

出芽酵母におけるアミノ酸とペプチド輸送体の機能と制御

阿部文快

青山学院大学理工学部; 海洋研究開発機構

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* ゲノムには 24 個のアミノ酸輸送体ホモログがコードされ、いずれも 12 回膜貫通型と予測されている。なかでもトリプトファン輸送体 Tat1 と Tat2 はストレス易損性であり、細胞のアキレス腱とも呼ばれている。両者はトリプトファンへの親和性からそれぞれ低親和性型と高親和性型に区別される。しかし、いずれも基質認識や輸送機構の詳細は不明である。私たちは TAT2 にランダム変異を導入し、主要な役割を演じるアミノ酸残基の同定を試みてきた。これを大腸菌のアルギニン/アグマチン対向輸送体 AdiC の結晶構造を鋳型としたモデリング解析とあわせ、TMD1, 3, 6, 7, 8 および 10 における 15 個のアミノ酸残基の重要性を明らかにした。特に TMD1 の GTG 配列と TMD6 の GIEMT 配列は、Tat2 が外開き構造からトリプトファンを抱えた閉じた構造に転移するために重要と考えられ、確かにアミノ酸置換は機能を失陥させた。相同部位のアミノ酸残基を Tat1 およびロイシン輸送体 Bap2/Bap3 で置換したところ、基質輸送に失陥が生ずる残基とそうでないものに分かれた。このことは、Tat2 による高親和性トリプトファン輸送に不可欠なアミノ酸残基が存在することを示唆している。ペプチド輸送体 Ptr2 はアミノ酸輸送体との相同性は低いが、同様のアプローチでその機能に重要なアミノ酸残基が見つかった。そこでこれをあわせて紹介したい。

Tat1 と Tat2 はいずれも Rsp5 ユビキチンリガーゼ依存的に分解される。Tat1 は非常に安定なタンパク質で、定常状態の半減期は 6 時間程度である。ところが、25 MPa (約 250 気圧) の水圧を細胞に負荷すると急速に分解が進む。最近私たちは、Tat1 の N 末端側 29 番目および 31 番目のリジン残基が、高圧下でユビキチン化されるターゲットリジンであることを明らかにした。近年、アレスチン様タンパク質 (ARTs) が酵母アミノ酸輸送体のユビキチン化を介在することが報告されている。Tat2 では Bul1, Art1, Art2 および Art8 が役割を果たす。Tat1 について調べたところ、Tat2 とは異なりそのユビキチン化は 9 個の ARTs と Bul1/Bul2 の重複した機能によって担われ、11 遺伝子欠損株においてはじめて分解抑制されることがわかった。

本講演では、トリプトファン輸送体を中心としたアミノ酸輸送体の機能とユビキチン依存分解、およびペプチド輸送体の機能に関する最近の私たちの研究成果について紹介したい。

出芽酵母におけるエンドサイトーシス経路のイメージング解析

十島二郎

東京理科大学基礎工学部

エンドサイトーシスは出芽酵母から哺乳類にいたる全ての真核生物細胞において見られる現象であり、栄養物質の摂取、細胞膜の恒常性維持、シナプス顆粒の放出、免疫応答反応、細胞外シグナルの制御など多様な生命現象に関与している。出芽酵母は、エンドサイトーシス、オートファジー、分泌経路などの細胞内輸送研究の優れたモデル生物であり、これらの生物種を超えた基本的な分子機構の解明に大きく寄与してきた。また、近年の蛍光顕微鏡技術の進歩は、細胞内の微細器官である輸送小胞のイメージングを可能にし、これにより、エンドサイトーシス研究も飛躍的に進んでいる。

私達の研究室では、出芽酵母の接合フェロモンである α -factor に蛍光分子を付加することにより、細胞が細胞外から取込んだ物質を液胞（リソソーム）まで輸送するエンドサイトーシス経路の完全な可視化に成功した。 α -factor は細胞膜上の Ste2 受容体に結合した後、クラスリン被覆ピットへと移動し、クラスリン小胞を介して初期エンドソームへと輸送される。クラスリン被覆小胞の形成とエンドソームへの輸送はアクチンの重合・脱重合により制御されており、初期エンドソームに取込まれた α -factor は、約 15 分で後期／多胞体エンドソームを経て液胞へと送られる。

私達は、この蛍光標識した α -factor の液胞への輸送過程をモニターすることで、エンドサイトーシス経路に異常のある出芽酵母変異体のスクリーニングを行った。この結果、 α -factor の各輸送段階に関与すると考えられる多くのエンドサイトーシス関連遺伝子の同定に成功した。本研究会では、これらの中から Rab5 関連タンパク質の関与するエンドサイトーシス経路について報告する。Rab5 は生物種を超えて広く保存されているタンパク質であり、それらの酵母変異体においては、 α -factor のエンドソーム間輸送に遅延がみられた。酵母 Rab5 ファミリー遺伝子変異体におけるエンドサイトーシス経路を詳細に解析した結果、エンドサイトーシス経路は細胞内において Rab5 依存的な経路と非依存的な経路に分岐することが分かった。これらの経路はゴルジ体から液胞への生合成経路と密接に関係しており、これまで知られていない新しいエンドサイトーシス経路の存在が明らかになった。

出芽酵母の糖鎖修飾に関わる膜蛋白質のオルガネラ局在化機構

野田陽一, 藤井聖也, 依田幸司

東京大学大学院農学生命科学研究科

真核細胞の膜蛋白質がオルガネラに正しく局在化する機構には未解明の点が多く残されている。我々は以前に、出芽酵母ゴルジ体膜蛋白質の網羅的な同定により、Svp26 と名付けた推定 4 回膜貫通型の蛋白質を見だし解析してきた(1)。Svp26 は Golgi での N 糖鎖付加に関わる Mnn2, Mnn5 や、主に O 糖鎖付加を行う Kre2 ファミリーに属する Kre2, Ktr1, Ktr3 など、多くの II 型膜蛋白質と COPII コートとのアダプターとして機能し、COPII 小胞への積み込みを促進することを明らかにした(2)。また同じく Kre2 ファミリーに属しているが、そのゴルジ体局在が Svp26 に依存しない Ktr4 の ER からの搬出を、Erv41–Erv46 複合体が促進することを見いだした(3)。Mnn6 (Ktr6) は Kre2 ファミリーのメンバーであり、N 糖鎖および O 糖鎖へのマンノースリン酸付加に関与することが報告されている。Mnn6 蛋白質はシヨ糖密度勾配遠心による分画で、ER の分布を示し *svp26* 遺伝子を欠損してもその分布パターンは変化しなかった。マンノースリン酸付加には、Mnn6 に加えて、おそらく II 型のトポロジーを持つ膜蛋白質 Mnn4 が必要である。野生株で Mnn4 はゴルジ体に見いだされたが、*svp26* 遺伝子破壊株では、Mnn4 の ER への顕著な蓄積が見られた。また *mnn6* 遺伝子破壊株においても同様に、ER への Mnn4 の蓄積が観察された。一方、Mnn1 のように ER 搬出アダプター候補遺伝子の単独の破壊では Golgi 局在が強く影響を受けない膜蛋白質がある。それらの局在に関与する分子を探索する目的で、COPII 小胞に多く存在することが報告されている膜蛋白質をコードする遺伝子を順に破壊した多重破壊株を作製した。*svp26* 破壊株から始めて、*erv41*, *erv46*, *erv14*, *erv29*, *emp46*, *emp47*, *got1* の計 8 つの遺伝子を破壊した株 ($\Delta 8$) は温度感受性の生育 (37°C で致死) を示した。Mnn1 の局在を顕微鏡で観察すると 6 重の破壊付近から ER の局在を示すリング状のシグナルを示すようになった。このことは、複数のアダプターが Mnn1 の ER からの搬出に関与していることを示唆している。またさらに $\Delta 8$ 株では GPI アンカー型蛋白質の一つである Gas1 の局在にも影響が見られ、シヨ糖密度勾配遠心による分画、間接蛍光顕微鏡観察により、ER に蓄積していることを見いだした。現在これらの表現型の原因の解明を進めている。

(1) Inadome, H. *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 25, 7696–7710 (2005)

(2) Noda, Y. and Yoda, K., *J. Biol. Chem.*, 285, 15420–15429 (2010)

(3) Noda, Y. *et al.*, 投稿中

ラクトコッカス属乳酸菌の機能性研究

鈴木チセ

(独) 農研機構 畜産草地研究所

乳酸菌は、有史以前から人類と深く関わってきた細菌であり、乳製品や漬け物などの発酵食品や醸造に利用されてきた。(独) 農研機構・畜産草地研究所では、乳業用乳酸菌、特にチーズ製造に用いられる *Lactococcus* 属乳酸菌について長年研究を行っている。近年健康志向の高まりのなかで、乳酸菌がもつ整腸効果や感染防御、抗アレルギー効果に期待が集まり、*Lactobacillus* 属や *Bifidobacterium* について健康効果に関する知見が蓄積しつつある。しかしながら、*Lactococcus* 属乳酸菌の健康効果についての知見はまだ少ない。ここでは *Lactococcus lactis* の免疫調節効果に関する *in vitro* と *in vivo* の研究について菌株の特異性や、生菌と加熱死菌の効果の違いについて紹介する。

研究所の保有する *L. lactis* 46 株を用い、マクロファージ様細胞 J774.1 株への添加試験を行った結果、菌株特異的なサイトカイン (IL-12、IL-6、TNF- α) 産生誘導能が見られた。加熱死菌体は生菌より IL-6、IL-12 産生誘導能が高かった。一方、生菌添加により TNF- α 産生を誘導する菌株を加熱すると誘導活性はなくなった。以上から、TNF- α 誘導に必要な刺激は熱感受性であり、IL-6 と IL-12 誘導に必要な刺激とは異なることが示唆された。

乳酸菌の経口投与による抗アレルギー効果を調べるため、サイトカイン誘導活性の異なる菌株をマウスに投与し、オボアルブミン感作を行った後、IgE 抗体産生を解析した。その結果、*in vitro* でサイトカイン誘導能が最も低かった *L. lactis* subsp. *lactis* C59 のみが IgE 抗体産生を抑制した。この効果は加熱処理した C59 株の投与では認められなかった。C59 株を投与したマウスの脾臓細胞を抗 CD3 抗体で刺激したときの IL-4 産生はコントロールと比べて有意に減少していた。IL-4 は IgE のクラス転換を促進し、プラズマ細胞に IgE 抗体の分泌を増強する。ため、C59 株による IgE 抗体産生の抑制は、IL-4 産生の阻害によるものと推定している。さらに、C59 株生菌をマウスに投与すると約 2 時間で糞中に生菌が検出され、8 時間以内に腸管を通過することを確認している。

C59 株は、サイトカインバランスを改善し、IgE 依存的なアレルギー疾患を予防する可能性を示した。*L. lactis* 菌株の利用法の開発と安全性の確認は社会問題となっている免疫疾患の改善に寄与することが期待される。(久しぶりの実家なので嫁ぎ先のグチも出るかもしれません。)

病原性真菌細胞壁アセンブリを標的とした抗真菌剤の創製と 分子ターゲット *GWT1* の発見

塚原 克平

エーザイ株式会社 ネクストジェネレーションシステムズ機能ユニット

GPI アンカー型細胞壁マンノプロテインは病原性真菌の宿主上皮細胞への付着に重要な役割を果たしている。したがってマンノプロテインの真菌表層への提示を阻害する低分子化合物は感染を阻止する新しいタイプの抗真菌剤となりうる。われわれはこの活性を指標にした化合物スクリーニングにより BIQ という新規化合物を発見した。BIQ は出芽酵母の増殖および GPI アンカー型マンノプロテインの細胞表層への局在を阻害し、さらに病原性真菌である *Candida albicans* の上皮細胞への付着を阻害する活性を有する。BIQ の作用点を解明するため、酵母増殖阻害 phenotype を多コピーで抑圧する出芽酵母遺伝子を探索したところ、機能未知遺伝子 *YJL091c* が同定された。*GWT1* と命名されたこの遺伝子は 490 アミノ酸からなる多段階膜貫通領域を持つタンパク質をコードしていた。*GWT1* 遺伝子を破壊した株が BIQ 処理した野生株と類似の phenotype を示すこと、BIQ 耐性変異株が *GWT1* 遺伝子内にアミノ酸置換を伴う変異を有していたこと、さらにこの変異型 Gwt1 タンパク質に BIQ が結合できなかったことから、Gwt1 タンパク質が BIQ のターゲット分子であることが示唆された。野生株および *GWT1* 遺伝子破壊株から調製した ER 膜画分を用いて GPI 生合成ステップを調べたところ、破壊株では GlcN-PI から GlcN-(acyl)PI への転換が起こらないことがわかった。このことから Gwt1 タンパク質はこれまで発見されていなかった GPI アシル基転移酵素であることが強く示唆された。そして BIQ が実際にこの酵素活性を阻害したことから、BIQ が Gwt1 タンパク質の酵素活性を阻害することにより GPI アンカー型マンノプロテインの細胞表層への局在を阻害し、真菌の増殖およびヒト臓器への付着を阻害することが明らかとなった。

現今における次世代シーケンサー、その利用と応用 ～酵母研究への新たな展開～

長畦慎一

株式会社ネットウエル 事業企画室 ライフサイエンス担当

2003年、ABI キャピラリーシーケンサーを大量動員して行われたヒトゲノム計画が事実上終了した2年後の2005年10月、454 Life Sciences (現 Roche) から、世界最初の次世代シーケンサー「Genome Sequencer 20」が発売され、その1年後の2006年には本命のSolexa (現 Illumina) から「Genome Analyzer」も発売され、一度に10億塩基(当時)の出力が得られるようになり、生物学研究の大きなパラダイムシフトが起きて後わずか7年、低価格のIon PGM や Illumina MiSeq 等の発売によりあっという間に日本でも導入が進み、酵母研究にも身近な存在になり、既にこの伝統ある研究会でもいくつかその様な研究成果が発表され、会員の皆様にも既に利用された方も居られることと思う。酵母は真核生物のモデル生物としてその生態が深く研究されて大きな成果を上げ確立された研究手法も多く、また既に全遺伝子が解明されその破壊株も容易に手に入るという恵まれた研究環境にあり、これに次世代シーケンサーと言う新たなパラダイムが加われば鬼に金棒で、モデル生物としての革新的新発見や、物質生産系としての新機能開発も今後期待出来るであろう。

今回は皆様にこの次世代シーケンスを身近に感じて頂く目的で、次世代シーケンスとは何で、現在何が出来て何が問題か？ そして天文学的数字で大量に出力される塩基データを生物学的に意味のある事柄に変換するソフトウェアの重要性について簡潔に御説明させて頂いた後、酵母研究への応用例を紹介させて頂きたいと考えている。例として弊社、ネットウエルが解析ソフトウェアを比較御評価頂く目的で無償提供している東京大学大学院総合文化研究科の太田邦史教授の研究室で行われた酵母を用いた研究を紹介する。

(1) 太田研究室では、好熱菌由来制限酵素 TaqI を用いた大規模ゲノム再編成システム「TAQing システム」を開発した。このシステムを出芽酵母に適用すると、特異な性質を持つ株が得られ、そのゲノム再編成を次世代シーケンサーを用いて明らかにした(東大・豊田中研よりデータ提供)。TAQing システムは、様々な性質を持つ酵母を新たに作り出し、酵母の有用性をさらに高める非常に実用性の高い方法であるが、その再構成された遺伝子構成を速やかに解析するには次世代シーケンサーの使用が不可欠になっている。

(2) 太田研究室ではいわゆる lnc (long non-coding) RNAの研究でも業績を挙げている。グルコース飢餓に応じて、*fbp1* 遺伝子上流から mRNA 型長鎖非コード RNA (mlonRNA) が転写される。これに応じて段階的にクロマチン構造が弛緩し、mRNA 転写活性化に至る機構を分裂酵母で明らかにした(Nature, 2008¹⁾)。RNA-seq を行うことで網羅的に新規 mlonRNA を探索することが可能となってきている。

なお、TAQing システムの研究は東京大学、株式会社豊田中央研究所の共同で行われました。データの提供を頂いた東大大学院の太田邦史教授、久郷和人特任助教、豊田中研の村本伸彦博士に感謝致します。

1) Hirota K., Miyoshi T., Kugou K., Hoffman C. S., Shibata T., and Ohta K. Stepwise chromatin remodeling by a cascade of transcription initiation of non-coding RNAs. *Nature*, 456: 130–134 (2008)