

出芽酵母*HKR1*遺伝子の特殊な発現制御機構およびストレス応答

今藤 俊宏

国立研究開発法人 産業技術総合研究所 生命工学領域 バイオモノづくり研究センター

研究概要

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の *HKR1* は全長約 5.4 kb のイントロンをもたない遺伝子で、過剰発現により他属のキラー酵母である *Hansenula mrakii* (*Cyberlindnera mrakii*) が産生する HM-1 キラートキシンに耐性をもたらす遺伝子として単離された。その発現産物である Hkr1 は複数のドメインをもつムチン様 I 型膜タンパク質であり、HOG MAP キナーゼ経路における最上流の浸透圧センサーとして機能する他、CWI MAP キナーゼ経路などにも関与するなど、多方面で細胞機能の制御に関わっている。本研究では、当該遺伝子のコード領域後半に位置する *HindIII* 部位からターミネーター領域に至る約 2.6 kb の断片のみを酵母細胞へ導入した場合でも強い HM-1 キラートキシン耐性を付与すること、また、1137 番目に位置するメチオニン残基が当該領域における翻訳開始点であることを明らかにした。さらに、*HKR1* は 5' 末端上流域に存在する本来のプロモーター領域とは別に、エキソンの内部にもプロモーターとして機能する領域が存在することを証明した。加えて、エキソン内部のプロモーターの活性は平常時、同一エキソン内の上流配列により抑制的な制御を受けているが、その抑制的な制御は NaCl による高浸透圧ストレスによって解除されることを解明した。なお、本研究は宮城大学大学院在籍時に実施したものである。



図1 *S. cerevisiae* の *HKR1* 遺伝子および Hkr1 タンパク質の構造と HM-1 キラートキシン耐性を付与する部分配列
HKR1 は 5.4 kb の ORF をもつイントロンのない遺伝子で、ムチン様 I 型膜タンパク質 Hkr1 をコードしている。図中には N 末端シグナルペプチド配列 (SS)、多くのムチンに共通して見られる反復配列 (TR)、Hkr1-Msb2 相同ドメイン (HMH)、膜貫通ドメイン (TM)、EF ハンドモチーフ、およびロイシンジッパーモチーフを示した。Hkr1 後半の部分配列における翻訳開始点として機能しうるメチオニン残基 (Hkr1 の 1137 番目に位置するメチオニン残基) は M で示した。また *HKR1* の本来のプロモーターとターミネーターは、それぞれ *P_{HKR1}*、*T_{HKR1}* と表記した。*HKR1^{tr}* の (I) は本来のプロモーターを欠きながら HM-1 キラートキシン耐性を付与する *HKR1* の 3' 末端側部分配列、(II) は Met-1137 の位置に変異 (ATG を TAG に置換) を導入した配列である。

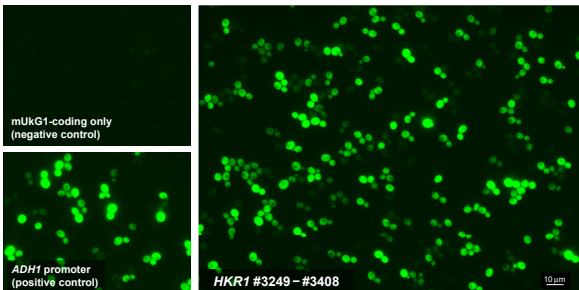


図3 mUkG1 を用いたエキソン内在プロモーターの活性評価
HKR1 の #3249 ~ #3408 の 160 bp の領域を *mUkG1* (ウミキノコ由来の緑色蛍光タンパク質 *mUkG1* をコードする) に連結し、2 μ DNA 由来のマルチコピープラスミドに挿入した。構築したプラスミドを酵母細胞へ導入し、得られた形質転換体を蛍光顕微鏡で観察した。ネガティブコントロールとしてプロモーターをもたない *mUkG1* のコード領域のみを、またポジティブコントロールとしては、*S. cerevisiae* の *ADH1* プロモーター下に *mUkG1* を連結したものをを用いた。実験区ではポジティブコントロールと同様に強い蛍光が認められ、*HKR1* の #3249 ~ #3408 の 160 bp の領域にはプロモーター活性があることが確認された。

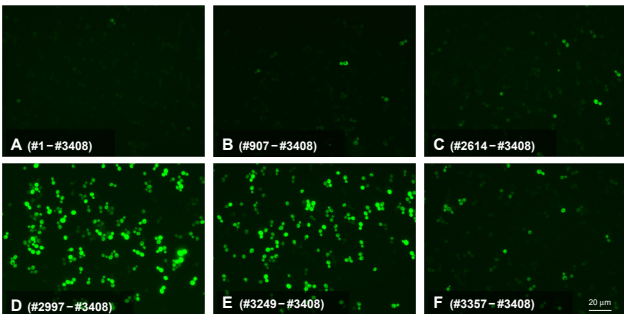


図5 エキソン内在プロモーターの領域長の検討・mUkG1 をレポーターとした実験
配列 D を用いた形質転換体では、当初エキソン内在プロモーターとして同定された配列 E を用いた形質転換体よりもさらに強い蛍光が確認された。また、配列 A、B および C を用いた形質転換体では顕著に蛍光強度が低下していた。スケールバーは 20 μ m を示す。

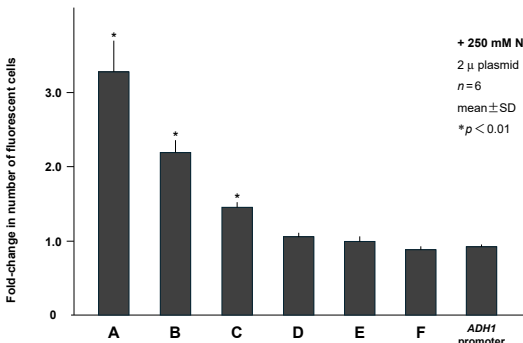


図7 NaCl による高浸透圧条件下で回復するエキソン内在プロモーター活性
配列 A ~ F を用いた各形質転換体を 250 mM の NaCl を含む液体培地で 18 時間培養した。プロモーター活性の定量測定はフローサイトメトリーにより行い、蛍光陽性細胞の数を NaCl を加えずに培養した場合と比較した。対照区には *S. cerevisiae* の *ADH1* プロモーターによって駆動した *mUkG1* 遺伝子を用いた。それぞれの値は各形質転換体において独立した 6 つのクローンの平均値およびエラーバーは標準偏差を示す。
*は対応のある検定を 1% の有意水準で実施した結果、有意差が確認されたことを示す。

結論

- S. cerevisiae* の細胞はプロモーターレスの *HKR1* 部分配列 (*HKR1^{tr}*) を導入した場合でも HM-1 キラートキシン耐性を獲得する。
- HKR1* のエキソン内部にはプロモーターとして機能する領域 (エキソン内在プロモーター) が存在し、Met-1137 は *HKR1^{tr}* における翻訳開始点として機能する。
- エキソン内在プロモーターの上流配列は本プロモーターを抑制的に制御している。
一方で、抑制されたエキソン内在プロモーターの活性は NaCl による高浸透圧ストレスによって再活性化する。
- HKR1* のエキソン内在プロモーターにより発現してくる Hkr1^{tr} は効率的なシグナル伝達に寄与していると考えられる。

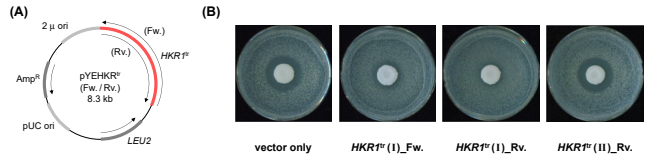


図2 *HKR1^{tr}* または Met-1137 に変異を導入した *HKR1^{tr}* を発現させた形質転換体の HM-1 キラートキシン耐性試験
(A) プロモーターを欠く *HKR1* の部分配列 *HKR1^{tr}* (I) をマルチコピープラスミドに挿入し、酵母細胞へ導入した。*HKR1^{tr}* は、*LEU2* マーカーに対して順方向 (Fw.) または逆方向 (Rv.) に挿入した。さらに Met-1137 の位置に変異 (ATG を TAG に置換) を導入した配列である *HKR1^{tr}* (II) を挿入したプラスミドについても酵母細胞へ導入した。(B) *HKR1^{tr}* (I) を発現する形質転換体はプラスミドにその配列を挿入する方向にかかわらず HM-1 キラートキシン耐性を示したことから、この配列が自律的に発現し、酵母細胞に HM-1 キラートキシン耐性を付与していると考えられた。一方で、*HKR1^{tr}* (II) を発現する形質転換体は HM-1 キラートキシン感受性であった。
本実験は *S. cerevisiae* の形質転換体を寒天培地全面に播菌し、中央に *H. mrakii* をスポットして共培養したもので、*H. mrakii* の周囲に形成されるクリアゾーンの有無で HM-1 キラートキシンへの感受性を評価した。

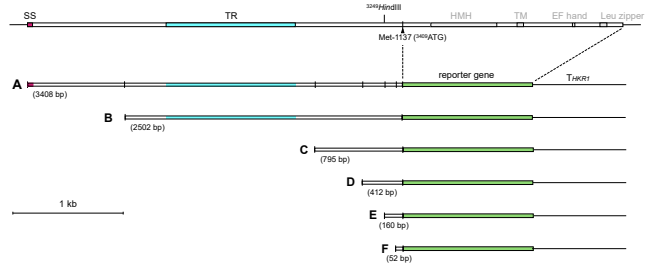


図4 *HKR1* の ²⁴⁰⁹ATG (Met-1137 に対応) 上流における様々な領域長のエキソン配列のプロモーター活性評価
Hkr1 の 1137 番目のメチオニン (Met-1137) に対応する ATG (²⁴⁰⁹ATG) コドンの上流配列を段階的に欠失させ、レポーター遺伝子の *mUkG1* または *lacZ* と連結してそれぞれの発現を確認した。用いた *HKR1* のエキソン配列は、A: #1 ~ #3408 (3408 bp)、B: #907 ~ #3408 (2502 bp)、C: #2614 ~ #3408 (795 bp)、D: #2997 ~ #3408 (412 bp)、E: #3249 ~ #3408 (160 bp)、F: #3357 ~ #3408 (52 bp) である。
mUkG1 の系は 2 μ DNA 由来のマルチコピープラスミドを、また、*lacZ* の系はセントロメプラスミドを用いて構築した。

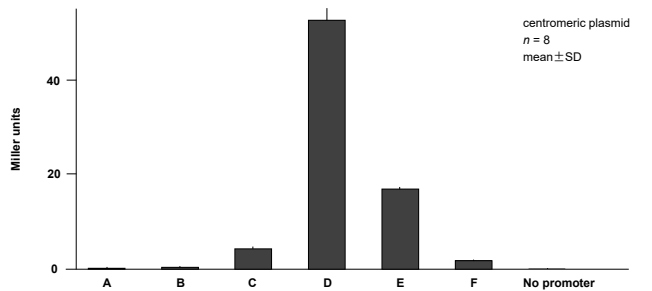


図6 エキソン内在プロモーターの領域長の検討・ β -ガラクトシダーゼをレポーターとした実験
mUkG1 の系と同様に配列 D を用いた形質転換体で最も高い活性が確認され、配列 A、B、C を用いた形質転換体については顕著に活性が低下していた。
それぞれの値は各形質転換体において独立した 8 つのクローンの平均値およびエラーバーは標準偏差を示す。

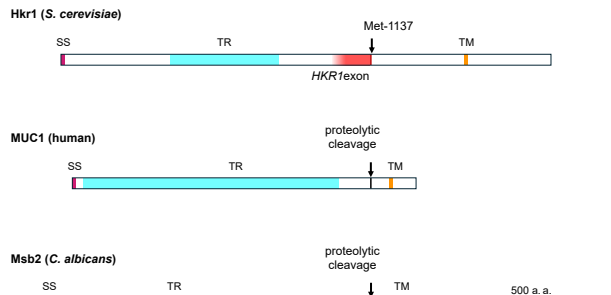


図8 *HKR1* のエキソン内在プロモーターにより発現が制御される Hkr1^{tr} およびヒト MUC1、*C. albicans* Msb2 のプロセッシング後に生成される断片の構造比較
S. cerevisiae の Hkr1、ヒトの MUC1、および *C. albicans* の Msb2 の構造を比較した。Hkr1 の Met-1137 は、*HKR1* のエキソン内在プロモーター (*HKR1* exon) からの転写産物の内在翻訳開始点として機能し、シグナル伝達におけるメッセンジャーとして機能する Hkr1^{tr} が生成してくる考えられる。また MUC1 と Msb2 では、プロテアーゼによる 1 α 所切断の後に短い C 末端側の断片が遊離してくる。Hkr1^{tr} と他のシグナリグムチンのプロセッシング後に生成される C 末端断片の構造には類似性が見られる。各ドメインについては図 1 を参照のこと。