

オルニチン高生産清酒酵母の分離

大橋 正孝^{*1)}, 那須野 亮^{*2)}, 磯貝 章太^{*2)}, 高木 博史^{*2)}

Isolation of ornithine accumulating sake yeasts

OHASHI Masataka^{*1)}, NASUNO Ryo^{*2)}, ISOGAI Shota^{*2)}, TAKAGI Hiroshi^{*2)}

プロリンの毒性アナログであるアゼチジン-2-カルボン酸に耐性を示す清酒酵母の変異株の中から、肝機能改善などの機能性を有するアミノ酸であるオルニチンを酵母細胞内に高生産する酵母を分離した。その酵母を用いて清酒小仕込み試験を行うと、清酒及び酒粕中に4倍以上のオルニチンを含有することが分かった。また、そのオルニチン高生産酵母の全ゲノム解析を行い、*N*-アセチルグルタミン酸キナーゼをコードする *ARG5,6* 遺伝子にアミノ酸置換を伴う変異を見出すとともに、その変異によってオルニチンが高生産されることを明らかにした。

1. 緒言

日本の伝統的なアルコール飲料である清酒の醸造には、エタノール生産性の高い清酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* が使用される。清酒酵母は、アルコール飲料に不可欠なエタノールを生産するだけでなく、清酒に吟醸香を与えるカプロン酸エチルや酢酸イソアミルなどの香気成分や、さわやかな酸味を呈するリンゴ酸やコクのある酸味を呈するコハク酸などの有機酸を生産する極めて重要な微生物である。

全国の清酒消費量の推移を見ると、最も消費量が多かった昭和50年には1,675千kLであったのが、令和元年には452千kLと約27%程度にまで減少している¹⁾。これは、清酒の仕込み配合などが旧態依然であり、清酒のほとんどが、既存の醸造協会系酵母を使用して製造され、その個性が失われていることが要因の一つとして考えられる。そこで、清酒消費量の低迷を打破するために、既存の醸造協会系酵母よりもさらにエタノールを高生産するような個性的な清酒酵母に対する強い要望を、奈良県酒造組合から受けた。

高木らは、これまでにタンパク質を構成するアミノ酸であるプロリンの毒性アナログ（アゼチジン-2-カルボン酸：AZC）に耐性を示す実験室酵母の変異株から、細胞内にプロリンを高生産する株を分離している。また、プロリン高生産株を解析し、プロリン合成系の初発酵素 γ -glutamyl kinase (Pro1; GK) (図1) をコードする *PRO1* 遺伝子に Asp154Asn, Ile150Thr などのアミノ酸置換を伴う変異が導入され、これらの変異が導入されるとプロリンによるフィードバック阻害感受性が低下し、プロリンが高生産されることを見出した²⁾。さらに、プロリンによるフィードバック阻害感受性が低下した変異型 GK (Asp154Asn, Ile150Thr) を発現する清酒酵母をセルフクロニング法で作製し、清

酒小仕込み試験を行ったところ、清酒中・細胞内のプロリン含量が顕著に増加し、醸造時間の短縮とエタノール生産性の向上に成功した³⁾。しかし現在、セルフクロニング法で育種した酵母は、食品産業や消費者に受け入れられる状況にない。

そこで、エタノール高生産清酒酵母を分離する目的で、既存の清酒酵母に突然変異処理を行った後、AZCに耐性を示す変異株の中からプロリンを細胞内に高生産する株を分離し、エタノール生産性に及ぼす影響を検討した。その結果、プロリンだけでなく、肝機能改善などの機能性を有するアミノ酸であるオルニチンを細胞内に高生産する株を取得した⁴⁾。

オルニチンは、ミトコンドリア内のアルギニン生合成経路において、グルタミン酸から種々のステップを経て生成する(図1)。アルギニン生合成経路における律速酵素である *N*-acetyl glutamate kinase (NAGK) は、*N*-acetyl glutamate (NAG) をリン酸化する酵素であり、その活性は最終生成物のアルギニンによってフィードバック阻害を受ける。そのため、NAGKによる *N*-acetyl glutamate のリン酸化が抑制され、必要以上にオルニチンは細胞内高生産されない⁵⁾。

本研究では、得られたプロリン及びオルニチンを細胞内に高生産する酵母において、NAGK と *N*-acetyl glutamyl phosphate を還元する *N*-acetyl glutamyl phosphate reductase (NAG5PR) をコードする *ARG5,6* 遺伝子に、アミノ酸置換 (Thr340 が Ile に置換) を伴う新規なホモ変異を見出した⁴⁾。次に、このアミノ酸置換が細胞内オルニチン含量の増加、NAGK 活性のアルギニンによるフィードバック阻害に及ぼす効果を検討した。また、得られた酵母を用いて、清酒小仕込み試験を行い、その酵母で醸造した清酒中のエタノール濃度、清酒及び酒粕中のオルニチン量を分析した。

^{*1)} バイオ・食品グループ, ^{*2)} 国立大学法人 奈良先端大学院大学

2. 実験方法

2.1 菌株及び培地

酵母は実験室酵母 (*S. cerevisiae*) の BY4741 株 (*MATa his3 Δ1 leu2 Δ0 met15 Δ0 ura3 Δ0*), 二倍体清酒酵母 K901 株, BY 4741 *arg5,6 Δ* 株 (BY4741 *arg5,6::kanMX6*) を使用した。

酵母の増殖には, YPD 培地 (10 g/L yeast extract, 20 g/L peptone, 20 g/L glucose), 最少合成培地 (SD) (1.7 g/L yeast nitrogen base without amino acid and ammonium sulfate, 5 g/L ammonium sulfate, 20 g/L glucose), 0.04 % L-leucine, 0.008 % L-histidine, L-methionine 含有 SD 培地 (SD + Leu + His + Met), 合成培地 SC-ura 培地 (0.67 % yeast nitrogen base without amino acids (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA), and 0.2 % drop-out mix lacking uracil) を使用した。Drop-out mix は, 0.002% adenine, 0.0008 % p-aminobenzoic acid, 0.04 % L-leucine, 0.008 % inositol, L-alanine, L-arginine, L-asparagine, L-aspartic acid, L-cysteine hydrochloride, L-glutamine, L-glutamic acid, glycine, L-histidine, L-isoleucine, L-lysine, L-methionine, L-phenylalanine, L-proline, L-serine, L-threonine, L-tryptophan, L-tyrosine, L-valine を含む。プロリン高生産株のスクリーニングには, SD 培地にアゼチジン-2-カルボン酸 (AZC) を 1 mg/mL 添加した培地を使用した。

プラスミドのクローニングやプラスミドの形質転換には, *Escherichia coli* の DH5α 株 (*F-φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 deoR recA1 endA1 hdr17 (r_k, m_k⁺) phoA supE44 λ thi-1 gyrA96 relA1*) を使用した。NAGK の発現及び精製には, *E. coli* の BL21 (DE3) 株 [*F ompT hsdS_B (Γ_{BM}⁻) gal dcm (DE3)*] を使用した。*E. coli* 形質転換体の培養は, 100 μg/mL ampicillin 含有 Luria-Bertani (LB) 培地 (5 g/L yeast extract, 10 g/L tryptone, 10 g/L NaCl) を用いた。必要に応じて, 2 % 寒天を培地に添加して固化させて, 平板培地とした。

2.2 AZC 耐性変異株の分離

二倍体清酒酵母 K901 株を 4 % ethyl methanesulfonate (EMS) 含有 100 mM リン酸緩衝液 (pH7.0) 中で, 30 °C, 1 時間インキュベート後 (変異処理), 10 % チオ硫酸ナトリウム及び滅菌水で洗浄した。変異処理を行った酵母の懸濁液を AZC 1 mg/L 含有 SD 液体培地に塗布し, 30 °C で培養後に生育したコロニーを AZC 耐性変異株として分離した。

2.3 細胞内アミノ酸含量の測定

AZC 耐性変異株を SD 液体培地で 30 °C, 48 時間振とう培養し, 集菌後, 滅菌水で洗浄した。OD₆₀₀ = 10 量の菌体を 500 μL の滅菌水に懸濁後, 99 °C で 20 分間の熱水抽出を行った。遠心分離後の上清を 0.45 μm メンブレンフィルターでろ過し, アミノ酸アナライザー (日本電子製) あるいは UF-Amino Station (島津製作所製) により, 細胞内のアミノ酸含量を測定した。

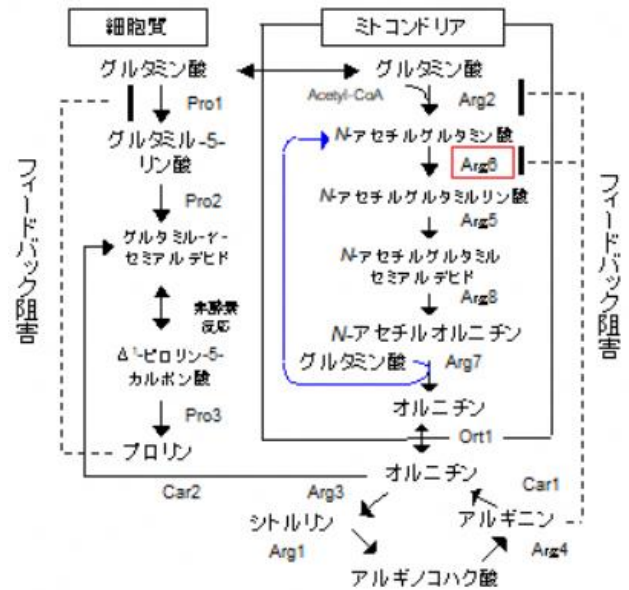


図 1 酵母におけるプロリン・オルニチン生合成経路 (文献⁴⁾より改変転載)

2.4 清酒小仕込み試験

親株及びプロリン高生産変異株を用いて, 総米 46 g の清酒小仕込み試験 (一段仕込み) を行った。α化米 36.4 g に, 乾燥麹米 9.6 g, 90 % 乳酸 50 μL, 酵母含有の水 87 mL を加えて, 15 °C, 28 日間培養した。もろみを遠心分離し, 上清を清酒, 残渣を酒粕とした。清酒を 5 倍希釈し, 0.45 μm メンブレンフィルターでろ過して, アミノ酸分析用サンプルとした。酒粕 5g を採取し, 99 °C で 30 分間の熱水抽出を行い, 15,000 × g で 5 分間遠心分離し, 上清を集めて, イオン交換水で 25 mL に定容後, 0.45 μm メンブレンフィルターでろ過して, アミノ酸分析用サンプルとした。それらのサンプルを用いて, アミノ酸アナライザー (日本電子製) あるいは UF-Amino Station (島津製作所製) により, 清酒及び酒粕中のアミノ酸含量を測定した。

2.5 全ゲノム解析

Qubit (Thermo Fisher Scientific 製) を用いて, AZC 耐性変異株 (A902-4) と親株 (K901) から抽出した DNA を定量した。Nextera DNA Library Preparation Kit (Illumina) を用いて, 次世代シーケンスライブラリーを作製した。MiSeq Reagent Kit v2 or v3 (Illumina) 及び MiSeq (Illumina 製) を用いて, 全ゲノムの DNA 配列情報を取得した。それらの DNA 配列情報について, CLC Genomics Workbench v 10.1.1 (Quiagen) を用いて, トリミングやリファレンス *S. cerevisiae* S288C (GCA_000146045) ゲノムへのマッピングなどのデータ処理を行った。

2.6 ARG5, 6 遺伝子発現プラスミドの構築

野生型 ARG5, 6 遺伝子を発現する pRS416-ARG5, 6^{WT} プラ

スミドを構築するために、BY4741 (*MATa his3 Δ 1 leu2 Δ 0 met15 Δ 0 ura3 Δ 0*) を鋳型として、*ARG5,6* の上流・下流 1,000 bp を含む領域を、KOD plus DNA polymerase を用いて、下記プライマーで増幅した。得られた DNA 断片を、In-fusion HD Cloning Kit を用いて、pRS416 の *HindIII-BamHI* 認識部位に挿入し、*DpnI* 処理後、*E. coli* DH5α 株に導入した。得られた形質転換体からプラスミドを抽出し、pRS416-*ARG5,6*^{WT} を得た。

ARG5,6 Fw (下線：制限酵素 *HindIII* 認識部位)
5'-CGGTATCGATAAGCTTAAGAAACTTATAAAAAGTATCCG-3'
ARG5,6 Rv (下線：制限酵素 *BamHI* 認識部位)

5'-TAGAACTAGTGGATCCTCTTATCGAATTGGACAGGT-3'
次に、変異型 *ARG5,6* (T340I) 遺伝子を発現する pRS416-*ARG5,6*^{T340I} を構築するために、pRS416-*ARG5,6*^{WT} を鋳型として、下記プライマーで、Quikchange Site-Directed Mutagenesis Kit により、変異型 *ARG5,6*^{T340I} 遺伝子を含む DNA 断片を作製し、*DpnI* 処理後、*E. coli* DH5α 株に導入した。得られた形質転換体から、プラスミドを抽出して、pRS416-*ARG5,6*^{T340I} を得た。*ARG5,6* 遺伝子領域の塩基配列は、BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit を用いて、DNA シーケンスで確認した。

ARG5,6 (T340I) q-change Fw (*が変異塩基)

5'-AAGAACTGTTTCAT*TGATTCTGGTGC-3'

ARG5,6 (T340I) q-change Rv (*が変異塩基)

5'-TTCTTGACAAGTA*ACTAAGACCACG-3'

次に、pRS416-*ARG5,6* WT 及び pRS416-*ARG5,6*^{T340I} を酢酸リチウム法で、BY4741 *arg5,6 Δ* (*MATa/MATa TRP1/trp1 ura3/ura3*) 株に導入し、SC-ura 平板培地に植菌後、30°C で 3 日間培養して、形質転換体を得た。

BY4741 *arg5,6 Δ* (pRS416-*ARG5,6*^{WT})

BY4741 *arg5,6 Δ* (pRS416-*ARG5,6*^{T340I})

2.7 NAGK 発現プラスミドの構築

組換え NAGK 発現プラスミドを下記のように構築した。*ARG5,6* 遺伝子は、アミノ末端の NAGK とカルボキシル末端の NAG5PR が連結された前駆体タンパク質をコードする⁶⁾。前駆体タンパク質はミトコンドリア内で 2 種類の酵素に分離した後、アミノ末端のミトコンドリア移行シグナル (MTS) 配列 (1-57 残基) が除去され、成熟型 NAGK に変換される⁷⁾。MTS 配列を欠損した NAGK を作製するために、酵素の 58-513 番目残基をコードする DNA 配列について、pRS416-*ARG5,6*^{WT} あるいは pRS416-*ARG5,6*^{T340I} を鋳型として、下記プライマー及び KOD plus DNA polymerase を用いて、PCR で増幅した。

pQE-2 NdHi Fw (*NdeI*) (下線：*NdeI* 認識部位)

5'-ATCACCATCACCATATGGTTTCATCTACTAACGGCTT-3'
pQE-2 NdHi Rv (*HindIII*) (下線：*HindIII* 認識部位)

5'-TCAGCTAATTAAGCTTTCACTACTTGCTGATGAGT-3'

In-Fusion HD Cloning Kit を用いて、得られた DNA 断片を pQE-2 の *NdeI* - *HindIII* 認識部位に挿入し、*DpnI* 処理後、Zymo 5α 株 (Zymo Research) に導入した。得られた形質転換体からプラスミドを抽出し、pQE-2-NAGK-WT、pQE-2-NAGK-T340I を得た。NAGK 領域の塩基配列は、DNA シーケンスで確認した。得られたプラスミドを BL21 (DE3) [*F-ompT hsdS_B (r_{BM}^B) gal dcm* (DE3)] 株に導入した。

2.8 組換え NAGK の発現

野生型及び変異型 NAGK 発現用プラスミド pQE-2-NAGK-WT、pQE-2-NAGK-T340I を導入した BL21 (DE3) 株の形質転換体をアンピシリン含有 LB 培地にて 37 °C で OD₆₀₀ = 0.6~0.8 まで培養した。培養液を 18 °C まで冷却し、isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) を終濃度 0.1 mM となるように添加し、18°C で 18 時間タンパク質の発現誘導を行った。集菌後、氷で冷却した sonication buffer (10 mM MgCl₂, 5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5)) で洗浄後、すぐに使用しない場合、-80 °C で保存した。

2.9 組換え NAGK の精製

BL21 (DE3) 株の形質転換体を冷却した sonication buffer で懸濁させ、超音波破砕機 (Ultrasonic generator US-150T, 日本精機製) を用いて、細胞を破砕した。破砕液を 15,000 rpm で 20 分間遠心した後、上清を 0.45 μm メンブレンフィルターでろ過し、粗酵素液とした。粗酵素液を sonication buffer で平衡化した Ni-affinity カラム (Ni Sepharose 6 Fast Flow resin) に負荷して、His-tag 付き NAGK を吸着させ、20 mM あるいは 70 mM imidazole を含む sonication buffer により、夾雑タンパク質を洗い流した後、500 mM imidazole を含む sonication buffer で、His-tag 付き NAGK を溶出させた。NAGK 精製タンパク質の純度は、SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS - PAGE) で分離後、Coomassie Brilliant Blue (CBB) 染色により、純度を評価した。NAGK 精製タンパク質の濃度は、Bio-Rad Protein Assay で定量した。

2.9 組換え NAGK の活性測定

NAGK 活性は、phosphoenol pyruvate (PEP) 及び pyruvate kinase (PK) 存在下で、NAG のリン酸化で生成される ADP を、lactate dehydrogenase (LDH) 依存的にピルビン酸が乳酸に還元される際に消費する nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) の減少量として、Synergy HTX microplate reader (Bio-Tek Instruments 製) で 340 nm をモニターすることにより測定した。NAGK 反応は、終濃度が ATP 5 mM, PEP 1 mM, HEPES (pH 7.5) 100 mM, MgCl₂ 10 mM, NADH 0.25 mM, arginine 0, 0.2, 0.4, 0.6, 1 mM となる溶液をマイクロプレートに加えた後、PK / LDH (20 U / 30U), 5 μg NAGK を添加し、30 °C で予備加温した後、NAG (終濃度 25 mM) を添加して、30 °C で 10 分間行った。NAGK 比活性 (U/mg) は反応の初

速度を NADH の減衰係数 ($\epsilon_{340\text{nm}} = 6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) から求めて算出した。

3. 結果及び考察

3.1 プロリン及びオルニチン高生産酵母の分離

エタノール高生産清酒酵母を分離する目的で, K901 を親株として EMS 処理後, AZC 含有 SD 培地に塗布し, 約 20 個の AZC 耐性変異株を取得した. 各変異株の細胞内アミノ酸量を定量したところ, 親株よりもプロリン含量が多い変異株を 3 つ取得した (A901-8: 9.7 倍, A902-4: 10.4 倍, A902-6: 6.4 倍). 興味深いことに, A902-4 と A902-6 には, 親株よりも, プロリンだけでなく, オルニチンもそれぞれ, 13.3 倍, 7.3 倍多く細胞内に含まれていた (図 2) .

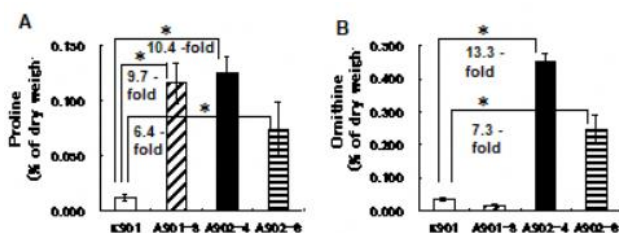


図 2 AZC 耐性変異株中の細胞内プロリン量 (A) とオルニチン量 (B) (文献⁴⁾より改変転載)

3.2 プロリン及びオルニチン高生産酵母の全ゲノム DNA 解析

プロリン及びオルニチン高生産に関与する遺伝子変異を探索するために, A901-8 (プロリン高生産酵母), A902-4 (プロリン及びオルニチン高生産酵母), K901 (親株) の全ゲノム解析を行った. その結果, 親株と比較して, A901-8 と A902-4 には open reading frame 内にアミノ酸置換を伴う変異を有する遺伝子がそれぞれ 256, 248 個存在していた. それらの遺伝子の中に, プロリン及びオルニチン生合成に関与する遺伝子 (*PRO1*, *PRO2*, *PRO3*, *ARG1*, *ARG2*, *ARG3*, *ARG4*, *ARG5,6*, *ARG7*, *ARG8*, *ORT1*, *CAR1*, *CAR2*) が含まれているかどうかを検索した. その結果, A901-8 では, GK をコードする *PRO1* 遺伝子に, Pro247 が Ser に置換されるホモ変異 (*PRO1*^{P247S}) が見られた. GK はグルタミン酸からプロリンを合成する生合成経路の重要な初発酵素であり, その活性は最終生成物であるプロリンによってフィードバック阻害を受ける⁸⁾. しかし, 高木らは, Ile150Thr⁹⁾や Pro247Ser⁹⁾といった変異型 GK がプロリンによるフィードバック阻害非感受性になることを報告している. 今回得られたプロリン高生産変異株 A901-8 では, GK をコードする *PRO1* 遺伝子に, Pro247 が Ser に置換されるホモ変異 (*PRO1*^{P247S}) が見られた. 従って, GK のアミノ酸置換 (Pro247Ser) により, フィードバック阻害が解除され, A901-8 でプロリンが高生産されることが強く示唆された.

一方, A902-4 では, NAGK をコードする *ARG5,6* 遺伝子に,

Thr340 が Ile に置換されるホモ変異 (*ARG5,6*^{T340I}) が見られた. また, A901-8 には, *ARG5,6* 遺伝子にオルニチン高生産に寄与する変異がなく, A902-4 には, *PRO1* 遺伝子にプロリン高生産に寄与する変異はなかった.

3.3 *ARG5,6* 変異が細胞内アミノ酸量に及ぼす影響

A902-4 で見出した *ARG5,6* 遺伝子の変異がオルニチン高生産に及ぼす影響を調べるために, 野生型 *ARG5,6*^{WT} 遺伝子と変異型 *ARG5,6*^{T340I} 遺伝子の発現プラスミドを構築した. BY4741 *arg5,6* Δ pRS416-*ARG5,6*^{WT} 株と BY4741 *arg5,6* Δ pRS416-*ARG5,6*^{T340I} 株を SD+Leu+His+Met 培地で培養し, 細胞内アミノ酸含量を測定した. その結果, 図 3 に示すように変異型の遺伝子導入株では, 野生型に比べてプロリンが 4.1 倍, オルニチンが 7.4 倍それぞれ増加していた.

変異型遺伝子導入株では, ゲノム由来の *ARG5,6* 遺伝子は破壊されているため, プラスミド由来の *ARG5,6*^{T340I} が発現し, プロリン及びオルニチンが細胞内で高生産されていることが示唆された.

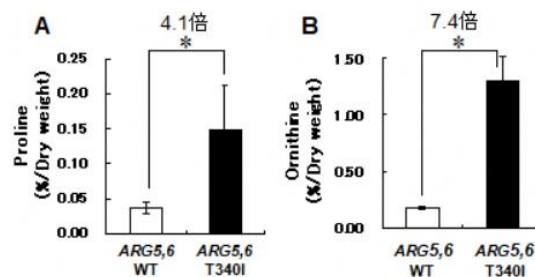


図 3 野生型及び変異型 *ARG5,6* 発現酵母中の細胞内プロリン量 (A) とオルニチン量 (B) (文献⁴⁾より改変転載)

3.4 NAGK のアミノ酸置換が NAGK 活性に与える影響

ARG5,6 遺伝子にコードされた前駆体タンパク質は, アミノ酸残基 510 番目から 540 番目の間で NAGK と NAG5PR に分離されるため⁶⁾, 今回の Thr340 のアミノ酸置換は, NAGK の活性に影響を与える可能性がある. NAGK 活性は, アルギニンによってフィードバック阻害を受ける⁵⁾. 従って, Thr340 のアミノ酸置換により NAGK のアルギニン結合部位が構造変化を起こすことでアルギニンによるフィードバック阻害が解除され, オルニチンが高生産される可能性を考えた. そこで, 精製した野生型及び変異型 NAGK を用いて, アルギニン存在下での NAGK 活性を測定した. その結果, 図 4 に示すように, アルギニンを添加しない場合, 変異型 NAGK-T340I の活性 ($1.57 \pm 0.10 \text{ U/mg}$) は, 野生型 ($1.73 \pm 0.06 \text{ U/mg}$) より若干低下したが, 野生型 NAGK の活性は, アルギニンを 0.2 mM 添加すると急激に低下し, 1 mM を添加すると, ほぼ消失するのに対して, 変異型 NAGK-T340I では, ほとんど活性が低下しなかった.

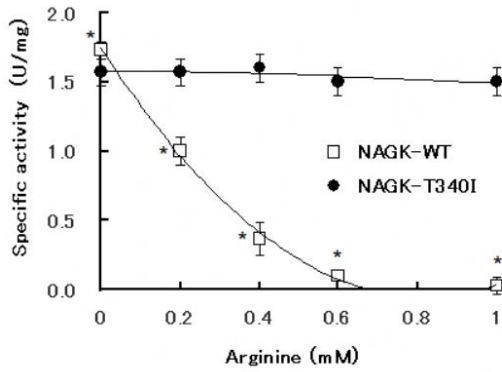


図4 アルギニンがNAGK活性へ与える影響
(文献⁴⁾より改変転載)

NAGK活性は、*S. cerevisiae*⁵⁾だけでなく、*Pseudomonas aeruginosa*¹⁰⁾、*Thermotoga maritima*¹¹⁾、*Corynebacterium glutamicum*¹²⁾、*Synechococcus elongatus*¹³⁾など、多くの微生物において、アルギニンによるフィードバック阻害を受ける。しかし、*E. coli*¹⁴⁾や*Thermus thermophilus*¹⁵⁾は、アルギニンによるフィードバック阻害を受けない。また、*S. cerevisiae*の変異型NAGK (Phe99Leu)⁵⁾もアルギニンによるフィードバック阻害に非感受性であるが、変異型NAGK-F99Lの活性は、野生型酵素の活性の半分程度しかなく、しかもアルギニン10 mM存在下では、さらに50%まで活性が減少する。それに対して、変異型NAGK-T340Iは、野生型より若干活性が低下しているものの、アルギニンによるフィードバック阻害非感受性を示した。これまでに、*S. cerevisiae*由来NAGKの三次元構造が決定されており(図5)¹⁶⁾、Lys265、Ser285、Lys336、Glu337、Thr340、Gly345がアルギニンと相互作用している。Thr340は、その主鎖のカルボキシル基とアルギニンのアミノ基の水素結合を介して結合している。一方、Thr340は、Lys336のカルボキシル基とThr340の側鎖の水酸基の水素結合により相互作用している。この340番目残基は、アルギニンによるフィードバック阻害に感受性を示す微生物のNAGKにおいて、ThrあるいはSerとして、高度に保存されているため⁴⁾、340番目残基の水酸基がアルギニンとの結合に極めて重要であると考えられる。NAGK-T340Ileでは、Thr340Ileの置換によって、Lys336との相互作用が失われるために、アルギニンによるフィードバック非感受性になったと考えられる。

オルニチンは、2種類の異なる生合成経路で合成される。一つは、*E. coli*¹⁴⁾や*Sulfolobus solfataricus*¹⁷⁾といった細菌やアーキアのようにN-アセチルオルニチンからの加水分解によって合成される経路(linear pathway)であり、もう一つは、*Streptomyces coelicolor*¹⁸⁾、*Bacillus stearothermophilus*¹²⁾、*Candida utilis*¹⁹⁾、*Neurospora crassa*²⁰⁾、*S. cerevisiae*⁵⁾のようにN-acetylglutamateからglutamateにアセチル基が転移してオルニチンが合成されると同時にN-acetylglutamateが再生される経路(cyclic pathway)である。N-acetylglutamate

synthase (NAGS)は、ARG2遺伝子にコードされ、グルタミン酸からN-acetyl glutamateを合成する酵素であるが、*S. cerevisiae*では、そのNAGSもまたアルギニンによって、フィードバック阻害を受ける⁴⁾。従って、プロリン及びオルニチンを高生産するA902-4のNAGSも、アルギニンによってフィードバック阻害を受けると考えられるが、A902-4では、NAGKがフィードバック阻害非感受性であり、cyclic pathwayにより、N-acetylglutamateからglutamateにアセチル基が転移してオルニチンが合成されると同時にN-acetylglutamateが再生されるため、NAGSがフィードバック阻害を受けても、それ以降の反応が進行するため、オルニチンが高生産されると考えられる。また、A902-4のPRO1遺伝子には、プロリン高生産に寄与する変異が見られなかったため、PRO1遺伝子もプロリンによるフィードバック阻害を受けると考えられる。しかし、*S. cerevisiae*は、ornithine transaminaseによって、オルニチンからプロリンを合成できるため²¹⁾、A902-4は過剰に生産されたオルニチンからプロリンを高生産する可能性が考えられる。

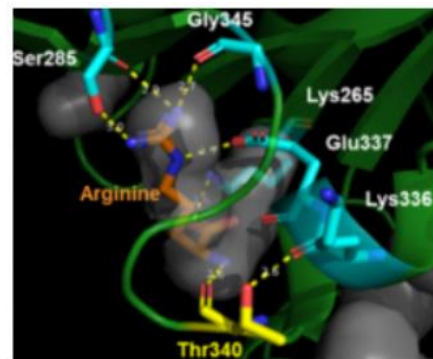


図5 *S. cerevisiae* NAGKのアルギニン結合部位
(文献⁴⁾より改変転載)

3.5 プロリン及びオルニチン高生産変異株を用いた清酒小仕込み試験

プロリン及びオルニチン高生産変異株A902-4と親株K901を用いて、総米46gの清酒小仕込み試験を行った。A902-4で醸造した清酒のエタノール濃度は $20.4 \pm 0.6\%$ であり、K901($19.5 \pm 0.1\%$)と比較して若干増加した。A902-4で醸造した清酒及び酒粕中のオルニチン量は、K901よりもそれぞれ5.0、4.2倍増加していた(図6)。

オルニチンは尿素回路で機能するアミノ酸で、尿素回路はアミノ酸の分解で生じるアンモニアを尿素に解毒する。オルニチンは、キノコ²²⁾、しじみ²³⁾、チーズ²⁴⁾などの食品に多く含まれていて、アルコール摂取後の疲労低減²⁵⁾、睡眠改善²⁶⁾、成長ホルモンの増加²⁷⁾などの機能性を有することが知られている。

これまでに*C. glutamicum*²⁸⁾、*S. cerevisiae*²⁹⁾といった微生物の遺伝子組換え株を用いて、オルニチンの過剰生産が報告されているが、遺伝子組換え微生物を用いた食品の製造

は極めて困難な状況である。ところが、今回取得したオルニチン高生産株は、食品産業に使用されている *S. cerevisiae* から従来の変異処理で取得されたものであり、遺伝子組換え微生物ではない。そのため、清酒、パン、ビール、ワインなど様々な発酵食品製造への応用が期待できる。

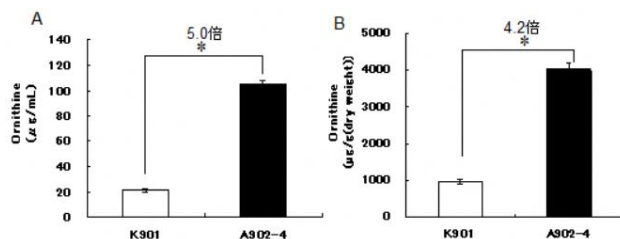


図6 清酒(A)及び酒粕(B)中のオルニチン量
(文献⁴⁾より改変転載)

4. 結言

エタノール生産能が向上した清酒酵母を分離するために、清酒酵母を突然変異原処理し、AZC耐性変異株を分離した。その変異株の中から、プロリンだけでなくオルニチンを細胞内に高生産する変異株 A902 を分離した。A902-4 の全ゲノム解析を行い、NAGK をコードする ARG6 遺伝子にアミノ酸残基置換 (Thr340Ile) を伴う新規な変異を見出した。この変異によって、NAGK 活性のアルギニンによるフィードバック阻害が解除され、オルニチンが高生産されることを明らかにした。これは、産業酵母で初めての事例である。また、A902-4 を用いて、清酒小仕込み試験を行ったところ、エタノール生産能が若干向上し、清酒及び酒粕中のオルニチン量が顕著に増加した。

謝辞

本研究の遂行にあたり、塚原正俊博士、阿部峻之博士 (株式会社バイオジェット)、橋田恵介氏 (木下酒造有限会社)、渡邊大輔准教授 (京都大学) から、様々な技術的な支援や助言をいただいたことに感謝いたします。

参考文献

- 1) 酒のしおり, 国税庁
<https://www.nta.go.jp/taxes/sake/shiori-gaikyo/shiori/2021/pdf/040.pdf>.
- 2) Takagi, H., Iwamoto, F., Nakamori, S., "Isolation of freeze-tolerant laboratory strain of *Saccharomyces cerevisiae* from proline-analogue-resistant mutants", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 47, 405–411, 1997
- 3) Takagi, H., Matsui, F., Kawaguchi, A., Wu, H., Shimoi, H.,

Kubo, Y., "Construction and analysis of self-cloning sake yeasts that accumulate proline", *J. Biosci. Bioeng.*, 103, 377–380, 2007

<https://doi.org/10.1263/jbb.103.377>

- 4) Ohashi, M., Nasuno R., Isogai S., Takagi H., "High-level production of ornithine by expression of the feedback inhibition-insensitive *N*-acetyl glutamate kinase in the sake yeast *Saccharomyces cerevisiae*", *Metab. Eng.*, 62, 1-9, 2020
- 5) Pauwels, K., Abadjieva, A., Hilven, P., Stankiewicz, A., Crabeel, M., "The *N*-acetylglutamate synthase/*N*-acetylglutamate kinase metabolon of *Saccharomyces cerevisiae* allows coordinated feedback regulation of the first two steps in arginine biosynthesis", *Eur. J. Biochem.*, 270, 1014–1024, 2003
<https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03477.x>
- 6) Boonchird, C., Messenguy, F., Dubois, E., "Determination of amino acid sequences involved in the processing of the ARG5/ARG6 precursor in *Saccharomyces cerevisiae*", *Eur. J. Biochem.*, 199, 325–335, 1991
<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1991.tb16128.x>
- 7) Abadjieva, A., Pauwels, K., Hilven, P., Crabeel, M., "A new yeast metabolon involving at least the two first enzymes of arginine biosynthesis: acetylglutamate synthase activity requires complex formation with acetylglutamate kinase", *J. Biol. Chem.*, 276, 42869–42880, 2001
<https://doi.org/10.1074/jbc.M103732200>
- 8) Sekine, T., Kawaguchi, A., Hamano, Y., Takagi, H., "Desensitization of feedback inhibition of the *Saccharomyces cerevisiae* γ -glutamyl kinase enhances proline accumulation and freezing tolerance", *Appl. Environ. Microbiol.*, 73, 4011–4019, 2007
<https://doi.org/10.1128/AEM.00730-07>
- 9) Tzolmonbaatar, A., Hashida, K., Sugimoto, Y., Watanabe, D., Furukawa, S., Takagi, H., "Isolation of baker's yeast mutants with proline accumulation that showed enhanced tolerance to baking-associated stresses", *Int. J. Food Microbiol.*, 238, 233–240, 2016
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.09.015>
- 10) Fernandez-Murga, M.L., Rubio, V., "Basis of arginine sensitivity of microbial *N*-acetyl-L-glutamate kinases: mutagenesis and protein engineering study with the *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* enzymes", *J. Bacteriol.*, 190, 3018–3025, 2008
<https://doi.org/10.1128/JB.01831-07>
- 11) Ramón-Maiques, S., Fernández-Murga, M.L., Gil-Ortiz, F., Vagin, A., Fita, I., Rubio, V., "Structural bases of feed-back control of arginine biosynthesis, revealed by the structures of

- two hexameric *N*-acetylglutamate kinases, from *Thermotoga maritima* and *Pseudomonas aeruginosa*", *J. Mol. Biol.*, 356, 695–713, 2006
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.11.079>
- 12) Sakanyan, V., Petrosyan, P., Lecocq, M., Boyen, A., Legrain, C., Demarez, M., Hallet, J.N., Glansdorff, N., "Genes and enzymes of the acetyl cycle of arginine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*: enzyme evolution in the early steps of the arginine pathway", *Microbiology*, 142 (Pt 1), 99–108, 1996
<https://doi.org/10.1099/13500872-142-1-99>
- 13) Maheswaran, M., Urbanke, C., Forchhammer, K., "Complex formation and catalytic activation by the PII signaling protein of *N*-acetyl-L-glutamate kinase from *Synechococcus elongatus* strain PCC 7942", *J. Biol. Chem.*, 279, 55202–55210, 2004
<https://doi.org/10.1074/jbc.M410971200>
- 14) Cunin, R., Glansdorff, N., Piérard, A., Stalon, V., "Biosynthesis and metabolism of arginine in bacteria", *Microbiol. Rev.*, 50, 314–352, 1986
- 15) Sundaresan, R., Rangunathan, P., Kuramitsu, S., Yokoyama, S., Kumarevel, T., Ponnuraj, K., "The structure of putative *N*-acetyl glutamate kinase from *Thermus thermophilus* reveals an intermediate active site conformation of the enzyme", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 420, 692–697, 2012
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.03.072>
- 16) de Cima, S., Gil-Ortiz, F., Crabeel, M., Fita, I., Rubio, V., "Insight on an arginine synthesis metabolon from the tetrameric structure of yeast acetylglutamate kinase", *PLoS ONE* 7, e34734, 2012
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034734>
- 17) Van de Castele, M., Demarez, M., Legrain, C., Glansdorff, N., Piérard, A., "Pathways of arginine biosynthesis in extreme thermophilic archaeo- and eubacteria", *J. Gen. Microbiol.*, 136, 1177–1183, 1990
<https://doi.org/10.1099/00221287-136-7-1177>
- 18) Hindle, Z., Callis, R., Dowden, S., Rudd, B.A., Baumberg, S., "Cloning and expression in *Escherichia coli* of a *Streptomyces coelicolor* A3(2) *argCJB* gene cluster", *Microbiology*, 140 (Pt 2), 311–320, 1994
<https://doi.org/10.1099/13500872-140-2-311>
- 19) Middelhoven, W.J., "The ornithine pathway in the yeast *Candida utilis*", *Biochim. Biophys. Acta*, 77, 152–154, 1963
[https://doi.org/10.1016/0006-3002\(63\)90482-7](https://doi.org/10.1016/0006-3002(63)90482-7)
- 20) Davis, R.H., "Compartmental and regulatory mechanisms in the arginine pathways of *Neurospora crassa* and *Saccharomyces cerevisiae*", *Microbiol. Rev.*, 50, 280–313, 1986
- 21) Kaino, T., Tasaka, Y., Tatehashi, Y., Takagi, H., "Functional analysis of the Cterminal region of γ -glutamyl kinase of *Saccharomyces cerevisiae*", *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 76, 454–461, 2012
<https://doi.org/10.1271/bbb.110682>
- 22) Manzi, P., Gambelli, L., Marconi, S., Vivanti, V., Pizzoferrato, L., "Nutrients in edible mushrooms: an inter-species comparative study", *Food Chem.*, 65, 477–482, 1999
[https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00212-X](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00212-X)
- 23) Uchisawa, H., Sato, A., Ichita, J., Matsue, H., Ono, T., "Influence of low-temperature processing of the brackish-water bivalve, *Corbicula japonica*, on the ornithine content of its extract", *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 68, 1228–1234, 2004, <https://doi.org/10.1271/bbb.68.1228>
- 24) Niro, S., Succi, M., Tremonte, P., Sorrentino, E., Coppola, R., Panfili, G., Fratianni, A., "Evolution of free amino acids during ripening of Caciocavallo cheeses made with different milks", *J. Dairy Sci.*, 100, 9521–9531, 2017
<https://doi.org/10.3168/jds.2017-13308>
- 25) Kokubo, T., Ikeshima, E., Kirisako, T., Miura, Y., Horiuchi, M., Tsuda, A., "A randomized, double-masked, placebo-controlled crossover trial on the effects of L-ornithine on salivary cortisol and feelings of fatigue of flushers the morning after alcohol consumption", *Biopsychosoc. Med.*, 7, 6, 2013
<https://doi.org/10.1186/1751-0759-7-6>
- 26) Miyake, M., Kirisako, T., Kokubo, T., Miura, Y., Morishita, K., Okamura, H., Tsuda, A., "Randomised controlled trial of the effects of L-ornithine on stress markers and sleep quality in healthy workers", *Nutr. J.*, 13, 53, 2014
<https://doi.org/10.1186/1475-2891-13-53>
- 27) Demura, S., Yamada, T., Yamaji, S., Komatsu, M., Morishita, K., "The effect of L-ornithine hydrochloride ingestion on human growth hormone secretion after strength training", *Adv. Biosci. Biotechnol.*, 1, 7-11, 2010
- 28) Kim, S.Y., Lee, J., Lee, S.Y., "Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for the production of L-ornithine", *Biotechnol. Bioeng.*, 112, 416–421, 2015
<https://doi.org/10.1002/bit.25440>
- 29) Qin, J., Zhou, Y.J., Krivoruchko, A., Huang, M., Liu, L., Khoomrung, S., Siewers, V., Jiang, B., Nielsen, J., "Modular pathway rewiring of *Saccharomyces cerevisiae* enables high-level production of L-ornithine", *Nat. Commun.*, 6, 8224, 2015
<https://doi.org/10.1038/ncomms9224>