

平成 22 年 6 月 14 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20780065
 研究課題名 (和文) 網羅的表現型解析に基づく出芽酵母の酸化ストレス傷害修復機構の解明
 研究課題名 (英文) Elucidation of oxidative stress damage repair mechanism of budding yeast based on comprehensive phenotype analysis.
 研究代表者
 安藤 聡 (ANDO AKIRA)
 農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所・微生物利用研究領域・主任研究員
 研究者番号：50414496

研究成果の概要 (和文)： 出芽酵母非必須遺伝子の破壊株セットを利用した網羅的表現型解析により、液胞酸性化や DNA 修復、ミトコンドリア機能等に関わる遺伝子が酸化ストレスを負荷した細胞の生育に必要であることを明らかにした。また、液胞酸性化を担う V-ATPase の機能が様々なストレス耐性に不可欠であることを見出した。酸化ストレス耐性を示す遺伝子破壊株について解析を進めた結果、一部の液胞関連遺伝子及びペルオキシソーム関連遺伝子の破壊は酸化ストレス耐性を付与する可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)： Based on comprehensive phenotype analysis using the complete collection of mutant strains deleted for each of all non-essential genes of budding yeast, I revealed that genes involved in vacuolar acidification, DNA-repair and mitochondrial function were required for the growth after exposure to oxidative stress. The function of V-ATPase, which is responsible for vacuolar acidification, was found to be indispensable for tolerance to multiple stresses. Analysis of deletion mutants that exhibited tolerance to oxidative stress suggested the possibility that deletions of a part of genes involved in vacuolar function and peroxisome function confer tolerance to oxidative stress.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,200,000	660,000	2,860,000

研究分野： 応用微生物学

科研費の分科・細目： 農芸化学・応用微生物学

キーワード：酸化ストレス、パン酵母、網羅的表現型解析、フェノミクス、遺伝子破壊株セット

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、酵母の実用的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ると考えられる。酸化ストレスに対する応答や耐性のメカニズムについては、レドックス制御系に関連した研究を中心に様々な研究がなされているが、酸化ストレスによって引き起こされる傷害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。

2. 研究の目的

本研究では酸化ストレスによって引き起こされる傷害の修復メカニズムの全貌解明を目的として、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いた全ゲノム網羅的なポストゲノム解析を実施する。

3. 研究の方法

遺伝子破壊株セット (*S. cerevisiae* 全非必須遺伝子の各々が破壊された株のセット) および遺伝子過剰発現株セット (*S. cerevisiae* 全遺伝子の各々の過剰発現が可能な株のセット) を用いて網羅的表現型解析を行い、酸化ストレス傷害の修復において重要な役割を担っている遺伝子を同定する。次いで、これらの遺伝子の破壊株あるいは過剰発現株における酸化ストレス傷害の性状を精査し、遺伝子機能と傷害修復との関連を明らかにする。

4. 研究成果

酸化ストレス負荷条件 (50 mM 過酸化水素で2時間処理後) 及び非ストレス条件における野生株と全遺伝子破壊株の生育を測定し、ストレス負荷条件における破壊株の野生株に対する生育 (濁度) の比を酸化ストレス感受性の指標とした。非ストレス条件において著しい生育遅延 (野生株の10%以下の生育) を示す株を解析対象から除外し、ストレス負荷条件において野生株の50%以下の生育を示す破壊株 (約300株) を酸化ストレス感受性株と定義した (図1 参照)。

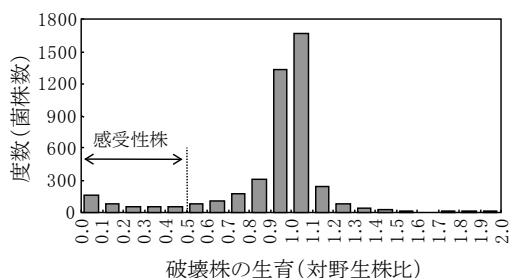


図1 酸化ストレス負荷条件における全遺伝子破壊株の生育

酸化ストレス感受性株において破壊されて

いる遺伝子の本来の機能は、酸化ストレス耐性に必要であると考えられることから、これらの遺伝子について、MIPS (Munich Information Center for Protein Sequences) データベースに基づく分類を行った (表1)。その結果、DNA修復、液胞酸性化、ミトコンドリア機能等が酸化ストレス耐性に重要である可能性が強く示唆された。

表1 酸化ストレス負荷後の生育に必要な遺伝子の機能分類

遺伝子機能カテゴリー	p 値 ^a
CELL CYCLE AND DNA PROCESSING	1.0E-07
DNA processing	2.2E-06
DNA recombination and DNA repair	5.4E-06
DNA recombination	3.3E-06
nuclear and chromosomal cycle	1.4E-05
PROTEIN SYNTHESIS	2.5E-06
ribosomal proteins	9.2E-06
BIOGENESIS OF CELLULAR COMPONENTS	4.5E-06
mitochondrion	6.7E-05
INTERACTION WITH THE ENVIRONMENT	4.9E-06
homeostasis	6.0E-05
homeostasis of cations	8.7E-05
homeostasis of protons	7.7E-08
CELLULAR TRANSPORT, TRANSPORT FACILITIES AND TRANSPORT ROUTES	7.0E-03
ion transport	7.9E-05
cation transport (H ⁺ , Na ⁺ , K ⁺ , Ca ²⁺ , NH ₄ ⁺ , etc.)	1.4E-05
electron transport	1.9E-05
transport ATPases	6.9E-09
vacuolar/lysosomal transport	3.7E-06

^a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-03のみを表示。

そこで、これらの細胞機能に関連する遺伝子の破壊株について、酵母の産業利用上問題となる冷凍および乾燥ストレスに対する感受性を調べたところ、多くの株において交差感受性を示す傾向が観察された。特に、液胞酸性化を担っているV-ATPaseをコードする遺伝子群の破壊株が、最も顕著な交差感受性を示すことが明らかとなった (表2)。この結果から、V-ATPaseが様々なストレス耐性において不可欠な役割を担っていると考えられた。

次に、酸化ストレスマーカーとしてDPPP (Diphenyl-1-pyrenylphosphine) 等を用いた実験により、酸化ストレス感受性を示す *tps1* 遺伝子破壊株において、脂質過酸化等の酸化ストレス傷害が野生株よりも亢進していることを示す結果が得られた。このことから、遺伝子破壊株における酸化ストレスによる傷害の評価手法として、DPPPをプローブとした脂質過酸化物の簡易定量が有効である可能性が示された。

また、酸化ストレス感受性を示す遺伝子破壊株について、V-ATPase機能に着目した解析 (pH感受性、亜鉛感受性、液胞酸性化能等の

評価) および評価結果のデータマイニングを行い、V-ATPase欠損型の表現型を示す新たな遺伝子破壊株を同定することができた。今後、これらの株において破壊されている遺伝子について、V-ATPase機能並びに酸化ストレス耐性との関連を検討することが酸化ストレス傷害の修復メカニズムの解明に有効であると考えられる。

表2 V-ATPaseのサブユニットおよびアセンブリ因子をコードする遺伝子の破壊株におけるストレス感受性

ドメイン	サブユニット	遺伝子名	当該遺伝子破壊株の感受性 ^a		
			冷凍	乾燥	酸化
V ₁	A	<i>TFP1</i>	0.03	0.05	0.01
	B	<i>VMA2</i>	0.01	0.01	0.01
	C	<i>VMA5</i>	ND	ND	0.61
	D	<i>VMA8</i>	0.02	0.40	0.02
	E	<i>VMA4</i>	0.07	0.01	0.01
	F	<i>VMA7</i>	0.02	0.02	0.01
	G	<i>VMA10</i>	ND	0.10	0.01
	H	<i>VMA13</i>	0.22	0.03	0.01
V ₀	a	<i>VPH1</i>	0.29	0.85	0.08
	c	<i>CUP5</i>	0.02	0.06	0.01
	c'	<i>TFP3</i>	0.12	0.02	0.01
	c''	<i>PPA1</i>	ND	0.02	0.01
	d	<i>VMA6</i>	ND	0.76	0.00
	e	<i>VMA9</i>	0.02	0.00	0.01
小胞体局在 (アセンブリ因子)		<i>PKR1</i>	0.77	0.72	0.31
		<i>VPH2</i>	0.01	0.01	0.00
		<i>VMA21</i>	0.03	0.02	0.01
		<i>VMA22</i>	ND	ND	ND

^a標記ストレス負荷条件における遺伝子破壊株の野生株に対する生育の比。

本研究における網羅的表現型解析では、酸化ストレス感受性株だけでなく、酸化ストレスに耐性を示す株も少ないながら見出すことができた。酸化ストレス耐性を示す遺伝子破壊株について解析を進めた結果、一部の液胞関連遺伝子あるいはペルオキシソーム関連遺伝子の破壊によって、酸化ストレス耐性が付与される可能性が示唆された。現在のところ、この耐性獲得のメカニズムは全く不明である。

遺伝子過剰発現株セットを活用した表現型解析については、GST融合遺伝子過剰発現株セット (OpenBiosystems) を用いて条件検討を行ったが、当該株セットの性質上、解析の実施は困難であると判断した。過剰発現株セットを活用した網羅的表現型解析を実施するには、当該株セットとは異なる過剰発現株コレクションあるいは過剰発現遺伝子ライブラリー等を利用する必要があると考えられる。

以上を総括すると、本研究実績は、酸化ストレス耐性並びに傷害修復における液胞関連

機能 (特にV-ATPase機能) の重要性を示したものであり、ストレス耐性の分子メカニズム解明に大きく貢献するものであると考えられる。今後、酸化ストレスに感受性を示す遺伝子破壊株の解析だけでなく、耐性を示す破壊株や過剰発現株コレクション等の解析を進めることによって、酸化ストレス耐性並びに傷害修復の分子メカニズム解明の基盤となる新たな知見が得られるものと期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

- ① Shunsuke Takahashi, Akira Ando*, Hiroshi Takagi, Jun Shima: Insufficiency of copper ion homeostasis causes freeze-thaw injury of yeast cells revealed by indirect gene expression analysis., *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 2009, 6706 - 6711 (*S.T. and A.A. contributed equally to this work.) 査読有り

[学会発表] (計7件)

- ① 安藤 聡、高木博史、島 純：遺伝子破壊によるストレス耐性実用パン酵母の育種、第60回日本生物工学会大会、平成20年8月27日、東北学院大学土樋キャンパス
- ② 安藤 聡、高木博史、島 純：酸化ストレス感受性遺伝子破壊株から見出された液胞酸性化欠損株の解析、酵母遺伝学フォーラム第41回研究報告会、平成20年9月10日、北海道大学学術交流会館
- ③ 安藤 聡、浜迫彰子、大家せつ子、岡井直子、高木博史、島 純：網羅的表現型解析を基盤とした実用パン酵母の分子育種、日本農芸化学会2009年度大会、平成21年3月28日、マリンメッセ福岡
- ④ 安藤 聡、島 純：網羅的表現型解析 (フェノミクス) を基盤としたパン酵母育種の試み、平成21年度関東甲信越地区食品醸造研究会、平成21年7月2日、千葉県産業支援技術研究所
- ⑤ 安藤 聡、島 純：V-ATPaseアセンブリ因子の過剰発現によるストレス耐性実用パン酵母の育種、第61回日本生物工学会大会、平成21年9月24日、名古屋大学
- ⑥ Akira Ando, Toshihide Nakamura, Jun Shima: Genome-wide identification of genes required for stress tolerance of yeast: application to breeding of stress-tolerant yeast for bread making and bioethanol production., *UJNR Food and Agricultural Panel 37th Annual*

Meeting, 平成 21 年 10 月 7 日, つくば国際会議場

- ⑦安藤 聡、村田里美、高木博史、島 純：
出芽酵母 V-ATPase 欠損株における遺伝子
発現様式の解析、日本農芸化学会 2010 年
度大会、平成 22 年 3 月 29 日、東京大学

[図書] (計 1 件)

- ①安藤 聡、島 純：朝倉書店（食品総合研
究所編）、食品技術総合辞典、2008、
p501-504

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
機構食品総合研究所・微生物利用研究領
域・主任研究員

研究者番号：50414496