

# 酵母の Hkr1p による新奇な高塩濃度環境応答の仕組みと高耐塩性酵母の分子育種

笠原 紳

宮城大学食産業学群

## 概要

本研究の対象である *HKRI* は、キラ酵母 *Lindnera mrakii* (旧名 *Hansenula mrakii*) が産生する HM-1 キラートキシンの耐性を付与する遺伝子として、*Saccharomyces cerevisiae* のゲノムから単離されたものである。*HKRI* はムチン様のマルチドメインから成る膜タンパク質 Hkr1p をコードする、5.4 kb の ORF をもつイントロンのない遺伝子である。Hkr1p は、細胞内領域にカルシウム結合モチーフである EF ハンドや、DNA 結合性のロイシンジッパーのコンセンサス配列を有しており、また HOG MAP キナーゼ経路における浸透圧センサーとしても知られている。

本研究では、*HKRI* のエキソン内に第 2 のプロモーターが隠れて存在しており、5' 末端上流領域にある本来のプロモーターとは別に、5' 末端から 3330 番目のヌクレオチド (nt. #3330) 付近からも転写が開始されることを見出した。さらにこのエキソン内在プロモーターの転写活性は、*HKRI* の同一エキソン内の上流配列によって抑制されていることも確認した。また本研究では、蛍光タンパク質や  $\beta$ -ガラクトシダーゼのレポーターアッセイ系を用いて、塩化ナトリウム添加による浸透圧変化などの外部刺激によりエキソン内在プロモーターの抑制された転写活性が回復することを確認した。さらに、エキソン内在プロモーターの領域長を様々に変えてレポーター遺伝子を連結し、*S. cerevisiae* の細胞に導入して、得られた形質転換体の蛍光強度や  $\beta$ -ガラクトシダーゼの活性を測定することでエキソン内在プロモーターの活性変化を評価した。

*HKRI* エキソン内在プロモーターの最大転写活性は、内在の翻訳開始点と考えられ #3409ATG ~ (Met1137 に対応) の上流 410 bp の配列を含む領域により示されることがレポーターアッセイによる実験から確認された。一方で、レポーター遺伝子を nt. #2600 ~ #3409ATG の領域の直下に連結した場合には、明らかに低いプロモーター活性を示すにとどまった。

これらの結果より、nt. #3000 ~ #3330 の領域が *HKRI* のエキソン内在プロモーターのコアとなる領域であり、さらにその上流配列はサイレンサーとして機能していることが示唆された。さらに興味深いことに、形質転換体を塩化ナトリウム添加による高浸透圧条件下で培養すると、抑制されたエキソン内在プロモーターの活性が回復することも認められた。こうした研究結果は、1 つの遺伝子が有する複数のプロモーターによる遺伝子制御機構の可能性を示唆するものであり、そのうちの 1 つは驚くべきことにエクソン内部に存在し、特定の条件の下で活性化されて当該タンパク質の C 末端側の部分配列を発現するのである。この現象は、限られた数の遺伝子がより複雑な生命現象を生み出す可能性を示すものとして注目すべき事例となりうる。

## 1. 研究目的

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のゲノムから、過剰発現によりキラ酵母 *Hansenula mrakii* (現学名 *Lindnera mrakii*) が産生する HM-1 キラートキシンの耐性をもたらす遺伝子が単離され、*HKRI* (Fig. 1) と命名さ

れている<sup>1)</sup>。*HKRI* は全長約 5.4 kb のイントロンをもたない遺伝子で、その産物である Hkr1p はムチン様 I 型膜タンパク質であり、細胞内領域には EF ハンドやロイシンジッパーの共通配列を有することから、シグナル伝達経路で何らかの役割を担っている可能性や核内で転写制御

に關与している可能性が考えられる。実際に、Hkr1p は HOG MAP キナーゼ経路における浸透圧センサーとして知られており<sup>2)</sup>、他方で細胞壁の健全性<sup>3)</sup>や出芽方向性を含む細胞極性の制御<sup>4)</sup>等にも關わるなど、多機能性をもち合わせていることも大きな特徴である。

ところで、*HKRI* はコード領域後半の *HindIII* 部位からターミネーター領域に至る約 2.6 kb の断片のみを導入した場合でも強い HM-1 キラートキシン耐性をもたらすことが知られている (Fig. 2)<sup>1)</sup>。つまり、*HKRI* には 5' 末端上流域にある本来のプロモーターとは別に、タンパク質のアミノ酸配列をコードする領域、すなわちエクソンに内在するプロモーターが存在すると考えられている。

そこで本研究においては、*HKRI* のエクソンに内在するプロモーターを確認し、それにより Hkr1p の C 末端領域のみが独立して発現するという極めて特殊な発現制御機構を実証することを目的とした。さらに、*HKRI* のエクソン内在プロモーターの活性は、通常は同一エクソン内の上流配列によって抑制されており、塩化ナトリウム添加による高浸透圧条件下に細胞を置いた場合にその活性が上昇するとの予備的知見があったため、この現象についても精査することとした。

## 2. 研究方法

### 2. 1

まず、エクソン内在プロモーター活性の定量評価系を確立した。プラスミド上で *HKRI* の推定エクソン内在プロモーター領域 (*HKRI* の 3249 塩基目の *HindIII* 部位から 3409 塩基目の ATG までの 160 bp の配列) の下に、ウミキノコの緑色蛍光タンパク質をコードする遺伝子 *mUkG1* あるいは大腸菌の  $\beta$ -ガラクトシダーゼをコードする遺伝子 *lacZ* を連結して *S. cerevisiae* へ導入し、プロモーター活性を緑色蛍光の強度 (Fig. 3) や  $\beta$ -ガラクトシダーゼの活性 (Fig. 4) として評価する系を立ち上げた。

また、エクソン内在プロモーター領域を 5' 末端側 (3249 塩基目の *HindIII* 部位以降) から段階的に欠失させてレポーター遺伝子を連結したプラスミドを作製 (Fig. 5) し、それらを導入した形質転換体についても同様の評価を行った。

### 2. 2

*HKRI* のエクソン内在プロモーターの存在が確認された後には、レポーターアッセイ系を用いてその領域長について調べ、レポーター活性の消長についても、特に塩を添加することによって高浸透圧ストレスを付与した状態での活性変化を中心に精査した。

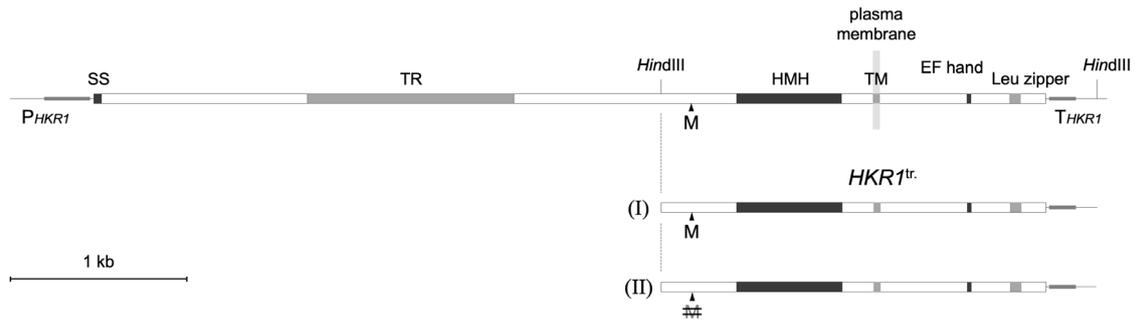
## 3. 研究結果

### 3. 1

プラスミド上で *HKRI* のコード領域後半の推定エクソン内在プロモーター領域 (3249 塩基目の *HindIII* 部位から 3409 塩基目の ATG までの 160 bp の領域) の下流に *mUkG1* や *lacZ* を連結して *S. cerevisiae* に導入したところ、明らかな緑色蛍光 (Fig. 3) や  $\beta$ -ガラクトシダーゼの活性 (Fig. 4) が検出された。このことから、当該領域はプロモーターとして機能することが示された。また、当該領域を 27 bp 程度ずつ数段階にわたって欠失させた場合、3249 塩基目の *HindIII* 部位から 108 bp を欠失させた段階で顕著に緑色蛍光や  $\beta$ -ガラクトシダーゼの活性が低下したこと (Fig. 6, Fig. 7) などから、当該領域の 81 bp 以降 108 bp までが転写開始に重要な領域であると考えられた。

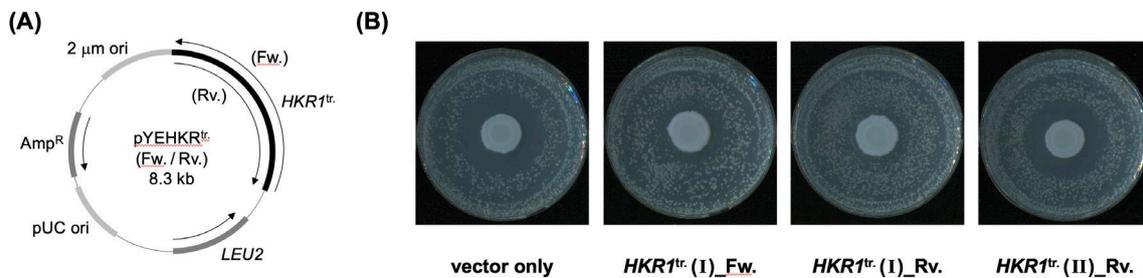
### 3. 2

*HKRI* エクソン内在プロモーターの最大転写活性は、内在の翻訳開始点と考えられる 3409 塩基目の ATG の上流 410 bp の配列を含む領域によりもたらされることが、レポーターアッセイによる実験から確認された。一方で、レポーター遺伝子を 2600 塩基目から 3409 塩基目の ATG までの 800 bp ほどの領域下に連結した場合には、明らかに低いプロモーター活性を示すこともわかってきた。これらの結果より、おおよそ 3000 塩基目以降 3330 塩基目までの領域が *HKRI* のエクソン内在プロモーターのコアとなる領域であり、さらにその上流配列はサイレンサー的に機能していることが示唆された。そして、特に興味深いことに、形質転換体を塩化ナトリウム添加による高浸透圧条件下で培養すると、抑制されたエクソン内在プロモーターの活性が回復して上昇することも確認された (Fig. 8)。



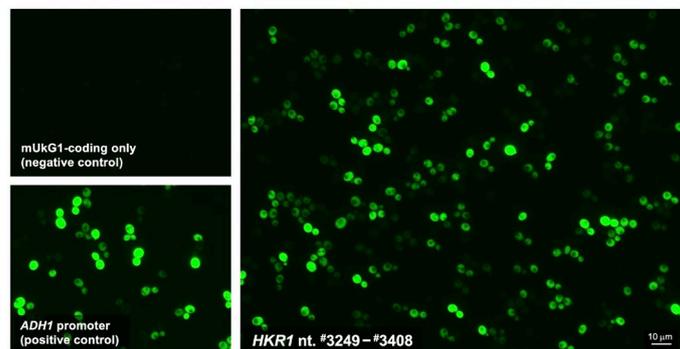
**Fig. 1** Structure of *S. cerevisiae* *HKR1*/Hkr1p and the truncated portion which is independently expressed and confers resistance to HM-1.

*HKR1* is an intronless gene with a 5.4 kb ORF encoding a mucin-like type I transmembrane protein, Hkr1p. Shown are the N-terminal signal peptide sequence (SS), the extracellular tandem repeats which are commonly found in most mucins (TR), the Hkr1p-Msb2p homology domain (HMH), the highly hydrophobic transmembrane domain (TM), the EF hand consensus and the leucine zipper motif. The internal methionine residue which could function as a translational initiation site in the C-terminal domain is marked as "M". The promoterless, 3' portion of *HKR1* (including the terminator) was used for HM-1 resistance assay (I). The same region with a mutation at the position of <sup>1137</sup>Met (replacing ATG with TAG) was also tested (II).



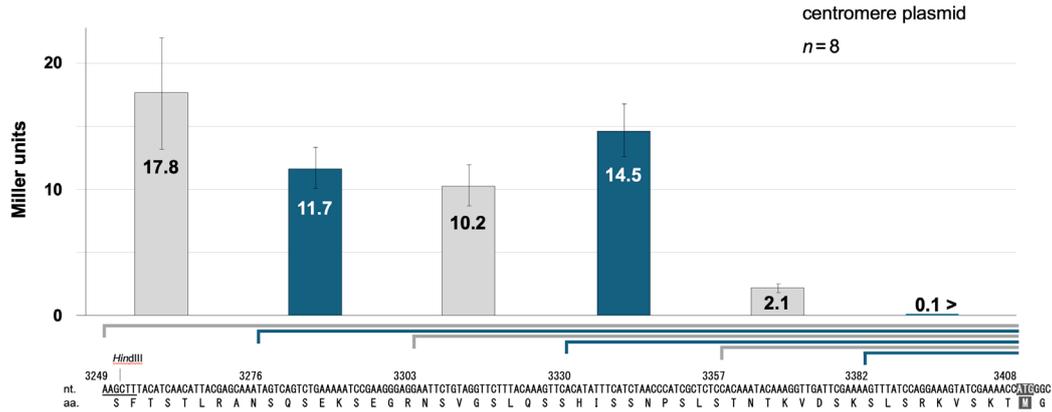
**Fig. 2** HM-1 resistance assay of transformants overexpressing the sequence (I) or (II).

- (A) The promoterless 3' portion of *HKR1* (*HKR1*<sup>tr</sup>) was introduced into *S. cerevisiae* cells with the multicopy plasmid vector, pYEHKR<sup>tr</sup>. *HKR1*<sup>tr</sup> was inserted into the vector either in the forward direction with the *LEU2* marker, or in the reverse direction (opposite to *LEU2*).
- (B) Transformants overexpressing the sequence (I) (see Fig. 1) exhibited strong HM-1 resistance showing that the 3' portion of *HKR1* was independently expressed and conferred HM-1 resistance on *S. cerevisiae* cells. Transformants overexpressing the sequence (II), where the methionine codon ATG was replaced with a stop codon TAG, were sensitive to HM-1. HM-1-producing *Lindnera mrakii* was spotted over the lawn of the *S. cerevisiae* transformants. See the clear zones formed around spotted *L. mrakii*.



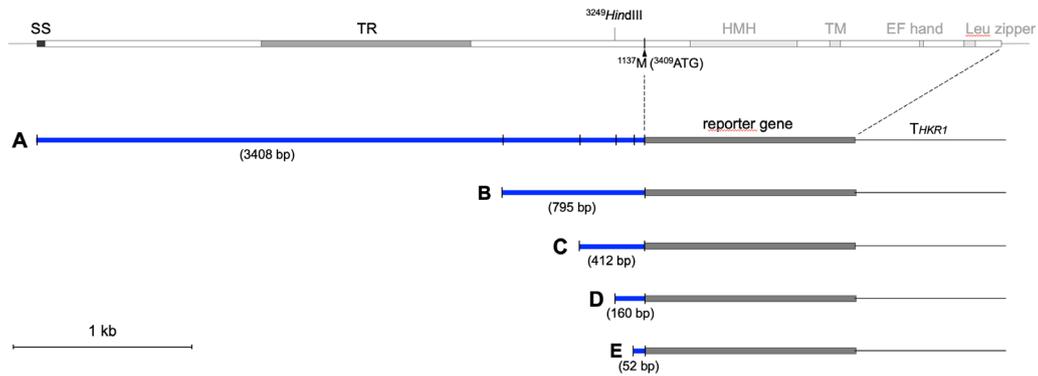
**Fig. 3** Detection of promoter activity by fluorescent protein reporter assay.

The 160 bp-long exonic sequence of *HKR1* (nt. #3249 to #3408) was ligated to the reporter gene mUkG1 which encodes the fluorescent protein "monomeric Umikino-Green 1", then inserted into the 2 μm DNA-derived multicopy vector and introduced into *S. cerevisiae* cells. Exponentially growing transformants were observed with a fluorescence microscope. The *ADH1* promoter of *S. cerevisiae* was used as a positive control and promoterless mUkG1 was a negative control.



**Fig. 4** Deletion analysis for the promoter activity detected in the 160 bp-region between the *Hind*III site and the ATG codon (<sup>3409</sup>ATG).

The 160 bp-sequence between the *Hind*III site and the ATG codon (<sup>3409</sup>ATG) was sequentially deleted. Each deleted sequence was ligated to the reporter gene *lacZ* of *E. coli* and inserted into the YCp-based plasmid vector. Activity of  $\beta$ -galactosidase which represents the promoter activity was measured with *o*-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (ONPG) as a substrate and Miller units were calculated.

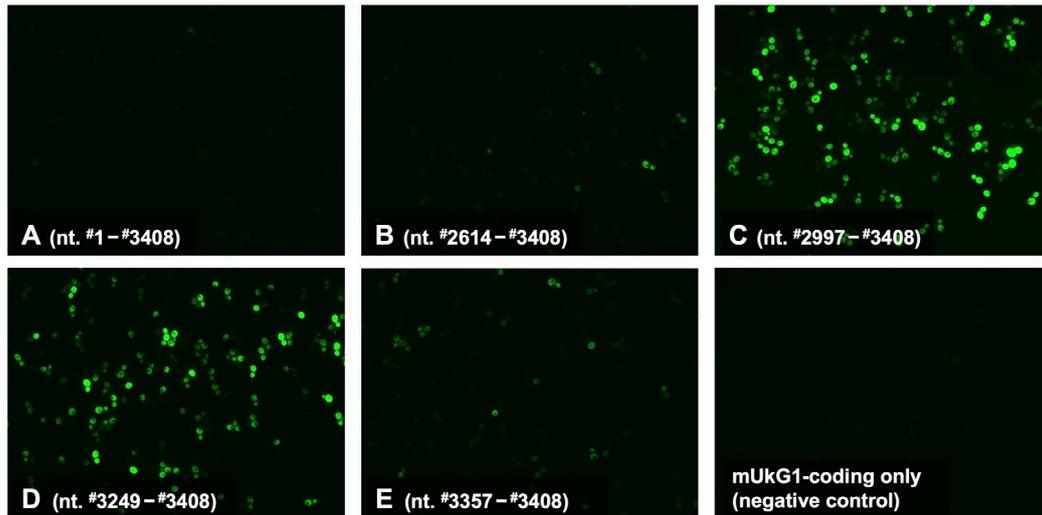


**Fig. 5** Constructs for promoter assay of various length of exonic sequence upstream <sup>3409</sup>ATG (<sup>1137</sup>Met) of *HKR1*.

The upstream sequence of the ATG codon corresponding to the internal methionine (<sup>1137</sup>Met) of Hkr1p was sequentially deleted (**A**, **B**, **C**, **D** and **E**) and ligated to the reporter gene, mUkG1 of *Sarcophyton* sp. (soft coral) or *lacZ* of *E. coli*.

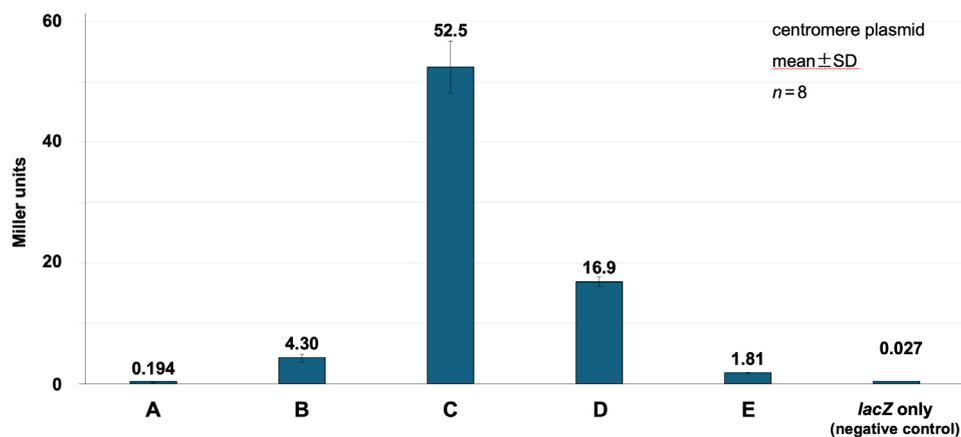
- A** : nt. #1 to #3408 (3408 bp)
- B** : nt. #2614 to #3408 (795 bp)
- C** : nt. #2997 to #3408 (412 bp)
- D** : nt. #3249 to #3408 (160 bp)
- E** : nt. #3357 to #3408 (52 bp)

The 2  $\mu$ m DNA-derived multicopy plasmid vector was used for fluorescence microscopy while the centromere plasmid was used for  $\beta$ -galactosidase assay.



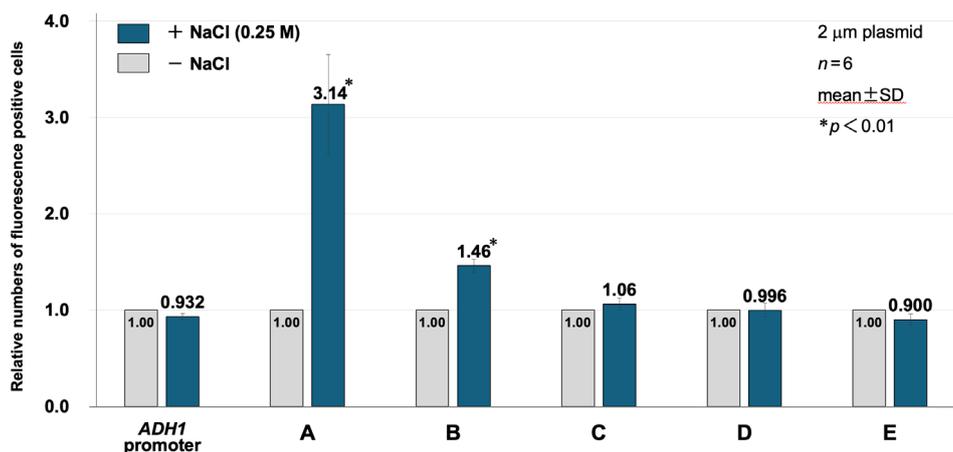
**Fig. 6** Fluorescence microscopy for promoter assay of various lengths of exonic sequence in the upstream region of <sup>3409</sup>ATG (<sup>1137</sup>Met) of *HKRI*.

The regions **A**, **B**, **C**, **D** and **E** shown in **Fig. 5** were inserted into the 5' end of the coding sequence of the fluorescent protein gene mUkG1 using the 2  $\mu$ m DNA-based multicopy vector and introduced into *S. cerevisiae* cells. Exponentially growing cells were observed with a fluorescence microscope. The clone carrying promoterless mUkG1 was a negative control.



**Fig. 7**  $\beta$ -Galactosidase assay for the quantitative analysis of various lengths of exonic sequence in the upstream region of <sup>3409</sup>ATG (<sup>1137</sup>Met) of *HKRI*.

The regions **A**, **B**, **C**, **D** and **E** shown in **Fig. 5** were ligated to the *lacZ* gene and inserted into the YCp-based plasmid vector, then used for the transformation of *S. cerevisiae* cells. Exponentially growing cells were used for  $\beta$ -galactosidase assay. The clone carrying promoterless *lacZ* was a negative control.



**Fig. 8** Recovery of suppressed promoter activity under high osmotic pressure conditions with NaCl.

The coding sequence of mUkG1 was driven by the putative promoter regions **A**, **B**, **C**, **D** and **E** shown in the Fig. 5. Using the multicopy plasmid vector, each sequence was introduced into *S. cerevisiae* cells and the transformants were treated with 0.25 M NaCl for 18 hours. Quantitative measurements of promoter activity were done by flow cytometry. The numbers of fluorescence positive cells of those transformants were compared to the ones cultured without NaCl. The mUkG1 gene driven by the *ADH1* promoter was used as a control

#### 4. 考察

エキソンに内在するプロモーターは極めて新奇で特異な事象であり、*HKRI* の場合、シグナル伝達分子として経路中での伝達効率を高めるにあたって有効に機能している可能性がある。Hkr1p がシグナル伝達機能として有する特定のドメインのみを集中的に発現させることは、特に Hkr1p のようにマルチドメインから成るマルチファンクショナルなタンパク質の場合には大きな意味をもつことだろう。ヒトの MUC1<sup>5)</sup>や *S. cerevisiae* の Msb2p<sup>6)</sup> のようなシグナル伝達ムチンでは、その全長に対してタンパク質分解酵素による 1 箇所切断が行われ、このプロセッシングによって細胞内で機能するシグナル伝達分子が生じるとされるが、エキソン内在プロモーターから生じてくる短い Hkr1p は、他のムチンでプロセッシング後に生成される C 末端部分のシグナル伝達分子に相当すると考えられる。塩化ナトリウム添加により高浸透圧条件を作り出すと、抑制されたエキソン内在プロモーターの活性が上昇するという発見は特に重要である。Hkr1p が HOG 経路で機能することを考えると、高浸透圧環境下でこうした現象が見られることも不思議ではない。このようなエキソン内在プロモーターの活性上昇が高浸透圧刺激によるものなのか、単に塩化ナトリウム等の電解質の添加によるものなのかは確定できず、引

き続き精査していかなければならない。さらには、塩化ナトリウム以外の化学物質や各種の外部刺激がエキソン内在プロモーターの活性上昇をもたらすのか、検討を続ける必要もあろう。

#### 5. 今後の課題

エキソン内在プロモーターの活性は、塩化ナトリウム添加により上昇することが確認できたため、この現象が高浸透圧ストレスに起因するものか、あるいは塩化ナトリウムのような電解質によるものなのか、精査する必要がある。また、今回の一連の実験は、すべてプラスミドを用いた実験系によるものであり、同じ現象が *S. cerevisiae* のゲノムに存在する *HKRI* においても確認できるかも課題である。本研究により真核細胞が有する高塩濃度(高浸透圧)環境への適応に係る機構の一端が解き明かされるものと期待しており、最終的には酵母など産業利用価値の大きい微生物の形質改善、分子育種へと展開していくための知見を蓄積することが重要で、また課題でもある。

#### 6. 文献

- 1) Kasahara S, Yamada H, Mio T, Shiratori Y, Miyamoto C, Yabe T, Nakajima T, Ichishima E, Furuichi Y. Cloning of the *Saccharomyces cerevisiae* gene whose overexpression

- overcomes the effects of HM-1 killer toxin, which inhibits  $\beta$ -1,3-glucan synthesis.  
*J. Bacteriol.* 1994;176(5):1488–99.
- 2) Tatebayashi K, Tanaka K, Yang H-Y, Yamamoto K, Matsushita Y, Tomida T, Imai M, Saito H.  
Transmembrane mucins Hkr1 and Msb2 are putative osmosensors in the SHO1 branch of yeast HOG pathway.  
*EMBO J.* 2007;26(15):3521–33.
- 3) Rodríguez-Peña JM, Díez-Muñiz S, Bermejo C, Nombela C, Arroyo J.  
Activation of the yeast cell wall integrity MAPK pathway by zymolyase depends on protease and glucanase activities and requires the mucin-like protein Hkr1 but not Msb2.  
*FEBS Lett.* 2013;587(22):3675–80.
- 4) Yabe T, Yamada-Okabe T, Kasahara S, Furuichi Y, Nakajima T, Ichishima E, Arisawa M, Yamada-Okabe H.  
*HKR1* encodes a cell surface protein that regulates both cell wall  $\beta$ -glucan synthesis and budding pattern in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.  
*J. Bacteriol.* 1996;178(2):477–83.
- 5) Singh PK, Hollingsworth MA.  
Cell surface-associated mucins in signal transduction.  
*Trends Cell Biol.* 2006;16(9):467–76.
- 6) Vadaie N, Dionne H, Akajagbor DS, Nickerson SR, Krysan DJ, Cullen PJ.  
Cleavage of the signaling mucin Msb2 by the aspartyl protease Yps1 is required for MAPK activation in yeast.  
*J. Cell Biol.* 2008;181(7):1073–81.

## A Novel Mechanism of Responding to High Salt Concentration by Yeast Hkr1p and Molecular Breeding of Highly Salt-Tolerant Yeast.

Shin Kasahara

Miyagi University School of Food and Agricultural Sciences

### Summary

*HKRI* was originally isolated from the genome of *Saccharomyces cerevisiae* as a gene that confers resistance to HM-1 killer toxin produced by the killer yeast *Lindnera mrakii* (synonym *Hansenula mrakii*). *HKRI* is an intronless gene with a 5.4 kb ORF encoding a mucin-like multidomain transmembrane protein, Hkr1p. Hkr1p contains a consensus sequence of EF hand, a calcium-binding motif and the DNA-binding leucine zipper motif in its cytoplasmic tail, and has actually been known as an osmosensor of the HOG MAP kinase complex. We recently found that *HKRI* has another cryptic promoter in its exon and is transcribed not only from the promoter in the 5' upstream region but also from the region around the 3330th nucleotide (nt. #3330) from the translation initiation site. In addition, it has been confirmed that the transcriptional activity of the exonic promoter is silenced by its upstream sequence within the exon of *HKRI*. In this study, we investigated whether the suppressed transcription is restored by external conditions such as osmotic pressure by using reporter assay systems. Plasmids containing various length of the exonic promoter region were constructed and a fluorescence protein gene or the *lacZ* gene of *Escherichia coli* was ligated to each promoter sequence, introduced into *S. cerevisiae* cells, then expression levels were evaluated by measuring the fluorescence intensity or  $\beta$ -galactosidase activity. The maximum transcriptional activity was observed when the reporter genes were ligated to the 410 bp-long region of *HKRI* starting at the nt. #3000 through the ATG (<sup>3409</sup>ATG) which corresponds to the internal translation initiation site (<sup>1137</sup>Met). A significantly lower transcriptional activity was detected when the reporter genes were ligated to the region between the nt. #2600 and <sup>3409</sup>ATG. These results suggest that the region between the nt. #3000 and the nt. #3330 is the core of the *HKRI* exonic promoter and its upstream sequence functions as a silencer-like regulator. Interestingly, the suppressed transcription was partially restored when the transformants were cultured under high osmotic pressure conditions. These observations suggest a novel mechanism of eukaryotic gene regulation with multiple promoters, one of which is even located within an exon and is conditionally activated to express a latter portion of the protein. It could be a remarkable example of how a limited number of genes can generate more complex biological phenomena.