

ビール醸造における下面発酵酵母の醸造特性と コピー数変化について

高橋 朋子

(アサヒクオリティードイノベーションズ(株) コアテクノロジー研究所)

ビール生産の大部分を占めるラガービールの製造に使用されている下面発酵酵母 *Saccharomyces pastorianus* は、低温での発酵が可能であり、発酵後期に凝集し酵母がタンク底へ沈むという特徴を有する。*S. pastorianus* は *Saccharomyces cerevisiae* と *Saccharomyces eubayanus* の両方の染色体を有する異質倍数性酵母であることが明らかとなっており、その起源は *S. cerevisiae* と *S. eubayanus* の自然交配であると考えられている。自然交配後、ビール醸造環境での馴化やビール醸造において利便性の高い株の選択等を経てその染色体は様々に変化し、現在の *S. pastorianus* は異数性であることが知られている。

ビール醸造において、発酵工程では、酵母は麦汁からエタノールや香気成分、その他多くの化合物を生成する。こうした発酵生成物はビールの味を決める重要な要素であるが、その量や組成は酵母の種類や酵母の状態に影響を受けるため、酵母はビールの品質を特徴づける重要な役割を担っている。一方で、下面発酵ビールの製造においては、*S. pastorianus* の酵母の凝集性を活用し、沈降した酵母をタンク底から回収し、次の発酵へ繰り返し使用することで効率的な製造を実現している。こうした下面発酵酵母特有のハンドリングに加え、上述した *S. pastorianus* の異質倍数性や異数性といった複雑な染色体構造が要因となり、糖消費速度や香気生成、凝集性といったビール醸造に重要な醸造特性に変化が生じることがある。安定して高品質なビールを製造するためには、こうした醸造特性変化の発生を抑える必要があり、アサヒグループでは安定的なビール醸造を目指して、酵母ハンドリング技術や醸造特性の変化した酵母の早期検出技術の開発に取り組んできた。

本研究会では、実際にビール醸造に使用した下面発酵酵母の網羅的解析から、染色体のコピー数変化と主要な醸造特性である凝集性の変化に関連性を見出した研究について紹介したい。

出芽酵母におけるホスファチジルセリン脱炭酸酵素 1 (Psd1)

制御機構の解析

宮田 暖

(国立感染症研究所 細胞化学部)

小胞体とミトコンドリアは、主要なリン脂質合成を担う細胞小器官であり、細胞内リン脂質恒常性維持において重要な役割を有している。ホスファチジルセリン (PS) 脱炭酸酵素 Psd1 は、出芽酵母において主要なホスファチジエタノールアミン (PE) 合成を担っている。Psd1 はミトコンドリア内膜に局在しており、Psd1 の基質となる PS の合成酵素 Cho1 は小胞体に局在することから、Psd1 を介した PE 合成は、PS の小胞体からミトコンドリア内膜への輸送に依存すると考えられてきた。しかし近年、Psd1 がミトコンドリア内膜に加え、一部が小胞体にも局在し、小胞体-ミトコンドリア間 PS 輸送に依存せずに PE を合成する可能性が示唆されている。このことから現在、小胞体、ミトコンドリアにおけるリン脂質代謝、輸送機構に関するこれまでのモデルについて再検討の必要に迫られている。本研究では、出芽酵母を用いた遺伝学的スクリーニングにより、Psd1 を介した PE 合成に影響する因子の探索を行った。その結果、小胞体膜タンパク質 Ice2 の欠損が Psd1 を介した PE 合成を低下させることを見出した。また、Ice2 欠損酵母における PE 合成の低下は、小胞体局在型 Psd1 量の低下に起因していた。ごく最近、Ice2 は、ホスファチジン酸 (PA) ホスファターゼ Pah1 の制御因子 Nem1/Spo7 の活性を抑制することで、Pah1 活性を負に制御することが報告されている。Nem1 欠損による Pah1 活性低下は、小胞体型 Psd1 量の増加を引き起こし、Ice2 欠損による小胞体型 Psd1 量の低下を打ち消した。これらのことより、小胞体型 Psd1 の存在量は、Nem1/Spo7-Pah1 経路によって制御される PA 量によって規定されていることが示唆された。また、小胞体型 Psd1 存在量は、E3 リガーゼ Hrd1 を介した小胞体関連分解によっても制御されていること、Psd1 のミトコンドリアへの輸送は、Djp1 に依存していることを見出した。さらに、Nem1/Spo7-Pah1 軸による PA 量制御、Hrd1 依存的な小胞体型 Psd1 量の分解、Djp1 依存的な Psd1 のミトコンドリアへの輸送による Psd1 量および Psd1 細胞内局在の制御は、細胞内 PE 合成制御に重要な役割を有していることを見出した。

醸造用出芽酵母のメタボローム解析から バイオアルコール生産代謝工学の知見を得る

松田史生

(大阪大学 大学院情報科学研究科)

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の醸造用株は、実験室株に比べ高いエタノール生産能を持つことが知られているが、そのメカニズムには不明な点が多い。また、*S. cerevisiae* はバイオアルコール生産に向けた代謝工学の有望な宿主であるが、以前我々が構築した 2,3-ブタンジオール (23BDO) 生産株は、生産収率、比生産速度ともにまだ改善の余地が大きく残されている。そこで、本研究では、複数の実用株と実験室株の 13C-代謝フラックス解析 (13C-MFA) とメタボローム解析を行い、得られたデータの比較解析から実用株が高いエタノール比生産速度を持つメカニズムを推定し、さらにその知見を 23BDO 生産株の改良に応用することを試みた。

S. cerevisiae の 2 倍体実用株 (実験室株: BY4947、ワイン株: QA23、パン株: RedStar、清酒株: Kyokai 7) を合成培地中、好気条件下で回分培養した。物質収支を比較したところ、実用酵母株は実験室株に比べ、グルコース比消費速度とエタノール比生産速度が高く、エタノール収率はむしろ低下する傾向があった。また、13C-MFA で代謝フラックス分布を推定した結果、実用株はいずれも TCA 回路のフラックス値が実験室株より高くなる傾向があった。また代謝フラックス分布から算出した ATP 消費速度は、実用株が実験室株より高くなり、実用株は何らかのメカニズムで ATP を浪費していると推測された [1]。そこで、23BDO 生産出芽酵母株 YHI030 に大腸菌由来の ATPase を導入して ATP を人為的に浪費させたところ、23BDO 比生産速度が 36% 上昇した [2]。

さらなる知見を得るため、醸造用株 11 株を同条件で培養し、メタボローム解析法で細胞内代謝物濃度を測定し、そこから、代謝反応や代謝経路のギブス自由エネルギー変化 (ΔG) を算出した。その結果、エタノール生産速度とエタノール生合成経路 (ピルビン酸をエタノールに変換する経路) の ΔG の間に相関があることを見出した。この知見をもとに、YHI030 株のピルビン酸を 23BDO に変換する経路の酵素を追加で強発現した結果、23BDO 生産比速度を 71% 増加できた。様々なレベルでの代謝計測が発酵能の理解および代謝工学に有効に知見をもたらすと期待される。

[1] Yatabe et al. *Biotechnol J* 2022, 17, 2000438

[2] Yatabe et al. *Microbial Cell Factories* 2023, 22, 204

[3] Sugimura et al. *Int J Mol Sci* 2023, 24, 16378

細胞内外のpH変動が紡ぐ生命現象

松浦 彰

(千葉大学 大学院理学研究院)

生物を取り巻く外部環境は、外的な要因に加え、自身の生命活動の結果により変化する。例えば、生命活動により環境中の栄養成分は消費され、その絶対量は徐々に減少する。一方、生物から環境へと放出される物質が自身の生存を脅かすまで蓄積する場合もある。生物はこのような外部環境の変化を検知しそれに対し適切に応答する機構により、個々の個体の生存を維持している。

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* をグルコースを含む培地で回分培養すると、解糖によりエネルギーを得て対数増殖を行った後、培地に放出されたエタノールを利用する好気呼吸に代謝を変えて増殖を続け、その後細胞数が一定となる定常期を迎える。定常期への移行は利用可能な炭素源の欠乏が引き金となっておきるが、定常期での細胞の生存は培地に含まれる窒素源の有無や種類に大きく影響される。我々は、定常期の細胞が時間経過とともに死を迎える「経時老化」と呼ばれる現象に、炭素源として利用可能な糖以外の物質の存在と、栄養源、特に特定の窒素源を取り込むために生じる外部環境変化 (pH の低下) が関与していることを明らかにしている (1, 2)。

細胞にとって、外部環境の pH 変化に対抗して内部の pH を一定に保つことは重要である。出芽酵母では、通常細胞質 pH は膜内外の H^+ の流入と流出のバランスにより中性付近に厳密に制御されているが、エネルギー枯渇条件では細胞質 pH は 5.5 付近にまで低下する。我々は、炭素源欠乏に加え、弱酸や過酸化水素などのストレスに暴露された酵母の細胞質 pH が低下することを見出した。細胞質 pH の低下は膜リン脂質のリン酸基のプロトン化状態を変化させるある種のシグナルとなり、その下流でタンパク質合成やストレス応答が制御されていることを示す結果を得ている (3)。本発表では、細胞内外の pH 変動がきっかけとなっておきるさまざまな生命現象とそのメカニズムを議論したい。

1. Maruyama et al. PLoS ONE 11: e0151894 (2016)
2. Kawamukai et al. Yeast 40: 1–9 (2023)
3. Fujii et al. in preparation