理後、プロリンのアナログである AZC 及びエタノールに対する耐性を指標として、エタノール生産性の高い清酒酵母の育種を試みて、プロリン・オルニチンを細胞内に高生産する変異株を 3 株取得できた。さらに、それら変異株の中で最もオルニチンを高生産する変異株 (A902-4 株) を用いた清酒小仕込み試験を行い、親株よりもエタノール生産性が向上し、清酒・酒粕中にオルニチンを高含有することを見出した。A902-4 株は、肝臓の働きを促進する機能を有するオルニチンを高含有する清酒・酒粕の製造を可能とする酵母であり、清酒・酒粕の付加価値を向上させることが期待できる。また、A902-4 株の *ARG5,6* 遺伝子に、*NAGK* のアミノ酸置換 (T340I) を伴う変異を見出し、その変異がプロリン・オルニチン高生産に寄与していることを遺伝学的解析で明らかにした。また、*NAGK* のアミノ酸置換により、アルギニンによる *NAGK* のフィードバック阻害感受性が低下することを生化学的解析で明らかにした。以上の結果から、プロリン・オルニチン高生産変異株のそれらアミノ酸の高生産メカニズムを明らかにした。以上の成果を論文 (71) にまとめている。

また、*NAGK* の 340 番目残基の側鎖にある水酸基と Lys336 の主鎖のカルボニル基との水素結合を介した相互作用がアルギニン認識に重要であることを部位特異的変異導入の解析により明らかにした。さらに、A902-4 株以外のプロリン・オルニチン高生産変異株に *NAGK* のアミノ酸置換 (C119Y、V267A) を見出し、その置換がプロリン・オルニチン高生産に寄与することを明らかにした。直接アルギニン認識に関与していない C119 及び V267 についても、アミノ酸の側鎖の大きさを変えた部位特異的変異導入の解析により、アルギニンによるフィードバック感受性が低下することを明らかにした。以上の成果の一部を論文にまとめている (96)。

第 2 章では、エタノールストレスからの細胞保護効果やアルギニン合成への寄与が示唆される *Mpr1* に着目して、*MPR1* 遺伝子を有していない清酒酵母において野生型 *Mpr1* 及び熱安定性の向上した変異型 *Mpr1-N203K* を発現させたところ、変異型 *Mpr1-N203K* が清酒醸造でエタノール生産性を向上させることを明らかにした。変異型 *Mpr1-N203K* 発現株では、僅かな差であるが、アルギニン合成の亢進が示唆された。以上の成果を論文にまとめている (97)。

本研究により、エタノール生産性の高い清酒酵母を分離・構築し、また清酒・酒粕の付加価値を高めることが可能なプロリン・オルニチン高生産清酒酵母を分離した。また、プロリン・オルニチン高生産メカニズムを遺伝学的・生化学的解析により解明した。これらの成果は、学術的な貢献や清酒の差別化といった応用面への貢献ができると考えられる。

## 謝辞

本研究の遂行ならびに論文の作成にあたり、熱心にご指導いただいた奈良先端科学技術大学院大学 高木博史教授に厚くお礼申し上げます。また、貴重な技術的助言をいただいた奈良先端科学技術大学院大学 加藤晃教授、渡辺大輔准教授、那須野助教、西村助教、磯貝特任助教、株式会社バイオジェットの塚原正俊氏、木下酒造有限会社の橋田恵介氏に厚くお礼申し上げます。

また、奈良県産業振興総合センター バイオ・食品グループの皆様、研究支援室の皆様にお礼申し上げます。

令和4年11月24日

## 参考文献

- 1) J. Steensels, T. Snoek, E. Meersman, M. P. Nicolino, K. Voordeckers, K. J. Verstrepen, Improving industrial yeast strains: exploiting natural and artificial diversity. *FEMS Microbiol. Rev.* **38**, 947–995 (2014).
- 2) R. Akada, Genetically modified industrial yeast ready for application. *J. Biosci. Bioeng.* **94**, 536–544 (2002).
- 3) K. Yoshizawa, Sake: Production and flavor. *Food Rev. Int.* **15**, 83–107 (1999).
- 4) 酒のしおり、国税庁  
<https://www.nta.go.jp/taxes/sake/shiori-gaikyo/shiori/2022/pdf/040.pdf>
- 5) J. Ding, X. Huang, L. Zhang, N. Zhao, D. Yang, K. Zhang, Tolerance and stress response to ethanol in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **85**, 253–263 (2009).
- 6) C. Pascual, A. Alonso, I. Garcia, C. Romay, A. Kotyk, Effect of ethanol on glucose transport, key glycolytic enzymes, and proton extrusion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* **32**, 374–378 (1988).
- 7) J. I. Ibeas, J. Jimenez, Mitochondrial DNA loss caused by ethanol in *Saccharomyces flor* yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 7–12 (1997).
- 8) S. Izawa, R. Takemura, T. Miki, Y. Inoue, Characterization of the export of bulk poly(A)<sup>+</sup> mRNA in *Saccharomyces cerevisiae* during the wine-making Process. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 2179–2182 (2005).
- 9) P. W. Piper, The heat shock and ethanol stress responses of yeast exhibit extensive similarity and functional overlap. *FEMS Microbiol. Lett.* **134**, 121–127 (1995).
- 10) V. Costa, E. Reis, A. Quintanilha, P. Moradasferreira, Acquisition of Ethanol Tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: The Key Role of the Mitochondrial Superoxide Dismutase. *Arch. Biochem. Biophys.* **300**, 608–614 (1993).
- 11) K. M. You, C.-L. Rosenfield, D. C. Knipple, Ethanol tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on cellular oleic acid content. *Appl Environ Microbiol.* **69**, 1499–1503 (2003).
- 12) H. Alexandre, I. Rousseaux, C. Charpentier, Relationship between ethanol tolerance, lipid composition and plasma membrane fluidity in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata*. *FEMS Microbiol. Lett.* **124**, 17–22 (1994).
- 13) A. Bandara, S. Fraser, P. J. Chambers, G. A. Stanley, Trehalose promotes the survival of *Saccharomyces cerevisiae* during lethal

- ethanol stress, but does not influence growth under sublethal ethanol stress. *FEMS Yeast Res.* **9**, 1208–1216 (2009).
- 14) H. Takagi, Proline as a stress protectant in yeast: physiological functions, metabolic regulations, and biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **81**, 211–223 (2008).
  - 15) S. Sato, T. Oba, K. Takahashi, K. Kokubu, M. Kobayashi, K. Kobayashi, Studies on taste of sake (part 7), *J. Brew. Soc. Japan* **72**, 801–805 (1977).
  - 16) E. Ichikawa, N. Hosokawa, Y. Hata, Y. Abe, K. Suginami, S. Imayasu, Breeding of a sake yeast with improved ethyl caproate productivity. *Agric. Biol. Chem.* **55**, 2153–2154 (1991).
  - 17) A. Kotaka, H. Sahara, Y. Hata, The construction and application of diploid sake yeast with a homozygous mutation in the *FAS2* gene. *J. Biosci. Bioeng.* **110**, 675–678 (2010).
  - 18) T. Takahashi, Y. Ohara, M. Sawatari, K. Sueno, Isolation and characterization of sake yeast mutants with enhanced isoamyl acetate productivity. *J. Biosci. Bioeng.* **123**, 71–77 (2017).
  - 19) H. Negoro, A. Kotaka, K. Matsumura, H. Tsutsumi, Y. Hata, Enhancement of malate-production and increase in sensitivity to dimethyl succinate by mutation of the *VID24* gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biosci. Bioeng.* **121**, 665–671 (2016).
  - 20) S. Yano, T. Asano, N. Kurose, J. Hiramatsu, H. Shimoi, K. Ito, Characterization of an  $\alpha$ -ketoglutarate-resistant sake yeast mutant with high organic acid productivity. *J. Biosci. Bioeng.* **96**, 332–336 (2003).
  - 21) T. Asano, S. Yano, Y. Takakura, K. Tamura, N. Kurose, J. Hiramatsu, K. Takahashi, Isolation of strains with high malate and succinate productivity from  $\alpha$ -ketoglutarate resistant mutants of sake yeast. *J. Brew. Soc. Jpn.* **98**, 217–220 (2003).
  - 22) H. Takagi, K. Hashida, D. Watanabe, R. Nasuno, M. Ohashi, T. Iha, M. Nezu, M. Tsukahara, Isolation and characterization of awamori yeast mutants with l-leucine accumulation that overproduce isoamyl alcohol. *J. Biosci. Bioeng.* **119**, 140–147 (2015).
  - 23) H. Takagi, M. Shichiri, M. Takemura, M. Mohri, S. Nakamori, *Saccharomyces cerevisiae*  $\Sigma$ 1278b has novel genes of the *N*-acetyltransferase gene superfamily required for L-proline analogue resistance. *J. Bacteriol.* **182**, 4249–4256 (2000).
  - 24) X. Du, H. Takagi, *N*-Acetyltransferase Mpr1 confers ethanol tolerance on *Saccharomyces cerevisiae* by reducing reactive oxygen species. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **75**, 1343–1351 (2007).

- 25) A. Nishimura, T. Kotani, Y. Sasano, H. Takagi, An antioxidative mechanism mediated by the yeast *N*-acetyltransferase Mpr1: oxidative stress-induced arginine synthesis and its physiological role. *FEMS Yeast Res.* **10**, 687–698 (2010).
- 26) M. Nomura, H. Takagi, Role of the yeast acetyltransferase Mpr1 in oxidative stress: Regulation of oxygen reactive species caused by a toxic proline catabolism intermediate. *Proc.Natl. Acad. Sci.USA* **101**, 12616–12621 (2004).
- 27) B. List, R. A. Lerner, C. F. Barbas, Proline-Catalyzed Direct Asymmetric Aldol Reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 2395–2396 (2000).
- 28) N. Shiraki, Nutrition and cell differentiation, *Journal of Japanese Biochemical Society*, 93(1): 59-66 (2021)
- 29) L. N. Csonka, Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol. Rev.* **53**, 121–147 (1989).
- 30) Y. Morita, S. Nakamori, H. Takagi, Effect of proline and arginine metabolism on freezing stress of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biosci. Bioeng.* **94**, 390–394 (2002).
- 31) Y. Morita, S. Nakamori, H. Takagi, l-Proline Accumulation and freeze tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* are caused by a mutation in the *PRO1* gene encoding  $\gamma$ -glutamyl kinase. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 212–219 (2003).
- 32) H. Takagi, F. Iwamoto, S. Nakamori, Isolation of freeze-tolerant laboratory strains of *Saccharomyces cerevisiae* from proline-analogue-resistant mutants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **47**, 405–411 (1997).
- 33) H. Takagi, K. Sakai, K. Morida, S. Nakamori, Proline accumulation by mutation or disruption of the proline oxidase gene improves resistance to freezing and desiccation stresses in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol.Lett.* **184**, 103–108 (2000).
- 34) Y. Terao, S. Nakamori, H. Takagi, Gene Dosage Effect of l-proline biosynthetic enzymes on l-proline accumulation and freeze tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 6527–6532 (2003).
- 35) A. S. Rudolph, J. H. Crowe, Membrane stabilization during freezing: The role of two natural cryoprotectants, trehalose and proline. *Cryobiology.* **22**, 367–377 (1985).
- 36) H. Takagi, Proline as a stress protectant in yeast: physiological functions, metabolic regulations, and biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **81**, 211–223 (2008).

- 37) T. Sekine, A. Kawaguchi, Y. Hamano, H. Takagi, Desensitization of feedback inhibition of the *Saccharomyces cerevisiae*  $\gamma$ -glutamyl kinase enhances proline accumulation and freezing tolerance. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 4011–4019 (2007).
- 38) B. J. Baum, L. S. Johnson, C. Franzblau, R. F. Troxler, Incorporation of L-azetidine-2-carboxylic acid into hemoglobin in rabbit reticulocytes in vitro. *J. Biol. Chem.* **250**, 1464–1471 (1975).
- 39) K. Bessonov, V. V. Bamm, G. Harauz, Misincorporation of the proline homologue Aze (azetidine-2-carboxylic acid) into recombinant myelin basic protein. *Phytochemistry.* **71**, 502–507 (2010).
- 40) H. Takagi, M. Takaoka, A. Kawaguchi, Y. Kubo, Effect of l-proline on sake brewing and ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 8656–8662 (2005).
- 41) H. Takagi, F. Matsui, A. Kawaguchi, H. Wu, H. Shimoi, Y. Kubo, Construction and analysis of self-cloning sake yeasts that accumulate proline. *J Biosci Bioeng.* **103**, 377–380 (2007).
- 42) P. Manzi, L. Gambelli, S. Marconi, V. Vivanti, L. Pizzoferrato, Nutrients in edible mushrooms: an inter-species comparative study. *Food Chemistry.* **65**, 477–482 (1999).
- 43) H. Uchisawa, A. Sato, J. Ichita, H. Matsue, T. Ono, Influence of low-temperature processing of the brackish-water bivalve, *Corbicula japonica*, on the ornithine content of its extract. *Biosci. Biotechnol Biochem.* **68**, 1228–1234 (2004).
- 44) S. Niro, M. Succi, P. Tremonte, E. Sorrentino, R. Coppola, G. Panfili, A. Fratianni, Evolution of free amino acids during ripening of Caciocavallo cheeses made with different milks. *J Dairy Sci.* **100**, 9521–9531 (2017).
- 45) T. Kokubo, E. Ikeshima, T. Kirisako, Y. Miura, M. Horiuchi, A. Tsuda, A randomized, double-masked, placebo-controlled crossover trial on the effects of L-ornithine on salivary cortisol and feelings of fatigue of flushers the morning after alcohol consumption. *BioPsychoSocial Medicine.* **7**, 6 (2013).
- 46) K. Takeda, T. Takemasa, An overview of ornithine, arginine, and citrulline in exercise and sports nutrition, p 627–636. In Bagchi D, Nair S, CK. Sen, (ed), Nutrition and enhanced sports performance, 2nd ed. Academic Press, New York, NY. (2019).
- 47) M. Miyake, T. Kirisako, T. Kokubo, Y. Miura, K. Morishita, H. Okamura, A. Tsuda, Randomised controlled trial of the effects of L-ornithine on stress markers and sleep quality in healthy workers. *Nutrition Journal.* **13**, 53 (2014).

- 48) K. Omori, Y. Kagami, C. Yokoyama, T. Moriyama, N. Matsumoto, M. Masaki, H. Nakamura, H. Kamasaka, K. Shiraishi, T. Kometani, T. Kuriki, Z. Huang, Y. Urade, Promotion of non-rapid eye movement sleep in mice after oral administration of ornithine. *Sleep Biol Rhythms* 10:38–45 (2012).
- 49) S. Demura, T. Yamada, S. Yamaji, M. Komatsu, K. Morishita, The effect of L-ornithine hydrochloride ingestion on human growth hormone secretion after strength training. *Adv. Biosci. Biotechnol.* 1:7–11. (2010).
- 50) A. Abadjieva, K. Pauwels, P. Hilven, M. Crabeel, A New yeast metabolon involving at least the two first enzymes of arginine biosynthesis: acetylglutamate synthase activity requires complex formation with acetylglutamate kinase. *J. Biol. Chem.* **276**, 42869–42880 (2001).
- 51) K. Pauwels, A. Abadjieva, P. Hilven, A. Stankiewicz, M. Crabeel, The N-Acetylglutamate synthase/N-Acetylglutamate kinase metabolon of *Saccharomyces cerevisiae* allows coordinated feedback regulation of the first two steps in arginine biosynthesis. *Eur.J.Biochem.* **270**, 1014–24 (2003).
- 52) Y. Huang, H. Zhang, H. Tian, C. Li, S. Han, Y. Lin, S. Zheng, Mutational analysis to identify the residues essential for the inhibition of N-acetyl glutamate kinase of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99**, 7527–7537 (2015).
- 53) J. Zhang, M. Xu, X. Ge, X. Zhang, T. Yang, Z. Xu, Z. Rao, Reengineering of the feedback-inhibition enzyme N-acetyl-l-glutamate kinase to enhance l-arginine production in *Corynebacterium crenatum*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **44**, 271–283 (2017).
- 54) T. Nishiya, (ed.): National Tax Administration of Japan prescript analysis methods with note (4th ed.), 7-33, Brewing Society of Japan, Tokyo (1993) (in Japanese).
- 55) R. Agatep, R. D. Kirkpatrick, D. L. Parchaliuk, R. A. Woods, R. D. Gietz, Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* by the lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol protocol. *Tech. Tips Online.* **3**, 133–137 (1998).
- 56) S. de Cima, F. Gil-Ortiz, M. Crabeel, I. Fita, V. Rubio, Insight on an arginine synthesis metabolon from the tetrameric structure of yeast acetylglutamate kinase. *PLOS ONE.* **7**, e34734 (2012).
- 57) D. Watanabe, T. Ota, F. Nitta, T. Akao, H. Shimoi, Automatic measurement of sake fermentation kinetics using a multi-channel gas monitor system. *J. Biosci. Bioeng.*, 112,54–57(2011).



- 58) A. Tsolmonbaatar, K. Hashida, Y. Sugimoto, D. Watanabe, S. Furukawa, H. Takagi, Isolation of baker's yeast mutants with proline accumulation that showed enhanced tolerance to baking-associated stresses. *Int. J. Food Microbiol.* **238**, 233–240 (2016).
- 59) M. Maheswaran, C. Urbanke, K. Forchhammer, Complex Formation and Catalytic Activation by the PII Signaling Protein of *N*-Acetyl-L-glutamate Kinase from *Synechococcus elongatus* Strain PCC 7942. *J. Biol. Chem.* **279**, 55202–10 (2005).
- 60) M. Fernandez Murga, V. Rubio, Basis of Arginine Sensitivity of microbial *N*-acetyl-L-glutamate kinases: Mutagenesis and protein engineering study with the *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* enzymes. *J. Bacteriol.* **190**, 3018–25 (2008).
- 61) S. Ramon-Maiques, M. L. Fernandez-Murga, F. Gil-Ortiz, A. Vagin, I. Fita, V. Rubio, Structural bases of feed-back control of arginine biosynthesis, revealed by the structures of two hexameric *N*-acetylglutamate kinases, from *Thermotoga maritima* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Mol Biol.* **356**, 695–713 (2006).
- 62) V. Sakanyan, P. Petrosyan, M. Lecocq, A. Boyen, C. Legrain, M. Demarez, J. N. Hallet, N. Glansdorff, Genes and enzymes of the acetyl cycle of arginine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*: enzyme evolution in the early steps of the arginine pathway. *Microbiology.* **142** ( Pt 1), 99–108 (1996).
- 63) R. Cunin, N. Glansdorff, A. Piérard, V. Stalon, Biosynthesis and metabolism of arginine in bacteria. *Microbiol Rev.* **50**, 314–352 (1986).
- 64) S. Udaka, Pathway-specific pattern of control of arginine biosynthesis in bacteria. *J. Bacteriol.* **91**, 617–621 (1966).
- 65) M. Van de Castele, M. Demarez, C. Legrain, N. Glansdorff, A. Piérard, Pathways of arginine biosynthesis in extreme thermophilic archaeo-and eubacteria. *Microbiology.* **136**, 1177–1183 (1990).
- 66) V. Sakanyan, A. Kochikyan, I. Mett, C. Legrain, D. Charlier, A. Piérard, N. Glansdorff, A re-examination of the pathway for ornithine biosynthesis in a thermophilic and two mesophilic *Bacillus* species. *Microbiology.* **138** (1992), pp. 125–130.
- 67) Z. Hindle, R. Callis, S. Dowden, B. A. M. Rudd, S. Baumberg, Cloning and expression in *Escherichia coli* of a *Streptomyces coelicolor* A3 (2) argCJB gene cluster. *Microbiology.* **140**, 311–320(1994).
- 68) W. J. Middelhoven, The ornithine pathway in the yeast *Candida utilis*. *Biochimica et Biophysica Acta.* **77**, 152–154 (1963).

- 69) R.H. Davis, Compartmental and regulatory mechanisms in the arginine pathways of *Neurospora crassa* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.*, **50**, 280–313(1986).
- 70) T. Kaino, Y. Tasaka, Y. Tatehashi, H. Takagi, Functional analysis of the C-terminal region of  $\gamma$ -glutamyl kinase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **76**, 454–461 (2012).
- 71) M. Ohashi, R. Nasuno, S. Isogai, H. Takagi, High-level production of ornithine by expression of the feedback inhibition-insensitive *N*-acetyl glutamate kinase in the sake yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering.* **62**, 1–9 (2020).
- 72) F. Messenguy, M. Penninckx, J.-M. Wiame, Interaction between Arginase and ornithine carbamoyltransferase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **22**, 277–286 (1971).
- 73) J.-P. Simon, V. Stalon, Epiarginasic regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **88**, 287–295 (1978).
- 74) S. Yoon, C. K. Govind, H. Qiu, S. Kim, J. Dong, A. G. Hinnebusch, Recruitment of the ArgR/Mcm1p repressor is stimulated by the activator Gcn4p: A self-checking activation mechanism. *Proc.Natl. Acad. Sci.USA.* **101**, 11713–11718 (2004).
- 75) M. El Alami, F. Messenguy, B. Scherens, E. Dubois, Arg82p is a bifunctional protein whose inositol polyphosphate kinase activity is essential for nitrogen and *PHO* gene expression but not for Mcm1p chaperoning in yeast. *Molecular Microbiology.* **49**, 457–468 (2003).
- 76) H. Qiu, E. Dubois, P. Broën, F. Messenguy, Functional analysis of ARGRI and ARGRIII regulatory proteins involved in the regulation of arginine metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **222**, 192–200 (1990).
- 77) T. Sekito, Y. Fujiki, Y. Ohsumi, Y. Kakimura, *IUBMB Life*, **60**, 519–525 (2008).
- 78) M. Shichiri, C. Hoshikawa, S. Nakamori (2001) A novel acetyltransferase found in *Saccharomyces cerevisiae*  $\Sigma$ 1278b that detoxifies a proline analogue, azetidine-2-carboxylic acid. *J. Biol. Chem.* **276**:41998–42002 (2001).
- 79) X. Du, H. Takagi, *N*-Acetyltransferase Mpr1 confers freeze tolerance on *Saccharomyces cerevisiae* by reducing reactive oxygen species. *J. Biochem.* **138**, 391–397 (2005).
- 80) Y. Sasano, S. Takahashi, J. Shima, H. Takagi, Antioxidant *N*-acetyltransferase Mpr1/2 of industrial baker's yeast enhances fermentation ability after air-drying stress in bread dough. *Int. J. Food Microbiol.* **138**, 181–185 (2010).

- 81) K. Iinoya, T. Kotani, Y. Sasano, H. Takagi, Engineering of the yeast antioxidant enzyme Mpr1 for enhanced activity and stability. *Biotechnol. Bioeng.* **103**, 341–352 (2009).
- 82) K. Shiraki, M. Kudou, S. Fujiwara, T. Imanaka, M. Takagi, Biophysical effect of amino acids on the prevention of protein aggregation. *The Journal of Biochemistry.* **132**, 591–595 (2002).
- 83) A. Gutiérrez, R. Chiva, M. Sancho, G. Beltran, F. N. Arroyo-López, J. M. Guillamon, Nitrogen requirements of commercial wine yeast strains during fermentation of a synthetic grape must. *Food Microbiol.* **31**, 25–32 (2012).
- 84) K. C. Thomas, W. M. Ingledew, Relationship of low lysine and high arginine concentrations to efficient ethanolic fermentation of wheat mash. *Can. J. Microbiol.* **38**, 626–634 (1992).
- 85) B. T. Mai Hoa, T. Hibi, R. Nasuno, G. Matsuo, Y. Sasano, H. Takagi, Production of *N*-acetyl cis-4-hydroxy-l-proline by the yeast *N*-acetyltransferase Mpr1. *J Biosci Bioeng.* **114**, 160–165 (2012).
- 86) R. Nasuno, Y. Hirano, T. Itoh, T. Hakoshima, T. Hibi, H. Takagi, Structural and functional analysis of the yeast *N*-acetyltransferase Mpr1 involved in oxidative stress tolerance via proline metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110**, 11821–11826 (2013).
- 87) R. Nasuno, S. Hirase, S. Norifune, D. Watanabe, H. Takagi, Structure-based molecular design for thermostabilization of *N*-acetyltransferase Mpr1 involved in a novel pathway of l -arginine synthesis in yeast. *J. Biochem.* **159**, 271–277 (2016).
- 88) B. Nancolas, I. D. Bull, R. Stenner, V. Dufour, P. Curnow, *Saccharomyces cerevisiae* Atflp is an alcohol acetyltransferase and a thioesterase in vitro. *Yeast.* **34**, 239–251 (2017).
- 89) K. Fukuda, N. Yamamoto, Y. Kiyokawa, T. Yanagiuchi, Y. Wakai, K. Kitamoto, Y. Inoue, A. Kimura, Balance of activities of alcohol acetyltransferase and esterase in *Saccharomyces cerevisiae* is important for production of isoamyl acetate. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 4076–4078 (1998).
- 90) O. Pines, S. Even-Ram, N. Elnathan, E. Battat, O. Aharonov, D. Gibson, I. Goldberg, The cytosolic pathway of l-malic acid synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of fumarase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **46**, 393–399 (1996).
- 91) Y. Kimura, S. Nakamori, H. Takagi, Polymorphism of the *MPR1* gene required for toxic proline analogue resistance in the *Saccharomyces cerevisiae* complex species. *Yeast.* **19**, 1437–1445 (2002).
- 92) M. Nomura, S. Nakamori, H. Takagi, Characterization of novel

- acetyltransferases found in budding and fission yeasts that detoxify a proline analogue, azetidine-2-carboxylic acid. *J. Biochem.* **133**, 67–74 (2003).
- 93) M. Wada, K. Okabe, M. Kataoka, S. Shimizu, A. Yokota, H. Takagi, Distribution of L-Azetidine-2-carboxylate *N*-Acetyltransferase in Yeast. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **72**, 582–586 (2008).
- 94) L. Fowden, Azetidine-2-carboxylic acid: a new cyclic imino acid occurring in plants. *Biochem J.* **64**, 323–332 (1956).
- 95) L. Fowden, F. C. Steward, Nitrogenous compounds and nitrogen metabolism in the *Liliaceae*: I. The occurrence of soluble nitrogenous compounds. *Annals of Botany.* **21**, 53–67 (1957).
- 96) M. Ohashi, S. Isogai, H. Takagi, Functional analysis of feedback inhibition-insensitive variants of *N*-acetyl glutamate kinase found in sake yeast mutants with ornithine overproduction. *Microbiology Spectrum.* **10**, e00822-22 (2022).
- 97) M. Ohashi, R. Nasuno, D. Watanabe, H. Takagi, Stable *N*-acetyltransferase Mpr1 improves ethanol productivity in the sake yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **46**, 1039–1045 (2019).