



・准教授
・北垣浩志
・共同研究者
氏名 元村沙織
- (佐賀大学
- 大学院生)

平成 5 年 東京大学農学部農芸化学科卒業
平成 7 年 同大学院農学生命科学研究科修了
平成 8 年 大阪国税局総務係長・鑑定官
平成 13 年 (独)酒類総合研究所研究員
平成 16 年 博士(農学、東京大学)
平成 17 年 米国サウスカロライナ医科大学
平成 20 年 佐賀大学農学部 准教授
平成 22 年 日本学術会議 連携会員

拡大培養工程での酵母ミトコンドリアの状態がバイオエタノール・酒類の醸造に与える影響の解析

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、酸素呼吸が起こらないバイオエタノールの醸造や酒類醸造においてはその役割をこれまでほとんど研究されてこなかった。しかしながら、本研究者は清酒酵母のミトコンドリアを GFP により可視化することにより、こうした醸造の環境においても酵母ミトコンドリアが存在し、ミトコンドリアの代謝が醸造において重要であることを明らかにした。

バイオエタノールや酒類の醸造の前には、酵母を拡大培養する必要がある。しかしながら、こうしたバイオエタノールや酒類の醸造の拡大培養期に醸造酵母のミトコンドリアがどのような形態をしているのか、そうしたミトコンドリアの活性がバイオエタノールや酒類の醸造においてどのような役割を持っているのかはこれまで一切明らかになっていなかった。

そこで、バイオエタノールや酒類の醸造の拡大培養条件の違いによる醸造酵母ミトコンドリアの形態を解析すると同時に、拡大培養時期の酵母ミトコンドリアの活性がバイオエタノールや酒類の本醸造における物質代謝にどのような影響を持つかを調べた。

実験方法

1 実験材料

清酒酵母の *his3* 株(RAK1536)に *HIS3* マーカーでミトコンドリアへ GFP をターゲットする plasmid を形質転換した株(K7 *his3/his3*pRS413GPD-mitGFP)を用いた。

2 拡大培養条件

酸素呼吸条件では、バッフル付き 300 ml 三角フラスコに YP -2% glycerol 培地を 50ml 入れ、30 で 200rpm で約 48 時間培養した。一方発酵条件においては、15ml の

ガラス試験管に 10ml の YPD (glucose 10% or 2%) 培地を入れ、流動パラフィンを上層して 30 で一夜培養した。

3 本培養条件

15ml のガラス試験管に 10ml の YPD (glucose 10%) 培地を入れ、流動パラフィンを上層して OD600=4.0 の細胞密度でセットし 30 で 48 時間静置培養した。

4 ミトコンドリア活性阻害試験

2 mM のミトコンドリア膜電位阻害剤 FCCP を 20 μ M の濃度で本培養の開始と同時に培地に 100 分の 1 の容量割合で混ぜ、本培養を行った。対照として蒸留水を 100 分の 1 の容量割合で加えた。

5 有機酸組成の分析

有機酸分析は、高速液体クロマトグラフィ (有機酸分析システム) を用い行った。すなわち、高速液体クロマトグラフィー (株式会社日立ハイテクノロジーズの L-21 30 型ポンプ 2 台) を用い、カラムには Shodex のガードカラム KC-LG 及び、KC-811 を 2 本連結したものをを用いた。流速 0.5 ml/min で 6 mM の過塩素酸を溶出液とし、カラム温度は 40 に保持し、ポストカラムで 0.6 ml/min の流速の 0.1 mM ブロモチモールブルー、30 mM リン酸一水素二ナトリウムを合流させ、検出は株式会社日立ハイテクノロジーズの L-2420 型 UV-VIS 検出器を用いて 440 nm で行った。

結果

1 拡大培養期における醸造酵母ミトコンドリアの形態の解析

ミトコンドリアを可視化した清酒酵母を用いて、拡大培養期のさまざまな培養条件における醸造酵母のミトコンドリアの形態を解析した。

その結果、グルコース濃度が 10% の培地で静置培養 (発酵条件に相当) したときには、ミトコンドリアは細胞内を縦走する数本の長いフィラメント状の形態を取っていた。一方、グリセロール培地で振とう培養したとき (酸素呼吸条件に相当) にはミトコンドリアは多くの枝分かれ構造を持ち、細胞全体に分布していた (図 1)。

培地のグルコース濃度が 2% 以上であれば酸素の有無に関わらずミトコンドリアは数本のフィラメント状になっていた (data not shown) ことから、ミトコンドリアの形態を決定する因子としては、グルコース濃度が最も大きな役割を持つと考えられた。

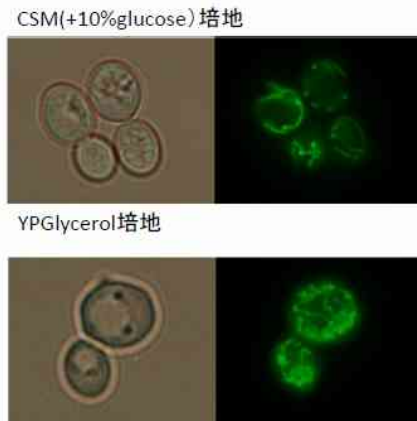


図1 拡大培養条件の違いによる酵母ミトコンドリアの形態の変化

2 拡大培養期における醸造酵母ミトコンドリアの活性が本醸造における物質代謝に及ぼす影響の解析

このように、拡大培養期における培養条件によって醸造酵母のミトコンドリアは大きくその形態を変えることがわかった。ミトコンドリアの形態はミトコンドリアの活

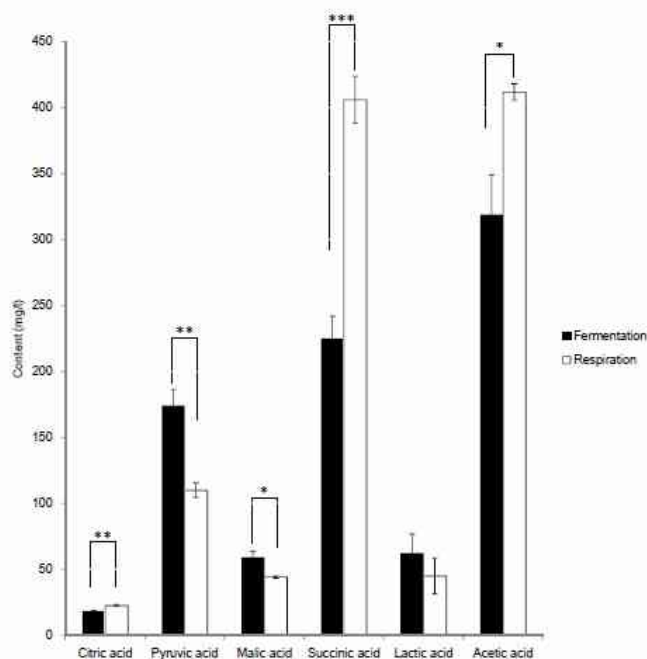


図2 培養条件を変えたときの有機酸組成

性と関連していることが知られている。そこで、拡大培養期の醸造酵母のミトコンドリアの活性を変化させることで、本培養時の物質代謝が変化するかどうかを調べることにした。

前培養から独立した3連の仕込を行いその有機酸組成を片側 t 検定で解析した結果、酸素呼吸条件では発酵条件と比べて $p < 0.002$ (***)でコハク酸が、 $p < 0.02$ (**)でクエン酸が、 $p < 0.06$ (*)で酢酸が増加し、 $p < 0.06$ (*)

でリンゴ酸が減少した(図2)。

酸素呼吸状態と発酵状態の細胞では、ミトコンドリアの活性だけでなく、他のさまざまな代謝経路に変化があると考えられる。そこで、上記の変化が本当にミトコンドリアの活性に由来するものなのかを確認するため、上記の振とう培養した細胞にミトコンドリアの活性を失わせるミトコンドリア膜電位阻害剤を加えて同様の実験を行った。その結果、ミトコンドリア膜電位阻害剤を加えた試験区では、 $p < 0.02$ (**)でリンゴ酸が増加し、 $p < 0.05$ (*)でピルビン酸と乳酸が増加し、 $p < 0.05$ では有意ではなかったがコハク酸と酢酸が減少し、ほぼ静置培養の有機酸組成に戻る事が明らかとなった(図3)。

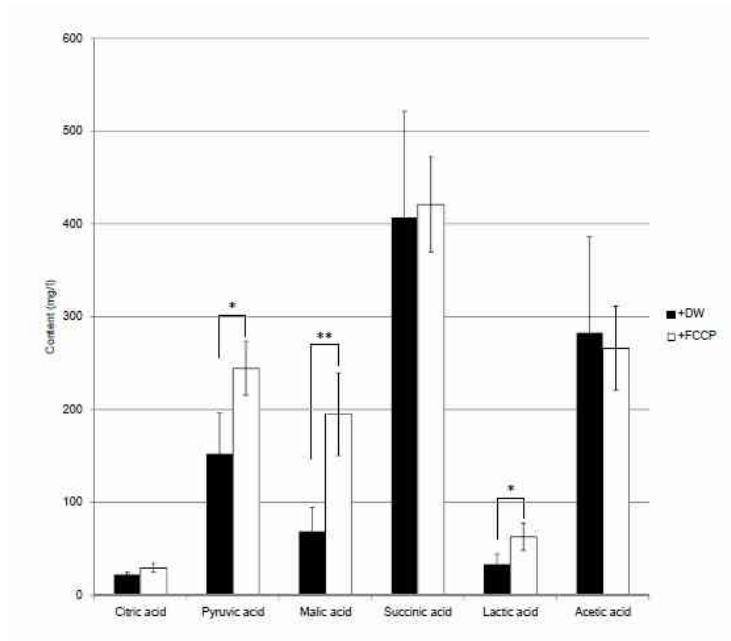


図3 拡大培養を酸素呼吸で行い本培養で FCCP を投与した時の有機酸代謝変化

これらの結果から、拡大培養時の酵母のミトコンドリアの活性が上がると本培養においてピルビン酸やリンゴ酸、乳酸が減少し、コハク酸や酢酸が増加すると考えられた(図4)。以上の研究により、拡大培養時のミトコンドリアの活性が本培養時のバイオエタノールや酒類醸造における物質代謝にどのように影響を及ぼすかが初めて明らかになり、拡大培養時のミトコンドリアの状態を制御することで酒類やバイオエタノール醸造時の物質代謝を改変する技術の開発への道が拓けたと考えている。

拡大培養における状態

発酵状態



酸素呼吸状態



本発酵における代謝

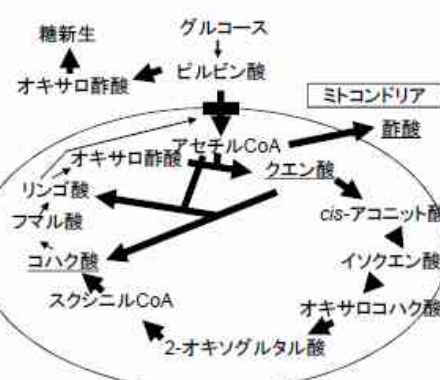
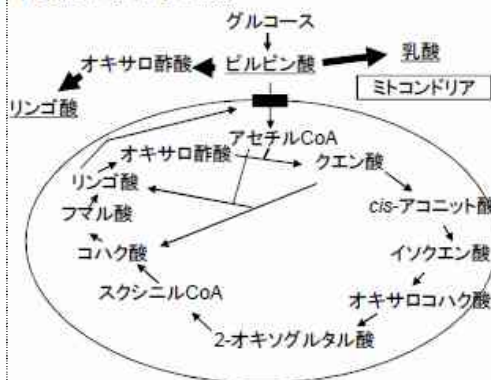


図4 拡大培養時のミトコンドリアの状態と本培養での有機酸代謝の関連

発表実績

元村沙織、北垣浩志

清酒酵母ミトコンドリアの呼吸・発酵転換時の形態変化とその意義の解析

2010年度日本生物工学会大会

元村沙織、北垣浩志

清酒酵母ミトコンドリアの呼吸・発酵転換時の形態変化とその意義の解析

(論文投稿準備中)

謝辞

本研究に助成いただいたサッポロ生物科学振興財団及び鋭意実験に取り組んでいただいた佐賀大学大学院生の元村沙織氏、RAK1536株をご供与いただいた山口大学の赤田倫治教授、pRS413GPD-mitGFPをご供与いただいた大阪大学の岡本浩二特任准教授に感謝したい。