

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14883

研究課題名(和文) 過酷な環境変動とストレスに曝される葉面C1酵母：生存戦略の分子機構

研究課題名(英文) Molecular mechanism of survival strategy of phyllosphere methylotrophic yeasts exposed to harsh environmental changes and stresses

研究代表者

阪井 康能 (SAKAI, Yasuyoshi)

京都大学・農学研究科・教授

研究者番号：60202082

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)：本研究では、植物から放出されるメタノールを利用して葉上で増殖・生存できるメタノール資化性酵母(C1酵母)を対象とし、C1酵母が環境変動・ストレス変化に適応するための生存戦略の分子機構解明を目的とした。葉上におけるC1酵母ストレス顆粒(SG)形成の生理的意義と葉上で日周変動するメタノール濃度をC1酵母が認識するメカニズムについて解析し、ストレス応答因子Hog1が高温ストレス時に隔離されることによって活性の抑制制御を受けること、細胞膜センサーWscタンパク質が高温ストレス応答とメタノール感知の両者に機能することなどを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to elucidate the molecular mechanism of survival strategy of methylotrophic yeasts which can survive and proliferate on growing plant leaves where cells are exposed to harsh environmental changes and stresses. Physiological role of stress granule (SG) formation and methanol-sensing mechanism in methylotrophic yeasts were investigated. We revealed that sequestration of activated Hog1 proteins in SGs is responsible for downregulation of Hog1 activity under high-temperature stress and that Wsc family proteins function in both the high temperature stress response and in methanol-sensing machinery.

研究分野：応用微生物学

キーワード：ストレス顆粒 メタノール *Candida boidinii* *Pichia pastoris*

## 1. 研究開始当初の背景

地球上の植物葉の表面積は、地球の表面積の2倍に匹敵する  $10^9 \text{ km}^2$  とされ、その表層には膨大な数 ( $10^{26}$  cells 以上) の微生物が棲息していると見積もられている。植物から年間1億トン放出されるメタノールを炭素源として利用する C1 微生物が葉面で優占化しているという事実は、葉面 C1 微生物が植物との相互作用を通じて地球規模での炭素循環に多大な影響を与えていることを示している。葉面は微生物にとって、貧栄養、乾燥、紫外線、活性酸素種など様々なストレスに曝される過酷な環境である。このような過酷な環境に微生物がどのように適応しているのかを理解する、微生物の自然界における生存戦略機構の分子レベルでの解明は、食糧増産技術を開発するためにも重要である。実際に、C1 酵母でペルオキシソーム分解に必要であることを見出した新規遺伝子 *ATG26* が、植物病原菌の感染樹立にも必要なことを明らかにした (Plant Cell 21:1291, 2009)。また、異種タンパク質発現宿主として優れた形質をもつ C1 酵母が、植物から放出されるメタノールを利用して葉上で増殖・生存が可能なこと、そのためにはメタノール代謝やペルオキシソーム生合成、オートファジー、硝酸代謝が必須であること、さらに葉上メタノール濃度が大きく日周変動することをこれまで明らかにした (PLoS ONE 6:e25257, 2011; Sci Rep 5:9719, 2015)。

本研究の特徴の一点目は、植物葉上において、微生物の細胞内動態を直接、調べる点にある。本研究で用いるシロイヌナズナを接種対象とした実験系においては、葉上の酵母細胞を蛍光顕微鏡、定量 PCR により解析することで、微生物の動態・応答を直接的に追跡することが可能である。いわゆる実験室培養条件では得ることの出来ない知見を得ることができ、このような方法で細胞微生物学を行うのは世界でも類を見ない。二点目は、C1 酵母を対象とし、葉上というこれまで誰も検討してこなかった生育環境におけるストレス顆粒の役割を調べる点である。ストレス顆粒は本来、熱や浸透圧などのストレスに誘導される細胞内構造体であるため、ストレスによる顆粒形成を追跡する研究がほとんどであり、栄養源やその他の環境因子が大きく変動する葉上における顆粒形成の意義を調べた研究は今までにない。さらに、C1 酵母を用いたストレス顆粒研究はこれまでになかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、植物から放出されるメタノールを利用して葉上で増殖・生存できるメタノール酵母 (C1 酵母) を対象とし、栄養源、温度、浸透圧などが大きく変動し、紫外線や

活性酸素種など様々なストレスに曝される過酷な環境に棲息する微生物がもつ、環境変動・ストレス変化に適応するための生存戦略の分子機構を探ることを目的に、1) 主にストレス応答時の mRNA の貯蔵・分解や翻訳制御に関与するストレス顆粒形成の葉上での生理的意義と、2) 大きく日周変動する葉上メタノール濃度に応答した遺伝子発現・細胞内動態制御の根幹を担うメタノール認識機構という2つの課題について分子レベルでの解明にチャレンジした。

研究代表者らが確立したユニークな実験系を用いて、植物-微生物間相互作用の過程で C1 酵母が受ける様々なストレスや栄養源などの日周変動を反映した環境適応を対象として以下の項目についての研究を行い、C1 酵母の葉上での生存戦略機構を分子レベルで解明しようとした。具体的には、酵母細胞内においてストレス応答時の mRNA 貯蔵・分解に関わるストレス顆粒をターゲットとし、葉上における C1 酵母のストレス顆粒形成と mRNA 貯蔵、その生理的意義を解明し、さらに、葉上で日周変動するメタノール濃度を C1 酵母がどのように認識し、メタノール代謝関連遺伝子の発現を制御しているか、センサータンパク質とシグナル伝達因子の機能から明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 葉上における C1 酵母ストレス顆粒形成の生理的意義の解明

C1 酵母 *Candida boidinii* のストレス顆粒 (SG) および SG と同様に mRNA の制御に関わる P-body に存在するタンパク質として Edc3、Pat1、Dcp2 (以上 P-body に蓄積)、Pab1、Pbp1 (SG に蓄積) を、*S. cerevisiae* のタンパク質との相同性を指標に *C. boidinii* ドラフトゲノム配列から同定し、各タンパク質と蛍光タンパク質との融合タンパク質発現株をシロイヌナズナ葉上に接種し、葉上におけるストレス顆粒形成の有無、日周変動を調べた。さらに、P-body、SG 両構造体の形成が著しく減少するということが知られている遺伝子破壊株、*EDC3* 破壊株、*PAT1* 破壊株、*EDC3/PAT1* 二重破壊株を作成し、それら変異株の葉上での顆粒の形成を調べた。続いて、それら遺伝子の葉上生育に与える影響を調べるため、各種変異株と野生株に *ACT1* プロモーター支配下において Venus 蛍光タンパク質を発現させ、*VENUS* 遺伝子を指標に定量 PCR、また蛍光顕微鏡観察を行う。さらに、他のストレス応答性転写因子の関与を調べた。

(2) 葉上で日周変動するメタノール濃度を C1 酵母が認識するメカニズムの解明

これまでに、C1 酵母のメタノール誘導性遺伝子発現におけるメタノールからのシグナル伝達に関与する新規因子として見出した細胞膜センサータンパク質 (Wsc ファミリータンパク質) について、センサー機能に必要とされる領域を決定するために、機能ドメインの欠失変異体や部位特異的アミノ酸変異体を作成し、変異型 Wsc 発現株の葉上およびメタノール培地での生育やメタノール誘導性遺伝子発現への影響を調べた。

#### 4. 研究成果

##### (1) 葉上における C1 酵母ストレス顆粒形成の生理的意義の解明

*C. boidinii* のストレス顆粒 (SG) および SG と同様に mRNA の制御に関わる P-body に存在する複数のタンパク質について、蛍光タンパク質との融合タンパク質発現株をシロイヌナズナ葉上に接種し、葉上におけるストレス顆粒形成の有無、日周変動を調べたところ、昼夜に関わらず葉上において P-body の形成が観察されたが、SG 形成は観察されなかった。各タンパク質の遺伝子破壊株を構築し、葉上での顆粒の形成、ならびに葉上での生育能を調べたが、顕著な表現型の違いは認められなかった。

また、本酵母の葉上生育に重要な役割を果たすことが予測されるいくつかのストレス応答因子について、細胞内動態や遺伝子破壊株の表現型解析を進めたところ、浸透圧応答に関わり、真核生物に広く保存されている MAP キナーゼである Hog1 の C1 酵母 *C. boidinii* におけるホモログ CbHog1 が、高温ストレス時にストレス顆粒 (SG) に局在することを見出した。またその局在には CbHog1 の N 末端  $\beta$  シート構造領域が必要かつ十分であり、SG への Hog1 の局在はそのアミノ酸配列によって規定されていることを明らかにした。さらに SG に局在しない変異体や不活性型の変異体を用いた解析により、高温ストレス時の CbHog1 の SG への隔離が、Hog1 活性の抑制制御に寄与していることを明らかにした (論文②)。

##### (2) 葉上で日周変動するメタノール濃度を C1 酵母が認識するメカニズムの解明

*P. pastoris* において、メタノール誘導性遺伝子発現におけるメタノールからのシグナル伝達に関与する細胞膜センサータンパク質 (Wsc ファミリータンパク質) の機能解析を行った。*P. pastoris* には3つの Wsc ファミリータンパク質が存在し、このうち PpWsc1 および PpWsc3 がメタノール感知および、メタノール誘導性遺伝子発現制御に関与することを初めて明らかにするとともに、PpWsc1 が高温ストレスなどの細胞表面ス

レス応答とメタノール感知の両者に機能し、それぞれ異なる刺激として感知してシグナル伝達することを明らかにした (論文③)。

また、Wsc ファミリータンパク質の下流のシグナル伝達には cell wall integrity (CWI) 経路があるが、CWI 経路中のキナーゼタンパク質の変異体を用いた解析により、メタノール誘導性遺伝子発現に関わる転写因子には、CWI 経路の途中から分岐する新規経路によってシグナル伝達されることを示唆する結果が得られた。

これまでの植物-微生物相互作用研究については、主に根圏微生物や植物病原菌を対象としたものがほとんどであったが、葉上で増殖可能な C1 酵母に着目した研究は、新しい観点からの研究アプローチである。得られる結果は、微生物のストレス応答機構に関する新しい知見を与えるだけでなく、植物生長促進効果を持つ C1 微生物に関する研究で得られた知見と統合し、食糧増産に向けた応用研究へと展開できる。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計3件)

- ① 由里本博也、大澤晋、阪井康能、異種タンパク質生産に有用な C1 酵母のメタノールセンシング機構、バイオサイエンスとイノベーション、76, 30-34 (2018). 査読有
- ② Kosuke Shiraishi, Takahiro Hioki, Akari Habata, Hiroya Yurimoto, and Yasuyoshi Sakai. Yeast Hog1 proteins are sequestered in stress granules during high-temperature stress. *J. Cell Sci.*, 131, jcs209114 (2018). 査読有 doi: 10.1242/jcs.209114
- ③ Shin Ohsawa, Hiroya Yurimoto, and Yasuyoshi Sakai. Novel function of Wsc proteins as a methanol-sensing machinery in the yeast *Pichia pastoris*. *Mol. Microbiol.*, 104, 349-363 (2017). 査読有 doi: 10.1111/mmi.13631

[学会発表] (計14件)

- ① 大澤晋、由里本博也、奥公秀、阪井康能、「メタノールセンサー因子 PpWsc1 による CWI 経路依存的なペキソファジー抑制機構の解析」、日本農芸化学会 2018 年 度大会 (2018).
- ② 阪井康能、大澤晋、白石晃将、川口甲介、由里本博也、「メタノールセンシングシグナル伝達の分子機構と植物葉上における C1 酵母のペルオキシソームダイナミクス」、2017 年度生命科学系学会合同年次大

- 会 (ConBio2017) (2017).
- ③ 白石晃将、日置貴大、由里本博也、阪井康能、「酵母 Hog1 のストレス顆粒への隔離機構とその生理機能」、第 50 回酵母遺伝学フォーラム研究報告会 (2017).
- ④ Shin Ohsawa, Hiroya Yurimoto, and Yasuyoshi Sakai. "Function of Wsc family proteins as a methanol-sensing machinery in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*", 28th International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology (2017).
- ⑤ 大澤晋、由里本博也、阪井康能、「酵母メタノール誘導性遺伝子発現のシグナル伝達経路の解析」、日本農芸化学会 2017 年度大会 (2017).
- ⑥ 阪井康能、「植物の葉上における C1 酵母の生存戦略とそれを支える分子細胞機能」、第 82 回酵母研究会 (2017).
- ⑦ 阪井康能、「メタノール資化性酵母の利用を出発点にした分子細胞生物学の発展」、大阪大学工学研究科酵母リソース工学寄附講座成果報告シンポジウム「メタノール資化性酵母研究の展望」(2017).
- ⑧ Kosuke Shiraishi, Takahiro Hioki, Hiroya Yurimoto, and Yasuyoshi Sakai. "Intracellular dynamics of Hog1 in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*", 14th International Congress on Yeasts (2016).
- ⑨ Shin Ohsawa, Hiroya Yurimoto, and Yasuyoshi Sakai. "Regulation of methanol-inducible gene expression by Wsc family proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*" 14th International Congress on Yeasts (2016).
- ⑩ Hiroya Yurimoto and Yasuyoshi Sakai, "Transcriptional regulation of methanol-regulated genes in the methylotrophic yeast", 14th International Congress on Yeasts (2016).
- ⑪ 大澤晋、由里本博也、阪井康能、「cell wall integrity (CWI) に関わる Wsc タンパク質のメタノールセンシング機構」、酵母遺伝学フォーラム第 49 回研究報告会 (2016).
- ⑫ 由里本博也、日置貴大、白石晃将、阪井康能、「メタノール資化性酵母 *Candida*

*boidinii* における Hog1 の細胞内動態」、酵母遺伝学フォーラム第 49 回研究報告会 (2016).

- ⑬ Kosuke Shiraishi, Takahiro Hioki, Hiroya Yurimoto, and Yasuyoshi Sakai. "Formation and function of mRNP granules in the methylotrophic yeast growing on methanol utilizing environment", Gordon Research Conference on Molecular Basis of Microbial One-Carbon Metabolism (2016).
- ⑭ Shin Ohsawa, Hiroya Yurimoto, and Yasuyoshi Sakai. "Molecular machinery of methanol sensing in methylotrophic yeast", Gordon Research Conference on Molecular Basis of Microbial One-Carbon Metabolism (2016).

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

阪井 康能 (SAKAI, Yasuyoshi)  
 京都大学・大学院農学研究科・教授  
 研究者番号：60202082

### (2) 連携研究者

由里本 博也 (YURIMOTO, Hiroya)  
 京都大学・大学院農学研究科・准教授  
 研究者番号：00283648

奥 公秀 (OKU, Masahide)  
 京都大学・大学院農学研究科・助教  
 研究者番号：10511230