

# 酵母の *N*-アセチルトランスフェラーゼ Mpr1 依存的な新規アルギニン代謝制御機構の解析

那須野 亮

奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科

**研究成果：** 酵母 *N*-アセチルトランスフェラーゼ Mpr1 が、オルニチンアセチルトランスフェラーゼ Arg7 の転写を誘導し、アルギニン合成中間体である *N*-アセチルグルタミン酸の合成を亢進することで、アルギニン合成を促進することを見出した。

## 研究の目的

アミノ酸はタンパク質を構成する生体に必須な物質だが、近年、遊離アミノ酸の生理機能が注目されている。我々は、*N*-アセチルトランスフェラーゼ Mpr1 が新規のアルギニン (Arg) 代謝制御を介して酵母の酸化ストレス耐性を向上させることを明らかにし、Mpr1 の立体構造の解明、構造に基づいた分子設計による安定型 Mpr1 の構築、安定型 Mpr1 の発現による酵母の Arg 合成能の強化に成功した<sup>1,2</sup>。しかし Mpr1 依存的な Arg 代謝制御機構には未だ不明な点も多い。そこで本研究では、Mpr1 依存的な Arg 代謝制御機構の全容解明を目指す。

## 方法

本研究では、ゲノム上に *MPR1* 遺伝子を持つ *Saccharomyces cerevisiae*  $\Sigma$ 1278b 株を親株とした L5685 株を用いた。遺伝子破壊は薬剤耐性マーカーを用いて、相同組換えにより行った。Arg5 および Arg6 は同一遺伝子 *ARG5,6* 上にコードされるミトコンドリア局在タンパク質であるため、Arg6 の機能欠損株は、*ARG5,6* 遺伝子を破壊し、Arg6 の活性中心にアミノ酸置換 Asp251Glu を導入した変異型 *ARG5,6* 遺伝子をプラスミドにより導入して構築した。*MPR1* 過剰発現には、*GPD* プロモーター支配下に *MPR1* をクローニングした多コピープラスミドを用いた。培養は、適宜アミノ酸や塩基を省いた完全合成培地を用いて 30°C にて行った。*ARG7* の転写量は、RT-PCR によって解析した。Mpr1 の酵素反応には、大腸菌を用いて組換え酵素として精製した Mpr1 を使用した。Mpr1 の新規基質の探索は、生成物である CoA によるイールマン試薬の呈色反応を用いて行った。Mpr1 酵素反応の生成物は、LC-MS により同定した。

## 結果

*S. cerevisiae* の *ARG2* 破壊株は Arg 非含有培地における顕著な生育抑制 (Arg 要求性) を示す。当研究室の先行研究<sup>1</sup>により、Mpr1 は Arg2 より下流、Arg8 よりも上

流の段階に関与することが分かっている (図)。Mpr1 が Arg 合成系のどの段階に関与するか検証するため、ARG2 破壊株、および ARG5,6 破壊株の Arg 非含有培地での生育を評価したところ、MPR1 過剰発現は ARG2 破壊株の Arg 要求性を相補したものの、Arg5,6 破壊株の Arg 要求性は相補しなかった。続いて、Arg6 の活性中心に変異を導入し活性を抑制した株を用いて同様の解析を行ったところ、MPR1 過剰発現による Arg 要求性の相補は見られなかった。また、ARG2 破壊株の Arg 要求性は、Arg2 の生成物である N-アセチルグルタミン酸 (NAG) を培地に添加することによって相補された。以上のことから、Mpr1 は何らかの機構によって、NAG を供給することにより Arg 合成を亢進することが示唆された。

オルニチンアセチルトランスフェラーゼ (OAT) Arg7 は、N-アセチルオルニチンを脱アセチル化する反応を触媒する酵素であるが、Arg2 と同様に NAGS 活性を有することが示唆されている<sup>3</sup>。これを検証するため ARG2 破壊株で ARG7 を過剰発現したところ、ARG2 破壊株の Arg 要求性が相補された。このことから、Arg7 は NAGS 活性を有すると考えられた。続いて、Mpr1 が Arg7 の発現に及ぼす影響を評価するため RT-PCR 解析を行ったところ、MPR1 過剰発現により ARG7 の転写量が顕著に上昇した。以上のことから、Mpr1 は ARG7 の転写を亢進し、Arg7 による NAG 合成を介して、Arg 合成を促進すると結論付けた。

## 結論

本研究では、遺伝子破壊株および変異株を用いた生育評価、および RT-PCR 解析により、Mpr1 が ARG7 を転写誘導し、Arg7 の NAGS 活性により NAG が新規合成され、Arg 合成が亢進することを示す結果を得た。当研究室の先行研究から、Mpr1 が細胞質およびミトコンドリアに存在することが示唆されているが<sup>1</sup>、Mpr1 の核移行

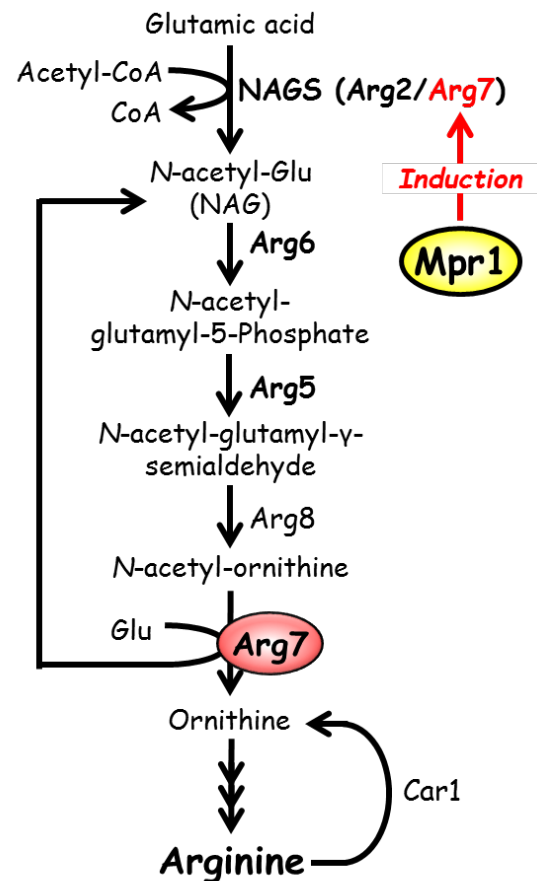


図 酵母におけるアルギニン代謝  
酵母 *S. cerevisiae* において、Arg はグルタミン酸を出発物質とし、N-アセチルグルタミン酸合成酵素 (NAGS) Arg2 によるアセチル化、Arg6 によるリン酸化、Arg5 による還元、Arg8 によるアミノ基転移を経て、N-アセチルオルニチンへ変換され、オルニチンアセチルトランスフェラーゼ (OAT) Arg7 による脱アセチル化を受けた後、数段階の反応により合成される。また、Arg は Car1 によりオルニチンへと分解される。

はこれまで観察されていない。一方、本研究で Mpr1 の新たな基質を探索したところ、塩基性条件において、プロリンをアセチル化することを見出した。N-アセチルプロリンに関する生物学的知見はほとんど無く、その生理機能は不明であるが、N-アセチルプロリンが Mpr1 依存的な ARG7 転写誘導に関与する可能性も考えられる。一方、N-アセチルトランスフェラーゼには低分子物質とタンパク質の双方に活性を示すものが報告されているため<sup>4</sup>、Mpr1 が何らかのタンパク質のアセチル化修飾を介して、ARG7 を誘導する可能性もある。

今後は、今回の結論をより詳細に検証すべく、Mpr1 が Arg7 タンパク質量、および NAGS 活性に及ぼす影響を評価する。また、Mpr1 が直接 ARG7 の転写誘導に関わるかどうかを、クロマチン免疫沈降法や Mpr1 の局在解析により検証するとともに、N-アセチルプロリンの生理機能や Mpr1 による ARG7 転写関連タンパク質の修飾などを評価し、Mpr1 依存的な ARG7 転写誘導の分子機構を明らかにする。

## 文献

1. Nishimura, A., Kotani, T., Sasano, Y., and Takagi, H. (2010) An antioxidative mechanism mediated by the yeast *N*-acetyltransferase Mpr1: oxidative stress-induced arginine synthesis and its physiological role. *FEMS Yeast Res.* **10**: 687-698.
2. Nasuno, R., Hirase, S., Norifune, S., Watanabe, D., and Takagi, H. (2016) Structure-based molecular design for thermostabilization of *N*-acetyltransferase Mpr1 involved in a novel pathway of L-arginine synthesis in yeast. *J. Biochem.* **159**:271-277.
3. Crabeel, M., Abadjieva, A., Hilven, P., Desimpelaere, J., and Soetens, O. (1997) Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* ARG7 gene encoding ornithine acetyltransferase, an enzyme also endowed with acetylglutamate synthase activity. *Eur. J. Biochem.* **250**: 232-241.
4. Sampath, V. *et al.*, (2013) Biochemical characterization of Hpa2 and Hpa3, two small closely related acetyltransferases from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **288**: 21506-21513.