

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15084

研究課題名(和文) mRNA分解と小胞体ストレス応答のクロストークによる小胞体恒常性維持機構

研究課題名(英文) Endoplasmic reticulum homeostasis through the interaction between mRNA degradation and ER stress response in filamentous fungi

研究代表者

五味 勝也 (Gomi, Katsuya)

東北大学・農学研究科・教授

研究者番号：60302197

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：小胞体膜局在型エンドヌクラーゼIreAが、麹菌のアミラーゼ高分泌生産時などの小胞体ストレス条件下において、 α -アミラーゼなどのmRNA分解に関与していることが示された。ireA発現抑制株では、 α -アミラーゼの生産が著しく抑制されており、IreAによって切断されるイントロンを欠失させたhacAを導入すると、 α -アミラーゼ生産が野生株と同等にまで回復した。HacAによって制御されるbipAやpdiAの高発現株においても、 α -アミラーゼの生産が有意に回復したことから、unfolded protein responseによる分子シャペロン遺伝子の発現誘導が α -アミラーゼ生産に必要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In a filamentous fungus, *Aspergillus oryzae*, the endoplasmic reticulum-localized endonuclease IreA was revealed to involve in excision of the mRNAs of α -amylase and maltose transporter genes under the conditions inducing ER stress response such as hyperproduction of amylolytic enzymes. The production level of α -amylase was significantly reduced in the strain whose ireA expression was downregulated, and it could be restored by the introduction of the hacA mutant with deletion of the intron spliced unconventionally by IreA. Furthermore, the α -amylase production levels were increased in the strains that overexpressed the bipA and pdiA genes. Taken together, induced expression of chaperone genes in the ER would be required for the higher production of α -amylase that may cause unfolded protein response.

研究分野：応用微生物学

キーワード：小胞体ストレス 糸状菌 mRNA分解 小胞体局在型エンドヌクラーゼ α -アミラーゼ生産

1. 研究開始当初の背景

麹菌における異種遺伝子のコドン最適化の効果転写レベルで解析している (Tanaka et al., 2012, 2014) 過程で、mRNA 分解に関わると考えられる因子 (Ski2 および Ski3) の破壊株がマルトースなどを炭素源としたアミラーゼ高生産条件下において著しい生育不良を示すことを見いだした。一方、アミラーゼ遺伝子の発現を制御する転写因子 AmyR を同時に欠損させるとマルトース培地における生育不良が完全に回復した。このことは、mRNA 分解機構が麹菌のタンパク質高分泌条件下における細胞の恒常性維持に非常に重要な役割を担っていることを強く示唆している。興味深いことに、ski2 と ski3 破壊株では、アミラーゼ生産に必要な誘導基質のマルトース取り込みに関わるマルトーストランスポーター MalP の mRNA の前半断片が蓄積していた。この結果は malP mRNA がエンドヌクレアーゼによる切断を受け、生じた断片後半領域が Ski2 および Ski3 依存的に分解されていることを示している。また、ski2 と amyR の二重破壊株では malP mRNA の切断が見られず、薬剤添加により人為的に小胞体ストレスを誘導すると、malP mRNA 切断が促進されたことから、生理的条件下ではアミラーゼ高生産によって小胞体ストレス依存的に malP mRNA が切断されるものと考えられる。申請者が初めて見出した誘導生産に必要な基質取り込みに関わるトランスポーターの mRNA 分解という現象は、タンパク質高分泌条件下における小胞体の恒常性を維持するために mRNA 分解機構が重要な役割を果たしていることを示していると考えられた。

2. 研究の目的

mRNA 分解による小胞体恒常性維持の分子機構を明らかにするため、以下の目標の達成を目指す。(1) mRNA 切断を誘導する条件や切断を行うエンドヌクレアーゼを同定する。

(2) 切断によって生じる mRNA 前半断片の分解に関わる因子を同定し、小胞体ストレス応答への関与を明らかにする。(3) mRNA 前半断片の翻訳の有無とその小胞体ストレスへの影響を明らかにする。(4) 切断部位に変異を導入した非切断型 malP や、切断部位にターミネータを連結した強制的 malP 前半断片を用い、小胞体ストレス応答・マルトース取り込み能・アミラーゼ遺伝子発現への影響を調べることにより、mRNA 切断・分解の小胞体恒常性維持への関与を明らかにする。

3. 研究の方法

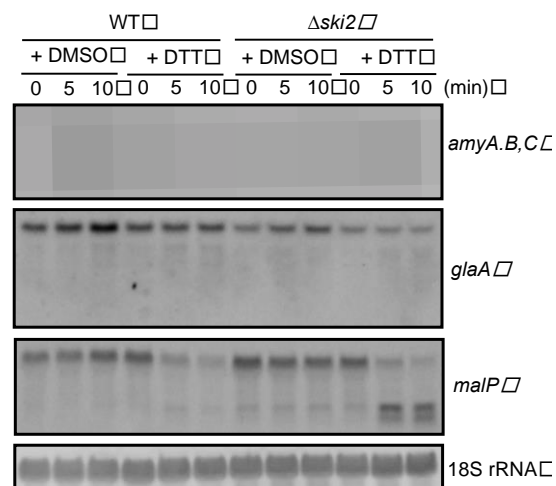
(1) 分泌生産されるアミラーゼ関連遺伝子の mRNA が小胞体ストレス依存的に切断されるか調べるとともに、小胞体膜に局在するエンドヌクレアーゼ IreA の mRNA 分解への関与について発現抑制株を用いて検討する。(2) HbsA-Dom34 複合体破壊株における mRNA 前半断片の分解を調べるとともに、mRNA 前半断片の翻訳の有無を GFP-MalP 融合タンパク質や切断部位に変異を導入した非切断型

malP を用いて調べる。(3) IreA ならびに小胞体ストレス応答に関わる因子 (Bip, PDI) のアミラーゼ遺伝子発現および分泌生産に及ぼす影響を破壊株や発現抑制株を用いて調べる。

4. 研究成果

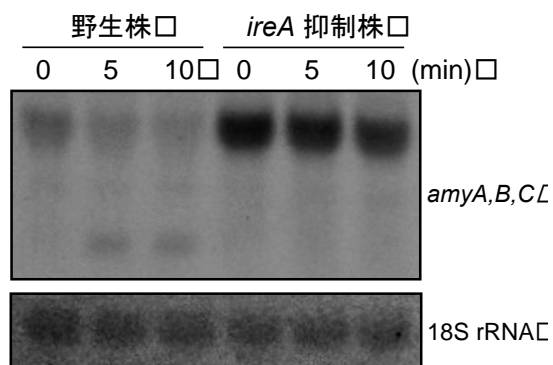
(1) 小胞体ストレス依存的に切断される mRNA と切断を行うエンドヌクレアーゼの同定

malP mRNA 以外に小胞体ストレス依存的に切断される mRNA があるかを調べるため、ski2 破壊株においてジチオトレイトール (DTT) 添加により強制的に小胞体ストレスを誘導させ、ノーザン解析によりアミラーゼ関連遺伝子を検出した。その結果、malP mRNA だけでなく、 α -アミラーゼ遺伝子 (amyA/B/C) の mRNA においても低分子の断片の蓄積がみられた。一方で、グルコアミラーゼ (glaA) mRNA では低分子の断片の蓄積はみられなかったため、小胞体ストレス依存的に切断される mRNA には選択性があることが示唆された (第 1 図)。小胞体ストレス応答 (Unfolded



第 1 図 DTT 添加後のアミラーゼ遺伝子 mRNA と malP mRNA のノーザン解析

protein response; UPR) では、転写因子 HacA をコードする mRNA のイントロンが活性化された小胞体貫通型エンドヌクレアーゼ IreA によるスプライシングを受け、それから翻訳された活性型転写因子がシャペロンタンパク質 BipA やジスルフィドイソメラーゼ PdiA など

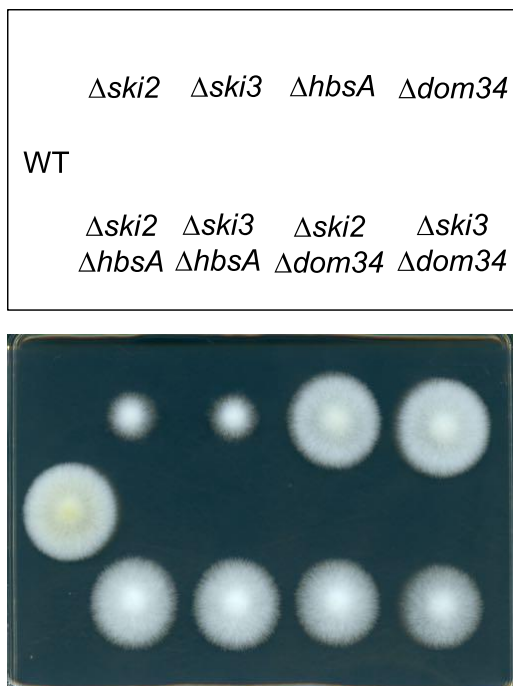


第 2 図 ireA 抑制株における DTT 添加後の amyA/B/C mRNA のノーザン解析

どの遺伝子発現を誘導する。最近、高等真核生物では Ire1 が分泌タンパク質などの小胞体上で翻訳される mRNA を切断していることが明らかとなっていることから、*malP* mRNA と *amyA/B/C* mRNA が IreA によって切断されている可能性が考えられた。野生株と *ireA* 発現抑制株において DTT 添加後の *amyA/B/C* mRNA をノーザン解析で調べた結果、*ireA* 発現抑制株では低分子断片の蓄積が見られなかった(第2図)。このことから、*malP* mRNA と *amyA/B/C* mRNA は IreA によって切断されていることが示唆された。

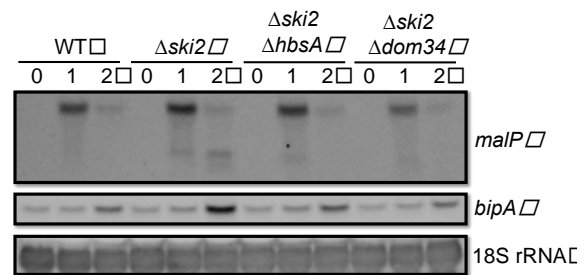
(2) 切断により生じる mRNA 前半断片の翻訳機構の解析

出芽酵母における研究では、翻訳終結因子と構造が類似した Hbs1-Dom34 複合体が nonstop mRNA からリボソームを解離して分解を引き起こすことが示されている。麴菌で *ski2*、*ski3* と *hbsA* および *dom34* との二重破壊株を作製したところ、*ski2* および *ski3* 破壊によるマルトース培地における生育不良がほぼ完全に回復した(第3図)。二重破壊株においては、*ski2* 単独破壊株と比較して *malP* mRNA の mRNA 切断が抑制されたことが示唆された。また、前半断片の蓄積量が減少しており、*bipA* の発現量も減少していた(第4図)。このことから、*hbsA* や *dom34* を破壊することで *ski2* 破壊株の小胞体ストレスが緩和され、*malP* mRNA 切断が抑制されたことが示唆された。



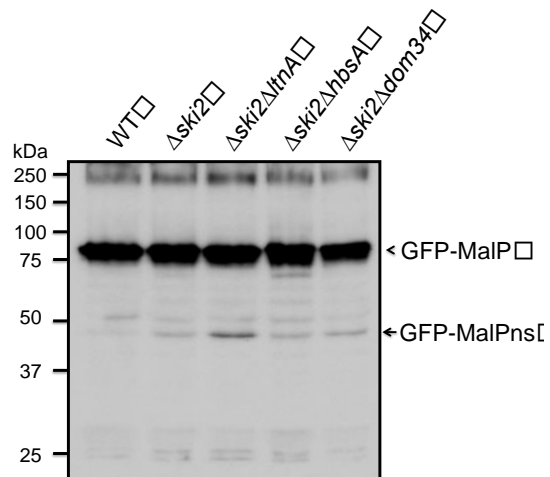
第3図 二重破壊株のマルトース培地における生育

hbsA や *dom34* を破壊することで、切断された *malP* mRNA の前半断片からの翻訳産物量に影響があるかを調べるため、GFP-MalP を発現させ、抗-GFP 抗体によるウェスタン解析により切断された *gfp-malP* mRNA からの



第4図 二重破壊株における *malP* mRNA および *bipA* mRNA のノーザン解析

翻訳産物 (GFP-MalPns) 量を調べた。その結果、*ski2* 破壊株と二重破壊株において GFP-MalPns と推定されるシグナルの強度に大きな違いは見られなかった。一方で、出芽酵母において nonstop mRNA からの翻訳産物の分解に関与するユビキチンリガーゼ Ltn1 のオソログ (*LtnA*) 遺伝子を *ski2* 破壊株で破壊した結果、GFP-MalPns と推定されるシグナルの強度が *ski2* 破壊株よりも増加した(第5図)。以上の結果から、*ski2* 破壊株において蓄積した *malP* mRNA 前半断片は HbsA-Dom34 非依存的に翻訳され、LtnA 依存的に分解されることが示唆された。しかし、*ski2* と *ltnA* の二重破壊株のアミラーゼ生産条件における生育は *ski2* 破壊株と同等であった。さらに、切断部位と予想された部位に終止コドンを導入した *malP* を野生株で高発現させたものの、生育への影響は見られなかった。これらの結果から、*ski2* 破壊株が示すアミラーゼ生産条件での生育不良の原因は、切断された *malP* mRNA から異常な翻訳産物が合成されるためではないことが示唆された。

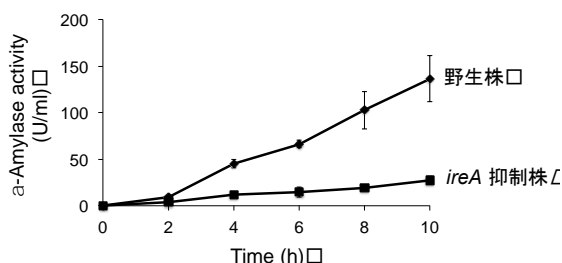


第5図 抗-GFP 抗体による GFP-MalP のウェスタン解析

(3) アミラーゼ生産における小胞体ストレス応答機構の役割の解析

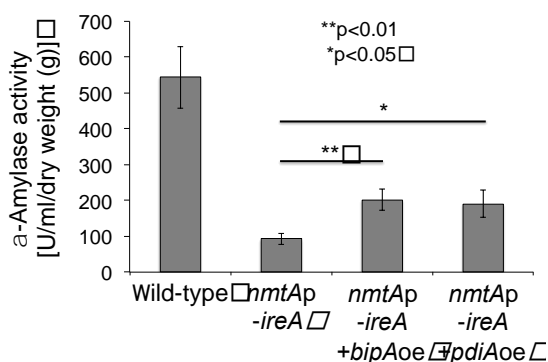
以前の研究により、*ireA* の発現を抑制すると、アミラーゼ生産条件での生育が完全に失われ、アミラーゼの生産を抑制することで生育が回復したことから、麴菌のアミラーゼ生産条件での生育に UPR が必要であることが示された (Tanaka et al., *Fungal Genet. Biol.*,

2015)。これまでの研究結果により、*malP* mRNA と *amyA/B/C* mRNA が *IreA* によって切断されることが示されたが、*ireA* の抑制がアミラーゼ生産に与える影響については不明であった。野生株と *ireA* 抑制株の α -アミラーゼ活性を比較した結果、*ireA* 発現抑制株では α -アミラーゼの生産が著しく抑制されていることが明らかになった (第 6 図)。



第 6 図 *ireA* 抑制株における α -アミラーゼ活性

IreA によって切断される 20 塩基のイントロンを人為的に欠失させた *hacA* を導入したところ、*ireA* 発現抑制株の α -アミラーゼ生産が野生株と同等にまで回復した。このことから、UPR が α -アミラーゼ生産に必要であることが示唆された。さらに、 α -アミラーゼ遺伝子の転写産物量を調べた結果、*ireA* 発現抑制株でも強い発現が認められたことから、UPR は転写後の過程において α -アミラーゼの生産に必要であることが示唆された。*ireA* 発現抑制株において α -アミラーゼ遺伝子のプロモーターで *bipA* や *pdiA* を強制発現させた結果、*pdiA* を強制発現させた場合において、アミラーゼ生産条件における生育がわずかに回復した。また、いずれの強制発現株においても、 α -アミラーゼの生産が有意に回復したことから、UPR による分子シャペロン遺伝子の発現誘導が α -アミラーゼ生産に必要であることが示唆された (第 7 図)。



第 7 図 *ireA* 抑制株における *bipA* および *pdiA* 強制発現による α -アミラーゼ生産の回復

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

- ① 田中瑞己、新谷尚弘、五味勝也：小胞体ストレス応答は麹菌のアミラーゼ生産に必要である、2018 年度日本農芸化学会大会、2018 年 3 月 15–18 日、名城大学 (名古屋)
- ② 田中瑞己、新谷尚弘、五味勝也：*Aspergillus oryzae* requires unfolded protein response for growth under condition inducing amylases production, The 14th International *Aspergillus* Meeting, 2017 年 3 月 13–14 日, Asilomar Conference Grounds, Asilomar, CA, USA

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

五味 勝也 (GOMI, KATSUYA)
 東北大学・大学院農学研究科・教授
 研究者番号：60302197

(2) 連携研究者

(3) 研究協力者

田中 瑞己 (TANAKA, MIZUKI)
 東北大学・大学院農学研究科・博士研究員
 静岡県立大学・食品栄養科学部・助教
 研究者番号：70803344