

優良微生物の創生と地域特性を有する酒類の開発(1)

誌名	高知県工業技術センター研究報告
ISSN	09168729
著者	上東, 治彦 加藤, 麗奈 河本, 織江 永田, 信治 味園, 春雄
巻/号	35号
掲載ページ	p. 17-19
発行年月	2004年11月

優良微生物の創生と地域特性を有する酒類の開発

1) 醸造用酵母の遺伝子解析とその応用に関する研究 清酒酵母の吟醸香カプロン酸エチル生成遺伝子の解析

上東治彦 加藤麗奈 河本織江* 永田信治* 味園春雄*

Analyses of the Genes Involved in Production of Ethyl Caproate from Sake Yeast

*Haruhiko UEHIGASHI Reina KATOH Oriie KAWAMOTO
Shinji NAGATA Haruo MISONO*

吟醸酒の主要な香り成分の一つであるカプロン酸エチルの生合成に関与するアルコールアシルトランスフェラーゼ(AACTase)をコードしている遺伝子(EHT1)と高い相同性(類似性)を持つ2種類の機能未知遺伝子(EHT2,3)をクローニングし、その一次構造を明らかにすると共に清酒酵母においてこれらの遺伝子産物がカプロン酸エチル生成能に及ぼす影響について検討した。その結果、EHT2,3をそれぞれ導入した酵母では、いずれの場合も親株の1.1~2.0倍のAACTase活性が見られた。さらに、小仕込み試験を行った結果、組換え株を用いた試験では親株と比較して、カプロン酸エチル生成量が1.2~1.7倍に増加していた。

1. まえがき

カプロイル-CoAとエタノールからカプロン酸エチル(EC)を生成するアルコールアシルトランスフェラーゼ(以下AACTase)の実体は長らく知られていなかったが、近年、大関酒造の坊垣らによって清酒酵母よりAACTaseが単離・精製され、それをコードする遺伝子(EHT1)が同定された。しかし、EHT1を導入した組換え酵母では顕著なカプロン酸エチル生成能増大がみられず、また遺伝子破壊によっても生成能の顕著な減少がみられなかったことが報告されている¹⁾。そこで、カプロン酸エチル生成に関与する別の遺伝子の存在を予測し、EHT1(YBR177c)と相同性を示す遺伝子を酵母で検索したところ、50%の相同性を持つYPL095cと、31%の相同性を持つYMR210wを見出した。そこで、これらの遺伝子を酵母に導入し、組換え酵母のEC生成能とAACTase活性の変化を解析した。

2. 実験材料及び方法

2. 1 使用菌株及び使用培地

大腸菌は*Escherichia coli* JM109を用い、培養には50 μ g/mlのアンピシリンを加えたLB培地を使用した。

清酒酵母はKA1(熊本酵母)、A-14(泡なし熊本酵母と協会7号の細胞融合株)、CEL-19(セルレニン耐性能を持つカプロン酸エチル高生産株)とその親株であるK701(協会7号泡なし株)を用いた。形質転換株の単離には、0.5 μ MオーレオバシジンA(宝酒造)を含むAY培地(2%グルコース、2%ポリペプトン、1%酵母エキス)を使用した。

2. 2 酵母染色体DNAからのEHT1遺伝子と機能未知遺伝子の増幅

K701の染色体DNAを*Hind*IIIで制限酵素処理したサンプルを鋳型とし、制限酵素認識部位を含む各種プライマー(図1、2)を用いてPCRによる遺伝子増幅を行った。AACTase遺伝子(EHT1)と相同性を持つ2つの機能未知遺伝子をそれぞれEHT2、EHT3とした。

* 高知大学農学部

EHT1: AAC1-BA 5' -GGGATCCAGGAAACAGACCATGTCAGAAGTTCCAAATGGCCAG-3
 AAC1-PS 5' -GGCTGCAGGAGAAACAGACCATGTCAGAAGTTCCAAATGGCCAG-3
 AAC1-HC 5' -GGAAGCTTCATACGACTAATTCATCAAACCTAGTGAAA-5'
 EHT2: AAC2-BA 5' -GGGATCCAGGAAACAGACCATGTTTCGCTCGGGTTACTATCCAA-3
 AAC2-SM 5' -GGCCCGGGAGGAAACAGACCATGTTTCGCTCGGGTTACTATCCAA-3
 AAC2-HC 5' -GGAAGCTTATAAACTAACTCATCAAAGCTGCCCAAGA-5'
 EHT3: AAC3-ER 5' -GGGAATTCAGGAAACAGACCATGCGCTTAAAGAATTGTTACC-3
 AAC3-HC 5' -GGAAGCTTCTAATTCGCGCGAAAGGTTGTGGCTATGGG-3

図1 大腸菌組換え株に用いたプライマー

EHT1: AAC1-SAL 5' -GGGTCGACATGTCAGAAGTTCCAAATGGCCAG-3
 AAC1-SAC 5' -GGGAGTCATACGACTAATTCATCAAACCTAGTGAAA-3
 EHT2: AAC2-SAL 5' -GGGTCGACATGTTTCGCTCGGGTTACTATCCAA-3
 AAC2-SAC 5' -GGGAGCTCTTATAAACTAACTCATCAAAGCTGCCCA-3
 EHT3: AAC3-SAL 5' -GGGTCGACATGCGCTTAAAGAATTGTTACCTAA-3
 AAC3-SAL 5' -GGGAGCTTCTAATTCGCGCGAAAGGTTGTGGCTATGGG-3

図2 清酒酵母組換え株に用いたプライマー

2. 3 酵母からの粗酵素調製

YM15液体培地 (500 μ Mオーレオバシジン添加) を用いた振とう培養にて得られた菌体約1.0gをアシストチューブ (アシスト社) に移し、破砕用緩衝液 (25mMイミダゾール-HCl、0.1M NaCl、20%グリセロール、1mMジチオスレイトール、0.1%トリトンX-100; pH7.5) 約1mlに懸濁した。遠心分離 (14,000rpm、4℃、10分) 後、細胞懸濁液が約1.2mlになるように緩衝液を加え、ガラスビーズ (井内盛栄堂社) 約1.2gを加えた後、ビードビーター (MINI-BEADBEATER™ BIOSPEC PRODUCTS) によって30秒間隔で5分間破砕を行った。その後、遠心分離 (14,000rpm、4℃、20分) して得られる上澄みを粗酵素液とした。

2. 4 酵素活性測定

10mlバイアル瓶中にて1M Tris-HCl (pH8.0) 10 μ l、6M エタノール 10 μ l、200mM カプロイル-CoA 5 μ lに粗酵素液を加え全量100 μ lとし、密栓後、25℃で1時間加温して反応させた。煮沸により反応を停止し、生成したカプロン酸エチルをガスクロマトグラフィーにて測定した。比活性は25℃で1時間に1 μ molのカプロン酸エチルを生成する酵素量を1Uとして算出した。

3 結果及び考察

3. 1 AACTase遺伝子と相同性をもつ機能未知遺伝子の増幅

EHT1 (YBR177c) と相同性を示す機能未知遺伝子を酵母で検索したところ、50%の相同性を持つYPL095cと31%の相同性を持つYMR210wを見出した。そこで、

AACTaseがどの遺伝子によって、また、どのような組み合わせによって制御されているのかを調べるため、まずK701株の染色体DNAを鋳型としてPCR法によりEHT1と目的とする2つの遺伝子の増幅を試みた。その結果、3種類の単一の遺伝子増幅断片が得られた (EHT1, 2, 3)。

3. 2 EHT1, 2, 3 を導入した組換え清酒酵母のスクリーニング

EHT1、2、3をpUC18を用いて大腸菌に導入した後、シーケンスによって塩基配列を確認した。大腸菌組換え株より調製した粗酵素液のAACTase活性を測定したところ、いずれの酵素でもわずかながら活性が見られ、3つの遺伝子がコードするそれぞれの酵素はいずれもAACTase活性を持つことが示唆された。しかし、その活性は低く、十分な比較は行えなかった。そこで、それらの遺伝子を導入した組換え清酒酵母を作成し、EHT遺伝子の導入が酵母のカプロン酸エチル生成能に与える影響を調べると共に、組換え体由来する粗酵素のAACTase活性の測定を試みた。

A-14、CEL-19を親株とし、各EHT遺伝子を導入したシャトルベクターpAUR101、123 (宝酒造) を用いて酵母の形質転換を行った結果、pAUR101を用いて作製した形質転換株はどちらの親株の場合も20~60株得られたのに対して、pAUR123を用いたものは、A-14で10株程度であり、CEL-19では組換え株は取得出来なかった。

得られた形質転換株を用いて一次スクリーニングを行い、カプロン酸エチル生成能が高かったもの36株を選択し、二次スクリーニングを行った。その結果、親株にA-14を用いた組換え株では1.3~1.8倍、CEL-19を親株に用いた場合では1.3倍程度のカプロン酸エチル生成量の増加が見られた (表1)。特にpAUR123をベクターに用いた株はpAUR101を用いた場合よりもカプロン酸エチル生成量が高い傾向が見られた。

3. 3 EHT1, 2, 3 を導入した組換え酵母のAACTase活性測定

スクリーニングの結果、カプロン酸エチル生成能の高かった株より粗酵素液を調製し、AACTase活性測定を行った。その結果、いずれの株も、親株以上の活性を示した (図3)。しかし、その活性の増加はA-14を親株とした形質転換株で1.2~2.0倍、CEL-19を親株とした形質転換株では1.1~1.2倍程度であった。これらの結果より、いずれのEHT遺伝子もAACTase活

表1 EHT1,2,3 組換え清酒酵母の小仕込み試験

	CO ₂ evolved (g)	glucose (g/dl)	Alcohol (%)	Acidity (ml)	Amino acidity (ml)	n-proOH (ppm)	i-butOH (ppm)	i-amyOH (ppm)	Etyl caproate (ppm)	Etyl caprylate (ppm)	Etyl acetate (ppm)	Isomyl acetate (ppm)
A-14	26.8	0.12	13.15	2.50	2.56	41.90	71.07	160.15	1.211	0.22	71.34	4.22
pAUR101-EHT1-15	32.1	0.13	14.35	2.25	2.00	45.48	63.86	161.67	1.435	0.42	75.70	5.13
EHT1-19	33.1	0.16	14.50	2.36	2.25	43.95	62.52	159.20	1.511	0.47	72.80	4.65
EHT2-17	27.8	0.11	13.20	2.40	2.25	44.86	63.52	154.10	1.471	0.30	86.30	4.90
EHT2-20	34.0	0.12	13.80	2.46	2.21	46.22	61.35	151.97	1.472	0.34	58.87	3.55
EHT3-17	41.2	0.13	13.65	2.40	2.30	42.20	60.31	151.05	1.575	0.40	56.09	3.71
EHT3-19	33.1	0.10	13.85	2.20	1.95	51.08	65.94	151.25	1.995	0.52	62.60	3.71
pAUR123-EHT1-6	34.9	0.13	14.20	2.38	2.52	49.17	57.80	149.39	2.205	0.58	69.95	4.78
EHT1-8	36.5	0.12	13.45	2.20	1.94	44.99	57.51	147.07	2.186	0.48	70.09	4.58
EHT2-7	36.1	0.16	13.75	2.36	2.25	48.71	55.78	143.17	1.954	0.43	59.86	3.81
EHT2-10	31.2	0.10	14.20	2.43	2.50	45.00	60.66	153.85	2.195	0.49	84.24	5.21
EHT3-1	35.9	0.15	14.10	2.25	2.25	47.15	57.17	147.21	1.939	0.50	58.00	3.90
EHT3-2	39.9	0.11	13.75	2.55	2.65	45.10	59.33	151.38	1.852	0.40	55.18	3.45
CEL19	35.4	0.18	14.35	2.20	2.20	45.30	57.63	160.12	7.521	1.43	55.14	3.85
pAUR-101-EHT1-7	38.4	0.29	15.45	2.35	2.35	50.26	52.18	153.55	7.779	1.99	53.73	3.60
EHT1-14	36.8	0.35	16.15	2.25	2.22	51.90	50.18	151.70	9.428	2.55	69.47	4.67
EHT2-6	36.6	0.32	15.80	2.30	2.10	55.47	49.81	146.02	9.240	2.41	60.97	4.31
EHT2-7	35.3	0.29	15.65	2.10	1.93	54.19	50.00	144.80	9.444	2.24	63.18	4.54
EHT3-5	37.1	0.46	16.40	2.13	2.14	56.83	46.11	134.08	9.950	2.70	70.06	4.84
EHT3-11	35.7	0.23	15.65	2.20	2.18	48.67	54.04	154.41	9.493	2.08	59.39	4.15

性を持っていることはわかったが、3つの遺伝子間の活性の差を特定することはできなかった。また、組換え酵母のカプロン酸エチル生成能の増加と酵素活性の間に相関性はみられず、どの遺伝子がAACTaseとして主に働いているのかを特定することはできなかった。

また、A-14とCEL-19の親株間で顕著なAACTase活性の差がみられたことから、清酒醸造に使用されている各種酵母の粗酵素を用いて同様にAACTase活性を測定したところ、中でもCEL-19やCEL-24（セルレニン耐性能を持つカプロン酸エチル高生産株）がひととき高い活性を示した。これらの酵母は、脂肪酸合成酵素の変異株であるため、脂肪酸合成酵素の変異がAACTaseの働きに何らかの影響を与えている可能性が示唆された。

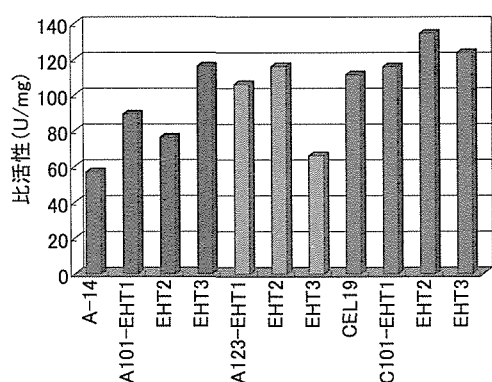


図3 AACTase活性測定

4. まとめ

カプロン酸エチルの生合成に関与するアルコールアシルトランスフェラーゼ (AACTase) は大関の坊垣らによって単離・精製され、コードする遺伝子 (EHT1) が同定されている。しかし、EHT1を導入した清酒酵母のカプロン酸エチル生成能には大きな変化はみられなかった。そこで本研究では、EHT1と高い相同性を持つタンパク質をコードする2種類の機能未知遺伝子をクローニングし、清酒酵母に導入して、これらの遺伝子が酵母のカプロン酸エチル生成能に及ぼす影響について検討した。得られた2種類の相同遺伝子 (EHT2,3) を導入した大腸菌組換え株では、顕著なAACTase活性は検出できなかった。しかし、2種の遺伝子を導入した酵母組換え株の粗酵素を用いたAACTase活性測定では、いずれの場合も親株と比較して、1.1~2.0倍の活性が見られた。また、いずれの組換え株も親株と比較して、カプロン酸エチル量が1.2~1.7倍に増加していた。これらの結果より、EHT1と相同性を持つ2つの機能未知遺伝子の遺伝子産物はAACTase活性を持つが、これら遺伝子を増強しても顕著なカプロン酸エチル高生産能にはつながらないことが示された。

5. 参考文献

- 1) 坊垣隆之、尾関健二、浜地正昭、熊谷知栄子
：2000年度日本農芸化学会講演要旨集 P329