

平成21年 4月28日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19780059

研究課題名 (和文) 染色体活性化ダイナミクスの制御によるストレス耐性細胞の分子育種

研究課題名 (英文) Molecular breeding of stress-tolerant cells by regulating the chromatin dynamics

研究代表者

黒田 浩一 (KURODA KOUICHI)

京都大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号：30432339

研究成果の概要：酵母の *GTS1* 遺伝子を過剰発現させた際に細胞の凝集・熱耐性が見られるが、この際にクロマチンの構造変化が示唆されている。Gts1 タンパク質と相互作用するタンパク質の精製・同定を試みたところ、Ssa1 が相互作用タンパク質であることを明らかにした。また、Ssa1 と相同性の高い Ssa2 も相互作用することが分かった。二重破壊株 *ssa1Δ ssa2Δ* を作製し、*GTS1* を過剰発現させると、細胞の熱耐性がより向上した。以上のように *GTS1* 過剰発現による細胞の熱耐性誘導機構に関して興味深い知見が得られた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	0	2,100,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	390,000	3,790,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：微生物遺伝・育種

1. 研究開始当初の背景

(1) 染色体活性化ダイナミクス

真核生物において転写・複製・修復などのゲノム機能はクロマチン機能による制御、すなわちクロマチンの構造変化(クロマチンリモ

デリング)を伴う。クロマチンリモデリングが特定遺伝子の転写の ON/OFF を切り替えるうえで重要な役割を果たしていると考えられている。クロマチンリモデリングの機構については長い間不明であった。最近になってリモデリングに関わるタンパク質複合体な

どの解析が急速に進みつつあるが、動作原理とその制御機構の詳細については分かっていない。

(2) 酵母 *GTS1* 遺伝子の過剰発現

出芽酵母において *GTS1* 遺伝子を過剰発現させた際に細胞凝集、熱耐性、薬剤耐性、細胞サイズ、エネルギー代謝振動など様々な表現型に影響を及ぼすことが知られている。この際に行われている *GTS1* 遺伝子を介した情報伝達については不明な点が多い。そこで研究代表者は DNA チップを用いた網羅的転写解析を行い、Tup1-Cyc8 というグローバルリプレッサーの関与とクロマチンリモデリングの誘起を明らかにしたが、Gts1 タンパク質がゲノム中の特定の部位をどのように認識してリモデリングを誘起しているかなど詳細については不明である。また *GTS1* 過剰発現による薬剤耐性・熱耐性の誘導についての詳細な機構も分かっていない。

2. 研究の目的

GTS1 遺伝子の過剰発現によりクロマチンリモデリングを作動させることができる。そこで *GTS1* 過剰発現細胞をリモデリング誘起のモデル系とし、クロマチンリモデリングの制御機構を明らかにするとともに、凝集以外の他の表現型(熱耐性・薬剤耐性など)について解析を行い、耐性の原因となる遺伝子・メカニズムを明らかにし、耐性機構を改良・増強することにより産業利用において有用性の高いストレス耐性細胞の分子育種を行う。

3. 研究の方法

(1) *GTS1* 過剰発現により細胞凝集が見られるが、この際に起こる *FLO1* 遺伝子の誘導発現

がその原因であることを明らかにしてきた。そこで、*FLO1* プロモーター領域において実際にクロマチンリモデリングが誘起されていること確認するために MNase assay を行った。細胞から核画分を抽出し、酵素処理によるクロマチン構造の断片化を行った後、DNA を抽出して電気泳動し、ヌクレオソームマッピングを行った。

(2) tandem affinity purification 法により、Gts1 タンパク質と相互作用する因子の同定を行った。Gts1 タンパク質を strep タグ、His タグを付けたタグ付きのタンパク質として過剰発現させた細胞を破碎したのち、細胞抽出液からタグを介して Gts1 タンパク質とこれに結合しているタンパク質を複合体として精製し、質量分析装置によって相互作用タンパク質の同定を行った。同定したタンパク質をコードする遺伝子をクローニングし、タグ付きのタンパク質として発現させた細胞からの細胞抽出液と *GTS1* 過剰発現細胞からの細胞抽出液を混合し、タグに対する抗体を用いた免疫沈降法により相互作用の確認を行った。

(3) 相互作用を確認することのできたタンパク質をコードする遺伝子の発現レベルを RT-PCR によって測定し、*GTS1* 過剰発現によって発現レベルにどのような影響を与えるのかを調べた。またこの遺伝子を破壊した破壊株を作製し、破壊株において *GTS1* を過剰発現させたときの表現型(熱耐性など)を観察した。

4. 研究成果

(1) MNase assay により、*GTS1* 過剰発現細胞における *FLO1* プロモーターのヌクレオソ-

ム構造を調べたところ、*GTS1* 過剰発現によって *FL01* プロモーターにおいて実際にクロマチンリモデリングが誘起されていることを明らかにした。したがって、*GTS1* の多面的効果は Tup1-Cyc8 グローバルリプレッサーからの脱抑制と、クロマチンリモデリングの誘起により引き起こされていると考えられた。

(2) tandem affinity purification により Gts1 タンパク質と相互作用するタンパク質を複合体として精製し、質量分析装置によって同定を行ったところ、Ssa1 タンパク質が相互作用因子として同定された(図 1)。さらに Ssa1 を HA タグ付きのタンパク質として発現する細胞を作製した。この細胞からの細胞抽出液と *GTS1* 過剰発現細胞からの細胞抽出液を混合したのち、抗 HA 抗体を用いた免疫沈降を行い、別の方法においても Gts1 タンパク質と Ssa1 タンパク質との相互作用を確認することができた。また、Ssa1 タンパク質と相同性の高い Ssa2 タンパク質が存在するため、同様の免疫沈降法により相互作用を調べたところ、Ssa2 タンパク質も Gts1 タンパク質との相互作用が確認された。以上の結果から、Gts1 タンパク質が Ssa1、Ssa2 タンパク質と相互作用していることを初めて明らかにした。

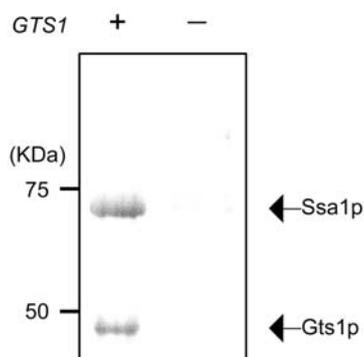


図 1 tandem affinity purification による相互作用タンパク質の同定

(3) 上記にて相互作用を確認することのできた 2 つのタンパク質をコードしている *SSA1*、*SSA2* 遺伝子の発現レベルを RT-PCR によって定量した結果、対数増殖期においては *GTS1* を過剰発現させてもほとんど変化しないが、定常期においては *GTS1* の過剰発現により、*SSA1*、*SSA2* ともに発現レベルが 2 倍以上に上昇していることが分かった。さらに 3 種類の破壊株 (*ssa1Δ*、*ssa2Δ*、*ssa1Δ ssa2Δ*) を作製し、これらの破壊株において *GTS1* を過剰発現させた際の熱耐性について調べ、Ssa1、Ssa2 タンパク質との相互作用の意義について考察を行った。1 遺伝子の破壊株 *ssa1Δ*、*ssa2Δ* では熱耐性にほとんど変化は見られず、*ssa1Δ* では *SSA2* が、*ssa2Δ* では *SSA1* が破壊した遺伝子の機能を相補していることが考えられた。ところが、二重破壊株 *ssa1Δ ssa2Δ* では *GTS1* を過剰発現させた際の熱耐性がより向上することが明らかとなった。Ssa1、Ssa2 タンパク質は相互作用を介して、Gts1 タンパク質による熱耐性の誘導を阻害していることが示唆された。以上のように、*GTS1* 過剰発現による細胞の熱耐性誘導機構に関して興味深い知見が得られたため、今後これらの知見を基に細胞の熱耐性を強化することも可能であると考えられる。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 1 件)

① 真田光彰, 黒田浩一, 植田充美

「*GTS1* 過剰発現時に見られる *GTS1* タンパク質の性質変化の解析」

日本分子生物学会・日本生化学会合同年会

2007 年 12 月 12 日

パシフィコ横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒田 浩一 (KURODA KOUICHI)

京都大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号：30432339

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者