

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 16 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05344

研究課題名（和文）分裂酵母を利用して、アグマチンの認識・取込み・代謝・自然界での役割を解明する

研究課題名（英文）Elucidating the Recognition, Uptake, Metabolism, and Natural Role of Agmatine Using Schizosaccharomyces pombe

研究代表者

田中 直孝（Tanaka, Naotaka）

香川大学・農学部・教授

研究者番号：60324109

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）：分裂酵母のアグマチナーゼは自然界で他の菌によって生産されるアグマチンを鋭敏に感知し、特異的なプロモーターによって発現が制御されていることが分かってきた。誘導発現に必要なプロモーター領域は長さが短く、本領域の下流には任意の遺伝子をつなぐことが可能であり、基礎的な解析や誘導性のタンパク質発現などの応用にも利用できることが分かってきた。また、アグマチナーゼの解析では、アグマチン添加による誘導時に、ゴルジ体での蛍光が観察され、アグマチンの除去により速やかに液胞へ輸送されることが分かった。本発見は、誘導性のタンパク質局在化機構を解析する良いモデルタンパク質になりうる成果である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自然環境の発酵過程の菌叢中に存在する物質であるアグマチンは、分裂酵母において、鋭敏な遺伝子発現を誘導するメディエーターであることが分かってきた。誘導されるタンパク質の一つであるアグマチナーゼは、ポリアミンの前駆体であり、DNAやRNAの転写制御、続く翻訳過程にも影響を与える生理活性物質である。本研究でアグマチナーゼは、ゴルジ体膜に局在し、不要になると速やかに液胞へ輸送される、制御された局在化機構を示すことも分かってきた。プロモーター領域もアグマチン添加時に発現が誘導されることが分かり、下流に任意の遺伝子をつなぐことで、人為的に発現量を制御でき、基礎・応用的な利用が可能であることが分かってきた。

研究成果の概要（英文）：Recent studies have revealed that the agmatinase of *Schizosaccharomyces pombe* sensitively detects agmatine produced by other microorganisms in nature, and its expression is regulated by a specific promoter. The promoter region necessary for inducible expression is short in length, and it has been found that any gene can be connected downstream of this region, making it useful for basic analysis and applications such as inducible protein expression. Furthermore, the analysis of agmatinase showed that during induction by agmatine addition, fluorescence was observed in the Golgi apparatus, and upon removal of agmatine, it was rapidly transported to the vacuole. This discovery represents a promising model protein for analyzing inducible protein localization mechanisms.

研究分野：応用微生物学

キーワード：アグマチン アグマチナーゼ 分裂酵母

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

アグマチナーゼはアグマチンをポリアミンであるプトレシンと尿素とに加水分解する反応を触媒する。一般的にポリアミンへの生合成経路にはオルニチンを経由する経路とアグマチンを経由する経路の2種類が知られている。オルニチンを経由する経路は、ほぼすべての生物が有しており、ポリアミン生合成の主要経路として知られている。一方で、アグマチンを経由する経路は、アグマチンという物質そのものが近年になって研究が進み始めた物質であり、その生理的機能や代謝される場所についても不明な点が多い。アグマチンは別名 4-アミノブチルグアニジンとも言い、生理的 pH ではジカチオンの分子である。アグマチンは 1910 年にニシンの精子中から初めて同定されたが、1994 年になって初めて具体的な局在としてウシの脳内で存在が確認された(D. J. Reis et al., 2006)。大腸菌では、胃液を通過する際の耐酸性機構の一部として利用されており、外部から取り込んだ 1 価アルギニンを経由してアグマチンへ脱炭酸を行うことでプロトンの消費を行っている。ここで生じたアグマチンを排出する際の対向輸送で 1 価アルギニンを取り込むことで耐酸性機構を構築していることが明らかになっている(E. M. Krammer et al., 2018)。また、哺乳類では脳内で産生された後シナプス小胞に貯蔵され、主に神経伝達物質として機能することが分かっている(D. J. Reis et al., 2000)。生物種によってアグマチンの生理的機能は様々であることが推察される中で、数年前から、アグマチンがサプリメントとして日本でも輸入販売されているが、研究の歴史が浅いため、不明な点が多い物質である。とりわけ酵母やカビを含む真菌類(真核微生物)に関しては、アグマチンそのものの生理的機能だけでなく、「アルギニンからアグマチンを生合成する経路の有無」や「細胞外からの取込み機構」、「代謝される場所」、「アグマチナーゼの酵素学的な諸性質」、「外部や内部のアグマチンを認識して代謝関連の遺伝子を発現誘導する機構」は、ほとんど明らかになっていない。

### 2. 研究の目的

多様な遺伝子発現制御と未知転写因子が関与している可能性  
アグマチナーゼがアグマチン添加により誘導され、制御された局在化機構の存在  
アグマチンがどのように細胞内に取り込まれ、ゴルジ体内腔まで輸送されるのか  
原核微生物のアグマチナーゼとは異なる酵素学的諸性質  
アグマチン誘導性のプロモーターとして基礎・応用的な利用方法の開発

### 3. 研究の方法

アグマチン添加によって生じる多様な遺伝子の発現と制御機構の解析  
次世代シーケンサーを用いた RNA-Seq 解析により、アグマチンの添加による遺伝子発現の変化を網羅的に確認したい。既知のストレス応答に関わる転写因子や、新規の候補が明らかになった場合は、ゲルシフトアッセイやレポーターアッセイ、比色法、蛍光法を用いて、結合領域の特定や制御領域の同定を行う。agm3 破壊株のアグマチン感受性を抑制することを指標にした、各種遺伝子ライブラリーを用いたスクリーニング系が確立できていることから、サプレッサーの単離に着手し、遺伝学的な解析も行う。

アグマチナーゼの制御されたゴルジ体膜局在化機構の解析

細胞質領域・膜貫通領域・内腔の領域でゴルジ体局在化に重要な領域をアミノ酸レベルで解析する。糖転移酵素の膜貫通領域との置換や、細胞質側のゴルジ体膜表面へのアンカリングなど、配向性も考慮した解析を行う。アグマチン誘導性のゴルジ体局在化に必要な領域とアグマチンを培地から除去した時の速やかな液胞への選別輸送に必要な領域が別れていることを想定しており、各種ゴルジ体-液胞間の輸送に関わる欠損株を所有していることから、各段階で関与するタンパク質複合体や小胞輸送との関連を解析する。

アグマチンがどのように細胞内に取り込まれ、ゴルジ体内腔まで輸送されるのか “アグマチンの輸送機構” の解析

アグマチンの HPLC による定量解析により、細胞内にアグマチンが取り込まれていることは明らかにしている。培地の pH と取込みが連関していることや、エンドサイトーシス変異株ではアグマチンの取込みに影響が出ていることから、細胞膜やゴルジ体膜での特定の輸送体の存在だけでなく、エンドサイトーシスによる直接的な取込みや受容体の存在、さらに、アグマチンの排出も考慮しながら、本当にゴルジ体に蓄積しているのか解析を行う。RI ラベルされたアグマチンも利用しながら、細胞分画法による蓄積場所の解析も試みたい。

原核微生物のアグマチナーゼとは異なる酵素学的諸性質

大腸菌では、37 °C において pH 7.2~7.4 の間で最大酵素活性を示すことが明らかになっている(C. Satishchandran et al., 1986)。しかしながら、分裂酵母は本条件では活性を示さない。膜貫通領域を除去しても機能的なアグマチナーゼや推定活性中心を変異させることで機能を欠失させたもの等、各種アグマチナーゼを過剰発現させる実験系が可能になったことから、分裂酵母から抽出液を調製し、詳細に酵素活性の解析を行う。

アグマチン誘導性のプロモーターとして基礎・応用的な利用方法の開発

プロモーター欠損領域の解析により、上流 700bp の範囲にアグマチン誘導性に必須な領域が存在することが分かってきた。必須遺伝子や、細胞周期、糖鎖の生合成に関わる遺伝子を下流につなぎ、アグマチンの有無による表現型の変化が忠実に再現できるかどうか解析を行う。

#### 4. 研究成果

##### アグマチン添加によって生じる多様な遺伝子の発現と制御機構の解析

次世代シーケンサーを用いた RNA-Seq 解析により、アグマチンの添加による遺伝子発現の変化を網羅的に確認した。予算の関係もあり、1 回しか行えなかったが、添加時に著しく発現が上昇する遺伝子候補が複数見つかっている。誘導条件の更なる検討や、再現性の確認が必須であり、個別の解析を行うことで、アグマチン誘導性プロモーターなどの新規な発現誘導機構の解析に繋がることを期待された。現在、アグマチン誘導性変異株を効率よく単離する実験系を構築しており、これら変異株の解析により、あらゆる角度からの解明につながることを期待される。

##### アグマチナーゼの制御されたゴルジ体膜局在化機構の解析

アグマチナーゼの推定シグナルペプチドは、WB 解析による分子量の変化が確認されないことから、膜貫通タンパク質として機能していると考えられた。膜タンパク質として報告されている、ゴルジ体の糖転移酵素の膜貫通領域と置換した結果、ゴルジ体に局在化し、感受性を相補することが分かった。一方、アグマチンを培地から除去した場合、アグマチナーゼは速やかに液胞へ輸送され、最終的に分解されているが、本キメラ体は、ゴルジ体に留まっており、アグマチン誘導性の局在化移行は見られなかった。この結果から、膜貫通領域は、誘導性の局在化機構に重要であることが推察された。興味深いことに、細胞質側領域やルーメン側も適した局在化に関与していることが想定されており、詳細な解析を行う予定である。

アグマチンがどのように細胞内に取り込まれ、ゴルジ体内腔まで輸送されるのか “アグマチンの輸送機構” の解析

アグマチンの細胞膜からの輸送体は、動物細胞では MATE ファミリーが報告されている。分裂酵母のホモログが複数存在することから、局在の確認を行ったが、いずれも液胞膜に局在することが分かった。現在、遺伝子破壊株を単離中であり、表現系の確認を行う予定である。アグマチナーゼの局在場所は液胞も関わってくることが想定されるため、気質の取り込みに関する輸送体の機能解析は興味深い。今回明らかに出来なかった、細胞膜やゴルジ体膜の候補についても解析を進める予定である。なお、RI ラベルされたアグマチンが高価であり、細胞内での挙動を生化学的に解析することは出来なかった。今後の進展により、詳細な解析に繋げたい。

##### 原核微生物のアグマチナーゼとは異なる酵素学的諸性質

無細胞系の発現系を用いることで、アグマチナーゼの酵素活性を捉えることに成功した。諸性質は論文にまとめる計画である。大腸菌と同じく、金属イオン要求性であり、活性中心の変異体は失活することが分かった。Agm1 および Agm2 の活性も解析できるため、生理的な役割とともに連関を解析することが可能になった。

##### アグマチン誘導性のプロモーターとして基礎・応用的な利用方法の開発

詳細なプロモーター欠損領域の解析により、700 bp よりもさらに短い範囲にアグマチン誘導性に必須な領域が存在することが分かってきた。本領域は、アグマチンの添加に応じた mRNA の発現誘導よりも、タンパク質の翻訳過程に関わる、もしくは、両方の協調に関わっている可能性が推測されている。今後、詳細な 5' UTR の解析と他のアグマチン誘導性プロモーターとの配列の比較などにより、アグマチン誘導性プロモーターの解明を行いたい。短い配列で機能することから、任意 ORF の発現誘導が可能であり、基礎的な解析ツールとしても利用可能と考えられる。誘導後の発現量は、中程度あるため、さらに高発現を達成するためには、総合的なプロモーターと 5' UTR の解析が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 飯田健斗, 青木克幸, 田中寛大, 石井友惟, 田淵光昭, 田中直孝
2. 発表標題 分裂酵母におけるアグマチナーゼホモログ遺伝子agm1+, agm2+ の機能解析
3. 学会等名 第54回酵母遺伝学フォーラム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石井友惟, 田中寛大, 石田麻里絵, 青木克幸, 田淵光昭, 田中直孝
2. 発表標題 アグマチンによって誘導される分裂酵母由来agm3+プロモーターの解析
3. 学会等名 日本ポリアミン学会 第12回年会
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------