

網羅的細胞形態解析による清酒酵母の高エタノール生産性に関する研究

渡辺 大輔
(酒類総合研究所)

研究の目的

清酒酵母は、分類学上は出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* に属する菌株群であるが、他の出芽酵母菌株と比べて清酒もろみにおいて高いエタノール生産性を示す。この現象に関わる新規メカニズムを明らかにするために、本研究では、出芽酵母の細胞形態情報をハイスループットに解析するための CalMorph システム¹⁾を用いて、清酒酵母細胞に固有の形態学的特徴を発見する。さらに、そのような細胞形態をもたらす遺伝子・変異を手掛かりとして、出芽酵母の発酵力の調節に重要な役割を果たす原因を明らかにする。

方法

YPD 培地において対数増殖期まで生育させた清酒酵母きょうかい 6 号、7 号、9 号、10 号及び実験室酵母 X2180 をホルマリン固定し、細胞壁・アクチン・核の三重染色後、CalMorph 解析に供した。

発酵試験については、50 ml の 20% グルコース含有 YPD 培地において初期植菌量 $OD_{660} = 0.1$ となるように各菌株を加え、30℃で静置培養した。清酒小仕込試験については、40 g の α 化米、10 g の乾燥麹、20 μ l の 90% 乳酸、80 ml の仕込水を混合し、初期植菌量 $OD_{660} = 1.0$ となるように各菌株を加え、15℃で静置培養した。発酵に伴い発生する二酸化炭素発生量を、ファーモグラフを用いて測定した²⁾。

細胞あたりの DNA 含量測定については、細胞をエタノール固定後ヨウ化プロピジウムにより染色し、フローサイトメーターにより蛍光強度を測定した。CLN3 mRNA 量の分析は、アクチンをコードする *ACT1* 遺伝子を内部標準とした定量リアルタイム PCR 法 (qRT-PCR 法) により行った。

結果

CalMorph システムを用いたハイスループット細胞形態解析の結果、対数増殖期の清酒酵母は実験室酵母とは異なる固有の形態学的特徴を有することが明らかになった。具体的には、未出芽の細胞の割合 (パラメータ C119) が少ない点や、出芽細胞における母細胞の長軸 (パラメータ C103_A1B) が短い点が見出された (図 1)。

これらの特徴はいずれも、細胞周期の G1 期が短い変異株と共通であることから、清酒酵母では G1 期の進行が亢進されていることが示唆された。

次に、発酵環境においても清酒酵母は細胞周期制御に何らかの異常を示すかどうか確認するため、20% グルコース含有 YPD 培地において発酵試験を実施し、発酵途中の酵母細胞の DNA 含量を測定した。その結果、実験室酵母と比べて清酒酵母は、対数増殖期においてだけでなく、発酵期においても G1 期の細胞の割合が低いことがわかった (図 2A)。また、G1 期サイクリンとして知られる CLN3 遺伝子の発現量についても、発酵期

間を通して清酒酵母は高い値を示した（図 2B）。通常、出芽酵母細胞は、増殖を終えると G1 期で細胞周期を停止することが知られているが、発酵途中の清酒酵母は G1 期停止に欠損を示すことが明らかになった³⁾。

このような清酒酵母における細胞周期調節の異常の原因を明らかにするために、近年報告された清酒酵母のゲノム情報⁴⁾を活用して、G1 期制御に関連していることが知られている遺伝子上の変異を検索した。その結果、細胞増殖後の G1 期停止に必須な役割を果たす Rim15p プロテインキナーゼの機能欠失を引き起こす新規のフレームシフト変異（*rim15*^{505insA} 変異）が同定された⁵⁾。ワイン酵母やビール酵母などを含む様々な実用酵母菌株についてこの変異の有無を調べたところ、興味深いことにきょうかい 6 号、7

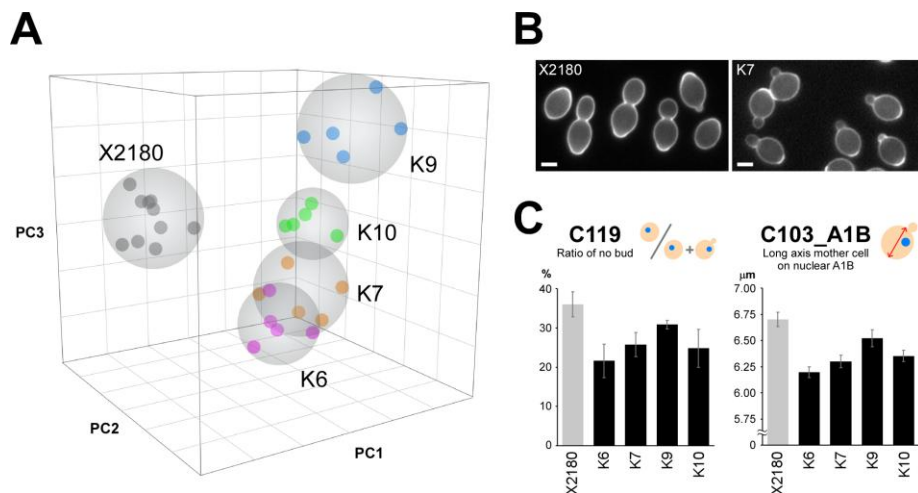


図 1 清酒酵母の形態学的特徴。(A) CalMorph データの主成分分析結果の 3 次元マッピング。各点は、1 回の実験に由来するデータ（200 以上の細胞の平均値）に対応する。清酒酵母きょうかい 6 号、7 号、9 号、10 号（K6、K7、K9、K10）及び実験室酵母 X2180 を実験に用いた。(B) 清酒酵母と実験室酵母の代表的な細胞形態。バーの長さは 3 mm に対応する。(C) 清酒酵母と実験室酵母間で有意な差を示した形態パラメータ。

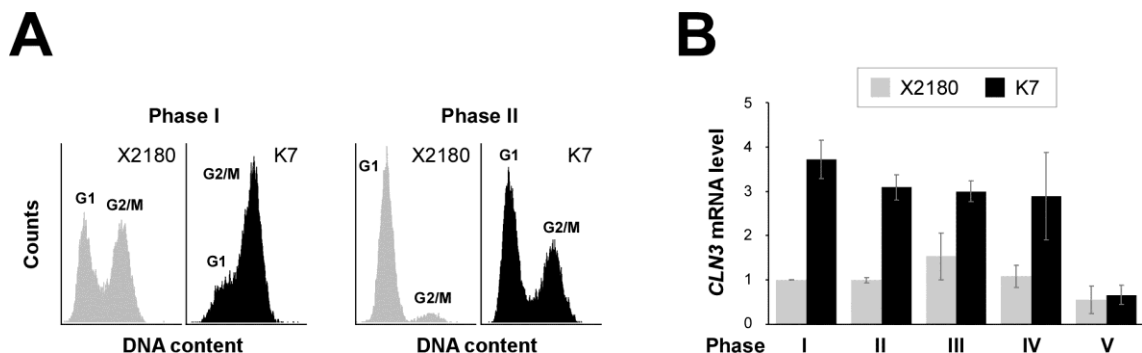


図 2 発酵条件における細胞周期関連解析。Phase I が対数増殖期、Phase II～IV が発酵期、Phase V が発酵終了時点に対応する。(A) DNA 含量。(B) qRT-PCR 法による *CLN3* mRNA の解析。相対発現量については、*ACT1* を参照遺伝子として、X2180 の Phase I における発現量に対する比を示す。

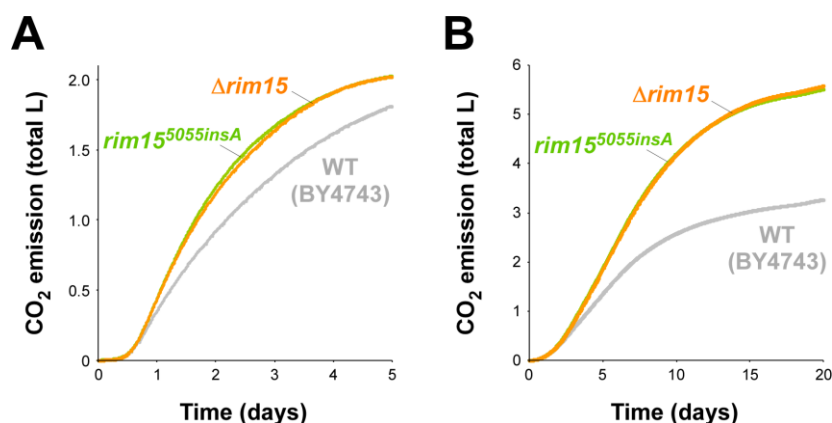


図3 Rim15p の機能欠損による発酵速度の改善。(A) 20%グルコース含有 YPD 培地における発酵試験。(B) 清酒小仕込試験。

号、9 号、10 号を含む清酒酵母菌株群にのみ特異的に分布することがわかった。さらに、清酒酵母において正常な *RIM15* 遺伝子を発現させると G1 期停止欠損の表現型が抑圧されたことから（データ省略）、この *rim15*^{5055insA} 変異が清酒酵母の G1 期停止欠損の原因であることが突き止められた。

最後に、清酒酵母の G1 期停止欠損が発酵力に及ぼす影響を明らかにするために、正常な *RIM15* 遺伝子を有する実験室酵母 BY4743 と、その $\Delta rim15$ 遺伝子破壊株・*rim15*^{5055insA} 変異株を用いて発酵試験を行った。その結果、Rim15p の欠損により発酵速度が有意に向上することが明らかになった（図 3）⁵⁾。さらに、清酒小仕込試験でも同様に発酵力の大幅な改善が見られ、発酵終了時のエタノール濃度は親株では 11.19 ± 0.17% であったのに対し、 $\Delta rim15$ 遺伝子破壊株では 17.03 ± 0.44%、*rim15*^{5055insA} 変異株では 16.76 ± 0.18% にまで達した。これらの結果から、清酒酵母に特異的なこの *rim15*^{5055insA} 機能欠失変異が高エタノール生産性をもたらす主要な原因であると結論づけられた。

結論

以上をまとめると、細胞形態学的解析手法を清酒酵母研究に新たに適用することにより、清酒酵母の新規表現型として G1 期調節の異常を見出し、その原因である *rim15*^{5055insA} 変異が、清酒酵母の高エタノール生産性を生み出した中心的な要因であることを解明した。今回の成果を含む清酒酵母の高発酵性原因変異の同定⁵⁻⁷⁾は、酵母の代謝プロファイルの人為的改変のために重要な知見を与えてくれるだろう。今後は、この Rim15p を介した細胞周期調節機構が発酵・エタノール生産を制御する分子メカニズムに関する研究の進展が期待される。

文献

- 1) 渡辺大輔, 大谷未稚, 森下真一, 大矢禎一. (2004) 画像解析に基づく網羅的な表現型解析. *細胞工学* **23**: 439-443.
- 2) Watanabe, D., Ota, T., Nitta, F., Akao, T., and Shimoi, H. (2011) Automatic measurement of sake fermentation kinetics using a multi-channel gas monitor system. *J. Biosci. Bioeng.* **112**:

54-57.

- 3) Watanabe, D., *et al.* (2011) Ethanol fermentation driven by elevated expression of the G1 cyclin gene *CLN3* in sake yeast. *J. Biosci. Bioeng.* **112**: 577-582.
- 4) Akao, T. *et al.* (2011) Whole-genome sequencing of sake yeast *Saccharomyces cerevisiae* Kyokai no. 7. *DNA Res.* **18**: 423-434.
- 5) Watanabe, D., Araki, Y., Zhou, Y., Maeya, N., Akao, T., and Shimoi, H. (2012) A loss-of-function mutation in the PAS kinase Rim15p is related to defective quiescence entry and high fermentation rates in *Saccharomyces cerevisiae* sake yeast strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**: 4008-4016.
- 6) Watanabe, D., Wu, H., Noguchi, C., Zhou, Y., Akao, T., and Shimoi, H. (2011) Enhancement of the initial rate of ethanol fermentation due to dysfunction of yeast stress response components Msn2p and/or Msn4p. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**: 934-941.
- 7) Noguchi, C., Watanabe, D., Zhou, Y., Akao, T., and Shimoi, H. (2012) Association of constitutive hyperphosphorylation of Hsf1p with a defective ethanol stress response in *Saccharomyces cerevisiae* sake yeast strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**: 385-392.