

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

氏名： 刀根 潤一  
Name

学位論文題目： 出芽酵母液胞アミノ酸トランスポーターファミリーの機能解明  
Title of Dissertation

学位論文要約：  
Dissertation Summary

出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の液胞は細胞体積の約 25% を占める巨大なオルガネラである。その内腔には様々な加水分解酵素を含み、エンドサイトーシスやオートファジーにより液胞内に運ばれた物質を分解する。また、種々の中間代謝物やイオンを蓄積する。特にアミノ酸は細胞全体の 50 % 程度が蓄積している。そのうち、塩基性アミノ酸は細胞全体の約 70~90 % が液胞内に存在するが、酸性アミノ酸は約 10 % 程度しか存在しない (1, 2)。このようなアミノ酸分布の偏りから、液胞膜には選択的なアミノ酸輸送機構が存在すると考えられていた。単離液胞膜小胞を用いた *in vitro* での輸送実験により、V-ATPase により形成されたプロトン濃度勾配を駆動力とするアミノ酸取り込み活性が報告され、7 種類の能動的アミノ酸輸送系の存在が示唆された (3, 4)。近年、逆遺伝学的アプローチおよび単離液胞膜小胞を用いた輸送実験により、液胞膜を介したアミノ酸輸送に関わるトランスポーターとして VBA ファミリーおよび AVT ファミリーが報告された (5, 6)。VBA ファミリーは Major Facilitator Superfamily に属し、VBA1~VBA5、AZR1 および SGE1 の 7 遺伝子により構成される (5, 7, 8, 9)。このうち、VBA1、VBA2、VBA3 は液胞内への塩基性アミノ酸の取り込みに関与することが明らかにされている (5)。AVT ファミリーは AAAP (Amino acid/Auxin Permease) ファミリー (10) に属し、AVT1~AVT7 の 7 遺伝子により構成される。先行研究において、Avt1p はグルタミン、イソロイシン、チロシンの取り込み、Avt3p および Avt4p はこれらアミノ酸の排出、Avt6p はアスパラギン酸およびグルタミン酸の排出に関与することが示唆された (6)。その後、当研究室でのアミノ酸組成解析や単離液胞膜小胞によるアミノ酸輸送活性測定により、Avt3p は液胞からの中性アミノ酸全般の排出に、Avt4p は中性アミノ酸および塩基性アミノ酸の排出に関与することが明らかとなった (11)。しかし、Avt2p、Avt5p、Avt7p の機能は未だ明らかになっていない。液胞膜を介したアミノ酸輸送は多様なトランスポーターにより担われていることが明らかにされつつあるが、個々の遺伝子に対する理解は不十分である。本研究では出芽酵母液胞アミノ酸蓄積におけるトランスポーターの意義解明を目的として、Avt1p および Avt7p に着目し、その機能解析を行った。

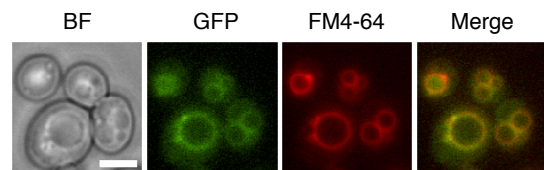


Fig. 1  
GFP-Avt1pの細胞内局在  
pADH-GFP-AVT1を導入した野生株を用いて、蛍光顕微鏡によりGFPと液胞膜を特異的に染色する色素であるFM4-64の蛍光を観察した。Bar, 5  $\mu$ m.

GFP 融合型 Avt1p を用いて局在を調べたところ、Avt1p は液胞膜に局在することが確認された (Fig. 1)。野生株由来の液胞膜小胞ではグルタミン酸、アスパラギン酸、アラニン、プロリン、バリン、スレオニンの取り込みは見られないことが報告されている (4)。このうち、アラニン等の中性アミノ酸は Avt3p および Avt4p により排出されるため、見かけ上取り込みが検出されなかったと考えられる。そこで、*avt3Δavt4Δ* 株を親株とし、単離液胞膜小胞による輸送活性に対する *AVT1* 欠損の影響を調べた

(Fig. 2)。その結果、*avt3Δavt4Δ* 株由来の液胞膜小胞においてイソロイシン、バリン、スレオニン、グルタミンの取り込み活性が検出され、この取り込み活性は *AVT1* の欠損により消失した。塩基性アミノ酸のうちヒスチジンの取り込みは *AVT1* の欠損により顕著に抑制された一方で、アルギニン、リジンの取り込みはほとんど影響を受けなかった。また、*AVT1* 遺伝子を過剰発現させた *avt1Δavt3Δavt4Δ* 株由来の液胞膜小胞において、ATP 依存的なイソロイシンおよびヒスチジンの取り込み活性が検出された。Avt1p によるイソロイシンおよびヒスチジンの取り込みの速度論パラメーターは、それぞれ  $K_m = 0.9 \pm 0.2$  mM、 $V_{max} = 193.7 \pm 33.5$  nmol/min/mg protein および  $K_m = 0.5 \pm 0.1$  mM、 $V_{max} = 89.5 \pm 13.8$  nmol/min/mg protein であった。以上の結果から、Avt1p がヒスチジンと中性アミノ酸の取り込みに機能することが示唆された。さらに、この取り込み活性はコンカナマイシン A、CCCP、およびナイジェリシン添加により阻害されたことから (Fig. 3A)、Avt1p によるアミノ酸輸送はプロトン濃度勾配に依存することが示された。また、イソロイシンおよびヒスチジンの取り込み活性はいずれもバリノマイシン添加により促進傾向にあったことから、Avt1p は側鎖に電荷を持たないアミノ酸を選択的に輸送する可能性があると考えられた。

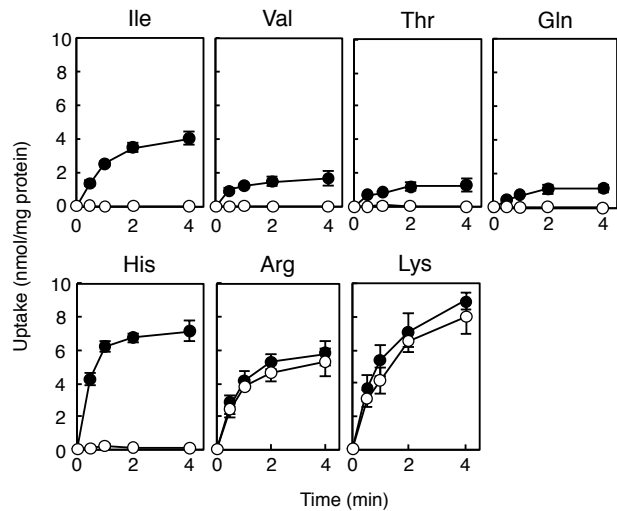


Fig. 2 液胞膜小胞によるアミノ酸取り込み活性 *avt3Δavt4Δ* 株 (black circles) および *avt1Δavt3Δavt4Δ* 株 (white circles) から液胞膜小胞を単離し、各種アミノ酸の ATP 依存的な取り込み量を測定した。結果は3回の実験の平均値±標準偏差で示した。

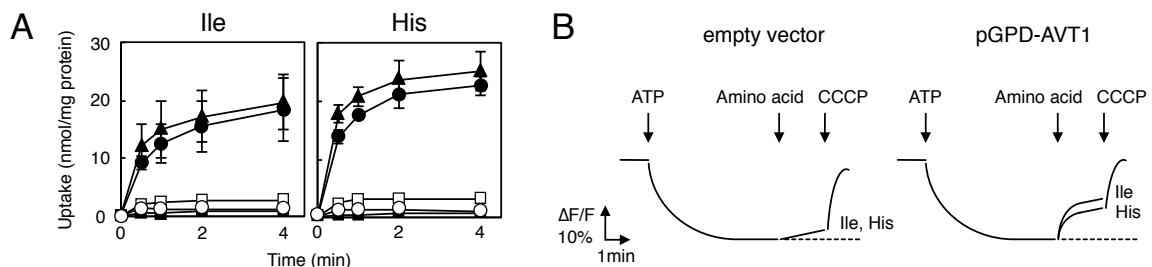


Fig. 3

(A) Avt1p 依存的なアミノ酸取り込み活性に対する各種阻害剤の影響

pGPD-AVT1 を導入した *avt1Δavt3Δavt4Δ* 株から液胞膜小胞を単離し、アミノ酸取り込み活性に対する各種阻害剤の影響を調べた。反応開始3分前に 10  $\mu$ M CCCP (white circles)、5  $\mu$ M nigericin (white squares)、5  $\mu$ M valinomycin (black triangles) または 1  $\mu$ M concanamycin A (black squares) を加えた。結果は3回の実験の平均値±標準偏差で示した。

(B) Avt1p によるプロトン輸送能の検討

Empty vector (A) または pGPD-AVT1 (B) を導入した *avt1Δavt3Δavt4Δ* 株から液胞膜小胞を単離した。キナクリンを添加し、蛍光が安定化した後、0.4 mM ATP を添加し反応を開始した。矢印で示した時点で 0.1 mM アミノ酸および 10  $\mu$ M CCCP をそれぞれ添加した。 $\Delta F/F$  は蛍光クエンチングと初期蛍光の比を示す。

(様式5) (Style5)

キナクリンの蛍光強度変化を指標とし、Avt1pによるアミノ酸取り込みに伴うプロトンの挙動を観察した結果、Avt1pを過剰発現した単離液胞膜小胞においては、ATP依存的なキナクリン蛍光のクエンチングはイソロイシンおよびヒスチジンの添加により部分的に解消した。このことから、Avt1pはプロトン/アミノ酸アンチポーターであることが示唆された。(Fig. 3B)。

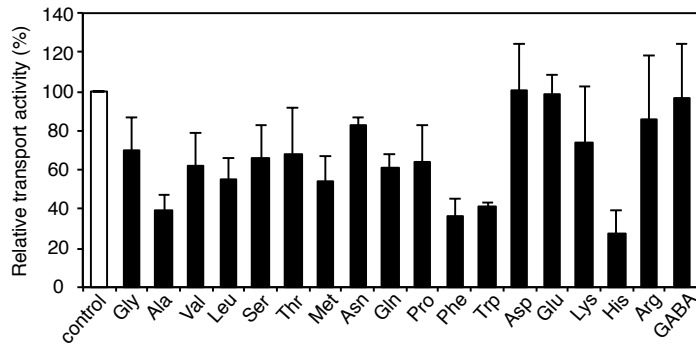


Fig. 4 Avt1p依存的イソロイシン取り込みに対する各種アミノ酸およびGABAの阻害効果  
pGPD-AVT1を導入した*avt1Δavt3Δavt4Δ*株から液胞膜小胞を単離し、非標識アミノ酸 (0.5 mM)の存在下で $[^{14}\text{C}]$ イソロイシン (0.1 mM)の0.5 minにおける取り込み活性を測定した (black bars)。非標識アミノ酸非存在下における取り込み活性を100%として算出した (white bar)。結果は3回の実験の平均値 $\pm$ 標準偏差で示した。

次に、イソロイシンの取り込みに対する各種アミノ酸の阻害効果を調べた (Fig. 4)。その結果、イソロイシンの取り込みはヒスチジン、フェニルアラニン、トリプトファン、アラニンにより強く阻害され、メチオニン、ロイシン、バリン、グルタミン、プロリン、セリン、スレオニン、グリシンによりわずかに阻害された。リジン、アスパラギンおよびアルギニンによる阻害は有意ではなく、アスパラギン酸、グルタミン酸およびGABAによってはほとんど阻害されなかった。また、ヒスチジン存在下および非存在下におけるイソロイシンの取り込み活性について Lineweaver-burk plot をとった結果、ヒスチジンによるイソロイシン取り込みの阻害は競合的であることが分かった ( $K_i=0.6\pm 0.1$  mM)。これらの結果から、Avt1pがヒスチジンおよび様々な中性アミノ酸を輸送することが明らかとなった。

Avt1pが属する出芽酵母 AVT ファミリーのうち、Avt2p、Avt5p、Avt7pの機能は明らかとなっていない。それぞれの GFP 融合タンパク質を出芽酵母で発現させたところ、GFP 融合型 Avt7pのみが液胞膜に局在した (Fig. 5)。Avt7pは液胞膜を介したアミノ酸輸送に機能する可能性があると考え、液胞からのアミノ酸排出に重複して機能する Avt3p および Avt4p を欠損した *avt3Δavt4Δ* 株を親株とし、AVT7欠損および過剰発現の

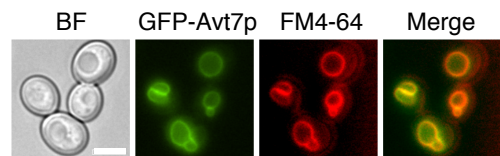


Fig. 5 GFP-Avt7pの細胞内局在  
pGPD-GFP-AVT7を導入した*avt7Δ*株を用いて、Fig. 1と同様に蛍光顕微鏡観察を行った。Bar, 5  $\mu\text{m}$ 。

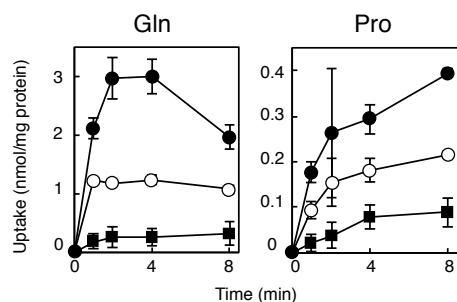


Fig. 6 液胞膜小胞によるグルタミンおよびプロリン取り込みに対するAVT7欠損および過剰発現の影響  
*avt3Δavt4Δ/empty vector* (white circles)、*avt3Δavt4Δ/avt7Δ/empty vector* (black circles)、*avt3Δavt4Δ/avt7Δ/pGPD-AVT7* (black squares)由来の液胞膜小胞に $[^{14}\text{C}]$ グルタミン (左図)および $[^{14}\text{C}]$ プロリン (右図)を負荷し、2mMのATPを添加した後、取り込み活性を調べた。取り込み活性は、各時点のものから0分の値を差し引いて計算した。結果は3回の実験の平均値 $\pm$ 標準偏差で示した。

(様式5) (Style5)

アミノ酸輸送活性に対する影響を検討した (Fig. 6)。その結果、*avt3Δavt4Δ* 株由来の液胞膜小胞で検出されたグルタミンおよびプロリンの取り込み活性は、*AVT7* 欠損により促進され、*AVT7* 過剰発現により抑制された。したがって、*Avt7p* はこれらのアミノ酸の液胞からの排出に関わることが示唆された。

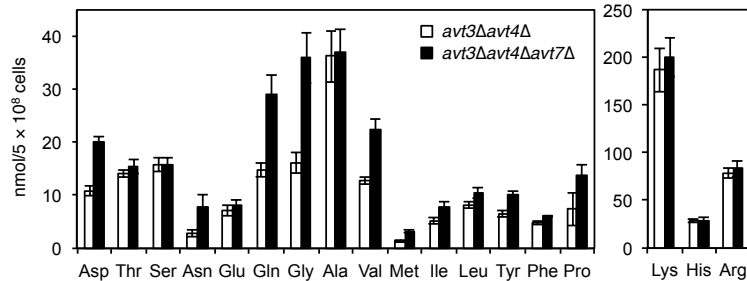


Fig. 7 窒素飢餓条件における液胞内アミノ酸組成に対する*AVT7*欠損の影響  
*avt3Δavt4Δ*株 (white bars)および*avt3Δavt4Δavt7Δ*株 (black bars)をYPD培地で培養後、SD-N培地に移し、6時間培養し、液胞内アミノ酸量を測定した。塩基性アミノ酸は右図に示した。結果は3回の実験の平均値±標準偏差で示した。

栄養飢餓時において、液胞内に蓄積されたアミノ酸は窒素代謝や新規タンパク質合成のために細胞質中へ排出されることが示唆されており (2, 12)、これには液胞アミノ酸トランスポーターが深く関与すると考えられる。*avt3Δavt4Δ* 株を親株として、液胞内アミノ酸含量に対する *AVT7* 欠損の影響を調べたところ、*AVT7* の欠損によりアスパラギン酸、アスパラギン、グルタミン、グリシン、バリン、メチオニン、イソロイシン、ロイシン、チロシン、プロリンの液胞内含量が顕著に増加した (Fig. 7)。以上の結果から、*Avt7p* は窒素飢餓条件における液胞からのアミノ酸排出に関与することが示された。

出芽酵母は非発酵性炭素源存在下において窒素飢餓にさらされると減数分裂を誘導し孢子を形成する。この過程において、液胞からのアミノ酸排出に関わるトランスポーターは孢子形成に必要なタンパク質合成のために、細胞質へアミノ酸を供給する役割を果たすと考えられる。当研究室では単離液胞膜小胞を用いたアミノ酸輸送実験により *Avt3p/Avt4p* の分裂酵母ホモログである *SpAvt3p* が液胞からのアミノ酸排出に機能することを見出している (Kakinuma *et al.*, 未発表データ)。さらに、分裂酵母では *SpAVT3* の欠損により孢子形成効率が低下することが報告されている (13)。以上のことから、出芽酵母の液胞アミノ酸排出系である *Avt3p*、*Avt4p* と共に、*Avt7p* についても孢子形成への関与を検討した (Fig. 8)。出芽酵母二倍体株を孢子形成培地で培養した後、孢子形成効率を算出したところ、野生株と比較して *avt7Δ* 株および *avt3Δavt4Δ* 株では孢子形成効率が低下する傾向が見られ、*avt3Δavt4Δavt7Δ* 株では有意に低下した。以上の結果から、*Avt7p* は *Avt3p* や *Avt4p* と同様に、孢子形成時における液胞からのアミノ酸排出に関わることが示唆された。

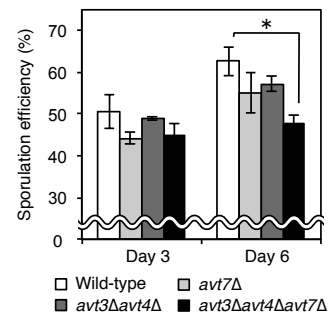


Fig. 8 孢子形成に対する*AVT7*欠損の影響  
孢子形成培地で野生株および*avt7Δ*、*avt3Δavt4Δ*、*avt3Δavt4Δavt7Δ*の二倍体株を6日間培養した。顕微鏡を用いて細胞数と孢子数を計数し、孢子形成効率を算出した。結果は5回の実験の平均値±標準偏差で示した。\*,  $p < 0.05$ 。

本研究では *Avt1p* について生化学的解析を行い、広範な基質特異性を有するプロトン/アミノ酸アンチポーターであることを

(様式 5) (Style5)

明らかにした。また、機能未知であった **Avt7p** が液胞からのアミノ酸排出に機能し、窒素飢餓および胞子形成時におけるアミノ酸排出に関わることを示した。これらの結果は出芽酵母液胞におけるアミノ酸蓄積の分子機構を理解する上で有用な知見であると考えられる。さらに、近年、ホスホプロテオミクス解析により **Avt1p** がリン酸化修飾を受けることが報告されている。今後は液胞アミノ酸トランスポーターの翻訳後修飾を明らかにしていくことで、その活性制御機構が解明されることが期待される。

参考文献

- [1] Wiemken A, Durr M. Characterization of amino acid pools in the vacuolar compartment of *Saccharomyces cerevisiae*. Arch. Microbiol. 1974;101:45-57.
- [2] Kitamoto K, Yoshizawa K, Ohsumi Y, Anraku Y. Dynamic aspects of vacuolar and cytosolic amino acid pools of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 1988;170:2683-2686.
- [3] Ohsumi Y, Anraku Y. Active transport of basic amino acids driven by a proton motive force in vacuolar membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 1981;256:2079-2082.
- [4] Sato T, Ohsumi Y, Anraku Y. Substrate specificities of active transport systems for amino acids in vacuolar-membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*. Evidence of seven independent proton/amino acid antiport systems. J. Biol. Chem. 1984;259:11505-11508.
- [5] Shimazu M, Sekito T, Akiyama K, Ohsumi Y, Kakinuma Y. A family of basic amino acid transporters of the vacuolar membrane from *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 2005;280:4851-4857.
- [6] Russnak R, Konczal D, McIntire SL. A family of yeast proteins mediating bidirectional vacuolar amino acid transport. J. Biol. Chem. 2001;276:23849-23857.
- [7] Shimazu M, Itaya T, Pongcharoen P, Sekito T, Kawano-Kawada M, Kakinuma Y. Vba5p, a novel plasma membrane protein involved in amino acid uptake and drug sensitivity in *Saccharomyces cerevisiae*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 2012;76:1993-1995.
- [8] Tenreiro S, Rosa PC, Viegas CA, Sá-Correia I. Expression of the *AZRI* gene (ORF YGR224w), encoding a plasma membrane transporter of the major facilitator superfamily, is required for adaptation to acetic acid and resistance to azoles in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, 2000;16:1469-1481.
- [9] Ehrenhofer-Murray AE, Würigler FE, Sengstag C. The *Saccharomyces cerevisiae* *SGE1* gene product: a novel drug-resistance protein within the major facilitator superfamily. Mol. Gen. Genet. 1994;244:287-294.
- [10] Young GB, Jack DL, Smith DW, Saier MH Jr. The amino acid/auxin:proton symport permease family. Biochim. Biophys. Acta. 1999;1415:306-322.
- [11] Sekito T, Chardwiriyaapreecha S, Sugimoto N, Ishimoto M, Kawano-Kawada M, Kakinuma Y. Vacuolar transporter Avt4 is involved in excretion of basic amino acids from the vacuoles of *Saccharomyces cerevisiae*. Biosci. Biotech. Biochem. 2014;78:269-275.
- [12] Onodera J, Ohsumi Y. Autophagy is required for maintenance of amino acid levels and protein synthesis under nitrogen starvation. J. Biol. Chem. 2005;280:31582-31586.
- [13] Mukaiyama H, Kajiwara S, Hosomi A, Giga-Hama Y, Tanaka N, Nakamura T, Takegawa K. Autophagy-deficient *Schizosaccharomyces pombe* mutants undergo partial sporulation during nitrogen starvation. Microbiology. 2009;155:3816-3826.