

3lp13 清酒酵母の分裂寿命と経時寿命

○小崎 太寅¹, 市橋 あづみ¹, 松田 宙大¹, 亀井 優香¹, 田村 隆行¹, 堤 浩子², 福岡 英一郎³, 向 由起夫¹
(¹長浜バイオ大院・バイオサイエンス, ²月桂冠・総研, ³阪大院・工・生命先端)
y_mukai@nagahama-i-bio.ac.jp

出芽酵母における分裂寿命は一つの細胞が死ぬまでに出芽する回数を数えることにより、経時寿命は細胞が増殖を停止した状態で生存できる期間を計ることにより決められる。これまでに、ビール酵母の分裂寿命は実験室酵母よりも短いこと、ワイン酵母の経時寿命は実験室酵母と同じであり、カロリー制限により寿命が延長することが報告された。本研究では、代表的な清酒酵母の分裂寿命と経時寿命を測定した。また、これらの清酒酵母の代謝と寿命の関係について検討した。清酒酵母きょうかい7号 (K7) 株、9号 (K9) 株、10号 (K10) 株およびK7株由来の泡なし酵母701号 (K701) 株について寿命を測定した。分裂寿命はYPD (2% グルコース) 培地での出芽回数から、経時寿命はSD (2% グルコース) 培地中での生存率から評価した。K7 株、K701 株およびK10 株の分裂寿命は、実験室酵母 X2180 株の平均 29.7 世代とほぼ同じであった。しかし、K9 株の分裂寿命 (平均 25.8 世代) は清酒酵母の中では顕著に短かった。一方、経時寿命に関して、K7 株と K10 株の細胞生存率は、X2180 株と同様に、10 日目まで緩やかに減少したが、K9 株と K701 株の細胞生存率は 6 日目から急激に下落した。プロトン核磁気共鳴法により測定した代謝プロファイルについて判別分析を行うと、K9 株のクラスターが他の株のクラスターから分離した。以上の結果から、K9 株の短寿命は K9 株に特有の細胞内代謝と関連することが示唆された。

Replicative and chronological lifespan in sake yeast

○Takanobu Kozaki¹, Azumi Ichihashi¹, Michihiro Matsuda¹, Yuka Kamei¹, Takayuki Tamura¹, Hiroko Tsutsumi², Eiichiro Fukusaki³, Yukio Mukai¹
(¹Grad. Sch. Biosci., Nagahama Inst. Bio-Sci. Tech., ²Res. Inst., Gekkeikan Sake Co., ³Dept. Mat. Life Sci., Osaka Univ.)

Key words sake yeast, replicative lifespan, chronological lifespan

3lp15 白麹菌 *Aspergillus kawachii* の遺伝子工学実験宿主の開発

○田代 智史¹, 二神 泰基², 梶原 康博³, 高下 秀春³, 大森 俊郎³, 竹川 薫², 後藤 正利²
(¹九大院・農, ²九大院・農, ³三和酒類)
mgoto@brs.kyushu-u.ac.jp

焼酎醸造において、白麹菌 *Aspergillus kawachii* は、糖質加水分解酵素を分泌して原料である麦や米などに含まれる多糖類を単糖類へ分解する。また、クエン酸を高生産し、もろみの pH を低く保ち雑菌の増殖を防ぐ役割を持つ。本研究では、*A. kawachii* の特徴的な機能を解析するために、高頻度相同組換え株、および栄養要求性株の開発を行った。黄麹菌と黒麹菌において、非同末端結合に関与する *ligD* 遺伝子を破壊すると遺伝子ターゲティング効率が劇的に上昇することが報告された。そこで、同様に *A. kawachii* IFO 4308 の *ligD* 遺伝子をピリチアミン耐性遺伝子により破壊した。得られた $\Delta ligD$ 株は野生株と同様の表現型を示したが、DNA 損傷を誘導する MMS に対して高感受性を示した。よって、 $\Delta ligD$ 株は非同末端結合による DNA 修復に異常をもつことが示唆された。次に、野生株と $\Delta ligD$ 株における相同組換え効率を、*argB* 遺伝子の破壊により比較した。その結果、野生株における $\Delta argB$ 株の取得効率は 0% であったのに対して、 $\Delta ligD$ 株を宿主として用いた場合は 90% に上昇した。さらに、 $\Delta ligD$ 株を宿主として *pyrG* 遺伝子を、5-FOA の選択圧により取得した。得られた $\Delta ligD \Delta pyrG$ 株は、ウラシル・ウリジン要求性を示した。本研究において構築した $\Delta ligD \Delta argB$ 株と $\Delta ligD \Delta pyrG$ 株は、それぞれ *argB* 遺伝子と *pyrG* 遺伝子をマーカーとして利用出来る高効率遺伝子組換え宿主として、白麹菌を特徴付ける機能の解析や分子育種に利用できると考えられる。

Development of genetic engineering system of white koji mold, *Aspergillus kawachii*.

○Satoshi Tashiro¹, Taiki Futagami², Yasuhiro Kajiware³, Hideharu Takashita³, Toshiro Omori³, Kaoru Takegawa³, Masatoshi Goto²
(¹Grad. Sch. Biores. Bioenviron. Sci., Kyushu Univ., ²Fac. Agric., Kyushu Univ., ³Sanwa Shurui Co. Ltd)

Key words *Aspergillus kawachii*, genetic engineering

3lp14 麹菌 *Aspergillus oryzae* を利用したエタノールの生産条件の検討

○齋藤 茜¹, 田島 麻理恵¹, 丸山 潤一², 北本 勝ひこ², 北垣 浩志¹
(¹佐賀大, ²東大院・農生科)
ktgkhrs@cc.saga-u.ac.jp

【背景・目的】

食糧資源と競合しない木質系バイオマスからのバイオエタノールの生産が注目されている。そこで我々は糸状菌が好気条件下でエタノール発酵を行うこと、麹菌 *Aspergillus oryzae* は固形状のセルロースやヘミセルロースの分解能をもち、五炭糖を資化すること、遺伝子組換えのための技術基盤が備わっていることに着目し、*A. oryzae* によるエタノール生産を検討した。このシステムが確立すれば、液化・糖化と発酵の 2 段階の工程をワンステップで行えることから、バイオエタノール生産工程の大幅な短縮につながる。そこで本研究では *A. oryzae* が生産したエタノール測定システムの確立のため、*A. oryzae* を使って固形状のバイオマス資源からワンステップでバイオエタノールを生産させるための麹の作製条件及び *A. oryzae* の生育の最適条件の検討を行った。

【方法・結果】

まず固相マイクロ抽出 SPME と GC-FID を用いた固形状の麹に含まれるエタノールの測定システムの検討を行った。検討の結果、相関係数 0.96 以上で検量線を作成でき、固形状の麹に含まれるエタノールの濃度の定量システムを確立した。次に実験室規模での *A. oryzae* を用いた米麹の作成を行った。以上のシステムを用いて米麹に含まれるエタノール濃度を測定したところ、1860 ± 664 mg/kg (n=3, 平均値 ± 標準誤差) と定量できた。現在、麹菌によるエタノール発酵の最適条件を検討するために、酸素濃度や温度、時間などの条件を変えて米麹を作成し SPME-GC-FID を用いて麹菌のエタノール生産量の分析を行っている。

Analysis of the conditions appropriate for ethanol production from solid biomass using *Aspergillus oryzae*

○Akane Saito¹, Marie Tashima¹, Junichi Maruyama², Katsuhiko Kitamoto², Hiroshi Kitagaki¹
(¹Saga Univ., ²Dept. Biomat. Sci., Univ. Tokyo)

Key words *Aspergillus oryzae*, bioethanol production, gas chromatography, metabolism

3lp16 アミノ酸高蓄積実用泡盛酵母における泡盛香味成分評価とゲノム解析

○塚原 正俊¹, 鼠尾 まい子¹, 笹野 佑², 橋田 恵介², 大津 厳生², 富木 崇史¹, 當間 士紋¹, 渡久地 政汰¹, 東 春奈¹, 高木 博史²
(¹バイオジェット, ²奈良先端大・バイオ)
tsuka@biojet.jp

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、食品やエタノールなど様々な発酵生産に用いられ、それぞれ多様なストレスに曝されながら有用機能を発揮しているものの、ある状況に達すると発酵がほぼ停止する。我々はこれまでに、プロリンやアルギニンのアミノ酸含量が増加した酵母が、様々なストレスに対する耐性が向上することを報告してきた。今回、これらの知見が泡盛醸造に与える影響を評価した。

アミノ酸を高生産する産業酵母 (清酒、パン、バイオエタノール) を用いて泡盛小仕込み試験を実施し、発酵特性解析と香氣成分の網羅的分析を行った。その結果、プロリン・アルギニン代謝関連酵素 (Pro1・Mpr1) の発現が泡盛香氣成分に影響を与えること、その影響は親株の種類により異なることを見出した。また、味認識装置を用いた分析から、味に有意な差異があること、アミノ酸高蓄積酵母を用いることで風味全体が増強していることが示唆された。この結果は、酵母が有用アミノ酸を蓄積し、ストレス耐性が向上したことで、醸造過程における香味生産能が高まった可能性を示唆している。

以上の知見をもとに、泡盛醸造への応用を目指し実用泡盛酵母のアミノ酸高生産変異株を分離した。これらの変異株を用いた小仕込み試験を行い、泡盛の風味成分を比較した。さらに、次世代シーケンサによる全ゲノム解析を行い、各菌株の変異点について比較解析を行ったので併せて報告する。

Analysis of flavor components of *Awamori* using "amino acid accumulation yeast", and whole genome analysis

○Masatoshi Tsukahara¹, Maiko Nezu¹, Yu Sasano², Keisuke Hashida², Iwao Ootsu², Takashi Tomiki¹, Shimon Touma¹, Shouta Toguchi¹, Haruna Azuma¹, Hiroshi Takagi²
(¹Biojet, ²Grad. Sch. Biol. Sci., NAIIST)

Key words yeast, amino acid, stress resistance, Awamori