

学位論文審査の結果の要旨

氏名	真鍋邦男
審査委員	主査 秋山 浩一 副査 大西 浩平 副査 田中 直孝 副査 阿野 嘉孝 副査 関藤 孝之

論文名

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 液胞塩基性アミノ酸輸送系に関する研究

審査結果の要旨

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 Vba1、Vba2、Vba3 及び Amino Acid/Auxin Permease (AAP) superfamily に属する Avt1 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依然として未同定トランスポーターの関与が示唆されている。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。出芽酵母の TOG superfamily に属する 3 種の Ypq タンパク質 (Ypq1p、Ypq2p、Ypq3p) はいずれも液胞膜に局在する。本研究では各 Ypq タンパク質について、主として、単離液胞膜小胞を用いた解析により検討した。

*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、ヒスチジンと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と考えられる。*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、また、その取り込み活性は 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わかった。

*ypq2Δ*株由来の液胞膜小胞の ATP 依存的なアルギニンの取り込み活性はわずかに低下した。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 はアルギニンの取り込みに関与すると考えられる。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ので、この点について検討したところ、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添加により大幅に増加したが、*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、*Ypq2* 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し、アルギニン添加によって排出されるヒスチジン量の測定により、この交換輸送のアルギニン/ヒスチジン量比は約 1 : 1 であることが示唆された。

*ypq3Δ*株由来の液胞膜小胞では、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。*avt1Δypq1Δypq2Δypq3Δ*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ことから、*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と考えられた。

本研究では、液胞膜タンパク質である *Ypq1p*、*Ypq2p*、*Ypq3p* が液胞への塩基性アミノ酸の取り込みに機能するトランスポーターであることが示唆された。液胞プロトン/ヒスチジンアンチポーターをコードする *AVT1* とともにこれら *Ypq* タンパク質をコードする遺伝子を全て破壊した *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、*Ypq* タンパク質及び *Avt1p* が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。また、*Ypq1p* と *Ypq3p* はいずれもそのホモログであるラット PQLC2 や線虫 LAAT-1、シスチノシンと同様、プロトン濃度勾配を利用することが示された。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、ヒスチジン濃度勾配を駆動力とすることが明らかとなった。しかし、*in vivo* での *Ypq* タンパク質の生理的意義については依然不明である。アルギニンアナログであるカナバニンへの感受性が *YPQ* 遺伝子破壊によって変化するという報告があることから、*Ypq* タンパク質が細胞内の塩基性アミノ酸濃度の維持に関与することが示唆される。本研究では *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ており、*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考えられる。こうした輸送基質による *Ypq* タンパク質レベルの調節機構の解明は、*Ypq* タンパク質の生理機能の理解につながるるとともに、出芽酵母の液胞に塩基性アミノ酸が高度に蓄積する意義についても重要な情報を提供すると考えられる。

以上、申請者は、微生物を含めて多くの真核生物に保存されている *YPQ* ファミリーの中で、出芽酵母液胞 *Ypq1p*、*Ypq2p*、*Ypq3p* について液胞膜小胞を用いて液胞塩基性アミノ酸輸送の主要経路であることを明らかにし、さらに *Ypq2p* については、長年実態が明らかになっていなかった、アルギニン・ヒスチジン交換輸送系の本体であることも初めて明らかにした。本研究は、液胞アミノ酸集積に関わるトランスポーターの多重性、多様性の意義を議論する上での切り口の一つになるものである。液胞への塩基性アミノ酸の集積は、真菌の細胞生理に密接に関わっており、*Ypq* を標的にした新しい抗真菌薬開発の手がかりとなりうる有益な情報を提供する可能性も期待される。

本論文に関する公開審査会は、平成 28 年 2 月 6 日に愛媛大学農学部において開催され、申請者の論文発表とこれに対する質疑応答が行われた。引き続き開催された学位論文審査会において、本論文の内容について審査した結果、審査委員全員一致して本論文は博士（農学）の学位を授与するに値するものと判定した。