

# 出芽酵母のアセトアルデヒドに対する細胞応答と耐性機構

誌名	日本醸造協会誌 = Journal of the Brewing Society of Japan
ISSN	09147314
著者名	中川, 智行
発行元	日本醸造協会
巻/号	107巻9号
掲載ページ	p. 632-637
発行年月	2012年9月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



# 出芽酵母のアセトアルデヒドに対する細胞応答と耐性機構

アセトアルデヒドという物質は、多くの人に対して負のイメージを想起させる。イメージだけでなく、実際に細胞毒性を有することもよく知られたことである。著者は、アセトアルデヒドに晒される機会の多い酵母をモデルとして用い、アセトアルデヒドに対する細胞応答機構について取り組み、多くの興味深い成果を上げておられる。アセトアルデヒドに対して酵母が有する多様な耐性機構を中心に、意外な側面である細胞の活性化に関する事柄も含め、多面的に解説していただいた。

中 川 智 行

## 1. はじめに

酒は「百薬の長」といわれ、適度に飲む酒は健康に良いとされており、「ストレス解消効果」、「リラックス効果」、さらには「人付き合いの潤滑油としての効果」なども合わせ持つことから、古来より冠婚葬祭や様々な交渉事、さらにはプライベートで楽しむ酒など、私たちの生活をより豊かにするためのツールとして重宝されてきた。その一方で、つつい調子に乗りすぎて深酒をしてしまい、失敗をしてしまうことも少なくない。例えば、古代エジプトのピラミッド建設の出勤簿にも「二日酔いで欠勤」の記録が残っているなど、人類は太古の昔から現在に至るまで「アルコールの魔力」に捕われてしまうこともしばしばである。

その二日酔いの主な原因物質は、摂取したエタノールの酸化体のアセトアルデヒドであるとの説がある<sup>1-3)</sup>。アセトアルデヒドは、シックハウス症候群の原因物質の一つにも数えられ<sup>4)</sup>、生体内でDNA、タンパク質などの生体成分と付加体を形成し<sup>5-7)</sup>、吐き気、呼吸促拍、心悸亢進、顔面紅潮、脈拍亢進、頭痛などを引き起こすほか、肝硬変の原因や発癌性物質としても知られている<sup>8)</sup>。つまり、アセトアルデヒドの速やかな除去とともに、その毒性を最小限に抑える仕組みを強化することが「アルコールの魔力」から解放される近道となる。

また、アセトアルデヒドの毒性に悩まされるのは

我々ヒトだけではない。例えば、酵母はグルコースからエタノールを生成する過程で必ず代謝中間体としてアセトアルデヒドを生成し、その濃度は300～400 mg/L、条件によっては1,000 mg/Lに達することもある<sup>10,11)</sup>。また、酢酸菌の酢酸発酵においても、エタノールから酢酸を生成する過程の重要な代謝中間体はもちろんアセトアルデヒドである。つまり、重要な産業用微生物たちも、それぞれの発酵過程でアセトアルデヒドによる毒性と戦っていることが、容易に想像がつく。

一方、上記のようにアセトアルデヒドは常に悪者扱いばかりされがちであるが、シェリーワインの独特の芳香はアセトアルデヒドに起因し、さらにアセトアルデヒドは酵母のさまざまなストレス耐性を促すことも報告されているなど<sup>12)</sup>、調べてみるとアセトアルデヒドは、実は完全なる悪者でもないようである。

これら背景から、私たちのグループでは生物のアセトアルデヒドに対する細胞応答に興味を持ち、将来、産業用微生物の分子育種への応用、さらには創薬への展開を目指し、出芽酵母をモデル系として生物のアセトアルデヒドに対する細胞応答および耐性機構の一端をひもとくことにした。

## 2. アセトアルデヒド耐性機構におけるグルコース代謝バランスの制御

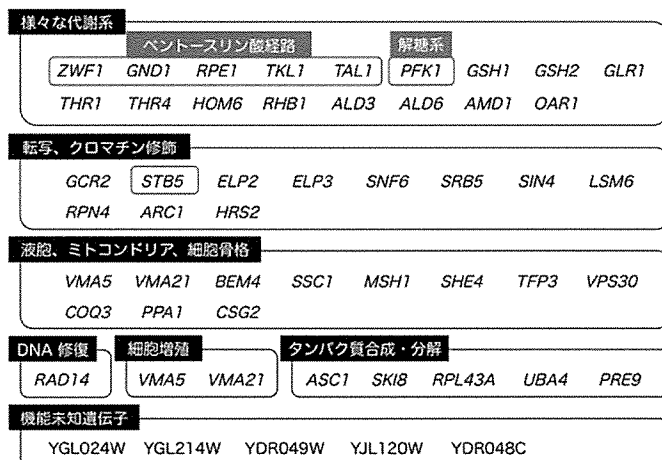
私たちは、まず、アセトアルデヒドを一般的な「毒性物質」として捉え、細胞の持つアセトアルデヒド耐性メカニズムの解明を目指すことにした。特に、出芽酵母はアルコール発酵時に自ら生産するアセトアルデヒドのストレスに曝されており、アセトアルデヒドの毒性に対する防御機構をある程度兼ね備えていることが推察できることから、アセトアルデヒド耐性メカニズムを解析するモデル生物として出芽酵母は最適であると考えた。

出芽酵母を用いてアセトアルデヒド耐性メカニズムを解明していく場合、その第一段階として、その耐性機構に関連性のある因子を網羅的に同定していくことが一つの近道となりうる。例えば、ArandaらはDNAマイクロアレイなどを用いてアセトアルデヒド依存的に誘導または抑制される遺伝子をスクリーニングし、その中からアセトアルデヒド耐性に関与する因子の同定を試みている<sup>13,14</sup>。彼らは、出芽酵母がアセトアルデヒドストレスを受けると硫黄代謝に関与するMET遺伝子群やポリアミントランスポーターをコードするTPO遺伝子群などの発現を増強することを示している<sup>13</sup>。

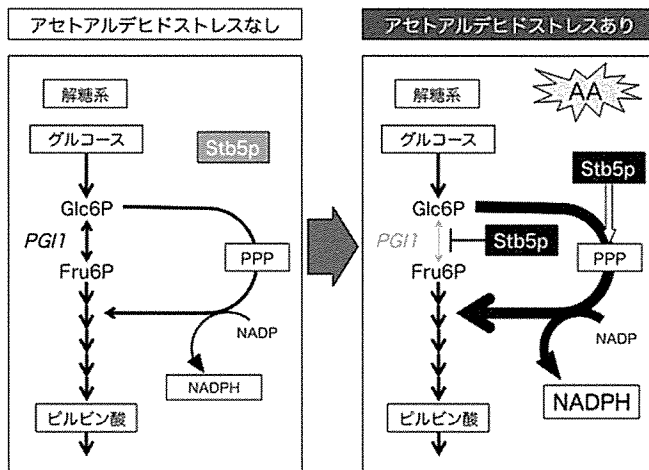
一方、私たちのグループではアセトアルデヒド耐性関連遺伝子(AAT)を同定する際、個々の遺伝子の

機能を直接表現系として観察できる「遺伝子欠損」を利用することにした。出芽酵母の約5,000個の非致死性遺伝子の破壊株コレクションを用いて、アセトアルデヒドに対して感受性を示す遺伝子欠損株をスクリーニングし、52個のAATを同定した<sup>15</sup>。AAT遺伝子群には、様々な機能を持つ遺伝子が含まれていたが、特にペントースリン酸経路(PPP)の構成因子はほとんどがAATであった(第1図)。また、PPP関連因子の遺伝子発現はアセトアルデヒド依存的に活性化されており、その発現誘導は転写因子Stb5p依存的であった<sup>16</sup>。これに対して、PFKIを除く大部分の解糖系遺伝子の欠損株はアセトアルデヒド耐性が上昇する結果を得た<sup>16</sup>。さらには、グルコースリン酸イソメラーゼをコードするPGIIの遺伝子発現はアセトアルデヒド存在下では非ストレス環境下の半分以下に抑制されており、PGIIのアセトアルデヒドに対する発現抑制もまたStb5pにより制御されていた<sup>16</sup>。つまり、出芽酵母はアセトアルデヒドストレス下ではPPPの誘導のみならず、解糖系の活性をも意図的に低下させ、グルコース代謝バランスを解糖系からPPPに、より流れるように制御することで、PPPを活性化していることが明らかとなった(第2図)。

では、どうして酵母はアセトアルデヒドのストレス下でPPPを活性化させる必要があるのだろうか?一般的に、生体内でのPPPの主な役割は「NADPHの供給」と「五単糖リン酸の供給」であるとされている。



第1図 出芽酵母におけるアセトアルデヒド耐性関連遺伝子AATの機能別分類



第2図 アセトアルデヒドストレス下における転写因子 Stb5p による PPP の活性化制御と NADPH の増産。

AA : アセトアルデヒド, PPP : ペントースリン酸経路, Glc6P : グルコース 6-リン酸, Fru6P : フルクトース 6-リン酸。

実際、出芽酵母は PPP の構成因子 *ZWF1* の欠損株では細胞内 NADPH 量は 5 分の 1 程度に減少し、*STB5* の過剰発現は細胞内 NADPH 量を増加させることも報告されている<sup>17)</sup>。また、私たちはアセトアルデヒドのストレス下では細胞内の NADPH 量は非ストレス下と比べて約 3.3 倍にまで増加することを観察している<sup>18)</sup>。さらには、私たちが同定した AAT 遺伝子群には 3 つの NADPH 依存型酵素をコードする遺伝子 *OARI*, *GLR1*, *HOM6* が含まれていた<sup>15)</sup>。これらのことを総合的に考察すると、アセトアルデヒドのストレス下では、出芽酵母はグルコース代謝バランスを総合的に制御し、NADPH 依存型代謝系に NADPH を多量に供給するために PPP をより活性化させていることが推測される。

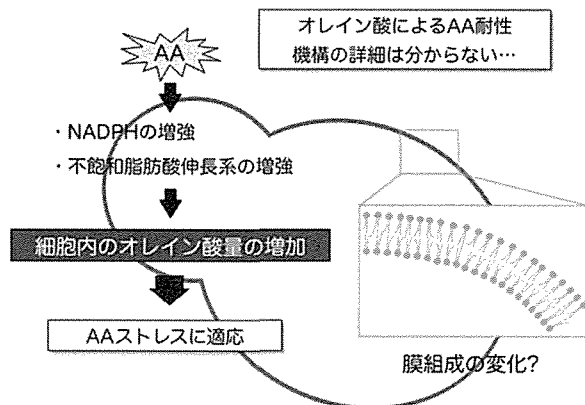
### 3. 脂肪酸合成系の活性化とオレイン酸増強によるアセトアルデヒド耐性機構

アセトアルデヒドストレス下で、出芽酵母が NADPH を増強する方向にグルコース代謝を制御していたことから、AAT 遺伝子群に含まれる 3 つの NADPH 依存型酵素は何らかの形でアセトアルデヒド耐性機構に関与することが想像できる。これら NADPH 依存型酵素のうち、*OARI* は 3-オキソアシル [ACP] レダクターゼ (*Oar1p*) をコードしており、

*Oar1p* は脂肪酸生合成および脂肪酸伸長反応において、NADPH 依存的に 3 オキソアシル-ACP の還元を触媒することが知られている。つまり、アセトアルデヒドストレス下において細胞内で生合成または伸長された脂肪酸が、アセトアルデヒド耐性機構において何らかの役割を持つことが推察される。

実際、出芽酵母はアセトアルデヒドのストレス下では C16 以下の脂肪酸を減少させ、C18:1 (オレイン酸) を増強する<sup>15)</sup>。さらには、脂肪酸不飽和化酵素をコードする *OLE1* の欠損株はアセトアルデヒド感受性を示すが、そのアセトアルデヒド感受性はオレイン酸では完全に抑制されるものの、同じ不飽和脂肪酸であるパルミトリン酸 (C16:1) ではそれを抑制することができなかった<sup>15)</sup>。また、オレイン酸は *ZWF1* など、いくつかの PPP 遺伝子欠損株のアセトアルデヒド感受性も完全に相補するため<sup>15)</sup>、出芽酵母のアセトアルデヒドストレス下での PPP による NADPH の供給は細胞内でのオレイン酸合成において重要であることが推測できる。

このように、細胞のアセトアルデヒド耐性システムにおいてオレイン酸が鍵因子の一つだということが容易に推測されるが、どのようにしてオレイン酸がアセトアルデヒド耐性機構に関与しているのか、その詳細な役割は未解明のままであり、その機能を解明するこ



第3図 アセトアルデヒド耐性機構におけるオレイン酸の増強のメカニズム。AA：アセトアルデヒド。

とは今後の課題の一つでもある（第3図）。

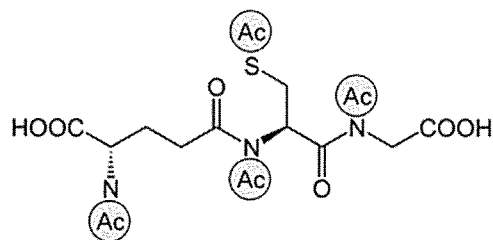
#### 4. グルタチオンを利用したアセトアルデヒド耐性機構

グルタチオンの還元（再生）を触媒するグルタチオンレダクターゼもNADPH依存型酵素であり、それをコードする遺伝子 *GLR1* もまた、その欠損が重篤なアセトアルデヒド感受性を示すAAT遺伝子群に含まれる<sup>19)</sup>。また、グルタチオン合成経路の因子をコードする *GSH1* および *GSH2* の欠損株も非常に重篤なアセトアルデヒド感受性を示し、さらには生育培地中に還元型グルタチオンを添加することで出芽酵母のアセトアルデヒド耐性性能は著しく上昇する<sup>19)</sup>。これらのことから、グルタチオン、特に還元型グルタチオンが出芽酵母のアセトアルデヒド耐性機構に何らかの形で関与していることが、容易に想像がつく。

では、グルタチオンはどのようにアセトアルデヒド耐性機構に関与しているのだろうか。グルタチオンはGlu-Cys-Glyから成るトリペプチドであり、構成アミノ酸であるCysのSH基を利用した細胞内の毒性物質の無毒化という重要な役割を担っていることが知られている<sup>20,21)</sup>。このグルタチオンが関わる生体防御システムは主に2つ報告されており、一方はグルタチオンペルオキシダーゼが触媒する「活性酸素消去」であり、他方はグルタチオンS-トランスフェラーゼが触媒する「グルタチオン抱合」である。しかし、両生体防御システムの鍵酵素をコードする *GPX* や *GTT* 遺伝子群を欠損させても、出芽酵母のアセトアルデヒド

ド耐性には全く影響を及ぼさないことから、これら酵素を介さない新たなグルタチオン依存型アセトアルデヒド耐性機構が存在することが示唆された<sup>19)</sup>。

一方、アセトアルデヒドストレス下において、出芽酵母はグルタチオンを増産するために、その生合成系の律速段階をコードする *GSH1* の発現量を3倍以上に増加させる<sup>13)</sup>。にもかかわらず、細胞内グルタチオン量はアセトアルデヒドの負荷量に応じて減少していった<sup>19)</sup>。つまり、グルタチオンはアセトアルデヒドによって何らかの形で消費され、アセトアルデヒドの毒性をスカベンジしていることが推測される。実際、アセトアルデヒドとグルタチオンを同一試験管内で混合すると、数時間後にはグルタチオンとアセトアルデヒドの付加体が形成されはじめる。この付加体のMS解析から、グルタチオンは最大4分子のアセトアルデヒドを分子内に補足し、アセトアルデヒドを無毒化できるようである（第4図）<sup>19)</sup>。



第4図 グルタチオンとアセトアルデヒドの付加体の構造。

Ac：アセチル基。

一方、Cysやグルタチオンの分解中間体であるCys-Glyがアセトアルデヒドと強固な付加体を形成することはすでに報告されている<sup>22,23,24</sup>。また、Arandaらはアセトアルデヒドストレス下で硫黄および含硫アミノ酸代謝に関与する因子が誘導されることから、酵母は細胞内のアセトアルデヒドを硫黄化合物あるいは含硫アミノ酸に直接結合させ、その複合体をトランスポーターで細胞外に排出することで毒性を回避しているのではと推測している<sup>13</sup>。しかし、出芽酵母の細胞内CysとCys-Gly濃度は、アセトアルデヒドストレス下でも変化せず、グルタチオンからCys-Glyの生産を触媒するECM38の遺伝子欠損株のアセトアルデヒド耐性も野生株と変わらなかった。つまり、出芽酵母は反応性の高いCysとCys-Glyを利用せず、アセトアルデヒドとの反応性に劣るグルタチオンを何故かアセトアルデヒドスカベンジャーとして活用しているようである。現状では、その意図とスカベンジャーの選択性の仕組みはよく分からないが、出芽酵母のアセトアルデヒド耐性機構にとってグルタチオンは非常に重要な役割を果たしていることは間違いない。

### 5. アセトアルデヒドによる細胞機能の活性化

ここまで、強い毒性を持ち、さらには発がん性をも示すアセトアルデヒドの生体への影響をどのように押さえ込むかを中心に解説してきたが、アセトアルデヒドは、実は根っからの悪者ではないようである。先にも記したが、シェリーワインではアルコール発酵後に表面にできる flor と呼ばれる膜構造に生息する酵母による二次発酵によりアルコールからアセトアルデヒドが生成され、これがシェリーワイン特有の芳香を生みだしている。つまりアセトアルデヒドは、シェリーワインに深い味わいを加える上で欠かせない化合物であるといえる。

また、少量のアセトアルデヒドは酵母のさまざまなストレス耐性を促すことが報告されている。Barberらは、出芽酵母のアルコールによる生育阻害は低濃度のアセトアルデヒドの添加により改善でき、中鎖脂肪酸ストレスにも効果を示すことを報告している<sup>12</sup>。

さらには、私たちが出芽酵母のメタボローム解析を行ったところ、アセトアルデヒドストレス下では、出芽酵母は細胞内のNADPHのみならずNADH量も増加させ、細胞内のエネルギー状態を高めていた<sup>18</sup>。

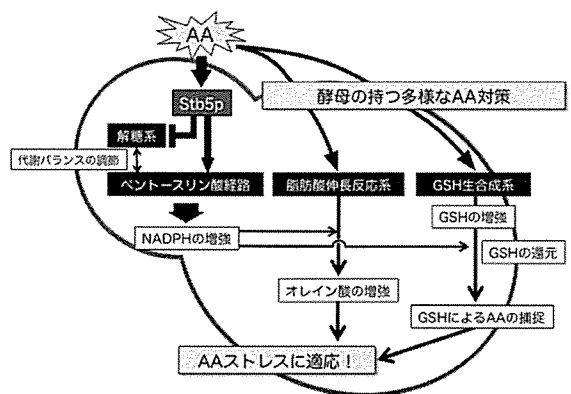
また、出芽酵母はアセトアルデヒドストレス下ではポリアミンの一種であるスベルミジンの細胞内レベルを増加させていた<sup>18</sup>。ポリアミンは、近年、寿命や細胞増殖の制御に関与することが報告されており<sup>25,26</sup>、さらに出芽酵母ではポリアミントランスポーターの遺伝子発現がアセトアルデヒドによって著しく上昇することから<sup>13</sup>、アセトアルデヒド耐性機構においてポリアミンが何らかの機能を持つかもしれない。

本節で述べてきたこれらの事実は、アセトアルデヒドが出芽酵母の細胞機能やエネルギー代謝をより活性化する方向に導いていると解釈することもできる。アセトアルデヒドによる細胞機能の活性化については、今後、さらなる研究の進展を期待している。

### 6. おわりに

本稿では、出芽酵母をモデルとした「生物のアセトアルデヒドに対する細胞応答」について解説してきた。アセトアルデヒドは非常に高い細胞毒性を示すため、出芽酵母はあの手この手でその毒性を回避する方策をとっているようである（第5図）。今後、これら出芽酵母の持つアセトアルデヒド耐性機構をひとつひとつ縋いていくことで、出芽酵母や酢酸菌などの産業用微生物の分子育種への応用、さらには、シックハウスや二日酔い等の創薬分野への展開などが期待できるのではと考えている。

また、本稿で解説したように、アセトアルデヒドが細胞機能を活性化させている可能性も考慮すると、適



第5図 これまで明らかになっている出芽酵母のアセトアルデヒド耐性機構の相関図。

AA：アセトアルデヒド、GSH；グルタチオン。

度な飲酒によって生体内で生じる適量のアセトアルデヒドは、まさしく「百薬の長」として機能しているのかもしれない。何事も「ほどほど」が大切であるということである。近年、世の中ではアセトアルデヒドのみならず、過剰な飲酒による社会・個人の健康に対するマイナス面ばかりがあまりにもクローズアップされがちではあるが、今後、未だ明らかになっていない酒やアセトアルデヒドの持つ本質的な長所に焦点が当てられることで、その魅力が引き立てられ、その存在感がより一層増すことを願っている。

〈岐阜大学応用生物科学部〉

## 文 献

- 1) Stephens, R., Ling, J., Heffernan, T. M., Heather, N., Jones, K.: *Alcohol Alcohol.* **43**, 163-170 (2008).
- 2) Swift, R., and Davidson, D.: *Alcohol Health Res. World* **22**, 54-60 (1998).
- 3) Wiese, J. G., Shlipak, M. G., and Browner, W. S.: *Ann. Intern. Med.* **132**, 897-902 (2000).
- 4) 厚生労働省 医薬食品局 審査管理課 化学物質安全対策室, <http://www.mhlw.go.jp/new-info/kobetu/seikatu/kagaku/>
- 5) Israel, Y., Hurwitz, E., Niemelä, O., and Arnon, R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 7923-17927 (1986).
- 6) Dellarco, V.: *Mutat. Res.* **195**, 1-20 (1988).
- 7) Yu, H. S.: *Chem. Biol. Interact.* **188**, 367-375 (2010).
- 8) Seitz, H. K., and Becker, P.: *Alcohol Res. Health* **30**, 38-41, 44-47 (2007).
- 9) Setshedi, M., Wands, J. R., and Monte, S. M.: *Oxid. Med. Cell. Longev.* **3**, 178-185 (2010).
- 10) Martínez, P., Pérez Rodríguez, L., and Benítez, T.: *Am. J. Enol. Viticult.* **48**, 160-168 (1997).
- 11) Martínez, P., Valcárcel, M. J., Piérez, L., and Benítez, T.: *Am. J. Enol. Viticult.* **49**, 240-350 (1998).
- 12) Barber, A. R. Vriesekoop, F., and Pamment, N. B.: *Enzyme Microb. Technol.* **30**, 240-250 (2002).
- 13) Aranda, A., and del Olmo, M. L.: *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 1913-1922 (2004).
- 14) Aranda, A. and del Olmo, M. L.: *Yeast* **20**, 747-759 (2003).
- 15) Matsufuji, Y., Fujimura, S., Ito, T., Nishizawa, M., Miyaji, T., Nakagawa, J., Ohyama, T., Tomizuka, N., and Nakagawa, T.: *Yeast* **25**, 825-833 (2008).
- 16) Matsufuji, Y., Nakagawa, T., Fujimura, S., Tani, A., Nakagawa, J.: *J. Basic Microbiol.* **50**, 494-498 (2010).
- 17) Hector, R. E., Bowman, M. J., Skory, C. D., Cotta, M. A.: *N. Biotechnol.* **26**, 171-180 (2009).
- 18) Matufuji, Y., and Nakagawa, T.: 未発表データ.
- 19) Matufuji, Y., Yamamoto K., Yamauchi, K., Mitsunaga, T., Hayakawa T., and Nakagawa T.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* In press.
- 20) Penninckx, M. J.: *Enzyme Microb. Technol.* **26**, 737-742 (2000).
- 21) Penninckx, M. J.: *FEMS Yeast Res.* **2**, 295-305 (2002).
- 22) Anni, H., Pristatsky, P., and Israel, Y.: *Alcohol Clin. Exp. Res.* **27**, 1613-1621 (2003).
- 23) Nagasawa, H. T., Goon, D. J., Muldoon, W. P., and Zera, R. T.: *J. Med. Chem.* **27**, 591-596 (1984).
- 24) Kera, Y., Kiriyama, T., and Komura, S.: *Agents Actions* **17**, 48-52 (1985).
- 25) Soda, K., Dobashi, Y., Kano, Y., Tsujinaka, S., and Konishi, F.: *Exp. Gerontol.* **44**, 727-32 (2009).
- 26) Igarashi, K. and Kashiwagi, K.: *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **42**, 39-51 (2010).

執筆者紹介 (順不同・敬称略)

中川智行 < Tomoyuki NAKAGAWA >

昭和45年10月11日生まれ < 勤務先とその所在地 >  
 岐阜大学応用生物科学部 〒501-1193 岐阜市柳戸1-1  
 < 略歴 > 平成5年東京農業大学農学部農芸化学科卒業,  
 平成7年東京農業大学大学院農学研究科農芸化学専攻  
 博士前期課程修了, 平成11年京都大学大学院農学研

究科農芸化学専攻博士後期課程修了, 博士(農学),  
 平成11年東京農業大学生物産業学部食品科学科助手,  
 平成13年同講師, 平成19年岐阜大学応用生物科学部  
 准教授, 現在に至る。 < 抱負 > 酵母の細胞機能を通し  
 て, 生命の神秘に迫りたい。 < 趣味 > FC 岐阜と阪神  
 タイガースの応援。