

# 下面発酵ビール酵母から単離した低温増殖不良株について

山岸 裕美

アサヒビール株式会社 醸造研究所

ビール醸造では、発酵後の酵母を回収して次の発酵に用い、酵母を長期にわたり繰り返し使用する。この繰り返し使用により、回収酵母中の一部の酵母が性状変化する可能性があるが、それらは系外に除かれることなくそのまま使用される。性状変化した酵母の出現頻度が低いとビール品質に大きな影響を及ぼさないが、性状変化した酵母の割合が多くなった場合、ビール品質に影響を及ぼす懸念がある。従って、ビール品質に影響を及ぼすほど性状変化した酵母の存在割合が多くなる前に、それらを早期に検出することが重要である。また、性状の変化した酵母を出現させない条件、たとえ出現しても淘汰されるような条件を見出すこと、更に、性状の安定な酵母を選択することが、ビール醸造において重要である。

下面発酵ビール酵母の重要かつ変化しやすい特性として低温増殖能があげられる。品質の変わらないビールを醸造する上では、低温増殖能が劣る酵母が出現することは問題である。回収酵母中に低温増殖不良を示す酵母の存在割合が多くなると、麦汁エキス低下速度が遅延して発酵プロセスに時間がかかり、またそれに伴う香味の変化が生じる懸念がある。低温増殖能を評価する方法としては、フラスコスケールで低温増殖及び発酵させたときの酵母数やエキスの低下を測定する方法があるが、時間がかかる上に実際にビール工場で起きている現象を必ずしも再現できているとはいえない。低温増殖能の正確で簡易で迅速な評価方法の確立が強く望まれていた。

本研究では、下面発酵ビール酵母から低温増殖優良株と低温増殖不良株を単離し性状の比較を行うことにより、低温増殖不良株の検出方法を開発することを試みた。下面発酵ビール酵母 NBRC 2003 の繰り返し培養した培養液から低温増殖優良株と低温増殖不良株を単離し、両株の性状を比較したところ、高温生育性に差異が認められた<sup>(1)</sup>。この低温増殖優良株と不良株の高温生育性の差異は、その他の下面発酵ビール酵母においても同様に認められた。この高温生育性を利用することにより、低温増殖不良株を簡易に検出し、酵母の低温増殖能を評価する方法を構築した。本発表では、下面発酵ビール酵母の低温増殖不良株の性質、検出方法、及び、低温増殖不良原因遺伝子<sup>(2)</sup>について紹介する。

## 引用文献

(1) Yamagishi, H. *et al.* (2001) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65** (10), 2361-2363.

(2) Yamagishi, H. *et al.* (2010) *J. Gen. Appl. Microbiol.* **56**, 297-312.

# 出芽酵母前孢子膜形成の分子機構

舘川 宏之

東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻

出芽酵母の孢子形成は、2倍体細胞の内部に4つの1倍体孢子が形成される細胞分化の過程である。この過程では、細胞内に形成される新規2重膜構造である前孢子膜が、減数分裂に伴い生ずる4つの1倍体の核をそれぞれに包み込み、孢子の前駆体を形成する。この減数分裂と同調しておこる前孢子膜形成は、細胞内にまったく新しい膜構造が形作られることから、生体膜形成のモデルと考えられる。

我々は、タイムラプス蛍光顕微鏡観察による前孢子膜形成過程の詳細な解析を行い、前孢子膜形成が以下の4つのステップによって進行することを明らかにした(図)<sup>1)</sup>。

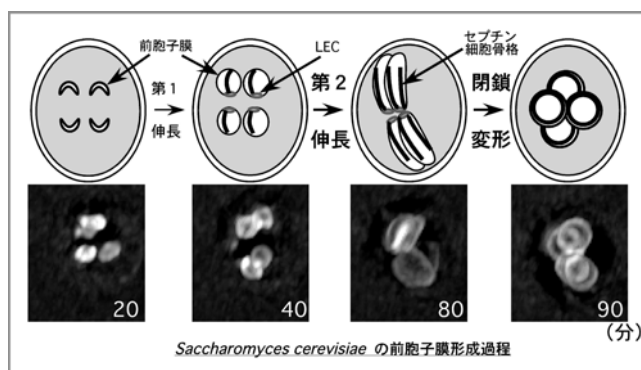
- 1 形成の開始：紡錘極体の近傍で輸送小胞が融合し、笠状の前孢子膜が出現。
- 2 第1伸長：伸長して核を包み込み、小さな球状の構造をとる。
- 3 第2伸長：細胞質やオルガネラを取り込み、カシュナツツ状に伸長する。
- 4 閉鎖と変形：伸長した前孢子膜の先端が閉じ、続いて球状へと変形する。

さらに、この過程に関与する遺伝子を明らかにするため、酵母遺伝子破壊株コレクションから孢子形成に異常を持つ変異株を300株選び、それぞれ前孢子膜を観察することにより、第2伸長および閉鎖と変形に異常を示す株のスクリーニングを行った。

前孢子膜の閉鎖と変形が異常になる株としては、*ama1* 破壊株と *swm1* 破壊株を得た。

*Ama1* はユビキチンリガーゼ複合体である Anaphase Promoting Complex (APC) の孢子形成時特異的な活性化サブユニット、*Swm1* は APC のコンポーネントであることから、減数分裂において働く APC が前孢子膜の閉鎖と変形においても機能する可能性が考えられた。更なる解析の結果、前孢子膜の先端に局在するリング状の構造である Leading Edge Complex (LEC) の消失に APC が必要であり、前孢子膜の閉鎖は APC 依存的な LEC の除去により行われていることが示された<sup>1)</sup>。

前孢子膜の第2伸長が異常になる株としては、以前から解析を行ってきた *gip1* 破壊株<sup>2) 3)</sup> に加えて、*spo71* 破壊株と *spo73* 破壊株を得た。*Spo71* は Pleckstrin Homology ドメインを2つ持ち、*Spo73* は *dysferlin* ドメインを持つタンパク質であり、いずれも孢子壁の形成に必要であるとされていた。しかしながら、これらの遺伝子の破壊株では小さな前孢子膜が形成されることから、膜の伸長に必要であることが明らかになった。また、細胞内局在解析の結果、いずれのタンパク質も前孢子膜に沿って局在することが示された。第2伸長の分子機構についてはいまだ不明な点が多く、現在検討を行っているので報告したい。



1) Diamond A, Park JS, Inoue I, Tachikawa H, Neiman AM. (2009) *Mol. Biol. Cell* 20: 134-145

2) Tachikawa H, Bloecher A, Tatchell K, Neiman AM. (2001) *J. Cell Biol.* 155: 797-808

3) Ishihara M, Suda Y, Inoue I, Tanaka T, Takahashi T, Gao XD, Fukui Y, Ihara S, Neiman AM, Tachikawa H. (2009) *Eukaryotic Cell* 8: 1027-1037

# 酵母と乳酸菌の相互作用と複合バイオフィーム形成

古川 壮一・森永 康

日本大学 生物資源科学部 食品生命学科 食品微生物学研究室

鹿児島県霧島市福山町に伝わる福山酢は、一つの壺の中で糖化、アルコール発酵、酢酸発酵が人工的な管理を施すことなく、一部並行しながら順次進行するトリプル発酵と称される形式を取る。福山酢のような伝統的発酵は、「もろみ」の状態で行われる。「もろみ」は多く固形物を含むが、その固形物の表面では、酵母や乳酸菌など複数種の微生物群集からなる複合バイオフィーム (Biofilm) が形成されているのではないかと考えられる。そして、この複合バイオフィームが発酵の成立に一定の役割を果たしているのではないかと推察される。我々は、福山酢の醸造試料から、複合培養にて顕著に複合バイオフィームを形成する酵母と乳酸菌及び酢酸菌の組合せを見出した。現在、この複合バイオフィームの形成機構解明と利用を目指した研究を行っている。

福山酢もろみサンプル (合資会社伊達醸より供与頂いた) より酵母と乳酸菌を分離し、複合バイオフィームを形成する組合せについてスクリーニングを行ったところ、乳酸菌 ML11-11 (*Lactobacillus plantarum*) と酵母 Y11-43 (*Saccharomyces cerevisiae*) との組合せで顕著な二菌種複合バイオフィーム形成をすることをみいだした。この複合バイオフィームの走査型電子顕微鏡観察、FISH-共焦点レーザー顕微鏡観察及び凝集試験の結果から、乳酸菌がアンカーの役割を果たし、その上に酵母が乳酸菌を介して凝集することにより高次構造体を形成していることがあきらかとなった(1)。また、凝集に及ぼす加熱や酵素処理などの影響を検討した結果、凝集には酵母表面のマナンと乳酸菌表面のタンパク間の相互作用が関与することが示唆された(2)。加えて、酵母と凝集沈殿しない乳酸菌を集積培養することで、乳酸菌の非凝集性自然変異株を十数株得ることができた。その後、さらに酵母のマナン合成欠損株を用いて検討を行った結果、マナン主鎖から枝分かれした側鎖構造を乳酸菌表層のマナンが認識していることが示唆された。

次に、既存の7属・35種・292株の乳酸菌を対象に出芽酵母と複合バイオフィームを形成する菌株をスクリーニングしたところ、新たに3株の乳酸菌(*L. plantarum* 2株と *Leuconostoc mesenteroides* 1株)をみいだすことができた。また、本乳酸菌 ML11-11 と複合バイオフィームを形成する酵母のスクリーニングを行ったところ、6属・8種・32株中30株 (内、清酒酵母14株) で複合培養時にバイオフィーム形成が上昇しており、そのほとんどの酵母は共凝集能も有していた。このことから、ML11-11 は幅広い種類の酵母と複合バイオフィーム形成及び共凝集能を有していることが明らかになった。

(1) Furukawa, S. et al.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 74, 2316 (2010).

(2) Furukawa, S. et al.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, in submitting.

# オートファジー研究から見えて来たオルガネラの 合成と分解のメカニズム

鈴木 邦律（くにのり）

東京工業大学 フロンティア研究機構

オートファジーとは、栄養飢餓に応答して細胞質にオートファゴソームと呼ばれるオルガネラが新規に形成された後、液胞／リソソームと融合して内容物ごと分解されるという一連の過程であり、真核細胞に広く保存されたシステムである。1960年代後半にこの現象が見出されて以降、オートファゴソーム形成を担う遺伝子群、オートファゴソームの形成される場所、オートファゴソーム膜の由来などがオートファジー研究者の興味の対象となってきた。

1990年代前半に大隅ら（現東工大）のグループにより、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いて一群のオートファジー不能変異体が取得されたことがその後の分子細胞生物学的解析を進める上での突破口となった。ほどなくしてオートファゴソームのマーカータンパク質 Atg8 が同定され、GFP を融合した Atg8 を用いた生細胞観察により、オートファゴソームが形成されてから液胞内で分解されるまでの過程を可視化することが可能となった。出芽酵母では、オートファゴソームは液胞近傍の限局された領域で、ひとつずつ形成されると考えられている。オートファゴソーム形成の1サイクルは約10分であり、そのサイクルが繰り返されることにより、次々とオートファゴソームが形成されて液胞へと送り込まれていく。液胞と融合したオートファゴソームが崩壊するまでには1分ほどの時間を要する。

オートファゴソーム膜の由来は残された大きな問題である。オートファゴソーム形成に必要な Atg タンパク質のうち、膜貫通型タンパク質は Atg9 ただ一つであるが、現在のところ、Atg9 がオートファゴソームに脂質を供給しているという証拠は得られていない。最近になって、オートファゴソームに脂質を供給しているオルガネラの候補として、小胞体・ミトコンドリア・細胞膜が続々と報告された。動物細胞において、形成中のオートファゴソーム膜と小胞体膜が物理的に接続されている様子が電子顕微鏡で得られていることもあり、現在脂質供給源として最有力なのが小胞体である。出芽酵母においては小胞体からの膜輸送システムがオートファゴソーム形成に重要な役割を果たしていることが変異体の解析により知られている。本会では最近の我々の解析結果を基にして議論を進めていきたい。

我々は、オートファゴソームと呼ばれる脂質二重膜からなるオルガネラの生合成と分解に興味をもち研究を進めてきた。こうした研究から得られた知見は他のオルガネラの形態形成の分子機構を理解する上でも大いに役立つと考えている。

# 分裂酵母の生育における TOR キナーゼの役割

山本正幸

東京大学大学院理学系研究科生物化学専攻

TOR キナーゼは真核生物に広く保存されたセリン/スレオニンキナーゼであり、栄養源など細胞外界の環境の変化に応じて細胞増殖を制御している。動物では TOR は一種類のタンパク質で、組成の異なる二つの複合体 TORC1 および TORC2 を形成して別個の機能を果たしている。分裂酵母には 2 つの TOR タンパク質 Tor1p と Tor2p が存在し、Tor2p が TORC1 を、Tor1p が TORC2 を構成する。TORC1 は増殖に必須である。いっぽう TORC2 は有性生殖やストレス条件下での生育に必要とされる。*tor2* 温度感受性株は、制限温度において TORC1 の機能が低下すると、栄養源存在下であっても有性生殖を開始する。このとき、有性生殖のための遺伝子を含む、窒素源飢餓で発現誘導される遺伝子の多くが発現してくる。すなわち、分裂酵母の TORC1 は、動物や出芽酵母の TORC1 と同様に、栄養源に反応して栄養成長を促進するのに加えて、栄養状態のよい条件では有性生殖の開始を押さえていることが分かった。

最近、上述した TORC1 による転写レベルでの有性生殖の負の制御に加えて、TORC1 が分裂酵母の減数分裂マスター制御因子 Mei2 を直接制御していることが明らかになってきた。我々の研究室では以前に、分裂酵母 TORC1 の構成因子の一つである Mip1 を、Mei2 に結合でき、Mei2 の活性化型変異が引き起こす異所的減数分裂を抑圧する因子として同定していた。またスペインのグループは Tor2 と Mei2 が物理的相互作用を示すという報告をしている。これらを受けて、Mei2 と Tor2 との関係を検討し、以下の知見を得た。

*tor2* 突然変異株の解析から、TORC1 によるリン酸化が Mei2 タンパク質を不安定化することが推測された。また、*in vitro* アッセイを用いて、Tor2 が Mei2 を直接リン酸化できることを確認した。さらに、9箇所同定されたこれらのリン酸化部位をアラニンに置換した変異型 Mei2 タンパク質は、安定性が増し、また有性生殖を誘導する能力が向上した。以上のことから、TORC1 は Mei2 を直接のターゲットとし、そのリン酸化を介して有性生殖開始を制御している可能性が新たに明らかとなった。