

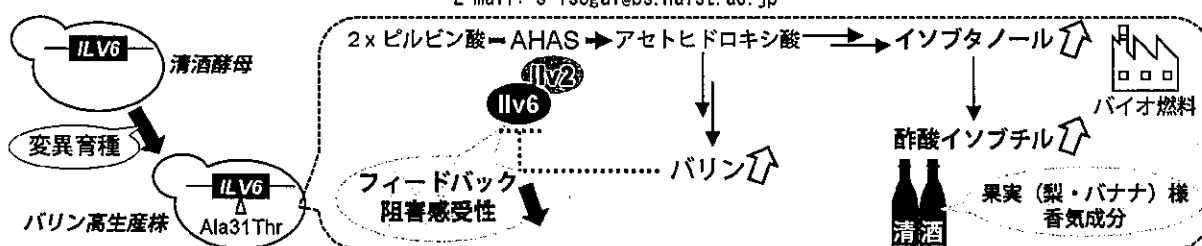
# アセトヒドロキシ酸シンターゼ制御サブユニットの Ala31Thr 置換による清酒酵母のバリンおよびイソブタノール生産性の向上

磯貝 章太<sup>1\*</sup>、西村 明<sup>1</sup>、村上 直之<sup>2</sup>、堀田 夏紀<sup>2</sup>、

小高 敦史<sup>2</sup>、豊川 洋一<sup>1</sup>、石田 博樹<sup>2</sup>、高木 博史<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 奈良先端科学技術大学院大学・研究推進機構、<sup>2</sup> 月桂冠株式会社・総合研究所  
〒630-0192 奈良県生駒市高山町 8916-5 奈良先端科学技術大学院大学 研究推進機構 発酵科学研究室  
Tel: 0743-72-6230

E-mail: s-isogai@bs.naist.ac.jp



バリンの代謝によって生成するイソブタノール・酢酸イソブチルは、酒類や食品の香気性に寄与する。そこで本研究では、付加価値の高い清酒の醸造を目的に、実用清酒酵母株からバリンを高生産する変異株 (K7-V7) を育種した。本株を解析した結果、バリン生合成の律速酵素であるアセトヒドロキシ酸シンターゼ (AHAS) の制御サブユニット Ilv6 に導入された Ala31Thr のアミノ酸置換により、AHAS に対するバリンによるフィードバック阻害が部分的に解除され、バリンおよびバリン由来の香気成分の生産性が向上したことを明らかにした。得られた知見は酵母によるバリンやその代謝産物の高生産に向けた AHAS の改変に応用できると考えられる。さらに、K7-V7 株を用いた清酒の小仕込み試験により、従来の清酒とは異なる香味性を有する清酒が醸造できる可能性が示された。

## 1. はじめに

清酒に対する世界的な関心の高まりに伴い、様々な呈味性・香味性を有する清酒の需要が増加している。清酒の醸造過程において、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、分岐鎖アミノ酸の一種であるバリンから、果実様 (梨・バナナ) の香りを示すイソブタノールおよび酢酸イソブチルを生成する<sup>[1]</sup>。これらの香気成分は、清酒を含む様々なアルコール飲料の呈味性・香味性に大きく寄与することが知られている<sup>[2],[3]</sup>。そのため、バリンを高生産する酵母を用いて清酒を醸造し、清酒中のバリンに由来する香気成分を増加させることができれば、高付加価値化に繋がることが期待できる。しかしながら、酵母のバリン生合成では、初発反応を触媒するアセトヒドロキシ酸シンターゼ (AHAS) の酵素活性が最終産物であるバリンによるフィードバック阻害を受けることで生合成量が調節されるため、細胞内にはバリンが過剰に蓄積しない (図 1A)<sup>[4]</sup>。そ

こで本研究では、実用清酒酵母株を親株にバリンを高生産する株を育種するとともに、育種株のバリン高生産機構について解析した<sup>[5]</sup>。

## 2. 結果と考察

(1) バリン高生産株の育種と高生産に寄与する遺伝子変異の同定

きょうかい7号系の実用清酒酵母株に突然変異処理を施し、細胞内バリン含量が親株の1.7倍に増加した変異株 (K7-V7 株) を取得した (図 1B)。本株の変異点を解析したところ、バリン生合成の律速酵素である AHAS の制御サブユニットをコードする *ILV6* 遺伝子に Ala31Thr (A31T) のアミノ酸置換を伴う新規変異を同定した。31 番目のアラニン残基は真菌類の AHAS の制御サブユニットに保存された N 末端領域に位置している。

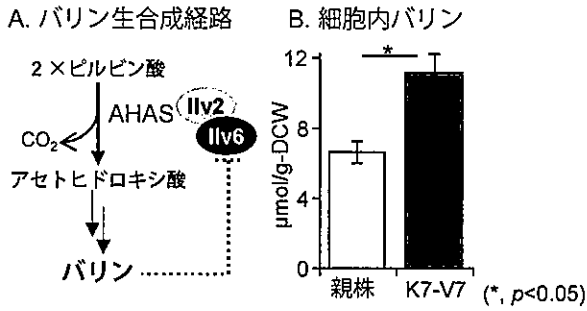


図1. 酵母のバリン生合成経路 (A) および育種株の細胞内バリン含量 (B)

(A) AHASは触媒サブユニット Ilv2 および制御サブユニット Ilv6 で構成される。Ilv6 にバリンが作用することで活性が制御される。(B) DCW: 乾燥菌体重量

(2) A31T のアミノ酸置換が AHAS 活性に与える影響

野生型 Ilv2、野生型および A31T 変異型 Ilv6 (Ilv6\_WT および Ilv6\_A31T) の各組換え酵素を調製し、バリンによるフィードバック阻害に与える影響を解析した。その結果、野生型 Ilv6 を用いた場合は、0.025 mM のバリン存在下で活性が 29% に低下したのに対し、A31T 変異型 Ilv6 では、57% の活性が残存していた (図 2)。

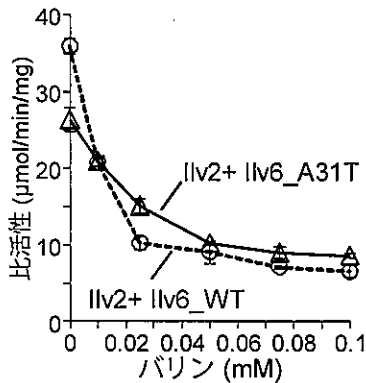


図2. A31T のアミノ酸置換がバリンによるフィードバック阻害感受性に与える影響

(3) A31T 変異型 Ilv6 の発現がバリンやその代謝産物の生産性に与える影響

次に、野生型および A31T 変異型の Ilv6 を実験室酵母で発現させバリン生産性に与える影響を解析した。その結果、A31T 変異型 Ilv6 発現株 (A31T) では、野生型 Ilv6 発現株 (WT) と比較して、細胞内バリンが 2 倍、細胞外イソブタノールが 2.2 倍に増加した (図 3)。

以上の解析から、A31T のアミノ酸置換に伴って、バリンによるフィードバック阻害が部分的に解除され、バリンおよびバリン由来香気成分の生産性が向上したことを明らかにした。また、真菌類の AHAS の制御サブユニットに保存された N 末端領域がバリンによる活性制御に関わることを初めて見出した。

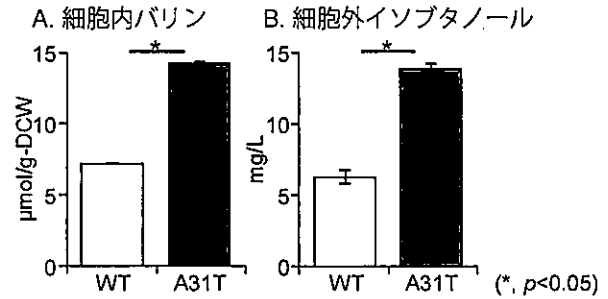


図3. Ala31Thr のアミノ酸置換がバリン (A) およびイソブタノール (B) 生産性に与える影響

(4) 清酒小仕込み試験

最後に、K7-V7 株を用いて清酒の小仕込み試験を行ったところ、親株と比較して、清酒中のイソブタノールや酢酸イソブチル含量が 1.5 倍に増加した (図 4)。

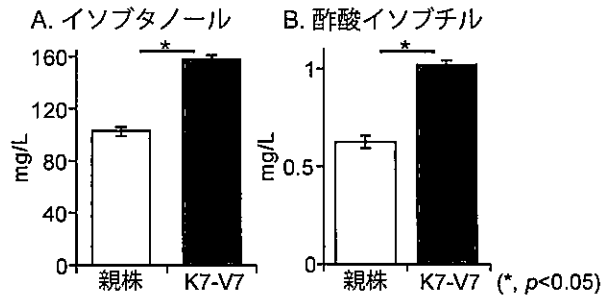


図4. 清酒中のバリン由来香気成分含量

3. 今後の展望

本研究で得られた知見は酵母によるバリンやその代謝産物の高生産に向けた AHAS の改変に応用できると考えられる。さらに、清酒小仕込み試験の結果から、本株を用いることで特徴的な香味性を有する清酒が醸造できる可能性が示された。

謝 辞

本研究は、農研機構生研支援センター「イノベーション創出強化研究推進事業」の支援を受けて実施した。

文 献

[1] Hazelwood LA *et al.*: *Appl Environ Microbiol* 74, 2259-66 (2008)  
 [2] Lilly *et al.*: *FEMS Yeast Res*, 6, 726-43 (2006)  
 [3] Pires E *et al.*: *Appl Microbiol Biotechnol*, 98, 1937-49 (2014)  
 [4] Pang SS *et al.*: *Biochem J*, 357, 749-57 (2001)  
 [5] Isogai S *et al.*: *FEMS Yeast Res*, 23, foad012 (2023)