(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2021-141831
(P2021-141831A)
(43)公開日　令和3年9月24日(2021.9.24)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/31	(2006.01)	C12N	15/31	ZNA	4B065
C12N 1/19	(2006.01)	C12N	1/19		
C12G 3/00	(2019.01)	C12G	3/00		

審査請求 未請求　請求項の数 8　ＯＬ　（全 12 頁）

(21)出願番号　特願2020-41757(P2020-41757)
(22)出願日　令和2年3月11日(2020.3.11)

（出願人による申告）国立研究開発法人　農業・食品産業技術総合研究機構　生物系特定産業技術研究支援センター　イノベーション創出強化研究推進事業、産業技術力強化法第１７条の適用を受ける特許出願

(71)出願人　504143441
国立大学法人　奈良先端科学技術大学院大学
奈良県生駒市高山町８９１６－５
(74)代理人　110000796
特許業務法人三枝国際特許事務所
(72)発明者　西村　明
奈良県生駒市高山町８９１６－５　国立大学法人奈良先端科学技術大学院大学内
(72)発明者　谷川　翼
奈良県生駒市高山町８９１６－５　国立大学法人奈良先端科学技術大学院大学内
(72)発明者　高木　博史
奈良県生駒市高山町８９１６－５　国立大学法人奈良先端科学技術大学院大学内
最終頁に続く

(54)【発明の名称】アルコール飲食品製造用組成物

(57)【要約】
【課題】酵母のプロリン資化能を向上させる方法の提供。
【解決手段】ＣＡＮ１変異酵母又はＣＡＮ１抑制酵母を含有する、アルコール飲食品製造用組成物。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ＣＡＮ１変異酵母又はＣＡＮ１抑制酵母を含有する、アルコール飲食品製造用組成物。
【請求項２】
前記ＣＡＮ１変異酵母が、野生型Can1タンパク質をコードする塩基配列において、少なくとも１個の塩基が欠失、置換、又は付加され、かつ野生型Can1タンパク質を構成するアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列をコードする核酸を有する、請求項１に記載のアルコール飲食品製造用組成物。
【請求項３】
前記ＣＡＮ１変異酵母又はＣＡＮ１抑制酵母が、アルギニン存在下でのプロリン取込能が向上した酵母である、請求項１又は２に記載のアルコール飲食品製造用組成物。
【請求項４】
前記酵母が、サッカロミセス属に属する酵母である、請求項１～３のいずれかに記載のアルコール飲食品製造用組成物。
【請求項５】
ＣＡＮ１変異酵母又はＣＡＮ１抑制酵母を用いることを含む、アルコール飲食品の製造方法。
【請求項６】
前記ＣＡＮ１変異酵母が、野生型Can1タンパク質をコードする塩基配列において、少なくとも１個の塩基が欠失、置換、又は付加され、かつ野生型Can1タンパク質を構成するアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列をコードする核酸を有する、請求項５に記載のアルコール飲食品の製造方法。
【請求項７】
前記ＣＡＮ１変異酵母又はＣＡＮ１抑制酵母が、アルギニン存在下でのプロリン取込能が向上した酵母である、請求項５又は６に記載のアルコール飲食品の製造方法。
【請求項８】
前記酵母が、サッカロミセス属に属する酵母である、請求項５～７のいずれかに記載のアルコール飲食品の製造方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本開示は、アルコール飲食品製造用組成物、及びアルコール飲食品の製造方法等に関する。
【背景技術】
【０００２】
ブドウには、窒素源としてプロリンが約４０％程度含まれている。しかしながら、ワイン製造（発酵段階）において、プロリンはほとんど消費されず、ワインに残存することが知られている。プロリンは苦みや甘味を呈するアミノ酸であるため、ワイン中のプロリン含有量が多くなると、苦みが増加したり、酸味が減少したりする等、味にも影響を及ぼすことから、ワインに残存するプロリン含有量を低減することが課題となっている。
また、ワイン製造（発酵段階）中に、アンモニウムなどの酵母が利用できる窒素源が枯渇した場合、アンモニウム塩などの人工窒素源を添加する必要がある。このことからも、資化されずに残存しているプロリンを窒素源として利用する方法の開発が行われている（特許文献１）。
【先行技術文献】
【特許文献】
【０００３】
【特許文献１】特開２００６－００６１０６
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】

【０００４】
本開示は、酵母のプロリン資化能を向上させることを課題とする。
【課題を解決するための手段】
【０００５】
本発明者らは、ＣＡＮ１遺伝子が、プロリンの取込に関与していることを見出し、さらに改良を重ねた。
【０００６】
本開示は、例えば以下の項に記載の主題を包含する。
項１．
ＣＡＮ１変異酵母又はＣＡＮ１抑制酵母を含有する、アルコール飲食品製造用組成物。
項２．
前記ＣＡＮ１変異酵母が、野生型Can1タンパク質をコードする塩基配列において、少なくとも１個の塩基が欠失、置換、又は付加され、かつ野生型Can1タンパク質を構成するアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列をコードする核酸を有する、項１に記載のアルコール飲食品製造用組成物。
項３．
前記ＣＡＮ１変異酵母又はＣＡＮ１抑制酵母が、アルギニン存在下でのプロリン取込能が向上した酵母である、項１又は２に記載のアルコール飲食品製造用組成物。
項４．
前記酵母が、サッカロミセス属に属する酵母である、項１～３のいずれかに記載のアルコール飲食品製造用組成物。
項５．
ＣＡＮ１変異酵母又はＣＡＮ１抑制酵母を用いることを含む、アルコール飲食品の製造方法。
項６．
前記ＣＡＮ１変異酵母が、野生型Can1タンパク質をコードする塩基配列において、少なくとも１個の塩基が欠失、置換、又は付加され、かつ野生型Can1タンパク質を構成するアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列をコードする核酸を有する、項５に記載のアルコール飲食品の製造方法。
項７．
前記ＣＡＮ１変異酵母又はＣＡＮ１抑制酵母が、アルギニン存在下でのプロリン取込能が向上した酵母である、項５又は６に記載のアルコール飲食品の製造方法。
項８．
前記酵母が、サッカロミセス属に属する酵母である、項５～７のいずれかに記載のアルコール飲食品の製造方法。
【発明の効果】
【０００７】
アルギニン存在下でのプロリン取込能が向上した酵母が提供される。前記酵母を含有する、アルコール飲食品製造用組成物が提供される。また、前記酵母を用いるアルコール飲食品の製造方法が提供される。
【図面の簡単な説明】
【０００８】
【図１】アルギニン添加培地における、野生株及びプロリン要求性株の生育を示す。
【図２】アルギニン添加培地における、プロリン要求性株及びＣＡＮ１変異体の生育を示す。
【図３】アルギニン添加培地においてプロリン要求性株及びＣＡＮ１破壊株を培養した際の、培地中のプロリン量、及びアルギニン量を示す。
【図４】アルギニン添加培地における、ＣＡＮ１破壊株に空ベクターを導入した株（ＣＡＮ１破壊株）、ＣＡＮ１破壊株に野生型ＣＡＮ１を発現させた株（野生株）、及びＣＡＮ１破壊株に変異型ＣＡＮ１(Can1 G434C) を発現させた株（ＣＡＮ１変異株）の生育を示

す。

【発明を実施するための形態】

【０００９】

以下、本開示に包含される各実施形態について、さらに詳細に説明する。

【００１０】

本開示は、ＣＡＮ１変異酵母又はＣＡＮ１抑制酵母を含有する組成物を包含する。本明細書において、当該組成物を「本開示の組成物」と表記することがある。

【００１１】

配列番号１は、サッカロミセス・セレビシエ由来の野生型Can1タンパク質を構成するアミノ酸配列である。また、配列番号２は、配列番号１に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列である。換言すれば、配列番号１に示すアミノ酸配列は、野生型Can1タンパク質を構成するアミノ酸配列の一例である。また、配列番号２に示す塩基配列は、野生型Can1タンパク質をコードする塩基配列の一例である。

【００１２】

本明細書において、野生型ＣＡＮ１遺伝子を発現する酵母、又は野生型Can1タンパク質を発現する酵母を、「野生型ＣＡＮ１酵母」と表記することがある。野生型ＣＡＮ１酵母としては、例えば、野生株が挙げられる。なお、ＣＡＮ１抑制酵母は、除外される。

【００１３】

野生型ＣＡＮ１遺伝子は、人為的な処理による遺伝子の変異（欠失、置換、又は付加など）を有していないＣＡＮ１遺伝子である。野生型Can1タンパク質は、人為的な処理によるアミノ酸の変化（欠失、置換、又は付加など）を有していないCan1タンパク質である。野生型ＣＡＮ１遺伝子としては、例えば、配列番号２に示す塩基配列と、８５％以上、９０％以上、９１％以上、９２％以上、９３％以上、９４％以上、９５％以上、９６％以上、９７％以上、９８％以上、又は９９％以上の同一性を有する塩基配列からなる核酸が挙げられる。好ましくは９０％以上、より好ましくは９５％以上、さらに好ましくは９８％以上、さらにより好ましくは９９％以上である。野生型Can1タンパク質としては、例えば、配列番号１に示すアミノ酸配列と、８５％以上、９０％以上、９１％以上、９２％以上、９３％以上、９４％以上、９５％以上、９６％以上、９７％以上、９８％以上、又は９９％以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドが挙げられる。好ましくは９０％以上、より好ましくは９５％以上、さらに好ましくは９８％以上、さらにより好ましくは９９％以上である。

【００１４】

本開示に用いられるＣＡＮ１変異酵母は、変異型ＣＡＮ１遺伝子を発現する酵母であってもよく、変異型Can1タンパク質を発現する酵母であってもよい。

【００１５】

ＣＡＮ１変異酵母は、野生型Can1タンパク質をコードする塩基配列において、少なくとも１個の塩基が欠失、置換、又は付加され、かつ野生型Can1タンパク質を構成するアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列をコードする核酸を有することが好ましい。少なくとも１個の塩基が欠失、置換、又は付加された塩基配列において、欠失、置換、又は付加された塩基の個数の上限は、例えば、１７７０個、１５００個、１０００個、８００個、６００個、４００個、２００個、１００個、５０個、４５個、４０個、３５個、３０個、２５個、２０個、１９個、１８個、１７個、１６個、１５個、１４個、１３個、１２個、１１個、１０個、９個、８個、７個、６個、５個、４個、３個、又は２個であってもよい。ＣＡＮ１変異酵母は、野生型Can1タンパク質を構成するアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列をコードする核酸を有することが好ましく、より具体的には、野生型Can1タンパク質を構成するアミノ酸配列とは少なくとも１個のアミノ酸が異なるアミノ酸配列をコードする核酸を有することが好ましい。野生型Can1タンパク質を構成するアミノ酸配列と異なるアミノ酸の個数の上限は、例えば、５９０個、５５０個、５００個、４００個、３００個、２００個、１００個、５０個、４５個、４０個、３５個、３０個、２５個、２０個、１９個、１８個、１７個、１６個、１５個、１４個、１３個、１２個、１１個、１０個、９個、

８個、７個、６個、５個、４個、３個、又は２個であってもよい。また、ＣＡＮ１変異酵母は、例えば、配列番号１に示すアミノ酸配列の第４３４位のグリシンがシステインに置換されたアミノ酸配列をコードする核酸を有していてもよい。また、後述する実施例で示す通り、Can1タンパク質をコードする遺伝子が、カナマイシン耐性遺伝子に置換された酵母であっても、所望の効果を示すことから、塩基、及びアミノ酸の変化の種類（例えば、欠失、置換、又は付加）、及び変異した塩基、及びアミノ酸の個数は、アルギニン存在下でのプロリン取込能が向上する限り、特に限定されない。要するに、本開示に用いられるＣＡＮ１変異酵母は、野生型Can1タンパク質をコードする塩基配列の全てを欠失した酵母であってもよい。

【００１６】

少なくとも１個の塩基の欠失、置換、又は付加などの変異を塩基配列に加える技術は当該技術分野において公知であり、任意の手法を用いて行うことができる。例えば、制限酵素処理、エキソヌクレアーゼやＤＮＡリガーゼ等による処理、位置指定突然変異導入処理、ランダム突然変異導入処理（例えば、薬剤処理、紫外線処理、放射線処理など）等を利用して行うことができる。薬剤処理としては、例えば、メタンスルホン酸エチル処理やN-メチル-N-ニトロソグアニジン処理などが挙げられる。また、ＣＡＮ１変異酵母はカナバニン等のアルギニンアナログを用いた公知スクリーニングで容易に取得できる。

【００１７】

本開示に用いられるＣＡＮ１抑制酵母は、野生型ＣＡＮ１遺伝子の発現が抑制された酵母であってもよく、野生型Can1タンパク質発現が抑制された酵母であってもよい。

【００１８】

遺伝子の発現を抑制する技術、及びタンパク質の発現を抑制する技術は当該技術分野において公知であり、任意の手法を用いて行うことができる。例えば、ＣＡＮ１抑制酵母は、ｓｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、ｍｉｃｒｏＲＮＡなどを用いるＲＮＡｉ法、アンチセンス法などにより製造することができる。

【００１９】

ＣＡＮ１抑制は、例えば、野生型ＣＡＮ１遺伝子の発現量を測定することによって確認することができる。また、遺伝子発現量の測定は、当該技術分野において公知の手法により確認することができる。野生型ＣＡＮ１酵母と比較して、野生型ＣＡＮ１遺伝子の発現量が減少している酵母は、ＣＡＮ１抑制酵母と判断することができる。

【００２０】

本開示に用いられるＣＡＮ１変異酵母、及びＣＡＮ１抑制酵母は、アルギニン存在下でのプロリン取込能が向上した酵母であることが好ましい。アルギニン存在下でのプロリン取込能は、プロリン及びアルギニンを含有する培地において、酵母を培養した際の培地に含まれるプロリン量を測定することによって確認することができる。より具体的には、０．１％Ｌ－プロリン（４．６ｍＭ）、及び０．０１％Ｌ－アルギニン塩酸塩（０．３６１ｍＭ）を含有する培地を用いて、後述する実施例に記載するプロリン量の測定方法により、確認することができる。野生型ＣＡＮ１酵母と、ＣＡＮ１変異酵母又はＣＡＮ１抑制酵母とを、同様の条件で培養し、野生型ＣＡＮ１酵母を培養した培地に含まれるプロリン量と比較して、ＣＡＮ１変異酵母又はＣＡＮ１抑制酵母を培養した培地に含まれるプロリン量が少ない場合には、プロリン取込能が向上したと判断することができる。

【００２１】

本開示に用いられるＣＡＮ１変異酵母、及びＣＡＮ１抑制酵母のアルギニンの取込能は、野生型ＣＡＮ１酵母と、同等以上であることが好ましい。アルギニン取込能は、プロリン取込能と同様に、培地に含まれるアルギニン量を測定することによって確認することができる。

【００２２】

酵母は、飲食品の製造に用いることができる酵母であれば、特に限定されない。例えば、サッカロミセス属、ピキア属、クルイベロマイセス属の酵母などが挙げられ、サッカロミセス属の酵母が好ましい。また酵母は、例えば、ワイン酵母、ビール酵母、清酒酵母な

どを用いることもできる。

【００２３】

アルコール飲食品は、アルコールを含有する飲食品を意味する。アルコール飲食品としては、果実酒（例えば、ワイン、シードルなど）、ビール、発泡酒、その他の発泡性酒類、日本酒などの醸造酒；焼酎、ウイスキー、ブランデーなどの蒸留酒；ワイン粕、ビール粕、酒粕、焼酎粕、ウイスキー粕等の発酵残渣類などが例示される。

【００２４】

アルコール飲食品製造用組成物中、ＣＡＮ１変異酵母又はＣＡＮ１抑制酵母の含有量は、適宜設定することができ、例えば、１～１００質量％とすることができる。

【００２５】

アルコール飲食品製造用組成物は、ＣＡＮ１変異酵母又はＣＡＮ１抑制酵母を含有し、さらに他の成分を含有することができる。

【００２６】

他の成分としては、例えば、溶媒、分散媒（例えば、グリセロール、ＤＭＳＯ、スキムミルク等）、保存剤、賦形剤、活性剤、防腐剤、ｐＨ調整剤、安定化剤、培地成分（例えば、寒天、グルコース、酵母エキス等）、アルコール飲食品の製造に用いられる原料（例えば、ブドウ、麦芽、ホップ、米、麦、これらの抽出液など）；などが挙げられる。アルコール飲食品の製造に用いられる原料は、プロリンを含有するものであってもよい。これらは、１種単独で又は２種以上を組み合わせて用いることができる。また、本開示の組成物は、ＣＡＮ１変異酵母又はＣＡＮ１抑制酵母と、他の成分を混合することによって用時調製されるものであってもよい。

【００２７】

本開示の組成物は、固体状（例えば、粉末状、顆粒状、ゲル状、ペースト状など）であってもよく、液体状（例えば、溶液状、懸濁液状）等であってもよい。

【００２８】

本開示の組成物は、ＣＡＮ１変異酵母又はＣＡＮ１抑制酵母と、必要に応じて他の成分とを組み合わせて常法により調製することができる。

【００２９】

本開示は、アルコール飲食品の製造方法をも包含する。本明細書において、当該方法を「本開示のアルコール飲食品の製造方法」と表記することがある。

【００３０】

本開示のアルコール飲食品の製造方法は、ＣＡＮ１変異酵母又はＣＡＮ１抑制酵母を用いることを特徴とする。換言すれば、本開示のアルコール飲食品の製造方法は、本開示の組成物を用いるものであってもよい。アルコール飲食品は、アルコール飲食品の種類に応じて、慣用の方法および任意の条件を採用し、製造することができる。例えば、本開示のアルコール飲食品の製造方法は、発酵工程を含んでいてもよい。ＣＡＮ１変異酵母又はＣＡＮ１抑制酵母は、アルコール飲食品の製造の任意の段階において用いることができる。また、本開示のアルコール飲食品の製造方法が、本開示の組成物を用いるものである場合、本開示の組成物は、アルコール飲食品の製造の任意の段階において用いることができる。任意の段階としては、例えば、発酵段階、発酵前、発酵後などが挙げられる。

【００３１】

本開示のアルコール飲食品の製造方法は、ＣＡＮ１変異酵母若しくはＣＡＮ１抑制酵母、又は本開示の組成物と、アルコール飲食品の製造に用いられる原料とを混合する工程を含むことが好ましい。アルコール飲食品の製造に用いられる原料は、アルコール飲食品の種類に応じて、適宜選択することができ、プロリンを含有するものであってもよい。アルコール飲食品の製造に用いられる原料に含まれるプロリンの含有量は、特に限定されないが、例えば、１質量％～９９質量とすることができ、当該範囲の上限若しくは下限は、例えば１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、又は９０質量％であってもよい。より具体的には、例えば、１０質量％～９０質量％であってもよい。

【００３２】

本開示のアルコール飲食品の製造方法において、アルコールを生産するために酵母（例えば、ワイン酵母、ビール酵母、清酒酵母など）が用いられる場合、当該酵母と、ＣＡＮ１変異酵母又はＣＡＮ１抑制酵母とは、同一であってもよく、異なっていてもよい。

【００３３】

本開示によれば、アルギニン存在下における酵母のプロリンの取込能を向上させることができる。好ましくは、野生型ＣＡＮ１酵母と比較して、アルギニン存在下におけるプロリンの取込能が向上した酵母を取得することできる。このため、本開示の組成物をアルコール飲食品の製造に用いることによって、アルコール飲食品中のプロリン含有量を低減することができる。好ましくは、野生型ＣＡＮ１酵母を用いる場合と比較して、アルコール飲食品中のプロリン含有量を低減することができる。よって、本開示の組成物は、アルコール飲食品製造用として好適に用いることができる。また、本開示の組成物は、アルコール飲食品中のプロリン含有量低減用として好適に用いることができる。また、本開示によれば、アルコール飲食品中のプロリン含有量が低減されるため、風味の優れたアルコール飲食品が提供される。また本開示によれば、原料に含まれるプロリンを有効に利用することができるため、アルコール飲食品製造における、人工窒素源の使用量を低減することができる。本開示によれば、野生型ＣＡＮ１酵母と同程度のアルギニン取込能を有する酵母を取得することができる。このため、本開示によれば、野生型ＣＡＮ１酵母を用いる場合と同程度の、アルコール飲食品中のアルギニン含有量を維持することができる。よって、本開示によれば、アルコール飲食品中のアルギニンの含有量が低値であるため、風味の優れたアルコール飲食品が提供される。

【００３４】

なお、本明細書において「含む」とは、「本質的にからなる」と、「からなる」をも包含する（The term "comprising" includes "consisting essentially of" and "consisting of."）。また、本開示は、本明細書に説明した構成要件を任意の組み合わせを全て包含する。

【００３５】

また、上述した本開示の各実施形態について説明した各種特性（性質、構造、機能等）は、本開示に包含される主題を特定するにあたり、どのように組み合わせられてもよい。すなわち、本開示には、本明細書に記載される組み合わせ可能な各特性のあらゆる組み合わせからなる主題が全て包含される。

【実施例】

【００３６】

本開示の内容を以下の実験例や実施例を用いて具体的に説明する。しかし、本開示はこれらに何ら限定されるものではない。下記において、特に言及する場合を除いて、実験は大気圧及び常温条件下で行っている。また特に言及する場合を除いて、「％」は「質量％」を意味する。

【００３７】

１．プロリン要求性株の取得

プロリンはグルタミン酸、又はアルギニンを出発物質として生合成されることが知られている。プロリン要求性株を取得するために、グルタミン酸を出発物質とする生合成経路の鍵酵素γ-glutamyl kinase (Pro1) と、アルギニンを出発物質とする生合成経路の鍵酵素Ornithine aminotransferase (Car2) をそれぞれコードする遺伝子を破壊した二重欠損株（pro1Δcar2Δ株）を作製した。具体的な作製方法を以下に示す。

先ず、薬剤耐性遺伝子を含むプラスミド（pFA6a-5FLAG-hphMX6：ハイグロマイシン耐性マーカーを含む）を鋳型として、PRO１遺伝子のＯＲＦの上流領域及び下流領域のそれぞれと相同な塩基配列を持つプライマー（配列番号３及び４）を用いて、ＰＣＲを行い、薬剤耐性遺伝子の上流及び下流にPRO１遺伝子の上流及び下流と相同な塩基配列を連結させて、PRO１遺伝子破壊用断片を作製した。２％グルコース、１％Bacto Yeast extract、２％Bacto Peptoneを含むYPD培地で対数増殖期（OD_{600} = 0.4-0.8）まで、培養したサッカロミセス・セレビシエX2180-1A株菌体を回収し、0.1 M 酢酸リチウムで懸濁した後、30

℃、15分間インキュベートした。遠心分離によって上清を取り除いた後、１Ｍ酢酸リチウム 36 μL、10 mg/mL サケ精子 DNA 25 μL、PRO１遺伝子破壊用断片50 μL、50% PEG4000 240 μLを添加し、混合した。この混合溶液を30 ℃、30分間インキュベートした後、DMSO 39 μLを加えて、さらに42 ℃、20分間インキュベートを行った。その後、上清を取り除き、30℃で1時間以上回復培養を行った。回復培養が終わった菌体を適切な選択培地に植菌し、形質転換体を取得した。その後、目的通りの形質転換体（pro1Δ株）が得られたことをPCR法によって確認した。

さらに、薬剤耐性遺伝子を含むプラスミド（pFA6a-natMX6：ノールセオトリシン耐性マーカーを含む）を鋳型として、CAR2遺伝子のＯＲＦの上流領域及び下流領域のそれぞれと相同な塩基配列を持つプライマー（配列番号５及び６）を用いて、ＰＣＲを行い、薬剤耐性遺伝子の上流及び下流にCAR2遺伝子の上流及び下流と相同な塩基配列を連結させて、CAR2遺伝子破壊用断片を作製した。得られたCAR2遺伝子破壊用断片について、サッカロミセス・セレビシエX2180-1A株に代えて、pro1Δ株を用いた以外は、上記と同様の方法により、プロリン要求性株（pro1Δcar2Δ株）を取得した。

【００３８】

２．固体培地における生育試験（スポット試験）１

プロリン培地 (SD-N+Pro)で培養した各菌株を、OD_{600}=1.0、0.1、0.01、0.001、0.0001、0.00001になるように希釈調製し、アンモニウムイオン添加培地 (SD-N+Pro+AS)、又はアルギニン添加培地 (SD-N+Pro+Arg)へ3 μLずつスポットした。なお、各培地の組成は、以下の通りとし、粉末寒天を終濃度２％となるようを添加して、固体培地を調製した。

プロリン培地(SD-N+Pro)：２％グルコース、０．１７％Yeast Nitrogen Base without amino acids and ammonium sulfate(Difco社製）、及び０．１％Ｌ－プロリン（４．６ｍＭ）

アンモニウムイオン添加培地(SD-N+Pro+AS)：２％グルコース、０．１７％Yeast Nitrogen Base without amino acids and ammonium sulfate (Difco社製）、０．１％Ｌ－プロリン（４．６ｍＭ）、及び０．５％硫酸アンモニウム（３７．８ｍＭ）

アルギニン添加培地(SD-N+Pro+Arg)：２％グルコース、０．１７％Yeast Nitrogen Base without Amino Acids and ammonium sulfate (Difco社製）、０．１％Ｌ－プロリン（４．６ｍＭ）、及び０．０１％Ｌ－アルギニン塩酸塩（０．３６１ｍＭ）

30℃で3日間インキュベートした後、生育を観察した。結果を図１に示す。

【００３９】

図１に示す通り、プロリン要求性株は、アルギニン添加培地において、生育が確認されなかった。

【００４０】

３．プロリン資化抑制「非感受性」株の取得とゲノム解析

アルギニン依存的なプロリン資化抑制を制御する遺伝子を同定するために、アルギニン存在下でプロリンを資化可能な変異株（資化抑制「非感受性」株）の取得を行った。プロリン培地 (SD-N+Pro) で培養したpro1Δcar2Δ株を菌数10^7個となるように調製し、アルギニン添加培地 (SD-N+Pro+Arg) 上に植菌した。30℃で5日間インキュベートし、生育したコロニーを単離した。単離したコロニーをアルギニン添加培地上にスポットし、表現型の再現性を確認した。再現が確認された菌株について、Genとるくん（商標）(酵母用) High Recovery (タカラバイオ社製) を用いてゲノムを抽出した。得られた試料の全ゲノム配列解析はバイオジェット社に委託した。解析結果をデータベース上のX2180-1A株のゲノム情報と比較し、アミノ酸置換を伴う遺伝子変異を同定した。

【００４１】

その結果、得られた変異体（ＣＡＮ１変異体）は、Can1タンパク質の434番目のグリシンがシステインに置換されていることが分かった。

【００４２】

４．固体培地における生育試験（スポット試験）２

アンモニウムイオン添加培地に代えて、プロリン培地を用いた以外は、上記２のスポッ

ト試験と同様の方法により、プロリン要求性株及びＣＡＮ１変異体の生育試験行った。結果を図２に示す。

【００４３】

図２に示す通り、プロリン要求性株は、アルギニン添加培地において、生育が確認されなかったのに対して、ＣＡＮ１変異体は、アルギニン添加培地においても生育できることが分かった。

【００４４】

５．ＣＡＮ１破壊株（pro1Δcar2Δ株のＣＡＮ１遺伝子を破壊した三重欠損株）の作成

サッカロミセス・セレビシエBY4741株can1::kanMX4（ゲノム中のＣＡＮ１のORFをKanMX4:カナマイシン耐性遺伝子で置換した株）のゲノムDNAを鋳型として、配列番号７及び８のプライマーを用いてPCRを行い、PCR産物を得た。得られたPCR産物について、サッカロミセス・セレビシエX2180-1A株に代えて、pro1Δcar2Δ株を用いた以外は、上記１と同様の方法により、ＣＡＮ１破壊株（pro1Δcar2Δcan1Δ株）を取得した。

【００４５】

６．プロリン量、アルギニン量の測定

プロリン培地（SD-N+Pro）で培養したコントロール（プロリン要求性株、pro1Δcar2Δ株）、及びＣＡＮ１破壊株を、それぞれOD_{600}=1.5となるようにアルギニン添加培地（SD-N+Pro+Arg)に植菌し、30℃で振盪培養した。継時的に培養上清を回収し、アミノ酸測定用試料とした。測定試料は、酢酸リチウム緩衝液（pH 2.0）で希釈した後、フィルターで濾過して調製した。その後、アミノ酸アナライザー（日本電子社製：JLC-500/V2）に供してアミノ酸濃度を測定し、培養前の試料と比較することで細胞による消費量を分析した。アミノ酸定量用の濃度既知スタンダードは、標準アミノ酸混合液（和光純薬社製）を用いた。n=2で試験を実施し、平均値を図３に示す。

【００４６】

図３に示す通り、プロリン要求性株を培養した培養上清におけるプロリン量に変化は見られなかった。一方、ＣＡＮ１破壊株を培養した培養上清におけるプロリン量は、経時的に減少していることから、ＣＡＮ１破壊株は、培地に含まれるプロリンを取り込むことができることが分かった（図３Ａ）。なお、プロリン要求性株、及びＣＡＮ１破壊株のいずれも、培養上清におけるアルギニン量は経時的に減少していることが確認された（図３Ｂ）。

【００４７】

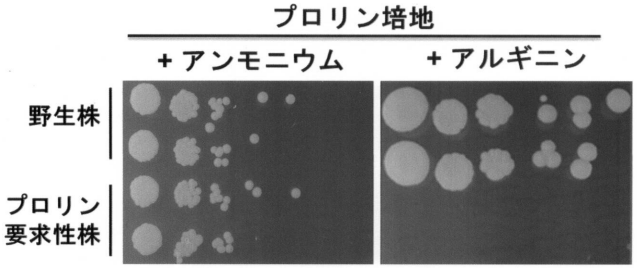
７．野生型ＣＡＮ１又は変異型ＣＡＮ１導入株の作成

野生株、又はＣＡＮ１変異体のゲノムを鋳型として、配列番号９及び１０のプライマーを用いてPCRを行い、PCR産物を得た。酵母発現プラスミドpAUR123(タカラバイオ社製)を制限酵素XbaＩおよびSacＩによって、線状化処理した後、PCR産物と混ぜ、infusion法(タカラバイオ社）によって連結することで、野生型ＣＡＮ１または変異型ＣＡＮ１(Can1 G434C)発現用プラスミドを構築した。PCR産物に代えて、構築したプラスミド及び空ベクターを用いて、さらにサッカロミセス・セレビシエX2180-1A株に代えて、ＣＡＮ１破壊株（pro1Δcar2Δcan1Δ株）を用いた以外は、上記１と同様の方法により、ＣＡＮ１破壊株に野生型ＣＡＮ１を発現させた株（野生株）、ＣＡＮ１破壊株に変異型ＣＡＮ１(Can1 G434C) を発現させた株（ＣＡＮ１変異株）、及びＣＡＮ１破壊株に空ベクターを導入した株（ＣＡＮ１破壊株）を取得した。得られた株を、プロリン培地及びアルギニン添加培地に播種し、生育を調べた。結果を図４に示す。

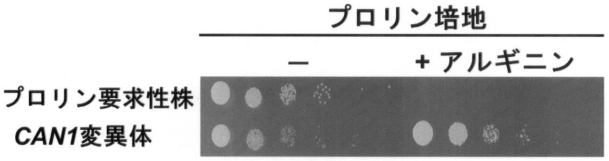
【００４８】

アルギニンを含まないプロリン培地上においては、各菌株は同等の生育を示した。一方、アルギニン添加培地においては、野生株（プロリン要求性株）の生育が完全に抑制されたのに対し、ＣＡＮ１破壊株及びＣＡＮ１変異株の生育は全く抑制されなかった。これらの結果から、Can1 G434Cの変異を有するＣＡＮ１変異株は、ＣＡＮ１破壊株と同様にプロリン資化抑制が解除されていることが分かった。

【図１】

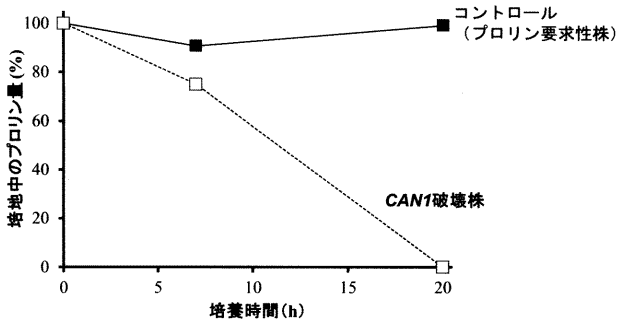


【図２】

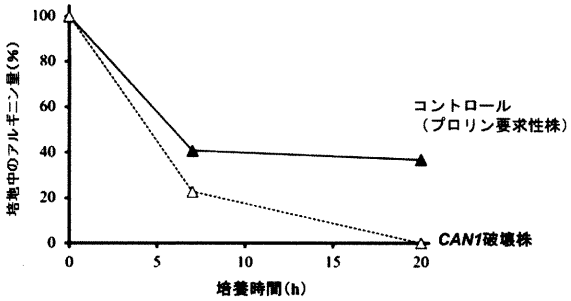


【図３】

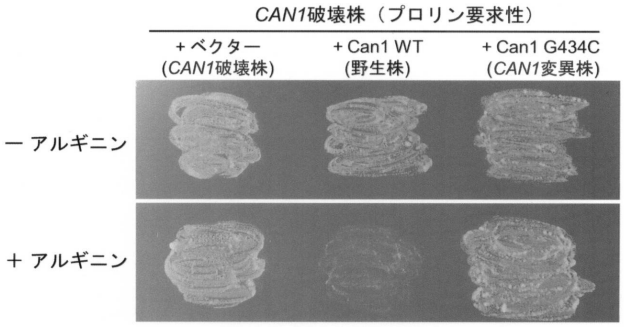
［図３Ａ］



［図３Ｂ］



【図４】



【配列表】
2021141831000001.app

フロントページの続き

Fターム(参考) 4B065 AA79X AA79Y AB01 AC14 BA01 CA06 CA42