

過剰発現プロファイリング ADOPT 法を用いた *S. cerevisiae* の ワイン醸造用ブドウ果汁への適応性評価

守屋 央朗・小野千由貴
(農芸化学コース)

Evaluator of adaptability of *S. cerevisiae* to grape juice using the overexpression profiling ADOPT method

Hisao Moriya, and Chiyuki Kohata Ono
Course of Agrochemical Bioscience

The authors have recently developed the overexpression profiling ADOPT method. In the ADOPT method, yeast strains overexpressing most of the genes in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* genome are mixed and competitively cultured, and the genes overexpressed in the enriched strains are systematically identified. Furthermore, the identified genes can be used to identify bottleneck factors that are necessary but lacking for growth of *S. cerevisiae* under given conditions. In our previous studies, we have identified bottlenecks in artificially created stress environments in the laboratory, but in this study, we used grape juice for winemaking as an example to see if industrial bottlenecks can be identified. ADOPT experiments with sulfite-added grape juice used in conventional winemaking resulted in a strong enrichment of strains overexpressing the sulfite pump *SSUI* and its transcription factor *FZF1*. Since enhancement of *SSUI* function is known to occur in wine yeast acclimation, ADOPT was also shown to be useful in the search for industrial bottlenecks. On the other hand, no genes were strongly enriched by ADOPT in grape juice without sulfite addition, suggesting that grape juice is a balanced medium with few bottlenecks for *S. cerevisiae* growth.

Key words : yeast, *S. cerevisiae*, overexpression, wine making

緒 言

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、その高いアルコール発酵能から、ビールやワイン、清酒などのアルコール飲料の醸造にもちいられてきた。これらの醸造環境において、*S. cerevisiae* は様々なストレスに晒され、それが酵母の発酵能力に悪影響を与える¹⁾。しかし、どんなストレスが存在し、それをどのように改善すれば良いかが完全に理解できているとは言いがたい。著者らの研究室では最近、*S. cerevisiae* ゲノムにコードされた約 6,000 種類の遺伝子から、特定の環境において過剰発現が有利に働く遺伝子を組織的に調査できる手法、過剰発現プロファイリング「ADOPT 法」を開発した²⁾(図 1)。ADOPT 法により、酵母が高温や高塩 (NaCl)、抗酸化 (H_2O_2) ストレスへの耐性を過剰発現によって向上させる遺伝子が取得された。また、それら遺伝子の機能から、これらのストレス耐性に必要だが不足している (ボトルネックとなる) 要因が明らかとなった。例えば、高塩ではカルシウムが、抗酸化ストレスでは銅が培地中に不足している事が明らかとなった。一般に、ボトルネックとなる培地成分の特定は試行錯誤に頼るしかなく、ADOPT

法はこれを効率的に「酵母に語らせる」手法であると考えられる。

これまで ADOPT 法は実験室条件でのボトルネックの同定に用いられてきたが、本研究では産業で用いられる条件で ADOPT 法が利用できるかを調査することとした。具体的には、ヨーロッパブドウ (*Vitis vinifera*) 種のマスカット・オブ・アレキサンドリア果汁 (以降、ブドウ果汁) からのワイン醸造におけるボトルネックを ADOPT により同定することを試みた。ワイン醸造に近い亜硫酸添加条件では、亜硫酸耐性遺伝子が取得され、ワイン醸造酵母の馴養により起きるゲノム変化が ADOPT により短期間に実験室で再現できることが分かった。一方、亜硫酸を添加しないブドウ果汁はボトルネックの少ない、酵母にとってバランスのとれた培養環境であることが示唆された。

Received October 2, 2023

Graduate School of Environmental and Life Science,
Okayama University

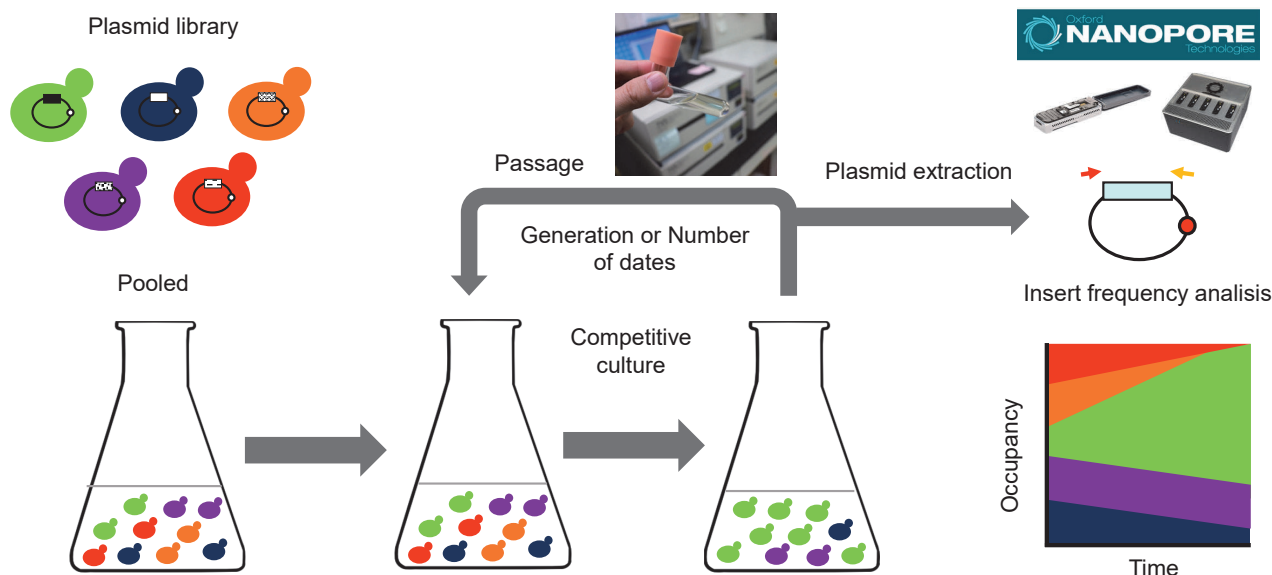


Fig. 1 The ADOPT analysis. Pooled yeast strains carrying overexpressing plasmids covering whole genomic genes of *S.cerevisiae* are competitively cultured. After certain generations or days of culture, the plasmids were extracted from the cell population and the frequency of inserts was analyzed by nanopore sequencing. The occupancies of inserted genes are used to estimate genes whose overexpression is favored for yeast growth in the culture conditions.

方 法

酵母, プラスミド, および酵母ライブラリー

酵母株は BY4741 (*MA Ta his3Δ 1 leu2Δ 0 met15Δ 0 ura3Δ*)³⁾, および BY4743HL (*MA Ta/α HIS3/his3Δ 1 LEU2/leu2Δ 0 MET15/met15Δ 0 LYS2/lys2Δ 0 ura3Δ 0*) (筆者らが作成) を, 過剰発現用プラスミドは pTOW40836⁴⁾ を用いた. ライブラリープール (BY4741-40836, BY4743HL-40836) の構築は佐伯ら²⁾ の方法に従った.

ブドウ果汁, および培地

2021年9月ふなおワイナリー(岡山県倉敷市船穂町)から採取されたマスカット・オブ・アレキサンドリア3房から手絞りでブドウ果汁を取得し, 10,000回転で10分間遠心した. 上清を濾紙, および0.2 μm フィルターで濾過し, 回収液をブドウ果汁(2L)とした. 必要に応じてピロ亜硫酸カリウム(K₂S₂O₅)を10, 50, 100 ppm, ヒスチジン(20 mg/L), ウラシル(8 mg/L), ロイシン(100 mg/L), メチオニン(20 mg/L)を加えた.

培養条件

試験管に培地 2 mL, 凍結保存された BY4741-40836 菌体を 200 μl 播種し, 30°C で一晩振盪培養した. 次に, L 字試験管に対象培地を 5 mL 分注し, 前培養した菌株を 50 μL 添加した. 振とう培養装置 (ADVANTEC 社 TSV062) を用いて 30°C で培養した. 70 rpm で振盪しながら 10分毎に 660 nm で光学密度(OD)を測定し記録した. 増殖曲線が静止期に移行後, 実験毎に 50 μL を新し

い培地 5 mL が入った L 字管に植え継いだ. これを 10日間繰り返した.

プラスミドインサート解析

プラスミドインサートの解析は佐伯ら²⁾の方法に従った. 培養液から菌体を回収しプラスミドを抽出, PCR でインサート配列を増幅後にナノポアシーケンサー (Oxford Nanopore Technologies 社) でリードを取得, その後, ライブラリーに含まれるインサートの出現頻度を 100万リードあたりのリード数 (RPM) として算出した. リードの頻度は円プロットとして描画した.

結 果

培養条件の検討

条件検討のため, ADOPT 法で用いる BY4741 株のブドウ果汁における増殖評価を行った. まず, 栄養要求性の BY4741 株が増殖するために必要十分な栄養源をブドウ果汁が含んでいるかを検討した. 無添加のブドウ果汁では, 40時間まで OD=0.5 程度までの増殖しか見られなかった. そこで, BY4741 株が要求するヒスチジン, メチオニン, ロイシン, ウラシルを添加したところ, 20時間まで OD=2.0 以上まで増殖した (結果示さず). このことから, ブドウ果汁には BY4741 が必要とするこれらの栄養素が十分に含まれていないことが分かった. 次に, BY4741 株がどの程度の亜硫酸耐性を持っているかを検討した. ブドウ果汁に K₂S₂O₅ (0, 1 ppm, 10 ppm, 50 ppm, 100 ppm) を添加した際の増殖を検討した. 結果として, 0, 1 ppm, 10 ppm では増殖阻害が観察されず,

50 ppm で増殖阻害が発生, 100 ppm では増殖が観察されなかった (結果示さず). 50 ppm では阻害が起きるものの増殖してきたことから, $K_2S_2O_5$ 50 ppm を培養条件として設定した. ウラシルはライブラリー用プラスミドの選択マーカー (*URA3*) として供給されることから, ADOPT 実験は, ヒスチジン, メチオニン, ロイシン, および $K_2S_2O_5$ 50 ppm を添加したブドウ果汁を用いて行うこととした.

亜硫酸添加ブドウ果汁の ADOPT による評価

次に, 上述の亜硫酸・アミノ酸添加ブドウ果汁で ADOPT 実験を行った. $K_2S_2O_5$ (50 ppm) およびヒスチジン, メチオニン, ロイシンを添加した培地にライブラリープール (BY4741-40836), およびコントロールとしてプラスミドベクターのみを保持した BY4741 (BY4741+pTOW40836) を用いて ADOPT を行った. これらの株の増殖測定を図 2 A に示す. 2つの株とも24時間後にほぼ OD=2.0 を超えたため, 24時間ごとに植え継いだ. 4 回目の植え継ぎ以降は, ベクターコントロールと比較してライブラリープールの最終 OD が高くなったことから, 何らかの適応が起きたことが示唆された. ライブラリープールに関して, 培養開始時 (0 hr), 植え継ぎ培養 5 日後 (120 hr),

10日後 (240 hr) の細胞液からプラスミド DNA を抽出し, ナノポアシーケンサーを用いて濃縮した遺伝子の解析を行った. その結果を図 2 B に示す. 0 hr ではほとんどの遺伝子が均一に検出されたが, 120 hr では *SSU1* と *FZF1* が, 240 hr では, *SSU1*, *FZF1*, および *MPC1* が 10 万 RPM 以上濃縮した. *SSU1* は細胞外への亜硫酸輸送ポンプをコードしており⁵⁾, *FZF1* は *SSU1* の転写活性化因子をコードしている⁶⁾. *MPC1* はミトコンドリアのピルビン酸トランスポーターをコードしている⁷⁾. これ以外に, 培養 10 日後に 1 万 RPM 以上濃縮された遺伝子として, *HSU1*, *YJR098C*, *YMR090W* が取得された. *HSU1* は最近, 活性の弱いホモシステイン合成酵素をコードし, 過剰発現が *met15* 欠損株での無機硫酸塩による毒性回避に関わることが報告された⁸⁾. *YJR098C* はミトコンドリアに局在する未知のタンパク質をコードしており, *YMR090W* は DTDP-glucose 4,6-dehydratases に類似したタンパク質をコードしている (*Saccharomyces* Genome Database; www.yeastgenome.org). なお, 本論文では BY4741-40836 の 1 回の試行結果しか示していないが, 同様の試行を別のライブラリープールにより 2 回行った際, *SSU1*, *FZF1*, および *HSU1* がすべての実験に共通して濃縮された (データ示さず). このことから,

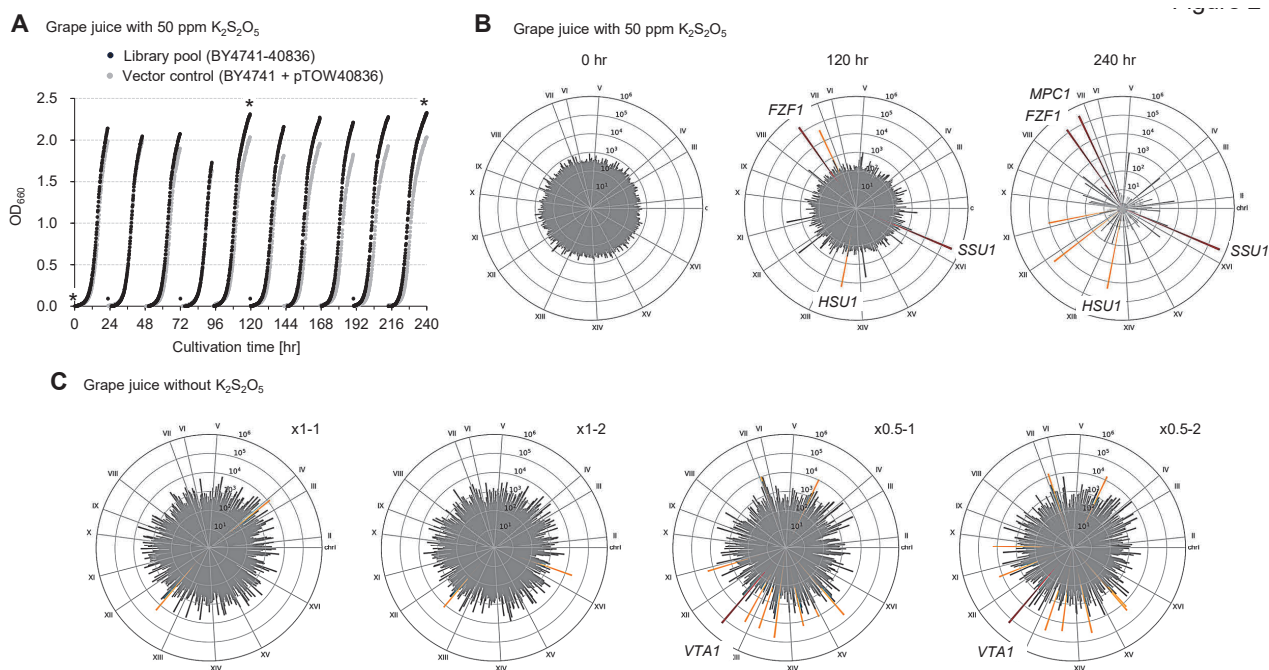


Fig. 2 ADOPT experiment under grape juice. **A**. Growth measurement of the vector control (BY4741+pTOW40836) and the library pool (BY4741-40836) under grape juice with 50 ppm $K_2S_2O_5$. Cultures were transferred into the fresh media every 24 hours. Analyzed samples are shown in asterisks. **B**. Circular plots showing the frequencies of plasmid inserts at indicated culture time under grape juice with 50 ppm $K_2S_2O_5$. **C**. Circular plots showing the frequencies of plasmid inserts after 10 days cultivation (5 passages) under grape juice without $K_2S_2O_5$. In B and C, the frequency is shown as the read number per million reads (RPM). The Roman numerals correspond to the chromosome numbers. Genes strongly enriched (more than 100,000 RPM), and *HSU1* are shown.

本条件で過剰発現が適応的に働く主要な遺伝子は *SSU1*, *FZF1*, *HSU1* であり, これらはすべて亜硫酸耐性に関わることから, これらの遺伝子の過剰発現はブドウ果汁に添加された亜硫酸への耐性を向上させたのだと考えられた。

亜硫酸無添加ブドウ果汁の ADOPT による評価

そこで次に, 亜硫酸を添加しないブドウ果汁で ADOPT 実験を行った。この際, アミノ酸添加の影響をなくすため栄養要求性のない BY4743HL-40836 ライブラリーを用いた。さらに, ブドウ果汁中の制限因子がより際立つと考え, ブドウ果汁をそのままもちいた場合とブドウ果汁を0.5倍に純水で希釈したものをを用いた。希釈培地では増殖が遅くなったため, 48時間ごと5回(10日間)の継代を行い, 複製を2回行った(データ示さず)。図2Cに遺伝子解析の結果を示す。希釈を行わなかったブドウ果汁では遺伝子の強い濃縮は見られなかった。このことは, ブドウ果汁が酵母の増殖にとって過不足のないバランスのとれた条件であることを示唆する。一方, 0.5倍に希釈したブドウ果汁においては, 唯一 *VTA1* が1万RPM以上の濃縮を見せた。*Vtal1* はエンドソームの1つである多包体の形成に関わる⁹⁾。多包体はトランスポーターを含む膜タンパク質のリサイクリングにかかわることから, 膜タンパク質のリサイクリングの活性化がブドウ果汁での適応性を上げる可能性が考えられるが, 詳細なメカニズムを考察するのは現時点では難しい。

考 察

本研究では, 筆者らの研究室で最近開発された過剰発現が有利に働く酵母遺伝子を体系的に取得できる ADOPT 法を用いて, ブドウ果汁における酵母の増殖のボトルネックの同定を試みた。ワイン醸造で通常もちいられる亜硫酸添加のブドウ果汁においては, 亜硫酸耐性に関わる3つの遺伝子 (*SSU1*, *FZF1*, *HSU1*) が得られた。亜硫酸添加により実験室酵母の増殖は低下するので, これらの遺伝子の過剰が耐性を向上させたのだろう。ワイン醸造において亜硫酸は, ブドウ果汁やワインの酸化を防ぐとともに雑菌の繁殖を抑える重要な役割を果たす。*S. cerevisiae* は亜硫酸耐性の酵母であるが, 特にワイン醸造に用いられるものは高い亜硫酸耐性を持つことが知られている^{10,11)}。これは「馴養」と呼ばれる人為的な酵母の選別の結果であり, その一端が *SSU1* の機能強化によりなされている事が知られている^{10,11)}。したがって, 本実験でこれらの遺伝子が取得されたことは予測の範囲を越えない。一方でこの結果は, ADOPT 法が産業環境で酵母が晒されるストレスをうまく浮かびあがらせ, その対処法を示すことの良い概念実証になったとも考えられる。

無添加のブドウ果汁での ADOPT 実験では, 特に希釈せずに行った際には特定の遺伝子の濃縮が起きなかった。

また, 希釈されたブドウ果汁では膜タンパク質のリサイクリングにより増殖が向上することが示唆されたが, 具体的なボトルネックが何かを示すことはできなかった。ADOPT 法の1つの弱点として, このように特定の遺伝子が濃縮されなかったり, 容易にメカニズムが類推できない遺伝子が取得された場合には, 有用な情報が得られないということがある。「ブドウ果汁は酵母に最適な環境である」という結論はそれで良いが, より生産効率を向上させるためには何らかのボトルネックを見つけたい。実際の醸造環境により近く, 酵母にとってより過酷な条件で ADOPT 法を行えば, 何らかのボトルネックが見つかるかもしれない。また, 現在用いている ADOPT 用のライブラリーに用いているゲノムと宿主細胞は, S288C 系の実験室酵母株由来であり, 基本的にはこの株がもつ過剰発現の潜在性しか調査することはできない。今後は, より広範囲の株, 例えば産業界で用いられている株や自然界から単離された株などを対象として ADPOT ライブラリーを構成する事も考えたい。

謝 辞

本研究を行うにあたり, ブドウの収穫, ブドウ果汁の調製, ワイン醸造での亜硫酸条件について指導・助言を頂いた岡山理科大学ワイン発酵科学センター金子明裕教授に感謝する。ブドウを提供頂いたふなおワイナリーに感謝する。研究を多方面でサポートしてくれた岡山大学・守屋研究室のメンバーに感謝する。

文 献

- 1) Stress Biology of Yeasts and Fungi (Springer Japan).
- 2) Saeki, N., Yamamoto, C., Eguchi, Y., Sekito, T., Shigenobu, S., Yoshimura, M., Yashiroda, Y., Boone, C., and Moriya, H. (2023). Overexpression profiling reveals cellular requirements in the context of genetic backgrounds and environments. *PLoS Genet.* **19**, e1010732.
- 3) Brachmann, C.B., Davies, A., Cost, G.J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P., and Boeke, J.D. (1998). Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* **14**, 115-132.
- 4) Makanae, K., Kintaka, R., Makino, T., Kitano, H., and Moriya, H. (2013). Identification of dosage-sensitive genes in *Saccharomyces cerevisiae* using the genetic tug-of-war method. *Genome Res.* **23**, 300-311.
- 5) Park, H., and Bakalinsky, A.T. (2000). *SSU1* mediates sulphite efflux in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **16**, 881-888.
- 6) Avram, D., Leid, M., and Bakalinsky, A.T. (1999). *Fzf1p* of *Saccharomyces cerevisiae* is a positive regulator of *SSU1* transcription and its first zinc finger region is required for DNA binding. *Yeast* **15**, 473-480.
- 7) Herzig, S., Raemy, E., Montessuit, S., Veuthey, J.-L., Zamboni, N., Westermann, B., Kunji, E.R.S., and Martinou, J.-C. (2012). Identification and functional expression of the mitochondrial pyruvate carrier. *Science* **337**, 93-96.
- 8) Van Oss, S.B., Parikh, S.B., Castilho Coelho, N., Wacholder, A.,

- Belashov, I., Zdancewicz, S., Michaca, M., Xu, J., Kang, Y.P., Ward, N.P., et al. (2022). On the illusion of auxotrophy : *met15* Δ yeast cells can grow on inorganic sulfur, thanks to the previously uncharacterized homocysteine synthase Yll058w. *J. Biol. Chem.* **298**, 102697.
- 9) Shiflett, S.L., Ward, D.M., Huynh, D., Vaughn, M.B., Simmons, J.C., and Kaplan, J. (2004). Characterization of Vta1p, a class E Vps protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **279**, 10982-10990.
- 10) Marsit, S., and Dequin, S. (2015). Diversity and adaptive evolution of *Saccharomyces wine yeast* : a review. *FEMS Yeast Res.* **15**. 10.1093/femsyr/fov067.
- 11) Goto-Yamamoto, N., Kitano, K., Shiki, K., Yoshida, Y., Suzuki, T., Iwata, T., Yamane, Y., and Hara, S. (1998). SSU1-R, a sulfite resistance gene of wine yeast, is an allele of SSU1 with a different upstream sequence. *J. Ferment. Bioeng.* **86**, 427-433.

過剰発現プロファイリング ADOPT 法を用いた *S. cerevisiae* の ワイン醸造用ブドウ果汁への適応性評価

守屋 央朗・小野千由貴
(農芸化学コース)

筆者らは最近、過剰発現プロファイリング ADOPT 法を開発した。ADOPT 法では、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* ゲノムのほとんどの遺伝子をそれぞれ過剰発現する酵母株を混合・競合培養し、その過程で濃縮されてきた株が過剰発現している遺伝子を体系的に同定する。さらに同定された遺伝子をたよりに、*S. cerevisiae* の与えられた条件での増殖に必要なだが欠落しているボトルネック因子を明らかにできる。これまでの研究では、実験室で人為的に構築したストレス環境でのボトルネックの同定を行ってきたが、本研究では産業上のボトルネックを明らかにできるかをワイン醸造用のブドウ果汁を例として検証した。通常のワイン醸造に用いられる亜硫酸添加ブドウ果汁での ADOPT 実験は、亜硫酸ポンプ *SSUI* とその転写因子 *FZF1* の過剰発現株が強く濃縮された。*SSUI* 機能の強化はワイン用酵母の馴養でも起きることが知られていることから、産業上のボトルネックを探索する際にも ADOPT が有効であることが示された。一方、亜硫酸添加のないブドウ果汁では ADOPT で強く濃縮された遺伝子は見られず、ブドウ果汁は *S. cerevisiae* の増殖にとってボトルネックの少ないバランスのとれた培地であることが示唆された。