

発表番号 55 (0349)

## 酵母の耐塩性向上のための基礎研究

助成研究者：前田 達哉（東京大学 分子細胞生物学研究所）

酵母は醤油・味噌・漬物といった高塩性発酵食品の生産に古くから利用されてきた。これら高塩性発酵食品の生産において、高塩濃度の発酵条件下で安定して優れた香味と高い生産性を維持するためには、用いられる酵母が耐塩性に優れていることが要求される。酵母は、高塩濃度条件下では、それによって生じるストレスに対抗するため、さまざまな生理的応答反応を引き起こすことで耐塩性を獲得している。本研究では、塩ストレスで活性化されて種々の応答反応を制御する情報伝達経路として、イオンストレスに応答する Cpl1-Rim101 経路に焦点を当て、その制御機構の新しい局面を明らかにした。

Cpl1-Rim101 経路は、イオンストレスに応答して転写因子 Rim101 を限定分解し活性化する経路である。この分解を触媒すると考えられているカルパイン様プロテアーゼ Cpl1 に加え、Rim8、Rim9、Rim20、Rim21 と呼ばれるタンパク質が経路の構成因子であることが知られており、これらの因子の欠損変異株は Rim101 を限定分解できず耐塩性が低下する。これらとは逆に、Vps2、Vps4、Vps24 と呼ばれるタンパク質の欠損変異株では、イオンストレス無しでも Rim101 限定分解が恒常的に活性化されていることを見出した。これら3つのタンパク質は、いずれもタイプ E Vps タンパク質と総称されるエンドソームから液胞へのタンパク質輸送に関わる因子のメンバーであり、Cpl1-Rim101 経路の活性制御がエンドソーム機能と密接に関連していることが明らかになった。また、遺伝学的解析により、これらの因子が以下のような順序で機能し、矢印で示したシグナルの流れがあることを明らかにした。

イオンストレス → Rim8・Rim9・Rim21 → Vps2・Vps4・Vps24 → Cpl1・Rim20 → Rim101 限定分解 → 耐塩性誘導

また、Rim101 が Cpl1 による限定分解とは独立に、イオンストレスに応答して Ca<sup>2+</sup>-カルモジュリン依存性プロテインホスファターゼであるカルシニューリンによる脱リン酸化を受けていることを明らかにした。限定分解と脱リン酸化という2つの異化反応により Rim101 が複雑な調節を受け、結果として適切イオンストレス応答反応が達成されていると考えられる。

酵母の耐塩性に関わるイオンストレス情報伝達経路の解析から、ストレス応答反応が細胞の生理機能と精妙に統合されている様子の一端が明らかになった。本研究で得られた知見をもとに、イオンストレス情報伝達経路と、塩ストレスのもう一つの局面である浸透圧ストレスに対する情報伝達経路とが、お互いにどのように協調しつつ耐塩性に関わる種々の応答反応を適切に統合しているのかを明らかにし、耐塩性に優れた酵母株創出のための基礎を整備することを目指したい。



23  
助成番号 0349

## 酵母の耐塩性向上のための基礎研究

前田 達哉 (東京大学 分子細胞生物学研究所)

### 研究目的

酵母は醤油・味噌・漬物といった高塩性発酵食品の生産に古くから利用されてきた。これら高塩性発酵食品の生産において、高塩濃度の発酵条件下で安定して優れた香味と高い生産性を維持するためには、用いられる酵母が耐塩性に優れていることが要求される。酵母は、高塩濃度条件下では、それによって生じるストレスに対抗するため、さまざまな生理的応答反応を引き起こすことで耐塩性を獲得している。例えば、細胞内に流入した有害なイオンを排出するトランスポーターを活性化したり、適合溶質を蓄積して細胞膜内外の浸透圧差を解消したりすることなどが知られているが、塩耐性獲得のために必要な応答反応を包括的に理解するには程遠いのが現状である。また、酵母が塩ストレス刺激を検知し、応答反応を引き起こすための情報伝達経路に関しても、不明な点が多く残されている。塩ストレスは、細胞内外のイオン環境の極端な不均衡により引き起こされるイオンストレスの側面と、過剰な浸透圧により引き起こされる浸透圧ストレスの側面とに分けて考えることができる。我々は、塩ストレスで活性化されて種々の応答反応を制御する情報伝達経路として、イオンストレスに応答する Cpl1-Rim101 経路と、浸透圧ストレスに応答する HOG 経路について研究を進めてきた。今年度は主に Cpl1-Rim101 経路に焦点を当てて解析を進めた。

Cpl1-Rim101 経路は、イオンストレスに応答して転写因子 Rim101 を限定分解し、活性化する経路である<sup>1)</sup>。この限定分解を触媒すると考えられているカルパイン様プロテアーゼ Cpl1 に加え、Rim8、Rim9、Rim20、Rim21 と呼ばれるタンパク質が経路の構成因子であることが知られているが、Cpl1 を除いては構造上の特徴に乏しく、これらの因子がどのような分子機構でイオンストレスを検知し、さらに Rim101 の限定分解を制御しているのかは分かっていない。これらの構成因子が欠損した変異株においては、いずれも共通して Rim101 の限定分解が起こらず、それに伴って耐塩性が低下することが観察されている。昨年度は、これらの欠損変異株とは逆に、イオンストレスにさらされていない条件下でも、経路が恒常的に活性化され Rim101 の限定分解が昂進している変異株を単離し、諸因子が経路内で機能する順序を遺伝学的に以下のように決定した。イオンストレス Rim8・Rim9・Rim21 Cpl1・Rim20 Rim101 限定分解。今年度は変異株のスクリーニングの規模を拡大し、恒常的活性化変異株を

包括的に単離するとともに、単離した変異株の原因遺伝子を同定し、ストレス検知と限定分解制御の分子機構を明らかにすることを目指す。また、イオンストレスに応答した Rim101 活性化の分子機構に関し、限定分解に加えて他のタンパク質修飾反応が関与している可能性について検討する。

塩ストレス応答反応に関わる情報伝達経路の解明を通じて、酵母の耐塩性獲得の分子基盤の詳細を明らかにし、耐塩性に優れた酵母株の創出のための基礎を整備することを目指す。

## 研究方法

### 1 . Cpl1-Rim101 経路の恒常的活性化変異株の包括的単離

Cpl1-Rim101 経路を構成する因子のうち、Rim9 と Rim21 は膜貫通領域と考えられる疎水性領域をそれぞれ4カ所と7カ所有し、膜タンパク質であると予測される。細胞外のイオンストレスを検知する場としては、細胞膜上が有力な候補として考えられ、これら2つのタンパク質はセンサーとして経路の最上流で機能していることが期待される。そこで、Rim9 ならびに Rim21 の欠損変異株から、塩化リチウムに対する耐性を指標に耐塩性を回復したような変異株を多数単離した。得られた耐塩性回復変異株において Rim101 の限定分解が同時に回復しているかどうかを、Rim101 に対するウエスタン法を用いて検討した。Rim101 の限定分解が回復したものは、経路が恒常的に活性化される変異株の候補であると考えられる。また、得られた Rim101 限定分解回復変異株を相互に掛け合わせて相補性試験を行うことにより、変異株を原因遺伝子ごとに分類した。

Rim101 限定分解回復の原因となっている変異を、Rim9 ならびに Rim21 欠損変異から分離して単独変異とした場合に、イオンストレスにさらされていない条件下でも Rim101 の限定分解が昂進しているか否か、すなわち Cpl1-Rim101 経路が恒常的に活性化されているか否かをウエスタン法を用いて検討した。

### 2 . Cpl1-Rim101 経路の恒常的活性化変異株の原因遺伝子の同定

1 で単離した耐塩性回復変異株は、Rim9 ならびに Rim21 欠損変異の耐塩性と Rim101 の限定分解を回復していることに加え、生育が温度感受性を示した。変異株に野生株ゲノムライブラリーを形質転換し、制限温度下での生育の回復を指標に原因遺伝子の単離を行った。単離したゲノムクローンの両端の塩基配列を決定し、酵母ゲノムデータベース (Saccharomyces Genome Database、<http://www.yeastgenome.org/>) を参照してクローンに含まれるゲノム領域を決定した。その領域に含まれる個々の遺伝子を含んだサブクローンを作製し、変異株に再導入して増殖の回復を確認することにより原因遺伝子を同定した。また、原因遺伝子で形質転換をすると Rim101 の限定

分解も不能になることを確認した。同定した遺伝子の欠損変異株を作製し、それぞれ掛け合わせにより Rim9 ならびに Rim21 欠損変異株との二重変異株を作製し、二重変異株の耐塩性と Rim101 限定分解を検討した。

### 3 . Cpl1-Rim101 経路の構成に関する遺伝学的解析

Vps2、Vps4、Vps24 の欠損変異株を作製し、既知の Cpl1-Rim101 経路構成因子である Cpl1、Rim8、Rim9、Rim20、Rim21 のいずれかの欠損変異との二重変異株を作製し、二重変異株で Rim101 の限定分解が起こっているか否かをウエスタン法により検討した。二重変異として組み合わせた Vps タンパク質を X、既知経路構成因子を Y とすると、Rim101 の限定分解が起こっていれば X は Y よりも経路において下流で機能すると考えられ、逆に限定分解が起こっていなければ X は Y よりも上流で機能すると考えられる。可能な全ての組み合わせで二重変異株を作製することにより、経路を構成する諸因子が経路内で機能する順序を決定した。

### 4 . カルシニューリンによる脱リン酸化を介した Rim101 の制御機構の解析

野生株と Cpl1 欠損株を、通常の培養条件である YPD 培地に加え、0.8M NaCl、もしくは pH7.5 の培養条件で刺激した後、Rim101 タンパク質をウエスタン法で検出した。また、Ca<sup>2+</sup>-カルモジュリン依存性プロテインホスファターゼであるカルシニューリンを欠損した Cnb1 欠損変異株を用いて同様の解析を行った。

N 末端に HA エピトープタグを付加した Rim101 を Cpl1 Cnb1 二重欠損変異株で発現し、抗 HA 抗体を用いた免疫沈降法により精製した。精製した Rim101 は全長型で高度にリン酸化されていた。これに、ウシ小腸アルカリホスファターゼ、カルシニューリン(ウシ)と Ca<sup>2+</sup>-カルモジュリン混合物、カルシニューリンと EGTA-カルモジュリン混合物、Ca<sup>2+</sup>-カルモジュリン混合物、カルシニューリンと Ca<sup>2+</sup>-カルモジュリン、カルシニューリン阻害剤シペルメトリン混合物、のそれぞれを作用させた後、ウエスタン法により Rim101 の電気泳動度の変化を評価した。

## 研究結果

### 1 . Cpl1-Rim101 経路の恒常的活性化変異株の包括的単離

これまでに同定されたこの経路の構成因子 Cpl1、Rim8、Rim9、Rim20、Rim21 のいずれかを欠損した変異株は、共通して Rim101 の限定分解が起こらず、それに伴い耐塩性が低下する。昨年度は、センサーの候補である Rim9 の欠損変異株から、耐塩性と Rim101 の限定分解を同時に回復した変異株(抑圧変異株)を単離した。今年度は、Rim9 欠損変異株からの抑圧変異株のスクリーニングの規模を拡大すると共に、やはりセンサーの候補である Rim21 の欠損変異株からも同様に抑圧変異株の単離を行い、

多数の抑圧変異株を得た。得られた抑圧変異株を相互に掛け合わせて相補性試験を行った結果、Rim9 欠損変異株由来の抑圧変異株は、2つの原因遺伝子のいずれかの変異に由来すること、Rim21 欠損変異株由来の抑圧変異株は、3つの原因遺伝子のいずれかの変異に由来することを明らかにした。

回復の原因となっている変異(抑圧変異)を、Rim9 あるいは Rim21 欠損変異から分離して単独変異とすると、イオンストレスにさらされない条件下でも Rim101 の限定分解が昂進し、経路が恒常的に活性化されていることが明らかになった(データは示していない)。

## 2 . Cpl1-Rim101 経路の恒常的活性化変異株の原因遺伝子の同定

Rim9 欠損変異株由来の恒常的活性化変異株(抑圧変異株)は2つの原因遺伝子のいずれかの変異に、Rim21 欠損変異株由来の恒常的活性化変異株(抑圧変異株)は3つの原因遺伝子のいずれかの変異に由来する。これらの抑圧変異株は、いずれも耐塩性と Rim101 の限定分解を同時に回復していることに加え、生育が温度感受性であったことから、この温度感受性の回復を指標に野生株ゲノムライブラリーから原因遺伝子の単離を行った。その結果、Rim9 欠損変異株由来の抑圧変異株の原因遺伝子は Vps2 と Vps24 というタンパク質をコードするもの、Rim21 欠損変異株由来の抑圧変異株の原因遺伝子は同じ Vps2、Vps24 に加え、Vps4 というタンパク質をコードするものであることが明らかになった。

これら3つのタンパク質は、いずれもクラス E Vps タンパク質のメンバーである。クラス E Vps タンパク質とは、エンドソーム経路で液胞へと輸送される液胞タンパク質をエンドソーム膜上でソーティング(仕分け)するための機構に關与する一群の因子である<sup>2)</sup>。Vps2、Vps4、Vps24 の欠損変異を新たに作製し、Rim9 ならびに Rim21 欠損変異株との二重変異株を作製したところ、いずれも耐塩性と Rim101 の限定分解を回復することができ、スクリーニングで単離された抑圧変異がこれら3つのタンパク質の欠損変異であったことが確認された(データは示していない)。

## 3 . Cpl1-Rim101 経路の構成に関する遺伝学的解析

Vps2、Vps4、Vps24 のいずれの欠損変異株でも Rim101 の限定分解は昂進していた。また、この3つの欠損変異のいずれかと、既知の Cpl1-Rim101 経路構成因子である Cpl1、Rim8、Rim9、Rim20、Rim21 のいずれかの欠損変異との二重変異株を全ての組み合わせで作製し、それぞれにおいて Rim101 の限定分解が起こるか否かを検討したところ、Rim8、Rim9、Rim21 との二重変異株においてはいずれも限定分解が起こっているのに対し、Cpl1、Rim20 との二重変異株においては限定分解が起こっていなかった(データは示していない)。また二重変異株の耐塩性は、限定分解の回復と一致

して回復した。このことから、この経路では構成因子が Fig. 1 に示す順序で機能し、黒矢印で示したシグナルの流れがあることが明らかになった。

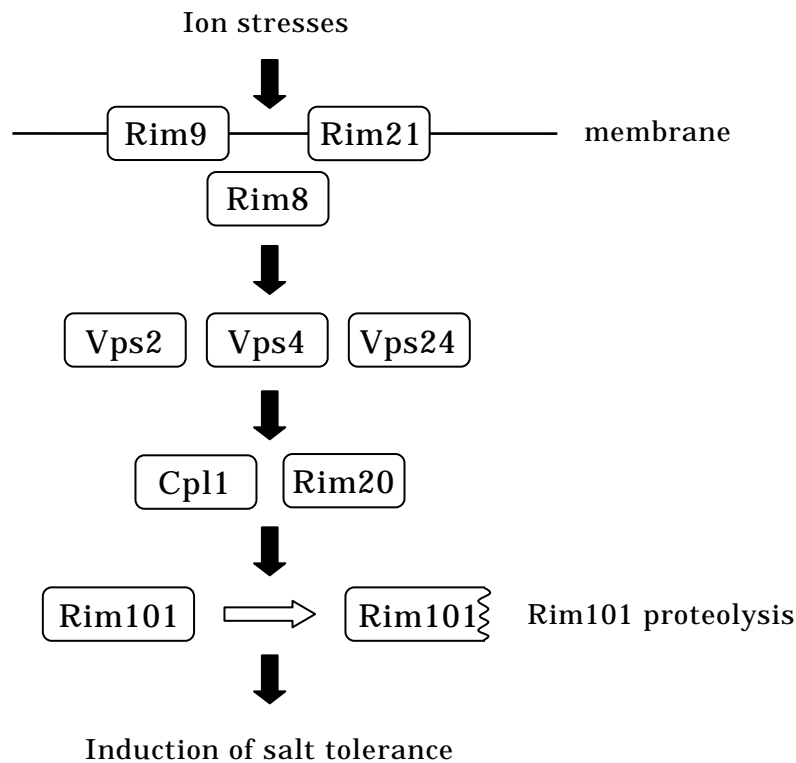


Fig. 1. Signal flow in the Cpl1-Rim101 pathway.

#### 4. カルシニューリンによる脱リン酸化を介した Rim101 の制御機構の解析

活性化された Cpl1-Rim101 経路は、最終的に多数の遺伝子の転写制御を介して耐塩性の獲得に寄与している。昨年度は、Rim101 の活性化に依存して転写が誘導されるものとして Ena1、Pho8、Shc1 をコードする 3 つの遺伝子、抑制されるものとして Prb1 をコードする遺伝子を同定した。このうち Ena1 は、Na<sup>+</sup>イオンや Li<sup>+</sup>イオンを細胞外へ排出するポンプとして機能するタンパク質である。Ena1 はイオンストレスに应答して転写レベルで強く誘導されるが、その転写誘導機構は複数の経路が関与する複雑なもので、未だ完全には解明されていない。これまでに明らかにされている転写誘導の機構の一つに、Ca<sup>2+</sup>-カルモジュリン依存性プロテインホスファターゼであるカルシニューリンが、イオンストレスで活性化されて転写因子 Crz1 を脱リン酸化し、これにより活性化された Crz1 が核内に移行して Ena1 遺伝子のプロモーター領域に結合して転写を誘導するというものがある<sup>3)</sup>。

Na<sup>+</sup>イオンや Li<sup>+</sup>イオンストレスにさらされた細胞内での Rim101 の挙動をウェスタン法により確認したところ、全長とプロセス型に相当する 2 本のバンドのいずれにお

いても電気泳動度の増大が見られた。また、この電気泳動度の増大はカルシニューリンの欠損変異株では起こらなかった。このことは、イオンストレスに応答して起こる Rim101 のこの電気泳動度の増大が、カルシニューリンによる Rim101 の脱リン酸化によるものであることを強く示唆している ( Fig. 2. )。また、これと一致して、酵母から精製したリン酸化型 Rim101 は、 *in vitro* でカルシニューリンにより  $Ca^{2+}$ -カルモジユリン依存的に脱リン酸化された ( Fig. 3. )。

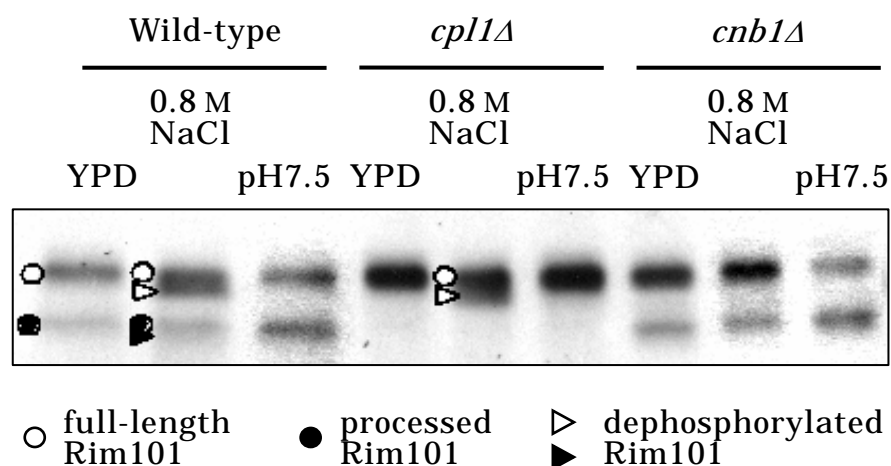
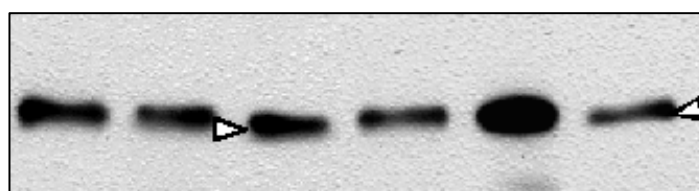


Fig. 2. Rim101 is dephosphorylated upon salt stress, but not upon alkaline stress, in calcineurin-dependent manner.

*cpl1Δ*: Cpl1-deficient mutant, *cnb1Δ*: calcineurin-deficient mutant

calcineurin	—	—	+	+	+	—
calmodulin/ $Ca^{2+}$	—	+	+	—	+	—
calmodulin/EGTA	—	—	—	+	—	—
cypermethrin	—	—	—	—	+	—
CIAP	—	—	—	—	—	+



▷ Dephosphorylated Rim101

Fig. 3. Rim101 is dephosphorylated by calcineurin in calmodulin/ $Ca^{2+}$ -dependent manner.

CIAP: calf intestinal alkaline phosphatase



## 考察

経路の最上流で機能していることが期待される Rim9 と Rim21 の欠損変異株から抑圧変異株を検索するという方法で、経路が恒常的に活性化された変異株を包括的に単離したところ、それらは Vps2、Vps4、Vps24 のいずれかの変異であった。これら3つのタンパク質は、いずれもクラス E Vps タンパク質に属する因子である。クラス E Vps タンパク質は、エンドソーム経路で液胞へと輸送される液胞タンパク質をエンドソーム膜上でソーティング（仕分け）するための機構に關与する一群の因子である。しかしながら、同じクラス E Vps タンパク質の欠損変異株であっても、この3つ以外の因子の欠損変異株には、逆に Rim101 の限定分解が欠損しているものがあるという予備的な結果を得ている（データは示していない）。このことは、エンドソーム膜上で起こる液胞タンパク質のソーティングの欠陥それ自身が、Rim101 の限定分解を引き起こしているわけではないことを意味している。すなわち、クラス E Vps タンパク質は、液胞タンパク質のソーティングに加え、イオンストレス検知に何らかの別の役割を果たしていることになる。

エンドソームはエンドサイトーシスを介して外界のイオン環境の影響を直接に受けるオルガネラであり、ここがイオンストレス検知の場であるという仮説も考えられる。この仮説に従えば、エンドソーム機能を攪乱する可能性のあるイオンストレスは、Rim9 もしくは Rim21 によりエンドソーム膜上で検知され、Rim8 を含む何らかの機構でクラス E Vps タンパク質の機能を抑制する。これにより、エンドソームにおける液胞タンパク質ソーティングとともにエンドソームから液胞への小胞輸送が停止し、酸性オルガネラである液胞の保護を図る。この状態のクラス E Vps タンパク質は、何らかの機構でプロテアーゼ Cpl1 を活性化して Rim101 の限定分解を引き起こし、標的遺伝子の転写制御を介してイオンストレスに対する応答反応を引き起こしていると考えられる。

さらに、Two-hybrid 法を用いた包括的なタンパク質間相互作用解析の結果から、クラス E Vps タンパク質のメンバーである Snf7 が Cpl1 と Rim20 とに結合し得ることが報告されており<sup>4)</sup>、Rim20 と Rim101 が結合するという報告とも考え合わせると<sup>5)</sup>、プロテアーゼ Cpl1 の活性化機構として次のようなモデルが考えられる。上記のように、イオンストレスによりクラス E Vps タンパク質の機能抑制が引き起こされ、その結果エンドソーム膜上に蓄積した Snf7 が Cpl1 と Rim20 をエンドソーム膜上にリクルートし、活性プロテアーゼ複合体を形成する。Rim101 は Rim20 との結合を介してこの複合体にリクルートされ、Cpl1 による限定分解を受けるというモデルである。

また、Rim101 が Cpl1 による限定分解とは独立に、カルシニューリンによる脱リン酸化を受けていることを明らかにした。カルシニューリンは Na<sup>+</sup>や Li<sup>+</sup>などのイオンストレスで活性化され、転写因子 Crz1 を脱リン酸化し活性化することが既に知られてい

る。Rim101は、カルシニューリンの新しい基質転写因子ということになる。限定分解と脱リン酸化という2つの異化反応によりRim101が複雑な制御を受け、精妙なイオンストレス応答反応を司っていることが考えられる。

### 今後の課題

Cpl1-Rim101経路によるイオンストレス検知とエンドソーム機能とが密接に関連しているという結果を得た。しかしながら、その全容の解明にはさらに詳細な解析が必要である。特に、Rim9やRim21がイオンストレスセンサーであるのか否か、イオンストレスによりクラスE Vpsを介したエンドソーム機能の抑制がおこるのか否か、活性プロテアーゼ複合体の形成がエンドソーム膜上で形成されるのか否か、この3点の解明は上記のモデルの当否を判断する上で今後に残された課題である。

また、このCpl1-Rim101経路がカルシニューリン経路と協調してイオンストレスに抗する応答反応を制御していることが明らかになった。耐塩性に優れた酵母株の創出のためには、これら2つのイオンストレス情報伝達経路と、塩ストレスのもう一つの局面である浸透圧ストレスに対する情報伝達経路とが、お互いにどのように協調しつつ耐塩性に関わる種々の応答反応を適切に統合しているのかを明らかにして行く必要がある。本研究で得られた知見をもとに酵母の耐塩性獲得の分子基盤を明らかにし、耐塩性を賦活化する方法論を確立することが必要である。

### 文献等

- 1) Penalva MA, Arst, HN Jr.  
Microbiol. Mol. Biol. Rev., 66: 426-446 (2002)
- 2) Katzmann DJ, Odorizzi G, Emr SD.  
Nat. Rev. Mol. Cell. Biol., 3: 893-905 (2002)
- 3) Cyert MS.  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 311: 1143-1150 (2003)
- 4) Ito T, Chiba T, Ozawa R, Yoshida M, Hattori M, Sakaki Y.  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 98: 4569-4574 (2001)
- 5) Xu W, Mitchell AP.  
J. Bacteriol., 183: 6917-6923 (2001)

## Basic research towards improvement in the salt tolerance of yeasts

Tatsuya Maeda

Institute of Molecular and Cellular Biosciences, The University of Tokyo

Yeasts have been used for the production of traditional fermented high salt foods, including soy sauce, miso, and pickles. To maintain superior flavor and continue high production of these foods under high salt fermentation conditions, yeasts used for the fermentation must be highly salt tolerant. Yeasts achieve the salt tolerance by exerting various physiological responses to adapt to the stress under high salt conditions. In this study, among the signal transduction pathways activated by the salt stress to induce adaptive responses, we focused the Cpl1-Rim101 pathway, which responds to ion stress, and elucidated novel regulatory mechanisms of the pathway.

The Cpl1-Rim101 pathway responds ionic stress by proteolytically cleaving and thus activating a transcription factor, Rim101. Cpl1, a calpain-like protease implicated in the Rim101 cleavage, as well as Rim8, Rim9, Rim20, and Rim21 have been identified as constituents of this pathway. Mutants defective in any of these factors are not able to cleave Rim101, and thus are salt sensitive. In contrast, we found in this study that mutants defective in any of three proteins, Vps2, Vps4, and Vps24, cleaved Rim101 constitutively, even without ion stress. These three proteins are members of “the Type E Vps proteins”, whose function is required for the protein transport from the endosome to the vacuole. Our finding suggests tight linkage between the Cpl1-Rim101 pathway and endosome functions. We also determined the order of actions among these constituents in the pathway as follows.

Ion stress	Rim8• Rim9• Rim21	Vps2• Vps4• Vps24	Cpl1• Rim20
	Rim101 cleavage	Induction of salt tolerance	

In addition, we found that Rim101 was dephosphorylated in response to ion stress, by the  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein phosphatase, calcineurin, and that this dephosphorylation occurred independently to the proteolytic cleavage by Cpl1. These results suggest that Rim101 is under the complex control through these two catabolic regulations, the proteolytic cleavage and the dephosphorylation, to achieve effective responses to the ion stress.

The analysis of the salt stress-responsive signal transduction pathway elucidates an elaborate regulatory mechanism coordinating the salt stress responses and the cellular physiology. Based on the observation obtained in this study, we would like to clarify the molecular basis for the acquisition of the yeast salt tolerance, and to design highly salt tolerant yeast strains.