

アンモニウムトランスポーターの生理機能：形態分化における役割

1. はじめに

ヒトにおいて、アミノ酸の代謝過程で生じるアンモニアは、強い毒性があるため過剰分は尿素に変えられて体外に排出される。一方、細菌・酵母などの微生物や植物は、環境中のアンモニウムを窒素源として取り込んでアミノ酸合成に利用している。また、アンモニアを酸化することによりエネルギーを得ているような細菌もいる。アンモニウムの膜透過を仲介するアンモニウムトランスポーターは、最近になって結晶構造が明らかにされた11回膜貫通型タンパク質である。これまでに様々な生物のアンモニウムトランスポーターについて、輸送のキネティクス・分子機構・生理的意義、また、転写や活性の制御などが調べられてきた。本稿では、アンモニウムトランスポーターによるアンモニウム輸送の生理機能、および、アンモニウムトランスポーターがアンモニウムセンサーとして機能する可能性について、分裂酵母を用いた筆者の研究結果を交えながら紹介したい。

2. Amt/Mep/Rh ファミリー

アンモニウムトランスポーター (Amt) は、1994年に出芽酵母とシロイヌナズナから初めて遺伝子がクローニングされて以来、多くの生物において同定され、真正細菌や古細菌から真核生物に至るまで広く保存されていることが知られている。ひとつの生物に特性が異なる複数のトランスポーターが存在することが普通であり、例えば、出芽酵母や分裂酵母には三つの、シロイヌナズナには六つのトランスポーターがある(図1)(ちなみに、出芽酵母のトランスポーターは、methylammonium permeaseを略してMepと呼ばれている)。

Amt/Mepの同定後、ヒトの赤血球膜に存在するRhタンパク質(Rh式血液型の抗原として知られていたが機能については不明だったタンパク質)がAmt/Mepと高い相同性を持つことが見出された。さらに、腎臓や肝臓といったアンモニアの動態に深く関わる臓器に、Rhタ

ンパク質のホモログが存在することが示され、アンモニウム輸送への関与が示唆されている¹⁾。しかし、Amt/MepとRhとのそれぞれによく似たタンパク質を同時に持つ生物(例えば、線虫やハエ)もいることから、両者は異なる機能を持つのではないかという推論もあり²⁾、実際、RhホモログがCO₂輸送に関与するという報告がある。

3. 結晶構造と輸送機構

最近、Amt研究に大きな進展がみられた。大腸菌および古細菌由来のAmtの結晶構造が1Å台という高解像度で決定されたのである³⁻⁵⁾。それによると、Amtは三量体を形成し、単量体それぞれが11の膜貫通ヘリックスを持ち、2回回転対称に近い構造をしていた。単量体の中心に、上下に広がっている部分をつなぐ形で細い通路があり、そこを基質が通過すると考えられた。この通路は疎水性でありNH₄⁺は通さずNH₃を選択的に透過させると推測され、Amtはガスチャネルであると提唱された^{3,4)}。しかし、ここで詳しくは述べないが、構造変化の有無については異なる結果が得られており、また、H⁺の挙動についても議論の余地が残っている⁵⁾。そんなわけで、輸送の分子機構が完全に解明されたわけではないが、立体構造の情報が今後のアンモニウムトランスポーター研究全般に大きく役立つことは間違いない。

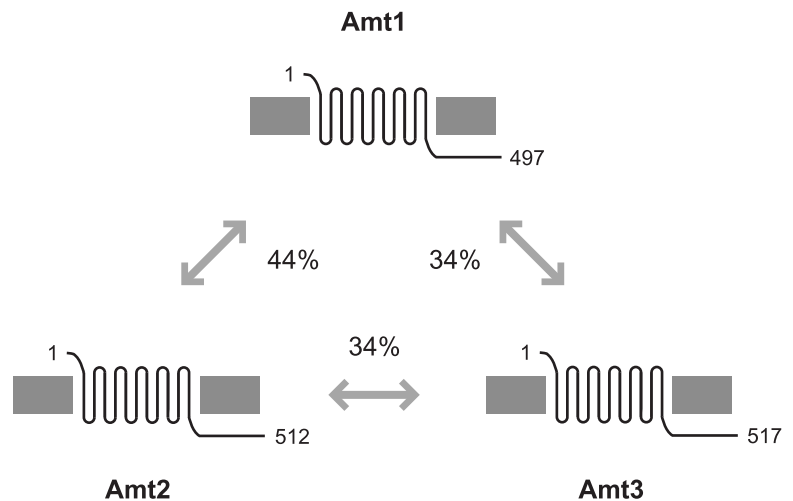


図1 分裂酵母のアンモニウムトランスポーター
アンモニウムトランスポーターの例として、分裂酵母のAmt1, Amt2, Amt3について、推定上のトポロジー(上が細胞外側)・アミノ酸残基数・アミノ酸の相同性(同一アミノ酸の割合)を示す。それぞれの遺伝子破壊株は異なる表現型を示す。詳細は文献7を参照。

4. 生理機能：細菌・真菌の場合

アンモニウムトランスポーターに関して、輸送の分子機構以外の重要な問題として、その生理機能は何か、言い換えると、生体内のいつどこで何のためにアンモニウムを輸送しているのかということがある。これについては、細菌・酵母・カビにおいてアンモニウムトランスポーターの遺伝子破壊株が作成され、アンモニウムトランスポーターが低濃度アンモニウムを窒素源とする生育に重要であることが示されている。例えば、出芽酵母の Mep1, Mep2, Mep3 の三重欠失株や、分裂酵母の Amt1, Amt2 の二重欠失株は、5 mM アンモニウムでの生育が野生型株と比べて非常に悪い^{6,7)}。つまり、アンモニウムを窒素源として利用する微生物にとって、アンモニウムトランスポーターの生理機能とは、アンモニウムを外界から取り込むことであり、これは当然のことと言えよう。

しかし不思議なことに、出芽酵母や分裂酵母の Amt/Mep 欠失株は、50 mM 以上のアンモニウムを含む培地（酵母の標準的な合成培地がそうである）では野生型株と変わらない生育を示す。アンモニウムトランスポーターが無いにもかかわらずアンモニウムを唯一の窒素源として生育できるというこの現象は細菌やカビにおいてもみられるが、可能性としては、NH₄⁺イオンと平衡状態にあり微量に存在する NH₃ ガス（これは生体膜を透過できる）が生育を支えているということが考えられる。これを支持する観察結果として、Amt/Mep 欠失株の高濃度アンモニウム下での生育が、NH₃ 濃度が減少する側に平衡を傾ける条件である低 pH において悪くなるということがある。別の可能性は、Amt/Mep ファミリー以外の低親和性のトランスポーターが存在するというものである。この点に関して、出芽酵母においてアンモニウムが K⁺ チャネルを介して細胞内に入ることを示唆する最近の研究⁸⁾は興味深い。さらに、アクアポリンがアンモニウムを輸送するという報告も相次いでいる（一例として文献 9）。

また、アンモニウムトランスポーターの生理機能として、アンモニウムを細胞内に維持するということが示唆されている。例えば、出芽酵母のアルギニン取り込み不能株をアルギニンを窒素源として含む寒天培地に広げ、そこで野生型株と Mep 欠失株を生育させると、後者の周辺でのみアルギニン取り込み不能株がサテライトコロニーとして生えてくる⁹⁾。この結果から、アルギニンの代謝により細胞内で生じたアンモニウムが細胞外に Mep 非依存的に出ること、および、それが Mep により取り込まれることが

推測される。アンモニウムトランスポーターのこの機能は、アンモニウム以外の窒素源を利用した生育においてみられるという点で、次に述べる細胞性粘菌の場合と似ていると言えるかもしれない。

5. 生理機能：細胞性粘菌の場合

アンモニウムトランスポーターの生理機能は、アンモニウムを窒素源として取り込むことだけではない。それを示す格好の例が細胞性粘菌である。実験室において大腸菌などを餌として培養する細胞性粘菌は、自然界でも森林土壌の細菌を食べて生きている。食物が枯渇すると粘菌の細胞は集合を開始し最終的に子実体を形成するが、この飢餓状態での形態形成過程で起こるタンパク質分解によりアンモニアが生じる。アンモニアは粘菌の形態形成の複数の段階に影響を及ぼすことが知られており、例えば、移動体からの子実体の形成がアンモニアによって阻害される。アンモニアの作用機作としては、DhkC ヒスチジンキナーゼを介して cAMP ホスホジエステラーゼ RegA を活性化することにより cAMP レベルを低下させると考えられている。

細胞性粘菌は三つのアンモニウムトランスポーターを持つが、そのひとつである AmtC を欠く変異株は子実体を形成できない¹⁰⁾。AmtC と同時に DhkC を無くすと子実体形成能が回復するので、AmtC が DhkC の上流で働いていることがわかる。Amt 欠失株が子実体を形成できない理由は、AmtC が無いと、子実体形成に向かうような条件で本来できるはずの局所的な低アンモニア状態ができないか、あるいは、低アンモニア状態は作られるがそれを感じることができないかにより、DhkC の活性化が続くためと考えられる。前者の可能性は、アンモニウム輸送の窒素源獲得以外の生理機能を示す例であり、一方後者は、アンモニウムトランスポーターがセンサーとして機能するという可能性である。これらを区別し、AmtC が DhkC の活性制御にどう関わっているかを明らかにすることは今後の課題である。

6. 酵母の形態分化とアンモニウムトランスポーター

上述のように、細胞性粘菌においては、代謝副産物であるアンモニアが形態形成のシグナル分子として機能する。興味深いことに、酵母においても、アンモニアがコロニー間のシグナル分子として働くということが提唱されている¹¹⁾。この過程にはアンモニウムトランスポーターは関与していないとされているが、一方で、アンモニウムトランスポーターが必要とされる形態分化が出芽酵母においても

知られている。偽菌糸分化と呼ばれるその現象は、窒素源が制限された培地で二倍体細胞が示す繊維状の成長で、より豊富な窒素源を獲得するために起こると考えられており、下流のシグナル伝達経路としてcAMP経路とMAPキナーゼ経路が関与していることが明らかになっている。

ところが、高親和性のトランスポーターであるMep2の欠失株では、アンモニウムを制限しても偽菌糸分化が起こらない¹²⁾。ただし、生育はアンモニウム制限下でも野生型株と変わらず、また、アンモニウム以外の窒素源を制限したときには偽菌糸に分化できる。アンモニウムトランスポーターが無ければ、低アンモニウム条件で誘導される偽菌糸分化は起こりやすくなるだろうというのが当初の予想であったが、上のように結果は逆だった。そこで、アンモニウム濃度を感知して偽菌糸分化に至るシグナルを生成するというMep2のセンサーとしての機能が提案され現在に至っている¹²⁾。

最近になって、ヒトの病原性真菌である*Candida albicans* やトウモロコシ黒穂病の原因真菌 *Ustilago maydis* における酵母型から菌糸型への形態変換にも、アンモニウムトラン

スポーターが関与していることが報告された^{13,14)}。さらに、分裂酵母においても低アンモニウムで誘導される形態分化が報告され¹⁵⁾、高親和性と推定されるAmt1トランスポーターがその形態分化に必要であることが見出された⁷⁾。図2A, Bに示すように、0.76 mM アンモニウムを窒素源として含む寒天培地において、野生型分裂酵母は、培地表面で成長する一方で、培地内部に侵入する。寒天内の細胞を顕微鏡で観察すると、繊維状に成長した特異な形態を示すコロニーを形成していた(図2C)。一方、Amt1の欠失株はそのような繊維状の侵入成長を全く示さない(図2B)。しかし、低グルタミン培地では、Amt1欠失株も寒天内に侵入する(図2B)。これらは出芽酵母の偽菌糸分化におけるMep2欠失株の表現型とよく似ており、興味深い可能性は、Amt1もアンモニウムセンサーとしての機能を持つというものである。ただし、Amt1欠失株は、低アンモニウム条件下、培地内部に侵入しないだけでなく、培地表面上での生育も野生型に比べて悪い(図2B)。培養を長く続けるほど顕著になるこの表現型は、Amt1が無いことによる低濃度アンモニウムの輸送欠損の結果であると思われる。

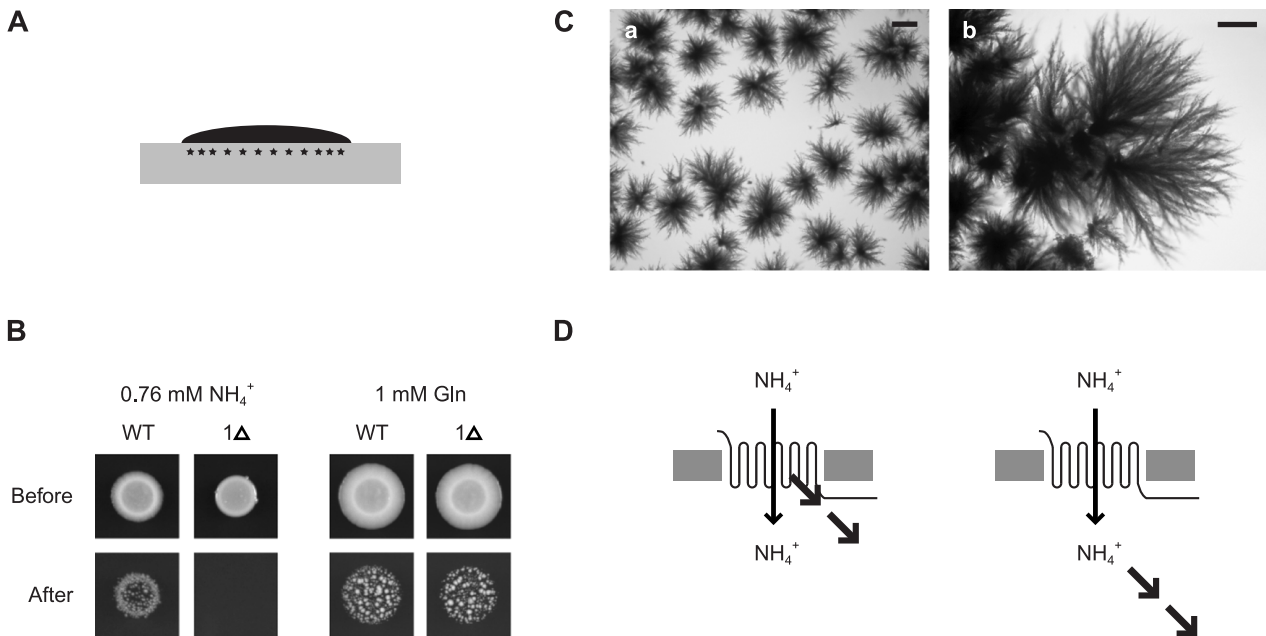


図2 窒素源の制限により誘導される分裂酵母の繊維状侵入成長におけるアンモニウムトランスポーターの役割

(A) 分裂酵母の侵入成長の模式図(断面図)。低アンモニウム寒天培地に細胞懸濁液を滴下して培養すると、培地表面下に繊維状成長を示すコロニー(★印)が形成される。(B) 侵入成長のアッセイ。低窒素源培地で30°C 14日間培養した後、寒天培地表面上の細胞を水で洗い流し、寒天内に残る細胞の有無を調べた(Beforeが洗う前、Afterが後)。Amt1欠失株(1Δ)は、低アンモニウム培地(0.76 mM NH₄⁺)で侵入成長を全く示さないが、低グルタミン培地(1 mM Gln)では野生型株(WT)と同様に培地内部に侵入する。(文献7より改変)(C) 寒天内のコロニーの形態。中央部(a)では全方向に、周辺部(b)では外側(図の右側)に向かう繊維状の成長がみられる。スケールバー:0.2 mm(文献7より改変)(D) 侵入成長の誘導に関する二つのモデル。詳細は本文を参照。

したがって、侵入成長不能もアンモニウム輸送能の低下が原因であるという可能性も否定できない。

つまり、アンモニウム制限により誘導される分裂酵母の侵入成長における Amt1 の役割については少なくとも二つのモデルが考えられる。ひとつは、Amt1 がアンモニウム濃度に応じてシグナルを生成するようなセンサーとして機能するというものである (図 2D 左)。アンモニウムの結合や輸送にともなう Amt1 の構造変化がシグナル伝達系の因子との相互作用に影響を与えるということなどが想像される。もうひとつは、Amt1 の機能はあくまでもアンモニウムを輸送することにあり、取り込まれたアンモニウムあるいはその代謝産物がシグナルとして働くという可能性である (図 2D 右)。これらの中間的な仮説として、Amt1 がアンモニウム代謝酵素と相互作用してシグナル分子としての代謝産物の合成を制御しているという可能性も考えられる。以上、分裂酵母の Amt1 について考察してきたが、出芽酵母の偽菌糸分化における Mep2 の機能に関しても、センサーであることが実証されたわけではなく、同じような議論が可能である。

7. おわりに

真正細菌、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は、その生物におけるアンモニウムの役割を反映した様々な生理機能を担っている。アンモニウムトランスポーターの生理機能を中心に解説した本稿では、結果として、理解が進んでいる微生物の研究を紹介することになった。今回は取り上げなかったが、植物のアンモニウムトランスポーターも盛んに研究されており、また、ヒトにおけるアンモニウム輸送の研究も、Rh タンパク質の Amt/Mep ホモログとしての同定を契機として急速に進展しつつある。

本稿の後半では、酵母や細胞性粘菌において見出されてきたアンモニウムトランスポーターと形態分化との関連について紹介した。はたして、アンモニウムトランスポーターは、条件に応じてシグナルを生成するセンサーとしての機能を持つのか、それともアンモニウムを輸送するだけでシグナルは細胞内で生成されるのかということは今後に残された問題である。いずれにしても、アンモニウムトランスポーターが関与する形態分化は、窒素源センシングの分子機構を理解するための有用なモデルになると期待される。

1) Van Kim, C.L., Colin, Y., & Cartron, J.-P. (2006) *Blood Rev.*,

20, 93–110.

- 2) Huang, C.-H. & Peng, J. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 15512–15517.
- 3) Khademi, S., O'Connell, J., III, Remis, J., Robles-Colmenares, Y., Miercke, L.J.W., & Stroud, R.M. (2004) *Science*, **305**, 1587–1594.
- 4) Zheng, L., Kostrewa, D., Bernèche, S., Winkler, F.K., & Li, X.-D. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 17090–17095.
- 5) Andrade, S.L.A., Dickmanns, A., Ficner, R., & Einsle, O. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 14994–14999.
- 6) Marini, A.-M., Soussi-Boudekou, S., Vissers, S., & Andre, B. (1997) *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 4282–4293.
- 7) Mitsuzawa, H. (2006) *Genes Cells*, **11**, 1183–1195.
- 8) Hess, D.C., Lu, W., Rabinowitz, J.D., & Botstein, D. (2006) *PLoS Biol.*, **4**, 2012–2023.
- 9) Liu, K., Nagase, H., Huang, C.G., Calamita, G., & Agre, P. (2006) *Biol. Cell*, **98**, 153–161.
- 10) Kirsten, J.H., Xiong, Y., Dunbar, A.J., Rai, M., & Singleton, C. K. (2005) *Dev. Biol.*, **287**, 146–156.
- 11) Palková, Z. & Váňová, L. (2003) *Int. Rev. Cytol.*, **225**, 229–272.
- 12) Lorenz, M.C. & Heitman, J. (1998) *EMBO J.*, **17**, 1236–1247.
- 13) Biswas, K. & Morschhäuser, J. (2005) *Mol. Microbiol.*, **56**, 649–669.
- 14) Smith, D.G., Garcia-Pedrajas, M.D., Gold, S.E., & Perlin, M.H. (2003) *Mol. Microbiol.*, **50**, 259–275.
- 15) Amoah-Buahin, E., Bone, N., & Armstrong, J. (2005) *Eukaryot. Cell*, **4**, 1287–1297.

光澤 浩^{1,2}

(¹ 日本大学総合科学研究所, ² 日本大学生物資源科学部)

Physiological functions of ammonium transporters: role in morphological differentiation

Hiroshi Mitsuzawa^{1,2} (¹University Research Center, Nihon University, 4-8-24 Minamikudan, Chiyoda-ku, Tokyo 102-8275, Japan; ²Nihon University College of Bioresource Sciences, 1866 Kameino, Fujisawa, Kanagawa 252-8510, Japan)

細胞性粘菌の分化誘導因子 DIF-1 が示す薬理作用：下等生物（粘菌）は面白い！

はじめに

近年、「細胞性粘菌 (cellular slime molds)」という土壤微生物の一群から多くの新規薬理活性物質が単離・同定され、今やこの生物は創薬のための「リード化合物の宝庫・資源」として注目されている¹⁾。