

2Bp12 酵母ミトコンドリアの機能は発酵から呼吸への転換を制御する

○北垣 浩志^{1,2}, コワート アシュレイ², マトマティ ナビル², モンテフスコ デビッド², ガンディ ジェイソン², バエナド アバロス シルビア², ノブゴロフ セルゲイ², ゼング ジム², オベイド リナ², ハヌン ユスフ²
(¹佐賀大, ²サウスカロライナ医科大学)

酵母の発酵から呼吸への転換 (diauxic shift) はゲノムワイドな遺伝子発現の制御を伴う、広範な代謝の変換に依存している。我々は当初、ミトコンドリアに局在する糖結合型スフィンゴ脂質の分解酵素 Isc1 の遺伝子破壊株の酸素呼吸能について解析していた。isc1 破壊株はミトコンドリアの機能は少ししか落ちていないのに、酸素呼吸環境下での増殖能が著しく低い。この表現型の差の原因は、遺伝子発現にあるのではないかとの仮説を立て、diauxic shift前後でマイクロアレイを行ったところ、確かにisc1破壊株では酸素呼吸に関わる遺伝子の発現上昇が抑制されていた。従って、isc1 破壊株の酸素呼吸能が低いのは、酸素呼吸に関わる遺伝子発現を上昇させられないためと考えられた。

この結果から、ミトコンドリアの機能が落ちていれば、diauxic shift は起きにくくなるのではないかという仮説を立てた。この仮説を検証するため、ミトコンドリア DNA を欠落させミトコンドリアの機能を低下させた株を作り、そのdiauxic shift前後の遺伝子発現をマイクロアレイで解析した。その結果、確かにこの株では親株に比べて酸素呼吸に関わる遺伝子の発現上昇が抑制されていた。以上の結果から、ミトコンドリアの機能が diauxic shiftを制御することが明らかとなった¹⁾。

1) Kitagaki et al., *J. Biol. Chem.*, 284, 10818-10830 (2009).

Mitochondrial function regulates diauxic shift in yeast.

○Hiroshi KITAGAKI^{1,2}, Ashley COWART², Nabil MATMATI², David MONTEFUSCO², Jason GANDY², Silvia VAENA DE AVALOS², Sergei NOVGORODOV², Jim ZHENG², Lina OBEID², Yusuf HANNUN²
(¹Saga Univ., ²Medical University of South Carolina)

Key words microarray, mitochondria, gene expression analysis, lipid

2Bp14 Molecular breeding of *Saccharomyces cerevisiae* strain with high amount of RNA

○VARESA CHUWATTANAKUL¹, KIM YEON-HEE¹, KENTA KURATA¹, KHATUN FAHMIDA¹, ISAO TOMITA¹, SUGIYAMA MINETAKA¹, NISHIUCHI HIROAKI², MIWA HARUHUMI², KANEKO YOSHINOBU¹, HARASHIMA SATOSHI¹

(¹Dept. Biotech., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., ²Ajinomoto Co., Inc.)

Transcription of rDNA by RNA polymerase I in *Saccharomyces cerevisiae* requires four factors, i.e., core factor, Rrn3p, TATA binding protein, and upstream activation factor (UAF) complex in addition to Pol I. *RRN10* gene, one of the UAF complex subunits, is indispensable to promote high level of transcription of rRNA gene. Although the *Arrn10* disruptant is viable, this mutant shows severe slow growth due to the decreased level of rRNA synthesis. To breed strain with increased amount of RNA content, we previously isolated seven suppressors which restored normal growth phenotype to the *Arrn10* disruptant. RNA content of suppressors (*Arrn10 SUP*) was 20-50% higher level than that of the *Arrn10* disruptant. In this study, we examined the possibility whether these suppressor mutations lead to further increased rRNA content when *RRN10* was introduced. We found that suppressors with *RRN10*⁺ showed 1.3-2.0 fold higher RNA content compared to wild-type strain, suggesting that this approach with suppressor of the rRNA transcription defective mutant is effective for breeding strain with increased amount of RNA.

Molecular breeding of *Saccharomyces cerevisiae* strain with high amount of RNA

○VARESA CHUWATTANAKUL¹, KIM YEON-HEE¹, KENTA KURATA¹, KHATUN FAHMIDA¹, ISAO TOMITA¹, SUGIYAMA MINETAKA¹, NISHIUCHI HIROAKI², MIWA HARUHUMI², KANEKO YOSHINOBU¹, HARASHIMA SATOSHI¹

(¹Dept. Biotech., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., ²Ajinomoto Co., Inc.)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, ribosomal RNA, *RRN10* gene

2Bp13 出芽酵母における染色体からのセントロメア配列の切り出しによる細胞死の誘導

○松崎 浩明, 菊池 正悦, 柳本 敏彰, 秦野 琢之
(福山大・生命工・生物工)

遺伝子組換え生物が野外で拡散すると、環境へ及ぼす影響が危惧される。遺伝子組換え生物の野外での拡散を防ぐために遺伝子組換え生物に条件致死性質や不穏性質を付与することが重要である。条件致死性質や不穏性質の付与に部位特異的組換えを利用して特定の条件下や時期に染色体からセントロメア配列を切り出し、細胞死を誘導することが有効であると考えられる。そこで、酵母 *S. cerevisiae* をモデル生物として pSR1 プラスミドの部位特異的組換えを利用してセントロメア配列の切り出しにより細胞死を誘導することを検討した。セントロメア配列の切り出しは、標的セントロメア配列の両側に組換え部位配列 (RS) を同じ方向に挿入し、R 発現プラスミドを導入した細胞を作製した後、この細胞をガラクトース培地で培養してレコンビナーゼの発現を誘導して行った。一倍体細胞で第IV番染色体のセントロメア配列を切り出すことで細胞死を誘導できた (プレート培養での生存率: 約 4×10^{-5})。さらに、二倍体細胞で第IV番相同染色体の両方からセントロメア配列を切り出すことで細胞死を誘導できた。しかし、この生存率は一倍体細胞よりも約10倍高かった。そこで、第IV番と第V番の相同染色体の全てからセントロメア配列を切り出した結果、生存率は一倍体細胞と同程度に低下した。二倍体細胞で多数の染色体からセントロメア配列を切り出すことで細胞死の効率を向上できた。

Cell death by excision of centromere sequence from a chromosome in *Saccharomyces cerevisiae*

○Hiroaki MATSUZAKI, Masayoshi KIKUCHI, Toshiaki YANAMOTO, Takushi HATANO
(Dept. Biotech., Fac. Life Sci. Biotech., Fukuyama Univ.)

Key words cell death, centromere, site-specific recombination, *Saccharomyces cerevisiae*

2Bp15 過剰発現で乳酸ストレス耐性を付与する出芽酵母 *HAA1* 遺伝子の機能解析

○杉山 峰崇, 赤瀬 晋平, 堀江 仁志, 金子 嘉信, 原島 俊
(阪大院・工・生命先端)

近年の様々な環境問題からバイオエタノールやポリ乳酸などの植物由来プラスチックの普及が切望されているが、出芽酵母の酸耐性化は、それらのコストダウンに寄与できる重要な形質のひとつである。そこで、酵母の酸ストレス耐性機構を理解しさらなる耐性化戦略を確立するため、過剰発現で乳酸ストレス耐性を付与する酵母遺伝子の単離と機能解析を行った。その結果、ストレス応答性膜タンパク質などの転写活性化因子をコードする *HAA1* を同定した。*HAA1* の過剰発現は酢酸ストレスに対しても耐性を付与した。酸ストレスの細胞内 pH への影響を調べた結果、*HAA1* 過剰発現株では乳酸ストレス条件下でも細胞内 pH が高く保たれており、これにより乳酸耐性が付与されていることが示唆された。次に *Haa1p*-GFP の細胞内局在を解析したところ、*Haa1p*-GFP は乳酸ストレス添加後迅速に核に蓄積することを見出した。また、*Haa1p* がリン酸化タンパク質であることも初めて明らかにしたが、興味深いことに、乳酸ストレスに応じて脱リン酸化型 *Haa1p* も増加してくることから、酸ストレスに応じた *Haa1p* のリン酸化/脱リン酸化による制御機構が示唆された。また、*Haa1p* の既知の下流遺伝子を破壊しても過剰発現株の乳酸耐性に顕著な影響は見られなかったことから、乳酸耐性は下流の機能重複した遺伝子あるいは未知の遺伝子の発現強化によって付与されていることが示唆された。

Isolation and functional analysis of *HAA1*, a gene enhancing lactic acid tolerance by overexpression, in *Saccharomyces cerevisiae*

○Minetaka SUGIYAMA, Shinpei AKASE, Hitoshi HORIE, Yoshinobu KANEKO, Satoshi HARASHIMA
(Dept. Biotech., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words acid tolerance, *HAA1*, *Saccharomyces cerevisiae*