

## プロテオーム解析による 有用酵母の分類・同定技術開発

釘本 龍平<sup>1</sup>・森永 浩通<sup>2</sup>・境田 博至<sup>2</sup>・榊原 陽一<sup>1</sup>・甲斐 孝憲<sup>2</sup>・水光 正仁<sup>1</sup>

<sup>1</sup>宮崎大学農学部 応用生物科学科 <sup>2</sup>雲海酒造株式会社

〒889-2192 宮崎市学園木花台西 1-1 電話: 0985-58-7211

Fax: 0985-58-7211 E-mail: ysakaki@cc.miyazaki-u.ac.jp

酵母は酒類の醸造等においてアルコール発酵を担う重要な微生物である。アルコール産生能などの観点から有用な酵母を選抜するために、現在では多段階に及ぶ選抜試験を行うため多くのコストや時間がかかっている。そのため、より簡便な有用酵母の分類・同定技術の開発が必要であると考えられる。そこで我々は、酵母発現タンパク質に着目し、代表的なプロテオーム解析技術である二次元電気泳動を用いて各酵母のタンパク質を解析した。そしてタンパク質発現パターンをもとにクラスター解析を行うことで有用酵母の分類・同定技術を開発するための基礎研究を実施した。また、よりハイスルーブットな解析が可能になる酵母のマススペクトルに基づく分類・同定技術の開発も進めている。

### 1. はじめに

出芽酵母は酒類の醸造やバイオエタノール生産においてアルコール発酵を担う重要な微生物である。特に焼酎など酒類の醸造においては酒類の味や香りにも影響を与えることから、新しい酒造りのためには新規酵母の選抜が重要と考えられる。またバイオエタノール生産においても、より効率的なアルコール発酵を行うためにはより高いアルコール産生能や幅広い糖質化性をもった新規酵母の開発が必要と考えられる。現在、遺伝子操作を用いた有用酵母の作製等が試みられている [1, 2]。しかしながら消費者のニーズは食品醸造に用いる場合は遺伝子操作されていない酵母を求めている。

現在、自然界から単離された新規酵母は、アルコール発酵試験、糖質化性試験等の多段階に及ぶ選抜試験が行われ、その結果、有用な酵母が選抜されている。しかしこの方法では、数千もの酵母一つ一つについて各種選抜試験を行う必要があり、そのため有用酵母を選抜するために多くのコストや時間がかかるという問題点がある。したがって、今後の新しい酒造りや効率的なバイオエタノール生産のために、より簡便な酵母の選抜及び分類・同定技術の開発が必要と考えられた。そこで我々は酵母に発現するタンパク質に着目し、タンパク質を網羅的に解析するプロテオーム解析を導入することで、より効率的な有用酵母の分類・同定技術

の開発を目指している。なお本研究では、有用酵母の重要なファクターの一つであるアルコール産生能の違いに着目して研究を実施した。

### 2. 実験方法およびデータ解析

#### (1) 内部標準を用いた蛍光標識ディファレンスゲル二次元電気泳動 (2D-DIGE) とクラスター解析

解析データには、自然界から採取した酵母 31 株および市販酵母 7 株の酵母から抽出したタンパク質を代表的なプロテオーム解析技術である二次元電気泳動で分離後、各タンパク質スポットの発現データを用いた。この際、通常の二次元電気泳動におけるゲル間のばらつき、定量性・再現性が悪いという問題を解決するために、内部標準を用いた 2D-DIGE を行った。

解析に使用した酵母は事前にアルコール発酵試験を行い、グループ分けを行った。2D-DIGE によって得られたタンパク質スポットの発現データを基に、解析ソフト GeneSpring GX を用いてクラスター解析を行い、酵母の系統分類を行った。

#### (2) マススペクトルに基づく酵母の分類

さらに、より簡便な酵母の分類・同定技術の開発として、酵母菌体の抽出物から MALDI-TOF MS を用いてマススペクトルを取得し、そのマススペクトルパター

ンに基づく分類を検討した。

### 3. 結果と考察

#### (1) クラスター解析

38 株の酵母発現タンパク質の中から、508 個のタンパク質の発現データを抽出し、解析ソフトを用いてクラスター解析を実施した (図 1)。縦軸にはタンパク質、

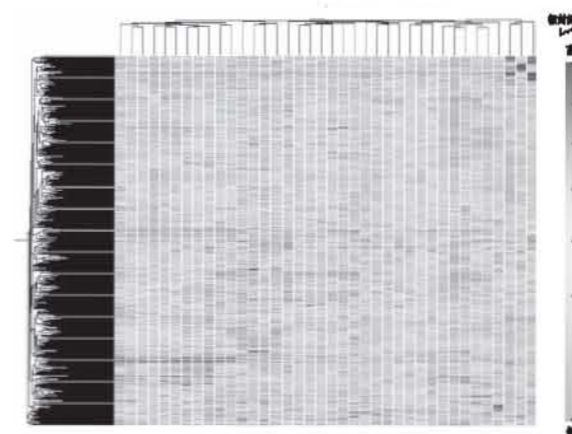


図 2. クラスター解析結果

横軸には酵母がそれぞれ並んでおり、タンパク質の相対的発現レベルに応じて色分けされている。図 2 は

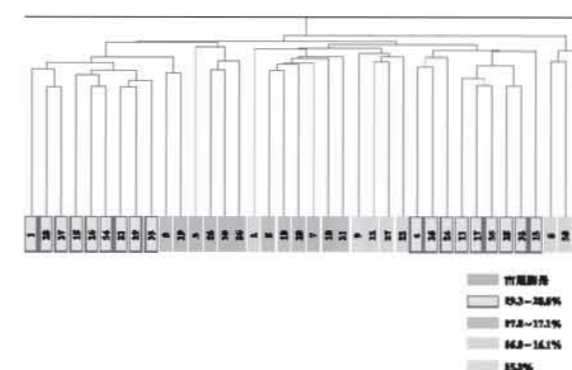


図 2. クラスター解析による酵母の分類

図 1 の横軸に示されたタンパク質発現パターンによる酵母の分類結果を示したもので、各アルコール産生能に応じてグループ分けしている。クラスター解析の結果、アルコール産生能に依存したサブクラスターが確認された。この結果は、プロテオーム解析によって、よりアルコール産生能の高い有用酵母を効率的に選抜・分類できる可能性を示すものであった。

#### (2) マススペクトルによる分類

2D-DIGE は酵母の培養から DIGE イメージを取得するまで 5 日以上かかるが、酵母のマススペクトルに基づく解析は、コロニーひとつで解析可能であるため、酵母培養から測定まで 2 日に短縮することができた。したがって、マススペクトルに基づく酵母の分類はハイスルーブット解析に適する可能性が示唆された。

### 4. 今後の展望

本研究により、酵母の発現タンパク質に着目したプロテオーム解析を用いることで、発酵試験を経ずにアルコール産生能の高い有用酵母を選抜・分類できる可能性が示された。今後、その他の糖質化性や香気成分等のファクターを当てはめ、本手法によって特に有用な酵母を効率的に選抜することができれば、実際に自然界から採取した酵母をスクリーニングする際により短時間で有用な酵母を絞ることができるのではないかと考えている。また、本研究ではアルコール産生能の高い酵母で特異的に高発現しているタンパク質を見出すことができた。したがって、これらを遺伝子操作の標的としてアルコール産生能を高めた酵母を開発することで、近年注目されているバイオエタノール生産において生産効率の向上が期待される。今後はマススペクトル解析も進めて、より短時間・低コストで可能なスクリーニング技術の開発を目指して研究を展開する。

本研究で我々が取り組んでいるプロテオーム解析による酵母の分類・同定技術開発は、前例のない新しい試みである。したがって、実用化に向けたさまざまな展開が期待できる研究と思われ、今後は生物工学、特に発酵工学分野において工業的に利用可能な技術として研究の完成を目指していきたい。

### 参考文献

- [1] Matsushika A, et al.: Appl. Microbiol. Biotechnol., 84(1), 37-53 (2009)
- [2] Hou L.: Appl. Biochem. Biotechnol., 160(4), 1084-1093 (2010)
- [3] Marouga R, et al.: Anal. Bioanal. Chem., 382(3), 669-678 (2005)