

論文内容の要旨

申請者氏名 大橋 正孝

清酒は米と米麴と水を原料として製造される。米に含まれるデンプンが *Aspergillus oryzae* などのカビが生産する糖化酵素によってグルコースに分解され、清酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* がグルコースをエタノールに変換して清酒となる。清酒の消費量は 1975 年をピークに現在その約 25%まで減少しており、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。本研究では、プロリン・アルギニンの代謝制御機構に着目し、清酒・酒粕の高付加価値を可能にする清酒酵母を取得するとともに、各菌株の遺伝学的・生化学的解析を行うことで、以下のような結果が得られた。

まず、清酒酵母 K901 株を親株として突然変異処理を行い、プロリンアナログ（アゼチジン-2-カルボン酸; AZC）およびエタノール耐性を指標として変異株を選抜した結果、親株に比べてプロリンだけでなく、オルニチンを細胞内に 10 倍以上含有する酵母を 3 株取得した。そこで、最もオルニチン含量が多い A902-4 株を用いて清酒小仕込み試験を行ったところ、親株よりもエタノール生産性が向上するとともに、清酒・酒粕中のオルニチン含量が親株よりも 4 倍以上増加していた。A902-4 株のオルニチン高生産メカニズムを解明するために、全ゲノム解析を行った結果、*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) をコードする *ARG5,6* 遺伝子に Thr340Ile のアミノ酸置換を伴う変異を見出した。野生型 NAGK の活性はアルギニンによるフィードバック阻害を受けるが、組換え酵素を用いた解析から、Thr340Ile 置換によりフィードバック阻害が解除され、オルニチンが高生産されることが判明した。また、Thr340 の側鎖の水酸基と Lys336 の主鎖のカルボニル基との相互作用がアルギニンの結合に重要であることが示唆された。さらに、A902-4 株以外のオルニチン高含有株においても、*ARG5,6* 遺伝子に NAGK のアミノ酸置換 (Cys119Tyr, Val267Ala) を伴う変異を見出し、その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低下し、オルニチンが高生産されることを明らかにした。

次に、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、新規な *N*-アセチルトランスフェラーゼ Mpr1 に着目した。Mpr1 は元々 AZC を *N*-アセチル化により解毒する酵素として実験室酵母の Σ 1278b 株に見出されたが、その後の研究によって細胞内の活性酸素種 (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。また、Mpr1 は細胞内でアルギニンの合成を亢進することも知られている。そこで、ゲノム上に同酵素をコードする遺伝子を有していない清酒酵母 K701 株において野生型 Mpr1 および熱安定性の向上した変異型 Mpr1-N203K を発現させた。その結果、変異型 Mpr1-N203K 発現株では、僅かではあるが有意に細胞内アルギニン含量が増加した。また、各菌株を用いて清酒小仕込み試験を行ったところ、野生型 Mpr1 および変異型 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。

□ やむを得ない事由[図書出版, 学術雑誌等への掲載, 特許・実用新案出願, 個人情報等の保護, その他 ()]により本要旨を非公表とする。

【※該当する事由に○印をすること】

論文審査結果の要旨

申請者氏名 大橋 正孝

清酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、日本の伝統的な酒類である清酒を製造する上で重要な微生物である。近年、清酒の消費量は減少しており、消費者ニーズに対応するためには、清酒の差別化や高付加価値化を可能とする清酒酵母の育種が必要である。申請者は、プロリン・アルギニン代謝機構に着目し、清酒・酒粕の高付加価値化を可能にする清酒酵母の取得、各株の遺伝学的・生化学的解析を行うことで、以下のような新しい知見を得た。

- 1) 清酒酵母 K901 株（親株）に突然変異処理を施し、プロリンアナログ（アゼチジン-2-カルボン酸）耐性およびエタノール耐性を示す変異株を選抜した。その結果、プロリンだけでなく、肝臓の働きを促進するオルニチンを細胞内に親株の 10 倍以上含有する変異株を 3 株取得した。それらの中で最もオルニチン含量の高い A902-4 株を用いて清酒小仕込み試験を行ったところ、A902-4 株は親株に比べてエタノール生産性が向上し、オルニチンを 4 倍以上含有する清酒・酒粕が製造可能であることを示した。
- 2) A902-4 株のオルニチン高生産メカニズムを解明するために、全ゲノム解析を行った結果、*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) をコードする *ARG5,6* 遺伝子に Thr340Ile のアミノ酸置換を伴う変異を見出した。野生型 NAGK の活性はアルギニンによるフィードバック阻害を受けるが、Thr340Ile のアミノ酸置換によりフィードバック阻害感受性が著しく低下し、プロリンおよびオルニチンが細胞内に高生産されることを明らかにした。
- 3) A902-4 株以外のオルニチン高生産株においても、*ARG5,6* 遺伝子に NAGK のアミノ酸置換 (Cys119Tyr, Val267Ala) を伴う変異を同定し、それらの変異によってプロリンおよびオルニチンが高生産されることを明らかにした。また、Thr340 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及ぼす影響を解析し、Thr340 と Lys336 との相互作用がアルギニンの結合に重要である可能性が示された。
- 4) *N*-アセチルトランスフェラーゼ Mpr1 の熱安定性向上型変異体 (Mpr1-N203K) を清酒酵母で発現させると、細胞内アルギニン含量が増加し、エタノール生産性が向上することを見出した。

本研究の成果は、エタノール生産性が向上した清酒酵母や清酒・酒粕の付加価値を高める清酒酵母の育種に資することができる。また、産業酵母において、NAGK のアミノ酸置換 (Thr340Ile) によるフィードバック阻害感受性の解除およびオルニチンの高生産についてはこれまで報告がなく、申請者が見出した知見は基礎・応用の両面で大きな意義がある。

以上のように、本論文はプロリン・アルギニンの代謝制御機構に着目し、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ものであり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。

やむを得ない事由[図書出版, 学術雑誌等への掲載, 特許・実用新案出願, 個人情報等の保護, その他 ()]により本要旨を非公表とする。

【※該当する事由に○印をすること】