

4Dp19 酸化ストレス耐性に関与する酵母必須遺伝子群の網羅的探索

○岡田 奈津実¹, 安藤 聡², 小川 順³, 島 純¹
 (¹京大・微生物科学, ²農研機構・食総研, ³京大院・農・応用生命)
 shimaj@kais.kyoto-u.ac.jp

【背景・目的】

酵母は産業利用の過程において、温度、浸透圧、乾燥などの様々なストレスに曝される。環境中および産業利用において酵母が負荷され得るストレスへの応答に関する解析については数多く報告されている。これら酵母のストレス応答に関連する遺伝子の網羅的表現型解析の多くは各遺伝子完全破壊株が用いられており、非必須遺伝子のみが解析対象となっていた。そこで本研究で我々は、ストレス耐性に関与する酵母の必須遺伝子を網羅的に把握することを目的として、二倍体出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* BY4743 株に由来する遺伝子ヘテロ破壊株コレクションを用いて、ストレス環境下において haploinsufficiency を示すヘテロ遺伝子破壊株の網羅的探索を行った。本大会では主に酸化ストレス耐性に関わる必須遺伝子について報告する。

【方法・結果】

二倍体の遺伝子ヘテロ破壊株コレクションを用いてストレス耐性に関与する遺伝子の網羅的表現型解析を行った。3 mM H₂O₂ 存在条件下で、野生株と比較して著しく増殖能が低下した破壊株を酸化ストレス感受性株とした。さらに、本研究で同定した酸化ストレス耐性に関与すると考えられた必須遺伝子を対象としてデータベースに基づき機能などによる分類を行った。本発表では、得られた結果を既報の酸化ストレス耐性に関与する非必須遺伝子の解析結果と比較することで、必須遺伝子に関わる酸化ストレス耐性機構について考察したい。

Comprehensive analysis of the essential genes involved in oxidative stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*

○Natsumi Okada¹, Akira Ando², Jun Ogawa³, Jun Shima¹
 (¹Res. Div. Microb. Sci., Kyoto Univ., ²Food Res. Inst., NARO, ³Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, oxidative stress, yeast deletion strains

4Dp21 椎茸菌体内の倍数核比率とセルロース分解力との関連

○外山 英男
 (南九大・食開)
 toyama@nankyudai.ac.jp

目的：演者はこれまでに微生物の同質倍数体を構築するために低温倍数化法を考案し、これを用いて椎茸株の増殖性を向上させることと微結晶セルロース分解力を向上させることに成功した。しかしながら微結晶セルロース分解力の向上は並行して研究を進めているセルラーゼ生産性糸状菌トリコデルマには及ばなかった。そこで、今回はさらに椎茸株のセルロース分解力の向上を図るために、菌体内の倍数核の比率とセルロース分解力の向上との関連を探ることを目的とした。

方法：椎茸 IFO 株の菌体を複数の条件で低温倍数化処理を行い、倍数核の比率を核染色によって算出した。セルロース分解力はすでに微結晶セルロース含有寒天培地を用いて行なう方法を考案していたので、それを用いて行った。結果：倍数核については、どのくらいの高次性のものがセルロース分解力の向上に必要なか、また菌体中に倍数核がどれくらいあればよいのかなどについて知見を収集し、この中で倍数核の菌体中の比率がセルロース分解力の変動に影響を及ぼすと思われる知見が得られたので報告する。

Relation between the ratio of autopolyploid nuclei in the *Shiitake* mycelia and the cellulose degrading ability

○Hideo Toyama
 (Dept. Food Sci. Tech.)

Key words cellulase, cellulolytic, *Lentinula edodes*, *Shiitake*

4Dp20 *Trichosporonoides megachiliensis* における Hog1(TmHog1) と高い相同性を示す TmHog2、TmHog3 の取得と解析

○西村 知美, 吉田 潤次郎, 小林 洋介, 荻原 淳, 加藤 順, 春見 隆文
 (日大・生資科)
 kasumi@brs.nihon-u.ac.jp

目的： *Trichosporonoides megachiliensis* は適合溶質としてエリスリトールを生成、蓄積する。 *Saccharomyces cerevisiae* と同様に本菌も浸透圧の感知およびシグナル伝達には HOG 経路が用いられており、その中心的な機能を担う MAPK Hog1 の存在がこれまでの研究で明らかにされている。今回、新たに *Hog1* と相同性の高い 2 つの遺伝子 (*TmHog2*, *TmHog3*) の存在を確認した。そこで、これらの遺伝子の cDNA を取得、機能解析を行うことにより、浸透圧ストレス応答における機能の異同性を比較解析した。

方法： *TmHog2*, *TmHog3* の全長を増幅するよう設計したプライマーを用いた PCR により、両遺伝子の完全長 cDNA を取得した。各遺伝子を pDB05 vector へトランスフォームし、*TmHog1*, *TmHog2*, *TmHog3* 及び pDB05 vector をそれぞれ *S. cerevisiae* BY4741 *hog1Δ* 株に遺伝子導入し、導入各株と、 *S. cerevisiae* BY4741 株、BY4741 *hog1Δ* 株を様々なストレスを含んだ培地で相補性の検討を行った。結果： 3 つの遺伝子の推定アミノ酸配列は、ScHog1 のそれとそれぞれ高い相同性を示した。また、主要なドメイン・モチーフは 3 者で良く保存されていた。プレート試験の結果、*ScHog1*, *TmHog1*, *TmHog2*, *TmHog3* 導入株においては生育に違いは見られなかったことから、*TmHog1*, *TmHog2*, *TmHog3* は ScHog1 に匹敵する機能を有しており、また、*TmHog1*, *TmHog2*, *TmHog3* の 3 つの間で浸透圧ストレス応答において MAPK としての機能に差はないと考えられた。

Functional of three Hog1 homologs (TmHog1, TmHog2, TmHog3) in osmotic stress response of *Trichosporonoides megachiliensis*.

○Tomomi Nishimura, Junjiro Yoshida, Yousuke Kobayashi, Jun Ogihara, Jun Kato, Takafumi Kasumi
 (Dept. Agric. Biol. Chem., Nihon Univ.)

Key words MAPK Hog1, stress response, *Trichosporonoides megachiliensis*

4Dp22 免疫活性化能をもつ酵母の細胞表層構造の解析

○溝瀨 彩乃, 高田 裕紀, 立花 太郎, 東 雅之
 (阪市大院・工・化生系)
 azuma@bioa.eng.osaka-cu.ac.jp

出芽酵母の細胞壁成分であるグルカンには免疫賦活活性が知られている。以前、酵母細胞とマウス由来のマクロファージ(RAW264.7)を直接接触させ、その活性化能を TNF-α の分泌量で評価した。その結果、細胞自身に高いマクロファージ活性化能を持つ変異株として MCD4 遺伝子破壊株を取得した。この変異株では、GPI アンカー型蛋白質の細胞壁固定に必要な MCD4 遺伝子の破壊により、細胞壁のマンナン量が極端に減少しグルカン量が増加していた。*Δmcd4* の他にマクロファージ活性化能の高い変異株を得るため、GPI アンカーの脂質リモデリングに関与する PER1 と GUP1 遺伝子、GPI アンカー型蛋白質の細胞壁固定への関与が示唆された ANP1 と ECM3 遺伝子に注目した。これらの単独の遺伝子破壊株と二重遺伝子破壊株を用い、マクロファージ活性化能の評価し、結果として *Δmcd4* の他に 3 株のマクロファージ活性化能の高い変異株を取得した (2011 年度日本生物工学会大会にて発表)。

本研究では、活性化能と細胞表層構造の関係を明らかにするため、細胞壁成分であるマンナン・グルカン・キチンの定量やグルカン構造など細胞表層構造の解析を行った。現在までの結果を考察すると、得られた変異株の高いマクロファージ活性化能を一つのファクターだけで説明することは難しく、これは複数のファクターが関与していると示唆される。現段階では「細胞壁最外層のマَنَّンの減少」と「表面電荷の変化」が大きなファクターと考えられるが、さらに詳細な解析を継続している。

Analysis of cell surface structure of *Saccharomyces cerevisiae* mutants with high activity for immunostimulation

○Ayano Mizobuchi, Yuki Takada, Taro Tachibana, Masayuki Azuma
 (Dept. Appl. Chem. and Bioeng., Osaka City Univ.)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, cell surface, glucan, immunostimulation