

醸造関連ストレス下における酵母の優先的翻訳機構の解明とその応用

井沢 真吾

京都工芸繊維大学大学院 工芸科学研究科

研究成果

醸造関連ストレスによる翻訳抑制下での優先的翻訳に関与する RNA 結合タンパク質の解析を通じ、相互作用する因子および優先的に翻訳されることが期待される mRNA などと同定した。

研究の目的

酒類醸造過程やバイオアルコールの発酵過程で出芽酵母は様々なストレスにさらされる。酵母自身が生み出すエタノールは高濃度 (> 9% v/v)になるとシビアな翻訳抑制を引き起こす。また、リグノセルロース系バイオマスの糖化前処理によって生じるバニリン、フルフラール、5-hydroxymethylfurfural (HMF)などの発酵阻害物質も酵母の翻訳活性を強く阻害するため、バイオエタノールの効率的製造や普及を進める上で大きな支障となっている¹⁾。

このような翻訳抑制を引き起こすストレス下でも、生き残りを図る上で緊急性を要する遺伝子の mRNA は優先的・選択的に翻訳されることが近年報告されている。ハーバード大学の O'Shea らは、グルコース枯渇による翻訳抑制下でも、プロモーター配列中に heat shock element (HSE) を持つ遺伝子の mRNA は優先的に翻訳されることを見出した²⁾。筆者らも、高濃度エタノールストレス下で *BTN2* が、高濃度バニリン存在下で *ADH7* や *BDH2* がそれぞれ優先的に翻訳されることを報告している^{1,3,4)}。これらの優先的翻訳はプロモーター配列依存的に転写段階で運命付けされるため、RNA 結合タンパク質が介在すると考えられている。本研究では翻訳抑制下における優先的翻訳の分子機構を明らかにするべく、高濃度のエタノールやバニリン存在下で優先的翻訳に関わる RNA 結合タンパク質の同定と解析に取り組んだ。

方法

翻訳抑制下での優先的翻訳に関与する RNA 結合タンパク質を見つけるために、出芽酵母の遺伝子破壊株ライブラリーにある RNA 結合タンパク質の欠損株 205 株を対象に、*BTN2* および *ADH7* の優先的翻訳が誘導されない株を探索した。同定した RNA 結合タンパク質については、高濃度エタノールまたは高濃度バニリン存在下で結合する mRNA およびタンパク質を解析した。

結果

205 株の欠損株を対象にスクリーニングを行なった結果、転写や mRNA の核外輸送に影響するものを除外し、翻訳抑制下での優先的翻訳に関与する RNA 結合タンパク質を計 7 種類同定することに成功した。そのうちの一つ、Rbp26 の欠損株 (*rbp26Δ*) では、10% エタノールストレス下で *BTN2* の翻訳が行われなくなり、エタノール高感受性を示した。また、共免疫沈降実験の結果、高濃度エタノールストレス下では Rbp26 に Hsp70 や翻訳伸長因子(eEF)が結合することが確認された。熱ショック下の動物細胞では、eEF1-A が核へと移行し、*HSP mRNA* と結合して効率的な翻訳をサポートすることが報告されている⁵⁾。高濃度エタノールストレス下の酵母細胞でも同様の機構が存在する可能性が期待され、現在検証実験を行なっている。

また、Rbp26 に結合する mRNA を解析した結果、*BTN2* 以外にも複数の mRNA が高濃度エタノールストレス下で特異的に結合することが確認された。これらの mRNA はエタノールによる翻訳抑制下でも優先的に翻訳される可能性が高いと推測され、現在発現誘導の確認を行っている。

高濃度バニリンによる翻訳抑制下での優先的翻訳に関与する Rbp15 についても同様の検討を行い、バニリン存在下で *YLL056c* mRNA が Rbp15 に強く結合することを見出した。*YLL056c* は非ストレス条件下ではほとんど発現が認められなかったが、バニリンなどによって転写および翻訳が活性化された⁶⁾。また、*ADH7* や *BDH2* よりも誘導される発現レベルが高く、バニリンやフルフラールによる翻訳抑制下でも効率的に翻訳される遺伝子であることを新たに明らかにした。*YLL056c* の欠損株はバニリンやフルフラールに感受性を示したほか、*YLL056c* のプロモーターを利用して任意の遺伝子をバニリンやフルフラール存在下でのみ効率的に発現させることにも成功した。*YLL056c* プロモーターを用いた発現系はバニリンなどのストレス下でのみ作用するため、他の構成的に働く発現系よりも細胞への負担が少なく、リグノセルロース系バイオマスからのバイオエタノール製造に適した酵母の分子育種に有効活用できると考えられた。

結論

醸造関連ストレスによる翻訳抑制下で誘導される優先的翻訳のメカニズム解明を目指して解析を行った。Rbp26・Hsp70・翻訳伸長因子などからなる複合体が mRNA に結合することで、高濃度エタノールストレス下での優先的な翻訳が可能になると推測された。また、Rbp26 に結合する mRNA の網羅的解析を通じて、*BTN2* 以外の優先的に翻訳される遺伝子の有力な候補を得ることができた。翻訳抑制下での優先的翻訳は、Rbp26 などの「翻訳サポート因子」が転写と並行してプロモーター内のシス配列を指標に mRNA 周辺へとリクルートされたのち、mRNA と結合して翻訳装置まで mRNA をエスコートするのではないかと現時点では推測している。今後は、*BTN2* 以外の優先的に翻訳される遺伝子を同定するとともに、それらの遺伝子のプロ

モーター内に共通するコンセンサス配列の役割についても詳細な解析を進める予定である。高濃度バニリンストレスについては、優先的に翻訳される遺伝子として *YLL056c* を新たに同定することに成功した。リグノセルロース系バイオマスからのアルコール発酵に適した酵母株を構築する上で、*YLL056c* のプロモーターは有用なツールだと考えられた。

文献

- 1) Kato, S., and Izawa, S. (2018) Improvement of yeast fermentation efficiency utilizing mRNAs preferentially translated under translational repression. in *Applied RNA Bioscience*, 1-15, Springer. ISBN 978-981-10-8371-6.
- 2) Zid, B. M., and O'Shea, E. K. (2014) Promoter sequences direct cytoplasmic localization and translation of mRNAs during starvation in yeast. *Nature*, 514:117–121.
- 3) Yamauchi, Y., and Izawa, S. (2016) Prioritized expression of *BTN2* of *Saccharomyces cerevisiae* under pronounced translation repression induced by severe ethanol stress. *Front. Microbiol.* 7:1319.
- 4) Kato, S., Yamauchi, Y., and Izawa, S. (2018) Protein synthesis of Btn2 under pronounced translation repression during the process of alcoholic fermentation and wine-making in yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102: 9669–9677.
- 5) Vera, M. *et al.* (2014) The translation elongation factor eEF1A1 couples transcription to translation during heat shock response. *eLife* 3:e03164. doi: 10.75554/eLife.03164
- 6) Nguyen, T. T. M., Ishida, Y., Kato, S., Iwaki, A, and Izawa, S. (2018) The *VFH1* (*YLL056C*) promoter is vanillin-inducible and enables mRNA translation despite pronounced translation repression caused by severe vanillin stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 35: 465-475.