

## *Rhizopus* 培養液による酵母のエタノールストレス応答

森谷 千星・鈴木 豪・手嶋 啓悟・中山 俊一  
中里 厚実・鈴木健一郎・門倉 利守\*

東京農業大学応用生物科学部醸造科学科

(2019年2月8日受付 2019年5月13日受理)

### Ethanol stress response of yeast as a result of treatment with *Rhizopus* culture liquid

Chise Moriya, Go Suzuki, Keigo Teshima, Shunichi Nakayama, Atsumi Nakazato, Ken-ichiro Suzuki, and Toshimori Kadokura\* (*Department of Fermentation Science, Faculty of Applied Bio-Science, Tokyo University of Agriculture, 1-1-1 Sakuragaoka, Setagaya-ku, Tokyo 156-8502*)  
Seibutsu-kogaku **97**: 540–545, 2019.

Our previous findings suggested that the culture liquid obtained from an aerobic culture of *Rhizopus javanicus* on a synthetic medium can impart ethanol tolerance to yeast. In this study, to investigate the changes in yeast response associated after the addition of *Rhizopus* culture liquid under ethanol stress, we analyzed the cell wall components, cellular fatty acid composition, and nuclear export of mRNA in yeast cultured in a medium containing ethanol to which *Rhizopus* culture liquid had been added. Since it has long been considered that rice-*koji* may increase the ethanol tolerance of yeast during sake brewing, this study also analyzed the effects of a rice-*koji* extract on yeast physiology. Addition of *Rhizopus* culture liquid significantly increased the protein content of the crude mannan-protein complexes in the yeast cell wall. In terms of the cellular fatty acid composition, stearic acid and oleic acid contents increased significantly while the palmitoleic acid content was maintained, suggesting that membrane fluidity was stabilized. mRNA typically accumulates in the nucleus of yeast grown on a medium containing ethanol, but it was found that mRNA did not accumulate in the nucleus when *Rhizopus* culture liquid was added to the culture medium. This suggests that components derived from *Rhizopus* cells contribute to enhanced stress tolerance of yeast in *Rhizopus* culture liquid; rice-*koji* extract had a similar action.

[**Key words:** *Rhizopus*, ethanol tolerance, stress response, sake yeast, mRNA localization]

### 緒 論

酵母のエタノール耐性の研究は、これまで多くの研究者により行われているが、細胞の構造、遺伝子、代謝などあらゆる事象が影響するため、その全貌は未解明といえる。しかし、それぞれの視点で酵母のエタノール耐性は解析されており、酵母のエタノール耐性機構は、オルガネラ膜の脂質組成の変化により膜の流動性が安定化される<sup>1)</sup>こと、ストレスセンサーのシグナル伝達系により細胞壁の合成が活性化される<sup>2)</sup>こと、ストレスタンパク

質などの発現が誘導される<sup>3)</sup>ことなどによるものと考えられている。また、清酒醸造における酵母のエタノール耐性については、かつては清酒醪中の麴<sup>4,5)</sup>や麴菌体の成分<sup>6)</sup>が酵母のエタノール耐性増強に作用していると考えられていたが、現在は清酒醪中で、酵母の細胞膜の脂肪酸組成やエルゴステロール量などが変化する<sup>7,8)</sup>ことが大きな要因であると考えられている。さらに近年では、ストレスと遺伝子発現との関連からエタノール耐性が着目されつつあり、Izawaらは、特定のストレス条件下において、必須なmRNAを細胞質に優先的に輸送するこ

\*連絡先 E-mail: kadokura@nodai.ac.jp

とで、効率的な転写調節および正確な遺伝子発現調節が行われ、酵母のストレス耐性が増強される<sup>9,10</sup>ことを報告している。特に、清酒醸造環境では、P-bodyの形成<sup>11</sup>や選択的なmRNAの核外輸送の誘導がビールやワインの醗とは異なる<sup>12</sup>ことが報告されている。また、エタノール発酵中に優先的に翻訳されるmRNAのプロモーターは、複数のタンパク質合成を誘導することで、高濃度エタノールストレス下における翻訳抑制を改善する<sup>13,14</sup>ことも報告されている。

筆者らは、これまでに*Rhizopus*属、*Aspergillus*属などの糸状菌を通気攪拌培養して得られる培養液が酵母エタノール耐性に及ぼす影響を検討し、通常は酵母が増殖できないとされるエタノール濃度において、各種培養液の添加により酵母が増殖可能となることを報告した<sup>15</sup>。また、前報<sup>16</sup>において*Rhizopus*培養液（以下*Rh.*培養液）のエタノール耐性増強作用は、*Rhizopus*の培養環境や菌糸形態、増殖量に影響を受けるため、*Rhizopus*菌体に由来する可能性が考えられたが、耐性を増強する物質や酵母が受ける影響の詳細については明らかにしなかった。

本研究では、エタノールストレス下において*Rh.*培養液を添加することによる酵母の応答変化を調べることを目的とし、エタノールを含む培地に*Rh.*培養液を添加、増殖させた酵母の細胞壁成分および菌体脂肪酸組成を解析した。さらにFISH法によるmRNAの核外輸送の解析についても検討した。また、古くから清酒醸造における酵母のエタノール耐性は、麴の影響が考えられていたことや、*Aspergillus*属の培養液にもエタノール耐性増強作用が*Rhizopus*属同様に認められる<sup>15</sup>ことから、麴の抽出液についても同様の検討を行った。

## 実験方法

**Rh.培養液、Rh.菌体抽出液、麴抽出液の調製** *Rh.*培養液の調製には、前報<sup>16</sup>同様に、研究室保存の*Rhizopus javanicus* 055Mを用いた。Waksmanら<sup>17</sup>の合成培地（10% glucose, 0.5% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.05% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.05% CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.005% ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O and 0.005% Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>）で通気攪拌培養（5 L容ジャーフェーマンター、通気量1.0 L/min、攪拌数1000 rpm、培養温度30°C）した後、糸状菌細胞懸濁液をろ紙（ADVANTEC No. 2）を用いてろ過し、ろ液を*Rh.*培養液（Cul. liq.）とした。抽出液の調製には、坂口フラスコを用いて、Waksmanらの合成培地で30°C、72時間振とう培養（懸濁状態にて培養）、または14日間静置培養（液体表面にて培養）した各*Rh.*菌体を用いた。菌体を-80°C、15分間にて冷凍後、乳鉢でよくすり潰した菌体破砕物に20倍量の蒸留水を添加して1時間振

とう抽出、*Rh.*培養液同様にろ過したものを各*Rh.*菌体抽出液（混濁状態：Pulpy mycelium ex., Pellet mycelium ex., および液体表面：Aerial mycelium ex.）とした。また、清酒用種麴（*A. oryzae*）で常法通り<sup>18</sup>に調製した米麴に、10倍量の蒸留水を添加して1時間振とう抽出、ろ過したものを麴抽出液（Rice-Koji ex.）とした。

**エタノール耐性試験** 前報<sup>16</sup>同様に清酒酵母ATCC 32700を用いた。2回の前培養後、*Rh.*培養液あるいは各抽出液を終濃度10%、およびエタノールを終濃度11%としたWickerham合成培地<sup>19</sup>で、25°C、10日間培養した。また、*Rh.*培養液あるいは各抽出液の添加なしにて、エタノール終濃度11%としたWickerham合成培地で培養したものをControl ①とした。

**酵母細胞壁成分の分析** エタノール耐性試験で培養した酵母を遠心分離（700 ×g, 10 min）、50 mM EDTA（pH 7.0）で2回洗浄後、Tonouchiら<sup>20</sup>の方法に従って3倍量の10% 2-mercaptoethanol溶液を加え、室温で懸濁した。その後、ただちに遠心分離（13700 ×g, 4°C, 10 min）で上澄液を回収し、これに3倍量の冷エタノールを加えて4°Cで一晩静置した。静置した溶液を遠心分離して沈殿を回収し、減圧乾燥して細胞壁粗マンナンタンパク質とした。また、比較として、*Rh.*培養液あるいは麴抽出液を終濃度10%添加、およびエタノール添加なしのWickerham合成培地で、25°C、3日間培養したものをControl ②とした。それぞれから得られた細胞壁粗マンナンタンパク質については乾燥重量を測定し、粗マンナンタンパク質中の全糖量をフェノール硫酸法で、タンパク質量をプロテインアッセイ（BIO-RAD）によるブラッドフォード法により測定した。

**酵母菌体脂肪酸の分析** 細胞壁成分分析に供したものと同様の酵母を遠心分離（700 ×g, 10 min）により集菌し、殺菌水で2回洗浄後、菌体脂肪酸組成測定用の試料とした。菌体脂肪酸組成はMIDI法（MIDI社製菌体脂肪酸組成分析システム）により（株）テクノスルガ・ラボにて委託分析した。

**FISH法によるmRNAの核外輸送の検出** Ambergら<sup>21</sup>、Dasら<sup>22</sup>、Takemuraら<sup>23</sup>の方法に準拠して行った。FISH用プローブは、Poly(A)をターゲットとして5'-末端をCy3標識した43merのオリゴ（dT）プローブを用いた。

細胞壁成分分析に供したものと同様の酵母を遠心分離（700 ×g, 10 min）にて集菌し、殺菌水で洗浄後、エタノールストレスとしてエタノール終濃度11%を含むWickerham合成培地に懸濁して1時間処理した。ストレス

処理後、この懸濁液1 mLを遠心分離 (3300 ×g, 1 min) して酵母を集菌し、4%パラホルムアルデヒド/0.1 Mリン酸カリウム緩衝液 (pH 6.5) 1 mLに懸濁、室温で1時間、緩やかに回転させながら固定処理した。固定後、0.1 Mリン酸カリウム緩衝液 (pH 6.5) で2回、SCP緩衝液 [1.2 Mソルビトール/0.033 Mクエン酸/0.1 Mリン酸カリウム緩衝液 (pH 6.5)] で1回洗浄した。固定した菌体に1 mg/mL Zymolyase 20T/SCP緩衝液を100 µL加えて懸濁し、30°Cで1時間、細胞壁を消化した。消化後、菌体をSCP緩衝液で2回洗浄、SCP緩衝液1 mLに再懸濁し、懸濁液20 µLをゼラチンコートしたマルチウェルスライドに滴下、37°C、1時間静置することでスライド上に固着させた。このスライドガラスを70%、90%、100%エタノールに5分間ずつ順次浸漬して脱水し、室温で乾燥させた。スライドガラスの各ウェルにプレハイブリダイゼーション溶液 [50%ホルムアミド/10%デキストラン硫酸/1% BSA/10 mM VRC (Vanadyl Ribonucleoside Complex)/500 µg/mL サケ精子DNA/125 µg/mL酵母tRNA/2 × SSC (0.15 M塩化ナトリウム/0.03 Mクエン酸ナトリウム)] 60 µLを加えて37°C、1時間、モイストチャンバー内で静置した。プレハイブリダイゼーション溶液を除去し、ハイブリダイゼーション溶液 [0.4 µg/mLオリゴdTプローブ/プレハイブリダイゼーション溶液] 50 µLを加えて37°C、一晚、遮光したモイストチャンバー内でハイブリダイズした。ハイブリダイズ後、遮光状態でスライドガラスを10%ホルムアミド/2 × SSCで2回、0.1% Triton X-100/2 × SSCで1回、1 × SSCで2回、1 × PBSで1回ずつ順次浸漬して洗浄し、DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) 染色法 (0.05 µg/mL DAPI) により核染色を行った。

蛍光観察と画像撮影は、落射蛍光顕微鏡BH2-RFCAと顕微鏡デジタルカメラDP50システム (OLYMPUS) を用いた。mRNAの分布をG励起でCy3標識プローブにより蛍光検出し、U励起でDAPI染色された核を観察、撮影した。

### 実験結果及び考察

**Rh. 培養液, Rh. 菌体抽出液および麴抽出液のエタノール耐性増強作用** Rh. 培養液, Rh. 菌体抽出液および麴抽出液が酵母のエタノール耐性に及ぼす影響をFig. 1に示す。清酒酵母ATCC 32700は培養温度25°C、エタノール終濃度11%を含むWickerham合成培地 (Control ①) ではまったく増殖できないが、Rh. 培養液を10%添加した場合には、これまでの報告<sup>15)</sup>と同様に増殖が可能であった。また前報<sup>16)</sup>同様、懸濁状態と液体表面のいずれの状態のRh. 菌体から調製したRh. 菌体抽出液を

Added solutions	Growth of yeast (OD at 660 nm)	
	0.3	0.6
Control ①	none	0.01±0.00
<i>Rh. javanicus</i>		
Cul. liq.		0.45±0.06*
Pulpy mycelium ex.		0.46±0.04*
Pellet mycelium ex.		0.57±0.02*
Aerial mycelium ex.		0.50±0.03*
<i>A. oryzae</i>		
Rice-Koji ex.		0.41±0.04*

Fig. 1. Effects of addition of *Rhizopus* culture liquid, various *Rhizopus* extract solutions and rice-koji extract on ethanol tolerance of sake yeast. *Rhizopus* culture liquid was obtained from culture growth on Waksman's medium containing 10% glucose, 0.5% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.1%KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.05% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.05% CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.005% ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O and 0.005% Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> in a 5 L jar fermentor. The cultivation of *Rhizopus* was carried out at 30°C under aeration at 1 L/min and agitation at 1000 rpm. *Rhizopus* mycelia were obtained from culturing on Waksman's medium. Cultivation of *Rhizopus* was carried out at 30°C in a Sakaguchi flask by shaking for 72 h or standing for 14 days. Mycelia were broken with a mortar after freezing, and were extracted with a 20-fold volume of distilled water. Rice-koji extract was prepared by adding a 10-fold volume of distilled water. The yeast strain used was the sake yeast, ATCC 32700. Cultivation of sake yeast was carried out at 25°C for 10 days under the following conditions: final concentration of each solution and ethanol at 0% and 11%, respectively (Control ①); and final concentration of each solution and ethanol at 10% and 11%, respectively, based on Wickerham's synthetic medium. Data are expressed as means ±SE of 3 independent experiments. Asterisks indicate statistical significance (p < 0.05) and P-values are for comparisons to cells cultured in 11% ethanol (Control ①). Cul. liq.; *Rhizopus* culture liquid.

添加した場合においても、同様のエタノール耐性増強作用が認められた。前報<sup>16)</sup>において、ペレット状に*Rhizopus*が生育したRh. 培養液には増強作用がないことを報告したが、今回、そのペレット状菌体の抽出液には増強作用が認められたことから、Rh. 培養液の酵母エタノール耐性増強作用はRh. 菌体成分に由来していることが示唆された。また、*A. oryzae*で調製した麴抽出液の添加においても、Rh. 培養液およびRh. 菌体抽出液の添加と同様に、エタノール存在下で清酒酵母の増殖が可能であった。以前の報告<sup>15)</sup>で、白米を基質とした*A. oryzae*培養液においてもRh. 培養液と同様の効果が認められており、今回、麴抽出液に作用が認められたことから、*Aspergillus*菌体成分がエタノール耐性増強に関与している可能性が示された。Maruyamaらの麴菌のWoronin bodyの研究<sup>24)</sup>において、低張液中で固体培養麴菌が溶菌する現象が報告されており、今回の検討で行っている蒸留水による抽出においても、麴中の麴菌が溶菌しているものと考えている。

**エタノール耐性酵母の細胞壁成分** 酵母のエタノール耐性の増強に寄与していると考えられるRh. 培養液あ

Table 1. Influence of addition of *Rhizopus* culture liquid and rice-*koji* extract on cell wall components of sake yeast grown under ethanol stress.

Solutions (%)	Amount added		After culturing yeast		
	Ethanol (%)		Crude manno-protein (mg/cell g)	Total saccharide ( $\mu$ g/Crude manno-protein mg)	Protein
Control ②	0	0.0	4.6 $\pm$ 0.3	375.0 $\pm$ 10.5	1.9 $\pm$ 0.1
<i>Rh.</i> Cul. liq.	10	0.0	4.2 $\pm$ 0.2	417.5 $\pm$ 6.5*	4.0 $\pm$ 0.3*
	10	11.0	2.7 $\pm$ 0.3*	485.5 $\pm$ 7.3*	6.3 $\pm$ 0.6*
<i>Rice-koji</i> ex.	10	0.0	5.8 $\pm$ 0.1*	495.9 $\pm$ 1.2*	6.2 $\pm$ 0.3*
	10	11.0	5.0 $\pm$ 0.1	458.8 $\pm$ 0.8*	7.9 $\pm$ 0.1*

Cultivation of sake yeast was carried out at 25°C for 3 or 10 days under the following conditions; no addition of each solution and ethanol at 0% and 0% respectively (Control ②); final concentration of each solution and ethanol at 10% and 0% respectively; and final concentration of each solution and ethanol at 10% and 11% respectively, based on Wickerham's synthetic medium. Cell wall components are shown as dry weight of crude mannan protein in sake yeast grown under ethanol stress, and the total sugar content, as well as crude mannan protein content contained therein. Data are expressed as means  $\pm$  SE of 3 independent experiments. Asterisks indicate statistical significance ( $p < 0.05$ ) and P-values are based on comparisons with cells cultured without additives (Control ②). *Rh.* cul. liq.; *Rhizopus* culture liquid.

Table 2. Influence of addition of *Rhizopus* culture liquid and rice-*koji* extract on cellular fatty acid composition of sake yeast grown under ethanol stress.

Solutions (%)	Amount added		After culturing yeast						
	Ethanol (%)		Fatty acid (%)						
			C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C18:0	C16:1	C18:1
Control ②	0	0.0	6.8 $\pm$ 0.5	6.0 $\pm$ 0.9	2.5 $\pm$ 0.3	25.2 $\pm$ 2.0	5.9 $\pm$ 1.0	35.2 $\pm$ 1.9	12.7 $\pm$ 2.3
<i>Rh.</i> Cul. liq.	10	0.0	10.1 $\pm$ 0.4*	7.0 $\pm$ 0.7	2.6 $\pm$ 0.1	24.8 $\pm$ 2.1	4.7 $\pm$ 0.9	34.9 $\pm$ 0.9	10.5 $\pm$ 0.3
	10	11.0	1.3 $\pm$ 0.2*	2.3 $\pm$ 0.5*	–	12.4 $\pm$ 1.9*	13.2 $\pm$ 1.7*	38.6 $\pm$ 3.0	27.0 $\pm$ 3.1*
<i>Rice-koji</i> ex.	10	0.0	8.7 $\pm$ 0.7	5.9 $\pm$ 0.6	2.5 $\pm$ 0.3	28.9 $\pm$ 1.3	7.7 $\pm$ 0.7	32.3 $\pm$ 2.5	12.7 $\pm$ 1.3
	10	11.0	1.9 $\pm$ 0.1*	2.7 $\pm$ 0.2*	–	15.8 $\pm$ 0.5*	17.5 $\pm$ 1.3*	33.1 $\pm$ 3.3	24.0 $\pm$ 2.4*

Culture conditions of sake yeast were identical to those in Table 1. Cellular fatty acid refers to the proportion of unsaturated fatty acid and saturated fatty acid in sake yeast grown under ethanol stress. Data are expressed as means  $\pm$  SE of 3 independent experiments. Asterisks indicate statistical significance ( $p < 0.05$ ) and P-values are comparisons with cells cultured without additives (Control ②). *Rh.* cul. liq.; *Rhizopus* culture liquid.

るいは麴抽出液の酵母に与える影響について知見を深めるため、細胞壁構成成分の変化に着目した。*Rh.* 培養液および麴抽出液を添加し、エタノール存在下で生育した酵母の細胞壁粗マンナンタンパク質の成分を Table 1 に示す。*Rh.* 培養液・エタノール添加なしで培養した場合 (Control ②) と比較して、*Rh.* 培養液のみ添加あり、または *Rh.* 培養液・エタノール添加ありで培養した場合は、酵母の細胞壁粗マンナンタンパク質量が減少傾向である一方、その粗マンナンタンパク質中のタンパク質含量は糖含量の増加に比べて顕著に増加した。さらに、麴抽出液の添加では、粗マンナンタンパク質量が増加しており、その粗マンナンタンパク質中の糖含量の増加に比べて、

タンパク質含量の割合の増加が顕著であった。細胞壁の構造変化によるストレス耐性の増強作用<sup>25)</sup>が報告されており、*Rh.* 培養液および麴抽出液を添加することによってエタノールストレスに耐性を示す現象と、酵母の細胞壁粗マンナンタンパク質中のタンパク質含量が顕著に増加し、細胞壁構造が変化していることの間には何らかの関係性があることが示唆された。

**エタノール耐性酵母の菌体脂肪酸組成** 次に、*Rh.* 培養液および麴抽出液を添加し、エタノール存在下で生育した酵母の菌体脂肪酸組成を Table 2 に示した。前述の酵母細胞壁成分への影響とは異なり、*Rh.* 培養液のみ添加ありで培養した酵母では、Control ②と比較して細胞

膜を構成する脂肪酸組成に大きな変化はなかった。酵母のエタノール耐性機構に関しては、細胞膜の脂肪酸組成の変化が膜の安定性維持に寄与しており、特にオレイン酸 (C18:1) を多く脂質膜に取り込むことで、膜流動性が緩和され、エタノール耐性が增强されるとの報告<sup>26-30)</sup>が多くある。また、エタノール存在下で増殖した酵母では、パルミトレイン酸 (C16:1) が減少する<sup>31,32)</sup>が、低温ストレス<sup>33)</sup>や酸素ストレス<sup>34)</sup>下で生育した酵母では増加するという報告がある。本報告において、*Rh.*培養液・エタノール添加ありで培養した場合に、飽和脂肪酸の多くが顕著に減少する一方で、飽和脂肪酸であるステアリン酸 (C18:0、オレイン酸の前駆体) および不飽和脂肪酸であるオレイン酸がControl ②に比較して約2.2倍に増加した。不飽和脂肪酸であるパルミトレイン酸には変化がなかった。麴抽出液の添加においても同様の傾向であった。*Rh.*培養液または麴抽出液が存在すると、エタノール添加条件下において増殖が可能となつて、酵母の不飽和脂肪酸含量が増加し、膜流動の安定性が增强されることでストレス適応していることが示唆された。

**エタノール耐性酵母のmRNAの局在性** 高濃度のエタノールストレスでmRNAの核外輸送が遮断される報告<sup>35,36)</sup>があることから、*Rh.*培養液あるいは麴抽出液の添加が酵母内のmRNAの核外輸送に与える影響を観察することを試みた。*Rh.*培養液および麴抽出液を添加し、エタノール存在下および非存在下で生育した酵母(いずれも良好な増殖能が維持されていることが確認されている)に、新たに1時間のエタノールストレス処理を行った際のmRNAの局在性をFig. 2に示す。*Rh.*培養液・エタノール添加なしの環境で準備された酵母 (Control ②) では、1時間のエタノールストレス処理後において、核染色された領域にmRNAが共局在していることが観察された。*Rh.*培養液のみ添加あり、または*Rh.*培養液・エタノール添加ありの環境で準備された細胞は、Control ②に比して、核染色された領域へのmRNAの局在は顕著に低下していた。麴抽出液の添加においても、Control ②に比して、mRNAが核内へ蓄積していない様子が観察された。特定のストレス存在下における選択的なmRNAの核外輸送は、酵母のストレス耐性を增强する<sup>9,10)</sup>ことが報告されている。本報告においても、*Rh.*培養液および麴抽出液の添加によって、エタノール耐性が增强される現象と、mRNAの核内蓄積解消が示唆されたことには、相関が認められた。また、清酒醸造において酵母のmRNAが核内蓄積しない<sup>37)</sup>現象が報告されており、共存する麴の作用の可能性が示唆された。

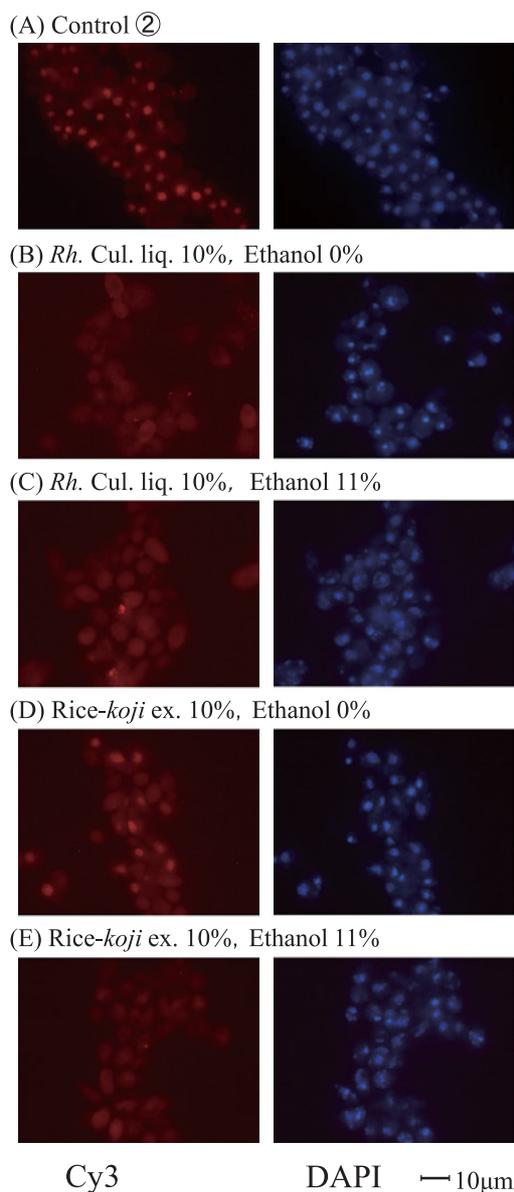


Fig. 2. Effects of addition of *Rhizopus* culture liquid and rice-*koji* extract on the nuclear export of mRNA in sake yeast grown under ethanol stress. The culture conditions of sake yeast were identical to those in Table 1. Ethanol stress treatment was carried out by suspending the yeast cells obtained from each culture condition in Wickerham synthetic medium containing 11% ethanol for 1 hour. The probe for FISH was a 43-mer oligo (dT) in which Poly (A) is targeted and 5'-end is Cy3-labeled. Fluorescence detection of Cy3-labeled probe by G excitation was taken as the distribution of mRNA, and DAPI staining by U excitation was taken as the nuclear position. Visualized Cy3 fluorescence is shown in the left figure. DAPI fluorescence is shown in the right figure. Yeast cells were cultured under the following conditions: (A) no addition of each solution and ethanol at 0% and 0% respectively (Control ②); (B) final concentration of *Rhizopus* culture liquid and ethanol at 10% and 0%, respectively; (C) final concentration of *Rhizopus* culture liquid and ethanol at 10% and 11%, respectively; (D) final concentration of rice-*koji* extract and ethanol at 10% and 0%, respectively; and (E) final concentration of rice-*koji* extract and ethanol at 10% and 11%, respectively. *Rh.* cul. liq.; *Rhizopus* culture liquid.

## 要 約

酵母が高いエタノールストレス耐性を発揮する際に、*Rh.* 培養液および *Rh.* 菌体抽出物が混在することの影響について調べた。 *Rh.* 菌体由来の成分がストレス耐性の増強に寄与していることが示唆された。 *Rh.* 培養液を添加することでエタノール存在下でも増殖可能となった酵母における細胞壁成分、菌体脂肪酸組成の変化、mRNAの核外輸送能力の変化を検証した。 *Rh.* 培養液を添加し、エタノールストレス下で増殖した酵母細胞の細胞壁成分は、細胞壁粗マンナンタンパク質中のタンパク質含量が顕著に増加した。菌体脂肪酸組成では、ステアリン酸およびオレイン酸含量の顕著な増加と、パルミトレイン酸含量の維持がなされ、膜流動性の安定化が示唆された。通常のエタノールストレス下では核内に蓄積する(核外輸送が遮断される) mRNAが、*Rh.* 培養液を添加した場合には核内蓄積されることが明らかとなった。さらに、清酒醸造における酵母のエタノール耐性において、麴の混在の影響が推定されたことから、麴抽出液についても同様の検討を行い、類似の現象が観察された。

## 文 献

- 1) Swan, T. M. and Watson, K.: *Can. J. Microbiol.*, **45**, 472–479 (1999).
- 2) Zu, T., Verna, J., and Ballester, R.: *Mol. Genet. Genomics*, **266**, 142–155 (2001).
- 3) Piper, P. W., Talreja, K., Panaretou, B., Moradas-Ferreira, P., Byrne, K., Praekelt, U. M., Meacock, P., Recnacq, M., and Boucherie, H.: *Microbiology*, **140**, 3031–3038 (1994).
- 4) 山崎何恵：醗酵協会誌, **16**, 335–341 (1958).
- 5) 中西 透, 灘井幸明, 照井堯造：醗酵工学 (大阪醸造学会第12回講演要旨), **38**, 564 (1960).
- 6) 福井三郎, 谷 喜雄, 岸部忠信：醗酵工学, **33**, 59–64 (1955).
- 7) 溝口晴彦, 原 昌道：生物工学, **72**, 167–173 (1994).
- 8) Mizoguchi, H., Ikeda, T., and Hara, S.: *J. Ferment. Bioeng.*, **80**, 586–591 (1995).
- 9) Izawa, S.: *Stress Biology of Yeasts and Fungi*, 43–57, Springer (2015).
- 10) Kato, S. and Izawa, S.: *Applied RNA Bioscience*, pp. 1–15, Springer (2018).
- 11) Izawa, S., Takemura, R., Ikeda, K., Fukuda, K., Wakai, Y., and Inoue, Y.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **69**, 86–91 (2005).
- 12) Izawa, S., Kita, T., Ikeda, K., Miki, T., and Inoue, Y.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 2800–2807 (2007).
- 13) Yamauchi, Y. and Izawa, S.: *Front. Microbiol.*, **7**, e1319 (2016).
- 14) Kato, S., Yamauchi, Y., and Izawa, S.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **102**, 9669–9677 (2018).
- 15) 門倉利守, 中里厚実, 竹田正久, 竹生新治郎, 谷村和八郎：生物工学, **74**, 167–170 (1996).
- 16) 門倉利守, 畠井 悟, 本多宏明, 中里厚実, 金子太吉, 竹田正久：生物工学, **85**, 115–119 (2007).
- 17) 友田亘孝ら編：微生物工学講座 第5, p. 89, 共立出版 (1956).
- 18) 石川雄章ら編：増補改訂 清酒製造技術, p. 155, 日本醸造協会 (2009).
- 19) 中里厚実, 村清司編：食品科学のための基礎微生物学実験, p. 99, 建帛社 (2010).
- 20) Tonouchi, A., Fujita, A., and Kuhara, S.: *J. Biochem.*, **115**, 683–688 (1994).
- 21) Amberg, D. C., Goldstein, A. L., and Cole, C. N.: *Genes Dev.*, **6**, 1173–1189 (1992).
- 22) Das, B., Butler, J. S., and Sherman, F.: *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 5502–5515 (2003).
- 23) Takemura, R., Inoue, Y., and Izawa, S.: *J. Cell Sci.*, **117**, 189–197 (2004).
- 24) Maruyama, J., Juvvadi, P. R., Ishi, K., and Kitamoto, K.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **331**, 1081–1088 (2005).
- 25) Li, X. E., Wang, J. J., and Phornsanthia, S.: *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **72**, 88–94 (2014).
- 26) Dong, S. J., Yi, C. F., and Li, H.: *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **69**, 196–203 (2015).
- 27) Wang, Y., Zhang, S., Liu, H., Zhang, L., Yi, C., and Li, H.: *J. Basic Microbiol.*, **55**, 1417–1426 (2015).
- 28) Dinh, T. N., Nagahisa, K., Hirasawa, T., Furusawa, C., Shimizu, H.: *PLoS ONE*, **3**, e2623 (2008).
- 29) Aguilera, F., Peinado, R. A., Millán, C., Ortega, J. M., and Mauricio, J. C.: *Int. J. Food Microbiol.*, **110**, 34–42 (2006).
- 30) You, K. M., Rosenfield, C. L., and Knipple, D. C.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 1499–1503 (2003).
- 31) 吉沢 淑, 大島秀隆, 角田潔和, 小泉武夫：日本醸造協会誌, **91**, 284–289 (1996).
- 32) 溝口晴彦：醸造協会誌, **92**, 86–94 (1997).
- 33) Ahvenainen, J.: *J. Inst. Brew.*, **88**, 367–370 (1982).
- 34) Patel, P. C. and Lewis, M. J.: *J. Amer. Soc. Brew. Chem.*, **40**, 26–30 (1982).
- 35) Izawa, S., Kita, T., Ikeda, K., and Inoue, Y.: *Biochem. J.*, **411**, 111–119 (2008).
- 36) Izawa, S.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 7–12 (2010).
- 37) Izawa, S., Takemura, R., Miki, T., and Inoue, Y.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 2179–2182 (2005).