

セルフクローニング法による実用パン酵母の育種： プロリン・アルギニン代謝に着目したストレス耐性の向上

高木 博史

パン酵母（イースト）は通常二倍体であり、そのほとんどは出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* に分類される。パン酵母は製パン過程において、冷凍、低温、乾燥、高浸透圧など過酷なストレス環境に曝されている。特に、冷凍パン生地やドライイーストの製造では、細胞内はミトコンドリア膜の損傷や酸化酵素群の変性などにより活性酸素種（ROS）が蓄積する「酸化ストレス」状態に陥るため、生育阻害や細胞死が引き起こされ、酵母の有用機能（炭酸ガスの発生、味・風味物質の生成など）が制限される。したがって、パン酵母に高度な酸化ストレス耐性を付与することにより、長期冷凍保存生地や無糖生地に適した「冷凍耐性パン酵母」、耐久性の強い高品質「ドライイースト」などの開発が可能になる。

実験室酵母では、すでにポストゲノム解析により膨大なデータが得られており、実験室酵母で得られた知見をパン酵母の課題解決に活用すべきである。また、従来の発酵生産力の限界を突破するためには、古典的方法（自然分離、突然変異、交雑など）だけでなく、遺伝子組換え技術などの分子生物学的手法の利用が望ましい。しかしながら、消費者や企業には依然として遺伝子操作に対する不信感や消極的な姿勢が見られる。2008年6月に策定された「遺伝子組換え食品（微生物）の安全性評価基準」（<http://www.mhlw.go.jp/topics/idsenhi/anzen/pdf/sankou5.pdf>）においては、「宿主に導入されたDNAが、当該微生物と分類学上の同一の種に属する微生物のDNAのみである場合（セルフクローニング）」に該当する微生物を利用して製造されたものは原則として安全性評価の対象に含めないと記載されている。セルフクローニング法は遺伝子操作技術の一つであるが、すべて酵母の遺伝子から構成され、外来（異種生物、化学合成など）の遺伝子を一切含まない方法で作製した酵母（セルフクローニング型酵母）は、厚生労働省から遺伝子組換え体には当たらないことが認定されると、通常の商品微生物として扱えることになる²⁾。

筆者は、実験室酵母を用いてプロリン（Pro）・アルギニン（Arg）代謝（図1）に着目したストレス耐性機構を解析し、パン酵母など産業酵母の育種への応用に取り組んでいる。本稿では、社会的受入れが比較的容易なセ

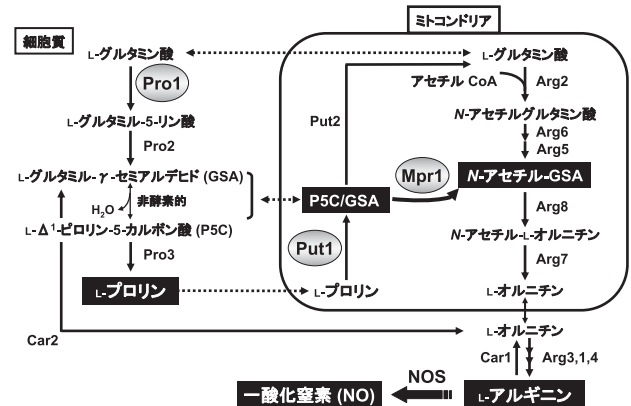


図1. 酵母におけるプロリン・アルギニン代謝。Pro1, γ -グルタミルキナーゼ；Put1, Pro オキシダーゼ；Mpr1, N-アセチルトランスフェラーゼ；NOS, NO合成酵素。

ルフクローニング法を用いて作製したパン酵母の研究を紹介する。

プロリンは冷凍から酵母細胞を保護する

筆者は以前から「冷凍耐性パン酵母」の育種を目的とした研究を進めており、アミノ酸のProが冷凍後の酵母細胞の生存率低下を抑えること（冷凍耐性の向上）を見いだしている³⁾。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の消去、核酸の T_m 値低下などの機能が報告されているが、ストレス下における細胞内での生理的役割については不明な点が多い⁴⁾。Proは水に対する溶解度がきわめて高く、細胞内の自由水との親和性が強いいため、おそらく冷凍ストレス下での氷結晶生成や脱水を防ぎ、細胞を保護していると考えられる。酵母において、Proは細胞質でおもにグルタミン酸から3種類の酵素により合成されるが、その一つ γ -グルタミルキナーゼ（Pro1）の活性が最終産物のProにより阻害されるため（フィードバック阻害）必要以上に合成されない。また、過剰のProはミトコンドリアで2種類の酵素により酸化分解され、グルタミン酸に変換される。したがって、通常の培養条件において、野生株の細胞内にProはほとんど検出されない。

多くの細菌や植物では、乾燥や高塩濃度のストレスに
 応答し、Proを細胞保護物質として蓄積するが、酵母は
 ストレス時にPro合成を誘導せず、トレハロースやグリ
 セロールを優先的に蓄積する⁴⁾。そこで、細胞内にPro
 を蓄積する実験室酵母の変異株をProの毒性アナログで
 あるアゼチジン-2-カルボン酸 (AZC) に耐性を示す変
 異株から分離し、詳細に解析した^{5,6)}。その結果、Pro1
 をコードする遺伝子に変異が入り、Asp154Asn,
 Ile150Thrなどのアミノ酸置換が導入されると、フィー
 ドバック阻害感受性が低下し、Proを過剰合成するこ
 とが判明した。また、Proの分解酵素の一つProオキシダー
 ゼ (Put1) をコードする遺伝子を破壊した実験室酵母で
 変異型Pro1遺伝子を発現させると、Pro含量の増加と冷
 凍耐性の向上が見られた。また、Pro蓄積株は冷凍以外
 に乾燥、酸化、高浸透圧、高濃度エタノールなどのスト
 レス条件下でも野生株に比べて生存率が高いことから、
 Proの有用性が実証された⁵⁻⁹⁾。

プロリン蓄積パン酵母は冷凍耐性が向上する

次に、実験室酵母で得られた知見をパン酵母に応用す
 ることを試みた。近年の冷凍生地製パン法の普及に伴い、
 冷凍に耐性を示すパン酵母がすでに開発されている。し
 かしながら、冷凍生地の長期保存、フランスパンなど無
 糖生地への使用を可能にするためには、高度な冷凍耐性
 を有するパン酵母の育種が必要である。そこで、セルフ
 クローニング法を用い、Proを蓄積するパン酵母を作製
 し、その特性を解析した¹⁰⁾。パン酵母 (一倍体) 染色体
 上の野生型Pro1遺伝子を相同組換えにより変異型遺伝
 子 (D154NまたはI150T) に置換し、さらにPut1遺伝
 子をUra3遺伝子に置換することで破壊した。各一倍体
 を接合して作製した二倍体は予想通り細胞内にProを蓄

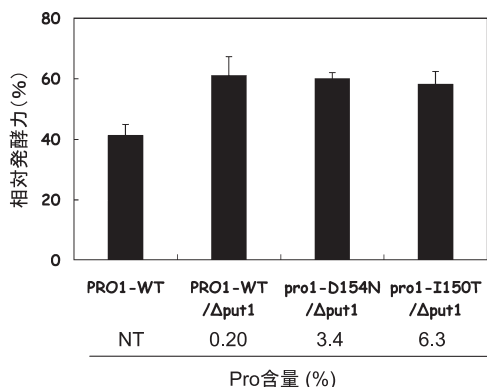


図2. プロリン蓄積パン酵母の冷凍後の発酵力。冷凍前の炭酸
 ガス発生量 (発酵力) を100%とする。

積していた。次に、実際にPro蓄積株と親株 (野生株)
 を用いてパン生地を調製し、前発酵後に-20°Cで冷凍し
 た。9日後に解凍し、パン生地の炭酸ガス発生量 (発酵
 力) を測定したところ、親株 (PRO1-WT) では冷凍前の
 約40%にまで低下したが、Pro蓄積株 (PRO1-WT/Δput1,
 pro1-D154N/Δput1, pro1-I150T/Δput1) は親株の約1.5倍
 を維持しており、冷凍耐性が著しく向上していた (図2)。
 以上の結果から、冷凍生地製パン法において、パン酵母
 の細胞内にProを蓄積させる方法が有効であることが確
 認できた。

Mpr1は酵母細胞を酸化ストレスから保護する

筆者が実験室酵母 *S. cerevisiae* Σ1278b株に見いだした
 MPR遺伝子 (MPR1/2) は、AZCをアセチル化により
 解毒するN-アセチルトランスフェラーゼMpr1をコード
 している^{11,12)}。最近、Mpr1は高温、冷凍、エタノール、
 過酸化水素などの処理で細胞内に生じるROSレベルを
 制御し、酵母を酸化ストレスから防御していることが判
 明した¹³⁻¹⁵⁾。興味深いことに、Mpr1は既知の抗酸化酵
 素と異なり、ROSには直接作用せず、ミトコンドリア
 でROS発生に関与するPro代謝中間体 (Δ¹-ピロリン-5-
 カルボン酸 (P5C)/グルタミン酸-γ-セミアルデヒド
 (GSA)) をアセチル化することで、ROS生成を防ぐ新規
 の抗酸化酵素である。MPR遺伝子はゲノム解析に用い
 られた *S. cerevisiae* S288C株や清酒酵母には存在しない
 が、*S. cerevisiae* の同胞種酵母 *S. paradoxus* や分裂酵母
Schizosaccharomyces pombe などにも同様の機能を有す
 るホモログ (Spa Mpr1, Ppr1) が存在する^{16,17)}。また、
Kluyveromyces lactis, *Candida albicans*, *Wickerhamia*
fluorescens など多くの酵母はMPR遺伝子と相同性の高
 い配列を含んでいることから^{15,18)}、MPR遺伝子は酵母に
 広く分布し、共通の祖先遺伝子に由来すると考えられる。

著書らは清酒酵母やパン酵母でMpr1を発現させると、
 エタノール、高温乾燥などのストレス耐性に関与するこ
 とを見いだしており^{19,20)}、各種の発酵生産 (パン類、酒
 類、バイオエタノールなど) に用いる産業酵母のストレ
 ス耐性向上への応用が期待される。

パン酵母のMpr2は高温乾燥から細胞を保護している

これまでにゲノミックPCRによって、国内のパン酵
 母はMPR遺伝子に相同性のあるDNA断片を有してい
 ることが示された (未発表)。そこで、パン酵母 (一倍体)
 におけるMPR遺伝子のコピー数を調べる目的で、パル
 スフィールドゲル電気泳動後にサザンブロット解析を
 行った。その結果、10番染色体にMPR遺伝子を1コピー

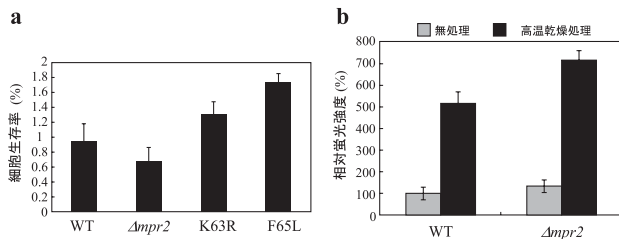


図3. パン酵母の高温乾燥後の細胞生存率 (a) および細胞内ROSレベル (b). 各菌株の高温乾燥前の生細胞数 (a) および親株 (WT) の無処理時のROSレベル (b) を100%とする.

保持しており、その塩基配列は *S. cerevisiae* $\Sigma 1278b$ 株の *MPR2* 遺伝子と一致していた²⁰。 *MPR1* 遺伝子は $\Sigma 1278b$ 株の14番染色体のサブテロメア付近に存在するが、10番染色体のサブテロメア付近にも1コピー存在する (*MPR2* 遺伝子)。両者の一次構造は85番目残基だけが異なっており (Mpr1: Gly, Mpr2: Glu)、機能的な違いは観察されていない¹¹。

ドライイーストの製造には優れた高温乾燥耐性を備えたパン酵母が必要である。そこで、高温乾燥条件下 (37°C, 4時間) における Mpr2 の役割を解析するために、各菌株の細胞生存率と細胞内ROSレベルを測定した (図3)²⁰。その結果、パン酵母の *MPR2* 遺伝子破壊株 ($\Delta mpr2$) は、親株 (WT) よりも高温乾燥処理後の生存率が約30%低下しており感受性を示した。また、親株の細胞抽出液では高温乾燥後のROSレベルが約5倍に上昇しており、高温乾燥処理に伴って細胞内にROSが発生し、生存率が低下することが分かった。興味深いことに、 $\Delta mpr2$ 株のROSレベルは親株よりも約40%高い値を示した。これらの結果は、Mpr2がパン酵母の細胞をROSレベルの制御によって高温乾燥処理から保護していることを示している。

さらに、Mpr2は製パン過程においてどのように関与しているかを調べる目的で、高温乾燥処理後の各菌株を用いて調製したパン生地の発酵力を測定した (図4)²⁰。その結果、高温乾燥処理前の発酵力は親株 (WT) と $\Delta mpr2$ 株で有意な差は見られなかった。しかしながら、高温乾燥処理後の $\Delta mpr2$ 株は、発酵力が親株の約65%にまで低下した。これらの結果から、パン酵母の Mpr2 は高温乾燥処理などの酸化ストレス条件下で細胞内ROSレベルの上昇を防ぐことにより、生存率の向上に寄与していることが明らかとなった。

変異型 Mpr1 発現パン酵母は高温乾燥耐性が向上する

筆者はこれまでに、エラープローンPCRを用いた

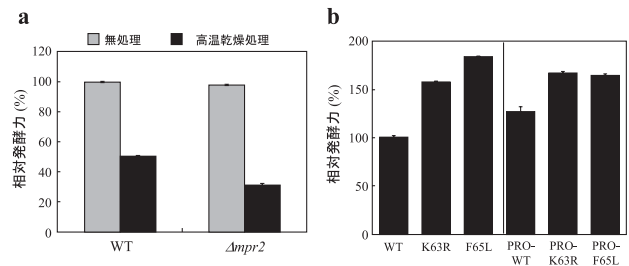


図4. パン酵母の Mpr2 遺伝子破壊株 (a) および変異型 Mpr1 発現株 (b) の高温乾燥後の発酵力. 親株 (WT) の無処理時 (a) および高温乾燥後 (b) の発酵力を100%とする.

MPR1 遺伝子へのランダム変異導入により、野生型酵素よりも過酸化水素やエタノール処理後のROSレベルを低下させ、生存率を向上させる変異型 Mpr1 (Lys63Arg, Phe65Leu) を取得している¹⁹。各変異型酵素はAZCを基質とした触媒活性が向上しており、F65L変異型酵素では温度安定性も著しく向上していた。また、K63, F65を含む領域は α ヘリックスを形成すると予想され、変異型酵素や分子モデリングによる解析からも、この領域の重要性が示唆されている。そこで、セルフクローニング法を用い、変異型 Mpr1 を発現するパン酵母を作製し、その特性を解析した²⁰。パン酵母 (一倍体) 染色体上の野生型 Mpr2 遺伝子を相同組換えにより変異型 Mpr1 遺伝子 (K63R または F65L) に置換した。各一倍体を接合して作製した二倍体は予想通り AZC に対する耐性が向上していた。変異型 Mpr1 発現株と親株 (野生株) の高温乾燥処理後の生存率を測定したところ、K63R 変異型 Mpr1 発現株 (K63R) と F65L 変異型 Mpr1 発現株 (F65L) は親株に比べて生存率が約40–80%増加していた (図3)。

次に、高温処理後の各菌株を用いてパン生地を調製し、その発酵力を測定した (図4)²⁰。高温乾燥処理前では、菌株間で明確な発酵力の差は認められなかった。しかしながら、変異型 Mpr1 発現株では、高温乾燥処理後の発酵力が野生株の1.5–1.8倍に増加しており、特に安定性の向上した F65L 変異型 Mpr1 の発現株が高い発酵力を示した。したがって、変異型 Mpr1 の発現によって、パン酵母は高温乾燥耐性が著しく向上し、パン生地中での発酵力も増加することが示された。ドライイーストの製造には強い乾燥耐性を示すパン酵母が必要であるため、高機能型 Mpr1 の発現により、長期保存可能な耐久性の優れたドライイーストを用いたパン生地の効率的生産が期待できる。

プロリンとアルギニンがパン酵母に酸化ストレス耐性を付与する

筆者は最近、実験室酵母 Σ 1278b 株では、Put1 遺伝子と Mpr1 遺伝子の転写が高温処理により誘導され、Pro から N-アセチル GSA を介して Arg の合成を亢進すること²¹⁾、および増加した Arg から一酸化窒素 (NO) が酵素的に生成し、細胞に酸化ストレス耐性を付与することを見いだした(投稿中)。また、Mpr1 はミトコンドリアで P5C/GSA を N-アセチル化することで、Pro と Arg の代謝経路を連結するとともに、P5C/GSA が関与している ROS の発生を抑えることも示唆された²¹⁾。そこで、変異型 Pro1 を発現するパン酵母を作製し、ストレス耐性の評価を行った。まず、過酸化水素 (2 mM) 処理後の細胞内 Pro・Arg 含量を経時的に測定した。その結果、Put1 遺伝子を破壊し、Pro 分解系を遮断した株 (PRO- Δ put1 株) は過酸化水素処理前の Pro 含量が最も高かったが、過酸化水素処理後では菌株間に顕著な差は見られなかった。また、Arg 含量については、過酸化水素処理前では各菌株とも同程度であったが、過酸化水素処理後には Pro 分解系が存在する株 (PRO 株) で顕著に増加していた。MPR2 遺伝子を破壊した株 (PRO- Δ mpr2 株) の Arg 含量も多少増加していたが、PRO 株よりは低く、PRO- Δ put1 株ではほとんど増加していなかった。以上の結果から、パン酵母においても酸化ストレスに応答し、Pro からの Arg 合成が起こることが示唆された。

次に、過酸化水素処理後の細胞生存率を経時に測定した(図5)。その結果、Pro を蓄積し、かつ酸化ストレス時に Pro から Arg を合成する PRO 株が最も高い生存率を示した。このことから、Pro 蓄積と酸化ストレスに応答した Arg 合成の組み合わせはパン酵母に酸化ストレス耐性を付与することが示された。Pro には ROS を除去する機能が知られていることから⁴⁾、パン酵母の細胞内に蓄積した Pro が ROS レベルに及ぼす影響について、酸

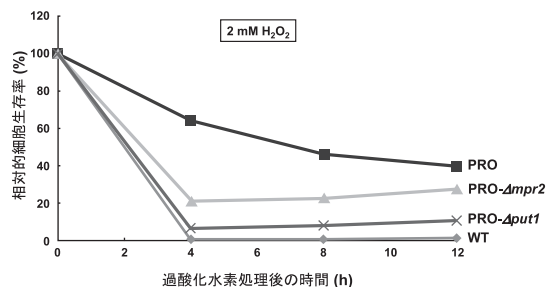


図5. パン酵母の過酸化水素処理後の細胞生存率。過酸化水素処理前 (0 h) の各菌株の生細胞数を100%とする。

化プローブを用いてフローサイトメトリーにより解析した。その結果、細胞懸濁液に高濃度 (15 mM) の過酸化水素を添加した急性の酸化ストレス条件において、処理前の Pro 含量が多いほど、細胞内 ROS レベルが低いことが判明した。以上の結果から、細胞内に蓄積した Pro は過酸化水素を添加した直後の細胞内 ROS を消去することで酸化ストレス耐性に関与していると考えられる。

さらに、Pro の蓄積と変異型 Mpr1 の発現を組み合わせたパン酵母を作製し、高温乾燥処理後の各菌株を用いて調製したパン生地の発酵力を測定した(図4)。高温乾燥処理前では、菌株間で明確な発酵力の差は認められなかったが、高温乾燥処理後の Pro 蓄積株 (PRO-WT) は親株 (WT) に比べて発酵力が約25%増加していた。筆者は実験室酵母や清酒酵母において、細胞内に蓄積した Pro が乾燥後の生存率低下を抑えることを報告しているが、今回の結果からパン酵母を用いた製パンプロセス条件下においても、Pro の有用性が実証できた。また、変異型 Mpr1 を発現する Pro 蓄積株 (PRO-K63R, PRO-F65L) では、高温乾燥処理後の発酵力が野生型 Mpr2 を発現する Pro 蓄積株 (PRO-WT) に比べて約1.4倍に増加しており、Pro 蓄積株においても変異型 Mpr1 の効果が実証できた。

古典的手法でも同様のメカニズムで冷凍耐性・高温乾燥耐性の向上したパン酵母の育種は可能である

本稿で述べたように、Pro 蓄積に関与する Pro1 遺伝子や酸化ストレスに伴う Arg (NO) 合成に関与する Mpr1 遺伝子に適切な変異が導入されたパン酵母は、Pro の毒性アナログである AZC に対する耐性が向上し、かつ冷凍や高温乾燥に対する耐性の向上も期待できる。した

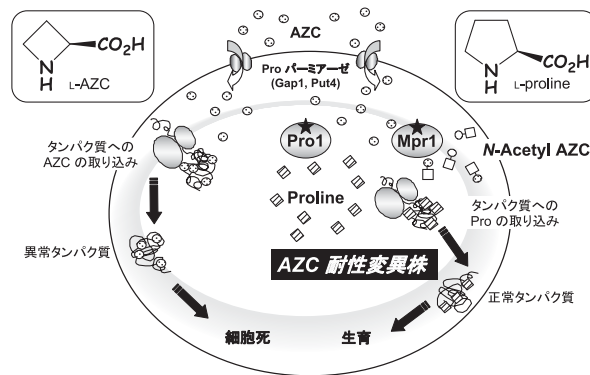


図6. 酵母の AZC に対する感受性(左)および耐性(右)の機構。変異型 Pro1 (Pro によるフィードバック阻害感受性低下など)または変異型 Mpr1 (触媒活性・安定性の向上など)を発現する酵母細胞は AZC 耐性を獲得する。

がって、古典的手法（突然変異処理など）を用いて親株よりもAZCに耐性を示す変異株を分離することで、同様のメカニズムによって冷凍耐性や高温乾燥耐性の向上したパン酵母を育種することも可能である（図6）。

今後、パン酵母におけるProやNOの生理機能の解析とともに、高機能型の変異酵素（Pro1, Mpr1など）を共発現させ、さまざまなストレス耐性を強化したパン酵母の開発によって、パン類（冷凍生地、超高糖生地、ドライイーストなど）の効率的生産が期待できる。また、細胞内ROSレベルを人為的に制御し、酵母に高度な酸化ストレス耐性を付与することにより、パン類以外にも、酒類やバイオエタノールなどの発酵生産性の改善に貢献できると考えられる。

本稿では、セルフクロニング法を用いて作製したパン酵母について、冷凍生地やドライイースト製造への応用に関する取り組みを紹介した。これまでに、セルフクロニング型酵母で製造した清酒が市販されているが²²⁾、パン酵母においてはまだ実用化されていない。セルフクロニング型パン酵母の安全性評価および環境アセスメントに向けた特異的検出系の構築も行われており²³⁾、今後、セルフクロニング法により開発された産業酵母の実用化が増えることを期待したい。

本稿で紹介した研究は、おもに生研センターの「基礎研究推進事業」および「イノベーション創出事業」の助成を受けて行った。また、共同研究者として、菌株の作製やストレス耐性試験を行った奈良先端科学技術大学院大学の戒能智宏博士（現・島根大学生物資源科学部准教授）、笹野 佑博士、および各菌株の製パン性試験を実施していただいた（独）農研機構・食品総合研究所の島 純博士（現・京都大学微生物科学寄附研究部門特定教授）、村田里美博士、高橋俊輔博士に心より感謝いたします。

文 献

- 1) Shima, J. and Takagi, H.: *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **53**, 155 (2009).
- 2) Hino, A.: *Toxicol. Pathol.*, **30**, 126 (2002).
- 3) Takagi, H. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **47**, 405 (1997).
- 4) Takagi, H.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **81**, 211 (2008).
- 5) Morita, Y. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 212 (2003).
- 6) Sekine, T. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 4011 (2007).
- 7) Takagi, H. *et al.*: *FEMS Microbiol. Lett.*, **184**, 103 (2000).
- 8) Terao, Y. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 6527 (2003).
- 9) Takagi, H. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 8656 (2005).
- 10) Kaino, T. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 5845 (2008).
- 11) Takagi, H. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **182**, 4249 (2000).
- 12) Shichiri, M. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **276**, 41998 (2001).
- 13) Nomura, M. and Takagi, H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 12616 (2004).
- 14) Du, X. and Takagi, H.: *J. Biochem.*, **138**, 391 (2005).
- 15) Du, X. and Takagi, H.: *Appl. Microbiol. Biotech.*, **75**, 1343 (2007).
- 16) Kimura, Y. *et al.*: *Yeast*, **19**, 1437 (2002).
- 17) Nomura, M. *et al.*: *J. Biochem.*, **133**, 67 (2003).
- 18) Wada, M. *et al.*: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **72**, 582 (2008).
- 19) Iinoya, K. *et al.*: *Biotechnol. Bioeng.*, **103**, 341 (2009).
- 20) Sasano, Y. *et al.*: *Int. J. Food Microbiol.*, **138**, 181 (2010).
- 21) Nishimura, A. *et al.*: *FEMS Yeast Res.*, **10**, 687 (2010).
- 22) Aritomi, K. *et al.*: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **68**, 206 (2004).
- 23) Ando, A. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 7075 (2005).