PUT1 遺伝子導入酵母株による甲州ブドウ果醪の プロリン資化

三木健夫^{1*}・添川一寛²・矢崎七瀬¹・石神裕康¹・猪狩信次²・林 幹夫²

(¹山梨大学ワイン科学研究センター・²(株)林農園)

平成 22 年 3 月 11 日受理

L-proline assimilation of *PUT1* gene transformed yeast in Koshu grape must.

Takeo MIKI^{1*}, Kazuhiro SOEKAWA², Nanase YAZAKI¹, Hiroyasu ISHIGAMI¹, Shinji IKARI², Mikio HAYASHI²

(¹Institute of Enology and Viticulture, University of Yamanashi, 13-1, Kitashin 1-chome, Kofu, Yamanashi, 400-0005

²Hyashi Winery Co, Ltd., 1298 Kikyogahara, Souga, Shiojiri, Nagano, 399-6461)

Japanese Koshu grape must contains several major amino acids, including L-arginine, L-glutamine, and L-proline. Among these three amino acids, the concentration of L-proline is as high as a constant $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ in Koshu grape must. Most amino acids, but not L-proline, in the must rapidly decrease at the beginning of wine fermentation. Consequently, L-proline is the major amino acid remaining in Koshu white wine after fermentation. In other words, these phenomena indicate that wine yeast does not assimilate L-proline easily. In this study we aimed to produce Koshu grape wine having a low L-proline level, using a yeast strain with enhanced L-proline assimilation. L-Proline is initially metabolized by L-proline oxidase to Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate. We transformed *PUT1* gene encoded L-proline oxidase to *Saccharomyces cerevisiae* DBY746 to accelerate the assimilation of L-proline. As a result of a measurement of L-proline assimilation of *PUT1* gene transformant in Koshu grape must, the *PUT1* gene transformant showed low L-proline assimilation, as did the control yeast strain.

Key words : *PUT1* 遺伝子, アミノ酸, プロリン, 甲州ブドウ果醪

緒 言

ブドウ果醪は、主な窒素化合物としてアミノ酸、ポリペプチド、タンパク質およびアンモニウムイオンを含む¹⁾。これらの窒素化合物の多くは発酵過程でワイン酵母により資化される^{2,3)}。甲州ブドウは、古来より山梨県で栽培される白ブドウ品種であり、本ブドウから醸造される甲州ワインは地域の特産品の一つとされている。本ワインに関しては、酒質向上のための新しい醸造法の構築や一般成分の年次別調査等の研究がなされている^{4,5,6,7)}。これらの研究結果から、甲州ワ

インは他の白ワインに比べて多量のプロリン（約 0.5 g/L ）を含む事が明らかになった。

甲州ブドウ果醪に含まれる多くのアミノ酸は酵母によって資化されるものの、プロリンは殆ど資化されずに多くが残存する。また、プロリンが多く残存するワインでは、苦味や呈味に影響が現れる事が報告されており⁸⁾、プロリンを低減できる醸造法の開発が求められている。

プロリンはアミノ酸の一種であり、タンパク質合成およびワイン発酵中に生成される芳香成分の前駆体としても利用される⁹⁾。また、プロリンは、酵母細胞内

へ輸送された後、プロリンオキシダーゼおよびピロリン-5-デヒドロゲナーゼを経てグルタミン酸へ代謝される。本代謝経路における律速酵素はプロリンオキシダーゼ (EC 1.5.99.8) とされており、低溶存酸素状態で進むワイン発酵過程でプロリン資化が減退するのは、本酵素が溶存酸素を要求するためと考えられている。実際に、ブドウ果醪の溶存酸素は、発酵開始直後から速やかに減少することが知られており、50 トン容タンクで赤ブドウ果醪を発酵させた場合では、中心部の溶存酸素濃度は $30 \mu\text{g/L}$ 以下になることが報告されている¹⁰⁾。この値は、酵母が呼吸作用するための限界溶存酸素濃度の $130 \mu\text{g/L}$ を下回り、飽和溶存酸素量 8.84mg/L (20°C) のわずか 0.34% である¹¹⁾。つまり、溶存酸素濃度の低下によって、プロリンオキシダーゼ活性が低下し、結果的に酵母のプロリン資化能が低下すると考えられている。しかし一方、プロリンを単一窒素源とする培養液で発酵を行った場合では、大部分のプロリンが資化されることも報告されおり¹²⁾、低溶存酸素濃度下での酵母のプロリン資化能に影響する因子については不明な点が多い。

発酵 (低溶存酸素) 条件下でプロリン資化量を増大させる手段として、プロリンオキシダーゼを高発現させることにより、少ない酸素分子を効率的に捕捉させる方法が考えられた。そこで、本研究では、プロリンオキシダーゼをコードする *PUTI* 遺伝子を過剰発現させた酵母を構築し、本株のプロリン資化能を発酵条件下で調査した。

実験方法

1. 供試果醪および発酵条件

発酵試験には、2006 年に山梨大学ワイン科学研究センター育種試験地 (南斜面) にて栽培された、甲州ブドウ (樹齢 15 ~ 20 年) より得られた甲州ブドウ果醪 (糖度 20%, pH3.2, プロリン 542mg/L) を使用した。各菌株は SD 合成液体培地 (2% グルコース, 0.67% yeast nitrogenbase w/o amino acids) で前培養を行った。甲州ブドウ果醪 200ml を含む 300ml 容三角フラスコに、波長 610nm における濁度が 0.5 になるよう各菌株を接種し、14 日および 21 日間、 16°C で発酵させた。また、発酵中に生産・放出される二酸化炭素により減少する培地重量を経時的に測定し、発酵の進行を調査した。

2. 供試菌株

ワイン酵母 *S. cerevisiae* W-3 株, OC-2 株, KN-35 株, KN-94 株および YM-41 株を供試した。また, *S. cerevisiae* DBY746 株 (*MAT a : trp1²⁸⁹, his3 Δ 1, leu2³⁻¹¹², ura3⁵²*) へ *PUTI* 遺伝子を導入した株を *PUTI* 株とした。すなわち, *S. cerevisiae* DBY746 株の染色体 DNA を鋳型とし, プライマー *PUTI*-F^{a)} および *PUTI*-R^{b)} を用いて PCR を行い, *PUTI* 遺伝子を含む DNA 断片 (約 2.6kbp) を得た。本断片をプラスミド pTA2 へ連結した後, プラスミド側に位置する制限酵素サイト *Sal* I および *Xba* I にて切出された DNA 断片 (約 2.6kbp: *PUTI* の 5' 上流域のプロモーター制御部位を含む) を多コピープラスミド pRS416 へ連結した。本プラスミドを *S. cerevisiae* DBY746 株へ導入した。

a) *PUTI*-F: AGTTGAGCGTCGACTATGCACA

b) *PUTI*-R: CTAACACTTCTAGATGTATTAT

3. アミノ酸分析方法

試料中のアミノ酸は Stocchi らの方法¹³⁾に従い測定した。すなわち, ワイン試料 20 μl を蒸留水で 5 倍に希釈し, これに 0.5M KHCO_3 緩衝液を 100 μl を加えた。これにアセトンに溶解した 2mM DabcyI-chloride (Cat. No. 524-32481; 和光純薬) を 100 μl を加え, 70°C で 10 分間加熱し, アミノ酸を標識した。この溶液を 70% エタノールで 5 倍に希釈したものを標識アミノ酸溶液とした。標識アミノ酸溶液 10 μl を HPLC に注入し, Sunfire C18 カラム (Waters 社: 粒子径 3.5 μm $4.6 \times 150 \text{mm}$) を用いてアミノ酸を分析した。

実験結果と考察

1) ワイン酵母株 (5 株) のプロリン資化能

供試ワイン酵母 5 株を用いて甲州果醪を 14 日間, 発酵させ, 残存するプロリン量を調査した。その結果, 果醪に残存するプロリン量は 347 ~ 439mg/L の間にあり, いずれの株を用いた場合でも, 初発プロリン量の 19 ~ 36% しか低下しない事がわかった。一般的に, 果醪に含まれるアミノ酸の多くは, 発酵開始直後より酵母によって資化され, 速やかに低下 (50mg/L 以下) するが, プロリン濃度は他のアミノ酸濃度に比べると低下せず, 生成したワインに残存することが知られている。実際, 市販ワイン酵母 (4 株) のプロリン

Fig. 1 Residual proline in Koshu grape must after 14 days fermentation. Koshu grape must was fermented by several wine yeast *S. cerevisiae* strains OC-2(A), W-3(B), KN-35(C), KN-94 (D), and YM41 (E) at 16 °C. Data indicate means $\pm$ SD (%) calculated by the amount of residual proline divided by the amount of initial proline in Koshu grape must.

資化能について調査が行われた結果、発酵温度や原料ブドウ種等を変更しても、プロリン資化量は最大でも40%程度であることが報告されている¹⁴⁾。この結果は、本研究の結果とよく一致しており、ワイン酵母株を変更するだけで甲州ワインのプロリンを低減化することは難しいと判断された。

ブドウ果醪に含まれるプロリンは、酵母細胞膜を透過した後、プロリンオキシダーゼ (PUT1 遺伝子) によってピロリン-5-カルボン酸へ代謝され、最終的にはグルタミン酸へ異化される。すなわち、酵母のプロリン資化能を増大させる為には、プロリンオキシダーゼの高発現による酸素分子の効率的な捕捉が有効であると考えられた。そこで PUT1 遺伝子を多コピーで導入した株 (PUT1 株) を作成し、本株のプロリン資化能について調査を行った。

2) PUT1 株の発酵性

コントロール株および PUT1 株の示す発酵曲線を比較した結果、両株の間に大きな差は見られなかった

Fig. 2 Fermentation progress in Koshu grape must. The fermentation progress was monitored by medium weight reduction by CO₂ production. Koshu grape must (200ml) was fermented by yeast (Control and PUT1 strain) at 16 °C over 21 days.

(Fig. 2)。また、発酵終了時まで生成したエタノールは、コントロール株で10.8%、PUT1株で10.5%であったことから、2006年度甲州ブドウ果醪を用いた発酵実験では、両株の間に大きな発酵力の差はないと考えられた。

3) PUT1 株のアミノ酸資化能

2006年度甲州果醪に含まれる総アミノ酸量の経時変化を Fig. 3 に示した。コントロール株は、発酵開始3日目で総アミノ酸濃度が320 ~ 340mg/L まで減少し、発酵終了時までほぼ一定であった。これに対して、PUT1 株は、コントロール株に比べてやや遅れて総アミノ酸濃度が低下し、14日目から21日にかけてわずかに上昇した。一方、甲州果醪に含まれるプロリンのみの濃度変化を Fig. 4 に示した。コントロール株および PUT1 株共にプロリン濃度は、発酵開始3日目で300 ~ 320mg/L まで減少し、その後、総アミノ酸濃度の変化 (Fig. 3) とほぼ同様の減少傾向を示すことがわかった。これらの結果から、両株の総アミノ酸の資化は発酵開始直後から速やかに始まり、3日目ではほとんどアミノ酸が資化された後、多量のプロリンが残存していることがわかった。また、PUT1 株のプロリ

Fig. 3 Amino acids reduction in Koshu grape must during fermentation. Koshu grape must (200ml) was fermented by yeast (Control and *PUTI* strain) at 16 °C for 21 days. The amount of nineteen amino acids were measured by DabcyI-chloride labeled methods. Data express the means $\pm$ SD of three experiments.

Fig. 4 Proline reduction in Koshu grape must during fermentation. Koshu grape must (200ml) was fermented by yeast (Control and *PUTI*) at 16 °C for 21 days. The amount of proline was measured by DabcyI-chloride labeled methods. Data express the means $\pm$ SD of three experiments.

ン資化能は、コントロール株との間に差が見られないことから、プロリン資化の第一段階に位置するプロリンオキシダーゼ遺伝子 (*PUTI*) を導入しただけでは、酵母株のプロリン資化能は増大しないことがわかった。この原因として、まず *PUTI* 遺伝子の発現不足が考えられた。Wang と Brandriss は¹⁵⁾、酵母を 0.1% プロリン存在下で発酵させると *PUTI* 遺伝子の発現が増大し、その値はプロリン非存在下の 24 倍であり、好氣的培養を行った場合の 1/3 程度であることを報告している。さらに、*PUTI* 遺伝子を多コピーで導入した *PUTI* 株は、SD 合成培地で培養した場合、細胞内プロリン濃度がコントロール株の 20% まで減少する (資料未記載)。これらのことから、本実験においても、*PUTI* 株のプロリンオキシダーゼ遺伝子は高発現していると考えられる。他方、低溶存酸素濃度条件下においても、*PUTI* 株の細胞内プロリン濃度は低下しており、プロリンオキシダーゼ活性は維持されていると考えられることから、甲州果醪中のプロリン濃度が変化しない理由として、低い溶存酸素濃度によるプロリンオ

キシダーゼの活性低下に加え、*PUTI* 株のプロリン取り込み能が制限されている事が示唆された。

酵母にプロリンを資化させようとする試みは古くから行われてきた^{16,17)}。大村らは、*PUT4* 遺伝子にコードされるプロリンパーミアーゼ (プロリン膜輸送酵素) を改変・発現させた酵母株を用いて麦汁をビール発酵させることによってプロリンを低減化できることを報告している¹⁸⁾。本研究ではプロリンの取り込みについて検討しておらず、ワイン発酵においてもプロリンパーミアーゼの発現がプロリン資化を促進するかどうか今後、確認する必要がある。

一方、プロリンは細胞保護にも関与することが報告されている。すなわち、*PUTI* 遺伝子を破壊し、プロリン代謝を遮断することにより、細胞内にプロリンを蓄積するように変化した酵母株は、冷凍およびエタノールストレスに耐性を示す^{19,20)}。逆に *PUTI* 遺伝子を過剰発現させ、細胞内プロリン濃度を低下させた株では、酸化的ストレスに対して感受性を示す様になる²¹⁾。発酵初期の甲州果醪中においても、*PUTI* 株の細胞内プロリン濃度の低下が予想されることから、発酵初期

に見られた *PUTI* 株のプロリン資化の遅延は、細胞内プロリン濃度の低下により、*S. cerevisiae* DBY746 株のストレス耐性能が低下した為に生じているのではないかと推察された。

要 約

本研究では、プロリンオキシダーゼをコードする *PUTI* 遺伝子を過剰発現させた酵母株 (*PUTI* 株) を構築し、本株のプロリン資化能を発酵条件下で調査した。結果、*PUTI* 株を用いて 2006 年度甲州果醪を発酵させた場合、甲州果醪のプロリン減少量はコントロール株と同等であったことから、*PUTI* 株のプロリン資化能は増大していないことがわかった。この理由の一つとして、プロリンパーミアーゼの活性が十分ではないことが示唆された。

参考文献

- 1) 醸造物の成分(財)日本醸造協会 (平成 11 年) p352-359
- 2) V., Jiranek, P., Langridge and P.A., Henschke: *Am. J. Enol. Vitic.*, **46**(1), 75-83 (1995)
- 3) G. Beltran, M. Novo, N. Rozès, A. Mas and J. M. Guillamón: *FEMS Yeast Res.*, **4**, 625-632 (2004)
- 4) 船橋章, 桑平秀夫, 菊池敬: *ASEV Jpn. Rep.*, **5**(2), 174-177 (1994)
- 5) 岸本宗和, 袖山政一: 醸協, **98**(3), 210-216 (2003)
- 6) 青木康宏, 土橋雅純, 三澤茂計, 荻野敏, 三木健夫, 柳田藤寿, 篠原隆: *J. ASEV Jpn.*, **15**(1), 2-8 (2004)
- 7) 三木健夫, 篠原隆: 醸協, **103**(12), 954-958 (2008)
- 8) 恩田匠, 小松正和, 中山忠博, 上垣良信, 鈴木幾雄, 莊富森, 斎藤典義, 久本雅嗣, 奥田徹, 前島善福: *J. ASEV Jpn.*, **20**(3), 76-77 (2009)
- 9) Graham H. Fleet (Ed) : *Wine Microbiology and Biotechnology*, Chapter4 pp130-135, Harwood Academic Publishers, Switzerland (1993)
- 10) V. F. Laurie, R. Law, W. S. Joslin and A. Waterhouse: *Am. J. Enol. Vitic.*, **59**, 215-219 (2008)
- 11) R. K. Finn: *J. Bacteriol.*, **70**(3), 352-353 (1955).
- 12) C. S. Ough, and R.M. Stashak: *Am. J. Enol. Vitic.*, **25**, 7-12 (1974)
- 13) V. Stocchi, F. Palm, G. Piccoli, B. Biagiarelli, , M. Magnani, L. Masat and L. Cucchiari: *Amino acids*, **3**, 303-309 (1992)
- 14) C. S. Ough, Z. Huang, D. An and D. Stevens: *Am. J. Enol. Vitic.*, **42**, 26-40 (1991)
- 15) S. S. Wang and M. C. Brandriss: *Mol. Cell. Biol.*, **7**(12), 4431-4440 (1987)
- 16) M. Jones and J.S. Pierce: *J. Inst. Brew.*, **70**, 307-315 (1964)
- 17) J.M. Salmon and B. Pierre: *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 3831-3837 (1998)
- 18) F. Omura, A. Fujita, K. Miyajima and N. Fukui: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **69**(6), 1162-1171 (2005)
- 19) H. Takagi: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **81**(2), 211-223 (2008)
- 20) T. Kaino and H. Takagi: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**(9), 2131-2135 (2009)
- 21) C. Chen, S. Wanduragala, D. F. Becker and M. B. Dickman: *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**(6), 4001-4006 (2006)