

# ミトコンドリア輸送に着目したピルビン酸・ $\alpha$ -アセト乳酸 低減清酒酵母の育種とその実用化・技術移転

北垣 浩志

ミトコンドリアは太古、真核生物に好気性細菌が寄生し、現在は細胞内共生している酸素呼吸のための細胞内小器官である。元来寄生生物であるミトコンドリアは、宿主である酵母の栄養素を「盗み取る」はずだとの洞察に基づき、ミトコンドリア輸送に着目してピルビン酸および $\alpha$ -アセト乳酸の低減した清酒酵母の突然変異による育種に成功した。さらにその技術開発も進め、産業界への技術移転にも成功した。本特集では、オルガネラへの輸送に着目した世界で初めての発酵微生物の育種と実用化となった研究・技術開発例を紹介したい。

## 寄生生物のミトコンドリアは宿主の 栄養素の「盗み取る」装置を持つ

多くの生物がエネルギーを得るグルコースは分解されていく過程で電子を放出することから、生物はその進化の過程で、硫黄や窒素、鉄、炭素などさまざまな元素から成る化合物を電子受容体として用いてきた。しかし、植物が出現して酸素分子を発生し、大気中の酸素分子濃度が高まると、酸化還元電位差の大きい酸素分子→水分子の反応を電子を受容するために用い、プロトンの浸透圧ポテンシャルとして蓄積する好気性原核生物が出現した。真核生物自体は依然としてこのシステムを持っていなかったが、上記の好気性原核生物を捕食した、もしくは感染された真核生物の中には、好気性原核生物を細胞内に共生させたものが現れた。この新しい真核生物は、細胞質の代謝で産生した還元力を捕食した原核生物の電子伝達系を通じて酸素分子に受け渡しプロトンの浸透圧ポテンシャルとしていったん蓄積したのち、ATPの高エネルギーリン酸結合ポテンシャルに変換するエネルギー効率の良いシステムの構築に成功し、細胞内共生原核生物を持たない真核生物を駆逐した。その感染、もしくは寄生し、その後細胞内共生している原核生物こそが、現在のミトコンドリアであると考えられている。

複数の異なる微生物を一緒に培養していると、培地に存在する栄養素を競争して取り合うことが観察される。一方、酵母のゲノム情報を調べると、寄生した原核生物の原形質膜に相当するミトコンドリアの内膜に局在するアミノ酸や有機酸、鉄イオンなどの栄養素を取り込むた

めの輸送体の遺伝子が多数含まれている<sup>1)</sup>。上記のことを考えると、これらのミトコンドリア輸送体は、ミトコンドリアが宿主である酵母の栄養素を「盗み取る」ための装置であると考えられた。

これまで筆者は清酒酵母のミトコンドリアにGFPをターゲットして清酒醸造中に観察することで、酵母ミトコンドリアが清酒醸造の最後まで存在することをすべての産業的なアルコール発酵で初めて明らかにしてきた<sup>2,4)</sup>。さらに、ミトコンドリアの断片化に関わる因子を遺伝子破壊し、ミトコンドリアの形態が網目状になった清酒酵母を作製して清酒を醸造し、その有機酸組成を解析することで清酒醸造中の酵母ミトコンドリアの形態が物質代謝に積極的な役割を持つことを明らかにし<sup>5,6)</sup>、酵母の発酵から呼吸に移るときに、ミトコンドリアへの物質の輸送が律速になることを明らかにしてきた。以上のことをすべて総合すると、清酒醸造の最後まで存在するミトコンドリアへの物質輸送に着目した育種、すなわち「ミトコンドリアによる物質の盗み取り」に着目した清酒酵母の育種が可能なのではないかと考えた。

## ピルビン酸および $\alpha$ -アセト乳酸の低減は 酒類醸造技術における長年の技術課題であった

清酒を含む酒類醸造において、ピルビン酸の残存はさまざまな問題を引き起こす。たとえば清酒の上槽前のアルコール添加時にピルビン酸濃度が高いと、ピルビン酸がアセトアルデヒドに脱炭酸され木香様臭を呈するようになる<sup>8)</sup>。また、酒類醸造中のピルビン酸濃度が高いときには細胞内においてピルビン酸の2位のカルボニル炭素がヒドロキシエチル-チアミンピロリン酸により求核攻撃を受けることにより新たな炭素間結合が形成されることで $\alpha$ -アセト乳酸が生合成され<sup>9)</sup>、細胞外に漏出する。上槽などの操作によって酵母と発酵液が切り離されると、 $\alpha$ -アセト乳酸は貯蔵中に非酵素的酸化的脱炭酸により官能閾値の低いジアセチルとなり、ジアセチル臭を呈するようになる<sup>10)</sup>。清酒の醸造においてピルビン酸と $\alpha$ -アセト乳酸の比率はほぼ一定の比率を示す<sup>11)</sup>ことから、ピルビン酸の低減は酒類醸造において長年、重要な技術課題と認識され、多くの研究が行われてきた<sup>12)</sup>。

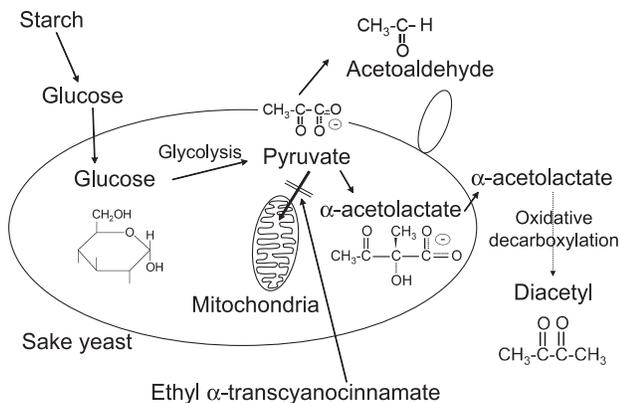


図1. ミトコンドリア輸送をターゲットとしたピルビン酸低減酵母の育種スキーム

### 「ミトコンドリアの盗み取り」に着目した ピルビン酸低減清酒酵母の育種

それまで、いくつかのミトコンドリアの研究グループによって、ピルビン酸のミトコンドリアへの輸送阻害剤として $\alpha$ -トランスシアノ桂皮酸エチルが使用されていた<sup>13)</sup>。ピルビン酸のミトコンドリアへの輸送を遮断すれば、ミトコンドリアが「栄養不足」になって細胞は死ぬと考えられる。この物質の存在下でも生き残る株は、ピルビン酸のミトコンドリアへの輸送が増強されているか、細胞質でピルビン酸を他の物質に変換してミトコンドリアに取り込む活性が強化された株だと考えられる。このような株では、ピルビン酸が減少すると同時に、ピルビン酸からの物質代謝が他の代謝に流れ、ピルビン酸周辺の物質代謝が変化しているのではないかと予想した(図1)。

そこで、まず清酒業界で最も使用されている「きょうかい7号」酵母を $\alpha$ -トランスシアノ桂皮酸エチルを含む培地で培養したところ、増殖を示さず、上記の現象が起きていると考えられた。そこで、きょうかい7号から $\alpha$ -トランスシアノ桂皮酸エチルへの耐性株を取得することにした。きょうかい7号にethyl methane sulfonate処理により突然変異を誘起し、 $\alpha$ -トランスシアノ桂皮酸エチルを含む培地で培養したところ、ほとんどの株はコロニーを形成しなかったが、約100万分の1の確率でコロニーが出現したので、これらを以後耐性株として解析した。それらの株を使って清酒を醸造し、ピルビン酸濃度を測定した。その結果、すべてではないがいくつかの株でピルビン酸が低減しているものがあつたので、ピルビン酸の低減しているひとつの株を選びだし、前培養から独立した6連の仕込で清酒を実験室スケール(総米83g)

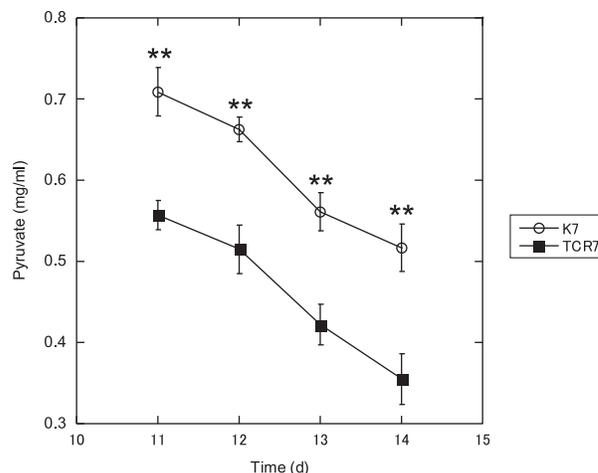


図2. 育種株とその親株の実験室スケールでの清酒小仕込時のピルビン酸濃度の推移. 総米83gの実験室スケールで前培養から独立した6連の仕込で清酒を仕込み、F-kit pyruvate (J. K. International社)を用いてピルビン酸濃度を測定した。結果は6点の測定結果の標本平均±標準誤差で表してある。\*\*は等分散を仮定しない片側 *t* 検定において  $p < 0.005$  で有意に育種株を使って仕込んだ酒のピルビン酸濃度が低減していた測定点を表す。

で仕込み、その上清のピルビン酸濃度を測定した。この $\alpha$ -トランスシアノ桂皮酸エチル耐性株で仕込んで清酒では、清酒醸造中、親株に比べてピルビン酸が統計的に有意に減少していた(図2, 片側 *t* 検定,  $p < 0.005$ )。このことから、実験室スケールの14日間において、ピルビン酸を低減するために発酵期間を2-3日短縮できることが明らかとなった<sup>14-17)</sup>。

### 育種したピルビン酸低減清酒酵母の実地醸造実証試験

より大きなスケールで $\alpha$ -トランスシアノ桂皮酸エチル耐性株のピルビン酸の低減性を確かめるために、清酒醸造蔵の協力を得て、親株のきょうかい7号とともに総米12kgで実地醸造実証試験を行うことにした。最初の12日間は開放タンクで醸造し、その後ビンにもろみを荒漉しして移してビン内で14日間二次発酵を行った。その結果、この中規模スケールの仕込みにおいても、 $\alpha$ -トランスシアノ桂皮酸エチル耐性株で仕込んだ清酒では親株のきょうかい7号で仕込んだ清酒と比べて顕著にピルビン酸濃度が低減していた(図3)。26日目でビンを開けて専門家により官能評価を行ったところ、その香味は問題のない良好なものであることが確認された。

さらに、この $\alpha$ -トランスシアノ桂皮酸エチル耐性株の取得という新規アプローチが他の清酒酵母にも適用できるかどうかを調べるため、吟醸酒醸造用の酵母であるF-4からも同様の手法で低ピルビン酸酵母を育種できる

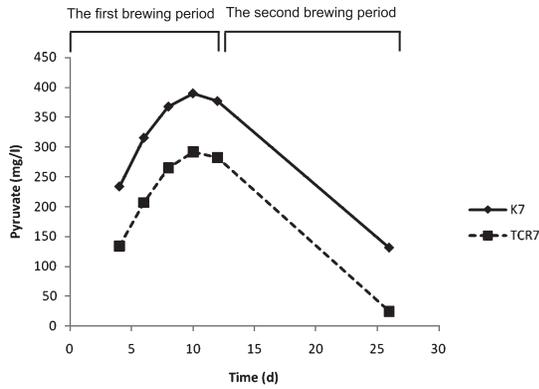


図3. 育種株 (TCR7) とその親株 (K7) の中規模パイロットスケールでの清酒仕込時のピルビン酸濃度の推移. 総米 12 kg で清酒を仕込んで14日間発酵させ、その後もろみを荒濾してビン詰めし12日間ビン内発酵させ、F-kit pyruvate (J. K. International社) を用いてピルビン酸濃度を測定した。

かを調べた。前述と同様の手法を用いて、F-4に突然変異を誘起させたのち、 $\alpha$ -トランスシアノ桂皮酸エチルを含む培地で培養して耐性株を取得した。それらの耐性株を用いて実験室スケール (総米 83 g) で清酒を仕込んだところ、いくつかピルビン酸の低減している株があったので、この株を用いて前培養から独立した6連の仕込みで清酒を同様に仕込んだ。その結果、 $\alpha$ -トランスシアノ桂皮酸エチル耐性株で仕込んだ清酒ではその親株と比べて調べたすべての清酒醸造期間中ピルビン酸が低減していた (最終日、片側  $t$  検定,  $p < 0.005$ )<sup>18)</sup>。このことから、 $\alpha$ -トランスシアノ桂皮酸エチル耐性株の分離によるピルビン酸の低減酵母の育種は、きょうかい7号だけではなく、他の酵母にも汎用性のある方法であることが明らかとなった。

**育種酵母を使った工業スケールの仕込で  
エタノール生産能の低下なくピルビン酸  
および $\alpha$ -アセト乳酸が顕著に低減している**

以上の研究結果から、育種した本酵母を用いれば実験室スケールおよび中規模パイロットスケールで清酒醸造におけるピルビン酸の低減が実現できることが明らかとなった。そこで、この育種した酵母が工場スケールでもピルビン酸や $\alpha$ -アセト乳酸の低減を示すかどうかを調べるため、清酒醸造蔵で総米1トンのサイズで本育種酵母 (F-4の $\alpha$ -トランスシアノ桂皮酸エチル耐性株F-4TCR1) とその親株 (F-4) を使って清酒を醸造した。その結果、F-4とF-4TCR1の発酵特性に差は認められなかったが、F-4TCR1では親株と比べて発酵全期間中を通じてF-4

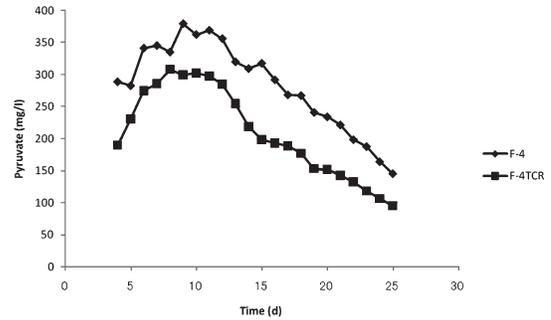


図4. 育種株 (F-4TCR) とその親株 (F-4) の工業スケールでの清酒仕込時のピルビン酸濃度の推移. 総米1トンで清酒を仕込んで25日間発酵させ、有機酸HPLC解析システムを用いてピルビン酸を測定した。

表1. 工業スケールで製造した清酒もろみでの $\alpha$ -アセト乳酸の濃度 (mg/l)

	9日目	14日目
F-4	0.28	0.08
F-4 TCR1	0.05	0.02

$\alpha$ -アセト乳酸は2,4-ジニトロフェニルヒドラジン誘導体化後液体クロマトグラフィーにより測定した<sup>11)</sup>。

表2. 工業スケールで製造した清酒もろみの25日目のエタノール濃度

	Ethanol (% v/v)
F-4	17.70
F-4TCR1	17.93

清酒もろみのエタノール濃度は、もろみをろ過したのち国税庁所定分析法により測定した。

と比べてピルビン酸の顕著な低減が認められた (図4)。また、発酵の9日目、14日目のもろみのジアセチルの前駆体となる $\alpha$ -アセト乳酸の含量を測定したところ、F-4TCR1ではF-4と比べて8割近くの顕著な低減が観察された (表1)。これらの結果から、F-4TCR1を使えば工業スケールで木香様臭の前駆体であるピルビン酸の、そしてジアセチルの前駆体である $\alpha$ -アセト乳酸の顕著な低減が可能であることが明確に示された。またF-4TCR1のエタノール生産能を調べるため、醸造期間中のもろみのエタノール濃度を測定したところ、F-4と醸造期間を通してほとんど差がなく、最終的なエタノール濃度もむしろF-4TCR1の方が高いものであった (表2)。さらに、その香味を客観的に検証するため、二点識別法により軽い酸味のする方をブラインドで親株と

F-4TCR1で醸造した清酒から選んでもらい二項検定を行った。その結果、危険率5%未満でF-4TCR1が選ばれたことから、F-4TCR1で醸造した清酒はF-4で醸造した清酒と比べて軽い酸味も持つことが明らかとなった。以上の結果から、工場スケールでピルビン酸・ $\alpha$ -アセト乳酸低減酵母の育種が有効かつ有用であることが明らかになった<sup>19)</sup>。これまでのピルビン酸低生産性酵母の育種は、ピルビン酸のアナログである $\beta$ -フルオロピルビン酸への耐性を指標に選択するものであり<sup>12)</sup>、エタノール生産性の低下も同時に引き起こしていたが、本研究で育種した酵母は工場スケールでエタノール生産性の低下を伴わずにピルビン酸の低減を可能とする初めての育種となった。

#### 育種したピルビン酸低減清酒酵母の醸造産業への技術移転

この育種した清酒酵母は上記の好ましい醸造特性を持つことがわかったため、すでに清酒醸造蔵において実製造に使われ始めている。また育種した酵母を使って、清酒の新しいジャンルであるスパークリング清酒を製造するビジネスプランは、佐賀ビジネスプランコンテストにおいて最優秀賞グランプリを受賞し、大学で産み出された知的資源を活用した地域醸造産業の振興事業として高い評価を受けた<sup>20)</sup>。今後、地域における産学官連携のモデルとして地域の醸造産業に貢献する研究が進展することが期待される。

清酒醸造中の酵母ミトコンドリアの解析という基礎的な研究から始まり、「清酒醸造中のミトコンドリアに栄養素を盗みとらせる」という新しい発想により、酒類業界において長年技術的課題になってきたピルビン酸・ $\alpha$ -アセト乳酸の低減という課題を解決し、さらにその技術の醸造産業への技術移転にも成功した研究例を紹介した。ミトコンドリアに限らず、オルガネラの輸送に着目した発酵微生物の育種はこれまでの発酵工学における育種の歴史の中でも考え方として前例がなく、発酵微生物の物質代謝を改変する上でひとつの重要なアプローチになっていくと考えられるので、新しい考え方として発酵

業界の皆様にも少しでも参考にしていただければ望外の喜びである。

本研究は日本学術振興会・科学研究費（若手研究B 21780078）、すかいらくフードサイエンス研究所、佐賀県地域産業支援センター・可能性試験と、さが農商工連携応援基金事業および九州地域バイオクラスター推進協議会・事業化案件発掘・支援事業の研究助成により行われたものである。

育種した酵母を使った清酒の仕込みや事業発案・立ち上げにご協力いただいた清酒醸造蔵、清酒酵母の育種や分析に鋭意取り組んでくれた佐賀大学大学院生の佐々木真君、分析や官能評価にご協力いただいた佐賀県工業技術センター・福岡県工業技術センターの皆様、産学官連携にご尽力いただいた佐賀大学産学官連携推進機構の皆様にも心から感謝したい。

#### 文 献

- 1) Palmieri, F. and Pierri, C. L.: *Essays Biochem.*, **47**, 37 (2010).
- 2) 北垣浩志：生物工学, **87**, 66 (2009).
- 3) Kitagaki, H.: *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **53**, 145 (2009).
- 4) Kitagaki, H. and Shimoi, H.: *J. Biosci. Bioeng.*, **104**, 227 (2007).
- 5) Kitagaki, H. et al.: *J. Biosci. Bioeng.*, **105**, 675 (2008).
- 6) 北垣浩志, 下飯 仁：醸協, **103**, 314 (2008).
- 7) Kitagaki, H. et al.: *J. Biol. Chem.*, **284**, 10818 (2009).
- 8) 土肥和夫ら：醗酵工学, **52**, 416 (1974).
- 9) Chuang, L. F. and Collins, E. B.: *J. Bacteriol.*, **95**, 2083 (1968).
- 10) 井上 喬：ジアセチル-発酵飲食品製造のキーテクノロジー, p.31, 幸書房 (2001).
- 11) 稲橋正明ら：醸学, **92**, 151 (1997).
- 12) 福田和郎ら：特願H10-179131
- 13) Paradies, G. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **935**, 79 (1988).
- 14) 北垣浩志：特願2010-111263
- 15) Horie, K. et al.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 843 (2010).
- 16) 北垣浩志：バイオサイエンスとインダストリー, **68**, 126 (2010).
- 17) 北垣浩志：醸協, **105**, 560 (2010).
- 18) 平田みよら：醸学, **106**, 323 (2011).
- 19) 佐々木真ら：生物工学, **89**, 222 (2011).
- 20) 北垣浩志ら：産学連携学会講演要旨集, p.170 (2011).