

大豆ペプチドを用いた転写因子Msn2による酵母の アミノ酸・ペプチド輸送体の活性制御機構の解析とその応用

高木博史*・Noreen Suliani Binti Mat Nanyan・渡辺大輔

奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科
バイオサイエンス専攻ストレス微生物科学研究室

Study of the Mechanism for Yeast Transcription Activator Msn2-Regulated Amino Acid/Peptide Transporter Activity by Using Soy Peptides and Its Application

Hiroshi TAKAGI*, Noreen Suliani Binti MAT NANYAN and Daisuke WATANABE

Laboratory of Applied Stress Microbiology, Graduate School of Biological Sciences,
Nara Institute of Science and Technology, Ikoma 630-0192

ABSTRACT

We cultured the wild-type and the transcription activator Msn2-overexpressing strains of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in the medium containing soy peptides (SP) or a free amino acid mixture (FAA) with the same amino acid composition as SP as the nitrogen source and examined the cell growth. The growth stimulation effect by SP was observed in both strains, but the growth ratio of SP/FAA in the Msn2-overexpressing strain was higher than that of the wild-type strain due to the influence of the growth delay by FAA in the Msn2-overexpressing strain. Next, we cultured both strains in the medium containing 10% glucose as the carbon source and measured their fermentation abilities (carbon dioxide production). The fermentation ability was enhanced when SP was used in both strains. The effect of SP was more remarkable in the Msn2-overexpressing strain when the carbon dioxide production ratio of SPP/FA was compared. Furthermore, we analyzed the transcription level of the genes encoding typical peptide transporters (Ptr2, Opt1). Unexpectedly, the expression of these transporters was not induced by SP, but tended to be high in the FAA medium that causes growth delay. These results suggest that the effect of SP on growth and fermentation in the Msn2-overexpressing strain is unrelated to the induction of the peptide transporter genes, and raise the possibility that the activities of Ptr2 and Opt1 are increased through the unknown transporter(s) involved in the uptake of SP or indirect influence except the transcription. *Soy Protein Research, Japan* **18**, 97-101, 2015.

*〒630-0192 奈良県生駒市高山町8916-5

Key words : yeast, transcription activator Msn2, fermentation ability, amino acid/
peptide transporter, soy peptides

大豆ペプチドはヒトの健康増進機能のみならず、酵母の生育、発酵の促進にも有効であると報告されている^{1,2)}。酵母に対する大豆ペプチドの効果は、遊離態では細胞内に取り込まれにくいアミノ酸がペプチド態として効率的に取り込まれるためだと考えられている。酵母に複数存在するペプチド輸送体については、Ptr2たん白質の機能解析が一部で行われているが³⁾、Ptr2を含めたそれらの活性制御機構には不明な点が多い。

我々はこれまでに、酵母のストレス応答に重要な転写活性化因子であるMsn2たん白質を産業酵母で過剰発現させ、ストレス条件下（発酵阻害物質・冷凍）における酵母の発酵力に及ぼす影響を解析した。その結果、バイオエタノール酵母では酸化ストレス耐性の向上、フルフラール存在下での生育速度の向上、エタノール生産開始時間の短縮が認められた⁴⁾。一方、パン酵母ではトレハロース含量の増加による冷凍ストレス耐性の向上、冷凍後の生地発酵力の顕著な増加が見られたことから⁵⁾、過剰発現させたMsn2の産業酵母における有用性が実証された。

また興味深いことに、Msn2を酵母で過剰発現させると、様々なアミノ酸（プロリン、アルギニン、フェニルアラニンなど）のアナログ（構造類似体）に対する感受性が高まることを見出した（未発表データ）。このことはMsn2の過剰発現が未知の機構によってアミノ酸やペプチド輸送体のエンドサイトーシスを抑え、細胞質膜に留めている可能性を示している。そこで本研究では、大豆ペプチドを用いて、Msn2の過剰発現が酵母の生育や発酵力、アミノ酸・ペプチド輸送体の発現に及ぼす影響について解析した。

方 法

酵母の作製

実験には酵母*Saccharomyces cerevisiae*の一倍体株であるBY4741株を用いた。Msn2の過剰発現株は、酵母において最も強力なプロモーターの一つであるグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子(*TDH3*)のプロモーターの下流にMsn2遺伝子(*MSN2*)のオープンリーディングフレームを連結したDNA断片をPCRによって調製し、BY4741株の染色体上の*MSN2*遺伝子座に相同組換えによって挿入することで作製した。

酵母の生育と発酵試験

S. cerevisiae BY4741株の野生型株およびMsn2過剰発現株を、SD-N最少培地（2%グルコース、0.67% yeast nitrogen base）に2%の大豆ペプチド（SP）（ハイニユートAM、不二製油社製）またはSPのアミノ酸組成²⁾に基づき調製した遊離アミノ酸混合物（FAA）を窒素源として添加した培地に植菌後、30℃で振とう培養し、経時的に培養液の600 nmにおける吸光度（OD₆₀₀）を測定することで酵母の生育を調べた。また、野生型株およびMsn2過剰発現株を2%の代わりに10%のグルコースを添加した上記の培地に植菌後、30℃で振とう培養し、経時的に炭酸ガスの生成量をファーマグラフ（Fermograph II、アトー社製）で測定することで酵母の発酵力を評価した。

定量的リアルタイムPCR

野生型株およびMsn2過剰発現株を2%のSPまたはFAAを含むSD-N最少培地（2%グルコース、0.67% yeast nitrogen base）に植菌し、30℃で12時間培養後、酵母の細胞から全RNAを抽出した。その後、4種類のプロリン輸送体（Gap1, Gnp1, Put4, Agp1）または2種類のペプチド輸送体（Ptr2, Opt1）について、各遺伝子の転写量を常法に従って定量的リアルタイムPCR（7300 Real-Time PCR system、アプライドバイオシステムズ社製）によって測定した。

結果と考察

大豆ペプチドが酵母Msn2過剰発現株の生育に及ぼす影響

大豆ペプチド（SP）またはSPと同じ組成の遊離アミノ酸混合物（FAA）を窒素源とする培地を用いて、酵母*S. cerevisiae*の野生型株とMsn2過剰発現株を培養し、細胞の生育を調べた。その結果、両菌株ともSPによる生育促進効果が認められたが（Fig. 1A）、Msn2過剰発現株ではFAAによる生育遅延の影響からSP/FAAの生育比が野生型株よりも高くなり、SPによる効果が大いことが示された（Fig. 1B）。したがって、Msn2過剰発現株では未知の原因によりFAAでの増殖が遅くなるが、SPにはこの悪影響を軽減させる効果があると言える。

大豆ペプチドが酵母Msn2過剰発現株の発酵力に及ぼす影響

次に、10%グルコースを炭素源とする各培地で発酵試験を行い、発酵力の指標である炭酸ガスの生成量を測定した。その結果、生育試験の結果と同様に、両菌株ともFAAよりSPを用いると発酵が促進された (Fig. 2A)。また、各時間でのSPP/FAAの総炭酸ガス生成量の比を比較すると、Msn2過剰発現株の方がSPによる効果が顕著であった (Fig. 2B)。実際は生育試験の結果と同様に、Msn2過剰発現株のFAAでの発酵遅延による影響が大きいと考えられる。

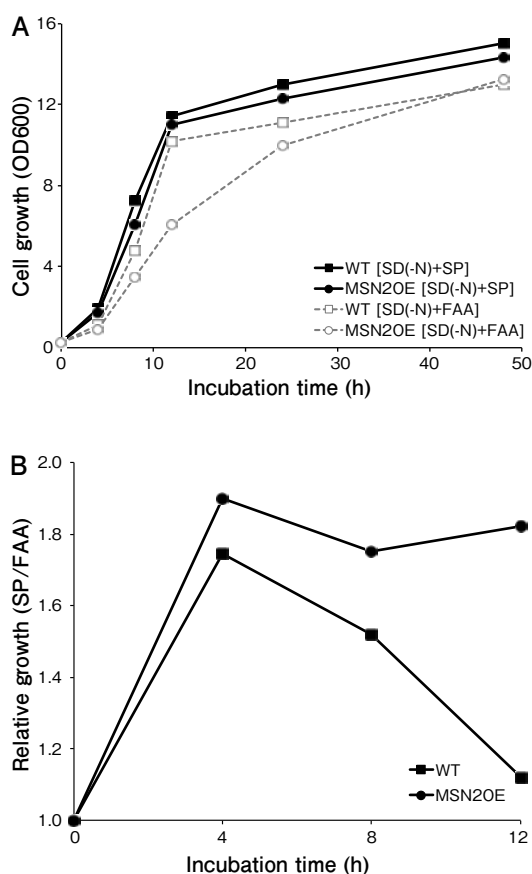


Fig. 1. Cell growth (A) and growth ratio of soy peptides (SP)/ a free amino acid mixture with the same amino acid composition as SP (FAA) (B) of the yeast *S. cerevisiae* wild-type (WT) and Msn2-overexpressing (MSN2OE) strains in the medium containing SP (SD (-N)+SP) or FAA (SD (-N) +FAA) as the nitrogen source.

大豆ペプチドが酵母Msn2過剰発現株のアミノ酸・ペプチド輸送体の発現に及ぼす影響

さらに、細胞膜に局在する代表的なアミノ酸輸送体 (Gap1, Gnp1, Put4, Agp1) およびペプチド輸送体 (Ptr2, Opt1) をコードする遺伝子の転写量を定量的リアルタイムPCRで測定した。その結果、予想に反してMsn2過剰発現株ではペプチド輸送体の発現がSPで誘導さ

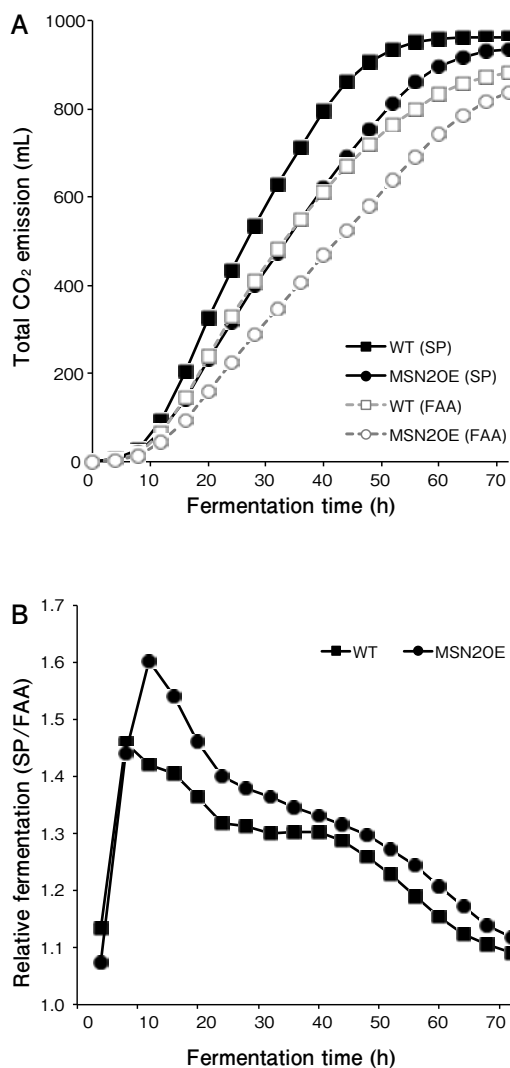


Fig. 2. Fermentation ability (A) and fermentation ratio of soy peptides (SP)/ a free amino acid mixture with the same amino acid composition as SP (FAA) (B) of the yeast *S. cerevisiae* wild-type (WT) and Msn2-overexpressing (MSN2OE) strains in the SP or FAA medium containing 10% glucose as the carbon source.

れず (Fig. 3A), 生育が遅延するFAA培地において発現が高い傾向にあった (Fig. 3B). したがって, Msn2過剰発現株で強く観察されたSPによる生育や発酵力への効果は, Ptr2, Opt1遺伝子のmRNAの発現誘導とは無関係であると考えられ, SPの取り込みに関わる未知の輸送体の存在, または転写以外の間接的な影響を介して, Ptr2やOpt1の活性が高まることに起因する可能性が示された. 今後, Msn2の過剰発現が酵母の発酵特性や酒質に及ぼす影響についても検討する予定である.

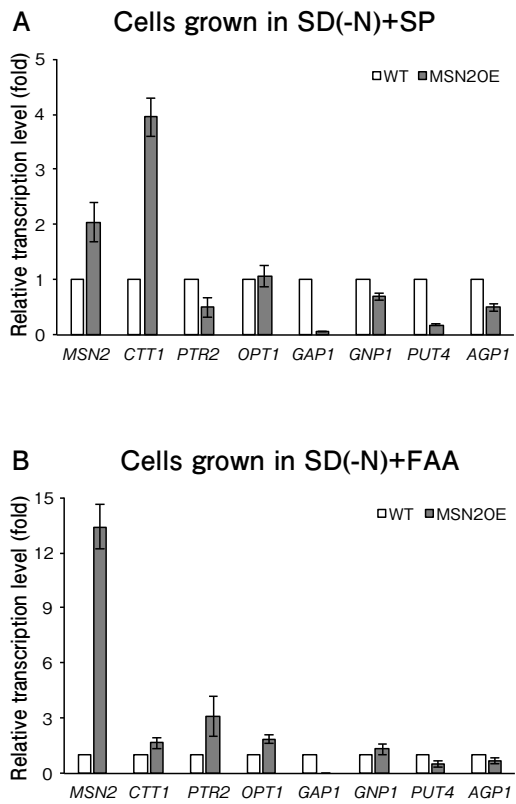


Fig. 3. Relative transcription levels of *MSN2*, the catalase gene (*CTT1*), and the amino acid transporter genes (*GAP1*, *GNP1*, *PUT4*, *AGP1*) and peptide transporter genes (*PTR2*, *OPT1*) in the yeast *S. cerevisiae* wild-type (WT) and Msn2-overexpressing (MSN2OE) strains grown in the medium containing SP (SD(-N)+SP) or FAA (SD(-N)+FAA) as the nitrogen source.

要 約

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の野生型株と Msn2 過剰発現株を大豆ペプチド (SP) または SP と同じ組成の遊離アミノ酸混合物 (FAA) を窒素源とする培地で培養し、細胞の生育を調べた。その結果、両菌株とも SP による生育促進効果が見られたが、Msn2 過剰発現株では FAA による生育遅延の影響から SP/FAA の生育比が野生型株よりも高くなった。次に、10% グルコースを炭素源とする各培地で培養し、発酵力 (炭酸ガス生成量) を測定した。その結果、生育試験と同様に、両菌株とも SP を用いると発酵が促進された。また、SP/FAA の炭酸ガス生成量比で比較すると、Msn2 過剰発現株の方が SP による効果が顕著であった。さらに、代表的なペプチド輸送体 (Ptr2, Opt1) をコードする遺伝子の転写量を調べたところ、予想に反して Msn2 過剰発現株ではペプチド輸送体の発現が SP により誘導されず、生育が遅延する FAA 培地において発現が高い傾向にあった。したがって、Msn2 過剰発現株で観察された SP による生育や発酵力への効果は、ペプチド輸送体の発現誘導とは無関係であると考えられ、SP の取り込みに関わる未知の輸送体の存在、または転写以外の間接的な影響を介して、Ptr2 や Opt1 の活性が高まることに起因する可能性が示された。

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) 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.
- 3) Kawai K, Moriya A, Uemura S and Abe F (2014): Functional implications and ubiquitin-dependent degradation of the peptide transporter Ptr2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell*, **13**, 1380-1392.
- 4) Sasano Y, Watanabe D, Ukibe K, Inai T, Ohtsu I, Shimoi H and Takagi H (2012): Overexpression of the yeast transcription activator Msn2 confers furfural resistance and increases the initial fermentation rate in ethanol production. *J Biosci Bioeng*, **113**, 451-455.
- 5) Sasano Y, Haitani Y, Hashida K, Ohtsu I, Shima J and Takagi H (2012): Overexpression of the transcription activator Msn2 enhances fermentation ability of industrial baker's yeast in frozen dough. *Biosci Biotech Biochem*, **76**, 624-627.