

## 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

八代田陽子

## はじめに

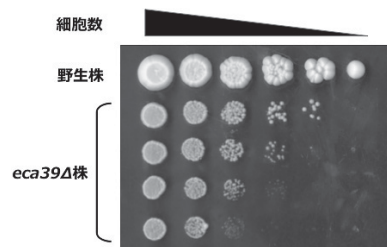
微生物は周りの環境を感知し、それに適応する能力がある。たとえば、栄養源を感知し、取り込み、代謝して自身の生育・増殖に利用する。また、誘引物質や忌避物質の濃度勾配に応じた行動である「走化性」は鞭毛をもつ細菌でみられる。これらの環境適応性は、基本的には微生物1匹がもつ能力として備わっているが、時には微生物同士が相互作用しあって、つまり、細胞自身が物質（化合物、ペプチドなど）を分泌し、それを介して細胞間のコミュニケーションをとって環境に適応することもある。細菌のクオラムセンシングによるバイオフィーム形成などはその例としてあげられる。

筆者らは、分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) から分泌される新規オキシリピンが同種の分裂酵母の別個体に働きかけて「細胞間コミュニケーション」を行い、窒素代謝を調節し、環境に適応している現象を発見したので本稿で紹介したい。

## アミノ酸要求性株が示した奇妙な「適応生育」

筆者らが分裂酵母の「細胞間コミュニケーション」研究に至ったそもそものきっかけは、偶然見つけた、分裂酵母のアミノ酸要求性株が示した奇妙な生育現象だった。本論に入る前に、予備知識として「窒素源カタボライト抑制 (Nitrogen Catabolite Repression)」について説明しておきたい。真核微生物である酵母においては、環境中の窒素源の質を感知して、窒素源の取り込みやその異化・同化プロセスを調節している。窒素源は利用しやすい良質なもの（グルタミン酸や $\text{NH}_4^+$ など）と利用しにくいもの（分岐鎖アミノ酸、プロリンなど）に分類される。利用しやすい窒素源が存在する場合には、それらを優先的に取り込んで利用し、利用しにくい窒素源の取り込みに必要な酵素やトランスポーター/透過酵素の発現が抑えられることが知られている。この仕組みを窒素源カタボライト抑制と呼ぶ<sup>1)</sup>。

分裂酵母において *eca39+* 遺伝子は分岐鎖アミノ酸アミノ基転移酵素をコードする。この酵素は分岐鎖アミノ酸（ロイシン、イソロイシン、バリン）の新規合成に必

図1. *eca39Δ*株の示す適応生育

須なので、*eca39+* 遺伝子破壊株 (*eca39Δ* 株) は分岐鎖アミノ酸を細胞外から取り込まなければ生育できない「分岐鎖アミノ酸要求性株」となる。*eca39Δ* 株は利用しやすい窒素源であるグルタミン酸を含む最少培地においては、いくら分岐鎖アミノ酸が十分量含まれていても生育不可能となる<sup>2)</sup>。このような培地においては、前述した窒素源カタボライト抑制が働き、*eca39Δ* 株は生育に必須である分岐鎖アミノ酸を取り込めないからである。しかし、同じ組成の培地にて、*eca39Δ* 株を分裂酵母野生株の近傍に置くと、*eca39Δ* 株の生育が可能となった (図1)。この現象を筆者らは「適応生育」と名付けた<sup>2)</sup>。興味深いことに、この *eca39Δ* 株の適応生育は、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 野生株の近傍では見られなかったことから、この現象は生物種特異的であると考えられた<sup>2)</sup>。この適応生育現象が野生株からの距離に応じて見られたことから、分裂酵母野生株から細胞外へ何らかの物質が分泌されて培地中に拡散し、それによって *eca39Δ* 株における窒素源カタボライト抑制が解除されることで分岐鎖アミノ酸の取り込み能が回復して生育できるようになるのではないかと想定した。そこで、筆者らはこの分泌物質の分離・同定に取りかかった。

## 適応生育誘導能を有するオキシリピンの同定

分裂酵母野生株は実際に活性物質を分泌しているのか？この問いに答えるため、まず、分裂酵母野生株の培養上清に *eca39Δ* 株の適応生育誘導活性があるかどうかを確認した。*eca39Δ* 株が単独では生育できない最少培地（窒素源としてグルタミン酸およびロイシン、イソロイシン、バリンを含む培地）に、ろ過滅菌した分裂酵母

野生株の培養上清を添加してから *eca39Δ* 株を植菌すると生育が確認されたが、出芽酵母野生株培養上清をろ過滅菌して加えた最少培地上では *eca39Δ* 株の生育は見られなかった<sup>3)</sup>。よって、分裂酵母野生株が *eca39Δ* 株の生育を誘導する活性物質を培地中に分泌していることが明らかとなった。さらに、有機溶媒（酢酸エチル、ブタノール、ヘキサン）分画やpH調整後の培養上清の分画を行った結果、活性物質は脂溶性かつ酸性であると考えられた<sup>3)</sup>。

そこで、活性物質を分離・同定するための大量培養を行った。分裂酵母野生株をグルタミン酸、分岐鎖アミノ酸を含む最少培地で2日間、合計40 Lを培養し、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*)-acetoxy-8(*Z*)-octadecenoic acid（アセトキシ体）（図2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2右）のいずれも構造新規のオキシリピンを同定した<sup>3)</sup>。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<sup>3)</sup>。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。筆者らは、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」と命名した。実は、この窒素源シグナリング因子の同定過程では当初、10-hydroxy-8(*E*)-octadecenoic acid（活性をもつ「ヒドロキシ体」の*E*体）が分離されたが、この*E*体には適応生育活性が確認できなかった。この*E*体はイネ科のチモシー（オオアワガエリ）に感染する病原菌（*Epichloe typhina*）から単離されている<sup>4)</sup>。本研究における分裂酵母のアミノ酸要求性株の適応生育においては、*E*体ではなく*Z*体に活性があることがわかったので、二重結合の幾何異性が活性に関与することが示唆された。

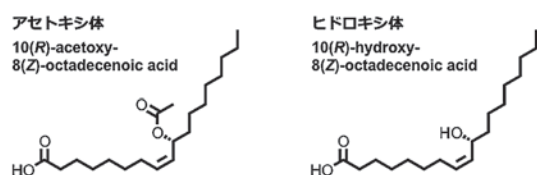


図2. 窒素源シグナリング因子

## 適応生育に関与するアミノ酸トランスポーター

適応生育現象は分岐鎖アミノ酸要求性の *eca39Δ* 株のみならず、ロイシン要求性である *leu1<sup>+</sup>* 遺伝子変異株 (*leu1-32* 株) でも観察された。*leu1-32* 株は、培地に高濃度のNH<sub>4</sub><sup>+</sup>が含まれると窒素源カタボライト抑制が起こり、ロイシンが十分量存在していてもロイシンの取り込みが抑制され、生育が阻害される。その培地に同定したアセトキシ体やヒドロキシ体を添加すると適応生育が観察された<sup>2,3)</sup>。つまり、ロイシンを取り込めるようになったと考えられる。そこで、*leu1-32* 株を用いて、適応生育におけるロイシンの取り込みを担うアミノ酸トランスポーターの同定を行った。分裂酵母のアミノ酸トランスポーターをコードする遺伝子の破壊株を用いて、*leu1-32* 変異と組み合わせて二重変異株を作製し、適応生育ができなくなる株をスクリーニングしたところ、出芽酵母の非選択性アミノ酸トランスポーターのホモログをコードする *agp3<sup>+</sup>* 遺伝子の破壊株のみ適応生育が見られなかった<sup>3)</sup>。よって、Agp3トランスポーターが適応生育におけるロイシンの取り込みに関与するトランスポーターであることが示唆された。

## 適応生育前後の遺伝子発現解析

適応生育の分子メカニズムを探るため、適応生育前後で *eca39Δ* 株の遺伝子発現レベルの変化をDNAマイクロアレイ解析により調べた<sup>2)</sup>。酵母エキスを含む富栄養培地で生育させた *eca39Δ* 株と最少培地（グルタミン酸およびロイシン、イソロイシン、バリンを含む培地）にて野生株近傍で「適応生育」した *eca39Δ* 株からそれぞれRNAを抽出し、遺伝子発現プロファイルと比較した。*eca39Δ* 株は適応生育前後で、遺伝子発現に変化がみられたことから、適応生育には転写レベルでの制御が関与することが示唆された。非常に興味深いことに、「適応生育」した *eca39Δ* 株の遺伝子発現プロファイルは Spt-Ada-Gcn acetyltransferase (SAGA) 複合体サブユニットの欠損株 *gcn5Δ*, *ada2Δ*, *ada3Δ* のそれらと高い相関性を示した。このことから、*eca39Δ* 株を野生株近傍に置かなくとも SAGA 複合体サブユニットを欠損させ、アセチル化酵素活性を抑えれば、「適応生育」可能な状態になり得ることが予想された。実際に *gcn5<sup>+</sup>* 遺伝子を欠損した *eca39Δ* 株は最少培地にて単独で生育可能となった。また、*gcn5<sup>+</sup>* 遺伝子欠損により *leu1-32* 株も高濃度NH<sub>4</sub><sup>+</sup>および十分量のロイシン存在下で生育可能となったことから、アミノ酸要求性株の適応生育と SAGA

複合体サブユニット Gcn5 との間に何らかの関連があることが考えられた。また、前項で示したように、適応生育には Agp3 トランスポーターを介したロイシンの取り込みの促進が示唆されたが、放射性同位体でラベルしたロイシンを用いた取り込み実験を行った結果、*gcn5Δ* 株においてロイシンの取り込みは野生株の2倍ほど増加しており、その増加が *agp3<sup>+</sup>* 遺伝子を欠損させることにより元に戻ることがわかった。すなわち、適応生育株でも *gcn5Δ* 株でも、Agp3 がロイシン取り込みを担っていることが明らかとなった。

### おわりに

筆者らは、分裂酵母における細胞間コミュニケーションの存在を示唆する偶然の発見から、それを担う鍵分子としてオキシリピン「窒素源シグナリング因子」を分離・同定した。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、Agp3 トランスポーターから分岐鎖アミノ酸を取り込めるようになる。そして、細胞間コミュニケーションにおいては Gcn5 が何らかに関与している (図3)。窒素源シグナリング因子は受容体を介して細胞に入るのか、細胞に入ったあとはどのようなパスウェイを経てアミノ酸の取り込みに至るのかなど、詳細はまだ不明ではあるが、このようにして、分裂酵母は細胞間コミュニケーションをとりながら窒素源の変化に適応する手段を持ち合わせて

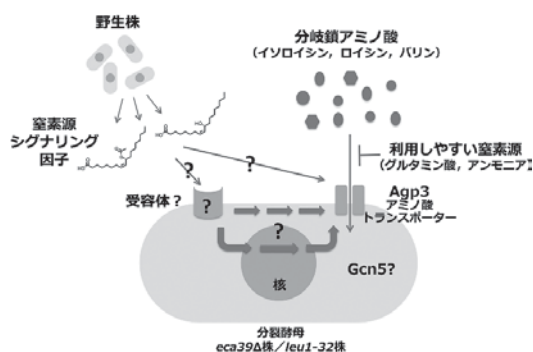


図3. 窒素源シグナリング因子により誘導される適応生育メカニズム

いるのではないかと推測される。オキシリピンのような脂肪酸がシグナル伝達や細胞間コミュニケーションの介在因子として機能することは知られているが<sup>7,8)</sup>、これまでに筆者らの報告以外には、酵母などの真核微生物において、脂肪酸が同種 (同属) 細胞間のコミュニケーション因子として作用して窒素源の取り込みなど、栄養源の代謝を変化させたという知見はない。

一方、2014年にJaroszらは、細菌とのコミュニケーションにより、出芽酵母の炭素源取り込みが変化することを報告している<sup>5)</sup>。彼らは、出芽酵母の炭素源カタボライト抑制 (グルコース存在下でグリセロールの取り込みが抑えられる) が近傍に生育するブドウ球菌 (*Staphylococcus* 属) から分泌される乳酸により解除されることを発見した<sup>6)</sup>。また、同様の細胞間コミュニケーションによる炭素代謝の調節は清酒酵母と生醗乳酸菌間でも観察される (渡辺らの項参照)。以上より、「窒素源」や「炭素源」などの栄養源の獲得をめぐる細胞間コミュニケーションを起こすという、酵母の一種の「生存戦略」が窺える。筆者らは分裂酵母のオキシリピンを介した細胞間コミュニケーションのさらなる解明から微生物の栄養環境適応研究を発展させて、微生物の機能・代謝の理解に貢献していきたいと考えている。

本研究は、理研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において吉田稔先生のご指導の下、孫曉穎博士、高橋秀和博士 (現・山口大) らにより遂行されました。オキシリピンの単離・構造決定・合成については平井剛博士 (九州大)、植木雅志博士 (理研) を含む多くの研究者の方々にご協力いただきました。この場を借りて御礼申し上げます。また、本研究は科学研究費助成事業 (25660070, 15K07376) の支援により行われました。

### 文 献

- 1) Magasanik, B. and Kaiser, C. A.: *Gene*, **290**, 1 (2002).
- 2) Takahashi, H. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **287**, 38158 (2012).
- 3) Sun, X. *et al.*: *Sci. Rep.*, **6**, 20856 (2016).
- 4) Koshino, H. *et al.*: *Tetrahedron Lett.*, **28**, 73 (1987).
- 5) Jarosz, D. F. *et al.*: *Cell*, **158**, 1083 (2014).
- 6) Garcia D. M. *et al.*: *ELife*, **5**, e17978 (2016).
- 7) Pohl, C. H. and Kock, J. L. F.: *Molecules*, **19**, 1273 (2014).
- 8) Fischer, G. J. and Keller, N. P.: *J. Microbiol.*, **54**, 254 (2016).