

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24780069

研究課題名(和文)野生酵母産膜シグナル伝達経路の全容解明と、革新的ワイン産膜防止法開発への応用

研究課題名(英文)Elucidation of signal transduction pathways for pellicle formation in wild yeast and its application to develop a novel method for preventing deleterious pellicle formation in wineries

研究代表者

中川 洋史 (NAKAGAWA, Youji)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号：30362081

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：山梨県内のワイナリーで分離された野生産膜性酵母株において、細胞表面の糖タンパク質をコードするFL011遺伝子に作用するグルコースシグナル伝達経路が産膜シグナル伝達経路であることを明らかにした。また、野生産膜性酵母株において、FL011プロモーター上の111 bpの転写抑制配列が欠損していることを明らかにした。さらに、グルコースシグナル伝達経路の下流に存在する転写活性化因子をコードするFL08遺伝子が産膜に必要であることを明らかにした。本研究で得られた知見から、Flo8pの阻害物質をワイン中に分泌するワイン用酵母や乳酸菌が、革新的なワイン産膜防止法の開発に有用であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we revealed that the glucose signal transduction pathway acting on FL011 gene, which encodes a cell surface glycoprotein, is one of the signal transduction pathways for pellicle formation by a wild pellicle-forming strain of *Saccharomyces cerevisiae* isolated from contaminated wine in Yamanashi prefecture, Japan. We also found that the wild pellicle-forming strain had the deletion of the 111-bp repression sequence in the FL011 promoter. Furthermore, we found that FL08 gene encoding a transcriptional activator in the glucose signal transduction pathway is required for pellicle formation by the wild pellicle-forming strain. Based on the results obtained in this study, yeast or lactic acid bacteria strains which secrete inhibitors of Flo8p would be useful to develop a novel method for preventing deleterious pellicle formation in wineries.

研究分野：応用微生物学

キーワード：野生酵母 産膜 ワイン FL011 FL08 遺伝子破壊

1. 研究開始当初の背景

酵母の産膜とは、液体培地の表面(液体と空気の界面)において、産膜性酵母が白いベール状または厚い蓋状の皮膜となり、時には表面全体を覆う現象である。*Saccharomyces* 属の野生産膜性酵母が原料のブドウを媒介としてワインの製造工程に持ち込まれると、白ワイン、赤ワインともに貯蔵熟成工程でワインの表面において産膜を引き起こし、アセトアルデヒドを主体とした“産膜臭”と呼ばれる異臭を生成する。これにより、ワインの商品価値が著しく低下するため、その防止はワイナリー(ワイン醸造所)にとって重要な課題となっている。しかしながら、ワイン産膜を防止するための汎用的な方法は未だ開発されておらず、新しい産膜防止方法が望まれている。研究代表者らは世界に先駆けて、実験室酵母や貯蔵熟成ワインを汚染する野生産膜性酵母において、細胞表層の糖タンパク質をコードする *FL011* 遺伝子が産膜に必須であることを明らかにしてきた。しかし、野生産膜性酵母において *FL011* の発現を制御する産膜シグナル伝達経路については不明であった。

2. 研究の目的

上記の背景から、研究代表者らは *FL011* の発現を人為的に制御するという新しい手法によって、ワイン産膜の防止が可能になると考えた。そこで本研究では、野生産膜性酵母において *FL011* の発現を制御する産膜シグナル伝達経路の全容を解明し、ワイナリーにおける貯蔵熟成ワインの産膜被害を防止するための、産膜シグナル伝達経路の人為的コントロールによる革新的なワイン産膜防止方法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

使用菌株として、山梨県内のワイナリーで分離された野生産膜性酵母株である *Saccharomyces cerevisiae* YFY-6 株と、非産膜性の実用ワイン酵母株である *S. cerevisiae* W3 株を用いた。*FL011* の発現を制御する産膜シグナル伝達経路の全容を解明するために、まず、ワイン醸造環境中で重要な炭素源であるグルコースの有無が産膜シグナルに關与する可能性を調べた。pH を 3.5 に調整した液体培地もしくは、赤ワインを用いた産膜試験によりグルコース存在下、非存在下における産膜能を調べ、*FL011* の発現量をリアルタイム RT-PCR 法により調べた。また、YFY-6 株と W3 株の *FL011* プロモーター配列を、塩基配列を解読することにより調べた。*FL011* のグルコースによる発現抑制が産膜に及ぼす効果は、YFY-6 株の *FL011* プロモーターを構成的プロモーターである *TDH3* プロモーターに置換することにより調べた。グルコースシグナル伝達経路の下流に存在する転写活性化因子である Flo8p タンパク質が産膜に必要なか否かを、Flo8p をコード

する *FL08* 遺伝子を破壊することにより調べた。

4. 研究成果

(1) 野生産膜性酵母における産膜シグナル伝達経路の解明

野生産膜性酵母株である YFY-6 株は、3% (v/v) エタノールを単一炭素源とする flor 培地においては産膜したが、flor 培地中のエタノールを 10% (w/v) グルコースに置換したグルコース培地においては産膜しなかった(図1)。従って、YFY-6 株の産膜はグルコースによって抑制されることが明らかになった。また、*FL011* mRNA の発現をリアルタイム RT-PCR 法により調べた結果、YFY-6 株において、*FL011* の発現が flor 培地に比べ、グルコース培地において顕著に低下していた(図2)。従って、野生産膜性酵母において、*FL011* の転写がグルコースによって抑制されることが明らかになった。出芽酵母では代替炭素源の資化や糖新生、呼吸に関わる遺伝子群など、多数の遺伝子の転写がグルコースによって抑制される。そこで、他の遺伝子ではなく、*FL011* のグルコースによる転写抑制が産膜を制御しているのかを調べるために、YFY-6 株の *FL011* プロモーターを、構成的プロモーターである *TDH3* プロモーターに置換した YFY-6 [*TDH3p-FL011*] 株を構築した。YFY-6 株はグルコース培地や 10% (w/v) グルコースを添加した赤ワインにおいては産膜しなかったのに対し、YFY-6 [*TDH3p-FL011*] 株はいずれの培地においても良好に産膜した(図3)。これらの結果から、YFY-6 株においては、*FL011* のグルコースシグナルによる転写抑制が産膜を制御していることが明らかになった。従って、野生産膜性酵母において、*FL011* の発現を制御するグルコースシグナル伝達経路が産膜シグナル伝達経路であることが示された。

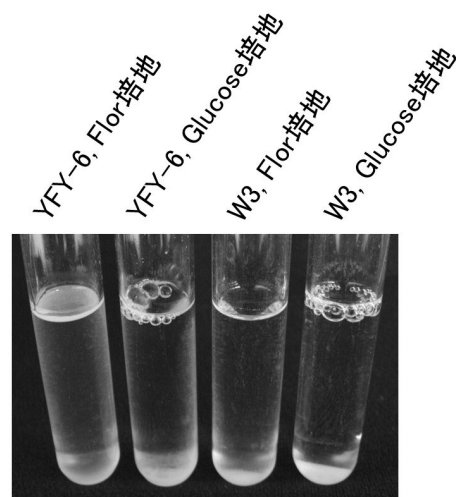


図1 野生産膜性酵母株と実用ワイン酵母株の産膜能

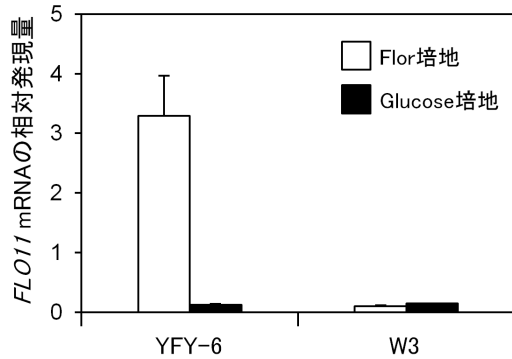


図2 野生産膜性酵母株と実用ワイン酵母株における *FLO11* mRNA の相対発現量 *ACT1* mRNA の発現量を内部標準とした際の相対発現量を示した。

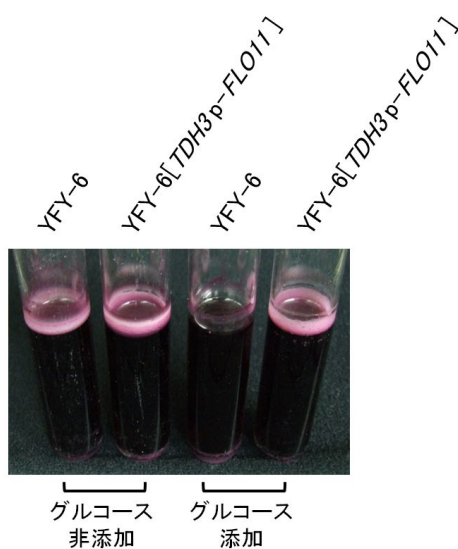


図3 野生産膜性酵母株とその *FLO11* プロモーター置換株の赤ワインにおける産膜能

(2) 野生産膜性酵母株および非産膜性実用ワイン酵母株の *FLO11* プロモーター配列の解析

スペイン、イタリア、フランス、およびハンガリーのシェリー型ワインの製造に用いられる実用産膜性酵母株において、*FLO11* プロモーター上の 111 bp の転写抑制配列が欠損していることが報告されている。そこで、YFY-6 株と W3 株において *FLO11* プロモーターの当該配列周辺の塩基配列を調べた結果、W3 株では 111 bp の転写抑制配列が存在していたが、YFY-6 株では欠損していることが明らかになった (図4)。従って、111 bp の転写抑制配列の欠損が、YFY-6 株の産膜能に関与していることが示唆された。日本のワイナリーで分離された野生産膜性酵母株が、地理的に離れたヨーロッパの実用産膜性酵母株と同じく *FLO11* プロモーター上の 111 bp の転写抑制配列を欠損していることは、この配列の欠損が産膜能の獲得にとって重要である

ことを示している。

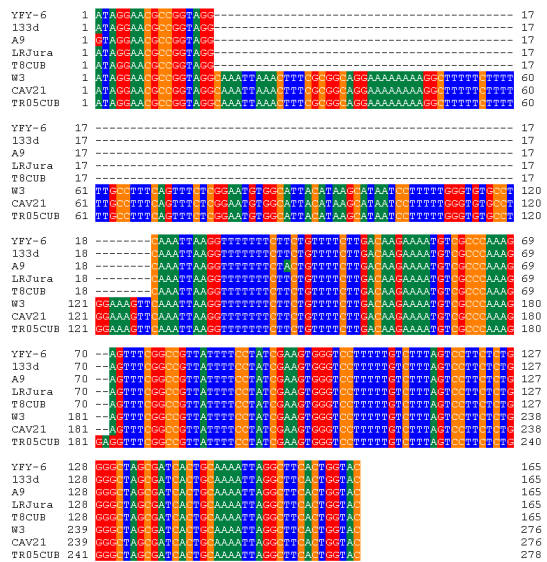


図4 *FLO11* プロモーターの 111 bp 転写抑制配列周辺の塩基配列

YFY-6 は日本の野生産膜性酵母株、133d、A9、LRJura、および T8CUB はそれぞれスペイン、イタリア、フランス、およびハンガリーのシェリー型ワインの製造に用いられる実用産膜性酵母株である。W3、CAV21、および TR05CUB はそれぞれ日本、フランス、およびハンガリーの非産膜性のワイン酵母株である。

(3) ワイン産膜防止のための標的因子の同定

FLO11 に作用する産膜シグナル伝達経路であるグルコースシグナル伝達経路を制御することで野生産膜性酵母による産膜を防止するためには、ワイン製造環境の酵母において、グルコース枯渇時に *FLO11* の転写脱抑制が起こらないようにすればよいと考えられる。しかしながら、一般にグルコースシグナル伝達経路は好氣的基質の代謝に必要な数多くの遺伝子のグルコース枯渇時における転写脱抑制にも必要であるため、本経路の制御によってワインの風味に影響を与えてしまう恐れがある。従って、実際のワイン産膜防止のための標的因子としては、グルコース枯渇時の *FLO11* の転写脱抑制に必要であり、かつ *FLO11* 以外の遺伝子の発現には最小限の影響しか与えない因子が望ましい。そのような視点で調査を行った結果、グルコースシグナル伝達経路の下流に存在する転写活性化因子である Flo8p を標的因子の候補として見出した。そこで、YFY-6 株の産膜に Flo8p が必要であるか否かを調べるために、Flo8p をコードする *FLO8* の破壊株である YFY-6 *flo8/flo8* 株を構築し、産膜能を調べた。その結果、YFY-6 *flo8/flo8* 株は flor 培

地において産膜しなかった(図5)に従って、*FL08* は野生産膜性酵母株における産膜に必要であることが明らかとなり、実際のワイン産膜防止のための標的因子として*Flo8p*を同定することに成功した。

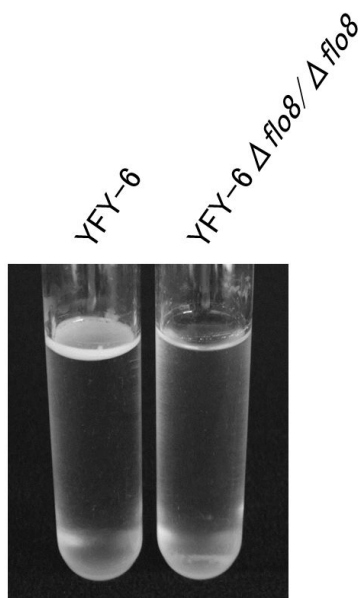


図5 野生産膜性酵母株とその *FL08* 破壊株の flor 培地における産膜能

(4) 今後の展望

本研究において、ワイン産膜防止のための標的因子として*Flo8p*を同定することに成功した。今後、*Flo8p*の阻害物質を発見し、それをワイン中に分泌するワイン用酵母や乳酸菌を育種することができれば、革新的なワイン産膜防止法の開発につながることを期待できる。

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)

[雑誌論文](計1件)

Youji Nakagawa, Toru Hasebe, Miyuki Ishiai, Hideki Yamamura, Yuzuru Imura, and Masayuki Hayakawa, Forced expression of *FL011* confers pellicle-forming ability and furfural tolerance on *Saccharomyces cerevisiae* in ethanol production, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 査読有, Vol. 78, No. 4, 2014, 714-717
DOI: 10.1080/09168451.2014.895660

[学会発表](計1件)

長谷部 亨、中川 洋史、山村 英樹、飯村 穰、早川 正幸、ストレス条件下での酵母によるエタノール生産における産膜プラスミ

ドの利用、第 65 回日本生物工学会大会、2013 年 9 月 18 日、広島国際会議場(広島県・広島市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中川 洋史 (NAKAGAWA, Youji)
山梨大学・総合研究部・助教
研究者番号: 30362081