

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07396

研究課題名(和文)液胞アミノ酸リサイクルシステムの調節機構解明

研究課題名(英文) Investigation for the regulatory mechanism of vacuolar amino acid recycle system

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：出芽酵母液胞アミノ酸トランスポーターAvt4の活性調節において窒素飢餓条件での発現誘導に転写因子Gln3とGat1が転写段階で重複して機能することと、栄養豊富条件ではAvt4のN末端親水性領域が翻訳後段階で抑制的に作用することを見出した。並行してシロイヌナズナ、分裂酵母、フザリウム菌のAvt4ホモログの解析も進め、これらが機能的にも保存され、液胞からのアミノ酸排出に機能することを報告した。さらにPQループタンパク質Ypq3がヒスチジン輸送活性を有する新規液胞アミノ酸トランスポーターであることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：On the research for regulation of Avt4, a vacuolar amino acid transporter in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*, we have found that its expression under nitrogen starvation condition is induced at transcriptional level by the transcription factors Gln3 and Gat1 in a redundant manner, and its activity to transport amino acids in nutrient-rich condition is repressed at post-translational level via the action of the N-terminal hydrophilic region. In parallel, we proceeded the analysis for the Avt4 homologs in the other organisms, and reported that the homologs in the plant (*Arabidopsis thaliana*), the fission yeast (*Schizosaccharomyces pombe*), and the plant pathogenic fungi (*Fusarium oxysporum*), are all involved in the vacuolar export of amino acids, showing that they are functionally conserved. We also revealed that Ypq3, a PQ loop protein, is a novel vacuolar amino acid transporter with histidine transport activity.

研究分野：分子生物学

キーワード：液胞 トランスポーター 出芽酵母 転写因子

1. 研究開始当初の背景

真核微生物および植物細胞内に発達する液胞は能動的にアミノ酸を取り込むとともにタンパク質分解によってアミノ酸を生成する。外部の窒素源が枯渇すると液胞内アミノ酸は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。こうした液胞内アミノ酸プールの形成・リサイクルの生理的意義を正確に理解するためには、液胞膜を介してアミノ酸を輸送するトランスポータータンパク質の同定解析が不可欠である。我々は酵母液胞アミノ酸トランスポーター *Avt3*、*Avt4*、*Avt7* がそれぞれ中性アミノ酸、中性/塩基性アミノ酸、中性アミノ酸全般を液胞外へと排出すること、さらに線虫リソソームアミノ酸トランスポーターの酵母ホモログ *Ypq1* が液胞膜で塩基性アミノ酸輸送に機能することを報告した。これら液胞アミノ酸トランスポーターの活性は栄養条件に応答して調節されると考えられるが、その報告は皆無であった。*Avt4* の N 末端には複数のリン酸化部位を含む約 300 アミノ酸残基の親水性領域が存在する。我々は *Avt4* が窒素飢餓条件で脱リン酸化されることから、活性調節を受けると考えた。N 末端の親水性領域内には 5 つの保存配列 (I~V) が見出され、このうち保存配列 V は液胞からのアミノ酸排出を抑制し、保存配列 I~IV は促進的に作用するとの結果を得ていた。さらに、14-3-3 タンパク質 (*Bmh1*) がこの領域と相互作用することを見出した。そこで、これらを相互に結びつけることにより、液胞アミノ酸トランスポーターとしては初の活性制御機構解明が可能と考えた。

2. 研究の目的

これまで同定されたアミノ酸トランスポーターの多くは栄養条件に応答した活性調節を受けることが示されているが、液胞のような内膜に局在するアミノ酸トランスポーターの活性調節は未だ報告がない。そこで本研究では液胞アミノ酸トランスポーター *Avt4* をモデルケースとしてその翻訳後レベルでの活性調節機構を明らかにすることを目的とした。さらに液胞のアミノ酸コンパートメンテーション機能を組み込んだ新たなアミノ酸代謝研究とその応用展開の基盤確立に向け、他生物種ホモログも含め、他の液胞アミノ酸トランスポーターについても同定解析を進めた。

3. 研究の方法

Avt4 のリン酸化状態が栄養条件に応答して変化することに着目し、推定リン酸化部位のアラニン置換変異型 *Avt4* および各種キナーゼ/ホスファターゼ欠損株での野生型 *Avt4* の活性を液胞内アミノ酸含量測定により評価した。また推定リン酸化部位が存在する N 末端親水性領域を欠損した変異型 *Avt4* について、液胞内アミノ酸含量測定とともに単離液胞膜小胞を用いてアミノ酸輸送活性の変化を検討した。*Avt4* の発現調節はリアルタイム PCR による mRNA 定量およびウエスタンブロット解析による GFP 融合 *Avt4* の検出によって検討した。

Ypq3 は発現量が低いことが分かったため、過剰発現し、液胞膜小胞の ATP 依存性ヒスチジン取り込み活性と、それに対する各種アミノ酸の阻害効果を調べた。出芽酵母以外の生物種の *Avt4* (*Avt3*) ホモログは各生物種細胞内での GFP 融合タンパク質の液胞膜局在を確認した後、出芽酵母で発現させ、単離液胞膜小胞のアミノ酸輸送活性への影響評価、および液胞内アミノ酸含量の変化についても検討した。

4. 研究成果

(1) *Avt4* N 末端親水性領域の推定リン酸化部位のアラニン置換により栄養豊富条件でも脱リン酸化された変異型 *Avt4* を発現すると、液胞内アミノ酸含量が窒素飢餓条件に比べ部分的に減少した (図 1)。また、プロテインホスファターゼ *Sit4* が窒素飢餓条件での *Avt4* の脱リン酸化に関与することを見出した。同条件での *SIT4* 破壊株の液胞内アミノ酸含量の減少は野生株に比べ部分的に抑制された。これらの結果より *Avt4* の窒素飢餓条件での活性化に脱リン酸化が関与することが示唆された。同時に、重複して機能する別の機構もしくは窒素飢餓条件特異的に発現する他因子の関与も示唆された。

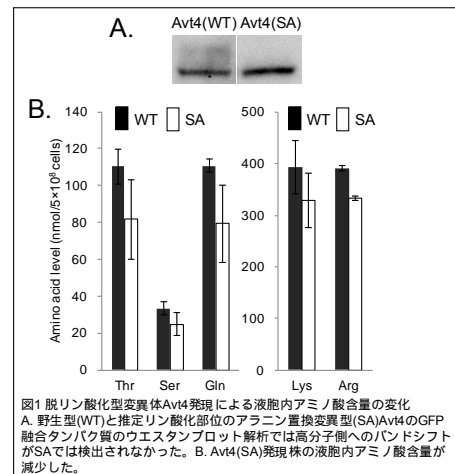


図1 脱リン酸化型変異型 *Avt4* 発現による液胞内アミノ酸含量の変化
A. 野生型 (WT) と推定リン酸化部位のアラニン置換変異型 (SA) *Avt4* の GFP 融合タンパク質のウエスタンブロット解析では高分子側へのバンドシフトが SA では検出されなかった。B. *Avt4* (SA) 発現株の液胞内アミノ酸含量が減少した。

(2) 染色体より発現した GFP 融合 *Avt4* の窒素飢餓条件での細胞内レベルの増加が、*Sit4* 欠損株では抑制されることを見出した。さらに *Sit4* 下流で機能する転写因子 *Gln3* と *Gat1* が *AVT4* の転写に重複して機能することを明らかにした。(1)の結果と合わせると、*Sit4* は転写と翻訳後の両段階で *Avt4* の活性調節に機能することが示唆された。さらに *AVT4* のプロモーター解析を進め、窒素飢餓条件での転写誘導に必要な領域を特定した。この領域内には転写因子 *Gln3* / *Gat1* の認識配列が存在し、変異導入により *AVT4* mRNA および細胞内 *Avt4* レベルが低下したことから、これら転写因子が *AVT4* の転写に直接的に関与することが示唆された。

(3) N 末端親水性領域を欠損した変異型 *Avt4* 発現株の液胞内アミノ酸含量および液胞膜小胞からのアミノ酸排出活性を調べた結果、N 末端親水性領域が栄養豊富条件で液胞からのアミノ酸排出を抑制することが示された。

(図2) これに対し、以前、N末端親水性領域中の保存配列の中には液胞からのアミノ酸排出に促進的に作用するものも見出されていた。共免疫沈降によるN末端親水性領域との相互作用タンパク質同定実験では、操作中の分解等により、良好な結果が得られなかったが、N末端親水性領域断片の過剰発現が液胞内アミノ酸含量を大きく変化させることを見出し、この断片にAvt4の活性制御因子が結合することが強く示唆された。

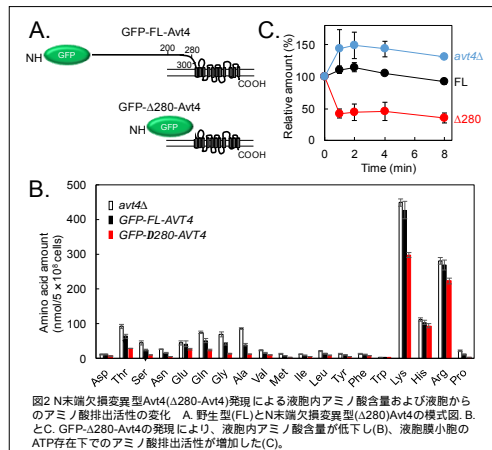


図2 N末端欠損変異型Avt4(Δ280-Avt4)発現による液胞内アミノ酸含量および液胞からのアミノ酸排出活性の変化 A. 野生型(FL)とN末端欠損変異型(Δ280)Avt4の模式図、B. とC. GFP-Δ280-Avt4の発現により、液胞内アミノ酸含量が低下し(B)、液胞膜小胞のATP存在下でのアミノ酸排出活性が増加した(C)。

(4) 14-3-3 タンパク質であるBmh1と重複して機能するBmh2にオーキシン依存的分解タグであるAIDタグを付加し、*bmh1Δ*株においてオーキシン添加を添加すると液胞内中性/塩基性アミノ酸含量の大幅な減少を検出した。しかし、この減少はAvt4に依存しなかったことから、14-3-3 タンパク質のAvt4の活性への関与を示すには至らなかった。

(5) Avt4による基質輸送の速度論的解析に向けたプロテオリポソーム再構成のために、Avt4大量精製系の確立を試み、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系によって全長タンパク質と膜貫通領域を合成した。しかし活性評価に十分な発現量は得られず、さらなる条件検討が必要とされた。

(6) シロイヌナズナ、分裂酵母および植物病原菌(フザリウム菌)のAvtホモログがいずれも液胞膜に局在することを明らかにし、出芽酵母に発現させると単離液胞膜小胞のATP依存的アミノ酸排出活性が増加したことから、これらは機能的にも保存されていることが示唆された(図3)。また、分裂酵母ホモログのN末端親水性領域を欠損すると孢子形成効率が低下することを報告した。

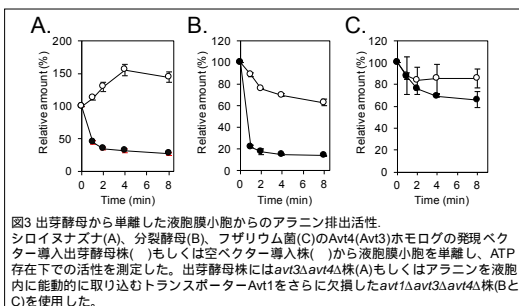


図3 出芽酵母から単離した液胞膜小胞からのアラニン排出活性。シロイヌナズナ(A)、分裂酵母(B)、フザリウム菌(C)のAvt4(Avt3)ホモログの発現ベクター導入出芽酵母株(○)もしくは空ベクター導入株(□)から液胞膜小胞を単離し、ATP存在下での活性を測定した。出芽酵母株にはavt3Δavt4Δ株(A)もしくはアラニンを液胞内に能動的に取り込むトランスポーター-Avt1をさらに欠損したavt1Δavt3Δavt4Δ株(BとC)を使用した。

(7) 他の液胞アミノ酸輸送系の同定解析を進め、Avt4と同じAAAPファミリーに属する

Avt1が中性アミノ酸全般とヒスチジンの液胞内への取り込みに機能するプロトン/アミノ酸アンチポーターであることと、液胞膜局在性PQループタンパク質Ypq3がヒスチジン輸送活性を有することを報告した。

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)

Yuki Fujiki, Hiromitsu Teshima, Shinji Kashiwao, Miyuki Kawano-Kawada, Yoshinori Ohsumi, Yoshimi Kakinuma, Takayuki Sekito, Functional identification of AtAVT3, a family of vacuolar amino acid transporters, in *Arabidopsis*, *FEBS Lett.*, 査読あり 591, 2017, 5-15

関藤孝之, 柿沼喜己, 液胞/リソソーム膜を介したアミノ酸輸送の分子機構, *化学と生物*(日本農芸化学会和文誌), 査読なし 5, 2016, 324-334

Miyuki Kawano-Kawada, Soracom Chardwiriyaapreecha, Kunio Manabe, Takayuki Sekito, Koichi Akiyama, Kaoru Takegawa, Yoshimi Kakinuma, The amino-terminal hydrophilic region of the vacuolar transporter Avt3p is dispensable for the vacuolar amino acid compartmentalization of *Schizosaccharomyces pombe*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 査読あり 80, 2016, 2291-2297

Kunio Manabe, Miyuki Kawano-Kawada, Koichi Ikeda, Takayuki Sekito, Yoshimi Kakinuma, Ypq3p-dependent histidine uptake by the vacuolar membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 査読あり 80, 2016, 1125-1130

Miyuki Kawano-Kawada, Pongsanat Pongcharoen, Rieko Kawahara, Mayu Yasuda, Takashi Yamasaki, Koichi Akiyama, Takayuki Sekito, Yoshimi Kakinuma, Vba4p, a vacuolar membrane protein, is involved in the drug resistance and vacuolar morphology of *Saccharomyces cerevisiae*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 査読あり 80, 2016, 279-287

Soracom Chardwiriyaapreecha, Kunio Manabe, Miyuki Kawano-Kawada, Takayuki Sekito, Siriporn Lunprom, Koichi Akiyama, Kaoru Takegawa, Yoshimi Kakinuma, Functional expression and characterization of *Schizosaccharomyces pombe* Avt3p as a vacuolar amino acid exporter in *Saccharomyces cerevisiae*, *PLoS One*, 査読あり 10, 2015, e0130542

Siriporn Lunprom, Pongsanat Pongcharoen, Takayuki Sekito, Miyuki Kawano-Kawada, Yoshimi Kakinuma, Koichi Akiyama, Characterization of vacuolar amino acid transporter from *Fusarium oxysporum* in

Saccharomyces cerevisiae, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 査読あり 79, 2015, 1972-1979

Junichi Tone, Ayumi Yoshimura, Kunio Manabe, Nami Murao, Takayuki Sekito, Miyuki Kawano-Kawada, Yoshimi Kakinuma, Characterization of Avt1p as a vacuolar proton/amino acid antiporter in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 査読あり 79, 2015, 782-789

〔学会発表〕(計 28 件)

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: 液胞アミノ酸トランスポーターAvt4 の発現調節と N 末端親水性領域を介した活性調節について、日本農芸化学会 2018 年度大会、2018 年 3 月 16 日、名城大学(愛知県名古屋)

上田大資, 津山愛美, 笠井瑠美, 関藤孝之, 河田美幸: 分裂酵母 PQ ループファミリー Stm1 の細胞内局在とアミノ酸輸送活性について、日本農芸化学会 2018 年度大会、2018 年 3 月 16 日、名城大学(愛知県名古屋)

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: 出芽酵母液胞アミノ酸トランスポーターAvt4 の転写/翻訳後段階での活性調節、Conbio2017, 2017 年 12 月 8 日、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

川崎祐美, 丸橋優那, 市村悠, 関藤孝之, 河田美幸: 出芽酵母新規液胞トランスポーターの同定と機能解析、第 35 回 YEAST WORKSHOP, 2017 年 11 月 24 日、レグザムホール(香川県高松市)

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: 出芽酵母 Ypq2 の PQ モチーフアラニン置換体の解析、第 35 回 YEAST WORKSHOP, 2017 年 11 月 24 日、レグザムホール(香川県高松市)

上田大資, 津山愛美, 笠井瑠美, 関藤孝之, 河田美幸: 分裂酵母液胞 PQ ループタンパク質 Stm1 によるアミノ酸輸送について、第 35 回 YEAST WORKSHOP, 2017 年 11 月 24 日、レグザムホール(香川県高松市)

津山愛美, 上田大資, 原田悠希, 笠井瑠美, 関藤孝之, 河田美幸: 出芽酵母及び分裂酵母の液胞 PQ-loop タンパク質の構造および機能について、第 8 回 愛媛微生物学ネットワークフォーラム、2017 年 10 月 28 日、愛媛大学情報総合メディアセンター(愛媛県松山市)

杉本航, 山縣里奈, 池田紘一, 真鍋邦男, 武村聡一郎, 河田美幸, 関藤孝之: 出芽酵母液胞膜局在性トランスポーターYpq3 のヒスチジンに応答した細胞内レベルの変化について、第 8 回 愛媛微生物学ネットワークフォーラム、2017 年 10 月 28 日、愛媛大学情報総合メディアセンター(愛媛県松山市)

関藤孝之: 液胞膜-未開のトランスポーターワールドの入り口にて、日本農芸化学会中四国支部第 26 回若手研究者シンポジウム「農

芸化学の新潮流を探る」, 2017 年 10 月 7 日、酒類総合研究所(広島県東広島市)

村上瑛夢, 杉本航, 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: 出芽酵母液胞アミノ酸トランスポーターAvt4 の合成と合成後における調節について、日本農芸化学会 2016 年度大会、2017 年 3 月 18 日、京都女子大学(京都府京都市)

池田紘一, 真鍋邦男, 山縣里奈, 河田美幸, 関藤孝之: 出芽酵母液胞膜タンパク質 Ypq2 と Ypq3 の機能解析、第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 12 月 1 日、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

山口翔悟, 村尾奈美, 河田美幸, 関藤孝之: 出芽酵母のリジンによる生育阻害の分子機構、第 34 回 YEAST WORKSHOP, 2016 年 11 月 5 日、島根大学松江キャンパス(島根県松江)

池田紘一, 真鍋邦男, 山縣里奈, 河田美幸, 関藤孝之: PQ ループタンパク質 Ypq1, Ypq2, Ypq3 の機能解析、第 34 回 YEAST WORKSHOP, 2016 年 11 月 5 日、島根大学松江キャンパス(島根県松江)

山縣里奈, 池田紘一, 真鍋邦男, 武村聡一郎, 杉本航, 河田美幸, 関藤孝之: 液胞ヒスチジントランスポーターYpq3 のアミノ酸に応答した細胞内レベルの変化について、第 34 回 YEAST WORKSHOP, 2016 年 11 月 5 日、島根大学松江キャンパス(島根県松江)

兵頭美波, 児玉理美, 石本晶也, 佐藤有美香, 村上瑛夢, 河田美幸, 関藤孝之: 液胞アミノ酸トランスポーターAvt4 の活性調節について、第 34 回 YEAST WORKSHOP, 2016 年 11 月 5 日、島根大学松江キャンパス(島根県松江)

関藤孝之: 液胞膜局在性アミノ酸輸送体の多様性と多重性について、第 7 回愛媛微生物学ネットワークフォーラム、2016 年 10 月 29 日、松山大学 樋又キャンパス

兵頭美波, 児玉理美, 石本晶也, 佐藤有美香, 村上瑛夢, 河田美幸, 関藤孝之: 出芽酵母液胞アミノ酸トランスポーターAvt4 の窒素飢餓条件での細胞内レベル増加について、第 7 回愛媛微生物学ネットワークフォーラム、2016 年 10 月 29 日、松山大学樋又キャンパス(愛媛県松山市)

山縣里奈, 池田紘一, 真鍋邦男, 武村聡一郎, 杉本航, 河田美幸, 関藤孝之: 液胞ヒスチジントランスポーターYpq3 のヒスチジン応答性細胞内レベル変化の分子機構、第 7 回愛媛微生物学ネットワークフォーラム、2016 年 10 月 29 日、松山大学樋又キャンパス(愛媛県松山市)

Miyuki Kawano-Kawada, Kunio Manabe, Takayuki Sekito, Koichi Ikeda, Yoshimi Kakinuma: The role of Ypq proteins in the transport of basic amino acids in vacuoles of *Saccharomyces cerevisiae*, 14th International Congress on Yeasts, 2016 年 9 月 11 日-15 日、Awaji Yumebutai International Conference

Center (兵庫県淡路市)

Takayuki Sekito, Niniko Yamashita, Atsushi Yamanaka, Naoko Sugimoto, Miyuki Kawano-Kawada, Yoshimi Kakinuma :

Involvement of vacuolar amino acid recycling in sporulation of *Saccharomyces cerevisiae*, 14th International Congress on Yeasts, 2016年9月11日-15日, Awaji Yumebutai International Conference Center (兵庫県淡路市)

②山下に子、山中敦詞、杉本直子、宮西遥香、河田美幸、関藤孝之、柿沼喜己 : 窒素飢餓条件における出芽酵母液胞アミノ酸トランスポーターAvt6の機能解析、第57回日本生化学会中国・四国支部例会、2016年5月28日、高知大学医学部(高知県南国市)

②山口翔吾、國米春香、兵頭美波、村尾奈美、河田美幸、関藤孝之、柿沼喜己 : 出芽酵母におけるリジンにตอบสนองしたTORC1活性の変化、日本農芸化学会2016年度大会、2016年3月28日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

②池田紘一、真鍋邦男、山縣里奈、河田美幸、関藤孝之、柿沼喜己 : 出芽酵母液胞膜タンパク質Ypq3のアミノ酸輸送活性及び発現調節、日本農芸化学会2016年度大会、2016年3月28日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

②真鍋邦男、池田紘一、中村恭輔、河田美幸、関藤孝之、柿沼喜己 : 出芽酵母液胞アルギニン/ヒスチジン交換輸送体の同定、第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会、2015年12月3・4日、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

②山口翔吾、村尾奈美、國米春香、河田美幸、関藤孝之、柿沼喜己 : リジン添加による出芽酵母生育阻害へのTORC1の関与について、第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会、2015年12月1日、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

②國米春香、児玉理美、石本晶也、佐藤有美香、河田美幸、関藤孝之、柿沼喜己 : 出芽酵母液胞アミノ酸トランスポーターAvt4のリン酸化による活性調節、第6回愛媛微生物学ネットワークフォーラム、2015年10月24日、松山大学薬学部(愛媛県松山市)

②山口翔吾、村尾奈美、國米春香、河田美幸、関藤孝之、柿沼喜己 : リジン添加による出芽酵母生育阻害の分子機構、第56回日本生化学会、中国・四国支部例会、2015年5月30日、島根大学大学会館(島根県松江市)

②石本晶也、佐藤有美香、児玉理美、本藤加奈、河田美幸、関藤孝之、柿沼喜己 : 出芽酵母液胞からアミノ酸を排出するトランスポーターAvt4の活性調節、第56回日本生化学会、中国・四国支部例会、2015年5月30日、島根大学大学会館(島根県松江市)

〔図書〕(計 1件)

大隅良典、吉森保、水島昇、中戸川仁 : オートファジー 分子メカニズムから病態の解

明まで、2017年、南山堂

〔その他〕
ホームページ等
<https://a5340.webnode.jp>

6. 研究組織

(1) 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

(3) 連携研究者

柿沼 喜己 (KAKINUMA YOSHIMI)
愛媛大学・農学部・教授
研究者番号 : 80134394
河田 美幸 (KAWADA MIYUKI)
愛媛大学・農学研究科・准教授
研究者番号 : 10454498