

3P-057 奈良八重桜酵母由来の赤色清酒酵母株の赤色素の排出機構

○岩口 伸一, 矢路 夏未
(奈良女子大学・理・生物科学)
iwaguchi@cc.nara-wu.ac.jp

ナラノヤエザクラ(奈良八重桜)の花から分離に成功した *Saccharomyces cerevisiae* 菌株(奈良八重桜酵母 P-684)は、高い有機酸生成能と芳香性を有し、従来の協会酵母にはない際だった特徴を有している。この酵母を利用した清酒「奈良の八重桜」は、これまでの日本酒と趣の異なる爽やかなワイン風味のものと評されている。奈良八重桜は花の色が白からピンク、赤へと変化する性質がある。この花のイメージを生かすために、奈良八重桜酵母から赤色の色素を生産するアデニン要求性株(NYR20)を作成し、濁り酒ではない赤色の清酒の醸造技術を確立し、商品化した。

赤色酵母はアデニン要求性をもち、アデニン欠乏状態になるとアデニン合成系の中間代謝産物が液胞膜のグルタチオン結合輸送体により液胞内へと輸送され、液胞内で酸化的重合をすることが知られている。通常、赤色素は液胞内に蓄積するため、赤色酵母を使って醸造した清酒は赤色にならない。しかし、NYR20株は赤色の清酒を作り出すことで、赤色素が細胞外に出ていくと考えられた。本研究では、NYR20株の赤色素はどのようにして細胞外に出ていくのかを明らかにするために、グルタチオン結合輸送体遺伝子の転写量を qRT-PCR 法により測定した。その結果、アデニン欠乏条件では *YCF1*, *YBT1* の転写量が著しく低下しており、これらのポンプによる赤色素の液胞への輸送効率が低下したため、NYR20株では赤色素が細胞質に蓄積し、菌体外へ出ていることが示唆された。

Mechanism of red pigment excretion in red refined sake yeast strain derived from Nara-yaezakura yeast

○Shin-Ichi Iwaguchi, Natsumi Yaji
(Dept. Biol. Sci., Nara Women's Univ.)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, sake yeast, transporter

3P-058 出芽酵母中心代謝制御のトランスオミクス解析

○松田 史生, 西野 駿佑, 清水 浩
(阪大院・情報)
fmatsuda@ist.osaka-u.ac.jp

【目的】出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の中心代謝酵素欠損株の解析を行なうことで、高い発酵能を維持する代謝制御機構の解明につながると期待される。そこで、解糖系上流の鍵反応を触媒するホスホククトキナーゼ(PFK)をコードする *PFK1* 遺伝子の欠損変異株について、中心代謝中間体の絶対定量、¹³C代謝フラックス解析、および定量プロテオーム解析を組み合わせたトランスオミクス解析を実施した。

【方法】*S. cerevisiae* S288C株の *PFK1* 遺伝子を *KanMX* 遺伝子と置換した *pfk1Δ* 株を作成した。SD培地中(100 mL)、30°C、150rpmで回分培養した菌体を各分析に供した。菌体から抽出したタンパク質のトリプシン消化物を nanoLC-UFMS (Shimadzu LCMS-8040, MRMモード)で分析し、中心代謝酵素量を測定した。代謝中間体は LC-MS/MS で測定した。さらに 100% [1-¹³C]グルコース含有 SD培地で培養した菌体のタンパク由来アミノ酸を GC-MS で分析し、¹³C濃縮度データから代謝フラックス分布を推定した。

【結果】酵母野生株(S288C)および *PFK1* 遺伝子破壊株(*pfk1Δ*)を微好気条件下で回分培養した。*pfk1Δ* の非増殖速度は 0.18 h⁻¹ と S288C に比べて 13%減少していた。対数増殖期の菌体を回収し、トランスオミクス解析を行った。その結果、*pfk1Δ* 株では *Tpi1p* や *Cdc19p* などの解糖系酵素タンパクの発現量が 20-30%程度増加したこと、グロバールレギュレーターである *Gcr1/2p* を通じて解糖系全体を活性化していると考えられた。また、F6P含量が増加していたことから、低下した PFK の活性を基質含量の増加で補っていると推測された。このような制御を通じて PFK 反応の代謝フラックス量を野生株の 76%にまで維持していると考えられた。

Trans-omics analysis of the central metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*

○Fumio Matsuda, Shunsuke Nishino, Hiroshi Shimizu
(Grad. Sch. IST, Osaka Univ.)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, central metabolism, proteome, regulation

3P-059 *Saccharomyces cerevisiae* の S-adenosyl-L-methionine 生産機構の解析

○早川 謙嗣^{1,2}, 松田 史生¹, 清水 浩¹
(¹大阪大院・情報科学・バイオ情報工,²大阪大院・工・カネカ基盤技術協働研究所)
shimizu@ist.osaka-u.ac.jp

【目的】S-Adenosyl-L-methionine (SAM) は *Saccharomyces cerevisiae* を宿主として工業生産され、医薬品等に利用されている。特に清酒酵母の SAM 蓄積量は、20 mg/(g 乾燥菌体重量)に達するが、SAM 高生産に関与する代謝制御機構には不明な点が多い。そこで、実験室酵母 S288C 株と清酒酵母協会 6 号株 (SAM 高生産株) の細胞内代謝物蓄積量を比較して SAM 生産機構の解析を行なった。【方法】S288C 株と協会 6 号株を 1.5 g/l メチオニン含有培地と未含有培地に接種し、振とう培養を行った。24 時間経過後に回収した細胞からメタノールで代謝物を抽出し、CE-TOFMS のアニオンモードとカチオンモードでメタボローム分析を行なった。主成分分析にはソフトウェア Mass Profiler Professional を用いた。

【結果と考察】代謝物の定量と主成分分析の結果、ATP 等のヌクレオシド三リン酸、グルタミンやグルタミン酸蓄積量が、SAM 生産量に応じて減少していることが明らかとなった。また、メチオニン含有条件では、SAM 生産量が増加し、菌体濃度と解糖系やコハク酸を除く TCA 回路中間体蓄積量が減少していた。続いて、酵母エキス未含有培地で協会 6 号株を培養したところ、5 g/l 酵母エキス含有培地と比較して菌体濃度が減少する一方、ヌクレオシド三リン酸蓄積量が増加し、SAM 生産量も 1.6 倍増加した。これらの結果から、SAM 高生産には、メチオニン以外に ATP 供給量向上も関与し、増殖活性低下等の菌体内 ATP 消費の効率化が重要と推定された。

Analysis of S-adenosyl-L-methionine production mechanism by***Saccharomyces cerevisiae***

○Kenshi Hayakawa^{1,2}, Fumio Matsuda¹, Hiroshi Shimizu¹
(¹Dept. Bioinfo. Eng., Grad. Sch. IST, Osaka Univ., ²KANEKA Fundamental Technol. Res. Alliance Lab., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, S-adenosyl-L-methionine, metabolic analysis

3P-060 セルロース系バイオマセタノール生産基盤技術の構築：実用酵母 *Saccharomyces cerevisiae* IR-2 由来 isogenic 系統の確立

○藤森 一浩¹, 清家 泰介¹, 小林 洋介¹, 佐原 健彦¹, 森田 直樹¹, 田口 久貴², 扇谷 悟¹, 赤松 隆², 鎌形 洋一¹
(¹産総研・生物プロセス,²崇城大・生物生命)
k-fujimori@aist.go.jp

【背景】*Saccharomyces cerevisiae* IR-2 は栗原山博博士により単離された二倍体凝集性酵母で、高い増殖性や比較的高い温度への耐性など優れた特性を有しており、バイオマセタノール生産等の産業利用が期待されてきた。一方で、凝集性や二倍体、低い発芽率、多数のヘテロ変異を持つ等の理由により、実験室酵母のように安定かつ自由に遺伝子工学を適用することは困難であった。そこで、本研究では、第二世代バイオマセタノール生産の基盤技術開発の一つとして、各種遺伝子操作や遺伝学が適用可能な一倍体株の取得、さらに isogenic 株の取得を試みた。

【方法】IR-2 性決定遺伝子 *HO* の二重破壊株 (*hoΔ::kanMX/hoΔ::bleMX*) を構築し、胞子形成の後、Tetrad dissection (TD)により一倍体を複数取得した。得られた異なる性、選択マーカーの一倍体を組み合わせ交配することにより二倍体を形成し、さらに TD を行い haploid 株の分離を行った。この過程を繰り返し、高い胞子形成率、高い発芽率、凝集性を欠損した株を取得した。

【結果】4 世代にわたる内部交配を繰り返すことで、異なる遺伝的背景を持つ 20 ペアの isogenic 株を分離した。なかでも、高い四胞子形成率、93%~100%の発芽率である 4 ペアを id 系統として樹立した。

Establishment of isogenic strain pairs of *Saccharomyces cerevisiae* IR-2 for production of the cellulosic biomass ethanol.

○Kazuhiro Fujimori¹, Taisuke Seike¹, Yosuke Kobayashi¹, Takahiko Sahara¹, Naoki Morita¹, Hisataka Taguchi², Satoru Ohgiya¹, Takashi Akamatsu², Yoichi Kamagata¹
(¹BRI, AIST, ²Fac. Biotechnol. Life Sci., Sojo Univ.)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, isogenic, germination, sporulation