

蛍光高分子による細胞内温度測定法の開発とその応用例

辻俊一

(キリン株式会社 基盤技術研究所)

細胞内温度は、古くより細胞の複雑な代謝機能と密接な関係にあると考えられている。その一例として、酒類製造の発酵工程では酵母の働きを制御するために精緻な温度制御をしており、生産物の質的变化に及ぼす細胞内温度の重要性が経験的に理解されている。この知見に着目し、酵母細胞内温度を測定できる感温性高分子を利用した分子レベルの蛍光性温度センサーの開発に取り組んだ。開発における課題は、酵母細胞内への温度センサーの導入法にあった。動物細胞内温度測定時に使用していたマイクロインジェクション法は、酵母細胞の硬い細胞壁に阻まれ使用困難になるため、全く別の導入方法を開発する必要性が生じた。検討の結果、カチオン性ユニットを組み込んだ新たな蛍光性温度センサーは、酵母細胞懸濁液と混ぜるだけで10分以内に酵母細胞質内へ移行することを見出した。そして、最も感度の高いセンサーである NN-AP2.5 は、25°C から 35°C で蛍光強度が約 2 倍、蛍光寿命も 6.2 ns から 8.6 ns へと変化し、最高で 0.09°C ものわずかな酵母細胞の温度差を検出できた [1]。

上記で開発したカチオン性温度センサーは、濃度等の実験条件に影響を受けにくい測定パラメータとして主に蛍光寿命を選択していたが、蛍光寿命装置が高価であり汎用性に乏しい現状もあった。そこで、温度変化によって二波長における蛍光強度の比が変化する、いわゆるレシオ型センサーの開発を行った [2]。得られたセンサーは、酵母細胞のみならず哺乳類細胞にも利用できる汎用性の高いものであった。そこでレシオ型センサーを用いて、生体内のエネルギー消費の観点から注目を集めている褐色脂肪細胞の温度測定を行った [3] ので、その結果についても簡単にご紹介したい。

【文献】

1. Tsuji, T. *et al.*, *Anal. Chem.*, 2013, 85, 9815
2. Uchiyama, S. *et al.*, *Analyst*, 2015, 140, 4498
3. Tsuji, T. *et al.*, *Sci. Rep.*, 2017, 7, 12889

醤油酵母における香気成分の生成機構

渡部 潤

(ヤマサ醤油株式会社)

醤油は麴（大豆及び小麦が原料）と食塩水とを混合した諸味を発酵・熟成させて得られる清澄な調味料であり、その存在抜きに私たちの食生活は成立しないだろう。醤油の香りは様々な製造条件（原料配合、微生物、温度など）の複合的な作用により形成されると考えられており、これまでに 300 種類以上もの香気成分が醤油から報告されている。今回の講演では、以下の 2 点について紹介する。

1. 醤油の特徴香成分の生成機構

4-hydroxy-2 (or 5)-ethyl-5 (or 2)-methyl-3(2*H*)-furanone (HEMF) は主に醤油の主発酵酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* により生産される香気成分で、醤油の特徴香成分と考えられている。HEMF はカラメル様の甘い芳香を有するだけでなく、抗酸化活性などを有することから機能性成分としても注目されており、その量をコントロールすることができれば、醤油の香気特性の改変や、醤油への機能性の付与が可能になると考えられる。我々の解析により、①リボースとグリシンのメイラード反応により 4-hydroxy-5-methyl-3(2*H*)-furanone (HMF) が生成し、②この HMF が発酵で発生したアセトアルデヒドと化学的に縮合することで (2*E*)-2-ethylidene-4-hydroxy-5-methyl-3(2*H*)-furanone (EDHMF) が生成し、③ EDHMF が YNL134Cp により NADPH 依存的に還元されることで、HEMF が生成することが明らかになった。

2. *Z. rouxii* の皮膜形成に伴う不快臭成分生成

Z. rouxii の野生株の中には、諸味表面に皮膜を形成し、イソ吉草酸等の不快臭成分を生成することで醤油の品質を低下させる株が存在する。皮膜形成と不快臭成分生成との関連を明らかにするため、皮膜形成株と、皮膜形成の原因遺伝子である *FLO11D* を破壊した株とを様々な条件で培養し、生産される香気成分を比較した。その結果、①イソ吉草酸などの不快臭成分はエーリッヒ経路を介した分岐鎖アミノ酸の異化によって生成すること、②ロイシンの異化には、これまで知られていた *Bat1p* に加え *Aro8p* も *in vivo* で関与すること、③皮膜形成により細胞が空気に暴露され、エーリッヒ経路が酸化側に傾くことが不快臭成分の生成の直接的な原因であり、細胞が空気に接触しない条件下では不快臭成分の生成は抑制されることが明らかになった。醤油諸味に皮膜が形成された場合、皮膜を諸味に押し込む「カビ消し」作業が伝統的に行われてきた。本研究結果から、「カビ消し」は皮膜形成した細胞を嫌氣的な諸味中に留めることで不快臭の生成を抑制する、理にかなった作業であることが裏付けられた。

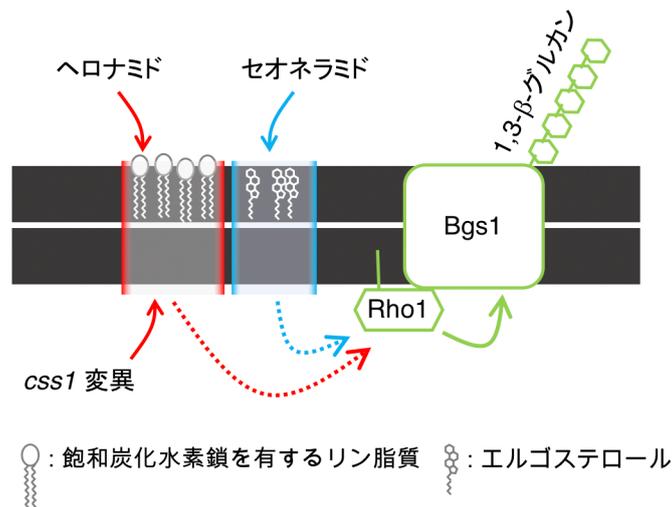
分裂酵母をもちいた生体膜標的型分子の探索と機能解析

西村慎一

(東京大学大学院 農学生命科学研究科)

細胞は細胞膜により外界と隔てられ、細胞内はオルガネラ膜により仕切られている。生体膜では様々な反応が制御され、疾患関連イベントも多く起こる。そのような生体膜の構造・機能をイメージするモデルに流動モザイクモデルや脂質ラフトモデルがある。しかし生体膜の重量にして約 50% を占めるとされる膜脂質は、遺伝子に直接コードされていないため解析手段に乏しく、機能の理解が進んでいない。一方で、膜脂質は感染症治療薬の標的となっており、脂質に結合する新しい化合物が求められている。

演者らは真菌細胞膜に作用する化合物の探索とその作用解析をすすめてきた。多様な化学構造を有し、ユニークな生理活性を示すことがしばしばある天然物を探索源として、スクリーニングは分裂酵母の遺伝子変異株を用いた比較試験により行ってきた。すなわち、膜脂質の主成分であるエルゴステロールの生合成に必要な遺伝子を欠損する変異株は、膜脂質を標的にする抗真菌化合物に感受性が低下することを利用して、野生株には効果を示すが変異株には効果の低い化合物を探すのである。本講演では細胞壁の肥厚というユニークな表現型を誘導する、ステロールを標的にする海洋天然物セオネラミド (*Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 519.) と、飽和炭化水素鎖を有するリン脂質を標的にする海洋放線菌代謝物ヘロナミド (*J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 5209.) について、化合物探索と作用メカニズムの解析について紹介する。



細胞壁肥厚の分子メカニズム。セオネラミドはエルゴステロールに結合し、ヘロナミドは飽和炭化水素鎖を有するリン脂質に結合する。その結果、低分子量 GTPase Rho1 と 1,3-β-グルカン合成酵素 Bgs1 の活性を通じて細胞壁の主成分の一つである 1,3-β-グルカンが過剰に合成される。活性化の分子メカニズムは未解明であり、現在解析中である。

出芽酵母前孢子膜形成の研究

—新しい膜構造を構築する分子メカニズムの理解を目指して—

舘川宏之

(東京大学 大学院農学生命科学研究科・

東京大学 微生物科学イノベーション連携研究機構)

出芽酵母の孢子形成は、2倍体細胞内に4つの新しい1倍体孢子をつくり出すダイナミックな細胞内再編成の過程である。この過程において、細胞内に前孢子膜と呼ばれる新規二重膜構造が形成され、細胞質や核を含むオルガネラを取り込んで伸長し、閉鎖して孢子膜となる。前孢子膜形成には、オートファジーの隔離膜の形成と類似点があるものの、全く異なる因子が関与している。また、オルガネラ形成や、高等動物の繊毛形成、精子の先体の形成、植物の細胞板形成も同様に新しい膜構造を構築する過程であり、前孢子膜形成の研究はこれらの過程の理解につながると考えられる。

我々は前孢子膜の伸長にフォーカスして、その分子メカニズムの解明を目指している。これまでの研究で、前孢子膜伸長に関与する因子として、1型プロテインホスファターゼである Gip1-Glc7 複合体に加えて¹⁾、Spo73, Spo71, Vps13 が必要であることを示してきた。Spo73 は機能未知のディスフェリンドメインのみからなり、Spo71, Vps13 と複合体を形成し²⁾³⁾、前孢子膜伸長に寄与することが推測されているものの、この複合体による膜伸長の分子機構は不明である。そこで、*spo73Δ* の孢子形成能を部分的に回復するマルチコピーサプレッサーのスクリーニングを行い、細胞膜上の PI 4-キナーゼ (PI4K) 複合体をコードする、*STT4* の遺伝子断片および *EFR3* を得た。これに基づいて様々な解析を行い、*spo73Δ* において前孢子膜上の PI4P 量を減少させることにより前孢子膜の伸長が回復することを明らかにした。このことは、Spo73 が前孢子膜上の PI4P の量の制御に関与することを示唆している。最近、Vps13 が細胞内の様々な膜コンタクトサイトに局在すること、PI4P の量の制御には膜コンタクトサイトが関係することが報告されている。そこで、小胞体-細胞膜接触部位の繫留タンパク質の孢子形成時における局在を解析したところ、それらが前孢子膜上に局在すること、またさらにその局在が *spo73Δ* において異常になることを見出した。これらの結果より、Spo73 が Spo71, Vps13 と複合体を形成し、小胞体-細胞膜接触部位の繫留タンパク質をリクルートして、ともに小胞体-前孢子膜接触部位を形成することにより前孢子膜の伸長に寄与するというモデルを立てて検証を試みているので報告したい。

1) Nakamura TS et al. 2017 *Mol. Biol. Cell* 28: 3881–3895.

2) Park JS et al. 2013 *Eukaryot. Cell* 12: 1530–1537.

3) Okumura Y et al. 2016 *mSphere* 1: 00038–15.

出芽酵母をモデルとした4Dイメージングで迫る真核生物の膜交通

黒川量雄

(理化学研究所 光量子光学研究センター

生細胞超解像イメージング研究チーム)

要旨)

生物の基本単位である細胞が生命活動を維持するためには、多種多様なタンパク質がそれぞれ働くべき場所に運ばれ、機能することが必要です。細胞内で新たに作られる全タンパク質の約3分の1は、小胞体で合成され、その後ゴルジ体へと輸送された後に仕分けされ、それぞれが働くべき場所であるオルガネラ等に輸送されます。ここでは小胞などの細胞内膜構造を介した輸送機構が働いており、この機構をメンブレントラフィック（膜交通）と呼んでおります。細胞内を縦横に結ぶ膜交通の破たんは、積荷として運ばれるタンパク質の輸送の破綻をもたらします。その結果、細胞の生命活動の阻害が起き、ヒトにおいては重大な疾患につながります。

この膜交通の基本的な仕組みは全ての真核生物に共通であると考えられております。現在までに遺伝学や生化学的なアプローチで多くの研究がおこなわれてきました。私は、生きた細胞内でどのように積荷タンパク質が輸送されるのか、その様子を直接見て理解していきたいと考え、モデル生物である出芽酵母を用いて研究を進めています。生きた細胞内の膜交通機構を明らかにするためには、高速、高感度、高解像度で細胞内のタンパク質局在を4次元（3次元+時間）で可視化する必要があります、そのために私たちの研究室では、SCLIM (Super-resolution Confocal Live Imaging Microscopy) と名づけた顕微鏡システムを開発し、それを用いて研究を進めています。本講演では、SCLIMを用いて明らかにしてきた出芽酵母のメンブレントラフィックについてご紹介いたします。

参考文献)

Ishii M, Suda Y, Kurokawa K, and Nakano A. (2016). COPI is essential for Golgi cisternal maturation and dynamics. *J Cell Sci.* 129: 3251-3261. DOI: 10.1242/jcs.193367.

Kurokawa K, Suda Y, and Nakano A. (2016). Sar1 localizes at the rims of COPII-coated membranes in vivo. *J Cell Sci.* 129: 3231-3237. DOI: 10.1242/jcs.189423.

Kurokawa K, Okamoto M and Nakano A (2014). Contact of cis-Golgi with ER exit sites executes cargo capture and delivery from the ER. *Nature Commun.* 5: 3653.