

学位論文要旨 Dissertation Abstract

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
Title of Dissertation 解明

学位論文要旨：
Dissertation Abstract

出芽酵母の液胞はアミノ酸を高度に蓄積する。特に塩基性アミノ酸は細胞全体の大部分が液胞内に存在するが、酸性アミノ酸は主として細胞質に存在することから、液胞膜には選択的なアミノ酸輸送機構の存在が示唆されていた。Satoらは、10種のアミノ酸がV-ATPaseにより形成されるプロトン濃度勾配を利用して液胞膜小胞へ輸送されることを示した (Sato *et al.*, 1984)。AVTファミリーは7種のメンバーから構成され、液胞膜小胞を用いたアミノ酸輸送実験によりAvt1pはグルタミン、チロシン、イソロイシンの液胞内への取り込み、Avt3p/Avt4pはこれらの液胞外への排出、Avt6pはアスパラギン酸やグルタミン酸の排出を行うことが示唆された。その後、当研究室によりAvt3p/Avt4pは液胞から中性アミノ酸全般を排出し、Avt4pは塩基性アミノ酸も排出することが報告された。本研究では液胞膜を介したアミノ酸輸送機構の解明を目的とし、AVTファミリーに属するAvt1pとAvt7pの機能解析を行った。

まず、AVT1を破壊し液胞内アミノ酸含量を測定したが、野生株との間に大きな変化は見られなかった。Avt1pの基質であるグルタミン、チロシン、イソロイシンはAvt3p/Avt4pによって液胞外へ排出されるため、取り込み活性が排出活性により打ち消されたと考えられた。そこで、*avt3Δavt4Δ*株においてAVT1を破壊したところ、中性アミノ酸全般の液胞内含量が減少した。次に酵母から液胞膜小胞を単離し、アミノ酸輸送活性を測定した。*avt1Δavt3Δavt4Δ*株では*avt3Δavt4Δ*株と比較してイソロイシン等の一部の中性アミノ酸とヒスチジンの取り込みが消失した。

また、*avt1Δavt3Δavt4Δ*株に *AVT1* を過剰発現すると ATP 依存的なイソロイシン取り込み活性を検出し、この活性はコンカナマイシン A、CCCP、およびナイジェリシンにより阻害された。イソロイシンの取り込みは各種中性アミノ酸やヒスチジンによっても阻害された。さらに、中性アミノ酸とヒスチジンの取り込みが *AVT1* の過剰発現により増加した。以上の結果は、Avt1p が広い基質特異性を有するアミノ酸/H⁺アンチポーターであり、液胞への中性アミノ酸およびヒスチジンの主要な取り込み系であることを示唆する。

Avt1p による液胞へのアミノ酸取り込みは、細胞内アミノ酸量の恒常性維持のために栄養条件に応答して調節を受ける可能性がある。そこで Myc⁹ タグを Avt1p に付加し、栄養豊富条件および窒素飢餓条件における細胞内レベルをウェスタンブロットティングにより調べた。その結果、窒素飢餓により Myc⁹-Avt1p の細胞内レベルは速やかに減少したが、mRNA レベルは変化しなかったため、転写後の制御が考えられた。そこで Avt1p が液胞内で分解される可能性を考え、液胞内プロテアーゼをコードする *PEP4* を破壊し Myc⁹-Avt1p の細胞内レベルを調べたところ、窒素飢餓処理後の減少が抑制された。以上のことから、窒素飢餓条件で Myc⁹-Avt1p が *PEP4* 依存的に分解されており、栄養条件に応答して Avt1p の細胞内レベルが調節されることが示唆された。

次に Avt7p の解析を行った。GFP-Avt7p は液胞膜に局在したため、液胞アミノ酸輸送への関与が考えられた。*avt7Δ*株では野生株と比較して液胞内アミノ酸含量に顕著な変化は見られなかったが、*avt3Δavt4Δ*株において *AVT7* を破壊すると一部の中性アミノ酸含量が増加した。液胞膜小胞を単離しアミノ酸輸送活性を調べたところ、*avt3Δavt4Δ*株と比較して *avt3Δavt4Δavt7Δ*株ではプロリンやグルタミンの取り込みが促進された。また、*avt3Δavt4Δavt7Δ*株に *AVT7* を過剰発現すると、これらの取り込みが抑制された。以上の結果は Avt7p が中性アミノ酸の液胞からの排出に機能することを示唆する。

窒素飢餓条件において液胞からのアミノ酸供給は細胞生存に重要である。窒素飢餓条件での *avt3Δavt4Δ*株と *avt3Δavt4Δavt7Δ*株の液胞内アミノ酸含量を比較したところ、両株とも栄養豊富条件に比べて含量が減少したが、*avt3Δavt4Δavt7Δ*株では中性アミノ酸の減少が抑制された。よって Avt7p は窒素飢餓条件でも機能することが示唆された。液胞内アミノ酸は窒素飢餓で誘導される胞子形成において細胞質へ排出され利用されると考えられているため、*AVT7* 破壊による胞子形成への影響を調べた。野生株と比較して *avt7Δ*株では胞子形成効率がやや減少し、*avt3Δavt4Δavt7Δ*株では大きく低下した。以上の結果は、Avt7p が窒素飢餓条件での液胞内中性アミノ酸の再利用に機能することを示唆する。