

酵母は何を感知して アルコール発酵を調節しているのか？

渡辺 大輔^{1,2*}・高木 博史²

酵母とは、文字どおり、発「酵」の「母」体となる微生物であり、中でもアルコール発酵は、パンや酒類の製造など、人類の生活と密接な関わりをもつ。そこで長年にわたって発酵力の高い酵母の選抜・育種が求められてきた。一方、エネルギー獲得のためにアルコール発酵を行う酵母自身にとっては、必要な時に必要な分のみ発酵力を発揮することが望ましい。このように、アルコール発酵とは人類と酵母のいずれにとっても重要な機能であり、発酵力の調節をめぐる、人類と酵母がせめぎ合ってきたのではないかと考えられる。高い発酵力を誇る清酒酵母の研究は、酵母が元来どんな発酵力調節メカニズムを有しているのか、また人類による選抜・育種がそのメカニズムに対してどんな影響を及ぼしたのかを明らかにするうえで貢献してきた。本稿では、筆者らの最新の研究成果を中心に紹介する。

清酒酵母の高発酵力を生み出す原因

清酒酵母とは、まさにアルコール発酵を行うために生まれてきたような酵母である。清酒もろみでは、麹菌に由来する酵素が米のデンプンを分解し、グルコースが生成される。清酒酵母は、グルコースをエタノールと二酸化炭素に変換し、最終的にアルコール度数15~20%程度にまで到達させる。高濃度のエタノールは酵母自身にとっても毒性を有するため、清酒もろみ末期では清酒酵母が死に絶える場合もある。自らを死滅に追い込むほどの高発酵力は一体どうやって生み出されたのだろうか。

清酒醸造の歴史の中で、突然変異などの理由により発酵力が低い酵母が生じると、使い物にならないとして捨てられてきた。このような人類の営みこそが、清酒酵母の進化における最強の選択圧だったのではないだろう

か。エタノールを生産し過ぎても死んでしまうが、発酵力を低下させると清酒酵母として存続することはできない。このような死滅や淘汰のリスクにさらされた世界の中で発酵力を最適化したのが現在の清酒酵母であると考えられる。酵母は、自らの生存を守るために、過剰なアルコール発酵を抑制するためのメカニズムを備えているが、清酒酵母は、あえてそのメカニズムを封印することで、人類社会に適応したのだらうと推察される。このような適応過程を経ていない実験室酵母S288Cと清酒酵母きょうかい7号(K7)のゲノムおよびトランスクリプトームを比較した結果、K7株では、Greatwallファミリープロテインキナーゼをコードする*RIM15*遺伝子上のフレームシフト変異(5054_5055insA; 図1)¹⁾により、遺伝子産物(Rim15p)のカルボキシル末端を欠失しており、アルコール発酵中の遺伝子発現に異常が見られることが明らかになった。これは、K7株と遺伝的に近縁な清酒酵母においてのみ共通に認められるホモザイガスな機能欠失変異であった。その意義を調べるために実験室酵母において*RIM15*遺伝子を欠損させると発酵力が顕著に上昇したことから、Rim15pは過剰なアルコール発酵を抑制するためのメカニズムに関与しており、その機能欠損が清酒酵母の高発酵力を生み出した原因の一つであると考えられるようになった¹⁻³⁾。

Rim15pは何を感知しているのか

Rim15pは細胞内シグナル伝達に関与するプロテインキナーゼであり、これ自身が細胞外の何かを感知するわけではないし、発酵力を直接変化させることもできない。Rim15pは一体何のシグナルを受け渡しているのだろうか。Rim15pの上流因子の一つとして、栄養シグナリングのマスターレギュレーターであるプロテインキナーゼ複合体TORC1(target-of-rapamycin protein kinase complex 1)が知られている(図2)。TORC1はSch9pと呼ばれる別のプロテインキナーゼをリン酸化して活性化し、Sch9pはRim15pのSer1061をリン酸化することで不活性化する⁴⁾。つまり、Rim15pとは、TORC1によって抑制され、TORC1の活性が低下した時にのみ機能を発揮する因子なのである。



図1. 清酒酵母*RIM15*遺伝子上の機能欠失変異

*著者紹介 ¹京都大学大学院農学研究科食品生物科学専攻(准教授) E-mail: watanabe.daisuke.2w@kyoto-u.ac.jp

²奈良先端科学技術大学院大学先端科学技術研究科

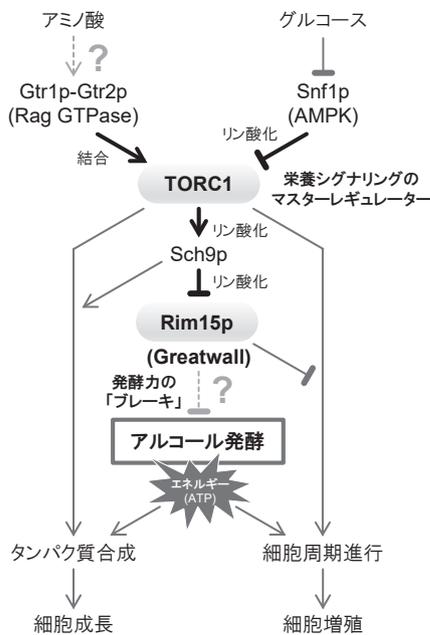


図2. Rim15pの上流経路とアルコール発酵

このTORC1は、酵母からヒトに至るまで広く保存されたプロテインキナーゼ複合体であり、細胞外の栄養状態が良好な時にタンパク質合成や細胞周期進行を促進して、細胞の成長や増殖を促す。一方、栄養状態の悪化やストレスによって不活性化されると、細胞の成長や増殖の抑制につながるだけでなく、オートファジーを誘導して飢餓に備える。したがって、TORC1とは、細胞が栄養源を感じながら生命活動を行うための基盤中の基盤であると言える⁵⁾。では、TORC1は酵母の発酵力の調節にも関与しているのだろうか。そのことを調べるために、筆者らがTORC1の阻害剤や変異による影響を調べたところ、TORC1の活性がアルコール発酵の初速度に直結していることが判明した⁶⁾。つまり、TORC1を活性化させるとアルコール発酵の勢いは強まり、不活性化させると弱まった。アルコール発酵は、酵母が成長や増殖に必要なエネルギーを獲得するための手段であり、TORC1が栄養状態に応答しながら細胞成長・増殖と発酵力の両方を調節することは合理的であると考えられる(図2)。さらに興味深いことに、Rim15pの機能を欠損して高発酵力を獲得した酵母では、TORC1活性を改変しても発酵力への影響が見られなくなった⁶⁾。したがってRim15pとは、「栄養状態の悪化によってTORC1の活性が低下した」というシグナルを受け取って機能する、アルコール発酵の「ブレーキ」であることがわかる。酵母にとっての栄養源が不足すると発酵力が下がることは古くからよく知られているが、その現象の根幹を担ってい

るのがこのTORC1-Greatwall経路なのである。Rim15pの機能が失われている清酒酵母では、本来アルコール発酵を抑制すべき環境においてもブレーキが効かず、発酵力を低下できないものと考えられる。

さらに、上流においてTORC1が栄養源を感知するためのメカニズムについても解析が進められている。現時点で酵母*Saccharomyces cerevisiae*において、もっとも研究が進んでいるのは細胞内アミノ酸がTORC1を活性化するメカニズムであり^{7,8)}、Ragファミリー低分子量GTPaseのヘテロ二量体であるGtr1p-Gtr2pがアミノ酸に応答してTORC1を活性化させることが報告されている。また、このシグナル伝達を仲介する因子としてSEAC (Seh1p-associated complex) が同定されている。一方、グルコース枯渇によってTORC1が不活性化される際には、細胞内エネルギーセンサーとして知られるAMPK (AMP-activated protein kinase) であるSnf1pによって、TORC1のコンポーネントであるKog1pのSer491/494がリン酸化されることが重要である⁹⁾。筆者らは以前に、清酒酵母K7株や近縁株が、Snf1pの下流で働く転写因子Adr1pおよびCat8pの機能に欠損を示すことを明らかにしている¹⁰⁾。もし清酒酵母のSnf1pに何らかの異常があるとすれば、グルコース枯渇に応答したTORC1の不活性化が起こりにくく、高発酵力の一因となり得るかもしれない。今後、TORC1-Greatwall経路に加え、アルコール発酵におけるSnf1pの役割を調べることで、栄養状態に応答した発酵力調節メカニズムの全体像に関する理解がさらに深まると期待される。

Rim15pは何をリン酸化しているのか

Rim15pは、真核生物に広く保存されたGreatwallファミリーに属するプロテインキナーゼであるが、リン酸化の標的タンパク質については不明であった。*S. cerevisiae*において、Rim15pの下流で転写因子Msn2/4p(相同性を有し機能が重複しているMsn2pとMsn4p)が活性化されることは報告されているが、Rim15pが細胞内でMsn2/4pをリン酸化している証拠は得られていなかった。実は、このMsn2/4pは、特定の炭素代謝関連遺伝子(UDP-グルコースピロフォスホリラーゼをコードする*UGPI*など)の転写誘導を介してグルコース代謝のリモデリングを行い、アルコール発酵を抑制する作用を有している(図3)^{11,12)}。したがって、Rim15pとMsn2/4pをつなぐシグナル伝達経路を明らかにすれば、Rim15pが発酵力の「ブレーキ」として働くためのメカニズムを解明することができるはずである。

Rim15pによって直接的にリン酸化される標的タンパ

ク質を探索するために行われたプロテオーム解析の結果、ENSA (α -endosulfine) ファミリーに属する Igo1/2p が同定された¹³⁾。Igo1/2p の機能欠損も、Rim15p の機能欠損と同様に発酵力を上昇させることから、Rim15p を介したアルコール発酵力調節メカニズムに関与することが示された^{1,6)}。さらに、リン酸化型 Igo1p は、プロテインフォスファターゼ複合体 PP2A^{B55 δ} (protein phosphatase 2A with the B55 δ regulatory subunit) と特異的に結合し、その活性を阻害することが見いだされた¹⁴⁾。この Greatwall-PP2A^{B55 δ} 経路は、酵母からヒトに至るまで高度に保存されたシグナル伝達経路であることが後に証明された。そして、これらの知見と矛盾することなく、PP2A^{B55 δ} の機能欠損 (PP2A^{B55 δ} に特異的な制御サブユニットをコードする *CDC55* 遺伝子の破壊) は、発酵力を顕著に低下させた⁶⁾。PP2A^{B55 δ} の機能を失った酵母では、Rim15p の機能欠損を組み合わせても発酵力を回復できないことから、PP2A^{B55 δ} は発酵力調節メカニズムの最下流に位置する「エンジン」として重要な役割を果たす、というモデルが提示された (図3)。

それでは、PP2A^{B55 δ} のプロテインフォスファターゼ活性が、どのようにアルコール発酵の調節に関与しているのだろうか。近年、PP2A^{B55 δ} が浸透圧ストレス存在下において転写因子 Msn2p を直接的に脱リン酸化し、その局在変化に関与することが報告された¹⁵⁾。もし、アルコール発酵の最中にも PP2A^{B55 δ} が Msn2/4p の調節に関与しているとすれば¹⁶⁾、Rim15p が Msn2/4p を介してアルコール発酵を抑制する経路の全体像を理解することが可能となる。一方、筆者らは、実験室酵母における *CDC55* 遺伝子破壊株のメタボローム解析を実施し、解糖系の律速段階の反応を触媒する PFK (phosphofructokinase)

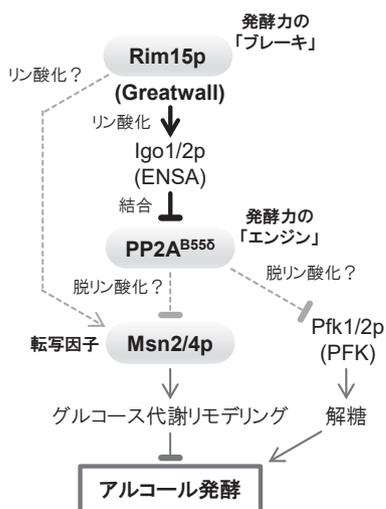


図3. Rim15p の下流経路とアルコール発酵

の活性調節に PP2A^{B55 δ} が関与する可能性を示した⁶⁾。PP2A^{B55 δ} が PFK の脱リン酸化に関与することを示唆する知見も得られている¹⁷⁾。以上の点を考え合わせると、PP2A^{B55 δ} が、転写因子や解糖系酵素などのアルコール発酵に関与する多様なタンパク質を的確に識別し、脱リン酸化することが、発酵力の「エンジン」として機能するうえで必須なのかもしれない。今後は、アルコール発酵における PP2A^{B55 δ} の基質を同定し、その脱リン酸化の意義を正確に理解していくことが重要な課題である。

発酵力の調節をめぐる人類と酵母の攻防

発酵力調節メカニズムにおける PP2A^{B55 δ} の重要性を考慮すると、高い発酵力を有する清酒酵母の PP2A^{B55 δ} には何か秘密が隠されているかもしれない。清酒酵母 K7 株や近縁株を用いて、PP2A^{B55 δ} に特異的な制御サブユニットをコードする *CDC55* 遺伝子の配列を調べたところ、意外な結果が明らかになった⁶⁾。まず K7 株では、2 コピー存在する *CDC55* のうち、片方のアレルにのみ、ヘテロサイガスなナンセンス変異 (G1375T) が存在しており、遺伝子産物のカルボキシル末端が失われていると考えられた。これはおそらく劣性変異であり、二倍体である K7 株においてその効果が顕在化することはない。次に、K7 株に由来する泡なし酵母として知られる K701 株について調べてみると、G1375T 変異は存在せず、別のヘテロサイガスなフレームシフト変異 (1092delA) が見いだされた。同様に、他の清酒酵母についても *CDC55* 遺伝子の解析を行った結果、過半数の株において固有のナンセンス変異またはフレームシフト変異が存在していた (図4)⁶⁾。これらの多様な機能欠失変異は、各清酒酵母が確立された後に独立に生じたと推測され、清酒酵母間に広く保存された *RIM15* 遺伝子上の機能欠失変異 (5054_5055insA; 図1) と対照的である。

清酒酵母の *CDC55* 遺伝子にこれほど多様な変異が生じたのはなぜだろうか (図5)。あくまで筆者らの推測に

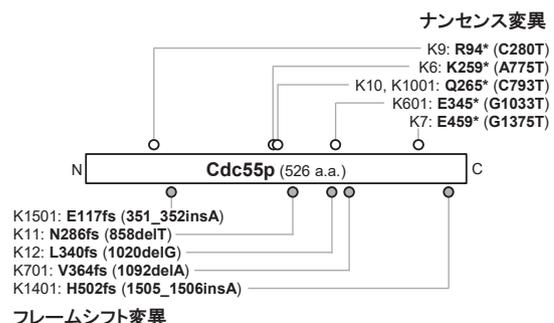


図4. 清酒酵母 *CDC55* 遺伝子上の機能欠失変異

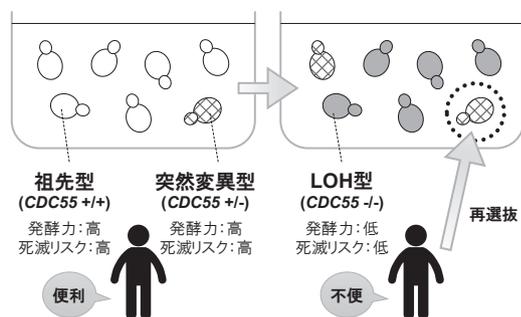


図5. CDC55 遺伝子上にヘテロサイガスな機能欠失変異をもつ清酒酵母が多く存在する理由に関する考察

過ぎないが、清酒酵母祖先株における Rim15p の機能欠損の結果、人類にとっては発酵力が高い便利な株が誕生した一方で、酵母自身にとっては過剰なアルコール発酵が行われるようになり、死滅のリスクが上昇したのかもしれない。この状態を回避するためには、過剰に活性化された PP2A^{B55δ} の機能を弱めるしかない。そこで、確立された各清酒酵母において独立に、突然変異と LOH (loss of heterozygosity)¹⁸ が起こることにより、Cdc55p の機能を完全に欠損した細胞が出現し始めたのではないかと推察される。ところが、このような細胞の割合が増えてくると発酵力は低下してしまう。発酵力の低下に気づいた人類が、各株において良好な発酵力を示す細胞を選抜し直した結果、Cdc55p の機能を完全に欠損した細胞は淘汰され、CDC55 遺伝子上にヘテロサイガスな機能欠失変異を痕跡のように残している細胞だけが存続したのかもしれない。つまり、ひたすらに高発酵力を望む人類と、自らの生存のために発酵力の低下を目指す酵母との攻防の結果が、現存する清酒酵母のゲノムに刻みこまれているのではないかと、というのが筆者らの仮説である。アルコール発酵の調節において重要な役割を果たす Greatwall-ENSA-PP2A^{B55δ} 経路の発見に基づいて、人類と清酒酵母との長く深い関わり合いを示唆する興味深い知見を得ることができた。

おわりに

本稿のタイトルは「酵母は何を感知してアルコール発酵を調節しているのか?」であるが、結論としては、その答えにまだ完全にはたどり着けていない。だが、少なくとも、酵母は環境中の栄養源をモニターすることで、アルコール発酵によってエネルギーを得て成長・増殖し続けるべきか、あるいはアルコール発酵を抑制すべきかを判断していると考えられる。この点自体は特に目新しいコンセプトではないかもしれないが、関与する分子メ

カニズムとして、真核生物において保存された TORC1-Greatwall-PP2A^{B55δ} というシグナル伝達経路の関与を見いだしたことは、一つの到達点と言えるのではないだろうか。さらに、この経路における機能欠失変異をさまざまな清酒酵母で調べ尽くすことにより、酵母の発酵力が人類との関わり合いの中でどのような影響を受けてきたのかに関する考察を深めることもできた。以上の点を考え合わせると、酵母は、生態系の一員として環境や人類と絶えず相互作用しており、アルコール発酵を調節することにより環境や人類社会にうまく適応しているのだろう。このような酵母の生きざまに関する理解を深めるための努力を継続していくことで、人類は今まで以上に酵母の潜在能力を発揮し活用することが可能になるのではないかと期待される。

謝 辞

本研究においてご指導を賜りました、独立行政法人酒類総合研究所下飯仁先生(現・日本醸造協会)、赤尾健先生、東京大学前田達哉先生(現・浜松医科大学)、京都工芸繊維大学井沢真吾先生、京都大学橋本渉先生をはじめとする多くの共同研究者の皆様方に、この場を借りまして心より御礼申し上げます。また本研究は、JSPS 科研費 JP16K18676 などの助成を受けて実施されたものです。

文 献

- 1) Watanabe, D. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **78**, 4008 (2012).
- 2) 渡辺大輔: *生物工学*, **91**, 2 (2013).
- 3) Watanabe, D. and Takagi, H.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **81**, 1061 (2017).
- 4) Swinnen, E. *et al.*: *FEMS Yeast Res.*, **14**, 17 (2014).
- 5) Schmelzle, T. and Hall, M. N.: *Cell*, **103**, 253 (2000).
- 6) Watanabe, D. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **85**, e02083-18 (2019).
- 7) 野村 亘, 井上善晴: *化学と生物*, **54**, 273 (2016).
- 8) 鎌田芳彰: *化学と生物*, **54**, 827 (2016).
- 9) Hughes Hallett, J. E. *et al.*: *Elife*, **4**, e09181 (2015).
- 10) Watanabe, D. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **77**, 2255 (2013).
- 11) Watanabe, D. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**, 934 (2011).
- 12) Watanabe, D. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **82**, 340 (2016).
- 13) Talarek, N. *et al.*: *Mol. Cell*, **38**, 345 (2010).
- 14) Bontron, S. *et al.*: *Cell Rep.*, **3**, 16 (2013).
- 15) Reiter, W. *et al.*: *Mol. Cell. Biol.*, **33**, 1057 (2013).
- 16) 川島幹也ら: *日本農芸化学会関西支部第511回講演会講演要旨集*, p. 8 (2019).
- 17) Baro, B. *et al.*: *Gigascience*, **7**, giy047 (2018).
- 18) 赤尾 健: *化学と生物*, **52**, 223 (2014).