

# 大豆ペプチド培地による酵母のストレス耐性付与機構の解析： 細胞内脂質代謝改変効果の検証

井沢真吾\*

京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科

## Improvement of Yeast Stress Tolerance by Soy Peptides -Study on the Effects of Soy Peptides on Yeast Lipid Metabolism-

Shingo IZAWA

Department of Applied Biology, Graduate School of Science and Technology,  
Kyoto Institute of Technology, Kyoto 606-8585

### ABSTRACT

We have previously reported that the cultivation of yeast cells in media containing soy peptides can improve tolerance to freeze-thaw stress, indicating that soy peptides are suitable ingredients of culture media to provide high-quality yeast cells for frozen-dough technology. We further investigated the mechanisms of the improved tolerance to freeze-thaw stress by soy peptides, and found that soy peptides affect the size and numbers of intracellular organelles. Compared with yeast cells cultured with casein peptone, cells cultured with soy peptides showed less of intracellular lipid bodies, in which neutral lipids are accumulated. The cultivation with soy peptides resulted in decreased levels of mRNA of lipid metabolism related genes such as *DGA1* and *ERG6*. These results suggest that the low-fat yeast cells can be supplied by the cultivation with soy peptides and can be utilized as a dietary supplement. *Soy Protein Research, Japan* **12**, 84-88, 2009.

Key words : soy peptides, baker's yeast, ergosterol, neutral lipids, lipid particle

生活習慣病の予防などのヒトの健康改善を目的とした大豆ペプチドの研究は目覚ましい進展を遂げてきたが、哺乳動物以外の生物に対する大豆ペプチドの有効利用に関しては非常に限られた情報しかないのが現状である。筆者らは大豆ペプチドを用いて食品有用微生物の品質や培養効率改良に取り組んでいる。これまで

に、大豆ペプチドによる培養によって酵母の冷凍耐性が改善され、冷凍パン生地の品質改良が可能になることを報告してきた<sup>1)</sup>。以降、大豆ペプチドによって酵母細胞の生理にどのような変化がもたらされるのか解析をすすめている。

哺乳動物では、腸管での脂質の吸収や血中中性脂質値に対し大豆の摂取が低減効果を持つことがよく知られているが<sup>2)</sup>、細胞レベルや分子レベルでメカニズム

\*〒606-8585 京都市左京区松ヶ崎御所海道町

が十分に解明されているわけではない。生体内の過剰な脂質は中性化され、リピッドボディ（脂肪滴）に蓄積され、脂肪肝の肝細胞や肥満細胞では大きく発達したりリピッドボディが多数形成される。今回、大豆ペプチドでの培養によって酵母のリピッドボディの形成が抑制されることを、細胞内小器官（オルガネラ）の形態学的解析を通じて見出した。このことは、酵母のような単細胞真核生物に対しても、大豆成分が細胞内脂質代謝の改変効果をもつ可能性を示唆するとともに、細胞レベルでその作用機序を解明する際に酵母がモデル生物として利用可能だということの意味する。本研究では、大豆ペプチドが酵母の脂質代謝に及ぼす影響について、分子細胞生物学的手法を用いて解析した。

## 方 法

### 菌体および培地

実験には清酒醸造やパン生地の発酵に良好な性質を示す二倍体酵母株*Saccharomyces cerevisiae* UT-1株を用いた<sup>3)</sup>。大豆ペプチド（SP）培地、Bacto peptone（BP）培地、およびCasein peptone（CP）培地として2.5% w/vの各ペプチドおよびpeptoneと2%グルコースを含む培地（pH 5.5）を調製した。また、実験室条件での標準的な培地であるYeast nitrogen base（YNB）培地（2%グルコース、0.67% YNB w/o amino acid, pH 5.5）も併用した。各培地にはトリプトファンとウラシルを添加して使用した。SPとして不二製油社製Hminute-Rを、BPとCPはそれぞれBecton Dickinson社とナカライテスク社より購入した。菌体は28℃、120 rpmの震盪培養で培養した。

### 解析手法

各GFP-fusionたん白質発現用プラスミドは染色体組み込み型ベクターpJK67を用いて構築した。リピッドボディ膜上に局在するTgl3p-GFP、Faa4p-GFP、Erg6p-GFPおよびNile Red染色を蛍光顕微鏡（Olympus, BX51 system）で観察・解析した。細胞内の脂肪酸解析は不二製油フードサイエンス研究所でガスクロマトグラフィー分析により、エルゴステロール含量は独立行政法人酒類総合研究所においてShobayashiらの方法<sup>4)</sup>で測定した。脂質代謝関連遺伝子の転写量はノーザンブロッティング解析を実施した。全てのプローブは $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTPでrandom labelingしたPCR産物を用いた。酵母の冷凍耐性の測定はMurakamiらの方法に従った<sup>5)</sup>。

## 結 果

### 大豆ペプチドによる酵母リピッドボディ形成の抑制効果

大豆ペプチド培地で培養した際の細胞内小器官の変化について、細胞形態学的な解析をおこなった。解析は核、核小体、小胞体、ミトコンドリア、ゴルジ体、液胞、ペルオキシソーム、エンドソーム、およびリピッドボディを対象に蛍光染色法や各種GFP-fusionたん白質を用いて顕微鏡解析を実施した。YNB、CP、およびSPの各種培地で対数増殖期、または定常期まで培養した細胞について各種オルガネラ形態を検討したところ、リピッドボディ形態に顕著な違いが観察された。SP培地で培養した細胞は、定常期においてもほとんどリピッドボディが形成されなかったのに対し、他の培地で培養した細胞は定常期に多数のリピッドボディの形成が確認された（Fig. 1）。このことは、細胞内における脂質代謝が大豆ペプチドによって変化する可能性を強く示唆した。

### 脂質代謝関連遺伝子の転写レベルに及ぼす影響

次に、脂質代謝に関連する遺伝子の転写量を検討した。各培地にて培養した対数増殖期および定常期の細胞からトータルRNAを調製し、ノーザンブロッティング解析をおこなった。リピッドボディ内に含まれる中性脂質の合成に関与するアシル基転移酵素をコードする*DGAI*、*LROI*、*ARE1*、*ARE2*の各遺伝子の転写量は、SP培地で培養した定常期細胞で少ないことが確認された（Fig. 2）。とくに、トリアシルグリセロール合成の主要酵素をコードする*DGAI*遺伝子は、YNB培地やCP培地において定常期で転写レベルが上昇するのに対し、SP培地では顕著に低く抑制されていた。一方、ステロールのエステル化酵素をコードする*ARE2*はCP培地で構成的に転写レベルが高いことが確認された。

トリアシルグリセロールの分解酵素TAG lipaseをコードする*TGL3*は定常期において転写が活性化されたが、他の培地に比べSP培地では転写レベルが押さえられていることが観察された。*TGL4*、*TGL5*については、その転写レベルがSP培地とYNB培地で構成的に低いレベルにあったのに対し、CP培地では定常期で転写レベルが上昇することが観察された。

その他、脂肪酸の合成や輸送・活性化に関与する*FAT*、*FAS*、および*FAA*といった遺伝子は、SP培地で培養した定常期細胞では転写が抑制されていることが明らかとなった。一方、CP培地で培養した場合には、これらの遺伝子の転写レベルが構成的に高いことが観察された（Fig. 2）。

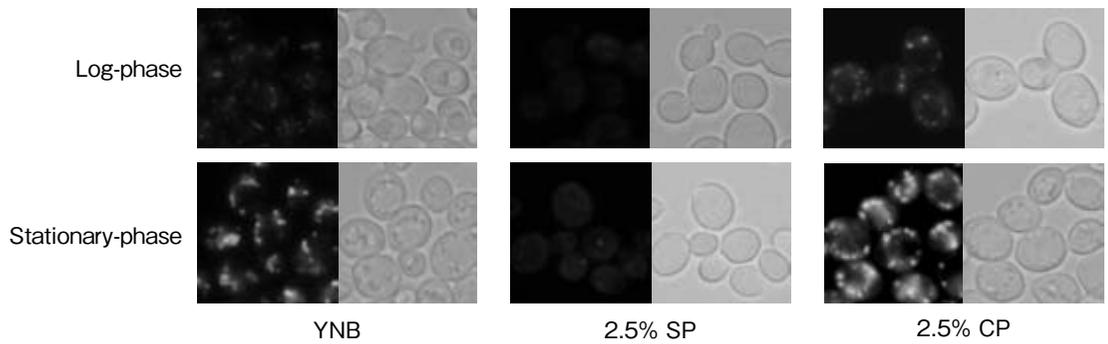


Fig. 1. Yeast cells were cultured in 100 mL of each medium with shaking (120 rpm) at 28°C. Logarithmic-growth phase cells were collected at  $OD_{610}=0.5$ , and stationary-growth phase cells were cultured for 30 hours. Intracellular lipid bodies were stained with Nile Red. YNB, yeast nitrogen base medium; CP, casein peptone medium; SP, soy peptides medium.

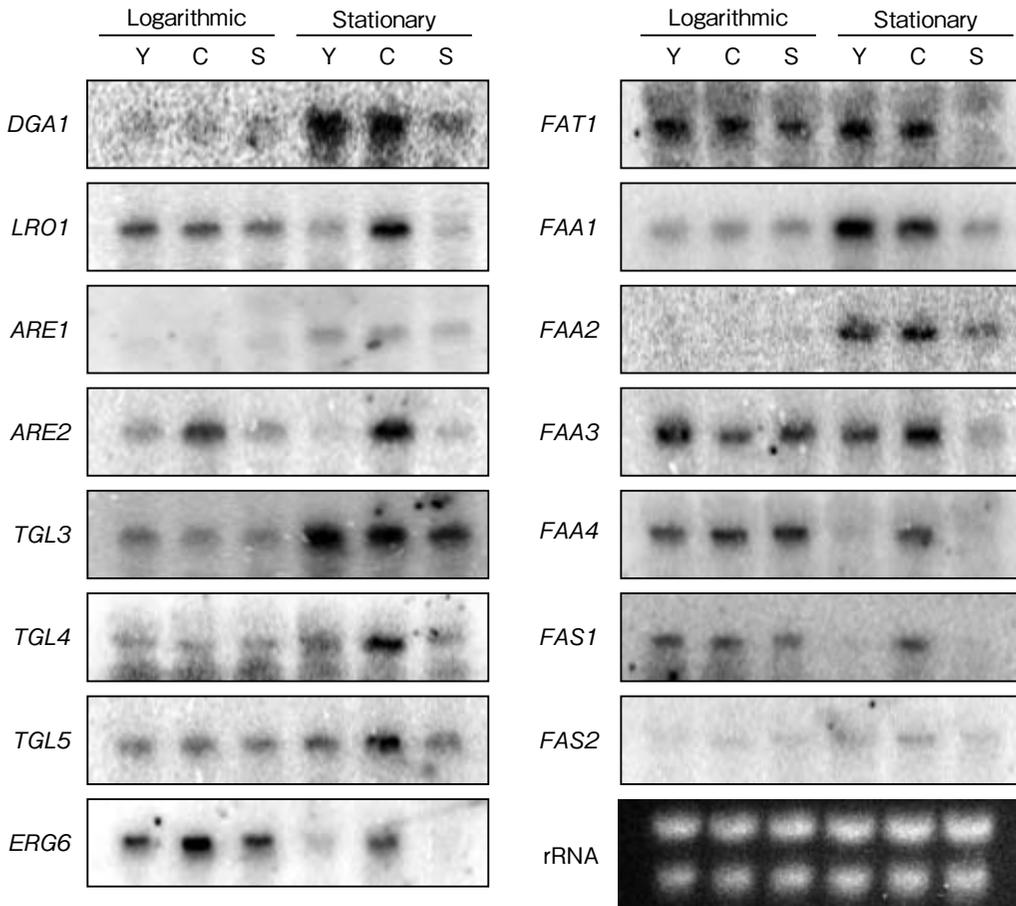


Fig. 2. Total RNA was extracted from logarithmic-growth phase or stationary-growth phase cells cultured in each medium. mRNA levels were analyzed by Northern blot analysis. YNB, yeast nitrogen base medium; CP, casein peptone medium; SP, soy peptides medium.

### リピッドボディ膜酵素の局在に及ぼす影響

リピッドボディは単層のリン脂質膜に包まれ、膜上にはTAGリパーゼやステロールエステル加水分解酵素など約40種のたん白質が局在する。そのため、近年は単なる中性脂肪の蓄積の場として以外にも、リピッドボディは生理機能を持つのではないかと考えられるようになってきている。そこで、リピッドボディ膜酵素の局在に及ぼす大豆ペプチドの影響を検討した。各種GFP-fusionを用いてリピッドボディ膜酵素の細胞内局在を観察した結果、リピッドボディの形成が抑制されたSP培地における定常期細胞では、液胞内部や小胞体膜上に局在することが確認された (Fig. 3)。液胞内部への移行はたん白質の分解を受けていると推測された。一方、一部の酵素が小胞体膜上に留まることがどのような生理的影響を及ぼすのかは現時点で不明であり、今後検証すべき課題だと考えられた。

### 考 察

以上の結果から、大豆ペプチドを培地成分として酵母を培養することにより、定常期細胞でのリピッドボ

ディの形成が抑制され、脂質代謝関連酵素の発現が抑制されることがあきらかとなった。実際に細胞内の脂肪酸レベルやエルゴステロールレベルが顕著に低下することが確認されたことや、大豆ペプチドと同じアミノ酸組成を持つ合成培地などではリピッドボディ形成抑制効果が観察されないことから、個々の細胞レベルでも脂質代謝を改変するような機能性ペプチドが大豆ペプチド中に含まれているのではないかと推測された。過剰な脂質の合成・蓄積を抑制する作用や、脂質の消費を促す作用について検証する必要があると考えている。また、動物細胞においても同様の作用があるか今後検討する予定である。

一方、筆者らは、大豆ペプチドによる培養によって、酵母の冷凍耐性が上昇することを報告している<sup>1)</sup>。大豆ペプチドによるエルゴステロールレベルの減少が生体膜組成に影響を及ぼしたため、冷凍耐性が変化したのではないかと考えられた。また、近年、酵母細胞そのものを健康補助食品素材として利用することが増えているため、脂質レベルの低いlow fat yeastをSP培地で調製することにより酵母の高付加価値化が実現できるのではないかと期待された。

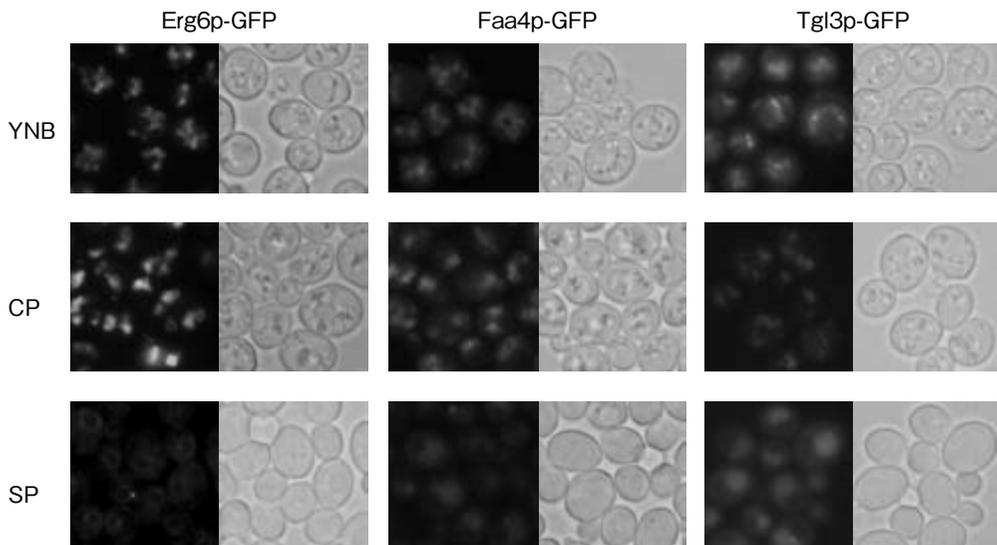


Fig. 3. Intracellular localization of lipid body membrane bound proteins was analyzed using GFP-fusion proteins. Yeast cells were cultured in 100 mL of each medium with shaking (120 rpm) at 28°C till stationary-growth phase. Tgl3p-GFP and Faa4p-GFP were accumulated in the vacuole, and Erg6p-GFP was retained at ER membrane in cells cultivated with soy peptides (SP) medium. YNB, yeast nitrogen base medium; CP, casein peptone medium.

## 要 約

大豆ペプチドでの培養によって酵母細胞内のリピッドボディ形成が抑制されることを見出した。また、脂質代謝関連遺伝子の転写レベルや中性脂肪レベルが低下することを確認した。これらの結果は、細胞レベルにおいても、過剰な脂質の蓄積を抑制する機能性ペプチドが大豆ペプチド中に存在することが強く示唆した。また、大豆ペプチドの生理機能を解明する上で、遺伝学的解析や分子細胞学的解析が容易な酵母はすぐれたモデル系として活用できると考えられた。一方、応用面では、大豆ペプチドにより、低脂肪酵母の供給が可能となり、サプリメント原料などでの利用が期待された。

## 文 献

- 1) Izawa S, Ikeda K, Takahashi N and Inoue Y (2007): Improvement of tolerance to freeze-thaw stress of baker's yeast by cultivation with soy peptides. *Appl Microbiol Biotechnol*, **75**, 533-538.
- 2) Moriyama T, Kishimoto K, Nagai K, Urade R, Ogawa T, Utsumi S, Maruyama N and Maebuchi M (2004): Soybean  $\beta$ -conglycinin diet suppresses serum triglyceride levels in normal and generically obese mice by induction of  $\beta$ -oxidation, downregulation of fatty acid synthase, and inhibition of triglyceride absorption. *Biosci Biotechnol Biochem*, **68**, 352-359.
- 3) Kitamoto K, Oda K, Gomi K and Takahashi K (1990): Construction of uracil and tryptophan auxotrophic mutants from sake yeast by disruption of *URA3* and *TRP1* genes. *Agric Biol Chem*, **54**, 2979-2987.
- 4) Shobayashi M, Mitsueda S, Ago M, Fujii T, Iwashita K and Iefuji H (2005): Effects of culture conditions on ergosterol biosynthesis by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci Biotechnol Biochem*, **69**, 2381-2388.
- 5) Murakami Y, Yokoigawa K, Kawai F and Kawai H (1996): Lipid composition of commercial baker's yeast having different freeze-tolerance in frozen dough. *Biosci Biotechnol Biochem*, **60**, 1874-1876.