

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07376

研究課題名(和文) 分裂酵母の新規細胞間情報交換メカニズムの解明

研究課題名(英文) Cell-to-cell communication in fission yeast

研究代表者

八代田 陽子 (Yashiroda, Yoko)

国立研究開発法人理化学研究所・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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：酵母には、利用しやすい窒素源が環境中に存在すると、利用しにくい窒素源の資化に必要な酵素やトランスポーターの発現が抑制される機構(Nitrogen catabolite repression; NCR)が存在する。本研究で我々は、分裂酵母のアミノ酸要求性変異株が示す「適応生育」の発見から、分裂酵母が極低濃度で作用する不飽和脂肪酸2種を分泌し、それらを介して細胞間情報交換を行い、NCRを解除して窒素代謝を変化させることを明らかにした。また、この脂肪酸を介した細胞間情報交換はアミノ酸トランスポーターAgp3依存적であることがわかった。

研究成果の概要(英文)：Yeast has nitrogen catabolite repression (NCR) by which unnecessary production of enzymes/transporters for utilization of non-preferred nitrogen sources is suppressed when a preferred nitrogen source such as glutamate (Glu) is available. NCR prevents growth of auxotrophic mutants that require particular amino acids (poor nitrogen sources) for their growth. Amino acid auxotrophic mutants of fission yeast were unable to grow on minimal medium containing Glu even when adequate amounts of required amino acids were supplied. However, growth of the mutant cells was recovered near the prototrophic strain, suggesting that some substances secreted from the growing cells allowed the mutants to switch their nitrogen source preference. We identified two fatty acid molecules secreted from fission yeast that abrogate NCR and allow the cells to uptake poor nitrogen sources even in the presence of preferred ones. We also showed that the Agp3 amino acid transporter was involved in the adaptive growth.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：細胞間情報交換 分裂酵母 窒素代謝

1. 研究開始当初の背景

単細胞である微生物は、自身の生存に環境の影響を直接受けやすく、環境への適応メカニズムが生存に欠かせない。個体としての生存はもとより、種としての生存を維持していくための環境適応機構として細胞(個体)間情報交換が挙げられる。たとえば、細菌は「クオラムセンシング」という自身の種に有利な情報交換メカニズムを有することが知られている。そこでは、個体は環境に応じてある物質を分泌しており、個体数が一定数に達すると、その物質の濃度が他の個体に対して活性を持つ濃度となり「バイオフィーム」を形成するなど、その種の個体全体の増殖を促進する。一方、真核微生物である酵母においては、細胞間情報交換因子として広く知られているのは性フェロモンである。分裂酵母の場合、培地中の栄養源のうち、特に窒素源が枯渇すると、貧栄養でも耐えて生き延びることができる胞子になるべく、効率よく異性を見つけて接合するためにペプチド性の構造をもつ性フェロモンを分泌する。また、原核生物の細菌に存在している密度依存的な調節機能「クオラムセンシング」は、実は真核生物である出芽酵母にも存在していることが、2006年に Fink らのグループにより示された。菌体数が過剰となり窒素源が低濃度になることに反応して、Tyrosol などの因子が偽菌糸形成を引き起こす。しかし、このような「クオラムセンシング」は分裂酵母では報告されていない。

我々はこれまでに、分裂酵母において窒素源確保のための「細胞間情報交換」を行っているかのような現象に出くわした。生物にとって、細胞外からの窒素源(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。酵母には、利用しやすい窒素源(NH_4^+ 、グルタミン酸等)を含む環境下では利用しにくい窒素源(分岐鎖アミノ酸 Branched-chain amino acid; BCAA 等)の利用・取り込みに必要な酵素やトランスポーターの発現が抑制される窒素源カタボライト抑制(Nitrogen catabolite repression; NCR)という機構が存在する。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、利用しやすい窒素源が含まれている培地上では十分量の BCAA が含まれていても(この条件を「最少培地」と記載する)それらを取り込むことができず、生育できない。ところが、同じ最少培地において、野生型株近傍に位置する *eca39Δ* 株の生育が回復するという「適応現象」を、我々は偶然に発見した(Takahashi *et al.*, 2012, *J. Biol. Chem.*)。また、この現象が野生株から分泌される「分泌ファクター」により引き起こされる現象であることを確認した。

2. 研究の目的

これまでの研究から、我々が見出した「適応現象」は、分裂酵母野生株から「分泌ファクター」が分泌され、それにより利用しやすい窒素源を多く含む培地においても、*eca39Δ* 株は利用しにくい BCAA の取り込み能が回復したことが示唆された。つまり、「分泌ファクター」により NCR が解除された、と予測できた。そこで本研究では、「分泌ファクター」を分離・構造決定し、そのファクターにより BCAA の取り込み能が回復する機構を解明する。環境に応じた代謝機能調節メカニズムを明らかにし、分裂酵母における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することを目指す。

3. 研究の方法

(1) 分泌ファクターの分離・同定

これまでの「挑戦的萌芽研究」(H25~26年度)において、分泌ファクターの1つが「10-hydroxy-8-octadecenoic acid」であることを明らかにしたが、まだ絶対立体配置の同定まで至っていなかったため、より詳しい構造解析を行う。また、他にもいくつか分泌ファクターが存在するという証拠が得られていたので、適応生育活性をもつ物質の同定に取り組む。

(2) 分泌ファクター類縁体の合成および合成類縁体や脂肪酸ライブラリーのスクリーニング

同定できた分泌ファクターの類縁体(合成化合物または市販の化合物をつかう)を試験することにより、構造活性相関研究を行う。また、Cayman 社から販売されている 86 種の脂肪酸が 96 穴プレートに収蔵された脂肪酸ライブラリーを用いて、最少培地上で *eca39Δ* 株を生育させる脂肪酸をスクリーニングする。

(3) 分泌ファクターの受容体および受容後のシグナル経路に関する因子のスクリーニング

分泌ファクターの作用機序解明のために遺伝学的手法を導入する。*eca39Δ* と Bioneer 社から購入した約 3,000 株の遺伝子破壊株(*xxxΔ*)とを掛け合わせ、胞子形成を行うことにより約 3,000 株の二重破壊株(*eca39Δ xxxΔ*)を作製し、分泌ファクター存在下では最少培地上で *eca39Δ* 株は生育できるが、同じ条件下で生育できない二重破壊株をスクリーニングすることにより、分泌ファクターの受容体および受容後のシグナリング経路に関する因子の同定が期待できる。

(4) 分泌ファクターの生産条件の検証および他の微生物への影響

様々な窒素源条件を検討し、「分泌ファクタ

ー」の生産性を確認する。また、分泌ファクターの他の微生物（出芽酵母、細菌等）の生育等に対する影響の確認を行う。

4. 研究成果

(1) 分裂酵母野生株を最少培地 40 L にて培養し、その培養上清を酢酸エチルで抽出し、シリカゲルカラム分画、HPLC 分画を経て活性フラクションを二つ得た（フラクション 1: 2.2 mg、フラクション 2: 0.9 mg）。それぞれのフラクションについて各種 NMR 解析、質量分析を実施した結果、フラクション 1 から 10(*R*)-acetoxo-8(*Z*)-octadecenoic acid（アセトキシ体）（図 1 左）およびフラクション 2 から 10(*R*)-hydroxy-8(*Z*)-octadecenoic acid（ヒドロキシ体）（図 1 右）のいずれも構造新規のオキシリピンを同定した。これらオキシリピンを全合成して、*eca39Δ* 株の適応生育誘導活性を調べた結果、最小有効濃度はいずれも 20~40 nM と、非常に低濃度で効果を示す物質であることがわかった。以上の結果から、分裂酵母がオキシリピンを生産、分泌し、それを介して同種個体に影響し、そのアミノ酸の取り込みを調節していることが示唆された。我々は、今回同定したオキシリピンをその機能にちなんで「窒素源シグナリング因子（Nitrogen signaling factor; NSF）」と命名した。

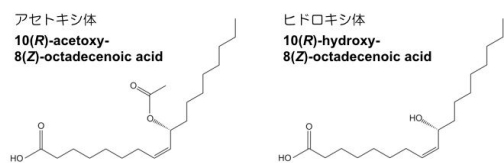


図 1. 窒素源シグナリング因子

(2) アセトキシ体およびヒドロキシ体の類縁体について合成品および市販の脂肪酸ライブラリーに収蔵されている化合物を集め、構造活性相関を調べた。その結果、C-8 の二重結合および C-10 の R 体のアセトキシ基あるいはヒドロキシ基が適応生育誘導能に必須であることがわかった。

(3) *eca39Δ* 株の生育が遅く、また掛け合わせにも適していなかったため、*eca39Δ* 株と同様に適応生育現象を示すロイシン要求性変異株 (*leu1-32* 株) を試験株として用いることにした。*leu1-32* 変異と約 3,000 遺伝子の欠失との二重変異株について、最少培地にて、野生株上清抽出物 (NSF が含まれている) を加えても生育できない、つまり適応生育できない株をスクリーニングした。その結果、適応生育の際の最終的なロイシン取り込みに必要なアミノ酸トランスポーター Agp3 を同定した。また他に、膜融合や小胞輸送に関与する SNARE タンパク質をコードする遺伝子などもスクリーニングにおいて選抜された。これらは NSF 受容後のシグナリング経路に関わる可能性がある。

(4) 野生株を窒素源の異なる培地で培養し、それらの上清の酢酸エチル抽出物について、*eca39Δ* 株の適応生育誘導活性を比較した。その結果、 NH_4^+ よりもグルタミン酸を含む最少培地で培養した野生株の培養上清において高い活性が見られた。また、対数増殖期より定常期の培養上清の適応生育誘導活性が高かった。

高濃度の NSF は *eca39Δ* 株の適応生育を誘導できなかったが、これは毒性を示したからではないことを分裂酵母および出芽酵母の野生株を用いて検証した。高濃度 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) から 2 倍段階希釈して感受性を調べたが、どちらの野生株においても NSF が増殖を阻害することはなかった。また、NSF を生産する分裂酵母の培養上清を用いて、さまざまな放線菌の増殖への影響を調べたが、放線菌の増殖阻害効果はなかった。

本研究では、分裂酵母の分泌する脂肪酸分子 2 種を同定し、それらを NSF と名付けた。分裂酵母において、利用しやすい窒素源の多い環境中では、NCR が起こり、利用しにくい窒素源の取り込みが制限されるが、近傍にいる別の同種細胞から分泌される NSF により NCR が解除され、アミノ酸トランスポーター Agp3 から利用しにくい窒素源の取り込みが起こることがわかった。分裂酵母において、窒素源確保のための NSF を介した「細胞間情報交換」が存在することが示された。NSF がオートインデューサのように機能し、蓄積が進む培養後期において、細胞に、利用しにくい窒素源を取り込ませるためのクオラムセンシングを起こして自分たちにとって有利な状況を作り出し、細胞増殖を調節している可能性も考えられる。今後は基盤 B 課題にて、NSF のさらなる作用機序解明を進めていきたい。

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 5 件)

1. Piotrowski, JS., Li, SC., Deshpande, R., Simpkins, SW., Nelson, J., Yashiroda, Y., et al. (30 人中 6 番目), Functional annotation of chemical libraries across diverse biological processes. *Nat. Chem. Biol.*, 13, 982-993, (2017). 査読有り

DOI: 10.1038/nchembio.2436

2. Sideri, T., Yashiroda, Y., David, AE., Rodriguez-Lopez, M., Yoshida, M., Tuite, MF., and Bähler J. The copper transport-associated protein Ctr4 can form prion-like epigenetic determinants in *Schizosaccharomyces pombe*. *Microb. Cell*, 4, 16-28 (2017). 査読有り

DOI: 10.15698/mic.2017.01.552

3. Li, G., Poulsen, M., Fenyvuesvolgyi, C/, Yashiroda, Y., et al. (8 人中 4 番目) , Characterization of cytopathic factors through genome-wide analysis of the Zika viral proteins in fission yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 114, E376-E385, (2017). 査読有り
DOI: 10.1073/pnas.1619735114

4. 八代田陽子「分裂酵母における分泌脂肪酸を介した窒素源カタボライト制御」2016 年 バイオサイエンスとインダストリー 74 巻 414-416. 査読有り

5. Sun, X., Hirai, G., Ueki, M., Hirota, H., Wang, Q., Hongo, Y., Nakamura, T., Hitora, Y., Takahashi, H., Sodeoka, M., Osada, H., Hamamoto, M., Yoshida, M., and Yashiroda, Y. Identification of novel secreted fatty acids that regulate nitrogen catabolite repression in fission yeast. *Sci. Rep.* 6, 20856, (2016). 査読有り
DOI: 10.1038/srep.20856

〔学会発表〕(計 10 件)

1. 八代田陽子「アミノ酸取り込みを調節する酵母細胞間相互作用」第 40 回日本分子生物学会年会、2017 年

2. 八代田陽子「脂肪酸化合物を介した酵母細胞間のコミュニケーション」第 54 回植物化学シンポジウム、2017 年

3. 八代田陽子「窒素代謝を変えるコミュニケーション-脂肪酸をつかった分裂酵母の生存戦略-」第 69 回日本生物工学会年会、2017 年

4. Yoko Yashiroda “Cell-to-cell communication mediated by fatty acids in fission yeast” The 3rd RIKEN-Academia Sinica Joint Conference (2017)

5. Yoko Yashiroda “A novel intra-species communication system for adaptation to environmental nutritional conditions in *Schizosaccharomyces pombe*” 14th International Congress on Yeasts (2016)

6. 八代田陽子「分裂酵母の窒素源カタボライト抑制を解除する分泌性活性物質の同定」日本農芸化学会関東支部 2016 年度第 2 回支部大会、2016 年

7. 八代田陽子「分裂酵母における細胞間コミュニケーションを担う窒素源シグナリング因子の発見」第 190 回酵母細胞研究会例会、2016 年

8. 八代田陽子「分裂酵母の新規細胞間コミュニケーションシステム」第 19 回真核微生物交流会、2016 年

9. 八代田陽子「分裂酵母の窒素源カタボライト抑制を制御する新規分泌性オキシリピンの同定」日本ケミカルバイオロジー学会第 11 回年会、2016 年

10. 孫曉穎、八代田陽子、平井剛、植木雅志ら、「分裂酵母の窒素源カタボライト抑制を解除する分泌性活性物質の同定」日本農芸化学会 2016 年度大会、2016 年

〔図書〕(計 1 件)

1. 五味勝也、阿部敬悦 (監修) シーエムシー出版「酵母菌・麹菌・乳酸菌の産業応用展開」2018 年 264 ページ
(第 10 章「酵母ケミカルゲノミクスを用いた化合物作用機序解明のための大規模高速解析法」八代田陽子、吉田稔)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)
取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

受賞
「日本農芸化学会 2016 年度大会トピックス賞」
2016 年 4 月

プレスリリース

「酵母のアミノ酸取り込みを調節する化合物を発見-分裂酵母細胞間のコミュニケーションを担う新規オキシリピン「NSF」-
http://www.riken.jp/pr/press/2016/20160226_1/
2016 年 2 月 26 日

6 . 研究組織

(1)研究代表者

八代田 陽子 (YASHIRODA, Yoko)
国立研究開発法人理化学研究所・吉田化学
遺伝学研究室・専任研究員
研究者番号：60360658

(2)研究分担者

植木 雅志 (UEKI, Masashi)
国立研究開発法人理化学研究所・伊藤ナノ
医工学研究室・専任研究員
研究者番号：90312264