

令和 2 年 7 月 7 日現在

機関番号：25301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K00655

研究課題名(和文) 出芽酵母Haa1による酢酸ストレス応答機構の解明と酢酸耐性酵母育種技術への応用

研究課題名(英文) Elucidation of acetic acid stress response mechanism by budding yeast Haa1 and application to acetic acid resistant yeast breeding technology

研究代表者

田中 晃一 (TANAKA, Koichi)

岡山県立大学・保健福祉学部・教授

研究者番号：90282615

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：Haa1は出芽酵母の酢酸ストレス耐性に重要な役割を果たす転写因子であるが、そのしくみは不明であった。私は、Haa1が細胞内にグリセロールを一過的に蓄積させることで、酵母は酢酸ストレスから保護され、生存・増殖が可能になることを明らかにした。Haa1は、グリセロール生合成に関わる酵素をコードするGPP2遺伝子の転写活性化と、グリセロールを細胞外へ排出する働きをするFps1タンパク質の分解誘導などを通じて、細胞内のグリセロール濃度を上昇させると考えられる。この研究成果は、バイオエタノール製造の高効率化・低コスト化に寄与する「酢酸耐性化酵母」の育種技術の開発に応用できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

再生可能エネルギーであるバイオ燃料の効率生産は、低炭素社会の構築に必要な基盤技術となる。セルロース系バイオマス为原料としたバイオエタノールの生産では、発酵を強力に阻害する酢酸が糖化液に残存することが大きな問題である。本研究成果をもとにして、酢酸存在下でも増殖や発酵が阻害されない「酢酸耐性化酵母」を開発することで、糖化液から酢酸を除去する必要がなくなるだけでなく、酢酸が持つ強い抗菌作用により培地の滅菌という高コスト工程も省くことが可能になる。従って、本研究成果はバイオエタノール製造の大幅な高効率化・低コスト化に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Budding yeast Haa1 is a transcription factor that plays an important role for resistance to acetic acid stress, but its mechanism was unclear. I revealed that Haa1 transiently accumulates intracellular glycerol, which protects yeast cells from acetic acid stress and enables their survival and growth. Haa1 increases intracellular glycerol concentration by activating transcription of the GPP2 gene encoding an enzyme involved in glycerol biosynthesis, and by inducing the degradation of Fps1 protein that has a role to export glycerol to the outside of cells. These results can be applied to the development of a novel breeding technology for "acetic acid-tolerant yeast" that contributes to more efficient bioethanol production.

研究分野：応用微生物学

キーワード：酵母 バイオエタノール 酢酸 ストレス グリセロール HAA1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

食料と競合しないセルロース系バイオマスを原料とするバイオエタノールの生産では、糖化処理に莫大なコストがかかることと、糖化液に酢酸を主とする発酵阻害物質が混在することが非常に大きな問題である。私は酢酸存在下でも増殖や発酵が阻害されない「酢酸耐性化酵母」を開発することで、この問題の一部を解決しようとしている。バイオエタノールの製造に酢酸耐性化酵母をもちいることで、糖化液から酢酸を除去する必要がなくなるだけでなく、酢酸が持つ強い抗菌作用により培地の滅菌という高コスト工程も省くことが可能になる。

これまでに私は、出芽酵母の酢酸耐性に重要な *HAA1* 遺伝子の発現を強化して、ワンステップで簡単に酵母に酢酸耐性を付与する技術を開発した (Tanaka et al, *Appl Environ Microbiol* 2012, 78: 8161)。さらに、この方法をもちいて酢酸に耐性を持つバイオエタノール生産用産業酵母を作成し、酢酸耐性酵母は酢酸による阻害を受けずにエタノールを生産すること、同条件下で雑菌の増殖は強く抑制されることを示した (Inaba et al, *AMB express* 2013, 3: 74)。この技術は、様々な特徴を有する産業酵母に、簡単に酢酸耐性能を追加付与することができるため、非常に汎用性が高いものである。しかし、*HAA1* 発現強化株は増殖が遅く、継代培養すると酢酸耐性を喪失した細胞が優先的に増殖してくるといった新たな問題が浮かび上がった。

*HAA1* 発現強化株が不安定である原因として、転写因子である Haa1 の標的遺伝子の中に、酢酸耐性に関わるものと増殖に悪影響を及ぼすものが共存する可能性が想定された。しかし、Haa1 の作用機序が不明であるために、この問題に対する有効な解決策を見いだすことができない。そこで、Haa1 による酢酸耐性化のメカニズムを分子レベルで明らかにし、その知見をより安定して強い酢酸耐性を持つ酵母の育種技術の開発に繋げることとした。

## 2. 研究の目的

### (1) Haa1 の標的因子の同定

Haa1 による酢酸耐性化のメカニズムを明らかにするため、はじめに Haa1 による制御を受ける標的分子や標的遺伝子を同定する。

#### 酢酸ストレスに応答して発現量が変化する遺伝子の探索

Haa1 は転写因子であることが示唆されているため、標的遺伝子の発現を調節することで酢酸ストレスに対する応答を引き起こす可能性が高い。そこで、酢酸ストレスによって転写が誘導あるいは抑制される遺伝子を探索する。

#### 酢酸ストレスに応答して細胞内濃度が変動する低分子化合物の探索

酢酸ストレスに対する応答は遺伝子発現を介して起こるだけとは限らず、酵素活性の調節などにより起こる可能性も十分に考えられる。この遺伝子発現量の変化では見えてこない標的を探るために、酢酸ストレスによって細胞内濃度が増加あるいは低下する細胞内成分を探索する。

#### Haa1 の標的因子の絞り込み

と見いだされた遺伝子発現の変化や細胞内成分の濃度変化の中から、Haa1 の働きによって引き起こされる変化を絞り込む。

### (2) 酢酸ストレス耐性化に寄与する Haa1 標的因子の同定と作用機序の解明

背景で述べたように、Haa1 標的因子の中には酢酸ストレス耐性に関わるものの他に、増殖遅延に関するものも含まれていると考えられる。Haa1 標的因子の中から酢酸耐性化に関与するもののみを選び出すとともに、酢酸耐性化に果たす役割について解析を進める。

### (3) 新たな酢酸耐性化技術の開発

Haa1 標的因子の中から選りだした酢酸耐性化に関与する因子を利用して、*HAA1* 遺伝子の発現強化に代わる新たな酢酸耐性化技術を開発する。

## 3. 研究の方法

### (1) Haa1 の標的因子の同定

酢酸ストレスを与える前と与えた後の細胞から mRNA や細胞抽出液を抽出し、定量 PCR や高速液体クロマトグラフィーをもちいて、酢酸ストレスに応答して発現量が変化する遺伝子や細胞内濃度が変動する低分子化合物の同定を進める。次に、*haa1* 遺伝子破壊株をもちいて同様の実験を行うことで、Haa1 に依存的な因子と非依存的な因子を区別する。

### (2) 酢酸ストレスに対する耐性化に寄与する Haa1 標的因子の同定と作用機序の解明

Haa1 依存的に発現量が変化する遺伝子や、Haa1 依存的に細胞内濃度が変動する低分子化合物の生合成に関わる遺伝子の破壊株を作製し、同定した Haa1 標的因子が酢酸ストレス耐性に必要とされる因子か否かを確認する。さらに、遺伝学的な解析や生化学的な解析を組合せてそれぞれの因子の関係性を調べることで、Haa1 による酢酸耐性化の分子メカニズムを解き明かす。

### (3) 新たな酢酸耐性化技術の開発

(2) で同定した Haa1 標的遺伝子の過剰発現株や、Haa1 標的因子を過剰生産する株を作製し、酢酸ストレス耐性をもつようになるかどうかを解析する。

## 4. 研究成果

### (1) 出芽酵母は酢酸ストレスにตอบสนองして細胞内にグリセロールを蓄積する

野生型株の培養液を 3 本に分け、そのうちの 2 本に終濃度 0.1% と 0.2% となるように酢酸を添加して培養を続けた。経時的にサンプリングした細胞から抽出液を調整し、高速液体クロマトグラフィーをもちいて細胞内成分の分析を行ったところ、酢酸ストレスにตอบสนองして細胞内濃度が顕著に増加する化合物を 1 種見いだした。種々の解析の結果、この化合物はグリセロールであることが示された。酢酸ストレスを与えない状態で培養を続けても細胞内グリセロールの量は変動しないが、酢酸を終濃度 0.1% で添加すると約 2.5 倍、0.2% で添加すると約 3 倍まで増加が見られた (図 1A)。しかし、このグリセロール蓄積は一過的であり、0.1% 酢酸の場合は添加後 1 時間、0.2% 酢酸の場合は添加後 1.5 時間をピークとして、その後再び低下した。このときの細胞増殖について調べてみると、酢酸添加後 15~30 分間程度増殖の停滞が観察されたが、その後増殖を再開し、非添加サンプルとほぼ同じ速度で増殖を続けることが分かった (図 1B)。興味深いことに、細胞内グリセロールの蓄積と増殖の再開のタイミングが一致していた。このことから、細胞内グリセロールの蓄積は酢酸ストレスによって誘導された増殖停止を解除する働きをする可能性が示唆された。

### (2) 酢酸ストレスにตอบสนองしたグリセロール蓄積は Haa1 によって制御されている

細胞内グリセロール蓄積と Haa1 との関係性を明らかにするために、HAA1 発現強化株と *haa1* 遺伝子破壊株をもちいて先ほどと同様の実験を行った。その結果、HAA1 発現強化株では酢酸を添加する前から野生型株の約 4 倍ものグリセロールの蓄積が見られ、酢酸添加後はさらに約 7 倍まで増加した (図 2)。一方、*haa1* 遺伝子破壊株では酢酸添加後もグリセロールの蓄積が全く起こらなかった。この結果は、酢酸ストレスにตอบสนองした細胞内グリセロールの増加は Haa1 によって制御されていることを示している。

### (3) 細胞内グリセロールの蓄積が酢酸ストレス耐性を誘導する

前述のように、酵母細胞は酢酸ストレスにตอบสนองして Haa1 依存的にグリセロールを蓄積することが明らかとなったが、グリセロールと酢酸ストレス耐性との関係は不明である。そこで、細胞内にグリセロールを蓄積することが酢酸耐性化に必要なかどうかを確認する実験を行った。出芽酵母はグリセロール 3-リン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を 2 つ (*GPD1*、*GPD2*) 有しており、両方を同時に破壊した株 (*gpd1Δ gpd2Δ*) はグリセロ

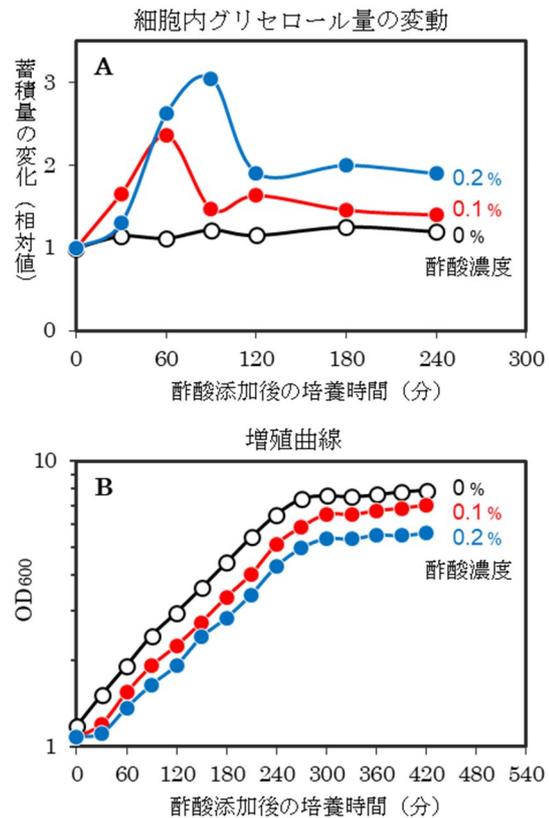


図 1 酢酸ストレスにตอบสนองしたグリセロール蓄積

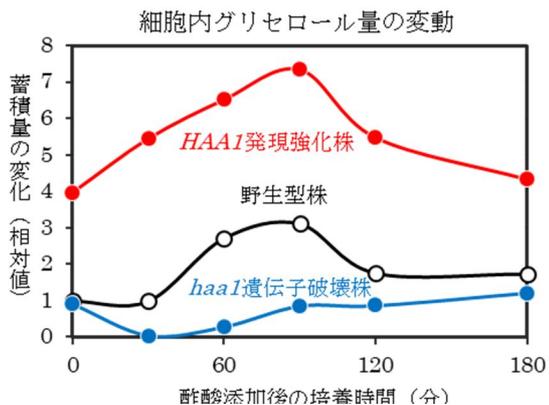


図 2 グリセロール蓄積は Haa1 に依存する

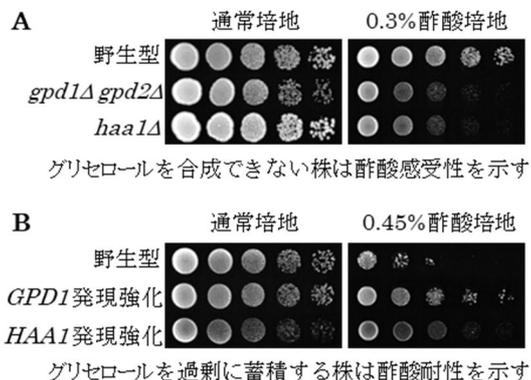


図 3 グリセロール蓄積が酢酸耐性化を誘導する

ールを合成できなくなる。この株を酢酸添加培地で培養したところ、*haa1* 遺伝子破壊株 (*haa1* Δ) と同じくらい強い酢酸感受性を示した (図 3A)。従って、細胞内グリセロールの蓄積は酢酸耐性化に必要な不可欠な現象であると言える。

次に、人為的なグリセロール増加が酢酸耐性化を誘導できるかどうかを確かめる実験を行った。*GPD1* 遺伝子の発現を強化した株は細胞内に高濃度のグリセロールを蓄積することがわかっている。この株を酢酸添加培地で培養したところ、*HAA1* 発現強化株と同等かそれ以上の酢酸ストレス耐性を示した (図 3B)。先の結果と考え合わせると、細胞内グリセロールの蓄積は酵母の酢酸耐性化に必要な十分であることが明らかとなった。

#### (4) Haa1 は *GPP2* 遺伝子の転写誘導を介してグリセロール合成を促進する

酢酸添加の前後の細胞から抽出した mRNA をもちいて行ったトランスクリプトーム解析により、酢酸ストレスに応答して転写量が変化する遺伝子が約 650 種見いだされている (Mira et al, *Microb Cell Fact* 2010, 9:79)。その中に、グリセロール合成経路で重要な役割を果たす酵素 (グリセロール 3-リン酸フォスファターゼ) をコードする *GPP2* 遺伝子が含まれていた。そこで、*GPP2* 遺伝子の発現に対する Haa1 の役割を調べた。野生型株に終濃度 0.2% の酢酸を与えると、*GPP2* 遺伝子の mRNA レベルは 30 分 ~ 45 分後をピークとして約 16 倍まで急激に増加し、その後速やかに低下した (図 4)。また、*HAA1* 発現強化株における *GPP2* 遺伝子の mRNA レベルは、酢酸ストレスを与える前から野生型株の約 4 倍程度高い状態にあり、酢酸を添加するとさらに約 11 倍まで上昇した後に徐々に低下した。一方、*haa1* 遺伝子破壊株における *GPP2* 遺伝子の mRNA レベルは、酢酸を添加した直後の急激な増加は見られなかったが、1 ~ 2 時間かけて緩やかに約 9 倍まで増えることが明らかとなった。

酵母には *GPP2* 遺伝子と同じ酵素をコードするパラログの *GPP1* 遺伝子が存在するが、*GPP1* 遺伝子の転写は酢酸ストレスや Haa1 による制御を受けていなかった。また、グリセロール 3-リン酸デヒドロゲナーゼをコードする *GPD1* 遺伝子と *GPD2* 遺伝子の転写も Haa1 による制御を受けていないことが示された。以上の結果より、*GPP2* 遺伝子は Haa1 の主要な標的であり、酢酸ストレスにより活性化した Haa1 が *GPP2* 遺伝子の転写を活性化することでグリセロール合成が促進される可能性が示唆された。また、酢酸ストレス存在下での *GPP2* 遺伝子の転写活性化は Haa1 だけに依存しているのではなく、Haa1 以外の因子も関与していると考えられる。

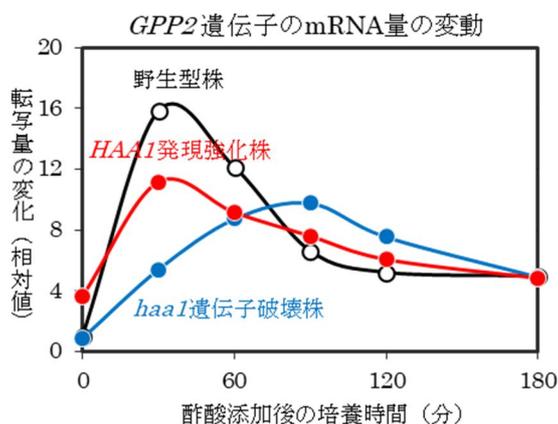


図 4 Haa1 に依存した *GPP2* 遺伝子の転写活性化

#### (5) *GPP2* 遺伝子の発現強化だけでは酢酸耐性化を誘導できない

*HAA1* 遺伝子の発現強化が引き起こす酢酸耐性化について、これまでの結果から最もシンプルに考えると、Haa1 が *GPP2* 遺伝子の転写を活性化することでグリセロール合成が促進され、細胞内に蓄積したグリセロールが酢酸ストレスに対する耐性を付与するというモデルが想定される。*HAA1* 発現強化に代わる新たな酢酸耐性化技術として、*GPP2* 遺伝子の発現強化が使えるかどうかについて検討した。*GPP2* 遺伝子過剰発現株を作製し、酢酸添加培地で培養したが、有意な酢酸ストレス耐性を見いだすことはできなかった。*GPP2* のパラログである *GPP1* 遺伝子を同時に過剰発現する株も作製したが、結果は同じであった。また、*HAA1* 発現強化株では酢酸ストレスが無い状態でも細胞内グリセロールのレベルが野生型株の 4 倍程度高い現象が見いだされたが、*GPP2* 発現強化株や *GPP1 GPP2* 発現強化株ではそのような傾向は見られなかった。更に、*gpp2* 遺伝子破壊株においても、酢酸ストレスに応答した細胞内グリセロールの蓄積が起こることが明らかとなった。以上の結果は、Haa1 が制御する細胞内グリセロールの蓄積現象において、*GPP2* 遺伝子が唯一無二の標的というわけではなく、*GPP2* 遺伝子の転写活性化以外にも別の標的が存在することを示唆している。

#### (6) Haa1 はアクアグリセロポリリン Fps1 の分解を誘導してグリセロールを蓄積する

アクアグリセロポリリンは生体膜を介して水やグリセロールなどの低分子物質の選択的透過および輸送を司るチャンネルタンパク質であり、出芽酵母では *FPS1* 遺伝子にコードされている。酵母は高浸透圧ストレスに曝されると脱水により一時的に収縮し、細胞内に適合溶質のグリセロールを蓄積することで再び水を吸収して元のサイズに戻る。高浸透圧ストレスに応答して細胞内にグリセロールを蓄積する際は、グリセロールを細胞外に排出する Fps1 の分解が起こることが報告されている。これまで示してきたように、酢酸ストレスに曝された際にも同様にグリセロールの蓄積が見られたことから、Haa1 が Fps1 の分解を誘導することでグリセロールの蓄積を

促進する可能性を検証した。酵母の培養液に酢酸を添加し、経時的にサンプリングしてウエスタンブロッティング法をもちいて細胞内の Fps1 レベルを解析した。野生型株においては酢酸添加後 30 分以内に Fps1 の分解が誘導されたが、*haa1* 遺伝子破壊株 (*haa1* Δ) では全く分解が起こらなかった (図 5)。この結果は、転写因子である Haa1 が何らかの方法で Fps1 の分解に関わることを示唆している。

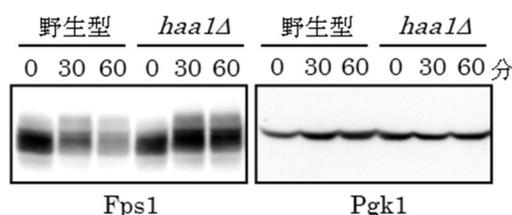


図 5 Haa1 は Fps1 の分解を誘導する

### (7) Haa1 は酢酸ストレス条件下においてストレス MAP キナーゼ Hog1 を活性化する

酵母のストレス活性化プロテインキナーゼ Hog1 は、高浸透圧ストレスを感知したキナーゼカスケードによるリン酸化を受けて活性化され、様々な標的タンパク質のリン酸化を介して細胞のストレス応答を引き起こす。アクアグリセロポリリン Fps1 の N 末端領域には MAP キナーゼのリン酸化部位が存在し、Hog1 によるリン酸化によりエンドサイトーシスが促進される可能性が示唆されている。先述のように、Haa1 が Fps1 の分解に必要であることが示されたため、Haa1 が Hog1 の活性化に関与する可能性について検討した。先ほどの実験と同様に、酵母の培養液に酢酸を添加し、経時的にサンプリングしてウエスタンブロッティング法により Hog1 のタンパク質量と活性化レベル (活性化に必要なリン酸化レベル) を検出した。野生型株では酢酸添加後速やかに Hog1 のリン酸化が誘導され、活性化が起こっていることが示された。一方、*haa1* 遺伝子破壊株ではリン酸化がほとんど見られないため、Hog1 の活性化が起こっていないことが示唆された。

*hog1* 遺伝子破壊株は酢酸ストレスに対して弱い感受性を示したが、*haa1* 遺伝子破壊株ほどではなかった。一方、高浸透圧ストレスに対しては、*hog1* 遺伝子破壊株は非常に強い感受性を示したが、*haa1* 遺伝子破壊株では全く影響は見られなかった。

以上の結果より、酵母の酢酸ストレスに対する応答においては Haa1 がストレス MAP キナーゼである Hog1 の上流で機能し、Hog1 の活性化を通じて Fps1 の分解を誘導することで、グリセロールの蓄積を促進することが示唆された。Haa1 は Hog1 を介さない別の経路 (*GPP2* 遺伝子の転写活性化など) でもグリセロール蓄積を制御していると考えられる。

### (8) まとめと展望

本研究により明らかとなった酵母の酢酸ストレス応答の分子機構を図 6 に示す。

酢酸の酸解離定数 pKa は 4.8 であり、酸性条件では非解離型の酢酸が多くなる。非解離型の酢酸が細胞膜を通過して細胞内に侵入すると、細胞内は中性であるため解離してプロトンを放出し、酢酸ストレスを生じる。ストレスにより活性化された Haa1 は *GPP2* 遺伝子の転写を誘導し、グリセロールの生合成を促進する。しかし、グリセロール排出チャンネルである Fps1 が存在すると合成したグリセロールが排出されてしまう。そこで、Haa1 はストレス MAP キナーゼである Hog1 の活性化を誘導し、Fps1 の分解を促進することでグリセロールの排出を抑制する。その結果、細胞内に一過的にグリセロールが蓄積し、酢酸ストレスに対する耐性化が起こると考えられる。グリセロールがどのようにして酢酸耐性化に寄与しているかはまだ不明であるが、細胞内構造や

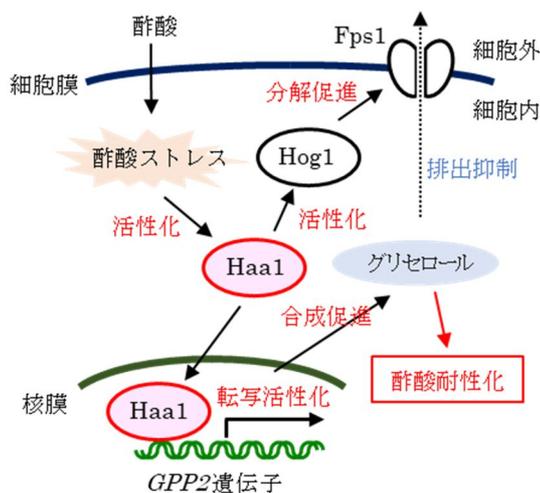


図 6 酵母の酢酸ストレス応答機構のモデル

種々の酵素タンパク質を酸ストレスによる変性から保護する役割があるのではないかと考えている。グリセロールは浸透圧ストレスへの耐性に重要な適合物質であるが、酸ストレスに対する耐性にも作用することは本研究により初めて見いだされた新事実である。

本研究課題の最終的な目的は *HAA1* 遺伝子の発現強化に代わる新たな酢酸耐性化技術を開発することであったが、残念ながらそこまで到達することができなかった。しかしながら、出芽酵母の酢酸耐性化には細胞内グリセロールの蓄積が必要かつ十分であることが明らかとなったことは非常に重要なヒントとなる。実際に *GPD1* 遺伝子の発現を強化して人為的に細胞内にグリセロールを蓄積させた株は *HAA1* 発現強化株と同等かそれ以上の酢酸耐性を示した (図 3)。このことは、*GPD1* 発現強化が次世代の酢酸耐性化技術における有力な候補であることを示唆している。また、*FPS1* 遺伝子を破壊することで細胞内グリセロールの蓄積が促進されると考えられるため、*fps1* 遺伝子破壊株の活用や *GPD1* 発現強化と組み合わせることで、さらに強力な酢酸耐性化を誘導できる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Mai Yamamoto, Takashige Kashimoto, Yukihiro Yoshimura, Nao Tachibana, Shiho Kuroda, Yoshiko Miki, Sou Kitabayashi, Ping Tong, Jianbo Xiao, Koichi Tanaka, Hiroshi Hamamoto, Kazuhisa Sekimizu, Koichiro Yamamoto	4. 巻 14
2. 論文標題 A silkworm infection model to study the <i>Vibrio vulnificus</i> virulence genes.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Molecular Medicine Reports	6. 最初と最後の頁 4243-4247
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/mmr.2016.5782	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 田中晃一	4. 巻 94
2. 論文標題 切れないハサミも使いよう	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 生物工学会誌	6. 最初と最後の頁 345
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 田中晃一
2. 発表標題 微生物の力で生活を豊かに
3. 学会等名 おかやまバイオアクティブ研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Koichi Tanaka
2. 発表標題 Identification and Characterization of Natural Lactic Acid Bacteria Having the Ability to Increase Cysteine Sulfoxide Contents in Vegetables.
3. 学会等名 The 11th Joint Conference on Nutrition and Food Science（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 田中晃一
2. 発表標題 低価格米粉の特性を活かした食品の開発
3. 学会等名 イノベーションジャパン2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Koichi Tanaka
2. 発表標題 Microorganisms from Local Environment in Okayama.
3. 学会等名 IFRPD 50th Anniversary International Seminar (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中晃一
2. 発表標題 岡山県の自然環境中に生息する野生酵母の包括的収集
3. 学会等名 八雲環境科学財団研究発表会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Koichi Tanaka
2. 発表標題 Microbial Approaches for Preventing High Blood Cholesterol.
3. 学会等名 International Seminar on Future Food for Well Being-Aging Society (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中晃一
2. 発表標題 低価格米粉の特性を活かした新商品・新メニューの開発
3. 学会等名 イノベーションジャパン2019
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----