



特任准教授
（当時: 助教）
西村 明

共同研究者
Kyria Boundy-Mills
（カリフォルニア大
学デービス校）

2012 年 4 月 株式会社 カネカ 研究員
2016 年 4 月 東北大学 大学院医学系研
究科 助教
2019 年 10 月 奈良先端科学技術大学院
大学 先端科学技術研究科 助教
2024 年 4 月 奈良先端科学技術大学院大
学 研究推進機構 特任准教授

プロリンを含まないワインやビールづくりへの挑戦 -野生酵母コレクションを活用したプロリン資化性酵母の探索-

1. 背景と目的

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) はワインやビールなどの醸造に用いられ、酵母による原料の資化が酒類の味や風味を決める。アミノ酸の一種であるプロリンは多くの酒類の原料（ブドウ、麦芽）に豊富（数 mM）に含まれるが、発酵中の酵母はプロリンを資化（細胞への取込み・利用）することができない。残存したプロリンは苦味の増加や酸味の減少を引き起こし、酒質を低下させる。また、プロリンを窒素源として利用できないため、発酵中に窒素源が枯渇し、人工窒素源（アンモニウム塩）が必要となる。このため、原料中のプロリンを消費するプロリン高資化性酵母は酒類の高品質化・差別化への貢献が期待されている。我々はこれまでに環境中の塩基性アミノ酸やグルコース・フルコースがプロリン資化抑制に関与していることを報告しているが、詳細は不明である [1-3]。

近年、自然界から単離された一群の *S. cerevisiae* が、窒素源応答に関わる遺伝子群に変異を有しており、これにより特定のアミノ酸に対する資化能が実用酵母（ワインやビール酵母など）よりも向上することが知られている [4]。すなわち、自然界にはアミノ酸の資化能力が異なる野生酵母が存在し、そのような遺伝的に異なる集団を用いることで、アミノ酸資化機構の解明および資化能力に係る育種が可能となる。申請者の共同研究先である Boundy-Mills 研究室（カリフォルニア大学デービス校）は、世界中の発酵食品から単離された約 1,300 株の *S. cerevisiae* (Phaff Yeast Culture Collection) を保有しており、大規模な酵母カルチャーコレクションからプロリン資化能を有する株の取得が期待できる。

また、次世代シーケンサーを用いた一塩基多型 (SNPs) 解析と、対象とする形質に関連したゲノムワイド関連解析により、形質に関わる未知の遺伝子群を検出することが可能である。つまり、これらのコレクションとアプローチにより、プロリン資化性酵母群の中からプロリン資化抑制に関わる遺伝子を網羅的に同定できることが期待される。

本研究では、大規模な酵母カルチャーコレクションを活用することで、酵母におけるプロリン資化抑制の分子機構を解明し、プロリン資化能を付与した酵母のビール醸造への応用を目指した。

2. 方法

2-1 菌株と培地

Boundy-Mills 研究室から分譲頂いた約 700 株の *S. cerevisiae* (Phaff Yeast Culture Collection から) を使用した。プロリン高資化性酵母のスクリーニングはプロリン含量を高くした完全合成培地 (SC+Pro) (2% glucose, 0.5% ammonium sulfate, 0.17% yeast nitrogen base without both amino acid and ammonium sulfate [Difco Laboratories, Detroit, MI, USA], 0.1% proline, 0.04% leucine, 0.008% alanine, 0.008% asparagine, 0.008% aspartic acid, 0.008% glutamine, 0.008% glutamic acid, 0.008% cysteine, 0.008% glycine, 0.008% histidine, 0.008% isoleucine, 0.008% lysine, 0.008% methionine, 0.008% phenylalanine, 0.008% serine, 0.008% threonine, 0.008% tryptophane, 0.008% valine, 0.008% uracil, 0.008%, inositol 0.008% *p*-aminobenzoic acid, and 0.002% adenine) を用いて行った。ビール発酵モデルは 10 °P 麦芽培地 (YMPD) を使用した。

2-2 プロリン測定

各上清中の残存プロリン含量は、イサチン比色法またはアミノ酸分析装置 (L-8800、日立) により測定した。イサチン法でプロリンを測定するために、4 倍希釈した試料をクエン酸緩衝液 (0.5M、pH 4.1) と混合した。アセトンとエタノールを 1:2 で混合した溶液で溶解したイサチン (0.075%) を等量加えた。試料を 99°C で 10 分間加熱して蒸発乾固した。その後、プロリンとイサチンの反応生成物を 66% アセトンに溶解し、 $A_{595\text{ nm}}$ をマイクロプレートリーダーによって測定した。アミノ酸分析装置を用いたプロリン測定では、試料をクエン酸緩衝液 (0.2M、pH 2.2) で 2 倍以上に希釈したあと、プロリン含量を測定した。

2-4 プロリン高資化性酵母スクリーニング

酵母細胞を 96 well プレートを用いて、SC+Pro で 48 時間振盪培養 (30°C、200 rpm) した。遠心分離により上清を回収した。プロリン量は、イサチン比色法で測定した。

2-5 簡易発酵試験

YMPD で前培養した酵母細胞を、OD=1.0 で YMPD もしくは、白ブドウ培地に植菌した。静置条件下、室温で培養した後、遠心分離で上清を回収した。上清を超音波洗浄器（B1500A-DTH 1.90 L, VWR Inter-national Radnor, PA, USA）で脱気した。次に、脱気した各サンプル中のアルコール含量を、Anton Paar Density Meter (DMA 5000 M)とアルコライザー(Alco-lyzer Beer M) (Anton Paar USA Inc., Torrance, CA, USA)を用いて測定した。プロリン含量はアミノ酸アナライザーを用いて測定した。

3. 結果と考察

多量検体のスクリーニングを行うために、簡便かつ安価なプロリン測定法が必要である。イサチンとプロリンの比色反応は報告されているが、培地中のプロリンを測定できるかは不明である [5]。まず、アメリカンエール酵母 *Saccharomyces cerevisiae* UCDFST 96-12 (Wyeast 1056) と既知のプロリン資化酵母 *Lachancea thermotolerans* UCDFST 04-833 を用いて、イサチンが培地中のプロリンを測定できるかを検討した。各酵母を SC+Pro 培地で培養し、上清のプロリン量をイサチン法と従来のアミノ酸アナライザーで分析した（表 1）。その結果、これまでの知見通り、*S. cerevisiae* はプロリンを消費できないが、*L. thermotolerans* は効率的にプロリンを消費することが判明した。また、イサチン法はアミノ酸アナライザーで測定した値よりもわずかに低い値を示すことが、培地中のプロリンを測定可能であることが判明した。

表 1 イサチン法 (Isatin) とアミノ酸アナライザー (A. A.) におけるプロリン測定

Strain	Time (h)	Proline concentration (mg/L)	
		by Isatin	by A. A. analyzer
<i>S. cerevisiae</i> UCDFST 96-12	24	990 ± 10.9	1066 ± 39.3
	48	916 ± 22.9	1100 ± 9.2
	72	1003 ± 2.5	1162 ± 5.2
<i>L. thermotorelans</i> UCDFST 04-833	24	800 ± 18.4	807 ± 18.0
	48	181 ± 0.0	208 ± 14.6
	72	103 ± 54.2	110 ± 54.9

イサチン法を用いて、約 700 株の *S. cerevisiae* のプロリン資化性を検討した（図 2）。その結果、これまでの知見通り、ほとんどの株はプロリンを資化しないことがわかった。しかし、約 30 株において、明らかなプロリン資化が認められた。特に 7 株（UCDFST 84-16、40-262、11-186、40-74、15-359、40-144、68-44）においては、48 時間で 0.1%（約 8 mM）のプロリンを完全に消費することが判明した。

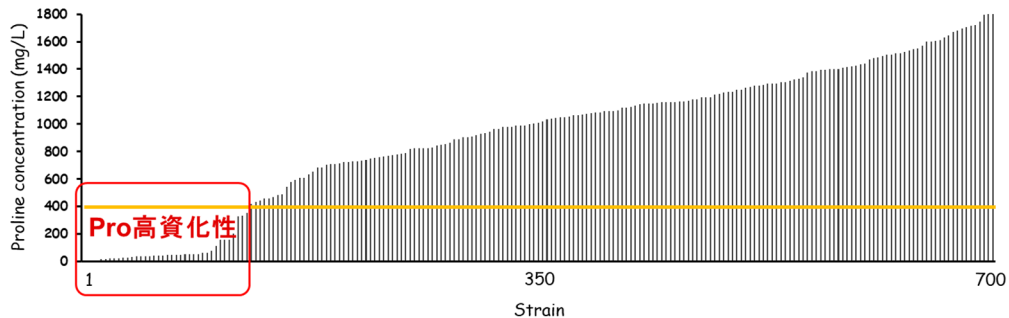


図 2 野生酵母コレクションからのプロリン高資化株の探索

最後に、簡易的なビールを行い、7 株（UCDFST 84-16、40-262、11-186、40-74、15-359、40-144、68-44）の実用性を検討した（図 3）。その結果、ビール発酵試験において、全ての株がプロリンを資化可能であることがわかった。また、アルコール量を測定した結果、40-144 と 68-44 のアルコール産生能は市販のエールビール酵母より若干低い、エールビール製造に適応可能であることが判明した [6]。

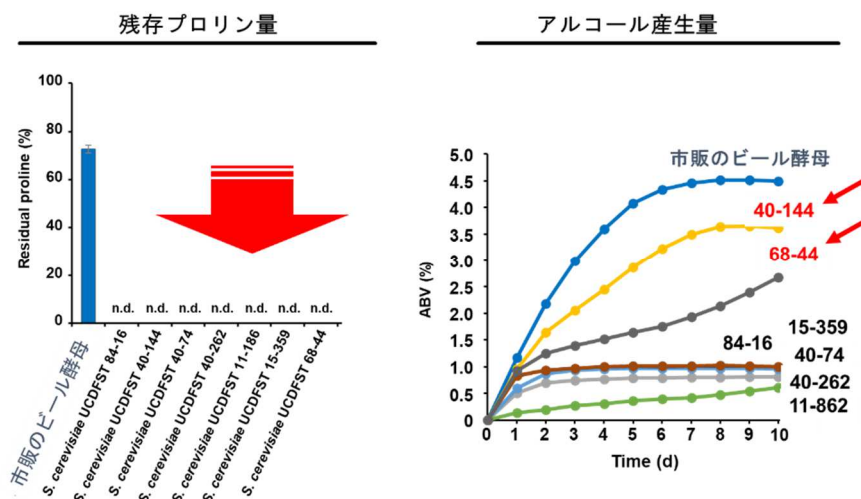


図 3 プロリン高資化株の簡易的なビール発酵試験
(左：残存プロリン量、右：アルコール産生量)

4. 今後の予定

ビール醸造が可能なプロリン高資化性株は世界で初めて取得されたものであり、大きな成果である。今後、これら株については共同研究先であるUC Davisのワイン・ビール研究所において、本格的な発酵試験を実施する予定である。また、プロリン資化が可能な株を多数取得できたので、個々の遺伝子のSNPレベルの比較検討ができると考えている。現在、30株のプロリン高資化性株の全ゲノムDNAシーケンスが完了し、SNPを抽出しているところである。解析を進めことで、プロリン資化抑制機構の全体像が明らかになると期待している。

5. 謝辞

本研究を遂行するに当たり貴重なご支援を頂いた公益財団法人サッポロ生物科学振興財団に厚く御礼を申し上げます。

6. 文献

1. Nishimura, A.; Tanikawa, T.; Takagi, H. Inhibitory effect of arginine on proline utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **2020**, *37*, 531-540.
2. Tanahashi, R.; Nishimura, A.; Morita, F.; Nakazawa, H.; Taniguchi, A.; Ichikawa, K.; Nakagami, K.; Boundy-Mills, K.; Takagi, H. The arginine transporter Can1 acts as a transceptor for regulation of proline utilization in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **2023**, *40*, 333-348.
3. Nishimura, A.; Ichikawa, K.; Nakazawa, H.; Tanahashi, R.; Morita, F.; Sitepu, I.; Boundy-Mills, K.; Fox, G.; Takagi, H. The Cdc25/Ras/cAMP-dependent protein kinase A signaling pathway regulates proline utilization in wine yeast *Saccharomyces cerevisiae* under a wine fermentation model. *Biosci Biotechnol Biochem* **2022**, *86*, 1318-1326.
4. Molinet, J.; Cubillos, F.A.; Salinas, F.; Liti, G.; Martínez, C. Genetic variants of TORC1 signaling pathway affect nitrogen consumption in *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation. *PLOS ONE* **2019**, *14*, e0220515.
5. Boctor, F.N. An improved method for colorimetric determination of proline with isatin. *Anal Biochem* **1971**, *43*, 66-70.
6. Tanahashi, R.; Nishimura, A.; Nguyen, M.; Sitepu, I.; Fox, G.; Boundy-Mills, K.; Takagi, H. Isolation of yeast strains with higher proline uptake and their applications to beer fermentation. *J Fungi* **2023**, *9*, 1137.