

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：16K15089

研究課題名(和文)メタノール酵母の高レベル転写能を利用するメタノールからの機能性RNA生産

研究課題名(英文)Production of functional RNA from methanol using high transcription potential of methylotrophic yeasts

研究代表者

由里本 博也 (YURIMOTO, Hiroya)

京都大学・農学研究科・准教授

研究者番号：00283648

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)：メタノールによる強力な遺伝子発現能とメタノールを炭素源とする高密度培養法が確立されているメタノール酵母を生産宿主として用い、メタノール酵母における機能性RNAの微生物生産手法の開発を最終目的とし、mRNAの貯蔵・分解に関わるRNA顆粒(P-body, SG)の形成と細胞内動態解析、メタノール酵母で高度に転写されるmRNAの細胞内動態解析を行った。P-bodyは様々なストレス条件下に加え、メタノール培養時にもその形成が認められたのに対し、SGは高温ストレス時にのみその形成が認められた。また高温ストレス時には、ストレス応答性制御因子Hog1がSGに共局在することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：For the purpose of development of production system for functional RNA from methanol using methylotrophic yeasts which have strong methanol-inducible gene expression and can grow at high cell density, we investigated formation and dynamics of RNA granules, P-bodies and stress granules (SGs), which are involved in storage and degradation of mRNA. We also analyzed intracellular dynamics of mRNAs which are highly transcribed during growth on methanol. Formation of P-bodies was observed under various stress conditions and during growth on methanol, but SGs were observed only under high-temperature condition. Furthermore, we revealed that a stress responsive regulator Hog1 is recruited to SGs under high-temperature condition.

研究分野：応用微生物学

キーワード：メタノール酵母 RNA顆粒 mRNA

1. 研究開始当初の背景

機能性 non-coding RNA (機能性 RNA) は、タンパク質をコードしない RNA の総称であり、近年、発生や分化における遺伝子発現調節を担う役割が明らかにされ、がん治療や再生医療における核酸医薬としても注目されている。20 塩基程度の micro-RNA (miRNA) が主な対象となっており、化学合成によって生産されるが、微生物による生産も検討されつつある。一方、機能性 RNA の中には、mRNA 型のものがあり、数百から数千塩基のものがあることが明らかとなってきたが、このような mRNA 型の機能性 RNA を化学合成で生産するには、時間とコストがかかり、安定性も問題とるため、低コストで簡便な生産技術の開発が望まれている。微生物による機能性 RNA 生産を実現するためには、高い転写量と転写された RNA の簡便な回収方法を兼ね備えた生産株を構築しなければならない。本研究は、メタノールによって強力に誘導される転写制御系をもつメタノール資化性酵母 (メタノール酵母) を用いることにより、炭素-炭素結合を持たない C1 化合物であるメタノールから、生体高分子である機能性 RNA を合成的に生産する手法を新たに開発できるという着想に基づいている。

メタノール酵母は、乾燥重量 100 g/L を超える程の高密度培養が可能のため、安価で高純度に供給可能なメタノールからの有用物質生産宿主として優れており、特に非常に強力なメタノール誘導性プロモーターを利用した異種タンパク質の高生産宿主として広く利用されている。申請者らはこれまでに、メタノール誘導性遺伝子の転写制御機構研究を行うとともに、有用タンパク質のオルガネラ内生産や高分泌発現などに成功してきた。

RNA 顆粒は、真核生物の細胞内に見られる構造体で、非翻訳状態にある mRNA と、その貯蔵、分解および翻訳制御に関わるタンパク質の複合体である。代表的なものに P-body と Stress Granule (SG) があり、酵母においては *Saccharomyces cerevisiae* を用いた研究が進んでいる。これら RNA 顆粒は、mRNA の翻訳、分解、細胞内局在の制御において重要な役割を果たしており、細胞の生育環境にตอบสนองしてその形成や細胞内動態が制御されている。一方、メタノール酵母ではメタノール代謝酵素遺伝子 *AOD1* や *DAS1* の発現は、メタノールによって強力に誘導される一方でグルコースにより抑制され、メタノール濃度が変動する自然環境中でだけでなく有用タンパク質生産プロセスにおいても、その mRNA は RNA 顆粒が関与する機構によって何らかの制御を受けると考えられるが、これまでにメタノール酵母における RNA 顆粒に関する研究は全く報告されていない。

2. 研究の目的

本研究では、メタノールによる強力な遺伝子発現能とメタノールを炭素源とする高密度培養法が確立されているメタノール酵母を生産宿主として用い、炭素-炭素結合を持たない C1 化合物であるメタノールから、生体高分子である機能性 RNA を合成的に生産する方法の確立にチャレンジするために必要な基盤的知見として、メタノール酵母においてこれまで明らかにされてこなかった、mRNA の貯蔵・分解や翻訳制御に関わる RNA 顆粒と呼ばれる細胞内構造体、および高レベルに転写される mRNA の細胞内動態を解析することを目的とした。メタノール酵母における mRNA 型機能性 RNA の微生物生産手法の開発を最終目的とし、本研究期間内では、(1) mRNA の貯蔵・分解に関わる RNA 顆粒の形成と細胞内動態解析、(2) メタノール酵母で高度に転写される mRNA の細胞内動態解析を行った。

3. 研究の方法

(1) メタノール酵母 RNA 顆粒の細胞内動態解析

メタノール酵母において、mRNA の貯蔵・分解に関わる RNA 顆粒 (P-body および SG) の形成と細胞内動態を解析するため、まず RNA 顆粒に含まれるタンパク質と蛍光タンパク質の融合タンパク質を発現する株を作成し、P-body および SG の可視化、およびその動態解析手法を確立した。様々なストレス条件 (飢餓ストレス、酸化ストレス、浸透圧ストレス)、培養条件 (グルコース、メタノール) での各タンパク質の細胞内局在を観察し、どのような条件で P-body や SG が形成されるのかを調べた。各構成タンパク質の遺伝子破壊株を作成し、各種ストレスおよび培養条件での遺伝子破壊株における RNA 顆粒の形成の有無や、各種培養条件での生育度および遺伝子発現制御に及ぼす影響を調べた。

(2) メタノール酵母において高度に転写される mRNA の細胞内動態解析

メタノール酵母において、メタノール培養時に高度に転写される mRNA として、*AOD1* を対象とし、培地シフト時の mRNA 量の挙動を野生株と遺伝子破壊株で比較するため、*AOD1* mRNA の非コード領域に特異的な配列を付加し、その配列を認識するタンパク質と蛍光タンパク質の融合タンパク質を発現するメタノール酵母を構築することで、*AOD1* mRNA の可視化手法を確立した。

4. 研究成果

(1) メタノール酵母 RNA 顆粒の細胞内動態解析

メタノール酵母において、mRNA の貯蔵・

分解に関わる RNA 顆粒 (P-body および SG) の形成と細胞内動態を解析するため、P-body のマーカータンパク質として Edc3、SG のマーカータンパク質として Pab1 および Pbp1 を用い、それぞれ蛍光タンパク質との融合タンパク質として発現する株を用い、各種ストレス条件下での各タンパク質の細胞内局在を観察した。その結果、P-body は様々なストレス条件下に加え、メタノール培養時にもその形成が認められたのに対し、SG は高温ストレス時にのみその形成が認められた。また高温ストレス時には、ストレス応答性制御因子 Hog1 が SG に共局在することを明らかにした (論文②)。

(2) メタノール酵母において高度に転写される mRNA の細胞内動態解析

メタノール培養時に高度に転写される AOD1 遺伝子および DAS1 遺伝子について、野生株と転写因子やシグナル伝達因子の遺伝子破壊株を用い、グルコース培養からメタノール培養へのシフト、あるいはメタノール培養からグルコース培養へのシフトで、それぞれの mRNA 量がどのように変動するかを定量的 RT-PCR により解析した。メタノール誘導性遺伝子発現に関わる転写因子やシグナル伝達因子の遺伝子破壊株では、mRNA 量が野生株に比べて顕著に低下したが (論文③, ⑤)、P-body および SG の各構成タンパク質の遺伝子破壊株においては、野生株との明確な違いは認められなかった。

メタノール培養時に高度に転写される AOD1 遺伝子および DAS1 遺伝子の mRNA 可視化については、AOD1 や DAS1 の mRNA が P-body あるいは SG による制御を受けるかどうかを検証するため、*in situ* mRNA ハイブリダイゼーションによる mRNA の可視化解析を進めたが、解析手法の確立には至らなかった。そこで、特定のタンパク質によって認識される mRNA 配列を各遺伝子に付加し、その配列を認識するタンパク質を蛍光タンパク質との融合タンパク質として発現するメタノール酵母株を構築することにより、その可視化に成功した。今後、メタノール誘導時やその他の培地への変換時の mRNA 動態の解析を進めて行く。この可視化技術の確立が難航したため、当初計画していた機能性 RNA 生産条件の検討には至らなかった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 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ンダストリー、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
- ④ 由里本博也、メタノール酵母による異種タンパク質生産: 高生産のための技術戦略、SUNATEC e-Magazine, 126, (2016). 査読無
<http://www.mac.or.jp/mail/160901/02.shtml>
- ⑤ Saori Oda, Hiroya Yurimoto, Nobuhisa Nitta, and Yasuyoshi Sakai. The unique C-terminal region of Hap3 is required for methanol-regulated gene expression in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*. Microbiology, 162, 898-907 (2016). 査読有
doi: 10.1099/mic0.000275

[学会発表] (計 18 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 由里本博也、池田竜太、小田沙織、阪井康能、「*Candida boidinii* Hap 複合体構成因子の核局在化機構」第 50 回酵母遺伝学フォーラム研究報告会 (2017).
- ④ 井上紘一、小田沙織、由里本博也、阪井康能、「メタノール誘導性転写活性化因子 Mpp1 の発現制御機構」、第 50 回酵母遺伝学フォーラム研究報告会 (2017).
- ⑤ 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).
- ⑥ Hiroya Yurimoto, Ryouta Ikeda, Saori Oda, and Yasuyoshi Sakai. "Nuclear

- translocation of Hap complex components required for methanol-regulated gene expression in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*", 28th International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology (2017).
- ⑦ 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).
- ⑧ 由里本博也、「メタノールを食べる酵母のユニークな代謝生理機能とその利用」、静岡大学工学部第 3 回バイオ応用工学特別セミナー「ビールと酵母について考えてみよう」(2017).
- ⑨ 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 年大会 (2017).
- ⑩ 池田竜太、小田沙織、由里本博也、阪井康能、「メチロトロフ酵母 *Candida boidinii* における Hap 複合体構成因子の核局在メカニズム」、日本農芸化学会関西支部第 498 回講演会 (2017).
- ⑪ Hiroya Yurimoto and Yasuyoshi Sakai, "Transcriptional regulation of methanol-regulated genes in the methylotrophic yeast", 14th International Congress on Yeasts (2016).
- ⑫ 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).
- ⑬ 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).
- ⑭ 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).
- ⑮ 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).
- ⑯ Hiroya Yurimoto. "Methanol sensing and signaling pathway in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*", Gordon Research Conference on Molecular Basis of Microbial One-Carbon Metabolism (2016).
- ⑰ 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).
- ⑱ 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

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

(2) 連携研究者

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