

令和 3 年 6 月 3 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：18K05440

研究課題名(和文) 液胞アミノ酸輸送の全容解明に向けたPQループファミリートランスポーターの機能解析

研究課題名(英文) Characterization of PQ-loop proteins involved in the vacuolar amino acid compartmentalization in yeasts

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究における酵母液胞PQループタンパク質のアミノ酸輸送機構の解析により、長年実体が不明であった単離液胞膜小胞で検出されるアルギニン/ヒスチジン交換輸送活性がYpq2に依存すること、また、分裂酵母のStm1が新規液胞PQループタンパク質として液胞アミノ酸輸送に関わることが明らかになった。さらに、生理的条件下ではPQループタンパク質が液胞からのアミノ酸排出に関わることを示唆する結果を得たことから、酵母液胞からのアミノ酸排出に関わるトランスポーター群を明確にすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

酵母の液胞は細胞内遊離アミノ酸の巨大な貯蔵庫であり、液胞アミノ酸含量は細胞の総アミノ酸量を大きく左右する。液胞内外へのアミノ酸輸送に関わる輸送タンパク質群の全体像解明により、液胞膜を介したアミノ酸輸送のコントロールによる、アミノ酸を高度もしくは選択的に蓄積した有用酵母株の創製が期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the mechanism of amino acid transport by yeast vacuolar PQ-loop proteins and indicated that the exchange activity of arginine/histidine across the vacuolar membrane of *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on Ypq2. Furthermore, we identified Stm1 of *Schizosaccharomyces pombe* as a novel vacuolar membrane protein involved in the transport of basic amino acids. From the results of amino acid determination of vacuolar fractions of the mutants disrupted genes encoding these PQ-loop proteins, it was suggested that these vacuolar PQ-loop proteins operate at the vacuolar membrane for the export of basic amino acids, especially arginine, from vacuoles.

研究分野：応用生物化学

キーワード：酵母 液胞 トランスポーター アミノ酸 PQ-loopタンパク質

1. 研究開始当初の背景

栄養豊富条件において生育している酵母においては、細胞内の遊離アミノ酸のうち約 50%が液胞に蓄積しており、特に塩基性アミノ酸はその大部分が液胞内に存在している。一方で飢餓条件では、オートファジーによりサイトゾル成分が液胞へと運ばれ、タンパク質分解により生じたアミノ酸が、液胞内に蓄積されていたアミノ酸とともにサイトゾルへと排出された後、タンパク質合成に再利用される。液胞は、アミノ酸を貯蔵／供給する巨大コンパートメントと言える。液胞膜を介したアミノ酸の移動は液胞膜局在性のアミノ酸トランスポーターによって行われることが知られている。したがって、液胞アミノ酸輸送を総合的に理解し、それに関わるトランスポーター群の基質特異性や輸送活性などをコントロールすることは、アミノ酸を高度もしくは選択的に蓄積した有用酵母株の創製につながり、食品の栄養価強化・風味改善に対する新規アプローチとなると考えられる。しかし、液胞アミノ酸輸送に複数のトランスポーターが関与することが分かっていたものの、未同定・未解析のトランスポーターが複数存在し、既知トランスポーターに関しても、その活性化や輸送の制御に関わる因子はほとんど特定されていなかった。液胞アミノ酸輸送の全体像を明らかにするためには、新規トランスポーターの同定と、個々のトランスポーターの輸送メカニズムおよび活性制御機構の解明が必須である。

そこで本研究では液胞 PQ ループタンパク質に着目した。PQ ループタンパク質は、近縁の植物糖輸送体 SWEET (SLC50)と同様に、近年トランスポーターとして認識された比較的新しいトランスポーターファミリーに属する。我々のグループは、遺伝子多重破壊等の遺伝学的解析が容易であるという酵母の利点を生かして、酵母 PQ ループタンパク質の液胞塩基性アミノ酸輸送への関与を明らかにし、その機能解析を進めていた。哺乳類 PQ ループタンパク質のシスチノシン¹⁾および PQLC2 (SLC66A1)²⁾は疾患／治療薬開発との関連が国外のグループにより示されており、病態の理解や治療薬開発など、幅広い領域において PQ ループタンパク質の機能解明が望まれていた。

2. 研究の目的

本研究は、液胞アミノ酸輸送の全容解明に向けて、液胞 PQ ループタンパク質によるアミノ酸輸送機構を解明し、液胞アミノ酸コンパートメントの形成および調節における役割を明らかにすることを目的とした。トランスポーターの輸送機構解明には輸送反応の生化学的解析が不可欠である。しかし、細胞内膜系に局在するトランスポーターは、生細胞を用いた活性評価が難しく、オルガネラの分画もしくはトランスポーターの精製を必要とする場合が多い。特に液胞膜に局在するトランスポーターは、液胞を破碎する際の液胞内プロテアーゼによる目的タンパク質分解が障害となり、大量精製が困難な場合が多い。PQ ループファミリーの機能解析のために、これまで液胞プロテアーゼ遺伝子欠損株や大腸菌を用いた Ypq2 の発現および精製を試みてきたが、いずれにおいても生化学的解析に利用可能なタンパク質量は得られていなかった。そこで、対象とする液胞トランスポーターを比較的容易に分画できる細胞膜へと局在変化させることにより、液胞トランスポーターの簡便な活性評価および精製系構築を試みた。

液胞膜を介したアミノ酸輸送は胞子形成など酵母の生理特性と密接に関連しており、これを指標としたトランスポーターの活性評価が可能である。しかし出芽酵母では複数のアミノ酸トランスポーターが重複して機能しており、個々の生理機能の評価が難しい。我々のグループでは、比較的ゲノムサイズが小さく遺伝子の機能重複が少ない分裂酵母を用いた液胞アミノ酸トランスポーターの機能評価系を確立している³⁾。分裂酵母の液胞 PQ ループタンパク質は Stm1 一つである。分裂酵母 *stm1+* 遺伝子破壊株利用して、液胞 PQ ループタンパク質の生理機能解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) 哺乳類 PQ-loop タンパク質のリソソーム局在シグナルを参考に、Ypq2 についてリソソーム局在配列の類似配列、末端欠失、もしくはランダム変異導入により変異型 Ypq2 を作製し、液胞膜へのタンパク質輸送に関わる CPY/ALP 経路の遺伝子破壊株などに発現させ、活性を維持した細胞膜局在型 Ypq2 変異体の単離を試みた。

(2) 液胞アミノ酸トランスポーター遺伝子多重破壊株に *YPQ1*、*YPQ2*、および *YPQ3* それぞれを発現さ

せた株より液胞膜小胞を単離し、アミノ酸輸送活性の速度論的解析を行った。

(3)PQ-loop タンパク質の生理機能解析に関して、分裂酵母液胞 PQ ループタンパク質をコードする *stm1+* 遺伝子の破壊株を作製し、液胞内アミノ酸含量、胞子形成能、栄養飢餓などの各種ストレス耐性に対する遺伝子破壊の影響を調べた。

4. 研究成果

(1) 出芽酵母 Ypq2 について細胞膜局在型変異体の作製を試みた。哺乳類 PQLC2 のリソソーム局在モチーフ類似配列をアラニンへ変異させた GFP-Ypq2(LA) を作製した結果、液胞膜局在が不完全になったことから、Ypq2 の当該モチーフが液胞膜局在に関与することが示唆された。しかし目的の細胞膜局在型 Ypq2 は取得できなかったため、単離液胞膜小胞を用いた輸送活性評価系を改良することにした。

(2) 出芽酵母の単離液胞膜小胞を用いた解析から、以前よりアルギニンとヒスチジンの交換輸送活性が検出されていたが⁴⁾、その分子実体は不明であった。我々のグループでは、出芽酵母液胞 PQ-loop タンパク質のうち Ypq1 が液胞へのリジンとアルギニンの取込みに、Ypq3 がヒスチジンの取込みに関わることを示してきた。今回、Ypq2 の基質輸送メカニズム解明を目指し、単離液胞膜小胞を用いた輸送活性の反応速度論的解析を進めた結果、以前より示されていた液胞膜を介したアルギニン/ヒスチジン交換輸送活性が、Ypq2 に依存することを明らかにした。さらに、このアミノ酸交換輸送活性においては Ypq2 の PQ モチーフ中の Pro 残基が活性に必須であることを示した(図 2)⁵⁾。また、Ypq2 はプロトン濃度勾配もしくはヒスチジン濃度勾配の、2 つのエネルギー共役機構でそれぞれ駆動されることが示唆された。しかし、野生株と *YPQ2* 遺伝子破壊株(いずれもアルギニン合成酵素遺伝子を破壊した株)の間に、アルギニン欠乏培地における生存率についてほとんど差が見られなかったことから、液胞膜を介したアミノ酸交換輸送の生理的重要性を含め、*in vivo* における Ypq2 の輸送機能についてはさらに解析が必要である。

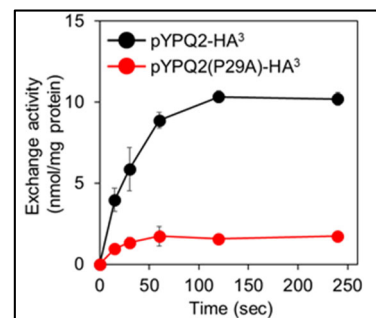


図 2. Arg/His 交換輸送活性
His を含有した液胞膜小胞を単離し、希釈により膜内外の His 濃度勾配を形成させ、¹⁴C Arg 添加により反応を開始した。P29A: Ypq2 PQ モチーフ変異

(3) 液胞 PQ ループタンパク質が 3 種存在する出芽酵母に対して、分裂酵母では液胞 PQ ループタンパク質をコードする遺伝子が報告されていなかった。Ypq1、Ypq2、および Ypq3 とのアミノ酸配列の相同性および系統解析から、分裂酵母液胞 PQ-loop タンパク質をコードする候補遺伝子として、*stm1+* を見出した。本遺伝子産物は以前に細胞膜局在の GPCR であると報告されていたが、GFP 融合型 Stm1 の局在解析から、Stm1 が分裂酵母液胞膜に局在することを明らかにした。また *stm1+* 遺伝子破壊により、液胞内の塩基性アミノ酸量が大きく変動したことから(図 3)、Stm1 が液胞への塩基性アミノ酸蓄積、特に液胞からのアルギニン排出に関与することが示唆された。さらに、*stm1+* を過剰発現させた出芽酵母から液胞膜小胞を単離し、アミノ酸輸送活性を測定した結果、*stm1+* 発現依存的に有意なアミノ酸輸送活性が検出された。以上の結果から、分裂酵母液胞 PQ ループタンパク質 Stm1 が液胞膜を介したアミノ酸輸送に関与することが強く示唆された⁶⁾。

しかし、本遺伝子の単一破壊株では窒素飢餓などの各種ストレス耐性試験において顕著な表現形が見出せなかった。これは、遺伝子重複が比較的少ない分裂酵母においても、他の液胞アミノ酸排出系トランスポーターである SpAvt3 などが機能していることが原因として考えられたため、今後これらトランスポーターと Stm1 の多重破壊株を作製し、解析を進める予定である。

(4) 上記の研究を進める中で、出芽酵母液胞への塩基性アミノ酸蓄積に、Avt ファミリーおよび Ypq タンパク質以外の、未同定のトランスポーターが寄与している可能性が強く示唆された。GFP 融合型トランス

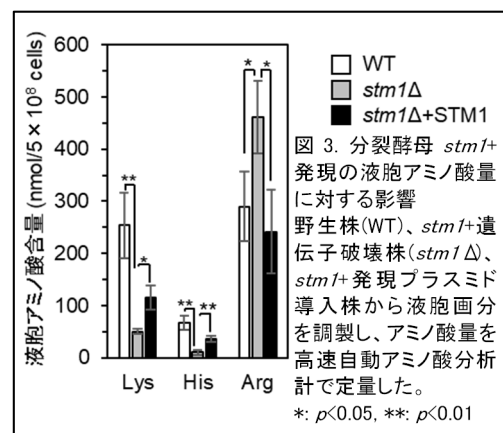


図 3. 分裂酵母 *stm1+* 発現の液胞アミノ酸量に対する影響
野生株(WT)、*stm1+* 遺伝子破壊株(*stm1*Δ)、*stm1+* 発現プラスミド導入株から液胞画分を調製し、アミノ酸量を高速自動アミノ酸分析計で定量した。
*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$

ポーター候補タンパク質の網羅的局在解析と液胞アミノ酸含量測定により、新規液胞膜タンパク質である Ygr125w/Vsb1 が、出芽酵母液胞への塩基性アミノ酸蓄積に関わる主要タンパク質であることを発見した⁷⁾。

本研究における酵母液胞 PQ ループタンパク質によるアミノ酸輸送機構の解析により、単離した液胞膜小胞で検出される、*in vitro* におけるアルギニン/ヒスチジン交換輸送活性が Ypq2 に依存すること、また、分裂酵母の Stm1 が新規液胞 PQ ループタンパク質として液胞アミノ酸輸送に関わることを示された。さらに、生理的条件下では PQ ループタンパク質が液胞からのアミノ酸排出活性に関わることを示唆する結果を得たことから、酵母液胞からのアミノ酸排出に関わるトランスポーター群を明確にすることができた。さらに、出芽酵母の新規液胞膜タンパク質 Ygr125w / Vsb1 の塩基性アミノ酸蓄積における重要性を明らかにした。前述のように、塩基性アミノ酸は液胞内に特に高度に蓄積するため、液胞膜に局在しこれらアミノ酸の輸送活性を有する PQ ループタンパク質および Vsb1 の機能解析は、液胞アミノ酸輸送の総合的理解と、液胞アミノ酸コンパートメンテーションの分子機構および生理機能の解明につながると期待できる。

引用文献

- 1) Cherqui S, *et al.*, *Mol Cell Biol*, 22, 7622-7632 (2002)
- 2) Jézégou A, *et al.*, *PNAS*, 110, E3434-E3443 (2012)
- 3) Kawano-Kawada M, *et al.*, *Biosci Biotechnol Biochem*, 80, 2291-2297 (2016)
- 4) Sato T, *et al.*, *J Biol Chem*, 259, 11509-11511 (1984)
- 5) Kawano-Kawada M, *et al.*, *Sci Rep*, 9, 15018 (2019)
- 6) Kawano-Kawada M, *et al.*, *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 1863, 183507 (2021)
- 7) Kawano-Kawada M, *et al.*, *Biosci Biotechnol Biochem*, 85, 2291-2297 (2021)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4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, 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 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/zbaa041	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, 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 Miyuki Kawano-Kawada, Kunio Manabe, Haruka Ichimura, Takumi Kimura, Yuki Harada, Koichi Ikeda, Shiho Tanaka, Yoshimi Kakinuma, Takayuki Sekito	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 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1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 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 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 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 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 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

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 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PQループタンパク質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 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

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

https://www.agr.ehime-u.ac.jp/academics/vital-function/applied-bioscience/ab09.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
連携研究者	関藤 孝之 (SEKITO Takayuki) (20419857)	愛媛大学・農学研究科・教授 (16301)	

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