The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	細胞育種に向けた遺伝子発現と表現型の網羅的情報の解析
Author(s)	吉川, 勝徳
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/23495
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

博甲 13569

細胞育種に向けた
遺伝子発現と表現型の網羅的情報の解析

2009 年 1 月

吉川　勝徳

細胞育種に向けた
遺伝子発現と表現型の網羅的情報の解析

提出先　　大阪大学大学院情報科学研究科

提出年月　2009 年 1 月

吉川　勝徳

学位取得に関わる発表論文

学術雑誌

[1] Katsunori Yoshikawa, Tadamasa Tanaka, Chikara Furusawa, Keisuke Nagahisa, Takashi Hirasawa, Hiroshi Shimizu. "Comprehensive phenotypic analysis for identification of genes affecting growth under ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae.*" FEMS Yeast Research. DOI: 10.1111/j.1567-1364.2008.00456.x, 2008.

[2] Katsunori Yoshikawa, Chikara Furusawa, Takashi Hirasawa, Hiroshi Shimizu. "Genome-wide analysis of effects of location and number of stress response element on gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*." J Biosci Bioeng. Vol. 106, pp. 507-510, 2008.

[3] Takashi Hirasawa[#], Katsunori Yoshikawa[#], Yuki Nakakura[#], Keisuke Nagahisa, Chikara Furusawa, Yoshio Katakura, Hiroshi Shimizu, Suteaki Shioya. "Identification of target genes conferring ethanol stress tolerance to *Saccharomyces cerevisiae* based on DNA microarray data analysis." J Biotechnol. Vol. 131, pp. 34-44, 2007. (#Equally contributed)

国際会議

[1] Katsunori Yoshikawa, Tadamasa Tanaka, Keisuke Nagahisa, Chikara Furusawa, Hiroshi Shimizu. "Integration analysis of phenome and transctiptome in yeast under stress conditions." XXIIIrd International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology, Yeast 24 (S1), p. S140, Melbourne, Australia. July 1-6, 2007.

[2] Katsunori Yoshikawa, Takashi Hirasawa, Keisuke Nagahisa, Chikara Furusawa, Suteaki Shioya, Hiroshi Shimizu. "The relationship between the gene expression and phenotype for breeding cell." 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress. (5P-B-182), p. 782. Kyoto, Japan. June 18-23, 2006

[3] Katsunori Yoshikawa, Gaurav Pandey, Takashi Hirasawa, Yoshio Katakura, Keisuke Nagahisa, Chikara Furusawa, Suteaki Shioya, Hiroshi Shimizu. "Molecular breeding of osmotic stress tolerant yeast strains based on clustering analysis of gene expression." 7th Asia Pacific Biochemical Engineering Conference. (P3–081), 4 pages, Jeju, Korea. May 15-19, 2005.

[4] Katsunori Yoshikawa, Gaurav Pandey, Takashi Hirasawa, Yoshio Katakura, Keisuke Nagahisa, Chikara Furusawa, Suteaki Shioya, Hiroshi Shimizu. "Analysis of DNA microarray data using self-organizing map and hierarchical clustering." 10th Asia Pacific Confederation of Chemical Engineering. (3P-01-055), 10 pages. Kitakyushu, Japan. October 17-21, 2004.

内容梗概

生物を用いた物質生産は、食料や医薬品、エネルギーなどの分野に至り、我々の生活に欠かせないものとなっている。物質生産効率の向上は有用物質生産のコストの削減、引いては工業化につながり、古くから物質生産効率の向上を目指して細胞の育種が行われてきた。近年の分子生物学や測定技術の発達により、ゲノム配列や遺伝子発現情報などの細胞の網羅的な情報が利用可能となり、これらを用いた新たな効率的な細胞育種法の開発が期待されている。そこで、網羅的に遺伝子発現情報の解析が可能であり、また高い汎用性を持つ DNA マイクロアレイに着目し、DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現情報による細胞育種法の開発に向けて研究を行った。遺伝子発現情報にもとづく細胞育種の先行研究として、解析環境下で発現量が大きく増加した遺伝子を操作することで、物質生産効率の向上など育種の成功例が報告されている。しかし、実際には、発現量が増加した遺伝子を破壊あるいは過剰発現などにより操作しても表現型が変化しないことは多く、どのような遺伝子発現変化を示した遺伝子を解析対象にすれば育種につながるのか、その体系的な方法論は確立されていない。そこで、本研究では、遺伝子発現情報にもとづく細胞育種法の開発に向け、遺伝子発現情報と 1 遺伝子破壊による表現型変化の関連性の解析などにより、どのような細胞状態の遺伝子発現情報を用い、どのように発現が変化する遺伝子を選択することが、遺伝子発現情報から細胞の表現型に影響を与える遺伝子の抽出につながるのかを明らかとすることを目的とした。研究には、解析対象の生物として、アルコール飲料やバイオエタノールなどの様々な有用物質生産に用いられる出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用い、解析対象の環境として、それらの物質生産過程で酵母細胞が曝され生産効率の低下を引き起こすエタノールや浸透圧ストレスについて研究を行った。

本学位論文は第 1 章から第 5 章より構成される。

第 1 章では、本研究の背景と目的、および、本論文の構成について記述した。

第 2 章では、遺伝子発現情報にもとづく細胞育種法の開発に向け、エタノール環境下における遺伝子発現情報にもとづきエタノール耐性酵母の育種を試みた。エタノール耐性能の異なる 2 種類の酵母株を用い、それらのエタノール環境下における遺伝子発現情報を DNA マイクロアレイにより解析した。得られた遺伝子発現情報から、互いに異なる遺伝子発現の経時変化を示す遺伝子を育種候補として選択した。さらに、それらの遺伝子の破壊株をエタノール環境下で培養し、破壊がエタノール感受性を引き起こす遺伝子を選択した。その結果、トリプトファン合成に関連する遺伝子が選択され、それらの遺伝子の過剰発現株を構築したところ、エタノール耐性株の育種に成功した。

第 3 章では、全ての遺伝子について遺伝子発現情報と 1 遺伝子破壊による表現型の変化の関連性を明らかとすることを目指した。そのため、ハイスループットかつ再現性が高い培養系を構築し、酵母の全ての遺伝子について、1 遺伝子を破壊した株の比増殖速

度を測定することで遺伝子破壊が表現型に与える影響を解析した。このように再現良く定量的に遺伝子破壊が増殖に与える影響を解析することで、破壊が比較的小さな増殖速度の変化を引き起こす遺伝子の選択を可能にした。この系を用いて1遺伝子破壊株を非ストレス環境下とエタノール環境下で培養し、破壊が非ストレス環境下で増殖速度の低下を引き起こす遺伝子を除くことで、エタノール環境下でのみ増殖に必要とされる遺伝子の選択を行った。まず、それらの選択された遺伝子の機能を解析した結果、ペルオキシソームがエタノール環境下での増殖に必要な機能であることを新規に発見した。次に、第2章で取得したエタノール耐性能の異なる2株の遺伝子発現情報を用い、選択したエタノール環境下で増殖に必要な遺伝子について、遺伝子発現情報の特徴の解析を行った。その結果、エタノール耐性能の異なる株のエタノール環境下や非ストレス環境下で異なる発現変化を示した遺伝子を選択することが、エタノール環境下で必要な遺伝子の抽出につながる可能性が高いことが示唆された。また、破壊がエタノール感受性を引き起こした遺伝子の過剰発現株を構築したところ、エタノール耐性は向上しなかった。しかし、その遺伝子を単に過剰発現するだけではなく、関連する反応経路の制御機構など生物学知見を考慮することで、エタノール耐性酵母の育種につながる可能性が示唆された。

第4章では、ストレス環境下における遺伝子発現制御機構の理解に向け、ストレス環境下で多くの遺伝子の発現制御に関わるシスエレメント Stress response element (STRE) が遺伝子発現に与える影響を解析した。その結果、ORF 上流 51 - 300 bp に STRE が存在するとストレス環境下で遺伝子発現量の増加が引き起こされ、また存在数が多いほど発現量が増加する確率が高く、さらに、発現量が大きく増加する傾向にあることを明らかとした。得られた結果は、ストレス環境下における遺伝子発現制御や、第2章で解析したエタノール耐性能の異なる株間で異なる発現変化を示した遺伝子について発現変化の違いをゲノム配列情報から理解するための基礎情報になると期待される。

第5章では、本研究で得られた知見をまとめ、遺伝子発現情報が細胞育種にどのように貢献できるのかについて論じ、また、今後の展望について述べた。

目次

第 1 章 序論 1
1. 1 研究の背景 1
1. 2 細胞育種法 2
1. 3 遺伝子発現情報を用いた細胞育種 3
1. 4 DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析 3
1. 5 遺伝子発現情報にもとづく既応の細胞育種と有効性 5
1. 6 本研究の目的および論文の構成 6
第 2 章 遺伝子発現情報にもとづくエタノール耐性酵母の育種 10
2. 1 緒言 10
2. 2 実験方法及び実験材料 12
2. 2. 1 使用菌株 12
2. 2. 2 培地 12
2. 2. 3 酵母の培養 12
2. 2. 4 1 遺伝子破壊株のエタノール感受性の評価 13
2. 2. 5 DNA マイクロアレイ解析 13
2. 2. 6 クラスタリング解析 14
2. 2. 6. 1 自己組織化マップ 14
2. 2. 6. 2 階層的クラスタリング 15
2. 2. 6. 3 自己組織化マップと階層的クラスタリングを組み合わせ DNA マイクロアレイの誤差を考慮したクラスタリング方法 16
2. 2. 7 遺伝子組換え実験 18
2. 2. 7. 1 FY834 株のトリプトファン合成酵素遺伝子 *TRP1* の復帰株の構築 18
2. 2. 7. 2 発現ベクターpAURΔCENARS の構築 18
2. 2. 7. 3 遺伝子過剰発現株の構築 19
2. 2. 8 ノーザン解析 21
2. 2. 9 細胞内アミノ酸濃度の測定 22
2. 2. 9. 1 細胞内アミノ酸の抽出 22
2. 2. 9. 2 誘導体化 22
2. 2. 9. 3 HPLC によるアミノ酸濃度測定 23
2. 2. 10 遺伝子機能分類 23
2. 2. 11 統計解析 24
2. 3 結果 25
2. 3. 1 酵母の増殖に対するエタノールストレスの影響 25
2. 3. 2 エタノール環境下における遺伝子発現情報のクラスタリング解析 26

2.3.3 クラスタリング結果にもとづくエタノール耐性酵母の育種候補遺伝子の選択 29
2.3.4 遺伝子破壊株コレクションを用いたエタノール感受性試験 35
2.3.5 *TRP* 遺伝子の発現量および細胞内トリプトファン濃度の解析 36
2.3.6 *TRP* 遺伝子の過剰発現のエタノール耐性への影響 37
2.3.7 トリプトファンの培地への添加およびトリプトファン取り込み酵素遺伝子の過剰発現のエタノール耐性への影響 38
2.4 考察 40
2.5 結言 43
第3章 遺伝子発現情報と1遺伝子破壊株の表現型変化の関連性解析 44
3.1 緒言 44
3.2 実験方法及び実験材料 47
3.2.1 使用菌株 47
3.2.2 培地 47
3.2.3 培養方法 (96ウェルマイクロタイタープレート) 47
3.2.3.1 培養用ストックの作成 47
3.2.3.2 培養 48
3.2.3.3 比増殖速度の計算 48
3.2.4 坂口フラスコによる培養 50
3.2.5 遺伝子機能分類 50
3.2.6 統計解析 51
3.2.7 1遺伝子過剰発現株の構築 51
3.3 結果 53
3.3.1 エタノール感受性株と耐性株の選択 53
3.3.2 本研究と先行研究で選択されたエタノール感受性遺伝子の比較 55
3.3.3 エタノール感受性遺伝子の機能に関する解析 57
3.3.3.1 エタノール感受性遺伝子の機能解析 57
3.3.3.2 *PEX* 遺伝子破壊株とエタノール感受性 61
3.3.4 遺伝子破壊が非ストレス環境下で増殖速度の低下を引き起こすがエタノール感受性を引き起こさない遺伝子 63
3.3.5 エタノール感受性遺伝子と浸透圧感受性遺伝子の比較 66
3.3.5.1 エタノール特異的感受性遺伝子 68
3.3.5.2 エタノールと浸透圧の両ストレスに共通の感受性遺伝子 71
3.3.5.3 浸透圧特異的感受性株 73
3.3.5.4 エタノール耐性遺伝子と浸透圧耐性遺伝子の関連性 75
3.3.6 1遺伝子破壊株の表現型変化と遺伝子発現情報の関連性の解析 77

3. 3. 6. 1 エタノール感受性遺伝子とエタノール環境下における遺伝子発現変化の関連性 77
3. 3. 6. 2 エタノール環境下における遺伝子発現情報のクラスタリング結果とエタノール感受性遺伝子の関係 84
3. 3. 6. 3 非ストレス環境下における遺伝子発現情報とエタノール感受性遺伝子の関係 90
3. 3. 6. 4 ストレス応答遺伝子とエタノール感受性遺伝子の関係 93
3. 3. 6. 5 エタノール感受性遺伝子の過剰発現のエタノール耐性への影響 95
3. 4 考察 97
3. 4. 1 エタノール感受性遺伝子の機能に関する考察 97
3. 4. 2 1 遺伝子破壊株の表現型変化と遺伝子発現情報の関連性解析に関する考察 98
3. 5 結言 102
第4章 網羅的遺伝子発現情報にもとづく Stress Response Element の存在位置と存在数が遺伝子発現に与える影響の解析 104
4. 1 緒言 104
4. 2 実験方法及び実験材料 106
4. 2. 1 ゲノム配列および STRE の抽出 106
4. 2. 2 遺伝子発現情報 106
4. 2. 3 無作為化検定 106
4. 3 結果 107
4. 3. 1 STRE の存在位置と遺伝子発現変化の関連性 107
4. 3. 2 STRE の存在数と遺伝子発現変化の関連性 109
4. 3. 3 STRE 間の距離と遺伝子発現変化の関連性 111
4. 4 考察 112
4. 5 結言 114
第5章 結言 115
参考文献 119
謝辞 133
付録　本論文の関連文献と各章の対応表 134

第1章　序論

1.1　研究の背景

微生物を始め、生物を用いた物質生産は我々の生活に欠かせないものである。例えば、酵母を用いた物質生産においては、ビールやワインなどのアルコール飲料、パンや醤油などの発酵食品の生産が行われている。さらに、近年では、酵母などの微生物を用いて、バイオマスを原料とし、バイオエタノール (Lin and Tanaka, 2006; Hahn-Hägerdal *et al.*, 2006) やプラスチックの原料となる乳酸など (Ishida *et al.*, 2006a, b)、様々な物質の生産が行われている。これらの物質生産効率を向上させるため、古くから細胞育種が行われてきた。物質生産効率を低下させる原因の一つとして、物質生産過程において細胞が様々なストレス環境下に曝されることにある。例えば、酵母を用いた物質生産過程では、酵母自身が生産するエタノールの培養液への蓄積によるエタノールストレスや、培養初期の高糖濃度や培養経過に伴う生産物質の培養液への蓄積による浸透圧ストレス、他にも酸化ストレスや低 pH ストレスなど様々なストレス環境下に酵母は曝される (Attfield, 1997; Gibson *et al.*, 2007)。その結果、増殖速度や物質生産効率の低下が引き起こされる。そのため、ストレス環境下でも増殖速度が低下しないストレス耐性株の育種も盛んに行われている。

細胞育種の方法としては、古くから、紫外線や変異誘導物質などにより細胞のゲノムに変異を導入し、得られた多数の変異体から目的とする性質をもつ細胞のスクリーニングを繰り返しすことにより行われてきた。この方法により、エタノール耐性株 (Nitta *et al.*, 2000) やアミノ酸生産菌 (Demain, 2000) などの多くの有用微生物の育種が行われてきた。しかし、変異処理により多数の変異が導入され、どのような変異がどのように細胞内の状態を変えた結果、細胞が目的の性質を持ったのかを明らかにすることは困難であり、細胞の性質の変化の原因がブラックボックスのまま解明されないこともしばしばある。そのため、有用な性質をもつ細胞が得られても、その原因の特定に至らないため、他の細胞に同じ性質を付与することが困難であり、新たな育種に活かし難い。また、多くの場合、変異処理により多数の変異が導入されるため、目的とする性質が向上しても、それ以外の不要または有害な性質も細胞に付与されることも多い (Ohnishi *et al.*, 2002)。

遺伝子の組換え技術が開発され (Cohen *et al.*, 1973)、分子生物学の発達により現在では遺伝子の破壊や過剰発現、変異の導入など自由に遺伝子を操作することが可能となった。また、人為的に遺伝子の改変を行う手法であるため、導入した遺伝子操作と表現型の変化の対応関係を理解した上で育種が可能となった。しかし、例えば、物質生産の向上を目的とした時、多くの場合知見と経験にもとづき育種候補遺伝子が選択されるため、

その物質生産に関わる既知の反応に関連する遺伝子が選択されることが多い。そのため、探索範囲が狭く、育種に有効な細胞機能を逃している可能性がある。

このように細胞育種において、多くの場合、育種は偶然や経験にもとづき行われており、有用な性質のみの細胞への付与や、育種候補遺伝子の探索範囲の拡大など、改善すべき点がある。微生物の物質生産効率の向上に向け、新たな細胞育種の方法の開発が望まれている。

1.2 細胞育種法

近年の分子生物学や測定技術、計算技術の発展により細胞の網羅的な情報が利用可能となり、これらを用いた新たな細胞育種法の確立が期待されている。以下に細胞育種法の例を示す。

ゲノムプロジェクトにより様々な生物種の全ゲノム配列が解読された。この情報を利用し、有用な性質を持つ変異株のゲノム配列と比較することで、導入された変異の特定が可能である。前節で述べたように変異処理では複数の変異が入り不必要な性質も付与されることが多い。そこで、まず、ゲノム配列を比較することで特定した変異株の変異を野生株に導入し、表現型の変化を解析することで、有用な性質を向上させる有効変異を特定する。次に特定した (複数の) 有効変異を野生株に導入することで、不必要な性質は付与されず、有用な性質のみ付与された株を構築するというゲノム育種が行われている (Ohnishi *et al.*, 2005)。

DNA マイクロアレイの開発は、細胞内の全ての遺伝子の発現量の測定を可能とした (Schena *et al.*, 1995; DeRisi *et al.*, 1997)。解析環境下において発現量が増加した遺伝子はその環境下において重要な機能を担っていると期待される。そこで、そのような遺伝子を破壊や過剰発現することによりストレス耐性能や物質生産能の向上など細胞の育種が行われている (Imaizumi *et al.* 2005; Bro *et al.*, 2005; Hirasawa *et al*, 2006a)。

コンピュータシミュレーションにもとづく育種も行われている。既知の代謝反応やゲノム配列にもとづき推定した代謝反応などを組み合わせることで、細胞内の全代謝反応をコンピュータ上で再構築し、*in silico* で細胞内の代謝反応を予測する方法が開発された (Genome-scale model, Edwards and Palsson, 2000; Förster *et al.*, 2003)。このモデルを用いることで、予め *in silico* で代謝反応の削除 (遺伝子の欠損) や追加 (遺伝子の導入) による物質生産能の変化を予測することが可能である。この方法を利用して、スレオニンの高生産株が育種された (Lee *et al.*, 2007)。

多くの遺伝子の転写制御に関わる転写因子に着目した育種も行われている。転写制御因子タンパク質をコードする遺伝子にランダム変異を導入することで、多くの遺伝子の発現量が変化した変異体集団を作成し、目的の性質を持つ細胞をスクリーニングする方

法が開発された (gTME; global transcription machinery engineering)。この方法を用いてエタノールや浸透圧ストレス耐性株の育種が行われている (Alper *et al.*, 2006; Alper and Stephanopoulos, 2007)。

このように、少数の要素の機能や限られた反応の改変のみでなく、細胞システムのモデルや網羅的情報を利用して探索範囲を拡大したり開発時間を短縮しようという試みが多く行われている。

1.3 遺伝子発現情報を用いた細胞育種

このように育種の効率化に向け、様々な方法が開発されている。前節で例に挙げたゲノム育種や Genome-scale model、gTME 法などは育種対象の探索範囲を従来法と比較して拡大するという点で有用な育種法である。また、DNA マイクロアレイは、基本的には全ての遺伝子発現情報を一度に解析可能な強力なツールであり、育種候補遺伝子の探索を全遺伝子まで拡大する。さらに、核酸の相互作用を利用した技術であるため、ゲノム配列が解読されていない生物においても、cDNA やゲノム断片をプローブとして用いることで遺伝子発現量を解析することが可能である。このように DNA マイクロアレイは汎用性、網羅性の観点において大きな長所を持つ。遺伝子発現情報により育種候補遺伝子を選択した後は、遺伝子操作により遺伝子改変が可能である。このような点から、本研究では遺伝子発現情報を用いた細胞育種法の開発に向け研究を行った。DNA マイクロアレイの原理について次節に記載した。

1.4 DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析

DNA マイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現情報の解析原理を紹介する。DNA を構成する塩基成分には、アデニン (A)、チミン (T)、グアニン (G)、シトシン (C) の 4 種類が存在し、A と T、G と C がそれぞれ水素結合を形成する。DNA マイクロアレイの原理は、DNA が相補する塩基配列 (A=T、G≡C) と相互作用により結合すること (ハイブリダイゼーション) にある。具体的にはガラスやシリコン基板上に解析対象の DNA 配列と相補的な塩基配列をプローブとして固定する。細胞から抽出した RNA から標識した cDNA を作成し、プローブとハイブリダイゼーションさせ、その蛍光強度を遺伝子発現量として測定する。現在利用されている DNA マイクロアレイには主に 2 種類存在し、スタンフォード型アレイ (Schena *et al.*, 1995; Shalon *et al.*, 1996) と Affimetrix 社による Gene Chip (Lockhart *et al.*, 1996) がある。スタンフォード型の DNA マイクロアレイは、プローブとして cDNA や 60 mer 程度のオリゴ DNA をガラスなどの基板上に機械的に、

または、インクジェット方式により格子状にスポットしたものである。cDNA をプローブに用いることで、ゲノム配列が明らかでない生物の遺伝子発現解析にも利用可能である。主に 2 種類の RNA サンプルにおける遺伝子発現量の比の解析に用いられる。具体的には、2 種類の細胞から RNA を抽出し、逆転写することで cDNA を作成しそれぞれ異なる蛍光色素で標識する。蛍光標識した 2 種類の cDNA をマイクロアレイ上のプローブと競合的にハイブリダイゼーションさせる。各スポットについて 2 種類の蛍光強度を測定し、その蛍光強度比をそのプローブに対応する遺伝子の両サンプルにおける遺伝子発現量比として用いる (Fig. 1.1)。Affimetrix 社による Gene Chip は、プローブとして各遺伝子に特異的な配列に相補する 25 mer 程度のオリゴ DNA をシリコン基盤上で光リソグラフィー技術 (Fodor *et al*., 1991) により合成したものである。スポット操作が必要でないため、スタンフォード型と比べ高密度にプローブが配置されている。Gene Chip では、抽出した RNA を cDNA に逆転写し、さらにビオチン標識した cRNA に転写する。ビオチン標識した cRNA をプローブにハイブリダイゼーションさせ、フィコエリトリン標識ストレプトアビジンと反応させ、その蛍光強度を測定することで、各プローブに対応する遺伝子の発現量の絶対値を測定することが可能である。

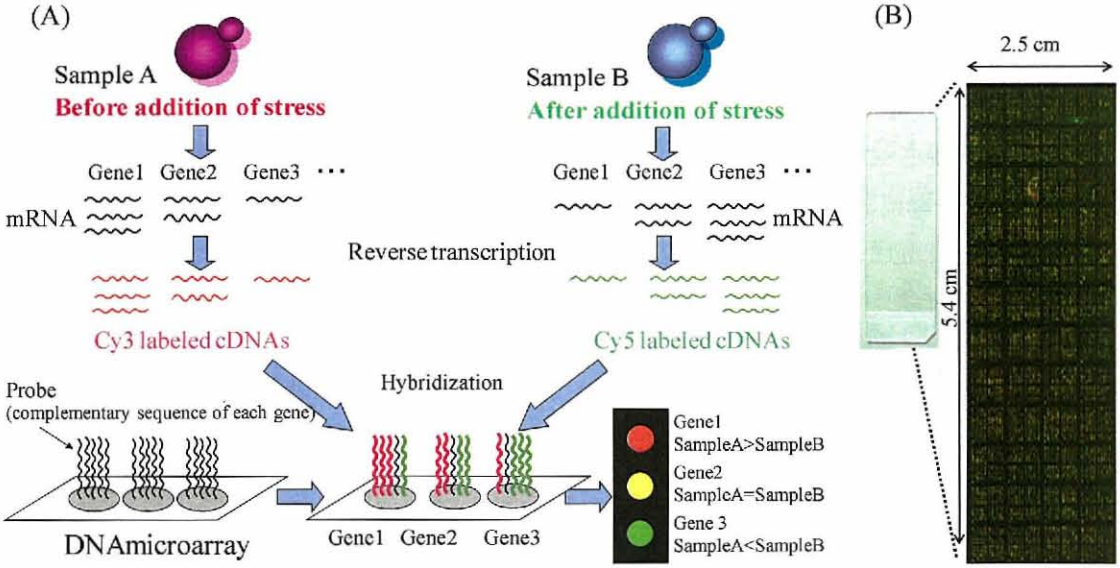

Fig. 1.1. DNA マイクロアレイを用いた実験例。(A) 2 種類のサンプルから mRNA を抽出し、逆転写により cDNA を合成する。この時、それぞれのサンプルを異なる蛍光色素 (Cy3 と Cy5) により標識する。DNA マイクロアレイ上には、解析対象の遺伝子と相補配列の核酸プローブがスポットされており、標識した cDNA をプローブとハイブリダイゼーションすることで、両サンプルが核酸プローブと競合的に結合する。各スポットについて 2 種類の蛍光色素の蛍光強度を測定し、その蛍光強度の比を対応する遺伝子についての 2 サンプルの遺伝子発現量の比として用いる。例えば、2 種類のサンプルをストレスに曝す前後の細胞を用いることで、ストレスによる遺伝子発現変化を解析することが可能である。(B) 実際の DNA マイクロアレイ (Yeast chip ver.2、DNA チップ研究所)。2.5 cm × 5.4 cm の領域に出芽酵母の約 7000 の遺伝子に対応するプローブがスポットされている。各丸点がある 1 遺伝子に対応するプローブを示す。

1.5 遺伝子発現情報にもとづく既応の細胞育種と有効性

DNA マイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現情報を用いた育種において、解析環境において大きく発現量が増加した遺伝子がその環境における細胞状態 (表現型) にとって重要な役割を担っていると考えられ、しばしば育種候補に挙げられる。例えば、ストレス環境へ細胞を曝したとき、遺伝子発現量が増加した遺伝子は、ストレス環境に適応するために必要な細胞機能に関連していると考えられる。また、表現型の異なる細胞間で異なる遺伝子発現量を示す遺伝子は、その表現型の違いを引き起こす原因に関連していると考えられる。DNA マイクロアレイによる遺伝子発現情報を用いた細胞育種

の例として、大腸菌において定常期に発現量が増加した *rmf* 遺伝子の破壊によるリジン高生産株の育種 (Imaizumi *et al*. 2005)、ガラクトース取込み効率の異なる酵母の遺伝子発現量を比較し、取込み効率が高い酵母でより高発現している遺伝子を取込み能の低い酵母で過剰発現させたことによるガラクトース取込み能を向上させた酵母の育種 (Bro *et al*., 2005)、酵母において浸透圧ストレス環境下で発現量が大きく増加した遺伝子の過剰発現による浸透圧ストレス耐性の育種 (Hirasawa *et al*, 2006a)、酵母を用いた乳酸生産過程において発現が大きく増加した遺伝子の破壊による乳酸高生産株の育種 (Ookubo *et al*., 2008)、など様々な細胞の育種の研究が報告されている (Lee *et al*., 2007; Pandey *et al*., 2007)。

このように、解析環境で発現量が増加した遺伝子に着目した育種の成功例が報告されている。しかし、発現量が増加した遺伝子を破壊や過剰発現をしても表現型が変化しないことは多く、そもそも、遺伝子発現量が増加した遺伝子に、解析環境下における表現型に関連する遺伝子が多く含まれているのかは明らかになっていない。また、どのような細胞状態の遺伝子発現情報を用いることが解析対象の環境で重要な役割を担う遺伝子の抽出につながるのかについても分かっていない。例えば、環境変化に曝された直後の細胞の遺伝子発現変化の情報と、環境変化からしばらく時間が経ち環境に適応した細胞の遺伝子発現情報のどちらにその環境で生育するために重要な遺伝子の抽出につながる情報が多く含まれているのかは分かっていない。もしくは、環境変化に対する遺伝子発現の経時変化の情報の解析が、そのような遺伝子の抽出につながるのかもしれない。

このように、遺伝子発現情報にもとづく細胞育種の成功例が報告されているが、実際には、どのような遺伝子発現変化を示した遺伝子を解析対象にすればいいのか、どのような細胞状態における遺伝子発現情報が必要であるのか、など、遺伝子発現情報にもとづく細胞育種の体系的な方法論は未だ確立されていない。すなわち、遺伝子発現変化と遺伝子破壊や過剰発現による表現型の変化に関連性があるのかが分かっていないのが現状である。

1.6 本研究の目的および論文の構成

微生物を用いた物質生産は我々の生活において欠かせないものであり、物質生産効率の向上はコストの削減、引いては有用物質生産の工業化につながる。そのため、効率的な細胞育種法の開発は常に望まれている。そこで、解析対象生物を問わない汎用性の高さなどを考慮し、DNA マイクロアレイによる遺伝子発現情報を用いた育種法を開発できれば、多くの微生物において利用可能な有用な方法になると考えられる。本研究では、遺伝子発現情報にもとづく細胞育種法の開発に向け、どのような細胞状態の遺伝子発現情報を用い、どのような発現変化する遺伝子を選択することで、遺伝子発現情報から細

胞の表現型に影響を与える遺伝子を抽出することができるのかを明らかとすることを目的とした。

解析対象の微生物として出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用い、解析環境としてエタノールと浸透圧ストレスを用い、エタノール耐性酵母の育種を目指した。酵母はアルコール飲料やバイオエタノールなど物質生産において有用な微生物である。また、選択したストレスは、酵母を用いた物質生産過程において酵母細胞が受ける主要なストレスであり、酵母の増殖速度や物質生産効率の低下を引き起こす。そのため、これらのストレスに対する遺伝子発現応答などの知見やストレス耐性酵母を育種することは、物質生産効率の向上につながる有用な結果である。そのため、本研究では、酵母を用い、エタノールや浸透圧ストレス環境を解析対象とした。

本学位論文は第 1 章から第 5 章より構成される (概要を Fig. 1.2 に示す)。

第 1 章では、本研究の背景として遺伝子発現情報を用いた育種に関する研究例と問題点、および、本論文の目的と構成について記述した。

第 2 章では、遺伝子発現情報にもとづく細胞育種の方法の開発に向け、遺伝子発現情報にもとづきエタノール耐性酵母の育種を試みた。エタノール耐性の異なる 2 種類の酵母を用い、それらのエタノール環境下における遺伝子発現の経時変化を DNA マイクロアレイにより解析した。クラスタリング解析により遺伝子を発現パターンの類似度に応じてグループ化した。エタノール耐性に関連する遺伝子は、エタノール耐性能の異なる株で異なる発現パターンを示すと推測し、そのような遺伝子が含まれるクラスタに含まれる遺伝子を育種候補として選択した。さらに育種候補の遺伝子を絞り込むために、それらの遺伝子の 1 遺伝子破壊株のエタノール感受性を調べた。その結果、トリプトファン合成に関連する遺伝子の 1 遺伝子破壊株がエタノール感受性を示すことが分かった。それらの遺伝子の 1 遺伝子過剰発現株を構築したところ、酵母のエタノール耐性を向上させることに成功した。

第 3 章では、遺伝子発現情報から遺伝子破壊が表現型に影響を与える遺伝子の抽出方法の開発を目指し、遺伝子発現情報と 1 遺伝子破壊による表現型の変化の関連性の解析を行った。そのため、酵母の全ての遺伝子について 1 遺伝子を破壊した株をエタノール環境下で培養し比増殖速度を測定することで、遺伝子破壊が表現型に与える影響を定量的に解析した。親株の比増殖速度を比較することで、破壊がエタノール感受性を引き起こす遺伝子を選択した。まず、選択した遺伝子の機能を解析することで、エタノール環境下で増殖に必要とされる細胞機能の解析を行った。次に、第 2 章で用いた酵母のエタノール環境下における遺伝子発現情報や非ストレス環境下における遺伝子発現情報を用い、破壊がエタノール感受性を引き起こす遺伝子について、遺伝子発現変化の特徴の抽出を試みた。この結果より、遺伝子発現情報を用いた育種において、どのような細胞状態の遺伝子発現情報を用い、どのような発現変化をする遺伝子を選択することが、その環境下で必要とされる遺伝子を効率的に抽出することが可能であるかを明らかにす

ることを試みた。また、抽出した遺伝子を過剰発現することでエタノール耐性酵母の育種につながるかを評価した。これらの結果をふまえ、第 2 章の結果を評価するとともに、遺伝子発現情報にもとづく細胞育種について論じた。

第 4 章では、遺伝子発現情報をもとにストレス環境下において多くの遺伝子の発現量の増加に関連するシスエレメント Stress Response Element (STRE) について解析を行った。遺伝子の発現は、発現量を制御する転写因子 (トランスエレメント) が ORF 上流に存在する特異的な認識配列 (シスエレメント) に結合することで制御される。STRE はストレス耐性にとって重要な役割を担う因子であり、例えば、STRE に結合し転写制御を行うトランスエレメントをコードする *MSN2* と *MSN4* の二重欠損はストレス感受性を引き起こすことや (Martínez *et al.*, 1996; Kandror *et al.*, 2004; Domitrovic *et al.*, 2006)、ストレス耐性に必要な多くの遺伝子の発現量の制御に関わっていることが報告されている (Kandror *et al.*, 2004)。このようなことから、STRE と遺伝子発現変化の関連性を理解することはストレス環境下における遺伝子発現制御の基礎的な理解につながる。そこで、ORF 上流における STRE の存在位置や存在数がストレス環境下における遺伝子発現量の増加へ与える影響を解析した。得られた知見は、ストレス環境下における遺伝子発現制御の理解や、また、第 2 章で解析したストレス耐性能の異なる株間で異なる発現変化を示した遺伝子について、ゲノム配列情報から発現変化の違いを理解するための基礎情報にもなると期待される。

第 5 章では、本研究で得られた知見をまとめ、遺伝子発現情報が細胞の育種にどのように貢献できるのかについて論じ、その結果を踏まえて今後の展望について論じた。

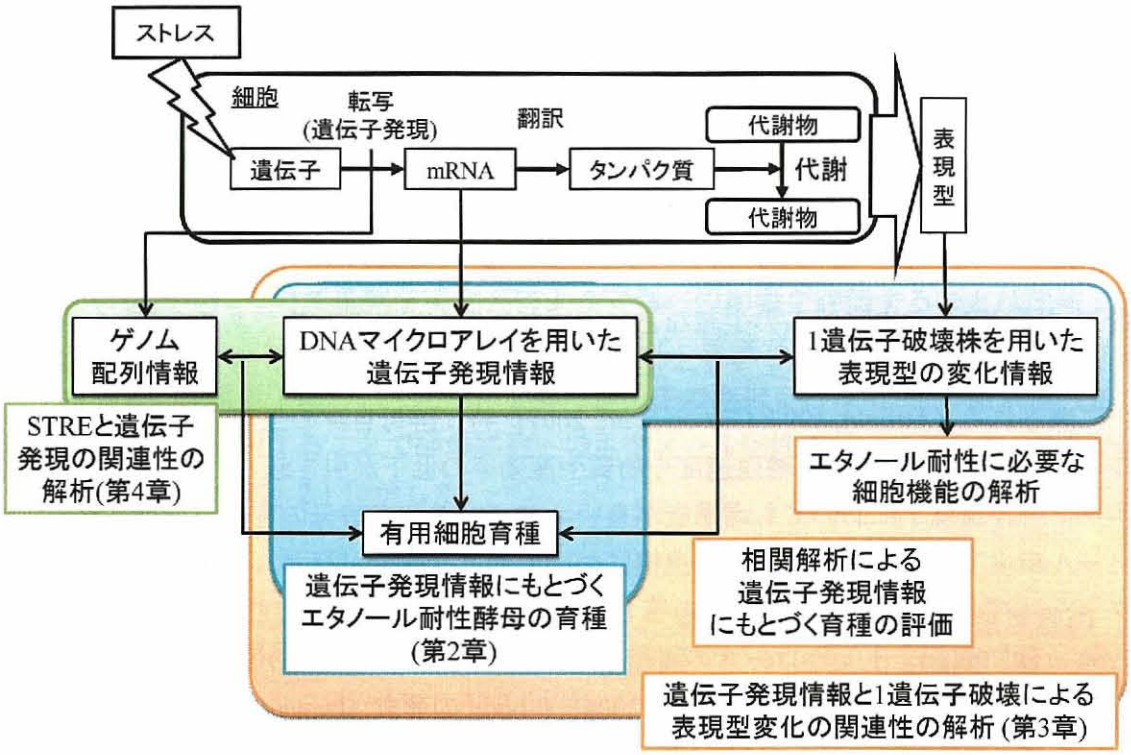

Fig. 1.2. 本論文の概要

第2章　遺伝子発現情報にもとづくエタノール耐性酵母の育種

2.1　緒言

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* はビールやワインなどのアルコール飲料の生産や、近年ではバイオエタノールの生産などに用いられる有用な微生物である。それらの物質生産過程において、酵母はエタノールや浸透圧、酸化ストレスなど様々なストレス環境下に曝される (Attfield, 1997; Gibson *et al.*, 2007)。特に酵母自身の生産物であるエタノールが主なストレスとなり、増殖速度や物質生産効率の低下が引き起こされる。そのため、エタノール環境下においても増殖能が良いエタノール耐性酵母の育種が期待され、エタノール環境下における酵母の応答機構について様々な研究が行われてきた。例えば、エタノール環境下における酵母の応答として、細胞膜の不飽和脂肪酸の組成の変化や (You *et al.*, 2003)、トレハロースの蓄積 (Kim *et al.*, 1996; Lucero *et al.*, 2000)、核からのmRNA の選択的輸送 (Takemura *et al.*, 2004)、P-body の形成 (Izawa *et al.*, 2007) などが明らかとされてきた。現在もなお、酵母のエタノール耐性に関する研究が広く行われている。

マイクロアレイが開発されたことにより、細胞内の全ての遺伝子の発現情報を解析することが可能となった (Schena *et al.*, 1995; DeRisi *et al.*, 1997)。エタノール環境下における酵母の遺伝子発現情報を網羅的に解析することで、エタノール環境下における細胞状態を遺伝子発現レベルで理解でき、新たなエタノール耐性に関連する細胞機能の抽出やエタノール耐性酵母の育種につながると期待される。これまでに、網羅的な遺伝子発現情報にもとづく細胞育種が行われ、成功例が報告されている (Imaizumi *et al.*, 2005; Hirasawa *et al.*, 2006a; Ookubo *et al.*, 2008)。多くの研究において、解析対象の環境下において遺伝子発現が増加した遺伝子が、その環境下にとって重要な機能を担っていると推測され、そのような遺伝子を破壊や過剰発現をすることでストレス耐性能や物質生産能の向上といった育種が試みられている。しかし、遺伝子発現量が増加した遺伝子を操作することが細胞育種に結びつくとは限らず、遺伝子発現情報にもとづく細胞育種において体系的な方法論はなく、試行錯誤的に育種が行われているのが現状である。遺伝子発現情報にもとづく育種の方法論を開発することができれば、育種の効率化を大きく進めると期待される。そこで、本章では、遺伝子発現情報にもとづく育種法の開発に向け、遺伝子発現情報にもとづきエタノール耐性酵母の育種を試みた。

上述したように、単にエタノール環境下において遺伝子発現情報が増加した遺伝子を選択したとしても、その遺伝子がエタノール耐性に関連するとは限らない。そこで、エタノール耐性に関連する遺伝子はエタノール耐性能の異なる株で遺伝子発現変化が異なる確率が高いと期待して、エタノール耐性の異なる酵母を解析に用いた。エタノール

耐性能の異なる酵母として、生物学の研究で用いられている実験室酵母 FY834 株と、日本酒醸造に用いられているエタノール耐性酵母である清酒酵母 IFO2347 株を用い、エタノール環境下におけるそれぞれの遺伝子発現情報を DNA マイクロアレイにより解析した。得られた 2 株のエタノール環境下における遺伝子発現変化の情報をクラスタリング解析し、エタノール耐性能の異なる株間で遺伝子発現変化が異なる遺伝子が含まれているクラスタに含まれる遺伝子をエタノール耐性酵母の育種候補として選択した。それら全ての遺伝子について過剰発現などにより育種への影響を評価することは困難であるため、選択した遺伝子の 1 遺伝子破壊株を用いて、破壊がエタノール感受性を引き起こすエタノール環境下において増殖に必要な遺伝子の選択を行った。その結果選択された遺伝子を過剰発現することで酵母細胞へのエタノール耐性の付与を試みた。本章で述べる研究の概要を Fig. 2.1 に示した。

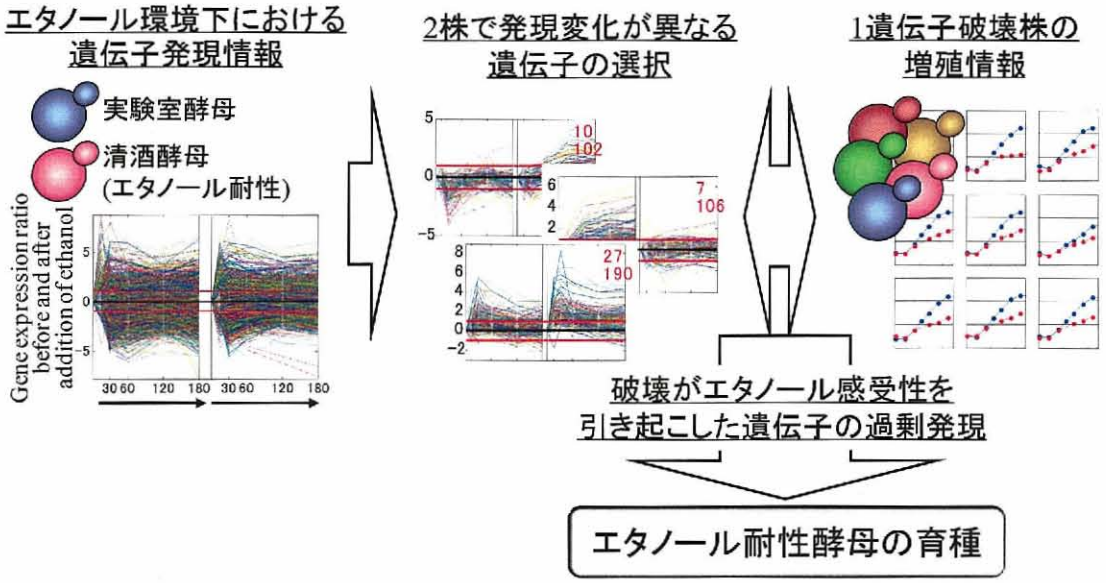

Fig. 2.1. 第 2 章の概要図

2. 2　実験方法及び実験材料

2. 2. 1　使用菌株

本章で用いた酵母菌株と大腸菌株を Table 2.1 に示す。酵母の 1 遺伝子破壊株コレクションは Open Biosystems (USA) より購入した。

Table 2.1. 第 2 章で用いた酵母菌株と大腸菌株

Strain	Genotype
Saccharomyces cerevisiae	
S288c	*MATα gal2*
FY834 (Winston *et al.*, 1995)	*MATα hisΔ200 ura3-52 leu2Δ1 lys2Δ202 trp1Δ63*
IFO2347	Not determined
BY4739 (Winston *et al.*, 1995)	*MATα leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0*
BY4742 (Winston *et al.*, 1995)	*MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0*
Yeast MAT alpha deletion strain collection (Winzeler *et al.*, 1999)	*ORF* :: *KanMX* based on BY4739 and BY4742
Escherichia coli	
JM109	*recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17*(r_K^- m_K^+), *e14*$^-$ (*mcrA*$^-$), *supE44, relA1, Δ (lac-proAB)/F'[traD36, proAB*$^+$, *lac I*^{q}, *lacZΔM15]*

2. 2. 2　培地

酵母の培養には、YPD 培地 (1% Bacto yeast extract、2% Bacto peptone、2% glucose) を用いた。目的に応じて YPD 培地に G418 (終濃度 150 μg/mL) や aureobasidin A (終濃度 250 ng/mL、Takara Bio) を添加した。酵母のトリプトファン栄養要求性の回復試験には SD 培地 (0.67% Yeast nitrogen base without amino acids、2% glucose、0.37% leucine、0.07% lysine、0.07% histidine、0.07% uracil、0.07% tryptophan) を用いた。寒天培地を作成する際は Agar (Wako Pure Chemical) を 2% (w/v) となるように加えた。

大腸菌の培養には、Lennox (L) 培地 (1% Bacto polypeptone、0.5% Bacto yeast extract、0.5 % NaCl、0.1% glucose) を用いた。プラスミドを保持した大腸菌の培養には L 培地に ampicillin (終濃度 50 μg/mL) を添加した。寒天培地を作成する際は Agar を 1.5% (w/v) となるように加えた。

2. 2. 3　酵母の培養

–80 °C で保存した菌体を、必要に応じ抗生物質を加えた YPD 寒天培地に画線植菌し、30 °C で 3 日間静置培養した。シングルコロニーを 5 mL の YPD 液体培地を入れた試験

管に植菌し、前培養として 30 °C で 24 時間振とう培養した (140 stroke/min)。前培養液 1 mL を 100 mL の YPD 液体培地を入れた 500 mL 容坂口フラスコに植菌し、30 °C、140 stroke/min で振とう培養を行った。増殖は分光光度計 UV mini-1240 (Shimadzu) を用い吸光度 (OD_{660}) により測定した。なお、培養途中に酵母にストレスを与える際は、対数増殖中期に当たる、FY834 株においては培養開始 5 時間後、IFO2347 株においては培養開始 4 時間後に、終濃度が 5、6、7、8% (v/v)となるように、それぞれ 25、30、35、40% (v/v) エタノール 25 mL を培地に添加した。また、ストレスを与えない際は、滅菌水 25 mL を培地に添加した。

2. 2. 4　1 遺伝子破壊株のエタノール感受性の評価

酵母の生育に必須でない遺伝子の 1 遺伝子破壊株セット Yeast MAT alpha collection (Open biosystems) を用いて 1 遺伝子破壊株のエタノール感受性評価をした。–80 °C で保存した 1 遺伝子破壊株を室温で融解し、100 μL の YPD 液体培地を入れた 96 ウェルマイクロタイタープレート (以下 96 ウェルプレート。Corning) に植菌し、30 °C で 1 日静置培養をした。100 μL の YPD 液体培地を入れた 96 ウェルプレートに 160 倍希釈した前培養液を植菌し、30 °C で静置培養し、1 時間毎に残留農薬測定装置プレートリーダー (HORIBA) で 495 nm の吸光度 (OD_{495}) を測定し、菌体濃度として用いた。プレートリーダーによる測定では培養液を希釈せずに測定を行っているため、高菌体濃度による吸光度の非線形性を補正する必要がある。そこで、複数の菌体溶液について、プレートリーダーで OD_{495} を測定し、一方で、同一菌体溶液を適宜希釈して分光光度計 UV mini-1240 により OD_{660} を測定した。両吸光度より、マイクロプレートリーダーの吸光度の補正式を計算した (式 [2.1])。OD はプレートリーダーの OD_{495} を、OD'は OD_{660} に相当する補正後の OD を示す。

$$OD' = 9.7302 \times OD^2 + 3.6433 \times OD + 0.1789 \qquad [2.1]$$

本培養においてエタノールストレス環境を作製するにあたっては、培養開始時に終濃度が 5 % (v/v)となるようにエタノールを添加し、エタノールの有無による生育の差を観察することで、破壊株のエタノール感受性を評価した。

2. 2. 5　DNA マイクロアレイ解析

酵母を 100 mL の YPD 液体培地を入れた 500 mL 容坂口フラスコで振とう培養し、対数増殖中期に終濃度が 5% (v/v) となるようにエタノールを添加した。エタノール添加前および添加後 15、30、60、120、180 分において全菌体を遠心により集菌し、液体窒素により凍結させ、RNA 抽出を行うまで–80 °C で凍結保存した。

酵母からの total RNA の抽出には Hot phenol 法を用いた (Köhrer and Domdey, 1991)。得られた total RNA を、添付のプロトコルに従い、RNeasy Mini Kit (Qiagen) により精製した。

DNA マイクロアレイ解析は Yeast Gene Chip ver.2 (DNA Chip Research) を用いた。なお、逆転写による蛍光標識 (Cy3・Cy5 標識) cDNA の作成には 25 μg の total RNA を用いた。蛍光標識 cDNA の作成、ハイブリダイゼーション、および洗浄はマイクロアレイ添付のプロトコルに従って行った。各スポットの蛍光強度の測定には GenePix™ 4000A (Axon Instruments) および GenePix™ Pro ver.3.0 software (Axon Instruments) を用いた。得られた蛍光強度のデータは蛍光色素の特性による影響を除くために、局所重みつけ線形回帰 (Lowess 法、Yang *et al.*, 2003) による正規化を行い、エタノール添加前後の遺伝子発現量の比を計算した。

2. 2. 6 クラスタリング解析

2. 2. 6. 1 自己組織化マップ

自己組織化マップ (SOM; Self organizing map) は生物の連想記憶にまつわる脳細胞の自己組織化機能をモデル化したものであり、多次元のデータを類似度により 2 次元平面上にマッピングするクラスタリング手法である (Kohonen, 1998)。SOM の概要として Fig. 2.2 に示すように、まず指定した数のニューロン (クラスタ) が格子状に並べられ、データが入力すると最も類似したしたニューロンが決定される。そのニューロンと近傍ニューロンが入力データに類似するように更新される。この過程が繰り返され最終的に最も類似したニューロンに入力データが帰属する (クラスタリングされる)。類似度の指標として本研究ではピアソンの相関係数を用いた。

SOM のニューロンの更新過程において、入力データの順によりニューロンの更新結果が変わるため、データの比較などの解析を困難にすることがある。そこで、データセットを一度に入力し、全ての入力データについて最も類似したニューロンを決定し、その後同時にニューロンの更新を行うことで、SOM のデータの入力順の依存性を回避した Batch-learning SOM を適用した (Kanaya *et al.*, 2001)。SOM のクラスタリング解析においては、クラスタ数 (ニューロン数) を決定する必要がある。クラスタ数決定の指標として、入力データに対するモデルの良さを示す赤池情報量基準 (AIC : Akaike's information criterion、Akaike, 1974) を用い適切なサイズを決定した。

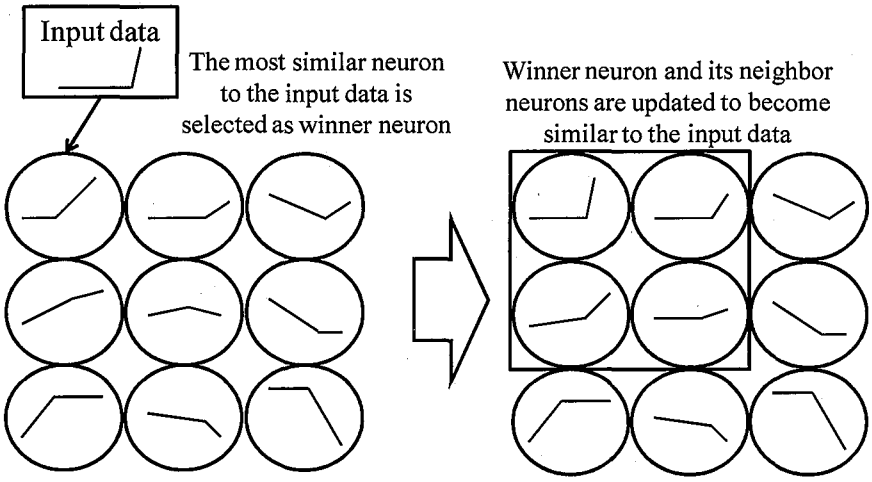

Fig. 2.2. 自己組織化マップ (SOM) によるクラスタリング。設定した数のニューロンが格子状に配置され、それぞれのニューロンが代表パターンをもっている。データが入力されると、もっとも類似したニューロンが選択される (Winner neuron)。Winner neuron とその近傍のニューロンが入力データに類似する用に更新される。この過程をニューロンの更新が起こらなくなるまで繰り返し、最終的に入力データは最も類似したニューロンに帰属する。

2. 2. 6. 2 階層的クラスタリング

階層的クラスタリングは、最も類似したデータを 1 つのクラスタとみなし、次々に類似したクラスタを統合することにより、データを類似度応じて階層的な木構造に分類する方法である。本研究においては、群平均法にもとづく階層的クラスタリング手法を用いた。群平均法では、クラスタ距離は二つのクラスタに含まれるデータの全ての組み合わせの距離の平均値により定義される (Fig. 2.3)。具体的には、クラスタ A (C_A) に N_A 個のデータ X_A が含まれ、クラスタ B (C_B) に N_B 個のデータ X_B が含まれるとき、クラスタ A とクラスタ B の距離は式 [2.2] により計算される。$D(C_A, C_B)$および $d(X_A, X_B)$はそれぞれのデータ間の距離を示す。なお、本研究では、$d(X_A, X_B)$の距離の計算にはピアソンの相関係数を用いた。

$$D(C_A, C_B) = \frac{1}{N_A N_B} \sum_{X_A \in C_A} \sum_{X_B \in C_B} d(X_A, X_B) \qquad [2.2]$$

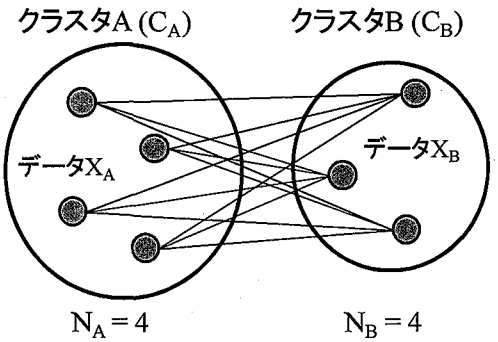

Fig. 2.3. 群平均法を用いた階層的クラスタリングにおけるクラスタ間の距離。クラスタ A (C_A) に N_A 個のデータ X_A が含まれ、クラスタ B (C_B) に N_B 個のデータ X_B が含まれるとき、クラスタ A とクラスタ B 間の距離は、各クラスタに含まれる全データの全ての組み合わせにおける距離の平均値により計算される。

2. 2. 6. 3 自己組織化マップと階層的クラスタリングを組み合わせ DNA マイクロアレイの誤差を考慮したクラスタリング方法

DNA マイクロアレイによる遺伝子発現の経時変化データを SOM によりクラスタリングし、AIC によりクラスタ数を決定した。現在のマイクロアレイ解析では実験誤差が生じることから、SOM の結果におけるアレイデータの誤差の影響を考慮する必要がある。つまり、類似した発現パターンを示すクラスタはアレイデータの誤差による変化以上の違いがみられないならば、同一のクラスタとみなすべきである。そのため、同一試料を用いてアレイ解析を行い、アレイデータの誤差の測定をした。理論的な発現比は 1 であり、この発現比を中心としたデータの分布が誤差となる。そこで、アレイデータの 99%のデータが含まれる範囲を誤差としたところ、約 1/2～2 倍であることがわかった。こうして決定した誤差の影響を解析するために、オリジナルデータに人工的に誤差を付加し、オリジナルデータの SOM の結果得られた各クラスタの代表パターンを用いて再クラスタリングした。誤差がクラスタリング結果へ与える影響の指標として、データセットに含まれる全遺伝子について、誤差を付加する前後に含まれるクラスタ間の類似度を計算し、その類似度の高い上位 N%のデータが含まれる類似度を設定した。すなわち、この類似度より高い類似度を示す発現パターンを持つ SOM のクラスタは、アレイデータの誤差を考慮したとき同じクラスタとみなすべきである。そこで、この誤差の影響として設定した類似度を、群平均距離法を用いた階層的クラスタリング (HC) の閾値とし、クラスタリングを行うことで、誤差の影響を考慮したクラスタリング手法の開発を行った。こうして SOM の二次元平面上に形成されたクラスタ境界が、アレイデータの誤差を考慮した際に、これ以上分類できない最小のクラスタとなる。こうして開発したクラスタリング手法の概要を Fig. 2.4 にまとめた。

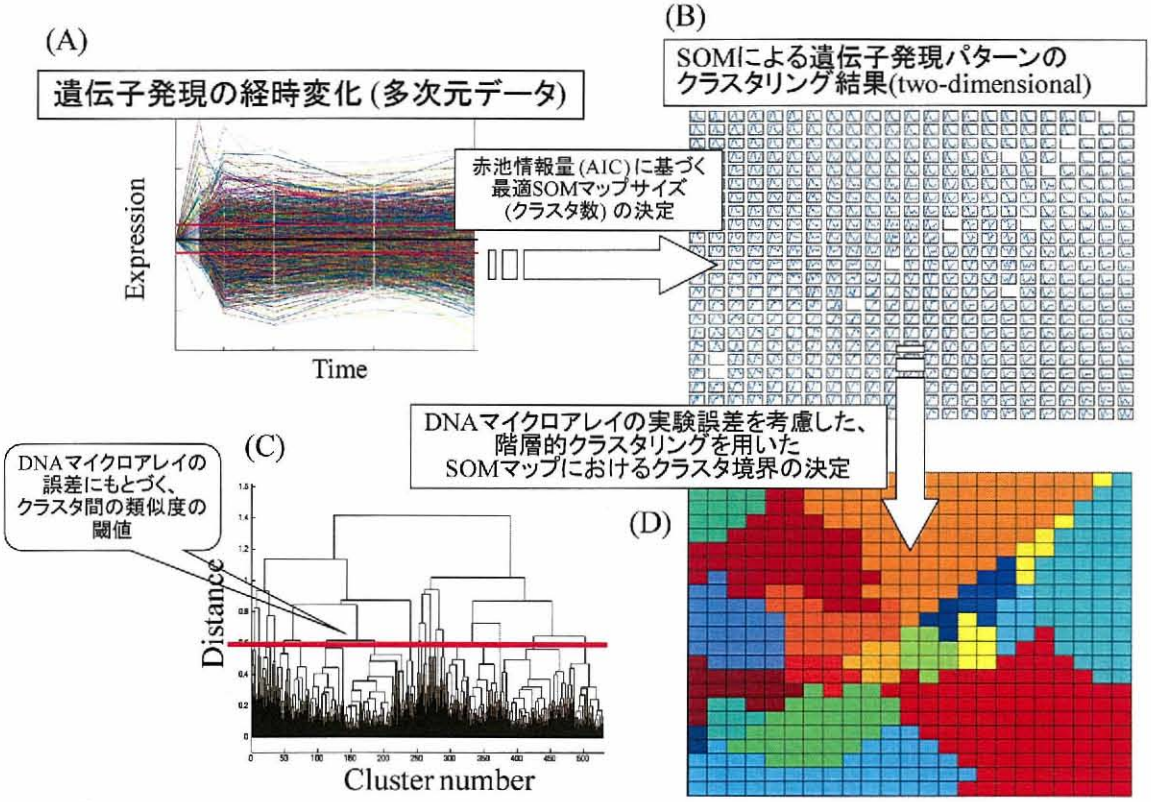

Fig. 2.4. SOM と階層的クラスタリングを統合した DNA マイクロアレイの実験誤差を考慮したクラスタリング方法。(A) DNA マイクロアレイにより取得した遺伝子発現の経時変化情報。横軸はタイムポイントを示し、縦軸は遺伝子発現量を示す。(B) SOM によるクラスタリング結果。SOM マップサイズは赤池情報量基準によって決定した。各クラスタに示す発現パターンはそのクラスタに含まれる遺伝子の平均発現パターンを示す。(C) 階層的クラスタリングによる SOM により得られたクラスタのクラスタリング。SOM のクラスタリング結果における DNA マイクロアレイの実験誤差の影響を評価し、決定したクラスタ間の類似度の閾値より類似した発現パターンを示すクラスタを階層的クラスタリングによりさらにクラスタ化した。(D) DNA マイクロアレイの誤差を考慮したクラスタリング結果。各四角は SOM により得られたクラスタを示し、同じ色で示されたクラスタは階層的クラスタリングによりクラスタ化されたクラスタである。SOM の二次元平面上に形成されたクラスタ境界により形成されたクラスタは、アレイデータの誤差を考慮した際に、これ以上分類できない最小のクラスタとなる。

2. 2. 7　遺伝子組換え実験

2. 2. 7. 1 FY834 株のトリプトファン合成酵素遺伝子 *TRP1* の復帰株の構築

FY834 株では、*TRP1* 遺伝子の一部 (約 600 bp の *Eco*RI－*Hin*dIII 領域) が欠損している (Fig. 2.5、Winzeler *et al.*, 1999)。そこで、欠損部を補完するために S288c 株の *TRP1* 遺伝子の開始コドンから上流 103 base に対合するプライマーTRP1-5'(2)と *TRP1* 遺伝子の 3'末端側に対合するプライマーTRP1-3' (Table 2.2) を用いて、*Z-Taq* ポリメラーゼ (Takara Bio) により PCR 増幅し、得られた *TRP1* 遺伝子断片を Wisard SV gel and PCR clean-up system (Promega) により精製した。精製した PCR 産物を酢酸リチウム法 (Gietz and Woods, 2002) により FY834 株に導入し、トリプトファンを含まない SD 培地に塗布した。得られた形質転換体から染色体 DNA を抽出し、この染色体 DNA を鋳型として、*TRP1* 遺伝子の両端に対合するプライマーTRP1-5'、TRP1-3'を用いた PCR 増幅により、*TRP1* 遺伝子断片の挿入を確認した。得られた *TRP1* 復帰株を FY834*TRP1*$^{+}$株と名付けた。

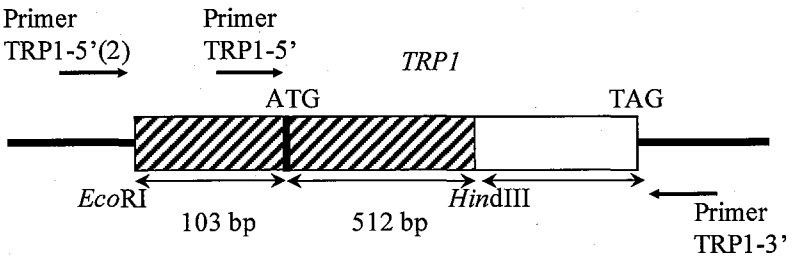

Fig. 2.5. *TRP1* 遺伝子の構造と *TRP1* 遺伝子復帰株構築のための PCR に用いたプライマーの対合位置。網掛け領域は FY834 株において欠失している領域を表す。

Table 2.2. *TRP1* 遺伝子復帰株の構築に用いたプライマー

プライマー名	プライマー配列(5' -> 3')
TRP1-5'(2)	GTTATGACGCCAGATGGCAGTAGTGG
TRP1-5'	GATTAGGTACCCAAAGGCAGCTTGG
TRP1-3'	AAGGCCTCGAGGCAAGTGCACAAAC

2. 2. 7. 2 発現ベクターpAURΔCENARS の構築

酵母の遺伝子過剰発現株を構築するに当たり、酵母の発現ベクターである pAUR123 (Takara Bio) をもとにして、pAUR123 の酵母細胞内で環状プラスミドとして複製するために必要な CEN4-ARS1 領域を欠失させた酵母染色体組込み型 (YIp 型) 発現ベクター pAURΔCENARS を構築した。pAUR123 を制限酵素 *Spe*I - *Bgl*II で処理し、T4 DNA ポリメラーゼ (Takara Bio) により突出末端の平滑化を行った後、DNA ligation kit ver.2.1 (Takara Bio) によりセルフライゲーションさせた。得られたプラスミドを pAURΔCENARS と命名した。

2. 2. 7. 3 遺伝子過剰発現株の構築

過剰発現対象の遺伝子は、FY834 株あるいは S288c 株の染色体を鋳型として、Table 2.3 に示すプライマーを用いて PCR 増幅した。PCR 産物を Wizard SV gel and PCR clean-up system (Promega) を用いて精製した後、Table 2.3 に示すプライマーに導入した制限酵素配列に応じ制限酵素で消化した。同じ制限酵素で消化した発現ベクター pAURΔCENARS と混合しライゲーションし、大腸菌に導入した。得られた形質転換体からプラスミドを回収し、目的とする遺伝子が挿入されていることを確認した。トリプトファン合成酵素をコードする遺伝子 *TRP1*、*TRP2*、*TRP3*、*TRP4*、*TRP5* をクローニングしたプラスミドは、酵母の遺伝子破壊株ライブラリーのそれぞれの破壊株に導入し、形質転換体のトリプトファン要求性の回復を確認してから FY834*TRP1*$^{+}$株に導入し、解析に用いた。トリプトファン取り込み酵素をコードする遺伝子 *TAT2* に関しては、シークエンスにより変異が入っていないことを確認し、FY834 に導入して解析に用いた。

pAURΔCENARS を元に作成したプラスミドは、プラスミド上の薬剤耐性マーカー遺伝子 *AUR1-C* (酵母の *AUR1* 遺伝子の変異型アリル) 内部で 1 か所切断して酵母細胞に導入することで、染色体上の *AUR1* 遺伝子とプラスミド上の *AUR1-C* 遺伝子において相同組換えを起こし、染色体に組み込まれる (Fig. 2.6)。染色体への組み込みの確認は、形質転換体の染色体を鋳型として、また酵母染色体上の *AUR1* 遺伝子の上流に対合するプライマーAUR1Fwd と、pAURΔCENARS の *ADH1* 遺伝子のプロモータ領域に対合するプライマーADH1Rev を用いた PCR により行った(Table 2.3、Fig. 2.6)。*ADH1* 遺伝子のプロモータは恒常的な高発現プロモータであるため、その下流に遺伝子をクローニングすることで遺伝子を過剰発現させることができる。

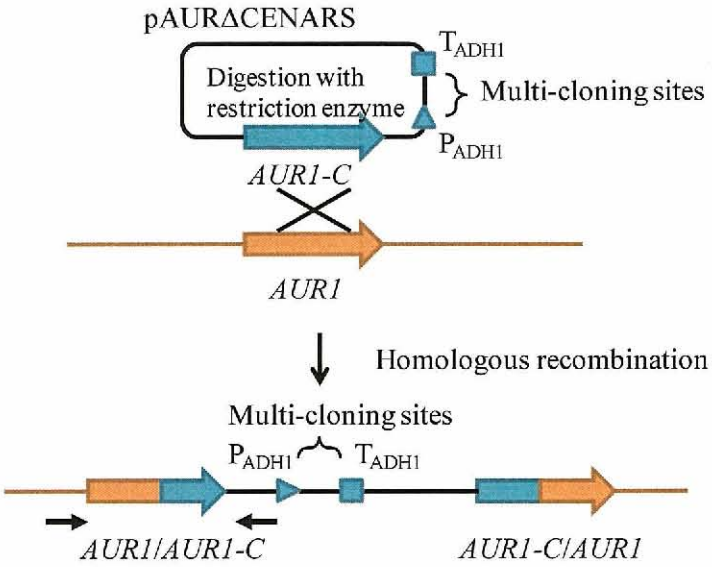

Fig. 2.6. pAURΔCENARS を用いた遺伝子過剰発現株の構築。出芽酵母由来の *ADH1* 遺伝子のプロモータ (P_{ADH1}) とターミネータ (T_{ADH1}) の間に過剰発現対象の遺伝子をクローニングすることで、対象遺伝子は *ADH1* プロモータにより恒常的に高発現する。*AUR1-C* 遺伝子内部で 1 か所切断される制限酵素で処理して線状にし、酵母菌体に導入されることで、染色体 DNA 上の *AUR1* 遺伝子と相同的組換えによりプラスミドが染色体内部に組み込まれる。矢印は pAURΔCENARS の染色体への組み込みの確認に用いた PCR プライマー (Table 2.3)。

Table 2.3. 過剰発現株構築プライマーと構築の確認に用いたプライマー

遺伝子名 プライマー名	プライマー配列(5' -> 3')	制限酵素
ADH1Rev	ACTTCATTGCTTGGCGGGTCATCGC	
AUR1Fwd	GTAACTGGAAGGAAGGCCGTATACC	
TRP1	GATTAGGTACCCAAAGGCAGCTTGG	*KpnI*
	AAGGCCTCGAGGCAAGTGCACAAAC	*XhoI*
TRP2	GCACTGGTACCCTGATTGGAAAAAAGGC	*KpnI*
	GTCGTCTCGAGGGAAAAAAACAGAGAATGC	*XhoI*
TRP3	TTGGTGGTACCTAGAACGCCATAAAAG	*KpnI*
	CTATACTCGAGGGCGTTCGCCCTTAC	*XhoI*
TRP4	CACAAGGTACCTTAGTATTCCCTTATC	*KpnI*
	GCGTATCTAGAGTAATGTTCAGCTTAG	*XbaI*
TRP5	AAGGGAGGTACCACACCGACAGACC	*KpnI*
	CTTATGAGCTCTTACTCATTAGGCAG	*SacI*
TAT2	ATAAGGTACCCAAATTACGCAACACAC	*KpnI*
	ATTGTGAGCTCGTTATGCATTAAATGATCTG	*SacI*

下線部は制限酵素サイトを示す。

2.2.8 ノーザン解析

トリプトファン合成酵素遺伝子 *TRP2*、*TRP3*、*TRP4*、*TRP5* および、コントロールとしてアクチンをコードする *ACT1* 遺伝子の発現を検出するためのプローブを作製した。*TRP2*、*TRP3*、*TRP4*、*TRP5* は Table 2.3 に示すプライマーを、*ACT1* は Table 2.4 に示すプライマーを用い、FY834 株の染色体 DNA を鋳型として PCR を行った。PCR 産物を WizardSV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) により精製し、約 1 μg の精製 PCR 産物を用いてフルオレセイン標識プローブを作製した。

ホットフェノール法により調製した FY834 株と IFO2347 株のそれぞれの total RNA 20 μg をホルムアルデヒド変性ゲル電気泳動に供した。泳動したゲルをアルカリで処理した後、ゲルからキャピラリーブロッティングにより RNA のメンブレンへのトランスファーを行った。メンブレンは Hybond-N^+ (Amersham) を用いた。そして、Gene Images Random-Prime Labelling and Detection System (GE Healthcare) 付属のプロトコルにしたがって、ハイブリダイゼーション、メンブレンの洗浄および転写産物の検出を行った。検出には X 線フィルム (Hyperfilm-MP; Amersham Bioscinces) を用いた。現像した X 線フ

ィルムを Image Scanner (Amersham Bioscinces) により画像として取り込み、Scion Image (Scion) を用いて転写産物のバンド強度の数値化を行った。

Table 2.4. *ACT1* 遺伝子のプローブ作成に用いたプライマー

遺伝子	プライマー配列(5' -> 3')
ACT1	GTTTCCATCCAAGCCGTTTTGTCC
	AACATACGCGCACAAAAGCAGAG

2. 2. 9 細胞内アミノ酸濃度の測定

2. 2. 9. 1 細胞内アミノ酸の抽出

–80 °C で保存した菌体を、YPD 寒天培地に画線植菌し、30 °C で 3 日間静置培養した。シングルコロニーを 5 mL の YPD 液体培地を入れた試験管に植菌し、前培養として 30 °C で 24 時間振とう培養した (150 stroke/min)。前培養液 1 mL を 100 mL YPD 液体培地を入れた 500 mL 容坂口フラスコに植菌し、30 °C で振盪培養を行った。FY834 株においては培養開始 5 時間後、IFO2347 株においては培養開始 4 時間後に、培養液 10 mL を回収し–80 °C で冷やした 75%メタノール 20 mL と混合させることで、代謝反応のクエンチを行った。4800 rpm で 5 分間遠心し、上清を除去した後に、–20 °C で冷やした 50%メタノール 20 mL を加え懸濁し、再び 4800 rpm で 5 分間遠心した。上清を除去した後、1 mL の滅菌水にペレットとなった菌体を懸濁し、30 分間煮沸した。その後遠心し、その上清を細胞内アミノ酸測定に用いた。

2. 2. 9. 2 誘導体化

アミノ酸の誘導体化は Bidlingmeyer ら (1984) の方法にもとづき行った。試験管 (6 x 50 mm) を 6 N 塩酸により洗浄し、Milli-Q でさらに洗浄した。試験管をエタノールで再洗浄した後、減圧乾燥した。乾燥した試験管にエタノール (HPLC グレード) : 水 : TEA (triethylamine) の 2:2:1 混合溶液を 20 μL 加え、測定サンプルを 10 ~ 100 μL 加え、さらに内部標準としてノルロイシン (50 pmon/μL) を加えた後、再び 3 ~ 4 時間、減圧乾燥した。乾燥した試験管にエタノール (HPLC グレード) : Water : TEA : PITC (phenylisothiocyanate) の 7:1:1:1 混合溶液を 20 μL 加えボルテックスにより混合した。室温で 20 分間放置し反応させ phenylthiocarbamyl (PTC) アミノ酸に誘導化した後 (Fig.2.7)、5~6 時間真空乾燥を行った。乾燥した試験管に 60 mM 酢酸ナトリウム (pH 6.0) : アセトニトリルの 94:6 混合溶液を 100 μL 加え、HPLC のサンプルとした。直ちに測定に用いない時は、乾燥状態で 4 °C で保存した。乾燥した試験管に 60 mM 酢酸ナトリウム (pH 6.0) : アセトニトリルの 94:6 混合溶液を 100 μL 加え、15 分間室温で反応させた。

サンプルをフィルターろ過し (Cosmonice Filter W 0.45μm, Nacalai)、10 μL を High performance liquid chromatography (HPLC) の測定に用いた。

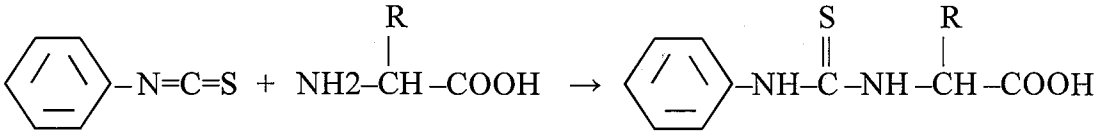

Fig. 2.7. PITC によるアミノ酸の誘導体化。PITC のアミノ酸の誘導体化はエドマン反応の第一段階であり、アミノ酸のアミノ基と PITC が反応し PTC アミノ酸誘導体となる。ほとんどの反応副生成物と誘導体化試薬は揮発性なので、真空下で乾燥させることで除去できる。

2. 2. 9. 3 HPLC によるアミノ酸濃度測定

HPLC の溶離液は、フィルターろ過した 60mM 酢酸ナトリウム (pH 6.0、酢酸で調整) とアセトニトリル (HPLC グレード、Kanto chemical) を、94 : 6 (溶離液 A) および 40 : 60 (溶離液 B) で混合し、脱気しすることで作成した。HPLC 分析には L-5.200 Intelligent Pump (日立ハイテクノロジーズ) を用い、溶離液 A : B が 20 分間で 100 : 0 から 30 : 70 になる線形勾配によりサンプルを溶離し、L-4000H UV Detector (日立ハイテクノロジーズ) を用いて波長 254 nm で検出した。カラムは Wakosil PTC (φ 4.0 mm×250 mm) アミノ酸分析用カラム (Wako Pure Chemical) を使用した。

誘導体化したアミノ酸を HPLC で測定し、各アミノ酸とノルロイシンのピーク強度の比を求めた。また、200、100、50、10 pmol/μL に希釈した標準アミノ酸 (Amino Acids Standard Solution、Wako Pure Chemical) および L-トリプトファン、内部標準物質である 50 pmon/μL ノルロイシンをそれぞれ 10 μL ずつ試験管に加え、上記と同じ方法で誘導体化をした。各標準アミノ酸とノルロイシンのピーク強度の比を用いて各アミノ酸について検量線を作成した。作成した検量線より各サンプルのアミノ酸の濃度を決定した。

2. 2. 10 遺伝子機能分類

遺伝子機能情報について、Munich Information Center for Protein Sequences (MIPS) データベース (http://mips.gsf.de/genre/proj/yeast/) における Functional Catalogue (FunCat, Ruepp *et al.*, 2004) と *Saccharomyces* genome database (SGD; http://www.yeastgenome.org/) を用いた。

2. 2. 11　統計解析

選択した遺伝子に存在する解析対象のカテゴリに含まれる遺伝子の割合が、全ての遺伝子における存在割合に対して有意に多いのかについて解析するために解析するために、超幾何分布にもとづく検定を行った。検定方法は式 [2.3]に示す。

$$P = \sum_{i=k}^{n} \frac{\binom{M}{i}\binom{N-M}{n-i}}{\binom{N}{n}} \qquad [2.3]$$

式 [2.3] において、N は全ての遺伝子数、M は全ての遺伝子に含まれる解析対象のカテゴリに属する遺伝子数、n は選択した遺伝子群の遺伝子数、k は選択した遺伝子群に含まれる解析対象のカテゴリに属する遺伝子数を示す。

2.3 結果

2.3.1 酵母の増殖に対するエタノールストレスの影響

実験室酵母 FY834 株と清酒酵母 IFO2347 株のエタノールストレス耐性の評価を行った。両株を YPD 液体培地で培養し、対数増殖中期に終濃度が 5、6、7、8% (v/v) となるようにエタノールを培地に添加した。その後の増殖を測定し、エタノール耐性の評価として比増殖速度を計算した (Fig. 2.8)。その結果、8%エタノール環境下では両株の比増殖速度に違いは見られなかったが、その他のエタノール濃度では FY834 株より IFO2347 株の方が高い比増殖速度を示した。このことより、FY834 株に比べ IFO2347 株はエタノールストレスに耐性であることが示された。また、5%エタノール環境下で両株の比増殖速度に最も大きな違いがみられたことから、この環境下において両株のエタノールストレスに対する遺伝子発現変化の違いを最も明確に解析できると推測した。そこで、5%エタノール環境をエタノールストレスに対する遺伝子発現変化の解析に用いることにした。

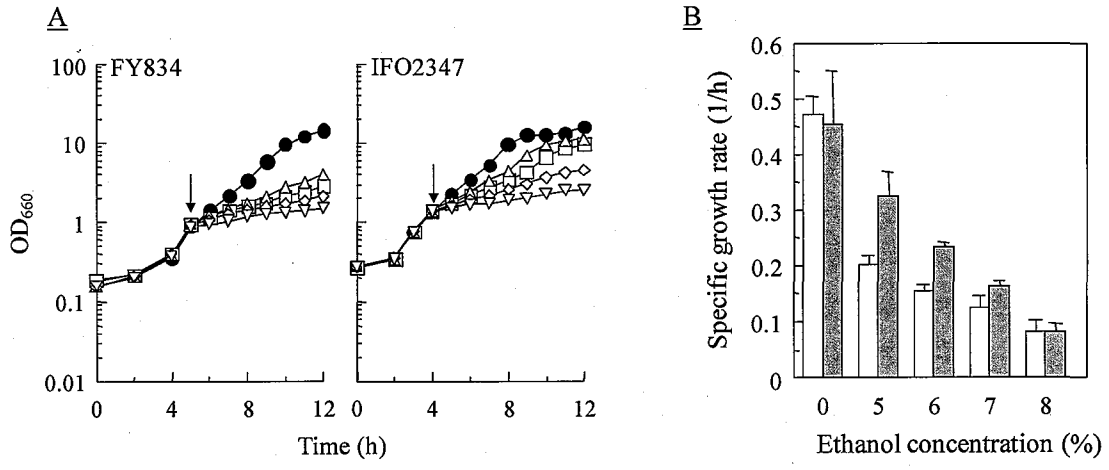

Fig. 2.8. FY834 株と IFO2347 株の生育に対するエタノール添加の影響。YPD 液体培地にて実験室酵母 FY834 株および清酒酵母 IFO2347 株を対数増殖中期（OD_{660}≒1）まで培養した後、終濃度が 5、6、7、8% (v/v) となるようにエタノールを添加し、培養を行った。(A) は両株の菌体濃度 OD_{660} の経時変化を示す。●はエタノールを添加しない非ストレス環境下における培養結果を、△□◇▽はそれぞれ、終濃度が 5、6、7、8% (v/v) エタノールを添加した培養結果を示す。(B) は両株におけるエタノール添加後の比増殖速度 (±95 %信頼区間) を示す。

2.3.2 エタノール環境下における遺伝子発現情報のクラスタリング解析

FY834 株と IFO2347 株の 5%エタノール環境下における遺伝子発現情報を DNA マイクロアレイにより解析した。両株を YPD 液体培地で培養し、対数増殖中期に終濃度が 5%エタノールとなるように添加した。添加直前及び添加後 15、30、60、120、180 分後の菌体から total RNA を抽出し、DNA マイクロアレイによりエタノール添加前に対する添加後の各タイムポイントにおける遺伝子発現量の変化を解析した。

FY834 株と IFO2347 株の遺伝子発現変化情報を解析するにあたり、本研究では遺伝子発現の経時変化の情報を用いているため、例えば、発現変化の差が大きい遺伝子の抽出を考えても、遺伝子発現変化の大きさや経時変化の違いを考慮すると様々な遺伝子発現変化のパターンが存在し、それぞれについて評価することは困難である。また、発現パターンが類似した遺伝子群には同じ機能に属する遺伝子が多く含まれることが多く報告されており、単に発現変化が大きい遺伝子に着目するより、発現パターンの類似度に応じて遺伝子を分類する方がより生物学的に意味のある情報を抽出することができると考えた。そこで、FY834 株と IFO2347 株の遺伝子発現情報に存在する発現の経時変化パターンを抽出するために、遺伝子発現の経時変化パターンの類似度にもとづき遺伝子をグループ化するクラスタリング解析を行った。クラスタリングには、2.2.9.3 節に示す DNA マイクロアレイの実験誤差を考慮した自己組織化マップ (SOM) と階層的クラスタリング (HC) を組み合わせた方法を用いた。クラスタリングの入力データとして、両株の遺伝子発現変化の経時変化のパターンをつなげたデータを用いた。なお、エタノール添加後、両株において全てのタイムポイントで有意な遺伝子発現量の変化 (2 倍以上の変化) を示さなかった遺伝子は解析から除いた。遺伝子発現パターンの類似度の計算において、エタノール添加直前 0 分から添加 15 分後の遺伝子発現量の変化を考慮に入れるため、エタノール添加直前における遺伝子発現量を一定として、0 分のタイムポイントのデータとして 1 を加えたデータを作成した。こうして得られた FY834 株と IFO2347 株の遺伝子発現の経時変化をつなげたデータを SOM によりクラスタリングし、729 (27×27) のクラスタを得た。

2.2.9.3 節で述べたように、マイクロアレイ解析では測定された発現比に対し 1/2 ~ 2 倍の実験誤差によりが生じることから、SOM のクラスタリング結果において、類似した発現パターンを示すクラスタはアレイデータの誤差による変化以上の違いがみられないならば、同一のクラスタとみなすべきである。そこで、2.2.9.3 節で述べたように、アレイデータの誤差の影響にもとづき、SOM のクラスタを HC によりさらにクラスタ化することとした (Fig. 2.4)。HC によるクラスタ数決定の閾値を計算するために、まず、オリジナルデータに 1/2 ~ 2 倍の誤差を付加したデータを、オリジナルデータによる SOM の結果得られた各クラスタの代表パターンに対して最も類似した発現パターンを示すクラスタに再クラスタリングした。誤差を考慮した際に同一とみなすべきクラスタの指標として、オリジナルデータと誤差を付加したデータが含まれる SOM のクラスタ

間の類似度を全ての遺伝子について計算し、その類似度の高い上位N%のデータが含まれる類似度をHCによるクラスタ数決定の閾値とした。この類似度までHCによりSOMのクラスタをクラスタ化することで、誤差の影響を考慮しても同一のクラスタにデータが維持されるクラスタとなる。

まず、このHCによるクラスタ数決定の閾値の決定を行った。理想的なクラスタリング結果として、各クラスタには互いに類似したデータが含まれ、一方で、アレイデータの誤差を考慮してもオリジナルデータと同じクラスタに属する頑健性が望まれる。そこで、SOMのクラスタリングを誤差の影響を考慮しHCによりさらにクラスタ化する際に用いる閾値を0、60、70、80、90、95%と変化させ、各閾を用いてHCを行い、得られたクラスタリング結果の評価を行うことで、適した閾値の決定を試みた。各閾値によるHCの結果、それぞれ729、95、57、29、12 、6のクラスタ数が得られた。このそれぞれの閾値を用いたHCによるクラスタリング結果に対し、各クラスタに含まれるデータの類似度の評価と、マイクロアレイの実験誤差に対する頑健性の評価を行った。

まず、各クラスタに含まれるデータの類似度の評価を行った。あるクラスタに含まれる遺伝子の発現パターンの平均値をそのクラスタの代表パターンとした。ある閾値を用いたHCのクラスタリング結果において、各クラスタに含まれる代表パターンとそのクラスタに含まれる各遺伝子の発現パターンとの相関係数の平均値を計算した。さらに、得られた全てのクラスタについての相関係数の平均値をその閾値におけるクラスタリング結果の代表値として計算した (average of correlation coefficient)。この値が高いほど、各クラスタに互いに類似した発現パターンを示す遺伝子が含まれていることを示す。

次に、誤差に対するクラスタリング結果の頑健性の評価を行った。マイクロアレイの実験誤差範囲にもとづき人工的に誤差を遺伝子発現データに付加したデータを20セット作成した。また、ある閾値を用いたHCのクラスタリング結果において、各クラスタの代表パターンと、誤差を付加した遺伝子発現データとの相関係数を計算し、最も相関係数が高いクラスタに誤差を付加した遺伝子発現データを再びクラスタリングした。全ての遺伝子発現データにおいて、誤差を付加したデータが、オリジナルデータと同じクラスタに維持された遺伝子の割合を計算した (re-clustering rate)。この値が高いほど、アレイデータの実験誤差を付加してもオリジナルデータと同じクラスタに維持される割合が高く、誤差の影響に対しクラスタリング結果が変化しない頑健なクラスタリングであることを示す。

こうして計算した2つのクラスタリングの評価の指標と、HCによるクラスタ数の決定に用いた閾値との関連性を解析した (Fig. 2.9)。その結果、閾値を高くするに従いre-clustering rateの値も高くなり、誤差の影響に対し頑健なクラスタリングになることが示された。一方で、閾値を高くするに従いaverage of correlation coefficientの値は小さくなり、閾値が80%より高くなるとその低下の傾きが大きくなることが分かった。average of correlation coefficientの低下は、同じクラスタに異なる発現パターンを示す遺伝子が

多く含まれることを示し、クラスタリング結果からの情報抽出が困難になる。これらのことより、80%の閾値を用いたクラスタリング結果は、DNA マイクロアレイの実験誤差に対し比較的頑健であり、発現パターンの類似した遺伝子のみをクラスタ化する精度のよい方法であると考えられる。よって、SOM の結果において DNA マイクロアレイの実験誤差の影響を考慮するために、HC によりさらにクラスタリングする際のクラスタ数決定の閾値として、80%を用いることとした。この閾値を用い、得られたクラスタは、アレイデータの誤差を考慮した際に、これ以上分類できない最小のクラスタとなる。

こうして決定したアレイデータの誤差の影響を考慮するための閾値を用い、エタノール環境下における FY834 株と IFO2347 株の遺伝子発現情報の SOM による 729 のクラスタを、マイクロアレイの実験誤差を考慮し HC によりさらにクラスタ化した結果、29 のクラスタが得られた。各クラスタに含まれる遺伝子発現の経時変化を Fig. 2.10 に示した。

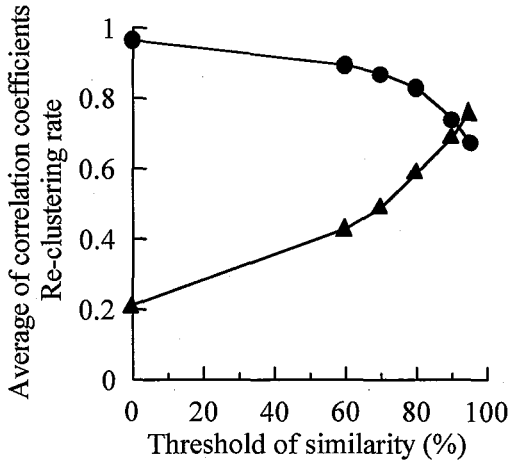

Fig. 2.9. クラスタ数決定に用いた閾値のクラスタリング結果への影響。●は average of correlation coefficient を示し、▲は re-clustering rate の値を示す。クラスタ数決定の類似度の閾値として 0、60、70、80、90、95%を用い、各値を計算した。

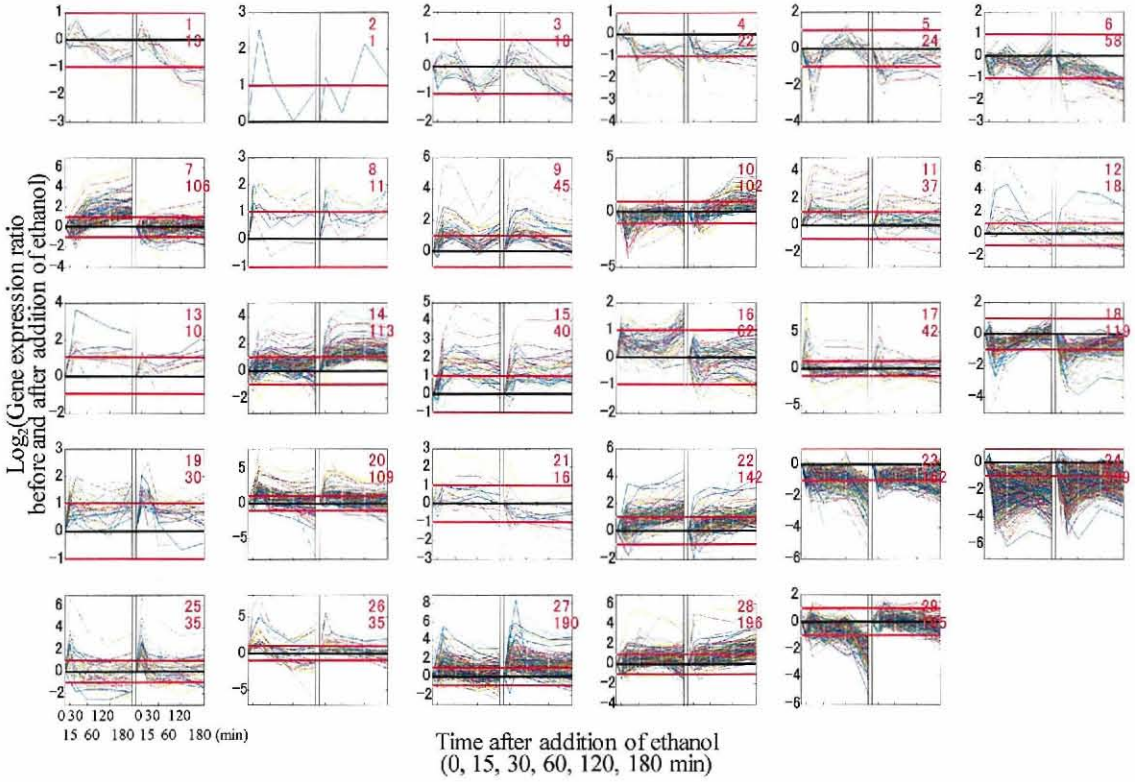

Fig. 2.10. エタノール環境下における遺伝子発現情報のクラスタリング結果。29 個の各クラスタに属する遺伝子の発現パターンを示す。各グラフの縦軸はエタノール添加前に対する添加後の遺伝子発現量の比の Log_2 の値を示し、横軸はエタノール添加後の時間を示す。各グラフの左側が FY834 株の遺伝子発現の経時変化を、右側が IFO2347 株の遺伝子発現の経時変化を示す。グラフ内の右上の数字は上段がクラスタ番号、下段がクラスタに存在する遺伝子数を示す。

2.3.3 クラスタリング結果にもとづくエタノール耐性酵母の育種候補遺伝子の選択

FY834 株と IFO2347 株のエタノール環境下における遺伝子発現の経時変化情報のクラスタリング結果から (Fig 2.10)、遺伝子の過剰発現によりエタノール耐性酵母を育種するための候補遺伝子を抽出するにあたり、(1) エタノール耐性に必要な遺伝子はエタノール環境下で発現が増加する、(2) エタノール耐性に関連する遺伝子はエタノール耐性能の異なる FY834 株と IFO2347 株において遺伝子発現変化が異なる、と推測した。この仮定に一致するクラスタとして、Fig. 2.11 に示す 3 つのクラスタ (No. 10、27、7) を選択した。各クラスタの特徴として、クラスタ No. 10 は、エタノール耐性能の高い IFO2347 株でのみ発現量が増加した遺伝子のクラスタ、クラスタ No. 27 は、両株で発現量が増加したがエタノール耐性能の高い IFO2347 株でより発現量が増加した遺伝子の

クラスタ、クラスタ No. 7 はエタノール耐性能の低い FY834 株でのみ発現量が増加した遺伝子のクラスタであった。各クラスタの発現パターンについて、クラスタ No. 10 と No. 27 は、エタノール環境下ではエタノール耐性に必要な遺伝子の発現を増加させる必要があるため、エタノール耐性能の高い IFO2347 株で発現がより増加したと推測した。またクラスタ No. 7 については、エタノール環境下ではエタノール耐性に必要な遺伝子の発現を増加させる必要があるが、IFO2347 株ではそれらの遺伝子が非エタノール環境下でもともと高発現しているためエタノール環境下で発現を増加させる必要がなかったと推測した。これらの推測にもとづき、選択したクラスタに含まれる遺伝子を過剰発現することで FY834 株のエタノール耐性能を向上することができると考えた。

各クラスタに含まれる遺伝子の機能の特徴を MIPS データベースの機能カテゴリにもとづき、各クラスタに存在するある機能カテゴリに含まれる遺伝子の存在割合が、全遺伝子における存在割合に対して有意に多く含まれる遺伝子機能を解析した (Table 2.5-2.7)。クラスタ No. 10 に多く含まれる遺伝子機能として、"Metabolism of methionine"、"Metabolism of glycine"、"Metabolism of serine"のアミノ酸合成機能が選択された。これらのアミノ酸とエタノール耐性の関連性は明らかとなっていないが、ストレス環境下ではアミノ酸の培地への添加や細胞内への蓄積がストレス耐性を向上させることが報告されている (Takagi *et al.*, 2005; Pandey *et al.*, 2007)。"Purine nucleotide anabolism" は細胞内の ATP 合成に関連している。エタノール環境下では細胞内が酸性化され (Rose and Sá-Correia., 1996)、細胞内 pH の恒常性を保つため、細胞内プロトンを H^+ V-ATPase により液胞に輸送することがエタノール耐性に重要な役割を担うと考えられている (Fujita *et al.*, 2006)。このプロトン輸送は ATP を必要とするため、細胞内 ATP 濃度が高いほど、H^+ V-ATPase によるプロトン輸送が活性化しエタノール耐性の向上につながると推測される。"Lipid, fatty acid and isoprenoid metabolism" に関しては、エタノール耐性には細胞膜の脂肪酸組成が関連していることや (You *et al.*, 2003)、エタノール耐性酵母では細胞膜のエルゴステロール量が高いことが報告されている (Castillo Agudo, 1992)。このように、クラスタ No. 10 のクラスタに含まれる遺伝子が関連する機能は、その活性や量が増加することがエタノール耐性の向上につながることが報告されており、IFO2347 株でこれらの遺伝子の発現量が増加していることがそれらの機能を活性化し、IFO2347 株のエタノール耐性を引き起こしているのではないかと推測された。

クラスタ No. 27 に含まれる遺伝子が多く含まれる遺伝子機能として、クラスタ No. 10 でも選択されたエタノール耐性に関連する"Lipid, fatty acid and isoprenoid metabolism" が選択された。"Stress response" にはトレハロース合成に関連する *TPS1* が含まれていた。トレハロースについては、細胞内トレハロースの量の増加がエタノール耐性の向上につながることが報告されている (Kim *et al.*, 1996; Lucero *et al.*, 2000)。これらの遺伝子発現量が IFO2347 株で FY834 株より発現量の増加比が高いことが、IFO2347 株のエタノール耐性につながっている可能性が考えられた。

クラスタ No. 7 に含まれる遺伝子が多く含まれる遺伝子機能として、“Metabolism of glutamine”、“Metabolism of arginine”、“Metabolism of aspartate”、“Metabolism of methionine”、“Metabolism of lysine”、“Biosynthesis of phenylalanine”、“Metabolism of tryptophan”、“Metabolism of histidine”の機能カテゴリが選択され、多くのアミノ酸合成に関連する遺伝子が含まれていることがわかった。しかし、これらの情報のみでは、これらのアミノ酸とエタノールストレス耐性の関連性は明らかではなく、さらなる解析が必要である。

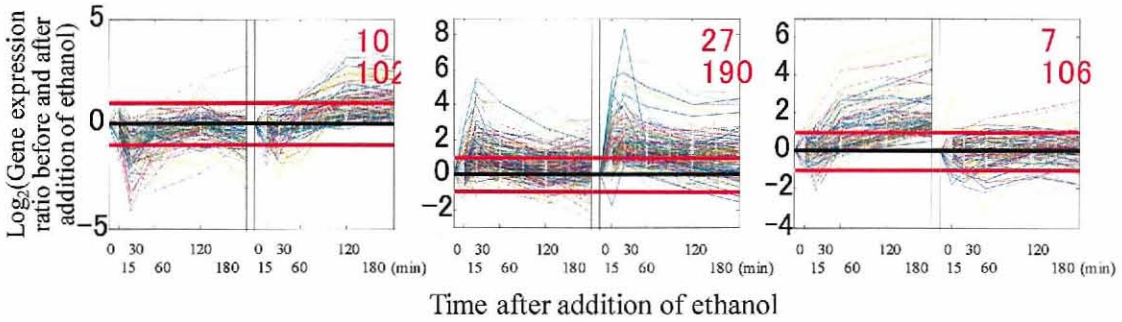

Fig. 2.11. エタノール耐性酵母の育種候補遺伝子として選択したクラスタ。縦軸はエタノール添加前に対する添加後の遺伝子発現比の Log_2 値を、横軸はエタノール添加後の時間を示す。各グラフの左側は FY834 株、右側は IFO2347 株の遺伝子発現の経時変化のパターンをそれぞれ示す。横軸に平行な黒線は遺伝子発現比が 1 を、赤線は遺伝子発現が 2 倍変化したことを示す。

Table 2.5. クラスタ No. 10 に含まれる遺伝子に多く含まれる遺伝子機能カテゴリ

MIPS functional category number	MIPS functional category	*p*-value	No. of genes in cluster No. 10 (102)	No. of all genes (6162)
01.01.06.05	Metabolism of methionine	1.95×10^{-5}	6	35
01.01.09.01	Metabolism of glycine	2.32×10^{-4}	3	8
01.01.09.02	Metabolism of serine	1.11×10^{-4}	4	16
01.02.01.11	Sulfate assimilation	4.71×10^{-6}	4	8
01.03.01.03	Purine nucleotide anabolism	1.85×10^{-8}	8	30
01.05.01	C-compound and carbohydrate utilization	3.67×10^{-4}	16	373
01.06	Lipid, fatty acid and isoprenoid metabolism	2.94×10^{-7}	18	268
01.07	Metabolism of vitamins, cofactors, and prosthetic groups	5.58×10^{-3}	8	164
16.21.07	NAD/NADP binding	2.14×10^{-4}	5	34
20.01.01.01.01	Heavy metal ion transport (Cu, Fe, etc.)	1.76×10^{-5}	7	51
20.01.03	C-compound and carbohydrate transport	5.14×10^{-3}	5	68
20.01.17	Nucleotide transport	1.81×10^{-4}	4	18
20.01.25	Vitamin/cofactor transport	1.12×10^{-3}	3	13
20.01.27	Drug transport	3.07×10^{-3}	4	37
20.09.18	Cellular import	1.78×10^{-5}	13	196
32.07	Detoxification	2.30×10^{-3}	7	111
34.01.01.01	Homeostasis of m*et al* ions (Na, K, Ca etc.)	1.36×10^{-4}	8	93

Table 2.6. クラスタ No. 27 に含まれる遺伝子に多く含まれる遺伝子機能カテゴリ

MIPS functional category number	MIPS functional category	*p*-value	No. of genes in cluster No. 27 (190)	No. of all genes (6162)
01.05.01	C-compound and carbohydrate utilization	2.87×10^{-6}	29	373
01.06	Lipid, fatty acid and isoprenoid metabolism	1.99×10^{-4}	20	268
02.16.01	Alcohol fermentation	6.57×10^{-3}	3	13
02.19	Metabolism of energy reserves (e.g. glycogen, trehalose)	4.51×10^{-3}	6	51
14.01	Protein folding and stabilization	1.58×10^{-3}	9	89
14.07	Protein modification	4.67×10^{-4}	35	639
14.13.01	Cytoplasmic and nuclear protein degradation	1.22×10^{-4}	16	180
32.01	Stress response	6.29×10^{-3}	25	480

Table 2.7. クラスタ No.7 に含まれる遺伝子に多く含まれる遺伝子機能カテゴリ

MIPS functional category number	MIPS functional category	*p*-value	No. of genes in cluster No. 7 (106)	No. of all genes (6162)
01.01.03.01	Metabolism of glutamine	9.53×10^{-5}	3	6
01.01.03.05	Metabolism of arginine	9.89×10^{-7}	6	21
01.01.06.01	Metabolism of aspartate	9.75×10^{-3}	2	9
01.01.06.05	Metabolism of methionine	2.87×10^{-3}	4	35
01.01.06.06	Metabolism of lysine	1.28×10^{-4}	4	16
01.01.09.04.01	Biosynthesis of phenylalanine	8.70×10^{-4}	2	3
01.01.09.06	Metabolism of tryptophan	3.24×10^{-4}	4	20
01.01.09.07	Metabolism of histidine	9.83×10^{-6}	5	18
01.02	Nitrogen and sulfur metabolism	5.11×10^{-3}	6	93
01.07.01	Biosynthesis of vitamins, cofactors, and prosthetic groups	1.03×10^{-4}	9	110
01.20	Secondary metabolism	2.34×10^{-4}	7	73
16.21.07	NAD/NADP binding	2.58×10^{-3}	4	34
16.21.17	Pyridoxal phosphate binding	2.83×10^{-3}	2	5

2.3.4 遺伝子破壊株コレクションを用いたエタノール感受性試験

クラスタリング解析により、酵母に存在する 6000 の遺伝子から、Fig. 2.8 に示す 3 つのクラスタに含まれる計 398 遺伝子を遺伝子の過剰発現によるエタノール耐性酵母の育種の候補遺伝子として選択した。しかし、未だ 398 遺伝子と数が多く、全ての遺伝子について遺伝子過剰発現株を構築することは困難である。そこで、さらにエタノール耐性酵母の育種候補遺伝子の絞り込みを行った。

エタノール耐性に必要な遺伝子を破壊すると、エタノール環境下における増殖速度が低下すると推測される。そこで、1 遺伝子破壊株コレクション (Winzeler *et al.*, 1999) を用いて、クラスタリング結果より選択した 398 の育種候補遺伝子について、それらの 1 遺伝子破壊株のエタノール環境下における増殖を測定し、破壊がエタノール環境下における増殖速度の低下を引き起こす (エタノール感受性) 遺伝子の選択を試みた。1 遺伝子破壊株のエタノール感受性試験には、96 ウェルプレートを用い、YPD 液体培地に 5% エタノールを添加した培地で培養を 2 回行い、増殖が遅い破壊株を選択した。さらにそれらの破壊株について、坂口フラスコを用いて対数増殖中期にエタノールを添加する培養を行い、比増殖速度を評価することでエタノール感受性株を選択した。結果を Table 2.8 にまとめた。

選択した 3 つのクラスタ (Fig. 2.11) に含まれる遺伝子の破壊株はクラスタ No. 10、27、7 においてそれぞれ 83、164、85 株存在した。1 遺伝子破壊株を用いた培養の結果、クラスタ No. 10 にはエタノール感受性を示した 1 遺伝子破壊株は存在しなかった。クラスタ No. 27 においては、*YPL017C*、*YPC1*、*SOH1* 遺伝子 (Mao *et al.*, 2000; Linder and Gustafsson, 2004) の 1 遺伝子破壊株が 96 ウェルプレートを用いた培養において、エタノール感受性を示したが、坂口フラスコを用いた培養においては有意な増殖速度の低下はみられなかった (data not shown)。クラスタ No. 7 においては、トリプトファン合成に関連する *TRP2*、*TRP3*、*TRP4* 遺伝子 (Zalkin *et al.*, 1984; Furter *et al.*, 1986) の 1 遺伝子破壊株が 96 ウェルプレートを用いた培養、また坂口フラスコによる培養において顕著な比増殖速度の低下を示した (Fig. 2.12)。

1 遺伝子破壊株を用いたエタノール感受性試験の結果、トリプトファン合成に関連する遺伝子 (*TRP2*、*TRP3*、*TRP4*) の破壊株がエタノール感受性を示したため、さらに他のトリプトファン合成に関連する遺伝子である *TRP1* と *TRP5* 遺伝子 (Tschumper and Carbon, 1980; Zalkin and Yanofsky, 1982) の 1 遺伝子破壊株についてもエタノール環境下における比増殖速度を測定した。その結果、*TRP1* と *TRP5* 遺伝子の 1 遺伝子破壊株もエタノール感受性を示した (Fig. 2. 12)。これらの結果より、トリプトファン合成に関連する *TRP* 遺伝子のエタノール環境下における遺伝子発現変化とエタノール耐性に関連性があることが示唆された。

Table 2.8. クラスタ No. 10、27、7 に含まれる遺伝子数とエタノール感受性を示した 1 遺伝子破壊株で破壊されている遺伝子

Cluster No	Number of genes in the cluster	Number of genes exitinig in the deletion collection	Genes deleted in ethanol sensitive strains (96well plate)	Genes deleted in ethanol sensitive strains (sakaguchi flask)
10	102	83	none	none
27	190	164	*YPL017C*、*YPC1*、*SOH1*	none
7	106	85	*TRP2*、*TRP3*、*TRP4*	*TRP2*、*TRP3*、*TRP4*

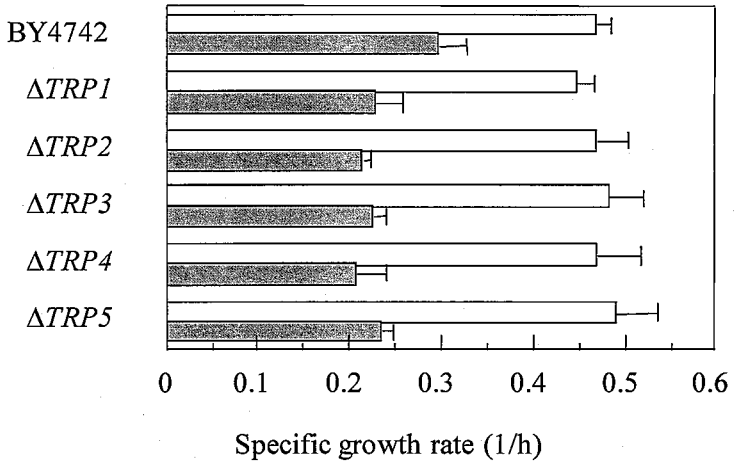

Fig. 2.12. *TRP* 遺伝子破壊株のエタノール環境下における比増殖速度。*TRP* 遺伝子の 1 遺伝子破壊株および親株 BY4742 株のエタノール環境下 (灰色) および 非エタノール環境下 (白色) における比増殖速度を示した。

2. 3. 5 *TRP* 遺伝子の発現量および細胞内トリプトファン濃度の解析

TRP 遺伝子が含まれていたクラスタ No. 7 は、エタノール耐性酵母である IFO2347 株ではエタノール環境下で発現が変化せず、FY834 株で遺伝子発現量が増加したクラスタに含まれていた。この発現パターンについて、IFO2347 株ではエタノールを添加する前の状態においてそれらの遺伝子発現量がもともと高く、エタノール環境下において発現量の増加がみられなかったと推測した。このことを確認するために、両株の対数増殖中期における *TRP2*、*TRP3*、*TRP4*、*TRP5* 遺伝子の発現量をノーザン解析により解析した。その結果、IFO2347 株において FY834 株に対して *TRP2* と *TRP5* 遺伝子の発現量が有意に高いことが確認された (Fig. 2.13)。この結果から、IFO2347 株では FY834 株よりトリ

プトファン合成が盛んに行われ、このことがIFO2347株のエタノール耐性に関与していることが考えられる。

さらに両株の非ストレス環境下における対数増殖中期の細胞内のトリプトファン濃度を測定した。菌体より抽出した細胞内アミノ酸をphenylisothiocyanate (PITC) により誘導体化した後、高速液体クロマトグラフィ (HPCL; High performance liquid chromatography) によりアミノ酸濃度を測定した。その結果、IFO2347株ではFY834株より細胞内トリプトファン濃度が若干高かったがその差は有意ではなかった (FY834株は1.494±0.091 mg/g dry cell、IFO2347株は1.538±0.258 mg/g dry cell)。

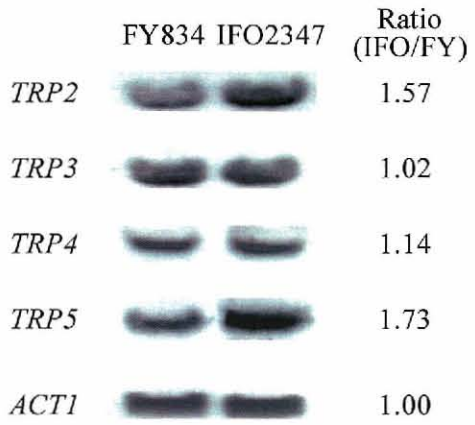

Fig. 2.13. 非ストレス環境下におけるFY834株とIFO2347株*TRP*遺伝子の発現量の比較。対数増殖中期の細胞より抽出したRNA用いてノーザンブロット解析により遺伝子発現量を解析した。*TRP2-5*遺伝子の発現比は*ACT1*遺伝子の発現比によりノーマライズした。

2.3.6 *TRP*遺伝子の過剰発現のエタノール耐性への影響

*TRP*遺伝子の1遺伝子破壊株がエタノール感受性を示したことから、トリプトファン合成はエタノール耐性にとって必要な機能であることが示唆された (Fig. 2.12)。また、ノーザン解析によりエタノール耐性酵母であるIFO2347株においてFY834株より*TRP*遺伝子が非エタノール環境下で高発現していることが分かった (Fig. 2.13)。このことより、非エタノール環境下でもともと*TRP*遺伝子の発現量が高いことがIFO2347株のエタノール耐性に関連していると推測し、*TRP*遺伝子の過剰発現がFY834株のエタノール耐性の向上につながると考えた。FY834株は*TRP1*遺伝子が破壊されトリプトファン要求性であり、IFO2347株では*TRP1*遺伝子は破壊されていない。そこで、FY834株の*TRP1*遺伝子を復帰させたFY834*TRP1*$^{+}$株を構築した。FY834*TRP1*$^{+}$株のエタノール環境下における比増殖速度を測定したところ、FY834株より増加したが、IFO2347株より低いことが分かった (Fig. 2.14)。

続いて、*TRP* 遺伝子を発現ベクターpAURΔCENARS にクローニングしたプラスミドおよび pAURΔCENARS のみを FY834*TRP1*$^{+}$株に導入し、*TRP* 遺伝子の 1 遺伝子過剰発現株およびその対照となるベクターのみを導入した株を構築した。それらのエタノール環境下における比増殖速度を測定した結果、*TRP1*、*TRP2*、*TRP3*、*TRP5* 遺伝子の 1 遺伝子過剰発現株はベクターのみを導入した FY834*TRP1*$^{+}$株より高い比増殖速度を示した。特に *TRP1*、*TRP5* 遺伝子の過剰発現株はエタノール耐性株である IFO2347 株と同程度の比増殖速度を示した。これらのことより、*TRP* 遺伝子の過剰発現はエタノール耐性を向上させることが分かった。

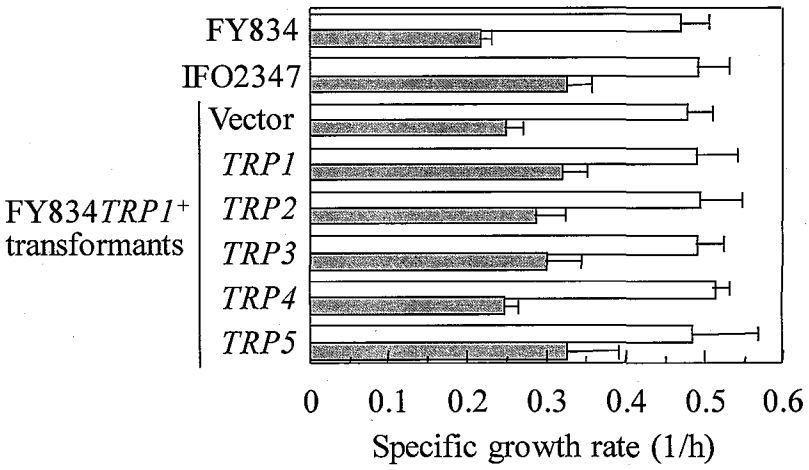

Fig. 2.14. *TRP* 遺伝子過剰発現株のエタノール環境下における比増殖速度。各培養において、エタノール環境下と非エタノール環境下における比増殖速度をそれぞれ灰色と白色の棒グラフで示した。Vector は FY834*TRP1*$^{+}$株に発現ベクターpAURΔCENARS のみを導入した株を示す。*TRP1-5* はそれぞれ FY834*TRP1*$^{+}$株を元株とした *TRP1-5* 遺伝子の過剰発現株である。

2.3.7 トリプトファンの培地への添加およびトリプトファン取り込み酵素遺伝子の過剰発現のエタノール耐性への影響

Bauer ら (2003) により、弱酸感受性は芳香族アミノ酸要求性に依存し、トリプトファンの培地への添加やトリプトファン取り込み酵素をコードする *TAT2* 遺伝子の過剰発現が弱酸感受性を抑制することが報告されている。本研究においても、*TRP* 遺伝子の破壊によるトリプトファン要求性株がエタノール感受性を示したため、トリプトファンの培地への添加や *TAT2* 遺伝子の過剰発現のエタノール耐性への影響を解析した。

YPD 液体培地にトリプトファンを 100 μg/mL となるように添加し、FY834 株を培養し、5% (v/v) エタノール環境下における比増殖速度を測定した。その結果、トリプトファン添加によりエタノール環境下における比増殖速度の向上がみられた (Fig.2.15A)。

TRP 遺伝子が含まれていたクラスタ No. 7 に存在する遺伝子が合成に関連する他のアミノ酸である、芳香族アミノ酸のフェニルアラニンや、リジン、メチオニンを培地に添加し培養を行ったが、エタノール環境下における比増殖速度の向上はみられなかった (Fig. 2.15A)。これらのことより、培地へのトリプトファンの添加がエタノール耐性の向上に関連することが示された。

また、FY834 株においてトリプトファン取り込み酵素をコードする *TAT2* 遺伝子 (Schmidt *et al.*, 1994) を過剰発現させた株を構築したところ、*TAT2* 過剰発現株は FY834 株にベクターpAURΔCENARS のみを導入した株に対してエタノール環境下における比増殖速度が高いことがわかった (Fig. 2.15B)。このことより、トリプトファンの取り込みの促進がエタノール耐性の付与に有効であることが示された。

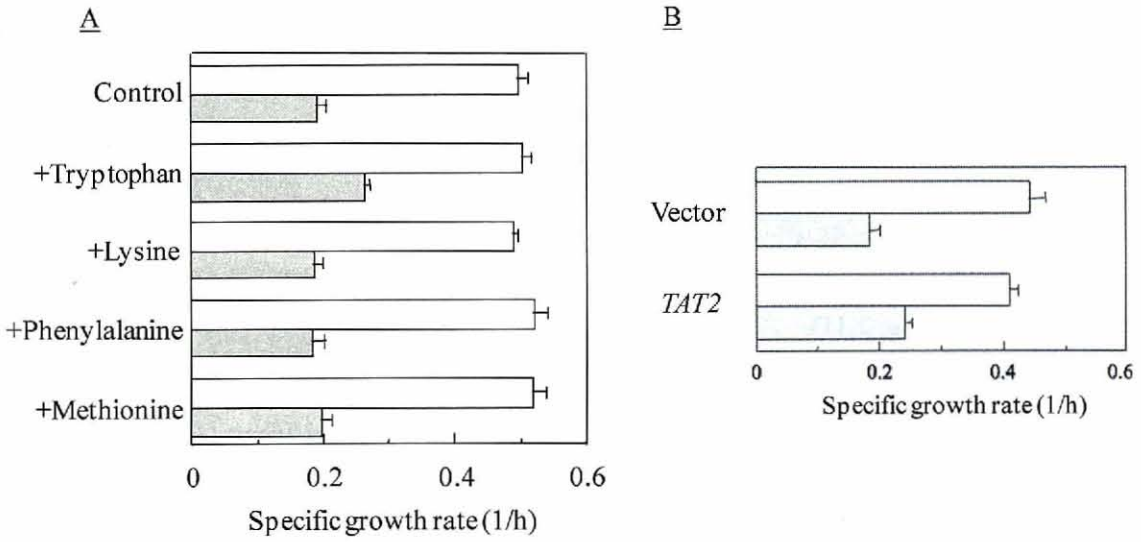

Fig. 2.15. エタノール耐性へのアミノ酸添加および *TAT2* 遺伝子の過剰発現の影響
各培養において、エタノール環境下と非エタノール環境下における比増殖速度をそれぞれ灰色と白色の棒グラフで示した。(A) トリプトファン (100 μg/mL)、リジン (100 μg/mL)、フェニルアラニン (84 μg/mL)、メチオニン (84 μg/mL) を YPD 液体培地に添加した培地と添加していない YPD 液体培地 (Control) における FY834 株の比増殖速度。(B) FY834 株において、トリプトファン取り込み酵素をコードする *TAT2* 遺伝子の過剰発現した株 (*TAT2*) とコントロールとしてベクターpAURΔCENARS のみを導入した株 (Vector) の比増殖速度。

2.4 考察

DNA マイクロアレイが開発され、網羅的に遺伝子発現情報を解析することが可能となった。この網羅的な遺伝子発現情報を利用することで新たな細胞育種法の開発ができるのではないかと期待されている。そこで、本章では、遺伝子発現情報にもとづく細胞育種法の開発に向け、酵母のエタノール環境下における遺伝子発現情報にもとづき、エタノール耐性酵母の育種を行うことを目指した。

まず、エタノール耐性に関連する遺伝子は、エタノール耐性能の異なる酵母においてエタノール環境下での遺伝子発現変化が異なっていると推測した。そこで、実験室酵母 FY834 株とエタノール耐性酵母である清酒酵母 IFO2347 株を用い、それぞれのエタノール環境下における遺伝子発現変化の情報を DNA マイクロアレイにより解析した。得られた遺伝子発現情報を、SOM と階層的クラスタリングを組み合わせ DNA マイクロアレイの実験誤差を考慮したクラスタリング手法により解析した (Fig. 2.4、Fig. 2.10)。得られたクラスタから、エタノール耐性に関連する遺伝子を抽出するために、エタノール耐性に関連する遺伝子は、(1) エタノール環境下において遺伝子発現が増加する、(2) エタノール耐性能の異なる酵母においてエタノール環境下における発現変化が異なる、という仮定を立てた。この仮定に一致する遺伝子発現変化を示す遺伝子が含まれるクラスタを選択した (Fig. 2.11)。さらにエタノール耐性酵母の育種候補遺伝子を絞り込むために、選択したクラスタに含まれる遺伝子の 1 遺伝子破壊株のエタノール環境下における増殖を解析した。その結果、トリプトファン合成に関連する *TRP2*、*TRP3*、*TRP4* 遺伝子の破壊株がエタノール感受性を示した (Fig. 2.12)。また、*TRP* 遺伝子の非ストレス環境下における遺伝子発現量をノーザンブロットにより解析したところ、エタノール耐性酵母である IFO2347 株において FY834 株より *TRP2* と *TRP5* 遺伝子が高発現していることが分かった (Fig. 2.13)。このことより、*TRP* 遺伝子の過剰発現が FY834 株のエタノール耐性の向上につながると考え、*TRP* 遺伝子の 1 遺伝子過剰発現株を構築したところ、エタノール耐性の向上に成功した (Fig. 2.14)。*TRP* 遺伝子の過剰発現株の中で、*TRP2* と *TRP5* 遺伝子の過剰発現株はエタノール耐性能が最も大きく向上し、IFO2347 株と同程度のエタノール耐性を示した。このことは *TRP2* と *TRP5* 遺伝子の IFO2347 株における FY834 株に対する発現比が他の *TRP* 遺伝子より高いことと一致しており、IFO2347 株において *TRP2* や *TRP5* が高発現していることが IFO2347 株のエタノール耐性の原因の一つである可能性が考えられる。

このように、非ストレス環境下で IFO2347 株において *TRP* 遺伝子が高発現していることや、*TRP* 遺伝子の過剰発現がエタノール耐性の向上につながることが分かった。これらのことより、IFO2347 株ではトリプトファン合成より促進され、細胞内トリプトファン濃度が FY834 株より高く、その結果が IFO2347 株のエタノール耐性に関連しているのではないかと推測した。そこで、細胞内トリプトファン濃度の測定を行った結果、

IFO2347 株では FY834 株よりトリプトファン濃度が若干高かったが有意な差ではなかった。この結果について、IFO2347 株では FY834 株と比べ、トリプトファンが何らかのエタノール耐性に関連する代謝物質に変換される活性が高いため、両株の細胞内トリプトファン濃度に有意な差がみられなかった可能性がある。また、エタノール耐性に必要な細胞内トリプトファン濃度が両株で異なることも考えられる。

Bauer ら (2003) により、酵母の弱酸感受性は芳香族アミノ酸要求性に依存し、トリプトファンの培地への添加やトリプトファン取り込み酵素をコードする *TAT2* 遺伝子の過剰発現が弱酸感受性を相補することが報告されている。また、この原因として、弱酸環境下におけるトリプトファン取り込み効率の低下が考えられている。本研究においても、弱酸環境下と同様に、エタノール環境下でトリプトファン要求性を示す *TRP* 遺伝子の破壊株がエタノール感受性を示した。そこで、トリプトファンの培地への添加や *TAT2* 遺伝子の過剰発現を行ったところ、エタノール耐性の向上につながった (Fig. 2.15)。このことより、エタノールストレスによりトリプトファン取り込み効率の低下が引き起こされ、*TRP* 遺伝子の過剰発現や、*TAT2* 遺伝子の過剰発現、培地へのトリプトファン添加がエタノール環境下におけるトリプトファン取り込み効率の低下を相補し、エタノール耐性の向上につながったと考えられる。

本研究でトリプトファンがエタノール耐性に関連することを明らかとしたが、アミノ酸とズトレス耐性については、いくつかの先行研究が報告されている。例えば、プロリンやアルギニンが冷凍耐性に関連することや、培地へのアミノ酸添加が NaCl による浸透圧ストレス耐性を向上させることが報告されている (Takagi *et al.*, 1997; Takagi *et al.*, 2000; Morita *et al.*, 2002; Pandey *et al.*, 2007)。またエタノールストレスに関しても、酵母のプロリン蓄積変異株がエタノール耐性を示すことが報告されている (Takagi *et al.*, 2005)。これらのことより、アミノ酸とストレス耐性には強い関連性があることが考えられる。

本研究においては、*TRP* 遺伝子や *TAT2* 遺伝子の過剰発現や、培地へのトリプトファン添加により FY834 株のエタノール耐性を向上させることに成功した。しかし、そのの比増殖速度は IFO2347 株と同程度であった。エタノール耐性に関連する因子としては、細胞膜の脂質組成 (del Castillo Agudo, 1992) やミトコンドリアゲノム (Aguilera and Benítez, 1985; Jiménez and Benítez, 1985)、トレハロースの蓄積 (Kim *et al.*, 1996; Lucero *et al.*, 2000) が報告されている。本研究においては 1 遺伝子の過剰発現など、単一の操作を行っただけであるため、複数の遺伝子を同時に過剰発現させなど、様々な操作を組み合わせることでさらなるエタノール耐性酵母の育種につながると期待される。

日本酒醸造やバイオエタノールなどの生産効率の向上に向け、よりエタノール耐性能の高い酵母の育種が望まれている。本研究では、FY834 株において *TRP* 遺伝子の過剰発現やトリプトファンの培地への添加がエタノール耐性の向上につながることを明らかとした。今後、エタノール耐性能の高い IFO2347 株のさらなるエタノール耐性の向上

を目指し、得られた結果がIFO2347株のエタノール耐性を向上させるのかを確認する必要がある。また、IFO2347株のエタノール耐性に関して、FY834株と遺伝子発現変化が異なる以外に、アミノ配列の違いによるタンパク質の活性の違いやIFO2347株にのみ存在する遺伝子がIFO2347株のエタノール耐性に関与している可能性もある。このように、異なる表現型を示す株間の解析にあたり、株間の遺伝子の存在の違いや配列の違いの解析といった比較ゲノム解析もまた細胞育種において重要な方法である。現在、FY834株は親株であるS288c株でゲノム配列が解読されているが (Goffeau *et al.*, 1996)、IFO2347株は解読中である。IFO2347株のゲノム解読が終了すれば、両株のゲノム配列を比較することにより、新たなエタノール耐性の向上に関連する情報を得ることができると期待される。

このように遺伝子発現情報にもとづき、エタノール耐性酵母の育種に成功した。網羅的な遺伝子発現情報の細胞育種への応用が期待される中、(1) ストレス耐性の異なる株の遺伝子発現情報から異なる発現変化を示す遺伝子を選択し、(2) それらの遺伝子おいて破壊がストレス感受性を引き起こす遺伝子を過剰発現する、という方法論を提案した。(1) と (2) の仮定は共に本研究での1例であり、全ての遺伝子について遺伝子破壊や過剰発現することにより、この方法の一般性を検証する必要がある。

2.5 結言

本章では、遺伝子発現情報にもとづく細胞育種法の開発に向け、実験室酵母 FY834 株とエタノール耐性酵母である清酒酵母 IFO2347 株のエタノール環境下における遺伝子発現情報を DNA マイクロアレイにより解析し、エタノール耐性酵母の育種を試みた。クラスタリング解析により、遺伝子発現の経時変化の類似度に応じ遺伝子をクラスタ化した。2 株で異なる遺伝子発現変化を示す遺伝子がエタノール耐性に関連すると推測し、そのような発現変化を示す遺伝子が含まれるクラスタを選択した。そのクラスタに含まれる遺伝子の 1 遺伝子破壊株のエタノール環境下における増殖を測定することで、破壊がエタノール感受性を引き起こす遺伝子を抽出した結果、*TRP* 遺伝子が選択された。FY834 株において *TRP* 遺伝子の過剰発現株を構築した結果、エタノール耐性の向上がみられ、遺伝子発現情報にもとづきエタノール耐性株の育種に成功した。

本章の結果より、遺伝子発現情報にもとづき育種を行う際、ストレス耐性の異なる株の遺伝子発現情報から異なる発現変化を示す遺伝子を選択し、それらの遺伝子において破壊がストレス感受性を引き起こす遺伝子を過剰発現することでエタノール耐性能を付与する一例が得られた。しかし、この方法の一般性を検証するため、第 3 章において、遺伝子の発現の網羅的情報と 1 遺伝子破壊による表現型変化の網羅的情報にどのような関連性があるのか、また、破壊が感受性を引き起こした遺伝子の過剰発現がストレス耐性を付与するのかについて詳細に解析した。

第3章　遺伝子発現情報と1遺伝子破壊株の表現型変化の関連性解析

3.1　緒言

DNA マイクロアレイが開発されたことにより、細胞内の全ての遺伝子の発現状態を解析することが可能となった。このような網羅的な遺伝子発現情報の細胞育種への応用が試みられている。先行研究として、解析対象の環境下において遺伝子発現が増加した遺伝子を破壊や過剰発現をすることでストレス耐性能や物質生産能の向上に成功した研究が報告されている (Imaizumi *et al.*, 2005; Hirasawa *et al.*, 2006a; Lee *et al.*, 2007; Ookubo *et al.*, 2008)。また、第2章で述べたように、遺伝子発現情報にもとづきエタノール耐性酵母の育種に成功した。このような、遺伝子発現情報を用いた育種において、解析対象の環境下において遺伝子発現量が増加した遺伝子はその環境にとって重要な役割を担っていると考えられ、しばしば育種候補の遺伝子として選択される。しかし、発現量が増加した遺伝子は必ずしもその環境にとって重要なものではなく、破壊や過剰発現を行ったとしても、表現型が変化しないことは多い。そもそも、環境変化により遺伝子発現が変化した遺伝子に、その環境の細胞状態 (表現型) に影響を与える遺伝子が多く含まれているのかは分かっておらず、その評価が行われていないのが現状である。その評価を行う方法として、全ての遺伝子について遺伝子破壊や過剰発現などの操作を行い、表現型の変化を引き起こした遺伝子を選択し、それらの遺伝子に遺伝子発現量が増加した遺伝子が多く含まれているかを解析することが考えられる。近年、出芽酵母において全ての遺伝子について1遺伝子を破壊した1遺伝子破壊株コレクションが構築された (Winzeler *et al.*,1999)。このコレクションを用いることで、全ての遺伝子について1遺伝子破壊が表現型に与える影響を解析することが可能となった。そこで、本章では、遺伝子発現情報にもとづく細胞育種方法の開発を目指し、環境変化に対する遺伝子発現変化の情報と、1遺伝子破壊株の表現型の変化の情報の関連性の解析を行った。

遺伝子発現情報として、第2章で取得した酵母のエタノール環境下における遺伝子発現変化の情報を用いた。1遺伝子破壊による表現型の変化の情報として、酵母の1遺伝子破壊株のエタノール環境下における比増殖速度を解析した。1遺伝子破壊株の培養結果より、破壊がエタノール環境下における比増殖速度を大きく低下させるエタノール感受性遺伝子を抽出した。続いて、遺伝子発現変化と1遺伝子破壊による表現型の変化の関連性について解析を行った。遺伝子発現変化と1遺伝子破壊株の表現型の変化の関連性については、それらに関連性が無いと報告されているが (Giaever *et al.*, 2002; Warringer *et al.*, 2003)、遺伝子発現変化と遺伝子破壊による表現型の変化の全ての遺伝子についての関連性を相関係数により評価されている程度であり、詳細な解析は行われていない。本章においては、エタノール感受性遺伝子の遺伝子発現の特徴について、エタ

ノール耐性能の異なる 2 株のエタノール環境下や非ストレス環境下における遺伝子発現情報を用いて解析し、どのような細胞状態の遺伝子発現情報を用い、どのような発現変化を示す遺伝子を選択することがエタノール環境下で増殖に必要な遺伝子の抽出につながるのかについて評価を行った。

一方で、1 遺伝子破壊株コレクションを培養し、増殖速度が低下した株で破壊されている遺伝子はその環境において必要な遺伝子 (機能) であり、その遺伝子が多く含まれる遺伝子機能を解析することで、その環境下で必要とされている細胞機能を理解することができる。このように 1 遺伝子破壊株は解析対象の環境に関連する遺伝子 (機能) の抽出に有用なツールであり、これまで 1000 を超えるストレスや化学物質環境下において 1 遺伝子破壊株を用いた解析が行われてきた (Giaever *et al.*, 2002; Warringer *et al.*, 2003; Scherens and Goffeau, 2004; Brown *et al.*, 2006; Hillenmeyer *et al.*, 2008)。第 2 章で述べたように、エタノールストレスは酵母を用いた物質生産過程で生産効率の低下を引き起こす重要な因子であり、酵母のエタノールに対する応答機構に関する研究が広く行われている。そこで、1 遺伝子破壊株をエタノール環境下で培養することで破壊がエタノール環境下における比増殖速度を大きく低下させるエタノール感受性遺伝子を抽出し、それらの遺伝子機能を解析することで、エタノール環境下で増殖に必要な細胞機能を抽出することを目的とした。

先行研究として、酵母の 1 遺伝子破壊株を用いたエタノール感受性遺伝子の選択が行われているが (Kubota *et al.*, 2004; Voorst *et al.*, 2006; Fujita *et al.*, 2006)、エタノールを添加した寒天培地上におけるコロニー形成による評価にもとづくため、定量的に 1 遺伝破壊が増殖に与える影響が解析されていない。本研究では、1 遺伝子破壊株をエタノールを添加した液体培地で培養し、比増殖速度を測定することで、1 遺伝子破壊がエタノール環境下での増殖に与える影響を定量的に解析した。このことにより、コロニー形成では評価できなかった比較的小さな増殖速度の変化を解析することが可能であり、より詳細にエタノール環境下において必要とされる遺伝子 (機能) の抽出ができると考えられる。また、浸透圧環境下においても 1 遺伝子破壊株を培養し、破壊が浸透圧感受性を引き起こす浸透圧感受性遺伝子を選択し、エタノール感受性遺伝子と比較することで、エタノールストレス特異的に必要な細胞機能の抽出を行った。

本章では、1 遺伝子破壊株の培養によるエタノール感受性遺伝子の選択について述べた後、まず、エタノール感受性遺伝子の遺伝子機能を解析することでエタノール環境下において必要とされる細胞機能について論じた。次に、遺伝子発現情報と 1 遺伝子破壊による表現型の変化の関連性を解析し、遺伝子発現情報が細胞育種においてどのように利用可能な情報であるかについて論じた。本章の概要を Fig. 3.1 に示した。

なお本論文では、遺伝子破壊が増殖速度の低下を引き起こした遺伝子を「感受性遺伝子」、増殖速度の向上を引き起こした遺伝子を「耐性遺伝子」と定義した。エタノール感受性を示した1遺伝子破壊株において破壊されている遺伝子は「エタノール感受性遺伝子」、エタノール耐性を示した1遺伝子破壊株において破壊されている遺伝子は「エタノール耐性遺伝子」として記述した。同様に浸透圧感受性もしくは耐性を示した1遺伝子破壊株において破壊されている遺伝子は「浸透圧感受性遺伝子」、「浸透圧耐性遺伝子」と記述した。

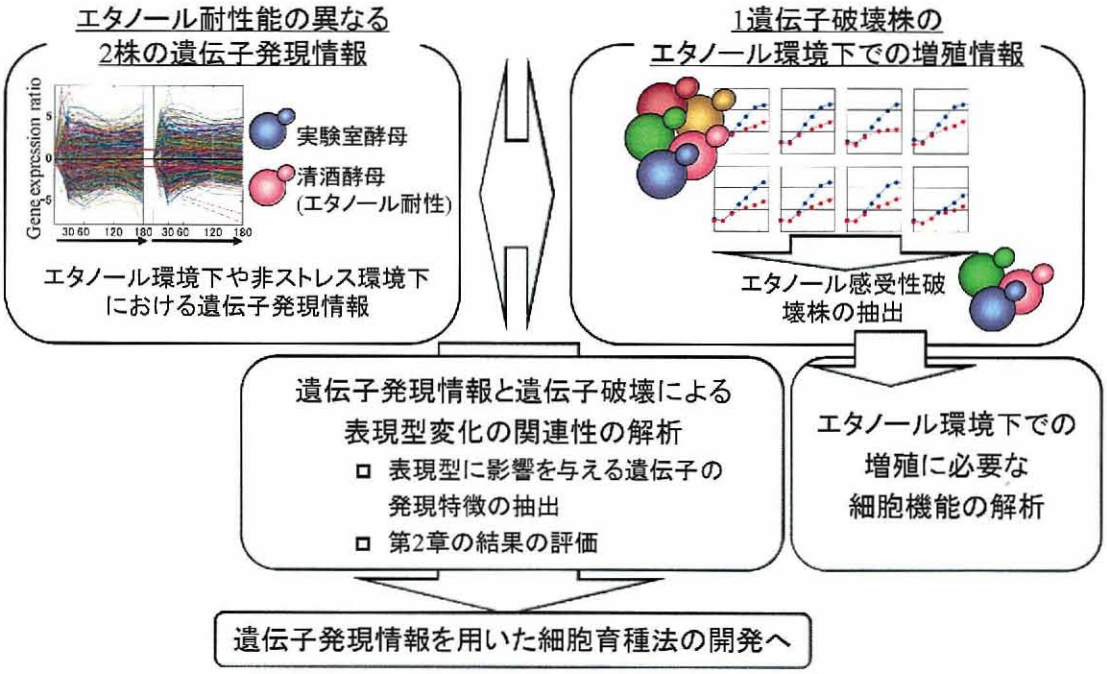

Fig. 3.1. 第3章の概要図

3.2 実験方法及び実験材料

3.2.1 使用菌株

本章で用いた酵母菌株と大腸菌株を Table 3.1 に示す。酵母の 1 遺伝子破壊株コレクションは Open Biosystems (USA) より購入した。

Table 3.1. 第 3 章で用いた酵母菌株と大腸菌株

Strain	Genotype
Saccharomyces cerevisiae	
FY834 (Winston *et al.*, 1995)	*MATα his∆200 ura3-52 leu2∆1 lys2∆202 trp1∆63*
BY4739 (Winston *et al.*, 1995)	*MATα leu2∆0 lys2∆0 ura3∆0*
BY4742 (Winston *et al.*, 1995)	*MATα his3∆1 leu2∆0 lys2∆0 ura3∆0*
Yeast MAT alpha deletion strain collection (Winzeler *et al.*, 1999)	*ORF* :: *KanMX* based on BY4739 and BY4742
Escherichia coli	
DH5α	F^-, Φ80d*lacZ*ΔM15, Δ(*lacZYA-argF*)U169, *deoR*, *recA*1, *endA*1, *hsdR*17(r_K^-, m_K^+), *phoA*, *supE*44, λ^-, *thi*-1, *gyrA*96, *relA*1

3.2.2 培地

酵母の培養には、YPD 培地 (1% Bacto yeast extract、2% Bacto peptone、2% glucose) を用いた。目的に応じて YPD 培地に G418 (終濃度 150 μg/mL) や aureobasidin A (終濃度 200 ng/mL、Takara Bio) を添加した。寒天培地を作成する際は Agar を 2% (w/v) となるように加えた。

大腸菌の培養には、L 培地 (1% Bacto polypeptone、0.5% Bacto yeast extract、0.5% NaCl、0.1% glucose) を用いた。プラスミドを保持した大腸菌の培養には L 培地に Ampicillin (終濃度 50 μg/mL) を添加した。寒天培地を作成する際は Agar を 1.5% (w/v) となるように加えた。

3.2.3 培養方法 (96 ウェルマイクロタイタープレート)

3.2.3.1 培養用ストックの作成

–80 °C で保存した 1 遺伝子破壊株セット Yeast MAT alpha collection (Open biosystems) を室温で融解した。マイクロピペットを用いて 2 μL の菌体溶液を YPD + 150μg/mL G418 寒天培地にスポットし、30 °C で 3 日間静置培養した。オートクレーブにより滅菌した爪楊枝を用いて、コロニーを掻き取り、200 μL の YPD + 15% グリセロール液体培地を分注した 96 ウェルマイクロタイタープレート (以下 96 ウェルプレート。Corning) に懸

濁した。この際、96 ウェルプレートの最外周に位置するウェルは乾燥しやすいため使用せず、それ以外の 60 ウェルを用いた。また、プレート間の培養状態の違いを補正するために、基準株として 1 遺伝子破壊株コレクションに含まれる BY4742Δ*his3* 株を各プレートの 4 ウェル ((3, 4), (3, 9), (6, 4), (6, 9)、括弧内は(行番号, 列番号)) に含めた。なお、*HIS3* 遺伝子は破壊株コレクションの親株 BY4742 株において遺伝子マーカーとして欠損されており、BY4742Δ*his3* 株は BY4742 株に対し G418 耐性である以外の遺伝子型は変わらないため、本論文では BY4742Δ*his3* 株を破壊株コレクションの親株とみなして取り扱った。こうして作成した 200 μL の菌体溶液を含む 96 ウェルプレートから 50 μL を新しい 96 ウェルプレートに分注し、それぞれ–80 °C で保存した。培養には 50 μL の菌体溶液を含むストックプレートを用いた。

3. 2. 3. 2 培養

–80 °C で保存したストックを室温で融解し、2 μL の菌体溶液をマイクロピペットにより 100 μL の YPD 液体培地を分注した 96 ウェルプレートに植菌した。前培養として 30 °C で 24 時間、マイクロプレートシェイカーTITRAMAX1000 (Heidolph Instruments, Germany) を用いて 1050 stroke/min で振盪した。30 °C で予め暖めた 100 μL の YPD 液体培地を分注した 96 ウェルプレートに、2 μL の前培養液を植菌し、30 °C で静置培養を行った。増殖はマイクロプレートリーダー1420 ARVO (PerkinElmer) による吸光度 (OD_{600}) を菌体濃度として測定した。なお、吸光度測定前には、沈んだ菌体を懸濁するためにプレートシェイカーにより 1 分間、1050 stroke/min で振とうした。

培養途中に酵母にエタノールストレスを与える際は、対数増殖中期に当たる培養開始 4 時間後に、終濃度が 5%もしくは 8%となるように 25%もしくは 40%エタノール 25 μL を培地に添加した。浸透圧ストレスを与える際は、終濃度が 1M NaCl となるように 25 μL の 5M NaCl を培地に添加した。また、ストレスを与えない際は、滅菌水 25 μL を培地に添加した。

3. 2. 3. 3 比増殖速度の計算

測定した吸光度 OD_{600} から、培地のみの吸光度 OD_{600} を差し引いた。続いて、プレートリーダーによる測定では培養液を希釈せずに測定を行っているため、高菌体濃度による吸光度の非線形性を補正する必要がある。そこで、複数の菌体溶液について、マイクロプレートリーダーで OD_{600} を測定し、一方で、同一の菌体溶液を適宜希釈して分光光度計 UV mini-1240 (Shimadzu) により OD_{660} を測定した。両吸光度より、マイクロプレートリーダーの吸光度の補正式を計算した。なお、エタノールや NaCl、滅菌水添加による培養液容量の変化に合わせ、2 種類の補正曲線を用いた。培養開始時の 100 μL の菌体溶液に対しては式 [3.1] を、エタノールや NaCl、滅菌水添加後の 125 μL の菌体溶液

に対しては式 [3.2] を用いた。OD はマイクロプレートリーダーの吸光度を、OD'は補正後の OD を示す。

$$OD' = 18.706 \times OD^3 - 13.941 \times OD^2 + 21.289 \times OD \quad [3.1]$$

$$OD' = 15.140 \times OD^3 - 10.744 \times OD^2 + 19.586 \times OD \quad [3.2]$$

各 1 遺伝子破壊株の比増殖速度は、非ストレス環境下においては、培養開始 5.5、7、9 時間後の OD'を、エタノールと浸透圧ストレス環境下においては培養開始 7、9、11 時間後の OD'を用いて計算を行った。なお、比増殖速度の計算に必要な測定データ数について、3 点 (培養開始 7、9、11 時間) と 5 点 (培養開始 7、8, 9、10、11 時間) の比増殖速度を比較したところ、Fig. 3.2 に示すように非常に高い相関がみられ、3 点の菌体濃度データが比増殖速度の計算に十分であると決定した。

さらに、異なるプレート間の比増殖速度を比較するために、各プレートに導入した基準株 (BY4742Δ*his3* 株) の比増殖速度を用いて各破壊株の比増殖速度の正規化を式 [3.3] を用いて行った。

$$\mu'_{i,j,k} = \mu_{i,j,k} \cdot \left(\frac{\mu_{std,k}}{\overline{\mu}_{std,j,k}}\right) \quad [3.3]$$

式 [3.3] において、$\mu_{i,j,k}$ はプレート j に含まれる 1 遺伝子破壊株 i の環境 k における比増殖速度を示す。$\overline{\mu}_{std,j,k}$ はプレート j の 4 ウェルに含まれる基準株の環境 k における比増殖速度の平均を示す。$\mu_{std,k}$ は環境 k における全てのプレートに含まれる基準株の比増殖速度の中央値を示す。$\mu'_{i,j,k}$ は正規化された比増殖速度を示す。

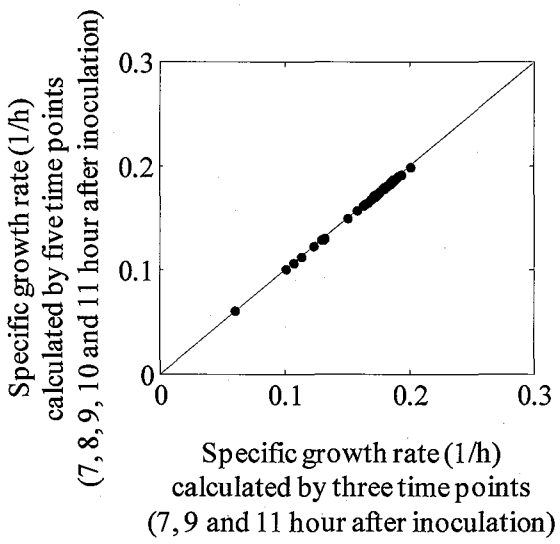

Fig. 3.2. 比増殖速度の計算に用いるデータ数の影響。60 株の 1 遺伝子破壊株について 8%エタノール環境下における比増殖速度を 3 点 (培養開始後 7、9、11 時間) および 5 点 (培養開始後 7、8、9、10、11 時間) の菌体濃度のデータより計算した。両比増殖速度の相関は高く、3 点のデータによる比増殖速度の信頼性は高いことが示された。

3. 2. 4 坂口フラスコによる培養

–80 °C で保存した菌体を、必要に応じ抗生物質を加えた YPD 寒天培地に画線し、30 °C で 3 日間静置培養した。シングルコロニーを 5 mL の YPD 液体培地を入れた試験管に植菌し、前培養として 30 °C で 24 時間振とう培養 (150 stroke/min) した。前培養液 1 mL を 100 mL YPD 液体培地を入れた 500 mL 容坂口フラスコに植菌し、30 °C、150 stroke/min で振とう培養 (MM10、タイテック) を行った。増殖は分光光度計 UV mini-1240 を用い吸光度 (OD_{660}) により測定した。なお、培養途中に酵母にストレスを与える際は、対数増殖中期に当たる培養開始 5 時間後に、終濃度が 5%もしくは 8%となるように 25%もしくは 40%エタノール 25 mL を培地に添加した。また、ストレスを与えない培養は、滅菌水 25 mL を培地に添加した。

3. 2. 5 遺伝子機能分類

遺伝子機能情報について、Munich Information Center for Protein Sequences (MIPS) データベース (http://mips.gsf.de/genre/proj/yeast/) における Functional Catalogue (FunCat, Ruepp *et al.*, 2004) と *Saccharomyces* genome database (SGD, http://www.yeastgenome.org/) を用いた。

3. 2. 6　統計解析

選択した遺伝子に存在する解析対象のカテゴリに含まれる遺伝子の割合が、全ての遺伝子における存在割合に対して有意に多いのかについて解析するために、超超幾何分布にもとづく検定を行った。検定方法は式 [3.4] に示す。

$$P = \sum_{i=k}^{n} \frac{\binom{M}{i}\binom{N-M}{n-i}}{\binom{N}{n}} \qquad [3.4]$$

式 [3.4] において、N は全ての遺伝子数、M は全ての遺伝子に含まれる解析対象のカテゴリに属する遺伝子数、n は選択した遺伝子群の遺伝子数、k は選択した遺伝子群に含まれる解析対象のカテゴリに属する遺伝子数を示す。

3. 2. 7　1 遺伝子過剰発現株の構築

第 2 章と同様の方法により遺伝子過剰発現株を構築した。*LDB19*、*MEH1*、*PRO2*、*YNL335W* の各 ORF 領域を BY4742 株から抽出した染色体を鋳型とし、KOD-plus- DNA ポリメラーゼ (TOYOBO) を用いて、94 °C 2 min -> [94 °C 15 sec -> 50 °C 30 sec -> 72 °C 1min/1kb] x 30 cycles - 72 °C 10 min -> 4 °C の条件 PCR により増幅した。なおプライマーには Table 3.2 に示す制限酵素サイトを導入した配列を導入した。PCR 増幅した DNA 断片をプライマーに導入した制限酵素で処理し、同じ制限酵素により処理した YIp タイプの発現ベクターpAURΔCENARS にクローニングした。クローニングした各遺伝子配列は DNA シークエンサーABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) と BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v. 3.1 (Applied Biosystems)を用いて、変異が導入されていないことを確認した。各遺伝子をクローニングしたプラスミドおよび pAURΔCENARS を、酢酸リチウム法により BY4742Δ*his3* 株に導入し、aureobasidine A (200 μg/mL) 含有 YPD 寒天培地で選択することで形質転換体を取得した。

Table 3.2. 過剰発現株構築用プライマー

遺伝子名	プライマー配列(5' -> 3')	制限酵素
YNL335W	CTCCGGTACCAAAGAATCAATCATG	*Kpn*I
	TGTTCATTCTAGACTCGCCTCATTG	*Xba*I
PRO2	GAGTAGGTACCAAAAGGAGCACAGG	*Kpn*I
	ACGTCCTCTAGACATGGAACTTAGC	*Xba*I
LDB19	TCACGGTACCATACGTTTTACCATG	*Kpn*I
	AAATCTCGAGTAAATACCTTTAACG	*Xho*I
MEH1	TAGTGGGTACCACGACAGATTTAAG	*Kpn*I
	AGCTTCTAGACCAATGATGTTATAC	*Xba*I

下線部は制限酵素サイトを示す。

3.3 結果

3.3.1 エタノール感受性株と耐性株の選択

1遺伝子破壊がエタノールストレス環境下における増殖に与える影響を定量的に解析するために、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の1遺伝子破壊株コレクション (Winzeler *et al.*, 1999) の非ストレス環境下およびストレス環境下における比増殖速度を解析した。1遺伝子破壊株を培養し、対数増殖中期に培養液にエタノール (終濃度 8% (v/v))や NaCl (終濃度 1M) を添加することでストレス環境を作成した。ストレス添加後の比増殖速度を測定することで、1遺伝子破壊がストレス環境下における増殖に与える影響を評価した。非ストレス環境下における全ての1遺伝子破壊株の比増殖速度は高い再現性を示した (Fig. 3.3)。

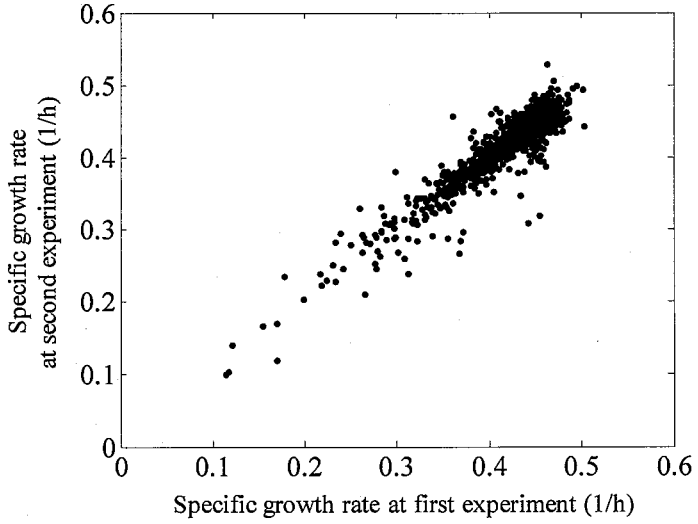

Fig. 3.3. 1遺伝子破壊株の培養結果の再現性。全ての1遺伝子破壊株を非ストレス環境下で2回培養し、比増殖速度の再現性を示した。各点がある遺伝子の破壊株の情報を示す。

1 遺伝子破壊株を 96 ウェルプレートで培養する際に、各プレートに基準株として BY4742Δ*his3* 株を 4 ウェルに含ませた。90 枚の 96 ウェルプレートに分注された全ての1遺伝子破壊株を各環境下で2回培養し、それとともに基準株について 720 (90 枚 × 4 ウェル × 2 回) の比増殖速度のデータを取得した。Table 3.3 に各環境下における基準株の 720 の比増殖速度のデータの平均値および標準偏差を示した。Table 3.3 より非ストレス環境下における基準株の比増殖速度の変動係数 (coefficient of variance; CV) 値は 1~4%と低く、本研究で用いた培養系を用いることで高精度に比増殖速度を評価できることが示された。

全ての 1 遺伝子破壊株からストレス感受性株と耐性株を選択するために、基準株の比増殖速度を用いて統計的に抽出した。基準株の比増殖速度の分布はベル型を示したことから (Fig.3.4)、正規分布と仮定すると平均値 ± 3.3 × 標準偏差の範囲内に全データの 99.9%が含まれることが期待される。そこで、基準株の比増殖速度の平均値 ± 3.3 × 標準偏差の範囲外の比増殖速度を示す 1 遺伝子破壊株を基準株と有意に比増殖速度が異なるストレス感受性株、耐性株と定義した ($p < 0.001$)。なお、1 遺伝子破壊株は各環境下で 2 回の培養を行っており、本研究では培養誤差の影響を考え、2 回の培養の比増殖速度がともに設定した閾値を超える 1 遺伝子破壊株をストレス感受性株、耐性株と定義した。ストレス感受性株と耐性株の選択に用いた比増殖速度の閾値は Table 3.3 に示す。また、各環境下におけるストレス感受性株と耐性株の数を Table 3.4 に示す。ストレス感受性を示した 1 遺伝子破壊株の多くは、非ストレス環境下においても増殖阻害を示したため、それらの 1 遺伝子破壊株を除いたストレス環境下でのみ増殖阻害が引き起こされるストレス感受性株の数を同じく Table 3.4 に示した。

Table 3.3. 基準株の各環境下における比増殖速度およびストレス感受性/耐性株の選択に用いた比増殖速度の閾値

Condition	Average specific growth rate (1/h)	Standard deviation (1/h)	Coefficient of variance (%)	Threshold for sensitive strains (1/h)*	Threshold for tolerant strains (1/h)*
Non-stress	0.452	4.4×10^{-3}	1.0	0.437	0.466
8% Ethanol	0.178	5.6×10^{-3}	3.1	0.160	0.196
1 M NaCl	0.203	7.6×10^{-3}	3.7	0.178	0.229

* 閾値は基準株の比増殖速度の平均値 ± 3.3 × 標準偏差と設定した。

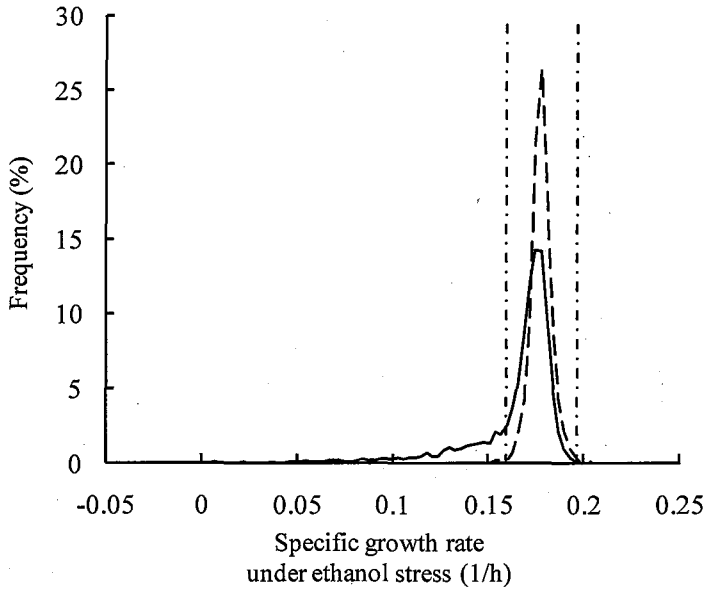

Fig. 3.4. エタノール感受性株と耐性株の選択。破線は 8% エタノール環境下における基準株の比増殖速度の分布を示し、実線は全ての 1 遺伝子破壊株のエタノール環境下における比増殖速度の分布を示す。縦軸に平行な 1 点破線はエタノール感受性株と耐性株の選択に用いた閾値を示す。

Table 3.4. 1 遺伝子破壊株のストレス感受性株と耐性株の数

	Sensitive	No-change	Tolerant
Non-stress	591 (0)	4095 (4095)	43 (43)
8% Ethanol	864 (446)	3862 (3690)	3 (2)
1 M NaCl	637 (329)	4080 (3799)	12 (10)

括弧内の数字は非ストレス環境下で増殖阻害を示した 1 遺伝子破壊株を除いた 1 遺伝子破壊株の数。

3. 3. 2 本研究と先行研究で選択されたエタノール感受性遺伝子の比較

1 遺伝子破壊株コレクションを用いたエタノール感受性遺伝子の選択について先行研究が報告されているため (Kubota *et al.*, 2004; Voorst *et al.*, 2006; Fujita *et al.*, 2006)、本研究で選択したエタノール感受性遺伝子と比較を行った。その結果、本研究で選択されたエタノール感受性遺伝子は、それぞれの先行研究に対して約 70%程度の共通性があった (Table 3.5)。また、先行研究で選択されたエタノール感受性遺伝子には、本研究で選択した破壊が非ストレス環境下において増殖阻害を引き起こした遺伝子が多く含まれていた (Table 3.5)。エタノール環境下における増殖情報のみからエタノール感受性遺伝子

を選択した場合、その遺伝子の破壊が非ストレス環境下における増殖の低下を引き起こしたため、エタノール環境下においても感受性遺伝子と評価された遺伝子を選択する可能性がある。そこで、エタノール感受性遺伝子から、破壊が非ストレス環境下で増殖阻害を引き起こした遺伝子を除き、エタノール環境下でのみ比増殖速度の低下を引き起こす遺伝子をエタノール感受性遺伝子として今後の解析に用いた。Warringer ら (2003) は、非ストレス環境下における増殖速度の低下を考慮するために、非ストレス環境下における比増殖速度に対するストレス環境下における比増殖速度の比 (Phenotype Index) を解析に用いた。しかし、この方法では、非ストレス環境下で大きな比増殖速度の低下を示した 1 遺伝子破壊株の Phenotype Index はストレス耐性と選択されるほど大きな値を示すことがある。そのような影響を除くため、本研究では、非ストレス環境下で増殖阻害を示す 1 遺伝子破壊株を除き、比増殖速度の値そのものを解析に用いた。

本研究と 3 つの先行研究それぞれについてエタノール感受性遺伝子は 70%の共通性を示したが、全ての研究に共通したエタノール感受性遺伝子は *GIM4*、*GIM5*、*SMI1*、*VPS36* の 4 遺伝子しか存在しなかった。エタノール感受性遺伝子の共通性が低い原因として、液体培養やコロニー形成といった培養方法の違いや、ストレスとして用いられたエタノール濃度の違いが考えられる。*GIM4* と *GIM5* 遺伝子は heterohexameric cochaperone prefolding complex のサブユニットのタンパク質をコードする (Geissler *et al.*, 1998)。これらの遺伝子の破壊株は本研究において、非ストレス環境下でも増殖阻害を示したため、*GIM4* と *GIM5* 遺伝子はエタノール環境下だけではなく通常の増殖にも必要な遺伝子であることが示唆された。*VPS36* 遺伝子は Endosomal Sorting Complex Required for Transport (ESCRT)-II の構成要素をコードする (Babst *et al.*, 2002a)。ESCRT には、ESCRT-I (*MVB12*、*SRN2*、*STP22*、*VPS28*、Katzmann *et al.*, 2001)、ESCRT-II (*SNF8*、*VPS25*、Babst *et al.*, 2002a)、ESCRT-III (*DID4*、*SNF7*、*VPS24*、Babst *et al.*, 2002b) が存在し、注目すべきことに ESCRT の全ての構成要素をコードする遺伝子は全てエタノール感受性遺伝子であった。ESCRT はタンパク質の後期エンドソーム多胞体への輸送・選別を担っており (Bowers and Stevens, 2005)、この機能はエタノール環境下における増殖に必要なものであること示唆された。*SMI1* 遺伝子がコードするタンパク質は、細胞周期の進行と cell wall integrity の調整に関連する。このことは、エタノール環境下で細胞周期の制御が重要な役割を担うという報告と一致した (Kubota *et al.*, 2004)。

Table 3.5. 本研究と先行研究で選択されたエタノール感受性遺伝子の比較

	No. of ethanol-sensitive strains	Kubota *et al.* (2004)	Voorst *et al.* (2006)	Fujita *et al.* (2006)	Present study
Kubota *et al.* (2004)	256 (114)		21 (5)	61 (27)	183 (63)
Voorst *et al.* (2006)	46 (20)			11 (5)	38 (14)
Fujita *et al.* (2006)	137 (56)				102 (33)
Present study	864 (446)				

括弧内の数字は非ストレス環境下で増殖阻害を示した1遺伝子破壊株を除いた1遺伝子破壊株の数。

3.3.3 エタノール感受性遺伝子の機能に関する解析

3.3.3.1 エタノール感受性遺伝子の機能解析

1遺伝子破壊株の培養から得られた、エタノール感受性遺伝子が多く含まれる遺伝子機能は酵母のエタノール耐性にとって重要な役割を担っていると考えられる。そこで、MIPS データベース (Ruepp *et al.*, 2004) の機能カテゴリを用いて、破壊株コレクションにおいて破壊されている遺伝子に対し、エタノール感受性遺伝子における存在割合が有意に ($p < 0.01$) 多い遺伝子機能カテゴリを解析した (Table 3.6)。

"Metabolism of tryptophan" の機能カテゴリにはエタノール感受性遺伝子としてトリプトファンをはじめとする芳香族アミノ酸の合成に関連のある *TRP1*、*TRP2*、*TRP3*、*TRP4*、*TRP5*、*ARO1*、*ARO2*、*ARO7* が含まれていた。Fig. 3.5 に芳香族アミノ酸の合成経路と関連する 1 遺伝子破壊株のストレス感受性の情報をまとめた。第 2 章において *TRP1-5* 遺伝子の破壊がエタノール感受性を、*TRP1-3* と *TRP5* 遺伝子の過剰発現がエタノール耐性を引き起こすことを報告した。本章ではさらにトリプトファン合成に関連する他の遺伝子である *ARO1*、*ARO2*、*ARO7* がエタノール耐性に関連することを明らかとした。*ARO1* と *ARO2* 遺伝子は芳香族アミノ酸の前駆体であるコリスミ酸の合成に関連し、それらの破壊は芳香族アミノ酸であるトリプトファン、チロシン、フェニルアラニン要求性を引き起こす (Lucchini *et al.*, 1978)。よって *ARO1* と *ARO2* 遺伝子の 1 遺伝子破壊株のエタノール感受性は、トリプトファン要求性に因ることだと推測される。*ARO7* 遺伝子は、コリスミ酸ムターゼをコードし、コリスミ酸をチロシンとフェニルアラニンの前駆体であるプレフェン酸に変換する。*ARO7* 遺伝子の変異株はチロシンとフェニル

アラニン要求性を引き起こすことが報告されている (Ball *et al.*, 1986)。それぞれのアミノ酸の合成に関連する *TYR1* と *PHA2* 遺伝子はエタノール感受性遺伝子でないため、両アミノ酸の二重要求性が *ARO7* 遺伝子の破壊がエタノール感受性を引き起こしたことと関連していると推測される。

"Vesicular transport (Golgi network, *etc.*)" と "Vacuolar transport" の機能カテゴリには、*VPS* 遺伝子 (*VPS4*、*VPS24*、*VPS25*、*VPS28*、*VPS30*、*VPS35*、*VPS36*、*VPS38*、*VPS54*、*VPS68*、*VPS74*) がエタノール感受性遺伝子として含まれていた。*VPS* 遺伝子は、3.3.2 節で述べた ESCRT によるソーティングを含むタンパク質の液胞へのソーティングに関連しており、先行研究と同様に、この機能がエタノール環境下における増殖に必要であることが示唆された (Kubota *et al.*, 2004; Voorst *et al.*, 2006)。

"Aerobic respiration" と "Mitochondrion" の機能カテゴリは、非常に低い p 値を示した。このカテゴリに含まれるエタノール感受性遺伝子はミトコンドリアの機能である ubiquinone (coenzyme Q) biosynthesis (*COQ5*、*COQ9*、*COQ10*)、cytochrome c oxidase (*COX7*、*COX9*、*COX11*、*COX12*、*COX14*、*COX16*、*COX18*、*COX23*)、mitochondrial ribosomal protein (*MRP1*、*MRP49*、*MRPL6*、*MRPL7*、*MRPL13*、*MRPL20*、*MRPL22*、*MRPL25*、*MRPL27*、*MRPL32*、*MRPL33*、*MRPL37*、*MRPL38*、*MRPL40*、*MRPL49*、*MRPS5*、*MRPS8*、*MRPS17*、*MRPS28*) に関連していた。ミトコンドリアの機能とエタノール耐性の関連性については、呼吸欠損株がエタノール感受性を示すことや (Aguilera & Benítez, 1985)、エタノール耐性がミトコンドリアゲノムに依存すること (Jiménez & Benítez, 1988) が報告されている。これらのことより、ミトコンドリアの機能がエタノール耐性にとって重要な役割を担っていることが確認された。

Table 3.6. エタノール感受性遺伝子に多く含まれる遺伝子機能カテゴリ

MIPS functional category number	MIPS functional category	*p*-value	No. of genes among selected genes (446)	No. of genes among all genes (4,138)
01.01.09.06	Metabolism of tryptophan	1.01×10^{-3}	8	16
01.01.09.06.01	Biosynthesis of tryptophan	2.49×10^{-3}	5	7
01.05.04	Regulation of C-compound and carbohydrate utilization	2.99×10^{-3}	18	84
01.20.15.03	Biosynthesis of ubiquinone	4.58×10^{-3}	3	4
02.11	Electron transport and membrane-associated energy conservation	2.04×10^{-3}	11	39
02.13.03	Aerobic respiration	1.07×10^{-11}	26	56
11.04.03.01	Splicing	2.52×10^{-3}	9	29
12.01.01	Ribosomal proteins	5.70×10^{-11}	36	105
12.07	Translational control	2.92×10^{-3}	10	35
12.10	Aminoacyl-tRNA-synthetases	2.14×10^{-3}	6	14
14.04	Protein targeting, sorting, and translocation	8.66×10^{-8}	39	151
14.10	Assembly of protein complexes	2.07×10^{-8}	31	100
16.07	Structural protein	3.57×10^{-3}	7	20
20.01.21	RNA transport	6.56×10^{-3}	9	33
20.09.01	Nuclear transport	4.17×10^{-4}	10	28
20.09.07	Vesicular transport (Golgi network, etc.)	3.82×10^{-3}	21	106
20.09.07.03	ER to Golgi transport	3.26×10^{-3}	9	30
20.09.10	Peroxisomal transport	6.64×10^{-3}	6	17

次ページに続く

Table 3.6. (続き) エタノール感受性遺伝子に多く含まれる遺伝子機能カテゴリ

MIPS functional category number	MIPS functional category	*p*-value	No. of genes among selected genes (446)	No. of genes among all genes (4,138)
20.09.13	Vacuolar transport	5.71×10^{-6}	28	108
30.01.05.05.01	Small GTPase-mediated signal transduction	2.55×10^{-3}	11	40
42.10.05	Nuclear membrane	6.54×10^{-3}	4	8
42.16	Mitochondrion	7.99×10^{-10}	36	114
43.01.03.05	Budding, cell polarity, and filament formation	8.68×10^{-3}	33	202

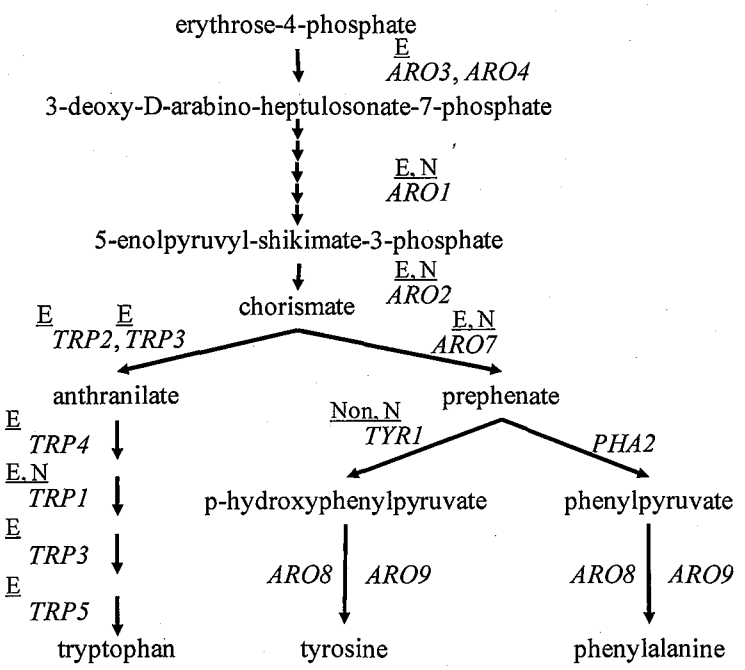

Fig. 3.5. 芳香族アミノ酸合成経路と 1 遺伝子破壊株のストレス感受性の情報。non、E、N はその遺伝子の 1 遺伝子破壊株が非ストレス、エタノール、浸透圧ストレス環境に感受性であることを示す。代謝経路は SGD の代謝経路マップ "Superpathway of phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis pathway" を参考にした。

3. 3. 3. 2 *PEX* 遺伝子破壊株とエタノール感受性

エタノール感受性遺伝子に多く含まれる遺伝子機能カテゴリとして抽出された "peroxisomal transport" にはエタノール感受性遺伝子として *PEX8*、*PEX14*、*PEX15*、*PEX17*、*PEX19*、*PEX22* 遺伝子が含まれていた。*PEX* 遺伝子の機能と破壊株のエタノール感受性について Table 3.7 にまとめた。また、ペルオキシソームにおける *PEX* 遺伝子の機能を Fig. 3.6 にまとめた。これらの *PEX* 遺伝子はペルオキシソームのタンパク質輸送機能やペルオキシソーム膜タンパク質の輸送機能に関連していた (Brown and Baker, 2003)。さらに、その他の *PEX* 遺伝子について調べたところ、ペルオキシソームのタンパク質輸送機能に関連する *PEX1*、*PEX4*、*PEX10*、*PEX12* 遺伝子の 1 遺伝子破壊株もエタノール感受性を示した。しかし、ペルオキシソーム輸送シグナル (PTS; peroxisome targeting signal) 受容体や、ペルオキソームの数や大きさの制御に関連する *PEX* 遺伝子の破壊株はエタノール感受性を示さなかった (Table 3.7)。

さらに、エタノール感受性を示した 1 遺伝子破壊株の *PEX* 遺伝子について、SGD や先行研究 (Erdmann *et al.*, 1989; Brocard *et al.*, 1997; Huhse *et al.*, 1998; Koller *et al.*, 1999; Hettema *et al.*, 2000; Rehling *et al.*, 2000; Albertini *et al.*, 2001; Birschmann *et al.*, 2005) によ

ると、それらの遺伝子破壊株ではペルオキソームの形成が観測されないことが報告されていた。このことより、*PEX* 遺伝子の破壊株のエタノール感受性は、ペルオキシソームそのものが合成されないことが原因であると推測される。また、ペルオキシソーム内での反応である脂肪酸のβ酸化やリジン合成 (Breitling *et al.*, 2002) に関連する酵素をコードする遺伝子の 1 遺伝子破壊株はエタノール感受性を示さなかった (Table 3.7)。このように、ペルオキシソームの存在がエタノール環境下における増殖に必要であるが、既知のペルオキシソーム内で行われる機能に関連する遺伝子の破壊はエタノール環境下における増殖に影響を与えたなったことより、ペルオキシソームはエタノール耐性に関連する未だ明らかにされていない機能を有している可能性が推測される。

Table 3.7. ペルオキシソームに関連する遺伝子と 1 遺伝子破壊株のエタノール感受性の情報

Category	Gene
Peroxisome transport machinery	*PEX1*, *PEX2*, *PEX4*, *PEX6**, *PEX8*, *PEX10*, *PEX12*, *PEX13*, *PEX14*, *PEX15*, *PEX17*, *PEX22*
Peroxisomal membrane protein import machinery	*PEX3*, *PEX19*
Peroxisome targeting signaling (PTS2) receptor	*PEX7*, *PEX18*, *PEX21*
Regulation of peroxisome size and numbers	*PEX11*, *PEX25*, *PEX27*, *PEX28*, *PEX29*, *PEX30*, *PEX31*, *PEX32**
β-oxidation of fatty acids	*CAT2*, *CTA1*, *DCI1*, *ECI1*, *FOX2*, *IDP3*, *MDH3*, *POT1*, *POX1*, *PXA1*, *PXA2*, *SPS19*
Lysine biosynthesis	*LYS1*, *LYS2*, *LYS4*, *LYS5*, *LYS9*, *LYS12*, *LYS14*

下線を引いた遺伝子の 1 遺伝子破壊株はエタノール感受性を示す。*はその遺伝子の 1 遺伝子破壊株が非ストレス環境下で増殖阻害を示すことを表す。

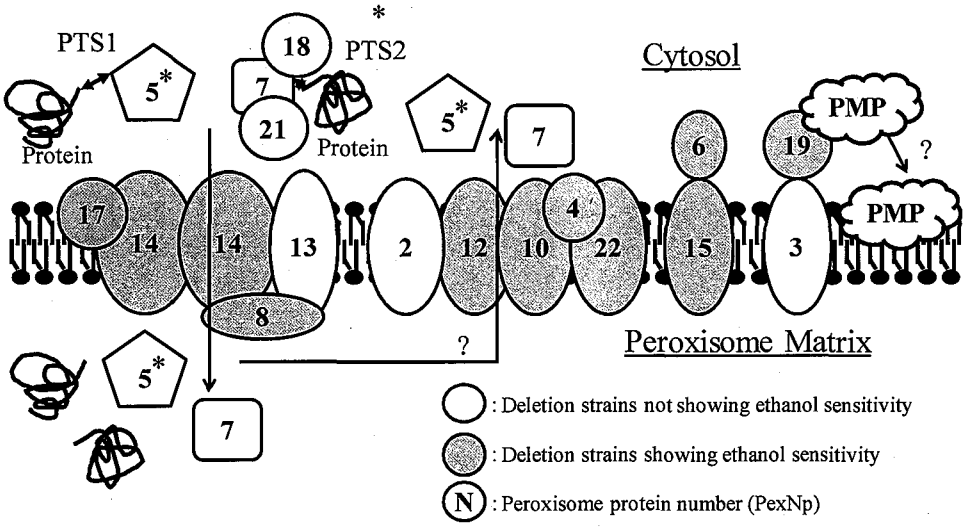

Fig. 3.6. ペルオキシソームタンパク質の機能と破壊株のエタノール感受性の情報。各図形内の数字はPexタンパク質の名前を示す (例えば、2はPex2pタンパク質を表す)。白抜きの図形は、その遺伝子の破壊株が非エタノール感受性であることを、灰色で示した図形はその遺伝子の破壊株がエタノール感受性株であることを示す。なお、*PEX5*遺伝子の破壊株については、コンタミネーションがみられたため、データが取得できなかった。タンパク質のペルオキシソーム輸送シグナル配列 (PTS; peroxisome targeting signal) である PTS1 と PTS2 を、その受容体質である Pex5p および Pex7p-Pex18p-Pex21p 複合体がそれぞれ認識する。PTS 受容体が結合したタンパク質は、Pex8p-Pex13p-Pex14p-Pex17p 複合体によりペルオキシソーム内に輸送される。PTS 受容体は、ペルオキシソーム内で輸送したタンパク質と分離された後、Pex2p-Pex4p-Pex10p-Pex22p 複合体により細胞質に輸送される。Pex6p と Pex15p は相互作用し、Pex6p はペルオキソームのタンパク質輸送に関する ATPase として働く。Pex3p-Pex19 複合体は、ペルオキシソーム膜タンパク質 (PMP peroxisomal membrane protein) をペルオキシソーム膜へ組み込む。この図は Brown ら (2003) の論文を参考に作成した。

3.3.4 遺伝子破壊が非ストレス環境下で増殖速度の低下を引き起こすがエタノール感受性を引き起こさない遺伝子

遺伝子破壊株において、非ストレス環境下で親株と比べて比増殖速度の低下がみられるが、エタノール環境下ではエタノール感受性を示さない株が 172 株存在した。このような破壊株において破壊されている遺伝子は、非ストレス環境下における比増殖速度に対するエタノール環境下における比増殖速度の低下が小さいという観点から、エタノール耐性の向上に関連していると考えられる。それらの遺伝子に含まれる遺伝子機能カテゴリの存在割合が高い機能カテゴリを解析したところ、“Ribosomal proteins” といった

タンパク質の合成に関与するリボソーム関連の機能カテゴリが多く選択された (Table 3.8)。このことは、タンパク質の正常な合成機能は非ストレス環境下において増殖に必要とされるが、エタノール環境下における比増殖速度の低い状態では増殖速度に影響を与えないことが示唆された。

Table 3.8. 遺伝子破壊が非ストレス環境下で増殖速度の低下を引き起こすがエタノール感受性を引き起こさない遺伝子エタノール感受性遺伝子に多く含まれる遺伝子機能カテゴリ

MIPS functional category number	MIPS functional category	*p*-value	No. of genes among selected genes (172)	No. of genes among all genes (4,729)
10.01.09.05	DNA conformation modification (e.g. chromatin)	9.50E-05	15	135
10.03.04.01	Centromere/kinetochore complex maturation	1.49E-03	3	7
11.04.01	rRNA processing	3.51E-03	5	29
12.01.01	Ribosomal proteins	2.29E-14	32	182
16.03.03	RNA binding	8.13E-06	13	84
42.10.03	Organization of chromosome structure	1.05E-03	8	58

3.3.5 エタノール感受性遺伝子と浸透圧感受性遺伝子の比較

本研究で選択したエタノール感受性遺伝子には、様々なストレス環境に共通して増殖に必要な遺伝子も含まれていると考えられる。そこで、エタノール環境下特異的に必要とされる遺伝子を抽出することで、エタノール耐性に必要な細胞機能の詳細な理解を目指した。そのため、浸透圧ストレス環境下における 1 遺伝子破壊株の比増殖速度を同様にして測定し、浸透圧感受性株を選択した。そして、エタノール感受性株と浸透圧感受性株を比較することで、エタノール環境下での増殖にのみ必要な遺伝子を選択するを試みた。エタノール環境下と浸透圧環境下における 1 遺伝子破壊株の比増殖速度の相関を Table 3.9 と Fig. 3.7 に示す。両ストレスに共通して感受性を示した 1 遺伝子破壊株の多くは非ストレス環境下において増殖阻害を示すことが分かった。非ストレス環境下において破壊が増殖阻害を引き起こす遺伝子を除き、エタノール特異的な感受性遺伝子、浸透圧特異的な感受性遺伝子、両ストレス共通の感受性遺伝子に着目し解析を行った。その結果、両ストレス共通の感受性遺伝子より(87 株)、エタノール (353 株) と浸透圧ストレス (242 株) それぞれに特異的な感受性遺伝子の方か多いことが分かった。このことは両ストレスに対する酵母の応答機能が大きく異なっていることを示唆する。またストレス環境下特異的に増殖に必要とされる *HOG1* や *PBS2* 遺伝子は、本研究結果においてもその破壊株が浸透圧特異的に感受性であることが示され (Fig. 3.7)、本研究で用いた培養系は、信頼できるものであることが確認された。

Table 3.9. エタノール環境下と浸透圧ストレス環境下における 1 遺伝子破壊株の感受性株/耐性株の関連性

			1 M NaCl	
		Sensitive	No-change	Tolerant
	Tolerant	1 (0)	2 (2)	0 (0)
8% Ethanol	No change	290 (242)	3568 (3444)	4 (4)
	Sensitive	346 (87)	510 (353)	8 (6)

括弧内の数字は非ストレス環境下で増殖速度の低下を示した 1 遺伝子破壊株を除いた 1 遺伝子破壊株の数。

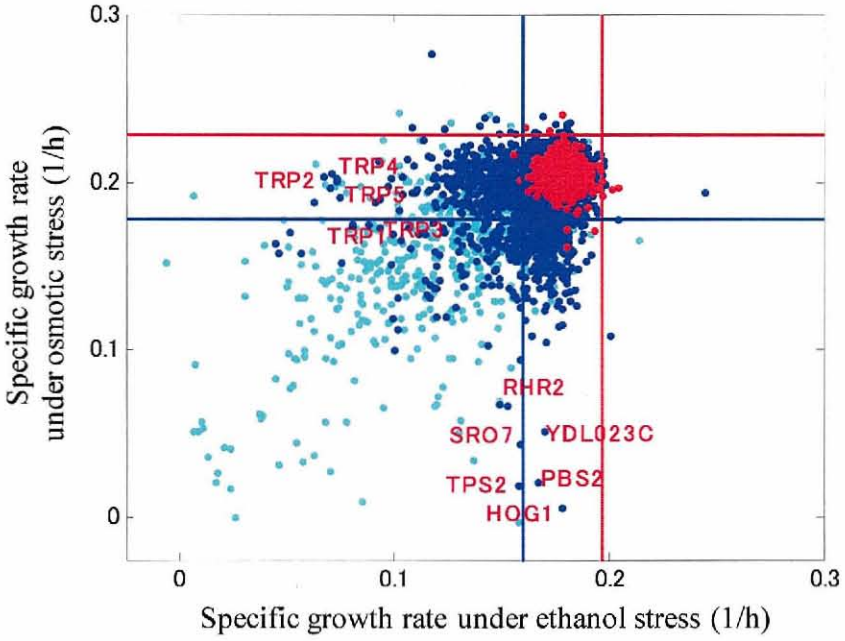

Fig. 3.7. エタノールと浸透圧ストレス環境下における 1 遺伝子破壊株の比増殖速度の関連性。赤点は基準株、青丸は非ストレス環境下で増殖阻害を示さなかった 1 遺伝子破壊株、水色点は非ストレス環境下で増殖阻害を示した 1 遺伝子破壊株を示す。各点は 2 回の培養の比増殖速度の平均値である。青線と赤線は各ストレス環境下における感受性株と耐性株の選択に用いた閾値の比増殖速度を示す。一部の遺伝子について遺伝子名を図内に記載した。

3. 3. 5. 1 エタノール特異的感受性遺伝子

エタノール環境下特異的に増殖に必要な遺伝子の機能を解析するために、エタノール感受性遺伝子から浸透圧感受性遺伝子を除き、その遺伝子が多く含まれる遺伝子機能カテゴリを抽出した (Table 3.10)。エタノール特異的な感受性遺伝子に多く含まれる機能は、“regulation of C-compound and carbohydrate utilization” や “small GTPase-mediated signal transduction” を除き、Table 3.6 に示す浸透圧感受遺伝子を除く前とほぼ同じであり、一方で、新たに “peptide binding”、“temperature perception and response”、“peroxisome” が抽出された。“temperature perception and response” の機能カテゴリは、エタノールと高温ストレスに対する酵母の応答機構が類似していることと一致した (Piper 1995)。“peroxisome” カテゴリが新たに抽出されたことや、3.3.3.2 節で抽出された “peroxisomal transport”に含まれる遺伝子が本解析においても全て残っていたことから、ペルオキシソームはエタノール環境下特異的に増殖に必要であることが示唆された。

Table 3.10. エタノール感受性遺伝子であるが浸透圧感受性遺伝子でない遺伝子に多く存在する遺伝子機能カテゴリ

MIPS functional category number	MIPS functional category	*p*-value	No. of genes among selected genes (359)	No. of genes among all genes (4,138)
01.01.09.06.01	Biosynthesis of tryptophan	1.58×10^{-3}	4	7
01.20.15.03	Biosynthesis of ubiquinone	2.42×10^{-3}	3	4
02.11	Electron transport and membrane-associated energy conservation	3.25×10^{-4}	11	39
02.13.03	Aerobic respiration	6.17×10^{-14}	26	56
11.04.03.01	Splicing	2.50×10^{-3}	8	29
12.01.01	Ribosomal proteins	2.58×10^{-12}	34	105
12.07	Translational control	5.42×10^{-4}	10	35
12.10	Aminoacyl-tRNA-synthetases	6.73×10^{-4}	6	14
14.04	Protein targeting, sorting, and translocation	9.67×10^{-6}	30	151
14.10	Assembly of protein complexes	2.18×10^{-9}	29	100
16.02	Peptide binding	7.51×10^{-3}	2	2
16.07	Structural protein	5.55×10^{-3}	6	20
20.01.21	RNA transport	1.48×10^{-3}	9	33
20.09.01	Nuclear transport	1.96×10^{-3}	8	28
20.09.07.03	ER to Golgi transport	6.94×10^{-4}	9	30
20.09.10	Peroxisomal transport	2.21×10^{-3}	6	17
20.09.13	Vacuolar transport	2.02×10^{-3}	19	108
34.11.09	Temperature perception and response	6.91×10^{-3}	5	15

次ページに続く

Table 3.10. (続き) エタノール感受性遺伝子であるが浸透圧感受性遺伝子でない遺伝子に多く存在する遺伝子機能カテゴリ

MIPS functional category number	MIPS functional category	*p*-value	No. of genes among selected genes (359)	No. of genes among all genes (4,138)
42.10.05	Nuclear membrane	2.94×10^{-3}	4	8
42.16	Mitochondrion	1.32×10^{-12}	36	114
42.19	Peroxisome	3.94×10^{-3}	8	31

3.3.5.2 エタノールと浸透圧の両ストレスに共通の感受性遺伝子

エタノールと浸透圧のストレス環境下に共通して増殖に必要とされる遺伝子の機能を抽出するために、エタノール感受性遺伝子と浸透圧感受性遺伝子に共通して存在する遺伝子の機能について解析を行った (Table 3.11)。その結果、"metabolism of phenylalanine"、"metabolism of tyrosine"、"metabolism of tryptophan"、"isoprenoid biosynthesis"、"budding, cell polarity, and filament formation"といった機能カテゴリに属する遺伝子が多く存在することが分かった。"metabolism of phenylalanine"、"metabolism of tyrosine"、"metabolism of tryptophan" の機能カテゴリには、芳香族アミノ酸合成に関連する *ARO1*、*ARO2*、*ARO7* 遺伝子が共通して含まれていた。"metabolism of tryptophan" のカテゴリには *TRP1-5* 遺伝子のうち、*TRP1* 遺伝子のみが含まれ、、エタノールストレスの場合と異なり *TRP2-5* 遺伝子の 1 遺伝子破壊株は浸透圧感受性を示さなかった。このことは González ら (2007) の結果と一致している。このことより、*ARO1* と *ARO2* 遺伝子の破壊株の浸透圧感受性は、トリプトファン合成に関連するものではないと考えられる。*ARO7* 遺伝子はチロシンとフェニルアラニン合成に関連することから、*ARO1*、*ARO2*、*ARO7* 遺伝子の 1 遺伝子破壊株の浸透圧感受性は、チロシンとフェニルアラニンの二重アミノ酸要求性によることだと推測される。"isoprenoid biosynthesis" には、エルゴステロール合成に関連する *ERG2*、*ERG3*、*ERG6* 遺伝子が含まれていた。エルゴステロールは酵母の細胞膜成分の重要な構成要素であり、細胞膜の流動性に関与する。高エルゴステロール含有酵母がエタノール耐性を示すことや (Castillo Agudo, 1992)、*ERG3* と *ERG6* 遺伝子の 1 遺伝子破壊株は浸透圧ストレスへの適応に長時間必要になるという報告 (Warringer *et al.*, 2003, Fernandez *et al.*, 2005) と一致して、ストレス耐性に必要な機能であることが示された。これらのことより、芳香族アミノ酸の合成や、エルゴステロールはエタノールと浸透圧の両ストレスに共通して必要であることが示唆された。

Table 3.11. エタノール感受性遺伝子と浸透圧感受性遺伝子に共通して存在する遺伝子に多く存在する遺伝子機能カテゴリ

MIPS functional category number	MIPS functional category	*p*-value	No. of genes in selected genes (87)	No. of genes in all genes (4,138)
01.01.09.04	Metabolism of phenylalanine	1.72×10^{-3}	3	12
01.01.09.05	Metabolism of tyrosine	1.31×10^{-3}	3	11
01.01.09.06	Metabolism of tryptophan	2.74×10^{-4}	4	16
01.06.01.07	Isoprenoid biosynthesis	6.82×10^{-3}	3	19
10.03.01.01.09	G2/M transition of mitotic cell cycle	7.90×10^{-3}	3	20
11.02.03.04.03	Transcriptional repressor	9.08×10^{-3}	3	21
14.04	Protein targeting, sorting, and translocation	4.07×10^{-3}	9	151
20.09.07.05	Intra Golgi transport	4.93×10^{-3}	3	17
20.09.13	Vacuolar transport	3.77×10^{-4}	9	108
32.01.03	Osmotic and salt stress response	9.36×10^{-3}	4	40
43.01.03.05	Budding, cell polarity, and filament formation	9.20×10^{-4}	12	202
43.01.03.09	Development of asco-, basidio-, or zygospore	8.66×10^{-3}	7	112

3. 3. 5. 3 浸透圧特異的感受性株

浸透圧ストレス環境特異的に増殖に必要とされる遺伝子の機能を抽出するために、浸透圧ストレス特異的な感受性遺伝子に多く含まれている遺伝子の機能について解析を行った (Table 3.12)。その結果、"phosphate utilization"、"G1/S transition of mitotic cell cycle"、"stress response" などのが抽出された。浸透圧ストレス環境下においては、*HOG1* 遺伝子がコードするタンパク質が細胞周期を制御し、G1 や G2 期において細胞周期を停止する (Bellí *et al.*, 2001; Escoté *et al.*, 2004; Clotet *et al.*, 2006)。浸透圧ストレス特異的な感受性株から"G1/S transition of mitotic cell cycle" が抽出され、エタノールと浸透圧ストレスに共通な感受性遺伝子から "G2/M transition of mitotic cell cycle" が抽出されたことは、細胞周期の調節は浸透圧ストレス環境下における増殖に必要であることを示した。"phosphate utilization" には、浸透圧ストレス応答に関連するシグナル伝達機構 (high osmolarity glycerol (HOG) 経路、Hohmann *et al.*, 2002) の構成要素である *STE20*、*SSK2*、*PBS2*、*HOG1* 遺伝子が浸透圧感受性遺伝子として含まれていた。これらの 1 遺伝子破壊株は浸透圧ストレス環境下で特に低い比増殖速度を示した。

Table 3.12. エタノール感受性遺伝子ではないが浸透圧感受性遺伝子である遺伝子に多く存在する遺伝子機能カテゴリ

MIPS functional category number	MIPS functional category	*p*-value	No. of genes in selected genes (242)	No. of genes in all genes (4,138)
01.01.06.04.01	Biosynthesis of threonine	9.83×10^{-3}	2	3
01.04.01	Phosphate utilization	7.16×10^{-3}	26	270
10.03.01.01.03	G1/S transition of mitotic cell cycle	4.15×10^{-4}	7	25
10.03.04.01	Centromere/kinetochore complex maturation	9.83×10^{-3}	2	3
32.01	Stress response	3.63×10^{-3}	30	310
32.01.01	Oxydative stress response	5.98×10^{-3}	8	48

3. 3. 5. 4 エタノール耐性遺伝子と浸透圧耐性遺伝子の関連性

エタノール耐性遺伝子として、*CYB5* と *YOR139C* 遺伝子が選択され、浸透圧耐性遺伝子として、*ALD6*、*HOC1*、*PRO1*、*SCP160*、*SKY1*、*TIP41*、*UBP6*、*YKL161C*、*YNR004W*、*YNR036C* 遺伝子が選択された。これらの遺伝子の機能を解析することで、それぞれのストレスに対する耐性機構の理解につながると期待される。これらの耐性遺伝子の遺伝子機能について Table 3.13 にまとめた。

2 つのエタノール耐性遺伝子において、*YOR139C* 遺伝子は dubious ORF であり、凝集性の抑制に関連する *SFL1* 遺伝子 (Robertson and Fink, 1998) の相補鎖に存在する遺伝子であった。*CYB5* 遺伝子は、エタノール耐性に必要とされているステロールや脂質の合成に関連する (Castillo Agudo, 1992; Lamb *et al.*, 1999; You *et al.*, 2003)。これらの遺伝子について詳細に解析を行うことでエタノール耐性に関連する有益な情報が得られると期待される。

10 の浸透圧耐性遺伝子において、*ALD6* と *SKY1* 遺伝子の 1 遺伝子破壊株は浸透圧耐性を示すことが報告されており (Eglinton *et al.*, 2002; Forment *et al.*, 2002)、と選択された浸透圧耐性耐性遺伝子は信頼できる情報であると期待される。*PRO1* 遺伝子はプロリン合成に関連し、破壊株はプロリン要求性を示す。*PRO1* 破壊株は NaCl と FK506 の両物質環境下で耐性を示すことが報告されている (Butcher and Schreiber, 2004)。また、他のプロリン合成に関連する遺伝子である *PRO2* 遺伝子の破壊株が本研究で浸透圧感受性を示すことや、プロリン過剰蓄積変異株は浸透圧耐性を示すことが報告されている (Sekine *et al.*, 2007)。これらのことよりプロリン合成と浸透圧耐性には強い関連性があることが示唆された。他の浸透圧耐性遺伝子については、その機能と浸透圧耐性の関連性は報告されていない。興味深いことに、浸透圧耐性遺伝子 10 株中 6 株 (*ALD6*、*HOC1*、*PRO1*、*SCP160*、*SKY1*、*YNR004W* 遺伝子の 1 遺伝子破壊株) はエタノール感受性遺伝子であった。しかし、それらの遺伝子の機能に共通性はみられなかった。このことと、両ストレス共通の感受性遺伝子が存在しないことや、両ストレスな感受性遺伝子が少ないことから、エタノールと浸透圧ストレスに対する酵母の応答機構が大きく異なっていることが示唆された。

Table 3.13. エタノール耐性遺伝子および浸透圧耐性遺伝子

Name	Description
Ethanol tolerant	
CYB5	Cytochrome b5, involved in the sterol and lipid biosynthesis pathways
YOR139C	Dubious open reading frame; partially overlaps *SFL1*
Osmotic tolerant	
ALD6	Cytosolic aldehyde dehydrogenase
HOC1	Alpha-1,6-mannosyltransferase involved in cell wall mannan biosynthesis
PRO1	Gamma-glutamyl kinase that catalyzes the first step in proline biosynthesis
SCP160	Essential RNA-binding G protein effector of mating response pathway
SKY1	SR protein kinase involved in mRNA metabolism and cation homeostasis
TIP41	Negatively regulates the TOR signaling pathway
UBP6	Ubiquitin-specific protease
YKL161C	Protein kinase implicated in the Slt2p mitogen-activated (MAP) kinase signaling pathway
YNR004W	Putative protein of unknown function
YNR036C	Mitochondrial protein

3.3.6　1遺伝子破壊株の表現型変化と遺伝子発現情報の関連性の解析

3.3.6.1 エタノール感受性遺伝子とエタノール環境下における遺伝子発現変化の関連性

まず、ある1株の遺伝子発現情報から、エタノール環境下で増殖に必要な遺伝子の抽出が可能であるのかを明らかとするために、FY834株のみのエタノール環境下における遺伝子発現情報を用い、エタノール感受性遺伝子の遺伝子発現変化の特徴の抽出を試みた。遺伝子発現情報として、FY834株においてエタノール添加30分後のストレス応答初期にあたる遺伝子発現変化の情報を用いた (第2章参照)。Fig 3.8に示すように、全遺伝子に対して、遺伝子発現変化と遺伝子破壊による比増殖速度の変化に相関はみられなかった (ピアソンの相関係数0.055)。このことは、先行研究の結果と一致した (Giaever *et al.*, 2002、Warringer *et al.*, 2003)。

しかし、全遺伝子にデータに対する相関係数を用いた解析では、部分的な関連性を見逃す可能性がある。そこで、エタノール感受性遺伝子の遺伝子発現変化の特徴を解析するために、1遺伝子破壊株コレクションにおいて破壊されている全4729遺伝子および446のエタノール感受性遺伝子のうち、エタノール環境下において遺伝子発現量が増加、減少した遺伝子の割合を比較した (Fig. 3.9A)。その結果、1遺伝子破壊株コレクションにおいて破壊されている全4729遺伝子に対し、エタノール感受性遺伝子では、遺伝子発現量が増加もしくは減少した遺伝子の割合がそれぞれ有意に少なく ($p < 0.01$)、遺伝子発現量が変化しなかった遺伝子の割合が有意に多いことが分かった ($p < 0.05$)。一方で、エタノール環境下において菌体の増殖がみられる適応後の状態に対応するエタノール添加後180分における遺伝子発現情報との比較においては、エタノール感受性遺伝子において遺伝子発現変化の顕著な特徴はみられなかった (Fig. 3.9B)。また、FY834株の浸透圧環境下における遺伝子発現情報を取得しており (Hirasawa *et al.*, 2006a)、浸透圧感受性遺伝子との関連性について同様に解析を行った。その結果、浸透圧感受性遺伝子において浸透圧環境下での遺伝子発現変化の特徴はみられなかった (data not shown)。これらのことより、ストレスに対する遺伝子発現変化のある時点での情報とその環境下における増殖に必要な遺伝子には関連性がないと推測される。

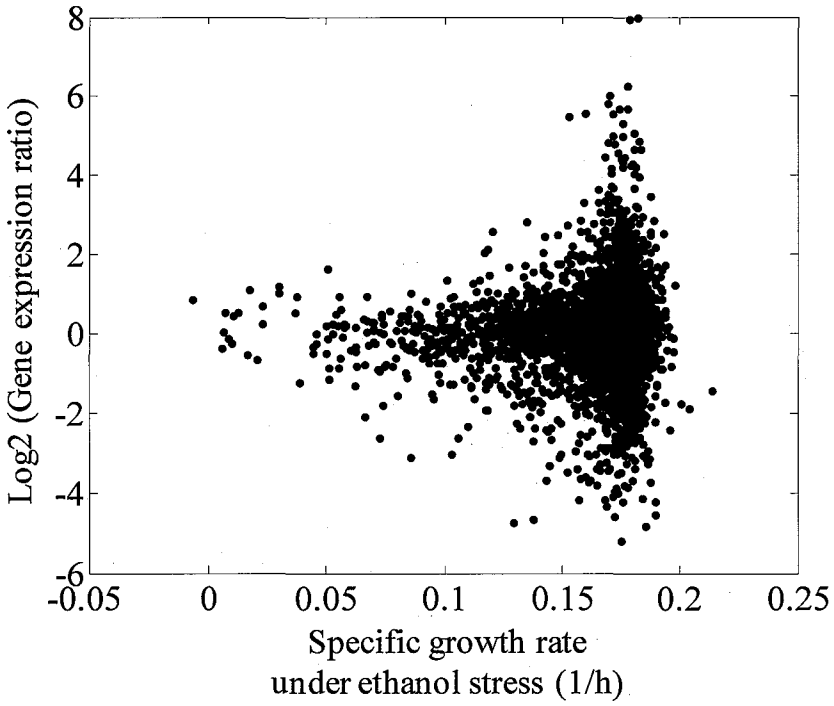

Fig. 3.8. エタノール環境下における遺伝子発現変化と1遺伝子破壊株の比増殖速度の関連性。各点がある遺伝子について、エタノール環境下における遺伝子発現変化の情報と、その遺伝子の1遺伝子破壊株のエタノール環境下における比増殖速度を示す。遺伝子発現情報には、第2章で解析したエタノール添加前に対する添加後30分における遺伝子発現の変化比を用いた。比増殖速度にはエタノール環境下における2回の培養の比増殖速度の平均値を用いた。全体として両データのピアソンの相関係数は0.055であった。

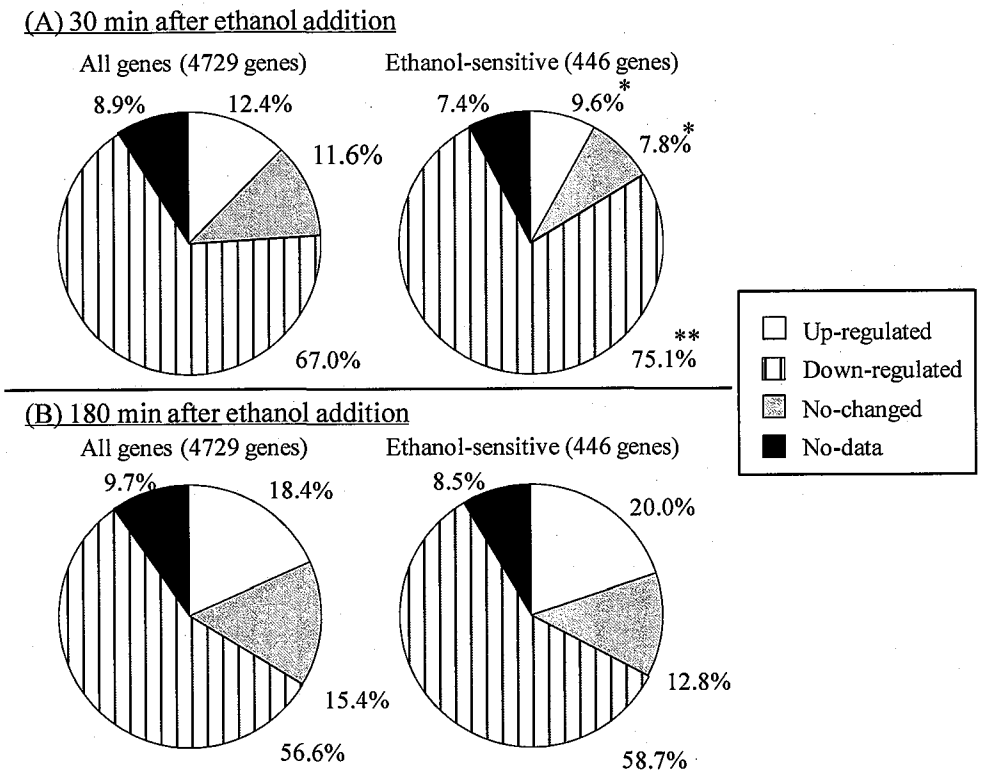

Fig. 3.9. エタノール感受性遺伝子とエタノール環境下における遺伝子発現変化の関連性。遺伝子発現情報として、エタノール添加前に対するエタノール添加後 (A) 30 分と、(B) 180 分の遺伝子発現量の比のデータを用いた。白色は遺伝子発現量が増加した遺伝子の割合、灰色は遺伝子発現量が減少した遺伝子の割合、網掛けは遺伝子発現量が変化しなかった遺伝子の割合、黒色はデータが存在しなかった遺伝子の割合を示す。全ての 1 遺伝子破壊株において破壊されている 4729 遺伝子の対し、446 のエタノール感受性遺伝子において、*で示した割合は有意に低いこと ($p < 0.01$)、**で示した割合は有意に高いこと ($p < 0.05$) を示す。

上記では、エタノール感受性遺伝子の観点から遺伝子を分類した後に各遺伝子発現情報の割合を計算したが、さらに、遺伝子を遺伝子発現情報の観点から遺伝子を分類した後にエタノール感受性の割合などを計算した。遺伝子発現情報としてエタノール添加前に対するエタノール添加 30 分後の遺伝子発現量の比のデータを用いた結果、全遺伝子に対し遺伝子発現量が増加、減少した遺伝子に含まれるエタノール感受性遺伝子の割合は全遺伝子に比べ有意に小さく、発現が変化しないクラスタに有意に多く含まれており、Fig. 3.9A と同様の結果が得られた (Fig. 3.10)。

また、遺伝子発現量が増加した遺伝子はその環境下での増殖にとって必要な遺伝子と考えられるが、発現量が増加した遺伝子群には、破壊がエタノールと非ストレスの両環境下において増殖に影響を与えない遺伝子の存在割合が有意に高い結果が得られた。それらの遺伝子に含まれる機能について解析した結果、“Stress response” といった既知のストレス環境下で応答する遺伝子や、“Unclassified proteins”に属する機能未知の遺伝子の存在割合も有意に高いことが示された (Table 3.14)。

遺伝子発現量が減少した遺伝子群に必須遺伝子が有意に多く含まれていた。それらの遺伝子の機能について解析した結果、転写や翻訳に関連する機能に関連する遺伝子の存在割合が全遺伝子に比べ有意に多いことが示された (Table 3.15)。これらの機能に関連する遺伝子の発現量がストレス環境下で減少がすることは多くのストレス環境下ですでに報告されており (Gasch *et al.*, 2000; Causton *et al.*, 2001)、ストレス環境下では転写や翻訳の頻度が低下していることが推測される。

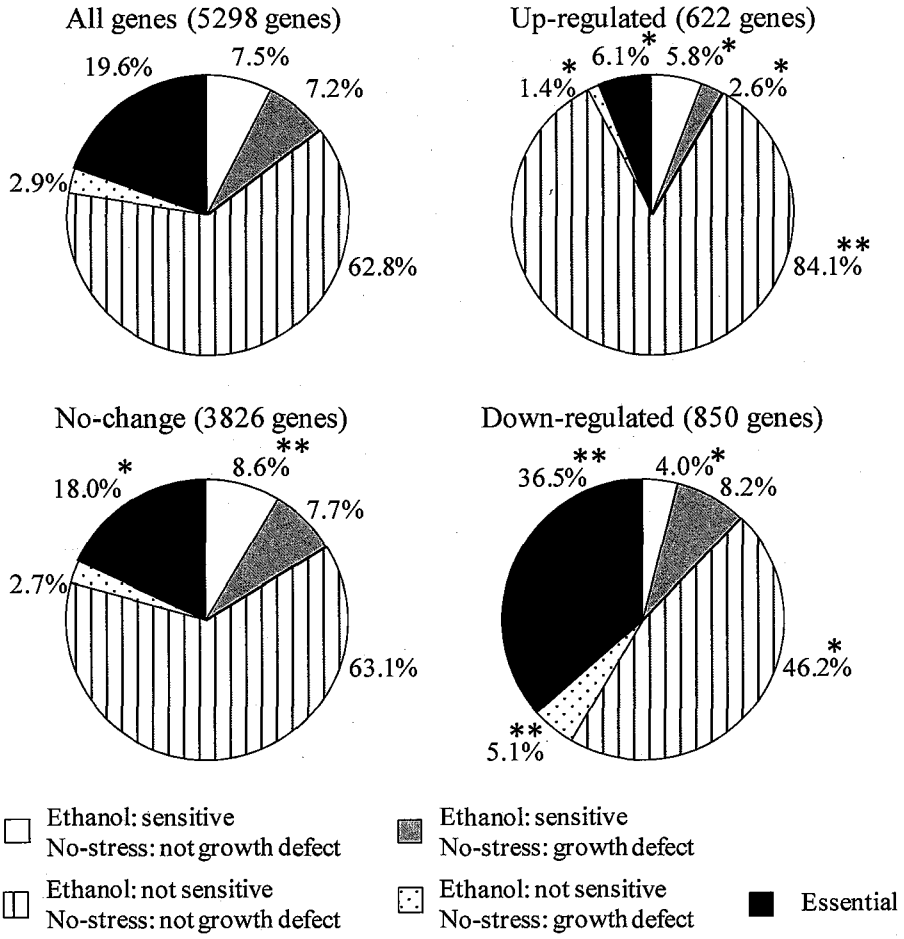

Fig. 3.10. エタノール感受性遺伝子とエタノール環境下における遺伝子発現変化の関連性。遺伝子発現情報として、エタノール添加前に対するエタノール添加後 30 分の遺伝子発現量の比のデータを用いた。それぞれのグループにおいて、エタノール感受性遺伝子 (白色)、エタノール感受性遺伝子であるが非ストレス環境下において増殖阻害を引き起こす遺伝子 (灰色)、エタノール環境下と非ストレス環境下の両環境下で増殖に影響を与えない遺伝子 (縦線)、非ストレス環境下でのみ増殖阻害を引き起こす遺伝子 (ドット)、必須遺伝子 (黒色) の割合を計算した。全ての遺伝子における各割合に対して、*で示した割合は有意に低いこと ($p < 0.05$)、**で示した割合は有意に高いこと ($p < 0.05$) を示す。

Table 3.14. 発現量が増加した遺伝子において、破壊がエタノールと非ストレスの両環境下で増殖に影響を与えない遺伝子に多く存在する遺伝子機能カテゴリ

MIPS functional category number	MIPS functional category	*p*-value	No. of genes in selected genes (314)	No. of genes in all genes (5,413)
01.03.16.01	RNA degradation	5.06×10^{-3}	8	47
01.06.01.07	Isoprenoid biosynthesis	2.42×10^{-4}	9	38
10.01.03.05	Extension/ polymerization activity	3.40×10^{-3}	7	35
11.02.01	rRNA synthesis	9.92×10^{-18}	25	53
11.02.02	tRNA synthesis	1.96×10^{-12}	17	36
11.04.01	rRNA processing	7.34×10^{-103}	109	160
11.04.02	tRNA processing	1.29×10^{-4}	10	43
11.06	RNA modification	5.65×10^{-12}	21	60
11.06.01	rRNA modification	1.43×10^{-16}	15	18
12.01	Ribosome biogenesis	4.15×10^{-25}	65	267
12.04	Translation	2.46×10^{-9}	21	80
12.10	Aminoacyl-tRNA-synthetases	1.22×10^{-4}	9	35
16.03.01	DNA binding	4.38×10^{-5}	22	150
16.03.03	RNA binding	1.23×10^{-21}	47	162
16.19.03	ATP binding	5.85×10^{-4}	21	167
20.09.01	Nuclear transport	2.09×10^{-3}	11	70

Table 3.15. 遺伝子発現量が減少した遺伝子群に必須遺伝子に多く存在する遺伝子機能カテゴリ

MIPS functional category number	MIPS functional category	*p*-value	No. of genes in selected genes (534)	No. of genes in all genes (5,413)
01.04.01	Phosphate utilization	2.46×10^{-4}	56	358
01.05.01.01.01	Sugar, glucoside, polyol and carboxylate catabolism	1.23×10^{-5}	20	72
01.05.01.03.01	Sugar, glucoside, polyol and carboxylate anabolism	1.99×10^{-4}	11	33
01.05.01.03.02.01	Glycogen biosynthesis	8.20×10^{-3}	3	5
02.01	Glycolysis and gluconeogenesis	8.10×10^{-4}	14	56
02.19	Metabolism of energy reserves (e.g. glycogen, trehalose)	1.76×10^{-7}	18	47
14.01	Protein folding and stabilization	1.93×10^{-4}	20	86
14.07.03	Modification by phosphorylation, dephosphorylation, Autophosphorylation	5.06×10^{-3}	28	172
14.07.11.01	Autoproteolytic processing	1.09×10^{-3}	8	23
18.02.01.02.03	Protease inhibitor	8.20×10^{-3}	3	5
32.01	Stress response	5.65×10^{-7}	76	445
32.01.01	Oxydative stress response	1.02×10^{-3}	13	51
32.01.07	Unfolded protein response (ER quality control)	4.82×10^{-3}	13	60
99	UNCLASSIFIED PROTEINS	2.72×10^{-14}	150	860

3.3.6.2 エタノール環境下における遺伝子発現情報のクラスタリング結果とエタノール感受性遺伝子の関係

エタノール感受性遺伝子とエタノール耐性の異なる酵母の遺伝子発現変化の違いの関連性について解析を行った。遺伝子発現情報として、第 2 章で解析を行った FY834 株と IFO2347 株のエタノール環境下における遺伝子発現情報のクラスタリング解析の結果を用いた (Fig. 3.11)。クラスタリング解析では、全てのタイムポイントで 2 倍以上発現量が変化しなかった遺伝子を解析に用いていなかった。遺伝子発現量が変化しなかった遺伝子も考慮に入れるために、29 のクラスタに加え、遺伝子発現量が変化しなかった遺伝子群を新たなクラスタと考え、解析に用いた。各クラスタに存在するエタノール感受性遺伝子の割合が、クラスタリング解析に用いた全遺伝子におけるエタノール感受性遺伝子の割合に対して有意に高いクラスタを選択した (Table 3.16)。その結果、クラスタ No. 6、7、16 にエタノール感受性遺伝子が有意に多く含まれていることが分かった (Fig. 3.12)。これらのクラスタに含まれる遺伝子発現量の経時変化のパターンの特徴として、クラスタ No. 6 に含まれる遺伝子は、FY834 株ではエタノール環境下において遺伝子発現量に変化はなく、IFO2347 株では遺伝子発現量の減少がみられた。クラスタ No. 7 と No. 16 に含まれる遺伝子は、FY834 株ではエタノール環境下で遺伝子発現量が増加し、IFO2347 株では遺伝子発現量に変化はみられなかった。また、第 2 章で抽出したエタノール耐性に関連する *TRP* 遺伝子が含まれていたクラスタは No. 7 であり、今回の解析においても同様に選択された。これらのことより、エタノール耐性能の異なる酵母においてエタノール環境下で異なる遺伝子発現変化を示す遺伝子を解析することは、エタノール環境下において増殖に必要な遺伝子の抽出につながると期待される。このことより、第 2 章において用いた、エタノール耐性の異なる株の遺伝子発現情報から異なる発現変化を示す遺伝子を選択する方法はエタノール耐性に関連する遺伝子を抽出することに対して、適した方法だったことが一つの可能性として考えられる。また、本章で示した結果は遺伝子の破壊と感受性の関係に過ぎないため、耐性を付与するために効果的な過剰発現遺伝子の選択方法を確立するためには、今後、クラスタ No. 6、7、16 のクラスタに含まれるエタノール感受性遺伝子の過剰発現株を構築し、エタノール耐性の向上につながるか検証する必要がある。

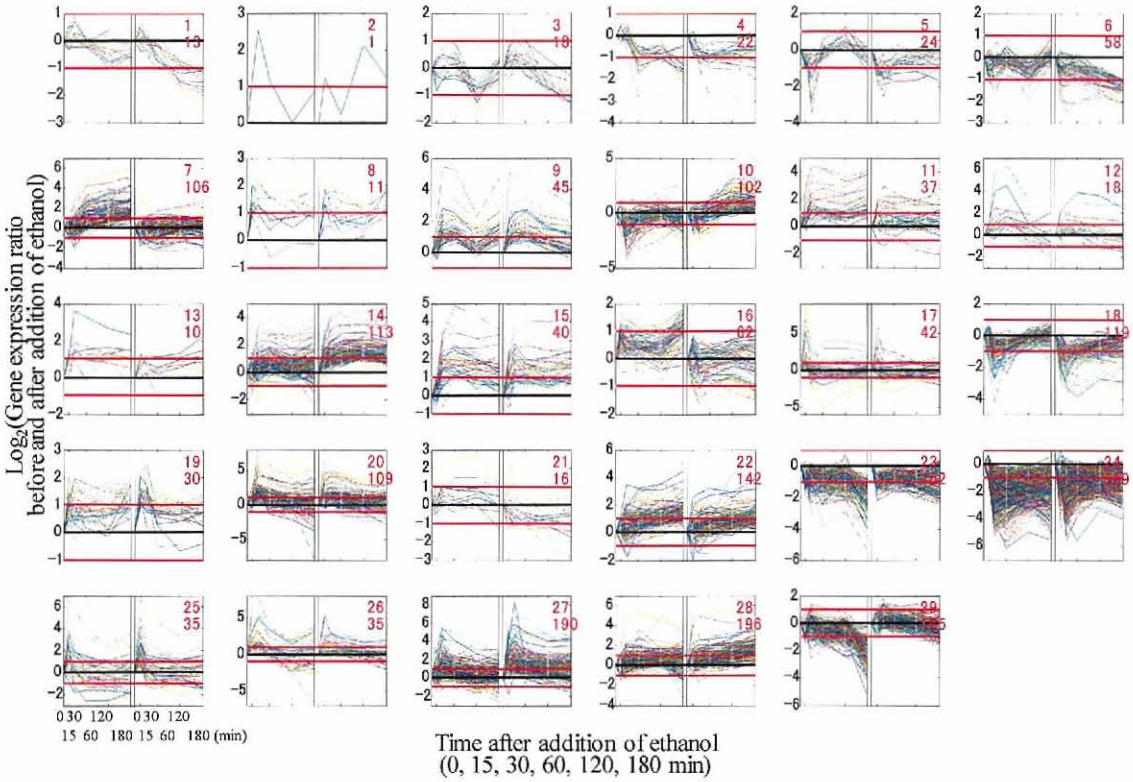

Fig. 3.11. エタノール環境下における遺伝子発現情報のクラスタリング結果 (Fig. 2.10 と同じ)。29 個の各クラスタに属する遺伝子の発現パターンを示す。各グラフの縦軸はエタノール添加前に対する添加後の遺伝子発現量の比の Log_2 の値を示し、横軸はエタノール添加後の時間を示す。各グラフの左側が FY834 株の遺伝子発現の経時変化を、右側が IFO2347 株の遺伝子発現の経時変化を示す。グラフ内の右上の数字は上段がクラスタ番号、下段がクラスタに存在する遺伝子数を示す。

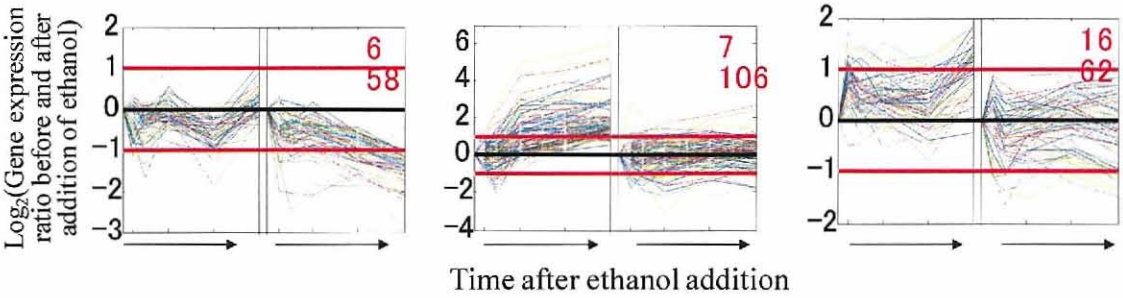

Fig. 3.12. エタノール感受性遺伝子が有意に多く含まれていたクラスタ。縦軸はエタノール添加前に対する添加後の遺伝子発現比の Log_2 値を、横軸はエタノール添加後の時間を示す。各グラフの左側は FY834 株、右側は IFO2347 株の遺伝子発現の経時変化をそれぞれ示す。横軸に平行な黒線は遺伝子発現比が 1 を、赤線は遺伝子発現が 2 倍変化したことを示す。

Table. 3.16. 各クラスタに含まれるエタノール感受性遺伝子の割合

(A) Cluster No.	(B) Number of genes	(C) Number of genes included in the genes deleted in the all deletion strains	(E) Number of ethanol sensitive genes (numbers in parentheses represent the percentage of (E) to (C))	p value
1	13	9	1 (11.1)	0.61
2	1	1	0 (0)	-
3	18	13	1 (7.7)	0.74
4	22	14	2 (14.3)	0.41
5	24	20	0 (0)	1.00
6*	58	41	9 (22.0)	0.02
7*	106	86	15 (17.4)	0.02
8	11	10	0 (0)	-
9	45	40	3 (7.5)	0.78
10	102	81	9 (11.1)	0.41
11	37	29	1 (3.4)	0.95
12	18	10	1 (10.0)	0.65
13	10	10	2 (20.0)	0.26
14	113	90	9 (10.0)	0.54
15	40	39	3 (7.7)	0.76
16*	62	44	9 (20.5)	0.03
17	42	30	1 (3.3)	0.96
18	119	81	11 (13.6)	0.18
19	30	22	1 (4.5)	0.90
20	109	79	6 (7.6)	0.81
21	16	11	0 (0)	-
22	142	120	15 (12.5)	0.21
23	162	98	11 (11.2)	0.38
24	599	314	17 (5.4)	1.00
25	35	25	2 (8.0)	0.73
26	35	23	1 (4.3)	0.91
27	190	165	12 (7.3)	0.91
28	196	155	9 (5.8)	0.98
29	185	106	13 (12.3)	0.25
No-change	1523	1103	121 (11.0)	0.08
Total	4063	2869	285 (9.9)	

No-Change と示したクラスタは、FY834 株と IFO2347 株においてエタノール環境下で全てのタイムポイントを通じて遺伝子発現が変化しなかった遺伝子群を示す。

クラスタリング結果において、エタノール感受性遺伝子が多く含まれるクラスタを解析した結果、FY834 株と IFO2347 株で異なる発現変化を示す遺伝子にエタノール感受性遺伝子が含まれる確率が高いことが示された。さらに、クラスタリングを行わず、単に2株の遺伝子発現の経時変化の類似度とエタノール感受性遺伝子に関連性があるのかについて解析を行った。クラスタリング解析に用いた全ての遺伝子について、FY834 株と IFO2347 株の遺伝子発現の経時変化の相関係数を計算し、遺伝子を負の相関 (相関係数 -1 ~ -0.4)、相関なし (-0.4 ~ 0.4)、正の相関 (0.4 ~ 1) のグループに分類した。各グループに含まれるエタノール感受性遺伝子などの割合を計算し、解析に用いた全遺伝子に含まれるそれぞれの割合と比較した。その結果、エタノール感受性遺伝子の割合は、FY834 株と IFO2347 株の遺伝子発現の経時変化が負の相関を示す遺伝子群に有意に多く、正の相関を示す遺伝子群に有意に少ない結果が得られた (Fig. 3.13)。また、負の相関を示した遺伝子群に含まれる 10 のエタノール感受性遺伝子はクラスタ No. 6、7、16、28 にそれぞれ 1、4、3、2 遺伝子が属しており、クラスタ No. 6、7、16 はクラスタリング結果においてエタノール感受性遺伝子が有意に多く含まれていたクラスタ (Fig. 3.12) と一致した。さらに、エタノール環境下における 2 株の遺伝子発現の類似度に対し、浸透圧感受性遺伝子の存在割合を解析した。その結果、エタノール環境下における 2 株の遺伝子発現変化の類似度と関連性が無いことが示された (Fig. 3.14)。このことより、エタノール環境下における 2 株の遺伝子発現変化の違いが、エタノール環境下での増殖に必要な遺伝子とのみ関連している可能性を示唆した。これらのことより、全遺伝子からエタノール耐性能の異なる株において発現変化が異なる遺伝子を選択することが、エタノール環境下において増殖に必要な遺伝子の選択につながることが示唆された。

また、エタノール環境下における 2 株の遺伝子発現変化の類似度と必須遺伝子の存在割合にも関連性がみられ、負の相関を示す遺伝子群には必須遺伝子が含まれる割合が有意に低く、正の相関を示す遺伝子群に有意に多いことが示された。必須遺伝子は株間や生物種で遺伝子発現量 (Rocha and Danchin, 2004) やネットワーク的性質 (Hahn and Kern, 2005) などの様々な性質が保存されていることが報告されている。先行研究においても、ストレス環境下での遺伝子発現変化において、必須遺伝子は異なる酵母の株間で同じ発現変化を示す傾向にあることが報告されており (Tirosh *et al.*, 2006)、遺伝子発現変化においても株間で保存されている可能性が示唆された。

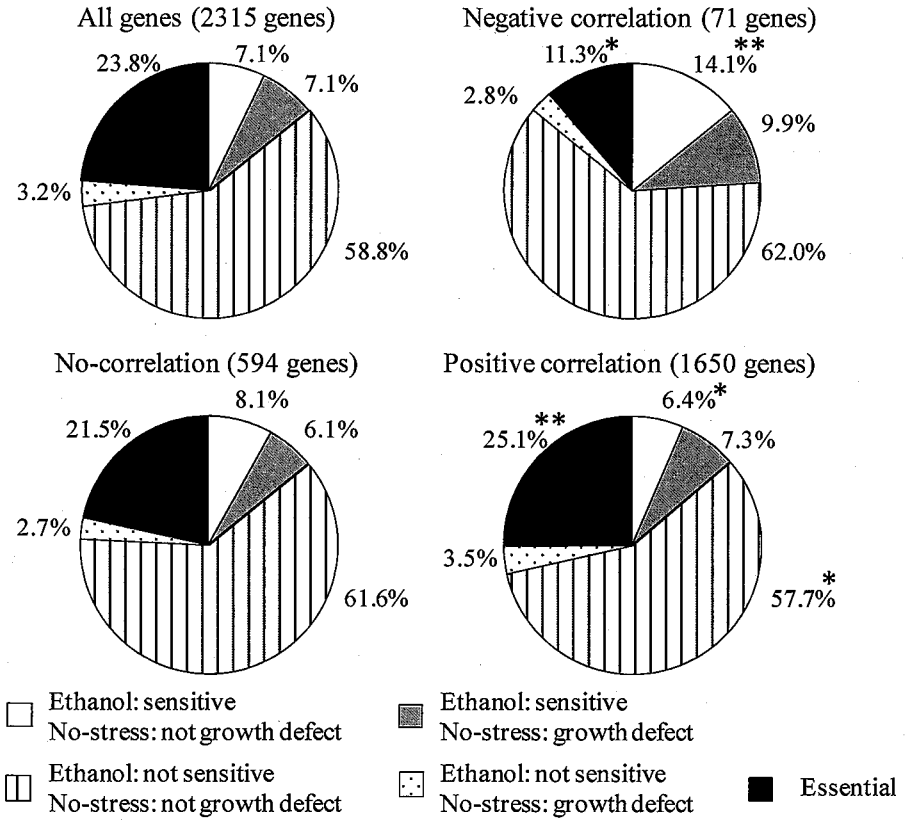

Fig. 3.13. エタノール感受性遺伝子と遺伝子発現変化の類似性の関連性。クラスタリング解析に用いた遺伝子について、FY834 株と IFO2347 株の遺伝子発現の経時変化の相関係数を計算し、逆相関 (相関係数-1 ~ -0.4)、相関なし (-0.4 ~ 0.4)、正の相関 (相関係数 0.4 ~ 1) の遺伝子に分類した。それぞれのグループにおいて、エタノール感受性遺伝子 (白色)、エタノール感受性遺伝子であるが非ストレス環境下において増殖阻害を引き起こす遺伝子 (灰色)、エタノール環境下と非ストレス環境下の両環境下で増殖に影響を与えない遺伝子 (縦線)、非ストレス環境下でのみ増殖阻害を引き起こす遺伝子 (ドット)、必須遺伝子 (黒色) の割合を計算した。全ての遺伝子における各割合に対して、*で示した割合は有意に低いこと ($p < 0.05$)、**で示した割合は有意に高いこと ($p < 0.05$) を示す。

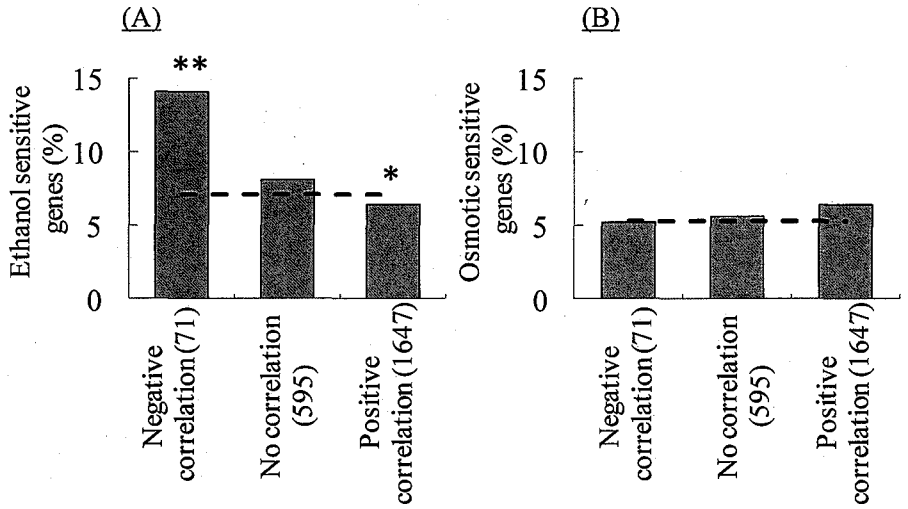

Fig. 3.14. エタノール感受性遺伝子と遺伝子発現変化の類似性との関連性。(A) エタノール環境下における FY834 株と IFO2347 株の遺伝子発現の経時変化の相関係数を計算し、逆相関 (相関係数-1~-0.4)、相関なし (-0.4~0.4)、正の相関 (相関係数 0.4~1) の遺伝子に分類した。それぞれのグループにおいて、エタノール感受性遺伝子の割合を棒グラフで示し、解析に用いた全ての遺伝子におけるエタノール感受性遺伝子の割合を破線で示した。全遺伝子におけるエタノール感受性遺伝子の割合と比較し、各グループにおいて、*で示した割合は有意に低いこと ($p < 0.05$)、**で示した割合は有意に高いこと($p < 0.05$) を示す。また、同じグループにおける浸透圧感受性遺伝子の割合を (B) に示した。

3.3.6.3 非ストレス環境下における遺伝子発現情報とエタノール感受性遺伝子の関係

ここまで、ストレス環境下における遺伝子発現変化の観点から、遺伝子発現情報と1遺伝子破壊による表現型の変化について解析を行った。第2章でエタノール耐性に関連する遺伝子として抽出した *TRP* 遺伝子は、エタノール耐性である IFO2347 株において FY834 株と比べ非ストレス環境下で発現量が高い遺伝子であった。このことから、エタノール耐性に関連する遺伝子は、非ストレス環境下においてエタノール耐性能の異なる株間でその発現量が異なっている可能性が考えられる。そこで、エタノール耐性能の異なる 2 株の非ストレス環境下における遺伝子発現の比較情報の観点から遺伝子発現情報と1遺伝子破壊による表現型の変化について解析を行った。

遺伝子発現情報として、対数増殖中期の FY834 株と IFO2347 株をそれぞれ培養し、対数増殖中期における遺伝子発現量の比を DNA マイクロアレイにより解析したデータを用いた。DNA マイクロアレイの実験誤差より、2 倍以上発現比が異なる遺伝子をそれぞれの株で特異的に高発現している遺伝子とした。その結果、405 遺伝子が FY834 株で特異的に高発現し、396 遺伝子が IFO2347 株で特異的に高発現していた。なお、第2章において *TRP* 遺伝子が IFO2347 株で高発現していることをノーザン解析で明らかにしたが、その発現比は 2 倍以下であり、アレイデータにおいても *TRP* 遺伝子の発現比は2倍以下であったため、IFO2347 株で高発現している遺伝子に *TRP* 遺伝子は含まれていなかった。

得られた FY834 株と IFO2347 株で発現量が異なる遺伝子の情報を用い、エタノール感受性遺伝子における両株で発現量の異なる遺伝子の割合を解析した。その結果、エタノール感受性遺伝子において、FY834 株で発現量が高い遺伝子は有意に少なく、IFO2347 株で遺伝子発現量が高い遺伝子は有意に多いことが分かった (Fig 3.15)。このことより、エタノール耐性株である IFO2347 株ではエタノール環境下での増殖に必要な遺伝子がもともと高く発現している傾向にあることが分かった。このことは、第2章において破壊がエタノール感受性を引き起こした *TRP* 遺伝子が IFO2347 株において FY834 株より高発現していたことと一致した。IFO2347 株において FY834 株より発現量が高い遺伝子には、エタノール耐性と関連があるエルゴステロール合成に関連する遺伝子 (*ERG5*、*ERG6*) や、ミトコンドリアの機能に関連する遺伝子 (*MRP1*、*MRPL32*、*MRPL40*、*MRPS17*、*QCR2*、*RIP1* など) が存在した。また、エタノール感受性遺伝子において IFO2347 株で発現量が高い 43 遺伝子中 27 遺伝子は、そのコードするタンパク質の局在部位がミトコンドリアであった。ミトコンドリアはエタノール耐性に重要な役割を担っていることが報告されており (Aguilera and Benítez 1985; Jiménez and Benítez 1988)、ミトコンドリアの機能に関するの遺伝子の高発現が IFO2347 株のエタノール耐性と関連している可能性がある。これらのことより、エタノール環境下に曝される前の遺伝子発現状態がエタノールストレス耐性にとって重要な要素である可能性が示唆された。

また、上記では、エタノール感受性遺伝子の観点から遺伝子を分類した後に各遺伝子発現情報の割合を計算したが、さらに、遺伝子を遺伝子発現情報の観点から分類した後にエタノール感受性の割合などを計算した。遺伝子を、FY834 株と IFO2347 株の遺伝子発現量を比較した遺伝子発現情報においてデータが存在した全遺伝子と、IFO2347 株において高発現している遺伝子、FY834 株で高発現している遺伝子、両株で変化がない遺伝子に分類し、エタノール感受性遺伝子の割合などを計算した。その結果、上述の結果と同様に、IFO2347 株で高発現している遺伝子に存在するエタノール感受性遺伝子の割合は全遺伝子に対して有意に高く、また、FY834 株において高発現している遺伝子に含まれるエタノール感受性遺伝子の割合は有意に低いことが示された (Fig. 3.16)。

また、必須遺伝子の存在割合が、両株で発現量が等しい遺伝子群に有意に多く含まれており、前節で必須遺伝子の発現変化が両株で類似していた結果とともに、必須遺伝子の遺伝子発現状態が株間で保存されていることがより示唆された。

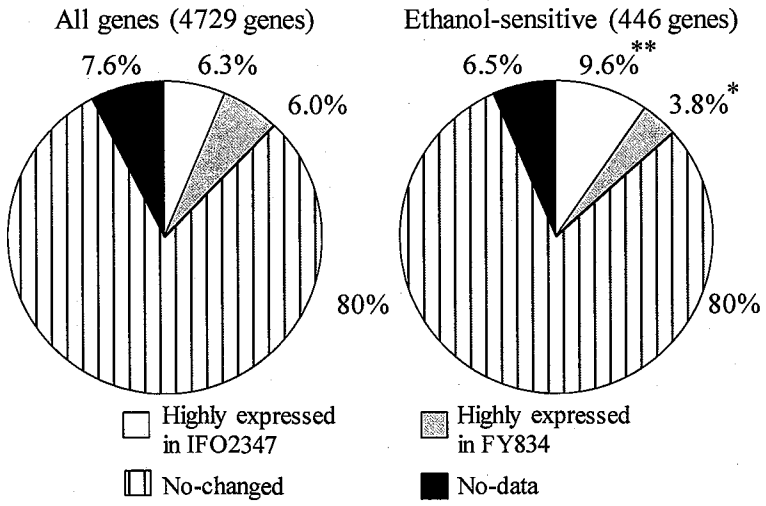

Fig. 3.15. エタノール感受性遺伝子とエタノール耐性能の異なる株間の非ストレス環境下における遺伝子発現量の比較情報の関連性。白色はエタノール耐性株である IFO2347 株で高発現している遺伝子の割合、灰色は FY834 株で高発現している遺伝子の割合、網掛けは両株で同程度の発現量を示す遺伝子の割合、黒色はデータが存在しなかった遺伝子の割合を示す。全ての 1 遺伝子破壊株において破壊されている 4729 遺伝子の対し、446 のエタノール感受性遺伝子において、*で示した割合は有意に低いこと ($p < 0.05$)、**で示した割合は有意に高いこと ($p < 0.01$) を示す。

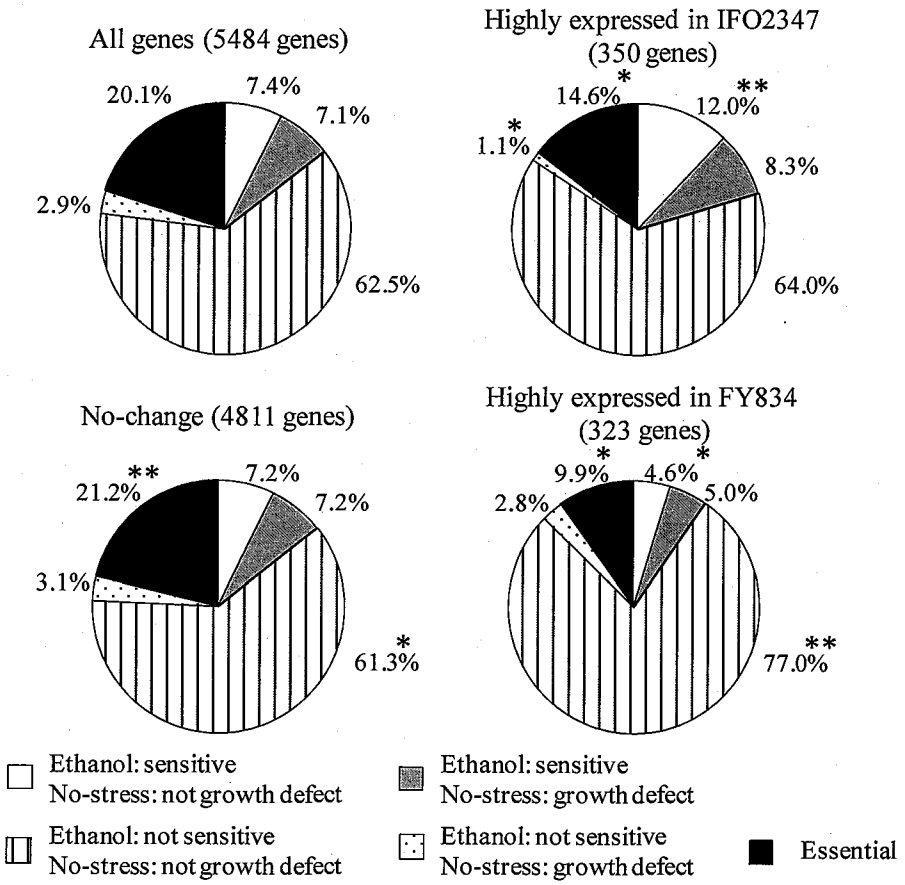

Fig. 3.16. エタノール感受性遺伝子とエタノール耐性能の異なる株間の非ストレス環境下における遺伝子発現量の比較情報の関連性。FY834 株と IFO2347 株の遺伝子発現量を比較した遺伝子発現情報においてデータが存在した全遺伝子と、IFO2347 株において高発現している遺伝子、FY834 株で高発現している遺伝子、両株で変化がない遺伝子に分けた。それぞれのグループにおいて、エタノール感受性遺伝子 (白色)、エタノール感受性遺伝子であるが非ストレス環境下において増殖阻害を引き起こす遺伝子 (灰色)、エタノール環境下と非ストレス環境下の両環境下で増殖に影響を与えない遺伝子 (縦線)、非ストレス環境下でのみ増殖阻害を引き起こす遺伝子 (ドット)、必須遺伝子 (黒色) の割合を計算した。全ての遺伝子における各割合に対して、*で示した割合は有意に低いこと ($p < 0.05$)、**で示した割合は有意に高いこと ($p < 0.05$) を示す。

3. 3. 6. 4 ストレス応答遺伝子とエタノール感受性遺伝子の関係

Gasch らは、浸透圧や高温、酸化などの様々なストレス環境下における酵母の遺伝子発現情報を解析することで、それらの環境に共通して遺伝子発現が増加、減少する遺伝子が数百存在することを明らかとし、Environmental Stress Response (ESR) 遺伝子と名付けた (Gasch *et al.*, 2000)。このように様々なストレス環境下に共通して発現が変化する ESR 遺伝子は、ストレス耐性とどのように関連しているのかを解析するために、遺伝子破壊株の情報との関連性を解析した。Table 3.17 に全ての遺伝子について各環境下における感受性遺伝子と耐性遺伝子の遺伝子数を再掲した。Table 3.18 に遺伝子発現量が減少する ESR 遺伝子について、各環境下における感受性遺伝子や耐性遺伝子の遺伝子数を示した。遺伝子発現量が増加する ESR 遺伝子についても同様に Table 3.19 に示した。感受性遺伝子や耐性遺伝子について、全ての遺伝子における割合と、ESR 遺伝子における割合を比較した。その結果、遺伝子発現量が減少した ESR には、非ストレス環境下において破壊により増殖速度の低下を引き起こした遺伝子が有意に多く、破壊が増殖速度に影響を与えない遺伝子は有意に少ないことが分かった (Table 3.18)。ストレス環境下においては、感受性遺伝子が多く含まれるなどの傾向は見られなかった。一方、遺伝子発現量が増加する ESR 遺伝子には、非ストレス環境下において破壊により増殖速度の低下を引き起こした遺伝子は有意に少なく、破壊が増殖速度に影響を与えない遺伝子は有意に多いことが分かった (Table 3.19) エタノール環境下において同様の傾向が見られたが、浸透圧環境下においてはその傾向は見られなかった。

Table. 3.17. 1 遺伝子破壊株コレクションにおいて破壊されている遺伝子における感受性遺伝子と耐性遺伝子の遺伝子数

	Sensitive	No-change	Tolerant
Non-stress	591	4095	43
Ethanol	446	3690	2
NaCl	329	3799	10

エタノールおよび NaCl 環境下における遺伝子数は、非ストレス環境下において破壊が増殖阻害を引き起こす遺伝子を除いたものである。

Table. 3.18. 遺伝子発現量が減少する ESR 遺伝子における感受性遺伝子と耐性遺伝子の遺伝子数

Repressed ESR	Sensitive	No-change	Tolerant
Non-stress	60*	150**	3
Ethanol	17	136	0
NaCl	14	137	2

エタノールおよび NaCl 環境下における遺伝子数は、非ストレス環境下において破壊が増殖阻害を引き起こす遺伝子を除いたものである。*はその遺伝子の割合が、Table 3.17 に示す遺伝子の割合と比べて有意に多く ($p < 0.05$)、**はその遺伝子の割合が有意に少ない ($p < 0.05$) ことを示す。

Table. 3.19. 遺伝子発現量が増加する ESR 遺伝子における感受性遺伝子と耐性遺伝子の遺伝子数

Induced ESR	Sensitive	No-change	Tolerant
Non-stress	10**	264*	1
Ethanol	12**	254*	0
NaCl	25	241	0

エタノールおよび NaCl 環境下における遺伝子数は、非ストレス環境下において破壊が増殖阻害を引き起こす遺伝子を除いたものである。*はその遺伝子の割合が、Table 3.17 に示す遺伝子の割合と比べて有意に多く ($p < 0.05$)、**はその遺伝子の割合が有意に少ない ($p < 0.05$) ことを示す。

3. 3. 6. 5 エタノール感受性遺伝子の過剰発現のエタノール耐性への影響

第 2 章において、遺伝子破壊がエタノール感受性を引き起こした *TRP* 遺伝子の過剰発現がエタノール耐性の向上につながった。そこで、エタノール環境下で破壊最も低い比増殖速度を示した 1 遺伝子破壊株において破壊されている遺伝子 (*LDB19*、*MEH1*、*PRO2*、*YNL335W*、Fig. 3.17) について過剰発現株を構築し、エタノール耐性への影響を解析した。

LDB19 遺伝子の破壊ではテロメア長の短縮を引き起こすことや、細胞表層の酸性糖タンパク質を染色するアルシアンブルーとの染色効率の低下を引き起こす (Askree *et al.*, 2004; Corbacho *et al.*, 2005)。しかし、これらの機能とエタノール耐性の関連性は報告されていない。*MEH1* 遺伝子の破壊は液胞の酸性化に感受性になることが報告されている (Gao *et al.*, 2005)。エタノールストレスは細胞内を酸性化するため (Rosa and Sá-Correia, 1996)、細胞内の pH の恒常性を保つために細胞内プロトンを H^+ V-ATPase により液胞に輸送することがエタノール耐性に重要な役割を担うと考えられている (Fujita *et al.*, 2006)。このことより、*MEH1* 遺伝子破壊株のエタノール感受性は、エタノール環境下におけるプロトンの液胞への輸送による液胞の酸性化が原因であると推測される。*PRO2* 遺伝子はプロリン合成に関連し、破壊株はプロリン要求性を示す。また、プロリン合成に関連する他の遺伝子である *PRO1* 遺伝子の破壊株もエタノール感受性を示した。酵母のプロリン蓄積変異株はエタノール耐性を引き起こすことが報告されている (Takagi *et al.*, 2005)。*YNL335W* 遺伝子の翻訳産物は hypothetical protein であるが、エタノール耐性に必要な何らかの機能を有している可能性がある。

これらの遺伝子のエタノール環境下における遺伝子発現情報については、*LDB19* 遺伝子のみがクラスタリング解析に用いられ、クラスタ No. 29 に含まれており、FY834 株で発現量が大きく低下していた。また、非ストレス環境下における FY834 株と IFO2347 株の遺伝子発現量の比較のデータにおいては全ての遺伝子においてアレイの実験誤差範囲内であり、両株で発現量に違いはなかった。*LDB19* 遺伝子に関しては IFO2347 株に比べ FY834 株で発現量が大きく減少していたことから、過剰発現によりエタノール環境下での発現量の減少が抑制され、エタノール耐性が向上する可能性が期待された。これらの遺伝子について、1 遺伝子破壊株の基準株として用いた BY4742Δ*his3* 株を元株として 1 遺伝子過剰発現株を構築し、エタノール環境下における比増殖速度を測定した。しかし、これらの過剰発現株は元株の比増殖速度に顕著な違いは観察されず、エタノール耐性を示さなかった (Table 3.20)。これらのことより、選択した 4 つの遺伝子の存在はエタノール環境下における増殖に必要ではあるが、その遺伝子発現量はエタノール耐性の向上には関連しないことが示された。

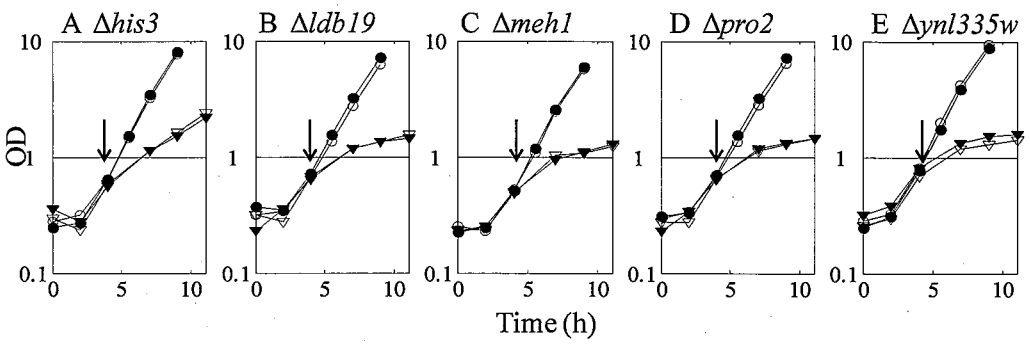

Fig. 3.17. エタノール環境下で最も低い比増殖速度を示した 1 遺伝子破壊株の培養結果。(A)基準株として用いた *HIS3* 破壊株、(B) *LDB19* 破壊株、(C) *MEH1* 破壊株、(D) *PRO2* 破壊株、(E) *YNL335W* 破壊株の非ストレス環境下 (○) とエタノール環境下 (▽) における培養結果を示す。白抜きと黒抜きの記号は繰り返し培養の結果を示す。

Table 3.20. エタノール環境下における 1 遺伝子過剰発現株の比増殖速度

Strain	Average specific growth rate (1/h)	Standard deviation of specific growth rate (1/h)
Δ*his3*/pLDB19	0.171	7.0×10^{-3}
Δ*his3*/pMEH1	0.171	5.9×10^{-3}
Δ*his3*/pPRO2	0.172	6.3×10^{-3}
Δ*his3*/pYNL335W	0.172	5.7×10^{-3}
Δ*his3*/pAURΔCENARS	0.176	6.3×10^{-3}

3 回の培養実験における比増殖速度およびその標準偏差を示す。Δ*his3*/pLDB19、Δ*his3*/pMEH1、Δ*his3*/pPRO2、Δ*his3*/pYNL335W はそれぞれ *LDB19*、*MEH1*、*PRO2*、*YNL335W* 遺伝子の遺伝子過剰発現株を示す。Δ*his3*/pAURΔCENARS は過剰発現株の構築に用いたベクターpAURΔCENARS を導入した株を示す。

3.4 考察

本章では、1遺伝子破壊株を用い、エタノール環境下で培養し比増殖速度を評価することで、破壊がエタノール環境下における比増殖速度を低下させるエタノール感受性遺伝子を特定した。前半では、この情報を用い、エタノール感受性遺伝子が多く含まれる遺伝子機能カテゴリを抽出することで、エタノール環境下において必要とされる遺伝子(機能) の解析を行った。また後半では、遺伝子発現情報を用いた細胞育種法の開発に向け、第2章で取得したエタノール環境下における遺伝子発現情報や非ストレス環境下における遺伝子発現情報と、1遺伝子破壊による表現型の変化の情報との関連性の解析を行った。それぞれの結果について考察を下記に示した。

3.4.1 エタノール感受性遺伝子の機能に関する考察

1遺伝子破壊株コレクションを用いることで、全ての遺伝子について解析環境下における1遺伝子破壊が表現型に与える影響を解析することが可能である。そこで、1遺伝子破壊株をエタノール環境下で培養し、破壊がエタノール感受性を引き起こすエタノール感受性遺伝子を選択し、それらの遺伝子が多く含まれる遺伝子機能を抽出することで、エタノール環境下において必要とされる細胞機能の抽出を目指した。

1遺伝子破壊株を用いてエタノール感受性遺伝子を選択するにあたり、先行研究ではコロニー形成による評価など定量的でない測定方法により解析が行われていた。そこで、遺伝子破壊がエタノール環境下での増殖に与える影響を定量的に解析することで比較的小さな増殖速度の変化を引き起こす遺伝子の抽出をすることができ、エタノール環境下での増殖に必要な細胞機能のより詳細な理解につながると考え、1遺伝子破壊株を液体培地で培養し、エタノール環境下における比増殖速度を測定した。1遺伝子破壊株の比増殖速度を基準株の比増殖速度と比較することで、各環境下において有意に比増殖速度が低い1遺伝子破壊株を選択した。エタノール感受性株の多くは、非ストレス環境下において増殖速度の低下を示した1遺伝子破壊株と共通性が高く、単にエタノール感受性株を選択することは、非ストレス環境下において増殖阻害を引き起こす遺伝子の選択につながる可能性がある。そこで、エタノールストレスに関連する遺伝子を正確に抽出するため、非ストレス環境下において破壊が増殖速度の低下を引き起こした遺伝子を除き、エタノール環境下でのみ破壊が増殖速度の低下を引き起こした446遺伝子をエタノール感受性遺伝子として解析に用いた。エタノール環境下における増殖に必要な細胞機能を抽出するために、エタノール感受性遺伝子が多く含まれる機能カテゴリの抽出を行った。その結果、第2章と同様にトリプトファン合成がエタノール環境下における増殖に必要な機能であり、*TRP1-5* 遺伝子がエタノール感受性遺伝子であることが確認された (Table 3.6)。また、ペルオキシソームがエタノール環境下における増殖に必要な機能であることを新規に明らかにした (Table 3.6)。ペルオキシソームに関連する *PEX* 遺伝

子に含まれるエタノール感受性遺伝子は全て、ペルオキシソームでのタンパク質輸送に関連する膜タンパク質をコードしており (Table 3.7)、さらにそれらの遺伝子の破壊株においてはペルオキシソームの合成が観察されないことが報告されている (Erdmann *et al.*, 1989; Brocard *et al.*, 1997; Huhse *et al.*, 1998; Koller *et al.*, 1999; Hettema *et al.*, 2000; Rehling *et al.*, 2000; Albertini *et al.*, 2001; Birschmann *et al.*, 2005)。また、ペルオキシソームの機能である、脂肪酸のβ酸化やリジン合成に関連する1遺伝子破壊株はエタノール感受性を示さず (Table 3.7)、既知のペルオキシソームの機能から *PEX* 遺伝子破壊によるエタノール感受性を説明することを説明することはできなかった。これらのことより、ペルオキシソームはエタノール環境下での増殖に必要であり、エタノール耐性に関わる解明されていない機能を有している可能性が示唆された。その他に、ミトコンドリアに関連する機能カテゴリにエタノール感受性遺伝子が特に多く含まれていることが分かった (Table 3.6)。ミトコンドリアの機能である呼吸の欠損株がエタノール感受性を示すことや (Aguilera & Benítez, 1985)、エタノール耐性がミトコンドリアゲノムに依存すること (Jiménez & Benítez, 1988) から、ミトコンドリアの機能はエタノール耐性と強く関連し得ていることが示唆された。

さらにエタノール耐性に必要な機能を詳細に解析するために、浸透圧ストレス環境下で1遺伝子破壊株を培養し、浸透圧感受性遺伝子を抽出した。エタノール感受性遺伝子から浸透圧感受性遺伝子を除き、エタノールストレス特異的な感受性遺伝子を抽出したところ、ほぼ全ての *TRP* 遺伝子や *PEX* 遺伝子、ミトコンドリア関連遺伝子が維持されており、エタノール環境下特異的に増殖に必要な遺伝子であることが分かった。

このように、1遺伝子破壊株を用いることで、解析対象の環境下での増殖に必要な細胞機能を抽出することが可能である。本研究では新規な知見として、ペルオキシソームがエタノール環境下における増殖に必要な機能であることを明らかとした。これまで明らかとされていなかった原因として、*PEX* 遺伝子の破壊株の比増殖速度はエタノール感受性株の選択に用いた閾値の比増殖速度に近く、これまでのコロニー選択による解析では抽出が困難であると考えられる。本研究で開発した高精度な1遺伝子破壊株の比増殖速度の評価系を用いることで、様々な環境下において必要な細胞機能のより詳細な理解につながり、細胞育種を行う際に有用な情報になると期待される。

3.4.2 1遺伝子破壊株の表現型変化と遺伝子発現情報の関連性解析に関する考察

まず、1株のみの遺伝子発現情報から、エタノール環境下で増殖に必要な遺伝子の抽出が可能であるかを検証するために、FY834株のエタノール環境下における遺伝子発現情報を用い、エタノール感受性遺伝子について、エタノール環境下で遺伝子発現が増加する遺伝子の割合を解析した。その結果、エタノール感受性遺伝子においてエタノールストレスに対する遺伝子発現変化の特徴はみられなかった (Fig. 3.9)。また、浸透圧環

境下における遺伝子発現情報と浸透圧感受性遺伝子を用いて同様の解析を行った結果、浸透圧感受性遺伝子に浸透圧ストレスに対する遺伝子発現変化の特徴はみられなかった。以上のことより、単に1株のみの環境変化に対するあるタイムポイントにおける遺伝子発現変化の情報から、その環境下において必要とされる遺伝子の抽出は困難であることが示唆された。この原因については、例えば、3.3.6.4節に記述したように、様々なストレス環境下に共通して遺伝子発現量が増加する遺伝子が数百存在し (ESR遺伝子)、それらの多くには発現制御に関わるシスエレメント Stress response element (STRE) がプロモータ領域に存在することから共通の発現制御下にあると考えられている (Gasch *et al.*, 2000)。しかし、発現量が増加する ESR 遺伝子に含まれるエタノール耐性に必要な遺伝子の割合は多くはなかった (Table 3.19)。また、多くのアミノ酸合成に関連する遺伝子は Gcn4 タンパク質により遺伝子発現が制御されている (Natarajan *et al.*, 2001; Hinnebusch, 2005)。しかし、第2章でみられたように発現量が増加した遺伝子が関連する全てのアミノ酸がエタノール耐性に関連していなかった (Fig. 2.15)。このように、その環境に必要とされる遺伝子以外の同じ制御下に置かれる遺伝子の発現も同時に変化させられている可能性がある。また、細胞には遺伝子の発現量の変化によりタンパク質量が変化し、触媒する反応の速度が変化する反応以外に、シグナル伝達経路のようにタンパク質の量 (遺伝子の発現量) に関係なくタンパク質のリン酸化・脱リン酸化などの修飾を通じて反応速度が変化する反応がある。そのため、シグナル伝達経路に属する遺伝子がその環境下における増殖に必要であった場合、遺伝子発現変化からは特定することができない。このようなことが、ある1株のみの環境変化に対する遺伝子発現変化の情報から、その環境下における表現型に関連する遺伝子を抽出することを困難にしていると考えられる。

さらに、エタノール耐性能の異なる酵母のエタノール環境下における遺伝子発現情報を比較することで、エタノール感受性遺伝子の抽出につながるかについて解析を行った。そのために、第2章で解析した FY834 株と IFO2347 株のエタノール環境下における遺伝子発現情報のクラスタリング結果において、どのクラスタに有意にエタノール感受性遺伝子が多く含まれているかを解析した。その結果選択された3つのクラスタに含まれる遺伝子は、両株で異なる発現パターンを示した (Fig. 3.12)。また、その中の一つは、第2章において抽出したエタノール耐性に関連する *TRP* 遺伝子が含まれるクラスタであった。また、遺伝子を FY834 株と IFO2347 株の遺伝子発現変化の類似度に応じて分類したところ、逆相関を示す遺伝子群にエタノール感受性遺伝子の割合が有意に多く含まれていた (Fig. 3.13-14)。これらことより、環境変化への適応能力の異なる株間において異なる遺伝子発現変化を示す遺伝子が、その環境下での表現型に関連する遺伝子の選択につながる可能性が示唆された。このことより、第2章でエタノール耐性能の異なる株の遺伝子発現情報を比較解析したことは、エタノール環境下での増殖に必要な遺伝子を選択するために適した方法であったと考えられる。

また、エタノール耐性酵母であるIFO2347株においてFY834株より非ストレス環境下で高発現している遺伝子にエタノール環境下での増殖に必要な遺伝子が多く含まれていた (Fig. 3.15-16)。最近、培養途中に培養液にNaClなどのストレスを添加すると同時にタンパク質の合成阻害剤であるシクロヘキシミドを添加しても、ストレスに対する耐性は変化しないことが報告された (Berry and Gasch, 2008)。すなわち、ストレス添加後に合成されたタンパク質はストレス耐性に影響を与えず、ストレス添加前の細胞状態がストレス耐性にとって重要な因子であることが示唆された。これらのことより、環境変化への適応にはその前の細胞状態が重要であり、ストレス耐性株において非ストレス環境下で発現量が高い遺伝子の過剰発現がストレス耐性の向上につながる可能性が考えられる。

以上をまとめると、(1) 遺伝子破壊によりストレス環境下での表現型が変化する遺伝子にストレス環境下で遺伝子発現が変化する遺伝子が多く含まれるという傾向はなく (Fig. 3.9)、ある1株のみのストレス環境下での遺伝子発現変化の情報から表現型に影響を与える遺伝子を抽出することは困難である、(2) ストレス耐性能の異なる株において、その環境下で異なる発現変化を示す遺伝子や (Fig. 3.12-14)、(3) 非ストレス環境下でストレス耐性が高い株においてより高発現している遺伝子を選択することが (Fig. 3.15-16)、全ての遺伝子から無作為に遺伝子を選択するより、破壊が表現型に影響を与える遺伝子の選択に成功する可能性が高い、ということが示された。

次に、エタノール環境下で必要とされる遺伝子の情報はエタノール耐性酵母の育種につながるのかについて解析を行った。第2章では、遺伝子破壊がエタノール感受性を引き起こした *TRP* 遺伝子の過剰発現を行うことで、エタノール耐性酵母の育種に成功した。本章においても、エタノール環境下で最も比増殖速度が低い4株の1遺伝子破壊株において破壊されている遺伝子 (*LDB19*、*MEH1*、*PRO2*、*YNL335W*) の過剰発現株を構築したが、エタノール耐性を示さなかった (Table 3.20)。この理由として、それらの遺伝子の存在はエタノール環境下での増殖に必要であるが、存在量はエタノール耐性に関係がないことが考えられる。また、それらの遺伝子が関連する反応経路の生産物の量がエタノール耐性の向上に関連するものであっても、律速段階の存在や、フィードバック阻害などの制御の存在により、1遺伝子の過剰発現が生産量の増加につながらず、エタノール耐性の向上につながらなかったことも考えられる。例えば、過剰発現の対象とした *PRO2* 遺伝子はプロリン合成に関連し、*PRO2* 遺伝子の破壊はプロリンを合成できず、プロリン要求性を引き起こす (Tomenchok and Brandriss, 1987)。また、最終生産物であるプロリンの蓄積変異株はエタノール耐性を示す (Takagi *et al.*, 2005)。そのため、*PRO2* 遺伝子の過剰発現により Pro2 タンパク質の量が増え、触媒する反応が活性化し、プロリンの生産量の増加によりエタノール耐性の向上が期待された。しかし、プロリン合成経路では、Fig. 3.18 に示すように合成されたプロリンが Pro1 タンパク質の活性をフィ

ードバック阻害するため (Sekine *et al.*, 2007)、ある一定以上プロリンの生産量は増えない。このことにより、*PRO2* 遺伝子の過剰発現はエタノール耐性の向上につながらなかったと推測される。実際には、プロリンのフィードバック阻害を受けない *PRO1* 変異遺伝子の作成がプロリン生産量を増加させることが報告されており (Takagi *et al.*, 2005)、そのような遺伝子操作によりエタノール耐性酵母の育種につながったと考えられる。このように、エタノール環境下で必要とされる遺伝子を単に過剰発現するだけではなく、その遺伝子が関連する経路の制御機構など生物学的知見を踏まえ育種の方策を考える必要がある。

以上より、遺伝子発現情報を用いた育種において、エタノール耐性能の異なる株においてエタノール環境下や非エタノール環境下において異なる発現変化を示す遺伝子を選択することで、エタノール環境下での増殖に必要な遺伝子を効率的に選択できる可能性が示唆された。また、破壊がエタノール環境下での増殖速度を低下させる増殖に必要な遺伝子を過剰発現することでエタノール耐性株の育種を試みたところ、第 2 章では成功したが、本章では成功に至らなかった。一方で、そのような遺伝子を単に過剰発現するのではなく、生物学知見を踏まえ育種の方策を立てることも必要であることを示した。これらのことより、遺伝子発現情報を用いることで、解析環境下において増殖に必要とされる遺伝子の効率的な抽出につながる可能性が示唆され、選択された遺伝子 (機能) は細胞育種の方策を立てるにための基盤情報になると期待される。

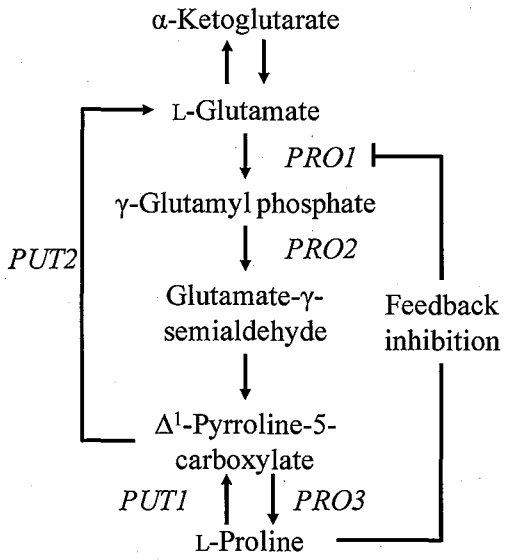

Fig. 3.18. プロリン合成経路。代謝物と各反応を触媒する酵素をコードする遺伝子名を示した。最終産物であるプロリンが Pro1 タンパク質の活性をフィードバック阻害するため、一定量以上のプロリンが合成されない。また、Put1 や Put2 タンパク質によりプロリンが前駆体に戻される。

3.5 結言

本章では、酵母の1遺伝子破壊株を用い、エタノール環境下で増殖に必要な細胞機能と、遺伝子発現情報と遺伝子破壊による表現型の関連性について解析を行った。

本章の前半では、1遺伝子破壊株のエタノール環境下での増殖情報から、エタノール環境下で増殖に必要な細胞機能の抽出を行った。これまで、遺伝子破壊がエタノール環境下における増殖に与える影響は定量的に評価されていなかったため、液体培養を行い、比増殖速度を測定することで定量的な評価を行った。ハイスループットかつ再現性の良い培養系の構築により、再現良く定量的に遺伝子破壊が表現型に与える影響の解析を可能にし、破壊が比較的小さな比増殖速度の変化を引き起こす遺伝子の選択を可能にした。構築した培養系を用い、1遺伝子破壊株をエタノール環境下で培養し、破壊がエタノール感受性を引き起こす遺伝子を抽出した。さらに非ストレス環境下においても1遺伝子破壊株を培養し、非ストレス環境下で増殖速度の低下を引き起こす遺伝子を特定した。この遺伝子をエタノール感受性遺伝子から除くことで、エタノール環境下でのみ増殖速度の低下を引き起こすエタノール感受性遺伝子を選択した。得られたエタノール感受性遺伝子が有意に多く含まれる遺伝子機能カテゴリを選択することで、エタノール環境下において増殖に必要な細胞機能の抽出を行った。その結果、第2章で明らかとしたトリプトファン合成や、ミトコンドリアの機能が選択された。また構築した再現良く定量的に増殖速度の変化を解析可能な培養系を用いたことより、新規な知見としてペルオキシソームがエタノール環境下で必要な細胞機能であることを明らかとした。

本章の後半では、遺伝子発現情報と1遺伝子破壊による表現型の変化の関連性ついて解析を行った。その結果、エタノール環境下で増殖に必要とされる遺伝子は、エタノール耐性能の異なる株において、エタノール環境下で異なる遺伝子発現変化を示す遺伝子や、非ストレス環境下でエタノール耐性酵母において高発現している遺伝子に含まれる確率が高いことを示した。この結果より、第2章でエタノール耐性能の異なる株の遺伝子発現情報を比較解析したことは、適した方法であったと考えられる。また、遺伝子破壊がエタノール感受性を引き起こした遺伝子について、第2章では *TRP* 遺伝子の過剰発現がエタノール耐性につながったが、本章で選択した遺伝子 (*LDB19*、*MEH1*、*PRO2*、*YNL335W*) の過剰発現はエタノール耐性の向上につながらなかった。*PRO2* 遺伝子が関連するプロリン合成経路にみられるように、生産物質のプロリンの蓄積がエタノール耐性の向上つながるものであったが、*PRO2* 遺伝子の過剰発現を行ってもフィードバック阻害により、プロリンの生産量は増えず、エタノール耐性は向上しない。これらのことより、第2章で仮定したその環境で必要な遺伝子の過剰発現が効率的な育種につながるかについては解析例が少なく評価できないが、その環境で必要な遺伝子を単に過剰発現するのではなく、その遺伝子が関連する反応経路の制御機構など生物学的知見を踏まえ、育種の方策を立てることでより育種の成功につながることが期待される。

遺伝子発現情報を用いなくても、本章前半で行った 1 遺伝子破壊株の培養により、直接的にその環境下において必要とされる機能を解析することは可能である。しかし、現在、1 遺伝子破壊株コレクションは大腸菌 (Baba *et al.*, 2006) や分裂酵母 (Park *et al.*, 2003、Baek *et al.*, 2008)、枯草菌 (Kobayashi *et al.*, 2003) など限られた生物種でしか構築されていない。一方、DNA マイクロアレイは、核酸のハイブリダイゼーションを活用した技術であり、生物種を問わず利用可能である。そのため、本章の後半で提案した方法は、多くの微生物において解析対象の環境で必要とされる遺伝子 (細胞機能) の抽出につながると期待される。

第4章　網羅的遺伝子発現情報にもとづく Stress Response Element の存在位置と存在数が遺伝子発現に与える影響の解析

4.1　緒言

第 2 章と第 3 章ではエタノール耐性能の異なる酵母において、異なる遺伝子発現変化を示す遺伝子がエタノール環境下での増殖に関連する遺伝子である傾向が強いことを明らかとした。その遺伝子発現変化が異なる原因の一つとして、両株で遺伝子発現の制御機構が異なっていること考えられる。遺伝子の発現は、RNA ポリメラーゼと複数のタンパク質からなる基本転写因子が ORF 上流に存在するプロモータ配列に結合し、RNA ポリメラーゼが DNA を RNA に転写することにより起こる (Fig. 4.1)。さらにトランスエレメントとよばれる様々なタンパク質が遺伝子の発現量に影響を与える。トランスエレメントは、ゲノム上の特異的な配列 (シスエレメント) に結合し、基本転写因子と直接もしくは間接的に相互作用することで発現量の制御を行う。このような制御機構において、発現変化に影響を与える原因の一つとして、シスエレメントの存在があげられる。例えば、株間でシスエレメントの存在の有無が異なれば、一方の株ではトランスエレメントが結合できないため遺伝子発現量の増加が引き起こされない。また、シスエレメント存在位置が異なればトランスエレメントと基本転写因子と距離が変わり相互作用することができない可能性もある。このようにシスエレメントの存在やその存在位置などが遺伝子発現変化に与える影響を明らかとすることができれば、FY834 株と IFO2347 株において異なる発現変化を示した遺伝子について、その発現変化の違いの原因をゲノム配列の違いで理解することができると期待される。

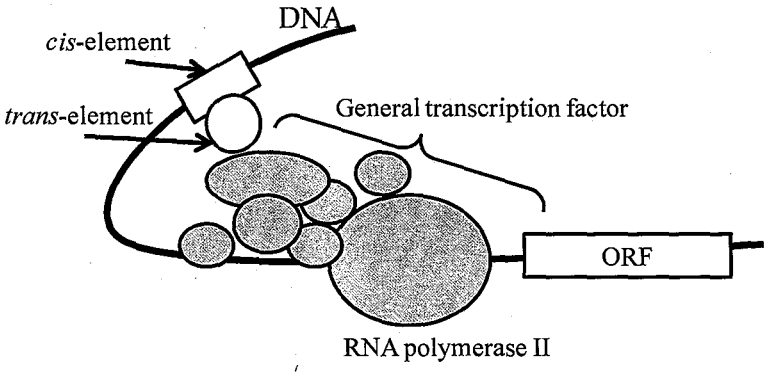

Fig. 4.1. 遺伝子発現機構。遺伝子の発現は RNA ポリメラーゼと複数のタンパク質からなる基本転写因子が ORF 上流に存在するプロモータ配列に結合し、RNA ポリメラーゼが DNA を鋳型に mRNA に転写することにより起こる。また、トランスエレメントが、ORF 上流領域に存在するシスエレメントと呼ばれる特異的な配列に結合し、基本転写因子と相互作用することで、遺伝子発現量が制御される。

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において、ストレス環境下で遺伝子発現量の増加を引き起こすシスエレメントとして Stress Response Element (STRE) が存在する。トランスエレメントである Msn2p もしくは Msn4p が STRE に結合することで遺伝子の発現量を増加させる (Martínez *et al.*, 1996; Schmitt *et al.*, 1996)。また、様々なストレス環境に共通して遺伝子の発現量が増加する遺伝数百の遺伝子が存在し、それらの遺伝子の ORF 上流には STRE が存在することから、ストレス環境下で多くの遺伝子が STRE により制御されている (Gasch *et al.*, 2000; Causton *et al.*, 2001)。*MSN2* と *MSN4* 遺伝子の二重欠損株においては、ストレス環境下で野生株では発現が増加する遺伝子の発現が抑制され (Gasch *et al.*, 2000; Causton *et al.*, 2001)、様々なストレスに感受性を示す (Martínez *et al.*, 1996; Kandror *et al.*, 2004; Domitrovic *et al.*, 2006) など、STRE はストレス耐性に重要な役割を担っている。STRE は酵母に存在する 6000 遺伝子の約半数の遺伝子の ORF 上流に存在しているが、実際にストレス環境下で発現量が増加する遺伝子数は数百程度である。そのため、ストレス環境下において遺伝子発現量の増加に影響を与える STRE の特徴を明らかにすることは、ストレス環境下における遺伝子発現制御の理解を深める有益な情報になると期待される。そこで、本章では、STRE の存在位置や存在数とストレス環境下における遺伝子発現量の増加の関連性を明らかとすることを目的とした。

現在、ストレス環境下における遺伝子発現に影響を与える STRE の特徴としては、STRE に制御される既知の遺伝子において、STRE は ORF 上流 100 - 600 bp の領域にクラスタ化して存在することや (Moskvina *et al.*, 1998)、ORF 上流に存在する STRE の数が、ストレス環境下における遺伝子発現量の増加割合に影響を与えることが報告されている (Kobayashi *et al.*, 1993; Marchler *et al.*, 1993; Varela *et al.*, 1995)。しかし、これらの解析は STRE に制御される既知の遺伝子の限られた遺伝子についてのみ行われており、遺伝子発現情報と STRE の存在位置や存在数の関連性についてゲノムワイドな解析は行われていない。そこで、本章では、ストレス環境下における酵母の網羅的な遺伝子発現情報を用い、STRE の存在位置や存在数とストレス環境下における遺伝子発現量の増加の関連性をゲノムワイドな観点から明らかとすることを目指した。

4.2 実験方法及び実験材料

4.2.1 ゲノム配列および STRE の抽出

Saccharomyces genome database (http://www.yeastgenome.org/) より全ての遺伝子について ORF とその上流 1000 bp の配列情報を取得し (ftp://genome-ftp.stanford.edu/pub/yeast/data_download/sequence/genomic_sequence/orf_dna/orf_genomic_1000_all.fasta.gz)、各遺伝子について ORF 上流 1000 bp の配列を抽出した。抽出した配列に対し、STRE のコンセンサス配列 (AGGGG と CCCCT) を用いて、各遺伝子の ORF 上流 1000 bp における STRE の存在位置と存在数を解析した。

4.2.2 遺伝子発現情報

遺伝子発現情報として、出芽酵母 FY834 (*MATα his3Δ200 ura3-52 leu2Δ1 lys2A202 trp1Δ63*) の NaCl およびソルビトールによる浸透圧ストレスに対する遺伝子発現変化を DNA マイクロアレイにより解析した情報を用いた (Hirasawa *et al.*, 2006a, Hirasawa *et al.*, 2006b)。ストレス環境下において遺伝子発現が変化した遺伝子の選択は、2 倍以上もしくは 2 倍以下に遺伝子発現量が変化した遺伝子を、それぞれ有意に発現量が増加した遺伝子、発現量が減少した遺伝子とした。また、浸透圧ストレス以外のストレス環境下における遺伝子発現情報として、高温、アルカリ、過酸化物、酸のストレス環境下における酵母の遺伝子発現情報を用いた (Causton *et al.*, 2001)。

4.2.3 無作為化検定

STRE が ORF 上流 1000 bp に存在しない遺伝子群から、解析対象と同数の遺伝子をランダムに抽出し、発現量が増加した遺伝子の存在割合を計算した。この操作を 1000 回繰り返し得られた発現量が増加した遺伝子の存在割合の分布において、実測値の発現量が増加した遺伝子の存在割合以上の割合を示すデータセット数の 1000 データセットに対する割合を p 値とした。

4.3 結果

4.3.1 STRE の存在位置と遺伝子発現変化の関連性

Saccharomyces genome database (http://www.yeastgenome.org/) より取得した酵母の各遺伝子の ORF 上流 1000 bp における STRE の存在位置を解析した。その結果、6718 遺伝子中 3627 遺伝子において STRE が 1 か所以上存在し、1391 遺伝子において STRE は 2 か所以上存在していることが明らかとなった。STRE の存在位置と遺伝子発現変化の関連性を解析するにあたり、複数の STRE の存在の影響を除くために、ORF 上流 1000 bp 内に STRE が 1 つのみ存在する遺伝子に対して解析を行った。ORF 上流 1000 bp を翻訳開始コドンから 50 bp ごとに区切り、遺伝子を STRE の存在位置に応じて分類した。各領域に STRE が存在する遺伝子群において、0.5 M NaCl ストレスにより遺伝子発現量が増加した遺伝子の割合を解析した (Fig. 4.2A)。その結果、51 - 300 bp に STRE が存在する遺伝子群において遺伝子発現量が増加した遺伝子の割合が STRE を持たない遺伝子群に対し有意に高いことが分かった($p < 0.01$)。

この結果の一般性を確認するために、他のストレスに対する遺伝子発現変化の情報を用いて解析を行った。その結果、酸ストレス (Fig. 4.2B) や、異なる NaCl 濃度によるストレス、ソルビトール、高温、アルカリ、過酸化物などのストレスに対する遺伝子発現情報 (Causton *et al.*, 2001; Hirasawa *et al.*, 2006a; Hirasawa *et al.*, 2006b) を用いた時も同様の結果が得られた。この結果が、STRE により引き起こされたことであるかを確認するために、STRE に結合する転写因子をコードする *MSN2* と *MSN4* の二重欠損株の酸ストレスに対する遺伝子発現変化の情報を用いて解析を行った。その結果、*MSN2 MSN4* 二重欠損株では、STRE の存在位置と遺伝子発現変化に関連性は見られなかった (Fig. 4.2C)。以上のことより、ORF 上流 51 - 300 bp に存在する STRE がストレス環境下における遺伝子発現量の増加に影響を与えることが示唆された。

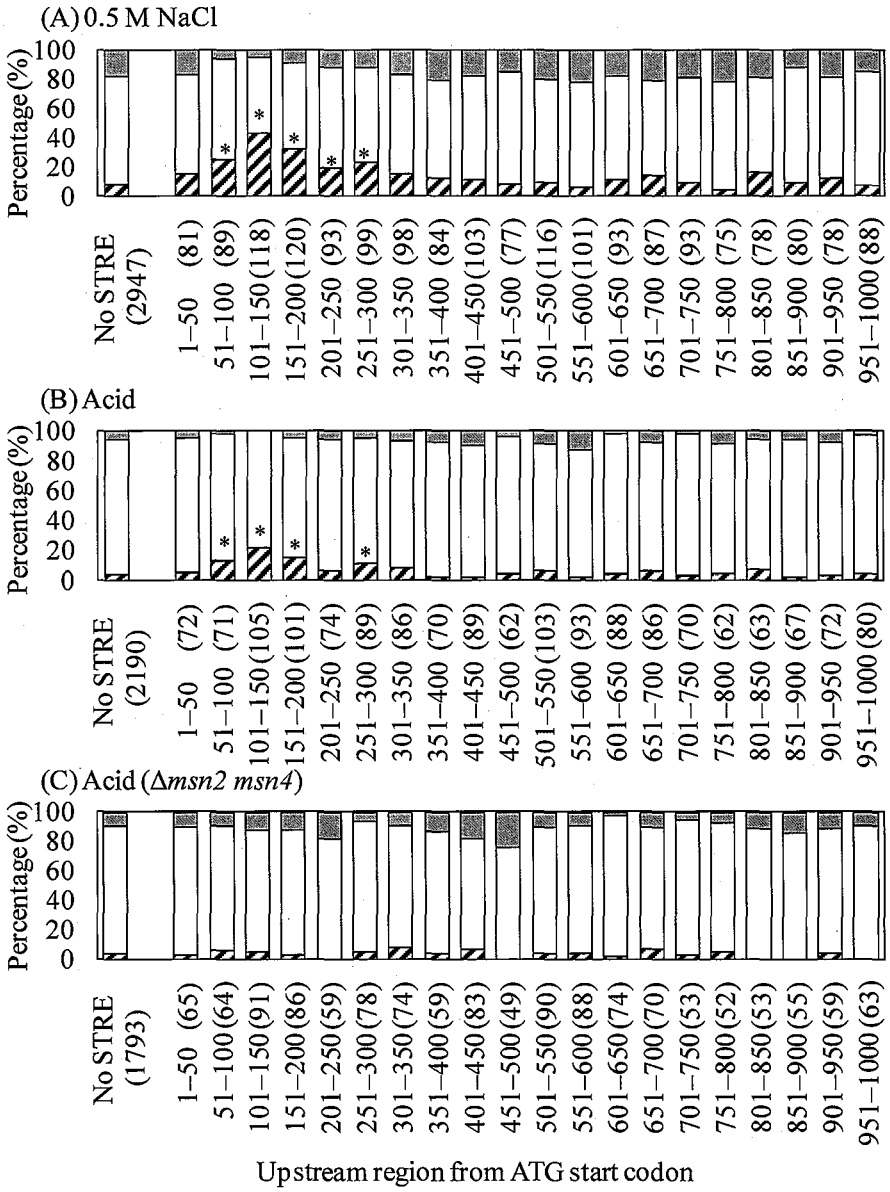

Fig. 4.2. STRE の存在位置とストレス環境下における遺伝子発現変化の関連性。括弧の外の数字は ORF から何塩基上流の領域であるかを示す。括弧内の数字は、ORF 上流 1000 bp 以内に 1 つのみ STRE が存在する遺伝子において、対応する領域に STRE が存在する遺伝子の数を示す。網掛けは遺伝子発現が増加した遺伝子の割合、白色は遺伝子発現が変化しなかった遺伝子の割合、灰色は遺伝子発現が減少した遺伝子の割合を示す。(A) 0.5 M NaCl 環境下における *MSN2 MSN4* 株、(B) 酸ストレス環境下における *MSN2 MSN4* 株、(C) 酸ストレス環境下における *Δmsn2 msn4* 株の遺伝子発現情報を用いた解析結果を示す。ORF 上流 1000 bp に STRE が存在しない遺伝子における各ストレス環境下にでの遺伝子発現変化については No STRE のカラムに示す。* は、その割合が STRE が上流配列に存在しない遺伝子における割合に対して有意に高い (p <0.01) ことを示す。

4.3.2 STRE の存在数と遺伝子発現変化の関連性

STRE の存在数とストレスに対する遺伝子発現変化の関連性について解析を行った。ORF 上流 1000 bp に存在する STRE の数に応じて遺伝子を分類し、0.5 M NaCl ストレスに対して遺伝子発現量が増加した遺伝子の割合を計算した。その結果、STRE の存在数と遺伝子発現量が増加した遺伝子の割合に正の相関がみられ、STRE が ORF 上流に多く存在するほど、ストレス環境下で遺伝子発現量が増加する傾向が高いことが分かった (Fig. 4.3A)。前節で解析した遺伝子発現変化に影響を与える STRE の存在領域である ORF 上流 51 - 300 bp に存在する STRE 数にもとづき同様の解析を行った。その結果、STRE の存在数が多いほど遺伝子発現量が増加する傾向がより顕著にみられ、STRE が 3 津存在する遺伝子にでは 80%の遺伝子で発現量の増加がみられた (Fig. 4.3B)。以上の結果より、STRE が多く存在するほど、ストレス環境下において遺伝子発現量が増加する傾向が強いことが示唆された。

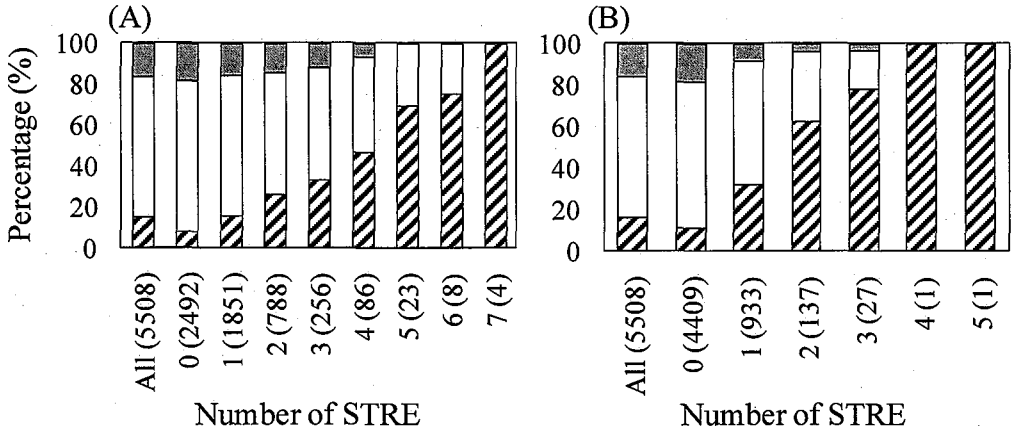

Fig. 4.3. STRE の存在数とストレス環境下における遺伝子発現変化の関連性。All は解析に用いた全ての遺伝子数を示す。0 ~ 7 の数字は ORF 上流 (A) 1000bp および(B) 51 - 300 bp に存在する STRE の数を示す。括弧内の数字は、対応する数の STRE が ORF 上流の各領域に存在する遺伝子数を示す。網掛けは遺伝子発現が増加した遺伝子の割合、白色は遺伝子発現が変化しなかった遺伝子の割合、灰色は遺伝子発現が減少した遺伝子の割合を示す。遺伝子発現情報には 0.5 M NaCl 環境下におけるデータを用いた。

さらに、STRE の存在数と遺伝子発現量の増加の大きさの関連性について解析を行った。ORF 上流に存在する STRE 数に応じ遺伝子を分類し、0.5M NaCl ストレスによる遺伝子発現変化の分布を調べた。その結果、STRE が多く存在する遺伝子ほど、ストレスにより発現量が大きく増加した。また、その傾向は、ORF 上流 1000 bp に存在する STRE

数より、51 - 300 bp に存在する STRE 数を用いた時により顕著になった (Fig. 4.4AB)。例えば、遺伝子発現量が 4 倍以上増加した遺伝子の割合は、ORF 上流 51 - 300 bp に 1 つのみ STRE が存在する遺伝子では 13%であるのに対し、3 つ STRE が存在する遺伝子では 63%と高かった。また他のストレス環境下の遺伝子発現情報 (Causton *et al.*, 2001; Hirasawa *et al.*, 2006a; Hirasawa *et al.*, 2006b) においても同様の結果が得られた。例えば、酸ストレス環境下においては、遺伝子発現量が 4 倍以上増加した遺伝子の割合は、51 - 300 bp に 1 つのみ STRE が存在する遺伝子では 2.3%であるのに対し、3 つ STRE が存在する遺伝子では 13.6%であった (Fig. 4.4CD)。

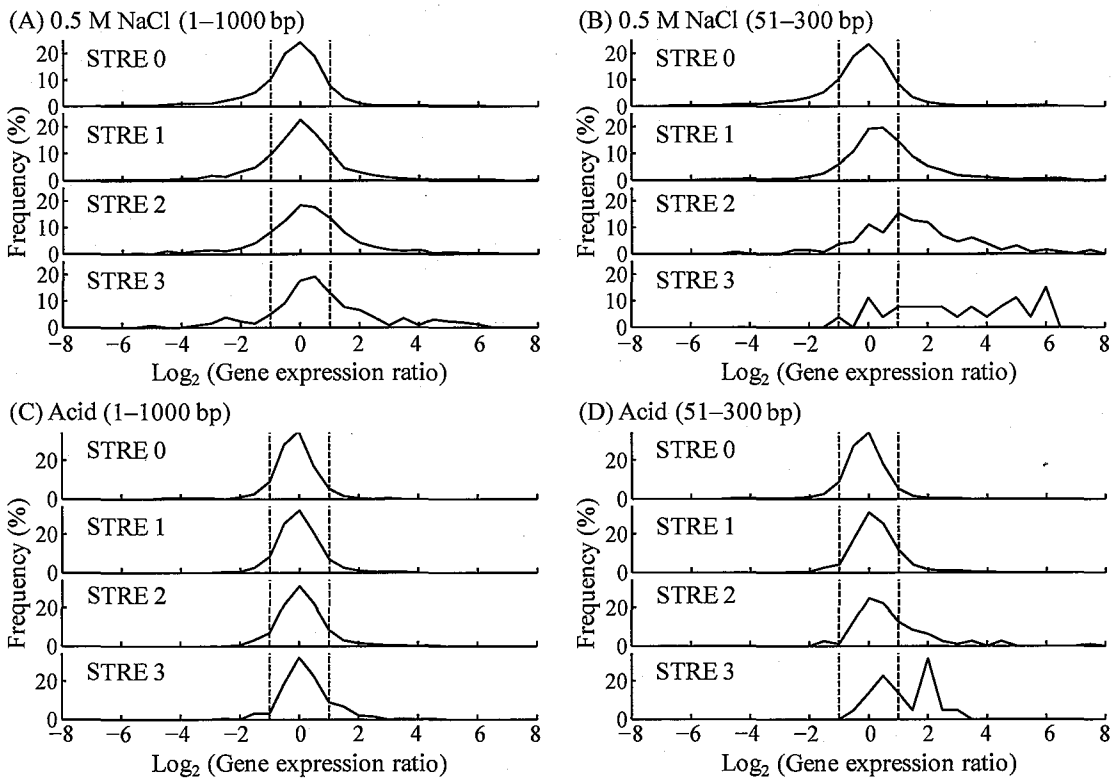

Fig. 4.4. STRE の存在数と遺伝子発現変化の大きさの関連性。実線は、図内に示した数の STRE が ORF 上流 (A) 1000 bp および (B) 51 - 300 bp に存在する遺伝子について 0.5 M NaCl 環境下における遺伝子発現変化比の分布を示す。酸ストレス環境下における遺伝子発現情報を用いて同様の解析を行った結果を (C) と (D) に示す。Y 軸に平行な破線は、有意に発現量が増加 (発現比 > 2)、減少 (発現比 < 0.5) した遺伝子の選択に用いた閾値の発現比を示す。

4. 3. 3　STRE 間の距離と遺伝子発現変化の関連性

STRE に制御される遺伝子は ORF 上流に複数の STRE が存在し、さらにそれらがクラスタ化して存在する傾向にあることが報告されている (Moskvina *et al.*, 1998)。このことより、複数の STRE が存在するとき、それらの距離が近いほどストレス環境下で遺伝子発現量が増加する傾向が高いと推測される。そこで、このことを確認するため、ORF 上流 51 - 300 bp に 2 つの STRE を有する遺伝子について、その 2 つの STRE の距離とストレスに対して遺伝子発現量が増加した遺伝子の割合の関連性について解析をおこなった。その結果、STRE の距離とストレスに対する遺伝子発現変化に関連性は見られなかった (Fig. 4.5)。

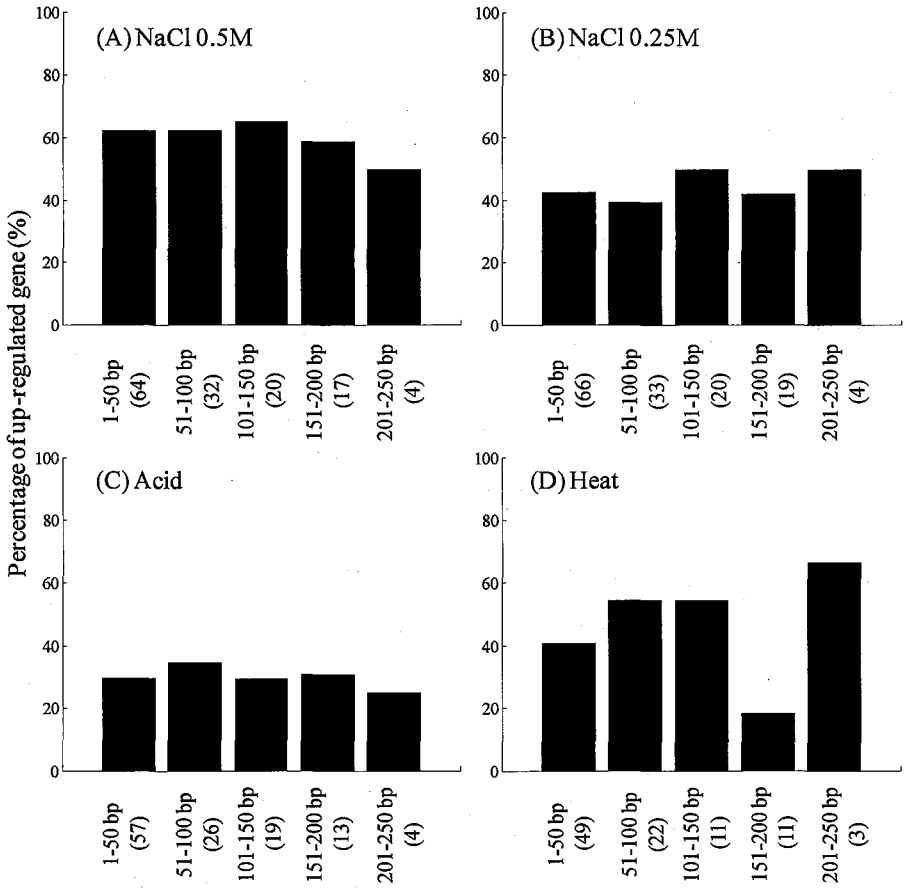

Fig. 4.5. ORF 上流に存在する 2 つの STRE 間の距離とストレス環境下における遺伝子発現変化の関連性。括弧の外の数字は、ORF 上流 51 – 300 bp に 2 つの STRE が存在する遺伝子における STRE 間の距離を示す。括弧内の数字は、その STRE 間の距離を示す遺伝子の数を示す。縦軸は、STRE 間の各距離を示す遺伝子において、(A) 0.5 M NaCl、(B) 0.25 M NaCl、(C) 酸、(D) 高温ストレス環境下において遺伝子発現が増加した遺伝子の割合を示す。.

4.4 考察

本章では、網羅的な遺伝子発現情報を用い、酵母のストレス環境下において多くの遺伝子の発現量の増加に関連するシスエレメントであるSTREについて、その存在位置と存在数と遺伝子発現の関連性について解析を行った。まず、STREの存在位置が遺伝子発現変化に与える影響を解析した。その結果、ORF上流51 - 300 bpに存在するSTREがストレス環境下における遺伝子発現量の増加に影響を与えることが分かった。また、STREの存在数と遺伝子発現変化の関連性について解析したところ、STREの存在数が多いほどストレス環境下で遺伝子発現量が増加する傾向が高く、発現量の増加量も大きくなることが明らかとなった。先行研究では、ORF上流100 - 600 bpに存在するSTREに着目していたが (Moskvina *et al.*, 1998)、網羅的遺伝子発現情報を用いゲノムワイドに解析を行った結果、ストレス環境下における遺伝子発現に影響を与えるSTREの存在領域をより詳細に特定することができた。遺伝子の発現は、シスエレメントに結合したトランスエレメントが基本転写因子と相互作用することで制御されている。そのため、ORF上流51 - 300 bpにSTREが存在することが、Msn2pやMsn4pと基本転写因子の相互作用に適した距離であると推測される。また、ORF上流に複数のSTREが存在するほど、その遺伝子はストレス環境下で遺伝子発現量が増加する傾向が高いことは、STREの存在数が多いほど、そのトランスエレメントであるMsn2pやMsn4pが結合する確率が高くなるためであると推測される。STREの存在数が多いほど遺伝子発現量が大きく増加することより、基本転写因子は複数のMsn2pとMsn4pと相互作用し、相互作用が多いほど転写が活性化されることが推測される。

本研究では、STREのコンセンサス配列にもとづき、ORF上流におけるSTREの存在を推測したため、必ずしも転写因子が結合するとは限らない。また、ヌクレオソームの結合部位などのクロマチン構造が転写因子の結合に影響を与えることもある (Segal *et al.*, 2006; Tirosh *et al.*, 2008)。現在、染色体免疫沈降法 (ChIP; Chromatin Immuno-Precipitation) とDNAマイクロアレイを組み合わせたChIP-chip法 (Ren *et al.*, 2000) を用いることで、細胞内において目的タンパク質が実際に結合しているゲノムの部位を同定することが可能である。ChIP-chip法を用い、ストレス環境下においてMsn2pとMsn4pが結合しているSTREを特定し、網羅的な遺伝子発現情報を用いることで、より詳細にSTREの存在位置や存在数が遺伝子発現変化へ与える影響を明らかにすることができると期待される。

これらの結果より得られた情報は、ストレス環境下における遺伝子発現制御の理解や、第2章と第3章で解析した、FY834株とIFO2347株において異なる発現変化を示した遺伝子の原因をゲノム配列の観点からの理解につながる情報になると期待される。ゲノム育種 (Ohnishi *et al.*, 2005) のように、表現型の異なる株間のゲノム配列の比較にもとづく育種が行われている。しかし、多くの場合、多数の配列の違いが得られるため、配列

の違いが表現型に与える影響を全てについて解析することは困難であり、絞り込む必要がある。そこで、本章で得られた遺伝子発現に影響を与える STRE の存在位置に配列の違いが存在すれば、遺伝子発現の違いが引き起こされるため、その配列の違いが表現型の違いに関連する可能性が考えられる。そのため、本章の結果は、ゲノム配列を用いた細胞育種において配列の比較情報から表現型に関連する配列の絞り込むための基礎情報になると期待される。

4.5 結言

本章では、ストレス環境下において多くの遺伝子の発現量の増加に影響を与えるシスエレメントの一つであるSTREについて、ORF上流における存在位置や存在量が遺伝子発現に与える影響を解析した。その結果、ORF上流51 - 300 bpに存在するSTREがストレス環境下における遺伝子発現量の増加に影響を与え、また、その存在数が多いほど発現量が増加する確率が高く、その発現量の増加割合も高いことが分かった。

第2章と第3章で実験室酵母FY834株と清酒酵母IFO2347株の遺伝子発現情報を解析したところ、多くの遺伝子が異なる発現変化を示した。そのような異なる株間で同じ遺伝子が異なる発現変化をする原因の一つとして、ORF上流領域の配列の違い (シスエレメントの存在の違い) により発現制御が異なることが挙げられる。現在、FY834株のゲノム配列は親株にあたるS288c株において解読されているが (Goffeau *et al.*, 1996)、IFO2347株のゲノム配列は解読の途中であるため、両株のゲノム配列を比較することはできない。IFO2347株のゲノム配列が解読された時、本研究で得られたSTREの存在位置と存在数が遺伝子発現に与える特徴についての知見は、FY834株とIFO2347株において異なる発現変化を示した遺伝子について、その発現変化が異なる原因を理解するための基礎情報になると期待される。

第5章　結言

本研究では、遺伝子発現情報にもとづく細胞育種法の開発に向け、エタノール耐性能の異なる酵母の遺伝子発現情報や、全ての遺伝子について1遺伝子破壊がエタノール環境下における増殖に与える影響の解析を行った。

第2章では、遺伝子発現情報にもとづく細胞育種法の開発に向け、遺伝子発現情報にもとづきエタノール耐性酵母の育種を試みた。エタノール耐性能の異なる酵母において、エタノール環境下で異なる発現変化を示す遺伝子は、エタノール耐性に関連する確率が高いと推測し、実験室酵母 FY834 株とエタノール耐性酵母である清酒酵母 IFO2347 株のエタノール環境下における遺伝子発現変化を DNA マイクロアレイにより解析した。クラスタリング解析をした後、両株で異なる発現変化を示す遺伝子が含まれるクラスタを選択した。それらのクラスタに含まれる遺伝子の1遺伝子破壊株をエタノール環境下で培養した結果、*TRP* 遺伝子の破壊株がエタノール感受性を示し、FY834 株で *TRP* 遺伝子を過剰発現した結果、エタノール耐性株の育種に成功した。この結果より、遺伝子発現情報を用いた育種において、ストレス耐性の異なる株の遺伝子発現情報から異なる発現変化を示す遺伝子を選択し、それらの遺伝子において破壊がストレス感受性を引き起こす遺伝子を過剰発現する、という一例を示した。

第3章では、全ての遺伝子について遺伝子発現情報と1遺伝子破壊による表現型の変化の関連性を解析し、遺伝子発現情報にもとづく細胞育種法の足掛りを得ることを目的とした。まず、1遺伝子破壊株のエタノール環境下における比増殖速度を測定することで、それまでコロニー形成の評価などにより定量的に評価されていなかった1遺伝子破壊が表現型に与える影響を定量的に解析した。得られた結果より破壊がエタノール感受性を引き起こすエタノール感受性遺伝子の抽出を行い、その遺伝子機能を解析することで、エタノール環境下において必要とされる細胞機能の抽出を行った。その結果、ペルオキシソームがエタノール耐性に必要な機能であることを新規に発見した。次に、第2章で取得した遺伝子発現情報と1遺伝子破壊株の増殖情報を用い、どのような遺伝子発現変化を示した遺伝子や、どのような細胞状態の遺伝子発現情報を用いることで、その環境下で必要とされる遺伝子を効率的に抽出できるのかについて解析を行った。その結果、エタノール環境下で FY834 株と IFO2347 株において、異なる遺伝子発現の経時変化を示す遺伝子や、非ストレス環境下で IFO2347 株において FY834 株より高発現している遺伝子に、エタノール環境下で増殖に必要な遺伝子が多く含まれていた。このことより、遺伝子発現情報から、ストレス耐性能の異なる株間において異なる遺伝子発現を示す遺伝子が、その環境下で必要とされる遺伝子 (機能) の抽出につながることを示した。1遺伝子破壊がエタノール感受性を引き起こした遺伝子の過剰発現株を構築したが、エタノール耐性の向上にはつながらなかった。しかし、その環境下で必要な遺伝子を単

に過剰発現するのではなく、その遺伝子が関連する反応経路の制御機構など生物学的知見を考慮することで、育種の成功につながる可能性が示された。

第 4 章では、酵母においてストレス環境下で多くの遺伝子の発現制御に関わるなど、ストレス耐性に重要な役割を担っているシスエレメント STRE が遺伝子発現にあたえる影響について解析を行った。その結果、ORF 上流 51 - 300 bp に存在する STRE が遺伝子発現量の増加に影響を与えること、多くの STRE が存在するほど遺伝子発現量が増加する確率は高く、さらに遺伝子発現量が大きく増加する傾向にあることを明らかとした。得られた結果は、ストレス環境下における遺伝子発現制御機構を理解するための基礎情報になると期待される。また、この結果は、第 2 章と第 3 章で解析した FY834 株と IFO2347 株の遺伝子発現情報において、両株で異なる発現変化を示した遺伝子について、発現変化が異なる原因についてゲノム配列レベルで理解するための情報になると期待される。

以上の研究結果をふまえ、遺伝子発現情報を用いた育種について論じる。遺伝子発現情報にもとづく細胞育種において、経験的に解析環境下で発現量が大きく増加した遺伝子に着目した育種が行われいる (Imaizumi *et al.*, 2005; Hirasawa *et al.*, 2006a; Lee *et al.*, 2007; Ookubo *et al.*, 2008)。しかし、どういった遺伝子発現変化を示す遺伝子に着目すれば育種につながるのかは分かっておらず、遺伝子発現情報と遺伝子破壊や過剰発現による表現型変化の関連性は明らかとされていない。先行研究において、遺伝子発現変化と遺伝子破壊による表現型変化の関連性に相関はないと報告されていたが、先行研究では全ての遺伝子における遺伝子発現変化と表現型変化の関連性を相関係数で評価する程度にとどまっており、詳細な解析は行われていなかった (Giaever *et al.*, 2002; Warringer *et al.*, 2003)。そこで、第 3 章において、全ての遺伝子について遺伝子発現情報と 1 遺伝子破壊株の表現型の情報の関連性を詳細に解析した。その結果、エタノール環境下で異なるエタノール耐性能を示す株において、エタノール環境下で異なる遺伝子発現の経時変化を示す遺伝子や、非ストレス環境下で耐性株において高発現している遺伝子に着目することが、エタノール環境下で増殖に必要な遺伝子 (機能) の効率的な抽出につながる可能性が示唆された。このようにエタノール耐性の異なる株の遺伝子発現情報を用いたことで、遺伝子発現情報と遺伝子破壊による表現型の変化の関連性を新規に示すことができた。

さらに、エタノール環境下で増殖に必要な遺伝子の過剰発現がエタノール耐性株の育種につながるかについて解析を行った。第 2 章では、エタノール環境下における増殖に必要と選択された *TRP* 遺伝子を過剰発現することによりエタノール耐性株の育種に成功した。しかし、第 3 章では破壊が最も大きな比増殖速度の低下を引き起こした遺伝子を過剰発現したがエタノール耐性の付与には至らなかった。一方で、解析対象の環境下で必要な遺伝子を過剰発現するだけではなく、その遺伝子についての生物学的知見を利

用することで細胞育種の成功例も得られた。例えば、第2章では、トリプトファン合成がエタノール環境下での増殖に必要な細胞機能であることを発見したが、同様にトリプトファン合成が増殖に必要とされる弱酸環境下で、トリプトファン取り込み酵素の過剰発現や培地へのトリプトファン添加が弱酸耐性を向上させることが報告されていた。このことから、この遺伝子の過剰発現やトリプトファンの培地への添加を行ったところ、新たにエタノールストレスについても有効であることを発見した。また第 3 章では *PRO2* 遺伝子がエタノール環境で増殖に必要であることが示されたが、この遺伝子を単に過剰発現するだけではエタノール耐性は向上しなかった。これはプロリン合成経路のフィードバック制御の影響により、プロリン蓄積が効果的に行えなかったためと考えられ、得られた情報を育種に生かすためには関連する反応系の知見を踏まえる必要のある場合も存在することが示された。

これらのことより、遺伝子発現情報を用いた育種において、ストレス環境下で異なる表現型を示す株を用い、異なる遺伝子発現情報を示す遺伝子に着目することが、その環境下で増殖に必要な遺伝子 (機能) の効率的な抽出につながる可能性が示唆された。また、エタノール環境下で増殖に必要とされる遺伝子について、過剰発現や生物学的知見を考慮することでエタノール耐性株の育種につながる例もみられた。しかし、増殖に必要な遺伝子を過剰発現することが効率的に育種につながるかについては、過剰発現を行った遺伝子が 1 部にとどまるため結論づけるには至っていない。今後、遺伝子発現情報にもとづく細胞育種法の開発に向け、増殖に必要な遺伝子と全ての遺伝子から無作為に選択した遺伝子について、どちらの遺伝子を過剰発現することが育種に成功する確率が高いのかといったことを評価する必要がある。

細胞育種においては、遺伝子発現情報を用いた育種以外に、表現型の異なる株間の配列の比較による育種や (ゲノム育種、Ohnishi *et al.*, 2005)、細胞内の代謝反応をモデル化し *in silico* で細胞育種につながる代謝改変の予測による育種 (genome-scale model、Edwards and Palsson, 2000; Förster *et al.*, 2003) などがある。細胞内では、遺伝子が発現しタンパク質となり、タンパク質が代謝反応を触媒することで細胞の表現型に影響を与える。この過程で、ゲノム育種はゲノム配列の変化がタンパク質の活性を変化させることに着目した育種法であり、genome-scale model は代謝反応の有無に着目した育種法である。一方、本研究の対象とした遺伝子発現情報にもとづく育種は、遺伝子発現量の変化 (タンパク質量の変化) が表現型に影響を与えることに着目した育種法である。遺伝子発現量の変化が表現型に与える影響はゲノム育種や genome-scale model では考慮されておらず、遺伝子発現情報にもとづく育種は、他の育種では解析できない細胞情報の側面から育種を目指す新たな方法になる。また、ゲノム育種や genome-scale model による育種では解析対象の生物のゲノム配列情報が必要となるが、遺伝子発現情報の解析に用いる DNA マイクロアレイはゲノム配列が解読されていない生物においても用いることが

可能であり、遺伝子発現情報にもとづく育種は多くの生物種に適応可能な汎用性の利点を持つ。このように遺伝子発現情報を用いた細胞育種は利点を持つが、遺伝子発現情報からは、配列の変化によるタンパク質活性の変化といった情報は得ることができない。そのため、育種においては、他の育種法を複合的に用いることで、育種法が対象とできない範囲を補うことが必要である。

今後、遺伝子発現情報にもとづく効率的な育種法の開発に向け、破壊すると増殖速度が低下するような解析環境下で必要な遺伝子は、過剰発現などにより増殖速度の向上など有用な性質を持った細胞の育種につながる確率が高いのかをより全般的に評価する必要がある。現在、酵母では、1 遺伝子破壊株コレクションに加え、1 遺伝子過剰発現株コレクションが構築され、1 遺伝子の過剰発現が表現型に与える影響についても解析が可能となった (Gelperin *et al*., 2005; Sopko *et al*., 2006; Niu *et al*., 2008)。この過剰発現株コレクションを用いることで、第 2 章で構築した *TRP* 遺伝子の過剰発現株のように、エタノール耐性株を抽出することができると期待される。この情報を用い、遺伝子の過剰発現によるエタノール耐性の向上と、遺伝子の破壊によるエタノール耐性の低下に相関があれば、本研究で提案した方法により、遺伝子発現情報から解析対象の環境下で必要とされる遺伝子を抽出し、過剰発現をすることが効率的な育種になると考えられる。また、本研究の結果は主にエタノール環境下におけるものであるため、今後、他のストレス環境下や物質生産時の遺伝子発現情報を用いた時も成り立つのか、また、大腸菌などの 1 遺伝子破壊株や 1 遺伝子過剰発現株が構築されている生物種を用いて (Kitagawa *et al*., 2005; Baba *et al*., 2006)、異なる生物種でも成り立つものかを検証する必要がある。環境負荷の低減などの観点から、微生物を用いた物質生産が重要視されている中、このような研究を通じて遺伝子発現情報と表現型の関連性の理解を進めることが、効率的な細胞育種法の開発につながり、有用な細胞の育種に貢献することができると期待される。

参考文献

Aguilera A, Benítez T. (1985) Role of mitochondria in ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol*. **142**: 389-392.

Akaike FH. (1974) A new look at the statistical model identification. *IEEE Trans. Automat. Control*. **19**: 716- L 723.

Albertini M, Girzalsky W, Veenhuis M, Kunau WH. (2001) Pex12p of *Saccharomyces cerevisiae* is a component of a multi-protein complex essential for peroxisomal matrix protein import. *Eur J Cell Biol*. **80**: 257-270.

Alper H, Moxley J, Nevoigt E, Fink GR, Stephanopoulos G. (2006) Engineering yeast transcription machinery for improved ethanol tolerance and production. *Science*. **314**: 1565-1568.

Alper H, Stephanopoulos G. (2007) Global transcription machinery engineering: a new approach for improving cellular phenotype. *Metab Eng*. **9**: 258-267.

Askree SH, Yehuda T, Smolikov S, Gurevich R, Hawk J, Coker C, Krauskopf A, Kupiec M, McEachern MJ. (2004) A genome-wide screen for *Saccharomyces cerevisiae* deletion mutants that affect telomere length. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **101**: 8658-8663.

Attfield PV. (1997) Stress tolerance: the key to effective strains of industrial baker's yeast. *Nat Biotechnol*. **15**: 1351-1357.

Baba T, Ara T, Hasegawa M, Takai Y, Okumura Y, Baba M, Datsenko KA, Tomita M, Wanner BL, Mori H. (2006) Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol*. **2**: 2006.0008.

Babst M, Katzmann DJ, Snyder WB, Wendland B, Emr SD. (2002a) Endosome-associated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body. *Dev Cell*. **3**: 283-289.

Babst M, Katzmann DJ, Estepa-Sabal EJ, Meerloo T, Emr SD. (2002b) Escrt-III: an endosome-associated heterooligomeric protein complex required for mvb sorting. Dev *Cell*. **3**: 271-282.

Baek ST, Kim DU, Han S, Woo IS, Nam M, Kim L, Heo KS, Lee H, Hwang HR, Choi SJ, Won M, Lee M, Park SK, Lee S, Kwon HJ, Maeng PJ, Park HM, Park Y, Kim D, Hoe KL. (2008) Genome-wide drug-induced haploinsufficient screening of fission yeast for identification of hydrazinocurcumin targets. *J Microbiol Biotechnol.* **18**: 263-269.

Ball SG, Wickner RB, Cottarel G, Schaus M, Tirtiaux C. (1986) Molecular cloning and characterization of *ARO7-OSM2*, a single yeast gene necessary for chorismate mutase activity and growth in hypertonic medium. *Mol Gen Genet.* **205**: 326-330.

Bauer BE, Rossington D, Mollapour M, Mamnun Y, Kuchler K, Piper PW. (2003) Weak organic acid stress inhibits aromatic amino acid uptake by yeast, causing a strong influence of amino acid auxotrophies on the phenotypes of membrane transporter mutants. *Eur J Biochem.***270**: 3189-3195.

Bellí G, Garí E, Aldea M, Herrero E. (2001) Osmotic stress causes a G1 cell cycle delay and downregulation of Cln3/Cdc28 activity in *Saccharomyces cerevisiae. Mol Microbiol.*, **39**: 1022-1035.

Berry DB, Gasch AP. (2008) Stress-activated genomic expression changes serve a preparative role for impending stress in yeast. *Mol Biol Cell.* **19**: 4580-4587.

Bidlingmeyer BA, Cohen SA, Tarvin TL. (1984) Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization. *J Chromatogr.* **336**: 93-104.

Birschmann I, Rosenkranz K, Erdmann R, Kunau WH. (2005) Structural and functional analysis of the interaction of the AAA-peroxins Pex1p and Pex6p. *FEBS J.* **272**: 47-58.

Bowers K, Stevens TH. (2005) Protein transport from the late Golgi to the vacuole in the yeast *Saccharomyces cerevisiae. Biochim Biophys Acta.* **1744**: 438-454.

Breitling R, Sharif O, Hartman ML, Krisans SK. (2002) Loss of compartmentalization causes misregulation of lysine biosynthesis in peroxisome-deficient yeast cells. *Eukaryot Cell.* **1**: 978-986.

Bro C, Knudsen S, Regenberg B, Olsson L, Nielsen J. (2005) Improvement of galactose uptake in *Saccharomyces cerevisiae* through overexpression of phosphoglucomutase: example of transcript analysis as a tool in inverse metabolic engineering. *Appl Environ Microbiol.* **71**: 6465-6472.

Brocard C, Lametschwandtner G, Koudelka R, Hartig A. (1997) Pex14p is a member of the protein linkage map of Pex5p. *EMBO J.* **16**: 5491-5500.

Brown JA, Sherlock G, Myers CL, Burrows NM, Deng C, Wu HI, McCann KE, Troyanskaya OG, Brown JM. (2006) Global analysis of gene function in yeast by quantitative phenotypic profiling. *Mol Syst Biol.* **2**:2006.0001.

Brown LA, Baker A. (2003) Peroxisome biogenesis and the role of protein import. *J Cell Mol Med.* **7**: 388-400.

Butcher RA, Schreiber SL. (2004) Identification of Ald6p as the target of a class of small-molecule suppressors of FK506 and their use in network dissection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101**: 7868-7873.

del Castillo Agudo L. (1992) Lipid content of *Saccharomyces cerevisiae* strains with different degrees of ethanol tolerance. *Appl Microbiol Biotechnol.* **37**: 647-651.

Causton HC, Ren B, Koh SS, Harbison CT, Kanin E, Jennings EG, Lee TI, True HL, Lander ES, Young RA. (2001) Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Mol Biol Cell.* **12**: 323-337.

Clotet J, Escoté X, Adrover MA, Yaakov G, Garí E, Aldea M, de Nadal E, Posas F. (2006) Phosphorylation of Hsl1 by Hog1 leads to a G2 arrest essential for cell survival at high osmolarity. *EMBO J.* **25**: 2338-2346.

Cohen SN, Chang AC, Boyer HW, Helling RB. (1973) Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **70**: 3240-3244.

Corbacho I, Olivero I, Hernández LM. (2005) A genome-wide screen for *Saccharomyces cerevisiae* nonessential genes involved in mannosyl phosphate transfer to mannoprotein-linked oligosaccharides. *Fungal Genet Biol.* **42**: 773-390.

Demain AL. (2000) Microbial biotechnology. *Trends Biotechnol.* **18**: 26-31.

DeRisi JL, Iyer VR, Brown PO. (1997) Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science.* **278**: 680-686.

Domitrovic T, Fernandes CM, Boy-Marcotte E, Kurtenbach E. (2006) High hydrostatic pressure activates gene expression through Msn2/4 stress transcription factors which are involved in the acquired tolerance by mild pressure precondition in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **580**: 6033-6038.

Edwards JS, Palsson BO. (2000) The *Escherichia coli* MG1655 in silico metabolic genotype: its definition, characteristics, and capabilities. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**: 5528-5533.

Eglinton JM, Heinrich AJ, Pollnitz AP, Langridge P, Henschke PA, de Barros Lopes M. (2002) Decreasing acetic acid accumulation by a glycerol overproducing strain of *Saccharomyces cerevisiae* by deleting the *ALD6* aldehyde dehydrogenase gene. *Yeast.* **19**: 295-301.

Erdmann R, Veenhuis M, Mertens D, Kunau WH. (1989) Isolation of peroxisome-deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **86**: 5419-5423.

Escoté X, Zapater M, Clotet J, Posas F. (2004) Hog1 mediates cell-cycle arrest in G1 phase by the dual targeting of Sic1. *Nat Cell Biol.* **6**: 997-1002.

Fernandez-Ricaud L, Warringer J, Ericson E, Pylvänäinen I, Kemp GJ, Nerman O, Blomberg A. (2005) PROPHECY--a database for high-resolution phenomics. *Nucleic Acids Res.* **33**: D369-D373.

Fodor SP, Read JL, Pirrung MC, Stryer L, Lu AT, Solas D. (1991) Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science.* **251**: 767-773.

Forment J, Mulet JM, Vicente O, Serrano R. (2002) The yeast SR protein kinase Sky1p modulates salt tolerance, membrane potential and the Trk1,2 potassium transporter. *Biochim Biophys Acta.* **1565**: 36-40.

Förster J, Famili I, Fu P, Palsson BØ, Nielsen J. (2003) Genome-scale reconstruction of the *Saccharomyces cerevisiae* metabolic network. *Genome Res.* **13**: 244-253.

Fujita K, Matsuyama A, Kobayashi Y, Iwahashi H. (2006) The genome-wide screening of yeast deletion mutants to identify the genes required for tolerance to ethanol and other alcohols. *FEMS Yeast Res.* **6**: 744-750.

Furter R, Paravicini G, Aebi M, Braus G, Prantl F, Niederberger P, Hütter R. (1986) The *TRP4* gene of *Saccharomyces cerevisiae*: isolation and structural analysis. *Nucleic Acids Res.* **14**: 6357-6373.

Gao XD, Wang J, Keppler-Ross S, Dean N. (2005) *ERS1* encodes a functional homologue of the human lysosomal cystine transporter. *FEBS J.* **272**: 2497-2511.

Gasch AP, Spellman PT, Kao CM, Carmel-Harel O, Eisen MB, Storz G, Botstein D, Brown PO. (2000) Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell.* **11**: 4241-4257.

Geissler S, Siegers K, Schiebel E. (1998) A novel protein complex promoting formation of functional alpha- and gamma-tubulin. *EMBO J.* **17**: 952-966.

Gelperin DM, White MA, Wilkinson ML, Kon Y, Kung LA, Wise KJ, Lopez-Hoyo N, Jiang L, Piccirillo S, Yu H, Gerstein M, Dumont ME, Phizicky EM, Snyder M, Grayhack EJ. (2005) Biochemical and genetic analysis of the yeast proteome with a movable ORF collection. *Genes Dev.* **19**: 2816-2826.

Giaever G, Chu AM, Ni L, *et al.*, (2002) Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature.* **418**: 387-391.

Gibson BR, Lawrence SJ, Leclaire JP, Powell CD, Smart KA. (2007) Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. *FEMS Microbiol Rev.* **31**: 535-569.

Gietz RD, Woods RA. (2002) Transformation of yeast by the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Methods in Enzymology.* **350**: 87-96.

Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M, Louis EJ, Mewes HW, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H, Oliver SG. (1996) Life with 6000 genes. *Science*. **274**: 546, 563-567.

González A, Larroy C, Biosca JA & Ariño J. (2007) Use of the *TRP1* auxotrophic marker for gene disruption and phenotypic analysis in yeast: a note of warning. *FEMS Yeast Res*. **8**: 2-5.

Hahn MW, Kern AD. (2005) Comparative genomics of centrality and essentiality in three eukaryotic protein-interaction networks. *Mol Biol Evol*. **22**: 803-806.

Hahn-Hägerdal B, Galbe M, Gorwa-Grauslund MF, Lidén G, Zacchi G. (2006) Bio-ethanol--the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends Biotechnol*. **24**: 549-556.

Hettema EH, Girzalsky W, van Den Berg M, Erdmann R, Distel B. (2000) *Saccharomyces cerevisiae* pex3p and pex19p are required for proper localization and stability of peroxisomal membrane proteins. *EMBO J*. **19**: 223-233.

Hillenmeyer ME, Fung E, Wildenhain J, Pierce SE, Hoon S, Lee W, Proctor M, St Onge RP, Tyers M, Koller D, Altman RB, Davis RW, Nislow C, Giaever G. (2008) The chemical genomic portrait of yeast: uncovering a phenotype for all genes. *Science*. **320**: 362-365.

Hinnebusch AG. (2005) Translational regulation of *GCN4* and the general amino acid control of yeast. *Annu Rev Microbiol*. 59: 407-450.

Hirasawa T, Nakakura Y, Yoshikawa K, Ashitani K, Nagahisa K, Furusawa C, Katakura Y, Shimizu H, Shioya S. (2006a) Comparative analysis of transcriptional responses to saline stress in the laboratory and brewing strains of *Saccharomyces cerevisiae* with DNA microarray. *Appl Microbiol Biotechnol*. **70**: 346-357.

Hirasawa T, Ashitani K, Yoshikawa K, Nagahisa K, Furusawa C, Katakura Y, Shimizu H, Shioya S. (2006b) Comparison of transcriptional responses to osmotic stresses induced by NaCl and sorbitol additions in *Saccharomyces cerevisiae* using DNA microarray. *J Biosci Bioeng*. **102**: 568-571.

Hohmann S. (2002) Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev*. **66**: 300-372.

Huhse B, Rehling P, Albertini M, Blank L, Meller K, Kunau WH. (1998) Pex17p of *Saccharomyces cerevisiae* is a novel peroxin and component of the peroxisomal protein translocation machinery. *J Cell Biol*. **140**: 49-60.

Imaizumi A, Takikawa R, Koseki C, Usuda Y, Yasueda H, Kojima H, Matsui K, Sugimoto S. (2005) Improved production of L-lysine by disruption of stationary phase-specific rmf gene in *Escherichia coli*. *J Biotechnol*. **117**: 111-118.

Ishida N, Suzuki T, Tokuhiro K, Nagamori E, Onishi T, Saitoh S, Kitamoto K, Takahashi H. (2006a) D-lactic acid production by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biosci Bioeng*. **101**: 172-177.

Ishida N, Saitoh S, Ohnishi T, Tokuhiro K, Nagamori E, Kitamoto K, Takahashi H. (2006b) Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient production of pure L-(+)-lactic acid. *Appl Biochem Biotechnol*. **131**: 795-807.

Izawa S, Kita T, Ikeda K, Miki T, Inoue Y. (2007) Formation of cytoplasmic P-bodies in sake yeast during Japanese sake brewing and wine making. *Biosci Biotechnol Biochem*. **71**: 2800-2807.

Jiménez J, Benítez T. (1988) Yeast cell viability under conditions of high temperature and ethanol concentrations depends on the mitochondrial genome. *Curr Genet*. **13**: 461-469.

Kanaya S, Kinouchi M, Abe T, Kudo Y, Yamada Y, Nishi T, Mori H. Ikemura Y. (2001) Analysis of codon usage diversity of bacterial genes with a self-organizing map (SOM): characterization of horizontally transferred genes with emphasis on the *E. coli* O157 genome. *Gene*. **276**: 89–99.

Kandror O, Bretschneider N, Kreydin E, Cavalieri D, Goldberg AL. (2004) Yeast adapt to near-freezing temperatures by STRE/Msn2,4-dependent induction of trehalose synthesis and certain molecular chaperones. *Mol Cell*. **13**: 771-781.

Katzmann DJ, Babst M, Emr SD. (2001) Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell*. **106**: 145-155.

Kim J, Alizadeh P, Harding T, Hefner-Gravink A, Klionsky DJ. (1996) Disruption of the yeast *ATH1* gene confers better survival after dehydration, freezing, and ethanol shock: potential commercial applications. *Appl Environ Microbiol*. **62**: 1563-1569.

Kitagawa M, Ara T, Arifuzzaman M, Ioka-Nakamichi T, Inamoto E, Toyonaga H, Mori H. (2005) Complete set of ORF clones of Escherichia coli ASKA library (a complete set of *E. coli* K-12 ORF archive): unique resources for biological research. *DNA Res*. **12**: 291-299.

Kobayashi N, McEntee K. (1993) Identification of *cis* and *trans* components of a novel heat shock stress regulatory pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*.**13**: 248-256.

Kobayashi K, Ehrlich SD, Albertini A. *et al*., (2003) Essential Bacillus subtilis genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **100**: 4678-4683.

Kohonen T. (1998) The Self-organizing map. *Neurocomputing*. **21**: 1-6.

Köhrer K, Domdey H. (1991) Preparation of high molecular weight RNA. *Methods Enzymol*. **194**: 398-405.

Koller A, Snyder WB, Faber KN, Wenzel TJ, Rangell L, Keller GA, Subramani S. (1999) Pex22p of *Pichia pastoris*, essential for peroxisomal matrix protein import, anchors the ubiquitin-conjugating enzyme, Pex4p, on the peroxisomal membrane. *J Cell Biol*. **146**: 99-112.

Kubota S, Takeo I, Kume K, Kanai M, Shitamukai A, Mizunuma M, Miyakawa T, Shimoi H, Iefuji H, Hirata D. (2004) Effect of ethanol on cell growth of budding yeast: genes that are important for cell growth in the presence of ethanol. *Biosci Biotechnol Biochem*. **68**: 968-972.

Lamb DC, Kelly DE, Manning NJ, Kaderbhai MA, Kelly SL. (1999) Biodiversity of the P450 catalytic cycle: yeast cytochrome *b*5/NADH cytochrome *b*5 reductase complex efficiently drives the entire sterol 14-demethylation (CYP51) reaction. *FEBS Lett.* **462**: 283-288.

Lee KH, Park JH, Kim TY, Kim HU, Lee SY. (2007) Systems metabolic engineering of *Escherichia coli* for L-threonine production. *Mol Syst Biol.* **3**: 149.

Lin Y, Tanaka S. (2006) Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol.* **69**:627-642.

Linder T, Gustafsson CM. (2004) The Soh1/MED31 protein is an ancient component of *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae* Mediator. *J Biol Chem.* **279**: 49455-49459.

Lockhart DJ, Dong H, Byrne MC, Follettie MT, Gallo MV, Chee MS, Mittmann M, Wang C, Kobayashi M, Horton H, Brown EL. (1996) Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol.* **14**: 1675-1680.

Lucchini G, Biraghi A, Carbone ML, de Scrilli A, Magni GE. (1978) Effect of mutation in the aromatic amino acid pathway on sporulation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* **136**: 55-62.

Lucero P, Peñalver E, Moreno E, Lagunas R. (2000) Internal trehalose protects endocytosis from inhibition by ethanol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol.* **66**: 4456-4461.

Mao C, Xu R, Bielawska A, Obeid LM. (2000) Cloning of an alkaline ceramidase from *Saccharomyces cerevisiae*. An enzyme with reverse (CoA-independent) ceramide synthase activity. *J Biol Chem.* **275**: 6876-6884.

Marchler G, Schüller C, Adam G, Ruis H. (1993) A *Saccharomyces cerevisiae* UAS element controlled by protein kinase A activates transcription in response to a variety of stress conditions. *EMBO J.* **12**: 1997-2003.

Martínez-Pastor MT, Marchler G, Schüller C, Marchler-Bauer A, Ruis H, Estruch F. (1996) The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *EMBO J.* **15**: 2227-2235.

Morita Y, Nakamori S, Takagi H. (2002) Effect of proline and argine metabolism on freezing stress of Saccharomyces cerevisiae. *J Biosci Bioeng.* **94**: 390–394.

Moskvina E, Schüller C, Maurer CT, Mager WH, Ruis H. (1998) A search in the genome of *Saccharomyces cerevisiae* for genes regulated via stress response elements. *Yeast.* **14**: 1041-1050.

Natarajan K, Meyer MR, Jackson BM, Slade D, Roberts C, Hinnebusch AG, Marton MJ. (2001) Transcriptional profiling shows that Gcn4p is a master regulator of gene expression during amino acid starvation in yeast. *Mol Cell Biol.* **21**: 4347-4368.

Nitta A, Uchiyama H, Imamura T. (2000) Breeding of ethanol-tolerant sake yeasts from K1 killer-resistant mutants. *Seibutsu-kogaku,* **78**: 77-81.

Niu W, Li Z, Zhan W, Iyer VR, Marcotte EM. (2008) Mechanisms of cell cycle control revealed by a systematic and quantitative overexpression screen in *S. cerevisiae*. *PLoS Genet.* **4**: e1000120.

Ohnishi J, Katahira R, Mitsuhashi S, Kakita S, Ikeda M. (2005) A novel gnd mutation leading to increased L-lysine production in *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol Lett.* **242**: 265-274.

Ookubo A, Hirasawa T, Yoshikawa K, Nagahisa K, Furusawa C, Shimizu H. (2008) Improvement of L-Lactate Production by *CYB2* Gene Disruption in Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Strain under Low pH Condition. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* doi:10.1271/bbb.80493. (Epub ahead of print)

Pandey G, Yoshikawa K, Hirasawa T, Nagahisa K, Katakura Y, Furusawa C, Shimizu H, Shioya S. (2007) Extracting the hidden features in saline osmotic tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* from DNA microarray data using the self-organizing map: biosynthesis of amino acids. *Appl Microbiol Biotechnol.* 75: 415-426.

Park JY, Jang YJ, You SJ, Kil YS, Kang EJ, Ahn JH, Ryoo YK, Lee MY, Park SY, Lee HJ, Kim JY, Kim SH, Yang WS. (2003) Drug-induced haploinsufficiency of fission yeast provides a powerful tool for identification of drug targets. *J Microbiol Biotechnol.* **13**: 317-320.

Piper PW. (1995) The heat shock and ethanol stress responses of yeast exhibit extensive similarity and functional overlap. *FEMS Microbiol Lett.* **134**: 121-127.

Rehling P, Skaletz-Rorowski A, Girzalsky W, Voorn-Brouwer T, Franse MM, Distel B, Veenhuis M, Kunau WH, Erdmann R. (2000) Pex8p, an intraperoxisomal peroxin of *Saccharomyces cerevisiae* required for protein transport into peroxisomes binds the PTS1 receptor pex5p. *J Biol Chem.* **275**: 3593-3602.

Ren B, Robert F, Wyrick JJ, Aparicio O, Jennings EG, Simon I, Zeitlinger J, Schreiber J, Hannett N, Kanin E, Volkert TL, Wilson CJ, Bell SP, Young RA. (2000) Genome-wide location and function of DNA binding proteins. *Science.* **290**: 2306-2309.

Robertson LS, Fink GR. (1998) The three yeast A kinases have specific signaling functions in pseudohyphal growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**: 13783-13787.

Rocha EP, Danchin A. (2004) An analysis of determinants of amino acids substitution rates in bacterial proteins. *Mol Biol Evol.* **21**: 108-116.

Rosa MF, Sá-Correia I. (1996) Intracellular acidification does not account for inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* growth in the presence of ethanol. *FEMS Microbiol Lett.* **135**: 271-274.

Ruepp A, Zollner A, Maier D, Albermann K, Hani J, Mokrejs M, Tetko I, Güldener U, Mannhaupt G, Münsterkötter M, Mewes HW. (2004) The FunCat, a functional annotation scheme for systematic classification of proteins from whole genomes. *Nucleic Acids Res.* **32**: 5539-5545.

Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science.* **270**: 467-470.

Scherens B, Goffeau A. (2004) The uses of genome-wide yeast mutant collections. *Genome Biol.* **5**: 229.

Schmidt A, Hall MN, Koller A. (1994) Two FK506 resistance-conferring genes in *Saccharomyces cerevisiae*, *TAT1* and *TAT2*, encode amino acid permeases mediating tyrosine and tryptophan uptake. *Mol Cell Biol.* **14**: 6597-6606.

Schmitt AP, McEntee K. (1996) Msn2p, a zinc finger DNA-binding protein, is the transcriptional activator of the multistress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**: 5777-5782.

Segal E, Fondufe-Mittendorf Y, Chen L, Thåström A, Field Y, Moore IK, Wang JP, Widom J. (2006) A genomic code for nucleosome positioning. *Nature.* **442**: 772-778.

Sekine T, Kawaguchi A, Hamano Y, Takagi H. (2007) Desensitization of feedback inhibition of the *Saccharomyces cerevisiae* gamma-glutamyl kinase enhances proline accumulation and freezing tolerance. *Appl Environ Microbiol.* **73**: 4011-4019.

Shalon D, Smith SJ, Brown PO. (1996) A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. *Genome Res.* **6**: 639-645.

Sopko R, Huang D, Preston N, Chua G, Papp B, Kafadar K, Snyder M, Oliver SG, Cyert M, Hughes TR, Boone C, Andrews B. (2006) Mapping pathways and phenotypes by systematic gene overexpression. *Mol Cell.* **21**: 319-330.

Takagi H, Iwamoto F, Nakamori S. (1997) Isolation of freeze-tolerant laboratory strains of *Saccharomyces cerevisiae* from proline-analogue-resistant mutants. *Appl Microbiol Biotechnol.* **47**: 405-411.

Takagi H, Sakai K, Morida K, Nakamori S. (2000) Proline accumulation by mutation or disruption of the proline oxidase gene improves resistance to freezing and desiccation stresses in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett.* **184**: 103-108.

Takagi H, Takaoka M, Kawaguchi A, Kubo Y. (2005) Effect of L-proline on sake brewing and ethanol stress in Saccharomyces cerevisiae. *Appl Environ Microbiol.* **71**: 8656-8662.

Takemura R, Inoue Y, Izawa S. (2004) Stress response in yeast mRNA export factor: reversible changes in Rat8p localization are caused by ethanol stress but not heat shock. *J Cell Sci.* **117**: 4189-4197.

Tirosh I, Weinberger A, Carmi M, Barkai N. (2006) A genetic signature of interspecies variations in gene expression. *Nat Genet.* **38**: 830-834.

Tirosh I, Weinberger A, Bezalel D, Kaganovich M, Barkai N. (2008) On the relation between promoter divergence and gene expression evolution. *Mol Syst Biol.* **4**:159.

Tomenchok DM, Brandriss MC. (1987) Gene-enzyme relationships in the proline biosynthetic pathway of Saccharomyces cerevisiae. *J Bacteriol.* **169**: 5364-5372.

Tschumper G, Carbon J. (1980) Sequence of a yeast DNA fragment containing a chromosomal replicator and the *TRP1* gene. *Gene.***10**: 157-166.

Varela JC, Praekelt UM, Meacock PA, Planta RJ, Mager WH. (1995) The *Saccharomyces cerevisiae HSP12* gene is activated by the high-osmolarity glycerol pathway and negatively regulated by protein kinase A. *Mol Cell Biol.* **15**: 6232-6245.

van Voorst F, Houghton-Larsen J, Jønson L, Kielland-Brandt MC, Brandt A. (2006) Genome-wide identification of genes required for growth of *Saccharomyces cerevisiae* under ethanol stress. *Yeast.* **23**: 351-359.

Warringer J, Ericson E, Fernandez L, Nerman O, Blomberg A. (2003) High-resolution yeast phenomics resolves different physiological features in the saline response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**: 15724-15729.

Winston F, Dollard C, Ricupero-Hovasse SL. Construction of a set of convenient *Saccharomyces cerevisiae* strains that are isogenic to S288C. *Yeast.* 1995, **11**, 53-55.

Winzeler EA, Shoemaker DD, Astromoff A, *et al.* (1999) Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science.* **285**: 901-906.

Yang IV, Chen E, Hasseman JP, Liang W, Frank BC, Wang S, Sharov V, Saeed AI, White J, Li J, Lee NH, Yeatman TJ, Quackenbush J. (2002) Within the fold: assessing differential expression measures and reproducibility in microarray assays. *Genome Biol.* **3**: research0062.

You KM, Rosenfield CL, Knipple DC. (2003) Ethanol tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on cellular oleic acid content. *Appl Environ Microbiol.* **69**: 1499-1503.

Zalkin H, Yanofsky C. (1982) Yeast gene *TRP5*: structure, function, regulation. *J Biol Chem.* **257**: 1491-1500.

Zalkin H, Paluh JL, van Cleemput M, Moye WS, Yanofsky C. (1984) Nucleotide sequence of Saccharomyces cerevisiae genes TRP2 and TRP3 encoding bifunctional anthranilate synthase: indole-3-glycerol phosphate synthase. *J Biol Chem.* **259**: 3985-3992.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、大阪大学工学部応用自然科学科 4 回生から大阪大学大学院情報科学研究科バイオ情報工学専攻の博士前期課程と博士後期課程の 6 年間、研究の場を与えて下さり、終始暖かく御指導、御助言を頂きました大阪大学大学院情報科学研究科バイオ情報工学専攻代謝情報工学講座、清水浩教授に心より御礼申し上げます。博士論文審査委員として、有益な御助言、御指導を頂きました大阪大学大学院情報科学研究科バイオ情報工学専攻の松田秀雄教授、四方哲也教授、前田太郎教授に心より感謝申し上げます。御指導を頂きました大阪大学大学院情報科学研究科バイオ情報工学専攻の柏原敏伸教授に心より感謝申し上げます。アドバイザリ委員として有益な御助言を頂きました大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻生物工学コースゲノム機能工学領域の金子嘉信准教授に心より感謝申し上げます。情報解析の基礎から研究の細部まで御指導頂きました代謝情報工学講座の古澤力准教授に心より感謝申し上げます。生物学実験から研究生活まで親身に御指導頂きました代謝情報工学講座の平沢敬助教に心より感謝申し上げます。生物学実験を基礎から御指導頂きました三菱ガス化学株式会社の永久圭介博士 (元代謝情報工学講座助教) に心より感謝申し上げます。解析方法や研究内容について御指導頂きました代謝情報工学講座の小野直亮特任准教授に心より感謝申し上げます。長期間長時間に及ぶ培養実験を共に行い、また、研究室生活でお世話になりました田中忠昌氏に心より感謝申し上げます。研究生活において、数多くの面でお世話になりました代謝情報工学講座の皆様に心から感謝申し上げます。

最後に、長年にわたる大学生活を精神的、経済的に支えて下さった両親、兄に心より感謝致します。

付録　本論文の関連文献と各章の対応表

第 1 章：序論

第 2 章：遺伝子発現情報にもとづくエタノール耐性酵母の育種

Takashi Hirasawa#, Katsunori Yoshikawa#, Yuki Nakakura#, Keisuke Nagahisa, Chikara Furusawa, Yoshio Katakura, Hiroshi. Shimizu, Suteaki. Shioya. "Identification of target genes conferring ethanol stress tolerance to *Saccharomyces cerevisiae* based on DNA microarray data analysis." J Biotechnol. Vol. 131, pp. 34-44, 2007. (#Equally contributed)

Katsunori Yoshikawa, Gaurav Pandey, Takashi Hirasawa, Yoshio Katakura, Keisuke Nagahisa, Chikara Furusawa, Suteaki Shioya, Hiroshi Shimizu. "Molecular breeding of osmotic stress tolerant yeast strains based on clustering analysis of gene expression." 7th Asia Pacific Biochemical Engineering Conference. (P3–081), 4 pages, Jeju, Korea. May 15-19, 2005.

Katsunori Yoshikawa, Gaurav Pandey, Takashi Hirasawa, Yoshio Katakura, Keisuke Nagahisa, Chikara Furusawa, Suteaki Shioya, Hiroshi Shimizu. "Analysis of DNA microarray data using self-organizing map and hierarchical clustering." 10th Asia Pacific Confederation of Chemical Engineering. (3P-01-055), 10 pages. Kitakyushu, Japan. October 17-21, 2004.

第 3 章：遺伝子発現情報と 1 遺伝子破壊株の表現型変化の関連性解析

Katsunori Yoshikawa, Tadamasa Tanaka, Chikara Furusawa, Keisuke Nagahisa, Takashi Hirasawa, Hiroshi Shimizu. "Comprehensive phenotypic analysis for identification of genes affecting growth under ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae.*" FEMS Yeast Research. DOI: 10.1111/j.1567-1364.2008.00456.x, 2008.

Katsunori Yoshikawa, Tadamasa Tanaka, Keisuke Nagahisa, Chikara Furusawa, Hiroshi Shimizu. "Integration analysis of phenome and transctiptome in yeast under stress conditions." XXIIIrd International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology, Yeast 24 (S1), p. S140, Melbourne, Australia. July 1-6, 2007.

Katsunori Yoshikawa, Takashi Hirasawa, Keisuke Nagahisa, Chikara Furusawa, Suteaki Shioya, Hiroshi Shimizu. "The relationship between the gene expression and phenotype for

breeding cell." 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress. (5P-B-182), p. 782. Kyoto, Japan. June 18-23, 2006.

第 4 章：網羅的遺伝子発現情報にもとづく **Stress Response Element** の存在位置と存在数が遺伝子発現に与える影響の解析

Katsunori Yoshikawa, Chikara Furusawa, Takashi Hirasawa, Hiroshi Shimizu. "Genome-wide analysis of effects of location and number of stress response element on gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*." J Biosci Bioeng. Vol. 106, pp. 507-510, 2008.

第 5 章：結言

その他の関連発表論文・会議

学術論文

[1] Siraje Arif Mahmud, Keisuke Nagahisa, Takashi Hirasawa, Katsunori Yoshikawa, Kengo Ashitani, Hiroshi Shimizu. "Effect of trehalose accumulation on response to saline stress in *Saccharomyces cerevisiae*." Yeast. 2008 (Accepted).

[2] Aki Ookubo, Takashi Hirasawa, Katsunori Yoshikawa, Keisuke Nagahisa, Chikara Furusawa, Hiroshi Shimizu. "Improvement of L-Lactate production by *CYB2* gene disruption in a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain under low pH condition." Biosci Biotechnol Biochem. Vol. 72, pp. 3063-3066, 2008.

[3] Gaurav Pandey, Katsunori Yoshikawa, Takashi Hirasawa, Keisuke Nagahisa, Yoshio Katakura, Chikara Furusawa, Hiroshi Shimizu, Suteaki Shioya. "Extracting the hidden features in saline osmotic tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* from DNA microarray data using the self-organizing map: biosynthesis of amino acids." Appl Microbiol Biotechnol. Vol. 75, pp. 415-426, 2007.

[4] Takashi Hirasawa, Kengo Ashitani, Katsunori Yoshikawa, Keisuke Nagahisa, Chikara Furusawa, Yoshio Katakura, Hiroshi Shimizu, Suteaki Shioya. "Comparison of transcriptional responses to osmotic stresses induced by NaCl and sorbitol additions in *Saccharomyces cerevisiae* using DNA microarray." J Biosci Bioeng. Vol. 102, pp. 568-571, 2006.

[5] Takashi Hirasawa, Yuki Nakakura, Katsunori Yoshikawa, Kengo Ashitani, Keisuke Nagahisa, Chikara Furusawa, Yoshio Katakura, Hiroshi Shimizu, Suteaki Shioya. "Comparative analysis of transcriptional responses to saline stress in the laboratory and brewing strains of *Saccharomyces cerevisiae* with DNA microarray." Appl Microbiol Biotechnol, Vol. 70, pp. 346-357, 2006.

[6] Keisuke Nagahisa, Toshiharu Nakajima, Katsunori Yoshikawa, Takashi Hirasawa, Yoshio Katakura, Chikara Furusawa, Suteaki Shioya, Hiroshi Shimizu. "DNA microarray analysis on *Saccharomyces cerevisiae* under high carbon dioxide concentration in fermentation process." Biotech Bioprocess Eng. Vol. 10, pp. 451-461, 2005.

国内会議

[1] 吉川勝徳, 田中忠昌, 永久圭介, 平沢敬, 古澤力, 清水浩, "浸透圧・エタノールストレス環境下における酵母 1 遺伝子破壊株の網羅的解析", BMB2007 (第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会), (1P-1033, 1T12-4), 横浜, 12 月 11-15 日, 2007 年.

[2] 吉川勝徳, 田中忠昌, 永久圭介, 平沢敬, 古澤力, 清水浩, "ストレス環境下における酵母の遺伝子破壊株の網羅的解析", 第 59 回日本生物工学会大会, (1D09-2), 広島, 9 月 25-27 日, 2007 年.

[3] 吉川勝徳, 永久圭介, 古澤力, 清水浩, "浸透圧環境下における酵母の遺伝子発現情報と遺伝子破壊株の表現型における関連性の解析", 日本農芸化学会大会 2007, (3A01p14), 東京, 3 月 25-27 日, 2007 年.

[4] 吉川勝徳, 永久圭介, 古澤力, 清水浩, "有用細胞創製に向けた遺伝子発現情報と破壊株の表現型における関連性の解析", 第 58 回日本生物工学会大会, (1B14-5), 大阪, 9 月 11-13 日, 2006 年.

[5] 吉川勝徳, 平沢敬, 中倉悠岐, 永久圭介, 片倉啓雄, 古澤力, 塩谷捨明, 清水浩, "遺伝子発現情報に基づくエタノールストレス耐性酵母の育種", 日本農芸化学会大会 2006, (2C34a09), 京都, 3 月 25-28 日, 2006 年.

[6] 吉川勝徳, Gaurav Pandey, 平沢敬, 永久圭介, 古澤力, 片倉啓雄, 塩谷捨明, 清水浩, "遺伝子発現情報のクラスタリング解析に基づいた浸透圧耐性酵母の育種", 第 27 回日本分子生物学会年会, (2PB-398), 神戸, 12 月 8-11 日, 2004 年.

[7] 吉川勝徳, Gaurav Pandey, 平沢敬, 片倉啓雄, 永久圭介, 古澤力, 塩谷捨明, 清水浩, "自己組織化マップを用いた酵母の遺伝子発現の解析におけるクラスタ境界の決定", 化学工学会第 69 年会, (Q309), 大阪, 4 月 2-4 日, 2004 年.

解説文

[1] 吉川勝徳, Gaurav Pandey, 平沢敬, 片倉啓雄, 永久圭介, 古澤力, 塩谷捨明, 清水浩, "DNA Microarray Analysis with an Integrating Method of Self-Organizing Map and Hierarchical Clustering." ソフトウェアバイオロジー, 第 4 号, pp. 12-15, 3 月, 2005 年.

受賞

[1] 7th Asia Pacific Biochemical Engineering Conference Outstanding Poster Presentation Award. Katsunori Yoshikawa, Gaurav Pandey, Takashi Hirasawa, Yoshio Katakura, Keisuke Nagahisa, Chikara Furusawa, Suteaki Shioya, Hiroshi Shimizu. "Molecular breeding of osmotic stress tolerant yeast strains based on clustering analysis of gene expression." 2005.

4
2