

機関番号：14401
研究種目：若手研究 (B)
研究期間：2009～2010
課題番号：21780072
研究課題名 (和文) 低炭素社会構築を目指した出芽酵母酸ストレス耐性化戦略の分子基盤
研究課題名 (英文) Molecular mechanisms conferring lactic acid resistance in *Saccharomyces cerevisiae*
研究代表者
杉山 峰崇 (SUGIYAMA MINETAKA)
大阪大学・工学研究科・助教
研究者番号：80379130

研究成果の概要 (和文)：

酵母の酸ストレス耐性化機構の分子基盤の解明を目指して、独自に同定した乳酸ストレス耐性化に関与する遺伝子の機能解析を行った。その結果、機能不明の膜タンパク質をコードする *ESBP6* の過剰発現による乳酸耐性化には、Pbs2 キナーゼや転写因子 Swi4、Rlm1、Skn7 が必須であることが明らかとなった。また、乳酸ストレスによって細胞内遊離アミノ酸が激減することを見出し、細胞内 pH 低下や酸化ストレスの緩和に関与するストレス保護アミノ酸の細胞内恒常性維持が乳酸ストレス耐性に重要であることが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

In this study, resistance mechanisms to lactic acid were analyzed in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Our analysis revealed that the Pbs2 kinase and Swi4, Rlm1, and Skn7 transcriptional activators played important roles in the lactic acid resistance conferred by overexpressed *ESBP6* that encodes a membrane protein of unknown function. Lactic acid stress caused a significant decrease in intracellular concentration of amino acids. Overexpression of *ESBP6* alleviated the decrease, especially amino acids involved in stress protection, suggesting that intracellular amino acid homeostasis is important for conferring lactic acid resistance.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：微生物遺伝・育種、低炭素社会、酸耐性

1. 研究開始当初の背景

低炭素社会の構築は、人類が直面する 21 世紀最大の課題である。CO₂削減効果を持つバイオエタノールやカーボンニュートラルプラスチック等の速やかな普及が切望されているが、コストダウンが必須である。産業上 有用な菌株である出芽酵母の酸耐性化は、1) 酸分解バイオマス由来の酸性糖溶液の直接利用や 2) 酸性条件での培養による雑菌汚染の防止（生産収率の向上）、3) 代表的なカーボンニュートラルプラスチックの原料となる乳酸の高生産等を可能とすることから、エタノール耐性化や高温耐性化と共にコストダウンに特に重要な形質である。しかし、酸ストレスに対する効果的な耐性付与戦略は明らかとなっていなかった。

そのため、申請者らは、酸耐性化の分子基盤の解明とさらなる耐性化戦略への応用を目指して、i) 乳酸・酢酸に対して耐性/感受性を引き起こす遺伝子破壊変異の網羅的な同定、ii) 過剰発現で乳酸・酢酸に耐性を付与する遺伝子の探索を行ってきた。i) からは 98 種と 107 種の遺伝子機能が酸耐性化を抑圧・促進することを見出し、ii) からは多剤排出輸送体遺伝子等の転写活性化因子をコードする *HAA1* と機能不明の膜タンパク質をコードする *ESBP6* を同定していた (図 1)。

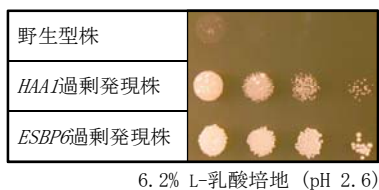


図 1. 酸耐性遺伝子

2. 研究の目的

本研究では、独自に同定した過剰発現で酸耐性を付与する 2 種の遺伝子や網羅的に同定

した酸耐性/感受性を引き起こす遺伝子破壊変異を用いて、乳酸ストレスに対する耐性化機構の分子基盤の解析を目的とした。

3. 研究の方法

液胞の酸性度と形態は、細胞にそれぞれ蛍光色素であるキナクリンと FM4-64 を取り込ませ、蛍光顕微鏡で観察することにより解析した。

細胞内遊離アミノ酸量は、過塩素酸を用いて細胞抽出液を調製し、アミノ酸アナライザー L-8500 を用いて解析した。

細胞内 pH の測定は、pH 依存性蛍光色素である SNARF-4F を細胞内に取り込ませ、フローサイトメーターで細胞の蛍光強度を解析することにより測定した。

4. 研究成果

乳酸ストレス感受性遺伝子破壊株 107 株中 57 株で液胞の酸性度の低下や断片化の異常を示すことを見出した。この 57 株のうち 23 株の液胞異常はこれまで報告されておらず、今回初めて見出したものであった (図 2)。液胞機能の完全性は、プロトンポンプ *Pma1* の正常な局在やさまざまなストレスへの耐性に必要であることから、乳酸ストレス条件下での液胞機能の維持や強化が乳酸ストレス耐性に有効である可能性が示唆された。

液胞異常を示さない残りの乳酸感受性遺伝子破壊株の内、20%程度 (10 株) がアミノ酸の生合成や取り込みに関する機能を持つものであり、これらの破壊株はアミノ酸の添加により、乳酸ストレス感受性が回復した。さらに、乳酸ストレス条件下での細胞内遊離アミノ酸量を解析した結果、乳酸ストレスは細胞内遊離アミノ酸量を顕著に低下させることを初めて見出した。アミノ酸の細胞内恒

常性維持が乳酸ストレス耐性に重要であることが明らかとなった。

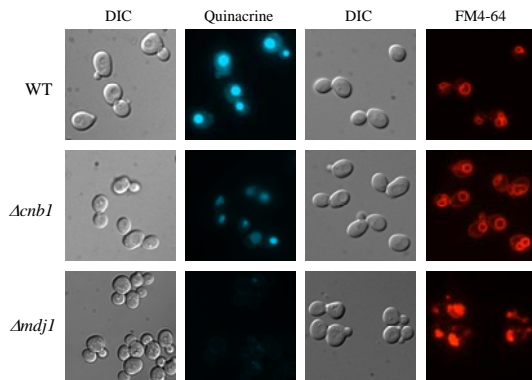


図 2. 乳酸ストレス感受性破壊株の液胞酸性度の低下と液胞形態の異常

乳酸ストレスを受けると細胞内 pH が顕著に低下することから、乳酸ストレス耐性遺伝子破壊株と感受性遺伝子破壊株（107 株中最も強い感受性を示す 22 株）の乳酸ストレス条件下での細胞内 pH を測定した。耐性破壊株の内、細胞内 pH の恒常性が最も亢進されたグループの遺伝子機能にはプロトンやイオンの輸送に関与する輸送体の転写との関連が見られ、一方、感受性破壊株の内、細胞内 pH の恒常性が最も低下したグループの遺伝子機能には、液胞の機能やリボソーム RNA の転写との関連が見られた。これらの細胞機能の強化により乳酸耐性化の可能性が示唆された。

これまでに、乳酸ストレス条件下では、Hog1 および Slt2 MAP キナーゼ経路が活性化されること、*ESBP6* を過剰発現させるとこれらの活性化が増強されることを見出している。過剰発現 *ESBP6* による乳酸耐性化機構の解析を行うため、Hog1 及び Slt2 キナーゼ経路の各遺伝子破壊株を用いた独自の評価系を立ち上げた。その結果、Hog1 経路において、過剰発現 *ESBP6* が付与する乳酸耐性化には、Pbs2 MAP キナーゼキナーゼのみが重要であり、

Slt2 経路においては、下流転写因子（Swi4、Rlm1、Skn7）のみが重要であることが明らかとなった。Pbs2 はプロトンポンプである Pma1 の活性化を促進する Ptk2 キナーゼと相互作用することから、Pbs2 と Ptk2 キナーゼを介した Pma1 の活性化による乳酸プロトンの排出が乳酸耐性化の分子基盤の一つである可能性が示唆された。

また、乳酸ストレス条件下において、*ESBP6* 過剰発現は、細胞内 pH 低下や酸化ストレスの緩和に関与しているストレス保護アミノ酸（Glu, Lys, Arg, Pro）を野生型株の 2 倍以上高く細胞内で維持できることを見出した。これらのストレス保護アミノ酸の増加も乳酸耐性化に向けて重要であることが示唆された。

遺伝子発現解析から、乳酸ストレス耐性化に関与する Haa1 下流の新規遺伝子の一つとして、カルシニューリンの調節因子をコードする *CNB1* 遺伝子が示唆された。*cnb1* 破壊株は強い乳酸感受性を示すことから、Haa1 下流で乳酸耐性化に寄与していることが強く示唆された。本研究から得られた乳酸耐性化の分子基盤の理解が進めば、更なる乳酸生産収率向上が期待され、ポリ乳酸プラスチックの一層の普及に貢献できると期待される。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 1 件）

①杉山峰崇ら、酵母の酸ストレス耐性とカーボニューラルバイオテクノロジーへの利用、日本醸造協会誌、査読無、104 巻、(2009)、944-950

〔学会発表〕（計 11 件）

- ①宗桃子、赤瀬晋平、倉本祐樹、杉山峰崇ら、乳酸耐性酵母の分子育種 — 過剰発現で乳酸耐性を付与する出芽酵母 *ESBP6* 遺伝子の機能解析—、BMB2010 第33回 日本分子生物学会年会、2010.12.9、神戸ポートアイランド
- ②鈴木俊宏、若園健太、杉山峰崇ら、乳酸耐性酵母の分子育種 — 出芽酵母の乳酸耐性に重要な細胞機構—、第62回 日本生物工学会大会、2010.10.29、宮崎シーガイア
- ③杉山峰崇ら、乳酸ストレスに対して細胞内 pH の恒常性を増強させる酵母遺伝子破壊変異の同定と機能解析、第62回 日本生物工学会大会、2010.10.29、宮崎シーガイア
- ④鈴木俊宏、若園健太、杉山峰崇ら、出芽酵母の乳酸耐性における細胞内アミノ酸の重要性、酵母遺伝学フォーラム「第43回研究報告会」、2010.9.9、ならまちセンター
- ⑤鈴木俊宏、若園健太、杉山峰崇ら、出芽酵母の乳酸耐性に重要な細胞機構、第4回 日本ゲノム微生物学会年会、2010.3.8、九州大学医学部百年講堂
- ⑥鈴木俊宏、若園健太、杉山峰崇ら、Identification of genes important for molecular breeding of lactic-acid tolerant yeast by genome-wide screening、日本分子生物学会 第32回年会、2009.12.12、パシフィコ横浜
- ⑦杉山峰崇ら、過剰発現で乳酸ストレス耐性を付与する出芽酵母 *HAA1* 遺伝子の機能解析、第61回 日本生物工学会大会、2009.9.24、名古屋大学東山キャンパス

⑧原島俊、杉山峰崇ら Molecular breeding of yeast displaying tolerance to high temperature and low pH for high-level bioethanol production、International Symposium on Bioprocess and Biosystems Engineering 2009、2009.8.4、East China University of Science and Technology

⑨杉山峰崇ら、過剰発現で酸ストレス耐性を付与する出芽酵母 *HAA1* 遺伝子の機能解析、酵母遺伝学フォーラム「第42回研究報告会」、2009.7.30、ノバホール

⑩鈴木俊宏、若園健太、杉山峰崇ら、出芽酵母の乳酸耐性化に必要な細胞機能の解析、酵母遺伝学フォーラム「第42回研究報告会」、2009.7.29、ノバホール

⑪杉山峰崇、出芽酵母の乳酸ストレス耐性機構、日本微生物資源学会 第16回大会、2009.6.26、大阪大学銀杏会館

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉山 峰崇 (SUGIYAMA MINETAKA)

大阪大学・工学研究科・助教

研究者番号：80379130