

微生物間相互作用と代謝，そしてプリオン

渡辺 大輔*・高木 博史

代謝レベルでの微生物間相互作用

微生物間相互作用の中でも，代謝レベルでの相互作用はもっとも広く認められる様式の一つである。具体的には，環境中の栄養源を微生物Aが代謝することで，微生物Bが利用しやすい形に変換される例があげられる。その結果，両方の微生物にとって適した生態系が形成される。代謝産物と生物の種類を増やしていけば，地球上の生物はみな食物連鎖によってつながっているのであり，代謝レベルでの微生物間相互作用の研究とは，そのような自然の営みの一部を切り取り，仕組みを明らかにしようとする試みに他ならない。そして，我々人類は，微生物の存在を知る遙か以前から，代謝レベルでの微生物間相互作用を生活の一部に取り入れている。伝統的な清酒醸造法として知られる生酛（きもと）造りでは，まず乳酸菌による乳酸発酵によって発酵環境を酸性に整えることで，清酒酵母以外の微生物が混入しにくくなり健全なアルコール発酵を行うことが可能になるとされている。酒類に限らず，さまざまな発酵食品の製造工程において微生物間相互作用の存在が報告されている。したがって，代謝レベルでの微生物間相互作用の研究を通じて，発酵生産によるものづくりの効率を高め，また，新規な製造方法の開発に資するための有用な知見が得られると期待される。

酵母における代謝調節とプリオン

本稿におけるもう一つのキーワードが，プリオンである。プリオンとはタンパク質性の遺伝因子の総称であり，哺乳類では狂牛病などの感染症の原因としてもよく知られている。筆者らが研究対象としている酵母 *Saccharomyces cerevisiae* にもプリオンは存在するが，宿主に対して悪影響を及ぼすのではなく，栄養環境の変化やストレスに対する応答メカニズムとしての意義を有する性格のものが多く報告されている^{1,2)}。ここではまず，もっとも古くから知られる酵母プリオンの一つである [URE3] を例にあげて紹介する (図1)。なお，プリオンは遺伝子上の変異ではないので遺伝子として表記することはないが，通例，プリオンとしての形質を獲得したタンパク質や株をカッコ付きの大文字で記載し，元の状態

のタンパク質や株をカッコ付きの小文字で記載する。

[URE3]株の存在自体は，1970年代の窒素代謝の研究においてすでに見いだされていた^{3,4)}。酵母は，アンモニアのような資化しやすい窒素源の存在下では，資化しにくい窒素源の取込みや代謝に関連する遺伝子の発現を抑制し，資化しやすい窒素源を優先的に消費する。これを，窒素カタボライト抑制と呼ぶ。[URE3]株は，アンモニア存在下にも関わらず，資化しにくいウレイドコハク酸を資化する株として単離された。この株を，元の株である [ure3] と接合させると，生じる二倍体株は [URE3] となる (優性遺伝)。また，この二倍体を孢子形成させて生じる四分子では，[URE3]:[ure3]の比が，2:2ではなく4:0となる (細胞質遺伝)。さらに，プリオンの形成には分子シャペロンの機能が必要であることから，特定の分子シャペロンの機能を阻害することで [ure3] 株に戻る (タンパク質性遺伝)⁵⁾。後に，[URE3]プリオンの正体は，同じスクリーニングを端緒として発見された Ure2p というタンパク質であることが明らかになった。Ure2p は，資化しにくい窒素源の取込みや代謝に関連する遺伝子の発現を誘導する転写因子 Gln3p に直接結合して機能を阻害するタンパク質であり，まさに窒素カタボライト抑制の原因そのものであった。Ure2p のアミノ末端のグルタミンとアスパラギンに富んだ領域が凝集して繊維状のアミロイドを形成すると感染性を獲得し，[URE3]プリオンとなる⁶⁾。この時，元の Ure2p の機能は失われるため，[URE3]株と URE2 遺伝子欠損株は一見まったく同じ表現型 (アンモニア存在下でのウレイドコハク酸の資化) を示す。しかし，変異によって失われた Ure2p の機能が復活する可能性はきわめて低いが，

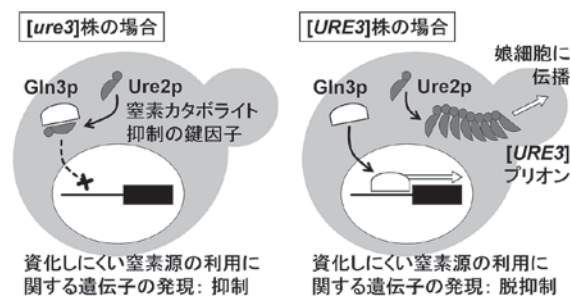


図1. 酵母プリオン [URE3] の概要

*著者紹介 奈良先端科学技術大学院大学先端科学技術研究科バイオサイエンス領域 (助教) E-mail: d-watanabe@bs.naist.jp

[URE3]株が[ure3]株に戻る頻度は比較的高い。このことから、窒素源が変動しやすい環境では、可逆的に表現型を変換させる能力を有するプリオンの存在が、酵母の生存にとって有利に働くのではないかと考えられている。

バクテリアの「声」を聴く酵母プリオン

近年、このようなプリオンの中で、微生物間相互作用を仲介する機能を有するものが発見された。[URE3]株は窒素カタボライト抑制の研究において発見されたが、同様に、炭素カタボライト抑制の研究から[GAR⁺] (glucose-associated repressionまたはglucosamine resistanceの略)と呼ばれる株が見いだされた^{7,8)}。酵母は、資化しやすいグルコースが存在する環境ではグルコース以外の炭素源を資化するための遺伝子の発現を抑制し、グルコースを優先的に消費する。この現象をグルコース抑制^{9,10)}と呼び、酵母がアルコール発酵により、グルコースをエタノールに効率良く変換する要因の一つとしても知られる¹¹⁾。一方、[GAR⁺]株は、グルコース存在下でもグリセロールやガラクトースなどの炭素源を資化することができる。[GAR⁺]株は、優性遺伝、細胞質遺伝、タンパク質性遺伝といった、プリオンに特徴的な伝播様式を示すが¹²⁾、プリオンを生み出す具体的なタンパク質の変化については同定されていない。このことから、本稿では[GAR⁺]を推定上のプリオンとして話を進める。

[GAR⁺]プリオンの性質として非常に興味深いのは、その形成が、バクテリアとの共培養により促進されるという点である。この現象を初めて報告したJaroszら¹³⁾は、実験中にたまたまプレート培地上に混入したバクテリアのコロニーの周囲に[GAR⁺]株の顕著な形成が認められ

たことからこの事実を発見した。筆者らも、この現象を再現してみた(図2A)。炭素源としてグリセロールを含み、酵母が代謝できないグルコースのアナログであるグルコサミンを少量加えた培地上に酵母を塗布すると、酵母はグルコース抑制を示しグリセロールを資化することができないので、コロニーを形成することができない。ところが、このプレート培地を軽く外気にさらした後フタをして数日間経つと、明らかに酵母とは外観の異なるコロニーが形成され(後に、バクテリアのコロニーであることを確認)、その周囲において、さかんに酵母が生育する様子が観察された。つまり、このバクテリアが何らかの手段によりプレート培地上の酵母に働きかけて[GAR⁺]プリオンの形成を促進し、酵母のグルコース抑制を解除したと考えられる。まるで、バクテリアの呼びかける「声」に応答して酵母が目覚めたかのようにも見える面白い現象ではないだろうか。

清酒酵母に生醗乳酸菌の「声」は届くか

この現象を発酵生産によるものづくりに応用するためには、まず、どのバクテリアがどの酵母の[GAR⁺]プリオンを形成することができるのかを理解しなければならない。実は、あらゆるバクテリアが[GAR⁺]株の形成促進能を有するわけではないことが現在までにわかっている^{13,14)}。特定のグループのバクテリアだけが有するということもなく、たとえば、*Lactobacillus*属の乳酸菌の中にも[GAR⁺]株の形成を促進できるものとできないものが混在している。さらには、同じ大腸菌*Escherichia coli*の中でも、形成促進能を有する株と有さない株が見つかっている。このことから、酵母に呼びかける「声」

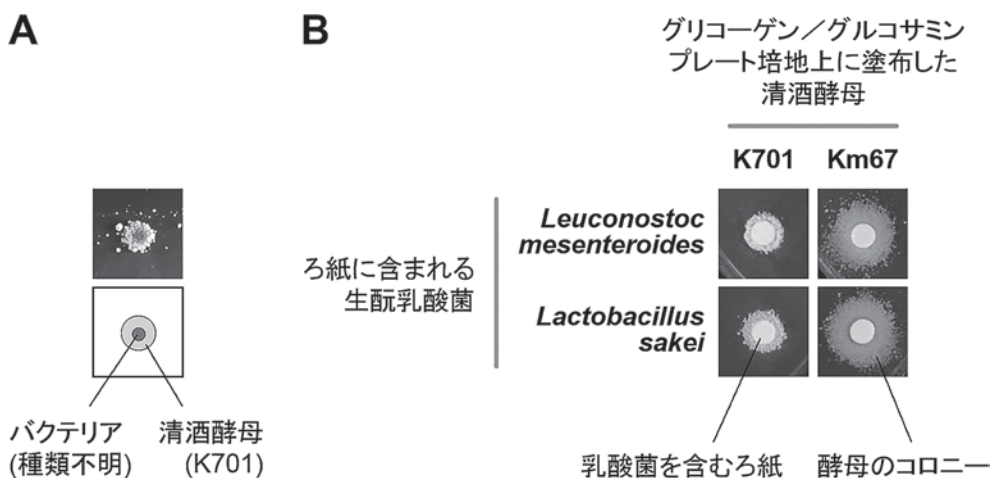


図2. バクテリアによる酵母[GAR⁺]株の形成促進。(A)Jarosz et al. (2013)¹³⁾の追試の結果。(B)生醗乳酸菌による清酒酵母[GAR⁺]株の形成促進。

を発する能力は、進化のある時点で、ある特定のバクテリアが獲得し広まっていったというよりも、さまざまなバクテリアが独自に獲得した可能性が高い。形成促進能を有するバクテリアの中には発酵食品の製造過程などで見られるものが多く存在しており、それぞれのバクテリアが酵母と共存してきた歴史の中でこの能力を身につけたのではないかとという仮説も提唱されている¹³⁾。一方、酵母については*S. cerevisiae*を含む幅広い種が[*GAR*⁺]株の形成能を有することが報告されており、「声」を受け取るメカニズムについては進化的に保存されたものであることが示唆されている¹⁵⁾。

筆者ら¹⁶⁾は、伝統的な清酒醸造法である生酛造りに用いられる清酒酵母（代表的な清酒酵母として知られるK701株および生酛に由来するKm67株）と、生酛乳酸菌(*Leuconostoc mesenteroides*および*Lactobacillus sakei*)を用いて、グリセロール/グルコサミン含有培地における[*GAR*⁺]株の形成を調べた(図2B)。その結果、どちらの生酛乳酸菌も、両方の清酒酵母における[*GAR*⁺]株の形成を促進することが明らかとなり、生酛造りの過程において実際に[*GAR*⁺]株が出現する可能性が示唆された(ただし、実験室内のプレート培地上で出現するからといって、実際の発酵環境で本当に出現するかどうかは調べてみない限りわからないため、今後取り組むべき重要な課題であると考えている)。また、K701株と比較して、Km67株の方がより顕著に[*GAR*⁺]株の形成を示した点は特筆に値する。このことは、生酛乳酸菌との共存の歴史を経たKm67株の方が、乳酸菌からの「声」に対して高い応答性を有することを意味している。酵母における応答性の強弱は筆者らにより初めて見いだされた知見であり、K701株とKm67株の比較により[*GAR*⁺]プリオンの本体または形成促進メカニズムの解明につながることを期待される。

生酛乳酸菌の「声」により清酒酵母はどう変わるのか

上述のように、生酛造りににおける微生物間相互作用に[*GAR*⁺]プリオンが関与することが示唆されたが、それでは、[*GAR*⁺]プリオンは清酒酵母にどのような変化をもたらし、ひいては清酒醸造に影響を及ぼすのだろうか。もっとも考えやすいのは、[*GAR*⁺]株ではグルコース抑制が解除されているから、炭素代謝に何らかの効果が見られるのではないかとという点である。筆者らは以前に、グルコース抑制の解除がアルコール発酵力の低下につながることを見いだしている¹¹⁾。また、筆者らによる研究と並行して、ワイン酵母における[*GAR*⁺]株の形成の影響についての解析を進めているグループがあり、アル

コール発酵力の低下が報告されている^{13,14)}。筆者らが、清酒酵母K701株とKm67株の[*gar*⁻]株(元株)および[*GAR*⁺]株を用いてYPD20培地での発酵試験を実施した結果、確かにK701株では[*GAR*⁺]プリオンの形成によりアルコール発酵力の低下が認められた。これに対し、Km67株では[*GAR*⁺]プリオンの形成がアルコール発酵力に及ぼす影響はほとんど見られなかった。このことから、生酛造りで用いられているKm67株では、[*GAR*⁺]株は出現しやすいものの、[*GAR*⁺]プリオンによるアルコール発酵力の低下は起こりにくい、という予想外の結論が得られた(図3)¹⁶⁾。これは、生酛造りで清酒醸造を行う人間にとっては有益な形質であると考えられる。

バクテリアが[*GAR*⁺]プリオンの形成を介してアルコール発酵力を低下させることにはどのような意義が考えられるだろうか。グルコースを用いた解糖は、酵母や乳酸菌に限らずほとんどすべての生物が有するエネルギー獲得方法であり、グルコースは多くの微生物にとって資化しやすい炭素源である。そこで、多様な微生物が共存するためには、環境中のグルコースを分かち合うことが望ましいはずである。ところが、非常に強力なグルコース抑制能力を有する酵母が環境中に存在すると、酵母はグルコースを優先的に消費し、グルコースが酵母に独占されてしまうことになる。さらに、*S. cerevisiae*をはじめとする酵母は、アルコール発酵によりエタノールを生産し、他の微生物の生育を抑制する(もっとも、エタノールは酵母にとっても毒性を有するが、酵母のエタノール耐性はバクテリアと比較すると高い)。このことから、さまざまな微生物が存在する環境において、アルコール発酵とは、酵母がエネルギーを獲得する手段であることに加え、他の微生物の生育を不利にするための排他的な生存戦略としての一面を有するのではないかと推察される。そこで、酵母と共存してきた歴史を有するバクテリアは、少々自分勝手な酵母に「声」をかける方法

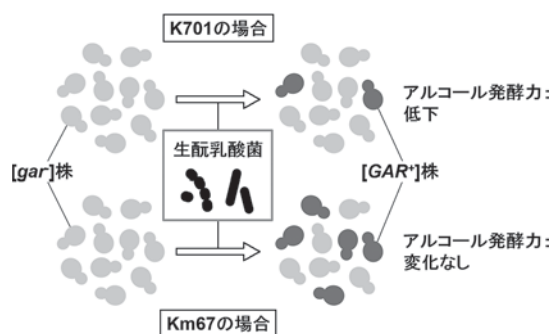


図3. 生酛において予想される清酒酵母[*GAR*⁺]株の形成と、そのアルコール発酵に対する影響。

を編み出すことで[*GAR*⁺]プリオンの形成を促進し、アルコール発酵を抑制することで、生存競争に勝ち抜いてきたのかもしれない。一方、生酏造りで用いられているKm67株は、この[*GAR*⁺]プリオンによるアルコール発酵の抑制をさらに打ち消すような、独自のメカニズムを発達させた酵母と考えられる。おそらく、生酏造りに携わる人間にとっては生酏の環境でも高いアルコール発酵力を維持する能力が望ましいとされ、そのような能力を有するKm67株が選抜されてきたのだろう。このように考えてみると、Km67という個性的な菌株は、酵母と乳酸菌、そして生酏造りで清酒醸造を行う人間、という三者の相互作用のもとに生まれたものであると考えられ、単なる微生物間相互作用を超えた、微生物と人間の営みに関するダイナミックな関係性を想像させてくれる。

Km67株では、[*GAR*⁺]プリオンを形成しやすいにも関わらず、アルコール発酵力はほとんど影響を受けないことがわかったが、[*GAR*⁺]プリオンの形成が清酒醸造にとって何か有益な効果をもたらすことはないのだろうか。[*GAR*⁺]プリオンの実体が不明である現時点では代謝に及ぼすすべての影響を予測することは容易ではない。そのため、今後、実際に[*gar*⁻]株と[*GAR*⁺]株を用いた清酒小仕込試験を実施することにより、清酒の風味・品質への影響も明らかにしていく必要があるだろう。従来、生酏造りにおける乳酸菌の意義として、①乳酸の生産により発酵環境を酸性に整え、清酒酵母以外の微生物の混入を防ぐ、②D-アミノ酸などの生産により独自の風味を付与する、といったことがあげられてきた¹⁷⁻²⁰⁾。しかし、これだけが目的であれば、乳酸菌の発酵産物と酵母の発酵産物を別々に作って混ぜ合わせることもできるかもしれない。実際に、現在主流となっている速醸造りは、仕込の時点で乳酸を添加することで、乳酸菌による乳酸発酵を省略した、比較的簡便な醸造方法である。生酏造りにおいて、乳酸菌が繁殖している環境で酵母を生育させ、両者が共存するプロセスを経ることに何らかの意味があるのだとすれば、[*GAR*⁺]プリオンの役割がその謎を解く鍵を握っているのかもしれない。

おわりに

酵母[*GAR*⁺]プリオンの研究には、その実体、形成促進メカニズム(「声」の正体)、代謝への効果を含め、まだ多くの謎が残されている。それらの解明を目指すとともに、微生物間相互作用における意義と発酵産業での活

用の方策をたえず考え続けていくことで、新規性の高い発酵生産プロセスの確立につなげることができるとはならないかと期待される。また、[*GAR*⁺]プリオンに限らず、[*URE3*]プリオンのように、代謝調節に関連するプリオンやエピゲノム因子などが他にも多数存在する可能性も秘められている。昨今ではゲノムワイドな代謝調節の研究が広く行われるようになってきたが、ゲノムを超えてさらに視野を広げることで醸造学に新しい風を吹き込んでいきたい。

本研究は、菊正宗酒造株式会社および奈良県産業振興総合センターとの共同研究により実施されました。研究に携わった砂田啓輔先生、高橋俊成先生、山田翼先生(以上、菊正宗酒造)、大橋正孝先生(奈良県)、熊野舞香氏、杉本幸子氏、伊藤稔氏(以上、奈良先端大)にこの場を借りて御礼申し上げます。また、本研究の立上げにあたって貴重なディスカッションを賜りました、日本大学生物資源科学部 故・古川社一准教授に心からの感謝を捧げます。

文 献

- 1) Wickner, R. B. *et al.*: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **79**, 1 (2015).
- 2) Harvey, Z. H. *et al.*: *Mol. Cell*, **69**, 195 (2018).
- 3) Lacroute, F.: *J. Bacteriol.*, **106**, 519 (1971).
- 4) Drillien, R. and Lacroute, F.: *J. Bacteriol.*, **109**, 203 (1972).
- 5) Wickner, R. B.: *Science*, **264**, 566 (1994).
- 6) Taylor, K. L. *et al.*: *Science*, **283**, 1339 (1999).
- 7) Ball, A. J. *et al.*: *Genetics*, **84**, 311 (1976).
- 8) Kunz, B. A. and Ball, A. J.: *Mol. Gen. Genet.*, **153**, 169 (1977).
- 9) Dashko, S. *et al.*: *FEMS Yeast Res.*, **14**, 826 (2014).
- 10) Kayikci, Ö. and Nielsen, J.: *FEMS Yeast Res.*, **15**, fov068 (2015).
- 11) Watanabe, D. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **77**, 2255 (2013).
- 12) Brown, J. C. and Lindquist, S.: *Genes Dev.*, **23**, 2320 (2009).
- 13) Jarosz, D. F. *et al.*: *Cell*, **158**, 1083 (2014).
- 14) Ramakrishnan, V. *et al.*: *Front. Ecol. Evol.*, **4**, 137 (2016).
- 15) Jarosz, D. F. *et al.*: *Cell*, **158**, 1072 (2014).
- 16) Watanabe, D. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, (in press).
- 17) Gogami, Y. *et al.*: *J. Chromatogr. B*, **879**, 3259 (2011).
- 18) Okada, K. *et al.*: *Amino Acids*, **44**, 489 (2013).
- 19) Kitagaki, H. and Kitamoto, K.: *Annu. Rev. Food Sci. Technol.*, **4**, 215 (2013).
- 20) Furukawa, S. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **116**, 533 (2013).