

研究終了報告書

「有用物質生産性向上に向けたメタノール酵母の mRNA 動態制御」

研究期間：2021 年 10 月～2024 年 3 月

研究者：白石 晃将

1. 研究のねらい

メタノール酵母は、メタノールを単一の炭素・エネルギー源として利用できる酵母であり、強力かつ厳密に制御されるメタノール誘導性プロモーターを利用した、異種タンパク質生産系の宿主として広く利用されている。メタノール酵母 *Candida boidinii* を例にとると、メタノール代謝に関わるジヒドロキシアセトンシンターゼ (*DAS1*)、アルコールオキシダーゼ (*AOD1*) 及びギ酸脱水素酵素 (*FDH1*) をコードする遺伝子プロモーターの活性は、メタノール培養時には、グルコース培養時の百～1 万倍程に上昇する (Yurimoto et al. *Biochim Biophys Acta*. 2000)。これまで、酵母細胞内の遺伝子発現量の調節は、主にこのようなプロモーター配列の交換により行われており、最小値から数千、数万倍の範囲での調整が可能である一方、細かい調節には向かず、培養条件の違いにより大きく変化する発現量が原因で、時に、代謝バランスの崩壊及び生育阻害を起こすといった課題が残る。メタノール酵母を用いた有用物質生産性向上のためには、遺伝子発現を制御し、タンパク質量を最適に調節することが非常に重要となる。

そこで本研究で目を付けたのが、メタノール誘導性 mRNA およびそれらの細胞内動態を制御する可能性のある因子、リボ核タンパク (Ribonucleoprotein: RNP) 顆粒である。前述の通り、メタノール培養により、その代謝に関わる酵素の mRNA 群が大量に発現誘導されるが、未だその細胞内動態は不明である。しかし、セントラルドグマにおいてその中間体として位置する mRNA は、遺伝子発現レベルの調節において重要であると予想した。この mRNA 群が細胞内でどのような動態を示すか、得られる知見からその動態を制御し有用物質生産に活かすことが出来れば、産業面及び学術面でも大きなインパクトがあると考えた。ここで RNP 顆粒は、mRNA や RNA 結合タンパク質などが凝集することにより構成される膜のない細胞質オルガネラである。その構成因子や制御機構は、酵母細胞から哺乳細胞まで種を超えて高度に保存されており、これまでにその構成因子、形成誘導条件、液-液相分離と呼ばれる性質で凝集体を形成することなどが明らかにされてきた。

これら背景を受け、本研究の目的は「酵母のメタノール代謝における RNP 顆粒の役割解明、及び mRNA の細胞内動態制御を通じたメタノール誘導性遺伝子発現の精密な調整システムの構築」に設定した。

2. 研究成果

(1) 概要

分子細胞生物学と化学の融合的な手法を用いて、主に以下四点の成果を得た。一点目は、メタノール誘導性 mRNA 顆粒 (methanol-inducible mRNA granules: mimRNAg と命名) の発見である(A)。メタノール代謝に関わる主要な mRNA 群の可視化に成功し、それらがメタノール誘導時に mimRNAg を形成することを見出した。また、転写量がピークを迎える際に mimRNAg の形成数も最大となり、メタノール誘導性の顆粒数と遺伝子発現量が連動することを示した。二点目は、mimRNAg が部分的に RNP 顆粒の一種 processing body: PB に局在することである(B)。メタノール培養時には mimRNAg の一部が PB と共局在した。メタノール酵母でも各種ストレス処理により PB 形成が増加すること (Shiraishi et al. *J Cell Sci* 2018) に着目したところ、ストレス条件下 mimRNAg との共局在率が上昇した。三点目は、mimRNAg の特性評価である(C)。液-液相分離を溶解する効果を持つ 1,6-ヘキサンジオール処理により、ほぼ全ての PB 凝集体が溶解したのに対し、mimRNAg についてはその多くが抵抗性を示した。これらより、mimRNAg が PB とは性質のこととなる新奇の顆粒であることが示唆された。PB には非翻訳 mRNA が蓄積するという知見 (Lui et al. *Cell Rep* 2014) を踏まえると、PB には 1,6-ヘキサンジオール感受性である非翻訳 mimRNAg が局在すると推察している。四点目は、PB 構成因子の欠損はメタノール誘導性遺伝子発現量に～十倍程度の大きさで影響することである(D)。*edc3*Δ株に加え PB の構成因子欠損 *pat1*Δ株を作成した。*pat1*Δ株においては PB 形成は見られるもののメタノール適応時の PB 形成数が著しく減少し、関連遺伝子の転写量が約 10 倍減少した。同遺伝子破壊株における転写量の増減が誘導 1 時間後のメタノール適応時に起こることから、PB はグルコース脱抑制の制御に関わることが示唆された。以上 A～D の結果より、RNP 顆粒特に PB はメタノール誘導性遺伝子発現に関与し、精密な発現量の調整には非翻訳 mimRNAg の制御がカギとなることが考えられた。

(2) 詳細

A. メタノール誘導性 mRNA は mimRNAg の発見と形成評価

生細胞におけるメタノール誘導性 mRNA (mimRNA) の動態を調べるため、ヒト RNA 結合性 U1A タンパク質を用いて Venus 蛍光タンパク質を標的 mRNA につなぎ、可視化する U1A システムを利用した (図 1)。メタノール酵母 *Candida boidinii* を用いて、メタノール代謝に関わる主要な酵素の mRNA を可視化したところ (図 2)、メタノール誘導時に mimRNAg を形成することを見

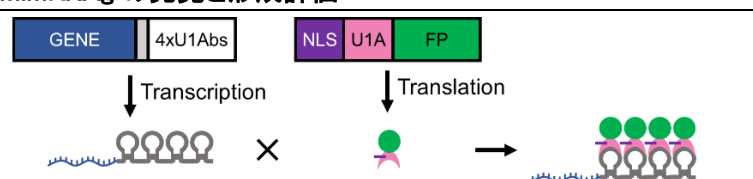


図 1: mRNA の可視化に用いた U1A システム

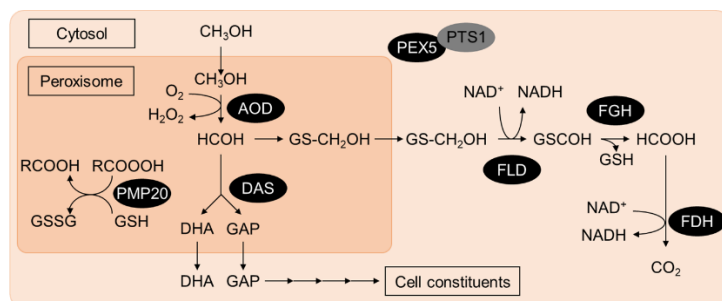


図 2: 酵母のメタノール代謝経路

出した。*DAS1* mRNA をモデルとして、メタノール誘導中の mimRNAg の動態を追跡した。グルコースからメタノールへの培地移行後、*DAS1* mRNA は核から細胞質へと移動し、顆粒の形成が観察

された。顆粒数の変化と遺伝子発現レベルの関連を調べるために、メタノール誘導中の *DAS1* mRNA レベルを調べた。その結果、転写量がピークを迎える際に mimRNAg の形成数も最大となり、メタノール誘導性の顆粒数と遺伝子発現量が連動することがわかった。細胞質酵素 FLD に翻訳される *FLD1* mRNA とメタノール非誘導性 *TDH3* mRNA についても同様の実験を行ったところ、メタノール誘導性 *FLD1* mRNA も同様の傾向にあり、mimRNAg と遺伝子発現量は連動して変動することがわかった。

B. mimRNAg は部分的に PB に局在する

DAS1 mRNA をモデルにメタノール誘導性遺伝子発現における RNP 顆粒の役割を解析した。mimRNAg および RNP 顆粒の一種 processing body (PB) の細胞内局在を調べるため、Venus で標識した *DAS1* mRNA およびマーカートンパク質 Edc3-Cerulean を発現する株 (*DAS1m-V/ Edc3-C* 株) を作成した。メタノール培養時には mimRNAg の数%が PB と共局在した。メタノール酵母でも各種ストレス処理により PB 形成が増加すること (Shiraishi et al. *J Cell Sci* 2018) に着目したところ、ストレス条件下 mimRNAg との共局在率が大幅に上昇した。現在は、ストレス条件下での RNP 顆粒による mimRNAg 隔離の生理的意義を追跡している。

C. mimRNAg の特性評価

1,6-ヘキサンジオール (HXD) は、PB のような液-液相分離 (liquid-liquid phase separation: LLPS) により凝集する顆粒を溶かす効果があることが知られている (Lin et al. *Cell* 2016)。メタノール誘導 3 時間後に HXD 処理をしたところ、Edc3-Cerulean 蛍光は完全に溶解したのに対し、*DAS1* mRNA を標識した Venus 顆粒は HXD に抵抗性を示すことがわかった。これらの結果より、mimRNAg は PB とは異なる特性を持つ顆粒であることがわかった。

D. PB 構成因子の欠損はメタノール誘導性遺伝子発現量に～十倍程度の大きさに影響する

edc3Δ 株に加え PB 構成因子欠損 *pat1Δ* 株を作成した。*pat1Δ* 株においては PB 形成は見られるもののメタノール適応時の PB 形成数が著しく減少し、関連遺伝子の転写量が約 10 倍減少した。両遺伝子破壊株における転写量の増減が誘導後のメタノール適応時に起こることから、PB はグルコース脱抑制の制御に関わることが示唆された。以上 A.～D. の結果より、RNP 顆粒特に PB はメタノール誘導性遺伝子発現に関与し、精密な発現量の調整には非翻訳 mimRNAg の制御がカギとなることが考えられた。

3. 今後の展開

これまでに得られた成果を踏まえ、今後は大きく三つの研究内容を展開する。一つ目は、mimRNAg とともに顆粒を形成する mRNA およびタンパク質を同定し、細胞内局在を時空間的に制御する因子を特定する。二つ目は、複数種の mimRNAg の細胞内動態を可視化解析できる系を確立すること、*Candida boidinii* を用いて構築してきた実験系を *Komagataella phaffii* など他のメタノール酵母にも展開する。これらの研究を達成することで、mimRNAg を自在に操る技術の開発が期待でき、申請者が目標とする数十倍程度の精密な調整を可能とする遺伝子発現系の構築に近づくとともに、mimRNAg 動態の普遍的な理解を得ることができる。三つ目は、自然界を模倣した実験系を用いることで、mimRNAg 形成の生理的意義を明らかにする。これにより、申請者が世界に先

駆けて推進してきたメタノール酵母における mRNA 研究分野を、微生物生態学分野や植物微生物相互作用分野などにも展開する。

4. 自己評価

おおよそ計画通り研究を進めることができ、メタノール誘導性 mRNA の可視化系を確立できたことは非常に重要である。当初は、mimRNAg の多くが RNP 顆粒に局在し、RNP がメタノール誘導性遺伝子発現に大きく関与するとの予想だったが、mimRNAg の RNP 顆粒への局在は通常数%に過ぎず、新奇の細胞質顆粒であることが示唆された。またここから研究を発展させて、ストレス条件下では mimRNAg が RNP 顆粒に積極的に隔離されるようになり、それは細胞のストレス耐性向上を生理的意義とすることを明らかにできた点も重要である。さらに、JSTACT-X 研究を今後さらに発展させるためのヒントになる結果も得られた。一方、mimRNAg に局在するタンパク質の網羅的解析がまだできていないことは急務に解決すべき課題の一つである。mimRNAg を抽出できる条件を検討し、細胞内局在を時空間的に制御する因子を特定することに努めたい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 0件

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: 0 件(特許公開前のものは件数にのみ含む)

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 酵母 *Candida boidinii* におけるメタノール誘導性 mRNA の可視化による細胞内動態
○白石晃将、赤木美穂、幅田亜香莉、由里本博也、阪井康能(京都大学大学院 農学研究科)
RNA Frontier Meeting 2021. 2022 年 3 月. オンライン
2. Visualization analysis of intracellular dynamics of methanolinduced mRNAs in yeast *Candida boidinii*
○Kosuke Shiraishi, Miho Akagi, Akari Habata, Hiroya Yurimoto, Yasuyoshi Sakai (Graduate School of Agriculture, Kyoto University)
The 23rd Annual Meeting of the RNA Society of Japan. July 2022. Kyoto, Japan
3. Visualization analysis of intracellular dynamics of methanol-induced mRNAs and RNP granules in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*
○Kosuke Shiraishi, Miho Akagi, Fuka Sekioka, Akari Habata, Hiroya Yurimoto, Yasuyoshi Sakai (Graduate School of Agriculture, Kyoto University)
The 24th Annual Meeting of the RNA Society of Japan. July 2022. Okinawa, Japan
4. メタノール酵母 *Candida boidinii* におけるメタノール誘導性 mRNA と RNP 顆粒の可視化解析
○関岡風花、白石晃将、赤木美穂、幅田亜香莉、由里本博也、阪井康能(京都大学大学院 農学研究科)
酵母遺伝学フォーラム第 56 回研究報告会. 2023 年 8 月. 新潟
5. 酵母 *Candida boidinii* におけるメタノール誘導性 mRNA 顆粒の時空間制御と特性評価

公開

○関岡風花、白石晃将、赤木美穂、幅田亜香莉、由里本博也、阪井康能（京都大学大学院
農学研究科）

日本農芸化学会 2024 年度大会. 2024 年 3 月. 東京