

tRNA を切断する毒素～巧妙な分子戦略に迫る～

小川哲弘

東京大学大学院農学生命科学研究科

微生物は、毒素を生産し、これを「武器」として生物学的優位性を獲得している。毒素の作用機構は、イオンチャネルの形成や DNA 合成阻害等様々であるが、これに加えて、この 10 年余りの間に、tRNA を標的とする毒素が新たに発見されてきた。酵母の世界では、*Kluyveromyces lactis* および *Pichia acaciae* が生産するキラ毒素である zymocin、PaT が挙げられる。Zymocin は、出芽酵母 tRNA^{Glu}_{mcm5s2UUC}, tRNA^{Lys}_{mcm5s2UUU}, tRNA^{Gln}_{mcm5s2UUG} (mcm⁵s²U: 5-methoxycarbonylmethyl-2-thiouridine) を、全て 34 位と 35 位 (アンチコドン 1 文字目と 2 文字目に相当する) の間で切断するリボヌクレアーゼであり、感受性酵母の細胞周期を G1 期で停止させる。一方、PaT は、出芽酵母 tRNA^{Gln}_{mcm5s2UUG} を、34-35 位および 32-33 位間で切断し、S 期停止を誘導する。原核生物では、大腸菌を殺菌する毒素であるコリシン E5、コリシン D が、tRNA 特異的リボヌクレアーゼである。コリシン E5 は、大腸菌 tRNA^{Tyr}, tRNA^{His}, tRNA^{Asn}, tRNA^{Asp} のアンチコドンループを、zymocin と同様、34-35 位間で切断する。また、コリシン D は、大腸菌に 4 種類存在する tRNA^{Arg} を、全てアンチコドンループの 3' 末端で切断する。

これら tRNA を標的とする毒素では、殺菌する細胞や、切断する tRNA 種は異なるものの、いくつかの共通点が見られる。第一に、tRNA のアンチコドンループを特異的に切断することである。コンパクトに折り畳まれた構造をとる tRNA は、アンチコドンループとアミノ酸受容システムのみがむき出しであり、種々のヌクレアーゼによる攻撃を受けやすい。しかし、これらリボヌクレアーゼは、アミノ酸受容システムではなく、アンチコドンループを切断する。第二に、これらリボヌクレアーゼは、特定の tRNA を選択的に切断する。こうした共通性は、tRNA 特異的リボヌクレアーゼによる翻訳阻害機構を明らかにする上で、重要な鍵となることが予想された。

我々は、コリシン E5、コリシン D の基質認識・触媒機構を、生化学的、結晶構造学的手法により明らかにすべく、研究を進めてきた。その過程で、切断された tRNA が、アミノアシル tRNA をリボソームへと運ぶ翻訳因子 (EF-Tu) と結合出来ることを明らかにした。また、tRNA 特異的リボヌクレアーゼが切断する tRNA は、全て細胞内存在量が多い分子種であった。これらを踏まえると、切断された tRNA が、リボソーム A 部位に運ばれて翻訳が阻害されること、また、存在量の多い tRNA を切断することで、翻訳渋滞の重篤化を引き起こすことが考えられる。これらの情報は、tRNA 特異的リボヌクレアーゼに見られる共通性をうまく説明出来る。

本講演では、こうした tRNA 特異的リボヌクレアーゼの巧妙な分子戦略について、最近の様々な知見を交えつつ紹介したい。

タンパク質と脂質の輸送と合成からみた酵母ミトコンドリアの生合成機構

遠藤斗志也

名古屋大学大学院理学研究科

ミトコンドリアは真核細胞に必須のオルガネラであり、好氣的 ATP 産生とともに様々な物質代謝・情報伝達を担い、アポトーシスにも関わる。ミトコンドリアの正常な構造と機能を維持するためには、ミトコンドリアを新たに作り出す必要がある。すなわち、細胞分裂に伴ってミトコンドリアを拡大分裂、娘細胞に分配するためにも、静止期の細胞で不良ミトコンドリアの除去に伴い新規ミトコンドリアを補充するためにも、ミトコンドリアの生合成が必要である。しかしミトコンドリアは *de novo* には作り出せないため、その構成成分であるタンパク質（出芽酵母では約 800 種類）と特定組成の脂質を、既存ミトコンドリアに合成・配送しなければならない。

ミトコンドリアへのタンパク質の配送を担うトランスロケータは、基質タンパク質自身に書き込まれた「行き先シグナル」を読み取り、ミトコンドリア内の適切な区画に仕分け、膜への組み込みや他のタンパク質とのアセンブリーを実現する。現在までに 5 種類の主要配送経路と 35 種を超える因子の関与が見いだされている。最近われわれは、ミトコンドリアや小胞体へのタンパク質の配送と新生鎖の品質管理が共役していることを見いだした。すなわち、ミトコンドリアタンパク質や分泌タンパク質の mRNA から終止コドンが欠損すると、翻訳が完了しないノンストップタンパク質が生じてリボソームをストールさせるとともに、ミトコンドリアやトランスロケータのチャンネルを詰まらせてしまうこと、これを防ぐために細胞にはトランスロケータのチャンネルをクリアランスする機構が存在することを明らかにした¹。

一方脂質については、リン脂質合成に関与する酵素が小胞体 (ER) 膜とミトコンドリア内膜など一部のオルガネラ膜上に同定されているものの、脂質合成経路のバックアップシステムも含めて、その全貌はまだ十分に解明されていなかった。さらに脂質合成経路の中間体や合成産物の脂質がどのようにオルガネラ膜間を移動するのかについてはほとんど分かっていなかった。最近われわれは、以前ミトコンドリア内膜のトランスロケータのメンテナンス因子として同定した Tam41 が、カルジオリピン合成に必須のミトコンドリア局在 CDP-DAG シンターゼであることを発見した²。一方小胞体とミトコンドリアの接合部位 (ERMES) が、両オルガネラ間の脂質輸送に関与する可能性があるが、われわれは ERMES 構成因子の一つ Mdm10 の X 線構造を決定した。大腸菌から精製した組換え Mdm10 には疎水性のポケットがあり、ここに大腸菌由来のリン脂質が結合していた。このことは Mdm10 が ERMES を介して脂質輸送に直接関わる可能性を示唆するものである。

1. T. Izawa, T. Tsuboi, K. Kuroha, T. Inada, S. Nishikawa, T. Endo (2012) *Cell Reports* 2, 447-453.
2. Y. Tamura, Y. Harada, S. Nishikawa, K. Yamano, M. Kamiya, T. Shiota, T. Kuroda, O. Kuge, H. Sesaki, J. Imai, K. Tomii, T. Endo (2013) *Cell Metab.* 17, 709-718.

清酒酵母のエタノール耐性

下飯 仁

独立行政法人農業環境技術研究所

清酒酵母のエタノール耐性と発酵力

清酒醸造の大きな特徴の一つは醪で 22% (V/V) にも達する高濃度のエタノールを生成することである。その原因の一つとして清酒酵母の使用があげられる。清酒酵母は、他の酵母よりも発酵速度が速く高濃度のエタノールを生成することができるため、他の酵母より高いエタノール耐性を持っていると考えられてきた。しかし、実際の清酒酵母は、Rim15 などのストレスシグナル伝達経路に欠損を持つため、むしろストレス感受性である。強いストレス適応はエタノール耐性を高めるが、細胞内の代謝を抑制し、エタノール発酵速度が低下する。

エタノール耐性清酒酵母変異株

清酒酵母は、エタノールストレス条件下でもエタノール発酵を続けるため清酒醪で高濃度のエタノールを生産するが、エタノール耐性が低いことから菌体が死滅しやすく、菌体が死滅した場合は細胞内容物が漏出し、生成酒の香味は劣化する。そこで、醪末期でも酵母が死滅せずにエタノール発酵を続ける清酒酵母の開発が行われてきた。醸造試験所の原らは、エタノール処理を繰り返して生き残った清酒酵母きょうかい7号 (K7) から、高濃度のエタノールでも死滅しにくいエタノール耐性変異株を分離した。この変異株は、高濃度のエタノールの存在下でも死滅しにくいため、清酒醪で親株より高濃度のエタノールを生産することができ、きょうかい11号酵母 (K11) として頒布されている。我々は、K7 及び K11 の遺伝子発現を DNA マイクロアレイで比較した結果、K11 では K7 と比べてストレス誘導遺伝子が高発現していることを明らかにした。K11 では、親株の K7 で低下していたストレス誘導遺伝子の発現が上昇しているためにエタノール耐性が向上したと考えられる。

エタノール耐性の原因遺伝子

それでは、どのような変異によってストレス誘導遺伝子の発現が上昇しているのだろうか。次世代シーケンサーを用いて K7 及び K11 の比較ゲノム解析を行った結果、第 10 番染色体に Loss of Heterozygosity (LOH) が生じていることが分かった。この領域にはストレス耐性に関係するアデニル酸シクラーゼをコードする *CYR1* が存在し、その 2066 番目の塩基が K7 では A/G であるのに対して K11 では A/A に変異していた。そこで、K11 に *CYR1*-2066G を導入するとエタノール耐性が低下し、2 コピーある K7 の *CYR1* の内 *CYR1*-2066G を破壊し *CYR1*-2066A のみとするとエタノール耐性が上昇した。以上の結果から、K7 の *CYR1*-2066A/G が LOH によってホモザイガス化し *CYR1*-2066A/A となったことが、K11 の高エタノール耐性の原因であることが示唆された。

(本研究は独立行政法人酒類総合研究所で行われた。)

清酒酵母の有機酸生成機構

中山 俊一

東京農業大学応用生物科学部醸造科学科

清酒酵母によって生成されるコハク酸，乳酸，リンゴ酸などの有機酸は発酵期間中に生成され，これら3種類で全有機酸の約80%を占める。これら有機酸は呈味に影響を与えることから，有機酸組成を改変した清酒酵母が多数取得されてきており特に爽やかな酸味を付与するリンゴ酸生成量が増加した清酒酵母が多く育種されている。そこで本研究会では，有機酸の中でもリンゴ酸生成機構を中心に清酒酵母の有機酸生成機構について紹介したい。

我々はこれまでに醸造協会頒布のリンゴ酸高生産性 No. 28 株と吟醸酵母として醸造協会から頒布されているきょうかい酵母 K901 を親株とした高リンゴ酸生産性変異株を対象としてリンゴ酸生成機構を解析してきた。清酒酵母においてリンゴ酸はミトコンドリアにおける TCA サイクルによってあるいは細胞質中で Pyruvate carboxylase (PYC) と NADH 要求性の Malate dehydrogenase (MDH) により生成されるが，高リンゴ酸生成株はリンゴ酸生成に直接的に関与するこれら酵素活性に顕著な違いがみられなかった。特に明らかな違いが見出されたのはミトコンドリア活性であり，高リンゴ酸生成株ではミトコンドリア活性が低かった。また，清酒酵母の呼吸欠損株はリンゴ酸生成量が増加することからミトコンドリア活性が高リンゴ酸生成の要因の一つであることが明らかとなった。これは，ミトコンドリア活性が低いことで解糖系で生じるピルビン酸がミトコンドリア内で代謝されないため細胞質中で PYC、MDH による変換経路が活発になるためであると推察した。一方，高リンゴ酸生成株の特徴の一つに NADH/NAD⁺比が高いことも見出した。高リンゴ酸生成株に酸化剤の一種であるアセトインを添加するとリンゴ酸生成量が低下することからも，リンゴ酸生成には NADH レベルが高いことも必須であることも明らかとなった。

以上の様に，清酒酵母においてリンゴ酸はミトコンドリア内ではなく細胞質中で生成され，高リンゴ酸生成には酵素活性よりもむしろミトコンドリア活性やレドックスバランスが有機酸組成を決定づける重要な因子の一つであることが明らかとなった。

窒素源飢餓シグナルが下面ビール酵母にもたらす影響

尾形 智夫

アサヒビール(株)醸造研究所

ビールの原料である麦汁は、実験室でよく用いられる培地、例えば、YPD 培地等に比べると、糖濃度が高く、窒素濃度が低い。従って、麦汁で発酵している酵母は、発酵が経過すると、窒素源飢餓ストレスに曝されると考えられる。しかし、これまで、DNA マイクロアレイのような網羅的な酵母転写物解析の研究では、麦汁での発酵過程での下面ビール酵母が、窒素源飢餓ストレス下にあることを示す明確な報告はない。一方で、麦汁より、さらに窒素含量が低い発酵液を用いた時に、硫化水素やチオール系オフフレーバーの産生量が増加する現象は、我々は、発酵に用いた下面ビール酵母が、窒素源飢餓ストレスに対応した結果である可能性を考えた。

現在、ビール醸造で用いられている下面ビール酵母 *Saccharomyces pastorianus* は、ビール醸造が後半になると、細胞が凝集し、発酵タンクの底面に沈降する特徴がある。この特徴は、ビールのクリアな味感を維持することや、回収した酵母を次の発酵に繰り返し使用することができるので、ビール醸造にとって、有利な特徴である。この下面ビール酵母に特徴的な凝集性に関与する遺伝子は、下面ビール酵母に特徴的な遺伝子である *Lg-FLO1* であること、この遺伝子に変化があると、下面ビール酵母に特徴的な凝集性が失われること等が、わが国のビール会社の研究者によって明らかにされてきた(1-3)。

我々は、ビール醸造の発酵の後期に、窒素源飢餓シグナルが下面ビール酵母に伝達され、その結果、下面ビール酵母に特徴的な凝集性の誘導や、先に述べたような、麦汁より窒素含量が低い発酵液中で、硫化水素やチオール系オフフレーバーの発生につながると考えた。そこで、*Lg-FLO1* 遺伝子プロモーターに、レポーター遺伝子を接続した遺伝子導入株の窒素源飢餓応答解析や、窒素源飢餓シグナルに関係する転写因子を改変した形質転換体下面ビール酵母等を造成し、硫化水素やチオール系オフフレーバー産生を調べた。これら、窒素源飢餓シグナルが下面ビール酵母にもたらす影響について結果をご報告したい(4, 5)。

- (1) Kobayashi, O. et al. J. Bacteriol. 180, 6503 (1998).
- (2) Sato, M. et al. J. Biosci. Bioeng. 93, 395 (2002).
- (3) Ogata, T. et al. J. Appl. Microbiol. 105, 1186 (2008).
- (4) Ogata, T. Yeast 29, 487 (2012)
- (5) Ogata, T. J. Inst. Brew. (in press)

ターミネーター領域を用いた出芽酵母における蛋白質発現量の制御 ～網羅的解析より～

伊藤洋一郎、松山崇

(株) 豊田中央研究所 フロンティア・松山研究 G

微生物の代謝を改変してバイオ樹脂原料やバイオ燃料を生産する技術、「代謝工学」が 1990 年代に誕生し、微生物が生来有していない代謝経路を導入して有用なケミカルの発酵生産が可能となった。続いて、メタボロミクス等のマルチオミクス解析や代謝フラックス解析の結果を、システム生物学の手法を用いた統合モデリングで解釈し、代謝システムのボトルネックを同定することが可能になりつつあり、より高い発酵生産が期待されている。

しかし出芽酵母においては、このような解析技術の飛躍的な進歩に対し、要求される特性を実現するための導入遺伝子発現制御技術の開発が遅れている。そこで我々は、大腸菌において細やかな遺伝子発現制御を可能にしているリボソーム結合部位配列のようなツールの開発を目指し、遺伝子のターミネーター領域に着目した。

ターミネーター領域（または 3'-UTR）は、転写の終了やポリ A の付加などの役割に加え、mRNA 半減期・翻訳効率・細胞内局在等の制御を通じて遺伝子発現を調節している。導入遺伝子の発現にはプロモーターとターミネーター領域が相乗的に作用すると考えられるが、これまで、強力なプロモーターの探索は盛んに行われたのにも関わらず、ターミネーター領域については、ほとんど研究されていなかった。そこで出芽酵母において、目的の導入遺伝子の蛋白質生産量を制御できるターミネーター領域を探索した。

最初に、GFP をレポーターとして用いて、導入遺伝子の蛋白質生産量をフローサイトメーターで測定する手法を確立し、*TPS1t* ターミネーター (*TPS1t*) が、常用されている *PGK1t* や *CYC1t* と比較して、2 割ほど高い活性を持つことを示した¹。続いて、*TPS1t* よりも活性の高いターミネーター領域を同定するため、*PGK1t* を基準として 5,302 (全体の約 90%) の相対活性を決定した²。この網羅的な解析データを元にして、*PGK1t* の約 2 倍高い活性を示した上位 5 種類のターミネーター領域に着目し、宿主株や培地中の炭素源等の違い、及び外来遺伝子であるセルラーゼの分泌発現への影響を調べた結果、*DIT1t* が最も蛋白質生産量を増加させることが示された³。本講演では、合成生物学的見地からのターミネーター領域の有用性も議論したい。

1) Yamanishi et al.: *Biosci Biotechnol Biochem*, **75**, 2234-2236. (2011)

2) Yamanishi et al.: *ACS Synth Biol* **2**, 337-347(2013)

3) Ito et al.: *J. Biotechnol.* in press