

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：32601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05397

研究課題名(和文) 輸送基質による酵母アミノ酸輸送体の動的構造変化と自己分解シグナルの伝達

研究課題名(英文) Substrate-induced degradation of yeast amino acid permeases and the autodegradation-signaling associated with dynamic structural changes

研究代表者

阿部 文快 (Abe, Fumiyo)

青山学院大学・理工学部・教授

研究者番号：30360746

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：微生物にとって飢餓は致命的なストレスだが、栄養過剰もまた寿命短縮などの害をもたらす。出芽酵母の2つのトリプトファン輸送体のうち、低親和性型Tat1は細胞外トリプトファン濃度に依存せず細胞膜に局在した。一方、高親和性型Tat2は低濃度トリプトファン条件下では細胞膜に局在するが、高濃度で基質を投与すると速やかに分解された。Tat2の細胞質ドメインにおけるacidic patchの変異D74R体では、分解が著しく抑制された。よって基質輸送に伴う動的構造変化がacidic patchを含む細胞質ドメインを露出させ、ユビキチン化による自己分解を誘発するものと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

トリプトファンの動態は、細胞内NAD⁺の調節、トリプトフォールやセロトニンなど細胞間伝達物質の合成、ヒトではトリプトファン輸送体MCT10が甲状腺ホルモンの輸送を担うなど、他のアミノ酸にはないユニークさがある。またトリプトファンは希少なアミノ酸であるうえ、ヒトの必須アミノ酸でもある。よって低濃度トリプトファン条件下における取り込みと、それとは逆に基質過剰時の取り込み抑制が特に重要だ。本研究で得られた成果は、酵母のトリプトファン輸送体Tat2が広範な生物種におけるトリプトファン制御のモデルとなることを示すとともに、1タンパク質分子がシグナルの受容と伝達を同時に担うユニークな側面を映し出している。

研究成果の概要(英文)：Nutrient starvation is a life-threatening stress while nutrient excess is also toxic in microorganisms. Among two yeast tryptophan permeases, Tat1 (the low-affinity type) was stably expressed in the plasma membrane whereas Tat2 (the high-affinity type) was rapidly degraded upon substrate addition. The D74R mutation in the acidic patch in the cytoplasmic domain abolished the substrate-induced Tat2 degradation. We hypothesize that the dynamic structural changes associated the substrate imports transmit the autodegradation signal of Tat2 allowing its own ubiquitination. We also explored cellular responses to nutrient limitation from aspects of poorly-characterized proteins and TORC1.

研究分野：細胞生物学

キーワード：酵母アミノ酸輸送体 動的構造変化 自己分解シグナル

1. 研究開始当初の背景

体液によって細胞を取り巻く恒常性が維持される多細胞生物とは異なり、微生物は直接環境にさらされるため、その変化を感知する仕組みが不可欠である。飢餓は普遍的な環境ストレスだが、過剰なカロリー摂取もまた寿命短縮など害をもたらす。よって細胞膜を介した栄養源輸送体の上方・下方制御は、厳密かつ瞬時に行わなければならない。一方、ヒトの悪性腫瘍細胞ではアミノ酸輸送体 LAT1 の発現が亢進しており、輸送体は分子標的治療薬の新たなターゲットとして注目されている。本研究では、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のアミノ酸輸送体、特にトリプトファン輸送体に着目し、細胞内外の基質濃度バランスやアミノ酸センシング、ユビキチン依存分解の観点からこの問題にアプローチした。

酵母では SPS センサー (Ssy1-Ptr3-Ssy5 複合体) が細胞外アミノ酸を認識すると、Ssy5 プロテアーゼにより活性化された Stp1/Stp2 転写因子が核内に移行し、数種のアミノ酸輸送体遺伝子の発現を誘導する。ただしこの機構は転写応答であり、すでに細胞膜上で機能している輸送体タンパク質は SPS センサーの支配下にはない。では輸送体タンパク質はどのように調節されているのか？ 貧栄養条件下で発現する総アミノ酸輸送体 Gap1 は、グルタミンなど良質な窒素源存在下では不要と見なされ、Rsp5 ユビキチンリガーゼ依存的に分解される。これは、上流にある栄養源センサー TORC1 (TOR 複合体 1) キナーゼを介した細胞内アミノ酸の総量調節であり、栄養状態の向上に適応する仕組みである。ところが Gap1 のように貧栄養下で発現する輸送体はむしろ例外であり、その他多くのアミノ酸輸送体は富栄養下で発現する。では、細胞は個々のアミノ酸をいかにして認識し、およそ 100 万分子もある酵母細胞膜上のタンパク質から、対応するアミノ酸輸送体だけを選んで分解するのか？これが本研究課題の核心をなす学術的問いである。申請者らはこれまで一貫して、酵母のトリプトファン輸送体 Tat1 と Tat2 の機能とユビキチン化に関する研究を行ってきた。トリプトファンは天然に希少なアミノ酸であり、タンパク質合成の材料のみならず、NAD⁺やセロトニンなど生理的に重要な物質の前駆体でもある。トリプトファン輸送体 Tat1 と Tat2 は 12 回膜貫通型 (TMD) のプロトン共輸送体で、高水圧や低温ストレスに感受性を示し、トリプトファン要求株の増殖を制限する。いずれの分解も Rsp5 と Bul1 などのアレクチン様アダプターとの複合体に依存することを明らかにしている。本研究では高親和性トリプトファン輸送体 Tat2 に着目した解析を行う。また研究過程で、これまで機能未知とされてきた一群のタンパク質が、栄養源輸送体の品質管理に重要な役割を果たすこともわかってきた。それらについても合わせて解析を行った。

2. 研究の目的

本研究では、Tat2 が基質を輸送する際、“輸送体の構造変化”が自身の分解シグナルになると考え、Rsp5 と Tat2 の相互作用、そしてユビキチン化に至る動態の解明を目的とした。すなわち、前述した SPS など個々のセンサーを仮定するよりも、Tat2 自身がトリプトファン濃度を感知し自己分解シグナルを発する方が合理的かつ効率的と考えた。Tat1 と Tat2 は、酵母が富栄養条件下で芳香族アミノ酸を取り込めるただ 2 つの輸送体である (貧栄養条件下では Gap1 が全てのアミノ酸取り込みを担う)。Tat1 と Tat2 という似て非なる両者を対比させ、機能と制御を解析することは進化過程におけるタンパク質の多様化の観点からも興味深い。いずれも結晶構造は不明だが、おそらく大腸菌の構造ホモログ輸送体 AdiC と同様に、外開き・基質内包・内開き構造を転移しつつ基質を輸送しているのであろう。トリプトファン、フェニルアラニンおよびチロシンは、それぞれ酵母のクオラムセンシングに関わる液性因子トリプトフォール、フェニルエタノールおよびチロソールの前駆体である。こうした芳香族アルコールは、単細胞生物である酵母が細

胞密度を認識し、遺伝子発現をコントロールするために重要であることがワイン醸造などで知られている。アミノ酸輸送体と芳香族アルコール生産との関係はこれまで調べられておらず、輸送体の基礎研究が発酵生産や醸造面に貢献するといった創造的展開も期待される。

また、研究当初には想定していなかったことで、アミノ酸輸送体を含むいくつかの栄養源輸送体が、これまで機能未知と分類されていた一群のタンパク質の制御下にあることが判明した。これについても得られた成果を記載する。

3. 研究の方法

出芽酵母のトリプトファン要求性の YPH499 株や非要求性の BY4742 株を親株とし、PCR ベースの遺伝子破壊と行い、HA あるいは GFP を Tat1 や Tat2 に標識して発現させ、ウェスタンブロットによる定量化や共焦点レーザー顕微鏡を用いた観察を行った。また、³H-標識したトリプトファンを用いた取り込みアッセイも行った。BY4742 株を親株として既に得られていた高圧感受性遺伝子破壊株、*ehg1Δ*, *mtc2Δ*, *mtc4Δ*, *mtc6Δ*, *dlt1Δ*、および *csf1Δ* 株にロイシン、ヒスチジン、リジン、およびウラシル合成の相補遺伝子をプラスミドで導入した prototroph を作製した。Ehg1 と栄養源輸送体の関係性を調べるため、ロイシン輸送体 Bap2、ヒスチジン輸送体 Hip1、およびウラシル輸送体 Fur1 との相互作用について、Split ubiquitin システムを用いた Yeast two-hybrid 解析、および免疫共沈法を用いて解析を行った。

4. 研究成果

本研究は、出芽酵母における栄養源取り込み、特にアミノ酸輸送の制御メカニズムの解明を目的として行った。*GAL1* プロモーターで *TAT1* と *TAT2* の転写を誘導し、グルコース添加と同時に高濃度トリプトファンを投与して、それらの存在量を追跡した。その結果、いずれの芳香族アミノ酸を投与した場合にも、Tat2 は 30 分以内に分解が促進され、効果はトリプトファン>フェニルアラニン>チロシンの順だった。一方、Tat1 では芳香族アミノ酸投与による分解は見られず、270 分後も安定に維持されていた。メチオニン輸送体 Mup1 やアルギニン輸送体 Can1 では、N 末端の細胞質ドメインの膜貫通領域 1 (TMD1) の近傍に、acidic patch と呼ばれる酸性アミノ酸に富む領域が存在する。Tat2 にも類似の領域が見いだされた。そこでこの領域の複数のアミノ酸残基をそれぞれアルギニンに置換したところ、基質による Tat2 の分解は著しく抑制された。Mup1 や Can1 のモデルによると、基質輸送に伴う動的構造変化が acidic patch を含む細胞質ドメインを露出させ、ユビキチン化による自己分解を誘発するものと推論されている。Tat2 ではトリプトファンによって同様の自己分解が引き起こされるものと考えられる。Tat1 にもやはり acidic patch と考えられる領域が N 末端細胞質ドメインに存在する。しかし前述のように、基質投与による分解は見られない。このことは、Tat1 による基質取り込み速度が Tat2 に比べて遅く、自己分解を引き起こすほどの大きな構造変化を示さない可能性を示唆している。そこで、³H-トリプトファンを用いた取り込みアッセイを行ったところ、細胞あたりのトリプトファン取り込みは、Tat1 依存性では Tat2 依存性の活性よりも有意に低いことがわかった。しかも、Tat2 の発現量が極めて低く、Tat1 のわずか 1/5~1/10 程度であることを考えると、単一分子あたりの比活性は Tat2 の方が遥かに高いことが予想される。Error-prone PCR と部位特異的変異導入によって、Tat2 の TMD6 に I285V と I285T という超高活性型変異を見出した。これら変異型 Tat2 の発現株は、4 μg/mL 以下の低濃度トリプトファン存在下で野生株を遥かに上回る増殖を示した (Amano et al. *Biophys. Biochem. Res. Commun.* 2019)。トリプトファンに対する K_m 値と V_{max} 値を調べたところ、両変異型 Tat2 ではトリプトファンへの親和性と取り込み速度が向上していることがわかった。I285 の近傍には E286 残基が位置しており、E286 は Tat2 のプロトン化されうるアミノ酸残基として私たちは注目してきた (Kanda and Abe, *Biochemistry* 2013)。よって、I285 における変異は

E286 のプロトン化に何らかの影響を及ぼすものと考えられる。

次に Tat2 の分解制御について、細胞膜のタイトなドメイン eisosome に着目し解析を行った。Eisosome は近年、アミノ酸輸送体の貯蔵コンパートメントとして注目されている。Eisosome のマーカー Pill-mCherry と Tat2-GFP との共局在は、高濃度トリプトファン添加により有意に低下した。すなわち、Tat2 はトリプトファン添加後 eisosome から離脱しエンドサイトーシスされ、液胞分解に至る可能性が示唆された。興味深いことに、D74R 変異体はトリプトファン非存在下でも eisosome 局在が低下しており、その傾向は Tat2 の前述の高活性型変異 I285V でも同様に見られた。すなわち、Tat2 はトリプトファンの取り込みと連動して eisosome から離脱し分解されるものと考えられる。このことは過剰な基質の取り込みを抑制する安全弁の存在を示唆するものである(投稿準備中)。一方、Tat1 は eisosome には局在せず(ただし積極的に排除もされない)、実際、Pill-mCherry との共局在性が低いことがわかった。さらに、3 種の芳香族アミノ酸いずれを投与しても Tat1 と eisosome の局在性は変化しなかった。以上の結果は、トリプトファン輸送体の eisosome 局在とそこから離脱が、基質取り込み活性と密接な関係にあることを示唆している。

酵母の機能未知遺伝子破壊株 *ehg1Δ*, *mtc2Δ*, *mtc4Δ*, *mtc6Δ*, *dlt1Δ*、および *csf1Δ* 株は、25 MPa における高圧感受性を示す (Abe and Minegishi, Genetics 2008)。これらの破壊株にロイシン、ヒスチジン、リジン、およびウラシル合成の相補遺伝子をプラスミドで導入した prototroph 株は、高圧下での増殖能を回復した (Kurosaka et al. Sci. Rep. 2019)。従って、Ehg1 をはじめとする機能未知タンパク質は、何らかのメカニズムで高圧下で栄養源輸送体の機能維持を担う可能性を示唆している。続いて、これら 6 個の機能未知タンパク質のうち Ehg1 に着目して研究を進めた。Ehg1 は小胞体膜に局在するタンパク質であることがわかった。Split ubiquitin システムを用いた Yeast two-hybrid 解析、および免疫共沈法による解析から、Ehg1 は Hip1 や Bap2、Fur4 と物理的に相互作用すること明らかとなった。その相互作用と機能には N 末端の細胞質ドメインが重要であり、メカニズムは不明だが、高圧下で輸送体を安定化していることを示唆した (Kurosaka et al. Sci. Rep. 2019)。未発表データではあるが、Tat2 と Ehg1 との相互作用についても確認している。

また、当初の研究目的には含まれていなかったが、栄養源センサーである TORC1 (セリン・スレオニンキナーゼ) についても興味深い知見が得られた。酵母遺伝子破壊ライブラリーの網羅的スクリーニングによって、少なくとも 84 個の遺伝子が高圧や低温といったストレス条件下での増殖に不可欠であることがわかっていた (Abe and Minegishi, Genetics 2008)。前述の 6 つの機能未知遺伝子もその範ちゅうに含まれ、それらの破壊株は prototroph 化することで高圧増殖能を回復することは前述の通りである。栄養源センサー TORC1 の上流で作用する EGO 複合体 (EGOC) は、Ego, Eog2, Ego3, Gtr1 および Gtr2 から構成される。これらの因子を 1 つでも欠損したときにもやはり高圧感受性を示すが、破壊株は prototroph 化しても高圧感受性のままだった (Kurosaka et al. Sci. Rep. 2019)。よって、酵母が高圧下で増殖するために TORC1-EGOC は不可欠だが、栄養源輸送体の制御とは異なる役割を持つことが示唆された。興味深いことに、高圧下に置かれた酵母細胞内では、TORC1 の基質である Sch9 のリン酸化レベルが亢進しており、TORC1 が活性化していることが見いだされた。TORC1 は栄養培地中でもともと活性化しているが、その活性がさらに高圧下で上昇した点は興味深い。その後の解析から、高圧下では細胞内のグルタミン濃度が異常上昇することがわかり、TORC1 の活性化はグルタミンセンサー Pib2 を介することが明らかとなった。その結果、Gln3 のリン酸化が亢進し、グルタミン合成にフィードバック障害がかかっていた。この研究は J. Cell Sci. 誌に掲載され、圧力という物理的刺激と TORC1 による栄養源センシングをリンクさせたユニークな成果として、Research Highlight に取り上げられた (Uemura et al. J. Cell Sci. 2020)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kurosaka, G., Uemura, S., Mochizuki, T., Kozaki, Y., Hozumi, A., Suwa, S., Ishii, R., Kato, Y., Imura, S., Ishida, N., Noda, Y., and Abe, F	4. 巻 9
2. 論文標題 A novel ER membrane protein Ehg1/May24 plays a critical role in maintaining multiple nutrient permeases in yeast under high-pressure perturbation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 18341
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-54925-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Amano Kaori, Ishii Ryoga, Mochizuki Takahiro, Takatsu Shiori, Abe Fumiyoshi	4. 巻 509
2. 論文標題 Hyperactive mutation occurs adjacent to the essential glutamate 286 for transport in the yeast tryptophan permease Tat2	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1047 ~ 1052
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.01.038	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ishii, R., Aramaki, M., Mochizuki, T., and Abe, F	4. 巻 in press
2. 論文標題 Identification of a regulatory element for yeast tryptophan permease Tat2 ubiquitination using high hydrostatic pressure.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 High Pressure Research	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/08957959.2019.1575377	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nemoto Shota, Ohnuki Shinsuke, Abe Fumiyoshi, Ohya Yoshikazu	4. 巻 36
2. 論文標題 Simulated microgravity triggers characteristic morphology and stress response in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Yeast	6. 最初と最後の頁 85 ~ 97
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/yea.3361	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kurosaka, G. and Abe, F.	4. 巻 30
2. 論文標題 The YPR153W gene is essential for the pressure tolerance of tryptophan permease Tat2 in the yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 High Pressure Research	6. 最初と最後の頁 90-98
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/08957959.2017.1413367	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Uemura, S., Mochizuki, T., Amemiya, K., Kurosaka, G., Yazawa, M., Nakamoto, K., Ishikawa, Y., Izawa, S., and Abe, F.	4. 巻 133
2. 論文標題 Amino acid homeostatic control by TORC1 in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> under high hydrostatic pressure.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Cell Sci.	6. 最初と最後の頁 ics24555
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.24555	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Dobriyala, N., Sagarikaa, P., Shrivastavaa, A., Vermaa, A.K., Islama, Z., Guptaa, P., Mochizuki, T., Abe, F., Sahi, C.	4. 巻 1862
2. 論文標題 Over-expression of Caj1, a plasma membrane associated J-domain protein in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> stabilizes amino acid permeases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochim. Biophys. Acta	6. 最初と最後の頁 183435
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbamem.2020.183435	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 加藤祐介、黒坂豪祐、上村聡志、望月貴博、伊村咲希、石田夏穂、石井凌賢、野田陽一、阿部文快
2. 発表標題 新規小胞体膜タンパク質Ehg1による酵母栄養源輸送体の制御
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 望月貴博、波多野絵梨、藤山未奈、阿部文快
2. 発表標題 出芽酵母の圧力適応に重要なシグナル伝達経路の探索
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 根來将吾、翠川雄斗、阿部文快
2. 発表標題 深海好圧性細菌 <i>Shewanella violacea</i> におけるペプチド輸送体の大腸菌内発現と機能解析
3. 学会等名 極限環境生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Goyu Kurosaka, Satoshi Uemura, Takahiro Mochizuki, Yuri Kozaki, Akiko, Hozumi, Sayuri Suwa and Fumiyoshi Abe
2. 発表標題 Functional linkage between poorly characterized genes and nutrient transport in yeast under high pressure
3. 学会等名 10th International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology (HPBB2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takahiro Mochizuki and Fumiyoshi Abe
2. 発表標題 Exploration of high-pressure sensor proteins in the yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
3. 学会等名 10th International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology (HPBB2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名	Yusuke Kato, Saki Imura, Natsuho Ishida, Ryoga Ishi, Goyu Kurosaka, Takahiro Mochizuki, Satoshi Uemura and Fumiyoshi Abe
2. 発表標題	A novel membrane protein Ehg1 physically interacts with nutrient permeases in the ER allowing yeast cells to grow under high pressure.
3. 学会等名	10th International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology (HPBB2018) (国際学会)
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	Satoshi Uemura, Kengo Amemiya, Takahiro Mochizuki, Goyu Kurosaka, Miho Yazawa, and Fumiyoshi Abe
2. 発表標題	Activation of the EGO complex-TORC1 signaling pathway enables the yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i> cells to grow under high pressure
3. 学会等名	10th International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology (HPBB2018) (国際学会)
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	Shogo Negoro, Yuto Midorikawa, Chiaki Kato and Fumiyoshi Abe
2. 発表標題	Heterologous expression and characterization of a peptide transporter from deep-sea piezophile <i>Shewanella violacea</i> in <i>Escherichia coli</i>
3. 学会等名	10th International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology (HPBB2018) (国際学会)
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	阿部文快、上村聡志、望月貴博、雨宮賢吾、中本景子、石川優、井沢真吾
2. 発表標題	高水圧によるTORC1の活性化と細胞内 アミノ酸ホメオスタシスにおける意義
3. 学会等名	酵母遺伝学フォーラム
4. 発表年	2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------