



清酒醪におけるイノシトールの成因と酵母の香気生成能およびエタノール耐性の促進に関する研究

古川, 恵司

(Degree)

博士 (農学)

(Date of Degree)

2005-03-11

(Date of Publication)

2010-07-12

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2798

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002798>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



神戸大学博士論文

清酒醪におけるイノシトールの成因と酵母の香気生成能
およびエタノール耐性の促進に関する研究

平成17年1月

古川 恵 司

目次

| | |
|--|----|
| 序論 | 1 |
| 第1章 酵母の増殖と菌体内イノシトールレベルに与える清酒醪中に存在するイノシトールの影響 | 6 |
| 第1節 序 | 6 |
| 第2節 清酒醸造工程におけるイノシトールの消長 | 6 |
| 第3節 酵母の増殖と形態に与える醪中に存在する遊離および結合型イノシトールの影響 | 10 |
| 第4節 醪中の酵母菌体内イノシトールレベルの変動とその要因 | 15 |
| 第5節 要約と考察 | 20 |
| 第2章 清酒醪においてイノシトールの生成に与える酵母酸性ホスファターゼの影響 | 22 |
| 第1節 序 | 22 |
| 第2節 フィチン分解に与える酵母酸性ホスファターゼの影響 | 22 |
| 第3節 フィチンからのイノシトールの生成に与える原料米成分の影響 | 29 |
| 第4節 フィチン分解に関与する主要酵母酸性ホスファターゼの同定 | 32 |
| 第5節 要約と考察 | 37 |
| 第3章 酵母のカプロン酸エチル生産に与えるイノシトールの影響 | 39 |
| 第1節 序 | 39 |
| 第2節 イノシトール供給量の製成酒カプロン酸エチル含量に与える影響 | 39 |
| 第3節 醪中の酵母のカプロン酸エチル生成活性およびカプロン酸生成量に与えるイノシトールの影響 | 44 |
| 第4節 イノシトールの制限による酵母のカプロン酸生成促進機構の解析 | 49 |
| 第5節 要約と考察 | 59 |

| | |
|--|-----|
| 第4章 酵母の酢酸イソアミル生産に与えるイノシトールの影響 | 62 |
| 第1節 序 | 62 |
| 第2節 イノシトール供給量の製成酒酢酸イソアミル含量に与える影響 | 62 |
| 第3節 酵母のアルコールアセチルトランスフェラーゼ活性と同遺伝子発現に与えるイノシトールの影響 | 66 |
| 第4節 酵母のアルコールアセチルトランスフェラーゼ活性に与える菌体内ホスファチジルイノシトールの影響 | 69 |
| 第5節 要約と考察 | 78 |
| 第5章 酵母のエタノール耐性に与える酵母菌体内イノシトールレベルの影響 | 80 |
| 第1節 序 | 80 |
| 第2節 菌体内イノシトールレベルとエタノール耐性との関係 | 80 |
| 第3節 イノシトールによる酵母H ⁺ -ATPase活性増大とその要因 | 85 |
| 第4節 醪中の酵母のエタノール耐性に与える菌体内イノシトールレベルの影響 | 90 |
| 第5節 要約と考察 | 95 |
| 総括 | 97 |
| 要約 | 101 |
| 英文要約 (Summary) | 103 |
| 文献 | 105 |
| 謝辞 | 114 |

Abbreviations

| | |
|--------|---------------------------|
| AP | acid phosphatase |
| AATase | alcohol acetyltransferase |
| PI | ホスファチジルイノシトール |
| PC | ホスファチジルコリン |
| PE | ホスファチジルエタノールアミン |
| PS | ホスファチジルセリン |
| PG | ホスファチジルグリセロール |
| ICP | intracellular pH |
| OD | optical density |

序論

清酒は「米」を唯一の主原料とするわが国を代表する伝統的醸造産物である。清酒醸造技術を歴史的に眺めると、先人たちによって試行錯誤が繰り返され、清酒製造方法に様々な改良が加えられた結果、清酒の安定的生産、収量あるいは品質の向上を可能とし現在に至っている。この間、確立された製法に対しては様々な研究の結果、その理論的裏付けもなされてきた。しかし今日においてもなお、清酒醸造における諸現象に対しては未解明な点も数多く残されている。

清酒醸造において原料米の一部は蒸きょう（蒸し）後、糖化酵素やタンパク分解酵素の生産を第一の目的として米麴の製造に使用され、他は掛米として蒸米のまま醪の仕込みに使用される。安土桃山時代には、これらの麴米および掛米ともに精白米を使用する、いわゆる諸白といわれる醸造法がみられるようになり¹⁾、江戸時代になると、搗精（精白）した白い米を清酒製造に使う効用が文献にもみられるようになった²⁾。さらに、天保年間には三日三晩水車を利用して連続搗精した高度精白米を用いた酒によって灘酒が名声を高めるなど³⁾、より白い（精米歩合の低い）米で酒を造ることによって清酒の品質を高める技術が確立されてきた。平成14酒造年度における清酒製造のための原料米の精米歩合は全国平均で66.6%であり⁴⁾、特にグレードの高い清酒である本醸造酒および吟醸酒製造の場合には、精米歩合がそれぞれ70%および60%以下であることが清酒の製法品質表示基準において規定されている。また他のアルコール飲料と比較した場合、中国の紹興酒に代表される黄酒やわが国の米焼酎製造に使用される米の精米歩合は一般的に90%程度であり¹⁾、清酒製造法は、米を原料とする酒類の中でも、原料米を高度に搗精する点において他に類をみないものであるといえる。

清酒製造における搗精の目的は、米粒外層部に多く存在し、製成酒の着色や雑味の原因となるタンパク質、脂質、灰分、ビタミンなどを除去することにあるといわれている⁵⁾。一方、フィチン（inositol hexakisphosphate）も米粒外層のアリューロン層に存在するため、精米歩合が低くなるとともにその含量が激減する⁶⁾。しかし、搗精によってフィチンを除去することが清酒の品質にどのように影響するかといった観点から検討された事例はほとんどみられない。フィチンはイノシトールに6つのリン酸がエステル結合した化合物であり、搗精によってフィチンを除去することは、換言すると醪に持ち込まれるイノシトールおよびリン酸量を減少させることに他ならない。このうち、リン酸は酵母の増殖に必要な因子であり、清酒醪における酵母へのリン酸の供給という観点から、米麴由来フィターゼおよび酸性ホスファターゼについての研究がみられる^{7,8)}。この中で、米麴の代替としてフィターゼおよび酸性ホスファターゼ活性のない酵素剤を使用して仕込んだ醪に酸性ホスファターゼを添加すると、醪工程初期の酵母数が20%程

度多くなり、醱酵が促進されることが報告されている。

本研究においては、イノシトールの酵母への供給という観点に立ち、原料米を搗精することによって、清酒醪における酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) へのイノシトールの供給量が制限されること、および醪末期における酵母菌体中のイノシトールレベルの増大が清酒の品質にどのような影響を与えるかを解明することを目的とする。

イノシトールは、酵母の増殖促進物質であるピオス I に含まれる成分の 1 つとして 1928 年に発見された⁹⁾。イノシトールには 9 種類の立体異性体が存在するが、天然に存在するイノシトールのほとんどは myo-イノシトールである。myo-イノシトールはビタミン B 群に分類されている。清酒製造工程中のイノシトールの消長に関する研究は、同工程におけるビタミン類の研究の一環として行われてきた¹⁰⁻¹⁶⁾。最近になって、酵母は *ITR 1* および *ITR 2* でコードされるイノシトール輸送系を持ち、そのうち *ITR 1* がイノシトールの細胞内への取り込みに主要な働きをもつことが明らかにされている¹⁷⁾。一方、酵母菌体においてイノシトールは、glucose-6-phosphate から *INO1* でコードされる inositol-1-phosphate synthase によって inositol-1-phosphate が生合成された後、これがホスファターゼによって脱リン酸されることによって生合成される¹⁸⁾。このように酵母は自らの生体内においてイノシトール合成能を有するので、醪におけるイノシトールの酵母への供給を考察する場合には、原料米から溶出したイノシトールの酵母菌体内への取り込みとともに、酵母自身の生合成も併せて考慮しなければならない。酵母は低温環境下においてはイノシトール要求性を示し、イノシトールが欠乏すると凝集し、死滅することが報告されている¹⁹⁻²¹⁾。本研究では、清酒醪において 15℃ という低温環境下で酵母が健全に増殖し醱酵が順調に営まれるためには、酵母のイノシトール合成能より原料米中のフィチンからのイノシトール供給が重要であること、また醪においてイノシトールの供給は十分ではなく、酵母はイノシトール制限環境下におかれることを見いだしている。

原料米中のフィチンからイノシトールが遊離するためには、イノシトールとリン酸とのエステル結合を酵素分解する必要がある。本研究においては、酵母の生産する酸性ホスファターゼ (AP) がフィチンからイノシトールの遊離を触媒することを明らかにした。酵母の AP は 4 種存在し、構成的発現を示す *PHO 3* 遺伝子および高リン酸環境下において発現が抑制される *PHO 5*, *PHO 11*, *PHO 12* 遺伝子によってコードされる²²⁾。これらの AP は酵母の細胞表層に局在し、一部は菌体外に漏出する。4 つの酵母 AP のうち、現在、優良清酒酵母として全国的に清酒製造に使用されている協会 6 号, 7 号, 9 号, 10 号酵母には構成ホスファターゼ活性が検出されないことが報告されている²³⁾。本研究においては、これらの協会酵母に見いだされている 3 つの抑制性 AP 遺伝子のうち、フィチン分解にい

ずれの遺伝子が最も重要であるかについても検討を行った。

高度に搗精された原料米を使用する清酒醪において、酵母に対するイノシトールの供給が制限されることは、清酒中のイノシトール含量を他の市販アルコール飲料中の含量と比較した結果から類推できる。Table 0-1に示すように、清酒は他の飲料に比べてイノシトール含量が極めて少なく、清酒はイノシトールが制限された環境下で醸される唯一のアルコール飲料であると言える。

本研究においては、原料米を十分に搗精することが清酒の品質に対してどのような影響を与えるかを明らかにするため、搗精によって原料米中の含量が大きく減少するイノシトールに着目した。清酒製造業において原料米価格は製造原価の70%近くを占めることから⁵⁾、精米歩合と清酒の品質との関係について知見を得ることは品質設計の上でも重要であると考えられる。

Table 0-1. Inositol content of commercial alcohol beverage

| Alcohol beverage | n ^a | Inositol (ppm) |
|------------------|----------------|----------------|
| Sake | 50 | 5 |
| Huan jiu | 3 | 210 |
| White wine | 4 | 396 |
| Red wine | 4 | 405 |
| Beer | 4 | 83 |

^a Number of analyzed samples.

イノシトールは清酒醪における醗酵の主役である酵母の増殖因子であるため、清酒の品質に直接影響を与えることが予想される。清酒の「香り」は品質に影響を与える因子の1つであり、芳香成分の多くは、醪において酵母によって生合成される。清酒中の代表的な芳香成分としてはカプロン酸エチルおよび酢酸イソアミルの2つが知られている^{24,25)}。前者は、caproyl-CoAおよびcaproic acidを基質としてそれぞれalcohol acyltransferaseおよびエステラーゼによって、また後者は、acetyl-CoAを基質としてalcohol acetyltransferase (AATase)によって、いずれも酵母菌体内で生合成される²⁵⁾。一般に、吟醸酒のように高度に搗精した原料米を使用して製造した清酒はこれらの芳香成分の含量は高いが²⁴⁾、精米歩合と芳香成分との関係を定量的に調べた研究は報告されていない。

また酵母による芳香成分生成に関する研究としては、酵母の脂肪酸合成反応において、温度を低下させると短中鎖長の脂肪酸の割合が増大することが報告されている²⁶⁾。したがって、吟醸酒製造のように醪を低温下で醗酵させることは、中鎖脂肪酸であるカプロン酸やカプロン酸エチルの生成量を増大させることにつながる。また、AATaseは10℃以上では失活しやすいので、吟醸酒製造において

低温で醗酵を行うことは酢酸イソアミルの生成量を高める要件であるとされている²⁵⁾。さらに、不飽和脂肪酸の豊富な培地で酵母を培養すると酢酸イソアミル生成量が低下すること、その原因として不飽和脂肪酸によってAATase活性が阻害されることが報告されている²⁷⁾。最近、AATaseをコードする*ATFI*遺伝子の発現が不飽和脂肪酸によって抑制されることが明らかにされた^{28,29)}。したがって、搗精によって玄米の外層に多く存在する脂質を除去することは、酢酸イソアミル含量の高い清酒を得る上で有利であると考えられる。

しかし、原料米を搗精すると製成酒の芳香成分の含量が高くなる原因について具体的に実証した研究はみられない。本研究においては、原料米を搗精することによってイノシトールの酵母への供給を制限することが、カプロン酸エチルおよび酢酸イソアミルの生成量を促進するとの仮定のもとに、十分量のイノシトールを添加した醪を調製し、イノシトールを添加しない通常の醪と製成酒の成分および酵母の諸性質の比較を行った。また、イノシトールの供給量が香りに影響を与える機作について解明することにした。

一方、イノシトールを酵母の菌体成分としてみた場合、イノシトールは、ホスファチジルイノシトール (PI) として主要リン脂質を構成する上で不可欠な物質である。また、イノシトールはスフィンゴ脂質の構成成分でもあり、近年、細胞膜における情報伝達物質として注目されている³⁰⁾。清酒醪において酵母菌体のイノシトールレベルは初期は低いですが、日数の経過とともに徐々に増大する。本研究において、醪における酵母菌体へのイノシトールの蓄積が原料由来か、あるいは酵母の生合成によるかを検討した。さらに、イノシトールの清酒品質に与える影響として、酵母の菌体内イノシトールレベルとエタノール耐性との関係について検討した。清酒醪は糖化と醗酵が同時に進行する並行複醗酵形式で進行し、醪中のエタノール濃度は醪末期には20%近くにも達する。このような高濃度エタノールを蓄積する特性は他の醸造では見られない現象である。酵母が醪末期の高エタノール環境下において死滅すると醗酵が停止するので、酵母が高エタノール環境において死滅しにくい性質、すなわちエタノール耐性を有することは製成酒のエタノール収率を高める上で重要である。さらに、酵母がエタノールによって死滅すると、様々な酵母菌体内成分が醪中に漏出するため清酒の呈味に影響を与えることになる。例えば、酵母の菌体内から漏出したカルボキシペプチダーゼが、醪中に残存するペプチドを分解することによって製成酒のアミノ酸含量が増大する^{31,32)}。アミノ酸は清酒特有の味を形成する上で重要な成分であるが、含量が高すぎると清酒の雑味の原因となるため、醪末期における酵母の死滅を防止することは清酒の品質の上でも重要である。

酵母のエタノール耐性に対して様々な角度から研究がなされているが³³⁻⁴⁴⁾、イノシトールとの関連についての研究はみられない。本研究においては、菌体内

イノシトールレベルがエタノール耐性にどのような影響を与えるかを調べた。また酵母細胞膜の H^+ -ATPaseに着目し、菌体内イノシトールレベルがエタノール耐性に影響を与える機作について解明することとした。

本研究の結果、搗精によって原料米中のイノシトール含量を低下させることが清酒の香りを増大させること、および醪工程末期に酵母がイノシトールを生合成し、菌体内イノシトールレベルを増大させることによってエタノール耐性を高めることがわかった。

本論文は序論、第1～5章および総括により構成される。序論では、従来の研究経過と清酒製造におけるイノシトールの役割を研究することの目的や意義を中心に述べる。第1章では、清酒醪中に存在するイノシトールが酵母の増殖と菌体内イノシトールレベルに与える影響について述べる。第2章では、原料米由来イノシトールの生成に与える酵母APの影響について述べる。第3章では、イノシトール制限下においてカプロン酸エチル生成量が増大することについて述べる。第4章では、イノシトール制限に下における酢酸イソアミル生成量の増大について述べる。第5章では、菌体内イノシトールレベルが増大することによるエタノール耐性の増大について述べ、以上の結果を総括において総合的に考察する。

第1章 酵母の増殖と菌体内イノシトールレベルに与える清酒醪中に存在するイノシトールの影響⁴⁵⁾

第1節 序

本章では、清酒醸造工程におけるイノシトールの消長と酵母への供給量を調べるとともに、醪中の酵母菌体内イノシトールレベルの変動とその要因について説明することを目的とする。

始めに、遊離イノシトールおよび加水分解によって遊離型を生じる結合型イノシトールそれぞれが、米および米麴などの原料および醪中にどの程度存在するかを明らかにする。また、それぞれのイノシトールが醪中の酵母の増殖にどの程度利用されるかについて検討し、醪中の酵母は増殖期にイノシトール制限下に置かれることを示す。さらに、酵母菌体内イノシトールレベルが醪日数の経過とともに増大することを示し、この現象が、原料由来イノシトールを酵母が取り込んだ結果によるのか、あるいは酵母の生合成によるかを調べる。

第2節 清酒醸造工程におけるイノシトールの消長

〈方法〉

1) 製麴および醪小仕込み試験

精米歩合70%の白米を用いて蒸米を調製した後、市販種麴を使用し恒温恒湿装置中で常法により製麴を行った⁴⁶⁾。醪は、精米歩合70%白米を原料米として*S. cerevisiae* H11株（日本醸造協会901号の単相体、*INO1*）を使用し、難波らの方法⁴⁷⁾により総米200 gの3段仕込みを行った。また、醪における原料由来イノシトールの溶出量を調べるため、酵母を添加しない仕込み（溶解醪と称する）を醪と同一の条件下で実施した。この時、微生物の増殖を防ぐため、8% (v/v) エタノール溶液を汲み水として使用した。

2) イノシトールの定量

蒸米および米麴などの固体試料中のイノシトールは、大内らの方法⁴⁸⁾にしたがって5倍量の蒸留水で抽出した。このうち、抽出液をそのまま定量に供したものを遊離イノシトール、酸加水分解後定量されるものを易溶性結合型イノシトールとした。また、固体試料を凍結乾燥粉碎した後、酸加水分解し、全イノシトールを定量した。醪上清についても同様に遊離および結合型イノシトールを定量した。さらに、醪全体をそのまま乳鉢でホモジナイズした後、酸分解し、全イノシトールを定量した。酸分解は6 N 塩酸で120℃、30時間行い、分解液をNo.5C濾紙（ADVANTEC、東京）で濾別した。塩酸を留去した後、フェノールレッド溶

液を指示薬として苛性ソーダで中和した。イノシトールは *Hanseniaspora uvarum* IFO 0630株を用いたバイオアッセイ法⁴⁹⁾により定量した。

3) 麴および酵母増殖量の測定

米麴中の麴菌体量は、米麴を4 N塩酸で加水分解した後、麴菌の細胞壁を構成するキチンから遊離するグルコサミンを定量することによって測定した⁵⁰⁾。醪中の酵母生菌数は平板培養法によって測定した。

〈結果〉

1) 原料処理工程におけるイノシトール含量の変化

原料米中のイノシトールは搗精とともに大きく減少した (Table 1-1)。特に搗精の初期には減少の度合いが大きく、全イノシトール含量は、精米歩合70%では玄米の5%まで減少した。また、イノシトールの一部は遊離あるいは易溶性結合型イノシトールとして溶解しやすい形で存在することがわかった。これらは精米歩合90%で最大となり、これ以下では全イノシトールと同様に搗精とともに減少した。

精米歩合70%の白米を洗米、浸漬した後、蒸きょうした時のイノシトール含量を測定した結果をTable 1-2に示す。遊離および易溶性結合型イノシトールが洗米浸漬過程で液中に溶出するため、白米レベルより大きく減少した。

Table 1-1. Changes in inositol content of rice by polishing

| Polishing ratio (%) | Extractive free inositol | | Extractive bound inositol | | Total inositol | |
|---------------------|--------------------------|-------|---------------------------|-------|----------------|-------|
| | content | ratio | content | ratio | content | ratio |
| | (mg/kg) | | (mg/kg) | | (mg/kg) | |
| 100 | 18.0 | 1.000 | 178.0 | 1.000 | 2611 | 1.000 |
| 90 | 31.3 | 1.738 | 492.7 | 2.768 | 1065 | 0.418 |
| 80 | 7.6 | 0.422 | 137.4 | 0.772 | 227 | 0.087 |
| 70 | 4.0 | 0.222 | 17.8 | 0.100 | 123 | 0.047 |
| 60 | 3.4 | 0.188 | 4.0 | 0.022 | 98 | 0.038 |
| 50 | 2.7 | 0.150 | 2.6 | 0.015 | 89 | 0.034 |
| 40 | 2.2 | 0.122 | 0.9 | 0.005 | 66 | 0.025 |

Table 1-2. Changes in inositol content during steeping and steaming of rice

| Sample | Extractive free inositol | | Extractive bound inositol | | Total inositol | |
|---------------|--------------------------|-------|---------------------------|-------|----------------|-------|
| | content | ratio | content | ratio | content | ratio |
| | (mg/kg) | | (mg/kg) | | (mg/kg) | |
| Polished rice | 4.1 | 1.0 | 26.7 | 1.0 | 126 | 1.0 |
| Steeped rice | 1.2 | 0.3 | 7.4 | 0.3 | 102 | 0.8 |
| Steamed rice | 1.0 | 0.2 | 2.7 | 0.1 | 103 | 0.8 |

2) 製麴工程におけるイノシトール含量の変化

製麴工程における米麴中のイノシトール含量を測定した結果を Fig. 1-1に示す。全イノシトール含量が製麴過程の後半に菌体の増殖と連動して急激に増大し、出麴時には取込み時の約2倍に達した。遊離および易溶性結合型イノシトール含量も製麴過程の後半に増大した。このうち遊離イノシトールは増加率が最も大きく、製麴中に元の蒸米の8倍に増加した。

3) 醪中のイノシトールの消長

醪中のイノシトールの消長を、酵母の存在しない溶解醪とともに測定した結果を Fig. 1-2に示す。溶解醪では、醪日数の経過とともに上清中の遊離イノシトールが増大した。これに対して醪では、初期に遊離イノシトールがわずかに増加するが、4日目以降は酵母の増殖とともに酵母菌体中に取り込まれるため減少し、7日目にはほとんど検出されなかった。

上清中の結合型イノシトールは、溶解醪では3日目以降、原料の溶解にともなう液相量の増大によって希釈されるため、徐々に減少するが、その減少量の変化は少なかった。醪上清中の結合型イノシトールは、遊離イノシトールの場合とは異なり、溶解醪との間に大きな差はみられなかった。また、酵母の増殖とは無関係に醪末期まで5 ppm 前後で推移した。

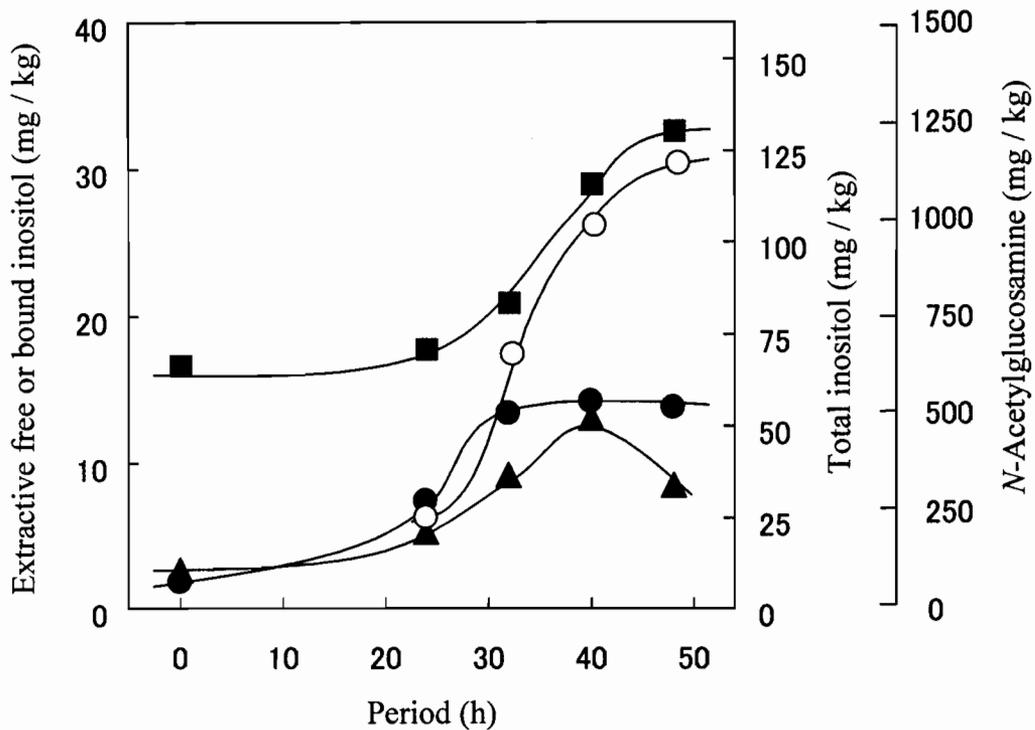


Fig. 1-1. Changes in inositol and *N*-acetylglucosamine contents during *koji*-making process. *Koji* mold was cultured on polished rice for 48 h. Extractive free (●), bound (▲), and total (■) inositols and *N*-acetylglucosamine (○) were determined.

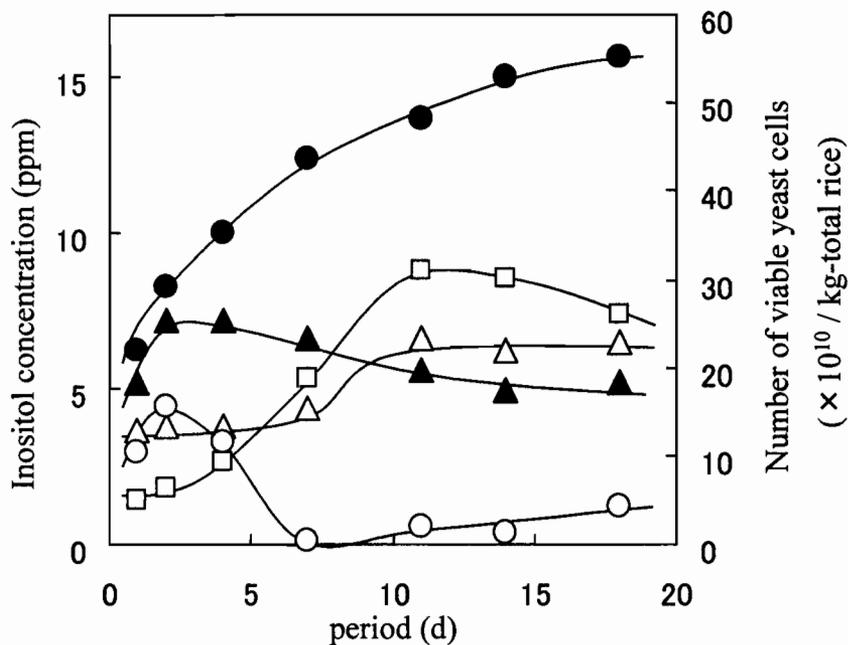


Fig. 1-2. Changes in inositol concentration and number of viable yeast cells in sake mash. Free (○) and bound (△) inositol concentrations in the supernatant and number of viable yeast cells (□) during fermentation of sake mash were determined. Free (●) and bound (▲) inositol concentrations during the dissolution of raw materials omitting yeast were also determined.

第3節 酵母の増殖と形態に与える醪中に存在する遊離および結合型イノシトールの影響

〈方法〉

1) 使用菌株

S. cerevisiae H11株 (*INO1*) およびH11株とイノシトール要求性株, OSF27株 (*ino1*) との交配株より Random-spore-plating法によって得た単相体, OS2727株 (*ino1*) を使用した. なお, OSF27株はONO130A株 (*leu2, met8*) とSH615株 (*ino1, gcn2, gcn3, his1*) を交配し, 上で述べた方法により取得した. SH615株は大阪大学工学部原島俊博士より分与された.

2) 小仕込み試験

本章, 第2節〈方法〉1) で述べた方法によって醪の小仕込みを行った. イノシトールを添加しない通常の醪とともに, 総米200 gあたり125 mgのイノシトールを添加した仕込みを併せて行った. 醪中の酵母は遠心分離法によって分画した⁵⁾. 酵母密度はヘマトメーターによって顕微鏡下で計測した.

3) フィチンおよび醪上清中結合型イノシトールの酵素分解試験

イノシトール生成酵素の活性は, 酵素反応に伴って生成するイノシトールをバイオアッセイ法 (本章第2節〈方法〉2)) で定量することにより測定した. Table1-3に示す反応液を用い, 酵素溶液を添加することにより, 反応を開始した. 反応温度は, フィターゼを使用した場合は55℃, 麴粗酵素溶液を用いた場合は40℃であった. 反応開始1時間後, 生成したイノシトールを定量した. フィチン酸ナトリウム (TYPE V) およびフィターゼ (wheat由来) はSigma-Aldrich製 (St. Louis, USA) を使用した. 醪上清は工業規模の仕込みの留3日目の上清をエタノール留去したものをを用いた. 麴粗酵素は, 米麴より水抽出したものをそれぞれイノシトールが不検出となるまで透析した後, 凍結乾燥して使用した. 基質中の遊離および結合型イノシトールは, 第1章, 第2節〈方法〉2) で述べた方法によって予め定量した.

イノシトール要求性*S. cerevisiae* OSF2727株は次のように培養した. 醪1 ml (遊離型イノシトール0.19 μg および結合型イノシトール5.4 μg を含む) に, 麴粗酵素5 mgを添加し, 0.45 μmフィルターを用いて無菌的に濾過した後, 15℃, 14日間放置し, 15℃, 10日間静置培養した. 麴粗酵素を添加した後, ただちに100℃, 10分間加熱して酵素を失活させたものを対照とした.

Table 1-3. Reaction mixture for inositol liberation assay

| Component | | Final concentration |
|-----------|--------------------------|--------------------------|
| Substrate | Supernatant of sake mash | 9.0 µg/ml (as inositol) |
| | Phytate | 10.7 µg/ml (as inositol) |
| Enzyme | Phytase | 1.25 mg/ml |
| | <i>Koji</i> -enzyme | 6.00 mg/ml |
| Buffer | Acetate buffer (pH 5.15) | 0.1M |

Phytase or *koji*- enzyme was added to the supernatant of sake mash at 3rd day or phytate containing 0.1 M acetate buffer. Reaction was carried out at 55 and 40°C for phytase and *koji*-enzyme, respectively. After 1 h, liberated inositol was determined.

〈結果〉

1) 酵母細胞密度および形態に与えるイノシトール制限の影響

醪において、酵母の増殖に必要な量のイノシトールが供給されているか否かを明らかにするため、通常行われているイノシトール無添加醪の仕込みと、充分量のイノシトールを添加した醪の仕込みを行った。醪中の酵母細胞密度および酵母単位細胞あたりの菌体重量の変化をFig. 1-3に示す。イノシトールを添加した醪中の酵母細胞密度は、増殖の全期間を通じてイノシトールを添加しない醪の1.5倍であった。一方、単位細胞あたりの菌体重量はイノシトール添加醪の方が無添加醪に比べて少なく、この傾向は醪工程末期まで続いた。Fig.1-4に醪工程5日目の酵母の顕微鏡写真を示す。イノシトールの添加によって細胞は小さく、細長くなることがわかった。すなわち、通常の醪ではイノシトールの供給が制限されるため、酵母の増殖が抑えられ、細胞が肥大化することが示された。

2) 醪上清中に存在する結合型イノシトールの酵母による利用性

醪上清中の結合型イノシトール (Fig.1-2) が醪中で直接、あるいは遊離イノシトールにまで分解された後、酵母菌体中に取り込まれ、利用され得るかについて検討した。

原料米中にはフィチンが含まれるので⁹⁾、結合型イノシトールがフィチンあるいはその部分分解物である可能性を考慮し、フィターゼおよび米麴から調製した酵素による分解を試みた。その結果、Table 1-4に示すように、醪上清にフィターゼを作用させた時、遊離イノシトールは生成しなかった。一方、フィチンを基

質として用いた場合は、2.39 µg/mlのイノシトールを遊離した。醪上清にフィチンを添加した場合もこれとほぼ同量のイノシトールを遊離し、その回収率は91%であった。これらの結果から、醪上清中においてイノシトールを遊離しないのは、醪中にフィターゼ活性を阻害する物質が含まれているためではないことがわかった。さらに、醪上清中に存在する結合型イノシトールはフィチンあるいはその部分分解物ではないことがわかった。

麴粗酵素を用いた時、フィチンおよびこれを醪上清に添加した場合にはほぼ同量のイノシトールを遊離したが、醪上清の結合型イノシトールからはイノシトールの遊離がみられなかった。

*S.cerevisiae*を用いて、実際の醪に近い条件下で結合型イノシトール利用の可能性を検討した結果をTable 1-4に示す。醪上清に麴酵素を添加して低温で14日間作用させた後、イノシトール要求性OSF2727株を培養したところ、麴酵素の作用の有無にかかわらずわずかな増殖しか示さなかった (Table 1-5)。しかし、イノシトールを2 ppm標準添加すると十分な増殖を示した。以上の結果より、上清中に存在する結合型イノシトール (5.4 ppm) は、醪中で酵母の増殖に利用されないことがわかった。

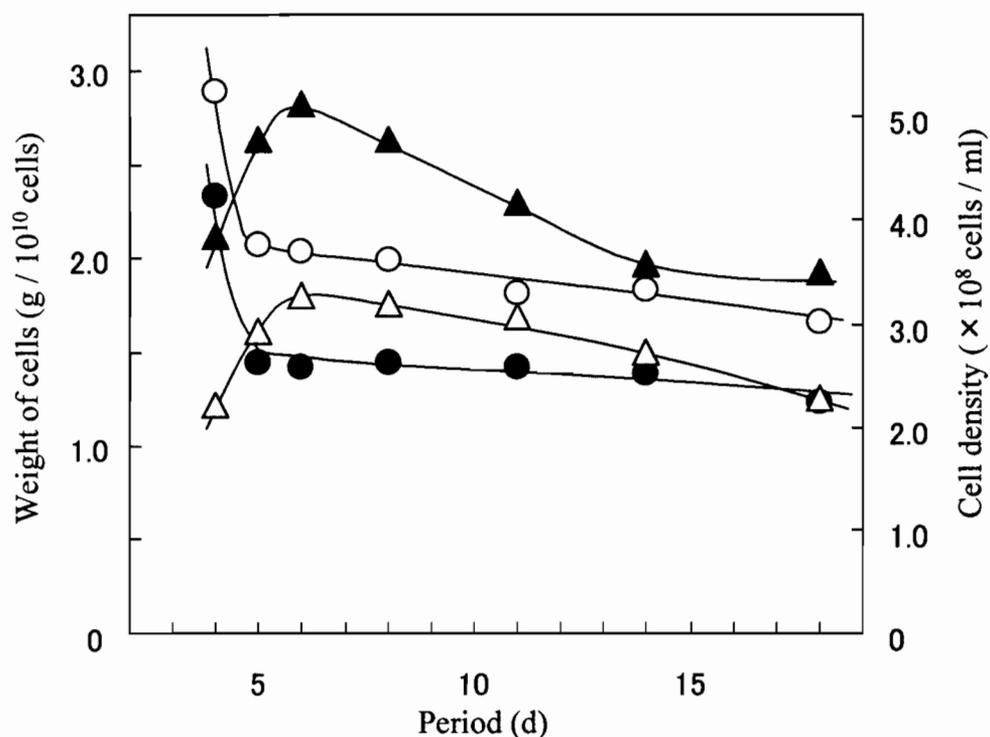


Fig. 1-3. Effect of inositol addition on the weight and density of cells in sake mash. Wet weight (○) and density (△) of yeast cells obtained in sake mash without inositol addition were determined. Wet weight (●) and density (▲) of yeast cells with inositol addition were also determined.

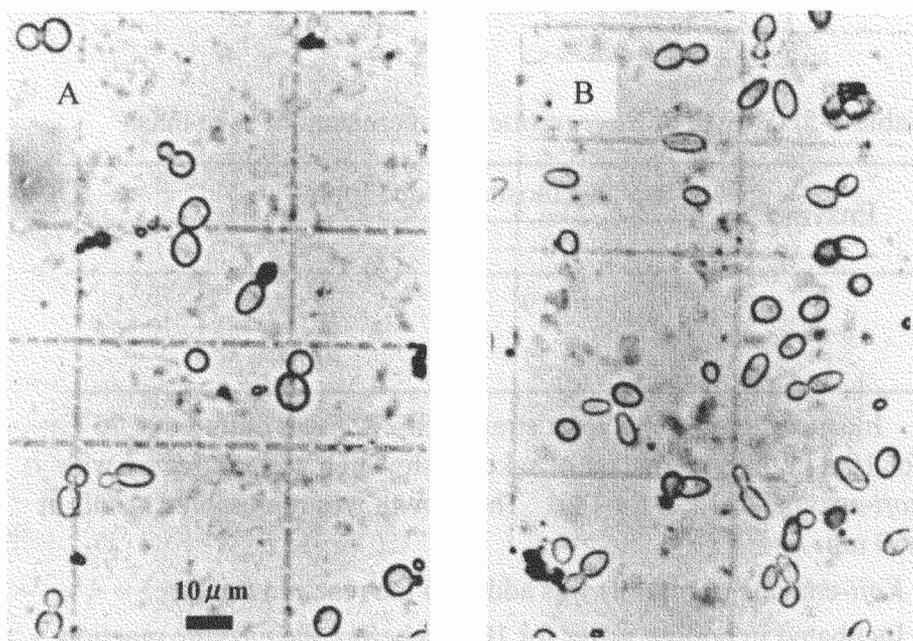


Fig. 1-4. Photographs of yeast cells in sake mash. Sake mash was prepared without (A) or with (B) the addition of inositol. Yeast cells were cultured for 5 day in sake mash.

Table 1-4. Liberation of inositol from bound inositol in supernatant of sake mash

| Enzyme | Substrate ^a | | Liberated inositol ^b (μg) | Recovery (%) |
|--------------------|------------------------|---------|---|--------------|
| | Supernatant | Phytate | | |
| Phytase | + | - | 0 | 91 |
| | - | + | 2.39 | |
| | + | + | 2.17 | |
| <i>Koji-enzyme</i> | + | - | 0 | 110 |
| | - | + | 3.30 | |
| | + | + | 3.64 | |

^a The supernatant of sake mash and authentic phytate contained 9.0 and 10.7 ppm inositol in bound form, respectively, in the reaction mixture.

^b The reaction was carried at 55 and 40°C in the presence of 1.25 mg/ml of phytase and 6 mg/ml of *koji-enzyme*, respectively for 1 h.

Table 1-5. Growth of *S.cerevisiae* in supernatant of sake mash

| Enzyme ^a | Inositol added (ppm) | |
|---------------------|----------------------|------|
| | 0 | 2 |
| - ^b | 0.19 | 2.92 |
| + | 0.22 | 2.61 |

Inositol auxotrophic yeast strain OSF2727 was cultured at 15°C for 10 d in the supernatant of sake mash which was pretreated with *koji-enzyme* at 15°C for 14 d. The growth was represented as OD at 660 nm.

^a *Koji-enzyme* (5 mg/ml) was added to the reaction mixture.

^b Incubated in boiling water for 10 min before the enzyme reaction.

第4節 醪中の酵母菌体内イノシトールレベルの変動とその要因

〈方法〉

1) 使用菌株および小仕込み試験

第1章，第3節〈方法〉1)で述べたH11およびOSF2727株を用いて，第1章，第3節〈方法〉2)に述べた方法によりイノシトール無添加および添加醪の小仕込み試験を行い，醪中の酵母を分画した．また第1章，第2節〈方法〉1)で述べた方法によって溶解醪を調製した．

2) 酵母無細胞抽出液の調製

約 2×10^9 の酵母細胞を 20 mMリン酸緩衝液 (pH 7.2) に懸濁した．懸濁液 0.75 mlを直径0.5-0.75 mmのガラスビーズ1.1 gと混合し，マルチビーズショッカーMB-200 (安井器械，大阪)を用いて4℃，30秒の条件下で4回運転し，細胞を破碎した．破碎液を3000 rpm，10分間遠心分離し，上清を無細胞抽出液とした．

3) イノシトールの定量

醪から分画した酵母を凍結乾燥した後，第1章，第2節〈方法〉2)で述べた方法によって塩酸で加水分解し，菌体内イノシトール含量を測定した．また，酵母無細胞抽出液中のイノシトールを定量し，菌体内遊離イノシトールとした．醪中の全イノシトールおよび醪上清中の遊離および結合型イノシトール，ならびに蒸米および米麴中の全イノシトール含量は第1章，第2節〈方法〉2)に述べた方法により定量した．

4) inositol-1-phosphate synthase活性測定法

酵母無細胞抽出液をウルトラフリーC3LTK (日本ミリポア，東京)により脱塩した後，5 mM glucose-6-phosphateを基質としてCulbertsonらの方法⁵²⁾に準じて30℃，30分間反応を行った．これに1 mlあたりアルカリホスファターゼ (タカラバイオ，大津) 6 unitsを添加し，40 mMトリス緩衝液 (pH 9.0) 中で37℃，1時間反応させてinositol-1-phosphateをイノシトールに変換した．1時間に1 μgのイノシトールを生成させる酵素量を1 unitと定義した．比活性はタンパク質1 mg当たりのunit数で示した．タンパク質はローリー法⁵³⁾により定量した．

〈結果〉

1) 醪中酵母の菌体内イノシトール含量

イノシトール無添加の通常の醪から分画した酵母菌体内のイノシトール含量を測定し、イノシトール添加醪と比較した。Fig. 1-5に示すように、イノシトール添加醪では初期から酵母菌体内イノシトール含量 (4 mg/g) は高く、以後ほぼ一定値で推移した。これに対し無添加醪では、初期は菌体内イノシトール含量 (2 mg/g以下) は低いが、日数の経過とともに増大し、上槽時にはイノシトール添加醪より高くなった。このうち、菌体内遊離イノシトール含量は、イノシトール添加醪ではほとんど変化がなく推移し、無添加醪では醪工程初期に含量が低く、末期に増大し、添加醪より高くなった。醪工程末期にイノシトール無添加醪酵母の菌体内イノシトール含量が添加醪を上回るのは、遊離イノシトールの蓄積によるものであった。

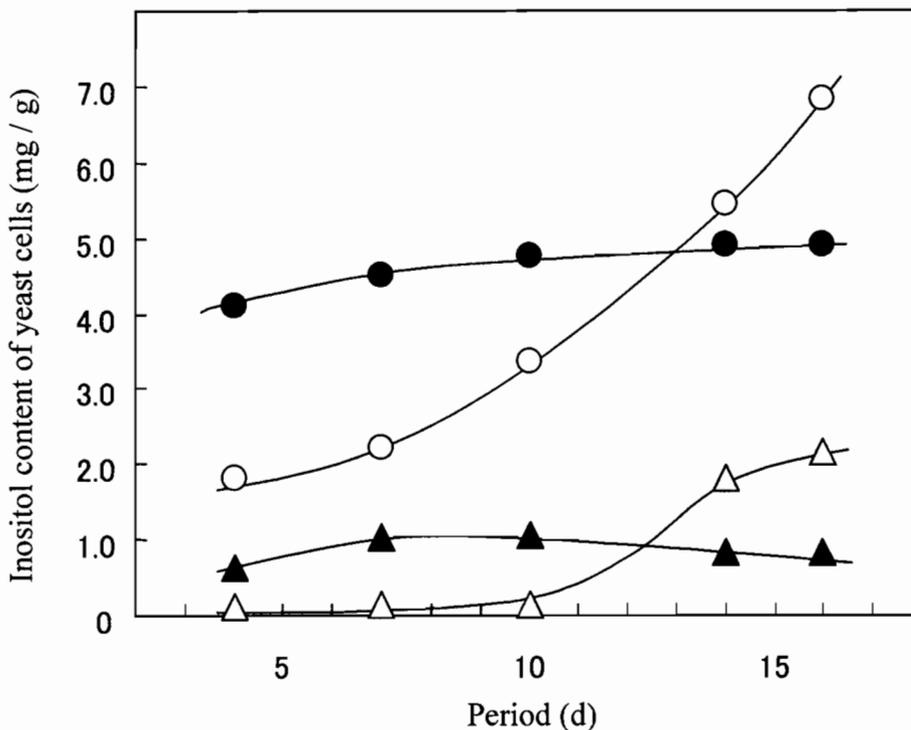


Fig. 1-5. Changes in inositol content of yeast cells in sake mash. Total (○) and free (△) inositol contents of yeast cells obtained in sake mash without inositol addition were determined. Total (●) and free (▲) inositol contents of yeast cells in sake mash without inositol addition were also determined.

2) 醪酵母イノシトール含量の増大要因

醪および溶解醪の全イノシトール含量を経時的に測定した結果をFig. 1-6に示す。溶解醪では全イノシトール含量に変化がみられないのに対して、酵母が関与する醪では菌体内イノシトールレベルの増大 (Fig. 1-5) に呼応して全イノシトール含量が後半に増大した。

さらにイノシトール合成能のないOSF2727株を用いて醪を仕込み、合成能を有するH11株を用いた醪と比較した。醪の各部位 (醪全体、酵母画分、および上清) に占めるイノシトール含量を総米1 kgの仕込みに相当する量として算出し、原料 (米麴および蒸米) 由来の量と比較した結果をFig. 1-7に示す。H11株では醪中の全イノシトール含量は仕込み1日目では麴および蒸米から由来する量に等しいが、18日目には大きく増大した。1日目から18日目にかけての醪の全イノシトールの増加量は酵母菌体に占めるイノシトール含量の増加量とほぼ一致した。18日目の醪上清に残存するイノシトール含量が醪全体のイノシトール含量に占める割合はわずかであった。これに対してイノシトール生合成能をもたないOSF2727株では醪の全イノシトール含量は18日目において1日目と差がなく、酵母菌体に占めるイノシトール含量はH11株に比べると顕著に低かった。

次にイノシトール添加および無添加の醪を同様に調製し、菌体内イノシトール含量を測定した。Fig. 1-8に示すようにOSF2727株はイノシトールを十分に添加した時は、H11株とイノシトール含量にほとんど差が見られなかったが、イノシトール無添加の場合にはH11株と異なり、7日目から18日目にかけてのイノシトール含量の増加は見られなかった。

Fig. 1-6, Fig. 1-7, Fig. 1-8に示す結果から、醪工程における菌体内イノシトール含量の増大は原料からの取り込みによるものではなく、大部分は酵母のイノシトール生合成によることがわかった。

3) 醪中の酵母のイノシトール生合成酵素活性

イノシトール添加および無添加醪の酵母から調製した無細胞抽出液について inositol-1-phosphate synthase活性を測定した結果をFig. 1-9に示す。イノシトール添加醪では本酵素は抑制を受け、ほとんど活性が検出されなかった。これに対してイノシトールを添加しない通常の醪では活性が認められ、特に7日目以降において高活性であった。

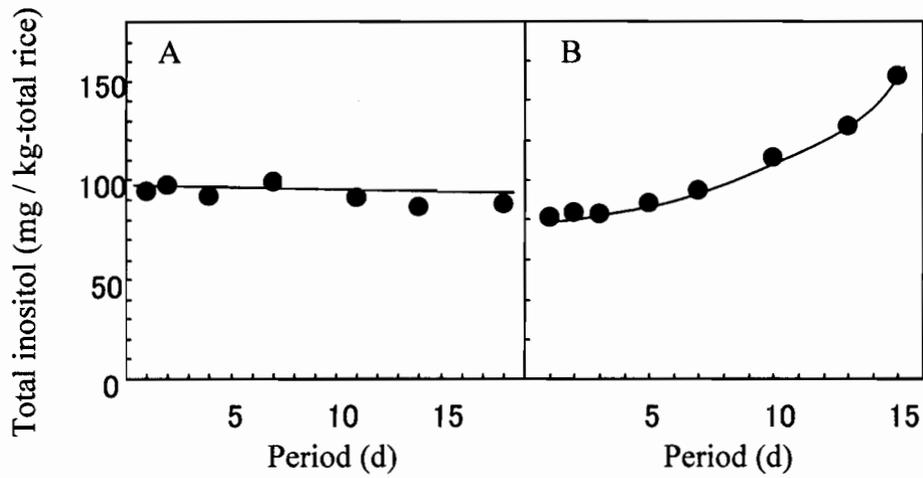


Fig. 1-6. Changes in the amount of total inositol during dissolution of raw materials (A) and fermentation of sake mash (B)

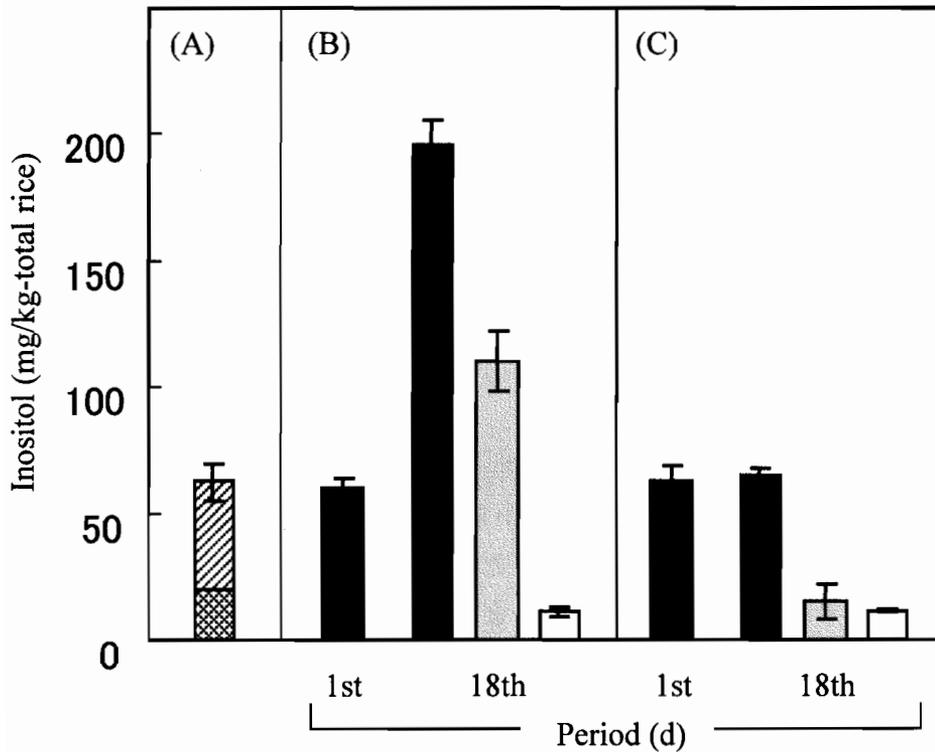


Fig. 1-7. The amounts of inositol in raw materials and the sake mash. The amounts of inositol derived from raw materials (A) and several parts of sake mash prepared with strain H11(B) and OSF2727(C) were determined. Each value was based on sake mash prepared with 1 kg of total rice. Symbols: , rice koji; , steamed rice; , total; , yeast cells; , the supernatant.

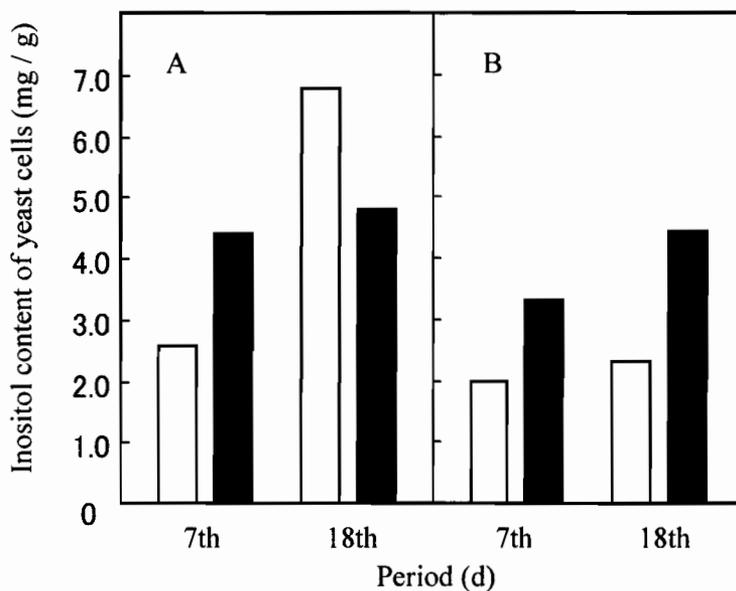


Fig. 1-8. Changes in inositol content of yeast cells during fermentation of sake mash. Sake mash was prepared without (□) or with (■) inositol addition using strains H11(A) and OSF2727 (B).

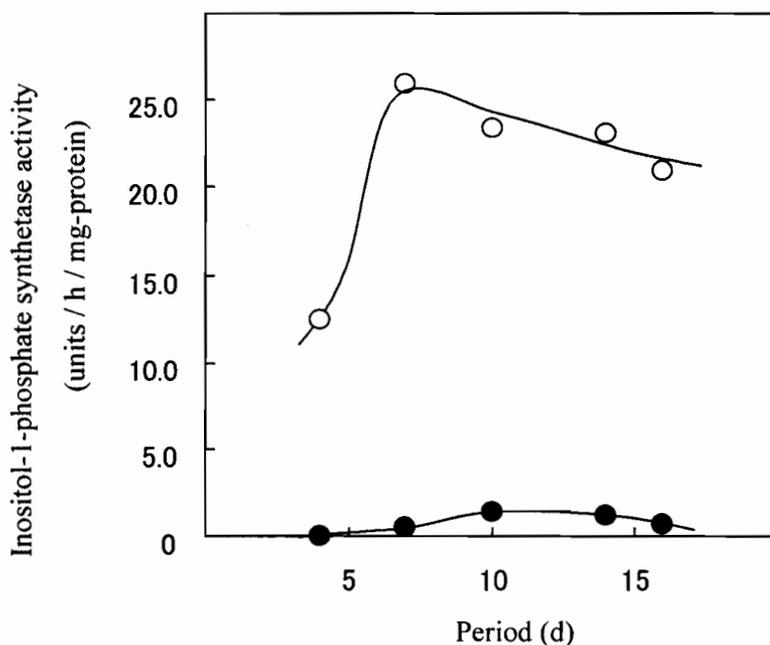


Fig. 1-9. Changes in inositol-1-phosphate synthetase activity of yeast in sake mash. Sake mash was prepared with strain H11 without (○) or with (●) inositol addition.

第5節 要約と考察

〈要約〉

原料米中のイノシトール含量は、搗精が進むにつれ大きく減少した。清酒醪の仕込みには高度に搗精された原料米が使用されるため、酵母へのイノシトールの供給は制限された。その結果、通常清酒醪では十分量のイノシトールが添加された醪に比べて、酵母の増殖は制限を受けた。さらに酵母の増殖期である醪工程初期において酵母の菌体内イノシトールレベルは低く抑えられた。しかし、菌体内イノシトールレベルは日数の経過とともに増大し、醪工程末期においては十分量のイノシトールを添加した醪を上回った。醪工程末期における酵母菌体内イノシトールの増大は原料から遊離したイノシトールを酵母が取り込むためではなく、酵母の生合成によるものであった。

〈考察〉

原料米を搗精することによってイノシトール含量が大きく減少した。これは玄米においてイノシトールが糊粉層にフィチンとして存在するためであり⁵⁴⁾、一般に精米歩合70%付近あるいはそれ以下の高度精白米を原料とする清酒醸造において、イノシトールの原料米からの供給量は少なかった。中でも、醪中で容易に溶出し酵母に利用される遊離イノシトールは洗米、浸漬工程でさらに減少した。一方、製麴中に全、遊離、易溶性結合型イノシトールは増大した。このうち、全イノシトールの増大は麴菌の生合成によると考えられる。製麴中の遊離イノシトールの増加率は大きく、麴の遊離イノシトール含量はもとの蒸米の8倍に達した。製麴中の遊離イノシトールの増大は原料米のフィチンが麴の酵素作用によって分解を受けたためであると考えられる。フィチンの酵素分解によるイノシトールの遊離については第2章で述べる。清酒醸造において原料米の約20%は麴の製造に使用され、残りの80%が蒸米のままの形で醪の仕込みに使用される。麴と蒸米の使用比率から計算すると、製麴過程において遊離イノシトールが8倍に増大することから、醪に持ち込まれる遊離イノシトールのうち、2/3が米麴に、1/3が蒸米に由来すると考えられる。

醪上清には遊離イノシトールおよび結合型イノシトールが存在した。結合型イノシトールの構造は不明であるが、フィターゼや麴由来の酵素によって遊離型にまで分解されることはない。また、直接酵母に取り込まれて増殖に利用されることもない。したがって、酵母の増殖に与える影響としては、遊離イノシトールに着目すべきである。醪において遊離イノシトールは米麴および蒸米から持ち込まれ、さらに麴酵素による原料溶解過程において徐々に溶出するが、これらは酵母によって容易に取り込まれ、酵母の増殖とともに急激に減少し、7日目にほとんど

ど消失した。この結果は、通常の清酒醪においてはイノシトールの供給が制限されることを示しており、イノシトールを十分に添加した醪に比べると、酵母細胞数も抑えられ、細胞自体もやや大きくなるなどの現象が見られた。合成培地で酵母を培養した時、イノシトールの欠乏によって細胞が肥大し、球形に近くなることが報告されている⁵⁵⁾。また、酵母はイノシトールが欠乏すると凝集し、死に至ることも報告されている^{18,56)}。清酒醪においても、イノシトール制限下では、酵母は死に至ることはないものの、増殖量や細胞形態に影響を受けることが確認できた。醪にイノシトールを添加すると、醗酵が促進されることが報告されており⁵⁷⁾、本研究においても同様の現象が見られた。これはイノシトールの添加により、酵母細胞の密度が増大したことによると考察した。

醪において、イノシトールの供給を制限すると醪初期に酵母の菌体内イノシトールレベルは低く抑えられたが、増殖が進むにつれてイノシトールレベルの増大が見られた。醪全体のイノシトール含量が醪工程末期に増大すること、イノシトール合成能のない酵母では菌体内イノシトールレベルの増大がみられないことから、醪酵母菌体内イノシトールレベルが末期に増大するのは原料から溶出するイノシトールを酵母が取り込むことによるのではなく、酵母自身が生合成した結果であることが判明した。

酵母のイノシトール合成酵素 *inositol-1-phosphate synthase* をコードする *INO1* 遺伝子は、増殖環境中のイノシトールが低濃度である時は発現するが、十分にイノシトールが存在する場合には抑制を受けることが報告されている⁵²⁾。本研究において、イノシトールを添加しない通常の醪で酵母中に *inositol-1-phosphate synthase* 活性が認められたことは、この報告のデータを支持するものである。また、イノシトール無添加醪において、本酵素活性が後半に増大したことは、菌体内イノシトールレベルがこの時期に増大した結果とよく一致している。

酵母は、醪のような低温条件下ではイノシトール要求性を示すため、酵母の増殖期である醪初期においては原料からのイノシトール供給が必要である。しかし、定常期である醪末期においては *inositol-1-phosphate synthase* の作用によりイノシトールが合成され菌体内に蓄積されるようになる。菌体内に蓄積されたイノシトールの大部分は結合型イノシトールであったことから、これらはPIなどに変換され、菌体構成成分として利用されると考えられる。

以上のように、醪工程初期において酵母はイノシトールの供給を原料からの溶出に依存し、エタノール濃度が高くなり増殖が停止する醪工程末期においては、酵母自身が生合成したイノシトールは菌体中に蓄積され、菌体内イノシトールレベルを増大させると結論した。

第2章 清酒醪においてイノシトールの生成に与える酵母酸性ホスファターゼの影響⁵⁸⁾

第1節 序

本章では、清酒醪において酵母の増殖には原料米中のフィチン由来イノシトールの供給が必要であることを示し、フィチンを分解する酵素として酵母の生産するAPに着目し、この役割を明らかにすることを目的とする。

また、フィチンの分解に与える原料米中のデンプンやタンパク質の影響についても検討する。

一般に、酵母は *PHO5*, *PHO11*, *PHO12* にコードされる3つの抑制APと *PHO3* にコードされる構成APを持つ。このうち *PHO5* は酵母の主要APをコードする遺伝子であり⁵⁹⁾, *PHO11* と *PHO12* は3塩基のみが異なるほとんど同一の遺伝子である。協会7号, 9号酵母に代表される優良清酒酵母では, *PHO5* とその下流に存在する *PHO3* が融合遺伝子を形成している (*PHO5-3* と称する) ため²²⁾, 構成APを持たない²³⁾。本章では *PHO5*, *PHO5-3*, *PHO11*, *PHO12* の4つの抑制 *PHO* 遺伝子のうちフィチンの分解に対して主要な役割を担う遺伝子を特定する。

第2節 フィチン分解に与える酵母酸性ホスファターゼの影響

〈方法〉

1) 培養および醪小仕込み試験

酵母液体培養および醪小仕込みのため、清酒酵母, *S. cerevisiae* 日本醸造協会901号 (K901) を使用した。

Hayashidaらの培地⁴⁴⁾ において炭素源を10% (w/v) グルコースに置き換え、イノシトールおよび KH_2PO_4 を省いたものを基本培地とし、これに低リン酸および高リン酸培地として KH_2PO_4 を、それぞれ21.5 ppmおよび1500 ppm 添加した培地で酵母を静置培養した。低リン酸培地, 高リン酸培地のいずれにおいても、十分量のカリウム (1,700 ppm KCl) を添加した。

清酒醪の小仕込みを、難波らの方法⁴⁷⁾ により総米50 gの3段仕込みで行った。麴を使用した通常の仕込み (麴歩合23%) および麴の代替として醸造用酵素剤を用いた酵素剤仕込みを行った。醸造用酵素剤として、コクミラーゼ剣 (日本資糧工業, 東京) およびプロテアーゼM (天野エンザイム, 名古屋) を総米1 kgあたり, それぞれ1 gおよび0.27 g使用した。それぞれについて総米1 kgあたり1,350 mgの KH_2PO_4 を添加して酵母APを抑制した醪と KH_2PO_4 を添加しない醪を調製した。以上4通りの醪についてイノシトール無添加の醪とともに, 総米1 kgあたり125 mgのイノシトールを添加した醪を調製した。蒸米および麴ともに

精米歩合70%の原料米を使用した。醪中の酵母生菌数は平板培養法によって測定した。

2) 麴および酵母酵素の調製

米麴中の酵素を0.5% (w/v) NaClで抽出したものを麴酵素とした。また、酵母K901株を、イノシトールとして10 ppmを含むフィチン添加低リン酸培地で15°C, 12日間培養した上清を酵母酵素とした。麴酵素および酵母酵素ともに、PM10膜(分画分子量10,000)を使用して限外濾過(グレースジャパン, 東京)によって透析および濃縮した。

3) 酵素活性測定

AP活性はTorrianiらの方法⁶⁰⁾により, 10 mM *p*-nitrophenylphosphateを基質として酵素反応によって生成する*p*-nitrophenolを定量することにより測定した。1時間に1 μmoleの*p*-nitrophenolを遊離する酵素量を1 unitとした。

フィチン分解活性は, 酵素反応に伴って生成する無機リン酸を定量することにより測定した。2 mM フィチン酸ナトリウム (Sigma-Aldrich) を基質として0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 4.0) 中で酵素溶液を添加することにより, 反応を開始した。35°C, 1時間反応させた後, 反応液と等量の20% (w/v) トリクロロ酢酸を添加して反応を停止し, 反応液中の無機リン酸をAllen法⁶¹⁾により定量した。1時間に1 μmoleの無機リン酸を遊離する酵素量を1unitとした。

〈結果〉

1) 液体培養における培地リン酸濃度のフィチン利用性に与える影響

酵母がフィチンを分解し, イノシトールとして利用できるかを検討するため, 構成APを持たないK901株²³⁾をイノシトール, フィチン(いずれもイノシトールとして10 ppm添加)、イノシトールとフィチンの両方を添加した計3種の培地(それぞれイノシトールとして10 ppm添加)、および両方を含まない培地について, 低リン酸あるいは高リン酸培地を用いて15°Cで静置培養し, 増殖量を経時的に測定した。

Fig. 2-1に示すように, リン酸濃度がいずれの場合も, イノシトールおよびフィチン無添加の場合にはほとんど酵母の増殖はみられなかった。低リン酸培地では, フィチンを添加すると酵母はよく増殖し, さらにイノシトールを添加しても増殖量は変わらなかった。

一方, 高リン酸培地においては, イノシトールを添加することにより良好な増殖を示したが, フィチンのみを添加した場合には, イノシトール無添加の場合と同様にほとんど増殖がみられなかった。酵母はAP発現条件下である低リン酸環

境下でのみフィチンをイノシトール源として増殖に利用することがわかった。

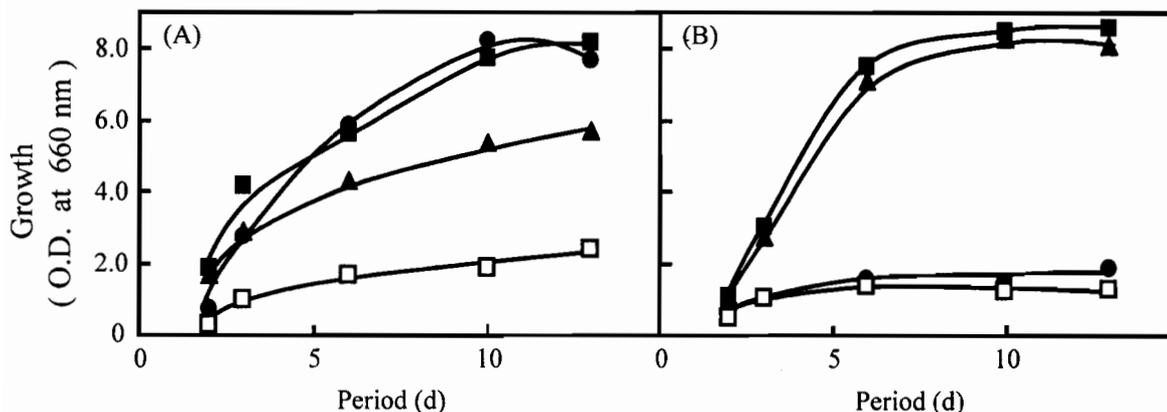


Fig. 2-1. Effect of phytate on yeast growth. (A) Low phosphate culture (21.5 mg/l KH_2PO_4 was added) (B) high phosphate culture (1,500mg/l KH_2PO_4 was added). Symbols : □, no addition ; ▲, inositol; ●, phytate; ■, inositol and phytate. Each addition contained 10 mg/l as inositol.

2) 醪における酵母APおよび麴酵素の酵母の増殖に与える影響

清酒醪におけるイノシトール生成に麴および酵母APがどの程度寄与するかを明らかにするため、麴を使用した通常の醪の仕込みおよび麴を醸造用酵素剤で代替した酵素剤仕込みを行った。 KH_2PO_4 およびイノシトールを添加した醪と無添加の醪を調製した。醪工程6日目の酵母細胞密度および酵母菌体AP活性を測定した結果をFig. 2-2に示す。

イノシトール無添加の場合でも、 KH_2PO_4 を添加しない時は麴、酵素剤仕込みともに酵母は 10^8 /ml以上まで増殖した。一方、 KH_2PO_4 を添加した時は麴、酵素剤仕込みいずれの場合にも酵母のAPの生合成は抑制され、麴仕込みでは 10^8 /ml以上まで増殖がみられたのに対し、酵素剤仕込みでは増殖量は著しく低下した。いずれの醪においても、酵母の増殖制限因子であるイノシトールを添加した時、菌数は増加した。

以上のように KH_2PO_4 を添加して酵母APを抑制した場合、麴仕込みでは酵母が十分に増殖したのに対して、フィチン分解酵素が生合成されない酵素剤仕込みでは²⁰⁾ 増殖量が低下した。酵素剤仕込みでも KH_2PO_4 を添加しないで酵母APが誘導生産された場合には酵母は増殖を示した。

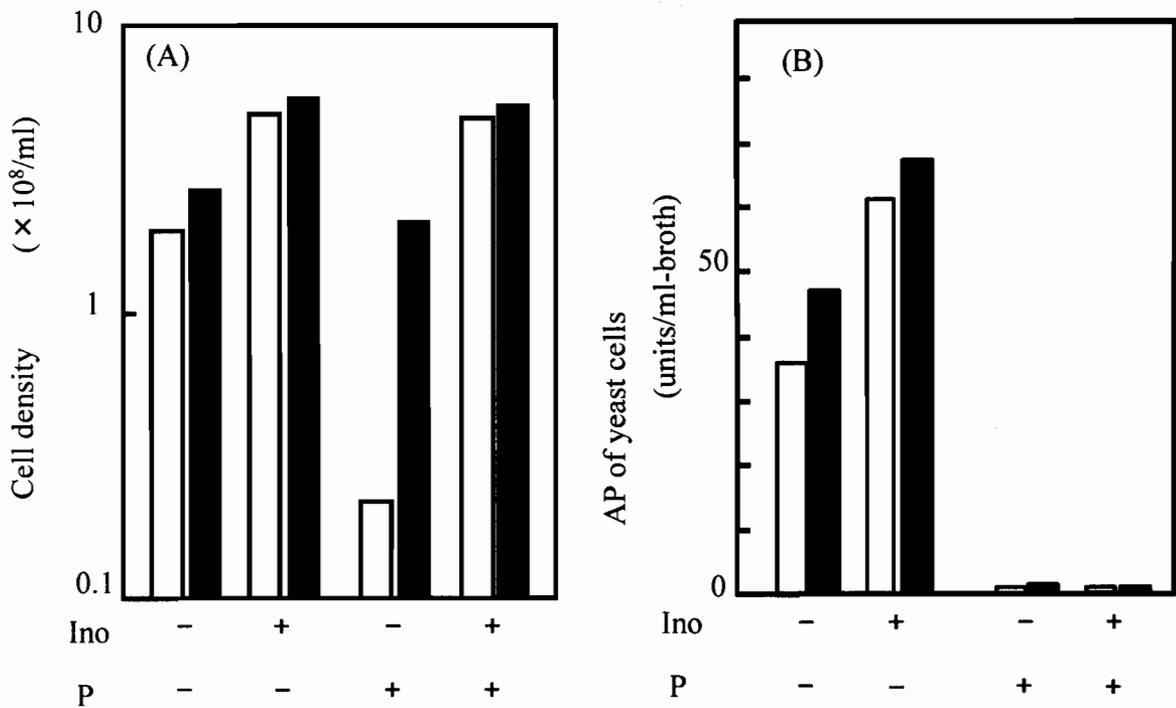


Fig. 2-2. Effect of phosphate on cell density and AP activity of yeast cells in sake mash at 6th day. (A) Cell density. (B) AP activity. Sake mash was prepared with (+) or without (-) the addition of inositol (Ino) and KH_2PO_4 (P). Commercial brewing enzyme preparation (□) or koji (■) was used for the dissolution of rice.

3) 醪上清中のフィチン分解活性

麴酵素と酵母酵素のフィチン分解活性を種々のpHで測定したところ、両酵素のpHプロファイルは大きく異なり、酵母酵素はpH 4.0において、麴酵素はpH 6.0においてそれぞれ最大活性を示した (Fig. 2-3). pH 4.0とpH 6.0における相対活性の比 (pH 6.0/pH 4.0) は酵母酵素で0.03, 麴酵素で2.70であった.

したがって、酵母および麴由来の酵素が混在する試料について、pH 4.0とpH 6.0で活性測定を行い、以下の式にもとづいて醪環境であるpH 4.0におけるそれぞれのフィチン分解活性を算出することができた.

$$Y = (2.7a - b) / 2.67 \quad (1)$$

$$K = (-0.03a + b) / 2.67 \quad (2)$$

Y: 酵母由来のpH 4.0におけるフィチン分解活性 (unit/ml), K: 麴由来のpH 4.0におけるフィチン分解活性 (unit/ml), a: pH 4.0におけるフィチン分解活性

測定値, b: pH 6.0におけるフィチン分解活性測定値

次に醪の小仕込みを行い, 式(1)および式(2)を用いて醪上清の酵母および麹由来のフィチン分解活性を算出した. Fig. 2-4に示すように, 麹由来の分解活性は仕込み3日目に最高値を示し, その後, 日数の経過とともに減少した. これに対して, 酵母由来の分解活性は醪初期には麹由来の活性の約1/3程度であったが, 日数の経過とともに増大し, 8日目以降は麹由来の活性を上回った.

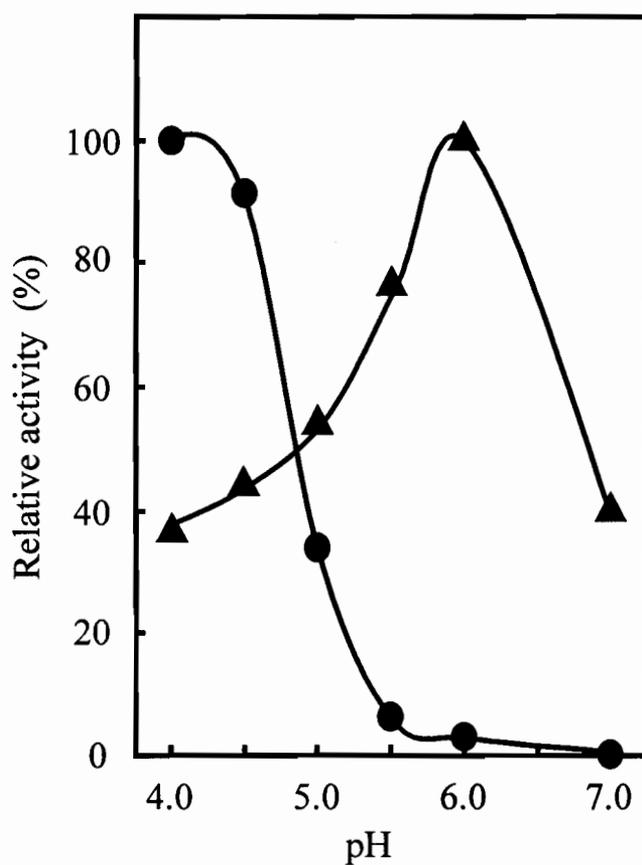


Fig. 2-3. Effect of pH on phytate hydrolyzing activity of yeast (●) and koji (▲). Yeast and koji-enzymes were prepared as described in the method section.

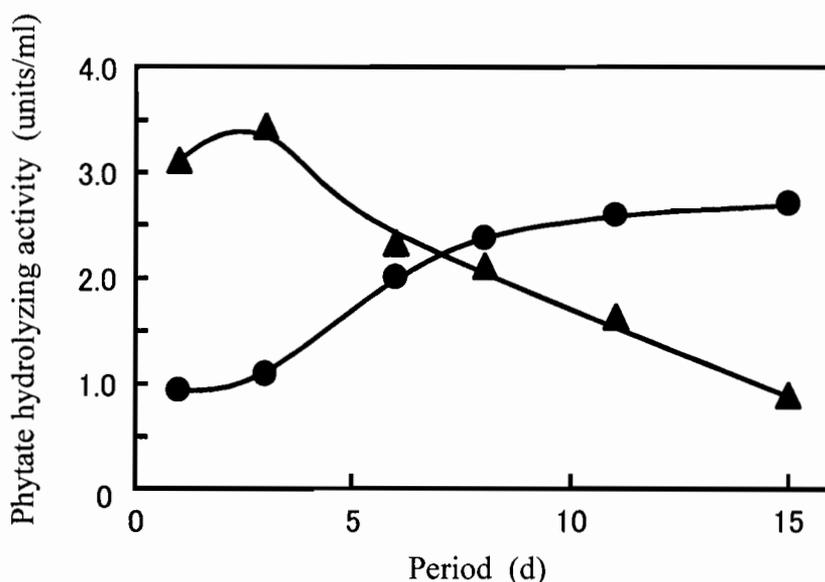


Fig. 2-4. The change of phytate hydrolyzing activity in the supernatant of sake mash. Sake mash was prepared using koji for dissolution of rice and the phytate hydrolyzing activity of yeast (●) and *koji* (▲) in the supernatant at pH 4.0 were calculated .

4) 酵母の増殖に与える酵母細胞表層APの影響

KH_2PO_4 を添加して酵母APの発現を抑制した醪，およびリン酸を添加しない醪を酵素剤仕込みで調製し，それぞれについて汲水1 mlあたりAPとして0-18 unitsの酵母酵素を添加した．醪工程6日目に上清AP活性および酵母生菌数を測定した結果をFig. 2-5に示す．

KH_2PO_4 添加および無添加いずれの醪においても，酵母AP添加量の増大とともに酵母生菌数も増大したが，APを発現し酵母細胞表層にAPが存在するリン酸無添加醪は，上清AP活性に対する生菌数が細胞表層にAPが存在しないリン酸添加醪を上回った．このことから醪において酵母菌体細胞表層に局在するAPも原料からのイノシトールの生成に効果があることがわかった．

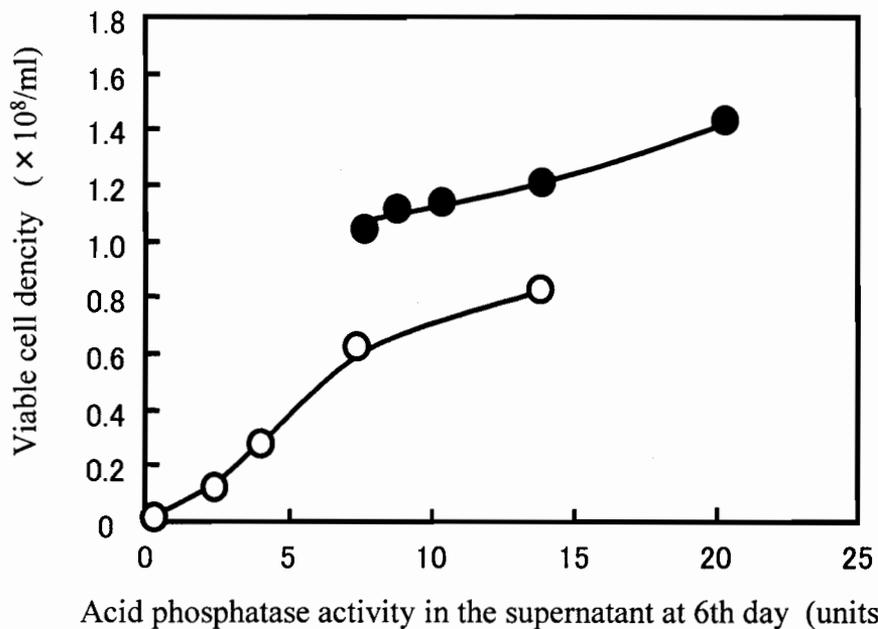


Fig. 2-5. Plot of viable cell density against AP activity in the supernatant of sake mash at 6th day. Sake mash, in which commercial brewing enzyme was used, was prepared with (○) or without (●) the addition of KH_2PO_4 . Yeast-enzyme (0.18 units/ml as AP) was added to each sake mash.

第3節 フィチンからのイノシトールの生成に与える原料米成分の影響

〈方法〉

1) 粉碎蒸米の調製

精米歩合70%の白米を用いて蒸米を調製した後、95℃で一晩乾燥した。これを高速振動試料粉碎機TI-100（平工製作所，いわき）により粉碎した。

2) 蒸米からのイノシトール生成試験用酵素

蒸米中のデンプンおよびタンパク質を分解するため、それぞれクライスターゼM5（大和化成，滋賀）およびペプシン（和光純薬，大阪）を使用した。コクミラーゼ剣（日本資糧工業，東京）とプロテアーゼM（天野エンザイム，名古屋）を等量混合したものを醸造用酵素剤として使用した。米麴酸性プロテアーゼはGomiらの方法⁶²⁾により精製した。麴および酵母酵素は第2章，第2節〈方法〉2) に示す方法によって調製した。

3) 原料米の分析

フィチン態イノシトールは以下の方法によって酵素分解した後、遊離したイノシトール定量することによって分析した。すなわち、試料1 mlに麴酵素450 μ g（APとして8.6 unitsを含む）およびペニシリン・ストレプトマイシン混液（Cambrex Corp., East Rutherford, NJ, USA）5 μ lを添加し、0.2 M酢酸緩衝液（pH4.0）中で、35℃，3日間反応後、生成するイノシトールを第1章，第2節〈方法〉2) に示す方法によって定量した。この時、麴酵素を添加せずに同様に操作して得られたブランク値を差し引いた。

全糖は2.3%（w/v）塩酸で100℃，2.5時間加水分解後、生成するグルコースを食品醗酵用分析装置AS-200（エイアンドティー，横浜）によって定量し、デンプン価に換算して表示した。全窒素量はケルダール法によって定量した。

〈結果〉

フィチンが醗中で液相中に遊離して存在するかどうかを調べるため、粉碎処理した蒸米をpH 4.0の酢酸緩衝液中に55℃で一晩放置し、上清に可溶化されたフィチンを定量した。Table 2-1に示すように、緩衝液中に蒸米を放置しただけでは上清中にフィチンは溶出せず、蒸米中のフィチンは不溶性の状態が存在することがわかった。

また、蒸米中のデンプンやタンパク質の分解がフィチンの液相への溶出に与える影響について検討するため、蒸米にクライスターゼまたはペプシンをpH 4.0で一晩作用させた後、上清のフィチンを定量した（Table 2-1）。本試験で使用し

た蒸米乾物 1 gあたりのデンプンおよび全窒素含量はそれぞれ890 mgおよび9.46 mgであり、クライスターゼおよびペプシンを一晩作用させることによって、蒸米中のデンプンおよびタンパク質のそれぞれ88%および89%が分解された。デンプンが分解されてもフィチンの溶解はみられなかったが、タンパク質が分解された時、蒸米1 g あたり約10 μ g のフィチンが液相中に可溶化された。米麴から精製した酸性プロテアーゼを作用させた場合にもフィチンの溶出がみられた。以上の結果から、蒸米中のタンパク質の分解によって、フィチンは液相中に可溶化されることがわかった。

蒸米を Table 2-1に示す方法によってクライスターゼで処理した残渣を基質として麴酵素または酵母酵素をペプシンあるいは醸造用酵素剤とともに作用させ、35 $^{\circ}$ C、20時間反応させた後、上清に遊離するイノシトールを定量した。麴酵素および酵母酵素を添加せずにペプシンあるいは醸造用酵素剤のみを作用させた時の値をblankとして差し引いた結果をTable 2-2に示す。酵母酵素単独では麴酵素を単独で作用させた場合に比べてイノシトールの生成量は低いですが、これにペプシンを共存させると、イノシトール生成量は飛躍的に増大した。また酵母酵素に醸造用酵素剤をあわせて添加した場合も、イノシトール生成量は増大した。プロテアーゼ活性が存在する麴酵素の場合には、酵母酵素の場合に比べてペプシンや醸造用酵素剤添加の影響は小さかった。

以上のことから、酵母APによって蒸米から効率よくイノシトールが生成するためには、蒸米中のタンパク質が分解されることによってフィチンが液相中に可溶化されることが必要であることがわかった。

Table 2-1. Effect of the degradation of starch and protein on the solubilization of phytate in steamed rice

| Enzyme | Degraded starch | Degraded protein | Solubilized phytate |
|--------------------------|-----------------|------------------|---------------------|
| | (mg/g rice) | (N mg/g rice) | (μ g/g rice) |
| No addition | 123 | 1.47 | 0 |
| Kleistase | 783 | 0.53 | 0 |
| Pepsin | 118 | 8.42 | 10.1 |
| Kleistase+Pepsin | 814 | 8.35 | 9.0 |
| Kleistase +Koji-protease | — ^a | 7.91 | 8.5 |

Milled steamed rice (5% (w/v)) was incubated with 0.5% (w/v) Kleistase , 0.25% (w/v) pepsin and/or *koji*-protease in 0.1M acetate buffer (pH 4.0) at 55°C overnight. *Koji*-protease extracted and purified from rice *koji* was added at the concentration of 5×10^2 units/ml. All values were indicated as the amount per gram of dry steamed rice.

^aUndetermined.

Table 2-2. Synergetic effects of commercial enzymes with the enzymes from yeast and *koji* on inositol liberation

| Enzyme | Added (mg/g steamed rice) | Liberated inositol (μ g/g steamed rice) | |
|---------------------|---------------------------|--|---------------------|
| | | Enzymes: from yeast | <i>Koji</i> -enzyme |
| None | — | 3.4 | 9.8 |
| Pepsin | 19 | 10.0 | 13.0 |
| Sake brewing enzyme | 1 | 7.3 | 9.6 |

After steamed rice was treated with Kleistase to remove starch as described in Table 2-1, pepsin or sake brewing enzyme (an equal mixture in weight of kokumilase-tsurugi and protease M) was added with yeast- or *koji*-enzyme (7 units/ml as AP) and incubated for 20 h at 35°C and pH 4.0. The amount of liberated inositol was then assayed.

第4節 フィチン分解に関与する主要酵母酸性ホスファターゼの同定

〈方法〉

1) 使用菌株および培養

清酒酵母として *S.cerevisiae* 日本醸造協会 901号 (K901) および701号 (K701) 由来のUT-1株 (*trp1/trp1, ura3/ura3*)⁶²⁾を, 実験室株としてX2180-1A (Yeast Genetic Stock Center : *MATa, SUC2, mal0, gal2, CUP1*) を使用した. UT-1株は東京大学大学院北本勝ひこ博士より分与された.

フィチン添加あるいは無添加の高リン酸および低リン酸培地は本章, 第2節〈方法〉1) に示す方法に従って調製した.

2) 麴および酵母酵素の調製

酵母をイノシトールとして10 ppmを含むフィチンを添加した低リン酸あるいは高リン酸培地で15°C, 12日間培養した. 麴酵素および酵母酵素は本章, 第2節〈方法〉2) に示す方法により調製した.

3) 酵素活性測定

フィチンからのイノシトール生成活性は, 酵素反応に伴って生成するイノシトールを定量することによって測定した. 50 μ M フィチン酸ナトリウム (P3168, Sigma-Aldrich) を基質として, 0.1 M酢酸緩衝液 (pH 4.0) 中でAP活性として1.5 units/mlの酵母酵素を添加することにより反応を開始した. 15°C, 1および3時間反応させた後, 100°C, 10分間加熱して反応を停止し, 反応液中のイノシトールを第1章, 第2節〈方法〉2) に示す方法によって定量した.

フィチン分解活性およびAP活性は第2章, 第2節〈方法〉3) に示す方法によって測定した.

4) イノシトールリン酸の調製

inositol bisphosphate, inositol trisphosphate, inositol tetrakisphosphate, inositol pentakisphosphateは, inositol hexakisphosphate (フィチン) の酵素部分分解物より以下の方法によって調製した⁶⁴⁾.

塩酸でpH 5.0に調整した1% (w/v) フィチン酸ナトリウム (P3168, Sigma-Aldrich) 溶液1 lにフィチン分解活性として5,600 unitsの麴酵素をを添加し, 35°C, 8時間反応させた後, 100 mlの2.4% (w/v) 塩酸を添加して反応を停止させた. 反応液をDOWEX 1-X8 (200-400 mesh, Cl型; ムロマチテクノス, 東京) イオン交換カラム (1.6×63 cm) に130 ml/hで送液し, 溶離液の塩酸濃度を48時間後に1.2 Nまで直線的に高めることによってイノシトールリン酸を溶出

した。溶離液を25 mlずつ分取し、6 N塩酸で120℃、30時間分解した後、遊離する無機リン酸を本章、第2節〈方法〉3)で述べた方法に従って定量することにより、イノシトールリン酸の溶出をモニターした。得られた各画分について同様に塩酸で分解を行い、遊離したイノシトールとリン酸のモル比よりイノシトールリン酸の分子種を決定した。本法により、inositol trisphosphate, inositol tetrakisphosphate, inositol pentakisphosphateを得た。また、フィチン分解活性12,700 unitsの麴酵素を添加し17時間反応させた後、上記と同様に分画し、inositol bis-phosphateを得た。なおinositol tetrakisphosphateおよびinositol pentakisphosphateはイオン交換クロマトグラフィーにおいてそれぞれ溶出時間の異なる2つの異性体が多量に得られたので、これらを基質として使用した。

inositol monophosphateはSigma-Aldrich製 (I 5250) を使用した。

5) 酵母AP遺伝子のクローニングと構成発現株の構築

DNA操作は*Escherichia coli* HB 101を宿主として用い、Hanahanの方法⁶⁵⁾により形質転換した。酵母はエレクトロポレーション法⁶⁶⁾によって形質転換した。PCRにはKOD DNA polymerase (東洋紡, 大阪) を、制限酵素*Bam*H Iはタカラバイオ製をそれぞれ使用した。DNAシーケンシング用の試料はAutoRead™ Sequencing Kit (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA) を用いて調製した。シーケンシングはALFred DNA sequencer (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて行った。

酵母抑制性AP遺伝子*PHO5*および*PHO11*を、各 Open reading frame (ORF) に*Bam*H Iサイトを付加したプライマーを設計し、PCRによって増幅した。*PHO5*はX2180-1A株の染色体DNAを、*PHO11*および*PHO12*はK901株の染色体DNAをそれぞれ鋳型としてPCRで増幅した。なお融合遺伝子、*PHO5-3*はK901株染色体DNAを鋳型として*PHO5*の5'側プライマーと*PHO3*の3'側プライマーを用いてPCRを行った。使用したプライマーを以下に示す。

PHO5 5': 5'-CCCg gatccAATGTTTAAATCTGTTGT

PHO5 3': 5'-CCCg gatccTATTGTCTCAATAGACTGG

PHO5-3 5': 5'-CCCg gatccAATGTTTAAATCTGTTGT

PHO5-3 3': 5'-CCCg gatccTTATTGTTTAAATAGGGTAT

PHO11 5': 5'-CCCg gatccAATGTTGAAGTCAGCCGT

PHO11 3': 5'-CCg gatccTATTTACTGTTTAAATAAAGTG

*PHO11*の塩基配列は*PHO12*と3塩基を除いて同一であるため、クローニング後、シーケンスを行って*PHO11*と*PHO12*を同定した。しかし得られた5クローンすべて*PHO11*であったので、*PHO12*のORF (1~1,404bp)の外側で*PHO11*と配列の異なる部分 (-694~1,742bp) について以下のプライマーを設計した。

PHO12 5':5'-AAGCGTAATTAAGGTGAGAAA

PHO12 3':5'-ATTCTTTTCACATCATAACCCA

これらのプライマーでK901株染色体DNAを鋳型にPCRを行ったが、増幅産物は得られなかった。そこで、X2180-1A株の染色体DNAを鋳型としてPCRを行い、得られたPCR産物を鋳型とし、さらに*PHO11*の増幅に使用した*Bam*H Iサイトを付加したプライマーを用いてPCRを行った。得られたクローンについてシーケンスを行い、*PHO12*遺伝子であることを確認した。

PCRで増幅した*PHO5*, *PHO5-3*, *PHO11*および*PHO12*遺伝子を *Bam*H I消化後、構成発現ベクターpG-1⁶⁷)に導入した。それぞれを用いてUT-1株を形質転換し、P5, P5-3, P11, P12株を得た。対照としてpG-1ベクターをUT-1株に導入し、G1株を得た。

〈結果〉

1) 各*PHO*遺伝子発現株のフィチン利用性

PHO5, *PHO5-3*, *PHO11*および*PHO12*を構成発現させた株（それぞれP5-3, P5-5, P11およびP12）をG1株（対照）とともにフィチン添加および無添加の低リン酸または高リン酸培地で静置培養した。増殖量およびAP活性をFig. 2-6に示す。G1株はFig. 2-1に示したK901株の場合と同様、低リン酸培地ではAPを誘導しフィチンを増殖に利用できたが、高リン酸培地ではフィチンを利用できなかった。酵母の主要AP遺伝子である*PHO5*⁵⁹⁾ および*PHO5-3*を発現させたP5およびP5-3株は、高リン酸培地において最もAP比活性が高かったが、フィチン添加と無添加の間にほとんど増殖量の差がみられなかった。これに対してP11およびP12株はAP比活性は低いが、フィチンの添加によって増殖量が顕著に増大し、G1株をフィチン添加低リン酸培地で培養した場合を上回った。以上の結果から、*PHO11*および*PHO12*はAP遺伝子としては低レベルの発現しか示さなかったが、フィチン存在下での増殖に最も寄与することがわかった。

また、G1株を低リン酸培地で、P5, P5-3, P11, P12株を高リン酸培地でそれぞれ培養した上清から粗酵素を調製し、APとしてそれぞれ1.5 units/mlをフィチンに作用させた時のイノシトール生成活性を測定したところ、Fig.2-7に示すように、イノシトール生成活性はP5およびP5-3株由来APが最も低く、P11とP12株由来APが高い値を示した。これらの結果は、Fig. 2-6に示す増殖への効果と一致した。

さらに、Fig. 2-7において使用した各酵母酵素のうちG1, P5, P5-3, P11由来酵素について、APとしてそれぞれ0.5 units/mlを各種イノシトールリン酸に作用させた。リン酸の生成を指標に分解活性を測定し、AP測定に使用した基質である*p*-nitrophenyl phosphateの分解活性に対する相対活性を求めた結果をTable

2-3に示す. いずれのイノシトールリン酸に対してもP11由来酵素は最も活性が高く, Fig. 2-7に示すように本酵素がフィチンからのイノシトール生成活性が高いのは, フィチンの部分分解産物全てに対しての分解活性が高いことによることがわかった.

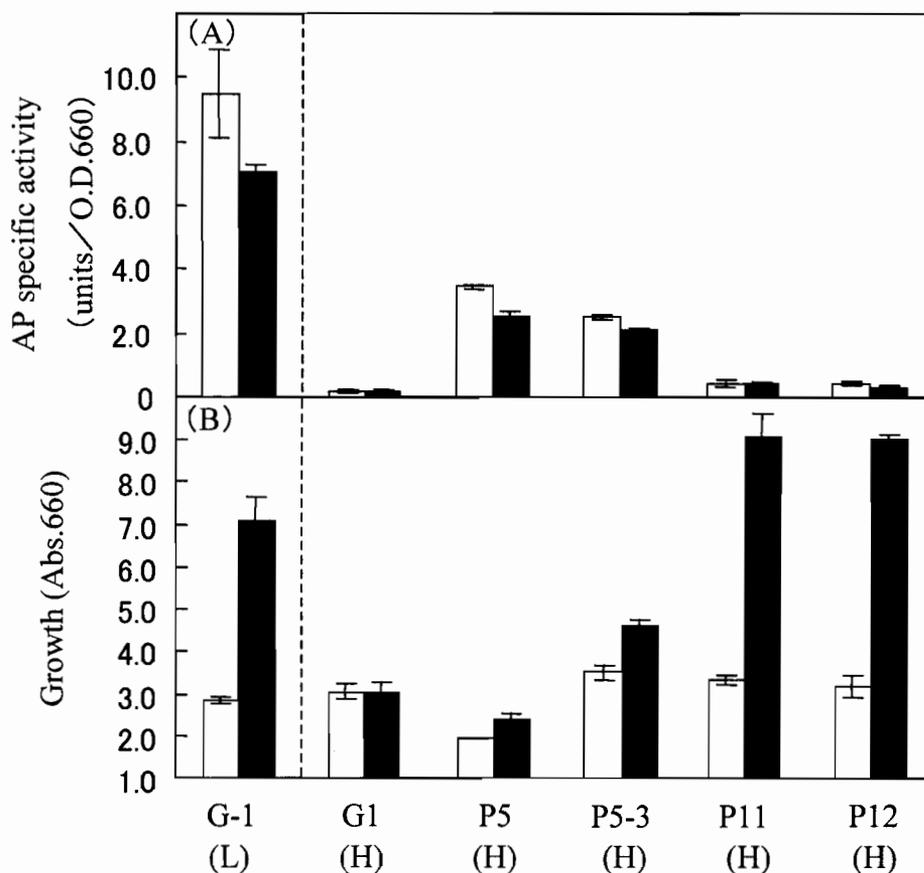


Fig. 2-6. Effect of the expression of *PHO* gene on the growth in the culture supplemented with or without phytate. (A): AP specific activity. (B): growth (OD at 660 nm). Strains P5, P5-3, P11, and P12 which expressed *PHO5*, *PHO5-3*, *PHO11*, and *PHO12* genes constitutively, respectively, were cultured in high (H) phosphate medium. G-1 in which pG-1 vector was introduced, was cultured as control in both low (L) and high (H) phosphate media. Each strain was cultured at 15°C for 10 d with (■) or without (□) phytate (10 mg/ml as inositol). Specific activity was represented as AP (units/ml) per growth (OD660). Data represented mean values of three independent experiments and bars indicate SD.

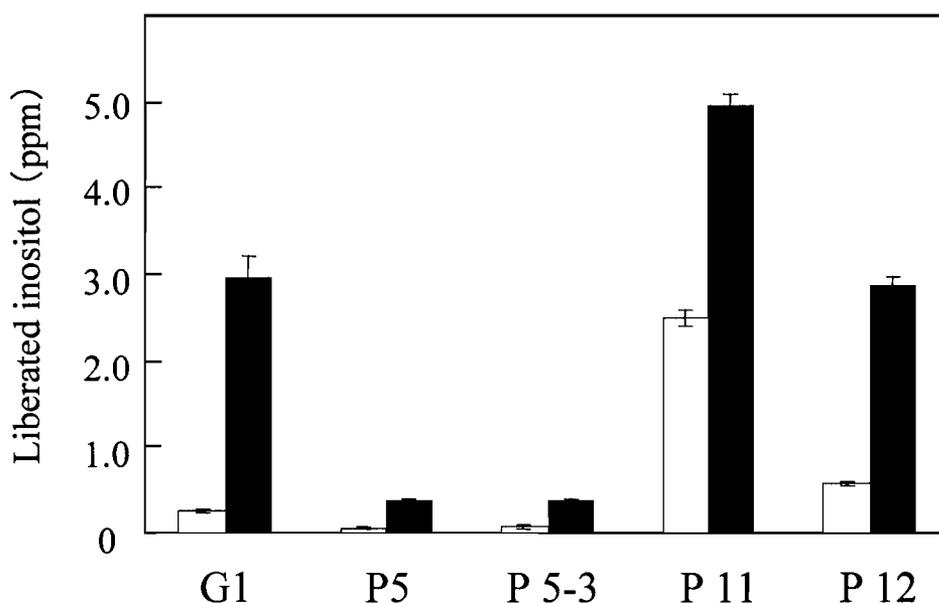


Fig. 2-7. Liberation of inositol from phytate by *PHO* gene products. Crude APs prepared from high phosphate culture of the strains P5, P5-3, P11, and P12 and from low phosphate culture of G-1 were added to 50 μ M phytate at 1.5 units/ml as AP activity. Reaction was done in 0.1 M acetate buffer (pH4.0) at 15°C for 1 h (□) or 3 h (■) and liberated inositol was determined.

Table 2-3. Inositol phosphates-hydrolyzing activity of *PHO* gene products

| Strain | Relative activity for inositol phosphates | | | | | | | |
|--------|---|-------|-------|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------|
| | Inositol phosphate: I-1-P | I-2-P | I-3-P | I-4-P ₁ | I-4P ₂ | I-5P ₁ | I-5P ₂ | I-6-P |
| G-1 | 0.41 | 0.94 | 0.84 | 0.71 | 0.53 | 0.59 | 0.44 | 0.36 |
| P 5 | 0.28 | 0.54 | 0.60 | 0.49 | 0.27 | 0.39 | 0.27 | 0.30 |
| P 5-3 | 0.25 | 0.53 | 0.55 | 0.48 | 0.27 | 0.35 | 0.21 | 0.23 |
| P11 | 0.67 | 1.64 | 1.21 | 0.84 | 1.03 | 0.87 | 0.69 | 0.47 |

Crude AP prepared from the high phosphate culture of P5, P5-3, and P11 and that from the low phosphate culture of G-1 were added to 2 mM each of inositol phosphate at the concentration of 0.5 units/ml. Reaction was done in 0.1 M acetate buffer (pH 4.0) at 35°C for 1 h, and liberated phosphate was measured. When *p*-nitrophenyl phosphate was used as a substrate, the activity was expressed as 1. Abbreviations used: I-1-P, inositol monophosphate; I-2-P, inositol bisphosphate; I-3-P, inositol trisphosphate; I-4-P₁, inositol tetra-phosphate (isomer-1); I-4-P₂, inositol tetra-phosphate (isomer-2); I-5-P₁, inositol pentakisphosphate (isomer-1); I-5-P₂, inositol pentakisphosphate (isomer-2); I-6-P, inositol hexakisphosphate .

第5節 要約と考察

〈要約〉

フィチンを添加した合成培地，または清酒醪において，酵母は低リン酸環境下で生合成されるAPによってフィチンを分解し，生成したイノシトールを利用して増殖することができた．酵母APによって蒸米中のフィチンが分解を受けるためには，蒸米中のタンパク質がプロテアーゼによって分解されることによって，フィチンが液相中に可溶化されることが必要であった．酵母の抑制性APのうち，*PHO11*または*PHO12*のコードするAPがフィチンの分解のために最も効果的に機能することがわかった．

〈考察〉

清酒醪における酵母へのイノシトール供給という観点からフィチン分解酵素について主に酵母APの影響について検討した結果，代表的な協会酵母の1つであり，構成的APをもたないK901株²³⁾は，低リン酸培地で培養し，APを誘導した時はフィチンをイノシトール源として利用できたことから，酵母APによってフィチンが分解されイノシトールが生成されると考える．

つぎに，清酒醪における蒸米からのイノシトール生成におよぼす酵母APの影響について明らかにするため，構成的APをもたないK901株を用いた仕込みをおこなった．麴の代替としてフィチン分解活性をもたない醸造用酵素剤²⁰⁾を用いた酵素剤仕込みでは，リン酸を添加して酵母APを抑制した場合には，酵母の増殖は著しく悪かったが，リン酸を添加しないで酵母のAPを誘導した場合には，酵母は麴を使用した醪と同程度にまで増殖した．増殖の著しく悪いリン酸添加酵素剤仕込みでも，イノシトールを添加すれば増殖は十分に回復したことから，醪においても低リン酸下で誘導される酵母APがイノシトールの供給を通して酵母の増殖に寄与すると結論した．

しかし酵母APによって蒸米中のフィチンからイノシトールが生成するには，フィチンがタンパク質の分解を通じて可溶化されることが必要であった．このことはフィチンの存在部位であるアリューロン顆粒がタンパク質で構成されていることと一致する⁶⁾．通常，清酒醸造において原料米は70%程度にまで搗精されるが，玄米外層に分布するアリューロン顆粒の一部は白米に残存し，顆粒中に集積するフィチンは仕込水に溶けにくく，極めて酵素作用を受けにくい状態で存在すると考える．

醪において酵母の増殖のためには，特に初期のイノシトール生成量が重要である．醪工程初期には上清の酵母由来のフィチン分解活性は，麴由来の活性に比べると低活性であったが (Fig. 2-4)，酵母細胞表層には細胞外を上回るAPが局

在し⁶⁸⁾、これがフィチンの分解に寄与することがわかった (Fig. 2-5)。その結果、酵素剤仕込みのようにフィチンの分解を酵母APのみに依存する場合においても、酵母は麹を使用した醪に遜色なく 10^8 /ml以上にまで増殖できると考察した (Fig. 2-2)。

低リン酸下で発現する酵母の4種の抑制性APのうち、どのAPがフィチンからのイノシトールの生成に寄与するかを明らかにするため、酵母APをコードする *PHO* 遺伝子をそれぞれ単独で発現させてフィチン分解性を検討した。X2180-1 A株ゲノムより *PHO5* および *PHO12* を、清酒酵母 K901株ゲノムより *PHO5-PHO3* 融合遺伝子 (*PHO5-3*) および *PHO11* を PCR クローニングした。K901株からは *PHO12* の ORF の外側のプライマーを用いた時、増幅産物が得られなかったことや ORF そのものを増幅する条件下で得られたすべてのクローンが *PHO11* のみであったことから、K901株には構成的 AP である *PHO3* と同様に、*PHO12* も存在しないか、あるいは存在するとしても組換えなどによって実験室株とは異なる状態で存在すると考えられる。

これらの4つの *PHO* 遺伝子を構成的 AP をもたない UT-1 株を宿主として高リン酸培地で構成発現させたところ、予想に反して主要 *PHO* 遺伝子である *PHO5*⁵⁹⁾ および *PHO5-3* はフィチン分解への寄与は低く、AP としては低活性である *PHO11* および *PHO12* の方がフィチンやその部分分解物であるイノシトールリン酸に対して基質特異性が高く、フィチン分解に寄与することがわかった。酵母 AP のフィチン分解性に関して、*PHO5* および *PHO11* の *Aspergillus oryzae* への導入によってフィターゼ活性の増大がみられたとする報告がみられるが⁶⁹⁾、酵母の主要 AP でない *PHO11* および *PHO12* に特異的な機能はこれまで見出されていなかった。本研究において *PHO11* および *PHO12* のフィチン分解に関する機能が明らかになったことは、これらの遺伝子の酵母における存在意義を考える上で興味深い。

以上のことからフィチンからのイノシトールの生成に対して、*PHO11* あるいは *PHO12* 遺伝子が主要な役割を果たす AP 遺伝子であると結論した。

第3章 酵母のカプロン酸エチル生産に与えるイノシトールの影響⁷⁰⁾

第1節 序

本章では原料米を搗精し、醪における酵母へのイノシトールの供給量を制限することが、製成酒のカプロン酸エチル含量にどのような影響を与えるかを明らかにすることを目的とする。

カプロン酸エチルは、炭素数6の直鎖中鎖脂肪酸であるカプロン酸または *caproyl-CoA* とエタノールを基質として酵母によって生合成される。したがって酵母のカプロン酸エチル生成に関与するする要因としては、基質の量およびカプロン酸エチルの生成・分解を触媒する酵素活性の2つが考えられる。本章では、イノシトールの供給量と酵母によるカプロン酸エチル生成との関係を、カプロン酸エチル生成に関与する酵母遺伝子の発現レベルから解明する。

第2節 イノシトール供給量の製成酒カプロン酸エチル含量に与える影響

〈方法〉

1) 菌株および醪小仕込み試験

清酒酵母 *S. cerevisiae* ATCC32694株、日本醸造協会701号 (K701)、901号 (K901)、8号 (K8)、C38株を使用した。C38株はセルレニン耐性を指標として K901株より得られたカプロン酸エチル高生産変異株である⁷¹⁾。醪はイノシトールを0~125 mg添加した総米200 gの3段仕込みを行った⁴⁷⁾。麴は精米歩合70%の白米から調製し、掛米は精米歩合70、80、90、98%の白米を使用した。

醪中の酵母細胞密度は、ヘマトメーターを用いて計測した。

2) カプロン酸エチルの定量

製成酒のカプロン酸エチルはガスクロマトグラフを用いてヘッドスペース法により定量した⁷²⁾。

〈結果〉

1) 精米歩合の製成酒カプロン酸エチル含量に与える影響

精米歩合70、80、90、98%の白米を掛米として、K901株を使用してイノシトール無添加あるいは125 mg添加した総米200 gの醪を調製し、上槽時の醪の酵母細胞密度および製成酒のカプロン酸エチル含量を測定した。

Fig. 3-1に示すように、イノシトールを添加しない通常の醪では、酵母細胞密度は精米歩合70%の白米を使用した場合に最も低かった。しかし、イノシトールを添加すると、精米歩合70%の白米を使用した醪においても他の醪との間に差が

みられなくなった。一方、精米歩合90%以上の場合にはイノシトール添加と無添加醪の間に細胞密度の相違は見られなかった。

イノシトール無添加の醪では、製成酒のカプロン酸エチル含量は精米歩合70%の場合に最も高くなり、イノシトールを添加するとその含量はイノシトール無添加醪の1/2に減少した。しかし精米歩合90%以上の場合には、細胞密度の場合と同様にイノシトールの添加と無添加の間にカプロン酸エチル含量の相違は見られなかった。

2) 醪へのイノシトール添加量と製成酒のカプロン酸エチル含量との関係

K901株を使用して0~125 mgのイノシトールを添加した醪を調製し（精米歩合70%）、酵母細胞密度および製成酒のカプロン酸エチル含量を測定した。Fig.3-2に示すように、イノシトール添加量が総米200 gあたり10 mgまでは添加量の増大とともに細胞密度は増大し、カプロン酸エチル含量は減少したが、それ以上添加しても両者ともほとんど変化が見られなかった。以降の実験においては精米歩合70%の白米を用いて総米200 gあたり125 mgのイノシトールを添加した醪を調製し、イノシトールを添加しない通常の醪と比較した。

次に、5株の清酒酵母を用いてイノシトール添加および無添加の醪を調製し（精米歩合70%）、製成酒のカプロン酸エチル含量を測定した。Table 3-1に示すように、カプロン酸エチル高生産株 C38を使用した場合最もイノシトール添加の影響は少なかったが、いずれの菌株を使用した場合においても、醪へイノシトールを添加すると製成酒中のカプロン酸エチル含量はイノシトール無添加醪の約1/2またはそれ以下にまで減少した。

これらのイノシトール添加および無添加醪から得られた製成酒の香りを14名のパネリストによって官能検査によって比較した。Table 3-2に示すように、いずれの菌株を使用して調製した製成酒においても、イノシトール無添加の方が、香りが高いと判定され、全体では危険率0.1%で有意な差として判定された。

以上のように精米歩合70%の白米を使用するとイノシトールの醪への供給が制限され、その結果、カプロン酸含量の高い製成酒が得られることがわかった。

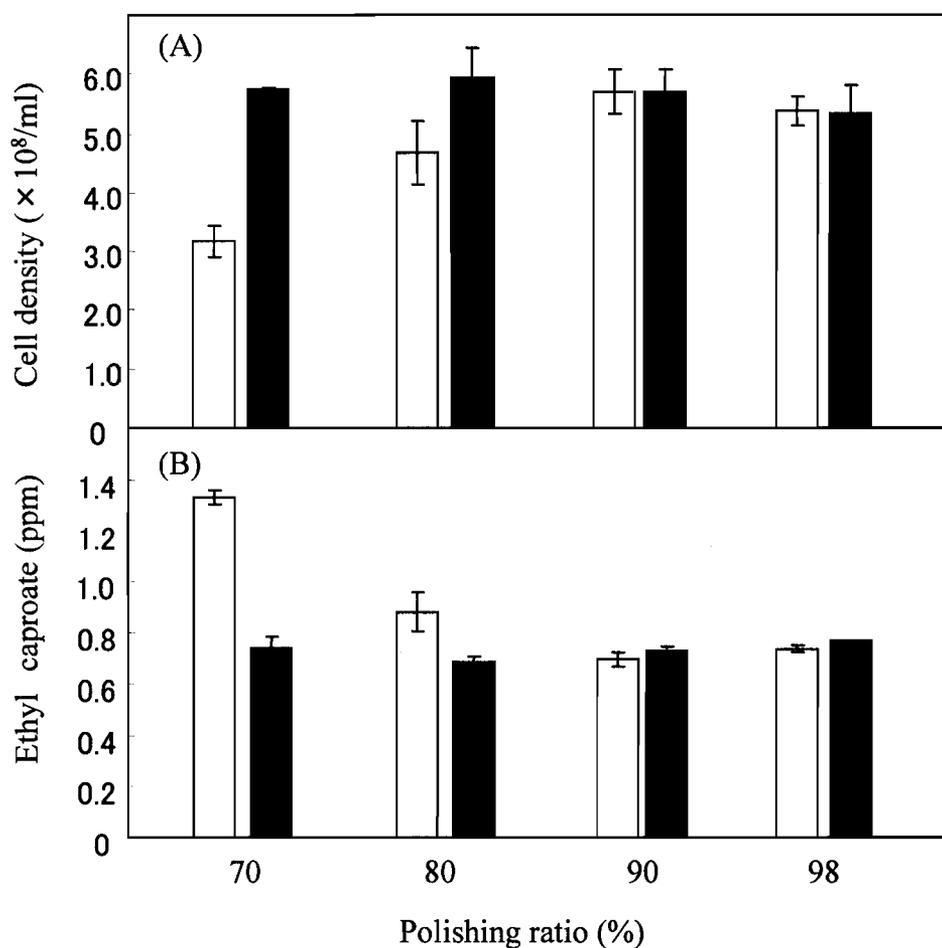


Fig. 3-1. Effect of polishing ratio on yeast cell density and ethyl caproate production in sake mash. Sake mash was prepared with strain K901 using 200 g of polished rice (polishing ratio: 70, 80, 90, and 98%) with (■) or without (□) the addition of inositol. The final yeast cell density (A) in sake mash was determined microscopically. The ethyl caproate concentration (B) in the supernatant (fresh sake) was measured by head space gas chromatography. Each data is the mean for two independent experiments and bars indicate standard deviation.

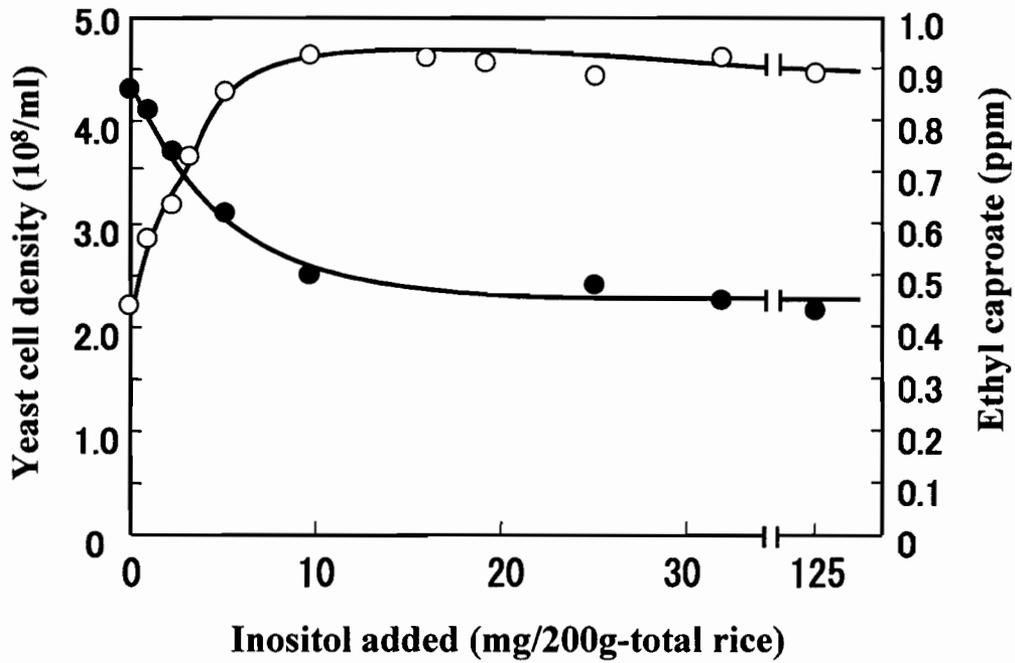


Fig. 3-2. Relationship between the amount of inositol supplemented and ethyl caproate production in sake mash. Sake mash to which 0-125 mg of inositol was added was prepared using 200 g of polished rice (polishing ratio 70%). The final yeast cell density (○) and ethyl caproate concentration (●) in sake mash were measured as shown in Fig. 3-1.

Table 3-1. Effect of inositol on the production of ethyl caproate in sake mash process

| Inositol | Ethyl caproate produced (ppm) | | | | | |
|----------|-------------------------------|------|------|------|-----------|-------|
| | Strain: | K701 | K901 | K8 | ATCC32694 | C38 |
| - | | 1.08 | 0.99 | 1.16 | 0.54 | 14.76 |
| + | | 0.38 | 0.44 | 0.16 | 0.15 | 8.28 |
| Ratio | | 0.35 | 0.44 | 0.14 | 0.28 | 0.56 |

Sake mash was prepared with several types of sake yeasts using 200 g of polished rice with (+) or without (-) the addition of inositol. The ethyl caproate concentration (ppm) of the supernatant (fresh sake) was measured by head space gas chromatography.

Table 3-2. Effect of inositol on the quality of sake evaluated by sensory test

| Inositol | The number judged to be better by 14 panelists | | | | | Total | |
|----------|--|------|------|-----|-----------|-------|------|
| | Strain: | K701 | K901 | K8 | ATCC32694 | | C38 |
| - | | 10 | 12* | 12* | 12* | 9 | 57** |
| + | | 4 | 2 | 2 | 2 | 5 | 15 |

Sake mash was prepared as shown in Table. 3-1. The odor of sake with or without the addition of inositol was evaluated by 14 panelists. The values represent the number of panelists which judged to be better for each sake.

* 5% significant, ** 0.1% significant

第3節 醪中の酵母のカブロン酸エチル生成活性およびカブロン酸生成量に与えるイノシトールの影響

〈方法〉

1) 醪小仕込み試験および酵母の培養

本章, 第2節〈方法〉1) に準じて, K901およびC38株を使用し, イノシトールを無添加 または 125 mg添加した総米200 g の醪の3段仕込みを行った.

SH615株 (*ino1*, *gcn2*, *gcn3*, *his1*) を0~200 ppmイノシトールおよび35 ppmヒスチジンを補填したHayashidaらの培地⁴⁴⁾を用いて15°C, 5日間静置培養した.

2) 酵素活性の測定

醪中の酵母は遠心分離法によって分画した⁵¹⁾. 約 2×10^9 の酵母細胞を1 mMジチオスレイトール溶液1 mlに懸濁し, 第1章, 第4節〈方法〉2) に示す方法によって細胞を破碎し, 無細胞抽出液を得た.

無細胞抽出液中のalcohol acyltransferase, カブロン酸エチル合成, カブロン酸エチル分解エステラーゼ活性を栗山らの方法⁷³⁾により測定した. ただし, alcohol acyltransferaseおよびカブロン酸エチル合成エステラーゼ活性の測定において, カブロン酸エチル定量の際に, カブロン酸メチルを内部標準として用いた. またカブロン酸エチル分解エステラーゼ活性は, 反応によって遊離するカブロン酸を定量することによって測定した. 1時間に1 μmole のカブロン酸エチルまたはカブロン酸を生成する酵素量を1 unitと定義した.

3) 中鎖脂肪酸の定量

カブロン酸, カプリル酸, カプリン酸を以下の方法によって定量した. 試料10 mlに対して1 mlの0.72 N塩酸および内部標準として20 μg のヘプタン酸を添加し, 3 mlエチルエーテルで3回抽出後, 窒素ガスを吹き付けて約100 μl まで濃縮した. 濃縮液中の中鎖脂肪酸をTable 3-3に示す条件下でDB-WAXカラム (J&W Scientific, Folsom, USA) を用いて, ガスクロマトグラフ-質量分析計 (GC-17A-QP5000, 島津製作所, 京都) によって定量した.

4) 菌体脂肪酸含量の測定

酵母菌体の脂肪酸は, 凍結乾燥菌体から植田の方法⁷⁴⁾ に準じて脂肪酸メチルエステルを調製した後, 吉沢らの方法⁷⁵⁾ にしたがってガスクロマトグラフィーにより分析した. ラウリン酸, ミリスチン酸, パルミチン酸, パルミトオレイン酸, ステアリン酸, オレイン酸の含量を合計したものを菌体脂肪酸含量とした.

Table 3-3. GS-MS conditions for the analysis of middle chain fatty acids

| | |
|--------------------|--|
| Column | DB-WAX, 0.32 mm i.d. × 30 m, 0.5 μm film thickness |
| Carrier gas | Helium, 2.0 ml/min |
| Column temperature | Initial, 120°C; held for 2 min, raised at 10°C/min Final, 200°C; held for 5 min |
| Injection volume | 1 μl |
| Sprit ratio | 1:50 |
| Interface | 250°C |
| Ionization | Electron impact ionization at 7.0 eV |
| Detection | Selected ion monitoring at m/z 60 |

〈結果〉

1) イノシトールの醪酵母カプロン酸エチル生成関連酵素活性に与える影響

K901株の無細胞抽出液について、カプロン酸エチル生成に関与する酵素として alcohol acyltransferase, カプロン酸エチル合成, カプロン酸エチル分解エステラーゼを定量した結果をFig. 3-3に示す。

これらの3つの酵素活性はいずれもイノシトール添加醪と無添加醪の間に差がみられなかった。このことから、過剰のイノシトールが醪に供給された時、カプロン酸エチル生成量が低下するのは、カプロン酸エチル生成に関連する酵素活性の低下によるものではないことがわかった。

2) イノシトールの製成酒中鎖脂肪酸含量に与える影響

K901株およびC38株を用いてイノシトール無添加醪および添加醪を調製し、製成酒の中鎖脂肪酸含量を測定した。Table 3-4に示すように、いずれの菌株を用いた場合も、醪にイノシトールを添加するとカプロン酸, カプリル酸およびカプリン酸の3つの中鎖脂肪酸含量が低下した。

このことから、過剰のイノシトールが醪に供給された時、カプロン酸エチル生成量が低下するのは、基質であるカプロン酸生成量が低下するためであることがわかった。

3) イノシトールが菌体脂肪酸含量に与える影響

SH615株をイノシトール濃度の異なる培地で液体培養した後、菌体脂肪酸含量を測定した結果をFig.3-4に示す。イノシトール濃度が2.5 ppmまでは、培地中の初発イノシトール濃度の増加とともに菌体脂肪酸含量は減少し、それ以上、イノシトール濃度が増加しても菌体内イノシトール含量は変化しなかった。このことから、イノシトールが制限された時、菌体脂肪酸含量が増加することがわかった。

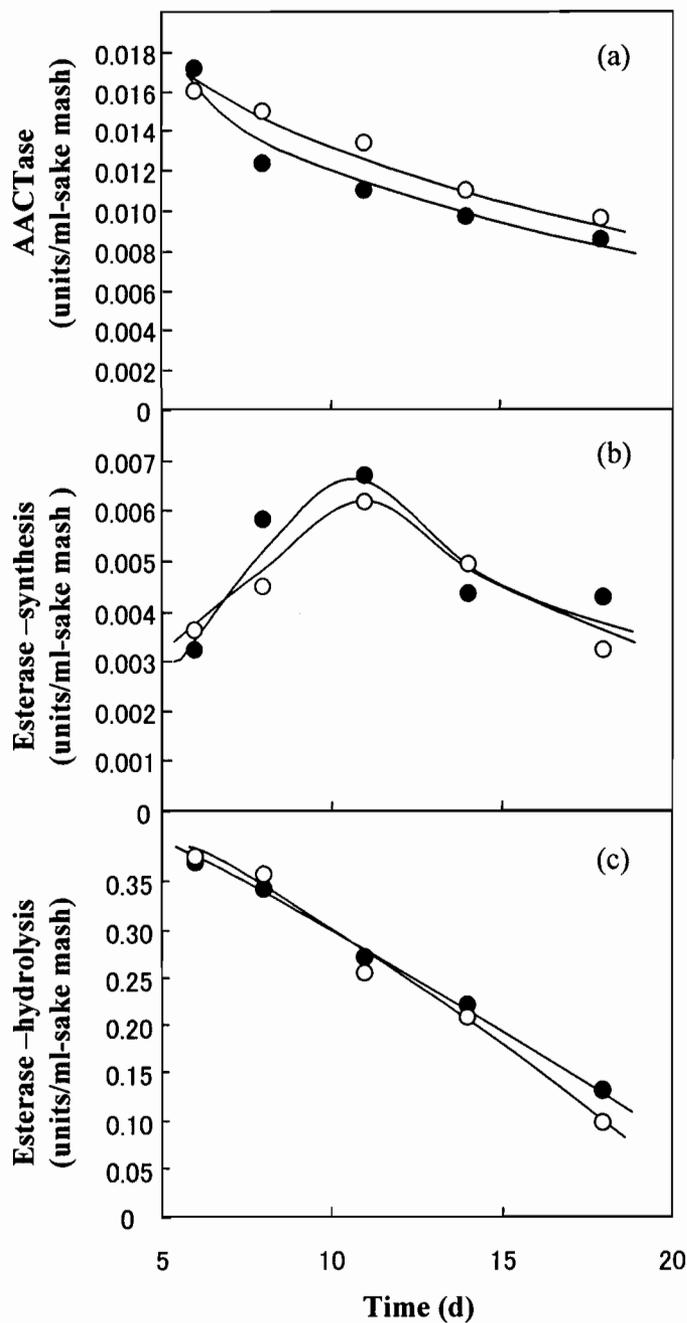


Fig. 3-3. Time course of AACTase and esterase activities of yeast in sake mash. Sake mash was prepared with strain K901 using 200 g of polished rice with (●) or without (○) the addition of inositol. The activities of AACTase (a) and esterases in ethyl caproate synthesis (b) and in ethyl caproate hydrolysis (c) of yeast cell-free extract were measured and are represented as units per ml of sake mash.

Table 3-4. Effect of inositol on the production of middle chain fatty acid in sake mash process

| Strain | Inositol | Middle chain fatty acid (ppm) | | |
|--------|--------------------|-------------------------------|-------------------------|-----------------------|
| | | <i>n</i> -Caproic acid | <i>n</i> -Caprylic acid | <i>n</i> -Capric acid |
| K901 | - | 4.2 | 2.7 | 0.42 |
| | + | 1.8 | 1.3 | 0.32 |
| | Ratio ^a | 0.43 | 0.48 | 0.76 |
| C38 | - | 28.8 | 6.5 | 0.93 |
| | + | 13.8 | 3.6 | 0.63 |
| | Ratio | 0.48 | 0.55 | 0.68 |

Sake mash was prepared as described in Table 3-1. Middle chain fatty acid concentration (ppm) of the supernatant (fresh sake) was measured by GC-MS.

^a Ratio of fatty acid without the addition of inositol to that with inositol.

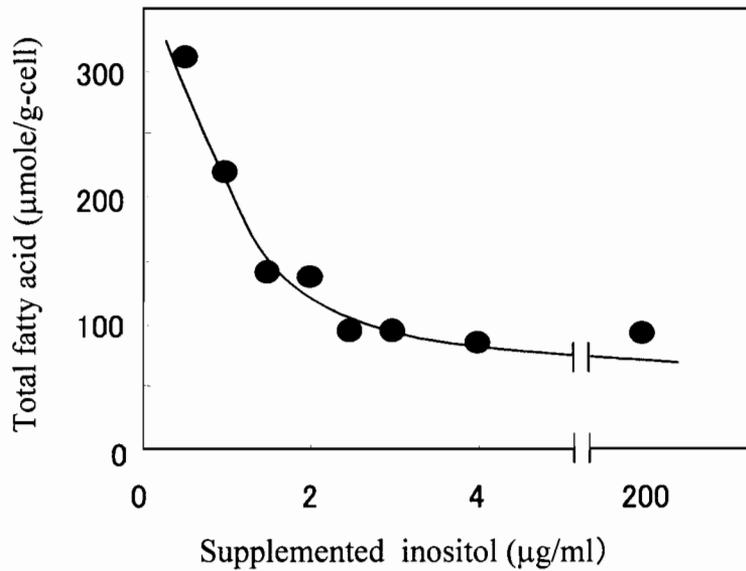


Fig. 3-4. Effect of inositol supplementation on cellular fatty acid content. Strain SH615 was cultured in Hayashida's synthetic medium containing 0.5-200 ppm inositol at 15°C for 5 d. Fatty acid content of lyophilized cells was determined by GC-MS. The sum of lauric acid, myristic acid, palmitic acid, palmitoleic acid, stearic acid, and oleic acid content is represented as total fatty acid.

第4節 イノシトールの制限による酵母のカプロン酸生成促進機構の解析

〈方法〉

1) 菌株

S.cerevisiae UT-1株 (*trp1/trp1, ura3/ura3*)⁶³⁾およびX2180-1A (Yeast Genetic Stock Center: *MAT α , ade2-1, ura3-1, his3-11, trp1-1, leu2-3, leu2-11, can1-100*) を使用した.

2) 培養および醪小仕込み試験

200 ppmイノシトールおよび10% (w/v) グルコースを含むWickerham合成培地で酵母を15°C, 5日間静置培養した. 対照として, イノシトール無添加の培地を用いた. それぞれの菌株の栄養要求性に応じて, 生育に必要な物質 (30 ppm アデニン, 25 ppmウラシル, 35 ppmヒスチジン, 100 ppmトリプトファン, 30 ppmロイシン) を添加した.

W303-1A株から*opi1*破壊株を得るため, AUR-YPD平板培地として500 μ g/lオーレオバシジンA (タカラバイオ), 1% (w/v) 酵母エキス, 2% (w/v) ポリペプトン (日本製薬, 東京), 2% (w/v) グルコース, 100 ppmアデニンおよび2% (w/v) 寒天からなる培地を使用した.

これ以外の形質転換株を得る場合には, 2% (w/v) 寒天を含むWickerham合成平板培地を基本として, それぞれの菌株の栄養要求性に応じて, 生育に必要な物質 (30 ppmアデニン, 25 ppmウラシル, 35 ppmヒスチジン, 100 ppmトリプトファン, 30 ppmロイシン) を添加した培地を使用した.

醪は精米歩合70%白米を原料米として難波らの方法⁴⁷⁾により総米200 gの3段仕込みで調製した. イノシトールを添加しない通常の醪とともに, 125 mgのイノシトールを添加した仕込みを併せて行った. すべての醪に27 mgトリプトファンおよび 68 mgウラシルを添加した.

3) *OPI1*遺伝子破壊株の作製

Fig.3-5に示す手順に従ってW303-1A株の*OPI1*遺伝子を破壊した.

2,372-bpの*OPI1* ORFの5'側隣接領域をK901株ゲノムDNAを鋳型としてPCRによって増幅した. この断片をプラスミド pAUR112 (タカラバイオ) に導入し, pAUROPFを得た. 2,058-bpの*OPI1* ORFの3'側隣接領域をPCRによって増幅した. この断片をpAUROPFにクローニングしpAUROPFRを得た. pAUROPFRは, PCRで増幅した*OPI1* ORFの5'および3'側の両隣接領域がマーカー遺伝子*AUR-1C*を挟んで同じ方向になるように作成した. pAUROPFRを*Bst*X I および*Afl*IIで切断し, 生じた*OPI1::AUR1-C*を含む6.8-kbの断片を用いてW303-1A株

を形質転換し、W303-1A株の *OPI1* 遺伝子を *AUR-1C* 遺伝子で置換した。aureobasidin A耐性を示す形質転換体から *OPI1*破壊株を得た。*OPI1*遺伝子が破壊されたことをPCRによって確認した。

次に、Fig.3-6に示す手順に従ってUT-1株の *OPI1* 遺伝子を破壊した。

OPI1 ORFとその5'および3'側隣接領域を含む5.86-kbのDNA断片を、K901株ゲノムDNAを鋳型としてPCRによって増幅した。この断片を、プラスミドpUC19に導入し、pUC19OPを得た。*TRP1*遺伝子をpG1Mを鋳型としてPCRによって増幅した。この断片を *Spe* I および *Bst* P I で切断し、pUC19OPの *Spe* I・*Bst* P I サイトに導入し、pUC19OPTを得た。*URA3* 遺伝子をpAUR112を鋳型としてPCRによって増幅した。これを *Spe* I および *Bst* P I で切断し、pUC19OPにクローニングし、pUCOPUを得た。UT-1株の2つの *OPI1* 遺伝子のうちの一方を *TRP1* 遺伝子で置換するため、pUCOPTを *Bam* H I および *Afl* II で切断し、生じたDNA断片を用いてUT-1株を形質転換した。トリプトファンを含まない平板培地で生育した形質転換体から片方の *OPI1* 遺伝子が破壊された株、UT-1TOPを得た。

pUC19OPUを *Bst* X I および *Afl* II で切断し、生じたDNA断片を用いてUT-1TOP株を形質転換し、UT-1株の残りの1つの *OPI1* 遺伝子を *URA3* 遺伝子で置換した。トリプトファンおよびウラシルを含まない最少平板培地で生育した形質転換体から両方の *OPI1* 遺伝子が破壊された株、UT-1DOPを得た。*OPI1* 遺伝子が破壊されたことをPCRによって確認した。

DNA操作および酵母の形質転換は第2章、第4節〈方法〉5)に述べた方法によって行った。PCRにはEx taq DNAポリメラーゼ(タカラバイオ)を使用した。制限酵素はタカラバイオ製を使用した。

4) 脂肪酸合成遺伝子構成発現株の作製

マルチコピー型ベクターpG-1M、pG-1MBおよびpG1MUをFig.3-7に示す手順にしたがって構築した。pG-1Mは、合成オリゴペプチドをアニーリングさせた後、pG-1ベクター⁶⁷⁾に導入しマルチクローニングサイトを付加することによって構築した。pG-1MUは、プラスミドpRS426⁷⁶⁾を鋳型として、*URA3* 遺伝子を含む断片をPCRによって増幅した後、*Sph* I で切断し、pG1Mに導入することによって構築した。

ACS2, *ACC1*, *FAS1*, *FAS2* 遺伝子構成発現ベクターは以下の方法にしたがって構築した。各遺伝子は、K901株を鋳型としてKOD DNAポリメラーゼ(東洋紡績、大阪)を用いてPCRによって増幅した。

ACS2 遺伝子は5'primer, 5'-TCCcgcggATGACAATCAAGGAACATAA-3' および3'primer, 5'-CCCgagctcCTCATTACGAAATTTTTCTC-3'を用いてPCRによ

って増幅した。増幅産物を *Sac*II および *Sac* I で切断した後、pG-1MUベクターに導入し、ACS2遺伝子構成発現ベクターpG1MU-ACS2を得た。

*FAS2*遺伝子は5'primer, 5'-TCCcgcggATGAAGCCGGAAGTTGAGCA-3' および3'primer, 5'-CCCgagctcCTATTTCTTAGTAGAAACGG-3'を用いてPCRによって増幅した。増幅産物を *Sac*II および *Sac* I で切断した後、pG-1MUベクターに導入し、*FAS2*遺伝子構成発現ベクターpG1MU-FAS2を得た。

*ACC1*遺伝子は5'primer, 5'-TCCcgcggATGAGCGAAGAAAGCTTATT-3'および3'primer, 5'-CCCgagctcGGTTTATTTCAAAGTCTTCA-3'を用いてPCRによって増幅した。増幅産物を *Sac*II および *Sac* I で切断した後、pG-1MBベクターに導入し、*ACC1*遺伝子構成発現ベクターpG1MU-ACC1を得た。

*FAS1*遺伝子構成発現ベクターはFig. 3-8に示す手順に従って構築した。

*FAS1*遺伝子ORFの前半部分 (bp 1-3543) をPCRによって増幅した。増幅産物を *Sac*II および *Sac* I で切断した後、pG-1MBベクターに導入し、pG1MB-DFAS1を得た。*FAS1*遺伝子ORFの後半部分 (bp 3251-6156) をPCRによって増幅した。増幅産物を *Bam*H I および *Sac* I で切断した後、pG-1MB-DFAS1ベクターに導入し、pG1MB-FAS1を得た。

pG1MU-ACS2, pG1MU-ACC1, pG1MB-FAS1およびpG1MU-FAS2をW303-1A株に導入した。pG-1MUおよびpG-1MBベクターをW303-1A株に導入した株を対照とした。

DNA操作および酵母の形質転換は第2章, 第4節〈方法〉5) に述べた方法によって行った。

5) 脂肪酸および脂肪酸エステルの分析

カプロン酸エチルは本章, 第2節〈方法〉2) に示す方法により, 中鎖脂肪酸は本章, 第3節〈方法〉3) に示す方法により定量した。

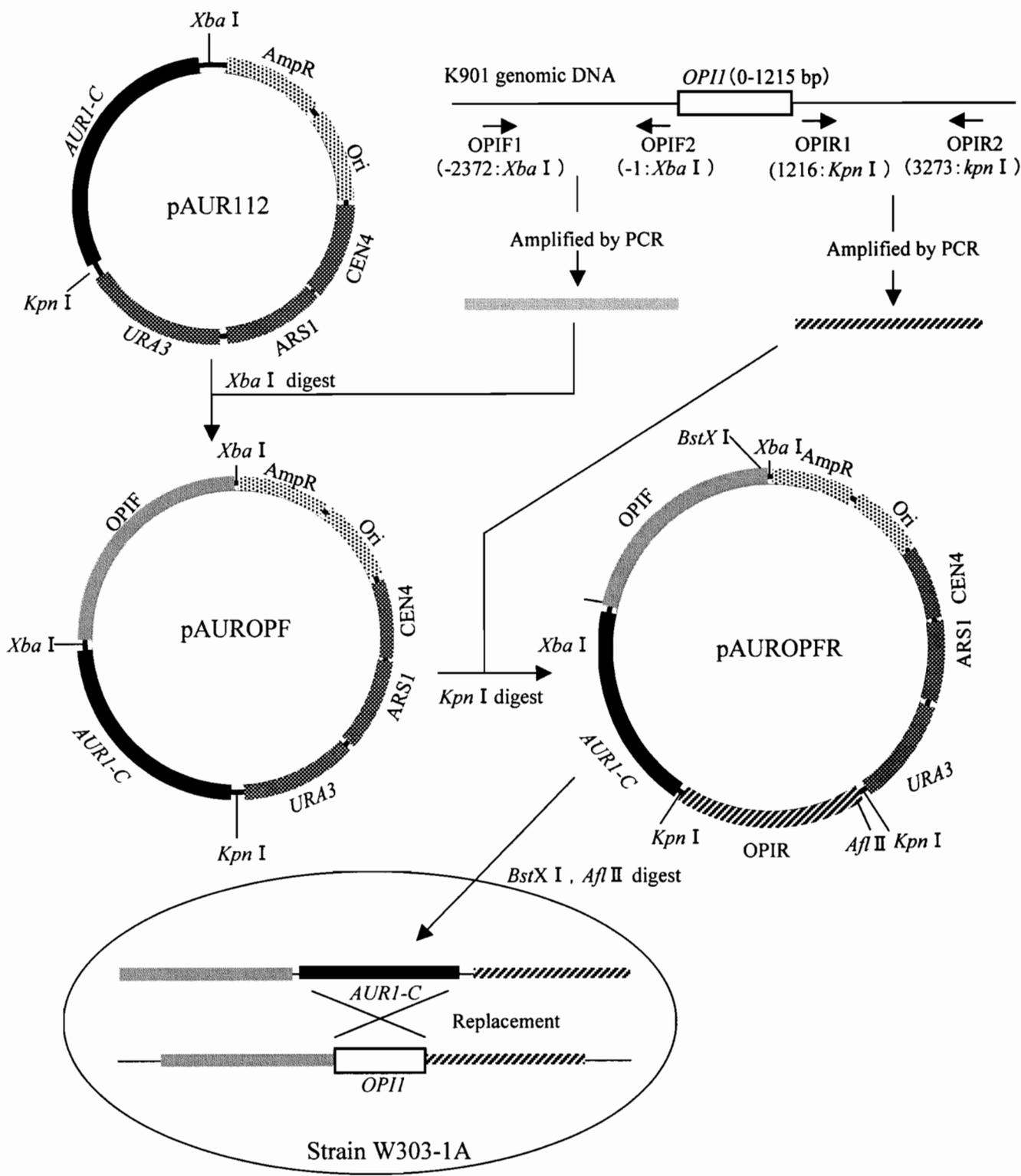


Fig. 3-5. Strategy for the disruption of *OPII* gene of strain W303-1A. Primers used to amplify the flanking regions of *OPII* ORF were follows:

- OPIF1, GCtctagaCCCAAACATTTGGTCTTATT; OPIF2, GCtctagaCAATGACTAGTATCTTCGTT
- OPIR1, CGGggtaccCCGAGACAGATTGAGGTCTT; OPIR2, CGGggtaccAAATCTTAAGGGTGAAGACA

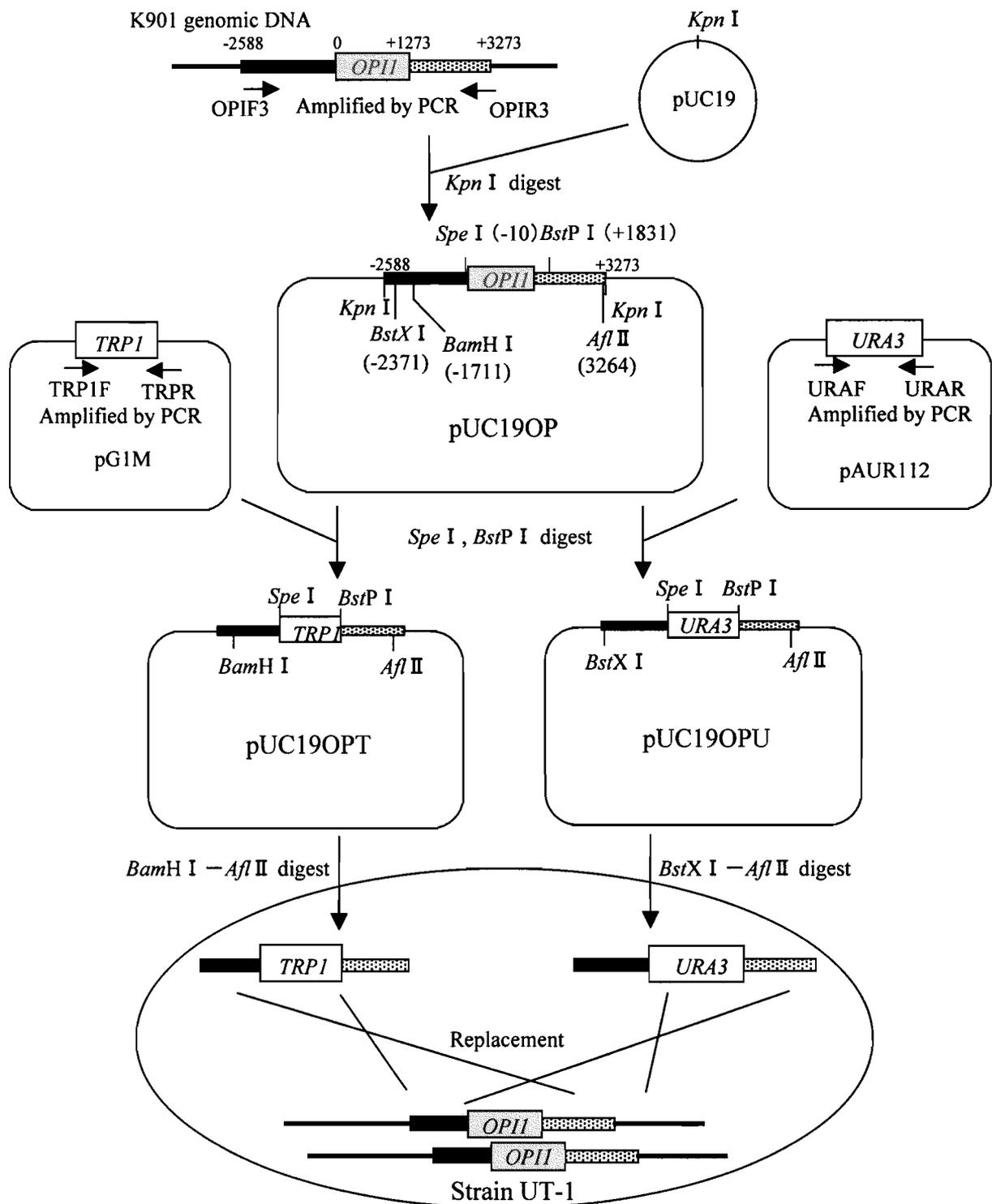


Fig. 3-6. Strategy for the disruption of *OPII* gene of strain UT-1. Primers used to amplify the flanking region of *OPII* ORF and *TRP1* and *URA3* genes were follows:

OIPF3, CCCggtaccAATCTATTCTCTTGGCCATC; OPIR3, CGGggtaccAAATCTTAAGGGTGAAGACA, TRPF, CCCactagtAATTCGGTTCGAAAAAGAAA; TRPR, CCCggtgaccAGATCTTTTATGCTTGCTTT, URAF, CCCactagtGTAAGCTTTTCAATTCATCA; URAR, CCCggtgaccCCCGGGTAATAACTGATATA

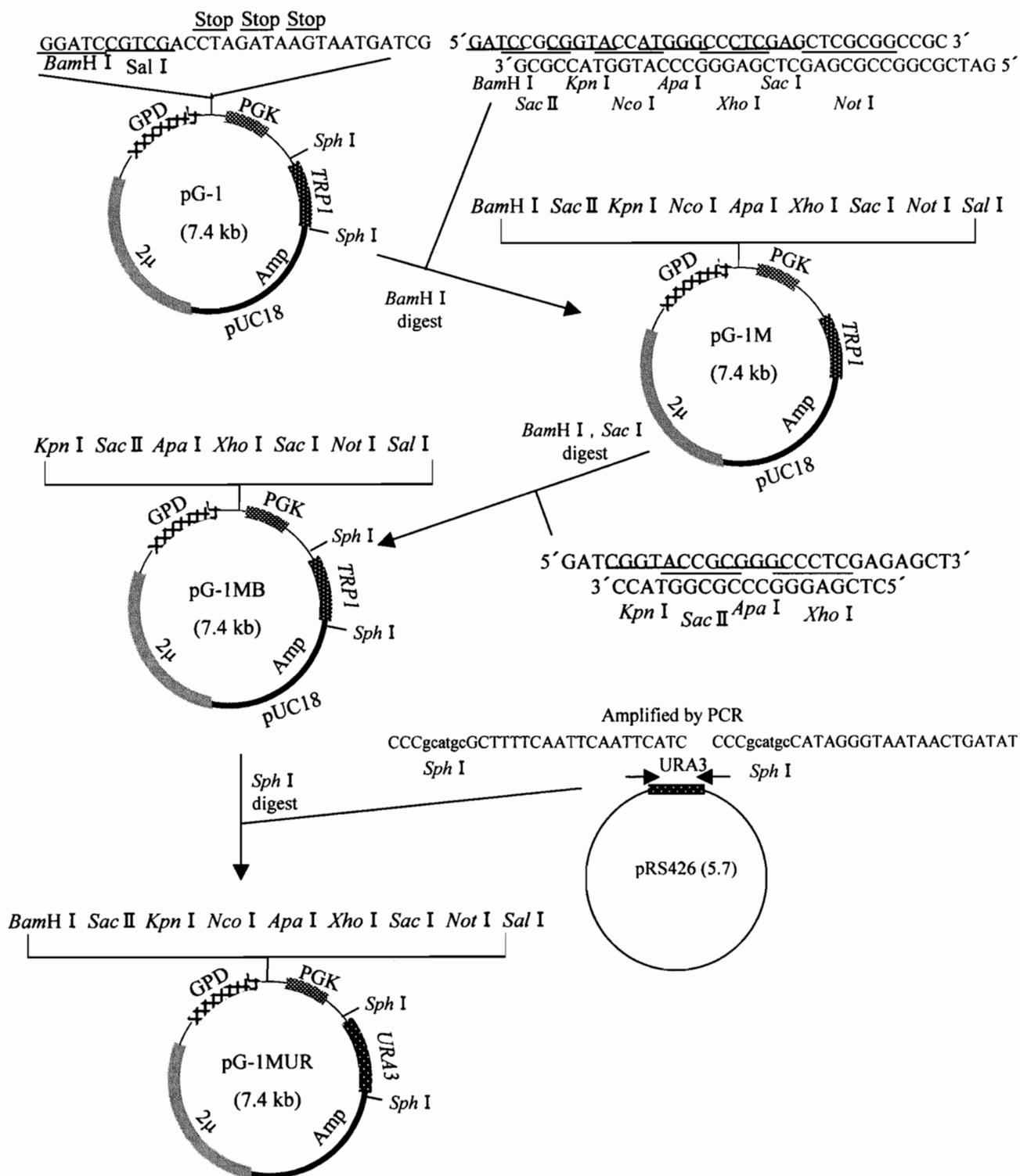


Fig. 3-7. Construction of multicopy vectors

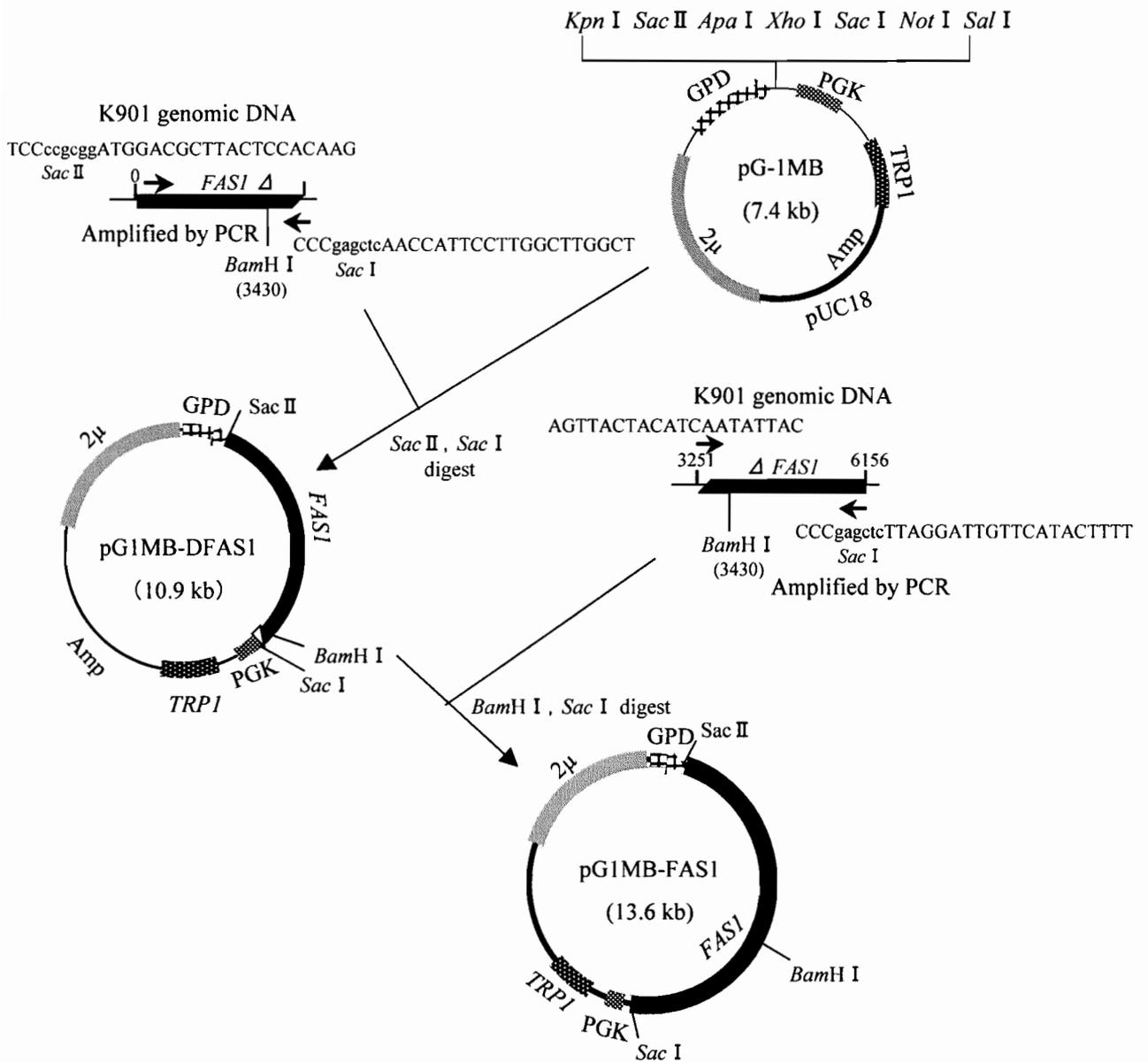


Fig. 3-8. Construction of the vectors for the constitutive expression of *FAS1* gene.

〈結果〉

1) *OPII*遺伝子破壊の静置培養および醪における中鎖脂肪酸生成量に与える影響

W303-1A株およびその*OPII*遺伝子破壊株，WDOP1を200 ppmイノシトールを含む培地で培養し，培養上清の中鎖脂肪酸含量を測定した結果を，イノシトール無添加培地の場合と比較してTable 3-5に示す。

W303-1A株をイノシトールを含まない培地で培養すると，上清の中鎖脂肪酸含量は増大した。これに対して，WDOP1株では十分量のイノシトールを添加した場合でもイノシトールを添加しない場合との間に，ほとんど差がみられず，W303-1A株より著量の中鎖脂肪酸を生成した。

次に，UT-1株および*OPII*遺伝子破壊株，UT-DOPを用いてイノシトール添加醪と無添加醪を調製し，製成酒の中鎖脂肪酸およびカプロン酸エチルを定量した。Table 3-6に示すように，UT-1株ではイノシトールを添加すると製成酒の全ての中鎖脂肪酸含量が，イノシトール無添加醪の1/2またはそれ以下にまで低下し，同時にカプロン酸エチル含量も低下した。これに対して，UT-DOP株ではイノシトールを添加しても製成酒の中鎖脂肪酸はほとんど低下せず，イノシトール添加と無添加醪の間にカプロン酸エチル含量の差はみられなかった。

Table 3-5およびTable 3-6に示す結果から，酵母が十分のイノシトールを供給される時，中鎖脂肪酸の生成抑制には*OPII*遺伝子が関与していることがわかった。

2) 脂肪酸合成に関与する遺伝子の構成発現の中鎖脂肪酸製成量に与える影響

脂肪酸合成遺伝子のうち，最も中鎖脂肪酸生成量に影響を与える遺伝子を特定するため，*ACS2*，*ACC1*，*FAS1*および*FAS2*遺伝子を構成発現するベクターを構築し，W303-1A株に導入した。200 ppmイノシトールを含む培地で培養し，イノシトール無添加の場合と比較して上清の中鎖脂肪酸を定量した結果をFig. 3-9に示す。

ACS2，*ACC1*および*FAS2*を構成発現させても対照株との間に中鎖脂肪酸生成量の差はみられなかった。これに対して，*FAS1*を構成発現させると中鎖脂肪酸生成量は有意に増大した。*FAS1*と*FAS2*を同時に構成発現させた場合，中鎖脂肪酸製成量はさらに増大し，十分量のイノシトールを添加した場合にも無添加の場合との間に中鎖脂肪酸含量の差がみられなくなった。

このことから，酵母の脂肪酸合成に関与する遺伝子のうち，中鎖脂肪酸生成量に影響を与える主要遺伝子は*FAS1*遺伝子であり，*FAS1*と*FAS2*遺伝子を同時に発現させると，さらに中鎖脂肪酸生成量が増大することがわかった。

TABLE 3-5 . Middle chain fatty acid formation in the culture of the *OPII* disruptant

| Strain | Inositol | Middle chain fatty acid (μmole/g-cells) | | | |
|---------|--------------------|---|------------------------|-------------------------|-----------------------|
| | | <i>n</i> -Butanoic acid | <i>n</i> -Caproic acid | <i>n</i> -Caprylic acid | <i>n</i> -Capric acid |
| W303-1A | - | 7.2 ± 0.45 | 13.8 ± 0.75 | 25.4 ± 1.78 | 10.7 ± 1.32 |
| | + | 5.5 ± 0.43 | 6.9 ± 0.47 | 12.9 ± 0.34 | 2.6 ± 0.10 |
| | ratio ^a | 0.76 | 0.50 | 0.51 | 0.24 |
| WDOP1 | - | 7.4 ± 0.71 | 20.3 ± 1.27 | 31.2 ± 1.45 | 10.6 ± 0.68 |
| | + | 8.1 ± 1.13 | 21.5 ± 0.09 | 29.5 ± 1.17 | 5.3 ± 0.12 |
| | ratio | 1.09 | 1.06 | 0.95 | 0.50 |

W303-1A (*OPII*) and WDOP1 (Δ *opi1::AURI-C*) were cultured in the synthetic medium containing 0 (-) or 200 ppm (+) inositol for 5 d at 15°C. Middle chain fatty acid in the culture supernatant was measured and is represented as amount per one g of dry cells. Each value was expressed as the mean ± S.D. of three independent experiments.

^a Ratio of fatty acid without the addition of inositol to that with inositol.

TABLE 3-6. Middle chain fatty acid and ethyl caproate concentrations in sake brewed with the *OPII* disruptant

| Strain | Inositol | Middle chain fatty acid (ppm) | | | | Total | Ethyl caproate (ppm) |
|---------|----------|-------------------------------|------------------------|-------------------------|-----------------------|--------------|----------------------|
| | | <i>n</i> -Butanoic acid | <i>n</i> -Caproic acid | <i>n</i> -Caprylic acid | <i>n</i> -Capric acid | | |
| UT-1 | - | 2.32 ± 0.03 | 4.49 ± 0.08 | 2.24 ± 0.10 | 0.13 ± 0.02 | 9.18 ± 0.02 | 0.71 ± 0.05 |
| | + | 1.18 ± 0.06 | 1.85 ± 0.08 | 0.97 ± 0.07 | 0.07 ± 0.02 | 4.07 ± 0.11 | 0.30 ± 0.01 |
| UT-1DOP | - | 2.32 ± 0.03 | 5.78 ± 0.11 | 3.03 ± 0.14 | 0.18 ± 0.01 | 11.32 ± 0.23 | 0.69 ± 0 |
| | + | 2.00 ± 0.12 | 4.97 ± 0.06 | 3.05 ± 0.03 | 0.18 ± 0.01 | 10.20 ± 0.01 | 0.64 ± 0.02 |

Sake mash was prepared with UT-1 (*OPII/OPII*) and UT-1DOP (Δ *opi1::TRP1/\Delta**opi1::URA3*) using 200 g of polished rice with the supplementation of 27 mg of tryptophan and 68 mg of uracil and 0 or 125 mg of inositol. Middle chain fatty acid and ethyl caproate concentrations (ppm) in sake were measured and expressed as the mean ± S.D. of two independent experiments.

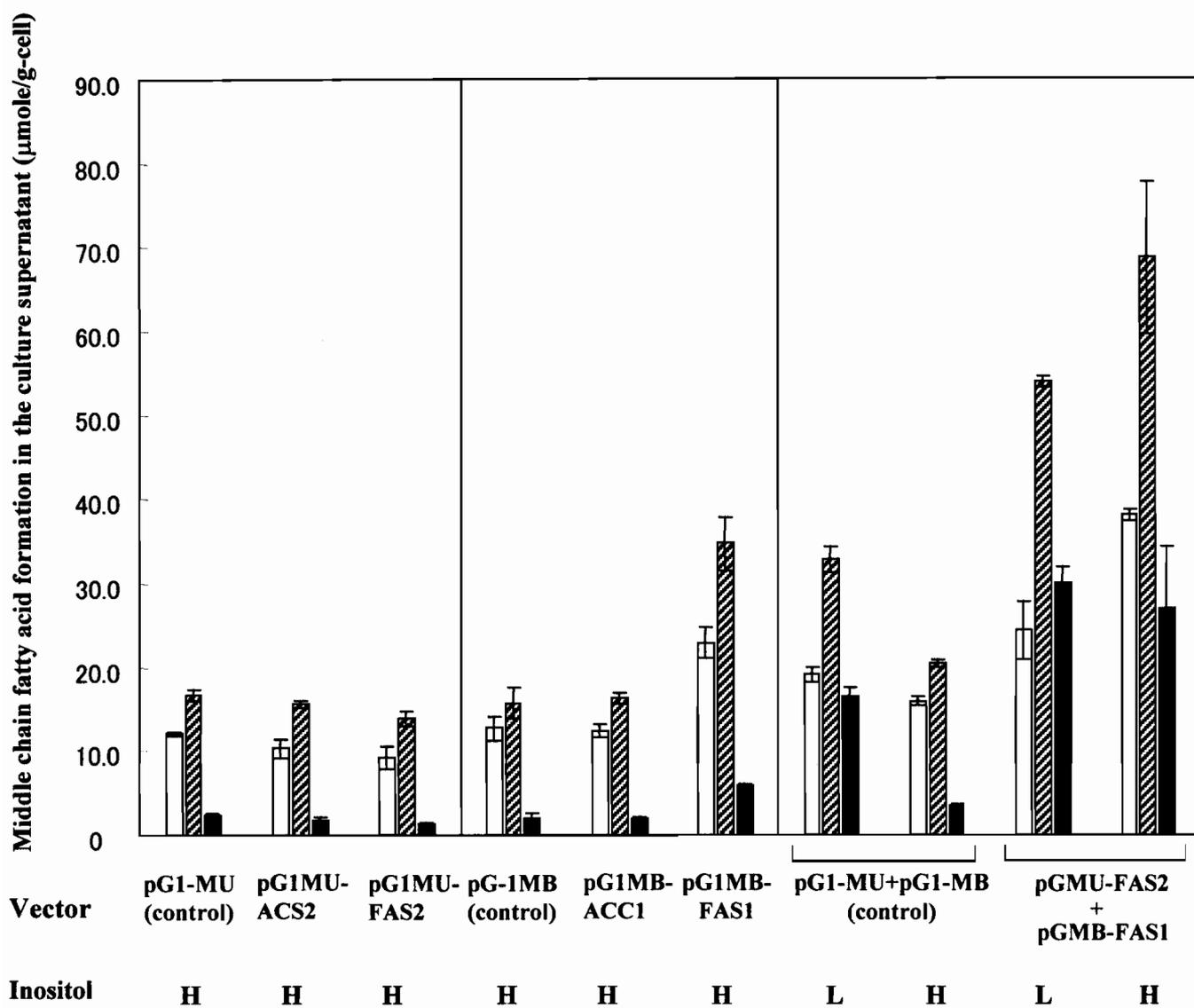


Fig. 3-9. Effect of the over expression of *ACS2*, *ACC1*, *FAS1*, and *FAS2* on middle chain fatty acid content in the culture supernatant. pGMU-*ACS2*, pGMU-*FAS2*, pGMB-*ACC1*, and pGMB-*FAS1*, and their respective control vectors, pGMU and pGMB, were used to transform strain W303-1A. Transformants were cultured in the synthetic medium containing 0 ppm (L) or 200 ppm (H) inositol for 5 d at 15°C. The culture supernatants were subjected to the analysis of middle chain fatty acids (C6, □; C8, ▨; C10, ■). Data were mean values of three independent experiments and bars indicate standard deviation.

第5節 要約と考察

〈要約〉

精米歩合70%の白米を醪の仕込みに使用すると、80%以上の白米を使用した場合に比べて製成酒のカプロン酸エチル含量は高くなった。醪にイノシトールを添加しない場合、精米歩合70%ではカプロン酸エチル含量はイノシトールを添加した場合の1/2に低下し、精米歩合70~98%の間に、含量の差はみられなかった。

イノシトールは酵母のカプロン酸エチル生成に関与する酵素活性に影響を与えなかった。イノシトールによるカプロン酸エチル生成抑制は中鎖脂肪酸生成の抑制によるものであった。イノシトールによる負の発現調節遺伝子である*OPI1*を破壊することにより、イノシトールによる中鎖脂肪酸生成抑制は解除された。脂肪酸合成遺伝子のうち、*FAS1*を構成発現させた場合のみ、中鎖脂肪酸合成量が増大した。

〈考察〉

精米歩合70%の白米を使用した醪では、精米歩合80%以上の白米を使用した醪よりもイノシトールの供給が制限されるため、酵母細胞密度が低いが、製成酒のカプロン酸エチル含量はもっとも高くなった。しかし、イノシトールを添加すると含量は無添加の場合の1/2に低下した。精米歩合70%の場合に製成酒のカプロン酸エチル含量は最大となるのはイノシトール供給が制限されるためであることがわかった。

イノシトールが制限されることによってカプロン酸エチル含量が増大する原因を明らかにするため、イノシトール無添加醪と添加醪を調製した。イノシトールを添加しても、醪中の酵母のカプロン酸エチル生成に関連する酵素活性は変わらなかった (Fig. 3-3)。しかし、イノシトールを添加すると醪上清のカプロン酸等の中鎖脂肪酸含量が減少した (Fig. 3-4)。このことから、イノシトールが制限されることによって製成酒のカプロン酸エチル含量が増大するのは、その基質であるカプロン酸の生成量が増大するためであると考察した。

イノシトールが制限されることによって中鎖脂肪酸生成量が増大する原因としては次の二つが考えられる。ひとつは嫌気培養において中鎖脂肪酸生成量が増大する原因として報告されているように⁷⁷⁻⁷⁹⁾、脂肪酸の鎖長延長が制限されることによって中鎖fatty acyl-CoAの放出が促進されることによるものである。もうひとつは、脂肪酸合成量が増大することによるものである。そこで、酵母の合成脂肪酸量を知るため、イノシトールを制限した培地と十分量のイノシトールを添加した培地でイノシトール要求株を培養し、酵母菌体脂肪酸含量を測定した。イノシトールを制限すると菌体脂肪酸含量が増大した (Fig. 3-4) ことから、イノ

シトールが制限されることによって中鎖脂肪酸生成量が増大するのは酵母の脂肪酸合成量が増大するためであると思われる。

*Saccharomyces carlsbergensis*はイノシトールが欠乏した時、細胞内fructose-1,6-P₂レベルが増大し、その結果、acetyl-CoA carboxylaseがアロステリックに活性化され、菌体に中性脂質を蓄積することが報告されている⁸⁰⁾。したがって、*S.cerevisiae*においても、イノシトールが制限されることによってacetyl-CoA carboxylaseがアロステリックに活性化されることが、脂肪酸合成が促進される原因の1つとして考えられる。一方、*ACS2* (acetyl-CoA synthetase 遺伝子)、*ACC1* (acetyl-CoA carboxylase 遺伝子)、*FAS1* (fatty acid synthetase 遺伝子β-subunit) および*FAS2* (fatty acid synthetase 遺伝子α-subunit) の一連の脂肪酸合成遺伝子はプロモーター領域にinositol/choline responsive elementという配列を持つ⁸¹⁻⁸⁴⁾。従って、イノシトールが制限されると脂肪酸合成が促進されるもう1つの原因として、一連の脂肪酸合成遺伝子の発現が転写レベルで増大することが考えられる。しかしこれらの脂肪酸合成遺伝子の発現量の制御レベルは*INO1*、*CHO1*および*OPI3*などのリン脂質合成に関与する遺伝子ほど顕著ではない⁸⁵⁾ ため、Northern解析で抑制の有無を検討することは困難である。

そこでイノシトールによる脂肪酸合成の促進が脂肪酸合成遺伝子の転写レベルの増大によるものかを知るため、イノシトールとコリンによる負の転写調節遺伝子である*OPI1*破壊株 (*Δopi1*) を作製した。液体培養および醗上清において*OPI1*破壊株は対照株 (*OPI1*) より著量の中鎖脂肪酸を生成し、イノシトールを十分量添加した場合と制限した場合との間に中鎖脂肪酸含量の差はほとんどみられなかった (Table 3-5, Table 3-6)。したがってイノシトールによって中鎖脂肪酸生成が抑制されるのはacetyl-CoA carboxylaseのアロステリックな活性化によるのではなく、*OPI1*を介した脂肪酸合成遺伝子の転写抑制によると考えられる。

脂肪酸合成遺伝子*ACS2*、*ACC1*、*FAS1* および*FAS2*を構成発現する株を作製し、液体培養した。acetyl-CoA synthetase は脂肪酸合成の律速酵素であり、in vitroにおいて脂肪酸鎖長の温度依存性の制御に関与することが報告されている⁸⁶⁾。しかし、*ACC1*を構成発現させても培養上清の中鎖脂肪酸含量に変化はみられなかった (Fig. 3-9)。同様に、*ACS2*および*FAS2*を構成発現させても中鎖脂肪酸生成は促進されなかった。一方、*FAS1*を構成発現させると培養上清の中鎖脂肪酸含量は増大した。*FAS1*と*FAS2*を同時に構成発現させると、含量はさらに増大し、イノシトールを十分に添加した場合と無添加の場合との間に中鎖脂肪酸含量の差はみられなくなった。これはfatty acid synthetaseのα、β、個々のサブユニットは単独で存在する時はタンパク分解酵素の作用によって分解されやすいので⁸⁷⁾、両者を同時に構成発現させた時、両サブユニットがComplexを形成

することによって、安定性が増大したためであると考えられる。

以上のことから、イノシトールの供給が制限された時、カブロン酸エチル生成量が増大するのは、*OPII*遺伝子を介する*FAS1*の転写抑制が解除され、中鎖脂肪酸の生成が促進されるためであると結論した。清酒醸造において使用する原料米を高度に搗精することはイノシトールの供給を制限し、カブロン酸エチル含量の高い、香り豊かな清酒の醸造を可能にすると考えられる。

第4章 酵母の酢酸イソアミル生産に与えるイノシトールの影響⁸⁸⁾

第1節 序

本章では、搗精した原料米を使用し、醪における酵母へのイノシトールの供給量を制限することが、製成酒の酢酸イソアミル含量とその生成酵素であるAATase活性にどのような影響を与えるかを明らかにすることを目的とする。

酢酸イソアミルは、イソアミルアルコールとacetyl-CoAを基質として酵母のAATaseによって生合成されるが、イソアミルアルコール生成量とAATase活性が、酢酸イソアミル生成量に影響を与えることが知られている。本章では、イノシトールの供給量と酵母のAATase活性との関係について、酵母細胞膜構成リン脂質の1つであるPIの作用という観点から分析した結果を述べる。

第2節 イノシトール供給量の製成酒酢酸イソアミル含量に与える影響

〈方法〉

1) 菌株および醪小仕込み試験

第3章，第2節，〈方法〉1) で述べた清酒酵母 *S. cerevisiae* ATCC32694株，日本醸造協会701号 (K701)，901号 (K901)，8号 (K8)，第3章，第4節 〈方法〉1) で述べたUT-1株および第3章，第4節 〈方法〉4) で述べたUT-1DOPを使用した。醪は難波らの方法⁴⁷⁾ にしたがってイノシトールを無添加および125 mg添加した総米200 gの3段仕込みを行った。麴は精米歩合70%の白米から調製し，掛米は精米歩合70，80，90，98%の白米を使用した。

2) 定量

酢酸イソアミルおよびイソアミルアルコールは，ガスクロマトグラフを用いてヘッドスペース法により定量した⁷²⁾。酢酸イソアミル含量のイソアミルアルコール含量に対する比をE/A比とした。

イソブチルアルコール，酢酸イソブチル，酢酸エチル，ピルビン酸エチル，乳酸エチルは以下の方法によって定量した。試料100 mlに0.1% (w/v) シクロヘキサノールを含むエタノール溶液100 μ lを添加した後，エーテル-ペンタン (2:1 v/v) 50 mlで30分間，3回振とう抽出した。蒸留水100 mlで洗浄した後，無水硫酸ナトリウムで脱水した。ウィットマー精留管付濃縮装置を用いて0.2 mlまで減圧下で濃縮した後，TC-WAX カラム (0.32 mm \times 60 m, 0.25 μ m film thickness ; GL Science, 東京) を用いて，坂本らの方法⁸⁹⁾ に従ってガスクロマトグラフィーにより定量した。

β -フェネチルアルコール，チロソール，トリプトフォール，酢酸 β -フェネチ

ルはAkitaらの方法⁹⁰⁾によってガスクロマトグラフィーにより定量した。

検出はすべてFIDを用いて行った。

(結果)

1) 精米歩合の製成酒酢酸イソアミル含量およびE/A比に与える影響

精米歩合70, 80, 90, 98%の白米を掛米として, K901株を使用してイノシトール無添加および添加醪を調製し, 製成酒の酢酸イソアミルおよびイソアミルアルコール含量を測定した結果をFig.4-1に示す. イノシトール添加の有無に関係なく, 精米歩合が高いほど, 製成酒のイソアミルアルコール含量が高くなった.

イノシトールを添加しない醪では, 精米歩合70%を用いた時, イソアミルアルコール含量が低いにもかかわらず, 酢酸イソアミル含量は最大となった. E/A比は精米歩合が低い場合ほど高くなり, 精米歩合70%の場合に最大となった. イノシトールを添加すると, 精米歩合70%の場合にはE/A比はイノシトール無添加の場合の50%にまで低下した. これに対して, 精米歩合90%以上の場合にはイノシトールを添加してもE/A比は変わらなかった.

2) イノシトール添加の製成酒酢酸イソアミル含量に与える影響

精米歩合70%の白米を用いて, イノシトール添加および無添加の醪を調製し, 製成酒の酢酸イソアミルおよびイソアミルアルコール含量を測定した結果をTable 4-1に示す. いずれの菌株を使用した場合においても, イノシトール添加と無添加との間に, イソアミルアルコール含量の差はみられなかった. しかし, 醪へイノシトールを添加すると製成酒の酢酸イソアミル含量およびE/A比は低下した.

3) イノシトール添加の製成酒芳香成分含量に与える影響

K901株を用いて醪を調製し(精米歩合70%), 製成酒中の種々の芳香成分の含量を測定した結果をTable 4-2に示す. イノシトールを添加しても高級アルコール, ピルビン酸エチル, 乳酸エチル含量はほとんど変わらなかった. 一方, すべての酢酸エステルの含量はイノシトールの添加によって低下した.

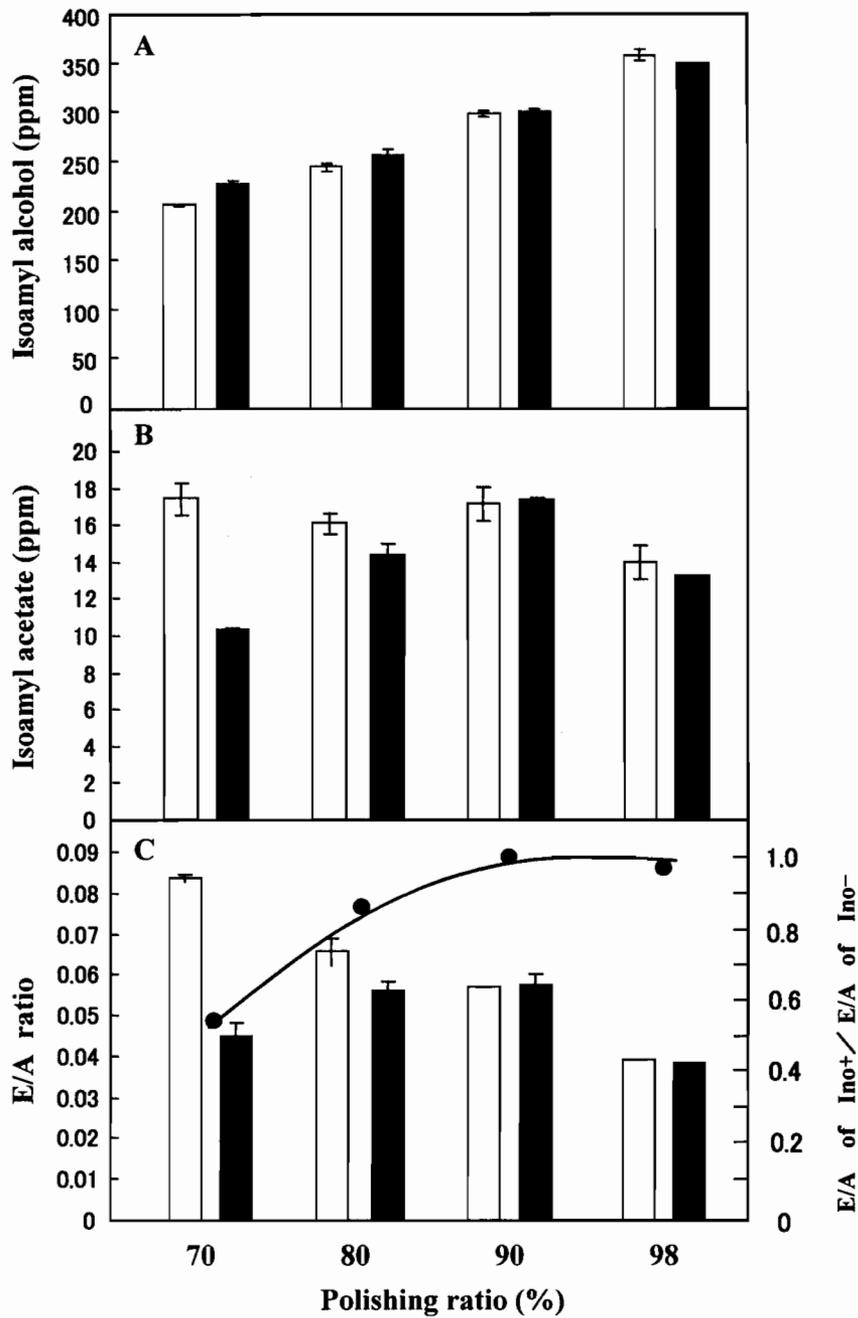


Fig. 4-1. Effect of polishing ratio on isoamyl alcohol and isoamyl acetate contents in sake mash. Sake mash was prepared with strain K901 using 200 g of polished rice (polishing ratios: 70, 80, 90, and 98%) without (Ino⁻, □) or with (Ino⁺, ■) the addition of inositol. Isoamyl alcohol (A) and isoamyl acetate (B) concentrations in the supernatant (fresh sake) were measured by headspace gas chromatography, and E/A ratio (isoamyl acetate / isoamyl alcohol) was calculated (C). The E/A ratio of Ino⁺ to Ino⁻ is represented as a closed circle. Data are means of two different samples of sake mashes and bars indicate standard deviation.

Table 4-1. Effect of inositol on isoamyl alcohol and isoamyl acetate contents of sake

| Strain | Isoamyl alcohol (ppm) | | | Isoamyl acetate (ppm) | | | E/A ratio | | |
|-----------|-----------------------|-------|-------|-----------------------|-------|-------|-----------|-------|-------|
| | Ino - | Ino + | Ratio | Ino - | Ino + | Ratio | Ino - | Ino + | Ratio |
| K701 | 169 | 157 | 0.93 | 4.2 | 2.4 | 0.57 | 0.025 | 0.015 | 0.60 |
| K901 | 158 | 157 | 0.99 | 9.8 | 5.3 | 0.54 | 0.062 | 0.034 | 0.55 |
| K8 | 130 | 112 | 0.86 | 2.7 | 1.1 | 0.41 | 0.021 | 0.010 | 0.48 |
| ATCC32694 | 200 | 184 | 0.92 | 5.3 | 4.1 | 0.77 | 0.027 | 0.022 | 0.81 |
| UT-1 | 218 | 231 | 1.06 | 5.4 | 4.4 | 0.81 | 0.025 | 0.019 | 0.76 |
| UT-1DOP | 184 | 183 | 0.99 | 5.3 | 4.0 | 0.75 | 0.029 | 0.022 | 0.76 |

Sake mash was prepared with several types of sake yeast using 200 g of polished rice (polishing ratio: 70 %) without (Ino-) or with (Ino+) the addition of inositol. The isoamyl alcohol and isoamyl acetate concentrations (ppm) of the supernatant (fresh sake) were measured by headspace gas chromatography, and E/A ratio (isoamyl acetate / isoamyl alcohol) was calculated.

Table 4-2. Effect of inositol on the production of odor-enhancing compounds in sake

| Compounds | Concentration (ppm) | | +/- ratio | |
|----------------|-------------------------------|------|-----------|------|
| | - | + | | |
| Higher alcohol | Isobutyl alcohol | 72.3 | 71.4 | 0.99 |
| | Isoamyl alcohol | 167 | 172 | 1.02 |
| | β -Phenyl ethyl alcohol | 222 | 211 | 0.95 |
| | Tyrosol | 181 | 144 | 0.80 |
| | Tryptophol | 13.5 | 11.4 | 0.84 |
| Acetate ester | Isobutyl acetate | 0.44 | 0.37 | 0.84 |
| | Isoamyl acetate | 10.7 | 6.3 | 0.59 |
| | β -Phenyl ethyl acetate | 5.4 | 3.1 | 0.57 |
| | Ethyl acetate | 112 | 81 | 0.72 |
| Other ester | Ethyl pyruvate | 0.20 | 0.20 | 1.00 |
| | Ethyl lactate | 2.37 | 2.28 | 0.96 |

Sake mash was prepared with strain K901 using 200 g of polished rice (polishing ratio: 70 %) without (-) or with (+) the addition of inositol. The concentrations of odor-enhancing compounds (ppm) of the supernatant (fresh sake) were measured by gas chromatography.

第3節 酵母のアルコールアセチルトランスフェラーゼ活性と同遺伝子発現に与えるイノシトールの影響

〈方法〉

1) 醪小仕込み試験

第3章, 第2節〈方法〉1) に準じて, K901を使用し, イノシトール無添加 または125 mg添加した総米200 gを用いて3段仕込みを行った.

2) AATase活性の測定

醪中の酵母は遠心分離法によって分画した⁵¹⁾. 約 2×10^9 の酵母細胞を1 mM ジチオスレイトールを含む20 mMリン酸緩衝液 (pH 7.5) 1 mlに懸濁し, 第1章, 第4節〈方法〉2) に示す方法によって細胞を破砕し, 無細胞抽出液を得た.

無細胞抽出液のAATase活性をYoshiokaらの方法²⁷⁾ に準じて測定した. 酵素反応によって生成した酢酸イソアミルを定量するため, 内部標準としてカブロン酸メチルを使用した. 1時間に1 μg の酢酸イソアミルを生成する酵素量を1 unitと定義した.

3) Northern解析

仕込み4日目の醪から分画した酵母から, 全RNAをホットフェノール法⁹¹⁾ によって抽出した. AATaseをコードする遺伝子*ATF1*および*ATF2*の発現量を測定するため, 以下の方法によってNorthern解析を行った.

10 μg のRNAを18% (v/v) ホルムアルデヒドを含む1% (w/v) アガロースゲルで電気泳動によって分離した後, Hybond-N⁺膜 (Amersham Pharmacia Biotech.) に転写し, DIGラベルしたプローブとハイブリダイズさせた. 約0.4 kbの*ATF1*および*ATF2*プローブ, 約0.1 kbの*ACT1*プローブは, PCR DIG Labeling and Detection kit (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) を用いて, K901株を鋳型としてPCRによって調製した. プライマーとして, 5'-primer: 5'-CGATGAGAAAAATCAGGCCCC-3', 3'-primer: 5'-CTTCTAATATTTGCTTCATTA-3' (*ATF1*), 5'-primer: 5'-ATGGAAGATATAGAAGGATA-3', 3'-primer: 5'-ATTGGTGA CTTTGAATCAT-3' (*ATF2*) および5'-primer 5'-TTCTGGTATGTGTAAAGCCG3', 3'-primer 5'-TCTTTTGGACCCATACCGAC-3' (*ACT1*) を使用した. それぞれのm-RNA量はBIO-1D (エムエス機器, 東京) を用いて画像処理によって定量化した. *ATF1*および*ATF2*の発現量は, *ACT1*の発現量に対する相対値として表示した.

〈結果〉

1) イノシトールの醪酵母AATase活性に与える影響

イノシトール無添加および添加醪中の酵母のAATase活性を経時的に測定した結果をFig.4-2に示す。醪にイノシトールを添加すると酵母のAATase活性は低下した。イノシトールを添加すると製成酒の酢酸イソアミル含量が低下する理由は、AATase活性が低下することによるものであることがわかった。

2) *ATF1*および*ATF2*遺伝子の発現量解析

イノシトール無添加および添加醪の酵母*ATF1*および*ATF2*遺伝子の発現量を比較した結果をFig.4-3に示す。イノシトールを添加しても両遺伝子の発現量に変化はみられなかった。イノシトールによってAATase活性が低下する理由は、これらの遺伝子の転写が抑制されるためではないことがわかった。

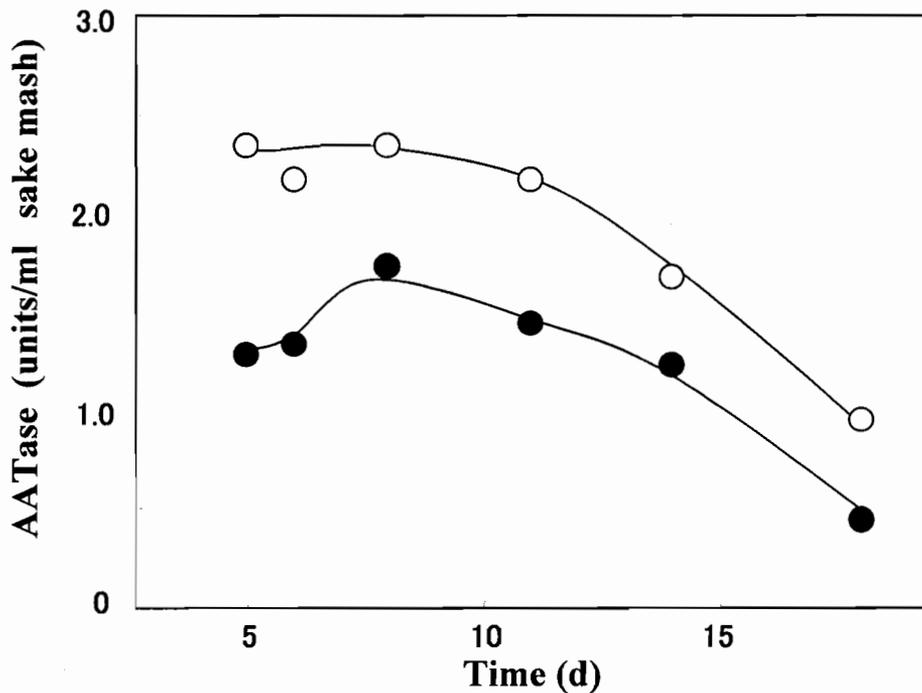


Fig. 4-2. Effect of inositol on alcohol acetyltransferase activity of *S. cerevisiae* in sake mash. Sake mash was prepared with strain K901 using 200 g of polished rice without (○) or with (●) the addition of inositol. The alcohol acetyltransferase (AATase) activity in cell-free extract was measured and is represented as units per ml of sake mash.

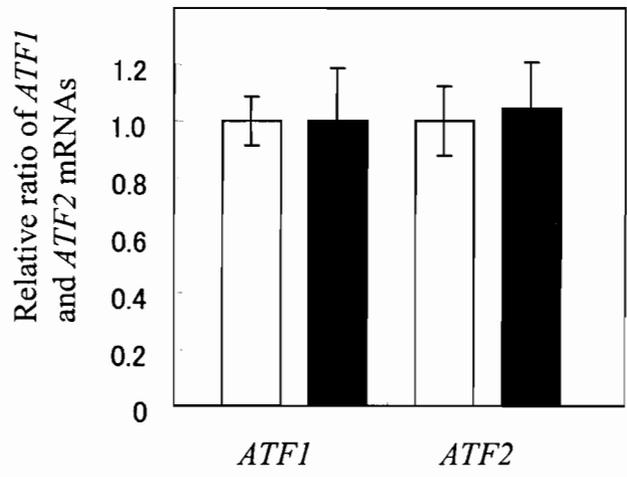
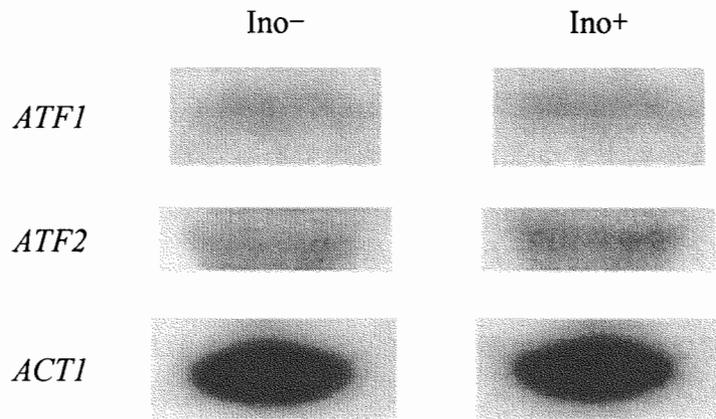


Fig. 4-3. Northern blot analysis of *ATF1* and *ATF2* genes. Sake mash was prepared with strain K901 using 200 g of polished rice (polishing ratio: 70%) without (*Ino*⁻; □) or with (*Ino*⁺; ■) the addition of inositol. Total RNA from yeast cells on the 4th day of brewing was prepared by the hot-phenol extraction method. The total RNA (10 μg) was separated on gels, transferred onto membranes, and hybridized with *ATF1*, *ATF2* and *ACT1* probes. The amount of mRNA was determined using *ACT1* mRNA as internal control. Data are means of three independent experiments and bars indicate standard deviation.

第4節 酵母のアルコールアセチルトランスフェラーゼ活性に与える菌体内ホスファチジルイノシトールの影響

〈方法〉

1) 醪小仕込み試験

本章，第3節〈方法〉1) に示す方法により，イノシトールを無添加および125 mg添加した醪の3段仕込みを行った。

2) 醪中の酵母由来リン脂質の調製

醪工程4日目のイノシトール添加醪から分画した酵母湿菌体180 gを用いて，脂質をBligh-Dyer法⁹²⁾によって抽出した。抽出した脂質をWakogel C-200カラム (20×850 mm, 和光純薬) にアプライした。中性脂質および糖脂質をそれぞれ2 lのクロロホルムおよび1 lのアセトンで溶出した後，2.7 lのメタノールでリン脂質を溶出した。リン脂質画分をエバポレーターで乾固した後，2 mlのクロロホルム-アセトン (7:3, v/v) に溶解した。

PI, ホスファチジルコリン (PC), ホスファチジルエタノールアミン (PE), ホスファチジルセリン (PS) はNUCLEOSIL 50-10カラム (GL Science) を用いてTable 4-3に示す条件下で高速液体クロマトグラフィーにより分離し，採取した⁹³⁾。それぞれのリン脂質画分150 mlに60 mlの蒸留水と120 mlのクロロホルムを添加し，振とうした後，3000×g, 10分間遠心分離した。クロロホルム層から各リン脂質を回収した後，減圧下で2mlに濃縮した。

各リン脂質は，第3章，第3節〈方法〉4) に示す方法により，構成脂肪酸をメチルエステル化した後，ガスクロマトグラフィーによって定量した。

Table 4-3. HPLC conditions for the analysis of phospholipids

| | |
|------------------|--|
| Column | NUCLEOSIL 50-10, 7.6 × 250 mm |
| Eluent | Acetonitrile -Methanol-Phosphoric acid (780:10:9, v/v) |
| Flow rate | 4.0 ml/min |
| Injection volume | 150 μl |
| Detection | 210 nm |

3) 酵母リン脂質含量の測定

酵母菌体のリン脂質含量は以下の方法によって測定した。750 mgの酵母凍結乾燥菌体中のリン脂質をFolchらの方法⁹⁴⁾に従って抽出した後、減圧下で1.5 mlに濃縮した。リン脂質は本章、第4節、方法2)に示す方法により高速液体クロマトグラフィーで分析した。各リン脂質の標準曲線は本章、第4節、方法2)で調製したリン脂質を用いて作成した。

酵母無細胞抽出液中のリン脂質は以下の方法によって定量した。試料中のリン脂質をクロロホルム-メタノール溶液 (1:2, v/v) で1回、クロロホルム-メタノール溶液 (2:1, v/v) で2回抽出した後、LK6D薄層クロマトグラフ用シリカゲルプレートKent ME16 (Whatman, OLS, UK) を用いて分離した。展開溶媒としてクロロホルム-メタノール-酢酸-水 (85:15:10:4, v/v) を使用した。薄層プレートをヨウ素蒸気に曝すことによってリン脂質を検出した。PI, PCおよびPEに相当するスポットをプレートから剥離し、クロロホルム-メタノール (2:1, v/v) で3回抽出した後、減圧下で乾固した。PI画分は2 N塩酸で120°C, 48時間加水分解した後、遊離するイノシトールを第1章、第2節〈方法〉2)に示す方法により定量した。PCおよびPE画分は硝酸2滴を加えた70% (w/v) 過塩素酸1 mlで160°C, 90分間加水分解した後、遊離したリン酸をモリブデン法によって定量した⁹⁵⁾。

4) AATaseの定量

本章、第3節、〈方法〉2)に示す方法によって酵母無細胞抽出液を調製し、AATase活性を測定した。

5) 粗AATaseの調製

K901株を、2 ppmイノシトール、20% (w/v) 沸石、10% (w/v) グルコースを含む600 mlのHayashidaらの合成培地⁴⁴⁾で15°C, 5日間培養した。菌体を集菌し、冷水で洗浄した後、洗浄菌体を1 mMジチオスレイトールを含む1/15 Mリン酸緩衝液 (pH 7.5) 40 mlに懸濁し、第1章、第4節〈方法〉2)に示す方法によって細胞を破碎した。15,000×g, 20分間遠心分離した後、上清を100,000×g, 60分間遠心分離した。生じた沈殿 (ミクロソーム画分) に1 mMのジチオスレイトール、1% (w/v) トリトンX-100, 20% (w/v) グリセロールを含む1/15 Mリン酸緩衝液 (pH 7.5, T-bufferと称する) 11 mlを添加し、4°C, 1夜放置した。100,000×g, 60分間遠心分離した後、上清を硫酸で塩析 (70%飽和) した。6000×g, 10分間遠心分離し、生じた沈殿を10 mlのT-bufferに溶解させた。0.5% (w/v) イソアミルアルコールを含むT-bufferで1夜透析し、粗AATaseを得た。

6) 無細胞抽出液からPIの除去

無細胞抽出液のリン脂質を2倍量のクロロホルムで抽出，除去した．水層の酵素タンパクを硫酸塩析（70%飽和）によって回収した．

また，無細胞抽出液0.5 mlに5 unitsのホスホリパーゼC（Sigma-Aldrich）を添加し，15°C，1夜反応させた後，酵素タンパクを硫酸塩析（70%飽和）によって回収した．

それぞれの塩析後の試料は，6000×g，10分間遠心分離し，生じた沈殿をT-bufferに対して1夜透析した．

7) リン脂質

PC（卵製；Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA）およびPCにホスホリパーゼDを作用させて調製したホスファチジルグリセロール（PG；Avanti Polar Lipids）を使用した．これらのPCおよびPGは同じ脂肪酸組成をもつことをガスクロマトグラフィーによって確認した．

〈結果〉

1) 醗中の酵母のリン脂質含量およびその脂肪酸組成

イノシトール無添加および添加醗の酵母のリン脂質含量を測定した結果をFig.4-4に示す．イノシトールを添加することによって酵母菌体のPI含量は約3倍に増大した．一方，PC，PE，PSの含量はイノシトールを添加しても変わらなかった．

イノシトール添加醗の酵母から調製したリン脂質の脂肪酸組成を分析した結果をFig.4-5に示す．PIおよびPSは，PCおよびPEに比べて飽和脂肪酸の割合が高く，構成脂肪酸の不飽和度が低かった（Fig.4-5）．

2) 無細胞抽出液からPI除去のAATase活性に与える影響

イノシトール無添加および添加醗の酵母から調製した無細胞抽出液のリン脂質をクロロホルムで抽出，除去した後，AATase活性およびPI含量を測定した結果をFig.4-6に示す．クロロホルム処理によって無細胞抽出液中のPIが除去された時，イノシトール無添加および添加醗の間のAATase活性の差は見られなくなった．

次に，イノシトール無添加および添加醗の酵母から調製した無細胞抽出液をホスホリパーゼCで処理した．Fig.4-6に示すように，無細胞抽出液中のPIは完全に除去されなかったが，イノシトール無添加および添加醗間のPI含量の差は見られなくなり，同時に，AATase活性の差も消失した．

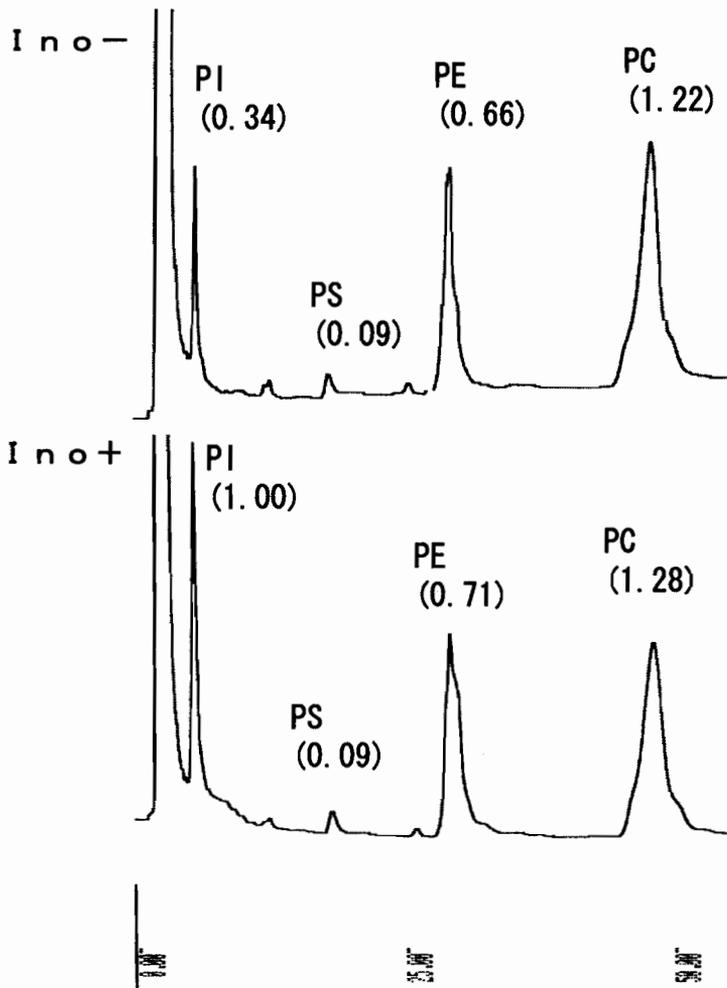


Fig. 4-4. HPLC analysis of phospholipids from sake mash yeast cells. Sake mash was prepared with strain K901 using 200 g of polished rice (polishing ratio: 70 %) without (Ino⁻) or with (Ino⁺) the addition of inositol. Phospholipids extracted from yeast cells in the sake mashes on the 4th day of brewing were subjected to HPLC using a NUCLEOSIL 50-10 column. Each phospholipid concentration was determined by calibration using a phospholipid preparation obtained from yeast cells in sake mash. Values in parentheses represent relative phospholipid concentrations.

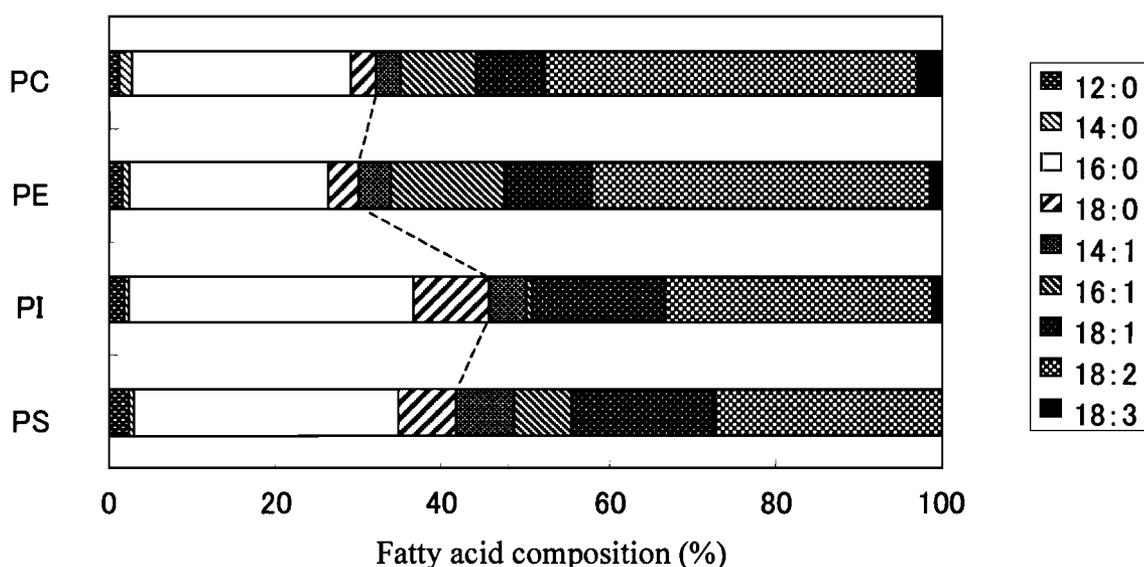


Fig. 4-5. Fatty acid composition of phospholipids extracted from yeast cells in sake mash. Yeast cells were cultured for 4 d in sake mash supplemented with inositol. The unsaturation values of PC, PE, PI, and PS, calculated using $(\% \text{ monoene} + 2 (\% \text{ diene}) + 3 (\% \text{ triene}))/100$, were 1.19, 1.14, 0.89, and 0.86, respectively.

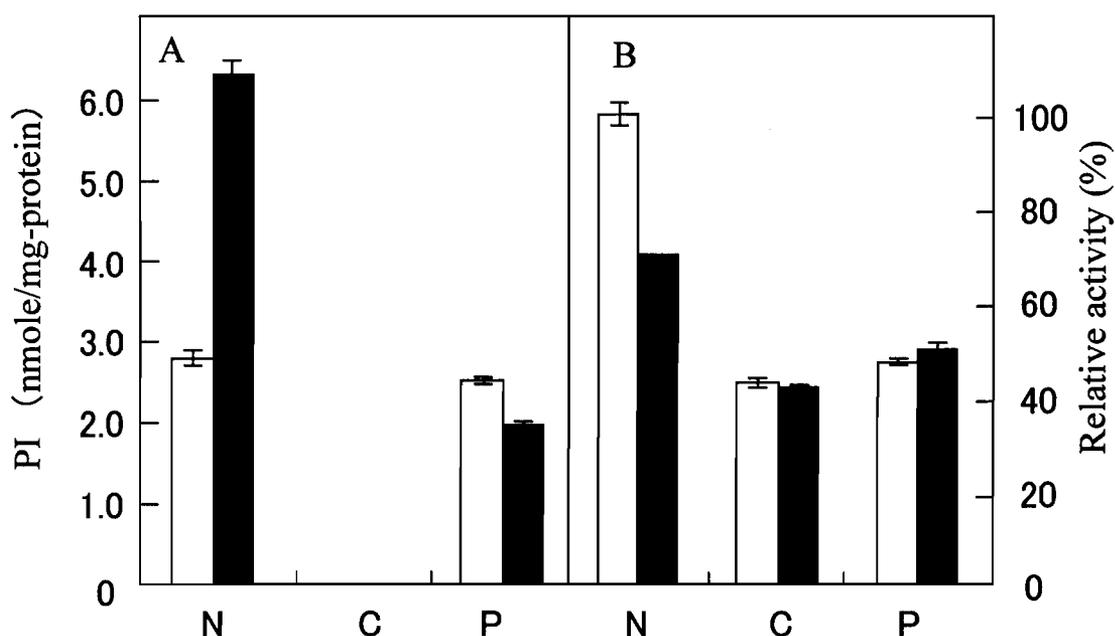


Fig. 4-6. Effect of treatment with chloroform or phospholipase C on the PI content and AATase activity of cell-free extracts. Sake mash was prepared with strain K901 using 200 g of polished rice (polishing ratio: 70%) without (\square) or with (\blacksquare) the addition of inositol. Cell-free extracts (N) were treated with chloroform (C) or phospholipase C (P), followed by salting out with ammonium sulfate (70% saturation). After dialysis, PI content per mg protein (A) and AATase activity (B) were evaluated. Data are means of two independent experiments and the bars indicate standard deviation.

3) リン脂質のAATase活性に与える影響

醪から調製したPI, PC, PEをそれぞれ0.25 mMおよび0.5 mMを12 unitsのAATaseを含む反応液に添加してAATase活性を測定した. Fig. 4-7に示すように, PIはPCおよびPEに比べて活性を強く阻害した.

PI, PC, PEおよびPSをイノシトール無添加および添加醪の酵母のリン脂質構成比 (Fig.4-4) となるように, 12 unitsのAATaseを含む反応液に添加して活性を測定した. Table 4-4に示すように, リン脂質をイノシトール添加醪のリン脂質組成比で添加した場合には, 無添加醪の組成比で添加した場合に比べて, 活性は26~55%にまで低下した.

以上の結果から, イノシトール添加醪の酵母が無添加醪の酵母よりAATase活性が低いのは, PI含量が高く, 活性を阻害するためであることがわかった.

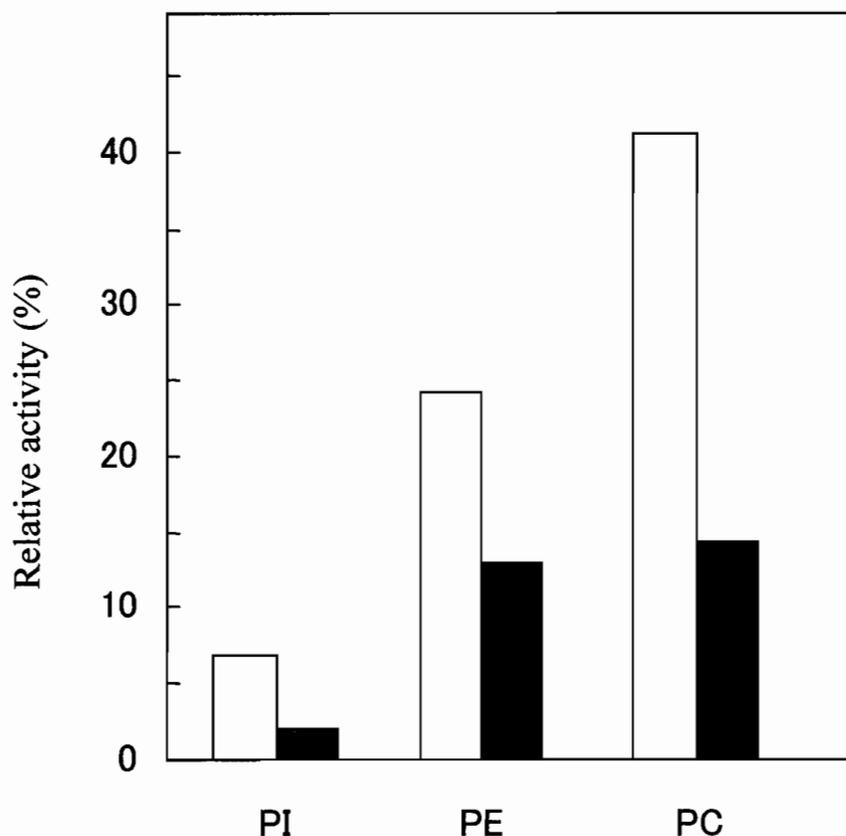


Fig. 4-7. Effect of phospholipids on AATase activity. PI, PC, and PE (□, 0.25 mM ; ■, 0.50 mM), which were prepared from sake mash yeast cells, were independently added to the reaction mixtures containing 12 units of AATase. AATase activity without phospholipid addition is represented as 100.

Table 4-4. Effect of phosphatidylinositol on the activity of alcohol acetyltransferase activity

| PI level | Phospholipids added to reaction mixture (mM) | | | | Relative activity (%) | Ratio ^a |
|----------|--|-------|-------|-------|-----------------------|--------------------|
| | PI | PC | PE | PS | | |
| L | 0.018 | 0.066 | 0.036 | 0.005 | 87.9 | 0.55 |
| H | 0.052 | 0.066 | 0.036 | 0.005 | 48.0 | |
| L | 0.021 | 0.080 | 0.043 | 0.006 | 66.0 | 0.36 |
| H | 0.062 | 0.080 | 0.043 | 0.006 | 23.9 | |
| L | 0.035 | 0.132 | 0.072 | 0.009 | 19.9 | 0.26 |
| H | 0.103 | 0.132 | 0.072 | 0.009 | 5.1 | |
| L | 0.070 | 0.262 | 0.143 | 0.018 | 8.8 | 0.30 |
| H | 0.205 | 0.262 | 0.143 | 0.018 | 2.6 | |

Phospholipids with two proportions (PI-PC-PE-PS (0.34:1.28:0.70:0.09) and (1.00:1.28:0.70:0.09)), corresponding to the phospholipid compositions of yeast cells from sake mashes, without (L) or with (H) the addition of inositol, respectively, were added to a reaction mixture containing 12 units of AATase. AATase activity was measured using a crude enzyme solubilized with Triton X-100. AATase activity without phospholipids is represented as 100.

^aRatio of relative activity of H to that of L.

4) リン脂質のタンパク質への吸着

イノシトール無添加および添加醪酵母の無細胞抽出液およびその硫酸塩析沈殿物（90%飽和）のリン脂質含量を測定した結果をTable 4-5に示す。いずれの醪の酵母においても、無細胞抽出液中のPIのほぼ100%が塩析沈殿物から回収された。これに対して、PCおよびPEの回収率は50%程度であった。以上の結果はPIがPCやPEに比べて、強くタンパク質に吸着されることを示している。

Table 4-5. Recovery of phospholipids in the precipitate with ammonium sulfate

| Preparation | Fraction | PE | | PC | | PI | |
|-------------|-------------|------------------------------------|-----------------|------------------------------------|-----------------|------------------------------------|-----------------|
| | | Content ($\mu\text{mole/ml}$) | Recovery (%) | Content ($\mu\text{mole/ml}$) | Recovery (%) | Content ($\mu\text{mole/ml}$) | Recovery (%) |
| Ino - | Cell-free | 0.29 | 0.41 | 0.33 | 0.44 | 0.075 | 0.93 |
| | Precipitate | 0.12 | | 0.17 | | 0.070 | |
| Ino + | Cell-free | 0.29 | 0.55 | 0.48 | 0.54 | 0.168 | 1.04 |
| | Precipitate | 0.16 | | 0.26 | | 0.174 | |

Sake mash was prepared with strain K901 using 200 g of polished rice (polishing ratio: 70%) without (Ino -) or with (Ino +) the addition of inositol. Cell-free extracts prepared from yeast cells in the Ino - or Ino + sake mash were subjected to ammonium sulfate precipitation (90% saturation), followed by the determination of phospholipids by TLC. The recoveries of PI, PC, and PE in the precipitate were calculated.

5) PGのAATase活性阻害効果

同じ脂肪酸組成を持つPGとPCのAATase阻害活性を測定した結果をFig.4-8に示す。PGはPCより強くAATaseを阻害することがわかった。

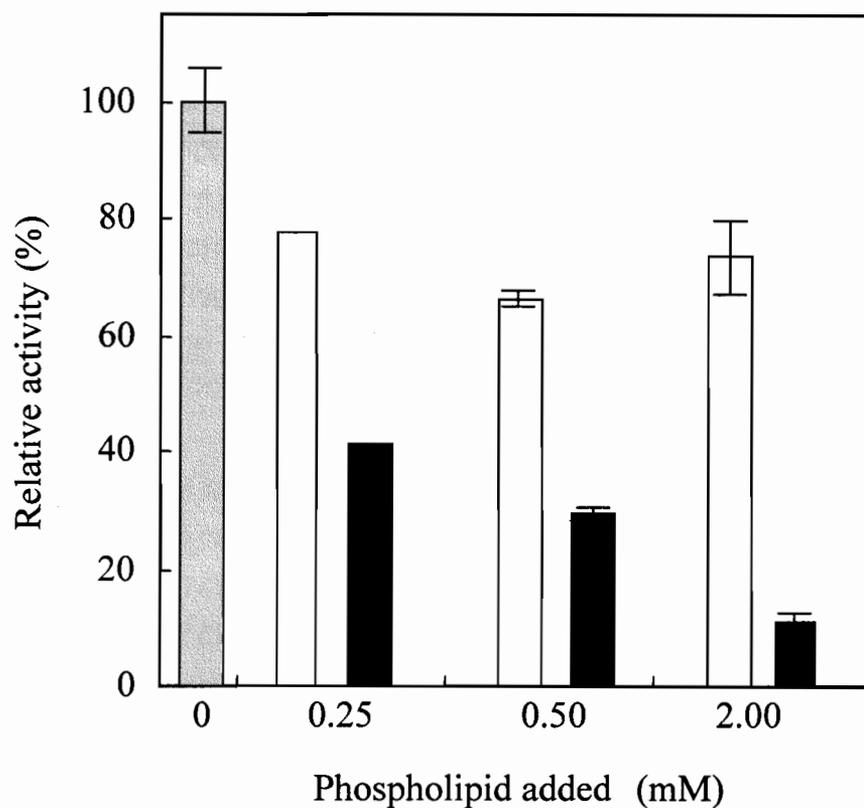


Fig. 4-8. Effect of PC and PG on AATase activity. Commercially available PC (□) and PG (■), which have the same fatty acid composition, were added to reaction mixtures containing 12 units of AATase. AATase activity without phospholipid addition (▨) is represented as 100. Data are means of two independent experiments and bars indicate standard deviation.

第5節 要約と考察

〈要約〉

精米歩合70%の白米を仕込みに使用すると、80%以上の白米を使用した場合に比べて製成酒のE/A比（酢酸イソアミル/イソアミルアルコール）が高くなった。精米歩合70%では、醪にイノシトールを添加すると、酢酸イソアミル含量およびE/A比がイノシトール無添加醪の1/2に低下したが、精米歩合90%以上の場合にはイノシトールの影響はみられなかった。イノシトールによる製成酒の酢酸イソアミル含量の低下は酵母のAATase活性の低下によるものであった。醪にイノシトールを添加しても、AATaseをコードする*ATF1*および*ATF2*遺伝子の転写レベルは変化しなかった。PIは酵素タンパクに吸着されやすいため、*in vitro*においてPCおよびPEよりAATaseを強く阻害した。イノシトールによってAATase活性が低下するのは、酵母菌体のPIが増大することによってAATaseが阻害されるためであることがわかった。

〈考察〉

醪の仕込みに使用する原料米の精米歩合が高いほど、製成酒のイソアミルアルコール含量が増大する結果を得た。これは高級アルコールの前駆体であるアミノ酸⁹⁶⁾が多く供給されたためであると考えられる。精米歩合70%の白米を使用した場合、基質であるイソアミルアルコール含量が低くなるにもかかわらず、製成酒の酢酸イソアミル含量は高くなった。その結果、E/A比は精米歩合70%の時、最大となり、これより精米歩合が高くなると低下した。E/A比は吟醸酒の官能評価と相関があり、清酒の香りの指標の1つである。精米歩合70%の場合、イノシトールを添加すると酢酸イソアミル含量はイノシトール無添加醪の1/2に減少した。精米歩合90%以上の場合には、イノシトールを添加しても酢酸イソアミル含量は変わらなかった。これは精米歩合90%以上の白米を使用した時、酵母に十分量のイノシトールが供給されることを示している。以上の結果から、精米歩合70%の白米を使用すると、酢酸イソアミルの生成量が増大するのはイノシトールの供給が制限されることによることがわかった。

精米歩合70%の白米を使用した醪において、イノシトールを添加した時、製成酒の酢酸イソアミル含量が低下するのは、その生成酵素であるAATaseの活性が低下するためであった（Table 4-2）。イノシトールによってAATase活性が低下する原因を検討するため、イノシトール無添加および添加醪の酵母についてAATaseをコードする*ATF1*および*ATF2*遺伝子の発現量を測定したが、差はみられなかった（Fig. 4-3）。第3章において述べたように、イノシトールによって中鎖脂肪酸生成量が低下するのは*OPI1*遺伝子を介した転写制御によるものである。

しかし、製成酒の酢酸イソアミル含量は*OPI1*を破壊しても変わらなかったことは、(Table 4-1) イノシトールによるAATase活性の低下が転写レベルの低下以外の原因によるものであることを示唆する。

AATaseは膜結合型酵素であるので^{97,98)}、酵母細胞膜の構成成分であるリン脂質含量を測定した。イノシトール添加醪の酵母は無添加醪の酵母の3倍のPI含量を示した (Fig. 4-4)。イノシトール無添加および添加醪の酵母から調製した無細胞抽出液を溶媒抽出または、ホスホリパーゼCで処理し、両者のPIレベルの差を皆無にしたところ、AATase活性の差もみられなくなった (Fig. 4-6)。したがってイノシトール添加醪の酵母のAATase活性が低いのはPI含量が高いためであると考えられる。

AATase活性は不飽和脂肪酸によって阻害されることが報告されているので²⁷⁾、醪中の酵母のリン脂質の脂肪酸組成を分析したが、PI構成脂肪酸はPCおよびPE構成脂肪酸より不飽和度が低かった (Fig. 4-5)。そこで*in vitro*でリン脂質がAATase活性に与える影響について検討した。無細胞抽出液に醪から調製したリン脂質を添加してAATase活性を測定したところ、PIはPCおよびPEより活性を強く阻害することがわかった (Fig. 4-7)。さらに、リン脂質をイノシトール添加醪の酵母のリン脂質組成比に合わせて反応液に添加した場合、無添加醪の酵母の組成比に合わせて添加した場合に比べて、活性は26~55%にまで低下した (Table 4-4)。

これらのことから、醪にイノシトールを添加した時AATase活性が低下するのは、酵母のPI含量が高くなり、PIがAATase活性を強く阻害するためであると結論した。なお、市販PIを用いてAATase阻害活性を測定したところ、構成脂肪酸の不飽和度の高いPIほど強い阻害活性を示したので、PIによるAATaseの活性阻害はその不飽和脂肪酸分子によると考察した。

無細胞抽出液中のタンパクを塩析によって集め、リン脂質含量を測定したところ、PCあるいはPEは約1/2が塩析沈殿物中に回収されたのに対して、PIはほぼ100%が回収された (Table 4-5)。したがって、PIがPCおよびPEより強くAATaseを阻害するのは、PIが酸性リン脂質であり、負の荷電をもつため、酵素タンパク質に吸着されやすいためであると仮定した。この仮説は、同じ脂肪酸組成をもつ市販PCとPGを使用した場合、酸性リン脂質であるPGはPCより強くAATase活性を阻害したことにより証明できた。

清酒醸造において、高度に搗精した原料米の使用はイノシトールの醪への供給を制限し、酵母のAATase活性を高め、酢酸イソアミル含量の高い清酒の醸造を可能にすると結論した。

第5章 酵母のエタノール耐性に与える酵母菌体内イノシトールレベルの影響⁹⁹⁾

第1節 序

本章では、酵母の菌体内イノシトールレベルがエタノール耐性にどのような影響を与えるかを明らかにすることを目的とする。

第1章において述べたように、清酒醪工程初期においては、原料からのイノシトール供給は制限されるため、酵母菌体内イノシトールレベルは低く抑えられる。しかし、酵母自身の生合成によって菌体内イノシトールレベルは醪工程の経過とともに増大し、末期には最大レベルに達する。したがって、清酒酵母の菌体内イノシトールレベルとエタノール耐性との関係を明らかにすることは、酵母のエタノール耐性獲得機構を解明する手段の1つとしてのみならず、醪工程末期に高濃度エタノールを蓄積する清酒醸造に特徴的な現象を解明する手段としても期待される。

本章では菌体内イノシトールとエタノール耐性との関係を明らかにするため、細胞膜H⁺-ATPaseに着目し、耐性獲得の機作について解析する。

第2節 菌体内イノシトールレベルとエタノール耐性との関係

〈方法〉

1) 菌株および培養

10および90 μMイノシトールを含むHayashidaらの合成培地⁴⁴⁾（炭素源：5% (w/v) グルコース）を使用した。*S.cerevisiae* 日本醸造協会901号（K901）を、15℃、5日間、定常期に達するまで静置培養した。

2) 醱酵速度の測定

酵母細胞を2% (w/v) グルコースおよび10 mM KH₂PO₄を含む0.18% (v/v) エタノール溶液に懸濁した。ヘッドスペースを窒素ガスで置換した後、15℃における炭酸ガス発生量を、O₂アップテスター（タイテック，埼玉）で測定した。

3) エタノール溶液中での生菌数および細胞内成分漏出量の測定

酵母菌体を遠心分離によって集菌し、12~20% (v/v) エタノール溶液で3回洗浄した。同濃度のエタノール溶液に懸濁し、15℃に放置した。必要に応じて、0.1 M乳酸緩衝液（pH 4.0または6.0）をエタノール溶液に添加した。生菌数は平板培養法によって測定した。懸濁液を遠心分離した後、上清に漏出した菌体内成分（核酸，リン酸，カリウム）を定量した。

核酸は260および280 nmにおける吸光度から定量した¹⁰⁰⁾。リン酸およびカリ

ウムはそれぞれモリブデン法⁹⁵⁾ および原子吸光法によって定量した。

〈結果〉

1) エタノール存在下における醗酵速度に与えるイノシトールレベルの影響

10および90 μM イノシトールを含む培地でK901株を培養したところ、Fig. 5-1に示すように、菌体1 gあたりのイノシトール含量はそれぞれ1.6 (低イノシトール菌体) および4.6 mg (高イノシトール菌体) であった。初発イノシトール濃度の異なる培地で酵母を培養することによって、イノシトールレベルの異なる菌体を調製することが可能であった。以降の実験において、本条件下で培養した酵母を使用した。

低イノシトールおよび高イノシトール菌体を用いて、0~18% (v/v) エタノール溶液における醗酵速度を測定した結果をFig.5-1に示す。両菌体とも、エタノール濃度が高くなるにつれて醗酵速度は低下したが、試験したすべてのエタノール濃度において、それぞれの菌体の間に、醗酵速度の差はみられなかった。イノシトールレベルはエタノール存在下での醗酵速度に影響を与えないことがわかった。

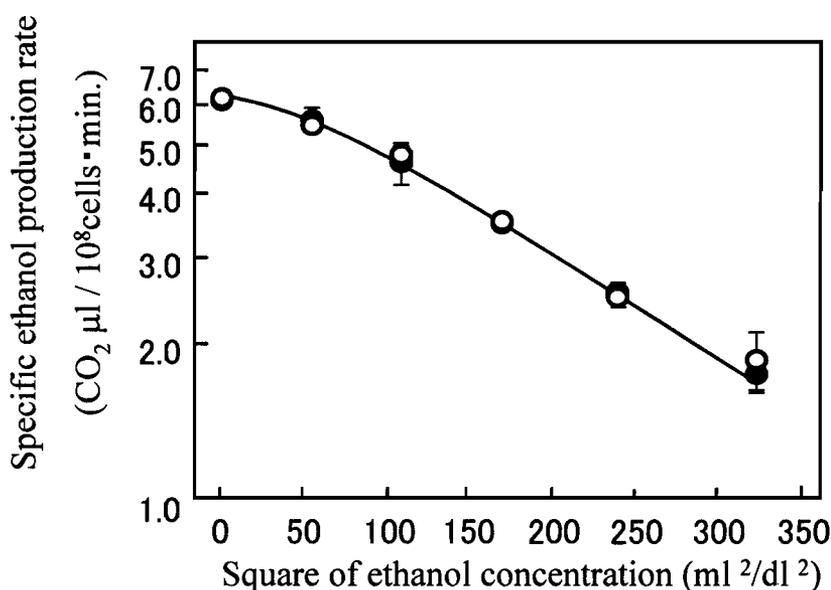


Fig. 5-1. Effect of cellular inositol level on specific ethanol production rate. Cells were cultured in the synthetic medium supplemented with 10 μM (○) or 90 μM (●) inositol for 5 d at 15°C (cellular inositol contents were 1.6 and 4.6 mg/g, respectively). The specific ethanol production rate was measured in 0-18% (v/v) ethanol containing 2% (w/v) glucose and 10 mM KH_2PO_4 at 15°C. Data are means of three independent experiments and bars indicate SD.

2) エタノール存在下における酵母の生存率に与えるイノシトールレベルの影響

低イノシトールおよび高イノシトール菌体を12% (v/v) エタノール溶液中に懸濁し、経時的に生菌数を測定した結果をFig.5-2 (A) に示す。生菌数は1次式にしたがって減少した。低イノシトール菌体は高イノシトール菌体より速く死滅した。

12-20% (v/v) エタノールにおいて測定した両菌体の死滅速度定数をFig. 5-2 (B) に示す。両菌体とも、エタノール濃度の増大とともに、死滅速度定数の対数値は直線的に増大した。すべてのエタノール濃度において低イノシトール菌体は高イノシトール菌体より死滅速度定数は大きかったが、直線の勾配はほぼ同じであった。以上より、全てのエタノール濃度において、低イノシトール菌体は高イノシトール菌体よりエタノール耐性が低いことがわかった。

低イノシトールおよび高イノシトール菌体をpH 4.0および6.0の0.1 M乳酸緩衝液を含む15% (v/v) エタノール溶液中に放置した時の生菌数の変化をFig.5-3 に示す。いずれのpHにおいても、低イノシトール菌体は高イノシトール菌体より死滅しやすかった。また、両菌体とも、pH 6.0よりpH 4.0において生菌数は大きく減少した。酸性条件はエタノールによる酵母の死滅を促進することを示している。

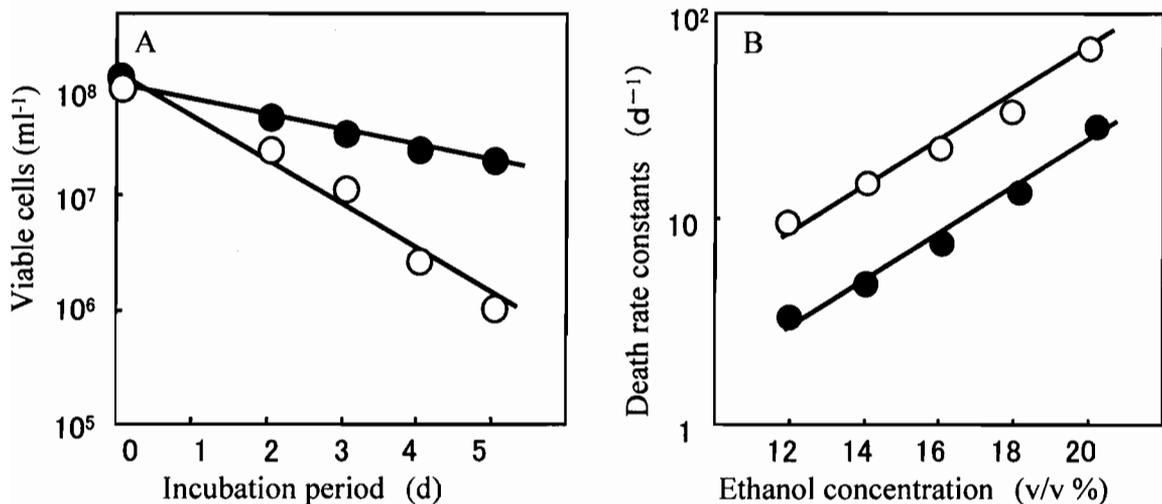


Fig. 5-2. Effect of cellular inositol level on cell viability in the presence of ethanol. Yeast strain K901 was cultured in the synthetic medium supplemented with 10 μ M (○) or 90 μ M (●) inositol as described in Fig. 5-1. Cells were suspended in 12-20% (v/v) ethanol and incubated at 15 °C. Viable cells were counted as CFU. The changes in viable cell number in the presence of 12% (v/v) ethanol (A) and death rate constants (B) in the presence of 12-20% (v/v) ethanol are represented.

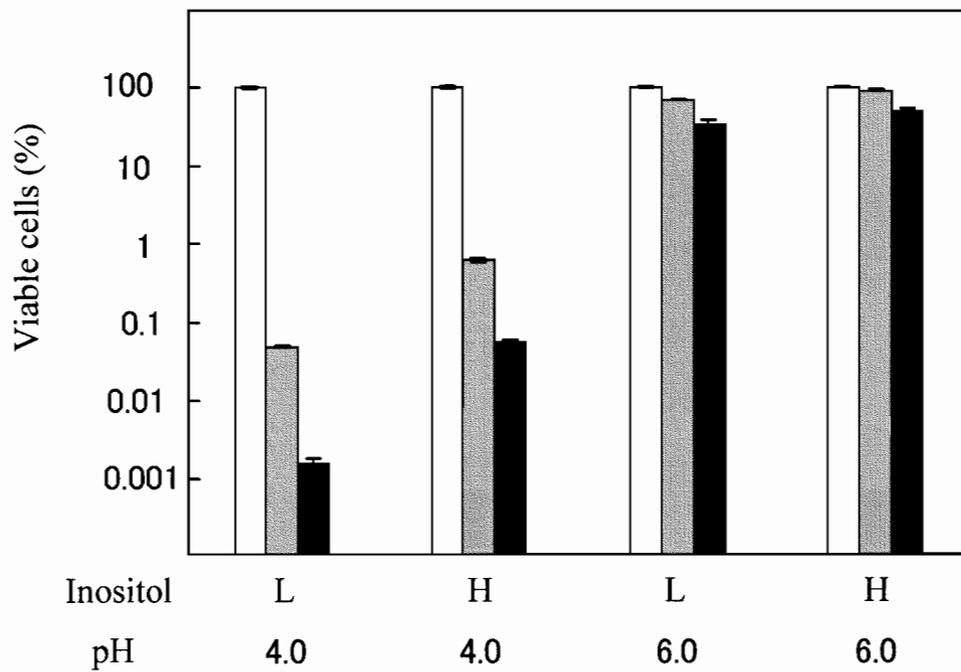


Fig. 5-3. Effect of pH of incubation buffer on ethanol tolerance. Cells were cultured in the synthetic medium supplemented with 10 μ M (L) or 90 μ M (H) inositol as described in Fig. 5-1. Cells were suspended in 15% (v/v) ethanol containing 0.1 M lactate buffer (pH 4.0 or 6.0) and incubated at 15°C. Viable cells after 0 d (\square), 1 d (\square), and 2 d (\blacksquare) of incubation were counted as CFU. Data are means of three independent experiments and bars indicate SD.

3) エタノール存在下における酵母菌体内成分の漏出

低イノシトールおよび高イノシトール菌体を12.5~17.5% (v/v) エタノール溶液中に懸濁し、15°Cで放置した後、上清の核酸、リン酸およびカリウムを定量した。Fig.5-4に示すように、全てのエタノール濃度において、低イノシトール菌体は高イノシトール菌体より著量の核酸、リン酸、カリウムを漏出した。

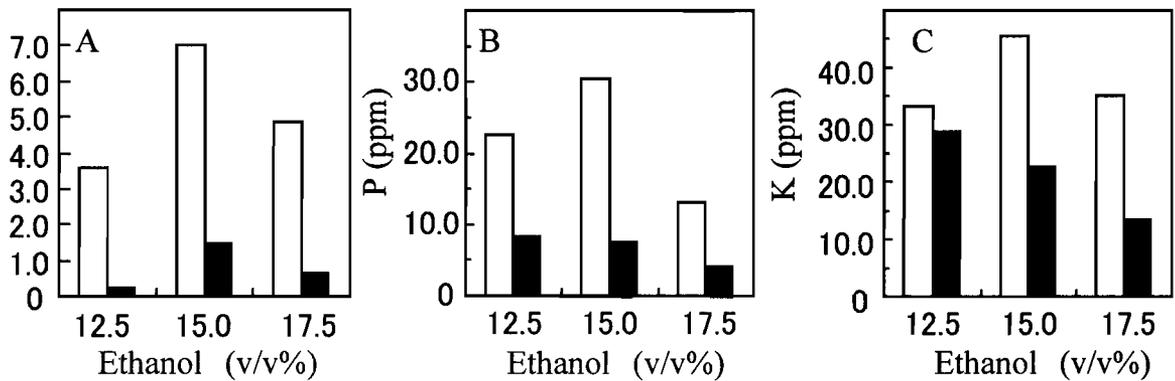


Fig. 5-4. Effect of cellular inositol level on leakage of intracellular components in the presence of ethanol. Cells were cultured in the synthetic medium supplemented with 10 μ M (○) or 90 μ M (●) inositol as described in Fig. 5-1. Cells were incubated in 12.5, 15.0 and 17.5 % (v/v) ethanol for 3, 2, and 1 d, respectively, at 15°C. Nucleotide (A), phosphate (B), and potassium (C) concentrations in the supernatant were determined.

第3節 イノシトールによる酵母H⁺-ATPase活性増大とその要因

〈方法〉

1) 菌株および培養

本章, 第2節〈方法〉1) に示す方法にしたがって, K901株を培養し, 低イノシトールおよび高イノシトール菌体を得た.

2) ICP値の測定

酵母細胞の活性度の指標として, Intracellular pH value (ICP値と称する) をImaiらの方法¹⁰¹⁾ によって測定した.

3) 細胞膜 H⁺-ATPase活性の測定

約50 mg (乾物) の酵母細胞を6 mM EDTAおよび0.6 mM phenylmethylsulfonylfluorideを含む 50 mMトリス塩酸緩衝液 (pH 8.5) 0.75 mlに懸濁した後, 第1章, 第4節〈方法〉2) に示す方法によって, ガラスビーズで細胞を破碎した. ホモジネートを0.2 mM EDTA, 0.2 mM ジチオスレイトールおよび20% (w/v) グリセロールを含む10 mMトリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) 0.8 mlで回収した後, 700×g, 10分間遠心分離し, 上清を無細胞抽出液とした. 無細胞抽出液を20,000×g, 20分間遠心分離し, 沈殿を回収した. 沈殿を蔗糖密度勾配遠心分離に供し, 43/53% (w/v) 界面から細胞膜を回収した¹⁰²⁾.

無細胞抽出液, 200,000×g沈殿画分, 細胞膜について, イノシトール含量および細胞膜H⁺-ATPase活性を測定した. イノシトール含量は, 第1章, 第2節〈方法〉2) に示す方法によって定量した.

細胞膜H⁺-ATPase活性は本酵素の特異的阻害剤であるdiethylstilbestrolを用いて, Table 5-1に示す方法によって測定した¹⁰²⁾. 混合ミセルアッセイにおいて同酵素活性の測定を行う場合は, 0.6 mM Zwittergent 3-14 (Calbiochem-Novabiochem Corporation, San Diego, USA) および1.9 mM PI (酵母製; フナコシ, 東京) を反応混合液に添加した.

diethylstilbestrol添加および無添加の反応液におけるATP分解量の差から, 細胞膜H⁺-ATPase活性を求めた. 1時間に1 μmoleのATPを分解する酵素量を1 unitと定義した. H⁺-ATPase活性はタンパク1 mgあたりのunit数 (比活性) で表示した. 粗酵素液中のタンパク質はローリー法⁵³⁾ により定量した.

4) イノシトール含有脂質含量の測定

凍結乾燥酵母菌体中の全脂質をHansonらの方法¹⁰³⁾ にしたがって抽出した. 全脂質から, 弱アルカリ性の条件下において, 分解されないスフィンゴ脂質およ

び不安定なグリセリン脂質を以下の方法にしたがって分離した。

全脂質を弱アルカリ分解した後， Celite545（ナカライテスク，京都）カラムを用いて，アルカリ安定性脂質を単離した¹⁰⁴⁾。全脂質およびアルカリ安定性脂質を2 N塩酸で125℃，45時間加水分解した後，遊離したイノシトールを第1章，第2節〈方法〉2) に示す方法によって定量した。アルカリに対して不安定な脂質の含量は全脂質含量からアルカリ安定性脂質含量を差し引くことによって算出した。

Table 5-1. Reaction mixture for H⁺-ATPase assay

| | | |
|-----------|--------------------------------|-----------|
| Substrate | 0.1M ATP | 20 μl |
| Enzyme | | 50 μl |
| Buffer | Incubation buffer ^a | 1 ml |
| Inhibitor | 0.1M diethylstilbestrol | 0 or 2 μl |

The reaction was started by adding 20 μl ATP and stopped after 60 min-incubation at 30°C with 2 ml of phosphate reagent consisting of 0.5% (w/v) SDS, 0.5% (w/v) ammonium molybdate, and 2% (w/v) sulfonic acid. After 5 min, absorbance at 750 nm was measured for the determination of liberated phosphate.

^a Consisting of 50 mM 2-*N*-morpholinoethanesulfonic acid adjusted to pH 5.7 with Tris, 5 mM MgSO₄, 50 mM KNO₃, 5 mM sodium azide, and 0.2 mM ammonium molybdate.

〈結果〉

1) ICP値に与える菌体内イノシトールレベルの影響

低イノシトールおよび高イノシトール菌体のICP値を測定した結果をTable 5-2に示す。高イノシトール菌体は低イノシトール菌体より高いICP値を示した。イノシトールレベルの高い菌体はプロトン排出能に基づく細胞のvitalityが高いことがわかった。

2) H⁺-ATPase活性に与える菌体内イノシトールレベルの影響

低イノシトールおよび高イノシトール菌体から調製した無細胞抽出液，200,000×*g*沈殿画分，細胞膜画分の，イノシトール含量およびH⁺-ATPase活性を測定した結果をTable 5-3に示す。細胞膜の精製が進むにつれて，タンパク当たりのイノシトール含量は高くなったが，いずれの画分についても高イノシトール菌体は低イノシトール菌体よりイノシトール含量が2倍高かった。H⁺-ATPase

活性も高イノシトール菌体は低イノシトール菌体の2倍高かった。酵母へのイノシトールを制限すると、細胞膜のイノシトールレベルが低くなり、細胞膜H⁺-ATPase活性が低下することを示している。

Table 5-2. Effect of cellular inositol level on ICP value

| Cells | ICP value |
|-------|-------------|
| L | 5.48 ± 0.02 |
| H | 5.66 ± 0.01 |

Cells were cultured in the synthetic medium supplemented with 10 μM (L) or 90 μM (H) inositol as described in Fig. 5-1. The intracellular pH (ICP) was measured according to the method of Imai *et al.* Data are means ± SD of three independent experiments.

Table 5-3. Effect of cellular inositol level on H⁺-ATPase activity

| Fraction | Inositol level | Inositol content (μg/mg-protein) | H ⁺ -ATPase (units/mg-protein) |
|-------------------|----------------|----------------------------------|---|
| Cell-free extract | L | 1.51 | 0.71 |
| | H | 2.90 | 1.67 |
| 20,000 × g pellet | L | 2.09 | 1.86 |
| | H | 4.78 | 3.55 |
| Plasma membrane | L | 6.84 | 8.76 |
| | H | 16.60 | 16.70 |

Cells were cultured in the synthetic medium supplemented with 10 μM (L) or 90 μM (H) inositol as described in Fig. 5-1. Cells were disrupted with glass beads and fractionated by centrifugation. Cell-free extracts (the supernatant in the centrifugation at 700 × g, 10 min) were centrifuged at 20,000 × g for 20 min, and the resultant pellets were subjected to sucrose gradient centrifugation to prepare plasma membranes.

3) イノシトール含有脂質含量に与える菌体内イノシトールレベルの影響

低イノシトールおよび高イノシトール菌体のイノシトール含有脂質含量を測定した結果をFig.5-5に示す。高イノシトール菌体は低イノシトール菌体より、グリセロリン脂質の指標であるアルカリ分解性脂質含量が高かった。一方、スフィンゴ脂質の指標であるアルカリ安定脂質含量は両菌体の間に差がみられなかった。イノシトールを制限すると、グリセロリン態イノシトール含量は低下するが、スフィンゴ態イノシトール含量は変化しないことを示している。

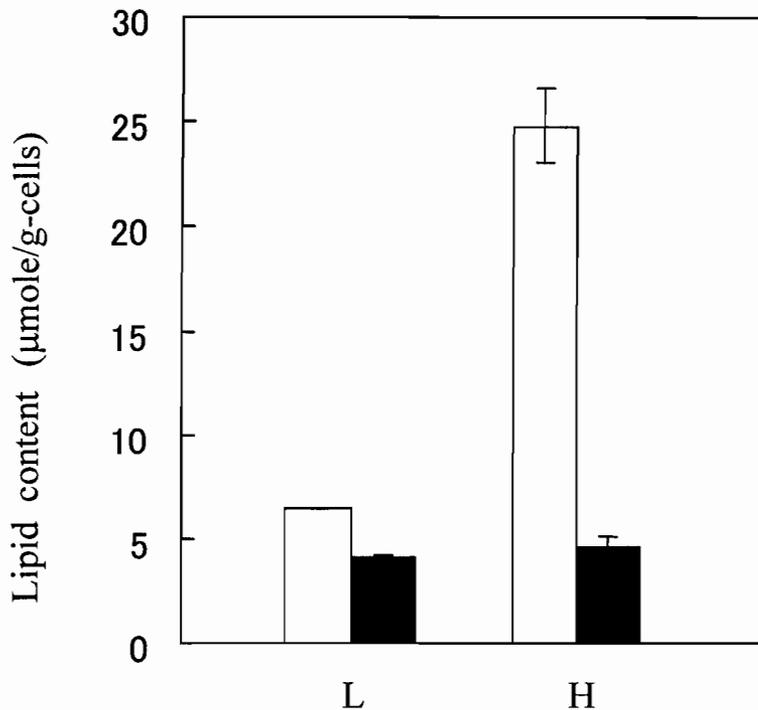


Fig.5-5. Effect of cellular inositol level on the content of inositol-containing lipids. Cells were cultured in the synthetic medium supplemented with 10 μ M (L) or 90 μ M (H) inositol as described in Fig. 5-1, followed by the determination of alkaline-labile (□) and -stable (■) inositol-containing lipids. Data are means of three independent experiments and bars indicate SD.

4) 混合ミセルアッセイにおけるH⁺-ATPase活性の測定

低イノシトールおよび高イノシトール菌体から調製した無細胞抽出液に Zwittergent 3-14および市販PIを添加し、混合ミセルを形成させて H⁺-ATPase 活性を測定した。Table 5-4に示すように、Zwittergent 3-14のみを添加した場合には、いずれの試料とも、活性は検出されなくなった。これにPIを併せて添加すると、活性は回復した。無細胞抽出液のみの場合には高イノシトール菌体は低イノシトール菌体より高活性であったが、PIを添加して混合ミセルを形成させた場合には、両者の間に活性の差は見られなかった。

Table5-4. Effect of cellular inositol level on H⁺-ATPase activity in the micellar assay system

| Zwittergent | PI | ATPase (units/mg protein) | |
|-------------|----|---------------------------|-------------|
| | | L | H |
| - | - | 0.85 ± 0.02 | 1.46 ± 0.01 |
| + | - | 0.01 ± 0.02 | 0.01 ± 0.03 |
| + | + | 0.46 ± 0.03 | 0.41 ± 0.01 |

Cells were cultured in the synthetic medium supplemented with 10 μM (L) or 90 μM (H) inositol as shown in Fig. 5-1. H⁺-ATPase was solubilized with the mixed micelles consisting of 0.6 mM Zwittergent 3-14 with or without 1.9 mM phosphatidylinositol (PI). Data are means ± SD of three independent experiments.

第4節 醪中の酵母のエタノール耐性に与える菌体内イノシトールレベルの影響

〈方法〉

1) 菌株および培養

S.cerevisiae 日本醸造協会901号 (K901) および701号 (K701) を使用した。

2) *INO1*破壊株の作製

Fig. 5-6に示す手順により、K701株から*INO1*遺伝子破壊株を作製した。DNA操作および酵母の形質転換は第2章、第4節〈方法〉5)に述べた方法により行った。PCRにはEx taq DNA ポリメラーゼ (タカラバイオ) を使用した。制限酵素はタカラバイオ製を使用した。

K901株 (*ECM31/ECM31*) ゲノムからPCRによって増幅した*ECM31*遺伝子をマーカーとして¹⁰⁵⁾、*INO1*破壊用ベクターpUC-INO-ECMを作製した。これを用いて、K701株 (*ecm31/ecm31*) を形質転換し、*INO1*遺伝子の片方を破壊した株K701-ino (Δ *ino1::ECM31/INO1*) を得た。これをYPD培地 [2% (w/v) ペプトン, 1% (w/v) 酵母エキス, 2% (w/v) グルコース] で30℃, 1日浸漬培養した後、イノシトール制限培地 [0.2 ppmイノシトールを含む炭素源を2% (w/v) グリセロールとしたBurkholder平板培地¹⁰⁶⁾] に平板1枚あたり約200のコロニーが生じるように塗抹し、30℃, 2日間培養した。約10,000のコロニーのうち、30の小さなコロニーを選択し、イノシトール無添加および2 ppmのイノシトールを含むBurkholder平板培地にレプリカした。2 ppmイノシトールを含む培地でのみ生育可能な*INO1*破壊株 Δ ino (Δ *ino1::ECM31/\Delta*ino1::ECM31*) 3株を得た。*

3) 醪小仕込み試験

第1章、第2節〈方法〉1)で述べた方法により醪の小仕込みを行った。イノシトールを添加しない通常の醪とともに、総米200 g あたり20 mgのイノシトールを添加した仕込みを行った。醪中の酵母は遠心分離法によって分画した⁵¹⁾。酵母細胞密度および酵母のメチレンブルー染色率は顕微鏡下で計測した¹⁰⁷⁾。酵母生菌数は平板培養法によって測定した。

4) エタノール溶液中での生菌数の測定

酵母のエタノール溶液中での生菌数を本章、第2節〈方法〉3)に示す方法によって測定した。

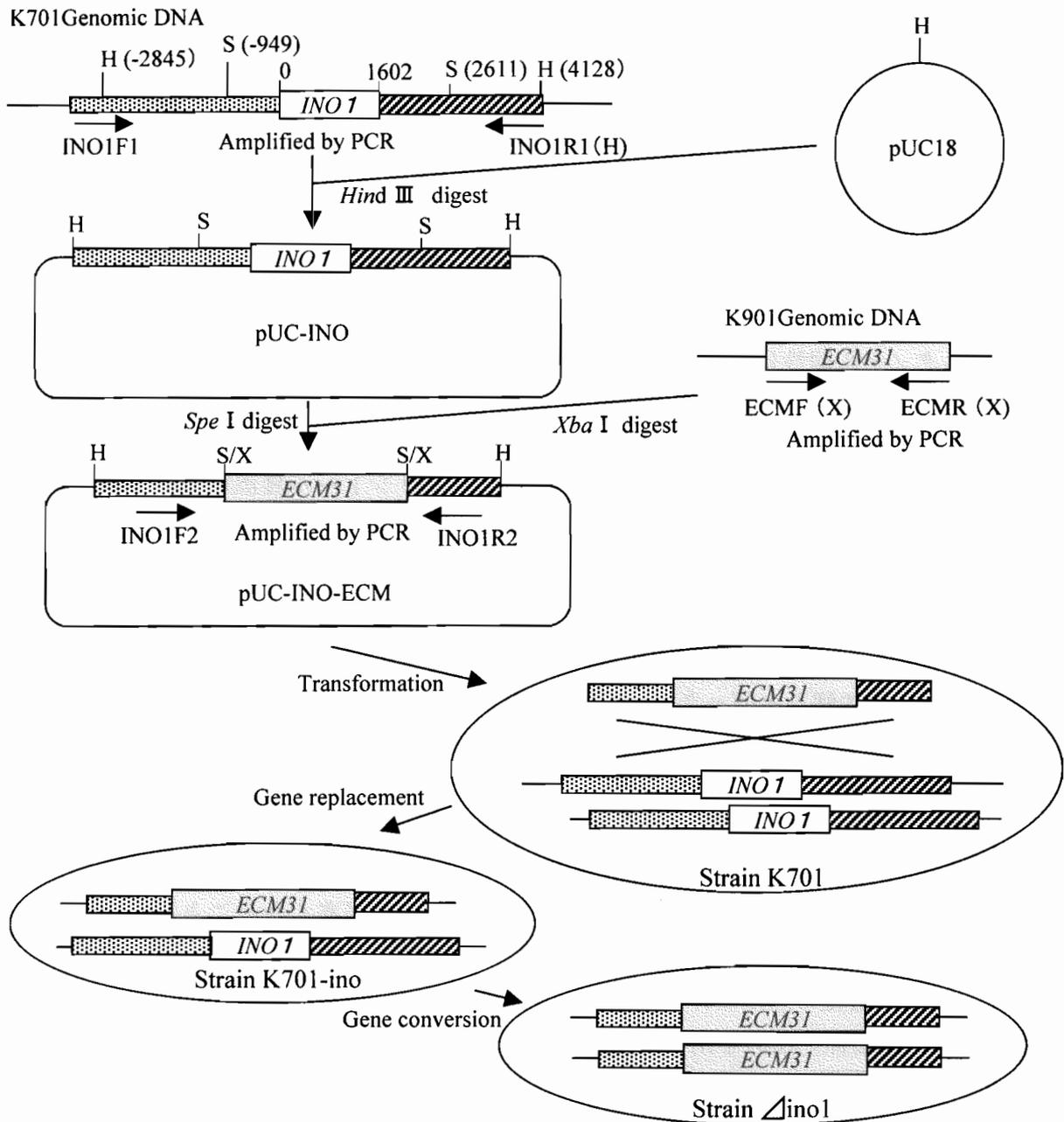


Fig. 5-6. The strategy for disruption of *INO1* gene of strain K701. Primers used to amplify *INO1* and *ECM31* genes were follows:

INO1F1, gaggatccatacagattacacttataatca; INO1R1, aatAAGCTTctttgtagagtgatcttgtc
 ECMF, gggTCTAGAAagcctcttacagttgctcg; ECMR, gggTCTAGAccgatcaaccatactcaa
 INO1F2, ctcgaattctttaaacttttcagcatttc; INO1R2, acatgcatgccacctttaatgaacgaaga
 Restriction enzyme: H, *Hind* III; S, *Spe* I; X, *Xba* I

5) 菌体内イノシトール含量の測定

酵母菌体内イノシトール含量は第1章，第4節〈方法〉3)に示す方法によって測定した。

6) 細胞膜 H⁺-ATPase活性の測定

酵母細胞膜H⁺-ATPase活性は本章，第3節〈方法〉3)に示す方法によって測定した。

〈結果〉

1) エタノール耐性に与える醪中の酵母菌体内イノシトールレベルの影響

K901株を用いて調製した醪の5日目および15日目の酵母細胞をそれぞれ15.0および17.5% (v/v) エタノール溶液に懸濁し，経時的に生菌数を測定した結果をFig.5-7Aに示す。醪工程初期（5日目）にはイノシトール無添加醪の酵母は添加醪の酵母より著しく死滅しやすく，エタノール耐性が低かった。醪工程末期（15日目）にはイノシトール無添加と添加醪の酵母の間にエタノール耐性の差はみられなかった。Fig.5-7Bに示すように，菌体内イノシトール含量は醪工程初期にはイノシトール無添加醪の酵母は添加醪の酵母の1/2以下であったが，醪工程末期には添加醪を上回った。Fig.5-7Cに示すように，醪工程初期にはイノシトール無添加醪の酵母のH⁺-ATPase活性は，添加醪の酵母の1/2であったが，醪工程末期には両者の差はほとんどみられなくなった。

醪工程初期において酵母の菌体内イノシトールレベルは低く，H⁺-ATPaseも低活性であり，エタノール耐性が低い。菌体内イノシトール含量が高くなる末期においてはH⁺-ATPaseが増大し，エタノール耐性が高くなることがわかった。

2) *INO1*破壊株の醪における挙動

*INO1*破壊株△*ino1*を用いてイノシトール無添加および添加醪を調製し，親株K701と比較したところ，Fig. 5-8に示すように，醪工程1日目から5日目まで，△*ino1*株はK701株と同じ醗酵経過を示した。しかし，6日目以降，△*ino1*株はK701株より炭酸ガス減量が低下した。イノシトールを添加した醪では，両株は全醪工程にわたって同じ醗酵経過を示した。

醪工程15日目に酵母細胞密度およびMB染色率を測定した結果をTable 5-5に示す。イノシトール添加醪では，△*ino1*株とK701株の間に酵母細胞密度およびMB染色率の差はみられなかったが，イノシトール無添加醪では，△*ino1*株はK701株より細胞密度が低く，MB染色率は高かった。

以上の結果は，*INO1*遺伝子を破壊してイノシトール合成能を失うと酵母は醪工程末期において細胞密度が低くなり，生存率が低下することを示している。

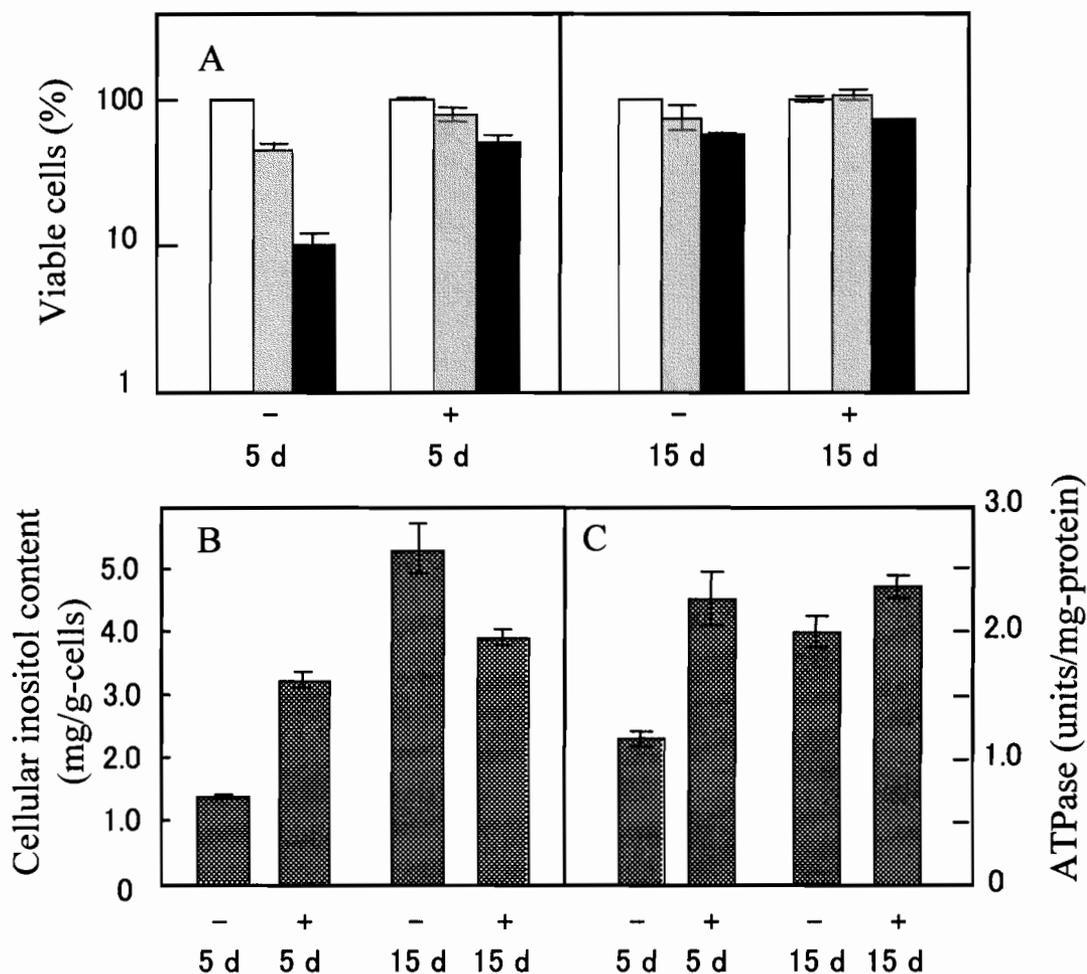


Fig. 5-7. Effect of inositol addition on ethanol tolerance (A), cellular inositol content (B) and H⁺-ATPase activity (C) of sake mash yeast. Sake mash was prepared with strain K901 using 200 g of polished rice without (-) or with (+) 20 mg of inositol addition. On the 5th (5 d) and 15th (15 d) days, yeast cells were fractionated and were suspended in 15 and 17.5% (v/v) ethanol, respectively. Viable cells after 0 d (□), 1 d (▒) and 2 d (◼) of incubation were counted as described in Fig. 5-3. The cellular inositol content and H⁺-ATPase activity of fractionated cells were determined. Data are means of three independent experiments and bars indicate SD.

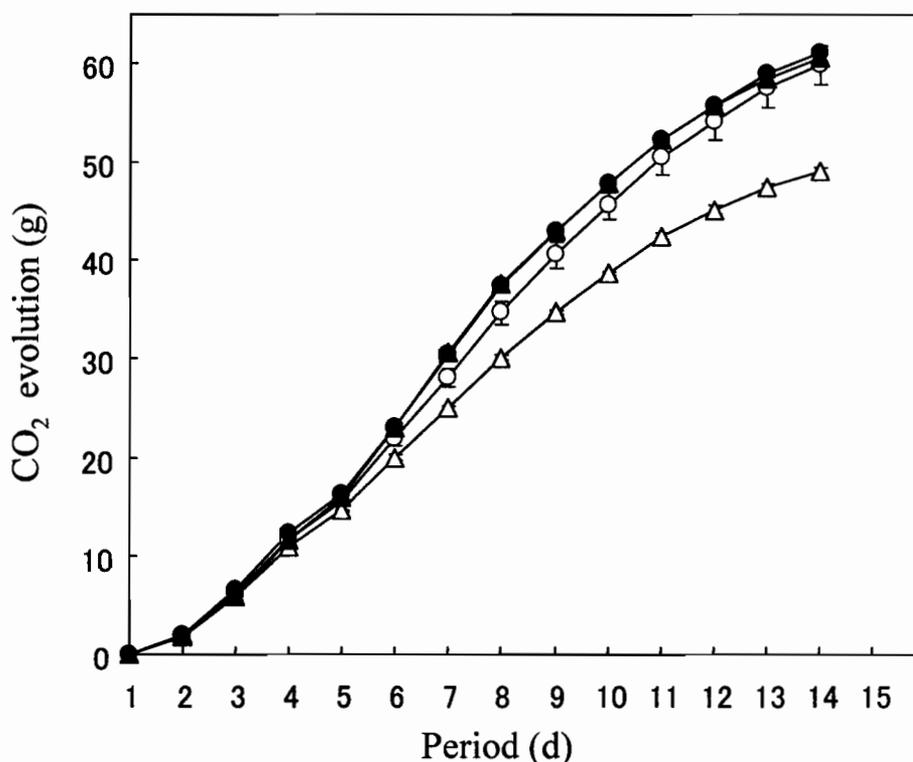


Fig. 5-8. Effect of the disruption of *INO1* gene on the fermentation of sake mash. Sake mash was prepared using strain Δ ino1 with (\blacktriangle) or without (\triangle) inositol addition (total rice 200 g). Sake mash was also prepared using strain K701 (*INO1*) with (\circ) and without (\bullet) inositol addition. The evolution of CO₂ was monitored in a time course experiment.

Table5-5. Effect of disruption of *ino1* gene on the cell density and MB staining ratio of yeast in sake mash

| Strain | Inositol added | Cell density ($\times 10^8$ cells/ml) | MB staining ratio (%) |
|---------------|----------------|--|-----------------------|
| K701 | - | 2.50 \pm 0.025 | 2.4 \pm 0.7 |
| | + | 4.31 \pm 0.11 | 0.2 \pm 0.3 |
| Δ ino1 | - | 1.66 \pm 0.12 | 29.4 \pm 1.6 |
| | + | 4.22 \pm 0.75 | 0.5 \pm 0.4 |

Sake mash was prepared using strain K701 and the disruptant of *ino1*, Δ ino1 without (-) or with (+) the addition of 20 mg of inositol, as shown in Fig. 5-8. Cell density and the ratio of cells stained with methylene blue (MB) were counted under a microscope on the 15th day. Data are means \pm SD of three independent experiments.

第5節 要約と考察

〈要約〉

イノシトールレベルの高い菌体は低い菌体に比べて、エタノール中で死滅しにくかった。しかし、エタノール中での醗酵速度には差がみられなかった。高イノシトール菌体のエタノール耐性が高い理由は、細胞膜 H^+ -ATPase活性が高いことに起因することがわかった。高イノシトール菌体が低イノシトール菌体に比べて、 H^+ -ATPase活性が高いのは、PI含量が高く、 H^+ -ATPase活性を高めるのに有利な膜脂質環境にあるためであることがわかった。イノシトールが制限され、菌体内イノシトールレベルが低い醗酵工程初期には、酵母 H^+ -ATPase活性は低く、エタノール耐性が低かったが、末期においてイノシトールレベルが増大すると、 H^+ -ATPase活性も増大し、エタノール耐性も高くなった。酵母の*INO1*遺伝子破壊すると、醗酵工程末期における菌数および生存率が低下した。

〈考察〉

高イノシトール菌体は低イノシトール菌体に比べ、エタノール溶液中で高い生存率を示し (Fig. 5-2)、細胞内成分の漏出も抑制された (Fig. 5-4) が、これは高イノシトール菌体が細胞膜の透過バリア能が高いことを示唆している。

また、高イノシトール菌体は、低イノシトール菌体より高いICP値を示した (Table 5-1)。ICP値は細胞のvitalityの指標の1つであり、酵母を酸性環境 (pH 3.0) に置いた時の細胞のプロトン排出能を測定する手法である。高イノシトール菌体はエタノールの存在しない場合においても、プロトン排出能が高く、細胞のvitalityが高いことがわかった。エタノール存在下における酵母の死滅は酸性条件下において特に顕著であったので (Fig. 5-3)、エタノール耐性を示すにはプロトン排出能が高いことが重要であると考えられる。またエタノール耐性の高い高イノシトール菌体のICP値が高く、プロトン排出能が高いのは、細胞膜 H^+ -ATPase活性が高いためであると考察した (Table 5-2)。

エタノールは細胞膜の疎水領域を攪乱ことによって膜透過性に影響し、プロトンの細胞内への受動的流入をもたらす¹⁰⁸⁾。その結果、細胞内成分の漏出を引き起こし、細胞は死に至る。したがって、細胞膜の透過バリアはエタノール中での生存を維持する上で重要であり、高イノシトール菌体は細胞質へのイオン恒常性を決定づける細胞膜 H^+ -ATPaseが高いため、膜バリア能が高く、エタノール耐性が高いものと結論した。

次に、高イノシトール菌体の H^+ -ATPaseが高い原因について検討した。イノシトールは酵母菌体において主に、PIあるいはスフィンゴ態イノシトール (セラミド) として存在し、細胞膜に分布する。低イノシトール菌体と高イノシトール

ル菌体の中にスフィンゴ態イノシトール含量の差はみられなかったものの、イノシトールを制限するとPI含量は著しく低下した (Fig. 5-5). PIがH⁺-ATPaseに影響する原因として、次の2つが考えられる。ひとつは、PIのターンオーバーにおいて、生成するジアシルグリセロールによって活性化されたprotein kinase CがATPaseタンパクの一部をリン酸化することによってATPaseが活性化されることであり、もうひとつはPIが細胞膜上で直接ATPaseを活性化する環境を形成することによるものである。前者に関しては、ATPase活性がグルコースの存在下で活性化される主な理由として報告されている¹⁰⁹⁾。後者に関しては、in vitroにおいて、PIを反応液に添加するとATPase活性が増大することが報告されている¹¹⁰⁾。高イノシトールおよび低イノシトール菌体から調製した無細胞抽出液をZwittergent 3-14で可溶化し、飽和量のPIを添加してATPaseを混合ミセル中で再構築した場合には、両菌体間のH⁺-ATPase活性の差は見られなくなった (Table 5-4)。このことから、イノシトールレベルの高い菌体のH⁺-ATPaseが高いのは、細胞膜においてPI含量が高くなることによって、H⁺-ATPase活性を高めるのに有利な膜脂質環境を形成するためであると考えられた。リン脂質とH⁺-ATPase活性との関係について、PS含量の高い細胞はPEやPC含量の高い細胞に比べて、エタノール耐性であり、リン脂質の陰イオンと両性イオンの比が耐性に重要であるとの報告がある¹¹¹⁾。また、リポソームの負荷電とミトコンドリアATPase活性が直線的関係にあるとする報告¹¹²⁾がある。酸性リン脂質であり、負荷電をもつPIの増大がATPaseの活性化をもたらしたことも、膜の荷電と関係があると推察した。

イノシトールが制限され、菌体内イノシトールレベルが低い醗工程初期には、酵母H⁺-ATPase活性は低く、エタノール耐性が低かったが、末期においてイノシトールレベルが増大すると、H⁺-ATPase活性も増大し、エタノール耐性も高くなった (Fig. 5-7)。酵母のイノシトール生合成遺伝子である*INO1*を破壊すると、末期における細胞密度が低下した (Table 5-5)。第2章において述べたように、醗において酵母が増殖するためのイノシトールはほとんど原料米中のフィチンの分解によって供給されるが、酵母による生合成も酵母の増殖に重要な因子であることがわかった。また、*INO1*を破壊すると醗工程末期の生存率が低下した。酵母のイノシトール合成遺伝子は醗工程末期の酵母の生存率を高める上で、重要であることがわかった。

醗において、酵母菌体内イノシトールレベルはエタノール耐性に影響を与える重要な因子であるとともに、酵母のイノシトール合成酵素は、醗における酵母の細胞密度を高め、末期の高エタノール環境下における生存率を高めることによって健全な醗酵を導く役割を担うと考える。

総括

本論文では、清酒醸造において原料から供給され、また酵母によって生合成されるイノシトールが清酒の品質にどのような影響を与えるかを解明することを目的として研究を行い、次のような成果を得ることができた。

原料米において、イノシトールの大部分はフィチン態として存在する。フィチンは、ほとんどが米粒外層の糊粉層に存在するため、高度精白米が使用される清酒醸造において、原料から供給されるイノシトールは限られている。その結果、醪におけるイノシトールの酵母への供給量は少なく、酵母の増殖期にイノシトールが枯渇し、増殖量も制限を受けた。また、このようなイノシトール制限環境のため、醪工程初期には、酵母菌体内イノシトールレベルも低く抑えられた。しかし、その後、醪工程の進行とともに、菌体内イノシトールレベルは増大し、末期においては最大レベルに達した。このような醪における酵母菌体内イノシトールレベルの増大は、原料から供給されたイノシトールを酵母が利用するためではなく、酵母のイノシトール生合成によるものであった。

次に、フィチンからイノシトールを生成する酵素について検討した。酵母を低リン酸培地で培養し、APを誘導させた場合には、フィチンをイノシトールとして利用し、増殖できたが、高リン酸培地でAPを抑制した場合には、増殖できなかった。したがって、酵母由来APはフィチンからイノシトールを生成する活性を有することがわかった。麴の代替として、フィチン分解活性をもたない醸造用酵素を用いて醪を仕込んだ場合、リン酸を添加しない醪では酵母は増殖できたが、リン酸を添加して酵母のAPの発現を抑制すると、イノシトールの不足によって増殖できなくなった。したがって、醪においても酵母APは原料米中のフィチンからイノシトールを遊離する役割を果たすことがわかった。

なお、原料米中のフィチンが酵素の作用によって分解し、イノシトールを生成するためには、フィチンが醪の液相中に可溶化されることが必要であった。米粒において、フィチンはアリューロン顆粒中で、不溶性の状態が存在する。アリューロン顆粒は蛋白質で構成されているため、醪において原料米中の蛋白質が分解を受けるとフィチンは液相中に可溶化された。したがって、醪において、麴のプロテアーゼは蛋白質の分解を通じてイノシトールの生成を促進すると考察した。

低リン酸下で誘導される酵母のAP遺伝子として、*PHO5*、*PHO5-3*、*PHO11*、*PHO12*が存在する。このうち、主要AP遺伝子として知られている*PHO5*および*PHO5-3*はフィチン分解に対する効果が低く、*PHO11*および*PHO12*が最もフィチンの分解に効果があることがわかった。この結果は、酵母における*PHO11*および*PHO12*遺伝子の新たな機能を見いだした点で重要であると考えられる。

イノシトールは酵母の増殖因子であり、特に、清酒醪のような低温環境下におい

て、酵母はイノシトール要求性を示すため、醪においてイノシトールの供給量が酵母の増殖や清酒の品質に影響を与える重要な因子であることが予想される。そこで、醪において酵母へのイノシトールの供給が制限されることが清酒の品質にとって、どのような意義があるかについて検討した。

まず、イノシトールが清酒の主要芳香成分の1つであるカブロン酸エチル生成量に与える影響を検討した。精米歩合70%の原料米を使用すると、80%以上の原料米を使用した場合よりも、製成酒のカブロン酸エチル含量が高くなった。これは高度精白米を使用すると、イノシトールの供給量が制限されることに起因した。

醪において、イノシトールの供給量は酵母のカブロン酸エチル生成に関与する酵素活性に影響を与えなかった。一方、イノシトールを制限すると、醪上清のカブロン酸等の中鎖脂肪酸含量が増大した。したがって、イノシトールが制限された時、カブロン酸エチル生成量が増大するのは、その基質であるカブロン酸の生成が促進されるためであることがわかった。

イノシトールによる負の制御遺伝子である *OPI1* 遺伝子を破壊すると、過剰のイノシトールを供給しても、カブロン酸の生成が抑制されなかったことから、イノシトールによってカブロン酸等の中鎖脂肪酸生成量が減少するのは、*OPI1* を介した脂肪酸合成遺伝子の転写抑制によると考えられた。そこで脂肪酸合成遺伝子のうち、どの遺伝子の発現が最もカブロン酸等の中鎖脂肪酸生成量に影響を与えるかを調べるため、*ACS2*, *ACCI*, *FAS1*, *FAS2* 遺伝子をそれぞれ構成発現させ、培養上清の中鎖脂肪酸を定量した。中鎖脂肪酸含量は、*FAS1* を構成発現させた場合にのみ増大し、その他の遺伝子を構成発現させても含量は変わらなかった。したがって、イノシトールが制限された時、カブロン酸エチルの生成が促進されるのは、*FAS1* 遺伝子の発現抑制が解除され、中鎖脂肪酸の生成量が増加するためであると結論した。

次に、製成酒のもう1つの主要芳香成分である酢酸イソアミル生成に与えるイノシトールの影響について検討した。精米歩合70%の原料米を使用すると、製成酒の酢酸イソアミルおよびE/A比（酢酸イソアミル/イソアミル含量）が高くなった。これは高度精白米を使用した場合、イノシトールの供給が制限されることによって酢酸イソアミル生成酵素であるAATase活性が増大するためであった。カブロン酸エチルの場合とは異なり、*OPI1* 遺伝子破壊株においても、醪に過剰のイノシトールを添加すると、酢酸イソアミル生成量は低下した。イノシトールを添加しても、AATaseをコードする *ATF1* および *ATF2* 遺伝子の発現量は変わらないことから、イノシトールによってAATase活性が低下するのは、遺伝子の転写量が増加することによるものではないと考察した。

そこでイノシトールによってAATase活性が低下する原因を明らかにするため、

以下の検討を行った。イノシトール添加醪の酵母は無添加醪の酵母の約3倍のPI含量を示した。イノシトール添加および無添加醪から調製した無細胞抽出液をクロロホルム抽出あるいはホスホリパーゼCで処理して、両者のPI含量の差をなくすと、両者のAATase活性の差はみられなくなった。また、AATaseの粗酵素溶液に種々のリン脂質を添加して活性を測定したところ、PCおよびPEよりPIは活性を強く阻害した。さらに、各リン脂質をイノシトール添加醪の酵母のリン脂質組成比に合わせて反応液に添加した場合は、無添加酵母の組成に合わせて添加した場合に比べて、AATase活性は26~55%に低下した。以上の結果から、イノシトール添加によって醪の酵母AATase活性が低下するのは、酵母のPI含量が高くなり、PIがAATase活性を強く阻害するためであると結論した。なお、PIが他のリン脂質より強くAATase活性を阻害するのは、PIが酸性リン脂質であり荷電をもつため、酵素タンパクにより強く結合し、リン脂質分子中の不飽和脂肪酸による活性阻害効果を高めるためであると考察した。

清酒醪において高度に搗精した原料米を使用することは、酵母へのイノシトール供給を制限することによって、清酒の重要な芳香成分であるカプロン酸エチルおよび酢酸イソアミル含量を同時に高め、香りの豊かな清酒を醸造する点で、極めて意義深いことであると結論した。

次に、酵母のエタノール耐性に与えるイノシトールの影響について検討した。第1章で述べたように、酵母菌体内イノシトールレベルは、醪工程初期には低いが、末期においては酵母のイノシトール合成酵素の働きによって最大のレベルに達する。菌体内イノシトールレベルが異なっても、エタノール存在下における醗酵速度は変わらなかったが、菌体内イノシトールレベルはエタノール存在下での生存率に影響を与え、イノシトールレベルの高い酵母は低い酵母に比べてエタノール耐性が高いことがわかった。また、イノシトールレベルの高い酵母はエタノール存在下において、死滅にともなう細胞内成分の漏出量も少なく、酵母のvitalityの指標の1つであるICP値（細胞内pH）も高かった。したがって、イノシトールレベルが高い酵母はプロトン排出能に基づく膜バリア能が高いことが示唆された。

そこで、イノシトールが細胞膜H⁺-ATPase活性に与える影響について検討した。イノシトールレベルの高い菌体は低い菌体の約2倍のH⁺-ATPase活性を示した。エタノールは細胞膜の疎水領域を攪乱することによって膜透過性に影響し、プロトンの細胞内への流入をもたらす、細胞内成分の漏出を引き起こし、細胞を死に至らしめる¹⁰⁸⁾。したがって、細胞膜の透過バリアはエタノール中での生存を維持する上で重要であり、酵母はイノシトールレベルが高い時、H⁺-ATPase活性が高くなるため、プロトン排出にもとづく膜バリア能が高く、エタノール耐性が高くなると結論した。

イノシトールレベルが異なっても、スフィンゴ態イノシトールのレベルは変わらなかったが、イノシトールレベルが高くなると酵母のPI含量が増大することを見出した。イノシトールレベルの異なる酵母から調製した無細胞抽出液をPIを飽和させた混合ミセル中に再配置すると、 H^+ -ATPase活性の差はみられなくなった。このことから、イノシトールレベルの高い酵母の H^+ -ATPase活性が高くなる理由はPI含量が高くなることによって H^+ -ATPase活性を高めるのに有利な膜脂質環境が形成されるためであると考えられる。

醪においてもイノシトールレベルの低い初期においては、 H^+ -ATPase活性が低く、エタノール耐性も低い。イノシトールレベルが高くなる末期には、 H^+ -ATPase活性が高くなり、エタノール耐性も高くなった。イノシトール生合成酵素遺伝子*INO1*を破壊すると、醪工程末期における酵母細胞密度が低下し、同時に、死滅率が上昇した。醪工程末期において酵母が死滅すると、エタノール収率が低下するだけでなく、酵母菌体内成分の漏出にともなう製成酒のアミノ酸の増大など、清酒の品質を劣化させる原因となる。醪において、酵母のイノシトール生合成酵素は、菌体のイノシトールレベルを増大させることによってエタノール耐性を向上させるとともに、酵母の細胞密度を高め、末期の高エタノール環境下における生存率を高めることによって健全な醪酵を導く役割を果たすと考察した。

本研究において、高度精白米の使用は、醪工程初期にイノシトール制限環境を作り出すことによって、香り高い清酒の醸造を可能にすることを示した。また、醪工程末期においては、酵母がイノシトールを合成することによって、エタノール耐性を高め、雑味のない清酒の醸造を可能とする点において、清酒醸造は理にかなった洗練された製法であることを証明した。

今後の課題としては、本研究において得られた知見を、香りの高い清酒を得るための新たな醸造方法の開発および新規な香気高生成酵母や高エタノール耐性酵母の育種に応用することである。例えば、第3章、第4節で示したように、酵母の*OPI1*遺伝子破壊株は、イノシトールが十分に供給された環境においても、著量のカプロン酸エチルを生成する。しかし、同遺伝子破壊株は現在のところ、実醸造に使用することができない。*OPI1*の機能を欠損した変異株を効率よく取得する技術を開発できれば、イノシトールの供給量の多少に関係なく、安定的に香りの高い清酒の製造が可能となることが期待できる。

要約

清酒醪におけるイノシトールの成因と酵母の香気生成能およびエタノール耐性の促進に関する研究

原料米を搗精するとともに、イノシトール含量は大きく減少した。清酒醪においては、高度に搗精された原料米が使用されるため、酵母へのイノシトールの供給が制限された。その結果、醪において、酵母は生育促進因子であるイノシトールが不足するため、増殖は制限を受け、同時に菌体内イノシトールレベルは低く抑えられた。しかし、醪工程末期には、酵母のイノシトール合成酵素の働きによって、菌体内イノシトールレベルは増大した。

醪において、酵母が増殖するためには、原料米中のフィチンの酵素分解によって、イノシトールが遊離し、酵母に供給されることが必要であった。麹の酵素以外に、低リン酸下で誘導される酵母APがフィチン分解酵素として作用した。主要な酵母APをコードする *PHO5* および *PHO5-3* はフィチンの分解にそれほど効果的ではなく、*PHO11* および *PHO12* がフィチンの分解に効果的であった。また、フィチンが酵素作用を受けるためには、原料米中のタンパク質が分解されてフィチンが可溶化されることが必要であった。

醪において、イノシトールの酵母への供給が制限されることは、製成酒の香気成分であるカプロン酸エチルおよび酢酸イソアミル含量を高める上で有利であることがわかった。

イノシトールが制限されると、酵母のイノシトールによる負の制御遺伝子である *OPI1* を介する脂肪酸合成遺伝子 *FAS1* の発現が脱抑制され、中鎖脂肪酸の生成が促進された。したがって、イノシトールが制限された時、カプロン酸エチル生成が促進されるのは、その基質であり、中鎖脂肪酸の1つであるカプロン酸生成量が増大することに起因することを示した。

醪において、イノシトールが制限された時、酵母の酢酸イソアミルの生成が促進されるのは、酵母の *AATase* 活性が増大するためであった。イノシトールの制限によって *AATase* 活性が増大するのは、酵母菌体において、他のリン脂質より強く *AATase* 活性を阻害する *PI* 含量が低下するためであった。*PI* が *AATase* 活性を強く阻害するのは、*PI* が酸性リン脂質であり、荷電をもつため、酵素タンパクに強く吸着することによることを示した。

イノシトールレベルの高い酵母はエタノール中での生存率が上昇した。イノシトールレベルが高い酵母は、細胞膜 H^+ -ATPase 活性が高く、プロトン排出にもとづく膜透過バリア能が高いため、エタノール耐性が高くなることがわかった。イノシトールレベルの高い酵母の H^+ -ATPase 活性が高くなるのは *PI* 含量が高く

なることによってH⁺-ATPase活性を高めるのに有利な膜脂質環境が形成されるためであるとことを示した。

清酒醸造において高度精白米が使用されることは、醪工程初期に、イノシトール制限環境を作り出すことによって、香り高い清酒の醸造を可能とする。また、醪工程末期においては、酵母はイノシトール合成酵素の作用によって、イノシトールレベルを高めることによって、エタノール耐性を高め、雑味のない清酒の醸造が可能となると結論した。

Summary

Study on the production of inositol during sake mash process and its function in the flavor-forming ability and ethanol tolerance of yeast

The content of inositol in rice markedly decreased during a polishing process of rice. In sake mash, the supply of inositol to yeast cells was limited, when highly polished rice was used. Consequently, at the initial stage of sake mash, the growth of yeast cells was limited and the cellular inositol level decreased due to the deficiency of inositol. However, at the final stage, the cellular inositol level was increased by the activation of inositol-1-phosphate synthesis in the cells.

In sake mash, yeast required inositol for the cell growth, liberated by the enzymatic hydrolysis of phytate. Acid phosphatase (AP) of yeast induced under low phosphate conditions had the same effect as *koji*-enzymes on the hydrolysis of phytate. Among the AP-encoding genes, *PHO11* and *PHO12* were more responsible for the hydrolysis of phytate than *PHO5* and *PHO5-3*, which are the major genes for AP in yeast. The hydrolysis of phytate was dependent on the solubilization of phytate, which was brought by the degradation of proteins in rice.

The insufficient supply of inositol to yeast cells increased the production of ethyl caproate and isoamyl acetate that bring perfume to sake. In addition, it increased the production of middle chain fatty acids, owing to the derepression of the fatty acid synthetic gene *FAS1* mediated by the

negative regulatory gene *OPII*. These results suggest that the production of ethyl caproate was promoted by the increase in caproate, which was brought by the limit of inositol in sake mash.

The insufficient supply of inositol to yeast cells also increased the activity of acetyltransferase (AATase), which catalyzes the biosynthesis of isoamyl acetate in yeast, with the increase in isoamyl acetate. The increase in AATase activity was probably due to the decrease in phosphatidylinositol (PI) in yeast cells, because PI inhibited the AATase activity more strongly than other phospholipids tested. PI is negatively charged, and likely to be adsorbed readily by the AATase.

The higher inositol level in yeast cells resulted in the increased cell viability in the presence of ethanol. It was demonstrated that the increased ethanol tolerance of yeast caused by inositol resulted from a high permeability barrier of yeast membrane based on a high capacity to extrude protons of plasma membrane H^+ -ATPase. It was considered that the increased H^+ -ATPase activity in high inositol cells resulted from the increased PI content available for the formation of lipid environment in the membrane to stimulate its activity.

I concluded that the use of highly polished rice makes it possible to produce sake with desirable perfume through the inositol-limited environment at the initial stage of sake mash. At the final stage of sake mash, the elevation of cellular inositol level by the increased biosynthesis of inositol resulted in the promotion of ethanol tolerance of yeast, which will lead to manufacture sake with a fine taste.

文献

- 1) 野白喜久雄, 吉澤淑, 鎌田耕造, 水沼武二, 蓼沼誠編: 醸造の事典, 朝倉書店, 1988年, 初版.
- 2) 半田市太郎編: 秋田県酒造史資料編, 秋田県酒造組合1970年.
- 3) 井上貞三編: 灘酒, 灘酒研究会, 1969年.
- 4) 大阪国税局鑑定官室: 平成15年度酒造講話会資料, 2003年.
- 5) 石川雄章, 佐藤和夫, 浜田由紀雄編: 増補改訂清酒製造技術, 日本醸造協会, 1998年, 第8版.
- 6) Tanaka, K., Yoshida, T., Asada, K., and Kasai, Z.: Sub cellular particles isolated from aleuronic layer of rice seeds. Arch. Biochem. Biophys., **155**, 136-143 (1973).
- 7) 岡部正人, 桜田博克, 清水弘人, 中谷俊多美, 三上重明, 岩野君夫: 原料米からの無機リン酸の遊離に寄与する清酒麴の酵素, 醸協, **91**, 203-208(1996).
- 8) 清水弘人, 中谷俊多美, 岡部正人, 三上重明, 岩野君夫: 酒清醪の並行複発酵に及ぼす酸性ホスファターゼ、フィターゼの影響, 醸協, **91**, 362-366 (1996).
- 9) Eastcott, E. V.: The isolation and identification of Bios I. J. Phys. Chem., **32**, 1094-1111 (1928).
- 10) 福井三郎, 谷喜雄, 岸辺忠信: 清酒醸造とビタミンB群の関係 (第5報), 精白工程中のパントテン酸, イノシトール, ビオチン及びビタミンB₆の変化, 醱酵工学, **33**, 238-239 (1955).
- 11) 福井三郎, 谷喜雄, 岸辺忠信: 清酒醸造とビタミンB群の関係 (第6報), 製麴中のパントテン酸, イノシトール, ビオチン及びビタミンB₆の変化, 醱酵工学, **33**, 239-242 (1955).
- 12) 福井三郎, 谷喜雄, 岸辺忠信: 清酒醸造とビタミンB群の関係 (第7報), 酒母及び醪におけるビオチン, イノシトール, 及びビタミンB₆の消長, 醱酵工学, **33**, 302-306 (1955).
- 13) 下出光男, 谷喜雄, 福井三郎: 清酒醸造合理化に関する研究 (6), 酵母仕込醪初期におけるビタミンおよびアミノ酸含量, 醸協 **61**, 273-276 (1966).
- 14) 鳥潟頭雄, 秋山裕一: 通気培養酵母による清酒醸造試験 (その1), 清酒もろみのビタミン含量の消長と酵母の保存試験, 醸協, **63**, 60-63 (1968).
- 15) 鳥潟頭雄, 秋山裕一: 通気培養酵母による清酒醸造試験 (その2), 酵母比較試験, 醸協, **63**, 64-66 (1968).
- 16) 福井三郎, 谷喜雄, 下出光男: 清酒酵母の生理的研究とその酵母仕込酒造法への応用, 醱酵工学, **44**, 610-621 (1966).

- 17) Nikawa, J., Tsukagoshi, Y., and Yamashita, S.: Isolation and characterization of two distinct myo-inositol transporter genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **266**, 11184-11191 (1991).
- 18) Johnson, M. D. and Henry, S. A.: Biosynthesis of inositol in yeast. *J. Biol. Chem.*, **264**, 1274-1283 (1989).
- 19) Amaha, M. and Takeuchi, M.: Temperature dependence of vitamin requirements of some brewery yeasts. *J. Inst. Brew.*, **67**, 339-344 (1961).
- 20) 竹田正久, 塚原寅次: 酵母とビタミンB群に関する研究 (第1報) 酵母の細胞形態に及ぼすビタミンの影響, *醸協*, **57**, 1036-1041 (1962).
- 21) 竹田正久, 塚原寅次: 酵母とビタミンB群に関する研究 (第2報) 酵母の低温培養におけるビタミン要求, *醸協*, **57**, 1109-1111 (1962).
- 22) 高下秀春, 大森俊郎, 下田雅彦, 松岡正佳, 小川隆平: 日本農芸化学会大会要旨集, p. 262 (1999).
- 23) 溝口晴彦, 藤田栄信: 酸性ホスファターゼ活性を利用した清酒醪中の野生酵母の検出, *醗酵工学*, **59**, 185-188 (1981).
- 24) 石川雄章編: 醸造物の成分, 日本醸造協会, 1999年.
- 25) 秋田修: 香気生成酵母の育種について. *醸協*, **87**, 621-625 (1992).
- 26) Okuyama, H., Saito, M., Joshi, V. C., Gunsberg, S., and Waki, S. J.: Regulation by temperature of the chain length of fatty acids in yeast. *J. Biol. Chem.*, **254**, 12281-11284 (1979).
- 27) Yoshioka, K. and Hashimoto, H.: Ester formation by alcohol acetyltransferase from brewers' yeast. *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 2183-2190 (1981).
- 28) Fujii, T., Nagasawa, N., Iwamatsu, A., Bogoki, T., Tamai, Y., and Hamachi, M.: Molecular cloning, sequence analysis, and expression of the yeast alcohol acetyltransferase gene. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 2786-2792 (1994).
- 29) Fujii, T., Kobayashi, O., Yoshimoto, H., Furukawa, S., and Tamai, Y.: Effect of aeration and unsaturated fatty acids on expression of *Saccharomyces cerevisiae* alcohol acetyltransferase gene. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 910-915 (1997).
- 30) Dickson, R. C. and Lester, R. L.: Sphinglipid functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1583**, 13-25 (2002).
- 31) 原昌道, 小幡孝之, 下田高久: 清酒もろみ末期のアミノ酸の増加におよぼす死滅酵母菌体内カルボキシペプチダーゼについて, *醸協*, **72**, 526-529 (1977).

- 32) 原昌道, 小幡孝之: 清酒もろみ末期のアミノ酸増加の要因について, 醸協, **72**, 530-533 (1977).
- 33) D'Amore, T. and Stewart, G. G.: Ethanol tolerance of yeast. *Enzyme Microb. Technol.*, **9**, 322-330 (1987).
- 34) Thomas, D. S. and Rose, A. H.: Inhibitory effect of ethanol on growth and solute accumulation by *Saccharomyces cerevisiae* as affected by plasma-membrane lipid composition. *Arch Microbiol.*, **122**, 49-55. (1979).
- 35) Walker-Caprioglio H. M., Rodriguez R. J., and Parks, L. W.: Recovery of *Saccharomyces cerevisiae* from ethanol-induced growth inhibition. *Appl. Environ. Microbiol.*, **50**, 685-689 (1985).
- 36) Aguilera, A. and Benitez, T.: Role of mitochondria in ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol.*, **142**, 389-392 (1985).
- 37) Thomas, D. S., Hossack, J. A., and Rose, A. H.: Plasma-membrane lipid composition and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol.*, **117**, 239-245 (1978).
- 38) Mizoguchi, H. and Hara, S.: Permeability barrier of the yeast plasma membrane induced by ethanol. *J. Biosci. Bioeng.*, **85**, 25-29 (1998).
- 39) Mizoguchi, H. and Hara, S.: Ethanol-induced alterations in lipid composition of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of exogenous fatty acid. *J. Biosci. Bioeng.*, **83**, 12-16 (1997).
- 40) Mishra, P. and Kaur, S.: Lipids as modulators of ethanol tolerance in yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **34**, 697-702 (1991).
- 41) Agudo, L. C.: Lipid content of *Saccharomyces cerevisiae* strains with different degrees of ethanol tolerance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **37**, 647-651 (1992).
- 42) Beaven, M. J., Charpentier, C., and Rose, A. H.: Production and tolerance of ethanol in relation to phospholipid fatty-acyl composition in *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 431. *J. Gen. Microbiol.*, **128**, 1447-1455 (1982).
- 43) Thomas, D. S., Hossack, J. A., and Rose, A. H.: Plasma-membrane lipid composition and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.*, **117**, 239-245 (1978).
- 44) Hayashida, S., Feng, D. D., and Hongo, M.: Function of high concentration alcohol-producing factor. *Agric. Biol. Chem.*, **38**, 2001-2006 (1974).
- 45) 古川恵司, 中津留有紀, 溝口晴彦, 原昌道: 清酒醪における酵母菌体イ

- ノシトール含量の増大要因, 生物工程学, **74**, 367-374 (1996).
- 46) 家村芳次, 加藤祐樹, 片岡浩平, 吉永和彦, 原昌道: 床期間密閉製麴と非密閉製麴の麴菌増殖と酵素生産に与える影響, 醸協, **91**, 439-455 (1996).
- 47) 難波康之祐, 小幡孝之, 萱島進, 山崎与四良, 村上光彦, 下田高久: 小仕込試験法の設定醸協 **73**, 295-300 (1978).
- 48) 大内弘造, 石戸輝雄, 菅間誠之助, 野白喜久雄: 麴における酵母の生態 (第4報) 醸協, **63**, 186-190 (1968).
- 49) Northam, B. E. and Orris, F. W. N.: A microbiological assay of inositol: its development and statistical analysis. *J. Gen. Microbiol.*, **7**, 245 (1952).
- 50) 古川恵司, 家村芳次, 古川彰久, 川崎恒: 高速液体クロマトグラフィーによる米麴中のグルコサミンの定量, 醸協, **86**, 801-803 (1991).
- 51) Mizoguchi, H., Ikeda, T., and Hara, S.: Differences in the intracellular lipids of sake yeast in main mash seeded respectively with two kinds of seed mash: *kimoto* and *sokujo-moto*. *J. Ferment. Bioeng.*, **80**, 586-591 (1995).
- 52) Culbertson, M. R., Donahue, T. F., and Henry, S. A.: Control of inositol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, **126**, 232-242 (1976).
- 53) Folin, O. and Ciocalteu, V.: On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *J. Biol. Chem.*, **73**, 627 (1927).
- 54) Ogawa, M., Tanaka, K., and Kasai, Z.: Isolation of high phytin containing particles from rice grains using an aqueous polymer. *Agric. Biol. Chem.*, **39**, 695-700 (1975).
- 55) 池見元宏, 大場俊輝: 清酒醸造工程中の清酒酵母の形態について, 醸協, **62**, 1034-1039 (1967)
- 56) Ghosh, A., Charalampous, F., Sison, Y., and Borer, R.: Metabolic functions of myo-inositol. *J. Biol. Chem.*, **235**, 2522-2528 (1989).
- 57) 北野一好, 嶋崎孝行, 浅黄雅彦, 原昌道: 日本農芸化学会大会講演要旨集, p. 301 (1981).
- 58) 古川恵司, 溝口晴彦, 原昌道: 清酒醪におけるイノシトール生成に及ぼす酵母酸性ホスファターゼの影響, 生物工程学, **79**, 133-141 (2001).
- 59) 秋山裕一編: 酵母のニューバイオテクノロジー, 医学出版センター, 1990年, 初版.
- 60) Torriani, A.: Influence of inorganic phosphate in the formation of phosphatases by *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta*, **38**, 460-469 (1960).

- 61) Allen, R. J. L.: The estimation of phosphorus. *Biochem. J.*, **34**, 858-865 (1940).
- 62) Gomi, K., Arikawa, K., Kamiya, N., Kitamoto, K., and Kumagai, C.: Cloning and Nucleotide sequence of the acid protease-encoding gene (pepA) from *Aspergillus oryzae*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 1095-1100 (1993).
- 63) Kitamoto, K., Oda, K., Gomi, K., and Takahashi, K.: Construction of uracil and tryptophan auxotrophic mutants from sake yeasts by disruption of *URA3* and *TRP1* genes. *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 2979-2987 (1990).
- 64) Phillipy, B. Q., White, K. D., Johnston, M. R., Tao, S. H., and Fox, M. R. S.: Preparation of inositol phosphates from sodium phytate by enzymatic and Nonenzymatic hydrolysis. *Anal. Biochem.*, **162**, 115-121 (1987).
- 65) Hanahan, D.: Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, **166**, 557-580 (1983).
- 66) Becker, D. M. and Guarente, L.: High-efficiency transformation of yeast by electroporation. *Methods Enzymol.*, **194**, 182-187 (1991).
- 67) Schena, M., Picard, D., and Yamamoto, K. R.: Vectors for constitutive and inducible gene expression in yeast. *Methods Enzymol.*, **194**, 389-398 (1991).
- 68) Boer, P. and Steyn-Prave, E. P.: Isolation and purification of an acid phosphatase from baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Biochim. Biophys. Acta*, **128**, 400-402 (1966).
- 69) Moore, E., Helly, V. R., Conneely, O. M., Ward, P. P., Power, R. F., and Headon, D. R.: Molecular cloning, expression and evaluation of phosphohydrolases for phytate-degrading activity. *J. Ind. Microbiol.*, **14**, 396-402 (1995).
- 70) Furukawa, K., Yamada, T., Mizoguchi, H., and Hara, S.: Increased ethyl caproate production by inositol limitation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biosci. Bioeng.*, **95**, 448-454 (2003).
- 71) Ichikawa, E., Hosokawa, N., Hata, Y., and Imayasu, S.: Breeding of sake yeast with improved ethyl caproate productivity. *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 2153-2154 (1991).
- 72) 吉沢淑 : Head space法による清酒香気成分の迅速定量法, 醸協, **68**, 59-61 (1973).
- 73) 栗山一秀, 芦田晋三, 斉藤義幸, 秦洋二, 杉並孝二, 今安聰 : 酵母のカブ

- ロン酸エチル合成および分解活性, 醗工, 64, 175-180 (1986).
- 74) 植田伸夫: 脂質のガスクロマトグラフ (I), 化学と生物, 17, 744-752 (1979).
- 75) 吉沢淑, 石川雄章, 野白喜久雄: 酒造米脂質の精米歩合による脂肪酸組成の変化, 農化, 47, 713-717 (1973).
- 76) Christianson, T., Sikorski, R. S., Dante, M., Shero, J. H., and Hieter, P.: Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene*, 110, 119-122 (1992).
- 77) Wakil, S. J., Stoops, J. K., and Joshi, V.: Fatty acid synthesis and its regulation. *Ann. Rev. Biochem.*, 52, 537-579 (1983).
- 78) Schweizer, E.: Genetics of fatty acid biosynthesis in yeast, p. 59-83. *In* Numa, S. (ed.), *Fatty acid metabolism and its regulation*. Elsevier, Amsterdam (1984).
- 79) Hammond, J. R. M.: Brewer's yeast, p. 620. *In* Rose, A. H. and Harrison. J. S. (ed.), *The yeast*, vol. V, *Yeast technology*. Academic Press, London (1993).
- 80) Hayashi, E., Hasegawa, R., and Tomita, T.: Accumulation of neutral lipids in *Saccharomyces carlsbergensis* by myo-inositol deficiency and its mechanism. *J. Biol. Chem.*, 18, 5759-5799 (1976)
- 81) Hiesinger, M., Wagner, C., and Schüller, H.-J.: The acetyl-CoA synthetase gene *ACS2* of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is coregulated with structural genes of fatty acid biosynthesis by the transcriptional activators Ino2p and Ino4p. *FEBS Lett.*, 415, 16-20 (1997).
- 82) Haßbacher, M., Ivessa, A. S., Paltauf, F., and Kohlwein, S. D.: Acetyl-CoA carboxylase from yeast is an essential enzyme and is regulated by factors that control phospholipid metabolism. *J. Biol. Chem.*, 268, 10946-10952 (1993).
- 83) Schüller, H.J., Hahn, A., Tröster, F., Schütz, A., and Schweizer, E.: Coordinate genetic control of yeast fatty acid synthase genes *FAS1* and *FAS2* by upstream activation site common to genes involved in membrane lipid biosynthesis. *EMBO J.* 11, 107-114 (1992).
- 84) Chirala, S. S.: Coordinated regulation and inositol-mediated and fatty acid-mediated repression of fatty acid synthetase genes in *Sacharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 10232-10236 (1992).
- 85) Greenberg, M. L. and Lopes, J. M.: Genetic regulation of phospholipid

- biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol. Rev., **60**, 1-20 (1996).
- 86) Hori, T., Nakamura, N., and Okuyama, H.: Possible involvement of acetyl-coenzyme A carboxylase as well as fatty acid synthetase in the temperature-controlled synthesis of fatty acids in *Saccharomyces cerevisiae*. J Biochem. (Tokyo), **101**, 949-956 (1987).
- 87) Schüller, H.-J., Förtsch, B., Rautenstrauss, B., Wolf, D. H., and Schweizer, E.: Differential proteolytic sensitivity of yeast fatty acid synthetase subunits alpha and beta contributing to a balanced ratio of both fatty acid synthetase components. Eur. J. Biochem., **203**, 607-614 (1992).
- 88) Furukawa, K., Yamada, T., Mizoguchi, H., and Hara, S.: Increased alcohol acetyltransferase activity by inositol limitation in *Saccharomyces cerevisiae* in sake mash. J. Biosci. Bioeng., **96**, 380-386 (2003).
- 89) 坂本宏司, 下田満哉, 箆島豊: 清酒香気成分のポラパックQカラムによる濃縮, 農化, **67**, 685-692 (1993).
- 90) Akita, O., Ida, T., Obata, T., and Hara, S.: Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* producing a large quantity of β -phenethyl alcohol and β -phenethyl acetate. J. Ferment. Bioeng., **69**, 125-128 (1990).
- 91) Kohrer, K. and Domdey, H.: Preparation of high molecular weight RNA. Methods Enzymol., **194**, 398-405 (1991).
- 92) Bligh, E. G. and Dyer, W. J.: A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol., **37**, 911-917 (1959).
- 93) 山中樹好, 藤田直: 高速液体クロマトグラフィーによるリン脂質の定量, 油化学, **39**, 393-397 (1990).
- 94) Folch, J., Ascoli, I., Lees, M., Meath, J. A., and LeBaron, F. N.: Preparation of lipid extracts from brain tissue. J. Biol. Chem., **191**, 833-841 (1951).
- 95) 日本油化学協会編: 基準油脂分析法2.2.8.5-86 (1986).
- 96) 吉沢淑: 酒類の香気成分 (1) 中性成分について, 醸協, **61**, 481-485 (1966).
- 97) Fujii, T., Nagasawa, N., Iwamatsu, A., Bogoki, T., Tamai, Y., and Hamachi, M.: Molecular cloning, sequence analysis, and expression of the yeast alcohol acetyltransferase gene. Appl. Environ. Microbiol., **60**, 2786-2792 (1994).
- 98) Nagasawa, N., Bogaki, T., Iwamatsu, A., Hamachi, M., and Kumagai,

- C.: Cloning and Nucleotide sequence of alcohol acetyltransferase II gene (*ATF2*) from kyokai no. 7. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 1852-1857 (1998).
- 99) Furukawa, K., Kitano, H., Mizoguchi, H., and Hara, S.: Effect of cellular inositol content on ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* in Sake Brewing. *J. Biosci. Bioeng.*, **98**, 107-113 (2004).
- 100) Mizoguchi, H. and Hara, S.: Effect of fatty acid saturation in membrane lipid bilayers on simple diffusion in the presence of ethanol at high concentrations. *J. Biosci. Bioeng.*, **81**, 406-411 (1996).
- 101) Imai, T., Nakajima, I., and Ohno, T.: Development of a new method for evaluation of yeast vitality by measuring intracellular pH. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **52**, 5-8 (1994).
- 102) Serrano, R.: H⁺-ATPase from plasma membranes of *Saccharomyces cerevisiae* and *Avena sativa* roots: purification and reconstitution. *Methods Enzymol.*, **157**, 533-544 (1988).
- 103) Hanson, B. A. and Lester, R. L.: The extraction of inositol-containing phospholipids and phosphatidylcholine from *Saccharomyces cerevisiae* and *Neurospora crassa*. *J. Lipid Res.*, **21**, 309-315 (1980).
- 104) Becker, G. W. and Lester, R. L.: Biosynthesis of phosphoinositol-containing sphingolipids from phosphatidylinositol by a membrane preparation from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, **142**, 747-754 (1980).
- 105) Shimoi, H., Okuda, M., and Ito, K.: Molecular cloning and application of a gene complementing pantothenic acid auxotrophy of sake yeast kyokai no. 7. *J. Biosci. Bioeng.*, **90**, 643-647 (2000).
- 106) 微生物研究法懇談会編：微生物学実験法，講談社，1779年，第4版。
- 107) 注解編集委員会編：国税庁所定分析法注解，（財）日本醸造協会，1984年，第3版。
- 108) Leao, C. and van Uden, N.: Effects of ethanol and other alkanols on passive proton influx in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta*, **774**, 43-48 (1984).
- 109) Coccetti, P., Tisi, R., Martebani, E., Teixeira, L. S., Brandao, R. L., Castro, I. M., and Thevelein, J. M.: The *PLC1* encoded phospholipase C in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is essential for glucose-induced phosphatidylinositol turnover and activation of plasma membrane H⁺-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta*, **1405**, 147-154 (1998).

- 110) Patton, J. L. and Lester, R.L.: Phosphatidylinositol phosphate, phosphatidylinositol biphosphate, and the phosphoinositol sphingolipids are found in the plasma membrane and stimulate the plasma membrane H⁺-ATPase. Arch. Biochem. Biophys., **292**, 70-76 (1992).
- 111) Mishra, P. and Prasad, R.: Role of phospholipid head groups in ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Gen. Microbiol., **134**, 3205-3211 (1988).
- 112) Cunningham, C. C. and Sinthusek, G.: Ionic charge on phospholipids and their interaction with the mitochondrial adenosine triphosphatase Biochim. Biophys. Acta, **550**, 150-153 (1979).

謝辞

本論文をまとめるにあたり，御指導，御鞭撻を賜りました青木健次教授，清水晃教授，杉本幸裕教授に心より感謝の意を表します。

本研究を行うにあたり，その機会を与えていただきました菊正宗酒造(株)岡本英輔常務取締役，渡邊和夫前常務取締役，研究所前所長故川崎恒博士，並びに終始適切な御指導をいただきました菊正宗酒造(株)前常務取締役原昌道博士，古川彰久前研究所長，研究所長溝口晴彦博士に深く感謝いたします。

さらに，本研究遂行に際し，ご指導と過分のご便宜をはかって戴きました菊正宗酒造(株)末野和男生産部長をはじめ，生産部の方々に厚く御礼申し上げます。

併せて実験に協力していただいた山田翼氏，北野秀幸氏，北ノ原（中津留）有紀氏をはじめ，研究所のみなさんに感謝いたします。