

令和 5 年 6 月 30 日現在

機関番号：81409

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K13832

研究課題名（和文）みそ・しょうゆ特有香氣成分の酵母による生成機構の解明および増強化技術への応用

研究課題名（英文）Elucidation of the HEMF formation mechanism in yeast and application to HEMF-enhancing technology in miso and soy sauce

研究代表者

上原 健二 (Uehara, Kenji)

秋田県総合食品研究センター・食品加工研究所・主任研究員

研究者番号：30781893

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：味噌・醤油に多く含まれる機能性フラノン化合物4-Hydroxy-2 (or 5)-Ethyl-5 (or 2)-Methyl-3(2H)-Furanone（HEMF）はメイラード反応物（MRPs）に含まれる前駆体から酵母により生成される。本研究ではHEMF高生産条件であるMRPs存在下での遺伝子発現解析を実施し、発現誘導される遺伝子群（エルゴステロール合成遺伝子、鉄取込関連遺伝子）や抑制される遺伝子群（分岐鎖アミノ酸合成遺伝子）を明らかにした。さらに、酵母由来の代謝産物や補酵素とHEMF生成との関連を明らかにし、HEMF生成経路の全容解明の手掛かりとなる有用な知見を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HEMFを含む食品は様々あるが、酵母発酵によりHEMFが生成される食品は味噌・醤油のみである。一方、酵母が関与するHEMF生成メカニズムは完全に解明されておらず、人為的な発酵調節によるHEMF生成制御技術は未だ確立されていない。本研究では前駆体を含むHEMF生成条件下での酵母の遺伝子応答を解析し、HEMF生成に影響を与える遺伝子や重要な代謝産物を明らかにした。今後生成メカニズムの全容が解明されれば、発酵条件の調節による発酵食品のHEMF高含有化に加え、HEMF高生産酵母の育種技術の開発にも応用され、日本の伝統的な発酵産業である味噌・醤油産業のさらなる発展に貢献できるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：4-Hydroxy-2 (or 5)-Ethyl-5 (or 2)-Methyl-3(2H)-Furanone (HEMF), a functional furanone compound found in miso and soy sauce, is formed by yeast from precursors derived from Maillard reaction products (MRPs). In this study, we performed gene expression analysis in the presence of MRPs, revealing that ergosterol biosynthesis genes and iron uptake-related genes were induced, on the other hands, branched-chain amino acid biosynthesis genes were suppressed. Furthermore, the relationship between HEMF production and yeast-derived metabolites or coenzymes was verified, providing useful insights into the elucidation of the entire HEMF formation mechanism.

研究分野：応用微生物学

キーワード：HEMF Saccharomyces cerevisiae Zygosaccharomyces rouxii Miso and soy sauce Acetaldehyde Maillard reaction

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

甘いカラメル様の香りを有する HEMF は、香気としての役割のほか甘味増強効果や抗腫瘍活性など様々な機能性を有する。したがって、味噌・醤油中の高含有化により風味向上はもちろんのこと、更なる機能性の付与も可能となる。味噌・醤油中の HEMF は主に耐塩性酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* により生成されるため、更なる高含有化には HEMF 高生産 *Z. rouxii* の利用が最も効果的であると考えられる。しかしながら、生成経路の全容は未だ不明であり現在までに効率的な育種法も確立されていない。

HEMF の推定生成経路としては、(i) ペントースリン酸 (PP) 経路中間代謝産物の糖リン酸体から酵母を介して生成する経路 (引用文献) と、(ii) メイラード反応物 (MRPs) とグルコース代謝物から酵母を介して生成する経路 (引用文献) の 2 つが提唱されている。これまでに研究代表者は、*Z. rouxii* と遺伝的に近縁であり且つ HEMF 生成能を有する *Saccharomyces cerevisiae* を用いて HEMF 生成に關与する遺伝子の網羅的なスクリーニングを行い、アルコールデヒドロゲナーゼ 1 の遺伝子破壊により細胞内にアセトアルデヒド (ACA) が蓄積し、HEMF 生産性が大きく向上することを明らかにした (引用文献)。さらに、*S. cerevisiae* の持つエノンオキシドレダクターゼ YNL134Cp が酵母における直接的な HEMF 生合成酵素であることを初めて証明した (引用文献)。本酵素は MRPs と ACA が化学反応して生成する HEMF 前駆体に作用し、HEMF を生成する。以上述べたように、研究代表者のこれまでの研究により、酵母における HEMF 生成経路の一端が明らかとなってきた (図 1)。

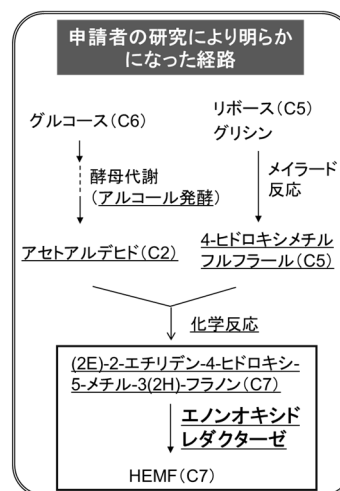


図 1. HEMF 推定生成経路

2. 研究の目的

上記のように *S. cerevisiae* において HEMF の直接的な生合成酵素 YNL134Cp が同定されたが、本酵素をコードする遺伝子を破壊しても HEMF 生成能が消失することはなかった。加えて、破壊により HEMF 生成能が低下する 87 の遺伝子群も存在したことから、*YNL134C* とは異なる別の生合成酵素遺伝子が複数存在することが示唆された。そこで本研究では、HEMF 高生産酵母の効率的育種を最終目標に、HEMF 生成条件である MRPs 存在下における遺伝子発現プロファイリング解析により HEMF 生成に關与する新規遺伝子の同定を行い、酵母の HEMF 生成経路の全容解明を目指すことにした。

3. 研究の方法

酵母の前培養は 2×YPD 液体培地を用いて 30℃、180rpm の条件で振盪培養により実施した。HEMF 生成実験に使用した HEMF 生成培地は、416 mM グルコース、200mM グリシン、200mM リボース、7.3mM リン酸二水素カリウム、20mM 硫酸マグネシウム、0.5% 酵母エキス、0.2M 食塩を含む溶液を pH6.0 に調整し、121℃ で 30 分加熱殺菌することで調製した。MRPs を含まない培地は、グリシン、リボース以外の組成を含む培地をオートクレーブ殺菌し、別に 0.2 μm フィルターろ過滅菌したグリシン、リボース溶液と混合することで調製した。RNA-seq 解析は、HEMF 生成培地または MRPs を含まない培地で培養後、菌体から RNA を調製し、タカラバイオ社に委託した。HEMF 生産性は、HEMF 生成培地に OD₆₆₀ = 2.0 となるように酵母前培養液を植え継ぎ、30℃ で 2 日間振盪培養後、HEMF を定量し、培養液の OD₆₆₀ 値で除することで算出した。培養液中の ACA 濃度は定量キットを用いて以下の手順で測定した。氷冷した 10% (W/V) 活性炭懸濁液を測定サンプルの半量加え、30 秒激しく攪拌し、遠心分離を行った。上清を冷却した超純水で適宜希釈し、マニュアルに従って濃度を測定した後、培養液の OD₆₆₀ 値で除することで ACA 生産性を算出した。エタノール生産性もキットも用いて定量し、同様に算出した。メタボローム解析のための試料調製は、酵母菌体にメタノールを加え超音波処理により細胞内代謝産物を抽出後、トリメチルシリル誘導体化処理を行うことで調製した。

4. 研究成果

(1) MRPs 存在下での遺伝子発現プロファイリング解析

酵母においてこれまでに明らかとなっている唯一の HEMF 生合成酵素は YNL134Cp のみであるが、遺伝子破壊実験から HEMF 生成への寄与率は約 60% であることが分かっている (引用文献)。この YNL134Cp は MRPs と ACA から生成される前駆体を用いて HEMF を生成していることから、同

条件下で発現誘導される別の酵素遺伝子が残りの HEMF 生成活性を有しているのではないかと考えられた。そこで、遺伝子発現を網羅的に解析可能な RNA-seq 解析を行い、MRPs 存在下での遺伝子発現プロファイルを取得したところ発現誘導される遺伝子が 97、発現抑制される遺伝子が 38 存在することが明らかとなった。

発現誘導された遺伝子セットを用いて遺伝子オントロジー (GO) エンリッチメント解析を行った結果、Biological process カテゴリーでは 18.0%が「Cell wall biogenesis/degradation」、8.2%が「Sterol (=Ergosterol) biosynthesis」、同じく 8.2%が「Iron transport」に属していた。さらに、Molecular function カテゴリーでも同様に解析した結果、14.8%が「Oxidoreductase」に属していた。YNL134Cp は oxidoreductase であることから、「Oxidoreductase」に含まれる遺伝子を候補遺伝子として選抜した。また、「Iron transport」に含まれる遺伝子も間接的に HEMF 生成に関与している可能性があるため、同様に候補遺伝子として選抜した。尚、「Sterol biosynthesis」に含まれる 5 遺伝子のうち、4 遺伝子は「Oxidoreductase」にも含まれていた。また、上記 GO エンリッチメント解析とは別に、PP 経路の反応中間体が HEMF 前駆体であることが示唆されていることから (引用文献)、PP 経路関連の遺伝子も加え、合計 15 の候補遺伝子を選抜した。

(2) HEMF 生合成酵素遺伝子のスクリーニング

遺伝子発現プロファイリング解析で選抜された候補遺伝子の解析

選抜された候補遺伝子の高発現株には HEMF 生産性が向上した株は無かったが、予想とは反して生産性が低下した株が多く存在していた。特に、*ADH6*、*YHB1* の 2 遺伝子で大きな HEMF 生産性の低下が確認された。*YHB1* 高発現株では HEMF 生産性が対照の 1/2 程度と大きく低下するため、その要因を代謝産物から解析することで HEMF 生成のキー成分が明らかになると考えられる。細胞内代謝産物を測定した結果、*YHB1* 高発現株では PP 経路反応中間体であるセドヘプチュロース-7-リン酸の細胞内蓄積量が大きく低下しており (図 2) PP 経路の反応中間体が HEMF 生成に関与している可能性を示す Sasaki らの報告 (引用文献) を支持する結果となった。さらに、HEMF の前駆体となる ACA の生産性も確認したところ、驚くべきことに *YHB1* 高発現株ではほぼゼロとなっていた (図 2)。原因は不明だが、この結果は ACA の分解または他成分への代謝を促進する方向に酵母の代謝経路を改変すると HEMF 生産性が低下することを示唆していた。

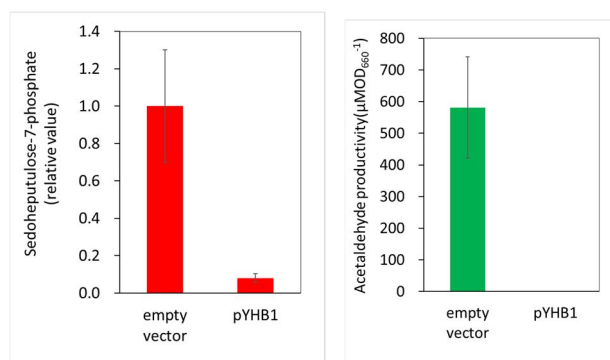


図 2. *YHB1* 高発現株の解析
(左: セドヘプチュロース-7-リン酸 (相対値) 右: ACA 生産性)

また、高発現により HEMF 生産性が低下する *Adh6p*、*Yhb1p* はともに補酵素として NADH や HADPH を必要とする。NADPH は YNL134Cp が HEMF 生合成を触媒する際にも利用されるため、これら遺伝子高発現株では NAD(P)H 消費が HEMF 生成と競合しており、結果生成量が低下したものと推定された。この NADPH 生成量と HEMF 生産性との関連を検証するため、酵母の主な NADPH 生成源である PP 経路を遮断し、その HEMF 生産性を確認した。予想通り、PP 経路の入口を触媒する *ZWF1* 破壊株では NADPH 生成に必要な oxidative phase が進行せず NADPH が供給されないため HEMF 生産性は低下した (図 3)。また、PP 経路の NADPH 生成反応以降の non-oxidative phase を遮断 (*TKL1*/*TKL2* 遺伝子破壊) してもやはり HEMF 生産性は低下し、その原因は ACA 生産性の低さであることが示唆された (図 3)。ACA 存在下で PP 経路遺伝子が *STB5* を介して誘導され、耐性を獲得するという報告はあるが (引用文献)、PP 経路の損傷が ACA 代謝に影響を及ぼすという報告はこれまで無く、HEMF 生成経路の全容を理解するうえでも重要な知見を得られた。

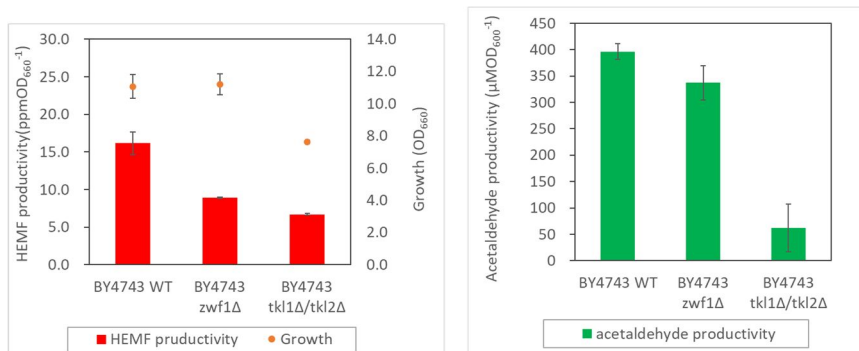


図 3. PP 経路遺伝子破壊株の解析
(左: HEMF 生産性および生育、右: ACA 生産性)

遺伝子破壊株ライブラリデータと発現プロファイリング解析により選抜された遺伝子の解析

さらに候補遺伝子を抽出するため、以前報告した *S. cerevisiae* 非必須遺伝子破壊株ライブラリーを用いた HEMF 生成関連遺伝子のスクリーニング結果と、本研究で実施した遺伝子発現解析結果とを組み合わせ、新たな候補遺伝子を選抜した。「破壊により HEMF 生産性が低下」、「MRPs 存在下で発現誘導される」という 2 つの基準で遺伝子を再スクリーニングしたところ、3 つの候補遺伝子 (*ECM33*, *TOS1*, *YJR120W* (= *DMO1*)) が新たに選抜された。これら遺伝子の破壊株を作成し、HEMF 生産性を確認したところ、*YJR120W* 破壊により HEMF 生産性が大きく低下することが明らかとなった (図 4)。*YJR120W* 破壊株では増殖性の低下は見られなかったが、エタノール生産性がわずかに低下した。ACA 生産性も確認したところ、*YJR120W* 破壊によりほぼゼロとなっていたことから、HEMF 生産性が低下した原因はおそらく前駆体としての ACA 量が不足したためと考えられる (図 4)。この結果は、先に示した *YHB1* 高発現株での解析結果と類似しており、酵母株の持つ ACA の代謝能力が HEMF 生産性に大きく影響していることを示していた。

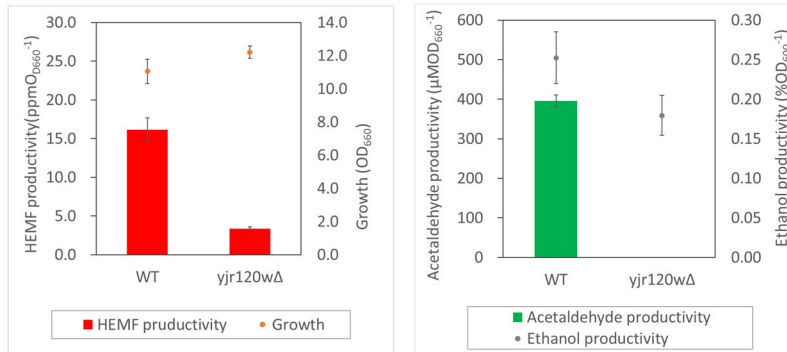


図 4. *YJR120W* 破壊株の解析

(左: HEMF 生産性および生育、右: ACA 生産性およびエタノール生産性)

YJR120W は、嫌気条件下でのステロールの取込に関与しているが (引用文献) 本研究ではすべて好気条件である振盪培養を行っているため、ステロール取込に関与している可能性は考えにくい。一方、本研究から酵母ステロール (= エルゴステロール) の生合成遺伝子は、MRPs 存在下で発現誘導されることから、未知のメカニズムで *YJR120W* とエルゴステロールが協調して HEMF 生成に関与している可能性も考えられた。

(3) 遺伝子発現プロファイリング解析結果から見た酵母細胞内代謝に関する考察

Iron transporter 関連遺伝子が発現誘導されていることから、MRPs 存在下では細胞内が鉄欠乏状態になっていると考えられた。この状態になると多くのヘムを必要とするエルゴステロール合成経路が活性化されることが報告されており、この鉄欠乏が MRPs 存在下でのエルゴステロール生合成遺伝子の誘導を引き起こした可能性が高い。興味深いことに、培地に細胞透過性の鉄キレーター (2,2'-Dipyridyl; DPI) を添加して酵母の鉄利用を抑えると、酵母の生育阻害は起こるが HEMF 生成量の大きな低下にはつながらず、生産性は向上した (図 5)。*YNL134C* は MRPs 存在下でも発現誘導されなかったが、この結果は鉄欠乏をシグナルとして *YNL134C* 以外の HEMF 生合成酵素遺伝子が活性化されている可能性を示唆していた。

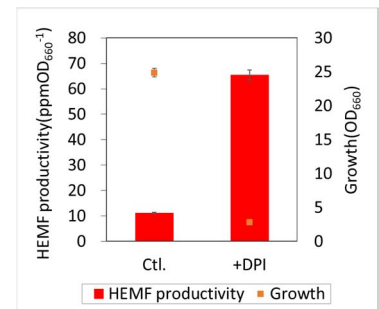


図 5. 鉄キレーター添加時の HEMF 生産性

(4) ミトコンドリアと HEMF 生成

以前報告した *S. cerevisiae* 非必須遺伝子破壊株ライブラリーを用いた HEMF 生成関連遺伝子のスクリーニング (引用文献) では、HEMF 生産性が低下した遺伝子破壊株には多数のミトコンドリア関連遺伝子が含まれており、その多くが表現型として呼吸欠損を示した。ミトコンドリアの有無が HEMF 生産性に及ぼす影響を解析するため、*S. cerevisiae* 及び *Z. rouxii* のミトコンドリア欠損株 (ρ^0) を取得し、HEMF 生産性を確認した。結果は、両酵母の ρ^0 株で HEMF 生産性が大きく低下したことや、エタノール生産性が向上したことは共通していたが (図 6)、ACA 生産性は *S. cerevisiae* では低下し、*Z. rouxii* では上昇傾向にあった (図 6)。このようにミトコンドリアの機能不全が HEMF の生成抑制につながる共通点はあったものの、そのメカニズムについては現段階では不明である。少なくとも *S. cerevisiae* においては ACA 蓄積量が低下する条件 (呼吸欠損、*YHB1* 高発現、*YJR120W* 破壊など) では HEMF 生産性が低下するが、*Z. rouxii* ではミトコンドリアで調節される ACA 以外の別の前駆体が存在するのかもしれない。

ミトコンドリアと本研究で解析した遺伝子との関連をさらに考察すると、Yhb1p は補酵素とし

て NADPH を利用し、且つ自身の生合成自体にヘムが必要であることから、これら 2 つを消費するエルゴステロール生合成と競合している可能性が考えられた。酸素存在下でもミトコンドリアの形態を維持するためにエルゴステロール生合成が重要であることが報告されており（引用文献）、*YHB1* は間接的にミトコンドリア機能に影響し、結果 HEMF 生成にも影響を及ぼしているのかもしれない。*YJR120W* についても、嫌気条件ではあるがエルゴステロール取込に關与しており、破壊によってエルゴステロール生合成に何らかの影響を及ぼしている可能性も否定できない。上記と同様、エルゴステロール生合成が正常に行われなくなると、ミトコンドリア機能不全に陥り、HEMF 生成能も低下すると考えられる。

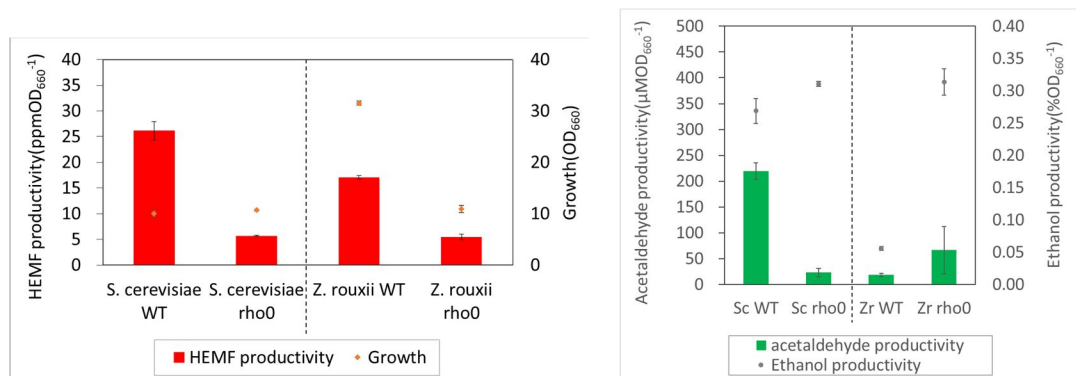


図 6. 呼吸欠損株の解析（左：HEMF 生産性および生育、右：ACA 生産性およびエタノール生産性）

(5) 本研究のまとめ

本研究では新規 HEMF 生合成酵素遺伝子の同定を目指し、MRPs 存在下での遺伝子応答を解析してきたが、新たな酵素の同定はできなかった。しかしながら、HEMF 生成メカニズムの全容解明のためには、HEMF 生成に直接関与する反応以外の経路や重要な中間代謝産物についても理解を深める必要がある。これまでは「MRPs と ACA から前駆体が生成し、そこから HEMF が作られる」ところまでしか明らかになっていなかったが、本研究を通して酵母細胞内での生成経路のおおよその全体像を把握できるようになった（図 7）。今後はエルゴステロール生合成やミトコンドリアと ACA 生成との関連を解析して酵母細胞“内”での生成経路を確定させるとともに、酵母細胞“外”からの取込機構も解析し、効率的な HEMF 高生産酵母の育種へとつなげていきたい。

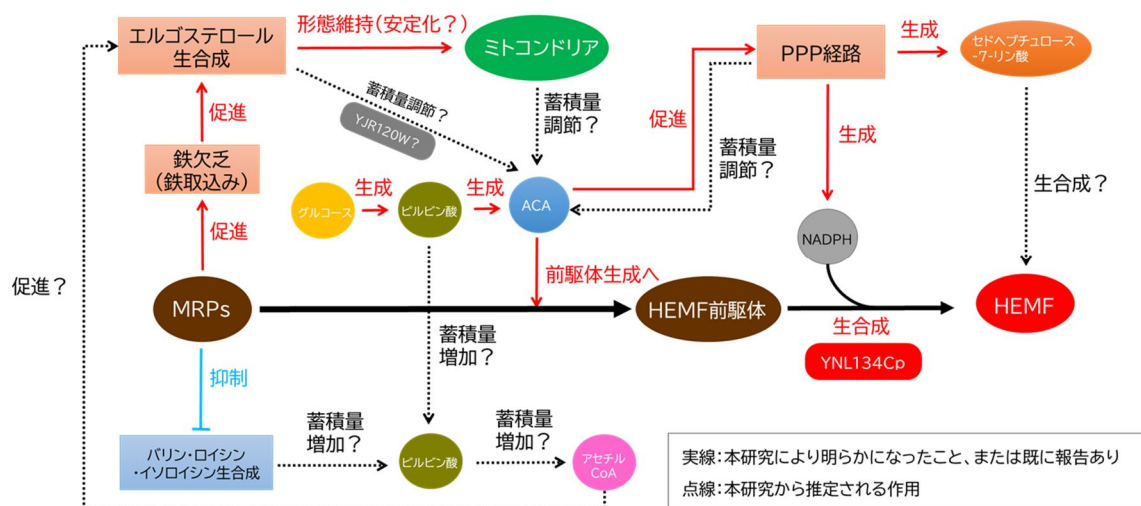


図 7. 本研究のまとめ

[引用文献]

- : Sasaki M *et al.*, *J Agric Food Chem* **39**: 934-938 (1991)
- : Ohata M *et al.*, *Biosci. Biotechnol Biochem* **71**(2): 407-413 (2007)
- : Uehara K *et al.*, *Appl Environ Microbiol* **81**: 453-460 (2015)
- : Uehara K *et al.*, *J Biosci Bioeng* **123**: 333-341 (2017)
- : Matsufuji Y *et al.*, *J Basic Microbiol* **50**: 494-498 (2010)
- : Reiner S *et al.*, *MBoC* **17**: 90-103 (2006)
- : Schneiter R *et al.*, *Biochimie* **89**: 255-259 (2007)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 上原 健二
2. 発表標題 味噌・醤油特徴香成分の酵母における生成機構の解明
3. 学会等名 日本醸造学会大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------