

薬剤感受性分裂酵母を用いた化学遺伝学的スクリーニング系の 構築と新規低分子阻害剤の同定

川島茂裕

(東京大学大学院薬学系研究科)

細胞内の複雑でダイナミックな過程を理解するためには、標的タンパク質の機能を数秒から数分という非常に早いタイムスケールで阻害できる低分子阻害剤が優れた研究ツールとなる。我々は、有用な低分子化合物を同定するため、多剤耐性に関与する7つの遺伝子を欠損または変異させた薬剤感受性分裂酵母株をこれまでに作製した。これにより、酵母遺伝学を組み合わせた効率的なケミカルスクリーニングおよびヒット化合物の標的同定が可能になり、これまでに染色体分配およびリボソーム生合成に関与する因子の選択的低分子阻害剤の同定に成功している。これまでに行ったスクリーニングと発見した新規低分子阻害剤を紹介し、薬剤感受性分裂酵母の新たなモデル生物としての有用性について議論したい。

参考文献

1. **Kawashima SA**, Takemoto A, Nurse P, and Kapoor TM. (2012). Analyzing fission yeast multi-drug resistance mechanisms to develop a genetically tractable model system for chemical biology. *Chem Biol.* 19(7): 893–901.
2. **Kawashima SA**, Chen Z, Aoi Y, Patgiri A, Kobayashi Y, Nurse P, and Kapoor TM. (2016). Potent, reversible and specific chemical inhibitors of eukaryotic ribosome biogenesis. *Cell.* 167(2): 512–524.

麹菌におけるカーボンカタボライト抑制制御機構の解析と 酵素タンパク質生産への応用

田中瑞己

(静岡県立大学 食品栄養科学部)

麹菌 *Aspergillus oryzae* は、アミラーゼを高生産する糸状菌（カビ）であり、日本酒・醤油・味噌などの醸造に用いられている。アミラーゼの生産は、マルトースが菌体内に取り込まれることで誘導されるが、グルコースが存在するとカーボンカタボライト抑制（CCR）によりアミラーゼ遺伝子の発現が強く抑制される。糸状菌の CCR は転写因子 CreA によって制御されるが、他の制御因子としてユビキチンプロテアーゼ複合体を形成する CreB・CreC と、ユビキチンリガーゼのアダプターとして機能すると推定される CreD が同定されている。麹菌の *creA* と *creB* を二重破壊することでアミラーゼ生産量が野生株の 5 倍以上に増加したことから、CCR の解除が酵素タンパク質生産において非常に有効であることが明らかになった。しかし、糸状菌における CCR 制御の分子機構についてはほとんど明らかとなっていなかった。

出芽酵母の CCR を制御する転写因子 Mig1 は、グルコース存在下では核内に局在し、グルコース欠乏条件では核内から細胞質に排出される。麹菌において GFP 融合 CreA の細胞内局在を調べた結果、グルコース存在条件では核内に局在したのに対し、マルトース存在条件下では核内の蛍光が消失した。さらに、CreA タンパク質の安定性を調べたところ、グルコース存在条件下と比較してマルトース存在条件下では CreA が不安定化していた。また、CreA の核外への排出を阻害することで CreA が安定化したことから、CCR 非誘導条件では CreA が核内から細胞質に排出されて速やかに分解されることが示唆された。しかし、*creB* を破壊することで細胞内の CreA 存在量は減少したものの、*creD* を破壊しても CreA の安定性は変化しなかったことから、CreD は CreA の分解に関与していないことが示唆された。

麹菌ではグルコースが存在すると、アミラーゼの誘導基質であるマルトースを取り込むトランスポーターがエンドサイトーシス依存的に細胞膜から液胞に輸送されて分解される。このトランスポーターの分解が *creD* の破壊により抑制されたことから、CreD がグルコース存在条件下でのエンドサイトーシスに関与していることが示された。また、*creD* を破壊することでアミラーゼ生産量が減少した一方で、CreD のリン酸化部位に非リン酸化変異を導入することで *creB* 破壊による CCR の解除が促進され、アミラーゼ生産量が増加することが明らかになった。これらの結果から、CCR 制御因子の破壊や変異導入を組み合わせることで、酵素タンパク質の高生産化が可能となることが示された。

マイクロ流体デバイスを用いて 分裂酵母の成長と死の動態を計測する

中岡秀憲

(東京大学大学院 総合文化研究科)

細胞の増殖率と死亡率は細胞の生理状態を評価する強力な指標であるが、意外なことに安定に増殖している細胞集団における成長率と死亡率の関係性は明らかになっていない。その理由の一つは、死亡率の定量が難しいことにある。とりわけ酵母のようなモデル微生物は最適な培養環境が知られているため、対数増殖期の細胞集団内では死細胞はほとんど見つからない。

今回、我々は分裂酵母を対象として、多数の独立した細胞系列を長期間ライブイメージングできるマイクロ流体デバイスを作製した。このシステムでは指数関数的増殖によって覆い隠されていた細胞死と、そこに至るまでの成長・分裂の履歴を直接観察することが可能である。

まず始めに分裂酵母の典型的な培養条件の範囲内で 100 世代近く培養を続け、その間細胞の分裂率と死亡率が一定であることを確認した。これはマイクロ流体デバイスが定常的な培養環境を実現できていることの証拠であると共に、分裂酵母には細胞老化表現型を示さない系列があるということを示唆する。

次にいくつかの非ストレス環境において成長率と死亡率を定量し、これらの間に正の相関関係があることを発見した。即ち、成長率が高い環境においては、死亡のリスクも高まっている。この成長と死のトレードオフ法則は、安定して持続的に成長する細胞の生理状態にはある種の拘束条件があることを示しており、逆にこの法則からずれるような場合には、その環境では細胞がストレスを感じているか、あるいは定常的成長状態にないことを表している可能性がある。

我々はさらに、これまでに細胞老化や細胞死と相関することが報告されている細胞質内部の蛋白質凝集体のダイナミクスを定量し、細胞死の直前に蛋白質凝集が突然加速することを見出した。さらに凝集加速反応の開始自体はその時点での凝集体量と関係なく生じることが明らかとなり、「蛋白質凝集体量がある閾値を超えると細胞死が誘導される」という単純なモデルは成立せず、細胞死誘導のシグナルは別に存在することが示唆された。

ビール酵母細胞壁を用いたプラントアクティベーターの開発

北川 隆徳

(アサヒバイオサイクル(株))

酵母中の β -グルカンにエリシター活性があることは古くから知られている。様々な検討を重ねた結果、酵母細胞壁に肥料成分のPとKを添加して高温高压化で反応させることにより、植物の生理活性を顕著に高めることのできるプラントアクティベーターの開発に成功した。生産現場での栽培試験の結果、水稻の収量を大きく増加させる効果や、ゴルフ場の芝管理において発根を促進しターフクオリティを向上させる効果があることがわかった。イネ(品種：日本晴)においては、病害抵抗性関連物質が合成され、次いでオーキシンが誘導されることが明らかになっている。

本剤使用により、水稻収穫量当たりの温室効果ガス排出量が低減することが示された。上記の取り組みとともに評価され、「第25回地球環境大賞 農林水産大臣賞」(主催：フジサンケイグループ)を受賞した。また、ゴルフ場の芝管理においても化学農薬使用量の低減、及び温室効果ガス排出量が低減することが示されている。

本講演ではこれらの取組について紹介する。