

1P-127 酵母のバニリンストレス応答に重要な遺伝子の探索

○ Nguyen Trinh TM, 岩城 理, 井沢 真吾
(京工繊大・応生)
mytrinhqh@yahoo.com

木質草本系バイオマスから生産される第二世代バイオエタノールは、食糧資源と競合しないことや未利用資源の有効活用という点で、今後の規模拡大が期待されている再生可能エネルギーである。しかし、バイオマスの糖化前処理の過程では副産物としてバニリンなどの発酵阻害物質が生じてしまう。バニリンは酵母の生育や発酵能を著しく阻害するため、発酵効率や製造コストの面で大きな問題となっている。これまでに我々は、バニリンによって引き起こされる酵母細胞内の変化や応答について解析を行い、ミトコンドリアの断片化を引き起こす酸化的ストレスや翻訳活性の抑制、翻訳制御に関わる細胞質 mRNP granule の形成などが誘導されることを明らかにした (Nguyen *et al.* (2014) *J. Biosci. Bioeng.*, 117:33-38)。

バニリンストレス下では翻訳抑制によって大部分の遺伝子の発現が抑えられる一方で、一部の遺伝子の優先的な発現が認められる。これらの遺伝子はバニリン耐性獲得において重要な役割を担っていると推測されたことから、その同定と解析を試みた。ポリソーム解析によりバニリンストレス下でポリソームを形成する mRNA を単離し、Western blot でその翻訳レベルを検証した。これまでに、バニリンによる翻訳抑制を回避して翻訳レベルが顕著に増加する遺伝子を3種同定した。これらの遺伝子欠損株はバニリンに対し高い感受性を示した。また、そのうちの一つを多コピーベクターで酵母細胞に導入するとバニリン耐性が顕著に改善された。以上の結果から、バニリンストレス応答において重要な遺伝子の同定がポリソーム解析によって高い確率で可能になると考えられた。

Screening of the essential genes for yeast response to vanillin stress

○ Trinh TM Nguyen, Aya Iwaki, Shingo Izawa
(Dept. Appl. Biol., Sch. Sci. Technol., Kyoto Inst. Technol.)

Key words stress response, yeast, lignocellulosic materials, vanillin

1P-128 酵母のエタノールストレス応答において重要な遺伝子の探索

○ 山内 雪菜, 岩城 理, 井沢 真吾
(京工繊大・応生)
yukinakunda@yahoo.co.jp

酵母自身が行うアルコール発酵によって生じるエタノールは、高濃度になると酵母細胞にとっても致命的なストレスとなる。これまで発酵効率の改善を視野に、酵母のエタノールストレス応答機構の解明やエタノール耐性の改良が長年に渡って取り組まれてきたが、未だ不明な点が多く十分な耐性改良には至っていない。9% 以上の高濃度エタノールストレス条件下の酵母細胞では、転写パターンの変化に加えて bulk poly(A)⁺ mRNA の核外輸送阻害や翻訳抑制、細胞質 mRNP granule の形成などが誘導され、mRNA flux が通常とは大きく異なることが明らかにされている (Takemura *et al.* (2004) *J. Cell Sci.*, 117:33-38; Kato *et al.* (2011) *Yeast*, 28:339-347; Iwaki *et al.* (2013) *Appl. Environ. Microbiol.*, 79:1661-1667)。一方で、高濃度エタノールストレス条件下でも一部の mRNA が優先的に合成・輸送・翻訳されている可能性が考えられたため、今回、その検証に取り組んだ。ポリソーム解析によりポリソーム画分から mRNA を回収し、DNA マイクロアレイ解析で高濃度エタノールストレス条件下のポリソームに結合している mRNA を同定した。qRT-PCR で転写レベルを、Western blot 解析で翻訳レベルを検討したところ、高濃度エタノールストレス条件下でも翻訳抑制されずに発現している遺伝子を複数確認することが出来た。これらの遺伝子破壊株は野生株よりも高いエタノール感受性を示したため、エタノールストレスへの応答において重要な役割を担っていると推測された。以上の結果から、エタノールストレス応答において重要な遺伝子の mRNA は、高濃度エタノールストレス存在下でも優先的に翻訳されていると考えられた。

Screening of the essential genes for yeast response to ethanol stress

○ Yukina Yamauchi, Aya Iwaki, Shingo Izawa
(Dept. Appl. Biol., Sch. Sci. Technol., Kyoto Inst. Technol.)

Key words ethanol stress, yeast, mRNA flux, polysome analysis

1P-129 細胞から乳化物質を容易に遊離する酵母遺伝子欠損株の探索

○ 松本 あずさ, 安藤 達也, 立花 太郎, 東 雅之
(阪市大院・工・化生系)
azuma@bioa.eng.osaka-cu.ac.jp

我々は、パン酵母と免疫担当細胞であるマクロファージ (RAW264.7) との接触により、マクロファージを強く活性化する酵母変異株を取得し、その細胞表面構造の解析を進めてきた。その過程で、マクロファージ活性化株の菌体懸濁液とテトラデカンを混合すると油が乳化する現象を見出した。さらに、この乳化物質は菌体懸濁液をボルテックス処理するだけで容易に菌体から遊離することや、その乳化活性はマクロファージ活性化能が高い株ほど高いことを見出し、2013 年度日本生物工学会大会で報告した。これらの株は免疫機能を活性化する株としてだけでなく、乳化物質 (バイオサーファクタント) 生産株としても有用と考えられた。本研究では、パン酵母の遺伝子変異と乳化物質の遊離の関係について情報を得るため、*S. cerevisiae* の遺伝子欠損株を用い、細胞から乳化物質を容易に遊離する株の探索を行った。まず、固体培地上で生育した酵母を水層に懸濁し、油と混合することで乳化が見られる株を選抜した。BY4741 株を元に構築された接合型 a の遺伝子欠損株 5153 株中、22 株で比較的高い乳化活性が見られた。その 22 株の中には直接細胞壁多糖合成に関わる遺伝子の欠損株は含まれておらず、機能未知である遺伝子の欠損株が 7 株含まれていた。選抜された欠損株について、菌体懸濁液をボルテックス処理し、遠心分離により菌体を除いた上清の乳化活性を測定した。現在、選抜株の細胞表面構造についても解析を進めている。

Screening of mutant strains releasing a biosurfactant easily from cells in *Saccharomyces cerevisiae*

○ Azusa Matsumoto, Tatsuya Ando, Taro Tachibana, Masayuki Azuma
(Dept. Appl. Chem. Bioeng., Grad. Sch. Eng., Osaka City Univ.)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, biosurfactant, cell surface, emulsification

1P-130 チオ硫酸塩による出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の生育促進やエタノール生産性の向上

○ 舟橋 依里, 河野 祐介, 渡辺 大輔, 大津 敏生, 高木 博史
(奈良先端大・バイオ)
iohtsu@bs.naist.jp

【背景・目的】我々は、大腸菌において、環境中に硫酸塩とチオ硫酸塩が同時に存在する時、チオ硫酸塩を優先的に利用してシステインを合成する硫黄源の選択的利用機構 (チオ硫酸リプレッション) を見出している。硫酸塩からのシステイン合成は、2 分子の ATP と 4 分子の NADPH の消費を伴う一方、チオ硫酸塩からのシステイン合成には 1 分子の ATP 消費のみと、大腸菌がシステイン合成のためにチオ硫酸塩を優先することは合理的な機構であると考えられる。そこで、本研究では、幅広い産業で応用されている出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のチオ硫酸塩の資化能について、またエタノール生産に及ぼす影響について調べることを目的とした。

【方法・結果】これまで、チオ硫酸塩を単一硫黄源として出芽酵母が生育できるのか、その有無については全く報告されていない。そこで、チオ硫酸塩を単一硫黄源とした SD 培地における野生株の生育について調べた。その結果、硫酸塩を単一硫黄源とした SD 培地と比べて、良好な生育を示すことが判明した。また、培地中のエタノール濃度をガスクロマトグラフィーにより測定したところ、2% (0.6g) のグルコースから単一硫酸塩を含む SD 培地では 24 時間で 0.9% のエタノールが生産されたのに対して、チオ硫酸塩では 18 時間で 1% に達し、出芽酵母の生育とエタノール生産性の向上に硫酸塩よりチオ硫酸塩が有効であることが明らかとなった。

An Effect of thiosulfate on the Ethanol production and growth of *Saccharomyces cerevisiae*

○ Eri Funahashi, Yusuke Kawano, Daisuke Watanabe, Iwao Ohtsu, Hiroshi Takagi
(Grad. Sch. Biol. Sci., NAIST)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, ethanol production, thiosulfate assimilation