

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：34504

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19190

研究課題名（和文）低温増殖性を獲得した酵母の応用に向けた基盤構築およびその分子メカニズムの解明

研究課題名（英文）The elucidation of molecular mechanism that confers cell growth in *Saccharomyces cerevisiae* under a low-temperature condition

研究代表者

田中 克典 (Tanaka, Katsunori)

関西学院大学・理工学部・教授

研究者番号：60273926

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：我々は、分裂酵母のDNA複製関連因子MCM-BPの機能を出芽酵母細胞を用いて解析を行ってきた。その過程において、偶然、低温で高い増殖能を示す出芽酵母株を見出していた。本研究結果により、この偶然得られた低温で高い増殖能を示す出芽酵母株の低温増殖性獲得の原因となる変異の特定に成功した。その変異は、トリプトファン輸送タンパク質Tat2のE27F変異（tat2-E27F）であった。さらに、この変異体の低温での発酵能力の検証を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

温度はさまざまな生理機能に影響を与え、生体の恒常性維持において最も重要な因子の一つである。しかし、細胞が温度を感知して機能発現にいたるメカニズムや、感知された温度情報が統合されて多様な生理現象にいたるメカニズムには未解明な課題が多い。

本研究結果による、出芽酵母の低温増殖性の獲得のしくみの解明やその応用は、清酒醸造において低温での増殖力の高い酵母の利用による製造期間の短縮や品質向上や、細胞が低温を感知して増殖を制御する普遍的メカニズムの解明、などにつながる事が期待できる。

研究成果の概要（英文）：We have analyzed the function of DNA replication-related factor MCM-BP of fission yeast using budding yeast cells. In the process, a budding yeast strain was found to have high growth ability at low temperature. Based on the results of this study, we succeeded in identifying the mutation that causes the cold-proliferation of this budding yeast strain. The mutation was the E27F mutation (tat2-E27F) of the tryptophan transport protein Tat2. Furthermore, the low temperature fermentation ability of this mutant was verified.

研究分野：分子細胞遺伝学

キーワード：出芽酵母 低温増殖能 発酵 清酒醸造 DNA複製

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

温度はさまざまな生理機能に影響を与え、生体の恒常性維持において最も重要な因子の一つである。しかし、細胞が温度を感知して機能発現にいたるメカニズムや、感知された温度情報が統合されて多様な生理現象にいたるメカニズムには未解明な課題が多い。

我々はこれまでに、分裂酵母をモデル生物に用いて、真核生物の染色体の動態に関する研究を遂行してきた。その一環として、近年、染色体 DNA 複製ヘリカーゼ (MCM 複合体) の結合因子である MCM-BP タンパク質の機能解明に取り組んでいる。MCM-BP は真核生物間で広く種を超えて保存されている。分裂酵母にもそのオルソログが存在し、DNA 複製に関与する生存に必須な因子である¹⁾。しかし不思議なことに、出芽酵母には MCM-BP オルソログは存在しない。

我々は、この両酵母間の MCM-BP の必要性の違いに着目し、MCM-BP の機能の本質に迫ろうと考えた。まず、分裂酵母 MCM-BP を出芽酵母内で発現させ (MCM-BP 導入株) 出芽酵母の DNA 合成期を中心とした細胞周期進行に及ぼす影響を調べた。その結果、分裂酵母 MCM-BP の高発現は、複製ヘリカーゼである MCM 複合体を崩壊させ、DNA 複製開始を阻害することを見出した。その際に、MCM-BP 導入株において、「コロニー形成後のプレート冷蔵庫内で保管している間に、コロニーが徐々に成長する」というなんと奇妙な現象に遭遇した。申請者はこの奇妙な現象に純粋に興味を抱き、事態の把握に努めた。その後の解析により、MCM-BP 導入株は確かに驚くべき低温増殖性を有する (4 °C での世代時間は約 3 日) こと、さらにその低温増殖性は分裂酵母 MCM-BP 遺伝子の出芽酵母への導入と密接な相関があること、が確認された。

本研究計画は、この「低温増殖性を獲得した酵母の発見」に立案したものである。

2. 研究の目的

細胞 (生物) が効率良く増殖する上で、重要な環境因子の一つが温度である。酵母の至適温度は 30 °C 付近の温度であり、15 °C 以下という低温では酵母の増殖能は著しく低下する。これは、酵母の生育に対し「低温」がストレスとなり増殖を抑制しているためと考えられる。しかし、我々の身の周りでは低温環境下でも酵母が利用されている。例えば清酒醸造においては、清酒酵母を用いて 10 °C 以下の低温で長い日数をかけ発酵させて製造する。研究成果を展開させ、清酒醸造において低温での増殖力の高い酵母の利用による製造期間の短縮や品質向上などへの貢献や、細胞が低温を感知して増殖を制御 (停止や遅延) する普遍的メカニズムの解明、などにつなげる。

本研究では、(1) 基礎分子メカニズム解明への戦略として、酵母の低温増殖性獲得の仕組みを解明すること、および (2) 応用展開のための戦略として、「低温増殖性を獲得した酵母」の産業応用に向けた基盤構築、を目的とした。

3. 研究の方法

「低温増殖性を獲得した出芽酵母」の発見を手掛かりに、基礎研究の観点から酵母の低温増殖性獲得の仕組みを探求し、さらに産業応用に向けた基盤構築をおこなうため、以下の方法により研究を遂行した。

(1) 【基礎分子メカニズム解明への戦略】低温増殖を可能とする分子メカニズムの解明：低温増殖性の実現に必要な因子の特定をおこない、分子メカニズムの解明を試みた。

低温増殖性の表現型に、発現した MCM-BP タンパク質が関与するのか、それとも導入した MCM-BP 遺伝子の DNA 断片 (配列) そのものが関与するのか、それ自体まだ不明である。まず、この点を明らかにすることを試みた。

の結果に基づいて、特定した変異が低温増殖性を付与する分子メカニズムの解明を試みた。

(2) 【応用展開のための戦略】産業応用に向けた基盤構築：産業応用に向けた基盤構築の目指し、低温増殖性が向上した酵母の発酵能に関する評価、および新たな低温増殖変異株の単離、をおこなった。

出芽酵母の低温増殖性は、清酒やビールの醸造において重要な低温発酵性に直結することが期待される。そこで、アルコール発酵により生じる二酸化炭素 (CO₂) を定量的に解析し、培地中における低温増殖性株の発酵能を評価した。

野生型の出芽酵母株に紫外線照射による突然変異を誘発し、低温増殖性を示す新たな変異体の取得を試みた。

4. 研究成果

(1) 低温増殖を可能とする分子メカニズムの解明

我々の先行研究において、分裂酵母の MCM-BP の機能解明を目的に、ガラクトース存在下で *mcb1*⁺ 遺伝子を発現誘導する *GAL-mcb1*⁺ 出芽酵母株を作製した。その際、作製した *GAL-mcb1*⁺ 出芽酵母株が低温で高い増殖性を示すことを見出した。このことから、*mcb1*⁺ 遺伝子の導入が低温増殖性の獲得に関わる可能性が高いと考え、再度新しく *GAL-mcb1*⁺ 株を作製した。しかし、新たに作製した *GAL-mcb1*⁺ 株は、低温増殖性を示さなかった。その後、当初の低温増殖性を示す *GAL-mcb1*⁺ 出芽酵母株を用い、更なる遺伝学的解析をおこ

なった。その結果、低温増殖能の獲得の原因は、出芽酵母株を *mcb1⁻* 遺伝子で形質転換した際に、宿主の出芽酵母の染色体上に偶然生じた変異に起因する可能性が極めて高いことが分かった。この結果は、本研究を開始した時点での想定とは全く異なるものであった。そこで、低温増殖能の獲得の原因となる変異の特定と、その変異が持つ性質について解明することに目的を再設定した。

その結果を踏まえて、低温増殖能の獲得の原因となる変異の特定を試みた。その後の解析により、トリプトファン非要求性 (*TRP⁻*) 出芽酵母株はトリプトファン要求性 (*trp⁻*) 出芽酵母株に比べて、高い低温増殖能を有することが分かった。さらに、先行研究において、トリプトファン輸送タンパク質 Tat2/Lgt3 が出芽酵母の低温増殖性に関与することが報告されていた²⁾。そこで、低温増殖能の獲得の原因となる変異は、*TAT2* 遺伝子そのもの、もしくは *TAT2* 遺伝子の発現制御に関与する領域、に存在する可能性を考えた。その可能性を検証するために、*TAT2* 遺伝子破壊株と低温増殖性株を交配させ、四分子解析をおこなった。その結果、*TAT2* 遺伝子破壊と低温増殖性の原因変異との二重変異体を取得することができなかった。よって、低温増殖性の原因変異は *TAT2* 遺伝子上か、またはその近傍にあることが強く示唆された。そこで、野生株および低温増殖性株の *TAT2* 遺伝子近傍領域のシーケンス解析を行った結果、*TAT2* 遺伝子の27番目のアミノ酸がグルタミン酸からフェニルアラニンに (*E27F*) 変異していることを見出した。さらに、*tat2-E27F* 遺伝子を有するプラスミドでトリプトファン要求性の野生株を形質転換すると、低温において顕著な生育の向上を確認することができた (図)。以上の結果より、低温増殖性獲得の原因は、トリプトファン輸送タンパク質 Tat2 の *E27F* 変異であるという結論に至った。この *tat2-E27F* 変異は、偶然にも高圧耐性変異体 (*HPG2-1*) の原因変異²⁾ と全く同一であった。*HPG2-1* 変異体は、高圧のみならず低温にも耐性を示すことが報告されており、我々の今回の知見と合致する。

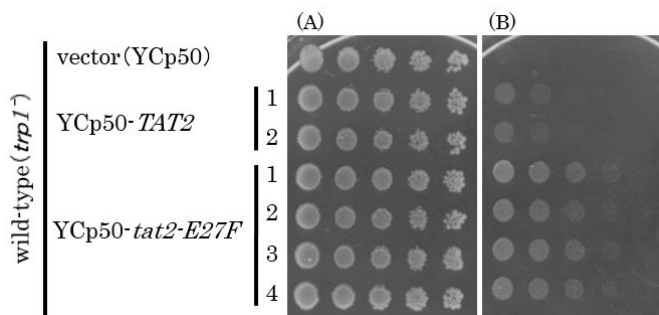


図 *tat2-E27F* プラスミドの導入による *trp⁻* 株の低温増殖性回復の確認
野生型の *TAT2* 遺伝子を含む Y Cp50-*TAT2*、低温増殖性株由来の *tat2-E27F* 遺伝子を含む Y Cp50-*tat2-E27F* でトリプトファン要求 (*trp⁻*) 野生株を形質転換した株をスポットアッセイ法を用いて SC-Uracil 寒天培地に塗布し、(A) 30 °C で 3 日間、(B) 10 °C で 7 日間培養した。

次に、この *tat2-E27F* 変異が出芽酵母の低温での増殖能を向上させる分子メカニズムを明らかにするために、*tat2-E27F* 変異が Tat2 タンパク質のタンパク質量に与える影響を解析した。その結果、*tat2-E27F* 変異により Tat2 タンパク質量は減少する傾向が見られた。一方、先行研究において、*tat2-E27F* 変異は Tat2 タンパク質の分解抑制に働いている可能性が報告されている。今後、より詳細に解析を継続し、*tat2-E27F* 変異が Tat2 タンパク質の機能にどのような影響を与えているのかを明らかにする必要がある。

(2) 産業応用に向けた基盤構築

tat2-E27F 変異が低温での発酵能力に与える影響の検証を行った。トリプトファン非要求性の野生株、トリプトファン非要求性の *tat2-E27F* 変異株、トリプトファン要求性の野生株、およびトリプトファン要求性の *tat2-E27F* 変異株を用いて、15 °C と 30 °C で発酵試験を行い CO₂ 発生量と CO₂ 発生速度を計測した。その結果、トリプトファン非要求性株では野生株に比べ *tat2-E27F* 変異株で低温 (15 °C) での発酵能の上昇が見られた。しかし、そのレベルはトリプトファン要求性株の野生株や *tat2-E27F* 変異株と同程度であるという、矛盾を含んだものであった。今後、より慎重に *tat2-E27F* 変異が低温での発酵能力に与える影響を検証する必要がある。

我々が取得した低温増殖性を示す変異体が既存の変異体と同一であったことから、低温増殖性を示す新規の変異体を取得することを試みた。トリプトファン要求性の野生型の出芽酵母株に紫外線照射による突然変異を誘発し、低温増殖性を示す新たな変異体を 15 株取得する事に成功した。今後、これらの低温増殖性変異株の低温での発酵能力を評価することで、産業利用価値の高い低温での発酵能力の高い新規酵母変異株の選抜を行う予定である。

<引用文献>

- 1) Santosa, V., Martha, S., Hirose, N., and Tanaka, K.(2013) The fission yeast minichromosome maintenance (MCM)-binding protein (MCM-BP), Mcb1, regulates MCM function during prereplicative complex formation in DNA replication. *J. Biol. Chem.* **288**, 6864-6880
- 2) Nagayama, A., Kato, C., and Abe, F. (2004) The N- and C-terminal mutations in tryptophan permease Tat2 confer cell growth in *Saccharomyces cerevisiae* under high-pressure and low-temperature conditions. *Extremophiles* **8**, 143-149

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kotomura Naoe, Tsunemine Satoru, Kuragano Masahiro, Asanuma Takahiro, Nakagawa Hiromi, Tanaka Katsunori, Murakami Yota	4. 巻 23
2. 論文標題 Sfh1, an essential component of the RSC chromatin remodeling complex, maintains genome integrity in fission yeast	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 738-752
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.12629	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hayashi Aki, Tanaka Katsunori	4. 巻 9
2. 論文標題 Short-Homology-Mediated CRISPR/Cas9-Based Method for Genome Editing in Fission Yeast	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 G3; Genes Genomes Genetics	6. 最初と最後の頁 1153-1163
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1534/g3.118.200976	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Mennie Amanda K., Moser Bettina A., Hoyle Alice, Low Ross S., Tanaka Katsunori, Nakamura Toru M.	4. 巻 2
2. 論文標題 Tpz1TPP1 prevents telomerase activation and protects telomeres by modulating the Stn1-Ten1 complex in fission yeast	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-019-0546-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

関西学院大学工学部生命科学科 染色体機能学研究室ホームページ
<http://sci-tech.ksc.kwansei.ac.jp/~tanaka/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	渡辺 大輔 (Watanabe Daisuke) (30527148)	京都大学・農学研究科・准教授 (14301)	