

酵母における *S*-アデノシルメチオニン(AdoMet)の生理機能に関する研究

水沼 正樹

(広島大学大学院先端物質科学研究科)

研究の目的

S-アデノシルメチオニン (AdoMet) は、生体内における様々なメチル化反応に使われる高エネルギー硫黄化合物である。AdoMetは、細胞増殖に様々な影響を及ぼす。以前、我々は出芽酵母*S*-アデノシルホモシステイン(AdoHcy) 水解酵素をコードする *SAH1* 遺伝子における変異を、*zds1* 破壊株が示すCa²⁺が誘導するG2 期遅延および芽の異常極性成長を抑圧する変異株として取得した^{1,2)}。興味深いことに、*sah1-1* 変異株はSah1 の基質であるAdoHcyのみならずAdoMetを細胞内に高蓄積することが分かった。ヒトのAdoHcy 水解酵素における患者の症例も報告され、酵母と同様、AdoHcyのみならずAdoMetが高蓄積することが分かった³⁾。このことから、細胞内AdoHcyやAdoMetの蓄積が引き起こす様々な現象を理解する上で、*sah1-1* 変異株をモデル系として解析することは有益と考えられた。本研究の目的は、*sah1-1*変異株の解析を通して、細胞増殖におけるAdoHcyやAdoMetの役割を調べることである。

方法

出芽酵母 (野生株, *sah1-1*, または *vps33Δ*) 株をYPD培地で培養した。特に記述がない限り培養は 25° Cで行った。細胞内AdoMet や AdoHcyの抽出は文献¹⁾に従った。細胞内AdoMet およびAdoHcy 含量はWaters Capillary Ion Analyzer (Milford, MA, USA) を用いたキャピラリー電気泳動法により測定した¹⁾。RNA の抽出および DNAマイクロアレイ実験は文献⁴⁾に従った。

結果

これまでに我々は、*sah1-1* 変異株のYPD培地、許容温度 25° Cにおける細胞内 AdoHcy および AdoMet 含量が高いことを見出した¹⁾。以前、液胞形態に重要な機能を持つ *VPS33* 遺伝子の破壊株においてAdoMetの高蓄積は、細胞増殖に悪い影響を及ぼすことが報告された。そこで、*sah1-1 vps33Δ*二重変異株を構築し、その増殖を調べた。その結果、期待通り *sah1-1 vps33Δ* 二重変異株は致死性を示した。このことは、細胞内 AdoHcy およびAdoMetは液胞で蓄積されることを意味し、さらに細胞内AdoHcyおよびAdoMetの高蓄積は酵母の細胞増殖を阻害することが示唆された。

我々は、*sah1-1* 変異株は14~37 °Cでは増殖遅延を示し、高温ではより顕著に増殖阻害が観察されることを見出した¹⁾。*sah1-1* 変異株における細胞内AdoHcy および

AdoMet含量が高温ではさらに増加すると予想した。そこで、*sah1* 変異株の制限温度である37°C・YPD培地における細胞内AdoHcy および AdoMet含量を測定した。AdoHcy およびAdoMet含量はキャピラリー電気泳動法により測定した。*sah1-1* 変異株における AdoHcy およびAdoMet 含量は25°C・YPD培地のときと比較して、それぞれ2.5および6倍に増加していた。細胞内 AdoHcy のみならず AdoMetの高蓄積が観察された。以前、シスタチオンβ合成酵素変異株では、細胞内AdoMet/AdoHcy比が1.5以下になると増殖阻害を示すことが報告された⁵⁾。我々は以前25°C・YPD培地で*sah1-1* 変異株における AdoMet/AdoHcy比が6.3であったことを見出した。37°Cにおいて、AdoMet/AdoHcy比は13.4であった。高温で観察されたAdoMet/AdoHcy 比の増加は、AdoHcy高蓄積による増殖阻害の解除のためAdoMet をさらに高蓄積させる未知の機構が作動したと予想された。さらに、*sah1-1*変異株を37°Cにシフトすると芽のない大きなG₁ 期の細胞が観察された。このことを確かめるためにFACS解析によりDNA含量を測定した。その結果、*sah1-1*変異株は G₁ 期遅延を示すことが確かめられた。

AdoHcy および AdoMet の高蓄積が遺伝子の発現に関与するか調べるため、DNA マイクロアレイを行った。その結果、*sah1-1*に依存したいくつかの特長的な遺伝子の発現が観察された。*sah1-1* 変異株で発現が2倍以上に増加した遺伝子を同定した。その結果、64 遺伝子が同定された。これらは脂質合成、リン酸・ポリリン酸合成およびメチオニン合成に関与するものであった。興味深いことに *SAH1* 遺伝子も高発現していた。さらに、37°Cにおいても同様な実験を行ったが、解析が出来なかった。

結論

本研究では、*SAH1* 遺伝子における変異を有する*sah1-1* 変異株の解析を行った。*sah1-1* 変異株では、Sah1 の基質であるAdoHcyのみならずAdoMetを細胞内に高蓄積することが高温(37°C)で顕著に観察される。高温では、*sah1-1* 細胞は、G₁ 期遅延する。DNAマイクロアレイの結果、*sah1-1* 変異株で観察される細胞内AdoHcy およびAdoMet の増加は、メチオニン合成関連遺伝子の高発現による影響と予想される。AdoHcyおよびAdoMetの生理機能を知るには、今後の更なる詳細な解析が必要である。

文献

- 1) Mizunuma M., Miyamura K., Hirata D., Yokoyama H., and Miyakawa T. Involvement of S-adenosylmethionine in G₁ cell-cycle regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**: 6086-6091 (2004).
- 2) Miyakawa T., and Mizunuma M. Physiological roles of calcineurin in *Saccharomyces cerevisiae* with special emphasis on its roles in G₂/M cell-cycle regulation. *Biosci Biotechnol Biochem.* **71**: 633-645 (2007).

- 3) Baric I., Fumic K., Glenn B., Cuk M., Schulze A., Finkelstein J. D., James S. J., Mejaski-Bosnjak V., Pazanin L., Pogribny I. P., Rados M., Sarnavka V., Scukanec-Spoljar M., Allen R. H., Stabler S., Uzelac L., Vugrek O., Wagner C., Zeisel S., and Mudd S.H. S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency in a human: a genetic disorder of methionine metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**: 4234-4239 (2004).
- 4) Shobayashi M., Ukena E., Fujii T., Iefuji H. Genome-wide expression profile of sake brewing yeast under shaking and static conditions. *Biosci Biotechnol Biochem.* **71**: 323-335 (2007).
- 5) Castro R., Rivera I., Struys E. A., Jansen E. E., Ravasco P., Camilo M. E., Blom H. J., Jakobs C., and Tavares de Almeida I. Increased homocysteine and S-adenosylhomocysteine concentrations and DNA hypomethylation in vascular disease. *Clin. Chem.*, **49**: 1292-1296 (2003).