

ワイン酵母における高糖濃度耐性機構の分子進化的解明と実用酵母育種への応用

中川 洋史

(山梨大学大学院医学工学総合研究部)

研究の目的

酵母に高糖濃度耐性を付与する技術は産業上非常に有用であるが、未だ確立されていない。我々は、高糖濃度のブドウ果汁中での発酵に適するように長い年月をかけて選抜され、進化を遂げてきたワイン酵母が顕著な高糖濃度耐性を持つこと、細胞壁糖タンパク質 Sed1p を高発現させることで出芽酵母の高糖濃度耐性が向上すること、ワイン酵母や清酒酵母等の *SEDI* 遺伝子のコード領域の長さが醸造環境特異的に異なることを明らかにしてきた。そこで、本研究では(1) *SEDI* による高糖濃度耐性メカニズムの解明、(2) ワイン酵母の高糖濃度耐性機構を利用した、実用酵母への高糖濃度耐性能付与技術の開発、を目的とした。

方法

高糖濃度耐性試験は、特に記載の無い限り 50% (w/v) グルコースを含む高糖濃度平板培地における生育を観察することにより行った。細胞内グリセロール含量は、F-キット グリセロール (Boehringer Mannheim) を用いた酵素法により測定した。Zymolyase耐性試験は、細胞懸濁液に対しZymolyase 20T (生化学工業) を 40 μ g/ml となるように加えた後、OD₆₀₀の減少を経時的に測定することにより行った。

結果

高糖濃度条件下では水分活性が変化することにより高浸透圧ストレスが生じる。出芽酵母においては、HOG (high osmolarity glycerol) 経路が高浸透圧ストレスに応答する主要なシグナル伝達経路であることが良く知られている。そこで、*SEDI* の高発現による高糖濃度耐性がHOG経路により制御される他の因子を必要とするか否かを調べるために、我々はHOG経路のMAPキナーゼをコードする *HOG1* 遺伝子を破壊した *Δhog1* 株を構築し、*SEDI* 高発現の効果調べた。その結果、*Δhog1* 株においては 20% (w/v) グルコース及び 50% (w/v) グルコースを含む高糖濃度培地において、*SEDI* 高発現による高糖濃度耐性は見られなかった。この結果より、*SEDI* 高発現による高糖濃度耐性はHog1pに依存していることが明らかになり、HOG経路により制御される他の因子が *SEDI* 高発現による高糖濃度耐性に必要であることが示唆された。

出芽酵母は高浸透圧ストレスに対し、適合溶質としてグリセロールを細胞内に蓄積することで適応することが知られている。そこで、Sed1p 高発現による高糖濃度耐性機構が、細胞内グリセロール含量の変化によるものであるか否かを調べるために、*SEDI* 高発現株と対照株の細胞内グリセロール含量を調べた。その結果、*SEDI* 高発現株と対照株との間で細胞内のグリセロール含量に違いは見られなかった。従って、*SEDI* 高発現による高糖濃度耐性は、細胞内グリセロール含量の差異によるものではないことが明らかになった。

SEDI の高糖濃度耐性における役割を調べるために *SEDI* 破壊株である *Δsed1* 株を構築し、高

糖濃度耐性試験を行った。その結果、 $\Delta sed1$ 株と野生型株は対数増殖期の細胞において高糖濃度条件下での生育に差が見られなかったのに対し、定常期の細胞において $\Delta sed1$ 株は高糖濃度条件下で野生型株に比べ顕著に生育の低下が見られた。従って、*SEDI* は定常期における高糖濃度耐性に必要であることが明らかになった。

Sed1p については最近、細胞壁だけでなくリボソームやミトコンドリアにおける役割も報告されている。そこで、Sed1p による高糖濃度耐性と細胞壁との関係を調べるため、野生型株、*SEDI* 高発現株、及び $\Delta sed1$ 株の細胞に対し細胞壁溶解酵素 Zymolyase への耐性試験を行った。その結果、高糖濃度耐性能と同様に、*SEDI* の高発現により Zymolyase への耐性が強まり、破壊により耐性が低下することが分かった。さらに、走査型電子顕微鏡を用い *SEDI* 高発現株の細胞表層の観察を行ったところ、*SEDI* 高発現株の細胞表層が粗かったのに対し、対照株の細胞表層は滑らかであった。これらの結果から、Sed1p による高糖濃度耐性には、細胞壁構造の変化が関与していることが示唆された。

Sed1p による高糖濃度耐性が細胞壁を介したものであるか否かを調べるため、我々は Sed1p の細胞壁への局在に必要な *KRE6* 遺伝子を破壊した $\Delta kre6$ 株を構築し、*SEDI* 高発現の効果調べた。高糖濃度培地における生育を調べたところ、 $\Delta kre6$ 株においては *SEDI* を高発現しても高糖濃度耐性を示さなかった。この結果より、Sed1p は細胞壁に局在することで高糖濃度耐性を付与していることが明らかになった。

SEDI 遺伝子にはコード領域の長さや塩基配列に遺伝子多型が存在することが報告されている。しかし、この多型に生理学的な意義があるか否かについてはこれまでに知見が無い。我々は、*SEDI* 遺伝子の多型が高糖濃度耐性能の差異に関与するのではないかと考えた。そこで、強い高糖濃度耐性を示すワイン酵母 OC-2 株と、実験室酵母 W303 株の *SEDI* 遺伝子の塩基配列をそれぞれ解読し、Sed1p タンパク質の一次構造の比較を行った。その結果、W303 株の Sed1p には 14 アミノ酸の配列が特異的に存在した。一方、3 個のシステイン残基を含む 51 アミノ酸のリピード構造が、W303 株の Sed1p には 2 つ存在するのに対し、OC-2 株の Sed1p には 3 つ存在することがわかった。このシステイン残基の数の違いが、チオール基によるジスルフィド結合を介してワイン酵母 OC-2 株の高糖濃度耐性に関与している可能性を考えている。

結論

SEDI 高発現による高糖濃度耐性は Hog1p の機能に依存していることを明らかにした。*SEDI* 高発現による高糖濃度耐性は、細胞内グリセロール含量の差異によるものではないことを明らかにした。Sed1p は定常期細胞の高糖濃度耐性に必要であることを明らかにした。*SEDI* の高発現により細胞壁の形態が変化することを明らかにした。Sed1p の細胞壁への取り込みが、高糖濃度耐性に必要であることを明らかにした。実用酵母の *SEDI* 遺伝子の多型を解読し、ワイン酵母と実験室酵母の Sed1p の一次構造に興味深い違いを見出した。