

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02131

研究課題名(和文) 分裂酵母の窒素源シグナリング因子を介した細胞間コミュニケーションの解明

研究課題名(英文) Nitrogen Signaling Factor (NSF)-mediated 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・環境資源科学研究センター・副チームリーダー

研究者番号：60360658

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：分裂酵母には、自身が微量に分泌する「窒素源シグナリング因子」を介した細胞間コミュニケーションが存在し、それにより窒素カタボライト抑制を解除し、窒素代謝を調節し「適応生育」現象を起こす。そのメカニズムを明らかにすることを目的とし、「窒素源シグナリング因子」の受容に関与する遺伝子を探索し、新たな適応生育誘導因子を同定した。また、適応生育現象は、その記憶維持機構も含めてエピジェネティックな制御を受けていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

分裂酵母における窒素源シグナリング因子を介した細胞間コミュニケーションによる代謝調節は、変異株を特定の培養条件に置くことで発見できたが、実は真菌類において広く存在している可能性がある。本研究から窒素源シグナリング因子の受容に関わる遺伝子や新たなコミュニケーション因子が明らかになった。この研究をさらに進めていくことにより、「細胞間コミュニケーション」による真菌類の生存戦略を解明するための糸口を見出すことが期待できる。

研究成果の概要(英文)：The fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* has cell-cell communication mediated by “Nitrogen Signaling Factors (NSF)” that are secreted from *S. pombe* cells. The NSFs can regulate nitrogen metabolism and induce “adaptive growth” phenomena in the fission yeast cells by canceling nitrogen catabolite repression. This project aims at elucidating NSF-mediated cell-cell communication in fission yeast. We screened genes related to NSF reception and identified novel chemical communication factors from a lipid library. The results also suggested that the adaptive growth phenomenon is epigenetically regulated, including its inheritance mechanism.

研究分野：酵母ケミカルバイオロジー

キーワード：細胞間コミュニケーション 分裂酵母 窒素代謝 オキシリピン

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

酵母は培地中の利用しやすい、増殖に適した良質な窒素源を優先的に取り込むため、利用しやすい窒素源存在下では、利用しにくい窒素源を取り込めない「窒素カタボライト抑制 (Nitrogen Catabolite Repression; NCR)」と呼ばれる機構がはたらく。我々はこれまでに、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* の分岐鎖アミノ酸要求性株 (*eca39Δ* 株) を用いて、利用しやすい窒素源 (グルタミン酸) の多い最少培地においては NCR が起こり、利用しにくい窒素源 (分岐鎖アミノ酸) の取り込みが制限され増殖できないが、近傍にいる別の同種細胞から分泌される「窒素源シグナリング因子」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り「適応生育」することを発見した (引用文献 1, 2)。窒素源シグナリング因子は極低濃度 (数十 nM) で作用する新規構造のオキシリピンであった (図 1) (引用文献 2)。しかしながら、この窒素源シグナリング因子を介した細胞間コミュニケーションの詳細は不明であった。

2. 研究の目的

分裂酵母の窒素代謝を制御する「窒素源シグナリング因子」を介した細胞間コミュニケーションのメカニズム (図 2) を明らかにするため、窒素源シグナリング因子の受容体および下流因子の同定、因子の産生および分泌機構の同定を行う。また、*eca39Δ* 株は「窒素源シグナリング因子」を受容することにより一旦獲得した形質の記憶維持機構の解明を行う。また、すでに同定したオキシリピン以外にも適応生育現象を誘導する物質の存在が示唆されることから、その分離・同定にも挑戦する。本研究から微生物が栄養環境に適応するための生存戦略を解き明かす。

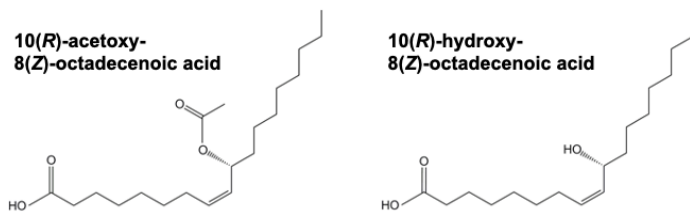


図1 窒素源シグナリング因子

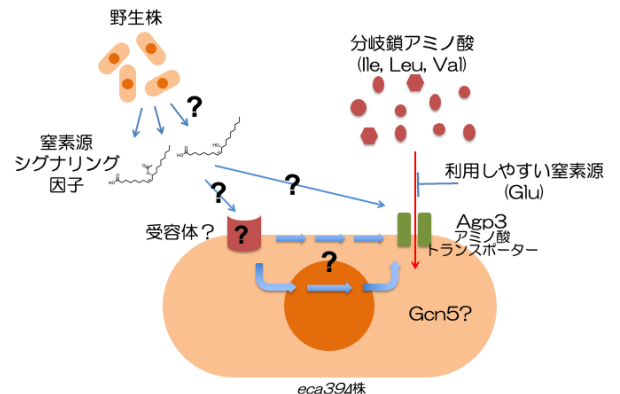


図2 窒素源シグナリング因子により誘導される適応生育メカニズム

3. 研究の方法

(1) 窒素源シグナリング因子の受容体および下流因子の同定

窒素源シグナリング因子の相互作用する受容体および下流因子 (標的分子) の同定には、それらをコードする遺伝子の破壊株を用い、因子存在下で適応生育できない破壊株をスクリーニングする。また、窒素源シグナリング因子の活性を保持したプローブ分子を有機合成手法により開発し、これと直接相互作用する標的の同定を行う。

(2) 窒素源シグナリング因子の産生・分泌機構の解明

遺伝子破壊株ライブラリーを用いたスクリーニングを行う。分裂酵母野生株上清からの、超遠心によるマイクロベシクル等の分離を試みる。

(3) 適応生育の記憶維持機構の解明

適応生育の記憶維持に関与する因子を同定するためにマイクロアレイ解析を行う。

(4) 新規の適応生育誘導因子の同定

分裂酵母野生株上清の酢酸エチル抽出物の分画より新規の適応生育誘導因子を同定する。同定が困難な場合は、市販の脂肪酸ライブラリーからの探索を実施する。

4. 研究成果

(1) 窒素源シグナリング因子の受容体および下流因子の同定

まず、高濃度アンモニアおよび十分量のロイシンを含む液体培地において、窒素源シグナリング因子を含む分裂酵母野生株の培養液上清を添加しても適応生育が見られない分裂酵母の遺伝子破壊株の取得を試み、いくつかのヒット株を得た。その後、寒天培地を用いて窒素源シグナリング因子そのものの添加の有無での適応生育を確認したところ、液体培地での試験と一致しない結果が得られた。そこで実験行程の再検証をしたところ、遺伝子破壊株のバックグラウンドから不必要な栄養要求性を取り除いたほうがクリアな結果が得られることを見出した。よって、ロイシン要求性のみ有する株を掛け合わせによって作製し (*leu1-32 xxxΔ*)、3,229 株から成る新たなライブラリーを準備した。高濃度の塩化アンモニウムと十分量のロイシンを含んだ培地において野生株の近傍で適応生育できない株をスクリーニングしたところ、3,229 株のうち 205 株が野生株の近傍で適応生育できなかった (図 3)。さらに窒素源シグナリング因子を添加して培養したところ、114 株が適応生育しなかった。その中には、液胞局在のアミノ酸トランスポーターをコードする遺伝子や G タンパク質共役受容体や細胞膜局在タンパク質をコードする遺伝子が含まれていた。また、Gene Ontology (GO) 解析で適応生育できなかった遺伝子の傾向を分析すると、呼吸や代謝に関連する遺伝子が多く含まれていた。

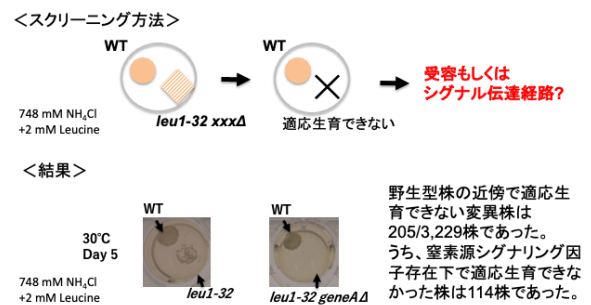


図3 野生株近傍での適応生育試験

窒素源シグナリング因子の結合パートナーを同定するためのプローブ分子の合成にも着手した。脂肪鎖先端にアルキンを導入したプローブを合成し、オリジナルの窒素源シグナリング因子より 30 倍ほど活性は低いものの、適応生育活性を保持していることを確認した。ジアジリンを有する光親和性標識プローブも各種合成し、適応生育活性を試験した。現在、プローブの最適化の最終段階に入っており、合成後に結合実験を実施する予定である。

(2) 窒素源シグナリング因子の産生・分泌機構の解明

上記のロイシン要求性型の遺伝子破壊株ライブラリー (*leu1-32 xxxΔ*) を用いて、グルタミン酸を含む最少培地にて *eca39Δ* 株の横にスポットし、*eca39Δ* 株が適応生育してこない株をスクリーニングした。選抜された株の中にはオキシリピンの合成に直接関与するような酵素は含まれていなかったが、ミトコンドリア関連の遺伝子が多く含まれていた。今後、窒素源シグナリング因子とミトコンドリアとの関連について検討する予定である。

細胞間コミュニケーションの媒介手段として細胞外小胞の関与の有無を調べるため、分裂酵母野生株上清の超遠心分画を行い、沈殿物の単離を複数回試行したが、明確な沈渣は検出できなかった。

(3) 適応生育の記憶維持機構の解明

適応生育の記憶維持に関与する因子を同定するために、窒素源シグナリング因子存在下で適応生育した *eca39Δ* 株、継代培養しても適応生育の記憶が保持されている *eca39Δ* 株および転写調節を司るヒストンアセチル化酵素 Gcn5 の欠失変異株 (*gcn5Δ* 株) を用いてマイクロアレイ解析を行ったところ、適応生育の記憶が保持されている *eca39Δ* 株と *gcn5Δ* 株の遺伝子発現プロファイルに類似点が見いだされた。すでに Gcn5 によるアミノ酸取り込み能の調節がこの適応生育現象に関与していることが示されており (引用文献 1)、また、(1) のスクリーニングにおいて、転写伸長制御複合体である PAF 複合体の因子も選抜されていたことから、適応生育現象はエビ

ジェネティックな制御を受けていることが示唆された。

(4)新規の適応生育誘導因子の同定

窒素源シグナリング因子は、培養液上清の酢酸エチル抽出物をシリカゲルカラムで分画後、適応生育活性の最も強い画分から単離、精製してきたが、今回、次に活性の強い画分について、逆相カラムを用いてさらなる分画を行ったが、残念ながらどの画分にも活性が認められなかった。

そこで、市販の脂肪酸ライブラリーの約 600 化合物の中から、*eca39A* 株の適応生育を誘導する化合物を探索し、マイクロモル濃度オーダーで適応生育活性を示す Platelet activating factor およびその類縁体、Sphingosine、Dihydrosphingosine 等を選抜した。

本研究で、窒素源シグナリング因子を介した分裂酵母の細胞間コミュニケーションの分子メカニズムに迫るための鍵となる役者を探索することができた。今後は、培養上清中あるいは細胞中の窒素源シグナリング因子の定量技術も取り入れながら、分子メカニズムの解明を包括的に進める予定である。

<引用文献>

The SAGA histone acetyltransferase complex regulates leucine uptake through the Agp3 permease in fission yeast.

Takahashi H, Sun X, Hamamoto M, Yashiroda Y, Yoshida M. J Biol Chem. 2012 Nov 2;287(45):38158-67.

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, Yashiroda Y. Identification of novel secreted fatty acids that regulate nitrogen catabolite repression in fission yeast. Sci. Rep. 6:20856 (2016).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yashiroda, Y., Yoshida, Y.	4. 巻 19
2. 論文標題 Intraspecies cell-cell communication in yeast.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FEMS Yeast Res.	6. 最初と最後の頁 foz071
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/femsyr/foz071	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 八代田陽子	4. 巻 96
2. 論文標題 オキシリピンを介した分裂酵母の細胞間コミュニケーション	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 生物工学会誌	6. 最初と最後の頁 454-456
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計19件（うち招待講演 6件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 大澤晋、八代田陽子、吉田稔
2. 発表標題 分裂酵母 <i>Schizosaccharomyces pombe</i> における窒素源カタボライト抑制解除に関連する因子の探索
3. 学会等名 平成30年度文部科学省新学術領域研究 学術研究支援基盤形成【先端モデル動物支援プラットフォーム】若手支援技術講習会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉田稔、大澤晋、八代田陽子
2. 発表標題 真核微生物における小分子を介した新しい細胞間コミュニケーション
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大澤晋、八代田陽子、吉田稔
2. 発表標題 分裂酵母における窒素カタボライト抑制解除機構に関連する因子の探索
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大澤晋、八代田陽子、吉田稔
2. 発表標題 Chemical and genetic regulation of nitrogen catabolite repression in the fission yeast <i>Schizosaccharomyces pombe</i>
3. 学会等名 第3回A3 Young Scientist & Young PI Meeting (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐々木舞雪、西村慎一、松山晃久、八代田陽子、掛谷秀昭、吉田稔
2. 発表標題 分裂酵母 <i>Schizosaccharomyces pombe</i> におけるセリン代謝制御機構の化学遺伝学的解析
3. 学会等名 第20回東京大学生命科学シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉田稔、西村慎一、八代田陽子
2. 発表標題 分裂酵母の分泌型シグナル分子を使った細胞間コミュニケーション
3. 学会等名 第23回酵母合同シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐々木舞雪、西村慎一、松山晃久、八代田陽子、掛谷秀昭、吉田稔
2. 発表標題 FKBP12によるセリン・スレオニン代謝制御の化学遺伝学的解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉住僚太郎、三浦俊一、西村慎一、八代田陽子、松山晃久、吉田稔
2. 発表標題 分裂酵母の適応生育をうながすフェロモン様分子の組織的探索
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 橋本莉央、八代田陽子、大澤晋、平井剛、森山裕充、吉田稔
2. 発表標題 分裂酵母のオキシリピンを介した窒素代謝に関わる細胞間コミュニケーションの解明
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐々木舞雪、西村慎一、松山晃久、八代田陽子、掛谷秀昭、吉田稔
2. 発表標題 分裂酵母におけるセリン代謝制御機構の化学遺伝学的解析
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第54回研究報告会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shin Ohsawa, Yoko Yashiroda, Minoru Yoshida
2. 発表標題 PAF complex regulates the cancelation of nitrogen catabolite repression
3. 学会等名 10th International Fission Yeast Meeting (Pombe meeting 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shin Ohsawa, Yoko Yashiroda, Minoru Yoshida
2. 発表標題 Chemical and genetic regulation of nitrogen catabolite repression by PAF complex in the fission yeast Schizosaccharomyces pombe
3. 学会等名 2019 Cold Spring Harbor Asia Conference on Chemical Biology and Drug Discovery (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 橋本莉央、八代田陽子、大澤晋、平井剛、森山裕充、吉田稔
2. 発表標題 分裂酵母の窒素シグナリング因子を介した細胞間コミュニケーションにおける受容機構の解明
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大澤 晋、八代田 陽子、吉田 稔
2. 発表標題 PAF複合体-SAGA複合体を介した窒素カタボライト抑制制御機構の解明
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三浦 俊一、八代田 陽子、西村 慎一、松山 晃久、吉田 稔
2. 発表標題 分裂酵母における栄養源感受性変異株の探索と解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 八代田陽子、大澤晋、吉田稔
2. 発表標題 分裂酵母の化学コミュニケーション ～環境適応のための代謝戦略～
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会（ワークショップ）（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 八代田陽子
2. 発表標題 分裂酵母の細胞間コミュニケーション ～“言語”をつかって栄養環境に適応する能力～
3. 学会等名 第22回酵母合同シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 八代田陽子
2. 発表標題 オキシリピンを介した分裂酵母の細胞間コミュニケーション
3. 学会等名 第13回化学生態学研究会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大庭滉平、水野雄太、寄立麻琴、八代田陽子、Huanlin Li、吉田稔、平井剛
2. 発表標題 光反応性官能基を導入した分裂酵母NSFの合成と活性評価
3. 学会等名 第38回日本薬学会九州山口支部大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	平井 剛 (Hirai Go) (50359551)	九州大学・薬学研究院・教授 (17102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
スイス	FMI		