

令和元年6月17日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K00826

研究課題名(和文) 蜂蜜から分離した酵母の高糖度耐性メカニズムの解明

研究課題名(英文) Study on osmotolerance of microorganisms isolated from honey

研究代表者

田村 倫子 (TAMURA, Tomoko)

東京農業大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：60451845

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：Zygosaccharomyces mellis は蜂蜜やメープルシロップなどの食品に生育可能でその品質を低下させることが知られている。カナダ産蜂蜜から単離したZ. mellis は、S. cerevisiae が生育できない60%グルコース含有培地で生育した。この時、糖新生に関連する遺伝子発現は低下した。一方、細胞壁合成に関連する遺伝子発現は増加した。

Z. mellis、塩耐性能の高いZ. rouxii, S. cerevisiae とでオルソログ解析を行うと、Z. mellis でのみ発現する遺伝子は174であり、シトクロム c オキシダーゼや グルカン合成タンパク質を含んだ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食の安全と衛生の担保に注目が集まる中、食品の加工や保蔵環境下における酵母の環境応答を明らかにすることは食品の品質保持のために重要である。本研究はAw活性の低い保存食品から酵母の一種であるZ. mellisを単離しその高糖度耐性能に関わる遺伝子とその発現変動を解析した。

食品の品質保持において食品の加工の工夫だけでなく、品質を劣化させる条件のうち大きな割合を占める微生物の高糖度耐性の仕組みに迫ったことは、食品保蔵の改善の一助となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Osmotolerant microorganisms can survive in high salt/sugar environment.

Zygosaccharomyces mellis can grow in preserved food such as honey and maple syrup. Zygosaccharomyces rouxii can grow in soy sauce and miso, which are traditional fermented foods in Japan containing high amounts of salt. Z. mellis is known to deteriorate the quality of honey. We isolated Z. mellis from purchased honey imported from Canada. The strain was able to grow in the YM medium (0.3% yeast extract, 0.3% malt extract, and 0.5% polypepton) with 60% glucose, in which Saccharomyces cerevisiae cannot survive. In the environment, gene expression related to glyconeogenesis was down-regulated. On the other hand, genes associated with cell-wall synthesis were up-regulated.

Orthologue analysis showed that the number of genes expressing only in Z. mellis was 174, and contained genes encoding methylglyoxal reductase, cytochrome c oxidase, beta-glucan synthesis-associated protein, and translation elongation factor.

研究分野：食品科学

キーワード：Zygosaccharomyces mellis 耐糖性 RNA-Seq トランスクリプトーム解析 オルソログ解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

浸透圧の高い食品に生育する酵母が知られている。例えば、食塩濃度の高い醤油諸味や味噌、糖濃度の高いシロップから、数多くの耐浸透圧性酵母が分離されている。これらは醸造食品の特徴的な香味形成などに関与する一方で、塩蔵品や糖蔵品の品質を劣化させる原因ともなる。

高浸透圧に対する浸透圧耐性メカニズムは *S. cerevisiae* で研究されており、high osmolality glycerol response (HOG) 経路がその中心であるとされている(図1)。この経路は細胞内外の浸透圧の差を感知して対応するまでの一連の経路であるが、塩化ナトリウム・グルコース・マンニトールといった浸透圧を与える物質が異なった場合、経路を共有して機能するかは詳しく検討されていない。例えば塩化ナトリウムに対する塩耐性には Na^+ の細胞内流入を防御する応答が有効であると考えられるが、グルコースに対してこの防御が有効であるとは考えにくい。

現在、*S. cerevisiae* の糖に対する浸透圧耐性は、HOG 経路から最終的にグリセロール合成に関わる酵素(*Gpd1*)やグリセロール輸送体(*Fps1*, *Stt1*)の転写促進によることが報告されているが研究者がこれまでに先行実験を行ったところ、*Z. mellis* の糖耐性は *S. cerevisiae* より高く、*Z. mellis* は高糖度耐性という有用な機能を既に保持している菌株と示唆された。

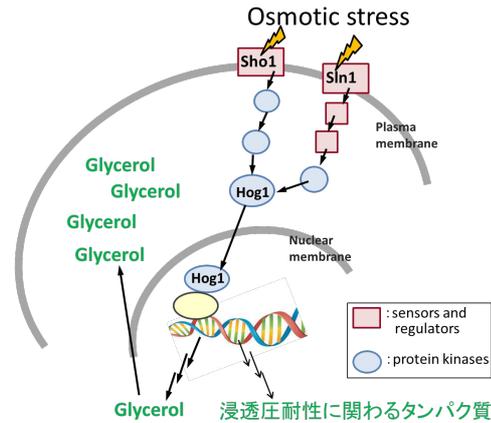


図1 出芽酵母の浸透圧応答経路

2. 研究の目的

蜂蜜から分離した酵母 *Zygosaccharomyces mellis* の耐糖メカニズムの解明を目的とした。具体的には、高糖度環境下で大きく発現変動する遺伝子群を抽出し、変動が見られた遺伝子群の RT-PCR を行うことで発現量を定量し、ターゲット遺伝子を *S. cerevisiae* に形質転換し、*S. cerevisiae* が浸透圧耐性能を獲得したか明らかにする。

3. 研究の方法

【高糖度環境下で大きく発現変動する遺伝子群の抽出】

1%グルコース含有 YM 培地と、50%グルコース含有 YM 培地とで *Z. mellis* を培養し、全 RNA を抽出した。次世代シーケンサーにより RNA-Seq を行い、発現が変動した遺伝子配列を得た。次いで遺伝子配列に annotation を付与することで、既知の遺伝子に類似の配列が抽出されたのか、*Z. mellis* で初めて解読された機能未知遺伝子なのか解析した。

【変動が見られた遺伝子群の RT-PCR】

抽出された遺伝子群の RT-PCR を行い、1%グルコース培地における遺伝子の発現量を 1 とした時の 50%グルコース培地における発現量を調べた。発現量に有意差が認められた遺伝子を次の実験に用いて、*Z. mellis* における浸透圧耐性メカニズムを予測した。

【*S. cerevisiae* 形質転換による *Z. mellis* 浸透圧耐性遺伝子の決定】

高糖度により発現増加した *Z. mellis* の遺伝子群を研究室酵母に形質転換し、糖耐性の低い研究室酵母が、高糖度耐性を獲得するか否かを検討した。

4. 研究成果

【高糖度環境下で大きく発現変動する遺伝子群の抽出】

グルコース 50%含有培地とグルコース 1%含有培地とで生育させた *Z. mellis* から RNA を抽出することで、耐糖性に関与する遺伝子の抽出が可能かどうか検証した。RNA の質はバイオアナライザーの指標で 9.3 以上と、質の高いものであった。そこで RNA-Seq に供した。その結果、12991 遺伝子群の発現を予測することができた。このことから、培養条件は目的の遺伝子を抽出するのに適していることが分かった。

【トランスクリプトーム解析】

次に、トランスクリプトーム解析を行った。リード数、ゲノム長、各種統計処理、発現倍数などをもとに、グルコース 50%含有培地とグルコース 1%含有培地とで生育させた *Z. mellis* の遺伝子発現量を比較した。発現量に差があると考えられる遺伝子を抽出し、これら遺伝子の相対的な発現量を RT-PCR で確認したところ、RNA-Seq により差があると示された遺伝子であ

っても、RT-PCR の発現量には差が見られない場合が多く見られた。この理由として CLC 解析の際に各条件におけるサンプル数が少なかったことが、統計処理の遂行に影響したと考えられた。サンプル数を調整し再度行くと、良好な結果が得られ、グルコース 50%含有培地において発現量が変動している遺伝子を選出された(表 1、2)。

表 1. 50%グルコース培地において up-regulate された遺伝子

Query	Accession	Fold Change	Description
G50_1494_c0_seq1	XP_002497395	5.2	26S proteasome regulatory subunit
G50_16902_c0_seq1	XP_002496124	4.2	Similar to restin (Reed-Steinberg cell-expressed intermediate filament-associated protein)
G50_15375_c0_seq1	CCW77435	4.0	Cytochrome c oxidase, subunit 1 (mitochondrion)
G50_8215_c0_seq1	XP_002497988	3.9	ARF GAP effector protein 1
G1_6632_c0_seq1	CDF90728	3.8	Prefoldin
G50_5309_c0_seq1	XP_002494545	3.8	Chitin synthase CHS2
G1_5272_c0_seq1	XP_002495143	3.7	Ammonium transporter MeaA
G50_300_c0_seq1	XP_002494436	3.6	Related to SUN4-Protein involved in the aging process; related to glucanases
G50_4411_c0_seq1	XP_002496272	3.6	APC/C activator protein, cell division control protein
G1_13232_c0_seq1	CAQ43237	3.6	Mitosis inhibitor protein kinase SWE1

表 2. 50%グルコース培地において down-regulate された遺伝子

Query	Accession	Fold Change	Description
G1_1809_c0_seq1	XP_002494598	3.3	Outer mitochondrial carnitine acetyltransferase
G1_2159_c0_seq1	XP_002494524	3.0	Glycine cleavage system T protein
G50_28992_c0_seq1	XP_002497691	2.8	DNA mismatch repair protein MutS
G50_6346_c0_seq1	XP_002494553	2.8	Galactose-1-phosphate uridylyltransferase
G1_2665_c0_seq1	XP_002495544	2.7	Helicase SEN1
G50_8553_c0_seq1	XP_002494504	2.5	Ureohydrolase
G1_8351_c0_seq1	XP_002498263	2.5	Exodeoxyribonuclease V alpha chain
G1_444_c0_seq1	EWS73078	2.5	ATP-dependent helicase Lhr
G1_2018_c0_seq1	XP_002497899	2.5	NDR1

【変動が見られた遺伝子群の RT-PCR】

そこでサンプル数を変更し再び解析を行った。有意に発現量が低下した遺伝子のうち、糖代謝に関する遺伝子の発現量を RT-PCR で相対比較すると、糖代謝(糖新生)に関わるフルクトース 1,6-ビスホスファターゼ(FBP)や、ホスホグルコノムターゼ(PGM)が有意に down-regulate された(図 2)。一方、有意に発現量が増加した遺伝子のうち、細胞壁合成関連酵素、糖代謝、各種転写調節因子をコードする遺伝子を *S. cerevisiae* に形質転換し、*S. cerevisiae* が 60%グルコース含有培地に生育可能か検証した。しかしいずれの遺伝子を導入した酵母も糖に対する耐性に変化は無かった。

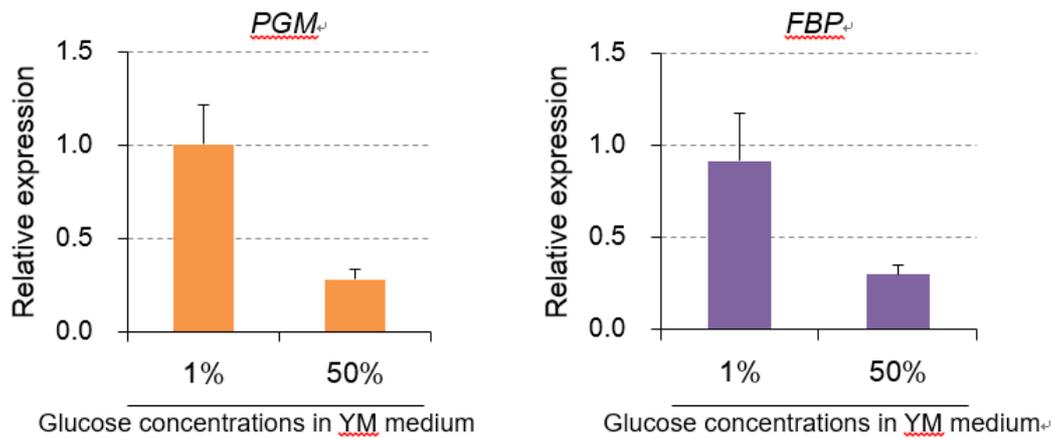


図2 RT-PCRによる相対的遺伝子発現変化

【オルソログ解析】

Z. mellis の近縁種である Z. rouxii、モデル生物である S.cerevisiae とのオルソログ解析も行った。Z. rouxii は 1990 年代までは Z. mellis と同種とされていた酵母であり、Z. mellis がシラップや蜂蜜に生息する一方で、Z. rouxii はしょう油や味噌といった塩濃度の高い食品に生育する高浸透圧耐性を有する。3 種のいずれか 1 種以上に発現している遺伝子の総数は 7021 genes であり、このうち 3961 genes はすべての種において発現している遺伝子であった。Z. mellis のみに発現している遺伝子は 174 genes であり (図3) この中には methylglyoxal reductase、cytochrome c oxidase、multidrug transporter、beta-glucan synthesis-associated protein、translation elongation factor、mRNA binding protein などが含まれた。

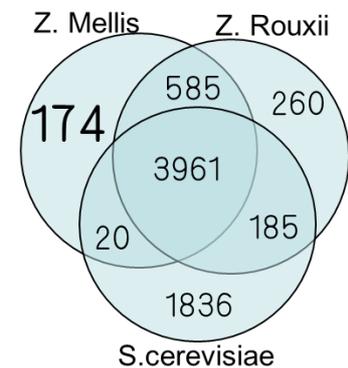


図3 3種の微生物の発現遺伝子比較

図中の数字は遺伝子数を示す

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

雑誌名: *Microbiology Resource Announcements*,

巻・発行年: *In printing*,

査読あり,

著者: Yuh Shiwa, Yu Kanasaki, Taichiro Ishige, Kiyoshi Mura, Taichi Hori, and

Tomoko Tamura (corresponding author)

題目: Draft genome sequence of *Zygosaccharomyces mellis* CA-7, isolated from honey.

DOI: 10.1128/MAR.00449-19