

清酒醸造における山廃酒母由来乳酸菌のバイオフィーム形成

藤原 久志

(黄桜株式会社 研究所)

清酒醸造において、山廃酒母とは、水、蒸米、米麴を用いて、微生物遷移を利用して製造される開放条件下での酒母製造法のことである。しかしながら、その微生物管理が難しいことや製造期間が約1ヶ月かかることから、最近では醸造用乳酸を添加して雑菌の増殖を抑制する速醸酒母や、酒母そのものを省略し培養酵母と適量の乳酸を加える酵母仕込が主流となっている。その一方で、山廃酒母から得られる清酒酵母は醗経過をより安定に保つことができ、さらに山廃酒母で仕込まれた清酒は独特の香味を持つことから、自社商品の独自性をアピールできる。

我々は以前に、自社の山廃酒母から桿状乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* LP-2 株を分離し、これを用いて香味に特長を有する山廃酒母仕込清酒を醸造することに成功している¹⁾。最近我々は、この LP-2 株が清酒酵母と強固な共凝集体を形成することを見出した。そこでさらに、山廃酒母中における LP-2 株と清酒酵母の共存状態を調査し、共凝集およびバイオフィーム形成が山廃酒母および山廃仕込清酒の酒質におよぼす影響について検討したので、その結果を報告する。

乳酸菌は自社で分離した桿状乳酸菌 LP-2 株と *L. sakei* LS-4 株、それぞれの Type strain の *L. plantarum* NBRC15891、*L. sakei* NBRC15893 を用いた。清酒酵母については、協会7号 (K-7) と泡なし協会701号 (K-701) を用いた。山廃酒母製造試験は総米250gで実施し、その一部を用いて総米170gで山廃仕込清酒製造試験を実施した。

LP-2 と清酒酵母は、山廃酒母中で共凝集すると同時に、*in vitro* で混合種バイオフィームを形成した。この現象は、LS-4 株や *L. plantarum* NBRC15891、*L. sakei* NBRC15893 では見られなかった。また、共凝集反応は、K-7 より K-701 の方が顕著であった。共凝集反応は、低 pH (< 3.0)、熱処理した LP-2 株、D-mannose 存在下では発生しなかったため、この作用は酵母表面のマンナン層と乳酸菌表面のタンパク質との相互作用によると推測された。さらに、山廃仕込試験により、LP-2 株を用いた山廃酒母は *L. plantarum* NBRC15891 を用いた場合よりも酒母完成時の酸度が上昇し、製成酒も香味に違いが確認された。

1) 「山廃酒母からの桿状乳酸菌の分離と特徴」 藤原久志ら: 日本醸造協会誌, 108, 767-777 (2013)

窒素飢餓応答の制御・細胞表層改変による 酵母セルファクトリーの構築

黒田浩一

(京都大学 大学院農学研究科)

持続可能な社会の実現に向け、環境負荷を低減させながら物質生産を行うための技術開発が必要である。酵母などの微生物機能を利用した物質生産に期待が寄せられており、高効率に高付加価値産物を生産する細胞をいかにして作製するかが重要である。中間産物・最終産物が細胞毒性やストレスを示す場合や、最終産物が同化に用いられる場合には、物質生産のための代謝経路だけに着目した細胞デザインには限界がある。我々は酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の細胞表層に様々な機能性タンパク質を集積・提示する細胞表層工学の開発^[1] とともに、宿主細胞のストレス耐性を強化するストレス耐性工学と耐性機構の解明によってこれらの課題克服に取り組んできた。

アンモニアは食料生産に必須な肥料の原料として、また水素のキャリアーとして需要の増加が見込まれる。酵母によりアンモニア生産を行う際、酵母の窒素同化能が強く、従来の代謝工改変では細胞内で作られたアンモニアは同化に用いられてしまうことが問題であった。我々は、細胞表層工学により細胞外で生産させることにより、窒素同化を回避して食品廃棄物等から高効率なアンモニア生産を実現することができた^[2]。

イソブタノールなどの分岐鎖アルコールは優れたバイオ燃料の1つであるが、細胞毒性を示すため生産に用いる細胞自体の耐性強化が重要である。酵母 *S. cerevisiae* は元来エタノール耐性が高いものの、ブタノール類に対して高い耐性が見られず、その生育阻害機構についての知見は乏しい。我々は、イソブタノール耐性に重要な役割を果たす経路・遺伝子群を同定した。中でも、窒素源カタボライト抑制に関わる転写因子の欠損により、分岐鎖アルコール特異的に耐性が向上するというユニークな表現型を見出した^[3]。また、本耐性株と野生株の比較トランスクリプトーム解析より、耐性機構の解明とイソブタノールによる新たな細胞生育阻害を明らかにした。さらに代謝改変によるイソブタノール生産を行う際、本耐性株を用いることで生産量を約5倍に増大させることができ、代謝工学とストレス耐性工学が相乗的に機能することを示した^[3]。

[1] Kuroda, K. and Ueda, M., *Methods Mol. Biol.*, 1152: 137-155 (2014)

[2] Watanabe, Y. et al., *AMB Express*, 10: 70 (2020)

[3] Kuroda, K. et al., *Cell Systems*, 9: 534-547 (2019)

酵母発現系を用いたキネシン阻害抗癌活性物質の探索と その臨床研究

登田 隆*、湯川格史

(広島大学・統合生命科学研究科／広島健康長寿研究拠点)

酵母は基礎研究のみならず、産業界・医療方面においても重要かつ有用な生物である。本講演では、分裂酵母を用いた新規抗癌剤開発とその臨床研究への発展について紹介したい。癌治療に広範に用いられる微小管をターゲットとする薬剤化合物は、癌細胞だけでなく神経細胞等の正常細胞に対しても毒性があるため、副作用として重篤な神経障害を惹起するという深刻な問題がある。そこで微小管に代わる分子標的として、微小管結合タンパク質—とりわけキネシン分子—に着目した。キネシンは微小管を介してタンパク質・オルガネラなど積荷を運ぶモーター分子で、紡錘体形成や細胞極性制御等に関与する。幾つかのキネシン分子については阻害剤開発が進められているが、未だ実用化には至っていない。我々は、癌化に関与することが示されているヒトキネシン遺伝子を分裂酵母細胞内で過剰発現させ、キネシンの細胞機能を阻害する天然由来の新規生理活性物質を探索し、いくつかのヒットを得た。本アプローチはキネシン分子に限らず、広範な分子に対する特異的阻害剤開発法を提供する。

1. Akabane, S., Oue, N., Sekino, Y., Asai, R., Thang, P. Q., Taniyama, D., Sentani, K., Yukawa, M., Toda, T., Kimura, K. I., Egi, H., Shimizu, W., Ohdan, H., and Yasui, W. (2021) KIFC1 regulates ZWINT to promote tumor progression and spheroid formation in colorectal cancer. *Pathol Int* 71. DOI:10.1111/pin.13098.
2. Kurisawa, N., Yukawa, M., Koshino, H., Onodera, T., Toda, T., and Kimura, K. I. (2020) Kolavenic acid analog restores growth in HSET-overproducing fission yeast cells and multipolar mitosis in MDA-MB-231 human cells. *Bioorg Med Chem* 28, 115154.
3. Yukawa, M., Yamauchi, T., Kurisawa, N., Ahmed, S., Kimura, K. I., and Toda, T. (2018) Fission yeast cells overproducing HSET/KIFC1 provides a useful tool for identification and evaluation of human kinesin-14 inhibitors. *Fungal Genet Biol* 116, 33–41.

病原真菌アスペルギルスフミガタスの遺伝型解析

高橋弘喜

(千葉大学 真菌医学研究センター)

我が国を始めとする先進国では、医療技術の進歩により、致死率の高い真菌症の増加が重大な問題となっている。環境菌である *Aspergillus fumigatus* を主な原因菌とする肺アスペルギルス症は極めて難治であることから、効果的な治療薬の開発が求められている。主として用いられるアゾール系抗真菌薬に対しても、耐性菌株が出現していることから、その治療は益々困難となっており、新たな創薬標的の創出が課題である。

我々は、*A. fumigatus* の感染機構がその頑強な環境応答能と密接に関係していることに着目して、環境適応能を定量的に理解して新たな治療戦略の確立に繋げることを目指している。これまでに、臨床分離株の性状解析と NGS による全ゲノム解析を統合した手法で、感染中におこるゲノムの変化や表現形質が変化することを明らかにしてきた。計測した表現形質間で有意な相関はみられないことから、菌株ごとに多様な形質を示すことが見えてきた。そこで、表現形質がどのように変化しうるのか、そしてそれに連動して病原性はどのように変わっていくのかという視点での解析にも着手している。本発表では、我々が進めてきた解析結果について紹介したい。