



酵母における環境応答と代謝調節に関する分子遺伝学的研究とその応用

奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科 助教 渡辺 大輔

はじめに

細胞は、外界の栄養環境を感知し、そのシグナルに応答して遺伝子発現を制御し、代謝のリモデリングを行うことによって、自らにとって必要なエネルギーや物質を生産する。したがって、環境応答と代謝調節は、細胞の生存・生育にとって最も根幹を成し、細胞を「生命」たらしめる必須な機能の一つである。私は、真核モデル生物である出芽酵母*Saccharomyces cerevisiae*を主に用いて、その全体像の解明に挑むと共に、得られた知見の産業への応用を目指している。

1. 酵母の細胞形態形成シグナル伝達経路に関するゲノムワイド解析とその応用

細胞形態は、細胞の機能を規定することに加え、細胞の生理状態を映し出す鏡でもある。出芽酵母は、細胞表層の特定の一箇所から芽と呼ばれる構造を形成し成長させ、適切なサイズに達するとそれをくびり切ることで増殖を行うが、環境やストレスに応答して芽の形成・成長を停止させる。私は、この形態形成プロセスに必須な、細胞壁の主要構成成分である1,3-β-グルカンの合成酵素Fks1pの上流因子の遺伝学的スクリーニングを行い、多機能分子スイッチとして知られる低分子量GTPase Rho1pの活性化・不活性化に関与するシグナル伝達経路の同定に携わった。さらに、形態形成の調節に関わる新規因子を明らかにするために、出芽酵母の全遺伝子破壊株ライブラリー約5,000株の細胞形態を網羅的に観察するプロジェクトに参画した。出芽酵母細胞の微細な形態の差を定量的に解析するために、顕微鏡画像から自動的に形態情報を抽出するためのCalMorphソフトウェアの開発に携わり、これを用いて全遺伝子破壊株の細胞形態に関するSCMDデータベースを構築した(図1)。これらの成果により、各遺伝子破壊株における1細胞レベルでの詳細な形態情報の記述をシステムティックに行うことが可能となり、出芽酵母の形態学的研究の精度が飛躍的に向上した。当技術は、発酵産業において用いられる実用酵母菌株にも応用可能であり、実際にCalMorphを用いた解析により発見した清酒酵母に固有の形態学的特徴が醸造特性と関連していることも見出したほか、ビール酵母の活性診断技術や薬剤のスクリーニングなどにも広く活用されるようになった。

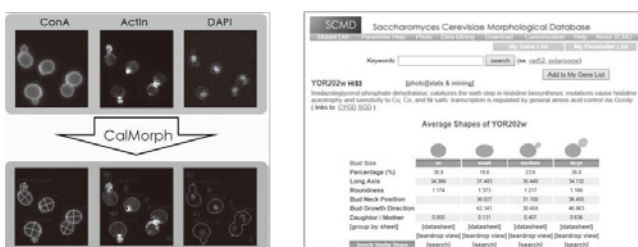


図1 CalMorphによる出芽酵母細胞形態情報の抽出の概略(左)およびそのデータに基づき構築されたSCMDデータベース(右)。

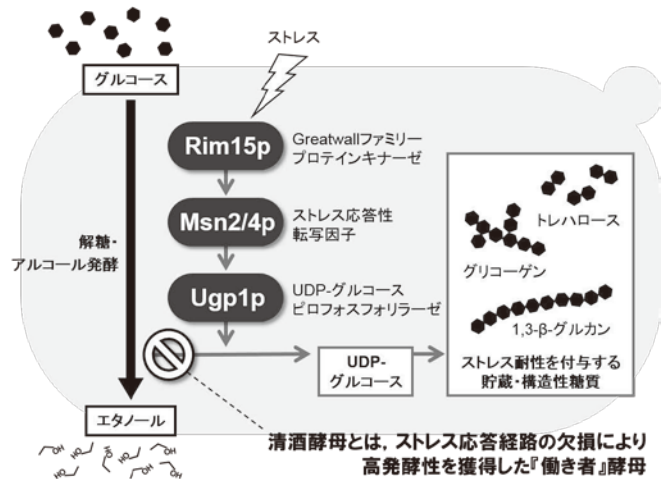


図2 清酒酵母において見出されたRim15p-Msn2/4p経路の欠損が発酵力の向上をもたらすメカニズム。

2. 酵母のアルコール発酵調節因子の同定とその応用

清酒酵母と呼ばれる菌株群は、多様な出芽酵母菌株の中でもアルコール発酵力が非常に高いことで知られているが、その原因は謎に包まれており解明が望まれていた。私は、清酒酵母と実験室酵母(生命科学研究に広く用いられるモデル菌株)の比較ゲノム・比較トランスクリプトーム解析に携わり、そこから得られたデータに基づいて、清酒酵母において機能が欠損している複数のシグナル伝達経路を同定し、それらが高発酵力と関連していることを明らかにした。中でも、発酵中の清酒もろみにおいて、清酒酵母はストレス応答に関連する遺伝子群の発現誘導を示しにくいこと、およびその原因として、出芽酵母の環境ストレス応答において中心的な役割を果たすGreatwallファミリープロテインキナーゼRim15p上と、その下流で働くストレス応答性転写因子Msn2/4pのうちMsn4p上の機能欠失変異が清酒酵母において同定されたことは驚くべき発見であり、「ストレスに対応できない『働き者』酵母が高い発酵力を有する」という新しい概念を確立するに至った。発酵環境中の微生物は様々なストレスにさらされており、ストレス耐性を付与することが発酵生産力を向上させる鍵であると従来考えられてきた。ところが、本研究により得られた知見はそれとは異なり、酵母は、ストレスを感知するとRim15p-Msn2/4p経路を介してアルコール発酵を抑制し、さらなる環境の悪化(殺菌効果を有するエタノールの濃度上昇)を防ぐ、という生存戦略を有していると結論づけられた。さらに、このRim15p-Msn2/4p経路の機能欠損は、UDP-グルコース合成を介した糖質同化経路の抑制により、相対的に解糖・アルコール発酵への代謝フラックスを増大させるというメカニズムも、炭素代謝プロファイルの解析により明らかにした(図2)。

このことに加え、従来、グルコースの豊富な発酵環境では起こらないと考えられていたグルコース脱抑制(グルコース枯渇に応答してグルコース以外の炭素源の資化に関わる遺伝子の発現が誘導される現象)の要となる転写因子Adr1pの機能欠損が発酵速度の上昇につながるという新たな高発酵メカニズムも見出し、清酒酵母におけるAdr1pの機能欠失変異も同定した。このように、環境変化に応答した遺伝子発現と代謝リモデリングの中には解糖・アルコール発酵を負に調節するものが存在しており、清酒酵母はこのような環境応答メカニズムを欠損することで、グルコースからのエタノール生産に特化した性質を獲得したのだろうと推測される。

以上の研究成果は、産業上実際に用いられている実用酵母菌株の高発酵原因変異の発見に世界で初めて成功したという意義を有することに加え、微生物の代謝や有用物質生産に関する研究分野全体にも新たな洞察をもたらすものとなった。本研究において見出された高発酵メカニズムは、清酒酵母以外の実用酵母菌株の育種にも応用可能であり、現在までに、産学との共同研究を通して、バイオエタノール酵母、ビール酵母、焼酎酵母などにおける有効性を実証している。

### 3. 酵母ユビキチンリガーゼを介したストレス応答に関する分子基盤の解析とその応用

以上のテーマに加えて、真核生物に広く保存されたタンパク質の翻訳後修飾の一種として知られるユビキチン化に着目した研究も行っている。ヒトNedd4のオルソログであり、出芽酵母において生育に必須な唯一のHECT型ユビキチンリガーゼであるRsp5pは、様々な基質タンパク質を認識しユビキチン化することで、タンパク質の分解や活性を調節し、多様な細胞機能に関与することが知られている。私達の研究グループでは、現在までに、ストレスによる変性などによって生じる異常タンパク質をRsp5pが認識し除去するという、オルタナティブなストレス応答メカニズムの解明を目指して研究を行ってきた。その過程において、Rsp5pと、エタノールストレスにより傷害を受けた細胞膜タンパク質との相互作用を特異的に仲介するアダプタータンパク質の存在を明らかにした。このことにより、Rsp5pが、近年注目を集める、細胞膜タンパク質の品質管理と呼ばれる現象において中心的な役割を果たすことが示された(図3)。また、Rsp5pは基質タンパク質との相互作用に関わるWWドメインを3つ有し

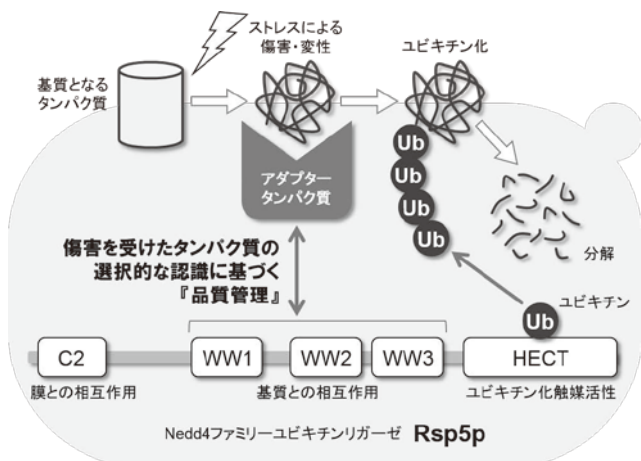


図3 酵母ユビキチンリガーゼRsp5pとアダプタータンパク質を介した細胞膜タンパク質の品質管理メカニズム

ているが、それぞれの推定上のリン酸化部位が基質認識の特異性に関与するという新たな分子メカニズムも発見した。将来的には、これらの研究成果の活用により、ストレスによって生じる異常タンパク質が酵母の生存・生育に及ぼす悪影響を効率的に除去し、酵母の発酵生産力をさらに高めることが可能になると考えている。

さらなる応用研究の一例として、Rsp5pの機能欠損変異株が示す高いストレス感受性を指標とした薬剤スクリーニング系の構築を行い、天然物由来の新規カルシニューリン阻害剤の同定に至った。また、ヒトにおいて異常タンパク質の蓄積はパーキンソン病やアルツハイマー病などの神経変性疾患の原因となることが報告されているが、その一因として知られる天然変性タンパク質 $\alpha$ -シヌクレインのユビキチン化と分解を特異的に促進する変異Rsp5pの取得にも成功しており、タンパク質のユビキチン化を介したストレス応答メカニズムを基盤とする新しい創薬シーズ探索研究の発展が期待される。

おわりに

以上の研究成果を通して、酵母という生命システム、つまり、酵母細胞にどのようなインプット(環境、ストレスなど)を与えるとどのようなアウトプット(遺伝子発現、翻訳後調節、形態形成、代謝など)が得られるのか、に関する理解をより深め、酵母を用いた産業(食品(パン・酒類)、環境(バイオ燃料)、医薬(創薬シーズ)など)に応用可能な知見を得るに至った。酵母は、先史時代から人類に活用されてきた最も身近な微生物であるにも関わらず、「酵母の細胞はなぜ丸いのか?」、「酵母の発酵力を高めるにはどうすれば良いのか?」、「単細胞生物である酵母はどのように傷害を癒すのか?」といった素朴な疑問の多くが未解決のまま残されていることに気付いた。これらの疑問に対する解答を探究する中で、酵母の未知なる可能性が開拓され、酵母機能を活用した産業利用の促進・効率化に資する有用な知見に辿り着くことができたのではないかと考えている。

謝辞 本研究は、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生命応答システム分野、独立行政法人酒類総合研究所醸造技術基盤研究部門酵母研究グループ、奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科ストレス微生物科学研究室において実施されました。学生時代から今日に至るまでたえず温かいご指導と励ましを賜り、酵母研究者として私を一から育成して下さいました東京大学大学院新領域創成科学研究科教授 大矢禎一先生、研究人生の転機となった清酒酵母との出会いを与え、豊富な知識に基づき的確に研究を導いて下さった独立行政法人酒類総合研究所醸造技術基盤研究部門長 下飯仁先生(現・岩手大学)、高いアクティビティを維持し続けることの重要性を教え、基礎と応用の垣根を越えた多彩な研究テーマに携わる機会を与えて下さった奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科教授 高木博史先生をはじめ、本研究に携わり多大なるご指導、ご助力を賜りました全ての先生方、先輩方、スタッフ・学生の皆様方、共同研究者の皆様方に対し、お一人お一人のお名前を挙げることはできませんが、心より感謝申し上げます。最後になりますが、本奨励賞にご推薦下さいました日本農芸化学会関西支部長 安達修二先生および関係の先生方に厚く御礼申し上げます。