

Title	"Pseudochochicystis ellipsoidea"の窒素栄養欠乏下における窒素安定同位体を用いたタンパク質分解物の代謝解析
Sub Title	
Author	田中, 美穂(Tanaka, Miho)
Publisher	慶應義塾大学湘南藤沢学会
Publication year	2012
Jtitle	生命と情報 No.19 (2012.) ,p.41- 44
JaLC DOI	
Abstract	<p>オートファジーは飢餓時に細胞質のオルガネラやタンパク質を液胞で低分子へとバルク分解する機構であり、細胞は分解されたアミノ酸をタンパク質合成に再利用することで飢餓に応答すると考えられている。緑藻"Pseudochochicystis ellipsoidea"は、窒素栄養欠乏(-N)下で中性脂質の一種であるトリアシルグリセロールを蓄積する。また、真核生物では飢餓時にオートファジーが誘導されることから、"P. ellipsoidea"の-N下においてもオートファジーによるタンパク質分解がおり、分解されたアミノ酸はタンパク質合成に再利用されている可能性がある。一方で、この際にタンパク質量とアミノ酸プールが顕著に減少することから、分解されたアミノ酸はタンパク質合成以外にも代謝されていることが考えられるが、利用先については知見が乏しい。</p> <p>本研究では"P. ellipsoidea"の-N下におけるタンパク質分解の仮説を検証し、さらに分解物がどの代謝物へ再利用されているのか明らかにすることを目的とした。唯一の硝酸源である$^{15}\text{N}_3$を用いてタンパク質を窒素安定同位体標識させた細胞を作出し、-N下に移行後、経時的にタンパク質と遊離アミノ酸のラベル率を測定したところ、遊離アミノ酸のラベル率が増加し、タンパク質分解が確認された。さらに、アミノ酸以外に同位体が検出された窒素代謝物を網羅的に解析したところ、ArgやLysの分解経路上の物質から標識が検出された。このことから、窒素がない状態においていくつかのアミノ酸は、アンモニアとして窒素源を排出するかアミノ基転移をすることで、炭素骨格へ分解されると推測された。</p>
Notes	慶應義塾大学湘南藤沢キャンパス先端生命科学研究会 2012年度学生論文集 修士論文ダイジェスト
Genre	Technical Report
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KO92001004-00000019-0041

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

“*Pseudochoricystis ellipsoidea*”の窒素栄養欠乏下における窒素安定同位体を用いたタンパク質分解物の代謝解析

政策・メディア研究科 修士課程2年

田中 美穂

要旨

オートファジーは飢餓時に細胞質のオルガネラやタンパク質を液胞で低分子へとバルク分解する機構であり、細胞は分解されたアミノ酸をタンパク質合成に再利用することで飢餓に応答すると考えられている。緑藻“*Pseudochoricystis ellipsoidea*”は、窒素栄養欠乏(-N)下で中性脂質の一種であるトリアシルグリセロールを蓄積する。また、真核生物では飢餓時にオートファジーが誘導されることから、“*P. ellipsoidea*”の-N下においてもオートファジーによるタンパク質分解が起こり、分解されたアミノ酸はタンパク質合成に再利用されている可能性がある。一方で、この際にタンパク質量とアミノ酸プールが顕著に減少することから、分解されたアミノ酸はタンパク質合成以外にも代謝されていることが考えられるが、利用先については知見が乏しい。

本研究では“*P. ellipsoidea*”の-N下におけるタンパク質分解の仮説を検証し、さらに分解物がどの代謝物へ再利用されているのか明らかにすることを目的とした。唯一の硝酸源である $^{15}\text{NO}_3$ を用いてタンパク質を窒素安定同位体標識させた細胞を作出し、-N下に移行後、経時的にタンパク質と遊離アミノ酸のラベル率を測定したところ、遊離アミノ酸のラベル率が増加し、タンパク質分解が確認された。さらに、アミノ酸以外に同位体が検出された窒素代謝物を網羅的に解析したところ、ArgやLysの分解経路上の物質から標識が検出された。このことから、窒素がない状態においていくつかのアミノ酸は、アンモニアとして窒素源を排出するかアミノ基転移をすることで、炭素骨格へ分解されると推測された。

キーワード：

1. オイル生産微細藻, 2. 窒素栄養欠乏, 3. オートファジー, 4. 窒素安定同位体, 5. メタボローム解析

略語：2-OG： α -ケトグルタル酸, Ac-CoA：アセチルCoA, Ala：アラニン, Arg：アルギニン, Asp：アスパラギン酸, Asn：アスパラギン, Cys：システイン, Gln：グルタミン, Glu：グルタミン酸, Gly：グリシン, His：ヒスチジン, Ile：イソロイシン, Leu：ロイシン, Lys：リジン, Met：メチオニン, Ox：オキサロ酢酸, Phe：フェニルアラニン, PI：ホスファチジルイノシトール, Pro：プロリン, Ser：セリン, Su：コハク酸, Su-CoA：スクシニルCoA, Thr：スレオニン, Trp：トリプトファン, Tyr：チロシン, Val：バリン

1. 序論

緑藻 “*Pseudochoricystis ellipsoidea*”は、窒素栄養欠乏 (-N) 下でトリアシルグリセロール (TAG) を蓄積する (Sato *et al.*, 2010) . しかし, -N下でのストレス応答やTAG蓄積の代謝制御機構は不明である. -N下でTAGを蓄積するいくつかのオイル生産微細藻において, -N下では新規のアミノ酸合成の低下 (Msanne *et al.*, 2012) , またアミノ酸プールやタンパク質量の減少が調べられている (Ito *et al.*, 2012; Bölling and Fiehn, 2005; Hu and Gao, 2006) .

オートファジーは飢餓時に細胞質のオルガネラやタンパク質を液胞で低分子へとバルク分解する真核生物で広く保存された機構であり (Mizushima, 2007) , 緑藻のモデル生物である *Chlamydomonas reinhardtii* の-N下でもオートファジーが誘導される (Pérez-Pérez *et al.*, 2010) . 酵母では-N下でアミノ酸プールが一時的に増加するとタンパク質合成が促進したことから, 分解されたアミノ酸がタンパク質合成に再利用されることが示されている (Onodera and Ohsumi, 2005) . このことから, 飢餓時に誘導されるオートファジーは, タンパク質合成のアミノ酸を供給することで, 飢餓に適応する役割があると考えられている. “*P. ellipsoidea*” の-N下においてもオートファジーによるタンパク質分解がおり, 分解されたアミノ酸はタンパク質合成に再利用されている可能性がある. 一方でタンパク質量とアミノ酸プールが顕著に減少したことから (Ito *et al.*, 2012) , タンパク質分解により供給されたアミノ酸はタンパク質合成以外にも代謝されていることが考えられる. しかし, 分解されたアミノ酸の利用先については, タンパク質合成以外に調べられていない. オートファジーのモニター方法には, オートファジーに必須であるオートファジー関連タンパク質8 (ATG8) の脂質修飾を検出する方法が利用されているが (Mizushima, 2004) , 物質分解を物質レベルで直接的にモニターする長寿命タンパク質分解アッセイ法もある (Klionsky *et al.* 2007; Ueno *et al.* 2008) . 例えば, [¹⁴C] Valの放射性同位体で長時間培養することで細胞内のタンパク質を標識した後, 非標識のValで短時間培養することで, 置換に時間のかかるタンパク質は標識されたまま, 遊離のValは非標識された細胞ができる. これに飢餓や薬剤添加といった処理を施し, その後, 細胞質や培地中に放出された物質の放射線量を測定することで, タンパク質分解率を定量することができる. この手法はほ乳類や酵母で古くから利用されているが, 単一のアミノ酸でタンパク質を標識しているため, タンパク質から分解された全てのアミノ酸の代謝を追跡することができない.

本研究では “*P. ellipsoidea*” の-N下におけるタンパク質分解の仮説を検証し, さらに分解物がどの代謝物へ再利用されているのか明らかにすることを目的とした. そのために, 長寿命タンパク質分解アッセイ法を参考に安定同位体により標識された化合物を細胞内に取り込ませてメタボローム解析を行う. 本手法では, 唯一の硝酸源である¹⁵NO₃を用いてタンパク質を窒素安定同位体 (¹⁵N) , 遊離アミノ酸を¹⁴Nとなるように標識させた細胞を作り出し, その後-N下で培養した細胞におけるタンパク質と遊離アミノ酸の¹⁴Nと¹⁵Nの割合を測定することでタンパク質分解を検証する. また, 分解されたアミノ酸は同位体標識されており, 同位体が検出された窒素代謝物を網羅的に解析することにより, 同時に-N下における窒素代謝物の分配を明らかにすることができると考えている.

2. 材料と手法

論文投稿のため非公開

3. 結果と議論

論文投稿のため非公開

4. 結論

本研究では, ¹⁵NO₃を用いて, タンパク質が¹⁵N, 遊離アミノ酸が¹⁴Nとなるように標識し, -N後

の標識率の変化を測定することで、タンパク質由来とみなされる高度に¹⁵N標識された遊離アミノ酸が検出され、”*P. ellipsoidea*”の-N下においてオートファジーによるタンパク質分解が起こる事を検証した。タンパク質由来のアミノ酸から代謝されたと考えられる高度に¹⁵N標識された代謝物が28物質検出された。その中には、ArgやLysの分解経路上の物質が検出され、窒素がない状態において一部のアミノ酸は分解されていることが分かった。またタンパク質分解によるアミノ酸供給があるにも関わらず遊離アミノ酸とタンパク質の量が顕著に減少したことから、他のアミノ酸も積極的に分解していると考えられる。これまでは他の真核生物において、オートファジーにより分解されたアミノ酸はタンパク質合成に再利用されていると言われてきたが、本研究により、その他にアミノ酸を積極的に分解していることが示唆された。これにより生産された炭素骨格はTAGの炭素源となっている可能性がある。また、本研究で述べた手法は、タンパク質分解を証明する際に一般的に用いられるプロテアーゼ活性測定法やオートファジー検出方法とは異なり、タンパク質分解の検証だけでなく、分解物から生産された代謝物も検出することに成功した。本手法を用いることでオートファジーによる分解物のリサイクルとその意義の解明が進むと期待している。

謝辞

アドバイザーの伊藤卓朗博士には研究の方向性から実験まで昼夜問わず御指導と御助言をいただきました。中東憲治博士、仲田崇志博士には多くの実りある議論をしてくださり、親身になってお力添えいただいた事に感謝致します。また、富田勝教授をはじめ、このような研究活動を行える環境と機会を設けてくださった先端生命科学研究会の皆様に、この場を借りて深く感謝申し上げます。

引用文献

- Arnbrust, E.V. *et al.* (2004) The genome of the diatom *Thalassiosira pseudonana*: ecology, evolution, and metabolism. *Science*, **306**, 79-86.
- Balavoine, S. *et al.* (1990) Rates of RNA degradation in isolated rat hepatocytes. *Eur. J. Biochem.*, **189**, 617-623.
- Bölling, C. and Fiehn, O. (2005) Metabolite profiling of *Chlamydomonas reinhardtii* under nutrient deprivation. *Plant Physiol.*, **139**, 1995-2005.
- Gronostajski, R.M. and Pardee, A.B. (1984) Protein degradation in 3T3 cells and tumorigenic transformed 3T3 cells. *J. Cell Physiol.* **119**, 127-132
- Hasunuma, T. *et al.* (2010) Metabolic turnover analysis by a combination of in vivo ¹³C-labelling from ¹³CO₂ and metabolic profiling with CE-MS/MS reveals rate-limiting steps of the C₃ photosynthetic pathway in *Nicotiana tabacum* leaves. *J. Exp. Bot.*, **61**, 1041-1051.
- Hu, H. and Gao, K. (2006) Response of growth and fatty acid compositions of *Nannochloropsis* sp. to environmental factors under elevated CO₂ concentration. *Biotechnol. Lett.*, **28**, 987-992.
- Ito, T. *et al.* (2012) Metabolic and morphological changes of an oil accumulating trebouxiophycean alga in nitrogen-deficient conditions. *Metabolomics*, 10.1007/s11306-012-0463-z
- Kanehisa, M. *et al.* (2008) KEGG for linking genomes to life and the environment. *Nucleic Acids Res.*, **36**, 480-484.
- Klionsky, D.J. *et al.* (2007) Methods for monitoring autophagy from yeast to human. *Autophagy*, **3**, 181-206.
- Lardeux, B.R. *et al.* (1987) RNA degradation in perfused rat liver as determined from the release of [¹⁴C]cytidine. *J. Biol. Chem.*, **262**, 14507-14513.
- Masanne, J. *et al.* (2012) Metabolic and gene expression changes triggered by nitrogen deprivation in the photoautotrophically grown microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* and *Coccomyxa* sp. C-169. *Phytochemistry*, **75**, 50-59.
- Mizushima, N. (2007) Autophagy: process and function. *Genes Dev.*, **21**, 2861-2873.
- Mizushima, N. (2004) Methods for monitoring autophagy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **36**, 2491-2502.
- Onodera, J. and Ohsumi, Y. (2005) Autophagy is required for maintenance of amino acid levels and protein synthesis under nitrogen starvation. *J. Biol. Chem.*, **280**, 31582-31586.
- Pérez-Pérez, M.E. *et al.* (2010) Inhibition of target of rapamycin signaling and stress activate autophagy in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant physiol.*, **152**, 1874-1888.
- Satoh, A. *et al.*, (2010) Characterization of the lipid accumulation in a new microalgal species, *Pseudochoricystis ellipsoidea* (Trebouxiophyceae). *J. Jpn. Inst. Energy*, **89**, 909-913.
- Soga, T. *et al.* (2003) Quantitative metabolome analysis using capillary electrophoresis mass spectrometry. *J. Proteome Res.*, **2**, 488-494.
- Soga, T. *et al.* (2009) Metabolomic profiling of anionic metabolites by capillary electrophoresis mass spectrometry. *Anal. Chem.*, **81**, 6165-6174.

- Sugimoto, M. *et al.* (2010) Correlation between sensory evaluation scores of Japanese sake and metabolome profiles. *J. Agric. Food Chem.*, **58**, 374-383.
- Sussenbach, J.S. and Strijkert, P.J. (1969) Arginine metabolism in *chlamydomonas reinhardi* Arginine deiminase: The first enzyme of the catabolic pathway. *FEBS Lett.*, **3**, 166-168.
- Ueno, T. *et al.* (2008) Loss of Pten, a tumor suppressor, causes the strong inhibition of autophagy without affecting LC3 lipidation. *Autophagy*, **4**, 692-700.