

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23510250

研究課題名(和文) 出芽酵母の全ゲノム網羅的表現型解析に基づく酸化ストレス傷害修復メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of repair mechanism for oxidative damage in budding yeast based on genome-wide phenotype analyses

研究代表者

安藤 聡 (ANDO, Akira)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・野菜茶業研究所野菜病害虫・品質研究領域・主任研究員

研究者番号：50414496

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の全非必須遺伝子の破壊株セットおよび全必須遺伝子の mRNA を不安定化した株のセットを活用し、酸化ストレス耐性に関する全ゲノム網羅的表現型解析を行った。先行研究で同定した液胞酸性化関連遺伝子に加えて、RNAポリメラーゼやユビキチン・プロテアソーム系等に関連する遺伝子が酸化ストレス耐性において重要な役割を担っている可能性が示唆された。また、遺伝子過剰発現プラスミドライブラリを用いて遺伝子過剰発現株セットを構築し、酸化ストレス感受性あるいは耐性を示す過剰発現株のスクリーニングを行った。

研究成果の概要(英文)：To identify gene functions involved in repair mechanism for oxidative damage in budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*, we conducted genome-wide phenotype analyses using the complete collection of mutant strains deleted for each of all non-essential genes of budding yeast and the Decreased Abundance by mRNA Perturbation (DAmP) Yeast Library. The results suggest that genes related to RNA polymerases and the Ubiquitin-Proteasome system, as well as vacuolar acidification that were identified to be critical for tolerance to oxidative stress in our previous study, play important roles in tolerance to oxidative stress. We constructed a systematic library for comprehensive overexpression screens in *S. cerevisiae* using the systematic collection of yeast genome in a high-copy vector. Using this overexpression library, we screened strains that showed resistance or sensitivity to oxidative stress.

研究分野：新複合領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・応用ゲノム科学

キーワード：酸化ストレス パン酵母 遺伝子破壊株セット 網羅的表現型解析

### 1. 研究開始当初の背景

酵母の産業利用において、酵母は高浸透圧や冷凍、乾燥等、様々なストレスに曝される。このような実用上問題となるストレスが酸化を伴う作用機序を持っている可能性が指摘されている。従って、酵母の実用上問題となるストレスに対する耐性には、酸化ストレス耐性が重要であり、実用的観点からは、過酷な酸化ストレスによって引き起こされた傷害の修復がストレス耐性に重要であると考えられる。しかし、その修復メカニズムについては未だ不明な点が多く残されている。そこで、研究代表者は、出芽酵母の非必須遺伝子の破壊株セットを用いた酸化ストレス感受性スクリーニングにより、酸化ストレスにより引き起こされる傷害の修復に関連している遺伝子の検索に着手した(平成 20-21 年度科研費 若手研究 B)。その結果、液胞酸性化や DNA 修復、ミトコンドリア機能等に関連する多くの非必須遺伝子が酸化ストレス耐性に不可欠であることが明らかとなった。また、液胞のアセンブリーやペルオキシソーム機能に関与する一部の遺伝子の破壊が、酸化ストレス耐性を付与する可能性を示唆する結果も得られた。以上の結果から、液胞関連機能が酸化ストレス傷害の修復において極めて重要な役割を果たしていると考えられた。しかしながら、上述の研究では未解析の非必須遺伝子破壊株が残されていることに加え、ユビキチン・プロテアソーム系に代表されるように、関連遺伝子の多くが必須遺伝子である細胞機能に関しては、得られる情報は十分でなかった。

### 2. 研究の目的

本研究では、上述の非必須遺伝子破壊株の解析を完遂することに加え、必須遺伝子を含む全ゲノム網羅的な表現型解析を行うことによって、酸化ストレス傷害の修復に関連している遺伝子の全てを検索することを目的とする。この検索によって、酸化ストレスによる細胞傷害の修復メカニズムの全貌解明に資する知見を取得する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 供試株

*S. cerevisiae* の S288C あるいはその類縁株に由来する下記の遺伝子改変株を供試した。

非必須遺伝子破壊株のうち研究代表者の先行研究(平成 20-21 年度科研費 若手研究 B)において対象としていない株(近年入手可能となった Homozygous Diploid deletion strain supplemental set, Open BioSystems)

必須遺伝子の mRNA 安定性を低下させた株のコレクション(Breslow et al.(2008) Nature Methods 5:711-718)(DAmP Yeast Collection, Open BioSystems)

過剰発現遺伝子ライブラリ(Jones et al.(2008) Nature Methods 5:239-241)を導

入した遺伝子過剰発現株コレクション(*S. cerevisiae* 全遺伝子の各々の過剰発現が可能な株のセット)

#### (2) 酸化ストレス関連株のスクリーニング

25-50 mM 過酸化水素による一過的な酸化ストレス負荷条件、あるいは 0.5-2 mM 過酸化水素による慢性的な酸化ストレス負荷条件において、感受性あるいは耐性を示す株を選抜した。以降、特に断らない限り、前者の条件で解析をおこなった。本研究では、このような酸化ストレス関連の表現型に基づく解析を網羅的表現型解析と称することとする。

### 4. 研究成果

出芽酵母の非必須遺伝子破壊株セットについて、近年入手可能となった supplemental set を用いて網羅的表現型解析を行い、酸化ストレスに対する耐性に必要な遺伝子を多数特定した。これによって、非必須遺伝子破壊株セットの全株についての表現型解析を完遂した。また、必須遺伝子の mRNA を不安定化した株のセットを活用し、酸化ストレス耐性に関する全ゲノム網羅的表現型解析を行った。すなわち、出芽酵母の全遺伝子について、各々の欠損が酸化ストレス負荷条件における酵母の生育にどのような影響を及ぼすかを調べることによって、ストレス耐性に重要な役割を担っていると考えられる遺伝子機能を同定した。その結果、酸化ストレス耐性に必須な役割を持つ非必須遺伝子として、過去の研究で既に同定された液胞関連遺伝子に加えて、RNA ポリメラーゼ II やミトコンドリアにおける翻訳に関連する遺伝子等を新たに同定することができた。また、必須遺伝子に関する表現型解析の結果(表 1 参照)から、酸化ストレス負荷条件下での生育には、不要タンパク質の分解に必要なユビキチン・プロテアソーム系が重要である可能性が示唆された。

表1 酸化ストレス負荷後の生育に重要な必須遺伝子の機能分類

遺伝子機能カテゴリー	p 値 <sup>a</sup>	各カテゴリーに含まれる遺伝子
tRNA processing	7.1E-05	<i>RPP1</i> 他 5 遺伝子
Proteasomal degradation	1.4E-04	<i>RPT3</i> 他 8 遺伝子
DNA binding	1.4E-04	<i>RFC5</i> 他 9 遺伝子
rRNA processing	2.4E-04	<i>SAS10</i> 他 9 遺伝子
Protein processing (proteolytic)	3.7E-04	<i>RPT3</i> 他 5 遺伝子
Biosynthesis of isoleucine	2.2E-03	<i>MMF1</i> 他 1 遺伝子
Transcriptional control	5.1E-03	<i>SAS10</i> 他 13 遺伝子
DNA conformation modification	7.9E-03	<i>SAS10</i> 他 7 遺伝子

<sup>a</sup>該当する遺伝子が偶然に当該カテゴリーに含まれる確率。  
p < 1.0E-02のみを表示。

次に、遺伝子過剰発現プラスミドライブラリを活用した出芽酵母遺伝子過剰発現株セットを作製した。本セットは、約 1600 株の過剰発現株を配した 96 穴マイクロプレート 20 枚で構成される。本セットを用いて、酸化ストレス負荷条件における生育の比較を行い、酸化ストレス感受性あるいは耐性を示す

過剰発現株のスクリーニングについて条件検討を行った。その結果、25 mM 過酸化水素による一過的なストレス負荷条件において、スクリーニングが可能であることが分かった。全株をスクリーニングに供した結果、上記のストレス負荷条件において顕著な感受性あるいは耐性を示す過剰発現株を同定した。図1に典型的な感受性および耐性を示す株の増殖曲線を例示した。このような高濃度過酸化水素による一過的なストレス負荷により、酵母細胞は顕著な脂質過酸化を伴いつつ、一定の割合で死に至ることから、この致死率やストレス負荷後の生育に影響を及ぼす過剰発現遺伝子は、酸化ストレス傷害の修復と密接に関連するものと考えられる。

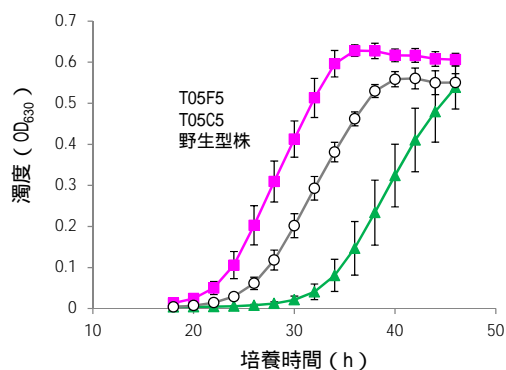


図1 酸化ストレス耐性あるいは感受性を示した過剰発現株の生育

25 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>に2時間暴露した後、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を含まない培地に接種した場合の増殖曲線

また、本研究では、酸化ストレス傷害修復機構に加えて、ストレス応答・適応機構に関連する遺伝子機能に付いての知見も得ることを目的として、一過的な強いストレスを負荷した後の生育だけでなく、慢性的な弱いストレス条件下での生育を指標とした網羅的破壊株解析を試みた。0.5-2 mM 過酸化水素による慢性的な酸化ストレス負荷条件において、感受性あるいは耐性を示す株を選抜したところ、上述の一過的なストレスの場合と比較して、多くの異なる株が見出された。これらの株について、現在、解析を進めているところである。

本研究によって、酸化ストレス傷害の修復に関連する遺伝子群の全体像が明らかになるだけでなく、酸化ストレス傷害の修復において液胞関連機能を始めた耐性関連機能がどのような役割を担っているのか解明されるものと考えられる。また、本研究によって得られる知見は、酵母の実用的ストレスに対する耐性のメカニズム解明に大きく貢献するものと期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計7件)

島純、小松崎典子、吉田綾子、安藤聡、中村敏英：パンづくりを支える微生物機能 - 酵母と乳酸菌を中心にして -、生物

工学会誌、91,618-620 (2013)  
Hasegawa S, Ogata T, Tanaka K, Ando A, Takagai H, Shima J.: Overexpression of vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase-related genes in bottom-fermenting yeast enhances ethanol., Journal of the Institute of Brewing, 118,79-185 (2012), (wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/jib.32 査読有り

Watanabe I, Miyata N, Ando A, Shiroma R, Tokuyasu K, Nakamura T.: Ethanol production by repeated-batch simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of alkali-treated rice straw using immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells., Bioresource Technology, 123, 695-698 (2012),

<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.07.052> 査読有り

Haitani Y, Tanaka K, Yamamoto M, Nakamura T, Ando A, Ogawa J, Shima J.: Identification of an acetate-tolerant strain of *Saccharomyces cerevisiae* and characterization by gene expression analysis., Journal of Bioscience and Bioengineering, 114, 648-651 (2012) 査読有り

Watanabe I, Ando A and Nakamura T.: Characterization of *Candida* sp. NY7122, a novel pentose-fermenting soil yeast. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 39,307-315 (2012) 査読有り

安藤聡、中村敏英：優れた発酵特性を有する酵母の探索、微生物遺伝資源探索収集調査報告書、24,51-56 (2011) 査読有り

島純、安藤聡、中村敏英：環境ストレス耐性に着目したバイオエタノール生産酵母開発の試み、生物工学会誌 89,536-538 (2011)

〔学会発表〕(計7件)

田中晃一、灰谷豊、吉山洋子、山本まみ、中村敏英、安藤聡、小川順、島純：産業プロセスに有用な酢酸ストレス耐性酵母の同定と耐性メカニズムの解析、日本農芸化学会 2013 年度大会、2013 年 03 月 26 日、東北大学

岡田奈津実、安藤聡、小川順、島純：酸化ストレス耐性に関与する酵母必須遺伝子群の網羅的探索、第 64 回日本生物工学会大会、2012 年 10 月 26 日、神戸国際会議場

長谷川園子、尾形智夫、田中晃一、安藤聡、小川順、高木博史、島純：液胞プロトンポンプ関連遺伝子の過剰発現によりビール酵母はエタノールストレス耐性を獲得する、第 4 回日本醸造学会若手

シンポジウム、2012年09月27日、北と  
ぴあ（東京都北区）

安藤聡、中村敏英： $\gamma$ -アミノ酪酸資化欠  
損パン酵母変異株を用いたパン生地発  
酵、日本農芸化学会 2012 年度大会、2012  
年 3 月 24 日、京都女子大学（京都府）  
灰谷豊、中村敏英、安藤聡、小川順、島  
純：遺伝子発現解析とエタノール発酵能  
に基づく酸耐性酵母の特性評価、日本農  
芸化学会 2012 年度大会、2012 年 3 月 23  
日、京都女子大学（京都府）

中村敏英、山本まみ、安藤聡、渡邊樹、  
島純：出芽酵母の高温耐性能に關与する  
遺伝子の探索、日本農芸化学会 2012 年  
度大会、2012 年 3 月 23 日、京都女子大  
学（京都府）

長谷川園子、安藤聡、小川順、高木博史、  
島純：Improvement of ethanol tolerance by  
overexpression of genes involved in yeast  
vacuolar ATPases (V-ATPase) function、第  
34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12  
月 16 日、パシフィコ横浜（神奈川県）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

安藤 聡 (ANDO Akira)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究  
機構 野菜茶業研究所 野菜病虫害・品質研  
究領域 主任研究員

研究者番号：50414496