

産業用酵母のアルデヒド耐性の分子メカニズムの解明と発酵産業への戦略的活用

中川 智行
岐阜大学 応用生物科学部

研究の目的

アルデヒドは反応性が高く、細胞内で様々な生体分子と付加体を形成するため、全ての生物に対して強い毒性を示す揮発性化合物である。一方、アルデヒドは多様なアルコールの酸化により細胞内で容易に生産される代謝中間体であり、細胞はその細胞内毒性を回避する必要がある。特に、出芽酵母のアルコール発酵では、「アセトアルデヒド」が必ず経由する代謝中間体であるため、細胞内のアセトアルデヒド蓄積は細胞機能の低下を導き、さらには清酒等の発酵製品の品質低下を招く。つまり、アルデヒドの細胞内毒性を巧妙に回避し、出芽酵母の細胞機能を最大限に引き出すことが可能であれば、高濃度でのアルコール発酵が達成でき、品質低下のリスクも低減できる。また、アルデヒドは二日酔いやシックハウス症候群、発ガンなどの原因物質として知られており、本研究で得られる細胞毒性回避システムの知見は、ヒトの創薬への応用の可能性も秘めている。

これら背景から、本研究では出芽酵母の「アルデヒド耐性機構」の詳細を分子・遺伝子レベルで明らかにし、産業用酵母の分子育種に向けた基盤構築と発酵産業への戦略的活用を目的としている。

方法

出芽酵母は BY4741 株を親株とし、その遺伝子欠損株は Invitrogen Co. (Carlsbad, CA., USA) から購入した。細胞内 $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ レベルは、Oku らの方法を用いて無細胞抽出液を作成し⁽¹⁾、Prominence nano HPLC (Shimadzu)-4000QTRAP Mass spectrograph system (AB SCIEX) を用いて決定した⁽¹⁾。

結果

1. NADPH を中心としたアルデヒド耐性機構における細胞内酸化還元制御系の機能と役割

アセトアルデヒドストレス下で生育した出芽酵母株の細胞内 $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ レベルを観察したところ、細胞内 $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ 比が上昇し、強いアセトアルデヒド感受性を示す *zwf1Δ* 株⁽²⁾では、アセトアルデヒドストレス下で $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ が大きく増加した。つまりアセトアルデヒド耐性機構におけるペントースリン酸経路 (PPP) の主要な役割は NADPH 供給であることが推測される。

一方、細胞内 $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ 量は、共にアセトアルデヒドストレスで大きく上昇した。よって出芽酵母はアセトアルデヒドストレス下では細胞内酸化還元バランスのみでなく、

NAD⁺/NADPH の絶対量を増強していることが明らかとなった。そこで、出芽酵母の NAD⁺/NADH キナーゼの遺伝子欠損株のアセトアルデヒド感受性を観察したところ、ミトコンドリア局在型 Pos5 の欠損株が強い感受性を示し、細胞質局在型 Yef1 および Utr1 は両遺伝子の欠損により弱いアセトアルデヒド感受性を示した。また、これら NAD⁺/NADH キナーゼ遺伝子のうち *YEF1* のみがアセトアルデヒド誘導型であった。

2. アルデヒド耐性機構における NADPH 依存型グルタチオン代謝系の機能と役割

出芽酵母には NADPH を要求する 3 つのアルデヒド耐性系としてオレイン酸合成系・グルタチオン (GSH) 還元系・スレオニン合成系が報告されている⁽²⁾。また GSH がアセトアルデヒドを捕捉し、一時的にその毒性を低減することを示してきたが⁽³⁾、それだけでは GSH 系によるアルデヒド毒性回避機構を説明することができない。Anni らは GSH の分解産物 Cys-Gly がアセトアルデヒドと強い付加体を形成することを報告している⁽⁴⁾。そこで、出芽酵母における GSH 分解系のアセトアルデヒド毒性回避機構における機能を解析した。その結果、GSH を Cys-Gly に分解する Dug2/Dug3 の発現は共にアセトアルデヒドストレスにより強力に誘導され、その *dug2Δ* 株はアセトアルデヒド感受性を示した。しかし、そのアセトアルデヒド感受性は非常に弱く、細胞内 Cys-Gly もアセトアルデヒドストレスの有無にかかわらず、ほぼ一定に保たれていた。

これらの結果から、出芽酵母はアセトアルデヒドの毒性回避に GSH および Cys-Gly を利用しているものの、アセトアルデヒドとの結合能の強い Cys-Gly よりもむしろ GSH を主要なアセトアルデヒドスカベンジャーとして利用している可能性がある。

結論

本研究では、出芽酵母のアセトアルデヒド毒性回避機構において NADPH の供給系として PPP が関与し、さらには NAD⁺/NADH キナーゼによる NAD⁺/NADH 絶対量の強化が重要であることを示した。また、NAD⁺/NADH キナーゼはミトコンドリア型 Pos5 がアセトアルデヒド毒性回避機構において主要な役割をはたしていることが推測された。ミトコンドリアはアセトアルデヒド耐性に必要な NADPH 依存型オレイン酸合成経路が局在し⁽²⁾、アセトアルデヒド耐性において鍵をにぎるオルガネラであることが考えられる。

一方、GSH もまたその還元過程で NADPH を要求する出芽酵母のアセトアルデヒド耐性の鍵をにぎる因子のひとつであり、アセトアルデヒドとの結合能力の強い Cys-Gly よりも GSH の方がアセトアルデヒド耐性機構への寄与が高いことが明らかとなった。

これら知見は、今後、アセトアルデヒド耐性能を高めた出芽酵母の戦略的育種に向けた重要な基盤構築の基礎となるものと考えている。

文献

- (1) Oku, M., Hozeki, J., Ichiki, Y. and Sakai, Y. (2013). A fluorescence resonance energy transfer (FRET)-based redox sensor reveals physiological role of thioredoxin in the yeast *Saccharomyces*

cerevisiae. *FEBS Lett.* **587**: 793-798.

- (2) Matsufuji, Y., Fujimura, S., Ito, T., Nishizawa, M., Miyaji, T., Nakagawa, J., Ohya, T., Tomizuka, N. and Nakagawa, T. (2008). Acetaldehyde tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* involves the pentose phosphate pathway and oleic acid biosynthesis. *Yeast*. **25**: 825-833.
- (3) Matsufuji, Y., Yamamoto, K., Yamauchi, K., Mitsunaga, T., Hayakawa, T. and Nakagawa, T. (2013). The novel physiological roles for glutathione in sequestering acetaldehyde to confer acetaldehyde tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**: 297-303.
- (4) Anni, H., Pristatsky, P. and Israel, Y. (2003). Binding of acetaldehyde to a glutathione metabolite: mass spectrometric characterization of an acetaldehyde-cysteinylglycine conjugate. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **27**: 1613-1621.