

(第5号様式)

学位論文審査の結果の要旨

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

論文名

Characterization of vacuolar amino acid transporters from *Fusarium oxysporum* and *Schizosaccharomyces pombe*
(フザリウム菌および分裂酵母における液胞アミノ酸トランスポーターに関する研究)

審査結果の要旨

酵母やカビ、植物細胞の液胞は、動物におけるリソソームと同等の機能を持つ酸性のコンパートメントと考えられている。液胞には、タンパク質分解や、カルシウム、リン酸、および、アミノ酸の貯蔵、pH や浸透圧、細胞質のイオン濃度の調節などの機能が知られている。出芽酵母の細胞体積の約25%を占める液胞には細胞全体の約50%のアミノ酸が蓄積されている。そのうち、塩基性アミノ酸は細胞全体の約70~90%が液胞に貯蔵されているが、酸性アミノ酸は10%程度である。このような分布の偏りは、液胞膜に存在するアミノ酸輸送システムによるものと考えられており、近年、液胞アミノ酸トランスポーター遺伝子が出芽酵母で明らかになって来ている。そのうちのひとつVBAファミリーはMajor Facilitator Superfamily (MFS) に属し、このうち、VBA1、VBA2、VBA3は液胞への塩基性アミノ酸の取り込みに関与することが報告されている。また、もう一つ別の、AVTファミリーはAAAP (Amino acid/Auxin Permease) ファミリーに属し、AVT1~AVT7の7つの遺伝子により構成される。これらの内、AVT1は中性アミノ酸およびヒスチジンの取り込みに関与し、AVT3は中性アミノ酸の排出に、AVT4は中性アミノ酸および塩基性アミノ酸の排出に、AVT6は酸性アミノ酸の排出に関与し、さらに、AVT7はいくつかの中性アミノ酸の排出に関与することが明らかになっている。また、AVT3およびAVT4は窒素飢餓等の栄養条件下でオートファジーが誘導された後、タンパク質分解により液胞内に蓄積されたアミノ酸を細胞質に輸送する機能があるのではないかと考えられている。このようなアミノ酸のリサイクルにMFSに属するATG22もAVT3やAVT4と同様に機能することが提唱されているが、ATG22のアミノ酸輸送機能はまだ明らかになっていない。本研究は、液胞アミノ酸トランスポーターのさらなる生理的、生物学的役割を明らかにするために、*Schizosaccharomyces pombe* (分裂酵母) および、*Fusarium oxysporum* (フザリウム菌) のAVT3ホモログおよび、フザリウム菌のATG22ホモログを同定し、性質を明らかにすることを目的としたものである。

分裂酵母ゲノムデータベースから出芽酵母Avt3pホモログSPAC3H1.09c (SpAvt3p)を見出した。GFP融合型SpAvt3pを分裂酵母および出芽酵母で発現させたところ、いずれも液胞膜に局在した。分裂酵母Spavt3Δ株およびSpAvt3p過剰発現株の液胞内アミノ酸含量の分析結果から、SpAvt3pは液胞内の中性ア

ミノ酸および塩基性アミノ酸を排出していることが示唆された。SpAvt3p を過剰発現させた出芽酵母 *avt3Δavt4Δ*株の液胞内アミノ酸含量の分析からも同様に中性アミノ酸、塩基性アミノ酸の排出に關与することが示唆された。SpAvt3p を過剰発現させた出芽酵母 *avt1Δavt3Δavt4Δ*株から単離した液胞膜小胞を用いて ATP 依存的なアミノ酸の輸送活性を測定したところ、対照区と比べて、アラニン、チロシンの排出活性の上昇が見られた。また、SpAvt3p を過剰発現させた出芽酵母 *avt3Δavt4Δ*株から単離した液胞膜小胞を用いて ATP 依存的なアミノ酸輸送活性を測定したところ、対照区と比べて、塩基性アミノ酸の取り込み活性の減少が見られた。アラニン、チロシンの排出活性は、V-ATPase の特異的阻害剤であるコンカナマイシン A によって阻害された。以上の結果から、SpAvt3p は V-ATPase によって形成されたプロトン濃度勾配を駆動力に、中性アミノ酸および、塩基性アミノ酸の排出に機能することが明らかとなった。さらに、変異型 SpAvt3p^{E469A} を過剰発現させた出芽酵母 *avt3Δavt4Δ*株の液胞アミノ酸含量の分析と液胞膜小胞を用いたアミノ酸の輸送活性の測定結果から、排出活性には第 6 番目の膜貫通領域に存在する 469 番目のグルタミン酸が重要であることを明らかにした。

次に、フザリウム菌ゲノムデータベースから、出芽酵母 Avt3p ホモログ FOXG_11334 (FoAvt3p)を見出した。GFP 融合型 FoAvt3p をフザリウム菌および出芽酵母で発現させたところ、いずれも液胞膜に局在した。FoAvt3p を過剰発現させた出芽酵母 *avt1Δavt3Δavt4Δ*株の液胞内アミノ酸含量の分析から、FoAvt3p は中性アミノ酸の排出に關与することが示唆された。一方 SpAVT3 とは対照的に、FoAVT3 発現による塩基性アミノ酸の蓄積量への影響はほとんど見られなかった。FoAvt3p を過剰発現させた出芽酵母 *avt1Δavt3Δavt4Δ*株から単離した液胞膜小胞を用いてアミノ酸輸送活性を測定した結果、対照区と比べて、プロリン、アラニン、スレオニン、バリンの排出活性の上昇が見られた。以上の結果から、FoAvt3p は中性アミノ酸を液胞から細胞質へ排出する液胞アミノ酸トランスポーターであると考えられた。

さらに、フザリウム菌ゲノムデータベースから、出芽酵母 ScAtg22p ホモログ FOXG_00164 (FoAtg22p)を見出した。GFP 融合型 FoAtg22p を出芽酵母で発現させたところ液胞膜に局在した。出芽酵母 *atg22Δ*株では、窒素飢餓などのオートファジー誘導条件下でのオートファジックボディーの液胞内への蓄積や、液胞内ペプチダーゼ *Apel* タンパク質のプロセッシングが進行しないと、オートファジーの不全を示す現象が観察される。*atg22Δ*株に FoAtg22p を発現させ、オートファジーを誘導して液胞を観察したところ、ScAtg22p を発現させたときと同様に、オートファジックボディーの蓄積が解消された。*atg11Δatg22Δ*株に FoAtg22p を発現させ、オートファジー誘導後の細胞内タンパク質をイムノブロッティングにより分析したところ、ScAtg22p を発現させたときと同様に *Apel* のプロセッシングの回復を検出することができた。以上の結果から、FoAtg22p は ScAtg22p と同様にオートファジックボディーの分解に機能することが明らかとなった。

以上、申請者は、これまでに研究が少ない分裂酵母およびフザリウム菌の液胞アミノ酸トランスポーターおよびオートファジー関連遺伝子の機能解析の手法を確立し、分裂酵母 SpAvt3p とフザリウム菌 FoAvt3p の同定および性質を明らかにし、さらに、オートファジー関連遺伝子 FoAtg22p を同定した。本研究は、液胞アミノ酸トランスポーターおよび、オートファジー関連遺伝子の生理的、生物学的意義を理解する上での有益な情報を提供する可能性が期待される。

本論文に関する公開審査会は、平成 27 年 8 月 1 日に高知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。