

下面発酵酵母の交雑育種技術の開発

太田拓

キリン（株）R&D 本部 酒類技術研究所

主要なビール醸造に用いられる下面発酵酵母（*Saccharomyces pastorianus*）は、*S. cerevisiae* と *S. eubayanus* との自然交雑によって生じた異質四倍体である。その高次倍数性のため突然変異育種が困難であり、接合可能な胞子の出現頻度が著しく低いいため交雑育種も困難であった。そのため優良菌株の獲得には、遺伝資源保存機関等から収集した酵母より成るバンクから、目的の形質を持つ株の選抜に頼るのが一般的である。しかしながら、主要な下面発酵酵母は、少数の祖先より変異の蓄積によって株が分化したと考えられており、形質の変異幅は狭く、また形質間にトレードオフの関係が存在する場合も多い。そこで我々は、多様な形質を持つ下面発酵酵母を作出するため、下面発酵酵母の交雑育種技術の開発に取り組んできた。本演題では、これまでに開発した2つの交雑育種技術と、それらを用いて作製した下面発酵酵母株間の交雑育種例について紹介したい。

まず我々は、HO エンドヌクレアーゼを利用した醸造酵母への接合能付与法を開発した。これは、接合型変換に関与する HO エンドヌクレアーゼを細胞内に強制的に発現させ、 α 型もしくは α 型特異的プロモーターに制御されたレポーター遺伝子を用いて、接合能が付与された細胞を選抜する方法である。本手法を用いることで、効率的に下面発酵酵母から、接合可能株やその交雑体の取得が可能となった。一方でこの方法は、一過的ではあるが遺伝子組換えを用いる点が、実用上の課題となりうる。そこで我々は、遺伝子組換えを用いない交雑育種技術の開発に取り組み、下面発酵酵母からの接合可能株の単離法を確立した。本手法は、接合可能株が分泌する性フェロモンに着目し、性フェロモン感受性酵母（ $\Delta bar1$ 、 $\Delta sst2$ ）に対する生育抑制効果を指標に、接合可能株を識別・単離する方法である。これにより、実用上問題のない non-GMO の交雑体を作製できるようになった。また、これらの技術を用いて、ビール未熟臭の原因となるダイアセチルの生成能が低い酵母株と、バナナ様香気をもたらす酢酸イソアミル生成能が高い酵母株から、交雑によって両者の形質を集積した下面発酵酵母株を作出した。さらにパイロットスケールでの試験醸造により、作出された交雑株は、目的の形質を持つ優良な株であることが確認された。

これらの手法は、下面発酵酵母だけでなく、清酒酵母やワイン酵母などの実用酵母にも応用可能であり、これまで制限されていた醸造酵母間の交雑育種の有効なツールとなると考えられる。

腸脳相関を介した SBL88 乳酸菌の機能作用

金田弘挙

(サッポロホールディングス株式会社 グループ研究戦略推進部
食品価値基盤開発グループ)

ビール業界と乳酸菌との関係は古く、日本で一般的なピルスナービールにおいては製品中に乳酸菌は存在してはならないとした品質管理における重要微生物である一方、ヨーロッパ等では酵母と乳酸菌の複合発酵ビールや伝統的なビール醸造における麦汁乳酸菌発酵ビール等、特徴あるビール醸造に活かされている。一方、食品業界において乳酸菌はその健康機能が注目を集めている。ヨーグルトをはじめとした乳業業界が持つ乳酸菌とは異なる由来のビール醸造からの乳酸菌には面白い健康機能があるのではとの期待から、サッポログループでは大麦より分離した乳酸菌 *Lactbacillus brevis* SBC8803 (SBL88) に着目し、便秘・下痢改善効果、潰瘍性大腸炎予防効果、肝機能保護効果、ストレス性睡眠障害予防効果、肌の保湿効果等を明らかにしてきた。

では、おなかの中に入った乳酸菌がどのようなメカニズムで健康に寄与するのか？生菌/死菌で効果が異なるのか？長年多くの研究者らによって乳酸菌の健康機能メカニズムに関する研究が行われてきたが、未だ最終的な解答に至っていないのが実情である。我々は、「SBL88 乳酸菌がストレス社会で乱された体内リズムを改善することで健康的な生活に寄与する」との仮説を立て、ストレスと密接に関連していると言われている「セロトニン」、「自律神経」に注目した乳酸菌の機能メカニズム解明（腸脳相関を介した）に挑戦した。セロトニンの大半は腸管に存在しており、そのセロトニンが分泌されることで、腸管神経系や腸迷走神経系の活動が影響を受けることが知られている。SBL88 乳酸菌は、腸管内でクロム親和性細胞 (EC 細胞) 等を刺激してセロトニン分泌を促進させると共に、ラットの十二指腸に SBL88 乳酸菌 (加熱菌体) を投与すると、腸迷走神経求心枝、皮膚動脈交感神経遠心枝や胃迷走 (副交感) 神経遠心枝の活動に影響を与えることが判明した。また、横隔膜下迷走神経を切断することで、胃迷走神経遠心枝の活動への作用は抑制された。一方、Granisetron (腸管神経系や腸迷走神経系の主要なセロトニン受容体 (5-HT₃) に対する阻害剤) 投与で、SBL88 乳酸菌の腸迷走神経求心枝、皮膚動脈交感神経遠心枝や胃迷走神経遠心枝への作用は顕著に抑制された。以上の結果は、「SBL88 乳酸菌を摂取すると腸管内において EC 細胞等の腸管上皮細胞を刺激しセロトニン分泌を促進させる。腸管の神経系の 5-HT₃ 受容体は分泌されたセロトニンを受容し、求心性の自律神経系を通じて脳へと刺激を伝達する。この情報は脳内で処理された後、遠心性の自律神経系を通じて様々な臓器へ伝達され、各臓器の活動に影響を及ぼす」ことを期待させるもので、乳酸菌の健康機能研究に新しい視点を提案するものとする。

浸透圧応答を制御する 出芽酵母 HOG MAP キナーゼ経路の活性化機構

山本勝良、斎藤春雄

東京大学 医科学研究所 分子細胞情報分野

運動能力のない酵母では、外界環境の大幅な変化に対する適応は死活問題である。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、細胞外からの高浸透圧ストレス刺激に曝されると、細胞膜上の浸透圧センサーがその刺激を感知し、その情報を high osmolarity glycerol (HOG) MAP キナーゼ(MAPK)経路を通じて Hog1 MAPK の活性化へと変換する。活性化した Hog1 は速やかに核へ移行して転写因子を活性化し、グリセロール合成酵素遺伝子などの発現を誘導する。細胞内にグリセロールが蓄積されると細胞内外の浸透圧差が解消され、酵母は高浸透圧ストレス環境下において生育できるようになる。Hog1 を直接活性化する Pbs2 MAPK キナーゼの上流には、Ssk2 と Ssk22 MAPKK キナーゼを含む SLN1 支経路と、Ste11 MAPKK キナーゼを含む SHO1 支経路と呼ばれる2つの独立した経路が存在する。どちらの支経路も高浸透圧ストレスに応答して Hog1 を活性化する。最近の研究から、SHO1 支経路の最上流に位置し、機能が重複した浸透圧センサーと考えられる Hkr1 と Msb2 は、異なる機構を介して Hog1 を活性化することがわかってきた。また SHO1 支経路の要分子である4回膜貫通タンパク質 Sho1 は多量体構造を形成しており、その構造は高浸透圧ストレス後に変化し、その結果アダプタータンパク質 Ste50 との結合が誘導されて Hog1 が活性化するということがわかり、Sho1 は浸透圧センサーであることが明らかとなった。

1回膜貫通タンパク質 Opy2 は SHO1 支経路を介した Hog1 の活性化に必要な分子である。Opy2 は Ste50 と結合し、Ste50 に構成的に結合している Ste11 を細胞膜へと移行させる機能を持つと考えられている。*S. cerevisiae* Opy2 と異種酵母やカビなどに存在する Opy2 ホモログとのアミノ酸配列を比較したところ、細胞外に進化的に保存された8個のシステイン残基を含む領域が存在することを見つけ、私達は cysteine-rich (CR)領域と名付けた。また細胞内においても良く保存された4つの領域(CR-A, CR-B, CR-C, CR-D)があることがわかった。これらの情報を基に Opy2 の機能解析を進め、本発表では SHO1 支経路を介した Hog1 の活性化における Opy2 の役割について紹介する。また上流の PAK キナーゼ Ste20 によるリン酸化の効果を模倣する活性化型 Ste11-Q301P を発現させた場合にのみ Hog1 の活性化を引き起こす変異体を探索し、transmembrane (TM)領域に変異を持つ Opy2 変異体を単離した。Opy2 TM 変異体の解析を通じて明らかとなった、Hkr1 に依存した SHO1 支経路を介した Hog1 の活性化には Opy2 と Sho1 との TM 領域間結合および Hkr1 の細胞内領域の機能が必要であることについても述べる。

酵母を利用した菌類ウイルスタンパク質の機能解析と応用研究

森山裕充¹、浦山俊一^{1,3}、東江昭夫²、川本 進²

1. 東京農工大学 大学院農学研究院 生物制御科学部門

2. 千葉大学 真菌医学研究センター

3. 海洋研究開発機構 海洋生命理工学研究開発センター

菌類や植物では、潜在的に感染する 2 本鎖 RNA(dsRNA)ウイルスが知られており、一方、菌類では遺伝子として機能するプリオンタンパク質も存在する。これらは、染色体の遺伝子とは独立した表現型を現すため、非メンデル遺伝因子と称される{1}。菌類ウイルスは、糸状菌、酵母菌、栽培キノコなどから広く検出されており、dsRNA をゲノムとするものが 7 科、プラス鎖 RNA ウイルスが 5 科、マイナス鎖 RNA ウイルスとしては 1 科が国際ウイルス分類委員会により定義されている{2}。このうち、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のキラー因子の担い手となる L-A ウイルス(dsRNA ゲノム)は、*Totiviridae* に属し、本ウイルス科の典型種として位置付けられている。一般に、菌類ウイルスは（以下、マイコウイルス）細胞外感染経路を持たず、細胞または菌糸融合により感染することを特徴とする。

これまでに植物病原糸状菌であるアルターナリア・アルタナータ菌やイネいもち病菌などからは宿主菌の生育を阻害する新種の dsRNA ウイルスが見出されてきたが、これらのマイコウイルス遺伝子配列は新規であり既知情報による機能の推測が困難であった。そこで私達はパン酵母異種遺伝子発現系を利用して、植物病原菌に感染する各種マイコウイルス由来のタンパク質を発現する酵母細胞の生育試験を行うことにより、宿主病原菌の生育阻害に関与するウイルス由来タンパク質を同定する手法を確立してきた{3}。次に、本手法で同定された新規な抗菌性タンパク質を、ヒト病原性酵母のクリプトコックス(*Cryptococcus neoformans*)細胞内で発現させる系を確立して、宿主菌の生育に関する影響調査を行った。その結果、イネいもち病菌マイコウイルス由来の ORF4 タンパク質を強制発現させたクリプトコックスは、生育速度の低下、異常な液胞の細胞内蓄積、莢膜多糖の形成阻害などが観察され、宿主菌の病原力を低下させ得ることが示唆された{4}。本評価方法は、糸状菌と酵母の両方の菌細胞に対して生育阻害活性を有するマイコウイルス由来抗菌性タンパク質のスクリーニングに有効であることが示された。またピキア酵母異種発現系を利用することで、生育阻害活性を有するマイコウイルスタンパク質は産生可能であることも確認された。

- 1) Wickner RB, Fujimura T, Esteban R. Virus and Prion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Advanced in Virus Researches*. 86:1-36. (2013)
- 2) Ghabrial SA, Castón JR, Jiang D, Nibert ML, Suzuki N. 50-plus years of fungal viruses. *Virology*. May; 479-480C:356-368. (2015)
- 3) Urayama S, Ohta t, Onozuka t, Sakoda t, Fukuhara T, Arie T, Teraoka T, Moriyama H. *Journal of Virology* 86(15):8287-8295. (2012)
- 4) Urayama S, Fukuhara T, Moriyama H, Toh-e A, Kawamoto S. *Microbiology and Immunology*. 58: 294-302. (2014)

カンジダの小胞体ストレス応答と病原性

宮崎 泰可

長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科 感染免疫学講座
臨床感染症学分野

病原真菌であるカンジダは、ヒトの体内で増殖するために様々な環境ストレスに対応している。小胞体は、タンパク質の合成や輸送など生命維持に重要な役割を担っており、種々のストレスによって構造異常タンパク質が増加すると、小胞体ストレスが引き起こされる。これに対し細胞は、センサータンパク質 Ire1 とその下流の転写調節因子 Hac1 を介したシグナル伝達経路を活性化させ、小胞体の仕事量を増やすことで対応する。この小胞体ストレス応答機序は、酵母からヒトに至るまで広く保存されており、unfolded protein response (UPR) と呼ばれている。病原真菌においては、UPR が抗真菌薬耐性と病原性の両者に関与していることから、新たな治療標的候補として近年盛んに研究が行われるようになった。臨床的に重要なカンジダ種の一つである *Candida glabrata* は、小胞体ストレスに高い忍容性を示すことが知られているが、従来の UPR を喪失し、新しい機序（これまで高等生物のみが有しているとされてきた機序）を獲得していることが我々の研究で明らかになった。このことは進化生物学的観点からも興味深い発見であり、本領域における今後の研究に重要な情報をもたらすものと考えられる。

本研究会では、他の病原真菌と比較しながら、*C. glabrata* の小胞体ストレス応答と病原性の関連について我々の研究内容を含めて紹介したい。