今日の話題

エタノールを作らない酵母に酔いしれる *Candida utilis* のゲノム解析

「酵母」は、明治時代にビールの製法が海外から伝えられたときに、「Yeast」の訳として「発酵の源(母)」を意味する字が当てられたのが語源と言われている。普段、われわれが「酵母」と言うと、出芽酵母の一種 *Saccharomyces cerevisiae* を指すことが多い。この酵母種は、醸造などの産業に利用されているだけでなく、ライフサイエンスの分野においても真核生物のモデル実験系として古くから用いられており、最先端の研究結果が多く生み出されてきた。今から15年あまり前には真核生物のなかで初めてゲノムの全塩基配列が報告された生物でもある。*S. cerevisiae* は高いエタノール生産能をもち、この性質は酒類の製造には欠かせないものである。一方、そのほかの物質の生産を目的とした場合には、このエタノール生産能が目的物質の収率低下の原因となることもある。したがって、酸素供給が十分な条件ではエタノール生産能を有さない非サッカロミセス酵母を選択することは、酵母を用いた物質生産において有効な戦略となる。

非サッカロミセス酵母には、たとえば、五単糖の一つであるキシロースからエタノールの生産ができる *Pichia stipitis*、メタノール誘導性の強力なプロモーターが利用できる *Pichia pastoris*、アンモニウム性窒素のほかにも亜硝酸性窒素や硝酸性窒素を窒素源として利用できる *Candida utilis* などがある。このなかでも、本稿で取り上げる *C. utilis* は、ほかの非サッカロミセス酵母と比較して高い増殖能をもち、組換えDNA技術も確立されている有用な酵母である。この酵母は、アメリカ食品医

薬局 (FDA) から食品としての安全性が認められており、グルタチオンやRNAを多く含む酵母エキストラ調味料などの生産に利用されている。また、モネリンなどの異種タンパク質や乳酸などの低分子化合物の生産にも用いられたことがある^(1,2)。しかし、*C. utilis* と同じく物質生産に有用である *P. stipitis* や *P. pastoris* の全ゲノムが公開された頃においても (それぞれ2007年⁽³⁾、2009年⁽⁴⁾)、*C. utilis* のゲノムは依然として明らかにされていなかった。そのようななかでわれわれは2012年、本酵母の進化的背景の解明、さらには物質生産への応用を目指し、次世代シーケンサーを用いた *C. utilis* のゲノム解析、およびトランスクリプトーム解析 (RNA-Seq) を行いその成果を報告した⁽⁵⁾。本稿では、そこで明らかにした新たな知見や、酵母のゲノム解析に関する今後の展望を紹介したい。

これまでに、*n*-アルカン (パラフィン) などの疎水性炭素源の資化能をもつ *Yarrowia lipolytica*、CTG コドン をロイシンではなくセリンに翻訳するCTG酵母群 (*Debaryomyces hansenii*, *P. stipitis*, *Candida albicans*)、メタノールを単一炭素源として生育できる酵母群 (*P. pastoris*, *Pichia angusta*)、*Saccharomyces*/*Kluyveromyces* 酵母群 (*Ashbya gossypii*, *Kluyveromyces lactis*, *Candida glabrata*, *S. cerevisiae*) (以上、出芽酵母)、さらには分裂により増殖する分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* など、多種多様な酵母のゲノム解析が行われてきた。これら11の酵母種に *C. utilis* を加えた進化系統解析により、*C. utilis* は、CTG酵母群やメタノール資化性酵母

群, *Saccharomyces*/*Kluyveromyces* 群のいずれにも属していないことが明らかになった (図1). つまり, *C. utilis* はこれまでにゲノムが解読された酵母とは, 遺伝的に比較的離れていることが示唆された. また, *C. utilis* ゲノム (14.6 Mb) の *in silico* 解析の結果, 本酵母にはアミノ酸長60以上として推定した遺伝子が8,646個あるとされ, このなかには, 3,000個以上の機能が推定できない遺伝子も含まれていた. なお, 次世代シーケンサーを用いたRNA-seq解析によって, この8,646個のうちの約9割の遺伝子の転写物が確認されたが, これは *in silico* 解析によって同定された遺伝子の存在を支持する結果であった. さらに, ほかの酵母種との比較ゲノム解析を行った結果, たとえば, *S. cerevisiae* (5,884遺伝子) や *C. albicans* (6,107遺伝子) と相同性を示すタンパク質は, それぞれ2,124個, 2,150個であった. つまり, これらの酵母と機能が類似していると推定された *C. utilis* の相同性をもつタンパク質は全体の約30%程度しか存在せず, そのほかの遺伝子が「*C. utilis* を *C. utilis* らしくしている」要因に関係していると推測される結果であった.

ところで先に述べたとおり, *C. utilis* は多様な窒素化合物を栄養源とすることができる. ちなみに, 植物は, 特に根から硝酸性窒素を吸収して栄養源としているが, 硝酸態の窒素は土壌に多量に残留した場合, 環境に芳しくない影響を及ぼすことも知られている. そのようななか, 硝酸性窒素からアンモニア性窒素へ変換するのに必須な3遺伝子が, *C. utilis* の染色体上に連続して並んで存在しており, さらにRNA-seqのデータによって, そ

れらの遺伝子は発現していることが明らかになった. 図1の系統樹に示した酵母のなかでは, 硝酸性窒素を栄養源にできる *P. angusta* も, 硝酸性窒素の代謝にかかわる3つの遺伝子をクラスターとして有しているが, *C. utilis* とは各遺伝子の染色体上の配置は異なっていた. また, 図1のほかの10種の酵母には見当たらないなか, 遺伝的に遠い関係にある2つの酵母が, 遺伝子の並び方が違うとはいえ, 同じ機能を示す遺伝子クラスターを有している理由についても言及されている⁽⁵⁾. 具体的には, 担子菌門あるいは子囊菌門に属するそのほかの生物種も含めて, それら3遺伝子のアミノ酸配列の相同性解析を行ったところ, *C. utilis* と *P. angusta* のアミノ酸配列が独立した一つのグループを形成していたことから, その遺伝子群がこれら2種の酵母に他生物種から特異的に水平伝播されたのではなく, ほかの酵母については, 進化の過程でその遺伝子群が脱落したが, 2種の酵母は保持していた可能性が高いと考えられた. 今後, そのほかの硝酸化能力をもつ酵母についてゲノム解析が進めば, 酵母がそれらの遺伝子を失った正確な時期, さらに自然環境中での酵母の生存戦略などの考察も可能になると考

図1 ■ 全ゲノムが公開されている12種の酵母の進化系統解析
12種の酵母が共通して一つもっている18個の遺伝子のアミノ酸配列を用いた. 配列を個別にアライメントし, 最終的に18個のアライメントされた配列を連結し, ソフトウェアRAxML version 7.2.8を用いた最尤法により系統樹を作成した.

図2 ■ *CuADH1* 領域のセンス鎖およびアンチセンス鎖の発現
(A) *C. utilis* のアセトアルデヒドをエタノールに変換するアルコール脱水素酵素1 (*CuADH1*) 遺伝子のセンス鎖とアンチセンス鎖. (B) 対数増殖期と定常期における *CuADH1* の発現量の違い. 発現量は, それぞれのフェーズでマッピングされたリード配列数の上位四分位数を用いて正規化した値を表している.

えられる。

つづいて、対数増殖期と定常期にある *C. utilis* の菌体の RNA-Seq 解析の結果のうち、本稿では特に、*in silico* による解析では遺伝子として予測されていなかった領域においても、2,000 以上の領域でその転写物が認められたことに注目したい。たとえば、アセトアルデヒドをエタノールに変換するアルコール脱水素酵素 1 (*CuADH1*) 遺伝子では、センス鎖だけでなく、遺伝子として予測されていないアンチセンス鎖も転写されていることが明らかになった (図2)。なお、その転写量は酵母の増殖時期によって大きく異なっていた。このアンチセンス鎖の機能についての詳細は解明されていないが、現在の *in silico* の解析ではタンパク質をコードする遺伝子のすべてが推定されているわけではないことから、このアンチセンス鎖が翻訳されている可能性は否定できない。もちろん、*in silico* 解析のとおり、このアンチセンス鎖の RNA は、タンパク質をコードしないノンコーディング RNA であるかもしれない。いずれにしても、アンチセンス鎖が転写されている状態は、コーディング鎖の転写に少なからず影響を与えることは想像に難くない。これは酵母の重要な形質の一つであるエタノールの生産において鍵となるアルコール脱水素酵素遺伝子の転写制御に、アンチセンス鎖の転写がかかわっている可能性が示された初めての知見である。ほかの重要な形質にかかわる遺伝子でも同様のことが起こっているのか、さらには、*C. utilis* 以外の酵母でも同様の現象が見られるのか、多くの研究者の関心の対象になっていくのではないだろうか。

近年のシーケンシング技術、および情報処理技術の発展によって、さまざまな生物の全ゲノムにアクセスすることが容易になった。その結果として、ライフサイエンス分野の研究のスピードは飛躍的に速くなり、新しい知見が次々と生み出されている。このようなトレンドのなかで、産業にも用いられている *C. utilis* のゲノムが新たに解読され、さらに同時に、RNA の配列を直接解読する RNA-seq によるトランスクリプトーム解析を行った。その結果、*C. utilis* の進化系統位置、すなわち、ほかの酵母種との遺伝的な違いなどが明らかになった。また、

アンチセンス RNA による発現制御の可能性なども示された。今後は、この遺伝子として予測されなかった転写物に関連するが、ゲノムが比較的単純な酵母であっても、現在の情報技術では予測されない遺伝子を見いだす方法の開発も必要になってくるであろう。本稿で紹介した *C. utilis* のゲノムおよびトランスクリプトームのデータの中には、*C. utilis*、ひいては生物全体に普遍的な、まだ知られざる転写制御などのメカニズムに迫る至宝のデータも眠っているかもしれない。今後、*C. utilis* という魅力的なノンアルコール酵母に多くの研究者が酔いしれ、新たな知見が次々と創出されることを期待してやまない。

- 1) K. Kondo, Y. Miura, H. Sone, K. Kobayashi & H. Iijima : *Nat. Biotechnol.*, **15**, 453 (1997).
- 2) S. Ikushima, T. Fujii, O. Kobayashi, S. Yoshida & A. Yoshida : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 1818 (2009).
- 3) T. W. Jeffries, I. V. Grigoriev, J. Grimwood, J. M. Laplaza, A. Aerts *et al.* : *Nat. Biotechnol.*, **25**, 319 (2007).
- 4) K. De Schutter, Y. C. Lin, P. Tiels, A. Van Hecke, S. Glincka *et al.* : *Nat. Biotechnol.*, **27**, 561 (2009).
- 5) Y. Tomita, K. Ikeo, H. Tamakawa, T. Gojobori & S. Ikushima : *PLoS ONE*, **7**, e37226 (2012).

(富田康之, 生嶋茂仁, キリン株式会社基盤技術研究所)

プロフィール

富田 康之 (Yasuyuki TOMITA)

＜略歴＞2003 年名古屋大学工学部化学・生物工学科卒業／2007 年日本学術振興会特別研究員 DC2／2008 年名古屋大学大学院工学研究科化学・生物工学専攻博士課程修了、博士 (工学)／同年キリンビール株式会社入社／2010 年国立遺伝学研究所遺伝情報分析研究室受託研究員／現在、キリン株式会社基盤技術研究所に在籍＜研究テーマと抱負＞バイオインフォマティクス＜趣味＞アウトドア

生嶋 茂仁 (Shigehito IKUSHIMA)

＜略歴＞2002 年大阪大学工学部応用生物工学科卒業／2004 年同大学大学院工学研究科応用生物工学専攻修士課程修了／同年キリンビール株式会社入社／2009 年博士 (農学) (東京大学)／現在、キリン株式会社基盤技術研究所に在籍＜研究テーマと抱負＞有用物質生産のための代謝工学＜趣味＞ドライブ、博物館巡り