

産業用酵母での凝集性遺伝子、マルトース遺伝子の多様性

尾形智夫

(前橋工科大学 工学部生物工学科)

【序論】

古来より、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、ビール、ワイン、清酒等の酒類製造やパン製造に用いられてきた。今日の工業プロセスでは、各産業に最も適した酵母菌株が用いられてきている。例えば、ビール醸造においては、発酵液である麦汁中にマルトースが豊富であることから、マルトース発酵能が強い酵母菌株が選択され、さらに、ビール醸造では、次の発酵工程に使用した酵母が再利用されるので、発酵終了時に細胞凝集する酵母菌株が選択されている。次世代シーケンサー等を用いたゲノム配列解析で、産業用酵母のゲノム配列のほとんどは、代表的な実験室酵母 *S. cerevisiae* S288C と同じであることがわかってきた。本研究では、産業用酵母の特徴を表すためのゲノム配列が、実験室酵母のゲノム配列とのどの差異によって生じているのかを検討した。

【産業用酵母での凝集性 (*FLO*) 遺伝子、マルトース遺伝子 (*MAL*) の多様性】

いくつかの *FLO*, *MAL* 遺伝子が産業用酵母からクローニングされた。これらの遺伝子配列は、代表的な実験室酵母 *S. cerevisiae* S288C の対応するものと異なっていた。例えば、下面ビール酵母の凝集性に関与する *Lg-FLO1* 遺伝子は、窒素飢餓シグナルに応答して転写が誘導されると考えられている。この遺伝子のゲノム上の存在位置は、実験室酵母では、*FLO5* に相当する部位であるが、DNA 塩基配列には差異がみられている。これら *FLO*, *MAL* 遺伝子は、染色体末端テロメア周辺に存在している。この様な染色体末端での DNA 塩基配列の差異が、産業用酵母を特徴づける遺伝的要因の一部になっているのではないかと推察している。

REFERENCES:

- Ogata T, Izumikawa M, Kohno K, Shibata K (2008) Chromosomal location of *Lg-FLO1* in bottom-fermenting yeast and the *FLO5* locus of industrial yeast. *J Appl Microbiol* 105: 1186–1198.
- Ogata T (2012) Nitrogen starvation induces expression of *Lg-FLO1* and flocculation in bottom-fermenting yeast. *Yeast* 29: 487–494.

出芽酵母の細胞内 ATP 濃度の可視化とストレス応答

高稲 正勝

(群馬大学 未来先端研究機構 / 生体調節研究所 細胞シグナル分野)

細胞はその恒常性の維持や増殖に膨大な化学エネルギーを消費している。細胞内のエネルギーの大部分は ATP として流通しているため、細胞内 ATP 濃度の動的変化を理解することは細胞のエネルギー代謝機構を理解する上で重大な意義がある。しかしながら個々の細胞内の ATP 濃度を計測することはこれまで技術的に困難であった。

今回我々は、最近開発された蛍光タンパク質改変型 ATP 濃度指示プローブ QUEEN⁽¹⁾ を使用して、個々の出芽酵母生細胞内の ATP 濃度をレシオイメージングにより可視化することに成功した。非同調的に栄養増殖している酵母細胞集団は、細胞の大きさや細胞周期と無関係にほぼ均一な細胞質 ATP 濃度を示した。この結果は ATP 濃度を安定に維持する機構の存在を示唆する。

QUEEN を用いた解析により我々はグルコース飢餓や酸化ストレスにより細胞質 ATP 濃度が可逆的に低下することを見出した。さらに細胞内 ATP 濃度が低下している既知の酵母変異株は酸化ストレスに感受性を示すことを発見した。この結果から細胞質 ATP 濃度を高く保つことが酸化ストレス時の生育に必須であると考えられる。また細胞の経時老化に伴って、富栄養状態における細胞内 ATP 濃度が徐々に低下した。以上の結果と老化と酸化ストレスは密接な関係にあることを考え合わせて、酸化ストレスあるいは細胞内で生じる ROS により、細胞のエネルギー代謝活性が短期的（ストレス応答）あるいは長期的（老化）に調節される仕組みがあるのではないかと現在は予想している。

本研究はバイオセンサーを利用して個々の細胞の ATP 濃度変化を可視化することの強力な有用性を示すと共に、環境変化に応答して酵母細胞内 ATP 濃度を調整する機構の存在を初めて明らかにするものだと考えている。

(1) Yaginuma *et al.*, *Scientific Reports*, **4**, 6522 (2014)

翻訳開始因子 eIF6/Tif6 のプロテアソーム形成への関与

八代田英樹、松崎哲郎、村田茂穂

(東京大学 大学院薬学系研究科 蛋白質代謝学教室)

細胞周期の進行や DNA 修復、変性タンパク質の除去など細胞増殖には様々な面で選択的なタンパク質分解が必要である。そのような選択的タンパク質分解を一手に引き受けているのがユビキチン・プロテアソームシステムであり、ユビキチン・プロテアソームシステムは真核生物にとって必須なシステムとなっている。ユビキチン化されたタンパク質を選択的に分解する 26S プロテアソームは約 2.5 MDa の巨大なタンパク質分解酵素複合体で、3 種類の触媒活性を持つ 20S core particle (CP) とそれを制御する 19S 複合体という 2 つのサブコンプレックスから形成されている。そして 20S CP はお互いに相同な 14 種類 ($\alpha 1 \sim 7$ と $\beta 1 \sim 7$) のサブユニットが各 2 個ずつ計 28 個のタンパク質から、19S 複合体は 19 種類のサブユニットから出来ている。このように巨大で複雑な構造を持つ 26S プロテアソームがどのように形成されているのかという問題は、純粋に生物学的な興味を引くとともに、がんの治療薬として 20S CP 活性阻害薬が用いられていることを考えると医薬の面でも重要である。

近年、26S プロテアソームの形成過程にはプロテアソーム形成専門に機能していると思われる様々なシャペロンが関与していることがわかってきた。しかしながら、細胞内環境によって 26S プロテアソーム形成がどのように制御されているのかなど未だ形成過程を制御する仕組みに関しては不明な点も多い。我々は出芽酵母の DAmP (The Decreased Abundance by mRNA Perturbation) 株ライブラリーを用いて必須遺伝子に対し 1) アミノ酸アナログに感受性、2) 26S プロテアソームによって分解されるモデル基質の分解不全、3) プロテアソーム関連遺伝子の欠損変異との合成増殖遅延の 3 つの表現型を引き起こす DAmP 変異を探索し、翻訳開始因子 Tif6 の DAmP 変異を同定した。またヒトの Tif6 ホモログである eIF6 をノックダウンすると 20S CP 量の減少がみられたことから、eIF6/Tif6 のプロテアソームへの関与は真核生物で保存されていることが示唆された。eIF6/Tif6 はリボソーム 40S サブユニットと 60S サブユニットとの結合を制御するタンパク質であり、eIF6/Tif6 を介してタンパク質合成と 26S プロテアソームによるタンパク質分解は何らかの形で協調した制御を受けているのではないかと考えている。

ミトコンドリア内リン脂質代謝と輸送 : Ups2-Mdm35 複合体の役割

久下 理

(九州大学大学院 理学研究院 化学部門)

リン脂質の代謝調節と細胞内輸送は、生体膜の形成・機能維持に必須の反応であり、その分子機構解明は、現代生化学、分子生物学、細胞生物学の最も重要な研究課題の一つである。しかし現在、リン脂質の細胞内輸送機構に関しては、膜小胞を介した輸送、可溶性の脂質結合タンパク質を介した輸送、あるいは供与体膜と受容体膜の接触領域を介した輸送などいくつかの脂質輸送機構が作業仮説的には提唱されているが、生体膜の形成維持に実際に重要な役割を担う脂質輸送分子・装置、あるいは輸送反応がどのようなものかは、数例の限られたリン脂質の限られた生体膜間での輸送を除き、未だ良く理解されていない。

ミトコンドリアは、外膜と内膜の二重の生体膜で囲まれており、それら生体膜は、カルジオリピン (CL) とホスファチジルエタノールアミン (PE) を豊富に持つ特徴的なリン脂質組成を示す。酵母と哺乳動物のミトコンドリアには、ホスファチジン酸 (PA) から CL を生合成するために必要な一連の酵素と PE を合成するホスファチジルセリン (PS) 脱炭酸酵素が存在する。しかしこれら酵素は、ミトコンドリア内膜の内層あるいは外層に局在するため、これら酵素による CL と PE の生合成には、その合成原料となる PA あるいは PS がそれぞれ生合成された場所からミトコンドリア外膜に輸送され、さらにそれに引き続く外膜横断輸送と内膜への輸送や内膜横断輸送が必要である。従って、これら経路のリン脂質の輸送機構を解明することが、ミトコンドリアにおけるリン脂質代謝の理解に不可欠である。しかしこれまで、ミトコンドリア内でのリン脂質輸送機構は、ほとんど理解されておらず、当該輸送因子としては、外膜から内膜へ PA を選択的に輸送でき、ヒトにオルソログを持つ酵母の Ups1-Mdm35 複合体が同定されているのみであった。そこで我々は、酵母のミトコンドリア内リン脂質輸送に関与する新規因子の同定を試み、極最近、Ups1 のホモログであり、Mdm35 と複合体を形成する Ups2 が PS のミトコンドリア外膜から内膜への輸送に関与することを明らかにした¹⁾。興味深いことに、Ups2-Mdm35 複合体による PS 輸送は、酵母の培養条件により、呼吸活性が上昇したミトコンドリア内で活発となり、呼吸活性の低いミトコンドリア内ではあまり機能していないことが示唆された。

参考文献

1) Miyata, N. *et al. J. Cell Biol.* **214**, 77–88 (2016)