

出芽酵母における液胞アミノ酸集積と調節のメカニズム

関藤 孝之
(愛媛大学 農学部)

研究の目的

出芽酵母の液胞はタンパク質等の生体分子の分解を行うとともにアミノ酸を集積するオルガネラである。通常、細胞全体の50%以上のアミノ酸が蓄積しており、液胞がアミノ酸代謝に重要な役割を担うことは明白である。特に近年は、飢餓条件での自食作用によって生じた液胞内アミノ酸の液胞からの排出と新規タンパク質合成へのリサイクルの過程は、自食作用研究のトピックとして注目されているが、その分子機構はブラックボックスのままである。本研究では液胞アミノ酸集積の分子機構および調節機構を明らかにする目的で液胞アミノ酸集積・排出に関わるトランスポーターの網羅的同定を行い、それらの機能解析を行なった。

方法

1. アミノ酸組成解析

出芽酵母をYPD培地(1% yeast extract, 2% polypeptone, 2% dextrose)で対数増殖初期まで培養し、集菌後、銅処理^{1,2)}により液胞アミノ酸を抽出した。また、対数増殖初期の細胞をSD-N培地(0.17% yeast nitrogen base w/o amino acids and ammonium sulfate, 2% dextrose)に移しさらに6時間培養することにより窒素飢餓処理を行い、同様に液胞アミノ酸を調製した。アミノ酸サンプルは自動アミノ酸分析装置(日立 L-8800)にて解析した。

2. 顕微鏡解析

GFP蛍光はオリンパス蛍光顕微鏡IX71により観察し、Metamorphソフトウェアにより画像取得および解析を行なった。

結果

1. AVT3/AVT4破壊株の液胞内アミノ酸組成

単離液胞膜小胞を用いた*in vitro*解析により出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において液胞内外へのアミノ酸輸送に機能するトランスポーターが数種同定されている³⁻⁵⁾。しかし、これらトランスポーターの*in vivo*での機能についてはこれまで検討されていない。Avt3とAvt4はいずれもグルタミン、チロシン、イソロイシンを液胞外へ排出することが*in vitro*解析より示唆されている³⁾。これらトランスポーターの単一破壊株および二重破壊株について液胞内アミノ酸組成を野生株と比較したところ、二重破壊株において中性アミノ酸全般の含量に増加傾向が見られた(図1A)。このことはAvt3とAvt4がグルタミン、チロシン、イソロイシンだけでなく多くの中性アミノ酸の液胞からの排出に重複して機能することを示唆する。液胞からのアミノ酸排出は自食作用アミノ酸リサイクルの必須プロセスである。Avt3とAvt4がこのプロセスに機能する可能性が高い

と考え、自食作用を誘導する窒素飢餓条件での液胞アミノ酸組成を調べたところ、二重破壊株において中性アミノ酸全般の含量増加を検出した(図 1B)。さらに野生株と *avt3Δ* 株では塩基性アミノ酸(リジン、ヒスチジン、アルギニン)の液胞内含量が大幅に低下するが、*avt3Δavt4Δ* 株と *avt4Δ* ではこの低下が抑えられ、野生株の 20 倍以上の塩基性アミノ酸が液胞内に存在した(図 1B)。このことは *Avt3* と *Avt4* が自食作用アミノ酸リサイクルに機能し、*Avt4* は中性アミノ酸だけでなく塩基性アミノ酸も液胞から排出する可能性を示唆する。

2. *Avt4* N 末端親水性領域の機能解析

トポロジー予測によると *Avt4* N 末端には約 300 アミノ酸残基の長い親水性領域が存在する。トランスポーターの親水性領域は翻訳後修飾や他のタンパク質との相互作用を介して活性調節に機能する例が報告されている。*Avt4* N 末端の機能を検証するため、この領域を N 末端から 100 アミノ酸ずつ欠損した変異型 *Avt4* の GFP 融合タンパク質を *avt3Δavt4Δ* 株で発現させ、細胞内レベル、液胞膜局在、および液胞内アミノ酸組成への影響を調べた。N 末端 300 アミノ酸残基を欠損した *Avt4* は窒素飢餓条件での細胞内レベル低下を示し、液胞膜への局在化にも欠損を示した。一方 N 末端から 100 および 200 アミノ酸残基を欠損した *Avt4* は野生型 *Avt4* とほぼ同じ細胞内レベルでかつ正常に液胞膜へと局在したが、窒素飢餓条件での液胞内アミノ酸含量の低下が抑えられ、野生型 *Avt4* 発現細胞に比べ 2 倍以上のアミノ酸が液胞内に存在した(図 2)。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に機能することを示唆している。

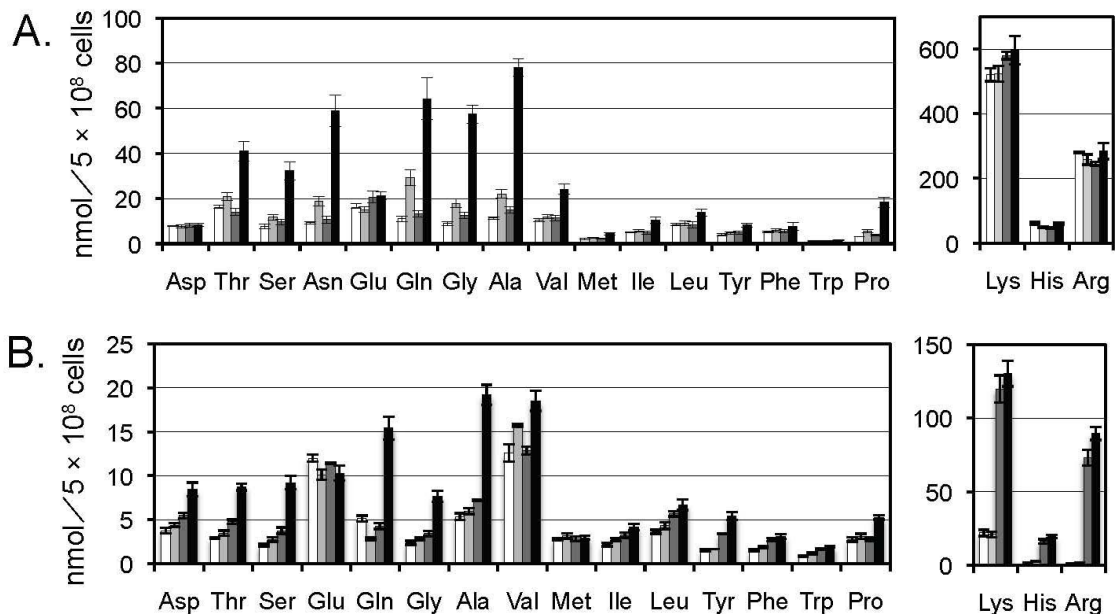


図 1 栄養豊富条件 (A) と窒素飢餓条件 (B) における液胞内アミノ酸含量
 野生株 (白色)、*avt3Δ* 株 (薄い灰色)、*avt4Δ* 株 (濃い灰色)、*avt3Δavt4Δ* 株 (黒色)
 それぞれを培養し、銅処理によって液胞アミノ酸プールを抽出した。液胞内含量の多い塩基性アミノ酸量は別のグラフ (右側) に示した。

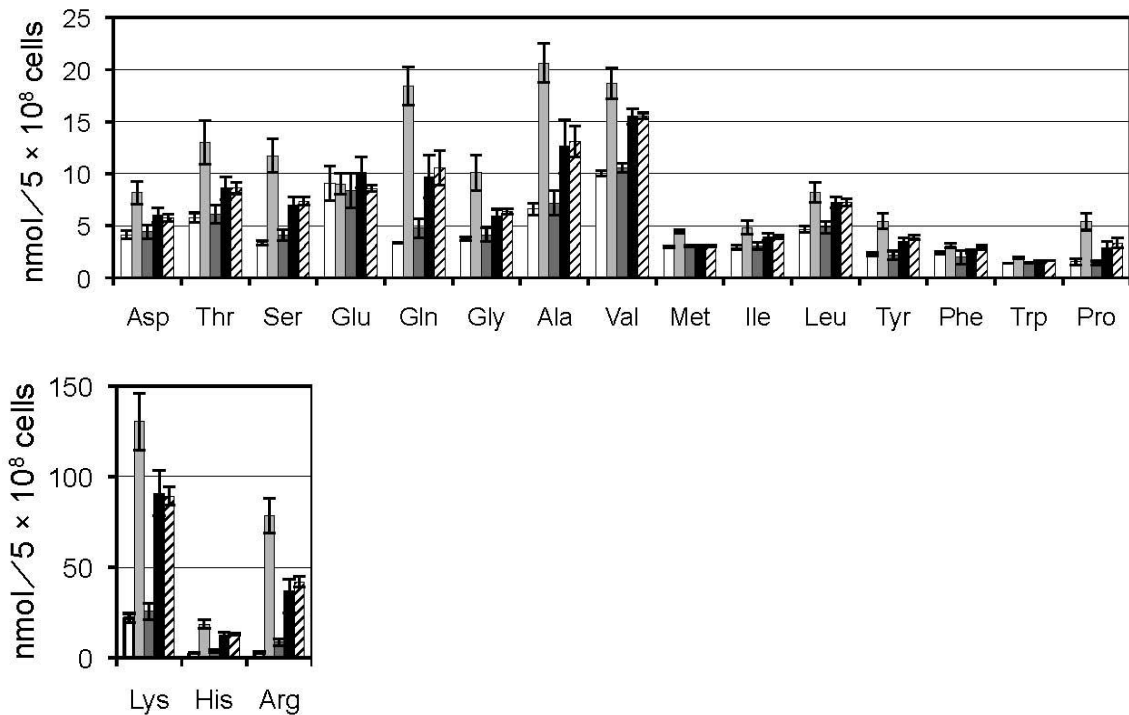


図2 Avt4 N末端親水性領域欠損による窒素飢餓条件での液胞内アミノ酸含量の変化
 各酵母株を窒素飢餓条件で培養し、液胞内アミノ酸含量を測定した。液胞内含量の多い塩基性アミノ酸量は別のグラフ（下側）に示した。空ベクターを導入した *avt3Δ*株（白色）、空ベクターを導入した *avt3Δavt4Δ*株（薄い灰色）、GFP-Avt4¹⁻⁷¹³ を発現させた *avt3Δavt4Δ*株（濃い灰色）、GFP-Avt4¹⁰¹⁻⁷¹³ を発現させた *avt3Δavt4Δ*株（黒色）、GFP-Avt4²⁰¹⁻⁷¹³ を発現させた *avt3Δavt4Δ*株（斜線）

3. 出芽酵母トランスポーターの細胞内局在解析

出芽酵母ゲノムにコードされるトランスポーター候補から機能未知のものに GFP を付加し蛍光顕微鏡観察により液胞膜局在の有無を調べた。30 種について調べたうち、6 種が液胞膜局在を示すことが明らかとなった。しかし各遺伝子破壊株での液胞内アミノ酸組成は野生株と比べ大きな変化が認められず、他のトランスポーターによる機能相補の可能性が考えられた。そこで現在、AVTや他のトランスポーターとの多重破壊株と個々のトランスポーターを過剰発現した株での液胞アミノ酸組成について検討中である。

結論

アミノ酸組成解析により、Avt3 および Avt4 が中性アミノ酸全般の液胞からの排出に機能することが示唆され、さらに窒素飢餓条件で培養した細胞の解析により Avt4 は塩基性アミノ酸の液胞からの排出にも機能することが示唆された。野生株と AVT 遺伝子破壊株から単離した液胞膜小胞のアミノ酸輸送活性の比較においてもこのことを支持する結果が得られており、Avt3 と Avt4 が広い基質特異性を有すると考えられた。液胞膜を介したアミノ酸輸送は細胞内へのアミノ酸取り込みやアミノ酸代謝系酵素などの活性と連動して細胞内アミノ酸レベルの適正化に機能すると考えられる。よって液胞アミノ酸トランスポーターの活性は細胞内アミノ酸レベルの変化に応答して厳密な調節を受け

る可能性が高い。液胞アミノ酸トランスポーターAvt4 には 300 アミノ酸残基の長い親水性領域が存在し、本研究によりこの領域が液胞からのアミノ酸排出に重要な機能を果たすことが示唆された。細胞膜に局在するアミノ酸トランスポーターの親水性領域は翻訳後修飾やそれに伴う他のタンパク質との相互作用を介してトランスポーターの活性調節に機能することが報告されている。Avt4 の N 末端も同様に活性調節に機能する可能性があり、今後さらに解析を進める予定である。また本研究では液胞膜局在性トランスポーターを新たに 6 種同定した。これらの中には窒素飢餓条件で発現量が増加するものも含まれており、アミノ酸輸送活性を有することが期待される。

参考文献

1. Ohsumi, Y., Kitamoto, K., and Anraku, Y. (1988) Changes induced in the permeability barrier of the yeast plasma membrane by cupric ion. *J. Bacteriol.* **170**: 2676-2682
2. Chahomchuen, T., Hondo, K., Ohsaki, M., Sekito, T., and Kakinuma, Y. (2009) Evidence for Avt6 as a vacuolar exporter of acidic amino acids in *Saccharomyces cerevisiae* cells. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **55**: 409-417
3. Russnak, R., Konczal, D., and McIntire, S. L. (2001) A family of yeast proteins mediating bidirectional vacuolar amino acid transport. *J. Biol. Chem.* **276**: 23849-23857.
4. Shimazu, M., Sekito, T., Akiyama, K., Ohsumi, Y., and Kakinuma Y. (2005) A family of basic amino acid transporters of the vacuolar membrane from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **280**: 4851-4857.
5. Sekito, T., Fujiki, Y., Ohsumi, Y., and Kakinuma, Y. (2008) Novel families of vacuolar amino acid transporters. *IUBMB Life* **60**: 519-525.