

**3S-Da04 清酒酵母におけるミトコンドリア活性とリンゴ酸生産性との相関**○大場 孝宏<sup>1</sup>, 中山 俊一<sup>2</sup>, 北垣 浩志<sup>3</sup><sup>1</sup>福岡工技セ, <sup>2</sup>東農大・応生科・醸造, <sup>3</sup>佐賀大・農  
ooba@fitc.pref.fukuoka.jp

近年、消費者の嗜好の変化に伴い清酒の味の多様化が求められており、リンゴ酸の生産性が向上した酵母を育種することで、清酒の味の多様化が図られている。我々は自然突然変異を利用し、清酒もろみからさわやかな酸味を有するリンゴ酸の生産性が増大した酵母の分離を行った。その結果、末期の清酒もろみから200～300株に1株の割合でリンゴ酸高生産株の取得に成功した。自然突然変異によって得られるリンゴ酸高生産株の出現頻度が予想より高かったため、清酒もろみにおいて清酒酵母が何からのメカニズムでリンゴ酸高生産性を獲得するのは？と考え、そのメカニズムを明らかにすることを目的にリンゴ酸高生産株の特性解明を行った。

リンゴ酸高生産株と親株についてリンゴ酸またはピルビン酸代謝に関わる酵素活性の比較を行ったところ、リンゴ酸高生産株において pyruvate carboxylase 及び malate dehydrogenase 活性が上昇していた。pyruvate carboxylase はピルビン酸からオキサロ酢酸への変換に、malate dehydrogenase はオキサロ酢酸からリンゴ酸への変換に関わる。以上のことから、我々は、リンゴ酸高生産株のリンゴ酸の生産量が增大した理由はミトコンドリアの活性が低下することで、細胞質内にピルビン酸が蓄積し、オキサロ酢酸を経てリンゴ酸が生成する経路が活性化されたためであると仮説を立てた。

グリセロールを唯一の炭素源として培養を行うと、ミトコンドリアが機能している株は生育するが、呼吸欠損株のようにミトコンドリアを持たない株は生育できない。そこで、様々なリンゴ酸高生産性を示す11株について、どの程度ミトコンドリアが機能しているかを検証するため、唯一の炭素源をグリセロールにして培養を行った。その結果、リンゴ酸を多く生産する株ほど生育が悪く、逆にリンゴ酸をあまり生産しない株ほど生育がよかった。すなわち、ミトコンドリアが機能していない株ほどリンゴ酸を高生産することがわかった。蛍光色素 Rhodamine123 はミトコンドリアの内膜から輸送されるプロトンにより生じる膜電位依存的に蛍光を発する。そこでリンゴ酸高生産株を Rhodamine123 で染色し、フローサイトメーターで蛍光強度とその菌個体数分布を測定した。その結果、菌個体数分布はリンゴ酸の生産量が高いほど比例的に蛍光強度の低い方へシフトしており、リンゴ酸高生産量が增大するほど、ミトコンドリアの活性が低下していた。また、実際にミトコンドリアの膜電位を減少させると、リンゴ酸生産量が低下するかどうか確かめるために、ミトコンドリア阻害剤を添加し、リンゴ酸生産性への影響を検討した。K901 にミトコンドリア阻害剤である carbonylcyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP) を添加すると添加しない場合に比べて、有意にリンゴ酸とピルビン酸量が増加しコハク酸量が減少していた。このことから、ミトコンドリア膜が正常である K901 でミトコンドリア膜が阻害されると細胞質でのピルビン酸の蓄積及びリンゴ酸の生産が上がるというリンゴ酸高生産株でみられた現象と一致した。以上の結果から、ミトコンドリアの膜電位とリンゴ酸の生産性に相関があると結論づけた。最後に、シクロヘキシミド耐性により取得されたリンゴ酸高生産清酒酵母 No.28 株のリンゴ酸高生産性のメカニズム解明やミトコンドリア阻害剤である 2,4-dinitrophenol(DNP) 耐性を利用したリンゴ酸高生産株の取得について報告し、清酒酵母におけるミトコンドリア活性とリンゴ酸生産性との相関について議論を深めたい。

**Correlation of mitochondrial activity and malic acid- productivity in the sake yeast**○Takahiro Oba<sup>1</sup>, Shunichi Nakayama<sup>2</sup>, Hiroshi Kitagaki<sup>3</sup><sup>1</sup>Fukuoka Ind. Technol. Center, <sup>2</sup>Dept. Ferment. Sci., Fac. Appl. Biosci., Tokyo Univ. Agric., <sup>3</sup>Fac. Agric., Saga Univ.)**Key words** *Saccharomyces cerevisiae*, sake yeast, flow cytometry, mitochondria**3S-Da05 ミトコンドリア局在酵素 Ilv5p の改変によるビールの香味改善**

○大村 文彦

(サントリー SIC・研究部)  
Fumihiko\_Omura@suntory.co.jp

ダイアセチルはバリン合成経路の中間産物  $\alpha$  アセト乳酸から非酵素的な酸化的脱炭酸によって形成されるビールの未熟臭成分であり、醸造直後の若ビールにバター様の不快臭を付与する。ビール製造工程では、主発酵後、濾過・瓶詰の前にダイアセチルを減少させるための貯酒期間を設ける必要があるため、ダイアセチルの低減は、生産性の向上やコスト削減の観点から重要である。また、ビール酵母が呼吸欠損株となると、醸造中のダイアセチルの生成量が顕著に増加することがよく知られている<sup>(1)</sup>。ダイアセチルの前駆体  $\alpha$  アセト乳酸は、アセトヒドロキシシンターゼ Ilv2p によって2分子のピルビン酸から合成される。Ilv2p は、本来ミトコンドリアに局在する酵素であるが、ミトコンドリアの呼吸機能低下によってミトコンドリア内膜の膜電位差が消失すると、Ilv2p の前駆体がミトコンドリアへ移行できなくなる。その結果、細胞質に存在する Ilv2p 活性によって細胞質で  $\alpha$  アセト乳酸が生成され、ダイアセチルの生成増加が生じると考えられている<sup>(2)</sup>。そこで本研究では、 $\alpha$  アセト乳酸を基質とするレダクトイソメラーゼ Ilv5p のミトコンドリア移行シグナルを改変し、得られた細胞質局在型 Ilv5p を高発現させてビール醸造におけるダイアセチル低減効果を評価した。N 末端 46 残基を欠失させた細胞質局在型 Ilv5p をビール酵母で高発現させたところ、細胞質に安定に存在し醸造中のダイアセチル生成を効果的に低減させた。一方で、天然型 Ilv5p をミトコンドリアで高発現させた場合に観察されるビールの香気成分バランスへの悪影響（ピルビン酸や酢酸の減少および高級アルコールやそのエステル増加など）は細胞質局在型 Ilv5p では見られず、ビール醸造における理想的なダイアセチル低減ツールであることが分かった<sup>(3)</sup>。

**参考文献**

- (1) Ernandes, J. R. et al. (1993) ASBC J. 51:16-20
- (2) Dasari, S. and Kolling, R. (2011) Appl. Environ. Microbiol. 77:727-731
- (3) Omura, F. (2008) Appl. Microbiol. Biotechnol. 78:503-513

**Targeting of mitochondrial Ilv5p to the cytosol and its effect on vicinal diketone formation in brewing**

○Fumihiko Omura

(Suntory Global Innov. Center)

**Key words** mitochondria, brewer's yeast, vicinal diketone, protein import