酵母とエタノールストレス

醸造酵母は発酵過程に自身が造ったエタノールからストレスを受け遂には死滅してしまう。このストレスに耐えるために、膜脂質の組成を変え、細胞膜の流動性を安定化してそれに耐える。一方、エタノールが細胞内に浸透し、細胞内のオルガネラ膜にダメージを与える。ストレスセンサーとしての遺伝子が見出され、それが細胞壁合成系の活性化を行う。たんぱく Asr1 の働き、種々のストレスによるヒートショックプロテインの発現誘導、mRNA の選択的核外輸送など酵母のエタノール耐性機構とストレス応答について解説してもらった。

井 沢 真 吾

1. はじめに

高濃度のエタノールは溶菌作用があるほか、タンパク質の変性や細胞内での代謝障害を引き起こす¹⁾。また、低濃度であっても、細胞膜の脂質組成や流動性、神経系などにおけるイオンチャンネルやレセプターの機能を変化させることが知られている^{2,3)}。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* およびその近縁種はアルコール発酵によりエタノールを生成し、日本酒や焼酎、ワイン、ビールといった酒造りに欠かせない主役のひとつである。出芽酵母は、他の微生物に比べて高いエタノール耐性を持つことが知られているが、醸造過程のエタノール生成は酵母自身にとって自らストレスの原因を作り出すという一種の「自虐行為」でもある。では、酵母細胞はエタノールストレスに対しどのような応答を示すのだろうか？酵母のエタノール耐性機構や応答能について理解を深めることは、醸造技術の改善にも役立つのではないだろうか？本稿では、酵母細胞のエタノール耐性・応答機構についてこれまでに報告された知見を概説する。

2. 細胞膜流動性と膜脂質組成

エタノールは、熱ショックと同様に生体膜の流動性を高めるため、以前より酵母のエタノール耐性に膜脂質組成が深く関与していると考えられている。実際に

エタノールストレスによって膜脂質組成が変化することも知られている。膜脂質組成のうち、不飽和脂肪酸の含有量が酵母のエタノール耐性と高い相関を持つことが報告されている。不飽和脂肪酸のなかでもオレイン酸 (C_{18:1}) がもっとも重要であり、不飽和度が高いリノール酸 (C_{18:2}) やリノレン酸 (C_{18:3}) よりも耐性賦与効果が高いとされている⁴⁾。特に好氣的条件下のエタノールストレスでは、不飽和度が高い膜脂質ほど酸化ダメージを受けやすくなるために耐性が減少してしまうと考えられている⁵⁾。

一方、飽和脂肪酸であるパルミチン酸 (C_{16:0}) によるエタノール耐性賦与効果も報告されている。清酒醸造において、速醸もと系酒母にくらべて生もとづくりによる酒母は、膜脂質組成に占めるパルミチン酸が大幅に上昇する。そのため、リン脂質組成や膜の透過性に大きな違いが生じ、生もと系の酵母は高いエタノール耐性を示す。わかりやすい日本語の解説がウェブ上や総説で用意されているので詳細はそちらを参照していただきたい^{6,7)}。オレイン酸、パルミチン酸、いずれの場合も生体膜の流動性や膜構造を適切な状態で安定化することが、エタノール耐性を獲得する上で重要であると考えられている。その他、生体膜安定性とエタノール耐性に対するエルゴステロールの効果が報告されている⁸⁾。

エタノールは細胞内にも容易に浸透するため、細胞

Ethanol-stress Response and Tolerance in Yeast.

Singo IZAWA (Laboratory of Molecular Microbiology, Graduate School of Agriculture, Kyoto University)

内のオルガネラ膜の流動性にも影響を及ぼすと考えられる。エタノールによるミトコンドリアへのダメージは呼吸欠損株の発生を引き起こすが、その発生頻度はミトコンドリア膜の流動性と膜脂質組成に左右される。

エタノールは直接ミトコンドリア DNA に作用して呼吸欠損株を発生させるのではなく、まず、ミトコンドリア膜にダメージを与え、膜が損傷を受けた結果、ミトコンドリア内部もダメージを受けるようになることが明らかにされた⁹⁾。そのため、ミトコンドリア膜の流動性を安定化するような長鎖脂脂肪酸やエルゴステロール含量が高い細胞は呼吸欠損株の発生頻度が低くなると報告されている。また、核膜への影響としては、核膜孔を介した核-細胞質間のタンパク質輸送が変化することが報告されている¹⁰⁾。エタノールなどのアルコールストレス条件下では、核膜の不安定化を介して核膜孔複合体が正常な構造や機能を維持できなくなることが原因であると推測されている。このように、エタノールがオルガネラ膜に与えるダメージがきっかけとなり、様々な細胞機能の異常が引き起こされることが近年報告されるようになってきた。ミトコンドリアや核だけでなく、各オルガネラは酵母の生育や発酵力に直接影響するものが多いだけに、個々のオルガネラに焦点を絞った解析は、エタノールによるダメージを具体的に理解する上で近道になるのではないだろうか。エタノールストレスに強いと同時に生育や発酵力に悪影響を与えないという、「丈夫で柔軟」な生体膜を持つ酵母の育種が国内外で精力的に取り組まれている。

3. ストレセンサーとしてのWSCファミリーと細胞壁合成

WSC1~4 遺伝子にコードされる WSC (cell wall integrity and stress response component) ファミリーのうち、Wsc 1, Wsc 2, Wsc 3 は細胞膜上に局在する膜貫通型タンパク質であり、熱ショックや浸透圧ストレスに対するセンサーとして機能する。エタノールストレスについても、*wsc1Δ* ははじめとする *wsc* 遺伝子の破壊株はエタノールに対する感受性が高まるほか、適応応答の誘導が不十分になる¹¹⁾。Wsc 1 の下流には small GTPase である Rho 1 や、MAP-キナーゼカスケードのひとつ Pkc 1/Mpk 1 カスケードが存在する。Rho 1 は細胞壁の生合成における 1, 3- β -グルカン合成酵素の活性制御に直接関与している。同時に、Rho 1 は Pkc 1 の活性化因子として Pkc 1/

Mpk 1-カスケードの活性化にも重要であり、Pkc 1/Mpk 1-カスケードの下流に存在する転写調節因子 Rlm 1 の活性制御にも関与している。Rlm 1 は細胞壁生合成系遺伝子の転写を活性化することから、WSC-Rho 1-Pkc 1/Mpk 1 シグナル伝達経路を介した細胞壁合成系の活性化がエタノールに対する耐性獲得に寄与していると考えられている。

WSC の研究とは別に、国内のグループによってエタノールストレス条件下での生育に必須な遺伝子の単離がおこなわれ、その中から *BEM2* と *ROM2* が同定された¹²⁾。興味深いことに、両者はそれぞれ Rho 1 の GAP (GTPase activating protein for Rho 1) と GEF (GDP-GTP exchange factor for Rho 1) をコードしており、Rho 1 を介して 1, 3- β -グルカン合成酵素や Pkc 1/Mpk 1-カスケードといった細胞壁の生合成系に深く関与する因子であった。また、両遺伝子の破壊株はザイモリエースや Calcoflour white に対し高感受性であり、細胞壁がもろくなっていることが確認されている。これらのことから、WSC-Rho 1-Pkc 1/Mpk 1 経路を介した細胞壁合成の活性化によって、「面の皮を厚くする」こともエタノールストレスへの対処法のひとつだと考えられる。

4. アルコール特異的なシグナル伝達因子候補としての Asr 1

Betz らによって最近報告された Asr 1 は¹³⁾、亜鉛結合ドメインを持つ 36 kDa のタンパク質であり、細胞内でホモダイマーを形成する。通常、Asr 1 は核-細胞質間をシャトルしているため細胞内全体に分布しているが、エタノールストレス条件下では核に蓄積ようになる。エタノールのほかプロパノールやブタノールなどのアルコールによっても核への局在化が引き起こされるが、浸透圧ストレスや酸化的ストレスなどのアルコール以外のストレスでは局在は変化しない。Asr 1 の局在変化がアルコール特異的に引き起こされることから、細胞の表面で感知したエタノールストレスのシグナルを核にまで伝達する因子ではないかと期待されている。現時点では、アルコールによって生じる細胞膜の変化をシグナルとして認識していると推測されているが、詳細なメカニズムはよくわかっていない。また、Asr 1 自体は DNA 結合能を持たないと考えられているので、核内で他の因子と複合体を形成することで核内に留まり、転写制御などを通じてアルコ

ールに対するストレス応答に貢献しているのではないかと考察されている。Asr 1 の核への局在化のメカニズムについては、Betz らの見解と異なるデータを我々のグループでは得ているので再考の余地があるのかもしれない。アルコールストレス特異的なシグナル伝達因子はこれまでに報告例がなく、先述の WSC-Rho 1-Pkc 1/Mpk 1 経路とは異なる、アルコールストレスに対する情報伝達経路解明の糸口として Asr 1 の機能解析が進展することが期待される。

5. Hsp 12 と Hsp 104

細胞は熱ショックなどのストレス条件下でヒートショックプロテイン (Heat Shock Protein, Hsp) の発現を誘導することがよく知られている。出芽酵母のゲノム中には Hsp ファミリーをコードする遺伝子が十数種類存在し、エタノールストレスによっても複数の HSP 遺伝子の転写が活性化される。出芽酵母の Hsp のひとつである Hsp 12 もエタノールストレスに応答してその転写が活性化されるが、その転写活性化はおもに *HSP12* 遺伝子のプロモーター領域に複数存在する STress Response Element (STRE: 5'-CCCCT-3' or 5'-AGGGG-3') を介した転写活性化因子 Msn 2/Msn 4 によるものであり、エタノール以外にも低温や浸透圧ストレス、定常期への移行によって転写量が増加する¹⁴⁾。Hsp 12 はエタノールや乾燥によるダメージから脂質二重膜を守る機能をもつことが *in vitro* では明らかにされている¹⁵⁾。そのため、酵母細胞内でもエタノールによる生体膜へのダメージを緩和する機能があると考えられている。実際に、*HSP12* 遺伝子破壊株はエタノールに対する感受性が増加し、10%以上のエタノールに対する死滅率が急激に高まることが報告されている¹⁵⁾。また、スペインの代表的な酒精強化ワイン (fortified wine) であるシェリー酒に用いられる産膜酵母 (flor yeast) のストレス耐性にも Hsp 12 が重要な役割を担っている。シェリー酒は、果汁発酵後、樽の中で熟成されて完成するが、この間、産膜酵母により皮膜が形成される。高いエタノール濃度とともに、その代謝産物であるアセトアルデヒドによるストレスにさらされることになる産膜酵母は、一般に高いエタノール耐性を持つ。そのストレス耐性には、*HSP12* をはじめとする HSP 遺伝子の転写活性化が深く関与している。また、産膜酵母では、アセ

トアルデヒドによっても HSP 遺伝子が著しく転写活性化されることが報告されている¹⁶⁾。興味深いことに、産膜酵母による皮膜形成には Hsp 12 が不可欠であり、*HSP12* 遺伝子破壊株は産膜を形成することができない¹⁷⁾。

Hsp 104 は様々なストレスに対する耐性に非常に重要な役割を担っていることが実験室酵母株を用いて明らかにされており、エタノールストレスによっても発現が誘導される。しかしながら、ストレス耐性が実験室株に較べて一般的に高い実用酵母に関しては、必ずしも Hsp 104 の発現量とストレス耐性との間に明確な相関が見られる訳ではない¹⁸⁾。これは、実験室酵母の解析が最適な培地を使った好気的条件下でおこなわれるのに対し、実用酵母の場合、高い糖濃度の果汁や麦汁をはじめとする生育条件の違いが影響していると考えられている。また、ビール酵母 (下面発酵酵母) に関しては、麦汁中での発酵の進行に従って熱ショックストレスに対する Hsp 104 の発現誘導が抑制され、ストレスに対する応答が鈍くなることが報告されている¹⁹⁾。実験室での最適な培養条件下とは異なり、実際の醸造過程では複数の因子による複雑な影響を受けやすくなるため、相対的にストレス耐性獲得に占める Hsp 104 の役割は小さくなるのかもしれない。Hsp の発現誘導やトレハロースの蓄積といった、熱ショックとエタノールの両ストレスに対する応答には共通点も多いが、その一方で、個々の Hsp の発現誘導については両ストレス間で大きく異なるものも存在する。両者の違いに着目することで、細胞へのエタノール特異的な影響が絞り込めるようになるのではないだろうか。

6. mRNA 核外輸送段階のストレス応答

真核細胞である酵母は、転写の場 (核) と翻訳の場 (細胞質) が核膜によって隔たれているため、核内で合成された mRNA は核から細胞質へと核外輸送される必要がある。核内で合成された mRNA は Cap 構造や poly A 鎖の付加などのプロセッシングを受けながら mRNA 核外輸送因子などと複合体を形成する。Messenger ribonucleoprotein complex (mRNP) と呼ばれるこの複合体は、核膜上の通路である核膜孔複合体 (nuclear pore complex: NPC) を通って核外へと輸送される。近年、次々と mRNA 核外輸送関連因子が同定され、mRNA の核外輸送機構が徐々に明

らかになりつつあるが、未解明な部分が多い。

一方、mRNA 核外輸送段階にもストレス応答が存在していることが確認された。ストレス条件下では、細胞が転写パターンや翻訳効率を変化させることで、すみやかにストレスに対する耐性獲得や適応をはかることがよく知られている。転写や翻訳段階でのストレス応答についてはこれまでに数多くの研究が行われてきたが、両者を結ぶ mRNA の核外輸送段階については注目されてこなかった。最近になって、エタノールや熱ショックなどのストレス条件下では、大部分の mRNA (bulk poly (A)+mRNA) の核外輸送が抑制され核内に蓄積してしまう一方で、Hsp などのストレスタンパク質をコードする遺伝子の mRNA は、その合成が活性化されるとともにスムーズに核外輸送されることが報告された²⁰⁾。つまり、ストレスへの防御などに必要な mRNA を優先して核外に運び、不要な mRNA は核内に留めて置くという「選択的な mRNA 核外輸送」によって、効率的な遺伝子発現とストレスへの対処を酵母細胞は行っていると考えられる。また、比較的弱いストレスで処理した細胞は、より強いストレスにも適応する能力を獲得すること (adaptation) が知られているが、mRNA 核外輸送についても熱ショックに対する adaptation が誘導されることが報告されている²¹⁾。これらの事実は、mRNA 核外輸送段階にもストレス応答が存在することを示しているが、その制御機構の全容はまだほとんどわかっていない。

最近、bulk poly (A)+mRNA の核外輸送が抑制されるエタノールストレス条件下では、mRNA 核外輸送関連因子のひとつである Rat 8 の局在が変化することが明らかになった²²⁾。Rat 8 はアルコールストレス特異的に迅速かつ可逆的な局在変化を示し、熱ショックなどでは局在は変化しない。bulk poly (A)+mRNA の核外輸送には、Rat 8 が NPC の細胞質側出口に正しく局在することが不可欠である。しかし、エタノールストレス条件下では Rat 8 が速やかに核内に蓄積してしまうため、bulk poly (A)+mRNA 核外輸送がブロックされることになる。Rat 8 の局在変化は熱ショックや浸透圧ストレスなど他のストレス条件下では見られなかったことから、エタノールストレスと熱ショックなどの他のストレスとは bulk poly (A)+mRNA 核外輸送段階のストレス応答が異なり、

mRNA 核外輸送経路にも多様性がある可能性を示唆している。また、Rat 8 の局在変化を通じて bulk poly (A)+mRNA 核外輸送のスイッチの「オン」と「オフ」が切り替わっているとすれば、Rat 8 は mRNA 核外輸送におけるアルコール応答性の制御因子として機能しているとも考えられた。

では、実際の酒類醸造過程の酵母細胞において、Rat 8 の局在や mRNA 核外輸送はどのようなストレス応答を示すのだろうか？ビール醸造過程では、エタノール濃度が 4~6%程度にまでしか上昇しないこともあって、Rat 8 の局在変化や bulk poly (A)+mRNA 核外輸送の抑制は観察されなかった。白ワイン醸造過程におけるワイン酵母では、発酵の進行に伴って 6%前後のエタノール濃度で Rat 8 の局在変化や bulk poly (A)+mRNA 核外輸送の抑制が始まる。さらに、ぶどう果汁内のエタノール濃度が 9%以上になるとほとんどの mRNA が核内に蓄積した。そのため、新規のタンパク質合成もほぼ完全に停止してしまい、ぶどう果汁内には糖分などがまだ残っているにもかかわらず 12~14%程度のエタノール濃度でアルコール発酵が停止してしまう²³⁾。ワインの場合、エタノール濃度が 6%を越えると発酵効率が低下しはじめるという報告もあることから²⁴⁾、mRNA 核外輸送と発酵の進行は密接に関連しているであろう。一方、清酒酵母を使った清酒醸造過程では、ワインや実験室条件の場合と異なり、エタノール濃度に単純に依存しないユニークな現象が観察された。清酒もろみ中では、エタノール濃度が 12~13%以上に達するまで、Rat 8 の局在変化も bulk poly (A)+mRNA の核内への蓄積も観察されなかった。さらに興味深いことに、エタノール濃度 15%以上の発酵後期になると、Rat 8 はもとの局在を回復し bulk poly (A)+mRNA の核外輸送も再開された²⁵⁾。この現象は、ワインより高いエタノール濃度まで清酒醸造では発酵が進むことの一因となっているのかもしれない。ワイン酵母で清酒を作った場合にも同様の現象が観察されるが、逆に、清酒酵母でワインを作った場合にはこのような現象は見られない。このことから、ワインと清酒醸造過程で観察された違いは酵母の種類に起因したものではなく、むしろ、清酒もろみ中という環境が mRNA 核外輸送における非常にユニークなエタノール応答を引き起こす原因だと考えられる。果汁や培地などに比べ、清酒もろみ中には

数多くの脂質や麹菌が作り出す成分などが多量に含まれることから、もろみ中の成分が影響していると推測される。清酒もろみ中にはエタノールストレスを緩和するような、未知の生理機能物質が隠されているのかもしれない。

筆者らのグループでは、エタノールストレス条件下での mRNA 核外輸送の制御機構について研究をおこなっている。ストレス条件下でどのような mRNA が優先的に核外輸送され翻訳にまで辿り着くのか？逆にどの mRNA の核外輸送が抑制されてしまうのか？解析を進めることにより、マイクロアレイなどによる転写パターンの解析では見えてこなかったエタノール応答に関する新しい知見が得られるのではないかと期待している。

7. おわりに

酵母のエタノール耐性機構に関する研究は長い歴史を持つにも関わらず、エタノール耐性の大幅な改良につながるような決定的な解答をいまだ見出せずにいる。このことは、それだけ複雑な作用と制御機構がエタノールストレス応答に関与していることを示唆している。上に記したそれぞれのエタノールストレス応答は、個々の現象だけで完結した単純なものではなく、相互に影響を与えあっていると考えるべきであろう。個々のメカニズムの各論的な解析だけでなく、細胞全体あるいは培養系全体を考慮した統合的な解析が将来的に必要となるであろう。この難題を解き明かすような意欲的な研究の発展と、その成果による醸造技術の大幅な改良に期待したい。

文献

- Ingram, L. O. and Buttke, T. M. : *Advances Microbiol. Physiol.* **25**, 253-300 (1984).
- Peoples, R. W. *et al.* : *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **36**, 185-201 (1996).
- Junget, S. *et al.* : *J. Biol. Chem.* **280**, 308-316 (2005).
- Swan, T. M. and Watson, K. : *Can. J. Microbiol.* **45**, 472-479 (1999).
- Steels E. L. *et al.* : *Microbiology* **140**, 569-576 (1994).
- 高橋俊成, 溝口晴彦 : バイオサイエンスとインダストリー **61**, 389-392 (2003).
- <http://www.kikumasamune.co.jp/daigakuin/hakushi/hakushi01.html>
- Novotny, C. and Karst, F. : *Biotechnol. Lett.* **16**, 539-542 (1994).
- Chi, Z. and Arnenborg, N. : *J. Appl. Microbiol.* **86**, 1047-1052 (1999).
- Shulga, N. and Goldfarb, D. S. : *Mol. Cell. Biol.* **23**, 534-542 (2003).
- Zu, T. *et al.* : *Mol. Genet. Genomics.* **266**, 142-155 (2001).
- Takahashi, T. *et al.* : *Mol. Genet. Genomics.* **265**, 1112-1119 (2001).
- Betz, C. *et al.* : *J. Biol. Chem.* **279**, 28174-28181 (2004).
- Kandrór, O. *et al.* : *Mol. Cell.* **13**, 771-781 (2004).
- Sales, K. *et al.* : *Biochim. Biophys. Acta* **1463**, 267-278 (2000).
- Aranda, A. *et al.* : *Arch. Microbiol.* **177**, 304-312 (2002).
- Zara, S. *et al.* : *Yeast* **19**, 269-276 (2002).
- Carrasco, P. *et al.* : *Arch. Microbiol.* **175**, 450-457 (2001).
- Brosnan, M. P. *et al.* : *J. Appl. Microbiol.* **88**, 746-755 (2000).
- Saaverda, C. *et al.* : *Genes Dev.* **10**, 1608-1620 (1996).
- Tani, T. *et al.* : *Mol. Biol. Cell*, **6**, 1515-1534 (1995).
- Takemura, R. *et al.* : *J. Cell Sci.*, **117**, 4189-4197 (2004).
- Izawa, S. *et al.* : *Appl. Environ. Microbiol.* (in press).
- Ansanay-Galeote, V. *et al.* : *Biotechnol. Lett.*, **23**, 677-681 (2001).
- Izawa, S. *et al.* : *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (in press).