

高濃度エタノールによる翻訳抑制下で 優先的に翻訳される酵母遺伝子の解析

井沢 真吾

(京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科)

グルコース枯渇ストレスは翻訳活性を強く抑制するため、大部分の酵母遺伝子は同ストレス下で転写活性化されてもその発現は抑制されてしまう。ところが、*HSP26* などの一部の遺伝子はグルコース枯渇ストレス下でも効率的に翻訳され、「選択的・優先的な翻訳」が酵母細胞内で行われることが近年明らかにされている (Zid and O'Shea, 2014)。このようなグルコース枯渇ストレス下での優先的翻訳にはプロモーター領域の heat shock element (HSE) の存在が不可欠であり、転写制御だけでなく、転写以降の mRNA flux の制御にもプロモーター領域が関与することを示唆している。また、熱ショック条件下の動物細胞では、翻訳伸長因子が核内の HSE にリクルートされ、さらに HSE をプロモーター領域に持つ遺伝子の mRNA と結合し、細胞質側の翻訳装置まで mRNA をエスコートすることで優先的な翻訳が行われるというモデルが提唱されている (Vera *et al.*, 2014)。そのため、酵母でも何らかの因子が mRNA に作用することで、選択的・優先的な翻訳が行われるのではないかと考えられている。

一方、アルコール発酵によって生じるエタノールは、酵母自身が作り出すにもかかわらず、高濃度になると酵母細胞に深刻な影響を及ぼすストレスとなる。高濃度のエタノールは酵母の mRNA flux に影響し、転写パターンの変化だけでなく bulk poly(A)⁺ mRNA 核外輸送の抑制、P-body や stress granule の形成促進、翻訳活性の抑制などを引き起こす。また、リグノセルロース系バイオマスの糖化前処理によって生じるバニリンやフラン化合物も高濃度で存在すると翻訳活性を阻害し、酵母の発酵や生育を抑制してしまう。グルコース枯渇ストレスと同様に、高濃度のエタノールやバニリンストレス下でも「選択的・優先的な翻訳」が行われていると予想されるが、これまでどの遺伝子が優先的に翻訳されているかは不明であった。

今回の研究会では、最近我々が同定した高濃度エタノールおよび高濃度バニリンストレス下でも優先的に翻訳される遺伝子について報告する。これらの遺伝子のプロモーターの有用性や、清酒酵母などの実用酵母と実験室酵母の違いなどを紹介するとともに、これらの遺伝子が優先的に翻訳されるメカニズムについても考察する予定である。

参考文献 Zid and O'Shea (2014) *Nature*, **514**: 117–121; Vera *et al.* (2014) *eLife*, **3**: e03164; Nguyen *et al.* (2015) *Front. Microbiol.*, **6**: 1390.

分裂酵母における細胞間コミュニケーションを担う

窒素源シグナリング因子の発見

八代田陽子

(理化学研究所 環境資源科学研究センター)

生物は環境中から生育に必要な栄養源を取り込む。特に単細胞で外界の環境に直接曝されている多くの微生物は、細胞外の状況を検知し、細胞内プロセスを調節する機構を発達させ、効率良く栄養源を確保する。酵母は培地中の利用しやすい良質な窒素源（アンモニア、グルタミン酸等）を優先的に取り込むため、利用しやすい窒素源が存在すると、利用しにくい窒素源（プロリン、分岐鎖アミノ酸（ロイシン、バリン、イソロイシン）等）の利用・取り込みに必要な酵素やトランスポーターの発現を抑制する。この機構は窒素源カタボライト抑制と呼ばれる。

分裂酵母の分岐鎖アミノ酸要求性株 (*eca39Δ* 株) は、利用しやすい窒素源であるグルタミン酸を含む最小培地においては、窒素源カタボライト抑制機構が働き、分岐鎖アミノ酸が含まれていてもそれらを取り込めず生育不可能となるが、野生株の近傍にて培養することにより生育が可能となる適応現象を我々は見出した。この現象は、野生株から細胞外へ分泌された何らかの物質により、*eca39Δ* 株において窒素源による抑制機構が解除され、アミノ酸の取り込み能が回復することで引き起こされたと考え、我々はこの分泌されている物質の分離・同定を行った。その結果、フェロモン様のナノモルレベルの極低濃度で作用する不飽和脂肪酸 2 種 10(*R*)-hydroxy-8(*Z*)-octadecenoic acid ($C_{18}H_{34}O_3$) および 10(*R*)-acetoxy-8(*Z*)-octadecenoic acid ($C_{20}H_{36}O_4$) を同定した。これらの不飽和脂肪酸により誘導される適応生育現象は *eca39Δ* 株だけではなく、ロイシン要求性株 (*leu1* 株) においても見られた。*leu1* 株は高濃度アンモニアを含む最小培地においてはロイシンが含まれていても生育が抑制されるが、不飽和脂肪酸を添加すると生育が促進された。さらに、その生育の促進はアミノ酸トランスポーターをコードする *agp3⁺* 依存的であることがわかった。よって我々はこれらの不飽和脂肪酸を「窒素源シグナリング因子 (Nitrogen Signaling Factors)」と命名した。本研究結果より、分裂酵母において、自ら分泌する窒素源シグナリング因子を介して、アミノ酸の取り込みを調節する新規の細胞間コミュニケーション機構が存在することが示唆された。この発見は、酵母をはじめとする微生物の化学物質を介した細胞間コミュニケーション機構を解明する上で重要な知見を提供すると考えられる。

TetR ホモログを利用した酵母制御性プロモーターの開発

生嶋 茂仁

(キリン株式会社)

遺伝子の時期特異的発現システムは、バイオテクノロジー分野の研究開発において必須のツールである。酵母においてはガラクトースやメタノール (C1 化合物) 誘導性のプロモーター、メチオニン抑制性のプロモーターなどが知られているが、いずれのプロモーターもその利用のためには細胞の培地組成に大きな制約がかかる。このことは、制御したい遺伝子以外、つまり、目的としていない遺伝子や代謝にも多大な影響を与えてしまう問題につながる。そこで発表者は、酵母細胞にとどまらず哺乳類細胞でも広く利用されているテトラサイクリンを利用した遺伝子発現システムに対してアナログな遺伝子発現システムの構築を試みた。本講演ではその取り組みの中で得られた成果を紹介するが、例えば、TetR ホモログである *Pseudomonas* 由来の CamR を利用した場合、カンファー (樟脳) を培地に添加することで、酵母細胞に導入した遺伝子の発現をオフにできるシステムの開発に成功した¹⁾。本システムは、テトラサイクリンによる遺伝子発現制御系との同時利用が可能であることや、発現制御に必要な濃度のカンファーを培地に添加しても酵母の増殖に影響しないことも明らかにした。なお、この発現系の開発に先立っては、複数の遺伝子断片を簡便にクローン化することができる One-pot ライゲーションシステムを整備した²⁾。以上の成果は、基礎から応用にわたる酵母を題材とした幅広い研究開発に貢献するツールとして期待できる。

本成果は Dr. Jef Boeke 研究室 (米国・Johns Hopkins 大学 / New York 大学) とキリン (株) が共同で創出したものである。

< 参考 >

1) Ikushima *et al.*, *G3 (Bethesda)*, Vol. 5, 1983–1990 (2015)

2) Agmon *et al.*, *ACS Synth. Biol.*, Vol. 4, 853–859 (2015)

乳酸菌と酵母で発酵した発酵乳の香りの機能性研究

川口恭輔

(アサヒグループホールディングス株式会社 コアテクノロジー研究所)

一般的に発酵乳は乳酸菌を用いて作られているが、古来より伝わるケフィールやクミスなど一部の伝統的な発酵乳では、乳酸菌のみならず酵母も利用されていることが明らかとなっている。アサヒグループでは、乳酸菌と酵母で発酵した発酵乳に着目し、本発酵乳の香りが嗜好選択性を高めることをこれまでに明らかにしてきた。発酵乳の生理機能研究に関してはメチニコフが1908年に提唱した「不老長寿説」を機に大きな関心が寄せられるようになり、これまでに発酵乳の摂取による寿命延長効果、抗腫瘍効果、感染防御・免疫賦活効果、血圧降下作用などの多岐にわたる生理機能が報告されているものの、その香りの機能性に着目した研究は少ない。そこで我々は、乳酸菌と酵母で発酵した発酵乳の香りに着目した機能性研究を実施した。

本発酵乳の香りが嗜好選択性を高めることから、自律神経活動への影響を動物実験にて検証した結果、本発酵乳の香りは鎮静様の自律神経調節（胃副交感神経活動の亢進・副腎交感神経活動の抑制）作用を有することが判明した。そこで、自律神経活動の変化から推定される生理機能を動物実験にて検証した結果、本発酵乳の香りは抗不安作用、日周リズム改善作用を有することを確認した。また、ヒト試験にて、本発酵乳を用いた乳酸菌飲料の香りは、副交感神経活動を亢進し、不安感を和らげることが明らかとなった。更に、本発酵乳の香りはノンレム睡眠期の占有率を増加させ、覚醒期の占有率を減少させるなど睡眠改善効果を有することが動物実験にて示唆された。

乳酸菌や酵母の産業利用を見据えた生理機能研究においては、菌体自体や発酵過程で生成するペプチド等の不揮発性物質に焦点を充てたものが大多数であるが、近年は主として酵母発酵を利用した飲食品であるワインやウイスキーの香りの生理機能に着目した研究も行われつつある。アサヒグループでは本発酵乳の香りの研究知見をもとに香料を作製し飲食品への活用を進めているが、本講演が産業利用を見据えた酵母研究を考える上での一助となれば幸いである。

清酒酵母の単細胞フェノタイピング

大矢禎一

(東京大学 大学院新領域創成科学研究科)

我々は CalMorph というハイスループット画像解析システムを使い、出芽酵母の単細胞フェノタイピングに関する基礎研究を長年行ってきた。単細胞フェノタイピングとは、細胞形態などの個々の細胞の表現型情報を集めて意味のある生物的知識を引き出すことである。その結果、類似した遺伝子機能の欠損は同じような表現型を示すことを示し、「遺伝子の機能」と「変異株の表現型」の間に見られる一般原理を明らかにした。さらに機能未知遺伝子の機能が予想できること、薬剤の細胞内標的が予想できることを示した。生物が持つ表現型のシステムレベルの理解を進め、システムが持つ頑強性（ロバストネス）を細胞の形態表現型の均一性から研究してきた。ごく最近 CalMorph の研究はバイオテクノロジーの分野でも利用されるようになってきており、今回の発表では清酒酵母の研究について概説する。

I. 遺伝的に安定な清酒酵母の簡便な検査法

清酒酵母の研究を始めたきっかけは、酒造会社との共同研究である。ごく最近朝日酒造（株）の田村博康、平田大らは、カプロン酸エチルを高生産し、紡錘体形成チェックポイントが正常で染色体が安定な清酒酵母（G9CR）の育種に成功した（Tamura et al., 2015）。我々は染色体の安定性と細胞システムの頑強性が関係していること、およびシステムの頑強性は細胞形態の均一性から判断できることから、「染色体が不安定な清酒酵母よりも染色体が安定な清酒酵母の方が、細胞システムが頑強、つまり形態的に均一ではないか」と考えた。実際に CalMorph で調べてみたところ、予想通りシステムの頑強性の指標である「形態ノイズ指標」に差が見られ、染色体が安定な清酒酵母の方が形態的に均一になっていた。さらに、染色体の不安定性、形態の不均一性を与える変異を突き止め（Goshima et al., 2016）、これらのことから染色体の安定性は形態ノイズ指標を用いて簡単に判断できることを提案した。

II. 清酒酵母の網羅的な形態解析からわかること

酒類総合研究所の赤尾健らの研究チームは、協会酵母を含む清酒酵母の網羅的なゲノム配列を明らかにしている。そこで、我々はこれら清酒酵母 27 株の単細胞フェノタイピングを行い、確率分布に基づく一般化線形モデルを導入して清酒酵母間の形態的違いを検出し、主成分分析などの多変量解析を行って清酒酵母間の形態的多様性を解析した。驚いたことに、遺伝的多様性は小さいにも関わらず、清酒酵母の形態的多様性は自然界に存在する全出芽酵母 *S. cerevisiae* 野生型株に匹敵するほどであり、形態的な変化が頻繁に清酒酵母内で起きていることが明らかになった。さらに形態情報を指標にして清酒酵母の育種過程を精査し、突然変異株を取得する時や交配の時にどのような形態変化が見られるか、その規則性を明らかにした。さらに上述した形態ノイズ指標を算出することにより、形態的に不均一になり、システムの頑強性が弱まっている清酒酵母を特定することができた。今回の網羅的な清酒酵母の単細胞フェノタイピングのデータは育種の上で様々な重要な情報を提供すると考えている。