



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

酵母Saccharomyces
cerevisiaeにおける圧力感受性機構の解明

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2016-12-02 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 野村, 一樹 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/51019

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* における圧力感受性機構の解明

2014 年

岐阜大学大学院連合農学研究科

生物資源科学

(岐阜大学)

野村 一樹

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* における圧力感受性機構の解明

野村 一樹

目次

第1章 序論.....	1
第1節 静水圧.....	1
第1項 圧力の特徴	2
第2項 高圧による微生物の不活性化.....	3
第3項 高圧研究の歴史－大気圧の発見から高圧研究の発展－	5
第4項 高圧研究の歴史－食品への高圧加工の応用－	8
第2節 酵母	12
第1項 モデル生物としての酵母.....	13
第2項 発酵食品としての酵母	15
第3節 高圧食品加工技術.....	16
第1項 高圧加工食品の開発と問題点.....	16
第2項 Pressure Regulated Fermentation	17
第3項 圧力感受性酵母の作出	18
第4節 研究目的	19
第2章 DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析	20

第1節 緒言	20
第1項 DNA マイクロアレイ解析	20
第2項 DNA マイクロアレイ解析の応用例	21
第3項 DNA マイクロアレイ解析におけるクロスハイブリダイゼーション ...	22
第4項 実験目的	23
第2節 実験材料および実験方法	24
第1項 使用菌株	24
第2項 培養条件	24
第3項 RNA 抽出方法	24
第4項 DNA マイクロアレイ解析方法	25
第5項 遺伝子発現の分類解析方法	26
第6項 quantitative PCR 方法	26
第3節 結果	28
第1項 遺伝子発プロファイルの概要	28
第2項 アップレギュレート遺伝子発現の解析	28
第3項 ダウンレギュレート遺伝子発現の解析	30

第4項	quantitative PCRによる遺伝子発現解析の評価.....	31
第4節	考察.....	32
第3章	ミトコンドリア機能の解析.....	35
第1節	緒言.....	35
第1項	酵母とミトコンドリア.....	35
第2項	実験目的.....	36
第2節	実験材料および実験方法.....	37
第1項	使用菌株.....	37
第2項	培養条件.....	37
第3項	二倍体株の作出.....	37
第4項	呼吸機能の解析方法.....	38
第5項	ミトコンドリアDNA欠失の解析方法.....	38
第6項	高圧処理方法.....	39
第3節	結果.....	40
第1項	呼吸機能の解析.....	40
第2項	ミトコンドリアDNAの欠失.....	40

第3項	二倍体株の作出	41
第4項	圧力不活性化挙動の解析	42
第5項	野生型ミトコンドリアによる欠失遺伝子の補完	42
第4節	考察	44
第4章	メタボロミクスによる圧力感受性機構の解析	47
第1節	緒言	47
第1項	メタボロミクス解析	47
第2項	メタボロミクス解析の応用例	48
第3項	アルギニン	48
第4項	実験目的	49
第2節	実験材料および実験方法	50
第1項	使用菌株	50
第2項	培養条件	50
第3項	メタボロミクス解析方法	50
第4項	代謝経路の解析方法	51
第5項	高圧処理方法	52

第3節 結果	53
第1項 メタボロミクス解析	53
第2項 アルギニン代謝解析経路に関する遺伝子の解析	53
第3項 アルギニンの圧力不活性化への寄与	54
第4節 考察	55
第5章 結論.....	58
第6章 謝辞.....	64
第7章 参考文献	66
第8章 図表.....	80

第 1 章 序論

第 1 節 静水圧

圧力 (pressure) とは、単位面積あたりに作用する力と定義される熱力学的パラメータの一種である。本研究で用いる静水圧 (hydrostatic pressure) とは、水等の液体を媒体とした圧力のことである。以下、静水圧は圧力と記載する。最も身近に存在する圧力の例として大気圧がある。地表の大気圧はおよそ 1 気圧であり、古くは大気を意味する atmosphere から 1 atm とも表された。現在では国際単位系により 1 気圧=1,013 hPa \doteq 0.1 MPa と表示する。1 Pa (パスカル) は、1 N/m² と定義されている。大気圧は大気の重さとも考えられ、高度が高くなるほど、大気圧は低くなる。また、水中では水深が 10 m 深くなる毎に 1 気圧 \doteq 0.1 MPa ずつ水圧が高くなり、地球上で 1 番深いマリアナ海溝は水深 10,911 m、およそ 1,100 気圧 \doteq 110 MPa の高圧の世界である。

第1項 圧力の特徴

圧力は、温度と同様にギブズエネルギーを変化させるパラメータであり、ある系の状態を変化させるために行使できるエネルギーである。例えるならば、食品の加工がわかり易い。食品は加熱することにより、食品中の様々な分子運動が活発になり、水等の揮発成分が気化して消失し、分子同士の衝突回数が増えて分子間の化学反応が促進される(山本, 小関, 2009)。その結果、分子中の官能基が他の官能基と反応して新たな加熱生成物を生じたり、共有結合が開裂して有用成分が失われたりする。一方、高圧による加工技術は、積極的な加熱を伴わない広義の非熱的処理であるために、上記の熱処理で促進される化学反応は原則的に起こらない。すなわち、高圧下においては共有結合の新たな生成や開裂は起こらず、非共有結合のみが影響を受ける(林, 1991)。例えば、タンパク質等の巨大分子では、その立体構造内の空隙を埋めるように、それまで分子を安定化していた分子内の水素結合等の非共有結合が開裂する。そして分子自体の体積を小さくするように、分子内の空隙が埋められて元の立体構造が崩れ、変性が引き起こされる(山本, 小関, 2009)。高圧は熱と同じようにタンパク質を変性させるが、上記のようにその変性メカニズムは異なる。このことは加熱では引き起こせない現象を加圧により引き起こすことを可能にし、またその逆も起こり得ることを示している。

第2項 高圧による微生物の不活性化

圧力は、非共有結合に作用して非熱的にタンパク質を変性させる。そのために高圧は生物に対する物理的ストレスであると言える。これまでに高圧による微生物の増殖阻害や不活性化に関して多くの報告がある(ZoBell and Cobet, 1964; Iwahashi *et al.*, 1991; Tamura *et al.*, 1992; Abe and Kato, 1999; Vogel *et al.*, 2005; Kawarai *et al.*, 2006)。例えば、いくつかの発酵食品の生産に利用される出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、温度条件によるが 150 MPa 以上の高圧は致命的な損傷を与えることが報告されている(Nomura *et al.*, 2014)。また、40 MPa 程度の高圧条件では、4°C では致命的な損傷を受けるが、25°C では増殖することが可能である(Iwahashi *et al.*, 2003)。Hashizume ら(1995)は 120~300 MPa、-20~50°C、2~40 min の高圧力条件で酵母の不活性化を速度論的に解析した。その結果、180 MPa 以下の高圧力範囲において、0~40°C の温度範囲ではほとんど不活性化が認められなかったが、-10°C 以下および 50°C 以上の温度域では同圧力で大きな不活性化が認められた。特に-20°C における不活性化効果が顕著であり、低温域での高圧力効果の有効性が示された。高圧条件下では水は氷点下であっても液体の状態で存在することが可能である。高圧および低温の条件はどちらも分子運動を低下させ、細胞膜の流動性を低下させるように機能する。細胞膜の流動性の低下は、リン脂質等の膜タンパク質の相転移により引き起こされる(Chong *et al.*, 1985)。

その結果、膜構造が破壊され、細胞が不活性化すると考えられている(Freitas *et al.*, 2012)。

Escherichia coli 細胞に高圧処理を施して不活性化を確認した後に、リン酸バッファー(PBS)中で 25°C、1 week 培養すると、それらの細胞が回復するという現象が報告された(Koseki and Yamamoto, 2006)。不活性化した細胞が炭素源や窒素源となる栄養のない PBS 中で回復することは考え難い。Ohshima ら(2013)は、高圧により不活性化した細胞が PBS 中で回復するメカニズムを解析した。彼らは、高圧により見かけ上不活性化された細胞群において、高圧による損傷を受けているが不活性化していない細胞が僅かに存在することを明らかにした。高圧損傷細胞は、4°C で保存している場合においては回復することはない。しかし、25°C の温度条件では、高圧損傷から回復し、その後、周囲の不活性化した細胞を栄養源として高圧処理する前の細胞数の 50%程度まで増殖することが明らかとなった。これらの報告は、不活性化した細胞であっても温度条件によっては回復し、増殖することを示しており、食品加工に高圧処理を応用する場合、処理後の温度管理が重要であることを示している。

第3項 高圧研究の歴史—大気圧の発見から高圧研究の発展—

圧力という概念が認知されたのは17世紀である。天文学の父として名高いGalileiとその弟子Torricelliによって真空の概念が発見されたのが1644年である。Torricelliは、水銀で満たしたガラス管を水銀浴槽中に倒立させると、およそ76 cmの高さまでが水銀でそれより上の部分が真空となることを明らかにした。この原理を応用した水銀気圧計を発明した功績から、圧力の単位「トル; Torr」はTorricelliの名にちなんでいる。そしてその4年後の1648年、Pascalによる大気圧の認識によって圧力という概念が初めて科学史に記された(Pascal, 1653)。Pascalは、水銀気圧計を用いて、地表と教会の屋根、地表とピュイ・ド・ドーム山の頂上において水銀柱の高さが変化することを見出し、大気圧の存在を証明した。また彼は、圧力(pressure)が圧迫(press)と異なる減少であることを“蠅は指に挟んでちょっと押せばつぶれるが高い圧力の世界ではつぶれない”と説明している(林, 2008)。大気圧を認識した功績から、今日では圧力単位のことを「パスカル; Pa」と呼ぶ。

1905年には、高圧研究の歴史に残る窒素と水素からアンモニアの化学合成が成功した。Haberは常温常圧では進行しないこの化学反応に対して、200-500°C、20-100 MPaという高温高圧条件と鉄を主体とした触媒を用いることによってアンモニア合成法を確立した(重松, 2013)。その後、Boschによりハーバー・ボッシ

ユ法と呼ばれるアンモニア化学合成が商業化された。本法は今日においても最も効率のよいアンモニアの化学合成方法であり、年間 1 億 8,700 トンのアンモニア態窒素が本法で生産されている(Galloway *et al.*, 2008)。生産効率の良い小麦の栽培には窒素分を含む大量の肥料の供給が不可欠であるが、当時の主要な窒素肥料は南米等で採掘される硝石に頼っており、小麦の大量生産は難しかった。ハーバー・ボッシュ法により合成されたアンモニアを肥料として用いることで、そのままでは耕作に適さない痩せた土地においても小麦等の穀物の生産が可能となり、世界の急激な人口増加と社会の発展に貢献した。この功績により、Haber は空気と水からパンを作った男としても知られており、1918 年にノーベル化学賞を受賞している。1931 年には Bosch も「高圧化学反応の研究」によりノーベル化学賞を受賞している。本法は高圧を利用した化学プロセスとして歴史的に最も有名であり、かつ人類にもたらした貢献も大きいものである(重松, 2013)。

19 世紀後半になると微生物への高圧効果について研究が進んだ。Regnard は約 300 MPa の高圧を発生させる圧力装置の開発に成功した。1884 年、彼はこの高圧装置を用いて 6,000 m の深海と同程度の圧力条件(約 60 MPa)において世界で初めてビール酵母の培養を試みた(Regnard, 1884)。その結果、高圧条件下においても酵母のエタノール発酵が引き起こされることを発見した。彼の研究は Buchner による無細胞での発酵の発見に間接的につながる。Buchner は、1897 年

に 40-50 MPa の圧力条件で酵母を圧搾して得た酵母抽出液が炭水化物を発酵することを報告した。彼は、発酵工程において生存している微生物が必ずしも必要ではなく、酵母の生産するチマーゼ(酵素)が発酵に重要であることを発見した。1907 年に「無細胞での発酵の発見と生化学による研究」の成果により、ノーベル化学賞を受賞した。彼は高圧条件下における酵素学の先駆者として知られている(Jaenicke, 2007)。

Roger は、1892 年に高圧条件下における細菌の不活性化についての 2 個の重要な報告をした(Roger, 1892; Roger, 1895)。1 個目は、高圧条件下の不活性化挙動が微生物の属種によって異なるという報告である。例えば、*Staphylococcus aureus* は 300 MPa 程度では大きな影響を受けないが、*Streptococcus* 属の細菌は同圧力条件下で 30%程度の生菌数の低下が認められる。2 個目は、栄養細胞と芽胞の圧力耐性の違いである。*Bacillus anthracis* の芽胞は栄養細胞の場合よりも圧力耐性が高いことを報告した。これらの報告は、高圧によって微生物が不活性化することを初めて示した報告であり、彼の発見以来、様々な微生物種の圧力耐性が研究され、重要な知見が蓄積されている。

第4項 高圧研究の歴史－食品への高圧加工の応用－

世界で初めて食品への高圧処理を報告したのは Hite (1899 年)である。彼は、ミルクの長期保存のために熱殺菌以外のアプローチを考案した最初の人物である。463 MPa、1 h の条件で高圧処理されたミルクは、少なくとも 24 h は酸性化が抑制されて甘味が保持されることを発見した。また、彼は高圧処理中の温度 (50~80°C)の影響も評価している(Hite *et al.*, 1914)。

Bridgman は、これまでよりも 10 倍以上高い高圧を発生させる高圧装置を開発した。それにより 1912 年に高圧下における水の状態変化の相関図を報告した (Bridgman, 1912)。1914 年には、鶏卵に 500~700 MPa、30~60 min の条件で高圧処理することにより、卵殻を割ることなく、卵黄・卵白が凝固することを発見した (Bridgman, 1914)。彼の報告は高温で観察されるタンパク質の変性が非熱的条件の高圧でも同様に引き起こされることを初めて明らかとした画期的な発見であり、その後のタンパク質の高圧変性メカニズムに関する研究の先駆けとなった。Bridgman は、「超高圧装置の開発とそれによる高圧物理学に関する発見」により 1946 年にノーベル物理学賞を受賞し、高圧物理学の父と呼ばれている。

しかし、Hite や Bridgman の高圧処理によって食品の風味や栄養価を熱変性で損なわずに食品の保存性を向上させる画期的な発見は、家庭用冷蔵庫の普及や氷の工業的生産等の新規冷蔵技術の開発により食品産業界に顧みられることは

なかった(鈴木, 2013)。

食品への高圧利用の転機となったことが 1968 年に起こった研究用潜水艦 Alvin 号の沈没事件である(Pope, 1973)。Alvin 号は Woods Hole Oceanographic Institution (WHOI)に所属する潜水艦である。1968 年の冬、Alvin 号は回航途中に事故に遭遇した。幸いにも乗員は全員脱出できたが船体は 1,543 m の深海へ沈んだ。Alvin 号が深海から引き揚げられたのは、その事故から 10 か月後である。その後の船体の調査において、驚くべきことが明らかとなった。船体と共に深海へ沈んでいたリンゴやサンドウィッチ等の外見、味、香りが沈没する前とほとんど変化していなかったのである。それだけではなく、微生物学的・生化学的にも食品の品質が良く保持されていたことが明らかとなった。一般的には、4°C 程度の冷蔵条件においては、デンプンやタンパク質等は数週間で劣化して腐敗する。Alvin 号の船体で保存されていた食品の品質は、深海特有の低温、貧栄養条件の他に地表の大気圧(約 0.1 MPa)と比較して 100 倍以上高い 15 MPa 程度の圧力によって維持されていた可能性が考えられた。この知見は、高圧条件が腐敗を引き起こす微生物の代謝活性を抑制するにも関わらず、食品の品質を劣化させないことを示しており、食品の低温殺菌への高圧が利用できることを示唆している。

Alvin 号の沈没事故以来、高圧技術の食品加工への応用の可能性が研究され、1987 年に林 力丸により食品加工への高圧利用が提唱された(Hayashi *et al.*, 1987)。

高圧は、生体分子の非共有結合のみに作用するために、①食品素材が持つ新鮮な風味、色、味わいを保持できる、②加熱により破壊されるビタミン C 等の有用成分の劣化が少ない、③加熱によるアクリルアミド等の異常物質や異臭が発生しない、④加熱加工とは異なる独特な物性が生じる、⑤加熱処理に比べて省エネルギーである等の利点がある(林, 1991)。「食品加工への高圧利用」の提唱以降、多くの研究者によって高圧技術を応用した低温殺菌技術、食品加工・製造技術、酵素活性やそれによる有用成分の増強等の研究が推進された。

日本国内では農林水産省により「食品産業超高压利用技術研究組合」が組織され、「食品産業の未来を拓く－高圧技術と高密度培養」という課題でプロジェクト(木村, 1993)が始まり、産学官が一体となった高圧技術に基づく新たな食品加工技術の研究・開発を進めた(Kasuga, 1998)。日本国内で最も高圧研究が活発に行われた都道府県の 1 つは新潟県である。1989 年に高圧食品加工の実用化を目指した「超高压技術の食品等への応用に関する研究会 (新潟県高圧応用食品研究会)」が発足し、その研究成果は「高圧利用に関する研究成果報告書」として発刊された(1991)。農林水産省の高圧関連プロジェクトの終了後も、新潟県では 2003 年に経済産業省の公募型委託研究事業「地域新生コンソーシアム－高圧処理を利用した新規機能性食材の開発と産業化」が採択され、2007 年には高圧技術に関する戦略的な標準化を推進するための「高圧基盤技術標準化機構」を立ち

上げている。2008年には、日本科学技術振興機構 (JST) 2007年度「新潟県地域結集型研究プログラムー食の高付加価値化に資する基盤技術の開発」を開始し、その成果はその成果を「進化する高圧食品加工技術」と題して発刊した。新潟県における高圧加工食品開発の歴史は、鈴木(2011)によってまとめられている。

高圧研究の成果を発表して議論し合う場として、生物関連高圧研究会が1988年に設立された。同年に第1回シンポジウムが京都で、2013年には第18回シンポジウムを岐阜大学で開催することができた。2015年には広島で第20回シンポジウムが開催される予定である。国外に目を向けると International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology (HPBB)が2000年に設立され、以降2年毎に世界各地で開催されている(Nomura and Iwahashi, 2014)。2014年に第8回大会がフランスで開催された。2016年には第9回大会がカナダで開催される予定である。

第 2 節 酵母

酵母(Yeast)は、直径 5~10 μm 程度の卵型で、出芽や分裂によって増殖する真核単細胞生物である。酵母にはヒトと同じように寿命も存在する。電子顕微鏡で出芽酵母を観察すると、細胞の表面に娘酵母が出芽する時に生じた出芽痕、自身が出芽した時に生じた出生痕と呼ばれる複数の凹凸が確認できる(野村, 岩橋, 2013)。この出芽痕が細胞の表面に残るため、その数が出芽回数、即ち酵母の寿命に相当する。約 20 回出芽すると、それ以上は出芽することができなくなることが報告されている(Egilmez and Jazwinski, 1989)。出芽回数は生理的な要因で影響を受けることもあり、環境ストレス等で容易に変化する。また、酵母は製パンや醸造等の食品産業分野に広く用いられているだけでなく、バイオテクノロジー分野においてもバイオエタノールの生産等に重要な役割を果たしている(Bravim, 2012)。

第 1 項 モデル生物としての酵母

最も一般的な酵母である *Saccharomyces cerevisiae* は、ヒトと同じ真核生物である上にゲノム構造が比較的単純であるので、大腸菌等の原核生物で得た知見と比較して、酵母の分子生物学的知見をヒトへ応用し易いという利点がある。また、世代時間が短く、安価な培地で増殖でき、毒性も無く、生理状態の高い再現性が期待できるために大学等の実験室の設備で比較的簡単に研究できる。これらの利点から酵母は分子生物学を始め様々な分野のバイオアッセイのモデル生物として利用されている(Haney *et al.*, 2001; Matsuoka *et al.*, 2005; Iwahashi *et al.*, 2007; Yasokawa and Iwahashi, 2010)。

1996 年には、真核生物として初めて *S. cerevisiae* の全ゲノムの塩基配列情報が解読された(Goffeau *et al.*, 1996)。酵母の約 6000 種類の遺伝子にコードされているタンパク質のうち、およそ 80%が生存に必須でないことも明らかとなっている。また、酵母ゲノムによってコードされているタンパク質の少なくとも 31%はヒトとホモログを持っており、逆に遺伝病に関連するヒトゲノムの約 50%の遺伝子を、酵母はホモログとして持っていることも報告されている(Hartwell, 2004)。すなわち、酵母とヒトのタンパク質の多くは同様に機能しており、ストレス応答メカニズム解明のためのモデル生物としても研究に利用されている(Haney *et al.*, 2001; Hohmann, 2002, Iwahashi *et al.*, 2003; Iwahashi *et al.*, 2005)。ま

た、酵母の全ゲノム解析後、全遺伝子を搭載した DNA チップが早急に供給された(岩橋, 2002)。それ故にゲノミクス解析結果の蓄積が豊富にあり、解析を容易にしている。酵母ゲノミクスの一番大きな利点は、各遺伝子の機能情報の豊富さであり、さらに解析を容易にしている。

酵母とヒトの呼吸機能に関連するタンパク質をコードする遺伝子は比較的よく保存されており、エネルギー生産のための酸化的リン酸化も同様の機能を有する。加えて、酵母はエタノール発酵により増殖することができるので、ミトコンドリアが変異して呼吸機能が欠失しても生存することが可能である。そのためにミトコンドリアに関連する遺伝病や癌を始めとした多くの病気や呼吸阻害剤等に対する基礎研究のモデル生物にもなっている (福原, 1986)。

近年、酵母が環境中に普遍的に存在する生物の 1 つであることが明らかにされ、酵母のトキシコゲノミクスが生態毒性評価に応用できることが報告された (Liti *et al.*, 2009)。これにより、環境中の残留農薬や金属ナノ粒子等の生体への毒性評価に酵母を利用することが可能となった。

第2項 発酵食品としての酵母

我々人類は、微生物と発酵という概念を理解していない古代から伝統的に発酵食品を生産してきた。アジアでは、小麦(Okada *et al.*, 1992)、とうもろこし(Adegoke and Babalola, 1988)、キャッサバ(Oyewole and Odunfa, 1988)、ソルガム(Mohammed *et al.*, 1991)等の小麦粉発酵食品が様々な微生物によって生産されている。ヨーグルトやチーズ(Mitsuoka *et al.*, 2002)、馬乳酒(Ishii, 2002)等の発酵乳製品は主に乳酸菌によって生産される。本研究で用いる *S. cerevisiae* は、アルコール発酵によりワイン、ビール、清酒等の酒類、味噌、醤油等の調味料、パン、漬物等の様々な発酵食品を生産する有用微生物として広く知られている(Nomura and Iwahashi, 2014)。これらの伝統的な発酵食品は主食としてだけでなく、抗酸化活性や抗アレルギー、免疫賦活等の有益な効果が期待できる健康食品やコミュニケーションを円滑にする嗜好品としても食されている(Yang *et al.*, 2010)。酵母は発酵食品の生産に役立つ一方、フルーツジュースのような食品の腐敗やキムチ等の過発酵を引き起こし、食品の品質を劣化させて重大な経済的損失を引き起こすことも知られている(Basak *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2003; Patrignani *et al.*, 2009)。

第 3 節 高圧食品加工技術

高圧食品加工技術とは、数百 MPa の高圧条件により食品の殺菌や機能性成分の富化、酵素活性の向上、付加価値の付与等を目的に非熱的あるいは加熱と組み合わせることにより、食品を加工する技術の総称である。1987 年に京都大学林力丸 助教授(当時)により高圧技術を食品加工に応用することを提唱され、本技術の研究が始まった。

第 1 項 高圧加工食品の開発と問題点

高圧技術にはビタミン C 等の食品中の有用成分や新鮮な風味等を熱変性で破壊することなく、食品の加工に応用できるという利点がある。そのために高圧食品加工は、非熱的あるいは従来の加熱加工よりも低い温度で食品を加工し、微生物を不活性化することが可能である。高圧食品加工は、これまでに加熱の代替に高圧加工を利用した高圧加工生ジャム (堀江ら, 1991)や穀類の吸水に高圧加工を利用した雑穀ごはんやパックごはん(山崎, 笹川, 2000)、食品添加物の代替として高圧殺菌したハムやソーセージ(大森, 重久, 1990; 辻田, 鈴木, 1990)、高圧による牡蠣の殻むき(Murokoshi, 2004)等に応用されている。しかしながら、高圧技術による様々な食品加工や微生物の不活性化には、300 MPa 以上の高圧が

必要である。そのためには高圧に耐えることができる高コストな耐圧容器を有する高圧装置が必須であり、食品への高圧加工は高付加価値を有する食品に限られており、高圧技術の普及が妨げられているのが現状である。

第 2 項 Pressure Regulated Fermentation

近年、食品への高圧加工をより普及させるために、より低い圧力により食品の発酵を制御する技術(Pressure Regulated Fermentation; PReF)の開発が提案されている(Nomura and Iwahashi, 2014)。発酵食品を生産する酵母の発酵が制御できない場合、調味液の白濁や容器の膨張等の過発酵を引き起こし、重大な経済的損失を生じる危険性がある。従来の発酵食品の発酵を制御する方法は、一般的に加熱や冷蔵、塩や酸の添加である。特に、乳酸菌の産生する乳酸は夾雑微生物の増殖を抑制するために、古くから酵母と共に発酵食品の生産に利用されてきた。PReF 技術は、高圧技術の利点を活かし、発酵食品中に存在するビタミン C 等の有用成分を維持しつつ、微生物の発酵を制御することを目指している。また、PReF 技術を応用することは、加熱による有用物質の劣化だけではなく、塩や酸の過剰添加による健康被害の発生も抑制することが期待できる。併せて、PReF 技術では、高圧装置のコストを削減するために、100~200 MPa 程度の穏やかな中高圧領域を用いる。PReF 技術は、数百 MPa 以上の高圧が必要な交雑微生物の滅菌

(sterilization)をターゲットするのではなく、主要な発酵微生物である酵母の殺菌(pasteurization)・不活性化をすることにより、過発酵を制御することを目的とするアプローチである。乳酸菌は自身の生産する乳酸による pH の低下により不活性化するため、PReF 技術においてはターゲットとしない。これらのことから PReF 技術の確立ためには、中高压条件で不活性化する圧力に弱い酵母株の作出が必要である。

第 3 項 圧力感受性酵母の作出

これまでに実験室モデル酵母株 *S. cerevisiae* KA31a 株を親株として、それよりも高い圧力感受性能を示す圧力感受性変異株 a924E1 株を紫外線照射法によるランダム突然変異導入により取得した(Shigematsu *et al.*, 2010a)。取得した a924E1 株は、KA31a 株と同等のエタノール発酵能を有しており、圧力だけでなく温度に対しても感受性を示すことが報告されている(Shigematsu *et al.*, 2010b)。これらの表現形質を有する産業用酵母株を作出できれば、PReF 技術における高压単体のあるいは加熱と組み合わせた高压処理への応用に有益である。しかしながら、a924E1 株はランダム突然変異により取得されたため、圧力感受性変異が導入された遺伝子座および圧力感受性の基礎となるメカニズムは、未だ明らかとなっていない。

第4節 研究目的

本研究の目的は、高圧装置の設備投資コストを低減するために、100–200 MPa 程度の中高圧により酵母 *S. cerevisiae* を不活性化する PReF 技術を作出することである。PReF 技術により発酵微生物を殺菌した後の発酵食品は低温条件で保存・流通される。従って、PReF 技術の実用化には、十分なエタノール生産能を有し、尚且つ高圧に感受性を示す産業酵母株の作出が必須となる。

これまでに作出した圧力感受性変異株 a924E1 株は、未だ明らかとなっていない未知の要因により圧力感受性能が付与された可能性がある。本研究では、圧力感受性の表現型を引き起こす変異遺伝子およびそのメカニズムを DNA マイクロアレイ解析およびメタボロミクス解析により解析した。

第2章 DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析

第1節 緒言

第1項 DNA マイクロアレイ解析

DNA マイクロアレイ(DNA チップ)とは、1枚数 cm^2 のスライドガラス(2.5 $\text{cm} \times 8.5 \text{ cm}$)からなる基板の上に、数百から数千種類の DNA プローブを配置させたものである(岩橋, 2002)。相同性の高い領域を有する DNA(遺伝子)は、一定の条件下で、互いに解離と結合を繰り返す。同一の一次構造を持つ DNA や相同性の高い DNA は互いに結合が可能であるが、一次構造が異なる DNA は結合することはない。従って、サンプル中に存在する DNA チップ上のプローブと相同性の高い DNA は、数千種類の DNA の中でその相同性の高いプローブを選択して結合する。

DNA マイクロアレイは、細胞から抽出した mRNA を用いて、実験条件における遺伝子の発現量を解析する。そのために DNA マイクロアレイ解析は、増殖フェイズや環境ストレス、化学物質、突然変異等の要因によって引き起こされる遺伝子発現の網羅的な変化を明らかにすることができる。

第2項 DNA マイクロアレイ解析の応用例

DNA マイクロアレイ解析は、同時に数千種類以上の遺伝子の発現変化を観察することが可能である。これまでにカドミウム(Momose and Iwahashi, 2001)、カプサイシン(Kurita *et al.*, 2002)、凍結(Odani *et al.*, 2003)、DMSO (Murata *et al.*, 2003)、ラウンドアップ(Sirisattha *et al.*, 2004)、トキシシン(Iwahashi *et al.*, 2008)、銅(Yasokawa *et al.*, 2008)、亜鉛(Yasokawa *et al.*, 2010)等の酵母の様々なストレス応答に関する報告がある。Fernandes ら(2004)は、200 MPa、室温、30 min の高圧条件で処理した後の mRNA プロファイルを報告した。しかし、このような高圧条件では転写反応は進行しないため(Yayanos and Pollard, 1969)、彼らの報告は高圧処理に対して安定な mRNA の発現を示しているに過ぎない。また、200 MPa 程度の致死的条件においては、免疫電子顕微鏡等の観察に頼らなければ、その損傷を観察することは難しい(Kobori *et al.*, 1995)。高圧処理による細胞への影響を DNA マイクロアレイで評価するためには、高圧処理により生じた損傷を回復する時に変化する遺伝子発現を観察してその影響を推定しなければならない。例えば、Iwahashi ら(2003)は、4° C において 180 MPa の高圧条件で一瞬、または 40 MPa で 16 h 酵母細胞を処理した。その後 1 h 回復培養した細胞から RNA を抽出して遺伝子発現プロファイルを解析したところ、オルガネラや膜構造に関連するタンパク質をコードする遺伝子の発現がアップレギュレートされていた。これら

の結果から、致命的な高圧条件に曝された細胞は、オルガネラや膜構造等の修復を活発に行っていた可能性が考えられ、高圧処理はオルガネラや膜構造等に損傷を引き起こすことが示唆された。同様に非致命的な圧力への適応を解析するために、酵母の対数増殖期細胞に対して 30 MPa、25°C の圧力条件で処理した (Iwahashi *et al.*, 2005)。その結果、非致命的圧力条件においては、タンパク質および膜代謝に関連するタンパク質をコードする遺伝子の発現がアップレギュレートされていた。これらの報告は、DNA マイクロアレイにより圧力不活性化あるいは高圧条件への適応という複雑なプロセスが解析できることを示している。

第 3 項 DNA マイクロアレイ解析におけるクロスハイブリダイゼーション

DNA マイクロアレイ解析は、「ある遺伝子は相同性の高い遺伝子とハイブリダイズ(交雑、結合)する」(岩橋, 2002)という原理に基づく。数千種類もの遺伝子発現を同時に網羅的に解析できる利点があるが、相同性が高いが一次構造の異なる遺伝子をも誤って結合してしまうクロスハイブリダイゼーションを引き起こす(Iwahashi *et al.*, 2007)。遺伝子発現の網羅的解析において不確実性を引き起こすクロスハイブリダイゼーションは、DNA チップ上のわずか数十塩基のプロープによって数千種類の遺伝子を識別するために引き起こされるリスクである。しかし、遺伝子発現プロファイル全体を俯瞰し、有意に発現が変動する遺伝子群

の機能を評価するためには、有用である。従って、DNA マイクロアレイ解析は、発現が変化した 1 遺伝子のみ注目するのではなく、発現の変化した遺伝子群の機能に着目すべきである。また、それらの遺伝子群の発現は、必要に応じてクロスハイブリダイゼーションが引き起こされないように厳密に設計されたプライマーを用いた逆転写 PCR (RT-PCR)等によって確認することが重要である。

第 4 項 実験目的

本章では、圧力感受性変異株 a924E1 株およびその親株 KA31a 株の遺伝子発現プロファイルを DNA マイクロアレイによって比較することにより、圧力感受性を付与する遺伝的要因を解析した。DNA マイクロアレイは、クロスハイブリダイゼーションによって変異遺伝子の同定に不確実性を引き起こすが、遺伝子発現プロファイルの有意な変動は変異遺伝子の機能を評価するために役立つ。

第 2 節 実験材料および実験方法

第 1 項 使用菌株

本実験には、実験室酵母株 *S. cerevisiae* KA31a 株および圧力感受性変異株 a924E1 株の定常期細胞を使用した(表 1)。圧力感受性変異株 a924E1 株は、紫外線照射による突然変異により取得した(Shigematsu *et al.*, 2010a)。これらの酵母株は、新潟薬科大学 重松 亨 教授より分与していただいた。

第 2 項 培養条件

YPD 培地(2.0% peptone、1.0% yeast extract; Becton Dickinson and Co., NJ, USA、2.0% glucose; 和光純薬工業, 大阪, 日本)を用いて、30°C、48 h の条件で振盪培養した定常期細胞を実験に供した。増殖曲線は Hasegawa ら(2012)の方法に従い、Bio Microplate Reader HiTS™ (Scinics, 茨城, 日本)を用いて 30°C、120 h の条件で測定した。

第 3 項 RNA 抽出方法

YPD 培地で培養した酵母細胞は 15,000 rpm、4°C、1 min の条件で遠心分離(MX-301; Tomy Seiko, 東京, 日本)により回収した。Total RNA は Fast RNA® Pro Red

Kit (MP Biomedicals, CA, USA)を用いてフェーノール-クロロホルム法により抽出した。細胞破碎を Multi-Beads Shocker[®] (安井器械, 大阪, 日本)で 10 min に、クロロホルム処理を 2 回に変更した以外は抽出キットのプロトコルに従った。RNA 濃度および純度は 260 nm の吸光度および Agilent 2100 Bioanalyzer[™] (Agilent Technologies, CA, USA)により測定した。

第 4 項 DNA マイクロアレイ解析方法

DNA マイクロアレイによる遺伝子発現の網羅的解析は、Yeast Oligo Microarray Kit (V2)[™] (Agilent Technologies)を用いて解析した。このマイクロアレイでは、*S. cerevisiae* S288c 株の 6,256 遺伝子に対応する DNA プローブを用いた。遺伝子発現解析は 1 色法により解析した。cDNA は Quick Amp Labeling Kit[™] (Agilent Technologies)を用いて total RNA から調製した。cRNA は、Cy5 色素により T7 RNA polymerase (Agilent Technologies)を用いてラベルした。cDNA および cRNA、Cy5 によるラベル化、プローブとのハイブリダイゼーションは Ecogenomics (福岡, 日本)に委託した。

第 5 項 遺伝子発現の分類解析方法

それぞれの ORF(Open Reading Frame)から検出されたシグナルは、クオンタイ
ル法により正規化した。KA31a 株で検出されたシグナルと比べて 2 倍以上ある
いは半分以下に a924E1 株のシグナル強度が変化した遺伝子をそれぞれアップレ
ギュレート遺伝子、ダウンレギュレート遺伝子とした。各遺伝子はスチューデン
トの t 検定($p < 0.05$)により統計処理した。発現が変化した遺伝子は MIPS GenRE
CYGD database (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/yeast/>)により解析し
た。本研究の DNA マイクロアレイデータは MIAME 基準に準拠し、生データは
Gene Expression Omnibus (GEO) database に寄託した(GSE55120)。

第 6 項 quantitative PCR 方法

上記の方法で酵母細胞から抽出された total RNA は、ReverTra AceR qPCR RT
Master Mix (TOYOBO, Osaka, Japan)を用いて 37°C、15 min の条件で逆転写した。
DNA マイクロアレイの結果に基づき、アップレギュレート遺伝子およびダウン
レギュレート遺伝子のプライマーを設計(表 2)し、Power SYBR® Green Master Mix
(Applied Biosystems, CA, USA)を用いて StepOnePlus™ real-time PCR System
(Applied Biosystems)により増幅した(95°C for 10 min, and 40 cycles: denaturation at
95°C for 15 s, annealing and extension at 60°C for 2 min)。得られた Ct 値から相対発

現レベルを算出した。*CDC48* 遺伝子は細胞周期に関連する必須遺伝子であり、
a924E1 株および KA31a 株の両株において同等の発現量であったためにハウスキーパー遺伝子として利用した。

第3節 結果

第1項 遺伝子発現プロファイルの概要

本章では、DNA マイクロアレイにより圧力感受性変異株 a924E1 株の遺伝子発現プロファイルを解析した。Total RNA は a924E1 株および KA31a 株からそれぞれ4回の独立した実験により抽出された。抽出 RNA の濃度はおよそ 1.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ である。この RNA を以下の DNA マイクロアレイおよび RT-PCR に供した。

DNA マイクロアレイにより検出されたシグナルデータはクオンタイル法により正規化し、5,821 遺伝子の発現データ 8 セットを取得した。これらの遺伝子のうち、a924E1 株の 498 遺伝子の発現レベルは KA31a 株の遺伝子の発現レベルよりも有意に高く ($p < 0.05$)、649 遺伝子の発現レベルは有意に低かった ($p < 0.05$)。

第2項 アップレギュレート遺伝子発現の解析

a924E1 株においてアップレギュレートされた 498 遺伝子は、MIPS GenRE CYGD database により分類解析された。発現の変動した遺伝子の割合が最も高く、 p 値が最も低い機能カテゴリーは“Energy”であった(表 3)。“Energy”カテゴリーに分類される 367 遺伝子のうちシトクロム c 酸化酵素、ATP 合成酵素、coenzyme Q 等に関連するタンパク質をコードする遺伝子(COX1、AII、COX17、COX18、

CYC7、*PET191*、*SHY1*、*NCA2*、*COQ8* 遺伝子)やミトコンドリアのリボソーム合成に関連するタンパク質をコードする遺伝子等 45 遺伝子(*MRPL1*、*MRPS35*、*MBA1* 遺伝子)がアップレギュレートされていた。

“Biogenesis of cellular components”カテゴリーはアップレギュレート遺伝子の割合が 2 番目に多かった(表 3)。同カテゴリーに分類される 862 遺伝子のうち 88 遺伝子がアップレギュレートされていた。また、同カテゴリーの下位カテゴリーである“Mitochondrion”サブカテゴリーに分類される 171 遺伝子のうち 32 遺伝子がアップレギュレートされていた。それらのアップレギュレートされた遺伝子のうち、21 遺伝子がミトコンドリアリボソームに関連するタンパク質をコードする遺伝子(*MRP51*、*MRPL1*、*MRPS35*、*RSM25*、*VARI* 遺伝子)であった。

それぞれの遺伝子がコードするタンパク質の局在位置分類(表 4)においては、ミトコンドリアに局在するタンパク質をコードする“Mitochondria”カテゴリーに分類される遺伝子群が最も低い p 値を示した($p < 0.01$)。これらのアップレギュレートされた遺伝子がコードしているタンパク質は酸化的リン酸化に関与しており、エネルギー産生に重要である。これらの結果は、a924E1 株において圧力感受性変異導入によりミトコンドリア機能に関連する遺伝子に影響が表れていることを示唆している。

第3項 ダウンレギュレート遺伝子発現の解析

a924E1 株において、ダウンレギュレートした遺伝子は 649 遺伝子検出された (表 5)。これらの遺伝子は MIPS GenRE CYGD database により分類され、“Protein synthesis”、“Transcription”、“Binding protein”カテゴリーの 3 カテゴリーが各カテゴリーに分類される遺伝子において変動遺伝子の高い割合、低い p 値を示した (表 5)。“Protein synthesis”カテゴリーに分類される遺伝子のうち 155 遺伝子がダウンレギュレートされ、“Transcription”カテゴリーでは 1,077 遺伝子のうち 155 遺伝子、“Binding protein”カテゴリーでは 1,049 遺伝子のうち 148 遺伝子がダウンレギュレートした。*RPS3*、*RPS5*、*RPS31*、*RPL10*、*RPL30* 遺伝子等のこれらのカテゴリーに分類されたダウンレギュレート遺伝子のいくつかは、リボソームの生合成や rRNA の合成、プロセッシング、修飾等に関連する。これらの遺伝子がコードするタンパク質は主に“Cytoplasm”および“Nucleus”に局在していた(表 6)。また、バリン、ロイシン、イソロイシン、アルギニン、セリン、トリプトファン等のアミノ酸の生合成に関連するサブカテゴリーに分類された遺伝子もダウンレギュレートした。これらの結果は、変異株においてタンパク質およびアミノ酸の生合成に関与する活性が減少していることを示唆している。

第 4 項 quantitative PCR による遺伝子発現解析の評価

アップレギュレートおよびダウンレギュレート遺伝子の発現を確認するために各遺伝子に対応するプライマーを設計した(表 2)。quantitative PCR により a924E1 株および KA31a 株の遺伝子発現を評価した(表 7)。a924E1 株のアップレギュレートした遺伝子の相対発現レベルは、KA31a 株の相対発現レベルよりも 2 倍以上高かった。一方、a924E1 株のダウンレギュレート遺伝子の相対発現レベルは KA31a 株と比較して半分以下であった。これらの結果は、DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析結果の妥当性を支持している。しかしながら、DNA マイクロアレイによってアップレギュレートされていた a924E1 株の *COXI* 遺伝子の相対発現レベルはとて少なかった。*COXI* 遺伝子の別の領域をターゲットとしたプライマーで確認したが、発現を観察することはできなかった(表 7)。

第4節 考察

本章では、圧力感受性能の付与機構を明らかとするために、DNA マイクロアレイにより圧力感受性変異株 a924E1 株の遺伝子発現プロファイルをその親株 KA31a 株のものと比較した。その結果、a924E1 株の 1,000 以上の遺伝子の発現が有意に変化したことが明らかとなった($p < 0.05$)。特にエネルギー代謝機能に関連するタンパク質をコードする遺伝子の発現がアップレギュレートし(表 3)、アミノ酸やタンパク質の生合成に関連するタンパク質をコードする遺伝子の発現がダウンレギュレートした(表 5)。アップレギュレートした遺伝子の多くはミトコンドリアに局在するタンパク質をコードする遺伝子であった。DNA マイクロアレイによる遺伝子発現の解析において注意しなければならないことは、発現が変動した機能遺伝子群が、なぜ発現を変動させる必要があったのか DNA マイクロアレイ解析の結果全体を俯瞰的に考察することである。ミトコンドリアに関連するタンパク質をコードする遺伝子がアップレギュレートされたことから、a924E1 株においてミトコンドリア機能が重要であることが考えられる。その原因としては、圧力感受性変異の導入により①ミトコンドリアが分解あるいは機能不全となったのか、②ミトコンドリア機能が強化されたのかわからない。この結果と併せて、ダウンレギュレートした遺伝子群がアミノ酸やタンパク質

の生合成に関連するタンパク質をコードしていたことから、圧力感受性能は a924E1 株のミトコンドリア機能が低下するような影響を引き起こしている可能性が考えられる。

RT-PCR により遺伝子発現を評価した結果、a924E1 株のアップレギュレートした遺伝子の相対発現レベルは、KA31a 株の相対発現レベルよりも 2 倍以上高い値を示した(表 7)。しかしながら、DNA マイクロアレイ解析によりアップレギュレートしていたミトコンドリアの酸化的リン酸化に関連するシトクロム c 酸化酵素をコードする *COXI* 遺伝子の発現は確認できなかった(表 7)。

DNA マイクロアレイは DNA チップ上のわずか数十塩基のプロープによって数千の遺伝子を識別する方法である。クロスハイブリダイゼーションすることが無いように厳密に設計された PCR 用のプライマーと異なり、DNA マイクロアレイのプロープはクロスハイブリダイゼーションするリスクよりも数千種類以上の遺伝子の発現を網羅的に解析することを優先している。そのために、この見かけ上の *COXI* 遺伝子のアップレギュレーションは、DNA マイクロアレイに特有のクロスハイブリダイゼーションであると考えられる。DNA プロープの塩基配列の相同性や蛍光強度のばらつき、細胞の培養条件等が原因でしばしばクロスハイブリダイゼーションが引き起こされることが報告されている(Iwahashi *et al.*, 2007)。実際に DNA チップ上の *COXI* 遺伝子のプロープは、他の遺伝子と極

めて高い相同性を示した。例えば、*COXI* 遺伝子プローブの 40-60 bp 部分は、5-ホスホリボシル-1- α -ピロリン酸合成酵素をコードする *PRS2* 遺伝子の塩基配列と一致した。加えて、*COXI* 遺伝子の発現について、遺伝子配列の異なる領域を対象とした quantitative PCR で再解析したところ、発現は確認できなかった(表 7)。これらの結果は、a924E1 株において *COXI* 遺伝子の発現がアップレギュレートしていないことを示唆している。

本章の結果をまとめると、a924E1 株は圧力感受性変異の導入によりミトコンドリアやアミノ酸等のタンパク質の生合成に関連する機能に影響が生じたことが示唆された。ミトコンドリアは、様々なアミノ酸等の中間代謝産物の生合成の主要な代謝経路であり、重要な役割を担う器官である。第 3 章では、DNA マイクロアレイ解析に基づき、a924E1 株の圧力感受性能が及ぼすミトコンドリア機能への影響について解析する。

第3章 ミトコンドリア機能の解析

第1節 緒言

第1項 酵母とミトコンドリア

ミトコンドリアは酸化的リン酸化によるエネルギー生産を司る細胞小器官である。ミトコンドリアは独自にDNA(ミトコンドリアDNA)を持ち、分裂、増殖を行うことができる。酵母のミトコンドリアDNAはおよそ76 kbpであり、ヒトはおよそ16.5 kbpである(福原, 1986)。ほとんどの真核生物はエネルギー獲得を好気呼吸に依存しているために、ミトコンドリアDNAの欠損等に起因するミトコンドリア機能の低下は致命的である。ミトコンドリアDNAの欠損に関連しているヒトの遺伝病も少なくない。また、ミトコンドリアの酸化的リン酸化により生成される活性酸素が癌を引き起こすことも示唆されている。

酵母はエタノール発酵により生存することが可能であるため、ミトコンドリアDNAの欠損はヒトほど致命的ではない。実際にEphrussiら(1955)も報告しているように酵母の呼吸欠損株については数多く報告されており、特にミトコンドリアDNAが欠失した株を ρ^- 株、完全に欠失した株を ρ^0 株と呼ぶ。酵母はヒトの呼吸機能に関連するタンパク質をコードする遺伝子のホモログを数多

く有している。そのためにミトコンドリアが関連する遺伝病や癌を始めとした多くの病気や呼吸阻害剤等に対する基礎研究として酵母のミトコンドリア研究が活発に進められている (福原, 1986)。

第 2 項 実験目的

第 2 章の DNA マイクロアレイ解析により、a924E1 株の圧力感受性とミトコンドリアの関連性が示唆された。ミトコンドリアは呼吸機能や細胞内代謝の中間代謝産物を生産する重要な器官である。本章ではミトコンドリア機能を表現形質解析により評価した。

第 2 節 実験材料および実験方法

第 1 項 使用菌株

本実験には、実験室酵母株 *S. cerevisiae* KA31a 株および圧力感受性変異株 a924E1 株の定常期細胞を使用した(表 1)。これらの酵母株は、新潟薬科大学 重松 亨 教授より分与していただいた。また、第 3 項で作出した二倍体株を使用した(表 1)。

第 2 項 培養条件

YPD 培地(2.0% peptone、1.0% yeast extract、2.0% glucose)を用いて、30°C、48 h の条件で振盪培養した定常期細胞を実験に供した。増殖曲線は Hasegawa ら (2012)の方法に従い、Bio Microplate Reader HiTS™ を用いて 30°C、120 h の条件で測定した。

第 3 項 二倍体株の作出

本実験で使用した二倍体株は、圧力感受性変異株 a924E1 株(a 型一倍体株)と野生型株 KA31a 株(α 型一倍体株)の接合により作出した。両株の培養液 300 μ L を YPD 培地 2.4 mL に加えてよく混合し、30°C、24 h の条件で静置培養した。培

養後、位相差顕微鏡により接合子を確認して YPD 寒天培地上に接合細胞をアイソレーションし、単離したコロニーを二倍体候補株とした。二倍体候補株を再び a924E1 株および KA31 α 株の培養液とそれぞれ混合し、接合子が観察されなかったコロニーを二倍体株とした。作出した二倍体株は、FACS CaliburTM flow cytometer (Becton Dickinson and Co., NJ, 米国)により DNA 量および細胞サイズを確認した。

第 4 項 呼吸機能の解析方法

酵母株の呼吸機能は 2,3,5-triphenyl-2*H*-tetrazolium chloride (TTC; Wako Pure Chemical Industries)によるコロニー染色法により Nagai(1959)の報告に従い解析した。

第 5 項 ミトコンドリア DNA 欠失の解析方法

ミトコンドリア DNA の欠失は PCR 法により解析した。Total DNA は、Dr. GenTLE[®] (from Yeast) High Recovery (タカラバイオ)を用いたザイモリアーゼ処理により抽出した。抽出した DNA は TE バッファー 50 μ L に溶解し、 -20°C で保存した。DNA 濃度は 260 nm の吸光度で測定した。ミトコンドリア DNA の増幅のために、Saccharomyces Genome Database (SGD, <http://www.yeastgenome.org/>) お

よび Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>)を用いて、15S rRNA、21S rRNA、*COX1*、*COX3*、*COB* 遺伝子を対象としたプライマーを設計した(表 2)。ハウスキーピング遺伝子としては *CDC48* 遺伝子を用いた。

第 6 項 高圧処理方法

高圧処理は、Shigematsu ら(2010a)の報告に従い、200 MPa、20°C、0-360 s の条件で行った。

第3節 結果

第1項 呼吸機能の解析

DNA マイクロアレイの網羅的遺伝子発現解析の結果から a924E1 株において、ミトコンドリアの機能が圧力感受性能に影響を与えていることが示唆された。そこで TTC 染色法により a924E1 株のミトコンドリアの呼吸機能を評価した。無色のテトラゾリウム塩は電子受容体として働き、酸化のリン酸化が行われるミトコンドリア膜間腔で赤色のホルマザン色素に還元される。KA31a 株のコロニーは TTC 寒天培地を重層後 20 min でピンク色に染まりはじめ、100 min 後には濃赤色に染色された(図 1)。対照的に、a924E1 株のコロニーは 100 min が経過してもわずかにピンク色に色付くだけであった(図 1)。これらの結果は、a924E1 株の好気呼吸能の活性が低下していることを示唆している。

第2項 ミトコンドリア DNA の欠失

酵母における呼吸機能の活性低下は、ミトコンドリア DNA の欠失が原因であることが多い。a924E1 株の呼吸機能の活性低下を引き起こした遺伝的要因を同定するために、ミトコンドリア DNA を対象として PCR 法により解析した。ミトコンドリア DNA の主要な遺伝子である 15S rRNA、21S rRNA、*COX1*、*COX3*、

COB 遺伝子をターゲットとしてプライマーを設計した(表 2)。*CDC48* 遺伝子は内部標準とした。その結果、a924E1 株において 15S rRNA、21S rRNA、*COX3*、*COB* 遺伝子のバンドは検出されたが、*COX1* 遺伝子を含む領域をターゲットとしたバンドは検出されなかった(図 5)。

第 3 項 二倍体株の作出

COX1 遺伝子の欠失と圧力感受性能の関連性を解析するために、a 型一倍体株 a924E1 株および α 型一倍体野生型株 KA31 α 株の接合により 5 株の二倍体株を作出した。作出した二倍体株の DNA 量および細胞サイズはフローサイトメトリーで確認した(図 2)。二倍体株の DNA 量(G1 期 : 2C、G2 期 : 4C)は、一倍体株(G1 期 : 1C、G2 期 : 2C)のおよそ 2 倍量であった。二倍体株の G2 期(DNA 量 : 4C)の細胞のサイズは、G1 期(2C)の細胞の 2 倍以上であり、同様に一倍体株においても、G2 期(DNA 量 : 2C)の細胞のサイズは、G1 期(1C)の細胞の 2 倍以上であった。二倍体株の増殖曲線は図 3 に示す。

第 4 項 圧力不活性化挙動の解析

作出した二倍体株および a924E1 株、KA31a 株を 200 MPa、20°C、0-360 s の条件で高圧処理した。YPD 寒天培地によるコロニーカウント法により生菌数を算出した。120 s、240 s、360 s の条件で高圧処理したサンプルの生菌数を 0 s 処理サンプルの生菌数で除して生存率とした。各処理条件の生存率の自然対数値を縦軸に高圧処理時間を横軸にプロットして圧力不活性化曲線を作成し、圧力不活性化速度定数を算出した(図 4)。その結果、KA31a 株と比較して a924E1 株の圧力感受性が確認できた。二倍体株は、KA31a 株と同程度の圧力耐性を示す群と a924E1 株に匹敵する圧力感受性を示す群に分かれた。

第 5 項 野生型ミトコンドリアによる欠失遺伝子の補完

呼吸欠損酵母株と野生型酵母株の接合において、呼吸欠損型ミトコンドリアは野生型ミトコンドリアに一定の割合で置換されることが報告されている。そこで、a924E1 株の呼吸欠損および圧力感受性の表現型が作出した二倍体株へどのように受け継がれるのか評価した。TTC 染色の結果、二倍体株は TTC ポジティブ(呼吸機能有)および TTC ネガティブ(呼吸機能低下) の 2 つの表現形質を示す群に分離した(図 1)。TTC ポジティブ群は KA31a 株と同程度の圧力耐性を示す群と同じであった。同様に TTC ネガティブ群は a924E1 株に匹敵する圧力感

受性を示した群と同じであった。また、TTC ポジティブ群で検出される *COXI* 遺伝子が、TTC ネガティブ群では欠失していることを PCR により確認した(図 5)。これらの結果は、圧力感受性能がメンデル式に遺伝するのではなく、呼吸欠損ミトコンドリアと共に細胞質遺伝したことを示唆する。

第4節 考察

本章では、DNA マイクロアレイ解析で示唆されたミトコンドリアと圧力感受性の関連性について焦点を当てて解析した。TTC 染色によりミトコンドリアの呼吸機能を評価したところ、a924E1 株の呼吸機能が低下していることが示された(図 1)。ミトコンドリア DNA を対象とした PCR によって *COX1* 遺伝子をコードする領域の欠失が示された(図 5)。*COX1* 遺伝子以外のミトコンドリア DNA の遺伝子においては、欠失は確認されなかった(図 5)。これらの結果は、a924E1 株のミトコンドリア呼吸機能の低下が *COX1* 遺伝子の欠失に起因していることを示唆している。一般的に呼吸欠損酵母株は全てのミトコンドリア DNA を欠損しているが、a924E1 株は *COX1* 遺伝子のみを欠失した非常に稀な呼吸欠損株であり、ミトコンドリアと呼吸機能に関する研究においても有益な変異株である。

作出した二倍体株において、*COX1* 遺伝子の欠失は、ミトコンドリアと共に細胞質遺伝した(図 1)。*COX1* 遺伝子を欠失したミトコンドリアを持つ呼吸機能が低下した二倍体株は、*COX1* 遺伝子欠失ミトコンドリアが野生型ミトコンドリアに置き換えられた呼吸機能を維持した二倍体株と比較して、有意に高い圧力感受性を示し、その圧力感受性能は a924E1 株に匹敵することが示された(図

4)。これらの結果は、*COX1* 遺伝子の欠失が a924E1 株に圧力感受性能を付与している一因であることを示している。ミトコンドリア機能が圧力感受性能に強く関連するというこれらの結果は前例が無いが、基礎的な圧力感受性機構を理解するためのブレイクスルーになる可能性がある。

ミトコンドリアは、ATP や NADH、様々なアミノ酸の中間産物等を生成する主要な代謝経路の中心的な役割を担う。いくつかの化合物は増殖に必須ではないが、ミトコンドリア機能の低下によって主要な代謝が停止することは、多くのストレス耐性を阻害することにつながる。例えば、プロリン、アルギニン、グルタミン酸、尿素等の代謝に関連する酵素はミトコンドリアに局在しており、これらは酸化ストレス、高温ストレス、凍結融解ストレス等のストレス耐性に寄与している。これらの結果は、a924E1 株に圧力感受性能を付与した要因として、*COX1* 遺伝子の欠失によるミトコンドリアの機能不全に起因する直接的な影響ではなく、ミトコンドリアの機能不全に伴うストレス耐性に寄与する代謝産物の減少によって様々なストレスに対する耐性が低下した可能性が考えられる。

一般的に呼吸欠損酵母株は全てのミトコンドリア DNA を欠損しており、そのエタノール発酵能および増殖能は野生型株と比較して大きく減少する。しかしながら、圧力感受性変異株 a924E1 株は *COX1* 遺伝子欠失に起因するミトコンドリア機能不全を引き起こしているにも関わらず、KA31a 株と同等のエタノー

ル発酵能(Shigematsu *et al.*, 2010a)および増殖能(図 3)を有する。Brauer ら(2005)によって、グルコース濃度が 0.5%以上の条件で培養する場合、*S. cerevisiae* の増殖は主にエタノール発酵に依存することが報告されていることから、a924E1 株および KA31a 株はエタノール発酵することにより見かけ上同等の増殖能を有していたと考えられる。また、これらの結果は、*COX1* 遺伝子の欠失に起因する代謝の変化がエタノール発酵能に影響を及ぼさずに圧力感受性を付与していることを示唆していることは、PReF 技術の実用化に向けて有益である。

本章の結果をまとめると、a924E1 株の圧力感受性能はミトコンドリアの機能不全により付与されたと考えられる。しかしながら、圧力感受性を付与する機構の直接的な証拠は明らかとならなかったが、a924E1 株のミトコンドリアを他の酵母株のミトコンドリアに補完することで容易に産業用酵母株に圧力感受性能を付与することが期待できる。

第4章 メタボロミクスによる圧力感受性機構の解析

第1節 緒言

第1項 メタボロミクス解析

メタボロミクスは、有機化合物、アミノ酸、核酸等の細胞内代謝産物をターゲットとした網羅的解析技術である(福崎, 2013)。メタボロミクスの大きな特性はその一般性である。DNA や RNA を網羅的に解析するゲノミクス、タンパク質を網羅的に解析するプロテオミクス等による解析では、その解析サンプルに特有の塩基配列等の情報が必要である。その一方、メタボロミクスの解析対象は代謝産物であり、当然のことながらそれらはヒトでも大腸菌でも生物間で互換性を有する化合物である場合が多い。しかし、メタボロミクスで解析できる代謝産物に機能性があるとは限らないために、生物学的な理由付けが難しいという問題もある。例えば、ある代謝産物が増加した場合、必要になったために蓄積したのか、不要になったのから蓄積したのかの解釈は、別の実験結果で理由付けを行う必要がある(野村, 岩橋, 2013)。

第2項 メタボロミクス解析の応用例

多種多様な化合物を分析するメタボロミクスに最もよく用いられる技術は、質量分析である。解像度と再現性に優れたガスクロマトグラフィー質量分析(GC/MS)や液体クロマトグラフィー質量分析(LC/MS)、糖リン酸や核酸等に有効なキャピラリー電気泳動質量分析(CE/MS)等の手法がよく知られている(福崎, 2013)。

Tanaka ら(2007)は、酵母のカドミウムストレス応答を解析するためにキャピラリー電気泳動質量分析法(CE/MS)を用いた細胞内代謝産物の網羅的解析を行い、ストレス応答解析におけるメタボロミクスの有用性を示した。また、ゲノミクスとメタボロミクスを組み合わせることで、機能情報と代謝情報を同時に解析することも報告されている(田中ら, 2013)。機能情報は原因であり、代謝情報は結果である。これらを組み合わせることで、どのような遺伝子の発現の変化が原因となって、ストレス等に適応する結果となるのか、より深く考察することができる。

第3項 アルギニン

アルギニンはグアニジンと類似したアミノ酸側鎖を有する塩基性アミノ酸の1種である(Hamada and Shirali, 2007)。グアニジンはタンパク質の凝集を抑制

する変性剤であるため、グアニジンに類似した側鎖を持つアルギニンも凝集したタンパク質のリホールディングを補助する有望な添加物である(Tsumoto *et al.*, 2004; Lyutoya *et al.*, 2007)。それ故に、アルギニンは酵母において酸化や凍結に対するストレス耐性に関与することが報告されている(Morita *et al.*, 2002; Nishimura *et al.*, 2010)。高圧は非共有結合の不安定化を引き起こしてタンパク質の変性を促進する。しかしながら、アルギニンの高圧ストレスに対する効果は未だあきらかとなっていない。

第4項 実験目的

第2章および第3章の結果から、a924E1株の圧力感受性能が *COX1* 遺伝子の欠失に起因するミトコンドリアの機能不全により付与されたことが示唆された。本項では、メタボロミクス解析により、ミトコンドリアの機能不全により圧力感受性を引き起こすメカニズムを解析した。また、メタボロミクス解析により様々なストレス耐性に寄与するアルギニンの減少が示されたために、アルギニンの圧力耐性への寄与についても併せて解析した。

第 2 節 実験材料および実験方法

第 1 項 使用菌株

本実験には、実験室酵母株 *S. cerevisiae* KA31a 株および圧力感受性変異株 a924E1 株の定常期細胞を使用した(表 1)。圧力感受性変異株 a924E1 株は、紫外線照射による突然変異により取得した(Shigematsu *et al.*, 2010a)。これらの酵母株は、新潟薬科大学 重松 亨 教授より分与していただいた。

第 2 項 培養条件

YPD 培地(2.0% peptone、1.0% yeast extract; Becton Dickinson and Co., NJ, USA、2.0% glucose; 和光純薬工業, 大阪, 日本)を用いて、30°C、48 h の条件で振盪培養した定常期細胞を実験に供した。増殖曲線は Hasegawa ら(2012)の方法に従い、Bio Microplate Reader HiTS™ (Scinics, 茨城, 日本)を用いて 30°C、120 h の条件で測定した。

第 3 項 メタボロミクス解析方法

代謝産物の抽出法は Human Metabolomics Technologies (HMT; 山形, 日本)のプロトコルに従った。CE/MS による代謝産物の検出は HMT に委託した。a924E1

株から検出した各化合物の相対値は KA31a 株のそれらと比較して 2 倍以上高い値を示す化合物、半分以下の低い値を示す化合物、値の変化の無い化合物に分類し、ウェルチの *t* 検定により統計的に解析した。KA31a 株と比較して有意に変動した化合物の代謝経路は KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) に従って解析した。

第 4 項 代謝経路の解析方法

total RNA は、Fast RNA[®] Pro Red Kit (MP Biomedicals, CA, USA)により抽出され、RNeasy[®] Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)により精製した。cDNA は、抽出した RNA から ReverTra Ace[®] qPCR RT Master Mix (Toyobo, 大阪, 日本)により逆転写した。アルギニン生合成に関連する 4 遺伝子に対してプライマーを設計した(表 2)。これらの遺伝子のうち 3 遺伝子は DNA マイクロアレイ解析により、ダウンレギュレートした遺伝子(*ARG3*、*ARG1*、*ARG4* 遺伝子)を対象とした。*ARG8* 遺伝子は有意差が認められなかったが、ダウンレギュレートしており、アルギニン生合成に重要な酵素をコードしているために選択した。PCR には GoTaq Green Master Mix (Promega, WI, USA)を用いて、前述の条件で増幅した。

第 5 項 高圧処理方法

高圧ストレス耐性へのアルギニンの影響を解析するために、アルギニン添加 (10-500 mM)あるいは未添加の条件において培養後、200 MPa、0-4°C、360 s の条件で高圧処理した。高圧処理はハンドポンプ型高圧装置 HP-500 (Syn Corporation, 京都, 日本)を用いた以外は、Shigematsu ら(2010a)の報告に従った。高圧処理後に生理食塩水で 10-100 倍に希釈して、5 μ L ずつ YPD 寒天培地にスポットし、30°C で静置培養した。

第3節 結果

第1項 メタボロミクス解析

CE/MS 解析により、250 種類の化合物を検出した(表 8)。本研究では a924E1 株において KA31a 株と比較して相対的に減少した化合物に着目した。グルタミン酸、アスパラギン酸、グルタミン、オルニチン、アルギニン等のアミノ酸を含む 48 種類の化合物は、KA31a 株のそれらと比較して有意に低い値であった($p < 0.05$)。アセチル CoA、アコニット酸、フマル酸、イソクエン酸等の TCA サイクルに関連する化合物等の 59 種類の化合物は、a924E1 株では検出されなかった。また、 α -ケトグルタル酸等のいくつかの化合物は a924E1 株および KA31a 株の両株で検出されなかった。また a924E1 株において、検出された TCA サイクルに関連する化合物のうち、コハク酸のみが例外的に増加していた。これらの a924E1 株において変動した化合物は、アルギニン生合成に関連している(表 8)。

第2項 アルギニン代謝解析経路に関する遺伝子の解析

表 9 に示されたグルタミン、アスパラギン酸、グルタミン酸、オルニチンは、アルギニンの生合成に関連するアミノ酸である。アルギニンはストレス応答に重要な役割を担うアミノ酸であるため、その生合成に関連する酵素群をコード

する遺伝子の発現を評価することは重要である。本項では、アルギニン生合成酵素をコードする *ARG8*、*ARG3*、*ARG1*、*ARG4* 遺伝子の発現を RT-PCR 法により解析した。内部標準としてアクチンをコードする *ACT1* 遺伝子を用いた。その結果、解析した 4 遺伝子において、KA31a 株では発現が確認できたが、a924E1 株では発現を確認できなかった(図 6)。

第 3 項 アルギニンの圧力不活性化への寄与

アルギニンの高圧ストレス耐性への影響を解析するために、スポット試験によりアルギニンの有無による a924E1 株の圧力感受性能を評価した。アルギニン無添加条件において、KA31a 株では高圧処理後に細胞の増殖が観察された。一方、a924E1 株では増殖が観察できなかった。a924E1 株において、培養時にアルギニンを添加して培養した場合、10 mM 以上の条件において、高圧処理後に細胞の増殖を観察した。KA31a 株においては、全ての条件で細胞の増殖が観察された(図 8)。

第4節 考察

メタボロミクス解析の結果、表 8 に示したように a924E1 株において TCA サイクルやアルギニン生合成に関連する化合物が相対的に減少していた(表 9)。TCA サイクルに関連する化合物のうち、アセチル CoA、アコニット酸、フマル酸、イソクエン酸等の化合物は減少していたが、コハク酸だけが例外的に増加した(表 8)。コハク酸は、ミトコンドリア膜間腔に局在する電子伝達鎖の複合体 II の触媒作用によってフマル酸に酸化される。a924E1 株におけるコハク酸の増加およびフマル酸の減少はミトコンドリア電子伝達鎖の機能不全を示唆している。DNA マイクロアレイ解析の結果から a924E1 株において、TCA サイクルに関連するタンパク質をコードする 31 遺伝子のうち 8 遺伝子(*CIT2*、*CIT3*、*GDH1*、*GDH3*、*IDP2*、*SDH1*、*SDH2*、*SHH3* 遺伝子)の発現が有意にダウンレギュレートしていた。特に電子伝達鎖の複合体 II(コハク酸をフマル酸に代謝する酵素)に関連するタンパク質をコードする遺伝子の半数がダウンレギュレートしていた(*SDH1*、*SDH2*、*SHH3* 遺伝子)。これらの結果は、*COX1* 遺伝子の欠失に起因するミトコンドリアの機能不全およびそれによるエネルギー不足によって、TCA サイクルが停止していることを示唆している。実際に、TTC 染色法により呼吸機能を評価した結果もそれらの結果を支持した(図 1)。

表 8 に示すように、a924E1 株においてアルギニンのみではなくグルタミン酸

やグルタミンも有意に減少している。グルタミン酸の生合成に関する酵素をコードする遺伝子(*GDH1*、*GDH3* 遺伝子)もダウンレギュレートしていたことから、TCA サイクルの停止は、アルギニン生合成の中間物質であるグルタミン酸の枯渇を引き起こしている可能性が考えられる。アルギニンの生合成にはグルタミン酸とエネルギーが必須であるために、a924E1 株においてアルギニン生合成経路の活性は必然的に低下するだろう。DNA マイクロアレイ解析の結果、アルギニンの生合成に関連する酵素をコードする 21 遺伝子のうち 8 遺伝子がダウンレギュレートしていた(*ARG1*、*ARG3*、*ARG4*、*ARG7*、*CPA1*、*MAK31*、*PUT1*、*VBA1* 遺伝子)。DNA マイクロアレイ解析の結果を確認し、アルギニンの相対的な減少の原因を評価するために、グルタミン酸からアルギニンを生合成する主要な酵素群をコードする遺伝子の発現を RT-PCR により解析した。その結果、a924E1 株においてアルギニン生合成に関連する遺伝子の発現の減少が確認された(図 6)。

これらの結果は、TCA サイクルの停止により、グルタミン酸からアルギニンを生合成する代謝経路の活性の低下していることを示唆している(図 7)。

アルギニンが高圧耐性に及ぼす影響を評価するために、アルギニン添加または未添加の条件で培養した後に高圧処理を施し、スポット試験により増殖を確認した。アルギニン未添加の場合、KA31a 株の増殖が観察されたが、a924E1 株の増殖は観察できなかった。この結果は、これまでの Shigematsu ら(2010a)によ

る a924E1 株が KA31a 株と比較してより高い圧力感受性能を有するという報告を支持した。しかしながら、アルギニンを添加して培養した場合、高圧処理後に a924E1 株および KA31a 株の両株において増殖を観察した(図 8)。これらの結果は、アルギニンが酵母細胞に対して、高圧耐性に寄与していることを示唆している。

本章の結果をまとめると、アルギニン生合成経路の活性の低下に起因するアルギニンの枯渇が、a924E1 株の圧力感受性能を付与する一因であることが示唆された(図 7)。また、本章の成果はアルギニンが酸化や凍結ストレス耐性のみならず、高圧ストレス耐性においても寄与することを示唆する初めての報告である。この新しい知見は PReF 技術の開発に大きく寄与することだろう。

第 5 章 結論

圧力は、非共有結合のみに作用し、非熱的にタンパク質を変性させることにより、微生物の増殖阻害や不活性化を引き起こす物理的ストレスである。1987 年に高圧を食品加工へ応用する高圧食品加工の概念が提唱された。食品中の有用成分や新鮮な風味、色、味わいを保持しつつ、微生物を不活性化させることが可能となった。しかし、微生物の不活性化には 300 MPa 以上の高圧が必要であるため、高圧に耐えられる圧力容器や圧力装置の設備コストの増大等により高圧技術の普及が妨げられているのが現状である。その問題を解決するために、高圧・高コストが必要な微生物の滅菌(sterilization)ではなく、100~200 MP 程度の中高圧条件によって発酵食品を生産する酵母の殺菌(pasteurization)に焦点を当て、圧力により発酵を制御する技術(Pressure Regulated Fermentation; PReF)が提案された(Nomura and Iwahashi, 2014)。PReF 技術の確立には、中高圧条件で不活性化する圧力に弱い酵母株の作出が必要である。

これまでに実験室酵母株 *S. cerevisiae* KA31a 株に対して紫外線照射法によるランダム突然変異の導入によって KA31a 株よりも高い圧力感受性能を示す圧力感受性変異株 a924E1 株を取得した。a924E1 株は、圧力感受性能のみならず、KA31a 株と同等のエタノール発酵能を有しており、PReF 技術の確立のためにはこれら

の表現形質を有する産業用酵母株の作出が必要である。しかし、a924E1 株はランダム突然変異により取得されたため、圧力感受性変異遺伝子が未だ明らかとなっていない。本研究では、a924E1 株の圧力感受性変異遺伝子の同定およびその圧力感受性機構の解明を目的とした。第 2 章および第 3 章では、DNA マイクロアレイによる遺伝子発現プロファイルの網羅的解析により、圧力感受性能を付与する変異遺伝子を絞り込み、ミトコンドリアの表現形質解析および PCR により圧力感受性変異遺伝子を同定した。第 4 章では、メタボロミクスにより代謝産物のプロファイルを網羅的に解析し、*COXI* 遺伝子の欠失によって圧力感受性能が付与されるメカニズムを解析した。以下に各章を総括する。

第 2 章では、a924E1 株の圧力感受性能を付与する遺伝的要因を解析するために、DNA マイクロアレイにより遺伝子発現プロファイルを KA31a 株のものと比較解析した(表 3-6)。その結果、5,821 遺伝子の発現データを取得し、これらの遺伝子のうち、a924E1 株の 498 遺伝子の発現レベルは KA31a 株の遺伝子の発現レベルよりも有意に高く($p < 0.05$)、649 遺伝子の発現レベルは有意に低かった($p < 0.05$)。a924E1 株において、“Energy”機能に関連するタンパク質をコードする遺伝子および“Mitochondria”に局在するタンパク質をコードする遺伝子の発現が最も有意にアップレギュレート($p < 0.05$)したことが明らかとなった。特に *COXI*、

AII、*COX17*、*COX18*、*CYC7*、*PET191*、*SHY1*、*NCA2*、*COQ8*、*MRPL1*、*MRPS35*、*MBA1* 遺伝子等のミトコンドリアやエネルギー代謝に関連するタンパク質をコードする遺伝子の発現がアップレギュレートした。また、*RPS3*、*RPS5*、*RPS31*、*RPL10*、*RPL30* 遺伝子等の “Protein synthesis”機能やバリン、ロイシン、イソロイシン、アルギニン、セリン、トリプトファン等のアミノ酸の生合成に関連するタンパク質をコードする遺伝子が有意にダウンレギュレート($p < 0.05$)したことが明らかとなった。Quantitative PCR によって DNA マイクロアレイの遺伝子発現を評価したところ、a924E1 株のアップレギュレートした遺伝子の相対発現レベルは KA31a 株の相対発現レベルと比較して 2 倍以上の値を示した。a924E1 株のダウンレギュレートした遺伝子の相対発現レベルは KA31a 株の相対発現レベルの半分以下であった(表 7)。これらの結果から、圧力感受性変異の導入によりミトコンドリア機能に影響が生じ、タンパク質やアミノ酸の代謝機能が低下している可能性を示している。しかし a924E1 株において、アップレギュレートしていた *COX1* 遺伝子の発現が例外的に確認できなかった(表 7)。*COX1* 遺伝子の他の領域をターゲットとした quantitative PCR により再解析した結果においても発現は観察できず、また *COX1* 遺伝子のプローブ配列が *PRS2* 遺伝子と高い相同性を示したことから、a924E1 株の *COX1* 遺伝子の発現の見かけ上のアップレギュレートはクロスハイブリダイゼーションであることが示唆された。

第3章では、遺伝子発現プロファイルの網羅的解析から明らかとなった a924E1 株のミトコンドリア機能と圧力感受性の関連性について解析した。TTC 染色によりミトコンドリアの呼吸機能を評価したところ、a924E1 株の呼吸機能の低下が明らかとなった(図 1)。酵母の呼吸機能の低下はミトコンドリア DNA の欠損に起因することが多い。ミトコンドリア DNA を PCR により解析したところ、*COXI* 遺伝子領域の欠失が明らかとなった(図 5)。また、*COXI* 遺伝子以外のミトコンドリア遺伝子の欠失は確認されなかった。これらの結果は、a924E1 株のミトコンドリア呼吸機能の低下が *COXI* 遺伝子のみの欠失に起因していることを示している。一般的な呼吸欠損酵母株は全てのミトコンドリア DNA を欠損しているが、a924E1 株は *COXI* 遺伝子のみを欠失した非常に稀な呼吸欠損株であり、ミトコンドリアと呼吸機能に関する研究においても有益な変異株であることが明らかとなった。*COXI* 遺伝子を欠失した a924E1 株(a 型一倍体)および *COXI* 遺伝子を欠失していない野生型株 KA31 α 株(α 型一倍体)を接合し、二倍体株を作出した。その結果、*COXI* 遺伝子の欠失はミトコンドリアと共に細胞質遺伝した(図 1,5)。*COXI* 遺伝子欠失ミトコンドリアを持つ二倍体株は、*COXI* 遺伝子を欠失していない野生型ミトコンドリアを持つ二倍体株よりも有意に高い圧力感受性を示し、その二倍体株の圧力感受性能は a924E1 株に匹敵することが明らか

となった(図 4)。これらの結果から、ミトコンドリア DNA の *COX1* 遺伝子の欠失が圧力感受性に強く関連することが明らかとなった。

第 4 章では、メタボロミクスにより代謝産物の網羅的解析により、*COX1* 遺伝子の欠失による圧力感受性能の付与機構を解析した(表 8)。その結果、CE/MS 解析により、250 種類の化合物を検出し、a924E1 株において 48 種類の化合物が KA31a 株と比較して相対的に減少した($p < 0.05$)。また、59 種類の化合物は、a924E1 株では検出されず、 α -ケトグルタル酸等のいくつかの化合物は a924E1 株および KA31a 株の両株で検出されなかった。これらの相対的に減少した化合物あるいは a924E1 株で検出されなかった化合物は TCA サイクルやアルギニン生合成に関与していた(表 9, 図 7)。DNA マイクロアレイによる遺伝子発現の網羅的解析の結果から、a924E1 株において、これらの化合物の代謝に関連する酵素をコードする遺伝子(*CIT2*、*CIT3*、*GDH1*、*GDH3*、*IDP2*、*SDH1*、*SDH2*、*SHH3*、*ARG1*、*ARG3*、*ARG4*、*ARG7*、*CPA1*、*MAK31*、*PUT1*、*VBA1* 遺伝子)の発現がダウンレギュレートしたことが明らかとなっている。様々なストレス耐性に寄与するアルギニン生合成に関与する酵素をコードする遺伝子である *ARG8*、*ARG3*、*ARG1*、*ARG4* 遺伝子の発現を RT-PCR で解析したところ、a924E1 株において発現の低下が明らかとなった(図 6)。アルギニンが圧力耐性に寄与する影響を評価

するために、アルギニン添加または未添加の条件で培養した後に高圧処理を施した。アルギニン未添加の場合、KA31a 株の増殖が観察されたが、a924E1 株の増殖は観察できなかった(図 8)。この結果は、これまでの a924E1 株が KA31a 株と比較してより高い圧力感受性能を有するという報告を支持した(Shigematsu *et al.*, 2010a)。また、10 mM 以上のアルギニンを添加して培養した場合、a924E1 株の圧力耐性の向上が確認された(図 8)。これらの結果から、アルギニンが酵母細胞に対して高圧耐性に寄与していることを明らかとした。

以上、本研究において、ミトコンドリア DNA の *COXI* 遺伝子が圧力耐性に寄与することが明らかとなった。圧力感受性変異株 a924E1 株は、*COXI* 遺伝子の欠失によるミトコンドリア機能の低下により、TCA サイクルやアルギニン生合成に関連する代謝機能が低下したことが示された(図 7)。本研究では、これらの結果から引き起こされたアルギニンの枯渇が圧力感受性能を付与した一因であることを明らかとした。また、本研究は、酸化や凍結ストレス耐性に寄与するアルギニンが、高圧ストレス耐性に対しても寄与することを示す初めての報告である。本研究の成果は、*COXI* 遺伝子欠失ミトコンドリアを産業用酵母株に供与することで、圧力感受性産業用酵母株を容易に作出することが可能であることを示唆し、PReF 技術の確立のための足掛かりとなることが期待できる。

第 6 章 謝辞

岐阜大学 岩橋 均 教授には、本研究の全般および本博士論文の執筆におきましてご指導を賜りました。研究に対する考え方、論文や申請書の構成、実用化研究におけるコスト意識等、独特のユーモアを交えて温かくご指導いただきました。また、ナノ粒子や動物実験等の高圧研究以外の研究、学会の運営の補助等を通じて他では経験することが難しいことを学ぶ機会を与えていただきました。心より御礼申し上げます。ありがとうございました。

岐阜大学 鈴木 徹 教授には、本研究の遂行や中間発表にてご助言いただき、本博士論文の構成および審査等におきましてご指導を賜りました。また、論文の作成やドクターコースの合宿等の様々イベントで温かくご指導いただきました。厚く御礼申し上げます。

静岡大学 小川 直人 教授には、本研究の遂行や中間発表にてご助言いただき、本博士論文の構成および審査等におきましてご指導を賜りました。また、研究の進め方や実験の手技、手法につきまして温かくご指導いただきました。厚く御礼申し上げます。

新潟薬科大学 重松 亨 教授、井口 晃徳 助教には、本研究で用いた *S. cerevisiae* KA31a 株および a924E1 株、それらの二倍体株等を分与していただき

ました。また、本研究の遂行および論文の執筆におきまして適切なお助言を賜りました。厚く御礼申し上げます。

産業技術総合研究所の高橋 淳子 博士、食品総合研究所の鈴木 忠宏 博士には、DNA マイクロアレイの解析につきましてご指導を賜りました。深く御礼申し上げます。

岐阜大学 中川 智行 教授、中村 浩平 准教授には、ミトコンドリアの染色実験および蛍光顕微鏡の観察におきましてご指導を賜りました。深く御礼申し上げます。

岐阜大学 岩間 智徳 准教授には、研究の遂行および研究生活におきまして適切なお助言を賜りました。深く御礼申し上げます。

お名前をお挙げできませんでしたが、学会等で本研究につきまして多くの先生方にご助言を賜りました。深く御礼申し上げます。

最後に、長い学生生活を支えていただいた両親と祖父母、弟に感謝いたします。ありがとうございました。

第 7 章 参考文献

- [1] Abe, F., and Kato, C. (1999) Barophysiology. *In*: Horikoshi, K., and Tsuji, K. [eds.] *Extremophile in Deep-sea Environments*, pp. 227-248. Springer, Berlin.
- [2] Adegoke, G. O., and Babalola, A. K. (1988) Characteristics of microorganisms of importance in the fermentation of fufu and ogi - two Nigerian foods. *J. Appl. Bacteriol.* 65, 449-453.
- [3] Aertsen, A., Houdt, R. V., Vanoirbeek, K., and Michiels, C. W. (2004) An SOS response induced by high pressure in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 186, 6133-6141.
- [4] Basak, S., Ramaswamy, H. S., and Piette, J. P. G. (2002) High pressure destruction kinetics of *Leuconostoc mesenteroides* and *Saccharomyces cerevisiae* in single strength and concentrated orange juice. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 3, 223-231.
- [5] Brauer, M. J., Saldanha, A. J., Dolinski, K., and Botstein, D. (2005) Homeostatic adjustment and metabolic remodeling in glucose-limited yeast cultures. *Mol. Biol. Cell* 16, 2503-17.
- [6] Bravim, F., Lippman S. I., Silva, L. F. D., Souza, D. T., Fernandes, A. A. R., Masuda, C. A., Broach, J. R., Fernandes, P. M. B. (2012) High hydrostatic pressure activates gene expression that leads to ethanol production enhancement in a *Saccharomyces*

cerevisiae distillery strain. Appl. Microbiol. Biotechnol. 97, 2093-2107.

- [7] Bridgman, P. W. (1912) Water, in the liquid and five solid forms, under pressure. Proc. Amer. Acad. Arts Sci. 47, 439-558.
- [8] Bridgman, P. W. (1914) The coagulation of albumen by pressure. J. Biol. Chem. 19, 511-512.
- [9] Chong, P. L., Fortes, P. A., and Jameson, D. M. (1985) Mechanisms of inhibition of (Na, K)-ATPase by hydrostatic pressure studied with fluorescent probes. J. Biol. Chem. 260, 14484-14490.
- [10] Egilmez, N. K., and Jazwinski, S.M. (1989) Evidence for the involvement of a cytoplasmic factor in the aging of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 171, 37-42.
- [11] Fernandes, P. M., Domitrovic, T., Kao, C. M., Kurtenbach, E. (2004) Genomic expression pattern in *Saccharomyces cerevisiae* cells in response to high hydrostatic pressure. FEBS Lett. 556, 153–6.
- [12] Freitas, J. M. D., Bravim, F., Buss, D. S., Lemos, E. M., Fernandes, A. A. R., and Fernandes, P. M. B. (2012) Influence of cellular fatty acid composition on the response of *Saccharomyces cerevisiae* to hydrostatic pressure stress. FEMS Yeast Res. 12, 871-878.

- [13]福原 宏 (1986) 酵母ミトコンドリア遺伝子の構造と機能. 化学と生物, 24, 707-716.
- [14]福崎 英一郎 (2013) メタボロミクスの現状と可能性, 福崎 英一郎[eds.] メタボロミクスの最先端技術と応用<普及版>, 第 1 版, 1-10. シーエムシー出版, 東京.
- [15]Galloway, J. N., Townsend, A. R., Erisman, J. W., Bekunda, M., Cai, Z., Freney, J. R., Martinelli, L. A., Seitzinger, S. P., and Sutton, M. A. (2008) Transformation of the Nitrogen Cycle: Recent Trends, Questions, and Potential Solutions. *Science* 320, 889-892.
- [16]Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J. D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E. J., Mewes, H. W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., and Oliver, S. G. (1996) Life with 6000 Genes. *Science* 274, 546-567.
- [17]Hamada, H., and Shiraki, K. (2007) L-Argininamide improves the refolding more effectively than L-arginine. *J. Biotechnol.* 130, 153-160.
- [18]Haney, S. A., Xu, J., Lee, S. Y., Ma, C. L., Duzic, E., Broach, J., and Manfredi, J. (2001) Genetic selection in *Saccharomyces* of mutant mammalian adenylyl cyclases with elevated basal activities *Mol. Gen. Genet.* 265, 1120-1128.

- [19]Hartwell, L. H. (2004) Yeast and Cancer. *Biosci. Rep.* 24, 523-544.
- [20]Hasegawa, T., Hayashi, M., Nomura, K., Hayashi, M., Kido, M., Ohmori, T., Fukuda, M., Iguchi, A., Ueno, S., Shigematsu, T., Hirayama, M., and Fujii, T. (2012) High-throughput method for kinetic analysis on high pressure inactivation of microorganisms using microplate. *J. Biosci. Bioeng.* 113, 788–91.
- [21]Hashizume, C., Kimura, K., and Hayashi, R. (1995) Kinetic Analysis of Yeast Inactivation by High Pressure Treatment at Low Temperatures. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59, 1455-1458.
- [22]Hayashi, R., Kawamura, Y., and Kunugi, S. (1987) Introduction of High Pressure to Food Processing: Preferential Proteolysis of β -Lactoglobulin in Milk Whey. *J. Food Sci.* 52: 1107–1108.
- [23]林 力丸 (1991) 食品への圧力加工—加工食品の物性. 熱物性 5, 284-290.
- [24]林 力丸 (2008) 生物に与える圧力効果と加圧食品の小史. 高圧力の科学と技術 18, 70-377.
- [25]Hite, B. (1899) The effect of pressure in the preservation of milk. *Bull. W. VA U. Agricultural Experiment Station* 58: 15-35.
- [26]Hite, B., Giddings, N. J., and Weakley, Jr. C. E. (1914) The effect of pressure on certain microorganisms encountered in the preservation of fruits and veges. *Bull. W.*

VA U. Agricultural Experiment Station. 146: 1-67.

[27]Hohmann, S. (2002) Osmotic Stress Signaling and Osmoadaptation in Yeasts.

Microbiol. Mol. Biolo. Rev. 66, 300-372.

[28]堀江 雄, 木村 邦男, 井田 雅夫 (1991) 加圧法によるジャム製造に関する研

究. 日本農芸化学会誌 65, 975-980.

[29]Ishii, S. (2002) Some microbiological findings on kumiss and their functions. J.

Brewing Society of Japan 97, 210-215.

[30]Iwahashi, H., Kaul, S. C., Obuchi, K., and Komatsu, Y. (1991) Induction of

barotolerance by heat shock treatment in yeast. FEMS Microbiol. Lett. 80, 325-328.

[31]岩橋 均 (2002) DNA マイクロアレイ, DNA チップーこれからの新技術ー. 環

境技術 31, 679-685.

[32]Iwahashi, H., Shimizu, H., Odani, M., and Komatsu, Y. (2003) Piezophysiology of

genome wide gene expression levels in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.

Extremophiles 7, 291-98.

[33]Iwahashi, H., Odani, M., Ishidou, E., and Kitagawa, E. (2005) Adaptation of

Saccharomyces cerevisiae to high hydrostatic pressure causing growth inhibition.

FEBS Lett. 579, 2847-52.

[34]Iwahashi, H., Kitagawa, E., Suzuki, Y., Ueda, Y., Ishizawa, Y., Nobumasa, H.,

- Kuboki, Y., Hosoda, H., and Iwahashi, Y. (2007) Evaluation of toxicity of the mycotoxin citrinin using yeast ORF DNA microarray and Oligo DNA microarray. *BMC Genomics* 8, 1-13.
- [35]Iwahashi, Y., Kitagawa, E., and Iwahashi, H. (2008) Analysis of mechanisms of T-2 toxin toxicity using yeast DNA microarrays. *Int. J. Mol. Sci.* 9, 2585-2600.
- [36]Jaenicke, L. (2007) Centenary of the award of a Nobel Prize to Eduard Buchner, the father of biochemistry in a test tube and thus of experimental molecular bioscience. *Angew. Chem. Int. Edit.* 46: 6776-6782.
- [37]Kasuga, K. (1998) Outline of the results of the food industry extrahigh-pressure application technology research association. *Food and Technology* 320: 15-17.
- [38]Kawarai, T., Arai, S., Furukawa, S., Ogihara, H., and Yamasaki, M. (2006) High-hydrostatic- pressure treatment impairs actin cables and budding in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biosci. Bioeng.* 101, 515-518.
- [39]木村 進 (1993) 食品産業の未来を拓く－高压技術と高密度培養. 食品産業超高压利用技術研究組合[Eds.] 健康産業新聞, 東京.
- [40]Kobori, H., Sato, M., Tameike, A., Hamada, K., Shimada, S., Osumi, M. (1995) Ultrastructural effects of pressure stress to the nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*: a study by immunoelectron microscopy using frozen thin sections. *FEMS Microbiol.*

Lett. 132, 253.

[41]Koseki, S., and Yamamoto, K. (2006) Recovery of *Escherichia coli* ATCC 25922 in phosphate buffered saline after treatment with high hydrostatic pressure. Int. J. Food Microbiol. 110, 108-111.

[42]Kurita, S., Kitagawa, E., Kim, C. H., Momose, Y., and Iwahashi, H. (2002) Studies on the antimicrobial mechanisms of capsaicin using yeast DNA microarray. Bios. Biot. Biochem. 66: 532-536.

[43]Lee, J.W., Cha, D.S., Park, H.J., and Hwang, K.T. (2003) Effects of CO₂ absorbent and high-pressure treatment on the shelf-life of packaged Kimchi products. Int. J. Food Sci. Technol. 38, 519-524.

[44]Liti, G., Carter, D. M., Moses, A.M., Warringer, J., Parts, L., James, S. A., Davey, R. P., Roberts, I. N., Burt, A., Koufopanou, V., Tsai, I. J., Bergman, C. M., Bensasson, D., O'Kelly, M. J. T., Oudenaarden, A. V., Barton, D. B. H., Bailes, E., Nguyen, A. N., Jones, M., Quail, M. A., Goodhead, I., Sims, S., Smith, F., Blomberg, A., Durbin, R., and Louis, E. J. (2009) Population genomics of domestic and wild yeasts. Nature 458, 337-341.

[45]Lyutova, E. M., Kasakov, A. S., and Gurvits, B.Y. (2007) Effects of Arginine on Kinetics of Protein Aggregation Studied by Dynamic Laser Light Scattering and

Turbidimetry Techniques. *Biotechnol. Prog.* 23, 1411-1416.

[46] Matsuoka, H., Suzuki, Y., Iwahashi, H., Arao, T., Suzuki, Y., and Tamura, K. (2005)

The biological effects of high-pressure gas on the yeast transcriptome. *Braz. J. Med.*

Biol. Res. 38, 1267-1272.

[47] Mitsuoka, T., Makita, S., and Asano, H. (2002) The characteristics of lactic acid

bacteria isolated from Masai fermented milk in Kenya. *Biosci. Microflora* 21, 171-

178.

[48] Mohammed, S. I., Steenson, L. S., and Kireleis, A. W. (1991) Isolation and

characterization of microorganisms associated with the traditional sorghum

fermentation for production of Sudanese kisra. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 2529-

2533.

[49] Momose, Y., and Iwahashi, H. (2001) Bioassay of cadmium using DNA microarray:

Genome-wide expression patterns of *Saccharomyces cerevisiae* response to cadmium.

Env. Tox. Chem. 20: 2353-2360.

[50] Morita, Y., Nakamori, S., and Takagi, H. (2002) Effect of proline and arginine

metabolism on freezing stress of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biosci. Bioeng.* 94,

390-394.

[51] Murata, Y., Watanabe, T., Sato, M., Momose, Y., Nakahara, T., Oka, S., and Iwahashi,

- H. (2003) DMSO exposure facilitates phospholipid biosynthesis and cellular membrane proliferation in yeast cells. *J. Biol. Chem.* 278: 33185-33193.
- [52]Murokoshi, A. (2004) Development of a device for shucking oysters. *Nippon Suisan Gakk.*, 70: 671-673.
- [53]Nagai, S. (1959) Induction of the respiration-deficient mutation in yeast by various synthetic dyes. *Science* 130, 1188–1189.
- [54]Nishimura, A., Kotani, T., Sasano, Y., and Takagi, H. (2010) An antioxidative mechanism mediated by the yeast *N*-acetyltransferase *Mpr1*: oxidative stress-induced arginine synthesis and its physiological role. *FEMS Yeast Res.* 10, 687-698.
- [55]野村 一樹, 岩橋 均 (2013) 高圧下における酵母細胞の死. *高圧力の科学と技術* 23, 53-58.
- [56]Nomura, K., and Iwahashi, H. (2014) Pressure-Regulated Fermentation: A revolutionary approach that utilizes hydrostatic pressure. *Reviews in Agricultural Science* 2, 1-10.
- [57]Odani, M., Komatsu, Y., Oka, S., and Iwahashi, H. (2003) Screening of genes that respond to cryopreservation stress using yeast DNA microarray. *Cryobiol.* 47: 155-164.
- [58]大森 丘, 重久 保 (1990) 畜産に及ぼす高圧作用. *In: 林 力丸[eds.] 加圧食*

品, 第 1 版 pp. 131-139. さんえい出版, 京都.

[59]Ohshima, S., Nomura, K., and Iwahashi, H. (2013) Clarification of the recovery mechanism of *Escherichia coli* after hydrostatic pressure treatment. High Pressure Res. 33, 308-314.

[60]Okada, S., Ishikawa, M., Yoshida, I., Uchimura, T., Ohara, N., and Kozaki, M. (1992) Identification and characteristics of lactic acid bacteria isolated from sour dough sponges. Biosci. Biotech. Biochem. 56, 572-575.

[61]Oyewole, O. B., and Odunfa, S. A. (1988) Microbiological studies on cassava fermentation for 'lafun' production. Food Microbiol. 5, 125-133.

[62]Pascal, B. (1653) 松浪信三郎訳 (1953) パスカル科学論文集, 第 4 版. Pp. 1-203. 岩波書店, 東京.

[63]Patrignani, F., Vannini, L., Kamdem, S. L. S., Lanciotti, L., and Guerzoni, M. E. (2009) Effect of high pressure homogenization on *Saccharomyces cerevisiae* inactivation and physico-chemical features in apricot and carrot juices. Int. J. Food Microbiol. 136, 23-31.

[64]Pope, D. H., and Berger, L. R. (1973) Inhibition of metabolism by hydrostatic pressure: What limits microbial growth? Arch. Microbiol. 93, 367-370.

[65]Roger, H. (1892) *Action des hautes pressions sur quelques bactéries*. C. R. Hebd.

Acad. Sci. 114.

[66] Roger, H. (1895) *Action des hautes pressions sur quelques bactéries*. Arch. Physiol. Norm. Path. 7:12–17.

[67] Shigematsu, T., Nasuhara, Y., Nagai, G., Nomura, K., Ikarashi, K., Hayashi, M., Ueno, S., and Fujii, T. (2010a) Isolation and characterization of barosensitive mutants of *Saccharomyces cerevisiae* obtained by UV mutagenesis. J. Food Sci. 75, M509-M514.

[68] Shigematsu, T., Nomura, K., Nasuhara, Y., Ikarashi, K., Nagai, G., Hirayama, M., Hayashi, M., Ueno, S., and Fujii, T. (2010b) Thermosensitivity of a barosensitive *Saccharomyces cerevisiae* mutant obtained by UV mutagenesis. High Pressure Res. 30, 524-529.

[69] 重松 亨 (2013) 高圧力下現象の特徴と化学反応. *In*: 重松 亨, 西海 理之 [eds.] 進化する食品高圧加工技術ー基礎から最新の応用事例までー, 第 1 版 pp. 11-16. エヌ・ティー・エス, 東京.

[70] Sirisattha, S., Momose, Y., Kitagawa, K. and Iwahashi, H. (2004) Genomic profile of Roundup treatment of yeast using DNA microarray analysis. Environ. Sci. 11: 313-323.

[71] 鈴木 敦士 (2011) 新潟県がリードする食品への高圧加工処理技術. New

Food Industry 53, 47-56.

[72]鈴木 敦士 (2013) 食品加工における先端加工技術と高圧技術の最新事情.

In: 重松 亨, 西海 理之[eds.] 進化する食品高圧加工技術－基礎から最新の
応用事例まで－, 第1版 pp. 11-16. エヌ・ティー・エス, 東京.

[73]Tamura, K., Shimizu, T., and Kourai, H. (1992) Effects of ethanol on the growth and
elongation of *Escherichia coli* under high pressure up to 40 MPa. FEMS Microbiol.

Lett. 99, 321-324.

[74]Tanaka, Y., Higashi, T., Rakwal, R., Wakida, S., and Iwahashi, H. (2007) J. Pharm.

Biomed. Anal. 44, 608-613.

[75]田中 喜秀, 東 哲司, Rakwal, R., 柴藤 淳子, 脇田 慎一, 岩橋 均 (2013) ゲ

ノミクスとメタボロミクスの生物学的解析技術としての融合, 福崎 英一郎

[eds.] メタボロミクスの最先端技術と応用<普及版>, 第1版, pp. 195-203. シ

ーエムシー出版, 東京.

[76]辻田純二, 鈴木邦宏 (1990) 高圧処理技術を利用した食肉加工品. *In:* 林 力

丸[eds.] 加圧食品, 第1版 pp. 123-130. さんえい出版, 京都.

[77]Tsumoto, K., Umetsu, M., Kumagai, I., Ejima, D., Philo, J. S., and Arakawa, T.

(2004) Role of Arginine in Protein Refolding, Solubilization, and Purification.

Biotechnol. Prog. 20, 1301-1308.

- [78]超高压技術の食品等への応用に関する研究会 (1991) 高压利用に関する研究成果報告書. pp. 1-88. 双葉印刷, 新潟.
- [79]Vogel, R. F., Pavlovic, M., Hörmann, S., and Ehrmann, M. A. (2005) High pressure-sensitive gene expression in *Lactobacillus sanfranciscensis*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 38, 1247-1252.
- [80]山本 和貴, 小関 成樹 (2009) 食品高压加工技術. 食糧—その科学と技術— 47, 37-50.
- [81]山崎 彬, 笹川 秋彦 (2000) 高压を利用した米加工食品の開発. 日本農芸化学会誌 74, 619-623.
- [82]Yasokawa, D., Murata, S., Kitagawa, E., Iwahashi, Y., Nakagawa, R., Hashido, T., and Iwahashi, H. (2008) Mechanisms of copper toxicity in *Saccharomyces cerevisiae* determined by microarray analysis. *Environ Toxicol.* 23, 599-606.
- [83]Yasokawa, D., Murata, S., Iwahashi, Y., Kitagawa, E., Kishi, K., Okumura, Y., and Iwahashi, H. (2010) DNA microarray analysis suggests that zinc pyrithione causes iron starvation to the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biosci. Bioeng.* 109, 479-486.
- [84]Yasokawa, D. and Iwahashi, H. (2010) Toxicogenomics using yeast DNA microarrays. *J. Biosci. Bioeng.* 110, 511-522.

[85] Yayanos, A. A., and Pollard, E. C. (1969) A study of the effects of hydrostatic pressure on macromolecular synthesis in *Escherichia coli*. *Biophys. J.* 9, 1464–82.

[86] ZoBell, C. E. and Cobet, A. B. (1964) Filament formation by *Escherichia coli* at increased hydrostatic pressures. *J. Bacteriol.* 87, 710-719.

第 8 章 图表

Table 1. *Saccharomyces cerevisiae* strains used in this study. ρ^+ ; normal respiration strain, ρ^- ; respiration-deficient strain.

Strain	Genotype	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> KA31a	<i>MATa his3 leu2 trp1 ura3</i>	Parent ρ^+ type haploid
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> a924E1	<i>MATa his3 leu2 trp1 ura3</i>	Barosensitive mutant ρ^- type haploid
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> KA31 α	<i>MATα his3 leu2 trp1 ura3</i>	Wild type ρ^+ type haploid
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> C208	<i>MATa/α his3 leu2 trp1 ura3</i>	ρ^- type diploid
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> E201	<i>MATa/α his3 leu2 trp1 ura3</i>	ρ^+ type diploid
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> E208	<i>MATa/α his3 leu2 trp1 ura3</i>	ρ^- type diploid
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> F102	<i>MATa/α his3 leu2 trp1 ura3</i>	ρ^- type diploid
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> F108	<i>MATa/α his3 leu2 trp1 ura3</i>	ρ^+ type diploid

Table 2. Sequences of oligonucleotide primers used in this study.

Gene name	Gene function	F-primer	R-primer	
ALD3	Aldehyde dehydrogenase	5'-ATGGGTGAAACCATTCCATT-3'	5'-CCATGTGGTTCCCTAAAGCT-3'	Upregulated
CAR1	Catabolism of arginine	5'-ACAGATTCCCCTTGACCTTG-3'	5'-ACACCATCGACGTCATAGGA-3'	Upregulated
MRP51	Mitochondrial ribosomal protein	5'-CGTCTGAGGATGAGTCTCA-3'	5'-CCAGCCATTATTGTCGTTG-3'	Upregulated
FBP1	Fructose-1,6-bisphosphatase	5'-TTGATCGTTTTTCCACAAAA-3'	5'-ATCCGTACATGGCATAGCAA-3'	Downregulated
ICL1	Isocitrate lyase	5'-GGTTGGCAGTGTTCATCAAC-3'	5'-CTAGCCATTGGTCAGGGAAT-3'	Downregulated
SFC1	Succinate-fumarate carrier	5'-TCACCGAAGCTGTTCTTGTC-3'	5'-TTTGGCTTTGGTGTGCATT-3'	Downregulated
COX1	Cytochrome c oxidase	5'-TTTAGTGGTATGGCAGGAACAG-3'	5'-CGTAGTAGTATCGTGAATGCTA-3'	COX1 gene 1
COX1	Cytochrome c oxidase	5'-GCTACAGATACAGCATTTCCAAGA-3'	5'-CACACCCTCCTGATACTTCAAA-3'	COX1 gene 2
15S rRNA	15S ribosomal RNA	5'-GAAAAGGGGGTGGGAGTAAA-3'	5'-GATTCCGATGTGCATGTCC-3'	Mitochondria
21S rRNA	21S ribosomal RNA	5'-CGCACTTTCAGAAAACGATA-3'	5'-ATAATGACGCCCCATCAAAA-3'	Mitochondria
COX1	Cytochrome c oxidase	5'-ATGCGGGGAAAACCCCTAAAGT-3'	5'-CCCTGTACCAGCACCTGATT-3'	Mitochondria
COX3	Cytochrome c oxidase	5'-TCCTTTCCTGGTTTATTCTGAGC-3'	5'-TACCTGCGATTAAAGGCATGA-3'	Mitochondria
COB	Cytochrome B	5'-GGGTTCTTTGATGCTGATGG-3'	5'-TATGGGAGTCCCACAAAAGC-3'	Mitochondria
CDC48	Cell division cycle	5'-TCCAAGCACATCAAGAAACC-3'	5'-CCTCCACAACAATCTCGTG-3'	Control
ARG8	N-acetyl-ornithine aminotransferase	5'-ACCAAAAAGGACGAGATTGC-3'	5'-ACTCAGCACCAAGCATCAAA-3'	Downregulated
ARG3	Ornithine carbamoyltransferase	5'-TGTC AACCCACAGCATCCAC-3'	5'-TCACACGGGCAAAAATACAT-3'	Downregulated
ARG1	Argininosuccinate synthetase	5'-GCCTTTGGATGTTTTCTTGG-3'	5'-TCTGGGGTGAAGTAGGAAACC-3'	Downregulated
ARG4	Arginosuccinate lyase	5'-ACTATGGGGTGGGAGATTCA-3'	5'-CGTAAGGATGACCAGCAAGA-3'	Downregulated
ACT1	Actin	5'-ATTGCCGAAAGAATGCAAAAAGG-3'	5'-CGCACAAAAGCAGAGATTAGAAACA-3'	Control

Table 3. Functional categories of upregulated genes in the mutant strain a924E1. *p*-values indicate the statistical significance of the observed upregulation of genes in each category.

Functional Category	Number of Total genes	Number of Altered genes	Percentage of Altered genes	<i>P</i> value
Energy	367	45	12.3%	0.003
Biogenesis of cellular components	862	88	10.2%	0.012
Unclassified proteins	1393	128	9.2%	0.042
Metabolism	1514	137	9.0%	0.085
Protein synthesis	480	42	8.8%	0.341
Cell fate	273	22	8.1%	1.000
Interaction with the environment	463	37	8.0%	1.000
Protein fate	1154	91	7.9%	1.000
Cellular transport	1038	76	7.3%	1.000
Cell type differentiation	452	33	7.3%	1.000
Cell cycle and DNA processing	1012	73	7.2%	1.000
Regulation of metabolism	253	17	6.7%	1.000
Binding proteins	1049	66	6.3%	1.000
Cell rescue, defense and virulence	554	34	6.1%	1.000
Signal transduction mechanism	234	13	5.6%	1.000
Transcription	1077	57	5.3%	1.000
Development	69	3	4.3%	1.000
Transposable elements	120	3	2.5%	1.000

Table 4. Locational categories of upregulated genes in the mutant strain a924E1. *p*-values indicate the statistical significance of the observed upregulation of genes in each category.

Locational Category	Number of Total genes	Number of Altered genes	Percentage of Altered genes	<i>P</i> value
Mitochondria	1047	124	11.8%	0.001>
Cell wall	44	10	22.7%	0.002
Extracellular	54	11	20.4%	0.004
Bud	150	17	11.3%	0.104
Cell periphery	216	23	10.6%	0.113
Endosome	58	7	12.1%	0.192
Cytoskeleton	204	20	9.8%	0.226
Microsomes	5	1	20.0%	0.347
Ambiguous	237	21	8.9%	0.381
Integral membrane / endomembranes	172	15	8.7%	0.436
Plasma membrane	186	15	8.1%	0.454
Transport vesicles	141	11	7.8%	1.000
ER	552	40	7.2%	1.000
Punctate composite	140	10	7.1%	1.000
Cytoplasm	2844	190	6.7%	1.000
Vacuole	284	19	6.7%	1.000
Golgi	158	10	6.3%	1.000
Nucleus	2136	131	6.1%	1.000
Peroxisome	52	2	3.8%	1.000
Lipid particles	27	1	3.7%	1.000

Table 5. Functional categories of downregulated genes in the mutant strain a924E1. *p*-values indicate the statistical significance of the observed downregulation of genes in each category.

Functional Category	Number of Total genes	Number of Altered genes	Percentage of Altered genes	<i>P</i> value
Protein synthesis	480	155	32.3%	0.001>
Transcription	1077	155	14.4%	0.001>
Binding proteins	1049	148	14.1%	0.001>
Energy	367	48	13.1%	0.071
Metabolism	1514	174	11.5%	0.111
Development	69	8	11.6%	0.453
Cell rescue, defense and virulence	554	57	10.3%	1.000
Cell fate	273	24	8.8%	1.000
Cellular transport	1038	90	8.7%	1.000
Cell cycle and DNA processing	1012	83	8.2%	1.000
Protein fate	1154	85	7.4%	1.000
Cell type differentiation	452	30	6.6%	1.000
Regulation of metabolism	253	16	6.3%	1.000
Biogenesis of cellular components	862	52	6.0%	1.000
Interaction with the environment	463	27	5.8%	1.000
Signal transduction mechanism	234	13	5.6%	1.000
Unclassified proteins	1393	74	5.3%	1.000
Transposable elements	120	5	4.2%	1.000

Table 6. Locational categories of downregulated genes in the mutant strain a924E1. *p*-values indicate the statistical significance of the observed downregulation of genes in each category.

Locational Category	Number of Total genes	Number of Altered genes	Percentage of Altered genes	<i>P</i> value
Cytoplasm	2844	386	13.6%	0.001>
Nucleus	2136	270	12.6%	0.001>
Peroxisome	52	7	13.5%	0.313
Microsomes	5	1	20.0%	0.430
Plasma membrane	186	16	8.6%	1.000
Vacuole	284	24	8.5%	1.000
ER	552	46	8.3%	1.000
Mitochondria	1047	86	8.2%	1.000
Cell periphery	216	17	7.9%	1.000
Lipid particles	27	2	7.4%	1.000
Integral membrane / endomembranes	172	11	6.4%	1.000
Golgi	158	8	5.1%	1.000
Cell wall	44	2	4.5%	1.000
Bud	150	6	4.0%	1.000
Ambiguous	237	9	3.8%	1.000
Extracellular	54	2	3.7%	1.000
Punctate composite	140	5	3.6%	1.000
Cytoskeleton	204	7	3.4%	1.000
Transport vesicles	141	4	2.8%	1.000

Table 7. Confirmation of DNA microarray analysis results.

ALD3, *CARI*, and *MRP51* genes of the mutant strain were upregulated compared to those of the parent strain, and *FBP1*, *ICL1*, and *SFC1* genes were downregulated. Relative expression level of the upregulated genes of the mutant strain was higher than that of the parent strain, and relative expression level of the downregulated genes was lower. Relative expression level of the *COX1* gene was very low or it could not be detected. The *CDC48* gene was amplified as a control. Reproducibility was confirmed by performing at least 3 independent experiments. N.D.; not detected. *; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$.

Gene name	Relative expression level		
	KA31a	a924E1	
<i>ALD3</i>	1.00	4.82 ± 1.09 *	Upregulated gene
<i>CARI</i>	1.00	2.70 ± 0.59 *	Upregulated gene
<i>MRP51</i>	1.00	2.57 ± 0.62 *	Upregulated gene
<i>FBP1</i>	1.00	0.03 ± 0.03 **	Downregulated gene
<i>ICL1</i>	1.00	0.12 ± 0.13 **	Downregulated gene
<i>SFC1</i>	1.00	0.02 ± 0.02 **	Downregulated gene
<i>COX1</i>	1.00	< 0.01 **	<i>COX1</i> gene 1
<i>COX1</i>	1.00	N.D.	<i>COX1</i> gene 2
<i>CDC48</i>	1.00	1.12 ± 0.53	Control

Table 8. Total detected metabolites. Metabolomics was carried out with three independent experiments (*; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$, ***; $p < 0.001$). N.A.; Not Available.

Compound name	Fold	P-value		Compound name	Fold	P-value	
ATP	0.01	0.109		Sarcosine	0.19	N.A.	
Gln	0.02	0.009	**	Mevalolactone	0.19	0.013	*
Guanidoacetic acid	0.02	0.012	*	p-Aminobenzoic acid	0.19	0.010	**
GDP-glucose	0.03	0.037	*	Imidazolelactic acid	0.20	0.001>	***
UDP-N-acetylglucosamine	0.06	0.061		2-Hydroxyvaleric acid	0.20	0.069	
N-Acetylleucine	0.06	0.015	*	N-Acetylornithine	0.20	0.001>	***
Butyric acid	0.07	0.090		3-Hydroxypropionic acid	0.20	0.001>	***
Citric acid	0.07	0.051		Isovaleric acid	0.21	0.096	
3-Hydroxy-3-methylglutaric acid	0.07	0.076		Thiamine diphosphate	0.21	0.054	
Mevalonic acid	0.07	0.071		Tyr	0.21	0.008	**
Creatinine	0.08	0.007	**	CMP-N-acetylneuraminate	0.21	0.066	
Anthranilic acid	0.09	0.013	*	Acetoacetamide	0.21	0.006	**
2-Isopropylmalic acid	0.09	0.074		3-Methylhistidine	0.21	0.006	**
Asp	0.09	0.012	*	Glutathione (GSSG)_divalent	0.22	0.028	*
Uridine	0.11	0.013	*	Glu	0.22	0.005	**
Fructose 6-phosphate	0.11	0.051		Phosphoenolpyruvic acid	0.22	0.007	**
Sucrose 6'-phosphate	0.11	0.012	*	Hydroxyproline	0.24	0.013	*
Pro	0.11	0.010	**	O-Acetylcarnitine	0.25	0.009	**
Leu	0.12	0.005	**	N-Acetylasparagine	0.26	0.018	*
Argininosuccinic acid	0.13	0.016	*	Carnosine	0.26	0.011	*
Betaine	0.13	0.002	**	2-Methylserine	0.28	0.004	**
Phosphorylcholine	0.14	0.019	*	Val	0.28	0.006	**
Ophthalmic acid	0.14	0.055		N6-Acetyllysine	0.28	0.022	*
2-Hydroxy-4-methylvaleric acid	0.15	0.043	*	N-Acetylhistidine	0.30	0.044	*
2-Aminoisobutyric acid	0.15	0.002	**	Cystine	0.33	0.066	
3-Hydroxybutyric acid	0.15	0.012	*	N-Acetyllysine	0.33	0.150	
Malic acid	0.15	0.059		Cysteine glutathione disulfide	0.33	0.074	
1-Methyladenosine	0.15	0.014	*	2-Amino adipic acid	0.33	0.105	
Adenine	0.16	0.021	*	Carboxymethyllysine	0.33	0.049	*
cis-4-Hydroxyproline	0.16	0.006	**	N-Ethylglycine	0.33	0.001>	***
Isobutyrylcarnitine	0.16	0.042	*	His	0.36	0.001>	***
Ile	0.17	0.001>	***	Ornithine	0.37	0.030	*
N-Acetylglutamic acid	0.18	0.067		Octanoic acid	0.37	N.A.	

Compound name	Fold	P-value		Compound name	Fold	P-value	
Isovalerylcarnitine	0.37	0.013	*	SDMA	0.66	0.136	
Nicotinamide	0.38	0.045	*	Heptanoic acid	0.67	0.166	
S-Methylcysteine	0.39	0.003	**	Citrulline	0.67	0.114	
N-Acetylglycine	0.40	0.023	*	Thiamine	0.67	0.017	*
Gluconic acid	0.40	0.022	*	S-Adenosylmethionine	0.69	0.080	
Creatine	0.40	0.003	**	FAD_divalent	0.72	0.398	
5'-Deoxy-5'-methylthioadenosine	0.40	0.006	**	Lys	0.73	0.016	*
4-Guanidinobutyric acid	0.41	0.054		Trp	0.73	0.063	
N-Methylalanine	0.42	N.A.		Carbachol	0.74	0.539	
Isoniazid	0.43	N.A.		Thr	0.75	0.082	
Glycerophosphocholine	0.43	0.001>	***	Thiamine phosphate	0.76	0.549	
Arg	0.44	0.001>	***	Ala	0.77	0.085	
Trimethylamine	0.45	N.A.		Glyceric acid	0.78	0.254	
Pyridoxamine	0.47	0.205		p-Toluic acid	0.78	0.441	
Dyphylline	0.47	0.009	**	Pelargonic acid	0.78	0.204	
Glutathione (GSH)	0.48	0.615		Pyridoxamine 5'-phosphate	0.79	0.158	
O-Acetylhomoserine	0.48	N.A.		γ-Butyrobetaine	0.81	0.008	**
NAD+	0.48	0.057		4-Methyl-5-thiazoleethanol	0.84	0.270	
β-Ala-Lys	0.48	0.124		NMN	0.84	0.096	
N6-Methyllysine	0.49	0.001>	***	Cys	0.87	0.844	
Asn	0.49	0.019	*	5-Hydroxylysine	0.90	0.298	
γ-Glu-2-aminobutyric acid	0.50	N.A.		FMN	0.92	0.733	
Theobromine	0.50	0.089		5-Oxohexanoic acid	0.93	0.737	
S-Lactoylglutathione	0.51	0.011	*	Homoserinelactone	0.95	0.753	
Ser	0.52	0.109		Imidazole-4-acetic acid	0.96	0.601	
Thiaproline	0.53	0.253		N-Acetylputrescine	0.98	0.853	
ADMA	0.54	0.007	**	GDP	0.98	0.951	
Xanthine	0.56	0.064		Lauric acid	0.99	0.955	
N6,N6,N6-Trimethyllysine	0.58	0.007	**	Urea	1.0	0.999	
5-Aminovaleric acid	0.58	0.003	**	11-Aminoundecanoic acid	1.0	0.916	
1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid	0.58	0.398		Morpholine	1.0	0.930	
Nω-Methylarginine	0.58	0.035	*	3-Aminopropane-1,2-diol	1.0	0.289	
Hexanoic acid	0.59	0.223		N8-Acetylspermidine	1.1	0.798	
NADP+	0.60	0.271		NADH	1.1	0.713	
Phe	0.60	0.004	**	N-Acetylglucosamine 6-phosphate	1.1	0.782	
S-Methylglutathione	0.63	0.050	*	Cyclohexylamine	1.2	0.694	
2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol	0.64	0.439		UDP	1.2	0.611	

Compound name	Fold	P-value	Compound name	Fold	P-value
ADP	1.2	0.585	5-Amino-4-oxovaleric acid	7.0	0.014 *
Choline	1.2	0.117	Orotic acid	7.4	0.004 **
Pantothenic acid	1.2	0.281	UMP	11.1	0.011 *
Decanoic acid	1.2	0.709	GMP	15.6	0.005 **
3-Amino-2-piperidone	1.2	0.083	AMP	22.7	0.002 **
Threonic acid	1.2	0.383	S-Adenosylhomocysteine	32.2	0.011 *
Glycerol	1.4	0.127	Pipecolic acid	43.9	0.001> ***
Taurocholic acid	1.4	0.536	1-Pyrroline 5-carboxylic acid	1>	N.A.
Trimethylamine N-oxide	1.4	0.059	2-Hydroxyglutaric acid	1>	N.A.
Spermidine	1.5	0.388	2-Oxoisovaleric acid	1>	N.A.
Ala-Ala	1.5	0.050	2-Phosphoglyceric acid	1>	N.A.
Urocanic acid	1.7	0.269	3-Hydroxykynurenine	1>	N.A.
Lactic acid	1.8	0.104	3-Methyladenine	1>	N.A.
Triethanolamine	1.8	0.275	3-Phosphoglyceric acid	1>	N.A.
Cystathionine	1.8	0.009 **	4-Acetamidobutanoic acid	1>	N.A.
Gly	1.9	0.002 **	4-Methyl-2-oxovaleric acid	1>	N.A.
Nicotinic acid	1.9	0.008 **	3-Methyl-2-oxovaleric acid	1>	N.A.
Met	2.2	0.003 **	5-Oxo-2-tetrahydrofurancarboxylic acid	1>	N.A.
Hypoxanthine	2.3	0.033 *	6-Aminohexanoic acid	1>	N.A.
Carnitine	2.5	0.001> ***	Acetyl CoA_divalent	1>	N.A.
Diethanolamine	2.6	0.001> ***	Acetylcholine	1>	N.A.
5-Oxoproline	2.6	0.003 **	Arg-Glu	1>	N.A.
myo-Inositol 1-phosphate	2.7	N.A.	Benzoic acid	1>	N.A.
myo-Inositol 3-phosphate	2.7	N.A.	Butyrylcarnitine	1>	N.A.
Ethanolamine	2.8	0.001 **	CDP	1>	N.A.
Tyramine	3.0	0.010 *	cis-Aconitic acid	1>	N.A.
Methionine sulfoxide	3.0	0.039 *	CoA_divalent	1>	N.A.
γ-Glu-Cys	3.0	0.197	CTP	1>	N.A.
CDP-choline	3.4	0.003 **	Cytidine	1>	N.A.
Saccharopine	3.6	0.004 **	Ectoine	1>	N.A.
CMP	4.3	0.006 **	Fructose 1,6-diphosphate	1>	N.A.
Adenosine	5.4	0.005 **	Fumaric acid	1>	N.A.
Cholic acid	5.9	0.005 **	Glucose 1-phosphate	1>	N.A.
Putrescine	6.0	0.083	Glucose 6-phosphate	1>	N.A.
GABA	6.5	0.001> ***	Gly-Asp	1>	N.A.
Succinic acid	6.5	0.001> ***	Glycerol 3-phosphate	1>	N.A.

Compound name	Fold	P-value	Compound name	Fold	P-value
Gly-Gly	1>	N.A.	Propionic acid	1>	N.A.
GTP	1>	N.A.	Propionyl CoA_divalent	1>	N.A.
Guanosine	1>	N.A.	PRPP	1>	N.A.
His-Glu	1>	N.A.	Pyridoxal	1>	N.A.
HMG CoA_divalent	1>	N.A.	Pyridoxine	1>	N.A.
Hypotaurine	1>	N.A.	Ribose 5-phosphate	1>	N.A.
Indole-3-ethanol	1>	N.A.	Sedoheptulose 7-phosphate	1>	N.A.
Inosine	1>	N.A.	Trehalose 6-phosphate	1>	N.A.
Isobutyryl CoA_divalent	1>	N.A.	UDP-glucose	1>	N.A.
Isocitric acid	1>	N.A.	UDP-galactose	1>	N.A.
Kynurenine	1>	N.A.	Uracil	1>	N.A.
Metronidazole	1>	N.A.	UTP	1>	N.A.
N-Acetylglutamine	1>	N.A.	2'-Deoxyadenosine	>1	N.A.
N-Acetylphenylalanine	1>	N.A.	5'-Deoxyadenosine	>1	N.A.
N-Acetylserine	1>	N.A.	Aminoacetone	>1	N.A.
N-Acetyl-β-alanine	1>	N.A.	Ethanolamine phosphate	>1	N.A.
NADPH_divalent	1>	N.A.	Histidinol	>1	N.A.
N-Methylglutamic acid	1>	N.A.	Homoserine	>1	N.A.
N-Methylproline	1>	N.A.	IMP	>1	N.A.
Orotidine 5'-monophosphate	1>	N.A.	N2-Succinylornithine	>1	N.A.
			N-Acetylalanine	>1	N.A.
			γ-Glu-Val-Gly	>1	N.A.

Table 9. Relatively decreased metabolites observed in the barosensitive mutant. Metabolites were selected by a Welch's t-test ($p < 0.05$) and by a two-fold cutoff in relative values compared with the parent strain. ●; metabolites not detected in the mutant strain but present in the parent strain. ×; metabolite not detected in either strain.

Relatively decreased	
Compound name	Fold
Glutamine	0.02
Aspartate	0.09
Argininosuccinic acid	0.13
Glutamate	0.22
Ornithine	0.37
Arginine	0.44
Succinic acid	6.48
<i>cis</i> -Aconitic acid	—●
Isocitric acid	—●
Acetyl CoA divalent	—●
Fumaric acid	—●
2-Oxoglutaric acid	—×

Fig. 1. Respiratory function of the mutant strains.

TTC staining of the parent strain (A and B), the mutant strain (C and D), the diploid strain group with normal respiration (E and F), and the respiration-deficient diploid strain group (G and H). Before staining, colonies were white (A, C, E, and G). The parent strain and the diploid strain group with normal respiration turned red at least 100 min after staining (B and F), while the mutant strain and the respiration-deficient diploid strain group became faintly pink within the same time frame (D and H). Reproducibility was confirmed in at least 3 independent experiments.

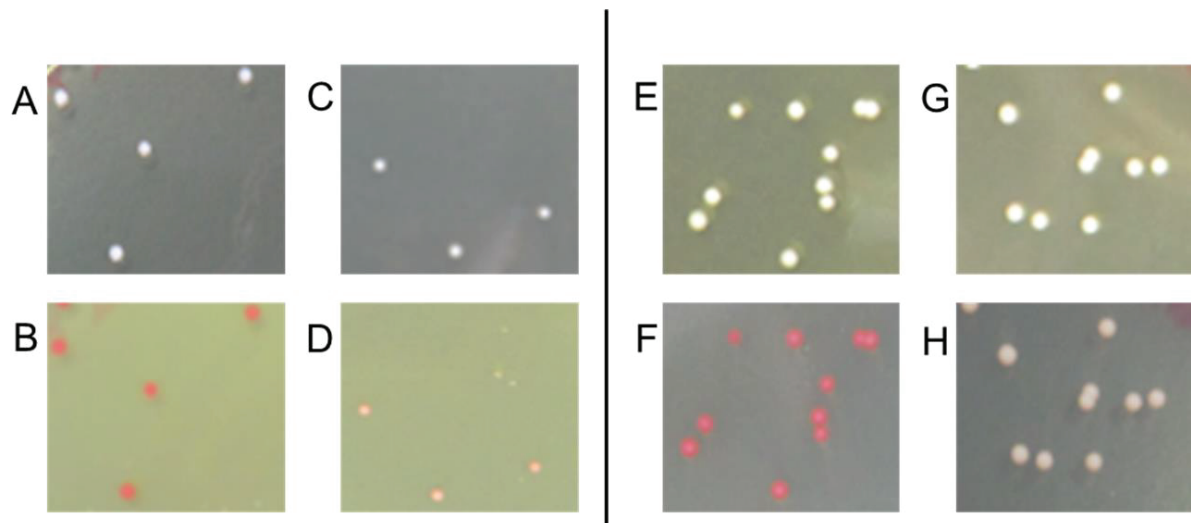


Fig. 2. DNA contents and cell sizes of the diploid strains.

DNA contents and cell sizes observed in a mixture of the diploid strains and the haploid strains. DNA contents of the diploid strains (G1 phase: 2C, G2 phase: 4C) were approximately 2-fold compared to those of the haploid strains (G1 phase: 1C, G2 phase: 2C), and cell sizes were also similar. Reproducibility was confirmed in at least three independent experiments.

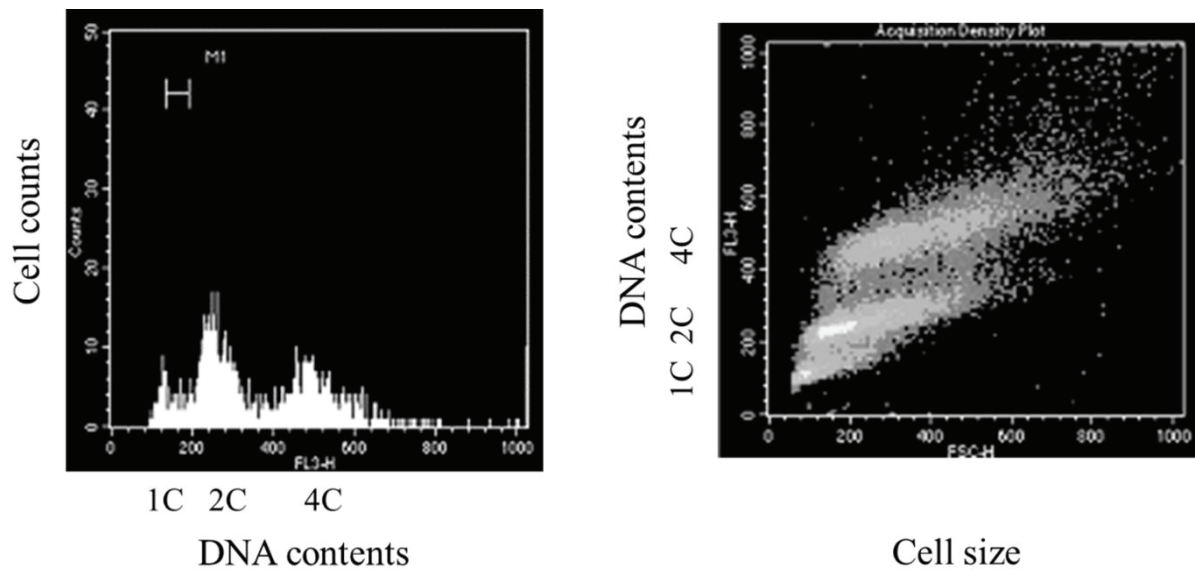


Fig. 3. Growth ability of the mutant strains.

Growth rates of the parent strain (open triangles), the mutant strain (open diamonds), the TTC-positive diploid strain group (shaded triangles), and the TTC-negative diploid strain group (shaded diamonds) were shown. Cell concentrations were measured by A_{660} .

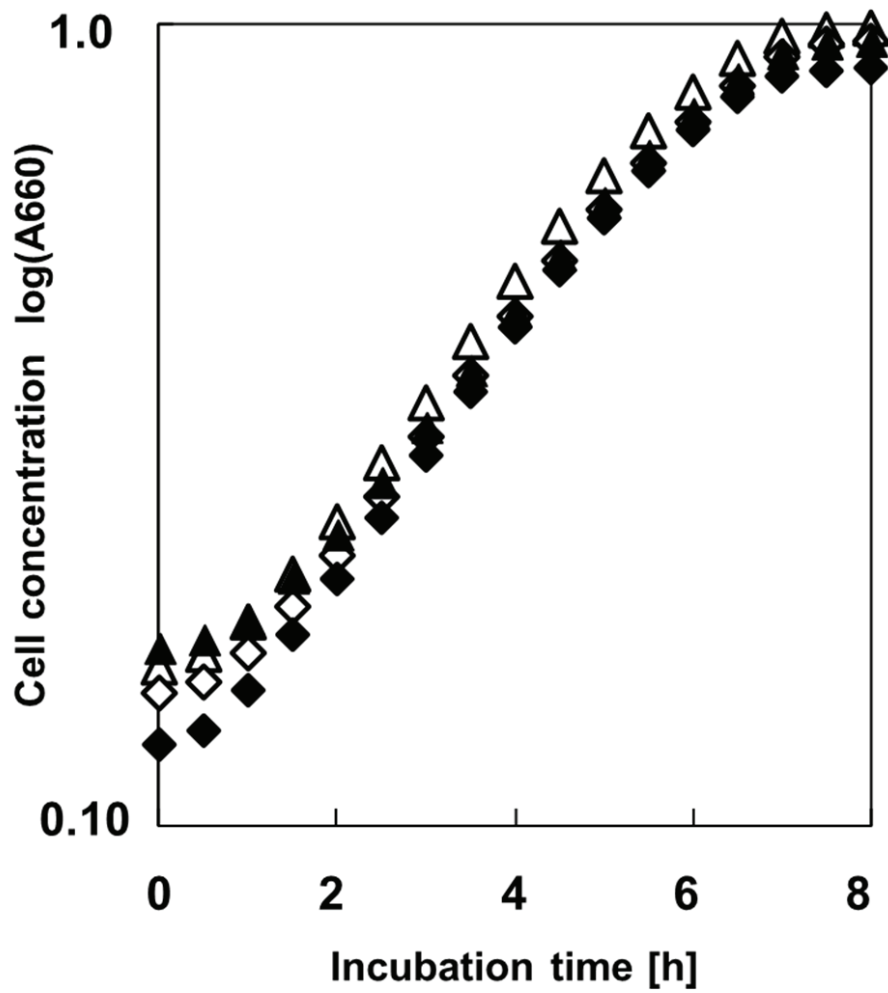


Fig. 4. Barosensitivity of the diploid strains.

Barosensitivity of the parent strain (open triangles), the mutant strain (open diamonds), the TTC-positive diploid strain group (shaded triangles), and the TTC-negative diploid strain group (shaded diamonds) after pressurized treatment at 200 MPa for 0–360 s. Means and standard deviations are shown from at least 4 independent experiments.

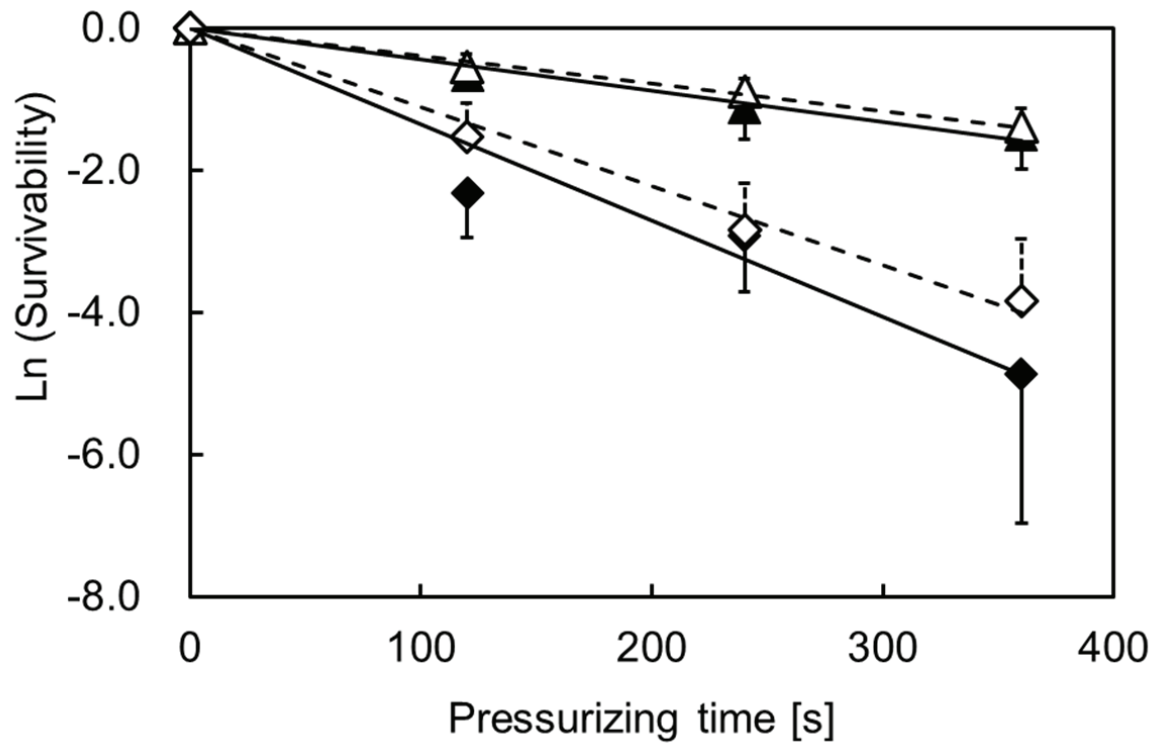
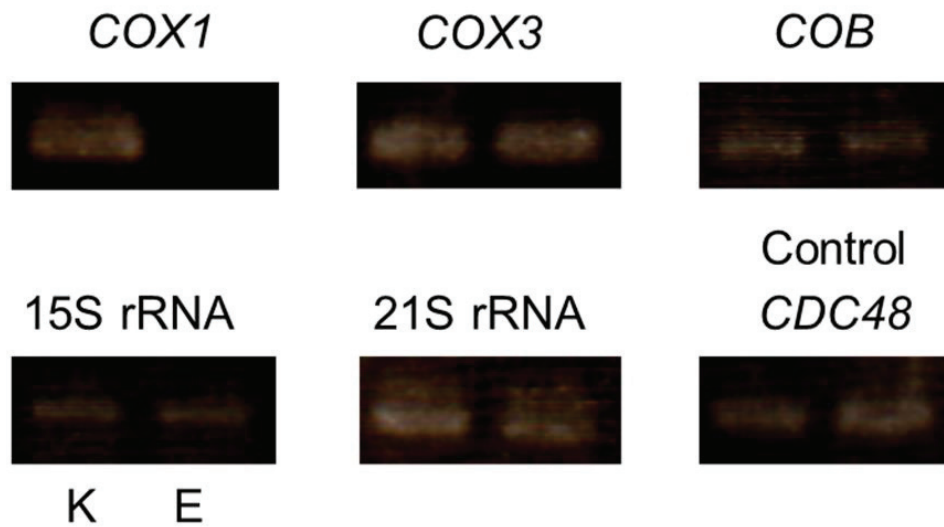


Fig. 5. Confirmation of gene deletion of the *COX1* gene.

K, KA31a (parent strain); E, a924E1 (mutant strain); P, TTC-positive diploid strain group; N, TTC-negative diploid strain group. Amplifications proceeded for 25 cycles. Amplification of the *CDC48* gene was used as a positive control. The results shown are representative of at least 3 independent experiments.

A. haploids



B. diploids



Fig. 6. Gene expression involved in arginine biosynthesis.

S; Molecular weight marker, W; the parent strain, M; the mutant strain.

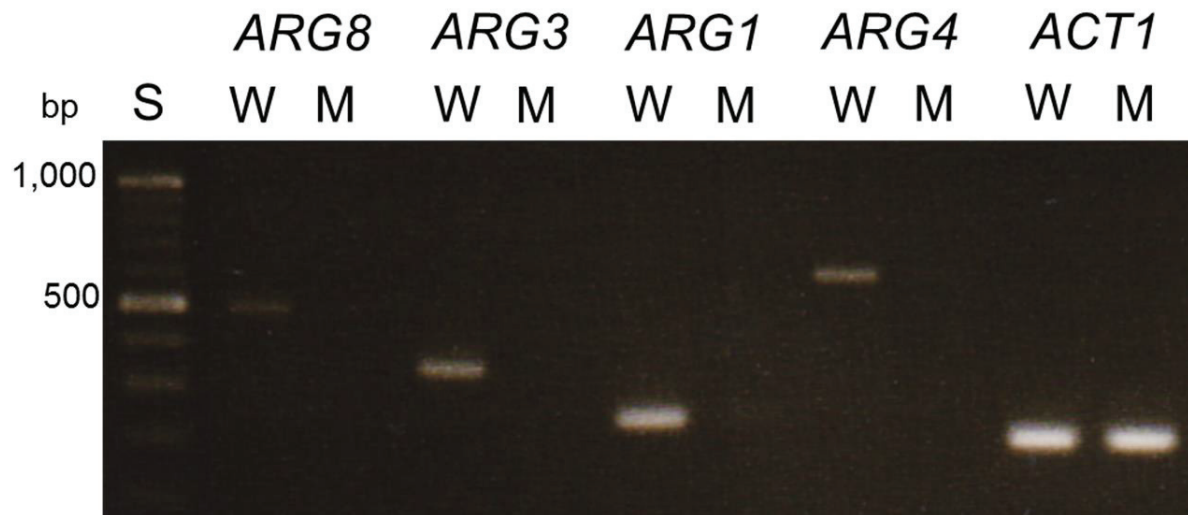


Fig. 7. Arginine biosynthesis pathway.

The vertical axis represents the relative values of each metabolite in the bar graphs. The dotted squares indicate genes for which mRNAs were decreased in the mutant strain. ○; relatively increased compound, ●; compounds not detected in the mutant strain but present in the parent strain, x; compound not detected in either strain. Metabolomics were carried out with three independent experiments (*; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$).

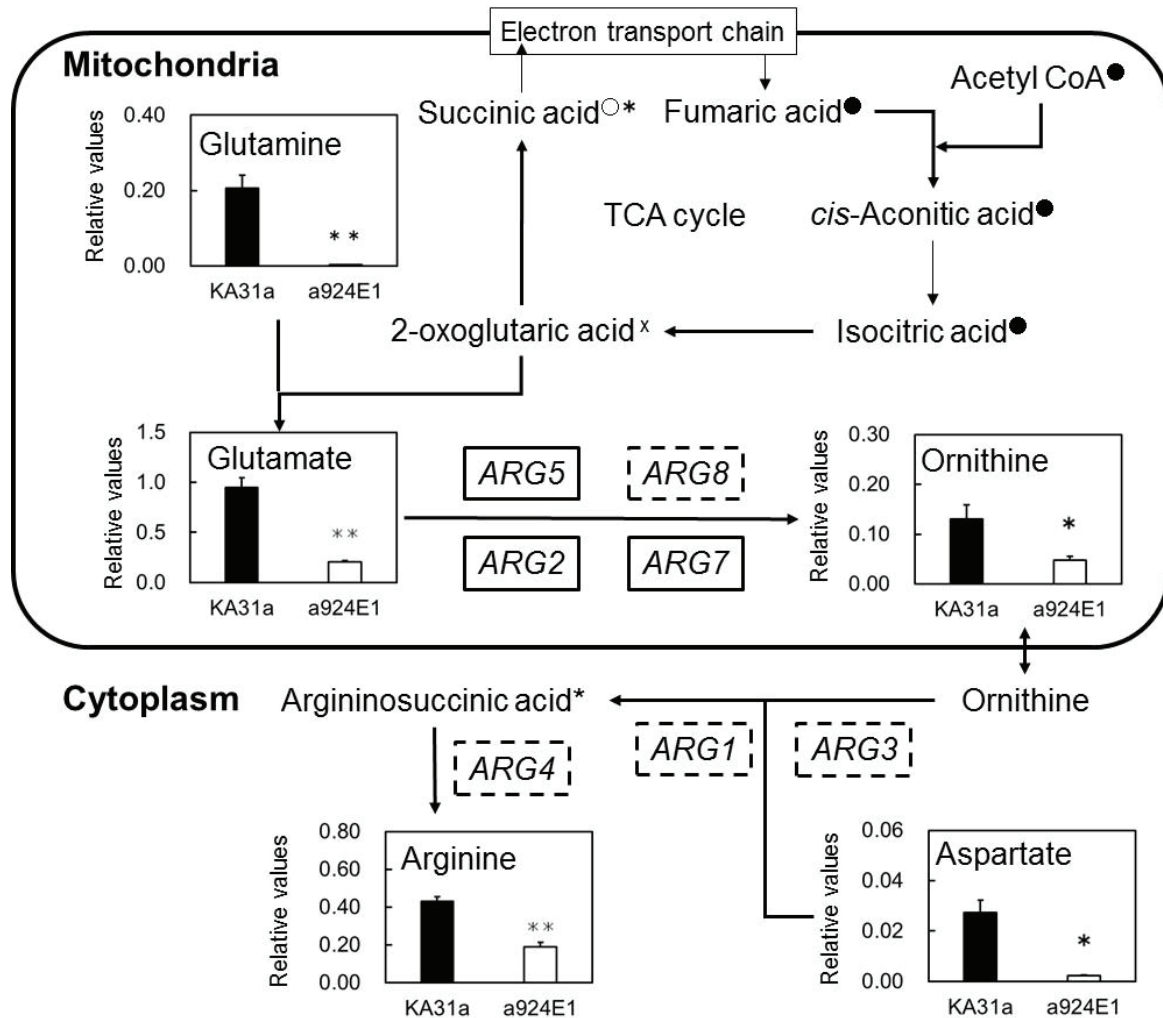


Fig. 8. Growth ability after treatment with or without arginine.

Treated cells were serially diluted from 10^{-1} to 10^{-2} and 5 μL of undiluted solutions and diluted solutions were spotted onto plates (from left to right).

