

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：35403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05790

研究課題名(和文) 史上最高の高温耐性野生酵母から解き明かす超高温ストレス耐性機構と発酵生産への利用

研究課題名(英文) Elucidation of mechanisms for high-temperature resistance of super thermotolerant wild yeasts and its application to fermentation biotechnology

研究代表者

杉山 峰崇 (SUGIYAMA, Minetaka)

広島工業大学・生命学部・教授

研究者番号：80379130

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：自然界から単離された出芽酵母*Saccharomyces cerevisiae*の野生株の中で史上最高の高温ストレス耐性を示す株を用いた解析から、リボソーム生成関連転写因子やアミノ酸生成関連転写因子の高発現を通じた、リボソーム生成や細胞周期、抗酸化遺伝子群の発現の促進が出芽酵母で優れた高温ストレス耐性を獲得するために重要であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年の地球温暖化問題によって、発酵生産に使用する微生物の高温耐性化が急務となっている。本研究では、発酵生産において中心的な役割を果たす出芽酵母の高温適応機構の一端を明らかにし、高温条件下でのバイオエタノールや乳酸の高生産化に成功したことから、SDGsの達成に重要となる発酵生産の効率化に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：To study the thermotolerant mechanism of yeast for biotechnological applications, a *Saccharomyces cerevisiae* wild strain isolated from nature, which shows an excellent thermotolerance at up to 42 °C, was analyzed. Results showed that enhanced ribosome biogenesis, robust cell cycle machinery and up-regulated expression of anti-oxidant genes based on the higher induction of SFP1 and GCN4 genes involved in ribosome biogenesis and amino acid metabolism, respectively, played important roles to confer superior thermotolerance on the yeast. Since thermotolerance of yeast is one of the most important characters for cost-effective fermentative production in tropical countries where biomass energy is much abundant, these findings will contribute to the improvement of microbial production that can help to achieve SDGs.

研究分野：応用微生物学

キーワード：出芽酵母 高温耐性 バイオエタノール 発酵生産

## 1. 研究開始当初の背景

近年の地球温暖化・異常高温化問題によって、増大する発酵時の冷却コストや急激な温度上昇による生産収率の不安定化を受けて、世界中で発酵生産微生物の高温ストレス耐性化が急務となっている。バイオマスが豊富なタイやインドネシアでは発酵温度が $\sim 45^{\circ}\text{C}$ になることもあり従来の生産株では対応できないことから大きな問題となっている。発酵産業で多用される出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の一般的な生育限界温度は $40^{\circ}\text{C}$ であり、 $35^{\circ}\text{C}$ 以上から増殖や発酵に大きな影響を受けるが、高温ストレス耐性形質の分子基盤は多数の遺伝子が寄与する量的形質であることからその全体像は驚くほどよく理解されていない<sup>1)</sup>。また、高いストレス耐性を示すことから産業利用が期待されており酵母種全体の中でも最も高い高温耐性を示す出芽酵母 *Pichia kudriavzevii* と *Ogataea polymorpha* に至ってはその驚異的な高温耐性機構は全く明らかとなっていないかった。

## 2. 研究の目的

そこで、本研究では自然界から単離された野生酵母 *S. cerevisiae* の中で史上最も高い高温耐性 ( $42^{\circ}\text{C}$ ) を示す野生株 SPY3 に加えて、高いストレス耐性と発酵能力を示すことから産業利用が期待されており酵母種全体の中でも高い高温耐性を示す *P. kudriavzevii* N77-4 と *O. polymorpha* NCYC495 を用いて、全く未解明であるその優れた高温耐性の分子メカニズムの一端を明らかにすることを進めた。そして、真核細胞に隠された新規のストレス適応メカニズムを明らかにすると同時に、両酵母を用いて高温条件下でバイオエタノールや基幹化合物である乳酸の高生産化を目指した。

## 3. 研究の方法

(1) 高温ストレス条件下でマイクロアレイ解析および RNA-seq 解析を行い、遺伝子発現プロファイルを取得した。そして、特徴的な発現を示す遺伝子を RT-PCR 解析により抽出し、遺伝子機能を推定すると同時に、遺伝子破壊や過剰発現、遺伝子産物の細胞内局在、活性酸素種 (ROS) 蓄積への影響、細胞周期の進行などを解析して、高温ストレス適応機構を解析した。

(2) ドラフトゲノム解析については、大学共同利用機関法人 情報・システム研究機構データサイエンス共同利用基盤施設 ゲノムデータ解析支援センターの協力を得て、イルミナ社の MiSeq やパシフィックバイオサイエンス社の PacBio を用いて解析を進めた。

## 4. 研究成果

### (1) *S. cerevisiae* SPY3 の高温ストレス耐性機構とバイオエタノール生産

マイクロアレイ解析から SPY3 ではリボソーム生合成関連の転写因子をコードする *SFP1* が高発現していることを見出した。この高発現には、アミノ酸生合成関連の転写因子をコードする *GCN4* が重要であることや *SFP1* のプロモーターに *Gcn4* 結合配列様の配列を見出し、*GCN4* も SPY3 で高発現していたことなどから、*GCN4* の高発現を介した *SFP1* の高発現という発現誘導経路が SPY3 の優れた高温耐性獲得に重要であることを明らかにした。SPY3 の高温耐性に寄与することが明らかとなった転写因子 Sfp1 は高温条件下で、高温感受性株よりも SPY3 の方で核局在率が顕著に高く、この転写因子によって制御を受ける下流遺伝子の発現が高温耐性獲得に寄与していることが強く示唆された (図1)。

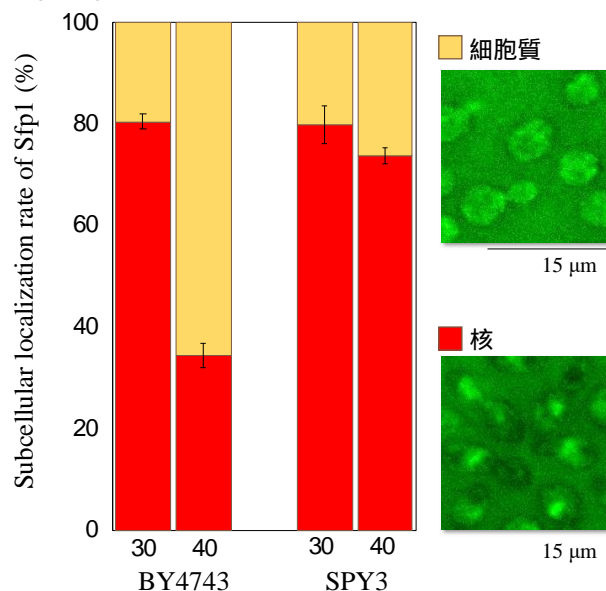


図1. 高温条件下における Sfp1 の細胞内局在  
高温感受性株 (BY4742) と高温耐性株 (SPY3) における Sfp1-GFP の細胞内局在を解析した。

そこで、この転写因子の推定結合DNAモチーフを用いて発現制御を受けると予想される下流遺伝子の抽出を行い、リボソーム生合成関連以外で抽出された下流遺伝子の発現レベルを解析した。その結果、高温条件下でこの転写因子依存的に高発現する細胞周期関連の遺伝子を1つ見出した。そしてこの遺伝子破壊株を作成したところ、高温条件下で顕著にSPY3の高温耐性能力が低下したことから、この遺伝子が細胞周期の制御を通じて優れた高温耐性の獲得に重要であることを明らかにした。一方で、SPY3で高発現しているアミノ酸生合成関連の転写因子Gcn4が高温条件下で増大するROSを除去するための抗酸化酵素遺伝子群の発現を正に制御していることを見出し、それにより高温条件下でもSPY3ではROSストレスが低く抑えられていることを明らかにした。加えて、遺伝子発現プロファイル解析から、SPY3の高温耐性と関連が高いとして抽出された高発現遺伝子群のうち、エルゴステロール合成酵素遺伝子群の律速段階となる幾つかの遺伝子に対して遺伝子破壊を行いSPY3の高温耐性を解析した。その結果、いくつかのエルゴステロール合成酵素遺伝子の破壊によって高温感受性を示すようになった。さらに、SPY3ではエルゴステロール合成酵素遺伝子群の転写因子も高発現していることを見出し、この転写因子によるエルゴステロール合成酵素遺伝子群の高発現を通じたエルゴステロール合成能力の向上が高温耐性獲得に重要となる結果を得た。したがって、リボソーム生合成関連転写因子とアミノ酸生合成関連転写因子の高発現を通じた、リボソーム生合成や細胞周期、抗酸化遺伝子群の発現促進が優れた高温耐性を獲得するために重要であることが明らかとなった。また、高温条件下では細胞膜の流動性が上昇し膜機能に障害が起こるが、エルゴステロール合成関連の転写因子の高発現を通じて合成されたエルゴステロールが細胞膜の流動性上昇を抑え、高温耐性化獲得に重要な働きをすることも示唆された。SPY3の特徴的な高温耐性能力をゲノム配列から調べるために、SPY3ゲノムのde novo解析を行った。その結果、SPY3において計5,643遺伝子を見つけ、そのうち機能不明の44個は他種生物の遺伝子と高い相同性を示すことがわかり、SPY3が非常に特異なゲノム構成を持つこと、これらの他種生物相同遺伝子がSPY3の優れた高温耐性能力に関与している可能性を見出した。SPY3を用いた高温条件下でのバイオエタノール生産について検討したところ、41.5°Cの高温条件下で好気条件でも嫌気条件でも対糖収率ほぼ100%でエタノールを生産させることに成功した。これらのことから、バイオマスが豊富な熱帯地域で従来よりも冷却コストを削減した条件下でバイオエタノールを効率よく生産させることが可能になると期待される。

## (2) *P. kudriavzevii* N77-4 の高温ストレス耐性機構

44°Cまでの優れた高温耐性を示すN77-4の高温ストレス耐性には、新規に見出したZnフィンガータンパク質であるPkZfp1が重要な役割を果たしており、高温ストレスによって生じる細胞内ROSの増大を防ぐ効果を持つことを明らかにした。このPkZfp1は、高温ストレス条件下で生じるROSストレスを除去する酵素遺伝子SOD<sup>2)</sup>の転写誘導を行う可能性を見出した。しかし、*P. kudriavzevii*においてSOD遺伝子は報告されていないことから、N77-4のドラフトゲノム解析を進めた。その結果、2つのPkSOD遺伝子 (*PkSOD1*と*PkSOD2*) を初めて見出し、両遺伝子破壊株を構築したところ、高温条件下でROSが顕著に蓄積し増殖速度も低下した。さらに、高温やエタノールストレス条件下では、*PkSOD*が発現誘導を受けることも見出したことから、N77-4はPkSodを通じてROSストレスに適応していることを明らかにした。また、2つのPkSodのうちPkSod2がミトコンドリアに局在し(図2)破壊実験からミトコンドリア局在のPkSod2はバイオエタノール生産や醸造などに必要となる嫌気条件下でも発酵生産能力を最大限発揮するために必須であることを明らかにした。したがって、PkSod2の機能改良を通じた*P. kudriavzevii*による高温条件下でのバイオエタノール生産や醸造発酵の改良の可能性が示唆された。

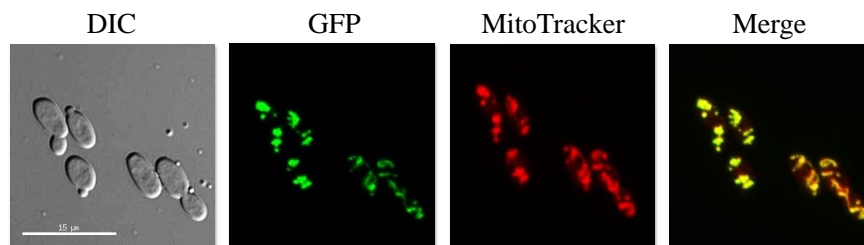


図2. PkSod2の細胞内局在  
N77-4におけるPkSod2-GFPの細胞内局在を解析した。

## (3) *O. polymorpha* NCYC495 の高温ストレス耐性機構と乳酸生産

NCYC495のRNA-seq解析を行ったところ、*S. cerevisiae*の抗酸化遺伝子であるSODやカタラーゼをコードする*CTT*遺伝子に相同性を示す遺伝子が高度に発現誘導を受けられることを見出し、その発現によってROSの蓄積レベルが低下することも見出した。さらに、*S. cerevisiae*において細胞壁に局在すると推定される糖タンパク質をコードする*SP11*と相同性の高い遺伝子が非常に強く発現していることを見出した。*S. cerevisiae*におけるSpi1は酸ストレス等の細胞壁ストレス耐性に関与していることが知られている<sup>3)</sup>。そこで、この相同遺伝子である*OpSP11*を破壊したところ、

NCYC495の高温耐性が顕著に低下した。したがって、*O. polymorpha*には、高温条件下で抗酸化遺伝子群や細胞壁ストレス適応遺伝子を誘導する機構が存在し、それらを介した防御機構がその優れた高温耐性獲得に重要であるということを明らかにした。高温条件下でポリ乳酸プラスチックの原料である乳酸を効率よく発酵生産させるために、NCYC495に乳酸脱水素酵素遺伝子を導入した。その結果、45°Cの高温条件下でもL-乳酸とD-乳酸をそれぞれ対糖収率97%と85%で生産させることに成功した。さらに、キシロースを炭素源とした高温条件下でも、対糖収率60%でL-乳酸を生産させることに成功した(図3)。本研究から、酵母の高温耐性獲得メカニズムの一端が明らかとなり、本成果は、発酵生産の効率化を通じてSDGsの達成に貢献することが期待される。

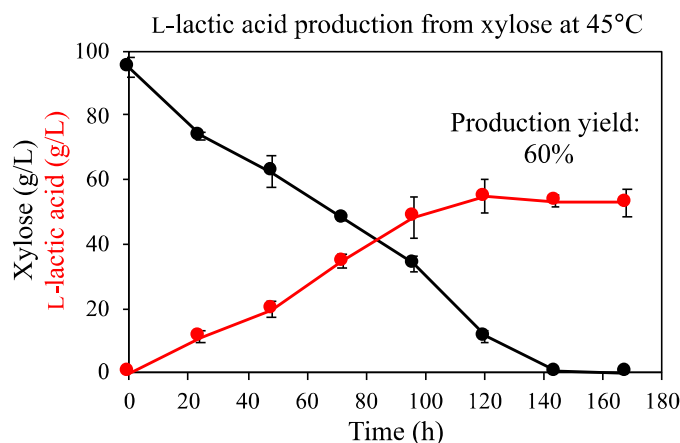


図3. 高温条件下でのキシロースからのL-乳酸生産  
L-乳酸脱水素酵素遺伝子をNCYC495に導入し、キシロースからのL-乳酸生産を解析した。

< 引用文献 >

- 1) Benjaphokee, S., Koedrith, P., Auesukaree, C., Asvarak, T., Sugiyama, M., Kaneko, Y., Boonchird, C., Harashima, S.: *CDC19* encoding pyruvate kinase is important for high-temperature tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *NewBiotechnology*, 29(2):166-176 (2012).
- 2) Chang, E. C., Crawford, B. F., Hong, Z., Bilinski, T., Kosman, D. J.: Genetic and biochemical characterization of Cu,Zn superoxide dismutase mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 266(7): 4417-4424 (1991).
- 3) Simões, T., Mira, N. P., Fernandes, A. R., Sá-Correia, I.: The *SPII* gene, encoding a glycosylphosphatidylinositol-anchored cell wall protein, plays a prominent role in the development of yeast resistance to lipophilic weak-acid food preservatives. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(11): 7168-7175 (2006).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 松下 青葉、大西 真駿、岡本 浩二、宮澤 秀幸、野口 英樹、MOON Ji-Young、KIM So-Young、YEO Soo-Hwan、杉山 峰崇
2. 発表標題 酵母 <i>Pichia kudriavzevii</i> N77-4におけるPks0D1とPks0D2の同定と機能解析
3. 学会等名 日本分子生物学会第43回年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 磯崎 日奈子、澤田 俊、工藤 大喜、宮澤 秀幸、野口 英樹、DEVANADERA Allan、PAIT Ivy Grace、PAJARES Irene、NAYVE JR. Fidel Rey P.、杉山 峰崇
2. 発表標題 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> SPY3の高温ストレス適応機構
3. 学会等名 日本分子生物学会第43回年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 磯崎日奈子、山崎真澄、澤田 俊、工藤大喜、Allan Devanadera、Ivy Grace Pait、Irene Pajares、Fidel Rey P. Nayve Jr.、杉山峰崇
2. 発表標題 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> SPY3の高温ストレス適応機構
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Isozaki, H., Yamazaki, M., Sawada, S., Kudo, D., Devanadera, A., Pait, I.G., Pajares, P., Fidel Rey P. Nayve Jr., F.R.P., Sugiyama, M.
2. 発表標題 Mechanism of Adaptation to high temperature stress in super thermotolerant <i>Saccharomyces cerevisiae</i> SPY3
3. 学会等名 The 35th International Specialized Symposium on Yeasts (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 磯崎日奈子、山崎真澄、澤田 俊、工藤大喜、Allan Devanadera、Ivy Grace Pait、Irene Pajares、Fidel Rey P. Nayve Jr.、杉山峰崇
2. 発表標題 Saccharomyces cerevisiae SPY3の高温ストレス適応機構
3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 磯崎日奈子、山崎真澄、澤田俊、工藤大喜、Allan Devanadera、Ivy Grace Pait、Irene Pajares、Fidel Rey P. Nayve Jr.、杉山峰崇	4. 発行年 2019年
2. 出版社 公益社団法人 日本生物工学会	5. 総ページ数 69
3. 書名 第71 回日本生物工学会大会講演トピックス集	

〔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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
フィリピン	フィリピン大学ロスバニョス校	BIOTECH	
韓国	NIAS, RDA		