

WEB版

# シーエンス

vol. 23



2025年3月

公益財団法人 奈良先端科学技術大学院大学支援財団

### ■ 研究報告

「奈良漬の製造工程に適応した微生物とその品質への役割の解明」  
「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」

### ■ 奈良先端科学技術大学院大学支援財団の概要

### ■ 奈良先端科学技術大学院大学支援財団の活動紹介

#### (1) 大学院大学支援事業

教育研究活動に対する支援  
国際交流活動に対する支援  
アワード事業

#### (2) 産学官交流事業

奈良先端大発 新産業創出支援事業  
奈良先端大産学連携フォーラム

#### (3) 地域交流事業

高山サイエンスタウンフェスティバル  
NAIST サイエンス塾  
夏休み科学実験教室  
けいはんなプラザ・プチコンサート in 高山  
サイエンスランドの運営  
高山サイエンスプラザの団体受入れ  
高山サイエンスプラザ

誌名「シーエンス」(CIENCE)の由来

シーエンス

(公財) 奈良先端科学技術大学院大学支援財団(Foundation For Nara Institute of Science and Technology)の「Science」(科学)と「支援」から「シーエンス」(CIENCE)と名付けました。

## ■研究報告

奈良先端科学技術大学院大学支援財団では、地元の中小企業等が奈良先端科学技術大学院大学と連携し、大学内で生まれた研究成果や技術シーズの実用化に向け取り組む研究を支援しています。

令和6年度に支援しました2件の研究を紹介します。

### ・奈良漬の製造工程に適応した微生物とその品質への役割の解明

奈良屋本店

奈良先端科学技術大学院大学 先端科学技術研究科 バイオサイエンス領域 准教授 渡辺 大輔

### ・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

#### 【研究協力者】

NAIST 研究推進機構・特任准教授 西村 明

NAIST 先端科学技術研究科 バイオサイエンス領域・博士前期課程2年 山田 康矢

# 「奈良漬の製造工程に適応した微生物とその品質への役割の解明」

奈良屋本店

奈良先端科学技術大学院大学 先端科学技術研究科 バイオサイエンス領域  
准教授 渡辺 大輔

## 【序論】

奈良漬は日本の食文化に古くから根付いている伝統的な発酵食品とされ、他の発酵漬物と同様に微生物の関与が推測されてきた。1970 年代の研究では、奈良漬から *Lactiplantibacillus pentosus*、*Lacticaseibacillus paracasei* といった乳酸菌や、*Saccharomyces* sp.、*Pichia* sp.などの酵母が単離されたことが報告されている(Yamagata & Fujita (1974); Kitamura *et al.* (2016))。しかし、これらの微生物が奈良漬の微生物叢においてどの程度の割合を占めるのか、またそれらの特性については十分に解明されていない。さらに、奈良漬の製造過程における微生物叢の変遷や、それらが品質に与える影響についての知見も不足している。そのため、奈良漬が発酵食品であると厳密に定義できるかどうかも明確ではない。

奈良漬の製造には、高濃度エタノールを含む熟成酒粕に塩漬野菜を漬け込むという、他の漬物とは異なる独特の方法が用いられる(図 1)。このため、奈良漬には塩分やエタノールに適応した微生物による特有の生態系が形成されていると考えられる。奈良漬を安定的に生産し、さらにその付加価値を向上させるためには、微生物学的な知見が不可欠であるが、他の漬物と比較しても未解明の点が多く残されている。

本研究では、奈良漬における微生物生態系の存在とその形成原理を明らかにすることを目的とする。奈良漬の製造工程における微生物叢のダイナミクス、品質への影響、および微生物の生育特性を解析することで、奈良漬の製造環境に適応した微生物の特徴を解明することを目指す。

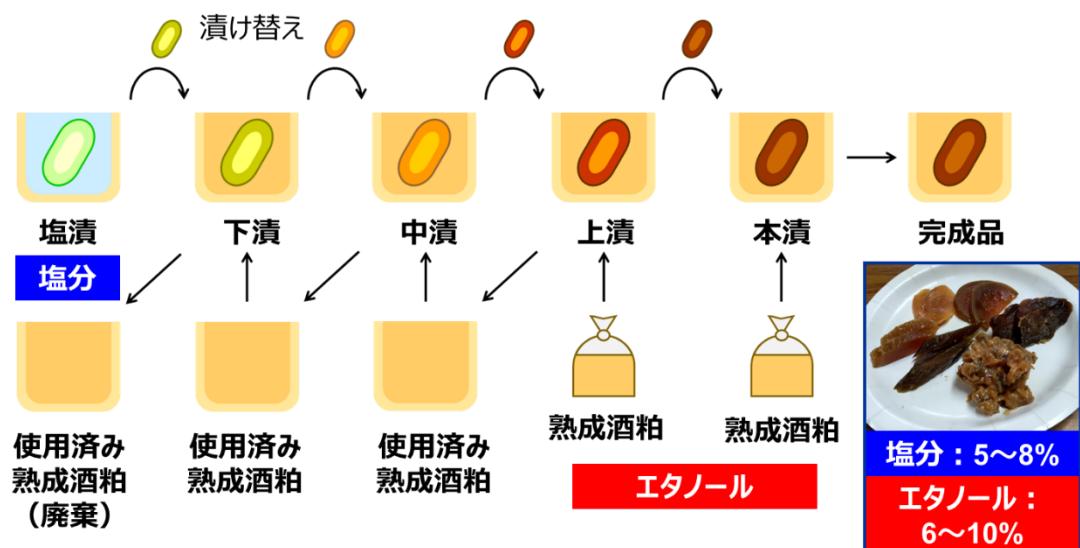


図 1. 奈良漬の製造方法

## 【結果と考察】

### 1. 奈良漬の微生物叢解析

本研究では、奈良漬の製造過程の微生物生態系の全体像を明らかにするため、原材料として塩漬野菜と熟成酒粕、仕掛け品前半として中漬（前回製造時の使用済み熟成酒粕に2回漬替えた状態）、仕掛け品後半として上漬（中漬が終わった仕掛け品を未使用の熟成酒粕に漬替えた状態）、および完成品の奈良漬をサンプルとして、各製造工程の微生物叢解析を実施した。サンプル中のそれぞれの微生物の占有率を調べるために、真菌ではITS1領域、細菌・アーキアでは16S rDNA V4領域に基づくアンプリコンシーケンス解析を行った。さらに、各製造工程でどのような微生物が生息しているかを調べるために、微生物の単離・簡易同定についても併せて実施した。これら2種類の実験データを統合して奈良漬の生態系の特徴付けを行った。

ITS1領域のアンプリコンシーケンス解析（図2）では、原材料から完成品までのすべての製造工程を通して標準的な製法を用いた2社（そのうちの1社が奈良屋本店）で類似した傾向を示した。新粕および熟成酒粕では、*Aspergillus*属と*Saccharomyces*属が大部分を占めていた。これらは清酒醸造に用いられた麹菌と清酒酵母にそれぞれ対応すると考えられる。細菌の増殖を抑制するためにク

口ラムフェニコールを加えたYPD培地を用いて真菌の単離を試みたところ、熟成酒粕からは *Aspergillus* 属や *Saccharomyces* 属の真菌は単離されなかった。したがってこれらの微生物は酒粕の熟成以降の工程では生菌として残存しているわけではないことが推察された。塩漬野菜においては、アンプリコンシーケンス解析の結果から、*Zygosaccharomyces* 属の酵母が優占的であることが明らかになった。また、2社のメーカーの塩漬野菜からクロラムフェニコール含有YPD培地において *Zygosaccharomyces rouxii* が単離されたことから、塩漬野菜中で *Z. rouxii* が優占種であることが示唆された。*Z. rouxii* は耐塩性の酵母として知られており、醤油や味噌などの高塩分な食品の発酵に関わっている。したがって、奈良漬の原材料である塩漬野菜の製造においても *Z. rouxii* が関与している可能性が示された。仕掛品および完成品の奈良漬では、塩漬野菜で優占的であった *Zygosaccharomyces* 属の酵母は減少し、原材料の熟成酒粕と類似した微生物叢となった。

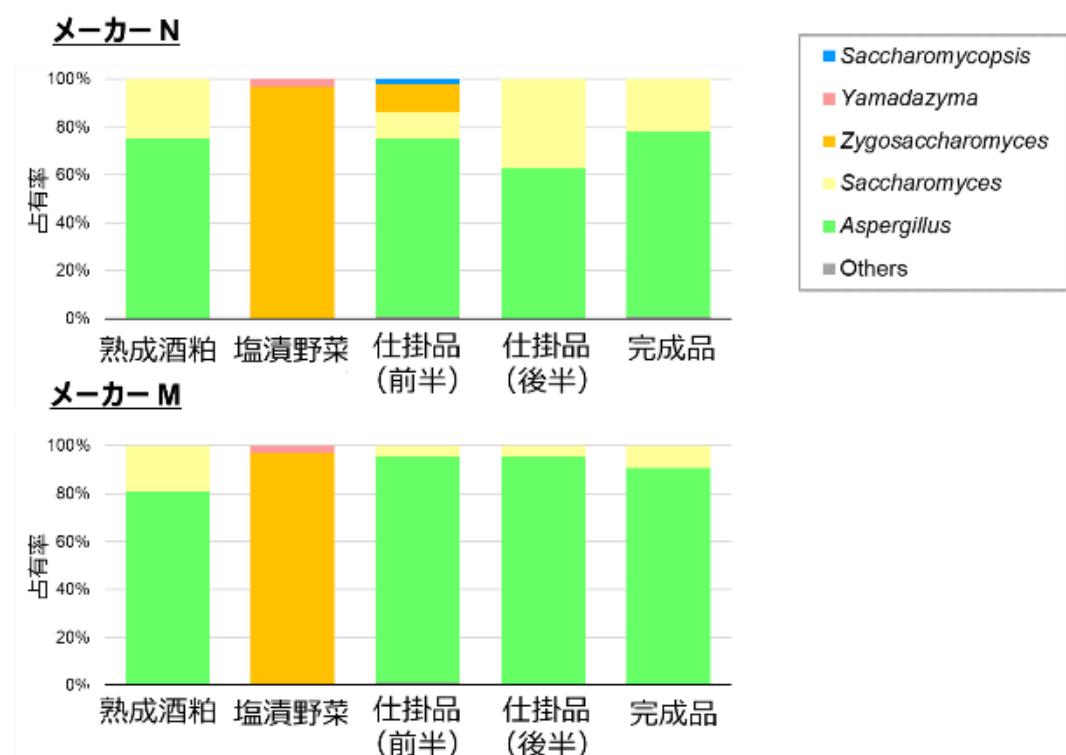


図 2. 奈良漬の製造工程における真菌の微生物叢(属レベル)

細菌・アーキアについても、原材料から完成品までのすべての製造工程を通して標準的な製法を用いた2社で類似した傾向を示した。アンプリコンシーケンス解析の結果(図3)では、熟成酒粕は主に *Staphylococcus* 属や *Bacillus* 属などの

細菌で構成されていた。塩漬野菜では、好塩性の種が多く属する Halomonadaceae 科や Halobacteriaceae 科などの多様な細菌やアーキアが見られた。仕掛品および完成品では、アンプリコンシーケンス解析の結果から、Lactobacillaceae 科が優勢であることがわかった。その大部分は単一のシーケンスから構成されており、該当するシーケンスは *Fructilactobacillus fructivorans* の 16S rDNA の部分配列と合致していた。単離実験では、当初実験に使用した一般的な乳酸菌用培地として知られる MRS 培地(エタノール非含有)では *F. fructivorans* の出現頻度は高くなかったが、奈良漬の製造環境により近いと考えられる 10%エタノール含有 SI 培地に切り替えたところ、標準的製法の 2 社に共通して仕掛品、完成品のいずれからも *F. fructivorans* のみが単離されるに至った。原材料としてウリ以外の野菜を用いた奈良漬でも、*F. fructivorans* が優占している点は共通していた。一方、非標準的製法で製造されたメーカー A、B、C の完成品は *Bacillaceae* 科の細菌や、*F. fructivorans* 以外の乳酸菌などによって構成されており、標準的製法とは異なる傾向を示した。したがって、奈良漬の標準的製法の製造環境に適応した微生物であると考えられる(図 4)。

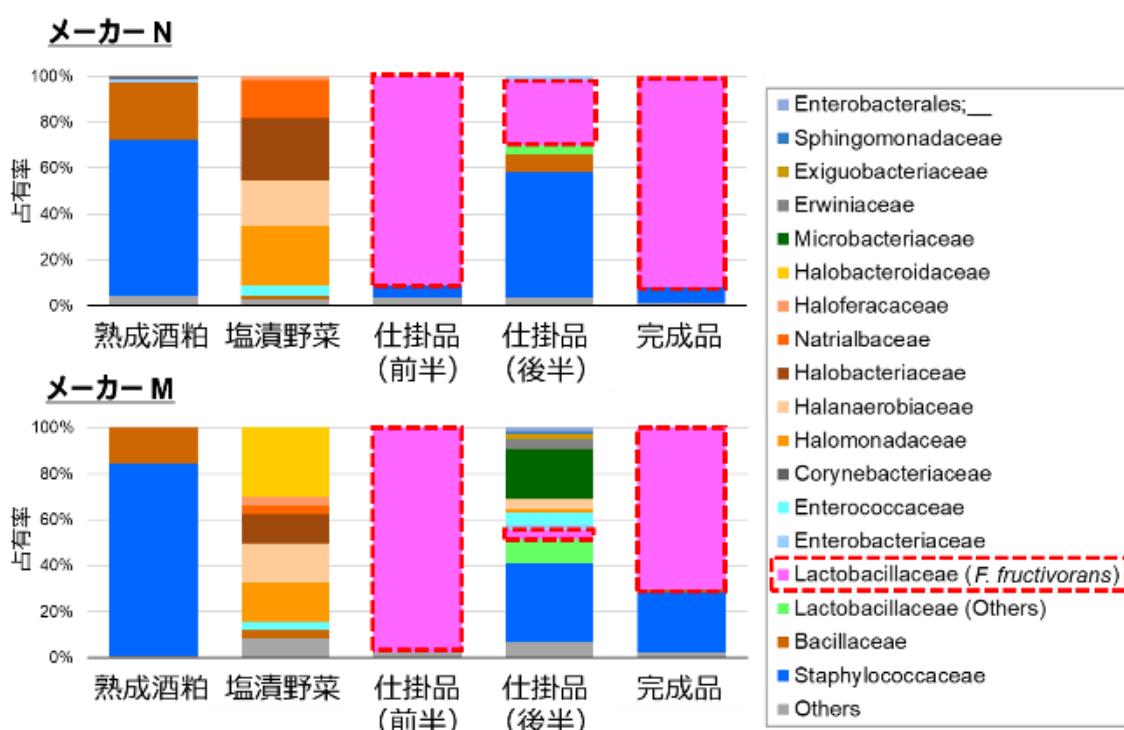


図 3. 奈良漬の製造工程における細菌・アーキアの微生物叢(科レベル)

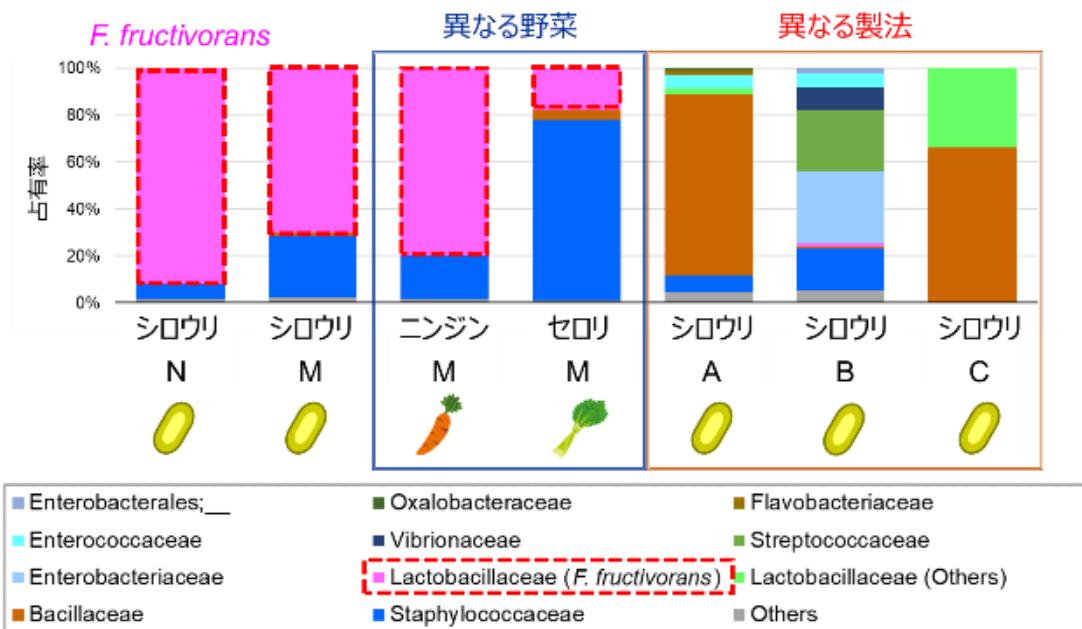


図 4. 原材料・製法の異なる奈良漬の完成品における細菌・アーキアの微生物叢 (科レベル)

## 2. 奈良漬から単離された *F. fructivorans* の生育特性の解析

奈良漬は飽和濃度の食塩水に漬けた塩漬野菜を、エタノールを含んだ熟成酒粕に漬けて製造する。原材料や環境中に存在する微生物は、高濃度の塩分やエタノールによるストレスに晒されていると考えられる。したがって奈良漬の優占種である *F. fructivorans* はこれらのストレス環境に適応した生育特性を有しており、選択的に増殖していると推察される。そこで、奈良漬から単離した *F. fructivorans* の生育特性を、他の発酵食品由来株などと比較しつつ明らかにすることで、奈良漬環境に適応した微生物の特徴を見出すことを目的とした。

まず、0%~15%の NaCl を含んだ SI 培地に *F. fructivorans* を植菌し、経時に OD<sub>600</sub> を測定した(図 5)。基準株 NBRC 13954 とドレッシング由来株 NBRC 14747 では、それぞれ最大 7.5%、10% NaCl 含有培地で増殖可能であった。清酒由来株 JCM 1198、NBRC 15887、NBRC 13118 では、それぞれ最大 5%、2.5%、0% NaCl 含有培地で増殖可能であった。本研究において単離された奈良漬由来株 CS-2、MS-5 株では、それぞれ最大 7.5%、2.5% NaCl 含有培地で増殖可能であった。これらの結果から、奈良漬に含まれる塩分に対する高い適応能力は認められなかった。

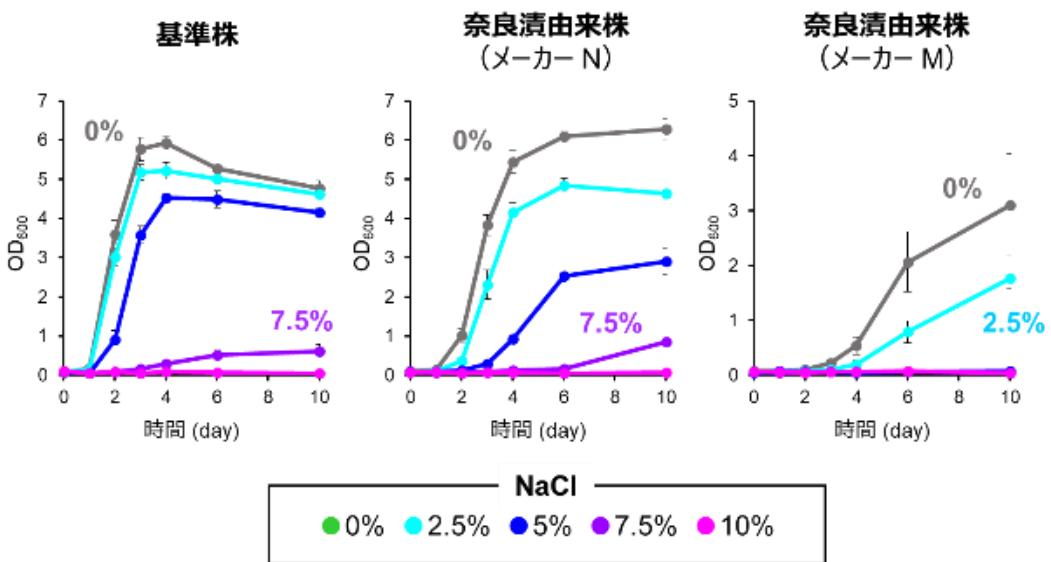


図 5. NaCl 含有 SI 培地における *F. fructivorans* の生育

次に、0%~20%のエタノールを含んだ SI 培地に *F. fructivorans* を植菌し、経時的に OD<sub>600</sub> を測定した(図 6)。基準株 NBRC 13954 とドレッシング由来株 NBRC 14747 は、ともに最大 12.5%エタノール含有培地で増殖可能であった。清酒由来株 JCM 1198、NBRC 15887、NBRC 13118 は、それぞれ最大 12.5%、17.5%、17.5%エタノール含有培地で増殖可能であった。本研究において単離された奈良漬由来株 CS-2、MS-5 株は、それぞれ最大 15%、17.5%エタノール含有培地で増殖可能であった。以上の結果から、奈良漬由来株は基準株やドレッシング由来株よりもエタノール耐性が高く、清酒由来株と同等の高いエタノール耐性を示す傾向が見られた。

それに加えて、奈良漬由来株 CS-2、MS-5 は、好エタノール性を有していることを見出した。基準株 NBRC 13954 やドレッシング由来株 NBRC 14747 は、エタノール非含有培地で最も良好な増殖を示し、2.5%以上のエタノールを含む条件では濃度の増加に伴って増殖遅延が見られた。これに対し、清酒由来株や奈良漬由来株ではエタノール非含有培地よりも 2.5%~12.5%のエタノールを含有する条件の方が良好な生育を示した。例えば、奈良漬由来株 MS-5 では 5%~7.5%のエタノールを含有する条件で最適な生育を示した。エタノール非含有培地での生育速度が他の株と比べて顕著に低いことから、単にエタノールによって生育が促進されるというよりも、健全な生育のためにエタノールを要求する性質を有すると推測される。

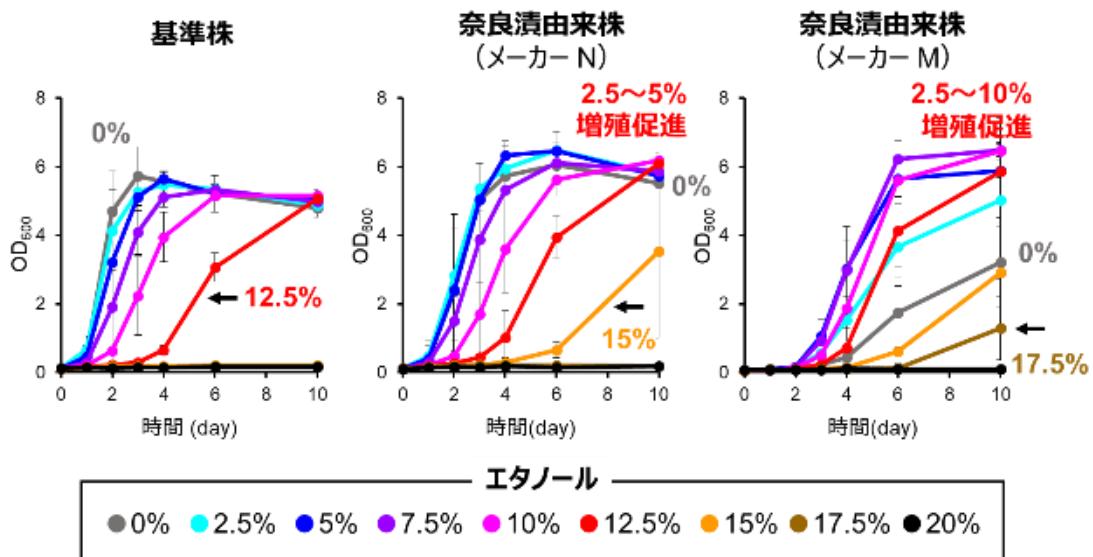


図 6. エタノール含有 SI 培地における *F. fructivorans* の生育

強力なエタノール耐性や好エタノール性は、奈良漬由来株と清酒由来株といったエタノールを含んだ環境から単離された株に共通していた。これらのエタノールに対する適応能力が、奈良漬の製造過程で *F. fructivorans* が優占種となる現象の鍵を握っていると考えられる。

### 3. 奈良漬の発酵試験

伝統的な漬物の多くは、乳酸菌や酵母などの微生物が関与する発酵食品である。微生物の発酵作用により、乳酸などの有機酸やアルコールなどの成分が産生され、漬物独特の風味が形成される。上述の微生物叢解析により、奈良漬の製造過程で乳酸菌 *F. fructivorans* が優占種となることが示された。したがって、奈良漬においても製造時に *F. fructivorans* による発酵が行われ、それに伴う成分変化が起こっていると推測される。本研究では、小スケールで奈良漬の製造を再現する発酵試験を実施した。発酵試験中の微生物の動態や成分変化を調べることで、*F. fructivorans* が奈良漬に及ぼす影響を検証した。具体的には、中漬の状態のサンプル(仕掛け品前半に該当)を未使用の熟成酒粕に漬けて嫌気的条件で培養を行うことで、上漬(仕掛け品後半に該当)を再現した。コントロールとして、仕掛け品前半の代わりに塩漬野菜を熟成酒粕に漬ける実験も行った(図 7)。

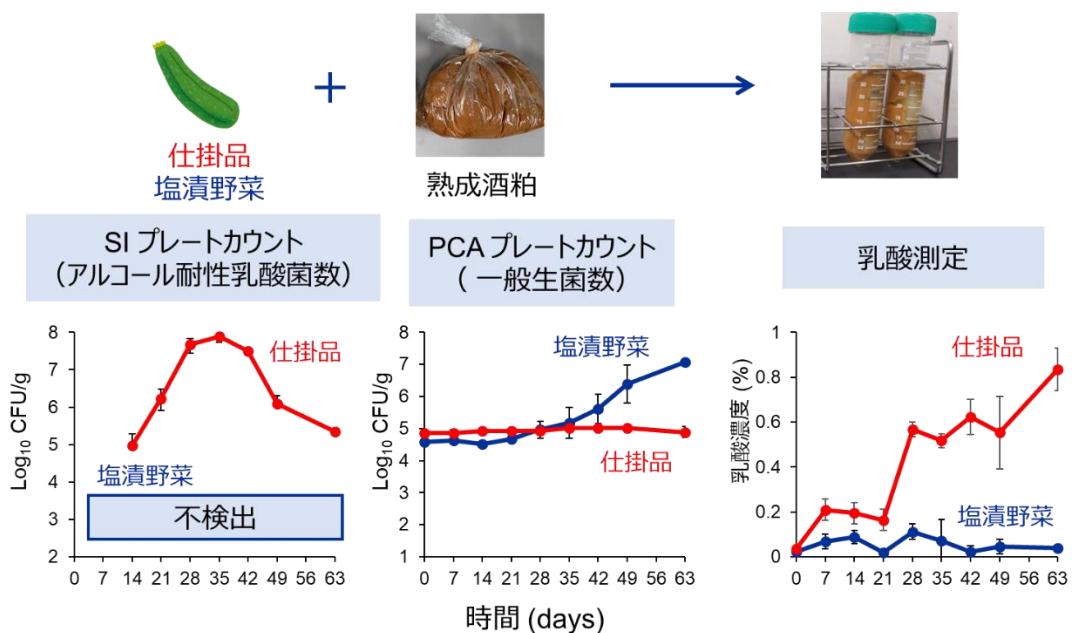


図 7. 発酵試験における微生物の生育および乳酸の生産

発酵試験中の *F. fructivorans* の生育を観察するため、経時的に 5% NaCl および 5% エタノール含有 SI 寒天培地プレートを用いて熟成酒粕に含まれるエタノール耐性乳酸菌数を測定した。その結果、仕掛け品前半を熟成酒粕に漬けた条件では、14 日目に初めてエタノール耐性乳酸菌が検出され 35 日目に菌数は最大となり( $7.8 \times 10^7$  cells/g)、その後徐々に減少していった。これに対し、塩漬野菜を熟成酒粕に漬けた条件では、実験を通して、エタノール耐性乳酸菌は検出限界以下であった。実験最終日 63 日目のコロニーをランダムに 15 個選び、簡易同定を行った結果、すべて *F. fructivorans* であった。また、PCA 寒天培地プレートを使用して一般生菌数の測定も行った。仕掛け品前半を熟成酒粕に漬けた条件では、0 日目から 63 日目まで  $7.2 \times 10^4 \sim 1.0 \times 10^5$  cells/g の間でほとんど一般生菌数が変化しなかった。これに対し、塩漬野菜を熟成酒粕に漬けた条件では、63 日目まで徐々に一般生菌数が上昇していった(最大で  $1.2 \times 10^7$  cells/g)。

奈良漬の製造過程で優占種となる *F. fructivorans* は乳酸菌であることから、他の伝統的な漬物と同様に乳酸発酵が行われていることが推察される。発酵試験中に経時的に乳酸濃度を測定した。仕掛け品前半を熟成酒粕に漬けた条件では、0 日目から 63 日目まで徐々に増加して最終的に 0.8 wt% にまで到達した。これに対し、塩漬野菜を熟成酒粕に漬けた条件では、乳酸濃度は 0.2 wt% 以下の範囲でほとんど変化しなかった。*F. fructivorans* は、乳酸と同時に二酸化炭素を生

成するヘテロ発酵型の乳酸発酵を行うことが知られている(Zheng *et al.* (2020))。発酵試験中の目視での観察結果において、仕掛け品前半を熟成酒粕に漬けた条件では、乳酸濃度が大きく上昇した 28 日目から気泡が観察された。以上の結果から、奈良漬の標準的製法に見られるような未使用の熟成酒粕に仕掛け品を漬けこむ工程において二酸化炭素の発生を伴うヘテロ乳酸発酵が行われることが示された。前章で示した微生物動態の結果と併せて考えると、*F. fructivorans* がヘテロ乳酸発酵を行う主体である可能性が高い。

発酵試験中の代謝物変化を網羅的に調べるために、発酵試験前後のサンプルを用いて CE-FTMS による水溶性・イオン性成分のメタボローム解析を実施した。解糖系の代謝産物やヌクレオチド類の多くは検出されなかつたが、発酵食品の風味の形成において重要な役割を果たすアミノ酸や有機酸に関連する多様な代謝産物が検出された。発酵試験中に產生される有用物質を見出すことを目的として、発酵前後で 0 日目には検出限界以下であり、63 日目に検出された化合物の探索を行った(図 8)。その結果、イノシン、グルタチオン、S-アデノシルメチオニンなど 25 種の化合物の含量が増加していることが明らかになった。これらの物質は乳酸菌や酵母などの微生物により生産される呈味成分・機能性成分として知られている (Kilstrup *et al.* (2005); Pophaly *et al.* (2012); Chu *et al.* (2013))。以上の結果から、奈良漬の製造過程で微生物の発酵作用により風味や機能性が付与される可能性が示唆された。

物質名	PubChem CID	0 day	63 days
3-Hydroxypicolinic acid	13401	N.D.	8.2E-05
3-Methoxy-4-hydroxyphenylethyleneglycol	10805	N.D.	3.8E-04
4-Hydroxyhippuric acid	151012	N.D.	1.4E-04
7-Amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid	6868	N.D.	7.4E-05
8-Hydroxyoctanoic acid-1	69820	N.D.	4.7E-04
Adenosine	60961	N.D.	1.2E-02
Azetidine 2-carboxylic acid	16486	N.D.	9.1E-04
Crotonic acid	637090	N.D.	1.8E-03
Diethanolamine	8113	N.D.	1.9E-03
Glutathione (GSH)	124886	N.D.	1.1E-04
Glutathione	11161	N.D.	1.0E-03
Guanosine	6802	N.D.	3.8E-04
Imidazole-4-methanol	1745	N.D.	8.5E-05
Inosine	6021	N.D.	2.5E-04
Maleic acid	444266	N.D.	1.8E-04
Met-Val-Pro	10291254	N.D.	1.1E-03
N-Methylalanine	5288725	N.D.	5.4E-04
N <sup>6</sup> -(Δ2'-Isopentenyl)adenine	92180	N.D.	3.3E-04
Propionic acid	1032	N.D.	2.2E-03
S-Adenosylmethionine	34755	N.D.	2.8E-04
S-Carboxymethylcysteine	193653	N.D.	4.7E-05
Sebacic acid	5192	N.D.	1.4E-04
Spectinomycin +H <sub>2</sub> O	15541	N.D.	6.0E-05
Spermine	1103	N.D.	4.6E-05
γ-Glu-Cys	123938	N.D.	1.2E-04
Lactic acid	612	3.4E-01	4.0E+00

図 8. 発酵試験終了時(63 日目)に特異的に検出された化合物の一覧

#### 4. 総括

本研究を通して、伝統的発酵食品の一種である奈良漬における微生物生態系の実態とその役割に関する新たな知見を得ることができた(図 9)。特に、乳酸菌 *F. fructivorans* が製造工程を通して優占的な生育を示し、その原因の一つである好エタノール性というユニークな特性まで解明に至った点は特筆すべきである。将来的に、奈良漬の生産を安定化させるためには、発酵において中心的な役割を果たす *F. fructivorans* の健全な生育をモニターし、促進させるための方策を講じていくことが必要である。また、奈良漬の高付加価値化のためには、本研究のメタボローム解析により見出された *F. fructivorans* の有用物質生産性をさらに探求し、標的とする化合物の生産性をさらに向上させる微生物育種が有効であると考えられる。本研究を端緒として、奈良漬という伝統的発酵食品の進化・次世代化に向けての研究開発につながる重要なヒントを得ることができた。



図 9. 本研究を通して明らかにされた奈良漬の微生物生態系とその意義

#### 【参考文献】

Chu, J., Qian, J., Zhuang, Y., Zhang, S., & Li, Y. (2013). Progress in the research of *S*-adenosyl-L-methionine production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 41-49.

Kilstrup, M., Hammer, K., Ruhdal Jensen, P., & Martinussen, J. (2005). Nucleotide metabolism and its control in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**, 555–590.

Kitamura, Y., Kusumoto, K., Oguma, T., Nagai, T., Furukawa, S., Suzuki, C., Satomi, M, Magariyama, Y., Takamine, K., & Tamaki, H. (2016). Ethnic fermented foods and alcoholic beverages of Japan. In *Ethnic Fermented Foods and Alcoholic Beverages of Asia*, Springer India, 193–236.

Pophaly, S. D., Singh, R., Pophaly, S. D., Kaushik, J. K., & Tomar, S. K. (2012). Current status and emerging role of glutathione in food grade lactic acid bacteria. *Microb. Cell Fact.* **11**, 114.

Yamagata, K. & Fujita, T. (1974) Characterization of salt-tolerant yeasts isolated from the pickling process of narazuke. *J. Ferment. Technol.* **52**, 217–224.

Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M. A. P., Harris, H. M. B., Mattarelli, P., O'Toole, P. W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G. E., Gänzle, M. G., & Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **70**, 2782–2858.

以上

## 「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、 $\gamma$ -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  $\mu\text{g}/\text{mL}$  のカナバニンを含有する 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  $\mu\text{m}$ ) 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 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 (アト一社) 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）。

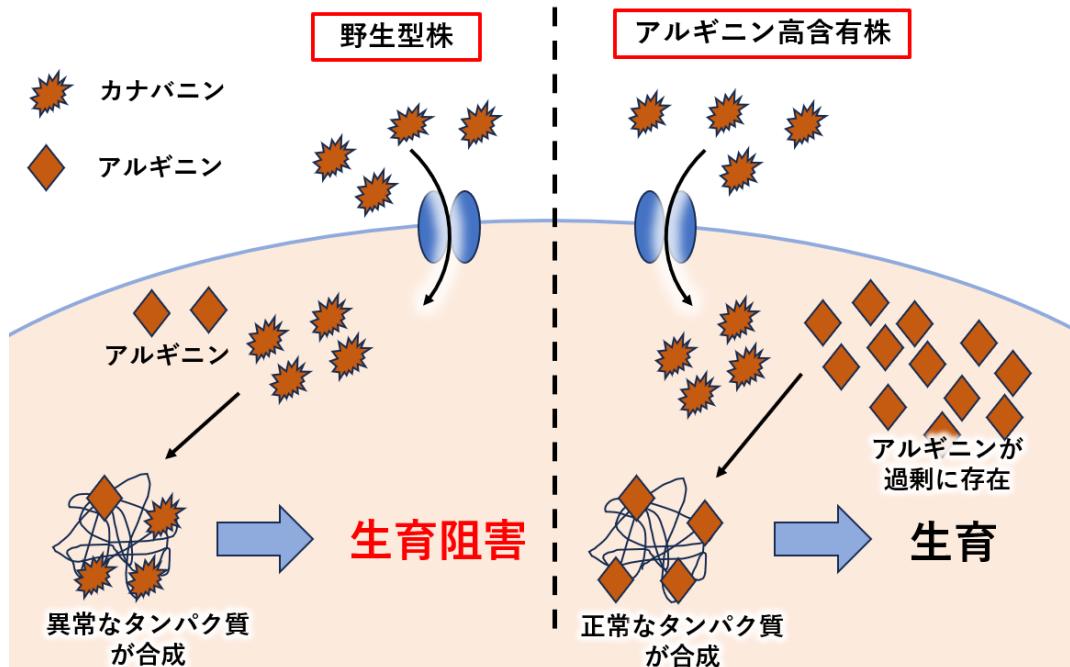


図1 カナバニン添加後の野生型株とアルギニン高含有株の生育

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）。

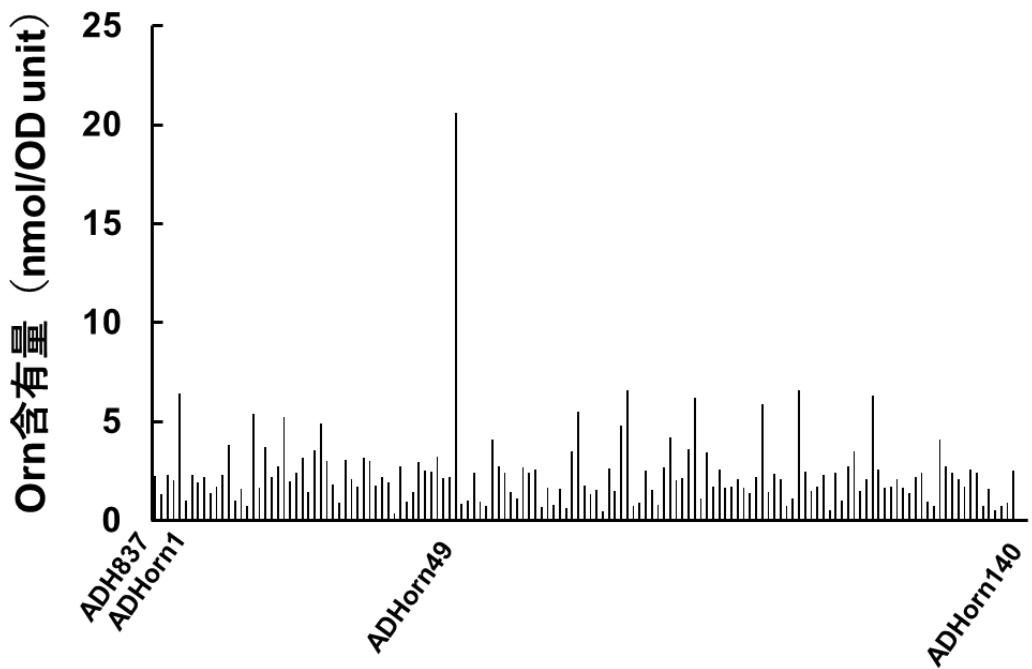


図 2 ADH837 株と各 ADHorn 株の細胞内オルニチン含量  
ADH837 株（親株）と各 ADHorn 株の細胞内オルニチン含量を測定した ( $n = 1$ )。

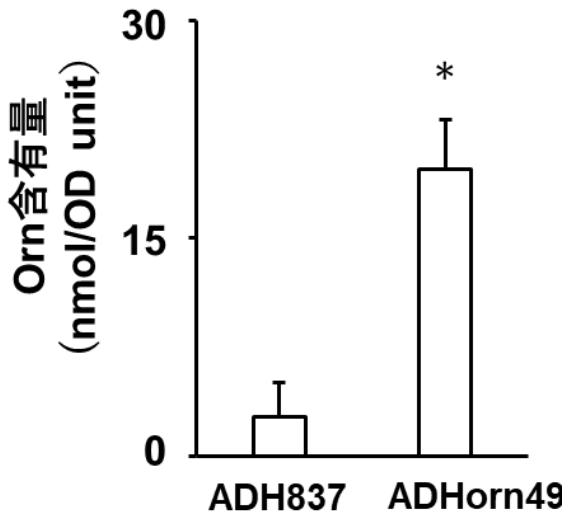


図 3 ADH837 株と ADHorn49 株の細胞内オルニチン含量  
ADH837 株と ADHorn49 株を YPD 培地で培養し、細胞内オルニチン含量を測定した。有意差検定は Student's *t*-test 法を用いて行った (\* $p < 0.05$  vs. ADH837,  $n = 3$ )。

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) 產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は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。

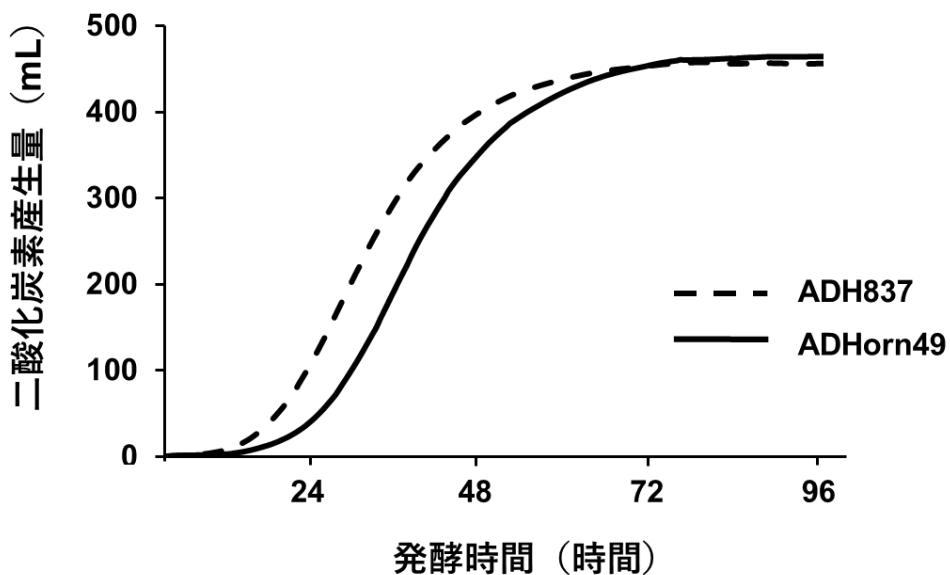


図 4 ビール発酵のモデル試験における酵母の二酸化炭素產生量  
麦汁培地で静置培養を行い、二酸化炭素產生量をファーモグラフによって測定した。

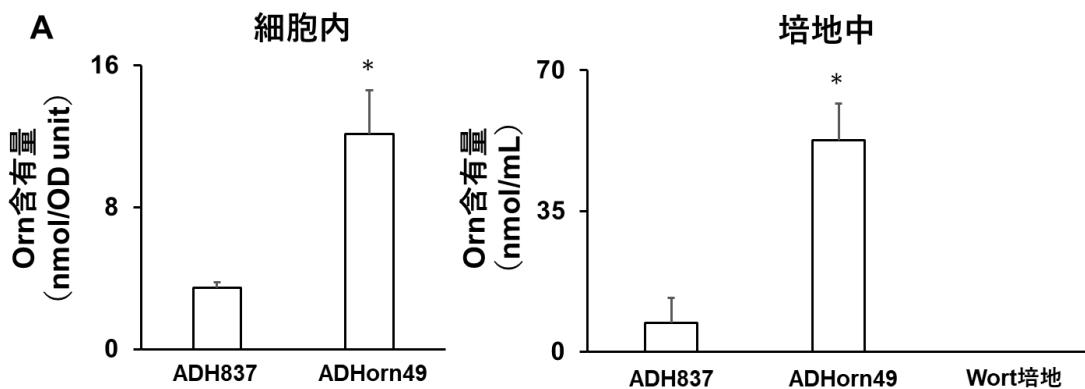


図 5 ビール発酵のモデル試験における細胞内および培地上清中の (A) オルニチン、(B) アルギニン、(C) リジン、(D)  $\gamma$ -アミノ酪酸含量

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*<sup>G351D</sup>; 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
<i>ARG5,6</i>	1052 G>A	Gly351Asp	ヘテロ

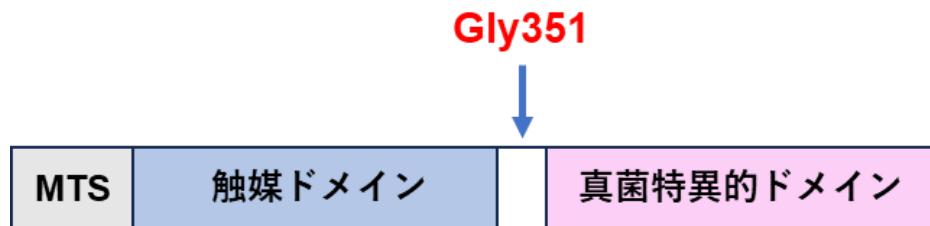


図 7 Arg6 のドメイン構造

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>	KELFTESGAGTLISRGFVI

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*; *Aspergillus nidulans*: *A. nidulans*; *Aspergillus 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。

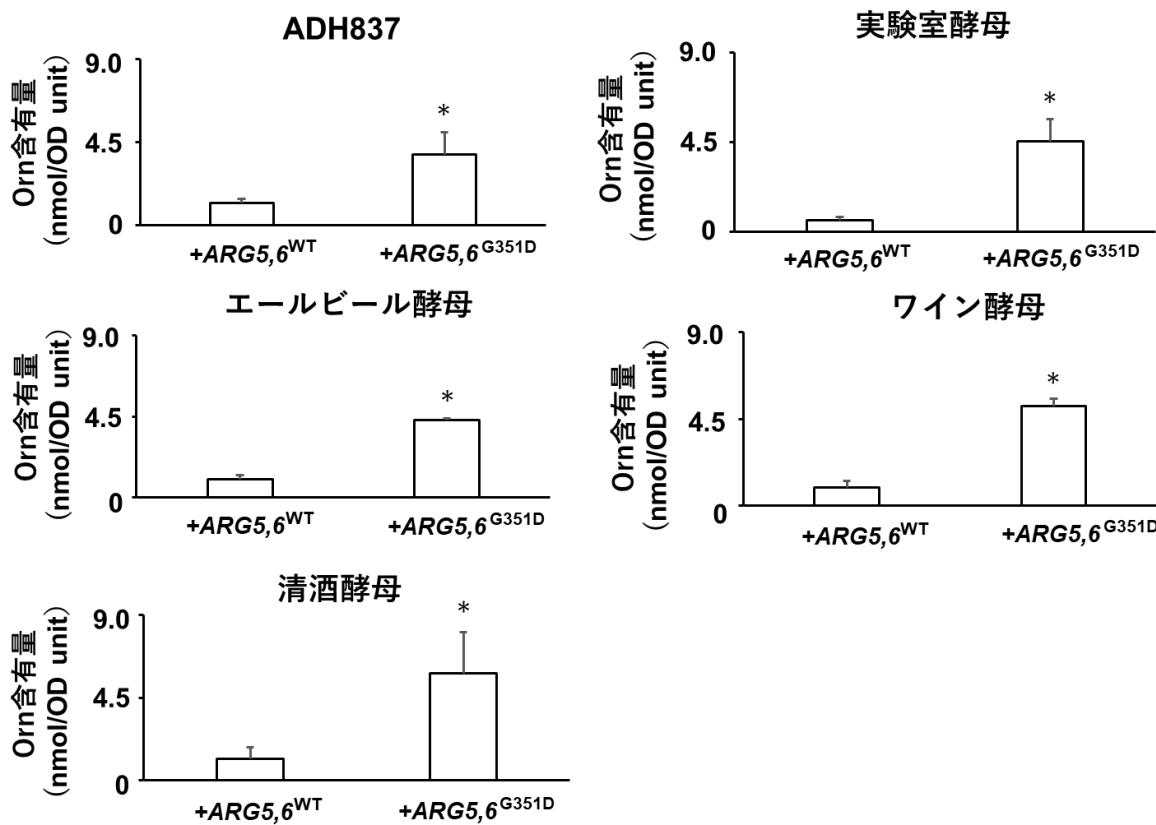


図 9  $ARG6^{G351D}$  発現株における細胞内オルニチン含量

$ARG5,6^{WT}$  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。

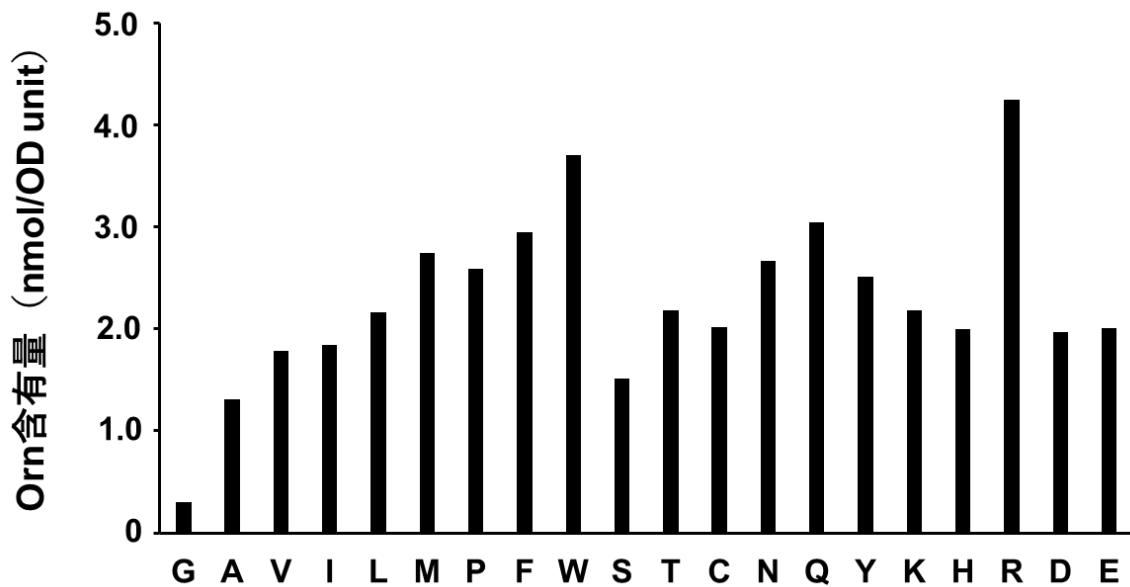
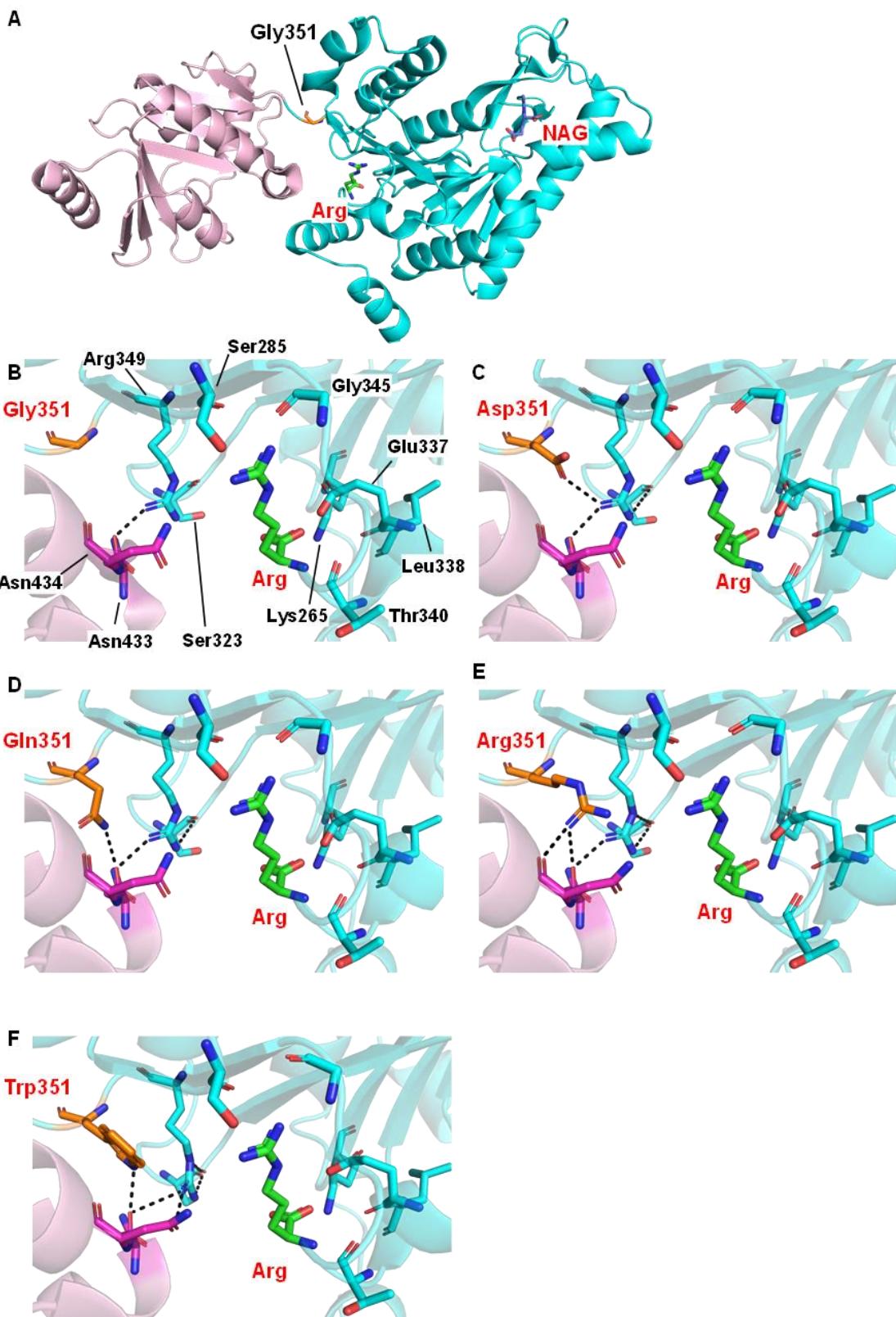


図 10 変異型 *ARG6* 発現株における細胞内オルニチン含量

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トンモデル、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)。

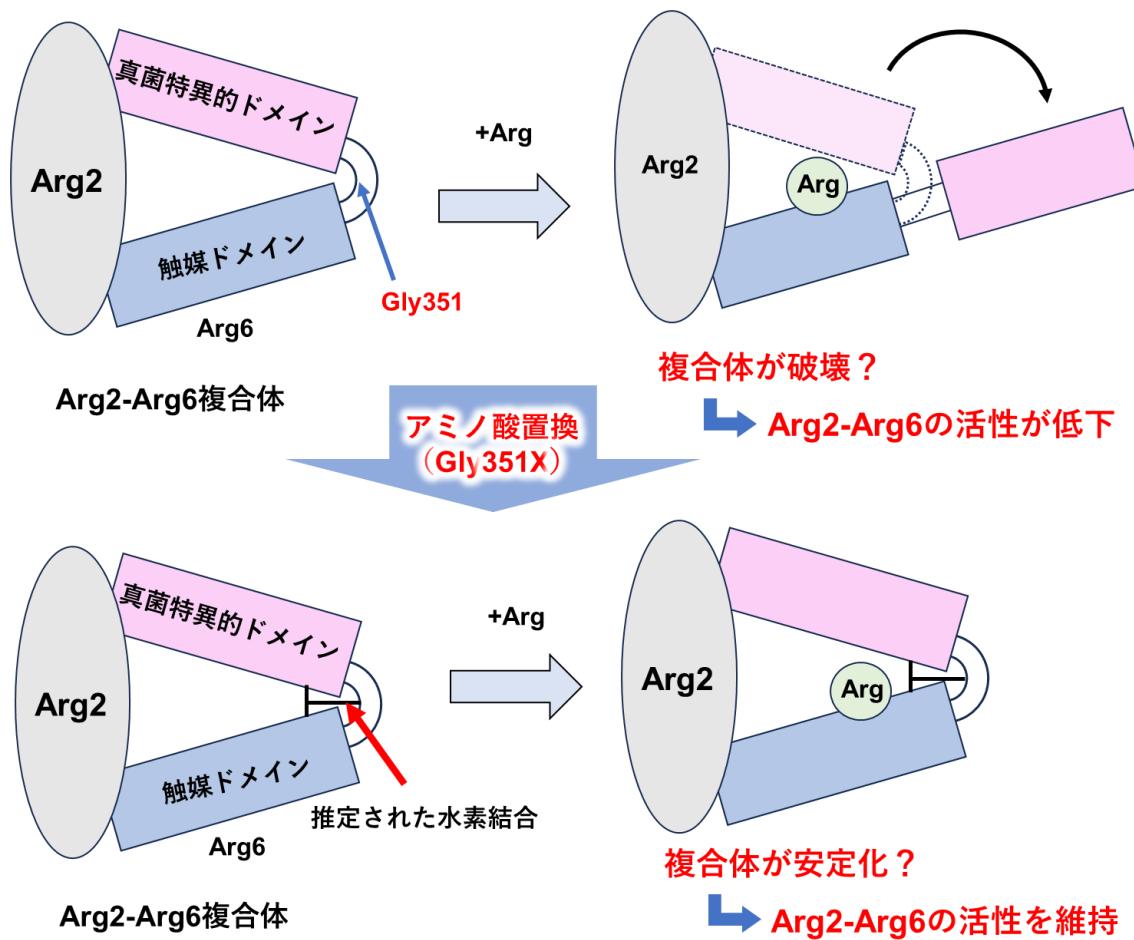


図 12 アルギニンによる Arg2-Arg6 複合体の制御機構（仮説）

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リ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。

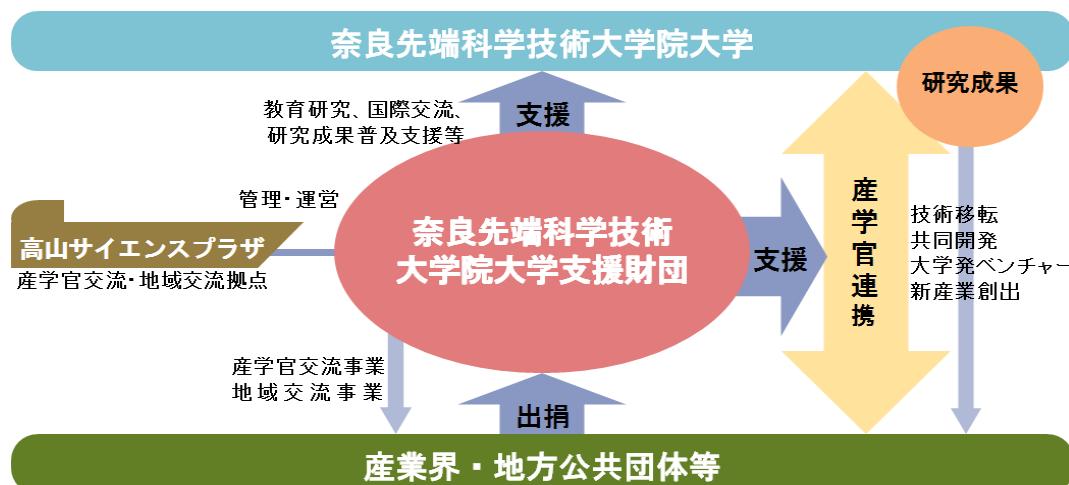
【今後の展開】

- ◎ 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

## ■奈良先端科学技術大学院大学支援財団の概要

- 名 称 公益財団法人 奈良先端科学技術大学院大学支援財団  
(Foundation for Nara Institute of Science and Technology)
- 所 在 地 奈良県生駒市高山町8916-12
- 沿 革 平成3年7月18日 財団設立  
平成23年6月1日 公益財団法人に移行
- 行 政 庁 内閣府（内閣総理大臣）
- 目 的 奈良先端科学技術大学院大学の持つ斬新かつ優れた特性及び機能を最大限に發揮していくために、その教育研究活動を支援するとともに、大学院大学と産業界、地方公共団体等との交流を促進することにより、先端科学技術分野の研究開発を担う研究者、技術者等の育成及び研究開発基盤の充実に寄与し、我が国の科学技術の発展に資することを目的としています。
- 事業内容
1. 大学院大学支援事業
    - (1) 大学院大学における教育研究活動に対する支援
    - (2) 大学院大学における国際交流活動に対する支援
    - (3) 大学院大学における学術研究成果の普及に対する支援
    - (4) 大学院大学に対するその他の支援
  2. 先端科学技術の普及啓発ならびに交流事業
    - (1) 産学官交流事業
    - (2) 地域交流事業
    - (3) 情報発信事業
  3. その他
    - (1) 高山サイエンスプラザの経営
    - (2) 高山サイエンスタウン駐車場の運営



## ■奈良先端科学技術大学院大学支援財団の活動紹介

### (1) 大学院大学支援事業

#### 令和6年度大学院大学支援事業

支援総額 8,800 千円

##### ① 教育研究活動に対する支援

- ・研究テーマ助成 ..... 3 件 1,500 千円

氏名	所属・職名	研究テーマ
真弓 大輝	先端科学技術研究科 ユビキタスコンピューティングシステム研究室 博士後期課程 2 年	糖分摂取量低減を補助する嗅覚インターフェースの開発
KHOK YONG SEN	先端科学技術研究科 環境微生物学研究室 博士後期課程 2 年	Production of p(GL-co-3HB) by Ideonella sakaiensis utilizing PET as main carbon source
酒井 隆裕	先端科学技術研究科 機能超分子化学研究室 博士後期課程 3 年	ドメインスワッピング制御による抗体酵素の高機能化

- ・社会人ドクター修学支援事業 ..... 3 名 600 千円

##### ② 国際交流活動に対する支援

- ・海外派遣支援 ..... 21 件 2,027 千円
- ・外国人留学生支援 ..... 6 名 2,652 千円
- ・大学間交流活動支援 ..... 8 件 681 千円

##### ③ アワード事業

- ・NAIST 最優秀学生賞 ..... 14 名 840 千円
- ・教員表彰 ..... 3 名 500 千円

## ■令和5年度アワード事業

学習や研究に対する意欲を高めるため、令和6年3月22日に開催された学位記授与式において、優秀な成績を修めた学生14名を理事長名で表彰し賞金を授与しました。

また、教育研究活動において優れた業績を挙げた教員の表彰に際し、賞金を贈呈しました。

#### ・NAIST 最優秀学生賞

14名 840 千円

情報科学領域

(博士前期課程) LIU HUAKUN、VASSELLI JUSTIN RAY、大武 一平

(博士後期課程) THONGLEK KUNDJANASITH、福田 りょう、笹田 大翔

バイオサイエンス領域

(博士前期課程) 宮嶋 渚、上原 由梨奈

(博士後期課程) 小林 利紗、NORSHIMA BINTIABU HASAN

物質創成科学領域

(博士前期課程) 西川 晃弘、衣川 翼  
(博士後期課程) 甚上 知美、勝見 志穂

・**教員表彰**

2名 300千円

情報科学領域「ベストティーチング賞」  
教授 和田 隆広

バイオサイエンス領域「バイオ領域賞」  
対象者なし

物質創成科学領域「NAIST 学術奨励賞」  
助教 PANDEY Manish

## (2) 产学官交流事業

奈良先端科学技術大学院大学支援財団では、国立大学法人奈良先端科学技術大学院大学（以下、「奈良先端大」と記します。）で生まれた革新的な科学技術等を産業界で積極的に活用していただくために、奈良先端大の研究成果や技術シーズの実用化に向けた取り組みを支援する「奈良先端大発 新産業創出支援事業」を平成16年度に立ち上げ、令和6年度も引き続き実施しました。

また、奈良先端大で生まれた先端的な研究成果、技術シーズ等を産業界に向けて発信する場、および奈良先端大と産業界との交流を図る場として「奈良先端大産学連携フォーラム」を開催しました。

### 奈良先端大発 新産業創出支援事業

地元の中小企業・ベンチャー企業等が、奈良先端大と連携して、奈良先端大で生まれた研究成果や技術シーズの実用化に向けた研究開発に取り組む場合に、研究開発に要する費用の一部を支援しています。

令和6年度は次の2件のテーマを支援しました。

#### 『奈良漬の製造工程に適応した微生物とその品質への役割の解明』

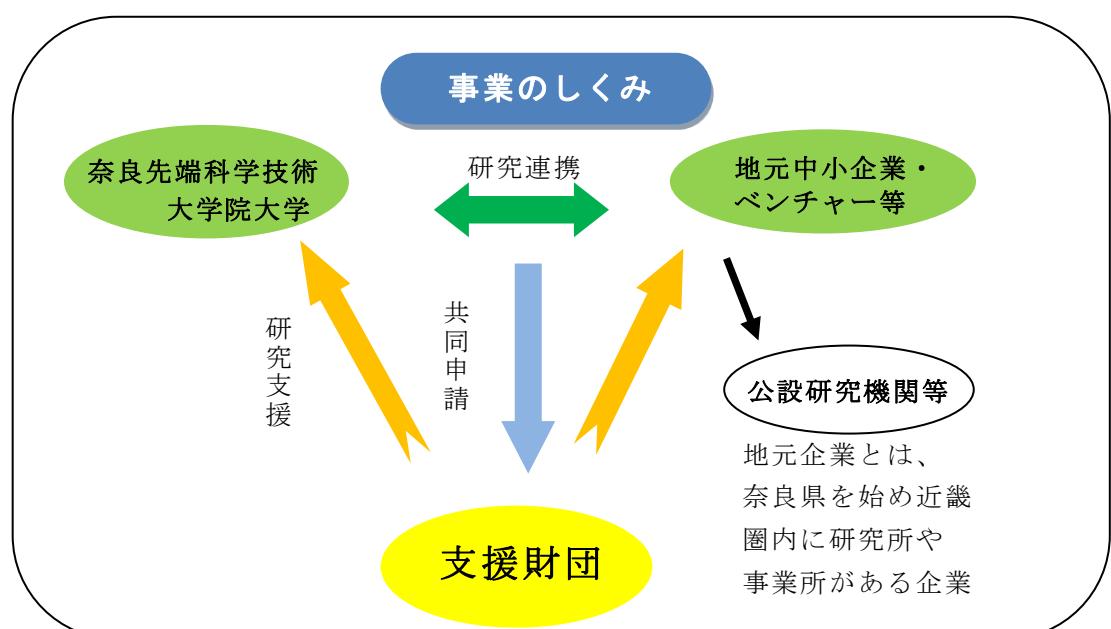
奈良屋本店

奈良先端科学技術大学院大学 先端科学技術研究科 バイオサイエンス領域 准教授 渡辺 大輔

#### 『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



## (成果報告会)

令和5年度に「奈良先端大発 新産業創出支援事業」で支援した研究開発の成果報告会を令和6年3月28日に開催しました。

### 【新産業創出支援研究成果報告（令和5年度）】

- 「ソフトウェアのコードレビュー支援を対象とした機械学習モデルの応用手法」  
株式会社 EASE 創研  
奈良先端科学技術大学院大学 先端科学技術研究科 情報科学領域 教授 飯田 元
  
- 「機能性アミノ酸高生産酵母の育種技術を活用したクラフトビールのブランド化」  
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

## 奈良先端大産学連携フォーラム

奈良先端大で生まれた先端的な研究や独創的な研究の成果を紹介するとともに、奈良先端大の研究者と産業界の研究者・技術者の交流の場を提供することを目的として、奈良先端大、(公社)関西経済連合会、当財団の共催でフォーラムを開催しています。令和6年度は、7月30日（火）、奈良先端大で開催し、38名の参加がありました。

### <研究紹介講演>

#### 「強化学習・模倣学習による人作業のロボット自動化」

奈良先端科学技術大学院大学 先端科学技術研究科 情報科学領域  
教授 松原 崇充

#### 「XR技術が実現するウェルビーイング」

奈良先端科学技術大学院大学 先端科学技術研究科 情報科学領域  
教授 清川 清

#### 「発酵・醸造食品のイノベーション～地域貢献から海外展開まで～」

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

### <研究室見学>

ロボットラーニング研究室

サイバネティクス・リアリティ工学研究室

発酵科学研究室

### <情報・意見交換会>

### (3) 地域交流事業

財団では、先端科学技術に対する地域住民の関心を高めるとともに、高山地区の立地施設と地域住民との相互理解を深めるために様々な地域交流事業を行っています。

#### 高山サイエンスフェスティバル

関西文化学術研究都市高山地区立地施設等連絡協議会（奈良先端大、参天製薬㈱奈良研究開発センター、上六印刷㈱、㈱Burley plus、㈱芦田製作所、㈱日阪製作所、当財団）の主催で、地域交流の一環として開催しています。

令和6年度は、11月16日（土）に、開催しました。

高山サイエンスプラザでは、コンサート・科学体験・紙漉き体験などを開催し、奈良先端大のオープンキャンパスとともに、来場者に楽しんでいただける一日となりました。

（高山サイエンスプラザ）

- ・音楽会「吹奏楽コンサート」
- ・親子科学教室
- 「自分で作る、空気抵抗だけで飛ばす『飛ぶ折り紙ヒコーキ』作りに挑戦しよう！」
- ・紙漉き体験

#### N A I S T サイエンス塾

平成18年11月から、概ね毎月第2土曜日に、子供の理科離れの防止を目的に、講師を奈良先端大にお願いして科学実験教室を開催しています。

##### 【令和6年度開催状況】

開催回数／6回

参 加 者／小学生 187名

内 容／

- 5月 「パンを作る生き物 『イースト』のひみつに迫ろう」
- 6月 「対戦ゲームでAI プログラミングに挑戦しよう！」
- 7月 「サイエンス探検隊～電気と磁気の旅～」
- 9月 「ブロックをつかって歩行ロボットをつくってみよう！」
- 10月 「身の回りのフシギを体感しよう！！」
- 1月 「光と海の波の共通点 溫めたチーズから見えるもの！」



## 夏休み科学実験教室

毎年夏休み期間中、科学のおもしろさ、楽しさを伝え、科学をより身近に感じてもらえるよう、科学実験教室を開催しています。

開催日／令和6年8月3日(土)

参加者／小学生 23名

内容／「風で遊ぼう！風で動くおもちゃや車をつくって科学しよう」

## けいはんなプラザ・ピチコンサート in 高山

関西文化学術研究都市高山地区立地施設等連絡協議会が協賛する「けいはんなプラザ・ピチコンサートin高山」が、オープンギャラリーにて開催されました。

### 【令和6年度開催状況】

開催回数／4回

参加者／171名

内容／

5月 「正岡将地ピアノコンサート」

6月 「音楽の花束コンサート」

9月 「秋のサクソフォンコンサート」

10月 「打楽器DUOコンサート」

## サイエンスランドの運営



奈良先端大との連携により、「科学に芽生える」をコンセプトとした幼児の遊び空間「サイエンスランド」に、ドラえもんをはじめ種々のソーラーカー、電磁石ゴマといったコンテンツを揃えました。



## 高山サイエンスラザの団体受入れ

「サイエンスランド」や屋外のオブジェを活用し、幼稚園児等の団体体験を受入れています。

## 高山サイエンスプラザ



高山サイエンスプラザは、当財団が行う産学交流や地域交流などの活動拠点であり、研究者や市民の交流の場となっています。

建物内部のガラス張りのオープンギャラリーは、水と緑と光があふれる吹き抜けの大空間で、コンサートなどの催しに利用されています。

磁石の反発力を利用した「磁気浮上階段」や、屋外の「科学する子供たちの広場」には、建物のガラス壁面に大きく映し出されたAINシュタインの顔や、ニュートン、野口英世などの偉大な科学者の像、「アルキメデスのねじ」のオブジェなどがあり、子供たちの科学する心をはぐくむ楽しい空間となっています。

平日の9時から17時まで開館しています。

