

パン酵母におけるストレス応答

The Stress Response of Budding Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*)

愛媛県立南宇和高等学校自然科学部 1年 松本 実夢・加納 璃乃・下田 葵・桑原 紘己・沖中 心兵 指導教諭 橋越 清一

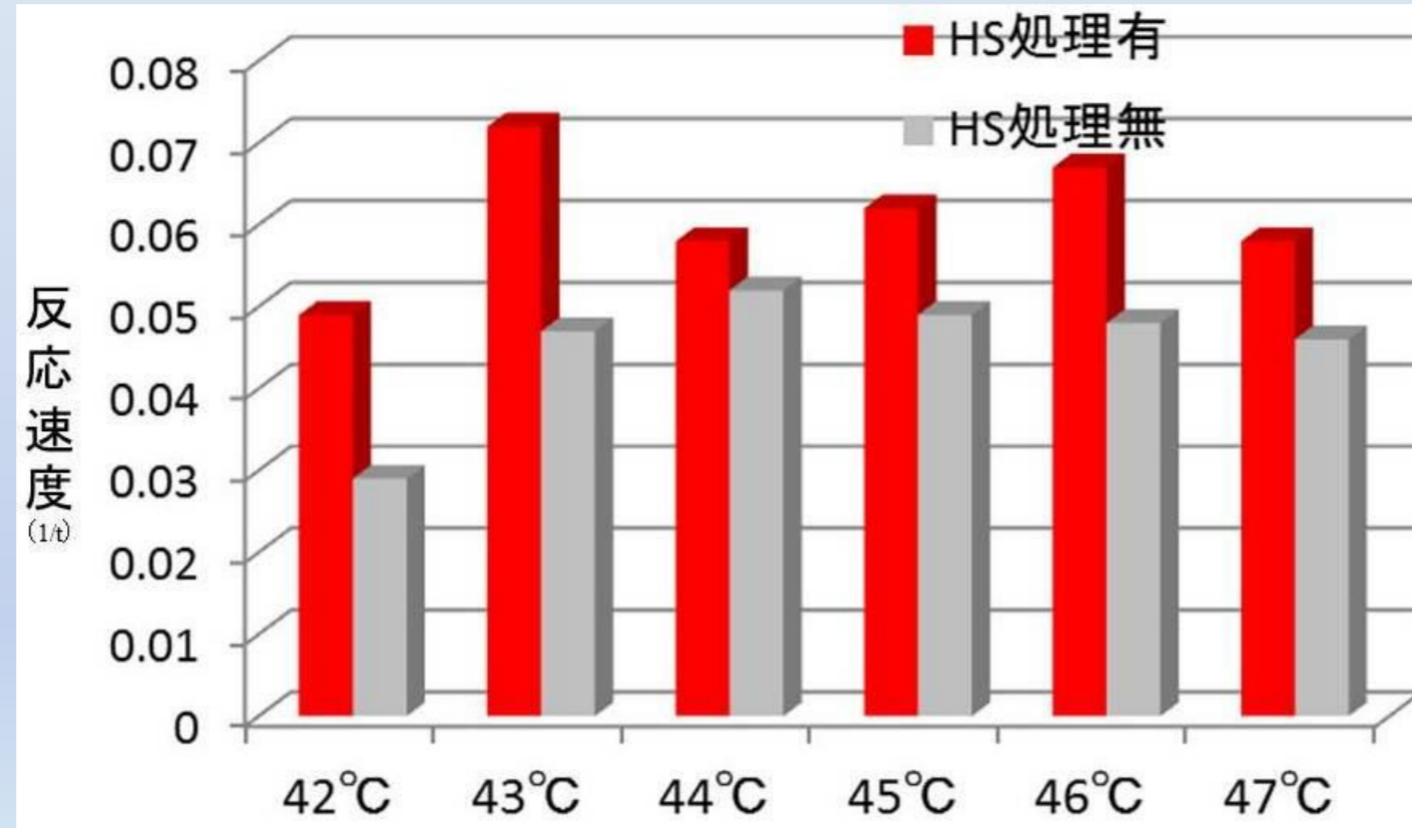
はじめに

パン作りに利用されているパン酵母は単細胞の真核生物であり、分類学的には真菌類に属している。パン酵母は、温度、pH、アルコールといった様々なストレスを受ける。筆者らは、高温(熱)耐性や急激な温度変化といったストレスに興味をもち、耐熱性に関するHSPがどこで作られているかという主題で研究するとともに、急激な温度変化というストレスをパン酵母に与えた場合の現象について研究し、いくつかの知見を得たので報告する。



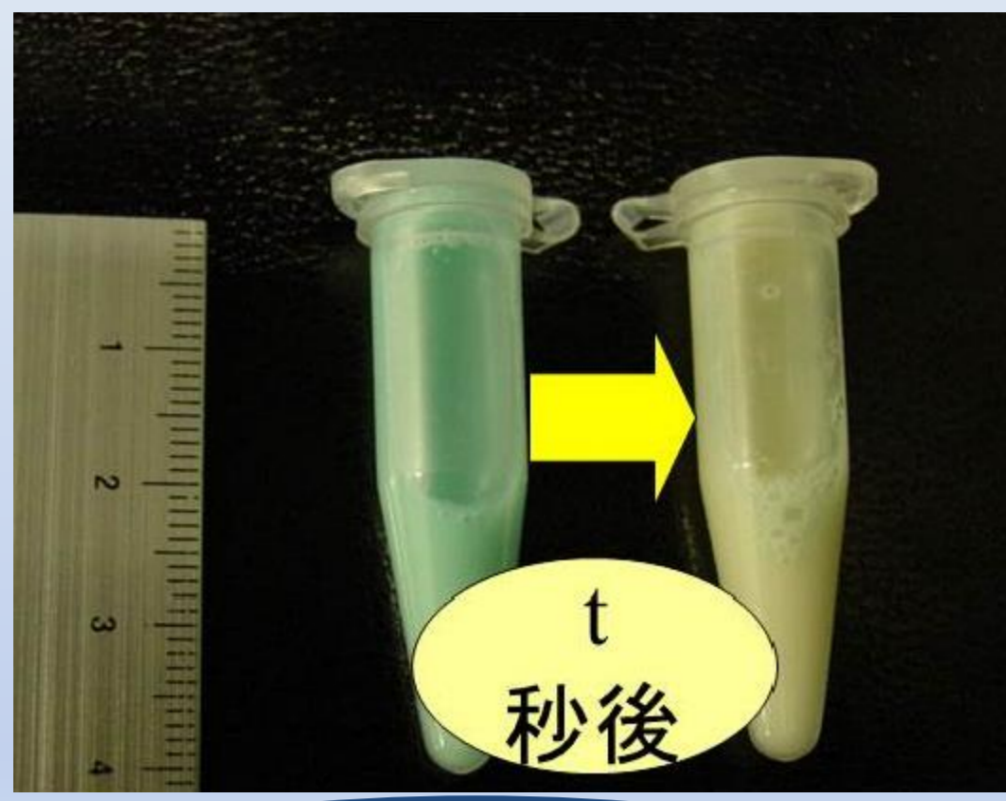
先行研究

熱ストレス、特に高温耐性の先行研究では、アルコール発酵に関する酵素群では、*in vivo*においてのみHSPのような分子シャペロンがつくられること、さらにはミトコンドリアのクエン酸回路におけるコハク酸デヒドロゲナーゼでは、42°C5分間のヒートショック処理でHSPのような分子シャペロンが形成される可能性や事前に高温にしていると耐熱性を獲得することが明らかにされている(早川ほか, 2003;小永井ほか, 2004;市川ほか, 2006;仲川ほか, 2007)。



実験材料及び薬品・器具

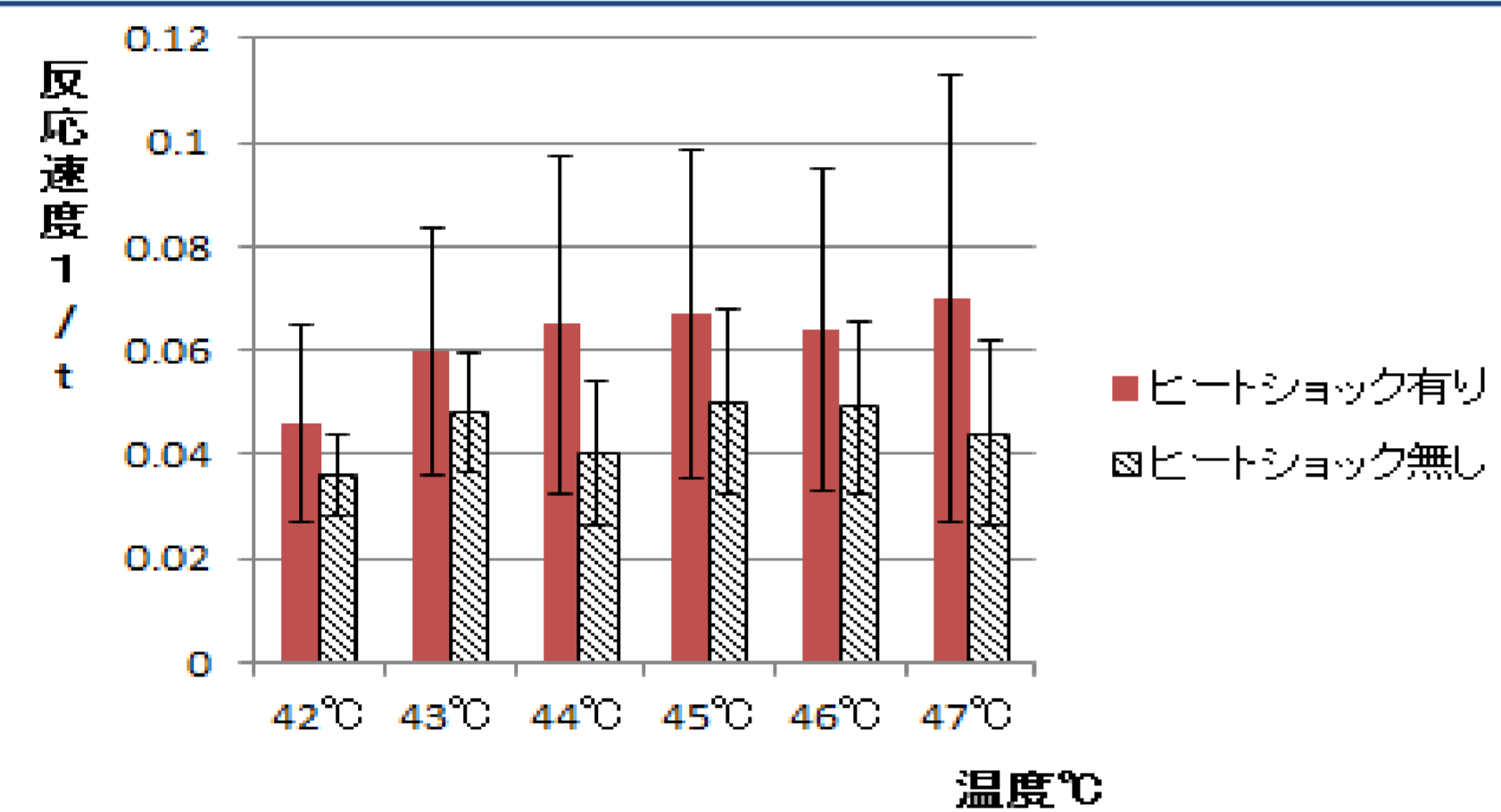
- 材料: パン酵母(スーパーカメラ(日清フーズ))
- 薬品及び溶液
 - 酵母液750μl
 - コハク酸ナトリウム水溶液350μl
 - pH7バッファー340μl
 - メチレンブルー(以下Mb) 50μl
- 器具
 - ウォーターバス
 - マイクロピペット
 - マイクロチューブ
 - ストップウォッチ
 - 遠心分離機など



Mbの脱色時間(t秒)の逆数(1/t)を反応速度として求めた!

I 先行研究の追試

42°Cで予め5分間HS処理を行い、42°C, 43°C, 44°C, 45°C, 46°C, 47°Cに入れて、Mbの脱色時間を測定しその逆数(1/t)を反応速度として求めた。



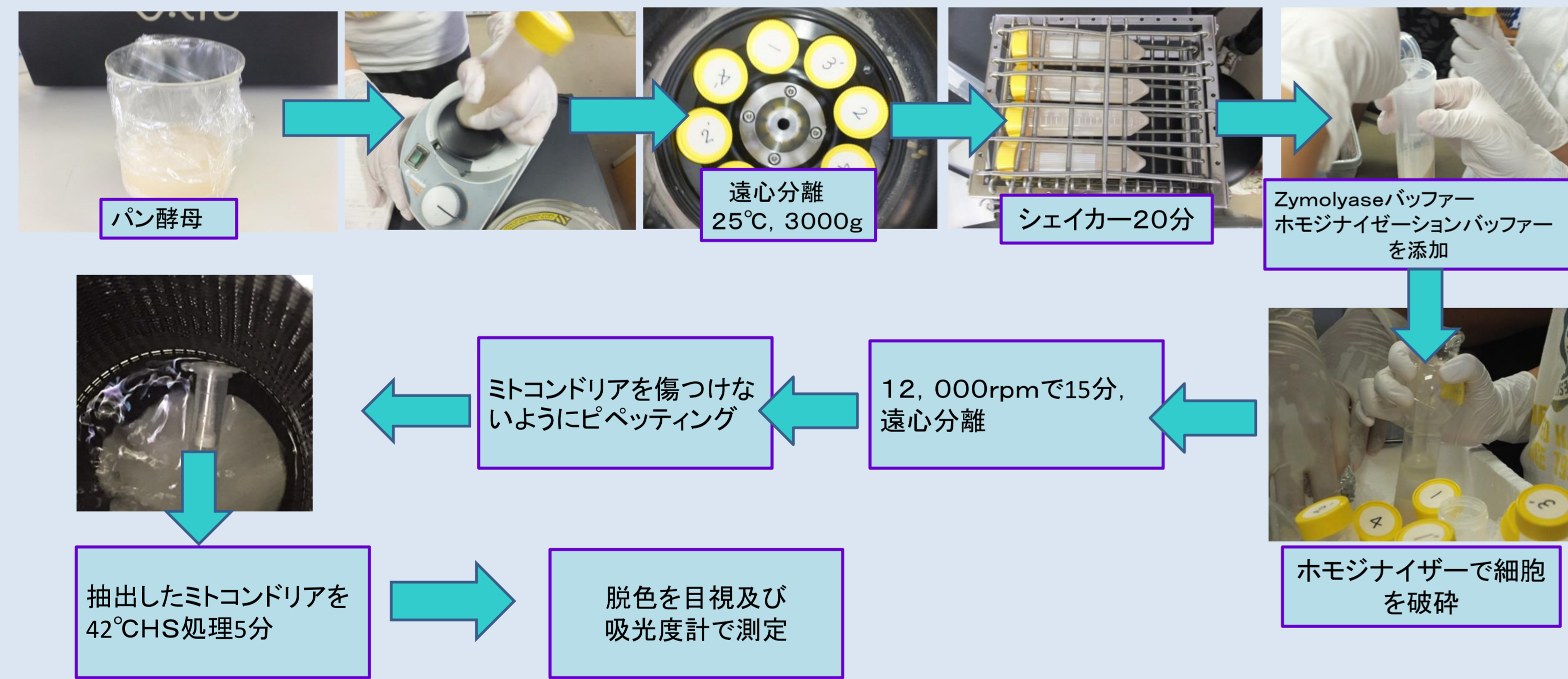
結果及び考察

先行研究の結果と同様になり、予めHS処理を行うと高温耐性を獲得することがわかった。このように、クエン酸回路内のコハク酸デヒドロゲナーゼも42°CのHS処理によってHSPのような分子シャペロンが合成され、パン酵母が高温耐性を獲得することが示唆された。

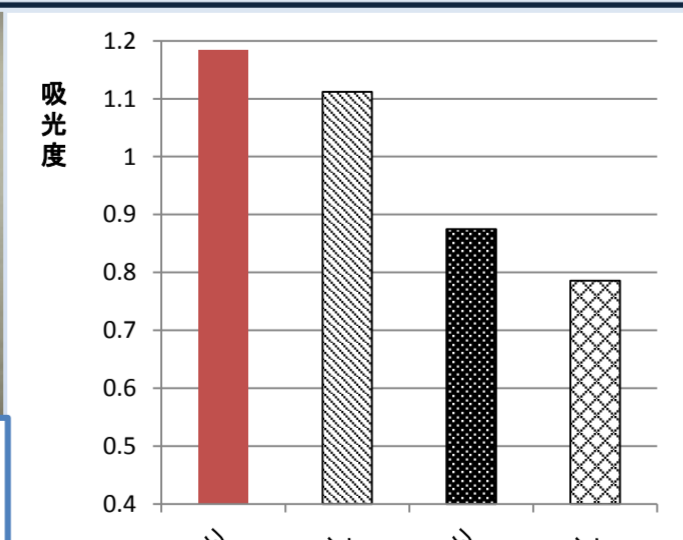
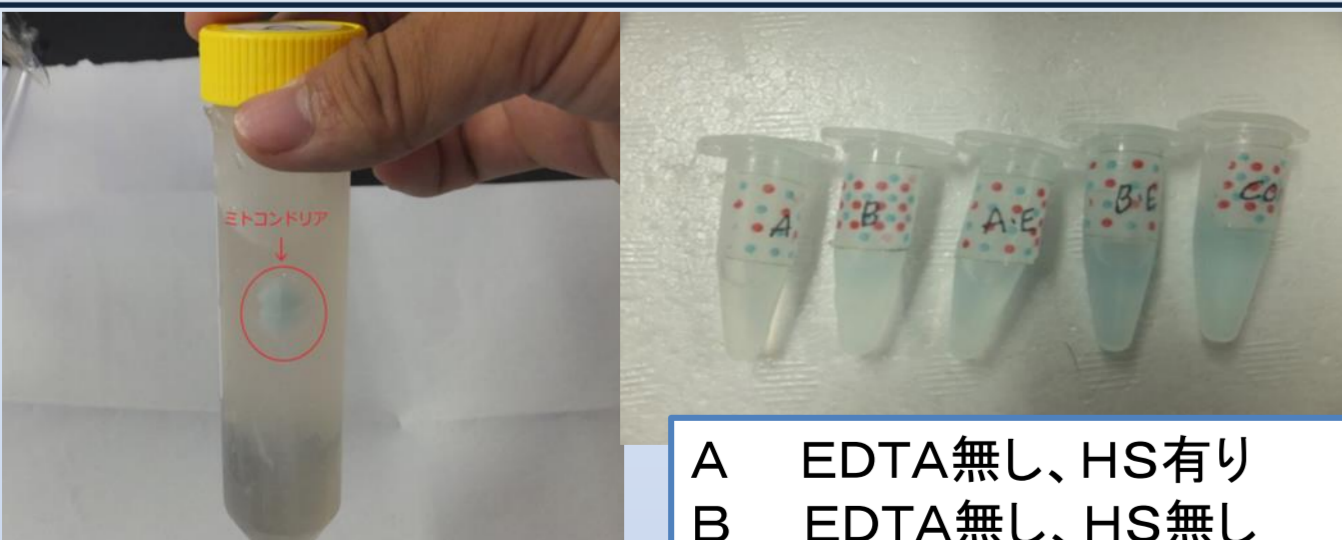
II ミトコンドリア内でもHSPが合成されるか?

仮説:「ミトコンドリア内でもHSPが合成される」

ミトコンドリアの抽出とHS処理



結果



プロトコルに従った方法及び簡易的な方法の両方でミトコンドリアを抽出することができた。その後、42°CでHS処理を5分行い、脱色を目視及び吸光度計で計測した。

考察

酵母菌の高温耐性に関するHSPはHSP104, sHSPなど多くあり、中でもミトコンドリア内のHSPにはHSP70sがある(永田ほか, 2001; Jacob Verghese et al., 2012)。HS処理有りの方が吸光度が高くMbが脱色していないという結果になったが、目視では明らかに脱色しコハク酸デヒドロゲナーゼが働いたことが示唆された。吸光度の結果と目視の結果が大きく異なるため、その原因を明らかにする必要がある。また、外部からはコハク酸はミトコンドリア内に入らず(林・座古, 私信)、ミトコンドリア内ではタンパク質がつくられない可能性が高く、さらに研究を行う必要がある。

III 急激な温度変化(低温領域)に酵母はどのように対応するのか?

仮説:「パン酵母のHSPは急激に低温の温度変化にも対応できる」

実験1

42°Cで5分間HS処理し、その後0°C, 10°C, 20°C, 30°Cで5分放置した場合とHS処理無しで各温度で処理した場合の2つについて、最適温度の42°Cで反応速度を計測した。

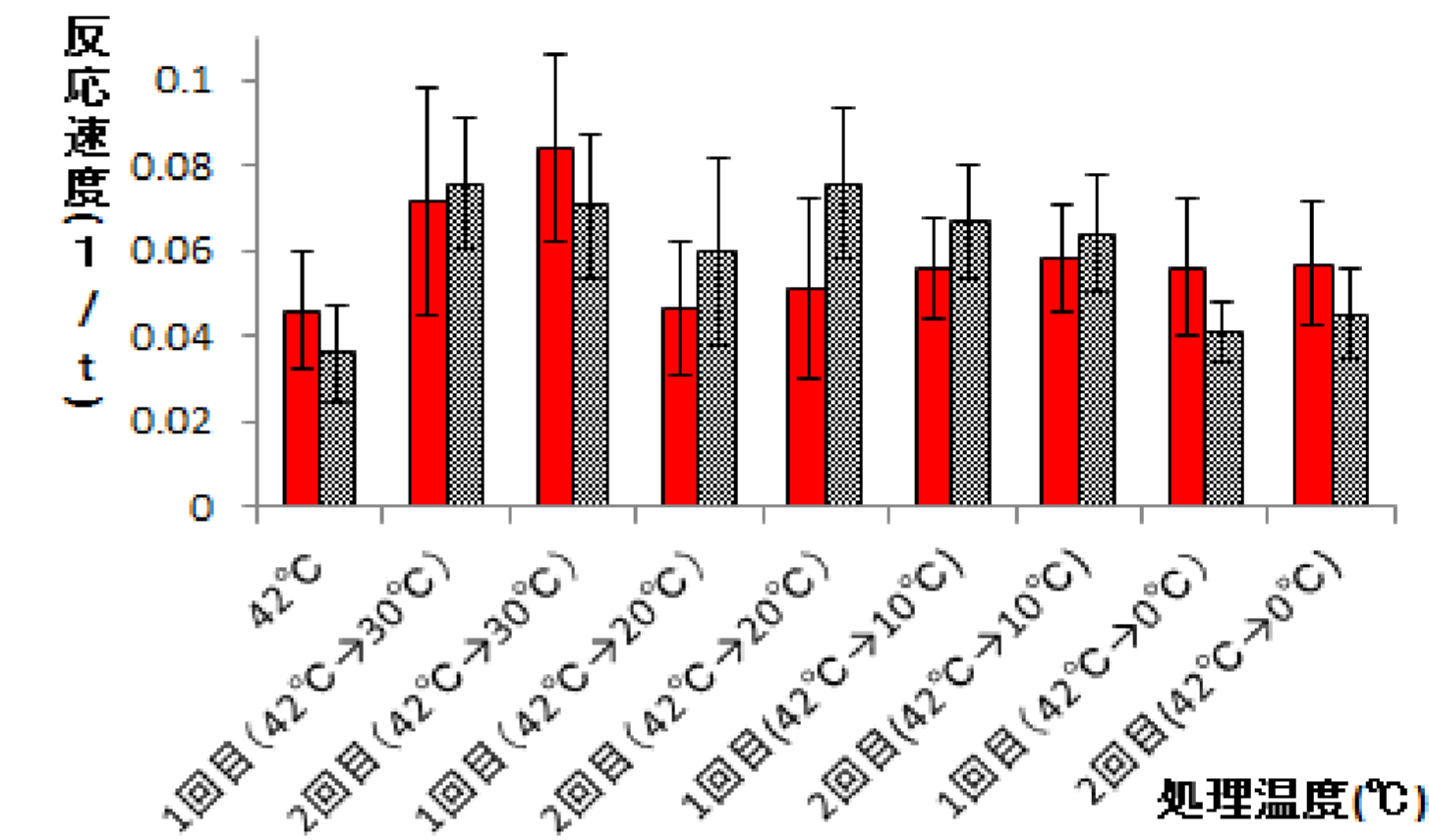


実験2

42°CHS処理を5分間行い、0°C, 2°C, 5°C, 7°C, 10°C, 20°C, 30°Cに温度を変化させ、5分間処理した場合のものを、再び42°Cに戻し反応速度を測定した。

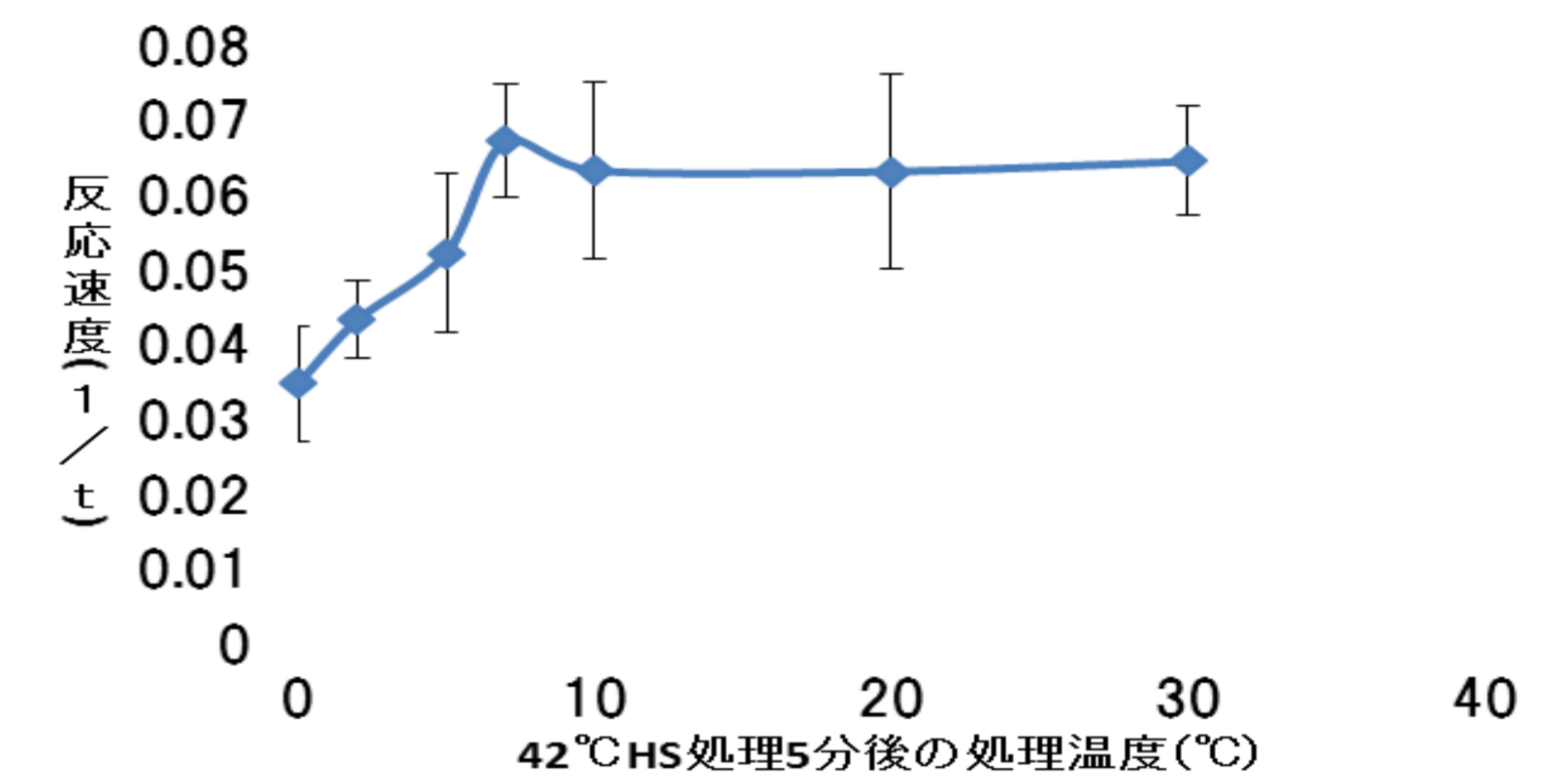
実験1の結果

30°Cの場合は、HS処理を行ったものとHS処理を行わなかったものが反応速度がそれぞれ速くなっていた。ところが、20°C, 10°Cの場合はHS処理を行ったものの方が反応速度が遅くなっていた。一方、0°Cの場合は、反応速度が不安定であった。



実験2の結果

7°C付近までは、反応速度が急激に速くなり、7°C以降は反応速度がほぼ一定だった。8回同様の実験を行った結果、ほぼ同様の結果を得られた。



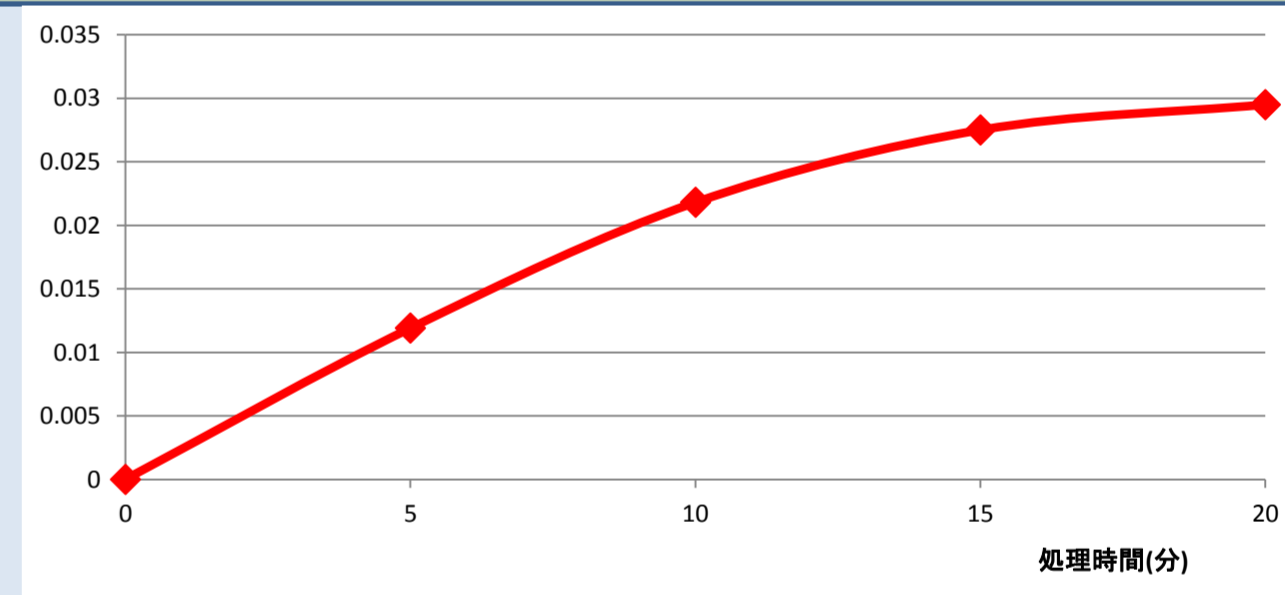
IV HSPはどれぐらいの時間で合成されるのか。(先行研究の追試)

仮説:「HSPは処理を始めて5分間で合成される」

42°Cでそれぞれ0分, 5分, 10分, 15分, 20分HS処理をし、反応速度1/tを測定する。

結果

0分(HS処理無し)の反応速度を0とした場合、HS処理時間が長いほど反応速度が速くなった。しかし、15分と20分の反応速度はそこまで変化がなかった。



考察

実験1では、30°CはHS処理を行ったものとHS処理を行わなかったものとの関係が明瞭ではなく、HS処理でパン酵母はHSPを合成したが、HSPが有効に利用されず混乱していると推察された。それに対して、20°C, 10°Cの場合はいずれもHS処理を行った場合の方が反応速度が遅くなっていることから、パン酵母がHSPを合成したが低温であるために有効に機能していないと考えられた。しかし、0°Cの場合はいずれもHS処理を行った場合の方が反応速度が速くなっていることから、HSPが低温というストレスに対して何らかのはたらきをしている可能性があるが、今後さらに検討を要する。また、低温処理であるためCSPがはたらいている可能性も捨てきれない。

実験2では、8回同様の実験を行ったが、どれも同様の傾向が見られた。このことから7°C付近が一番混乱するところではないかと考えられる。実験3では、HS処理時間が15分~20分にした時が一番反応速度が速かったことから、15分~20分でHSPが合成されることが示唆された。

今後の課題

今後の課題としては、以下のようなことが考えられる。

1 コハク酸デヒドロゲナーゼを修復するHSPはどこで合成されるのか?

(1)ミトコンドリア内で合成されるHSPか?(仮説I)

(2)核のDNAがもとになって合成されるHSPか(仮説II)

(3)すでに細胞質基質にあるHSPか?(仮説III)

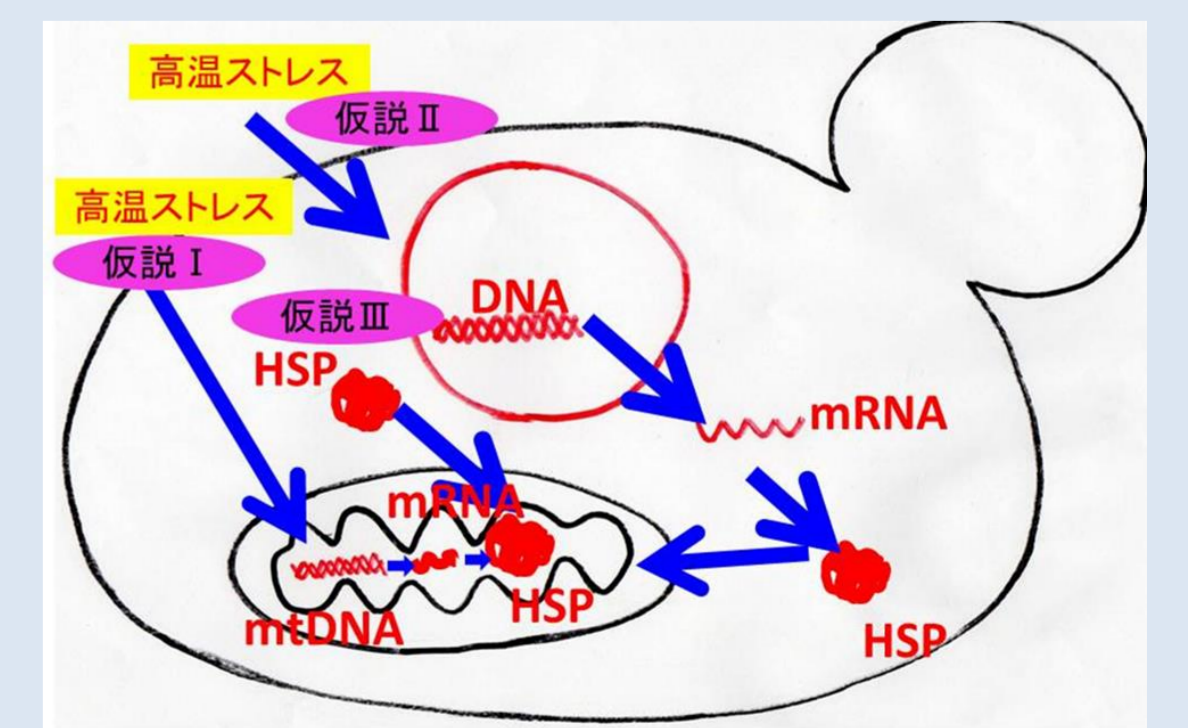
ただし仮説Iについては、ミトコンドリア内でHSPが作られない可能性もあり、今後さらに研究を行う必要がある。

2 HSPの種類を特定し、定量する。

3 酵母菌に急激な温度変化というストレスを与えた場合、細胞内でどのようなことが起きているか?

4 HS処理時間を15分以上にした場合、結果はどうなるか?

5 低温処理とHS処理の関係を明らかにする。



謝辞

本研究において、研究計画などでご教示・ご指導いただいた本校のOBである国立長寿医療研究センターの山崎泰豊研究員、インディアナ大学特任教授北山雅彦先生、愛媛大学理学部教授の林秀則先生、座古保先生に心から感謝いたします。さらに、ミトコンドリアの抽出など当初よりご指導いただいた愛媛大学南予水産センターの太田耕平准教授、清水園子准教授、そしてTV会議などで有益なご助言やホモジナイザーなどの器具の提供をいただいた愛媛大学農学部の間藤孝之准教授、渡辺保夫教授、河田美幸准教授にも感謝申し上げます。また、パン酵母の文献の提供をいただいた東京大学大学院総合文化研究科応用分子生物学専攻基礎科学系若本研究室の小野すみれ氏にも感謝します。

文献 永田和宏・森正敬・吉田賢右, 分子シャペロンによる細胞機能制御, 219pp, シュプリンガー・フェアラーク東京株式会社. Jacob Verghese, Jennifer Abrams, Yanyu Wang, and Kevin A. Morano 2012, Biology of the Heat Shock Response and Protein Chaperon: Budding Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a Model System, Microbiology and Molecular Biology Reviews, 76, 115-158. 水島 徹, 2012, HSPと分子シャペロン, 270pp., 講談社. 仲川千尋・兵頭遥子・福井沙希子・山口琴絵・石田幹・松平未来, 2007, 生物における42°Cの意味を探るーパン酵母におけるヒートショック処理ー, 第48回日本植物生理学会年会特別企画「高校生生物研究発表会」要旨集, 日本植物生理学会. 早川実奈ほか, 2003, パン酵母におけるヒートショック処理の影響 I, 平成14年度ARD課題研究発表資料, 愛媛県立宇和島東高等学校. 小永井文二ほか, 2004, *Uwajimensis*, (1), 1-10, 愛媛県立宇和島東高等学校生物部. 石丸悠子ほか, 2005, パン酵母におけるヒートショック処理の影響 II, 平成 16年度ARD課題研究発表資料, 愛媛県立宇和島東高等学校. 市川明宏ほか, 2006, パン酵母におけるヒートショック処理の影響 III, 平成17年度ARD課題研究発表資料, 愛媛県立宇和島東高等学校.