

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：14303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580113

研究課題名(和文) エタノールに対する応答過程および醸造過程における酵母細胞内 mRNA 動態の解析

研究課題名(英文) Study on yeast mRNA flux in ethanol stress response and during the process of alcoholic fermentation

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000 円、(間接経費) 1,260,000 円

研究成果の概要(和文)：種々の醸造関連ストレス条件下で、不要不急の mRNA の翻訳が抑制されて細胞質中の P-body や stress granule (SG) に隔離されることを明らかにした。また、ストレスへの対処に必要なとされる mRNA の優先的・効率的な翻訳に P-body や SG が大きく寄与することを見出した。さらに、エタノールストレス条件下でも優先的に翻訳される mRNA を同定し、その遺伝子の発現制御機構を解析した。清酒醸造やワインのマロラクティック発酵、バイオエタノール発酵工程の乳酸菌汚染なども深く関連する乳酸ストレスが翻訳抑制と P-body の形成を速やかかつ可逆的に誘導する一方で、SG の形成は誘導しないことを見出した。

研究成果の概要(英文)：We found that unnecessary mRNA is not translated and segregated in P-bodies or stress granules (SGs) in yeast cells under stress conditions of alcoholic fermentation. We also demonstrated several data that indicate the contribution of P-bodies and SGs to effective and selective translation of mRNAs that are really required for the rapid stress response. Additionally, we isolated and characterized several mRNA that were preferentially translated under ethanol stress conditions. Furthermore, we verified that lactic acid can induce P-body formation and translational repression but not SG formation. Effects of acetic acid and propionic acid on mRNP granule formation were different from that of lactic acid.

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：P-body stress granule mRNA flux ポリソーム解析 ストレス 醸造 酵母

1. 研究開始当初の背景

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* およびその近縁種は、日本酒やワインをはじめとする酒類醸造に欠かすことができないだけでなく、近年はバイオマスからのバイオエタノール製造にも活躍する重要な産業微生物のひとつである。出芽酵母はアルコール発酵により自身でエタノールを作り出すだけあって、他の生物種に比べ高いエタノール耐性をもつ。そのため、エタノールストレスに対する酵母の応答機構や耐性獲得機構については古くから関心が払われてきたが、いまだ十分にメカニズムが解明されたとはいえない状況にある。

ゲノム DNA 配列解読完了後、DNA マイクロアレイなどによってエタノールストレス条件下における酵母全遺伝子を対象とした転写レベルの網羅的解析が盛んにおこなわれてきたが、エタノールに対する耐性機構を解明する上で決定的な手掛かりは得られていない。その理由として、エタノールストレス条件下の mRNA レベルが翻訳産物レベルに反映されないことが一因と考えられる。

真核生物である酵母は、転写の場(核)と翻訳の場(細胞質)が核膜によって隔てられており、mRNA は核内での様々なプロセシングや核外への輸送を経てからようやく翻訳される。そのため、mRNA レベルの変動がタンパク質レベルに必ずしも反映されず、単純に mRNA レベルの増減だけでストレス応答を論じると、誤った理解や解釈を導く危険性を孕んでいる。加えて、6%以上のエタノールストレス条件下では、mRNA の核外輸送が選択的におこなわれるとともに、細胞質側においても mRNA の隔離や翻訳制御が起こることを本申請者らは報告している。そのため、転写レベルに重点を置く従来の解析手法では、エタノールへの応答機構や耐性獲得機構の本質に迫る

ことは困難だと考えられる。そこで本研究では、転写から翻訳・分解に至る一連の mRNA の流れ(mRNA flux)でストレス応答をとらえ直し、新たな視点から考察することにより、酵母のエタノール応答機構や耐性獲得機構の本質に迫ろうと研究を行った。

2. 研究の目的

酒類醸造やバイオエタノール製造において重要な出芽酵母はエタノールストレスに対して高い耐性を持つ。これまで、転写段階を中心に耐性獲得機構の解明に向けた取り組みが多数おこなわれてきたが、詳しいメカニズムや実際の醸造過程における酵母の生理は十分に解明されていない。

そこで本研究では、これまでになく視点から、酵母のエタノール応答機構や耐性獲得機構の解明に取り組む。mRNA の選択的核外輸送や細胞質構造体における mRNA の隔離・分解・翻訳制御といった転写以降のステップに焦点を当てて解析をおこない、従来の転写段階中心の解析からは見えてこなかったエタノール応答機構の本質に迫ることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、エタノールストレス条件下の細胞質内で mRNA の隔離や分解、翻訳制御において重要な役割を担う Processing body (P-body)とストレス顆粒(Stress Granule, SG)に着目した。これらの構造体に運び込まれる mRNA 種の解析、反対にエタノールストレス条件下でこれらの構造体に隔離されず、ポリソームを形成して優先的に翻訳される mRNA 種の同定などを通じて、エタノールに対する応答機構・耐性獲得機構に関する新たな知見の収集に取り組んだ。

P-body および SG に隔離される mRNA 種については、ストレス除去後の回復段階や長時間のエタノールストレス処理に適応し

耐性を獲得する際に、リボソームへ再輸送され翻訳されるのか？あるいは P-body の構成因子であるヌクレアーゼにより分解されるのか？それぞれ検証をおこない、ストレスからの回復や耐性獲得段階で必要とされる遺伝子なのか否かを検討した。また、これらの遺伝子の転写段階や核外輸送段階の状況についても検討した。

4 . 研究成果

種々の醸造関連ストレス条件下で、不要不急の mRNA の翻訳が抑制されて細胞質中の P-body や stress granule (SG)に隔離されることを明らかにした。また、ストレスへの対処に必要とされる mRNA の優先的・効率的な翻訳に P-body や SG が大きく寄与することを見出した。

さらに、エタノールストレス条件下でも優先的に翻訳される mRNA を同定し、その遺伝子の発現制御機構を解析した。

そのほか、清酒醸造やワインのマロラクティック発酵、バイオエタノール発酵工程の乳酸菌汚染などとも深く関連する乳酸ストレスが翻訳抑制と P-body の形成を速やかかつ可逆的に誘導する一方で、SG の形成は誘導しないことを見出した。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. Y. Yamamoto and S. Izawa (2013) Adaptive response in stress granule formation and bulk translational repression upon a combined stress of mild heat shock and mild ethanol stress in yeast. *Genes Cells*, **18**(11), 974-984.
2. A. Iwaki, S. Ohnuki, Y. Suga, S. Izawa and Y. Ohya (2013) Vanillin inhibits translation and Induces messenger ribonucleoprotein (mRNP) granule formation in *Saccharomyces cerevisiae*: application and validation of

high-content, image-based profiling. *PLoS ONE*, **8**(4), e61748.

3. A. Iwaki, T. Kawai, Y. Yamamoto, and S. Izawa (2013) Biomass conversion inhibitors, furfural and 5-hydroxymethylfurfural, induce the formation of mRNP granules and attenuate translation activity in yeast. *Appl. Environ. Microbiol.*, **79**(5), 1661-1667.
4. A. Iwaki and S. Izawa (2012) Acidic stress induces the formation of P-bodies but not stress granules with mild attenuation of bulk translation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J.*, **446**(2), 225-233.

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 井沢 真吾 「mRNA fluxから見た酵母のストレス耐性と発酵能の改良」、日本農芸化学会2014年大会、2014年3月30日、明治大学.
2. 井沢 真吾 「リグノセルロース系バイオマス由来発酵阻害剤に対する酵母のストレス応答」、日本化学工学会第45回秋季大会、2013年9月18日、岡山大学.
3. Trinh TM Nguyen、河合孝朗、岩城理、井沢 真吾 「木質バイオマス由来発酵阻害物質バニリンによる酸化的ストレスの惹起と酵母ミトコンドリアの断片化」、第65回日本生物工学会大会、2013年9月19日、広島国際会議場.

〔図書〕(計 1 件)

4. 井沢 真吾 分担執筆 (2013) 第4章 RNAの輸送・代謝制御 p51-65 原島 俊・高木博史 編「酵母の生命科学と生物工学 産業応用から基礎科学へ」化学同人、京都.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

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：