

令和 6 年度 奈良女子大学研究推進プロジェクト経費研究報告書

奈良女子大学長 殿

研究代表者

所 属 ・ 職 研究院自然科学系生物科学領域・准教授
氏 名 岩口 伸一

本年度の交付を受けた研究推進プロジェクト経費について、下記のとおり報告いたします。

申請区分	☐ (A) 多様な人材の協働による研究
	☒ (B) 一般研究
研究課題	奈良八重桜由来ストレス耐性酵母 <i>Torulaspora delbrueckii</i> の新規pH依存性凝集タンパク質の機能解析および大学発の新たなブランド商品（ワイン）への展開

1. プロジェクトの成果

2008年に始まった創立100周年奈良八重桜プロジェクト（清酒醸造酵母の分離、奈良女子大学オリジナル清酒「奈良の八重桜」の製造）のために、奈良公園の奈良八重桜の花から分離された酵母種には清酒醸造用の*S. cerevisiae*株（P-684）の他に、ストレス耐性酵母*T. delbrueckii*（3株）が含まれていた。この種は一般的に冷凍ストレスや浸透圧ストレスなどに対して耐性が高い酵母であり、ベルギーでは小麦ビールの醸造、東欧ではライ麦パン製造、近年ワイン醸造では多様化した消費者の嗜好や製品の差別化のために利用されており、*S. cerevisiae*酵母とは異なる芳香性、ストレス抵抗性をもつことが注目されている酵母種の1つである。この*T. delbrueckii*菌株の1つであるB61株は種々のストレス（冷凍、高浸透圧、酸化）に対して優れた耐性を示し、また、pH 4～7の範囲において高い凝集性が見られ、有用性のある酵母としての可能性が示唆されていた。酵母の凝集性は古くから知られ、また産業上有用な性質である。

本研究課題では、*T. delbrueckii* B61株で見られる凝集性に関与していると予想されるタンパク質を質量分析法（MALDI-TOF-MS/MS）により同定、遺伝子をクローン化し、その遺伝子産物が凝集性を引き起こす機構を明らかにすることを第一の目的としている。さらに、ストレス耐性と凝集性をもつこの株を利用し、ワイン醸造などの発酵食品に利用できるかについて試験醸造を実施し、奈良女子大学発の新たなブランド商品（ワイン）の開発を目指すことを目的とした。

これまでの研究から表層タンパク質には、160 kDa 付近、50 kDa 以下にいくつかの大きさを示すものがSDS-PAGEで認められる。160 kDa 付近の領域をゲルから切り出し、質量分析を行ったところ、候補タンパク質は見出されたが、凝集株においてそのタンパク質の遺伝子を破壊しても凝集性は失われなかったことから原因遺伝子ではないと考えられた（上原・修士論文、2009）。今回の実験でも同じタンパク質は同定されると予想されたため、遺伝子破壊株を使用して、表層タンパク質の同定を行った。B61株に特異的に見られるどのタンパク質（ポリペプチド）が凝集性に関与しているか調べるために、前回同様、鈴鹿医療科学大学薬学部で、MALDI-TOF MS/MS（Ultra FlexIII, Bruker 社）を使用してタンパク質の同定を行った。2回にわたって解析を行ったが、今回は相同性のあるタンパク質は特定することは出来なかった。原因として高分子タンパク質に付随した糖鎖を十分に除外できていなかったことが考えられた。今後、糖鎖消化処理の条件検討を行い、質量分析を再度行う予定である。

今回質量分析がうまく進まなかったため、別のアプローチとしてトランスクリプトーム解析を実施した。非凝集株（B11）と凝集株（B61）を凝集と非凝集の条件で培養し、RNAを精製し、転写物の塩基配列決定（RNA Seq）を受託業者に依頼した。得られたデータを基にWEB上のクラウド解析サービス（basepair）でDESeq2解析を行った。その結果、凝集株（B61）において、他に比べ高い転写量（5～7倍）を示す遺伝子が2つ見つかった。これら転写物の亢進によって凝集が生じることが予想されたため、高発現ベクターにこれらの遺伝子をクローン化し、解析を進めている。

本研究の第2の目的である奈良女子大学発の新たなブランド商品の開発では、ワイン醸造の可能性について検討を加えた。*T. delbrueckii* B61株は花から分離される過程で耐糖性を示すと共に高い芳香性をもつ株として選抜された。近年多様化した消費者の嗜好や製品の差別化のための観点から新規酵母種の開拓が欧州では盛んであり、その筆頭候補として本研究で使用する *T. delbrueckii* が注目されている。B61株のもつ凝集性は発酵過程で生じる澱（オリ、不要物）の沈殿の促進効果も期待できる。まず、ワイン醸造に不可欠な亜硫酸耐性試験、アルコール耐性試験を行った。ブドウの実には様々な種類の大量の微生物（細菌、酵母、カビ）が付着している。そのため、良好な発酵を保障するために抗菌活性のあるメタ亜硫酸カリウムを添加する。また、アルコール醸造ではそれに対する耐性も必要である。国内で使用されている赤ワイン用、白ワイン用酵母と比較したところ、これらには少し劣るものの B61株はワイン酵母としての適性が高いと判断された。ワイン醸造について本学は醸造免許を有していないため、ワイン醸造用添加酵母としての有用性の評価は、科研費で共同研究を実施している福山大学ワイン醸造所の吉崎隆之准教授（工学部生物工学科）にご協力のもと検討予定である。

2. プロジェクト成果の発表

<学会発表>

吉崎隆之、石岡綺音、佐藤義鳳、大塚智貴、山本覚、岩口伸一「白ワイン醸造におけるNYR 20酵母による赤色色素分泌」日本農芸化学会2025年度札幌大会（2025年3月）

<論文>

山田怜奈「ストレス耐性酵母 *Torulaspora delbrueckii* の凝集性メカニズムの解析」2024年度修士学位論文、奈良女子大学大学院人間文化総合科学研究科

3. 支 出 内 訳						
備 品 費		消耗品費	旅 費	謝金等	その他	計
品 名	金 額					
撮影フドー式	円 26810	円 711190 (質量分析費、遺伝子発現解析依頼費、酵素類、試薬類他)	円 61000 (鈴鹿医療科学大学)	円 0	円 0	円 799000