

酵母のエタノール耐性：内と外から細胞を護る

渡辺 大輔・高木 博史*

はじめに

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* によるエタノール発酵は、パンをはじめとする食品や酒類、バイオエタノールなどの製造に用いられる、人類にとってもっとも馴染みの深い微生物機能の一つである。数多くの微生物の中で *S. cerevisiae* が世界中で用いられるようになった主な理由は、環境中にグルコースが存在するとその資化に専念できる「グルコース抑制」と、その代謝の結果生じるエタノールにより容易に死滅しないための「エタノール耐性」という2つの特性を併せ持つことにより、グルコースをエタノールに効率良く変換する装置として機能するためであると考えられる。本稿では、酵母による発酵生産に欠かすことのできないエタノール耐性を生み出す分子メカニズムに関する研究の経緯と最新の知見を概説する。

内側から護る～エタノール耐性関連転写因子

S. cerevisiae が高いエタノール耐性を有することは古くから知られていたが、その分子メカニズムが明らかにされ始めたのは21世紀に入ってからのことである。当初、酵母のストレス耐性に関する研究は、主に熱ショックや高浸透圧、酸化、栄養飢餓などのストレスを対象にしたものが主流であった。これは、酵母自身の性質を解明することよりも、むしろ *S. cerevisiae* をモデル生物として用いることで真核生物に共通のストレス応答機構を解明することに主眼が置かれていたためである。

酵母のエタノール耐性の研究の発展に先導的な役割を果たしたのが、実は「清酒酵母」を用いた研究であることを読者の皆様方にご存知だろうか。清酒醸造に用いられる清酒酵母と呼ばれる菌株群は、分類学上は *S. cerevisiae* に属するにも関わらず、他の菌株には見られない高いエタノール生産を示す¹⁾。このため、清酒酵母のエタノール耐性が注目されてきた。高エタノール耐性清酒酵母の遺伝子発現プロファイルの解析²⁾、清酒酵母へのトランスポゾン導入によるエタノール耐性原因遺伝子の探索³⁾などで用いられた手法が、実験室酵母でのDNAマイクロアレイ解析やノックアウトライブラリーの表現型に基づくスクリーニングなどの手法として世界

中に受け継がれ、その結果としてエタノール耐性に関連する遺伝子のゲノムワイドな同定に至ったことは注目に値する。

現在までに行われた一連のスクリーニングの結果、数百もの遺伝子の関与が明らかにされており^{4,5)}、炭素代謝やミトコンドリアでの電子伝達、タンパク質修復・分解、活性酸素解毒、細胞周期調節、細胞壁構築など多様な細胞機能に関連する遺伝子の発現がエタノールに応答して誘導され、エタノール耐性の獲得に必要であることが示されている。このような遺伝子発現において中心的な役割を果たすのが、代表的な環境ストレス応答転写因子として知られる Msn2p および Msn4p (Msn2/4p) や、元々は熱ショック、酸化ストレスへの応答にそれぞれ必要な転写因子として同定された Hsf1p、Yap1p である⁵⁾。このことから、エタノールが他のストレスと共通のメカニズムでこれらの転写因子を活性化していること、さらに、これらの転写因子の機能強化が、エタノール耐性と他のストレスに対する耐性を同時に向上し、ストレス存在下での発酵生産力の改善に有用であることが示唆される。実際に筆者らは、Msn2p をコードする遺伝子 (*MSN2*) の過剰発現により、発酵阻害物質であるフルフラールの存在下でエタノール生産の初速度を改善したバイオエタノール酵母⁶⁾や、冷凍ストレス後のパン生地発酵力が低下しにくいパン酵母⁷⁾の作出に成功している(図1)。なお、かつてはエタノールストレスに特異的

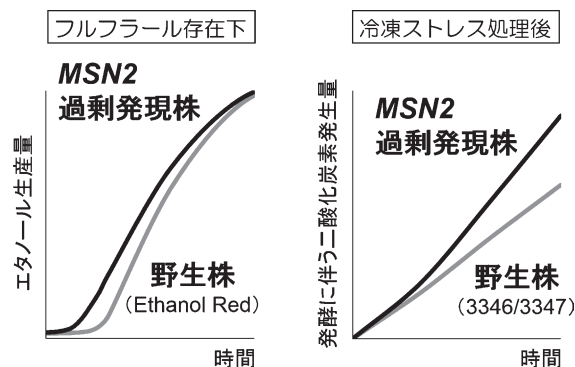


図1. *MSN2* 過剰発現によるエタノール発酵の改善。(左) バイオエタノール酵母 Ethanol Red のフルフラール存在下での発酵に対する *MSN2* 過剰発現の影響。(右) パン酵母 3346/3347 の冷凍ストレス処理後の発酵に対する *MSN2* 過剰発現の影響。

*著者紹介 奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科(教授) E-mail: hiro@bs.naist.jp

に応答する転写因子Asr1pの存在が提唱されていたが⁸⁾、後にそのエタノール耐性やエタノール発酵への関与は否定されており⁹⁾、転写因子の改変によってエタノール耐性を単独で強化することは現在のところ困難であると考えられている。

清酒酵母のエタノール耐性

ところで、酵母のエタノール耐性研究の端緒となった清酒酵母は、上述の転写因子の機能が低いからエタノール発酵力が優れているのだろうか。少々複雑な話で恐縮だがその答えは「ノー」で、標準的な実験室酵母であるX2180と比較して、きょうかい7号（以下、K7；もっとも広く用いられている清酒酵母株の一つ）に近縁な清酒酵母はMsn2/4pやHsf1pの活性が低く、意外なことに高濃度のエタノールにさらすと生存率が急速に低下することを筆者らは見いだしている^{1,10,11)}。さらにその原因変異として、Msn2/4pやHsf1pの上流活性化因子の一つであるGreatwallプロテインキナーゼRim15p上の機能欠失変異が、K7に近縁な清酒酵母に特異的に分布することを明らかにしている¹²⁾。実験室酵母でRim15pをコードする遺伝子（RIM15）を破壊するとエタノール生産が顕著に上昇したことから¹²⁾、すべてのデータを総合すると、「清酒酵母はエタノール耐性が低いからエタノール生産が高い」という一見奇妙な帰結が導かれる（図2）。

そもそも、酵母はなぜエタノール耐性機構を有しているのだろうか。酵母は、解糖系によりエネルギーを得て増殖するためにグルコースを消費し、エタノールを生産

するが、自らが生産するエタノールによって死滅してしまっては元も子もない。自らが死なない程度に増殖してエタノールを生産した時点で、そのことを感知してエタノール生産を止め、エタノール耐性を高めることのできる酵母が優れた生存戦略を有していることになる。このように酵母の立場に立って整理すると、Msn2/4pやHsf1pがエタノール耐性を高めるとともに、エタノール生産を抑制する機能を有していることは理にかなっていることがわかる。したがって、ストレスの少ない環境では、Msn2/4pやHsf1pの活性を抑制することが発酵生産力の上昇につながり、逆に過酷なストレス環境下では、Msn2/4pやHsf1pの活性を強化して死滅を防ぐことが発酵生産力の維持につながると考えられる。この仮説と合致して、バイオエタノール酵母のRIM15破壊株を用いた発酵試験では、比較的ストレスの少ない条件でのみ発酵促進効果が認められ、高温・高糖濃度ストレス条件下では観察されなかった¹³⁾。以上の結果から、「発酵環境に応じた適度なエタノール耐性の付与が発酵生産の最適化に必要である」という結論に辿り着いた。

ただし筆者らは、清酒酵母はエタノール耐性が低い、と断じるつもりではないのでご留意いただきたい。K7に近縁な清酒酵母が急性のエタノールストレスに対して高い死滅率を示すことは確かであるが、系統の異なる清酒酵母菌株では必ずしもそうではない。また、緩やかにエタノール濃度が上昇する清酒もろみにおいて、約20%という高濃度のエタノール存在下でも全滅することなく生き延びていることも事実であり、Msn2/4pやHsf1pを介さない未知のアルコール適応機構を有している可能性も推測される。

外側から護る〜クローズアップされる細胞膜の役割

本稿の後半では、最新のトピックスとして、エタノール耐性を担う新規因子として注目される「細胞膜」に関連する2つの話題を提供したい。細胞膜は、細胞外に存在するエタノールが最初に細胞にコンタクトするいわばエタノール耐性獲得の最前線であり、上述したような、細胞内で起こるシグナル伝達や遺伝子発現制御とはまったく異なるエタノール耐性獲得のためのメカニズムを有していることが徐々に明らかになりつつある。

昨秋、Science誌に、酵母のエタノール耐性に関する報文が掲載された¹⁴⁾。そこに示されたのは実にシンプルな話で、培地にリン酸一カリウムを添加するだけで酵母のエタノール生産を改善することができたのだと言う。確かにリン酸一カリウムは発酵助剤として用いられており、酵母にとって必要な栄養分だから、とも考えられる

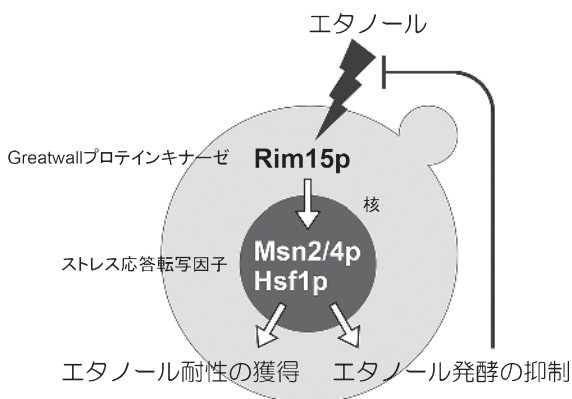


図2. 清酒酵母の研究から明らかになったエタノール耐性とエタノール発酵の関係。GreatwallプロテインキナーゼRim15pと下流のストレス応答転写因子Msn2/4p、Hsf1pは、エタノールにより活性化されエタノール耐性に必要な遺伝子の発現を誘導すると共に、エタノール発酵を抑制する。このことから、本メカニズムがエタノール生産の負のフィードバック調節において、中心的な役割を果たすと考えられる。

が、本当にそうなのだろうか。この作用がカリウムイオンによるものか、それともpHの上昇によるものかを調べるために、塩化カリウムと水酸化カリウムを個別に添加したところ、どちらも同様にエタノール生産を上昇させた。さらに、細胞内にカリウムイオンを取り込むTrk1pや細胞外にプロトンを出すPma1pといった細胞膜上のATP依存性イオンチャンネルの活性化によってエタノール生産が上昇することも見いだされた。以上の結果から、発酵過程におけるエタノール濃度の上昇が、細胞膜の透過性を高めることによってイオンを漏出させ、細胞内外のカリウム/プロトン勾配を消失させることがエタノールによる毒性の本質であり、これを防ぐことによって酵母はエタノール耐性を獲得し発酵力を維持することができる、というモデルが提唱された(図3)。このような生物物理的なメカニズムは、従来の遺伝学的なスクリーニングだけでは容易に発見されなかったのかもしれない。

話は変わるが、近年、筆者らを含む複数の研究グループにより、エタノールストレスなどによって傷害を受けた細胞膜上のタンパク質を認識し、除去するための「細胞膜の品質管理」という現象の存在が提唱されており、その分子メカニズムに、ユビキチン化を介したタンパク質分解が関与することが明らかになり始めている¹⁵⁻¹⁷⁾。この現象は、外界からの刺激に直接さらされた細胞膜が正常な状態に回復するためのプライマリーなイベントであり、酵母がエタノールストレスに適応し、耐性を獲得する上で重要な役割を果たすと考えられる。その鍵となる因子が、*S. cerevisiae*において生存に必須で唯一の

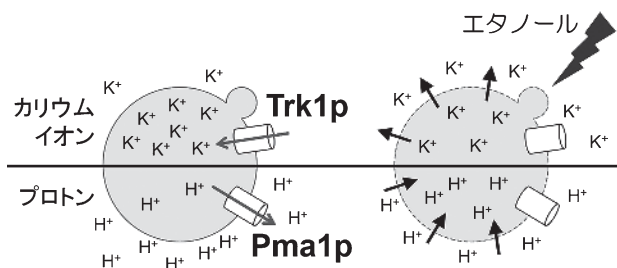


図3. 最近見いだされたカリウム/プロトン勾配を介したエタノール耐性メカニズム。(左) ストレスのない環境では、細胞内にカリウムイオンを取り込むTrk1pと細胞外にプロトンを出すPma1pの働きによって、細胞内のカリウムイオン濃度は高く、プロトン濃度は低く抑えられている。(右) エタノールによって細胞膜の透過性が上昇するとイオンの漏出・流入が起こり、カリウム/プロトン勾配が消失することで細胞死が誘導される。イオンの漏出・流入を防ぐためには、細胞外のカリウムイオン濃度を上げ、プロトン濃度を下げることが有効である。あるいは、Trk1p, Pma1pを活性化することにより、イオンの漏出・流入に対抗して細胞内のイオン環境を維持することができる。

Nedd4 ファミリーユビキチンリガーゼであり、種々のストレス応答にも関与するRsp5p^{18,19)}、およびRsp5pと相互作用し、細胞内に10種類以上存在するアレスチン様アダプタータンパク質²⁰⁾である(アレスチンは、哺乳類における視覚ロドプシンを介したシグナル伝達因子として発見され、真核生物に広く保存されたタンパク質である)。

一例として、細胞膜上のアミノ酸パーミアーゼGap1pのエタノールストレス応答についてご紹介したい。Gap1pの分解制御については、細胞膜の品質管理としての研究以前から、窒素源の変化に応答した経路の解析が進んでいる。Gap1pは、環境中に資化しにくい窒素源のみ存在する時は細胞膜に局在し、アミノ酸を細胞内に取り込むが、アンモニウムイオンのような資化しやすい窒素源が存在し、アミノ酸の取り込みが不要になると、Rsp5p上のタンパク質相互作用ドメインであるWWドメインと、アレスチン様アダプタータンパク質の一種であるBul1pまたはBul2p (Bul1/2p) 間の相互作用を介してユビキチン化される。このことが引き金となり、Gap1pはエンドサイトーシスを経て液胞に輸送され、分解される。筆者らは、同様の現象がエタノールストレスを含む他のストレスにおいても引き起こされ、細胞膜の品質管理の一翼を担うことを見いだしたが、興味深いことに、エタノールストレスによるGap1pのエンドサイトーシスはBul1/2pに完全には依存していなかった(図4)¹⁶⁾。このことは、窒素源の変化のようにGap1pがその活性を維持したまま単に不要になった場合の分解と、ストレスによって傷害・変性を受けた場合の分解は、異なるアダプタータンパク質によって認識されることを意味しており、細胞膜の品質管理に特異的な分子メカニズムの存在が示唆される。さらに筆者らは、Rsp5pの基質特異性を生み出す新たなメカニズムとして、3つのWWドメイン上の保存されたスレオニン残基のリン酸化による調節も見いだしている^{21,22)}。今後は、各WWドメインとアダプタータンパク質が変性タンパク質をどのように見分けているのかを解析することで細胞膜の品質管理に関する全体像を明らかにし、エタノール耐性の付与につながる知見を得たい。現在までにすでに、Rsp5pをコードする遺伝子(*RSP5*)の過剰発現により、ビールの高濃度醸造や高温でのバイオエタノール生産性向上に資する菌株が取得されているが^{23,24)}、さらなる研究の進展によって高効率で緻密なエタノール耐性の改善が可能となることが期待される。

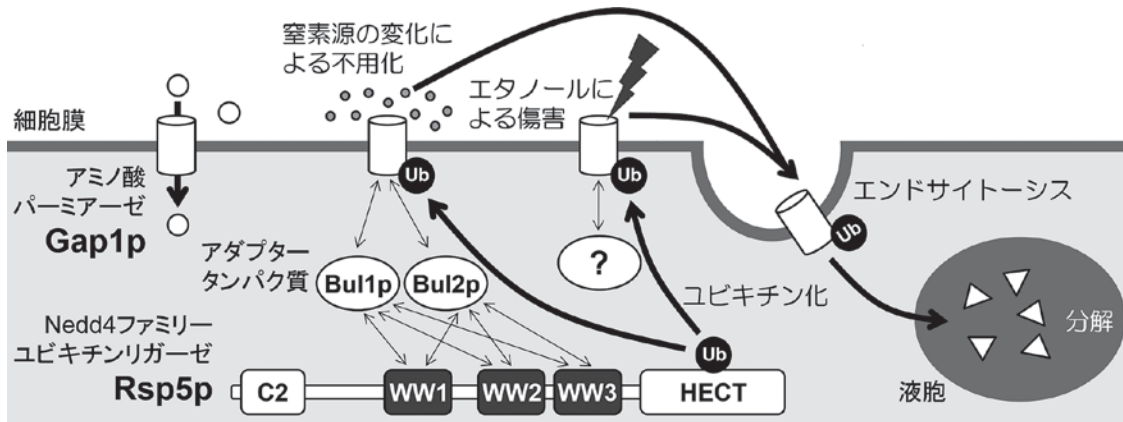


図4. エタノールストレスに応答した細胞膜の品質管理メカニズム. アミノ酸パーミアーゼGap1pは、窒素源の変化に応答して、ユビキチンリガーゼRsp5pとアダプタータンパク質Bul1/2pとの相互作用を介してユビキチン化され、エンドサイトーシスによって液胞に運ばれ分解される。エタノールストレスによっても同様の現象が引き起こされるが、傷害を受けたGap1pを認識するのはBul1/2pとは異なる未知のアダプタータンパク質であると考えられる。

おわりに

本稿では、古くて新しい「酵母のエタノール耐性」をキーワードとして、その分子メカニズムと実用酵母菌株への応用に関する知見を概説した。分子メカニズムについては、ストレス応答転写因子を介した転写調節からタンパク質のユビキチン化修飾を介した翻訳後調節、さらには細胞膜内外のイオン濃度勾配という生物物理的なプロパティまで、細胞の内と外から、実に多様な生命現象がエタノール耐性を創り出していることを知っていただけたのではないと思う。このことは、グルコースを消費してエネルギーを得るとともにエタノールを生み出すこと、さらにそのエタノールに適応して生き延びることが、酵母という生命システムにとっていかに重要であるかを如実に物語っている。また、「清酒酵母は不要なストレス応答遺伝子を捨てることによってエタノール生産が向上した」という驚くべき発見は、人類が微生物の機能を有効利用しようとする際に、まずその微生物自身のことを深く理解しなければならない、という当たり前ではあるがつい忘れがちな教訓を改めて教えてくれた。これからも、「微生物に学ぶ」という謙虚さと敬意を持って酵母に接しながら、その素晴らしい能力を自らの手で発見し、伝えていきたい。

謝辞

本稿で紹介した研究の一部は、独立行政法人酒類総合研究所で行われたものであり、下飯 仁博士（現・岩手大学農学部教授）をはじめとする皆様に感謝致します。

文献

- 1) Watanabe, D. *et al.*, "Stress Biology of Yeasts and Fungi", p. 59, Springer (2015).
- 2) Ogawa, Y. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **90**, 313 (2000).
- 3) Takahashi, T. *et al.*: *Mol. Genet. Genomics*, **265**, 1112 (2001).
- 4) Stanley, D. *et al.*: *J. Appl. Microbiol.*, **109**, 13 (2010).
- 5) Ma, M. and Liu, Z. L.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **87**, 829 (2010).
- 6) Sasano, Y. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **113**, 451 (2012).
- 7) Sasano, Y. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **76**, 624 (2012).
- 8) Betz, F. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **279**, 28174 (2004).
- 9) Izawa, S. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **72**, 560 (2010).
- 10) Urbanczyk, H. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **112**, 44 (2011).
- 11) 渡辺大輔: 生物工学, **91**, 2 (2013).
- 12) Watanabe, D. *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **78**, 4008 (2012).
- 13) Inai, T. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **116**, 591 (2013).
- 14) Lam, F. H. *et al.*: *Science*, **346**, 71 (2014).
- 15) Zhao, Y. *et al.*: *eLife*, **2**, e00459 (2013).
- 16) Shiga, T. *et al.*: *Eukaryot. Cell*, **13**, 1191 (2014).
- 17) Crapeau, M. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **289**, 22103 (2014).
- 18) Hoshikawa, C. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 11505 (2003).
- 19) 高木博史: 化学と生物, **49**, 100 (2011).
- 20) Lin, C. H. *et al.*: *Cell*, **135**, 714 (2008).
- 21) Sasaki, T. and Takagi, H.: *Genes Cells*, **18**, 459 (2013).
- 22) Watanabe, D. *et al.*: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **463**, 76 (2015).
- 23) Ogata, T. *et al.*: *J. Brew. Distilling*, **3**, 1 (2012).
- 24) Shahsavarani, H. *et al.*: *Biotechnol. Adv.*, **30**, 1289 (2012).