

令和元年5月23日現在

機関番号：14603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18676

研究課題名(和文) 清酒酵母において見出されたTORシグナルを介した高発酵メカニズムの解明とその応用

研究課題名(英文) Analysis and application of TOR signaling-mediated fermentation control in sake yeast

研究代表者

渡辺 大輔 (Watanabe, Daisuke)

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・助教

研究者番号：30527148

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：酵母のアルコール発酵の調節において、真核生物に保存された栄養シグナリングの鍵因子であるTORC1が重要な役割を果たしており、TORC1の高活性化が清酒酵母の高発酵力の原因であることが明らかとなった。TORC1は、発酵の「ブレーキ」であるRim15pプロテインキナーゼの抑制に加え、アミノ酸ホメオスタシス関連因子の制御を介して発酵力を高めており、細胞外の栄養環境に応じて炭素-窒素代謝クロストーク調節を司る全体像の解明に至った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

酵母のアルコール発酵は、酒類やパン、バイオエタノールの製造などに広く用いられる重要な微生物機能であるが、その人為的な調節は困難であった。本研究では、高い発酵力を有する清酒酵母の研究を端緒として、真核生物に保存されたTORシグナリングが発酵調節の鍵を握ることを見出し、その詳細なメカニズムを解明した。本研究成果を通して、産業用酵母菌株の発酵力を自在に改変するための「発酵デザイン技術」の確立につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：We revealed that TORC1, the master regulator of nutrient signaling in eukaryotic cells, plays significant roles in the control of alcoholic fermentation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. High TORC1 activity is associated with high fermentation performance in sake yeast strains of *S. cerevisiae*. TORC1 positively regulates fermentation via the harmonious control of a major fermentation inhibitor Rim15p protein kinase and amino acid homeostasis-related factors. Thus, TORC1 governs the crosstalk regulation between carbon and nitrogen metabolism in response to external nutrient environments.

研究分野：応用微生物学

キーワード：酵母 清酒酵母 アルコール発酵 TORシグナル TORC1 Rim15p アミノ酸ホメオスタシス 発酵デザイン

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

1. 研究開始当初の背景

清酒酵母は、分類学上は出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* に属する菌株群であるが、他の出芽酵母菌株と比べて、清酒もろみにおける顕著なアルコール発酵力を示す。研究代表者は、この原因を明らかにするために、代表的な清酒酵母菌株として知られるきょうかい7号 (K7) と実験室酵母 S288C (モデル生物として生命科学研究に広く用いられる菌株) の比較ゲノム解析 (引用文献) および比較トランスクリプトーム解析 (引用文献) を実施した。その結果、清酒酵母は、真核生物に広く保存された Greatwall プロテインキナーゼをコードする *RIM15* 遺伝子に機能欠失変異 (*rim15^{5055_5056insA}*) を有し、これが高発酵力の一因であることを明らかにした (引用文献)。Rim15p は、UDP-グルコース合成酵素 (Ugp1p) の遺伝子発現を誘導し、解糖系/アルコール発酵への代謝フラックスを低下させる、発酵の「ブレーキ」として機能することも見出した (引用文献)。

Rim15p は、真核生物における栄養シグナル伝達 (target-of-rapamycin (TOR) シグナル伝達) の鍵因子である TOR complex 1 (TORC1) により不活性化されることが報告されている (引用文献) したがって、酵母は、環境中の栄養分が豊富であることをモニターして TORC1 を活性化し、Rim15p という「ブレーキ」の解除によって解糖系/アルコール発酵を促進する、というモデルが考えられる (図1)。TORC1 と Rim15p の発酵調節における役割を解析することで、「酵母がどのように環境をモニターし、発酵力を調節しているのか」という、発酵調節メカニズムの全体像の解明につながると期待される。

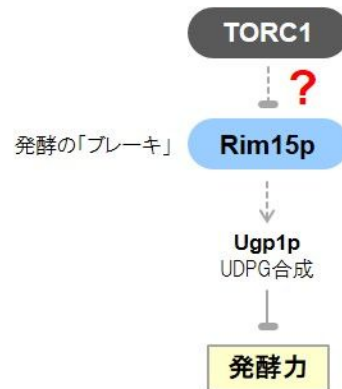


図1 TORC1 と Rim15p を介する発酵調節メカニズムのモデル

2. 研究の目的

そこで本研究課題では、TOR シグナル伝達経路とアルコール発酵の関係を解析すると共に、そこから得られた知見に基づいて産業酵母菌株の高発酵メカニズムの解明および発酵力改善に資する育種技術 (発酵デザイン技術) の開発を目指すことを目的とする。

3. 研究の方法

発酵試験については、特筆しない限り、20%グルコース含有 YPD 培地を用いて、30℃、静置培養により実施した。アルコール発酵に伴い発生する二酸化炭素をファーモグラフ II (アトー社製) により定量することで、発酵力を解析した。最少培地での発酵試験では、20%グルコース含有 SD 培地、または同培地の窒素源をグルタミン酸に変更した SD - N + Glu 培地を使用した。繰返し発酵試験では、20%グルコース含有 YPD 培地での発酵を7日間行った後、酵母菌体を集菌・洗浄し、新たに20%グルコース含有 YPD 培地を添加した。同様の操作を繰り返し、10 サイクル目での発酵力を測定した。高糖濃度での発酵試験では、40%グルコース含有 YPD 培地を使用した。Sch9p のリン酸化の解析は、過去の報告 (引用文献) を参考に実施した。メタボローム解析のための試料調製については、Human Metabolome Technologies 社のプロトコルに従って実施し、CE-QqQMS および CE-TOFMS による解析を同社に委託した。細胞内アミノ酸レベル解析では、集菌・洗浄した酵母菌体から熱水中でアミノ酸を抽出し、アミノ酸アナライザー JLC-500/V (日本電子社製) により各アミノ酸の定量を行った。

4. 研究成果

(1) TOR シグナルと発酵力の関係

TORC1 活性とアルコール発酵の関係を調べるために、TORC1 の主要な標的タンパク質である Sch9p の 737 番目のスレオニン残基のリン酸化を認識する抗体を用いたウェスタンブロットにより、発酵中の TOR シグナルを解析した (図2)。実験室酵母、清酒酵母のいずれにおいても、Sch9p のリン酸化は、発酵力が最も高い発酵初期においてのみ観察され、その後急激に減衰したが、発酵初期において清酒酵母は実験室酵



図2 発酵中の酵母における Sch9p のリン酸化

母と比べて顕著に高いリン酸化レベルを示した。この結果から、発酵力の高い清酒酵母が、発酵初期に高い TORC1 活性を有することが示唆された。

TORC1 活性の改変が発酵力に及ぼす影響を調べるために、実験室酵母に TORC1 を高機能化させる *TOR1^{L2134M}* または *TOR2^{L2138M}* 変異を導入し、発酵試験に供したところ、発酵初期の発酵力が有意に上昇することが示された(図 3A)。一方、TORC1 の阻害剤であるラパマイシンの添加や、TORC1 の上流活性化因子である Gtr1/2p の欠損は発酵力の低下をもたらした(図 3B)。さらに、実験室酵母の *RIM15* 遺伝子破壊株や、元々 Rim15p を欠損している清酒酵母では、TORC1 活性を変化させても発酵力への影響は認められなかった。以上の結果から、TORC1 活性は発酵力と連動しており、その効果を発揮する上で Rim15p が重要な役割を果たすと考察された。

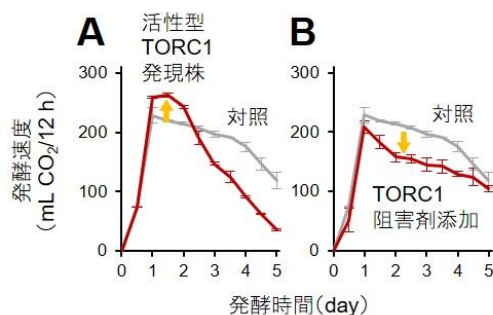


図 3 TORC1 が発酵力に及ぼす影響

(2) Rim15p を介した発酵調節メカニズム

近年の研究により、Rim15p が B55 δ 結合型プロテインフォスファターゼ 2A (PP2A^{B55 δ}) を不活性化することで細胞周期の調節に関与することが報告された(引用文献)。Rim15p による発酵調節に PP2A^{B55 δ} が関与するかどうかを調べたところ、まず、PP2A^{B55 δ} の調節サブユニットをコードする *CDC55* 遺伝子の破壊により発酵力が著しく低下することが見出された(図 4A)。さらに、実験室酵母の *RIM15* 遺伝子破壊株や、元々 Rim15p を欠損している清酒酵母においても、*CDC55* 遺伝子の破壊により発酵力が低下した(図 4B)。以上の結果から、PP2A^{B55 δ} が Rim15p の下流で働く発酵の「エンジン」として機能していることが示され、清酒酵母の高発酵力を生み出す原因であることが明らかとなった。上述の TORC1-Rim15p-PP2A^{B55 δ} 経路は、*S. cerevisiae* から系統的に遠い分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* においても同様に発酵力に関与していたことから、真核生物に保存された代謝調節メカニズムであることが示唆された。

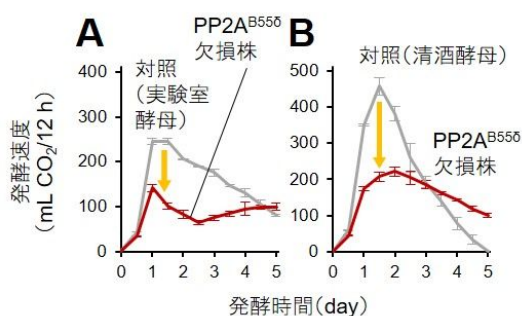


図 4 PP2A^{B55 δ} が発酵力に及ぼす影響

PP2A^{B55 δ} が解糖系 / アルコール発酵を制御する作用点を明らかにするために、発酵初期の実験室酵母における細胞内代謝産物に対する *CDC55* 遺伝子破壊の影響をメタボローム解析により調べた(図 5)。その結果、グルコース-6-リン酸 (G6P)、フルクトース-6-リン酸 (F6P) への影響は小さかったのに対し、フルクトース-1,6-ビスリン酸 (F1,6BP) の細胞内レベルは *CDC55* 遺伝子破壊によって低下した。このことから、PP2A^{B55 δ} が F6P から F1,6BP への変換を触媒するフォスホフルクトキナーゼ (PFK) の活性を正に制御している可能性が示唆された。PFK は、解糖系の律速段階の反応を担う鍵酵素として知られており、PP2A^{B55 δ} による直接的な脱リン酸化を介した活性調節の可能性を今後検証していく必要がある。

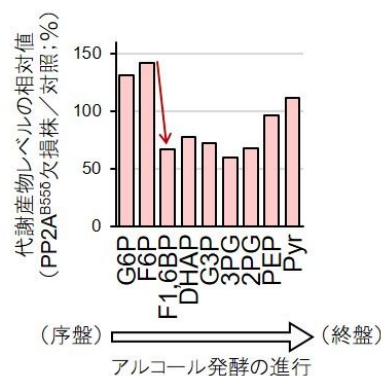


図 5 PP2A^{B55 δ} が解糖系中間代謝産物レベルに及ぼす影響

以上の (1)(2) により、酵母が細胞外の栄養状態をモニターして TORC1 を活性化し、発酵の「ブレーキ」である Rim15p を抑制することで、発酵の「エンジン」である PP2A^{B55 δ} が活性化されるという発酵調節メカニズムの全体像を理解するに至った(図 6)。Rim15p が欠損した清酒酵母では、PP2A^{B55 δ} が恒常的に活性化されることによって高発酵力が生み出されたのだらうと推察される。ここまでの研究成果を、次章〔雑誌論文〕のにて報告した。

(3) Rim15p 以外の TORC1 下流因子を介した発酵調節メカニズム

TORC1 は、Rim15p 以外にも多数の標的タンパク質を有している。Rim15p 以外の TORC1 下流因子が発酵力に及ぼす影響を明らかにするために、遺伝子破壊株を用いた発酵試験を実施したところ、アミノ酸合成関連遺伝子の発現を誘導する転写因子 Gcn4p の欠損が発酵力を高めることを見出した。さらに、アミノ酸を細胞内に取り込むトランスポーターの遺伝子発現を誘導する転写因子 Gln3p、Gat1p や、トランスポーターの細胞膜局在を正に制御する Npr1p プロテインキナーゼの欠損も発酵力を上昇させた。一方、リボソーム生成やタンパク質合成を司る転写因子 Sfp1p の欠損により発酵力は低下した。リボソームやタンパク質の合成が細胞内アミノ酸プールの消費につながることを考慮すると、TORC1 を介したアミノ酸ホメオスタシスの制御が発酵調節に関与する、という新たな可能性が示唆された。

発酵初期における細胞内アミノ酸レベルの測定の結果、清酒酵母は実験室酵母よりもアミノ酸レベルが低く、TORC1 を活性化する *TOR1^{L2134M}* 変異もアミノ酸レベルを低下させた。一方で、*RIM15* 遺伝子の破壊はアミノ酸レベルに影響を及ぼさなかった。また、代表的なアミノ酸トランスポーター Gap1p を強制的に細胞膜上に発現させ、最少培地上で発酵試験を行うと、窒素源がアンモニウムの場合には発酵力への影響は認められなかったが、窒素源がグルタミン酸の場合には顕著な発酵力の低下を示した。以上の結果を組み合わせると、TORC1 は、Rim15p とは独立した経路でアミノ酸ホメオスタシスの調節に関与しており、細胞内アミノ酸レベルの上昇が発酵力の低下につながるという知見を得ることができた(図7)。TORC1 は、Rim15p 以外に複数の発酵の「ブレーキ」(Gcn4p、Gln3p、Gat1p、Npr1p)の機能を抑制し、「アクセル」(Sfp1p)の機能を促進している。このような協調的な制御によって、発酵調節のマスターレギュレーターとしての役割を果たしていると考えられる。

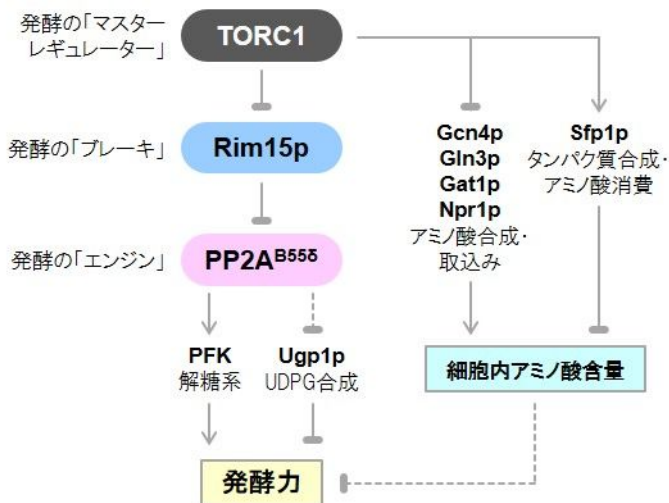


図6 本研究により明らかにされた TORC1 を介した発酵調節メカニズムの全体像

(4) 産業酵母菌株の発酵デザイン

本研究成果を応用して産業酵母菌株の高発酵メカニズムを明らかにするために、関連遺伝子上の変異を探索した結果、清酒酵母 K7 では、*RIM15* 遺伝子のフレームシフト変異 (*rim15^{5055_5056insA}*) に加え、*GCN4* 遺伝子のプロモーター上の欠失変異 (*gcn4^{-319_-317delTTA}*)、*GAT1* 遺伝子の ORF に終止コドンを生じさせる挿入変異 (*gat1^{72_73insTA}*) が見出された。このように、清酒酵母は、発酵の「ブレーキ」であると考えられる複数の因子を欠損することにより、相加的・相乗的に発酵力を高めていると推察される。また、焼酎酵母の鹿児島 2 号やワイン酵母 OC-2 においても、清酒酵母とは異なる部位に新規な *RIM15* 遺伝子の機能欠失変異が存在することが明らかとなり、高発酵力の原因解明に資することが期待される。

Rim15p は、ストレス応答にも必須であるため、極端にストレスの強い発酵環境では、Rim15p の欠損が酵母の生育・生存に悪影響を及ぼし発酵力の低下につながることもある。そこで、*RIM15* 遺伝子のプロモーターを改変することにより、発酵初期には *RIM15* 遺伝子の発現量が低く、ストレスが強まる発酵後期に発現が誘導される株を作出した。この株は、バイオエタノールの製造で見られるような繰返し発酵や高糖濃度での発酵において高い発酵力を維持できることが判り、次章〔雑誌論文〕にて報告した。同様に、菌株や発酵条件の違いに応じて適切な遺伝子を改変し発酵力を最適化する「発酵デザイン技術」を確立することができれば、発酵産業における育種・選抜の効率を飛躍的に改善することが可能となるだろう。

〔引用文献〕

- Akao T *et al.*, *DNA Res* **18**: 423-434 (2011).
Watanabe D *et al.*, *Appl Environ Microbiol* **77**: 934-941 (2011).
Watanabe D *et al.*, *Appl Environ Microbiol* **78**: 4008-4016 (2012).
Watanabe D *et al.*, *Appl Environ Microbiol* **82**: 340-351 (2016).
Pedruzzi I *et al.*, *Mol Cell* **12**: 1607-1613 (2003).
Takahara T and Maeda T, *Mol Cell* **47**: 242-252 (2012).
Moreno-Torres M *et al.*, *Nat Commun* **6**: 8256 (2015).

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 14 件)

Watanabe D, Kajihara T, Sugimoto Y, Takagi K, Mizuno M, Zhou Y, Chen J, Takeda K, Tatebe H, Shiozaki K, Nakazawa N, Izawa S, Akao T, Shimoi H, Maeda T, Takagi H, Nutrient signaling via the TORC1-Greatwall-PP2A^{B55δ} pathway is responsible for the high initial rates of alcoholic fermentation in sake yeast strains of *Saccharomyces cerevisiae*, *Appl Environ Microbiol* **85(1)**: e02083-18 (2019). DOI: 10.1128/AEM.02083-18. 査読有

Watanabe D, Takagi H, Pleiotropic functions of the yeast Greatwall-family protein kinase Rim15p: a novel target for the control of alcoholic fermentation, *Biosci Biotechnol Biochem* **81(6)**:1061-1068 (2017). DOI: 10.1080/09168451.2017.1295805. 査読有

渡辺 大輔, 高木 博史, お酒をつくる酵母 - ゲノムから解き明かす醸造特性のひみつ, 生命の科学 遺伝 **71(3)**: 206-212 (2017). 査読有

Watanabe D, Kaneko A, Sugimoto Y, Ohnuki S, Takagi H, Ohya Y, Promoter engineering of the *Saccharomyces cerevisiae* RIM15 gene for improvement of alcoholic fermentation rates under stress conditions, *J Biosci Bioeng* **123(2)**: 183-189 (2017). DOI: 10.1016/j.jbiosc.2016.08.004. 査読有

渡辺 大輔, 高木 博史, ここまでわかった! きょうかい酵母(清酒用)の高発酵力を生み出す RIM15 変異遺伝子, 日本醸造協会誌 **111(10)**: 638-647 (2016). 査読有

〔学会発表〕(計 42 件)

渡辺 大輔, 高木 博史, 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?, 第70回日本生物工学会 大会シンポジウム (2018). 招待講演

渡辺 大輔, 清酒酵母の高発酵力に関する研究, 平成 29 年度日本醸造学会大会 技術賞受賞記念講演 (2017). 招待講演

Watanabe D *et al.*, Mechanism of high alcoholic fermentation performance of sake yeast *Saccharomyces cerevisiae*, The 14th International Congress on Yeasts (ICY14) (2016). 国際学会

渡辺 大輔, 新しい酵母の創生による発酵生産性・品質の向上を目指して, イノベーション・ジャパン 2016 (2016). 招待講演

渡辺 大輔, 酵母における環境応答と代謝調節に関する分子遺伝学的研究とその応用, 日本農芸化学会関西支部第 495 回講演会 ミニシンポジウム (2016). 招待講演

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕(計 0 件)

〔その他〕(計 0 件)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。