

# 大豆ペプチドによるグリコーゲン高蓄積酵母の育種と分子機構の解析

井沢真吾\*

京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科応用生物学専攻微生物工学研究室

## Study of the Mechanisms of Yeast Glycogen Accumulation Caused by Soy Peptides

Shingo IZAWA\*

Laboratory of Microbial Engineering, Department of Applied Biology,  
Graduate School of Scientific Technology, Kyoto Institute of Technology, Kyoto 606-8585

### ABSTRACT

We have previously reported that the cultivation of yeast cells in media containing soy peptides improves the tolerance against freeze-thaw stress and prevents the formation of lipid bodies in *Sacchaomyces cerevisiae*. Additionally, we found that soy peptides increase the level of cellular glycogen. DNA microarray analysis indicated that the up-regulation of glycogen biosynthesis system was caused by the cultivation with soy peptides. Compared with yeast cells cultured with casein peptone, cells cultured with soy peptides showed an increase in the levels of cellular glycogen. The cultivation with soy peptides caused activation of general stress responsive transcription factors Msn2/Msn4 and subsequently resulted in the increased levels of the glycogen synthases (Gsy1 and Gsy2) and branching enzyme (Glc3). Additionally, expression of various heat shock proteins such as Hsp30 was also induced by soy peptides. These results suggest that cultivation with soy peptides is likely a kind of stress condition for yeast cells, and that it is possible to induce the accumulation of glycogen by the combination of soy peptides and other stresses. *Soy Protein Research, Japan* **15**, 46-49, 2012.

Key words : soy peptides, baker's yeast, glycogen, heat shock proteins

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、冷凍パン生地の品質改良が可能になることや、リピッドボディの形成が抑制され中性脂質レベルが非常に低いLow fat yeastの育種が可能であることを報告してきた<sup>1,2)</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

\*〒606-8585 京都市左京区松ヶ崎御所海道町

おこなっている。

これまでのDNAマイクロアレイ解析から、大豆ペプチドでの培養により、酵母細胞内のグリコーゲン代謝系酵素をコードする遺伝子のmRNAレベルが有意に上昇することを見出している。酵母細胞は不溶性グリコーゲンとして細胞壁の外側にもグリコーゲンを蓄積することが報告されている。細胞壁の不溶性グリコーゲンが冷凍耐性をはじめとするストレス耐性の向上に寄与している可能性が考えられたことから、本研究ではグリコーゲンレベル上昇の分子機構とストレス耐性への寄与について解析をおこなった。

## 方 法

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株および代表的実験室株W303-1A株を用いた。また、サンドイッチ法によりglycogen synthetaseをコードするGSY1遺伝子およびGSY2遺伝子を破壊し、グリコーゲン合成能欠失株の構築をおこなった。S. cerevisiaeのHIS3遺伝子をGSY1遺伝子ORFの一部と置き換えた*gsy1Δ::HIS3*カセット、および Euroscarfの遺伝子破壊株コレクション中の*gsy2Δ::kanMX*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*gsy2Δ::kanMX*カセットをW303-1A株に形質転換し、二重遺伝子破壊株*gsy1Δ gsy2Δ*を構築した。培養には大豆ペプチド (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) を調製し用いた<sup>2)</sup>。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。

グリコーゲン合成酵素をコードするGSY1遺伝子のGFP-fusionプラスミドは、プライマーセット5'-CAGAGGCCATTTCCATGGTTGTTTT-3'および5'-GAGATCTCGAGAATTATCCTCGTAGTATGCAGACGT-3'により増幅したGSY1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、EcoRIによる線状化後、酵母細胞に形質転換した。Hsp30-GFPプラスミドは加茂らの方法で構

築した<sup>3)</sup>。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<sup>4)</sup>。

## 結 果

### ストレス応答性転写因子Msn2/Msn4の活性化

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遺伝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グリコーゲン合成に関与する多くの遺伝子のmRNAレベル上昇が観察された (Fig. 1)。これらの遺伝子のプロモーター領域を解析したところ、ストレス応答性の転写因子Msn2/Msn4の認識配列であるSTRE (stress responsive element) と同じ配列<sup>5)</sup>、5'-CCCCT-3'および5'-AGGGG-3'が存在することが確認された (Fig. 2)。そこで、Msn2-GFPおよびMsn4-GFPを用いてこれらの因子の細胞内局在を検討したところ、両者とも大豆ペプチド培地中では核内に蓄積し、Msn2/Msn4標的遺伝子の転写活性化が強く示唆された。つぎに、Gsy1-GFPやGlc3-GFPによる細胞内局在や発現を検討したところ、カゼインペプトン培地に比べ大豆ペプチド培地ではGFPシグナルの顕著な増加が確認された (Fig. 3)。また、FLAGタグを用いたウェスタンブロット解析によっても、大豆ペプチド培地によるたん白質レベルでの発現量の増加が確認された。これらの結果から、大豆ペプチド培地中ではMsn2/Msn4の活性化が引き起こされ、標的遺伝子の発現がたん白質レベルでも上昇することが明らかとなった。

### 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。大豆ペプチドによる培養によって、GSY1/GSY2/GLC3をはじめとするグリコーゲン合成系遺伝子の発現レベルが上昇することが確認されたことから、大豆ペプチド培地、カゼイン培地、およびYNB培地の各種培地で定常期まで培養した細胞についてグリコーゲンレベルを比較した。その結果、大豆ペプチド培地で培養した酵母細胞は顕著に高いレベルを示した。一方、カゼイン培地で培養した酵母細胞は、YNB培地で培養した酵母細胞と比較しても低いレベルのグリコーゲンしか保持していなかった。

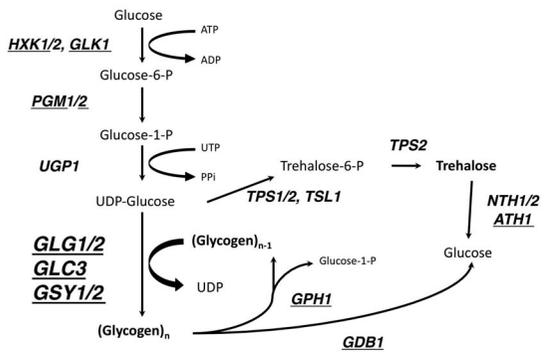


Fig. 1. Glycogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. Genes upregulated by soy peptides are underlined. *HXK1*, hexokinase; *GLK1*, glucokinase; *PGM2*, phosphoglucomutase; *GLG1/2*, glycogenin-like protein; *GLC3*, glycogen-branching enzyme; *GSY1/2*, glycogen synthase; *GPH1*, glycogen phosphorylase; *GDB1*, glycogen-debranching enzyme; *ATH1*, acid trehalase.

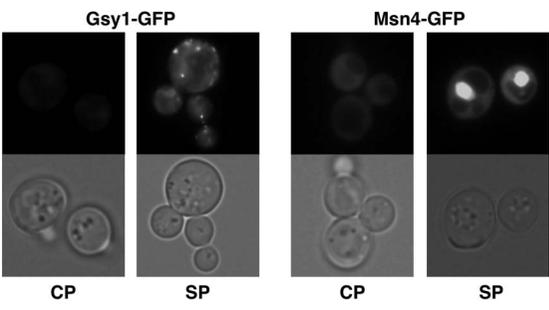
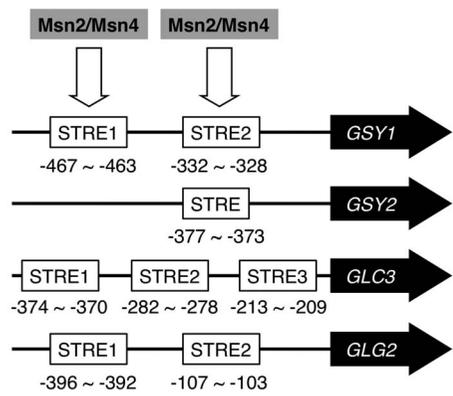


Fig. 3. Intracellular localization of glycogen synthase protein (Gsy1) and general stress responsive transcriptional factors (Msn2/Msn4) were analyzed using GFP-fusion proteins. Yeast cells were cultured in 100 mL of each medium with shaking (120 rpm) at 28°C. Soy peptides cultivation activated Msn2/Msn4 and subsequently induced the expression of Gsy1 in the cytoplasm as foci. CP, casein peptone medium; SP, soy peptide medium.



STRE consensus sequence: 5'-CCCCT-3' or 5'-AGGGG-3'

Fig. 2. Promoter region analysis of glycogen synthesis related genes. Each gene contains STREs (stress responsive element), a recognition motif for general stress responsive transcription factors Msn2/Msn4<sup>5)</sup>.

**グリコーゲン合成能欠失株のストレス耐性**

グリコーゲンレベルの上昇が酵母の冷凍耐性改善に寄与している可能性が考えられたため、グリコーゲン合成酵素遺伝子をコードするGSY1/GSY2両遺伝子を破壊したグリコーゲン合成能欠失株 (*gsy1Δ gsy2Δ*) を構築し、冷凍耐性をはじめとするストレス耐性を検

討した。カゼイン培地で培養した際には、野生株および*gsy1Δ gsy2Δ*株間で大きなストレス耐性の違いは確認されなかった。一方、大豆ペプチドで培養した際には、野生株が高い冷凍耐性を示したのに対して、*gsy1Δ gsy2Δ*株の冷凍耐性は野生株ほど高いものではなかった。*gsy1Δ gsy2Δ*株にGSY1遺伝子あるいはGSY2遺伝子をプラスミドで導入すると、冷凍耐性は野生株なみに回復した。このことは、大豆ペプチドによる冷凍耐性向上にグリコーゲンレベルの上昇が一部寄与している可能性を強く示唆した。

**Hsp30の冷凍耐性に対する寄与**

7回膜貫通型のヒートショックプロテインであるHsp30はストレスにตอบสนองして細胞膜上に発現するが、HSP30遺伝子もプロモーター領域にSTREを持ち、大豆ペプチド培地中での発現誘導がGFPやウェスタンブロット解析から確認された。Hsp30の欠損株*hsp30Δ*を構築し、カゼインペプチド培地および大豆ペプチド培地で培養後、ストレス耐性を野生株と比較した。その結果、カゼインペプチド培地で培養した際には野生株と欠損株の冷凍耐性に大きな違いは観察されなかったが、大豆ペプチド培地で培養した場合には、*hsp30Δ*株は十分な耐性向上を示さなかった。このことから、グリコーゲン同様、Hsp30の発現誘導も大豆ペプチド培養による冷凍耐性の向上に一部寄与していると考えられた。

## 考 察

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、ストレス応答性の転写調節因子Msn2およびMsn4が活性化され、グリコーゲン合成系の遺伝子発現が上昇することを確認した。また、グリコーゲンを合成できない遺伝子破壊株では、大豆ペプチド培地による冷凍耐性の上昇が不十分であった。これらの結果から、グリコーゲンを高濃度で蓄積する酵母の育種が大豆ペプチドの利用により可能であ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、大豆ペプチド培地が細胞内グリコーゲンレベルの上昇に大きく貢献していると思われる。また、Msn2/Msn4を活性化するその他のストレス条件と組

み合わせることにより、グリコーゲン高蓄積株の育種も十分可能だと考えられた。実際に、大豆ペプチドで培養した酵母細胞を、中程度の熱ショックストレスである39℃で1時間細胞を処理することにより、細胞内グリコーゲンレベルがさらに上昇することが観察されたことから、何らかの応用に役立てられるのではないかと期待している。他の培地に比べ大豆ペプチドによる培養は酵母細胞の増殖効率を改善することから、酵母にとって非常に快適な環境だとこれまで考えられていた。しかしながら、大豆ペプチド培地がMsn2/Msn4を活性化することから、酵母細胞に幾ばくかの負荷を与えるような環境なのかもしれない可能性が今回の研究で示唆された。現時点では、適度の負荷が酵母細胞の活性化やストレス耐性を向上させ、生育にも好影響を与えていると考えている。大豆ペプチドによるMsn2/Msn4の活性化機構について、更なる解析を継続している。

## 要 約

大豆ペプチドでの培養によって、ストレス応答性転写活性化因子Msn2およびMsn4が活性化され、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。グリコーゲン合成に関わる遺伝子を破壊した*gsy1Δ gsy2Δ*株では、大豆ペプチド培地による冷凍耐性の改善が不十分であったことから、酵母細胞のグリコーゲン、とくに細胞壁に結合するグリコーゲンが冷凍耐性向上の上で重要な役割を担っていると考えられた。また、Msn2/Msn4の活性化が誘導されたことから、大豆ペプチドによる培養が酵母細胞にとって適度なストレスとなり、細胞の活性化を引き起こしている可能性が示唆された。大豆ペプチド培地での培養と39℃などのストレス処理との組合せにより、さらにグリコーゲンを蓄積した酵母の生産が可能であることが明らかになった。

## 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**, 533-537.
- 2) Ikeda K, Kitagawa S, Tada T, Iefuji H, Inoue Y and Izawa S (2011): Modification of yeast characteristics by soy peptides: cultivation with soy peptides represses the formation of lipid bodies. *Appl Microbiol Biotechnol*, **89**, 1971-1977.
- 3) Kamo K, Takabatake A, Inoue Y and Izawa S (2012): Temperature dependent N-glycosylation of plasma membrane heat shock protein Hsp30p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun*, **420**, 119-123.
- 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.
- 5) Martinez-Pastor MT, Marchler G, Schüller C, Marchler-Bauer A, Ruis H and Estruch F (1996): The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *EMBO J*, **15**, 2227-2235.