

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26350091

研究課題名(和文) 甲州ワインの高品質化に適した醸造用酵母株の構築とプロファイリング

研究課題名(英文) Construction and profiling of yeast that contribute to construction of proline eliminating method from Koshu wine.

研究代表者

三木 健夫 (MIKI, Takeo)

山梨大学・大学院総合研究部・准教授

研究者番号：10313793

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：甲州ワインには、一般的な白ワインと比較して多量のプロリンが含まれており、これが酒質低下の一因とされている。本研究では、甲州ワインの高品質化を図る為、酵母を用いたプロリン低減化技術の構築を目指した。プロリン生合成経路に位置するPRO3遺伝子破壊を試みたが、複数存在するPRO3遺伝子を破壊することは困難であることがわかった。PUT4遺伝子過剰発現株をプロリン含有培地で静置培養するとパルミチン酸、ステアリン酸の割合が増大し、逆にパルミトオレイン酸、オレイン酸が減少することがわかった。野生酵母の取得と解析を行い、高プロリン資化性株の存在について検証した結果、1株のみ約70%の減少率を示した。

研究成果の概要(英文)：A lot of Koshu wine-products contained a proline abundantly. There is indication the proline abundance is one of the factors to reduce the wine quality. Aim of this study is a construction of proline eliminating method from Koshu wine by using yeast. 1) We attempt to construct PRO3 gene disruptant for blocking proline de novo synthesis. However, the yeast strain OC-2 was diploid, it was difficult to construct PRO3 gene double knockout. 2) We found the change lipid composition in expressing PUT4 gene encoded proline transporter in SD medium with 50mM proline. In total lipid composition, palmitic and stearic acid were increased, palmitoleic and oleic acid were decreased adversely. It is unclear the valuable lipid composition of PUT4 gene transformant. 3) We screened a new wild yeast strain which show high proline assimilation. Proline assimilation was tested by proline contained minimum SD medium. As a result, only one strain can assimilate proline over 70%.

研究分野：微生物学

キーワード：プロリン 遺伝子 酵母

1. 研究開始当初の背景

ワインの風味を左右する要因の一つとして、ワインに含まれる遊離アミノ酸バランスが挙げられる。主としてブドウ果皮に由来する遊離アミノ酸は 20 種類あり、その濃度は通常 10~600mg/l の間にあるとされる(1)。多くの遊離アミノ酸は発酵中、酵母によって資化されるものの、プロリンだけはほとんど資化されずにワイン中へ残存する。これは、酵母がプロリン難資化性を持つためであるが、その原因について不明である。結果的に、ワイン発酵に用いる酵母株のアミノ酸利用率(資化性)の違いにより、ワイン中に残存するアミノ酸の種類および量に差が生じ、これが酒質の違いにつながっている。

我々は、甲州ワインをより高品質化するための新しい発酵技術について研究を行ってきた。甲州ワインの原料である甲州ブドウは、古来より山梨県で栽培される白ブドウ品種であり、地域性を主張できる唯一のブドウ品種である。しかし、従来の製造法で甲州ワインを製造した場合、他の白ワインに比べ、官能評価学的に香りや呈味性に乏しく低酸味であると評される。甲州ワインの低酸味の原因を探るべく酸性成分の総量を測定した結果、本ワインの酸性成分量は、外国産高品質白ワインと同等かそれ以上であることがわかった(2)。これらのデータから甲州ワインの低酸味は、他物質による味覚阻害作用に起因することが強く示唆される。

甲州ワインには多量のプロリン(300~800mg/L)が含まれており、他の白ワインと比較しても非常に多い(2)。そこで、我々はプロリンと低酸味との関連性を検証することを目的に、甲州ブドウ果汁からプロリンを除去する新技術の開発を試みた(平成 21~24 年科学研究費補助金 基盤研究 C)。この結果、プロリン分解代謝 (Fig. 1) に関わる 3 遺伝子 (PUT1,2,4) を多コピー導入した OC-2 株のうちプロリンを細胞内に輸送する膜タンパク質をコードする PUT4 遺伝子を導入した株 (PUT4 株) が最も高いプロリン資化性を示し、その程度は親株の 1.5~2.0 倍であることを明らかにした。さらに、PUT4 株を用いて甲州ブドウ果汁を発酵させた場合、プロリン初発濃度を最大約 40% 低下させる技術の開発に成功した(3)。さらに、本技術を用いて醸造した甲州ワインを、大学生 15 名による官能評価に供した結果、9 名のパネリストがコントロールと比較して酸味が増したと評価した。この結果は、プロリン低減化により、甲州ワインの高品質化が可能であることを示す。

しかしながら、本技術を用いて醸造した甲州ワインでも、プロリンは 180~480mg/L 程度残存し、この値は外国産高品質ワインに含まれるプロリン(50~100mg/L)量と比較しても依然として高い。甲州ワインのさらなる高品質化を目指すには、PUT4 株を上回るプロリン資化能力を示す酵母を遺伝子工学

的手法により構築するか、もしくは自然界から探し出す必要がある。

2. 研究の目的

甲州ブドウは日本独自の栽培品種であり、本ブドウ品種を用いて製造される甲州ワインに関しては、国外で研究された例は少ない。また、国内においては甲州ワインの成分分析が行われているのみであり、本ワインの醸造面からの品質向上に資する研究については、ほとんど行われていない。我々は、これまで酵母のプロリン資化に関連する遺伝子 (Fig. 1) のみ着目し、甲州ワインの品質向上に関する研究を行ってきた。しかし、現状で PUT4 株を上回るプロリン資化能を示す酵母株は得られていない。本研究では、プロリン高資化性新規酵母株を用いた甲州ワインの高品質化技術の開発を目的とした。

3. 研究の方法

(1) プロリン生合成を阻害し、生育に要するプロリンを細胞外から取込むよう改変した株すなわち、ワイン酵母 OC-2 株のプロリン生合成経路に位置する PRO3 遺伝子破壊を試みた。

(2) 細胞膜脂質構成成分の変化とプロリン細胞内輸送との関連性について、PUT4 遺伝子過剰発現株を用いて調査した。

(3) 野生酵母株を分離・育種し、高いプロリン資化性を保持する株の存在について検証した。

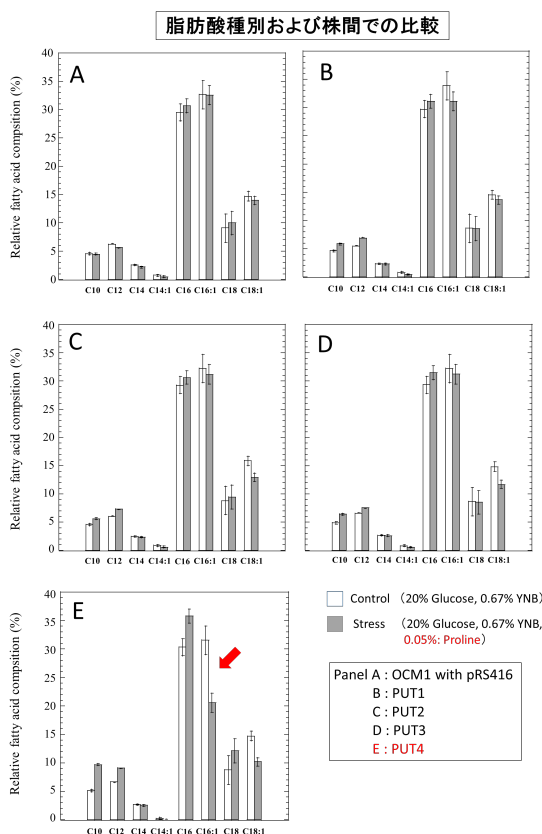
4. 研究成果

(1) 遺伝子破壊システム Kan-MX システムを用いて OC-2 株の Delta 1-pyrroline-5-carboxy late reductase 遺伝子 (PRO3) の破壊を試みたが、これを研究期間内には得ることができなかった。これは OC-2 株が 2 倍体であることから²⁾、複数存在する PRO3 遺伝子を同時に破壊することは困難であるためと推定された。

(2) *S. cerevisiae* OCM-2 株 (MAT a/a, delta ura3/ura3) および本株に PUT1, PUT2, PUT3 および PUT4 遺伝子を導入した株を、プロリン (0.5 g/L) を含む SD 合成培地 (150ml) に、波長 610nm における濁度が 0.1 になるよう接種し、28℃ で静置培養した。培養後、菌体を集菌・洗浄し凍結乾燥させ、脂肪酸抽出メチル化キットおよびメチル化脂肪酸精製キット (Cat. No. 06482-04, 06482-94; ナカライテスク) を用いて脂肪酸を抽出・精製した。メチル化脂肪酸試料をガスクロマトグラフィーに供し、脂肪酸構成比を測定した。

S. cerevisiae OCM-2 株 (MAT a/a, delta ura3/ura3) および本株に PUT1, PUT2, PUT3 および PUT4 遺伝子を導入した株の脂肪酸組成を比較した結果、プロリンを含まない SD

培地で培養した場合ではいずれの株の脂肪酸組成 (C10, C14, C14:1, C16, C16:1, C18, C18:1, C20, C20:1) は同様であったのに対して、プロリンを含む培地で培養した場合、PUT4 遺伝子導入株で C16:1 および C18:1 の割合が低下した。この現象は、PUT4 株をプロリン含有培地で培養した場合のみ見られることから、細胞内にプロリンを多く取込んだ酵母は、何らかのストレスを受けている可能性が示唆された。PUT4 遺伝子過剰発現株では、プロリン (50mM) を含んだ SD 液体培地で静置培養した場合、パルミチン酸 (C16:0) およびステアリン酸 (C18:0) の割合が増大し、逆にパルミトオレイン酸 (C16:1) およびオレイン酸 (C18:1) が減少することを見出した。



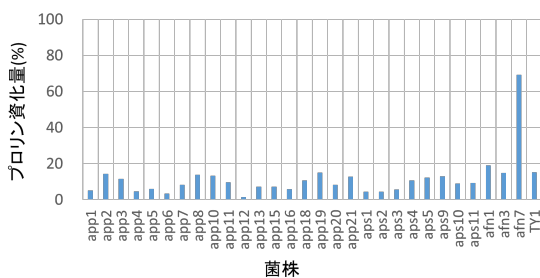
通常、酵母の全脂肪酸組成比は種によって異なるが、単一種内ではほぼ一定であることが報告されている³⁾。また、低温で培養した酵母 3 種の脂肪酸組成変化を調査した結果、12 で培養した *S. cerevisiae* は、低温アルコール発酵に適する酵母 *S. kudriavzevii* に比べて不飽和脂肪酸 (C18:1) が増加し、さらにそれらが C16:1 へ代謝される傾向が見られることが報告されている⁴⁾。本研究で見いだされた遺伝子組み換え株の脂肪酸組成の変化は、これまでに報告されていない現象であり、新規知見である可能性が高く、プロリンと細胞脂質成分およびストレス反応

との関連性が強く示唆された。

(3) 酵母は培地中のアミノ酸を細胞内に取り込み資化することで速やかに増殖する。しかし、酵母が増殖をする際、プロリンはアミノ酸であるにも関わらず、ほとんど資化されないこと (プロリン難資化性) が知られている¹⁾。酵母がプロリン難資化性を示す原因については明らかにされておらず、本現象が酵母特有の性質であるかも不明である。他方、発酵中に資化されず残ったプロリンは、製品の品質に悪影響を与えることが懸念されている。というのも、天然に存在する遊離型プロリンは苦みを与えることが報告されており⁵⁾、発酵終了後も発酵生産物にプロリンが多く残っているため苦みを呈する。この味に対する悪影響を解消するために発酵終了後における生産物中のプロリン量の低減化を図ることが必要となる。

これらの背景から、発酵する際にプロリンの低減化を図ることのできる酵母すなわち、プロリン資化能を有した酵母を純粋株として取得し、取得した株を発酵に用いることで発酵生産物におけるプロリンの低減化を図れ、産業面においてこのような酵母を利用できることは利点であると考えられた。

研究期間中、継続的に野生酵母の取得と解析を行い、高プロリン資化性株の存在について検証を進めた。新規に採取した酵母 30 株分離した。各株をプロリン含有最小培地で 25 日間、20 で静置培養した後、培養液中のプロリン減少量を測定したところ、29 株のプロリン減少率は 5~15% の間にあったものの、1 株のみ約 70% の減少率を示した。この値は PUT4 遺伝子過剰発現株が示すプロリン減少率 (40%) を上回っており、酵母を用いたプロリン低減化に大きく寄与すると考えられた。



野生酵母株のプロリン資化量

< 参考文献 >

1) C.S. Ough, and R.M. Stashak: Am. J. Enol. Vitic., 25, 7-12 (1974)
 2) Miki T. et al., J. Brew. Soc. Japan., 108(3), 181-187 (2013)
 3) Kaneko H. et al., Lipids, 12, 837-844 (1976)
 4) Tronchoni J., et al., Int.J.Food Microbiol., 155, 191-198(2012)

5) 荻原清和:食品の苦み成分,調理科学, 13
巻,1号,21-26,(1980)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 3 件)

三木健夫,篠筈光慶 酵母 *Saccharomyces cerevisiae* YM41 株の保持するキラー遺伝子の取得 (日本生物工学会大会)2017
三木健夫 PUT4 遺伝子導入酵母株の脂肪酸組成の変化 (日本生物工学会大会) 2016

三木健夫,村松昇 浸透圧ストレスがワイン酵母 OC-2 株の脂肪酸構成に与える影響 (日本生物工学会大会) 2015

6. 研究組織

(1)研究代表者

三木 健夫 (MIKI, Takeo)

山梨大学・大学院総合研究部・准教授

研究者番号: 10313793