

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月30日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570200

研究課題名（和文） 液胞アミノ酸プールの形成機構と生理機能の解明

研究課題名（英文） The molecular mechanism and the physiological role of vacuolar amino acid pool formation

研究代表者

関藤 孝之（SEKITO TAKAYUKI）

愛媛大学・農学部・助教

研究者番号：20419857

研究成果の概要（和文）：酵母 AVT トランスポーターファミリーの Avt3 および Avt4 が中性アミノ酸全般の排出に機能し、Avt4 はさらに塩基性アミノ酸排出にも機能することが示唆された。一方 Avt1 は中性アミノ酸全般とヒスチジンの取り込みに機能することが新たに明らかとなった。機能未知トランスポーターの網羅的局在解析より 13 種の新規液胞膜局在性トランスポーターを同定し、このうち数種が液胞膜を介したアミノ酸輸送に関与する可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：This study suggests that Avt3 and Avt4 in *Saccharomyces cerevisiae* AVT transporter family are redundantly involved in the export of a broad range of neutral amino acids from vacuoles, and that Avt4 but not Avt3 functions to extrude vacuolar basic amino acids during nitrogen starvation. On the other hand, Avt1 was suggested to uptake various neutral amino acids and histidine into vacuoles. In addition, we newly identified 13 transporters localized to the vacuolar membrane, and found that some of these transporters may be involved in the vacuolar amino acid transport.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学、細胞生物学

キーワード：細胞機能・構造

1. 研究開始当初の背景

微生物や植物の液胞はアミノ酸を蓄積し、さらに飢餓時には、オートファジータンパク質分解によってもアミノ酸を生じる。液胞内のアミノ酸含量は栄養条件に応じて変化することが知られている。我々と他のグループ

は出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いて液胞内外へのアミノ酸輸送に機能するトランスポーターを AVT/VBA 各トランスポーターファミリーより数種同定していた。我々はさらに液胞からグルタミン酸/アスパラギン酸を排出する液胞アミノ酸トラン

スプーターAvt6 がオートファジーアミノ酸リサイクルに機能することを報告し、他のグループからもAvt3とAvt4のロイシンリサイクルへの関与が報告されていた。しかし、塩基性アミノ酸をはじめ他の多くのアミノ酸の液胞からの排出経路は依然未知であった。液胞へのアミノ酸取り込みについても、塩基性アミノ酸取り込みに機能するVba1、Vba2、Vba3 全てを欠損しても液胞内に塩基性アミノ酸の蓄積がみられることから、未知の塩基性アミノ酸トランスポーターの存在が予想された。また、単離液胞膜小胞を用いた実験により7種のアミノ酸/プロトン対向輸送系の存在が示唆されていたが、未同定の輸送系が残っていた。液胞アミノ酸プールの生理機能解明にはこれら液胞内外へのアミノ酸トランスポーターを網羅的に同定することが不可欠と考えられた。

2. 研究の目的

S. cerevisiae を用いてアミノ酸を液胞内外に輸送するトランスポーターの同定を進め、液胞アミノ酸プールの生理機能解明に向けた研究基盤構築を目指す。また、基礎生物学研究所（現埼玉大学）藤木友紀研究員と連携し、高等植物モデル生物であるシロイヌナズナ *AVT/VBA* ホモログの解析を進めることにより、多細胞生物における液胞アミノ酸プールの形成機構と生理機能を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

酵母ゲノムデータベースの機能未知トランスポーターから液胞膜局在を示すものを選抜し、そこからアミノ酸トランスポーターを輸送アミノ酸基質とともに同定する。次に液胞アミノ酸トランスポーター多重欠損株の表現型や細胞内アミノ酸濃度の解析により、液胞アミノ酸トランスポーターの細胞内アミノ酸濃度維持における役割を中心に検討する。平行して酵母液胞アミノ酸トランスポーターのシロイヌナズナホモログの解析を進め、発現の組織特異性やノックアウト植物の表現型等の解析により植物の多様な生命活動における液胞アミノ酸プールの働きを明らかにする。

4. 研究成果

(1) 機能未知トランスポーターに GFP を付加し、細胞内局在を調べた結果、13 種の新規液胞膜局在性トランスポーターを同定した。これらのアミノ酸輸送能をより直接的に評価するため、単離液胞膜小胞を用いて放射ラベルしたアミノ酸の取り込みおよび排出活性を調べた結果、過剰発現もしくは遺伝子破壊によってアミノ酸輸送活性が変化するものを数種見出した。また、Avt1 と Avt3/Avt4

が中性アミノ酸全般をそれぞれ液胞内外に輸送することを見出し（図 1）、現在その生理機能および活性調節機構を解析中である。また Avt1 については基質特異性について再検討を行い、塩基性アミノ酸であるヒスチジンも液胞内に取り込むことを示唆する結果を得た。以前我々が同定した塩基性アミノ酸トランスポーターVba との多重欠損株を単離し、解析する予定である。

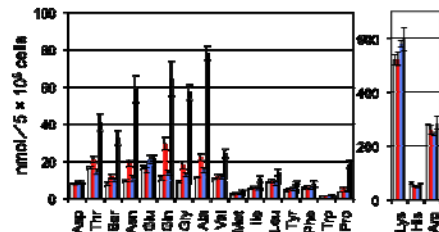


図1 AVT3/AVT4遺伝子破壊による液胞内アミノ酸組成の変化
野生株(□), avt3Δ株(■), avt4Δ株(▲), avt3Δavt4Δ株(●)

(2) Gap1 を恒常的に活性化した株 (*GAP1^{K16R}*) において *VBA* 遺伝子を破壊し、生育への影響を調べた。単一アミノ酸を培地に加えると Gap1 によってアミノ酸が細胞内に過剰に取り込まれ、生育が停止した。*VBA* 遺伝子破壊株の生育停止期が野生株より長かったことより、細胞内アミノ酸濃度の速やかな適正化に Vba タンパク質が機能すると考えられた（図 2）。

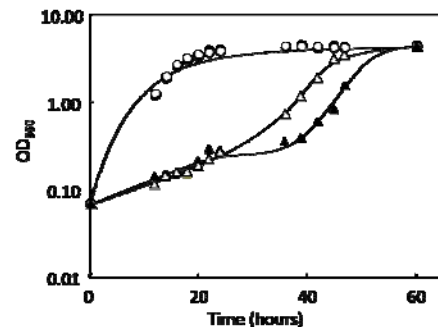


図2 *GAP1^{K16R}* 発現 *VBA* 遺伝子破壊株の成長曲線
GAP1^{K16R} を発現する野生株(▲)、*vbaΔ*株(●)とコントロールとして *yeGAP1^{K16R}* の代わりに空ベクターを導入した株(野生株:○、*vbaΔ*株:●)をSD培地で培養した後、ヒスチジン(20 μg/ml)添加培地で希釈しOD₆₀₀を定期的に測定した。

(3) 液胞アミノ酸トランスポーターの植物ホモログを出芽酵母液胞アミノ酸トランスポーター欠損株に発現させ、液胞膜への局在を確認後、単離液胞膜小胞を用いたアミノ酸

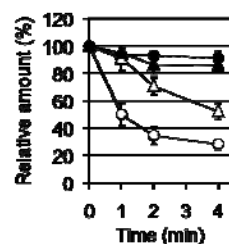


図3 液胞膜小胞からのアラニン排出
シロイヌナズナ *Avt3* ホモログ発現ベクター(丸印)もしくは空ベクター(三角印)を導入した出芽酵母 *avt3Δ avt4Δ* 株から液胞膜小胞に14Cラベルアラニンを負荷し、ATP添加後(白)の小胞内含量を経時的に測定した。コントロールとしてATP未添加(黒)で同様の実験を行った。

輸送実験により植物ホモログがアミノ酸輸送活性を有することを明らかにした(図3)。

(4) 分裂酵母 Avt トランスポーターホモログの細胞内局在およびアミノ酸輸送活性を解析し、これらが出芽酵母同様、液胞膜を介したアミノ酸輸送に機能することを明らかにした

(5) 分裂酵母ゲノムにコードされる Vba ホモログは3種と出芽酵母の7種に比べ少ないことから、遺伝子破壊により細胞の生育/アミノ酸組成に大きな変化を生じる可能性がある。これらはいずれも液胞膜に局在し、出芽酵母に発現させ液胞膜小胞を用いたアミノ酸輸送実験を行なった結果、出芽酵母 Vba トランスポーターと同様に液胞への塩基性アミノ酸取り込みに機能する一方、中性アミノ酸も取り込むことが示唆された。

(6) Myc タグを付加した各 Vba タンパク質のウェスタン解析により、窒素飢餓条件下で Vba1-Myc のレベルが顕著に増加することを見出した。一方、Vba4-Myc の細胞内レベルは窒素飢餓条件下で急速に減少した(図4)。これらは各 Vba タンパク質の生理機能を理解する上で重要な情報であり、栄養条件を変えて各遺伝子破壊の影響を解析中である。また、液胞外へアミノ酸を排出するトランスポーターAvt4についてはN末端親水性領域に依存した活性調節機構の存在が示唆された。

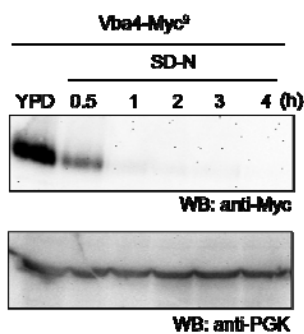


図4 窒素飢餓条件下におけるVba4-Myc⁺細胞内レベルの経時変化

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8件)

- ①N. Sugimoto, T. Iwaki, S. Chardwiriyaapreecha, M. Shimazu, M. Kawano, T. Sekito, K. Takegawa and Y. Kakinuma, Atg22p, a vacuolar membrane protein involved in the amino acid compartmentalization of *Schizosaccharomyces pombe*, *Biosci.*

Biotechnol. Biochem., 査読あり 75, 2011, 385-387

- ②N. Sugimoto, T. Iwaki, S. Chardwiriyaapreecha, M. Shimazu, T. Sekito, K. Takegawa and Y. Kakinuma, Vba2p, a vacuolar membrane protein involved in basic amino acid transport in *Schizosaccharomyces pombe*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 査読あり 74, 2010,
- ③S. Chardwiriyaapreecha, H. Mukaiyama, T. Sekito, T. Iwaki, K. Takegawa and Y. Kakinuma, Avt5p is required for vacuolar uptake of amino acids in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, *FEBS Lett.*, 査読あり 584, 2010, 2339-2345
- ④T. Sekito, T. Kawamata, R. Ichikawa, K. Suzuki and Y. Ohsumi, Atg17 recruits Atg9 to organize the pre-autophagosomal structure, *Genes Cells.*, 査読あり 14, 2009, 525-538
- ⑤T. Chahomchuen, K. Hondo, M. Ohsaki, T. Sekito and Y. Kakinuma, Evidence for Avt6 as a vacuolar exporter of acidic amino acids in *Saccharomyces cerevisiae* cells, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 査読あり 55, 2009, 409-417

[学会発表] (計30件)

- ①刀根潤一、出芽酵母液胞アミノ酸トランスポーターAvt1は広い基質特異性を有する、日本農芸化学会2012年度大会、2012年3月25日、京都女子大学
- ②手嶋博光、Functional expression of the *Arabidopsis thaliana* AVT3A gene for a tonoplast amino acid exporter in *Saccharomyces cerevisiae*, 第34回日本分子生物学会年会、2011年12月15日、パシフィコ横浜
- ③関藤孝之、オートファジーアミノ酸リサイクルにおける液胞アミノ酸トランスポーターAvt3/Avt4の機能、第84回日本生化学会大会、2011年9月24日、京都国際会館
- ④Takayuki Sekito, Amino acid recycling by vacuolar amino acid transporters Avt3 and Avt4 during autophagy of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*, 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会、2010年12月9日、10日、神戸ポートアイランド
- ⑤関藤孝之、出芽酵母の液胞アミノ酸排出系Avt3/Avt4の性質、第36回日本生体エネルギー研究会、2010年11月19日、大阪大学
- ⑥Soracom Chardwiriyaapreecha, Vacuolar amino acid transporters in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, 28th International Specialized Symposium on Yeasts, 2010年9月17日、Montien Riverside Hotel, Bangkok, Thailand
- ⑦関藤孝之、液胞内アミノ酸リサイクルにおける液胞アミノ酸トランスポーターの役割、

日本生体エネルギー研究会、2009年12月20日、旭川医科大学

⑧関藤孝之、The role of AVT vacuolar amino acid transporter family in amino acid recycling during autophagy in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*、第32回日本分子生物学会年会、2009年12月11日、パシフィコ横浜

⑨柿沼喜己、出芽酵母液胞 VBA アミノ酸トランスポーターの発現変動とその生理機能解析、第82回日本生化学会大会、2009年10月22日、神戸ポートアイランド

[その他]

ホームページ等

<http://web-abs.agr.ehime-u.ac.jp/mpg/mpg-j/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

関藤 孝之 (SEKITO TAKAYUKI)

愛媛大学・農学部・助教

研究者番号：20419857

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

藤木 友紀 (FUJIKI YUKI)

埼玉大学・大学院理工学研究科・助教

研究者番号：00414011

柿沼 喜己 (KAKINUMA YOSHIMI)

愛媛大学・農学部・教授

研究者番号：80134394