

分裂酵母の窒素源感知におけるアンモニウムトランスポーターの役割

光澤 浩

(日本大学 短期大学部)

研究の目的

アンモニウムは多くの微生物や植物にとって重要な窒素源であり、外界から取り込まれアミノ酸の合成に利用される。アンモニウムの膜透過を仲介するのは、真正細菌や古細菌から真核生物に至るまで保存されているアンモニウムトランスポーターと呼ばれる膜タンパク質である (1)。興味深いことに、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* および植物やヒトの病原真菌である *Ustilago maydis* や *Candida albicans* において、窒素源の制限により誘導される酵母形態から繊維状形態への変換にアンモニウムトランスポーターが関与している (2-4)。最近私は、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* の3つのアンモニウムトランスポーター Amt1, Amt2, Amt3 を初めて機能的に同定し、低アンモニウム培地で起こる形態分化 (寒天培地内部での繊維状の成長、以下、侵入成長; 図 1A) に Amt1 が必要であることを見出した (5,6)。この形態分化における Amt1 の役割に関しては2つのモデルが考えられる。ひとつは、Amt1 がアンモニウムのセンサーとして機能しシグナルを生成する (図 1B 左) というもので、もうひとつは、取り込まれたアンモニウムまたはその代謝産物がシグナルとして働く (図 1B 右) というものである。本研究の目的は、窒素源感知における役割に焦点を当てながら、分裂酵母のアンモニウムトランスポーターの生理機能を明らかにすることである。

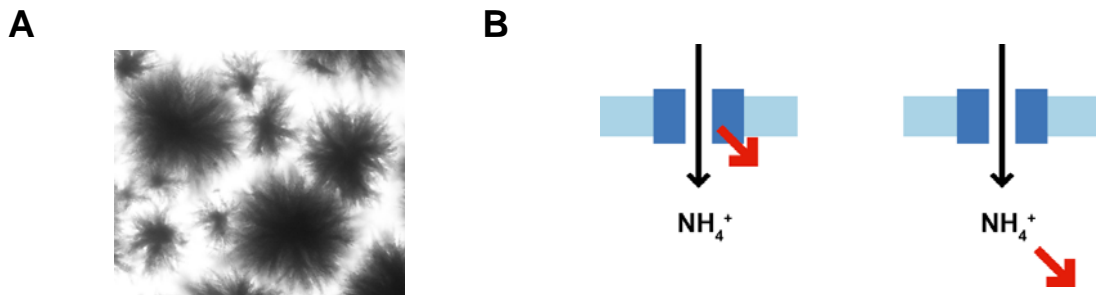


図1 分裂酵母の形態分化における Amt1 の役割。(A) 寒天内のコロニーの形態。(B) 侵入成長の誘導に関する2つのモデル。

方法

本研究で用いた分裂酵母の野生型株および遺伝子破壊株については報告済みである (5)。分裂酵母の侵入成長は、アンモニウム濃度を変えた LNB 寒天培地を用い、培地表面の細胞を水で洗い流すことにより調べた (5)。また、窒素源を含まない EMM-N 培地および EMM-N にアンモニウム以外の窒素源を添加した培地を用いて生育を調べた。孢子形成の有無は顕微鏡により観察した。出芽酵母の *MEP2* 破壊二倍体 (*mep2Δ/mep2Δ*) 株は、一倍体株の *MEP2* 遺伝子を PCR 法を用いて *URA3* マーカーで破壊したのち接合により作製した。二倍体出芽酵母の偽菌糸成長は SLAD 寒天培地 (2) のアンモニウム

濃度を変えて調べた。

結果

1. 形態分化におけるアンモニウムトランスポーターの役割

1 mM アンモニウムを含む寒天培地において、分裂酵母の野生型株は侵入成長を示すが、*amt1* 遺伝子の破壊 (*amt1Δ*) 株は示さない (図 2)。侵入成長の誘導における *Amt1* の役割が図 1B 右のモデルのようであれば、アンモニウムの濃度を上げることによって *amt1Δ* 株の侵入成長欠損が回復する可能性が考えられる。実際に、5 mM アンモニウムでは *amt1Δ* 株も寒天培地内に侵入した (図 2)。次に、二倍体出芽酵母の偽菌糸成長に必要であり、アンモニウムセンサーとしての機能が提唱されている *Mep2* について遺伝子破壊株を作製し、その偽菌糸成長不能表現型に対するアンモニウム濃度の効果について検討した。分裂酵母の場合とは異なり、*mep2Δ/mep2Δ* 株はアンモニウム濃度を上げて偽菌糸成長を示さなかった。

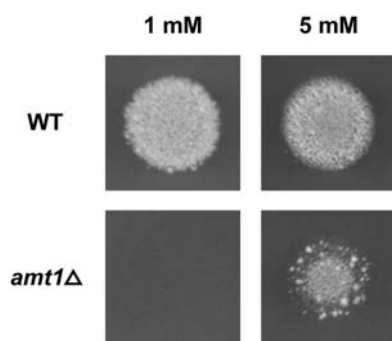


図 2 *amt1Δ* 株の侵入成長欠損に対するアンモニウム濃度の効果。30°C で 14 日間培養したプレート上の細胞を水で洗い流したあと寒天内に残った細胞を示している。

2. アンモニウムの細胞内保持におけるアンモニウムトランスポーターの役割

分裂酵母のアンモニウムトランスポーターの三重破壊 (*amt1Δ amt2Δ amt3Δ*) 株は低アンモニウム培地における生育が野生型株に比べて非常に遅い (5; 図 3)。今回新たに、*amt1Δ amt2Δ amt3Δ* 株がアンモニウム以外の窒素源での生育においても欠損を示すことを見出した。例えば、アンモニウムの代わりにトリプトファンを窒素源として含む培地において、三重破壊株は野生型株と比較して明らかに生育が遅かった (図 3)。また、窒素源を含まない培地 (EMM- N) においても、三重破壊株は野生型株より生育が悪かった (図 3)。これらの一見奇妙な結果は、アミノ酸の代謝によって生じたアンモニウムが細胞内から細胞外へ漏れ出すかあるいは排出され、それがアンモニウムトランスポーターによってふたたび細胞内に取り込まれると考えることにより説明できる。三重破壊株の EMM- N 培地におけるオートファジーの有無について孢子形成能を指標にして検討したところ、オートファジーは起きていることが示唆された。このことは、三重破壊株が EMM- N 培地において生育欠損を示すのは、オートファジーが起こらないためではなく、オートファジーの結果生じたアンモニウムを細胞内に保持できないためであることを示している。

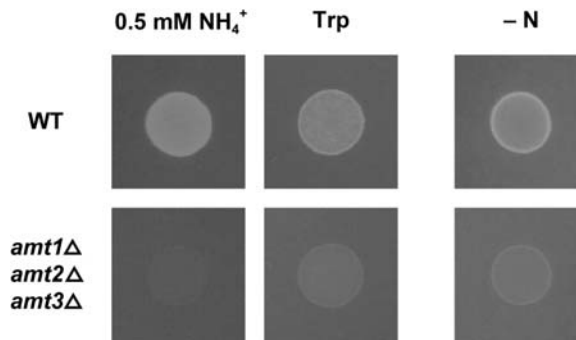


図3 アンモニウム以外の窒素源を含む培地および窒素源を含まない培地における *amt1Δ amt2Δ amt3Δ*株の生育欠損。

結論

アンモニウムトランスポーター欠損株の形態分化不能表現型に対するアンモニウム濃度の効果から、窒素源感知におけるアンモニウムトランスポーターの役割が分裂酵母と出芽酵母とで異なっていることが示唆された。また、分裂酵母アンモニウムトランスポーターの生理機能としてアンモニウムの細胞内保持を見出し、アンモニウム以外の窒素源での生育においても、アンモニウムトランスポーターがアンモニウムの輸送や感知に役割を果たしている可能性が示された。これらは今後の解析の基礎となる重要な知見である。

参考文献

1. Andrade, S.L., and Einsle, O. The Amt/Mep/Rh family of ammonium transport proteins. *Mol. Membr. Biol.* **24**: 357–365 (2007)
2. Lorenz, M.C., and Heitman, J. The MEP2 ammonium permease regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **17**: 1236–1247 (1998)
3. Smith, D.G., Garcia-Pedrajas, M.D., Gold, S.E., and Perlin, M.H. Isolation and characterization from pathogenic fungi of genes encoding ammonium permeases and their roles in dimorphism. *Mol. Microbiol.* **50**: 259–275 (2003)
4. Biswas, K., and Morschhäuser, J. The Mep2p ammonium permease controls nitrogen starvation-induced filamentous growth in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* **56**: 649–669 (2005)
5. Mitsuzawa, H. Ammonium transporter genes in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: role in ammonium uptake and a morphological transition. *Genes Cells* **11**: 1183–1195 (2006)
6. Mitsuzawa, H. Ammonium transporters in fungi. In M. Fujiwara, K. Tanaka, and H. Takahashi (eds.), *Adaptive Gene Regulations – From Microorganisms to Organelles*. Research Signpost, Kerala, India, pp. 123–133 (2008)