

酵母における低温誘導性遺伝子と低温適応機構の解明

太田 明德

(東京大学大学院 農学生命科学研究科)

酵母を用いる発酵生産を低温で行うことが多い。また、パンの製造においても凍結に強い酵母が求められている。しかしながら、このような酵母の低温に対する適応に関して意外に知見がなく、特に低温における遺伝子発現とその調節機構に関してはほとんど不明なままと言って良い。そこで、低温誘導の分子機構を解明し、酵母の低温適応のしくみを総合的に明らかにすることを目的とした。

研究対象酵母として、ゲノム情報の整備などの諸条件を考慮し、*Saccharomyces cerevisiae* の実験室菌株を用いた。これまでの研究結果を以下に述べる。

1. *LOT4*/*NRK1* のプロモーターの解析

cDNA サブトラクション法によって捕捉した低温 (10°C) によって誘導される遺伝子 6 種¹⁾ のうち、*LOT4*/*NRK1* のプロモーターを含む 793 bp の 5' 非翻訳領域について欠失解析を行った。プロモーターに欠失を持つ *LOT4* を YCp50 ベクター上に載せ、*LOT4* 遺伝子破壊株に導入してノーザン解析を行ったところ、翻訳開始点上流 -787 bp から -674 bp の領域が低温シフト後の *LOT4* mRNA の上昇に必要であった。この領域には Y ボックス (CCAAT あるいは ATTGG) 1 カ所と Yap1p の結合部位 TTACTAA が 2 カ所存在した。

Y-ボックスは上記方法によって得られた低温誘導性遺伝子のプロモーターの何れにもあった。-683 から -679 の ATTGG を GGGGG に置き換えた変異型では転写物を全く検出できなかったのも、この配列が *LOT4* の発現に重要であると考えられた。しかしながら、この配列を DNA への結合の核とする転写因子 Hap2p をコードする *HAP2* の遺伝子破壊株では *LOT4* の転写物のレベルは影響を受けず、*LOT4* 遺伝子破壊株が低温感受性になるのに対して 10°C の生育にも野生株との差が認められなかった。従って *HAP2* 以外の Y-ボックス結合因子が *LOT4* の低温応答に関わると結論された。

LOT4 プロモーターの Yap1p 結合部位を欠失させると、低温における *LOT4* の mRNA の増加の程度が若干低下した。また、Yap1p を *GAL1* プロモーターの下流に置いて高発現させると、*LOT4* の転写産物の量が増加した。従って、*LOT4* の低温における転写高進に強く関わっていないくても、この結合部位は有効と思われる。*YAP1* 自身の mRNA の量も低温へのシフトによって増加した。

2. *YAP1* のプロモーターの解析

そこで、*YAP1* の 5' 側非翻訳領域を見たところ、Y-ボックス様の配列が 5 カ所に存在した。そこで、*LOT4* の場合と同様に翻訳開始点から -997 bp の地点から 100 bp ずつ欠失させ、ノーザン解析を行った。-693 bp まで削っても低温シフトに伴う転写物の

増加は見られたが、-594 bp まで削ると増加が見られなかった。すなわち、この間の 100 bp に低温における mRNA の増加に関わる因子が存在することが推定された。この領域には Y-ボックスが 2 カ所 (-640~-644 と -625~-629) あり、これらを GGGGG あるいは CCCCC に変換すると、1 カ所の変換でも低温における *YAP1* mRNA の増加が見られなかった。これらの結果は Y-ボックス配列の低温応答における重要性を示している。

3. 低温応答と酸素ストレス応答

主として酸素ストレス応答に関わるとされていた *YAP1* の転写物の水準が低温シフトによって増加することから、低温シフトに伴って酸素ストレスが生じていることが考えられた。そこで、活性酸素を無毒化するのに大きな役割を有する superoxide dismutase (SOD) をコードする *SOD1* と *SOD2* の mRNA 量の変化を調べた。*SOD2* については低温シフトに伴う変化は見られなかったが、*SOD1* については増加が観察された。また、SOD の活性も 100 分後には約 1.5 倍に増加していた。また、カタラーゼの活性も 120 分後にはやはり約 1.5 倍になった。これらのことは実際に低温では細胞内に活性酸素が増えている可能性を示唆している。そこで、低温シフト 2 時間後における活性酸素量を DCF の蛍光量の変化によって調べたところ、やはり約 1.5 倍増加していた。以上のことから、低温処理によって活性酸素レベルが上昇し、酸素ストレス応答が誘起されることが明らかになった。そうであるならば、あらかじめ低温に曝すことによって酵母細胞は酸素ストレスに対して迅速に適応できるはずである。実際に 10°C に 2 時間おいた後、過酸化水素 1.8 mM を添加し、30°C で培養すると、生育を再開するまでの時間が低温に曝していない菌よりも約 4 時間短縮された。しかしながら、逆に酸素ストレスに曝した後に低温への適応時間は短縮されなかった。すなわち、酸素ストレス応答は低温適応の一部ではあっても、迅速な低温適応についての本質的な部分ではない。しかしながら、酸素ストレス応答は低温環境における酵母の生存にとって重要な意義を有するものと思われる。

4. 低温適応に必要な遺伝子の網羅的検索

当初の計画では DNA チップを用いて低温で誘導される遺伝子を検索し、その中から低温適応に中心的な役割を果たす遺伝子を得るつもりであった。しかしながら、その後、他研究室での酵母低温誘導遺伝子の DNA チップによる解析の情報に加え、多数の遺伝子について発現の変動が予想され、酵母の低温応答に本質的な遺伝子の抽出は困難と思われた。そこで、欧州の研究共同体ユーロスカーフによって作製された *S. cerevisiae* の生存可能な 5000 株の破壊株コレクションを入手し、低温に感受性となる遺伝子破壊株の検索を行い、16 株の遺伝子破壊株が低温感受性であることを見出した。現在これら変異株の性質を検討中である。

1) Chang, L., Ohta, A., Horiuchi, H., Takagi, M., and Imai, R. Multiple mechanisms regulate

expression of low temperature responsive (LOT) genes in *Saccharomyces cerevisiae*.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 283: 531-535 (2001).