

第37回（平成21年度）研究奨励金受領者研究報告

分裂酵母コエンザイムQ合成不能株の表現型と硫黄代謝の関連性の解明

島根大学生物資源科学部生命工学科 戒能智宏

コエンザイムQ(CoQ)はユビキノンとも呼ばれ、古くから電子伝達系や酸化的リン酸化の必須因子として広く知られている物質であり、近年、CoQが脂質の過酸化防止や活性酸素の消去などにも関与することが見いだされた。これまでの研究により、分裂酵母のCoQ非生産株は高濃度硫化水素発生、呼吸欠損、酸化ストレス感受性、最少培地上での生育遅延などの表現型を示すことが知られている^{1,2)}。硫化水素は細胞内においてSulfideから発生すると考えられており、分裂酵母は*hmt2*にコードされるSulfide:quinone oxidoreductase(SQR)がSulfideの電子を最終的にCoQのようなキノンに供与することで酸化代謝する。しかし、分裂酵母のCoQ非生産株ではこの機構が機能しないため、Sulfideが過剰に蓄積され、高濃度硫化水素を発生すると考えられる(図1)。

分裂酵母においてSulfide代謝に関与する酵素はHmt2の他に、Sulfideを基質としてアミノ酸を生合成するCysteine(Cys) synthase(*cys1a*)とHomocysteine synthase(*met17*)、SulfideをSulfiteから合成するSulfite reductase(*sir1*)がある(図1)。CoQ非生産株に過剰のCysを添加すると、硫化水素発生と最少培地での生育遅延の表現型が抑制されることから、CoQと硫黄代謝系経路の関与が示唆される。そこで本研究では、CoQと硫黄代謝系の関係について解析するために、CoQ非生産株におけるCysおよびその他のアミノ酸類似物質による表現型の抑制と、各硫黄代謝関連遺伝子(*hmt2*, *cys1a*, *met17*)の遺伝子発現量の定量および高発現における表現型の抑制について検討した。

分裂酵母のCoQの側鎖を合成するデカブレンイル二リン

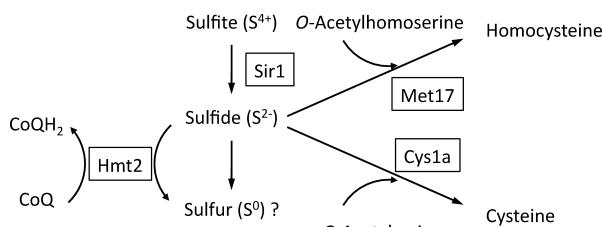


図1 分裂酵母Sulfide代謝とCoQの関係。

酸合成酵素遺伝子(*dps1*)欠損株であるLJ1030は最少培地で生育が遅延し硫化水素を発生するがCysの添加により表現型の抑制が見られる。同様の実験をHomocysteineとMethionine(Met)を用いて行ったところ、生育遅延は回復しなかったが(図2)、Homocysteineでは硫化水素発生の抑制効果がみられ、Metでは全く効果が見られなかった。また、*cys1a*をプラスミドで発現した場合、硫化水素発生の抑制は見られたが、生育の回復は見られなかつたことから、細胞内の硫化水素はCysへの代謝とCysの抗酸化能によることが示唆された。

次に、CoQ非生産株LJ1030のSulfide代謝関連遺伝子の発現解析を行った。野生株(PR110)とLJ1030をYES培地を用いて30℃で培養し、細胞が初期対数増殖期、後期対数増殖期、定常期の時の各遺伝子の発現量を定量

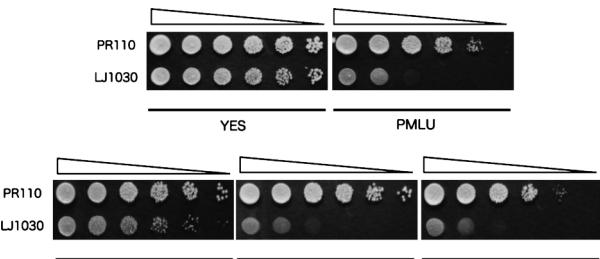


図2 含硫アミノ酸代謝産物の添加によるCoQ非生産株の生育。

野生株(PR110)とCoQ非生産株(LJ1030)は5倍ずつ段階希釈して、各寒天培地にスポットし30℃で培養した。

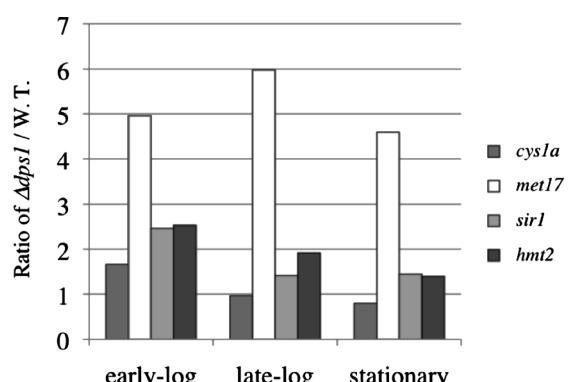


図3 CoQ非生産株におけるSulfide代謝遺伝子の発現量。野生株(PR110)とLJ1030をYES培地を用いて30℃で培養し、細胞が初期対数増殖期、後期対数増殖期、定常期の時の各遺伝子の発現を定量PCRを用いて測定した。CoQ非生産株の各遺伝子の発現量は、野生株の発現量を1とした時の相対値で算出した。

PCR を用いて測定した。CoQ 非生産株の各遺伝子の発現量は、野生株の発現量を 1 とした時の相対値で算出した。その結果、いずれの培養時期においても *met17* の発現量が野生株に比べて大きく上昇しており、Sulfide の代謝に寄与していることが示唆された（図 3）。一方、各 Sulfide 代謝関連遺伝子 (*cys1a, met17*) の高発現により Sulfide の発生が抑制されることから³⁾、細胞内の Sulfide の代謝制御には CoQ と Hmt2 の経路と Sulfide 代謝関連遺伝子 (*cys1a, met17*) の経路が密接に関与していることが示唆された。

今後は、CoQ 非生産株での代謝系における Cys と抗酸

化能としての Cys の役割に注目して、含硫アミノ酸代謝経路と CoQ の関係について詳細な解析を行っていきたいと考えている。

最後に、本研究を遂行するにあたり研究奨励金を賜りました財団法人農芸化学研究奨励会に感謝致します。

参考文献

- 1) M. Kawamukai. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **53**, 217 (2009).
- 2) R. Saiki, A. Nagata, N. Uchida, T. Kainou, H. Matsuda and M. Kawamukai. *Eur. J. Biochem.*, **270**, 4113 (2003).
- 3) M. Zhang, J. Luo, Y. Ogiyama, R. Saiki, M. Kawamukai. *FEBS J.*, **275**, 3653 (2008).

実用醸造酵母のミトコンドリアの可視化とその醸造過程における形態の解明

佐賀大学農学部 北垣浩志

緒論

ミトコンドリアは酸素呼吸のための細胞内小器官である。そのため、酸素呼吸を伴わない醸造におけるその役割はこれまで充分に検討されてこなかった。ミトコンドリアは細胞の生理的な状態に応じて急速かつ大きくその形態を変えることから、その形態には細胞内の状態に関する重要な情報が含まれている。そこで本研究者らは、ミトコンドリアにターゲットする GFP を清酒酵母で発現させ、清酒醸造においても酵母ミトコンドリアが存在し、その構造が断片化していくことを明らかにした¹⁾。この情報を元に、ミトコンドリア断片化を遺伝子組換技術により阻害することでリンゴ酸高生産酵母¹⁾の、ミトコンドリア輸送をターゲットとすることで突然変異によりピルビン酸低生産酵母の育種²⁾に成功してきた。このように、清酒醸造を酵母ミトコンドリアという新しい切り口で解析することにより、新たな清酒醸造の理解が生まれ、新しい発想の醸造技術の開発につながった。

しかしながら上記の研究は清酒醸造についての研究であり、他の伝統醸造食品の製造環境、例えば酢酸発酵や焼酎醸造におけるその挙動は解析の対象となっていました。これらの醸造食品の製造における酵母ミトコンドリアの形態を解析することで、新しい発想の醸造技術の開発につながる可能性がある。そこで、ミトコンドリアを GFP により可視化した清酒酵母を用いて、これらの醸造食品を製造し、それらの環境におけるミトコンドリアの形態を解析した。また、焼酎酵母などの他の醸造酵母でもミトコンドリ

ア GFP を可視化することを目指した。

実験方法

1. 実験材料

清酒酵母の *his3* 株に *HIS3* マーカーでミトコンドリアへ GFP をターゲットする pRS413-mitGFP を形質転換した株 (K7 *his3/his3* pRS413pGPD-mitGFP) を用いた。

酢酸発酵には酢酸菌 (*Acetobacter pasteurianus*, NBRC3283) を用いた。

焼酎醸造には白麹菌 (*Aspergillus kawachii*, NRIB SC60) を用いた。

2. 酢酸発酵

- 1) K7 *his3/his3* pRS413pGPD-mitGFP を 10 ml 試験管の中に CSM (-His) 2 ml を入れて植菌し、前培養を行った。
- 2) 前培養したものから 1.2 ml とって、CSM (-His) 60 ml を 300 ml フラスコに入れ 30℃, 24 h 振とう培養した。
- 3) 本培養済みのものから 2.0×10^9 cells 遠心して一回滅菌水で wash した。
- 4) 乾燥米 64.9 g 乾燥麹 6.00 g 水 212 ml 乳酸 48 µl を用意した。
- 5) 500 ml ピンに、4 と 5を入れてよく混ぜた。24 時間後に擡入れした。
- 6) 4, 5 日後、アルコールチェッカーで測りながら度数が 10.0% を超えたら滅菌水を 200 ml バッフル付きフラスコ (200 ml) を二つ用意してそれぞれに上澄みを 75 ml ずつ入れ、片方には酢酸菌を OD が 0.5 になるように入れた。
- 7) 200 rpm で振とう培養し、ミトコンドリアを経時的に観察した。

3. 焼酎醸造

吸水歩合 30% の米を 1 時間蒸し、放冷して白麹菌を摂