

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：32601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07162

研究課題名(和文)リン酸化がもたらす酵母アミノ酸輸送体の新たな制御機構

研究課題名(英文)A new regulatory mechanism of the yeast amino acid permease by phosphorylation

研究代表者

望月 貴博(Mochizuki, Takahiro)

青山学院大学・理工学部・助教

研究者番号：40783387

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：必須アミノ酸の1つ、トリプトファンが細胞内に取り込めなくなるとハートナップ病などの尿細管異常症が発症し、小児の成長障害を引き起こす。そのため、病態の解明や治療法が求められている。本研究では、真核細胞のモデルである出芽酵母のトリプトファン輸送体の基本的な理解のために、低親和性トリプトファン輸送体Tat1のリン酸化依存的な分解について検討した。Tat1のリン酸化や分解について検討するため、リン酸化に関連する変異株を用いて実験を行なったところ、Tat1はカゼインキナーゼによってリン酸化されること、そしてTat1のN末端側細胞質ドメインのリン酸化が分解を制御していることがわかった。

研究成果の概要(英文)： It is known that defects in availability of tryptophan, one of the essential amino acids, cause Hartnup disorder and failure to thrive in childhood. Therefore, exploration of the mechanism of the diseases is important from the medical perspectives. This study aimed at basic understandings of the regulation of tryptophan permease in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. We examined whether degradation of the low-affinity tryptophan permease Tat1 depended on its phosphorylation. Mutants with altered phosphorylation activities were used to analyze the degradation of Tat1. We suggested that a casein kinase mediated phosphorylation of Tat1, and phosphorylation occurred at the N-terminal cytoplasmic domain of Tat1.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：アミノ酸輸送体 リン酸化 出芽酵母 アレスチン様タンパク質

1. 研究開始当初の背景

20種類存在するアミノ酸のうち、ヒトなど哺乳動物では9種類が必須アミノ酸と呼ばれ、体内で生合成することができない。そのため、食物から摂取する必要がある。必須アミノ酸の1つトリプトファンはヒトの中性アミノ酸輸送体 B⁰AT1 によって細胞内に取り込まれるが、その取り込み量が低下すると Hartnup 病などの尿細管異常症が発症し、低身長など小児の成長障害をもたらす。小児にとって成長障害は日常生活の不利益だけでなく、精神的な外傷も大きい。このため病態の解明、治療法や予防策の確立が求められている。そこで、アミノ酸輸送体の基質取り込みや分解の制御機構の解明は極めて重要である。

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の高親和性トリプトファン輸送体 Tat2 はトリプトファンを細胞内に取り込むために、膜貫通領域に存在する15個のアミノ酸残基が不可欠である。一方、高親和性ロイシン輸送体 Bap2 がロイシンを細胞内へ取り込むためには、Tat2 のトリプトファン取り込みに必要なアミノ酸残基の15個中、7つのアミノ酸残基が重要である。低親和性トリプトファン輸送体 Tat1 については芳香族アミノ酸であるトリプトファン、チロシンやフェニルアラニンを取り込む。また Tat1 は細胞を高圧 (25 MPa) に曝すと速やかに分解される。この分解には Rsp5 ユビキチンリガーゼと Tat1 を介在するアダプタータンパク質として、機能的に重複した複数のアレスチン様タンパク質が働く。しかしながら、アダプタータンパク質が Tat1 のどの部位を認識し、分解を制御しているのかは不明である。一方、膜タンパク質である α -ファクター受容体 Ste2 は、 α -ファクターを受容すると細胞膜に存在するカゼインキナーゼ Yck1 と Yck2 によって C 末端側細胞質ドメインのセリン残基がリン酸化され、ユビキチン化されることが報告されている。つまり、様々な膜タンパク質の分解にはリン酸化が関与している可能性を示唆している。

2. 研究の目的

アミノ酸輸送体によるアミノ酸取り込みの失陥は、病態や成長障害の原因の一つであり、治療法や予防策の確立が求められている。本研究では出芽酵母の低親和性トリプトファン輸送体 Tat1 はリン酸化されており、基質の取り込み能や分解が制御されているのか明らかにすることが目的である。本研究の成果は、多様なアミノ酸輸送体の基質取り込みと分解の制御機構を明らかにする基

盤となり、病態や成長障害の原因の理解に貢献するものと期待される。

3. 研究の方法

・ Tat1 の精製

Tat1 の精製を行なうため、Tat1 の N 末端側に GST と His タグを融合させた GST-6His-TAT1 発現プラスミドを構築し、野生株 BY4742 に導入後、SD (Synthetic Dextrose) 培地で振とう培養した。終夜培養後、遠心分離によって菌体を回収し、ガラスビーズを用いて破碎を行なった。破碎後、グルタチオンカラムとコバルトカラムを用いて GST-6His-Tat1 を精製した。SDS-PAGE、銀染色や抗 GST 抗体を用いたウエスタンブロッティングを用いて GST-6His-Tat1 や夾雑タンパク質の有無を確認した。

・ Tat1 のリン酸化の確認とキナーゼの探索

Tat1 のリン酸化を確認するため、HA タグを融合させた Tat1 発現プラスミドを野生株 BY4742 株に導入した。SD 培地で培養後、ガラスビーズを用いて酵母を破碎、13,000×g で10分遠心し、膜画分を抽出した。膜画分に脱リン酸化酵素を用いて脱リン酸化処理を行ない、抗 HA 抗体を用いたウエスタンブロッティングによってバンドシフトを確認した。

Tat1 のリン酸化を担うキナーゼを同定するために、遺伝子破壊株ライブラリーからキナーゼ欠損株を選出し、野生型 Tat1 発現プラスミドを導入後、ウエスタンブロッティングによってバンドシフトを確認した。

・ スピリットユビキチンシステム

Tat1 とアレスチン様タンパク質の相互作用を確認するため、Tat1 の N 末端側細胞質ドメインにユビキチン C 末端領域 (Cub)-人工転写因子 (LexA-VP16) を融合したプラスミド、アレスチン様タンパク質にはユビキチン変異 N 末端領域 (NubG) を融合したプラスミドを作製した。宿主酵母 (NMY51) に各プラスミドを導入後、選択培地を用いて増殖を比較した。

4. 研究成果

(1) Tat1 のリン酸化部位の同定

当研究室では以前、エラープローン PCR により Tat1 の分解が抑制される変異の同定を試みた。その結果、36 番目のイソロイシンの変異は Tat1 の高圧依存的な分解を抑制することがわかった。

また、35 と 37 番目のスレオニンを変異させても高圧依存的な分解は抑制されていた。これは、35と37番目のスレオニンがリン酸化されなくなったことが原因であると考えられた。そこでまず最初に、酵母細胞から膜画分を回収し、脱リン酸化処理を行なった。その結果、Tat1 は低分子両側へとバンドシフトしていた。そこで質量分析法によって Tat1 のリン酸化部位の同定を試みた。グルタチオンカラムとコバルトカラムを用いて GST-6His-Tat1 を精製した。しかし、銀染色によって Tat1 のバンドは確認できたものの、精製できた量が少量であることや夾雑タンパク質が含まれていたため、質量分析を行うことはできなかった。そこで、Tat1 の N 末端側細胞質ドメインのみを発現させるプラスミドを構築し、リン酸化部位の同定を行なうことにした。

GST タグを融合させた Tat1 の N 末端側細胞質ドメイン発現プラスミドを野生株 BY4742 に導入し、ウエスタンブロッティングを行ったところ複数のバンドが確認された。Saccharomyces Genome Database (SGD) によると、Tat1 の N 末端側細胞質ドメインは 9 箇所 (S13, Y17, S18, S20, T37, S44, T47, S80, S84) がリン酸化されている。そこで予想されているリン酸化部位に様々な組み合わせで複数のアラニン変異を導入し、ウエスタンブロッティングによってバンドを確認した。その結果、野生型で見られた複数のバンドが消失していた。このことから S13, Y17, S18 もしくは S20 のいずれかがリン酸化されていることが明らかとなった。

(2) Tat1 のリン酸化を担うキナーゼの同定

Tat1 のリン酸化を担っているキナーゼを同定するため、BY4742 株の遺伝子破壊株ライブラリーの中からキナーゼ欠損株のうち約 80 株を選び、全ての株に野生型 Tat1 発現プラスミドを導入、ウエスタンブロッティングによってバンドシフトを調べた。その結果、Yck1, Yck2 と Kns1 の欠損株において、野生型 Tat1 と比べて低分子両側にバンドシフトしていた。そのため、これらのキナーゼによって Tat1 がリン酸化されている可能性が考えられた。

(3) Tat1 のリン酸化と分解の関連

Tat1 の N 末端側細胞質ドメインのリン酸化が高圧依存的な分解に影響するのか検討を行なった。まずリン酸化すると予想された部位を全てアラニンに置換 (Tat1^{STY>A}) すると Tat1 の高圧依存的

な分解が抑制された。一方、リン酸化部位を全てアスパラギン酸 (擬似リン酸化) に置換した (Tat1^{STY>D}) 場合には野生型 Tat1 と同様に分解されていた。このことは、Tat1 がリン酸化されることが分解の引金となっていることを示唆している。しかし、単独変異もしくはリン酸化すると明らかにした S13, Y17, S18 と S20 を同時アラニンに置換した場合においては Tat1 の高圧依存的な分解は抑制されなかった。これは、Tat1 が分解される際は複数箇所が様々な組み合わせによってリン酸化される、もしくは Tat1 の N 末端だけでなく C 末端領域、あるいは既知のリン酸化部位以外がリン酸化されることでアダプタータンパク質が認識している可能性を示唆している。

次に、Tat1 のリン酸化を担っているキナーゼ Yck1, Yck2 と Kns1 の欠損株においても Tat1 の分解が抑制されるのか検討を行なった。野生型 Tat1 発現プラスミドを *yck1Δ*, *yck2Δ*, *yck1Δyck2^{ts}* と *kns1Δ* 株に導入し、高圧依存的な Tat1 の分解を検証した。その結果、予想に反して野生株と同様に高圧依存的に Tat1 は分解されていた。この結果が高圧依存的な Tat1 の分解に特異的な結果である可能性が考えられたため、他の条件下での Tat1 の分解について調べることにした。免疫抑制剤であるラパマイシンを細胞に投与すると、TORC1 が不活性化し、アルギニン輸送体 Can1 は分解されることが知られている。この条件下で Tat1 の分解について検討を行なったところ、Tat1 も速やかに分解されることがわかった。そこで、まず Tat1^{STY>A} の分解について検討を行なったところ、ラパマイシン依存的な Tat1 の分解も抑制されており、やはりリン酸化部位が Tat1 の分解に重要であることがわかった。一方、*yck1Δ*, *yck2Δ*, *yck1Δyck2^{ts}* と *kns1Δ* 株においても、ラパマイシン依存的な分解について検討したが、高圧と同様に分解されていた。よって、Kns1, Yck1 および Yck2 の関連性は明らかではないが、Kns1, Yck1 と Yck2 は Tat1 の分解に関与せず、Tat1 が分解される際は他キナーゼによってリン酸化されていることが考えられた。

(4) Tat1 とアレスチン様タンパク質の相互作用解析

Tat1 がアレスチン様タンパク質と直接相互作用し、ユビキチン化され、分解されることを明らかにするため、スピリットユビキチンシステムを行なった。野生型 Tat1 とアレスチン様タンパク質 Art1 ~10, Bul1 と Bul2 を用いてスピリットユビキチン

システムを行なったところ、Art3、4とBul2がTat1と相互作用していることが明らかとなった。現在検討中であるが、リン酸化部位をアラニンに置換した変異型Tat1がArt3、4やBul2と相互作用しなければ、Tat1のリン酸化部位をArt3、4やBul2が認識し、ユビキチン化していることが言えるであろう。

また、Yck1、Yck2とKns1がTat1と相互作用しているか検討を行なったところ、相互作用は見られなかった。この結果はYck1、Yck2やKns1はTat1のリン酸化を担っているが、直接的ではなく間接的に関わっている可能性、もしくは相互作用する時間が極端に短いために検出できなかった可能性が考えられた。

(5) まとめ

本研究によって、酵母の低親和性トリプトファン輸送体Tat1はカゼインキナーゼによってリン酸化されていること、そしてリン酸化によって分解が制御されていることが明らかとなった。しかし、定常状態でのリン酸化は分解に関与していないことが示唆されている。酵母のアンモニウムイオン輸送体Mep2は細胞質ドメインがリン酸化され、これによって活性型となる。そのため、Tat1も定常状態でのリン酸化は、基質である芳香族アミノ酸の取り込みを制御しているのかもしれない。

今後さらにリン酸化によるアミノ酸輸送体の制御機構を明らかにしていく。これによって、例えばリン酸化を担うキナーゼに特異的に効く薬剤を探索し、必要なアミノ酸の取り込みや分解を人為的にコントロールすれば、アミノ酸欠乏の改善、それにともなって小児の成長障害が減ると期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Uemura Satoshi., Mochizuki Takahiro., Kurosaka Goyu., Hashimoto Takanori., Masukawa Yuki., Abe Fumiyoshi, (2017年) Functional analysis of human aromatic amino acid transporter MCT10/TAT1 using the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1859, 2076-2085. (査読有)

[学会発表] (計 3 件)

(1) 望月貴博、小幡咲希子、阿部文快
酵母トリプトファン輸送体Tat1の分解における細胞質末端リン酸化の関与
日本農芸化学会2017年度大会 2017年3月18日
京都女子大学

(2) 石井凌駕、天野香織、野際佳奈、望月貴博、上村聡志、阿部文快
トリプトファン輸送体Tat2における基質輸送能とユビキチン依存分解の関係
酵母遺伝学フォーラム第 50 回研究会報告会
2017年9月12日 東京大学

(3) 石井凌駕、天野香織、野際佳奈、今村恵莉、望月貴博、阿部文快
出芽酵母トリプトファン輸送体Tat2における基質輸送活性とユビキチン依存性分解
日本農芸化学会 2018 年度大会 2018年3月16日 名城大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

望月 貴博 (MOCHIZUKI, Takahiro)

青山学院大学・理工学部・助教

研究者番号:40783387