

3P-039 高リンゴ酸生産・低酢酸生産性清酒酵母の細胞内代謝物プロファイル

○中山 俊一, 小杉 慎吾, 清 啓自, 門倉 利守, 中里 厚実
(東農大・応生科・醸造)
s3nakaya@nodai.ac.jp

【目的】これまでに我々は、呼吸阻害剤 2,4-dinitrophenol (DNP) 耐性株を取得することで、リンゴ酸高生産性・酢酸低生産性清酒酵母を取得している。この DNP 耐性株は、親株であるきょうかい酵母 K901 と比較してミトコンドリア活性が低下しており細胞質中の NADH/NAD⁺比が上昇していることを明らかにしている。本研究では、メタボローム解析により NADH/NAD⁺比上昇による細胞内代謝物への影響を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】DNP 耐性株と親株である K901 をグルコース 10% を含む YM 培地にて 48 時間静置培養し、集菌後菌体より代謝物を抽出し細胞内代謝物を測定した。DNP 耐性株の解糖系の代謝物においては、NAD⁺要求性の Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)を境に上流の代謝物が増加しており、下流の代謝物は減少していた。このことから、NADH/NAD⁺比の増加により GAPDH が新規な律速経路になることが示唆された。この蓄積に付随して、DNP 耐性株においてはペントースリン酸経路の代謝物も顕著に蓄積していた。一方、NAD(P)H を生成する経路が多い各種アミノ酸合成経路を比較したところ、DNP 耐性株では親株と比較して各種アミノ酸量が減少していた。以上の様に、NADH/NAD⁺比の上昇により様々な代謝経路に影響を及ぼすことが明らかとなった。

Global metabolic change in respiratory inhibitor 2,4-dinitrophenol (DNP) resistant sake yeast altering the NADH/NAD⁺ ratio

○Shunichi Nakayama, Shingo Kosugi, Keiji kiyosi, Toshimori Kadokura, Atsumi Nakazato
(Dept. Ferment. Sci., Fac. Appl. Biosci., Tokyo Univ. Agric.)

Key words sake yeast, redox balance, mitochondria, metabolic analysis

3P-041 出芽酵母 PE-2 株における RIM15 遺伝子欠失による糖蜜発酵性の向上

○村上 智子¹, 井内 智美¹, 渡辺 大輔¹, 周 延¹, 深田 理恵¹, 赤尾 健¹, 鳥 純², 高木 博史³, 下飯 仁¹
(¹酒総研, ²京大・微生物科学, ³奈良先端大・バイオ)
simoi@nrib.go.jp

バイオエタノール生産をさらに向上させるためには、糖蜜などに含まれる発酵性糖源の効率的なアルコール発酵が要求される。そこで我々は、清酒酵母において、ストレス応答に中心的な役割を果たす転写因子 Msn2p 及び Msn4p (Msn2/4p) 並びにその上流活性化因子であるプロテインキナーゼ Rim15p の機能欠損が高発酵性につながる点に着目した。サトウキビからのバイオエタノール生産に広く用いられる PE-2 株由来の一倍体を用いてこれらの遺伝子の破壊株を作製し、サトウキビ由来の糖蜜を使った発酵試験における影響を解析した。その結果、RIM15 または MSN2 遺伝子の欠失は、この株における糖蜜発酵速度を顕著に上昇させ、発酵期間を短縮した。また、発酵中の糖蜜成分を分析した結果、RIM15 遺伝子破壊はグルコース枯渇後のスクロース資化の速度を特異的に向上させることが明らかになり、インペルターゼ活性も親株と比べて急激に上昇していた。このように、PE-2 株は元々発酵性が非常に高い菌株として単離されたにもかかわらず、我々が清酒酵母において見出した Rim15p-Msn2/4p 経路の欠損による発酵性改善が有効に機能したことは興味深い。同様の手法を応用することにより、バイオエタノール生産用酵母を含む幅広い実用酵母菌株の育種に資することが期待される。

Improved molasses fermentation by deleting the RIM15 gene in Saccharomyces cerevisiae strain PE-2

○Tomoko Murakami, Tomomi Inai¹, Daisuke Watanabe¹, Yan Zhou¹, Rie Fukada¹, Takeshi Akao¹, Jun Shima², Hiroshi Takagi³, Hitoshi Shimoi¹
(¹NRIB, ²Res. Div. Microbial Sci., Kyoto Univ., ³Grad. Sch. Biol. Sci., NAIST)

Key words alcoholic fermentation, sucrose utilization, sugarcane molasses, stress response

3P-040 出芽酵母におけるグルコース脱抑制の機能欠損によるアルコール発酵の速度向上

○水野 恵¹, 渡辺 大輔¹, 橋本 直哉^{1,2}, 周 延¹, 赤尾 健¹, 下飯 仁¹
(¹酒総研, ²福井県食加研)
simoi@nrib.go.jp

【背景・目的】清酒酵母は、清酒もろみにおいて定常期でも高い発酵速度を示し、かつバランスの良い香味成分を生成するなど他の酵母菌株にはない優れた醸造特性をもつ。また、定常期における清酒酵母の生理状態は共通の表現型を示すことから、定常期での遺伝子発現上の特徴を明らかにすることは、この優れた発酵メカニズムを理解するために有効であると考えられる。そこで、清酒酵母と実験室酵母の遺伝子発現プロファイルを比較し、清酒酵母に特徴的な遺伝子機能について検討した。

【実験方法・結果】清酒酵母きょうかい 701 号 (K701) と実験室酵母 X2180 の定常期細胞を用いた DNA マイクロアレイ解析の結果、清酒酵母はグルコース脱抑制に関連する遺伝子の発現レベルが低く、転写因子 Adr1p 及び Cat8p を介したグルコース脱抑制に欠損を示すことが分かった。そこで、実験室酵母 X2180 の ADR1、CAT8 の遺伝子破壊株を用いて YPD 培地での発酵試験と清酒小仕込試験を行ったところ、 $\Delta adr1 \Delta cat8$ 二重破壊株において後半の発酵速度が向上し、清酒小仕込試験で得られた製成酒のエタノール濃度は親株より高くなった。さらに、清酒酵母 K701 の ADR1 遺伝子において、転写因子としての機能に必須な DNA 結合ドメイン上に推定上の機能欠失変異を見出した。以上の結果から、グルコース脱抑制メカニズムの欠損がアルコール発酵を促進することが示唆された。

Accelerated alcoholic fermentation caused by impaired glucose derepression in Saccharomyces cerevisiae

○Megumi Mizuno¹, Daisuke Watanabe¹, Naoya Hashimoto^{1,2}, Yan Zhou¹, Takeshi Akao¹, Hitoshi Shimoi¹
(¹NRIB, ²Fukui Pref. Food Proc. Res. Inst.)

Key words sake yeast, alcoholic fermentation, glucose derepression, *Saccharomyces cerevisiae*

3P-042 エタノール耐性清酒酵母の原因遺伝子の解析

○森中 和也^{1,2}, 赤尾 健¹, 渡辺 大輔¹, 渡辺 守^{1,2}, 下飯 仁^{1,2}
(¹酒総研, ²広島大院・先端物質)
simoi@nrib.go.jp

【背景・目的】清酒酵母の中で広く使用されている優良菌株は、実験室酵母と比較して発酵力が高く、高濃度のエタノールを生成することができるが、一方でエタノールへの耐性は低い。そこで代表的な菌株であるきょうかい 7 号 (K7) の自然変異株として、エタノール耐性菌株 K11 と K7-126 が分離されている。本研究は、次世代シーケンサーを利用して比較ゲノム解析結果から、エタノール耐性の原因遺伝子の探索と解析を行った。

【実験方法・結果】K7、K11、K7-126 の SNP 分布パターンを比較したところ、K7 でヘテロザイガスな SNP が集中している領域のうち、K11 と K7-126 に共通して Loss of Heterozygosity (LOH) が生じたとみられる領域が存在した。そこで、この LOH がエタノール耐性の原因となっているのではないかと考え、K7 ではヘテロザイガスだが、K11 と K7-126 では共通してホモザイガスな SNP を検索した結果、主に第 10 番染色体左腕を中心とした 66 個の SNP が抽出された。抽出した SNP の中から、ストレス耐性に関与することが知られている Ras/cAMP/PKA 経路のアデニル酸シクラーゼをコードする CYR1 遺伝子の多型 CYR1^{2066G} に注目した。この部位は K7 では A/G であるのに対して、K11 と K7-126 では A/A に変異していた。CYR1^{2066A} または CYR1^{2066G} のアレルをプラスミドにより、K11 と K7-126 に導入したところ、いずれの株も CYR1^{2066G} の導入によりエタノール耐性が顕著に低下した。以上の結果から、K7 の CYR1^{2066A/G} が LOH によってホモザイガス化し、CYR1^{2066A/A} となったことが K11 と K7-126 の高エタノール耐性に関与していることが示唆された。

Genetic analysis of the ethanol-tolerant sake yeast strains

○Kazuya MORINAKA^{1,2}, Takeshi AKAO¹, Daisuke WATANABE¹, Mamoru WATANABE^{1,2}, Hitoshi SHIMOI^{1,2}
(¹NRIB, ²Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)

Key words sake yeast, ethanol stress, genome, single nucleotide polymorphism