

酵母の凍結ストレス耐性改善へのアプローチ

本城, 賢一
九州大学大学院農学研究院

町田, 豪
福島県立医科大学

菅, 向志郎
長崎大学大学院水産・環境科学総合研究科

宮本, 敬久
九州大学大学院農学研究院

<https://hdl.handle.net/2324/7183497>

出版情報 : Cryobiology and Cryotechnology. 61 (1), pp.13-17, 2015-04-15. Japanese Society of Cryobiology and Cryotechnology

バージョン :

権利関係 : © 2015 Japanese Society of Cryobiology and Cryotechnology



酵母の凍結ストレス耐性改善へのアプローチ

¹九州大学大学院農学研究院, ²福島県立医科大学, ³長崎大学大学院水産・環境科学総合研究科
本城 賢一^{1†}, 町田 豪², 菅 向志郎³, 宮本 敬久¹

Approaches of Improvement of Freezing-Stress Tolerance of Yeast

Ken-ichi HONJOH^{1†}, Takeshi MACHIDA², Koushirou SUGA³, Takahisa MIYAMOTO¹

¹Department of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Graduate School, Kyushu University, 6-10-1
Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japan

²Department of Immunology, Fukushima Medical University, 1 Hikarigaoka, Fukushima 960-1295, Japan

³Graduate School of Fisheries Science and Environmental Studies, Nagasaki University, 1-14 Bunkyo, Nagasaki
8521-8521, Japan

([†]Corresponding author, e-mail: honjoh@agr.kyushu-u.ac.jp)

Freezing is one of extreme environments for organisms. On the other hand, freezing is useful strategy for storage of foods. The authors have studied on development of freezing tolerance of plants for storage and stable supply of foods. In order to understand the mechanisms of the freezing tolerance, low-temperature inducible genes were isolated from *Chlorella*, and genes responsible for synthesis of taurine and trehalose were isolated from common carp and tobacco plant, respectively. The cloned (*LEA*, *FAD2*, *NTRC*, *PRX*, *CDO*, *CSD*, *TPS*, *TPP*) genes were modified and respectively subcloned into expression vectors for expression in *Saccharomyces cerevisiae*. Freezing tolerance of the yeast cells expressing the genes was investigated to estimate functions of the expressed gene products.

(Received Sep. 9, 2014; Accepted Jan. 5, 2015)

緒 言

生物は様々な環境変化に適応していく。凍結は、生物にとっては過酷な環境になるが、生物を食品と

してとらえた場合、有効な保存方法の一つとなる。これまで著者らは食品の長期保蔵や安定供給を目的として、植物の凍結耐性機構について研究を行ってきた。この中で、凍結耐性を獲得するクロレラの低温応答機構の解明に基づく低温誘導性遺伝子の同定、加えてコイやタバコから適合溶質として期待される物質の合成に関わる酵素遺伝子の取得を行い、モデル生物である酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) に得られた遺伝子を導入することによって、凍結耐性機構の解明ならびに改善へ取り組んできた。本稿では、

総説「低温／乾燥に適応した生物の生き残り戦略としての休眠」

[Key words: *Saccharomyces cerevisiae*, late embryogenesis abundant, NADPH dependent thioredoxin reductase C, taurine, trehalose; 酵母, LEA, NtrC, タウリン, トレハロース]

これまでの著者らの取り組みについて紹介する。

クロレラ低温誘導性遺伝子の単離と利用

著者らは、3°C、24時間の低温処理により凍結耐性を獲得するクロレラ¹⁾を用いて、低温誘導性遺伝子の単離・同定を行ってきた。cDNA ディファレンシャルスクリーニング、cDNA subtraction 法などを用いて、137種のcDNAを取得している (Table 1)。そのうち、発現量が多く凍結耐性に強く関与していると推定されたものを中心に解析を進めてきた。本総説で紹介する Late embryogenesis abundant (LEA) タンパク質^{2,3)}、小胞体局在型 Δ12 脂肪酸不飽和化酵素 (FAD2)⁴⁾、葉緑体局在型 NADPH 依存性チオレドキシ還元酵素 (NtrC)^{5,6)}といったタンパク質は特に凍結耐性獲得に重要であろうと推定されるものである。

Category	Function (Product)	
	Subtotal number of kinds of product	
Transcription/Translation	60S ribosomal proteins (L10)	
	40S ribosomal proteins (S20)	
	50S ribosomal proteins (L1)	
	30S ribosomal proteins (S6)	
	Elongation factor	
	Translation initiation factor	
	29	
Stress response	Late embryogenesis abundant (LEA) proteins (HIC8, HIC12)*	
	Desiccation-related protein	
	NADPH thioredoxin reductase C (NtrC)	
	Catalase	
	5	
Metabolism	Δ12 fatty acid desaturase (FAD2)	
	ω-3 fatty acid desaturase (FAD3)	
	Tryptophan synthase	
	Thiazole biosynthesis enzyme	
	Prohibitin	
	Transketolase	
	Flavodoxin	
	Methionine synthase etc.	
		18
	Repair and degradation	Chaperonin 60β
HSP 70		
Profolin		
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase		
Clp protease		
P1-H		
Ubiquitin-conjugating enzyme		
Ferritin		
		9
Photosynthesis	Ferredoxin	
	Chlorophyll a/b-binding protein	
	2	
Transportation	2-oxoglutarate/malate translocator	
	ATP/ADP translocator	
	2	
Signal transduction	Ca ²⁺ -binding protein	
	GTP-binding protein	
	Adenylylsulfate kinase	
	3	
Unknown	70	
Total	137	

*HIC: hardening-induced *Chlorella*

凍害防御機能に基づく凍結耐性向上

LEA タンパク質は Dure⁷⁾によって報告されたタンパク質であり、現在ではいくつかのグループに

分類されている。著者らが取得した LEA タンパク質が有するグループ3の LEA タンパク質の特徴である 11 アミノ酸の繰り返し配列構造が何らかの機能を持つと考え、その繰り返しの長さが異なるポリペプチドと改変タンパク質を合成して凍結感受性酵素に対する凍害防御作用について調べた。その結果、凍害防御活性には少なくとも2つ以上の11アミノ酸の繰り返し構造が必要なことを示した⁸⁾。さらに、本 LEA 遺伝子の導入により酵母の凍結耐性が向上することを明らかにした⁹⁾。LEA 遺伝子導入による酵母の凍結耐性向上についてだが、凍害防御効果による耐性向上は一つの理由に過ぎないと考えられ、その他、膜の安定化などの機能¹⁰⁾が関わっていることが推察される。

脂肪酸不飽和化による凍結耐性向上

生物の低温耐性獲得と膜脂質の脂肪酸不飽和化の現象はラン藻、植物など様々な生物で共通の現象であり^{11,12)}、本クロレラの凍結耐性獲得時にも同様の応答が予想されたため、不飽和化酵素遺伝子 (*FAD2*, *FAD3*) を単離後、それらの低温誘導性について調べ、そのことを確認した。また、*FAD2* 遺伝子を酵母への導入発現させたところ、通常酵母では生成されない C18:2¹³⁾ならびに C16:2 脂肪酸の生成が認められた。*FAD2* 発現酵母を用いて -20°Cでの凍結耐性について調べてみたところ、わずかであるが向上傾向が認められた (Table 2)。*S. cerevisiae* においては通常 C18:1 の不飽和脂肪酸しか見られないが、不飽和度を上げることで膜の流動性を改善し、凍結耐性を向上させることができるのではないかと考えられた。

Table 2 Freezing tolerance of yeast cells carrying pESC/*FAD2*

Yeast strain	Plasmid	Viability (%)
<i>S. cerevisiae</i> YPH500	pESC-TRP	3.7
	pESC-TRP/ <i>FAD2</i>	10.2

酸化ストレス緩和による凍結耐性向上

次に、植物では葉緑体において抗酸化作用を示す NtrC-Prx 抗酸化系を酵母に導入した。この際、*NTRC* 遺伝子および NtrC と協調的に過酸化水素分解に作用するペルオキシレドキシシン (Prx) をコードする遺

伝子を、輸送ペプチド領域を除いた成熟型で、それぞれの遺伝子を単独あるいは同時に酵母に導入した¹⁴⁾。その結果、*NTRC*を導入したものと両遺伝子を導入したもので凍結耐性の向上が認められ、menadioneによって誘発された酸化ストレスでは、*NTRC*, *PRX*両遺伝子の導入が耐性向上に有効なことが明らかになった (Fig. 1)。酸化ストレスに対して酵母の損傷程度を緩和することが耐性向上に寄与すると考えられ、凍結耐性においても重要であろうと推察された。

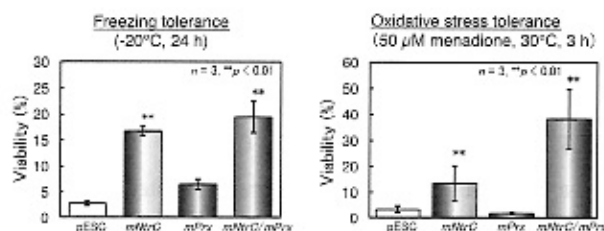


Fig. 1 Freezing and oxidative stress tolerance of transformed yeast cells expressing *mNtrC* and/or *mPrx* genes.

タウリンの蓄積による凍結耐性向上

適合溶質として機能する物質として、 β -アミノ酸であるタウリンに着目し、その蓄積による酵母の凍結耐性ならびに酸化ストレス耐性の変化について検討した¹⁵⁾。その結果、タウリンが細胞内に蓄積すると耐性が向上することが明らかになった。また、タウリン合成につながる二つの酵素（システインジオキシゲナーゼ (*CDO*) および、システインスルフィン酸デカルボキシラーゼ (*CSD*)) 遺伝子をコイから単離し、それらをそれぞれ単独あるいは融合タンパク質として発現するように酵母に導入した¹⁶⁾。その結果、タウリンあるいはその前駆体であるヒポタウリンを細胞内に蓄積させることに成功した。特に融合タンパク質として発現させることでヒポタウリン、タウリンの合成効率が高く、その存在比はタウリン:ヒポタウリン=3:7であった。凍結耐性の改善傾向が認められた。ヒポタウリンからタウリンへの変換割合を高められれば、凍結耐性をさらに向上できると考えられた。また、menadioneにより誘発される酸化ストレス耐性については顕著に向上し、酸化ストレス緩和に対してヒポタウリンまたはタウリンの蓄積が有効であることが推察された。

遺伝子改変によるトレハロース蓄積の可能性

既知の適合溶質であるトレハロースにも着目し、その合成に関わる二つの酵素（トレハロース 6-リン酸合成酵素 (*Tps*) およびトレハロース 6-リン酸脱リン酸酵素 (*Tpp*)) 遺伝子をタバコから単離した¹⁷⁾。単離した *TPS* 遺伝子を、酵素活性に影響する N 末端領域を欠損させた Δ *NTPS* 遺伝子へと改変し、この改変遺伝子あるいは未改変の *TPS* 遺伝子のいずれかと *TPP* 遺伝子の二つを、個別 (Δ *NTPS/TPP*, *TPS/TPP*) あるいは融合タンパク質 (Δ *NTPS-TPP*, *TPS-TPP*) として発現する組換え体を作製した。トレハロース合成能ならびに凍結耐性が低下した酵母である *TPS* 遺伝子欠損株 (Δ *tps1*) に導入した。その結果、 Δ *NTPS* 遺伝子を導入した酵母で顕著にトレハロース合成能ならびに凍結耐性回復が認められた (Fig. 2)。また、これらの効果は各遺伝子を個別で発現するよりも融合タンパク質として発現させる方がより効果が高いことが示された。以上の結果は植物由来の *TPS* 遺伝子を改変して植物に戻すことで、トレハロース含量を高められ、ストレス耐性向上に役立つ可能性を示すものとなった。

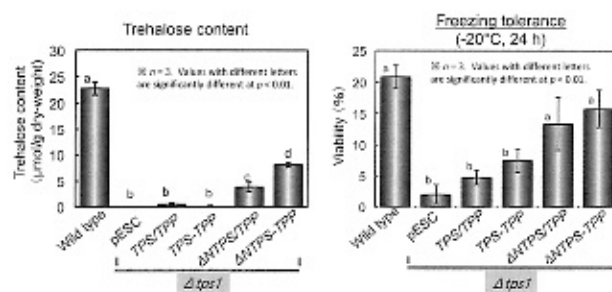


Fig. 2 Trehalose content and freezing stress tolerance of transformed yeast cells expressing *TPS/TPP*, *TPS-TPP*, Δ *NTPS/TPP*, or Δ *NTPS-TPP* genes.

ま と め

以上の様に、凍結耐性を獲得するクロレラから単離した遺伝子を中心として、その他に、タウリンおよびトレハロース合成に関与する遺伝子を酵母に導入することにより、凍結耐性を向上させた例を紹介した。今後は、青果物の低温誘導性遺伝子についての解析結果に基づいて、モデル生物として酵母を利

用し、最終的には青果物の凍結貯蔵性の向上に取り組んでいきたいと考えている。

文 献

- 1) Hatano S, Sadakane H, Tutumi M, Watanabe T: Studies on frost hardiness in *Chlorella ellipsoidea* L. Development of frost hardiness of *Chlorella ellipsoidea* in synchronous culture, *Plant Cell Physiol*, **17**, 451-458 (1976)
- 2) Joh T, Honjoh K, Yoshimoto M, Funabashi J, Miyamoto T, Hatano S: Molecular cloning and expression of hardening-induced genes in *Chlorella vulgaris* C-27: the most abundant clone encodes a late embryogenesis abundant protein, *Plant Cell Physiol*, **36**, 85-93 (1995)
- 3) Honjoh K, Yoshimoto M, Joh T, Kajiwara T, Miyamoto T, Hatano S: Isolation and characterization of hardening-induced proteins in *Chlorella vulgaris* C-27: identification of late embryogenesis abundant proteins, *Plant Cell Physiol*, **36**, 1421-1430 (1995)
- 4) Suga K, Honjoh K, Furuya N, Shimizu H, Nishi K, Shinohara F, Hirabaru Y, Maruyama I, Miyamoto T, Hatano S, Iio M: Two low-temperature-inducible *Chlorella* genes for $\Delta 12$ and ω -3 fatty acid desaturase (FAD): isolation of $\Delta 12$ and ω -3 *fad* cDNA clones, expression of $\Delta 12$ *fad* in *Saccharomyces cerevisiae*, and expression of ω -3 *fad* in *Nicotiana tabacum*, *Biosci Biotechnol Biochem*, **66**, 1314-1327 (2002)
- 5) Machida T, Murase H, Kato E, Honjoh K, Matsumoto K, Miyamoto T, Iio M: Isolation of cDNAs for hardening-induced genes from *Chlorella vulgaris* by suppression subtractive hybridization, *Plant Sci*, **175**, 238-246 (2008)
- 6) Machida T, Kato E, Ishibashi A, Sato J, Kawasaki S, Niimura Y, Honjoh K, Miyamoto T: Expression pattern of a chloroplast NADPH-dependent thioredoxin reductase in *Chlorella vulgaris* during hardening and its interaction with 2-Cys peroxiredoxin, *Biosci Biotechnol Biochem*, **73**, 695-701 (2009)
- 7) Dure L III, Greenway SC, Galau GA: Developmental biochemistry of cottonseed embryogenesis and germination changing messenger ribonucleic acid populations as shown by in vitro and in vivo protein synthesis. *Biochemistry*, **20**, 4162-4168 (1981)
- 8) Honjoh K, Matsumoto H, Shimizu H, Ooyama K, Tanaka K, Oda Y, Takata R, Joh T, Suga K, Miyamoto T, Iio M, Hatano S: Cryoprotective activities of group 3 late embryogenesis abundant proteins from *Chlorella vulgaris* C-27, *Biosci. Biotechnol. Biochem*, **64**, 1656-1663 (2000)
- 9) Honjoh K, Oda Y, Takata R, Miyamoto T, Hatano S: Introduction of the *hlc6* gene, which encodes a homologue of a late embryogenesis abundant (LEA) protein, enhances freezing tolerance of yeast, *J Plant Physiol*, **155**, 509-512 (1999)
- 10) Khurana P, Vishnudasana D, Chhibbar AK: Genetic approaches towards overcoming water deficit in plants - special emphasis on LEAs, *Physiol Mol Biol Plants*, **14**, 277-298 (2008)
- 11) Wada H, Murata N: Temperature-induced changes in the fatty acid composition of the cyanobacterium, *Synechocystis* PCC6803, *Plant Physiol*, **92**, 1062-1069 (1990)
- 12) Siminobvitch D, Rheume B, Pomeroy K, Lepage M: Phospholipid, protein, and nucleic acid increases in protoplasm and membrane structures associated with development of extreme freezing resistance in black locust tree cells, *Cryobiology*, **5**, 202-225 (1968)
- 13) Stuke JE, McDonough VM, Martin CE: Isolation and characterization of *OLE1*, a gene affecting fatty acid desaturation from *Saccharomyces cerevisiae*, *J Biol Chem*, **264**, 16537-16544 (1989)
- 14) Machida T, Ishibashi A, Kirino A, Sato J, Kawasaki S, Niimura Y, Honjoh K, Miyamoto T: Chloroplast NADPH-dependent thioredoxin reductase from *Chlorella vulgaris* alleviates environmental stresses in yeast together with 2-Cys peroxiredoxin, *PLoS One*, **7**, e45988 (2012)
- 15) Honjoh K, Machida T, Nishi K, Matsuura K, Soli KW, Sakai T, Ishikawa H, Matsumoto K, Miyamoto T, Iio M: Improvement of freezing and oxidative stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* by taurine, *Food Sci Technol Res*, **13**, 145-154 (2007)
- 16) Honjoh K, Matsuura K, Machida T, Nishi K, Nakao

- M, Yano T, Miyamoto T, Iio M: Enhancement of menadione stress tolerance in yeast by accumulation of hypotaurine and taurine: co-expression of cDNA clones, from *Cyprinus carpio*, for cysteine dioxygenase and cysteine sulfinic acid decarboxylase in *Saccharomyces cerevisiae*, *Amino Acids*, **38**, 1173-1183 (2010)
- 17) Machida T, Honjoh K, Aso A, Yamamoto M, Iio M, Miyamoto T: Trehalose 6-phosphate synthase and trehalose 6-phosphate phosphatase from *Nicotiana tabacum* function in trehalose biosynthesis and environmental stress tolerance of yeast, *J Fac Agr, Kyushu Univ*, **55**, 261-268 (2010)