

(第5号様式)

学位論文審査の結果の要旨

| 氏名 | PONGSANAT PONGCHAROEN |
|------|--|
| 審査委員 | 主査 柿沼 喜己 副査 大西 浩平 副査 田中 直孝 副査 秋山 浩一 副査 関藤 孝之 |

論文名

Characterization of the VBA transporter family in yeast
(酵母液胞膜トランスポーターVBAファミリーの機能解析)

審査結果の要旨

液胞は、真核微生物から高等植物に至るまで、細胞内の巨大コンパートメントを形成するオルガネラであり、アミノ酸などの代謝物やイオンの蓄積、リソソームと同様に物質分解などの役割を担っている。出芽酵母においては細胞質の約30%程度の容積を占め、アミノ酸については塩基性アミノ酸（アルギニン、リジン、ヒスチジン）を蓄積する一方で、グルタミン酸は、細胞質濃度以下の低レベルに維持することにより、細胞内のアミノ酸濃度調節に関与している。このような液胞と細胞質間のアミノ酸の不均衡分布は、液胞膜に能動輸送機構が機能していることを示しており、主として液胞膜小胞を用いた輸送実験により解析が行われてきた。その結果、液胞のアミノ酸輸送には、主としてAVT familyとVBA familyに属するトランスポーターが機能していることが明らかになってきた。VBAはMajor Facilitator Superfamilyに属するトランスポーターファミリーの一つで、VBA1からVBA5、AZR1、SGE1の7個の遺伝子から構成される。VBA1からVBA3は塩基性アミノ酸の液胞への取り込みに、AZR1、SGE1はそれぞれ薬剤感受性に関与することが明らかになっているが、VBA4、VBA5の機能については解析が行われていない。一方、分裂酵母*Schizosaccharomyces pombe*にも、VBAホモログ遺伝子が3個見出されているが、それらの機能解析はほとんど進められていない。このように、液胞に関してその細胞生理上の重要性は認識されながらも、トランスポーター、特にアミノ酸輸送に関してはほとんど研究が進展していない状況にある。本研究は、出芽酵母および分裂酵母を対象に、液胞膜VBAファミリートランスポーターの機能を明らかにすることを目的としたものである。

出芽酵母VBAファミリーのVba3pとVba5pは複製遺伝子産物と言えるもので、一次構造上の違いは、膜貫通部分（アミノ酸残基数458個）の中の5個のアミノ酸残基の違いと、Vba5pがそのN末端に124個のアミノ酸残基を余分に有する点にある。はじめにGFP融合Vba5pの細胞内局在性を調べ、液胞膜ではなく細胞膜に局在することを明らかにした。Vba5pのN末端部分とVba3pとの融合蛋白質が細胞膜局在を示したことから、N末端が局在性決定因子であることがわかった。Vba5p過剰発現株では、リジン、アルギニンの取り込み活性が上昇したこと、カナバニン、4-nitroquinoline N-oxide (4-NQO)などの薬剤に対する感受性が上昇したこと、これらの薬剤感受性がアルギニンの添加により回避されたことか

ら、Vba5p はこれら薬剤を含めて広い基質特異性を有する細胞膜塩基性アミノ酸取り込み系であることが示唆された。一方液胞膜局在性の Vba4p については、その過剰発現株の液胞膜小胞の解析から、塩基性アミノ酸の取り込みに関わることが示唆された。Vba4p 欠損株ではケトコナゾールに対する感受性が亢進し、VBA4 遺伝子の導入により抑制されたことから、Vba4p がケトコナゾールの輸送能を有する可能性が考えられた。

分裂酵母においてもアミノ酸コンパートメントとしての液胞の重要性が指摘されており、出芽酵母 VBA ホモログとして、Fnx1p, Fnx2p, SpVba2p の3個が見出されて、液胞膜局在が確認されている。生細胞を用いた取り込み活性の解析より、それぞれアミノ酸取り込みに関与することが間接的に示唆されていたが、トランスポーターとしての働きについて直接的な証明が行われていなかった。分裂酵母の液胞はそのサイズが小さいために、他のオルガネラとの明確な分離が困難であり、未だにその単離精製法が確立されていない。本研究では、Fnx2p, SpVba2p を出芽酵母細胞に発現させ、液胞膜小胞による解析を試みた。GFP-Fnx2p, GFP-SpVba2p いずれも出芽酵母細胞においても液胞膜に局在が見られた。GFP-Fnx2p, GFP-SpVba2p を過剰発現した出芽酵母細胞の液胞画分のアミノ酸組成分析の結果を踏まえて、GFP-Fnx2p, GFP-SpVba2p を過剰発現した液胞膜小胞による解析により、いずれもリジン、アルギニンの取り込み活性を有することがわかった。これらの活性は、液胞型 H^+ -ATPase の特異的阻害剤であるコンカナマイシン A、プロトノフォアである carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone により阻害を受けたことから、 H^+ との対向輸送のメカニズムが推定された。引き続き、SpVba2p については、4-NQO、キニジンなどの薬剤に対する感受性に対する関与を調べたところ、出芽酵母における Vba4p と異なり、SpVba2p 欠損株ではキニジンに対する感受性が低下し、リジンの添加によりその効果が回避された。

以上、申請者は、真核微生物を中心に多くの生物に保存されている VBA ファミリーの中で、出芽酵母 Vba4p, Vba5p 及び分裂酵母 Fnx2p, SpVba2p のアミノ酸トランスポーターとしての機能を明らかにするとともに、これらの働きが薬剤感受性に密接に関連していることを見出した。真核微生物の薬剤耐性には、一般に ABC 型ポンプの関与が知られているが、通常は H^+ 共役型のアミノ酸トランスポーターとして機能しているものが薬剤感受性にも関与していることを示した新しい研究成果である。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り、また病原性真菌の薬剤耐性に対する化学療法を検討する上で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 26 年 8 月 2 日に香川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（学術）の学位を授与するに値するものと判定した。