

清酒酵母の減数分裂染色体組換え欠損について

下飯 仁

(公益財団法人日本醸造協会)

清酒酵母は *Saccharomyces cerevisiae* に属する二倍体であるので、孢子形成により一倍体を取得し、それらを接合させることで交配育種が可能である。しかし、現在使用されている清酒酵母の多くは孢子形成率が低く、まれに形成された孢子の発芽率も非常に低いことが、交配育種の問題点となっている。我々は、清酒酵母きょうかい7号(K7)およびその近縁株では減数分裂時の染色体組換えに必要な *SPO11* の変異のために、孢子形成率および孢子発芽率が低下していることを明らかにしたのでご紹介したい。

まず、清酒酵母の減数分裂における染色体組換えについて以下の三つの方法で検討した。① K7 一倍体 100 株における 3 番および 8 番染色体の 2 か所のヘテロザイゴシティー間の組換え、② K7 一倍体 4 株の次世代シーケンサーによるゲノム解析、③ K6、K7、K9、K10 (K7 グループ) について、5 番染色体左腕 *CAN1* と *URA3* の間の組換え。その結果、①、②、③のいずれにおいても染色体組換えに由来する遺伝子型は観察されず、K7 グループの清酒酵母は減数分裂時の染色体組換えに異常があることがわかった。

次に、清酒酵母の減数分裂染色体組換え欠損の詳細を解析するために、組換え欠損を相補する遺伝子のクローニングを試みた。K7 由来株から *CAN1*、*TRP1*、*ADE2*、*HIS3* をヘテロザイガスに持ち、*ade2* と *his3* がシスの関係にある株 UTCAH-3 を選択して、プラスミドゲノムライブラリを形質転換した。形質転換体を孢子形成させた後、*canavanine* および 5-fluoroanthranilic acid を含みヒスチジンを含まない選択培地で培養し、一倍体のみがコロニー形成するようにした。*ADE2* と *HIS3* は共に 15 番染色体にあるため、染色体組換えがない場合、選択培地で生育する株は *can1 trp1 ADE2 HIS3* であり、すべて白コロニーとなる。一方、染色体組換えが生じた場合、組換え体である *can1 trp1 ade2 HIS3* も増殖するため赤コロニーも生じることになる。スクリーニングの結果、約 1 万個の形質転換体の中から赤色のコロニーを 1 株取得した。この株のプラスミドの中には減数分裂組換え時の染色体二重鎖切断をおこなう酵素をコードする *SPO11* が含まれていた。実験室酵母の *SPO11* で UTCAH-3 を形質転換すると、減数分裂染色体組換えと孢子発芽能が回復したが、K7 の *SPO11* を形質転換しても、減数分裂染色体組換えと孢子発芽能は回復しなかった。また、K7 *SPO11* は、実験室酵母の *spoil1Δ/spoil1Δ* の低孢子形成能や低孢子発芽率を回復させることができなかった。以上の結果から、K7 では *SPO11* が機能していないことが染色体組換え欠損と低孢子発芽能の原因であると考えられた。

Aspergillus 属糸状菌におけるセルラーゼ・ヘミセルラーゼ遺伝子の 発現制御メカニズム

國武 絵美

(三重大学 大学院生物資源学研究科)

糸状菌は自然界に存在する多様な多糖を資化することが可能であり、糸状菌由来の多糖分解酵素は様々な産業分野で利用されている。再生可能な資源であるセルロース系バイオマス利用の観点から、近年は特にセルラーゼ・ヘミセルラーゼの需要が高まっている。セルラーゼ・ヘミセルラーゼの生産は基質に由来する単糖や少糖による転写誘導と、グルコースのような資化しやすい炭素源によるカーボンカタボライト抑制 (CCR) により制御されているが、その詳細なメカニズムについては不明な点が多く残されている。効率的な酵素生産法の改良を目的とした分子育種を行うには、誘導と抑制の両面から遺伝子発現制御の分子メカニズムを解明することが重要である。本発表では、我々が研究対象とする *Aspergillus* 属におけるこれらの成果について紹介する。

Aspergillus 属の CCR に関わる転写抑制因子として Mig1p のオルソログである CreA が古くから知られている。しかしプレート培養時のグルコース存在下でのセルラーゼ生産は *creA* 変異株でも抑制されたままであることが *Aspergillus nidulans* において観察され、CreA 非依存的な CCR 経路の存在が明らかとなった。最近になって cAMP 依存性プロテインキナーゼ触媒サブユニット PkaA が CreA 非依存的 CCR の主要因子であることが発見され、また PkaA の上流因子である三量体 G タンパク質 α サブユニット 3 種のうち、group III の GanB が主に関与することも明らかになった。PkaA/GanB は CreA とは独立した CCR 経路に関与するが、培養方法や抑制炭素源の種類でその依存度は異なっており、複雑な CCR 機構が存在すると考えられる。セルラーゼに限らずキシラナーゼやマンナーゼの CCR にもこれら因子の関与が示唆されている。

セルラーゼ・ヘミセルラーゼ遺伝子の転写は各酵素遺伝子に特異的な $Zn(II)_2Cys_6$ 型転写因子により活性化されるが、これらは構造が類似しているにも関わらずその分子メカニズムは因子により異なる。*A. nidulans* のセルラーゼ遺伝子の発現は $Zn(II)_2Cys_6$ 型特異的転写因子 ClrB と広域転写因子 McmA (Mcm1p のオルソログ) に制御される。ClrB は全てのセルラーゼ遺伝子の発現に必須であるのに対し、McmA の依存度は遺伝子によって異なる。これは McmA と ClrB がヘテロ複合体として結合する CCGN₂CCN₆GG と McmA 非依存的に ClrB が結合する CGGN₈CCG の二種類の *cis*-element の存在により決定付けられている。ClrB や McmA が誘導物質であるセロビオースにどのように応答して遺伝子の転写を調節するのかは不明であり、今後の解析で明らかにしていきたい。

出芽酵母 *S. cerevisiae* が持つゲノムの記憶の分子機構

飯田哲史

(東京大学定量生命科学研究所)

細胞に必要な大量のリボゾームを供給するため、バクテリアからヒトまで複数コピーのリボゾーム RNA 遺伝子 (rDNA) がゲノム中に存在し、そのコピー数は各生物種で一定に維持されている。出芽酵母 *S. cerevisiae* においては、9.1 kb の rDNA ユニットが約 150 コピーのタンデムリピートを形成し第 XII 染色体上に維持されている。一般にリピート遺伝子のコピー数はユニット間の相同組み換え反応により減少する傾向にあるが、コピー数が減少した rDNA リピートは、ゲノム複製時に DNA 二本鎖切断 (DSB) を誘導する仕組みを利用し、DSB の不均等な組み換え修復によって rDNA コピー数を回復する。しかし、酵母がどのように (i) rDNA の“適正な”コピー数 (150 コピー) を“記憶”し、(ii) コピー数減少の異常を感知したのち、(iii) 組み換え修復を起動させコピー数を回復するかは長い間謎であった。我々は、一連の rDNA の適正なコピー数の記憶と維持の分子機構を明らかにするため、不均等な組み換え修復を抑制する *SIR2* 遺伝子の発現制御に注目し、遺伝学スクリーニングによる関連因子の同定と解析を行った。その結果、リボゾーム RNA の転写活性化因子 UAF を介した極めてシンプルな *SIR2* 遺伝子の発現制御機構により、適正なコピー数の記憶と rDNA コピー数の維持制御が行われていることが明らかとなった。

rDNA リピートにおける転写や組み換え修復の制御は、RNA ポリメラーゼ I、RNA ポリメラーゼ II、RNA ポリメラーゼ III の転写制御や、細胞増殖シグナル、細胞周期、DNA 複製、クロマチン構造、組み換え修復など様々なゲノム制御機構からなっている。rDNA の一見複雑な生命現象についても、次世代シーケンサーを用いた古典的な酵母の順遺伝学は、極めて迅速にシンプルな解を与えてくれた。この発表では、我々が酵母の順遺伝学の為に維持してきた、“誰もが使える次世代シーケンサーによる変異同定ツール”についても紹介したい。

過剰発現実験により探る酵母細胞の生き様

守屋 央朗

(岡山大学 環境生命科学研究科／異分野融合先端研究コア)

出芽酵母 (*S. cerevisiae*) の 2 μ m DNA を改変した 2 μ プラスミドは、古くから多コピーの安定なベクターとして利用されてきた。多コピープラスミドにネイティブな制御領域ごとなんらかの遺伝子を組み込むと、コピー数が増えた分だけその遺伝子が過剰発現することになる。もし、組み込まれた遺伝子の過剰が酵母の増殖に悪影響を与えるようなら、細胞あたりのプラスミドのコピー数は、その遺伝子が増殖阻害を起こさないコピー数以下に維持される。ネイティブな制御領域を持つ遺伝子の発現量がコピー数の増加に伴って直線的に増えていくと仮定すると、細胞内のプラスミドのコピー数は、その遺伝子がネイティブな発現量から何倍増えたら増殖阻害を起こすかという、「限界発現量」を反映している。培養条件により 100 コピー以上になる性質をもつ 2 μ プラスミドを用いると、組み込んだ遺伝子が 100 コピーまでのどのコピー数で増殖阻害を起こすかを見積もることができる

私たちは、このような原理に基づく実験法を「遺伝子つなひき (gTOW) 法」と呼び、これまでに出芽酵母の 5,800 種類すべての遺伝子の限界発現量を見積もった。その結果、80% 以上の遺伝子は 100 倍以上の過剰発現が起きても酵母の増殖を阻害しないが、115 種類の遺伝子はわずか 10 倍程度の過剰により増殖阻害を起こすことを明らかにしている。さらに私たちは、なぜこれらの遺伝子がわずかに過剰になっただけで増殖阻害を起こすのかを調べることで、過剰発現による増殖阻害の一般的なメカニズムを調べている。

過剰発現は酵母の増殖に悪影響を与えるだけではない。環境によっては、特定の遺伝子の通常の発現量を超えた過剰発現が増殖に有利に働く場合もある。酵母のそれぞれの遺伝子を組み込んだ 2 μ プラスミドを保持する酵母細胞を混ぜる。それを特定の環境で競合的に培養した後に、細胞集団からプラスミドを回収して次世代シーケンサーでインサートの出現頻度を調べる。すると、どの遺伝子の過剰がその環境で有利に働いたかが分かる。私たちは、現在このような方法で様々な環境で過剰が有利に働く遺伝子の取得を試みている。例えば、富栄養条件の高温での増殖には高温で分解されやすい 2 つのタンパク質の過剰が有利に働いた。それ以外の様々な条件で取得されてきたものは、なぜそれらの過剰がその環境で有利になるのか説明できない遺伝子が多数含まれていた。