

# 野生酵母の高次元表現型多様性解析

大貫慎輔

(東京大学 大学院新領域創成科学研究科 先端生命科学専攻)

野生酵母は、発酵食品などヒトの生活圏だけでなく植物や土壌などの自然界に世界中で広く分布しており、多様な環境から単離することが可能である。最近、世界中の様々な環境から単離された 1000 以上の野生酵母 (*S. cerevisiae*) 株においてゲノム配列が決定され、野生酵母が遺伝的に複雑な集団構造を持ち高い多様性を示すことが明らかになった (Peter et al., 2018, Nature)。同種の個体間に現れる遺伝子型や表現型の違いを調査し多様性の仕組みを明らかにすることは、集団遺伝学における大きな目標の一つであり、出芽酵母は集団遺伝学の研究に極めて有用なモデル生物である。そこで本研究では、野生酵母の遺伝的集団構造と表現型の関係を明らかにするために、野生酵母株を用いて 500 形質以上の表現型を定量し高次元表現型解析を行った。

野生酵母の表現型解析は、これまで主に *S. cerevisiae* と近縁種 (*S. paradoxus* や *S. pombe* など) の間で増殖表現型を用いて多様性を比較する研究がおこなわれてきた。例えば、*S. cerevisiae* に比べて *S. paradoxus* や *S. pombe* は、遺伝的多様性の高さの割に増殖表現型の多様性は低いことが示された (Warringer et al., 2011, PLoS Genet.)。本研究では生物学的資源を増やし知見を深めるために、モデル生物である *S. cerevisiae* だけでなく非モデル生物である *Lachancea kluyveri* (*Saccharomyces Kluyveri*) の表現型解析も行った。*L. kluyveri* は *S. cerevisiae* と異なって全ゲノム重複前のプロトプロイド酵母であり、全長 11.3 Mb の染色体 8 本をもつ遠縁種である。

我々は *S. cerevisiae* 36 株と *L. kluyveri* 27 株それぞれにおいて、多様な細胞内プロセスを反映する形態表現型を画像解析プログラム CalMorph (Ohya et al., 2005, PNAS) を用いて 501 の観点から定量し、高次元形態表現型と増殖表現型の比較解析を行なった。その結果、両種で形態表現型に高い多様性を示し、形態類似性から 3 つに分けられた。また、表現型の多様性は *L. kluyveri* の方が高く、これは遺伝的多様性と相関していた。一方、増殖表現型は *L. kluyveri* の方が多様であったことから、形態表現型と増殖表現型は全くことなる特徴を反映している表現型であることがわかった。これらのことから、*L. kluyveri* は集団遺伝学の調査において新たな生物資源として有用な生物種であり、また細胞形態は表現型の多様性を生み出す仕組みを理解するために新たな知見を与えると考えられた。

# リンゴ酸高生産清酒酵母の変異遺伝子

根来宏明

(月桂冠株式会社 総合研究所)

清酒中のリンゴ酸は、酵母が生成する主要な有機酸の一つであり、爽やかな酸味を与える。これまでに清酒業界ではリンゴ酸高生産酵母の育種法が数多く開発されてきたが、生産能上昇に寄与する具体的な遺伝子については特定されていなかった。そこで、いくつかのリンゴ酸高生産酵母について変異遺伝子の同定に取り組んだので紹介したい。

## ◆ 変異遺伝子の同定と解析 (VID24)

日本醸造協会から頒布されている酵母 K-901 株を親株として、リンゴ酸高生産酵母 K-901H を取得した。ゲノムシーケンスにより K-901H の変異点を解析すると、VID24 という遺伝子のミスセンス変異によりリンゴ酸高生産となったことを見出した。

Vid24p は GID (Glucose Induced degradation Deficient) 複合体のサブユニットとして知られている。GID 複合体はグルコースの存在に応答し、Fbp1p、Pck1p、Mdh2p 等の糖新生酵素をユビキチン化して分解させる役割を持つ。VID24 変異株のリンゴ酸高生産能に寄与する要因について解析を進めると、Mdh2p が関与しており、細胞質での還元的経路でリンゴ酸を生産していると考えられた。プロテオーム解析を行った結果、VID24 欠損株では Mdh2p の蓄積が認められ、さらに解糖系のグルコースからピルビン酸への反応を担ういくつかのたんぱく質も高蓄積していた。これらのたんぱく質量の変化がリンゴ酸高生産に寄与していると推察した。

## ◆ 変異遺伝子の同定と解析 (PEX22)

次に、K-701 株を親株として、リンゴ酸高生産酵母 F-701H を育種した。先述と同様にしてゲノムシーケンス解析を行った結果、PEX22 遺伝子のナンセンス変異がリンゴ酸高生産の原因であると判明した。

Pex22p は、ペルオキシソームの恒常性維持に関わるタンパク質群“ペルオキシシン”の一つである。酵母が持つ 29 のペルオキシシンを調べると、peroxisome targeting signal 1 (PTS1) 保有タンパク質をペルオキシソームへ輸送する役割を持つペルオキシシン (Pex22p もこれに入る) を欠損した場合に、リンゴ酸生成能が上昇した。PTS1 保有タンパク質にはグリオキシル酸回路を担う Mdh3p、Mls1p、Mls2p、Cit2p 等が含まれる。これらのたんぱく質について調べた結果、PEX22 変異株は Mdh3p の局在がペルオキシソームから細胞質へ変化することでリンゴ酸高生産となることを確認した。

# 種横断的なシステインパーサルフィド産生経路とその生理的意義

西村 明

(東北大・院医・環境医学)

我々はシステインパーサルフィド (CysSSH) をはじめとした活性イオウ分子が体内で多量に存在し、強力な抗酸化活性や親電子シグナル制御機能を発揮していることを見出してきた。しかしながら、活性イオウ分子の生成機構や生理機能については未だ不明な点が多い。最近我々は、ポリサルフィド化タンパク質合成機構を解析する過程で、翻訳関連酵素の1つである cysteinyl-tRNA synthetase (CARS) がシステインからピリドキサルリン酸 (PLP) 依存的に CysSSH を合成することを発見した。組換え CARS や CARS 欠損・変異細胞およびマウス組織を用いた解析から、CARS による CysSSH 合成経路は大腸菌から酵母、哺乳類まで種横断的に保存されていることがわかった。さらに我々は、CysSSH の生理機能を解明するために、モデル生物である出芽酵母の CARS に変異 (PLP 結合部位のリジンをアラニンに置換) を導入し、細胞内 CysSSH 含量が低下した変異株を作製した。この株の表現型を探索したところ、野生株に比べて寿命が大幅に減少していることを発見した。また、低下した寿命は活性イオウ分子ドナーの添加によりほぼ完全に回復することも見出した。これらの結果から、CARS によって産生される CysSSH は寿命の新規制御因子であることが考えられた。今後、CysSSH による寿命制御機構を解明することで、老化防止・長寿や老化に伴う各種疾患 (生活習慣病やがん) の発症機構の理解やその予防・治療法の開発に大きく寄与することが期待される。

## “型破りな分泌”の謎に迫る

吉田 知史

(早稲田大学国際学術院 / ナノ・ライフ創新研究機構 / JST さきがけ)

出芽酵母はグルコース飢餓状態に置かれると糖新生に必要な Fbp1 やアシル CoA 結合タンパク質 Acb1 などの分泌シグナルを持たないタンパク質が「型破りな分泌：Unconventional protein secretion (UPS)」と呼ばれる分泌様式で細胞外へと放出されることが知られている。古典的な ER-Golgi 分泌経路とは異なり UPS 経路の細胞外小胞形成の分子メカニズムやカーゴ蛋白質が小胞に選択的に取り込まれる仕組みはほとんど明らかになっていない。我々は非常に高感度で簡便な UPS アッセイ系を構築しそれを利用して出芽酵母非必須遺伝子破壊株において UPS 欠損変異株及び UPS 異常亢進株を網羅的に同定することに成功した。本研究会では同定された遺伝子群の機能と UPS のどの過程に異常が起こるのかを紹介し「型破りな分泌」と「古典的な分泌」の共通性と特異性について考察する。また UPS 機構の理解が基礎研究だけでなく産業応用にもたらす可能性についても紹介したい。