

「オルニチン高生産酵母を活用した健康系クラフトビールの開発」

テンフィールズファクトリー株式会社

奈良先端科学技術大学院大学 研究推進機構 特任教授 高木 博史

【背景】

現在、日本国内には700ヶ所を超えるクラフトビールの醸造所が存在し、多種多様なクラフトビールが製造販売されている。その結果、市場では過剰な供給が生じており、他製品と差別化できるビールの開発が求められている。クラフトビールの主要成分の多くは、酵母のアミノ酸代謝によって生成されるため、クラフトビールの品質向上や個性の創出には、アミノ酸の組成や生成量に特徴を持つ酵母の開発が極めて重要である。昨年度の本支援事業において、我々はNAISTキャンパス内からクラフトビール醸造が可能な野生酵母 *Saccharomyces cerevisiae* (ADH837株) を単離した。ADH837株は、リジンやアスパラギン酸、 γ -アミノ酪酸 (GABA) などのアミノ酸を多く含む健康系クラフトビールの醸造が可能であることが判明し、昨年5月に健康系クラフトビールとして販売を開始した。

【目的と研究プロセス】

本研究では、テンフィールズファクトリー株式会社 (TFF) と奈良先端大 (NAIST) の共同研究によって、新たな健康系クラフトビールの開発を目指す。オルニチンはシジミやシメジなどに多く含まれるアミノ酸で、タンパク質の構成成分ではないものの、肝臓の解毒作用促進やアルコール性疲労の抑制、成長ホルモンの分泌促進などの生理作用が報告されている。特に肝機能の向上に寄与することから、クラフトビールに含まれるアルコールの分解を助けることが期待される。したがって、オルニチン高含有酵母を用いることで、健康イメージを強調し、付加価値の高いクラフトビールの開発が可能になると考えた。具体的には、NAISTはオルニチン高含有酵

母の育種とその高含有メカニズムの解析を行う。一方、TFF はそれらの酵母を用いてビールの試験醸造を行い、ビール醸造への有用性（味・香りの差別化、高付加価値化など）を実証する。

【実験方法】

◎ アミノ酸の毒性アナログを用いたスクリーニング

ADH837 株にエチルメタンスルホン酸 (EMS) 処理 (6%、30 分) を施し、染色体 DNA にランダムな変異を導入した。EMS 処理後の細胞懸濁液を 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のカナバニンを含む SD 培地 (2% グルコース、0.17% 窒素源ベース、0.5% 硫酸アンモニウム) に塗布した後、30°C で培養を行い、生育の速いコロニーを取得した。

◎ オルニチン含量の分析

各変異株を YPD 培地 (2% グルコース、1% 酵母エキス、2% ペプトン) で 30°C、250 rpm、24 時間、もしくは麦汁で 23°C、静置、48 時間培養した。集菌・洗浄後に、 $\text{OD}_{600} = 40$ 相当の細胞を 1 mL の水で懸濁し、100°C で 20 分間処理し、細胞から総アミノ酸を抽出した。遠心分離後の上清に等量のクエン酸リチウム緩衝液 (pH 2.0) を加えてフィルターろ過 (0.22 μm) を行うことで、アミノ酸分析用の試料とした。オルニチン含量は JLC500/V2 (日本電子社) で測定し、細胞内アミノ酸含量は $\text{nmol}/\text{OD}_{600}$ unit で示した。アミノ酸定量用の濃度既知スタンダードは、標準アミノ酸混合液 (和光純薬社) を用いた。

◎ 発酵試験

各菌株をオートクレーブ滅菌済みの麦汁に植菌し、ファーモグラフ (アトー社) によって生成する炭酸ガス量を経時的に測定することで発酵力を評価した。測定条件としては、初期菌体濃度を $\text{OD}_{600}=1.5$ に調整し、23°C で静置培養を行った。

◎ 立体構造予測

Gly351Asp 変異型 N-アセチルグルタミン酸キナーゼ Arg6 の推定立体構造は、SWISS model (<https://swissmodel.expasy.org>) を用いて、Arg6 の結晶構造 (PDB ID: 3zzi) を鋳型にホモロジーモデリングにより構築した。野生型および変異型 Arg6 の構造は、Pymol (<http://www.pymol.org/>) を用いて描画した。

【実験結果】

◎ オルニチン高生産株の育種

オルニチンはアルギニンの代謝中間体であるため、アルギニン高含有株からオルニチン高含有株を取得できると考えた。そこで、アルギニンの毒性アナログであるカナバニンに耐性を示す変異株の取得を行った（図 1）。

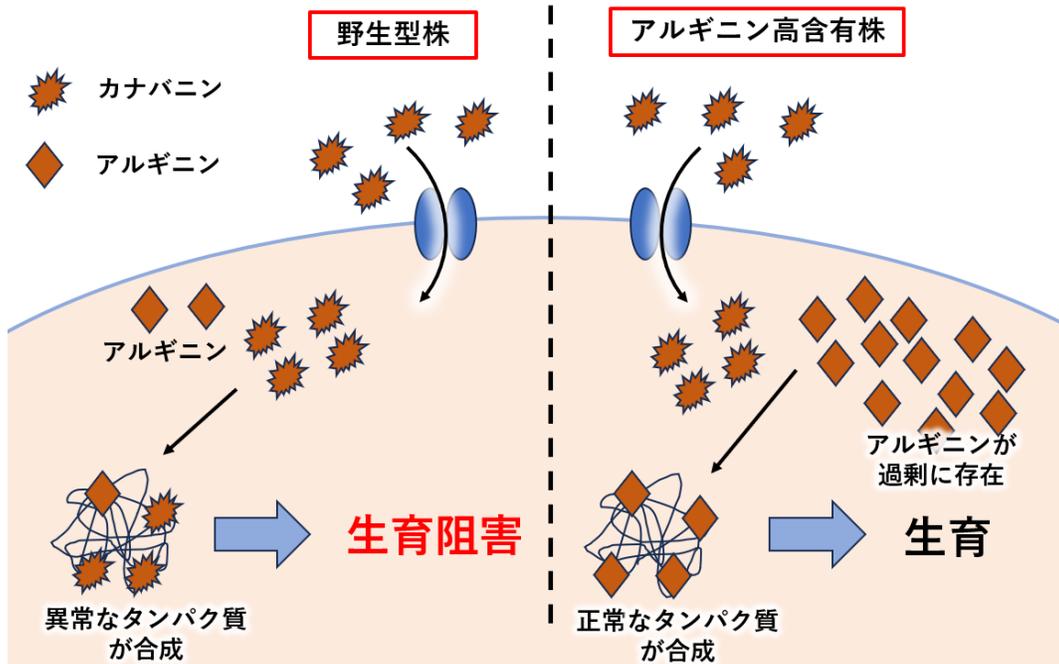


図 1 カナバニン添加後の野生型株とアルギニン高含有株の生育

野生型株では、カナバニンがタンパク質合成の際にアルギニンと競合し、タンパク質中に取り込まれる。その結果、構造や機能が異常なタンパク質が合成され、生育が阻害される。一方、アルギニン高含有株では、過剰なアルギニンがカナバニンのタンパク質中への取り込みを防ぐことで正常なタンパク質を合成できるため、カナバニン存在下でも生育が可能になる。

ADH837 株を EMS で処理し、アルギニンアナログであるカナバニンに耐性を示す変異株をスクリーニングした結果、カナバニン含有培地でも生育可能な株を 534 個分離した。次に、カナバニン培地における生育を詳細に検討した結果、親株よりも明らかに生育が良好な 140 株を選抜した (ADHorn 株と命名)。ADHorn 株の細胞内オルニチン含量を測定した結果、親株と比較して 9 倍以上のオルニチン含量を示す株を 1 株 (ADHorn49 株) 取得した (図 2)。ADHorn49 株のオルニチン含量を再測定した結果、ADHorn49 株は親株と比較して富栄養培地である YPD 培地では約 8.5 倍に増加することが判明し、オルニチン高含有株であることが示された (図 3)。

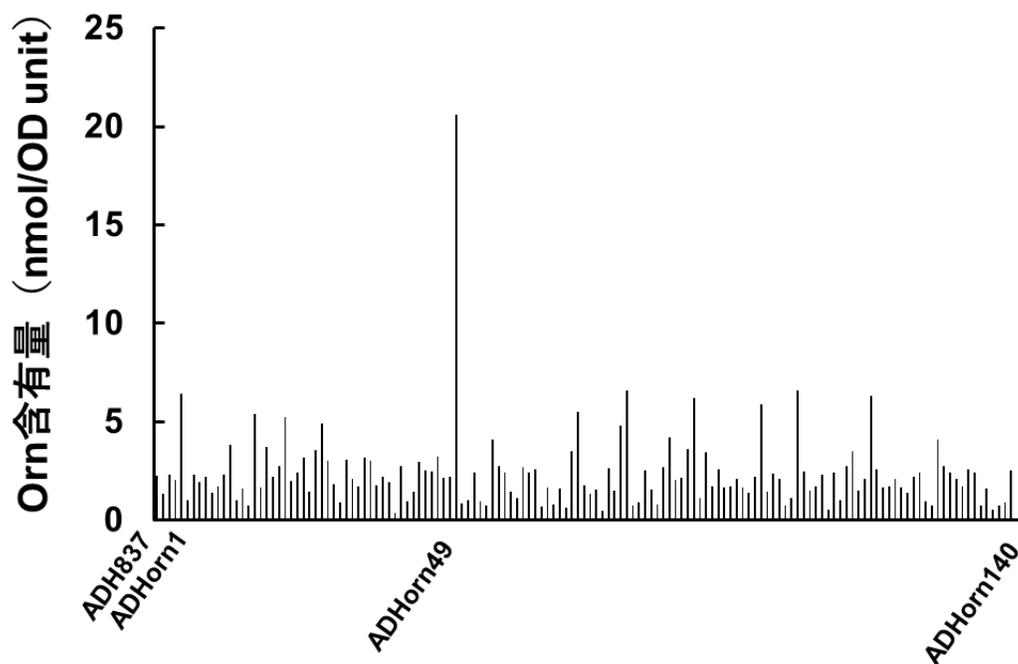


図2 ADH837株と各ADHorn株の細胞内オルニチン含量

ADH837株（親株）と各ADHorn株の細胞内オルニチン含量を測定した（ $n = 1$ ）。

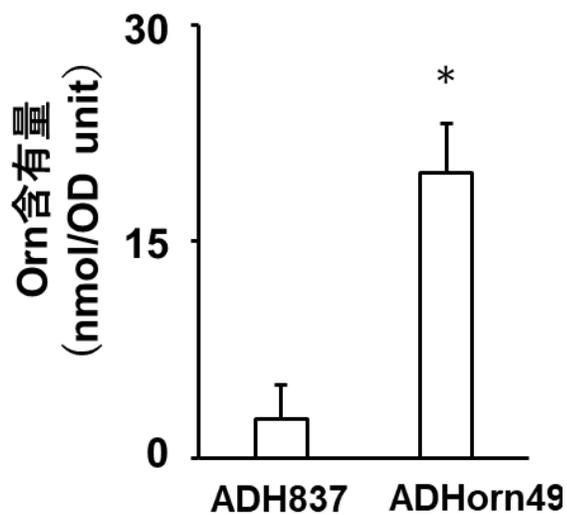


図3 ADH837株とADHorn49株の細胞内オルニチン含量

ADH837株とADHorn49株をYPD培地で培養し、細胞内オルニチン含量を測定した。有意差検定はStudent's *t*-test法を用いて行った（* $p < 0.05$ vs. ADH837, $n = 3$ ）。

次に、ADHorn49 株のクラフトビール醸造への応用を検討するため、ADH837 (親株) と ADHorn49 株を用いて麦汁培地を使用したビール発酵のモデル試験を行った。その結果、ADH837 株と ADHorn49 株の二酸化炭素 (炭酸ガス) 産生速度に顕著な差は認められなかった (図 4)。また、各菌株の細胞内および発酵液上清中のアミノ酸含量を測定した。ADHorn49 株の細胞内オルニチン含量は ADH837 株より、約 3.5 倍高いことが判明した。培養上清については、ADHorn49 株を用いた発酵によってオルニチン含量が顕著に増加することを見出した (図 5)。最後に、ADHorn49 株のキラー性を検討したが、ADHorn49 株は市販のエールビール酵母やラガービール酵母を積極的に死滅させないことが判明した (図 6)。以上より、ADHorn49 株はオルニチンを多く含む健康系クラフトビールの醸造が可能であることが示された。

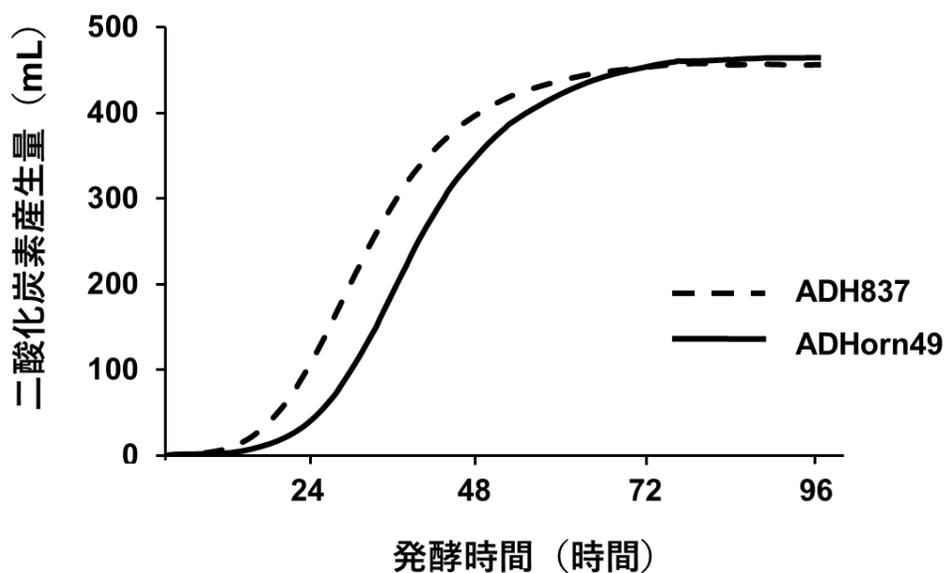


図 4 ビール発酵のモデル試験における酵母の二酸化炭素産生量
麦汁培地で静置培養を行い、二酸化炭素産生量をファーマグラフによって測定した。

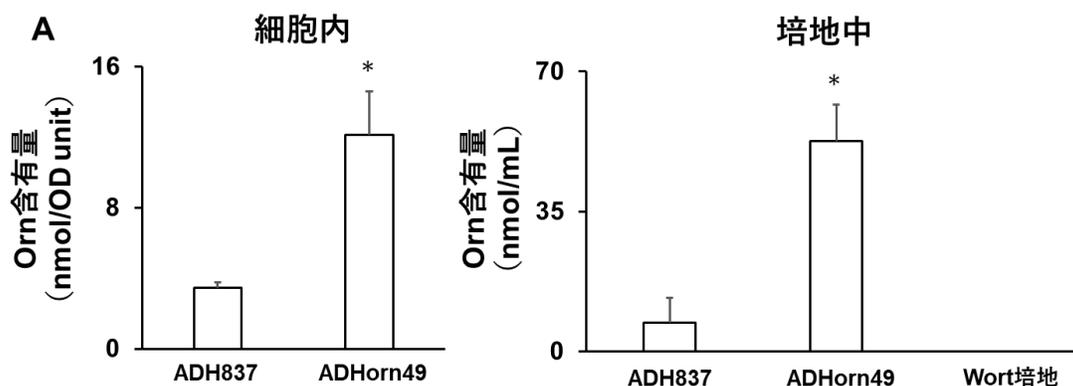


図5 ビール発酵のモデル試験における細胞内および培地上清中の (A) オルニチン、(B) アルギニン、(C) リジン、(D) γ -アミノ酪酸含量
 麦汁培地で静置培養を行い、細胞内と培地上清中のアミノ酸含量を測定した。有意差検定は Student's *t*-test 法を用いて行った (* $p < 0.05$ vs. ADH837, $n = 3$)。



図6 キラー性試験
 YPD 培地上で ADHorn49 株とラガービール酵母、エールビール酵母が交差するように白金耳で塗布後、30°C で3日間培養して生育を観察した。

◎ オルニチン高含有メカニズムの解析

オルニチン高含有に関与する遺伝子の変異を探索するために、ADHorn49 株の全ゲノム DNA 解析を行った。親株 (ADH837 株) のゲノム DNA 配列と比較した結果、アミノ酸置換を伴う変異を 327 個見出した。次に、アルギニン・オルニチン代謝に関与する遺伝子を文献情報から調べた結果、*N*-アセチルグルタミン酸キナーゼ Arg6 をコードする ARG6 遺伝子にアミノ酸置換 (Gly351Asp) を伴う変異 (ARG6^{G351D}; 1,052 G>A、ヘテロ変異) を同定した ((表 1)。また、このアミノ酸置換部位は Arg 内の 2 つのドメイン (触媒ドメイン、真菌特異的ドメイン) を繋ぐリンカー部分に一していた (図 7)。さらに、351 番目残基のグリシン (Gly351) の保存性を調査したところ、真菌類の間で高度に保存されていることが判明した (図 8)。

表 1 ADHorn49 株のオルニチン合成に関する遺伝子の変異

遺伝子	変異 (塩基)	置換 (アミノ酸)	遺伝子型
ARG5,6	1052 G>A	Gly351Asp	ヘテロ

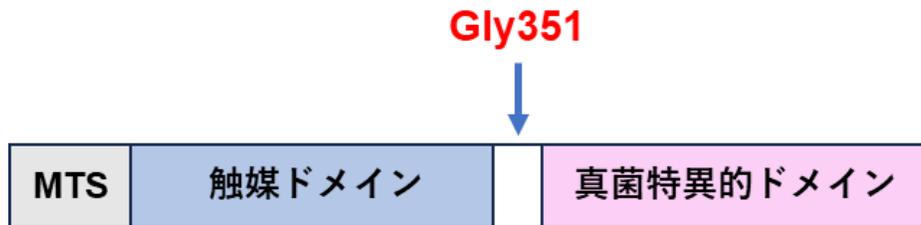


図 7 Arg6 のドメイン構造

Arg6 はミトコンドリア移行配列 (MTS)、触媒ドメイン、真菌特異的ドメインで構成される。今回同定したアミノ酸置換は両ドメインの間に存在する。

	351
<i>S. cerevisiae</i>	KELFTDSGAGTMIRRGYKL
<i>C. glabrata</i>	KELFTDSGAGTMIRRGYKL
<i>C. albicans</i>	KELFTDSGAGTLIRRGYRL
<i>A. nidulans</i>	KELFTDSGAGTLIRRGNKV
<i>A. fumigatus</i>	KELFTDSGAGTLIRRGNKV
<i>S. pombe</i>	KELFTESGAGTLISRGEVI

図 8 Arg6 の 351 番目残基の保存性

上の数字は *S. cerevisiae* の N-アセチルグルタミン酸キナーゼにおけるアミノ酸残基番号 (*Saccharomyces cerevisiae*: *S. cerevisiae*; *Candida glabrata*: *C. glabrata*; *Candida albicans*: *C. albicans*; *Asprgillus nidulans*: *A. nidulans*; *Asprgillus fumigatus*; *A. fumigatus*; *Schizosaccharomyces pombe*: *S. pombe*)。

オルニチン高含有に及ぼす変異 ($ARG6^{G351D}$) の影響を調べるために、様々な産業酵母や実験室酵母の細胞内で変異型 $ARG6$ 遺伝子 ($ARG6^{G351D}$) を発現させた。その結果、いずれの酵母でも $ARG6^{G351D}$ を導入すると細胞内オルニチン含量が大幅に増加することが判明した (図 9)。このため、ADHorn49 株のオルニチン高含有は $ARG6$ 遺伝子のアミノ酸置換を伴う変異 (Gly351Asp) が寄与していることが強く示唆された。

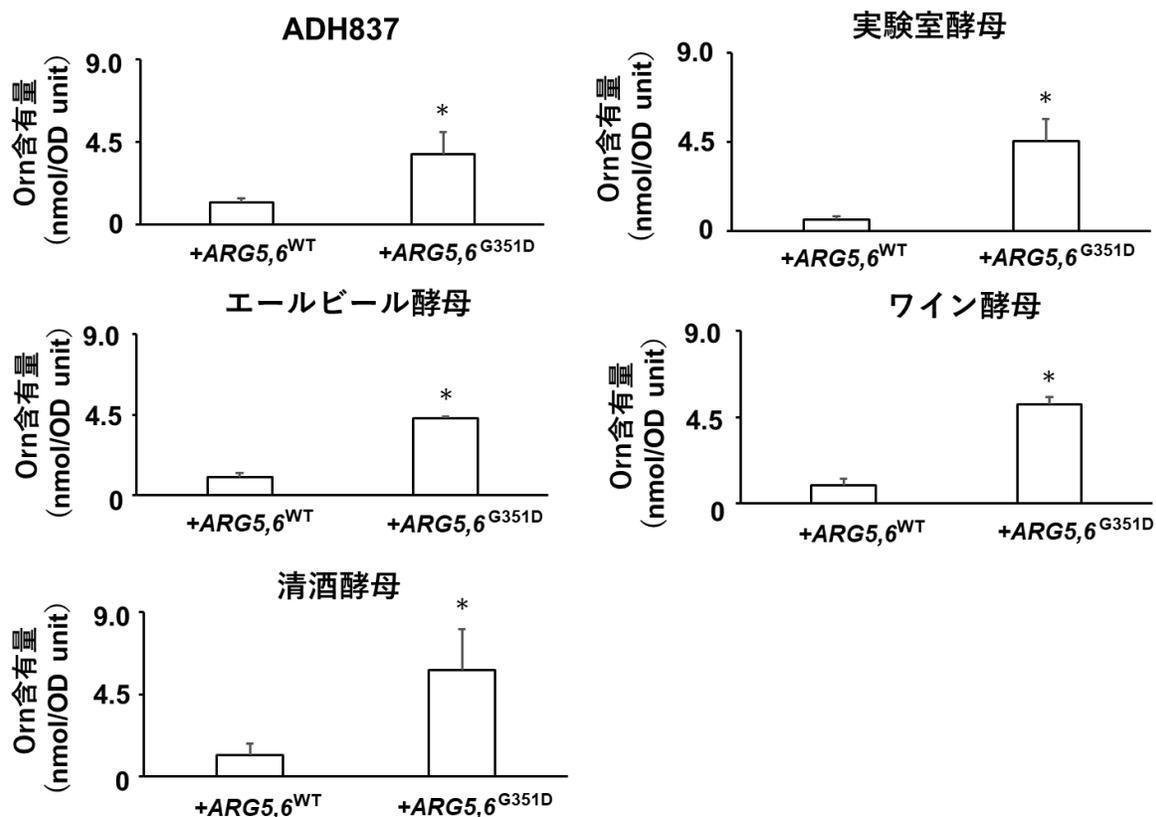


図9 $ARG6^{G351D}$ 発現株における細胞内オルニチン含量

$ARG5,6^{WT}$ と $ARG6^{G351D}$ を発現させた株を YPD+G418 培地で 1 日間培養し、オルニチン含量を測定した (* $p < 0.05$ vs. + $ARG5,6^{WT}$, $n = 3$)。

また、Arg6 における 351 番目残基の重要性を解析するために、351 番目残基のグリシンを他の 19 種類のアミノ酸に置換した変異型遺伝子を構築した。これらの変異型 $ARG6$ 遺伝子を実験室酵母に導入した結果、いずれの形質転換体においても細胞内オルニチン含量が顕著に増加することが判明した (図 10)。以上より、Arg6 の 351 番目のグリシンはオルニチン合成を負に制御している可能性が考えられた。

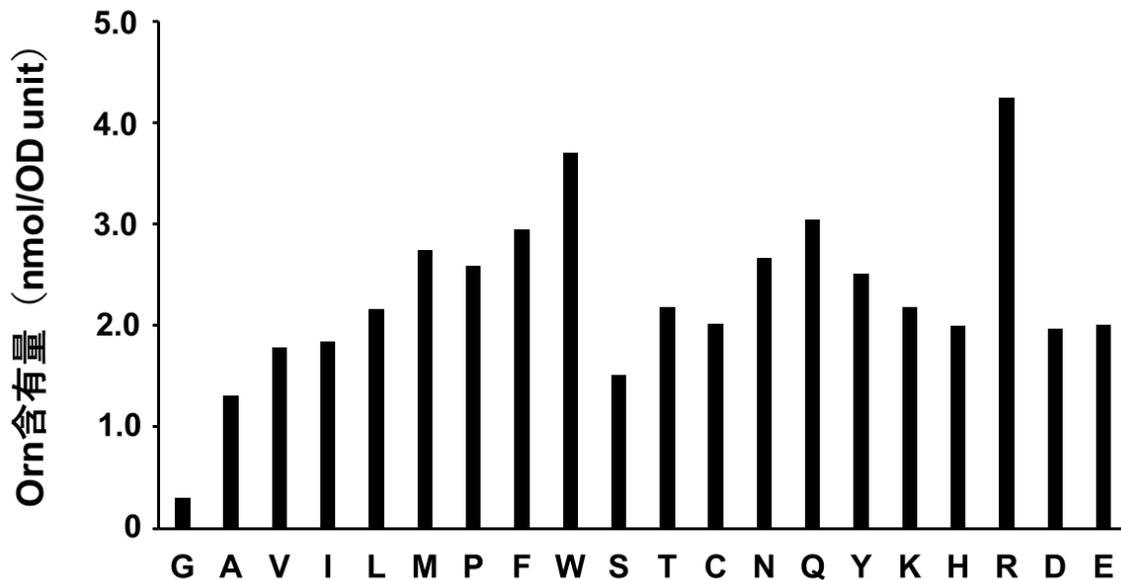


図 10 変異型 ARG6 発現株における細胞内オルニチン含量

野生型 ARG6 と変異型 ARG6 を発現させた株を SC-Ura 培地で 1 日間培養し、オルニチン含量を測定した ($n=1$)。置換した各アミノ酸残基を 1 文字表記で示す。

351 番目残基の役割を検討するために、Arg6 変異体 (G351D、G351Q、G351R、G351W) のモデル構造を構築した。まず、Arg6 の立体構造を観察したところ、Gly351 は *N*-アセチルグルタミン酸 (NAG) (基質) やアルギニン (阻害剤) の結合部位から離れた距離に位置していた (図 11 A)。次に、各 Arg6 変異体のモデル構造と野生型酵素の立体構造を比較すると、アルギニン結合部位の周辺残基の位置は全く同じであった (図 11 B-F)。G351D および、G351Q、G351R、G351W 変異体において、Ser323 と Arg349 の位置の変化が起こり、両残基間に水素結合が形成される可能性が示された (図 11 C-F)。また、G351D 変異体は 351 番目残基と Arg349 の距離が近づき、両残基間に新たに水素結合が形成されると予測された (図 11 C)。G351Q および Q351R、G351W 変異体においては、351 番目残基と Asn433 の距離が近づき、両残基間に水素結合が形成される可能性が示された (図 11 D-F)。さらに、G351R 変異体は 351 番目残基と Asn434 の距離が近づき、両残基間に水素結合が形成されていた (図 11 E)。また、G351W 変異体は Arg349 と Asn434 の位置が変化し、両残基間に水素結合が形成されると推測された (図 11 F)。以上より、351 番目残基をグリシンから他のアミノ酸に置換することで、Arg6 の触媒ドメインと真菌特異的ドメインの間の相互作用が強まることが示唆された。

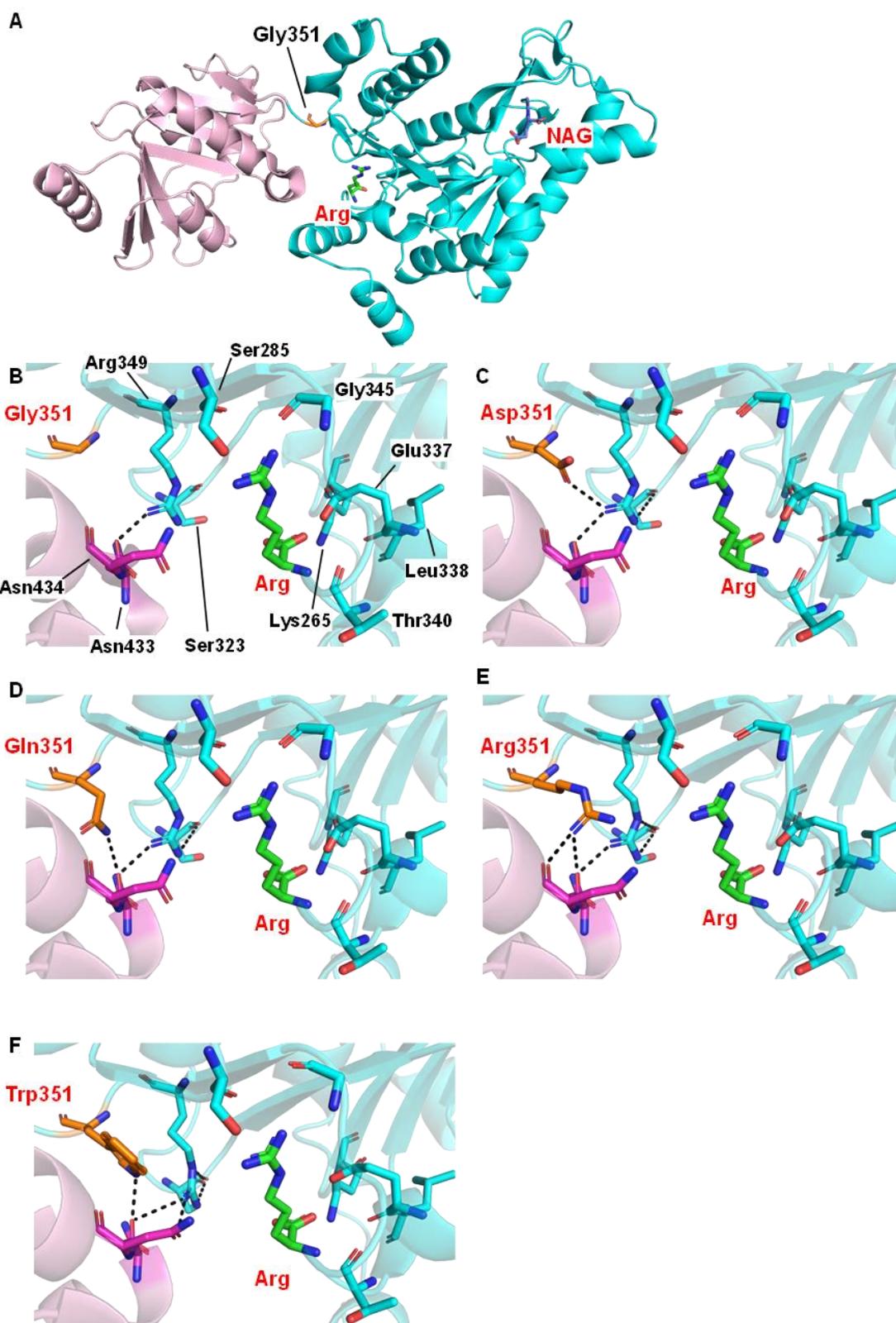


図 11 Arg6 変異体の推定立体構造

A: Arg6 の全体構造。触媒ドメインおよび真菌特異的ドメインはシアンまたはピンクのカーボンモデル、Gly351 はオレンジのスティックモデルでそれぞれ示す。Arg の結晶構造 (PDB ID:3zzh) 中の触媒ドメインにおいて、基質 (NAG) および阻害剤 (Arg) を青または緑のスティックモデルでそれぞれ示す。

B: 野生型 Arg6 の 351 番目残基周辺の構造。351 番目残基およびアルギニンはオレンジまたは緑のスティックモデルでそれぞれ示す。アルギニンの認識に関わる残基 (Lys265, Ser285, Glu337, Leu338, Thr340, Gly345) も同様にスティックモデルで示す。また、残基間の推定水素結合を黒の破線で示す。

C-F: G351D (C), G351Q (D), G351R (E), G351W (F)変異体における 351 番目残基周辺の推定構造。351 番目残基およびアルギニンはオレンジもしくは緑のスティックモデルでそれぞれ示す。351 番目残基と相互作用の形成が示唆される残基 (Arg349, Asn433, Asn434) やアルギニンの認識に関わる残基 (Lys265, Ser285, Glu337, Leu338, Thr340, Gly345) も同様にスティックモデルで示す。また、残基間の推定水素結合を黒の破線で示す。

Arg6 タンパク質の活性制御は、ArgR による発現抑制とアルギニンによる酵素活性阻害によって行われることが知られている。特に、アルギニンによる酵素活性阻害が重要な役割を果たしている。実際、我々のグループは清酒酵母において Arg6 のアルギニン結合部位付近のアミノ酸残基を置換することで、酵素活性のアルギニン感受性を低下させ、オルニチンの高生産に成功している。一方で、本研究で見出した 351 番目残基のアミノ酸置換はアルギニン結合部位から離れており、このアミノ酸置換はアルギニン結合部位の構造に影響を与えないことが示唆された。

近年、アルギニン代謝の初発酵素 Arg2 と Arg6 が物理的に結合しており (Arg2-Arg6 複合体)、両者のタンパク質としての安定性に寄与していることが報告された。また、Arg2-Arg6 複合体形成はアルギニン感受性を制御しており、両者の酵素活性制御にも重要であると考えられている。アルギニン結合型 Arg6 と非結合型 Arg6 の構造比較から、Arg6 の構造はアルギニンの結合で大きく変化することが示されている。アルギニンが結合することで、Arg6 の構造は 351 番目残基周辺のリンカー領域を中心に回転し、全体構造が大きく変化する。このため、アルギニンは Arg2-Arg6 複合体の構造を壊すことで、細胞内オルニチン・アルギニン合成を抑制する可能性がある。351 番目残基のアミノ酸置換によって生じる触媒ドメインと真菌特異的ドメインの新たな水素結合 (相互作用) はこの制御機構を解除すると考えられる。つまり、351 番目残基のアミノ酸置換はアルギニン存在下における Arg2-Arg6 複合体の安定化に寄与し、両者の酵素活性を維持することが示唆される (図 12)。

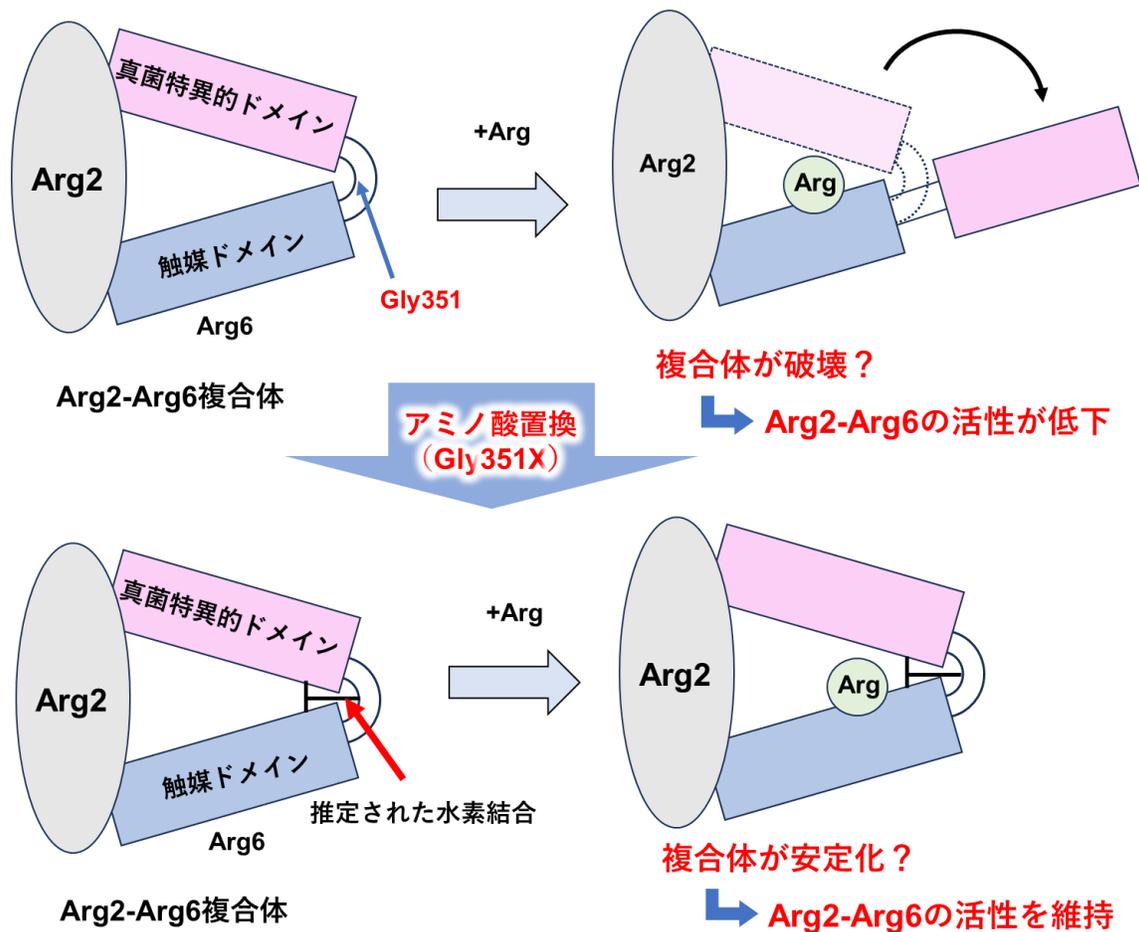


図12 アルギニンによる Arg2-Arg6 複合体の制御機構 (仮説)

アルギニンは Arg2-Arg6 複合体の構造を壊す。351 番目残基のアミノ酸置換体はリンカー領域周辺に水素結合 (相互作用) が生じることで、アルギニン存在下においても Arg2-Arg6 複合体の構造が安定化すると考えられる。

【今後の展開】

- ◎ ADHorn49株を用いたクラフトビールの試験醸造および醸造特性の解析を行う。
- ◎ Arg2-Arg6複合体形成の観点から、Gly351が酵素機能に及ぼす影響を検討する。

以上