

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：32658
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23780092
 研究課題名（和文） 出芽酵母のエタノールストレス応答はエピジェネティクス制御を受けるか？
 研究課題名（英文） Analysis of histone acetylation level involved in regulation of gene expression through ethanol stress response in *Saccharomyces cerevisiae*.
 研究代表者
 藤村 朱喜 (FUJIMURA SYUKI)
 東京農業大学・生物産業学部・助教
 研究者番号：00453803

研究成果の概要（和文）：出芽酵母の持つエタノールストレス応答とエピジェネティクス制御との関連を解析し、環境応答に関わる遺伝子発現制御機構の解明を目指した。

ストレス下におけるヒストンアセチル化レベルを解析した結果、野生株ではアセチル化レベルの上昇が見られた。エタノール感受性が見られるエピジェネティクス関連遺伝子欠損株においてはアセチル化レベルが上昇しない株が存在した。本応答に関わるエピジェネティクス関連因子は存在し、複合的に寄与していると推測される。

研究成果の概要（英文）：In this study, the epigenetic regulation for ethanol stress response was investigated to reveal for regulation of gene expression through environmental response in *Saccharomyces cerevisiae*.

First of all, the level of histone acetylation under ethanol stress condition in *S. cerevisiae* wild type strain was examined. As a result the level of it were elevated. Next, the epigenetic gene-disrupted strains were examined. Among them some ethanol sensitive strains showed decreased level under ethanol condition. These results imply that there are epigenetic related genes involved in the regulation of gene expression and the system including stress response in yeast could be complicated.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

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、環境応答、エタノールストレス、エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* が持つアルコール発酵能力は古くから人々が利

用し、醸造産業やバイオエタノールなどその需要は高まるばかりである。しかし、アルコ

ール発酵に関わる酵母の働きや仕組みはまだ未知な点が多く、その詳細を解明する必要がある。酵母はアルコール発酵の際、自らもエタノールストレスを受けるため、いかにエタノールストレスに耐えるかということが最も重要である。そこで本研究では酵母のエタノールストレスに対抗する仕組みについて明らかにしたいと考えた。また、*S. cerevisiae*は単細胞真核生物であり、ヒトを含む真核細胞の生命現象を解明するためのモデル生物としての役割を果たしていることから、エタノールストレス適応機構の解明により真核生物に普遍に存在する環境応答機構を見出せると考え本研究課題の着手に至った。

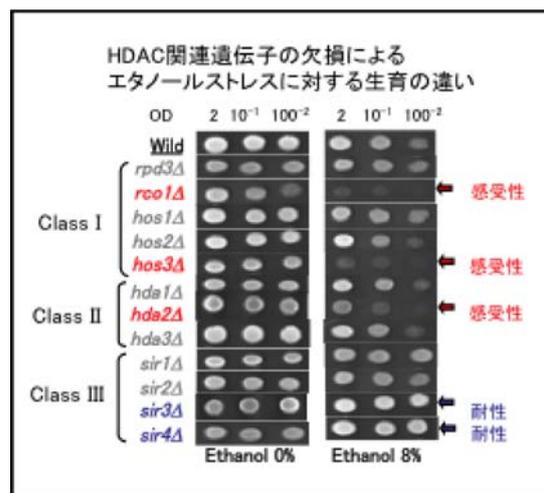
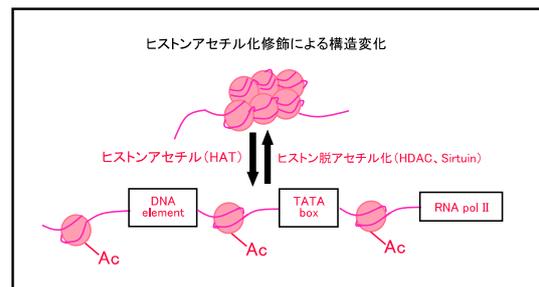
現在までエタノールストレス応答についての研究は、ストレスの感知、シグナル伝達、そして個々の遺伝子発現制御が生じ、これらの結果代謝制御が起こり生命を維持するという流れで解析されてきたが、これらは全て、ある遺伝子の発現制御の結果として起こる応答である。そこで、近年その重要性が認識されつつあるエピジェネティクスによる遺伝子発現制御に着目した。

2. 研究の目的

申請者は *S. cerevisiae* の非致死遺伝子破壊株セットを用い、エタノール存在下において野生株と比べ感受性が見られる HDAC 遺伝子欠損株を見出している。また、エタノールに対し耐性を示す欠損株 (*•sir3* および *•sir4*) の存在を見出した。HDAC 関連遺伝子 (*RCO1*, *HOS3*, *HDA2* 遺伝子) は、脱アセチル化に関わり、ユークロマチンの形成の結果、一般的には転写が促進されるとされる。また Sirtuin 関連遺伝子 (*SIR* 遺伝子) はヘテロクロマチンの形成を導き、一般的にはテロメア付近の遺伝子サイレンシングに関わると

される。

つまり、これら遺伝子の欠損株においてエタノールストレスに対し感受性や耐性が見られることは大変興味深い。そこで、エピジェネティクス関連因子とエタノールストレス応答との関係について解析を行い、酵母の環境応答に関わる遺伝子発現制御とエピジェネティクスとの関連性について明らかにすることを目的とした。



3. 研究の方法

クロマチン構造の変化とエタノール応答の関係について明らかにするため、*S. cerevisiae* 非致死遺伝子破壊株セットを用いエタノールストレス存在下において野生株に比べ、生育の様子が異なり、感受性を持つ、または、耐性を持つエピジェネティクス遺伝子欠損株を選抜した。これらの株をエタノールストレス応答性株と考え、本研究に用いた。これらの株について、エタノール存在下におけるヒストンアセチル化レベルを解析した。

その結果、野生株に比べ、エタノール感受性を示したもののエタノール存在下においてもアセチル化レベルには差異がほとんど見られない株も存在した。一方で、ヒストンのアセチル化レベルが上昇している株も存在した。野生株については、エタノールストレスに関するヒストン脱アセチル化阻害剤などの影響を観察し、クロマチンリモデリングとの関連性を検討した。これらの結果からエタノールストレス応答とエピジェネティクス制御の関係について考察した。

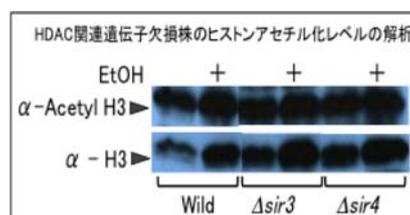
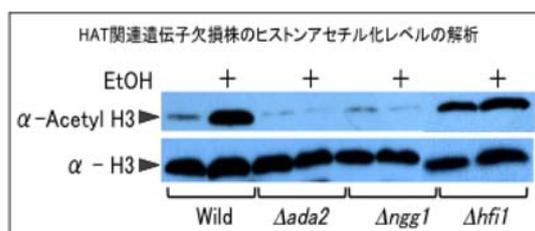
4. 研究成果

出芽酵母におけるエタノールストレス応答を観察するため、好気条件及び嫌気条件においてエタノール存在下での野生株とエピジェネティクス関連遺伝子欠損株の生育を比較した。その結果、HDAC 関連遺伝子に加えて HAT 関連遺伝子 *ADA2*、*HFI1*、*NGG1* の酵母のエタノールストレス応答制御機構への関与が示唆され、これらは酸素の有無にかかわらずと考えられた。

酵母のエタノールストレス応答制御機構における HDAC 阻害剤による影響を観察した。HDAC 阻害剤 SAHA を加えたエタノール添加培地における野生株の生育に抑制傾向が見られた。これより、SAHA によってクラス I 及び II 型 HDAC を阻害することで酵母のエタノールストレス応答機構に影響を与える可能性があることが示唆された。

HDAC 関連遺伝子の欠損によるヒストンアセチル化レベルへの影響を解析するため、野生株と *•rpd3* 株のヒストンアセチル化レベルを比較した。その結果、野生株に比べ、*•rpd3* 株はヒストンアセチル化レベルの顕著な上昇が見られたことから HDAC 関連遺伝子の欠損は、酵母のヒストンアセチル化レベルに影響を与えることが考えられる。

エタノール感受性が見られた HAT 関連遺伝子欠損株 *•ada2* 株、*•hfi1* 株、*•ngg1* 株、エタノール耐性傾向がみられた HDAC 関連遺伝子欠損株 *•sir3* 株、*•sir4* 株を用いて、エタノールストレスによるヒストンアセチル化レベルへの影響を解析した。その結果、エタノール存在下で野生株と *•sir3* 株及び *•sir4* 株においてヒストンアセチル化レベルの上昇が見られた。また、*•ada2* 株、*•hfi1* 株、*•ngg1* 株については、エタノールストレスによるヒストンアセチル化レベルへの大きな影響は見られなかった。これらの結果から、酵母細胞がエタノールストレスに応答するためには、エピジェネティクス関連因子が関わっており、それらの中に HAT 関連遺伝子 *ADA2*、*HFI1*、*NGG1* が含まれる可能性が示唆された。また、*•sir3* 株、*•sir4* 株では野生株と比べて差異はやや小さいもののアセチル化レベルの上昇が見られた。両株は、エタノールに耐性傾向がみられるが、エタノール存在下では野生株よりもアセチル化レベルは低く、さらに、ノンストレス時ではアセチル化レベルは高い可能性が示された。



本研究では、エタノールストレス応答に関わるエピジェネティクス関連因子は多数存在することを見出した。また、それぞれの因子は、複合的に作用していることが推測され、さらにストレス適応と耐性ではその機構が

異なる可能性が示され、ストレス応答に対してエピジェネティクス制御が深く関与していると考えられる。

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 2 件)

- (1) Fujimura S., Yurimoto H., Kurimoto S., Matsufuji Y., Ito T., Hayakawa T., Tomizuka N., Sakai Y., Nakagawa T. Expression level of methanol-inducible peroxisomal proteins and peroxisome morphology are affected by oxygen conditions and mitochondrial respiratory pathway function in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*. FEMS Yeast Research 査読有 Vol. 13. Issue 4. 2013. 359-366.
DOI:10.1111/1567-1364.12040
- (2) Matsuda T., Fujimura S., Suda H., Matsufuji Y., Nakagawa J. Alteration of ethanol tolerance caused by the deficiency in the genes associated with histone deacetylase complex in budding yeast. Biosci Biotechnol Biochem. 査読有 Vol. 75. 2011. 1829-1831
DOI:10.1271/bbb.110232

[学会発表] (計 4 件)

- ① 藤村朱喜、磯貝宜美、齋藤優生、方壁あゆみ、村中梨紗、妙田貴生、西澤信、戸枝一喜、永島俊夫、藤森嶺、中川純一。ワインの香り成分生成に関わる酵母のエピジェネティクス。日本食品科学工学会第 59 回大会。2012 年 8 月。北海道

- ② Fujimura S., Matsuda T., Suda H., Nakagawa J. Epigenetic regulation involved in ethanol stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. The 2012 Yeast Genetics and Molecular Biology Meeting Princeton, July31-August 5, 2012, New jersey, USA.

- ③ 藤村朱喜、磯貝宜美、齋藤優生、方壁あゆみ、村中梨紗、妙田貴生、西澤信、戸枝一喜、大山徹、永島俊夫、藤森嶺、中川純一。ワイン醸造における香り成分生成に関わる酵母の作用に関する解析。日本農芸化学会 2012 年度大会。2012 年 3 月。京都。

- ④ 藤村朱喜、松田宇央、須田宙、松藤淑美、中川純一。Saccharomyces cerevisiae のエタノールストレス応答に関わるエピジェネティクス関連因子。第 63 回生物工学会大会。平成 23 年 9 月。東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤村 朱喜 (FUJIMURA SYUKI)
東京農業大学・生物産業学部・助教
研究者番号：00453803