

令和元年6月7日現在

機関番号：14603

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14726

研究課題名(和文) 基礎生命科学における真核生物モデルとしての耐熱性酵母の生物学の樹立と展開

研究課題名(英文) Basic cellular biology using high-temperature resistant yeasts

研究代表者

木俣 行雄 (Kimata, Yukio)

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・准教授

研究者番号：60263448

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：増殖が速く、多様な遺伝学的アプローチが可能な酵母は、真核生物共通の生命現象解明のためのモデル生物として、極めて汎用性および重要性が高い。本研究では、これまで歴史的に多用されてきた酵母である *Saccharomyces cerevisiae* (出芽酵母) および、耐熱性であり新たなバイオロジーへの展開が期待される *Kluyveromyces* sp. を実験材料として、小胞体ストレス応答についての解析を進めた。そして、小胞体ストレスセンサー Ire1 はサイトゾルの ADP/ATP レベルを感知して自信の活性を調節するなど、数多くの知見を得ることが出来た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小胞体ストレス応答は真核生物共有の生命現象であり、例えばヒトでは糖尿病を含む様々な疾患に関わり、また、酵母では組換えタンパク質の分泌生産時に惹起され、その生産効率にポジティブあるいはネガティブに作用することが分かっている。複数の種類の酵母において、小胞体ストレス応答がどのような局面で惹起されるのかにアプローチした本研究は、小胞体ストレス応答の生理学的役割の理解を深め、その臨床あるいは産業上の意義を見出すことにも貢献することができたと考えている。

研究成果の概要(英文)：Yeast cells are highly valuable model organisms for studying the molecular biological aspects of phenomena commonly found in eukaryotic species. By using two species of yeasts, *Saccharomyces cerevisiae* (budding yeast) and *Kluyveromyces* sp. (thermotolerant yeast), here I approached physiological conditions in which the endoplasmic reticulum (ER) stress response is evoked. For instance, the ER stress response is triggered upon diauxic shift, in which yeast cells changes their energy generation system from fermentation to mitochondrial respiration. Moreover, Ire1, which is the ER stress response initiating protein that is located on the ER membrane, is regulated not only by ER accumulation of unfolded proteins but also by reduction of cytosolic ATP/ADP ratio. This finding strongly suggests that the ER stress response is controlled alongside overall vividness of cells.

研究分野：微生物科学

キーワード：小胞体

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

酵母は培養許容温度が広く、かつ単細胞で扱いやすい真核生物である。そこで、真核生物のストレス応答など、真核生物特有の生命現象を解明するため、酵母のモデル生物としての利用価値は高いと言えよう。酵母には耐熱性酵母 *Kluyveromyces sp.* および汎用出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* など、多様な種類が存在する。そこで、ストレスに強く、かつ、有するタンパク質の安定性が高いとされる耐熱性酵母、および出芽酵母のストレス耐性機構を調べ、比較検討することにより、新たな基礎生物学への展開が可能になると期待した。

2. 研究の目的

(1) 小胞体はあらゆる真核生物で保存されている細胞小器官である。その役割の一つに分泌タンパク質の折り畳みが挙げられる。新規に合成された分泌タンパク質は、小胞体内でジスルフィド結合形成や糖鎖付加などの修飾を受け、高次構造を形成する。その他にも小胞体は膜脂質の合成やカルシウムの貯蔵などの役割を担う。小胞体の機能不全は小胞体内腔への構造異常タンパク質蓄積などを伴い、細胞にとって障害となる（小胞体ストレス）。細胞は小胞体ストレスへの防衛機構として小胞体ストレス応答（Unfolded Protein Response:UPR）を引き起こす。

(2) 小胞体膜上のタンパク質が小胞体ストレスセンサーとして小胞体内の構造異常タンパク質蓄積を察知することにより、UPR は惹起される。出芽酵母は小胞体ストレスセンサーとして Ire1 を有する。Ire1 は真核生物全般に保存されている I 型膜タンパク質であり、サイトゾル側に RNase ドメインと Kinase ドメインを併せ持つ。また、小胞体内腔ドメインには密に折りたたまれた領域（Core Stress Sensing Region (CSSR)）が存在しているのに加え、膜貫通ドメイン直前は天然変性状態にある（サブ領域 V）。非ストレス状態では Ire1 には、サブ領域 V に分子シャペロンである BiP が結合しており、ホモ会合と活性を抑制していると考えられる。小胞体ストレス状態になると Ire1 から BiP が解離し、Ire1 はオリゴマー化（クラスター化）する。Credle 等による X 線結晶構造解析により、CSSR はダイマー状態で構造異常タンパク質を捕捉できる溝を形成すると考えられている。小胞体内に蓄積した構造異常タンパク質と CSSR の直接的な相互作用は、Ire1 の自己リン酸化へとつながり、次いで、Kinase ドメインへの ADP の配位を経て Ire1 は RNase として活性化される。出芽酵母では、RNase として活性化された Ire1 は HAC1 mRNA のスプライシングを行う。成熟型 HAC1 mRNA の翻訳により生じた HAC1 タンパク質は転写因子として機能し、小胞体内在性分子シャペロンや膜脂質合成酵素など小胞体の機能に関わるタンパク質全般を転写レベルで発現誘導し、小胞体ストレスを緩和へと向かわせる。

(3) 一方で、本段落で例示するように、これ以外の Ire1 活性制御メカニズムの存在も想定される。出芽酵母 Ire1 は、CSSR の部分欠失変異 (Δ III 変異) によって、構造異常タンパク質捕捉能が不全を来すことが分かっている。よって、N 結合型糖鎖付加阻害剤ツニカマイシンやジスルフィド結合開裂剤 DTT など、タンパク質の折り畳み不全を来す薬剤の培地への添加によって小胞体ストレスを惹起すると、野生型 Ire1 は強く活性するが、 Δ III 変異型 Ire1 は弱くしか活性化しない。しかし、ストレスがかかる時間が長くなると、 Δ III 変異型 Ire1 も強い活性を示すようになる。また、膜脂質構成成分であるイノシトールの欠損を含む膜脂質の不全により、野生型 Ire1 と Δ III 変異型 Ire1 は同程度に活性化される。すなわち、CSSR による構造異常タンパク質認識以外にも、Ire1 を活性化するメカニズムが存在するはずなのである。Ire1 とは無関係の二量体化ペプチド（出芽酵母核転写因子タンパク質 Gcn4 由来のベータシクロイシンジッパー配列；bZIP）にて小胞体内腔ドメインを置き換えた Ire1 キメラ体も、小胞体ストレスに応じて活性化される。この知見は、従来考えられてきたものとは異なるメカニズム、すなわちサイトゾル側の関与によっても Ire1 が活性化することを示唆している。

(4) よって本研究では、サイトゾル側における Ire1 活性制御機構において、何らかの様式でミトコンドリアが寄与している可能性を考え、出芽酵母をモデル生物として用い、そのことにアプローチすることを目指した。

3. 研究の方法

(1) 出芽酵母の培養は全て 30°C にて行った。グルコース含有培地としては、YPD 培地（1% Yeast extract, 2% Bactopecton, 2% Glucose）、SD 培地（2% Glucose, 0.66% Difco yeast nitrogen base w/o amino acids）、を用いた。SD 培地には用いる菌株の栄養要求性マーカーに見合った栄養を添加している。データを得るための実験では、すべて液体振盪培養を行っている。本培養と同じ培地で前培養を行い（終夜培養）、OD600 が約 0.2 になるように本培養の培地に植え次ぎ、さらに約 4 時間培養し、さまざまな薬剤添加を含む解析に供した。なお、ツニカマイシン添加は本培養開始後 1 時間後に行った。

(2) 本研究では主として、SEY6210 系統の IRE1 遺伝子破壊株 KMY1005 (MAT α trp1 ura3

his3 ire1::TRP1)を用いた。

(3) IRE1 遺伝子(5'-UTR, 3'-UTR を含む)を有するシングルコピープラスミド pRS313-IRE1 については、研究室ストックのものを用いた。また、In vivo homologous recombination 法を用いて pRS313-IRE1 上の IRE1 遺伝子にさまざまな変異を導入した。

(4) 酵母へのプラスミド DNA の導入には、酢酸リチウム法を用いた。YPD 培地 1ml にて 30°C で一晚培養した酵母培養液 500 μ l を、5ml の YPD に植え継ぎ、さらに 4 時間培養した。これを 3000rpm 2min の遠心にかけて集菌し、10ml の TE-LiAc buffer (10mM Tris-HCl(pH8.0), 1mM EDTA, 100mM 酢酸リチウム) で 1 回洗浄した。その菌体を TE-LiAc buffer 200 μ l に懸濁し、30°C で 1 時間振とう (60rpm) した。この菌体懸濁液から 100 μ l を分取し、サケ精液由来 DNA (キャリア DNA) 5 μ l、プラスミド溶液 5 μ l を加え、30°C で 30 分間静置した。これに 40% PEG4000 を含む TE-LiAc buffer 800 μ l を加え、再度 30°C で 1-3 時間静置した。これを選択培地(SD 寒天培地)に塗布し、30°C で培養することにより、プラスミドが導入された酵母菌株のコロニーを得た。

(5) 出芽酵母からの全 RNA サンプルの抽出にはホットフェノール法を用い (Kimata et al., 2003)、Promtek et al. (2011)に記した方法にて RT-PCR に供した。RT-PCR での逆転写反応においては、Invitrogen SuperScript II 逆転写酵素を用い、また、プライマーには dT18 オリゴヌクレオチドを用いた。そして、この反応産物 2 μ l に対して HAC1 増幅用プライマー (forward:5'-TACAGGGATTTCCAGAGCACG-3', reverse:5'-TGAAGTGATGAAGAAATCATTC AATTC-3', 各 10 μ M) を 1 μ l、2.5mM dNTP mix を 2 μ l、TAKARA Taq DNA polymerase 付属 10 \times PCR buffer を 2.5 μ l、DDW を 16.37 μ l、TAKARA Taq DNA polymerase(5U/ μ l)を 0.13 μ l 混和し、94°C 30 秒、54°C 30 秒、72°C 60 秒の PCR 反応を 25 サイクル行った。この PCR 産物を 2% アガロースゲル (EtBr 含有) による電気泳動に供し (0.5 \times TBE buffer)、FUJIFILM LAS-4000 を用いて蛍光画像を取得し、画像データを Fujifilm ImageGauge ソフトウェアで解析し HAC1 mRNA スプライシング%を算出した。なお、HAC1 mRNA スプライシング%は以下の式により算出される。

HAC1 mRNA スプライシング%: [HAC1^{Sp}のバンドの濃さ] / ([HAC1^{Sp}のバンドの濃さ] + [HAC1^{Un}のバンドの濃さ]) \times 100

4. 研究成果

(1) Ire1 小胞体内腔ドメインサブ領域 V は、BiP 結合部位として機能する。一方、サブ領域 I も別の機能により Ire1 の活性抑制に寄与する。そこで、サブ領域 I と V を欠く Δ I Δ V 変異体は、非ストレス条件下でもある程度の活性を有することが分かっている。一方、前々項で示した通り、 Δ III 変異は Ire1 が構造異常蛋白質を認識する能力を失わせ、Ire1 の UPR 惹起能を著しく減退させる。本研究ではまず、 Δ I Δ III Δ V Ire1 遺伝子の小胞体内腔ドメインにランダムに点変異を導入し、 Δ I Δ III Δ V 変異の UPR 惹起不全を抑圧するようなクローンを選択した。こうして得られた変異が Y225H である。Y225 は CSSR 内に位置する。 Δ III 単独変異 Ire1 に Y225H 変異を導入したところ、野生型 Ire1 と同程度のストレス応答性、および、UPR 惹起能を示した。また、 Δ I Δ V Ire1 に Y225H 変異を導入したところ、非ストレス条件下でも高い活性を示すことが明らかとなった。

(2) 大腸菌で発現させた CSSR 蛋白質の in vitro モデル変性蛋白質凝集抑制実験の結果から、Y225H は Δ III 変異による変性蛋白質認識能不全を回復させるわけではないこと、および、むしろ Y225H は CSSR による変性蛋白質認識に関して負に作用することが分かった。よって我々は、Y225H が前パラグラフのような表現型を呈する原因として、Y225H が導入されたことにより、Ire1 は小胞体内腔ドメインによる変性蛋白質の直接的認識を経ずに活性化できると考えた。すなわち、 Δ I Δ III Δ V/Y225H Ire1 は、小胞体内腔ドメインによる制御をバイパスして活性化出来るのである。しかし、 Δ I Δ III Δ V/Y225H Ire1 の UPR 惹起能は恒常的ではなく、なおも小胞体ストレスにより制御されていることが明らかとなった。これは、Ire1 の小胞体内腔ドメインが関係しない何だかの制御メカニズムが存在していることを示唆する。

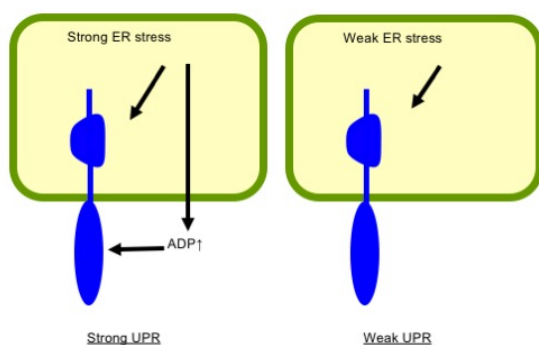
(3) そこで我々は、サイトゾル側ドメインの寄与を想定した。Ire1 のキナーゼ領域は前述の通り Ire1 の RNase としての活性を制御する役割りを担っている。すなわち、これまでの In vitro 構造生物学的および生化学的研究により、Ire1 のキナーゼ領域は活性化リガンドとして ADP を捕捉し、それが Ire1 サイトゾル側ドメイン全体の構造変化に繋がり、Ire1 は RNase として強い活性を発揮する。そして、キナーゼドメインの変異である D797N/K799N 変異により、ADP 結合の必要性は無くなることが知られている。そこで我々は、 Δ I Δ III Δ V/Y225H/D797N/K799N Ire1 を作製し、その活性がほとんど小胞体ストレスに影響されず、恒常的であることを見いだした。この知見は、 Δ I Δ III Δ V/Y225H Ire1 が小胞体内の環境そのも

のでは無く、サイトゾルの ADP 量（あるいは ADP/ATP）依存的に制御されていることを示唆するものである。なお、キナーゼドメインおよび ADP 依存的な Ire1 の活性化においては、ATP は阻害効果を有することが分かっている。

(4) 蛍光レポーター Perceval HR を用いた解析では、強い小胞体ストレスによって実際にサイトゾルの ADP/ATP 比を計測したところ、強い小胞体ストレスにより、有意に ADP/ATP 比が上昇することが明らかとなった。また、小胞体ストレスは惹起しないが ATP 産生については阻害効果を有するアジ化ナトリウムにより、 $\Delta I \Delta III \Delta V / Y225H$ Ire1 が活性化した。これらの知見は、前項の学説を強く支持するものである。

(5) よって我々は、Ire1 の活性が小胞体内腔ドメインとサイトゾル側ドメインの両方で制御されていると提唱する (図 1)。強い小胞体ストレス時は、細胞全体の活力が低下し、ATP 産生にも支障を来し、サイトゾルの ADP/ATP 比が上昇することにより、Ire1 は強く活性化できる。この仕組みは、細胞全体の活力を低下させないような弱い小胞体ストレス状態では、Ire1 の活性を弱く抑え、不要な UPR を防止することに寄与すると考えられる。

図 1
ストレスの強度の違いによる Ire1 活性化強度の調整



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Ishiwata-Kimata Y, Le QG, Kimata Y “Stress-sensing and regulatory mechanism of the endoplasmic stress sensors Ire1 and PERK” *Endoplasmic Reticulum Stress in Diseases* In press (2019 年) 査読有
- ② Tran MD, Takagi H, Kimata Y “Categorization of endoplasmic reticulum-stressing stimuli into unfolded-protein accumulation and membrane-lipid aberrancy using yeast Ire1 mutants.” *Biosci. Biotechnol. Biochem.* Vol.83, 326-329 (2019 年) doi: 10.1080/09168451.2018.1530098. 査読有
- ③ Nguyen TMP, Ishiwata-Kimata Y, Kimata Y “Monitoring ADP/ATP ratio in yeast cells using the fluorescent-protein reporter PercevalHR” *Biosci. Biotechnol. Biochem.* Vol.83, 824-828 (2019 年) doi: 10.1080/09168451.2019.1574204. 査読有
- ④ Mai CT, Le QG, Ishiwata-Kimata Y, Takagi H, Kohno K, Kimata Y “4-Phenylbutyrate suppresses the unfolded protein response without restoring protein folding in *Saccharomyces cerevisiae*.” *FEMS Yeast Res.* Vol.18, foy016 (2018 年) doi: 10.1093/femsyr/foy016. 査読有
- ⑤ Mai TC, Munakata T, Tran DM, Takagi H, Kimata Y “A chimeric mutant analysis in yeast cells suggests BiP independent regulation of the mammalian endoplasmic reticulum-stress sensor IRE1 α .” *Biosci. Biotechnol. Biochem.* Vol.82, 1527-1530 (2018 年) doi: 10.1080/09168451.2018.1478716. 査読有
- ⑥ Tran DM, Kimata Y “The unfolded protein response of yeast *Saccharomyces cerevisiae* and other organisms” *Plant Morphol.* Vol.30, 15-24 (2018 年)
https://www.jstage.jst.go.jp/article/plmorphol/30/1/30_15/_pdf-char/ja 査読有
- ⑦ Le QG, Ishiwata-Kimata Y, Kohno K, Kimata Y “Cadmium impairs protein folding in the endoplasmic reticulum and induces the unfolded protein response.” *FEMS Yeast Res.*

Vol.16, fow049 (2016 年) doi: 10.1093/femsyr/fow049. 査読有

〔図書〕 (計 1 件)

Kimata Y, Nguyen TMP, Khono K “Response and cytoprotective mechanisms against proteotoxic stress in yeast and fungi” Stress Response in Fungi (Springer 社)における分担著作, pp.161-189 (2018 年)

〔その他〕

ホームページにおける研究成果公開

<http://kimata4.wixsite.com/home>

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。