

有用性酵母の新規開発に向けた液胞アミノ酸集積と制御システムの解明

柿沼 喜己
(愛媛大学 農学部)

研究の目的

液胞は真核微生物が共有する細胞内小器官（オルガネラ）であり、リソソームと同じ分解オルガネラと各種代謝物・イオンの集積・隔離オルガネラとしての機能上の二面性を有する。近年では、飢餓条件等で誘導される自食作用によるタンパク質分解の場として注目されている。液胞は細胞全体の 50%以上のアミノ酸を蓄積し、全種類のアミノ酸の細胞内動態に関わっている。タンパク質合成・分解を含めてアミノ酸代謝に直結する重要性が明白であるにも関わらず、液胞アミノ酸集積、制御、アミノ酸代謝との関連性など、分子レベルの解析は未だに手つかずの状況にある。本研究は、出芽酵母を材料に、真核微生物に共通する液胞アミノ酸集積とその制御機構に関する知見を獲得し、液胞輸送能改変を発酵産業等で有効利用するための分子基盤を構築することを目的とする。

方法

1. 使用菌株と培養条件

出芽酵母 X2180-1B (*MAT α SUC2 mal mel gal2 CUP1*)由来株を使用し、SD+CA 培地 (0.17% yeast nitrogen base w/o amino acids and ammonium sulfate, 0.5% casamino acids, 0.5% ammonium sulfate, 2% dextrose) にて対数増殖初期まで培養した。胞子形成効率は細胞を胞子形成培地 (0.1% yeast extract, 0.05% glucose, 1% potassium acetate) にて 25°C で培養し顕微鏡観察により計測した。

2. アミノ酸組成解析

銅処理¹⁾により抽出した液胞アミノ酸を自動アミノ酸分析装置 (日立 L-8900) にて解析した。

3. 単離液胞膜小胞を用いたアミノ酸輸送実験

フィコールを用いた超遠心分離により酵母スフェロプラスト破碎液から単離精製した液胞膜小胞²⁾に ¹⁴C 標識した各アミノ酸を前負荷し、ATP 添加後の小胞内放射活性を経時的に測定することにより小胞からのアミノ酸排出を解析した³⁾。小胞内への ATP 依存的なアミノ酸取り込み活性は以前報告された方法により測定した^{2,4)}。

結果

1. Avt4p N 末端親水性領域を介した液胞アミノ酸輸送活性調節

Avt4 は液胞からの中性アミノ酸排出に Avt3 と重複して機能し、さらに塩基性アミノ酸の排出にも機能する^{3,5)}。細胞を窒素飢餓条件に移すと液胞内アミノ酸は速やかに減少するが、*avt4 Δ* 株ではこの減少が抑制されることから同条件での Avt4 の活性化が示唆されている³⁾。Avt4 のトポロジーを予測すると N 末端側に約 300 アミノ酸残基の長い親水性領域の存在が予想される (図 1A)。トランスポーターのこのような長い親水性領域には活性調節に機能するものが報告されている。菌類 Avt4 ホモログの N 末端側にはいずれも長い親水性領域の存在が

予想され、これらのアミノ酸配列アラインメントより5つの保存配列(図1A、I-V)が見出された。各保存配列を欠損した変異型Avt4(Avt4 Δ I-V)のGFP融合タンパク質をAVT4ネイティブプロモーターよりavt3 Δ avt4 Δ 株に発現させたところ、これらの発現レベルや液胞膜局在に大きな変化はなかったが、液胞内中性アミノ酸含量がI-IVの各欠損により野生型Avt4のGFP融合タンパク質発現株に比べて増加した一方、Vを欠損すると減少した(図1B)。また塩基性アミノ酸含量はAvt4 Δ V発現により大幅に低下した(図1B)。一方、酸性アミノ酸含量は変異型Avt4発現によって大きく変化しなかった。単離液胞膜小胞からのATP依存的なアラニン排出活性はAvt4 Δ V発現により大幅に増加した一方、Avt4 Δ IV発現株由来の小胞ではアラニンは排出されず、むしろATP依存的に取り込まれた(図1C)。以上の結果はAvt4 N末端親水性領域が液胞からのアミノ酸排出活性を正負両方向に調節することを示唆する。

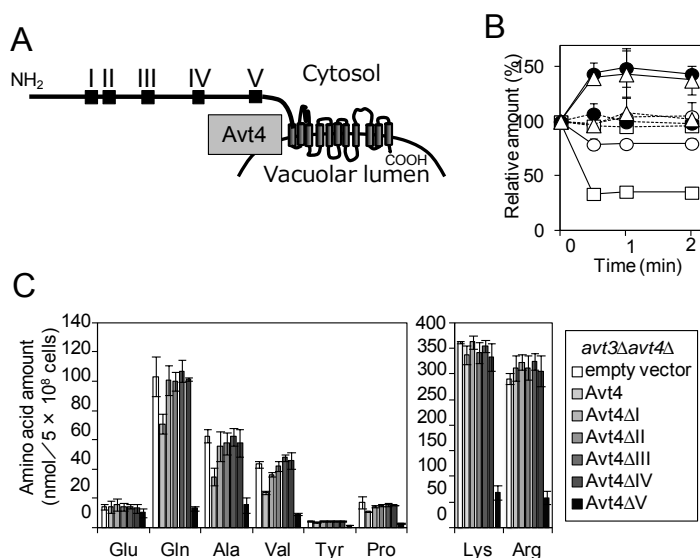


図1 Avt4 N末端親水性領域の機能解析

(A) Avt4のトポロジー予測とN末端親水性領域中の保存配列(I-V)。(B)変異型Avt4発現による液胞膜小胞アラニン輸送活性の変化。野生型Avt4(○)、Avt4 Δ IV(△)、Avt4 Δ V(□)の各発現ベクターもしくは空ベクター(●)を導入したavt3 Δ avt4 Δ 株から単離した液胞膜小胞に¹⁴C標識したアラニンを前負荷し、ATP存在下(実線)もしくはATP非存在下(点線)での小胞内放射活性を経時的に測定した。グラフには前負荷したアラニン量を100%としてプロットした。(C)変異型Avt4発現による液胞内アミノ酸含量の変化。図に示した各株の液胞内アミノ酸含量を測定した。塩基性アミノ酸含量は別グラフ(右側)に示した。

2. 新規液胞アミノ酸トランスポーターの同定解析^{6,7)}

出芽酵母 *S. cerevisiae* ゲノムにコードされる7種のAVTファミリートランスポーターのうちAvt1、Avt3、Avt4、Avt6は液胞アミノ酸輸送に機能することが明らかとなっている⁵⁾。我々は機能未知AVTトランスポーター(Avt2、Avt5、Avt7)のうちAvt7のGFP融合タンパク質が液胞膜に局在することを見出した。液胞からのアミノ酸排出を抑えたavt3 Δ avt4 Δ 株においてさらにAVT7を破壊すると中性アミノ酸全般の液胞内含量が増加し、特にグルタミンとプロリン含量の増加が比較的顕著であった(data not shown)。また、avt3 Δ avt4 Δ avt7 Δ 株から単離した液胞膜小胞へのグルタミンおよびプロリンの取り込みはavt3 Δ avt4 Δ 株由来の小胞に比べて増加し、AVT7を過剰発現すると減少した(図2A)。これらの結果はAvt7が液胞からの中性アミノ酸排出に機能する新規液胞アミノ酸トランスポーターであることを示唆する。液胞内アミノ酸のリサイクルは窒素飢餓条件下での細胞内タンパク質合成維持に重要である。窒素飢餓条件で誘導される胞子形成において、野生株に比べavt3 Δ avt4 Δ 株およびavt7 Δ 株では胞子形成効率がわずかに減少し、avt3 Δ avt4 Δ avt7 Δ 株では減少がさらに顕著化した(図2B)。この結果は液胞アミノ酸リサイクルが飢餓ストレスへの適応に重要な役割を果たすことを示唆する。

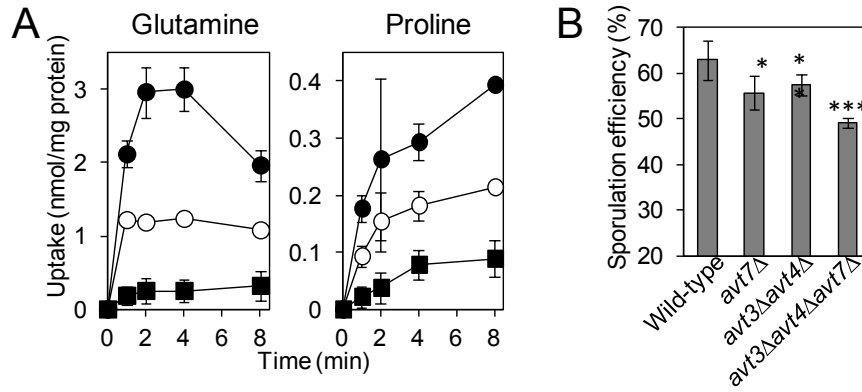


図 2 AVT7 遺伝子発現による液胞膜小胞へのアミノ酸取り込み活性および孢子形成効率の変化
 (A) *avt3Δavt4Δ* + 空ベクター (○)、*avt3Δavt4Δavt7Δ* + 空ベクター (●)、*avt3Δavt4Δavt7Δ* + AVT7 過剰発現ベクター (■) の各株から単離した液胞膜小胞に ¹⁴C 標識したグルタミンもしくはプロリンを前負荷後、ATP を添加し、経時的に小胞内の放射活性を測定した。グラフには各測定ポイントで小胞内アミノ酸量から前負荷されたアミノ酸量を差し引いた値をプロットした。(B) 図に示した各株を孢子形成培地に移し 25°C で 6 日間培養した。顕微鏡下で計測した全細胞数と孢子を形成した細胞数より孢子形成効率を算出しプロットした。

線虫/ラットリソソームの塩基性アミノ酸輸送に機能する LAAT-1/PQLC2 の出芽酵母ホモログ Ypq1p は液胞膜に局在することが報告されている⁸⁾。そこで *ypq1Δ* 株から液胞膜小胞を単離し、ATP 依存的な塩基性アミノ酸 (リジン、アルギニン、ヒスチジン) の取り込み活性を野生株由来の小胞と比較したところ、*ypq1Δ* 株由来の小胞ではリジンの取り込みが大幅に低下し、アルギニン取り込みも部分的に低下した一方、ヒスチジンの取り込みはほとんど変化しなかった (図 3)。また、カルシウムや中性アミノ酸であるチロシンの取り込みに大きな変化はなく (図 3)、液胞膜小胞中の V-ATPase 量やキナクリン蛍光消光により計測した酸性化も野生株由来の小胞とほぼ同レベルであったことから V-ATPase 活性への *ypq1* 破壊の影響は認められなかった (data not shown)。以上より、Ypq1p が液胞へのリジンおよびアルギニンの取り込みに特異的に機能することが示唆された。

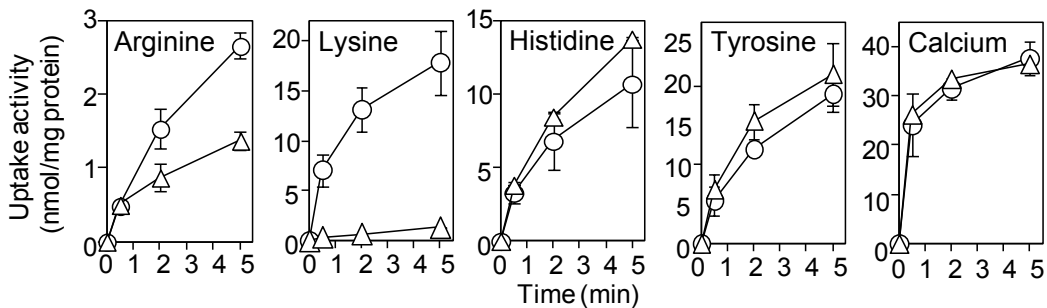


図 3 YPQ1 遺伝子破壊による液胞膜小胞へのアミノ酸およびカルシウム取り込み活性の変化
 野生株 (○) および *ypq1Δ* 株 (Δ) から単離した液胞膜小胞の ATP 依存的な各種アミノ酸およびカルシウムの取り込みをプロットした。

結論

液胞アミノ酸トランスポーター *Avt4* の N 末端親水性領域中に見出された 5 つの保存配列 I-V のうち I、II、III、IV が液胞からのアミノ酸排出活性に促進的に作用し、V が抑制的に作用することを明らかにした。本研究ではさらに出芽酵母 AVT トランスポーターの中で機能未知であった *Avt7* が *Avt3/Avt4* とともに中性アミノ酸全般の液胞外への排出に機能し、孢子

形成実験よりこれら AVT トランスポーターの飢餓ストレスに対する細胞適応への関与が示唆された。また、線虫/ラットのリソソームアミノ酸トランスポーターホモログである Ypq1 がリジンとアルギニンの液胞内への取り込みに機能することが明らかとなった。

文献

- 1) Ohsumi Y, Kitamoto K, Anraku Y. (1988) Changes induced in the permeability barrier of the yeast plasma membrane by cupric ion. *J. Bacteriol.* **170**, 2676-2682.
- 2) Ohsumi Y, Anraku Y. (1981) Active transport of basic amino acids driven by a proton motive force in vacuolar membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **256**, 2079-2082.
- 3) Sekito T, Chardwiriyaapreecha S, Sugimoto N, Ishimoto M, Kawano-Kawada M, Kakinuma Y. (2014) Vacuolar transporter Avt4 is involved in excretion of basic amino acids from the vacuoles of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **78**, 269-275.
- 4) Shimazu M, Sekito T, Akiyama K, Ohsumi Y, Kakinuma Y. (2005) A family of basic amino acid transporters of the vacuolar membrane from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **280**, 4851-4857.
- 5) Russnak R, Konczal D, McIntire SL. (2001) A family of yeast proteins mediating bidirectional vacuolar amino acid transport. *J. Biol. Chem.* **276**, 23849-23857.
- 6) Tone J, Yamanaka A, Manabe K, Murao N, Kawano-Kawada M, Sekito T, Kakinuma Y. A vacuolar membrane protein Avt7p is involved in transport of amino acid and spore formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* *in press*.
- 7) Sekito T, Nakamura K, Manabe K, Tone J, Sato Y, Murao N, Kawano-Kawada M, Kakinuma Y. (2014) Loss of ATP-dependent lysine uptake in the vacuolar membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae* *ypq1*Δ mutant. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **78**, 1199-1202.
- 8) Jézégou A, Llinares E, Anne C, Kieffer-Jaquinod S, O'Regan S, Aupetit J, Chabli A, Sagné C, Debacker C, Chadefaux-Vekemans B, Journet A, André B, Gasnier B. (2012) Heptahelical protein PQLC2 is a lysosomal cationic amino acid exporter underlying the action of cysteamine in cystinosis therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **109**, E3434-3443.