

## E-Cell System を用いた酵母菌のストレス応答 MAPK 経路のモデル構築

仲嶋なつ\*, 鎌田真由美\*, 石川千里\*\*, 高田雅美\*\*, 城和貴\*\*  
\*奈良女子大学理学部情報科学科  
\*\*奈良女子大学大学院人間文化研究科情報科学専攻

### 概要

日本酒の製造過程において高濃度アルコールを生成するためには、発酵を行う酵母菌にアルコール耐性を持つものが適するとされている。そのような酵母菌を発見するために様々な実験が行われているが、実際の培養には酵母菌死滅を含む多くの代償が伴う。そこでこのような代償を少なくするため、酵母菌のアルコール耐性に関するシミュレーションモデルを構築し、アルコール耐性に関する新たな知見の獲得を試みる。本研究ではアルコール耐性と酵母菌細胞壁との関係に着目し、E-Cell System を用いた細胞壁合成 Pkc1-MAPK 経路の部分的なモデル構築を行う。

## A Simulation Model for Stress Response MAPK Pathway of Yeast for the E-Cell System

Natsu Nakajima\*, Kamada Mayumi\*, Ishikawa Chisato\*\*, Takata Masami\*\*, Joe Kazuki\*\*  
\*Department of Information and Computer Sciences, Nara Women's University  
\*\*Graduate School of Humanities and Sciences, Nara Women's University

### Abstract

It is supposed that yeasts with alcoholic tolerance are suitable to generate high density alcohol in the process of Nippon Shuzo Brewery. Actually, a lot of compensation including the yeast extinction though various experiments are conducted to discover such yeasts. We try to model the response mechanism of yeast cells to alcohol by computer simulation to reduce such compensation. It pays attention to the relation between alcoholic tolerance and yeast cell wall. In this paper, we model a partial cell wall synthesis Pkc1-MAPK pathway using the E-Cell System.

### 1. はじめに

日本酒の起源は古事記に記された「口嚙酒」(くちのかみさけ)であると言われている。また奈良時代に至っては日本酒の原型とも言われる鞠酒が造られるようになる[1]。このように奈良は古くから酒造の先進地として、また地域性を活かした伝統的な酒造技法を持つ地域として酒造の歴史において重要な役割を果たす。

日本酒造りにおける発酵には「平行復発酵」が採用されている。これは他の酒類の醸造方法とは異なり、最初から酵母菌に大量の糖分を与えず段階を得て必要な量だけを与えるという発酵方法である。よい日本酒を造るためには、常に酵母菌の糖分を適量に保つことが不可欠である。また日本酒の個性は酵母菌の特性に依存するものが多く様々な酵母菌の培養が進められている。特に日本酒に含まれる高濃度アルコ

ールを生成するためには、強いアルコール耐性を持つ酵母菌が必要である。これは自身の作り出す高濃度アルコール下で長期間にわたって生育する酵母菌が、その環境に順応し細胞壁に厚みを増すことで、その結果アルコール耐性を持つようになったものである[2]。本学においても生物科学科が「奈良の八重桜」より酵母菌の抽出を試みている。しかし抽出された酵母菌は未だ培養段階であり、アルコール耐性は弱い。また培養には、長時間にわたる実験時間、それに伴う酵母菌の死滅、また多くの人手といった様々な代償を伴う。

このような代償を少なくするため、E-Cell System を用いてコンピュータ上に酵母菌のアルコール耐性に関するモデルを構築し、その振る舞いをシミュレートする。このシミュレーションの有効性を確認するために、実際に高いアルコール耐性を持つとされている酵母菌のデータとシミュレーショ

ン結果とを比較し、培養条件などより目的に合ったデータの取得を試みる。

## 2. 酵母菌のアルコール耐性

数ある日本酒の中でも味のすっきりした淡麗で吟醸香のあるものは、酵母菌の生育状態と深い関係がある。

飲み手にとって良いと感じるものである程、培地の温度、PH 濃度、酸素濃度など酵母菌が生育するにはストレスの多い厳しい環境が必要となる。中でもアルコール発酵によって自身が作り出すアルコールは酵母菌にとって最も厳しく危険なストレスとなる[3]。

しかしこの様な環境に慣れさせることで酵母菌はストレスに対する耐性ができる。

アルコール耐性は酵母菌のストレス耐性の中でも非常に複雑なメカニズムを持つ。そのため、未だ研究段階であり、アルコール発酵のメカニズムは確立されていない。しかしながらアルコール耐性酵母菌は、同時に細胞壁溶解酵素に対しても耐性になっていることなどが明らかになっている[4]。これは細胞壁の強度とアルコール耐性に深い関係があることを示唆している。

アルコール耐性酵母菌ができるメカニズムは以下の通りである。酵母菌が自身の作り出すアルコールを感知すると、それを刺激として細胞膜上で受け取る。受け取った刺激はシグナルとしてストレス応答シグナル伝達経路を介し細胞内へと伝えられる。さらにシグナルは核内へと輸送されストレス応答遺伝子を発現し、その結果細胞壁を強化するため、細胞壁溶解を防いでいると考えられる。

そこでこの過程をシミュレーションするためには、細胞壁における反応のモデル構築[5]と細胞壁合成シグナル伝達反応のモデル構築とを行わなければならない。なお、本研究では細胞壁合成シグナル伝達反応のモデルのみを構築する。

## 3. モデルの構築

### Pkc1p-MAP キナーゼシグナル伝達経路

生物を構成する個々の細胞は細胞外環境の変化に対し常に応答する極めて動的なものである。この応答は細胞が様々な刺激を受け取りその情報を核へと伝え、ふさわしい遺伝子を発現することで引き起こされる。

この応答の大部分を占めるストレス応答シグナル伝達経路は、生物の自己防御システムとして極めて重要な役割を果たす。この情報伝達系の中核となるのがストレス応答 MAP キナーゼ (MAPK) 経路である[6]。

酵母菌にはこのストレス応答経路がいくつか存在するが、フェロモンや浸透圧など環境ストレスの種類によって伝達経路を変え、細胞内にシグナルを伝える。

この中でも細胞壁合成を含む細胞骨格再編成の制御には

Pkc1p を介した MAPK 経路が関与していることが報告されている[4][7]。そこで本研究では細胞壁合成 Pkc1-MAPK 経路のモデル構築を行う。図 1 に Pkc1-MAPK 経路を図式化したものを示す。

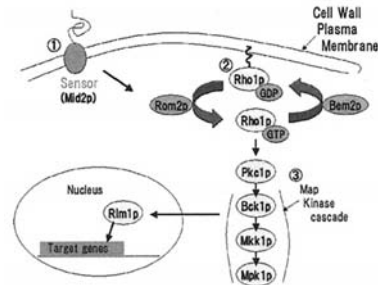


図 1 : Pkc1-MAPK 経路の流れ

### 代謝パスウェイ

MAPK 経路は、ストレスセンサーの感知、Rho 低分子量 G タンパク質のスイッチ、MAPK カスケードの大きく 3 つの部分から構成されている。この中で MAPK カスケードは長年研究されている分野である。そこで本研究では最初にこの部分のシミュレーションモデルを構築する。モデルを構築する上で必須のパスウェイは、KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) [8] の PATHWAY データベースを参考に作成する。

図 2 に作成した Pkc1-MAPK 経路における MAPK カスケードのパスウェイを示す。

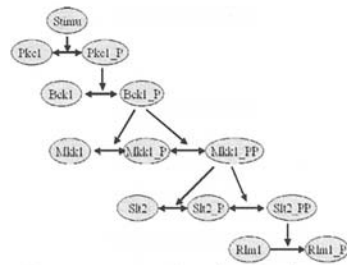


図 2 : MAPK カスケードのパスウェイ

### 各反応における反応速度式

モデル構築における化学反応速度を表す方法として、Michaelis - Menten 式に当てはめる場合と微分方程式で導出する場合とに大きく分けられる。前者では反応を 1 基質 1 酵素の定常状態 (steady state) と仮定した時の酵素反応速度を表し、簡易な速度式を用いることができる。しかし複数の酵素、基質を含む反応やフィードバック制御などの生体内の複雑なメカニズムを正確に表現することができない。一方

後者では、反応の時間遅れを考慮し各変数が非線形の影響を受けるため、より複雑な反応物濃度の時間的変動を観察することができる。ただし、解を導くためのパラメータが未確定であることが多く、研究が積み重ねられてきた反応系以外には適応できないなどが挙げられる[9]。

MAPK カスケードは盛んに研究されている分野であり、微分方程式を用いてモデル化された研究[10]も存在する。本研究では 36 個の物質、26 個の反応速度式から構成される MAPK カスケードのモデルを構築する。

#### パラメータ設定

Michaelis-Menten 式を用いて速度方程式を導く場合、生物学的実験により得られた実験値等を参考にパラメータを設定することが可能である。しかし微分方程式を用いて速度方程式を導く場合、既存研究の実験値が有効であるとは限らないため、パラメータ設定を行うことは非常に困難である。

従って本研究では酵母菌のデータだけではなく、類似すると考えられる他の生物のデータや生物学的常識の範囲内でパラメータの設定を行う。用いたデータ獲得には文献及び DODQS (Database of Quantitative Cellular Signalling) [11]を参考にしている。以下の表 1 に設定したパラメータの概要を記載する。

表 1 : 各物質のパラメータ値

物質	濃度(モデル)	濃度(文献値)	Ref.
Pkc1	5.0001e+03 M		
Bck1	2.0004e-01 M	3.0000e-09 M	[9]
Mkk1	2.0004e-01 M	1.2000e-06 M	[9]
Slf2	2.0004e-01 M	1.2000e-06 M	[9]
Rlm1	1.0001e-03 M	2.0000e-09 M	[11]
Pkc1_Pase	5.0001e-05 M		
Bck1_Pase	5.0001e-05 M	5.0001e-022 M	[9]
Mkk1_Pase	2.0004e-02 M	5.0001e-022 M	[9]
Slf2_Pase	2.0004e-02 M	2.0003e-019 M	[9]

## 4. 実験と結果

実験は全て時間刻み幅 0.001 のもと、 $5.2e+15$  秒間走らせる。また結果のグラフは主に縦軸に各物質のモル濃度 (mol/L)、横軸は経過時間 (sec) として表示する。

#### 実験 1.

刺激 (Stimu) の濃度を  $1.0000e+05$  M と一定に保ち基質濃度に対する刺激応答物質の変化を調べる。

図 3 にその結果を示す。縦軸には Rlm1\_P の濃度、横軸に

は Bck1 の濃度をとる。

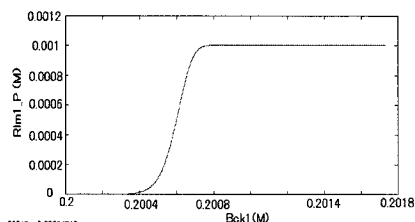


図 3 : Rlm1\_P の濃度と基質濃度との関係

酵素濃度は一定とする。縦軸に酵素反応速度 (ここでは Rlm1\_P)、横軸に基質濃度 (Bck1) をとりプロットすると、図 3 のようにシグモイド (S 字) 型の反応曲線が得られた。

#### 実験 2.

刺激である Stimu の初期値を大きく 4 段階に振り、同様に Rlm1\_P の挙動を調べる。なお Stimu の各濃度は  $1.0000e+40$ ,  $1.0000e+50$ ,  $1.0000e+62$  M に設定する。

図 4 は経過時間として  $2e+12$  秒間における、Rlm1\_P の濃度を示す。

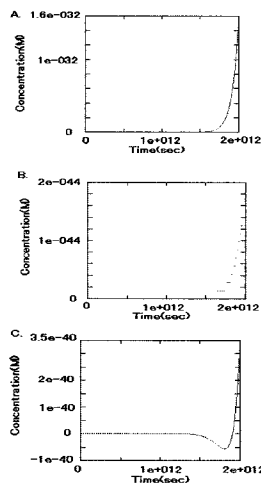


図 4 : A. Stimu= $1.0000e+40$   
B. Stimu= $1.0000e+50$   
C. Stimu= $1.0000e+62$

図 4 の 3 つのグラフは  $5.2e+15$  秒シミュレーションを行った中の  $2.0e+15$  秒までの Rlm1\_P の濃度をプロットしたものである。図の C. では顕著な減衰振動が見られる。これは、刺激 (Stimu) が一定値以上になることによって Rlm1\_P の振る舞いに変化を及ぼしたことが原因と考えられる。

### 実験 3.

実験 2 で行ったシミュレーションに関して、Rlm1\_P 以外の物質の挙動を観察する。図 5 に示すように MAPK カスケードの MAPKK である Mkk1 にのみ、特徴的な振る舞いが見られる。

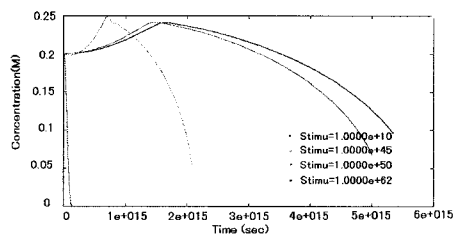


図 5 : Mkk1 の濃度と経過時間との関係

Stimu=1.0000e+10 とした時の基質 Mkk1 の反応曲線は一時的な酵素反応における基質の減少を表している。しかし Stimu=1.0000e+45, 1.0000e+50, 1.0000e+62 においては、減少を始めるまでに一時増加するといった振動波形が見られる。これは刺激の初期値が一定値以上になることで、カスケード内の基質濃度の減少を抑制することを示している。

### 5. まとめ

本研究において、アルコール耐性酵母菌に着目しシグナル伝達 Pkc1-MAPK 経路の一部である MAPK カスケードのモデルを構築した。提案モデルを用いて Stimu の初期値を大きく変化させ、反応系に外乱操作を行うことで各物質に見られる変化を調べる。外乱の処理として、まず Rlm1\_P はある濃度以上になると振動現象を起こす。また Rlm1\_P の急激な増加に伴い基質の 1 つである Mkk1 は一時的に増加するが、その後緩やかに減少する。これは一定値の刺激の濃度に対して、基質の減少を抑制する働きによるものと考えられる。しかしこれらは計算機上でモデルを仮定した結果であり、実際の生物にこのような法則が当てはまるとは限らない。

生物学的立場では、アルコール耐性酵母菌のシグナル伝達はアルコール濃度約 12% までは本研究で取り上げた Pkc1-MAPK 経路による。しかしそれ以上の濃度では別の経路と共同で行われるであろうと言われている。従って、Pkc1 経路のみではなく、他の経路もふまえたモデル構築が必要である。

完全な MAPK 経路のモデル構築のために、今後は G タンパク質のスイッチに関するモデル構築を行う予定である。

### 謝辞

生物学における知識やご指摘を頂いた奈良女子大学理学部生物科学科 鈴木教授、また E-Cell System に関してご教

授頂いた慶応義塾大学 松崎由理研究員に感謝申し上げます。

### 参考文献

- [1] 日本酒のいわれ お酒の辞典 月桂冠 HP  
<http://www.gekkeikan.co.jp/enjoy/encyclopedia/00102.html>
- [2] 濱田アルコール研究所月例報告書 HP :  
[http://www.melma.com/backnumber\\_168933/](http://www.melma.com/backnumber_168933/)
- [3] 久保本家酒造初霞純米原酒 HP :  
<http://www.kitora.com/hatugasumi-suiryu-kimono-jyunmai.html>
- [4] 下飯 仁 : 清酒酵母の醸造特性に関する遺伝子の解析, 生化学会誌第 80 巻第 2 号 P64-69.(2002)
- [5] 鎌田真由美, 仲嶋なつ, 石川千里, 高田雅美, 城和貴  
「E-Cell System を用いたグルカン合成に関するモデル構築」情報処理学会研究会報告, 2007-BIO-11, pp.113-120 (2007)
- [6] 特定領域研究『ストレス応答シグナル伝達経路の制御機構』:  
<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/MolCellSignal/StressSignal/ProgressReports/ProgressReport2003.html>
- [7] David E. Levin : Cell Wall Integrity Signaling in *Saccharomyces cerevisiae*, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, p.262-291(2005).
- [8] KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes Genomes :  
<http://www.genome.jp/kegg/>
- [9] 有田正規 : 生体シミュレーション  
[http://www.iu.a.u-tokyo.ac.jp/lectures/system\\_biology/050223\\_1.pdf](http://www.iu.a.u-tokyo.ac.jp/lectures/system_biology/050223_1.pdf)
- [10] F.Huang, James E .Ferrell : Ultrasensitivity in the mitogen-activated protein kinase cascade, *Biochemistry* Vol.93,pp.100078-10083(1996).
- [11] DOQCS : Database of Quantitative Cellular Signalling,  
<http://doqcs.ncbs.res.in/>