

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 12 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：21K05507

研究課題名（和文）排出系液胞アミノ酸トランスポーターAvt4の調節と生理機能に関する研究

研究課題名（英文）The study on the regulation and the physiological role of a vacuolar amino acid exporter Avt4

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） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：近位依存性ビオチン標識により液胞アミノ酸トランスポーターAvt4の相互作用因子候補として同定したTORC1関連因子の欠損株でのAvt4の脱リン酸化と、Avt4のアラニン置換によるアミノ酸輸送活性亢進を検出した。その一方でAVT4破壊によるTORC1阻害剤耐性付与などTORC1の活性化も示され、Avt4とTORC1が相互に調節し合うことが示唆された。

Avt4と他の液胞アミノ酸トランスポーターの多重破壊により窒素飢餓条件下でのカタラーゼレベルが減少し、放射標識アミノ酸のタンパク質への取り込みも低下したことから、液胞からのアミノ酸排出が窒素飢餓条件下でのタンパク質合成に寄与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

液胞/リソソームアミノ酸輸送は細胞内アミノ酸ホメオスタシスに重要な役割を果たす。その基幹装置であるアミノ酸トランスポーターの同定に続く次の課題として、その活性調節機構について新たな知見を得た。さらにトランスポーターがTORC1によって制御される一方で、直接的にTORC1の制御にも関わることが示唆された。このことは栄養情報伝達下流で機能するトランスポーターがレセプターとして上流因子に作用する新たな機構モデルを提案している。またトランスポーター多重欠損による表現型発現機構について分子レベルでの知見が得られ、活性調節機構解明と合わせ当該分野の研究を加速させる基盤を構築することができた。

研究成果の概要（英文）：By proximity biotinylation method, TORC1 and its related factors were suggested to interact with Avt4, a vacuolar amino acid exporter. Deletion of those genes suppressed the phosphorylation of Avt4. Alanine substitution of phosphorylation sites in Avt4 reduced the vacuolar amino acids, implying the elevation of vacuolar amino acid export. The growth recovery in the presence of TORC1 inhibitor and the phosphorylation of the TORC1 substrate in AVT4 knockout cells suggested that Avt4 downregulates the TORC1 activity. These propose that Avt4 and TORC1 are mutually regulated.

As to physiological role of Avt4, the elevation of catalase level under nitrogen starvation was suppressed and the incorporation ¹⁴C-labelled valine into proteins was noticeably reduced by multiple deletion of vacuolar amino acid exporters including Avt4. These suggest that the vacuolar amino acid export substantially contributes to the maintenance of protein synthesis under nitrogen starvation.

研究分野：細胞生物学

キーワード：液胞 トランスポーター TORC1 オートファジー アミノ酸

1. 研究開始当初の背景

飢餓条件において、オートファジータンパク質分解によって液胞/リソソーム内に生じるアミノ酸はサイトソルに排出され、生存に不可欠なタンパク質合成にリサイクルされる。こうしたオートファジーによる分解産物リサイクルの根幹を担うのが液胞/リソソームからアミノ酸を排出するトランスポーターである。酵母では液胞にアミノ酸を取り込むトランスポーターも存在し、我々は排出系/取り込み系それぞれで複数のトランスポーターが重複して機能することを明らかにしてきた。これらトランスポーターはサイトソル中のアミノ酸濃度を好適に維持するために厳密な調節を受けているはずである。その機構解明は、液胞内アミノ酸の生理的意義の理解につながり、液胞アミノ酸輸送と他のアミノ酸代謝装置のクロストークにおいても学術的に新たな発見をもたらすことが期待できる。ところが液胞アミノ酸トランスポーターの調節機構は申請者が報告した転写誘導と他グループが発表したユビキチン化による積極的分解以外は報告がなかった。その原因として、液胞膜には取り込み系と排出系のトランスポーターが共存する他、同じ輸送方向のトランスポーター間でも機能が重複するため、個々のトランスポーターの遺伝子破壊では表現型が現れにくかったことがあげられる。しかし、我々のトランスポーター同定解析の積み重ねにより、トランスポーターを多重欠損することで窒素飢餓条件での生存率低下などの表現型が得られるようになり、液胞アミノ酸輸送の意義を問う環境が整いつつあった。加えて、液胞/リソソーム内のアミノ酸は単なる栄養としてだけでなく、栄養情報伝達の起点としても機能することが示唆され、その生理機能を多面的に探索する必要が生じていた。

2. 研究の目的

出芽酵母では液胞アミノ酸トランスポーターの同定が進捗し、生理機能へのアプローチが可能な段階に差し掛かっている。本研究ではこれまで多くの液胞アミノ酸トランスポーターを同定解析した優位性を活かし、トランスポーター多重破壊株の解析や液胞アミノ酸輸送の活性調節機構解明を通して、生理機能を理解するための基盤構築を目指した。また液胞アミノ酸トランスポーターは「調節される」だけでなく、情報伝達系の上流で他の因子を「調節する」可能性が示唆されている。本研究では単なる備蓄栄養ではない液胞内アミノ酸の新規機能についても検討した。

3. 研究の方法

・近位依存性ビオチン標識による相互作用タンパク質同定

液胞アミノ酸トランスポーターとビオチン化酵素(AirID)の融合タンパク質を出芽酵母に発現させ、アルカリ/TCA処理によって抽出したタンパク質のトリプシン分解試料から精製したビオチン化ペプチドを質量分析によって解析した。

・タンパク質合成活性評価

培地に¹⁴C標識バリンを添加し一定時間培養後、トリクロロ酢酸処理によってタンパク質を回収し測定した放射活性よりタンパク質に取り込まれた¹⁴C標識バリン量を算出した。同時に細胞に超純水を加えて煮沸後測定した放射活性を細胞に取り込まれた¹⁴C標識バリン量とし、サイトソル中のColdバリン量を測定・換算して細胞のタンパク質合成活性を一定時間当たりのタンパク質へのバリン取り込み量として算出した。

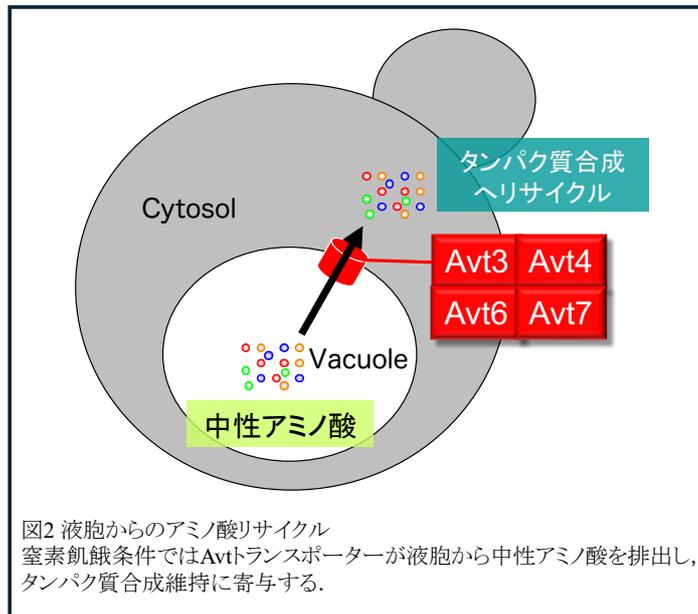
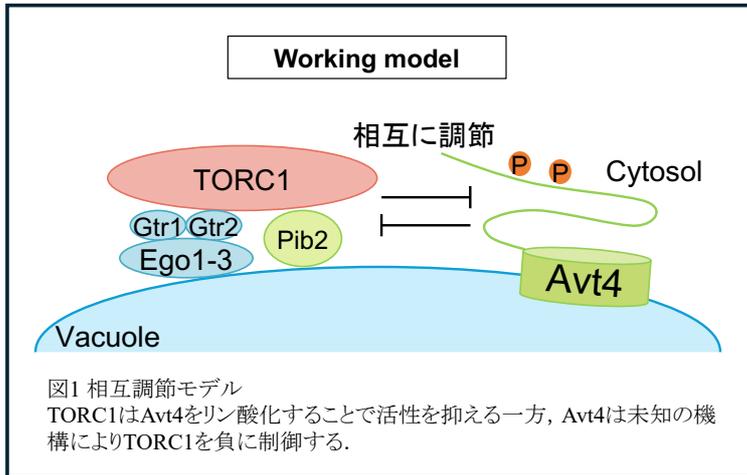
・液胞内アミノ酸含量測定

分裂酵母細胞を0.5 mM銅溶液で処理することにより、細胞膜を選択的に破壊しサイトソル中アミノ酸を洗浄除去した後、得られた液胞画分を煮沸処理して抽出したアミノ酸をアミノ酸自動分析計を用いて定量した。

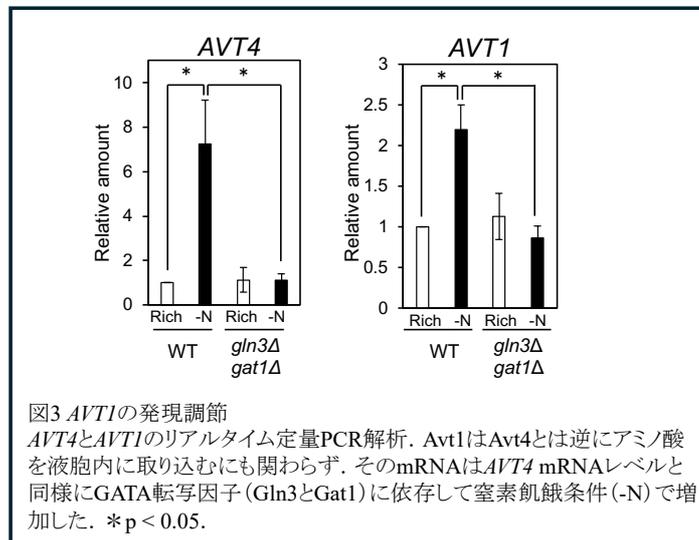
4. 研究成果

(1)液胞アミノ酸トランスポーターであるAvt4のN末端親水性領域200アミノ酸残基を欠損すると単離液胞膜小胞からのアラニン排出活性が失われるのに対し、280アミノ酸残基を欠損すると全長型より活性がむしろ亢進する。近位依存性ビオチン化酵素AirIDを付加した液胞アミノ酸トランスポーターAvt4の発現細胞をビオチン添加培地で培養し、ライセートより精製したビオチン化ペプチドを質量分析によって解析したところ、複数のTORC1関連タンパク質がAvt4の相互作用タンパク質候補として同定された。また、異なる栄養条件でのビオチン化ペプチドの解析より、TORC1関連タンパク質とAvt4の相互作用が栄養条件に応じて変化することを示唆する結果も得た。さらにTORC1関連因子の欠損株においてAvt4の脱リン酸化を検出し、Avt4リン酸化部位のアラニン置換によるアミノ酸輸送活性の亢進を示唆する結果も得た。その一方でAVT4破壊によるTORC1阻害剤への耐性付与などからTORC1の活性化が示され、Avt4とTORC1が相互に調節し合うことが示唆された(図1)。

Avt4の生理的役割については、他のAvt液胞アミノ酸トランスポーターとの多重欠損により、窒素飢餓条件でオートファジー依存的に増加するはずのカタラーゼの細胞内レベルが増加せず、放射標識アミノ酸のタンパク質への取り込みも低下したことから、液胞からのアミノ酸排出が窒素飢餓条件でのタンパク質合成維持に寄与することが示唆された(図2)。



(2) Avt1 は Avt4 とは逆向きにアミノ酸を輸送し、液胞内へアミノ酸を取り込む。液胞内へのアミノ酸取り込みは余剰なアミノ酸が存在する栄養豊富条件で活性化すると考えられたが、予想に反して Avt4 同様、飢餓条件で GATA 因子依存的に発現が誘導されることを見出した(図 3)。さらにクロマチン免疫沈降実験により GATA 転写因子が直接的に *AVT1* の転写を調節することが示唆され、これら結果をまとめ学会で報告した。Avt1 は細胞中のアミノ酸ストレスの緩和に働くことで細胞寿命に寄与している可能性が報告されており、Avt1 の発現誘導との関係について現在解析を進めている。



(3) 出芽酵母の新規液胞アミノ酸トランスポーターとして当研究室が報告した Vsb1 の分裂酵母ホモログ SpVsb1 の液胞膜局在を明らかにし、その遺伝子破壊および過剰発現による液胞内塩基性アミノ酸含量の変化を検出することにより、Vsb1 が分裂酵母において機能的にも保存されていることを明らかにした(図 4)。さらに、出芽酵母 Vsb1 の液胞内塩基性アミノ酸蓄積に必須な保存アスパラギン酸残基(D223)に相当する SpVsb1 の D174 のアラニン置換が分裂酵母液胞内の塩基性アミノ酸含量を著しく低下させたことから(図 4)、種を越えてアミノ酸輸送に関わる重要アミノ酸残基であることが示され、これら結果をまとめて論文発表した。

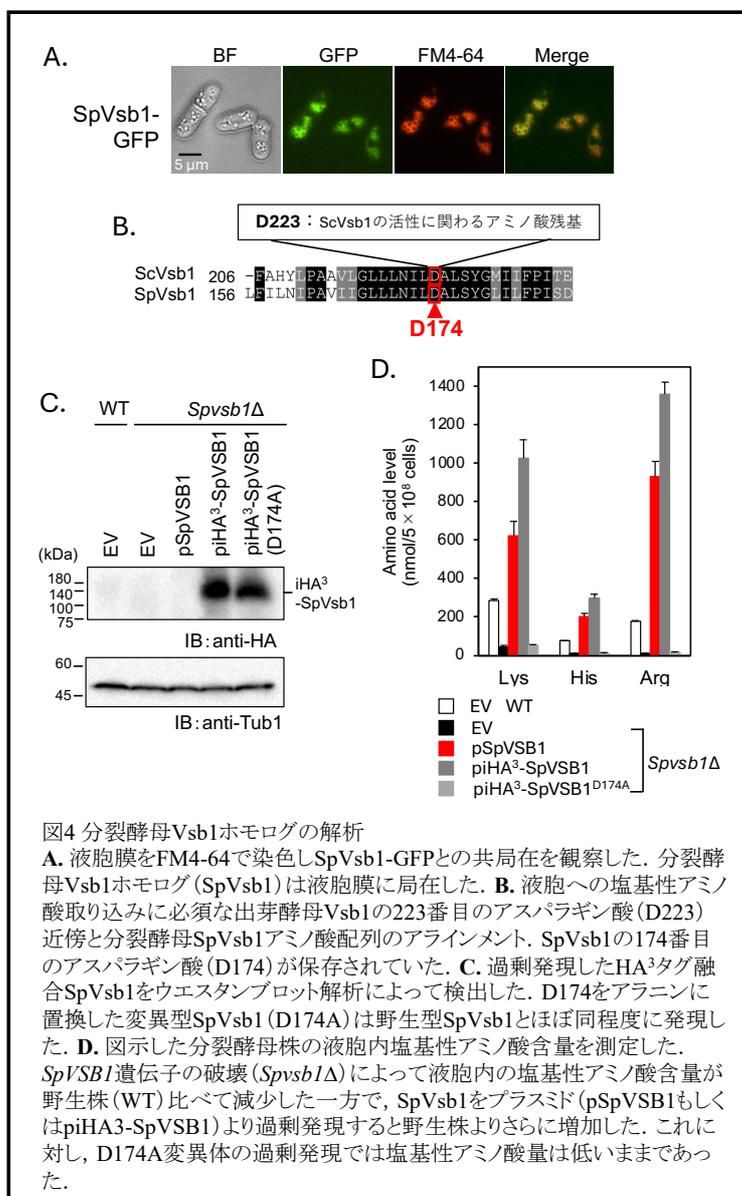


図4 分裂酵母Vsb1ホモログの解析

A. 液胞膜をFM4-64で染色しSpVsb1-GFPとの共局在を観察した。分裂酵母Vsb1ホモログ(SpVsb1)は液胞膜に局在した。**B.** 液胞への塩基性アミノ酸取り込みに必須な出芽酵母Vsb1の223番目のアスパラギン酸(D223)近傍と分裂酵母SpVsb1アミノ酸配列のアラインメント。SpVsb1の174番目のアスパラギン酸(D174)が保存されていた。**C.** 過剰発現したHA³タグ融合SpVsb1をウエスタンブロット解析によって検出した。D174をアラニンに置換した変異型SpVsb1(D174A)は野生型SpVsb1とほぼ同程度に発現した。**D.** 図示した分裂酵母株の液胞内塩基性アミノ酸含量を測定した。SpVSB1遺伝子の破壊(Spvsb1Δ)によって液胞内の塩基性アミノ酸含量が野生株(WT)比べて減少した一方で、SpVsb1をプラスミド(pSpVSB1)もしくはpiHA3-SpVSB1より過剰発現すると野生株よりさらに増加した。これに対し、D174A変異体の過剰発現では塩基性アミノ酸量は低いままであった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2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 関藤孝之, 河田(河野)美幸	4. 巻 95
2. 論文標題 液胞/リソソームアミノ酸トランスポーターによる細胞内アミノ酸ホメオスタシス	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 747-756
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14952/SEIKAGAKU.2023.950747	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 -

1. 著者名 Saeki N, Yamamoto C, Eguchi Y, Sekito T, Shigenobu S, Yoshimura M, Yashiroda Y, Boone C, Moriya H.	4. 巻 19
2. 論文標題 Overexpression profiling reveals cellular requirements in the context of genetic backgrounds and environments	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLoS Genetics	6. 最初と最後の頁 e1010732
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pgen.1010732	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 Ohnishi Shota, Kawano-Kawada Miyuki, Yamamoto Yusuke, Akiyama Koichi, Sekito Takayuki	4. 巻 in press
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 in press
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24件（うち招待講演 3件／うち国際学会 3件）

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 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 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(招待講演)
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 中城遥登, 中川榮, 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, 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	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
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	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
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 益村晃司, 金井宗良, 米山香織, 河田美幸, 関藤孝之, 水沼正樹
2. 発表標題 出芽酵母の寿命制御に関与する液胞膜局在性トランスポーターSsg1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 Sekito T
2. 発表標題 Vacuolar membrane ~A new world of transporters~
3. 学会等名 Kagawa International Forum on Advanced Genomics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023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

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 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 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 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
4. 発表年 2022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
---------	---------