

リジン強化パン酵母の育種に向けた活性化型液胞 リジントランスポーター発現変異株の創成

愛媛大学大学院 農学研究科
河田 美幸

1. 研究の目的と背景

小麦の制限アミノ酸であるリジンの強化においてはリジン添加小麦粉を用いた製パンが試みられている。しかしリジン添加法では、製パン工程における損失率が問題となる。一方、パン酵母（出芽酵母）の液胞には、リジン等の塩基性アミノ酸が細胞全体量の90%程度蓄積されることから、リジン高含有パン酵母株の育種開発により、リジン強化パンの新たな製造工程が開発できると考えた。本研究では、酵母液胞へのリジン蓄積に関する基礎的知見を得ることを目的とし、液胞リジントランスポーターの同定と機能解析、およびその機能強化変異株のスクリーニングを行った。

2. 研究の方法

酵母の生育阻害剤であるチアリジン（リジンアナログ）を用い、チアリジン耐性を指標として、液胞へのリジン取込みが亢進した酵母株をスクリーニングした。チアリジン耐性株について、さらにアミノ酸分析装置を用いて液胞内チアリジン蓄積量を定量し、高度リジン蓄積株の単離を試みた。並行して、新規液胞トランスポーター同定のために、GFP融合型推定トランスポーターの網羅的局在解析およびアミノ酸分析を行った。

3. 研究内容

リジントランスポーター欠損株および野生株について、チアリジン感受性となる薬剤濃度を設定し、高度チアリジン耐性を示す活性化型トランスポーター発現株の取得を試みた。しかし、同条件で細胞内・液胞内アミノ酸/チアリジン含量を定量した結果、当初対象としていたトランスポーターは、単離液胞膜小胞による *in vitro* での活性測定結果と異なり、*in vivo* ではリジン取込み活性が非常に低い可能性が示された。目的の変異体獲得が困難であると判断されたため、リジン取込みに関与する新規液胞トランスポーターの同定を集中的に行った。筆者らのグループでは、酵母に約250個存在する推定トランスポーター遺伝子のGFP融合型発現ライブラリーを構築中である。各々の細胞内局在を調べ、これまでに液胞膜局在性トランスポーターを複数同定した。さらに、これらのうち破壊により液胞内リジン含量が著しく減少する遺伝子Xの同定に

成功し、現在輸送活性評価、活性部位の特定など、リジントランスポーターとしての機能解析を進めている。

4. 研究の実施経過

3に記したように研究遂行中に目的変異体取得が困難であると判断されたため、手法を変更し、リジン輸送に関わる液胞トランスポーターの網羅的探索を行った。GFP融合型タンパク質の局在解析とアミノ酸定量の結果、液胞へのリジン蓄積に関与する新規遺伝子の同定に成功した。この点について解析を進め、2018年度中に4件の学会発表を行った。さらに、当初の対象トランスポーターとそのホモログについて輸送活性の生化学的解析を行い、アミノ酸トランスポーターとしての性質を明らかにしつつある。これについては4件の学会発表を行い、現在論文投稿中である。また同時に、液胞への蓄積量増加に加え、細胞外からのリジン取込み活性を増強した変異体を作製する目的で、細胞膜局在性アミノ酸トランスポーターの栄養条件に応答した局在変化・分解メカニズムの解明に向けた研究を進めている。

5. 研究から得た結論・考察

本研究により、推定液胞トランスポーターをコードする新規遺伝子が取得された。現在、アミノ酸定量および単離液胞膜小胞を用いた輸送活性測定の両方において、本遺伝子が液胞へのリジン蓄積に関わるという結果を得ている。今後は本遺伝子を軸として、液胞への高度リジン蓄積株創成へむけた研究が進捗すると期待される。

6. 残された問題、今後の課題

液胞リジン排出トランスポーター遺伝子の破壊と、本研究で同定したリジン取込みトランスポーター、さらには細胞膜リジン取込みトランスポーターの高発現株を組み合わせることにより、液胞内にリジンを高度に蓄積したリジン強化酵母の育種開発が可能である。これはセルフクローニングにより作製可能であるが、消費者心理を考慮すると、遺伝子操作を伴わない変異体取得が望ましい。今後、様々な培養条件におけるリジン高度蓄積株の表現型を明らかにすることにより、リジン強化酵母の新たなスクリーニング系構築が必要であると考えられる。

7. 学会発表

- 1 河田美幸, 真鍋邦男, 池田紘一, 原田悠希, 田中志穂, 柿沼喜己, 関藤孝之, 酵母液胞膜タンパク質 Ypq2 による塩基性アミノ酸交換輸送について, 日本生体エネルギー研究会第 44 回討論会, 発表番号 P21, (2018 年 12 月 7 日)
- 2 市村悠, 川崎祐美, 関藤孝之, 河田美幸, 塩基性アミノ酸蓄積に関わる液胞トランスポーターの生理的役割について, 第 36 回 YEAST WORKSHOP, 発表番号 P-50, O-46, (2018 年 11 月 3 日)
- 3 川崎祐美, 市村悠, 関藤孝之, 河田美幸, 新規液胞膜局在性トランスポーターによる塩基性アミノ酸輸送活性について, 第 36 回 YEAST WORKSHOP, 発表番号 P-51, O-47, (2018 年 11 月 3 日)
- 4 原田悠希, 真鍋邦男, 池田紘一, 田中志穂, 佐藤明香音, 河田美幸, 関藤孝之, 出芽酵母 Ypq2 アルギニン/ヒスチジン交換輸送活性に対する PQ モチーフ変異の影響評価, 第 91 回日本生化学会大会, 発表番号 3P-172, (2018 年 9 月 26 日)
- 5 市村悠, 川崎祐美, 田中志穂, 笠井瑠美, 関藤孝之, 河田美幸, 塩基性アミノ酸の液胞内蓄積に関与する出芽酵母新規液胞トランスポーター同定の試み, 第 91 回日本生化学会大会, 発表番号 2P-147, (2018 年 9 月 25 日)
- 6 上田大資, 津山愛美, 笠井瑠美, 関藤孝之, 河田美幸, 分裂酵母 PQ ループタンパク質 Stm1 によるアミノ酸輸送の検討, 酵母遺伝学フォーラム第 51 回研究報告会, 発表番号 P09, (2018 年 9 月 10 日)
- 7 川崎祐美, 市村悠, 田中志穂, 笠井瑠美, 関藤孝之, 河田美幸, 塩基性アミノ酸輸送に関わる新規液胞膜局在性トランスポーターの探索, 酵母遺伝学フォーラム第 51 回研究報告会, 発表番号 P21, (2018 年 9 月 10 日)
- 8 田中志穂, 原田悠希, 池田紘一, 真鍋邦男, 河田美幸, 関藤孝之, 出芽酵母液胞膜タンパク質 Ypq2 の解析, 酵母遺伝学フォーラム第 51 回研究報告会, 発表番号 P48, (2018 年 9 月 11 日)