

平成22年5月24日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19570138

研究課題名（和文）分裂酵母アンモニウムトランスポーターの生理機能の解析

研究課題名（英文）Analysis of physiological functions of the fission yeast ammonium transporters

研究代表者

光澤 浩 (MITSUZAWA HIROSHI)

日本大学短期大学部・生物資源学科・准教授

研究者番号：50202346

研究成果の概要（和文）：

微生物や植物はアンモニウムを窒素源として環境から取り込む機構を備えている。アンモニウムの膜透過を仲介するタンパク質であるアンモニウムトランスポーターの生理機能について、分裂酵母をモデルにして解析を行い、アンモニウムトランスポーターが、アンモニウムの取り込みだけではなく、低アンモニウム条件で誘導される酵母型から菌糸型への形態分化や、代謝によって生じたアンモニウムの細胞内保持にも関与していることを見出した。

研究成果の概要（英文）：

In microorganisms and plants, ammonium is an important nitrogen source that is used for amino acid synthesis. Microorganisms and plants have mechanisms of its uptake. In this study, fission yeast was used as a model to elucidate physiological functions of ammonium transporter, which mediate transport of ammonium across the membrane. It has been found that ammonium transporter plays a role not only in uptake of ammonium from the environment but also in morphological differentiation from yeast to filamentous form induced by low ammonium and retention of intracellular ammonium produced from metabolism.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：膜輸送と輸送タンパク質

## 1. 研究開始当初の背景



ヒトにおいて、アミノ酸の代謝過程で生じるアンモニアは、強い毒性があるため過剰分は尿素に変えられて体外に排出される。一方、細菌・真菌などの微生物や植物にとってアンモニウムはアミノ酸を合成するための重要な窒素源であり、環境からそれを取り込む機構を備えている。アンモニウムの膜透過を仲介するアンモニウムトランスポーターは、最近になって結晶構造が明らかにされた 11 回膜貫通型タンパク質で、原核生物から真核生物に至るまで広く保存されている (Khademi *et al.* 2004; Zheng *et al.* 2004; Andrade *et al.* 2005)。

分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* のアンモニウムトランスポーターが、遺伝子破壊株を用いた解析により初めて機能的に同定された (Mitsuzawa 2006)。Amt1, Amt2, Amt3 と名付けられた 3 つのアンモニウムトランスポーターが異なる輸送特性と生理機能を持つことが明らかになり、さらに興味深いことに、高親和性と推測される Amt1 が低アンモニウムで誘導される形態分化に必要であることが見出された。

アンモニウムトランスポーターの形態分化への関与は、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae*、トウモロコシ黒穂病菌 *Ustilago maydis*、ヒト病原性真菌 *Candida albicans* においても報告されていた (Heitman *et al.* 1998; Smith *et al.* 2003; Biswas and Morschhäuser 2005)。これらの結果から、アンモニウムトランスポーターが、アンモニウム濃度を感知し形態分化を誘導するシグナルを生成するようなセンサーとしても機能するという仮説が提唱されていたが、細胞内に取り込まれたアンモニウムあるいはその代謝産物がシグナルである可能性もあり、低アンモニウムによる形態分化誘導の分子メカニズムは不明のままであった。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、Mitsuzawa (2006) において行った分裂酵母のアンモニウムトランスポーターの解析を発展させ、その生理機能の全体像を明らかにすることである。特に、低アンモニウム条件により誘導される形態分化におけるアンモニウムトランスポーターの役割を、アンモニウムトランスポーターがアンモニウム濃度のセンサーとしての機能を

持っているという仮説を検証することにより分子レベルで明らかにし、形態分化誘導のシグナルの実体とその伝達機構を解明することを目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) 分裂酵母の侵入成長およびアンモニウムを含まない培地における生育の解析

低アンモニウム (LNB) 培地の作成と侵入成長の解析は、Mitsuzawa (2006) にしたがった。低アンモニウム培地 (アンモニウム濃度は 0.76 mM) に細胞懸濁液をスポットし、30°C 14 日間培養後、寒天表面の細胞を水道水で洗い流し、寒天内部に細胞が残るかどうかを調べた。cAMP は最終濃度が 0.5 mM になるように加えた。

また、窒素源を含まない培地、およびアンモニウムの代わりに、セリン、フェニルアラニン、トレオニン、またはトリプトファンを窒素源として含む培地を用いて生育を調べた。

### (2) 出芽酵母の偽菌糸成長の解析

出芽酵母 *MEP2* 遺伝子の上流、下流の配列に出芽酵母 *URA3* 遺伝子上流、下流の配列をそれぞれ付加したプライマーを用い、*URA3* をマーカーとして持つプラスミド pRS316 (Sikorski and Hieter 1989) を鋳型にして、*MEP2* 破壊用断片 *mep2::URA3* を PCR により増幅した。この断片により出芽酵母 MLY40 株 (*MATa ura3-52*) および MLY41 株 (*MATa ura3-52*) を形質転換した。得られた *Ura<sup>+</sup>* のコロニーからゲノム DNA を調製し、PCR により遺伝子破壊を確認した。接合により *MEP2/MEP2*, *MEP2/mep2*, *mep2/mep2* 二倍体株を作製し、遺伝子型を PCR により確認した。偽菌糸形成は SLAD 培地 (Gimeno *et al.* 1992) を用いて調べた。

### (3) アンモニウムトランスポーター機能解析用プラスミドの構築

Overlap extension PCR 法を用いて、分裂酵母 *amt1* および *amt2* 遺伝子の 3' 末端 (終止コドンの直前) に、FLAG エピトープ配列を、制限酵素部位を両端に持つカセットとして付加した。そのために、終止コドン周辺の配列と FLAG カセットを含む相補的なプライマーと、ベクターへのクローニングのための制



限酵素部位を含む上流プライマーおよび下流プライマーをデザインした。分裂酵母ゲノム DNA を鋳型とした 20 サイクルの PCR を LA Taq (TaKaRa) を用いて行い、その PCR 産物を鋳型にした 10 サイクルの PCR により *amt1*-Kpn/FLAG/Pst および *amt2*-Kpn/FLAG/Pst 断片を調製した。これを pUC19 にクローニングし、ジデオキシ法により ORF 全長の塩基配列を決定し、PCR の過程で変異が生じていないものを選択した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 形態分化誘導に関わるシグナル伝達系の解明

分裂酵母の野生型株は低アンモニウム培地で寒天内部に侵入し繊維状に成長するが、*Amt1* の欠損株ではそのような繊維状侵入成長が見られない (Mitsuzawa 2006)。このことは、分裂酵母の形態分化に高親和性のアンモニウムトランスポーター *Amt1* が必要であることを示している。アンモニウムトランスポーターの下流にあり形態分化の誘導に関わるシグナル伝達系を同定するために、形態分化誘導における cAMP の効果について検討した。低アンモニウム培地に 0.5 mM cAMP を添加すると、*Amt1* 欠損株が繊維状侵入成長を示すことが明らかになった。この結果は、分裂酵母の形態分化誘導において、cAMP 経路がアンモニウムトランスポーターの下流でシグナル伝達系として機能していることを示唆している。

cAMP 経路の関与を確認するために、cAMP 分解酵素である cAMP ホスホジエステラーゼの遺伝子破壊株の作製を現在行っている。

##### (2) 形態分化誘導のシグナルの実体の解明

低アンモニウム条件下で分裂酵母が示す繊維状侵入成長におけるアンモニウムトランスポーターの役割に関しては 2 つのモデルが考えられる。細胞内に取り込まれたアンモニウムあるいはその代謝産物がシグナル分子である可能性と、アンモニウムトランスポーターがアンモニウム濃度センサーとして機能しシグナルを生成するという可能性である。もし、前者のモデルが正しければ、アンモニウム濃度を上げれば、高親和性のトランスポーターである *Amt1* がなくてもアンモ

ニウムが細胞内に入り、形態分化が起こることが期待される。実際、アンモニウム濃度を 5 mM に上げると *Amt1* 欠損株が繊維状侵入成長を示すようになった。この結果は、前者のモデルを支持している (ただし、*Amt1* 以外のトランスポーターが高アンモニウム条件下でセンサー機能を示すという可能性は否定できない)。

(1) の結果と合わせ、この結果から、分裂酵母においては、アンモニウムトランスポーターによって取り込まれたアンモニウムあるいはその代謝産物が形態分化誘導のシグナルであり、それが cAMP 経路を活性化しているという可能性が明らかになった。このことは、シグナル分子の実体および cAMP 経路の活性化機構の解明という今後の研究の方向性を明確にしたという点でも意義深い。

##### (3) 出芽酵母の形態分化におけるアンモニウムトランスポーターの役割

分裂酵母において、形態分化誘導のシグナルがアンモニウムトランスポーターによって細胞内に取り込まれたアンモニウム (またはその代謝産物) である可能性が示唆されたので、出芽酵母について同様の解析を行った。低アンモニウム条件下で誘導される出芽酵母の偽菌糸成長 (二倍体株が示す形態分化) に必要であり、センサーとしての機能が提唱されている高親和性アンモニウムトランスポーター *Mep2* について、遺伝子破壊株を作製しアンモニウム濃度の効果について検討した。分裂酵母の場合とは異なり、*Mep2* 欠損株はアンモニウム濃度を上げても偽菌糸成長を示さなかった。この結果は、(2) の結果と合わせ、分裂酵母と出芽酵母とでは形態分化誘導におけるアンモニウムトランスポーターの役割が異なるという興味深い可能性を示唆している。

##### (4) 分裂酵母アンモニウムトランスポーターの新規機能の解明

分裂酵母の 3 つのアンモニウムトランスポーター遺伝子 *amt1*, *amt2*, *amt3* すべてを破壊した三重破壊株は、低アンモニウム培地における生育が野生型株に比べて非常に遅い (Mitsuzawa 2006; 光澤 2006)。これは、アンモニウムを窒素源として外界から取り込むためにはアンモニウムトランスポーターが必要であることを示している。本研究におい



て、意外なことに、三重破壊株がアンモニウム以外の窒素源での生育においても欠損を示すことを見出した。例えば、アンモニウムの代わりにセリン、フェニルアラニン、トレオニン、またはトリプトファンを窒素源として含む培地において、三重破壊株は野生型株と比較して明らかに生育が遅かった。さらに、窒素源を含まない培地においても、三重破壊株は野生型株より生育が悪かった。これらの結果は、アミノ酸の代謝等によって細胞内で生じたアンモニウムがアンモニウムトランスポーター非依存的に細胞外へ漏れ出すかあるいは排出され、それがアンモニウムトランスポーターによってふたたび細胞内に取り込まれると考えることにより説明できる。以上の結果は、分裂酵母のアンモニウムトランスポーターがアンモニウムの細胞内保持という生理機能を持つことを示している。これはアンモニウムトランスポーターがアンモニウムを外界から窒素源として取り込む以外にも役割を果たしていること意味する興味深い結果である。

#### (5) 分裂酵母アンモニウムトランスポーターの構造と機能の解析

分裂酵母の3つのアンモニウムトランスポーター Amt1, Amt2, Amt3 は異なる輸送特性と生理機能を持っている (Mitsuzawa 2006)。Amt1 は高親和性で形態分化に必要であるのに対して、Amt2 は低親和性である。Amt1, Amt2 の構造と機能の関係を明らかにするために、部位特異的変異導入用プラスミドを作製した。amt1, amt2 遺伝子の3'末端(終止コドンの直前)にFLAG エピトープ配列を付加し、抗FLAG抗体を用いたウエスタン解析により発現の確認ができるようにした。また、FLAG エピトープはアフィニティー精製による相互作用因子の単離にも有用である。このFLAG エピトープ配列は、両端に制限酵素部位を持つカセットとして付加しており、他の任意の配列と置き換えることができる。例えば、GFP (緑色蛍光タンパク質) 遺伝子により置換することにより、C末端にGFPが融合したアンモニウムトランスポーターを発現させ細胞内局在を調べることができる。

今回作製したプラスミドにより、アンモニウムトランスポーターの構造と機能の解析、細胞内局在の検討、アフィニティー精製による相互作用因子の同定など、今後の幅広い研

究展開が可能になった。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

① Hiroshi Mitsuzawa, Ammonium transporters in fungi, Adaptive Gene Regulations-From Microorganisms to Organelles, pp.123-133, 2008, 査読無

[学会発表] (計4件)

① 光澤 浩、佐藤 琢磨、白石 まり子、高橋 秀夫、酵母の形態分化誘導におけるアンモニウムトランスポーターの役割、第32回日本分子生物学会年会、2009年12月9日、パシフィコ横浜

② Hiroshi Mitsuzawa, Role of ammonium transporter in morphological transition of fission yeast, The 5th International Fission Yeast Meeting (第5回分裂酵母国際会議)、2009年10月28日、東京 国立オリンピック記念青年総合センター

③ 光澤 浩、佐藤琢磨、白石まり子、高橋秀夫、酵母の形態分化誘導におけるアンモニウムトランスポーターの役割、酵母遺伝学フォーラム第42回研究報告会、2009年7月28日、つくばノバホール

④ 光澤 浩、酵母の窒素源シグナル伝達におけるアンモニウムトランスポーターの役割、第4回トランスポーター研究会、2009年5月23日、東京大学弥生講堂

[その他]

ホームページ等

日本大学短期大学部生物資源学科生物学研究室

<http://hp.brs.nihon-u.ac.jp/~hmitsuza/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

光澤 浩 (MITSUZAWA HIROSHI)  
日本大学短期大学部・生物資源学科・  
准教授  
研究者番号：50202346

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし