

文 献

- 1) <http://www.tigr.org/tdb/mdb/mdb.html>
- 2) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/unfinished-genome.html>
- 3) 中井謙太：化学と生物，**36**，408 (1998).
- 4) <http://www.genome.ad.jp/kegg/>
- 5) <http://www.expasy.ch/ch2d/>
- 6) http://www.cifn.unam.mx/Computational_Biology/
- 7) <http://cmgm.stanford.edu/pbrown/>
- 8) <http://genemark.biology.gatech.edu/GeneMark/>
- 9) <http://www-scc.jst.go.jp/YEBIS/GeneHacker/>
- 10) <http://www.tigr.org/softlab/glimmer/glimmer.html>
- 11) Tada, T. et al.: *Bioinformatics*, 印刷中.
- 12) Yada, T. et al.: *Intellig. Syst. Mol. Biol.*, **5**, 354 (1997).
- 13) <http://www-scc.jst.go.jp/YEBIS/MotifExtraction/>
- 14) Goffeau, A.: *Nature Biotechnology*, **16**, 907 (1998).
- 15) <http://psort.nibb.ac.jp/>
- 16) Nakai, K. and Horton, P.: *TiBS*, **24**, 34 (1999).
- 17) Chou, K.-C. and Elrod, D. W.: *Protein Eng.*, **12**, 107 (1999).

酵母ゲノム情報の糸状菌遺伝子解析への利用

北 本 勝ひこ

真核微生物である糸状菌は150万種にも及ぶ広範な種を含むと言われており、微生物のなかで最大のグループをなしている。もっとも単純な単細胞真核生物である酵母よりゲノムサイズで約2～3倍程度と大きく、多細胞からなる filamentous な細胞形態を維持し、多様な環境で生育でき、かつ胞子形成など特異的な形態分化を起こす。その中には、わが国の醸造食品に永年にわたって使用されている麹菌 (*Aspergillus oryzae*, *A. awamori*, *A. sojae*) や、東南アジアの麹に使用される *Rhizopus*, *Mucor* などが含まれる。また、これらは種々の酵素を大量に生産する能力があることから酵素剤の生産にも古くから使用されており、工業的に重要な微生物である。糸状菌は、医薬の開発の観点からも、新しい生理活性物質のスクリーニング源として重要な位置を占めている。また遺伝生化学的研究材料としては、*Neurospora crassa* (アカパンカビ) や *Aspergillus nidulans* が研究室株として古い歴史を有し、多くの成果が得られている。しかしながら、最近数十年の間にめざましい研究の進展が見られた酵母 (*S. cerevisiae*) と比べれば、これら糸状菌の理解は格段に遅れている。1997年から、糸状菌で初めて *A. nidulans* のゲノムプロジェクトが米国で開始され、EST (Expressed Sequence Tag) database が公開されている。本稿では、工業的に重要な麹菌の分子生物学的解析および育種を主眼として、まず *A. nidulans* EST の情報と酵母ゲノム情報を利用することにより、目的とする遺伝子を効率よく単離、解析することが可能であることを液胞形成関連遺伝子の例を中心として紹介する。

1. *A. nidulans* のゲノムプロジェクト

1996年8月に米国 Oklahoma 州立大学において、第1

回 Fungal Genome Workshop が開催され、糸状菌として *A. nidulans* を対象として、ゲノムプロジェクトを開始することが決まった。まず、先導プロジェクトとして、mRNA より逆転写した cDNA の配列を決定する EST database の作製と、8本ある染色体のうちもっとも短い第4番染色体の塩基配列の決定が提案された。¹⁾ このプロジェクトのために、産業界、大学関係のメンバーからなる運営委員会が組織された。これらの解析情報は、web site (<http://www.genome.ou.edu/fungal.html>) で得ることができる。現在、第8回の data release (99年3月) で、14,900の cDNA クローンのうち6,000クローンについて解析した結果について公開されている。染色体の塩基配列結果についても一部が公表されている。

2. 酵母での液胞形成欠損および液胞酵素のミスソート変異株の解析

液胞は酵母の体積の約25%も占めるもっとも大きなオルガネラであり、細胞の恒常性維持に必須であること、また、なかでも不要となったタンパク質をリサイクルするための重要な機能を果たすために複雑なネットワークを形成していることも明らかになりつつある。その形態は、細胞周期により変化をする。糸状菌でも、液胞形態は位相差顕微鏡などで容易に観察される。ただし、酵母と異なり、個々の細胞 (先端の細胞、基部の細胞など) で、その形態は異なることが観察されるが、詳しい解析はまったくなされていない (Fig. 1)。酵母では、これまでに約40の液胞形成関連遺伝子が同定されており、そのうちの多くが *vps* (vacuolar protein sorting) もしくは *vam* (vacuolar morphology) 変異株として単離され、その機能が詳細に解析されている。これらの変異株の液胞形態に

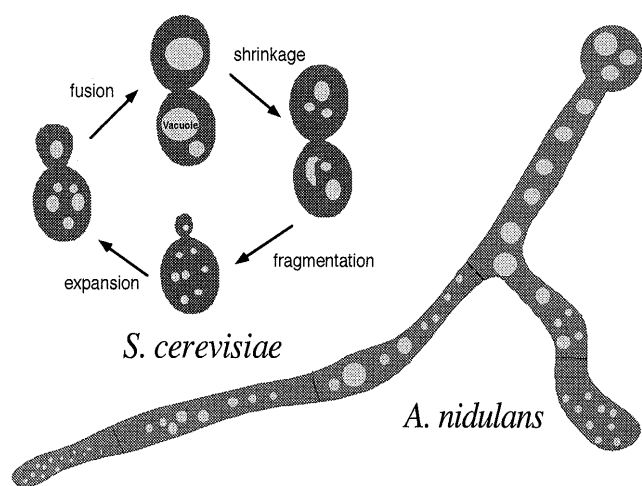


Fig. 1. Morphology of vacuoles of yeast *S. cerevisiae* and filamentous fungus *A. nidulans*.

については, Class A から Class F までの 6 つに分類されている (Fig. 2).²⁾

一方, 糸状菌では, 変異株の取得およびその解析が酵母に比べて困難であることから, 液胞の形態, 機能に関して分子生物学的な解析はこれまでなされていない. しかし, 最近の分子生物学的手法の進展, 上述のような糸状菌ゲノムプロジェクトの情報を利用することにより, 比較的容易に目的の遺伝子を *A. nidulans* から単離することが可能となった. そこで, 先端成長により増殖する多細胞生物である糸状菌での液胞の機能を調べることを目的として, 酵母での液胞関連遺伝子ホモログを *A. nidulans* から取得し解析を行った.

3. *A. nidulans* EST の情報と酵母ゲノム情報を利用した液胞形成関連遺伝子の単離

1) **VPS1 遺伝子ホモログの単離**³⁾ *A. nidulans* ゲノムプロジェクトの database を検索したところ, Vps1 の C 末端約 100 アミノ酸をコードする部分と相同性が高い

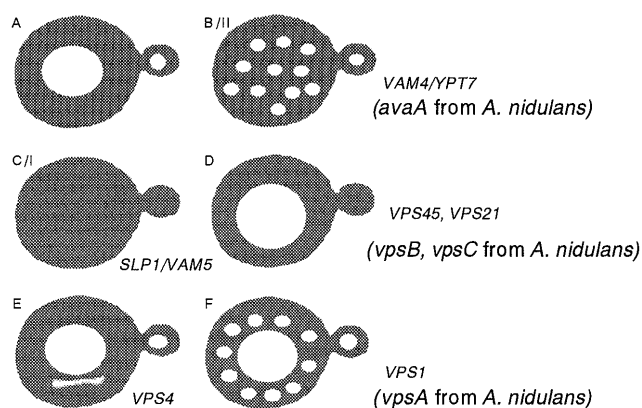


Fig. 2. Classification of *vps/vam* mutants by their vacuole morphology in *S. cerevisiae*.

EST を見いだした. Vps1 はダイナミンとの相同性が高く, 酵母ではトランスゴルジからプレ液胞コンパートメントへの輸送小胞形成に関与しており, 液胞形態から Class F に分類される (Fig. 2).⁴⁾ この配列をもとにしてオリゴヌクレオチドプライマーをデザインし, *A. nidulans* cDNA library を template として PCR 法により Vps1 ホモログをコードすると考えられる約 1.9 kb の cDNA 断片を増幅した. これをプローブとして genomic library から遺伝子を単離し, *vpsA* と命名した. *vpsA* 遺伝子は 696 アミノ酸からなり, 7 個のイントロンを含んでいた. *vpsA* 遺伝子破壊株は生育が野生株に比べ遅く, 菌糸のどの部分にも野生株で見られる大きな液胞がなく, 細分化された液胞のみが観察された.

2) **VPS45 遺伝子ホモログの単離**⁵⁾ Vps45 は, Sec1 family であり, トランスゴルジからの輸送小胞とプレ液胞コンパートメントとの融合に関与していると言われており, 液胞形態から Class D に分類される (Fig. 2).^{6,7)} *A. nidulans* ゲノムプロジェクトの database を検索したところ, Vps45 の C 末端約 200 アミノ酸をコードする部分と相同性が高い EST を見いだした. この配列をもとに, 上記と同様にして Vps45 ホモログをコードする遺伝子を単離し, *vpsB* と命名した. *vpsB* 遺伝子は 593 アミノ酸からなり, 2 個のイントロンを含んでいた. また, アミノ酸レベルで, Vps45 と 39.5%, *S. pombe* Yab3 と 50.8% の相同性が認められた.

3) **VPS21 遺伝子ホモログの単離**⁸⁾ Vps21 は, 液胞形成に関連する small GTPase であり, トランスゴルジからの輸送小胞とプレ液胞コンパートメントとの融合に関与していると言われており, 液胞形態から Class D に分類される (Fig. 2).⁹⁾ *A. nidulans* ゲノムプロジェクトの database を検索したところ, Vps21 の C 末端約 110 アミノ酸をコードする部分と相同性が高い EST を見いだした. この配列をもとにして, 同様にして Vps21 ホモログをコードすると考えられる遺伝子を単離し, *vpsC* と命名した. *vpsC* 遺伝子は 218 アミノ酸からなり, 4 個のイントロンを含んでいた. また, アミノ酸レベルで, Vps21 と 54.1%, *S. pombe* Ypt5 と 74.0% の相同性が認められた. *vpsC* 遺伝子破壊株は生育が野生株に比べ遅く, 液胞形態の異常も観察された.

4) **VAM4 遺伝子ホモログの単離**^{10,11)} 液胞が細分化するクラス B の遺伝子である *VAM4* (酵母以外の生物では Rab7 と呼ばれている) ホモログを *A. nidulans* から単離, 解析した. 酵母の Vam4 タンパク質はプレ液胞コンパートメントからの輸送小胞が液胞に融合するのに

必要な因子であり、また、液胞同士の融合にも必要な因子である。¹²⁾

本遺伝子の単離には、EST 情報ではなく、*S. cerevisiae* VAM4, human *rab7*, シロイヌナズナ *rab7* の間で高度に保存されている領域をもとにプライマーをデザインし、ゲノム DNA をテンプレートに PCR を行って得たプローブを使用して、*A. nidulans* の cosmid library から Vam4 ホモログをコードする遺伝子の全長を取得し、*avaA* (*A. nidulans* vacuolar morphology) と命名した。*avaA* 遺伝子は 206 アミノ酸からなり、5 個のイントロンを含んでいた。

AvaA タンパク質は human の Rab7 タンパク質ともっとも相溶性が高く、71.8%, *S. cerevisiae* Vam4 タンパクとは 67.3%, シロイヌナズナの Rab7 タンパクとは 64.6% だった。*avaA* cDNA を酵母 *vam4* 破壊株に導入することによる機能相補実験では、破壊株の液胞は細分化されたままであり、相補できなかった。*avaA* 遺伝子破壊株は、コロニーの形態、生育速度において野生株との差は見られなかったが、分生子形成効率が著しく低下し、野生株の約 10 分の 1 であった。液胞観察の結果、分生子、菌糸ともに細分化された液胞が認められた。

5) カルボキシペプチダーゼ Y 遺伝子ホモログの単離¹³⁾ 酵母では、液胞マーカー酵素として、カルボキシペプチダーゼ Y (CPY) が頻用されている。*A. nidulans* から液胞形成欠損変異株の作製をしたが、これらの機能を調べるための液胞マーカー酵素をコードしている遺伝子は *Aspergillus* からは単離されていない。そこで、*A. nidulans* CPY 遺伝子の取得を、*A. nidulans* の EST データベースを利用して行った。酵母の CPY と相溶性が高いクローンを見だし、この配列を利用して、AnCPY をコードすると考えられる遺伝子を取得し、*cpyA* と命名した。CpyA が液胞に局在することを確認するために、GFP との融合タンパクを作製し発現させたところ、細胞内の液胞と思われる位置に蛍光が観察された。また、*cpyA* 破壊株において、細胞質の CPY 活性が減少したことから、CpyA は液胞酵素マーカーとして使用できることが確認された。

4. ソーティング工学による液胞酵素の 培地中への分泌生産

酵母液胞内には、プロテアーゼ、ヌクレアーゼ、ホスファターゼなどの加水分解酵素が局在する。酵母での *vps* 変異株の解析から、これらの液胞酵素が培地中に分泌されることが知られている。したがって、上記の *A. nidulans* の *vpsA*, *vpsB*, *vpsC* 変異株については、液胞酵素

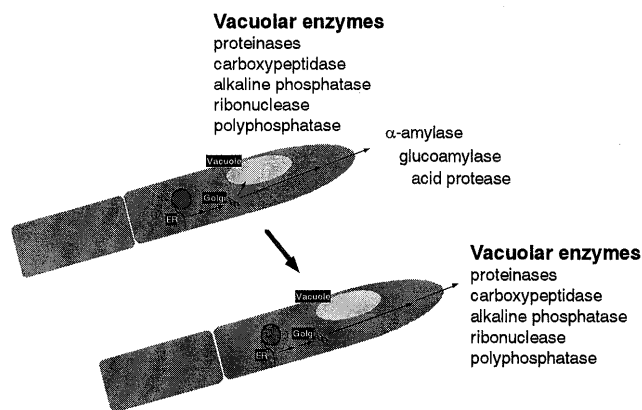


Fig. 3. Sorting engineering by *vps* mutants in filamentous fungi.

を培地中へ missort すると予想される (Fig. 3). ソーティング工学の観点からは、麹菌の液胞局在酵素の培地中への分泌生産を可能にするものと考えている。これまで、*A. oryzae* による有用タンパク質の分泌生産に関する研究が進められているが、キモシンのように細胞外に分泌される酵素が主な対象となっている。植物の液胞（動物ではリソゾーム）局在酵素の中には、有用酵素が多数含まれる。液胞局在酵素などの培地中への分泌生産のための宿主として、これらの *vps* 遺伝子破壊株が有効であることが確認されれば、そのホモログ遺伝子を *A. oryzae* から単離し、遺伝子破壊を行うことにより、ソーティング工学のための *A. oryzae* の宿主が育種できると考えている。*A. nidulans* と *A. oryzae* の遺伝子は相溶性が一般的に高い (70-90%) ので、*A. nidulans* からホモログ遺伝子が取得できれば、比較的容易であると思われる。

5. 糸状菌ゲノム解析プロジェクトの現状と展望

現在、糸状菌の 2 番目のプロジェクトとして米国、欧州を中心として *Neurospora crassa* ゲノム解析 (<http://www.genome.ou.edu/fungal.html>) が進行しつつある。塩基配列決定技術の飛躍的な進展が進みつつあり、さらに多くの糸状菌プロジェクトが今後進行すると思われる。我が国で、本年より国立研究所（醸造研究所、生命工学工業技術研究所、食品総合研究所）および大学（東京大学、名古屋大学、東北大学、東京農工大学）などが共同で麹菌 *A. oryzae* の EST 解析プロジェクトが開始されている。これらの EST 解析情報により、これまで産業的にもっとも重要な微生物でありながら、分子生物学的解析が遅れていた麹菌にも、新たな展開が開かれるものと期待される。

文 献

- 1) 阿部敬悦：醸協，**92**, 322 (1997).
- 2) 野田健司，大隅良典：蛋白質 核酸 酵素，**42**, 2325 (1997).
- 3) 樽谷芳明ら：日本農芸化学会大会講演要旨集，p. 226 (1998).
- 4) Rothman, J. H. *et al.*: *Cell*, **61**, 1063 (1990).
- 5) 樽谷芳明ら：日本農芸化学会大会講演要旨集，p. 212 (1999).
- 6) Cowles, C. R. *et al.*: *J. Cell Sci.*, **107**, 3449 (1994).
- 7) Piper, R. C. *et al.*: *Eur. J. Cell Biol.*, **65**, 305 (1994).
- 8) 松田 豊ら：日本農芸化学会大会講演要旨集，p. 213 (1999).
- 9) Horazdovsky, B. F. *et al.*: *EMBO J.*, **15**, 1297 (1994).
- 10) 大隅恵介ら：日本生物工学会大会講演要旨集，p. 76 (1998).
- 11) 大隅恵介ら：日本農芸化学会大会講演要旨集，p. 212 (1999).
- 12) Wada, Y. *et al.*: *Protoplasma*, **191**, 126 (1996).
- 13) 大隅恵介ら：日本生物工学会大会講演要旨集，p. 77 (1998).

実用酵母の理解のための酵母ゲノム情報の利用

家 藤 治 幸

実用酵母とは実際の産業に関わる酵母 (Industrial yeast) のことをいう。わが国の酵母利用産業は現在年間約 8 兆円の市場を形成し、また世界のパン酵母の生産重量は年間 2 百万トンを超えるといわれ、実用酵母は巨大な産業を担っている。

実用酵母は清酒酵母，ワイン酵母，ビール酵母，アルコール酵母，パン酵母など，*Saccharomyces* に属する酵母がその主体であるが，それと対極に位置するのが実験室酵母 (laboratory yeast) といえる。実験室酵母は 1940 年代以降に複雑な交配を重ね，遺伝学用の実験生物として育種された酵母²⁾であり，遺伝学的解析が容易で，遺伝子工学的にも取り扱いやすい。また 1996 年には真核生物として初めて実験室酵母 S288C 株の全ゲノム塩基配列が公表され，いまや真核生物のモデル生物となり生命機能の解明に貢献している。

一方，実用酵母，たとえば清酒酵母では，もろみで 20% に達するまでのアルコール生産を行うことが可能であり，10℃ 以下という通常の実験室酵母では増殖が困難な低温で増殖可能である。またワイン酵母では亜硫酸耐性，ビール酵母では凝集性，マルトースの高い資化性などを有する。これらの酵母は長年醸造現場においてその醸造環境に耐え，またすぐれた酒質を生産する酵母として選りすぐられてきたものであり，それぞれ醸造工程上欠かせない特性を有している。

これら実用酵母の固有の性質が何に由来するか，興味あるところではあるが，実用酵母は 2 倍体ないしは高次倍数体のため遺伝解析が難しく，遺伝子工学の適用も容易でなかったことより，その理解は進んでいるとはいえない。一方，実用酵母に関する断片的遺伝子情報から，それは実験室酵母のゲノムシーケンスと基本的にはよく

一致することがわかってきた。逆に言うと，実験室酵母と実用酵母の遺伝子レベルでのわずかな差の部分に，それぞれの実用酵母を特徴づける重要な因子が存在する可能性が高い。実用酵母の特性にはなんらかの特定遺伝子が関わっており，その遺伝子の ORF の構造，コピー数，プロモーターの発現制御などの実験室酵母との差異が，その酵母を醸造酵母たらしめている要因となっていることが考えられる。現在，実用酵母の特性を理解するために，実験室酵母で得られたゲノムシーケンスやゲノム情報が強力な武器となってきた。

醸造研究所の後藤ら³⁾は，ワイン酵母の亜硫酸耐性機構につき興味ある知見を示した。まずワインもろみより得られた亜硫酸耐性の強い酵母 Y-9 の遺伝子ライブラリーより，実験室酵母の亜硫酸耐性を強くする遺伝子 *SSUI-R* を取得した。本遺伝子断片に含まれる ORF は，Bakalinsky らが実験室酵母の亜硫酸感受性変異を相補する遺伝子として取得していた *SSUI* と 99.7% のホモロジーを示した。この *SSUI* は酵母のゲノムデータベースの 16 番染色体にコードされ，現在，菌体から亜硫酸を排出するためのトランスポーターではないかと考えられているものである。Y-9 より得られた *SSUI-R* はその下流はゲノムデータベースの *SSUI* と同様に *GLR1* がコードされていたが，上流部の配列にはホモロジーが見られず，なんと 8 番染色体テロメア近傍の遺伝子 *ECM34* のプロモーター領域に相当する配列を有していた。PFGE 解析等の結果，Y-9 株では本来第 16 番染色体上に存在していたはずの *SSUI* が第 8 番染色体上に移動し，その際，組み込みが起こった部位の上流の配列が *SSUI* を高発現させるようになったのではないかと後藤らは推察している。ノーザン解析の結果，事実 Y-9 株は *SSUI* が高発現