

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450099

研究課題名(和文) 酵母の転写因子変異により獲得した有機溶媒耐性の耐性メカニズム解析

研究課題名(英文) Analysis of organic solvent tolerant mechanism triggered by mutation of transcription factor in yeast

研究代表者

黒田 浩一 (Kuroda, Kouichi)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30432339

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は、連続培養中に得られた有機溶媒耐性酵母KK-211株を解析し、転写因子Pdr1pの1アミノ酸変異が重要性を発見してきた。本研究ではPdr1p変異体において転写誘導される細胞膜、細胞壁タンパク質群の中で耐性を与える直接的原因となるものを同定し、親水性・疎水性という性質の違いによって関与するものが異なることを明らかにした。またPdr1pの相同遺伝子であるPdr3pに着目し、有機溶媒ストレスに対するシグナル伝達について調べたところ、有機溶媒ストレス応答にはPdr3pが関与していることを明らかにした。さらに、そのシグナルはミトコンドリアを介してPdr3pに伝達されるという機構を提唱した。

研究成果の概要(英文)：The applicant have found that one point mutation of transcription factor Pdr1p is important for organic-solvent tolerance by analyzing organic-solvent-tolerant yeast strain KK-211 that was isolated through serial culture. In this study, the applicant identified the proteins that cause directly organic-solvent-tolerance among the upregulated cell membrane and cell wall proteins in Pdr1p mutant. In addition, it was found that the identified proteins differed depending on the features of hydrophobic or hydrophilic organic solvent. By analyzing the involvement of Pdr3p, that is a paralog of Pdr1p, in the signal transduction of organic-solvent stress, Pdr3p was demonstrated to play a role in the signal transduction. Furthermore, the applicant proposed the mechanism in which signal of organic-solvent stress was transmitted to Pdr3p via mitochondria.

研究分野：応用生化学

キーワード：有機溶媒耐性 転写因子 ABCトランスポーター 細胞壁タンパク質 パン酵母

1. 研究開始当初の背景

微生物などを生体触媒として用いる物質生産(バイオプロダクション)は、環境にやさしい技術として期待が高まりつつある。しかし、これまで工業的規模で行われてきたバイオプロダクションでは親水性物質を対象としたものがほとんどであり、疎水性物質の生産は困難であった。疎水性の基質や生成物は培地等にはほとんど溶けず、水/有機溶媒二層系など有機溶媒存在下で生体触媒反応を行うことが多いため、有機溶媒の毒性による生育阻害を受け、最終的な生産効率低下の一因となっている。有機溶媒存在下での生体触媒反応を促進するため、生体触媒として用いる微生物に有機溶媒耐性を付与することが重要な技術課題として位置づけられている。

原核生物では、高い毒性をもつトルエンなどに耐性を示す *E. coli* や *Pseudomonas* 属などグラム陰性細菌をはじめ、古細菌や外膜を持たず有機溶媒に弱いと考えられてきたグラム陰性菌でも有機溶媒耐性株が単離され、有機溶媒中や水/有機溶媒二層系において有用物質生産への試みがされつつある。しかし、真核生物については有機溶媒耐性株の単離自体、報告がほとんどなく、これまでに細胞内の有機溶媒を排出する膜トランスポーターの存在や、細胞膜脂質の組成や透過性の変化、小分子の輸送を行う細胞膜孔(ポーリン)の減少などが提起されているものの、真核生物の詳細な有機溶媒耐性機構についてはほとんどが不明である。申請者の所属する研究室では有機溶媒(イソオクタン)存在下でドライイーストを長期連続培養している過程で、真核生物の中では最初の例である有機溶媒耐性酵母 *Saccharomyces cerevisiae* KK-211 株を単離した。KK-211 株は野生株では生育することのできないイソオクタン、ノナン、オクタン、ジフェニルエーテルなどの有機溶媒存在下においても生育可能である。申請者はこのような KK-211 株の有機溶媒耐性機構を分子レベルで明らかにするため、mRNA Differential Display (DD-PCR)法やトランスクリプトーム解析を行い、耐性に関わる因子の検出・同定を試みてきた。通常の培地で生育させた KK-211 株と DY-1 株とで全遺伝子の転写レベルを比較した結果、KK-211 株において ABC トランスポーターや各種細胞表面タンパク質をコードする遺伝子の転写上昇が見られた。これらの遺伝子群に共通の特徴を調べたところ、プロモーター領域中に Pleiotropic Drug Response Element (PDRE) という転写因子 Pdr1p の認識配列の存在が見られた。そのため、PDR1 遺伝子に着目し、その塩基配列を調べたところ、821 番目のアルギニンからセリンへの変異 (R821S) を持つことが明らかとなり、Pdr1p の 1 アミノ酸変異 (R821S) が有機溶媒耐性の原因であることを突き止めた。

2. 研究の目的

有機溶媒耐性酵母 KK-211 株において Pdr1p の 1 アミノ酸変異が重要であることを明らかにしてきたが、この株で誘導されているタンパク質のうち有機溶媒耐性に直接関与するタンパク質については明らかでない。KK-211 株で変異型 Pdr1p により制御されている遺伝子だけでなく、プロモーターに PDRE を持たないにもかかわらず転写レベルの上昇した遺伝子群の中から実際に耐性に関わるものを同定するとともに、耐性を示す有機溶媒の種類を調べることによって耐性機構の解明を試みる。また、変異型 Pdr1p による転写活性化の分子機構は全く分かっていない。したがって、これまでの研究成果を基に、Pdr1p がどのように活性化し、その下流で制御される遺伝子がどのように選択されるか、そして選択されたもののうちどれが有機溶媒耐性に関与しているかを調べることによって、Pdr1p による転写制御機構の全体像解明へと展開する。

3. 研究の方法

(1) 有機溶媒耐性酵母 KK-211 株で転写量が上昇した遺伝子群の中で、実際に有機溶媒耐性に関与している遺伝子の同定を行った。これまでの研究で、真核生物の有機溶媒耐性に関与する因子として特定されたのは転写因子 Pdr1p のみであった。有機溶媒耐性酵母 KK-211 株では、4 つの ABC トランスポーターをコードする遺伝子 (*PDR10*, *SNQ2*, *YOR1*, *PDR15*)、及び 6 つの細胞壁タンパク質をコードする遺伝子 (*TIP1*, *WSC3*, *CIS3*, *PRY3*, *PIR1*, *YNL190W*) の転写量が上昇していた。そこで、転写量が上昇した遺伝子群を実験室酵母で過剰発現させ、有機溶媒を添加した液体培地および固体培地における生育を測定することにより作製した株の有機溶媒耐性を評価した。用いる疎水性有機溶媒として *n*-デカン、*n*-ノナン、イソオクタンを、親水性有機溶媒としてジメチルスルホキシド (DMSO) を使用した。また、PDR 経路の代表的な転写因子である Pdr1p と Pdr3p の多剤耐性型変異体や *PDR5* 過剰発現株、排出機能を失った *PDR5* 変異体過剰発現株をそれぞれ作製し、同様に有機溶媒耐性を調べた。

(2) 有機溶媒ストレスに対してどのように転写応答しているかを調べるために、有機溶媒存在下で生育させた酵母から mRNA を抽出し、リアルタイム PCR によって各ターゲット遺伝子について転写変動を調べた。

4. 研究成果

(1) 過剰発現株の有機溶媒耐性試験の結果、ABC トランスポーター群のうち Pdr10p, Snq2p, Yor1p が有機溶媒耐性に関与しており、

特に、Pdr10p は疎水性有機溶媒に、Yor1p は親水性有機溶媒に特異的に関与していることが明らかになった。さらに細胞壁タンパク質群のうち、Wsc3p, Pry3p, Ynl190wp は疎水性・親水性有機溶媒の両方に関与していることが明らかになった。Wsc3p は細胞壁完全性の維持に関わるストレスセンサーであり、細胞壁の強化に関わっている可能性があった。Ynl190wp は Gly 含量が 6% より高く、hydrophilicity index 1.0 以上のヒドロフィリンであるため、細胞壁の親水化に関与していることが考えられる。

(2) 酵母が有機溶媒に接触した際に受ける有機溶媒ストレスへの応答経路を調べた。有機溶媒耐性への関与が明らかになった ABC トランスポーター Pdr10p, Snq2p, Yor1p や転写因子 Pdr1p は多剤耐性に関わる PDR 経路の構成因子であることから、PDR 経路の有機溶媒耐性への関与を調べた。出芽酵母の PDR 経路では、転写因子 Pdr1p、及び相同タンパク質 Pdr3p が薬剤排出ポンプをコードする遺伝子の転写を制御している。転写因子 Pdr1p, Pdr3p は二量体を形成し、プロモーター上の Pleiotropic drug response element (PDRE) という配列を認識して常時結合している。細胞が薬剤にさらされると、Pdr1p, Pdr3p は薬剤と直接相互作用し、下流の遺伝子の転写量を上昇させる。PDR 経路の代表的な転写因子である Pdr1p と Pdr3p の多剤耐性型変異体を作製し、有機溶媒耐性を調べたところ、有機溶媒耐性を示した。次に、PDR 経路で中心的な役割の薬剤排出ポンプ Pdr5p の過剰発現株を作製したところ有機溶媒耐性を有した。一方で薬剤排出活性を失った変異型 Pdr5p を過剰発現させた株では耐性の向上が見られなかった。従って、Pdr5p は有機溶媒を細胞外に排出することで、有機溶媒耐性を引き起こす機能を持つと推測できる。さらに、野生株の酵母において、有機溶媒ストレスに応答して PDR5 の転写量が上昇することも示し、野生株の有機溶媒ストレスへの対処にも Pdr5p が関わっていることが分かった。以上の結果より、有機溶媒ストレスへの応答には多剤耐性に関わる PDR 経路が関与することを明らかにした。

次に、有機溶媒に応答して WSC3, YNL190W を誘導発現する経路を探索した。まず、WSC3, YNL190W の転写量は有機溶媒に応答して上昇することを示した。さらに、WSC3, YNL190W の転写が、PDR5 と同様に PDR 経路に制御される可能性を調べた。PDR 経路の転写因子の二重破壊株 *pdr1Δpdr3Δ* においては有機溶媒による転写誘導は維持されており、さらに転写因子 Pdr1p 及び Pdr3p の多剤耐性型変異体において WSC3 と YNL190W の転写量は上昇しなかったことから、WSC3 と YNL190W は、PDR 経路の制御下にはないことが分かった。破壊株 *wsc3Δ, ynl190wΔ* は野生株と比較して薬剤耐性が低下しないこと

からも、WSC3 と YNL190W は多剤耐性には関与しないと結論づけた。

さらに、Wsc3p が細胞壁の強度維持に関わる cell wall integrity (CWI) 経路の細胞壁センサーであることから、CWI 経路が関与する可能性を調べた。CWI 経路の欠損株における有機溶媒による転写量の変動を調べ、CWI 経路の中でも特に細胞壁センサー Wsc3p, Mid2p と転写因子 Swi4p, Swi6p が関与していることを示した。以上の結果より、有機溶媒ストレスへの応答には少なくとも 2 つの経路、すなわち多剤耐性と共通の PDR 経路と、有機溶媒耐性特有の細胞壁を誘導する CWI 経路が関与することを明らかにした。

(3) 転写因子 Pdr1p と Pdr3p は遺伝子重複から生じた相同遺伝子であり、多剤耐性において両者は重複した機能を持っている。どちらも PDR 経路の転写因子であり、薬剤に応答して下流の薬剤排出ポンプの発現を上昇させる。しかし今回、有機溶媒ストレスへの応答に対しては、Pdr1p と Pdr3p の作用に違いがあることを以下のように見出した。

pdr1Δ と *pdr3Δ* の欠損株では、有機溶媒に応答した時の PDR5 の転写量の変動が異なっていた。薬剤ストレスとしてシクロヘキシミド (CHX) を添加して 1 時間後では、従来の報告通り *pdr1Δ* と *pdr3Δ* 共に PDR5 の転写量は 2 倍近く上昇していた。一方で、有機溶媒ストレスとしてイソオクタンを添加して 1 時間後、*pdr1Δ* では野生株の場合 (2 倍) と比較して PDR5 の転写量が大きく上昇し (約 7 倍)、逆に *pdr3Δ* では上昇しなかった。この結果より、有機溶媒ストレスへの応答に関して、Pdr3p は PDR5 の転写活性化に対して促進的な作用があり、逆に Pdr1p は抑制作用があると考えた。そのため実際に野生株の有機溶媒ストレスへの応答に直接関係しているのは Pdr3p であると推測した。Pdr1p と Pdr3p は同一の認識配列 PDRE を持ち、PDRE 上で競合していると予想されている。そのため、Pdr1p がない条件では Pdr3p が結合する確率が高まるため、より Pdr3p による制御が起こりやすくなる可能性がある。最初に単離された有機溶媒耐性株 KK-211 では Pdr1p に変異が入っていたが、Pdr1p と Pdr3p は同一の認識配列 PDRE を持ち、転写制御する遺伝子も重複しているため、結果的に有機溶媒耐性の獲得につながったと考えられる。

Pdr1p は関与しないが Pdr3p は関与していることが分かっている経路の一つとして、ミトコンドリアの損傷による PDR5 の転写活性化がある。ミトコンドリア損傷のシグナルに関与する因子の欠損株を用いて PDR5 の有機溶媒による転写量の変動を調べてみると、*lge1Δ, psd1Δ* の破壊株で PDR5 の転写誘導に変化が見られた。以上の結果より、有機溶媒はミトコンドリアに影響を与え、ミトコンドリア損傷のシグナル経路を通して Pdr3p に情報が伝

達され、PDR5 の転写量が活性化される可能性がある (図 1)。

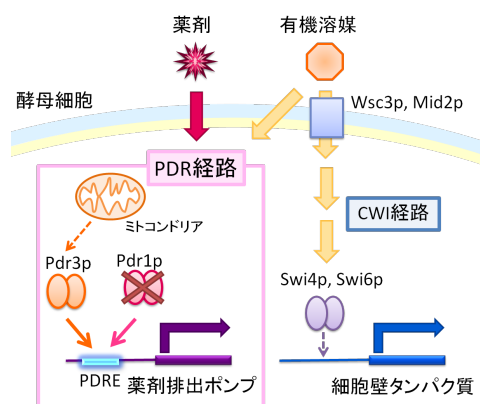


図 1 有機溶媒ストレス応答経路

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 6 件)

Nao Nishida-Aoki, Hitoshi Mori, Kouichi Kuroda, Mitsuyoshi Ueda, Activation of the mitochondrial signaling pathway in response to organic solvent stress in yeast, *Current Genetics*, 査読有, 61, 153-164 (2015)
DOI: 10.1007/s00294-014-0463-9

里村淳, 黒田浩一, 植田充美, 高効率物質生産に向けた転写因子デザインによるストレス耐性工学, *日本生物工学会誌*, 査読無, 93, 539-541 (2015)

Atsushi Satomura, Kouichi Kuroda, Mitsuyoshi Ueda, Environmental stress tolerance engineering by modification of cell surface and transcription factor in *Saccharomyces cerevisiae*, *Current Environmental Engineering*, 査読有, 1, 149-156 (2014),
DOI:10.2174/221271780103150522154913#sthash.zmliWLKj.dpuf

Nao Nishida, Dongyu Jing, Kouichi Kuroda, Mitsuyoshi Ueda, Activation of signaling pathways related to cell wall integrity and multidrug resistance by organic solvent in *Saccharomyces cerevisiae*, *Current Genetics*, 査読有, 60, 149-162 (2014)
DOI: 10.1007/s00294-013-0419-5

Nao Nishida, Naoki Ozato, Kouichi Kuroda, Mitsuyoshi Ueda, ABC transporters and cell wall proteins involved in organic solvent tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*,

Journal of Biotechnology, 査読有, 165, 145-152 (2013)
DOI: 10.1016/j.jbiotec.2013.03.003

黒田浩一, 植田充美, 包括的転写制御による効率の物質生産に向けたストレス耐性育種, *日本生物工学会誌*, 査読無, 91, 342-345 (2013)

[学会発表] (計 4 件)

Kouichi Kuroda, Nao Nishida-Aoki, Hitoshi Mori, Mitsuyoshi Ueda, Mitochondria-mediated signaling pathway involved in stress response to organic solvent in yeast, 115th American Society for Microbiology (ASM) General Meeting, 2015/6/1, New Orleans, USA

Kouichi Kuroda, Nao Nishida, Mitsuyoshi Ueda, Organic solvent-activated signaling pathways via cell surface sensors and transcription factors, American Society for Biochemistry and Molecular Biology (ASBMB) Annual Meeting, 2014/4/27, San Diego, USA

西田奈央, 黒田浩一, 植田充美, 酵母の多剤耐性と有機溶媒耐性機構の共通性と違いについて, 第 36 回 日本分子生物学会年会, 2013/12/3, 神戸国際会議場

Nao Nishida, Kouichi Kuroda, Mitsuyoshi Ueda, Effects of recognition sequence variations on transcription regulation of multidrug resistance regulator Pdr1p in yeast, American Society for Biochemistry and Molecular Biology (ASBMB) Annual Meeting, 2013/4/23, Boston, USA

[図書] (計 0 件)

[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
<http://www.tenko.kais.kyoto-u.ac.jp/>

6．研究組織
(1)研究代表者

黒田 浩一 (KURODA, Kouichi)
京都大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号： 3 0 4 3 2 3 3 9

(2)研究分担者

(3)連携研究者