

酵母キラー細胞のキラー 感受性細胞への攻撃

Effects of Yeast Killer Toxin on Sensitive Cells

北野一好

(国税庁醸造試験所)

Kitano Kazuyoshi

(National Research Institute of Brewing)

I はじめに

酵母Aを、酵母Bを培地全体に接種した寒天培地上に画線接種した後、数日間培養すると、酵母Aの周辺部に酵母Bの生育出来ない阻止帯の形成されることがある(図1)。この時、酵母Aをキラー酵母といい、酵母Bをキラー感受性株という。このような、キラー酵母の発見は、1963年、英国のBevanとMakowerによってなされた¹⁾。引続いて、その遺伝的な性質、分泌されるキラー物質の性質、あるいは、このようなキラー酵母の分布等についての研究が行なわれた結果この性質は、染色体遺伝子ではなく、細胞質遺伝子に支配されること²⁾、分泌キラー物質は、熱、pH等の影響を受け易い蛋白質であること³⁾が明らかとなったが、同時に、キラー酵母は、広い範囲に分布し、その性質も多種多様なことが明らかとなった。更に近年の分子生物学の進歩に伴い、RNAプラスミドの分子構造から生合成・分泌の過程、そして作用機作に至るまで、そ

の詳細が明らかになりつつ有る。

II キラー酵母の分布と種類

最初に発見されたキラー酵母は、*Saccharomyces cerevisiae*に属するものであったが、その後、研究機関の保存株をはじめ、清酒、ビール、



図1 酵母のキラー現象

pH 4.5に調整した寒天培地に、感受性酵母を接種した後キラー酵母を画線接種し、20°Cで2-3日培養するとキラー毒素による生育阻止帯が形成される。

ワイン等の醸造場や、自然界に分布する野生酵母等からキラー酵母が見出され、キラー酵母の分布が広い範囲にわたることが知られている。*Saccharomyces* 属以外では、*Hansenula* 属酵母の中にキラー酵母が高頻度に認められ、この形質は特定の種 (species) とその近縁の酵母に片寄る傾向が認められる⁹⁾。Young と Yagiu は、NCYC (National Collection of Yeast Cultures) の保存株についてキラー酵母を選抜し、キラー酵母の相互作用から $K_1 \sim K_{10}$ のタイプに分類している⁵⁾。このうち *Saccharomyces* 属キラー酵母は $K_1 \sim K_3$ の3タイプが存在する。 K_1 タイプのキラー酵母は、 K_2 タイプのキラー酵母を殺し、また逆に K_2 タイプのキラー酵母に殺されるといったキラー作用の違いがあるが、一方において、そのキラー性が、RNA プラスミドに支配されていること、また、分泌されるキラートキシンの熱、pH に対し不安定なこと、これらトキシンによって殺される酵母は、*Candida glabrata* 等一部の例外を除いて *Saccharomyces* 属酵母に限られるといった共通した性質を有している。Bevan らによって最初に見出されたキラー酵母は、 K_1 タイプに属するが、このタイプのキラー酵母は実験室株にしばしば認められる。これは、交雑が繰返えされる度に、細胞質遺伝のキラー形質が次々と伝達される為と考えられる。醸造関係の酵母においては、清酒キラー酵母では K_1 タイプ⁶⁾ が、ワイン・ビールキラー酵母では K_2 タイプ⁶⁾ のキラー酵母が多く認められる。種々のキラー酵母のうち、最も研究の進んでいるのは K_1 タイプのキラー酵母であり、以下、 K_1 タイプのキラー酵母によって得られた知見を中心に述べる。

III キラートキシンの生成

K_1 タイプのキラー酵母は、致死性のトキシンを菌体外に分泌して感受性酵母を殺す。同じタイプのキラー酵母は、キラートキシンに対する免疫性を持つため影響を受けない。先にも述べ

(I) (II)

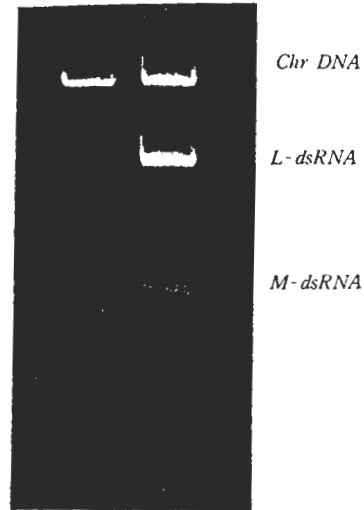


図2 キラー酵母のRNAプラスミド

Fried らの方法¹⁰⁾により菌体を破砕しないで比較的容易に抽出することが出来る。アガロース電気泳動により検出する (I) ワイン醸造用酵母 (K_1)、(II) キラー酵母 (K_1)

たように、キラー性は RNA プラスミドに支配されている。 K_1 タイプのキラー酵母からは、分子量の異なる2種類の RNA プラスミドが検出される(図2)。これらはいずれも線状の2重鎖 RNA で、その分子量は大きい方(L-dsRNA)が約 3×10^6 ダルトン (約 4.7 Kb)、小さい方 (M-dsRNA) は、約 1.5×10^6 ダルトン (約 1.9 Kb) である。細胞内においては、コート蛋白に包まれたウイルス様粒子の状態が存在する。その大きさは、プラスミドの分子量に関係なく約 40 nm である¹¹⁾。これら2種類の RNA プラスミドは異なる機能を有しており、キラー性の発現には、両方のプラスミドの存在が不可欠である。このうち分子量の小さい M-dsRNA には、キラートキシンの合成および免疫性の獲得に必要な情報がコードされており、他方、分子量の大きい L-dsRNA には、プラスミドが細胞内で安定に保持される為に必要なコート蛋白の合成に必要な情報等がコードされている。この為、M-dsRNA 単独で存在することは出来ず、L-dsRNA について

は、単独で存在することは可能であるが、その酵母はキラー性を示さないし、キラーに対する免疫性も持たない。

RNA プラスミドのような核外遺伝子は、ミトコンドリア DNA にも認められるように¹²⁾、染色体遺伝子に比べ不安定で脱落を起こし易い。キラー性についても、シクロヘキシミド¹³⁾や5-フルオロウラシル¹⁴⁾等の薬剤存在下や生育限界に近い高温条件下¹⁵⁾で培養した場合、キラー性の失われることがある(curing)。これらキラー性を失った酵母の RNA プラスミドをみると、多くは M-dsRNA を失っている。L-dsRNA については、通常分子量が同じで性質の異なる複数の dsRNA からなり、その一部は M-dsRNA と同様に脱落を起こすが、他の dsRNA は安定でありキュアリング処理によっても失われない¹⁶⁾。

このようにキラー性は、RNA プラスミドが支配しているが、その複製・発現には、宿主である酵母の多数の染色体遺伝子が必要であり、現在のところ 40 を超える遺伝子の関与が知られている。もし、これらの遺伝子を欠くと、RNA プラスミドが保持出来なかつたり、正常なキラートキシンの分泌が出来ないことになる。

RNA プラスミドの複製について、最近 Esteban ら¹⁷⁾は、図 3 に示すような M-dsRNA の複製・転写モデルを提案している。M-dsRNA より、RNA ポリメラーゼにより合成されたプラスの単鎖 RNA をもとに M-dsRNA が複製される

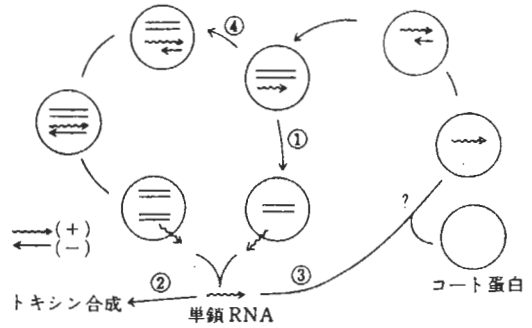


図 3 M-dsRNA の複製系¹⁷⁾

RNA ポリメラーゼによってつくられたプラスの単鎖 RNA は、①ウイルス様粒子から出て、②トキシン合成に使用されるか、③新しいコート蛋白に入ってマイナス鎖の合成により元の dsRNA に戻る、しかし一部は外に出ないで、そのままウイルス様粒子の中に留まり、もう 1 つの dsRNA が複製される

が、単鎖 RNA が別の新しいコート蛋白粒子に移行する場合と、移行しないで同じ粒子内で複製する場合の 2 種類が考えられている。また、単鎖 RNA の一部は、リボゾームにおいてキラートキシンの合成に使用される。これと良く似た複製・転写モデルが L-dsRNA についても提案されている¹⁸⁾。

次に、M-dsRNA の構造についてみると(図 4)、全长 1.9 Kbp の鎖状構造の M-dsRNA の中央付近に約 200 bp の AU-rich な部分があり、S₁ ヌクレアーゼ処理等により 1 Kbp の M-1 と 0.6 Kbp の M-2 の 2 つに切断される¹⁹⁾。このうち M-dsRNA の 5'-末端側の M-1 の部分に、キラートキシンおよび免疫性の獲得に関与する情

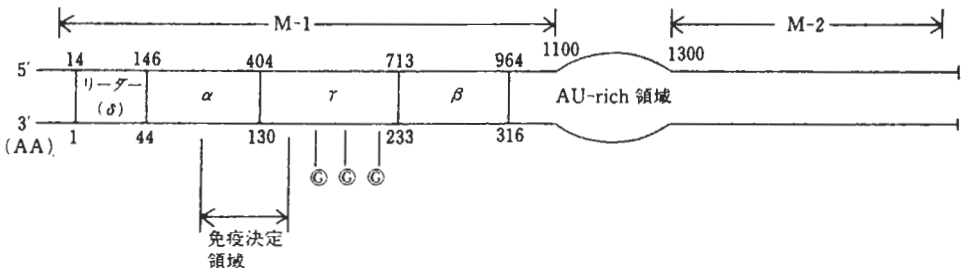


図 4 M₁-dsRNA の構造^{20,23)}

200 bp の AU-rich 領域をはさんで 1 Kbp の M-1 と 0.6 Kbp の M-2 に分けられる M-1 にトキシン前駆体のコード領域がある。このうち α、β のペプチドが成熟キラートキシンとなる。また、α の C-末端側と γ の N-末端側を含む領域が免疫性の獲得に関与する。(AA) : アミノ酸、⊙-糖鎖

報がコードされている。この主要な部分について、Bostianら²⁰⁾は、DNAに逆転写した後、クローニングを行ない、これを使って分子レベルでの構造解析を行なった。この結果、トキシン前駆体は、アミノ酸44個からなるシグナルペプチド、トキシンを構成する86個のアミノ酸からなる α -トキシンサブユニット、免疫性に関与すると考えられる γ -ペプチド(アミノ酸103個)、および、アミノ酸83個からなる β -トキシンサブユニットからなることが明らかとなった。この316個のアミノ酸からなるトキシン前駆体は、細胞内で生合成された後、プロテアーゼによる修飾を受けた後、成熟した形のキラートキシンとなって分泌されるが、その過程を図5に示す。M-dsRNAから複製された単鎖RNAは、粗面小胞体膜上のリボゾームで翻訳される。このトキシン前駆体は小胞体内部に送り込まれるが、この過程で、中央の γ -ペプチドの3ヶ所に糖鎖の付加が行なわれるとともに α -トキシンサブユニットと β -トキシンサブユニットの間で3ヶ所のS-S結合が形成される。また、N-末端に近いシグナルペプチドの部分は、切断されることなく、小胞体膜に埋め込まれたままの状態、ゴルジ体を経て分泌顆粒に移行する。分泌顆粒において、特異的なプロテアーゼの作用により切断され、 α 、 β -のトキシンサブユニットからなる成熟したキラートキシンとなる。そして、分泌顆粒の酵母細胞膜との融合の後、トキシンは菌体外に分泌される。このような一連の生合成から分泌に至る過程は、酵母の α -ファクター、インベルターゼ、酸性フォスファターゼ等の分泌型蛋白と類似し^{21),22)}、分泌系変異(sec)株では、いずれも正常な菌体外への分泌が阻害される。また、これら分泌系は、酵母の増殖と密接に関連しており、キラートキシンの分泌が、主として対数増殖期に行なわれ、増殖の停止した定常期に行なわれないのは、この為である。

一方、これらキラ酵母のキラートキシンに対する免疫の機構については、トキシン前駆体

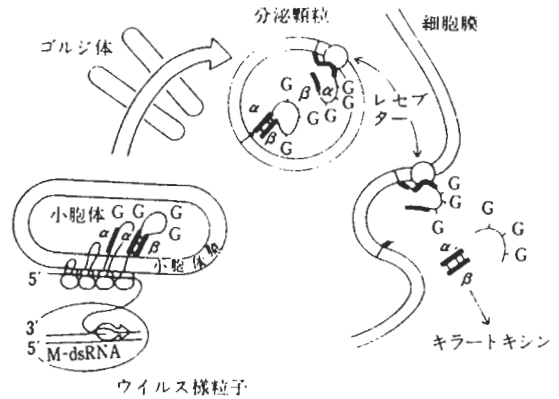


図5 キラートキシンの生合成と分泌過程^{20,23)}

M-dsRNAより合成された単鎖RNAをもとに、小胞体膜上のリボゾームによりトキシン前駆体がつくられる。トキシン前駆体は、小胞体膜に結合した状態で糖鎖が付与されるとともにゴルジ体を経て分泌顆粒にいたる。一部の前駆体はレセプターと結合し、免疫性を付与するが他のトキシン前駆体はプロテアーゼの作用により成熟したトキシンとなって分泌される。

に含まれる γ -ペプチドのレセプターへの結合によるものと考えられて来たが、最近Booneら²³⁾は、キラートキシンの生産と、免疫性の発現が可能なDNAプラスミドに変異を与え、変異位置と、免疫性の有無を検討した。この結果、図5に示したように、 γ -ペプチドがレセプターに直接、結合するのではなく、分泌顆粒内でトキシン前駆体にあるときレセプターと結合する。結合部位は、成熟トキシンと同じく α -サブユニットのC-末端側の疎水領域と推定されるが、成熟トキシンと異なりキラ作用は示さない。このようなトキシン前駆体によってレセプターが塞がれてしまうため、成熟トキシンからの攻撃に対し、免疫性を持つと考えられる。

IV キラートキシンによる感受性酵母の変化

キラ酵母により分泌されたトキシンは、熱・pH等の変化に対し不安定で、30°C、30分で活性は半減する。また、活性の至適pHは4.7付近にあり、安定にキラ作用するのはpH4から6の範囲である。このほかプロテアーゼ処理

によっても活性は失われる。このようなキラートキシンによって感受性酵母は殺されるが、トキシシンが主として対数増殖期に分泌されるのと同様に、感受性酵母も対数増殖期にあるものが最も作用を受け易く、定常期のものは作用を受け難い。感受性酵母をトキシシンで処理すると、40分程度の誘導期を経て、ATP や K^+ イオンの漏出が起こり²⁴⁾、やがて菌は死滅する。このキラートキシシンの作用機作に関しては、不明な点も多いが次のように考えられている。

α 、 β の2つのサブユニットからなるキラートキシンは、まず、酵母細胞壁の β -(1→6)-D-グルカンを受容体として結合する²⁵⁾。この結合は、エネルギー非依存的に進行し、数分以内に完了する。この細胞壁受容体は1つの細胞に約 1×10^7 個存在し²⁶⁾、この受容体と直接結合するのはトキシシンのうち β -サブユニットと考えられている。次の段階において、トキシシンは細胞膜へ移行し、細胞膜受容体と結合する。この細胞膜受容体へは、トキシシンの α -サブユニットが結合する。86個のアミノ酸からなる α -サブユニットのうち、C-末端側の2ヶ所に高度の疎水領域があるが、この領域と細胞膜の結合により、疎水領域の間にある親水性領域が内部にイオンチャンネルを形成し、膜機能を破壊するものと考えられている^{27,28)}。

正常な細胞においては、ATP 関与のプロトンポンプが働き、プロトン (H^+) が菌体外へ排出され、このため、細胞膜の内外にプロトン勾配が形成される。このプロトン勾配の存在は酵母にとって極めて重要であり、これにより、カリウムイオンの蓄積、アミノ酸の取り込み、細胞内の pH の保持が可能となる。ところが、キラートキシシンの細胞膜の結合によりイオンチャンネルが形成されると、プロトン勾配が破壊されてしまい、これに連動するアミノ酸等の細胞内への取り込み停止や、細胞内 pH の低下が生じ、このため正常な代謝が出来なくなり死に至るものと考えられる (図 6)。

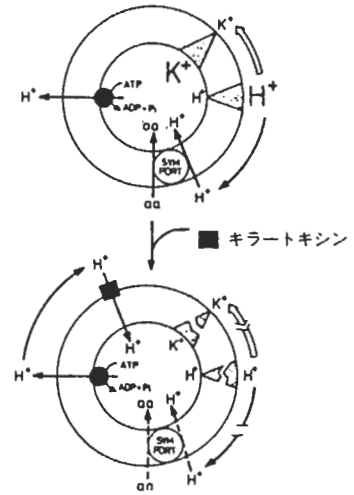


図 6 キラートキシンによる感受性酵母の変化²⁷⁾
 キラートキシンによる細胞膜のイオンチャンネル形成によりプロトンポンプの機能が破壊され、カリウムイオン (K^+) や、アミノ酸 (AA) の菌体内とり込みが出来なくなる。

V その他のキラースystem

今まで述べてきた K_1 キラーのほか、同じ *Saccharomyces* 属酵母においても K_2 、 K_3 の異なるタイプのキラー酵母の存在が知られている⁵⁾。これらはいずれも K_1 タイプのキラー酵母と同様に、2種類の分子量の異なる RNA プラスミドを有しており、また、分泌されるトキシシンの活性至適 pH、温度安定性等において類似するが、一方において、M-dsRNA について K_1 と K_2 とでは相同性が殆んど認められず²⁹⁾、また、トキシシンに対する免疫性も異なるために互いに殺し合うといった相異点も認められる⁵⁾。 K_3 はもとより、 K_2 タイプのキラーにおいても M-dsRNA の両端部の塩基配列の決定²⁹⁾、および、分泌トキシシンの精製とその性質が明らかにされた段階であり³⁰⁾、その作用機作に関して、十分な知見は得られていない。

Kluyveromyces lactis のキラー酵母の場合、その形質は、2種類の分子量の異なる線状2重鎖 DNA プラスミド (pGK1 1, pGK1 2) に支配されており、このうち分子量の小さい方 (pGK1 1)

にトキシンの生合成および免疫性に関与する情報がコードされている³¹⁾。なお、pGK11については全塩基配列が決定されその構造が明らかになっている³²⁻³⁴⁾。分泌されるキラートキシンは、 K_1 キラートキシンとは異なり、分子量 27 Kd と 80 Kd のサブユニットからなる糖蛋白で、活性至適 pH も 4.0~8.0 と広い。更に、そのキラートキシン作用も、菌体内酵素アデニレートサイクラーゼの活性阻害にあり、感受性株は、このため、正常な細胞増殖が阻害され、G1 期で停止する^{35,36)}。このように、*K. lactis* のトキシンは、他の多くのキラートキシンの致死的な作用とは著しく異なっている。なお、*K. lactis* のキラートキシンプラスミドは細胞融合によって *S. cerevisiae*, *Kluyveromyces fragilis* および *Candida pseudotropicalis* へ導入し、発現させることが可能である^{37,38)}。

このほか、種属の異なる広い範囲の酵母を殺し、分泌キラートキシンの熱、pH の変化に対する安定性も極めて高い *Hansenula marakii* のトキシニン³⁹⁾ に関しては、モノクローナル抗体を用いたアフィニティクロマトグラフィーによって精製され、分子量 10.7 Kd、88 個のアミノ酸からなる単純蛋白であることが明らかとなった⁴⁰⁾。このトキシンは、100°C に加熱した後も活性を有しており、pH 4~9 の広い範囲でキラートキシン作用を示す。このようなトキシンの高い安定性については、分子内に存在する 10 個の Cys-残基による分子内 S-S 結合が関与するものと考えられている。また、その作用機作も、今まで述べたものとは異なり、酵母細胞壁グルカンの生合成を阻害するためと考えられる⁴¹⁾。また、*H. marakii* と近縁の *H. saturnus* のキラートキシンも精製され⁴²⁾、その分子量は約 8.5 Kd である。トキシンの性質も *H. marakii* に似ている。

また、*Pichia kluyveri* の分泌するキラートキシンは、分子量約 19 Kd の糖蛋白であり⁴³⁾、 K_1 トキシニンと類似の性質を示し、その作用も、感受性酵母細胞膜におけるイオンチャンネルの形成によるものと考えられている⁴⁴⁾。

このように、キラートキシンにおける遺伝的背景、分泌トキシンの性質、その作用機作のいずれにおいても多種多様であり、更に、現在までに知られているキラートキシン酵母は、自然界に分布するキラートキシン酵母の一部に過ぎず、今後、更に新しい現象が見出されるものと思われる。筆者らも、主としてワイン醸造に関与する酵母について、キラートキシンの分布と性質の検討を行なっているが、この中には従来知られているものとは全くタイプの異なるものが認められる。例えば、*Saccharomyces* 属のキラートキシン酵母でありながら RNA プラスミドを持たず、キラートキシン遺伝子が染色体上に有るもので、このタイプのキラートキシン酵母は、プラスミドタイプのキラートキシン酵母に比べ高温条件下やシクロヘキシミド等の薬剤存在下においてもその形質は安定に保持されるが、トキシンの、感受性酵母に対する作用が弱い特徴がある。また、RNA プラスミドに支配されるタイプの *Saccharomyces* 属キラートキシン酵母でも、従来の K_1 ~ K_3 タイプとは異なり *Saccharomyces* 属以外の酵母にも強いキラートキシン性を示すとともに、分泌トキシンの温度・pH に対する安定性の高いキラートキシン酵母を分離している⁴⁶⁾。

従来 non-*Saccharomyces* 属キラートキシン酵母においては、*K. lactis* 酵母における DNA プラスミドの場合を除き、キラートキシンに関与するプラスミドは知られていないが、最近、筆者らは、ワイン原料となるぶどう果汁中に広く分布するレモン型酵母 *Kloeckera apiculata* の中に RNA プラスミド支配のキラートキシンシステムを有する酵母を分離した⁴⁷⁾。

このような、興味有る新しいタイプのキラートキシンシステムについて、現在検討を行なっているが、単に、基礎的な研究のみにとどまらず、例えば、ワイン醸造技術の向上といったような応用の分野にまで発展させることが出来ればと考える次第である。

なお、キラートキシンに関しては、Wickner⁴⁸⁾、Tipper と Bostian²⁸⁾、原⁴⁹⁾、大内ら^{50,51)} の総説が有るので参照されたい。