

次世代シーケンサーを用いた *Candida utilis* のゲノム解析

富田 康之

キリン株式会社・基盤技術研究所

(現所属：キリン株式会社・飲料技術研究所)

酵母は細菌や糸状菌と比較すると、酸耐性が強い、増殖・発酵が速い、培養ハンドリングが容易、栄養要求性が少ないなどの多くの面において優位性がある。しかしながら、最も代表的な「酵母」である *Saccharomyces cerevisiae* が有している高いエタノール生産能は、酒類の製造には長所となるが、その他の物質の生産の場合には、目的物質の収率低下の原因となり得る。したがって、培養条件や遺伝子操作によってエタノール生産を抑制することが可能な酵母を採用することは、酵母の有用性を利用した物質生産において有効な戦略となる。

本発表で取り上げる *Candida. utilis* は、Crabtree 効果陰性酵母であり、酸素の供給が十分な培養条件ではエタノールの生成を大きく低下させることが可能である。また、アメリカ食品医薬局 (FDA) から食品としての安全性が認められており、グルタチオンや RNA を多く含む酵母エキス調味料などに利用されている。その上、組換え DNA 技術も開発されているため、モネリンなどの異種タンパク質や乳酸などの低分子化合物の生産に用いられたこともある(1)、(2)。そのような中で講演者は、本酵母の遺伝的要素を解明するため、*C. utilis* のゲノムの解読、およびトランスクリプトーム解析 (RNA-Seq) に取り組んだ (3)。

サンガー法と次世代シーケンサーを併用し、*C. utilis* NBRC0988 株のゲノムサイズは約 14.6 Mb であると推定した。さらに *in silico* 解析により、8,646 遺伝子の存在を予測したが、その中には機能が推定できないものも 3,000 以上含まれていた。また、他種酵母との比較ゲノム解析の結果、*C. utilis* に特徴的な遺伝子群も見出された。次に、RNA-Seq 解析を行ったところ、先の 8,646 遺伝子の内の 9 割以上が発現していること、さらには、*in silico* では遺伝子として抽出されなかった 2,000 以上のアンチセンス領域でも転写物があることが明らかになった。本発表では、以上の結果の仔細とともに、講演者が考える今後のゲノム解析の方向性や、ゲノム情報を用いた物質生産に関する展望を紹介したい。

- 1) Kondo K. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, 15, 453–457 (1997).
- 2) Ikushima S. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 73, 1818–1824 (2009).
- 3) Tomita Y. *et al.*: *PLoS ONE*, 7(5), e37226 (2012).

次世代シーケンサーを活用した研究事例と、 それを支える公共ツール・データベース

大田 達郎

情報・システム研究機構 ライフサイエンス統合データベースセンター

超並列 DNA シーケンサー、いわゆる次世代シーケンサー(NGS)は、1塩基配列あたりのシーケンスコストの急激な低下をもたらし、医学生物学における様々な分野で利用されるようになった。しかし、NGS から得られるデータは、従来の実験装置から得られるデータと比較して非常にデータサイズが大きいことや、データの処理に従来よりも大型の計算資源を要することなど、これまでの生命科学研究では見られなかった情報学的な問題を引き起こしている。さらに、昨今のシーケンシング技術の進歩は非常に速く、それに伴って新たなシーケンシングの応用手法、そしてデータ解析手法が次々と生み出されているため、研究者がそれぞれの研究目的に対して、最も適当な技術や手法を選択することが困難となっている。このような問題を受け、NGS のデータやデータ解析手法、さらにそこから得られた知見を集積・整理し、それらを再度研究において利活用することの重要性が高まっている。

ライフサイエンス統合データベースセンター(DBCLS)では、大規模な塩基配列データに関する諸問題を解決するため、公共の NGS データ・レポジトリである Sequence Read Archive (SRA)に登録されたデータを、関連するデータベースと統合することで整理し、より高度なデータ検索技術を開発することで、研究者が必要な情報に対して容易にアクセスできる環境を構築している(1)。2014年5月現在、SRA には 39,000 以上の NGS プロジェクト、79,000 以上のシーケンスデータが登録されている。これらの大量のデータに付随する実験条件やサンプルの情報などを機械的に抽出し、データベースを構築・可視化を行うことで、NGS を用いた研究全体を俯瞰することが可能となった(2)。また、登録されるデータの特徴の変化を時系列に追うことで、研究に用いられるシーケンス技術の変化を可視化し、分野ごとの研究動向を把握、将来的な変化を予測するという試みを行っている。さらに現在、日本 DNA データバンク(DDBJ)との連携の元、塩基配列データに関する様々なデータを横断的に検索することを可能にすることで、データベース利用者に対して必要な情報を正確に提供するための枠組みの構築に取り組んでいる。

本講演では、DBCLS における塩基配列に関連するデータベースの整理・構築と、DDBJ などの関連組織によって提供されているデータベースやデータ解析ツールについて紹介する。また、データベースに登録された実際の研究事例に基づく NGS 技術の動向の予測を通して、公的なデータベースによる個々の研究プロセスの質の向上に資する情報を提供したい。

(1) DBCLS SRA <http://sra.dbcls.jp/>

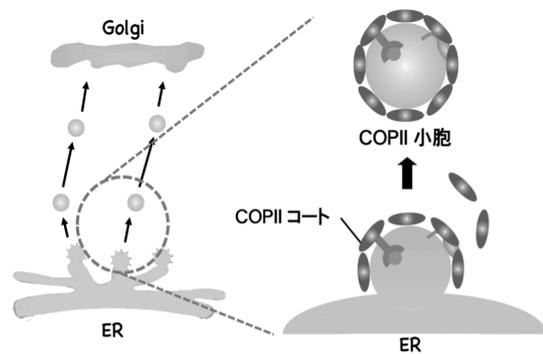
(2) Nakazato, T., Ohta, T., & Bono, H. (2013). Experimental Design-Based Functional Mining and Characterization of High-Throughput Sequencing Data in the Sequence Read Archive. *PloS one*, 8(10), e77910.

出芽酵母をモデルとした小胞体における輸送小胞形成の時空間制御

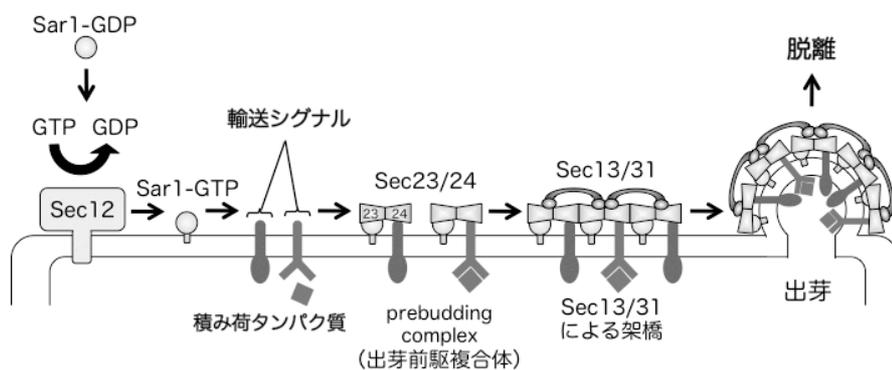
佐藤 健

東京大学 大学院総合文化研究科

「メンブレントラフィック」(小胞輸送)が昨今、細胞生物学でホットな研究分野の一つとなっている。昨年のノーベル医学生理学賞がこの分野の基礎を築いた研究に贈られたことは記憶に新しい。メンブレンとは、真核細胞内のオルガネラを指し、トラフィックとは運び役の膜小胞によるタンパク質や脂質の輸送である。タンパク質は合成された時から細胞内のどこへ運ばれるのかがきちんと指定されており、メンブレントラフィックによって指定通りの場所まで輸送される。特に小胞体からの輸送は、各オルガネラで機能するタンパク質や分泌タンパク質など、細胞内の全タンパク質の約3分の1が経由するメンブレントラフィックの大動脈である。この小胞体からのメンブレントラフィックを担うのがCOPIIコートと低分子量GTPase Sar1によって形成されるCOPII小胞とよばれる輸送小胞である。COPII小胞による輸送反応は高度に時間的、空間的制御を受けており、例えば輸送を必要とするタンパク質の増減に応じて小胞形成が促進や抑制を受けて刻々と変化する。また、COPII小胞の形成はER exit siteと呼ばれる小胞体上のサブコンパートメントで行われ、このコンパートメントの数を増減させることによっても輸送が調整されている。



これまでに我々は出芽酵母をモデルとして、小胞体からのCOPII小胞の形成を精製因子とプロテオリソームを用いて再現する試験管内再構成系や、COPII小



胞の形成過程のダイナミクスをリアルタイムで蛍光イメージングする手法を用いて、積み荷タンパク質が厳密な分子選別を受けてCOPII小胞へと濃縮されるメカニズムや、ER exit siteの構築機構について詳細な解析を行ってきた。本講演では、我々の研究から明らかになってきた小胞体からのメンブレントラフィックの分子メカニズムについて紹介する。

酵母に見出した一酸化窒素による抗酸化機構とその応用

高木 博史

奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科

一酸化窒素 (NO) は細胞内でアルギニンから NO 合成酵素 (NOS) によって生成し、シグナル分子として血圧調節、神経伝達、アポトーシス、感染・炎症など幅広い生命現象に関わっている。酵母 *Saccharomyces cerevisiae* においても、NO はストレス応答に関与すると考えられるが、ゲノム上に哺乳類 NOS のオルソログが存在せず、ほとんど研究は進んでいない。

我々は最近、酵母において高温処理のような酸化ストレス下で、アルギニンから Tah18 タンパク質依存的に NO が生成し、細胞にストレス耐性を付与することを見出した^{1), 2)}。Tah18 はジフラビンレダクターゼファミリーに属しているが、一次構造上 NOS 活性に必須のオキシゲナーゼドメインが欠落しており、Tah18 による NO 合成機構は明らかになっていない。通常、Tah18 は Dre2 タンパク質と相互作用し、鉄硫黄クラスターの形成に関与している。興味深いことに、Dre2 は Tah18 依存的な NOS 活性を抑制することから、酸化ストレスによって Tah18-Dre2 複合体から Tah18 が遊離することで NOS 活性が誘導されるモデルを考えている。Tah18 は真菌に高度に保存されており、抗真菌剤の標的分子として利用できる可能性もある。

またこれまでに、非酵素的な NO 発生ドナー (SNAP) を用いた解析から、NO が銅イオン代謝に関与する転写因子 Mac1 の活性化を介して、細胞内の銅含量と銅依存性スーパーオキシドディスムターゼ Sod1 の活性を上昇させることを示唆する結果を得ている。Mac1 にはシステイン残基を多く含むモチーフが存在し、銅イオンが結合することで不活性状態になる。また、細胞内の銅イオンが枯渇すると、何らかのシグナルにより Mac1 は活性化し、銅イオンの取り込みを促進する。我々は Mac1 が NO の標的タンパク質であると予想しており、実際に高温処理を行った酵母では、未処理の酵母に比べ細胞内の銅含量や Sod1 の活性が有意に増加した。これらの結果から、高温ストレス下で酵母の細胞内で生成した NO によって活性化された Mac1 が銅の取り込みを促進し、Sod1 を活性化することで、高温に伴い細胞内に発生する活性酸素種 (ROS) が除去され、ストレス耐性を獲得するというモデルを考えている。

産業酵母への応用例として、プロリン/アルギニン代謝を強化したパン酵母の二倍体株を製作した³⁾。その結果、野生株に比べ細胞内の NO レベルは有意に上昇し、ROS レベルが低下した。また、酸化ストレス耐性が向上し、製パンストレスである乾燥、冷凍に対しても同様の結果が得られた。NO が細胞に酸化ストレス耐性を付与し、乾燥・冷凍耐性を獲得したと考えられる。さらに、野生株に比べ乾燥後及び冷凍後の生地発酵力がそれぞれ約 20%増加した。これらの結果は、NO が複数の製パンストレスに対する耐性を向上させることを示している。

¹⁾ *FEMS Yeast Res.*, **10**, 687-698, 2010. ²⁾ *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **430**, 137-143, 2013. ³⁾ *Microb. Cell Fact.*, **11**:40 doi:10.1186/1475-2859-11-40, 2012.