

機関番号：14303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20580077

研究課題名(和文) ストレス下および醸造過程の酵母における転写後ステップでの遺伝子発現制御機構の解析

研究課題名(英文) Study on the post transcriptional regulation of yeast gene expression under stressed conditions and brewing process

研究代表者

井沢 真吾 (IZAWA SHINGO)

京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・准教授

研究者番号：10273517

研究成果の概要(和文)：mRNAの核外輸送の抑制や hyperadenylation、P-body や stress granule の形成誘導などから、エタノールストレス条件下では全体として mRNA の翻訳が抑制される傾向にあることがわかった。また、エタノールストレス条件下では、必ずしも転写が活性化した遺伝子が優先的に翻訳されるわけではないことも明らかになった。それゆえに、このような状況下でも優先的に発現してくる遺伝子にこそ、酵母の高いエタノール耐性の秘密が隠されていると考えられる。転写以降の制御や、転写から翻訳・分解に至る mRNA flux に着目することで、これまででは見えてこなかった醸造過程の酵母の生理やエタノール応答機構について理解を深めることができた。

研究成果の概要(英文)：We found that severe ethanol stress generates budding yeast stress granules (SGs) in a manner independent of the phosphorylation of eIF2 α . The concentration that generated budding yeast SGs (above 10 %) was higher than that causing P-bodies (more than 6 %), and P-bodies were assembled prior to SGs. As well as mammalian SGs, the assembly of budding yeast SGs under ethanol stress was blocked by cycloheximide. On the other hand, the budding yeast SGs caused by ethanol stress contained eIF3c but not eIF3a and eIF3b, although the eIF3 complex is a core constituent of mammalian SGs. We also found that the formation of budding yeast SGs might play a role for sufficient recovery from ethanol stress. Additionally, we found novel phenomena about the selective export of mRNA and hyperadenylation of *HSP* mRNAs under ethanol stressed conditions and brewing process.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：応用微生物学

科研費の分科・細目：農芸化学 ・ 応用微生物学

キーワード：出芽酵母、エタノール、mRNA 核外輸送、ストレス、醸造

1. 研究開始当初の背景

真核生物の遺伝子発現は、核内における転写段階だけでなく、mRNA の核外輸送や細胞質側における翻訳・分解などのステップによっても巧妙に制御されている。熱ショック条件下では、ストレス耐性獲得に必要とされるヒートショックプロテイン(HSP)をコードする HSP 遺伝子の mRNA を優先的に細胞質へと核外輸送する一方で、耐性獲得に不要な mRNA 種は核内に留め置くといった「mRNA の選択的核外輸送」が行われることが知られていた。また、グルコース枯渇や浸透圧ストレス条件下では、プロセッシング ボディ (cytosolic processing body, P-body) と呼ばれる細胞質構造体に mRNA が隔離されて翻訳が抑制されることも報告された。これらのことを勘案すると、ストレス条件下の遺伝子発現制御を正しく理解するためには、転写段階の解析だけでは不十分であり、mRNA の核外輸送や細胞質側での代謝といった転写以降の制御についても検証が不可欠である。

研究開始当初までに本申請者らが得た研究成果も、エタノールストレス条件下や酒類醸造過程における酵母の遺伝子発現においては転写以降のステップによる制御が重要な役割を担っていることを強く示唆していた。しかし、mRNA の選択的核外輸送や P-body を介した翻訳抑制のメカニズムについては、研究が緒についたばかりで未解明な部分が大変多く、今後の研究進展が期待されている研究領域であった。また、エタノールストレス条件下の遺伝子発現や応答機構については、熱ショックや浸透圧ストレスに比べると研究報告例も少なく情報が非常に限られていた。しかし、醸造・発酵産業での酵母の重要性を考慮すると、エタノールストレス条件下の遺伝子発現制御に関する情報こそがより一層重要であり、本研究課題は細胞生物学のみならず農芸化学領域においても非常に重要な研究対象であった。

2. 研究の目的

真核生物の遺伝子発現は、核内における転写段階での制御だけでなく転写以降のステップによってもコントロールされるため、転写段階の解析だけでは遺伝子発現の全容を正しく理解することはできない。しかし、転写の制御機構に比べると、転写後の制御に関する情報は極めて限られている。本研究では、ストレス条件下の出芽酵母における mRNA 核外輸送段階と細胞質 P-body やストレス顆粒による遺伝子発現制御機構について解析を進め、転写後制御に関する新たな知見獲得を目的とする。また、酒類醸造過程における醸造用酵母の遺伝子発現については、転写レベルを除くと

ほとんど解析がおこなわれていないのが現状である。そこで、転写以降のステップを対象として解析を進め、酒類醸造過程における醸造用酵母の遺伝子発現について実態解明を目指す。さらに、mRNA 核外輸送機構の改変による醸造効率改善の可能性を検証する。

3. 研究の方法

ストレス下で P-body 内に隔離される mRNA 種、およびエタノールストレス条件下で優先的に核外輸送される mRNA 種の同定をおこなうとともに、それらの mRNA がコードする遺伝子産物のストレス応答における生理的役割を解析した。また、P-body 同様に非翻訳状態の mRNA が蓄積するストレス顆粒 (stress granules, SG) の形成機構について、構成因子の GFP fusion を構築し、エタノールや醸造過程での形成機構を解析した。また、転写と mRNA の核外輸送をつなぐ因子である TREX-2 complex の欠損株を各種構築し、P-body や SG の形成に及ぼす影響を解析した。解析を通じて、核内-細胞質間での mRNA-flux に関する相互の情報交換について考察をおこなった。また、ストレス条件下での mRNA の選択的核外輸送において、mRNA を選別する際に 3'-末端非翻訳領域が果たす役割を検証した。以上の点について、実験室レベルでの解析だけではなく、清酒とワインの醸造試験をおこない、実際の醸造過程における挙動や生理的意義の解析をおこなった。

4. 研究成果

(1) エタノールストレス条件下における SG と P-body の形成について検討を行い、その生理的意義を考察した。解析の結果、SG は P-body よりも厳しいエタノールストレス条件下で形成され、さらにその形成は P-body 形成後に誘導された。加えて、シクロヘキシミドによって SG の形成は阻害されることや、eIF2 α のリン酸化に非依存的事であることが明らかとなった。また、熱ショック (46°C) によっても SG の形成は誘導されるが、エタノールによって誘導される SG と熱ショックによる SG とでは構成因子に違いが存在することを見出した。さらに、SG の形成が抑制される遺伝子破壊株を用いて生理的意義を検討したところ、野生株に比べて遺伝子破壊株はエタノールストレス処理後の生育回復が不十分であった。そのため、SG はエタノールストレスからの回復時に重要な役割を担っていると考えられる。実際の醸造過程における SG 形成については、清酒小仕込試験および白ワインの醸造試験を行って検討した。

(2) エタノールストレス条件下では *HSP* mRNA の polyA 鎖が過剰に伸長すること (hyper-adenylation) を見出し、エタノールと熱ショックの両ストレス条件下における *HSP* mRNA 核外輸送効率の違いが 3'-末端プロセシングの違いに起因することを明らかにした。

(3) 出芽酵母では P-body と SG 間で mRNA や構成因子が一部共有されるとともに、先に形成された P-body から SG が生じると考えられている。核内に局在する TREX-2 complex の構成因子欠損株で、SG 構成因子に関するユニークな表現型を確認した。酵母 TREX-2 complex は Sac3p, Cdc31p, Thp1p, Sus1p によって構成され、核外へ輸送される mRNA と輸送因子の複合体を核膜孔へと誘導する上で重要な役割を担っている。TREX-2 complex 構成因子の変異株における P-body および SG の形成を検討したところ、アルコールストレス条件下の *sac3Δthp1Δ* 二重欠損株において一部の SG 構成因子が異常な細胞内局在を示すことを見出した。一方、*sus1Δ* や *cdc31-1* 株ではこれらの局在異常が見られなかった。これらの結果は、TREX-2 complex が関与する核内イベントの状況が細胞質における mRNA flux にも影響する可能性を示唆している。

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 8 件)

1. K. Kato, Y. Yamamoto, and S. Izawa (2011) Severe ethanol stress induces assembly of stress granules in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **28**, 339-347. 査読有
2. S. Izawa, K. Ikeda, T. Miki, Y. Wakai, and Y. Inoue (2010) Vacuolar morphology of *Saccharomyces cerevisiae* during the process of wine making and Japanese sake brewing. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **88**(1), 277-282. 査読有
3. S. Izawa (2010) Ethanol stress response in mRNA flux of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**(1), 7-12. 査読有
4. 井沢真吾 (2010) 出芽酵母のエタノールストレス応答における mRNA の動態 ~ mRNA の hyperadenylation と P-body・Stress granule の形成~. 日本醸造協会誌 **105** (2), 63-68. 査読無し
5. S. Izawa and Y. Inoue (2009) Posttranscriptional regulation of gene expression in yeast under ethanol stress.

Biotech. Appl. Biochem., **53**, 93-99. 査読有

6. S. Izawa, T. Kita, K. Ikeda, and Y. Inoue (2008) Heat shock and ethanol stress provoke distinctly different responses in 3'-processing and nuclear export of *HSP* mRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.*, **411** (1), 111-119. 査読有
7. T. Miki, Y. Ito, K. Kuroha, S. Izawa, and T. Shinohara (2008) Potential of yeasts isolated from botrytized grape to be new wine yeast. *Food Sci. Tech. Res.*, **14** (4), 345-350. 査読有
8. 井沢真吾、井上善晴 (2008) 酵母のエタノールストレス応答と転写後遺伝子発現調節. バイオサイエンスとインダストリー **66** (10), 557-561. 査読無し

[学会発表] (計 10 件)

1. 日本農芸化学会 2011 年大会 加藤健太、山本陽佑、井沢真吾「酵母ストレス顆粒形成におけるストレス種の影響」2011 年 3 月 27 日京都女子大学
2. 日本農芸化学会 2011 年大会 山本陽佑、加藤健太、井沢真吾「酵母ストレス顆粒形成に及ぼす TREX-2 構成因子欠損の影響」2011 年 3 月 27 日京都女子大学
3. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会 山本陽佑、加藤健太、井沢真吾「酵母 stress granule の形成における TREX-2 complex 構成因子欠損の影響」2010 年 12 月 8 日神戸国際展示場
4. 日本生物工学会 2010 年大会 加藤健太、山本陽佑、三木健夫、若井芳則、井沢真吾「エタノールストレス応答における酵母 stress granule 形成とその生理学的意義」2010 年 10 月 28 日宮崎市フェニックスシーガイアイリゾート
5. 日本生物工学会 2010 年大会 山野圭博、井沢真吾「醸造過程における酵母形態変化の解析」2010 年 10 月 27 日宮崎市フェニックスシーガイアイリゾート
6. 2010 年酵母遺伝学フォーラム 加藤健太、山本陽佑、三木健夫、若井芳則、井沢真吾「エタノールストレス応答における酵母 stress granule 形成とその生理学的意義」2010 年 9 月 9 日奈良市ならまちセンター

7. 日本農芸化学会 2010 年大会 加藤健太、鈴木秀之、井沢真吾「エタノールストレスによる酵母ストレス顆粒の形成」2010 年 3 月 28 日東京大学駒場キャンパス
8. 2009 年酵母遺伝学フォーラム 野村亘、喜多恵子、井沢真吾、井上善晴「P1c1 を介した Pkc1-Mpk1 シグナル伝達系の活性化機構」2009 年 7 月 30 日つくばノバホール
9. 日本農芸化学会 2009 年大会 井沢真吾、井上善晴「エタノールストレス条件下における酵母の mRNA flux」2009 年 3 月 28 日福岡国際会議場
10. 2008 年酵母遺伝学フォーラム 井沢真吾、北剛臣、池田佳代、井上善晴「出芽酵母のエタノールストレス適応機構の解析」2008 年 9 月 10 日北海道大学学術交流会館

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.cis.kit.ac.jp/~hideyuki/bisei/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井沢 真吾 (IZAWA SHINGO)
京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・
准教授
研究者番号：10273517

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：