

様式3

令和2年度愛媛大学プロテオサイエンスセンター共同研究報告書

令和3年2月18日

国立大学法人愛媛大学  
プロテオサイエンスセンター長 殿

研究代表者

所属機関：広島大学

部局・職名：大学院総合生命科学研究科・教授

氏名：水沼 正樹

1. 研究課題

寿命をコントロールする液胞膜局在性トランスポーターの生化学的解析

2. 研究組織

氏名	所属機関・部局	職名	分担内容
研究代表者 水沼 正樹	広島大学・大学院総合生命科学研究科	教授	研究統括、実験材料(精製標品、菌株等)の提供、寿命測定、メカニズム解明
研究分担者 米山 香織	愛媛大学・大学院農学研究科	助教	質量分析
河田 美幸	愛媛大学プロテオサイエンスセンター	准教授	自動分析計によるアミノ酸含量測定、液胞膜小胞単離およびアミノ酸輸送活性測定
関藤 孝之	愛媛大学プロテオサイエンスセンター	教授	液胞膜小胞単離およびアミノ酸輸送活性測定

3. 研究成果

研究課題名

寿命をコントロールする液胞膜局在性トランスポーターの生化学的解析

研究者所属・職・氏名

広島大学大学院総合生命科学研究科・教授・水沼正樹

## 研究目的

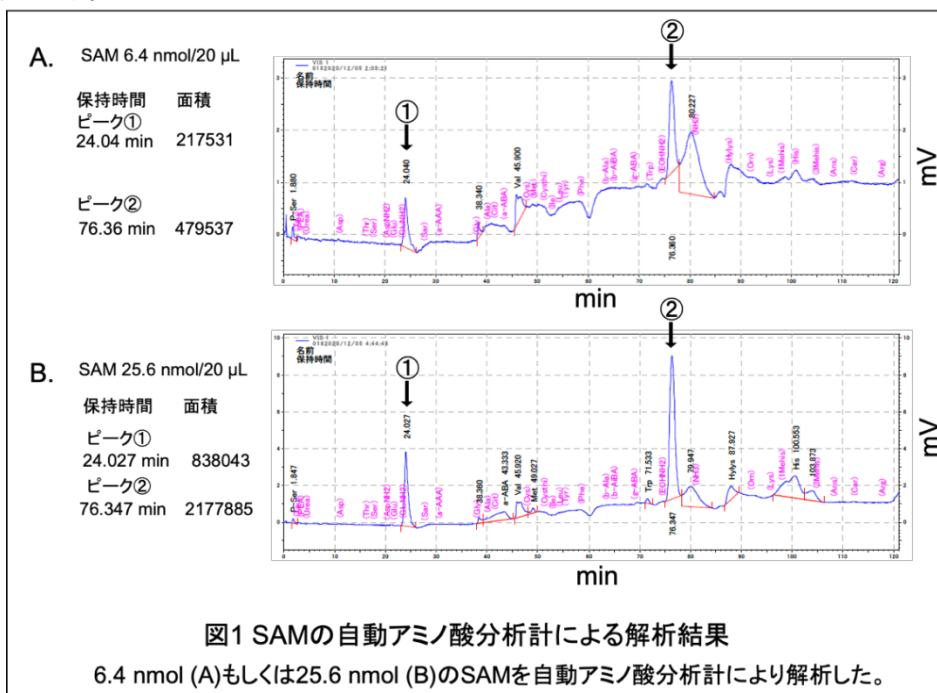
我々は実験室酵母が *SSG1* 変異によって *S*-アデノシルメチオン(SAM)を液胞内に高度に蓄積し、寿命が延長することを見出した。寿命メカニズムは酵母から哺乳類まで広く保存され、さらにSAMは抗鬱、肝機能、アルツハイマー病などの疾患や質の高い睡眠にも効果があることも示唆されていることから、SAM高蓄積酵母株の育種などの応用が期待される。フレームシフト変異による伸長型 *SSG1* をコードする清酒酵母では、Ssg1タンパク質が液胞膜に発現し、液胞内にSAMを蓄積することから、Ssg1はSAMを液胞内へと輸送するトランスポーターであると考えている。本研究ではSsg1のSAM輸送活性を検出するとともに、コムギ無細胞タンパク質合成系を用いてSsg1をプロテオリソームとして合成し、生化学的解析によりトランスポーターとしての性質を明らかにすることを目的とする。

## 研究内容

SAMホメオスタシスやメチル化が関与する寿命制御機構については不明な点が多い。*SSG1*変異株を用いて、これらのメカニズムの解明に取り組む上で細胞内のSAM検出/定量が必要となる。本年度はSAM精製標品のアミノ酸自動分析および質量分析装置による定量条件の設定を行った。

## 研究成果

SAM検出/定量のためまず、SAM精製標品(New England Biolabs)をアミノ酸自動分析計により解析した。クロマトグラムでは2つのピークが検出された(図1)。ピーク①はSAM、ピーク②は脱炭酸によるアミノプロピル体と考えられた。将来、酵母抽出液中での解析を行う際は特にピーク②がアンモニアのピークと重なり正確な定量が困難となる可能性がある。続いて、質量分析(LC/MS/MS)による検出を試みた。LCではRT=0.74に溶出した画分(図2A矢印)のMS/MS解析の結果SAMのスペクトルパターンが得られたことから、現有のシステムで定量可能であると判断した(図2B)。



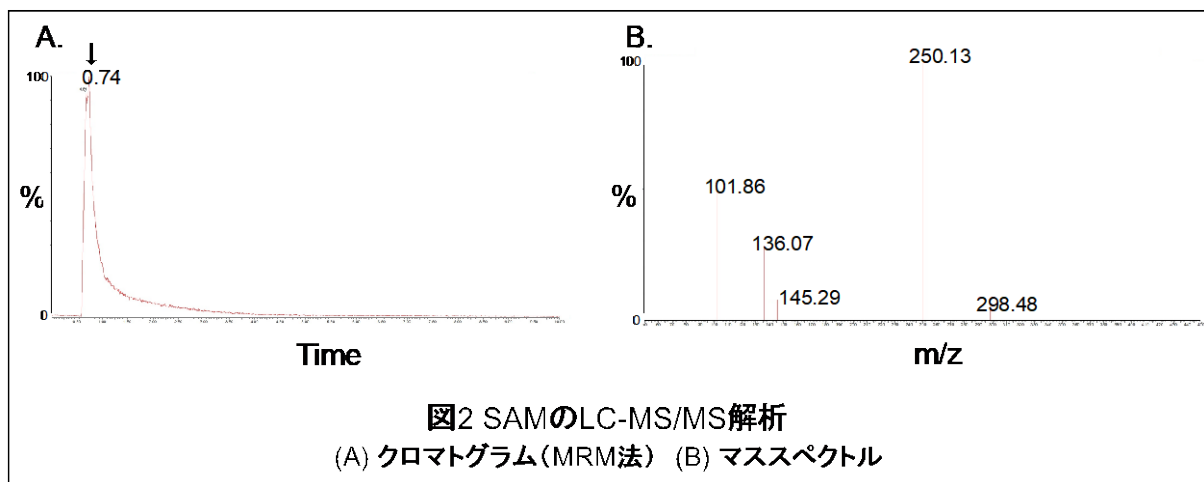


図2 SAMのLC-MS/MS解析  
(A) クロマトグラム(MRM法) (B) マススペクトル

### 成果発表

第 43 回日本分子生物学会年会

発表日: 2020 年 12 月 4 日

「出芽酵母の液胞膜トランスポーターと予想される寿命延長因子 Ssg1 の機能解析」

場所: Web 開催

発表者: 益村晃司、金井宗良、河田美幸、関藤孝之、曾我朋義、水沼正樹

日本農芸化学会 2020 年度 中四国支部大会 第 57 回講演会

発表日: 2020 年 9 月 18 日

「出芽酵母のトランスポーターと予想される寿命延長因子 Ssg1 の機能解析」

場所: Web 開催

発表者: 益村晃司、金井宗良、河田美幸、関藤孝之、曾我朋義、水沼正樹

酵母遺伝学フォーラム第 53 回研究報告会

発表日: 2020 年 9 月 8 日

「出芽酵母のメチオニン代謝が関与する寿命制御機構の解析」

場所: Web 開催

発表者: 水沼正樹、益村晃司、河田美幸、関藤孝之、曾我朋義、久米一規

### 今後の課題

保持時間の改善のため溶離液組成変更などは必要であるが、SAMの検出・定量が現有のLC-MS/MSシステムで可能であることが示された。今後は Ssg1 の SAM 輸送活性を検出するために野生株および *ssg1* 変異株より液胞膜小胞を単離し、Ssg1 による SAM 輸送の生化学的解析により、Ssg1 トランスポーターの性質を明らかにする。液胞膜局在性のトランスポーターの多くは、ATP 存在下に形成されるプロトン濃度勾配を利用する。SAM 添加後 ATP 存在下もしくは非存在下での小胞内 SAM 含量を定量する。また SAM 同様 *ssg1* 変異株で液胞内に蓄積する SAH の輸送活性測定および SAM 取り込みに対する阻害実験を行い、Ssg1 の基質特異性についても検討したい。液胞膜小胞には多くのトランスポーターが存在するため、Ssg1 による SAM/SAH 取り込み活性の検出には Ssg1 以外の複数のトランスポーター遺伝子を破壊しなければならない可能性もある。また、Ssg1 の SAM 輸送活性を正確に評価する上でも、コムギ無細胞での発現系を利用した Ssg1

タンパク質のプロテオリポソーム再構成とこれを用いたアッセイ系が有効と考える。こちらについても実験系構築を進めたい。