

ミトコンドリアをターゲットとした新たな醸造酵母育種の研究

北垣 浩志
(佐賀大学 農学部)

研究の目的

酵母ミトコンドリアは基本的には酸素呼吸のための細胞内小器官であるため、これまで酸素呼吸の起こらない酒類醸造における役割や存在の研究は非常に少なかった。従って、発酵産業における酵母ミトコンドリアの役割もほとんど研究されてこず、ミトコンドリアを直接のターゲットとした醸造酵母の育種も行われてこなかった。しかし近年、我々のグループによる解析の結果、酒類醸造においても酵母ミトコンドリアが最後まで存在することが明らかになった¹⁾。ミトコンドリアは酸素呼吸だけではなく、さまざまな生物学的イベントの場でもある。そこで、発酵産業における酵母ミトコンドリアの研究を行うことで、発酵産業で取られる工程での酵母ミトコンドリアの役割が明らかになったり、ミトコンドリアをターゲットとした、まったく新しい発想の醸造酵母の育種が可能になるのではないかと考え、研究を開始した。

方法

1. 発酵から呼吸への転換における酵母ミトコンドリアの役割の解明

実験室株JK93d⁻を用いた。酵母はYPD培地にOD₆₀₀=0.1の濃度で接種し、振盪して30℃で培養して4時間後、24時間後にサンプリングした。ミトコンドリアDNAの欠落は、盛んに増殖している酵母を 2×10^6 cells/mlの濃度に1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose, 50 mM potassium phosphate, pH 6.24に懸濁し、50 μMのEthidium bromideを加えて遮光して30℃で8時間培養し、YPDプレートに塗布し30℃で2日間培養することによって行った。非発酵性糖を含むプレートでの非増殖性により呼吸能の欠損を確認した。

RNAの抽出・精製は、酵素による溶菌の後、QiagenのRNeasy RNA Isolation Kitを用いて行った。cDNAの合成とマイクロアレイへのハイブリダイゼーションはAffymetrix Expression Analysis Technical Manualに従って行った。全体のシグナルを2500になるようにnormalizationを行った。呼吸可能株の24時間における発現が300以上のもので、かつ24時間後の発現が4時間後の発現の2倍以上となった遺伝子を選抜し、発現値のLog₁₀値を取り、培養4時間後と24時間後の発現値の比率を計算してグラフにプロットした。

2. ミトコンドリアの形態をターゲットとする清酒酵母の育種

清酒酵母より孢子形成により取得した株で、発酵力が二倍体と同等の一倍体酵母No. 868を親株として用いた。FIS1遺伝子の破壊には、配列情報に基づいてPCRにより作成した破壊カセットを用いた。形質転換体は、100 μg/ml nourseothricinを含む培地で選抜した。またミトコンドリア可視化プラスミドを保持させるため、宿主ゲノム上のLEU2遺伝子の破壊を、配列情報に基づいてPCRにより作成した破壊カセットを用いて行っ

た。形質転換体を500 µg / mlのG418を含む培地で選抜を行った。清酒酵母の野生株における酵母ミトコンドリアの可視化には、山口大学赤田倫治教授にご供与いただいたRAK1536と基礎生物学研究所の岡本浩二博士にご供与いただいたpYX142-mitoGFP、Utah大学のShaw教授にご供与いただいたpRS413GPD-mtGFPを用いた。清酒は2 × 10⁹cellsの酵母を、60gの米と、23gの乾燥麹、45 µlの乳酸、200mlの蒸留水と混ぜて15 で14日間置くことで醸造した。有機酸含量の測定は電導度検出器CDD-10AとShim-pack SPR-Hを装着したHPLC LC-10AD（島津）で行った。

結果

1. 発酵から呼吸への転換における酵母ミトコンドリアの役割の解明

発酵産業においては、酵母の拡大培養工程を必ず伴う。この際、振盪培養で酵母を培養している企業は実態として非常に多い。このとき酵母は呼吸状態にあると考えられ、一方酒類醸造時には酵母は発酵状態にあると考えられる。このように、発酵産業で発酵と呼吸の状態をコントロールすることは非常に大事である。しかし、呼吸と発酵との転換の間で酵母ミトコンドリアがどのような役割を持っているかは明らかにされていない。

そこで、酵母ミトコンドリアDNAを欠落させ、発酵から呼吸の状態に酵母を移した時の酵母の遺伝子発現をゲノムワイドに調べた（図1）。

その結果、酵母ミトコンドリアの機能が健全な株に比べて、酵母ミトコンドリアDNAを欠落させた株では、発酵から呼吸への転換（diauxic shift）時の、遺伝子発現の変化が抑制されていた。すなわち、野生株において、発酵から呼吸への転換時に、発現が上昇する遺伝子群のうち、一部の遺伝子の発現上昇が、ミトコンドリアDNA欠落株では、抑制されていた。ミトコンドリアDNA欠落株で発現上昇が抑制された遺伝子群は、グルコース抑制される遺伝子群とは必ずしも一致していなかったため、ミトコンドリアDNAにコードされるミトコンドリアの機能は、発酵から呼吸への転換を特異的に制御すると考えられた。

以上の結果から、酵母が発酵から呼吸に代謝を移行させるときの遺伝子発現制御に、ミトコンドリアの機能が関与していることが世界で初めて示された²⁾。

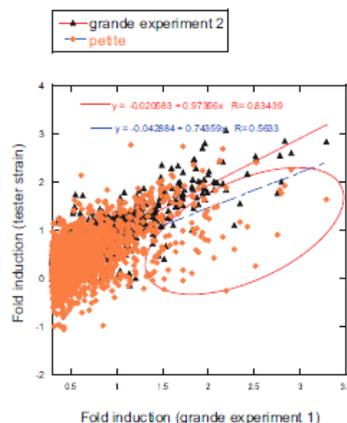


図1 呼吸可能株と呼吸欠損株の diauxic shift に伴う遺伝子発現の変化の比較

2. ミトコンドリアの形態をターゲットとする清酒酵母の育種

それまでの研究から、清酒醸造中に酵母ミトコンドリアは醸造途中で断片化していくことが観察されていた¹⁾。そこで、この知見を元に、ミトコンドリアの形態をターゲットとする新規な醸造酵母が育種できないかを調べた。

まず、清酒醸造中の酵母ミトコンドリアの断片化に必要な因子を調べた。ミトコンドリア外膜を貫通する膜たんぱく質である Fis1 をコードする *FIS1* 遺伝子破壊するとエタノールで誘導されるミトコンドリアの断片化が起きなかった³⁾ことから、遺伝子としては *FIS1* 遺伝子をターゲットとした。清酒酵母で *FIS1* 遺伝子を破壊し、得られた遺伝子破壊株のミトコンドリアの形態を栄養増殖条件下で調べたところ、栄養増殖条件下の実験室株と同じく⁴⁾網目状の形態になっていた。次にこの株を使って清酒を醸造してミトコンドリアの形態を調べた。その結果、清酒酵母野生株では酵母ミトコンドリアは清酒醸造初期ではフィラメント状であったが清酒醸造中に断片化していった(図2)のに対し、清酒酵母 *fis1* 破壊株ではミトコンドリアの断片化は起きず、網目状のまま清酒醸造の最初から最後まで推移した(図3)。

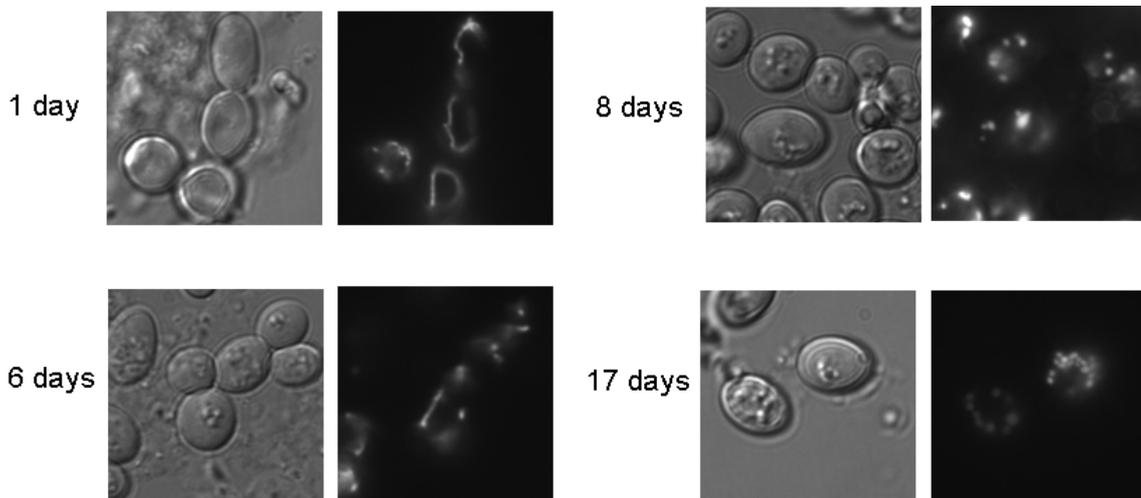


図2 清酒酵母野生株における清酒醸造時酵母ミトコンドリアの形態変化

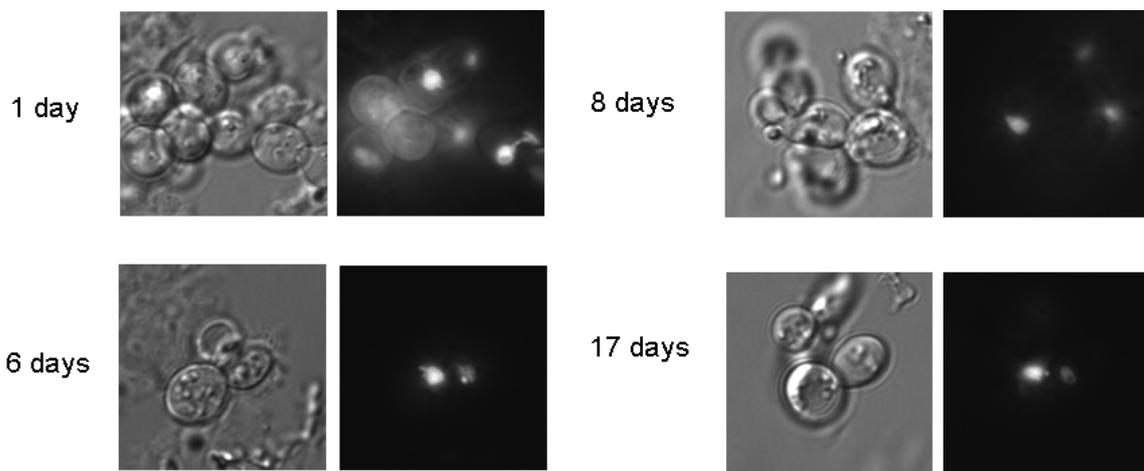


図3 清酒酵母 *fis1* 遺伝子破壊株の清酒醸造中の酵母ミトコンドリアの形態

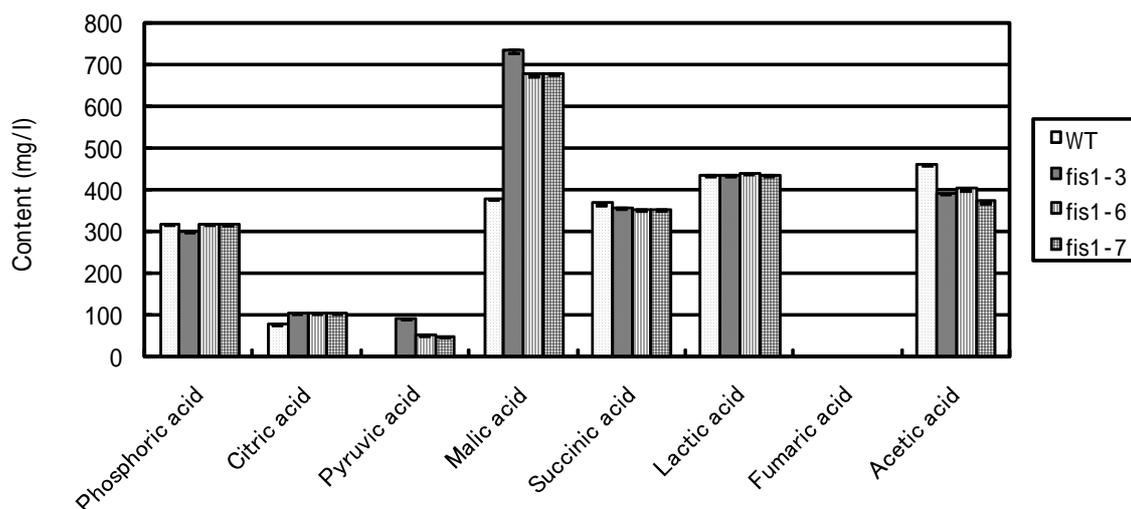


図4 清酒酵母野生株と *fis1* 遺伝子破壊株醸造清酒の有機酸組成

以上のことから、清酒醸造中の酵母ミトコンドリアの断片化には Fis1 が必須であることが明らかとなった。

次に、このミトコンドリアの形態変化が醸造特性にどのような影響を与えるかを調べるため、*fis1* 破壊株を用いて醸造した清酒の有機酸組成を測定して、野生株（親株）を用いて醸造した清酒と比較した。その結果、*fis1* 破壊株を用いて醸造した清酒中には、さわやかな酸味を持つとされるリンゴ酸が、2 倍近く多く存在し、オフフレーバーとされる酢酸は少なかった（図4）ことから、*fis1* 破壊株は、良好な醸造特性を持つ、優良な醸造酵母と考えられた。以上のことから、ミトコンドリアの形態が醸造酵母の育種のターゲットとなることが世界で初めて示された⁵⁻¹⁰。

結論

本研究により、(1) 発酵から呼吸への転換に酵母ミトコンドリアの機能が重要な役割を持つこと、及び(2) 酵母ミトコンドリアの形態が醸造酵母の育種のターゲットになりうること、が世界で初めて示された。

参考文献

1. Kitagaki H, Shimoi H. (2007) Mitochondrial dynamics of yeast during sake brewing. *J. Biosci. Bioeng.* **104**, 227-230.
2. Kitagaki H, Cowart LA, Matmati N, Montefusco D, Gandy J, de Avalos SV, Novgorodov SA, Zheng J, Obeid LM, Hannun YA. (2009) ISC1-dependent metabolic adaptation reveals an indispensable role for mitochondria in induction of nuclear genes during the diauxic shift in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **284**, 10818-10830.
3. Kitagaki H, Araki Y, Funato K, Shimoi H. (2007) Ethanol-induced death in yeast exhibits features of apoptosis mediated by mitochondrial fission pathway.

FEBS Lett. **581**, 2935-2942.

4. Okamoto K, Shaw JM. (2005) Mitochondrial morphology and dynamics in yeast and multicellular eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.* **39**, 503-536.
5. Kitagaki H, Kato T, Isogai A, Mikami S, Shimoi H. (2008) Inhibition of mitochondrial fragmentation during sake brewing causes high malate production in sake yeast. *J. Biosci. Bioeng.* **105**, 675-678.
6. 北垣浩志、三上重明、下飯仁、(2007) 酵母のリンゴ酸生産性を向上させる方法、特願 2007-320389
7. Kitagaki H. (2009) Mitochondrial-morphology-targeted breeding of industrial yeast strains for alcohol fermentation. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **53**, 145-153.
8. 北垣浩志 (2009) 清酒醸造における酵母ミトコンドリアの役割の解析とその育種への応用、*生物工学会誌*、**87**, 66-71.
9. 北垣浩志 (2008) 細胞内空間を制御する微生物育種、*生物工学会誌*、**86**, 238.
10. 北垣浩志、下飯仁(2008) 酒類醸造における酵母ミトコンドリアの役割とその育種への応用、*日本醸造協会誌*、**103**, 314-320.