

博士論文番号：1081017

酵母のオルガネラに存在する  
プロリン輸送・代謝関連因子の機能解析

西田 郁久  
奈良先端科学技術大学院大学  
バイオサイエンス研究科 ストレス微生物科学研究室  
(高木 博史 教授)

平成 28 年 1 月 19 日提出

## 目次

序章	4
第1章 オルガネラにおけるプロリン輸送体の同定と機能解析	
序論	7
1. 材料と方法	18
1.1.1 菌株	18
1.1.2 培地	20
1.1.3 プラスミド	21
1.1.4 DNA オリゴマー	25
1.1.5 DNA マイクロアレイ解析	27
1.1.6 定量リアルタイム PCR	28
1.1.7 酵母の形質転換	28
1.1.8 細胞内及び液胞アミノ酸含量の測定	29
1.1.9 破壊株の作製	29
1.1.10 蛍光顕微鏡観察	30
1.1.11 ミトコンドリアの単離	30
1.1.12 ウェスタンブロッティング	31
1.1.13 ミトコンドリアにおけるアミノ酸輸送活性試験	32
1.1.14 生育試験	32
2. 結果	33
1.2.1 DNA マイクロアレイ解析によるプロリンが <i>AVT</i> 遺伝子の発現に及ぼす影響の解析	33
1.2.2 <i>Avt</i> トランスポーターによる液胞のプロリン輸送への関与	36
1.2.3 <i>Avt1</i> , <i>Avt3</i> , <i>Avt7</i> の細胞内局在解析	37
1.2.4 <i>AVT</i> 遺伝子破壊株におけるストレス耐性への影響の評価	38
1.2.5 ミトコンドリア輸送体遺伝子破壊株と過剰発現株の表現型解析	41
1.2.6 ミトコンドリアにおけるプロリン輸送活性の検出	42
3. 考察	45

## 第2章 ミトコンドリアにおけるプロリン代謝調節に関与する 新規因子 Fmp12 の機能解析

序論	49
1. 材料と方法	52
2.1.1 菌株	52
2.1.2 培地	53
2.1.3 プラスミド	53
2.1.4 DNA オリゴマー	55
2.1.5 破壊株の作製	56
2.1.6 生育試験	56
2.1.7 Fermograph を用いた発酵力の測定	56
2.1.8 ウェスタンブロッティング	57
2.1.9 Fmp12-GFP の蛍光顕微鏡観察	57
2.1.10 大腸菌における Fmp12 の発現と精製	58
2.1.11 Fmp12 の活性測定 (LC-MS/MS 解析)	58
2.1.12 アミノ酸解析	59
2.1.13 定量リアルタイム PCR	59
2. 結果	60
2.2.1 <i>FMP</i> 遺伝子破壊株におけるプロリンを単一炭素源とする培地 における表現型解析と <i>FMP12</i> の取得	60
2.2.2 <i>FMP12</i> 過剰発現株の表現型解析	61
2.2.3 Fmp12 の細胞内局在解析	62
2.2.4 様々な炭素源の際の Fmp12 の発現解析	63
2.2.5 <i>FMP12</i> 破壊株における細胞内アミノ酸含量の測定	64
2.2.6 <i>FMP12</i> 破壊株と過剰発現株を用いた発酵試験	64
2.2.7 <i>FMP12</i> とプロリン分解系下流遺伝子との多重破壊株の表現型解析	66
2.2.8 Fmp12 の精製と酵素反応生成物の LC-MS/MS による測定	68
3. 考察	71
謝辞	75
参考文献	76

## 序章

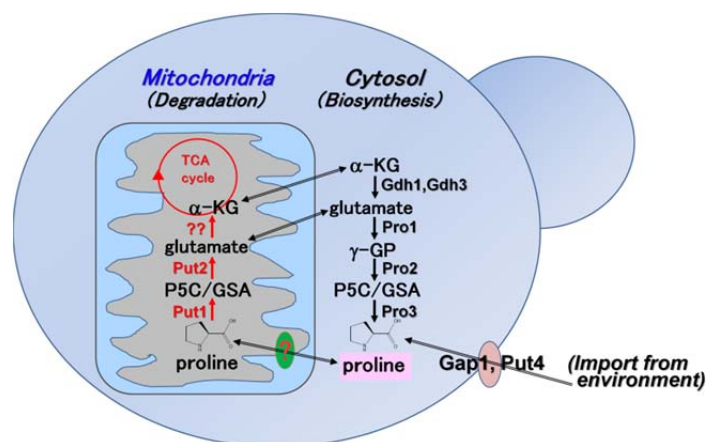
酵母 *Saccharomyces cerevisiae* はパンや酒類等の発酵食品やバイオエタノールの製造において重要な産業微生物であるが、発酵過程で温度、浸透圧、pH、酸化、エタノールなどで生じるストレスにより、その発酵生産性が低下することが問題となっている。ストレス下では、膜やタンパク質などの生体高分子が障害を受けることによって、その有用機能が制限される。従って、酸化ストレス等の障害から酵母細胞を保護し、発酵生産性の低下を抑制する機構についての研究は重要である。これまでに当研究室では、プロリンの毒性アナログ耐性を指標に分離したプロリン蓄積株において、プロリン合成の鍵酵素である  $\gamma$ -glutamyl kinase (Pro1) のアミノ酸置換に伴い、プロリンによるフィードバック阻害感受性が低下し、プロリン合成系が強化されることを見出した。酵母は野生株や通常の培養条件において、細胞内にプロリンを蓄積することはないが、代謝工学的手法により作製したプロリン蓄積株は冷凍、乾燥、酸化、エタノールなどのストレスに対して耐性を示すことが明らかとなった (Takagi, 2008)。また、プロリン蓄積株が高スクロースストレスや冷凍製パン生地における発酵力を向上することも明らかとなり、プロリンとストレス耐性との関連について基礎・応用研究を進めている (Sasano et al., 2012a, b; Kitagaki and Takagi, 2014)。

L-プロリン (2-pyrrolidinecarboxylic acid) は、19 世紀末に初めて化学合成され (Willstätter, 1900)、casein の加水分解物より分離同定され命名されたアミノ酸 (イミノ酸) である (Fisher, 1901)。プロリンはコラーゲンに多く含まれ、以前はゼラチンからプロリンを製造していたが、最近では発酵法において得ることが多い。タンパク質のポリペプチド鎖においてプロリンは、水素結合を形成できずに屈曲点やよれの原因となる (大沢ら、1989)。コラーゲン以外にも *S. cerevisiae* の RNA polymerase Rpo21、*Candida albicans* の Hwp1、大腸菌の TonB、タバコの extensin、トウモロコシの zein、ラットの synapsin I、ヒトの calcineurin A、HIV-I の Nef、ミツバチの abacecin、イカの rhodopsin、マウスの WBP-1 や 3BP1 等はプロリンリッチなタンパク質の代表例である (丸山、1997)。また、SH3 (Src homology 3) ドメインや2つのトリプトファン残基を持つ WW ドメインは、標的とする基質タンパク質のプロリンリッチな配列を特異的に認識している。例えば、SH3 ドメインを持つ Src は RPLPPLP モチーフに結合し、WW ドメインを持つ Rsp5、Nedd-4、Dystrophin などは、PPxY モチーフを認識する (Kay et al., 2010)。タンパク質中のプロリンに富む配列は加水分解を受けにくい、プロリン周辺を特異的に切断する酵素である proline imino peptidase、prolylendopeptidase、HIV-I protease、aminopeptidase P、prolinase、prolidase、*Streptomyces* 属細菌のプロリン特異的 dipeptidyl carboxypeptidase 等が報告されている (丸山、1997)。

プロリンはタンパク質構成成分として以外にも様々な生命現象に関わってお

り、哺乳類においてはプロリン残基がペプチドホルモンや神経伝達物質などのシグナル分子の構成要素となっている (Mentlein, 1988)。また、プロリンベタイン、ピログルタミン酸、ピペコリン酸、AZC (アゼチジン-2-カルボン酸)、D-プロリン、アセチルプロリン、ヒドロキシプロリン (様々な異性体を有する) など多くの L-プロリン誘導体や類縁化合物が存在する。さらにプロリンは、化学合成の際の不斉触媒として使用されることでも知られている (List, 2002)。

プロリンには様々な生理機能が報告されており、細胞内の浸透圧を調節する適合溶質としての機能のほか、冷凍、乾燥、高温時のタンパク質や膜の保護、活性酸素種の消去などの多彩な機能が知られている。ストレスとプロリンの細胞内局在に関する研究においては、塩ストレスを与えないジャガイモ培養細胞では全プロリンの一定量が液胞に局在するが、塩ストレスを与えた細胞では 20 時間後に全プロリン含量が数倍に増大し、液胞に局在するプロリンの割合は急激に減少するという報告もある (Fricke and Pahlich, 1990)。当研究室では酵母細胞内で過剰に蓄積したプロリンは一定量液胞へ局在することを明らかにした (Matsuura and Takagi, 2005)。これらの研究から、液胞がプロリンの貯蔵の場として働くだけでなく、ストレス時のサイトゾルにおける適合溶質の濃度制御にも重要な役割を持っていることが示唆されている。出芽酵母において液胞には、AVT (Amino acid Vacuolar Transport) や VBA (Vacuolar Basic Amino acid transporter) など様々なアミノ酸トランスポーター (輸送体) のファミリーが局在し (Sekito et al., 2008)、トランスポーターを介した液胞におけるアミノ酸輸送の仕組みが明らかになりつつある。機能未知のトランスポーター様タンパク質が数多く局在しているにも関わらず、プロリンの液胞輸送機構に関しては全真核生物でほとんど解析されておらず、酵母の液胞に相当するオルガネラである高等動物のリソソーム、植物の液胞 (トノプラスト) におけるプロリン輸送の機構に関する知見も非常に少ない。



**Fig. 1. *S. cerevisiae* におけるプロリンの代謝経路**

Gap1 と Put4 は、プロリンの環境中からの取り込みを、図中の“?”はプロリンの推定ミトコンドリアトランスポーターを示す。また、プロリンがグルタミン酸を経て TCA に入る経路 (図中の“??”) も良く分かっていない。

GSA: glutamate- $\gamma$ -semialdehyde,  
 $\gamma$ -GP:  $\gamma$ -glutamyl-5-phosphate  
P5C:  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate,  
 $\alpha$ -KG:  $\alpha$ -ketoglutarate をそれぞれ示す。

プロリンは酵母のサイトゾルにおいて Pro1、Pro2、Pro3 の 3 つの酵素によりグルタミン酸から還元的に合成される。また過剰量のプロリンはミトコンドリア内においてのみ Put1、Put2 の 2 つの酵素により酸化分解され、エネルギー源や窒素源、炭素源となる。ここでプロリンが、炭素源としてどのような経路を経て TCA 回路に入るかなど不明な点が多いのも現状である (Fig. 1)。酵母はプロリンを単一窒素源として生育できるが、そのためには原形質膜上のトランスポーター (Put4、Gap1) から取り込まれたプロリンは、ミトコンドリア内に輸送される必要がある (Fig. 1)。ミトコンドリア内膜にはミトコンドリアトランスポーターファミリーに属する様々な有機酸やアミノ酸のトランスポーターが存在しており、プロリンを特異的に輸送するトランスポーターの存在が示唆される報告はいくつか存在するが (Di Martino et al., 2006; Pallotta, 2014)、特定のアミノ酸トランスポーターの活性を網羅的に簡易に検出するような実験系は確立されておらず、全真核生物においてその同定には至っていない。

そこで第 1 章では、プロリンによる細胞保護機能に関与すると考えられている液胞と、プロリン分解系酵素が局在するミトコンドリアに着目し、これらオルガネラにおけるプロリンの輸送・代謝に関連する因子の同定と機能解析を目的とした。また、第 2 章ではプロリンの炭素源としての代謝に関わる Fmp12 の機能解析を行った。

## 第1章 オルガネラにおけるプロリン輸送体の同定と機能解析

### 序論

#### プロリンの生理機能と *S. cerevisiae* におけるプロリンの細胞保護効果

プロリンは、塩、乾燥などの浸透圧ストレスに応答して細胞内に浸透圧調節物質の一つとして蓄積されることが多くの植物 (Delauney and Verma, 1993; Hare et al., 1999) や細菌 (Csonka, 1989) で知られている。プロリンは浸透圧調節以外にも、冷凍・乾燥・高温時のタンパク質や膜の保護 (Rudolph and Crew, 1985)、活性酸素種 (ヒドロキシラジカル) の消去 (Chen and Dickman, 2005)、核酸の融解温度低下 (Rajendrakumar et al., 1997) などの機能が知られている (Fig. 2)。

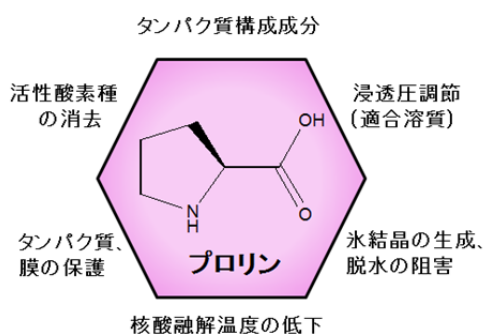


Fig. 2. プロリンの生理機能

一方、*S. cerevisiae* ではストレスに応じて、細胞保護作用のあるトレハロースやグリセロールを蓄積するのに対し、プロリン合成系遺伝子の誘導はほとんど起こらない (Causton et al., 2001)。また、エタノールやソルビトールストレスを受けた時にもプロリン代謝系遺伝子の転写は上昇せず、プロリンを積極的に蓄積していない (Kaino and Takagi, 2008)。

*S. cerevisiae* における既知のプロリン合成調節のメカニズムは、*PRO1* がコードする GK ( $\gamma$ -glutamyl kinase) の活性が鍵酵素として働き、プロリンによるフィードバック阻害を受けるというものである (Li and Brandriss, 1992)。当研究室では、プロリンの毒性アナログである AZC に耐性を示す変異株の中から、GK 遺伝子上の変異 (*pro1*<sup>D154N</sup>) によりプロリンを蓄積する株を分離した (Morita et al., 2003)。また、*PRO1* へのランダム変異導入によりフィードバック阻害感受性を低下させる変異型 *PRO1* を複数取得 (*pro1*<sup>I150T</sup>、*pro1*<sup>E149K</sup>、*pro1*<sup>N142D/I166V</sup> 等) した (Sekine et al., 2007)。これらの変異型 GK を発現するプロリン蓄積株は、冷凍、乾燥、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、エタノールなどのストレス耐性を示すことから (Terao et al., 2003; Takagi et al., 2000; 2005; 2008)、*S. cerevisiae* においてもプロリンが細胞保護効果を有することが初めて見出された。さらに、プロリン蓄積株において液胞の機能を欠損するとエタノールや高温ストレスへの耐性が失われることが明らかとなり、液胞の機能がプロリン蓄積よりもたらされるストレス耐性に必須であることが示唆された (Matsuura and Takagi, 2005)。しかし、ストレス時のオルガネラにおけるプロリンの局在については不明点が多いのも現状である。

プロリンと *S. cerevisiae* の元来の細胞保護物質であるトレハロースとの関係性も検証された。*S. cerevisiae* のトレハロース合成系遺伝子 *TPS1* を破壊したトレハロース非合成株におけるプロリンのストレス耐性効果の解析では、変異型 *PRO1*

を発現するプラスミドを *PUT1* 破壊株や *TPS1* 破壊株に導入してプロリンを蓄積させても、トレハロース非合成株ではプロリンのストレス保護効果は見られず、人工的に蓄積させたプロリンがトレハロースの代替にはならないと考えられた (Kaino and Takagi, 2009)。最近、プロリンや野生型 *PRO1* の過剰発現がリグノセルロース系バイオマス由来発酵阻害剤 (フルフラール、酢酸、フェノール) を添加した培地におけるストレス耐性に寄与することも報告されている (Wang et al., 2015) が、その詳細な耐性獲得機構は不明である。また、プロリン合成系の遺伝子 *PRO1*、*PRO2*、*PRO3* のそれぞれの単独破壊株では、ツニカマイシンや dithiothreitol (DTT) といった薬剤により誘発される ER ストレスに感受性を示す (Liang et al., 2014)。 *S. cerevisiae* において *PRO1* 遺伝子を破壊するとストレス感受性を示すが、GK 活性のない変異型 *PRO1* の発現によりストレス耐性が回復することから、Pro1 タンパク質自体がプロリン合成とは無関係な新奇機能を有し、細胞保護に関与する可能性も示唆されている (立橋・博士論文、2016)。

また、proline oxidase 遺伝子 (*PUT1*) の機能欠損による分解系の阻害と変異型 *PRO1* (*pro1*<sup>H150T</sup>、*pro1*<sup>D154N</sup>) による合成系強化を組み合わせたプロリン高蓄積株において、エタノールや H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理による細胞内 ROS レベルの上昇及び生存率の低下が抑制された。ただし、細胞内プロリン含量とストレス耐性には相関が見られなかったため (田口・修士論文、2009)、その耐性獲得には最適なプロリン含量が存在し、どのような代謝工学的手法でプロリンを蓄積させたかも重要であることが示唆された。さらに、当研究室では酵母細胞内におけるプロリンの蓄積とプロリン代謝を介した経路が高温や酸化ストレスの耐性に関与すること (Nishimura et al., 2010; 白川・修士論文、2011) や、Put1 の過剰発現が酸化ストレス感受性に関与しないこと (筒井・修士論文、2013) も報告した。以上のことから、プロリンはストレス耐性の付与に関与するが、その効果がプロリンによる直接的なものであるかどうかについては未だに議論が続いている。

### *S. cerevisiae* と他種生物におけるプロリンの代謝系

*S. cerevisiae* はサイトゾルにおいてグルタミン酸から三種類のプロリン合成酵素 ( $\gamma$ -glutamyl kinase (Pro1)、 $\gamma$ -glutamyl-5-phosphate reductase (Pro2)、 $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate reductase (Pro3)) によって合成される (Tomenchok and Brandriss, 1987)。Pro1 はキナーゼドメイン、リンカー領域、PUA ドメインから構成される。PUA ドメインは GK 活性に必須ではないが、酵素として高い活性を有するためには必要である (田坂・修士論文、2009)。プロリンは、ミトコンドリアにおいて二つの酵素; proline oxidase (Put1)、 $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase (Put2) によって酸化分解を受ける (Brandriss, 1979; Wang and Brandriss, 1987)。Put1 は FAD を補酵素とし、ミトコンドリア内膜の CoQ (ユビ



キノン)からの電子の受取を介してミトコンドリアにおいてプロリンの分解を行っていることが知られている (Wanduragala et al., 2010)。proline oxidase はハエの飛翔筋ミトコンドリアにおいて内膜の膜間スペース側に局在することは明らかになっているが (Balboni and Hecht, 1977)、*S. cerevisiae* における Put1 の局在が内膜の膜間スペース側かマトリックス側かは明らかになっていない。また、Put2 は、ミトコンドリアのマトリックスに局在し (Brandriss and Krzywicki, 1986)、植物の P5C dehydrogenase は、ミトコンドリア内膜結合タンパク質として見出されている (Elthon and Stewart, 1981)。さらに、プロリンはアルギニン代謝系とも関連しており、サイトゾルの ornithine aminotransferase (Car2)は、オルニチンを分解し、P5C ( $\Delta^1$ -ピロリン-5-カルボン酸)を生じる反応を触媒する (Deschamps and Wiame, 1979)。これらプロリンの代謝経路は以下の Fig. 3 に示した。

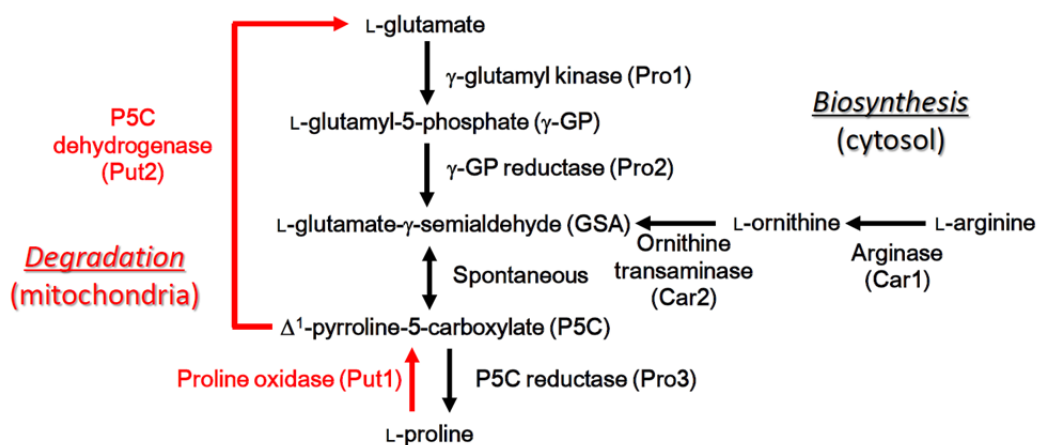


Fig. 3. 酵母 *S. cerevisiae* のプロリンの代謝経路と関連経路に参与する酵素群

大腸菌やサルモネラにおけるプロリン生合成系は *S. cerevisiae* と同様だが、分解系は、proline oxidase ドメインと P5C dehydrogenase ドメインを持つ putA タンパク質によりプロリンからグルタミン酸まで分解される (Maloy and Roth, 1983)。一方、ヒトやシロイヌナズナ等の高等真核生物では、P5CS タンパク質 ( $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthase)によりグルタミン酸から P5C を合成し、P5C reductase で P5C からプロリンを合成する (Hu et al., 1992; Pérez-Arellano et al., 2010)。*S. cerevisiae* では同定されていないが、オルニチンからプロリンを合成する ornithine cyclodeaminase の存在もバクテリアや真核生物で広く知られている (Costilow and Laycock 1971; Sharma et al., 2013)。*Clostridium sticklandii* や *Trypanosoma cruzi* では L-proline と D-proline の相互変換を触媒するプロリンラセマーゼが知られている (Chamond et al., 2003)。

### プロリンと転写制御

プロリン合成系遺伝子の *PRO1* と *PRO2* の発現は、転写活性化因子 Gcn4

(General Control Nonderepressible 4)による一般アミノ酸制御 (General amino acid control) で制御されている (Li and Brandriss, 1992; Natarajan et al., 2001)。一方、*PRO3* はその制御を受けておらず、恒常的に発現している (Natarajan et al., 2001)。プロリン合成系鍵酵素の遺伝子である *PRO1* は、グルタミン酸によって誘導されず、プロリンによって発現抑制されない (Li and Brandriss, 1992)。また、プロリンの分解系は多くの転写因子によって制御されていることが知られており、プロリンに応答した経路と、窒素源枯渇に応答した経路がある。

プロリンに応答した *PUT1* や *PUT2* の転写は、Zn (II)<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub> ファミリーに属する転写因子の Put3 が関与している (Marczak and Brandriss, 1991)。Zn (II)<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub> ファミリータンパク質は binuclear zinc cluster と呼ばれる DNA 結合ドメインを有する。このドメインは Put3 の他にも Gal4、Ppr1、Leu3、Hap1、Lac9 などに存在することで知られており、それぞれがホモダイマーで機能する (Todd and Andrianopoulos, 1997; MacPherson et al., 2006)。Put3 は、CGG-N<sub>10</sub>-CCG という特定の DNA の配列を認識し、恒常的に *PUT1* のプロモーターに結合しているが、プロリンと結合すると高リン酸化状態となり、*PUT1* の転写を活性化すると考えられている (Axelrod et al., 1991; Sellick and Reece, 2003)。Put1 はその酵素活性に補酵素として FAD を必要とすることで知られているが、Put3 は、原形質膜のリボフラビントランスポーターをコードする *MCH5* も誘導する (Spitzner et al., 2008)。一方、その他の原形質膜トランスポーターやオルガネラトランスポーターの Put3 による制御についてはあまり良く分かっていない。

培地中の窒素源が、*S. cerevisiae* にとって資化しやすいグルタミン、アルギニン、アンモニアなどの場合、難資化性のプロリンや、 $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA)、アラントインなどの代謝関連遺伝子の転写は窒素カタボライト抑制 (Nitrogen Catabolite Repression: NCR) と呼ばれる機構により抑制されている (Cooper, 2002)。プロリンの資化に関与する *PUT1* や *PUT2* も同様であり、その転写活性化は、培地中にプロリンが存在する時 (Brandriss, 1987; Siddiqui and Brandriss, 1989)、あるいは窒素源飢餓時やラパマイシン処理時に起こる (Saxena et al., 2003)。NCR を司る GATA ファクターは窒素源飢餓時あるいは、TOR (target of rapamycin) 複合体 1 の阻害剤であるラパマイシン (Heitman et al., 1991) の処理時に働く転写因子である。GATA ファクターは、2つの活性化因子 (Gat1/Nil1, Gln3) と、2つの抑制因子 (Dal80/Uga43, Gzf3/Deh1/Nil2) からなる。資化しやすいアミノ酸を豊富に含む培地では、Gat1 と Gln3 はリン酸化されており、プリオン様タンパク質の Ure2 によってサイトゾルに隔離されているが (Cox et al., 2000; Cunningham et al., 2000)、難資化性窒素源のみが存在する培地では核に移行し、*PUT1* などの難資化性窒素源の代謝関連遺伝子の転写を活性化する。Dal80 と Gzf3 は、標的遺

伝子のプロモーターと競合的に結合し、核内の活性化因子と結合することで、標的遺伝子の転写を抑制する (Ljungdahl and Daignan-Fornier, 2012)。

### 原形質膜におけるアミノ酸の輸送系

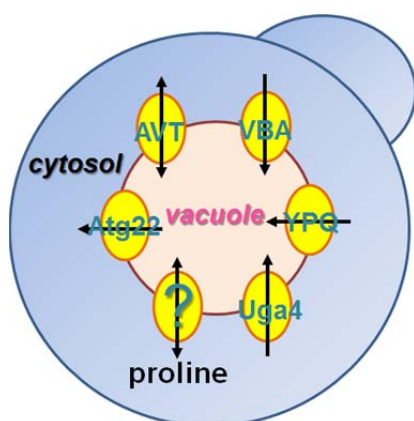
アミノ酸トランスポーターに関する研究は動植物の細胞や微生物などにおいて 1940 年代ごろより始まった (Barnett, 2008)。*S. cerevisiae* においても 1960 年代から 1980 年代にかけて輸送系を欠損する変異株が多く分離され(大隅, 1982)、*S. cerevisiae* S288C 株のゲノムの全塩基配列決定 (Goffeau et al., 1996) がされて以降、原形質膜やオルガネラのアミノ酸トランスポーターをコードする推定の遺伝子が見出され (Paulsen et al., 1998; Van Belle and André, 2011)、アミノ酸トランスポーターを含む多くのトランスポーターの輸送基質が同定されていった (Ren et al., 2004; Ljungdahl and Daignan-Fornier, 2012)。アミノ酸トランスポーターには高親和性のものと低親和性のものがあることが知られている。あるアミノ酸に特異的な高親和性のトランスポーターは、構造的に非常に似ている分子種によってのみ阻害を受ける。*S. cerevisiae* の原形質膜におけるアミノ酸輸送系は主に APC (Amino Acid-Polyamine-Organocation) Family のトランスポーターによって担われるが、(Regenberg et al., 1999)、一部 MFS (Major Facilitator Superfamily) によって輸送されるものもある。オリゴペプチドトランスポーターはジ・トリペプチドトランスポーターの PTR (Peptide TRansport) と、4~5 アミノ酸残基のオリゴペプチドトランスポーターの OPT (OligoPeptide Transport) によって輸送される (Wiles et al., 2006)。原形質膜のアミノ酸トランスポーターは環境中の栄養条件やストレス等によって転写レベルでの制御、翻訳レベルでの制御、翻訳後の制御を受けている。APC Family トランスポーターの Gap1 は、全てのアミノ酸を輸送する General amino acid permease (Jauniaux and Grenson, 1990) として知られており、アンモニアなどの資化しやすい窒素源がある時や環境ストレスに応答して ubiquitin ligase である Rsp5 とそのアダプターを介して原形質膜からエンドサイトーシスされることが報告されている (Springael and André, 1998; Shiga et al., 2014, 佐々木・博士論文, 2013)。プロリンは原形質膜における 4 種類の APC Family のトランスポーター (Gap1, Put4, Agp1, Gnp1) によって細胞外から取り込まれるが、Gap1 やプロリンに高親和性な Put4 による取り込みが主となる (Andréasson et al., 2004; Lasko and Brandriss, 1981)。また、*S. cerevisiae* のアミノ酸センサーの Ssy1 とトランスポーターは構造的な類似性があるが、Gap1 はアミノ酸を感知するセンサー (Transceptor) としての役割も報告されている (Van Zeebroeck et al., 2008)。

大腸菌では主に 3 種のプロリン取り込み系が知られており、ナトリウム/プロリンシンポーターの PutP、プロトン/プロリンシンポーターの ProP、ABC トラン

スポーター複合体の ProU システムにおいて取り込まれる (Culham et al., 1993)。ヒト (Galli, 1999) や植物 (Hayat et al., 2012; Verslues and Sharma, 2010) での高親和性プロリントランスポーターは広く知られており、ストレス耐性や栄養源枯渇時におけるプロリンの輸送などに関わっている。

### *S. cerevisiae* の液胞のアミノ酸輸送系

*S. cerevisiae* はプロリンを環境中から、主に Put4 と Gap1 で取り込むが、プロリンを含まないアンモニアを窒素源とする SD 最少培地においてはプロリンの細胞内含量が、細胞内の数%を占めるグルタミン酸やアルギニンなどのアミノ酸に比べて低く保たれており、乾燥細胞重量当たり 0.01%程度しか検出されない (Tsolmonbaatar et al., 2012)。また、*S. cerevisiae* 液胞におけるプロリンのプールも少ないことに加え、プロリンを添加した培養条件での解析も行われなかったため、液胞内におけるプロリンの局在や輸送に関わる分子機構に関してはあまり注目されてこなかった。当研究室はこれまでに、*S. cerevisiae* の定常期においてプロリンは主に液胞に存在することを示しており (Morita et al., 2002)、酵母細胞において、液胞内のプロリンがストレス耐性に関与することが示唆されている。さらに *S. cerevisiae* においてプロリンの液胞膜を介した液胞内腔への取り込み系の存在 (Matsuura and Takagi, 2005) や排出系の存在 (Ishimoto et al., 2012) が示されている。*S. cerevisiae* の液胞は細胞体積の 30%を占めるオルガネラであり、単層の液胞膜によって囲まれている。内腔が酸性に保たれ、細胞内の異物や不要になったタンパク質等を分解し再利用する。この生理機能の発現には、液胞の  $H^+$  ATPase の働きが必要である (安楽, 2005)。液胞膜におけるアミノ酸輸送はこの  $H^+$  ATPase によって形成されるプロトン勾配を用いた二次的輸送である (Ohsumi and Anraku, 1981; Sato et al., 1984)。アミノ酸以外にも、ヌクレオチド、カチオン、アニオン、重金属などがこの濃度勾配を用いて液胞内腔に輸送されていることが知られている (Li et al., 2009)。*S. cerevisiae* の液胞には、



サイトゾルから取り込まれたアミノ酸のほか、液胞内腔の protease による分解で生じたアミノ酸やペプチドが存在しており、タンパク質を構成する全てのアミノ酸を含む。しかし、液胞に局在するアミノ酸の構成はサイトゾルとは大きく異なっている (Kitamoto et al., 1988; Wiemken and Durr, 1974)。対数増殖期の *S. cerevisiae* では、70~90%の塩基性アミノ酸が液胞に局在していることが知られている。一方で、グルタミン酸やアスパラギン酸などの酸性アミノ酸の多くは、液胞から排出されておりサイトゾルに局在する。中性ア

**Fig. 4.** *S. cerevisiae* における液胞のアミノ酸トランスポーター  
矢印の向きは輸送基質が輸送される方向を示している (詳細は Table 1 を参照)

ミノ酸は、一般的に酸性アミノ酸ほどは液胞から排出されない。しかしながら、対数増殖期の *S. cerevisiae* においてプロリンは主にサイトゾルに局在することが知られている (Kitamoto et al., 1988; 西田・修士論文, 2010)。これまでに、液胞のアミノ酸トランスポーターが複数同定されてきたが (Avt1~Avt7, Vba1~Vba5, Atg22, Uga4, Ypq1 など; Fig. 4)、どのアミノ酸がどのトランスポーターで輸送されているかについては部分的にしか解明されていない (Russnak et al., 2001; Shimazu et al., 2005; Yang et al., 2006; Umemura et al., 2004; Sekito et al., 2008, 2014b)。ヒト (Schiöth et al., 2013) や植物 (Yong et al., 1999) にも存在している AVT ファミリーのタンパク質のうち、Avt1、Avt3、Avt4、Avt6 は、酸性あるいは中性アミノ酸の輸送に関わることが報告されている (Russnak et al., 2001; Chahomchuen et al., 2009)。最近、Avt4 が塩基性アミノ酸の排出に関わることも明らかになった (Sekito et al., 2014a)。Avt2、Avt5、Avt7 の輸送基質は未知であったが、近年 Avt7 が中性アミノ酸の輸送や胞子形成に関わることが報告された。また、栄養豊富な培地から窒素源飢餓の環境に移動させた際、AVT3, AVT4, AVT7 の三重破壊株では AVT3, AVT4 の二重破壊株に比べて、液胞におけるプロリンの排出が低下したことが示された (Tone et al., 2014)。さらに、Vba1、Vba2、Vba3 は塩基性アミノ酸の輸送に関わる MFS (Major Facilitator Superfamily) タンパク質として知られている (Shimazu et al., 2005)。MFS タンパク質は、*S. cerevisiae* の原形質膜に多く局在しており、そのオルソログ遺伝子は高等真核生物にも存在する (Wipf et al., 2002)。Atg22 は栄養飢餓時に機能し、液胞におけるオートファジックボディーの分解に伴い、様々なアミノ酸の排出を行うトランスポーターである (Yang et al., 2006)。Uga4 は、液胞と原形質膜の GABA 取り込みトランスポーターである (Umemura et al., 2004)。Ypq1 は液胞膜でリジンの取り込みに関与する (Sekito et al., 2014b)。液胞アミノ酸トランスポーターの輸送基質については Table 1 にまとめた。

**Table 1** *S. cerevisiae* における液胞のアミノ酸トランスポーターと輸送基質

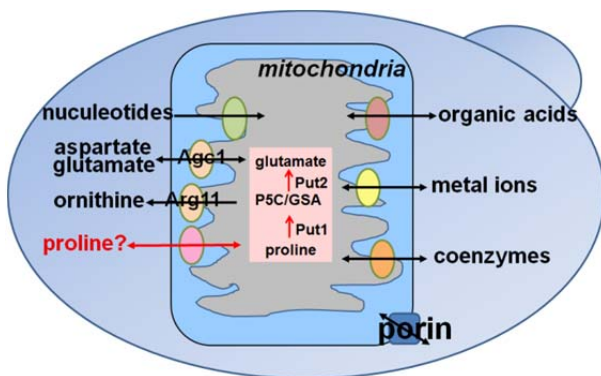
Protein	Transport substrate and direction
Avt1	Import of glutamine, isoleucine, tyrosine
Avt2	?
Avt3	Export of glutamine, isoleucine, tyrosine
Avt4	Export of glutamine, isoleucine, tyrosine
Avt5	?
Avt6	Export of aspartate, glutamate
Avt7	?
Atg22	Export of amino acids
Uga4	Import of GABA
Vba1	Import of basic amino acids
Vba2	Import of basic amino acids
Vba3	Import of basic amino acids
Vba4	Import of basic amino acids
Ypq1	Import of basic amino acids
Ypq2	Import of basic amino acids
Ypq3	Import of basic amino acids

## ミトコンドリアのアミノ酸輸送系

プロリンの分解の場合はミトコンドリアであるため、Put1 がミトコンドリアのマトリックスに局在する場合、プロリンはミトコンドリア外膜と内膜の両方を通過する必要がある。その輸送・分解に伴う分子機構の詳細については良く分かっていない。また、プロリンとその分解産物である P5C はプロリン-P5C サイクル (Phang et al., 2008; Miller et al., 2009) を形成して細胞内の酸化還元バランスを制御しており、この過程におけるプロリンと P5C のトランスポーターの関与が示唆されている。しかしながら、ミトコンドリア内外へのプロリンや P5C の輸送に関する分子機構の詳細については不明点が多い。これまでに、*S. cerevisiae*、コムギ、ホウレンソウ、ラット、ツェツェバエなどにおいて、ミトコンドリアにおけるプロリン輸送を示唆する報告はあるが (Pallotta, 2014; Di Martino et al., 2006; Yu et al., 1983; Njagi et al., 1992; Atlante et al., 1994; 1996)、内膜トランスポーターの同定には至っていない。

ミトコンドリアの外膜では、ポーリンと呼ばれる非特異チャネルによって 6000 ダルトン以下の物質がミトコンドリアの膜間スペースに輸送される (Cohen et al., 1982; Benz, 1985; Schmid et al., 1992)。酵母では、Por1 と Por2 がミトコンドリアのポーリンとして知られている (Lee et al., 1998)。一方、多くのトランスポーターが局在するミトコンドリア内膜は極めて選択性が高い。

*S. cerevisiae* においては、35 種類のミトコンドリアトランスポーターファミリー (MC (mitochondrial carriers) ファミリーや、MTP (Mitochondrial transport proteins) などと呼ばれる) のタンパク質が存在し、アミノ酸や有機酸、カチオン、リン酸、補酵素、ヌクレオチドなどを輸送する (Fig. 5)。これらの物質は、ミトコン



**Fig. 5. *S. cerevisiae* におけるミトコンドリアの物質輸送**

ミトコンドリアでは、MC ファミリーや MPC といった内膜のトランスポーターが様々な物質輸送に関与する。プロリンがどのような経路で輸送され、Put1, Put2 による分解を受けているかは明らかでない。

ドリアにおける酸化的リン酸化などにおけるエネルギー産生や糖新生、アミノ酸や脂肪酸の合成と分解、ミトコンドリア DNA の複製やそれにコードされる遺伝子の発現に必要である。アミノ酸やその類縁体を輸送する MC ファミリーでは、アスパラギン酸/グルタミン酸交換トランスポーターの AGC、グルタミン酸トランスポーターの GC、カルニチン/アシルカルニチン交換トランスポーターの CRC、オルニチントランスポーターの ORC、アルギニントランスポーターの BAC などが知られている (Monné et al., 2015)。*S. cerevisiae* にはアミノ酸やアミノ酸類縁体の MC としてカルニチン/アシルカル

ニチントランスポーターの Crc1 (Palmieri et al., 1999)、オルニチントランスポーターの Arg11/Ort1 (Crabeel et al., 1996; Palmieri et al., 1997; Soetens et al., 1998)、アスパラギン酸/グルタミン酸交換トランスポーターの Agc1 (Cavero et al., 2003)、S-アデノシルメチオニントランスポーターの Pet8/Sam5 (Marobbio et al., 2003) が同定されている。

高等真核生物においても、MC ファミリーのトランスポーターは保存されており、SLC25 ファミリーとして知られる。ヒトでは 53 種類、シロイヌナズナでは 58 種類、ヒメツリガネゴケでは 93 種の SLC25 トランスポーターが存在する

(Palmieri et al., 2011)。一方、MC ファミリーのトランスポーターは原核生物では全く存在しておらず、進化の過程でどのように生じたのかは未知である。MC ファミリーの多くのタンパク質は約 300 アミノ酸残基からできており、約 100 アミノ酸残基の類似配列が 3 回反復していることが明らかになっている。世界で初めに同定され配列決定された MC タンパク質は、ウシミトコンドリアの ADP/ATP 交換トランスポーターである (Aquila et al., 1982)。ADP/ATP 交換トランスポーターは P-X-[DE]-X-X-[RK] といったモチーフを有するが、このような配列は全ての MC に保存されている。MC ファミリーの多くはミトコンドリア内膜に局在するが、Ugo1 はミトコンドリア外膜に局在する。Ugo1 は MC ファミリーであるにもかかわらず、トランスポーターではなく、ミトコンドリアの融合を仲介する分子として機能する (Sesaki and Jensen, 2001)。また、Ant1 はペルオキシソームに局在する (Palmieri et al., 2001)。S. cerevisiae における MC ファミリーの系統樹を Fig. 6 に示す。

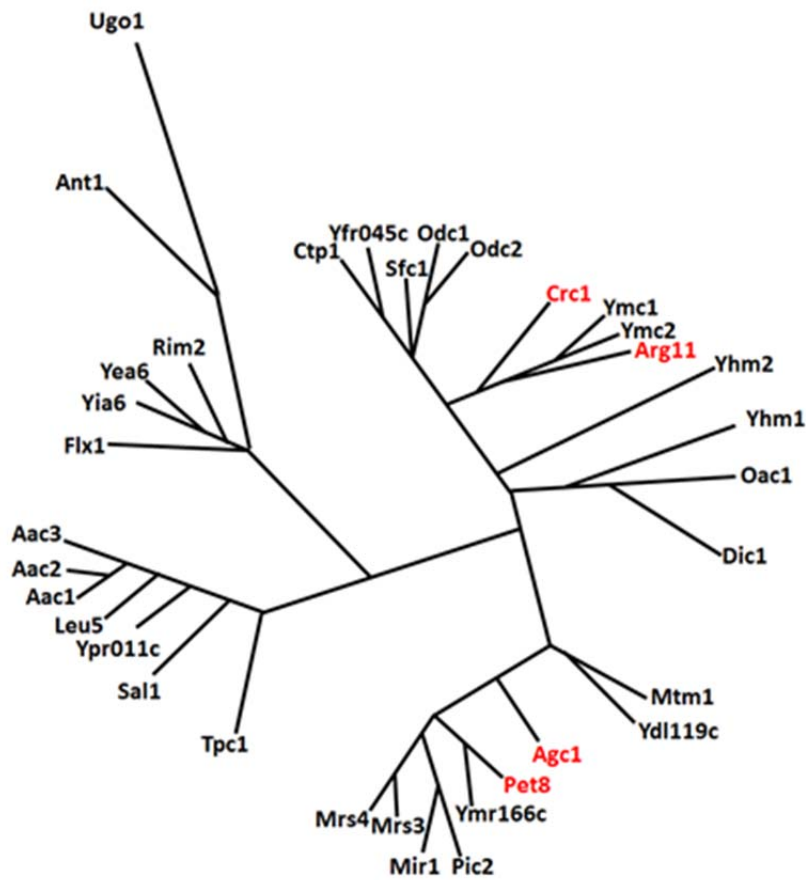
近年、MC ファミリーではないミトコンドリアトランスポーターとして、ピルビン酸トランスポーターの Mpc1, Mpc2, Mpc3 が同定されており (Bricker et al., 2012; Divakaruni and Murphy, 2012; Herzig et al., 2012)、機能未知のミトコンドリアトランスポーターがプロリン輸送に関与する可能性も考えられる。植物では、APC ファミリーのトランスポーターがミトコンドリアの GABA 輸送に関与しているという報告もある (Michaeli et al., 2011)。

本研究では、機能未知のものを多く含む MC および Mpc に着目しミトコンドリア内膜のプロリントランスポーターの候補として解析を行った。これら 38 種のトランスポーターとその輸送基質を Table 2 にまとめた。

Table 2 本研究で用いたミトコンドリアトランスポーターとその輸送基質

<b>Protein</b>	<b>Possible substrates etc</b>
Aac1	ADP/ATP
Aac2	ADP/ATP
Aac3	ADP/ATP
Agc1	Asparate/Glutamate
Ant1	Adenine nucleotide
Arg11/Ort1	Ornithine
Crc1	Carnitine
Ctp1	Tricarboxylate
Dic1	Dicarboxylate
Flx1	Fravin
Leu5	CoA
Mir1	Phosphate
Mrs4	Fe
Mrs3	Fe
Mtm1	Manganese ion
Oac1	Oxaloacetare
Odc1	2-oxoadipate, 2-oxoglutarate
Odc2	2-oxoadipate, 2-oxoglutarate
Pet8	S-adenosylmethionine
Pic2	Phosphate
Rim2	Tyrimidin nucleotide
Sal1	ATP/ADP
Sfc1	Succinate-Fumarate
Tpc1	Thiamine diphosphate
Ugo1	Required for outer and inner mitochondrial membrane fusion
Ydl119c	Organic acid?
Yfr045w	Organic acid?
Yea6	NAD+
Yhm1/Ggc1	GDP/GTP
Yhm2	Tricarboxylate
Yia6	NAD+
Ymc1	Organic acid
Ymc2	Organic acid
Ymr166c	?
Ypr011c	High energy compounds?
Mpc1	Pyruvate
Mpc2	Pyruvate
Mpc3	Pyruvate?





**Fig. 6.** *S. cerevisiae* におけるミトコンドリアトランスポーター (MC) の系統樹

*S. cerevisiae* には 35 種の MC ファミリーのタンパク質が存在しており、その系統樹を作製した。アミノ酸やアミノ酸類縁体トランスポーターとして同定されているもの (Crcl, Arg11, Agc1, Pet8) を赤で示しており、それらにホモロジーの高いトランスポーターはアミノ酸を輸送している可能性が示唆される。系統樹は (Palmieri, 2010) を参考にして作製した。

## 1. 材料と方法

本研究における基本的な実験操作は、Molecular Cloning (Sambrook and Russel, 2001)、バイオ実験イラストレイテッド7 (水野、2003)、酵母ラボマニュアル (山本、大矢=共編、1998) を参考にして行った。

### 1.1.1 菌株

本研究で作製、および使用した酵母菌株を Table 3 に示す。

**Table 3-1** 液胞プロリントランスポーターの探索で使用した酵母菌株

Strain	Relevant genotype	Source
BY4741	MATa <i>his3</i> Δ1 <i>leu2</i> Δ0 <i>met15</i> Δ0 <i>ura3</i> Δ0	Derived from BY4743 spore
Δ <i>avt1</i>	BY4741 <i>avt1::kanMX4</i>	This study
Δ <i>avt3</i>	BY4741 <i>avt3::kanMX4</i>	This study
Δ <i>avt7</i>	BY4741 <i>avt7::kanMX4</i>	This study
Δ <i>avt1</i> Δ <i>avt3</i>	BY4741 <i>avt1::kanMX4 avt3::natNT2</i>	This study
Δ <i>avt1</i> Δ <i>avt7</i>	BY4741 <i>avt1::hphNT1 avt7::kanMX4</i>	This study
Δ <i>avt3</i> Δ <i>avt7</i>	BY4741 <i>avt3::natNT2 avt7::kanMX4</i>	This study
Δ <i>avt1</i> Δ <i>avt3</i> Δ <i>avt7</i>	BY4741 <i>avt1::hphNT1 avt3::natNT2 avt7::kanMX4</i>	This study
YKOΔ <i>avt1</i>	BY4741 <i>avt1::kanMX4</i>	Open Biosystems
YKOΔ <i>avt2</i>	BY4741 <i>avt2::kanMX4</i>	Open Biosystems
YKOΔ <i>avt3</i>	BY4741 <i>avt3::kanMX4</i>	Open Biosystems
YKOΔ <i>avt4</i>	BY4741 <i>avt4::kanMX4</i>	Open Biosystems
YKOΔ <i>avt5</i>	BY4741 <i>avt5::kanMX4</i>	Open Biosystems
YKOΔ <i>avt6</i>	BY4741 <i>avt6::kanMX4</i>	Open Biosystems
YKOΔ <i>avt7</i>	BY4741 <i>avt7::kanMX4</i>	Open Biosystems
Δ <i>pep3</i>	BY4741 <i>pep3::natNT2</i>	This study
Δ <i>avt1</i> Δ <i>pep3</i>	BY4741 <i>avt1::kanMX4 pep3::natNT2</i>	This study
Δ <i>avt7</i> Δ <i>pep3</i>	BY4741 <i>avt7::kanMX4 pep3::natNT2</i>	This study
Δ <i>avt1</i> Δ <i>avt7</i> Δ <i>pep3</i>	BY4741 <i>avt1::hphNT1 avt7::kanMX4 pep3::natNT2</i>	This study
MB329-17C	Mat α <i>trp1 ura3-52 put1-54</i>	MC Brandriss

**Table 3-2** ミトコンドリアプロリントランスポーターの探索で使用了酵母菌株

Strain	Relevant genotype	Source
BY4741	MATa <i>his3</i> Δ1 <i>leu2</i> Δ0 <i>met15</i> Δ0 <i>ura3</i> Δ0	Derived from BY4743 spore
Δ <i>aac1</i>	BY4741 <i>aac1::kanMX4</i>	Open Biosystems
Δ <i>aac2</i>	BY4741 <i>aac2::kanMX4</i>	This study
Δ <i>aac3</i>	BY4741 <i>aac3::kanMX4</i>	Open Biosystems
Δ <i>agc1</i>	BY4741 <i>agc1::kanMX4</i>	Open Biosystems
Δ <i>ant1</i>	BY4741 <i>ant1::kanMX4</i>	Open Biosystems
Δ <i>arg11</i>	BY4741 <i>arg11::kanMX4</i>	Open Biosystems
Δ <i>crc1</i>	BY4741 <i>crc1::kanMX4</i>	Open Biosystems
Δ <i>ctp1</i>	BY4741 <i>ctp1::kanMX4</i>	Open Biosystems
Δ <i>dic1</i>	BY4741 <i>dic1::kanMX4</i>	Open Biosystems
Δ <i>flx1</i>	BY4741 <i>flx1::kanMX4</i>	Open Biosystems
Δ <i>leu5</i>	BY4741 <i>leu5::kanMX4</i>	This study
Δ <i>mir1</i>	BY4741 <i>mir1::kanMX4</i>	Open Biosystems
Δ <i>mrs3</i>	BY4741 <i>mrs3::kanMX4</i>	Open Biosystems
Δ <i>mrs4</i>	BY4741 <i>mrs4::kanMX4</i>	Open Biosystems
Δ <i>mtm1</i>	BY4741 <i>mtm1::kanMX4</i>	Open Biosystems
Δ <i>oac1</i>	BY4741 <i>oac1::kanMX4</i>	Open Biosystems
Δ <i>odc1</i>	BY4741 <i>odc1::kanMX4</i>	Open Biosystems
Δ <i>odc2</i>	BY4741 <i>odc2::kanMX4</i>	This study
Δ <i>pet8</i>	BY4741 <i>pet8::kanMX4</i>	This study
Δ <i>pic2</i>	BY4741 <i>pic2::kanMX4</i>	Open Biosystems
Δ <i>put1</i>	BY4741 <i>put1::kanMX4</i>	Open Biosystems
Δ <i>rim2</i>	BY4741 <i>rim2::kanMX4</i>	This study
Δ <i>sal1</i>	BY4741 <i>sal1::kanMX4</i>	Open Biosystems
Δ <i>sfc1</i>	BY4741 <i>sfc1::kanMX4</i>	Open Biosystems
Δ <i>tpc1</i>	BY4741 <i>tpc1::kanMX4</i>	Open Biosystems
Δ <i>ugo1</i>	BY4741 <i>ugo1::kanMX4</i>	Open Biosystems
Δ <i>ydl119c</i>	BY4741 <i>ydl119c::kanMX4</i>	Open Biosystems
Δ <i>yfr045c</i>	BY4741 <i>yfr045c::kanMX4</i>	Open Biosystems
Δ <i>yea6</i>	BY4741 <i>yea6::kanMX4</i>	Open Biosystems
Δ <i>yhm1</i>	BY4741 <i>yhm1::kanMX4</i>	Open Biosystems
Δ <i>yhm2</i>	BY4741 <i>yhm2::kanMX4</i>	Open Biosystems
Δ <i>yia6</i>	BY4741 <i>yia6::kanMX4</i>	Open Biosystems
Δ <i>ymc1</i>	BY4741 <i>ymc1::kanMX4</i>	Open Biosystems
Δ <i>ymc2</i>	BY4741 <i>ymc2::kanMX4</i>	Open Biosystems
Δ <i>ymr166c</i>	BY4741 <i>ymr166c::kanMX4</i>	Open Biosystems
Δ <i>ypr011c</i>	BY4741 <i>ypr011c::kanMX4</i>	Open Biosystems
Δ <i>mpc1</i>	BY4741 <i>mpc1::kanMX4</i>	Open Biosystems
Δ <i>mpc2</i>	BY4741 <i>mpc2::kanMX4</i>	Open Biosystems
Δ <i>mpc3</i>	BY4741 <i>mpc3::kanMX4</i>	Open Biosystems

### 1.1.2 培地

酵母の生育培地として、SD 最少合成培地 (2% glucose and 0.17% Bacto yeast nitrogen base without amino acids and ammonium sulphate 0.5% ammonium sulphate) と完全天然培地 YPD (2% glucose, 1% yeast extract, and 2% peptone) を使用した。固体培地の作製には 2% agar を用いた。Bacto yeast nitrogen base without amino acids and ammonium sulphate、yeast extract、peptone は Difco Laboratories 社のものを用いた。

最少培地の単一アミノ酸として、あるいは SD 培地への添加にプロリン (ナカライテスク社) を用いた。特定のアミノ酸や核酸を欠いた完全合成培地の作製には、SD 培地に 2% の Drop out mix を混合した。

\*Drop-out mixture は、下記の物質から必要に応じて特定の物質を取り除き、残りをよく混合したものを使用した。

Adenine	0.5 g	L-Alanine	2.0 g	<i>p</i> -Aminobenzoic acid	0.2 g
L-Arginine	2.0 g	L-Asparagine	2.0 g	Uracil	2.0 g
L-Aspartic acid	2.0 g	L-Cysteine-HCl	2.0 g	L-Valine	2.0 g
L-Glutamine	2.0 g	L-Glutamic acid	2.0 g	L-Tyrosine	2.0 g
Glycine	2.0 g	L-Histidine	2.0 g	L-Serine	2.0 g
Inositol	2.0 g	L-Isoleucine	2.0 g	L-Tryptophan	2.0 g
L-Leucine	10.0 g	L-Lysine	2.0 g	L-Threonine	2.0 g
L-Methionine	2.0 g	L-Phenylalanine	2.0 g	L-Proline	2.0 g

培地は全てオートクレーブで滅菌し作製した。YPD 完全培地には必要に応じて抗生物質である G418 (200 mg)、clonNAT (100 mg) や、hygromycin B (300 mg) を 1 L の培地に対してオートクレーブ後に添加した。培地には必要に応じて粉末寒天 (20 g) を添加した。ミトコンドリア単離用には乳酸完全培地 (酵母ラボマニュアル (山本、大矢=共編、1998) を参照) を用いた。酵母の液体培養は、試験管や三角フラスコにシリコ栓で蓋をして行った。

大腸菌の生育培地として天然完全培地 LB 培地 (1% NaCl, 0.5% yeast extract, and 1% tryptone) を使用した。1L の LB 培地に対して必要に応じて抗生物質 (ampicillin (100 mg)、kanamycin (50 mg))、寒天 (20 g) を添加した。

### 1.1.3 プラスミド

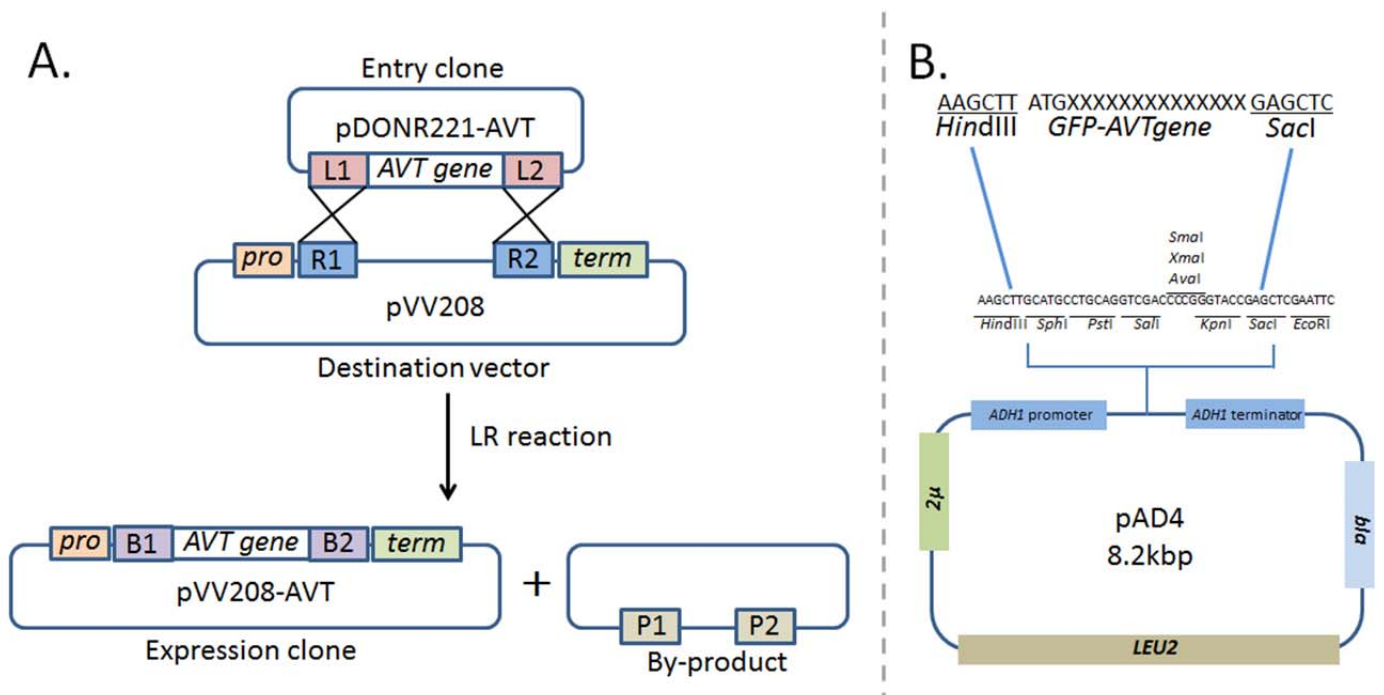
本章で構築、および使用したプラスミドを Table 4 に示す。

AVT1, AVT 3, AVT7 の過剰発現プラスミドの構築は酵母の Gateway™ システム (Hartley et al., 2000; Van Mullem et al., 2003) を用いて行った。S. cerevisiae BY4741 株からゲノム DNA を抽出後、PCR によって AVT7 を増幅させた。用いるプライマーには目的遺伝子配列の 5'側に attB1 配列 (AAAAAGCAGGCT)、3'側に attB2 配列 (AGAAAGCTGGGT) を付加した。PCR で増幅した産物をアガロースゲル電気泳動によって分離し、目的サイズの DNA 断片を切り出した (Gel Extract Kit; キアゲン社)。AVT1 と AVT3 では BP 反応用の PCR 断片は作製せずに ORF コレクションの BG1805 に既にクローニングされたプラスミドを用いた。

抽出した AVT7 を含む PCR 産物もしくは BG1805-AVT1 や BG1805-AVT3 とクローニング用ベクター pDONR™221 (Invitrogen 社) と BP 反応により組換えた。BP 反応は付属の説明書に従って行った。得られた反応物で 100 µl の大腸菌 DH5α コンピテントセルを形質転換後、kanamycin (50 µg/ml) 含有の LB プレートで選択した。形質転換体からアルカリ SDS 法をベースにした QIAprep spin miniprep kit (QIAGEN 社) を用いてプラスミドを抽出し、PCR によりプラスミドの完成を確認し pDONR221-AVT1、pDONR221-AVT3、pDONR221-AVT7 を得た。これらを発現用ベクター pVV208 (EUROSCARF) と LR 反応 (Fig. 7A) により組換えた。LR 反応は付属の説明書に従って行った。得られた反応物で 100 µl の大腸菌 DH5α コンピテントセルを形質転換後、ampicillin (100 µg/ml) 含有の LB プレートで選択した。得られた転換体からプラスミドを抽出し、PCR で確認後、実験に用いる酵母を形質転換した。

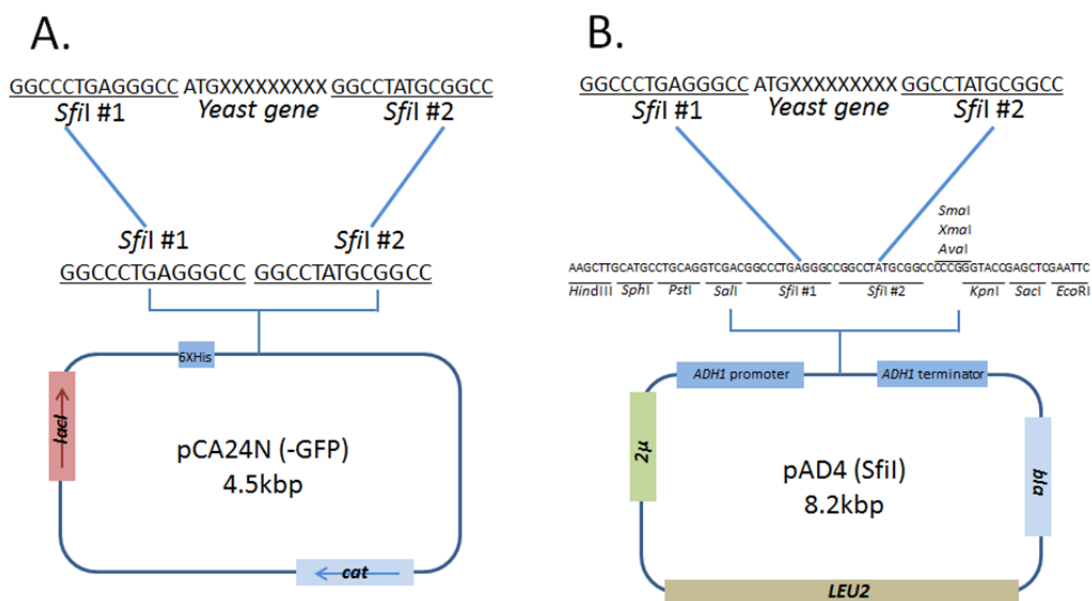
Avt1, Avt3, Avt7 の細胞内局在性を観察するため、N 末端に GFP を融合させたタンパク質を ADHI プロモーター制御下で発現させるプラスミドを構築した。その概略は Fig. 7B に示した。GFP とこれらの AVT 遺伝子を結合させるインサートの調製には、二段階 PCR 法 (Krawchuk and Wahls, 1999) を用いた。pAD4-GFP-AVT7 を構築するために、1<sup>st</sup> PCR として鋳型に pFA6a-GFP(S65T)-KanMX6 を用いて HindIII-GFPN-F と GFP-C-start-AVT7N-R で GFP 領域を増幅した。また、AVT7 の増幅の為に pVV208-AVT7 を鋳型として start-AVT7N-ORF1-F と AVT7stop-SacI-R を用いて増幅した。次に 2<sup>nd</sup> PCR として、1<sup>st</sup> PCR でできた 2 種の断片と HindIII-GFPN-F と AVT7stop-SacI-R を用いることにより、融合遺伝子の増幅を行った。同様にして、pFA6a-GFP(S65T)-KanMX6 を鋳型に HindIII-GFPN-F と GFPC-R、BG1805-AVT1 を鋳型に GFP-C-AVT1 と SacI-AVT1-R で 1<sup>st</sup> PCR を行い、HindIII-GFPN-F と SacI-AVT1-R を用いた 2<sup>nd</sup> PCR でそれらの断片を連結させた。また pFA6a-GFP(S65T)-KanMX6 を鋳型に PstI-GFPN-F と GFPC-R、BG1805-AVT3 を鋳型に GFP-C-AVT3 と SacI-AVT3-R

で 1<sup>st</sup> PCR を行い、PstI-GFPN-F と SacI-AVT1-R を用いた 2<sup>nd</sup> PCR でそれらの断片を連結させた。*HindIII* と *SacI* サイトを含む GFP-AVT1 と GFP-AVT7 は *HindIII* と *SacI* で消化し、同様に *HindIII* と *SacI* で消化した pAD4 とライゲーションさせた。*PstI* と *SacI* サイトを含む GFP-AVT3 は *PstI* と *SacI* で消化し、同様に *PstI* と *SacI* で消化した pAD4 とライゲーションさせた。ライゲーションには Ligation high var. 2 (TOYOBO 社) を用いた。得られた反応物で 100  $\mu$ l の大腸菌 DH5 $\alpha$  コンピテントセルを形質転換後、ampicillin (100  $\mu$ g/ml) 含有の LB プレートで選択した。得られた転換体からプラスミドを抽出し、制限酵素断片長により確認後、実験に用いる酵母を形質転換した。



**Fig. 7. AVT 遺伝子の過剰発現プラスミドと GFP 融合タンパク質発現用プラスミドの構築**  
 (A) AVT 遺伝子過剰発現プラスミド構築の流れ。エントリークローンの pDONR221-AVT を LR 反応により pVV208 と組換え、発現クローンである pVV208-AVT プラスミドを得た。pDONR221-AVT は、P21 に示した方法で BP 反応により得た。(B) 二段階 PCR で GFP と AVT 遺伝子を連結させ、両端に制限酵素サイトを含む DNA 断片の GFP-AVT を得た。GFP-AVT1 と GFP-AVT7 の場合は、図のように pAD4 の *HindIII*, *SacI* サイトにクローニングした。GFP-AVT3 の場合は、図中に詳細を示していないが *PstI*, *SacI* サイトにクローニングした。

ミトコンドリアトランスポーターの大腸菌発現用として、本学のシステム微生物学研究室（森研究室）から分譲して頂いた pCA24N(-GFP)の *SfiI* サイトに各ミトコンドリアトランスポーター遺伝子を導入した (Fig. 8A)。制限酵素断片長や PCR による挿入の確認とシーケンス解析を行った。また、*ADHI* プロモーター制御下での酵母過剰発現用として、pAD4 の *SalI* と *SmaI* サイトの内側に新たに *SfiI* サイトを付加したプラスミドを構築した。pCA24N(-GFP)にクローニングした各遺伝子を、pAD4 の *SfiI* サイトに導入し (Fig. 8B)、制限酵素断片長や PCR により確認した。



**Fig. 8. pCA24N と *SfiI* サイトを導入した pAD4 の構造**

(A) pCA24N(-GFP)の *SfiI* サイトに各ミトコンドリアトランスポーター遺伝子をクローニングした。(B) pAD4 に新たに付加した *SfiI* サイトに各ミトコンドリアトランスポーター遺伝子をクローニングした。

**Table 4-1 液胞プロリントランスポーターの探索で使したプラスミド**

Plasmids	Plasmid type	Source
BG1805-AVT1	BG1805-GAL1-AVT1-ZZ-HA-6HIS, URA3, CEN	Addgene (Gelperin et al., 2005)
BG1805-AVT3	BG1805-GAL1-AVT3-ZZ-HA-6HIS, URA3, CEN	Addgene (Gelperin et al., 2005)
pAD4	LEU2 2μm	J. Nikawa
pAD4-GFP-AVT1	LEU2, GFP-AVT1 2μm	This study
pAD4-GFP-AVT3	LEU2, GFP-AVT3 2μm	This study
pAD4-GFP-AVT7	LEU2, GFP-AVT7 2μm	Ts. Ariunzaya
pDONR221	Gateway Donor vector	Invitrogen
pDONR221-AVT1	Gateway Entry vector	This study
pDONR221-AVT3	Gateway Entry vector	This study
pDONR221-AVT7	Gateway Entry vector	This study
pFA6a-hphNT1	<i>hphNT1</i>	Euroscarf (Janke et al., 2004)
pFA6a-natNT2	<i>natNT2</i>	Euroscarf (Janke et al., 2004)
pFA6a-GFP(S65T)-KanMX6	GFP(S65T), KanMX6	Addgene (Longtine et al., 1998)
pRS415CgHIS3MET15	LEU2, CgHIS3, MET15, CEN	S. Morigasaki
pRS416CgHIS3MET15	URA3, CgHIS3, MET15, CEN	S. Morigasaki
pTV3	TRP1 2μm	J. Nikawa (Rose et al., 1991)
pUV2	URA3 2μm	J. Nikawa (Rose et al., 1991)
pVV208	URA3, CEN, pTetO7	Euroscarf (Van Mullem et al., 2003)
pVV208-AVT1	URA3, CEN, pTetO7, AVT1	This study
pVV208-AVT3	URA3, CEN, pTetO7, AVT3	This study
pVV208-AVT7	URA3, CEN, pTetO7, AVT7	This study

**Table 4-2** ミトコンドリアプロリントランスポーターの探索で使したプラスミド

Plasmids	Plasmid type	Source	Plasmids	Plasmid type	Source
pAD4	<i>LEU2 2μm</i>	J Nikawa	pCA24N(-GFP)	<i>Cm<sup>R</sup> lacI<sup>q</sup></i>	ASKA Library (Kitagawa et al., 2005)
pAD4-AAC1	<i>LEU2 2μm AAC1</i>	This study	pCA24N-AAC1	<i>Cm<sup>R</sup> lacI<sup>q</sup> AAC1</i>	This study
pAD4-AAC2	<i>LEU2 2μm AAC2</i>	This study	pCA24N-AAC2	<i>Cm<sup>R</sup> lacI<sup>q</sup> AAC2</i>	This study
pAD4-AAC3	<i>LEU2 2μm AAC3</i>	This study	pCA24N-AAC3	<i>Cm<sup>R</sup> lacI<sup>q</sup> AAC3</i>	This study
pAD4-AGC1	<i>LEU2 2μm AGC1</i>	This study	pCA24N-AGC1	<i>Cm<sup>R</sup> lacI<sup>q</sup> AGC1</i>	This study
pAD4-ANT1	<i>LEU2 2μm ANT1</i>	This study	pCA24N-ANT1	<i>Cm<sup>R</sup> lacI<sup>q</sup> ANT1</i>	This study
pAD4-ARG11	<i>LEU2 2μm ARG11</i>	This study	pCA24N-ARG11	<i>Cm<sup>R</sup> lacI<sup>q</sup> ARG11</i>	This study
pAD4-CRC1	<i>LEU2 2μm CRC1</i>	This study	pCA24N-CRC1	<i>Cm<sup>R</sup> lacI<sup>q</sup> CRC1</i>	This study
pAD4-CTP1	<i>LEU2 2μm CTP1</i>	This study	pCA24N-CTP1	<i>Cm<sup>R</sup> lacI<sup>q</sup> CTP1</i>	This study
pAD4-DIC1	<i>LEU2 2μm DIC1</i>	This study	pCA24N-DIC1	<i>Cm<sup>R</sup> lacI<sup>q</sup> DIC1</i>	This study
pAD4-FLX1	<i>LEU2 2μm FLX1</i>	This study	pCA24N-FLX1	<i>Cm<sup>R</sup> lacI<sup>q</sup> FLX1</i>	This study
pAD4-LEU5	<i>LEU2 2μm LEU5</i>	This study	pCA24N-LEU5	<i>Cm<sup>R</sup> lacI<sup>q</sup> LEU5</i>	This study
pAD4-MIR1	<i>LEU2 2μm MIR1</i>	This study	pCA24N-MIR1	<i>Cm<sup>R</sup> lacI<sup>q</sup> MIR1</i>	This study
pAD4-MRS3	<i>LEU2 2μm MRS3</i>	This study	pCA24N-MRS3	<i>Cm<sup>R</sup> lacI<sup>q</sup> MRS3</i>	This study
pAD4-MRS4	<i>LEU2 2μm MRS4</i>	This study	pCA24N-MRS4	<i>Cm<sup>R</sup> lacI<sup>q</sup> MRS4</i>	This study
pAD4-MTM1	<i>LEU2 2μm MTM1</i>	This study	pCA24N-MTM1	<i>Cm<sup>R</sup> lacI<sup>q</sup> MTM1</i>	This study
pAD4-OAC1	<i>LEU2 2μm OAC1</i>	This study	pCA24N-OAC1	<i>Cm<sup>R</sup> lacI<sup>q</sup> OAC1</i>	This study
pAD4-ODC1	<i>LEU2 2μm ODC1</i>	This study	pCA24N-ODC1	<i>Cm<sup>R</sup> lacI<sup>q</sup> ODC1</i>	This study
pAD4-ODC2	<i>LEU2 2μm ODC2</i>	This study	pCA24N-ODC2	<i>Cm<sup>R</sup> lacI<sup>q</sup> ODC2</i>	This study
pAD4-PUT1	<i>LEU2 2μm PUT1</i>	This study	pCA24N-PET8	<i>Cm<sup>R</sup> lacI<sup>q</sup> PET8</i>	This study
pAD4-PET8	<i>LEU2 2μm PET8</i>	This study	pCA24N-PIC2	<i>Cm<sup>R</sup> lacI<sup>q</sup> PIC2</i>	This study
pAD4-PIC2	<i>LEU2 2μm PIC2</i>	This study	pCA24N-RIM2	<i>Cm<sup>R</sup> lacI<sup>q</sup> RIM2</i>	This study
pAD4-RIM2	<i>LEU2 2μm RIM2</i>	This study	pCA24N-SAL1	<i>Cm<sup>R</sup> lacI<sup>q</sup> SAL1</i>	This study
pAD4-SAL1	<i>LEU2 2μm SAL1</i>	This study	pCA24N-SFC1	<i>Cm<sup>R</sup> lacI<sup>q</sup> SFC1</i>	This study
pAD4-SFC1	<i>LEU2 2μm SFC1</i>	This study	pCA24N-TPC1	<i>Cm<sup>R</sup> lacI<sup>q</sup> TPC1</i>	This study
pAD4-TPC1	<i>LEU2 2μm TPC1</i>	This study	pCA24N-UGO1	<i>Cm<sup>R</sup> lacI<sup>q</sup> UGO1</i>	This study
pAD4-UGO1	<i>LEU2 2μm UGO1</i>	This study	pCA24N-YDL119C	<i>Cm<sup>R</sup> lacI<sup>q</sup> YDL119C</i>	This study
pAD4-YDL119C	<i>LEU2 2μm YDL119C</i>	This study	pAD4-YFR045W	<i>Cm<sup>R</sup> lacI<sup>q</sup> YFR045W</i>	This study
pAD4-YFR045W	<i>LEU2 2μm YFR045W</i>	This study	pCA24N-YFR045W(CDS)	<i>Cm<sup>R</sup> lacI<sup>q</sup> YFR045W(CDS)</i>	This study
pAD4-YFR045W(CDS)	<i>LEU2 2μm YFR045W(CDS)</i>	This study	pCA24N-YEA6	<i>Cm<sup>R</sup> lacI<sup>q</sup> YEA6</i>	This study
pAD4-YEA6	<i>LEU2 2μm YEA6</i>	This study	pCA24N-YHM1	<i>Cm<sup>R</sup> lacI<sup>q</sup> YHM1</i>	This study
pAD4-YHM1	<i>LEU2 2μm YHM1</i>	This study	pCA24N-YHM2	<i>Cm<sup>R</sup> lacI<sup>q</sup> YHM2</i>	This study
pAD4-YHM2	<i>LEU2 2μm YHM2</i>	This study	pCA24N-YIA6	<i>Cm<sup>R</sup> lacI<sup>q</sup> YIA6</i>	This study
pAD4-YIA6	<i>LEU2 2μm YIA6</i>	This study	pCA24N-YMC1	<i>Cm<sup>R</sup> lacI<sup>q</sup> YMC1</i>	This study
pAD4-YMC1	<i>LEU2 2μm YMC1</i>	This study	pCA24N-YMC2	<i>Cm<sup>R</sup> lacI<sup>q</sup> YMC2</i>	This study
pAD4-YMC2	<i>LEU2 2μm YMC2</i>	This study	pCA24N-YMR166C	<i>Cm<sup>R</sup> lacI<sup>q</sup> YMR166C</i>	This study
pAD4-YMR166C	<i>LEU2 2μm YMR166C</i>	This study	pCA24N-YPR011c	<i>Cm<sup>R</sup> lacI<sup>q</sup> YPR011c</i>	This study
pAD4-YPR011c	<i>LEU2 2μm YPR011c</i>	This study	pRS416GgHIS3MET15	<i>URA3, CgHIS3, MET15, CEN</i>	S. Morigasaki
pAD4-MPC1	<i>LEU2 2μm MPC1</i>	This study			
pAD4-MPC2	<i>LEU2 2μm MPC2</i>	This study			
pAD4-MPC3	<i>LEU2 2μm MPC3</i>	This study			



### 1.1.4 DNA オリゴマー

本章で使用した DNA プライマーを Table 5-1 および 5-2 に示す。

**Table 5-1** 液胞プロリントランスポーターの探索で使用したプライマー

Primer	Sequence (5'>3')
ACT1-1-F	CACCAACTGGGACGATATGGA
ACT1-2-R	GGCAACTCTCAATTCGTTGTAGAA
AVT1-dis1-F	GTGTATATTTAGGTTCCGAA
AVT1-dis2-R	TTGAATTCCTTGAATTAGAT
AVT1-ORF-1	CGCTCCACAGACCATATTCA
AVT1-RT-F	TTTCAGTCTGACGGGTTTCATGA
AVT1-RT-R	AGCCACAGGATGGTCCAA
AVT1-S1	GTAGACTTACGTATTCTGTATAACTGATTCCGAGACGCAACGTACGCTGCAGGTCGAC
AVT1-S2	GTAAATGAATTTTAAAGTAGAGTAAGTATGCCCTCGTGAATCGATGAATTCGAGCTCG
AVT2-dis1-F	CTTTTTGGGACAAATTTTGG
AVT2-dis2-R	TAGCTTTAGTCATGCTTAC
AVT3-dis1-F	GTTTATTAGTGCTATTTAAG
AVT3-dis2-R	TTTGGCTGCGTATGGAGCTG
AVT3-RT-F	AGGAAGCTTTGGAAACGGAAA
AVT3-RT-R	GGATGGCGCCCGTGT
AVT3-S1	AAAGTTTATTAAGAAGCGTATAAGGGATTGCATCGCGGATCGTACGCTGCAGGTCGAC
AVT3-S2	TATGTGTCTGTACATGATGTACTCGGTCAAAAATGGCGGAATCGATGAATTCGAGCTCG
AVT4-dis1-F	GTATGTGTTGTGTGATCTCA
AVT4-dis2-R	CATCCACGTCATCATAAAAA
AVT5-dis1-F	CGAGGCGGAAATTGCTAGAA
AVT5-dis2-R	CCAGAGTTGGTCCCTTTCAG
AVT6-dis1-F	CCAGGAAGATAACTTGAACC
AVT6-dis2-R	GTCGGTAGCCATACGTGAAG
AVT7-dis1-F	TATAACTACTAAAACCGCCC
AVT7-dis2-R	AGTTGATAGATGATGGTTGA
AVT7_Gateway_F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGGAGGCTACATCAAGTGCTCTT
AVT7_Gateway_R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGGGCTTCATCTGAACGGTTGAATACA
AVT7stop-SacI-R	AGCTGAGCTCTTATTAGGCTTCATCTGAACGGTTGA
AVT7-ORF-1	ATGGAGGCTACATCAAGTGC
AVT7-ORF-2	TGAAGAACTAGATCAATTG
AVT7-ORF-3	AGTAATTGGCAAATTCTGTC
AVT7-ORF-4	TAAGCATGTATACCTTGCGC
GFPC-R	CTATTTGTATAGTTCATCCATGCCA
GFP-C-AVT1	ACATGGCATGGATGAACTATACAAAATGCCTGAGCAAGAACCATT
GFP-C-AVT3	ACATGGCATGGATGAACTATACAAAATGAATGGAAAAGAGGTTTC
GFP-C-start-AVT7N-R	ACGAAAGAGCACTTGATGTAGCTCCATTTTGTATAGTTCATCCATGCCATGT
HindIII-GFPN-F	AGCTAAGCTTATGAGTAAAGGAGAAGAAGCTTTT
PstI-GFPN-F	AGCTCTGCAGATGAGTAAAGGAGAAGAAGCTTTT
PUT2-3-F	CCGATATGTTTGGCATATTGCA
PUT2-4-R	TGGAAGTTCGGGATGTGTTCA
RT-AVT7-F	TCCGCTGCGCATAGCA
RT-AVT7-R	TGCCCCACCATAAGTGATCTC
start-AVT7N-ORF1-F	ATGGAGGCTACATCAAGTGCTCT
SacI-AVT1-R	AGCTGAGCTCTTATGAAATAATTGCAGCAC
SacI-AVT3-R	AGCTGAGCTCTTACTGGCTCCACATTTTAA

Table 5-2 ミトコンドリアプロリントランスポーターの探索で使用したプライマー

Primer	Sequence (5'>3')	Primer	Sequence (5'>3')
AAC1-ds1-F	AAGAGCTATAGGGCATGGC	AAC1-Sfi-F	AACTATGGCCCTGAGGGCCATGTCTCACACAGAAACACA
AAC1-ds2-R	AGTTTCAAGAGCGCAAGGTA	AAC1-Sfi-R	CTTAGTGGCCCGCATAGGCCCTCACTTGAATTTTTTGGCAA
AAC2-ds1-F	GCCCAACTGATAACGAAATA	AAC2-Sfi-F	AACTATGGCCCTGAGGGCCATGTCTTCCAACGCCCAAGT
AAC2-ds2-R	GTTCTCTAGGTCGACGTCTA	AAC2-Sfi-R	CTTAGTGGCCCGCATAGGCCCTAATTTGAACTTCTTACCAA
AAC3-ds1-F	CCAAGCTATAGTACACTGTG	AAC3-Sfi-F	AACTATGGCCCTGAGGGCCATGAGTAGCGACGCTAAGCA
AAC3-ds2-R	TATGCTCATCTGTATAAAGC	AAC3-Sfi-R	CTTAGTGGCCCGCATAGGCCCTAATTTGAAATTTTTTACCGA
AGC1-ds1-F	TGCCAGCTGTGAAATTTGTT	AGC1-Sfi-F	AACTATGGCCCTGAGGGCCATGGAGCAAAATCAATTCGAA
AGC1-ds2-R	TCTGTCCGTGAAATAATTGG	AGC1-Sfi-R	CTTAGTGGCCCGCATAGGCCCTCACCCGTTAATGTCTCTTA
ANT1-ds1-F	ACCGATGTACTGCGACATTG	ANT1-Sfi-F	AACTATGGCCCTGAGGGCCATGTAACTCTAGAGTCTGC
ANT1-ds2-R	CTGGCAGAGGATTTGTTGA	ANT1-Sfi-R	CTTAGTGGCCCGCATAGGCCCTCAAGTGAAGCCAGCTTGC
ARG11-ds1-F	TGAAGCACTCAATCTGACTAT	ARG11-Sfi-F	AACTATGGCCCTGAGGGCCATGGAGGACAGTAAAAAGAA
ARG11-ds2-R	GGAACGTTTAAAGATCTGGCG	ARG11-Sfi-R	CTTAGTGGCCCGCATAGGCCCTAAAGGTGAGAAAGAGTCT
CRC1-ds1-F	CTCGTTTGGCGTTACATTG	CRC1-Sfi-F	AACTATGGCCCTGAGGGCCATGTCTTACAGACTTCAAT
CRC1-ds2-R	GGACCCGCTCTGAAATCCAT	CRC1-Sfi-R	CTTAGTGGCCCGCATAGGCCCTCATATGCCATACTTCTTGA
CTP1-ds1-F	TGAAGTTCGCCAGCGATTAC	CTP1-Sfi-F	AACTATGGCCCTGAGGGCCATGTCCAGTAAAGCTACCAA
CTP1-ds2-R	TTACACACATCTCACGCAGC	CTP1-Sfi-R	CTTAGTGGCCCGCATAGGCCCTCAGGCTAGCATAAATAAGA
DIC1-ds1-F	TCACAGCATGAGTATTCCCC	DIC1-Sfi-F	AACTATGGCCCTGAGGGCCATGTCAACCAACGCAAAAGA
DIC1-ds2-R	GGACAGATAAATCTCCAGTA	DIC1-Sfi-R	CTTAGTGGCCCGCATAGGCCCTACTTGTCTTCTTTGGCA
FLX1-ds1-F	TTGATGGGGGAAAGTCTTAT	FLX1-Sfi-F	AACTATGGCCCTGAGGGCCATGTGTCGATCACCAGTGGAC
FLX1-ds2-R	GGAACGTTTAAAGATCTGGCG	FLX1-Sfi-R	CTTAGTGGCCCGCATAGGCCCTAAAGCCTATGCTTAAAGT
LEU5-ds1-F	ATTACCCCTCTATTTTCAG	LEU5-KanMX4-F	TTTCTCGAGGTAACGTGCTAAATAAACACAGTCTTAAAGTCGTACGCTGACGGTCCGAC
LEU5-ds2-R	GTTTAAAGTTTTATGACAGC	LEU5-KanMX4-R	TTCATGGCATATGCAATAAACCAAAATGCGATGCATAAATCGATGAATTCGAGCTCG
MIR1-ds1-F	CATTACGCACAATTAAGCAGC	LEU5-Sfi-F	AACTATGGCCCTGAGGGCCATGACGCGAGATAGCCOCA
MIR1-ds2-R	ACAGCACTGTGTTGTGTA	LEU5-Sfi-R	CTTAGTGGCCCGCATAGGCCCTAAATGCCAAAATTCCTAT
MRS3-ds1-F	AATGGCATGACACCCCCCA	MIR1-Sfi-F	AACTATGGCCCTGAGGGCCATGTCTGTCTGTCTGCTCC
MRS3-ds2-R	TTTAAACTTAAGGGAGCACC	MIR1-Sfi-R	CTTAGTGGCCCGCATAGGCCCTAATGACCACCACCACCAA
MRS4-ds1-F	TTCTCGCTTTTATAGCCAGC	MRS3-Sfi-F	AACTATGGCCCTGAGGGCCATGGTAGAAAACCTCGTCGAG
MRS4-ds2-R	TCATGGGAAGATGATATTGC	MRS3-Sfi-R	CTTAGTGGCCCGCATAGGCCCTAATACGTCATTAGGAAAT
MTM1-ds1-F	AAACGCAAAAAGAAAGGGGAA	MRS4-Sfi-F	AACTATGGCCCTGAGGGCCATGAATACTTCAGAACTGTC
MTM1-ds2-R	TCTAATGTGGAGAGGTGGCT	MRS4-Sfi-R	CTTAGTGGCCCGCATAGGCCCTCAATTTTTTCAATAAAAAT
OAC1-ds1-F	TACAACCCGAAAAGATGCCG	MTM1-Sfi-F	AACTATGGCCCTGAGGGCCATGAGTGATCGCAATACAAAG
OAC1-ds2-R	AGTACACACTCTTTTCAACG	MTM1-Sfi-R	CTTAGTGGCCCGCATAGGCCCTCACTGATGCAATTTTGTTC
ODC1-ds1-F	GTTCTCGAACCACAAAGATGGA	OAC1-Sfi-F	AACTATGGCCCTGAGGGCCATGTCTATCTGCAACTCTAA
ODC1-ds2-R	ACAAGAACAAGATCAAAACC	OAC1-Sfi-R	CTTAGTGGCCCGCATAGGCCCTAATTTATGGCCTAAAACCTC
ODC2-ds1-F	TTGTGTACTTTCGGTTTAGC	ODC1-Sfi-F	AACTATGGCCCTGAGGGCCATGACATCTATAGATAATAG
ODC2-ds2-R	CTCTCTCTTTGCTGGTTTA	ODC1-Sfi-R	CTTAGTGGCCCGCATAGGCCCTATTGTTTTTACCATACT
PET8-ds1-F	TTGAATAGAGAAGTATCTGG	ODC2-Sfi-F	AACTATGGCCCTGAGGGCCATGTCTACAGACTCAAAACCG
PET8-ds2-R	GGTATGATTCCAAAGGGGCA	ODC2-Sfi-R	CTTAGTGGCCCGCATAGGCCCTCAGTGTCCGTACTTCAGAT
PIC2-ds1-F	GTACCCGCTTCAAGAAATAC	ODC2-KanMX4-F	TTCTATATAGTCAAGTAATTCGAGGTAGCATCAAAGTAAATCGTACGCTGACGGTCCGAC
PIC2-ds2-R	AAATACACGTGGTTAGAGCCA	ODC2-KanMX4-R	AAGATGGAAGAGGAAAGAGGATTTCTATATACAAATAAATAATCGATGAATTCGAGCTCG
RIM2-ds1-F	CTGGTTTTGTATCGAAAAAG	PET8-KanMX4-F	GACACACCGATGAACATAAAATTCGCTTTGAAAAGTTGTCTGCTACGCTGACGGTCCGAC
RIM2-ds2-R	ACGAAATGGAAGACAGCAT	PET8-KanMX4-R	ACCTCTTACAACCTGGTAGTGTCTTTGCTCTATGTTTTCAATCGATGAATTCGAGCTCG
SAL1-ds1-F	TCCTCAAAGTCTAAATTTGTC	PET8-Sfi-F	AACTATGGCCCTGAGGGCCATGAATACTTTTTTCTTTCT
SAL1-ds2-R	TCTGTTCTTTTGTCTTACAC	PET8-Sfi-R	CTTAGTGGCCCGCATAGGCCCTACGCTCTCAATTTCTCCAG
SAL1-ORF1	CCACCAGACTCAGATTTATAC	PIC2-Sfi-F	AACTATGGCCCTGAGGGCCATGGAGTCCAAATAAACCAACC
SFC1-ds1-F	CAAACGGACCTTAATTTGTA	PIC2-Sfi-R	CTTAGTGGCCCGCATAGGCCCTAACCCGGTGGTTGGTAAGC
SFC1-ds2-R	CTTGGGATTTTGAAGCCCGT	PUT1-Sfi-F	AACTATGGCCCTGAGGGCCATGATAGCTTCCAAAAGCTC
TPC1-ds1-F	CACAGACTGCCGTAATTTAT	PUT1-Sfi-R	CTTAGTGGCCCGCATAGGCCCTCATAGGCCCTACTCTTTTGT
TPC1-ds2-R	ATGCCACTCTAAGAAAGGGT	RIM2-Sfi-F	AACTATGGCCCTGAGGGCCATGTCTAAAATAATCCATTTGA
UGO1-ds1-F	ACTAAGGGCAAACCATTAATA	RIM2-Sfi-R	CTTAGTGGCCCGCATAGGCCCTACGATAGTAGCCTTATAA
UGO1-ds2-R	CAGTGTACCCTTCTTCTGCAA	SAL1-Sfi-F	AACTATGGCCCTGAGGGCCATGTCTGTAATAAATTTGCGA
UGO1-ORF1	GCCAAAGACACGAAATAAAC	SAL1-Sfi-R	CTTAGTGGCCCGCATAGGCCCTAATACACATAAAGGATGTGC
YDL119C-ds1-F	TGACAGGCACCAACATTAAT	SFC1-Sfi-F	AACTATGGCCCTGAGGGCCATGTCTCAAAAAAAGAAAGGC
YDL119C-ds2-R	GAGGCTCATCCGGATTTGAT	SFC1-Sfi-R	CTTAGTGGCCCGCATAGGCCCTACTTTAATGGCTTTGGCT
YFR045W-ds1-F	CAACATGTGTCTATTATAGT	TPC1-Sfi-F	AACTATGGCCCTGAGGGCCATGTCTCAAAGAGGAGGACTC
YFR045W-ds2-R	TCTGAAGATTTACCAAGCGCA	TPC1-Sfi-R	CTTAGTGGCCCGCATAGGCCCTTAGTACATCCGCAATAAAT
YEA6-ds1-F	CATCACCAATAATGATACGA	UGO1-Sfi-F	AACTATGGCCCTGAGGGCCATGAACAACAATAATGTTAC
YEA6-ds2-R	TGAATTAATAATAGTTCCGG	UGO1-Sfi-R	CTTAGTGGCCCGCATAGGCCCTCAGAATCTCTTGTGTCCA
YHM1-ds1-F	AACTCTCAAGAGACTGCAAAAG	YDL119C-Sfi-F	AACTATGGCCCTGAGGGCCATGACTGAGCAAGCAACTAA
YHM1-ds2-R	GCTATGAGCTGTGATGTTGT	YDL119C-Sfi-R	CTTAGTGGCCCGCATAGGCCCTACATGAATCTTTTGGACCA
YHM2-ds1-F	CTAGGTCCTGTCGGCAAAAT	YFR045w-Sfi-F	AACTATGGCCCTGAGGGCCATGGCTAACCCAGTAAAGTAG
YHM2-ds2-R	TCACATCTTGAAGGTTGCTG	YFR045w-Sfi-R	CTTAGTGGCCCGCATAGGCCCTCAAGACCTGGAAGAGAAGC
YIA6-ds1-F	AGTTTGAAGCTGTCTATTTG	YFR045w (CDS)-Sfi-F	AACTATGGCCCTGAGGGCCATGGCTAACCCAGAACTCTGA
YIA6-ds2-R	CTGGATAGAATTTCTTGAGG	YEA6-Sfi-F	AACTATGGCCCTGAGGGCCATGAATAATGGAGACAATAA
YMC1-ds1-F	ATACTGGTACATACACCCGA	YEA6-Sfi-R	CTTAGTGGCCCGCATAGGCCCTATTGAAAAAAAAGTAGTAA
YMC1-ds2-R	GCTTGAGTAGGGAATCCAC	YHM1-Sfi-F	AACTATGGCCCTGAGGGCCATGCCTCATACCGATAAGAA
YMC2-ds1-F	TTTTGAATCCATTACCAAT	YHM1-Sfi-R	CTTAGTGGCCCGCATAGGCCCTATTGCTCAACAGGTTAT
YMC2-ds2-R	GCCAAGAGAAACAATTTGAC	YHM2-Sfi-F	AACTATGGCCCTGAGGGCCATGCCATCTACCATAATAC
YMR166C-ds1-F	GCATTTACGGGGGATATTAT	YHM2-Sfi-R	CTTAGTGGCCCGCATAGGCCCTAATGTTTGGCAACTGGGG
YMR166C-ds2-R	GCCGAGAAAAAGAGATAGAT	YIA6-Sfi-F	AACTATGGCCCTGAGGGCCATGACACAGACTGATAATCC
YPR011C-ds1-F	GTTTTACGGCATTTAGAAGC	YIA6-Sfi-R	CTTAGTGGCCCGCATAGGCCCTAAAATACCATAGTGCTAA
YPR011C-ds2-R	CTTAGAAAGCATCAAGTCAG	YMC1-Sfi-F	AACTATGGCCCTGAGGGCCATGTCTGAAGAAATTTCCATC
MPC1-ds1-F	GAAAGAAAAGAAAGAGGGGA	YMC1-Sfi-R	CTTAGTGGCCCGCATAGGCCCTCAACCCAAATAACCTCATCG
MPC1-ds2-R	GAGAATTAATACTGGGTGT	YMC2-Sfi-F	AACTATGGCCCTGAGGGCCATGAGTGAAGAAATTTCTCTAC
MPC2-ds1-F	TCGCTTCCAAGAGTATATCA	YMC2-Sfi-R	CTTAGTGGCCCGCATAGGCCCTACTCTCCCCAGAAATC
MPC2-ds2-R	TCAGTGGCACAAATCTTTCA	YMR166C-Sfi-F	AACTATGGCCCTGAGGGCCATGAACACTATGGAACCTGAG
MPC3-ds1-F	CCTCCACCAAAAGCAAAATGA	YMR166C-Sfi-R	CTTAGTGGCCCGCATAGGCCCTTAGTCCGTTGGAAATGCGT
MPC3-ds2-R	GAACGTAGATGCAATTTTCG	YPR011c-Sfi-F	AACTATGGCCCTGAGGGCCATGGCAGAAAGTACTGACCGT
		YPR011c-Sfi-R	CTTAGTGGCCCGCATAGGCCCTACCAAAATTTCTTACAGAAT
		MPC1-Sfi-F	AACTATGGCCCTGAGGGCCATGTCTCAACCCGGTCAACG
		MPC1-Sfi-R	CTTAGTGGCCCGCATAGGCCCTACTGTTTACCAGTTTTTT
		MPC2-Sfi-F	AACTATGGCCCTGAGGGCCATGTCTACATCATCCGTAACG
		MPC2-Sfi-R	CTTAGTGGCCCGCATAGGCCCTATCTGCCCGTAGTAATTT
		MPC3-Sfi-F	AACTATGGCCCTGAGGGCCATGTCTCAGCATCAGCTTTTAA
		MPC3-Sfi-R	CTTAGTGGCCCGCATAGGCCCTAGTGCCTATTGGCCGAT

### 1.1.5 DNA マイクロアレイ解析

#### ◆酵母の培養条件とサンプリング

*S. cerevisiae* の MB329-17C [pTV3, pUV2] 株を 50 ml の SD 最少培地に植菌し、2 日間 30°C で振盪培養した。OD<sub>600</sub>=10.04 の前培養液 22 ml を新しい SD 培地 195 ml に植菌し、217 ml 30°C で培養開始した（プロリン添加-2 時間、OD<sub>600</sub>=0.94）。2 時間後 OD<sub>600</sub>=1.050 の細胞を、RNA 抽出用として 12 ml、アミノ酸抽出用に 5 ml をそれぞれサンプリングし氷中で 10 分間冷却した。4°C、6,000 rpm で集菌後、1 ml の冷却滅菌水で 3 回洗浄した。RNA 抽出用には液体窒素でペレットを-80°C で凍結保存し、プロリン含量測定用には熱水抽出（後述）後、-20°C で保存した。次に、RNA とプロリン抽出用の合計 17 ml サンプリング後に残った 200 ml の培養液に対し、5 M のプロリンを 2 ml 添加することにより、SD+50 mM での培養を開始した（この時点のプロリン添加後 0 時間とする）。以降、同様にしてプロリン添加 1, 3, 5, 7, 9 時間後の細胞を RNA 抽出用にサンプリングし、1, 3, 5, 7, 9, 12, 16, 20, 24, 30, 36, 46 時間後の細胞をプロリン抽出用にサンプリングし、その際 OD の測定も行った。サンプリングの量は細胞の増殖に応じて適宜調節した。

#### ◆Total RNA の抽出

*S. cerevisiae* からの total RNA の抽出には RNeasy mini kit（キアゲン社）を用い、製品の取扱説明書に従った。菌体の破碎は 0.5 mm 低アルカリガラスビーズ（安井器械社）を加え、マルチビーズショッカー®（安井器械社製）で 4°C、2,700 rpm で 60 秒間破碎後 60 秒間冷却するというサイクルを 6 回繰り返して行った。DNA と RNA の核酸混合物をキットのカラムに吸着させ、カラム上にて RNase-free DNase set（キアゲン社）を用いて DNase 処理を行い洗浄後、RNase を含まない純水で溶出することで total RNA を得た。この際、クオリティチェックとして、RNA の電気泳動を行い、SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain（Thermo Fisher 社）を用いて 18S rRNA と 28S rRNA の検出を行った。また、得られた total RNA を逆転写して cDNA を合成し、プロリン添加に伴い発現誘導される *PUT2* の発現解析を定量リアルタイム PCR で行った。

#### ◆マイクロアレイ解析

次に、total RNA を株式会社バイオマトリックス研究所に送付し、より精密なクオリティチェックとマイクロアレイ解析を依頼した。まずサンプル RNA 溶液を用いて Agilent 2100 Bioanalyzer（Agilent Technologies 社製）と、NanoDrop（Thermo Fisher Scientific 社製）での評価（total RNA 量の定量）を行った。RNA 用 LabChip® キットや NanoDrop を用い、total RNA の品質や純度に問題ないことを確認した。Agilent 社 Quick Amp labeling kit を用いた cRNA 合成（Agilent

社プロトコールに準ずる) を行い、ハイブリダイゼーションに必要な cRNA 量が得られていることを確認した。次に Yeast オリゴ DNA マイクロアレイ (4×44K) とのハイブリダイゼーション (Agilent 社 Gene expression hybridization kit を使用) を行った。Agilent Microarray Scanner で DNA マイクロアレイのイメージを読み取り、Feature Extraction Software (v.9.5.3.1) にて各スポットの蛍光シグナルを数値化した。

### 1.1.6 定量リアルタイム PCR

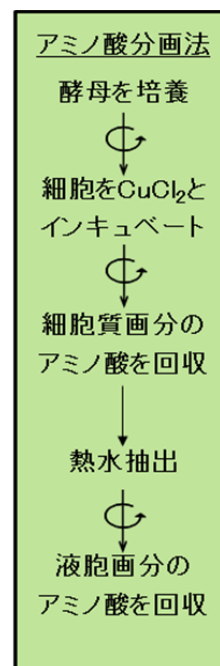
マイクロアレイの際と同様の操作で、酵母菌体からトータル RNA を抽出した。total RNA から cDNA への逆転写は High-Capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems 社) を用い、取扱説明書に従って行った。リアルタイム PCR は cDNA を鋳型とし、SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems 社) を用いて行った。反応液組成は 20 ng の cDNA、1×SYBR Green PCR master mix 液、プライマー溶液 (終濃度 100 nM) から成り、25 μl とした。反応条件は 50°C で 2 分間、95°C で 10 分間の加熱を行った後、95°C で 15 秒間と 60°C で 1 分間の加熱を 40 回繰り返した。内在性コントロールとして *ACT1* を用い、 $\Delta\Delta Ct$  法で発現量を計算した。Kaino et al. (2008) の方法に準じて解析した。

### 1.1.7 酵母の形質転換

酵母菌体を 5 ml の YPD 培地で 30°C、試験管で 24 時間振盪し、前培養を行った後、その一部を 100 倍希釈して 12 時間培養した。YPD 培地 50 ml に  $OD_{600}=1$  以下で植菌し、 $OD_{600}=0.5\sim 5$  程度まで増殖させた。3,000 rpm、室温で 5 分間遠心分離後の菌体を滅菌水で 2 回、続いて 0.1% 酢酸リチウム溶液で 1 回洗浄後、 $OD_{600}=10$  になるよう 0.1% 酢酸リチウムを加えた。100 μl の細胞懸濁液をマイクロチューブへ移し、30°C で 5 分間静置後、Sheared cod and herring sperm DNA (Roche 社; 100°C、5 分熱処理後、直ちに氷冷) 25 μl と、プラスミドや、PCR で増幅した遺伝子破壊用 DNA 断片を必要量、さらに酢酸リチウム入り 40% PEG 溶液\*を 700 μl 加え、攪拌した。30°C で 0.5~2 時間静置後、42°C、15 分間ヒートショックを与え、集菌した細胞を滅菌水 1 ml で洗浄後、再び遠心し、菌体を滅菌水 100 μl で懸濁して選択寒天培地に塗布した後、30°C で 2~3 日間培養し、目的の形質転換体を得た。\*PEG 溶液: 40% polyethylene glycol 4000、100 mM  $CH_3COOLi$

### 1.1.8 細胞内及び液胞アミノ酸含量の測定

菌体乾燥重量の算出は Kaino et al. (2008)の方法に従った。培養液 (5 ml) の吸光度 ( $OD_{600}$ ) を測定し、 $x=y/978.45$  ( $x$ : 5ml あたりの菌体乾燥重量 (g)、 $y$ :  $OD_{600}$ ) より算出した。液胞画分の調製は、銅イオン処理を用いる Ohsumi et al. (1988) の方法に従った。アミノ酸を液胞とサイトゾル画分に分ける際には、SD 最少培地あるいは SD+50 mM プロリン培地で培養した対数増殖期の各菌株の  $OD_{600}$  で 20 unit の細胞を 600  $\mu$ l の buffer A (2.5 mM KPB (pH6.0)、0.6 mM sorbitol、10 mM glucose、1.0 mM  $CuCl_2$ ) に懸濁し、30°C で 20 分インキュベートした。微量高速冷却遠心機 (TOMY, MX-201) において 6,000 rpm、3 分で遠心分離後の菌体を 150  $\mu$ l の buffer A w/o  $CuCl_2$  で 2 回洗浄して合一し、計 900  $\mu$ l をサイトゾル画分とした。その後、遠心分離した菌体を 450  $\mu$ l の滅菌水に懸濁し、100°C、20 分熱水処理した上清を液胞抽出液とした (右に示したような流れで行った)。



各画分の抽出液をシリンジフィルター (Nylon-66 メンブレン、0.2  $\mu$ m、mdi 社) でろ過し、全自動アミノ酸分析機 (AminoTac JLC500/V; 日本電子社製) に供した。アミノ酸濃度を計算するためのスタンダードには標準アミノ酸混合液 (AN-II 型と B 型) を各 1 ml ずつとり、これにアスパラギン溶液 (終濃度 1.25 mM)、グルタミン溶液 (終濃度 2.5 mM)、トリプトファン溶液 (終濃度 2.5 mM) を加え、1st buffer で 25 ml に調製したものをを用いた (アミノ酸類はすべて和光純薬工業社)。アミノ酸解析に用いるバッファー類は指定のマニュアルに従って作製した。アミノ酸分析機を用いたアミノ酸の発色にはニンヒドリン試薬セット (日本電子社) を用いた。

### 1.1.9 破壊株の作製

*S. cerevisiae* の非必須遺伝子破壊株コレクションである YKO (Euroscurf) ([http://www-sequence.stanford.edu/group/yeast\\_deletion\\_project/deletions3.html](http://www-sequence.stanford.edu/group/yeast_deletion_project/deletions3.html)) の遺伝子破壊は全てコロニーPCR で確認した。この際、目的遺伝子が破壊されていない、あるいは YKO ライブラリーに目的破壊株が存在していないような場合は新たに破壊株を作製した。

プラスミドに挿入されているマーカー遺伝子や非必須遺伝子破壊株ライブラリーのゲノム DNA を PCR の鋳型として利用し、抗生物質耐性や栄養要求性マーカー遺伝子に各 AVT 遺伝子の ORF 領域の上流、下流 40~500 bp を付加した破壊断片を増幅した。この PCR 断片を用いて酵母を酢酸リチウム法により形質転換し、野生株の遺伝子を破壊した。

AVT 遺伝子やミトコンドリアトランスポーター遺伝子を単独で破壊する際は、*kanMX4* を含む破壊断片を作製して遺伝子破壊した。AVT1 と AVT7 の二重破壊株の作製には pFA6a-hphNT1 を鋳型にしてプライマーAVT1-S1 および AVT1-S2 を用いて PCR で増幅した *avt1::hphNT1* の破壊断片を用いて  $\Delta avt7$  株を形質転換した。同様に AVT1 と AVT7 の三重破壊株を作製する際は pFA6a-natNT2 を鋳型にしてプライマーAVT3-S1 および AVT3-S2 を用いて PCR で増幅した *avt3::natNT2* の破壊断片を用いて  $\Delta avt1\Delta avt7$  株を形質転換した。さらに、 $\Delta pep3$  株の作製や  $\Delta pep3$  株を用いて多重破壊株を作製する際は、pFA6a-natNT2 を鋳型にしてプライマーPEP3-S1 および PEP3-S2 を用いて PCR で増幅し *pep3::natNT2* の破壊断片を用いた形質転換を行った。

破壊断片を用いた形質転換後、YPD+選択培地 (G418, clonNAT, hygromycin B のいずれか) で生育したコロニーからシングルコロニーを分離し、遺伝子の破壊をコロニーPCRにより確認した。

#### 1.1.10 蛍光顕微鏡観察

GFP 融合タンパク質の細胞内局在性観察を行うために、SD 培地で培養した対数増殖期の細胞を集菌後、40  $\mu\text{M}$  の FM4-64 色素 (PromoCell 社) を加え、10 分間室温でインキュベートし、氷冷した培地で 3 回洗浄してから 30 分間 25°C で培養することで液胞を染色し、観察を行った。蛍光顕微鏡は Axiovert 200M (Carl Zeiss 社製) を用い、画像を HBO 100 Microscope Illuminating System (Carl Zeiss 社製) のデジタルカメラで取り込み、その画像を解析した。

#### 1.1.11 ミトコンドリアの単離

ミトコンドリアの調製は遠藤ら (1991) による分画遠心法で行った。酵母のミトコンドリアは 1,500 $\times g$ , 5 分間の遠心では上清に回収されるが、10,500 $\times g$ , 10 分間の遠心では沈殿に回収されるという原理に基づいている。

酵母の培養は主に乳酸完全培地 (3% yeast extract, 0.05% glucose, 0.05%  $\text{CaCl}_2$ , 0.05%  $\text{NaCl}$ , 0.03%  $\text{MgCl}_2$ , 0.1%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.1%  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 2% lactate, pH 5.6) で培養したが、プラスミドを保持させて培養させるような場合は、酵母エキスの代わりに (0.17% Bacto yeast nitrogen base without amino acids and ammonium sulphate (Difco Laboratories 社), 0.5% ammonium sulphate, 2% dropout mix) を添加した。

1 L の本培養を行う際は、評価菌株について乳酸完全培地 5 ml $\times$ 2、試験管内で前培養を行った (1 日~3 日)。2 本の 2 L フラスコにそれぞれ 500 ml の乳酸培地を入れ、前培養液 5 ml $\times$ 2 を加えた。乳酸天然完全培地の場合は約 15 時間、乳酸完全合成培地の場合は約 24 時間本培養し、適切な遠心管で (3,000 $\times g$ ) 集菌した。この時の OD が 2 くらいとなる。菌体を 50 ml のプラスチック製コンカル

チューブ (BD Bioscience 社、Corning 社、Greiner 社 等) に移し、滅菌水で洗浄した。ここで得られた菌体の湿重量を測定した。Tris バッファー (100 mM Tris SO<sub>4</sub> (pH 9.4)-10 mM DTT) 50 ml に菌体を懸濁し、30 分間、30°C の恒温槽で振盪した。2000×g で 5 分間遠心して集菌した。沈殿を 45 ml の Sorbitol バッファー (1.2 M sorbitol-20 mM KPi (pH 7.4)) に懸濁し、2000×g で 5 分間遠心して集菌した。沈殿を 40 ml の Sorbitol バッファーに懸濁した。1 g の細胞あたり、5 mg の Zymolyase 20-T (生化学工業社もしくはナカライテスク社) を加え、30°C で 30 分以上、軽く振盪しながら細胞壁を消化した。適当な時間インキュベーションしたところで細胞懸濁液 10 µl を 1 ml の水に加え濁度が減少しているか、分光光度計等を用いて確認した。スフェロプラスト化がうまくいけば、50 ml プラスチック製コニカルチューブを用いて 6000×g、4°C で 5 分間遠心し、スフェロプラスト沈殿として回収した。スフェロプラストを 0°C に冷やしたソルビトールバッファー 30 ml に懸濁し、3000×g、4°C で 5 分間遠心し、沈殿を回収した。以降の操作は 0°C で行い、溶液は全て 0°C に冷やしたものを用いた。スフェロプラスト沈殿をブレーキングバッファー (0.6 M mannitol-20 mM Hepes-KOH pH7.4, 1 mM PMSF, 0.5 mM EDTA) 30 ml に懸濁した。スフェロプラスト懸濁液を予め冷やしておいた Dounce homogenizer に移し、氷上で 15 回ホモジナイズした。1,000×g で 5 分間遠心し、上清を 25 ml 取り分けた。ここで得られた 5 ml の未破碎細胞溶液に 25 ml のブレーキングバッファーを加え、懸濁後、Dounce homogenizer に移し、氷上で 15 回ホモジナイズした。次に 1,500×g で 5 分間遠心し、上清を 25 ml 取り分け、先に得られた上清と合一した (計 50 ml)。上清を 10,500×g で 10 分間遠心し、沈殿を回収した。この沈殿に 30 ml のブレーキングバッファーを加え、ピペットで十分懸濁した。1,500×g で 5 分間遠心し、上清をピペット等で回収した。この上清を 10,500×g で 10 分間遠心し、沈殿を回収した。PMSF を除去するために、この沈殿を 30 ml のブレーキングバッファー (without PMSF) に懸濁し、10,500×g で 10 分間遠心し、沈殿を回収した。この沈殿を約 500 µl のブレーキングバッファー (without PMSF) に懸濁し、ミトコンドリア懸濁液とした。

ミトコンドリア抽出液にプロリンを添加してインキュベートする事により、プロリンの分解反応を行った。この際、分解物であるグルタミン酸の検出は、アミノ酸アナライザーで行い、定量した。

#### 1.1.12 ウェスタンブロッティング

調製したミトコンドリアのサンプルは、サンプルバッファー (50 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2 % ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、4.5 % グリセロール, 0.01 % ブロモフェノールブルー, 0.7 M メルカプトエタノール) で懸濁後、95°C で 5 分熱処理を行った。得られた抽出液のタンパク質量を、Protein assay kit (BIO-RAD

社) を用いて、ブラッドフォード法により定量した。10 %-SDS-PAGE によりタンパク質を分離後、ニトロセルロース膜に転写し、ブロッキング後、一次抗体反応を行い TBS-T (Tris buffered saline + 0.05% tween 20) で洗浄した。さらに二次抗体反応を行い TBS-T で洗浄後、ECLplus (GE Healthcare 社) を用い、X 線フィルムに感光させ目的タンパク質を検出した。一次抗体として anti-yeast GAPDH ウサギポリクローナル抗体 (Nordic Immunology 社)、anti-yeast mitochondrial porin マウスモノクローナル抗体 (Molecular Probes 社) を使用した。二次抗体として、西洋ワサビ peroxidase 結合 anti-rabbit IgG および anti-mouse IgG 抗体 (Promega 社) を用いた。GAPDH はサイトゾルのマーカーとして、また、porin はミトコンドリアのマーカーとして使用した。

#### 1.1.13 ミトコンドリアにおけるアミノ酸輸送活性測定

単離したミトコンドリアに放射性プロリンを取り込ませた。取り込み活性測定には 5  $\mu\text{M}$  の  $^{14}\text{C}$  プロリンを含むマンニトールバッファー (0.6 M mannitol, 5 mM EGTA-Na pH8) を 30°C でインキュベートさせた。取り込み試験は、0.5 mg のミトコンドリアを添加する事により開始した (トータル 500  $\mu\text{l}$  の反応液)。反応液は、の 1 ml の 1 M マンニトールに重層し、4°C、14,000 rpm, 1 分遠心分離する事で反応停止させた。

#### 1.1.14 生育試験

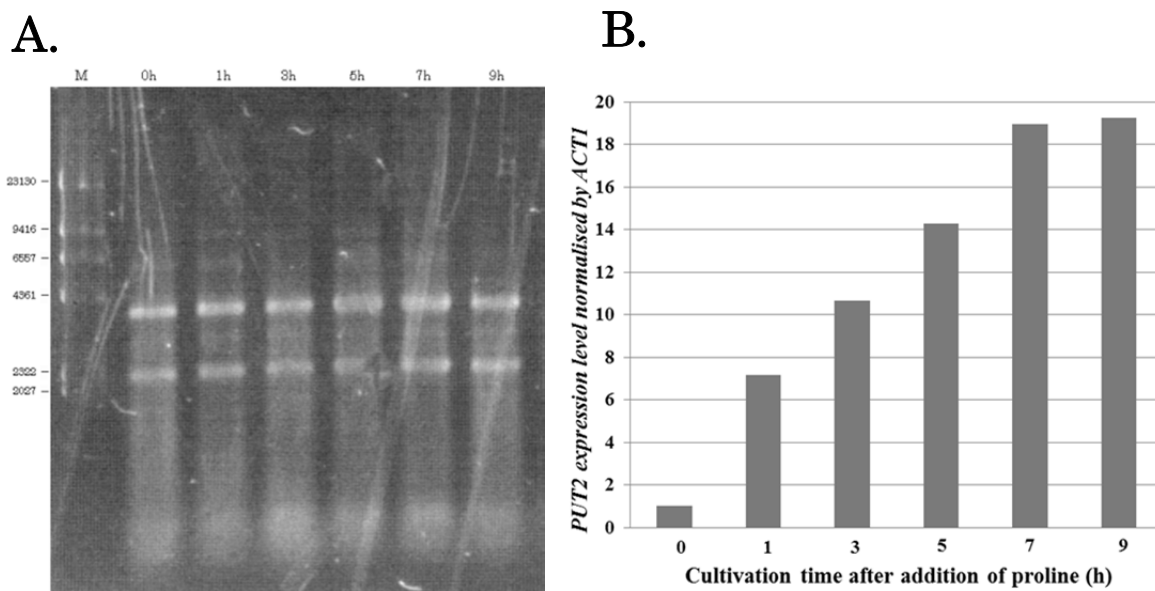
寒天培地において 30°C で増殖させた酵母を 5 ml の SD 培地に植菌し、30°C で 1 日培養して定常期まで増殖させた。その細胞を滅菌水で 3 回洗浄し、OD<sub>600</sub> が 1 になるよう原液を調製し、その原液を  $10^{-1}$ ~ $10^{-3}$  もしくは  $10^{-1}$ ~ $10^{-4}$  までの希釈系列を作製し、4  $\mu\text{l}$  ずつ各培地にスポットし、30°C で培養した。



## 結果

### 1.2.1 DNA マイクロアレイ解析によるプロリンが *AVT* 遺伝子の発現に及ぼす影響の解析

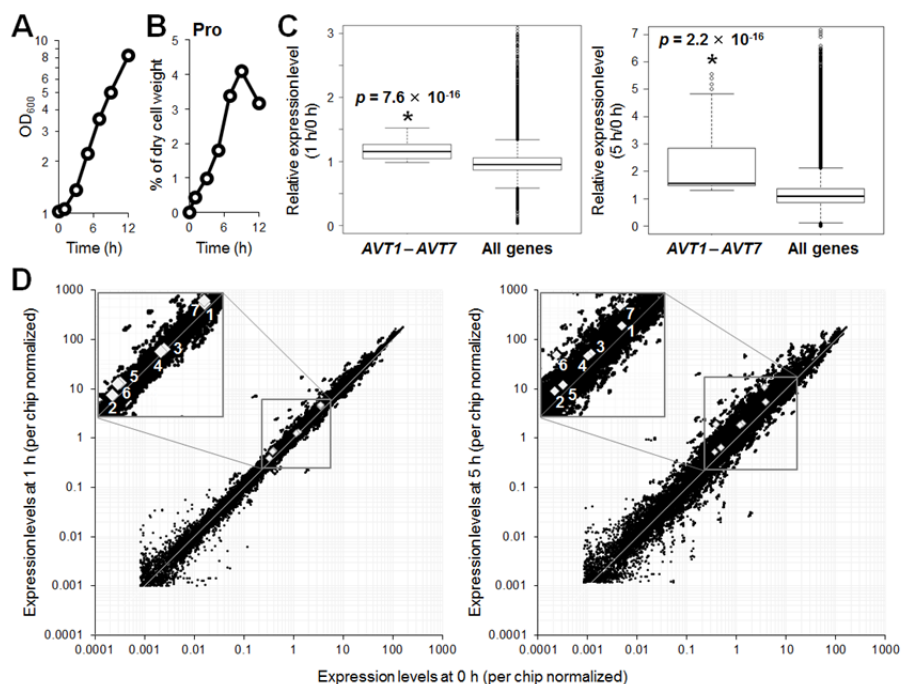
液相アミノ酸トランスポーターのプロリンによる遺伝子発現の変化を解析するため、プロリン分解酵素遺伝子 *PUT1* の変異株 (MB329-17C) を用いたトランスクリプトーム解析を行った。プロリンを添加した最少培地で *PUT1* 変異株を培養すると、プロリンが細胞内で分解されずに蓄積する。そこで、プロリンの細胞内含量が増加し、かつ分解系遺伝子 (*PUT2*) の発現が上昇し始める時期の細胞から抽出した RNA (Fig. 9) を用いてマイクロアレイ解析を行い、プロリン添加の有無による全遺伝子の発現パターンの解析を試みた (Figs. 10, 11)。



**Fig. 9. RNA の品質チェックと *PUT2* の転写レベルの確認**

(A) 左端の M はマーカーである  $\lambda$ /HindIII を示す。2 番目からのサンプルはプロリン添加後 0、1、3、5、7、9 時間後に回収した菌体から抽出した RNA を示す。RNA の電気泳動確認により、28S、18S、5S の rRNA が確認された。(B) プロリンを添加した際の *PUT2* 発現量の経時的变化。*ACT1* の発現量で各サンプルの *PUT2* の発現量を標準化した。横軸の数字は、プロリン添加後の時間を示している。

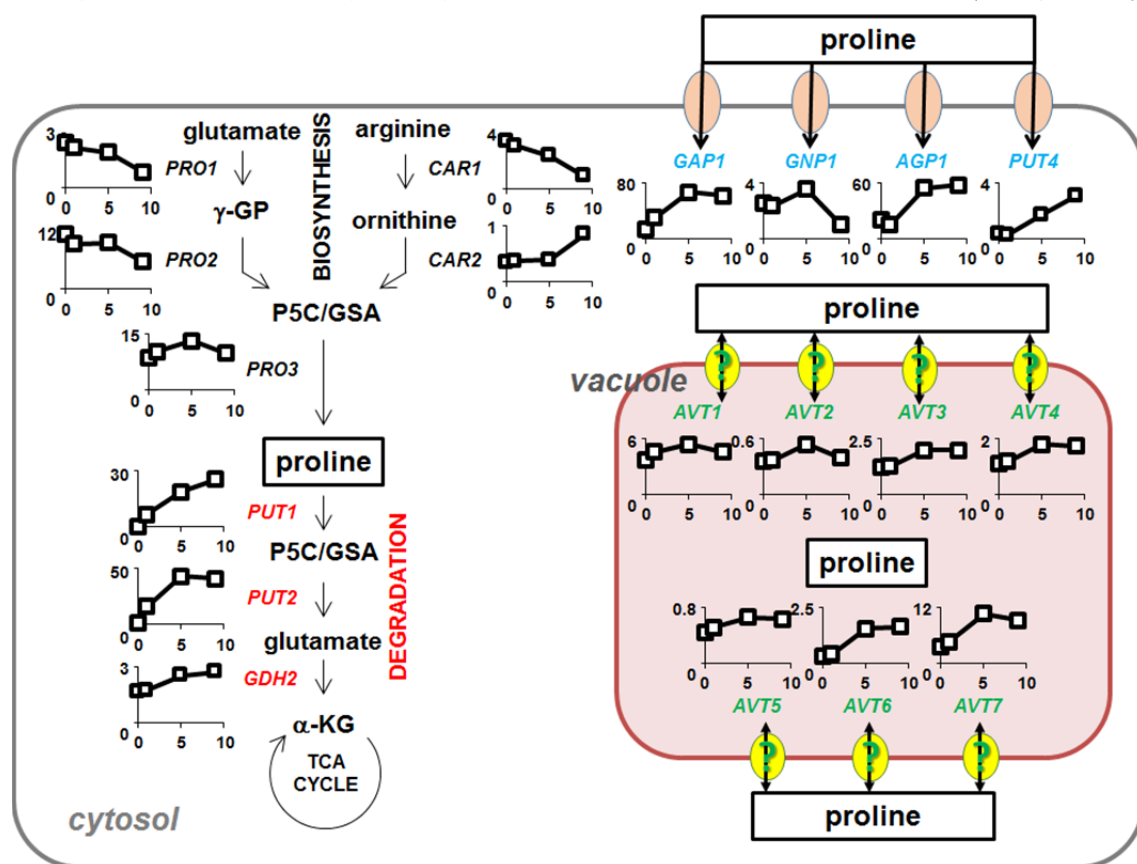
*PUT1* の変異株はプロリン添加後 12 時間後ごろまでほぼ対数増殖を示したが (Fig. 10A)、細胞内プロリン含量は、9 時間頃がピークとなった (Fig. 10B)。マイクロアレイ解析では、プロリンなどの中性アミノ酸輸送に関わると考えられる *AVT* 遺伝子群 (*AVT1*~*AVT7*) と、プロリン代謝や輸送に関わることで知られている遺伝子群に着目した。その結果、プロリン添加後、1 時間と 5 時間において、*AVT* 遺伝子群は他の遺伝子の変動と比較して有意な発現誘導を示した (Fig. 10C, D)。いずれの *AVT* 遺伝子も、プロリン添加後 0 時間と比較して発現変動がないことを示す白線よりも上方に位置し、発現レベルが上昇していることが明らかとなった (Fig. 10D)。



**Fig. 10. 培地へのプロリン添加後に発現誘導された *AVT* 遺伝子群**

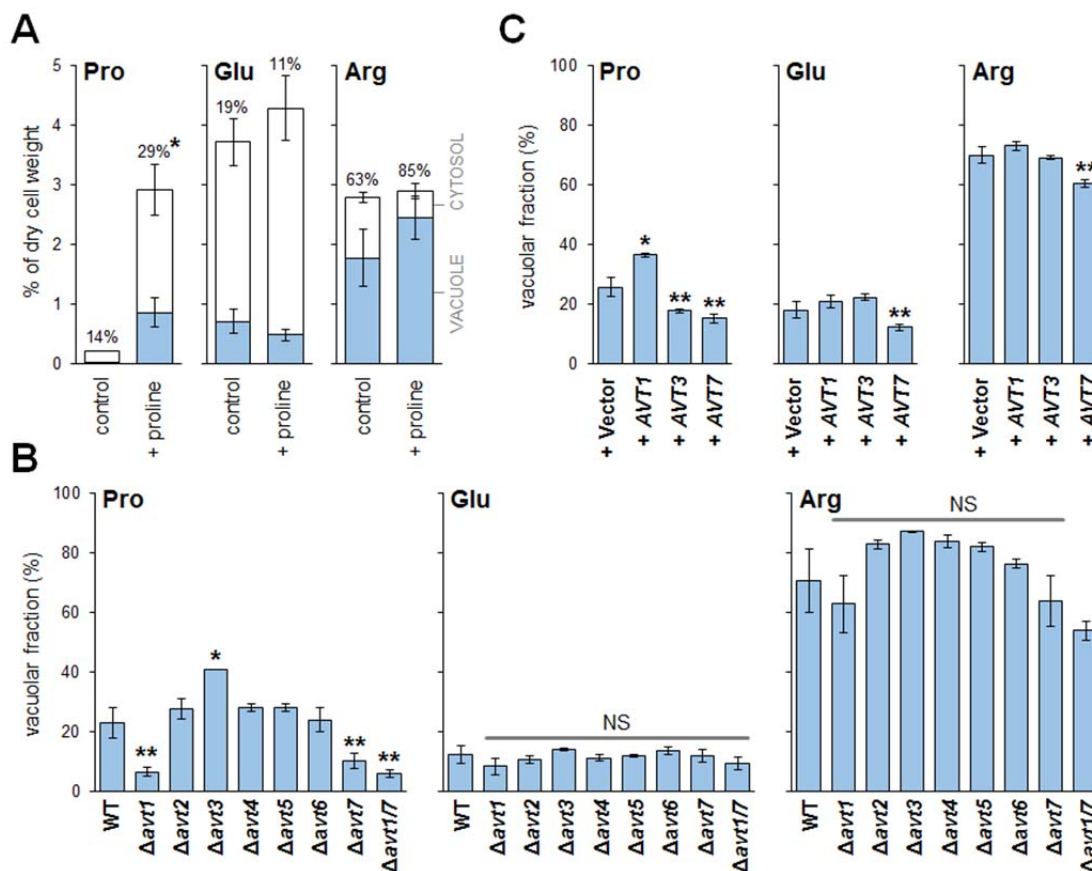
(A) プロリン添加後の生育曲線。(B) (A)の際の細胞内プロリン含量。(C) (A)の0時間後に対する1時間後 (左) および5時間後 (右) における*AVT1*~7遺伝子と全てのその他の遺伝子の発現量の変化を、0時間の値でノーマライズし、全遺伝子と比較してBoxプロットで表した。\*は全ての遺伝子に対して有意な増加を示す (Wilcoxon rank sum testで $p < 10^{-15}$ )。(D) (C)と同じデータの両対数プロット。0時間目の値でノーマライズした1時間後 (左) および5時間後 (右) の全ての遺伝子の発現量を示す。白の菱形 (◇) は各*AVT*遺伝子のデータを示しており、番号は、どの*AVT*遺伝子かを示している。全てのデータはDNAチップごとにノーマライズされている (それぞれのサンプルにおける発現した遺伝子における中央値のシグナルを用いた)。白線は、発現変動がないことを示す。

また、培地へのプロリン添加によりプロリン合成に関わる遺伝子群 (*PRO1*, *PRO2*, *CAR1*) の発現が低下し、プロリン分解に関わる遺伝子 (*PUT1*, *PUT2*, *GDH2*) の全てが5時間後まで発現量が増加した。原形質膜上でプロリンの輸送に関わるトランスポーターをコードする全ての遺伝子 (*GAP1*, *GNP1*, *AGP1*, *PUT4*) も、5時間後まで発現量が増加した (Fig. 11)。Fig. 4と同様に、*AVT*遺伝子も全て5時間後まで発現量が増加していた (Fig. 11)。 *PUT1*変異株はプロリン添加に伴い野生株に比べて5倍程度の過剰なプロリンを細胞に蓄積する。プロリンの資化に関わる遺伝子群に比べると度合いは小さいが、過剰なプロリンにより液胞アミノ酸トランスポーターである*AVT*遺伝子が誘導されることが示唆された。そこで、各*AVT*遺伝子の破壊株が、細胞内のプロリンの局在に及ぼす影響を調べた。



**Fig. 11. プロリン添加に伴うプロリン代謝に関連遺伝子と*AVT*遺伝子の発現変動**  
 プロリンの合成系 (*PRO1*, *PRO2*, *PRO3*, *CAR1*, *CAR2*)、分解系 (*PUT1*, *PUT2*, *GDH2*)、原形質膜でのプロリン取り込み系 (*GAP1*, *GNP1*, *AGP1*, *PUT4*)、各*AVT*遺伝子の発現変動を示している。各グラフの縦軸は、DNAマイクロアレイ解析により得られたシグナル強度の生データを、各アレイ解析における中央値で割った値である (per chip normalization)。

## 1.2.2 Avt トランスポーターによる液胞のプロリン輸送への関与



**Fig. 12. AVT1, AVT3, AVT7 の液胞におけるプロリン蓄積への関与**

(A) プロリン添加に伴う野生株における液胞内プロリン含量の変動（グルタミン酸はサイトゾルに多いアミノ酸のコントロール、アルギニン液胞に多いアミノ酸のコントロールを示している。）上部の白いバーはサイトゾルの、下の青色のバーは液胞のアミノ酸含量をそれぞれ示す。(B) プロリン添加に伴うAVT遺伝子単独破壊株とAVT1とAVT7の二重破壊株における液胞内に占めるプロリンの割合の変動。(C) プロリン添加に伴うAVT1, AVT3, AVT7過剰発現株における液胞内に占めるプロリンの割合の変動。\*は有意な増加 $P < 0.01$ , \*\*は有意な低下 $P < 0.05$ , NS: 有意差なしを示す。A, Bにおいてはそれぞれの菌株は空ベクターとしてpAD4とpRS416CgHIS3MET15を保有している。Cでは空ベクターとしてpVV208とpRS415CgHIS3MET15を保有する、過剰発現の際にはpVV208の代わりに、pVV208-AVT1、pVV208-AVT3、pVV208-AVT7を導入した。

まず野生株において、SD培地への50 mMプロリンの添加の有無による細胞（液胞）内プロリン含量や割合の変動を解析した。その結果、プロリンを添加してから2時間後に細胞内プロリン含量が増加し、特に、液胞画分における割合が有意に上昇した（Fig. 12A）。一方、サイトゾルに多いアミノ酸のコントロールであるグルタミン酸や液胞に多いアミノ酸のコントロールであるアルギニンについては有意な差は見られなかった。次に、各AVT遺伝子破壊株において、プロリン添加から2時間後における液胞のプロリンの割合を解析した。その結果、AVT1とAVT7の単独破壊株において、液胞画分におけるプロリンの割合が有意に低下

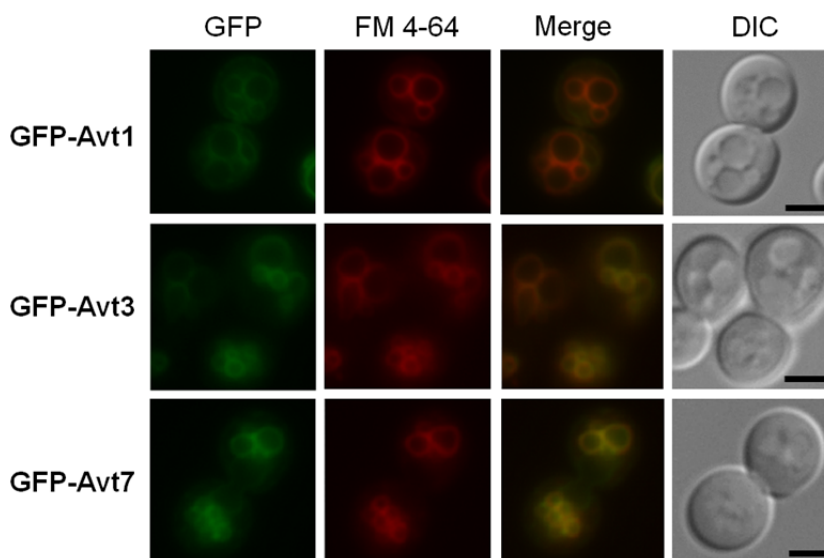
した (Fig. 12B)。このことから、AVT1とAVT7がプロリンの液胞内腔への取り込みに関与していることが示唆された。またこれらの遺伝子の二重破壊は明確な相加効果を示さなかった (Fig. 12B)。従って、Avt1あるいはAvt7はリダンダントな機能を有するが、そのいずれかが液胞内腔への間接的なプロリンの取り込みに関与している可能性が考えられた。一方、AVT3破壊株は液胞画分におけるプロリンの割合が有意に上昇した (Fig. 12B)。サイトゾルと液胞のコントロールである、グルタミン酸およびアルギニンについては有意な変化は認められなかった。このことから、AVT3がプロリンの液胞内腔からの排出に関与していることが示唆された。さらに、遺伝子破壊により液胞画分におけるプロリンの割合に影響を及ぼしたAVT遺伝子の過剰発現系を構築した。その結果、AVT1の過剰発現は液胞画分におけるプロリンの割合を上昇させたのに対し、AVT3あるいはAVT7の過剰発現は、液胞画分におけるプロリンの割合を低下させた (Fig. 12B)。以上のことから、Avt1が液胞へのプロリンの取り込み、Avt3が液胞からのプロリンの排出に関与することが示唆された。AVT7の過剰発現は、プロリンだけでなく液胞画分におけるグルタミン、グルタミン酸およびアルギニンの割合も低下させたことから、過剰発現により細胞あたりの液胞の存在量自体が減少する可能性などが示唆された。ただし、過去の報告においてAvt7が窒素源枯渇時におけるプロリンの排出に関わることも知られており (Tone et al., 2014)、AVT7の過剰発現による液胞のプロリン含量の低下は、今回の実験条件においてもAvt7がプロリンの液胞からの排出に関与することを示している可能性も考えられる。その場合、Avt7はプロリンの液胞への取込みと液胞からの排出のどちらにも関わるといふ結論となり、Avt7を介したプロリンの輸送の方向性を決定付ける未知の因子の存在が推定される。

### 1.2.3 Avt1、Avt3、Avt7の細胞内局在性観察

Avt1、Avt3、Avt7のアミノ酸残基はそれぞれ602、692、490であり、いずれも10回膜貫通ドメインを有する膜タンパク質である事が予測されている

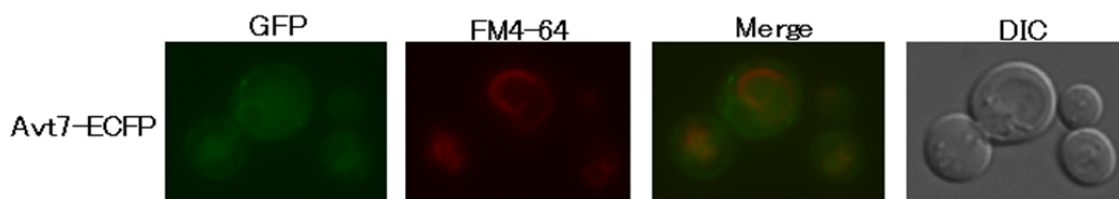
(*Saccharomyces* Genome Database (<http://www.yeastgenome.org/>))。そこで、本研究で液胞のプロリンの局在に影響を及ぼすことが明らかになったAvt1、Avt3、Avt7のN末端にGFPを融合させて細胞内局在性解析を行った。その結果、GFP-Avt1、GFP-Avt3、GFP-Avt7の蛍光は液胞マーカーのFM4-64の蛍光と共局在することが明らかとなり (Fig. 13)、これらのタンパク質がSD培地およびSD+プロリン培地で液胞に局在する事が示唆された。これらのGFP融合タンパク質の液胞局在に関しては過去の報告 (Chahomchuen et al., 2008; Sekito et al., 2014; Tone et al., 2014, 2015)の結果とも一致する。しかしながら、GFP-Avt1、GFP-Avt3、GFP-Avt7のいずれにおいても、cortical ERや核外膜といった液胞以外への膜系

にもある程度存在した。特に *Avt7* の C 末端に GFP を付加した際はその傾向が顕著であり (Fig. 14)、*Avt* タンパク質の C 末端が液胞膜への局在に重要な役割を果たしていると考えられる。今後、各 *Avt* タンパク質の液胞膜局在に必要なタンパク質ドメインの特定も重要な課題である。



**Fig. 13. GFP-Avt1, GFP-Avt3 and GFP-Avt7 の蛍光顕微鏡観察**

野生株に、pAD4-GFP-AVT1, pAD4-GFP-AVT3、pAD4-GFP-AVT7 のいずれかを導入した菌株を作製し、蛍光顕微鏡観察を行った。SD 最少培地で対数増殖期まで培養した。FM4-64 は液胞を特異的に染色する試薬である。Merge は AVT-GFP の蛍光と FM4-64 による染色像の重ね合わせである。DIC は微分干渉観察を示す。それぞれの菌株は空ベクターとして pRS416CgHIS3MET15 を保有する。DIC に示す黒いバーの長さは、2  $\mu$ m を示す。



**Fig. 14. Avt7-ECFP の蛍光顕微鏡観察**

野生株に、pAG415GPD AVT7ECFP と pRS416CgHIS3MET15 を導入した菌株を作製し、蛍光顕微鏡観察を行った。SD 最少培地で対数増殖期まで培養した。

#### 1.2.4 AVT 遺伝子破壊株におけるストレス耐性への影響の評価

これまでの当研究室の結果から、プロリン蓄積株において液胞の機能を欠損するとエタノールや高温ストレスへの耐性が失われることが明らかとなり、液胞の機能がプロリン蓄積よりもたらされるストレス耐性に必須であることが示唆されている (Matsuura and Takagi, 2005)。また、液胞の欠損により過剰にサイトゾルに蓄積したプロリンが毒性を示すことが示唆されている。そこで、本研究を通してプロリンの液胞への局在に関与する事が示された *Avt1*、*Avt3*、*Avt7*

のストレス耐性への関与を評価した。まず、プロリンの液胞内腔への輸送に関わると考えられる *AVT1* と *AVT7* に着目し、2.5 M という高濃度のプロリン培地における  $\Delta avt1$ ,  $\Delta avt7$ ,  $\Delta avt1\Delta avt7$  株におけるストレス耐性を評価した (Fig. 15)。その結果、非ストレス培地である SD 培地および、2.5 M プロリン添加培地でも、野生株と各破壊株において増殖には変化がなかった。このことから、液胞内腔へのプロリン取り込みに関わると考えられる *AVT1* と *AVT7* が存在しなくても高濃度プロリン存在下における *S. cerevisiae* の液胞の機能が野生株並みに保たれることが明らかとなった。また、液胞機能欠損と *AVT1* と *AVT7* の遺伝学的関係を検証するために液胞形態形成に関わる  $\Delta pep3$  において、*AVT1* と *AVT7* を破壊した際の高濃度プロリン感受性について評価した (Fig. 15)。 *PEP3*

(carboxyPEPTidase Y-deficient 3) は、*VPS18* (Vacuolar Protein Sorting 18) とも呼ばれ、液胞膜の融合に関与する遺伝子である (Mortimer and Schild, 1985; Rothman et al., 1989)。過去に報告されている通り、 $\Delta pep3$  では高濃度のプロリン添加培地 (1.5 M あるいは 2.5 M) において感受性を示した。一方、液胞形態が異常な  $\Delta pep3$  株では *AVT1* や *AVT7* の有無に関係なく高濃度プロリンに同様の感受性を示した。このことから、液胞形態が不完全な菌株における高濃度プロリン感受性は *AVT1* や *AVT7* の有無によって影響しないことが明らかとなった。

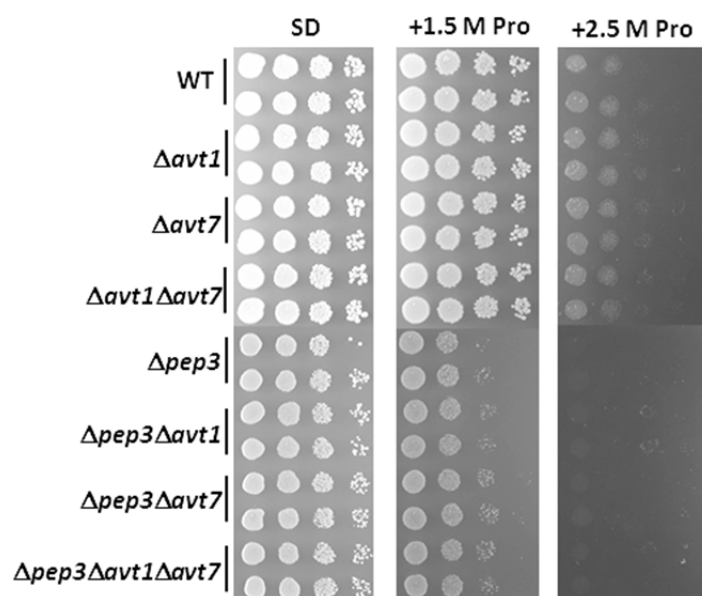


Fig. 15. 高濃度プロリン添加時における酵母の生育

SD 培地と 1.5 M あるいは 2.5 M のプロリン添加培地で培養した。上の 4 株は野生株をバックグラウンド、下の 4 株は *PEP3* 破壊株がバックグラウンドである。*PEP3* 破壊株は、液胞形成不全株であり、高濃度プロリンで生育阻害を示す。

次に、*AVT1*、*AVT3*、*AVT7* の多重破壊株を作製し、各種ストレス（エタノール、過酸化水素、AZC）とおよびプロリンを単一窒素源とする培地での生育を評価した（Fig. 16）。*Avt1*、*Avt3*、*Avt7* が液胞における毒物に対する毒性緩和に関与するかを明らかにするために、プロリンの毒性アナログである AZC を用いた。また、液胞における特定のアミノ酸の取り込みや排出は酵母の生育に影響すると考えられたため、液胞へのプロリンの取り込みや排出への関与が示された *AVT1*、*AVT3*、*AVT7* のプロリン資化能に対する表現型を評価した。その結果、エタノール、過酸化水素、AZC のいずれのストレスにおいても *AVT1*、*AVT3*、*AVT7* を単独あるいは、多重で破壊しても野生株と差は見いだせなかった。さらに、プロリンを単一の窒素源とする培地でも同様に生育に差がなく、これらの遺伝子破壊がプロリンの資化には影響しないことが明らかとなった。

これらのことから、*AVT1*、*AVT3*、*AVT7* の破壊はエタノール、過酸化水素、AZC のストレスには関与しないことが明らかとなった。また、用いた菌株はプロリンを単一窒素源とする培地で生育しているため原形質膜のプロリントランスポーターを介してプロリンの取り込みができると考えられるが（Fig. 16）、*AVT1*、*AVT3*、*AVT7* を破壊してもプロリンの資化に関しては、大きな影響はないことが示唆された。

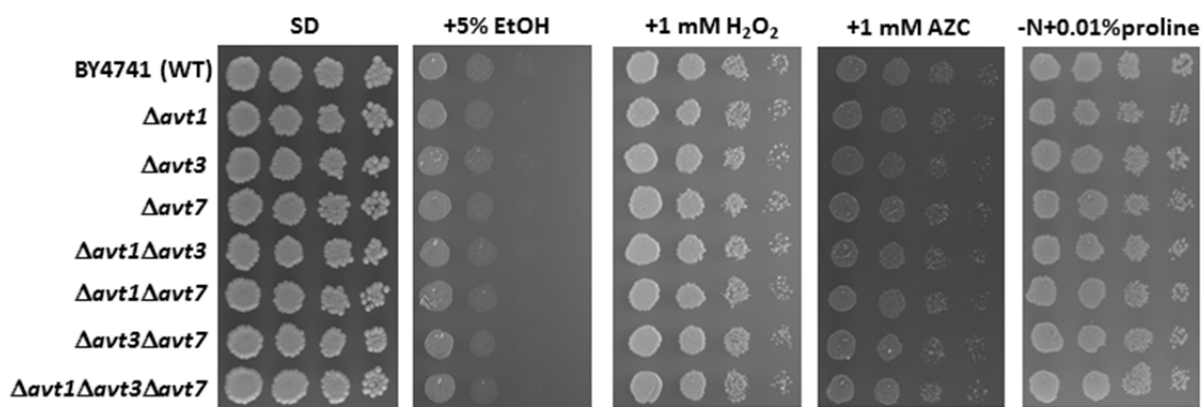


Fig. 16. ストレス条件下における各 *AVT* 変異株の生育

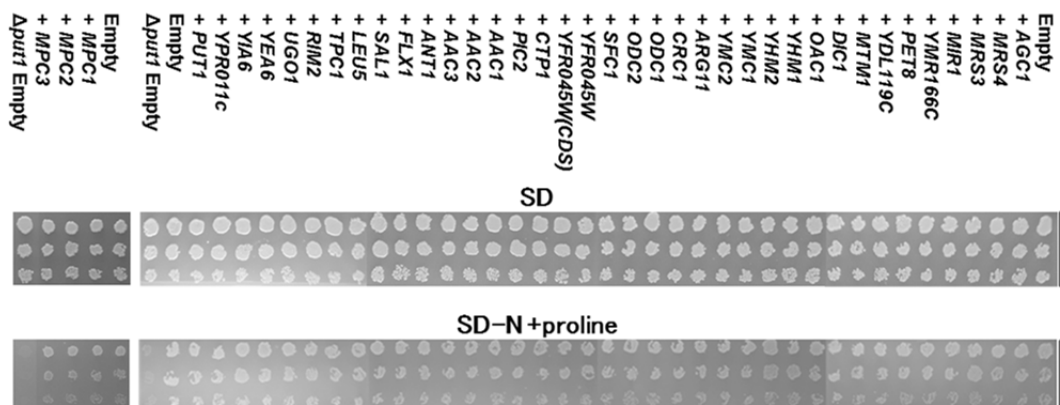
SD 培地、および 5%エタノール、1 mM 過酸化水素、1 mM AZC を含むストレス培地、あるいは 0.01%プロリンを単一窒素源とする寒天培地において各菌株を 30°C で 4.5 日間培養した。WT は野生株を示す。



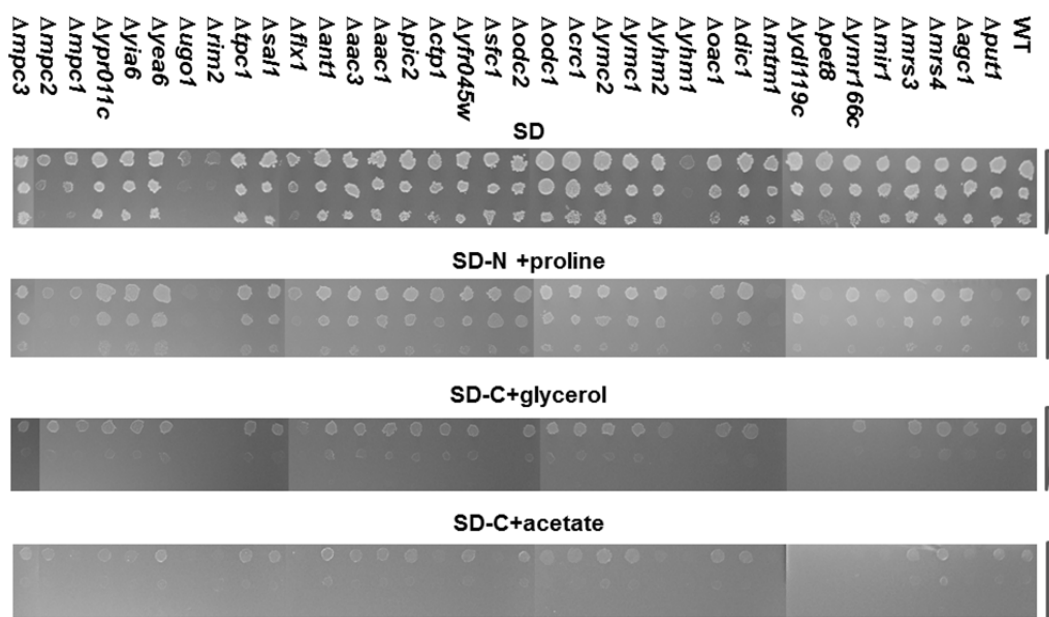
### 1.2.5 ミトコンドリア輸送体遺伝子破壊株と過剰発現株の表現型解析

ミトコンドリアのプロリントランスポーターを探索するために、35種類のMCファミリーと3種のMPCタンパク質に着目し、遺伝子過剰発現株および破壊株におけるプロリン資化能を評価した (Fig. 17)。

**A**



**B**

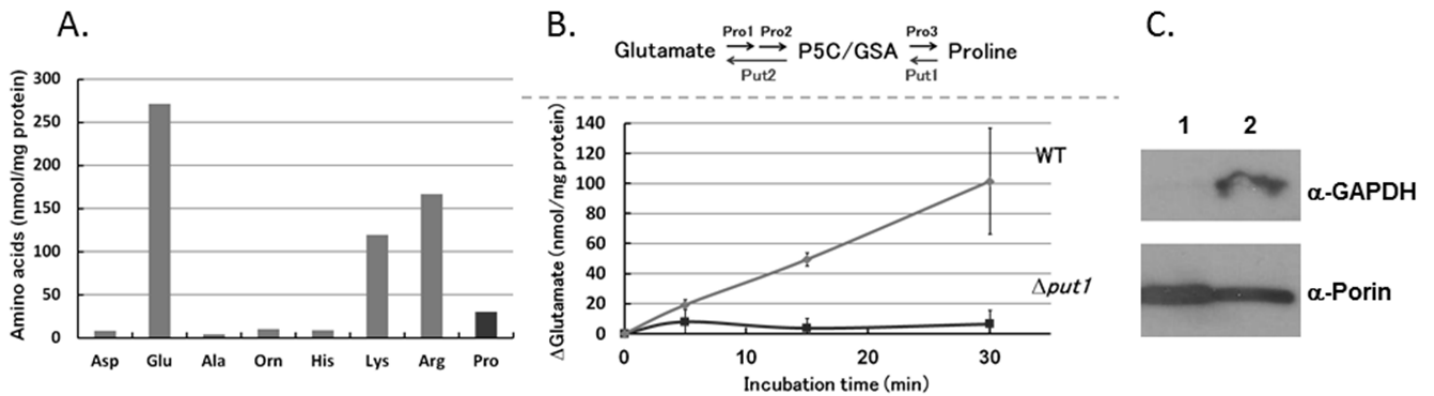


**Fig. 17. MC および MPC ファミリー遺伝子の過剰発現と破壊によるプロリン資化への影響**  
 プロリン単一窒素源培地における、MC、MPC 遺伝子過剰発現(A)および破壊株(B)の生育。それぞれの菌株は、pRS416CgHIS3MET15 と pAD4 を保有する。-N+Pro はプロリン 0.1%を単一窒素源として含む。-C+glycerol は 3%グリセロールを単一炭素源として含む。-C+acetate は 3%酢酸ナトリウムを単一炭素源として含む。過剰発現株では、pAD4 の代わりに、各トランスポーター遺伝子を導入した pAD4 を保持する。Empty はベクターコントロールを示す。Δput1 は、プロリンを単一窒素源として生育できないネガティブコントロールとして用いた。WT は野生株を示す。

その結果、 $\Delta put1$  株はプロリン単一窒素源培地で生育しないが、他のミトコンドリアトランスポーター遺伝子の過剰発現株は野生株と比べてプロリン単一窒素源の培地で生育に差がないため、いずれの遺伝子を過剰発現しても、プロリンの資化能には影響しなかった (Fig. 17A)。また、プロリンを分解できない  $\Delta put1$  株と同様に  $\Delta mir1$ 、 $\Delta pet8$ 、 $\Delta mtm1$ 、 $\Delta yhm1$ 、 $\Delta flx1$ 、 $\Delta ugo1$ 、 $\Delta rim2$ 、 $\Delta mpc1$ 、 $\Delta mpc2$  の菌株では、プロリンを単一の窒素源とする培地で生育の低下が認められたが、非発酵炭素源であるグリセロールや酢酸でも同じような傾向が見られた (Fig. 17B)。これらの破壊株では、無機リン酸、S-アデノシルメチオニン、フラビン、ヌクレオチド、マンガン、ピルビン酸など、ミトコンドリアの機能や呼吸に重要な分子をミトコンドリアマトリックスに輸送できない。そのため、ミトコンドリアの形成や機能が不全となり正常に呼吸鎖における電子伝達ができなくなり、プロリンが分解できないと考えられた。これらの結果より、ミトコンドリアトランスポーター遺伝子の過剰発現や破壊による表現型への影響を指標としてプロリントランスポーターを同定する事は困難であると考えられた。実際に、プロリンを単一窒素源とする培地上での生育に欠損を示した株のミトコンドリアの単離を試みたが、ミトコンドリアを発達させるための乳酸培地での生育は悪く、単離はできなかった。

### 1.2.6 ミトコンドリアにおけるプロリン輸送活性の検出

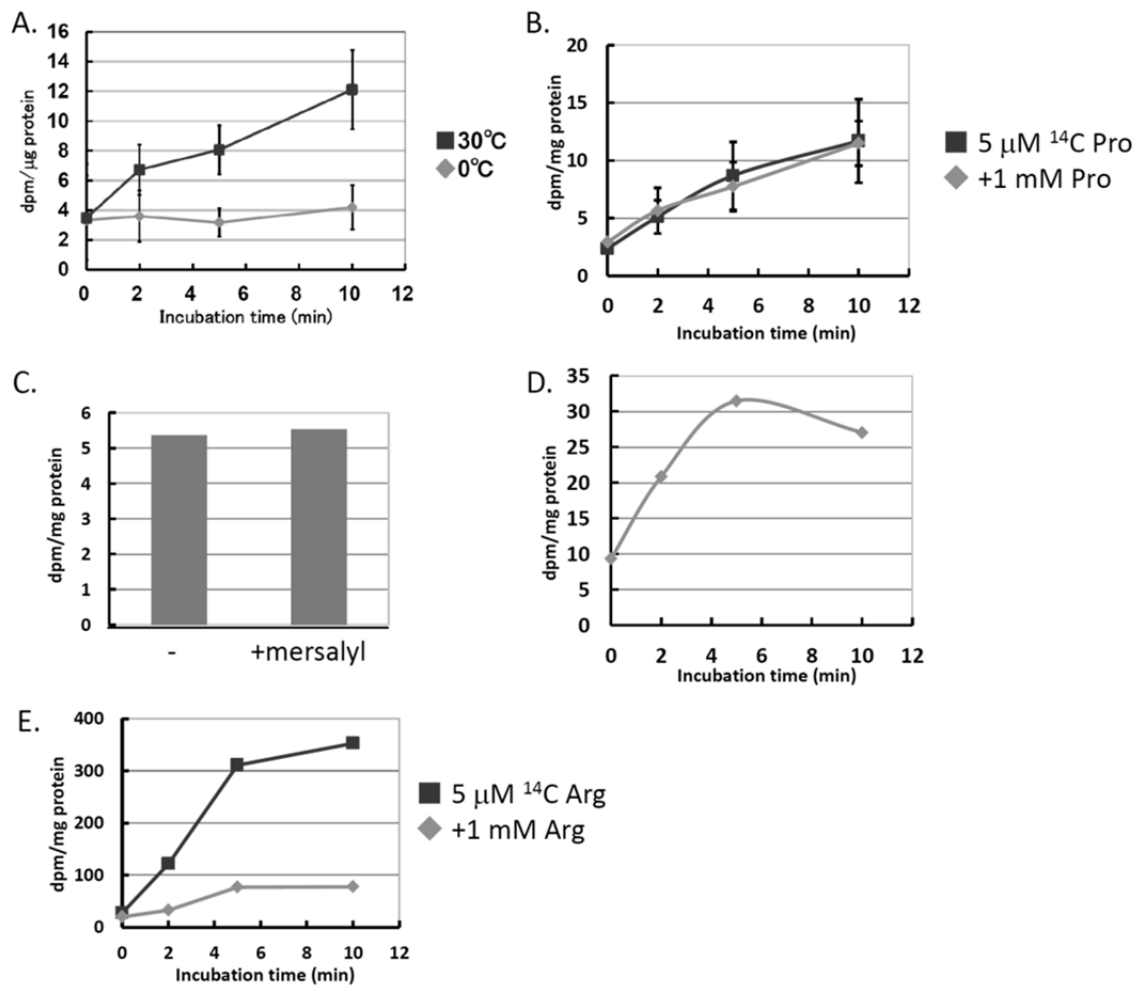
次に、生化学的手法でプロリンがミトコンドリアに輸送され、分解されるかを *S. cerevisiae* の野生株で解析した。まず、乳酸天然完全培地で培養した酵母からミトコンドリアを単離し、ミトコンドリア内のアミノ酸を検出したところ、少なくとも 8 種類のプロリンを含むアミノ酸が検出された (Fig. 18A)。ミトコンドリア画分ではプロリンの合成系の酵素が検出された報告はなく、それらの酵素はミトコンドリア移行シグナルも有していない。このことから、プロリンはミトコンドリアのトランスポーターを介して輸送されていることが示唆された。細胞全体のアミノ酸組成と大きく異なることから、トランスポーターによる能動輸送の可能性が示唆された。次に、単離したミトコンドリアにプロリンを添加し、プロリンからグルタミン酸が生成するかを確認した。その結果、野生株由来のミトコンドリアではプロリンが Put1 と Put2 の酵素活性により分解されグルタミン酸が生成した。一方、*PUT1* を破壊するとその分解は起こらなかった。このことから単離ミトコンドリアがプロリン分解活性を持つことが明らかとなった (Fig. 18B)。また、これらの条件で単離したミトコンドリア画分では、サイトゾルマーカである GAPDH がほとんど検出されず、ミトコンドリアのポーリンが全細胞画分に比べて高い割合で検出された (Fig. 18C)。



**Fig. 18.** ミトコンドリアにおけるプロリンの検出とその分解

(A) 単離ミトコンドリアでのプロリンやその他のアミノ酸(アスパラギン酸、グルタミン酸、アラニン、オルニチン、ヒスチジン、リジン、アルギニン) の検出。(B) 単離ミトコンドリアに 10 mM のプロリンを添加した際におけるグルタミン酸の経時的な生成。野生株(WT)から単離したミトコンドリアではプロリンがミトコンドリアに取り込まれグルタミン酸が生成されるが、プロリン分解酵素遺伝子 *PUT1* の破壊株では、グルタミン酸の生成は見られない。(C) 野生株のミトコンドリア画分(1)と全細胞画分(2)における GAPDH と Porin の検出。

さらに、 $^{14}\text{C}$  ラベルしたプロリンを単離ミトコンドリアに取り込ませたところ、 $30^\circ\text{C}$ での取り込み活性が検出された。一方、 $0^\circ\text{C}$ では取り込みが起こらなかった (Fig. 19A)。しかしながら  $30^\circ\text{C}$ でのプロリンの取り込み活性は検出されたものの、このような取り込み活性は、1 mM プロリン (Fig. 19B) やミトコンドリアトランスポーターの阻害剤である mersalyl の添加条件 (Fig. 19C) でも観察され、またそれらは阻害効果を示さなかったため、単純拡散などの内膜トランスポーター非依存的な様式によってミトコンドリア内に入っていることが推察された。さらに、ミトコンドリアマトリックスに取り込まれない事で知られているスクロースを  $^{14}\text{C}$  ラベルしてミトコンドリアに取り込ませたところ、ミトコンドリアに取り込まれた (Fig. 19D)。一方、 $^{14}\text{C}$  プロリンの取り込みとは異なり、 $^{14}\text{C}$  ラベルした 5  $\mu\text{M}$  のアルギニンの場合は 1 mM アルギニンの添加により取り込みが阻害されたため (Fig. 19E)、ミトコンドリアのアミノ酸輸送活性測定系は構築できていると考えた。これらの結果から、ミトコンドリアには  $30^\circ\text{C}$ の条件でプロリン、スクロース、アルギニンは取り込まれ、そのうちアルギニンにおいてのみトランスポーター依存的な輸送活性が見られた。以上より、本実験条件ではプロリンのトランスポーターを介したマトリックスへの輸送は起こらないと結論づけた。また、 $0^\circ\text{C}$ の条件では非特異的にプロリンを取り込むチャンネルが閉じているということが考えられた。



**Fig. 19.** ミトコンドリアにおけるプロリンやスクロースの取り込みと阻害剤の影響

(A) 30°Cにおける5  $\mu$ Mプロリンの継続的な取り込み。(B) RI標識した5  $\mu$ Mプロリンにさらに200倍量(1 mM)の非RIのプロリンを添加した際の取り込み試験。(C) RI標識した5  $\mu$ Mプロリンに50  $\mu$ M mersalylを無添加の際(-)と添加の際のプロリンの取り込み試験。(D) スクロースの取り込み試験。(E) RI標識した5  $\mu$ Mアルギニンにさらに200倍量(1 mM)の非RIのアルギニンを添加した際の取り込み試験。

### 3. 考察

#### ◆液胞のプロリントランスポーターの探索と機能解析

本研究における DNA マイクロアレイの結果より、アミノ酸の取り込みと排出の両方に関わる AVT 遺伝子群がプロリン添加に伴い発現誘導されることが明らかとなった (Fig. 11)。また、Put3 や Gat1 などの既存の制御系 (Ljungdahl and Daignan-Fornier., 2012) を介して誘導されるプロリン分解系の酵素遺伝子

(*PUT1/2*) に比べると AVT 遺伝子群の発現誘導が弱いため、Put3 や Gat1 などの既知の制御とは異なった様式で誘導された可能性が考えられた。さらに、プロリン合成系遺伝子の (*PRO1/2*, *CARI*) がプロリンの添加により発現が低下していた。これら遺伝子のプロモーター領域には Put3 などの推定結合部位が存在しないため、プロリン合成系の新規な転写抑制経路の存在も示唆された。

また本研究では、これまでにグルタミン、アスパラギン、ロイシン、イソロイシン、チロシンなど中性のアミノ酸トランスポーターとして報告されている Avt1 (Russnak et al., 2001) が液胞へのプロリンの取り込みにも関わり、それらの排出トランスポーターとして報告されている Avt3 が液胞からのプロリンの排出にも関与すること強く示唆された。Avt1 は、栄養飢餓応答や寿命制御に関わることが報告されている (Hughes and Gottschling, 2012)。そのため、Avt1 はプロリンが豊富にある環境下においてプロリンを液胞に輸送し、蓄えたプロリンを栄養飢餓時に利用できるように備えていることが考えられる。Avt3 は、液胞からプロリンを排出することで、プロリンの効率的な分解に寄与していることが考えられる。約 40% の相同性を示す Avt3 と Avt4 はいずれも中性アミノ酸の排出系として知られているが (Russnak et al., 2001)、そのうちどちらが主にプロリンの排出に関わっているかはこれまで調べられていなかった。本研究より Avt3 が主にプロリンの排出に働いていることが初めて明らかになった。このことから、プロリンを主な窒素源として生育する際やプロリンを液胞に蓄積後における飢餓条件において Avt3 発現を調節させると、生存やストレス耐性に影響を与える可能性が考えられた。これまでに、液胞膜におけるプロリンの排出活性は見出されており (Ishimoto et al., 2012)、今後 Avt3 のどのドメインがプロリンを輸送基質として認識して排出するのか、詳細な解析が必要である。今回 AVT7 を破壊するとプロリンの液胞取り込みが低下したことから、Avt7 がプロリンの取り込みに関与する事が明らかとなった。一方、AVT7 の過剰発現は、液胞の様々なアミノ酸の割合も低下させたことから、過剰発現により細胞当りの液胞の存在量が低下していることや、間接的に液胞のアミノ酸輸送全体に影響を与えている可能性が示唆された。このことは、過去に Avt7 がプロリンの排出に関わるという報告とも矛盾しない (Tone et al., 2014)。本研究の結果より、Avt7 は両方向性のプロリン輸送を液胞膜で制御していると考えられる。AVT7 を破壊した

際にも細胞全体のアミノ酸含量が変動する事も知られており（西田・修士論文、2010; Tsolmonbaatar et al., 2010）、液胞機能の変化等の間接的な影響でプロリンの取り込みを低下させてしまい栄養飢餓時における液胞内のプロリン等の利用能が低下し、過去に報告されているような胞子形成の低下とも関連していることが考えられる（Tone et al., 2014）。本研究により *AVT7* は、液胞の機能や形態にも関与する事が示唆されたため、*AVT7* をはじめとする *AVT* ファミリー遺伝子の破壊株や過剰発現株における液胞形態形成や液胞関連タンパク質の機能に与える影響を、形態学的解析やプロテオーム解析、相互作用解析が必要である。

また、酵母を用いた単離液胞膜ではプロリンの取り込み活性が測定しにくいことが知られている（Kitamoto et al., 1988）が、今後、*Avt1*, *Avt3*, *Avt7* のプロリンの輸送能について、乳酸菌（Herzig et al., 2012）やアフリカツメガエルでの異種発現系（Hägglund et al., 2011）やプロテオリポソーム等（寺田・吉村, 1992; Indiveri, 2010）を用いてより詳細な生化学的な検証を行うことも必要である。

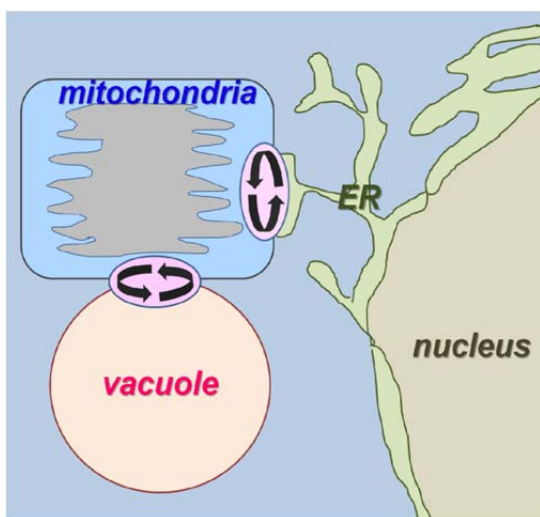
今回、*AVT1* や *AVT7* といった液胞へのプロリン取り込み系に関与する遺伝子を破壊してもストレスの感受性や高濃度プロリン感受性には影響しないことも明らかとなった。このことから、プロリンが高蓄積した際に液胞におけるプロリントランスポーターの輸送能が低下しただけでは、細胞の生育には大きな影響が出ないと考えられた。また、液胞形態形成に関わり、高濃度プロリン蓄積により感受性を示す *PEP3* の破壊株において *AVT1* や *AVT7* を破壊しても、相加効果は見られなかったため（Fig. 15）、液胞形態が異常な  $\Delta pep3$  では *Avt1* や *Avt7* は、正常に機能できていないことが考えられた。 $\Delta pep3$  におけるこれらのタンパク質発現や局在性についての解析も必要である。

*Avt* タンパク質は、ヒトや高等植物に広くオルソログが存在している事で知られており（Wipf et al., 2002）、高等真核生物においてもプロリン輸送との関わりをより詳細に解析することは重要である。*Avt1* は シロイヌナズナの AT5G02170 やヒトの SLC36A6 (SNAT6) にホモロジーがある。*Avt3* はシロイヌナズナ AT2G42005 遺伝子やヒトの SLC36A2 (PAT1, PAT2) とホモロジーがある。PAT1 と PAT2 はプロリンの取り込みに関与する事が分かっている。（Metzner et al., 2006; Sagné, C., 2001）。*AVT7* オルソログも シロイヌナズナの AT3G30390 ヒトの SLC38A1, SLC38A2（Zhang et al., 2011）、SLC38A7（Hägglund et al., 2011）で保存されている。興味深いことに、*Avt* タンパク質と相同性を示すマウスの SNAT2 (SLC38A2) はプロリンが誘導する ES 細胞の分化（Tan et al., 2011）に関与することが明らかとなっている。さらに、哺乳類では、*S. cerevisiae* の *AVT* オルソログ遺伝子産物である SLC38 のリソソームトランスポーターが mTORC1 構成因子と関連していることが報告されており（Rebsamen et al., 2015）、トランスポー

ター以外の機能も明らかになってきた。今後 *S. cerevisiae* における TORC1 活性の AVT ファミリーによる調節機構の解明にも期待される。

また、植物のストレス時にプロリンの液胞からの排出が必要である事 (Fricke and Pahlich, 1990) や、哺乳類細胞のコラーゲンの分解とそれに伴うプロリンの分解にリソソームの機能が必要であることが示されており (Berg et al, 1984)、動植物における、液胞やリソソームにおけるプロリン輸送の分子機構の解明にも期待がされる。

近年、ミトコンドリアと液胞や小胞体が直接コンタクトする vCLAMP (vacuole and mitochondria patch) や ERMES (endoplasmic reticulum-mitochondrial encounter structure) と名付けられた接触部位 (contact site) の存在 (Fig. 20) も注目されている (Klecker and Wetermann, 2014; Hönscher et al., 2014; Elbaz-Alon et al., 2014)。vCLAMP にはアミノ酸などのトランスポーターが集まり、物質輸送の場として機能することが見出されている。本研究では、液胞膜上におけるプロリンの取り込みと排出の両方の存在が示唆されたが、もしプロリンがサイトゾルからミトコンドリアに直接輸送されるのではなく、液胞と vCLAMP のような膜コンタクトサイトを経由してミトコンドリアに輸送されるとすれば、液胞に一度取込んだプロリンを、必要に応じて液胞から排出し、ミトコンドリアに輸送するような機構が存在する可能性も考えられる。ミトコンドリアが液胞で分解される「マイトファジー」(Müller et al., 2015) なども含め、オルガネラ同士の相互作用と細胞内アミノ酸動態に関する知見の蓄積は今後の課題である。



**Fig. 20. 酵母における vCLAMP と ERMES**  
ミトコンドリアは液胞や小胞体と接触部位 (vCLAMP や ERMES) を形成し、アミノ酸などの物質のオルガネラ間における物質輸送を行っているという可能性が示唆されている。

#### ◆ミトコンドリアのプロリントランスポーターの探索

本研究ではミトコンドリアのプロリントランスポーターを同定することはできなかった。候補となるミトコンドリアトランスポーター遺伝子の破壊株や過剰発現株でのプロリン資化能を指標にした探索は困難であった。Fig. 17B で見出されたように、呼吸欠損を示すようなミトコンドリアトランスポーター遺伝子の破壊株では、プロリン資化をする事ができないことが明らかとなった。プロリンオキシダーゼ Put1 は呼吸鎖の活性を必要とするが (Wanduragala et al., 2010)、これらの呼吸活性の低下した破壊株において Put1 の活性が大幅に低下し、プロリンを窒素源として利用できず、生育阻害を示したと考えられる。

また、ミトコンドリアには 30°C の条件で放射性プロリンやアルギニンが取り込まれた。しかしながら放射性アルギニンでは大過剰の非放射性アルギニンの添加により取り込み活性が阻害されたのに対し、放射性プロリンでは同様な現象は見られず、また Mersalyl などの阻害剤の添加による取り込み活性の低下は見られなかった (Fig. 19)。このことから、本研究の *in vitro* の実験条件の範囲では、内膜トランスポーターを介したプロリンのマトリックスへの輸送は起こらないと考えられた。しかしながら、単離したミトコンドリアではプロリンが検出され、また分解活性も検出出来たことから (Fig. 18)、*S. cerevisiae* における生細胞のミトコンドリアではプロリンがトランスポーターによりマトリックスに能動的に輸送され、分解を受けている可能性も考えられた。マトリックスでプロリンが分解を受ける場合は、Put1 もマトリックスに存在する必要があるため、生化学的手法を駆使し、Put1 がマトリックス局在の酵素であることを検証することが必要である。

今後、*S. cerevisiae* においてさらにミトコンドリア内膜におけるプロリン輸送の存在を追求するには精製したミトコンドリア内膜タンパク質を再構成し

(Cavero et al., 2003)、その vesicle にプロリンの輸送活性があるかを生化学的に解析する必要がある。さらに、プロテオミクスやリガンド結合解析を用いた候補膜タンパクの絞り込みも効果的であると考えられる。またこれまでに、ホウレンソウ、ラット、ツェツェバエなどにおいて、ミトコンドリアにおける内膜系を介したプロリン輸送を示唆する報告はあるため (Yu et al., 1983; Njagi et al., 1992; Atlante et al., 1994, 1996)、ミトコンドリアにおけるプロリンの内膜における透過性や、輸送活性に伴う補因子の要求性は、真核生物種によって異なる可能性も考えられる。今後、様々な真核生物のミトコンドリアを対象とした、詳細な生化学的比較検討が急務である。



## 第2章 ミトコンドリアにおけるプロリン代謝調節に 関与する新規因子 Fmp12 の機能解析

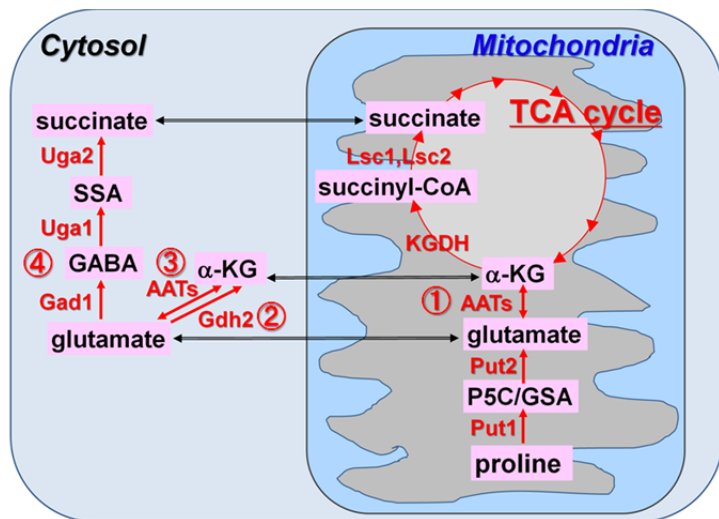
### 序論

#### プロリン分解系と炭素源としての推定利用経路

プロリンは炭素・窒素源、エネルギー源として利用され、原核生物 (Maloy and Roth, 1983) やガン細胞の増殖 (Phang et al., 2015)、ハエなど昆虫の飛翔筋の動力源 (Bursell, 1963; Njagi et al., 1992)、植物細胞において乾燥ストレスから解放された際のエネルギー源として働くこと (Verbruggen and Hermans, 2008) などが知られている。しかしながら、プロリンを炭素源として生育するためにどのような遺伝子群が働き、それらがどのように制御されることにより微生物の増殖あるいは増殖の停止に繋がっているか、メカニズムの詳細は明らかではない。古くから、放線菌や大腸菌、枯草菌などの原核生物において、グルタミン酸、プロリン、アルギニン、アスパラギン酸、分岐鎖アミノ酸などが単一の炭素源として利用し、生育可能なことが知られている (Romano and Nickerson, 1958; Chen and Maloy, 1991; Moses et al., 2012)。それらの経路には、Glutamate Dehydrogenase (GDH)、Amino Acid Transaminase (AAT)、Aspartase などの酵素群が働き、その反応生成物が、TCA サイクルに入る事を通してそれらの細菌は生育することができる。また、キシロース資化性酵母である *Scheffersomyces stipitidis* 等の酵母では、プロリンやグルタミン酸を単一の炭素源かつ窒素源とする培地で良好に生育し、その生育には Glutamate dehydrogenase の Gdh2 の機能が重要であることが示されている (Freese et al., 2011)。一方、*S. cerevisiae* はグルコースを好んで利用しエタノール発酵を行う微生物であるが、非発酵性炭素源であるアミノ酸、乳酸、グリセロールなどを単一炭素源とする液体最少培地では生育しないことが知られている (Freese et al., 2011; McInnes et al., 2013)。従って、環境中のグルコースなどの利用しやすい炭素源が減少した際に、プロリンやグルタミン酸を炭素源として生育することが困難であり、プロリンやグルタミン酸を単一炭素源とする液体培地での生育も見られず (Freese et al., 2011)、その原因は不明である。ワインやビールの醸造においてプロリンは *S. cerevisiae* において利用されずに残存する場合があります、プロリンを炭素源として利用する事ができれば収率を上げることができ、産業上も有意義であると考えられる。プロリンあるいはグルタミン酸を炭素源として利用するための推定経路を Fig. 21 に示す。プロリンは、ミトコンドリアにおいて、Put1、Put2 によって分解され、グルタミン酸を生成する事が良く知られている (Brandriss and Magasanik, 1979)。このグルタミン酸が次の四つの経路 (Fig. 21 の①~④に対応) のいずれかにより TCA サイクルに入ることによって炭素源としての利用が可能になると考えられる。

①ミトコンドリアにおける AAT による分解を受けて  $\alpha$ -KG に変換され TCA 回路

に入る、以下はグルタミン酸がミトコンドリアからサイトゾルに輸送された後に起こると考えられる反応で、② Glutamate dehydrogenase の Gdh2、あるいは③AAT による分解を受けて $\alpha$ -KG へと変換された後にミトコンドリアの TCA 回路に入る、④



Gad1 (glutamate decarboxylase)、Uga1 (GABA transaminase)、Uga2 (succinate semialdehyde dehydrogenase) からなる代謝系を経て GABA からコハク酸へと変換された

Fig. 21. *S. cerevisiae* におけるプロリンを炭素源として利用するための推定経路

P5C:  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate, GSA: glutamate- $\gamma$ -semialdehyde,  $\alpha$ -KG:  $\alpha$ -ketoglutarate, GABA:  $\gamma$ -aminobutyric acid, SSA: succinic semialdehyde KGDH:  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase complex

後にミトコンドリアの TCA 回路に入る (Ramos et al., 1985; Coleman, 2001)。①～③の経路の場合、 $\alpha$ -KG は KGDH ( $\alpha$ -KG dehydrogenase) によって succinyl-CoA へ変換される。KGDH は Kgd1 (E1)、Kgd2 (E2)、Lpd1 (E3) という構成因子から成り、最近の研究において Kgd4 が安定な KGDH 複合体形成のためのアダプターとして機能していることが明らかとなった (Heublein et al, 2014)。また、①および③の経路において必要な AAT については、サイトゾルとミトコンドリアの両方において様々なタイプの酵素が存在しており、 $\alpha$ -KG を必要とする反応を触媒するものも多い (Table 6)。一例として、Alanine aminotransferase (Glutamic pyruvic transaminase と呼ばれる) の触媒反応を Fig. 22 に示す。

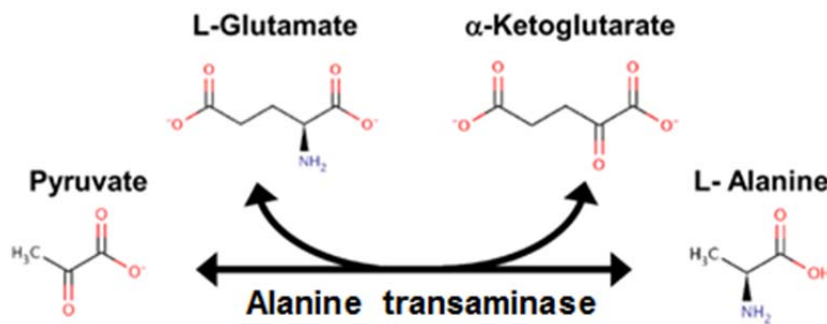


Fig. 22. Alanine transaminase の反応

ピルビン酸がアミノ基の受容体となり、アラニンに変換される。それと同時に、グルタミン酸が $\alpha$ -ケトグルタル酸に変換される。

Table 6 *S. cerevisiae* における様々な AAT

Gene name	Gene product	Reaction	EC number
<i>AAT1</i>	Mitochondrial aspartate aminotransferase	L-aspartate + $\alpha$ -ketoglutarate $\rightleftharpoons$ oxaloacetate + L-glutamate	2.6.1.1
<i>AAT2</i>	Cytosolic aspartate aminotransferase involved in nitrogen metabolism	L-aspartate + $\alpha$ -ketoglutarate $\rightleftharpoons$ oxaloacetate + L-glutamate	2.6.1.1
<i>AGX1</i>	Mitochondrial alanine glyoxylate aminotransferase (AGT)	L-alanine + glyoxylate $\rightleftharpoons$ pyruvate + glycine	2.6.1.44
<i>ALT1</i>	Mitochondrial alanine transaminase (glutamic pyruvic transaminase)	L-alanine + $\alpha$ -ketoglutarate $\rightleftharpoons$ pyruvate + L-glutamate	2.6.1.2
<i>ALT2</i>	Cytosolic catalytically inactive alanine transaminase	L-alanine + $\alpha$ -ketoglutarate $\rightleftharpoons$ pyruvate + L-glutamate	2.6.1.2
<i>ARG8</i>	Mitochondrial acetylmethionine aminotransferase	<i>N</i> (2)-acetyl-L-ornithine + $\alpha$ -ketoglutarate $\rightleftharpoons$ <i>N</i> -acetyl-L-glutamate 5-semialdehyde + L-glutamate	2.6.1.11
<i>ARO8</i>	Cytosolic aromatic aminotransferase I	an aromatic amino acid + $\alpha$ -ketoglutarate $\rightleftharpoons$ an aromatic keto acid + L-glutamate	2.6.1.57
<i>ARO9</i>	Cytosolic aromatic aminotransferase II	L-kynurenine + $\alpha$ -ketoglutarate $\rightleftharpoons$ 4-(2-aminophenyl)-2,4-diketobutanoate + L-glutamate	2.6.1.7
		an aromatic amino acid + $\alpha$ -ketoglutarate = an aromatic keto acid + L-glutamate	2.6.1.57
		L-kynurenine + $\alpha$ -ketoglutarate $\rightleftharpoons$ 4-(2-aminophenyl)-2,4-diketobutanoate + L-glutamate	2.6.1.7
		L-leucine + $\alpha$ -ketoglutarate $\rightleftharpoons$ 4-methyl-2-ketopentanoate + L-glutamate	
<i>BAT1</i>	Mitochondrial branched-chain amino acid (BCAA) aminotransferase	L-isoleucine + $\alpha$ -ketoglutarate $\rightleftharpoons$ ( <i>S</i> )-3-methyl-2-ketopentanoate + L-glutamate	2.6.1.42
		L-valine + $\alpha$ -ketoglutarate $\rightleftharpoons$ 3-methyl-2-ketobutanoate + L-glutamate	
		L-leucine + $\alpha$ -ketoglutarate $\rightleftharpoons$ 4-methyl-2-ketopentanoate + L-glutamate	
<i>BAT2</i>	Cytosolic branched-chain amino acid (BCAA) aminotransferase	L-isoleucine + $\alpha$ -ketoglutarate $\rightleftharpoons$ ( <i>S</i> )-3-methyl-2-ketopentanoate + L-glutamate	2.6.1.42
		L-valine + $\alpha$ -ketoglutarate $\rightleftharpoons$ 3-methyl-2-ketobutanoate + L-glutamate	
<i>BIO3</i>	Cytosolic 7,8-diamino-pelargonic acid aminotransferase (DAPA)	<i>S</i> -adenosyl-L-methionine + 8-amino-7-ketonoanoate $\rightleftharpoons$ <i>S</i> -adenosyl-4-methylthio-2-ketobutanoate + 7,8-diaminononoate	2.6.1.62
<i>CAR2</i>	Cytosolic L-ornithine transaminase (OTase)	L-ornithine + an $\alpha$ -keto acid $\rightleftharpoons$ L-glutamate 5-semialdehyde + an L-amino acid	2.6.1.13
<i>GFA1</i>	Glutamine-fructose-6-phosphate amidotransferase	L-glutamine + D-fructose 6-phosphate $\rightleftharpoons$ L-glutamate + D-glucosamine 6-phosphate	2.6.1.16
<i>HIS5</i>	Cytosolic histidinol-phosphate aminotransferase	L-histidinol phosphate + $\alpha$ -ketoglutarate $\rightleftharpoons$ 3-(imidazol-4-yl)-2-ketopropyl phosphate + L-glutamate	2.6.1.9
<i>SER1</i>	Cytosolic 3-phosphoserine aminotransferase	<i>O</i> -phospho-L-serine + $\alpha$ -ketoglutarate $\rightleftharpoons$ 3-phosphonoxy-pyruvate + L-glutamate	2.6.1.52
		4-phosphonoxy-L-threonine + $\alpha$ -ketoglutarate $\rightleftharpoons$ (3 <i>R</i> )-3-hydroxy-2-keto-4-phosphonoxybutanoate + L-glutamate	
<i>UGA1</i>	Cytosolic gamma-aminobutyrate (GABA) transaminase	4-aminobutanoate + $\alpha$ -ketoglutarate $\rightleftharpoons$ succinate semialdehyde + L-glutamate	2.6.1.19
<i>YER152C</i>	Cytosolic protein with 2-aminoadipate transaminase activity	L-2-aminoadipate + $\alpha$ -ketoglutarate $\rightleftharpoons$ $\alpha$ -ketoadipate + L-glutamate	2.6.1.39

## 材料と方法

### 2.1.1 菌株

大腸菌の菌株はプラスミド構築用に DH5 $\alpha$  を使い、タンパク質発現用には、Rosetta<sup>TM</sup> DE3 株 [*F<sup>-</sup> ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm (DE3) pRARE (Cam<sup>R</sup>)*] (Merck 社) を用いた。本章で使用した酵母菌株は以下の表に示す。

**Table 7** 本章で用いた酵母菌株

Strain	Relevant genotype	Source
BY4741	MATa <i>his3</i> $\Delta$ 1 <i>leu2</i> $\Delta$ 0 <i>met15</i> $\Delta$ 0 <i>ura3</i> $\Delta$ 0	NBRP yeast, BY23849
$\Delta$ alt1	BY4741 <i>alt1::hphNT1</i>	This study
$\Delta$ alt1	BY4741 <i>alt1::HISMX6</i>	This study
$\Delta$ gad1	BY4741 <i>gad1::HISMX6</i>	This study
$\Delta$ gad1	BY4741 <i>gad1::hphNT1</i>	This study
$\Delta$ gdh1	BY4741 <i>gdh1::hphNT1</i>	This study
$\Delta$ gdh2	BY4741 <i>gdh2::hphNT1</i>	This study
$\Delta$ gdh3	BY4741 <i>gdh3::hphNT1</i>	This study
$\Delta$ kgd1	BY4741 <i>kgd1::hphNT1</i>	This study
$\Delta$ put1	BY4741 <i>put1::hphNT1</i>	This study
$\Delta$ put2	BY4741 <i>put2::hphNT1</i>	This study
$\Delta$ gad1 $\Delta$ gdh2	BY4741 <i>gad1::hphNT1</i> <i>gdh2::natNT2</i>	This study
$\Delta$ gdh1 $\Delta$ gdh2	BY4741 <i>gdh1::hphNT1</i> <i>gdh2::natNT2</i>	This study
$\Delta$ gdh2 $\Delta$ gdh3	BY4741 <i>kgd1::hphNT1</i>	This study
$\Delta$ gdh1 $\Delta$ gdh2 $\Delta$ gdh3	BY4741 <i>gdh1::aur1-C</i> <i>gdh2::natNT2</i> <i>gdh3::hphNT1</i>	This study
$\Delta$ alt1 $\Delta$ gdh1 $\Delta$ gdh2 $\Delta$ gdh3	BY4741 <i>alt1::HISMX6</i> <i>gdh1::AUR1-C</i> <i>gdh2::natNT2</i> <i>gdh3::hphNT1</i>	This study
$\Delta$ gad1 $\Delta$ gdh1 $\Delta$ gdh2 $\Delta$ gdh3	BY4741 <i>gad1::kanMX4</i> <i>gdh1::AUR1-C</i> <i>gdh2::natNT2</i> <i>gdh3::hphNT1</i>	This study
$\Delta$ gad1 $\Delta$ gdh1 $\Delta$ gdh2 $\Delta$ gdh3	BY4741 <i>gad1::HISMX6</i> <i>gdh1::AUR1-C</i> <i>gdh2::natNT2</i> <i>gdh3::hphNT1</i>	This study
$\Delta$ fmp12	BY4741 <i>fmp12::kanMX4</i>	This study
$\Delta$ fmp12 $\Delta$ alt1	BY4741 <i>fmp12::kanMX4</i> <i>alt1::hphNT1</i>	This study
$\Delta$ fmp12 $\Delta$ gad1	BY4741 <i>fmp12::kanMX4</i> <i>gad1::hphNT1</i>	This study
$\Delta$ fmp12 $\Delta$ gdh1	BY4741 <i>fmp12::kanMX4</i> <i>gdh1::hphNT1</i>	This study
$\Delta$ fmp12 $\Delta$ gdh2	BY4741 <i>fmp12::kanMX4</i> <i>gdh2::hphNT1</i>	This study
$\Delta$ fmp12 $\Delta$ gdh3	BY4741 <i>fmp12::kanMX4</i> <i>gdh3::hphNT1</i>	This study
$\Delta$ fmp12 $\Delta$ kgd1	BY4741 <i>fmp12::kanMX4</i> <i>kgd1::hphNT1</i>	This study
$\Delta$ fmp12 $\Delta$ put1	BY4741 <i>fmp12::kanMX4</i> <i>put1::hphNT1</i>	This study
$\Delta$ fmp12 $\Delta$ put2	BY4741 <i>fmp12::kanMX4</i> <i>put2::hphNT1</i>	This study
$\Delta$ fmp12 $\Delta$ gad1 $\Delta$ gdh2	BY4741 <i>fmp12::kanMX4</i> <i>gad1::hphNT1</i> <i>gdh2::natNT2</i>	This study
$\Delta$ fmp12 $\Delta$ gdh1 $\Delta$ gdh2	BY4741 <i>fmp12::kanMX4</i> <i>gdh1::hphNT1</i> <i>gdh2::natNT2</i>	This study
$\Delta$ fmp12 $\Delta$ gdh2 $\Delta$ gdh3	BY4741 <i>fmp12::kanMX4</i> <i>gdh2::natNT2</i> <i>gdh3::hphNT1</i>	This study
$\Delta$ fmp12 $\Delta$ gdh1 $\Delta$ gdh2 $\Delta$ gdh3	BY4741 <i>fmp12::kanMX4</i> <i>gdh1::AUR1-C</i> <i>gdh2::natNT2</i> <i>gdh3::hphNT1</i>	This study
$\Delta$ fmp12 $\Delta$ gdh1 $\Delta$ gdh2 $\Delta$ gdh3	BY4741 <i>fmp12::kanMX4</i> <i>gdh1::AUR1-C</i> <i>gdh2::natNT2</i> <i>gdh3::hphNT1</i>	This study
$\Delta$ fmp12 $\Delta$ gad1 $\Delta$ gdh1 $\Delta$ gdh2 $\Delta$ gdh3	BY4741 <i>fmp12::kanMX4</i> <i>alt1::HISMX6</i> <i>gdh1::AUR1-C</i> <i>gdh2::natNT2</i> <i>gdh3::hphNT1</i>	This study
$\Delta$ fmp12 $\Delta$ gad1 $\Delta$ gdh1 $\Delta$ gdh2 $\Delta$ gdh3	BY4741 <i>fmp12::kanMX4</i> <i>gad1::HISMX6</i> <i>gdh1::AUR1-C</i> <i>gdh2::natNT2</i> <i>gdh3::hphNT1</i>	This study
Fmp12-yeGFP	BY4741 <i>FMP12::FMP12-yeGFP-hphNT1</i>	This study
$\Delta$ fmp10	BY4741 <i>fmp10::kanMX4</i>	Open Biosystems
$\Delta$ fmp12	BY4741 <i>fmp12::kanMX4</i>	Open Biosystems
$\Delta$ fmp16	BY4741 <i>fmp16::kanMX4</i>	Open Biosystems
$\Delta$ fmp22	BY4741 <i>fmp22::kanMX4</i>	Open Biosystems
$\Delta$ fmp23	BY4741 <i>fmp23::kanMX4</i>	Open Biosystems
$\Delta$ fmp27	BY4741 <i>fmp27::kanMX4</i>	Open Biosystems
$\Delta$ fmp29	BY4741 <i>fmp29::kanMX4</i>	Open Biosystems
$\Delta$ fmp33	BY4741 <i>fmp33::kanMX4</i>	Open Biosystems
$\Delta$ fmp34	BY4741 <i>fmp34::kanMX4</i>	Open Biosystems
$\Delta$ fmp39	BY4741 <i>fmp39::kanMX4</i>	Open Biosystems
$\Delta$ fmp41	BY4741 <i>fmp41::kanMX4</i>	Open Biosystems
$\Delta$ fmp42	BY4741 <i>fmp42::kanMX4</i>	Open Biosystems
$\Delta$ fmp48	BY4741 <i>fmp48::kanMX4</i>	Open Biosystems
$\Delta$ fmp49	BY4741 <i>fmp49::kanMX4</i>	Open Biosystems
$\Delta$ fmp52	BY4741 <i>fmp52::kanMX4</i>	Open Biosystems
$\Delta$ gad1	BY4741 <i>gad1::kanMX4</i>	Open Biosystems
BY4741	MATa <i>his3</i> $\Delta$ 1 <i>leu2</i> $\Delta$ 0 <i>met15</i> $\Delta$ 0 <i>ura3</i> $\Delta$ 0	Derived from BY4743 spore
BY4741u	MATa <i>ura3</i> $\Delta$ 0	S. Morigasaki
BY4742	MATa <i>his3</i> $\Delta$ 1 <i>leu2</i> $\Delta$ 0 <i>lys2</i> $\Delta$ 0 <i>ura3</i> $\Delta$ 0	Open Biosystems

## 2.1.2 培地

第1章と同様にして作製した。アミノ酸を炭素源や窒素源とする最少培地は、以下の表に示した要領で作製した。

**Table 8** 本章で用いた最少培地

Media	Carbon and nitrogen source		
SD	0.5% ammonium sulphate	and	2% glucose
-N+Pro	0.1% proline	and	2% glucose
-C+Pro	0.5% ammonium sulphate	and	3% proline
-N-C+Pro		3% proline	
-N-C+MSG		3% monosodium glutamate	
-N-C+Ala		3% alanine	

\*All media contain 0.17% yeast nitrogen base without amino acids and ammonium sulphate

大腸菌のタンパク質発現は、M9+CA 培地(0.4% glucose、0.6% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.3% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、8.6 mM NaCl、18.7 mM NH<sub>4</sub>Cl、1 mM MgSO<sub>4</sub>、2% casamino acid) に 100 µg/ml ampicillin、30 µg/ml chloramphenicol、100 µM IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) を添加した。また、大腸菌の選択用として LB 培地に 100 µg/ml ampicillin、30 µg/ml chloramphenicol、50 µg/ml kanamycin を適宜追加した。

## 2.1.3 プラスミド

第2章で使用したプラスミドを以下の表に示す。プラスミドの取り扱いは、第1章と同様にして行った。

**Table 9** 本章で用いたプラスミド

Plasmids	Plasmid type	Source
BG1805-ALT1	BG1805-GAL1-ALT1-ZZ-HA-6HIS, URA3, CEN	Addgene (Gelperin et al., 2005)
BG1805-FMP12	BG1805-GAL1-FMP12-ZZ-HA-6HIS, URA3, CEN	Addgene (Gelperin et al., 2005)
pAD4	LEU2 2µm pADH1	J. Nikawa
pAUR123	AUR1-C, CEN pADH1	Takara Bio
pET-53-DEST	6xHis/attR1Cam <sup>r</sup> ccdBattR2/Strep Amp <sup>r</sup>	Merck
pET-53-FMP12	6xHis-FMP12-Strep Amp <sup>r</sup>	This study
pET-53-FMP12(-MTS)	6xHis-FMP12(-MTS)-Strep Amp <sup>r</sup>	This study
pET-53-NcBBH	6xHis-NcBBH-Strep Amp <sup>r</sup>	This study
pDONR221	Gateway Donor vector	Invitrogen
pDONR221-ALT1	Gateway Entry vector	This study
pDONR221-FMP12	Gateway Entry vector	This study
pDONR221-FMP12(-MTS)	Gateway Entry vector	This study
pDONR221-NcBBH	Gateway Entry vector	This study
pFA6a-hphNT1	hphNT1	Euroscarf (Janke et al., 2004)
pFA6a-natNT2	natNT2	Euroscarf (Janke et al., 2004)
pFA6a-GFP(S65T)-His3MX6	GFP(S65T), His3Mx6	Addgene (Longtine et al., 1998)
pFA6a-GFP(S65T)-KanMX6	GFP(S65T), KanMx6	Addgene (Longtine et al., 1998)
pRS416MET15	URA3, MET15, CEN	S. Morigasaki
pRS416CgHIS3MET15	URA3, CgHIS3, MET15, CEN	S. Morigasaki
pVV208	URA3, CEN, pTetO7	Euroscarf (Van Mullem et al., 2003)
pVV208-ALT1	URA3, CEN, pTetO7, ALT1	This study
pVV208-FMP12	URA3, CEN, pTetO7, FMP12	This study
pVV209	URA3, CEN, pTetO7, 3HA	Euroscarf (Van Mullem et al., 2003)
pVV209-ALT1	URA3, CEN, pTetO7, ALT1-HA	This study
pVV209-FMP12	URA3, CEN, pTetO7, FMP12-HA	This study
pYM25	hphNT1, yeGFP	Euroscarf (Janke et al., 2004)

*ALT1* と *FMP12* の過剰発現プラスミドの構築は酵母の Gateway™ システム (Van Mullem *et al.*, 2003) を用いて行った。BG1805-*ALT1* あるいは BG1805-*FMP12* とクローニング用ベクター pDONR™221 (インビトロジェン社) とを BP 反応により組換えた。BP 反応は付属の説明書に従って行った。得られた反応物で 100 µl の大腸菌 DH5α コンピテントセルを形質転換後、kanamycin (50 µg/ml) 含有の LB プレートで選択した。形質転換体からアルカリ SDS 法をベースにした QIAprep Spin Miniprep Kit (キアゲン社) を用いてプラスミドを抽出し、PCR によりプラスミドの完成を確認後、これらを発現用ベクター pVV208 や pVV209 (EUROSCARF 社) と LR 反応により組換えた。LR 反応は付属の説明書に従って行った。得られた反応物で 100 µl の大腸菌 DH5α コンピテントセルを形質転換後、ampicillin (100 µg/ml) 含有の LB プレートで選択した。得られた転換体からプラスミドを抽出し、PCR やシーケンシングで確認後、実験に用いる酵母を形質転換した。pET-53-DEST は大腸菌発現させたタンパク質を His タグ精製するためのプラスミドである。pVV プラスミドの場合と同様にして、pET-53-DEST に *FMP12*、*FMP12* の推定ミトコンドリア移行シグナルを除去した *FMP12(-MTS)*、アカパンカビ (NBRC 6067 *Neurospora crassa*) の  $\gamma$ -butyrobetaine dioxygenase 遺伝子 *BBH* を LR 反応でそれぞれ導入し、pET-53-*FMP12*、pET-53-*FMP12(-MTS)*、pET-53-*NcBBH* を構築した。*NcBBH* 領域を増幅するためには、NBRC から取り寄せたアカパンカビから抽出したゲノム DNA を用いて PCR を行った。*NcBBH* のクローニングは (Franken *et al.*, 2015) を参考にした。

また、酵母の栄養要求性を相補するために、pAD4、pRS416MET15、pRS416CgHIS3MET15 も必要に応じて空ベクターとして使用した。

## 2.1.4 DNA オリゴマー

本章で使用したプライマーを以下に示す。

Table 10 本章で用いたプライマー

Primer name	Sequence (5'>3')	Source
ALT1-CgHIS3-F	ATAAATATATTTCCCCAGTCTTTATTTTGCTCTCTCCACGGTTTAGCTTGCCTCGTCC	This study
ALT1-dis1-F	GCGCTGCCCCACACACATA	This study
ALT1-dis2-R	TTCAATAACCTTATTCGGAC	This study
ALT1-S1	ATAAATATATTTCCCCAGTCTTTATTTTGCTCTCTCCACGGTACGCTGCAGGTCGAC	This study
ALT1-S2	TATTTAAATGTTTATTGAAGACTGTTCTGCCCTTTTATATCGATGAATTCGAGCTCG	This study
FMP12-dis1-F	AACAGCAGCAACAGTACAGG	This study
FMP12-dis2-R	GCTGTTGATGTTGCTCTAAT	This study
FMP12C-STOP-S3(F)	AAGAGTAAATTAAGTCTTTGGAAGAGAAGTTTCTCATGACAAACGTACGCTGCAGGTCGAC	This study
FMP12-ORF	ATATAGACCCAGTTATGG	This study
FMP12-S1	AAAGAAAAATAATTATTAGAAACCAATTACCAACACAAGCGTACGCTGCAGGTCGAC	This study
FMP12-S2	TAAATATAAAGAATCACATAACTATGCTGAAAAAATGAAGATCGATGAATTCGAGCTCG	This study
GAD1-CgHIS3-F	CGTCGCTCTTAAACAATCCAGGCTGAACAAAAACAAGGAATAGTTTAGCTTGCCTCGTCC	This study
GAD1-dis1-F	TCTAGTTGGTCTTGACATT	This study
GAD1-dis2-R	CATACAGCCAGTACCTTCCC	This study
GAD1-S1	CGTCGCTCTTAAACAATCCAGGCTGAACAAAAACAAGGAATACGTACGCTGCAGGTCGAC	This study
GAD1-S2	CATACATATAGGGGCGGTATATTGGATGACCTTTTCAACATCGATGAATTCGAGCTCG	This study
GDH1-dis1-F	AGTGTATCAGGCTCCCCTTA	This study
GDH1-dis2-R	AAATTCAAATCTGCCGACGA	This study
GDH1-S1	CGCATTATTCTAATATAACAGTTAGGAGACCAAAAAGAAAAAGAACGTACGCTGCAGGTCGAC	This study
GDH1-S2	GAACTTTTATGAACTTTCTCTTTCTTTCTTTTAGACTATATCGATGAATTCGAGCTCG	This study
GDH2-dis1-F	TAACTGGAAGAATAGCAATG	This study
GDH2-dis2-R	TAGTTTAGTTTTGAGCAAGG	This study
GDH2-S1	TACAAAACAAGGATATTAATTCACAACAATAAAAAAGAATAAAGACGTACGCTGCAGGTCGAC	This study
GDH2-S2	TTTCTGACGGCAGAACTAATTATACAAAACAATTTATTGAAGCATCGATGAATTCGAGCTCG	This study
GDH3-dis1-F	AACGCCATTA AAAAAGAAAGG	This study
GDH3-dis2-R	TGTTATTCTTATTGCTGTTG	This study
GDH3-S1	GGGAAGTAGCAACAGTCACCGAAAAAGAAAAGGTA AAAAGTAAAAACGTACGCTGCAGGTCGAC	This study
GDH3-S2	CATACACAGATAGTTACGAACA AAAAAGAAAATAGCGCTTACGGATCGATGAATTCGAGCTCG	This study
KGD1-dis1-F	AGCGAATATAATTCTTTGAG	This study
KGD1-dis2-R	AGGTTGTGACTGTAACCTCG	This study
KGD1-S1	GAAAAGAAAGCAGTTTTTAGAAAACTAAATTTTACC GTTCGTACGCTGCAGGTCGAC	This study
KGD1-S2	TATGGCTGATTTTCATGTTTTTCATATTTGAATTCATCTATCGATGAATTCGAGCTCG	This study
PUT1-dis1-F	GCGAGGCAGAAAGGGATGAA	Kaino et al 2009
PUT1-dis2-R	ATACGTTGGTTTACTAACAC	Kaino et al 2009
PUT1-S1	AAACATCGCTACATAGTAATAACACTAACGCACGCTAGAACGTACGCTGCAGGTCGAC	This study
PUT1-S2	TTGGTTTGCTTTGAAATTGGAGTATATATTATAGTCCTCATCGATGAATTCGAGCTCG	This study
PUT2(+)	ACATATCCCTTGCCATCTTC	Lab Stock
PUT2(-)	TTTGGACGGTTGGTTCAATG	Lab Stock
PUT2-S1	TCTATATTGTATAGAAGGCCAATTC AAATTCACAGGAATTCGTACGCTGCAGGTCGAC	This study
PUT2-S2	GAAGTACTGCATTCGCGTTCTATTCCACAAAAATTTTATCGATGAATTCGAGCTCG	This study
S1-AUR1-F	CGTACGCTGCAGGTCGACAAAGTGCCCATCAGTGTT	This study
S2-AUR1-R	ATCGATGAATTCGAGCTCGAGAGGAAAGAATAACGCAAA	This study

### 2.1.5 破壊株の作製

第1章と同様にして破壊断片を作製した。本章では、多重破壊株作製のため、5種類の破壊断片を使用した。単独破壊株の場合、酵母非必須遺伝子破壊株コレクションよりゲノムDNAを調製し、破壊したい遺伝子上流と下流500bpを含む*kanMX4*断片をPCRで増幅し、その断片を用いて酵母を形質転換した。多重破壊株作製の為には、pFA6a-*hphNT1*を鋳型に破壊したい遺伝子上流と下流40bpを含む*hphNT1*断片をPCRで増幅したもの、同様にしてpFA6a-*natNT2*を鋳型に*natNT2*を、pFA6a-GFP(S65T)-His3MX6を鋳型に*HIS3MX6*を、S1-*AUR1-C* S2断片を鋳型に、*AUR1-C*を含む破壊断片を増幅したものをを用いて酵母を形質転換した。*HIS3MX6*は、*TEF*プロモーター・ターミネーター制御下で*Schizosaccharomyces pombe*の*his5*を発現させる配列である。S1-*AUR1-C*-S2はpAUR123(タカラバイオ社)を鋳型にS1、S2配列を付加したPCR断片である。*AUR1-C*は、タカラバイオ社が*S. cerevisiae*より取得したAureobasidin A耐性遺伝子で、*AUR1*遺伝子の2カ所のアミノ酸を遺伝子工学的に置換した変異遺伝子である。酵母の形質転換体は、導入する破壊断片の種類に応じてG418(200 µg/ml)、clonNAT(100 µg/ml)、Hygromycin B(300 µg/ml)、Aureobasidin A(0.25 µg/ml)のいずれかを含むYPD寒天培地、あるいはSC-His培地で選択した。遺伝子の破壊は、コロニーPCRで確認した。また、*yeGFP*をFmp12のC末端に融合させた菌株を作製するために、pYM25(Euroscarf社)を鋳型に、プライマーのFMP12-STOP-S3-(F)とFMP12-S2を用い、STOPコドン削除したFMP12のC末端の配列(40bp)に*yeGFP*、*hphNT1*、FMP12遺伝子の下流40bpを融合させたようなDNA断片をPCRで増幅し、その精製DNA断片を用いて酵母を形質転換した。Hygromycin Bで選択後、コロニーPCRでFMP12-*yeGFP*-*hphNT1*断片の存在を確認した。

### 2.1.6 生育試験

寒天培地において30°Cで増殖させた酵母を5mlのSD培地に植菌し、30°Cで1日培養して定常期に増殖させた。その細胞を滅菌水で3回洗浄し、OD<sub>600</sub>が2になるよう原液を調製し、その原液を10<sup>-1</sup>~10<sup>-3</sup>の希釈系列を作製し、5 µlずつ各培地にスポットし、30°Cで培養した。

### 2.1.7 Fermographを用いた発酵力の測定

AF-1101W Fermograph(Atto社製)を用いて発酵力測定した。Fermographは、パン生地中の酵母、あるいは培地やもろみ中の酵母より発生する炭酸ガス量を、10~20検体並行して自動測定することが出来る装置である。酵母はSD最少培地(10%グルコース+0.5%硫酸アンモニウム)あるいはプロリンを唯一の窒素源



とする培地（10%グルコース+3%プロリン）によって評価した。前培養を SD 最少培地で 2 日行い、菌体を洗浄後、OD<sub>600</sub>=0.2 で本培養を開始した（30℃）。培養は静置で一週間行った。ソフトウェア Fermograph II でデータ取り込み、fermo\_plot で解析した。

### 2.1.8 ウェスタンブロッティング

#### 1) タンパク質抽出液の調製（TCA 沈殿）

対数増殖期（OD<sub>600</sub>=1.0）になるまで培養した酵母培養液の遠心したペレットやプレートからかき取った菌体を滅菌水に懸濁した。細胞を再度遠心により沈殿させ、-80℃で保存した。沈殿を 10% (w/v) トリクロロ酢酸液 100 μl で再懸濁後、0.5 mm 低アルカリガラスビーズ（安井器械社）を加え、マルチビーズショッカー®（安井器械社製）で 4℃、2,500 rpm で 60 秒間破碎後 60 秒間冷却するというサイクルを 7 回繰り返して行った。細胞破碎液を遠心分離し、得られた沈殿を 150 μl の 0.5 M Tris-HCl (pH 8.0) を含むサンプルバッファー（50 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、4.5% グリセロール, 0.01% ブロモフェノールブルー, 0.7 M メルカプトエタノール）で懸濁後、95℃で 5 分間熱し、氷冷した。タンパク抽出液は、Protein assay kit（BIO-RAD 社）を用いて、ブラッドフォード法によりタンパク質定量した。

#### 2) SDS-PAGE およびウェスタンブロッティング

調製したサンプルは、10%-SDS-PAGE によりタンパク質を分離後、ニトロセルロース膜に転写し、ブロッキング後、一次抗体反応を行い TBS-T (Tris Buffered Saline + 0.05% Tween 20) で洗浄した。さらに二次抗体反応を行い TBS-T で洗浄後、Pierce™ ECL Plus Western Blotting Substrate (Thermo Fisher 社) を用い、X 線フィルムに感光させ、GFP を含む融合タンパク質を検出した。一次抗体として α-GFP マウスモノクローナル抗体 (Roche Diagnostics 社)、anti-HA ウサギポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology 社)、anti-yeast GAPDH ウサギポリクローナル抗体 (Nordic Immunology 社) を使用した。二次抗体として、西洋ワサビ peroxidase 結合 anti-rabbit IgG および anti-mouse IgG 抗体 (Promega 社) を用いた。

### 2.1.9 Fmp12-GFP の蛍光顕微鏡観察

SD 培地で培養した対数増殖期の Fmp12-GFP 発現細胞を用いて GFP 融合タンパク質の細胞内局在性観察を行った。ミトコンドリアを可視化するために、菌体を 40 nM の MitoTracker® Orange CMTMRos (Invitrogen 社) で 30 分間処理した。細胞を滅菌水で洗浄し、観察を行った。蛍光顕微鏡は Axiovert 200M (Carl Zeiss 社製) を用い画像を HBO 100 Microscope Illuminating System (Carl Zeiss 社製) のデジタルカメラで取り込み、その画像を解析した。

### 2.1.10 大腸菌における Fmp12 の発現と精製

大腸菌 Rosetta (DE3) 株に、構築したプラスミド (pET-53-Fmp12、pET-53-Fmp12(-MTS)、pET-53-NcBBH のいずれか) を導入し、ampicillin と chloramphenicol 含有 LB 寒天培地にストリークし、37°C で培養した。得られた各単一コロニーを 5 ml の 2% カザミノ酸、ampicillin と chloramphenicol 含有の M9+CA 液体培地に植菌し、37°C で一晩前培養した。前培養液を同組成の 400 ml のカザミノ酸含有 M9 液体培地に 1% 植菌し、37°C で約 3 時間培養し、タンパク質発現誘導剤を添加する前に、培養液を誘導温度である 16°C に下げるため、16°C で 30 分間振盪培養し、OD<sub>600</sub> = 約 0.5 まで増殖させた。その後、氷上で冷やした菌液に対して IPTG を終濃度 0.1 mM になるように添加し、16°C で 20 時間振盪培養にて、各タンパク質 (Fmp12、Fmp12(-MTS)、NcBBH) の発現を誘導させた。IPTG による発現誘導を行った大腸菌 (Rosetta (DE3)/ pET-53-Fmp12 or pET-53-Fmp12(-MTS) or pET-53-NcBBH) を高速冷却遠心機 SRX-201 (TOMY 社製) で集菌し (3,500 rpm、10 min、4°C)、40 ml の A buffer (50 mM sodium phosphate、500 mM ammonium sulfate、pH 7.4) にて洗浄し、再度集菌した。40 ml の A buffer に再懸濁し、終濃度 1 mM の phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) を添加し、超音波破碎機 (SONIFIER450、Branson 社製) を用い、Out Put Control 3、30 秒 ON、30 秒 OFF、6 サイクルの超音波処理により氷上で破碎した。得られた細胞破碎液を遠心分離機で遠心分離 (10,000 ×g、15 min、4°C) により上清を回収し、0.2 μm のフィルターでろ過した。4°C の条件下において、COSMOGEL® His-Accept (ナカライテスク社) を 10 ml の結合 buffer で平衡化した後、得られた無細胞抽出液をカラムに通した。その後、10 ml の洗浄 buffer (A buffer + 70 mM イミダゾール pH 7.4) で洗浄後、5 ml の溶出 buffer (A buffer + 300 mM イミダゾール pH 7.4) で溶出画分を回収し、精製酵素とした。必要に応じてタンパク質を Centriplus (Millipore 社) で濃縮した。精製の確認として 10% SDS ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動 (SDS-PAGE) を行った。

### 2.1.11 Fmp12 の活性測定 (LC-MS/MS 解析)

過去の論文 (Vaz et al., 1998) を参考に  $\gamma$ -butyrobetaine dioxygenase 活性を測定した。250 μl の反応液組成は : Purified enzyme (75 μl), 1 mM  $\gamma$ -butyrobetaine, 3 mM  $\alpha$ -ketoglutarate, 0.25 mM ferrous ammonium sulfate, 10 mM sodium ascorbate 20 mM KPB (pH7.0) であり、37°C で反応を行い、100°C の熱処理で反応停止させた。無細胞抽出液の場合は 25-50 μg、精製酵素の場合は 7-21 μg のタンパク質を用いた。LC-MS/MS 解析では、サンプルを UHPLC システム (Nexera X2 ; 島津製作所社製) で分離し、オンライン接続したトリプル四重極型質量分析計 (LCMS-8030 plus、島津製作所社製) で検出した。条件を次ページに示す。

### 【LC 条件】

カラム：Acquity CSH C18 HPLC column (1.7  $\mu$ m, 2.1  $\times$  150 mm; Waters)

移動相：(A) 0.1% ギ酸 水

(B) 0.1% ギ酸 アセトニトリル

流速：0.25 ml/min

グラジエントプログラム：

0%B (0 min) – 0%B (2 min) – 10%B (5 min) – 100%B (6.5 min) – 100%B (10.7 min) –

0%B (11 min) – 0%B (16.5 min)

インジェクション：10  $\mu$ l

カラム温度：40°C

### 【MS 条件】

イオン化インターフェース：ESI, 正 (4.5 kV) / 負 (-3.5 kV)

DL 温度：250°C

ヒートブロック温度：400 °C

ネブライザーガス：窒素ガス (1.5 L/min)

ドライイングガス：窒素ガス (10 L/min)

各測定分子の MS/MS における  $m/z$  と保持時間：

- ・ カルニチン 162.05 > 60.10 2.764 min
- ・  $\gamma$ -ブチロベタイン 146.05 > 86.95 2.647 min
- ・ コハク酸 117.30 > 73.10 5.238 min
- ・  $\alpha$ -ケトグルタル酸 145.25 > 101.15 7.296 min

それぞれの標的分子の定量値は、内部標準である CSA (D-Camphor-10-sulfonic acid) に対するマスクロマトグラフィーのピーク面積比として算出した (相対値)。

#### 2.1.12 アミノ酸解析

アミノ酸解析は、第 1 章と同様にして行った。

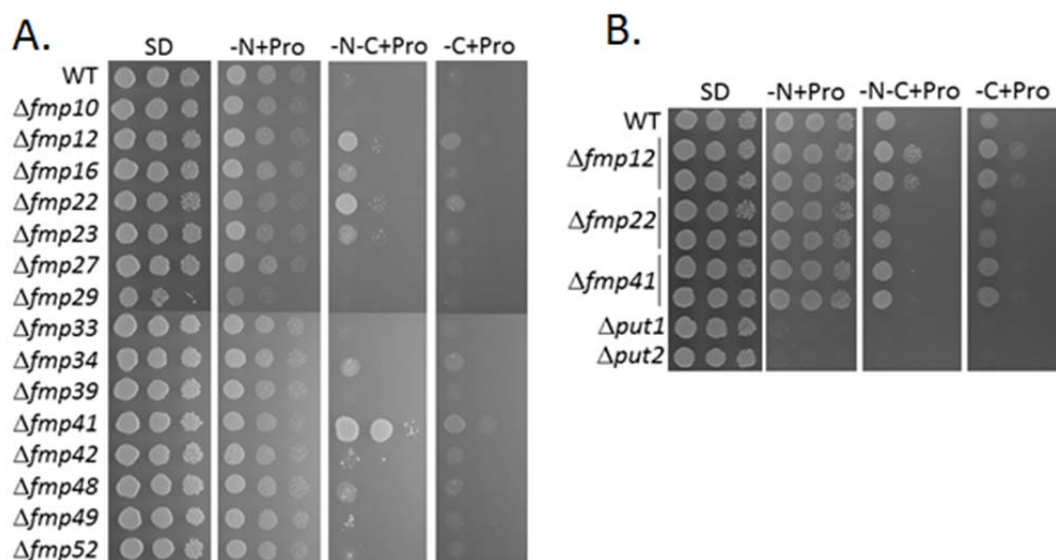
#### 2.1.13 定量リアルタイム PCR

total RNA と cDNA の調製、リアルタイム PCR の反応条件等は第 1 章と同様に行い *FMP12* の遺伝子発現を解析した。

## 2. 結果

### 2.2.1 FMP 遺伝子破壊株におけるプロリンを単一炭素源とする培地における表現型解析と FMP12 の取得

*S. cerevisiae* は、炭素源としてグルコースを好み、アミノ酸を単一炭素源として利用しないと考えられている (Freese et al., 2011)。一方、キシロース資化性酵母の *Scheffersomyces stipitis* などはアミノ酸を炭素源として資化して生育できるため、*S. cerevisiae* には炭素源としてのアミノ酸の利用を抑制する未知の機構が存在するものと推測される。そこで、プロリンの代謝に関連する新規因子の解明を目的として、以前の研究においてミトコンドリアのプロテオームから同定されたタンパク質 (Found in Mitochondrial Proteome; FMP) をコードする遺伝子 (Chacinska et al., 2004) のうち、15 遺伝子の破壊株を用い、プロリンを炭素源とする寒天培地での表現型解析を行った (Fig. 23)。その結果、グルコースを炭素源、硫酸アンモニウムを窒素源とする通常の最少培地やプロリンを単一窒素源とする寒天培地において、FMP29 破壊株が生育遅延を示した以外は、ほとんどの破壊株が野生株と同等の生育を示した。一方、興味深いことに、プロリンを単一の炭素源とする培地 (SD-N-C+Pro および SD-C+Pro 培地) において、FMP12 破壊株 ( $\Delta fmp12$ )、FMP22 破壊株 ( $\Delta fmp22$ )、FMP41 破壊株 ( $\Delta fmp41$ ) が野生株に比べて良好に生育することを見出した (Fig. 23A)。



**Fig. 23. 各 FMP 遺伝子の破壊が酵母の生育に及ぼす影響**

(A) 一次スクリーニングの結果を示す。各酵母菌株について培養液の希釈系列を作製し、各種寒天培地の上にスポットした。(B) 二次スクリーニングの結果を示す。作製しなおした、菌株における表現型解析。 $\Delta fmp12$  においてのみプロリンを炭素源とする培地で生育したことから、A で生育した  $\Delta fmp22$  や  $\Delta fmp41$  は偽陽性と考えた。*PUT1* と *PUT2* の遺伝子破壊株はプロリンを分解できないネガティブコントロールである。培地の組成は Table 8 に記載している。※Fig. A の野生株 BY4741 (BY4743 の胞子由来) と Fig. B の野生株 BY4741 (NBRP 由来) は系統が異なり、プロリンの炭素源としての利用の表現型に差異がある。

Fig. 23A では、一次スクリーニングとして、市販の酵母非必須遺伝子破壊株コレクションの YKO (Euroscarf) を用いたが、予備検討において YKO に含まれるミトコンドリアトランスポーターの遺伝子破壊株のうち、破壊したトランスポーター遺伝子とは無関係にアミノ酸の炭素源としての代謝が亢進している (偽陽性を示す) 場合がしばしばみられた。そこで、二次スクリーニングとして、ナショナルバイオリソースプロジェクト (NBRP) 酵母由来の BY4741 を親株に、*FMP12*, *22*, *41* の単独破壊株 ( $\Delta fmp12$ ,  $\Delta fmp22$ ,  $\Delta fmp41$ ) を独自に作製した。また、プロリンの利用に必須である *Put1/2* をコードする遺伝子の破壊株 ( $\Delta put1$  および  $\Delta put2$ ) も解析対象に加えた。その結果、SD 培地ではいずれの破壊株も親株と同様の生育を示したのに対し、プロリンを窒素源とする培地では、 $\Delta put1$  および  $\Delta put2$  が生育に欠損を示し、他の *FMP* 遺伝子破壊株は親株と同様に生育した (Fig. 23B)。また興味深いことに  $\Delta fmp12$  においてのみ、プロリンを単一の炭素源とする培地 (SD-N-C+Pro および SD-C+Pro 培地) での生育向上が再現良く観察されたことから、*FMP12* 遺伝子の破壊がプロリンの炭素源としての利用を亢進していることが明らかになった (Fig. 23B)。従って、*Fmp12* はプロリンの炭素源としての利用を抑制する新規因子であることが示された。以上の結果は、*S. cerevisiae* がプロリンを炭素源として生育することが可能であり、それを抑制する機構が存在する事を示唆する初めての知見となった。YKO の *FMP22* 破壊株、*FMP41* 破壊株では、ゲノムのいずれかのサイトにプロリンの炭素源としての利用を亢進させる変異が存在して偽陽性を示したと推察される。

### 2.2.2 *FMP12* 過剰発現株の表現型解析

次に、*FMP12* 遺伝子の過剰発現が酵母の生育に及ぼす影響を解析した。その結果、まず空ベクター導入株も長時間の培養 (7 日間) により SD-N-C+Pro においてわずかに生育することが示された (Fig. 24)。これに対し、*FMP12* の過剰発現が、プロリンを単一の窒素源かつ炭素源とする培地での生育を阻害する事が示された。このことは、上述の  $\Delta fmp12$  の解析結果 (Fig. 23) と合致しており *Fmp12* が、プロリンの炭素源としての利用を阻害することを示すものと考えられる。また、 $\Delta fmp12$  で *FMP12* を過剰発現させても、同様の傾向が見られた (Fig. 24)。後述の *Fmp12* の細胞内局在解析のために HA タグ融合 *Fmp12* を過剰発現する株も作製した。*Fmp12*-3HA 融合タンパク質も、部分的ではあるが *Fmp12* と同様に、プロリンを単一の炭素源かつ窒素源とする培地での生育を阻害した。また、グルタミン酸ナトリウム (MSG) を単一の炭素源かつ窒素源とする培地 (SD-N-C+MSG) を用いた場合にも、SD-N-C+Pro と同様の生育への影響が認められたことから、*Fmp12* は、プロリンの分解により生じるグルタミン酸の炭素源としての利用も抑制することが示唆された。

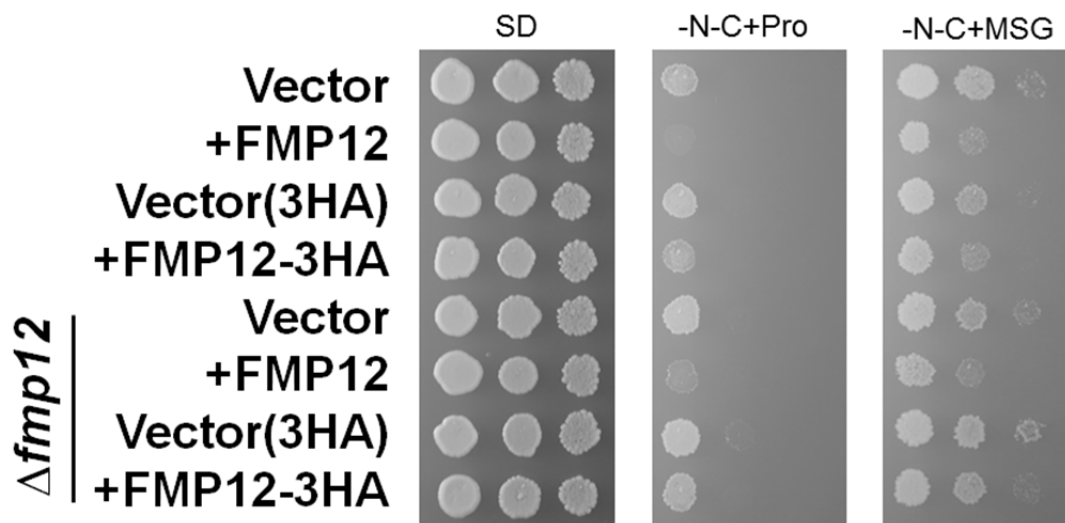
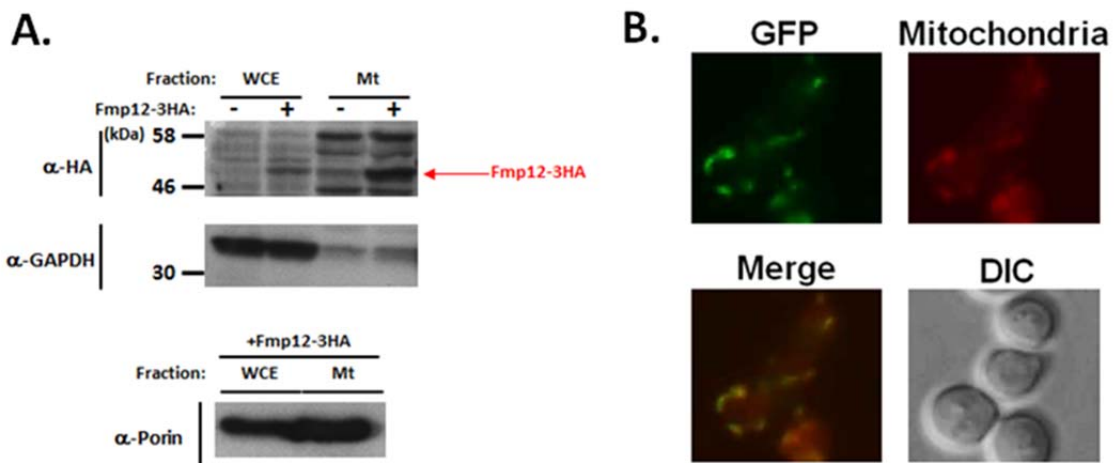


Fig. 24. *FMP12* の過剰発現が酵母の生育に及ぼす影響

各酵母菌株について培養液の希釈系列を作製し、SD 最少培地、あるいはプロリンやグルタミン酸ナトリウム (MSG) を炭素・窒素源とする寒天培地の上にスポットした。親株として、BY4741u 株を使用し、空ベクターには pVV208 あるいは pVV209 を用いた。

### 2.2.3 *Fmp12* の細胞内局在解析

*Fmp12* はミトコンドリアのプロテオーム中から見出されたタンパク質であるが (Chacinska et al., 2004; Reinders et al., 2006)、その細胞内局在性については未知である。HA タグを付加した *Fmp12*-3HA 融合タンパク質を過剰発現させた菌株を用いてミトコンドリア画分を調製し、ウエスタンブロッティングを行ったところ (Fig. 25A)、矢印で示すように全細胞破砕液とミトコンドリア画分において、*Fmp12*-3HA の過剰発現依存的なバンドを検出することができた。同じミトコンドリア画分のサンプルで、ミトコンドリアマーカーであるポーリンの発現についても確認した。このシグナルは、サイトゾルマーカーである GAPDH と比較してミトコンドリア画分において顕著に濃縮されたことから、*Fmp12*-3HA がミトコンドリアに局在する事が示唆された。ただし、*Fmp12* は本来のサイズである (58kDa) よりも低分子量で検出された。また、ミトコンドリア移行シグナルを予測する Mitoprot (<https://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html>) においても、N 末端の 46 アミノ酸残基が切断されるという解析結果を得た。これらのことから、この 46 アミノ酸のペプチド配列 (MTS) がミトコンドリア移行時に切断されている可能性が考えられた。さらに、*Fmp12* の C 末端に yeGFP タグを付加した融合タンパク質を発現する株を用いた蛍光顕微鏡観察により *Fmp12* の細胞内局在を解析した結果、GFP に由来する蛍光シグナルが、ミトコンドリアのマーカーである MitoTracker による染色像と合致した (Fig. 25B)。以上の結果から、*Fmp12* はミトコンドリアに局在することが明らかになった。

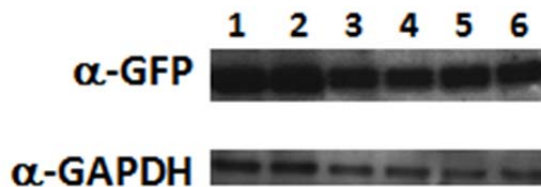


**Fig. 25. Fmp12 の細胞内局在性**

(A) ウェスタンブロッティングによる Fmp12-3HA の検出および全細胞 (WCE) とミトコンドリア (Mt) における局在性解析。図中の“-”は Fmp12-3HA を発現していない細胞、“+”は発現させている細胞を示す。Fmp12-3HA はプラスミド pVV209-FMP12 を用いて過剰発現させた。GAPDH は 33 kDa のサイトゾルのマーカータンパク質である。ポーリンは 30 kDa のミトコンドリア外膜のマーカータンパク質である。(B) 蛍光顕微鏡による Fmp12-yeGFP の検出および細胞内局在性解析。ミトコンドリアの可視化には MitoTracker を用いた。Merge は Fmp12-GFP の蛍光と MitoTracker による染色像の重ね合わせである。DIC は微分干渉観察を示す。

#### 2.2.4 様々な炭素源の際の Fmp12 の発現解析

これまでの解析結果から、ミトコンドリア局在タンパク質 Fmp12 がプロリンの炭素源としての利用を阻害することが示唆されたが、このような現象が、プロリンを単一炭素源とする特殊な環境においてのみ起こるものであるかどうかの手がかりを得るために、異なる栄養条件における Fmp12-yeGFP 融合タンパク質の発現レベルを解析した。その結果、解析した栄養条件ではいずれも、発現量に大きな影響を及ぼさなかった (Fig. 26)。このことから、Fmp12 は炭素源に関係なく恒常的に発現しており、通常の生育条件においてもプロリンの炭素源としての利用を抑制している可能性が考えられた。ただし、培養条件によって Fmp12 が異なる翻訳後修飾を受けている可能性もあり、今後詳細な解析が必要である。



**Fig. 26. 様々な炭素源で培養した酵母の Fmp12-yeGFP 発現解析**

BY4741 Fmp12-yeGFP 株 (ゲノム上のオウンプロモーターで Fmp12-yeGFP 発現する) を使用し、GFP 抗体を用いたウェスタン解析を行った。GAPDH はローディングコントロールである。タンパク質は TCA 沈殿で抽出し、以下の培養条件のサンプルを用いた。5  $\mu$ g protein をそれぞれのレーンで用いた。固体培地で 5 日間培養した細胞を用いた。培養条件と番号は次のように対応する。1.SD, 2.SD+Pro, 3.-N-C+Pro, 4.-C+Pro, 5.-N-C+MSG, 6.-C+MSG

### 2.2.5 *FMP12* 破壊株における細胞内アミノ酸含量の測定

Fig. 23 の結果から、*FMP12* 遺伝子の破壊により、プロリンの炭素源としての資化が促進されることが示唆された。また、プロリンのみが炭素源として含まれる特殊な条件では、過剰なプロリンがストレスとなる可能性が考えられた。これらのことから、野生株においてはプロリンの細胞内への過剰な流入により細胞毒性を發揮するが、*FMP12* 遺伝子を破壊することによってプロリンの分解が促進され、毒性を緩和していると予想した。そこで、*Fmp12* が細胞内のプロリン代謝に及ぼす影響を検証するため、プロリンを単一の窒素・炭素源とする寒天培地上で培養した酵母の細胞内アミノ酸含量をアミノ酸アナライザーで定量した。その結果、 $\Delta fmp12$  は、プロリンと、その分解によって生じるグルタミン酸の含量が野生株とほぼ同程度であったことから (Fig. 27)、*Fmp12* が細胞内のプロリン代謝やアミノ酸バランスに影響を及ぼすという仮説は否定された。

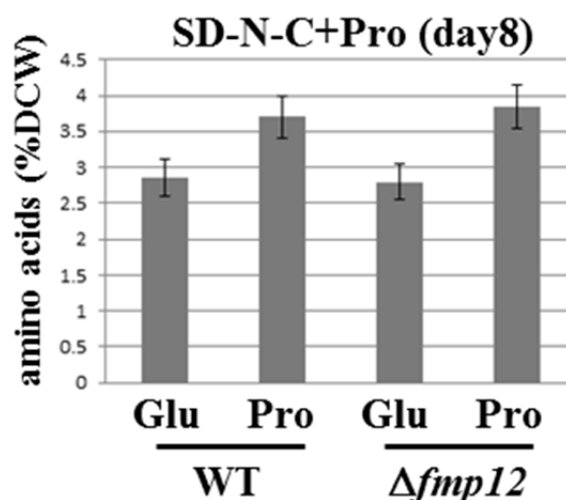
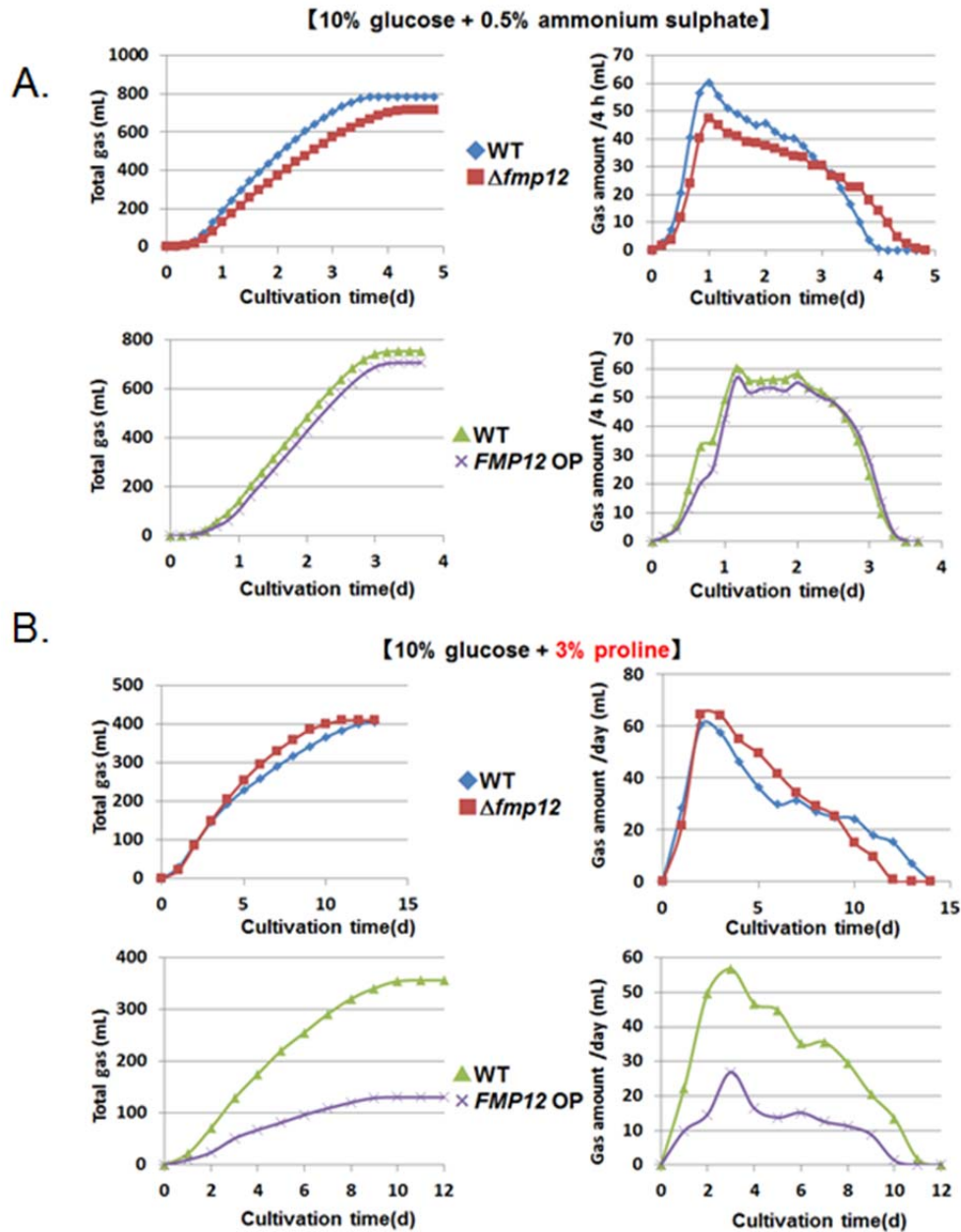


Fig. 27. プロリンを単一の窒素源・炭素源とする培地で培養した酵母のアミノ酸解析  
アミノ酸含量をアミノ酸アナライザーで定量し、乾燥細胞重量当たりのプロリン含量とグルタミン酸含量を定量した。

### 2.2.6 *FMP12* 破壊株と過剰発現株を用いた発酵試験

これまでの解析結果から、*FMP12* が炭素代謝に影響を及ぼす新規因子であることが示唆されるが、そのことをより明確に示すために、*S. cerevisiae* における最も主要な炭素代謝経路であるエタノール発酵に及ぼす影響を解析した。その結果、硫酸アンモニウムを単一窒素源とする培地 (SD、ただしグルコース濃度を 10% に高め、エタノール発酵が長期間持続するようにしている) では、*FMP12* 遺伝子の破壊および過剰発現が発酵速度に及ぼす影響は小さかった (Fig. 28A)。一方、興味深いことに、プロリンを単一窒素源とする培地 (SD-N+Pro) においては、 $\Delta fmp12$  株は野生型株よりもわずかながら有意な発酵速度の向上を示し、*FMP12* の過剰発現は発酵速度を著しく有意に低下させた (Fig. 28B)。したがって、*Fmp12* が、プロリンの存在下において特異的に酵母の炭素代謝に影響を及ぼす可能性が示唆された。





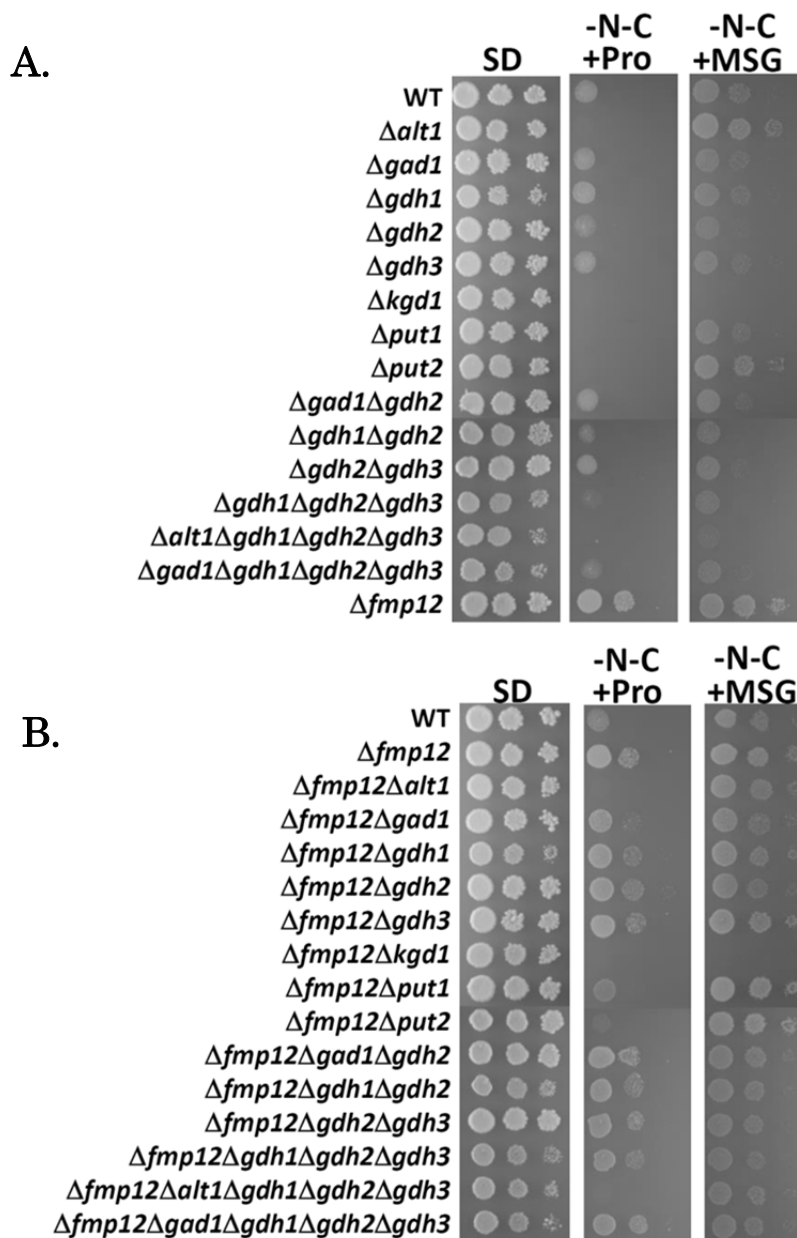
**Fig. 28. 酵母の発酵試験**

SD 最少培地 (10%グルコース+0.5%硫酸アンモニウム) (A)と SD 最少培地 (10%グルコース+3%プロリン) 培地(B)における酵母の発酵試験を行った。各菌株の発酵力を Fermograph (アトー社製) で測定するガス発生量によって評価した。前培養を SD 最少培地で 2 日行い、菌体を洗浄後、OD<sub>600</sub>=0.2 で本培養を開始した (30°C)。Fig. A, B のいずれにおいても、横に並んだグラフの左側は発酵試験開始から発生したガスの累積量であり、右側は単位時間 (培養日数) 当たりのガス発生量を示している。アンモニアを窒素源とした場合(A)の方がプロリン(B)の場合よりも発酵速度が速い事に注意。

◆野生株 (WT) : BY4741/pRS416CgHIS3MET15, pAD4、■FMP12 破壊株 ( $\Delta fmp12$ ) : BY4741  $\Delta fmp12$ /pRS416CgHIS3MET15, pAD4、▲野生株 (WT) : BY4741u/pVV208、  
 ×FMP12 過剰発現株 (FMP12 OP) : BY4741u/pVV208-FMP12

### 2.2.7 FMP12 とプロリン分解系下流遺伝子との多重破壊株の表現型解析

*S. cerevisiae* において、プロリンを炭素源として利用するための代謝経路を明らかにするために、野生株やプロリンを単一炭素源とする培地で顕著に生育する  $\Delta fmp12$  における、各種酵素の関与を遺伝学的に解析した (Fig. 29)。その結果、プロリンを単一の窒素源かつ炭素源とする最少培地 (SD-N-C+Pro) における FMP12 遺伝子破壊による生育の改善効果が、PUT1 や PUT2 遺伝子の破壊によりほとんど消失した。このことから、Put1 および Put2 からなるプロリン分解経路が、Fmp12 によって抑制される代謝経路に含まれることが示唆された (Fig. 29B)。次に、プロリン分解により生じるグルタミン酸が、ミトコンドリアに局在する AAT を介して  $\alpha$ -KG に変換され炭素源として利用される可能性 (Fig. 21 の①) を考え、Alanine transaminase 遺伝子 ALT1 を破壊したところ、予想通り、FMP12 遺伝子破壊による生育改善効果が消失した (Fig. 29B)。一方、GDH による  $\alpha$ -KG への変換を触媒する Gdh2、および主にその逆反応 ( $\alpha$ -KG からグルタミン酸への変換) を触媒すると考えられる Gdh1、Gdh3 の遺伝子を単独あるいは全て破壊した場合にも、 $\Delta fmp12$  の SD-N-C+Pro 培地での生育に影響を及ぼさなかった (Fig. 29B)。また、GABA からコハク酸へのバイパス経路の酵素である Gad1 も FMP12 単独破壊株の表現型に影響を及ぼさなかった (Fig. 29B)。さらに、GDH1~3 および GAD1 遺伝子の四重破壊でも同様であった。以上の結果から、プロリンを単一の窒素源かつ炭素源とする培地におけるプロリン分解により生じたグルタミン酸は、Alt1 を含むミトコンドリア局在型の AAT により特異的に  $\alpha$ -KG に変換され、炭素源として利用されるのではないかと考えられる。興味深いことに、Alt1 欠損による生育阻害は、グルタミン酸ナトリウムを炭素源かつ窒素源とする培地 (SD-N-C+MSG) では観察されなかったため、SD-N-C+MSG 培地の際は、Alt1 以外の他の AAT (Table 6) の活性が増大していることが推察された。さらに、KGD1 (KGDH 複合体の E1 コンポーネント遺伝子) の破壊により、SD-N-C+Pro 培地での生育に顕著な欠損を示した (Fig. 29B)。このことから、プロリン分解により生じる  $\alpha$ -KG が KGDH を介して succinyl-CoA に変換され TCA 回路に入る事で、炭素源として利用される可能性が考えられた。一方、FMP12 をゲノムに有する  $\Delta gdh1$  や  $\Delta gdh2$  では、プロリンを単一窒素源かつ炭素源とする培地での生育阻害が見られた (Fig. 29A)。このことから、FMP12 をゲノムに有する菌株では、Gdh1、Gdh2 の活性が、SD-N-C+Pro 培地における生育に必要であることが示唆された。



**Fig. 29.** プロリンを炭素源として利用する際の推定経路の遺伝子を破壊した際の表現型  
各酵母菌株について培養液の希釈系列を作製し、各種寒天培地の上にスポットした。(A) 野生株を親株に、様々な遺伝子を破壊した菌株を用いて評価した。(B)  $\Delta fmp12$  株を親株に、様々な遺伝子を破壊した菌株を用いて評価した。培地の組成は SD あるいは、プロリンやグルタミン酸ナトリウム (MSG) を単一の窒素源かつ炭素源とする培地である。※野生株と各変異株の親株は BY4741 (NBRP 由来) である。培地組成は Table 8 に示した。

以上より、*S. cerevisiae* では、プロリンを炭素源とする際、以下のようなミトコンドリアの酵素を用いた代謝経路を通ることが明らかとなった。



**Fig. 30.** *S. cerevisiae* においてプロリンを炭素源として利用するミトコンドリアの代謝経路

## 2.2.8 Fmp12の精製と酵素反応生成物のLC-MS/MSによる測定

これまでの結果から、*S. cerevisiae*においてプロリンを炭素源として利用するミトコンドリアの代謝経路 (Fig. 30) が初めて明らかになり、Fmp12がその阻害に関与していることが明らかになったが、どのような機能を有しているか解明を試みた。*FMP12*は*AIM17* (Altered Inheritance rate of Mitochondria 17) (Hess et al., 2009) としても報告されており、ミトコンドリア機能に関与していることが明らかとなっている。また、Fmp12はoxide reductaseドメインを有するが、一酸化窒素合成酵素の活性は持たないことも知られる (西村・博士論文、2012)。

*FMP12*の遺伝子産物のアミノ酸配列を調べた結果、clavaminic acid synthase (CAS) 様のスーパーファミリーに属する $\alpha$ -KG依存性dioxygenaseであると考えられ、その一次構造はカルニチン生合成系の酵素である $\gamma$ -butyrobetaine dioxygenaseやtrimethyllysine dioxygenaseとの相同性があり、*Pseudomonas*属の細菌 (Fmp12との相同性28%) や、多くの酵母、ショウジョウバエ (Fmp12との相同性26%)、ヒト (Fmp12との相同性25%) などに保存されている。さらに酵母*Candida albicans*のFmp12の相同タンパク質は、 $\gamma$ -butyrobetaine dioxygenaseのBbh1 (Fmp12との相同性32%) やtrimethyllysine dioxygenaseのBbh2 (Fmp12との相同性22%) として既に同定されている (Strijbis et al., 2009, Fig. 31)。Fmp12と相同性を持つタンパク質を有する生物の代表例はTable 11にまとめた。

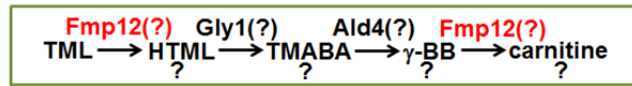
Table 11 *FMP12* オルソログを有する生物種及びオルソログ遺伝子産物とFmp12との相同性

Speices	Identity
<i>Saccharomyces eubayanus</i>	90
<i>Candida glabrata</i>	44
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	44
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	35
<i>Candida albicans</i>	32
<i>Scheffersomyces stipitis</i>	31
<i>Yarrowia lipolytica</i>	28
<i>Pseudomonas mendocina</i>	28
<i>Neurospora crassa</i>	25
<i>Drosophila melanogaster</i>	26
<i>Homo sapiens</i>	25
<i>Virgibacillus halodenitrificans</i>	22

*C. albicans*のBbh1はFmp12と同様にMTSを有することが明らかとなっている (Fig. 31)。*C. albicans*のBbh2とBbh1はいずれも $\alpha$ -KGをコハク酸に変換する反応と共役して、アミノ酸の誘導体であり脂質代謝に関与する事が知られているカルニチンの生合成経路の初めと終わりのdioxygenase反応をそれぞれ触媒するが、*S. cerevisiae*におけるカルニチン合成は現在までに報告されていない (Fig. 31)。

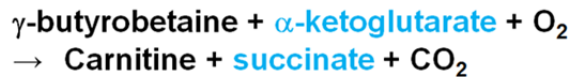
**Saccharomyces cerevisiae**

**Fmp12** MTS α-KG-dependent dioxygenase-like 465a.a.

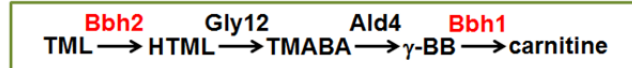


**Candida albicans**

**Bbh1** MTS γ-butyrobetaine dioxygenase 407a.a.



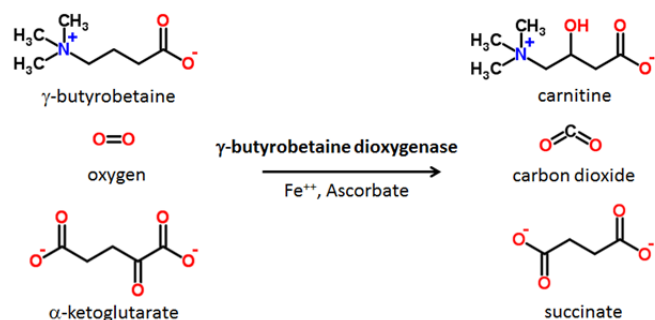
**Bbh2** 6-N-trimethyllysine dioxygenase 397a.a.



**Fig. 31.** Fmp12 と *C. albicans* の相同タンパク質の構造およびカルニチン合成経路

*S. cerevisiae* の Fmp12 の模式図（上段）と、Fmp12 に相同性を有する *C. albicans* の Bbh1, 2 の模式図とその触媒反応（下段）を示している（MTS：ミトコンドリア移行配列）。また、*C. albicans* で報告されているカルニチン合成経路と *S. cerevisiae* におけるその推定経路もそれぞれの枠内で示した。*C. albicans* では、Bbh2 が 6-N-trimethyllysine, Gly12 が 3-hydroxy-6-N-trimethyllysine aldolase, Ald4 が 4-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase, Bbh1 が γ-butyrobetaine dioxygenase である。*S. cerevisiae* ではカルニチン合成系が報告されていないが、相同性を示すタンパク質は保存されている。TML, 6-N-trimethyllysine; HTML, 3-hydroxy-6-N-trimethyllysine; TMABA, 4-trimethylaminobutyraldehyde; γ-BB, γ-butyrobetaine or 4-N-trimethylaminobutyrate

Fmp12 が *C. albicans* の Bbh1 と同様に γ-butyrobetaine dioxygenase 活性 (Fig. 32) を有しているかどうか検証するために、Fmp12 およびポジティブコントロールとして γ-butyrobetaine dioxygenase 活性が既に報告されている *Neurospora crassa* の NcBBH (Franken et al., 2015) を大腸菌で発現させ組換え酵素を精製した。その結果、Fmp12 と NcBBH のバンドが水溶性の画分で検出され、精製が確認された (Fig. 33)。なお、Fmp12 のミトコンドリア移行シグナルを削除した Fmp12-MTS は不溶性画分にもみ発現し、精製することはできなかった (データ示さず)。

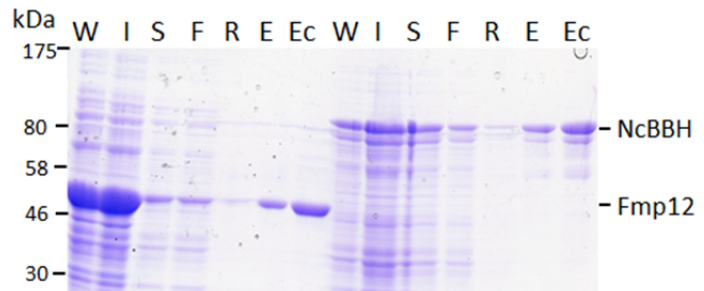


**Fig. 32.** γ-butyrobetaine dioxygenase の反応機構

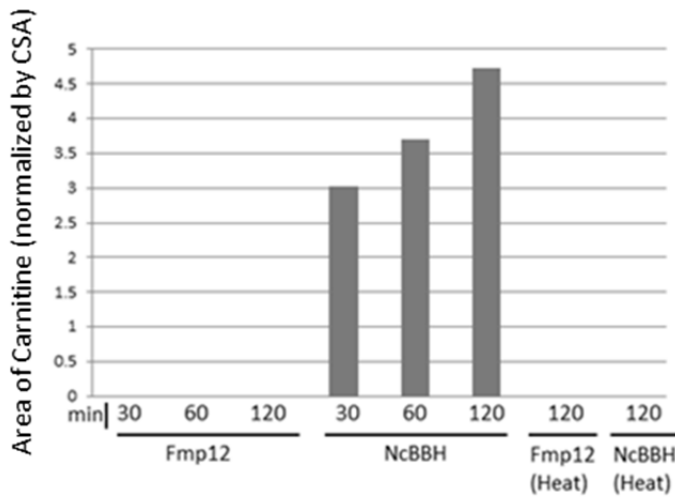
$\gamma\text{-butyrobetaine} + \alpha\text{-KG} + O_2 \rightarrow \text{carnitine} + \text{コハク酸} + CO_2$  といった3基質3反応生成物という酵素反応を触媒し、二価の鉄イオンとアスコルビン酸を要求する。

Fmp12 と NcBBH を用いた *in vitro* の酵素活性測定の結果、NcBBH を用いた場合のみ時間依存的に顕著なカルニチン合成活性が検出された (Fig. 34)。しかしながら、Fmp12 では同一の反応条件においてもカルニチンの生成は認められず、少なくとも NcBBH のような高い活性は有していないことが示された

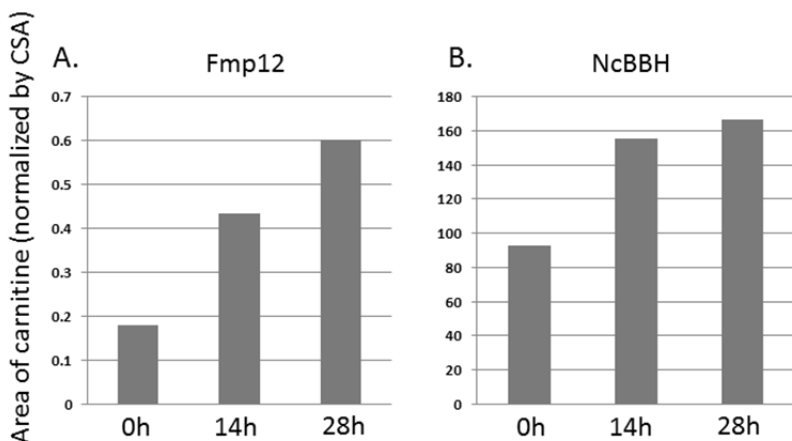
(Fig. 34)。一方、大腸菌から得た Fmp12 を発現させた無細胞抽出液を用いた反応液ではわずかにカルニチンのピーク見られたため (Fig. 35)、大腸菌の抽出液には Fmp12 の  $\gamma$ -butyrobetaine dioxygenase 活性に必要な補因子が含まれている可能性やカルニチンを非酵素的に生成する性質を持つ可能性が考えられた。



**Fig. 33. Fmp12 と NcBBH のタンパク質発現と精製**  
それぞれの画分におけるタンパク質の CBB 染色。レーンごとの画分についての情報は次に示す。  
W: Whole cell, I: Insoluble fraction S: Supernatant, F: Flow through, R: Rinse, E: Eluted protein, Ec: Eluted protein (concentrated)



**Fig. 34. 精製した NcBBH によるカルニチンの生成**  
横軸はそれぞれ反応時間を示す。縦軸は CSA でノーマライズしたカルニチンのピーク面積の相対値を示す。Heat は予め熱処理をした酵素で反応させたものである。



**Fig. 35. Fmp12、NcBBH を発現する大腸菌抽出液による Carnitine 生成**  
横軸はそれぞれ反応時間を示す。(A) は Fmp12、(B) は NcBBH を発現した大腸菌の無細胞抽出液を基質と反応させた。\*0 時間は、反応液を加えてからしばらくして熱で失活させるため、数分間の酵素反応は起こっている。また、(A) と (B) とでは縦軸が大きく異なる点に注意。

### 3. 考察

*S. cerevisiae* は、炭素源としてグルコースを好み、アミノ酸を炭素源として好んで利用しない。本研究では、*S. cerevisiae* には炭素源としてのアミノ酸の利用を抑制する未知の機構の解明を目的に、プロリンを炭素源として利用可能であるかについて、解析を行った。その結果、機能未知のミトコンドリアタンパク質をコードする *FMP12* 遺伝子の破壊が、プロリンの炭素源としての効率的な利用につながることを初めて見出した (Fig. 23)。

微生物の栄養要求性や資化性については古くから多くの研究が行われており、分子遺伝学が発展する以前は、微生物種の同定の為に用いられ、重要な表現型であると考えられてきた。真核生物のモデル生物としてまた、発酵食品やバイオ燃料製造に用いられる産業微生物である酵母 *S. cerevisiae* の栄養資化性の制御機構に関する研究は、やり尽くされていると考えられがちである (Ljungdahl and Daignan-Fornier, 2012)。しかしながら、本研究によりアミノ酸の一種であるプロリンを単一の炭素源として生育可能であることが明らかになったことは、学術上・産業上の両面において大きな意義を有すると考えられる。*S. cerevisiae* を最少培地で培養する際に、グリセロールや乳酸などプロリン以外の炭素源でも、単一炭素源として資化できないことが知られているが、本研究と同様の方法を用いることで、*S. cerevisiae* の新規な栄養資化性を開拓することにより、これまで生育不能であるとされていたような環境での生育も可能になると考えられ、*S. cerevisiae* を用いた物質生産にも応用できる可能性を秘めている。

プロリンは、細胞内に取り込まれた後、ミトコンドリアの Put1、Put2 によりグルタミン酸に分解され、窒素源としての利用が可能になるが、炭素源としての利用も同じ経路を用いていることが本研究により明らかになった (Fig. 29B, SD-N-C+Pro 培地の結果)。他の生物では、このグルタミン酸を GDH 活性により  $\alpha$ -KG に変換することが炭素源としての利用の鍵になるのに対し (Freese et al., 2011)、*S. cerevisiae* ではこの GDH は不要でありミトコンドリアの ALT (Alt1) を介したトランスアミナーゼ活性が必須であることがわかった点は新規性が高い。ALT を介したプロリンの分解は、トリパノソーマ (Spitznagel et al., 2009) やツェツェバエ (Bursell, 1963) などにおいてごくわずかな報告例があるのみで真菌類では初めての報告であり新規な発見である。グルタミン酸をミトコンドリア外に輸送して代謝することによって生じることが可能な  $\alpha$ -KG やコハク酸を再びミトコンドリア内に取り込んで TCA サイクルに使うことを行わず、ミトコンドリア内で完結させること (Fig. 30) が、*S. cerevisiae* の炭素源としてのプロリンの資化に必要であることが示唆された。*S. cerevisiae* では、他のプロリンを炭素源として資化する生物と比べてグルタミン酸や  $\alpha$ -KG やコハク酸のミトコンドリアトランスポーター (Agc1, Odc1, Odc2, Sfc1 など) の輸送活性がもと

もと低いか、これらの輸送を抑制する調節機構が存在している可能性も考えられる。このことは TCA サイクルの中間代謝産物をミトコンドリアとサイトゾルの間で無駄に行き来させることなく、ミトコンドリアに留めることにより、TCA サイクルを効率的に行うための機構である可能性も考えられた。同様の報告例として、近年、ミトコンドリアとサイトゾルの両方に存在するイソブタノール代謝系の酵素をミトコンドリアに集約することによってバイオ燃料の生産向上に貢献する知見を得たものもある (DeLoache and Dueber, 2013)。このように、オルガネラにおける代謝の区画化の全体像を明らかにするためには、ミトコンドリアにおけるアミノ酸や有機酸のトランスポーターが同定されることに加えて、それらの代謝に関わる酵素群の活性制御機構を明らかにしていく必要性が考えられる。

さらに本研究過程において得られた興味深い知見の一つとして、*Scheffersomyces stipitis* などのキシロース資化性酵母ではプロリンを単一炭素源とする固体培地と液体培地との両方において生育可能である (Freese et al., 2011) のに対し、*S. cerevisiae* の野生株や  $\Delta fmp12$  は固体培地のみでしか生育しないことが明らかとなった。このことから、*S. cerevisiae* におけるプロリンの利用には、固体培地と液体培地の違いに基づく未知の生命現象が関与する可能性が示唆される。*S. cerevisiae* と同じく真菌類である *Aspergillus* 属の麹菌では、固体培養と液体培養で遺伝子発現に大きな違いがあることが報告されており (Machida et al., 2008)、*S. cerevisiae* における固体培養と液体培養の差をもたらす機構の解析の進展が待たれる。

本研究では、ミトコンドリアの機能未知遺伝子に着目し、プロリンを単一の炭素源として利用する経路を抑制する新規因子である *Fmp12* を同定した。*FMP12* 遺伝子の破壊は、プロリンを単一炭素源とする寒天培地で野生株に比べて良好な生育を示した (Fig. 23) のに対し、*FMP12* 遺伝子を過剰発現すると、野生株に比べて生育阻害を示すことを見出した (Fig. 24)。*Fmp12* タンパク質は、栄養条件に関わらず恒常的に発現しているミトコンドリア局在タンパク質であることを明らかにしたが (Figs. 25, 26)、*FMP12* 過剰発現株における炭素代謝の抑制効果については細胞外のプロリンに依存していることを示唆するデータも得られた (Fig. 28)。このことから、*Fmp12* が、プロリンに応答した翻訳後調節機構によって活性調節を受ける可能性も示唆された。プロリンに応答した翻訳後調節機構として、例えばプロリン応答性の転写因子として知られる *Put3* のリン酸化や立体構造変化などが知られており、同様のシグナル伝達経路が *Fmp12* の活性調節機構にも関与している可能性が考えられた。

*Fmp12* との相同性検索の結果から、酵母 *Candida albicans* における  $\gamma$ -butyrobetaine dioxygenase の *Bbh1* や trimethyllysine dioxygenase の *Bbh2* (Strijbis



et al., 2009) などと同様に、Fmp12 が $\alpha$ -ケトグルタル酸依存性 dioxygenase である可能性が考えられ、その検証を試みたが、明確な酵素活性の検出には至らなかった。その一つの原因として、大腸菌で発現させた Fmp12 において本来切断されるべき N 末端の MTS 配列が切断されずに存在しているため、酵素活性に影響を与えた可能性が考えられた。今回、MTS を欠いた Fmp12 は可溶化できなかったため、発現条件の検討が必要である。また、Fmp12 が未知の補因子を要求したり、 $\gamma$ -butyrobetaine や trimethyllysine といった既知の基質以外の化合物を触媒している可能性もある。今後これらの点を改善し、条件検討を行い、Fmp12 の酵素としての機能を明らかにすることが急務であると考えている。また、既知の $\gamma$ -butyrobetaine dioxygenase との立体構造比較による Fmp12 の基質の推定やメタボローム解析などによる Fmp12 の触媒反応経路の特定も今後の課題である。

もし、Fmp12 が $\alpha$ -KG 依存性 dioxygenase であれば、ミトコンドリアにおける Fmp12 の酵素反応で $\alpha$ -ケトグルタル酸からコハク酸に至る TCA 回路のバイパス経路が活性化し、そのことが厳密な炭素源の選択に寄与しているのではないかと推測される (Fig. 36)。その詳細なメカニズムは不明であるが、このバイパス経路は TCA サイクルにおける succinyl-CoA の合成を飛ばしてしまうことから、succinyl-CoA を基質とするヘム等の生合成に欠損を生じる可能性も考えられる。 $\alpha$ -KG 依存性 dioxygenase ファミリーによる[推定基質+ $\alpha$ -KG+O<sub>2</sub>→推定基質の水酸化物+コハク酸+CO<sub>2</sub>]という水酸化反応やそれに類似した脱メチル化反応を行う酵素には様々なタイプが存在しており、様々な生命現象に関与することが知られている。*S. cerevisiae* には、少なくとも 7 種類が報告されている (Table 11) が、これらの過剰発現や活性化によって、FMP12 の過剰発現と同様にプロリンの炭素源としての利用が阻害されるのかについても詳細な検討することが望まれる。これらの遺伝子のオルソログのいくつかは哺乳類にも保存されており、ガン細胞でオンコメタボライトとして同定されているフマル酸、コハク酸、2-ヒドロキシグルタル酸が $\alpha$ -ケトグルタル酸依存性 dioxygenase を競合阻害することが報告されており、炭素源の代謝と $\alpha$ -KG 依存性 dioxygenase の関連性について研究が進んでいる (Xu et al., 2011)。プロリンを炭素源とする際に生育阻害を示す理由の一つの可能性として、Fmp12 が TCA 回路の succinyl-CoA の欠乏を招くことが推察される。*S. cerevisiae* では、利用しやすいグルコースを優先的に資化して勢力を拡大し、利用しにくい炭素源であるプロリンが環境中に炭素源として唯一存在する際に、生育をしないよう制御する一つの方法として Fmp12 を利用している可能性が考えられる。

Table 12 *S. cerevisiae* における $\alpha$ -ケトグルタル酸依存性 dioxygenase

Gene name	Gene product
<i>FMP12</i>	Putative $\alpha$ -KG dependent dioxygenase
<i>GIS1</i>	Histone demethylase and transcription factor; has JmjC and JmjN domain in N-terminus
<i>JHD1</i>	JmjC domain family histone demethylase specific for H3-K36
<i>JHD2</i>	JmjC domain family histone demethylase; promotes global demethylation of H3K4
<i>JLP1</i>	Fe(II)-dependent sulfonate/ $\alpha$ -KG dioxygenase; involved in sulfonate catabolism
<i>RPH1</i>	JmjC domain-containing histone demethylase; targets tri- and dimethylated H3K36
<i>TPA1</i>	Fe(II)/ $\alpha$ -KG dependent dioxygenase family member; catalyzes the repair of methyl-base lesions in both ss and dsDNA by oxidative demethylation

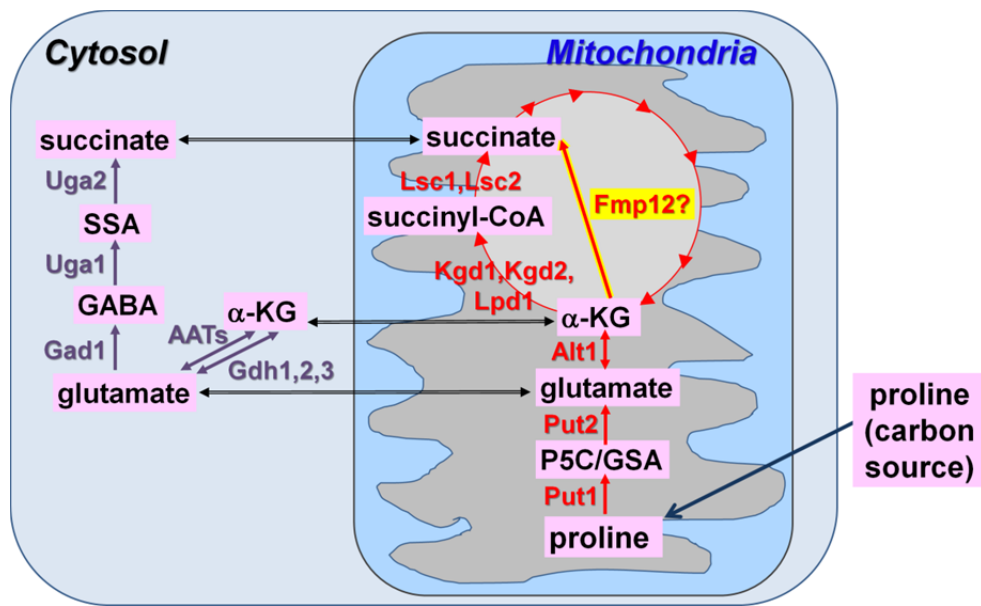


Fig. 36. プロリンを単一の窒素・炭素源とする際の Fmp12 による阻害

野生株では Fmp12 の経路 ( $\alpha$ -KG $\rightarrow$ succinate) がプロリンを単一の窒素源・炭素源とする培地において活性化され、succinyl-CoA などの生成を阻害することで TCA 回路を抑制していると考えられる。赤矢印の経路 (Put1, Put2, Alt1, Kgd1(KGDH)) は、本研究で遺伝学的に同定されたプロリンを炭素源として利用する際に通る経路である。

## 謝辞

本博士論文の作成にあたり、終始熱心にご指導ご鞭撻を賜りました当研究室の高木博史教授に厚く御礼申し上げます。長い間、至らぬ点多々ありすみませんでしたが、少しでも筆者が成長できるようにと研究面から生活面までいつも真剣に考えて頂いて、多くの貴重なアドバイスを誠に有難うございました。

困難な場面に遭遇した際にも親身になって相談に乗って頂き真摯にまた核心的なアドバイスを多く頂いた渡辺大輔助教、研究活動やプレゼンなど重要な局面において的確なアドバイスを多く頂いた大津徹生助教、生化学的視点から多くのアドバイスを頂き書類作成面でもお世話になった吉田信行元助教、本研究の開始時から研究に必要な考え方や実験手法を丁寧に教えて下さり多くのアドバイスを頂いた戒能智宏博士、いつも研究に対して丁寧に妥協を許さない真剣な姿勢をもってディスカッションして頂いた森ヶ崎進博士に感謝申し上げます。

副査としてお世話になった森浩禎教授、木俣行雄准教授、前アドバイザー委員の横田明穂特任教授に感謝申し上げます。

桂樹徹元准教授、石井寛子博士、浮辺健博士、河野祐介博士、笹野佑博士、平石裕之博士、三浦雅史博士、山田博美さん、井田慶子さん、大橋正孝氏、杉本幸子さん、橋田恵介氏、平井梢さん、吉野みほ子さんに様々な場面でお世話になり感謝申し上げます。研究室修了生の Natthawut Wiriyathanawudhiwong 博士、佐々木俊弥博士、田口純平氏、西村明博士、西村(田坂)侑美さん、Bach Thi Mai Hoa 博士、Indah Wijayanti 博士、大城聡博士、坂田梢さん、仲谷豪博士、那須野亮博士、早崎琢也氏、Astuti Rika Indri 博士、秦野智行博士、矢野嵩典博士に有益なアドバイスを頂き、また公私ともにお世話になり感謝申し上げます。

当研究室において筆者と同じグループあるいは関連グループの後輩であった、白川麻耶さん、井田貴之氏、Tsolmonbaatar Ariunzaya さん、立橋祐樹氏、筒井健史氏、岡部晃幸氏、Takpho Natthaporn さんには、自らの至らなさを気付かされ、何かとご迷惑おかけしましたが、感謝申し上げます。

お忙しいなか有益なアドバイスを頂きました、粟野直樹博士、大木出元助教、尾形智夫博士、小川拓哉元助教、北垣浩志博士、佐藤洋一博士、Su-Ju Lin 博士、関藤孝之博士、永森収志博士、Ferdinando Palmieri 博士、向由紀夫博士、森智行特任助教、山内隆好博士、日本電子株式会社 ME ソリューショングループに感謝申し上げます。実験材料の提供や貸し出しでは、Marjorie C Brandriss 博士、Janet M Wood 博士、菊池純一教授、木俣行雄准教授、中屋敷徹元助教、仁川純一博士、森浩禎教授、細胞間情報学研究室の皆様、NBRC、NBRP に感謝申し上げます。秋田知己博士をはじめ学部生時代からお世話になった皆様、阿部愛さん、浦岡行治教授、大谷ひふみさん、塚原麻伊さん、Jeeeranun Doangkum さん、労昕甜博士、本学 NASC 等の課外活動でお世話になった皆様に感謝申し上げます。

また、当研究室関係者の皆様、恩師、友人全てに感謝申し上げます。

本研究・研究生活を行うに当たり財政的な支援をして頂いた日本学術振興会の特別研究員奨励費(11J07980)及び研究奨励金、生物系特定産業技術研究支援センター・イノベーション創出基礎的研究推進事業、グローバル COE プログラム、卓越した大学院拠点形成支援補助金、公益財団法人 アサヒグループ学術振興財団に感謝申し上げます。

最後となりますが、8年間の本研究活動を辛抱強く応援してくれた父の西田律夫博士を初めとする家族全員と、<sup>敬</sup>西田久夫(淳學)氏、<sup>敬</sup>藤田求氏を初めとする親戚一同に感謝申し上げます。

平成 27 年 1 月 19 日

## 参考文献

- Andréasson, C., Neve, E. P., Ljungdahl, P. O. (2004) Four permeases import proline and the toxic proline analogue azetidine-2-carboxylate into yeast. *Yeast*, **21**, 193-199.
- Aquila, H., Misra, D., Eulitz, M., Klingenberg, M. (1982) Complete amino acid sequence of the ADP/ATP carrier from beef heart mitochondria. *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.*, **363**, 345-349.
- Atlante, A., Passarella, S., Pierro, P., Quagliariello, E. (1994) Proline transport in rat kidney mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.*, **309**, 139-148.
- Atlante, A., Passarella, S., Pierro, P., Di Martino, C., Quagliariello, E. (1996) The mechanism of proline/glutamate antiport in rat kidney mitochondria. Energy dependence and glutamate-carrier involvement. *Eur. J. Biochem.*, **241**, 171-177.
- Axelrod, J. D., Majors, J., Brandriss, M. C. (1991) A proline-independent binding of *PUT3* transcriptional activator protein detected by footprinting *in vivo*. *Mol. Cell. Biol.*, **11**, 564-567.
- Balboni, E., Hecht, R. I. (1977) Studies on the inner mitochondrial membrane localization of proline dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta*, **462**, 171-176.
- Barnett, J. A. (2008) A history of research on yeasts 13. Active transport and the uptake of various metabolites. *Yeast*, **25**, 689-731.
- Benz, R. (1985) Porin from bacterial and mitochondrial outer membranes. *CRC Crit. Rev. Biochem.*, **19**, 145-190.
- Brandriss, M. C., Magasanik, B. (1979) Genetics and physiology of proline utilization in *Saccharomyces cerevisiae*: enzyme induction by proline. *J. Bacteriol.*, **140**, 498-503.
- Brandriss, M. C., Krzywicki, K. A. (1986) Amino-terminal fragments of delta 1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase direct beta-galactosidase to the mitochondrial matrix in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **6**, 3502-3512.

Brandriss, M. C. (1987) Evidence for positive regulation of the proline utilization pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **117**, 429-435.

Berg, R. A., Schwartz, M. L., Rome, L. H., Crystal, R. G. (1984) Lysosomal function in the degradation of defective collagen in cultured lung fibroblasts. *Biochemistry*, **23**, 2134-2138.

Bricker, D. K., Taylor, E. B., Schell, J. C., Orsak, T., Boutron, A., Chen, Y. C., Cox, J. E., Cardon, C. M., Van Vranken, J. G., Dephoure, N., Redin, C., Boudina, S., Gygi, S. P., Brivet, M., Thummel, C. S., Rutter, J. (2012) A mitochondrial pyruvate carrier required for pyruvate uptake in yeast, *Drosophila*, and humans. *Science*, **337**, 96-100.

Bursell, E. (1963) Aspects of the metabolism of amino acids in the tsetse fly, *Glossina* (Diptera). *J. Insect. Physiol.*, **9**, 439-452.

Crabeel, M., Soetens, O., De Rijcke, M., Pratiwi, R., Pankiewicz, R. (1996) The *ARG11* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a mitochondrial integral membrane protein required for arginine biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, **271**, 25011-25018.

Causton, H. C., Ren, B., Koh, S. S., Harbison, C. T., Kanin, E., Jennings, E. G., Lee, T. I., True, H. L., Lander, E. S., Young, R. A. (2001) Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Mol. Biol. Cell.*, **12**, 323-337.

Cavero, S., Vozza, A., del Arco, A., Palmieri, L., Villa, A., Blanco, E., Runswick, M. J., Walker, J. E., Cerdán, S., Palmieri, F., Satrústegui, J. (2003) Identification and metabolic role of the mitochondrial aspartate-glutamate transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.*, **50**, 1257-1269.

Chacinska A, et al. (2004) (Personal Communication to SGD).

Chahomchuen, T., Sekito, T., Hondo, K., Nishimoto, S., Sugahara, T., Kakinuma, Y. (2008) Characterization of the Vacuolar Transporters for Amino Acid Recycling in Yeast Autophagy. *Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry—Biological Responses to Chemical Pollutants*, Eds., Murakami, Y, Nakayama, K., Kitamura, S. I., Iwata, H. Tanabe, S., 251-261.

Chahomchuen, T., Hondo, K., Ohsaki, M., Sekito, T., 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.

Chamond, N., Grégoire, C., Coatnoan, N., Rougeot, C., Freitas-Junior, L. H., da Silveira, J. F., Degrave, W. M., Minoprio, P. (2003) Biochemical characterization of proline racemases from the human protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* and definition of putative protein signatures. *J. Biol. Chem.*, **278**, 15484-15494.

Chardwiriyaapreecha, S., Manabe, K., Iwaki, T., Kawano-Kawada, M., Sekito, T., Lunprom, S., Akiyama, K., Takegawa, K., Kakinuma, Y. (2015) Functional expression and characterization of *Schizosaccharomyces pombe* Avt3p as a vacuolar amino acid exporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One*, **10**, e0130542. 1-15

Chen, C., Dickman, M. B. (2005) Proline suppresses apoptosis in the fungal pathogen *Colletotrichum trifolii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 3459-3464.

Chen, L. M., Maloy, S. (1991) Regulation of proline utilization in enteric bacteria: cloning and characterization of the *Klebsiella put* control region. *J. Bacteriol.*, **173**, 783-790.

Cohen, F. S., Akabas, M. H., Finkelstein, A. (1982) Osmotic swelling of phospholipid vesicles causes them to fuse with a planar phospholipid bilayer membrane. *Science*, **217**, 458-460.

Coleman, S. T., Fang, T. K., Rovinsky, S. A., Turano, F. J., Moye-Rowley, W. S. Expression of a glutamate decarboxylase homologue is required for normal oxidative stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **276**, 244-250.

Cooper, T. G. (2002) Transmitting the signal of excess nitrogen in *Saccharomyces cerevisiae* from the Tor proteins to the GATA factors: connecting the dots. *FEMS Microbiol. Rev.*, **26**, 223-238.

Costilow, R. N., Laycock, L. (1971) Ornithine cyclase (deaminating). Purification of a protein that converts ornithine to proline and definition of the optimal assay conditions. *J. Biol. Chem.*, **246**, 6655-6660.

Cox, K. H., Rai, R., Distler, M., Daugherty, J. R., Coffman, J. A., Cooper, T. G. (2000) *Saccharomyces cerevisiae* GATA sequences function as TATA elements during nitrogen catabolite repression and when Gln3p is excluded from the nucleus by overproduction of Ure2p. *J. Biol. Chem.*, **275**, 17611-17618.

Csonka, L. N. (1989) Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol. Rev.*, **53**, 121-147.

Culham, D. E., Lasby, B., Marangoni, A. G., Milner, J. L., Steer, B. A., van Nues, R. W., Wood, J. M. (1993) Isolation and sequencing of *Escherichia coli* gene *proP* reveals unusual structural features of the osmoregulatory proline/betaine transporter, ProP. *J. Mol. Biol.*, **229**, 268-276.

Cunningham, T. S., Andhare, R., Cooper, T. G. (2000) Nitrogen catabolite repression of *DAL80* expression depends on the relative levels of Gat1p and Ure2p production in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **275**, 14408-14414.

Delauney, A. J., Verma, D. P. S. (1993) Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant J.*, **4**, 215-223.

DeLoache, W. C., Dueber, J. E. (2013) Compartmentalizing metabolic pathways in organelles. *Nat. Biotechnol.*, **31**, 320-321.

Deschamps, J., Wiame, J. M. (1979) Mating-type effect on cis mutations leading to constitutivity of ornithine transaminase in diploid cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **92**, 749-758.

Divakaruni, A. S., Murphy, A. N. (2012) Cell biology. A mitochondrial mystery, solved. *Science*, **337**, 41-43.

Di Martino, C., Pizzuto, R., Pallotta, M. L., De Santis, A., Passarella, S. (2006) Mitochondrial transport in proline catabolism in plants: the existence of two separate translocators in mitochondria isolated from durum wheat seedlings. *Planta*, **223**, 1123-1133.

Elbaz-Alon, Y., Rosenfeld-Gur, E., Shinder, V., Futerman, A. H., Geiger, T., Schuldiner,

M. (2014) A dynamic interface between vacuoles and mitochondria in yeast. *Dev. Cell.*, **30**, 95-102.

Elthon, T. E., Stewart, C. R. (1981) Submitochondrial location and electron transport characteristics of enzymes involved in proline oxidation. *Plant Physiol.*, **67**, 780-784.

Feller, A., Georis, I., Tate, J. J., Cooper, T. G., Dubois, E. (2012) Alterations in the Ure2  $\alpha$ Cap domain elicit different GATA factor responses to rapamycin treatment and nitrogen limitation. *J. Biol. Chem.*, **288**, 1841-1855.

Fisher, E. (1901) Ueber die Hydrolyse des Caseins durch Salzsäure. *Zeitsch. Physiol. Chem.*, **33**, 151-176.

Franken, J., Burger, A., Swiegers, J. H., Bauer, F. F. (2015) Reconstruction of the carnitine biosynthesis pathway from *Neurospora crassa* in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **99**, 6377-6389

Freese, S., Vogts, T., Speer, F., Schäfer, B., Passoth, V., Klinner, U. (2011) C- and N-catabolic utilization of tricarboxylic acid cycle-related amino acids by *Scheffersomyces stipitis* and other yeasts. *Yeast*, **28**, 375-390.

Fricke, W., Pahlich, E. (1990) The effect of water stress on the vacuole-extravacuole compartmentation of proline in potato cell suspension cultures. *Physiol Plant*, **78**, 374-378.

Galli, A., Jayanthi, L. D., Ramsey, I. S., Miller, J. W., Fremeau, R. T. Jr., DeFelice, L. J. (1999) L-proline and L-pipecolate induce enkephalin-sensitive currents in human embryonic kidney 293 cells transfected with the high-affinity mammalian brain L-proline transporter. *J. Neurosci.*, **19**, 6290-6297.

Gelperin, D. M., White, M. A., Wilkinson, M. L., Kon, Y., Kung, L. A., Wise, K. J., Lopez-Hoyo, N., Jiang, L., Piccirillo, S., Yu, H., Gerstein, M., Dumont, M. E., Phizicky, E. M., Snyder, M., Grayhack, E. J. (2005) Biochemical and genetic analysis of the yeast proteome with a movable ORF collection. *Genes Dev.*, **19**, 2816-2826.

Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert,



F., Hoheisel, J. D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E. J., Mewes, H. W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., Oliver, S. G. (1996) Life with 6000 genes. *Science*, **274**, 563-567.

Hägglund, M. G., Sreedharan, S., Nilsson, V. C., Shaik, J. H., Almkvist, I. M., Bäcklin, S., Wrangé, O., Fredriksson, R. (2011) Identification of SLC38A7 (SNAT7) protein as a glutamine transporter expressed in neurons. *J. Biol. Chem.*, **286**, 20500-20511.

Hare, P. D., Cress, W. A., Van Staden, J. (1999) Proline synthesis and degradation: a model system for elucidating stress-related signal transduction. *J. Exp. Bot.*, **50**, 413-434.

Hartley, J. L., Temple, G. F., Brasch, M. A. (2000) DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Res.*, **10**, 1788-1795.

Hayat, S., Hayat, Q., Alyemini, M. N., Wani, A. S., Pichtel, J., Ahmad, A. (2012) Role of proline under changing environments: a review. *Plant. Signal. Behav.*, **7**, 1456-1466.

Herzig, S., Raemym E., Montessuitm S., Veutheym J. L., Zamboni, N., Westermann, B., Kunji, E. R., Martinou, J. C. (2012) Identification and functional expression of the mitochondrial pyruvate carrier. *Science*, **337**, 93-96.

Hess, D. C., Myers, C. L., Huttenhower, C., Hibbs, M. A., Hayes, A. P., Paw, J, Clore, J. J., Mendoza, R. M., Luis, B. S., Nislow, C., Giaever, G., Costanzo, M., Troyanskaya, O. G., Caudy, A. A. (2009) Computationally driven, quantitative experiments discover genes required for mitochondrial biogenesis. *PLoS Genet.*, **5**:e1000407, 1-16.

Heitman, J., Movva N. R., Hall, M. N. (1991) Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science*, **253**, 905-909.

Heublein, M., Burguillos, M. A., Vögtle, F. N., Teixeira, P. F., Imhof, A., Meisinger, C., Ott, M. (2014) The novel component Kgd4 recruits the E3 subunit to the mitochondrial  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase. *Mol. Biol. Cell.*, **25**, 3342-3349.

Hönscher, C., Mari, M., Auffarth, K., Bohnert, M., Griffith, J., Geerts, W., van der Laan, M., Cabrera, M., Reggiori, F., Ungermann, C. (2014) Cellular metabolism regulates

contact sites between vacuoles and mitochondria. *Dev. Cell.*, **30**, 86-94.

Hu, C. A., Delauney, A. J., Verma, D. P. (1992) A bifunctional enzyme (delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase) catalyzes the first two steps in proline biosynthesis in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 9354-9358.

Hughes, A. L., Gottschling, D. E. (2012) An early age increase in vacuolar pH limits mitochondrial function and lifespan in yeast. *Nature*, **492**, 261-265.

Ishimoto, M., Sugimoto, N., Sekito, T., Kawano-Kawada, M., Kakinuma, Y. (2012) ATP-dependent export of neutral amino acids by vacuolar membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **76**, 1802-1804.

Indiveri, C. (2010) Studying amino acid transport using liposomes. *Methods. Mol. Biol.*, **606**, 55-68.

Janke, C., Magiera, M. M., Rathfelder, N., Taxis, C., Reber, S., Maekawa, H., Moreno-Borchart, A., Doenges, G., Schwob, E., Schiebel, E., Knop, M. (2004) A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast*, **21**, 947-962.

Jauniaux J. C., Grenson, M. (1990) *GAPI*, the general amino acid permease gene of *Saccharomyces cerevisiae*. Nucleotide sequence, protein similarity with the other bakers yeast amino acid permeases, and nitrogen catabolite repression. *Eur. J. Biochem.*, **190**, 39-44.

Jauniaux, J. C., Vandenbol, M., Vissers, S., Broman, K., Grenson, M. (1987) Nitrogen catabolite regulation of proline permease in *Saccharomyces cerevisiae*. Cloning of the *PUT4* gene and study of *PUT4* RNA levels in wild-type and mutant strains. *Eur. J. Biochem.*, **164**, 601-606.

Kaino, T., Takagi, H. (2008) Gene expression profiles and intracellular contents of stress protectants in *Saccharomyces cerevisiae* under ethanol and sorbitol stresses. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **79**, 273-283.

Kaino, T., Tateiwa, T., Mizukami-Murata, S., Shima, J., Takagi, H. (2008) Self-cloning

baker's yeasts that accumulate proline enhance freeze tolerance in doughs. *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 5845-5849.

Kaino, T., Takagi, H. (2009) Proline as a stress protectant in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: effects of trehalose and *PRO1* gene expression on stress tolerance. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 2131-2135.

Kaino, T., Tasaka, Y., Tatehashi, Y., Takagi, H. (2012) Functional analysis of the C-terminal region of  $\gamma$ -glutamyl kinase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **76**, 454-461.

Kitagaki, H., Takagi, H. (2014) Mitochondrial metabolism and stress response of yeast: Applications in fermentation technologies. *J. Biosci. Bioeng.*, **117**, 383-393.

Kitagawa, M., Ara, T., Arifuzzaman, M., Ioka-Nakamichi, T., Inamoto, E., Toyonaga, H., Mori, H. (2005) Complete set of ORF clones of *Escherichia coli* ASKA library (a complete set of *E. coli* K-12 ORF archive): unique resources for biological research. *DNA Res.*, **12**, 291-299.

Kitamoto, K., Yoshizawa, K., Ohsumi, Y., Anraku, Y. (1988) Dynamic aspects of vacuolar and cytosolic amino acid pools of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, **170**, 2683-2686.

Klecker, T., Westermann, B. (2014) Mitochondria are clamped to vacuoles for lipid transport. *Dev. Cell.*, **30**, 1-2.

Krawchuk, M. D., Wahls, W. P. (1999) High-efficiency gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe* using a modular, PCR-based approach with long tracts of flanking homology. *Yeast*, **15**, 1419-1427.

Lasko, P. F., Brandriss, M. C. (1981) Proline transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, **148**, 241-247.

Lee, A. C., Xu, X., Blachly-Dyson, E., Forte, M., Colombini, M. (1998) The role of yeast VDAC genes on the permeability of the mitochondrial outer membrane. *J. Membr. Biol.*, **161**, 173-181.

- Li, S. C., Kane, P. M. (2009) The yeast lysosome-like vacuole: endpoint and crossroads. *Biochim. Biophys. Acta*, **1793**, 650-663.
- Li, W., Brandriss, M. C. (1992) Proline biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: molecular analysis of the *PRO1* gene, which encodes  $\gamma$ -glutamyl kinase. *J. Bacteriol.*, **174**, 4148-4156.
- Liang, X., Dickman, M. B., Becker, D. F. (2014) Proline biosynthesis is required for endoplasmic reticulum stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **289**, 27794-27806.
- List, B. (2002) Proline-catalyzed asymmetric reactions (Tetrahedron Report number 613) *Tetrahedron*, **58**, 5573-5590.
- Ljungdahl, P. O., Daignan-Fornier, B. (2012) Regulation of amino acid, nucleotide, and phosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **190**, 885-929.
- Longtine, M. S., McKenzie, A. 3rd., Demarini, D. J., Shah, N. G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P., Pringle, J. R. (1998) Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **14**, 953-961.
- MacPherson, S., Larochelle, M., Turcotte, B. (2006) A fungal family of transcriptional regulators: the zinc cluster proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **70**, 583-604.
- Machida, M., Yamada, O., Gomi, K. (2008) Genomics of *Aspergillus oryzae*: learning from the history of Koji mold and exploration of its future. *DNA Res.*, **15**, 173-183.
- Maloy, S. R., Roth, J. R. (1983) Regulation of proline utilization in *Salmonella typhimurium*: characterization of *put::Mu d(Ap, lac)* operon fusions. *J. Bacteriol.*, **154**, 561-568.
- Marobbio, C. M., Agrimi, G., Lasorsa, F. M., Palmieri, F. (2003) Identification and functional reconstitution of yeast mitochondrial carrier for S-adenosylmethionine. *EMBO J.*, **22**, 5975-5982.

Matsuura, K., Takagi, H. (2005) Vacuolar functions are involved in stress-protective effect of intracellular proline in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biosci. Bioeng.*, **100**, 538-544.

McInnes, J., Rehders, M., McFaline-Figueroa, J. R., Brix, K., Pon, L. A., Nevoigt, E. (2013) Defects in mitochondrial distribution during the prolonged lag phase of *Saccharomyces cerevisiae* preceding growth in glycerol as the sole source of carbon. *FEMS Yeast Res.*, **13**, 706-710.

Mentlein, R. (1988) Proline residues in the maturation and degradation of peptide hormones and neuropeptides. *FEBS Lett.*, **234**, 251-256.

Metzner, L., Neubert, K., Brandsch, M. (2006) Substrate specificity of the amino acid transporter PAT1. *Amino Acids*, **31**, 111-117.

Michaeli, S., Fait, A., Lagor, K., Nunes-Nesi, A., Grillich, N., Yellin, A., Bar, D., Khan, M., Fernie, A. R., Turano, F. J., Fromm, H. (2011) A mitochondrial GABA permease connects the GABA shunt and the TCA cycle, and is essential for normal carbon metabolism. *Plant J.*, **67**, 485-498.

Miller, G., Honig, A., Stein, H., Suzuki, N., Mittler, R., Zilberstein, A. (2009) Unraveling delta1-pyrroline-5-carboxylate-proline cycle in plants by uncoupled expression of proline oxidation enzymes. *J. Biol. Chem.*, **284**, 26482-26492.

Monné, M., Miniero, D. V., Daddabbo, L., Palmieri, L., Porcelli, V., Palmieri, F. (2015) Mitochondrial transporters for ornithine and related amino acids: a review. *Amino Acids*, **47**, 1763-1777.

Morita, Y., Nakamori, S., Takagi, H. (2002) Effect of proline and arginine metabolism on freezing stress of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biosci. Bioeng.*, **94**, 390-394.

Morita, Y., Nakamori, S., Takagi, H. (2003) L-Proline accumulation and freeze tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* are caused by a mutation in the *PRO1* gene encoding  $\gamma$ -glutamyl kinase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **69**, 212-219.

Mortimer, R. K., Schild, D. (1985) Genetic map of *Saccharomyces cerevisiae*, edition 9.

*Microbiol. Rev.*, **49**, 181-213.

Moses, S., Sinner, T., Zaprasis, A., Stöveken, N., Hoffmann, T., Belitsky, B. R., Sonenshein, A. L., Bremer, E. (2012) Proline utilization by *Bacillus subtilis*: uptake and catabolism. *J. Bacteriol.*, **194**, 745-758.

Müller, M., Lu, K., Reichert, A. S. (2015) Mitophagy and mitochondrial dynamics in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1853**, 2766-2774.

Natarajan, K., Meyer, M. R., Jackson, B. M., Slade, D., Roberts, C., Hinnebusch, A. G., Marton, M. J. (2001) Transcriptional profiling shows that Gcn4p is a master regulator of gene expression during amino acid starvation in yeast. *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 4347-4368.

Nishida, I., Kaino, T., Ohtsu, I., Takagi, H. (2010) Screening of novel intracellular proline transporters in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *3rd International Symposium on Proline Metabolism.*, P14

Nishimura, A., Kotani, T., Sasano, Y., Takagi, H. (2010) An antioxidative mechanism mediated by the yeast *N*-acetyltransferase Mpr1: Oxidative stress-induced arginine synthesis and its physiological role. *FEMS Yeast Res.*, **10**, 687-698 .

Njagi, E. N., Olembo, N. K., Pearson, D. J. (1992) Proline transport by tsetse fly *Glossina morsitans* flight muscle mitochondria. *Comp. Biochem. Physiol. Pt. B*, **102**, 579-584.

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.

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.

Omura, F., Fujita, A., Miyajima, K., Fukui, N. (2005) Engineering of yeast Put4 permease and its application to lager yeast for efficient proline assimilation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **69**, 1162-1171.

- Pallotta, M. L. (2014) L-proline uptake in *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria can contribute to bioenergetics during nutrient stress as alternative mitochondrial fuel. *World. J. Microbiol. Biotechnol.*, **30**, 19-31.
- Palmieri, F. (2008) Diseases caused by defects of mitochondrial carriers: a review. *Biochim. Biophys. Acta*, **1777**, 564-578.
- Palmieri, F., Pierri, C. L. (2010) Mitochondrial metabolite transport. *Essays Biochem.*, **47**, 37-52.
- Palmieri, F., Pierri, C. L., De Grassi, A., Nunes-Nesi, A., Fernie, A. R. (2011) Evolution, structure and function of mitochondrial carriers: a review with new insights. *Plant J.*, **66**, 161-181.
- Palmieri, L., De Marco, V., Iacobazzi, V., Palmieri, F., Runswick, M. J., Walker, J. E. (1997) Identification of the yeast *ARG-11* gene as a mitochondrial ornithine carrier involved in arginine biosynthesis. *FEBS Lett.*, **410**, 447-451.
- Palmieri, L., Lasorsa, F. M., Iacobazzi, V., Runswick, M. J., Palmieri, F., Walker, J. E. (1999) Identification of the mitochondrial carnitine carrier in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.*, **462**, 472-476.
- Palmieri, L., Rottensteiner, H., Girzalsky, W., Scarcia, P., Palmieri, F., Erdmann, R. (2001) Identification and functional reconstitution of the yeast peroxisomal adenine nucleotide transporter. *EMBO J.*, **20**, 5049-5059.
- Paulsen, I. T., Sliwinski, M. K., Nelissen, B., Goffeau, A., Saier, M. H. Jr. (1998) Unified inventory of established and putative transporters encoded within the complete genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.*, **430**, 116-125.
- Pérez-Arellano, I., Carmona-Alvarez, F., Martínez, A. I., Rodríguez-Díaz, J., Cervera, J. (2010) Pyrroline-5-carboxylate synthase and proline biosynthesis: from osmotolerance to rare metabolic disease. *Protein Sci.*, **19**, 372-382.
- Phang, J. M., Pandhare, J., Liu, Y. (2008) The metabolism of proline as microenvironmental stress substrate. *J. Nutr.*, **138**, 2008S-2015S.

Phang, J. M., Liu, W., Hancock, C. N., Fischer, J. W. (2015) Proline metabolism and cancer: emerging links to glutamine and collagen. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.*, **18**, 71-77.

Rajendrakumar, C. S., Suryanarayana, T., Reddy, A. R. (1997) DNA helix destabilization by proline and betaine: possible role in the salinity tolerance process. *FEBS Lett.*, **410**, 201-205.

Ramos, F., el Guezzar, M., Grenson, M., Wiame, J. M. (1985) Mutations affecting the enzymes involved in the utilization of 4-aminobutyric acid as nitrogen source by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.*, **149**, 401-404.

Regenberg, B., Düring-Olsen, L., Kielland-Brandt, M. C., Holmberg, S. (1999) Substrate specificity and gene expression of the amino-acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.*, **36**, 317-328.

Reinders, J., Zahedi, R. P., Pfanner, N., Meisinger, C., Sickmann, A. (2006) Toward the complete yeast mitochondrial proteome: multidimensional separation techniques for mitochondrial proteomics. *J. Proteome Res.*, **5**, 1543-1554.

Ren, Q., Kang, K. H., Paulsen, I. T. (2004) TransportDB: a relational database of cellular membrane transport systems. *Nucleic Acids Res.*, **32**, (Database issue):D284-288.

Romano A. H., Nickerson W. J. (1958) Utilization of amino acids as carbon sources by *Streptomyces fradiae*. *J. Bacteriol.*, **75**, 161-166.

Rose, M. D., Broach, J. R. (1991) Cloning genes by complementation in yeast. *Methods Enzymol.*, **194**, 195-230.

Rothman, J. H., Howald, I., Stevens, T. H. (1989) Characterization of genes required for protein sorting and vacuolar function in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.*, **8**, 2057-2065.

Rudolph, A. S., Crowe, J. H. (1985) Membrane stabilization during freezing: the role of two natural cryoprotectants, trehalose and proline. *Cryobiol.*, **22**, 367-377.



Russnak, R., Konczal, D., McIntire, S. L. (2001) A family of yeast proteins mediating bidirectional vacuolar amino acid transport. *J. Biol. Chem.*, **276**, 23849-23857.

Sagné, C., Agulhon, C., Ravassard, P., Darmon, M., Hamon, M., El Mestikawy, S., Gasnier, B., Giros, B. (2001) Identification and characterization of a lysosomal transporter for small neutral amino acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 7206-7211.

Sambrook, J., Russel, D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* Volume 1, 2, 3 (New York : Cold Spring Harbor Laboratory).

Sato, T., Ohsumi, Y., Anraku, Y. (1984) Substrate specificities of active transport systems for amino acids in vacuolar-membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*. Evidence of seven independent proton/amino acid antiport systems. *J. Biol. Chem.*, **259**, 11505-11508.

Sasano, Y., Haitani, Y., Hashida, K., Ohtsu, I., Shima, J., Takagi, H. (2012) Simultaneous accumulation of proline and trehalose in industrial baker's yeast enhances fermentation ability in frozen dough. *J. Biosci. Bioeng.*, **113**, 592-595.

Sasano, Y., Haitani, Y., Ohtsu, I., Shima, J., Takagi, H. (2012) Proline accumulation in baker's yeast enhances high-sucrose stress tolerance and fermentation ability in sweet dough. *Int. J. Food Microbiol.*, **152**, 40-43.

Schiöth, H. B., Roshanbin, S., Hägglund, M. G., Fredriksson, R. (2013) Evolutionary origin of amino acid transporter families SLC32, SLC36 and SLC38 and physiological, pathological and therapeutic aspects. *Mol. Aspects Med.*, **34**, 571-585.

Schmid, A., Krömer, S., Heldt, H. W., Benz, R. (1992) Identification of two general diffusion channels in the outer membrane of pea mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*, **1112**, 174-180.

Sesaki, H., Jensen, R. E. (2001) *UGO1* encodes an outer membrane protein required for mitochondrial fusion. *J. Cell Biol.*, **152**, 1123-1134.

Sekine, T., Kawaguchi, A., Hamano, Y., Takagi, H. (2007) Desensitization of feedback inhibition of the *Saccharomyces cerevisiae*  $\gamma$ -glutamyl kinase enhances proline

accumulation and freezing tolerance. *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 4011-4019.

Sekito, T., Chardwiryapreecha, S., Sugimoto, N., Ishimoto, M., Kawano-Kawada, M., Kakinuma, Y. (2014a) Vacuolar transporter Avt4 is involved in excretion of basic amino acids from the vacuoles of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **78**, 969-975.

Sekito, T., Fujiki, Y., Ohsumi, Y., Kakinuma, Y. (2008) Novel families of vacuolar amino acid transporters. *IUBMB Life*, **60**, 519-525.

Sekito, T., Nakamura, K., Manabe, K., Tone, J., Sato, Y., Murao, N., Kawano-Kawada, M., Kakinuma, Y. (2014b) Loss of ATP-dependent lysine uptake in the vacuolar membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae* *ypq1Δ* mutant. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **78**, 1199-1202.

Sharma, S., Shinde, S., Verslues, P. E. (2013) Functional characterization of an ornithine cyclodeaminase-like protein of *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol.*, **13**:182. 1-15.

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.

Shiga, T., Yoshida, N., Shimizu, Y., Suzuki, E., Sasaki, T., Watanabe, D., Takagi, H. Quality control of plasma membrane proteins by *Saccharomyces cerevisiae* Nedd4-like ubiquitin ligase Rsp5p under environmental stress conditions. *Eukaryot. Cell*, **13**, 1191-1199.

Sickmann, A., Reinders, J., Wagner, Y., Joppich, C., Zahedi, R., Meyer, H. E., Schönfisch, B., Perschil, I., Chacinska, A., Guiard, B., Rehling, P., Pfanner, N., Meisinger, C. (2003) The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 13207-13212.

Siddiqui, A. H., Brandriss, M. C. (1989) The *Saccharomyces cerevisiae* *PUT3* activator protein associates with proline-specific upstream activation sequences. *Mol. Cell. Biol.*, **9**, 4706-4712.

Soetens, O., Crabeel, M., El Moulaj, B., Duyckaerts, C., Sluse, F. (1998) Transport of arginine and ornithine into isolated mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.*, **258**, 702-709.

Spitzner, A., Perzlmaier, A. F., Geillinger, K. E., Reihl, P., Stolz, J. (2008) The proline-dependent transcription factor Put3 regulates the expression of the riboflavin transporter *MCH5* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **180**, 2007-2017.

Spitznagel, D., Ebikeme, C., Biran, M., Nic a' Bháird, N., Bringaud, F., Henehan, G. T., Nolan, D. P. (2009) Alanine aminotransferase of *Trypanosoma brucei* - a key role in proline metabolism in procyclic life forms. *FEBS J.*, **276**, 7187-7199.

Springael, J. Y., André, B. (1998) Nitrogen-regulated ubiquitination of the Gap1 permease of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell*, **9**, 1253-1263.

Strijbis, K., van Roermund, C. W., Hardy, G. P., van den Burg, J., Bloem, K., de Haan, J., van Vlies, N., Wanders, R. J., Vaz, F. M., Distel, B. (2009) Identification and characterization of a complete carnitine biosynthesis pathway in *Candida albicans*. *FASEB J.*, **23**, 2349-2359.

Takagi, H., Takaoka, M., Kawaguchi, A., Kubo, Y. (2005) Effect of L-proline on sake brewing and ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **71**, 8656-8662.

Takagi, H., Sakai, K., Morida, K., Nakamori, S. (2000) Proline accumulation by mutation or disruption of the proline oxidase gene improves resistance to freezing and desiccation stresses in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **184**, 103-108.

Takagi, H. (2008) Proline as a stress protectant in yeast: physiological functions, metabolic regulations and biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotech.*, **81**, 211-223.

Tan, B. S., Lonic, A., Morris, M. B., Rathjen, P. D., Rathjen, J. (2011) The amino acid transporter SNAT2 mediates L-proline-induced differentiation of ES cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **300**, C1270-1279.

Terao, Y., Nakamori, S., Takagi, H. (2003) Gene dosage effect of L-proline biosynthetic enzymes on L-proline accumulation and freeze tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **69**, 6527-6532.

Tsolmonbaatar, A., Nishida, I., Takagi, H. (2012) Functional Analysis of Avt7 in Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The 5th Indonesia Biotechnology Conference An International Forum* (proceedings), 820-827.

Todd, R. B., Andrianopoulos, A. (1997) Evolution of a fungal regulatory gene family: the Zn(II)<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub> binuclear cluster DNA binding motif. *Fungal Genet. Biol.*, **21**, 388-405.

Tomenchok, D. M., Brandriss, M. C. (1987) Gene-enzyme relationships in the proline biosynthetic pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, **169**, 5364-5372.

Tone, J., Yamanaka, A., Manabe, K., Murao, N., Kawano-Kawada, M., Sekito, T., Kakinuma, Y. (2014) A vacuolar membrane protein Avt7p is involved in transport of amino acid and spore formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **79**, 190-195.

Tone, J., Yoshimura, A., Manabe, K., Murao, N., Sekito, T., Kawano-Kawada, M., Kakinuma, Y. (2015) Characterization of Avt1p as a vacuolar proton/amino acid antiporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **79**, 782-789.

Uemura, T., Tomonari, Y., Kashiwagi, K., Igarashi, K. (2004) Uptake of GABA and putrescine by *UGA4* on the vacuolar membrane in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **315**, 1082-1087.

Van Belle, D, André, B. (2001) A genomic view of yeast membrane transporters. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **13**, 389-398.

Van Mullem, V., Wery, M., De Bolle, X., Vandenhaute, J. (2003) Construction of a set of *Saccharomyces cerevisiae* vectors designed for recombinational cloning. *Yeast*, **20**, 739-746.

Vaz, F. M., van Gool, S., Ofman, R., Ijlst, L., Wanders, R. J. (1998) Carnitine biosynthesis: identification of the cDNA encoding human gamma-butyrobetaine

hydroxylase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **250**, 506-510.

Verbruggen, N., Hermans, C. (2008) Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids*, **35**, 753-759.

Wanduragala, S., Sanyal, N., Liang, X., Becker, D. F. (2010) Purification and characterization of Put1p from *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **498**, 136-142.

Wang, S. S., Brandriss, M. C. (1986) Proline utilization in *Saccharomyces cerevisiae*: analysis of the cloned *PUT1* gene. *Mol. Cell. Biol.*, **6**, 2638-2645.

Wang, X., Bai, X., Chen, D. F., Chen, F. Z., Li, B. Z., Yuan, Y. J. (2015) Increasing proline and myo-inositol improves tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* to the mixture of multiple lignocellulose-derived inhibitors. *Biotechnol. Biofuels*, **8:142**, 1-13.

Wiemken, A., Durr, M. (1974) Characterization of amino acid pools in the vacuolar compartment of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.*, **101**, 45-57.

Wiles, A. M., Cai, H., Naider, F., Becker, J. M. (2006) Nutrient regulation of oligopeptide transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, **152**, 3133-3145.

Willstätter, R. (1900) Synthese der Hygrinsäure. Berlin, *Ber. Deutschen. Chem. Ges.*, **33**, 1160-1166.

Wipf, D., Ludewig, U., Tegeder, M., Rentsch, D., Koch, W., Frommer, W. B. (2002) Conservation of amino acid transporters in fungi, plants and animals. *Trends Biochem. Sci.*, **27**, 139-147.

Yang, Z., Huang, J., Geng, J., Nair, U., Klionsky, D. J. (2006) Atg22 recycles amino acids to link the degradative and recycling functions of autophagy. *Mol. Biol. Cell*, **17**, 5094-5104.

Young, G. B., Jack, D. L., Smith, D. W., Saier, M. H. Jr. (1999) The amino acid/auxin:proton symport permease family. *Biochim. Biophys. Acta*, **1415**, 306-322.

Yu, C., Claybrook, D. L., Huang, A. H. (1983) Transport of glycine, serine, and proline into spinach leaf mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.*, **227**, 180-187.

Zhang, Z., Zander, C. B., Grewer, C. (2011) The C-terminal domain of the neutral amino acid transporter SNAT2 regulates transport activity through voltage-dependent processes. *Biochem. J.*, **434**, 287-296.

安楽泰宏 (2005) 酵母液胞膜 ATPase の構造と機能. 帝京科学大学紀要 **1**, 1-12.

遠藤斗志也、中井正人 (1991) 蛋白質の膜透過 ミトコンドリア膜透過実験法. 蛋白質 核酸 酵素 **36**, 1951-1956

大隅良典 (1982) III.酵母の輸送系とその制御. 化学と生物 **20**, 799-806

大沢利昭、大木道則、田中元治、千原秀昭 編 (1989) 化学大辞典. 東京化学同人

白川麻耶 (2011) 酵母におけるプロリン代謝を介した細胞保護機能. (本学修士論文)

佐々木俊弥 (2013) 酵母の Nedd4 様ユビキチンリガーゼ Rsp5 のリン酸化によるアミノ酸パーミアーゼの活性制御機構の解析. (本学博士論文)

田口純平 (2009) 酵母におけるプロリンの抗酸化機能：アポトーシス様細胞死との関連性. (本学修士論文)

田坂侑美 (2009) 酵母におけるプロリン合成の鍵酵素 $\gamma$ -グルタミルキナーゼのドメイン構造と酵素機能の解析. (本学修士論文)

寺田弘、吉村哲郎 (編著) (1992) ライフサイエンスにおけるリポソーム 実験マニュアル. シュプリンガー・フェアラーク東京

西田郁久 (2010) 出芽酵母のオルガネラに存在する新規プロリントランスポーターの探索. (本学修士論文)

西村明 (2012) 酵母におけるアルギニン：一酸化窒素の合成を介した新規抗酸

化機構. (本学博士論文)

立橋祐樹 (2016) 酵母における  $\gamma$ -グルタミルキナーゼの機能解析. (本学博士論文)

筒井健史 (2013) 酵母の酸化ストレス下におけるプロリンオキシダーゼ Put1 とリボソームタンパク質 Grc5 の機能解析. (本学修士論文)

丸山進 (1997) 生体機能調節にかかわるプロリンに富む領域とプロリン特異的ペプチダーゼ. 蛋白質核酸酵素 **42**, 857-864

水野貴之 (2003) バイオ実験イラストレイテッド 7 使おう酵母できる Two Hybrid. 学研メディカル秀潤社

山本正幸、大矢禎一 (共編) (1998) 酵母ラボマニュアル—酵母分子細胞生物学実験法. (Springer lab manual) シュプリンガー・フェアラー東京出版