

# 産業用酵母育種に資する「不均衡変異導入法」 ～ゲノムワイドな変異スペクトル解析を中心に

笠原 堅

株式会社ネオ・モルガン研究所

不均衡進化理論は、ラギング鎖の複製に伴う複製エラーに進化の原動力が潜むという考え方である。我々はこの説に則り、ラギング鎖の複製エラー頻度を高め、進化の原動力を活性化する方法として不均衡変異導入法を確立し、主に微生物の物質生産性能・物質転換性能の向上で実績をあげてきた。

突然変異を導入する方法としては、物理的に DNA を損傷し変異を導入する紫外線や X 線照射、化学的に DNA を損傷し変異を導入する N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (MNNG) やエチルメタンサルホン酸 (EMS) などのアルキル化試薬処理もあるが、複製エラー頻度を高める不均衡変異導入法とは変異発生メカニズムが異なるため、変異の質も異なると考えていた。今回、出芽酵母において、不均衡変異株と EMS 処理株をそれぞれ非選択圧下でクローン化し、次世代シーケンサーによるゲノムワイドな変異解析により、その本質的な違いについて検証した。

【変異スペクトル】EMS 処理によって得られる変異は、GC→AT のトランジションに偏ることはすでに知られていたが、今回も、EMS 処理株では GC→AT への偏りが確認された。一方、不均衡変異株では、変異の入り方にほとんど偏りがなく、また非同義置換が 8 割を超えており、高頻度でアミノ酸置換を引き起こしていた。

【見かけの変異頻度と実際の変異頻度】シーケンスした不均衡変異株・EMS 処理株、それぞれのクローンを含む元集団を用いた薬剤耐性試験では、EMS 処理群より不均衡変異株群の方が高頻度で薬剤耐性株が出現し、変異頻度は不均衡変異株の方が高いと示唆されていたが、実際のシーケンス結果では、EMS 処理株の方が高頻度で変異が確認された。

【クローンの重複】不均衡変異株は複製を伴う変異導入法であることから、複製に伴うクローンの重複が懸念されていたが、今回評価した不均衡変異株 5 クローンには、ほとんど重複は見られなかった。

つまり、不均衡変異導入法により効率よく多様なクローンを含む集団を調製することで、微生物の能力向上などが実現できたと考えられる。(本取り組みは、革新的ゲノム情報解析を用いた生物資源ゲノム解析と農学新領域の創出プロジェクトの成果である。)

また、生研センターイノベーション創出基礎技術推進事業・リボゾーム工学と不均衡変異導入技術による微生物育種法の開発の一環で得られた変異株(放線菌)についても、RNA ポリメラーゼ β サブユニット (RpoB) をコードする遺伝子の変異スペクトルについて検証したので合わせて紹介する。

# トルラ酵母 *Candida utilis* による木質系バイオマスからの バイオエタノール、バイオ乳酸の生産

玉川 英幸

キリンホールディングス（株）フロンティア技術研究所

地球温暖化が急速に進み、低酸素社会の実現へ向けた化石資源を使用しない効率的な炭素の循環が切望される近年、非可食系バイオマスを原料として物質生産する取り組みが注目されている。酵母は物質生産宿主として有望視されているが、こうしたバイオマスに多分に含まれるキシロースを資化・発酵できないことが課題とされていた。

我々は増殖力や発酵力が非常に優れ、調味料生産などにも利用されているトルラ酵母 *Candida utilis* に着目し、有用物質を生産する取り組みを行ってきた。本発表では *C. utilis* にキシロース発酵能付与するキシロース代謝酵素の変異導入、キシロース代謝経路遺伝子発現量の最適化、キシロース代謝時の細胞内の遺伝子発現・代謝物の網羅的解析について紹介する。また、これらの知見を利用して構築した *C. utilis* 株を用いて、ビール仕込粕糖化液から乳酸生産を行った事例についても紹介したい。

# ケミカルバイオロジー研究に適した酵母の作成と利用

臼井 健郎

筑波大学 生命環境系

ケミカルバイオロジー（化学生物学）は、生理活性物質や蛍光プローブ等の小分子化合物を用いて生命現象を解明する研究分野であり、フォワードケミカルジェネティクス（順化学遺伝学）は、興味深い生理活性を有しながらその標的分子や作用機構が不明な小分子化合物を対象に、その生体内標的分子の同定・作用機構解析を通じて生命機能を明らかにする研究手法の一つである。生体内標的分子を明らかにする方法はいくつか存在するが、遺伝学的解析が容易な生物種を用いたアプローチも有力な手法の一つである。

中でも出芽酵母は真核生物のモデルであり、種々の遺伝的アプローチ、解析手法が可能であることから、薬剤標的分子の同定に頻繁に用いられている。しかしその反面、動物細胞と比較して一般に薬剤耐性が高いことが解析を妨げる大きな要因となっている。したがって、より薬剤感受性の高い「薬剤感受性株」を確立することが出芽酵母を用いる上で非常に重要である。さらに、薬剤標的を同定するために遺伝学的解析を行うことを考慮すると、出来るだけ遺伝解析に影響の無い株であることが望まれるが、これまで解析に用いられてきた薬剤感受性株は形質転換能や接合・胞子形成能が劣るものがほとんどであった。

そこで我々は、遺伝解析に必要な「形質転換能」「接合能」及び「胞子形成能」を維持した薬剤感受性株の作成を試みた。薬剤透過性を上げるエルゴステロール合成系遺伝子の破壊は遺伝解析に困難にするため手を加えず、細胞膜上の薬剤排出ポンプ、及びその転写因子の合計 12 遺伝子を破壊することで、多くの薬剤に対して高い感受性を示す「多剤超感受性株 12gene $\Delta$ 0」を作成した。得られた株は「形質転換能」と「接合能」は親株と同程度維持していたものの、「胞子形成能」が著しく低下していた。そこでさらに胞子形成能を上昇させる変異を導入することで、最終的に「遺伝学解析可能な多剤超感受性株 12gene $\Delta$ 0HSR」の作成に成功した(1)。作成した 12gene $\Delta$ 0HSR を用いた薬剤標的分子探索の現状についても合わせて報告する予定である。

(1) Chinen, T., *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**, 1588-1593 (2011).

# 減数分裂におけるテロメアを介した染色体動態制御： ゲノムの多様性創出と恒常性の維持機構

山本 歩  
静岡大学・理学部

配偶子形成に必須な減数分裂では相同染色体の組み換えが起こるとともに、その分配が起こり、染色体数が半減する。これによってゲノムの多様性が生み出されるとともに、配偶子の融合によって生じる次世代の個体の染色体数が一定に保たれ、ゲノムの恒常性が維持される。この相同染色体の組み換えおよび分配には、「対合」と呼ばれる相同染色体同士が相同領域を介して結合することが必要である。対合は核内で空間的に離れた相同染色体の相同領域が近づき物理的に接触することによって起こる。近年の研究により、この近接化および接触が染色体のテロメアが集合することによって起こることが明らかとなってきた。テロメアは真核生物で保存された SUN/KASH 核膜蛋白質複合体と結合し、さらにこの核膜蛋白質が細胞質内の細胞骨格と相互作用することによってテロメアの集合が起こることが種々の生物において示されている。しかし、テロメアが SUN/KASH 核膜蛋白質を介して細胞骨格と相互作用することによって、どのように集合するかは不明である。我々は分裂酵母を用いてテロメア集合機構を解析し、テロメア集合が起こるときにテロメアに中心体様の構造体（テロセントロゾーム）が形成されることを見いだした。さらに染色体の動態解析や種々の変異株および薬剤を用いた解析から、テロセントロゾームから形成された微小管と微小管モーター蛋白質の働きにより、テロメアが自発的に集合すると考えられた。本発表ではこれら未発表の内容を含む分裂酵母における相同染色体の対合機構を紹介するとともに、この機構の普遍性について議論したい。

# 出芽酵母における糖タンパク質糖鎖の代謝

鈴木 匡

理化学研究所 基幹研究所 糖鎖代謝学研究チーム

タンパク質の糖鎖付加は、真核細胞において最も普遍的な共翻訳・翻訳後修飾の一つであり、これまでにタンパク質の可溶性や熱安定性といった物理化学的性質に加え、細胞内外の局在性や生理活性といった生理学的性質も制御し得ることが知られている。糖タンパク質糖鎖の生合成に関する知見はこの 20 年で急速に蓄積され、現在出芽酵母や哺乳動物においてその生合成に関わる一群のタンパク質の遺伝子は、その殆どが明らかにされている。一方で、糖鎖の分解に関してはこの“ポストゲノム”と称される現在においても未だ不明な点が多い。

教科書的な知識では、糖鎖の代謝は主にリソソーム（出芽酵母においては液胞）において行われる、とされる。我々は真核細胞の細胞質に糖タンパク質の *N* 型糖鎖を根元から切り出す酵素、ペプチド:*N*-グリカナーゼ (PNGase) 活性が存在することを発見し<sup>(1,2)</sup>、出芽酵母を実験材料にしてその酵素の構造と機能についての研究を行ってきた<sup>(3-7)</sup>。本酵素はタンパク質の品質管理の一環として、小胞体においてフォールディング不全、あるいは機能不全のタンパク質を分解する“小胞体関連分解” (ER-associated degradation; ERAD) に関わっており、変性糖タンパク質がプロテアソームによって分解される際に、細胞質 PNGase が変性糖タンパク質から糖鎖の脱離を行いその分解の効率を高めていることが明らかにされている。

これまで、PNGase で切り出された糖鎖に関しては、哺乳動物において秩序立ったプロセッシング（非リソソーム糖鎖代謝）が行われることが我々の研究を中心に明らかにされてきている<sup>(3,8,9)</sup>。一方で出芽酵母においては、細胞質における遊離糖鎖の生成、分解機構について哺乳動物との相違点が明らかにされつつある。特に出芽酵母においては、細胞質の *N* 型糖鎖由来の遊離糖鎖はほぼ細胞質 PNGase 依存的に作られており、それ故、細胞質の遊離糖鎖構造を詳細に解析することで、ERAD における糖鎖代謝の際の糖鎖プロセッシングの全体像を明らかにすることが出来る<sup>(10,11)</sup>。本講演では、出芽酵母における糖タンパク質糖鎖の代謝機構について、最新の知見を紹介したい。

## 参考文献

- (1) Suzuki, T., *et al.*, *J. Biol. Chem.* **269**, 17611 (1994);
- (2) Suzuki, T., *et al.* *J. Biol. Chem.* **273**, 21526 (1998);
- (3) Suzuki, T., *et al.* *J. Cell Biol.* **149**, 1039 (2000);
- (4) Suzuki, T., *et al.* *J. Biol. Chem.* **276**, 21601 (2001);
- (5) Suzuki, T., *et al.* *J. Biol. Chem.* **281**, 22152 (2006);
- (6) Kim, I., *et al.* *J. Cell Biol.* **172**, 211 (2006);
- (7) Hosomi, A., *et al.* *J. Biol. Chem.* **285**, 24324 (2010);
- (8) Suzuki, T., *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 9691 (2002);
- (9) Suzuki, T., *et al.* *Biochem. J.* **400**, 33 (2006);
- (10) Hirayama, H., *et al.* *J. Biol. Chem.* **285**, 12390 (2010);
- (11) Hirayama, H. and Suzuki, T., *Glycobiology* **21**, 1341 (2011).