

電子顕微鏡を用いたサッカロミセスのストラクトーム解析

山口正視、川本 進

千葉大学 真菌医学研究センター

【はじめに】細胞構造の研究は、光学顕微鏡や電子顕微鏡を用いて、100年以上にわたってなされてきた。しかし、細胞構造の定量的、三次元的解析は、細胞機能を理解する上で非常に重要であるにもかかわらず、これまで殆どなされてこなかった。私達は、「電子顕微鏡レベルにおける細胞の定量的、三次元的全構造情報」を「ストラクトーム」(structure プラス-ome)と定義し[1]、今回、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を材料としてストラクトーム解析を行った。

【材料と方法】将来、遺伝子と構造の対応ができるように、ゲノム解析に用いられた S288c 株を用いた。YPD 液体培地で培養した細胞を遠心で集め、サンドイッチ法により急速凍結を行なった[2]。連続超薄切片法で細胞を 1 万倍で撮影し、コンピュータを用いて三次元再構築を行なった。

【結果と考察】ストラクトーム解析の結果、G1 期の細胞には、1~3 個のミトコンドリアがあるが、体積は細胞の 2% にすぎないこと、約 22 万個のリボソームがあること、小胞体/ゴルジ体は 13~28 個存在するが、動物と異なり、ネットワークを形成していないこと、核は細胞の体積の 11% を占めること、細胞壁は 17% を占めること、液胞は 6% を占めること、サイトゾルは 64% を占めることなどが明らかになった[3]。

【応用】ストラクトーム解析の応用例として、深海微生物の構造解析に用いた例を紹介する[4]。

【文献】

- [1] Yamaguchi M: Structome of *Exophiala* yeast cells determined by freeze-substitution and serial ultrathin sectioning electron microscopy, **Current Trends in Microbiology**, 2: 1-12, 2006.
- [2] Yamaguchi M, Okada H, Namiki Y: Smart specimen preparation for freeze-substitution and serial ultrathin sectioning of yeast cells. **J Electron Microsc** 58: 261-266, 2009.
- [3] Yamaguchi M, Namiki Y, Okada H, Mori Y, Furukawa H, Wang J, Ohkusu M, Kawamoto S: Structome of *Saccharomyces cerevisiae* determined by freeze-substitution and serial ultrathin sectioning electron microscopy. **J Electron Microsc** 60: 337-351, 2011.
- [4] Yamaguchi M et al: Prokaryote or eukaryote? A unique microorganism from the deep-sea. **J Electron Microsc** 2012; doi: 10.1093/jmicro/dfs062.

時間分解プロテオームによる病原性真菌 *Candida albicans* の動態解析

青木 航¹、植田 充美^{1,2}

¹ 京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻、² 京都バイオ計測センター

Candida albicans は常在性の真菌であるが、ヒトの免疫力が落ちるとカンジダ症を引き起こす日和見病原性真菌として知られている。カンジダ症に対する早期診断薬や効果的な治療薬は少なく、特に全身性カンジダ症における致死率は 50% を超えると推定されている。高齢化社会を迎えるにあたりカンジダ症の患者数は増大すると考えられており、病原性の解明および新規治療薬の開発が急務である。

新規薬剤を開発する上で、薬剤ターゲットを網羅的にスクリーニング可能なプロテオーム解析は有力な手法である。現在のプロテオーム解析は、質量分析計を用いたショットガン法が主流であるが、イオン化抑制などの技術的問題が存在しており、高等生物におけるプロテオームの一斉解析は達成されていなかった。そこで当研究室では、新規薬剤ターゲットの効率的な同定を目的として、液体クロマトグラフィーの高性能化を目指した分離媒体の開発、これを利用した様々なシステム構築、更に、プロテオーム解析への応用を検討してきた。新規分離媒体であるシリカ担体のモノリスカラムの調製法を確立し、構造を最適化した結果、汎用的に用いられている粒子充填カラムでは不可能な理論段数 100 万段を可能にする実用的な条件も達成している。

このモノリスカラムと質量分析計をオンライン接続し、*C. albicans* の血液環境への適応・生存過程における時間分解プロテオームの測定を行った。血液への適応は、致死率の高い全身性カンジダ症に繋がる重要なプロセスである。このダイナミックに変動するプロセスを時間分解プロテオームで捉えることで、新規薬剤ターゲットの候補を見つける試みを行っている。

血液環境で発現が上昇するタンパク質を同定するために、*C. albicans* をタイムコースに従って YNB±FBS (fetal bovine serum) 培地で培養し、各時間のサンプルから LC/MS/MS によって網羅的にタンパク質を同定した。その結果、全体で 1000 種以上のタンパク質を同定することに成功し、そのうち血清への適応過程で発現が上昇するタンパク質を数種類発見した。その結果をまとめて報告する。

【参考文献】

Aoki W., Kitahara N., Miura N., Morisaka H., Yamamoto Y., Kuroda K., and Ueda M. Comprehensive characterization of secreted aspartic proteases encoded by a virulence gene family in *Candida albicans*. *J. Biochem.* **150**, 431–438 (2011)

Aoki W., Kitahara N., Miura N., Morisaka H., Yamamoto Y., Kuroda K., and Ueda M. *Candida albicans* possesses Sap7 as a pepstatin A-insensitive secreted aspartic protease. *PLoS ONE*. **7**, e32513 (2012)

Aoki W., Ueda T., Tatsukami Y., Kitahara N., Morisaka H., Kuroda K., and Ueda M. Time-course proteomic profile of *Candida albicans* during adaptation to a fetal serum. *Pathog. Dis.* in press (2012)

TAQing システムを用いた酵母の大規模ゲノム改変

太田邦史¹、久郷和人¹、中村隆宏¹、小林亜貴¹、
村本伸彦²、片平悟史²、光川典宏²

¹東大院・総合文化、²豊田中研・バイオ

大規模なゲノムシャッフリングによるゲノム改変は、有効な生物育種の方法の一つである。また、次世代シーケンサー技術の発展により、ゲノムシャッフリングとゲノム・リシーケンシングを併用することで、新世代のゲノム育種が可能な段階に入ってきた。

我々は、細胞内でゲノム DNA に多数箇所でも和に二本鎖切断を導入し、大規模なゲノム再編成を誘発する「TAQing システム」を開発した。高熱細菌由来の 4 塩基認識の制限酵素 *TaqI* は、酵母が生育する 30°C ではきわめて活性が低く抑えられているため、細胞内での発現が可能である。本システムでは、*TaqI* を細胞内で発現させ、一過的に温度を上昇させることで、ゲノム全体の DNA 切断を温和に誘発する。これにより、酵母や植物のゲノムで、多様な再編成を誘発することに成功している。

それぞれ形質の異なる 1 倍体酵母を細胞融合した後、TAQing システムを稼働させると、両者の良形質を安定的に保持する新たな酵母株を獲得することができた。*TaqI* を発現していない細胞融合株では、このような再編成はほとんど見いだせず、また複数の良形質の維持も困難であった。

TAQing システムにより新たに形態的变化を示すようになった酵母株について、パルスフィールド電気泳動法やゲノムタイリングアレイによる解析、次世代シーケンサーを用いてリシーケンス解析（100 bp のペアエンド解析）を行った。その結果、染色体転座、一塩基置換や挿入、欠失などの多様なスペクトルの変異を検出することが出来た。

本システムでは、体細胞分裂において、減数分裂同等あるいはそれ以上のゲノム再編成の効果が得られる。したがって、本システムは酵母、特に胞子形成が不能な酵母種のゲノム育種に非常に有効であると考えられる。

出芽酵母 (*S. cerevisiae*) の脂肪酸組成とストレス耐性 ～ エタノール耐性とアルカリ耐性の解析 ～

植村 浩

(独) 産業技術総合研究所 生物プロセス研究部門

我々は、モデル酵母である出芽酵母と分裂酵母を用いて有用な脂肪酸の生産及び酵母の脂肪酸組成とストレス耐性の関係に関する研究を行っている。今回はその中で酵母の脂肪酸組成とストレス耐性との関係に焦点を当て、脂肪酸組成とエタノール耐性及びアルカリ耐性に関する研究結果について報告する。

出芽酵母は発酵能力の強い酵母としてエタノール生産に広く応用されている。しかしそのエタノール耐性機構はまだ完全には解明されていない。そこでエタノール耐性機構メカニズム解析のため、必須遺伝子を除く全遺伝子が各々破壊された出芽酵母破壊株の集合体である **Yeast Deletion Pool** を用いて、エタノール耐性株のスクリーニングを行った。その結果、8% エタノールを含む培地中で野生株よりも増殖が有意に速い株として $\Delta ura7$ 株と $\Delta gal6$ 株が得られた。これらの破壊株は細胞壁成分を溶解する *zymolyase* に対する耐性が強化されていた。更にエタノールストレス存在下での増殖時には、野生株においてもオレイン酸 (C18:1) の割合が増加するが、その割合が破壊株では更に増加していた。このことより、得られた耐性株では細胞壁、細胞膜の双方がアルコールに対して強化されている事が示唆された。

脂肪酸は脂質二重層 (細胞膜) を構成するリン脂質の構成成分であるため、脂肪酸組成は細胞膜の流動性を左右し、膜の物理的な性質に影響すると共に、多くの膜タンパク質の機能や活性に影響を与える。そこでオレイン酸含量の増加がエタノール耐性の一つの要因であることを明らかにし、新たなアルコール耐性株を人為的に構築することを目的として、異種の脂質代謝遺伝子を導入してオレイン酸を高濃度に蓄積する株の構築を試みた。出芽酵母 *S. cerevisiae* は脂肪酸不飽和化酵素として *OLE1* しか持たず、*OLE1* により不飽和結合を1つ持つパルミトオレイン酸 (C16:1) とオレイン酸 (C18:1) が作られる。我々は *OLE1* を高発現するよりも、ラット脂肪酸鎖長延長酵素 (*rELO2*) を高発現することで、より効率的にオレイン酸量を増加させた株を作成した。そこでこの株のアルコール耐性を調べたところ、予想通りにエタノールに対する耐性が増加していた。さらにこの株はプロパノール、2-プロパノール、ブタノールを含む培地中でも生存率の増加が認められ、アルコール耐性に対するオレイン酸含量の重要性が示された。

出芽酵母 *S. cerevisiae* は $\Delta 9$ 不飽和化酵素 (*OLE1*) しか持たないため、2個以上の不飽和結合を持つ高度不飽和脂肪酸を合成できない。そこで *S. cerevisiae* に *K. lactis* の $\Delta 12$ 不飽和化酵素及び $\omega 3$ 不飽和化酵素を発現させ、高度不飽和脂肪酸であるリノール酸 (C18:2) とアルファリノレン酸 (C18:3n-3) を合成させた。この *S. cerevisiae* が本来持たない高度不飽和脂肪酸を生産する株の性質を調べたところ、この株は親株に比べてアルカリ pH に対して耐性を示し、通常の株が増殖出来ない pH8 でも遅いながら増殖した。そこでこの表現型の獲得に関与している遺伝子を特定するために、遺伝子発現を網羅的に解析したところ、アルカリ刺激を与えていない状態でも、転写抑制因子 *Rim101p* の標的遺伝子の多くのもので発現が親株に比べて低下していることから *Rim101p* 活性が上昇していることが示唆された。*Rim101p* は pH 応答や細胞壁の形成に関与した転写因子であり、実際 *Rim101p* の下流に位置するアルカリイオントランスポーター *Ena1p* の転写も上がっていたため、この株のアルカリ耐性機構の1つは *Rim101p* を介した *Ena1p* の活性化によると考えられる。

以上の解析により、脂肪酸組成の改変が細胞のストレス耐性に影響を与えることが示されたため、今後は更に脂肪酸組成とストレス耐性の関係を追及し、新たなストレスに対して耐性を示す酵母を構築していきたい。

酵母発酵における大豆ペプチド取り込み特性の解析とその利用

北川さゆり

不二製油株式会社 蛋白加工食品カンパニー 開発研究所

大豆ペプチド（以下 SP）は、アミノ酸バランスに優れる大豆タンパク質を加水分解して得られるペプチド混合物であり、易消化・易吸収の窒素源として、スポーツ飲料などに広く使用されている。また、SP は酵母や乳酸菌等に対して発酵助成力が強く、種々の発酵培地用途にも使用されている。

我々は、SP の発酵助成力の強さについて、ペプチドの取り込み特性に着目し、酵母を用いてそのメカニズムの解析を行っている。発酵食品製造によく使用される *Saccharomyces* 属酵母では、通常プロテアーゼの菌体外分泌能は低く、外界にある遊離アミノ酸や低分子のペプチドをそのままの形で取り込むケースが多い。酵母のアミノ酸輸送体は、特異性の高いもの・低いもの合わせて数十種類の報告があり、分子種による取り込まれ易さの違いなどが古くから研究されているのに対し、ペプチド輸送体は、特異性が低いものが数種報告されているのみであり、分子種による取り込まれ易さについては、これまで殆どわかっていなかった。

ところで、アミノ酸種の中には、酵母にとって、或いは酵母の醸造物を得ている我々にとって特別な働きを持つものがある。このような特別な働きを持つアミノ酸種を、培地に SP を使用し、酵母の取り込み特性をうまく利用することにより、効率的に取り込ませられることが分かってきた。

1) フェニルアラニン（Phe）のビール酵母での取り込みと香気成分産生

下面酵母によるビール発酵において、SP を窒素源として培養液に添加すると、香気成分の一種である β -フェネチルアルコール（PheOH）が多く産生する。これは、PheOH の前駆体であり、遊離アミノ酸態では取り込まれにくい Phe が、低分子ペプチドの形では早期に取り込まれ代謝されることによって生じる現象であることが判明した。

2) トリプトファン（Trp）取り込みと低温ストレス耐性の付与

低温ストレスにより、Trp 輸送体が分解され遊離 Trp が取り込まれにくくなって酵母増殖が停止することが知られているが、ペプチド組成を工夫した特別な SP を培地に用いることにより、低温における増殖が活発に維持されることが見出された。

本講演では、上記の 2 つの事例を詳しく解説し、SP への培地使用のメリットについてご紹介したい。また、これまで殆どわかっていなかった、ペプチド輸送体のペプチド分子種による親和性の違い（取り込まれやすさ）についても、最近の知見を報告する。