

# 出芽酵母の定常期特異的なアミノ酸異化経路の解明と細胞長寿命化への応用に関する研究

松浦 彰

千葉大学大学院 理学研究院 生物学研究部門

## 研究の目的

紀元前より醸造に利用されてきた出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、モデル生物として生命現象の基本的機構の研究材料として使われてきた。液体培養中の出芽酵母の細胞が定常期以降に生存率を失う過程は「経時老化」と呼ばれ、非増殖細胞の老化のモデルとして解析されている。これまでの国内外のグループから、活性酸素種産生、定常期における貯蔵炭水化物などの内的要因と、培地の炭素源量、アミノ酸量、pH 変動などの外的要因が、経時老化プロセスに関与することが示されている。

出芽酵母の経時老化研究の多くは、硫酸アンモニウムを単一の窒素源として含む最小合成培地である SD 培地が用いられてきた。出芽酵母をこの培地で培養すると、調製直後はおよそ 4.5 である培地の pH が急激に低下していき、翌日には 2.2 付近まで下がる。この培地に 14 種類のアミノ酸を加えた SC 培地<sup>1)</sup>を用いると、培地 pH の低下が抑制され、pH は SD 培地よりも高い 2.8 付近で維持される。このような培地 pH の低下の抑制が起こると、酵母の寿命が延長することをこれまでに見出している<sup>2)</sup>。本研究では、アミノ酸の添加による経時老化の遅延機構を酵母細胞内の代謝変化に注目して解析することにより、生理的ストレス環境への新規適応経路を明らかにし、それを利用した産業酵母の長寿命化戦略を考案することを目的とする。

## 方法

材料：出芽酵母 *S. cerevisiae* YOM36 株 (*MATa* wild-type)<sup>2)</sup>

培地：SD 培地 (2% glucose、0.17% Bacto-yeast nitrogen base without amino acid and ammonium sulfate, 0.5% ammonium sulfate) および AYD 培地 (特許 6429627、興人ライフサイエンス(株))。

培地組成変化の計測：培養液を 3,000 rpm 2 分で遠心し、上清を使用して各種計測を行った。pH は pH 電極 (Mettler Toledo)、アンモニア濃度はアンモニウム電極 (Toko Chemical Laboratories)、セリン濃度は DL-Serine assay kit (Sigma Aldrich) を用いて計測した。

## 結果

### (1) 培地酸性化を抑制するアミノ酸の探索

SC 培地に含まれるアミノ酸のうちの一種類のみを同モル濃度で含む培地を作成し、定常期 (培養開始後 9 日目) の培地 pH を測定した。その結果、L-グルタミン酸

と L-セリンに培地酸性化抑制作用があり、特に L-セリンが顕著な作用を示した。

アミノ酸を高濃度で含む AYD 培地で培養した場合には、培地の pH が定常期中に上昇していくことを見出しているが、AYD から L-セリンを除去した培地では、AYD 培地での培養に比べて pH が低下した。このことから、培地に添加されるアミノ酸のうち、L-セリンが培地環境の酸性化抑制効果を最も有することが確認された。この効果は D-セリン添加時には観察されないことから、酵母細胞によるセリンの取り込みもしくはその後の代謝が関与していると考えられる。

## (2) 培地セリンの消費時期

L-セリン添加培地では、定常期で 1 週間以上経過した後に pH が上昇に転じる。培地中のセリン量を定量したところ、培養初期から一定速度でセリン含有量の減少がみられた。また、L-セリン添加培地での培養では、培地に含まれるアンモニウムイオンの消費が抑制されていた。

## (3) セリン添加で誘導される代謝系の関与

L-セリン添加条件で誘導される遺伝子のうち、*CHAI* はセリンスレオニンデヒドラターゼをコードする<sup>3)</sup>。この酵素にはセリンをアンモニウムとピルビン酸に分解する活性がある。実際、通常の培養条件ではほとんど発現が見られない *Chal* タンパク質が、L-セリン添加培養時には対数増殖期から高発現されていた。

*CHAI* の欠損株では、セリン添加によるアンモニウムイオン消費抑制がみられなくなり、また培地 pH は野生型株をセリン不含培地で培養した際と同様に大きく低下した。この結果は、セリンは *Chal* タンパク質によるセリン分解により生じるアンモニウムが対数増殖期とそれ以降の窒素源として利用されていることを意味する。

## (4) 炭素源としてのセリンの機能

*S. cerevisiae* は単一アミノ酸を窒素源として利用可能である一方、炭素源としてアミノ酸のみを含む培地では生育できないことが知られている<sup>4)</sup>。このことは、本来この微生物が窒素源が制限された環境で生育していることを意味している。

本研究で定常期以降の酵母集団の生育における重要な機能が明らかになった *Chal* は、セリンに加えてスレオニンを分解する活性があるが、スレオニンにはセリンと同様の効果が観察されなかった。このことは、*Chal* によって産生される産物のうち、この現象に関与するのはアンモニウムイオンではなくピルビン酸であることを示唆する。セリン添加培養において細胞の最大収量が増加することから、セリンが特定の条件ではエネルギー源としても利用されていると考えられる。また、培養前期の酵母をセリン添加培養後期の培地で培養すると培地 pH 上昇の時期が早まることから、この培地で酵母を培養した際に、pH 上昇を刺激する培地組成の変化が生じていることが示唆された。

## 結論

経時老化を遅延させる培地条件の解析の過程で、培地に特定のアミノ酸が一定量存在する場合に生存率が上昇すること、その際のアミノ酸利用は増殖が停止した定常期の期間中にも続いていることを見出した。出芽酵母は、遊離アミノ酸を単独の炭素源として増殖できないことが知られているが、我々の結果は炭素源が制限されている定常期細胞において特定のアミノ酸をソースとした代謝反応が進行し、これが生存の維持に寄与していることを示している。

本研究で見出された、*S. cerevisiae* が極限状態で行うアミノ酸代謝の解析は、通常環境で隠されていた本酵母のアミノ酸利用能力の解明に繋がると考えられる。本研究の成果をもとにアミノ酸異化過程を恒常的に活性化した酵母を利用することで、炭素源を利用した発酵における培地酸性化の問題を回避し、培地 pH が原因の一つである経時老化や細胞死の抑制が可能となる。今後は遺伝的操作により微生物の長寿命化をもたらす代謝改変を行い、*S. cerevisiae* を始めとした微生物を利用する発酵産業における物質生産能の向上に寄与したい。

## 文献

- 1) Sherman, F. (1991) Getting started with yeast. *Methods Enzymol.* **194**: 3-21.
- 2) Maruyama, Y., Ito, T., Kodama, H., and Matsuura, A. (2016) Availability of amino acids extends chronological lifespan by suppressing hyper-acidification of the environment in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS ONE* **11**: e0151894.
- 3) Lee, J. C. Y., Tsoi, A., Kornfeld, G. D., and Dawes, I. W. (2013) Cellular responses to L-serine in *Saccharomyces cerevisiae*: roles of general amino acid control, compartmentalization, and aspartate synthesis. *FEMS Yeast Research* **13**: 618-634.
- 4) Large, P. J. (1986) Degradation of organic nitrogen compounds by yeasts. *Yeast* **2**: 1-34.