

第15回 NAIST 産学連携フォーラム



# 酵母の新しい ストレス耐性機構の解析とその応用

2007年2月26日

バイオサイエンス研究科  
細胞機能学講座  
高木 博史

## 細胞機能学講座

教授: 高木 博史  
(味の素 → 福井県立大学)

助教授: 桂樹 徹

助手: 小野寺 慶子、吉田 信行

博士研究員3名、博士後期学生4名  
博士前期学生12名、特別研究学生3名

微生物細胞

応用分子微生物学  
(Applied Molecular Microbiology)

## 微生物のバイオサイエンス

スクリーニング  
(自然分離、変異処理)



ゲノム情報

## 微生物機能の解析と改変

遺伝子工学



タンパク質工学

代謝工学

細胞工学

## 有用な微生物育種、物質生産、技術開発

食糧



環境

生命

エネルギー

## ニューバイオインダストリーの創製

## 細胞機能学講座(高木研究室)

### 1) 有用微生物の機能解析と分子育種

- ① 酵母のストレス耐性機構の解明と産業酵母の分子育種(高木)
- ② システインの代謝調節機構の解明と生産菌の分子育種(高木)

### 2) 微生物有用酵素の機能改変

- ① プロテアーゼのフォールディング機構の解明と機能改変(高木)
- ② アマドリ化合物分解酵素の糖尿病臨床診断への利用(吉田)

### 3) 微生物機能の活用(微生物による化合物変換、環境保全・浄化)

- ① 光学活性物質の生産(小野寺)、パーム油の有効利用(桂樹)
- ② 備蓄原油に存在する微生物の分子遺伝学的解析と利用(吉田)

### 4) 微生物スクリーニングシステムの構築と応用

- セルソーターによるアスタキサンチン生産株の改良・育種(桂樹)

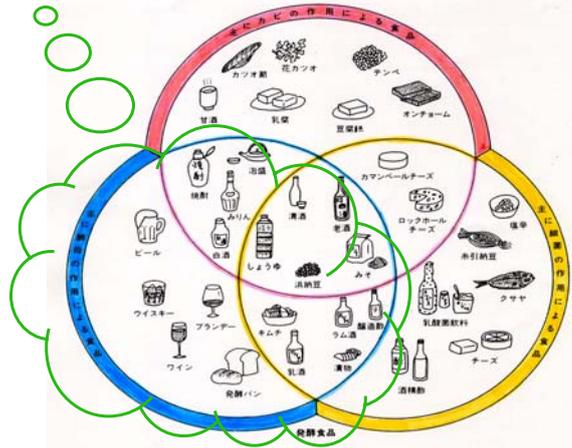
# 酵母 *Saccharomyces cerevisiae*

## <実験室酵母>

高等生物のモデルなど基礎研究に使用

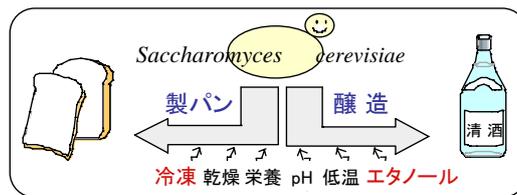
## <産業酵母>

酒類、パン類、発酵食品などの製造に使用 → **8兆円産業の主役**

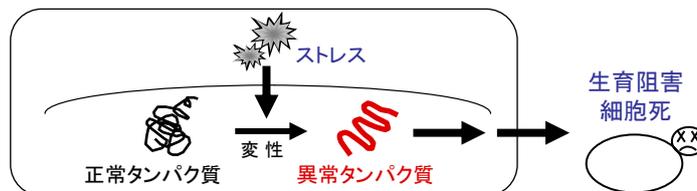


## 産業酵母の問題点

酵母の発酵環境は過酷なストレス



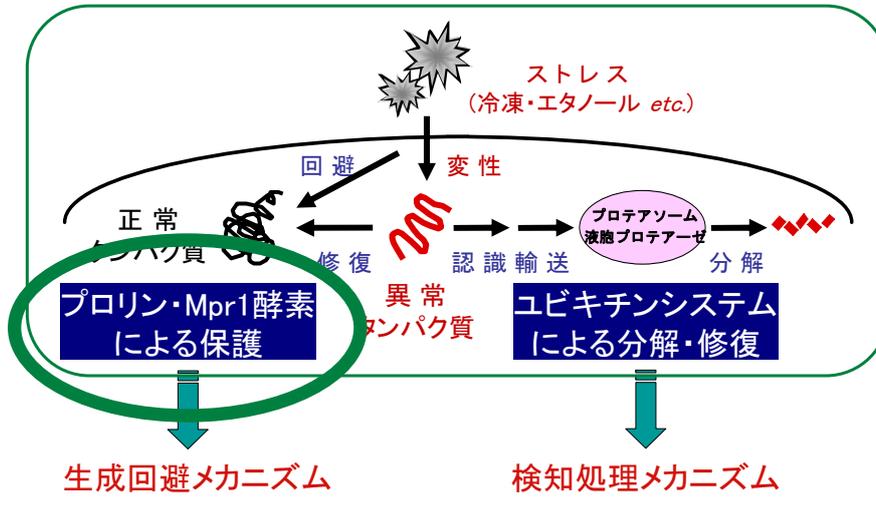
ストレスによって、細胞内タンパク質が変性、**異常タンパク質**として蓄積



**酵母の有用機能が制限、発酵生産力に限界**

# 私たちが取り組む研究

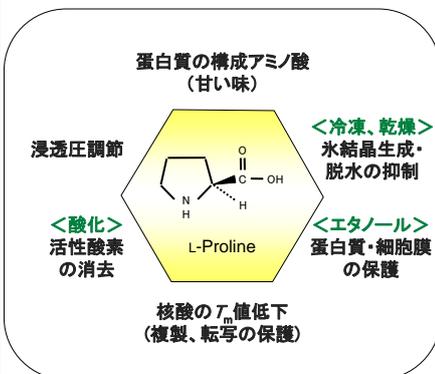
## 酵母の新しいストレス耐性機構 !!



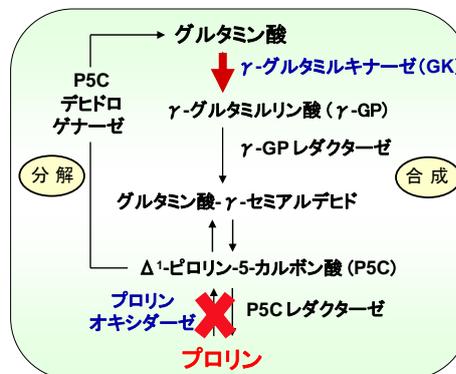
### ① プロリン

<植物、細菌> 乾燥や塩ストレスに応答し、浸透圧調節物質として機能  
 <酵母> 生理機能や代謝調節機構は不明な点が多い

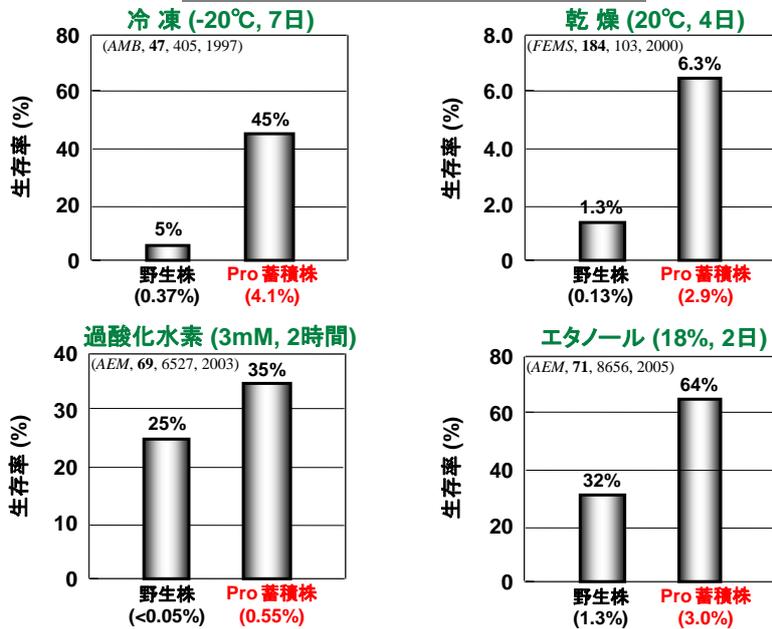
#### プロリンの生理機能



#### プロリンの代謝調節機構



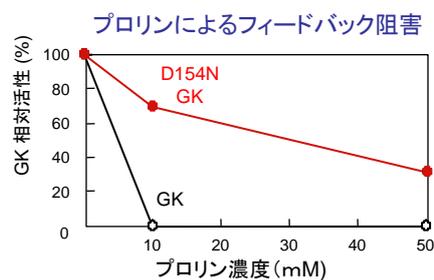
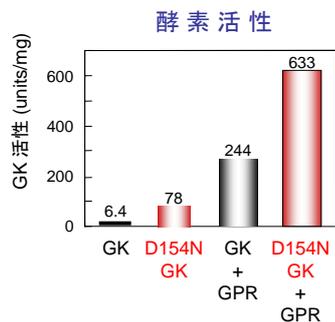
## プロリンの細胞保護効果



## プロリンの過剰合成機構



プロリン蓄積変異株の解析  $\rightarrow$  GK遺伝子に変異 (Asp154Asn)



### 酵母の $\gamma$ -グルタミルキナーゼ(GK)

- ・GPR存在下で活性が発現
- ・プロリンによるフィードバック阻害

$\Rightarrow$  プロリン合成量を制御

### Asp154Asn変異型GK

- ・フィードバック阻害感受性の低下!!
- ・触媒活性、熱安定性の向上!!

$\Rightarrow$  プロリンの過剰合成!!

## GKの高機能化

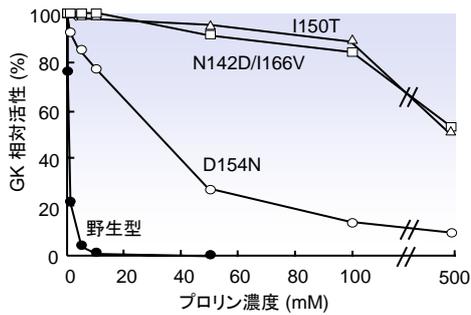


## プロリン合成能の向上

GK遺伝子へのランダム変異導入 → 酵母に導入 → D154N-GK導入株よりもプロリンを蓄積する菌株を取得

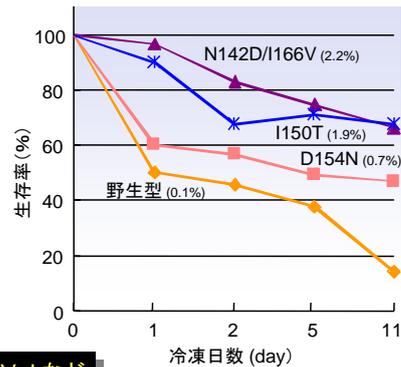
### <変異型 GK>

フィードバック阻害非感受性 → プロリンの過剰合成



### <変異型 GK 発現酵母>

プロリン増加に伴い、冷凍ストレス耐性が向上

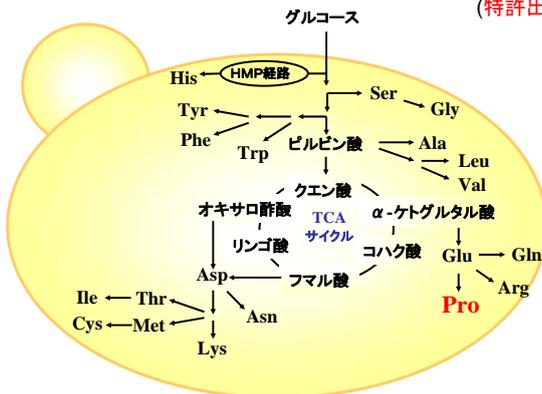


<変異型 GK> Ile150Thr, Asn142Asp/Ile166Val など  
→ プロリン合成能(冷凍ストレス耐性)が向上

(特許出願 2005-246916)

## 清酒酵母の育種への応用

(特許出願 2004-251466; AEM, 71, 8656, 2005)

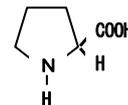


### 清酒の味

アミノ酸、有機酸の組成に大きな影響を受ける

### 味の多様化

アミノ酸の組成や生成量に特徴をもつ酵母の育種が重要



### プロリン

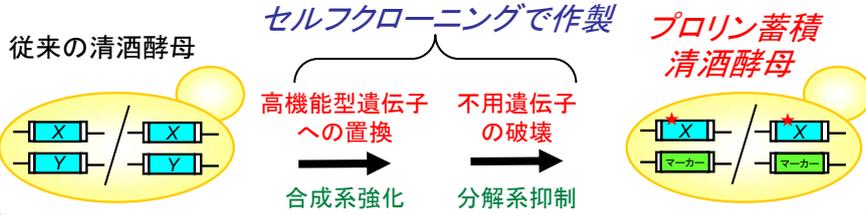
・エタノールストレスから酵母を保護  
・呈味的に「甘い」アミノ酸

### 清酒の製造環境

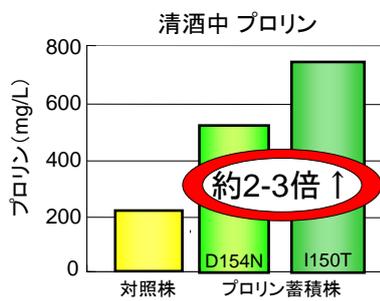
酵母は、エタノール、低温、浸透圧、偏栄養などのストレスを受ける

有用機能が制限

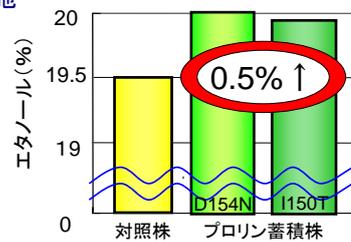
# 実用化可能な清酒酵母の開発



プロリン蓄積株を作製、清酒小仕込試験を実施



19日目のエタノール生産量



- ・醸造期間の短縮？
- ・高濃度アルコールの生産？

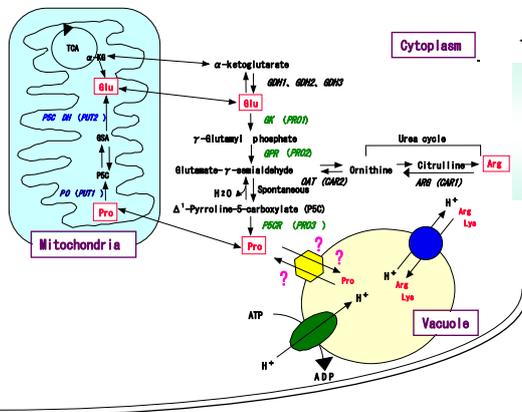
## ① プロリン

<これまでの成果>

*Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **47**, 405, 1997; *FEMS Microbiol. Lett.*, **184**, 103, 2000; *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 212, 2003; **69**, 6527, 2003; **71**, 8656, 2005; *J. Biosci. Bioeng.*, **94**, 2002; **100**, 538, 2005 etc.

★ プロリンにストレスからの細胞保護機能を発見  
異常タンパク質の生成を回避？

★ プロリンの蓄積とストレス耐性(冷凍、エタノール、酸化)の向上に成功  
合成系の強化(プロリン蓄積変異株) + 分解系の遮断



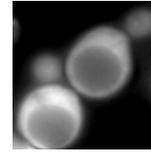
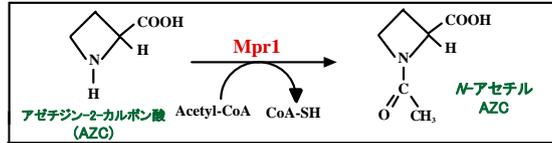
<今後の方針>

- ・プロリンの生理機能の解明
- ・プロリンの代謝調節機構の解明
- ・ $\gamma$ -グルタミルキナーゼの高機能化

プロリン蓄積酵母の作製  
ストレス耐性能力の評価

## ② 新規アセチル化酵素 Mpr1

プロリンアナログ AZC の解毒酵素  
(*sigma 1278b genes for proline-analogue resistance*)



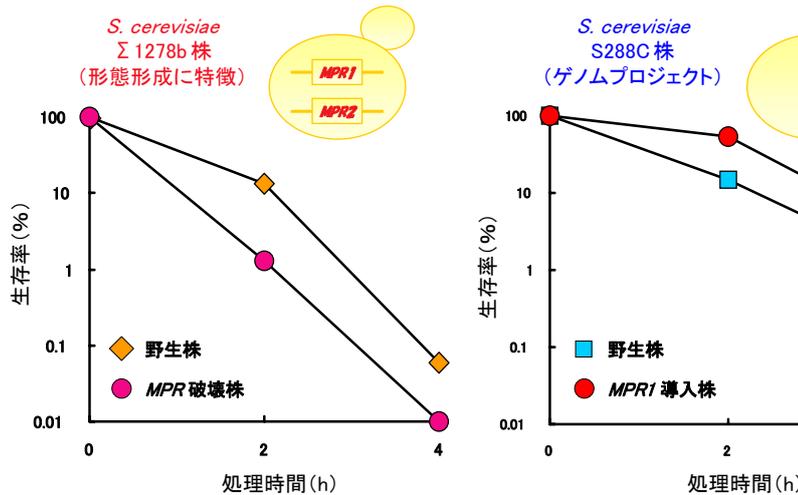
*J. Bacteriol.*, **182**, 4249, 2000; *J. Biol. Chem.*, **276**, 41998, 2001;  
*Yeast*, **19**, 1437, 2002; *J. Biochem.*, **133**, 67, 2003 etc.

	10	20	30	40	50	60
MPR1	MDAESIEWKLTANLRNGP	TFQPLAD	SIEPLQFKLIGSD	TVATAFPV	FDTKYIP	DSLINY
ppr1	-----	-----	MKDPNTI	PPWRC	TDNACI	AVDKSTNVKNKEELLST
Spa MPR1	MDAECIEWKSTANLHNGPA	FFQPLT	DSIEPLQFKLIGS	NLATAFPV	FDTKYIP	DSLINY
	70	80	90	100	110	
MPR1	LFKLFNLEIESGK	TYPQLHSLTK	QGFNLNWFH	SAVVVLQ	TDEK-----	FIQDNQDWN
ppr1	LTYFINYBIEMG	QTYPIDIKM	TRNEAED	FFPKFCTV	ICVPVE	SETSPAPDLATASIDWKT
Spa MPR1	VFSLFNMEIESG	KTYPQLDVL	TKQEF	LKYWFH	SAVIVLQ	TDKK-----YIEDNQDWH
	120	130	140	150	160	170
MPR1	VLLGTFYIKPNY	APRCSHNC	NAGFLVNG	AHRGQK	VGYRLAQ	VYLNWAPLLGKYISIFNLV
ppr1	SLLGAFYIKPNY	PGRCSHIC	NGGFLV	SPSHRS	KGIGRNL	ANAYLYFAPRIGFKSSVFNLV
Spa MPR1	VLLGTFYIKPNY	APRCSHNC	NAGFLVNS	TRHGQK	IGYRLAQ	VYLNWAPLLGKYISIFNLV
	180	190	200	210	220	
	***	*	*	****	*	*

なぜ、酵母には Mpr1 が存在するのか？

\*N-acetyltransferase スーパーファミリーのモチーフに保存されている残基

## 熱ショック処理後の細胞生存率

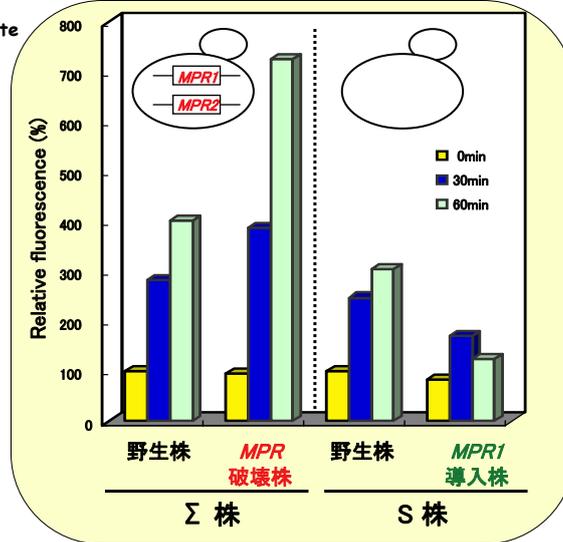
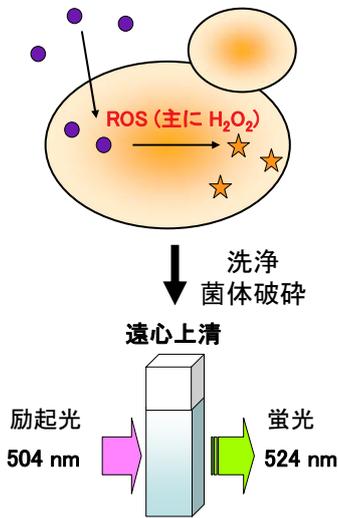


Mpr1 は酸化ストレスから酵母を防御する

(M. Nomura and H. Takagi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 12616, 2004)

## 熱ショック処理後の細胞内の活性酸素種 (ROS) レベル

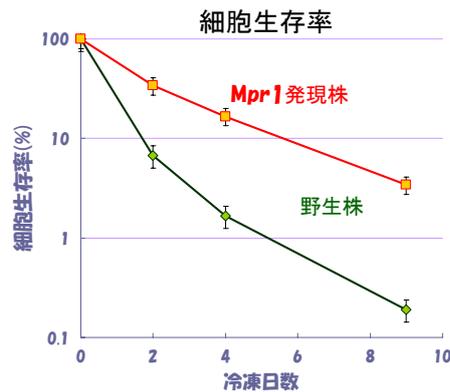
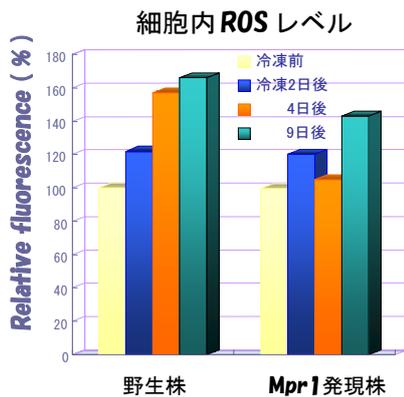
<酸化プローブ>  
2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA)



**Mpr1 は細胞内 ROS レベルを減少させる**

## 冷凍ストレスにおける Mpr1 の機能解析

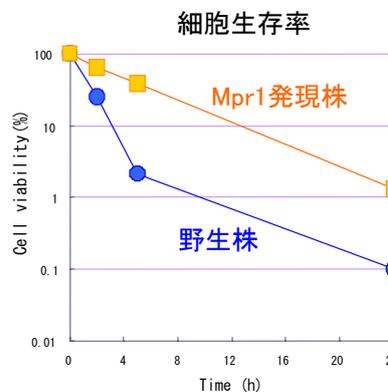
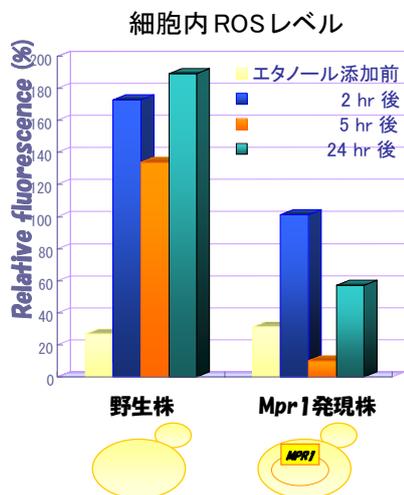
(X. Du and H. Takagi, *J. Biochem.*, **138**, 391-397, 2005)



**冷凍ストレスにおける Mpr1**

- ・ROSを減少させる
- ・細胞保護作用あり
- ・プロリンとの相乗効果もあり!!

## エタノールストレスにおける Mpr1 の機能解析



### エタノールストレスにおける Mpr1

- ・ROS を減少させる
- ・細胞保護作用あり

## Mpr1 の高機能化

## 抗酸化能の向上

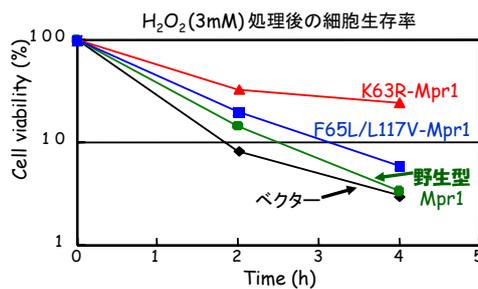
Mpr1 遺伝子へのランダム変異導入  
(変異ライブラリーの構築)

↓

酵母 (Mpr1 非存在株) に導入

↓

野生型 Mpr1 発現株よりも  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 耐性を示す菌株を取得

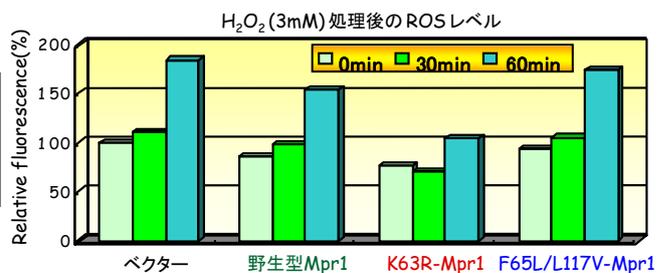


<変異型 Mpr1>

- ・Lys63Arg
- ・Phe65Leu/Leu117Val

→ 抗酸化能が向上

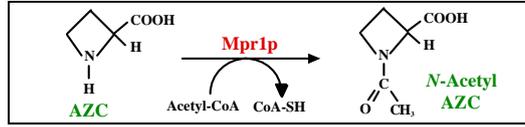
(特許出願 2006-194365)



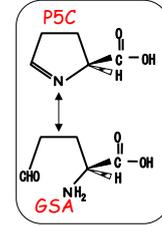
## ② 新規アセチル化酵素 Mpr1

<これまでの成果>

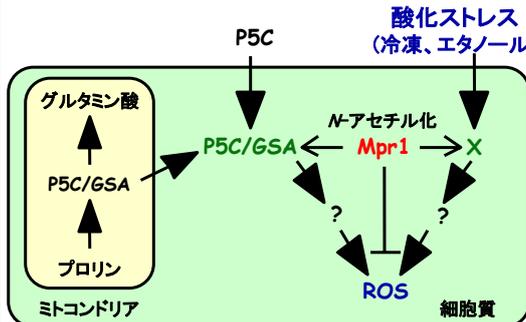
★ プロリンアナログ AZC を解毒する新規の N-アセチルトランスフェラーゼ



*J. Bacteriol.*, **182**, 4249, 2000; *J. Biol. Chem.*, **276**, 41998, 2001 etc.



★ 細胞内の活性酸素種 (ROS) を制御し、酸化 (冷凍、エタノール) ストレスから保護



*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 12616, 2004; *J. Biochem.*, **138**, 391, 2005

<今後の方針>

- ・生理機能の解明 (細胞内基質の同定)
- ・立体構造の解明
- ・高機能化 (触媒活性・安定性の向上)

高機能 Mpr1 発現酵母の作製  
酸化ストレス耐性能力の評価

## バイオインダストリーへの貢献

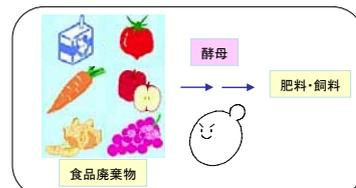
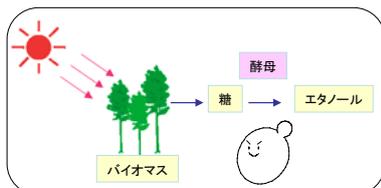
ストレス耐性産業酵母 → 新規発酵生産系

### <酵母利用産業の発展>

- ① 発酵生産性の改善と向上  
酒類、冷凍パン生地などの効率的生産  
→ 省エネ、省コスト、低環境負荷
- ② 高付加価値食品の開発  
代謝産物プロファイルの改変  
→ 味・香り・栄養価などの向上

### <酵母機能を活用した新産業の創出>

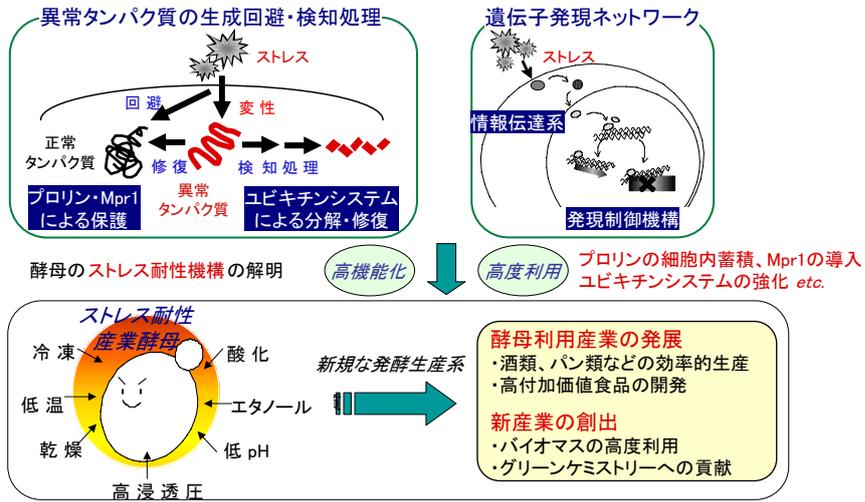
- ① バイオエタノールの生産  
エタノール生産能の強化
- ② グリーンケミストリー  
食品廃棄物などの効率的処理



(独) 農業・食品産業技術総合研究機構 生物系特定産業技術研究支援センター(生研センター)  
 「新技術・新分野創出のための基礎研究推進事業」(H16-20度)

## 酵母の発酵環境ストレス適応機構の解明と 新規な発酵生産系開発への基盤研究

○ 高木 博史(奈良先端大)  
 島 純(食総研)  
 下飯 仁(酒類総研)



## Acknowledgements

### プロリン

岩本 文代  
 毛利 美穂  
 森田 華奈  
 酒井 空見  
 森田 佑子  
 寺尾 幸泰  
 松浦 啓介  
 高岡 みき  
 河口 あかり  
 松井 芙美  
 関根 朋子

Marjorie C. Brandriss  
 (New Jersey 医歯大学)

### アセチル化酵素 Mpr1

竹村 美保  
 七里 美雅  
 木村 泰子  
 野村 倫世  
 関口 綾子  
 杜 小一  
 伊井谷 薫

竹川 薫  
 (香川大学)  
 Jack M. Widholm  
 (Illinois 大学)

### ユビキチンシステム

星川 直良  
 久野 未怜  
 灰谷 豊  
 出前 美佳  
 平石 裕之

島 純  
 (食品総合研究所)

下飯 仁  
 (酒類総合研究所)

