

大豆ペプチドによるリピッドボディ形成抑制分子機構の解析

井沢真吾

京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科

Inhibition of Yeast Lipid Body Formation by Soy Peptides

Shingo IZAWA

Graduate School of Scientific Technology, Kyoto Institute of Technology, Kyoto 606-8585

ABSTRACT

Excess lipid is neutralized by acylation and accumulates in the lipid body (lipid particle, lipid droplet) as triacylglycerol or sterol ester. We have previously reported that the cultivation of yeast cells in media containing soy peptides prevents the formation of lipid bodies. Compared with yeast cells cultured with casein peptone, cells cultured with soy peptides showed fewer intracellular lipid bodies. In this study, we investigated the effects of soy peptides on the lipid metabolisms using DNA microarray analysis. The cultivation with soy peptides resulted in decreased levels of mRNA of lipid synthesis and acylation-related genes such as *DGAI*, whereas the transcription of glycogen synthesis-related genes such as *GLC3* and *GSY1/2* was activated. These results suggest that the cultivation with soy peptides might facilitate the formation of glycogen but not the lipid bodies as an energy storage system. *Soy Protein Research, Japan* **13**, 96-100, 2010.

Key words : soy peptides, baker's yeast, glycogen, lipid particle, DNA microarray

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パン酵母の冷凍耐性が改善され、冷凍パン生地の商品改良が可能になることを報告してきた¹⁾。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おこなっている。

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リピッドボディが多数形成される。ところが、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、大豆由来成分が細胞内脂質代謝の改変効果を保持する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を意味していた。哺乳動物では、腸管での脂質の吸収や

血中中性脂肪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²⁾、細胞レベルや分子レベルでメカニズムが十分に解明されているわけではない。そこで本研究では、大豆ペプチドが酵母の脂質代謝に及ぼす影響について、DNAマイクロアレイ解析により、どのような遺伝子の転写が活性化あるいは抑制されるのか検討するとともに、分子細胞生物学的手法を用いて分子機構を解析した。解析の結果、カゼインペプトンなどとは異なり、大豆ペプチドで培養することにより中性脂質の合成が抑制されてリピッドボディの形成が抑えられる一方で、グリコーゲン合成系の遺伝子発現が活性化される効果が確認された。本研究から、大豆ペプチドの利用によりエネルギー源の貯蔵形態を脂質ではなくグリコーゲンとして積極的にこなわせる応用研究シーズが見つかった。

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³⁾。また、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) は適宜アミノ酸や核酸を添加して使用した。SPとして不二製油社製Hminute-Rを、BPとCPI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の震盪培養で定常期まで培養した。

また、サンドイッチ法によりglycogen branching enzymeをコードする*GLC3*遺伝子を破壊し、グリコーゲン非蓄積株の構築をおこなった。*Candida glabrata*の*TRP1*遺伝子を鋳型にプライマー 5'-CTTCCTGTACTATTTAAGAACACCAAACCAAGTATAAAGAACCGAGGTCGACTCTAGAGGATCC-3'と5'-CTTCCTGTTGTTCCATTCCAAATCGGTGGTAAAGAATTCGGAACCTCACAGGAAACAGCTATGACC-3'の組み合わせによる*glc3Δ::CgTRP1*カセット、およびEuroscarfの遺伝子破壊株コレクション中の*glc3Δ*株から調製したゲノムDNAを鋳型にプライマー 5'-ACTATCTCTTCCGCAATACCCCTTT-3'と5'-GTTATGTACGTTTAGATATCTACCA-3'によって合成した*glc3Δ::kanMX*カセットをUT-1株に形質転

換し、UT-1 *GLC3*遺伝子破壊株 (*MAT a/a ura3/ura3 trp1/trp1 glc3Δ::CgTRP1/glc3Δ::kanMX*) を構築した。

DNAマイクロアレイ解析

大豆ペプチドおよびカゼインペプトン培地で定常期直前まで培養した酵母細胞より、それぞれトータルRNAを抽出し、マイクロアレイ解析 (3D-Gene Yeast Oligo Chip 6K, Toray Industries Inc., Tokyo Japan) により転写レベルの比較を行った。3D-Gene Yeast Oligo Chipは柱状構造上端面へのプローブの固定やビーズによる試料の攪拌を通じて、従来の方法に比べて格段に感度を上昇させたDNAマイクロアレイである。

各種解析

リピッドボディ膜上に局在するErg6p-GFPおよび Nile Red染色を蛍光顕微鏡 (Leica, AF6500 system) で観察・解析した。グリコーゲン合成系における分枝酵素をコードする*GLC3*遺伝子のGFP-fusionプラスミドは、プライマーセット5'-ATGCTTCTAGAAACGT CGAGGATGGGTGTA-3'と5'-GTATACTCGAGATTCTTTTAAGGCAAGCACCAAAGCGA-3'により増幅した*GLC3*遺伝子を染色体組み込み型ベクター pJK67のXbaI/XhoIサイトに挿入して構築し、HpaIによる線状化後、酵母細胞に形質転換した。細胞内グリコーゲンレベルは、Parrou and Françoisの方法により測定した⁴⁾。脂質代謝関連遺伝子の転写量はノーザンブロットング解析を実施した。

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

大豆ペプチド培地、カゼイン培地、およびYNB培地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。大豆ペプチド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。

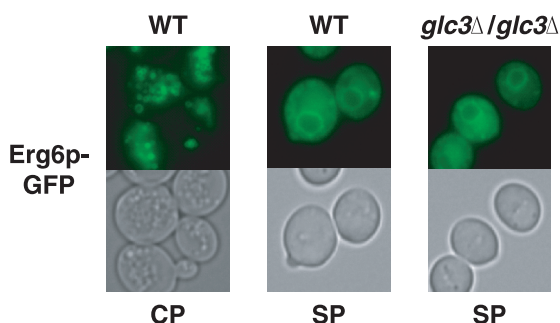


Fig. 1. Yeast cells (wild-type and *glc3Δ/glc3Δ*) were cultured in 100 mL of each medium with shaking (120 rpm) at 28°C till stationary-growth phase. Intracellular lipid bodies were monitored with Erg6p-GFP. CS, casein peptone medium; SP, soy peptide medium.

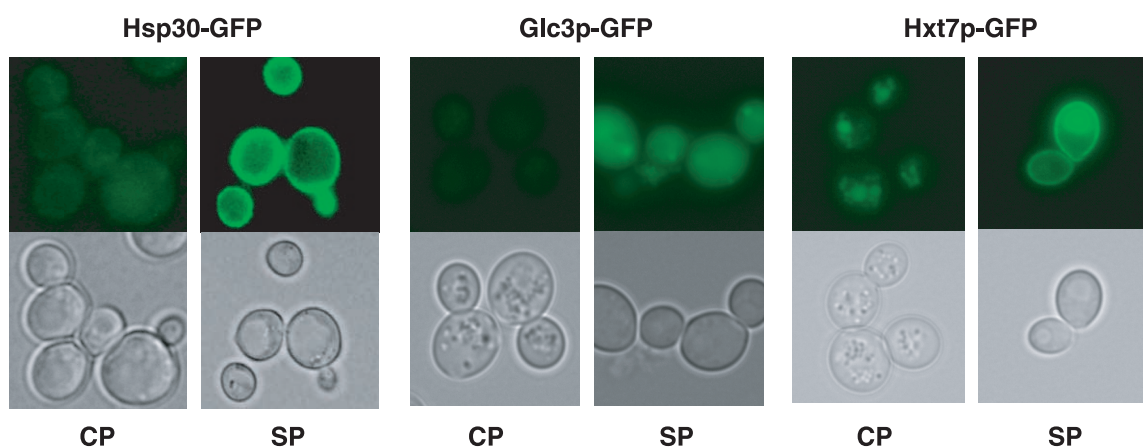


Fig. 2. Intracellular localization of glycogen-branching enzyme protein (Glc3p), small heat shock protein (Hsp30p), and hexose transporter (Hxt7p) was analyzed using GFP-fusion proteins. Yeast cells were cultured in 100 mL of each medium with shaking (120 rpm) at 28°C till stationary-growth phase. Soy peptides cultivation induced the expression of Glc 3 p in the cytoplasm as foci. CS, casein peptone medium; SP, soy peptide medium.

大豆ペプチドによる培養が転写レベルに及ぼす影響

大豆ペプチドでの培養によって転写レベルが顕著に変化する遺伝子をDNAマイクロアレイ解析で検討した。カゼインペプトン培地および大豆ペプチド培地で後期対数増殖期まで培養し、トータルRNAを抽出後、3D-Gene Yeast Oligo ChipによるDNAマイクロアレイ解析で両培地における転写レベルの比較をおこなった。解析の結果、大豆ペプチド培地では、低分子量HSP遺伝子の転写レベルの増加が確認された。また、ヘキソーストランスポーターの転写パターンにも違いが観察された。これらの遺伝子産物についても、GFP fusionを用いた解析から、たん白質レベルでも発現量が増加していることを確認した (Fig. 2)。一方、中性脂質の合成に関わる遺伝子については、カゼイン培地

での培養時に比べ、有意に減少していた。一部の遺伝子の転写レベルに関しては、ノーザンブロットング解析によっても、その違いを確認することができた。マイクロアレイ解析によっても、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*DGA1*, *LRO1*, *ARE1*, *ARE2*の各遺伝子の転写量は、大豆ペプチド培地で培養した細胞で少ないことが確認された。

酵母グリコーゲンレベルに及ぼす影響

定常期酵母細胞は不溶性グリコーゲンを細胞壁の外に、可溶性グリコーゲンを細胞質内に保持する。マイクロアレイ解析の結果、大豆ペプチドによる培養によって、グリコーゲン合成系遺伝子の転写レベルが有意に上昇することを見出した。それぞれ遺伝子の転写

レベルはカゼイン培地培養時に比べ、それぞれ*GLG2* 約14倍、*GLC3*約18倍、*GSY1*約11倍、*GSY2*約17倍 上昇していた。そこで、実際の細胞内グリコーゲンレベルの測定をおこなったところ、確かに大豆ペプチド培地で培養した細胞は、他の培地で培養した際に比べ約2倍のグリコーゲンを保持していた (Fig. 3)。この結果から、大豆ペプチドの利用により中性脂質ではなくグリコーゲンとしてエネルギー源の貯蔵をおこなっているのではないかと考えられた。

次に、エネルギー源貯蔵形態であるグリコーゲンと中性脂質の蓄積に関して、両者間になんらかの相互作用があるのではないかと考えた。そこで、グリコーゲンの合成能を低下させた変異株では、大豆ペプチドによっても中性脂質の蓄積がおこなわれるのではないかと予想して検討をおこなった。グリコーゲンの分岐鎖形成酵素をコードする*GLC3*遺伝子の破壊株*glc3Δ/glc3Δ*を構築し、大豆ペプチド培地培養時のグリコーゲンの蓄積およびリピッドボディ形成を検討した結果、予想に反して*glc3Δ/glc3Δ*株でもリピッドボディの形成は抑制された (Figs. 1 and 3)。

考 察

マクロアレイ解析の結果から、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、定常期細胞内の中性脂質の蓄積やリピッドボディの形成が抑制され、一方でグリコーゲン合成系が活性化されることが示唆された。実際に細胞内のグリコーゲンレベルが顕著に増加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グリコーゲンの蓄積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。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。大豆ペプチドによるグリコーゲンレベルの増加が冷凍耐性に及ぼす影響について詳細に検証をおこなう予定である。また、*GLC3*遺伝子破壊株でもリピッドボディの形成抑制が観察されたことから、グリコーゲンの蓄積とリピッドボディ形成抑制におよぼす効果はそれぞれ独立したものだと考えられた。

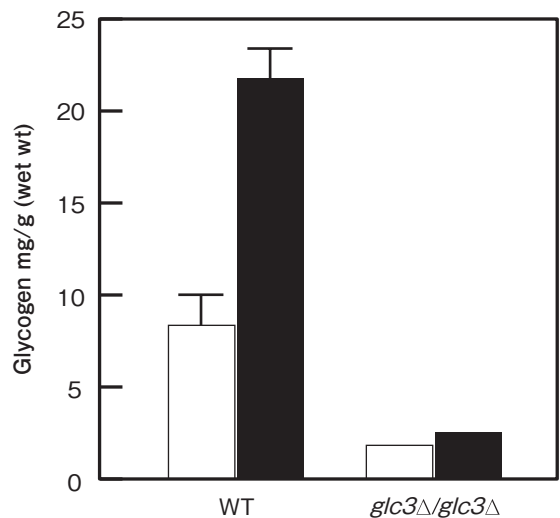


Fig. 3. Cellular glycogen level was higher in the cells (wild-type and *glc3Δ/glc3Δ*) cultivated with soy peptides (black bars) compared with the cells cultivated with casein peptone (white bars).

要 約

大豆ペプチドでの培養によって、中性脂質の合成系遺伝子の転写が抑制される一方で、グリコーゲン合成系遺伝子群の転写は活性化されることが、DNAマイクロアレイの解析結果から示唆された。また、実際に酵母細胞内のグリコーゲンレベルが上昇することを見出した。大豆ペプチドはグリコーゲン合成に関わる遺伝子を破壊した変異株においてもリピッドボディの形成を抑制したことから、グリコーゲン蓄積の亢進は中性脂肪レベル低下とは別の独立した作用であると考えられた。これらの結果は、脂質ではなくグリコーゲンによるエネルギー源貯蔵の活性化が大豆ペプチドの利用により実現できる可能性を示唆した。動物細胞においても同様の効果があるか今後検討したいと考えている。

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 β -conglycinin diet suppresses serum triglyceride levels in normal and generically obese mice by induction of β -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) Parrou JL and François J (1997) A simplified procedure for a rapid and reliable assay of both glycogen and trehalose in whole yeast cells. *Anal. Biochem.*, **248**, 186-188.