

清酒酵母のアスパラギン酸キナーゼ遺伝子破壊が コハク酸生産性に及ぼす影響

久保義人*

Effect of Gene Disruption of Aspartate Kinase on Succinate Production in a Sake Yeast Strain

Yoshito KUBO*

酵母の *HOM3* 遺伝子にコードされるアスパラギン酸キナーゼ(Aspartate kinase, EC 2.7.2.4)は、アスパラギン酸からトレオニンやメチオニンを生合成する経路の第一段階を触媒する酵素である。筆者は変異処理により取得した複数のコハク酸低生産株が類似するアミノ酸要求性を持つことを見出し、アミノ酸要求性とコハク酸低生産性の関連を明らかにするため *HOM3* 遺伝子破壊株を作成し解析を行った。*HOM3* 遺伝子破壊株はトレオニンおよびメチオニン要求性を示し、アスパラギン酸キナーゼ活性は検出されなかった。*hom3* 破壊株のコハク酸生産性は、栄養培地 (YPD-10) では変化は認められなかったが、最小培地 (SD-10) および清酒小仕込試験では親株の 35 ~ 60% に低下した。最小培地におけるコハク酸生産性の低下は振とうおよび静置の両条件で観察されるのに対し、*hom3* 破壊株の菌体内アスパラギン酸の蓄積は静置条件でのみ観察されることから、*hom3* 破壊株のコハク酸生産性にはアスパラギン酸によるピルビン酸カルボキシラーゼ活性阻害以外の要因が存在すると推測した。

最小培地にアミノ酸混合物を添加すると、低濃度で *hom3* 破壊株のコハク酸生産量が低下したが、高濃度では親株との違いは観察されなかった。また、清酒小仕込試験でのコハク酸生産量の低下は、もろみ中のアミノ酸濃度に起因していることが示唆された。

キーワード：アスパラギン酸キナーゼ、遺伝子破壊、コハク酸、酵母、清酒

．緒 言

有機酸は清酒の味を形成する重要な成分であり、その大部分が酵母により生産される¹⁶⁾。中でもコハク酸は清酒の主要有機酸であり、味に大きな影響を与えることが知られており^{13, 16)}、清酒酵母のコハク酸生成に関する研究が報告されている。筆者らはこれまでに、清酒醸造条件でのコハク酸生成にコハク酸デヒドロゲナーゼは関与していないことを明らかにしている⁹⁾。Arikawa らは、TCA サイクルを構成する各種酵素遺伝子破壊株を用いて清酒もろみ期間中のコハク酸生産について解析を行い、もろみ前半は TCA サイクルの酸化的経路により生産されるのに対し、もろみ後半では還元的経路で生産されると

報告している^{3, 4)}。また、Asano らも同様の手法を用い、清酒に含まれるコハク酸の約半分が TCA サイクルの酸化的経路で生産されるとしている⁵⁾。一般的にコハク酸はグルコースからピルビン酸を経由して生成すると考えられているが、Albers らはトレーサー実験により嫌気条件下でグルタミン酸がコハク酸に変換されることを報告している¹⁾。Muratsubaki は、グルコースからのコハク酸生成は細胞内のアスパラギン酸濃度によりピルビン酸カルボキシラーゼ活性が制御されることにより調節され、グルタミン酸からのコハク酸生成もアスパラギン酸濃度により制御されていると述べている¹⁰⁾。

著者らは清酒醸造用酵母の育種過程で、コハク酸低生産性変異株がトレオニン、メチオニン、バリン、イソロイシンなど、同一生合成経路に属するアミノ酸類の要求性を示すことを見出した。酵母におけるこれらアミノ酸類の生合成は、ピルビン酸からアスパラギン酸の合成を初発とする同一経路で合成されており⁷⁾、この経路がコハク酸生産に影響を与えていることが示唆された。この

* 福井県農業試験場 食品加工研究所 技術開発研究グループ

ことを確認する目的で、生合成経路の第一段階を触媒する酵素アスパラギン酸キナーゼ遺伝子 (*HOM3*) 破壊株を取得し、有機酸生産性に対する影響について検討した。

2. 試験方法

1. 使用菌株および培地

通常の培養には YPD 培地 (2% glucose, 1% yeast extract, 2% peptone) を使用した。培養試験には、YPD-10 培地 (10% glucose, 1% yeast extract, 2% peptone) および SD-10 培地 (10% glucose, 0.67% yeast nitrogen base without amino acids [Difco Laboratories], 40 mg/l methionine, 400 mg/l threonine) を使用した。形質転換体の選抜には SC-Ura 培地 (2% glucose, 0.67% yeast nitrogen base without amino acids, 0.19% SC-URA powder [BIO 101 #4410-622], 2% agar) を使用した。アミノ酸の添加試験には、Amino acid mixture (BIO 101 #4400-022) を用いた。この製品は、1g あたり 899.9 mg のアミノ酸を含有している。

2. *HOM3* 遺伝子破壊株の取得

HOM3 遺伝子を含む DNA 領域を増幅するためのプライマーを設計し、XU-1 株のゲノム DNA を鋳型として polymerase chain reaction (PCR) 反応を行った。*HOM3* 遺伝子内の *Bgl*II-*Eco*T14I 間 1,579bp を酵母 *URA3* 遺伝子に置換した破壊用断片を作成し、XU-1 株を形質転換して遺伝子置換破壊を行った。得られた形質転換体の *HOM3* 遺伝子破壊をサザン解析で確認し、*hom3* 破壊株 (Dhom3) を取得した。対照として、XU-1 株を pRS406¹⁴⁾ で形質転換し、ウラシル要求性を相補した株 (XU-1U) を作成した。*HOM3* 遺伝子増幅に使用したプライマーは以下のとおり。
Forward: 5'-GGICTAGATTTACTCTACTGTGG-3'
Reverse: 5'-GGTCTAGAATGGTATTGCGATGG-3'
(下線部は *Xba*I サイトを示す)

3. 粗酵素液の調製とアスパラギン酸キナーゼ活性測定

50ml の YPD 培地で培養した酵母菌体を洗浄後、1 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 5% glycerol, Protease Inhibitor Cocktails (Sigma P-8215, 50 μl/g of wet cells) を含む 3 倍量の 20 mM Tris-HCl buffer (pH7.5) に懸濁した。約 0.4g のガラスビーズを加え 5 分間激しく攪拌して菌体を破碎し、遠心分離後得られた上清を粗酵素溶液とした。アスパラギン酸キナーゼ活性測定は既報¹⁵⁾ に従い、酵素 1 ユニットの 1 分間に 1nmol の hydroxamate を生成する量とし

た。

4. *hom3* 破壊株の培養試験

供試菌株を 5ml YPD 培地で 30 1 日前培養後洗浄し、10ml の各培地に 1×10^6 cells/ml となるように接種した。振とう条件での培養は L 字型試験管を使用し 35 strokes/min にて 30 2 日間行い、静置条件では蓋付き試験管を使用し 30 7 日間培養した。培養液中の有機酸濃度は、有機酸分析システム (島津製作所) にて測定した。エタノールおよびグリセロール濃度は、DAISOPAK SP-120-5-ODS-BP カラム (Daiso) と SCR-101C カラム (島津製作所) を直列で接続した高速液体クロマトグラフ (ウォーターズ model 2695) を使用し、水を移動相として示差屈折計にて測定した。

5. 清酒小仕込試験

難波らの方法¹¹⁾ に準じ総米 200g にて行った。原料米の精白歩合は 70% とし、麴は凍結麴を、掛米は 米を使用し、初発菌数が汲水あたり 1×10^7 cells/ml となるように供試株を添加した。1 日あたりの炭酸ガス減量が 1g 未満となった時点で発酵を終了し、遠心分離により上槽した。製成酒の一般分析は、国税庁所定分析法注解⁶⁾ に従った。有機酸濃度は有機酸分析システム (島津製作所)、アミノ酸濃度はアミノ酸アナライザー (日立 L-8500) にて加水分解条件で測定した。

6. 菌体内アミノ酸濃度の測定

約 5×10^8 個の酵母菌体を 0.9% NaCl 溶液で 2 回洗浄後 0.5ml のイオン交換水に懸濁し、10 分間水浴上で煮沸して菌体内アミノ酸を抽出した。抽出液を 0.02 mol/l HCl 溶液で適宜希釈後、アミノ酸アナライザー (日立 L-8500) にて加水分解条件で測定した。アミノ酸含量は、乾燥菌体重あたりの μmol 当量で示した。アスパラギンおよびグルタミン濃度は、同一試料の加水分解前後の濃度を比較し、加水分解により増加したアスパラギン酸およびグルタミン酸濃度から算出した。

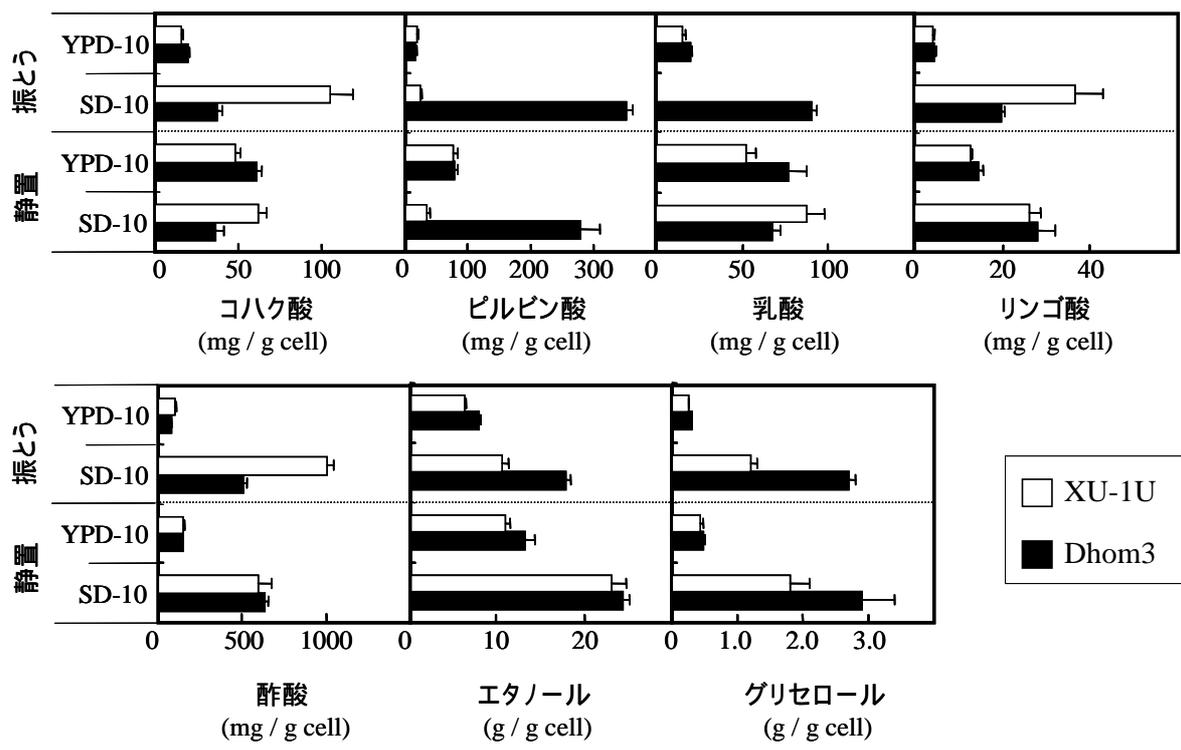
第1表 *hom3* 破壊株 (Dhom3) および対照株 (XU-1U) のアスパラギン酸キナーゼ比活性、遺伝子型および栄養要求性

菌株	比活性 (U/mg protein)	遺伝子型	栄養要求性
XU-1U	6.2 ± 1.9 ^{a)}	<i>URA3</i> ^{c)}	-
Dhom3	N.D. ^{b)}	<i>gcn4::URA3</i>	Met ⁻ Thr ⁻

a) 6回の異なる実験結果の平均値 ± 標準偏差

b) 未検出

c) 挿入プラスミド pRS406 由来



第1図 培養試験における有機酸および各種代謝産物の生産性
「異なる5回の実験結果の平均値および標準偏差」を示す

実験結果

1. HOM3 遺伝子破壊株の性質

hom3 破壊株(Dhom3)はメチオニンおよびトレオニン要求性を有しており、また、アスパラギン酸キナーゼ活性は検出されなかった。(第1表)。この結果は、Dhom3の *HOM3* 遺伝子が破壊されていることを示している。

2. *hom3*破壊株の培養試験

hom3 破壊株(Dhom3)と対照株(XU-1U)を液体培地で培養し、コハク酸を始めとする各種代謝産物の生産量を測定した(第1図)。栄養培地(YPD-10)では、振とうおよび静置の両条件共に *hom3* 破壊株と対照株の明確な差は認められなかったのに対し、最小培地(SD-10)では両株間に多くの差が認められた。

hom3 破壊株のコハク酸生産量は、振とう条件で対照株の35%、静置条件で58%に減少した。一方、ピルビン酸の生産量は、振とうおよび静置条件で対照株の8~15倍に増加した。酢酸、リンゴ酸、乳酸の生産量は振とう条件でのみ変化し、酢酸は対照株の51%、リンゴ酸は54%に減少した。乳酸については、*hom3*破壊株でのみ生産が認められた。

有機酸以外では、エタノールとグリセロールの生産量が、これまで同様に最小培地で変化した。

hom3 破壊株のエタノール生産量は振とう条件でのみ増加したのに対し、グリセロール生産量は振とうおよび静置の両条件で増加した。

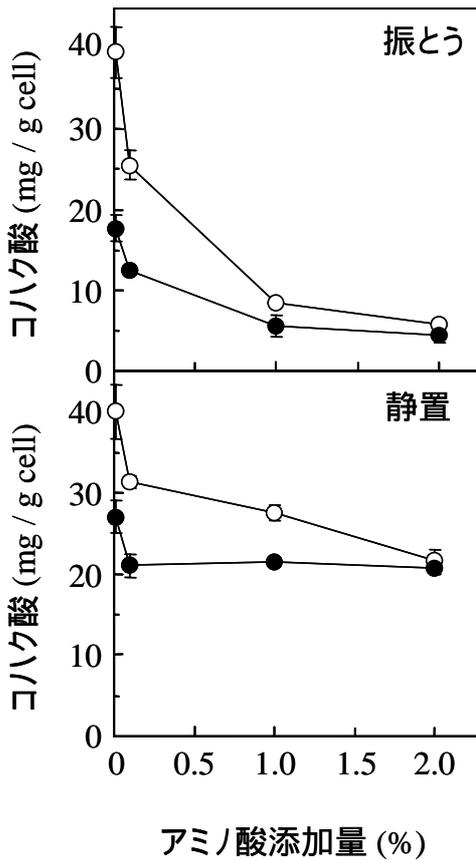
これらの結果より、*hom3*破壊の影響は培地中の栄養素が乏しい場合に顕著に表われることが明らかとなった。栄養培地(YPD-10)と最小培地(SD-10)の組成で大きく異なるのはアミノ酸含量であるため、培地中のアミノ酸濃度が今回の結果に大きく影響しているのではないかと推測した。

最小培地での振とうおよび静置培養後の対照株に対する *hom3*破壊株の菌体内主要アミノ酸濃度は、静置条件では総じて増加したのに対し、振とう条件では顕著に減少していた(第2表)。

第2表 最小培地培養後の菌体内アミノ酸濃度

	アミノ酸含量 (μmol/g cell)			
	振とう条件		静置条件	
	Dhom3	XU-1U	Dhom3	XU-1U
Asp	14 ± 1	108 ± 7	32 ± 6	17 ± 5
Asn	70 ± 6	163 ± 11	60 ± 7	48 ± 3
Glu	165 ± 15	615 ± 28	188 ± 27	156 ± 28
Gln	755 ± 57	891 ± 53	415 ± 29	241 ± 16

数値は「5回の異なる実験結果の平均値 ± 標準偏差」を示す



第2図 コハク酸生産性に及ぼす
アミノ酸添加の影響

「異なる5回の実験結果の平均値および標準偏差」
を示す : Dhom3 : XU-1U

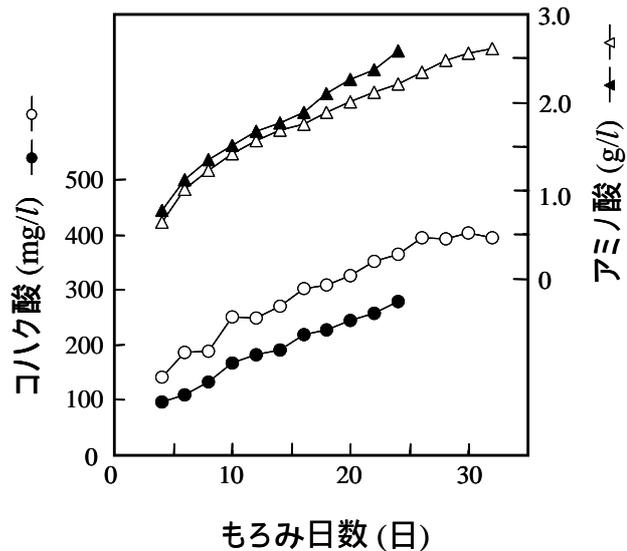
3. コハク酸生産に対するアミノ酸添加の影響

培地中のアミノ酸濃度がコハク酸生産に与える影響を確認するため、最小培地(SD-10)にアミノ酸混合物を0.01, 0.1, 1, 2%(アミノ酸濃度で0.009, 0.09, 0.9, 1.8%)添加した場合のコハク酸生産性の変化を試験した。第2図に示すように、アミノ酸混合物の添加量が少なくなるに従い *hom3* 破壊株と対照株のコハク酸生産性の差は増加した。この現象は振とうおよび静置の両条件共に認められたが、静置条件において両株の差が大きくなる傾向であった。この結果から、*hom3*破壊のコハク酸生産性への影響は、培地中のアミノ酸濃度が低くなると現れることが明らかとなった。

第3表 小仕込試験酒の有機酸およびエタノール濃度

菌株	有機酸 (mg/l)				エタノール (%)
	コハク酸	リンゴ酸	酢酸	乳酸	
XU-1U	432 ± 21	226 ± 19	961 ± 27	579 ± 17	16.0 ± 1.0
Dhom3	264 ± 14	176 ± 9	652 ± 22	501 ± 12	16.2 ± 0.5

数値は「4回の異なる実験結果の平均値 ± 標準偏差」を示す



第3図 清酒もろみ中のコハク酸および
総アミノ酸濃度の変化
: Dhom3 : XU-1U

4. 清酒小仕込試験

清酒醸造環境での *hom3* 遺伝子破壊の影響を調べるため、*hom3*破壊株を使用した清酒小仕込試験を行った。発酵期間を通して *hom3*破壊株(Dhom3)の炭酸ガス発生量は対照株(XU-1U)とほぼ同等であった。製成酒の有機酸およびエタノール濃度を第3表に示す。*hom3*破壊株酒と対照株酒のエタノール濃度に差はなく、*hom3*遺伝子破壊による発酵停滞等は観察されなかった。*hom3*破壊株酒のコハク酸濃度は、対照株酒の約60%に減少した。また、リンゴ酸、酢酸、乳酸も同様に減少したが、他の有機酸については変化は認められなかった。

第3図に発酵期間中のコハク酸濃度およびアミノ酸濃度の推移を示す。もろみ中のアミノ酸濃度は6日目に1g/l (0.1% w/v)に達しており、この時点で *hom3*破壊株のコハク酸濃度はXU-1Uの59%に減少していた。

考 察

*hom3*遺伝子破壊が各種代謝産物生産に与える影響は、栄養素を制限した条件で顕著に表われた(第1図)。*hom3*遺伝子破壊によりアスパラギン酸キナーゼ活性が消失した株(Dhom3)のコハク酸生産性は、最小培地(SD-10)で低下したが栄養培地(YPD-10)では変化しなかった。両培地でのコハク酸生産性の違いは培地のアミノ酸含量に起因すると推測し、最小培地にアミノ酸を

濃度を変えて添加しコハク酸生産性の変化を追跡した(第2図)。この結果は、*hom3*遺伝子破壊がコハク酸生産に及ぼす影響は低アミノ酸条件で現れることを明確に示している。

これまでに、コハク酸生産とアミノ酸の関係に関していくつかの研究が報告されている²⁾。Muratsubakiら¹⁰⁾は、嫌気条件下でのコハク酸生産は菌体内アスパラギン酸濃度により制御されており、この制御はアスパラギン酸によるピルビン酸カルボキシラーゼ活性阻害を介して行われていると報告している。さらに、Huetら⁸⁾は、ピルビン酸カルボキシラーゼ活性は、窒素源にアスパラギン酸、アスパラギン、グルタミン酸、グルタミンを使用した場合に低下するとしている。アスパラギン酸はアスパラギン酸キナーゼの主要基質であるため、アスパラギン酸キナーゼ活性が消失している*hom3*破壊株(Dhom3)では菌体内アスパラギン酸の蓄積が予想される。最小培地(SD-10)での試験の結果、静置条件では予想どおりアスパラギン酸の蓄積が観察されたが、振とう条件ではコハク酸生産性が低下しているにもかかわらず、菌体内アスパラギン酸濃度は減少していた(第2表)。この結果は、*hom3*破壊株のコハク酸生産性は振とう条件と静置条件では異なる要因に影響されていることを示唆している。

Pinesら¹²⁾は培地中の窒素源(NH₄Cl)濃度とリンゴ酸生産には関連性があり、*MDH2*遺伝子過剰発現株における有機酸の過剰生産には窒素源の制限が必要であると報告している。これらの知見および今回の結果を考え合わせると、*hom3*破壊株のコハク酸生産性が低アミノ酸濃度で低下する現象をアスパラギン酸の蓄積によるピルビン酸カルボキシラーゼ活性阻害のみで説明することは困難である。特に振とう条件においては他の要因が存在することが推測され、更なる研究が必要である。

清酒醸造環境においても、*hom3*破壊株のコハク酸生産量は、対照株と比較して低くなった(第3表)。*hom3*破壊株使用もろみのコハク酸濃度は、「留添」後6日目ですでに対照株使用もろみの59%に減少しており、この比率は発酵終了まで殆ど変化しなかった(第3図)。この結果は、*hom3*破壊株と対照株のコハク酸生産性の差はもろみ初期に発生しており、もろみ中期から後期には両者の差はなくなっていることを示している。もろみ中のアミノ酸濃度は第3図に示すように、もろみ初期には低く、以降経時的に増加している。最小培地へのアミノ酸添加試験では、添加量1%(アミノ酸濃度で0.9%)以下で*hom3*破壊株と対照株のコハク酸生産量に差が認められており(第2図)、もろみ中のアミノ酸濃度は6日目で約1%に到達している。このことから、両株のコハク酸生産量の差は、もろみ初期に形成されていることが明らかとなった。アミノ酸濃度がコハク酸生産に影響する現象は、*hom3*遺伝子を破壊していない対照株(XU-1U)でも認められる(第3図)。このことは、一般の清酒醸造においても、コ

ハク酸生産量はもろみ中のアミノ酸濃度に影響されている可能性を示唆しており、更なる検討が必要である。

*hom3*破壊株を最小培地で振とう培養した場合に、乳酸とピルビン酸の生産量が顕著に増加しエタノールとグリセロールの生産量が2倍程度に増加する現象が認められた。酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)を高糖濃度で培養した場合、グルコースによる呼吸関連酵素の抑制制御により好气的条件でもアルコール発酵することが知られており、クラブトリー効果(Crabtree effect)と呼ばれている¹⁷⁾。*hom3*破壊株のアミノ酸制限条件下での好気培養において、クラブトリー効果に類似の現象が観察されたことは大変興味深い結果である。

引用文献

- 1) Albers, E. · Gustafsson, L. · Niklasson, C. · Lidén, G. (1998). Distribution of 14C-labelled carbon from glucose and glutamate during anaerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 144 : 1683-1690
- 2) Albers, E. · Larsson, C. · Lidén, G. · Niklasson, C. · Gustafsson, L. (1996). Influence of the nitrogen source on *Saccharomyces cerevisiae* anaerobic growth and product formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 62 : 3187-3195
- 3) Arikawa, Y. · Kobayashi, M. · Kodaira, R. · Shimosaka, M. · Muratsubaki, H. · Enomoto, K. · Kodaira, R. · Okazaki, M. (1999). Isolation of sake yeast strains possessing various levels of succinate- and/or malate-producing abilities by gene disruption or mutation. *J. Biosci. Bioeng.* 87 : 333-339
- 4) Arikawa, Y. · Kuroyanagi, T. · Shimosaka, M. · Muratsubaki, H. · Enomoto, K. · Kodaira, R. · Okazaki, M. (1999). Effect of gene disruption of the TCA cycle on production of succinic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biosci. Bioeng.* 87 : 28-36
- 5) Asano, T. · Kurose, N. · Hiraoka, N. · Kawakita, S. (1999). Effect of NAD⁺-dependent isocitrate dehydrogenase gene (*IDH1*, *IDH2*) disruption of sake yeast on organic acid composition in sake mash. *J. Biosci. Bioeng.* 88 : 258-263.
- 6) 注解編集委員会編(1993). 第四回改正国税庁所定分析法注解. 日本醸造協会. p7-33
- 7) Farfán, M. J. · Aparicio, L. · Calderón, I. L. (1999). Threonine overproduction in yeast strains carrying the *HOM3-R2* mutant allele under the control of different inducible promoters. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 : 110-116.

- 8) Huet, C. • Menendez, J. • Gancedo, C. • François, J. M. (2000) . Regulation of *pyc1* encoding pyruvate carboxylase isozyme I by nitrogen sources in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 267 : 6817-6823
- 9) Kubo, Y. • Takagi, H. • Nakamori, S. (2000) . Effect of gene disruption of succinate dehydrogenase on succinate production in a sake yeast strain. *J. Biosci. Bioeng.* 90 : 619-624
- 10) Muratsubaki, H. (1987) . Regulation of reductive production of succinate under anaerobic conditions in baker's yeast. *J. Biochem.* 102 : 705-714
- 11) 難波康之祐 • 小幡孝之 • 萱島進 • 山崎与四良 • 村上光彦 • 下田高久 (1978) . 小仕込試験法の設定 . *醸協* 73 : 295-300
- 12) Pines, O. • Shemesh, S. • Battat, E. • Goldberg, I. (1997) . Overexpression of cytosolic malate dehydrogenase (*MDH2*) causes overproduction of specific organic acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48 : 248-255
- 13) Sato, S. • Oba, T. • Takahashi, K. • Kokubu, S. • Kobayashi, M. • Kobayashi, K. (1977) . Studies on taste of sake. . *J. Brew. Soc., Japan* 72 : 801-805
- 14) Sikorski, R. S. • Hieter, P. (1989) . A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122 : 19-27
- 15) Stadtman E.R. • Cohen G.N. • LeBras G. • Robichon-Szulmajster H. (1961) . Feed-back inhibition and repression of aspartokinase activity in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J. of Biol. Chem.* 236 : 2033-2038
- 16) Tomizawa, M. • Yonezaki, H. • Ueda, R. • Hayashida, M. (1960) . Studies on utilization rate of raw materials on sake-making industry. . *Hakkokogaku* 38 : 342-350
- 17) Zeeman, A. M. • Luttik, M. A. H. • Thiele, C. • Dijken, J. P. • Pronk, J. T. • Steensma, H. Y. (1998) . Inactivation of the *Kluyveromyces lactis* KIPDA1 gene leads to loss of pyruvate dehydrogenase activity, impairs growth on glucose and triggers aerobic alcohol fermentation. *Microbiology* 144 : 3437-3446

Effect of Gene Disruption of Aspartate Kinase on Succinate Production in a Sake Yeast Strain

Yoshito KUBO

Summary

Aspartate kinase of *Saccharomyces cerevisiae*, which encoded by *HOM3* gene, catalyzed first step in the branched pathway leading to the synthesis of threonine and methionine from aspartate. We discovered that the *HOM3* gene disruption influenced a succinic acid and other metabolic products. The aspartate kinase activity was disappeared in the *hom3* disruptant, and this disruptant showed methionine and threonine auxotroph. Succinate productivity of the *hom3* disruptant was decreased about 35-60% relative to the control strain in a minimal medium and under sake brewing conditions. On the other hand, significant difference in succinate production was not observed between the *hom3* disruptant and the control strain in a nutrient-rich medium. Furthermore, addition of amino acid mixture in a minimal medium, the succinate production of the *hom3* disruptant became equivalent to the control strain. Succinate production of the *hom3* disruptant in a minimal medium decreased on both shaking and static conditions. Intracellular aspartate accumulation in the *hom3* disruptant was observed under static conditions, but not observed under shaking conditions. These results suggest that the *hom3* gene disruption was contributes to succinate production under low amino acids conditions. In addition, we supposed that succinate production is not regulated only by the cellular level of aspartate though the pyruvate carboxylase inhibition, and more factor correlate with nitrogen and/or amino acid metabolism is exist.