

メタボロミクスを利用した下面発酵酵母の育種

吉田 聡

ビールに含まれる硫黄系化合物はビールの香味に大きな影響を与えることが知られている。その中の1つである亜硫酸は高い抗酸化作用を持つ化合物であり、食品や飲料、医薬品などの分野では酸化防止剤として広く利用されており、ビール醸造においても製品の鮮度の維持に重要な役割を果たしているため、一定量以上含まれていることが望まれる。一方、同じく含硫化合物の1つである硫化水素は腐った卵様の臭いを有し、ビール醸造においては製品のオフフレーバーの原因となるだけでなく、その他のオフフレーバー原因物質の前駆体となる場合があるため、酵母の硫化水素生産能は低い方が望ましい。つまり製品中で亜硫酸含量を高めると同時に醸造中に硫化水素の生成を抑えることができれば、香味安定性にすぐれた製品を提供することができる。しかし、これら2つの物質は硫酸イオンからメチオニンを合成する硫黄系物質代謝経路¹⁾(図1)で直近に位置することもあり、従来の醸造法において通気、温度などの条件を変えて一方を増減させると、他方も連動して増減するという問題がある。そのため、ビール醸造において硫化水素を減少させ、亜硫酸を増加させるような技術が求められている。下面発酵酵母(ビール酵母)において硫化水素を増やさ

ずに亜硫酸高生産を実現する方法として、亜硫酸から硫化水素を作る亜硫酸還元酵素をコードする *MET10* 遺伝子の破壊の報告がある²⁾。また、パン酵母(実験室酵母)において亜硫酸を細胞外へ排出するポンプをコードする *SSU1* 遺伝子とメチオニン合成系の上流に位置する *MET14* 遺伝子を同時に高発現させることにより、亜硫酸生産量が10倍近く上がるとの報告もされている³⁾。しかしながら、いずれの場合も遺伝子組換えによるものであること、および細胞内のメチオニンが欠乏することによる増殖遅延が見られるなどの欠点がある。特にメチオニンの欠乏は、アミノ酸などの窒素源がビール麦汁よりも少ない麦汁でつくる発泡酒などの製造において大きな問題となりうる。

下面発酵酵母とパン酵母のトランスクリプトーム解析とメタボローム解析

下面発酵酵母は亜硫酸および硫化水素を高生産するが、パン酵母はそれらの生産量が低いことが知られている⁴⁾。そこで、筆者らは代謝フラックスの改変を行い、亜硫酸生産量を増加させ、硫化水素生産量を減少させた下面発酵酵母の育種を目標に、まず初めに両酵母の遺伝子発現、代謝物を網羅的に解析し、細胞内の代謝の流れを調査することにした。ビールを造る下面発酵酵母 *Saccharomyces pastorianus* は、パン酵母 *Saccharomyces cerevisiae* とワイン醸造などに使われる *Saccharomyces bayanus* が自然交配してできたものと考えられており、遺伝子構造的には互いの相同性が約80%のSc型遺伝子(*S. cerevisiae*由来)とLg型遺伝子(*S. bayanus*由来とされる)からなる異質倍数体である⁵⁾。そこで、筆者らは下面発酵酵母においてできる限りこれらLg型、Sc型遺伝子の発現を区別して調べるために下面発酵酵母用の独自のマイクロアレイを作製し⁶⁾、遺伝子発現の網羅的解析に用いた。一方、代謝物質の分析に関しては硫化水素をガスクロマトグラフィー、亜硫酸を高速液体クロマトグラフィー、そしてその他のイオン性化合物についてはキャピラリー電気泳動-質量分析計(CE-MS)を用いた。

マイクロアレイ解析から *MET16*、*MET2* 遺伝子などにおいて両酵母間で発現パターンに違いが見られた。また、*HOM3* 遺伝子については下面発酵酵母ではパン酵母に

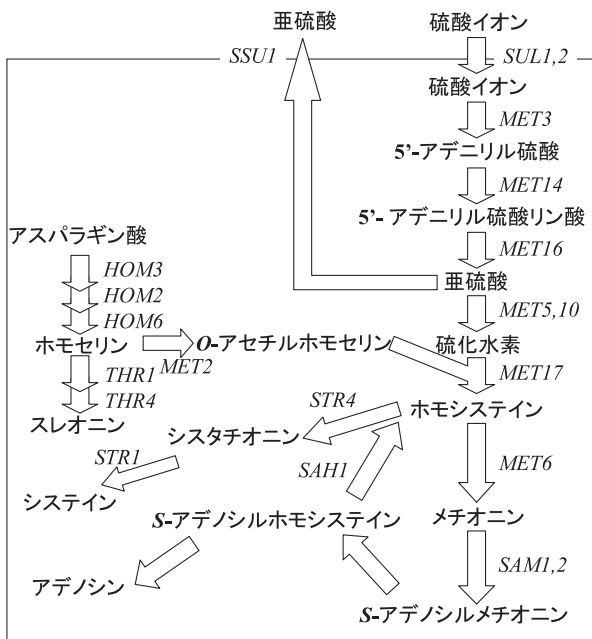


図1. 酵母の硫黄系化合物代謝経路

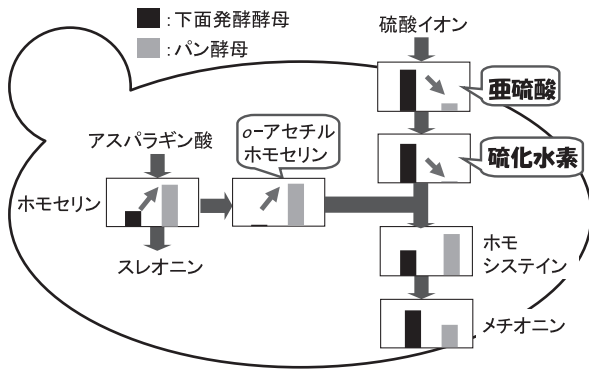


図2. 下面発酵酵母とパン酵母のメタボローム解析. 発酵開始後24時間目のデータを記す. 培養はアミノ酸の含まれていない最少培地 (SD培地) を用いて行った.

比べて発酵初期で発現量が低いことが明らかとなった. 一方, 細胞に必須なアミノ酸であるメチオニンは硫化水素とO-アセチルホモセリン(OAH)から合成されるホモシステインを経て作られるが, メタボローム解析から下面発酵酵母ではパン酵母に比べて細胞内のOAH量がきわめて少ないことが明らかとなった(図2). 以上の結果から, 下面発酵酵母ではOAH生成に関与する遺伝子発現が低いことなどの要因もあり細胞内OAH量が低く, そのため亜硫酸・硫化水素が蓄積していることが考えられ, OAHが亜硫酸・硫化水素生産の律速因子であることが示唆された⁷⁾.

O-アセチルホモセリンは亜硫酸・硫化水素生産の律速因子である

次に, OAHが酵母において亜硫酸・硫化水素生産の律速因子であるという仮説について, 以下に示す実験により検証した. パン酵母においてスレオニンはHOM3によってコードされるアスパラギン酸キナーゼをフィードバック阻害すること⁸⁾, スレオニンを添加すると亜硫酸生産量が増加すること⁹⁾が報告されており, パン酵母にスレオニンを添加すると硫黄系物質の代謝が下面発酵酵母型になる. このときの細胞内外の代謝物質のメタボローム解析を行ったところ, スレオニンを添加した酵母では, 報告通り亜硫酸・硫化水素生産量が増加していた. 一方, 注目している細胞内OAH量については, スレオニンを添加した酵母では添加していない酵母に比べて低下していることが明らかとなった. これらの結果から, スレオニンがHom3アスパラギン酸キナーゼをフィードバック阻害し, そのためOAH量が減り, 結果として亜硫酸・硫化水素生産量が増加したということが言える. 以上のことから, OAHは亜硫酸・硫化水素生産の律速因子の一つであるということが示された¹⁰⁾.

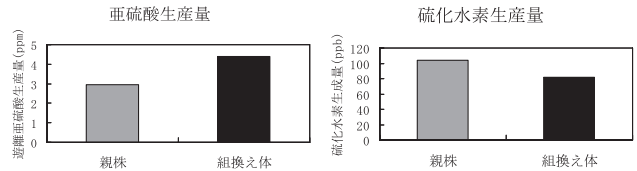


図3. 遺伝子組換え体の亜硫酸・硫化水素生産量. 富栄養培地 (YPD培地) にて培養開始後, 24時間後の培地中に含まれる濃度を示す.

遺伝子組換えを用いた下面発酵酵母での亜硫酸高生産・硫化水素低生産酵母の育種

硫酸イオンから硫化水素への代謝経路は亜硫酸, 硫化水素生産に重要であることはすでに報告されている³⁾. これまで記した知見を基に, 筆者らはアスパラギン酸からOAHへの代謝流量を増大させ, 同時に硫酸イオンから亜硫酸への還元経路の代謝流量を増加させることによる, 亜硫酸高生産・硫化水素低生産変異株の育種を試みた. まず初めにこの育種法の有効性について, 下面発酵酵母でHOM3遺伝子とMET14遺伝子を同時に過剰発現させることにより, 亜硫酸高生産, 硫化水素低生産になるかどうか調べた. その結果, 両遺伝子の共発現株ではコントロールの親株に比べて亜硫酸生産量で1.6倍, 硫化水素生産量で0.8倍となっていた(図3). このことから, 本手法は亜硫酸高生産・硫化水素低生産株の育種法として有効であることが示唆された.

実生産可能な亜硫酸高生産・硫化水素低生産酵母の育種

次に, 育種株の実生産への使用を考慮し, 同様の代謝流量の増加を2種類のアミノ酸アナログに対する耐性変異株を取得することにより試みた. つまり, メチオニンのアナログであるエチオニンに対する耐性株の中にはメチオニン(およびS-アデノシルメチオニン)によるフィードバック阻害が解除されているものがあると考えられ, まず耐性株の中から亜硫酸高生産, かつ硫化水素高生産となっている株を単離した. ひき続いてその株から同様にスレオニンによるOAH生産のフィードバック阻害が解除されているものを取得するため, スレオニンのアナログであるヒドロキシノルバリンに対する耐性株を単離し, 耐性株の中から亜硫酸生産量が親株と比べて高く, 硫化水素生産量が低い株を選抜した(図4上に育種コンセプトの概略を記す). この手法を用いて2種類の醸造用酵母から親株に比べて硫化水素生産量が増えず亜硫酸生産量が増えた変異株をそれぞれ単離することに成功した(一例を図4下に示す). 以上のことから, 2つの経路の代

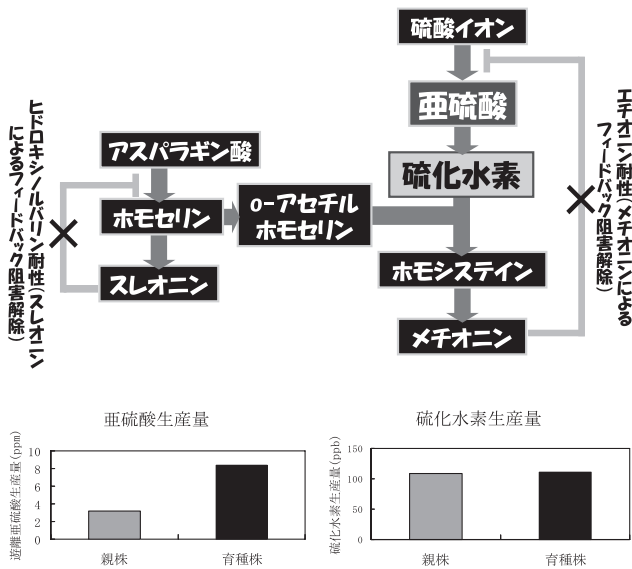


図4. アミノ酸アナログ耐性株選抜による亜硫酸高生産・硫化水素低生産性酵母の育種コンセプト(上図)と育種株の亜硫酸・硫化水素生産量(下図). 富栄養培地(ビール麦汁)にて培養開始後, 24時間後の培地中に含まれる濃度を示す.

謝フラックスを制御することによる本育種法のコンセプトが酵母種によらず普遍的であることを示すことができた¹¹⁾.

メタボローム解析の今後の課題と展望

メタボローム解析は疾患と関連した代謝分子(バイオマーカー), 新規生理活性物質の迅速な同定, 遺伝子組換えを含んだ植物品種改良などにも有用であり, また本報で用いたCE-MSをさらに高感度化したCE-TOFMS(キャピラリー電気泳動-時間飛行型質量分析計)による新規のバイオマーカー候補の発見も報告されている¹²⁾. 筆者らもCE-TOFMSを用いたディファレンシャル・ディスプレイの手法により, パン酵母S288Cにはない下面発酵酵母特異的遺伝子のひとつであるアミダーゼホモログ遺伝子AMH1について, この遺伝子産物がニコチン酸合成な

どに関与していることを突き止めている¹³⁾.

植物では本報の下面発酵酵母の解析で使ったメタボローム解析にトランスクリプトーム解析を組み合わせるという手法により, 細胞内の代謝の全体像を把握することがすでに報告されている¹⁴⁾. 今回筆者らは代謝の全体的な流れを把握した後に, 律速段階を同定し, そこを改変することで目的の物質の代謝を制御することが可能となってきたことを報告した¹⁵⁾. 今後は, このような手法が酵母に限らずさまざまな微生物や植物などの育種に応用され, 産業界に活かされていくことが期待される.

上記の育種の研究は, 本研究所の港紀子, 大内梨愛, 石黒達治, 水谷悟, 善本裕之とともに, 慶應義塾大学先端生命科学研究所 井元淳氏, 富田勝教授, 曽我朋義教授との共同研究で実施したものである.

文 献

- 1) Thomas, D. and Surdin-Kerjan, Y.: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **61**, 503 (1997).
- 2) Hansen, J. and Kiehlbrand, M. C.: *Nature Biotech.*, **14**, 1487 (1996).
- 3) Donalies, U. E. B. and Stahl, U.: *Yeast*, **19**, 475 (2002).
- 4) Takahashi, T. et al.: *Bull. Brew. Sci.*, **26**, 29 (1980).
- 5) Yoshida, S. et al.: *Yeast*, **24**, 599 (2007).
- 6) 善本裕之ら: *バイオサイエンスとインダストリー*, **64**, 27 (2006).
- 7) 井元 淳ら: *日本生物工学会大会講演要旨集*, p.28 (2006).
- 8) Farfán, M. -J. et al.: *Appl. Env. Microbiol.*, **65**, 110 (1999).
- 9) Gyllang, H. et al.: *Proc. Eur. Brew. Conv. Congr.*, p.347 (1989).
- 10) 港 紀子ら: *日本生物工学会大会講演要旨集*, p.29 (2006).
- 11) 大内梨愛ら: *日本生物工学会大会講演要旨集*, p.29 (2006).
- 12) Soga, T. et al.: *J. Biol. Chem.*, **281**, 16768 (2006).
- 13) Yoshida, S. et al.: *Yeast*, in press.
- 14) Hirai, M. Y. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 9949 (2004).
- 15) 吉田 聡ら: *日本生物工学会大会講演要旨集*, p.74 (2006).