

学位論文要旨 Dissertation Abstract

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

学位論文要旨：
Dissertation Abstract

出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の液胞には細胞全体の約 70~90% の塩基性アミノ酸 (リジン・ヒスチジン・アルギニン) が蓄積し、これには液胞膜を介した選択的アミノ酸輸送機構が関与する。液胞への塩基性アミノ酸取り込みにはこれまで Major Facilitator Superfamily (MFS) 中の VBA サブファミリーに属する Vba1p、Vba2p、Vba3p 及び Amino Acid/Auxin Permease (AAP) superfamily に属する Avt1p が機能することが報告されている。しかし、これら多重破壊株の解析からは、液胞への塩基性アミノ酸取り込みには依然として未同定トランスポーターの存在が示唆されている。最近、Transporter-Opsin-G protein coupled receptor (TOG) superfamily に属するラット (*Rattus norvegicus*) の PQLC2 及び線虫 (*Caenorhabditis elegans*) 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。本研究では、出芽酵母の TOG superfamily に属する Ypq1p、Ypq2p、Ypa3p のアミノ酸輸送能について単離液胞膜小胞の ATP 依存的な ¹⁴C 標識アミノ酸輸送活性を測定することによって検討した。

*ypq1Δ*株由来の液胞膜小胞の ATP 依存的なリジンの取り込み活性は野生株由来の小胞に比べて大幅に低下し、アルギニンの取り込み活性も部分的に低下した。一方で、ヒスチジン・チロシンの取り込み活性に大きな変化はみられなかった。キナクリン蛍光クエンチングによる小胞内の酸性化及びウエスタンブロットによる V-ATPase サブユニット Vph1p のタンパク質レベルに対する *YPQ1* 遺伝子破壊の影響はほとんどみられなかったことから、取り込み活性の低下は V-ATPase 活性の低下によるものではないことが示唆された。*YPQ1* 過剰発現液胞膜小胞のリジン取り込み活性は大幅に増加した一方、CCCP 添加により大きく阻害されたことから、Ypq1p はプロトン濃度勾配を駆動力とするリジン・アルギニンの取り込みに関与することが示唆された。

*ypq2Δ*株由来の液胞膜小胞は ATP 依存的なアルギニンの取り込み活性がわずかに低

下した一方、リジン・ヒスチジン・チロシンの取り込み活性はほとんど変化しなかった。また、*YPQ2* と *YPQ1* の二重破壊株の液胞膜小胞では、アルギニン取り込み活性が各単一破壊株の液胞膜小胞より大幅に低下したことから、*Ypq2p* がアルギニンの取り込みに関与することが示唆された。出芽酵母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いる (Sato *et al. J. Biol. Chem.*, 259, 11509-11511, 1984)。野生株および *ypq1Δ* 株より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を添加すると大幅に増加したが、*ypq2Δ* 株由来の小胞では増加しなかった。また、ヒスチジンを前負荷した小胞の希釈によって小胞内外でヒスチジン濃度勾配を形成させると ATP 非存在下でも野生株の小胞はアルギニンを取り込んだのに対し、*ypq2Δ* 株の小胞は顕著な取り込みを示さず、この取り込み活性は *YPQ2* の発現量に依存して変化した。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。また、この交換輸送のアルギニン/ヒスチジン量比は約 1 : 1 であることが示された。

ypq3Δ 株由来の液胞膜小胞は ATP 依存的なリジン・アルギニン・チロシンの取り込み活性に大きな変化はみられなかったが、ヒスチジンの取り込み活性が部分的に低下した。*ypq1Δypq2Δypq3Δavt1Δ* 株由来の液胞膜小胞は各塩基性アミノ酸の ATP 依存的取り込みがほぼ消失したが、この株に *YPQ3* を *GPD* プロモーターより過剰発現すると液胞膜小胞のヒスチジンの取り込みのみが検出された。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、他の未標識アミノ酸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。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むことが示唆され、ヒスチジン取り込みの主要経路として報告された *Avt1p* と重複して機能することが示唆された。*Avt1p* と *Ypq3p* についてはさらにアルギニン/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関与を検討した。*ypq2Δ* 株由来小胞同様、*avt1Δ* 株由来小胞においても ATP 依存的なアルギニン取り込みはヒスチジンを添加しても増加しなかったが、*ypq3Δ* 株由来小胞は野生株同様増加した。一方で、*avt1Δ* 株由来小胞はヒスチジン濃度勾配を形成させると野生株同様にアルギニンを取り込んだ。したがって、*Ypq2p* による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。最近、リジン飢餓条件下において *Ypq1p* が液胞内へ移行し分解する vReD (vacuolar recycling and degradation) 経路が報告され (Ming Li *et al. Mol. Cell*, 57, 467-478, 2015)、*Ypq3p* についても HA³ タグを付加し、アミノ酸飢餓培地における細胞内レベルを調べたところ、ヒスチジン飢餓によって増加した一方でリジンおよび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発現制御を受けることが示唆された。