

# 発酵環境におけるプロリン資化抑制機構の解明と酒類醸造への応用

西村 明

奈良先端科学技術大学院大学 先端科学技術研究科

## 研究の目的

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、ワインなどの酒造に用いられる微生物であり、酵母による原料の資化（細胞への取り込みと利用）が、酒類の特性を決めている。特に窒素源の資化は、味や香りに影響を与える窒素源の代謝に直接関係し、酒質を決める重要な因子となっている。プロリンはワインの原料であるブドウ中に最も豊富に含まれる窒素源である。しかし、発酵中の酵母はプロリンをほとんど利用することができず、発酵後も多量に残存することが知られている<sup>1)</sup>。残存したプロリンは苦味の増加や酸味の減少を引き起こし、最終製品であるワインの酒質を低下させると考えられている。さらに、発酵中の窒素源枯渇を防ぐために、人工窒素源（アンモニウム塩など）の添加が必要となる。この添加物は、ワインの品質に影響を与えるだけでなく、製造コストの増加要因にもなっている。このため、プロリンは「最も無駄な窒素源」として認識されており、いかにしてプロリンを資化できるかという試みが30年以上前からなされてきたが、現在でも未解決のままである。

本研究では、実用ワイン酵母を用いて、プロリン資化の抑制に関与する遺伝子群の探索・解析を行うことで、プロリン資化抑制機構の解明およびプロリン高資化性酵母の創製を目指した。

## 方法

### 1. 菌株

本研究では、ワイン酵母 *S. cerevisiae* (Adelaide 大学・Walker 博士から供与) の野生株 (WT/WT) とプロリン要求性株 (*pro3Δ/pro3Δ*)、*cdc25<sup>Glu916</sup>* 変異株 (*cdc25<sup>Glu916Stop</sup>/cdc25<sup>Glu916Stop</sup>*) を使用した。

### 2. プロリン消費量の測定

各菌株を白ブドウ液体培地に OD<sub>600</sub>=0.1 になるように植菌した。30°C で静置培養（1回攪拌/day）または、振盪培養を開始して、経時的に培養上清を回収した。上清を 100 mM クエン酸リチウム緩衝液 (pH 2.0) で 4 倍希釈し、上清中のアミノ酸含量をアミノ酸アナライザー (JLC500/V2, 日本電子社) によって測定した。アミノ酸定量用の濃度既知スタンダードは、標準アミノ酸混合液 (和光純薬社) を用いた。

### 3. 白ブドウ培地で生育可能なプロリン要求性株の取得

*pro3Δ/pro3Δ* 株を白ブドウ固体培地に約 10<sup>10</sup> 個植菌した。30°C で 3 日間培養し、生育したコロニーを単離した。取得した変異体はフェノール/クロロホルムに懸濁し、ガラスビーズで破砕 (2,500 rpm, on/off: 30/30 sec, 9 cycles) を行った。DNA が含

有した水層を単離し、エタノール沈殿によってゲノムDNAを精製した。得られたゲノムDNAの全ゲノム配列解析をレリクサ社に委託した。

#### 4. cAMPレベルの測定

グルコースを添加し、5分、10分、30分後に細胞（OD<sub>600</sub> ユニット換算で 20）を回収した。5%トリクロロ酢酸（TCA）を添加した後、液体窒素によって急速凍結した。解凍後、遠心分離によって上清を回収し、上清中の cAMP 量を Cyclic AMP EIA kit（Cayman Chemical 社）を用いて測定した。

#### 5. PKA 依存的なリン酸化タンパク質の検出

PKA 依存的なリン酸化タンパク質は抗リン酸化 PKA RRxS/T ウサギ抗体（Cell Signaling Technology 社）を使用して、Western blotting 解析によって検出した。

### 結果

プロリン要求性株はプロリン資化が抑制される環境では生育できないため、プロリン要求性株を使用することでプロリン資化抑制に関与する遺伝子のスクリーニングが可能である。そこで、ワイン酵母のプロリン要求性株を親株として、白ブドウ培地でも生育可能な自然突然変異株をスクリーニングしたところ、2個の変異株を取得した。また、これらの変異株のプロリン消費を測定した結果、白ブドウ培地でもプロリン資化が可能であることがわかった。これらの変異株の全ゲノムDNAシーケンス解析を実施し、親株のゲノム情報と比較した。その結果、両者のゲノムのCDC25遺伝子にストップコドンが生じる同一のホモ変異が存在していることが判明した。Cdc25はグルコース応答に関わるGTPase involved in G-protein signaling in adenylate cyclase activation (Ras1/2) の制御因子として知られている。Ras1/2はcAMP産生酵素（Cyr1）を調節することで、Protein kinase A（PKA）活性を制御している。取得した変異株は活性部位であるRas-GEFドメインが削除された変異型Cdc25を発現するため、機能欠損型である可能性が考えられた。実際、野生株は白ブドウ培地で急激なcAMP含量の増加が見られるが、変異株では全く見られなかった。さらに、PKA依存的なリン酸化タンパク質の量も変異株で減少することがわかった。最後に、CRISPR/Cas9システムによって野生株にcdc25変異を導入した結果、野生株はプロリン消費が全く見られない一方で、cdc25変異株は有意にプロリンを消費することが判明した。

### 結論

本研究では、プロリン要求性株を利用して、プロリン資化抑制に関与する遺伝子の探索とその解析を行った。その結果、糖代謝の制御に重要な Cdc25/Ras/cAMP 依存性プロテインキナーゼ A シグナル経路がプロリン資化抑制を制御していることが判明した<sup>2)</sup>。以上より、酵母において糖代謝とプロリン代謝の密接なクロストークの存在が強く示唆された（図 1）。

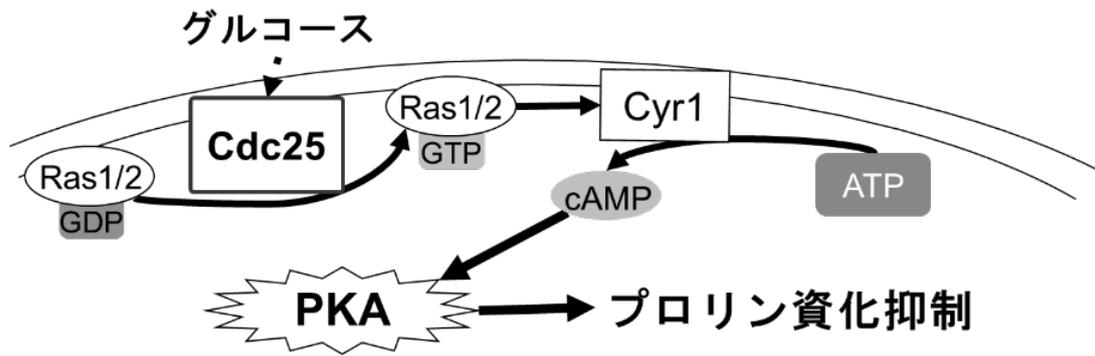


図 1 PKA 依存的なプロリン資化抑制機構

ワイン発酵条件に存在するグルコースは PKA 経路を活性化させ、プロリン資化を抑制している。

#### 文献

- 1) Valero, E., Millán, C., Ortega, J. M., and Mauricio, J. C. (2003) Concentration of amino acids in wine after the end of fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* strains, *J. Sci. Food Agric.* **83**: 830-835.
- 2) Nishimura, A. et al. The Cdc25/Ras/cAMP-dependent protein kinase A signaling pathway regulates proline utilization in wine yeast *Saccharomyces cerevisiae* under a wine fermentation model, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **86**: 1318-1326.