

2010年 生物工学奨励賞（江田賞）受賞



メタボロミクスを利用した 下面発酵酵母の育種

吉田 聡



Breeding of bottom-fermenting yeasts using metabolome analysis

Satoshi Yoshida (Central Laboratories for Frontier Technology, Kirin Holdings Co. Ltd., 1-13-5 Fukuura, Kanazawa-ku, Yokohama, Kanagawa 236-0004) *Seibutsu-kogaku* **89**: 58-65, 2011.

はじめに

1995年にインフルエンザ・ウイルス、1996年に真核生物モデルの1つである出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae*、1997年に原核生物のモデルとして長年使われてきた大腸菌 *Escherichia coli* の全ゲノムの解読がなされた。さらに、2003年にヒトゲノムの解読も完了して以来、分子生物学はゲノムプロジェクトの時代からポストゲノム時代に突入している。そして、その一連の流れとして、遺伝子の発現プロファイル、タンパク質や代謝物質の挙動、さらに最終的に現れてくる表現型についての網羅的解析の報告が多数なされてきている。これらの中で、分析機器の高性能化に伴い、代謝物質の網羅的解析手法であるメタボローム解析がめざましい発展を遂げ、近年、特に注目を浴びている。メタボローム解析はキャピラリー電気泳動-質量分析計 (CE-MS)¹⁾、ガスクロマトグラフ-質量分析計 (GC-MS)²⁾、液体クロマトグラフ-質量分析計 (LC-MS)³⁾ のように物性に基づいて効率よく物質を分離し、質量分析計を用いて高感度で分析するというハイスループットにも対応した解析ができるようになって、21世紀に入り飛躍的な進歩を遂げてきた。そして、2004年にはメタボロミクス研究を推進する学会も設立され⁴⁾、さらには2007年にはヒト・メタボローム・プロジェクトから、25,000の代謝物質、1,200の薬品、3,500の食品由来物質を含むヒトのメタボロームも発表されるほどになってきた⁵⁾。

メタボローム解析の手法は、ターゲットとなる代謝物質を絞り詳細にそれらの動きを一斉に調べる方法と、

ターゲットを絞らずに複数のサンプルでできる限り多くの物質を同時に検出し、差のある物質（バイオマーカー）を見つける方法に大別される。本稿においては、下面発酵酵母におけるメタボローム解析の実例として、ターゲットを絞った手法に関しては硫黄系物質代謝に注目して遺伝子発現解析も組み合わせた解析と、その解析結果を利用した亜硫酸高生産・硫化水素低生産酵母の育種法の開発について報告する^{6,7)}。また、本研究を遂行する過程で、硫黄系物質代謝に関与する新規なユビキチン-プロテオソーム系を見つけ、そのメカニズム解明もメタボローム解析を用いて行ったので、併せて報告する⁸⁾。また、ターゲットを絞らない手法に関しては、一般に基礎研究で用いられているパン酵母のゲノム上にはない、下面発酵酵母に特異的な遺伝子の機能解明と育種への可能性について報告する⁹⁾。

1. 亜硫酸高生産・硫化水素低生産下面発酵酵母の育種

ビールなどのアルコール飲料に含まれる硫黄系化合物は香味に大きな影響を与えることが知られている¹⁰⁾。その中の1つである亜硫酸は高い抗酸化活性を持ち、製品の鮮度維持に重要な役割を果たしている。一方、同じく含硫化合物である硫化水素は腐った卵様の臭いを有し、ビール系飲料の醸造において商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物質の前駆体となる場合がある。そのため、ビール系飲料の醸造において硫化水素を減少させ、亜硫酸を増加させることができれば、香味安定性に優れた製品を提供することができ、そのような技術が求められている。

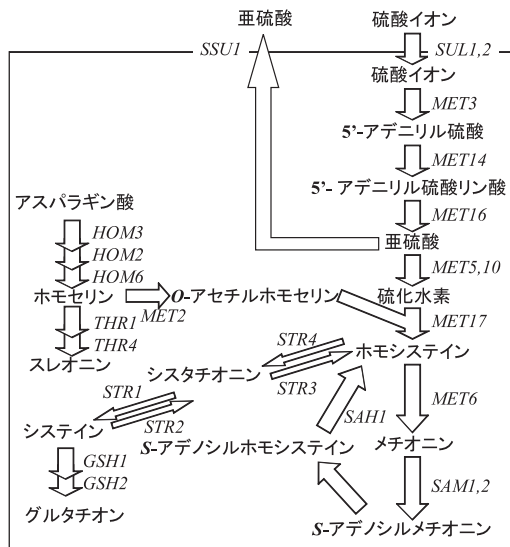


図1. 酵母の硫黄系物質の生合成経路

ところで、亜硫酸と硫化水素は共に無機硫酸イオンの還元過程で作られるものであり、酵母による発酵がなければ生成されない物質である¹¹⁾。図1に示すように、麦汁中の硫酸イオンはSUL1, SUL2によってコードされる膜透過酵素により細胞内に取り込まれ、MET3, MET14, MET16にコードされる酵素により順次、亜硫酸まで還元される。そして、亜硫酸はMET5とMET10にコードされる亜硫酸還元酵素により硫化水素へ還元される。アスパラギン酸から作られるO-アセチルホモセリン(OAH)とここでできる硫化水素から、MET17にコードされる酵素によりホモシステインが合成され、さらにシステイン、メチオニン、S-アデノシルメチオニン(SAM)などへと代謝されていく。SAMは硫黄系物質代謝経路に関与するほとんどすべての遺伝子の発現を転写レベルで抑制していることが知られている¹¹⁾。また、亜硫酸は酵母細胞にとっては毒性を有することもあり、SSU1遺伝子にコードされる亜硫酸排出ポンプにより細胞外へ排出される。ビール醸造で注目される亜硫酸と硫化水素は上記の硫黄系物質代謝経路で直近に位置する(図1)こともあり、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。

世界でつくられるビールの9割近くが下面発酵酵母を用いた下面発酵ビールであり、特に日本のビールはほとんどが下面発酵ビールである。ゲノムの観点から見ると、下面発酵酵母は*Saccharomyces pastorianus*に属し、パン酵母*S. cerevisiae*とワイン醸造などに用いられる*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70-

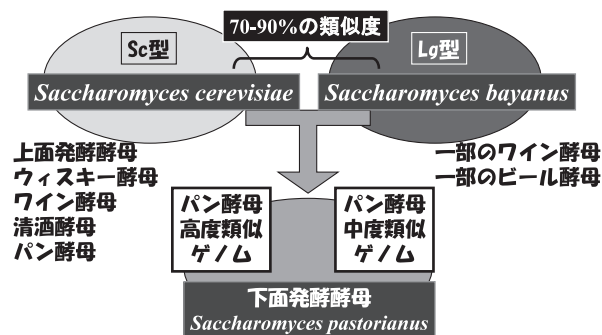


図2. 下面発酵酵母のゲノム構造

90%のSc型遺伝子(*S. cerevisiae*由来)とLg型遺伝子(*S. bayanus*由来)からなる異質倍数体である(図2)¹²⁻¹⁴⁾。筆者らは下面発酵酵母のEST(expressed sequence tag)解析を行ってきた¹⁵⁾が、近年、下面発酵酵母の全ゲノム配列も報告されてきている¹⁶⁾。

ところで、下面発酵酵母において硫化水素を増やさずに亜硫酸を高生産させる方法として、MET10遺伝子の破壊¹⁷⁾、SSU1の高発現¹⁸⁾などが試みられてきた。しかしながら、いずれ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という欠点があった。特に酵母細胞内含量の少ない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の製造において大きな問題となりうる。そこで、製造に使用可能な亜硫酸高生産・硫化水素低生産株の育種を試みた。

1-1. 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 今までの亜硫酸高生産・硫化水素低生産に関する研究は、両物質の生産に関係する遺伝子をピンポイントで狙った研究がほとんどであり、そのため目的物質の量を調節できてもその他の重要な代謝物の量が大きく変動してしまうなどの影響があった。さらには、遺伝子組換え体ということもあり、実用には至っていないのが現状である¹⁷⁾。その一方で、今までは酵母の物質代謝全体を総合的に解析し、注目する代謝経路の律速段階を同定し、その代謝を制御するという研究はなされていなかった。そこで、筆者らは下面発酵酵母において、遺伝子発現、硫黄系物質代謝関連化合物の挙動を網羅的に解析し、それらの結果を基に硫黄系物質代謝のフラックスを改変することで、亜硫酸生産量を増加させ、硫化水素生産量を減少させるという下面発酵酵母の育種を試みた。

下面発酵酵母は亜硫酸、硫化水素を共に蓄積するが、基礎研究などで用いられるパン酵母(実験室酵母)はそれらを蓄積しない¹⁹⁾。そこで、まず初めにこの原因を探るために、両酵母の違いを遺伝子発現レベル、および代

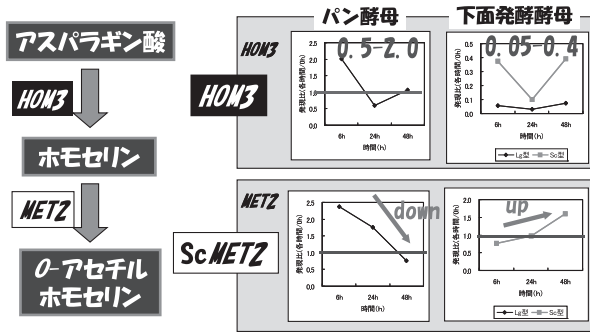


図3. パン酵母, および下面発酵酵母のマイクロアレイ解析. 0時間目の酵母 (前培養酵母) に対する各時間での遺伝子発現量の相対値をグラフに記す. 図には特に両酵母間で差のあった遺伝子について例示する.

謝物レベルで比較した. その際, Lg型, Sc型遺伝子の発現を区別して遺伝子発現量を調べるために下面発酵酵母用のマイクロアレイを作製し^{20,21)}, 遺伝子発現の網羅的解析を行った. 一方, 代謝物の分析に関して, 硫化水素はガスクロマトグラフ-化学発光硫黄検出器(GC-SCD), 亜硫酸, システインは高速液体クロマトグラフ (HPLC), アミノ酸中間体などのイオン性物資はCE-MSを用いてそれぞれ測定した.

まず, 遺伝子発現解析の結果から *MET2*, *MET16* において両酵母間で発現プロファイルに違いが見られ, また *HOM3* については, 下面発酵酵母ではパン酵母に比べてSc型, Lg型遺伝子共に発酵初期で発現量が低いことが明らかとなった(図3). 一方, 細胞の増殖に必須なアミノ酸であるメチオニンは, 硫化水素とOAHからホモシステインを経て作られるが, 図4Aに示した代謝物に関する経時的な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4B). 以上のトランスクリプトーム, およびメタボローム解析の結果より, 下面発酵酵母ではOAH生成に関与する *HOM3* 遺伝子の発現が低いことも一因で細胞内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.

1-2. 亜硫酸・硫化水素生産の律速因子としてのO-アセチルホモセリン 次に, 酵母においてOAHが亜硫酸・硫化水素生産の律速因子であるという仮説の証明を以下の実験により行った.

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²²⁾, およびスレオニンを添加すると亜硫酸生産量が増加すること²³⁾がすでに報告されている. パン酵母にさまざまなアミノ酸を添加し, 亜硫酸・硫化水素生産への影響を調査したところ, スレオニンを添加した場

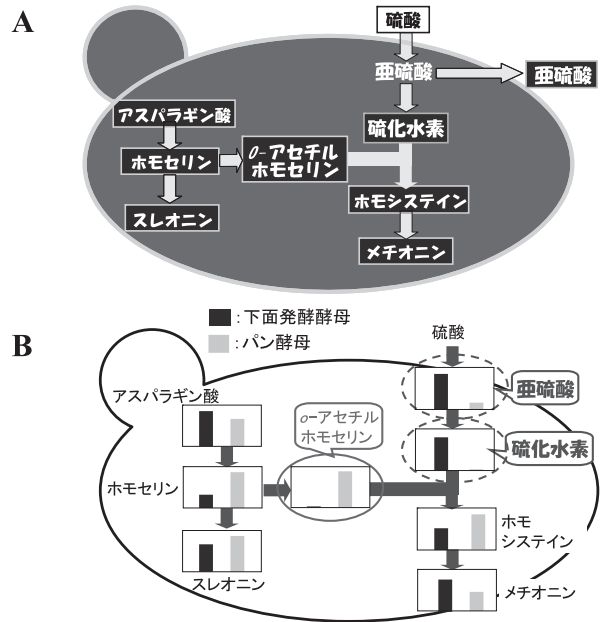


図4. パン酵母, および下面発酵酵母のメタボローム解析. (A) 定量解析を行った硫黄系代謝物質を示す. (B) SD培地 (最少培地) で培養後24時間の細胞内代謝物質量を模式的に示す.

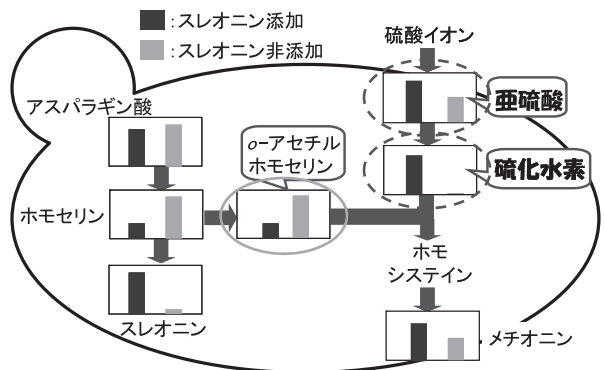


図5. スレオニン添加時のパン酵母のメタボローム解析. パン酵母をSD培地 (最少培地) で培養し, スレオニンを添加・非添加したときの細胞内代謝物質を測定した. 図は発酵開始後24時間目の細胞内代謝物質量を模式的に示す.

合, 亜硫酸・硫化水素生産量が増加し, 見かけ上硫黄系物質の代謝が下面発酵酵母型になることが明らかとなった. そこで, 1-1と同様に, パン酵母にスレオニンを添加した条件でトランスクリプトーム解析, およびメタボローム解析を実施した. その結果, スレオニンを添加した酵母においては, 亜硫酸・硫化水素生産量が増加しており, 同時に細胞内OAH量が低下していることが明らかとなった(図5). これらのことから, 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の生産量が減り, 結果として亜硫酸・硫化水素の生産量が増加したことが示唆された. さらに, 下面発酵酵母においてYPD培地にOAHを添加すると

硫化水素生産が抑えられるという結果も得られた⁷⁾。以上の結果から、OAHが亜硫酸・硫化水素生産の律速因子の一つであることが示された。

1-3. 遺伝子改変による亜硫酸・硫化水素生産への影響
 酵母においてOAHが亜硫酸、硫化水素生産の律速因子であることが示されたので、次に遺伝子工学的に代謝を改変させ、各代謝経路の亜硫酸・硫化水素生産への影響を調査することとした。ところで、下面発酵酵母はLg型、およびSc型遺伝子をそれぞれ2コピーずつ持つ4倍体に近い異質倍数体であることが示唆されている²⁴⁾ので、遺伝子操作をしやすくするために下面発酵酵母KBY011株を減数分裂させて、Lg型、およびSc型遺伝子をそれぞれ1コピーずつ持つと考えられる減数体(2倍体)を単離した。そして、これら多数の減数体の中から、発酵過程において亜硫酸、硫化水素生成プロファイルがKBY011株と類似した減数体としてB43株を選抜し、以下に行う実験の遺伝子改変用の元株として用いた。

まず初めに、OAHは硫化水素生産の律速因子であるので、アスパラギン酸からOAHへの代謝フラックスを増加させたときの亜硫酸・硫化水素生産への影響を調査した。*HOM3* 遺伝子をB43株で過剰発現させたところ、コントロールと比較して硫化水素生産量が約50分の1に低下した。一方、このときの亜硫酸生産量は約半分となった(図6A)。このことから、アスパラギン酸からOAHへの代謝を改変すると、亜硫酸生産量よりも硫化水素生産量により大きな影響を及ぼすことが示された。

次に、硫酸イオンから亜硫酸への代謝フラックスを増加させたときの亜硫酸・硫化水素生産量について調査した。*Met14* タンパク質を過剰生産させたところ、コントロールと比較して亜硫酸生産量が約2.5倍に増加した。一方、このときの硫化水素生産量は約1.6倍に増えた(図6B)。この結果は、硫酸イオンから亜硫酸への代謝改変は、硫化水素生産量よりも亜硫酸生産量により大きな影響を及

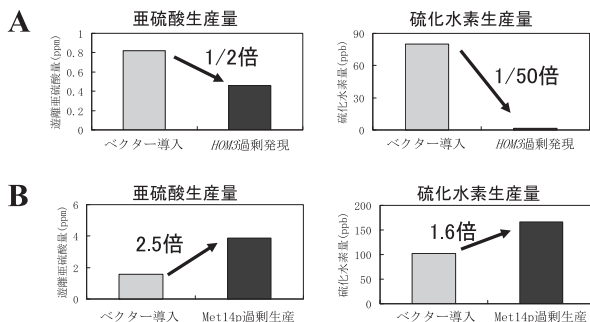


図6. 代謝改変による亜硫酸・硫化水素生産への影響。各形質転換体をYPD10(富栄養培地)で培養し、亜硫酸・硫化水素生産量を測定した。(A) *HOM3* 過剰発現株、(B) *Met14p* 過剰生産株 (*Askp2*)。図は発酵開始後24時間目の結果を示す⁷⁾。

ぼすことを示している。これらの知見を基に、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代謝流量を増加させるという、2つの代謝改変の組み合わせによる亜硫酸高生産・硫化水素低生産変異株の育種の検討を行った。

1-4. 代謝改変による亜硫酸高生産・硫化水素低生産酵母の育種
 上記育種法の有効性について、下面発酵酵母B43株において*ScHOM3* 遺伝子と*ScMET14* 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を調査した。その結果、両遺伝子の共発現株ではコントロールと比較して亜硫酸生産量が1.6倍、硫化水素生産量が0.8倍となっており、本手法の有効性が示唆された(図7A)。なお、この株では*met10*破壊株で問題となっていたアセトアルデヒドの増加¹⁷⁾は見られず、また、他の香味成分への顕著な影響もみられなかった(図7B)。

次に、実生産への利用を考え、実用株を変異育種することを試みた。具体的には、上述したものと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順次取得することによる育種を試みた(図8A)。なお、変異源処理を行うと目的の遺伝子以外のさまざまなところに変異が入ってしまい、そのような酵母で造ったビールは香味特性が著しく変わってしまうことが想定されるので、変異株の単離は全て自然突然変異により行った。まず初めに、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、エチオニン耐性を取得し、それらの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

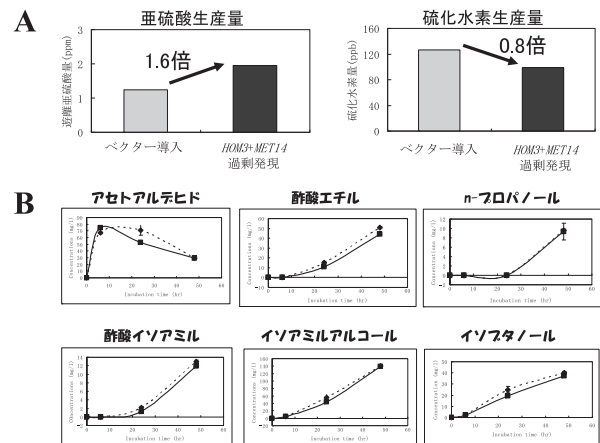


図7. 遺伝子組換えによる亜硫酸高生産・硫化水素低生産株の構築。形質転換体をYPD10(富栄養培地)で培養し、亜硫酸・硫化水素生産量を測定した。(A) 発酵開始後24時間目の亜硫酸・硫化水素生産量。(B) 各香料物質の経時的な生産量。点線がベクター導入株、実線が*HOM3*, *MET14* 共発現株を示す⁷⁾。

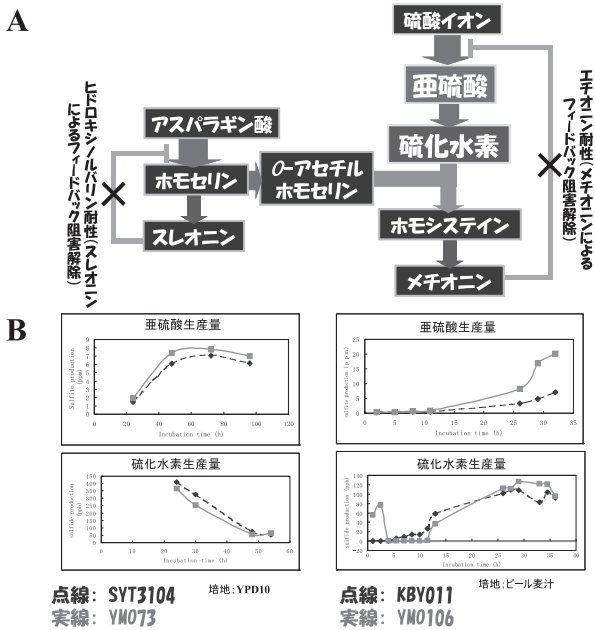


図8. 下面発酵酵母の亜硫酸高生産・硫化水素低生産の育種. (A) 2種類の異なるアミノ酸アナログ耐性株を順次選抜することによる、亜硫酸高生産・硫化水素低生産性酵母の育種法. (B) 下面発酵酵母SYT3104, およびKBY011株から得られた育種株の亜硫酸・硫化水素生産量. SYT3104株はYPD10で, KBY011株はビール麦汁で酵母を培養した結果を示す。

き, この株からスレオニンによる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るために, 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た(図8A). そして, それらの株の中から

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. この手法を用いて2種類の醸造用酵母から元の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ができた(図8B). 以上のことから, 2つの代謝経路のフラックスを同時に改変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。

1-5. 育種酵母を用いたビール醸造と成分解析 次に, KBY011株より単離した亜硫酸高生産酵母YMO106株を用いて, 2-klのパイロットプラントによるビール醸造を行い, それらのビールの成分分析を行った. その結果を表1に示す^{7,25)}. YMO106株で造ったビールは, すべての条件において親株であるKBY011株で造ったビールと比較して, 亜硫酸含量が高かった. また, 硫化水素含量については, 発酵1回目では低かったが, 2回目ではあまり差が見られなかった. これらの結果は, 実験室レベルで行った発酵試験の結果と一致するものであった. 以上のことから, 本手法によって単離した変異株は硫化水素含量が増加せず, 亜硫酸含量が高いビールを造ることができ, 本変異株は実生産可能な株であることが示された.

2. 酵母における新規な硫化水素生産メカニズムの解明

1の研究の過程で硫化水素生産に関与する遺伝子を単離するため, 以下に示すパン酵母一倍体の遺伝子破壊株コレクションを利用した網羅的解析を行った⁸⁾. 硫化物イオンは鉛イオンと反応することで硫化鉛の黑色沈殿を

表1. 親株KBY011と育種株YMO106のビールの成分解析

	Concentration	KBY-1	YMO-1	KBY-2	YMO-2
Sulfite (fermentation tank)	mg/l	1.5 <	2.2	2.5 <	7.1
Sulfite (bottled beer)	mg/l	1.3 <	3.7	1.6 <	4.2
Hydrogen sulfide (fermentation tank)	μg/l	49.0 >	30.3	27.1 >	25.7
Hydrogen sulfide (bottled beer)	μg/l	2.6 >	2.0	2.9	3.3
Total diacetyl	mg/l	-	-	0.04	0.04
Acetaldehyde	mg/l	7.0	4.1	4.0	5.0
Ethyl acetate	mg/l	23.8	18.3	21.3	23.9
Amyl alcohol	mg/l	70.4	97.4	85	78.2
Isoamyl acetate	mg/l	2.0	1.8	1.8	2.2
Sulfate	mg/l	89	100	110	99
Maleic acid	mg/l	96	109	104	92
Citric acid	mg/l	204	199	190	207
Succinic acid	mg/l	119	116	85	96
Lactic acid	mg/l	97	106	92	107
Acetic acid	mg/l	89	57	112	133

KBY-1は親株KBY011で造った連用1回目のビールを, KBY-2は連用2回目のビールを示す. YMO-1は亜硫酸高生産株YMO106で造った連用1回目のビールを, YMO-2は連用2回目のビールを示す。

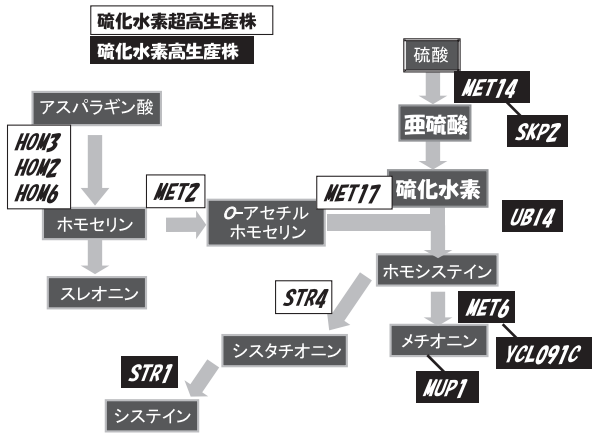


図9. パン酵母からの硫化水素高生産となる遺伝子破壊株のスクリーニング. *SKP2*, *UBI4*はユビキチン関連遺伝子である.

形成する²⁶⁾. そこで、硝酸鉛を含む培地で黒色コロニーを形成する遺伝子破壊株のスクリーニングを行った. 最終的に12個の遺伝子破壊株が硫化水素高生産性となることが明らかとなった. それらの変異株は図9に示すように、ほとんどが既知の硫黄系物質代謝経路上の遺伝子であることがわかった. ところで、*SKP2* (*YNL311C*) 遺伝子はユビキチン-プロテオソーム系で働くF-boxタンパク質をコードしているが、その機能は未知であった. そこで、*SKP2* 遺伝子の機能解析を行えば硫化水素生産制御法の開発の糸口がつかめると考え、以下の実験を行った.

網羅的な酵母two-hybrid解析、およびSkp1p複合体とのクロスリンク実験の結果から、Skp2pはMet14pと相互作用することが報告されていた^{27,28)}ために、まず最初にその再現性を調べた. 酵母two-hybrid解析でのprey-baitのスイッチ実験、β-ガラクトシダーゼ・アッセイの結果から、これらの2つのタンパク質の相互作用が確認された. このことから*skp2*破壊株で硫化水素が高生産するのは、*skp2*破壊株ではMet14pが安定化するためと考えられた.

さらに、実験を進めていく過程で、*skp2*破壊株は最少培地で増殖遅延をおこすことを見いだした. そこで、この増殖遅延がおこる理由を解明するために、*skp2*破壊株のトランスクリプトーム解析、およびメタボローム解析を実施した. その結果、*skp2*破壊株では野生株と比較して転写レベルでは顕著な差は見られなかったが、代謝物レベルでは細胞内のシステイン含量がきわめて低く、シスタチオニン含量が高いことが明らかとなった(図10). この点に関して、システイン合成に関する酵素タンパク質の安定性に関する解析を行ったところ、*skp2*破壊株ではStr2p, Str3p, Str4pが安定化しており、そのためにシステイン含量が低くなっていることが示唆された⁸⁾.

硫黄系物質代謝経路はSCF^{Met30}により経路上のほとん

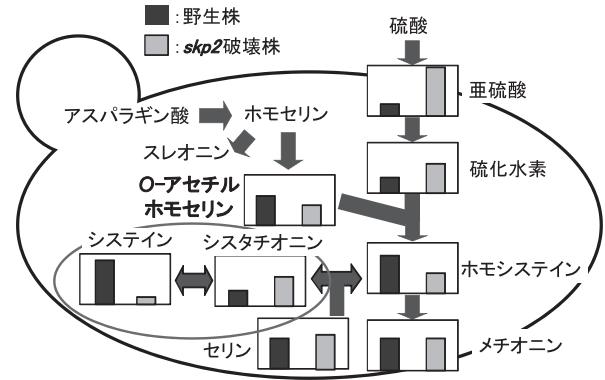


図10. *skp2*破壊株のメタボローム解析. 窒素源を減らしたYPD培地で培養したときの細胞内代謝物質を測定した. 図は発酵開始後24時間目の細胞内代謝物質量を模式的に示す⁸⁾.

どの遺伝子の発現が制御されていることが知られている²⁹⁾. 今回の知見から、硫黄系物質代謝はSCF^{Met30}以外にSCF^{Skp2}によっても制御されていることが示された. *skp2*破壊株はアザセリンに対して感受性になる³⁰⁾ので、アザセリン耐性株を単離することにより硫化水素低生産株を単離できる可能性が示唆された.

3. 機能未知下面発酵酵母特異的遺伝子の機能解明

下面発酵酵母は前述したようにLg型とSc型染色体からなるゲノム構造を持つ異質倍数体である. 一方、下面発酵酵母はパン酵母と比べて亜硫酸高生産能以外に、低温増殖能、エステル高生産能などを有する²⁵⁾. これらの特性はLg型遺伝子を含む下面発酵酵母にのみ存在する遺伝子や下面発酵酵母特有の遺伝子発現制御によるものと考えられる. 特に、パン酵母ゲノム上には相同遺伝子が存在しない下面発酵酵母特異的遺伝子を同定し、その機能を解明することは、有用な特性を持つ下面発酵酵母を育種する上で有効であると考えられる. そこで、筆者らは下面発酵酵母の網羅的な遺伝子解析を行い¹⁵⁾、下面発酵酵母特異的遺伝子を同定し、次いでメタボローム解析を用いてその遺伝子の機能を解析した⁹⁾.

3-1. 下面発酵酵母特異的遺伝子の同定 筆者らはビール醸造中に発現している下面発酵酵母の遺伝子を調査するためにEST解析を行った¹⁵⁾. そして、それらの塩基配列をパン酵母S288Cのゲノムデータベースと比較し、S288Cの配列と相同性がきわめて低い配列として、約400個の下面発酵酵母特異的遺伝子*BFY* (bottom-fermenting yeast specific) を同定した. これら*BFY*遺伝子の中には、下面発酵酵母などの実用酵母にのみ存在するという報告がすでにされている*RTM1*³¹⁾, *FSY1*³²⁾, *MTY1*³³⁾ 遺伝子などが含まれていた.

3-2. アミダーゼホモログ*AMII* 遺伝子の解析 *BFY*

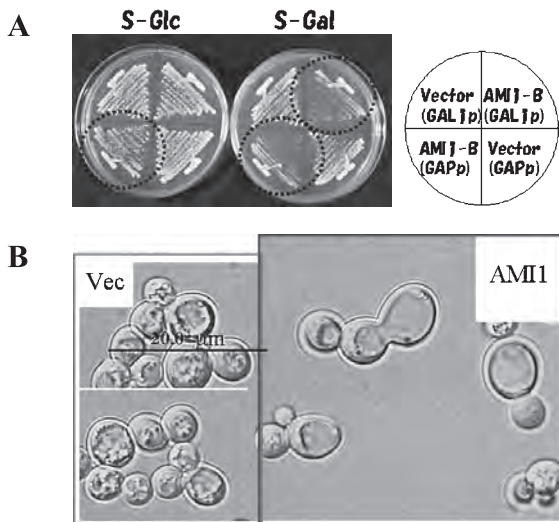


図11. *AMII* 遺伝子を過剰発現させたパン酵母の表現型。(A) *AMII* 過剰発現による増殖遅延。図は24°Cで3日間培養した最少培地のプレートの写真を示す。(B) ベクターと*AMII*を過剰発現させた株の写真。図はそれぞれ24°Cで2日間培養した細胞を示す⁹⁾。

遺伝子の1つである*AMII* 遺伝子は、枯草菌、分裂酵母、アカパンカビ、植物、および他の一部の *Saccharomyces* 属の酵母で保存されており、アミダーゼと相同性を有するタンパク質をコードしているが、その機能は報告されていない。そこで、*AMII* 遺伝子の機能を調べるために、*AMII* 遺伝子を持っていないパン酵母において当該遺伝子を過剰発現させ、ベクターのみをいれたコントロールとの表現型の比較を行った⁹⁾。その結果、コントロールと比べると*AMII* 過剰発現株では増殖遅延が見られ(図11A)、また大きな液胞をもつ細胞が出現することが明らかとなった(図11B)。

さらに、過剰発現株の増殖遅延の原因を含めて *Amilp* の機能を調査するために、CE-TOFMS (時間飛行型質量分析計) を用いて *AMII* 過剰発現株とコントロール株の細胞内イオン性代謝物質の一斉分析、および差分解析を行った。その結果、*AMII* 過剰発現株においてはコントロール株に比べてヒスチジン、アルギニンなどの含量が高く、またスレオニン、リジン、ニコチン酸などの含量が低いことが明らかとなった⁹⁾ (表2)。

これらの結果から、*Amilp* はアミノ酸やニコチン酸代謝に関与するアミド化合物を加水分解しているアミダーゼである可能性が示唆された。ヒスチジン、アルギニン、リジンなどの塩基性アミノ酸は液胞に蓄えられるという報告がすでになされており³⁴⁾、これらの細胞内塩基性アミノ酸の含有量に関する結果は*AMII* 過剰発現株での液胞の形態異常と関係している可能性を示唆している。また、特にニコチン酸の含量がコントロールに比べて100

表2. *AMII* 遺伝子過剰発現株の細胞内メタボローム解析

	比率 (<i>AMII</i> /Control)
リジン	0.50
ヒスチジン	1.92
アルギニン	1.51
アスパラギン酸	0.53
アスパラギン	1.37
メチオニン	0.50
スレオニン	0.50
ニコチン酸	0.01
アデノシン	2.50
ニコチンアミドモノヌクレオチド	0.12
グルコース 1-リン酸	0.32

AMII 遺伝子過剰発現株、およびコントロール株についてSD培地で培養し、細胞内代謝物質をCE-TOFMS解析にかけた。比率は*AMII* 過剰発現株の物質量の積分値をコントロール株の値で割った相対値を示す⁹⁾。

分の1以下になっていることから、*AMII* 過剰発現株ではNADなどが関与する細胞内の酸化還元バランスが崩れており、その結果として増殖が遅延していると考えられる。実際、パン酵母であっても自然界に存在するRM11-1a株は、この*AMII* 遺伝子を持っていることがゲノム配列情報からわかってきており、*AMII* 遺伝子は実験室レベルの菌株では必要ない遺伝子だが自然界では機能しており、細胞内の酸化還元バランスを保つのに役立っているのかもしれない。*AMII* のような遺伝子をターゲットにした育種を行えば、酸化還元バランスの変動に強い、ストレスに強い実用酵母が育種できるかもしれない。

おわりに

メタボローム解析は病気に関連したバイオマーカーや新規生理活性物質の同定、遺伝子組換えを含む植物品種改良にも有用であり³⁵⁾、すでに本稿で用いたCE-TOFMS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³⁶⁾。また、疾患メカニズムの解明にも利用され、がん細胞の代謝解析の結果を基にした抗がん剤の開発もなされるようになってきた³⁷⁾。さらに、すでに植物では報告されている³⁸⁾が、前半で紹介したようなメタボローム解析とトランスクリプトーム解析の組み合わせにより、細胞内の代謝の全体像を把握し、代謝の律速段階を同定し、その段階を改変することで目的物質の代謝を制御することが可能となってきた。今後は、このような手法が酵母や植物に限らずさまざまな微生物の育種に応用され、産業界に活かされていくことが期待される。さらに、下面発酵酵母について言えば、すでに下面発酵酵母の全ゲノム配列が報告されている¹⁶⁾ので、そこから下面発酵酵母特異的遺伝子を抽出し、さらにそれらの中

から醸造に有用となる遺伝子をマイクロアレイ解析・表現型解析などを用いて選抜することができる,そして,その遺伝子が関与するメカニズムを解明した後,その機能・代謝に注目して育種・改良することで,品質のより優れた新しい商品を提供することも可能となると思われる.今後も,今回紹介したメタボローム解析を使い,伝統的な育種法も取り入れることで,実用可能な株を創製することが期待される.

最後に,本稿で紹介させて頂いた研究はキリンホールディングス フロンティア技術研究所(旧キリンビール基盤技術研究所)の港 紀子,大内梨愛,石黒達治,水谷 悟,橋本 香,金井圭子,嶋田恵美子,小林 統,善本裕之と共に,キリンビールの今井健夫博士,杉原真麻氏,岡崎基礎生物学研究所の鎌田芳彰博士,慶應義塾大学の井元 淳氏,杉本昌弘博士,富田 勝教授,曾我朋義教授との共同研究で実施したものです.関係の皆様,この場を借りて深く感謝申し上げます.

文 献

- Soga, T., Ohashi, Y., Ueno, Y., Naraoka, H., Tomita, M., and Nishioka, T.: *J. Proteome Res.*, **2**, 488–494 (2003).
- Fiehn, O., Kopka, J., Dormann, P., Altmann, T., Trethewey, R. N., and Willmitzer, L.: *Nature Biotechnol.*, **18**, 1157–1161 (2000).
- Wilson, I. D., Nicholson, J. K., Castro-Perez, J., Granger, J. H., Johnson, K. A., Smith, B. W., and Plim, R. S.: *J. Proteome Res.*, **4**, 591–598 (2005).
- <http://www.metabolomicsociety.org/>
- Wishart, D. S., Tzur, D., Knox, C., Eisner, R., Guo, A. C., Young, N., Cheng, D., Jewell, K., Arndt, D., Sawhney, S., Fung, C., Nikolai, L., Lewis, M., Coutouly, M.-A., Forsythe, I., Tang, P., Shrivastava, S., Jeroncic, K., Stothard, P., Amegbey, G., Block, D., Hau, D. D., Wagner, J., Miniaci, J., Clements, M., Gebremedhin, M., Guo, N., Zhang, Y., Duggan, G. E., Macinnis, G. D., Weljie, A. M., Dowlatabadi, R., Bamforth, F., Clive, D., Greiner, R., Li, L., Marrie, T., Sykes, B. D., Vogel, H. J., and Querengesser, L.: *Nuc. Acids Res.*, **35** (Database issue), D521–526 (2007).
- 吉田 聡: 生物工学, **85**, 497–481 (2007).
- Yoshida, S., Imoto, J., Minato, T., Oouchi, R., Sugihara, M., Imai, T., Ishiguro, T., Mizutani, S., Tomita, M., Soga, T., and Yoshimoto, H.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **24**, 2787–2796 (2008).
- Yoshida, S., Imoto, J., Minato, T., Oouchi, R., Kamada, Y., Tomita, M., Soga, T., and Yoshimoto, H.: *Yeast*, **28**, 109–121 (2011).
- Yoshida, S., Hashimoto, K., Kanai-Tanaka, K., Yoshimoto, H., and Kobayashi, O.: *Yeast*, **24**, 1075–1084 (2007).
- 小野美代子: 醸造物の成分, p.222–225, 日本醸造協会 (1999).
- Thomas, D. and Surdin-Kerjan, Y.: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **61**, 503–532 (1997).
- Fujii, T., Yoshimoto, H., Nagasawa, N., Bogaki, T., Tamai, Y., and Hamachi, M.: *Yeast*, **12**, 593–598 (1996).
- Kodama, Y., Omura, F., and Ashikari, T.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 3455–3462 (2001).
- Tamai, Y., Tanaka, K., Umemoto, H., Tomizuka, K., and Kaneko, Y.: *Yeast*, **16**, 1335–1343 (2000).
- Yoshida, S., Hashimoto, K., Shimada, E., Ishiguro, T., Minato, T., Mizutani, S., Yoshimoto, H., Tashiro, K., Kuhara, S., and Kobayashi, O.: *Yeast*, **24**, 599–606 (2007).
- Nakao, Y., Kanamori, T., Itoh, T., Kodama, Y., Rainieri, S., Nakamura, N., Shimonaga, T., Hattori, M., and Ashikari, T.: *DNA Res.*, **16**, 115–129 (2009).
- Hansen, J. and Kielland-Brand, M. C.: *Nature Biotechnol.*, **14**, 1587–1591 (1996).
- Donalies, U. E. and Stahl, U.: *Yeast*, **19**, 475–484 (2002).
- Takahashi, T., Hojito, M., and Sakai, K.: *Bull. Brew. Sci.*, **26**, 29–36 (1980).
- 善本裕之, 港 紀子, 吉田 聡: バイオサイエンスとインダストリー, **64**, 27–28 (2006).
- Minato, T., Yoshida, S., Ishiguro, T., Shimada, E., Mizutani, S., Kobayashi, O., and Yoshimoto, H.: *Yeast*, **26**, 147–165 (2009).
- Farfán, M.-J., Aparicio, L., and Calderon, I. L.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 110–116 (1999).
- Gyllang, H., Winge, M., and Korch, C.: *Proc. Eur. Brew. Conv. Congr.*, 347–354 (1989).
- Tamai, Y., Momma, T., Yoshimoto, H., and Kaneko, Y.: *Yeast*, **14**, 923–933 (1998).
- 吉田 聡: 生物工学, **87**, 232–235 (2009).
- Gregory, J. C. and Boeke, J. D.: *Yeast*, **12**, 939–941 (1996).
- Ito, T., Chiba, T., Ozawa, R., Yoshida, M., Hattori, M., and Sakaki, Y.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 4569–4574 (2001).
- Tagwerker, C., Flick, K., Cui, M., Guerrero, C., Dou, Y., Auer, B., Baldi, T., Huang, L., and Kaiser, P.: *Mol. Cell. Proteomics*, **5**, 737–748 (2006).
- Kaiser, P., Flick, K., Wittenberg, C., and Reed, S. I.: *Cell*, **102**, 303–314 (2000).
- Bianchi, M. M., Ngo, S., Vandenbol, M., Sartori, G., Morlupi, A., Ricci, C., Stefani, S., Morlino, G. B., Hilger, F., Garignani, G., Slonimski, P. P., and Frontali, L.: *Yeast*, **18**, 1397–1412 (2001).
- Ness, F. and Aigle, M.: *Genetics*, **140**, 945–956 (1995).
- Gonçalves, P., Rodrigues de Sousa, H., and Spencer-Martins, I.: *J. Bacteriol.*, **182**, 5628–5630 (2000).
- Salema-Oom, M., Pinto, V. V., Gonçalves, P., and Spencer-Martins, I.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 5044–5049 (2005).
- Ohsumi, Y. and Anraku, Y.: *J. Biol. Chem.*, **256**, 2079–2082 (1981).
- 富田 勝・西岡孝明編: メタボローム研究の最前線, シュプリンガー (2003).
- Soga, T., Baran, R., Suematsu, M., Ueno, Y., Ikeda, S., Sakurakawa, T., Kakazu, Y., Ishikawa, T., Robert, M., Nishioka, T., and Tomita, M.: *J. Biol. Chem.*, **281**, 16768–16776 (2006).
- Hirayama, A., Kami, K., Sugimoto, M., Sugawara, M., Toki, N., Onozuka, H., Kinoshita, T., Saito, N., Ochiai, A., Tomita, M., Esumi, H., and Soga, T.: *Cancer Res.*, **69**, 4918–4925 (2009).
- Hirai, M. Y., Yano, M., Goodenowe, D. B., Kanaya, S., Kimura, T., Awazuhara, M., Arita, M., Fujiwara, T., and Saito, K.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 10205–10210 (2004).