

# 大豆ペプチドによるリン脂質合成系の活性化を介した 酵母発酵能改善機構の解析

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 on the Mechanisms of Improved Fermentation Ability of Yeast Cells Caused by Soy Peptides

Shingo IZAWA\*

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

### ABSTRACT

We have previously reported that cultivation in media containing soy peptides improves the growth and fermentation ability of *Sacchaomyces cerevisiae*. Compared with yeast cells cultured with casein peptone or bacto peptone, cells cultured with soy peptides showed the increase in the mRNA levels of genes involved in phospholipid synthesis. The *ino4Δ* and *tgl3Δtgl4Δtgl5Δ* mutants showed decreased growth rate in the soy peptide medium. Since they have deficiency in the transcriptional activation of genes involved in phospholipid synthesis and in the supply of fatty acids and diacylglycerol from triacylglycerol, it was considered that stagnation of phospholipid synthesis caused the delayed growth of these mutants in the soy peptide medium. Conversely, it is likely that the smooth supply of phospholipids is induced in the soy peptide medium and contributes the improved growth of yeast cells. Additionally, we found that soy peptides improve the efficiency of mutant construction, suggesting the soy peptide's utility for the breeding of brewer's yeast strains. *Soy Protein Research, Japan* **18**, 93-96, 2015.

Key words : soy peptides, yeast, phospholipids, spontaneous mutation

---

\*〒606-8585 京都市左京区松ヶ崎橋上町1

これまでに筆者等は、大豆ペプチドによる培養によって、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の冷凍耐性が改善され冷凍パン生地の高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>。また、大豆ペプチドを窒素栄養源として利用することによって、出芽酵母の増殖効率や発酵能が改善されることも明らかになっている。このような経緯から、我々の研究室では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をもたらされるのか解析している。近年、酵母細胞において、中性脂質の蓄積を抑制し、リン脂質合成に関わる遺伝子群の転写が活性化される可能性を見出した。また、出芽酵母は、脂肪酸を唯一の炭素源として増殖することが可能であり、脂肪酸の影響をよりダイレクトに解析する上で、動物細胞にはない優位性を有している。そこで本研究では、脂質代謝に関連する解析を行うとともに、大豆ペプチドによる脂肪酸毒性緩和効果などについても検証を行った。また、発酵関連ストレスについても検討を行い、大豆ペプチドの応用に関する新たな可能性を検討した。

## 方 法

酵母細胞の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) は適宜アミノ酸や塩基を添加して使用した。SP として Hinute-AM (不二製油)、およびソイペプトン (ナカライテスク) を、BP と CP はそれぞれ Becton Dickinson とナカライテスクより購入した。菌体は 28°C、120 rpm の振とう培養で調製した。

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は野生株として BY4741 株と BY4742 株を用いた。また、BY4741 を親株として triacylglycerol lipase をコードする *TG13/4/5* 遺伝子を破壊した *tg13Δtg14Δtg15Δ* 三重破壊株と、BY4742 を親株として アシルトランスフェラーゼを欠損した *dga1Δlro1Δare1Δare2Δ* 株を使用した。*tg13Δtg14Δtg15Δ* 株は Gunter Daum 博士より、*dga1Δlro1Δare1Δare2Δ* 株は Klaus Natter 博士よりそれぞれ分与された<sup>3,4)</sup>。

リン脂質合成系遺伝子 (*CHO1*, *PSD1/2*, *PEM1/2*,

*EPT1*, *CPT1*) の転写量は、Thermal Cycler Dice Real Time System Lite (TAKARA Bio) を用いて quantitative real time-PCR (qRT-PCR) で解析した。

## 結果と考察

### リン脂質合成系遺伝子の転写活性化

大豆ペプチドでの培養によって、リン脂質合成系の遺伝子転写レベルが活性化するのか検証した。活発な増殖を行う対数増殖期の細胞で比較検討したところ、BP 培地や CP 培地での培養時に比べ、各 SP 培地ではリン脂質合成系遺伝子の転写レベルが優位に高いことが明らかとなった (Fig. 1)。SP 培地に用いた Hinute-AM およびソイペプトンの違いについてはほとんど確認されず、どの大豆ペプチドでも同様の効果が認められた。また、SP 培地と同様のアミノ酸組成を持つアミノ酸培地<sup>5)</sup> では、リン脂質合成系遺伝子の転写活性化は認められなかった。

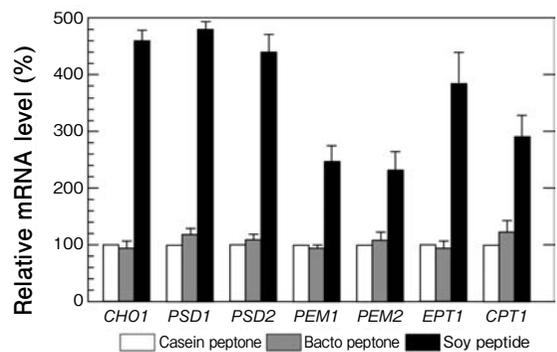


Fig. 1. Transcriptional activation of the yeast genes involved in phospholipid synthesis by soy peptides. Cells were cultivated in casein peptone medium (white bars), bacto peptone medium (gray bars), and soy peptides medium (black bars). The mRNA levels of cells in an exponential phase of growth were analyzed by qRT-PCR. To compare mRNA expression levels, the mRNA level of each gene was normalized to that of *ACT1*. The mRNA level in cells cultivated in casein peptone medium was considered 100%. Data are shown as mean  $\pm$  SD of three independent experiments.

## Ino4およびtriacylglycerol lipase欠損の影響

リン脂質合成系遺伝子の多くが転写因子Ino4によって転写活性化されることから、Ino4欠損株 (*ino4Δ*) の生育とアルコール発酵能を比較した (Fig. 2, 3). 野生株に比べ *ino4Δ* 株は、SP培地での増殖効率が低下することが確認された。しかし、BP培地やCP培地では増殖の遅れはほとんど認められなかった。また、triacylglycerolを分解して脂肪酸を供給する上で重要なtriacylglycerol lipaseであるTgl3/4/5の三重欠損株 (*tgl3Δtgl4Δtgl5Δ*) についても同様の検討を行った。なお、transacylase活性を持つTgl3とTgl5は脂肪酸からリン脂質を合成することも可能であることが報告されている<sup>6)</sup>。解析の結果、SP培地での*tgl3Δtgl4Δtgl5Δ*株の増殖効率やアルコール発酵能が有意に低下することが確認された (Fig. 2, 3)。これらの結果から、SP培地における効率的な増殖にはリン脂質合成系の活性化と、リン脂質の材料となる脂肪酸やdiacylglycerolなどがTgl3/4/5を介して供給されることが大きな役割を担っていると考えられた。また、活発な膜リン脂質の供給を実現するために脂肪酸はほとんど中性化・蓄積されず、そのためにSP培地中では脂肪滴がほとんど形成されないのではないかと考えられた<sup>2)</sup>。これらの結果から、大豆ペプチドが酵母細胞の増殖効率に対して強い改善効果を持つのは、膜成分であるリン脂質のスムーズな供給が一因であると考えられた。リン脂質合成系を活性化するペプチドやそのレセプターの同定を通じて、大豆と脂質代謝の関係がより明らかになるのではないかと期待している。

## オレイン酸毒性に対する影響

中性脂質の合成に必要なアシルトランスフェラーゼを全て欠損した*dgal1Δlro1Δare1Δare2Δ*株は、脂肪酸の中性化や脂肪滴の形成を行えず、オレイン酸を炭素源とする培地中では脂肪酸毒性によって生育が著しく抑制されてしまう<sup>4)</sup>。しかし、大豆ペプチドによってオレイン酸の脂肪酸毒性が大幅に改善された。そのため、中性化とは違う方法による脂肪酸の無毒化が大豆ペプチドによって誘導されたと考えられた。

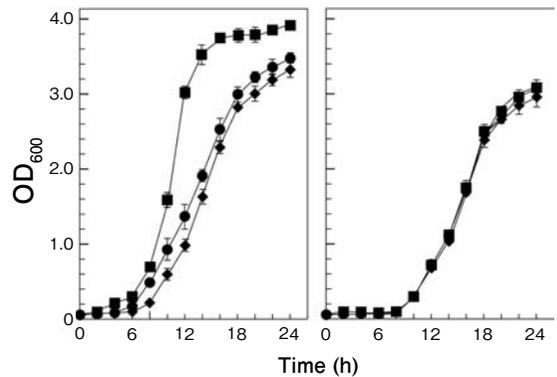


Fig. 2. Deficiency of Ino4 and Tgl3/4/5 caused the delayed growth in the soy peptides medium. Cells were cultured at 28°C in soy peptides medium (left) and casein peptone medium (right). Growth of cells was monitored by measuring the optical density at 600 nm (OD<sub>600</sub>). Data are shown as mean ± SD of three independent experiments. The strains examined were as follows: squares, wild type; circles, *tgl3Δtgl4Δtgl5Δ*; diamonds, *ino4Δ*.

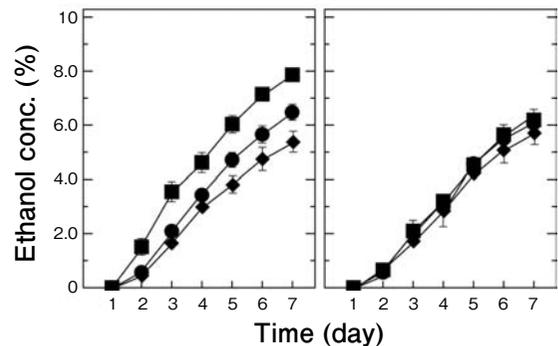


Fig. 3. Deficiency of Ino4 and Tgl3/4/5 repressed ethanol production in the soy peptides medium. Fermentation was carried out in high glucose medium containing 15% glucose and 2.5% soy peptides (right) or 2.5% casein peptone (left) without shaking at 28°C for 6 days. Ethanol concentrations in the medium are shown as means ± SD of three independent experiments. The strains examined were as follows: squares, wild type; circles, *tgl3Δtgl4Δtgl5Δ*; diamonds, *ino4Δ*.

## 要 約

大豆ペプチドで培養することにより、Ino4を介したリン脂質合成系が活性化することを確認した。また、Ino4やtriacylglycerol lipase欠損株では、大豆ペプチドによる生育の促進が抑制され、発酵能も低下した。これらの結果から、大豆ペプチドによること生育および発酵の促進は、リン脂質の供給による生体膜の合成促進に一部起因していることが強く示唆された。

## 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) Ikeda K, S. Kitagawa, T. Tada, H. Iefuji, 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) Athenstaedt K and Daum G (2005): Tgl4p and Tgl5p, two triacylglycerol lipases of the yeast. *Saccharomyces cerevisiae* are localized to lipid particles. *J Biol Chem*, **280**, 37301-37309.
- 4) Petschnigg J, Wolinski H, Kolb D, Zellnig G, Kurat CF, Natter K and Kohlwein SD (2009): Good fat, essential cellular requirements for triacylglycerol synthesis to maintain membrane homeostasis in yeast. *J Biol Chem*, **284**, 30981-30993.
- 5) Kitagawa S, Mukai N, Furukawa Y, Adachi K, Mizuno A and Iefuji H (2008): Effect of soy peptide on brewing beer. *J Biosci Bioeng*, **105**, 360-366.
- 6) Rajakumari S and Daum G (2010): Janus-faced enzymes yeast Tgl3p and Tgl5p catalyze lipase and acyltransferase reactions. *Mol Biol Cell*, **21**, 501-510.