



酵母のストレス耐性に関する新規な分子機構と高機能開発

奈良先端科学技術大学院大学 先端科学技術研究科 高木 博史

はじめに

微生物は環境からの様々なストレスに应答し、細胞内の遺伝子発現、タンパク質間相互作用・酵素活性、代謝経路などを巧妙に制御することで種々の機能を発揮しながら、地球上の激しい環境変化に適応してきた。一方で、微生物による発酵生産過程は細胞にとってストレス環境であり、温度、冷凍、乾燥、浸透圧、pH、有機溶媒、異常タンパク質蓄積などに曝されている。連続的・複合的なストレスにより、細胞の生育は阻害され、細胞死に至ることが多い。そのため、微生物の有用機能（エタノール、炭酸ガス、味・風味成分、アミノ酸、酵素などの生産）が制限され、発酵生産力にも限界がある。したがって、発酵・醸造食品やバイオ燃料、有用物質の生産性向上・高付加価値化には、細胞の高度なストレス耐性が必要である。

筆者は高等生物のモデル生物として、また様々な発酵化学産業において重要な酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を主な研究対象とし、実験室酵母に見出した細胞の新しいストレス耐性機構を解析してきた。また、得られた基盤的知見を産業酵母の高機能開発に資することで、実用株の育種への応用を試みてきた。

1. プロリン・アルギニン代謝を介したストレス耐性機構 (図1)

1-1. プロリン

多くの細菌や植物では、乾燥や塩ストレスに应答してプロリン (Pro) を適合溶質として蓄積するが、酵母はストレス時に Pro ではなく、トレハロースやグリセロールを蓄積する。Pro には、浸透圧の調節、タンパク質や細胞膜の安定化、ヒドロキシラジカル等の除去、核酸の T_m 値低下などの機能が報告されているが、細胞内の生理的役割には不明な点が多い。筆者は Pro の毒性アナログ (アゼチジン-2-カルボン酸; AZC) に耐性を示す実験室酵母の変異株から、細胞内に Pro を蓄積する株を分離し、解析した。その結果、Pro 蓄積株は野生型株に比べて冷凍、乾燥などに耐性を示すこと、Pro 合成系の初発酵素 γ -グルタミルキナーゼ Pro1 に Asp154Asn, Ile150Thr などのアミノ

酸置換が導入されると、Pro によるフィードバック阻害感受性が低下し、Pro が過剰合成されることを明らかにした。また、Pro の生理機能を解析し、液胞への局在の重要性、ストレスに伴い上昇する活性酸素種 (ROS) レベルの制御、リボソームの選択的オートファジー (リボファジー) への関与、細胞寿命の延長効果などを見出した。さらに、産業酵母 (清酒酵母、パン酵母) において Pro 蓄積株をセルフクロニング法や突然変異法で作製し、清酒小仕込み試験における醸造時間の短縮とエタノール生産量の増加、製パン性試験 (冷凍生地、高糖生地、乾燥酵母) における発酵力の向上などの高機能開発に成功した。

1-2. N-アセチルトランスフェラーゼ Mpr1

筆者は Pro の研究過程で、AZC, *cis*-4-ヒドロキシ Pro などの環状二級アミンを基質とする新規 N-アセチルトランスフェラーゼ Mpr1 を酵母に見出した。興味深いことに、Mpr1 を発現する酵母では ROS レベルが上昇するストレス (冷凍、エタノール、乾燥など) に対する耐性が向上した。その後、Mpr1 がアルギニン (Arg) 合成系酵素 (Arg7) の活性化を介して Arg 合成を亢進することで一酸化窒素 (NO) の生成を誘導し、ストレス耐性に寄与することを示唆する結果を得た。また、X線結晶構造解析により Mpr1 のユニークな構造と反応機構を解明するとともに、ランダム変異導入や分子設計に基づき熱安定化変異体 (Phe65Leu, Asn203Arg/Lys) を創製し、パン酵母や清酒酵母の発酵力を向上させることができた。

1-3. 一酸化窒素 (NO)

NO はシグナル分子として様々な生命現象に関与し、哺乳類では Arg が NO 合成酵素 (NOS) により酸化され生成する。一方、酵母では哺乳類 NOS のオルソログが存在せず、NO の研究は進んでいない。筆者は最近、高温などの酸化ストレスに应答し、Mpr1 を介して増加した Arg から Tah18 タンパク質依存的に NO が合成され、細胞の酸化ストレス耐性に寄与することを見出した。Tah18 は NADPH の電子を Dre2 タンパク質に渡すことで細胞質の鉄硫黄タンパク質合成に関わるジフラビン還元酵素であるが、NO 合成への関与は初の知見である。さらに、Dre2 が Tah18 依存的な NO 合成を阻害すること、酸化ストレス (高温、過酸化水素) に应答し、Tah18-Dre2 複合体が解離することから、Dre2 による新規 NO 合成制御機構を提唱した。現在、酵母細胞内の NO 測定系を確立するとともに、NO 合成に必要な NADPH の生成酵素を同定し、Arg の酸化に関わる酵素の同定を急いでいる。また、高温で生成する NO が銅代謝に関与する転写因子 Mac1 を活性化し、銅の取込系の亢進を介して銅依存型スーパーオキシドジスムターゼ Sod1 活性を上昇させることで、高温で生成する ROS を除去し、細胞保護に寄与することを示した。一方で、過剰量の NO は細胞死を誘導することから、酵母における NO の機能二面性 (細胞保護・

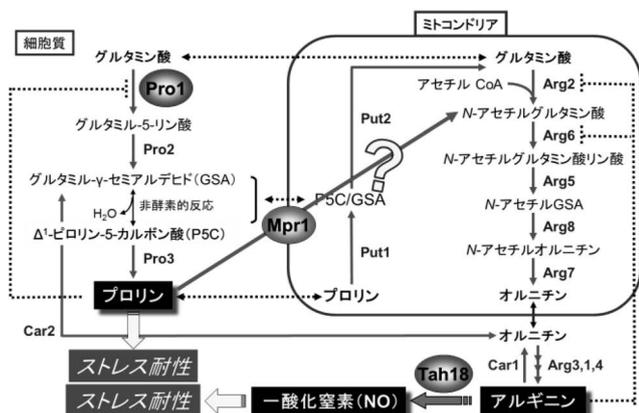


図1. 酵母におけるプロリン・アルギニンの代謝経路

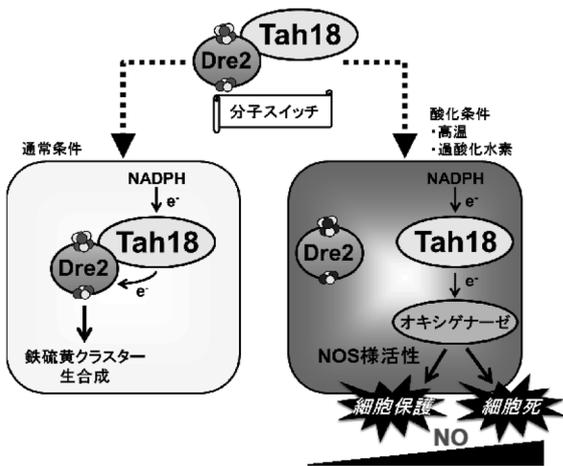


図2. 酵母におけるNOの機能二面性

細胞死)を提唱した(図2)。また、パン酵母においてはProおよびNO合成系の強化により製パン過程のストレス(冷凍、乾燥)に対する耐性と発酵力が向上した。さらに、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* においてもNOの合成系や解毒酵素の同定、酸化ストレス下におけるNOを介したシグナル伝達系の存在を実証した。

2. ユビキチンシステムによるストレス下におけるタンパク質の品質管理機構

細胞はストレスにより傷害を受けたタンパク質の品質管理機構(修復、分解)を備えている。筆者は発酵生産環境のストレス下において、高温、酸化、エタノール、浸透圧など様々なストレスに感受性を示す酵母の変異株を分離した。この変異株には生育に必須なユビキチン(Ub)リガーゼRsp5の基質認識ドメイン(WWドメイン)にアミノ酸置換(Ala401Glu)が生じていたため、Rsp5がストレス下のタンパク質品質管理に関与するモデルを提唱した。これまでに、高温やエタノールなどのストレス下で、Rsp5がストレス関連転写因子(Hsf1, Msn2/4)の発現制御を介して分子シャペロンなどのストレスタンパク質の発現を調節し、タンパク質の修復に関与すること、細胞質タンパク質(Egd2, Pda1)や細胞膜上のアミノ酸パーミアアーゼGap1をUb化し、分解を促進することを明らかにし、ストレス下におけるRsp5の生理的役割に対する理解を深めることができた。

さらに、知見の乏しい細胞膜タンパク質の品質管理についてGap1をモデル基質として解析した。その結果、Gap1は環境変化に応答し、異なるアダプタータンパク質に認識され、Ub化されることから、ストレス下における特異的なタンパク質品質管理機構が存在することを示した。また、Rsp5の基質特異性を生み出す新たな機構として、3つのWWドメイン内の保存されたThr残基のリン酸化による制御を見出し、Rsp5による基質認識の特異性・多様性の一端を明らかにした(図3)。

応用研究としては、Rsp5を中心とするUbシステムを強化する手法により、ストレス耐性の向上を目指してきた(Ubシステム工学)。実験室酵母では、Rsp5とUb結合酵素(Ubc1-13)の共過剰発現によって様々なストレス耐性が向上した。また、WWドメインへのランダム変異導入により取得したRsp5変異体(Thr255Ala, Thr357Ala)は細胞の酢酸ナトリウムやAZC耐性を高めた。産業酵母では、Rsp5の過剰発現により高濃度醸造に資するビール酵母が作製できた。また、Thr255Ala

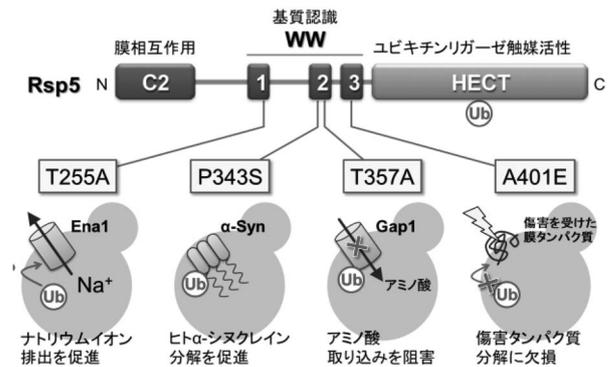


図3. Rsp5によるUb化を介した多様なストレス応答

変異体は酢酸ナトリウム存在下でのバイオエタノール酵母の発酵力を向上させた。さらに最近、パン酵母が冷凍後も高発酵力を維持する仕組みとして、Ub-プロテアソーム系が冷凍により変性したタンパク質の分解に寄与することを見出し、育種への応用を試みている。その他、Rsp5機能欠損株を用いた薬剤スクリーニング系の構築、神経変性疾患に関与するヒト α -シヌクレインの分解を促進するRsp5変異体(Pro343Ser)の取得など、Ub化を介したタンパク質品質管理に基づく創薬シーズ探索を行っている。

3. 転写因子の人為的な発現調節によるストレス耐性の向上

筆者は転写因子にも着目し、機能解析や産業酵母の高機能化を行ってきた。酸化ストレス応答に重要なMsn2をバイオエタノール酵母で過剰発現させると、バイオマスの前処理で生成するフルフラールの存在下で良好に生育し、エタノールの生産速度が増加した。パン酵母においてもMsn2の過剰発現により冷凍後の発酵力が向上した。最近では、Msn2の新しい機能として、Pro輸送体や脱Ub化酵素の活性制御に関わることを報告した。さらに、Rsp5変異株のストレス感受性を相補する多コピー抑制因子として単離したPog1が、リン酸化を介した細胞周期制御によりストレス応答に関与することを示した。パン酵母ではPog1の過剰発現や遺伝子破壊により、高シヨ糖や冷凍など製パンストレス下における発酵力が向上した。

おわりに

以上、筆者は「アミノ酸・タンパク質の代謝制御」に基づく新しい着想により、これまでの酵母分子遺伝学から導き出されたストレス耐性機構とは異なるメカニズムを見出してきた。これらの成果は、高等生物・原核生物のストレス研究、微生物による物質生産研究にブレークスルーをもたらすと期待される。

謝辞 本研究は福井県立大学生物資源学部、奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科で行われたものであり、ご協力いただいた研究室の教員(福井県立大学:中森茂、和田大、濱野吉十各先生、奈良先端科学技術大学院大学:渡辺大輔、那須野亮、西村明、吉田信行各先生)、研究員・技術員、学生各位、および島純博士((独)食品総合研究所)、下飯仁博士((独)酒類総合研究所)、アサヒビール(株)、オリエンタル酵母工業(株)、テーブルマーク(株)、(株)島津製作所、バイオジェット(株)をはじめ、多くの国内外の産学官共同研究の皆様により感謝申し上げます。また、筆者を微生物研究に導いていただき、長い間ご支援いただいた味の素(株)に深謝いたします。最後に、温かいお言葉を賜り、ご推薦いただきました清水昌先生(京都大学名誉教授)に厚くお礼申し上げます。