

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05383

研究課題名(和文) 酵母液胞におけるアミノ酸集積メカニズムの解明

研究課題名(英文) Investigation for the mechanism underlying accumulation of amino acids in yeast vacuoles

研究代表者

河田 美幸 (KAWANO-KAWADA, Miyuki)

愛媛大学・農学研究科・准教授

研究者番号：10454498

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々はお芽酵母液胞への塩基性アミノ酸蓄積に液胞膜タンパク質Vsb1が必須であることを明らかにしている。本研究では、Vsb1ホモログとして見出した分裂酵母SPAC24H6.11c(vsb1+)の機能解析を行い、その遺伝子破壊により液胞内塩基性アミノ酸量が顕著に減少し、酸性および中性アミノ酸量は有意な影響を受けなかったことから、本遺伝子産物がお芽酵母VSB1と同様に、液胞への塩基性アミノ酸蓄積に必須の遺伝子であることを示した。Vsb1ホモログは酵母だけでなく担子菌や不完全菌にも広く分布しており、Vsb1による液胞への塩基性アミノ酸蓄積は、真菌に共通する重要な生理的役割を担っていると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究とこれまでの研究により、酵母液胞への塩基性アミノ酸取り込み/排出に関わる液胞膜タンパク質がほぼ明らかとなった。本研究では液胞アミノ酸トランスポーターが細胞内の栄養応答シグナル伝達に影響を与えることを示唆する結果も得られており、液胞の新たな生理機能解明に向けた足がかりとなると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this research, we identified SPAC24H6.11c (vsb1+), which is essential for the accumulation of basic amino acids into vacuoles of *Schizosaccharomyces pombe*. We also found a conserved acidic residue in the first putative transmembrane domain, Asp174, is required for its activity. Vsb1 homologs are highly conserved among fungi, suggesting that the accumulation of basic amino acids in vacuoles by Vsb1 plays an important physiological role in these organisms.

研究分野：生化学 分子生物学

キーワード：酵母 液胞 アミノ酸 トランスポーター

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

出芽酵母の液胞は細胞内アミノ酸の約 50%を蓄積するアミノ酸貯蔵庫である。特に塩基性アミノ酸は細胞全体量のうち 70~90%が液胞内に存在し、液胞への集積が特に顕著である。塩基性アミノ酸の液胞への蓄積については、その生理的意義が一時的に検討されたが、関与する分子装置が不明で近年ほぼ手付かずであった。液胞内のアミノ酸は窒素飢餓条件など必要に応じてサイトゾルへ排出され、タンパク質合成にリサイクルされる。液胞膜を介した液胞内外へのアミノ酸輸送には、液胞膜局在性の複数のアミノ酸トランスポーターが重複して関わる。我々はこれまでに出芽酵母、分裂酵母、および植物 (*Arabidopsis*) の液胞アミノ酸トランスポーターの同定とその機能解析を進めてきたが、依然として未知の取込み系トランスポーターの存在が示唆されていた。しかし最近、長年不明であった酵母液胞への塩基性アミノ酸蓄積における必須因子 Vsb1 を同定し、液胞へのアミノ酸蓄積に関わるアミノ酸トランスポーターがほぼ全て明らかになった。

液胞/リソソームのアミノ酸トランスポーターに関する研究は近年飛躍的に進展してきた。さらに最近、動物細胞リソソーム内腔のアミノ酸が、細胞の成長・増殖・代謝などをコントロールする TORC1 キナーゼ複合体の活性に影響を与えることが示され(Wang S, *et al.*, Science, 2015)、リソソームが細胞の栄養応答に深く関与することが明らかになってきた。しかしその詳細な分子機構については未だ不明な点が多く残されている。加えて、酵母液胞へのアミノ酸蓄積に関わるアミノ酸トランスポーターと栄養応答との関係性は全くの未知であった。

2. 研究の目的

本研究は、塩基性アミノ酸の蓄積に関わる液胞膜タンパク質 Vsb1 と、中性アミノ酸およびヒスチジン取込みに関わる既知液胞アミノ酸トランスポーター Avt1 の機能解析を中心として、液胞へのアミノ酸集積機構を明らかにすることを目的とした。さらに、その栄養応答への関与を検討することで、アミノ酸応答シグナル伝達における液胞機能の解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) 液胞アミノ酸トランスポーターの活性評価

各トランスポーターの活性は、液胞画分のアミノ酸含量定量と、出芽酵母から単離した液胞膜小胞による ¹⁴C 標識アミノ酸の ATP 依存的な取り込み活性測定により評価した。

(2) Vsb1 の相互作用因子の探索

Vsb1 の N および C 末端親水性領域を pGBKT7 ベクターにクローニングし、pGADT7 ベクターにクローニングされた酵母 cDNA ライブラリーを用いた two-hybrid スクリーニングにより相互作用因子同定を試みた。さらに、近位依存性ピオチン標識法による相互作用因子同定のために、前後にリンカー配列を付加したピオチン化酵素 AirID (Kido K, *et al.*, eLife, 2020) を Vsb1 の C 末端親水性領域中に挿入し、活性を保持した AirID 挿入型 Vsb1 を構築した。AirID 挿入型 Vsb1 発現株をピオチン含有培地で培養し、抽出したピオチン化ペプチドを質量分析法により同定した。

(3) 野生株および VSB1 遺伝子破壊株における遺伝子発現をマイクロアレイ解析によって比較した。

4. 研究成果

(1)我々は出芽酵母液胞への塩基性アミノ酸蓄積に関して、液胞膜タンパク質 Vsb1 が必須であることを明らかにしている。本研究では、Vsb1 ホモログとして見出した分裂酵母 SPAC24H6.11c(*vsb1*)の機能解析を行った。GFP 融合型 Vsb1p が分裂酵母液胞膜に局在したことから、本遺伝子産物が新規液胞膜タンパク質であることを示した。分裂酵母において *vsb1* 遺伝子の単一破壊により液胞内塩基性アミノ酸量が顕著に減少した一方で、酸性および中性アミノ酸量は大きく変化しなかったことから、出芽酵母 VSB1 と同様に液胞への塩基性アミノ酸蓄積に関与する遺伝子であることが示唆された(図 1A)。トランスポーター活性の解析に使用する液胞膜小胞単離のため出芽酵母での *vsb1* 発現を試みたが、異種発現させた分裂酵母 Vsb1p は出芽酵母の液胞膜に局在せず、単離液胞膜小胞を用いた Vsb1p 輸送活性の生化学的解析は不可能だった。

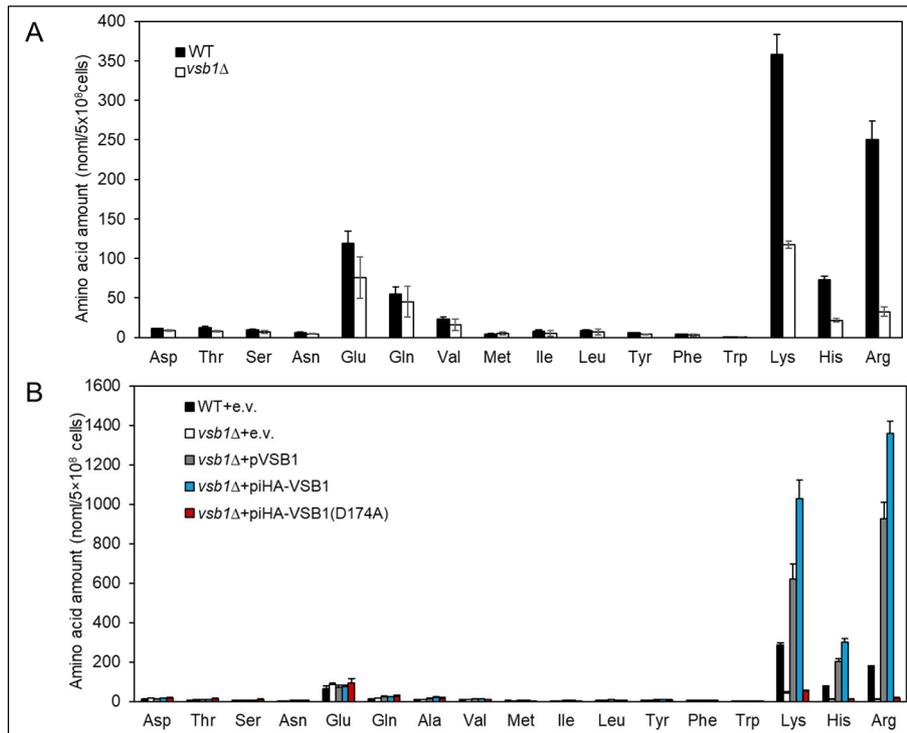


図 1. (A) YES 培地で対数増殖初期まで培養した分裂酵母野生株および *vsb1* 株の 10OD₆₆₀ 相当を集菌し、銅処理法により抽出した液胞画分のアミノ酸を L8900 高速アミノ酸分析計(日立)により定量した。(B) EMM(-Leu)培地で対数増殖初期まで培養した分裂酵母野生株、*vsb1* 株、および野生型 *vsb1* または D174A 変異型 *vsb1* が過剰発現プラスミドを導入した *vsb1* 株について、液胞内アミノ酸量を(A)と同様に定量した。

出芽酵母 Vsb1 と分裂酵母 Vsb1p は推定膜貫通領域において特に保存性が高い。推定第一膜貫通領域内に保存されたアスパラギン酸残基のアラニン置換変異型 Vsb1p^(D174A) 過剰発現株では、液胞内塩基性アミノ酸量が回復しなかったことから、分裂酵母 Vsb1p の D174 残基が活性に関わる重要アミノ酸残基であることを示した(図 1B)。これらの結果をまとめ、分裂酵母液胞への塩基性アミノ酸蓄積における Vsb1 の機能について論文報告した。Vsb1 ホモログは酵母だけでなく担子菌や不完全菌にも広く分布しており(図 2)、動物や植物等の高等真核生物には存在しない。Vsb1 による液胞への塩基性アミノ酸蓄積は、真菌に共通する重要な生理的役割を担っていると考えられる。

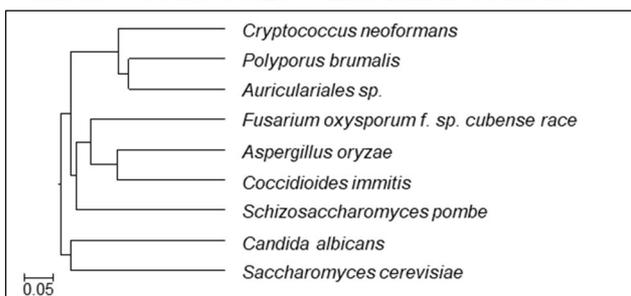
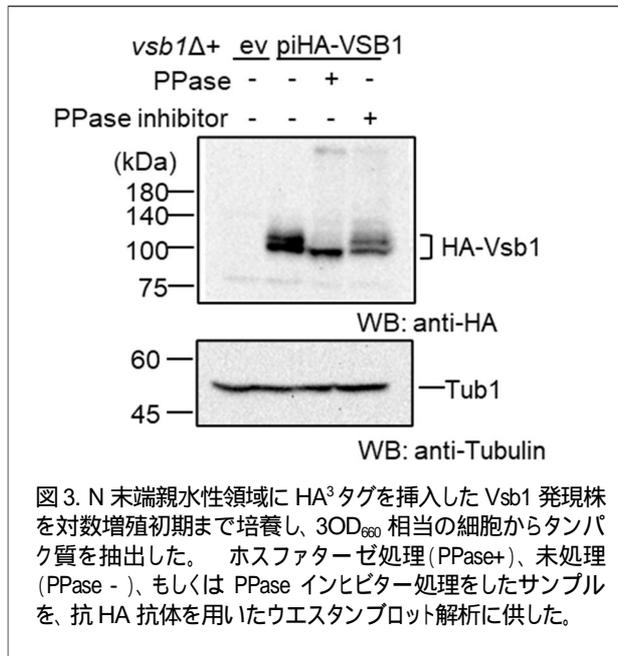


図 2. 真菌 Vsb1 ホモログのアミノ酸配列について ClustalX を用いてアライメントを作成し、近隣結合法により系統樹を作成した。

(2) Vsb1 はその N および C 末端に網羅的質量分析によって同定された複数のリン酸化部位を含む長い親水性領域を持つ。ウエスタンブロット解析により、栄養豊富条件ではホスファターゼ処理によって低分子量側に移行するバンドが検出されたことから(図 3)、Vsb1 は栄養豊富条件でリン酸化されていることが示唆された。そこでリン酸化が Vsb1 の活性調節などに関与する可能性を考え、キナーゼやホスファターゼを含む、Vsb1 の相互作用因子同定を試みた。

まず、Vsb1 の N または C 末端親水性領域を bait として酵母 two hybrid スクリーニングによる同定を試みたが、有望な候補は同定できなかった。そこで、近位依存性ピオチン化酵素 AirID を利用したピオチン標識法による相互作用因子同定を試みた。N もしくは C 末端にタグを付加した Vsb1 はそれが HA や FLAG などの小分子量タグであってもその機能を失うため、親水性領域中、他生物種ホモログ間での保存性が低い箇所に AirID を挿入した。AirID の両端にリンカー配列を付加することにより、部分的に活性を保持した AirID 挿入型 Vsb1 を構築できた。これをもとに Vsb1 近傍タンパク質のピオチン標識および質量分析によるピオチン化ペプチドの同定を行った結果、複数のキナーゼ/ホスファターゼを含む相互作用因子候補が同定された。今後、これら相互作用因子候補の遺伝子破壊株におけるアミノ酸定量などにより、リン酸化による Vsb1 活性調節の有無について検証する予定である。



(3) アルギニンの毒性アナログに対する感受性を指標として親水性領域欠損変異型 Vsb1 の活性を評価したところ、N 末端親水性領域の大部分が Vsb1 活性に必須ではない一方で、C 末端親水性領域は Vsb1 の細胞内レベルと活性に関わることが示唆された。

(4) 野生株および Vsb1 欠損株について、窒素飢餓および栄養再添加条件下でマイクロアレイ解析を行ったところ、Vsb1 欠損株において栄養再添加時にリン酸代謝関連遺伝子の発現が低下していた。我々は栄養再添加時のオートファジー減衰が Vsb1 欠損株で早期化することも見出している。これらの点については、細胞内のアミノ酸/リン酸応答シグナル伝達経路に対する Vsb1 の直接的作用と、Vsb1 欠損による液胞内の塩基性アミノ酸蓄積量減少による間接的作用の両面から検討を加える必要がある。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Ohnishi Shota, Kawano-Kawada Miyuki, Yamamoto Yusuke, Akiyama Koichi, Sekito Takayuki	4. 巻 86
2. 論文標題 A vacuolar membrane protein Vsb1p contributes to the vacuolar compartmentalization of basic amino acids in <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 763-769
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bbb/zbac041	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29件（うち招待講演 1件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 中城遥登・阿部創始・中川栞・濱田和・山本悠介・河田(河野)美幸・関藤孝之
2. 発表標題 酵母における液胞アミノ酸リサイクル低下の影響評価
3. 学会等名 第64回日本生化学会中国・四国支部例会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Mitomo H, Sato A, Yagi W, Nozawa A, Kosako H, Sawasaki T, Kawano-Kawada M, Sekito T
2. 発表標題 Regulation of yeast vacuolar amino acid transporter Avt1.
3. 学会等名 The Protein Island Matsuyama 2023, the 21st International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 尾坂夏味・川内凜子・山口翔吾・村尾奈美・河田(河野)美幸・関藤孝之
2. 発表標題 出芽酵母におけるリジンの生育阻害効果の作用機序について
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度中四国・西日本支部合同大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中川菜, 中城遥登, 阿部創始, 濱田和, 河田(河野)美幸, 関藤孝之
2. 発表標題 出芽酵母における液胞アミノ酸リサイクルの重要性について
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度中四国・西日本支部合同大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 寺下晴夏・山本悠介・佐藤有美香・石本晶也・野澤彰・小迫英尊・澤崎達也・関藤孝之・河田(河野)美幸
2. 発表標題 液胞アミノ酸トランスポーターAvt4のTORC1依存的なリン酸化について
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中川菜・中城遥登・阿部創始・濱田和・河田(河野)美幸・関藤孝之
2. 発表標題 液胞からのリジンリサイクルは窒素飢餓条件での生存に必須である
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 御供遥・佐藤明香音・八木新葉・岡崎真士・野澤彰・小迫英尊・澤崎達也・河田(河野)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Avt1の調節とその生理について
3. 学会等名 第40回YEAST WORKSHOP
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 川内凜子・大西祥太・尾坂夏味・市村悠・田上慶佳・西浦秀志・山本悠介・関藤孝之・河田(河野)美幸
2. 発表標題 液胞膜局在性トランスポーターVsb1の親水性領域の機能解析
3. 学会等名 第40回YEAST WORKSHOP
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中城遥登・中川栞・阿部創始・濱田和・河田(河野)美幸・関藤孝之
2. 発表標題 出芽酵母における液胞アミノ酸トランスポーター欠損が生育に与える影響
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 寺下晴夏・山本悠介・佐藤有美香・石本晶也・國米春香・野澤彰・小迫英尊・澤崎達也・関藤孝之・河田(河野)美幸
2. 発表標題 出芽酵母液胞アミノ酸トランスポーターAvt4のリン酸化による制御の検討
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 川内凜子・大西祥太・尾坂夏味・市村悠・西浦秀志・山本悠介・関藤孝之・河田(河野)美幸
2. 発表標題 出芽酵母SuIPファミリートランスポーターVsb1のリン酸化およびN末端親水性領域の機能について
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 河田(河野)美幸・野澤彰・小迫英尊・澤崎達也・関藤孝之
2. 発表標題 酵母液胞膜に局在するアミノ酸トランスポーター相互作用タンパク質の同定解析から迫る液胞アミノ酸輸送の制御機構
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 八木新葉・岡崎真士・河田(河野)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Avt3とAvt4の比較解析
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部第67 回講演会(例会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 御供遥・佐藤明香音・八木新葉・岡崎真士・河田(河野)美幸・関藤孝之
2. 発表標題 液胞にアミノ酸を取り込むトランスポーターAvt1の調節とその意義について.
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部第67 回講演会(例会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 御供遥, 佐藤明香音, 河田(河野)美幸, 関藤孝之.
2. 発表標題 酵母液胞アミノ酸トランスポーターAvt1の調節とその生理的意義の検討
3. 学会等名 第63回日本生化学会中国・四国支部例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 河田（河野）美幸，関藤孝之
2. 発表標題 酵母液胞膜の多様なアミノ酸トランスポーター
3. 学会等名 第16回トランスポーター研究会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yamamoto Y, Kawano-Kawada M, Sato Y, Ishimoto M, Nozawa A, Kosako H, Sawasaki T, Sekito T
2. 発表標題 The N-terminal hydrophilic region of Avt4 plays a regulatory role on its and TORC1 activity to maintain amino acid homeostasis.
3. 学会等名 The Protein Island Matsuyama, the 20th International Symposium. (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Sekito T, Kawano-Kawada M.
2. 発表標題 The analysis of vacuolar amino acid transporters involved in the autophagic amino acid recycling.
3. 学会等名 The 10th International Symposium on Autophagy. (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 御供遥、佐藤明香音、中城遥登、河田（河野）美幸、関藤孝之.
2. 発表標題 酵母液胞アミノ酸トランスポーターの発現誘導とその生理的役割について
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会.
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本悠介, 佐藤有美香, 石本晶也, 野澤彰, 小迫英尊, 澤崎達也, 関藤孝之, 河田(河野)美幸
2. 発表標題 液胞アミノ酸トランスポーターAvt4の輸送活性調節におけるN末端親水性領域による活性調節の役割について.
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大西祥太, 市村悠, 川崎裕美, 山本悠介, 秋山浩一, 関藤孝之, 河田(河野)美幸. 液胞への塩基性アミノ酸蓄積に関わるタンパク質の同定とその機能解析. 第45回日本分子生物学会年会
2. 発表標題 液胞への塩基性アミノ酸蓄積に関わるタンパク質の同定とその機能解析.
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本悠介, 佐藤有美香, 石本晶也, 野澤彰, 小迫英尊, 澤崎達也, 関藤孝之, 河田(河野)美幸.
2. 発表標題 液胞アミノ酸トランスポーターAvt4 N末端領域の機能とその分子機構解明.
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部第64回講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中城遥登, 瀧田和, 阿部創始, 中川栞, 河田(河野)美幸, 関藤孝之.
2. 発表標題 液胞アミノ酸リサイクルの生理的意義.
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部第64回講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大西祥太, 山本悠介, 秋山浩一, 関藤孝之, 河田(河野)美幸.
2. 発表標題 液胞塩基性アミノ酸蓄積における分裂酵母Vsb1pの役割について.
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部第61回講演会(例会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大西祥太, 市村 悠, 川崎裕美, 関藤孝之, 河田(河野)美幸.
2. 発表標題 液胞アミノ酸トランスポーターVsb1の基質輸送に関わるアミノ酸残基の探索.
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山本悠介, 佐藤明香音, 石本晶也, 野澤 彰, 小迫英尊, 澤崎達也, 関藤孝之, 河田(河野)美幸.
2. 発表標題 出芽酵母液胞アミノ酸トランスポーターAvt4の活性調節機構について.
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大西祥太, 市村 悠, 川崎裕美, 関藤孝之, 河田(河野)美幸.
2. 発表標題 液胞アミノ酸トランスポーターVsb1による基質輸送について.
3. 学会等名 第62回日本生化学会中国・四国支部例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 御供 遥, 佐藤明香音, 河田(河野)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Avt1の窒素飢餓に応答した発現調節.
3. 学会等名 第62回日本生化学会中国・四国支部例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山本悠介, 佐藤明香音, 石本晶也, 野澤 彰, 小迫英尊, 澤崎達也, 関藤孝之, 河田(河野)美幸.
2. 発表標題 液胞アミノ酸トランスポーターAvt4相互作用因子の同定.
3. 学会等名 第62回日本生化学会中国・四国支部例会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

遺伝子制御工学教育分野HP http://web.agr.ehime-u.ac.jp/~idenshi/index.html
--

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
---------	---------