

液胞機能の改変による新規有用酵母の創成

和田 洋

(大阪大学産業科学研究所 生体応答科学部門)

研究の目的

出芽酵母 *Saccharomyce cerevisiae* の細胞小器官の一つである液胞は、酵母の細胞体積の 25-50%を占め、各種イオン・中間代謝産物の貯蔵・高分子のリサイクリングに機能する大きなコンパートメントを形成し、環境変化への対応に中心的な役割を果たす。そこで液胞の機能を担う分子装置を強化、あるいは新たな機能素子の付与により、環境適応能力に長けた出芽酵母を創成することが可能であると考えられる。液胞と細胞基質の間の物質輸送には、低分子を輸送するためのタンパク質からなる各種の能動輸送装置、あるいは高分子の液胞の取り込みに機能するオートファジー装置など、異なるメカニズムが存在する。これらの中で、とりわけ能動輸送による低分子の液胞への蓄積は細胞外のイオン環境変化に対する細胞基質の環境変化を調節する重要な機能を持つことが明らかになっており、液胞コンパートメントを欠く酵母では高濃度の塩やアミノ酸に対する抵抗性が著しく低下することが明らかになっている。

液胞膜に存在する低分子輸送は、液胞膜を介した H^+ の電気化学的ポテンシャル差 ($\Delta\mu H^+$) が駆動力となっている。 $\Delta\mu H^+$ は液胞膜上のプロトン輸送性V-ATPaseにより、ATPの加水分解に共役した、エネルギー勾配に逆らったプロトンの液胞内腔への輸送によって形成される。すなわち、V-ATPaseは液胞における物質集積、ひいては細胞基質のイオン環境調節を担う最もファンダメンタルな分子装置であるといえる。V-ATPaseはA, B, C, D, E, F, G, H, a, c, c', c''と多数のサブユニットから構成されるタンパク質であり、複雑な構造をもつ。出芽酵母の場合、全ゲノムを俯瞰して、それぞれのサブユニットはaを除いては単一の遺伝子座にコードされていることから、構造上の多様性は限定されたものであると予想できる。他方、高等動物のV-ATPaseの構造遺伝子を検索すると、aサブユニットでは4つ、Gサブユニットでは3つの構造遺伝子が存在することが示され、さらには、スプライシングの差により、それぞれの遺伝子座からバリエーションが発現されることも明らかにされてきた。したがって高等生物ではV-ATPaseにはサブユニット構成による多様性が存在することが予想された。哺乳動物液胞型V-ATPaseサブユニット遺伝子を酵母に組み込み、多様なプロフィールをもつプロトンポンプを液胞膜上に発現させ耐環境ストレスが増強した酵母を作出することを目的として研究を進めている。これま

で、温度依存性の異なる、動物・酵母ハイブリッドV-ATPaseを液胞膜上に発現することに成功している。

方法

マウス EST database を検索して出芽酵母の V-ATPase 各サブユニット構造遺伝子と相同性を示す cDNA を網羅的に検索した。同定された cDNA は遺伝子バンクより入手、もしくは手持ちの cDNA ライブラリーより取得してその DNA 配列を再度決定した。構造遺伝子であると思われるものに関しては、出芽酵母の発現ベクター、pKT10 に組み込み、TDH3 プロモータの制御下に酵母内で発現を行った。また、合成ペプチド、もしくは大腸菌内で発現させたタンパク質を抗原として特異的抗体を作成した。これらの抗体を用いて動物組織におけるサブユニットイソフォームの発現パターンを免疫抗体法によって明らかにした。酵母の液胞はフィコールを用いたステップグラディエント超遠心分画により調整し、ATPase 活性、プロトン輸送活性を生化学的方法、分光学的方法により測定した。

結果

V-ATPaseの膜内在部分Voはa, c, c', c''から形成されている。ESTデータベースを用いた検索、さらにはサザンハイブリダイゼーションによる検討の結果、ヒトおよびマウスでは一つの遺伝子がcサブユニットをコードしていることが示された。c''は酵母からマウスに至るまで一つの遺伝子によってコードされている。

マウスにはa1, a2, a3, a4の4種のイソフォームが存在し、それぞれの別々の遺伝子によってコードされていた。Northern blotによって調べると、a1, a2, a3のmRNAはいろいろな臓器に見出されたが、a4は腎臓にのみ発現していた。腎臓のV型ATPaseを膜分画から可溶化しa4の抗体で免疫沈降すると、c, AなどVoとV-ATPase表在性部位V1のサブユニットを同定できた。すなわち、a4はV型ATPaseのサブユニットであることが確認された。さらに詳しく調べると腎臓の中でも集合管の介在細胞(H⁺分泌細胞)のApical側、細胞(HCO₃⁻分泌細胞)のBasolateral側に局在していた。これに対して主細胞には存在していなかった。以上の結果からV型ATPaseが介在細胞の細胞形質膜に局在するためのシグナルはa4サブユニットにあると考えられる。V型ATPaseが細胞のどちら側の形質膜に局在するか、これがどのようにして決められているのかは興味深い問題である。

V-ATPase 表在性部位, V1 部分は A, B, C, D, E, F, G, H のサブユニットから形成されている。EST クローンを整理し, cDNA をクローン化することによって, E サブユニッ

トに2種のイソフォームが存在することを見出した。マウスの $E1$ と $E2$ の2つのイソフォームの間には70%のアミノ酸残基の相同性がある。 $E2$ が胎児期から普遍的に多くの臓器や細胞に発現している。 $E1$ は3週令から精巣に発現し、それも減数分裂後の精子細胞と精子に限られていた。精子のV型ATPaseはアクロソームに存在し、 a サブユニットのイソフォームのうちで $a2$ が発現していた。 $E1$ と $E2$ も対応する酵母の遺伝子を欠いた *vma4* 株を相補することができた。しかし $E1$ を持つV型ATPaseは温度感受性であり、37度ではATP加水分解活性を示すがプロトン輸送が行えない、脱共役したポンプであることが示された。

これらの特徴的なサブユニットイソフォームに加えてGサブユニット、Cサブユニットにもイソフォーム多様性が存在することを明らかにした。また、V-ATPaseの触媒機構に関して、サブユニット間の回転運動を伴う分子モータであることを酵母Gサブユニットを用いて明らかにすることができた。

結論

本研究の結果、V-ATPaseのサブユニットに関して高等動物には極めて多くのイソフォームが存在し、構造のみではなく機能に関しても多様性を付与することが明らかになった。酵母での外来遺伝子発現系も機能することを示し、サブユニットの違いによるポンプ機能の変化も観察することができている。今回、機能増強した酵母を作出することはできなかったが、液胞機能の改変において本研究で採用したストラテジーが有効であることを明らかにすることができた。

文献

1. Hirata, T. *et al.*, Subunit rotation of vacuolar-type proton pumping ATPase: Relative rotation of the G as to c subunit, *J. Biol. Chem.* 278, 23714-23719, 2003
2. Sun-Wada, G.H. *et al.*, Mouse proton pump ATPase C subunit isoforms ($C2$ -a and $C2$ -b) specifically expressed in kidney and lung. *J. Biol. Chem.* 278, 44843-44851, 2003
3. Sun-Wada, G.H. *et al.*, Diversity of mouse proton-translocating ATPase: presence of multiple isoforms of the C , d and G subunits. *Gene* 302, 147-153, 2003
4. Toyomura, T. *et al.*, From lysosomes to plasma membrane: Localization of vacuolar type H^+ -ATPase with the $a3$ isoform during osteoclast differentiation. *J. Biol. Chem.* 278, 22023-22030, 2003