

清酒酵母のS-アデノシルメチオニン高蓄積メカニズム

水沼 正樹¹・金井 宗良²

はじめに

清酒酵母は、その他の醸造用酵母および実験室酵母と比較して、高アルコール発酵能などの醸造特性やS-アデノシルメチオニン (SAM) など、さまざまな栄養成分を多く蓄積する特性を持ち合わせている。しかし、清酒酵母のSAM高蓄積のメカニズムやその生理学的意義については不明な点が多い。筆者らはSAM高蓄積機構の解明を通して、SAM高蓄積酵母の育種、清酒酵母の醸造特性、さらにはアルコール高発酵メカニズムに資する知見を得ることを期待している。

SAMの応用展開のための課題

SAMは多様な機能性を有する成分であり、医学的臨床試験により、アルコール性肝機能障害、老人性認知症、鬱病、関節炎、一部のがんやAIDSといったさまざまな疾患に対し、予防および改善効果が報告されている。このような効用から、EU諸国においては処方箋薬として、またカナダや米国などではサプリメントとして地位を確立している。SAMの工業的生産は一般的に、SAMを高蓄積することが知られている酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) から抽出されているが¹⁾、培養に用いる培地成分として高価なアミノ酸の一つであるメチオニンが大量に必要であるため生産コストが高いうえに、酵母におけるSAMの蓄積機構については不明な点が多いなどの問題点がある。したがって、現状の課題として、酵母におけるSAM高蓄積機構の詳細な解明や、従来のSAM生産系よりも迅速かつ安価で大量生産が可能な培養系の構築などがあげられる。その解決策の一つとして、清酒醸造に用いられる清酒酵母が有する特性であるSAM高蓄積能の分子機構の解析を行い、その知見を利用して新規SAM高蓄積酵母の育種を行った。

SAM高蓄積に関する遺伝子の同定

清酒酵母のSAM高蓄積メカニズム解明のため、ある交雑株の塩基配列の多型アレルと形質 (SAM高蓄積能) の連鎖解析を行う遺伝統計学的手法であるQTL (quantitative trait locus: 量的形質遺伝子座) 解析を利用し、清酒酵母のSAM高蓄積能に寄与している遺伝子群をゲ

ノムワイドに調べた。具体的には、清酒酵母と実験室酵母の交雑株によるSAM高蓄積能のQTL解析を行った結果、清酒酵母が持つSAM高蓄積能に *YHR032W/ERC1* 遺伝子が関与していることがわかった²⁾。これまでに、*ERC1* は多剤排出トランスポーターと相同配列を持ち、エチオニン (メチオニンの構造アナログ) 耐性やSAM高蓄積に関与すると報告されている³⁾。

興味深いことに、*YHR032W* 遺伝子配列を清酒酵母と実験室酵母との間で比較すると、清酒酵母ではフレームシフト変異 (N545I) が生じ、これが清酒酵母のSAM高蓄積に大きく寄与していることが分かった^{2,4)}。実際、実験室酵母はSAMの蓄積がほとんど観察されないが、清酒酵母型の *YHR032W* 遺伝子を実験室酵母に導入したところ、SAMの高蓄積が観察された。さらに、実験室酵母に清酒酵母型の *YHR032W* 遺伝子を持つ株は酸化ストレスなどのストレス耐性の獲得や寿命延長が観察された⁴⁾。この寿命延長メカニズムは、SAM合成に必要なメチオニンとATPがSAM合成活性化により多く消費された結果、酵母AMP依存性プロテインキナーゼ (AMPK) である *Snf1* の高活性化によるものであった⁴⁾。AMPKは酵母からヒトにまで高度に保存されたキナーゼで、細胞内のエネルギー状態をモニターし、グルコース欠乏などで細胞内ATP量が不足すると、異化作用を促進し寿命延長にも関与することが知られている。

以上の結果から、実験室酵母の *YHR032W* 遺伝子は機能を失い、清酒酵母の *YHR032W* 遺伝子はその機能を有していることが分かった。清酒酵母はSAM高蓄積と連動した形で清酒醸造中の過酷なストレス環境下に適応し、一方、実験室酵母は細胞増殖 (同化) が活発な株が選抜されてきた結果、清酒酵母型の *YHR032W* 遺伝子のような異化作用するものは機能欠損したと推察される。

SAM蓄積に関する新規遺伝子の同定

次に、実験室酵母を用いて、酵母のSAM高蓄積に寄与する新規遺伝子の同定を試みた。酵母にSAMを高蓄積させるためには、培養に用いる培地へSAMの前駆体であるメチオニンの添加が効果的である。そこで、酵母において高濃度のメチオニンに対して耐性を示す株を取得し、その原因遺伝子 (変異) を同定することができれば、

著者紹介 ¹ 広島大学大学院統合生命科学研究科生物・生命科学分野 (教授) E-mail: mmizu49120@hiroshima-u.ac.jp

² 独立行政法人酒類総合研究所 (主任研究員) E-mail: kanai@nrib.go.jp

その変異は、酵母細胞内へ取り込まれる過剰のメチオニン効率良くSAMへと変換させることを可能とする遺伝子であると仮説を立てた。実験室酵母の非必須遺伝子破壊株セット (BY4742株由来) の約5,000株を用いて、親株において顕著に増殖が抑制されたメチオニン濃度 (60 mM) をメチオニン耐性株取得の際の指標としてスクリーニングを行った。その結果、顕著に増殖が良好となったメチオニン耐性株を128株取得した。次に、この128株のメチオニン耐性株について、SAM高蓄積培地 (O培地: グルコース5%, ペプトン1%, 酵母エキス0.5%, KH_2PO_4 0.4%, K_2HPO_4 0.2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, L-メチオニン0.15%)¹⁾で振とう培養し、30°C, 48時間培養した時のSAM蓄積量を測定した。その結果、酵母のSAM高蓄積に寄与する新規遺伝子の一つとして、*ADO1* 遺伝子を同定した⁵⁾。

次に、親株 (X2180-1A株) とその*ADO1* 遺伝子破壊株 ($\Delta adol$ 株) を用いてSAM高蓄積にどのような遺伝子の発現が関与しているか網羅的に調べるため、DNAマイクロアレイ解析を行った (図1)。

その結果 (30°C, 9時間の振とう培養), 親株と比較し、 $\Delta adol$ 株において発現が2倍以上に増加した遺伝子は、SAM周辺の代謝に関与する*MET6*, *SAM2*, *SAH1*, *MET13*, *MET17*, リン酸取り込みに関与する*PHO89*, *PHO5*, *PHO12*, *PHO11*, 糖取り込みに関与する*HXT1*, *HXT2*, *HXT3*, *HXT4*, *HXT6*, *HXT11*などがあつた。また、発現が0.5倍以下に減少した遺伝子は、リボソームタンパク質をコードする遺伝子群、銅結合性タンパク質をコードする*CUPI-1*, *CUPI-2*があつた。以上の結果から、 $\Delta adol$ 株では、SAM合成に関わる*SAM2*を含め、メチオニン合成経路の中でSAMの前駆体であるメチオ

ニンを合成する*MET6*や、SAMからメチル基が外れた代謝産物であるS-アデノシルホモシステイン (SAH) を水分解する*SAH1*が発現上昇しており、SAMの代謝を司るメチオニンサイクル経路全体が活性化していることが示唆された。また、リン酸および糖取り込みに関与する遺伝子の発現上昇の理由については不明であるが、 $\Delta adol$ 株では何らかの理由で細胞の中が一時的にリンおよび糖欠乏状態であると認識し、その結果として発現上昇しているのではないかと推測している。

次に、親株 (X2180-1A株) とその $\Delta adol$ 株を用いて30°C, 24時間の振とう培養におけるそれぞれのSAM周辺代謝産物量 (ホモシステイン, システイン, 無機リン酸, ポリリン酸, アデノシン) を分析した。その結果、ホモシステインは、 $\Delta adol$ 株のSAM蓄積量が最大になる培養24時間後の時点で大きく減少し、システインは、両株に大きな差はなかった。この結果は、 $\Delta adol$ 株ではメチオニンサイクルの活性化により、SAMの前駆物質であるホモシステインが過剰に消費され減少した結果だと推測している。一方、無機リン酸およびポリリン酸量については、 $\Delta adol$ 株では親株と比較して多く蓄積していた。この原因は不明であるが、 $\Delta adol$ 株におけるSAM合成活性化 (メチオニンとATPにより合成される) の際に副次的に生成する無機リン酸がポリリン酸の形で液胞に輸送・高蓄積した結果、細胞質におけるリン酸が欠乏の状態だと細胞が認識したものと推察することができ、これは先のDNAマイクロアレイの結果で見られた*PHO*遺伝子群の発現上昇とも合致した結果であった。アデノシンについては、 $\Delta adol$ 株菌体内のアデノシンは親株と比較して減少していたが、菌体外の培地中のアデノシンについては、親株と比較して $\Delta adol$ 株の方が増加していた。アデノシンは哺乳類において血液凝固の抑制や、炎症の抑制、睡眠への関与など、それ自身が重要な生理活性物質であることが知られているが、酵母細胞内での生理的な役割については不明な点が多い。 $\Delta adol$ 株では、アデノシンの代謝経路が断たれているため、菌体内にアデノシンが蓄積していると予想していたが、結果はむしろ減少していた。これは、 $\Delta adol$ 株ではアデノシンが菌体内に蓄積しないように積極的に細胞外にアデノシンを排出する機構が働いていることなどが予想されるが、詳細は不明である。

以上、 $\Delta adol$ 株を用いたDNAマイクロアレイ解析による遺伝子発現と、SAM周辺の代謝産物の分析結果から、*ADO1*破壊によるSAM高蓄積はメチオニン代謝経路の活性化により引き起こされていることが示唆された⁵⁾。

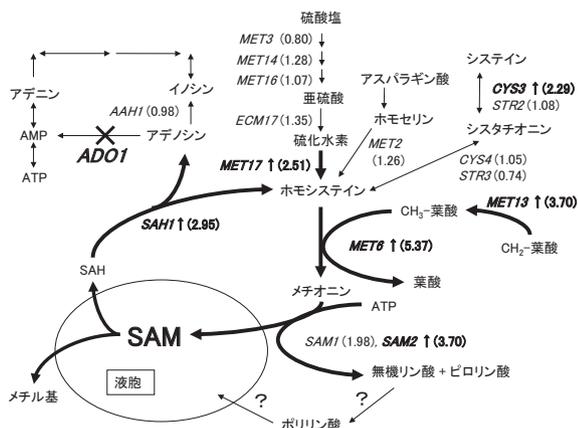


図1. $\Delta adol$ 株におけるメチオニン合成経路近辺遺伝子の発現挙動 (各遺伝子の括弧内の数字は、 $\Delta adol$ 株において親株と比較して、各遺伝子が何倍発現変動したかを示す)。

遺伝子組換え操作によらない*ADOI*機能欠損株の育種

SAM高蓄積株の産業利用目的の観点から考えると、*Δado1*株は遺伝子組換え体であることから、産業利用は難しい。そこで、清酒酵母を親株として使用し、遺伝子組換えによらない手法による*ADOI*変異株(SAM高蓄積株)の育種を試みた。具体的には、*Δado1*株がコルディセピン(Cordycepin, 3'-デオキシアデノシン)に耐性を示す性質を利用し⁶⁾、清酒酵母である、きょうかい7号酵母(K7)および9号酵母(K9)に紫外線照射を行い、コルディセピン耐性株を取得した。

コルディセピンは、滋養強壮薬として用いられる冬虫夏草(*Cordyceps sinensis*)特有の成分であり、RNAポリメラーゼの阻害剤としてRNA合成時に未成熟な終結を誘導することが知られている。また、プロテインキナーゼの阻害効果により、抗腫瘍、抗真菌性、抗ウイルス性薬品としても研究されている薬剤である。清酒酵母の一倍体(K7H893)の*ADOI*遺伝子破壊株(K7H893*Δado1*)によるコルディセピン耐性試験を行った結果、親株であるK7H893株はコルディセピン濃度が高くなるにつれて生育が悪くなるが、K7H893*Δado1*株ではコルディセピンに対して耐性を示し増殖阻害が見られなかった。したがって、今回の目的であるSAM高蓄積株(*ADOI*遺伝子変異株)を育種する戦略としてコルディセピンが使用可能であることが分かった。

そこでまず、菌株の育種を実施するにあたり、コルディセピン濃度の条件検討を行った。その結果、スクリーニングに使用するコルディセピン濃度を600 μg/mL、継代培養時間は生育が完全に阻害される3日間と設定し、さらに培養3日おきに新しい培地へ交換する継代培養を用いて育種を行うこととした。変異導入には紫外線照射を用いてスクリーニングを行った結果、K9から25株(NY9-1~25)、K7からは7株(NY7-1~9)のコルディセピン耐性株(育種株)を取得した。さらに、得られた育種株のSAM量の測定を行った結果、野生株と比較してすべての育種株でSAM蓄積量が高かった(Patent No. P5641192)。

次に、特にSAM蓄積量の高かった育種株NY9-10に着目し、親株(K9)と育種株(NY9-10)の*ADOI*遺伝子のシーケンスを行い、SAM蓄積に寄与する原因変異の同定を試みた結果、育種株における*ADOI*遺伝子の773番目の塩基C(シトシン)がT(チミン)に変異しており、アミノ酸では258番目のトレオニンからイソロイシンへのアミノ酸置換が生じていた。また、他の育種株(NY9-1, 4, 9, 24)についても*ADOI*遺伝子のシーケ

ンスを行ったところ、これらすべての育種株の*ADOI*遺伝子にNY9-10と同じ変異が入っていることが確認できた。したがって、コルディセピン耐性として取得されたSAM高蓄積育種株がSAMを高蓄積した原因の一つとして、*ADOI*遺伝子変異によるアデノシンキナーゼ活性の変化あるいは不活化の可能性が考えられる⁷⁾。

次に、DNAマイクロアレイ解析を行い、親株(K9)と育種株(NY9-10)の遺伝子発現レベルを調べた。親株と比較し、育種株において発現が2倍以上に増加した遺伝子は、メチオニン代謝系に關与する*MET14*、*MET13*、*MET2*、リン酸輸送に關与する*PHO84*、*PHO89*、アミノ酸分解に關与する*PUT1*、*ARO10*などがあった。また、発現が0.5倍以下に減少した遺伝子は、細胞周期の制御に關与する*SWE1*、*SWI4*、*GIN4*、*BUB1*、サイクリン依存性キナーゼである*CLN1*、*CLN2*、*CLN6*、細胞の分裂、増殖およびDNA複製に關与する*CDC45*、*UBI4*、*RNR3*などがあった。以上の結果より、硫酸塩からホモシステインを合成する経路の*MET14*、ホモセリンからホモシステインを合成する*MET2*の発現が上昇しており、育種株はメチオニン合成の基質であるホモシステイン量が増加している可能性が考えられる。しかし、上述した*Δado1*株のDNAマイクロアレイ解析で示されたメチオニン合成経路自身の活性化(*SAM2*、*MET6*、*SAH1*など)が観察されなかったことから、同じSAM高蓄積という表現型でありながら、*Δado1*株とNY9-10とでは異なる機構によりSAMを高蓄積していることが予想された。

さらに、清酒酵母親株(K9)と育種株(NY9-10)を用いて、メチオニン代謝系に關する各種代謝成分(ホモシステイン、アデノシン、SAH)の測定を行った。親株ではホモシステインが未検出なのに対して育種株では明確に検出された。この結果から、育種株は、メチオニン合成に必要なホモシステイン増加により能動的にメチオニンが増加し、それに伴いSAM生産量も増加した可能性が考えられる。アデノシン測定の結果、親株では経時的にアデノシンが増加しているが、育種株では、アデノシンが培養初期に多くその後経時的に減少していることが確認された。この理由については不明である。SAH測定の結果、親株ではほとんどSAHが確認できなかったのに対して、育種株ではSAHが顕著に増加していた。したがって、育種株にみられるメチオニンサイクル代謝産物(ホモシステイン、SAM、SAH)の増加は、ホモシステイン経路の遺伝子発現上昇によりホモシステインが増加し、能動的にホモシステインを代謝した結果、メチオニンサイクル代謝産物であるSAMやSAHが増加

したものと予想される。

以上より、コルディセピン耐性を示す育種株 (NY9-10) を用いたDNAマイクロアレイ解析の結果と、SAM周辺の代謝産物の分析結果を総合して考察すると、育種株はメチオニン合成の基質となるホモシステイン量が増加することでメチオニンの合成が活性化され、そのことで能動的にSAMの合成および蓄積量が増加したと考えられる。つまり、酵母のSAM高蓄積機構には多様な経路が存在することが示唆され、学術的にも産業的にも大変興味深い結果を得た。

育種株を用いた清酒小仕込み試験

応用展開として、K9と今回取得した育種株 (NY9-10) を用いた清酒小仕込み試験を行い、清酒醸造に適しているかどうか調べた。方法としては、総米400gの清酒小仕込み試験を行い、液部および固形部のSAM量を測定した。掛米は α 化米、麴は乾燥麴を用いて、各酵母3本ずつ仕込み、90%乳酸を240 μ l添加し、酒母としては麴エキス (ポーメ5) で培養した酵母を用いた。留後、1日に1 $^{\circ}$ C水温を上げ最高品温を15 $^{\circ}$ C \times 4日間とし、その後1日に1 $^{\circ}$ Cずつ温度を下げ、経時的に生成する炭酸ガスの放出による1日あたりの仕込みビン重量の減少が2g前後になったところで上槽した (留後19日目)。上槽はもろみを160 mLとり、遠心分離し、固形部と液部に分けた。分析項目としては、炭酸ガス減量、メチレンブルー染色率、アルコール度数 (蒸留後、振動式密度計で分析)、日本酒度 (振動式密度計で分析)、酸度・アミノ酸度 (国税庁所定分析法により同時に分析)、液部・固形部のSAM含量 (CEを用い分析) を分析した。結果、育種株においても通常レベルのアルコール量は生産され、一般成分値も親株と比較してほぼ変化がなかったことより、通常の清酒醸造が可能な菌株であることが分かった。一方、もろみ固形部のSAM含量について、育種株と親株との間に差は見られなかったが、液部のSAM含量は育種株の方が親株より有意に高く、もろみのSAM含量の総量は育種株の方が親株より高くなる傾向が示唆された。つまり、育種株は産業的にも有用な酵

母であり、応用展開としても高付加価値の付与が可能な魅力的な酵母であることが示唆された。

おわりに

清酒酵母とは、長い間清酒造りが行われてきた過程で、選抜されてきた醸造用酵母である。すなわち、その他の醸造用酵母と比べて、清酒造りにもっとも適した酵母であると言える。そのため、清酒を醸す微生物として生き残るためには、清酒酵母として、高発酵性、低温増殖性、乳酸耐性、香気成分高生成など、さまざまな特徴を備える必要があった。それが、原因か結果かは分からないが、近年、その他実験室酵母および醸造用酵母と比べて、清酒酵母がさまざまな機能性成分を有していることが明らかとなってきている。筆者らは、清酒酵母のエタノール生産などの醸造特性についてSAM高蓄積という視点からアプローチしていきたい。清酒酵母がなぜ清酒酵母になりえたのか、清酒酵母の機能性成分解析 (シグナル伝達と代謝産物との関連性) と醸造特性解析 (高アルコール発酵能など) との両面から清酒酵母の正体を明らかにし清酒酵母の魅力をもっと引き出すことで、その知見をもとに産業界への応用展開が今後も一層進むことを期待している。

謝 辞

本研究の一部は、公益財団法人発酵研究所および公益財団法人野田産業科学研究所、および科研費 (16H04898) の支援によって行われた。

文 献

- 1) Shiozaki, S. *et al.*: *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 2293 (1984).
- 2) Kanai, M. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **123**, 8 (2017).
- 3) Shiomi, N. *et al.*: *J. Ferment. Bioeng.*, **71**, 211 (1991).
- 4) Ogawa, T. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 11913 (2016).
- 5) Kanai, M. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **97**, 1183 (2013).
- 6) Iwashima, A. *et al.*: *FEMS Microbiol. Lett.*, **127**, 23 (1995).
- 7) Kanai, M. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **83**, 1530 (2019).