

## 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」－

### 要旨

理化学研究所（理研）吉田化学遺伝学研究室の孫暁穎大学院生リサーチ・アソシエイト、環境資源科学研究センター ケミカルゲノミクス研究グループの吉田稔グループディレクター、八代田陽子専任研究員、明治大学農学部生命科学科 浜本牧子教授らの共同研究グループ<sup>\*</sup>は、分裂酵母の分泌するオキシリピン<sup>[1]</sup>の1つである「窒素源シグナリング因子（NSF）<sup>[2]</sup>」がナノモルレベルの極低濃度で分裂酵母<sup>[3]</sup>のアミノ酸の取り込みを制御することを発見しました。

生物にとって細胞外からの窒素源の取り込みは、生命を維持する重要な代謝機能の一つです。単細胞真核生物である分裂酵母は、アンモニアやグルタミン酸といった利用しやすい良質の窒素源を優先的に利用するため、その存在下では利用しにくい窒素源を取り込むためのトランスポーター<sup>[4]</sup>の発現が抑制されます（窒素源カタボライト抑制<sup>[5]</sup>）。一方で、分岐鎖アミノ酸（イソロイシン、ロイシン、バリン）の合成に関する遺伝子が欠損した分裂酵母である *eca39Δ* 株は分岐鎖アミノ酸を外から取り込まないと生育できません。したがって *eca39Δ* 株は良質の窒素源を含む最小培地<sup>[6]</sup>では窒素源カタボライト抑制が起こるため利用しにくい窒素源である分岐鎖アミノ酸を取り込むことができず、生育不可能となります。

しかし、共同研究グループは、同じ培地上で *eca39Δ* 株の隣に野生株が生えていると、その近傍から *eca39Δ* 株が生えてくるという「適応生育」現象を発見しています<sup>注</sup>。この結果から、近傍の野生株から何らかの物質が分泌され *eca39Δ* 株が分岐鎖アミノ酸を取り込めるようになったと予想できます。つまり、この物質を介して窒素源カタボライト抑制を解除しアミノ酸トランスポーターを活性化するという、分裂酵母の細胞間コミュニケーション機構の存在を示唆しています。

共同研究グループはこの活性物質を分離・同定し、新規オキシリピンであることを突き止め「NSF」と命名しました。NSFは分裂酵母自身によって生産され、培地中で一定濃度に達すると生育を誘導する自己制御因子であることを明らかにしました。*eca39Δ* 株だけでなく、*leu1* 株という別の分裂酵母の適応生育も NSF により誘導されることが分かりました。また、適応生育に必要となるアミノ酸トランスポーターは Agp3 であることも分かりました。これらの研究成果により、分裂酵母における、低分子化合物を介してアミノ酸取り込みを調節する新しい細胞間コミュニケーション機構の存在が明らかになりました。

本研究は、英国のオンライン科学雑誌『*Scientific Reports*』（2月19日付け：日本時間2月19日午後7時）に掲載されました。

注) Hidekazu Takahashi, Xiaoying Sun, Makiko Hamamoto, Yoko Yashiroda and Minoru Yoshida, `The SAGA Histone Acetyltransferase Complex Regulates Leucine Uptake through the Agp3 Permease in Fission Yeast` J. Biol. Chem. 2012, 287:38158-38167.

## ※共同研究グループ

理化学研究所

吉田化学遺伝学研究室

大学院生リサーチ・アソシエイト

孫 暁穎 (ソン・ギョウエイ)

環境資源科学研究センター

ケミカルゲノミクス研究グループ

グループディレクター

吉田 稔 (よしだみのる)

専任研究員

八代田 陽子 (やしろだ ようこ)

研究嘱託

廣田 洋 (ひろた ひろし)

触媒・融合研究グループ

専任研究員

平井 剛 (ひらい ごう)

特別研究員

Wang Qianqian (オウ・センセン)

グループディレクター

袖岡 幹子 (そでおか みきこ)

ケミカルバイオロジー研究グループ

グループディレクター

長田 裕之 (おさだ ひろゆき)

伊藤ナノ医工学研究室

専任研究員

植木 雅志 (うえき まさし)

明治大学 農学部生命科学科

教授

浜本 牧子 (はまもと まきこ)

## 1. 背景

生物は絶えず環境変化にさらされており、生き残るためにはその環境変化に対応できなければなりません。例えば、単細胞真核生物である分裂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ます。具体的には、環境中の窒素源の利用しやすさに応じて、窒素代謝関連の遺伝子発現が制御されています。すなわち、アンモニアやグルタミン酸といった利用しやすい良質の窒素源の存在下では、利用しにくい窒素源の取り込みを制御するトランスポーターの発現が抑えられます。このように、分裂酵母が良質の窒素源を優先的に利用する仕組みは「窒素源カタボライト抑制」と呼ばれます。

分裂酵母の Eca39 タンパク質は分岐鎖アミノ酸アミノ基転移酵素です。この酵素は分岐鎖アミノ酸 (イソロイシン、ロイシン、バリン) の生合成を触媒します。この酵素をコードする遺伝子を欠失させた遺伝子破壊株である *eca39Δ* 株は、良質な窒素源を取り込んでも分岐鎖アミノ酸を生成することができないため、分岐鎖アミノ酸自体を取り込まなければ生育できません。したがって、*eca39Δ* 株は良質の窒素源 (アンモニアやグルタミン酸) を含む最小培地では「窒

素源カタボライト抑制」が起こるため、必要な分岐鎖アミノ酸が添加されていても、それを取り込むことができず、単独では生育できません。一方で、共同研究グループは以前に興味深い適応生育現象を見いだしています。*eca39Δ*株が単独では生育できない培地上で、隣に野生株を生育させると、その近傍から *eca39Δ*株が生えてくるのが分かりました（図1）。この現象は、近傍に生える野生株から何らかの物質が培地中に分泌され、それにより「窒素源カタボライト抑制」が解除され、*eca39Δ*株が分岐鎖アミノ酸を取り込めるようになったことを予想させました。しかし、分泌される物質の分離・同定には至っていませんでした。

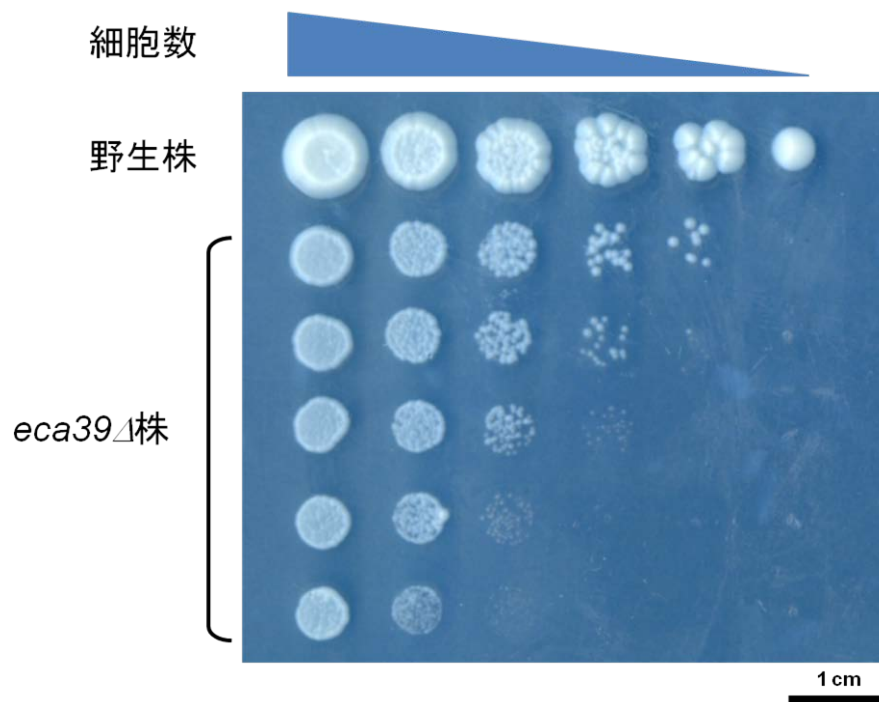


図1 アミノ酸要求性株 *eca39Δ*株が示す適応生育

利用しやすい窒素源であるグルタミン酸を含む最小培地に分岐鎖アミノ酸（イソロイシン、ロイシン、バリン）を加えて、その培地上に野生株および *eca39Δ*株の培養液をスポットした。野生株に近い距離の *eca39Δ*株ほど生育できるようになる「適応生育」現象が見られた。

## 2. 研究手法と成果

共同研究グループは、*eca39Δ*株の適応生育を評価するスポットアッセイ法を開発しました。これは分岐鎖アミノ酸を添加したグルタミン酸を含む最小培地上に *eca39Δ*株の細胞液をスポットするものです。野生株の培養上清（培養液の上澄み）を最小培地に含ませた場合に *eca39Δ*株が生育できたことから、野生株の培養上清中に適応生育を誘導する活性物質が存在することが明らかになりました（図2）。

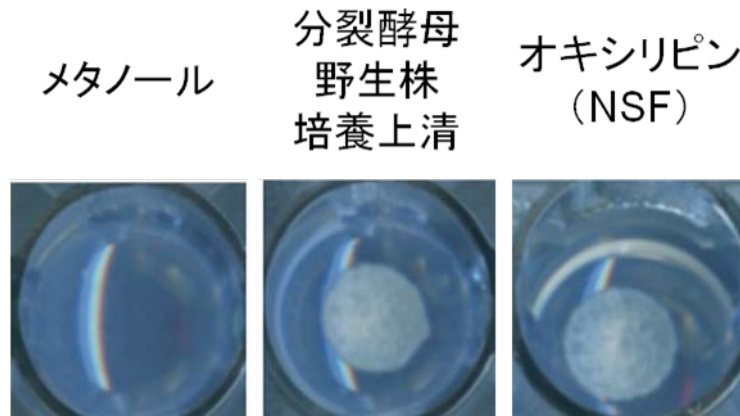


図 2 *eca39Δ*株の適応生育を評価するスポットアッセイ法

グルタミン酸を含む最小培地に分岐鎖アミノ酸（イソロイシン、ロイシン、バリン）を加えて、メタノール（溶媒）（左）あるいは分裂酵母の野生株培養上清（中央）を染み込ませた最小培地を用意した。そこに *eca39Δ*株の培養液をスポットすると、分裂酵母の野生株培養上清を染み込ませた培地では *eca39Δ*株が生育できた。このことから、分裂酵母の野生株は *eca39Δ*株の適応生育を誘導する活性物質を分泌していることがわかる。また、同定したオキシリピン（NSF）（右）を染み込ませた培地でも *eca39Δ*株は生育できた。

次に、野生株の培養上清について小スケールで溶媒の種類や pH の変化による分離を行い、活性物質が脂溶性の酸性物質であることを突き止めました。さらに、この活性物質の分離・同定を試みました。野生株の培養上清を酢酸エチルで抽出し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーおよび HPLC<sup>[7]</sup>で分離・精製後、各種 NMR 等で解析した結果、新規構造のオキシリピンである 10(*R*)-hydroxy-8(*Z*)-octadecenoic acid および 10(*R*)-acetoxy-8(*Z*)-octadecenoic acid を同定しました。各化合物を全合成して活性を確認したところ、最小有効濃度はそれぞれ 12ng/mL（約 40nM）、6.1ng/mL（約 18nM）という、ナノモルレベルのものでした。共同研究グループはこれらのオキシリピンを「窒素源シグナリング因子（NSF）」と名付けました。

共同研究グループは、適応生育を可能にするためのアミノ酸トランスポーターの探索も行いました。適応生育現象は *eca39Δ*株のみならず、取り込んだ窒素源からロイシンのみが生成できない *leu1* 株においても観察されました。*leu1* 株は高濃度のアンモニアを含む最小培地においてはロイシンが含まれていても、窒素源カタボライト抑制が働き、必要なロイシンが取り込めず生育が抑えられます。しかし、活性物質である NSF を培地に添加すると生育できるようになりました。さまざまなアミノ酸トランスポーターをコードする遺伝子破壊株を用いた実験により、この *leu1* 株の NSF により誘導される適応生育が Agp3 アミノ酸トランスポーターに依存的であることがわかりました。つまり、利用しやすい良質の窒素源が過剰に存在する培地において、生育に必要なアミノ酸を取り込めなくなったアミノ酸要求性変異株は、同じ分裂酵母の分泌する NSF により「窒素源カタボライト抑制」が解除されることにより、Agp3 トランスポーターを介してアミノ酸を取り込むことが明らかになりました（図 3）。

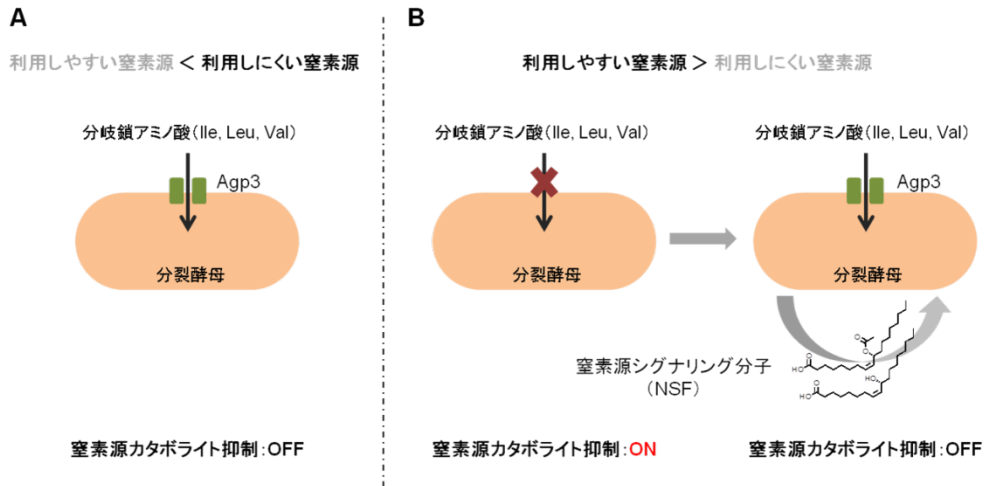


図3 窒素源シグナリング因子を介した細胞間コミュニケーションの模式図

A: 利用しやすい窒素源が利用しにくい窒素源より少ない培地中では「窒素源カタボライト抑制」は起こらないので、分裂酵母は利用しにくい窒素源である分岐鎖アミノ酸を Agp3 から取り込むことができる。  
 B: 利用しやすい窒素源が利用しにくい窒素源より多い培地中では「窒素源カタボライト抑制」が起こるので、分裂酵母は分岐鎖アミノ酸を取り込めないが、自身あるいは近傍の分裂酵母が分泌する窒素源シグナリング因子により「窒素源カタボライト抑制」が解除されることにより分岐鎖アミノ酸を取り込めるようになる。

### 3. 今後の期待

ヒトではプロスタグランジンやロイコトリエンなどのオキシリピンがシグナル分子として働きますが、本研究により、分裂酵母は自身の分泌するオキシリピンである NSF により窒素源カタボライト抑制を解除して窒素源の取り込みを制御し、窒素代謝を変化させていることが明らかになりました。また、NSF がナノモルレベルの極低濃度で作用することから、分裂酵母におけるフェロモン<sup>[8]</sup>のような機能をもつことがわかりました。この結果は細胞間のコミュニケーションにおける化学物質の機能を理解するうえで重要な成果です。

今後は、NSF がどのように合成、分泌、受容されるのか、また、NSF 受容後にどのようなシグナル伝達が起こるのかを詳しく解明していくことが課題です。オキシリピンは、酵母をはじめとする微生物の生育を調節する物質として利用できる可能性があります

### 4. 論文情報

<タイトル>

Identification of novel secreted fatty acids that regulate nitrogen catabolite repression in fission yeast

<著者名>

Xiaoying Sun, Go Hirai, Masashi Ueki, Hiroshi Hirota, Qianqian Wang, Yayoi Hongo,

Takemichi Nakamura, Yuki Hitora, Hidekazu Takahashi, Mikiko Sodeoka, Hiroyuki Osada, Makiko Hamamoto, Minoru Yoshida, and Yoko Yashiroda

<雑誌>

*Scientific Reports*

<DOI>

10.1038/srep20856

## 5. 補足説明

### [1] オキシリピン

脂肪酸から酸化反応を経て得られる生理活性脂質。植物、動物、菌類に広く含まれ、生体内のさまざまなプロセスにおいてシグナル分子として働く。

### [2] 窒素源シグナリング因子 (NSF)

本研究で同定した新規オキシリピン 10(*R*)-hydroxy-8(*Z*)-octadecenoic acid および 10(*R*)-acetoxy-8(*Z*)-octadecenoic acid の、その機能にもとづく呼称。Nitrogen Signaling Factor の略。

### [3] 分裂酵母

アフリカで古くから作られていたビールから単離された酵母。真核生物のモデル生物として、出芽酵母（パン酵母）とともに、遺伝学的解析や分子生物学的解析によく用いられている。

### [4] トランスポーター

細胞膜を介して物質を輸送する膜タンパク質の総称。

### [5] 窒素源カタボライト抑制

カタボライトとは異化産物、分解産物を意味する。酵母において、利用しやすい良質な窒素源（アンモニア、グルタミン酸など）を取り込み、代謝した際に、その代謝産物により、利用しにくい窒素源（分岐鎖アミノ酸、プロリン、尿素など）の代謝に関与する酵素や取り込みに必要なトランスポーターの発現が抑えられる機構。生育に有利な窒素源を効率的に利用する仕組みであると言える。

### [6] 最小培地

ある細胞の生育に必要な栄養成分（炭素源、窒素源、ミネラルなど）を最小限に含む合成培地。

### [7] シリカゲルカラムクロマトグラフィーおよび HPLC

シリカゲルカラムクロマトグラフィーは、シリカゲル（固定相）を詰めた筒状のガラス容器（カラム）に、溶媒に溶かした試料（化合物）（移動相）を流して、シリカゲルとの親和性などの相互作用による流出速度の差によって化合物を分離・精製する手法である。HPLC（高速液体クロマトグラフィー、High Performance Liquid Chromatography）は、高圧ポンプを用いて移動相溶媒を高流速でカラムに流すことにより、分離能や検出感度を高くした技術である。

[8]フェロモン

微生物や動物の体内で作られ、体外に分泌されて、非常に低濃度で同種他個体に作用する生理活性物質。

**6. 発表者・機関窓口**

<発表者> ※研究内容については発表者にお問い合わせ下さい

理化学研究所

吉田化学遺伝学研究室

大学院生リサーチ・アソシエイト 孫 暁穎 (ソン・ギョウエイ)

環境資源科学研究センター ケミカルゲノミクス研究グループ

グループディレクター 吉田 稔 (よしだみのる)

専任研究員 八代田 陽子 (やしろだ ようこ)

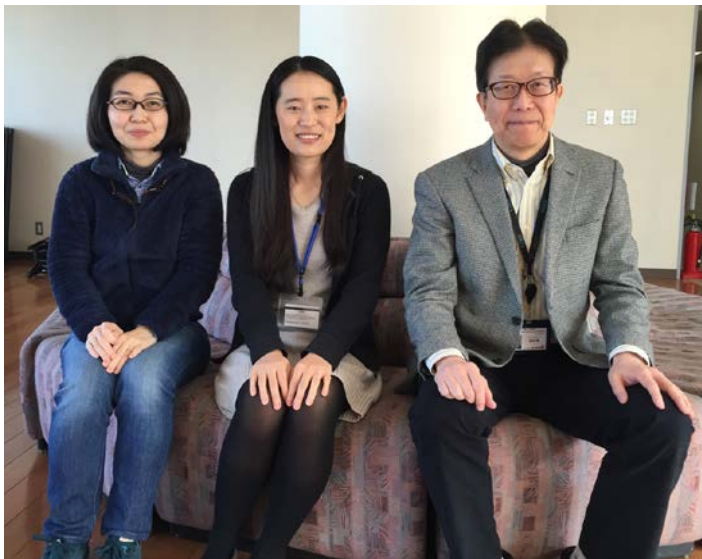
TEL : 048-462-1335 (八代田) FAX : 048-462-1749 (八代田)

E-mail : ytyy@riken.jp (八代田)

明治大学 農学部生命科学科

教授

浜本 牧子 (はまもと まきこ)



左から、八代田専任研究員、孫リサーチ・アソシエイト、吉田グループディレクター

<機関窓口>

理化学研究所 広報室 報道担当

TEL : 048-467-9272 FAX : 048-462-4715

E-mail : ex-press@riken.jp

明治大学 広報課

TEL : 03-3296-4330 FAX : 03-3296-4087

E-mail : koho@mics.meiji.ac.jp