

# 出芽酵母の形態変化に基づく vanillin の細胞内標的探索

2011 年修了 学生証番号 47-096321 先端生命科学専攻 菅洋平  
指導教員 大矢禎一 教授

キーワード : *Saccharomyces cerevisiae*, vanillin, target-prediction, cell morphology

## 【序論】

近年、地球温暖化や燃料の枯渇を回避する方策として農業残渣や木質からのバイオエタノール生産が注目されている。残渣や木質の主成分であるリグノセルロースからバイオエタノールを生産するためには熱化学処理という工程を経るが、このとき発生するフラン化合物やフェノール化合物は後の工程で使用される酵母の増殖を阻害し、発酵によるエタノール生産量を低下させるという問題点がある。それらの化合物の中でも特に微量で酵母の増殖阻害を示すものは vanillin (図 1) である。そこで私は出芽酵母に対する vanillin の作用標的を調べ増殖阻害のメカニズムを解明することで、バイオエタノールを高生産する酵母の育種開発につながると考えた。現在までに当研究室では薬剤の細胞内標的を予測する高次元細胞形態プロファイリング法を開発している

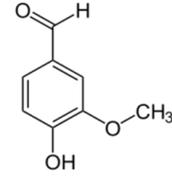


図 1. vanillin の構造式

(Ohnuki *et al.*, 2010)。これは薬剤処理をした出芽酵母の形態を CalMorph 画像解析プログラムによって 501 種類の定量的測定値に変換し、得られたデータと出芽酵母非必須遺伝子破壊株 4718 株の形態データを統計学的に比較するという方法である。本研究では、この高次元細胞形態プロファイリング法を用いて vanillin の細胞内標的を探ることを目的とした。

(Ohnuki *et al.*, 2010)。これは薬剤処理をした出芽酵母の形態を CalMorph 画像解析プログラムによって 501 種類の定量的測定値に変換し、得られたデータと出芽酵母非必須遺伝子破壊株 4718 株の形態データを統計学的に比較するという方法である。本研究では、この高次元細胞形態プロファイリング法を用いて vanillin の細胞内標的を探ることを目的とした。

## 【結果】

### 1. 野生型酵母による vanillin の標的予測

まず野生型酵母に vanillin を作用させたときの濃度依存的形態変化を Jonckheer 検定で評価したところ、vanillin 濃度に依存して値が変化する形態パラメーターは全パラメーター 501 個中 98 であり (FDR=0.2)、その中には細胞周期全てのステージにおける細胞サイズの減少が含まれていた。次に薬剤による形態変化の濃度依存性プロファイルと遺伝子破壊による形態変化プロファイルを比較し、プロファイルの類似性に基づき vanillin 標的遺伝子の予測を行ったところ、4718 遺伝子中 95 遺伝子が標的候補として検出され (図 2、 $P < 0.05$ )、予測結果の上位 30 遺伝子にはリボソーム大サブユニットを構成する遺伝子の約 12 倍の濃縮が見られた。

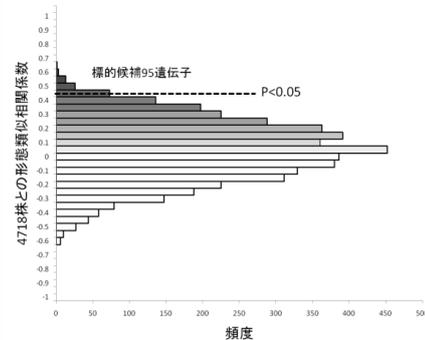


図 2. 野生型酵母の vanillin 濃度依存的形態変化と遺伝子破壊株 4718 株の形態との比較 野生型酵母に vanillin を 0~1mM の間で作用させて形態情報を取得し、vanillin による形態変化と遺伝子破壊による形態変化の類似性を評価した。

### 2. *erg6Δ* による vanillin の標的予測

近年の研究から、エルゴステロール合成経路の遺伝子欠損株が vanillin 感受性を持つことが知られている (Endo *et al.*, 2008)。この感受性が、vanillin がエルゴステロール合成経路に直接作用することによるものなのかを調べるために、エルゴステロール合成経路の欠損株である *erg6Δ* を用いて上記と同様の実験を行ったところ、野生型酵母と同様の形態パラメーターが濃度依存的な変化を示し、細胞周期全てのステージでの細胞サイズの減少が見られた。次に標的予測を行ったところ、4718 遺伝子中 123 遺伝子が標的候補として検出され ( $P < 0.05$ )、予測結果の上位 30 遺伝子には野生型酵母と同様にリボソーム大サブユニットを構成する遺伝子の約 12 倍の濃縮が検出

された。

### 3. ADH6 破壊による vanillin 代謝の影響と標的予測

vanillin は出芽酵母の細胞内で vanillyl alcohol に代謝され (Fitzgerald *et al.*, 2003)、その反応は *in vitro* では Adh6p と Adh7p によって触媒されることが知られている (Larroy *et al.*, 2002)。そこで野生型酵母 (*his3Δ*) の ADH6 を破壊した株 (*his3Δ adh6Δ*) を作製し、vanillin 存在下で培養して培地中の vanillin を定量したところ、野生型酵母のような著しい vanillin の減少は見られず、vanillin の代謝が抑制されていることが分かった (図 3)。

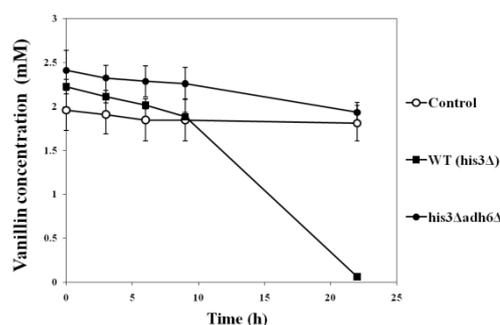


図 3. 培地中の vanillin 濃度 control として細胞無しのものを用意し、野生型酵母と ADH6 破壊株の培地中の vanillin 濃度を経時的に測定した。

次に代謝産物の影響をより少なくするために *his3Δ adh6Δ* を用いて上記と同様の実験を行ったところ、野生型酵母と同様の形態パラメーターが濃度依存的な変化を示し、細胞サイズの減少が見られた。標的予測では 4718 遺伝子中 252 遺伝子が候補として検出され ( $P < 0.05$ )、予測結果の上位 10 遺伝子には野生型酵母と

同様にリボソーム大サブユニットを構成する遺伝子の濃縮 (約 21 倍) が検出された。

#### 【3 株の形態変化からの考察】

今回の研究から出芽酵母が vanillin によって細胞サイズを減少させることが分かった。

また *erg6Δ* と野生型酵母、及び ADH6 欠損株と野生型酵母の標的予測結果は高い相関を示した (図 4)。これは vanillin の各変異株に対する効果と野生型酵母に対する効果の方向性が同様であることを示唆し

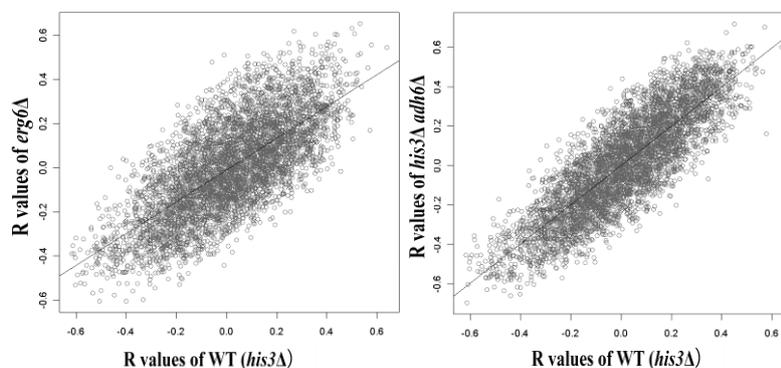


図 4. 各変異株と野生型酵母との標的予測結果の相関 各株の形態プロファイリングから得られる 4718 の R value を 2 軸プロットして相関を調べた。左が *erg6Δ* と野生型酵母 (相関係数 0.713)、右が *his3Δ adh6Δ* と野生型酵母 (相関係数 0.840) を表す。

表 1. vanillin 標的予測結果のまとめ

株	標的候補 ( $P < 0.05$ )	相関係数 (R) の最大値	リボソーム構成遺伝子の濃縮
野生型株 ( <i>his3Δ</i> )	95 遺伝子	0.638	11.9 倍
<i>erg6Δ</i>	123 遺伝子	0.653	11.9 倍
<i>his3Δ adh6Δ</i>	252 遺伝子	0.719	21.4 倍

ている。vanillin が各変異株の欠損遺伝子に関わる経路に作用しているとする野生型酵母とは異なった特徴的な効果を示すと考えられるので、今回の結果からはこれらの遺伝子産物は vanillin の直接の標的ではないことが示唆された。*erg6Δ* の場合には細胞膜の構成成分であるエルゴステロールが欠損することで vanillin が細胞内に取り込まれやすくなり、感受性が引き起こされていることが考えられる。また ADH6 欠損株の場合はプロファイリングの標的候補遺伝子の数、相関係数の最大値、リボソーム構成遺伝子の濃縮率が野生型酵母に比べ高い値を示したことから (表 1)、*adh6Δ* によって vanillin の代謝産物の影響が抑制され、細胞内作用を観察しやすくなっていることが考えられる。

【まとめ】高次元細胞形態プロファイリングによって、今回用いた 3 株には vanillin 処理時に共通してリボソーム大サブユニットの遺伝子破壊株との類似性が検出された。このことから vanillin がリボソームに関わる機能を阻害することで酵母の増殖を抑制している可能性が示唆された。