

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05560

研究課題名(和文) 液胞アミノ酸排出機構解明によるオートファジーアミノ酸リサイクルの生理的意義の検討

研究課題名(英文) Investigation for the physiological role of amino acid recycle from vacuoles during autophagy by elucidating the mechanism of vacuolar amino acid export

研究代表者

関藤 孝之 (Sekito, Takayuki)

愛媛大学・農学研究科・教授

研究者番号：20419857

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：液胞膜でアルギニン/ヒスチジン交換輸送を行うYpq2と、プロトン濃度勾配依存的な塩基性アミノ酸取り込みに関与するVsb1を同定した。また、Ypq2の分裂酵母ホモログStm1が液胞膜を介したアミノ酸輸送に関与し、機能的にも保存されていることを報告した。さらにアミノ酸を液胞外へ排出するトランスポーターAvt4とAvt6の発現がGATA転写因子によって転写レベルで直接的に制御されることを明らかにした。GATA転写因子は窒素源の変化に対するアミノ酸代謝の適応応答で中心的な役割を担う。その直接的な標的であることから細胞内アミノ酸恒常性への寄与が液胞アミノ酸輸送の生理機能の一つであることが強く示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞内のアミノ酸ホメオスタシスは細胞の適正な成長・増殖を維持するとともに、ストレス時の生存にも必須である。液胞/リソソームはその中で重要な役割を担うと考えられている。本研究でのYpq2とVsb1の同定解析で得られた知見はその分子機構の解明に大きく貢献する。また、本研究を含めこれまでの研究により、液胞アミノ酸トランスポーターの同定が大きく進捗した。本研究ではトランスポーター欠損による生育表現型や活性調節に関する知見も得られており、液胞内アミノ酸の生理機能解明への突破口になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this research, we identified Ypq2, which mediates the arginine/histidine exchange across the vacuolar membrane, and Vsb1, which is involved in the uptake of basic amino acids into vacuoles. We also revealed that Stm1, a Ypq2 homolog in the fission yeast, is functionally conserved. In addition, the expression of AVT4 and AVT6, both of which are transporters to export amino acids from vacuoles, were shown to be directly regulated at the transcriptional level by the GATA transcription factors. Since the GATA transcription factors play a central role in the adaptation of cellular amino acid metabolism in response to the changes in environmental nitrogen availability, our results strongly suggest that the vacuolar amino acid transport system contributes to the cellular amino acid homeostasis.

研究分野：細胞生物学

キーワード：液胞 オートファジー *Saccharomyces cerevisiae* トランスポーター TORC1

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

申請者の研究グループは出芽酵母を用いて液胞アミノ酸トランスポーターの同定解析を進め、AVTファミリーの Avt3、Avt4、Avt6、Avt7 がそれぞれ中性アミノ酸、中性/塩基性アミノ酸、酸性/中性アミノ酸、中性アミノ酸を液胞外へ排出することを明らかにしている。さらに動物リソソームアミノ酸トランスポーターLAAT-1/PQLC2の酵母ホモログ Ypq1 と Ypq3 が液胞膜に局在し、塩基性アミノ酸の輸送活性を有することも報告した。

オートファジーは当初報告されたアミノ酸リサイクルだけでなく、不要タンパク質/オルガネラの除去や、核酸/脂質/糖/各種ミネラル等のリサイクルも行うことが示されている。こうした生理機能の中でアミノ酸リサイクルの意義を正確に理解するためには、液胞からのアミノ酸排出のみを抑えたことによる影響を評価することが不可欠である。そのためには、液胞アミノ酸トランスポーターのさらなる同定が必要であった。また、オートファジーの持続・減衰の機構は誘導やオートファゴソーム形成に比べて理解が大幅に遅れている。TORC1 はアミノ酸等の栄養が豊富な条件で活性化し、オートファジーを負に制御している。申請者は、TORC1 活性とアミノ酸リサイクルのクロストークがオートファジー活性の持続に作用するとの仮説を立てている。この仮説を検証するためにも液胞アミノ酸トランスポーターを全て同定し、それらの多重破壊株を使った解析が必要とされていた。さらに、既知の液胞アミノ酸トランスポーターについても、活性調節機構の解明は液胞からのアミノ酸リサイクルの生理的意義を理解する上で重要な手掛かりを与えるはずであるが、ほぼ手付かずの状態であった。

### 2. 研究の目的

現在同定されている液胞アミノ酸トランスポーターの多重欠損株はオートファジー欠損株に比べて生育等の表現型が依然部分的である。本研究では未知トランスポーターを同定し、多重破壊による生育表現型を探索すると共に、活性調節の分子機構を明らかにすることにより、液胞アミノ酸リサイクルの生理的意義の解明を目的とした。また、TORC1 をはじめとする他のアミノ酸関連代謝(アミノ酸やタンパク質の分解/合成)の調節との重複・連携といった側面からも液胞アミノ酸輸送の役割を検討しその重要性を明らかにすることを目指した。

### 3. 研究の方法

#### ・アルギニン/ヒスチジン交換輸送活性の検出

出芽酵母から単離した液胞をヒスチジン含有バッファーで懸濁して液胞膜小胞を単離し、これを  $^{14}\text{C}$ -アルギニンを添加したヒスチジン非含有バッファーで希釈することによって小胞内外でのヒスチジン濃度勾配を形成させ、その際の  $^{14}\text{C}$ -アルギニン取り込みを検出した。

#### ・新規液胞アミノ酸トランスポーターの同定解析

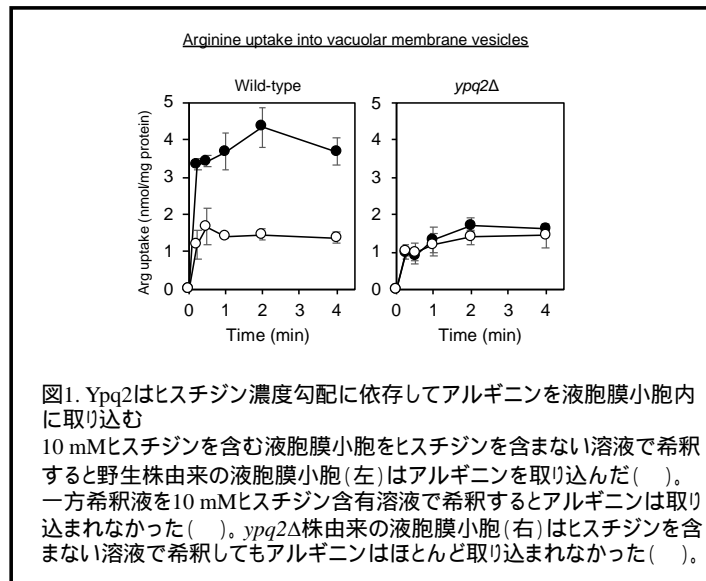
液胞膜局在性トランスポーターを網羅的に同定し、それら破壊株の液胞内アミノ酸含量を測定することによって液胞アミノ酸トランスポーター候補 Ygr125w を見出し、これを欠損すると液胞内塩基性アミノ酸量が大幅に低下することを見出した。さらに YGR125W 過剰発現株から調製した液胞膜小胞に ATP と  $^{14}\text{C}$ -アルギニンを添加し、小胞内の放射活性を経時的に測定した。

#### ・AVT 遺伝子プロモーターと GATA 転写因子の相互作用検出

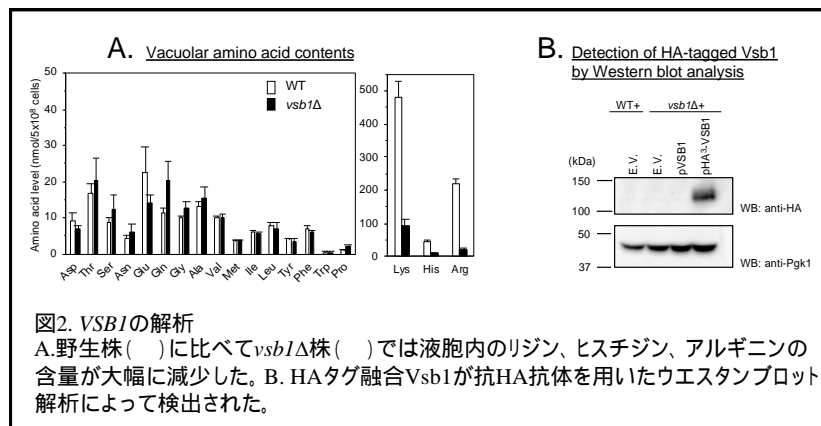
GATA 転写因子である Gat1 と Myc<sup>13</sup> の融合タンパク質を発現させた酵母細胞を、ホルムアルデヒド処理によって DNA とタンパク質を架橋させ、調製した抽出液に抗 Myc 抗体を加え免疫沈降実験を行なった。沈降試料中の AVT 遺伝子プロモーター-DNA 断片量をリアルタイム定量 PCR によって定量解析した。

### 4. 研究成果

(1) 高等生物まで広く保存されている PQ ループタンパク質の酵母ホモログ Ypq2 が液胞膜小胞のアルギニン/ヒスチジン交換輸送活性の分子実体であり、さらにプロトン濃度勾配に依存してアルギニンを輸送する活性も有することを論文発表した(図 1)。また、その分裂酵母ホモログ Stm1 を出芽酵母に発現させ、単離した液胞膜小胞を用いて Stm1 が Ypq2 同様ヒスチジン濃度勾配およびプロトン濃度勾配依存的なアルギニン取り込み活性を有するとともに、リジンの取り込み活性も有することが示唆された。これら結果をまとめ、PQ ループタンパク質が種を越えて液胞アミノ酸輸送に機能することを論文発表した。



(2)液胞内には細胞全体の 70-90%の塩基性アミノ酸が蓄積する。網羅的なタンパク質局在解析によって同定した液胞膜タンパク質のうち、出芽酵母 *Ygr125w* を欠損すると液胞内塩基性アミノ酸含量が大幅に低下することを見出した(図 2A)。欠損株の解析をさらに進め、液胞内に塩基性アミノ酸を蓄積する生理的意義について新たな知見を得ることができた。*YGR125W* については他のグループからも発表があり、以後遺伝子名を *VSB1* と改めその遺伝子産物である *Vsb1* タンパク質が塩基性アミノ酸を液胞内に取り込むトランスポーターであるとの仮説を立て実験を進めた。*Vsb1* の N 末端親水性領域と第1膜貫通領域の境界付近に HA タグを挿入することにより、機能を保持した HA-*Vsb1* 融合タンパク質の検出に成功し(図 2B)、液胞膜小胞を用いて、HA-*Vsb1* 依存的なアミノ酸輸送活性が検出されたことから、*Vsb1* が液胞アミノ酸トランスポーターとして機能することが強く示唆された。また液胞内塩基性アミノ酸蓄積に重要な *Vsb1* 中のアミノ酸残基も特定し、これらの結果を合わせて論文発表した。



(3)液胞アミノ酸トランスポーターの発現調節については、中性・塩基性アミノ酸を液胞外へと排出するトランスポーター *Avt4* の発現調節を中心に研究を進め、窒素飢餓条件での細胞内 *Avt4* レベルの増加が、GATA 転写因子 *Gln3* と *Gat1* の二重欠損によって低く抑えられることを明らかにした。また、*AVT4* プロモーター領域の *Gln3* / *Gat1* 結合配列に変異を導入しても、窒素飢餓条件での *AVT4* mRNA と *Avt4* タンパク質レベルが低く抑えられたことから、GATA 転写因子が直接 *AVT4* の転写に機能することが示唆された。さらに、クロマチン免疫沈降実験を行い、GATA 転写因子と共沈降したクロマチン試料に *AVT4* プロモーター断片を検出したことから、*AVT4* は GATA 転写因子の直接的なターゲットであることが明らかとなった。*AVT4* に加え、酸性アミノ酸トランスポーターをコードする *AVT6* もクロマチン免疫沈降実験によって GATA 転写因子の直接的な調節を受けることを明らかにし、まとめて論文発表した。GATA 転写因子は窒素源の変化に反応してアミノ酸代謝関連因子の発現を誘導する。GATA 転写因子の直接的な制御下にある液胞アミノ酸トランスポーター遺伝子を他にも見出しており、細胞内アミノ酸恒常性への寄与が液胞アミノ酸輸送の生理機能の一つであることが強く示唆された。

その一方で、プロモーターへの変異導入によって細胞内 *Avt4* レベルが減少しても窒素飢餓条件での液胞内アミノ酸は野生株と同様に減少した。したがって、発現調節のアミノ酸排出活性への影響を検出するには至っておらず、*AVT4* 発現誘導の生理的意義を明らかにすることはできなかった。これについては他のアミノ酸トランスポーターによる相補が考えられ、現在検討中である。

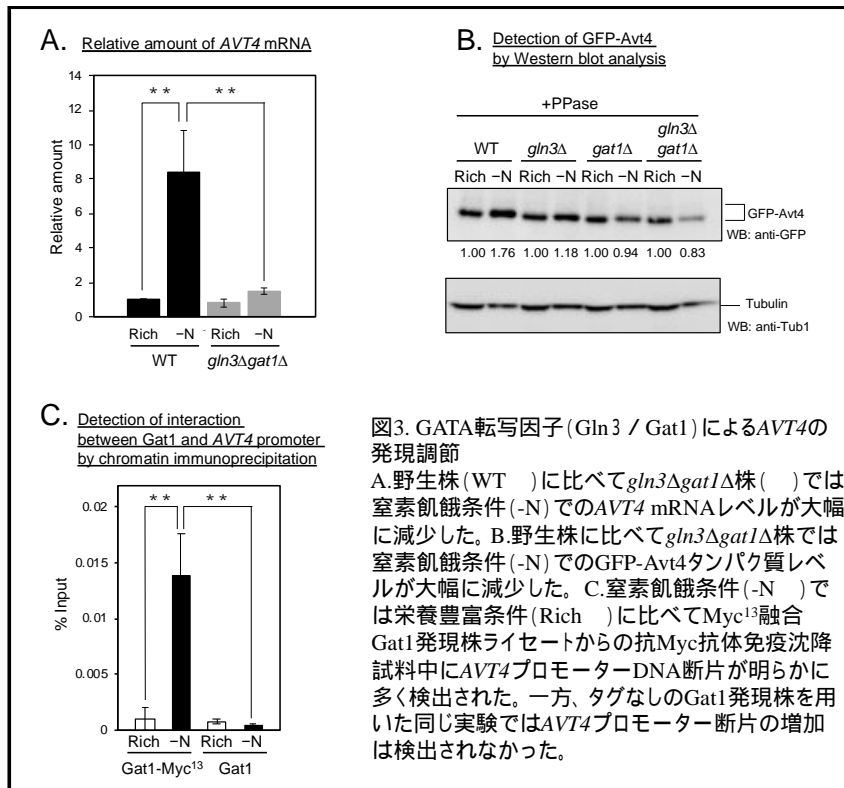


図3. GATA転写因子 (Gln3 / Gat1) によるAVT4の発現調節

A. 野生株 (WT) に比べて *gln3Δgat1Δ* 株 ( ) では窒素飢餓条件 (-N) での AVT4 mRNA レベルが大幅に減少した。B. 野生株に比べて *gln3Δgat1Δ* 株では窒素飢餓条件 (-N) での GFP-Avt4 タンパク質レベルが大幅に減少した。C. 窒素飢餓条件 (-N) では栄養豊富条件 (Rich) に比べて Myc<sup>13</sup> 融合 Gat1 発現株ライゼートからの抗 Myc 抗体免疫沈降試料中に AVT4 プロモーター DNA 断片が明らかに多く検出された。一方、タグなしの Gat1 発現株を用いた同じ実験では AVT4 プロモーター断片の増加は検出されなかった。

(4) Avt4 の翻訳後の活性調節機構解明に向けて、Avt4 N 末端親水性領域と相互作用するタンパク質候補を数種同定し、細胞内での相互作用を共免疫沈降によって検討した。その際、Avt4 のリン酸化に依存した相互作用の可能性も考慮し、推定リン酸化部位をアラニンもしくはアスパラギン酸に置換した変異型 Avt4 との相互作用も検討した。しかし、操作中の分解や界面活性剤の影響などが原因で共免疫沈降実験は結果が安定しないことが問題となった。また GST pull-down による相互作用因子の探索にも着手したが、Avt4 N 末端の GST 融合タンパク質は大腸菌細胞内で不溶化するなど良好な結果を得られていない。現在、別法での相互作用検出に着手している。

(5) 液胞アミノ酸トランスポーターの欠損および過剰発現によって生育等において表現型を示す培養条件を見出し、液胞アミノ酸リサイクルの生理機能に関わる手がかりを得た。また液胞内アミノ酸が TORC1 活性に作用することを示唆する結果も得られており、これらの成果はシンポジウム・国際学会等で発表した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4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 Kawano-Kawada Miyuki, Ichimura Haruka, Ohnishi Shota, Yamamoto Yusuke, Kawasaki Yumi, Sekito Takayuki	4. 巻 85
2. 論文標題 Ygr125w/Vsb1-dependent accumulation of basic amino acids into vacuoles of <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1157~1164
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bbb/zbab015	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 Sato Akane, Kimura Takumi, Hondo Kana, Kawano-Kawada Miyuki, Sekito Takayuki	4. 巻 85
2. 論文標題 The vacuolar amino acid transport system is a novel, direct target of GATA transcription factors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 587 ~ 599
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bbb/zbba041	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 Kawano-Kawada Miyuki, Ueda Taisuke, Mori Hikari, Ichimura Haruka, Takegawa Kaoru, Sekito Takayuki	4. 巻 1863
2. 論文標題 Stm1 is a vacuolar PQ-loop protein involved in the transport of basic amino acids in <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes	6. 最初と最後の頁 183507 ~ 183507
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbamem.2020.183507	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 Kawano-Kawada Miyuki, Manabe Kunio, Ichimura Haruka, Kimura Takumi, Harada Yuki, Ikeda Koichi, Tanaka Shiho, Kakinuma Yoshimi, Sekito Takayuki	4. 巻 9
2. 論文標題 A PQ-loop protein Ypq2 is involved in the exchange of arginine and histidine across the vacuolar membrane of <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15018
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-51531-z	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 Kawano-Kawada Miyuki、Kakinuma Yoshimi、Sekito Takayuki	4. 巻 41
2. 論文標題 Transport of Amino Acids across the Vacuolar Membrane of Yeast: Its Mechanism and Physiological Role	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 1496 ~ 1501
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b18-00165	査読の有無 無
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24件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 佐藤明香音, 木村匠, 河田 (河野) 美幸, 関藤孝之
2. 発表標題 AVT液胞アミノ酸トランスポーターの窒素飢餓に応答した発現調節
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部第58回講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 市村悠, 大西祥太, 川崎祐美, 山本悠介, 関藤孝之, 河田美幸
2. 発表標題 出芽酵母における液胞内塩基性アミノ酸蓄積に関与するトランスポーターの機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部第58回講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤明香音, 中津秀介, 木村匠, 村上瑛夢, 兵頭美波, 児玉理美, 河田美幸, 関藤孝之
2. 発表標題 窒素源に応答したAVT液胞アミノ酸トランスポーターの転写調節
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 市村悠, 大西祥太, 川崎祐美, 山本悠介, 関藤孝之, 河田美幸
2. 発表標題 塩基性アミノ酸蓄積に関わる出芽酵母液胞トランスポーターの機能解析
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 関藤孝之, 河田美幸
2. 発表標題 液胞膜を介したアミノ酸輸送の分子装置
3. 学会等名 第72回日本生物工学会大会シンポジウム「酵母細胞内における最大の貯蔵庫「液胞」が果たす機能の多様性とその応用展開について」 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大西祥太, 川崎裕美, 市村悠, 関藤孝之, 河田美幸
2. 発表標題 塩基性アミノ酸蓄積に関わる液胞トランスポーターの同定とその機能解析
3. 学会等名 第61回日本生化学会中国・四国支部例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山本悠介, 大槻華, 佐藤明香音, 國米春香, 石本晶也, 関藤孝之, 河田美幸
2. 発表標題 液胞アミノ酸トランスポーターAvt4の活性調節機構
3. 学会等名 第61回日本生化学会中国・四国支部例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中津秀介, 木村匠, 佐藤明香音, 村上瑛夢, 兵頭美波, 児玉理美, 本藤加奈, 河田美幸, 関藤孝之
2. 発表標題 液胞アミノ酸トランスポーター発現の窒素飢餓応答
3. 学会等名 第61回日本生化学会中国・四国支部例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤明香音, 木村匠, 村上瑛夢, 兵頭美波, 児玉理美, 河田美幸, 関藤孝之
2. 発表標題 AVTトランスポーター遺伝子の転写調節について
3. 学会等名 第37回YEAST WORKSHOP
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 市村悠, 金子拓磨, 山口翔吾, 村尾奈美, 関藤孝之, 河田美幸
2. 発表標題 リジン添加培地における出芽酵母の生育阻害メカニズムについて
3. 学会等名 第37回YEAST WORKSHOP
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大槻華, 金子貴大, 佐藤明香音, 木村匠, 関藤孝之, 河田美幸
2. 発表標題 液胞アミノ酸トランスポーターAvt4の相互作用因子探索
3. 学会等名 第37回YEAST WORKSHOP
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 金子拓磨, 村尾奈美, 山口翔吾, 市村悠, 河田美幸, 関藤孝之
2. 発表標題 プロリンを窒素源とした培地におけるアミノ酸の毒性発現機序について
3. 学会等名 第60回日本生化学会中国・四国支部会例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木村匠, 佐藤明香音, 村上瑛夢, 兵頭美波, 児玉理美, 本藤加奈, 河田美幸, 関藤孝之
2. 発表標題 出芽酵母AVT液胞アミノ酸トランスポーターの発現調節
3. 学会等名 第60回日本生化学会中国・四国支部会例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 関藤孝之, 河田美幸
2. 発表標題 液胞アミノ酸コンパートメンテーションの機構・生理・応用
3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akane Sato, Takumi Kimura, Emu Murakami, Minami Hyodo, Satomi Kodama, Miyuki Kawano-Kawada, Takayuki Sekito
2. 発表標題 Vacuolar amino acid transport is regulated by the GATA transcription factors
3. 学会等名 ASCB EMBO 2019 meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Haruka Ichimura, Takuma Kaneko, Shogo Yamaguchi, Nami Murao, Takayuki Sekito, Miyuki Kawano-Kawada
2. 発表標題 The molecular mechanism underlying growth inhibition of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> by supplementing lysine to the medium containing proline as sole nitrogen source
3. 学会等名 ASCB EMBO 2019 meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 久賀夏子, 河田美幸, 関藤孝之, 秋山浩一
2. 発表標題 植物病原菌 <i>Fusarium oxysporum</i> におけるオートファジー関連遺伝子 ATG15 の機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部第56回講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上田大資, 津山愛美, 笠井瑠美, 関藤孝之, 河田美幸
2. 発表標題 分裂酵母 PQL-ブタンパク質 Stm1 によるアミノ酸輸送の検討
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第51回研究報告会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川崎祐美, 市村悠, 田中志穂, 笠井瑠美, 関藤孝之, 河田美幸
2. 発表標題 塩基性アミノ酸輸送に関わる新規液胞膜局在性トランスポーターの探索
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第51回研究報告会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中志穂, 原田悠希, 池田紘一, 真鍋邦男, 河田美幸, 関藤孝之
2. 発表標題 出芽酵母液胞膜タンパク質Ypq2の解析
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第51回研究報告会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤明香音, 村上瑛夢, 兵頭美波, 児玉理美, 佐藤有美香, 石本晶也, 河田美幸, 関藤孝之
2. 発表標題 液胞アミノ酸トランスポーターAvt4の発現とアミノ酸輸送活性の調節
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第51回研究報告会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 市村悠, 川崎祐美, 田中志穂, 笠井瑠美, 関藤孝之, 河田美幸
2. 発表標題 塩基性アミノ酸の液胞内蓄積に関する出芽酵母新規液胞トランスポーター同定の試み
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 原田悠希, 真鍋邦男, 池田紘一, 田中志穂, 佐藤明香音, 河田美幸, 関藤孝之
2. 発表標題 出芽酵母Ypq2アルギニン/ヒスチジン交換輸送活性に対するPQモチーフ変異の影響評価
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 河田美幸, 真鍋邦男, 池田紘一, 原田悠希, 田中志穂, 柿沼喜己, 関藤孝之
2. 発表標題 酵母液胞膜タンパク質Ypq2による塩基性アミノ酸交換輸送について
3. 学会等名 日本生体エネルギー研究会第44回討論会
4. 発表年 2018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