

小胞体ストレス応答を活用した油脂高産生酵母の創出

木俣 行雄

奈良先端科学技術大学院大学 先端科学技術研究科

研究の目的

真核生物細胞は、総じて小胞体を有する。小胞体は単層の生体膜（リン脂質 2 重層）で覆われた袋状のオルガネラであり、扁平、あるいはチューブ状の形態を呈する。小胞体の役割として、分泌蛋白質や細胞表層蛋白質の高次構造形成と、脂質の生合成が挙げられる。小胞体の内腔には分子シャペロンやその関連蛋白質が存在し、小胞体表層には脂質代謝・合成酵素群が存在している。分泌蛋白質や細胞表層蛋白質をコードする mRNA は小胞体表面に付着したリボゾームにて翻訳され、新生ポリペプチドは小胞体にて折り畳まれる。そして、正常な高次構造となった蛋白質のみが、COPII 輸送小胞に詰め込まれ、ゴルジ体を経て細胞表層へと運ばれる。種々の病的な状態に細胞が置かれたとき、あるいは小胞体への過剰な蛋白質流入に応じて、小胞体が機能不全を起こした場合、それから回復する仕組みとして、小胞体ストレス応答が引き起こされる。

酵母の小胞体ストレス応答においては、小胞体膜貫通蛋白質 Ire1 が小胞体内腔に蓄積した変性蛋白質のセンサーとなり、細胞内情報伝達経路を活性化する^{文献 1}。なお、Ire1 のサイトゾル側ドメインは、蛋白質キナーゼ領域とエンドリボヌクレアーゼ領域を有する。小胞体ストレスに応じて、Ire1 は自己リン酸化を引き起こす。そして、それはエンドリボヌクレアーゼとしての活性化に繋がる。*Saccharomyces cerevisiae* では、Ire1 のエンドリボヌクレアーゼとしての標的は、*HAC1* 遺伝子産物 mRNA である。*HAC1* mRNA は、ストレスが無い状態ではイントロンを有しており、蛋白質に翻訳されない。一方、活性化したエンドリボヌクレアーゼは *HAC1* mRNA のスプライシング（イントロンの除去）を引き起こし、スプライシングされた成熟型 *HAC1* mRNA は転写因子蛋白質 Hac1 へと翻訳される。Hac1 蛋白質は、小胞体内在性分子シャペロンやリン脂質生合成酵素の発現を転写レベルで誘導し、小胞体の機能は再活性化する。

そこで本研究では、以下の事項にアプローチすべく研究を進めた。

- (1) Ire1 が自己リン酸化、あるいはキナーゼ領域によって活性制御される意義。
- (2) 通性好気性菌である *S. cerevisiae* において、分子状酸素が小胞体ストレスや小胞体ストレス応答に及ぼす影響。
- (3) メタノール資化酵母 *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) における小胞体ストレス応答。
- (4) 成熟型 *HAC1* mRNA 恒常的発現酵母の応用的利用。

方法

HAC1 mRNA のスプライシングを調べるためには、Reverse transcriptase (RT)-PCR を行った。RT 反応においては、PolyT プライマーを用いた。PCR プライマーは *HAC1* 特異的プライマーセットを用い、イントロン保有型と成熟型の PCR 産物のサイズ長の違いによりスプライシング効率を定量出来るようにした。

また、*S. cerevisiae* や *P. pastoris* の遺伝子操作、および、蛋白質サンプルの解析については文献に記す^{文献2)4)}。

結果

(1) *S. cerevisiae* Ire1 の小胞体内腔側ドメインに変異を導入し、小胞体ストレスの有無に関わらず Ire1 を恒常的に活性化できるようにした場合も、細胞の栄養状態依存的に *HAC1* mRNA スプライシングのレベルは変化した。一方、その Ire1 変異体のサイトゾル側ドメインにさらに変異を導入し、自己リン酸化非依存的にエンドリボヌクレアーゼ活性を発揮できるようにしたところ、*HAC1* mRNA スプライシングの栄養状態依存性は解消した。すなわち、Ire1 の自己リン酸化は、栄養状態による小胞体ストレスの強度の変化に関わると考えられる^{文献2)}。

(2) *S. cerevisiae* を嫌気条件にて培養したところ、小胞体ストレス誘導剤ツニカマイシンやジチオスレイトールによる *HAC1* mRNA スプライシングの程度は、通気条件時よりも高かった。また、ミトコンドリアゲノム完全欠損変異を導入し、ミトコンドリアによる呼吸を停止させた場合でも、同様の傾向が認められた^{文献3)}。

(3) *S. cerevisiae* とは異なり、*P. pastoris* では、通常培養条件でも *HAC1* mRNA スプライシングが高レベルで起きており、それはジチオスレイトールによって増強された。*P. pastoris* Ire1 遺伝子を *S. cerevisiae* に導入した場合、野生型 *S. cerevisiae* 株と同じく、非ストレス時での *HAC1* mRNA スプライシングは認められない。すなわち、*P. pastoris* 細胞は通常培養条件でも小胞体ストレス状態にあると考えられる。*P. pastoris* からの蛋白質分泌量は、*S. cerevisiae* に比して著しく多い。また、*P. pastoris* において *IRE1* 遺伝子および *HAC1* 遺伝子破壊株を作製し、次世代シーケンサー解析(RNAseq 解析)に供することにより、*P. pastoris* における小胞体ストレス経路標的遺伝子を同定した。

(4) 成熟型 *HAC1* mRNA を *S. cerevisiae* にて恒常的に発現させると、脂質生合成酵素群の発現が誘導され、細胞内にリン脂質や中性脂質(油脂)が蓄積する。また、遊離脂肪酸の分泌量も増大する。しかし、成熟型 *HAC1* mRNA 恒常的発現株は増殖が遅く、脂質生産のための実用化への障壁になると考えられた。今回の研究では、成熟型 *HAC1* mRNA 恒常的発現株にてヒストン脱アセチル化酵素遺伝子 *HDA3* を破壊することにより、高い脂質生産能を有したまま、増速速度を回復することが出来た(図1)。

結論

- (1) 酵母 Ire1 のサイトゾル側キナーゼドメインは、栄養条件による小胞体ストレス応答の強度の調節に関わる。
- (2) *S. cerevisiae* では、ミトコンドリア呼吸とは無関係に、分子状酸素は小胞体ストレスを減弱する。
- (3) *S. cerevisiae* とは異なり、*P. pastoris* は蛋白質分泌が盛んであり、通常培養時でも小胞体ストレス状態にある。
- (4) 成熟型 *HAC1* mRNA 恒常的発現と *HDA3* 遺伝子破壊を併せることにより、高い脂質生産能を示し、かつ、増殖が速い *S. cerevisiae* 株を作出することが出来た。

文献

- 1) Le, Q.G., and Kimata, Y. (2021) Multiple Ways for Stress Sensing and Regulation of the Endoplasmic Reticulum-stress Sensors. *Cell Struct. Funct.* **46**: 37-49.
- 2) Le, Q.G., Ishiwata-Kimata, Y., Phuong, T.H., Fukunaka, S., Kohno, K., and Kimata, Y. (2021) The ADP-binding kinase region of Ire1 directly contributes to its responsiveness to endoplasmic reticulum stress. *Sci. Rep.* **24**: 4506.
- 3) Phuong, T.H., Ishiwata-Kimata, Y., Nishi, Y., Oguchi, N., Takagi, H., and Kimata, Y. (2021) Aeration mitigates endoplasmic reticulum stress in *Saccharomyces cerevisiae* even without mitochondrial respiration. *Microb. Cell* **8**: 77-86.
- 4) Fauzee, Y.N.B.M., Taniguchi, N., Ishiwata-Kimata, Y., Takagi, H., and Kimata, Y. (2020) The unfolded protein response in *Pichia pastoris* without external stressing stimuli. *FEMS Yeast Res.* **20**: foaa053.

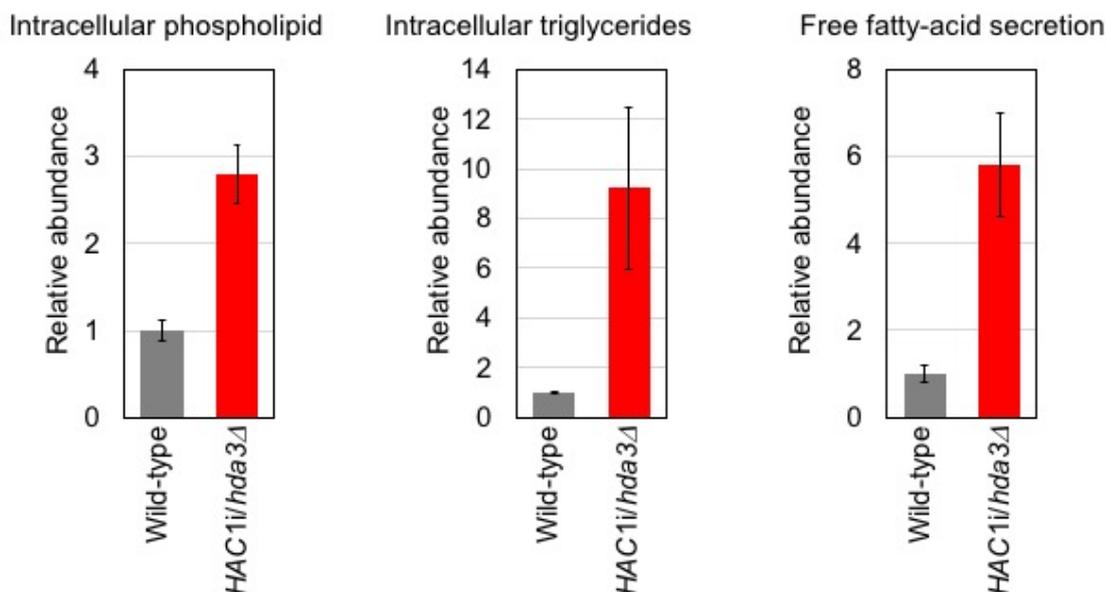


図1 *S. cerevisiae* 脂質高生産株の作製: 野生型(Wild-type)株および今回の研究で作製された変異株(成熟型 *HAC1* mRNA 恒常的発現+*HDA3* 遺伝子破壊: *HAC1i/hda3Δ*) を30°CにてSD培地で培養後に、脂質関連分子の定量を行った。