

2 0 1 7 年度

青山学院大学審査学位論文の要約

指導教員 阿部 文快 教授

出芽酵母の機能未知遺伝子 *EHG1* が制御する

栄養源輸送と高水圧への適応機構

Nutrient transports and high-pressure adaptation
regulated by a poorly characterized gene *EHG1* in

Saccharomyces cerevisiae

理工学研究科

理工学専攻

黒坂 豪祐

本論文では、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* ゲノムに見いだされた機能未知遺伝子 *EHG1* が小胞体膜タンパク質をコードすること、酵母が数百気圧もの高水圧下で生存するために Ehg1 タンパク質が不可欠であること、そして Ehg1 タンパク質が細胞膜に局在する栄養源輸送体の機能維持に重要な役割を演じていることを論ずる。

温度とともに圧力は生物にとって重要な環境因子である。例えば海洋生物の場合、深度に依存して圧力がかかり、水深 6,000 m 以深の超深海では陸上の 600 倍以上の水圧にさらされる。こうした環境からも多様な微生物が単離されており、中には大気圧下より高圧下で良好に増殖する好圧性細菌や、大気圧下では増殖できず高圧下でのみ増殖可能な絶対好圧性細菌などが見つかっている。一方、大腸菌は 40 MPa (約 400 気圧に相当；以後、単位として MPa を使用) 程度の高圧下では細胞分裂ができないままタンパク質合成が進み、菌体は異常伸長する。また、ヒトにおいても運動時に関節には数十 MPa もの圧力がかかっている。このように身近な物理量である圧力だが、これまで生体作用に関する分子レベルの研究はあまり進んでいない。本研究では出芽酵母 *S. cerevisiae* を用い、高水圧に対する細胞応答と適応機構の解明に向け分子遺伝学的なアプローチを行った。*S. cerevisiae* は細胞レベルの基本的な分子機構が高等生物との間でよく保存されていることから、真核生物のモデルとして古くから用いられてきた。得られた知見は多様な生物種に適用可能である。また、遺伝学や生化学の膨大な知見と洗練された分子遺伝学的ツールは広範な研究を後押ししている。

出芽酵母では、細胞膜上のトリプトファン輸送体 Tat1 および Tat2 の機能が高圧下で顕著な脆弱性を示す。その結果、トリプトファン要求性株 (トリプトファンを自ら合成できないため生存には培地からの取り込みが必須) の増殖は、15–25 MPa で停止する。一方、トリプトファン非要求性株 (トリプトファンを自ら合成できる) では同じ条件下で増殖可能である。トリプトファン非要求性株を親株とする非必須遺伝子破壊株ライブラリーを用いたスクリーニングが行われ、高圧や低温条件下での増殖に不可欠な 84 個の遺伝子が同定された。本研究ではまず、これら 84 株の高圧/低温感受性がトリプトファン以外の栄養要求性とどのような関係にあるのかを調べた。意外なことに、栄養要求性を非要求性にするだけで、すなわちロイシン、ヒスチジン、リジンおよびウラシルの合成を可能にするだけで、多数の遺伝子破壊株の高圧増殖能が回復した。特に、これまで機能がほとんど解析されてこなかった未知遺伝子群の破壊株に大幅な回復傾向が見られた。こうした遺伝子のうち、本研究では高圧増殖能の回復効果が最も顕著だった機能未知遺伝子 *EHG1/YPRI53W* に着目し、詳細な解析を行った。なお、出芽酵母の遺伝学における命名法に従い、*EHG1* のように大文字イタリック表記は遺伝子を、*ehg1Δ* の表記はその遺伝子の欠損株を、Ehg1 の表記はタンパク質を表すものとする。また以後、出芽酵母 *S. cerevisiae* を単に酵母と表記する。

酵母のトリプトファン非要求性株において見出された 84 個の遺伝子破壊株は、なぜ高圧/低温感受性を示すのか？その原因の一部が栄養源取り込みの失陥にあることを

論ずる。解析に用いられた野生型の親株 BY4742 株は、ヒスチジン、ロイシン、ウラシルおよびリジンの合成を担う遺伝子 (それぞれ *HIS3*、*LEU2*、*URA3* および *LYS2*) の 4 種を欠損するため栄養要求性を示す。すなわち増殖のため 4 種の栄養源を培地から取り込む必要がある。そこで、84 株全てに上記 4 種の遺伝子をプラスミドで導入し栄養源を自ら合成する株を作製した。それらを大気圧・常温 (0.1 MPa、25°C)、高圧 (25 MPa、25°C)、および低温 (0.1 MPa、15°C) で 24 時間培養し、増殖能を濁度 (OD₆₀₀) から評価した。その結果、高圧または低温条件下で増殖能が回復する 20 個以上の遺伝子破壊株が見いだされた。特に顕著な高圧増殖能を示す株の中には、これまで機能未知とされてきた遺伝子の一群が含まれていた。その他、エルゴステロール合成、転写/mRNA 分解、ミトコンドリア機能、膜輸送、イノシトールリン酸代謝、ストレス応答、およびアミノ酸合成に関わる遺伝子が含まれていた。従って、これらの遺伝子を欠損した結果、4 つの栄養源のうち 1 つあるいは複数の取り込みに失陥が生じている可能性が示唆された。そこで以後、最大の回復効果が見られた遺伝子 *YPR153W* に着目した。*YPR153W* の欠損株では、大気圧・常温下の増殖能が OD₆₀₀ 換算で野生株の約 90% を維持しており、大きな差は認められなかった。一方、25 MPa での増殖能は大幅に低下し、野生株の約 10% 程度だった。詳細に調べたところ、欠損株の増殖能は 15 MPa までは野生株とほぼ同等であるものの、20-25 MPa で顕著に低下することがわかった。そして、栄養要求性の相補により *YPR153W* 遺伝子欠損株の高圧増殖能は約 7 倍にまで向上することがわかった。次に Ypr153w タンパク質の細胞内局在を明らかにするため、C 末端に緑色蛍光タンパク質 GFP を融合して発現させた。その結果、Ypr153w-GFP は核の周りの小胞体 (endoplasmic reticulum, ER) と細胞膜直下の小胞体 (表層小胞体, cortical ER) に局在することがわかった。よって *YPR153W* が小胞体タンパク質をコードする高圧増殖に必須な遺伝子であり、これを *EHG1* (ER-associated high-pressure growth gene 1) と名付けた。

Ehg1 は 140 アミノ酸残基からなるタンパク質で、膜貫通領域予測プログラム TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) では、3 つの膜貫通領域の存在が示唆された。この膜トポロジーの妥当性について検証するため、Split ubiquitin system を用いた Yeast two-hybrid 法を実施した。実験系として、N 末端が細胞質側を向く既知小胞体タンパク質 Alg5 の N 末端に NUbI を融合し、Ehg1 の N 末端や C 末端、あるいはその部分欠失変異体に CUb を融合し、相互作用の有無を調べた。融合した NUbI と CUb が小胞体上で同じ側を向いていれば相互作用が検出される。その結果、発現させた全ての Ehg1-CUb 融合体は、N 末端が細胞質側を向く NUbI -Alg5 と相互作用した。すなわち Ehg1 は膜を貫通しておらず、トポロジー予測に反する結果が得られた。膜貫通領域と予測された領域は疎水性が高いため、細胞質に露出しているとは考えにくい。よって、膜を貫通せず膜内に埋没している可能性が考えられる。Ehg1 にアミノ酸残基の欠失変異を導入し、高圧増殖能に重要な部位の同定を試みた。その結果、Ehg1 の N 末端側 16-20 アミノ酸残基が特に重要であり、欠失とともに高圧増殖能も消失した。Ehg1 は機能未知である

ものの、ホモログは出芽酵母に近縁種の子囊菌類に見いだされ、中には深海底泥から単離された酵母菌も含まれている。特にプロリン残基に富むN末端配列の保存性が高い。そこで、これらのプロリンを中心にアラニン変異体を作製し、高圧増殖能に及ぼす影響を調べた。その結果、Phe19 と Pro17/Pro20 をそれぞれアラニンに置換した変異体は高圧増殖能を示さなかった。プロリンリッチな配列の中で PxxP モチーフ (x は任意のアミノ酸残基) は、SH3 (Src-homology 3) ドメインタンパク質と結合することが知られている。SH3 ドメインタンパク質は細胞内シグナル伝達において重要な役割を果たしており、Ehg1 もこうした経路で働いているのかもしれない。しかし Ehg1 の PxxP モチーフはその典型配列とは異なるため、真に SH3 ドメインタンパク質と結合するの可否かは今後の検討を要する。

前述した高圧増殖能の回復する株のスクリーニングでは、*EHG1* をはじめ *MTC2*、*MTC4*、*MTC6*、*DLT1*、および *CSF1* など多くの機能未知遺伝子の欠損株が取得された。これらの株の高圧感受性と栄養要求性の関連を調べたところ、4種の栄養要求性のうち、いずれか1つのみを相補した株では顕著な高圧増殖能の回復は見られなかった。一方、3種の栄養要求性を同時に相補した場合には、その傾向は *CSF1* を除く全ての遺伝子欠損株間で酷似していた。この結果は、高圧増殖に関わる複数の機能未知遺伝子が、栄養源取り込みにおいて共通の経路で働く可能性を示唆している。

次に *ehg1Δ* 株において、栄養源取り込み能の増強が高圧増殖能を回復させることを論ずる。Fur4 はウラシルの輸送体であり酵母細胞膜に局在する。これを *ehg1Δ* 株に過剰発現させたところ、高圧増殖能が回復した。従って、*ehg1Δ* 株におけるウラシル輸送能の低下が高圧下での増殖を制限するものと考えられる。ただしこのとき、ウラシル以外の栄養要求性 (ヒスチジンとロイシン) を相補しておく必要があることから、ヒスチジンやロイシンの輸送能についても *ehg1Δ* 株では減弱していることが予想された。高圧が *ehg1Δ* 株のウラシル輸送能に及ぼす影響を定量的に調べるため、³H 標識ウラシルを用いた取り込み実験を行った。大気圧下で細胞を培養した場合、*ehg1Δ* 株のウラシル輸送活性は野生株と同程度だった。ところが、*ehg1Δ* 株を 25 MPa で 3 時間培養した後のウラシル輸送活性は、同じ条件で野生株を培養したときの約 50% にまで減弱していた。このことは小胞体タンパク質である Ehg1 が、高圧下では栄養源輸送体の活性維持に重要な役割を果たすことを示唆している。その原因を探るため、細胞膜上のウラシル輸送体 Fur4 の発現レベルをウェスタンブロッティングにより解析した。その結果、野生型と *ehg1Δ* 株ではいずれも 25 MPa で培養すると Fur4 が分解傾向にあるものの、*ehg1Δ* 株の増殖が停止する高圧培養後 12 時間であっても、Fur4 発現量に両者の間で大きな差は見られなかった。また、Fur4-GFP の細胞内局在についても、高圧培養後の経時変化を見る限り野生株と *ehg1Δ* 株の間に大きな差はみられず、ウェスタンブロッティングの結果を支持した。一般に酵母の基質輸送体はユビキチン依存分解による量的制御下にあり、結果として細胞内への基質取り込みが調節されている。しかし、Ehg1 は高圧下における

輸送体の量的な調節を行っているのではなく、「輸送活性」を正に制御していることが新規であり特筆すべき点である。このことは Ehg1 が演じる新たな輸送体制御メカニズムの存在を示唆する（後述）。

次に Ehg1 による酵母トリプトファン輸送体 Tat2 の制御について論ずる。Tat2 は他の多くの基質輸送体とは異なり、高水圧や低温のみならず様々な薬剤に対して著しい脆弱性を示す。結果としてトリプトファン要求性株は多様なストレスに超感受性である。*EHG1* 欠損が輸送体 Tat2 に及ぼす影響を調べるため、トリプトファン要求性の野生型 YPH499 株の *EHG1* 遺伝子を破壊し高圧増殖能を評価した。同じ野生型であっても前述の BY4742 株に比べ YPH499 株の高圧増殖能は低く、15 MPa 程度の圧力下で増殖が遅延・停止する。興味深いことに *EHG1* の欠損株は、わずか 10 MPa 程度の圧力下で増殖停止することがわかった。また、この増殖能の減弱はトリプトファン輸送体 Tat2 やヒトトリプトファン輸送体 hTAT1 の過剰発現により回避された。従って、*EHG1* の欠損によるトリプトファン輸送能の低下が高圧感受性の原因であり、Ehg1 が高圧ストレス下における Tat2 の輸送活性にも重要であることが示唆された。さらに、*EHG1* の欠損は大気圧下で低トリプトファン培地 (4 mg/L) における増殖能を低下させたことから、Ehg1 は Tat2 の活性維持、特に高親和性輸送に貢献していると言える。Tat2 は高圧ストレスの他にも、低温やある種の薬剤投与で分解されやすいタンパク質である。こうした条件下で易損性を示す輸送体では、Ehg1 による制御が重要となるに違いない。

本研究では、これまで機能未知とされてきた酵母遺伝子 *EHG1* に着目し、この遺伝子にコードされたタンパク質が高圧条件下でウラシルやトリプトファンなど栄養源輸送体の機能を維持することを明らかにした。この生命現象は、栄養要求性株を用いてはじめて明確な表現型として捉えられた。深海性酵母など自然界に由来する微生物は一般にウラシルやアミノ酸などを自ら合成するが、周囲に栄養源がある限りそれらを利用する。*EHG1* のホモログが子囊菌類に広く保存されている事実から、前述した機能は普遍的である可能性が高い。小胞体に局在する Ehg1 が細胞膜上の栄養源輸送体の機能を高圧下でどのようにして維持しているのか？現在のところ、次のような作業仮説を立てている。膜タンパク質の新生ポリペプチド鎖は小胞体膜で適切にフォールディングされたのち、COPII 小胞に乗りゴルジ体へと輸送されやがて細胞膜に運ばれる。高圧は膜や膜タンパク質の構造に摂動を与えるが、Ehg1 存在下でフォールディングされた輸送体タンパク質には高圧耐性が付与されている可能性が考えられる。ただしその構造の実体はつかめていない。また、酵母細胞膜の直下には表層小胞体が存在しそこにも Ehg1 は局在する。よって、表層小胞体の Ehg1 が細胞膜上の輸送体タンパク質と直接相互作用し、高圧下で構造安定化をはかっている可能性も考えられる。*EHG1* を欠損したとき生ずる輸送体の構造変化の検出と、相互作用の証明が今後の課題となる。こうした検討を通じて高圧下における酵母の生理機能、さらには深海生物における高圧適応機構解明への貢献が期待される。