

♥ 教養学部 Sセメ 微生物の科学 シケフリ ♥

初めまして、平成 29 年度入学、理科 2 類 10 組の由紀と申します(自己紹介→東大生研に入っています、出身高校は奈良県にある東大寺じゃない方です)。本稿は農 2 が教養学部で開講する「微生物の科学」の試験対策フリントです。

著者がこの授業を受けたとき、試験は持ち込み可能で、オムニバスで講義をした計 13 教員がそれぞれ出題する問題のうち、5 つを選択して解答する形式のものでした。

皆さんがこのシケフリを使うころにはどのような形式になっているかは存じ上げませんが、僕が受けたときは、解答する予定の出題教員のできる限りの情報をこのシケフリに詰め込んで受けに行きました。

テストでは筆者は

福田良一教員 多様な酵母の能力とその応用

舘川宏之教員 酵母の細胞生物学とその応用

有岡学教員 バイオテク/ロギーを利用したタンパク質生産の技術

足立博之教員 細胞性粘菌のバイオテク/ロギー

手塚武揚教員 形態分化のモデル生物としての放線菌

を解答しました。したがってこのシケフリの中身は以上 5 教員分の講義内容を踏まえたものとなっております。

持ち込み可の試験でこのようなフリントを作ったことで、もしかしたら将来的に成績評価の方式が変わってしまうかもしれませんが、たとえレポートになったとしても使いやすい中身になっていると思います。

では各章の凡例は以下のようになります

タイトル

大見出し(1～)

小見出し(1、～)

小小見出し(数字振ってない)

★出題問題★←私の年に各教員が出した問題を記憶をたどって書き込みました。(問題用紙は回収されたので)。略解も簡単に書きましたがこんな単純な回答ではないので、そこは各章の中身を使ってしっかり理解しておきましょう。

うす緑枠で囲ったところは、教員が生徒が送った質問に対応した際に先生がおっしゃってた内容の部分で、正直テストはこのあたりからめっちゃ出ました。

内容：講義＋内容を強化するためのネットからの情報(Wiki から先生のラボの HP まで)＋補足プリントの情報

(その他)

- タイフのミスがあるかもしれませんが、大きくは外れていないはずです。あ、けど学名だけはきをつけてください。
- 学名を手書きするときには下線を引くこと、酵母の漢字、遺伝子組換え(×組み換え)を試験では注意しましょう。
- 先頭に目次を付けたのでそれも参照してください。
- なんだかんだでしっかり勉強すればこの科目は楽しいですよ。是非に頑張ってください。

それでは本文のはじまりはじまり～！

目次

第六回多様な酵母の能力とその応用	5
1 イントロダクション	5
2 酵母の生態学的位置	5
3 人間生活と酵母	5
4 お酒について	6
1、清酒酵母	6
G0 期に関して	6
2、ビール	7
ビールの味(上面発酵と下面発酵)	7
3、ワイン	7
4、パン	8
5 Non-conventional yeast(従来のでない酵母)	8
1、しょうゆ、みそ	8
2、酵母エキス	8
3、バイオサーファクタント	8
6 脂質合成と酵母	8
1、産業微生物 <i>Yarrowia lipolytica</i> (ヤロリワ リポリチカ)	8
7 補足	9
メイラード反応	9
エタノールに対する耐性機構	10
★出題問題★	10
第7回酵母の細胞生物学とその応用	11
1 酵母遺伝学・細胞生物学の研究	11
1、真核生物のモデルとしての酵母	11
2、酵母研究の歴史	11
3、細胞周期研究	12
4、オルガネラと細胞内膜輸送	12
5、オートファジー	12
6、コンタクトサイトや最新研究	13
2 応用(酵母を用いた神経変性疾患の研究)	13
IAPP と二型糖尿病	13
3 胞子形成研究	14
4 補足	14
変異株作成	14
生活環	14
★出題問題★	15

第9回バイオテクノロジーを利用したタンパク質生産の技術	16
1 イントロダクション	16
2 インスリン大量生産の道のり	17
1、配列検討	17
2、作用機序検討	17
3 タンパク質生産の手法と課題	18
1、異種生産	18
2、たくさん生産するためには	18
強いプロモーターを使う	18
コドンの最適化を行う。	18
分解抑制	19
どの宿主を選ぶか	20
試験管内タンパク合成	20
メリフィールド法	20
4 補足	20
コドンについて	20
トルラ酵母	21
★出題問題★	21
第10回細胞性粘菌のバイオテクノロジー	22
1 細胞性粘菌のあれこれ	22
1、生活環	22
2、実験室での培養法	22
3、分類	23
2 広義細胞運動	23
1、細胞質分裂	23
2、食作用、飲作用	23
3、細胞移動	24
3 モデル生物としての要件と細胞性粘菌の素晴らしさ	24
1、細胞質分裂研究の研究～細胞質分裂の研究を例にとって～	25
2、正方向遺伝学 REMI 法	25
3、逆方向遺伝学	25
★出題問題★	26
第11回形態分化のモデルとしての放線菌	27
1 放線菌の分離法	27
1、分類学的位置	27
2、薬剤生産	27
3、単離法	27
<i>Streptomyces</i> 属	27

希少放線菌について.....	28
2 放線菌の特徴・複雑な形態分化.....	28
1、放線菌の形態分化と抗生物質生産は同調して開始される。.....	28
2、二次代謝と遺伝子クラスター.....	28
クラスターの利点と進化的要因.....	29
クラスター解析.....	29
3、休眠打破のシグナル.....	29
リン酸と気中菌糸形成.....	30
栄養飢餓→二次代謝の似た例.....	30
4、形態分化研究.....	30
希少放線菌の分離法.....	31
<i>Actinoplanes</i> 属の遊走子と二次代謝.....	31
多細胞状態になるために.....	31
★出題問題★.....	32

第六回多様な酵母の能力とその応用

福田教員分

1 イントロダクション

紀元前 4000-6000 年ごろから酵母菌はパン製造、ビール造り¹等に使われていた。その記録は粘土板や法律あるいは物質的なものとして残っている。世界各地で愛されていたようである。ただその働きをしているのが酵母菌であることに気づいたのは 1800 年ごろからであった。

1680	レーウェンフック	酵母の観察
1860	パスツール	アルコール発酵を確認
1883	ハンセン	酵母の純粋培養
1897	ブフナー	アルコール発酵の酵素反応を見出す

2 酵母の生態学的位置

酵母はユーカリア、真菌類に属する生物である。ただキノコとカビを明確に分けるような派生形質はまだ同定されていない。

酵母は**子囊菌系**と**担子菌系**にわけることができる。この分類はもちろん有性生殖の過程によるものであるが、有性生殖が確認されていない酵母についても DNA 配列の相同性から分類されている。

★子囊菌門＝胞子を子囊の中に作る。担子菌門＝胞子を細胞の外に作る。

3 人間生活と酵母

酵母の使い道は様々で、酒造、パン製造、化粧品までその分類は様々である。

清酒	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (セルビシエ)
上面発酵ビール	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
下面発酵ビール	<i>Saccharomyces pastorianus</i> (パストリアヌス)
ワイン	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	<i>Saccharomyces bayanus</i> (バイアヌス)
製パン	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

Saccharomyces cerevisiae がアルコール発酵を行う利点については種々の究極要因が考えられている。例えば、ほかの生物の生育を抑え、一方で自分自身は耐性をもつアルコール(しかも栄養になる)を作ることとは有利であるなどのことがあげられる。

Saccharomyces cerevisiae は 12Mbp の DNA を有している。

¹酵母菌はでんぷんを代謝することができない。なので酵母菌を用いて麦酒を作るためにはまず一度パンを焼き、それを砕いてでんぷんをショ糖やグルコースに変換してから酵母菌に代謝させていた。

またこのようにして作られたビールは濾過が甘かったので、ほとんど**液体のパン**であり、ピラミット建設の配給品としてももちいられていたらしい。

★*Saccharomyces cerevisiae* は出芽酵母、*Shizosaccharomyces pombe*(シゾサッカロマイセスポンベ)は分裂酵母。

4 お酒について

お酒の発酵についてさらに深掘りしてゆく。

酒類は法律上は以下のように分類される。

醸造酒	原料をそのまま発酵させた酒	清酒、ビール、ワイン
蒸留酒	醸造酒を蒸留した酒	焼酎、ウイスキー、ブランデー、テキーラ
混成酒	蒸留酒に果汁など添加物を加えた酒	リキュール

醸造酒を作るような様々な酵母は作る酒の種類によって変わる。

1、清酒酵母

Saccharomyces cerevisiae によっておこなわれる。

- ・ヘテロタリック(自家不和合性)な二倍体。
- ・孢子形成効率と出芽効率が弱いため、解析が不可能
- ・高濃度(-20%)のアルコールを生成(並行複発酵)。
- ・細胞外の高濃度アルコールに対して G₀期として休止する能力がないので延々酒造をすることができる。

並行複発酵とは

麹菌によるでんぶんの糖化と酵母によるグルコースのアルコール発酵を一つの樽の中で同時並行に行う発酵形式のことである。

また酵母は清酒の香りである酢酸イソアミルやカプロン酸エチルを作る。

G₀ 期に関して

G₀ 期に入ることができない(≡ストレス応答の欠損)のは、清酒酵母のたぐいまれなる特徴であるが、清酒酵母にとっても不利となることがある。

G₀ 期に入れないと、様々なストレスに感受性になります。清酒酵母が G₀ 期に入れなくなったのは、RIM15 というストレスに応答して情報を伝達するタンパク質リン酸化酵素遺伝子の欠損のためです。

2、ビール

旧来型上面発酵(エール)はみんな大好き *Saccharomyces cerevisiae* よって行われる。

現代型下面発酵(ラガー)は *Saccharomyces pastorianus* によって行われている。パストリアヌスは別名 **ラガー酵母** と呼ばれる。

下面発酵よろしくパストリアヌスは **低温での発酵能力が高く、凝集性** を持つ。またパストリアヌスは セルビシエとパタゴニアで発見され(その後世界各地でも発見され)た *Saccharomycesu bayanus*(エウバヤヌス)の自然交雑したハイブリッド種 であると遺伝子解析の結果判明した。

パストリアヌスはほかの酵母と比べてマルトースの発酵力が強い(低温耐性あり)。で下面発酵なので凝集性を持つ。

ビールの味(上面発酵と下面発酵)

ビールのうち下面発酵のものは穏やかで爽快感な味。一方、上面発酵のものは華やかでフローラルな香り(エステル)と個性的な味。

講義では説明しませんでしたでしたが、ビールはもともと上面発酵で作られていましたが、15世紀後半頃からドイツのバイエルン地方で低温で発酵させるビールが作られるようになりました。気温の低い時期に醸造するほうが変質や腐敗などの失敗が少なく、品質が安定し、香味も穏やかで風味が良かったため各地に広がっていったと考えられています。この低温で発酵させるビールの製造に用いられていた酵母が下面酵母であったと考えられています。

上面発酵と下面発酵

ビールの発酵が終了した時、酵母が液面に浮上してくるものを上面発酵と呼び、酵母が凝集して樽底にたまるものを下面発酵と呼ぶ。上面発酵は **常温で素早く** 発酵を行い、下面発酵は **5-10℃の低温で長時間** かけて発酵を行う。

Q 上面発酵酵母と下面発酵酵母の違いは何か？

下面発酵酵母は細胞表層に Lg-Flo1 というタンパク質を持っており、これが他の酵母の細胞表層のマンノースと結合することによって凝集します。上面発酵酵母にはこのタンパク質がなく、酵母は炭酸ガスとともに液面に浮き上がり層を作ります。

3、ワイン

ブドウの皮にはもともと天然の酵母は存在するが、近年はここに人為的に酵母を入れている。

セルビシエまたはバイアヌスによって作られる。

まとめ：清酒、ビール、ワインそれぞれの発酵法

清酒：

米でんぷん→(麹菌アミラーゼ)→グルコース→(清酒酵母がアルコール発酵)→エタノール

ビール：

麦デンプン→(麦芽βアミラーゼ)→マルトース→(ビール酵母 with マルトース発酵性)→エタノール

ワイン：

ブドウ果汁グルコース→(ワイン酵母)→エタノール

4、パン

Saccharomyces cerevisiae によって行われ、昔の日本人は甘酒で小麦粉をこねて酵母をパン生地を導入した。

5 Non-conventional yeast (従来のでない酵母)

酵母の中には油脂生産を行うものなど、多くの有用形質が眠っている。

酵母の産業面での長所

ゲノム解析が簡単

異種タンパクを分泌できる(分泌系がつよい)

ウイルス汚染が少ない

細胞が堅牢

菌体回収が簡単

1、しょうゆ、みそ

Zygosaccharomyces rouxii が用いられる。この酵母は香気成分を出しながらしょうゆやみその風味を与えてくれる。(海外では含糖食品の変敗酵母として嫌われる)。

2、酵母エキス

酵母エキスとは酵母の有用な成分を抽出したエキス。アミノ酸や拡散関連物質やミネラルやビタミンなどを含み、調味料、培地などに利用される。*Saccharomyces cerevisiae* や *Saccharomyces pastorianus* や *Candida utilis* (トルラ酵母) が産生している。

3、バイオサーファクタント

これは生物が作る界面活性剤をさす。種々の生体高分子がバイオサーファクタントとして機能する。微生物が産生するものでは糖脂質ソロフォリピッドや糖脂質マンノシルエリスリトールリピッドなどがあげられる。この物質の有利な点は宿主への侵入やエネルギー保存に使える点がある。

Q. バイオサーファクタントについて述べよ。

微生物の中には界面活性作用を持つ化合物を生産し、菌体外に分泌するものがあります。界面活性剤とは分子内に親水性の部分と疎水性の部分を持つ化合物で、極性物質(例えば水)と非極性物質(例えば油)を均一に混合させたり、表面張力を弱めたりする作用を持っています。酵母がそのような界面活性物質を生産する理由は分かっていませんが、例えば疎水性の栄養(油脂など)を細胞内に取り込みやすくするのに利用したりしているのではないかと考えられます。酵母が作る界面活性物質には洗剤や保湿剤として優れた性質を持つものがあり、実際に食器洗浄機用の洗剤や化粧品の成分として使用されています

6 脂質合成と酵母

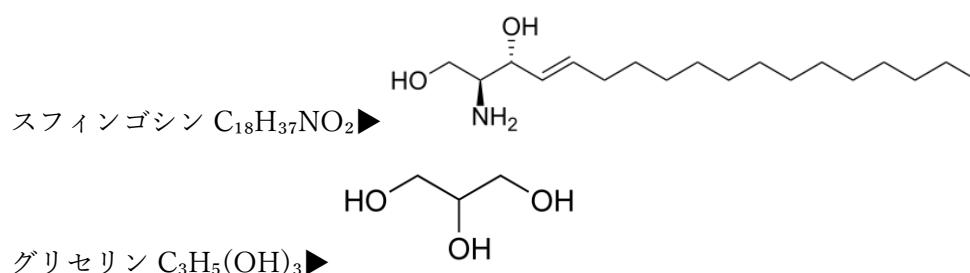
1、産業微生物 *Yarrowia lipolytica* (ヤロリワ リポリチカ)

この酵母はノンコンベンショナルイーストとして代表的なものである。油脂などの疎水性化合物を炭素源として利用でき、脂質合成・貯蔵の能力を持つ。また 37°C で生育できず、ヒトへの感染リスクが低いことも利点の一つである。

アメリカのデュポン社がこの *Yarrowia lipolytica* を使ってエイコサペンタエン酸 EPA(C20:5)の産生を行わせた。EPA は PDG などのエイコサノイドの前駆体として働き、必須脂肪酸の一種(α リノレン酸から低効率で生産)として支持されており、様々な疾患予防を行えるという。生体内での合成効率が低いこともポイントである。

補足：生体膜はリン脂質(コリンとかエタノールが付く/グリセロリン脂質)とスフィンゴ脂質、ステロールから構成されている。

リン脂質は、大きく分けてグリセリンを骨格とするグリセロリン脂質と、スフィンゴシンを骨格とするスフィンゴリン脂質の2つが存在する。



Yarrowia lipolytica は脂肪滴(トリアセルグリセロールやステロールエステル)を脂質顆粒として細胞内に蓄積させている。

Yarrowia lipolytica が EPA を作るためには、(もともと *Yarrowia lipolytica* が持っている代謝経路ではリノール酸(18:2)までしか合成できないので)ほかの生物からとってきた脂肪鎖伸長酵素や不飽和酵素を導入してあげることによって(20:5)の ω -3 の EPA を作っているのである。

7 補足

メイラード反応

メイラード反応(メイラードはんのう、Maillardreaction)とは、還元糖とアミノ化合物(アミノ酸、ペプチドおよびタンパク質)を加熱したときなどに見られる、褐色物質(メラノイジン)を生み出す反応のこと。褐変反応(browningreaction)とも呼ばれる。アミノカルボニル反応の一種であり、褐色物質を生成する代表的な非酵素的反応である。

赤味噌と白味噌の色の違いはメイラード反応の程度に起因します。白味噌では大豆を煮るため糖やタンパク質が水に溶けて除かれるためメイラード反応が起こりにくいのにに対して、赤味噌では大豆を蒸してメイラード反応が起こりやすいそうです。味噌の種類ごとに作り方が違うので酵母の働きにも違いがある可能性もあるとは思いますが、聞いたことはありません。

メイラード反応は、食品に色を付ける際の重要な反応です。パンの表面が茶色に着色しているのも、加熱によってメイラード反応を起こさせているからです。「パンを焼く」の字面から、パンの表面が燃えて焦げて茶色になっていると思うかもしれませんが、決してそうではありません。食品製造において、焦がすという操作はほとんど行いません。

エタノールに対する耐性機構

最後に、清酒酵母が G0 期に入れないことと高濃度のエタノール生産との関連について、補足しておきます。酵母は、自分自身で生産したエタノールにより、害を受けます。酵母は、pH5 付近の酸性で最も良く増殖してエタノール発酵を行いますが、エタノール濃度が高くなると細胞膜の流動性が増加してしまい、細胞内にプロトン (H+) が流入してきます。これにより細胞内が酸性化して、酵母はストレス状態になります。ビール酵母 (ならびに本来の清酒酵母) はこれにより G0 期に入ってしまう、エタノール発酵を停止します。ワイン酵母の場合は、この細胞内酸性化に対して、細胞膜にある H⁺-ATPase で細胞内のプロトンを細胞外に排出することで細胞内を中性に保とうと対応します。H⁺-ATPase とは、ATP のエネルギーを利用して、細胞内のプロトンを細胞外に排出するポンプです。これは「乳酸菌はエネルギー (ATP) を使って細胞内のプロトン (H⁺) を排出することによって細胞内の酸性化を防いでいます。」と書いていたことと全く同じです。ワイン酵母が H⁺-ATPase を動かすための ATP をどのように作るかというと、エタノール発酵で作るしか術はありません。つまり、自分で作ったエタノールに刺激されて、さらにエタノールを作り続けるしかないという循環に陥っているのです。そうして、ブドウ果汁に含まれる 20 数%の糖分をすべて食べ尽くすまでエタノール発酵が続くので、エタノール濃度 10% 強のワインができます。現在の清酒酵母の場合も、G0 期に入れない以上、この H⁺-ATPase によるプロトン排出を継続するしか生きる術がありません。かつ、並行複式発酵では、いわば無限にグルコースが供給され続けます。そのため高濃度のエタノール生産につながると考えられます。

★出題問題★

問 1

清酒酵母、ビール酵母、ワイン酵母について、それぞれの特徴及びそれがどの様に当該酒種を作るのに役立つかかけ。

問 2

酒造りの現場では、わざわざ酸素を抜かなくてもアルコール発酵は起こる。これはなぜか。

(略解)

問 1

清酒酵母→G0 期に入れない：清酒のアルコール同数は高い。

ビール酵母→マルターゼ活性が高い：麦由来マルトースでアルコール発酵

ワイン酵母→H⁺-ATP アーゼを使う。：アルコール度数高い。

問 2 嫌気的な環境が自然とできるから。



第7回酵母の細胞生物学とその応用

舘川教員分

1 酵母遺伝学・細胞生物学の研究

1、真核生物のモデルとしての酵母

酵母の利点

有性世代を持ち、一倍体と二倍体の二つが存在する
 遺伝子操作が容易である
 培養が安価で早い、世代期間が短い
 ベクター、マーカー、変異株等研究環境が整っている
 真核生物の細胞の細胞内構造と似ている
 真核生物の細胞における分子機構の保存

★酵母は単細胞世代を持つ真菌の総称である。

酵母は**一倍体世代**²(一倍体出芽増殖)を持つ**単細胞真核生物**である。一倍体細胞の利点はこれにより遺伝子改変をしたときに遺伝子型がそのまま発現型になることである。

単細胞真核生物であることは、ほかの多細胞真核生物の細胞の分子内構造(オルガネラ)の相同性や、遺伝子の相同性(人においても重要な遺伝子は比較的保存されている)を意味している。これらのことから酵母は「制御しやすい、生命科学の一般的理解に役立つ生物」としてのモデル生物として有用である。

★教員は「酵母は真核生物の細胞のモデル」というのが大好きである。

2、酵母研究の歴史

古典性化学と酵母	レーヴェンフックやパスツールによる酵母の発見、ブフナーによる アルコール発酵の発見 (酵母の無細胞液でもアルコールができる。)
酵母遺伝学の発展	ある特定の発現形質に着目した 網羅的な突然変異体の単離及び解析
ポストゲノム時代	全ゲノム解析 ゲノムワイドな発現解析 遺伝子破壊株のコレクション ³ GFP タグコレクション プロテインアレイ ⁴ などの技術開発

²一倍体世代の酵母は二倍体への世代交代を自発的に行うことがあるがこれは Lab で使われている酵母は之が起こらないようになる。

³生存に必須な遺伝子 2000 個を除外して選択的に deletion を起こさせた酵母株。

⁴Protein Array にはさまざまな種類がありますが、一般に、タンパク質に特異的に結合する抗体のような分子をスライドガラスやメンブレンなどの支持体の上にアレイ (配列) 状にスポットしたものを示します。反応原理は DNA マイクロアレイと同様で、アレイ上の分子とサンプルを反応させ、アレイに結

次節からは有名な研究をいくつか取り上げる。

3、細胞周期研究

酵母における分裂周期の遺伝的制御は Leland H Hartwell, Paul Nurse 両氏により 1974 年の論文で大きく解明された。本研究では、一倍体の酵母に対してランダムイズされた変異をいくつも作って、そのうえで温度感受性(temperature sensitive/TS)株の選抜を行った。Cdc1~32 という株を形態別に選抜してきた。この形態は細胞のかたちと核の形状により分けられた。

TS 株では温度を上げたときに一定の細胞形態で生育が止まる。これを選抜した。低温条件下ではうまく生育するが高温である段階に於いて増殖を止めるのならば、その段階を進行させるために要求される酵素に対して変異が入っているはずだと考えるのである。

この研究により**サイクリン依存性キナーゼ**(Cdc28)や**セプチン**(Cdc3, 10, 11, 12)(細胞分裂の際くびれを作る因子)が同定された。

Hartwell⁵は細胞周期のチェックポイントの概念を確立した。細胞周期のチェックポイントには DNA 損傷チェックポイント、DNA 未複製チェックポイント、紡錘体集合チェックポイント、染色体分離チェックポイントがある。

4、オルガネラと細胞内膜輸送

この機構の理解にも酵母は大活躍した。

ジェームズ・ロスマン⁶、ランディ・シェックマン、トーマス・サドホッフに与えられた 2013 のノーベル賞がそれであった。

ランディ・シェックマンは厳しい条件になったときに比重が上昇する(酵母内で分泌タンパク質がたまってしまうので)ような酵母を、密度に応じて分離してきた。その酵母を電子顕微鏡で観察すると、細胞内に小胞がたくさんできていた。このようにして分離してきた酵素群の解析を行い、出芽の解析、コートたんぱく質の同定、SNARE 仮説(v-SNARE-t-SNARE 相互作用)などを打ち出した。

5、オートファジー

大隅良典が見つけた細胞内のリサイクル機構である。細胞内の不要物質を非選択的・誘導的にオートファゴソームにより包み込み、それを液胞及びリソソームに呼び込み、それを分解するこれには Atg タンパク質 33+2 個が関与している。

オートファゴソームの二重膜の外膜だけが液胞膜(一重膜)と融合すると、オートファゴソームの内膜と中身が液胞内に放出されます。

水島昇の研究はこのオートファジーがヒトの疾患と極めて関連していることをいろいろ明らかにした。

合したタンパク質を検出・定量します。

⁵Hartwell はグダグダの泳ぐのが大好きなおじさんだそう。

⁶ロスマンは昔大御所をぼこぼこにしたせいでノーベル賞の受賞が遅れたそう。

6、コンタクトサイトや最新研究

酵母のさらなる研究として**コンタクトサイト**があげられる。これは細胞内の細胞小器官同士がコネクションされているという新理論である。

まだまだゲノムシーケンスの結果や顕微鏡技術において発展は止まらない。例えば神経細胞の酵母によるモデリングやがん細胞のモデリング⁷が提案されている。

2 応用(酵母を用いた神経変性疾患の研究)

さて本項ではアルツハイマー病やハンチントン病の研究を題材にして話を進めて行く。これらの神経変性疾患はタウやプリオンなどのタンパク質の細胞内における蓄積が原因である。

このような蓄積たんぱく質は酵母内に発現させてやると酵母の増殖が抑えられる(このような酵母を**疾患モデル酵母**と呼ぶ)。スーザン・リンドキストは酵母に対して特定の薬を効かせることにより、その耐性付与効果に依って有用化合物のスクリーニングを行った。またこの研究で発見された **α シヌクレイン** (パーキンソン病)の毒性を抑える NAB という薬剤は *C.elegans* においても神経細胞を再生させる働きを示した。

NAB のターゲットを見つける研究においては、NAB の持つもう一つの特性「高濃度における細胞成長阻害」を手掛かりにして行われた。この観点から細胞内のタンパク質の NAB 2 (NAB の類似化合物)下におけるエクспRESSIONライブラリを検討し、NAB の標的タンパクを探し出した。

NAB の標的タンパク質探索の具体的な手順

NAB が proteinX とくっついて X がなくなること成長阻害が起こるという仮定①と、NAB が proteinX と結合することでその複合体が毒性を持つこと成長阻害が起こるという仮定②を各々検証する。

すなわち、①変異株において、ある遺伝子がマルチコピーされたことにより Over expression して NAB 2 に対する毒性を緩和したものを見つけてその遺伝子をターゲットとしてみた(マルチコピーサプレッサー)ものと、②SNP や deletion により NAB 耐性を得た個体を見てその遺伝子をターゲットとしてみたもの(サプレッサー)の二つ(①+②の両方)を用いて標的タンパク質の推定を行った。

これらの推定標的タンパク質は(やはり)エンドサイトーシスと関連していることが推測された。これはヒトの iPS 細胞での効果がみられたという。

またスーザンはこれ以外にもアルツハイマー病のモデルや 2 型糖尿病(β 細胞がダメになるタイプ)のモデルを作成していたりした。Diabase type2 のモデルでは、細胞内に IAPP(islet amyloid polypeptide)⁸を増加させていた。研究成果としては、この IAPP 増加に対してこの毒性を緩和するタンパク質 Ste24 を同定した。

IAPP と二型糖尿病

IAPP を酵母で発現させると、生育が悪くなり、IAPP 毒性の疾患モデルとなると考えられました。この

⁷これはアニュープロイドという、遺伝子のバランスを崩してやることにより行われる。

⁸IAPP はランゲルハンス島から大量に分泌される物質である。これは細胞内において蓄積毒性を持ち、これがランハンをこわして二型糖尿病が起こる。

毒性を回復する遺伝子を酵母で探したところ、細胞質から小胞体へのタンパク質の移行で重要なトランスロコンという穴を作っている構造の詰まりを取るタンパク質分解酵素が取れました。そのヒトにおけるホモログについて調べたところ、変異が入っていると2型糖尿病になりやすいという傾向が明らかになりました。

★酵母の系を用いれば疾患のスクリーニングができる。①真核生物のモデルとしての酵母②疾患モデルとしての酵母の重要性③疾患の分子機構と薬の候補物質の探索を本章では見てきた。

3 胞子形成研究

酵母の胞子形成の研究を舘川教員はやっている。

胞子形成過程

1 栄養欠乏による細胞内の転写翻訳制御

2 核分裂(1→4)

3 胞子壁形成。前胞子膜については、伸長して先端が閉じた後に、二重膜の膜の間に胞子の壁ができます。

舘川教員は自分の研究を、前胞子膜の形成に関与するタンパク質のホモログがヒトの疾患に関与していることで意義づけている。

またこの前胞子膜形成のような新しく膜をつくる研究は精子形成と同じであること、胞子形成を操ることができることと酵母の育種は同義であることも胞子形成の研究からわかるかもしれない。

4 補足

変異株作成

酵母の変異株の作製法について、説明不足だったので方法を書きます。変異株の作り方ですが、酵母を変異剤で処理します。変異剤とは、DNAに傷をつける薬剤で、その傷を酵母が修復するときに、ある程度の頻度で塩基配列が変化します

生活環

①二倍体が一倍体になるには、胞子を形成することが必要です。胞子からは一倍体細胞が発芽します。逆に、一倍体が二倍体になるのは、接合によります。

②僕からも補足しておきます。研究用の出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)は、2倍体で生きることがを好みます。ただし、栄養の枯渇などで増殖が難しくなると、減数分裂をして四つの子嚢胞子(1倍体)となります。実験室では、窒素源を与えないことで、減数分裂を誘導します。子嚢は、あらためて栄養源に触れるまで子嚢の形態のままでいて、子嚢胞子も当然発芽しません。栄養に触れると子嚢が破けて子嚢胞子がそれぞれ発芽して1倍体の細胞になります。ただし1倍体細胞として増殖するのは短期間で、a型と α 型との間でどんどん接合して、2倍体細胞に戻っていきます。

+ α 栄養の枯渇

条件の悪化はすなわち培地からの窒素源の枯渇と、非発酵性の糖の存在です。分かりやすくいうと、アミノ酸などの元になる NH_4 などがなくなり、グルコースなど美味しい糖もなく、代わりにグリセロールや酢酸などの美味しくない炭素源があるときということになります。それぞれのセンサーとシグナル伝

達系があって、そのシグナルが孢子形成に関与する遺伝子発現を誘導します。孢子形成に必要な窒素はオートファジーによるリサイクルで、エネルギー(ATP)は TCA サイクルで作られます。

★出題問題★

問 1

(1)オートファジーについてそのシステムと利点を説明せよ。

(2)オートファジーの研究はどのようなことに役立つか記せ。

問 2

疾患モデル酵母を用いた研究について、一つ挙げ、その利点を説明せよ。

(略解)

問 1 (1)略(2)疾患研究

問 2 二型糖尿病 OR パーキンソン病



第9回バイオテクノロジーを利用したタンパク質生産の技術

有岡教員分

1 イントロダクション

カビなどの微生物は産業用酵素、ヒトに役立つ物質の生産に用いられる。

例を以下挙げて行く

- ① α -グルカン関連の酵素
- ② β -グルカン関連の酵素
- ③タンパク、脂質、エステル分解酵素
- ④うまみ成分の生物酵素系における生産
- ⑤乳化作用様の酵素
- ⑥洗剤⁹への利用
- ⑦インシュリン¹⁰などの医用

インシュリンの単離にはドラマがある。

1921年カナダのトロント大学出身のバンディングとベストによりインスリンの発見があった。バンディングは開業医をしていたが、なかなか病院がはやらなかったので、暇で暇で仕方なかったという。その時読んだ医学雑誌にインスリンの記載があったという。それを見たバンディングは之だと思い、医院をたたんで研究を始めた。この研究を始める際、当時の権威マクラウド教授に相談したがその提案は棄却された。3度彼に相談しに行ったときに、ついに夏の間研究を行うことができた。この時のお手伝いを選ばれたのがとうじ4年生のベストであった。

研究を始める前に、マクラウドは二人に犬の膵管結紮術をおしえ、故郷のスコットランドに帰った。研究では二人がなんと犬で糖尿病を発現させ、それでほかの個体の膵臓抽出物を打つと、血糖値が下がったことを確認した。翌年1922年1月11日、彼らはウシの膵臓抽出物をdiabaseのトンプソン少年に注射したが、失敗。ただ、生化学者のコリップがこれを生成するとうまくいった。

これについてはジャーナルに記載されたが、この時マクラウドは著者にならなかった。ただ、学界における質問はベストとバンディングの代わりにマクラウドが代わりにこたえていたという。

この年の8月、インスリンによりエリザベス・ヒューズ(有力者の娘)の治療に成功し、大いなる評価を受けた(3年でノーベル賞まで届いた)。

この時、受賞したのはバンディングとマクラウドが受けた。この二人はそれぞれ仲が悪く、ノーベル賞のレクチャーにも出席せず、バンディングとベスト、マクラウドとコリップでそれぞれ賞金を折半したという。

最終的には、ベストはいい研究者になったという。

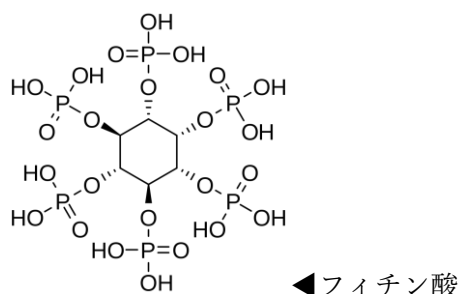
⁹この洗浄性は液体洗剤<粉末洗剤となっており、これは液体洗剤の中の水が、加水分解の最中の水の供給源となってしまう、自己分解をしてしまう。このための阻害剤が入っているので洗浄性が落ちてしまう。

¹⁰日本で初めてdiabaseに罹患したのは藤原道長といわれている。

フィターゼとフィチン酸

フィターゼは、フィチン酸（イノシトール-6-リン酸）を分解して、無機リンを遊離する酵素群の総称である。鶏や豚等の単胃動物ではフィターゼの活性が弱いため、フィチン酸に含まれるリンの利用率が極めて低い（鶏：10%程度、豚：20～30%程度）。飼料中に含まれるリンを有効に利用するため、フィターゼを飼料に添加することにより、リンの利用性を改善することができる。

フィチン酸について：フィチン酸の形のリンは、非反芻動物ではフィチン酸消化酵素であるフィターゼ（フィチン酸を加水分解しリン酸を遊離する酵素）がないため、一般に吸収されにくい。一方反芻動物はルーメン（反芻胃）内の微生物によって作られるフィターゼがこれを分解するためフィチンを利用できる。現在非反芻動物（ブタ、ニワトリなど）は主にダイズ、トウモロコシなどの穀物で肥育されているが、これらに含まれるフィチンは動物に吸収されずに腸管を通過するため、自然界のリン濃度を上昇させ、富栄養化などの環境問題につながる恐れがある。飼料にフィターゼを添加することでフィチン由来のリンの吸収を増すことができる。



さて、インスリンの種差に関して述べてゆこう。インスリンは動物由来の物と人由来のものでアミノ酸残基が微妙に違う。またヒトの治療に使うためには一年に豚 70 頭分の膵臓が必要であり、この供給元を確保するのは大変な問題であった。

2 インスリン大量生産の道のり

1、配列検討

1978 年にはノボ社がブタインシュリンのアミノ酸残基をヒト型のものに置換した半合成インシュリンを作成。

1979 年にはイーライリリー社が化学合成した DNA 鎖を用いて、大腸菌により完全なヒトインシュリン¹¹を合成した。

2、作用機序検討

インシュリンは 6 量体で合成され、これが分離しないと人に作用しない。このため、この分解時間のために、インシュリンを皮下注する時間が制限されていた(ex;食事の 30min 前に必ず打つ)。これは QOL の大きな低下をもたらす。

大腸菌に、解離速度を変えた DNA 配列を入れ込むことでこの問題は解決された。たとえば食事時に打

¹¹この合成インシュリンがヒトのものと同じか否かは、精製技術において、相違ないかがみられた。

てばよい即効性の物や、解離速度が遅い、定常分泌インスリンを模したものが作られた。
また、このインシュリンを投与する形も注射器から微細針のついたシールなどが開発されている。

3 タンパク質生産の手法と課題

1、異種生産

異種生産

これは宿主とは異なる生物に由来する DNA をある宿主に入れてタンパク質生産を行わせることを指す。セントラルドグマのながれに沿って、DNA をうまい発現ユニット (promotor + gene + terminator) 宿主に入れてやれば転写翻訳を起こす。

一連の DNA 並列はそれをプラスミドにぶち込めばよい。このときの selection に関しては *URA3* (栄養欲求) やアンピシリン耐性 (薬剤耐性) が用いられる。

形質転換にはカチオン (陽) を用いた方法や、エレクトロポレーション、リポフェクションが用いられる。
※カチオンを用いた方法とは、対数増殖期の細胞を 2 価陽イオン存在下で冷却することによりコンピテントセルを作成することをさす。

2、たくさん生産するためには

これには幾つかの方法がある。

強いプロモーターを使う

GAL システム → 培地にガラクトースを投与すると強度発現

AOX システム → 培地にメタノールを投与すると強度発現」ここまで酵母。

T7 プロモーターを入れてあげる。」これは大腸菌。

T7 システムについて

他の発現システムは、その生物が持つ RNA ポリメラーゼをそのまま使っているのですが、この大腸菌のシステムの場合、大腸菌自身の RNA ポリメラーゼは使っておらず、代わりに T7 ファージ (大腸菌に感染するウイルス) の RNA ポリメラーゼを使っています。この T7 RNA ポリメラーゼは非常に強力であると同時に、特異的で、T7 プロモーター配列しか認識しません。まず、発現させたい目的の遺伝子を T7 プロモーターの下流に連結し、大腸菌に導入します。その際、宿主となる大腸菌として、その染色体に T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子が組み込まれているものを使用します。この T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子は常時作られるのではなく、ある物質 (ここでは IPTG) を入れた時のみ作られるように細工がしてあります。目的の遺伝子を発現させるためには、まず IPTG を入れて T7 RNA ポリメラーゼの発現を誘導し、できた T7 RNA ポリメラーゼが目的遺伝子の転写を開始することになるので 2 段階構えと言いました。

コドンの最適化を行う。

生物のコドンは揺らぎがあるが、この好みは生物種により異なる。(Ex; *E.coli* は R のために CGC をよく用い、AGG をよく用いない。)

遺伝子を導入する際、このコドンを、宿主細胞が好むものに調節してやると、発現効率が上昇する。

このコドンの使用頻度は tRNA の量と相関を示す。

実際にコドンを最適化してやると、発現量がぐぐぐーっと上がってきた (Trends Biotechnol 22, 346 (2004))

という。

この時遺伝子を組み立てようとする少しばかりコストが膨れてしまう。この時の改善策としては tRNA をふやしてやるという方法が考えられる。之も効くといえは効くらしい。

この理由は tRNA が足りなくなるとリボソームの働きが停滞してしまうので、量的に少ない rare codon に対応する tRNA を増やしてリボソームの停滞が起こらないようにする、ということです。

APPENDICS RARECODON の意義

アカパンカビがつくる赤色色素は概日リズムにしたがっているという。

このアカパンカビの概日リズムに関与する FRQ(frequency)タンパクについて。此のタンパク質中には Rare なコドンがよくつかわれていた。

この Rare コドンを使用頻度の高いコドンに変えてやるという実験が行われた(Nature 495,111(2013))。FRQ を Knockout したアカパンカビに最適化した FRQ 遺伝子を入れてやると、この概日リズムは回復されなかった。

この時には安定性の悪いたんぱく質が多くできていたと考えられた。得られたタンパク質に対して、凍結融解を繰り返してやると WT の物が強く、Ideal な MUTANT は弱いことが示された。翻訳速度の違いが安定性に関与していると考えられる。

コドンの方言①「近縁関係にある大腸菌とサルモネラ菌はほぼ同一の方言を用いています。系統上近縁関係にある生物種は似た方言を持ち、系統上遠くなるにつれて方言も異質になることが知られています。言い換えれば、コドン選択の方言は進化の過程で比較的安定に保持される性質と言えます。」と書かれています

コドンの方言②同一生物種の遺伝子間を比較した場合、多量にタンパク質を生産する遺伝子ほど方言がきつく、生産量が下がるにつれて、同質の方言を用いながらも、その方言の程度が緩くなります。

ほかの例：大腸菌のある遺伝子 (rpoS) の場合、rare codon が多いそうなのですが、これをよく使うコドンに変更すると、逆にタンパク質の量が減ってしまったそうです。これは、rare codon が多いとリボソームの動きが停滞するので、mRNA 上にたくさんのリボソームが結合していることになり、RNaseE という RNA 分解酵素による分解を免れるためだと説明されています (コドンを変更するとリボソームが停滞せず、リボソーム間の距離が広がってしまい、RNaseE で分解されやすくなる)。

分解抑制

目的産物を分解するプロテアーゼの遺伝子を生存に影響がない範囲で Knock out してやるとよい。

今回遺伝子破壊の対象になったプロテアーゼはおおむね細胞外に出てゆく (分泌される) プロテアーゼと考えられます (生産したヒト成長ホルモンも分泌タンパク質です)。考察されたように、細胞内のプロテアーゼをコードする遺伝子を破壊してしまうと、分解すべきタンパク質が細胞の中に蓄積してしまい、毒性を発揮すると思われますが、細胞外であれば問題は少ないと思われます。ハンドアウトに書いたように、「ユビキチン-プロテアソーム系」のプロテアーゼが最初から候補から除かれていたのは、この系が細胞内でのタンパク質分解に関わっているためと考えられます。

どの宿主を選ぶか

E.coli は速度や費用にかんして非常に優秀であるが、翻訳後修飾(糖鎖修飾)に弱い。抗体やオプシーボなどは糖タンパクなので、これは大腸菌では不可能である。

ではこれが酵母ならよいのかということもそういうわけでもなく、糖鎖修飾パターンが若干異なるということがある。

この問題を解決するため、糖鎖修飾の酵素に関して、ヒト型の物を酵母に導入する試みも進んでいる。

翻訳後修飾は、例えば N 型糖鎖修飾の場合、大腸菌はそもそも型糖鎖修飾の仕組みを持っていません。また、酵母や糸状菌の糖鎖の構造はヒトとはかなり違っているので、高付加価値のヒトタンパク質を作りたい場合は問題です。タンパク質分泌の能力は、培養液 1 リットル当たりの生産量で比較したりします。糸状菌は極めて高い生産性を持つことが知られています。ただし、この順序については私の私見がかなり入っています

試験管内タンパク合成

翻訳に必要な物資を試験管内でミックスしてやると、少量だがタンパク合成をすることができる。これは宿主に毒性があるものでも作ることができる。

メリフィールド法

ペプチド結合を人為的反応の下で作らせる方法である。

4 補足

コドンについて

生物がタンパク質合成に用いているアミノ酸は、20 種類です(セレノシステインという 21 番目のアミノ酸が極一部のタンパク質に含まれる場合もあります)。mRNA は A,G,C,U の 4 種類のヌクレオチドで構成されるので、21 種類のコドン(20 種のアミノ酸+終止コドン)を作るには、3 ヌクレオチドのつながりをコドンとしなくてはなりません(4³ で 64 種のコドンがつくれる。2 ヌクレオチドのつながりでは、4² で 16 種のコドンしか作れない)。ここで、64-20=44 のコドンをすべて終止コドンとしてしまうと、突然変異によってアミノ酸をコードするコドンが終止コドンに変わってしまいタンパク質を合成できなくなる確率が高くなりすぎます。そこで、終止コドンは 3 種だけにして、一つのアミノ酸に複数のコドンに対応させることで、とにかくタンパク質合成を継続できるようになっています。すなわち、ここまでの内容は、単純に数学的な課題です。コドンとアミノ酸の対応関係は、すべての生物で共通しています。ところが、生物のゲノムにおける塩基の使い方(GC 含量: この用語がなにを意味するかは、自分で調べてください。)は生物ごとに異なっていて、GC 含量は 20%~80%の範囲でばらついています(なぜこんなにばらついているのかは、わかっていません)。このことが、その生物がどういうコドンを優先して使うかを決めています。例えば、GC 含量が 80%の生物は、3 番目の塩基が G か C のコドンしか使いません。そして、3 番目の塩基が A か U のコドンをたまたま使っていれば、それがレアコドンになります。上記とは別に、GC 含量が同程度の生物間でも、どのコドンを優先的に使用するかが異なる場合は多々あります

トルラ酵母

かなり以前ですが、微生物を安価な培地で培養してタンパク質を作らせ、それを食料に利用しようとする試みはありました（「Single Cell Protein」）。

トルラ酵母（torulayeast、学名:*Cyberlindnera jadinii*）は、酵母の種である。蛋白質資源としての家畜用飼料や、加工食品の添加物として用いられる。製紙産業などの森林産業の副産物を使って培養される。生化学製品の原料としても用いられる。

微生物タンパクを利用する目的で、第一次世界大戦中ドイツで、木材の酸分解糖液を原料にして、トルラ酵母を培養し、食料として利用しようという研究が行われた。これは実用化しなかったが、製紙産業の亜硫酸パルプ廃液を利用して培養する方法で、1950年代から家畜用飼料として用いられるようになった。

★出題問題★

問 1

- (1) フィターゼの利用法をかけ。
- (2) フィターゼがあることによる利点をかけ。

問 2

- (1) ヒトインスリンとブタインスリンの違いをかけ。
- (2) 板倉啓壺によるインスリン合成戦略をかけ。
- (3) 組換え DNA を用いたインスリン生産の利点は何であるか述べよ。

問 3

- (1) セントラルドグマとは何か。
- (2) コドン選択性とは何か。

(略解)

問 1(1)食品加工や飼料におけるフィチン酸分解(2)遊離態リン酸を試料中で増やすことができる。

問 2(1)B鎖30位のアミノ酸がウシではアラニン、ヒトではスレオニン(2)組換えDNAを用いた大腸菌による生産(3)安価、手軽、素早く、適度な改変を施したインスリンを作れる。

問 3(1)略(2)略



第 10 回細胞性粘菌のバイオテクノロジー

足立教員分

1 細胞性粘菌のあれこれ

これだけ覚えよう細胞性粘菌のコト

- ① *Dictyostelium discoideum*(キイロタマホコリカビ)
- ② キイロタマホコリカビ
- ③ 英語で Dicty
- ④ 真核微生物

1、生活環

胞子は水のあるところで発芽し始める。胞子からはアメーバのようなものが遊走しだす。まるで動物細胞である。これらはバクテリアを貪食し、急速に分裂成長してゆく。成長の過程で粘菌に食べられた(貪食)バクテリアは食胞に包まれ消化される。

次第にバクテリアが枯渇すると、それまでばらばらに移動していたアメーバが一つの方向に向かって移動し始める。このときの誘引物質は cAMP である。かつてばらばらに行動していたアメーバは行進を始める。集合体の中心部ではアメーバの更新の流れが集中している。やがてナメクジのような移動体が形成される。これは光を求めて移動する。この移動体の進行方向は先端部が決定しているという。この移動体は粘液のさやを残して移動する。移動体はやがて子実体に変化するが。移動体の前部 1/3 は子実体の丙に分化する予定運命を、後ろは胞子になる予定運命を有している。

(この子実体は、柄と呼ばれる細胞の上に胞子をたくさん含んだ胞子のうが乗っているような構造です。柄は液胞が発達してセルロースなどを外に分泌した死んだ細胞で、子実体はまるで植物体のような生き物です。つまり、細胞性粘菌は単細胞生物と多細胞生物の両方の時期があり、動物と植物の両方の特徴を持つ生き物です。)

子実体の成長が止まるとやがて突起部が内没する。

誘引物質は cAMP について：飢餓状態になると細胞はサイクリック AMP (cAMP) を出すようになり、ある細胞が最初にサイクリック AMP を出すとそれに対する走化性により周りの細胞がその細胞を中心に集まり始めます。サイクリック AMP を感知するとその細胞は走化性運動を示すだけでなく、自分もサイクリック AMP を作るため、その後ろ側の細胞はその細胞について行くように動くことになります。これにより一定の方向に向かって行く動きができます。

2、実験室での培養法

①二員培養

この培養法ではまず DM の Agar Plate に E.coli を塗り増やし(ローン)、そこに対して細胞性粘菌をたらし、増殖させ(ハローという名前でコロニーと呼ばれる)培養を行う。

ハローの構造は外から内に向かって発生が進んだような形になる。

②無菌培養

とても強い系統では富栄養培地でそのまま育成することができる。

3、分類

五界説→原生生物界、三ドメイン説→真核生物

真核生物(Eukaria)で植物と動物が分岐した直後に、動物方向のノードから分化したとされている。
つまり特に菌というわけではないということである。実際、動物細胞と似た(細胞壁をもたない、基質にくっつく、形を変えて動く)ようなふるまいを見せるのである。なので、動物細胞を研究する際のモデル生物ともいえるのである。

細胞性粘菌は「究極の細胞」酵母が持たない移動能力を有しているという点で素晴らしいモデル生物なのである。

更には多細胞生物の細胞運動・発生・分化・形態形成のモデルとしても用いられている。

★細胞性粘菌のいいところ→真核生物なのでヒトと似通う微生物なので簡単に入手できる

単細胞アメーバの時代→細胞質分裂の研究(がん細胞研究とつながる??)・細胞移動の研究

多細胞体・子実体→発生の研究

☆細胞性粘菌は分化形態形成研究のモデル生物☆

ちなみに迷路を解く真性粘菌の代表種にはモジホコリが存在する。比較に関してはスライド参照。

2 広義細胞運動

講義細胞運動は簡単に言ってしまうと細胞運動全般を指す言葉である。

細胞の形は、細胞膜を裏打ちする細胞骨格(アクチン細胞骨格)が決定する。

どの細胞運動現象も厳密な形態変化の制御が必要であり、どのように時空的制御を受けるかを分子レベルで解析する必要がある。

本節では、広義細胞運動の例として

①cytokinesis(細胞質分裂)

②Phagocytosis

macropinocytosis(飲作用)

③migration

を見て行く。

1、細胞質分裂

覚える言葉収縮環・分裂溝・中央体。

細胞性粘菌の細胞質分裂は動物細胞のそれと酷似している。

ミオシンIIがかかわっていることは細胞性粘菌のおかげで分かった。

2、食作用、飲作用

食作用が起こる際にはファゴシティックカップが作られ、そこにはアクチンが高度に局在している。また

GfIB というタンパクも同時同箇所には局在している。

マクロ飲作用時には王冠状突起が作られ、それが液体とともにとりこまれ、マクロピノソームが形成される。この王冠状突起にもアクチンと GfIP が集合する。

補足：マクロピノサイトーシス（マクロ飲作用）は細胞が比較的大きな容積の細胞外液を非特異的に取り込む現象で、細胞性粘菌などのアメーバからヒトまで進化的に良く保存されています。マクロピノサイトーシスはアクチン細胞骨格（注 4）依存的で、アクチン細胞骨格が王冠状の突起（クラウン）を形成し、突起が閉じることで細胞外液を細胞内に取り込みます。

今回、稲葉弘哲、足立博之准教授らはマクロピノサイトーシスのモデル生物である細胞性粘菌を用い、マクロピノサイトーシスの制御因子として Rap1 の活性化因子である GfIB を見出しました。

Rap1 はヒトにも保存されている情報伝達因子であり、本研究は進化的に保存されたマクロピノサイトーシスの分子機構の解明に大きく寄与するものと考えられます。

注：細胞内で情報を下流に伝達する分子スイッチである低分子量 G タンパク質の一種で、細胞—細胞間結合や細胞—基質間結合を制御することで良く知られています

アクチンの重合について：ただし、アクチンが集まるというか、重合が促進されてアクチンフィラメントが局所的に増える場所では、情報伝達に関わる Ras という膜タンパク質が活性化され、それに活性化された PIP3 キナーゼという酵素が細胞膜に PIP3（ホスファチジルイノシトール 3 リン酸）という脂質を作り、PIP3 が情報をさらに伝達することが知られています。これらの情報伝達分子とアクチンの重合が何かしら関係するものと考えられています。

3、細胞移動

細胞が移動するとき、先端部でアクチンが集合し、葉状仮足を作りそれが身体を押し出して移動を行う。

・②に関してはともに GfIP というタンパクが関与しており、欠損すると各作用がうまく執り行われなくなる。

◎分子生物学の研究手法

①減少に関与する新規タンパク質の発見

②そのタンパク質の動的局在

③タンパク質間の物理的相互作用

① 遺伝学的相互作用

3 モデル生物としての要件と細胞性粘菌の素晴らしさ

①一倍体(半数体であること)→変異株の作出系統立てが容易である

②分子生物学の方法が使える→electrophoresis、プラスミドシャトルベクター¹²、耐性マーカー、正方向

¹²2 つ（以上）の異なる宿主で複製ができるベクターのこと。大腸菌と酵母、その他の細菌などではプラスミドの複製に必要な ori（複製開始点）が違います。シャトルベクターは ori を 2 つ（以上）持って

遺伝学(タギング法/REMI 法)、逆方向遺伝学(相同組み換えによる標的遺伝子破壊)

《特性》

ゲノムサイズは 34Mbp

ゲノム計画は 2005 年に完成

遺伝子数は 13000(酵母の三倍・人の約半分)

1、細胞質分裂研究の研究～細胞質分裂の研究を例にとって～

細胞質分裂の様子を見ながら、多核になっているような細胞をさがす。

- ① この変異遺伝子を探してゆくのが**正方向遺伝学**。
- ② 既知遺伝子に Mutation をいれ、それが多核細胞になれば、それが原因遺伝子とするのが**逆方向遺伝学**。

(形質の変異から原因遺伝子を探る**正方向遺伝学**に対し、人為的に遺伝子変異を起こし、遺伝子の機能を調べる手法は**逆方向遺伝学**と呼ばれています。)

2、正方向遺伝学 REMI 法

◎タギング法 REMI 法(正方向)

- ①WT の細胞に対して、Tag Vector(薬剤耐性と大腸菌の遺伝子が乗っている)を、**制限酵素**と一緒に電気穿孔する。**制限酵素**は宿主 DNA を適当な場所で切ってゆく。
- ②すると多核細胞にさせるような mutant においては、この時 Tag は標的遺伝子を分断するように導入されている。
- ③このような mutant を増やし、そこから DNA を抽出、**構造遺伝子**を含むように、《**構造-Tag-遺伝子**》のように切だし、ベクターとして再構成する。
- ④この得られた円環の DNA を大腸菌に導入すれば、Tag の影響で、《-制限酵素 Site-構造-Tag-遺伝子-Site-》となっているものだけが増える。
- ⑤増やした plasmid を**制限酵素 Site**で切って WT 宿主に電気穿孔して導入してやると、高確率で構造遺伝子を含めた周辺配列と相同組み換えを高確率で起こす。すると細胞の中でターゲットとした構造遺伝子の中に Tag が侵入する。
- ⑥⑤で遺伝子導入した WT が形質転換を起こして、それが本当に細胞質分裂に関与しているなら、標的遺伝子は原因遺伝子と証明できる。

3、逆方向遺伝学

ミオシン II が細胞質分裂にかかわっている証明(逆方向)を例にとる。

この Myosin II を Knockout してやったものでは、細胞質分裂が起こらないことが証明された。また Myosin II の阻害物質を滴下するとやはり多核になった。

実際染色してやると、収縮環に Myosin2 が集合していることがみられた。

◎教員の研究では、D47-1p をしらべていて、それは《スペクトリンリピート—Actin Binding site x2》のような構造をしている。スペクトリンリピートは細胞膜タンパクとの結合を行う。なので、D47-1p は

います。

細胞膜を裏打ちしながら、膜タンパクとの結合を行うと考えられている。

染めてみると、細胞移動の際に、細胞後端をひっこめる働きをするらしい。また、細胞質分裂における中央体において、膜の引きちぎりに関与しているらしいことが分かった。

正方向と逆方向の違い；質問ですね。全く情報がないところである遺伝子（タンパク質）がある現象に関わるかどうかは全くわかりませんので、数千から数万ある遺伝子の中からある既知の遺伝子を破壊してたまたま目的表現型になる確率は極めて低く、それが逆方向遺伝学の欠点です。確かに、出芽酵母で既に行われているように、1つの生物の全ての遺伝子（出芽酵母では約 6,000 個）の1つ1つを破壊した変異株（出芽酵母では約 6,000 株：壊すと死ぬ必須遺伝子があるので実際は約 5,000 株）のセットを作り、その表現型を1つ1つ調べれば目的を達成できますが、それが簡単ではないのは容易に想像できると思います。一方、正方向（古典的）遺伝学では、ゲノム上のランダムな位置に変異を起こさせてそれぞれ異なる位置に変異を持った変異株の集団を得るのですが、それが数万（その生物の遺伝子の数より十分多いことが必要）株であっても株の作製にさほど手間はかかりません。あとは目的の表現型を調べる方法があれば、目的の変異株は比較的簡単に得られます。ただし、取れた変異株から変異遺伝子にたどり着く方法があることが必要です。細胞質分裂におけるミオシンIIの関与が逆方向遺伝学で証明できたのは、筋肉でのアクチンとの関係から関与が推定されたためです。ミオシンIIに加え、いくつかのアクチン結合タンパク質も同様に逆方向遺伝学から細胞質分裂の関与が証明されています

★出題問題★

問1 動物細胞の細胞質分裂の研究に関して、この過程に関与するタンパク質が細胞性粘菌の研究から明らかになった。これについて以下の問いに答えよ。

- (1) このタンパク質は何か。
- (2) このタンパク質はどのように推定されたか。
- (3) そのタンパク質はどのようにして反応への関与が証明されたか、その手順を具体的に述べよ。

問2 細胞性粘菌を使って研究されている広義細胞運動の定義を述べよ。またその例について、2つ挙げ、それぞれ細胞形態や構造名を使いながら説明せよ。

(略解)

問1(1) ミオシンII (2) 筋肉での相互作用 (3) 逆方向遺伝学で示された。

問2 略



第 11 回形態分化のモデルとしての放線菌

足立教員分

1 放線菌の分離法

1、分類学的位置

放線菌とは、グラム陽性¹³、高 GC(グアニンとシトシン)含量の真正細菌の総称。門レベルでの分類である。

旧来は菌糸形成を行う、放射状に細長く伸長して増殖する形態を示すグラム陽性細菌を指していた。現在は、rRNA 遺伝子の塩基配列によって分類を行うため、菌糸状だけでなく、桿菌や球菌も含まれる。

2、薬剤生産

放線菌 = 『生理活性物質の天然の貯蔵庫』(多様な二次代謝)例には免疫抑制剤や、抗生物質、抗がん剤などがある。イベルメクチンもその例である。

抗生物質生産を行っている抗生物質生産菌の 6 割は放線菌であり、このような背景からも、放線菌は工業微生物としての役割を確固たるものになっている。

3、単離法

Streptomyces 属

では本題に移る。どのように放線菌を菌群の中から単離してくるのだろうか。

基本的に土壌中に生息する放線菌なので、まずは土壌試料を得てきてこれを水で希釈し、寒天培地上に播種する。しばらくするとコロニーができ、ここからシングルコロニーから菌を pickUp して、純粋培養を行う。

放線菌に限らず、土壌中には様々な種類の微生物が生息している。この状態において放線菌を選抜してくるためには、

①放線菌に最適化した培地を用いる。

EX:C 源をグリセリンに限定し、N 源をアスパラギンに局限する。放線菌の生態解析から得られた知識(with 腐食酸下で優勢)から、最適化した培地を作る。

②放線菌特有の休眠状態を起こしてやる薬剤処理を行う。

¹³グラム染色によって細菌類は大きく 2 種類に大別される。染色によって紫色に染まるものをグラム陽性、紫色に染まらず赤く見えるものをグラム陰性という。この染色性の違いは細胞壁の構造の違いによる。グラム陽性はペプチドグリカン層が厚く、グラム陰性はペプチドグリカン層が薄く、さらに外膜を有する。そしてこの細胞壁の構造の違いは、この両者が生物学的に大きく違うことを反映しており、グラム染色は細菌を分類する上で重要な手法になっている。

③放線菌に対して無害な抗生物質を使ってセレクションを行う。

の3方法がある。

希少放線菌について

○*Streptomyces* 属放線菌は分離を行ったとき、非常に多くの割合でとれてくる。それ以外の物は**希少放線菌**とよばれ、今まで抗生物質を分離してくる生物として研究が深まっていない分、ターゲットになりやすくなっている。(つまり分離法の工夫に関する研究がブームになりだしている。)

薬剤耐性菌の出現も進む中、ここで新規抗生物質の出現は望まれている。

○希少放線菌の分離方法

1 前処理法

各種放線菌の生態に沿うようにうまく条件を整えてあげる(分離試料の前処理を行う)子ことで、分離効率を上げる。

2 釣餌法

運動性のある希少放線菌を、種特異的な誘引物質を用いてそちらに走らせ、誘引物質にきた菌を培養してやる。

3 毛细管捕集法

キャピラリー中に誘引物質溶液をいれ、ここに遊走させ、それを培地に塗り広げて培養してあげる。

2 放線菌の特徴・複雑な形態分化

孢子→発芽→基底菌糸(ねっこ)→気中菌糸(くきと葉っぱ)→隔壁形成→孢子鎖の形成

のような面白い生活環を有している。多様な形態(特に菌糸形態を示すものは)の孢子や孢子嚢は見えても面白いものがある。

1、放線菌の形態分化と抗生物質生産は同調して開始される。

まず基底菌糸を栄養がなくなるまで伸ばし続け、そのあと空中に菌糸(気中菌糸)を伸ばしてゆく(これが形態分化)。そしてその時に自身を溶菌(プログラム細胞死)して、それを気中菌糸伸長の原料にしている。このときに同時に抗生物質を作ることで、非自己の物を自身の原料にしないようにしているのでは？(仮説段階)

2、二次代謝と遺伝子クラスター

二次代謝産物の生合成遺伝子クラスター→細菌では1つの二次代謝産物の生産を行う遺伝子群はゲノム上の一か所に固まっていることが多い。

このクラスターの中には、酵素をコードする遺伝子以外に、転写制御因子や、自己耐性タンパク質(自分がつくる物質から自己を守る)、輸送タンパク質などを含む。

EX；黄色色素グリキサゾンの生産

この生産の有無しは肉眼による識別が可能であり、これは研究上の大きな利点である。

グリキサゾン是一次代謝産物 2 種類が酵素反応を経て作られる。このグリキサゾンは GriR という転写活性化因子がグリキサゾン生産関連遺伝子の転写を上げてあげることで、グリキサゾンが生産され始める。

ところで原核生物では転写翻訳が時空的に同一に行われる。したがって、この遺伝子群の発現調節の中での最も重要な点は転写制御にあるという考え方が一般的である。

したがって、クラスタ内の転写制御因子(経路特異的転写活性化因子)がクラスタ全体の発現において、もっとも強力に制御を担っているということである。

放線菌における有用二次代謝産物合成遺伝子クラスタはほとんどが休眠状態にある。したがって、これらの休眠状態にある遺伝子を起床させてやることは、合成可能な二次代謝産物の幅を拡大してくれるのだ。

また二次代謝産物の生合成クラスタの発現はカスケード状に制御されているので、このカスケードの解析はとても大切。

クラスターの利点と進化的要因

：二次代謝産物の生合成遺伝子がゲノム上でクラスターを形成しているのは、細菌における遺伝子の発現様式が大きく関係していると考えられます。放線菌を含む細菌では、機能が密接に関連したタンパク質をコードする遺伝子がゲノム上に隣接して存在し、これらの遺伝子がまとめて 1 本のメッセンジャー RNA に転写されることが知られています。こうした同一の転写単位を構成する遺伝子群をまとめてポリシストロンとか、ポリシストロニックなオペロンと呼びます。二次代謝産物の生合成遺伝子群の場合、コードされているタンパク質が特定の二次代謝産物の生産という密接に関連した機能を持つため、多くの場合 1 つまたは複数のポリシストロニックなオペロンを形成しています。そのため、講義で紹介した経路特異的な転写活性化因子がゲノム上のごく近傍のいくつかの転写単位の転写を活性化することで、遺伝子クラスター全体の転写活性化が可能になっています。また、これは二次代謝産物の生産菌にとってアドバンテージとなるか分かりませんが、二次代謝産物の生合成遺伝子がクラスターを形成してゲノム上でまとまって存在しているため、この遺伝子クラスターが近縁の他の細菌にまとまって水平伝播したと考えられる例がいくつか知られています。講義で紹介した通り、基本的に放線菌が生産する二次代謝産物は種ごとに全く異なりますが、ごく一部の二次代謝産物については近縁の複数の種で全く同一、または非常に化学構造の類似した化合物を生産する例が知られています。

クラスター解析

培養条件を色々変えて休眠している二次代謝が活性化されるか調べる実験が最も一般的です。栄養源を制限したり、他のストレスをかけたりします。この他には休眠している二次代謝産物の生合成遺伝子クラスターを丸ごと他の放線菌に導入して活性化する手法や、放線菌と他の微生物を一緒に培養することで二次代謝を活性化する手法などが報告されています

3、休眠打破のシグナル

培地のリン酸濃度を大きく下げてやると、グリキサゾンの発現が起こってくる。すなわち、リン酸飢餓が二次代謝産物合成クラスターを活性化することを意味する。このリン酸飢餓シグナルが、先述のカスケー

ドの上流の因子であるならば、このシグナルで、多くの二次代謝経路を活性化できる可能性がある。

また GriR のプロモータ領域を適当なユニバーサルに発現するプロモーターに置換してやると、たとえ貧リン酸条件でなくとも、発現が起こる。

リン酸と気中菌糸形成

形態分化と二次代謝が同時期に開始されることと、二次代謝が栄養飢餓状態で活性化されることは密接に関連しています。放線菌は栄養状態が良い環境では基底菌糸を伸張して栄養増殖していますが、栄養が枯渇して飢餓状態になると増殖を停止し、胞子を形成して休眠するために形態分化を開始します。この時に自身の基底菌糸を溶菌させて栄養源として利用するわけですが、この栄養源を他の微生物に利用されないようにするため、二次代謝産物を生産すると考えられています。したがって、リンのような必須元素が枯渇した環境において二次代謝が活性化されることは合理的であると言えます

栄養飢餓→二次代謝の似た例

一般的には栄養を制限することで二次代謝が活性化する例が報告されています。例えば *Streptomyces griseus* という放線菌はストレプトマイシンという結核の特効薬を生産しますが、このストレプトマイシンの生産は培地中の炭素源を減らすことで促進されることが分かっています。逆に培地中にグルコースを加えると生産が大幅に減少します。

4、形態分化研究

◎放線菌の形態分化

形態分化を研究することは、放線菌の産業利用に対して生育法の理解など、多くの価値がある。

①基底菌糸の伸長

寒天培地上で菌糸を寒天内に潜り込ませて伸ばしてゆく

放線菌は**先端成長**により成長する。

先端成長…細胞の極で伸長が起こる成長様式(細胞極複合体を作り、これで成長してゆく)

基底菌糸は隔壁により仕切られていて、これは基底菌糸の伸長の際に何か細胞の破壊が起こったとき、被害を抑える役割をもつ。またこの隔壁で仕切られたコンパートメントでは複数コピーの genome DNA がぞんざいしてゆく。これは先端が伸びるごとに先端に移動してゆく。

②気中菌糸伸長

栄養が枯渇すると気中菌糸が伸長し始める。

気中菌糸の表面が疎水性のタンパク質に覆われているということは重要なことである。此のタンパク質は基底菌糸の時代からつくられていて、さいごこれをまとって空気中に進出しやすいように働いているという。

③胞子鎖の形成

胞子の隔壁 septum は、同時に同間隔で形成され、基底菌糸に形成される隔壁とは異なる制御を受けているようである。このとき DNA の分配はうまく 1 コピーずつ行われる。

気中菌糸の内部ではゲノム DNA が 1 コピーずつ分離する形で隔壁が形成され、その後孢子鎖が成熟します。基底菌糸では複数コピーのゲノム DNA が 1 つのコンパートメントに存在し、ストレス環境における溶菌の伝播等を防止するために隔壁が形成されるため、等間隔とはなっていません。

孢子嚢；ある種の放線菌は気中菌糸を伸ばさずに孢子嚢を作って休眠状態になる。この孢子嚢の中には 100－200 個ほどの孢子が含まれている。孢子と孢子の間には細胞間マトリックスが存在している。休眠しているので、実際に水分などの環境変化に応じて開裂、孢子の遊走が起こる。この遊走子は一一つ袋で包まれている。(このような多くの袋で包まれていることが、環境耐性に繋がっているのだろう。)

○遊走速度

希少放線菌の遊走速度はとても速い。何か特殊なモーターを持つのではないかな？

○希少放線菌の遊走子の走化性

そもそも走性は方向転換の頻度が減ることで特徴づけられる。しかし放線菌はこの方向転換が観測されていない。

希少放線菌の分離法

：希少放線菌の遊走子を誘引する物質の選択は経験則に基づく面が大きいです。運動能と走化性を持つ細菌は多くの場合アミノ酸や糖類に対して正の走化性を示すことが知られており、希少放線菌の分離でもこうした化合物が誘引物質として使用されています。また、自然環境では希少放線菌の遊走子が枯れ葉や花粉から分離された菌が複数報告されています。こうした生態学的な知見に基づいて花粉や植物の細胞壁成分を誘引物質に使用することも、希少放線菌の選択的な分離法として有効です

Actinoplanes 属の遊走子と二次代謝

Actinoplanes 属の希少放線菌の場合は孢子嚢の形成と二次代謝産物の生産がほぼ同時期に開始されます。その後、培養を続けると孢子嚢が成熟して休眠状態となり、孢子嚢が水分を感知すると開裂して遊走子を外部に放出します。走化性を示すのはこの遊走子であり、この遊走子が運動する際には二次代謝産物の生産は行われていません

多細胞状態になるために

多細胞形態の微生物において個々の細胞が機能分化するためには、細胞間のコミュニケーションを行い、全体として調和のとれた生命活動を行う必要があります。このような細胞間コミュニケーションにはさまざまな手段が使われており、放線菌の菌糸では種ごとに異なる低分子化合物を分泌して利用していることが分かっています。

○形態変化の研究法

プリント参照

◎境界微生物としての放線菌(オマケ)

最近の多細胞形態として、①子実体(粘液細菌)をつくり、細胞集団の中で役割分担を行うもの、②糸状体(アナベナなど)においてヘテロシストのような機能分化、③菌糸などがある。

この多細胞形態⇔単細胞状体や、単純な形態変化は比較的簡単な環境要因によりドラスティックなかたちで起こる。

抗生物質の存在は生育にとってマイナス要因であることは事実である。ただ、もしかしたらこの抗生物質に対する適応のために形態の進化(菌糸体の方が生存に有利)を放線菌は行ってきたのかもしれない。

★出題問題★

問 1 希少放線菌の定義を書き、またその分離法を一つあげて説明せよ。

問 2 放線菌の二次代謝反応の休眠打破の方法を一つ挙げ、それについて二次代謝反応関連酵素軍がどのようなものかを交えながら説明せよ。

(略解)

問 1 略

問 2 形態変化・抗生物質と絡めて書く。

