

## 学位論文全文に代わる要約 Extended Summary in Lieu of Dissertation

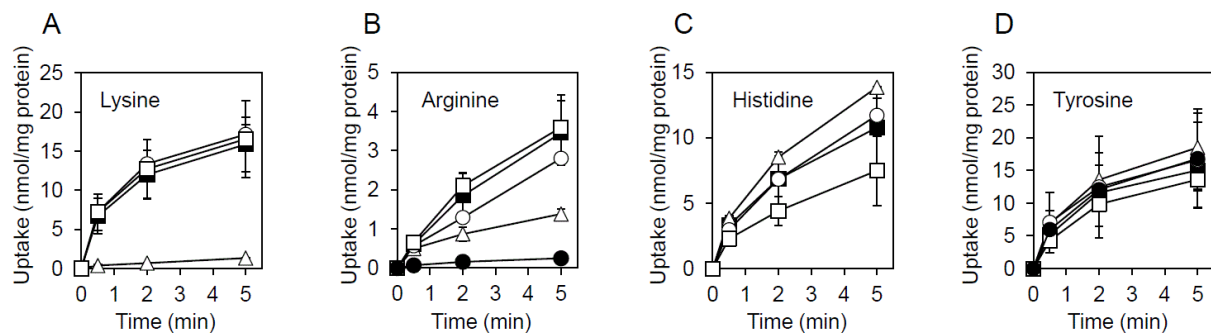
氏名： 真鍋 邦男  
Name

学位論文題目： 出芽酵母*Saccharomyces cerevisiae*液胞塩基性アミノ酸輸送系に関する研究  
Title of Dissertation

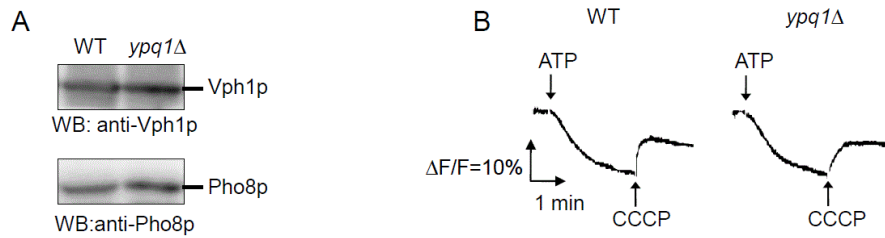
学位論文要約：  
Dissertation Summary

出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の液胞は能動的アミノ酸輸送により細胞全体の約70~90%の塩基性アミノ酸 (リジン/ヒスチジン/アルギニン) を蓄積する[1, 2]。その分子機構についてMajor Facilitator Superfamily中のVBAサブファミリーに属するVba1p, Vba2p, Vba3pが液胞への塩基性アミノ酸取り込みに機能し[3]、Amino Acid/Auxin Permease Superfamilyに属するAvt1pが液胞プロトン/ヒスチジンアンチポーターとして機能することが報告されている[4, 5]。しかし、VBA及びAVT多重破壊株由来の液胞膜小胞でも依然として各塩基性アミノ酸の取り込み活性が検出されたことから、未知のトランスポーターの存在が示唆されていた。最近、Transporter-Opsin-G protein coupled receptor (TOG) Superfamilyに属するラットのPQLC2及び線虫のLAAT-1がリソソームの塩基性アミノ酸輸送に関与することが報告された[6, 7]。これらはプロリン-グルタミン配列を含むPQLープとよばれる保守配列を2カ所有する7回膜貫通型タンパク質である[8]。本研究では、出芽酵母のTOG Superfamilyに属する液胞膜タンパク質Ypq1p, Ypq2p, Ypq3pの塩基性アミノ酸輸送能を単離液胞膜小胞のATP依存性<sup>14</sup>C標識アミノ酸輸送活性測定により検討した。

Ohsumi ら[9]の方法に従って単離した液胞膜小胞は *YPQ1*、*YPQ2*、*YPQ3* 遺伝子のいずれを破壊しても ATP 依存性なチロシンの取り込み活性に大きな変化はなかったが、リジンの取り込み活性が *YPQ1* 遺伝子破壊により大幅に低下した (Fig. 1A, D)。液胞膜小胞の V-ATPase レベルや小胞内の ATP 依存性な酸性化は *YPQ1* 遺伝子破壊によってほとんど変化せず (Fig. 2A, B)、*YPQ1* を過剰発現すると液胞膜小胞のリジン取り込みが大幅に増加し、この活性は CCCP 添加により大きく阻害されたことから (data not shown)、Ypq1p はプロトン濃度勾配を駆動力とするリジンの取り込みに特異的に機能することが示唆された。

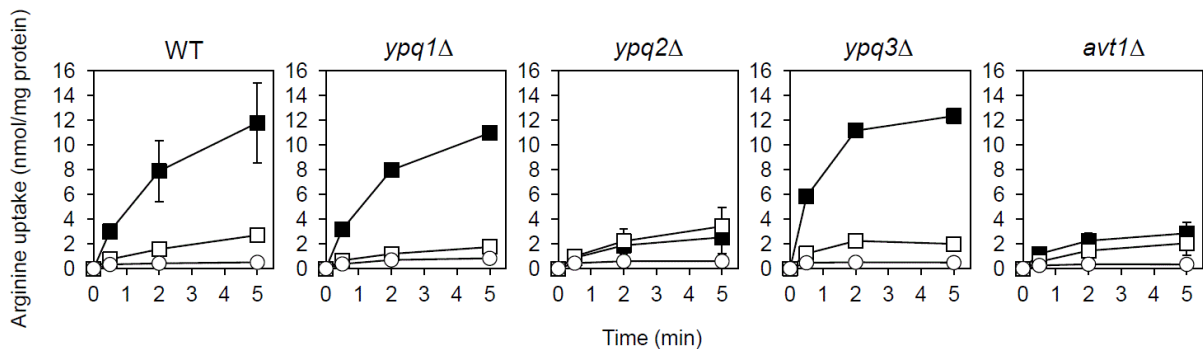


**Fig. 1** *YPQ*遺伝子破壊株由来液胞膜小胞のATP依存性アミノ酸取り込み活性  
野生株 (closed squares)、*ypq1*Δ株 (open triangles)、*ypq2*Δ株 (open circles)、*ypq3*Δ株 (open squares)、*ypq1*Δ*ypq2*Δ株 (closed circles) から液胞膜小胞を単離し、<sup>14</sup>C-リジン(A)、アルギニン(B)、ヒスチジン(C)、チロシンの取り込み量を測定した。結果は3回の実験の平均値±標準偏差を示した。



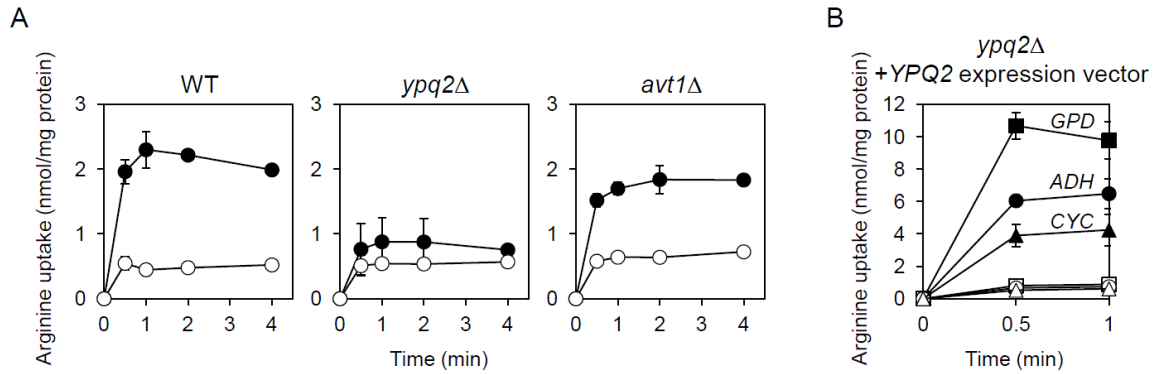
**Fig. 2** *ypq1Δ*株由来液胞膜小胞のウエスタンブロット解析及びH<sup>+</sup>輸送活性の測定  
(A) 野生株及び*ypq1Δ*株由来の液胞膜小胞のVph1p (V-ATPaseサブユニット)、Pho8p (液胞アルカリホスファターゼ) をそれぞれ抗Vph1p抗体、抗Pho8p抗体を用いたウエスタンブロットによって検出した。  
(B) 野生株及び*ypq1Δ*株由来の液胞膜小胞にキナクリンを添加し蛍光が安定した後、0.5 mM ATPを添加し反応を開始した。定常状態に達したところで10 μM CCCPを添加した。ΔF/Fは蛍光クエンチングと初期蛍光の比を示す。

液胞膜小胞のアルギニンの取り込み活性は*YPQ1*と*YPQ2*各遺伝子破壊により部分的に低下し、*YPQ1*と*YPQ2*の二重破壊によってさらに低下した。一方、*YPQ3*遺伝子破壊ではアルギニン取り込み活性に大きな変化は見られなかった (Fig. 1B)。液胞膜小胞のアルギニン取り込みについてはアルギニン/ヒスチジン交換輸送活性が報告されており[10]、この性質に注目した。野生株及び*ypq1Δ*株から単離した液胞膜小胞のATP依存的なアルギニン取り込みはヒスチジン添加によって増加したのに対し、*ypq2Δ*株由来の小胞ではほとんど増加しなかった (Fig. 3)。また、ヒスチジンを前負荷した野生株由来の小胞は、



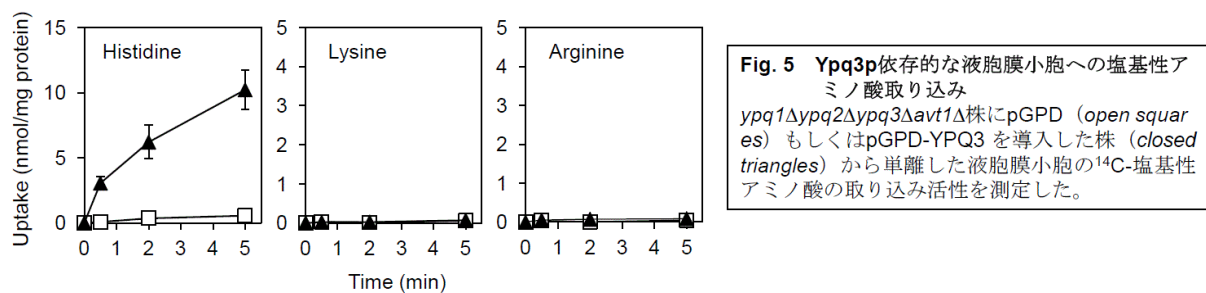
**Fig. 3** *YPQ*遺伝子及び*AVT1*遺伝子破壊のヒスチジン存在下での液胞膜小胞のアルギニン取り込みに対する影響  
野生株、*ypq1Δ*株、*ypq2Δ*株、*ypq3Δ*株、*avt1Δ*株から単離した液胞膜小胞をそれぞれ0.5 mM ATP (□)もしくは0.5 mM ATP及び0.5 mM ヒスチジン(■)含有バッファーと25°Cで1分間インキュベートした後、53 μM <sup>14</sup>C-アルギニンを添加し小胞内<sup>14</sup>C-アルギニン量を経時的に測定した。ATP非存在下での<sup>14</sup>C-アルギニン取り込みは(○)で示す。

希釈により小胞内外でヒスチジン濃度勾配を形成させるとATP非存在下でもアルギニンを取り込んだが、*YPQ2*遺伝子を破壊するとこの取り込みが大きく抑えられ (Fig. 4A)、異種プロモーターより*YPQ2*を発現させると、発現量に依存して取り込み活性が変化した (Fig. 4B)。以上の結果は、Ypq2pがアルギニン/ヒスチジン交換輸送の本体であることを示唆している。さらに、<sup>14</sup>C標識ヒスチジンを前負荷した小胞への未標識アルギニン添加によって排出されたヒスチジン量の測定より交換輸送のアルギニンとヒスチジンの量比は約1:1であることが示された (data not shown)。



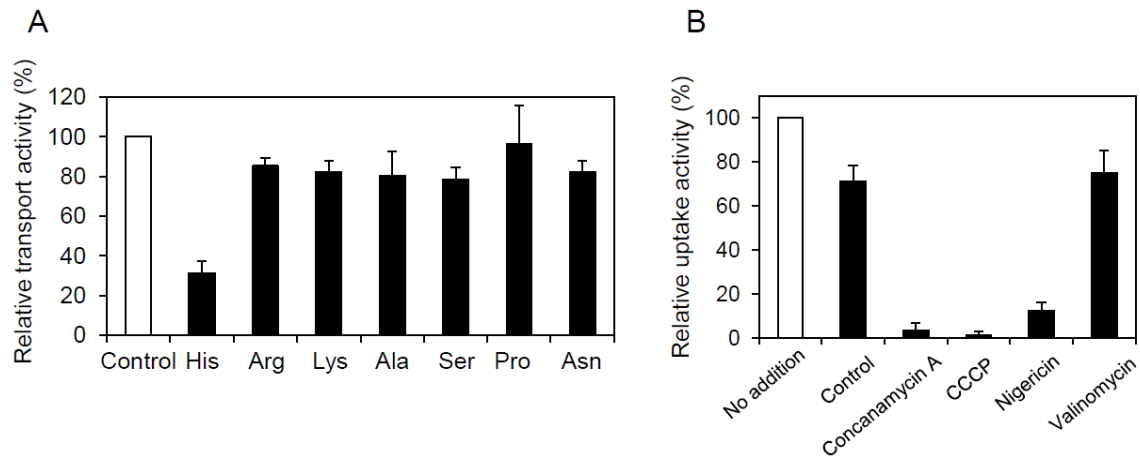
**Fig. 4** YPQ2遺伝子及びAVT1遺伝子破壊、YPQ2発現強度の変化によるヒスチジン濃度勾配に依存した液胞膜小胞のアルギニン取り込みに対する影響  
 (A) 野生株及び $ypq2\Delta$ 株、 $avt1\Delta$ 株から単離した液胞膜小胞を10 mM ヒスチジンを含んだバッファー中で25°Cで6分間インキュベートした後、53  $\mu$ M  $^{14}$ C-アルギニンを含んだバッファーで50倍に希釈し、15°Cで取り込み活性を経時的に測定した(●)。コントロールとして液胞膜小胞を10 mM ヒスチジンと53  $\mu$ M  $^{14}$ C-アルギニンを含んだバッファーで50倍に希釈し取り込み活性を測定した(○)。  
 (B) 発現強度の異なるプロモーター (CYC<ADH<GPD) によりYPQ2を発現するプラスミドpCYC-YPQ2 (triangles)、pADH-YPQ2 (circles)、pGPD-YPQ2 (squares)をそれぞれ $ypq2\Delta$ 株に導入し、単離した液胞膜小胞のヒスチジン濃度勾配形成時 (closed) 及び非形成時 (open) でのアルギニン取り込み量を (A)と同様に測定した。

液胞膜小胞のヒスチジン取り込み活性は *YPQ3* 遺伝子破壊により部分的に低下した一方、*YPQ1* 及び *YPQ2* 遺伝子の破壊によってはほとんど変化しなかった (Fig. 1C)。 $ypq1\Delta ypq2\Delta ypq3\Delta avt1\Delta$ 株から単離した液胞膜小胞は各塩基性アミノ酸 (リジン、アルギニン、ヒスチジン) の取り込み活性がほぼ消失したが、この株に *YPQ3* を *GPD* プロモーターにより過剰発現すると小胞のヒスチジン取り込みのみが検出された (Fig. 5)。この *Ypq3p* 依存的なヒスチジン取り込みは未標識ヒスチジンの添加によって顕著に阻害されたが、その他の未標識アミノ酸の添加ではほとんど阻害されなかった。また、Concanamycin A、CCCP、Nigericin 添加によっても大幅に阻害された (Fig. 6A, B)。以上の結果から、*Ypq3p* がプロトン濃度勾配に依存してヒスチジンを特異的に液胞内へと取り込み、*Avt1p* と重複して機能することが示唆された。また、ネイティブプロモーターにより発現した *Ypq3p*-HA<sup>3</sup> の細胞内レベルはヒスチジン飢餓によって増加した一方、リジンもしくはアルギニンの飢餓では大きく変化しなかったことから、*Ypq3p* はその輸送基質によって特異的な発現制御を受けることが示唆された (Fig. 7)。

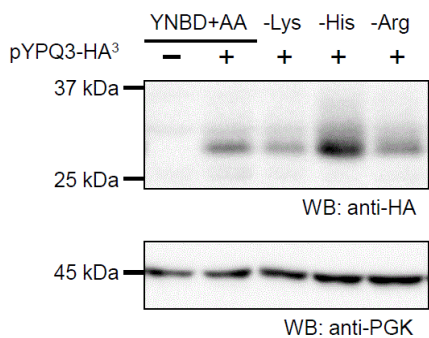


**Fig. 5** *Ypq3p*依存的な液胞膜小胞への塩基性アミノ酸取り込み  
 $ypq1\Delta ypq2\Delta ypq3\Delta avt1\Delta$ 株にpGPD (open squares) もしくはpGPD-YPQ3を導入した株 (closed triangles) から単離した液胞膜小胞の $^{14}$ C-塩基性アミノ酸の取り込み活性を測定した。

さらにアルギニン/ヒスチジン交換輸送の駆動力となるヒスチジン取り込みへの *Avt1p* と *Ypq3p* の関与について検討したところ、 $ypq3\Delta$ 株由来小胞のATP依存的なアルギニン取り込みはヒスチジン添加によって野生株由来の小胞と同様に増加したが、 $avt1\Delta$ 株由来の小胞では $ypq2\Delta$ 株由来の小胞同様増加しなかった (Fig. 3)。その一方で、 $avt1\Delta$ 株由来の小胞はヒスチジン濃度勾配を形成させると野生株由来の小胞と同様にアルギニンを取り込んだ (Fig. 4A)。したがって、*Ypq2p*によるアルギニン/ヒスチジン交換輸送の駆動力となるヒスチジン濃度勾配は *in vitro* では *Avt1p* によって形成されることが示唆された。



**Fig. 6 Ypq3p依存的な<sup>14</sup>C標識ヒスチジン取り込みに対する各種アミノ酸及び阻害剤の影響**  
 (A) *ypq1Δypq2Δypq3Δavt1Δ/pGPD-YPQ3*株から単離した液胞膜小胞の0.1 mM <sup>14</sup>C-ヒスチジンの取り込みの初速に対する1 mM各種未標識アミノ酸添加の影響を検討した。未標識アミノ酸非添加時の活性 (control) を100%として各種アミノ酸添加による阻害効果を算出した。  
 (B) (A) 同様、*YPQ3*過剰発現液胞膜小胞の<sup>14</sup>C-ヒスチジンの取り込みの初速に対する各種阻害剤の影響を検討した。反応開始3分前に1 μM Concanamycin A、10 μM CCCP、5 μM Nigericin、5 μM Valinomycinをそれぞれ加えた。コントロールとして1% Ethanol添加時の活性を測定した。阻害剤非添加時の初速 (No addition) を100%として阻害効果を算出した。



**Fig. 7 アミノ酸飢餓条件下での細胞内Ypq3p-HA<sup>3</sup>タンパク質レベルの変化**  
 塩基性アミノ酸要求株STY5959に空ベクター (-) もしくはpYPQ3-HA<sup>3</sup> (+)を導入し、アミノ酸混合液を添加したYNBD培地 (+AA) もしくは、リジン (-Lys)、ヒスチジン (-His)、アルギニン (-Arg)をそれぞれ含まないアミノ酸混合液を添加したYNBD培地で4時間培養し、タンパク質抽出後、抗HA抗体を用いたウエスタンブロット解析を行った。ローディングコントロールとしてphosphoglycerate kinase (PGK)を検出した。

本研究では、液胞膜タンパク質である Ypq1p 及び Ypq3p がプロトン濃度勾配を利用してリジン・ヒスチジンの液胞内への取り込みにそれぞれ機能することが示唆された。一方、Ypq2p は長年実体が不明であったアルギニン/ヒスチジン交換輸送体として機能し、その駆動力となるヒスチジン濃度勾配の形成に Avt1p が機能することが明らかとなった。*ypq1Δypq2Δypq3Δavt1Δ*株から単離した液胞膜小胞において塩基性アミノ酸の取り込みがほぼ消失したことから、*in vitro* では Ypq タンパク質及び Avt1p は主要な塩基性アミノ酸取り込み系として機能すると考えられる。最近、Ypq1p がリジン飢餓条件でユビキチン化され、液胞内で分解されることが報告された[11]。本研究においても、Ypq3p がヒスチジン飢餓により細胞内レベルが増加することを新たに見出し、Ypq タンパク質の合成と分解の調節が細胞内外のアミノ酸濃度の変化に応答して細胞の環境適応に機能する可能性が示唆された。Ypq タンパク質による基質輸送分子機構のさらなる解析と細胞内レベルの調節機構の解明はその生理機能の理解につながるとともに、液胞内に塩基性アミノ酸を高度に蓄積する意義についても重要な情報を提供することが期待される。

【参考文献】

- [1] Wiemken A, and Durr M. (1974). Characterization of amino acid pools in the vacuolar compartment of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* 101, 45-57.
- [2] Kitamoto K, Yoshizawa K, Ohsumi Y, and Anraku Y. (1988). Dynamic aspects of vacuolar and cytosolic amino acid pools of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 170, 2683-2686.
- [3] Shimazu M, Sekito T, Akiyama K, Ohsumi Y, and Kakinuma Y. (2005). A family of basic amino acid transporters of the vacuolar membrane from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 280, 4851-4857.
- [4] Russnak R, Konczal D, and McIntire S. L. (2001). A family of yeast proteins mediating bidirectional vacuolar amino acid transport. *J. Biol. Chem.* 276, 23849-23857.
- [5] Tone J, Yoshimura A, Manabe K, Murao N, Sekito T, Kawano-Kawada M, and Kakinuma Y. (2015). Characterization of Avt1p as a vacuolar proton/amino acid antiporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 79, 782-789.
- [6] Liu B, Du H, Rutkowski R, Gartner A, and Wang X. (2012). LAAT-1 is the lysosomal lysine/arginine transporter that maintains amino acid homeostasis. *Science.* 337, 351-354
- [7] Jézégou A, Llinares E, Anne C, Kieffer-Jaquinod S, O'Regan S, Aupetit J, Chabli A, Sagné C, Debacker C, Chadefaux-Vekemans B, Journet A, André B, and Gasnier B. (2012). Heptahelical protein PQLC2 is a lysosomal cationic amino acid exporter underlying the action of cysteamine in cystinosis therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109, E3434-3443.
- [8] Yee DC, Shlykov MA, Västermark A, Reddy VS, Arora S, Sun EI, and Saier MH Jr. (2013). The transporter-opsin-G protein-coupled receptor (TOG) superfamily. *FEBS J.* 280, 5780-5800.
- [9] Ohsumi Y, and Anraku Y. (1981). Active transport of basic amino acids driven by a proton motive force in vacuolar membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 256, 2079-2082.
- [10] Sato T, Ohsumi Y, and Anraku Y. (1984). An arginine/histidine exchange transport system in vacuolar-membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 259, 11505-11508.
- [11] Li M, Rong Y, Chuang YS, Peng D, and Emr SD. (2015). Ubiquitin-dependent lysosomal membrane protein sorting and degradation. *Mol. Cell.* 57, 467-478.