

学位論文審査の結果の要旨

氏名	刀根潤一
審査委員	主査 柿沼 喜己 副査 麻田 恭彦 副査 大西 浩平 副査 秋山 浩一 副査 関藤 孝之

論文名

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

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。出芽酵母の液胞は細胞質の約 25%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）や中性アミノ酸を蓄積する一方で、酸性アミノ酸（グルタミン酸、アスパラギン酸）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、アミノ酸の能動輸送機構が液胞膜で機能していることを示しており、これまで主として液胞膜小胞を用いた輸送実験によりその解析が行われてきた。その結果、AVT ファミリートランスポーター(Avt1p から Avt7p)が液胞の主要なアミノ酸輸送系を構成することが明らかになってきた。Avt3p が中性アミノ酸全般の排出、Avt4p が中性アミノ酸全般と塩基性アミノ酸の排出、Avt6p が酸性アミノ酸の排出に関与する。しかしながら AVT ファミリーの中で唯一の取り込み系と考えられる Avt1p の機能解析は充分ではなく、また、Avt2p, Avt5p, Avt7p については全く解析が行われていない。このように、細胞内のアミノ酸プールやアミノ酸代謝における液胞の重要性は認識されながらも、液胞膜を介するアミノ酸輸送に直接関わる分子、トランスポーターに関する研究は十分に進展していない状況にある。本研究は、Avt1p のトランスポーターとしての特徴的な性質を明らかにするとともに、Avt7p が液胞アミノ酸輸送にどのように関与しているかを明らかにすることを目的としたものである。

Avt1p について、液胞膜小胞による ATP 依存的なイソロイシンの取り込みが、野生株に比べ *avt3Δavt4Δ*株から単離した膜小胞で増加したのに対し、*avt1Δavt3Δavt4Δ*株由来の液胞膜小胞ではほぼ完全に消失することを見出した。*avt1Δavt3Δavt4Δ*株に *AVT1* 遺伝子を過剰発現することにより液胞膜小胞のイソロイシン及びヒスチジンの取り込み活性が回復した。この活性が V-ATPase 阻害剤 concanamycin A やプロトノフォア CCCP により阻害され、さらに V-ATPase による液胞内 pH の酸性化が、Avt1p 依存

的にイソロイシンやヒスチジンの添加により部分的に解消されたことから、Avt1p がアミノ酸/プロトンアンチポーターであることを実験的に明らかにした。イソロイシンの取り込みはヒスチジンにより競合阻害を受けるとともに、多種の中性アミノ酸によって阻害されたことから、Avt1p が幅広い基質特異性を有するアミノ酸の主要な取り込み系であることも明らかになった。Avt1p による液胞内へのアミノ酸取り込みは、細胞内アミノ酸濃度の恒常性を維持するために栄養条件の変化に応答して調節を受ける可能性が考えられる。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ティングにより調べた。その結果、窒素飢餓条件において Myc⁹-Avt1p の細胞内レベルは速やかに減少したが、液胞内プロテアーゼ *PEP4* 遺伝子破壊株では Myc⁹-Avt1p の減少が抑制されることを見出した。いずれの条件においても Avt1p の mRNA レベルはほとんど変化しなかったことから、Avt1p の細胞内レベルは栄養条件に応答して転写後に制御される可能性が考えられた。

Avt7p について、その N 末端に GFP を融合し、顕微鏡観察を行ったところ、GFP-Avt7p は液胞膜に選択的に局在した。このことから、Avt7p は液胞膜を介したアミノ酸輸送に関与する可能性があると考え、機能解析を行った。avt7 Δ 株と野生株の液胞内のアミノ酸含量を比較しても顕著な変化は見られなかったが、avt3 Δ avt4 Δ 株と avt3 Δ avt4 Δ avt7 Δ 株の液胞内アミノ酸含量を比較したところ、avt3 Δ avt4 Δ avt7 Δ 株において一部の中性アミノ酸含量の増加が観察された。液胞膜小胞による ATP 依存的なプロリンやグルタミンの取り込みを調べたところ、avt3 Δ avt4 Δ 株から単離した液胞膜小胞と比較して avt3 Δ avt4 Δ avt7 Δ 株由来の小胞ではこれらのアミノ酸の取り込みが促進され、さらに、avt3 Δ avt4 Δ avt7 Δ 株に対して *AVT7* 遺伝子を過剰発現したところ、avt3 Δ avt4 Δ avt7 Δ 株と比較して ATP 依存的なプロリンやグルタミンの取り込みが減少した。これらの結果は Avt7p が中性アミノ酸の液胞からの排出に関与することを示唆する。avt7 Δ による液胞内アミノ酸含量の上昇は、窒素飢餓条件でも観察されたので、胞子形成に対する *AVT7* 遺伝子破壊の影響を調べたところ、野生株と比較して avt7 Δ 株と avt3 Δ avt4 Δ 株では胞子形成効率にほとんど変化は見られなかったが、avt3 Δ avt4 Δ avt7 Δ 株では胞子形成効率が有意に低下した。これらの結果は、Avt7p が窒素飢餓条件での液胞内中性アミノ酸の再利用に関与することを示唆する。

以上、申請者は、微生物を中心に広く真核生物に保存されている AVT トランスポーターファミリーの中で、出芽酵母 Avt1p のアミノ酸トランスポーターとしての特徴的な性質と Avt7p が液胞アミノ酸輸送に関与することを実験的に示すとともに、これらの働きが *in vivo* において液胞アミノ酸の組成及び含量に反映されることを明らかにした。Avt7p については、胞子形成にも密接に関連し、真核微生物の環境適応機構の一部として Avt7p の働きが重要であることを見出した。本研究は、液胞アミノ酸集積および利用に関わるトランスポーターの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、また植物液胞や動物リソソームなど AVT ファミリーが分布する他の生物のアミノ酸集積利用機構を理解する上での有益な情報を提供することも期待される。

本論文に関する公開審査会は、平成 27 年 2 月 7 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（学術）の学位を授与するに値するものと判定した。