出芽酵母のエタノールストレス応答における mRNA の動態

～ mRNA の hyperadenylation と P-body・Stress granule の形成 ～

酵母が発酵によって生産するエタノールは、一方で酵母細胞自身にとって増殖や生理活性を阻害する毒物でもある。したがって、酵母はエタノールストレスに対する耐性メカニズムを備えていると考えられるが、その研究は主に mRNA の転写レベルで行われてきた。本論文の著者らは、エタノールストレス適応において mRNA 転写後の翻訳に至る過程で様々な調節が行われていることを明らかにした。また、清酒醸造においては酵母細胞内の mRNA の動態が他のエタノール発酵系と異なることを示した。

井 沢 真 吾

1. はじめに

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* およびその近縁種は、アルコール発酵によってエタノールを生成し、日本酒やワイン、焼酎、ビールといった酒造りに欠かすことができないだけでなく、近年ではバイオマスからのバイオエタノールの製造などにも活躍するもっとも重要な産業微生物のひとつである。エタノールは、高濃度では溶菌作用やタンパク質の変性、細胞内での代謝障害を引き起こすほか、低濃度であっても、細胞膜の脂質組成や流動性、神経系などにおけるイオンチャンネルやレセプターの機能を変化させることが知られている^{1,3)}。そのため、醸造過程のアルコール発酵によるエタノール生成は、酵母自身にとって自らストレスの原因を作り出すという一種の「自虐行為」だと解釈することもできる。

出芽酵母は、自身でエタノールを作り出すだけであって、他の生物種に比べて高いエタノール耐性を持つ。そのため、その耐性獲得機構やエタノールストレスに対する応答機構については古くから高い関心が払われてきたが、いまだ十分に解明されたとは言えない状況

にある。残念なことに、ヒートショックや酸化的ストレス、浸透圧といった他のストレス種に対する応答と比較しても、エタノールストレス応答に関する知見はわずいふんと少なく、解析が遅れている感が否めない。さらに、醸造過程でエタノール濃度が徐々に上昇していくもろみ中の酵母の生理に関してもまだまだ未解明な部分が多いのが現状である。

このような状況を打開すべく、筆者らは、エタノールに対する酵母の耐性機構や応答能について、従来に無い視点から解析を進めている。本稿では、転写以降の mRNA の流れ (flux) に焦点を置いて、酵母細胞のエタノール耐性・応答機構について最近の知見を紹介する。

2. HSP mRNA 核外輸送の抑制

真核細胞である酵母は、転写の場 (核) と翻訳の場 (細胞質) が核膜によって隔たれているため、mRNA は核内での様々なプロセッシングや核外への輸送などを経てからようやく翻訳される (第1図)。そのため、mRNA レベルとタンパク質レベルが必ずしも比例せず、両者のズレが原核細胞以上に大きくなると予想さ

Ethanol Stress Response in mRNA Flux of *Saccharomyces cerevisiae*

Shingo IZAWA (Laboratory of Microbial Engineering, Graduate School of Science and Technology, Kyoto Institute of Technology (K.I.T))

第1図 出芽酵母における転写から翻訳・分解に至る mRNA の流れ
核内で合成された mRNA は、polyA 鎖の付加や輸送担体との複合体形成などの核内プロセッシングを適切に終えてから翻訳の場である細胞質側へと核外輸送される。細胞質側ではポリソームで翻訳されるほか、P-body や stress granule で隔離・分解される。各ステップは遺伝子発現を監視したり制御するステップとなりうる。

れる。実際に酵母細胞では、mRNA レベルの上昇が対応するタンパク質レベルの変動に必ずしも反映されないことが確認されており、単純に mRNA レベルの増減だけに注目してストレス応答時の遺伝子発現を論じると、誤った理解や解釈を導いてしまう危険性が指摘されている⁴⁾。

筆者らの研究でも、エタノールストレスによって転写が活性化される遺伝子の発現を検討したところ、mRNA レベルが劇的に増加するにもかかわらずタンパク質レベルがほとんど増加しない遺伝子が複数存在することを確認することができた。ヒートショックプロテイン (HSP) をコードする HSP 遺伝子もそのうちの一つであり、一定濃度以上のエタノールストレス条件下では、その発現の多くが mRNA の輸送段階で抑制されていることが明らかとなった⁵⁾。

酵母細胞を 9-10% (v/v) のエタノールストレスに曝すと、ヒートショックの場合と同様に HSP mRNA

の転写も活性化され転写量が著しく増加するが、HSP のタンパク質レベルについては、ヒートショックの場合と違ってほとんど増加しない^{5,6)}。転写が活性化されるにもかかわらず翻訳産物のレベルが上昇しなかったことから、転写後調節による発現の抑制が考えられた。そこで、HSP mRNA (SSA4, HSP42, HSP104) の細胞内局在を fluorescence *in situ* hybridization (FISH) で検討したところ、これらの HSP mRNA はエタノール濃度が上昇するにつれ核内に滞留してしまうことが確認された (第2図)⁵⁾。この結果は、せっかく転写が活性化されたにもかかわらず、mRNA の輸送段階で遺伝子の発現が抑制されてしまう典型的な例であった。また、mRNA の核外輸送のステップにもエタノールストレスに応答した制御機構が存在し、その制御はヒートショックに対する応答とは異なるものであることを意味している。

比較的高濃度のエタノールストレス条件下では、上

第2図 エタノールストレス条件下における *HSP* mRNA の核内滞留
各 *HSP* mRNA の細胞内局在を FISH 法で解析した。ヒート
ショック条件下では *HSP* mRNA レベルが上昇し、細胞質側
へと核外輸送されるため、細胞全体にシグナルが観察された。
エタノールストレスによっても *HSP* mRNA レベルは上昇す
るが、*HSP* mRNA の polyA 鎖が過剰に伸長し核内に滞留す
るため、ドット状のシグナルが核内に確認される。DAPI 染
色は核 DNA の位置を示している。

記の *HSP* 遺伝子以外にも mRNA の核外輸送が抑制される遺伝子が多数存在する。そのため、転写レベルの変化だけで、エタノールストレス条件下の遺伝子発現を議論することには無理があり、常に翻訳産物やその活性のことを考慮するべきであろう。1996年にゲノム DNA 全塩基配列が解読されて以降、エタノールストレス条件下や各種酒類醸造過程についても、それぞれマイクロアレイによる解析が報告されている^{7,9)}。これらのデータは、酵母細胞のエタノールストレス応答を理解する上で重要な情報であることに疑いの余地はないが、あくまでも転写レベルの変化を観察したに過ぎず、最終的な翻訳産物にまで至る遺伝子発現全体を反映したものではないので、利用に際しては十分な配慮が必要である。

3. mRNA poly (A) 鎖の過剰伸長と転写活性化の合目的性

エタノールストレス条件下で *HSP* 遺伝子の mRNA が核内に滞留するメカニズムについて検討したところ、ヒートショック条件下とは異なり、*HSP* mRNA の 3' 末端 poly (A) 鎖が過剰に伸長した hyperadenylation の状態にあることが確認された⁵⁾。Poly (A) 鎖の過剰伸長が mRNA の核外輸送効率に密接に関連することがすでに報告されていることから、適切な長さ

の poly (A) 鎖を持たない hyperadenylation の状態にあることが、*HSP* mRNA が核内に滞留した一因だと考えられる¹⁰⁾。この poly (A) 鎖の過剰な伸長はエタノール濃度依存性かつ可逆的に起こる反応であり、エタノール濃度が上昇するにつれ poly (A) 鎖も徐々に長くなり、反対に核外輸送効率は低下して核内に留まる *HSP* mRNA 量が増加した⁵⁾。また、エタノールストレス処理後、エタノールを取り除くことによって速やかに poly (A) 鎖は通常の高さに短縮化され、*HSP* mRNA が核外輸送され翻訳レベルが上昇することが確認された。エタノール濃度依存性に poly (A) 鎖長が速やかに変化することから、エタノールストレスによって 3' 末端側のプロセッシング全体が破綻したとは考えにくい。むしろ、周囲のエタノール濃度に応じて積極的に poly (A) 鎖の長さを変化させ、*HSP* mRNA の核外輸送効率を調節しているのではないかと考えられた。このような poly (A) 鎖長の調節は、全ての mRNA に対し一律におこなわれている訳ではないので、標的とする mRNA を選別する機構が存在するはずである。どの mRNA の poly (A) 鎖長がエタノールストレス条件下で変化するのかを解析することによっても、酵母細胞がエタノールストレスに対してどのような対処をしようとしているのかを読み解く、新しい手がかりが得られると考えられる。

ところで、エタノールストレスによってせっかく *HSP* 遺伝子の転写を活性化したにもかかわらず、細胞質側に mRNA が輸送されないために翻訳されないという上記の現象は、一見すると無駄な転写活性化がおこなわれたようにも思える。エタノールをはじめとしてストレスによって誘導される遺伝子の転写活性化は、常に合目的的となるように調節されたものではなく、想像以上に無駄も多い比較的大雑把な応答である可能性を示唆しているのかもしれない。一方で、状況に応じた細かな遺伝子発現制御は、mRNA のプロセシングや核外輸送段階をはじめとする転写以降のステップが担っていることを意味しているのかもしれない。いずれにしても、エタノールストレス条件下における酵母の遺伝子発現制御では、mRNA のプロセシングや核外輸送といった転写以降の段階が重要な役割を担っており、転写レベルのみを反映した DNA マイクロアレイのデータだけでは窺い知れない複雑な制御系が機能していることが明らかとなった。

4. 細胞質での mRNA flux と P-body

真核生物では、翻訳と mRNA の分解は密接に関連していて、その制御は遺伝子発現を制御する上で重要である^{11, 12)}。非翻訳状態の mRNA は、細胞質において RNA 分解装置や翻訳抑制因子などとともに、P-body (cytosolic processing body) という構造体を形成する^{13, 14)}。当初、P-body は mRNA 分解の場だと考えられていたが、ストレス条件下で非翻訳状態の mRNA を隔離・保管する場であることが最近になってわかってきた^{15, 16)}。いわば、mRNA の「墓場」だと思われていたものが実は「避難所」でもあったという訳である。また、NMD (nonsense mediated decay) や RNAi への関与も示唆されていて、真核生物の遺伝子発現制御や mRNA の flux に重要な役割を担っている。

P-body には非翻訳状態の mRNA が隔離されることから、翻訳抑制と P-body の形成には相関性があると考えられており、実際に、翻訳が抑制されるようなストレス条件下で P-body の形成が誘導される (図 3)。ストレスによって翻訳が抑制されるとポリソームから mRNA が離れて P-body に運ばれるため、細胞内 P-body の数やサイズが増加するわけである。酵母の場合、グルコース枯渇条件下や浸透圧ストレス下では

第 3 図 エタノールストレス条件下で形成される P-body と stress granule

P-body と stress granule の構成因子を GFP で標識して蛍光顕微鏡で観察した。

SD 培地中では、エタノールで酵母細胞を処理すると 5 分前後で形成が確認される。P-body の形成が誘導されるエタノール濃度に比べ、stress granule が誘導されはじめる濃度は高い。

P-body の形成が活発になり、その数やサイズが増加する。逆に、グルコースを補充することで速やかに P-body は減少・消失する¹⁵⁾。

エタノールストレス応答時の P-body に関する情報が無かったことから、筆者らは各種濃度のエタノールストレス条件下や醸造過程における P-body の形成について検討を行った¹⁷⁾。その結果、SD 最小培地では、6% (v/v) 以上のエタノールストレスによって P-body の形成が誘導されるようになり、エタノール濃度依存的にサイズや数が増加することが確認された。また、エタノールを取り除くことにより P-body が速やかに消失したことから、エタノール濃度に応じて可逆的に P-body の形成・分解はおこなわれることが明らかとなった。

さらに、清酒酵母系の UT-1 株を用いて白ワインと清酒の小仕込み試験を実施し、醸造過程の P-body 形成についても検討した。その結果、ワインの醸造過程では、SD 培地の時と同様に、果汁中のエタノール濃度が 6% 以上になると濃度依存的に P-body の形成が誘導された。ところが清酒醸造の場合には、単純にエタノール濃度に依存した誘導は観察されなかった。発酵が進み、もろみ中のエタノールが 6% 以上になっても P-body の形成は誘導されず、エタノール濃度が 13% 前後にまで上昇した発酵の最終段階間際になってようやくはっきりとした P-body の形成が確認された。このことは、清酒もろみ中では醸造過程の全般に渡っ

て翻訳が抑制されにくいことを示唆しており、酵母の翻訳効率や mRNA の flux に関しては、ワインと清酒の醸造過程で大きな違いが存在することを意味している。

清酒もろみ中で見られた、エタノール濃度に単純に依存しないユニークな挙動は mRNA (bulk poly (A)⁺ mRNA) の核外輸送についても確認されている。SD 培地やワイン果汁中のエタノール濃度が 6% 以上になると、核から細胞質への bulk poly (A)⁺ mRNA の輸送が抑制され、核内に滞留するようになるが、清酒醸造過程のもろみ中ではエタノール濃度が 12-13% になるまで mRNA の核内滞留が起きない^{6, 18, 19)}。このことを併せて考えると、清酒もろみ中では高いエタノール存在下でも遺伝子の発現が比較的スムーズであり、mRNA の flux や遺伝子発現に関してエタノールによる影響を受けにくい状況が保たれているのではないかと推測される。果汁や培地などに比べ、清酒もろみ中には数多くの脂質や麹菌が作り出す成分などが多量に含まれることから、もろみ中の成分が影響しているのかもしれないが、現時点でそのメカニズムは全く不明である。ただ、清酒醸造過程のもろみ中の酵母は、実験室の培地や果汁の中で生育した酵母と大きく異なる状態にあることは明らかである。

5. Stress granule の形成

P-body と同様に、非翻訳状態の mRNA が隔離される構造体として stress granule (ストレス顆粒) が動物細胞では知られていた。Stress granule は、翻訳開始因子 (eIF4E, eIF4G, eIF4A など) や 40S リボソームサブユニット、poly (A) 結合タンパク質 (Pab など) などが非翻訳状態の mRNA とともに凝集体を形成し、P-body と結合・解離をおこなって、mRNA とタンパク質の複合体 (mRNP) を交換しているといわれている^{20, 21)}。細胞が置かれた状況に応じて、非翻訳状態の mRNA はポリソームから P-body や stress granule の間を行き来している訳であるが、どのような順序で移動するのかについてははっきりとした答えは得られていない^{22, 23)}。

これまで、酵母には stress granule は存在しないと考えられていたが、最近、酵母でも mRNA と eIF4E, eIF4G, Pab1 が凝集体をつくり、動物細胞と同様の stress granule が形成されることが明らかとなっ

た^{23, 24, 25)}。酵母の stress granule の形成はグルコース枯渇や 46℃ のヒートショックによって誘導される。エタノールストレスについて SD 培地で検討したところ、エタノール濃度 10% 以下では誘導されないが、11-15% という高い濃度になると stress granule が形成されることが確認された²⁶⁾。一方、清酒もろみ中では stress granule の形成はほとんど観察されなかった。P-body の形成が誘導される条件よりも高いエタノール濃度で stress granule が形成されることから、同じように mRNA を隔離してはいるが、エタノールストレス応答における両者の役割には違いがあると考えられる。P-body から stress granule が形成されるというモデルも提唱されており²³⁾、よりシビアなストレス条件下での mRNA flux の制御をおこなうために stress granule が重要な役割を担っていると推測されるが、両者の協調関係や役割分担については現在のところよくわかっていない。

分解されずに隔離・保管された mRNA は、ストレスが取り除かれた際には速やかにポリソームへと戻され翻訳を再開することが可能となる。そのため、ストレスから回復する際に重要な mRNA が優先的に stress granule へと隔離され、大事に保管されているのかもしれない。eIF4E などの翻訳開始因子が stress granule の構成因子であることから、ストレスの危機から脱出した後に速やかな回復をはかるために必要なかもしれない。実際に、ストレス除去後の翻訳再開や stress granule 消失の度合いがストレスの種類や程度によって異なることから、ストレスの違いによって stress granule が果たす役割も異なっているのかもしれない。筆者らも、エタノールストレスへの耐性や適応においても、stress granule がどのような役割を担い、どのような mRNA が隔離されているのかについて興味を持っており、現在解析を進めている。

6. おわりに

mRNA の核外輸送の抑制や hyperadenylation, P-body や stress granule の形成誘導などから、エタノールストレス条件下では全体として翻訳が抑制される傾向にあることがわかる。それゆえに、このような状況下でも優先的に発現してくる遺伝子にこそ、酵母の高いエタノール耐性の秘密が隠されていると考えられ、筆者らの研究室でもこの難題の解明に取り組んでいる。

転写以降の制御や、転写から翻訳・分解に至る mRNA flux に着目することで、これまでは見えてこなかった醸造過程の生理やエタノール応答機構について理解が深まると期待している。

エタノールストレス応答時の mRNA flux の詳細はほとんどが未解析のままで、情報が非常に限られているというのが現状である。優先的に核外輸送・翻訳される mRNA がどのように選別されるのか？ P-body や stress granule に隔離される mRNA と分解される mRNA の違いは何か？など興味は尽きず、清酒もろみの中ではさらに複雑なことが起きていると考えられる。酵母のエタノール耐性に関する研究の奥深さを再認識させられるが、mRNA flux に限らずこれまでに無い様々な切り口から解析が進むことによって、醸造過程の酵母の生理やエタノール耐性獲得機構の実体が明らかにされることを期待したい。

＜京都工芸繊維大学＞

文献

- Ingram, L. O. and Buttke, T. M.: *Advances Microbiol. Physiol.* **25**, 253-300 (1984) .
- Peoples, R. W. *et al.*: *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **36**, 185-201 (1996) .
- Junget, S. *et al.*: *J. Biol. Chem.* **280**, 308-316 (2005) .
- Gygi, S. P. *et al.*: *Mol. Cell. Biol.* **19**, 1720-1730 (1999) .
- Izawa, S. *et al.*: *Biochem. J.* **411**, 111-119 (2008) .
- Takemura, R. *et al.*: *J. Cell Sci.* **117**, 4189-4197 (2004) .
- Wu, H. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 7353-7358 (2006) .
- James, T.C. *et al.*: *J. Appl. Microbiol.* **94**, 432-448 (2003) .
- Rossignol, T. *et al.*: *Yeast* **20**, 1369-1385 (2003) .
- Hammell, C. M., *et al.*: *Mol. Cell. Biol.* **22**, 6441-6457 (2002) .
- Jacobson, A. and Peltz, S. W.: *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 693-739 (1996) .
- Coller, J. and Parker, R.: *Annu. Rev. Biochem.* **73**, 861-890 (2004) .
- Sheth, U. and Parker, R.: *Science* **300**, 805-808 (2003) .
- Parker, R. and Sheth, U.: *Mol. Cell* **25**, 635-646 (2007) .
- Teixeria *et al.*: *RNA* **11**, 371-382 (2005) .
- Brengues *et al.*: *Science* **310**, 486-489 (2005) .
- Izawa, S. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**, 2800-2807 (2007) .
- Izawa, S. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 2179-2181 (2005) .
- Izawa, S. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **69**, 86-91 (2005) .
- Anderson, P. and Kedersha, N.: *J. Cell Biol.* **172**, 803-808 (2006) .
- Kedersha, N. *et al.*: *J. Cell Biol.* **169**, 871-884 (2005) .
- Anderson, P. and Kedersha, N.: *Trends Biochem. Sci.* **33**, 141-150 (2008) .
- Buchan, J. R. *et al.*: *J. Cell Biol.* **183**, 441-455 (2008) .
- Brengues, M. and Parker, R.: *Mol. Biol. Cell.* **18**, 2592-2602 (2007) .
- Hoyle, N. P. *et al.*: *J. Cell Biol.* **179**, 65-74 (2007) .
- Kato, K. *et al.*: 投稿準備中