

論文内容の要旨

応用生命工学専攻
平成 13 年度博士課程入学
氏 名 海野 研二
指導教員名 北本 勝ひこ

論文題目

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* における RNase T1 発現感受性変異株に関する研究

麹菌 *Aspergillus oryzae* はアミラーゼ、プロテアーゼ、ヌクレアーゼなどの多種類の有用な酵素を大量に分泌生産することから、清酒、味噌、醤油などの醸造に広く利用されている。麹菌のさらなる有効利用を目的として、これら分泌酵素の遺伝子がクローニングされ、出芽酵母 *S. cerevisiae* で発現させるという試みがなされてきた。その結果、 α -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、アルカリ性プロテアーゼ、中性プロテアーゼ II、及びヌクレアーゼ S1 などを発現させた場合、宿主酵母は正常に生育し、培地中に活性のある酵素を分泌生産することが報告されている。

これに対し、同じく麹菌の分泌酵素である RNase T1 の酵母における発現について検討した結果、多コピープラスミドにより *GALI* プロモーター制御下で RNase T1 を発現誘導した場合酵母の生育は阻害されるが、単コピープラスミドで発現誘導した場合宿主酵母の生育は阻害されないことを見出している。変異型 RNase T1、及び分泌シグナル欠損の RNase T1 を用いた解析から、酵母の RNase T1 発現感受性は、活性を持った RNase T1 が分泌経路から外れて細胞質に誤局在することによることが示唆されている。

分泌経路の各ステップがブロックされる変異株において RNase T1 を単コピープラスミドで発現させたところ、小胞体膜透過、小胞体-ゴルジ体間輸送、及び液胞形成に関与する変異株の多くが RNase T1 発現に対して強い感受性を示すことがわかった。これらのことから、RNase T1 発現感受性と分泌経路の欠損が密接に関連した現象であり、RNase T1 発現感受性を指標にした分泌変異株の取得が可能であることが示唆された。

RNase T1 発現感受性のメカニズムを理解し、分泌経路に関する新たな知見を得ることを目的として、単コピープラスミドによる RNase T1 発現により生育が阻害される RNase T1 発現感受性 (ribonuclease T1 expression sensitive ; *rns*) 変異株 (GN1~GN38) が単離されている。現在までに、GN14 (*rns1*)、GN1 (*rns2*)、GN3 (*rns3*) 株の変異遺伝子がそれぞれゴルジ体-小胞体間の逆行輸送に関与する *DSL1*、異常分泌タンパク質の分解に関与する *UMPI*、及び α -SNAP をコードする *SEC17* と同一であることがわかっており、この方法で実際に分泌に関わる遺伝子の同定が可能であることを確認している。

本研究では、GN29 (*rns4-1*) 株の変異遺伝子の同定を行なうと共に、RNase T1 発現感受性の機構について細胞遺伝学的に解析することにより、*RNS4* 遺伝子産物 (*Rns4*) の分泌経路における役割の解明をめざした。さらに、RNase T1 発現時の酵母細胞の応答を網羅的遺伝子発現解析により検討し、RNase T1 発現感受性のメカニズム解明と共に、分泌経路における新規知見を得ることを目的とした。

1. *rns4* 変異株の変異遺伝子の同定

種々の薬剤に対する *rns* 変異株の感受性を検討した結果、GN29 (*rns4-1*) 株がツニカマイシンに対して感受性を示すことを見出した。そこでこの性質を利用して GN29 (*rns4-1*) 株における変異遺伝子の同定を試みた。GN29 (*rns4-1*) 株に YEp13 ベース酵母ゲノムライブラリーを導入し、ツニカマイシン感受性を相補する遺伝子として *VPS32/SNF7* が含まれていることを見出した。*VPS32/SNF7* を単コピープラスミドを用いてオリジナルプロモーターにより GN29 (*rns4-1*) 株で発現させた結果、RNase T1 発現感受性、ツニカマイシン感受性、及び炭素源ラフィノース培地での生育欠損を相補した。

GN29 (*rns4-1*) 株における *RNS4* ORF の塩基配列を解析した結果、55 番目のコドンのチミンが脱落し、フレームシフトにより *Rns4/Vps32* タンパク質の C 末端側の大部分を欠失することがわかった。実際、遺伝的背景の異なる BY4741 を親株とする *rns4/vps32* 破壊株と GN29 (*rns4-1*) 株では、RNase T1 発現感受性、ツニカマイシン感受性、温度感受性、ミオイノシトール要求性、炭素源ラフィノース培地での生育欠損、DTT 非感受性、200 mM CaCl_2 感受性、アルカリ感受性、1 M NaCl 感受性など、調べた限り全て同じ表現型を示した。以上の結果から、GN29 (*rns4-1*) 株の変異遺伝子が *VPS32/SNF7* であると結論した。

2. *rns4* 変異株の表現型解析

GN29 (*rns4-1*) 株の RNase T1 発現感受性の機構を解明するため、*Rns4/Vps32* と相互作用することが知られている *Vps24*、*Vps4*、*Vma6*、*Rim13*、*Rim20*、*Ygr122w*、及び *Ydr541c* をコードする遺伝子の破壊株について RNase T1 発現感受性を調べた。その結果、Multivesicular body (MVB) ソーティング経路の下流で機能する ESCRT-III の構成因子 *Vps24* と AAA-ATPase である *Vps4* をコードする遺伝子の破壊株のみが RNase T1 発現感受性を示した。

そこで、他の MVB ソーティング変異株についても同様の実験を行った結果、Vps20 を除く ESCRT-III タンパク質 (Rns4/Vps32, Vps2, Vps24) 及び Vps4 をコードする遺伝子の破壊株が RNase T1 発現感受性を示すことがわかった。膜輸送系における小胞の出芽や融合には Ca^{2+} 及びカルモジュリン (CaM) が重要な働きをすることが知られており、MVB ソーティング経路の下流においても Ca^{2+} や CaM が陥入小胞の形成に関与している可能性が考えられる。実際、Vps20 を除く ESCRT-III タンパク質及び Vps4 はすべて推定上の CaM 結合部位を持つことを見出した。さらに、CaM の推定結合部位を除去した変異型 Rns4/Vps32 では GN29 (*rns4-1*) 株の RNase T1 発現感受性を相補できないことがわかった。細胞質内の Ca^{2+} 濃度はストレス応答により増加する。そこで、MVB ソーティング変異株の RNase T1 発現感受性と外界ストレス (200 mM $CaCl_2$, pH 8.0, 1 M NaCl) 感受性との相関性を調べたところ、*rns4/vps32* 破壊株のみが RNase T1 発現感受性と共に上記の外界ストレスに感受性を示すことがわかった。近年、Rns4/Vps32 が塩 (イオン) ストレス応答に関与する Rim101 経路の活性化に必要な因子であることが報告されたことから、GN29 (*rns4-1*) 株の外界ストレス感受性の機構は Rim101 経路の欠損による可能性が考えられた。しかし、Rim101 経路に関与する Rim13、又は Rim20 をコードする遺伝子の破壊株は RNase T1 発現感受性を示さなかった。

DNA マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析から、GN29 (*rns4-1*) 株は富栄養・非ストレス条件下において、窒素源飢餓応答等のストレス応答及び関連遺伝子の発現上昇が見出された。特に、オートファジー関連遺伝子、液胞内プロテアーゼ及び液胞内プロテアーゼインヒビターをコードする遺伝子の発現が上昇しており、液胞内で菌体成分の分解を活発に行なっていることが示唆された。一方、不活性型 RNase T1*-GFP 融合タンパク質を作製し発現させたところ、YPH500-P (*RNS4 pep4 Δ*) 株では窒素源飢餓や低温処理等のストレス条件下で GFP 蛍光の液胞への局在が観察されたのに対し、GN29-P (*rns4-1 pep4 Δ*) 株では、ストレスの有無に関わらず、RNase T1*-GFP 融合タンパク質が液胞と小胞体に局在することが観察された。以上の結果から、GN29 (*rns4-1*) 株においては“RNase T1 発現感受性を引き起こす機構と Rim101 経路とは独立した恒常的ストレス応答を誘導する機構”との関連が想定された。また、GN29 (*rns4-1*) 株では、小胞体に蓄積した RNase T1 が細胞質に誤局在し、生育に必要な RNA を分解するため、RNase T1 発現に感受性を示すと考えている。

3. 網羅的遺伝子発現解析による RNase T1 発現感受性機構の解析

野生型株 YPH500 で RNase T1 を発現させた時にその防御機構としてどのような一連の遺伝子が関与しているか調べることを目的として、RNase T1 発現時の細胞応答を網羅的遺伝子発現解析により検討した。*GALI* プロモーター制御下で RNase T1 を発現誘導する単コピープラスミド、又はコントロールプラスミドを導入した YPH500 株を炭素源グルコースの選択培地で対数増殖期まで増殖させ、炭素源ガラクトースの選択培地に移し、2 時間、及び 4 時間 RNase T1 を発現させた菌体の mRNA を使用し、DNA マイクロアレイの解析を行な

った。4時間 RNase T1 を発現させた場合は遺伝子発現変化の変動が大きくなることが予想されたため、2 回行い再現性のとれた遺伝子のみ選抜した。2 時間の RNase T1 発現により 1.5 倍以上発現が上昇した遺伝子は 21 個存在し、菌体内物質輸送に関連する遺伝子は *BFR1* のみであり、転写制御に関連する遺伝子としては RNA ポリメラーゼ III (PolIII) の転写制御因子 TFIII B の構成因子をコードする *BDPI* が含まれていた。1.5 倍以下に発現が低下した遺伝子は 17 個存在した。4 時間の RNase T1 発現では、1.5 倍以上発現が上昇した遺伝子は 29 個存在し、菌体内物質輸送に関連する遺伝子は見出されなかったが、転写因子をコードする *CIN5* の発現が上昇していた。興味深いことに、tRNA などの 7 個の PolIII 転写産物の存在量の増加が検出された。対照として 4 時間麹菌の α -アミラーゼを発現させた場合は、このような PolIII 転写産物の増加はほとんど認められなかった。4 時間の RNase T1 発現により、1.5 倍以下に発現が低下した遺伝子は 21 個存在し、その中には *BDPI* が含まれていた。これらの結果から、野生株で RNase T1 を発現させた場合、tRNA などの PolIII 転写産物の 1 本鎖 RNA 領域が切断され、*BDPI* の発現制御により PolIII 転写産物の量を調節している可能性が考えられる。

DNA マイクロアレイにより富栄養条件下における *rns1/dsl1* 変異株の網羅的遺伝子発現解析を行なった結果、YPH500 株に比べ 2 倍以下に発現が低下した 229 個の遺伝子の中に、YPH500 株で RNase T1 を発現させることにより *CIN5* と共に発現上昇する *BNA1*、*TDH1*、*CPS1*、*UGA4*、*MEP2*、*YJL218w*、*YHR029c*、*YGL088w*、*YFR055w* が含まれていた。Cin5 は小胞体-ゴルジ体間の小胞輸送への関与が報告されている Rns1/Dsl1 と相互作用し、*cin5* 破壊株が RNase T1 発現感受性を示すことが既に明らかにされていることから、これらの遺伝子は Cin5 のターゲットの可能性があり、単独あるいは協調して働くことにより RNase T1 発現に対する防御に関与していると考えている。

本研究では、酵母の RNase T1 発現感受性の機構を解明していく過程で、野生株ではストレス依存的に液胞に蓄積する RNase T1*-GFP 融合タンパク質が、*rns4* 変異株ではストレスの有無に関係なく液胞と小胞体に蓄積するという興味深い知見を得た。また、酵母の RNase T1 発現に対する防御機構として、PolIII 転写産物と Bdp1 の転写制御機構や Rns1/Dsl1-Cin5 を構成因子とするシグナル伝達経路が関与している可能性を見出した。RNase T1 は細胞質への微量の誤局在が強い生育阻害をもたらすと考えられることから、細胞内タンパク質輸送の精度・効率に関与する因子の解析への有効なツールであり、その発現ストレスに対する応答機構の解析からさらに多くの細胞生物学的に興味深い知見が得られることが期待される。