酵母の環境ストレス耐性：産業利用における重要性と分子機構

島 純[§], 安藤 聡*, 中村敏英*

京都大学微生物科学寄附研究部門

* 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所

Environmental Stress Tolerance of Yeast : Importance in Industrial Uses
and Molecular MechanismsJun Shima[§], Akira Ando* and Toshihide Nakamura*Research Division of Microbial Sciences, Kyoto University,
Kitashirakawa Oiwake-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8502

* National Food Research Institute, NARO, 2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642

A yeast *Saccharomyces cerevisiae* is one of the most important microorganisms for human beings, because this yeast is necessary to produce almost all the fermented foods and alcohol beverages. During industrial processes using *S. cerevisiae*, numerous environmental stresses, such as supraoptimal temperatures, oxidation, hyperosmolarity, drying and freezing/thawing, are exposed to yeast cells. To improve the industrial fermentation processes, yeast cells should have higher levels of the tolerance against the environmental stress. In this review, we describe 1) the importance of the tolerance against the environmental stress of yeast cells during industrial uses, 2) molecular mechanisms of the tolerance against the environmental stress, and 3) molecular breeding of stress tolerant yeast strains.

(Accepted Mar. 19, 2010)

Keywords : yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, environmental stress, stress tolerance, fermented foods, alcohol beverage**キーワード** : 酵母, *Saccharomyces cerevisiae*, 環境ストレス, 発酵食品, アルコール飲料

1. はじめに

酵母は我々の食卓に最も貢献してきた産業微生物のひとつであり、人類のパートナーとも呼べる微生物である。酵母が介在する食品・飲料は、パン類、酒類、味噌・醤油、漬け物をはじめとして極めて多岐に及ぶ^{1)~6)}。このように重要な産業微生物である酵母を発酵食品製造に利用する場合に鍵となるのが、製造プロセスで負荷される環境ストレスに対する耐性である^{7)~9)}。環境ストレス耐性を有する酵母の開発および利用は、食品製造技術の高度化や低コスト化に直結する。このような背景から、酵母のストレス耐性にフォーカスした3回に渡るシリーズ総説を企画した。本稿では、シリーズ総説の初回として、産業プロセスにおいて酵母に負荷される環境ストレスの概要とそれらストレスに対する耐性機構について概説したい。また、それらの知

見を活用したストレス耐性酵母の分子育種に関する研究例についても紹介したい。

製パン、清酒醸造およびワイン醸造に用いられる酵母の実用菌株は、出芽酵母の1種である *Saccharomyces cerevisiae* に分類される¹⁾³⁾⁵⁾。ビール醸造には、*S. cerevisiae* と *Saccharomyces bayanus* の雑種である *Saccharomyces pastorianus* が下面発酵酵母として使用されている¹⁰⁾。また、味噌や醤油の醸造においては、耐塩性酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* が用いられる¹¹⁾。食品製造には、実用的な観点から優れた形質を有する株が選択されて使用されており、実用酵母株と呼ばれている。一方、遺伝学的・分子生物学的解析の容易さから、*S. cerevisiae* は多くの基礎的研究のモデル生物となっている。その研究内容は、遺伝子発現、細胞内輸送、細胞周期制御を含め極めて広範囲にわたり、細胞に関する基礎科学的知見が集積している生物としての側面を有している。これらの研究には、形質転換効率、孢子形成性等の優れた *S. cerevisiae* 株が使用されており、一般に実験室酵母株と呼ばれ、実用酵母株と区別して考えられている。本

[†] 606-8502 京都府京都市左京区北白川追分町* [†] 305-8642 茨城県つくば市観音台 2-1-12[§] 連絡先 (Corresponding author), shimaj@kais.kyoto-u.ac.jp

稿では、産業的に有用性の高い *S. cerevisiae* を中心として、酵母の環境ストレス耐性機構についてまとめた。

人類や動物が最適ではない環境におかれた場合に、ストレスを感じ適応反応を起こすのと同様に、微生物である酵母も生存に最適ではない環境下では、さまざまな生理的変化を起こす。本稿では、酵母の生育や発酵に最適ではない環境が細胞に及ぼす影響を「環境ストレス」と表現する。また、環境ストレスに対する適応反応を「環境ストレス応答」、環境ストレス負荷条件において生育や発酵が正常に行われる特性を「環境ストレス耐性」と整理することとした。

酵母の産業利用における発酵生産環境は極めて過酷なストレス環境であり、高温、低温、冷凍、乾燥、酸化、高浸透圧、高濃度アルコール、偏栄養、化学物質など多種多様なストレスが負荷される⁷⁾¹²⁾。他の生物と同様に、酵母は環境ストレスに応答して、ある程度適応する能力を備えている。しかし、適応能力を超えた過酷なストレス環境では、その有用機能は著しく制限される。また、多くの産業プロセスでは単一の環境ストレスばかりではなく、複合的および連続的に環境ストレスが負荷される。したがって、酵母の産業利用を高度化するうえで、環境ストレスに対する応答・耐性メカニズムを科学的に理解し、その知見を活用することは極めて重要である。

2. 食品製造プロセスで酵母に負荷される環境ストレス (表 1)

(1) 温度および冷凍ストレス

酵母の生育・発酵に適する温度は、種および菌株により大きく異なる。*S. cerevisiae* に属する多くの株の最適温度は 30℃ 前後である場合が多い。最適温度から大きく離れ

た温度に細胞が曝されると、温度ストレスが負荷される¹²⁾。温度ストレスが負荷されると、生体膜の流動性が変化するとともに、遺伝子発現に変化が生じ、ヒートショック応答またはコールドショック応答が引き起こされる。高温下に細胞がおかれた場合の直接的な影響としては、酵素を含むタンパク質の変性が挙げられる。また、活性酸素種 (ROS) が生成し、酸化ストレスが細胞に負荷され細胞構成成分に損傷が生じると考えられる⁷⁾。そのほか、細胞質の酸性化およびイオン恒常性の異常が生じる。

パン酵母製品を製造する培養プロセスでは、酵母細胞に高温ストレスが負荷される。培養プロセスで高温が負荷されることにより、ヒートショック応答が生じ、パン酵母製品に含まれる酵母細胞のストレス耐性が增強されると考えられている。また、乾燥酵母 (ドライイースト) を製造するための乾燥プロセスにおいても高温ストレスが負荷される。一方、清酒、ビール、ワインなどの酒類の醸造工程には、低温でのプロセスが含まれている。低温により酵母細胞にストレスが負荷されるが、低温発酵は酒類の味や風味の醸成に強く寄与していると考えられている。

また、環境温度が低下して、細胞外水または細胞内水が凍結した場合には、冷凍ストレスが細胞に負荷される。氷結晶の成長により、生体膜やタンパク質等の生体高分子が損傷を受ける。また、オルガネラの損傷に起因すると考えられる ROS レベルの上昇や金属イオンの恒常性の異常が生じる。さらに、細胞内水が細胞外に漏洩し細胞が乾燥状態におかれると考えられている。

近年普及が進んでいる冷凍生地製パン法との関連から、冷凍ストレス耐性は製パン用酵母にとって極めて重要な性質と考えられている¹³⁾。冷凍生地製パン法は、製パン用酵母を含むパン生地を -20℃ 程度で冷凍することにより、製

表 1 酵母に負荷される環境ストレスの種類

酵母の種類	環境ストレスの種類	環境ストレスが負荷される産業プロセス
製パン用酵母	冷凍ストレス	冷凍生地製パン
	高浸透圧ストレス	高糖生地製パン
	乾燥ストレス	乾燥酵母製造プロセス
	高温ストレス	パン酵母製品の製造 (培養) プロセス 乾燥酵母製造プロセス
	酸化ストレス	パン酵母製品の製造 (培養) プロセス 乾燥酵母製造プロセス
酒類酵母 (清酒, ワイン, ビール)	エタノールストレス	発酵プロセス (特に, 発酵後期)
	高浸透圧	発酵プロセス (特に, 高濃度仕込みの場合)
	低温ストレス	発酵プロセス
	酸化ストレス	発酵プロセス (エタノールストレス) 種培養の製造プロセス
耐塩性酵母 (味噌, 醤油)	塩ストレス	発酵プロセス

パンを一時中断させる方法である。この製パン法を用いると、焼き立てパンの提供や労働力の軽減など多くのメリットが生まれる。しかし、冷凍プロセスにおいて高度な冷凍ストレスが負荷されるため酵母細胞は障害を受け、解凍後の製パンプロセスに悪影響を与える。したがって、冷凍ストレスに耐性を有する製パン用酵母の開発が必要となり、冷凍耐性酵母の開発が進められた¹⁴⁾。

(2) 浸透圧ストレス

浸透圧ストレスとは、細胞内と細胞外の浸透圧の差に起因する環境ストレスであり、外部環境の浸透圧に依存して、高浸透圧ストレスと低浸透圧ストレスが生じる可能性がある。低浸透圧ストレス環境下では、細胞外水の流入などの影響が考えられるが、一般に、発酵力などの有用機能が著しく損なわれるまでには至らない場合が多い。低浸透圧ストレスは、製パン用酵母の水洗浄ステップやビール酵母の酸洗浄などで酵母細胞に負荷される。

高浸透圧ストレスに細胞が曝されると、膨圧や細胞容積の低下が生じ、生育阻害や発酵能の低下などの顕著な影響が観察される¹²⁾。産業的には、高浸透圧ストレスは、食品や酒類の製造プロセスの様々な場面で問題となる。小麦粉あたり 20～40% のショ糖を含む高糖生地（菓子パン生地）の発酵プロセスでは、高濃度のショ糖に由来する高浸透圧ストレス（高ショ糖ストレス）が負荷され、発酵が顕著に阻害される¹⁵⁾。また、酒類の発酵プロセスでも高浸透圧ストレスが酵母細胞に負荷される¹²⁾。特に、発酵プロセスの効率化のために高濃度で酒類の仕込みを行った場合には、発酵液に含まれる糖質原料や発酵産物であるエタノールなどにより、酵母は高度な高浸透圧ストレスに曝される。

(3) 乾燥ストレス

乾燥ストレスは細胞内水の減少により負荷される環境ストレスであり、生体膜やタンパク質等の細胞構成成分に強い損傷をもたらす。細胞からの脱水が生じることから、高浸透圧ストレスと類似したストレスが細胞に与えられると考えられる⁷⁾。

製パン用乾燥酵母（ドライイースト）は、専用の乾燥機を用いた通風乾燥により製造される¹⁶⁾。このプロセスでは、乾燥ストレスと高温ストレスが同時にパン酵母細胞に負荷されると考えられる。したがって、高い発酵力を持つ乾燥酵母の製造には、乾燥および高温ストレスに対する耐性を有する酵母株が必要となる。また、酒類製造においても、発酵の安定制御等のために乾燥酵母を使用するケースがあるため、酒類用酵母においても乾燥ストレス耐性は必要な特性であると考えられる。

また、乾燥ストレスが負荷された場合には、副次的に細胞内に ROS が高蓄積すると考えられる。したがって、乾燥ストレス耐性には、ROS 除去系や抗酸化タンパク質の機能が重要となる。

(4) 酸化ストレス

好気的な呼吸によるエネルギー獲得には、分子状酸素が必要不可欠である。しかし、好気的な環境下では、スーパーオキシドラジカル、ヒドロキシラジカルなどの ROS が生じる¹²⁾。これら ROS は、細胞構成分子にダメージを与えると同時に、老化や細胞死との関連性があることも指摘されている。具体的には、脂質の過酸化、タンパク質の変性、核酸の障害などが ROS により生じるとされる。したがって、パン酵母製品の製造過程における好気的培養プロセスやビール醸造における種培養プロセスでは、酵母細胞に酸化ストレスが負荷される。通常の場合、呼吸により生じた ROS はカタラーゼやスーパーオキシドディスムターゼにより処理される。

また、冷凍ストレス、エタノールストレス等はミトコンドリアをはじめとしたオルガネラに損傷を与え、ROS の細胞質への漏洩を引き起こす可能性が考えられている⁷⁾。酵母の産業利用において負荷される環境ストレスの多くは、酸化ストレスを副次的に生じさせると考えることができる。したがって、酸化ストレス耐性機構の解明および酸化ストレス耐性酵母の開発は、酵母の産業利用に必要な不可欠と考えられる。

(5) エタノールストレス

酒類の製造プロセスにおいて、重要な環境ストレスとなるのが、酵母の代謝産物であるエタノールによる環境ストレスである。全ての酒類の製造では、エタノールを含む飲料の製造が目的であり、必然的に酵母細胞にエタノールストレスが負荷される。ビールの醸造工程等では、酵母細胞を繰り返し使う場合もあり、エタノールによる細胞障害の回避がのぞまれる。エタノールによる細胞障害は、エタノール濃度依存性であると考えられており、生育の阻害、細胞サイズの減少、生残性の減少等が引き起こされる¹²⁾。エタノールストレスの主要な標的は、細胞を構成する生体膜であると考えられている。すなわち、エタノールストレスにより生体膜の透過性が高まると同時に、細胞質の酸性化が生じるとされる。高濃度で酒類を仕込んだ場合には、最終エタノール濃度も高くなることから、エタノールストレスの度合いも高まる。エタノールストレス耐性には、細胞膜の組成が重要であることが指摘されている。特に、不飽和脂肪酸の組成とエタノールストレス耐性に密接に関与することが報告されている¹²⁾。

3. 酵母の環境ストレス耐性機構 (表 2)

(1) ストレス応答情報伝達系

環境ストレスが負荷されない状態の細胞に、高浸透圧等のストレスが負荷されると、環境ストレス応答が誘導され、ストレス耐性機構が活性化すると考えられる。一般に、増殖期の細胞では cAMP 依存性のプロテインキナーゼ A が活性化されており、細胞増殖に関する遺伝子群の転写が

表 2 ストレス耐性因子の機能

ストレス耐性因子	抑制を受ける環境ストレス	細胞保護メカニズム
トレハロース	冷凍ストレス 高温ストレス 乾燥ストレス 酸化ストレス	生体膜, 膜タンパク質の保護
グリセロール	高浸透圧ストレス 冷凍ストレス	浸透圧の平衡化, 膨圧の維持
プロリン及び電荷アミノ酸	冷凍ストレス 乾燥ストレス 酸化ストレス	タンパク質の変性抑制
ユビキチン系	酸化ストレス 高温ストレス 冷凍ストレス?	変性タンパク質の検知, 除去
ヒートショックタンパク質	高温ストレス	変性タンパク質の正常化, タンパク質の変性防止
H ⁺ -ATPase (細胞質型および液胞型)	高温ストレス 乾燥ストレス 冷凍ストレス 高浸透圧ストレス	プロトンの排出, 細胞内 pH の調節
カタラーゼおよび スーパーオキシドディスムターゼ	酸化ストレス	活性酸素種の無毒化

強く促進されている。一方、プロテインキナーゼ A が活性化されている状態では、ストレス耐性に関与する遺伝子群の発現は著しく抑制される。増殖期にある細胞に、環境ストレスや栄養飢餓条件を与えると環境ストレス応答が生じ、cAMP 依存性のプロテインキナーゼ A の不活性化を介して、ストレス耐性に関与する遺伝子の誘導が生じるとされる⁷⁾¹⁷⁾。

また、上記のような一般的なストレス応答に加えて、特異的な環境ストレスをシグナルとした応答機構に関しても詳細な解析が行われている。細胞表層のセンサータンパク質により得られたシグナルにより、細胞内情報伝達系を介して、転写や翻訳後修飾が調節される。高浸透圧条件下では、HOG-MAP キナーゼ系を介した情報伝達が生じ、グリセロール蓄積量の増加を介した浸透圧応答がなされと考えられている¹⁸⁾。また、高温ストレス、酸化ストレスなどに応答する情報伝達系についても豊富に知見が蓄積されている。ストレス応答に関する情報伝達系の詳細については、他稿を参照されたい⁷⁾¹²⁾¹⁷⁾。

(2) 適合溶質

酵母細胞では、環境ストレスに適応するために適合溶質と呼ばれる細胞保護物質の生合成に関与する代謝系が促進され、適合溶質の顕著な蓄積を生じることが知られている。酵母においては、トレハロース、遊離アミノ酸、グリセロールが主要な適合溶質として機能していると考えられている。トレハロースはグルコース 2 分子が α -1,1 結合した非還

元性の二糖類であり、栄養飢餓条件において炭素源として機能する。また、貯蔵糖質としての機能に加えて、ストレス適応における重要な適合溶質として機能することが指摘されている。ストレス環境下におけるトレハロースの細胞保護機能の詳細な分子メカニズムについては不明な点が残されているが、細胞膜や膜結合型タンパク質等の保護を介していると推定されている。トレハロースの細胞内レベルは、ストレス耐性と密接な相関があり、高温ストレス、エタノールストレス、高浸透圧に反応して高濃度になる。また、トレハロースは酸化ストレスに対する耐性にも寄与していることが示唆されている¹²⁾。

日野らは、トレハロースが冷凍ストレス耐性の決定因子として機能する可能性を指摘した¹⁹⁾。冷凍ストレスに対する耐性能が高い酵母は、定常期に細胞内に大量のトレハロースを蓄積する傾向にあり、通常はトレハロース蓄積が観察されない対数増殖期の状態でも一定量以上のトレハロースを蓄積していることが明らかになった。また我々の研究グループはトレハロース代謝関連遺伝子破壊株の解析から、トレハロースの蓄積は冷凍期間の延長に有効であることを見出し、長期の冷凍による細胞の脱水にトレハロースが機能していると考えている²⁰⁾。

グリセロールは高浸透圧ストレスに対する適合溶質として中心的役割を果たしていると考えられている。環境ストレスに反応して生合成されたグリセロールが細胞内に蓄積することにより、細胞の膨圧が維持され、細胞が保護さ

れると考えられている。環境ストレスに応答したグリセロールの生合成については、その情報伝達経路が詳細に解析されている¹⁸⁾。すなわち、Sho1 等のセンサータンパク質からのシグナルが、HOG-MAP キナーゼ系を介して Gpd1 タンパク質に伝達され、グリセロール生合成を調節していると考えられている。また、Fps1 タンパク質はストレス環境下でグリセロールの細胞外流出を阻害する機能を有する可能性が指摘されている。

細菌や植物において、プロリンが高浸透圧耐性に関与することが明らかになっている。高木らの研究グループでは、酵母においてもプロリンが適合溶質として機能する可能性を指摘した²¹⁾。プロリンを高蓄積する酵母株では、冷凍ストレス、乾燥ストレス、酸化ストレスおよびエタノールストレスに対して耐性を示すことが明らかにされている。プロリンはトレハロースと同様に細胞膜やタンパク質の安定化に寄与すると考えられている。我々の研究グループでは、アルギニン等の電荷アミノ酸が冷凍耐性に関与するという作業仮説のもと、アルギニン代謝酵素のひとつであるアルギナーゼを遺伝子破壊により不活性化し、アルギナーゼ破壊株では、アルギニンやグルタミン酸などの電荷アミノ酸が大量蓄積されることにともない、冷凍耐性が向上することが明かになった²²⁾。

(3) タンパク質保護および除去系

酵母に負荷される環境ストレスの多くは細胞内タンパク質の変性を引き起こす。したがって、タンパク質の保護や変性タンパク質の除去系がストレス耐性に必要となる。高温ストレスに応答して発現するヒートショックタンパク質は、分子シャペロンとしてタンパク質の構造維持を介して、ストレス保護機能を発揮していると考えられている。ヒートショックタンパク質のうち、Hsp104 は高温ストレス耐性に必須なタンパク質として、その重要性が指摘されている⁷⁾。

変性したタンパク質等の除去にはユビキチン-プロテアソーム系が重要な役割を担っている。このユビキチンを介したタンパク質分解系はストレス応答に関しても重要な機能を果たしている可能性が指摘されている。ユビキチンリガーゼの1種である Rsp5 がストレス環境下で生じた異常タンパク質の検知や分解に関与している可能性が報告されている²³⁾。

(4) 抗酸化系

様々なタイプの環境ストレスが酵母に負荷された場合に、ROS が生成し酸化ストレスが負荷される。したがって、環境ストレス耐性には、ROS の消去能を有する抗酸化系が重要となる。ROS の消去に機能する抗酸化酵素としては、カタラーゼ、スーパーオキシドディスムターゼ、チトクローム C ペルオキシダーゼ等が挙げられる。また、酵素以外の抗酸化物質の代表的な物質としては、グルタチオンが挙げられる。グルタチオンは3つのアミノ酸からなる

ペプチドであり、細胞内酸化レベルの恒常性に機能していると考えられる。

また、最近になり見いだされた抗酸化関連タンパク質として、Mpr1 および Eos1 が挙げられる。Mpr1 は、プロリンアナログであるアゼチジン-2-カルボン酸 (AZC) を無毒化する N-アセチルトランスフェラーゼとして、*S. cerevisiae* の $\Sigma 1278b$ 株から単離された²¹⁾。細胞に酸化ストレスが負荷された場合に、Mpr1 が ROS 消去に重要な役割を果たすと考えられている²¹⁾。現在、Mpr1 の抗酸化能の分子メカニズムの解析が進められている。

我々の研究グループでは、酸化ストレス耐性に必要なタンパク質として Eos1 を見出した²⁴⁾。*EOS1* を破壊すると、過酸化水素による酸化ストレスに対して高度な感受性を示す。*EOS1* 破壊株における過酸化水素感受性は、亜鉛の恒常性に関与する *IZH2* の過剰発現により相補されたこと等から、*EOS1* も亜鉛の恒常性維持を介して酸化ストレス耐性に関与していると考えている²⁵⁾。現在、Eos1 の機能解析を分子レベルで行っている。

4. 環境ストレス耐性酵母の開発と利用

(1) 冷凍ストレス耐性酵母の開発

環境ストレス耐性機構に関する知見を活用した環境ストレス耐性酵母の開発が多くの研究グループにより進められている。ストレス耐性酵母の開発については、様々な手法が考えられる。第一に挙げられるのが、自然界から有用形質を持った菌株を検索する手法である。自然界から得られた菌株そのものを使用するのが難しい場合にでも、有用形質に関する遺伝資源として有効利用できる。また、交雑や突然変異の誘発と選抜を組み合わせた従来型の育種手法も重要な手法と言える。現在、食品製造や酒類醸造に使用されているほぼ全ての実用菌株は、従来型の育種手法で育成された株である。

近年の分子生物学の進展やゲノム情報およびポストゲノム情報の蓄積により、酵母の分子育種が可能になりつつある。潜在的に酵母が有しているストレス耐性能を大きく上回る特性を有する酵母株の育種が可能であることから、今後、ストレス耐性酵母の分子育種に関する研究が重要性を増すものと思われる。そこで、本稿では、我々の研究グループで行った冷凍ストレス耐性酵母および乾燥ストレス耐性酵母の分子育種について紹介する。

トレハロースが製パン用酵母の冷凍ストレス耐性の決定因子のひとつである可能性については前述した。トレハロースの蓄積量は冷凍ストレス耐性と高い相関性を有していることから、分子生物学的手法によりトレハロース代謝系を調節すれば、人為的にトレハロース蓄積量が増加した冷凍耐性パン酵母を開発することができると仮定した。そこで、トレハロース分解酵素 (トレハラーゼ) の遺伝子破壊による不活性化を試みた²⁶⁾。セルフクローニング法によ

る遺伝子破壊を中性トレハラーゼ遺伝子 (*NTH1*) や酸性トレハラーゼ遺伝子 (*ATH1*) に適用した。セルフクロニング法では、酵母自体の有する遺伝子をマーカー遺伝子等として用いるため、他種生物の遺伝子を利用することなく、遺伝子導入や遺伝子破壊を行うことができる。トレハラーゼ遺伝子破壊株は、野生型株と比較して著しく高いトレハロース蓄積量を示し、それに伴い高い冷凍耐性を有していることが明かになった²⁶⁾。以上のことから、トレハラーゼ遺伝子破壊は、冷凍耐性酵母の分子育種に有効であると考えられた。

(2) 乾燥ストレス耐性酵母の開発

製パン用の乾燥酵母は、温風を用いた通風乾燥により圧搾酵母を乾燥させることにより、製造される。乾燥ストレスは細胞内の ROS レベルを高度に上昇させることから、酸化ストレスも同時に酵母細胞に負荷される。そこで、乾燥ストレス耐性酵母の開発に向けて、酸化ストレス耐性を増強したパン酵母の作出を試みた。前述のように高木らのグループの研究により、N-アセチルトランスフェラーゼである Mpr1 は細胞内 ROS レベルを低下させる機能を有していることが示されている²¹⁾。また、変異導入により、Mpr1 の高機能型変異体が既に取得されている。実験室酵母 *S. cerevisiae* Σ 1278b 株は、2 種の *MPR* 遺伝子 (*MPR1* および *MPR2*) を有しているが、実用パン酵母系統は *MPR2* のみ有しており、Mpr2 が乾燥ストレス耐性に関与している可能性が示唆された。そこで、*MPR2* の高機能型変異 [アミノ酸配列 63 番目のリジンがアルギニンに置換した変異 (K63R) および 65 番目のフェニルアラニンがロイシンに置換した変異 (F65L)] を実用パン酵母に導入した。その結果、高機能変異型の *MPR2* を有する株では、乾燥ストレス負荷後においても高い発酵力が残存していた²⁷⁾。以上の結果から、変異型 *MPR* 遺伝子の導入により、乾燥および酸化ストレスに高度な耐性を有する株が分子育種できることが強く示唆された。

5. おわりに

本稿では、シリーズ総説の初回として、酵母に負荷される環境ストレスとそれらストレスに対する耐性機構について紹介した。*S. cerevisiae* をはじめとする酵母は、細胞に関する科学的知見が最も蓄積した微生物の 1 つである。環境ストレス耐性機構についても研究例が極めて多く存在する。しかし、研究例のほとんどは、モデル的な環境ストレス条件において、実験室酵母株を用いて行われている。したがって、蓄積された基礎科学的技術や知見を実用的ストレス耐性酵母の開発にそのまま適用するのは難しい。今後、基礎科学的研究で蓄積された環境ストレス耐性に関する知見を実用条件にあてはめていく橋渡し研究の重要性が増すように思われる。そのためには、酵母の産業利用を想定した実用条件におけるストレス応答・耐性機構に関する知見

を蓄積して、実験室酵母株で蓄積されたデータと比較検討することが重要であると思われる。

また、酵母の産業利用プロセスで負荷される環境ストレスのほとんどは、副次的に ROS を発生させ、酸化ストレスを細胞に負荷しストレス障害の度合いを高めていると思われる。したがって、酸化ストレス耐性を向上させることで、実用条件に即した複合的なストレス環境における耐性の獲得が可能になると考えられる。そのためには、既知の抗酸化システムの機能調節に加えて、新たな抗酸化系の開拓が必要になるように思われる。

S. cerevisiae の実験室株では、ゲノム解読が早期になされ、清酒用酵母などの実用酵母株においても、最近になりゲノム解析が行われた。これらの情報を生物情報学的に解析し、細胞デザインに有効活用していく試みも重要であろう。また、*S. cerevisiae* の実験室株のゲノム情報を基盤としたポストゲノム解析技術も発展している。これらのツールの活用により、実用条件において重要な機能を新たに見出すことも必要であると思われる。我々の研究グループが行った、製パン用酵母のポストゲノム解析の概要については、本シリーズの第 2 回および第 3 回において詳述する予定である。

上記のような研究を積み重ねていくことで、精緻な細胞制御により高度なストレス耐性酵母の開発が可能となり、発酵プロセスの飛躍的な発展に結びつくと考えられる。産業利用を基盤とした応用研究と基礎科学的な解析が相互作用的に進展し、大きな社会貢献が実現することを願っている。

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、イノベーション創出基礎的研究推進事業の支援により行なった。また、本総説の執筆にあたり、財団法人発酵研究所の助成を受けた。また、本稿で紹介した乾燥ストレス耐性酵母に関する研究は、奈良先端科学技術大学院大学の高木博史教授との共同で行った。

文 献

- 1) Kunkee, R.E. and Amerine, M.A., Yeasts in wine-making. In "The yeasts volume 3" eds. Rose, A.H. and Harrison, J.S. Academic Press, London, pp. 5-71 (1970).
- 2) Rainbow, C., Brewer's yeasts. In "The yeasts volume 3" eds. Rose, A.H. and Harrison, J.S. Academic Press, London, pp. 147-224 (1970).
- 3) Kodama, K., Sake yeast. In "The yeasts volume 3" eds. Rose, A.H. and Harrison, J.S. Academic Press, London, pp. 225-282 (1970).
- 4) Harriosn, J.S. and Graham, J.C.J., Yeasts in distillery practice. In "The yeasts volume 3" eds. Rose, A.H. and Harrison, J.S. Academic Press, London, pp. 283-348 (1970).
- 5) Burrows, S., Baker's yeast. In "The yeasts volume 3" eds. Rose, A.H. and Harrison, J.S. Academic Press, London, pp. 349-420 (1970).

- 6) 島 純, 森 勝美, 発酵微生物におけるゲノム研究の動向, 食料と安全, **4**, 58-63 (2006).
- 7) Attfield, P.V., Stress tolerance: The key to effective strains of industrial baker's yeast. *Nat. Biotechnol.*, **15**, 1351-1357 (1997).
- 8) Shima, J. and Takagi, H., Stress-tolerance of baker's yeast cells: stress protective molecules and genes involved in stress tolerance. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **53**, 155-164 (2009).
- 9) 島 純, 環境ストレス耐性: 酵母の発酵生産における重要性, 日本食品微生物学会雑誌, **22**, 81-88. (2005).
- 10) 児玉由紀子, ビール酵母のゲノム情報, 「酵母の全て」, 大隅良典, 下田親編, (シュプリンガー・ジャパン, 東京), pp. 92-102 (2007).
- 11) Murooka, Y. and Yamshita, M., Traditional healthful fermented products of Japan. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **35**, 791-798 (2008).
- 12) Gibson, B.R., Lawrence, S.J., Leclaire, J.P., Powell, C.D. and Smart K.A., Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. *FEMS Microbiol. Rev.*, **31**, 535-569 (2007).
- 13) 島 純, 冷凍生地製パン法と冷凍耐性酵母, 食品と容器, **49**, 631-635 (2008).
- 14) 島 純, 高野博幸, 冷凍耐性パン酵母の科学と応用, バイオサイエンスとインダストリー, **60**, 27-30 (2003).
- 15) 島 純, パン酵母のポストゲノム解析とデータベースの構築, 食品と技術, **447**, 11-18 (2008).
- 16) Shima, J., Ando, A. and Takagi, H., Possible roles of vacuolar H⁺-ATPase and mitochondrial function in tolerance to air-drying stress revealed by genome-wide screening of *Saccharomyces cerevisiae* deletion strains. *Yeast*, **25**, 179-190 (2008).
- 17) Aguilera, J., Randez-Gil, F. and Prieto, J.A., Cold response in *Saccharomyces cerevisiae*: new functions for old mechanisms. *FEMS Microbiol. Rev.*, **31**, 327-341 (2007).
- 18) Hohmann, S., Control of high osmolarity signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.*, **583**, 4025-4029 (2009).
- 19) Hino, A., Mihara, K., Nakashima, K. and Takano, H., Trehalose levels and survival ratio of freeze-tolerant versus freeze-sensitive yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 1386-1391 (1990).
- 20) Nakamura, T., Takagi, H. and Shima, J., Effects of ice-seeding temperature and intracellular trehalose contents on survival of frozen *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Cryobiology*, **58**, 170-174 (2009).
- 21) Takagi, H., Proline as a stress protectant in yeast: physiological functions, metabolic regulations, and biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **81**, 211-223 (2008).
- 22) 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).
- 23) Hoshikawa, C., Shichiri, M., Nakamori, S. and Takagi, H., A nonconserved Ala401 in the yeast Rsp5 ubiquitin ligase is involved in degradation of Gap1 permease and stress-induced abnormal proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **100**, 11505-11510 (2003).
- 24) Nakamura, T., Ando, A., Takagi, H. and Shima, J., *EOS1*, whose deletion confers sensitivity to oxidative stress, is involved in N-glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **353**, 293-298 (2007).
- 25) Nakamura, T., Takahashi, S., Takagi, H. and Shima, J., Multicopy suppression of oxidant-sensitive *eos1* mutation by *IZH2* in *Saccharomyces cerevisiae* and the involvement of Eos1 in zinc homeostasis. *FEMS Yeast Res.*, **10**, 259-269 (2010).
- 26) 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**, 2841-2861 (1999).
- 27) Sasano, Y., Takahashi, S., Shima, J. and Takagi, H., Antioxidant N-acetyltransferase Mpr1/2 of baker's yeast enhances fermentation ability after air-drying stress in bread dough. *Int. J. Food Microbiol.*, **138**, 181-185 (2010).

(平成 22 年 3 月 19 日受理)