

東北ハイテク研究会セミナー

『「知」の集積と活用の中』プロジェクト成果発信Onlineセミナー

2020年11月27日



東北大学

機能性アミノ酸高含有酵母の育種

アミノ酸取り込み促進によるアミノ酸高蓄積の試み

東北大学大学院農学研究科

新谷尚弘 五味勝也

目次

- 第3コンソーシアムの概要
- アミノ酸アナログ耐性を指標としたアミノ酸高蓄積の試み
 - 月桂冠、奈良先端大の研究の紹介
- アミノ酸取り込み促進によるアミノ酸高蓄積の試み
 - 研究背景
 - 改変型プロリン輸送体、改変型ロイシン輸送体
 - 改変株のアミノ酸分析
 - 考察・展望
- 総括

第3コンソーシアム

- プロジェクト名

機能性アミノ酸高含有酵母の育種技術を活用した発酵・醸造食品の高付加価値化および海外ブランド化

- 参画機関

奈良先端科学技術大学院大学（高木博史・代表）

月桂冠（株）（小高 敦史）

キッコーマン（株）（仲原 丈晴）

東北大学大学院農学研究科（五味勝也・新谷尚弘）

プロジェクトの背景・目的

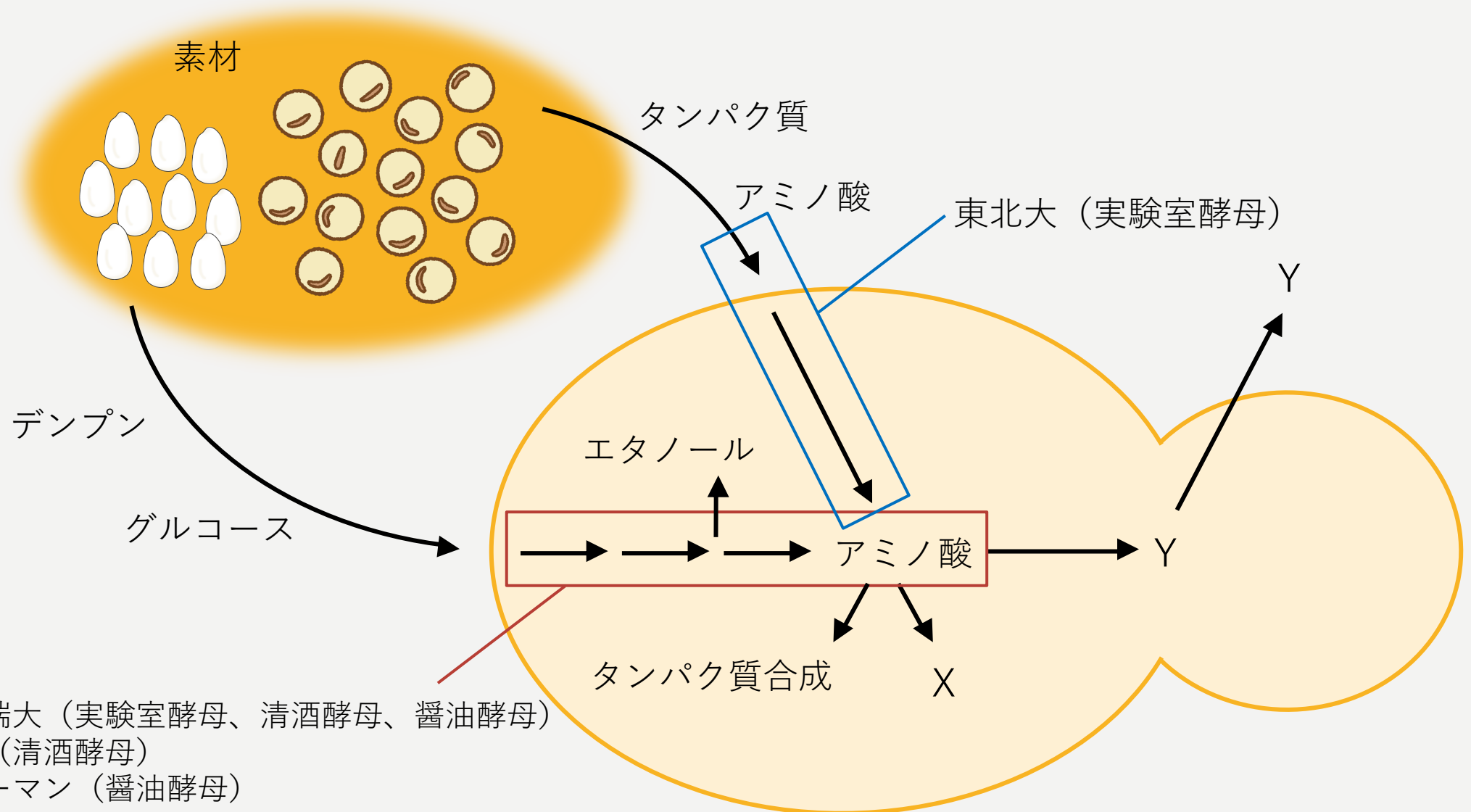
- 背景：

伝統的発酵技術で製造する**醤油、清酒・酒粕**は、日本食の**海外展開・輸出促進**に不可欠な食材であるが、国内における消費低迷の打破や海外展開には**高付加価値化や高度化製造技術**が必要である。

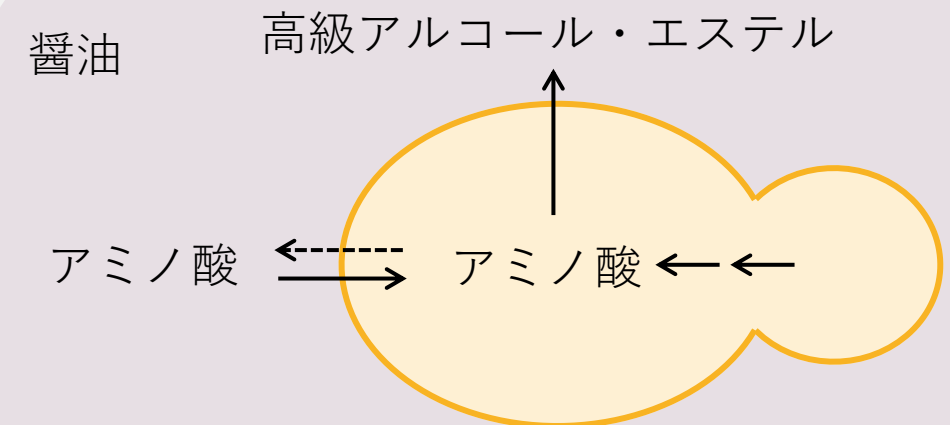
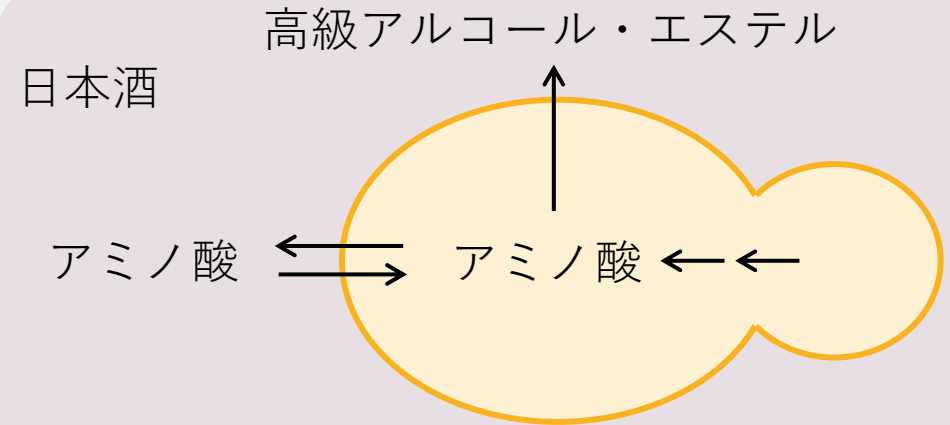
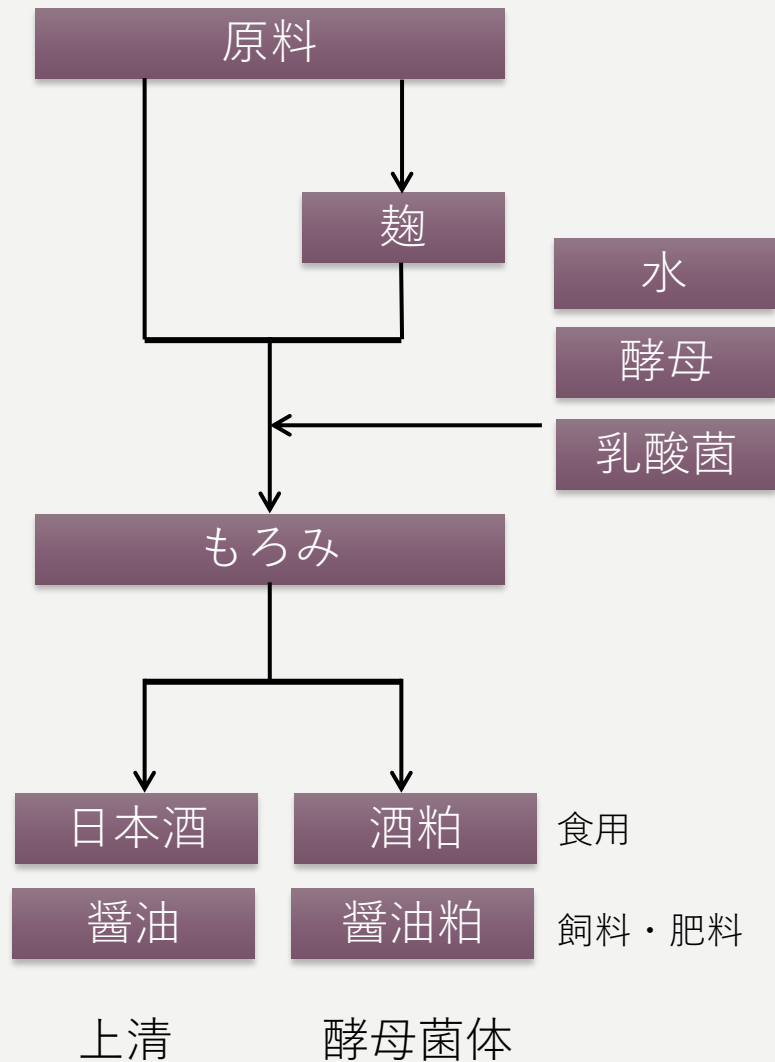
- 目的：

多くの飲食品に添加されているアミノ酸の機能性に着目し、酵母における**アミノ酸の代謝制御機構や生理機能、育種・醸造などの基盤シーズを活用**することで、機能性アミノ酸を高蓄積する酵母を作製し、付加価値を高めた醤油、清酒・酒粕を開発する。

プロジェクトの概要ーアミノ酸の合成と取り込みの強化ー



発酵食品製造に用いられる酵母



研究概要

アミノ酸高含有
酵母の創製

酵母の育種
技術の確立

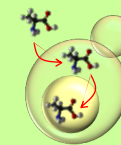
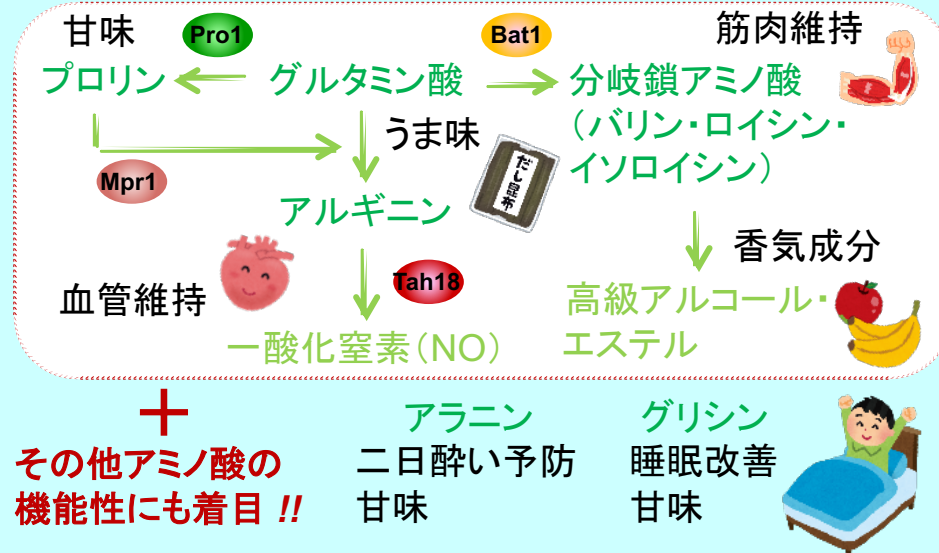
醤油・清酒・酒粕の製造：
有用性の実証へ



奈良先端科学技術大学院大学

アミノ酸高含有変異株の創成
(アミノ酸アナログ耐性株・アミノ酸代謝改変株)

独自に解明したアミノ酸代謝に関する知見を活用 !!

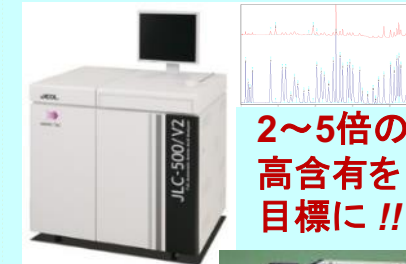


東北大学

アミノ酸取込み改変株の取得

アミノ酸動態に関する新発見に期待 !!

アミノ酸高含有株の選抜
アミノ酸アナライザー

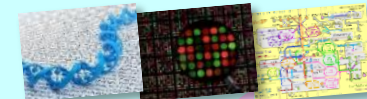


↑ 日本電子
JCL-500/V
(リース予定)

発酵モニタリング装置

アミノ酸高含有株の
育種技術の確立

マルチオミクス解析で
高含有機構を解明 !!



非遺伝子組換え
手法への変換

ゲノム編集
技術の検討



酵母育種・醸造に関する最高峰の技術を有し、
発酵・醸造食品業界を牽引するリーディングカンパニー !!

kikkoman キッコーマン株式会社

優良株の選抜、醤油の製造と特性評価

例) グルタミン酸高含有による「うま味」の増強
高級アルコール・エステル高生産による「香り」の強化



GEKKEIKAN 月桂冠株式会社

優良株の選抜、清酒・酒粕の製造と特性評価

例) プロリン、アラニン等による「健康イメージ」付与
分岐鎖アミノ酸による酒粕「栄養機能」の向上

本プロジェクトでターゲットとした アミノ酸とその機能性

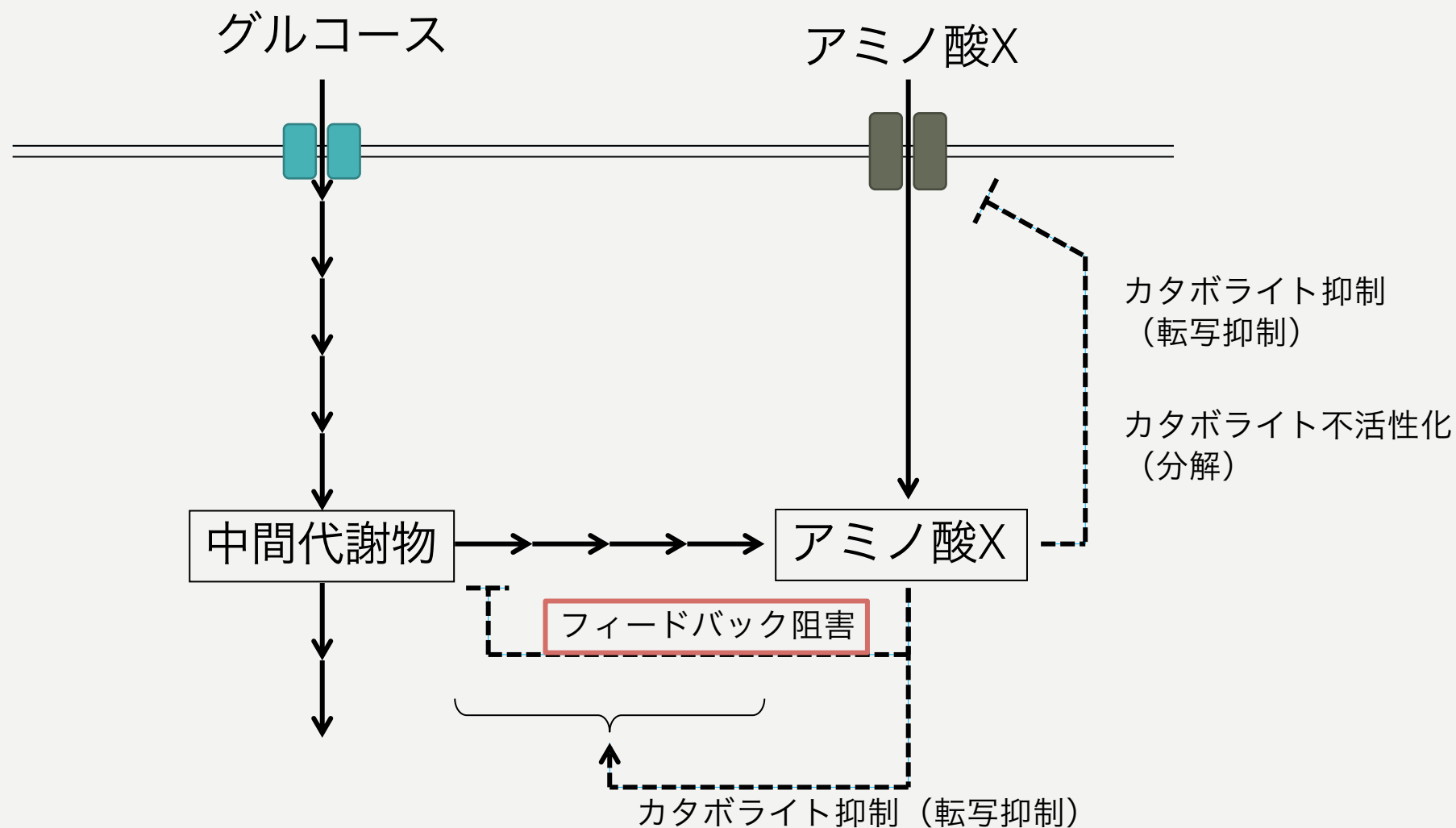
アミノ酸	機能
プロリン	甘味、コラーゲンの主要成分
アルギニン	一酸化窒素の前駆体、血管維持
グルタミン酸	旨味
アラニン	甘味、二日酔い予防
フェニルアラニン	ドーパミン・ノルアドレナリンの材料
ロイシン	筋タンパク質の維持、香気成分前駆体
バリン	筋タンパク質の維持、香気成分前駆体
イソロイシン	筋タンパク質の維持、香気成分前駆体

- 清酒の味の多様化
- 健康志向への対応（高アミノ酸含有の酒粕、減塩醤油）

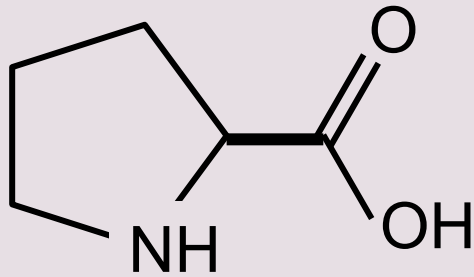
目次

- 第3コンソーシアムの概要
- アミノ酸アナログ耐性を指標としたアミノ酸高蓄積の試み
 - 月桂冠、奈良先端大の研究の紹介
- アミノ酸取り込み促進によるアミノ酸高蓄積の試み
 - 研究背景
 - 改変型プロリン輸送体、改変型ロイシン輸送体
 - 改変株のアミノ酸分析
 - 考察・展望
- 総括

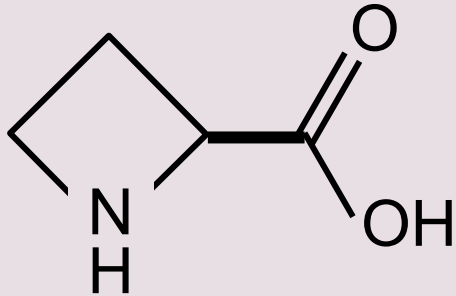
アミノ酸生合成の制御



プロリンアナログ・アゼチジン-2-カルボン酸耐性を指標としたプロリン高生産株の取得



プロリン



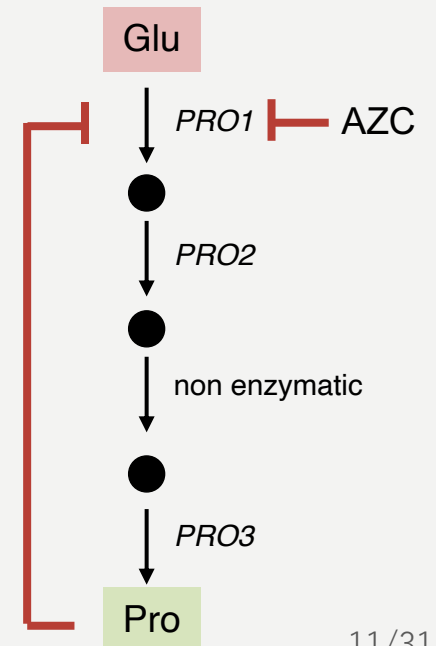
アゼチジン-2-カルボン酸 (AZC)

- 協会9号酵母→AZC耐性株 (K-9-AZC株) の取得

- PRO1*遺伝子 (γ -グルタミル・キナーゼ遺伝子) のQ79H変異 **新しい変異体**

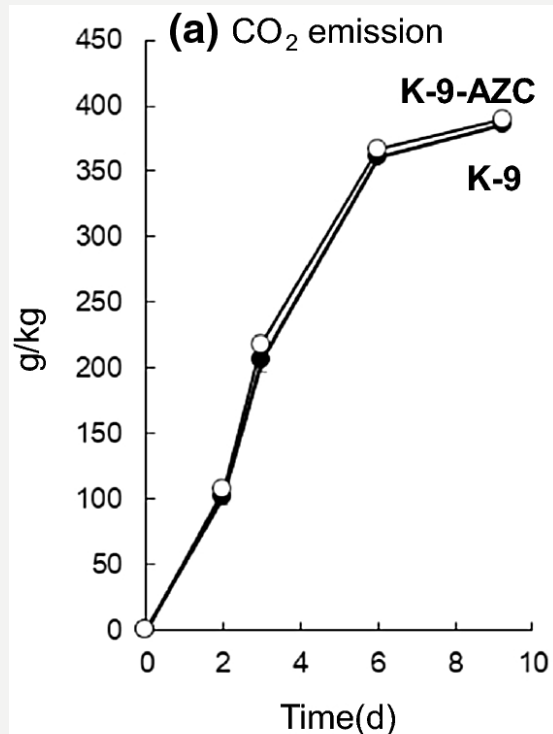
- フィードバック阻害の解除

Murakami et al., 47, 715-723 (2020)
Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology

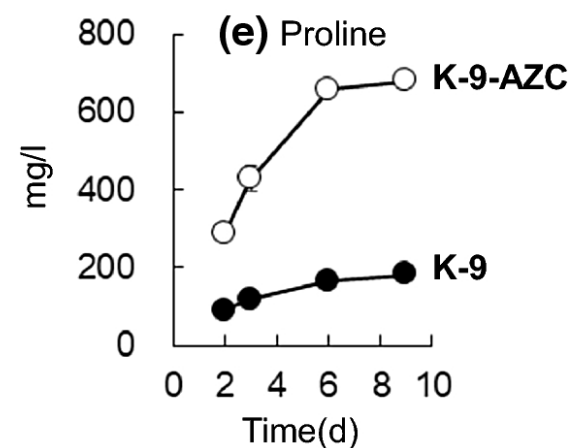
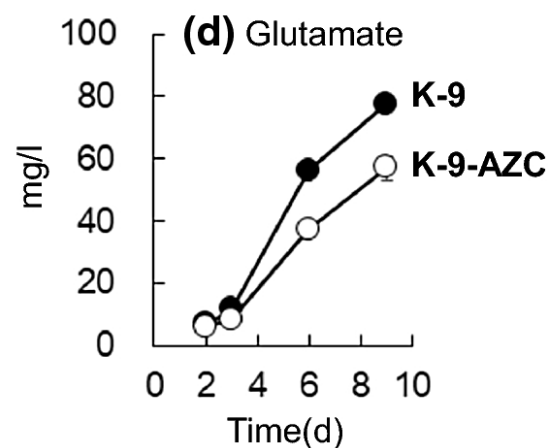
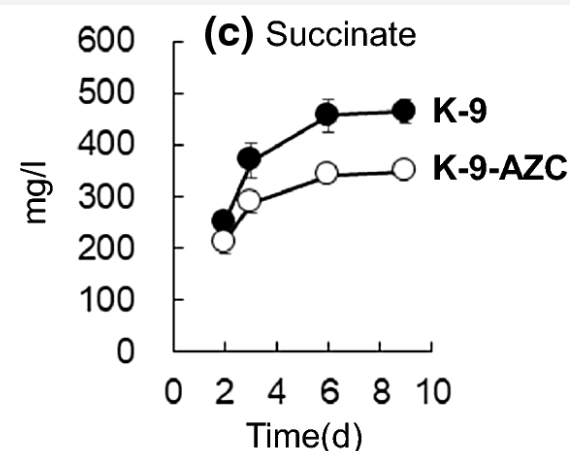
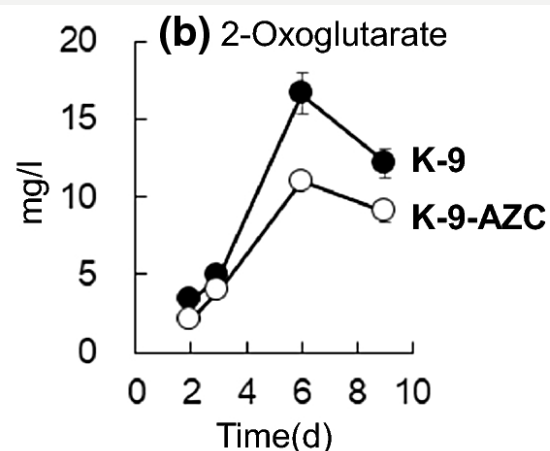


K-9-AZC株を用いた小仕込み試験

発酵速度



もろみの上清 (= 酒) 成分の変動



発酵速度に変化なし

K-9-AZC
プロリン ↑

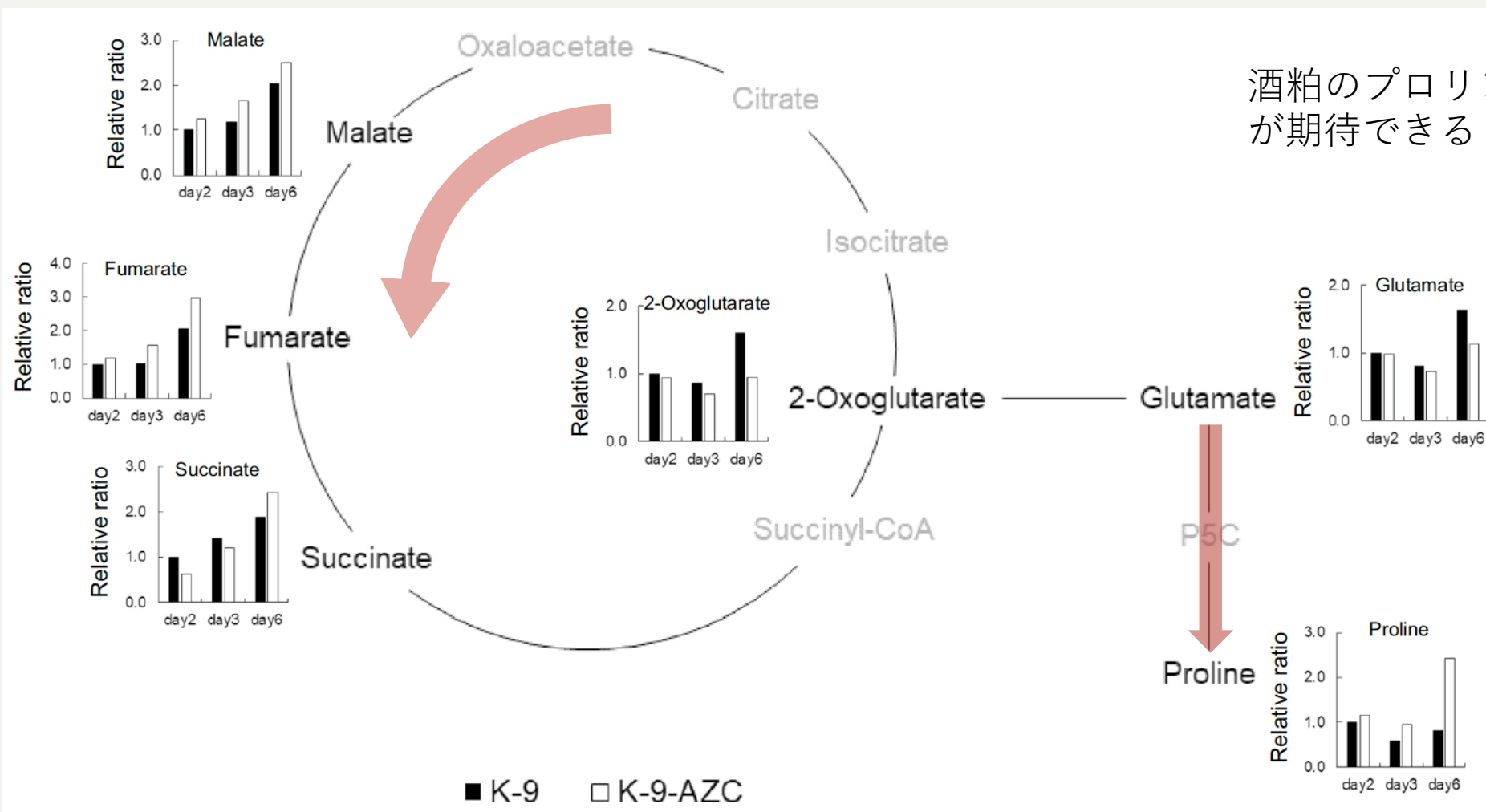
2-オキソグルタル酸 ↓

コハク酸 ↓

グルタミン酸 ↓

K-9-AZC株を用いた小仕込み試験

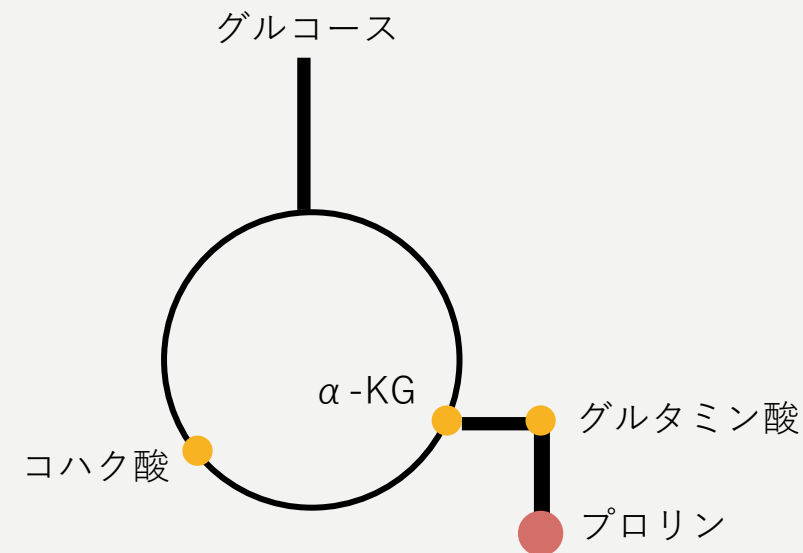
酵母細胞内の代謝物解析



K-9-AZCの発酵特性

Table 3 Fermentation profiles in brewed sake with K-9 and K-9-AZC

Parameter	Sake yeast strain	
	K-9	K-9-AZC
Sake meter	21.8 ± 0.3	22.1 ± 0.2
Ethanol (vol%)	14.8 ± 0.0	14.8 ± 0.0
Acidity	1.71 ± 0.06	1.38 ± 0.03
Amino acid content	1.00 ± 0.02	1.06 ± 0.01
Organic acid (mg/l)		
Citrate	66 ± 1	69 ± 1
2-Oxoglutarate	12 ± 1	9 ± 1
Succinate	464 ± 23	349 ± 11
Fumarate	2 ± 0	2 ± 0
Malate	134 ± 3	141 ± 3
Amino acid (mg/l)		
Glutamate	77 ± 2	57 ± 4
Proline	182 ± 8	679 ± 7



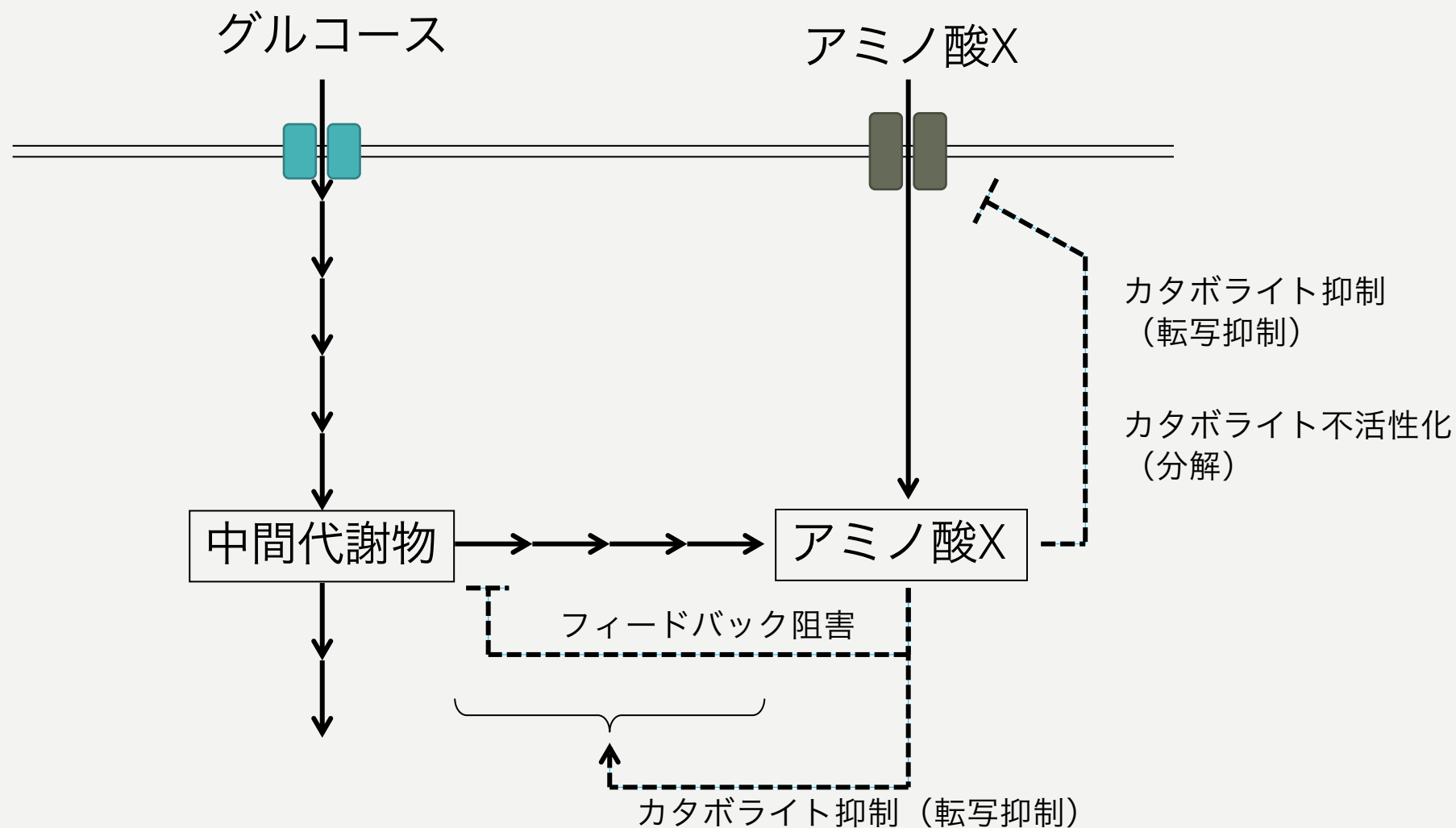
高プロリン、低コハク酸
「淡麗辛口清酒」の製造が期待できる

Murakami et al., 47, 715-723 (2020)
Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology

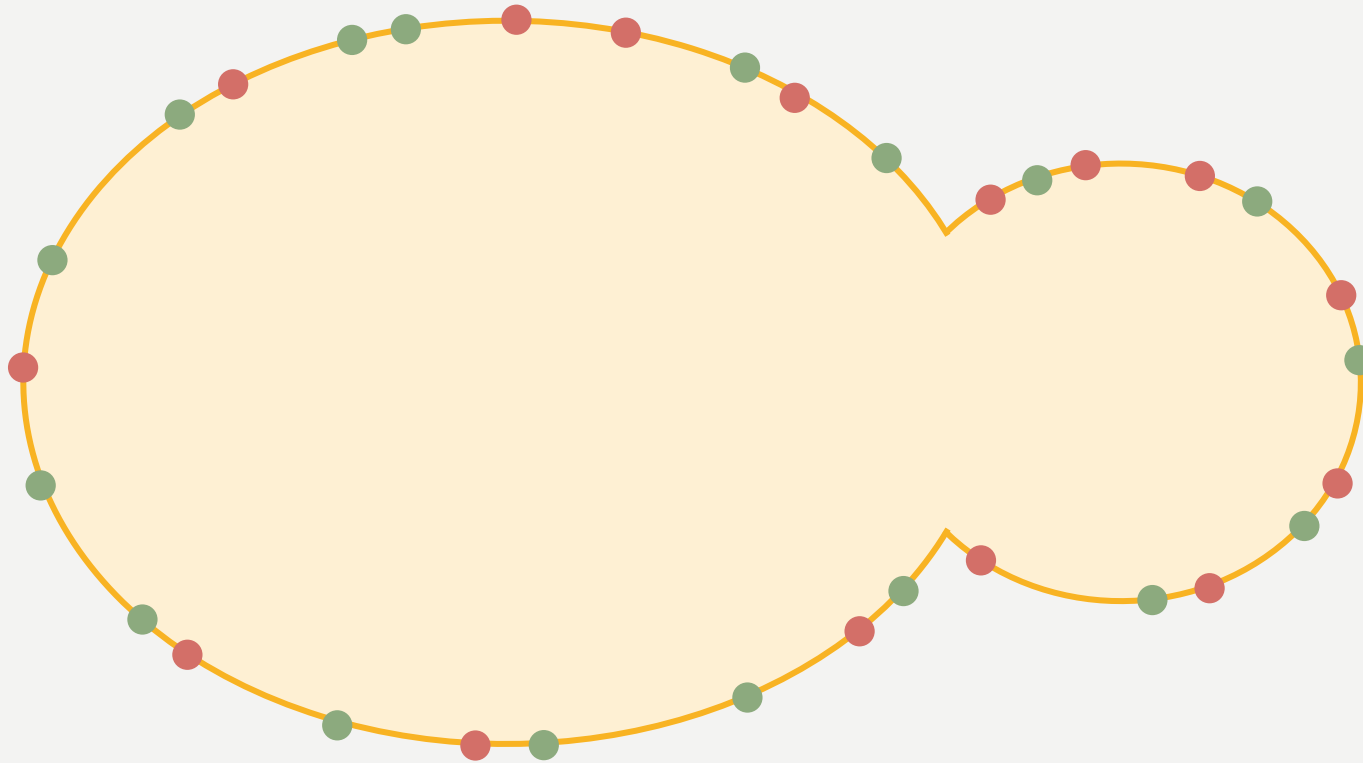
目次

- 第3コンソーシアムの概要
- アミノ酸アナログ耐性を指標としたアミノ酸高蓄積の試み
 - 月桂冠、奈良先端大の研究の紹介
- アミノ酸取り込み促進によるアミノ酸高蓄積の試み
 - 研究背景
 - 改変型プロリン輸送体、改変型ロイシン輸送体
 - 改変株のアミノ酸分析
 - 考察・展望
- 総括

アミノ酸生合成の制御

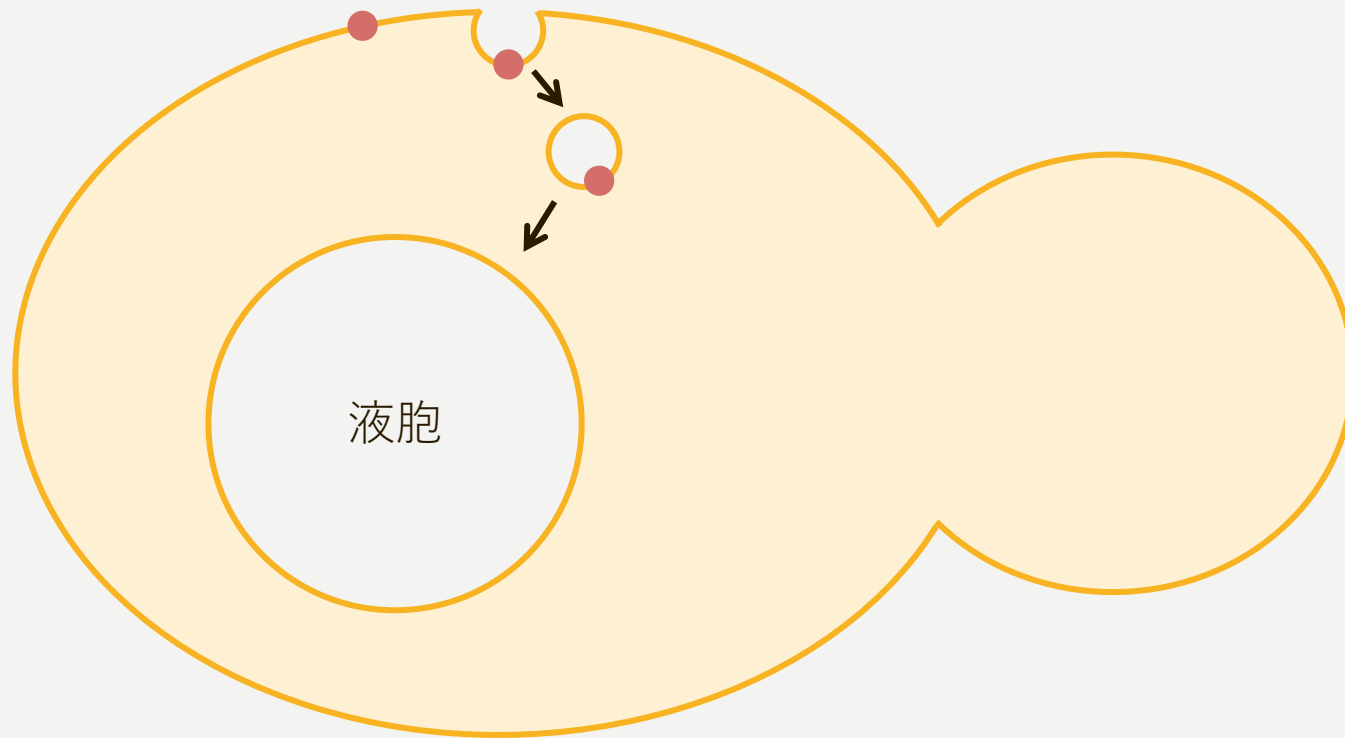


膜輸送体の合成と分解



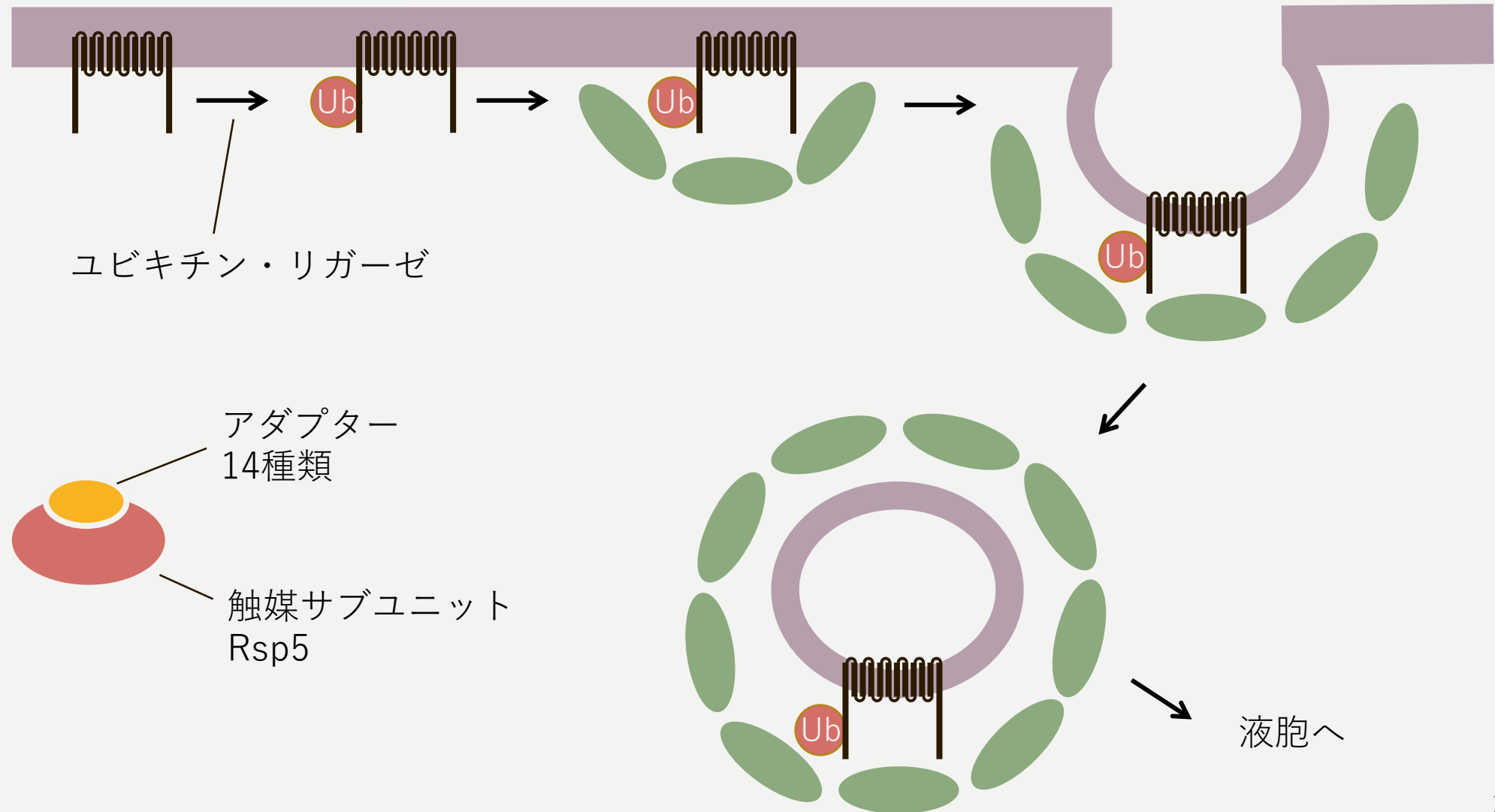
- 膜輸送体は常に原形質膜にあるわけではない
- 栄養源の必要性に応じて膜輸送体の合成と分解が行われる
- 膜輸送体はエンドサイトーシス経路で液胞に運ばれ、分解される

膜輸送体の合成と分解



- 膜輸送体は常に原形質膜にあるわけではない
- 栄養源の必要性に応じて膜輸送体の合成と分解が行われる
- 膜輸送体はエンドサイトーシス経路で液胞に運ばれ、分解される

膜輸送体の選択的エンドサイトーシス



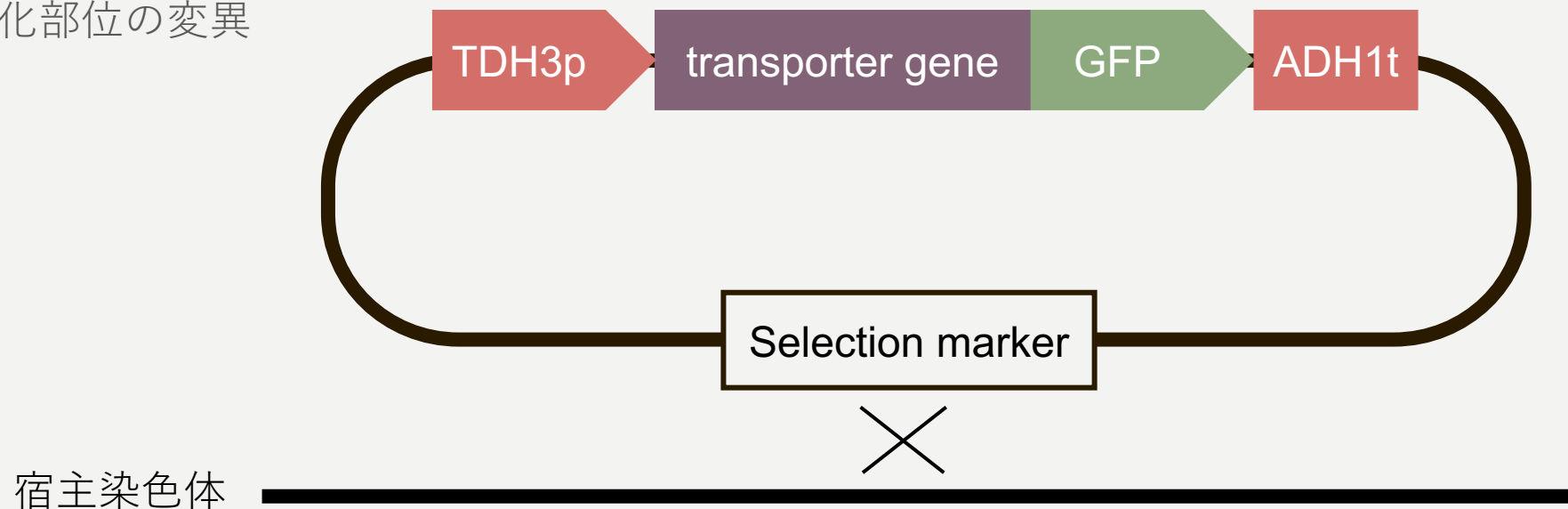
膜輸送体を安定的に発現させる方策

- カタボライト抑制の抑制

構成的高発現プロモーターの制御下で膜輸送体遺伝子を発現させる

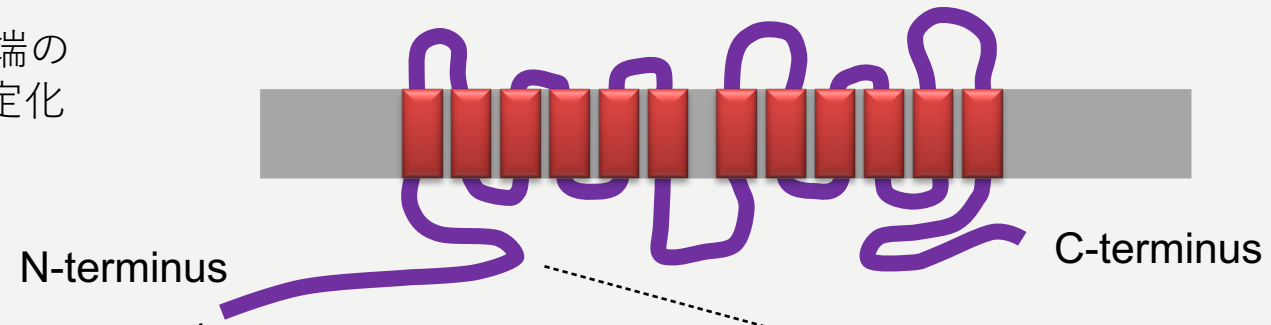
- カタボライト不活性化の抑制

ユビキチン化部位の変異

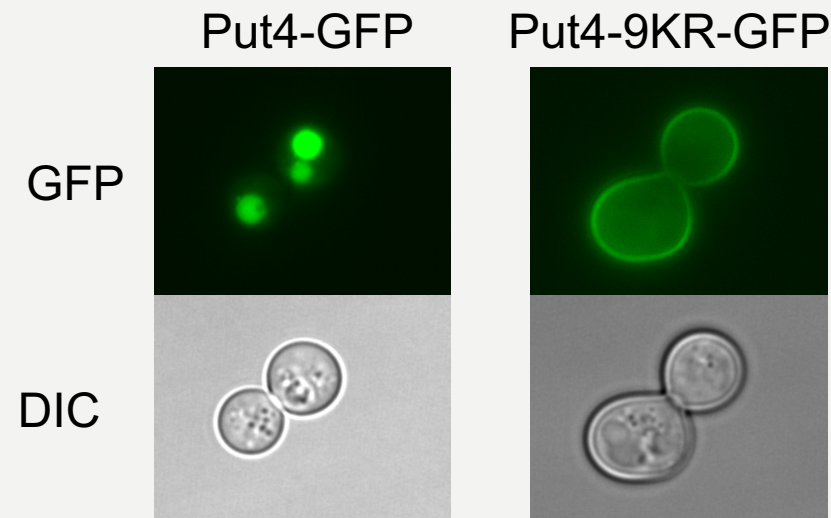


プロリン輸送体Put4のユビキチン化部位の変異

Omuraら (2005)によってN末端のリシン残基の置換により、安定化することが報告されている



1 MVNILPFH_{K₉}NNRHSAGVVTCADDVSGDGSGGDT_{K₃₄}_{K₃₅}EEDVVQVTEPSSGSRNNHRSD
NE_{K₆₀}DDAIRME_{K₆₈}ISK₇₁NQSASSNGTIREDLIMDVDLE_{K₉₃}SPSVDGDSEPH_{K₁₀₅}L_{K₁₀₇}QGLQSRH 114



安定型Put4発現株におけるアミノ酸の取込み

- アミノ酸含量の測定

使用株

- *ura3*Δ株 (BY4742株由来)
- *TDH3*プロモーターでPut4-WT、Put4-9KRを発現
(染色体 *URA3* のプロモーター領域に挿入→原栄養株)

本研究で使用したYPD+Pro培地
1% 酵母エキス (ナカライテスク)
2% ハイポリペプトン (日本製薬)
2% グルコース
0.04% プロリン

培養方法

- YPD+0.4 g/L Pro 液体培地にOD = 0.25となるように植菌し、30°Cで24時間、48時間震盪培養

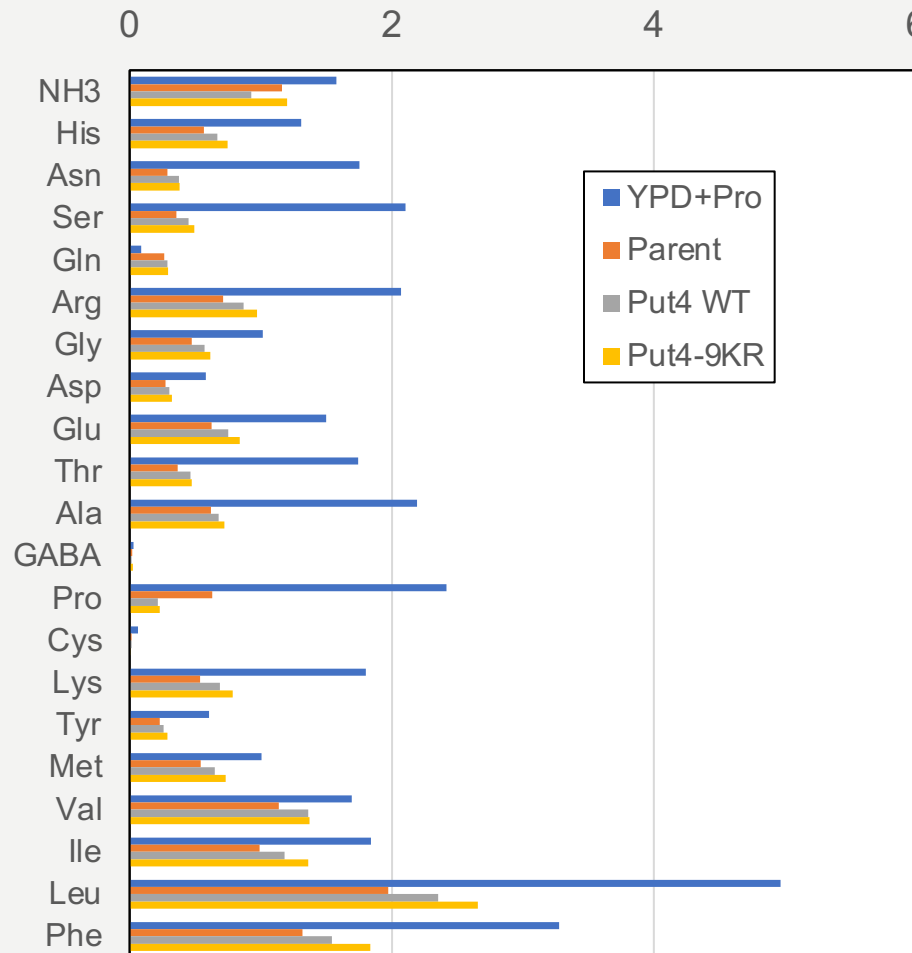
アミノ酸分析装置

- ACQUITY UPLC H-Class system (日本ウォーターズ)

24時間培養後のアミノ酸量

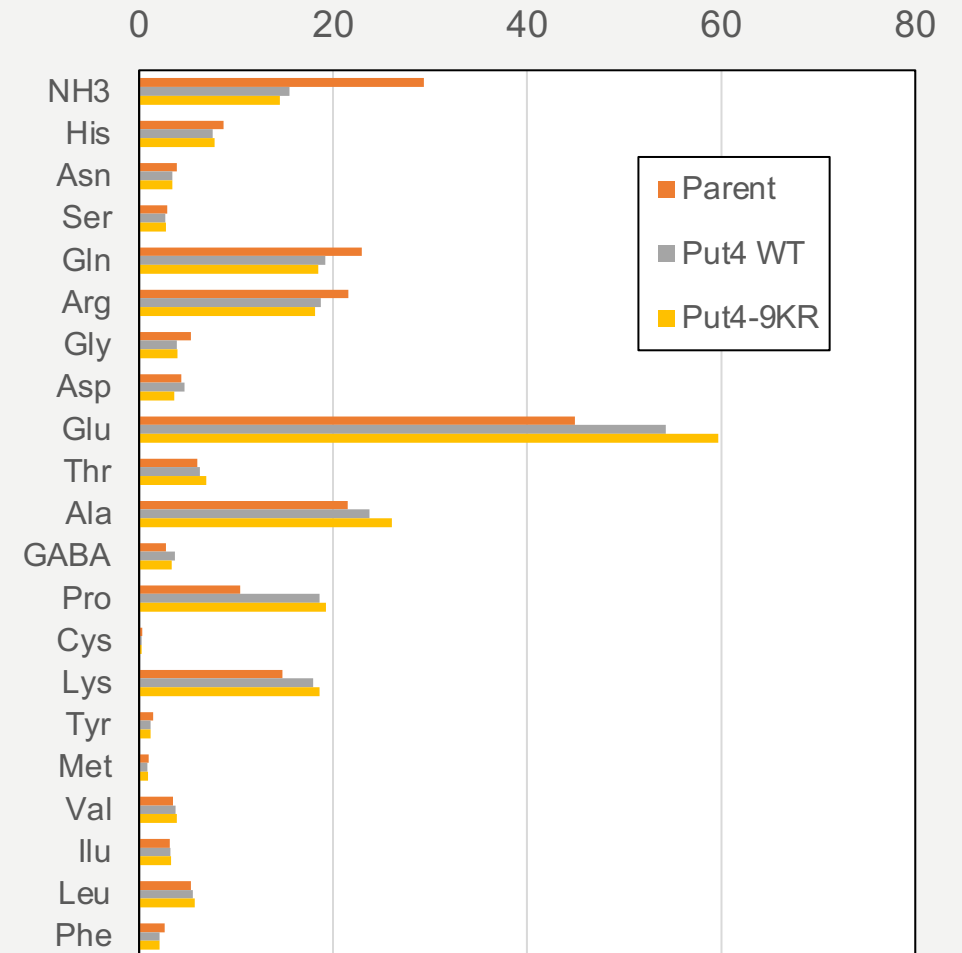
培養上清

アミノ酸濃度 (nmole/ μ L)



菌体内

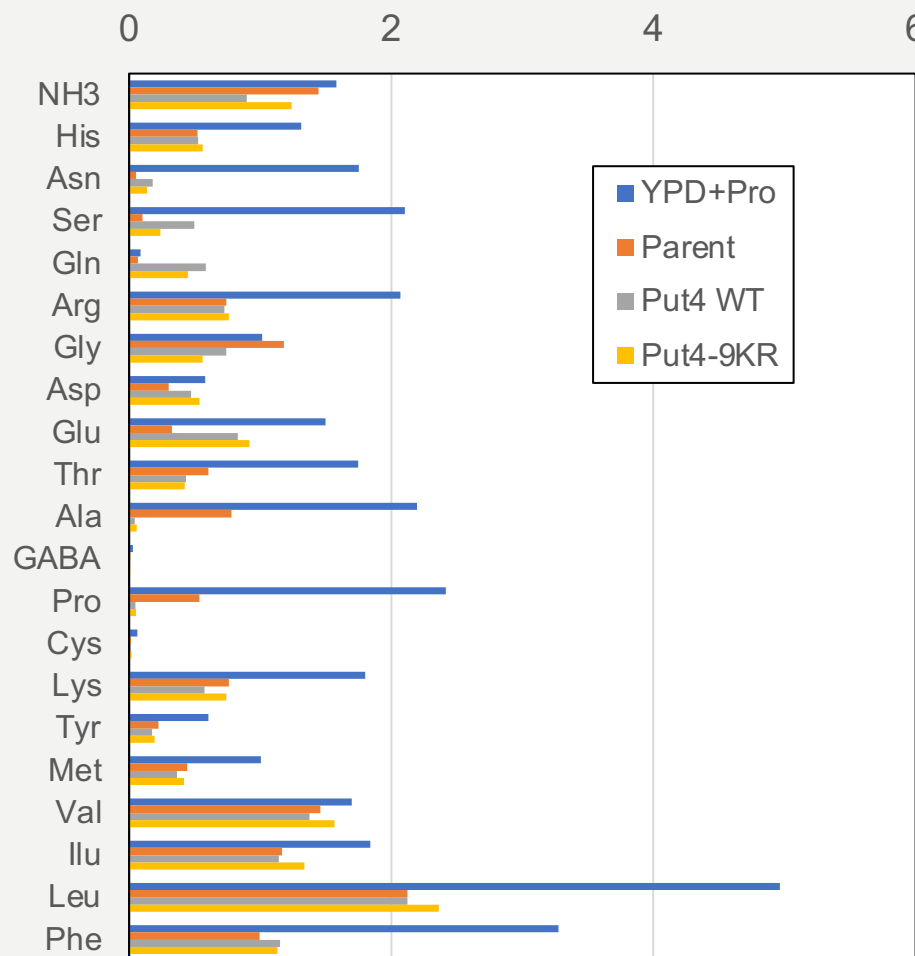
アミノ酸含量 (nmole/OD)



48時間培養後のアミノ酸量

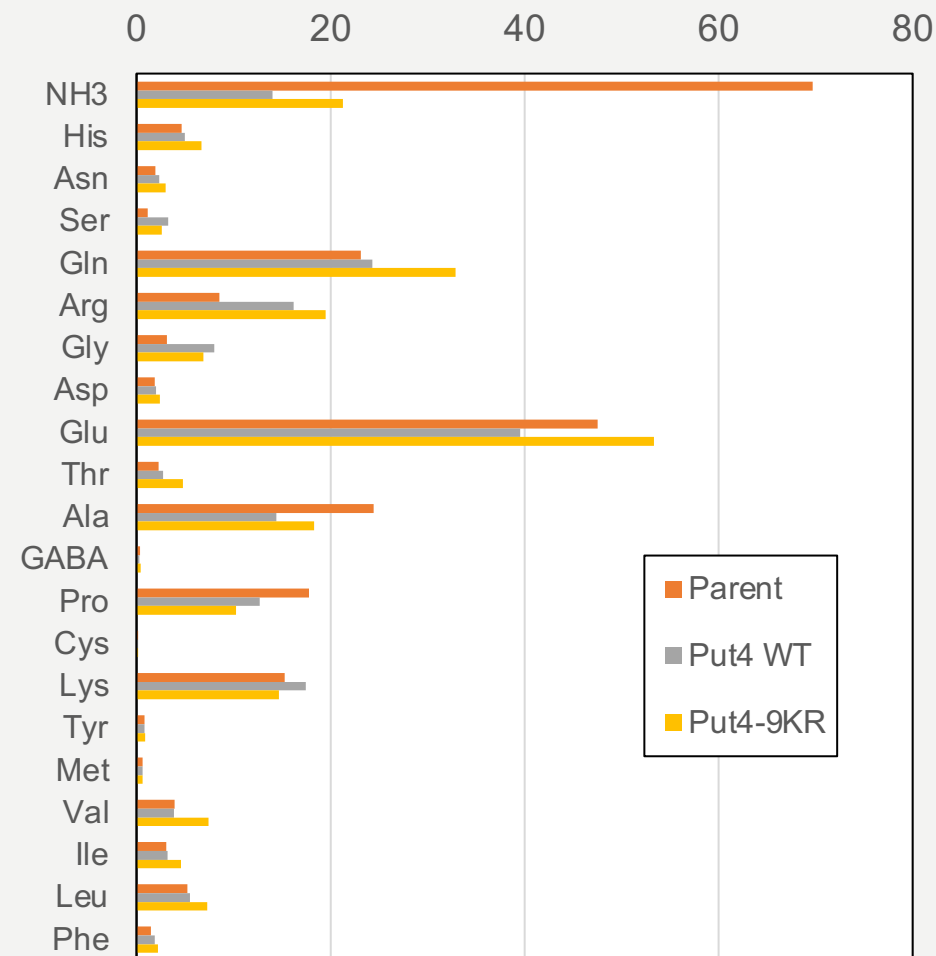
培養上清

アミノ酸濃度 (nmole/ μ L)

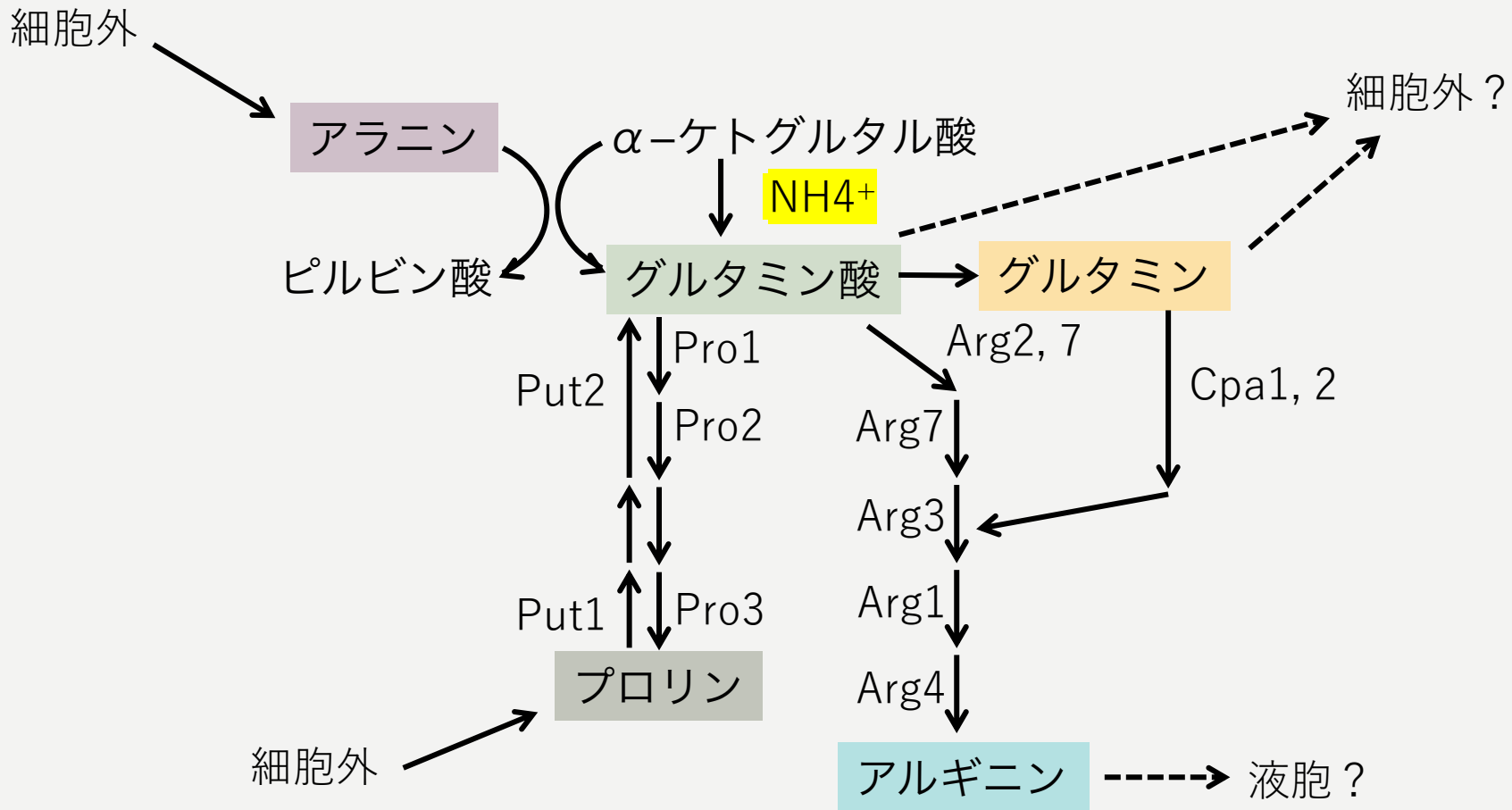


菌体内

アミノ酸含量 (nmole/OD)

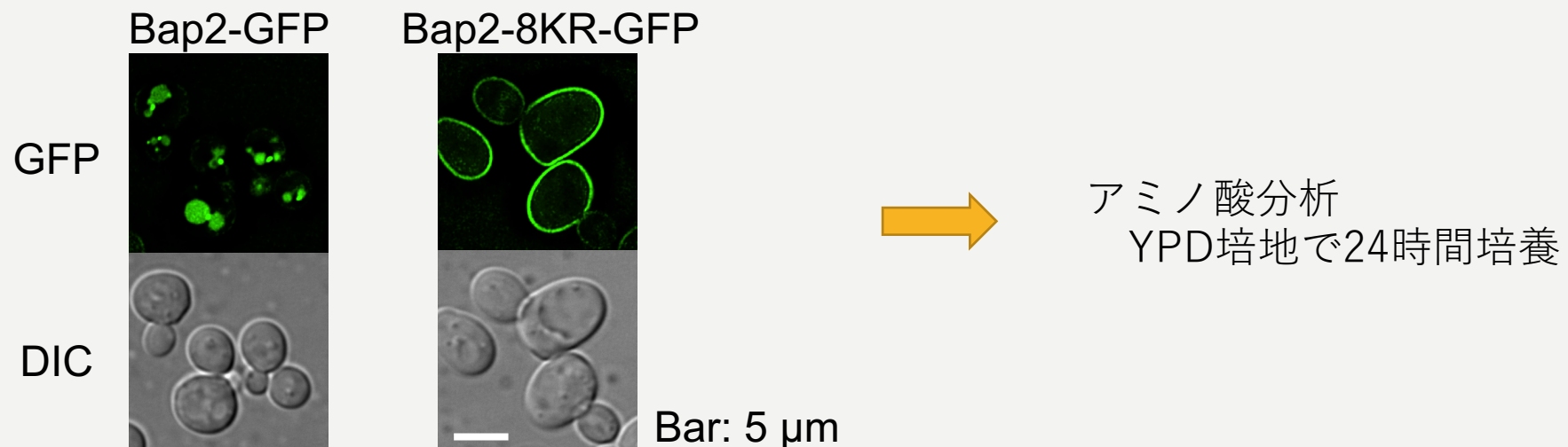
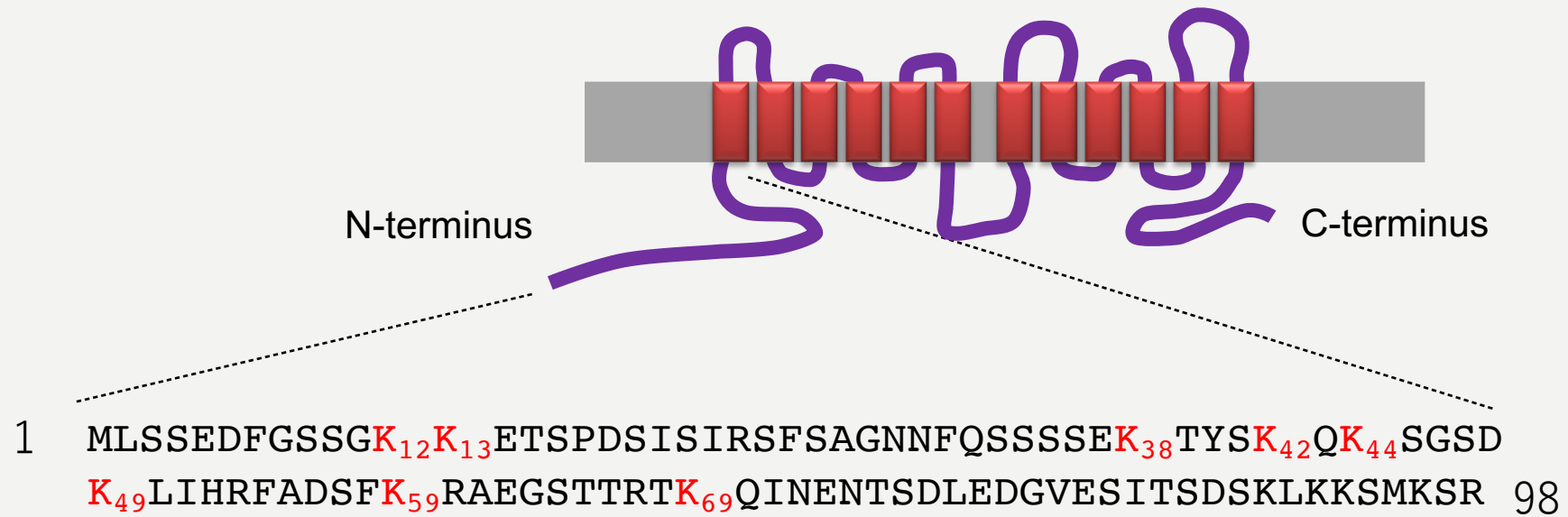


グルタミン酸属アミノ酸の生合成経路

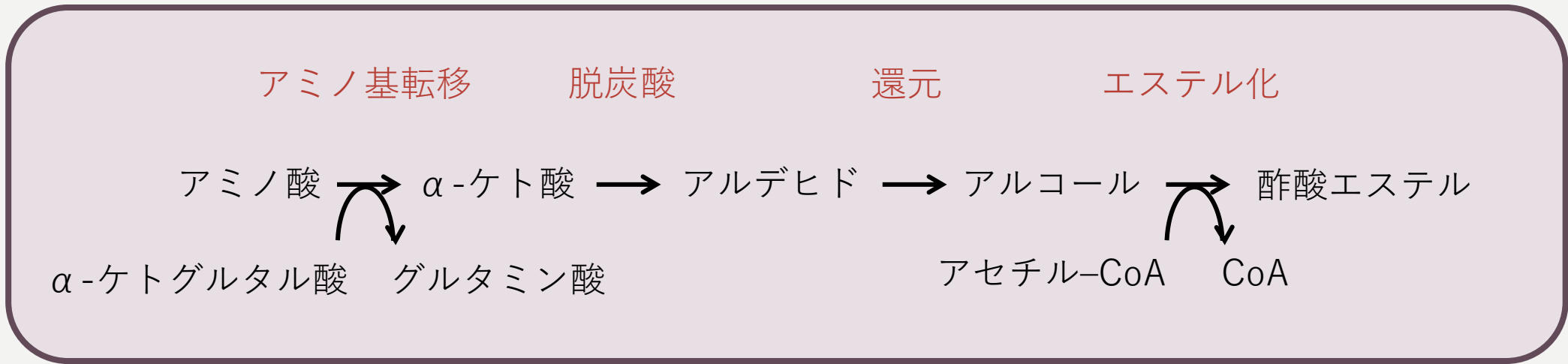


プロリン、アラニンとアンモニウムを原料にグルタミン酸、グルタミン、アルギニンが合成された可能性

ロイシン輸送体Bap2におけるユビキチン化部位の変異



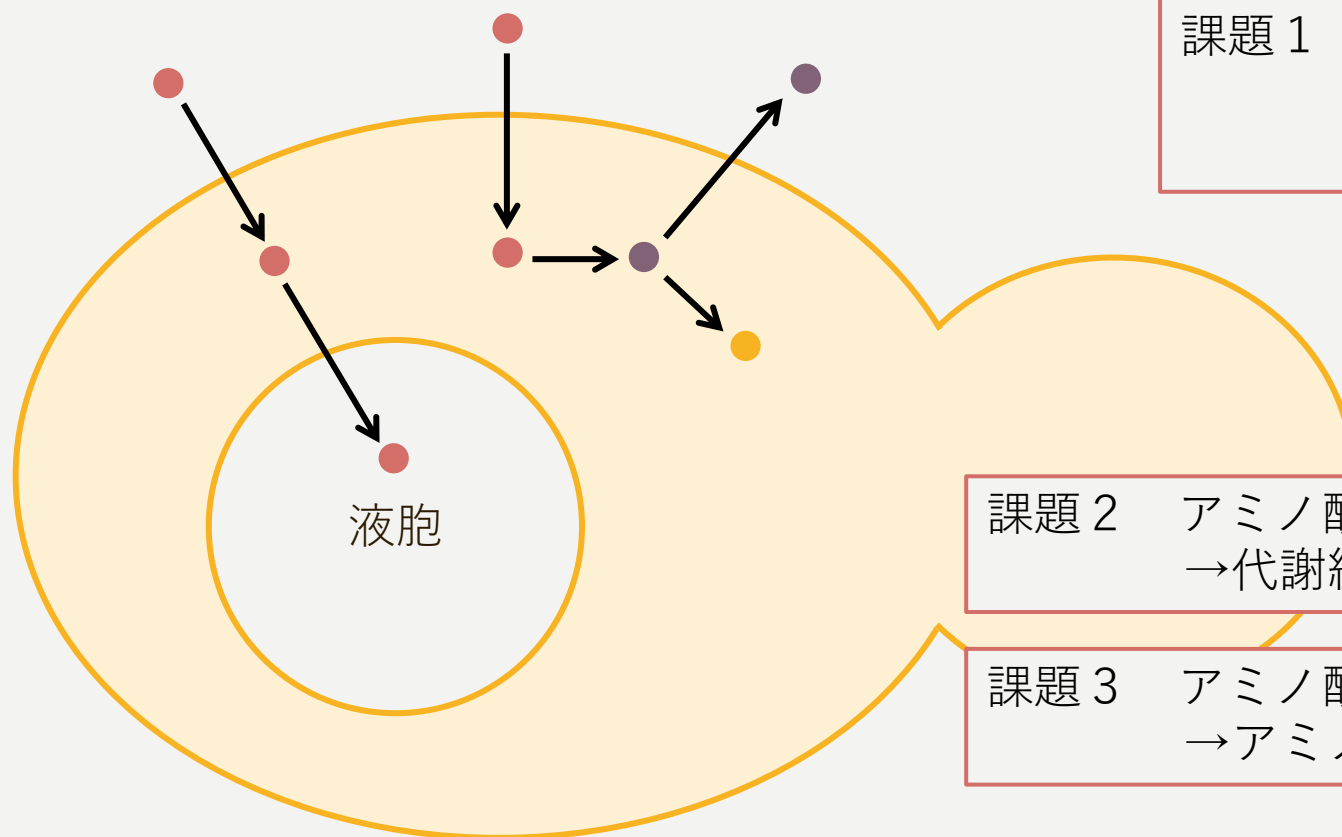
アミノ酸の分解による高級アルコールの生成



フェニルアラニン	→	→	フェネチルアルコール	→	酢酸フェネチル
			バラの香		桃の花の香
ロイシン	→	→	イソアミルアルコール	→	酢酸イソアミル
バリン	→	→	イソブタノール	→	酢酸イソブチル
イソロイシン	→	→	2-メチル-1-ブタノール	→	酢酸2-メチルブチル
					果物の香、吟醸香

アミノ酸取り込み促進による高アミノ酸含有化の課題

狙ったアミノ酸の取り込み促進は可能



課題1 アミノ酸として維持したい
→液胞に貯蔵できるか？
→分解を抑える

課題2 アミノ酸を積極的に他の化合物に変換したい
→代謝経路の改変が必要？

課題3 アミノ酸を積極的に細胞外に排出したい
→アミノ酸排出のメカニズムは？

総括

- 第3コンソーシアムでは清酒・醤油の高付加価値化を目指して、高アミノ酸含有酵母の育種を行っている
- アミノ酸アナログ耐性株を取得することで、各種アミノ酸を高生産する清酒酵母、醤油酵母を作出している
- 選択的なアミノ酸取込みによって、ある種のアミノ酸の高含有やアミノ酸代謝物の高生産の可能性を調査している

謝辞

- 本研究は生研支援センター「「知」の集積と活用による研究開発モデル事業」の支援を受けて行った
- 奈良先端科学技術大学院大学
高木博史 教授
- 東北大学大学院農学研究科
早川俊彦 准教授（植物細胞生化学分野）
藤田翔貴 助教（発酵微生物学寄附講座）
安藝萌（遺伝子情報システム学分野 大学院生）
渡部遼（遺伝子情報システム学分野 大学院生）