

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660070

研究課題名(和文)代謝調節機能をもつ分裂酵母の分泌ファクターの同定

研究課題名(英文) Identification of a secreted factor that regulates nitrogen metabolism in fission yeast

研究代表者

八代田 陽子 (Yashiroda, Yoko)

独立行政法人理化学研究所・吉田化学遺伝学研究室・専任研究員

研究者番号：60360658

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：分裂酵母が分泌し、他の分裂酵母細胞に対して作用し、窒素源(アミノ酸等)の取り込みを変化させる化合物として炭素数18のヒドロキシ脂肪酸およびアセトキシ脂肪酸を同定した。本研究により、分裂酵母においてこれらの化合物(分泌ファクター)を介した窒素源確保のための細胞間情報交換システムが存在することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We identified a hydroxy fatty acid and an acetoxy-fatty acid that are secreted from fission yeast. In the presence of preferred a nitrogen source like ammonia, yeast prevent permeases to uptake non-preferred nitrogen sources like amino acids. Our study reveals that in the presence of those fatty acids, yeast seems to uptake non-preferred nitrogen sources even in the presence of much ammonia in the media. This result suggests that there exists a novel compound-mediated cell-cell communication system for nitrogen metabolism in fission yeast.

研究分野：分子生物学、遺伝学

キーワード：分裂酵母 代謝 細胞間情報交換

1. 研究開始当初の背景

すべての生物は様々な環境変化を認識し、その環境変化に適応することで生きていく。生物にとって、細胞外からの窒素源 ( $\text{NH}_4^+$ 、アミノ酸) の取り込みおよび細胞内でのアミノ酸合成は、生命を維持する重要な代謝機能の一つである。単細胞真核生物である酵母には、アミノ酸のような栄養源の取り込みを制御することにより、周りの環境変化に迅速に適応する機構が備わっている。窒素源の細胞外からの取り込みは、細胞膜上にある透過酵素を介する。良好な窒素栄養素である  $\text{NH}_4^+$  が細胞外に存在するときは、 $\text{NH}_4^+$  を優先して取り込むため透過酵素によるアミノ酸の取り込みが阻害される。したがって、アミノ酸を合成できない変異株は  $\text{NH}_4^+$  のみを含む培地では生育できない。分岐鎖アミノ酸 (Branched-chain amino acid; BCAA) アミノ基転移酵素はグルタミン酸を基質として、BCAA (Leu, Ile, Val) を合成する。分裂酵母において、BCAA アミノ基転移酵素をコードする *eca39* 遺伝子の破壊株 (*eca39Δ* 株) は、窒素源として  $\text{NH}_4^+$  が含まれている培地上では BCAA が含まれていても取り込むことができず、生育できない。ところが、窒素源として  $\text{NH}_4^+$  の代わりにグルタミン酸 (Glu) を添加した培地上では、野生型株近傍に位置する *eca39Δ* 株の生育が回復することを、申請者らは偶然に発見した (Takahashi, et al., *J. Biol. Chem.*, 2012, 287: 38158-38167) (図 1)。また、予備実験により、野生型株の培養上清を添加した培地上 (窒素源は Glu, Leu, Ile, Val) では *eca39Δ* 株が生育でき、培養上清を熱処理することにより、回復能が失活することがわかった。これはつまり、良好な窒素源が少ない環境では野生型株から細胞外へ何らかのファクターが分泌され、それにより、*eca39Δ* 株がアミノ酸取り込み能を回復したことを示す。これまで、分裂酵母においては窒素源の取り込みに関与する制御因子の解明が進んでいなかった。また、窒素源の違いによる代謝経路についても不明な点が多い。

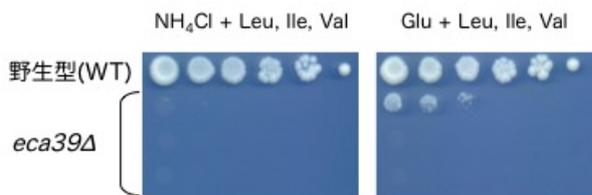


図 1 最小培地での *eca39Δ* 株の生育

2. 研究の目的

本研究では、分裂酵母のアミノ酸取り込み能を回復する「分泌ファクター」の同定を目的とする。また、この「分泌ファクター」を同定することにより、環境に応じた酵母の代謝機能調節メカニズムの解明を行うとともに

に、窒素源確保のための「細胞間情報交換」という、これまでに報告のない新しい仕組みを提唱し、明らかにする。「分泌ファクター」を同定することにより、「環境に応じた代謝機能調節メカニズム」および「窒素源確保のための分泌ファクターによる『細胞間情報交換』の仕組み」の解明に至ることができる。これは、分裂酵母の分子レベルの窒素代謝機構の解析研究をリードする極めて重要な研究であるとともに、生物の環境適応および酵母の細胞間情報交換システムについて重要な知見を与える画期的な研究として位置づけられる。

3. 研究の方法

(1) *eca39Δ* 株の生育を回復させる活性のある培地成分からの分画精製

予備実験により、野生型株を培養した培地中に「分泌ファクター」が存在することがわかったので (図 2)、培養上清からの分画精製を試みる。カンジダ酵母および出芽酵母のクオラムセンシング分子 (低分子化合物) を同定した際の方法 (Chen et al., 2004, *PNAS*; Chen and Fink, 2006, *Genes Dev.*) を参照し、HPLC 精製を行う。

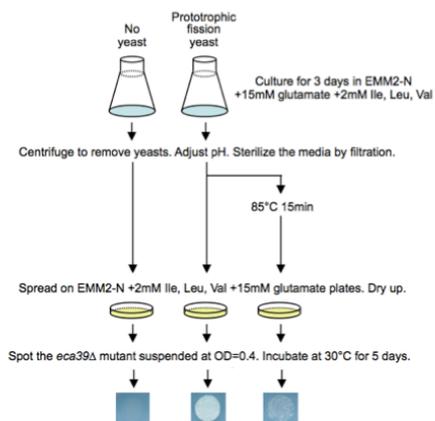


図 2 「分泌ファクター」は野生型株の培養上清中に存在し、熱で失活する

(2) *eca39Δ* 株の生育を回復させることのできない分裂酵母遺伝子破壊株の探索

「分泌ファクター」がタンパク質 (あるいはペプチド) である場合、*eca39Δ* 株の生育を回復させることのできない遺伝子破壊株をスクリーニングすることは同定・解決のための近道となる。この方法は、「分泌ファクター」がタンパク質以外の物質であった場合に、その生合成経路に必須の酵素を同定することにも使える。そこで、Bioneer 社から購入した約 3,000 個の遺伝子破壊株ライブラリーを用いてスクリーニングを行う。図 3 に示すように、48 穴プレートに寒天培地を流し込み、遺伝子破壊株と *eca39Δ* 株をスポットし、

**eca39Δ** 株の生育を回復させない遺伝子破壊株を同定する。ポジティブコントロールとして分裂酵母の野生型株を、ネガティブコントロールとして出芽酵母をスポットする。出芽酵母をスポットしたときには **eca39Δ** 株が回復しないことは既に確認済みである (Takahashi, et al., *J. Biol. Chem.*, 2012, 287: 38158-38167)。

### (3) **eca39Δ** 株の生育の回復を促進させる分裂酵母遺伝子過剰発現株の探索

③の方法とは逆の発想で、「分泌ファクター」そのもの、あるいは「分泌ファクター」生産に関与する遺伝子を過剰発現させた株を近傍に置いた場合、**eca39Δ** 株の生育回復時期が、何も遺伝子を導入していない野生型株と比較して早まることが考えられる。その

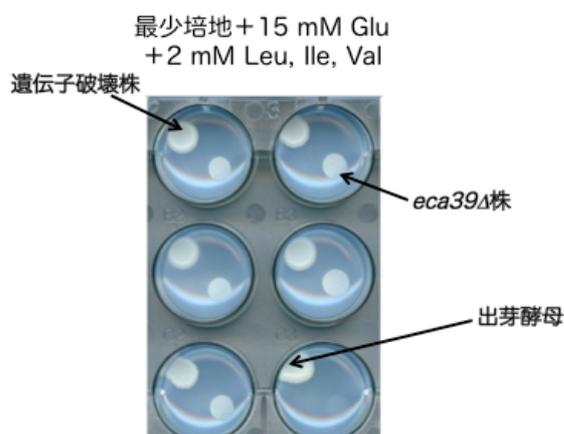


図3 **eca39Δ**株の生育を回復させない遺伝子破壊株のスクリーニング

ような **eca39Δ** 株の生育の回復を促進させる分裂酵母遺伝子過剰発現株の探索を行う。申請者らが構築した分裂酵母遺伝子過剰発現株 (Matsuyama et al., 2006, *Nat. Biotechnol.*) を用いて、③と同様にスポットアッセイを行う。

## 4. 研究成果

(1) 当初、分泌ファクター候補を同定する、あるいは絞り込むためにメタボローム解析を利用することを考えた。「分泌ファクター」は分裂酵母から分泌されるが、出芽酵母からは分泌されない。この知見を利用し、分裂酵母野生型株の培養上清および出芽酵母野生型株の培養上清の代謝物の比較・解析を行おうとしたが、培地成分など多数の夾雑物があり、少量で作用すると考えられる「分泌ファクター」の同定は難しいと判断し、分画精製による分泌ファクターの同定に注力した。分裂酵母の培養上清について、酢酸エチル、ヘキサンおよびブタノール等の溶媒による分画を行い、pH3、7および10に調整した培養上清については酢酸エチルを用いて分画を行い、各画

分について活性試験したところ、分泌ファクターは酸性の脂溶性分子であることがわかった。そこで培養上清中の「分泌ファクター」を酢酸エチルで抽出後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーおよびHPLCで分画・精製した活性画分についてLC/MS及びNMRで解析し、構造を決定した結果、2種の化合物(炭素数18のヒドロキシ脂肪酸およびアセトキシ脂肪酸)を同定した。本結果は、分裂酵母において化合物(分泌ファクター)を介した窒素源確保のための細胞間情報交換システムが存在することを示唆する。

(2) 「分泌ファクター」の実体もしくはコード遺伝子の同定を遺伝学的解析から試みた。分裂酵母の遺伝子破壊株ライブラリー(約3,000株)および遺伝子過剰発現株(約5,000株)ライブラリーを用いて、グルタミン酸添加培地上で**eca39Δ**株の増殖が回復しない株のスクリーニングを行った。その結果、13遺伝子破壊株および19遺伝子過剰発現株が見出され、これらはグルタミン酸添加培地上で**eca39Δ**株の増殖回復を促す「分泌ファクター」に関係のある遺伝子である可能性が示唆された。

(3) 「分泌ファクター」の実体と考えられる2種の化合物を同定した。また、遺伝学的スクリーニングから得られた分泌ファクターの生成、分泌に関与すると考えられる遺伝子も得られた。これらの主要要素をもとに、この新しい細胞間情報交換システムのメカニズム詳細を引き続き基盤C課題で明らかにしていきたい。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

Yoshida M, Ohnuki S, Yashiroda Y, and Ohya Y. Profilin is required for  $Ca^{2+}$  homeostasis and  $Ca^{2+}$ -modulated bud formation in yeast. *Mol. Genet. Genomics*, 2013, 288: 317-328. (査読あり)

[学会発表] (計2件)

①孫曉穎、八代田陽子、植木雅志、廣田洋、高橋秀和、長田裕之、浜本牧子、吉田稔 「分裂酵母のアミノ酸取り込みにおける適応現象を制御する内因性物質の同定」 日本農芸化学会 2015年度大会 2015年3月29日 岡山大学(岡山県岡山市)

②孫曉穎、八代田陽子、植木雅志、高橋秀和、長田裕之、浜本牧子、吉田稔 「分岐鎖アミノ酸アミノ基転移酵素遺伝子破壊株が示す適応現象の解析」 酵母遺伝学フォーラム第46回研究報告会 2013年9月9日

東北学院大学土樋キャンパス（宮城県仙台市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

八代田 陽子 (YASHIRODA, Yoko)

独立行政法人理化学研究所・吉田化学遺伝学研究室・専任研究員

研究者番号：60360658