

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産まれ、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 μ l を用意した。
- 5) 500 ml ピンに、4 と 5 を入れてよく混ぜた。24 時間後に擽入れした。
- 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

取し 37°C で 3 日培養したものを焼酎麹とした。これを 20 g とり、米 63 g と水 200 ml と混ぜ、K7 *his3/his3* pRS413pGPD-mitGFP を 10^7 cells/ml 加えて 15°C で発酵させた。

4. メチレンブルー染色

- 1) メチレンブルー四水和物 0.4 g に対して滅菌水 20 ml で溶かした。死滅させた酵母 (98°C 20 分処理) をポジコンとして用いた。
- 2) 死滅後、緩衝液とメチレンブルーを各々 0.45 ml ずつ取ってその中に先ほど死滅させたサンプルを 100 μ l 入れ、それをボルテックスした。
- 3) 細胞を 25 μ l 取りトーマ氏血球計数盤に入れて、顕微鏡で観察した。
- 4) 計 50 区画を数えて、その区画内にいる酵母の菌数を数えた。生菌率は $\{(生菌数)/(トータル菌数)\} \times 100$ として計算した。

5. 酢酸濃度の測定

酢酸濃度は HPLC を使ったポストカラム誘導体化法により³⁾測定した。

実験結果

1. 酢酸発酵における清酒酵母ミトコンドリア GFP の挙動

まずエタノール 10% 程度の清酒を醸造し、水で半分に希釈してエタノール濃度を約 5% にした後、酢酸菌を添加して通気培養することにより酢酸発酵を行った。その結果、図 1 に示す通り培養時間に応じて酢酸が増えていくことがわかった。さらに酵母の生菌率を調べたところ、図 2 に示す通り、漸次的に、恐らく酢酸の影響で酵母の生菌率

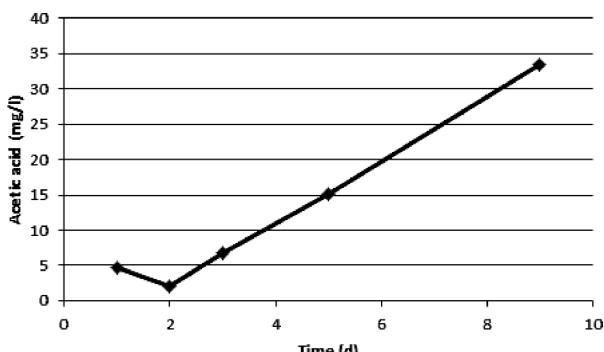


図 1 酢酸発酵時の酢酸濃度の推移。

ミトコンドリアを可視化した清酒酵母 (K7 *his3/his3* pRS413pGPD-mitGFP) と酢酸菌 (*Acetobacter pasteurianus*, NBRC3283) を混ぜて 37°C で振とう培養し、経時にサンプリングして酢酸濃度を測定した。

が低下していくことが明らかとなった。

酵母を経時にサンプリングしてミトコンドリア GFP を観察すると、酢酸菌を加えなかったもろみに対して、酢酸菌を加えたもろみから採取した酵母ではミトコンドリアが一か所に大きく固まっているような像が多く観察される傾向にあった (図 3)。

2. 酢酸添加が清酒酵母ミトコンドリア GFP に与える影響の解析

酢酸発酵中の酵母ミトコンドリアの形態の変化の要因を

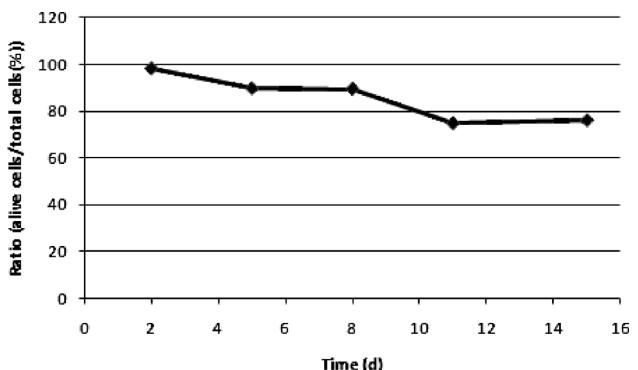


図 2 酢酸発酵時の酵母の生菌率の推移。

ミトコンドリアを可視化した清酒酵母 (K7 *his3/his3* pRS413pGPD-mitGFP) と酢酸菌 (*Acetobacter pasteurianus*, NBRC3283) を混ぜて 37°C で振とう培養し、経時にサンプリングして酵母の生菌率を測定した。

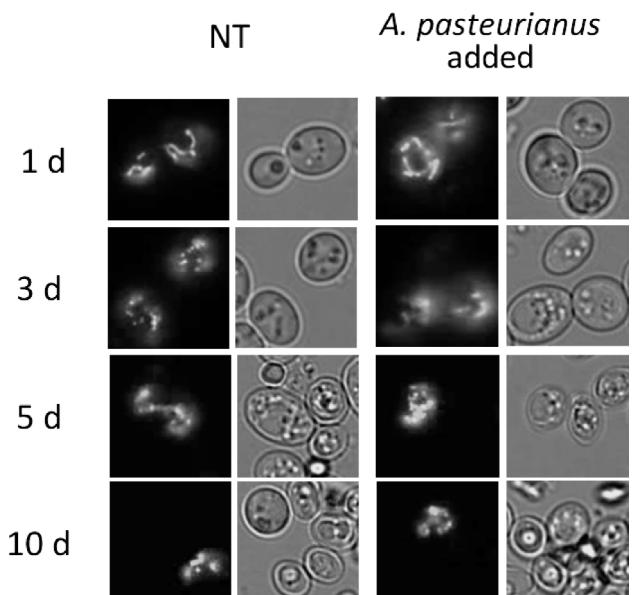


図 3 酢酸発酵時の酵母ミトコンドリアの形態。

ミトコンドリアを可視化した清酒酵母 (K7 *his3/his3* pRS413pGPD-mitGFP) と酢酸菌 (*Acetobacter pasteurianus*, NBRC3283) を混ぜて 37°C で振とう培養し、経時にサンプリングしてミトコンドリアの構造を観察した。

探るため、液体培地で培養した清酒酵母に酢酸の純品を添加してミトコンドリア GFP を観察した。

その結果、52.6 mM の酢酸を添加した酵母では、ミトコンドリアの細いフィラメント構造が崩れ始めた。87.8 mM の酢酸を添加した酵母では、ミトコンドリア GFP のシグナルを観察できる細胞自体が少なくなり、細いフィラメント状の形態が失われ、よりまとまった形態を示す細胞が多くなった。123 mM の酢酸を添加した酵母では観察できるすべてのミトコンドリア GFP で細いフィラメント状の形態をしているものはなくなり、すべての細胞で細胞内の一カ所に固まった形態のものばかりになった（図 4）。この結果から、酢酸自体が、ミトコンドリア GFP の形態に影響を及ぼし、細かい構造を失わせ、細胞内の一カ所に固まるような形態変化を引き起こすことが明らかとなった。

3. 焼酎醸造における清酒酵母ミトコンドリア GFP の挙動

焼酎の製造は、黒麹菌や白麹菌などの焼酎麹菌で行われ

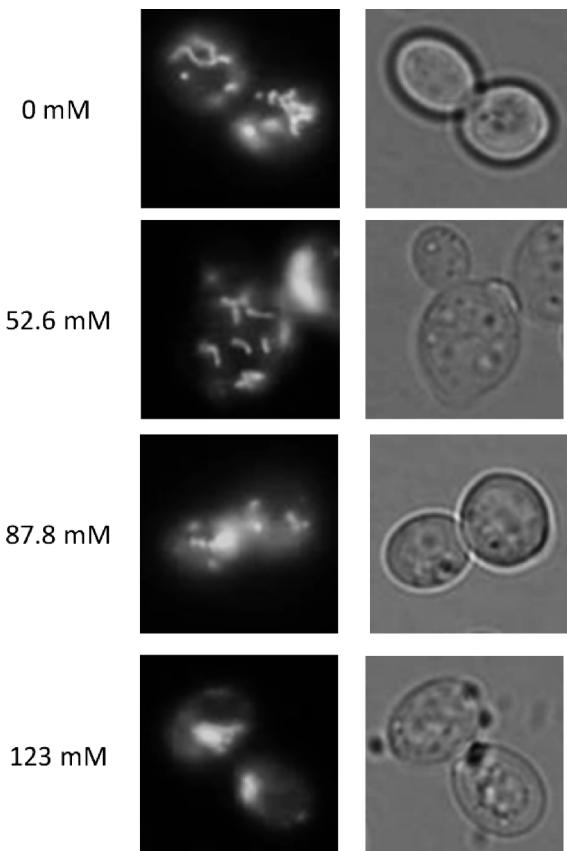


図 4 酢酸添加時の酵母ミトコンドリアの形態変化。
ミトコンドリアを可視化した清酒酵母 (K7 *his3/his3* pRS413pGPD-mitGFP) を CSM-His, glucose 培地で 30°C で振とう培養し対数増殖期でサンプリングしてミトコンドリアの構造を観察した。

る。焼酎麹菌は清酒醸造に使われる黄麹菌と異なりクエン酸を多量に生成するため、酵母が醸造中にさらされる環境は大きく異なると考えられる。そこで、焼酎麹菌のひとつである白麹菌で製造した麹でもろみを作成し、ミトコンドリアを可視化した清酒酵母で醸造を行った。エタノール濃度は発酵 26 日目で 6.0% であった。

その結果、最初の数日間と比べて後半のもろみではミトコンドリアの長さは若干短縮しているような傾向もあったが、ミトコンドリアは全体としてフィラメント状を維持していた。このことから、焼酎もろみに含まれる濃度のクエン酸は清酒酵母のミトコンドリアに大きな影響を及ぼさないと考えられた。

4. クエン酸が清酒酵母ミトコンドリア GFP に与える影響の解析

以上のことを探るために、クエン酸の濃度を変えてミトコンドリアを可視化した清酒酵母に加え、その形態を解析した。焼酎もろみ中のクエン酸濃度は 0.3-

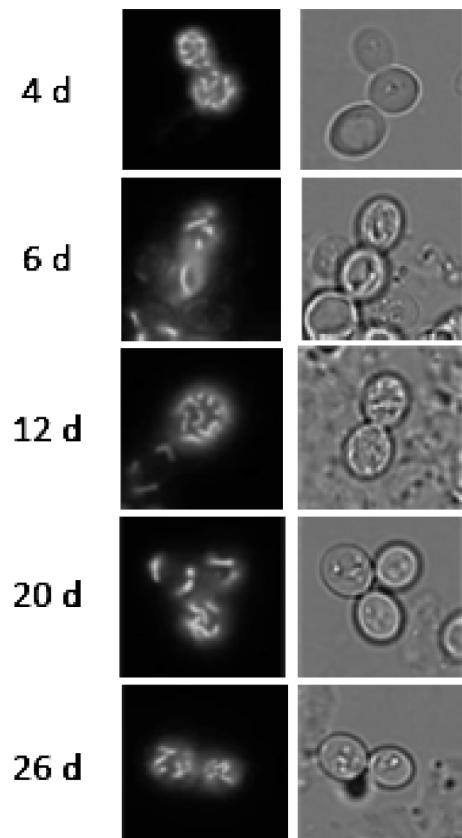


図 5 焼酎醸造工程における酵母ミトコンドリアの形態の解析。
焼酎麹菌 (*Aspergillus kawachii*) で焼酎麹を製造し米と水とミトコンドリアを可視化した清酒酵母 (K7 *his3/his3* pRS413pGPD-mitGFP) を混ぜ醸造させミトコンドリアの構造を観察した。

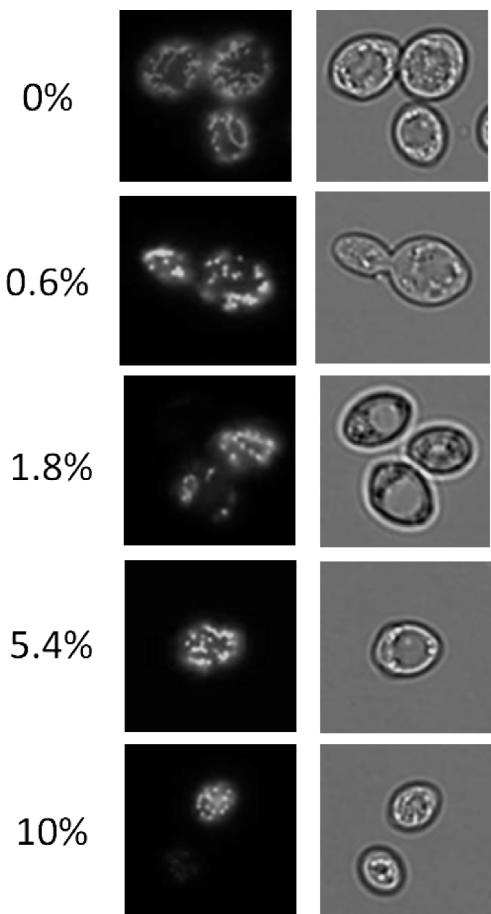


図6 クエン酸添加が酵母ミトコンドリアの形態に及ぼす影響の解析。

ミトコンドリアを可視化した清酒酵母 (K7 *his3/his3* pRS413pGPD-mitGFP) を CSM-His, glucose 培地で 30℃で振とう培養し対数増殖期でさまざまな濃度のクエン酸を添加しミトコンドリアの構造を観察した。

1.0% (w/v) であると報告されている⁴⁾ことから、0.067-10% (w/v) での濃度でクエン酸を与えて酵母ミトコンドリアを観察した。その結果、クエン酸濃度 0.067% (w/v), 0.2% (w/v) ではミトコンドリアはフィラメント状の形態を取っていたが、0.6% (w/v) ではミトコンドリア GFP の蛍光を発する細胞自体が少なくなりいくつかの細胞でミトコンドリアが断片化しており、1.8% (w/v) 以上では多くの細胞でミトコンドリアが断片化していた。これらのことから、0.6-1.8% (w/v) のクエン酸濃度で清酒酵母のミトコンドリアは断片化すると考えられた。焼酎もろみ中ではミトコンドリアの断片化が起きるかどうかの境界であるため、明確な断片化が起きないと考えられた。

5. 焼酎酵母におけるミトコンドリア GFP の可視化

実際に焼酎醸造に使われている焼酎酵母にミトコンドリア GFP を形質転換したほうが好ましいと考え、鹿児島大学の玉置尚徳准教授から焼酎酵母の *leu2* 遺伝子破壊株をご供与いただき、LEU マーカーを活用することで焼酎酵母へのミトコンドリア GFP のプラスミドの導入と焼酎酵母のミトコンドリアの可視化に成功した。しかしながら、この株を使って焼酎醸造中の焼酎酵母ミトコンドリアの形態を観察しようとしたところで助成期間の期限が来てしまい、この報告書にはデータを掲載することができなかつた。焼酎醸造中の焼酎酵母ミトコンドリアの形態については今年度の関連の学会でその詳細を発表する予定である。

ま と め

1. 酢酸発酵時に、酢酸の影響で清酒酵母ミトコンドリアは細いフィラメント状の形態から細胞内の一か所に集まつた形態になることが示唆された。
2. 清酒酵母のミトコンドリアは 0.6-1.8% (w/v) のクエン酸濃度で断片化するが、焼酎醸造中には大きな影響は受けないと考えられた。
3. 焼酎酵母におけるミトコンドリアの可視化に成功した。

謝 辞

研究助成を賜りました財団法人日本農芸化学研究奨励会に感謝いたします。焼酎酵母の *LEU2* 遺伝子破壊株をご供与いただいた鹿児島大学の玉置尚徳准教授に感謝いたします。また鋭意実験に取り組んでくれた、佐賀大学大学院生の徳永直也君と佐賀大学農学部生の高橋宏志朗君、福崎久詩君に感謝いたします。

参 考 文 献

- 1) 北垣浩志. 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 (2009).
- 2) 北垣浩志. ミトコンドリア輸送阻害剤耐性株取得によるピルビン酸低減清酒酵母の育種. 日本醸造協会誌, **105**(9), 560-567 (2010).
- 3) 佐々木 真, 大場孝宏, 末永 光, 稲橋正明, 佐藤真佐恵, 鶴田裕美, 小林元太, 柏植圭介, 吉村臣史, 小金丸和義, 北垣浩志. 吟醸酒製造用清酒酵母からのピルビン酸低生産株の育種と実製造でのピルビン酸及び α -アセト乳酸の低減. 生物工学会誌, **89**(5), 222-227 (2011).
- 4) 大森俊郎, 小川 清, 下田雅彦. 大麦焼酎もろみでの酵母のグリセリン生成に及ぼすクエン酸の影響. 生物工学会誌, **73**(2), 89-95 (1995).