総 説

製パンプロセスにおけるパン酵母のストレス耐性： プロリン・アルギニン代謝と育種への応用

Stress Tolerance of Baker's Yeast during Bread-Making Processes: Proline/Arginine Metabolism and Its Application to Breeding

高 木 博 史

(奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科)

Hiroshi TAKAGI

(Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology,
Takayama-cho, Ikoma, Nara 630-0192)

1. はじめに

パン酵母（ほとんどは*Saccharomyces cerevisiae*の2倍体）は発酵によって生産されるパン製品に必要な成分であり、世界中で年間約200万トンのパン酵母が製造されている^{3,32)}。製パンプロセスにおけるパン酵母の機能は、1) 発酵中にガス生成によって生地を重量を増やすこと、2) 生地を構造や質感を形成すること、3) 生地に特徴的な風味を付与することなどである⁴⁾。パン酵母は主にクリームイースト、生イースト（圧搾酵母）、ドライイースト（乾燥酵母）の形態で製造される。クリームイーストは乾燥重量で約20%の酵母を、部分的な脱水によって製造する生イーストは乾燥重量で約30%の酵母をそれぞれ含んでいる。日本ではほとんどのパン酵母がクリームイーストか生イーストとして製造されている。一方、水分が5%以下のドライイーストは欧州などから輸入され、貯蔵・輸送の利便性が高いことからホームベーカリーやベーカリーショップでの使用が増加している。

風味はパンの品質において重要な要因であり、発酵や焼成の段階で生成し、アルコール、エステル、ジアセチル、有機酸、カルボニル化合物などさまざまな化合物が関与している⁵⁷⁾。例えば、イソブチルアルコールやイソアミルアルコールはパン製品の風味に関与することが知られており、それらの前駆体であるロイシンの毒性アナログ（4アザ-DL-ロイシン）に耐性を示す変異株から両化合物を高生産するパン酵母が分離されている⁵⁵⁾。

メリビオースとマルトースの利用もパン酵母における育種の標的である。メリビオースはパン酵母の製造に用

いる糖蜜中のラフィノースから変換される二糖類で、マルトースは小麦粉中に存在する糖類の一つである⁷⁾。パン酵母は α -ガラクトシダーゼを欠損しているため、メリビオースを分解できず、炭素源として利用できない。また、マルトースの利用には透過酵素（パーミアーゼ）と分解酵素（マルターゼ）が必要であるが、グルコースによってそれらの発現が抑制される。したがって、下面ビール酵母に見いだされた α -グルコシダーゼ遺伝子(MELI)をパン酵母で発現させる¹⁸⁾、あるいはマルトース利用に必要な遺伝子のプロモーターを恒常的に発現するプロモーターに置換するなどの試みが行われている³⁰⁾。

パン酵母は製パンプロセスにおいて、冷凍（凍結-融解）、高温乾燥、高浸透圧などの多様な環境ストレスにさらされながら有用機能（炭酸ガスの発生、味・風味成分の生成など）を発揮している。しかしながら、パン酵母にこれらのストレスが長時間または複合的に負荷されると、細胞内では蛋白質、核酸、脂質などの重要な生体高分子が変性する。また、ミトコンドリア膜の損傷、抗酸化酵素の失活などにより活性酸素種(Reactive oxygen species; ROS)が蓄積する「酸化ストレス」状態に陥り、生育阻害や細胞死が引き起こされる。

本稿では、パン酵母が製パン過程で受ける環境ストレス（製パン関連ストレス）、およびこれらのストレスに対する酵母の応答・耐性機構を概説するとともに、これまで筆者が取り組んできたプロリン・アルギニン代謝を介した酵母のストレス耐性機構とパン酵母の育種への応用について紹介する。

2. 製パン関連ストレス

製パン産業における重要な技術の一つは、高い発酵力と多様な製パン法に対応できる耐久性を備えたパン酵母

図1. パン酵母を用いた製パン法と製パン関連ストレス

の開発である。例えば、ドライイーストは生イーストに比べ、長期間の貯蔵や輸送経費の削減が可能になるため広く使用されている。また、菓子パン用生地（高糖生地）には小麦粉重量当たり最高で40%ものショ糖が含まれている。さらに近年、冷凍生地製パン法が消費者にオープンフレッシュベーカーリーを提供するために開発されてきた。パン生地の発酵やパン酵母の製造の過程で、酵母の細胞は冷凍（凍結-融解）、高濃度ショ糖、高温乾燥など多くのストレス（製パン関連ストレス）に複合的あるいは連続的にさらされている^{3,42)} (Fig. 1)。このようなストレスは細胞内蛋白質の変性（異常蛋白質の生成）を誘導するだけでなく、ミトコンドリアの傷害に伴い、細胞内のROSレベルを上昇させるため、二次的には酸化ストレスとも言える^{3,42)}。

一般に、微生物にはある程度環境ストレスに適応する能力を備えている。酵母も各ストレスに応答するシグナル伝達経路に関連する遺伝子群の発現を制御することで、シャペロンなどのストレス蛋白質の誘導、ストレス保護物質や適合溶質の蓄積、細胞膜組成の変化、翻訳の抑制などさまざまなストレス適応メカニズムを獲得している。しかしながら、過酷なストレス下では、生育阻害や細胞死が引き起こされ、パン酵母の有用機能（炭酸ガスの発生、味・風味物質の生成など）が制限される。したがって、パン酵母に高度なストレス耐性を付与することにより、長期冷凍保存生地や無糖生地に適した「冷凍耐性パン酵母」、耐久性の強い高品質「ドライイースト」などの開発が可能になる。

2.1 冷凍（凍結-融解）ストレス

近年、オープンフレッシュベーカーリーやコンビニエンスストアでは、製パン過程の途中で生地を冷凍する「冷凍生地」で製造されるパンが多く販売されている。製パン業界の国内市場規模は2010年で約1兆4,000億円と算出され、その約10%（約1,400億円）が冷凍生地で製造されている。冷凍に伴う製パン作業の一時中断により、焼き立てに近いパンの提供、労働環境の改善・省力化など多くのメリットがあるため、製パン業界におけるニーズも高い。一方で、生地中のパン酵母は凍結-融解にさ

らされることで発酵力が顕著に低下する。凍結-解凍のプロセスは細胞内にフリーラジカルを大量に生成し、酸化ストレスを誘導することも知られている³⁰⁾。現在、冷凍生地の保存期間は1カ月程度に限定され、家庭用冷凍生地の商品化には至っていない。また、ショ糖を含まない生地（フランスパン）では細胞の損傷が著しく、冷凍生地の製造がいまだに困難である。したがって、従来に比べ一段と強い冷凍耐性を備えたパン酵母の開発によって、家庭用冷凍生地やフランスパンの冷凍生地が可能になると考えられる。

冷凍耐性酵母はこれまでに自然界や保存菌株から分離されただけでなく^{11,12,29)}、従来の突然変異や交雑²¹⁾によっても作製されてきた。また、凍結-融解による細胞の損傷は、冷凍前に生地を加熱処理すると低減できることもある²²⁾。冷凍耐性を示す酵母(*S. cerevisiae*)は、通常の酵母に比べてトレハロースを蓄積している^{12,29)}。酵母は種々のストレス条件下でトレハロースの合成を誘導する^{15,52)}。細胞内に蓄積したトレハロースはストレスから細胞を保護する物質として機能するが、トレハロースの細胞内濃度は、その合成と分解の代謝バランスによって調節されている。トレハロース分解酵素の一つである中性トレハラーゼNth1をコードする遺伝子(*NTH1*)を破壊すると、細胞内のトレハロース濃度が増加し、冷凍生地におけるパン酵母の発酵力が向上した⁴¹⁾。

転写因子のMsn2はさまざまなストレスに応答し、抗酸化酵素、トレハロース合成系、熱ショック蛋白質などストレス耐性に関与する多くの遺伝子の転写を活性化する。清酒酵母やバイオエタノール酵母では、Msn2の過剰発現により上記の遺伝子の転写量が増加し、アルコール発酵性や発酵阻害物質（フルフラール）存在下での発酵速度が向上した^{38,56)}。筆者らは、パン酵母においてMsn2を過剰発現させたところ、細胞内のトレハロース含量が増加し、冷凍生地の発酵力も野生型株に比べて著しく向上した（約2.5倍）³⁴⁾。

2.2 高濃度ショ糖ストレス

パンの生地は生地に含まれる砂糖の濃度に基づいて低糖（リーン）生地と高糖（リッチ）生地に分けられる。低糖生地には、フランスパンのように砂糖が全く含まれていないか、食パンのように少量の砂糖（小麦粉重量当たり5%以下）が含まれている。一方、高糖生地は小麦粉重量当たり30%程度のショ糖を含有している場合が多い。このような高いショ糖濃度は細胞の構成成分に著しい傷害を与え⁵⁴⁾、発酵を阻害するため、菓子パン生地に使用するパン酵母には高浸透圧ストレス耐性が必要である。また、高濃度ショ糖を含む培地での発酵中に、ROSの蓄積がワイン酵母の細胞に酸化的ダメージを引き起こすことが報告されている¹⁷⁾。日本における製パンの商品別市場規模構成では、菓子パンが約4割ものシェアを占めており、小麦粉重量当たりおよそ40%のショ糖を含有する「超高糖生地」においても、十分に発

酵力を維持できるパン酵母の開発が望まれている。

酵母が高浸透圧耐性になる機構は、例えばストレス蛋白質の誘導、ストレス保護物質や適合溶質の蓄積、膜構成の変化などが関与している⁴³⁾。酵母は浸透圧を感知すると、グリセロールやトレハロースを細胞内に蓄積する^{5, 13, 41)}。DNAマイクロアレイによる網羅的解析や遺伝子破壊株コレクションを用いたゲノムワイドなスクリーニングによって、グリセロールやトレハロースの代謝が高濃度ショ糖ストレス耐性に重要であるとされている^{2, 50)}。また、後述するプロリンも浸透圧ストレスに応答して、多くの細菌や植物の細胞で蓄積されることが報告されている^{6, 53)}。

2.3 高温乾燥ストレス

現在、パン酵母の国内市場規模は約200億円であり、ドライイーストは高級ベーカリーでの使用や家庭製パンの定着などにより需要が増加し、欧州からの輸入も増加している。ドライイーストの製造の際、酵母は熱気による乾燥だけでなく、熱気によって細胞内が37℃程度まで上昇する。したがって、ドライイーストの製造プロセスで、酵母は高温と乾燥（脱水）という2種類のストレス（高温乾燥ストレス）にさらされている。高温乾燥ストレスは、細胞内蛋白質のミスフォールディング（折り畳み不全）、ミトコンドリアの機能不全および液胞の酸性化など多くの有害な影響を細胞に及ぼし、酵母の発酵力を低下させる^{23, 43)}。また、これらのストレスによって細胞内のROSレベルは上昇する^{10, 25)}。好気性生物では、通常の呼吸代謝の間にROSが副産物として生成するが、さまざまな抗酸化酵素によって消去される。しかし、長期間または過酷な高温・脱水処理によって、抗酸化に関与する酵素や蛋白質が失活するため、ROSレベルが増加し、発酵力の低下や細胞死を引き起こす。したがって、長期保存可能なドライイーストの製造を行うには、優れた高温乾燥ストレス耐性を備えたパン酵母が必要である。

3. プロリン・アルギニン代謝に着目したパン酵母の育種

3.1 プロリン代謝

酵母において、プロリンは細胞質で主にグルタミン酸から3種類の酵素（ γ -グルタミルキナーゼPro1, γ -グルタミルリン酸レダクターゼPro2, Δ^1 -ピロリン-5-カルボン酸(P5C)レダクターゼPro3）により合成される(Fig. 2)。また一部、アルギニンからオルニチン、P5Cを経て合成される。一方、プロリンはミトコンドリアで2種類の酵素（プロリンオキシダーゼPut1, P5CデヒドロゲナーゼPut2）により酸化され、グルタミン酸に変換される(Fig. 2)。プロリンの代謝は他のアミノ酸と同様に転写レベルで制御されており、Pro1とPro2が一般アミノ酸制御(General amino acid control)下にあると報告されている。また、分解にかかわる酵素(Put1,

図2. パン酵母のプロリン・アルギニン代謝

プロリンにはストレスから酵母を保護する機能があり、プロリン蓄積株ではさまざまなストレス耐性が向上した。また、高温ストレス下では、Mpr1を介した新規のアルギニン合成が亢進され、増加したアルギニンからTah18依存的に一酸化窒素(NO)が生成し、細胞のストレス耐性に寄与している。

Put2)はプロリンにより転写が誘導され、プロリン含量の調節に関与している。翻訳後では、初発酵素のPro1がプロリンによりフィードバック阻害を受けるため、必要以上に合成されない。したがって、野生株や通常の培養では細胞内にプロリンはほとんど検出されない⁴⁴⁾。

近年の冷凍生地製パン法の普及に伴い、冷凍ストレスに耐性を示すパン酵母が既に開発されている。しかしながら、冷凍生地の長期保存、フランスパンなど無糖生地への使用を可能にするためには、高度な冷凍ストレス耐性を有するパン酵母の育種が必要である。筆者らは以前から冷凍耐性パン酵母の育種を目的とした研究を進めており、プロリンが冷凍後の酵母の生存率低下を抑えること（冷凍ストレス耐性の向上）を見いだした⁴⁵⁾。プロリンには、浸透圧の調節、蛋白質や細胞膜の安定化、ヒドロキシラジカルの消去、核酸の T_m 値低下などの機能が報告されているが、ストレス下における細胞内での生理的役割については不明な点が多い。プロリンは水に対する溶解度が極めて高く、細胞内の自由水との親和性が強いいため、おそらく冷凍ストレス下での氷結晶生成や脱水を防ぎ、細胞を保護していると考えられる⁴⁴⁾。

多くの細菌や植物では、乾燥や塩ストレスに応答してプロリンを浸透圧調節物質として蓄積するが^{6, 53)}、酵母はストレス時にプロリン合成を誘導せず、トレハロースやグリセロールを優先的に蓄積する^{5, 13, 15, 41)}。そこで、細胞内にプロリンを蓄積する変異株をプロリンの毒性アナログであるアゼチジン-2-カルボン酸(AZC)に耐性を示す変異株から分離し、詳細に解析した。その結果、Pro1の遺伝子にIle150Thr, Asp154Asnなどのアミノ酸置換を伴う変異が導入されると、プロリンによるフィードバック阻害感受性が低下し、プロリンを過剰合成することが判明した^{20, 39)}。また、プロリン分解の初発酵素Put1の遺伝子を破壊した菌株で変異型Pro1を発現させ

図3. 野生型株(WT)と変異型Pro1・Mpr1発現株の特性

A: 冷凍処理後(−20℃, 9日間)の酵母の相対発酵力(冷凍前の発酵力を100%)。

B: 高糖生地(小麦粉重量当たり30%のショ糖を含有)の酵母の相対発酵力(野生型株の発酵力を100%)。

C: 高温乾燥処理後(37℃, 4時間)の酵母の相対発酵力(野生型株の発酵力を100%)。

ると、プロリン含量の増加と冷凍ストレス耐性の向上が見られた^{20,51)}。プロリン蓄積株は冷凍以外に乾燥、酸化、浸透圧、エタノールなどのストレス条件下でも野生株に比べて生存率が高いことから、プロリンの有用性が実証された^{19,20,46,47,49,51)}。

次に、プロリンを蓄積するパン酵母の実用株を作製し、その特性を解析した¹⁶⁾。後述するセルフクローニング法(すべて酵母の遺伝子から構成され、異種生物や化学合成など外来のDNAを一切含まない方法)を用いて、パン酵母1倍体の野生型Pro1遺伝子を変異型Pro1(*PRO1*^{I150T}, *PRO1*^{D154N})^{20,39)}に置換し、さらにPut1遺伝子を破壊した($\Delta put1$)。各1倍体を接合させ作製した2倍体を培養すると、予想どおり細胞内にプロリンが蓄積されていた。実際にプロリン蓄積株と野生型株を用いてパン生地を調製し、9日間冷凍した後の炭酸ガス発生量(発酵力)を測定した(Fig. 3A)。その結果、野生型株では発酵力が冷凍前の約40%にまで低下したが、プロリン蓄積株の発酵力は野生型株の約1.5倍を維持しており、冷凍生地製パン法への有用性が実証できた。

また、菓子パン製造時の高濃度ショ糖に対する影響についても解析した³⁶⁾。プロリン蓄積株は30%ショ糖存在下でのROSレベルが減少し、細胞の生存率も野生型株より約20%上昇した。プロリンの蓄積によって酸化ストレス耐性が向上し、高濃度ショ糖耐性を獲得したと考えられる。また、プロリン蓄積株は野生型株と比較して、高糖生地での発酵力が30~50%増加しており、その有用性が確認できた(Fig. 3B)。

さらに、冷凍保護物質のトレハロースとプロリンを同

時に細胞内に蓄積させるために、中性トレハラーゼの遺伝子(*NTH1*)を破壊したプロリン蓄積株を作製した³⁵⁾。その結果、プロリンとトレハロースを同時に蓄積する株は、プロリン、トレハロースの各単独蓄積株と比較して、過酸化水素や冷凍に10~100倍の耐性を示した。また、1週間冷凍した後の発酵力も約20%増加した。以上の結果から、製パン関連ストレス耐性を強化するパン酵母の育種戦略として、変異型Pro1(Ile150Thr, Asp154Asnなど)の発現による細胞内プロリンの蓄積が極めて有効であることが示された。また、*NTH1*遺伝子の欠損によるトレハロースの蓄積も相加効果のあることが明らかとなった。

3.2 プロリンとアルギニンの代謝を連結する Mpr1

筆者らが実験室酵母(Σ 1278b株)に見いだしたMpr1(*sigma* 1278b gene for proline-analogue resistance)はプロリンアナログのAZCをアセチル化により解毒する*N*-アセチルトランスフェラーゼである^{40,48)}。興味深いことに、Mpr1は熱ショック、冷凍、エタノール、過酸化水素、乾燥などの処理で細胞内に生じるROSレベルを制御し、酵母を酸化ストレスから防御している^{9,10,28)}。また、Mpr1はROSに作用する既知の抗酸化酵素と異なり、ミトコンドリアでROS発生に関与するプロリン代謝中間体(P5C/グルタミン酸- γ -セミアルデヒド(GSA))をアセチル化することで、プロリンとアルギニンの代謝経路を連結するとともに、P5Cが関与しているROSの発生を抑えることも示された^{24,27)}。

次に、Mpr1の機能をパン酵母の育種に応用すること

図4. 野生型株(WT)と変異型Pro1・Mpr1発現株の特性

A: 高温乾燥処理後(37℃, 90分)の酵母の細胞内NO(左)およびROS(右)レベル.

B: 高温乾燥処理後(37℃, 90分)(左)および冷凍処理後(−20℃, 3週間)(右)の酵母の相対発酵力(野生型株の発酵力を100%(左), 冷凍前の発酵力を100%(右)).

を試みた. ドライイースト用のパン酵母には優れた高温乾燥耐性が必要である. パン酵母はMpr2遺伝子(Mpr1遺伝子と一塩基のみ異なるが, 同じ機能を有している)を保持しているため, 高温乾燥条件下(37℃, 4時間)におけるMpr2の役割を解析した³⁷⁾. その結果, Mpr2遺伝子の破壊株は高温乾燥処理後のROSレベルが野生型株よりも約40%高く, 生存率が約30%低下した. さらに, 高温乾燥処理後の各菌株を用いてパン生地を調製したところ, 高温乾燥処理後のMpr2遺伝子破壊株は, 発酵力が野生型株の約65%にまで低下した. これらの結果から, パン酵母のMpr2は高温乾燥処理などの酸化ストレス下で細胞内ROSレベルの上昇を防ぐことで細胞の生存に寄与していると考えられる.

これまでに, エラーブローンPCRを用いたMpr1遺伝子へのランダム変異導入により, 野生型酵素よりも高いAZC耐性を細胞に付与し, かつ過酸化水素やエタノール処理後のROSレベルを低下させ, 生存率を向上させる変異型Mpr1(Lys63Arg, Phe65Leu)を取得している¹⁴⁾. 各変異型酵素は触媒活性が少し向上し, Phe65Leu変異型酵素では温度安定性が著しく向上していた. そこで, セルフクローニング法を用い, 変異型Mpr1を発現するパン酵母の2倍体を作製し, その特性を解析した³⁷⁾. パン酵母の染色体上の野生型Mpr2遺伝子を相同組換えにより変異型Mpr1遺伝子(Lys63Arg, Phe65Leu)に置換した. 作製した菌株に高温乾燥処理を施したところ, 変異型Mpr1発現株は野生型株に比べて生存率が約40~80%増加した. 次に, 高温乾燥処理後の各菌株を用いて

パン生地を調製し, 発酵力を測定した(Fig. 3C). 高温乾燥処理前では, 菌株間で発酵力に差はなかったが, 変異型Mpr1発現株は高温乾燥処理後の発酵力が野生型株の1.5~1.8倍に増加しており, 特に, 安定性の向上したPhe65Leu変異型Mpr1の発現株が高い発酵力を示した. また, 上述のIle150Thr変異型Pro1のみを発現させても高温乾燥後の発酵力が向上しており, プロリンの効果も確認できた(Fig. 3C). これらの結果から, 変異型Mpr1によって長期保存可能な耐久性の優れたドライイーストを用いたパン生地の効率的生産が期待できる.

3.3 プロリンからアルギニン・一酸化窒素へ

筆者らは最近, 実験室酵母(Σ1278b株)では, Put1遺伝子とMpr1遺伝子の転写が高温処理により誘導され, プロリンからN-アセチルGSAを介してアルギニンの合成を亢進すること, および増加したアルギニンが酵母の高温ストレス耐性に寄与することを見いだした²⁵⁾. これまでにアルギニンを分解するアルギナーゼCar1の遺伝子を破壊すると, パン酵母の細胞内にアルギニンが蓄積し, 冷凍ストレス耐性が向上することが明らかになっている⁴²⁾. アルギニンには, 冷凍ストレス下で蛋白質の変性(凝集)を防ぐ作用が知られているが, 筆者らはアルギニンが哺乳類においてシグナル分子として関与する一酸化窒素(NO)の前駆体であることに着目し, 酵母においてもNOがアルギニンから酵素的に生成し, 細胞に酸化ストレス耐性を付与することを見いだした²⁶⁾. また, NOが銅代謝に関与する転写因子Mac1の活性を制御し, スーパーオキシドジスムターゼ活性の上

昇を介して、酸化ストレス耐性を付与している可能性が示された。

そこで、パン酵母2倍体（野生型株）を親株とし、変異型のPro1 (Ile150Thr)とMpr1 (Phe65Leu)を同時に発現させることで、ストレスに応答してプロリンからアルギニンを経てNOを効率良く生成する株を作製した³³⁾。その結果、変異型Pro1・Mpr1発現株は酸化ストレス耐性が約10倍向上していた。また、高温乾燥、冷凍などの製パンストレス条件下においてもその効果が実証できた。特に、高温乾燥処理条件においては、変異型Pro1・Mpr1発現株では野生型株やプロリン蓄積株に比べ、細胞内のNOレベルが増加し、ROSレベルが減少した(Fig. 4A)。プロリンからのNO合成が細胞に酸化ストレス耐性を付与し、高温乾燥・冷凍耐性を獲得したと考えられる。さらに、変異型Pro1・Mpr1発現株は野生型株に比べて、高温乾燥処理後、冷凍3週間後の発酵力がそれぞれ約20%向上した(Fig. 4B)。以上の結果から、プロリンとアルギニンの合成系強化が酸化ストレスおよび複数の製パンストレスに対する耐性を向上させ、パン酵母の育種法として有効であることが示された。

3.4 実用化可能なパン酵母の育種

本稿で述べてきたように、プロリン蓄積に関与するPro1遺伝子や酸化ストレスに伴うアルギニン（またはNO）の合成に関与するMpr1遺伝子、本稿では触れなかったがストレスによって生成する変性（異常）蛋白質の処理に関与するユビキチンリガーゼRsp5遺伝子に適切な変異が導入されたパン酵母は、プロリンの毒性アナログであるAZCに対する耐性が向上し、かつ冷凍や高温乾燥に対する耐性の向上も期待できる。したがって、古典的手法（突然変異処理など）を用いて親株よりもAZCに耐性を示す変異株を分離することで、同様のメカニズムによって冷凍耐性や高温乾燥耐性の向上したパン酵母を育種することも可能である(Fig. 5)。

図5. 酵母のAZCに対する感受性(左)および耐性(右)の機構

変異型Pro1（プロリンによるフィードバック阻害感受性低下など）、変異型Mpr1（触媒活性・安定性の向上など）、あるいは変異型Rsp5（異常蛋白質認識能の向上など）を発現する酵母細胞はAZC耐性を獲得する。

今後、パン酵母におけるプロリンやNOの生理機能の解析とともに、酵素機能が向上した変異型酵素（Pro1, Mpr1など）を共発現させ、さまざまなストレス耐性を強化したパン酵母の開発によって、パン類（冷凍生地、超高糖生地、ドライイーストなどの効率的生産が期待できる。また、細胞内ROSレベルを人為的に制御し、酵母に高度な酸化ストレス耐性を付与することにより、パン類以外にも、酒類やバイオエタノールなどの発酵生産性の改善に貢献できると考えられる。

4. おわりに

実用パン酵母の育種には、ポストゲノム解析により実験室酵母で得られたデータを活用することが可能である。また、従来の発酵力の限界を突破するためには、古典的方法（自然分離、突然変異、交雑など）だけでなく、遺伝子組換え技術などの分子生物学的手法の利用が望ましい。しかしながら、消費者や企業には依然として遺伝子操作に対する不信感や消極的な姿勢が見られる。2008年6月に策定された「遺伝子組換え食品（微生物）の安全性評価基準」においては、「宿主に導入されたDNAが、当該微生物と分類学上の同一の種に属する微生物のDNAのみである場合（セルフクローニング）」に該当する微生物を利用して製造されたものは原則として安全性評価の対象に含めないと記載されている。セルフクローニング法は遺伝子組換え技術の一つであるが、すべて酵母の遺伝子から構成され、外来遺伝子（異種生物、化学合成など）を一切含まない方法で作製した酵母は、厚生労働省から「遺伝子組換え体に当たらない」と認定されると、通常の食品微生物として扱えることになる(Fig. 6)。

本稿では、主にセルフクローニング法を用いて作製したパン酵母について、冷凍生地やドライイースト製造への応用に関する取り組みを紹介した。これまでに、セルフクローニング型酵母で製造した清酒が市販された例があるが、パン酵母においては依然として社会的受入れが困難な状況にあり、まだ実用化されていない。セルフクローニング型パン酵母の安全性評価および環境アセスメントに向けた特異的検出系の構築も行われており¹⁾、今後、セルフクローニング法により開発された産業酵母の実用化が増えることを期待したい。

図6. セルフクローニング法による新しい酵母の作製。

謝 辞

本稿で紹介した研究は、主に生物系特定産業技術研究支援センターによる「基礎研究推進事業」および「イノベーション創出事業」の支援を受けて行った。また、共同研究者として、菌株の作製やストレス耐性試験を行った奈良先端科学技術大学院大学の天津巖生助教、渡辺大輔助教、戒能智宏博士（現・島根大学生物資源科学部准教授）、笹野 佑博士（現・大阪大学大学院工学研究科助教）、橋田恵介氏（現・木下酒造有限公司）、各菌株の製パン性試験を実施していただいた（独）農研機構・食品総合研究所および京都大学微生物科学寄附研究部門の島純特定教授（現・龍谷大学農学部教授）、村田里美博士、高橋俊輔博士、灰谷 豊博士に心より感謝いたします。

文 献

- Ando, A., Suzuki, C. and Shima, J.: Survival of genetically modified and self-cloned strains of commercial baker's yeast in simulated natural environments: environmental risk assessment. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 7075-7082 (2005).
- Ando, A., Tanaka, F., Murata, Y., Takagi, H. and Shima, J.: Identification and classification of genes required for tolerance to high-sucrose stress revealed by genome-wide screening of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.*, **6**, 249-267 (2006).
- Attfield, P. V.: Stress tolerance: the key to effective strains of industrial baker's yeast. *Nat. Biotechnol.*, **15**, 1351-1357 (1997).
- Burrows, S.: Baker's yeast: The yeast, Vol. 3, Yeast technology. Rose, A. H. and Harrison, J. S. (eds.), p. 349-420, Academic Press, London (1970).
- Cronwright, G. R., Rohwer, J. M. and Prior, B. A.: Metabolic control analysis of glycerol synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 4448-4456 (2002).
- Csonka, L. N.: Proline over-production results in enhanced osmotolerance in *Salmonella typhimurium*. *Mol. Gen. Genet.*, **182**, 82-86 (1981).
- Dequin, S.: The potential of genetic engineering for improving brewing, wine-making and bread making. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **56**, 577-588 (2001).
- Du, X. and Takagi, H.: *N*-acetyltransferase Mpr1 confers freeze tolerance on *Saccharomyces cerevisiae* by reducing reactive oxygen species. *J. Biochem.*, **138**, 391-397 (2005).
- Du, X. and Takagi, H.: *N*-Acetyltransferase Mpr1 confers ethanol tolerance on *Saccharomyces cerevisiae* by reducing reactive oxygen species. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **75**, 1343-1351 (2007).
- Franca, M. B., Panek, A. D. and Eleutherio, E. C.: Oxidative stress and its effects during dehydration. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, **146**, 621-631 (2007).
- Hahn, Y. S. and Kawai, H.: Isolation and characterization of freeze-tolerant yeasts from nature available for the frozen-dough method. *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 829-831 (1990).
- Hino, A., Takano, H. and Tanaka, Y.: New freeze-tolerant yeast for frozen dough preparations. *Cereal Chem.*, **64**, 269-275 (1987).
- Hirasawa, T., Nakakura, Y., Yoshikawa, K., Ashitani, K., Nagahisa, K., Furusawa, C., Katakura, Y., Shimizu, H. and Shioya, S.: Comparative analysis of transcriptional responses to saline stress in the laboratory and brewing strains of *Saccharomyces cerevisiae* with DNA microarray. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **70**, 346-357 (2006).
- Iinoya, K., Kotani, T., Sasano, Y. and Takagi, H.: Engineering of the yeast antioxidant enzyme Mpr1 for enhanced activity and stability. *Biotechnol. Bioeng.*, **103**, 341-352 (2009).
- Kaino, T. and Takagi, H.: Gene expression profiles and intracellular contents of stress protectants in *Saccharomyces cerevisiae* under ethanol and sorbitol stresses. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **79**, 273-283 (2008).
- Kaino, T., Tateiwa, T., Mizukami-Murata, S., Shima, J. and Takagi, H.: Self-cloning baker's yeasts that accumulate proline enhance freeze tolerance in doughs. *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 5845-5849 (2008).
- Landolfo, S., Politi, H., Angelozzi, D. and Mannazzu, L.: ROS accumulation and oxidative damage to cell structures in *Saccharomyces cerevisiae* wine strains during fermentation of high-sugar-containing medium. *Biochim. Biophys. Acta*, **1780**, 892-898 (2008).
- Liljeström-Suominen, P. L., Joutsjoki, V. and Korhola, M. P.: Construction of a stable α -galactosidase producing baker's yeast. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 245-249 (1988).
- Matsuura, K. and Takagi, H.: Vacuolar functions are involved in stress-protective effect of intracellular proline in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biosci. Bioeng.*, **100**, 538-544 (2005).
- Morita, Y., Nakamori, S. and Takagi, H.: L-Proline accumulation and freeze tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* are caused by a mutation in the *PRO1* gene encoding γ -glutamyl kinase. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 212-219 (2003).
- Nakagawa, S. and Ouchi, K.: Construction from a single parent of baker's yeast strains with high freeze tolerance and fermentative activity in both lean and sweet doughs. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 3499-3502 (1994).
- Nakagawa, S. and Ouchi, K.: Improvement of freeze tolerance of commercial baker's yeasts in dough by heat treatment before freezing. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **58**, 2077-2079 (1994).
- Nakamura, T., Mizukami-Murata, S., Ando, A., Murata, Y., Takagi, H. and Shima, J.: Changes in gene expression of commercial baker's yeast during an air-drying process that simulates dried yeast production. *J. Biosci. Bioeng.*, **106**, 405-408 (2008).
- Nasuno, R., Hirano, Y., Itoh, T., Hakoshima, T., Hibi, T. and Takagi, H.: Structural and functional analysis of

- the yeast *N*-acetyltransferase Mpr1 involved in oxidative stress tolerance via proline metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **110**, 11821–11826 (2013).
- 25) Nishimura, A., Kotani, T., Sasano, Y. and Takagi, H.: An antioxidative mechanism mediated by the yeast *N*-acetyltransferase Mpr1: oxidative stress-induced arginine synthesis and its physiological role. *FEMS Yeast Res.*, **10**, 687–698 (2010).
 - 26) Nishimura, A., Kawahara, N. and Takagi, H.: The flavo-protein Tah18-dependent NO synthesis confers high-temperature stress tolerance on yeast cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **430**, 137–143 (2013).
 - 27) Nishimura, A., Nasuno, R. and Takagi, H.: The proline metabolism intermediate Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate directly inhibits the mitochondrial respiration in budding yeast. *FEBS Lett.*, **586**, 2411–2416 (2012).
 - 28) Nomura, M. and Takagi, H.: Role of the yeast acetyltransferase Mpr1 in oxidative stress: regulation of oxygen reactive species caused by a toxic proline catabolism intermediate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **101**, 12616–12621 (2004).
 - 29) Oda, Y., Uno, K. and Ohta, S.: Selection of yeasts for breadmaking by the frozen-dough method. *Appl. Environ. Microbiol.*, **52**, 941–943 (1986).
 - 30) Osinga, K. A., Beudeker, R. F., van der Plaats, J. B. and de Hollander, J. A.: EU Patent 0306107A2 (1988).
 - 31) Park, J. I., Grant, C. M., Davies, M. J. and Dawes, I. W.: The cytoplasmic Cu, Zn superoxide dismutase of *Saccharomyces cerevisiae* is required for resistance to freeze-thaw stress. *J. Biol. Chem.*, **273**, 22921–22928 (1988).
 - 32) Randez-Gil, F., Sanz, P. and Pietro, J. A.: Engineering baker's yeast: room for improvement. *Trends Biotechnol.*, **17**, 237–244 (1999).
 - 33) Sasano, Y., Haitani, Y., Hashida, K., Ohtsu, I., Shima, J. and Takagi, H.: Enhancement of the proline and nitric oxide synthetic pathway improves fermentation ability under multiple baking-associated stress conditions in industrial baker's yeast. *Microb. Cell Fact.*, **11**, 40 (2012a). doi:10.1186/1475-2859-11-40
 - 34) Sasano, Y., Haitani, Y., Hashida, K., Ohtsu, I., Shima, J. and Takagi, H.: Overexpression of the transcription activator Msn2 enhances fermentation ability of industrial baker's yeast in frozen dough. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **76**, 624–627 (2012).
 - 35) Sasano, Y., Haitani, Y., Hashida, K., Ohtsu, I., Shima, J. and Takagi, H.: Simultaneous accumulation of proline and trehalose in industrial baker's yeast enhances fermentation ability in frozen dough. *J. Biosci. Bioeng.*, **113**, 592–595 (2012).
 - 36) Sasano, Y., Haitani, Y., Ohtsu, I., Shima, J. and Takagi, H.: Proline accumulation in baker's yeast enhances high-sucrose stress tolerance and fermentation ability in sweet dough. *Int. J. Food Microbiol.*, **152**, 40–43 (2012).
 - 37) Sasano, Y., Takahashi, S., Shima, J. and Takagi, H.: Antioxidant *N*-acetyltransferase Mpr1/2 of industrial baker's yeast enhances fermentation ability after air-drying stress in bread dough. *Int. J. Food Microbiol.*, **138**, 181–185 (2010).
 - 38) Sasano, Y., Watanabe, D., Ukibe, K., Inai, T., Ohtsu, I., Shimoi, H. and Takagi, H.: Overexpression of the yeast transcription activator Msn2 confers furfural resistance and increases the initial fermentation rate in ethanol production. *J. Biosci. Bioeng.*, **113**, 451–455 (2012).
 - 39) Sekine, T., Kawaguchi, A., Hamano, Y. and Takagi, H.: Desensitization of feedback inhibition of the *Saccharomyces cerevisiae* γ -glutamyl kinase enhances proline accumulation and freezing tolerance. *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 4011–4019 (2007).
 - 40) Shichiri, M., Hoshikawa, C., Nakamori, S. and Takagi, H.: A novel acetyltransferase found in *Saccharomyces cerevisiae* Σ 1278b that detoxifies a proline analogue, azetidine-2-carboxylic acid. *J. Biol. Chem.*, **276**, 41998–42002 (2001).
 - 41) Shima, J., Hino, A., Yamada-Iyo, C., Suzuki, Y., Nakajima, R., Watanabe, H., Mori, K. and Takano, H.: Stress tolerance in doughs of *Saccharomyces cerevisiae* trehalase mutants derived from commercial baker's yeast. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 2841–2846 (1999).
 - 42) Shima, J., Sakata-Tsuda, Y., Suzuki, Y., Nakajima, R., Watanabe, H., Kawamoto, S. and Takano, H.: Disruption of the *CARI* gene encoding arginase enhances freeze tolerance of the commercial baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 715–718 (2003).
 - 43) Shima, J. and Takagi, H.: Stress-tolerance of baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) cells: stress-protective molecules and genes involved in stress tolerance. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **53**, 155–164 (2009).
 - 44) Takagi, H.: Proline as a stress protectant in yeast: physiological functions, metabolic regulations, and biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **81**, 211–223 (2008).
 - 45) Takagi, H., Iwamoto, F. and Nakamori, S.: Isolation of freeze-tolerant laboratory strains of *Saccharomyces cerevisiae* from proline-analogue-resistant mutants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **47**, 405–411 (1997).
 - 46) Takagi, H., Matsui, F., Kawaguchi, A., Wu, H., Shimoi, H. and Kubo, Y.: Construction and analysis of self-cloning sake yeasts that accumulate proline. *J. Biosci. Bioeng.*, **103**, 377–380 (2007).
 - 47) Takagi, H., Sakai, K., Morida, K. and Nakamori, S.: Proline accumulation by mutation or disruption of the proline oxidase gene improves resistance to freezing and desiccation stresses in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **184**, 103–108 (2000).
 - 48) Takagi, H., Shichiri, M., Takemura, M., Mohri, M. and Nakamori, S.: *Saccharomyces cerevisiae* Σ 1278b has novel genes of the *N*-acetyltransferase gene superfamily required for L-proline analogue resistance. *J. Bacteriol.*, **182**, 4249–4256 (2000).
 - 49) Takagi, H., Takaoka, M., Kawaguchi, A. and Kubo, Y.: Effect of L-proline on sake brewing and ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 8656–8662 (2005).

- 50) Tanaka-Tsuno, F., Mizukami-Murata, S., Murata, Y., Nakamura, T., Ando, A., Takagi, H. and Shima, J.: Functional genomics of commercial baker's yeasts that have different abilities for sugar utilization and high-sucrose tolerance under different sugar conditions. *Yeast*, **24**, 901–911 (2007).
- 51) Terao, Y., Nakamori, S. and Takagi, H.: Gene dosage effect of L-proline biosynthetic enzymes on L-proline accumulation and freeze tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 6527–6532 (2003).
- 52) Van Dijck, P., Colavizza, D., Smet, P. and Thevelein, J. M.: Differential importance of trehalose in stress resistance in fermenting and nonfermenting *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 109–115 (1995).
- 53) Verbruggen, N. and Hermans, C.: Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids*, **35**, 753–759 (2008).
- 54) Verstrepen, K. J., Iserentant, D., Malcorps, P., Derdelinckx, G., Van Dijck, P., Winderickx, J., Pretorius, I. S., Thevelein, J. M. and Delvaux, F. R.: Glucose and sucrose: hazardous fast-food for industrial yeast? *Trends Biotechnol.*, **22**, 531–537 (2004).
- 55) Watanabe, M., Fukuda, K., Asano, K. and Ohta, S.: Mutants of baker's yeasts producing a large amount of isobutyl alcohol or isoamyl alcohol, flavor components of bread. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **34**, 154–159 (1990).
- 56) Watanabe, M., Watanabe, D., Akao, T. and Shimoi, H.: Overexpression of *MSN2* in a sake yeast strain promotes ethanol tolerance and increases ethanol production in sake brewing. *J. Biosci. Bioeng.*, **107**, 516–518 (2009).
- 57) Wick, E. L., De Figueiredo, M. and Wallace, D. H.: The volatile components of white bread prepared by a preferment method. *Cereal Chem.*, **41**, 300–315 (1964).