細胞内温度の測定という新たな酵母活性評価技術の可能性

非常に大規模な酵母利用産業であるビール製造においては、酵母の活性が製品の質を左右することから、酵母の品質管理には多大な注意が払われており、そのための活性評価技術の開発も盛んである。著者らは、新たな酵母の活性評価指標として個々の細胞内の温度に注目し、複数の機能性ユニットを有する極めて高度な機能性分子を蛍光プローブとして利用し、その温度による蛍光変化をモニターする技術開発に取り組んでいる。まだまだ、実用までのハードルは残されているようだが、その現状を解説していただいた。挑戦的かつ刺激的な内容であり、是非ご一読いただきたい。

辻 俊一¹・内山 聖一²

はじめに

酵母は、パンやアルコールの製造に関わる食品産業において古くより活用されており、近年ではバイオエタノール生産などの地球温暖化対策にも欠かせない存在である。酵母を産業利用する場合には、用いる酵母の「活性」を予め把握しておくことが重要である。酵母の活性は、発酵や物質生産の成否を握る重要な因子の1つであり、高品質の製品を安定して造るためには、高い活性を示す酵母を用いる必要がある。例えば、ビール醸造、特に回分式を用いた製造においては、酵母は主発酵終了後にタンク底（下面発酵酵母）または発酵液上面（上面発酵酵母）から回収され、再び次の発酵に用いられる。ワイン醸造のように主に乾燥酵母を復水して醸造に用いることもある。いずれの場合においても、使用する酵母の活性は、ビールやワインという最終発酵製品の品質に大きな影響を与えることがわかっており、酵母活性の評価技術に関しては、コロニー形成能の評価（cfu）、細胞内還元力¹⁾、あるいは細胞内 pH（ICP）²⁾といった幾つかの手法が頻繁に用いられている。

その活性評価技術の違いを、評価に要する時間、評価の精度、そして技術的難易度の観点で比較してみる

と次のようになる。cfu 評価は、細胞がコロニーを形成する能力、つまり細胞増殖能を評価する方法であり、手法が簡単な上に酵母活性としての増殖能を明確に評価できる。しかし、コロニーを形成するまでに1日以上を要するため、使う場面が限られてしまうというデメリットもある。細胞内の還元力はメチレンブルー法などの染色法によって評価できる。この手法も簡便で、しかも評価には1時間程度しかからないメリットはあるものの、基本的に死細胞とそれ以外の細胞を区別するものであり、生死（viability）を判別できるが、生きている細胞の活性（vitality）の微妙な差を評価することは難しい。細胞内 pH を指標にした測定方法（ICP 法）は、他の2つの方法に比べて生細胞のわずかな活性の違いを見分けることのできる高い精度を持った技術であり、蛍光光度計が備えられている環境であれば技術的難易度も低く、醸造界に限らず、科学分野においても広く利用される技術となっている³⁾。

ICP 法は、酵母の細胞膜 ATPase の活性（ATPase タンパク質量）に着目し、低 pH 条件下における細胞のプロトン排出能を分析する技術⁴⁾である。この技術は、特に低温保存におけるビール酵母の発酵力や酵母の繰り返し利用による劣化の評価に適していることがわかっている³⁾。言い換えれば、細胞膜 ATPase の活

Intracellular Temperature Measurement for the Evaluation of Yeast Vitality

Toshikazu TSUJI¹・Seiichi UCHIYAMA² (¹Central Laboratories for Key Technologies, Kirin Company, Limited, ²Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo)

性は、低温保存や酵母の繰り返し利用というストレス条件下の酵母の異変を如実に反映する一方、他のストレス条件に対して全く応答を示さない可能性もある。実際、お客様のニーズが刻々と変化している昨今、醸造技術も多様化している。従来の醸造ではあまり扱われなかった原料や発酵方法が利用されることも多くなってきた。酵母の置かれる環境が変化してきた今こそ、各醸造条件に適用できる多様な活性評価指標・技術が求められており、最近も細胞形態に着目した活性評価技術などの新しい技術が報告されている⁵⁾。

1. 細胞内温度に着目した背景

新しい酵母活性評価技術に必要とされている条件がいくつかある。先ほどから述べている ICP 法が優れている点として、実製造現場で生じる酵母活性の微妙な差を捉えられる「高い感度」が挙げられる。また、メチレンブルー法のような染色法も実用的な現場では頻繁に利用されているが、これは高価な機器や特殊な装置を必要とせず、染色試薬と顕微鏡があれば評価できる「簡便さ」に因る。さらに言えば、活性評価技術の1つのあり方として、細胞集団の平均値や平均的な値として算出されるような値ではなく、「1細胞レベルの活性」値がどのような分布を示すかを明らかにできる手法であればなお良い。なぜなら、今井らによって報告されているように、細胞集団の平均値としては殆ど変化が見られないが、個々の細胞の活性を分布として評価した場合に、部分的に変調をきたしている例が存在するためである³⁾。したがって、「高い感度」、「簡便さ」そして「1細胞レベルでの測定」という3つの条件を満たす活性測定方法が、最も望ましいといえる。

ここでわれわれが注目したのが、細胞内の温度である。ごく最近、細胞周期による細胞内の温度変化や、ミトコンドリアからの発熱⁶⁾など、哺乳類細胞において細胞内温度と細胞の機能との関連性が見出され始めており、同じ真核生物である酵母細胞でも細胞の機能と細胞内温度に何らかの関係があるのではないかと考えられた。特に、「発酵熱」という言葉が表すように、酵母は発酵の際に多量の熱を発生しているため、新たな酵母活性評価技術の確立を目指して、細胞内の温度に着目するのは自然な流れである。実際、Rigoulet らが、酵母細胞の発酵効率とカロリーメトリー法によって

測定した酵母細胞からの発熱量に相関があることを見出している⁷⁾。以上より、細胞内の温度変化を感度よく、簡便に測定することができれば、酵母細胞に対する新たな活性評価技術になりうると考えられた。そこで、近年、0.1℃程度の温度差を測定可能な「高い感度」に加え、細胞内の温度⁸⁾や温度分布⁶⁾を「1細胞レベルで測定」できることで注目を集めている高分子蛍光温度プローブに着目し、これを酵母に対して応用することを目指した。この高分子蛍光温度プローブに「簡便性」という新たな技術価値を付与することを追求し、昨年、酵母細胞1つ1つの細胞内温度を測定する手法を開発したので、ここに紹介する⁹⁾。

2. 高分子蛍光温度プローブについて

高分子蛍光温度プローブの改良について論じる前に、本研究で用いた高分子蛍光温度プローブの機能性と、他の蛍光温度プローブに対する優位性について簡単に述べておきたい。

今回開発したプローブは第1a図に示す通り、感温性ユニット、カチオン（プラス電荷）性ユニット、蛍光性ユニットから構成されており、これらのユニットがランダムに並んだ高分子である。感温性ユニットである NNPAM ユニットあるいは NIPAM ユニットは、周囲が低温環境の時には伸張した構造をとるが、周囲の温度上昇に伴い、小さく丸まった構造へと変化する。蛍光性ユニットである DBD-AA は周囲に水が存在すると蛍光強度が低下し、周囲の水が排除されると蛍光強度が上昇するという特徴をもつ。この蛍光性ユニットを感温性ユニットに組み込むことで、感温性ユニットの温度依存的な構造変化を蛍光強度の変化という形で検出することができる（第1b図）。また、今回新たにカチオン性ユニットを適切な量で組み込むことにより、10分という短時間で自発的に細胞内に導入される性質を付与することができた。この詳細については下記3の項で改めて紹介する。

生細胞用の蛍光温度プローブとして最近報告されているものに量子ドット¹⁰⁾、ユーロピウム錯体¹¹⁾や蛍光タンパク質 GFP^{12,13)}を用いたものがあるが、実現場で酵母活性を評価することを考えた場合、高分子蛍光温度プローブは、それ以外の蛍光温度センサーと比較して3つの優れた特徴を有している。1つ目は、温度に応答して蛍光強度が上昇するため、感度良く発熱

第 1 図 開発した温度プローブ (NN-AP2.5 および NN/NI-AP2.5) の構造 (a) と温度プローブが温度に応答して蛍光を発するメカニズム (b)

現象を捉えられることである (他のセンサーは一般的に温度上昇に伴い蛍光強度が低下する)。2 つ目は、10℃ 程度の温度上昇に伴って蛍光強度が最大約 5 倍も変化する高い応答性である。そして最後に温度以外の因子 (pH, イオン濃度, タンパク質など) に対する応答が少ないことである。合成したプローブは pH6.8, イオン強度 0.25-0.35 (KCl 濃度に換算して 125-175 mM) の条件でほぼ同一の温度応答性を示すことが確認されている⁹⁾。

3. カチオン型高分子蛍光温度プローブの酵母細胞内への自発的な移行

高分子蛍光温度プローブの酵母細胞への応用において取り組むべき課題となったのが、プローブの細胞内への導入法であった。今までの高分子蛍光温度プローブは、小さな注射針を用いて細胞に直接試薬を注入する、いわゆるマイクロインジェクション法による細胞

への導入を前提としているため、細胞サイズが小さく、硬い細胞壁に囲まれた酵母細胞にそのまま適用することはできなかった。細胞膜はマイナス電荷を帯びたリン脂質で構成されているために、細胞内への自発的な移行能を持つ分子にはプラス電荷を帯びたものが多い。そこで、はじめにカチオン性ユニットを組み込んだ高分子蛍光温度プローブを複数種類合成した (NN-AP2.5, NN-AP5, NN-AP7.5, NN/NI-AP2.5)。1.2 M ソルビトール溶液に懸濁した出芽酵母 (実験室酵母) SYT001 細胞¹⁴⁾の懸濁液に、最終濃度が 0.05 w/v% となるように温度プローブを混ぜた。25℃, 10 分間の処理後に、遠心操作によって導入されなかったプローブを除き、リン酸緩衝液で洗浄した後、顕微鏡下で蛍光観察を行った。その結果、細胞内での強い蛍光が観察できた (第 2a 図)。一方対照実験として、イオン性ユニットの組み込まれていない温度プローブ (NN) とマイナス電荷のユニットの組み込まれたプローブ

(a)

(b)

第2図 酵母細胞内への温度プローブの導入結果。(a) NN-AP5, NN-AP7.5はNN-AP2.5のAPTMAユニット量をそれぞれ2倍, 3倍にして合成したプローブ。NNはNN-AP2.5ユニットからAPTMAユニットを除いて合成したプローブ。NN-SPA5はNN-AP2.5のAPTMAユニットの代わりにマイナス電荷を帯びたSPAユニットを導入したプローブ。barは5 μ mを示す。(b) NN-AP2.5を導入した酵母の微分干渉像(左)および蛍光像(中央)。右図は, 同一の酵母をCalcofluorWhiteによって細胞壁を染色した像(右)。barは2 μ m。

(NN-SPA5)を合成し, 同様に細胞と混同したところ, 細胞内での蛍光は観察されなかった(第2a図)。さらに細胞壁との共染色を行った出芽酵母を観察したところ, 第2b図に示すように細胞質内での蛍光が観察された。細胞内に導入された後の温度プローブは, 導入2時間後も同様に蛍光観察されたことから, 細胞外へと流出することなく細胞内に留まっていることがわかる⁹⁾。

また, 温度プローブの導入に影響を及ぼすいくつかの条件を, プローブの細胞への導入率(全細胞におけるプローブが導入された細胞の割合)を比較しながら

検証した。その結果, 導入時の温度は導入率に大きく影響を与えないが, 細胞懸濁液の組成は導入率に大きく影響を及ぼすことがわかった(第1表)。特に, 懸濁液には非イオン性の糖溶液や糖アルコール溶液を使用する必要があることも明らかとなった。温度プローブを導入するのに必要な時間に関しては, 第2表に示すように10分程度で充分な導入を確認できている。以上の実験結果より, カチオン性ユニットを持つ温度プローブを新たに開発することで, 酵母内に温度プローブを簡便に導入できる技術を確認したといえる。前述のように, 細胞温度測定技術の中には, 蛍光タンパ

第1表 温度プローブの酵母細胞への導入率に与える細胞懸濁液の影響

細胞懸濁液 ^a	導入温度 (°C)	酵母細胞への導入率 (%) ^b	
		NN-AP2.5	NN/Ni-AP2.5
1.2 M ソルビトール	25	49.1 ± 4.5	65.7 ± 3.5
1.2 M ソルビトール	4	46.4 ± 4.0	19.0 ± 3.6
0.30 M ソルビトール	25	59.4 ± 5.9	19.0 ± 2.5
0.28 M グルコース	25	6.4 ± 2.1	3.4 ± 2.7
水	25	12.4 ± 1.9	11.9 ± 1.4
50 mM KCl	25	0	0
リン酸緩衝液 (PBS)	25	0	0
YPD 培地	25	0	0

^a プローブの濃度は 0.05 w/v%。^b 平均値 ± 標準偏差, $n=3$.

第2表 NN-AP2.5 および NN/Ni-AP2.5 の処理時間と酵母への導入率の関係

温度プローブ	導入率 (%) ^a		
	1 min	10 min	20 min
NN-AP2.5	14.0 ± 4.2	49.1 ± 4.5	71.7 ± 4.2
NN/Ni-AP2.5	22.6 ± 1.9	65.7 ± 3.5	67.7 ± 9.5

^a 平均値 ± 標準偏差, $n=3$. 細胞は全て 1.2 M ソルビトールに懸濁し, 25°C で導入した。導入時のプローブ濃度は 0.05 w/v% となるようにした。

ク質を利用したものもある。この場合、プローブの細胞内への導入には、通常実験でよく用いられる形質転換技術を用いるのみでよいが、遺伝子組み換えを伴うために、実製造段階での使用は法律上きわめて困難で

ある。本技術のように細胞懸濁液と混ぜるだけで利用できるプローブは、そのような法的制約もないため、実用性も高いといえる。

4. 酵母細胞内における温度プローブの応答

次に、導入した温度プローブにおける細胞内での応答を確認した。実験室出芽酵母に温度プローブの1つである NN-AP2.5 または NN/Ni-AP2.5 を導入し、リン酸緩衝液に懸濁した状態で、周囲の温度を変化させながら細胞から発せられる蛍光の強度を蛍光光度計で測定した。測定方法を第3a図に、その結果を第3b図に示す。

NN-AP2.5 は、酵母細胞内部でも温度に対して蛍光応答し、15°C から 35°C の温度変化に対して蛍光強度が約 2.2 倍上昇することが認められた。また NN/Ni-AP2.5 は応答範囲が約 5°C 程度高温にずれたような曲線を示すこともわかった。なお、第2a図で示した他のカチオン型の温度プローブである NN-AP5 および NN-AP7.5 に関しても、細胞内において温度上昇に対する蛍光強度の上昇が観測された。しかし、その蛍光強度の変化量は 15°C から 35°C の温度変化に対して、それぞれ約 1.5 倍、約 1.3 倍程度であり、プローブ内のカチオン性ユニットの含有量が高くなるにつれて、温度変化に対する蛍光強度の変化量は小さくなった。このように、温度プローブの蛍光強度が温度変化に応

第3図 酵母細胞内に導入された温度プローブの応答。(a) 測定方法の概略図。酵母細胞が均一に拡散するようにスターラーを使用している。(b) 酵母細胞内に導入した NN-AP2.5 および NN/Ni-AP2.5 の温度変化に対する蛍光強度の変化。15°C = 1 としている。SYT001 細胞懸濁液 (1.2 M ソルビトール) に、0.05 w/v% のプローブを混ぜ、25°C、10 分間の処理を行った。平均値 ± 標準偏差, $n=3$ 。

第4図 温度変化に対する酵母細胞内に導入されたNN-AP2.5の蛍光寿命変化と温度分解能。SYT001細胞懸濁液(1.2M ソルビトール)に、0.05w/v%のプロープを混ぜ、25℃、10分間の処理を行った。平均値±標準偏差, n = 3。

じて変化しているので、温度プローブは細胞内においても温度に応答したといえる。ここまで、温度変化に応じて変化する温度プローブの蛍光特性としては蛍光強度を議論してきたが、より正確な温度測定を行うためには温度プローブの蛍光寿命(励起された温度プローブが蛍光を発し、基底状態へと戻るまでの時間の指標)を用いた議論が望ましい。なぜなら、温度プローブの蛍光強度は、温度変化以外にもプローブの濃度や励起光の強度といった実験条件の変化に大きく影響を受けてしまうのに対し、蛍光寿命はプローブの濃度や励起光の強度に影響を受けず温度変化に対してのみ可変となるためである。そこで、NN-AP2.5を導入した酵母細胞に対して、蛍光寿命の変化も測定した。その結果を第4図に示す。蛍光強度の応答範囲と同じ温度領域で蛍光寿命も伸長し(第4図左軸)、繰り返し測定における標準偏差から区別可能な最小温度(温度分解能)を評価したところ、0.09-0.78℃という高い水準を示した(第4図右軸)。これらの結果から、酵母内へと移行した温度プローブは、温度の変化に応じて蛍光強度や蛍光寿命を変化させ、酵母細胞内部でも機能を果たしていることが認められた。

5. まとめと今後の展望

今回開発した技術は、酵母の細胞内温度を「高い感度」で、かつ「簡便」に、そして「1細胞レベルで測定」という、われわれが酵母活性評価技術に必要な

だと考えた条件を全て満たした技術である。温度プローブを酵母細胞に導入して測定するという基本的な検討は終わり、これからは、「酵母が発酵する過程で本当に熱くなっているのか」や、「酵母の温度は動物細胞などと同じように細胞周期によって変化するのか」、など酵母細胞の温度と細胞機能との関係に迫っていく段階になったといえる。もちろん技術に関して完全に課題がなくなったわけではない。ビール醸造では発酵温度が10℃近辺になることは珍しくない。また、ワイン発酵でも約15℃～20℃が最適な発酵温度といわれている。今回合成した温度プローブは温度応答範囲が20℃から35℃であったことから、より低温で機能する温度プローブがなければリアルタイムでこれらの発酵時の温度をモニターすることはできない。これに関しては、Gotaらが、今回使ったNNPAMユニットよりも低温側で機能する感温性ユニットを報告しており¹⁵⁾、それをを用いることで解決できるのではないかと考えている。加えて、第3b図の結果でも示したとおり、感温性ユニットを複数組み合わせることで、温度プローブが応答する温度領域を少しずつ移動させることができる¹⁶⁾。この特徴によって、使用する酵母が変わった場合や、醸造プロセスが変わった場合などの計測条件の変動にも、適切なプローブを合成して対応できる。

今後、温度プローブを用いた酵母活性評価技術の検討を進め、お客様に喜んでいただける美味しいビール醸造へ貢献することが期待される。その一方で、今回開発した技術は、酵母細胞のみならず、哺乳類由来の細胞にも同じように利用できることがわかっている⁹⁾。例えば、ガン細胞は正常細胞よりも熱産生が亢進していることも示唆されており、ガン治療や創薬へと本技術が利用できる可能性もある。細胞の機能と細胞内温度の関係は、今度ますます本格的に検討され、次々と新たな知見が明らかになるであろう。そして、哺乳類細胞での知見が酵母に活かされることで、醸造という古くから伝わっている技術に新しい方法をもたらすかもしれない。醸造の新たな発展を願って、少しでも本研究を発展させていきたい。

<¹ キリン株式会社, ² 東大大学院薬学部>

文献

- 1) Sami, M., Ikeda, M., Yabuuchi, S.: *J. Ferment.*

- Bioeng.*, **78**, 212-216 (1994).
- 2) Imai, T., Ohno, T. : *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 3604-3608 (1995).
 - 3) 今井健夫 : 醸協, **103**, 230-237 (2008)
 - 4) Takeuchi, T., Imai, T.: *In Brewing Yeast Fermentation Performance* (1st Edition), Oxford : Blackwell Science Ltd., 27-33 (2000)
 - 5) 善本裕之 : 醸協, **106**, 353-361 (2011)
 - 6) Okabe, K., Inada, N., Gota, C., Harada, Y., Funatsu, T., Uchiyama, S. : *Nat. Commun.*, **3**, 705 (2012)
 - 7) Dejean, L., Beauvoit, B., Bunoust, O., Fleury, C., Guérin, B., Rigoulet, M. : *Biochim. Biophys. Acta* **1503**, 329-340 (2001).
 - 8) Gota, C., Okabe, K., Funatsu, T., Harada, Y., Uchiyama, S. *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 2766-2767 (2009)
 - 9) Tsuji, T., Yoshida, S., Yoshida, A., Uchiyama, S. : *Anal. Chem.*, **85**, 9815-9823 (2013).
 - 10) Yang, J. M., Yang, H., Lin, L. : *ACS Nano*, **5**, 5067-5071 (2011)
 - 11) Oyama, K., Takabayashi, M., Takei, Y., Arai, S., Takeoka, S., Ishiwata, S., Suzuki, M. : *Lab Chip*, **12**, 1591-1593 (2012)
 - 12) Donner, J. S., Thompson, S. A., Kreuzer, M. P., Baffou, G., Quidant, R. : *Nano Lett.*, **12**, 2107-2111 (2012)
 - 13) Kiyonaka, S., Kajimoto, T., Sakaguchi, R., Shinmi, D., Omatsu-Kanbe, M., Matsuura, H., Imamura, H., Yoshizaki, T., Hamachi, I., Morii, T., Mori Y.: *Nat. Methods*, **10**, 1232-1238 (2013).
 - 14) Yoshida, S., Imoto, J., Minato, T., Oouchi, R., Sugihara, M., Imai, T., Ishiguro, T., Mizutani, S., Tomita, M., Soga, T., Yoshimoto, H. : *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 2787-2796 (2008)
 - 15) Gota, C., Uchiyama, S., Yoshihara, T., Tobita, S., Ohwada, T. : *J. Phys. Chem. B*, **112**, 2829-2836 (2008)
 - 16) Uchiyama, S., Matsumura, Y., de Silva, A. P., Iwai, K.: *Anal. Chem.*, **76**, 1793-1798 (2004).

執筆者紹介 (順不同・敬称略)

辻 俊一 < Toshikazu TSUJI >

昭和 58 年 11 月 14 日生まれ <勤務先と所在地> キリン株式会社基盤技術研究所 〒236-0004 神奈川県横浜 市金沢区福浦 1-13-5 <略歴> 平成 20 年東京大学大学院新領域創成科学研究科卒。同年, キリンビール (株) 入社。同年 7 月キリンホールディングス (株) フロンティア技術研究所。平成 25 年キリン (株) 基盤技術研究所。現在に至る。 <抱負> 新たな技術を開発し, お客様が喜んで頂ける価値を提供していきたい。 <趣味> 卓球, お酒を飲むこと, 料理。

内山聖一 < Seiichi UCHIYAMA >

昭和 50 年 4 月 1 日生まれ <勤務先と所在地> 東京大学大学院薬学系研究科 〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1 <略歴> 平成 14 年東京大学大学院薬学系研究科博士課程修了。平成 14 年日本学術振興会特別研究員 PD (奈良女子大)。平成 17 年東京大学大学院薬

学系研究科, 助教。現在に至る。 <抱負> 最近お酒を飲む機会が減っている。今回の執筆を機に消費量を増やす。 <趣味> とにかく競馬。国内外を問わずどこへでも。昨年, 20 年ぶりに将棋をやり始める。

宮本敬久 < Takahisa MIYAMOTO >

昭和 34 年 1 月 31 日生まれ <勤務先と所在地> 九州大学大学院農学研究院 〒812-8581 福岡市東区箱崎 6-10-1 <略歴> 昭和 61 年九州大学大学院農学研究科食糧化学工学専攻博士後期課程単位取得満期退学。昭和 63 年 10 月農学博士 (九州大学) の学位取得。昭和 61 年 4 月九州大学農学部助手に採用。平成 6 年 3 月九州大学農学部助教授に昇任。平成 17 年 4 月九州大学大学院農学研究院生物機能科学部門教授に昇任。現在に至る。 <抱負> フードチェーン全体の衛生管理, 微生物制御法の確立。 <趣味> ラジコン