

《農芸化学奨励賞》

酵母のストレス応答における mRNA 代謝機構に関する研究



京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻 助教 井 沢 真 吾

はじめに

酵母をはじめとする真核細胞では転写と翻訳の場が核膜によって隔てられているため、必ずしも原核細胞のように転写と翻訳が連動して起こるわけではない。真核細胞の遺伝子発現は、核内における転写段階だけでなく、mRNA のプロセッシングやスプライシング、核外への輸送、細胞質側における翻訳・分解などの段階によっても巧妙に制御されている (図 1)。そのため、真核細胞の遺伝子発現制御を正しく理解するためには、転写以降の制御に関する情報が不可欠である。本研究では、ストレス応答における酵母の遺伝子発現について、転写レベルのみならず、mRNA の核外輸送段階や細胞質 P-body による転写後の制御について解析を行った。また、実際の酒類醸造過程の酵母における mRNA の代謝についても検討した。

1. ストレス応答における mRNA の選択的核外輸送

生物は周囲の環境変化 (ストレス) にさらされると、遺伝子の発現パターンを変化させて速やかにストレスに対する防御と適応を図る。ストレス条件下の転写制御には、各種のストレス応答性転写調節因子が重要な役割を担っており、熱ショック応答における Hsf1 をはじめとして、出芽酵母では酸化的ストレス応答性の Yap1 やさまざまなストレスに応答する Msn2 や Msn4 などがよく知られている。ストレスによってそれぞれの標的遺伝子の転写が活性化され、熱ショック条件下では Hsf1 や Msn2/Msn4 によってヒートショックプロテイン (HSP) をコードする HSP 遺伝子などの mRNA レベルが上昇する。一方で、各ストレス条件下で転写が抑制され、mRNA レベルが減少する遺伝子も多数存在している。ストレスによる出芽酵母各

遺伝子の転写レベルの変化は網羅的な解析が行われており、Saccharomyces Genome Database (<http://www.yeastgenome.org/>) にデータが公開されている。

従来は、細胞のストレス応答を転写レベルの増減だけで論じることが少なかったが、近年、mRNA の核外輸送段階による遺伝子発現制御の重要性が注目されるようになった。熱ショック (42°C) に細胞がさらされると、先述のとおり HSP 遺伝子の転写が活性化され、mRNA レベルの上昇に続いて HSP のタンパク質レベルが速やかに上昇する。これは、合成された HSP mRNA が核内から細胞質側へとスムーズに輸送され、無事に翻訳された結果である。一方で、HSP mRNA 以外の大部分の mRNA (bulk poly(A) mRNA) は、核外への輸送がブロックされ、核内に滞留してしまうことが fluorescence *in situ* hybridization 解析によって明らかになった。耐性獲得に不要な mRNA を核内にとどめることによって、ストレスへの防御や適応のために緊急性を要する HSP mRNA が優先的に核外輸送経路や翻訳装置を利用することができ、効率よく HSP のタンパク質レベルを増加させることが可能になる。このことは同時に、ストレス条件下では合成された mRNA すべてが必ずしも翻訳装置にまで運ばれるわけではないことも意味している。

2. mRNA 核外輸送関連因子のストレス応答

ストレスに速やかに対応するうえで、このような「mRNA の選択的核外輸送」が果たす役割は小さくないが、その詳細はほとんど未解明のままであった。筆者らは、mRNA 核外輸送にかかわる因子に着目して網羅的に解析を行い、一部の輸送因子やスクレオポリン、核小体因子の局在や機能がストレスに応答して変化することを見いだした。そのうちの一つ、Gle2 は核膜孔複合体 (NPC) の構成因子であり、poly(A) 鎖をもつ RNA の核膜孔通過に関与しているが、熱ショック (42°C) によって Gle2 は NPC から速やかに乖離した。また、酵母細胞は 37°C で前処理することによって適応応答が誘導され熱ショックへの耐性が上昇するが、Gle2 の局在についても、37°C での前処理によって 42°C でも正しい局在を維持できるようになった。このとき、bulk poly(A) mRNA の核外輸送の阻害も解除されるが、Gle2 の欠損株ではこのような mRNA 核外輸送における適応応答は誘導されなかった。Gle2 の局在変化は bulk poly(A) mRNA の核内滞留と高い相関性を示したことから、NPC が担っている核-細胞質間物質輸送のゲートとしての機能が Gle2 の NPC からの乖離によって一部変化すると推測される。哺乳動物では細胞周期に連動して NPC 構造と物質輸送が変化することが報告されているが、ストレスに対しても NPC の構造や機能は柔軟に変化すると考えられた。

3. アルコールストレス特異的な Rat8 の局在変化

エタノールストレスも、熱ショック同様に bulk poly(A) mRNA の核内滞留を引き起こすが、両ストレスが同じメカニ

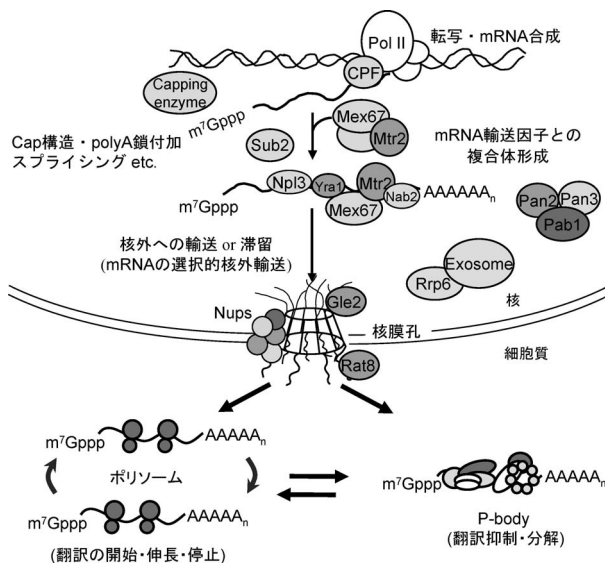


図 1 ストレス条件下における真核生物の mRNA flux
転写段階だけでなく複数の遺伝子発現制御ポイントが存在する。

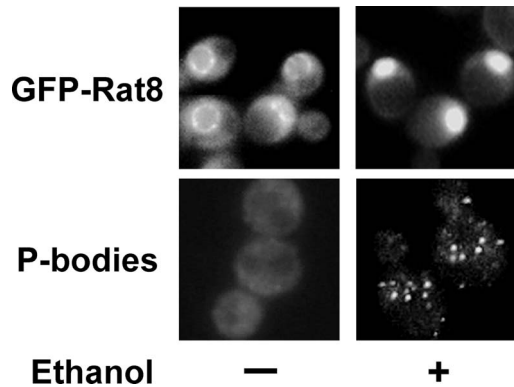


図2 Rat8とP-bodyのエタノールストレス応答

ズムで mRNA の核内蓄積を引き起こすのはわかっていなかった。NPC の細胞質側出口に局在する Rat8 は、NPC から mRNA をリリースする段階に関与する生育に必須な輸送関連因子である。筆者らは、NPC の細胞質側に局在していた Rat8 がエタノールストレス条件下では速やかに核内に蓄積してしまうことを見いだした (図2)。このエタノールに応答した Rat8 の局在変化は可逆的、かつエタノール濃度依存的であり、9% 以上のエタノール濃度ではほぼすべての Rat8 が核に蓄積してしまう。そのため、mRNA の輸送効率が著しく低下し、bulk poly(A) mRNA の核外輸送が抑制されると考えられた。Rat8 の局在はエタノール以外のアルコールによっても変化したが熱ショック条件下では変化しなかったことから、両ストレス条件下で NPC の機能や mRNA 核外輸送の制御機構が異なることが明らかになった。

4. 3'-末端プロセシングにおけるストレス応答と転写活性化の合理性

mRNA の選択的核外輸送に関する熱ショックとエタノールストレスの違いは、HSP 遺伝子の発現にも見ることができる。熱ショック同様に、エタノールストレスによって Msn2 や Msn4 が活性化され細胞内の HSP mRNA レベルは速やかに上昇したが、HSP のタンパク質レベルは全く増加してこないことを見いだした。そのメカニズムを解析した結果、エタノールストレス条件下では HSP mRNA の poly(A) 鎖が過剰に伸長すること (hyperadenylation), HSP mRNA は核内に蓄積することなどが明らかとなった。これは、遺伝子の発現が転写段階ではなく mRNA の核外輸送段階で制御されている典型的な事例であった。また、エタノール濃度に比例して poly(A) 鎖が伸長し核内に蓄積する HSP mRNA が増えることや、poly(A) 鎖の短縮化によって核外輸送が再開されること、熱ショック条件下では HSP mRNA の hyperadenylation が誘導されないことなどから、個々の mRNA の核外輸送を決定する上で 3'-末端プロセシングが重要な役割を担っていると考えられた。また、エタノールストレスによる HSP 遺伝子の転写活性化は、一見すると無駄であり非合理的に思える。ストレスによって誘導されるさまざまな転写活性化が、常にタイミングよく合理的なも

のなのかを検証することによって、ストレス応答の新たな側面が見えてくるのではないかと考えている。

5. 醸造過程における mRNA の動態と細胞質での mRNA 代謝

実験室条件で得られた知見を基に、実際の醸造過程の酵母における mRNA 代謝についても解析を行った。ワイン醸造過程ではエタノール濃度の上昇に伴って Rat8 などの輸送因子の局在変化が引き起こされ、bulk poly(A) mRNA が核内に滞留した。一方、清酒醸造過程ではエタノール濃度の上昇に単純に依存しない、より複雑な制御を受けることを見いだした。これらの解析は、実際の醸造過程における酵母の mRNA 輸送状態を初めて観察したものである。

一方、細胞質に存在する一部の mRNA は、ストレス条件下で cytosolic processing body (P-body) と呼ばれる構造体に一時的に隔離されることによって翻訳が抑制される。筆者らは、エタノールストレス条件下で P-body の形成が誘導されることを明らかにした (図2)。さらに、P-body 形成についてもワインと清酒醸造過程で違いが観察され、細胞質での mRNA 代謝についても両醸造過程には大きな差異があることを見いだした。清酒醸造過程で見られる一連のユニークな応答には、もろみ中の成分が影響していると考えており、アルコールストレスを緩和するような新しい機能性物質がもろみから見つかるのではないかと期待している。

おわりに

mRNA の合成から翻訳・分解までの一連の流れで遺伝子発現制御をとらえ直すことによって、転写段階の解析だけでは見えてこなかった真核細胞のストレス応答の実体が見えてくるのではないかと考えている。現段階では、mRNA の核外輸送や細胞質での mRNA 代謝のメカニズム自体が十分に解明されているわけではないため、ストレス条件下での制御については多くが未解明のままである。醸造・発酵産業での応用も視野に入れて、ストレス応答における転写以降の mRNA 代謝機構の解明に今後も取り組みたいと考えている。

本研究は、京都大学食糧科学研究所微生物分子育種分野ならびに京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻エネルギー変換細胞学分野において行われたものです。自由な研究環境を与えていただいた木村 光京都大学名誉教授と喜多恵子京都大学教授に厚く御礼申し上げます。また、学生時代よりご指導いただき、本研究遂行のうえで物心両面にわたって多大なるご支援を賜った井上善晴先生に心より感謝申し上げます。本研究成果は、前田圭子さん、池田佳代さん、北 剛臣君、竹村玲子さんら卒業生・在学生の協力によるものであり、また、多くの方がたのご指導の賜物であります。この場を借りて、深く御礼申し上げます。最後になりましたが、本奨励賞にご推薦くださいました京都大学大学院生命科学科教授・山本憲二先生に心より御礼申し上げます。