

原核・真核細胞におけるポリアミン輸送蛋白質に関する研究

2001年

富取 秀行

原核・真核細胞におけるポリアミン輸送蛋白質に関する研究

2001年

富取 秀行

目次

序論	1
第一章 大腸菌ポリアミン輸送蛋白質の基質認識	4
第一節 プトレスシン特異的結合蛋白質 PotF の結晶構造解析 および基質認識部位の同定	5
【材料および実験方法】	5
【結果】	7
【考察】	8
第二節 大腸菌ポリアミン輸送系における基質特異性の相違	10
【材料および実験方法】	10
【結果】	11
【考察】	12
第二章 酵母ポリアミン輸送蛋白質遺伝子の同定および機能解析	14
第一節 ポリアミン輸送蛋白質遺伝子の同定	15
【材料および実験方法】	15
【結果】	21
【考察】	26
第二節 TPO1 の基質認識	28
【材料および実験方法】	28
【結果】	28
【考察】	30
第三節 TPO1 の輸送活性調節	31
【材料および実験方法】	31
【結果】	31
【考察】	33
参考文献	35
要旨	39
論文目録	42
謝辞	43

序 論

ポリアミンとは、原核生物から真核生物に至るほとんど全ての生物体内に普遍的に存在する生体アミンの総称であり、現在までに 20 種類以上のポリアミンが見いだされている。生体内に見いだされる代表的なポリアミンは、プトレスシン $[\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2]$ 、スペルミジン $[\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2]$ 、スペルミン $[\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2]$ の 3 種類であり、大腸菌などの原核生物ではプトレスシンとスペルミジンが、酵母、高等植物、哺乳動物などの真核生物ではスペルミジンとスペルミンが多く存在している(1)。

ポリアミンの生理的役割は多岐にわたり、その主なものとして核酸、特に RNA と強く相互作用することにより、蛋白質及び核酸の合成を促進し、細胞増殖因子として機能することが知られている(2)。ポリアミンが細胞増殖を促進するという報告は、1948 年、Herbst、Snell によって発表されたが、その中で彼らはある種の乳酸菌の生育にプトレスシンとスペルミジンが必須であることを示した。その後、1971 年に Russell らが、癌患者の尿中にポリアミンが増加することを報告したことで、ポリアミンと細胞増殖の関連が注目され始めた(3)。更に、大腸菌(4)、酵母(5)、チャイニーズハムスター卵巣細胞(6)においてポリアミン生合成欠損株が分離され、培地中にポリアミンを添加することによりこれらの株の細胞増殖が強く促進を受けたことから、ポリアミンの細胞増殖因子としての地位が確立した。また、細胞内のポリアミン量が減少するだけでなく、過剰になることでも細胞増殖阻害が起こることが明らかとなり、ポリアミンの細胞内濃度調節機構の解明が重要となってきた。

細胞内のポリアミン濃度は生合成、分解、外界からの取り込み、及び排出によって厳密に調節されている(7)。ポリアミンの生合成はオルニチンを出発物質とし、生合成の律速酵素であるオルニチン脱炭酸酵素 (Ornithine decarboxylase; ODC) によりプトレスシンが合成される。プトレスシンはスペルミジン合成酵素によりスペルミジンへ、スペルミジンはスペルミン合成酵素によりスペルミンへ変換される。スペルミジン、スペルミン合成に必要なアミノプロピル基は、S-アデノシルメチオニンが S-アデノシルメチオニン脱炭酸酵素 (S-Adenosylmethionine decarboxylase) により脱炭酸された decarboxylated adenosylmethionine によって供給される。一方、ポリアミンの分解はスペルミン、スペルミジンがアセチル基転移酵素の働きにより、 N^1 -アセチル化体となり、さらにこれらはポリアミンオキシダーゼの働きにより、スペルミジン、プトレスシンへと変換されることにより行われる。

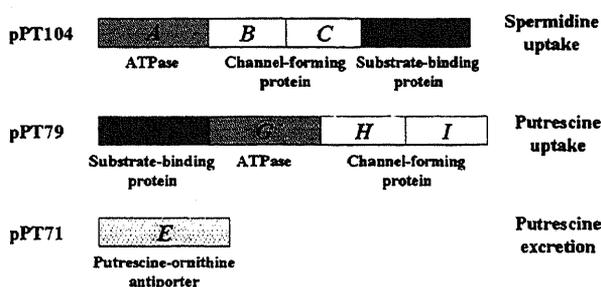


Fig. I. Genes for polyamine transport proteins in *Escherichia coli*. pPT104, that encodes PotABCD, is the spermidine-preferential uptake system. pPT79, that encodes PotFGHI, is the putrescine-specific uptake system. pPT71, that encodes PotE, is the putrescine-ornithine antiporter.

ポリアミンの取り込み、及び排出に関しては、大腸菌において非常によく研究されている。当研究室において大腸菌のポリアミン生合成欠損株にニトロソグアニジン処理を繰り返し行った結果、スペルミジン輸送欠損株、及びプトレスシン・スペルミジン両輸送欠損株を分離し、さらにこれらの変異株を用いて Fig. 1 に示す 3 種のポリアミン輸送系遺伝子 (pPT104, pPT79, pPT71) のクローニングに成功した(8)。pPT104 は *potABCD* より成るオペロン(9)を、また pPT79 は *potFGHI* より成るオペロン(10)を形成しており、それぞれスペルミジン優先取り込み系、プトレスシン特異的取り込み系をコードする。これら 2 種類の輸送系は ATP の加水分解によりエネルギーを得ている ABC (ATP binding cassette) transporter superfamily に属する。ABC transporter はバクテリアからヒトまで様々な生物に広く存在しており、その数は 30 種類以上といわれている。この family に属する他の輸送系として主なものはマルトース輸送系、ヒスチジン輸送系、腫瘍細胞に高発現が認められる多剤耐性輸送系、及び嚢胞性繊維症の原因遺伝子である cystic fibrosis transmembrane regulator などが挙げられる。大腸菌に代表されるグラム陰性菌の ABC transporter はペリプラズムに各々の基質を特異的に認識する結合蛋白質を持つ。ポリアミン輸送系もまた、PotD および PotF がそれに相当する。ペリプラズムに存在する基質結合蛋白質のいくつかは、X 線結晶構造解析によりその高次構造が明らかとなっており、これらはアミノ酸配列の相同性が 20% 以下にも関わらず、主鎖構造は互いに類似していることが報告されている。スペルミジン・プトレスシン結合蛋白質である PotD も 1996 年にその高次構造が明らかとなり、また変異蛋白質を用いた解析も行われたことでその基質認識機構が分子レベル・原子レベルで明らかとなった(11-13)。一方、pPT71 にコードされるポリアミン輸送蛋白質 PotE はプトレスシン排出活性を持ち、なおかつプトレスシン取り込み活性も有するユニークな輸送蛋白質である(14)。これまでに PotE によるプトレスシン取り込み活性は膜電位依存的であること、また排出活性はプトレスシン・オルニチンアンチポーター活性によるものであることが明らかとなっている。このように塩基性アミノ酸とその脱炭酸化物とのアンチポーターは PotE 以外にはリジン・カダベリン、およびヒスチジン・ヒスタミンを基質とするものが同定されている。これらの基質認識機構、および基質特異性についても不明な点が多く、分子レベルでの機能解析は行われていなかった。

PotF と PotD はアミノ酸配列上、34%の相同性を持ち、その基質認識部位も類似していると推測された。しかし、なぜ PotF がプトレスシンのみを特異的に認識するのかは大きな疑問であった。本研究では最初に、プトレスシン特異的取り込み系の基質結合蛋白質である PotF について結晶構造解析による高次構造の解明、および変異蛋白質を用いた活性測定による基質認識部位の同定を行い、PotD, PotF 両蛋白質における基質認識機構の差異について検討を行った。また、大腸菌における 3 種類のポリアミン輸送系は全てプトレスシンを基質として認識するが、基質に対する親和性が異なる (pPT104, 71, 79: $K_m=1.5, 1.8, 0.5 \mu M$) ことを踏まえ、各輸送系における基質特異性の相違についても検討を行った。

一方、真核細胞におけるポリアミン輸送に関する研究は上述した大腸菌のそれと比較すると遅々としたものがあり、その最大の原因はやはり輸送蛋白質本体が同定されていないことにあると考えられる。勿論、培養細胞を用いたポリアミン輸送系の解析は着々に行われており、L1210 白血病細胞ではポリアミン類が同一の輸送系で輸送されること(15)、またマウス神経芽細胞および FM3A 細胞においてポリアミン輸送がエネルギー依存的であること(16)、ODC 調節蛋白質であるアンチザイム(17)がポリアミン取り込みを抑制し、排出を促進すること(18)等、輸送活性調節に関する報告が近年続々と得られてきている。また真核細胞のモデルとして遺伝子工学的にも

有用である酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いた系でも研究は進んでおり、当研究室ではこれまでに培地中のマグネシウム濃度を通常の 2 mM から 50 μ M に低下させるとポリアミンによる細胞増殖阻害が見られることを見出し(19)、この性質を利用して単離した変異株 YTM22-8 は低マグネシウム培地においてもポリアミンによる細胞増殖阻害が起こらず、またこの変異株におけるポリアミン取り込み活性は減少していることを明らかにした。また、液胞のポリアミン取り込みはプロトン濃度勾配依存的であること(20)を明らかにし、少なくとも *S. cerevisiae* におけるポリアミン輸送は細胞膜および液胞膜に存在する輸送系によって調節を受けていることが示唆された。さらに上記の変異株を用いてスクリーニングした結果、2種類のセリン・スレオニンリン酸化酵素の同定に成功し(21,22)、これらがポリアミン輸送を調節しているものと考えられた。1996年に全ゲノム配列が決定された *S. cerevisiae* (23)では急速に研究が進み、その後ポリアミン輸送に関与する数種類のセリン・スレオニンリン酸化酵素が他研究室にて同定された(24,25)。しかし、肝心のポリアミン輸送蛋白質本体はどの研究室でも同定されなかった。そこで本研究では第二に真核細胞におけるポリアミン輸送蛋白質遺伝子を、今までとは異なったアプローチで同定することを試みた。

第一章

大腸菌ポリアミン輸送蛋白質の基質認識

第一章 大腸菌ポリアミン輸送蛋白質の基質認識

第一節 プトレスシン特異的結合蛋白質 PotF の結晶構造解析および基質認識部位の同定

スペルミジン・プトレスシン結合蛋白質 PotD は X 線結晶構造解析および変異蛋白質を用いた活性測定により、その基質認識部位の詳細が明らかとなった。N ドメインおよび C ドメインという 2 つのドメイン構造を持つこの蛋白質の高次構造は、これまでに解析された他の基質結合蛋白質のものと同様であり、2 つのドメインに囲まれた中央部には基質結合ドメインであるクレフトが存在する。このクレフトに基質であるスペルミジンが結合された形で解析は行われた。

PotD の基質認識にはスペルミジンのアミノ基を認識する酸性アミノ酸残基と、プロピルおよびブチル骨格を認識する芳香族アミノ酸残基が重要であることが明らかとなった。また、プトレスシンの認識部位はスペルミジンのアミノブチル基認識部位と重複することが解析の結果より明らかとなり、このことは PotD におけるスペルミジンとプトレスシンに対する親和性の違い(スペルミジン, $K_d = 3.0 \mu\text{M}$; プトレスシン, $K_d = 100 \mu\text{M}$) を説明できる結果であった。

上述したように、PotD と PotF のアミノ酸配列上の相同性は 34% と、他の基質結合蛋白質と比較すると高く、その基質認識部位および主鎖構造も酷似していると思われる。そこで、PotD および PotF のアミノ酸配列を基に、PotF のプトレスシン認識部位の同定を試みた。また、PotF の結晶化、および X 線結晶構造解析は生物工学研究所の森川博士、Vassyryev 博士(現理化学研究所播磨研究所研究員)により行われた。

【材料および実験方法】

1. 菌株および培養条件

大腸菌野生株 TG1, JM105、およびポリアミン合成・輸送欠損株 KK313*potF::Km* は L-broth、2YT medium もしくは MMO 培地で培養した。pPT79.3(*potGHI* をコード)を導入した株は 30 $\mu\text{g/ml}$ クロラムフェニコールを添加した培地にて培養した。pMW*potF*、および pUC*potF* を導入した株は 100 $\mu\text{g/ml}$ アンピシリンを添加した培地にて培養した。培地の組成を以下に示す。

・ L-broth (栄養培地)

Component	Composition (per liter)
Bacto tryptone	10 g
Yeast extract	5 g
NaCl	5 g

・ 2YT medium (栄養培地)

Component	Composition (per liter)
Bacto tryptone	16 g
Yeast extract	10 g
NaCl	5 g

・MMO medium (合成培地)

Component	Composition (per liter)
K ₂ HPO ₄	7 g
KH ₂ PO ₄	3 g
Na ₃ -Citrate 2H ₂ O	0.5 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.1 g
Thiamine	2 mg
Leucine	100 mg
Threonine	100 mg
Methionine	100 mg
Serine	100 mg
Glycine	100 mg
Ornithine	100 mg
Biotine	10 mg

使用時に最終濃度 0.4% グルコースを添加する。

2. potF への変異導入およびプラスミド DNA 調整

部位特異的変異導入は Sayers らの方法(26)により、Sculptor™ *in vitro* mutagenesis system (Amersham)、もしくは Braman らの方法(27)により、QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (STRATAGENE)を用いて行った。導入した変異は DNA sequence により確認した。これらのプラスミド DNA はアルカリ-SDS 法により調整した。

3. 形質転換

形質転換には一般的に塩化カルシウム法を用いた(28)。また、より効率の高い形質転換が必要とされる場合は電気穿孔法 (25μF, 200Ω, 1.5kV) にて、0.1 cm 幅のキュベットを用いて行った。

4. 変異 PotF 蛋白質におけるプトレスシン結合活性の測定

pUCpotF または pUC mutated potF を導入した JM105 よりペリプラズム分画を得た。ペリプラズム分画の分画方法は Oliver and Beckwith の方法に従った(29)。PotF 蛋白質が約 50%となるようにペリプラズム分画を調整し、反応液 (10 mM Tris-HCl (pH7.5), 30 mM KCl) に PotF 蛋白質として 10 μg となるよう、ペリプラズム分画を加える。氷冷後、最終濃度が 4 μM となるように [¹⁴C] プトレスシン (2.24 GBq/mmol) を添加し、反応を開始する。反応は 30℃の恒温槽で 5 分間インキュベーションすることで行い、反応終了後、反応液をニトロセルロースフィルター (cellulose nitrate, 0.45 mm; Advantec Toyo) 上にトラップし、蛋白質を回収した。PotF 蛋白質に結合したプトレスシンの放射活性は液体シンチレーションカウンターにより測定した。活性測定に用いた蛋白質量は Lowry らの方法(30)で定量した。

5. 生細胞におけるプトレスシン取り込み活性測定

pPT79.3 および pMW*potF* (または pMW *mutated potF*) を導入した KK313*potF::Km* を L-broth で一晩前々培養する。前々培養した菌を MMO 培地に移し、一晩前培養する。翌日、新しい同培地に菌を移し、540 nm での吸光度が 0.3 になるまで培養し、集菌する。集菌後、Buffer I (62 mM potassium phosphate (pH 7.0), 1.7 mM sodium citrate, 7.6 mM (NH₄)₂SO₄, 0.41 mM MgSO₄) で菌を洗い、200 μl の同 Buffer で懸濁した。30°C、5 分間プレインキュベーション後、最終濃度が 10 μM となるように [¹⁴C]プトレスシン (370MBq/mmol) を加えた。一定時間後、反応液を membrane filter (cellulose acetate, 0.45 μm; Advantec Toyo) でろ過することにより菌を回収した。菌内に取り込まれたプトレスシンの放射活性は液体シンチレーションカウンターにより測定した。活性測定に用いた菌体の蛋白量は Lowry らの方法(30)で定量した。

【結果】

1. X 線結晶構造解析による PotF の立体構造

PotF の 3 次元立体構造は解像度 2.3Å の高分解能で決定された (Fig. 1-1)。PotF は 370 アミノ酸からなるが、そのアミノ末端は 26 アミノ酸からなるシグナル配列であり、翻訳後、ペリプラズムに輸送される際に切断される。またアミノ末端の 2 アミノ酸残基、およびカルボキシ末端の 1 アミノ酸残基が結晶として解析できず、従って PotF は 29-369 番目までのアミノ酸からなる結晶構造として示された。この蛋白質は全体的に楕円形の構造をとっており、構造的に類似した 2 つのドメインから形成される。この 2 つのドメイン間には基質結合ドメインであるクレフトが存在する。このクレフトには 4 個の水分子および基質であるプトレスシンの存在が確認された。

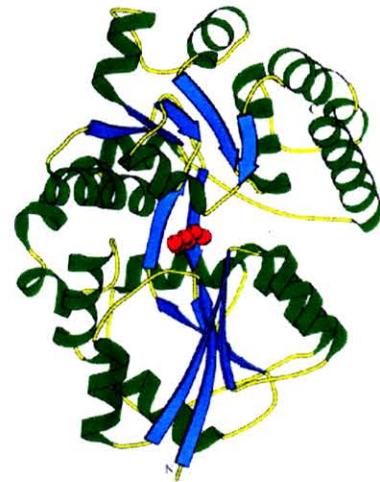


Fig. 1-1. Overall view of PotF in complex with putrescine. The PotF molecule is shown as a ribbon diagram. The β -strands, α -helices, and loop regions are blue, green, and yellow, respectively. The putrescine atoms are shown as red spheres. The figure was produced with the MOLSCRIPT program.

2. PotF のプトレスシン認識に関与するアミノ酸残基の同定

PotD・PotF 両アミノ酸配列の alignment より推定された PotF のプトレスシン認識に関与すると思われるアミノ酸残基を部位特異的変異導入法により変異させた PotF W37L, S38A, D39N, Y40A, S85A, S87A, E185Q, S226A, W244L, F276L, D278N, Y314A, および K349Q を作製し、それらのプトレスシン結合活性、およびそれらを発現させた株におけるプトレスシン取り込み活性を測定した (Fig. 1-2)。その結果、両活性とも W37L, S85A, E185Q, W244L, および D278N 変異体で著しい活性の低下が見られた。また結晶解析の結果より、プトレスシン認識に関与すると推測されたアミノ酸残基 D247 をアラニンに置換した変異体 D247A を作製し、同様に活性測定を行ったところ、結合、輸送両活性がほぼ完全に消失した。これら変異 PotF を用いた活性測定結果は X 線

結晶構造解析の結果と完全に一致するものであった。以上の結果より、PotF のプトレスシン認識には PotD と同様、3つの酸性アミノ酸残基、および3つの芳香族アミノ酸残基が必要であることが明らかとなった。

【考察】

今回の X 線結晶構造解析の結果より、PotD と PotF は推測された通り、非常に良く似た主鎖構造をとる蛋白質であることが明らかとなった (Fig. 1-3)。また2つのドメインからなる構造およびそれぞれのドメインにおけるトポロジーは、ペリプラズムに存在する他の基質結合蛋白質と類似している。PotD, PotF 両蛋白質の N ドメインはそれらの C ドメインより構造的に相同性が高く、このことは他の基質結合蛋白質にも共通して言えることである。両蛋白質間での構造的に大きな相違は、PotF だけに見られるジスルフィド結合であり、C ドメインの 175, 239 番目のシステイン残基間で形成されている。このことからこれらの残基が架橋を形成することにより、C ドメインの構造が安定に保たれていることが示唆される。PotD-スペルミジン複合体と PotF-プトレスシン複合体の立体構造を重ね合わせると、PotF 上のプトレスシンの結合部位は PotD に結合するスペルミジンのアミノブチル部分に相当することが分かる。これは両蛋白質のアミノ酸配

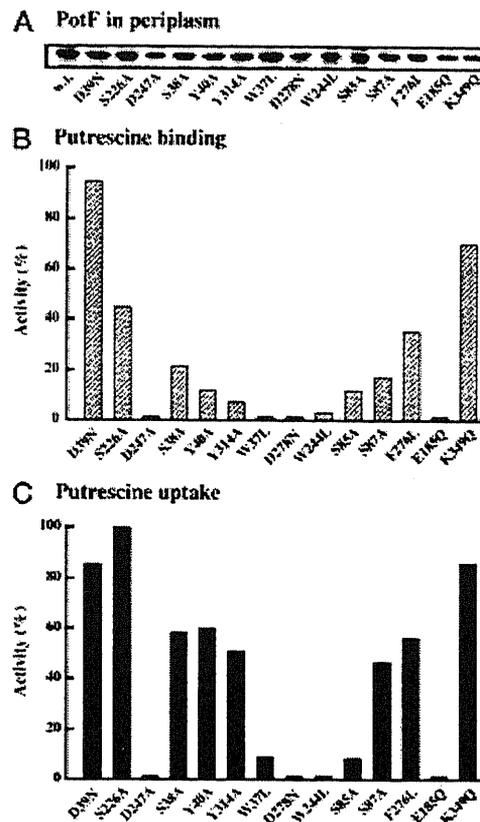


Fig. 1-2. Putrescine binding and uptake activities of mutated PotF proteins. A, PotF protein in periplasm. Periplasmic protein (10 μ g) was electrophoresed on 12% polyacrylamide gel (31) and stained with Coomassie Brilliant Blue R250. B, putrescine binding. The control activity with the normal PotF protein was 3.59 nmol/mg of protein. C, putrescine uptake activity. The control activity was 0.66 nmol/min/mg of protein. Each value is the average of duplicate determinations.

列の相同性より推測されたことと一致する。PotD のスペルミジン認識に関与する 13 アミノ酸残基のうち、7 アミノ酸残基は PotF 上で完全に保存されており、7 残基は全て PotF のプトレスシン認識に関与していた。S85 および E185 はプトレスシンと直接相互作用していないにも関わらず、これらのアミノ酸残基の変異体では著しい活性の低下が見られた。この 2 残基は水分子を介してプトレスシンのアミノ基と相互作用する。この水分子の存在は基質結合ドメインであるクレフトの構造保持に重要であり、S85 および E185 は水素結合によりこの水分子を安定化させている。また E185 は W244 と水素結合を形成しており、W244 を適切な位置に保ち役割を担っているものと思われる。

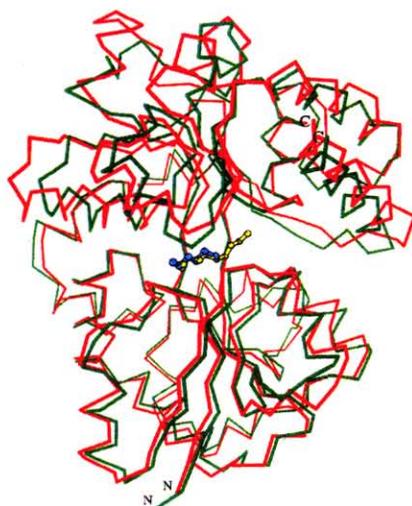


Fig. 1-3. Comparison of PotF and PotD. The PotD molecule (green) is superimposed on the PotF molecule (red). Putrescine bound to PotF and spermidine bound to PotD are shown as cyan and yellow ball and stick models, respectively. The figure was drawn with the MOLSCRIPT program.

上述したように、PotD におけるスペルミジンおよびプトレスシンに対する親和性は大きく異なるが、それはアミノプロピル基部分に対する相互作用の有無で説明がつく。プトレスシンはスペルミジンに比べ、アミノプロピル基の分だけ短く、アミノ基が 1 つ少ない。このアミノプロピル基の存在により、スペルミジンは PotD に対して高い親和性を持つものと考えられる。ところが PotF ではプトレスシンに対する親和性が $K_d = 2.0 \mu\text{M}$ と、PotD のプトレスシンに対する親和性に比べ 50 倍も高い。これは X 線結晶構造解析の結果、PotF 上の酸性アミノ酸残基 D247 およびその近隣に位置する 3 個の水分子と、プトレスシンのアミノ基との間に形成される強固な水素結合によるものであることが判明した。この水素結合により、プトレスシンのアミノ基はしっかりと固定された状態となるため、PotF のプトレスシンに対する親和性が高いのではないかとと思われる。

第二節 大腸菌ポリアミン輸送系における基質特異性の相違

大腸菌に存在する3種のポリアミン輸送系はいずれも基質としてプトレスシンを認識する。その中で、PotABCD (pPT104) はプトレスシンだけでなく、スペルミジンも認識し、取り込むことが出来るが、PotE (pPT71) および PotFGHI (pPT79) はプトレスシンのみを取り込む。また X 線結晶構造解析の結果から、PotF は PotD よりも大きなクレフトを持つことが分かり、PotF にはスペルミジンを認識し得るだけの空間が存在することが明らかとなった。これらの輸送系におけるプトレスシンに対する親和性は Table 1 に示すように異なることから、これらの輸送系におけるプトレスシン認識機構の相違を検討した。

Table 1 The K_m and V_{max} values of polyamine transport systems in *E.coli*.

Plasmid	Substrate	K_m (μM)	V_{max} (nmol/min/mg protein)
pPT104	Putrescine	1.5	19.8
	Spermidine	0.1	14.9
	Spermine	1.2	9.4
pPT79	Putrescine	0.5	22.1
pPT71	Putrescine	1.8	3.4

【材料および実験方法】

1. ポリアミン誘導体

ポリアミン誘導体 1,3-Diaminopropane, N-(3-aminopropyl)-n-propylamine, N-(3-aminopropyl)-n-butylamine, N-(3-aminopropyl)-n-pentylamine, N-ethylputrescine, *trans*-1,4-Diamino-2-butene, *cis*-1,4-Diamino-2-butene, *trans*-1,4-Cyclohexanediamine, *cis*-1,4-Cyclohexanediamine, 4-Aminomethyl-piperidine は城西大学薬学部の白幡昌教授より合成、分与して頂いた。

2. プトレスシン輸送活性に対する阻害剤の効果

pPT71 を導入した KK313 *potF::Km*、および pPT79 を導入した KK313 を L-broth で一晚培養後、MMO medium でさらに一晚培養する。さらに同培地で $A_{540} = 0.3$ になるまで 37°C で培養した後、遠心により集菌する。Buffer I で 1 回洗浄し、2 ml の同 buffer にて懸濁後、最終濃度が、50 μM もしくは 200 μM となるようにポリアミン誘導体を添加し、30°C で 5 分間インキュベーションする。その後、最終濃度が 10 μM となるように [^{14}C]プトレスシン (370 MBq/mmol) を添加し、一定時間ごとに反応液 0.5 ml を分取し、membrane filter (cellulose acetate, 0.45 μm ; Advantec Toyo) でろ過することにより菌を回収した。菌内に取り込まれたプトレスシンの放射活性は液体シンチレーションカウンターにより測定した。活性測定に用いた菌体の蛋白量は Lowry らの方法(30)で定量した。

【結果】

プトレスシン誘導体によるプトレスシン輸送阻害効果

KK313*potF::Km*/pPT71 および KK313/pPT79 におけるプトレスシンとの親和性がそれぞれ 1.8 μ M および 0.5 μ M であることから、各誘導体の濃度を KK313*potF::Km*/pPT71 に対しては 50 μ M、また KK313/pPT79 に対しては 200 μ M とした。誘導体非存在下における各輸送系のプトレスシン輸送活性を 100% とし、誘導体存在下における各輸送系のプトレスシン輸送活性を割合で示した (Fig. 1-4)。

両輸送系で最も阻害効果を示している誘導体は 6 番の *trans*-1,4-Diamino-2-butene であり、プトレスシン輸送活性が 40% にまで低下しているのが見られた。また、両輸送系で、顕著に違いが見られた誘導体は 1 番の 1,3-Diaminopropane、および 5 番の *N*-ethylputrescine であり、これら 2 種類の誘導体は共に pPT79 (*potFGHI*) に対しては阻害効果を示すが、pPT71 (*potE*) にはほとんど阻害効果を示さないことが明らかとなった。他の誘導体を添加した場合は両輸送系とも著しい阻害が見られなかったことから、pPT79 および pPT71 のプトレスシン輸送において基質認識がより厳密であるのは、pPT71 にコードされる PotE であることがこの実験より示唆された。

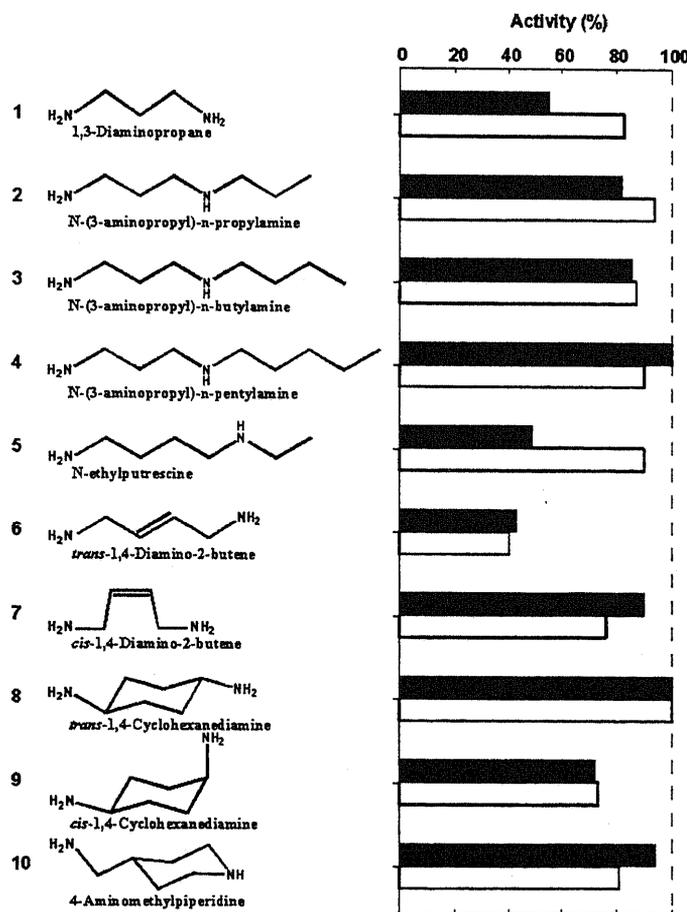


Fig. 1-4. Effect of putrescine analogues on putrescine uptake activities by PotE and PotF, G, H, and I. pPT71 encodes PotE and pPT79 encodes PotF, G, H, and I. The putrescine analogues added to the reaction mixture of PotE and PotF, G, H, and I were 50 and 200 μ M, respectively. Closed bar, putrescine uptake by PotF, G, H, and I; open bar, putrescine uptake by PotE. 100% activity of putrescine uptake by PotE and PotF, G, H, and I was 4.51 and 22.5 nmol/min/mg protein, respectively. Each column represents the mean of duplicate measurements.

【考察】

プトレスシン誘導体を用いた阻害効果の検討より、PotE における基質認識が最も厳密であることが示唆された。データは示していないが、pPT104 にコードされる PotABCD 輸送系についても同様の検討を行ったところ、予想された通り、PotFGHI 輸送系よりも基質認識が緩く、様々な種類のプトレスシン誘導体で阻害効果が見られた。

PotE は柏木らの実験により、Fig. 1-5.に示すような形でプトレスシンを認識していることが示唆された(32)。PotE の輸送活性に関与するアミノ酸残基は、細胞質側の親水性ループ、もしくは細胞質側に隣接する膜貫通部位に局在する。基質であるプトレスシンは PotE の表面部分ではなく、やや細胞膜内に入り始めた部分で認識されていると思われる。また、プトレスシンのアミノ基 N1,N2 を両側から取り囲むように酸性アミノ酸残基が位置するため、5 番の N-ethylputrescine のようなプトレスシンよりも構造的に大きい分子を認識できないのだと考えられる。しかし、PotE はプトレスシンよりも炭素鎖が1つ短い1番の 1,3-Diaminopropane も認識しない。このことから、第 III-第 VI 膜貫通ドメインと第 XII 膜貫通ドメインの距離は非常に厳密に保たれていることが示唆される。このことは、アミノ基間の距離がほぼ一定であると思われる 6 番の *trans*-1,4-Diamino-2-butene により、プトレスシン輸送が阻害されることから推測できる。

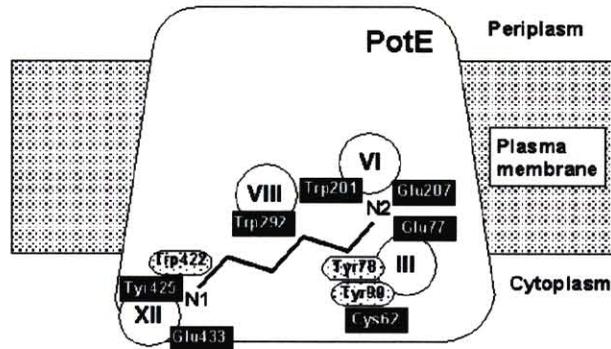


Fig. 1-5. Model of putrescine recognition sites on PotE. Amino acid residues shown in rectangles are involved in both uptake and excretion of putrescine, and amino acid residues in ellipses are in the high affinity uptake of putrescine.

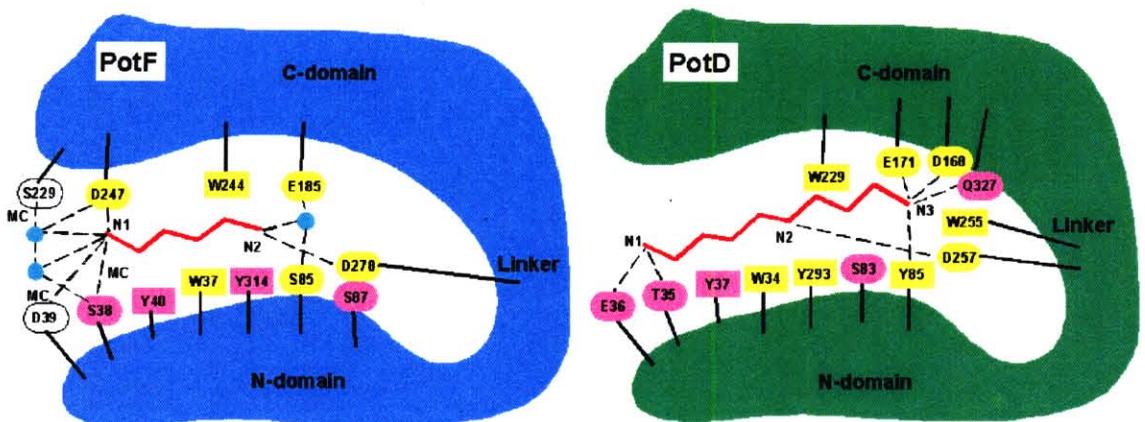


Fig. 1-6. Schematic drawing of PotF and PotD. The polar and hydrophobic residues are drawn as ellipses and rectangles, respectively. The most crucial residues from the structural and mutational analyses are colored yellow, and the other residues, which affect substrate binding, are colored pink. The polar interactions between proteins and substrates are shown as broken lines. The water molecules are shown as pale-blue circles. MC, main chain.

一方、PotF 蛋白質には、N-ethylputrescine のような分子を認識できるだけのスペースをもっていると思われるが、スペルミジンを認識しない。共同研究者の Vassilyev、森川らによると、PotD の場合、基質認識ドメインであるクレフトに、基質であるプトレスシン、スペルミジンを支えるためのチロシン残基の存在が確認されたが、PotF ではそのアミノ酸残基がセリン残基に置き換わっていたことが、PotF がスペルミジンを認識できない理由の1つであるとコメントしている。また、PotF-スペルミジン複合体をコンピュータ上でシミュレーションした結果、理論的に構造を組むことは不可能であるという結論に至った。これは、PotF が基質認識の際に PotD に比べ、多くの水分子が必要であること、また、これらの水分子が互いに強固な水素結合を形成していることによるものかもしれない (Fig. 1-6)。

第二章

酵母ポリアミン輸送蛋白質遺伝子の同定および機能解析

第二章 酵母ポリアミン輸送蛋白質遺伝子の同定および機能解析

第一節 ポリアミン輸送蛋白質遺伝子の同定

大腸菌では3種類のポリアミン輸送系が同定され、その詳細な解析が行われているが、真核細胞では未だに輸送系本体が同定されず、従って細胞内ポリアミン濃度調節機構に関する研究は遅れている。これまでも培養細胞、酵母などを用いてポリアミン輸送系のクローニングが幾度となく試みられたが、いずれも輸送系本体の同定には至らなかった。大腸菌ポリアミン輸送蛋白質である PotE と相同性が見られる蛋白質は mammalian、および酵母 *Saccharomyces cerevisiae* ゲノムデータベース上に見出すことが出来なかった。1997年に Gerner らのグループにより、枯草菌 *Bacillus subtilis* の多剤排出蛋白質である BIt によって、スペルミジンが排出されるという報告がなされた(33)。そこで、BIt のアミノ酸配列に相同性のある蛋白質をコードする遺伝子を酵母ゲノムデータベースより選別する方法で、ポリアミン輸送蛋白質遺伝子の同定を試みた。

【材料および実験方法】

1. 酵母細胞および培養条件

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* YW5-1B, YPH499 は和田洋博士より分与していただいた。スペルミン耐性・輸送欠損株は当研究室の丸山らにより分離された株である(19)。これらの株は YPD medium, SD medium, もしくは CSD medium で培養した。培養は 30℃、好氣的条件下で行った。以下に培地の組成を示す。

・ YPD medium

Component	Composition
Yeast extract	1 g
Polypeptone	2 g / 100 ml

Autoclave 後、最終濃度 2% のグルコースを添加して使用する。

寒天培地として使用する場合、最終濃度 2% の agar を予め添加しておく。

・ SD medium

Component	Composition
Yeast nitrogen base w/o amino acids	0.67 g / 100 ml

Autoclave 後、最終濃度 2%のグルコース、および Supplement を添加して使用する。

各 Supplement の濃度は以下に示してある。

寒天培地として使用する場合、最終濃度 2%の agar を予め添加しておく。

・ CSD medium

Component	Composition (per liter)
[Amino acids]	
Asparagine	1500 mg
Serine	400 mg
Threonine	220 mg
Valine	150 mg
Glutamic acid-HCl	100 mg
Aspartic acid	80 mg
Phenylalanine	50 mg
Methionine	40 mg
Tyrosine	30 mg
Isoleucine	30 mg
Arginine	20 mg
[Inorganic salts]	
NaCl	100 mg
H ₃ BO ₃	0.5 mg
MnCl ₂ 4H ₂ O	0.4 mg
Zn(CH ₃ COO) ₂ H ₂ O	0.4 mg
FeCl ₃ H ₂ O	0.2 mg
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.2 mg
KI	0.1 mg
KH ₂ PO ₄	850 mg
K ₂ HPO ₄	150 mg
2% CuSO ₄	2 μl
(NH ₄) ₂ SO ₄	3.5 g
[Vitamins]	
Inositol	10 mg
D-Pantothenic acid calcium salt	2 mg
Niacin (nicotinic acid)	400 μg
Pyridoxine hydrochloride	400 μg
Thiamine hydrochloride	400 μg
p-Aminobenzoic acid	200 μg
Riboflavin	200 μg
Folic acid	100 μg
D-Biotin	20 μg
[Supplements]	
Leucine	100 mg
Uracil	20 mg
Adenine sulfate	20 mg
Tryptophan	20 mg
Histidine	30 mg
Lysine-HCl	30 mg

10 倍濃度に調整した[Amino acids]、[Inorganic salts]および(NH₄)₂SO₄の混合液と、100 倍濃度に調

整した[Vitamins]、および 100 倍濃度に調整した[Supplements]を一晩もしくは完全に溶解するまで攪拌後、濾過滅菌を行う。これらを適宜混合し、さらにグルコース（最終濃度 2%）、およびマグネシウム（最終濃度 50 μ M）を添加する。滅菌水でメスアップ後、再度、濾過滅菌を行い、4°Cで保存する。

2. 酵母染色体 DNA の分離

定常期の細胞を 0.2 M Tris-HCl (pH 8.0), 4% 2-mercapto ethanol で 5 分間処理する。遠心後、細胞を 1M Sorbitol に懸濁し、最終濃度 5 mg/ml Zymolyase 20T を加え、30°Cで 30 分間加温する。遠心後、細胞を Lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.2 M NaCl, 10 mM EDTA, 5% SDS) に懸濁し、最終濃度 100 μ g/ml Proteinase K を加え、60°Cで 20 分間処理する。その後、Phenol/CHCl₃ 処理をし、エタノール沈殿後、TE buffer に溶解し、RNase A で処理したものを染色体 DNA として用いた。

3. 酵母遺伝子に関する情報検索

枯草菌 *Bacillus subtilis* の多剤排出蛋白質である BIt のアミノ酸配列 (Accession No. AAC36944) と、相同性のある蛋白質をコードする遺伝子は、National Center for Biotechnology Information の BLAST search (URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) を用いて検索することで得た。また、候補となった酵母遺伝子の DNA 塩基配列、およびアミノ酸配列は全て Stanford University の公開データベースである *Saccharomyces* Genome Database (URL: <http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces/>) より引用した。

4. アミノ酸配列 alignment および系統樹の作製

アミノ酸配列 alignment は京都大学化学研究所 GenomeNET (URL: <http://www.genome.ad.jp>) より提供されている配列形成プログラム CLUSTALW multiple sequence alignment program (version 1.7)を用いた(34)。また系統樹は、CLUSTALW の結果を基に分子系統樹作製プログラム PHYLIP version 3.6 (URL: <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html> より release) を用いて作製した(35)。

5. プラスミドの作製

各候補遺伝子の ORF 上流 3~400 bp および下流 2~300 bp 付近の、適当な制限酵素配列が付加されたプライマーを設計し、染色体 DNA を template として、PCR で増幅した。これらの DNA 断片、およびベクターである YEp351 を制限酵素で処理し、低融点アガロースゲルにて精製後、各々を適当量混合し、T4 DNA ligase を加え、16°Cで一晩静置した。エタノール沈殿後、TE buffer に溶解し、適量が大腸菌に導入後、プラスミドを単離し、目的の DNA 断片が挿入されていることを確認した。

6. 酵母細胞の形質転換

形質転換は酢酸リチウム法を用いた(36)。5 ml の YPD medium 中で対数増殖中期 ($A_{540} = 0.5\sim 0.6$) まで増殖した酵母を遠心後、適量の TELiAc 溶液 (10 mM Tris-HCl, 100 mM Lithium acetate, 1 mM EDTA) で洗い、同溶液 50 μ l で懸濁した。予め熱変性させておいた 10 mg/ml salmon testis ss DNA solution 5 μ l およびプラスミド DNA 1 μ g を混合し、さらに懸濁した細胞とよく混合した。DNA と細胞の混合液に PEG/TELiAc 溶液 (40% poly-ethylene glycol in TELiAc) 300 μ l を加え、よく混合し、30°C で 30 分、42°C で 20 分処理した。遠心により細胞を回収後、100 μ l の滅菌水に懸濁し、全量を選択培地に広げ、30°C で 2, 3 日培養し、コロニーを形成させた。

7. 細胞の乾燥質量測定

細胞を適量、NUCLEOPORE membrane filter (polycarbonate, 0.4 μ m, 25 mm) 上に集め、デシケーター内で 2, 3 日乾燥後、その質量を測定し、風袋との差をもって細胞の乾燥質量とした。

8. 細胞の蛋白定量

細胞を遠心後、適量の 10% TCA に懸濁し、70°C で 1 時間、途中、数回激しく混合しながら加熱する。加熱終了後、遠心して上清を取り除き、沈殿に 0.2 N NaOH を適量加え、よく混合し、37°C で 1 時間加温した。適宜、凍結融解を数回繰り返し、沈殿をほぼ完全に溶解させ、この溶液を蛋白定量に用いた。定量法は Lowry らの方法(30)に従った。

9. ポリアミンによる細胞増殖阻害の検討

50 μ M マグネシウム含有 CSD medium 5 ml で細胞を 24 時間培養し、前培養とした。これを 540 nm における吸光度が 0.03~0.05 になるように新しい同培地に植えた。さらに適量のポリアミンを加え、growth check を開始し、開始後 50~100 時間ほど、細胞の増殖を 540 nm における吸光度の増減で測定した。

10. 生細胞へのポリアミン取り込み活性の測定

対数増殖後期 ($A_{540} = 0.8\sim 1.0$) の細胞を遠心後、適量の Na-HEPES buffer (20 mM Na-HEPES (pH 7.2), 10 mM glucose) で 2 回洗浄する。同 buffer で 1 OD/ml となるように細胞を懸濁し、内 0.5 ml を同 buffer 2.0 ml に希釈した。これを 30°C、5 分間インキュベーション後、 $[^{14}\text{C}]$ スペルミン (37 MBq/mmol)、または $[^{14}\text{C}]$ スペルミジン (37 MBq/mmol) を添加し、反応を開始した。一定時間ごとに反応液 0.5 ml を分取し、membrane filter (cellulose acetate, 0.45 μ m; Advantec Toyo) でろ過することにより細胞を回収した。細胞に取り込まれたポリアミンの放射活性は液体シンチレーションカウンターにより測定した。

尚、TPO 遺伝子を導入した株はポリアミン存在下 (0.3 mM スペルミン) で培養した細胞を、TPO 遺伝子破壊株はポリアミン非存在下で培養した細胞を用いた。

11. 酵母液胞膜小胞の調整

大隈らの方法に従って行った(37)。

4 liter の対数増殖中期の細胞 ($A_{540} = 0.6$, total 1×10^{11} cells) を遠心後、精製水で 2 回洗浄した。Sorbitol buffer (1 M sorbitol, 13 mM Tris-HCl (pH8.0)) で 1 回洗浄後、同 buffer で 2.0×10^8 cells/ml となるように懸濁し、最終濃度 20 $\mu\text{g/ml}$ の Zymolyase 20T (生化学工業) を加え、30°C、150 分間振盪した。遠心後、細胞を 6 倍量の Buffer A (12% Ficoll 400, 10 mM Mes-Tris (pH 6.9), 0.1 mM MgCl_2) に懸濁し、Dounce homogenizer (loose type) でホモジナイズ後、超遠心用チューブに分注した。同 buffer を等量重層し、スイング型ローターで 26,000 x g、30 分間遠心を行った。遠心終了後、液面上に浮かんだ画分をスパーテルですくい取り、少量の Buffer A に懸濁し、超遠心用チューブに分注した。Buffer B (8% Ficoll 400, 10 mM Mes-Tris (pH 6.9), 0.5 mM MgCl_2) を重層し、スイング型ローターで 26,000 x g、30 分間遠心を行い、遠心終了後、液面上に浮かんだ画分をスパーテルですくい取り、少量の Buffer B に懸濁し、等量の 2 x Buffer C (10 mM Mes-Tris (pH 6.9), 5 mM MgCl_2 , 25 mM KCl) と混合した。さらに等量の 1 x Buffer C で希釈し、遠心終了後、得られた沈殿を適量の 1 x Buffer C に懸濁し、これを液胞膜小胞とした。

12. 酵母液胞膜小胞へのポリアミン取り込み活性の測定

柿沼らの方法に従い(20)、一部改良して行った。

反応液 (25 mM Tris-Mes (pH7.4), 4 mM MgCl_2 , 25 mM KCl, 0.5 mM ATP; 100 μl) に調整した液胞膜小胞を 30-50 μg 加え、 $[^{14}\text{C}]$ スペルミン (74 MBq/mmol) を添加し、25°C で反応を開始する。一定時間後、反応液を 5 ml の wash buffer (10 mM Tris-Mes (pH 6.9), 5 mM MgCl_2 , 25 mM KCl) で希釈し、membrane filter (cellulose acetate, 0.45 μm ; Advantec Toyo) でろ過することにより液胞膜小胞を回収した。液胞膜小胞に取り込まれたスペルミンの放射活性は液体シンチレーションカウンターで測定した。

13. TPO 遺伝子破壊株の作製

One-step gene disruption method に従って行った(38)。5. で作製したプラスミド YEpTPO1, TPO2, TPO3, TPO4 をそれぞれ *NcoI*-*AatI*, *NcoI*-*SpeI*, *ApaI*, *SpeI* で切断し、そこに *HIS3* 断片を挿入することで、それぞれの遺伝子を破壊したプラスミド YEpTPO1::*HIS3*, TPO2::*HIS3*, TPO3::*HIS3*, TPO4::*HIS3* を作製した。次にこれらのプラスミドを template とし、PCR にて目的の断片を増幅した。この増幅した DNA 断片を酵母に linear- transformation し、ヒスチジン欠損 SD medium 上で、コロニーを形成したものを遺伝子破壊株とした。それぞれの遺伝子破壊株は Southern blot、または PCR により、目的の遺伝子が破壊されているかどうか確認した。

14. total RNA の単離、および Northern blot analysis

酵母からの total RNA の単離は、hot-phenol 法に従って行った(39)。得られた total RNA を 2.2 M ホルムアルデヒドを含む 1% アガロースゲルで電気泳動後、Gene screenTM Plus transfer membrane (NEM research products) に転写し、UV crosslinker (120,000 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$) によって RNA を固定させた。この membrane を hybridization buffer (50% formamide, 1% SDS, 10% dextran sulfate, 1 M NaCl)

に浸し、最終濃度 100 $\mu\text{g/ml}$ サケ精子 DNA を加え、42°C で 60 分間 pre-hybridization した後、probe を加え、42°C で 24 時間 hybridization させた。membrane を 2 x SSC で 5 分間 x 2 回、2 x SSC + 0.1% SDS で 45 分間 x 2 回、0.1 x SSC + 0.1% SDS で 20 分間 x 2 回洗浄後、風乾し、BAS2000 imaging analyzer を用いて解析を行った(40)。

15.細胞分画法

Joho らの方法(41)を一部、改良して行った。

対数増殖期もしくは定常期の細胞を遠心により集め、1 mM EDTA で 2 回洗浄する。細胞を 0.5 ml の Mes buffer (10 mM Mes-Tris (pH 6.0), 0.6 M Sorbitol, 10 mM Glucose) に懸濁し、最終濃度 0.5 mM の CuSO_4 を添加する。30°C で 10 分間加温後、遠心した上清と、0.5 ml の 1 mM EDTA in Mes buffer で洗浄後の上清を合わせて細胞質画分とする。さらに、0.5 ml の 10% TCA で細胞を懸濁し、沸騰水浴中で 15 分間加熱する。遠心した上清と 0.5 ml の 10% TCA で洗浄した上清を合わせて液胞画分とする。また、細胞を洗浄後、1 ml の 10% TCA で懸濁し、70°C で 1 時間処理した上清を細胞全体とした。

16.ポリアミン定量

五十嵐らの方法(42)に従った。

高速液体クロマトグラフィーを用いて、TSK gel Polyaminepak (4.6 x 50 mm) カラムを Buffer II (0.35 M Na-citrate (pH 5.3), 2 M NaCl, 20% methanol) で平衡化し、50°C、0.42 ml/min の条件で分離を行った。分離されたポリアミンは OPA buffer (0.4 M boric acid-KOH (pH 10.4), 0.06% o-phthalaldehyde, 37 mM β -mercapt ethanol, 0.1% Brij-35) を 0.4 ml/min の割合で溶離液と混和し、50°C で反応させ、励起波長 336 nm、蛍光波長 470 nm の条件で蛍光強度を測定することで定量した。

【結果】

1. ポリアミン輸送蛋白質候補遺伝子の選別

Bacillus subtilis の多剤排出蛋白質 Blt と相同性のある酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の蛋白質を BLAST search により得、内 9ORF を選別した (Fig. 2-1)。これらは全て Major Facilitator Superfamily (MFS) に属し、multi drug resistant protein に相同性を持つ蛋白質であり、12~14 の膜貫通領域を持つ膜蛋白質であることがデータベース検索より確認された(43)。

これまでに、当研究室の丸山らにより、低マグネシウム完全合成培地 ($50 \mu\text{M Mg}^{2+}$) にポリアミンを添加することで酵母の増殖阻害が見られること(19)が報告されていることから、この現象を利用し、選別した 9 遺伝子をマルチコピーベクターにより過剰発現させた形質転換株のうち、低マグネシウム培地でもポリアミンによる増殖阻害を受けないものを選択し、その株に導入した遺伝子をポリアミン輸送蛋白質遺伝子とした。

樹形図に示した候補遺伝子を導入した形質転換株を作製し、それらのポリアミンに対する感受性を検討した (Fig. 2-2)。通常、酵母は低マグネシウム条件下、0.3 mM のスペルミン添加により著しい増殖阻害を示すことが明らかとなっている。ところが、*YLL028w*, *YGR138c*, *YPR156c*, *YOR273c* を導入した株では実験開始 20~30 時間後から増殖の回復が見られた。他の候補遺伝子を導入した形質転換株では顕著な増殖の回復が観察されなかったことから、この 4 種類の遺伝子をポリアミン輸送蛋白質遺伝子とし、*TPO1* (*YLL028w*)、*TPO2* (*YGR138c*)、*TPO3* (*YPR156c*)、*TPO4* (*YOR273c*) と命名した。

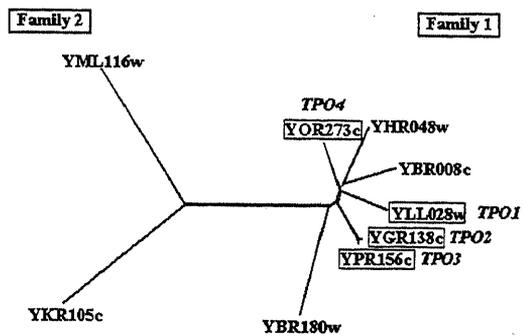


Fig. 2-1. Phylogenetic tree of MFS genes from *Saccharomyces cerevisiae* exhibiting amino acid sequence similarity to *YLL028w*. The phylogenetic tree was calculated as described in Materials and Methods section.

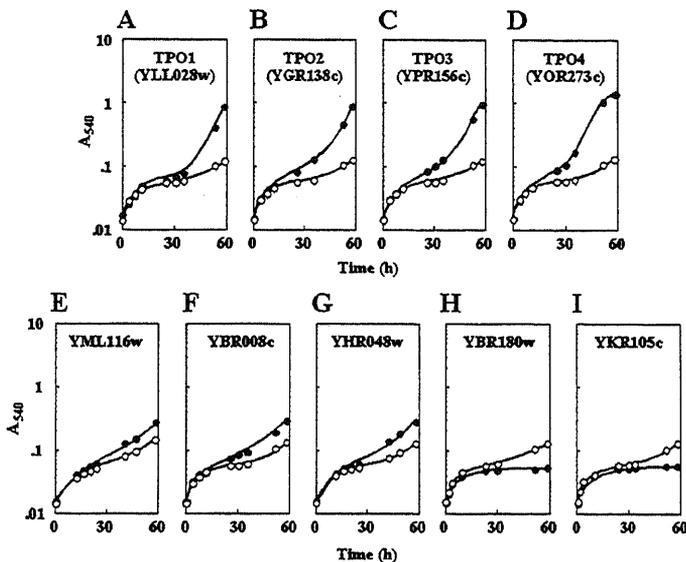


Fig. 2-2. Effect of various MFS genes on cell growth in the presence of spermine. Yeast strain YW5-1B transformed with YEp351 (○) or YEp351 containing an MFS gene (●) was cultured in the presence of 0.3 mM spermine. The MFS genes tested are shown in each panel. Cell growth was followed by measuring A_{540} .

2. ポリアミン誘導体および金属カチオンに対する効果

これらの遺伝子産物 TPO1, TPO2, TPO3, TPO4 がポリアミン特異的な輸送蛋白質であることを確認するため、低マグネシウム培地にポリアミンの誘導体であり、細胞増殖阻害作用のある MGBG (methylglyoxal bis (guanyl- hydrazone)) (44,45)、または 2 価の金属カチオンであるコバルトを添加し、前述と同様、細胞増殖阻害の有無を検討した (Fig. 2-3)。その結果、TPO 遺伝子を導入した株のみ、MGBG 存在下で増殖の回復が見られた。他の遺伝子を導入した株では親株と同様、増殖の回復は見られなかった。また、コバルトを添加した培地ではいずれの株においても増殖の回復が見られなかったことから、TPO1, 2, 3 および 4 はポリアミン特異的な輸送蛋白質であることが示唆された。

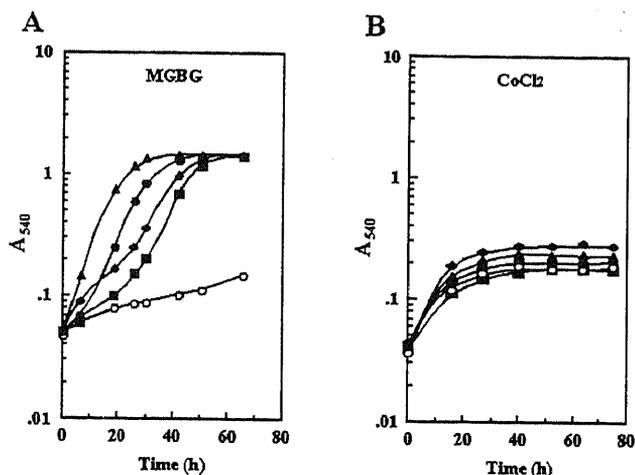


Fig. 2-3. Effect of MGBG and Co^{2+} on cell growth of wild-type yeast and MFS gene-transformed yeast. Yeast cells were cultured in the presence of 1 mM MGBG (A) or 0.05 mM CoCl_2 (B). Symbols; \circ , wild-type strain; \blacksquare , TPO1 gene-transformed cells; \bullet , TPO2 gene-transformed cells; \blacklozenge , TPO3 gene-transformed cells; \blacktriangle , TPO4 gene-transformed cells. Cell growth was followed by measuring A_{540} .

3. TPO 過剰発現株におけるポリアミン取り込み活性

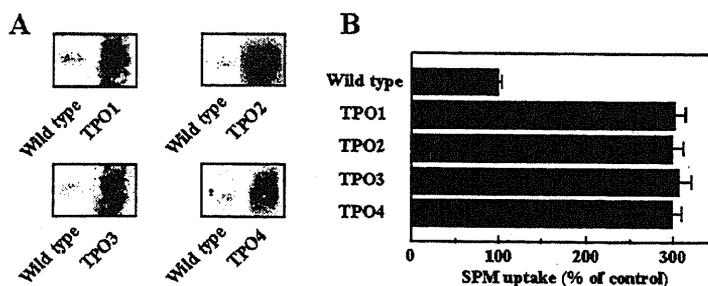


Fig. 2-4. Northern blot analysis of TPO genes (A), and spermine uptake activity (B). Cells were cultured in the presence of 0.3 mM spermine. (A) TPO1, TPO2, TPO3 and TPO4 mRNA species of the wild-type strain and TPO gene transformed cells were compared by Northern blot analysis. (B) Spermine uptake was measured with the wild-type strain and TPO gene transformed cells. 100% spermine uptake activity was 65 pmol/min/mg dry weight. Values are means \pm S.D. for triplicate experiments.

TPO1, 2, 3 および 4 は、過剰ポリアミンによる細胞増殖阻害を解除する機能があることから、細胞質膜に局在するポリアミン排出蛋白質、もしくは液胞膜に局在するポリアミン取り込み蛋白質であることが示唆された。そこでこれらの輸送蛋白質の存在部位を確認する目的で、最初に TPO 遺伝子を導入した株におけるポリアミン輸送活性を測定した。0.3 mM スペルミン存在下、

540 nm の吸光度が 1.0 (親株は $A_{540} = 0.1$ を 10 倍量) になるまで生育した細胞を用いた。これらの株は Northern blot analysis により、TPO 遺伝子の過剰発現が確認された (Fig. 2-4A)。

また、輸送活性を測定した結果、いずれの株においても親株に比べ、約 3 倍の活性の上昇が見られた (Fig. 2-4B)。この結果より、TPO1, 2, 3 および 4 は細胞質膜に存在する排出蛋白質ではなく、液胞膜に存在する取り込み蛋白質であることが示唆された。

4. bafilomycin A₁ の影響

これまでの研究により、酵母の液胞膜にはポリアミン取り込み活性があり、その輸送活性はプロトン濃度勾配依存的であることが明らかとなっている。また、液胞膜のプロトン濃度勾配は主に V-type ATPase により形成されることから、V-type ATPase の阻害剤である bafilomycin A₁ により、液胞膜におけるポリアミンの取り込み活性が消失することも明らかとなっている (20,46)。

そこで、TPO 過剰発現株における bafilomycin A₁ の影響を検討した (Fig. 2-5)。その結果、スペルミン存在下で見られる TPO 過剰発現株の生育阻害の回復は、50 μ M bafilomycin A₁ 添加により、完全に消失した。ポリアミン輸送欠損株である YTM22-8 株 (21) では bafilomycin A₁ 添加による生育阻害が見られなかった (Fig. 2-5B)。以上の結果より、TPO1, 2, 3 および 4 は液胞膜に存在し、細胞質から液胞内腔へポリアミンを取り込む輸送蛋白質であることが明らかとなった。

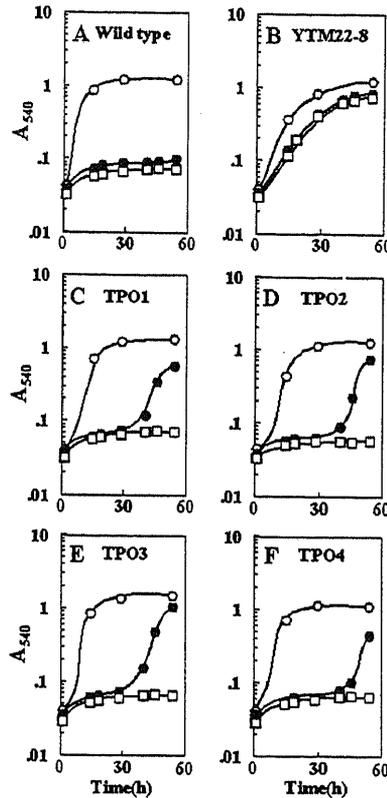


Fig. 2-5. Effect of bafilomycin A₁ on cell growth cultured with spermine. (A) Wild-type strain; (B) polyamine transport-deficient mutant; (C-F) TPO gene transformed cells as indicated. Symbols; ○, cells cultured without spermine; ●, cells cultured with 0.3 mM spermine; □, cells cultured with 0.3 mM spermine and 50 μ M bafilomycin A₁. Cell growth was followed by measuring A_{540} .

5. TPO 遺伝子破壊株のポリアミンに対する感受性

各 TPO 遺伝子を破壊した株 Δ TPO1、 Δ TPO2、 Δ TPO3 および Δ TPO4 を作製し、これらの遺伝子の細胞増殖に対する影響、およびポリアミンに対する感受性を検討した。ポリアミン非存在下では、いずれの遺伝子破壊株も増殖したことから、いずれも致死遺伝子ではないことが確認された。しかし、 Δ TPO1 では増殖速度が親株 YPH499、および他の TPO 遺伝子破壊株に比べて遅い (growth rate; YPH499 = 0.3 h⁻¹, Δ TPO1 = 0.18 h⁻¹) ことが明らかとなった (Fig. 2-6A)。また、培地中に 0.2 mM のスペルミンを添加すると、いずれの株においても親株に比べ増殖阻害が起こり、

スペルミンに対して感受性を示すことが明らかとなった (Fig. 2-6B)。 $\Delta TPO4$ は 60 時間後には増殖が回復してきていることから、TPO4 のスペルミン輸送活性は弱いことが示唆される。一方、基質を 2.5 mM のスペルミジンに変えると、感受性を示したのは $\Delta TPO1$ および $\Delta TPO4$ のみであった (Fig. 2-6C)。この結果より、TPO1 および TPO4 はスペルミン、スペルミジン共に基質として認識するのに対し、TPO2 および TPO3 はスペルミンのみを基質として認識する輸送蛋白質であることが示唆された。

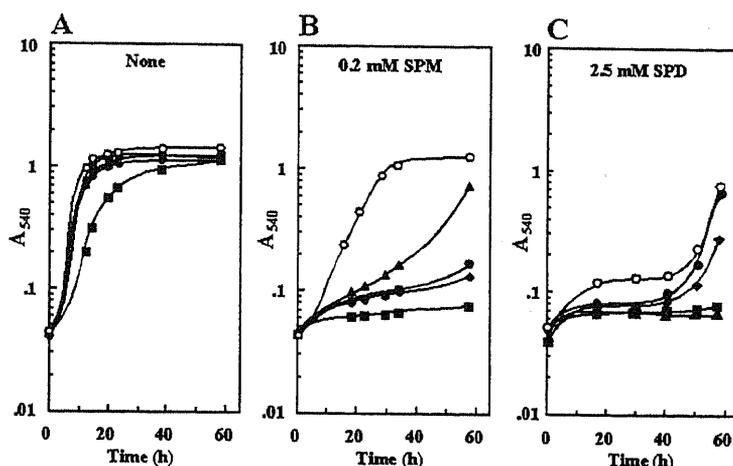


Fig. 2-6. Effect of spermine and spermidine on cell growth of *TPO* gene-disrupted cells. Cells were cultured in the absence of spermine or spermidine (A) and in the presence of 0.2 mM spermine (B) or 2.5 mM spermidine (C). Symbols; O, wild-type strain; ■, *TPO1* gene-disrupted cells; ●, *TPO2* gene-disrupted cells; ◆, *TPO3* gene-disrupted cells; ▲, *TPO4* gene-disrupted cells. Cell growth was followed by measuring A_{540} .

6. *TPO* 遺伝子破壊株におけるポリアミン取り込み活性

Table 2-1 Spermine and spermidine uptake activities of *TPO* gene-disrupted cells. Delta indicates disrupted gene. Cells were cultured in the absence of polyamines. Values are mean \pm S. D. of triplicate experiments.

Strain	Uptake activity (pmol/min/mg dry weight)	
	Spermine	Spermidine
Wild type	150 \pm 3.4	110 \pm 3.8
$\Delta TPO1$	76.7 \pm 1.3	53.2 \pm 1.7
$\Delta TPO2$	111 \pm 1.8	113 \pm 4.1
$\Delta TPO3$	108 \pm 1.5	112 \pm 4.7
$\Delta TPO4$	124 \pm 2.1	86.3 \pm 2.9

続いて、これら遺伝子破壊株のスペルミンまたはスペルミジン取り込み活性を測定した。結果を Table 2-1 に示した。 $\Delta TPO1$ はスペルミンおよびスペルミジン共に取り込み活性が親株に対し、約 50%も減少していることが明らかとなった。他の遺伝子破壊株におけるスペルミン取り込み活性は $\Delta TPO2$ および $\Delta TPO3$ では約 25%の減少、 $\Delta TPO4$ では約 15%の減少が見られた。一方、 $\Delta TPO2$ および $\Delta TPO3$ ではスペルミジン取り込み活性の減少が全く見られなかった。この結果は前項における増殖阻害実験の結果を反映しており、以上の結果から、TPO1, TPO4 は基質として

スペルミンおよびスペルミジンを認識するのに対し、TPO2, TPO3 はスペルミンのみを認識することが明らかとなった。

7. 液胞膜におけるポリアミン取り込み活性

これまでの実験結果より、TPO1 が4種のポリアミン輸送系の中で最も活性が高いと思われた。そこで、TPO1 遺伝子破壊株、および TPO1 遺伝子導入株より液胞膜小胞を分離し、それぞれのスペルミン取り込み活性を測定した。その結果、Fig. 2-7 で示すように、親株 YPH499 より分離した液胞膜小胞の持つスペルミン取り込み活性に比較し、TPO1 遺伝子破壊株より調整した液胞膜小胞では約 1/2 の活性が、また TPO1 遺伝子導入株より調整した液胞膜小胞では約 3 倍の取り込み活性が見られた。また、この取り込み活性は細胞全体のポリアミン取り込み活性の結果を反映していることから、TPO1 は液胞膜に存在し、細胞質内から液胞内腔へポリアミンを取り込む輸送蛋白質であることが明らかとなった。他の TPO 蛋白質もこれまでの実験結果より、TPO1 と同様の表現型を示すことから、TPO1 と同様、液胞膜に存在するポリアミン輸送蛋白質であることが示唆された。

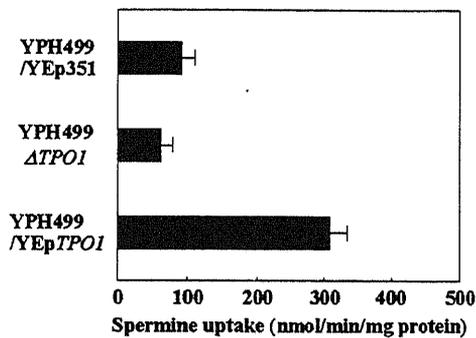


Fig. 2-7. Effect of *TPO1* gene on spermine uptake activities in the vacuolar membrane vesicles. Vacuolar membrane vesicles are isolated as indicated in Material and Methods. ATP-dependent spermine uptake activity in vacuolar membrane vesicles was shown as the value with ATP minus that without ATP. Values are mean \pm S.D. of triplicate experiments.

8. 細胞内のポリアミン分布

Table 2-2 Spermine content in whole cells, cytosol and vacuoles. Cells were cultured for 60 h in the presence of 0.3 mM or 0.2 mM spermine. Fractionation into cytosol and vacuoles was performed by the method of Joho *et al.* [21]. Spermine content was measured using wild type strain, *TPO* gene-transformed cells and *TPO* gene-disrupted cells, and was expressed as nmol/ 10^8 cells. Values are mean \pm S.D. of triplicate experiments.

Strain	Spermine in medium (mM)	Spermine content (nmol/ 10^8 cells)		
		Whole cells	Cytosol	Vacuoles
<i>TPO</i> gene-transformed cells				
Vector	0.3	42.3 \pm 2.3	17.5 \pm 1.5	25.2 \pm 2.5
TPO1	0.3	83.6 \pm 4.8	15.8 \pm 1.7	67.1 \pm 3.4
TPO2	0.3	80.1 \pm 6.1	16.2 \pm 1.3	63.7 \pm 2.9
TPO3	0.3	81.9 \pm 4.3	16.1 \pm 1.8	64.2 \pm 5.2
TPO4	0.3	79.8 \pm 5.2	16.4 \pm 2.2	61.5 \pm 4.5
<i>TPO</i> gene-disrupted cells				
Wild type	0.2	40.3 \pm 3.9	17.1 \pm 1.2	24.0 \pm 2.2
Δ TPO1	0.2	24.5 \pm 1.5	18.7 \pm 1.6	7.5 \pm 1.0
Δ TPO2	0.2	33.8 \pm 3.3	18.0 \pm 2.0	14.2 \pm 1.7
Δ TPO3	0.2	31.4 \pm 1.9	18.2 \pm 1.3	13.1 \pm 1.1
Δ TPO4	0.2	37.1 \pm 4.2	18.1 \pm 0.8	19.3 \pm 1.9

TPO1, 2, 3 および 4 が液胞膜に存在する輸送蛋白質であることを確認するため、0.3 mM および 0.2 mM スペルミン存在下で培養した TPO 遺伝子過剰発現株および TPO 遺伝子破壊株について細胞分画を行い、細胞質および液胞内腔のスペルミン含量を測定した。Table 2-2 に示すように、TPO 遺伝子過剰発現株ではいずれの株においても細胞全体のスペルミン含量が増加しているのが見られた。ところが、細胞質画分のスペルミン含量はほとんど変化しておらず、液胞画分のみが増加が見られた。

また、TPO 遺伝子破壊株でも同様の結果が見られた。細胞全体のスペルミン含量は $\Delta TPO1$ で最も少なく、次いで $\Delta TPO2 = \Delta TPO3 > \Delta TPO4$ となっていたが、細胞質画分のスペルミン含量はいずれの遺伝子破壊株でも親株とほぼ同じであり、液胞膜画分が細胞全体のスペルミン含量の変化を反映していることが明らかとなった。以上の結果より、TPO1, 2, 3 および 4 は液胞膜に存在し、細胞質の過剰なポリアミンを液胞内に取り込む輸送蛋白質であることが明らかとなった。

【考察】

真核細胞で初めてポリアミン輸送蛋白質遺伝子の同定に成功した。今回同定した 4 種類の輸送蛋白質はいずれも酵母の液胞膜上に存在する輸送蛋白質であった。このことは、酵母では細胞質のポリアミン濃度を調節するために、複数の輸送系が必要であることを示唆している。本研究では、同様の方法で、樹形図に示した以外にもまだ機能の判明していない、膜蛋白質をコードする遺伝子 50~60 種類について検討を行った。しかし、結局、細胞膜上に存在すると思われるポリアミン輸送蛋白質の同定には至らなかった。また、TPO1 遺伝子を破壊した株では細胞全体でのスペルミン・スペルミジン両取り込み活性が、親株の半分にまで低下しているのが観察された (Table 2-1) ことも含め、酵母におけるポリアミンの取り込み活性に、液胞が非常に重要な役割を果たしていることが示唆される。

ポリアミンを液胞内に取り込むことは、細胞内のポリアミン濃度調節維持だけではなく、酵母が増殖する上で重要なものかもしれない。低マグネシウム完全合成培地中で、親株 YPH499 は growth rate が $0.33 \text{ (h}^{-1}\text{)}$ に対し、TPO1 遺伝子破壊株では、 $0.18 \text{ (h}^{-1}\text{)}$ と、約 2 倍の差が見られる (Fig. 2-6A)。このことは、酵母にとって TPO1 がいかに重要な役割を果たしているかを示している。また、液胞内にはポリアミンだけではなく、塩基性アミノ酸(47)、マグネシウム(48,49)、亜鉛(50)などの必須金属、ポリリン酸(51)等、生体にとって必須であるものが高濃度に存在する。亜鉛に関しては、その細胞内濃度調節機構が詳細に研究されており、細胞膜に存在する取り込み系、液胞膜に存在する取り込み系および液胞内腔から細胞質へ輸送する系が既に同定されている(50)。ポリアミンもまた、亜鉛と同様、最近の研究により、液胞内腔から細胞質へポリアミンを輸送すると思われる輸送蛋白質の同定に成功した。従って、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* におけるポリアミンの細胞内濃度調節は、細胞膜上、および液胞膜上において行われており、液胞膜上の輸送系がより強く働くことにより、液胞内にポリアミンを常時高濃度に蓄積していると思われる。そして細胞質のポリアミン濃度が低下すると、液胞内から細胞質へポリアミンを輸送することにより、細胞質の濃度を一定に保っているのではないかと思われる。

TPO1 と相同性を持つ蛋白質は分裂酵母 *Shizosaccharomyces pombe* にも見られる。TPO1 との相同性はアミノ酸配列上、約 45%と、細胞増殖の marker でありポリアミン生合成の律速酵素である ODC (オルニチン脱炭酸酵素) が両酵母間で 50%程度の相同性を持つことから考えると、比

較的相同性が高く、保存されていると考えられる。*S.pombe*において、この TPO1 に類似した蛋白質がどういう働きをしているのかについては、現在のところ全く不明である。しかし、両酵母は系統分類上、極めて近縁というわけではなく、むしろ、これら両酵母間で保存されているものは生体にとって非常に重要な役割を果たしているものが多いと言われる。このことから、TPO1 が生体にとって、非常に重要な役割を果たしているのではないかと思われる。

Stanford university の公開データベースである *Saccharomyces Genome Database* より、TPO1 の発現が孢子形成の初期過程で著しく上昇するという情報を得た。また、以前 Tabor らにより作成されたポリアミン生合成欠損株では、スペルミジンおよびスペルミンを完全に枯渇させた場合、孢子形成が阻害されることが報告されている(52)ことから、孢子形成過程におけるポリアミンの細胞内濃度調節がいかに大切であるかが分かる。酵母の孢子形成過程はまた、高等動物の生殖細胞形成過程と非常に類似した過程であることが知られており、今後、酵母の孢子形成過程におけるポリアミンの役割を明らかにすることで、生殖細胞形成過程でのポリアミンの生理的意義を解明することが可能になるかもしれない。

酵母の液胞にはポリアミンの蓄積が見られたが、このように細胞内オルガネラへのポリアミンの蓄積は酵母に限ったことではなく、動物細胞でも見られる。その一つが神経細胞のシナプス小胞に見られる。当研究室の益子らによって、ニューロン、グリア細胞、およびシナプス小胞においてポリアミンの取り込み活性が観察され、また、シナプス小胞には細胞質に比べ、高濃度のポリアミンが蓄積していることが明らかにされた (unpublished data)。神経細胞におけるポリアミンの役割はシナプス後膜上に存在するイオンチャネルの調節(53)が知られているが、ポリアミンは他の神経伝達物質同様、シナプス小胞に蓄積された後、シナプス小胞が神経細胞膜と融合することによってシナプス間隙に放出されるのではないかと思われる。このシナプス小胞には 12 回膜貫通型の膜蛋白質である SV2 (Synaptic Vesicle 2) protein が存在しているが、最近のホモロジー検索の結果、この蛋白質と TPO1 の間に相同性が認められた。SV2 protein は未だ輸送基質が不明であるが、この遺伝子を欠損させたノックアウトマウスでは神経伝達物質のシナプス間隙への放出が減少し、その結果、個体成長の遅滞、重度の発作、寿命の短命化などの著しい変化が観察される(54,55)。この蛋白質がポリアミン輸送蛋白質であるかどうかは現在解析中である。本研究を足がかりに、今後、動物細胞においてポリアミン輸送系の解明が進むことを期待する。

第二節 TPO1 の基質認識

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* には、4 種類のポリアミン輸送蛋白質 TPO1, 2, 3 および 4 が存在し、そのいずれもが液胞膜に存在することが明らかとなった。また、TPO1, 4 はスペルミン、スペルミジン共に、TPO2, 3 はスペルミンのみを基質として認識することも前節で明らかにした。これらの輸送蛋白質は基質をどの部位で認識するのだろうか。大腸菌ポリアミン輸送系では全ての系において、基質認識には酸性アミノ酸および芳香族アミノ酸が重要であった。そこで、酵母ポリアミン輸送蛋白質の中で最も輸送活性が強いと思われる TPO1 を用いて酵母ポリアミン輸送蛋白質の基質認識に必要なアミノ酸残基の同定を試みた。

【材料および実験方法】

1. アミノ酸配列 alignment の作製

第二章第一節【材料および実験方法】4. アミノ酸配列 alignment および系統樹の作製に従った。

2. TPO1 への変異導入

Braman らの方法(27)に従い、一部改良して行った。

変異導入を行う部位を中心に 30 mer のプライマーを鋳型鎖および相補鎖で作製した。YE*pTPO1* を template とし、作製したプライマーを用い、PCR にて反応を行った。反応の際、正確さを期すため、Pyrobest DNA polymerase (TAKARA) を使用した。反応終了後、反応液を Phenol/CHCl₃ 抽出し、エタノール沈殿後、*DpnI* で 37°C、2 時間処理したもので大腸菌 DH5α を形質転換し、得られたコロニーより、プラスミドを回収した。塩基配列は DNA sequence を行うことで確認した。

【結果】

1. TPO 蛋白質間におけるアミノ酸配列上の相同性

TPO 蛋白質はそのアミノ酸配列からいずれも 12 ヶ所の膜貫通領域を持つことが示唆された。大腸菌ポリアミン輸送蛋白質 PotE も 12 ヶ所の膜貫通領域を持つことが明らかとなっており、その基質認識部位は第一章第二節で論じた(56)。PotE では特に 3 個の酸性アミノ酸残基が基質認識に重要であると考えられており、そのアミノ酸残基は第 II-第 III 膜貫通領域間、第 VI-第 VII 膜貫通領域間、およびカルボキシ末端の親水性ループに存在することが明らかとなっている。TPO 蛋白質のアミノ酸配列 alignment より、これらの蛋白質にも PotE と類似した位置に酸性アミノ酸残基が見られ、保存されていることが明らかとなった (Fig. 2-8)。また、アミノ末端には約 140 アミノ酸からなる非常に長い親水性ループを持ち、その領域はセリンおよびスレオニンに富んでいることが分かる。これに関しては次節で論ずる。

2. TPO1 の輸送活性に対する酸性アミノ酸残基の影響

保存されている 3 ヶ所の酸性アミノ酸残基がポリアミン輸送活性に必須であるかどうかを確

かめるため、TPO1 の3個の酸性アミノ酸残基 E207, E324 および E574 を部位特異的変異導入法により変異させた TPO1 E207Q, E324Q, および E574Q を作製し、これらを導入した株を用いてスペルミンによる増殖阻害効果を検討した (Fig. 2-9)。その結果、TPO1 E207Q および E574Q を導入した株では親株と同様、スペルミン添加による増殖阻害が見られた。一方、TPO1 E324Q を

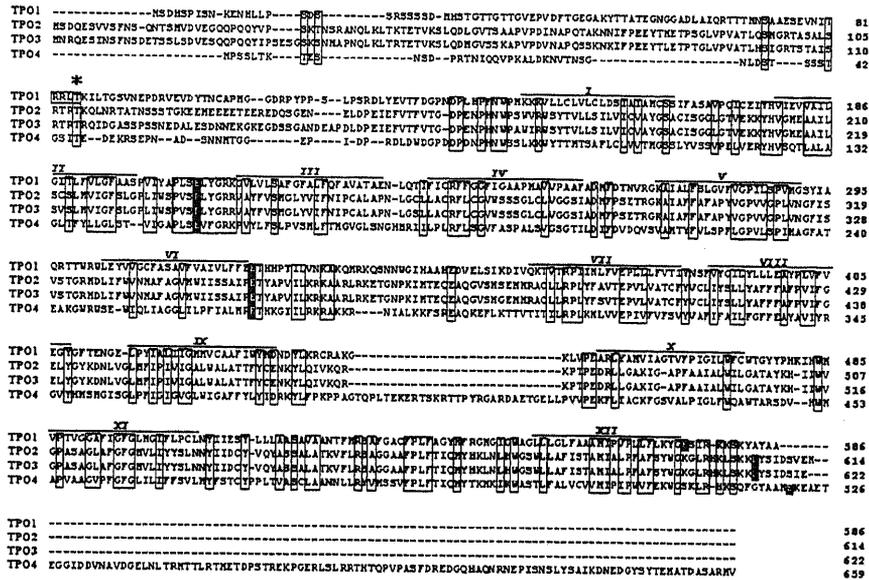


Fig. 2-8. Alignment of the deduced amino acid sequences of TPO1, TPO2, TPO3 and TPO4. Putative transmembrane segments are indicated by I-XII. Identical and similar residues in TPO1 to TPO4 are shown by boxes. The putative calcineurin recognition sequence is shown by rectangle; the asterisk shows the putative Thr residue that is phosphorylated by PTK1 or PTK2. Three glutamate or aspartate residues that might interact with polyamines are indicated by black boxes with white lettering.

導入した株は野生型 TPO1 を導入した株と同様、スペルミン添加による増殖阻害が見られず、スペルミン耐性を示した。TPO1 の323番目、および324番目のアミノ酸残基は共にグルタミン酸であるため、一方に変異が入った場合、もう一方がその機能を相補することが考えられる。そこで、2アミノ酸残基を共に変異させた TPO1 E323Q/E324Q を作製し、同様に検討を行った結果、野生型 TPO1 の示すスペルミン耐性はほぼ完全に消失した (Fig. 2-9)。

また、これらの変異 TPO1 を発現させた株のスペルミン取り込み活性を測定したところ、TPO1 E207Q, E323Q/E324Q および E574Q を発現させた株において、著しい活性の低下が見られた (Fig. 2-10)。

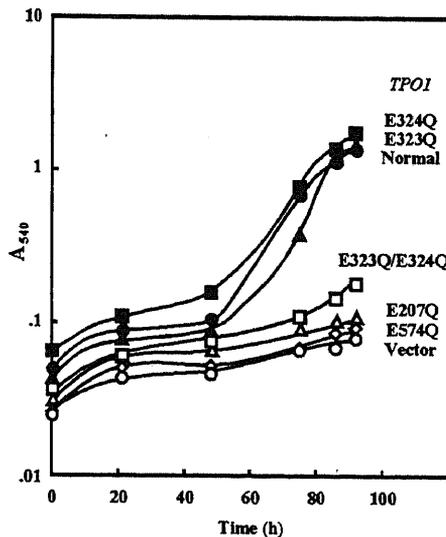


Fig. 2-9. Effect of TPO-gene mutants on cell growth in the presence of spermine. Yeast cells transformed with normal TPO1 and mutated TPO1 genes were cultured in the presence of 0.35 mM spermine. Cell growth was followed by measuring A₅₄₀.

以上の結果より、TPO1 のポリアミン輸送活性には酸性アミノ酸残基 E207, E324 (または E323) および E574 が必要であることが明らかとなった。

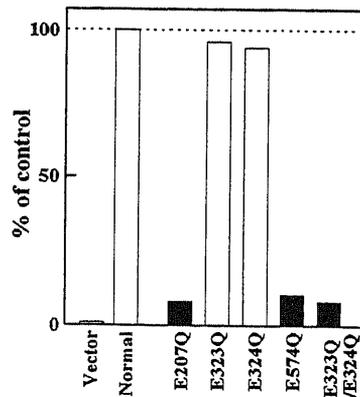


Fig. 2-10. Effect of glutamic acid residues on spermine uptake activity of TPO1. Cells were harvested at $A_{540} = 1.0$. 100% activity of normal TPO1-transformed cell was 131 pmol/min/mg dry weight.

【考察】

TPO1 のポリアミン認識には、大腸菌ポリアミン輸送蛋白質 PotE と同様、酸性アミノ酸残基が必須であった。これらの酸性アミノ酸残基は PotE の基質認識部位と同様、第 II-第 III 膜貫通領域間の親水性ループ、第 VI-第 VII 膜貫通領域間の親水性ループ、およびカルボキシ末端の親水性ループに存在した。これらの酸性アミノ酸残基は TPO1 のみならず、TPO2-4 に至る全ての TPO 蛋白質に見られた (Fig. 2-8)。PotE の基質認識部位であるアミノ酸残基は PotD および PotF の基質認識部位のアミノ酸残基の配置と非常に類似していると示唆されている(32)ことから、TPO1 の基質認識に関わるアミノ酸残基の配置も非常に類似しているのではないかと思われる。

また、前節で触れたシナプス小胞に存在する膜蛋白質 SV2 protein にも、PotE および TPO 蛋白質と同様、類似した位置に酸性アミノ酸残基の存在が確認された(57)。このことから、ポリアミン認識部位のアミノ酸残基の配置は原核・真核細胞を通して保存されていることが考えられる。しかし、PotE は基質としてジアミンであるプトレスシンのみを認識する(14,58)のに対し、TPO 蛋白質はスペルミジンまたはスペルミンを認識する。今回同定した 3ヶ所の酸性アミノ酸残基は恐らく、スペルミンまたはスペルミジンのアミノブチル骨格部分を認識しているのであろう。そうであるならば、TPO1 および TPO4 にはスペルミジンおよびスペルミンのアミノ基を認識するための酸性アミノ酸残基があり、また TPO2 および TPO3 にはスペルミンのみを認識するような酸性アミノ酸残基が存在するはずである。基質認識に関わる芳香族アミノ酸残基も含め、プトレスシン、スペルミジン、スペルミンそれぞれに特異的な基質認識部位の同定は、今後の課題である。

第三節 TPO1 の輸送活性調節

これまでの研究により、酵母のポリアミン輸送活性は PTK1、PTK2、NPR1、および SKY1 という複数のセリン・スレオニンリン酸化酵素により活性調節を受けていることが明らかとなっている(21,22,25,59)。しかし、これらのリン酸化酵素の標的が何であるかは明確にされていない。

TPO1 蛋白質のアミノ末端は、約 140 アミノ酸からなる非常に長い親水性に富んだループであり、複数のセリン・スレオニン残基が局在する。モチーフ検索の結果、アミノ末端、および他の親水性ループに複数のリン酸化モチーフが見出された。そこで、TPO1 の輸送活性がリン酸化によって調節されているかを明らかにする目的で検討を行った。

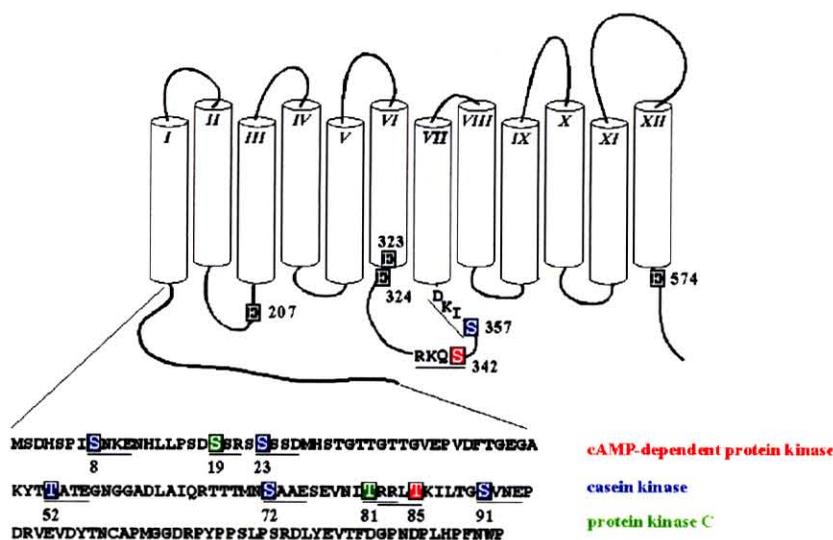


Fig. 2-11. Model of putative phosphorylation sites by serine/threonine protein kinases on TPO1 protein. Putative phosphorylation motifs and phosphorylated residues are indicated by underlines and boxes with white lettering. Red, blue, and green are indicated that these residues are phosphorylated by cAMP-dependent protein kinase, casein kinase, and protein kinase C. Glutamic acid residues indicate putative polyamine recognition sites.

【材料および実験方法】

1. モチーフ検索

モチーフ検索は、GenomeNet より提供されている蛋白質配列検索プログラム MOTIF (<http://motif.genome.ad.jp/>) を用いて行った。

2. TPO1 への変異導入

第二章第二節【材料および実験方法】2. TPO1 への変異導入に従った。

【結果】

1. TPO1 のリン酸化モチーフが TPO1 の活性に与える影響

モチーフ検索の結果、TPO1 には Fig. 2-11 に示すようにセリン・スレオニンリン酸化酵素によ

リン酸化を受け得る部位が、複数見出された。そこで、モチーフ検索により見出された 10ヶ所のリン酸化部位のセリンまたはスレオニン残基をアラニンに置換した変異 TPO1 を作製し、これらを導入した株について、スペルミンに対する感受性について検討した (Fig.2-12)。その結果、8, 19, 357 番目のセリンおよび 85 番目のスレオニン残基をアラニンに置換した TPO1 を導入した株は野生型 TPO1 を導入した株に比べ、過剰スペルミンに対し、感受性を示した。特に、85 番目のスレオニンを変異させた TPO1 ではスペルミンに対する耐性が著しく消失しているのが観察された。また、23, 91, および 342 番目のセリンをアラニンに置換しても TPO1 の示すスペルミン耐性には変化が見られなかった。一方、52, 81 番目のスレオニン、および 72 番目のセリンを置換すると、野生型 TPO1 に比べ、過剰スペルミンによる増殖阻害からの回復が早くなったことから、スペルミンに対する耐性が増したと思われる。

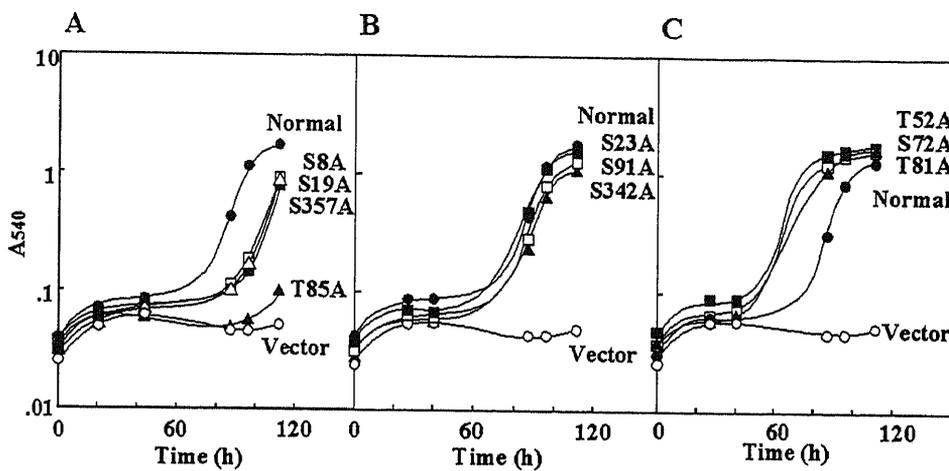


Fig. 2-12. Effect of putative phosphorylation sites on TPO1 by serine/threonine protein kinase on cell growth in the presence of spermine. Yeast cells transformed with normal TPO1 and mutated TPO1 genes were cultured in the presence of 0.35 mM spermine. A, cells that were more sensitive to spermine than normal TPO1 transformed cells. B, cells that were no effect on the sensitivity to spermine. C, cells that were more resistant to spermine than normal TPO1 transformed cells. Cell growth was followed by measuring A_{540} .

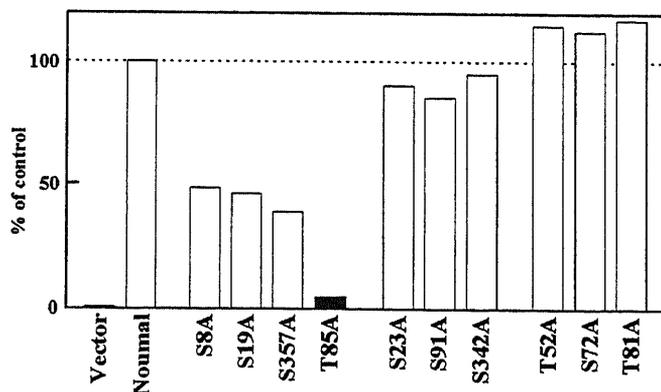


Fig. 2-13. Effect of putative phosphorylation sites on spermine uptake activity of TPO1. Cells were harvested at $A_{540} = 1.0$. 100% activity of normal TPO1-transformed cell was 131 pmol/min/mg dry weight.

これらの株を用いて、それぞれの株におけるスペルミン取り込み活性を測定したところ、上述

した実験結果を示唆する結果が得られた。Fig. 2-13 に示すが、スペルミンに対してより感受性を示した株 (S8A, S19A, S357A, T85A) では予想された通り、スペルミンの取り込み活性が低下しており、特に、T85A を導入した株では野生型 TPO1 の示すスペルミン取り込み活性がほぼ完全に消失していた。また、52, 81 番目のスレオニン、および 72 番目のセリンを置換した TPO1 を導入した株ではわずかではあるが、取り込み活性の上昇が見られた。

以上の結果から、TPO1 は複数の部位でリン酸化されることによってその輸送活性が調節されていることが示唆された。

【考察】

これまでの研究により、酵母におけるポリアミン取り込み活性は複数のセリン・スレオニンリン酸化酵素により活性調節を受けることが明らかとなっており、当研究室ではこれまでにセリン・スレオニンリン酸化酵素 PTK1 および PTK2 が、ポリアミン輸送欠損株 YTM22-8 株の輸送活性を回復させることを見出していた。しかし、YTM22-8 株はどの遺伝子に変異が起きているのか、また、両リン酸化酵素 PTK1, PTK2 が何をリン酸化しているのかについては全く不明であった。また、他研究室で同定されたセリン・スレオニンリン酸化酵素 NPR1 および SKY1 についても同様、どの蛋白質を標的とするのか分からなかった。

2000 年、Serrano らのグループにより、PTK2 の標的は細胞膜に存在するプロトン ATPase である PMA1 であることが明らかとなり(60)、これまで説明のつかなかった数々の問題が一気に片付いた。PTK2 遺伝子破壊株ではポリアミン取り込み活性が低下するだけでなく、ナトリウムやリチウムといった塩に対しても耐性を示し、また、細胞毒性を示す抗生物質にも耐性を示すことが実験の結果明らかとなっていた。PTK2 の変異により、細胞膜の membrane potential を形成している PMA1 のリン酸化が起こらなくなり、その結果、PMA1 の活性が抑制され、細胞膜上の membrane potential 依存的な輸送系の活性が全て阻害される。ポリアミンの取り込み活性が低下し、培地中の過剰なポリアミンに対して耐性を示すのはこのような理由によるものと考えられる。

しかし、今回同定した TPO1 は液胞膜上に存在するため、このような影響は受けないと思われる。恐らく、細胞膜上の蛋白質ではなく、液胞膜上の蛋白質を標的とするリン酸化酵素が存在するものと思われる。

最近の実験結果より、PTK1 遺伝子破壊株では導入した TPO1 遺伝子の影響により、過剰スペルミンに対し、耐性を示すのに対し、SKY1 遺伝子破壊株では導入した TPO1 遺伝子の影響が全く見られないことが明らかとなった。これは、SKY1 によって TPO1 のリン酸化が行われていることが示唆される。また、SKY1 は SR protein kinase と呼ばれる哺乳動物に存在するリン酸化酵素と相同性を持つことが知られている(61,62)が、詳細な機能については不明な蛋白質であることから、TPO1 を基質とする可能性に期待が持てる。

TPO1 の 85 番目のスレオニン付近は R-R-X-S/T というモチーフになっているが、これはセリン・スレオニン脱リン酸化酵素であるカルシニューリンの認識配列と一致する(63)。カルシニューリンは元々、神経細胞で初めてクローニングされたが、生体内に広く分布し、哺乳動物から酵母まで、そのアミノ酸配列は良く保存されている。また、機能が多彩であり、イオンホメオスタシス、エンドサイトーシス、細胞壁合成、細胞形態、細胞周期等に重要であり、細胞内シグナル伝達の多くを担っていると考えられている(64)。カルシニューリンはその基質特異性が狭く(65)、

また自身の分子内に自己阻害部位として同様のモチーフを持っていることから、TPO1 がカルシニューリンの標的になっている可能性は高いと考えられる。今後、リン酸化・脱リン酸化により TPO1 が輸送活性調節を受けていることを証明するために更なる検討が必要である。

参考文献

1. Tabor, C.W., Tabor, H. 1,4-Diaminobutane (putrescine), spermidine, and spermine. *Annu. Rev. Biochem.* **45**, 285-306 (1976).
2. Cohen, S.S. *A Guide to the Polyamines* (Oxford University Press, Oxford, 1998).
3. Russell, D.H., Levy, C.C., Schimpff, S.C., Hawk, I.A. Urinary polyamines in cancer patients. *Cancer Res.* **31**, 1555-1558 (1971).
4. Maas, W.K. Mapping of genes involved in the synthesis of spermidine in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* **119**, 1-9 (1972).
5. Cohn, M.S., Tabor, C.W., Tabor, H. Regulatory mutations affecting ornithine decarboxylase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **142**, 791-799 (1980).
6. Steglich, C., Scheffler, I.E. An ornithine decarboxylase-deficient mutant of Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* **257**, 4603-4609 (1982).
7. Tabor, C.W., Tabor, H. Polyamines. *Annu. Rev. Biochem.* **53**, 749-790 (1984).
8. Kashiwagi, K., Hosokawa, N., Furuchi, T., Kobayashi, H., Sasakawa, C., Yoshikawa, M., Igarashi, K. Isolation of polyamine transport-deficient mutants of *Escherichia coli* and cloning of the genes for polyamine transport proteins. *J. Biol. Chem.* **265**, 20893-20897 (1990).
9. Furuchi, T., Kashiwagi, K., Kobayashi, H., Igarashi, K. Characteristics of the gene for a spermidine and putrescine transport system that maps at 15 min on the *Escherichia coli* chromosome. *J. Biol. Chem.* **266**, 20928-20933 (1991).
10. Pistocchi, R., Kashiwagi, K., Miyamoto, S., Nukui, E., Sadakata, Y., Kobayashi, H., Igarashi, K. Characteristics of the operon for a putrescine transport system that maps at 19 minutes on the *Escherichia coli* chromosome. *J. Biol. Chem.* **268**, 146-152 (1993).
11. Sugiyama, S., Matsuo, Y., Maenaka, K., Vassilyev, D.G., Matsushima, M., Kashiwagi, K., Igarashi, K., Morikawa, K. The 1.8-Å X-ray structure of the *Escherichia coli* PotD protein complexed with spermidine and the mechanism of polyamine binding. *Protein Sci.* **5**, 1984-1990 (1996).
12. Sugiyama, S., Vassilyev, D.G., Matsushima, M., Kashiwagi, K., Igarashi, K., Morikawa, K. Crystal structure of PotD, the primary receptor of the polyamine transport system in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **271**, 9519-9525 (1996).
13. Kashiwagi, K., Pistocchi, R., Shibuya, S., Sugiyama, S., Morikawa, K., Igarashi, K. Spermidine-preferential uptake system in *Escherichia coli*. Identification of amino acids involved in polyamine binding in PotD protein. *J. Biol. Chem.* **271**, 12205-12208 (1996).
14. Kashiwagi, K., Suzuki, T., Suzuki, F., Furuchi, T., Kobayashi, H., Igarashi, K. Coexistence of the genes for putrescine transport protein and ornithine decarboxylase at 16 min on *Escherichia coli* chromosome. *J. Biol. Chem.* **266**, 20922-20927 (1991).
15. Porter, C.W., Miller, J., Bergeron, R.J. Aliphatic chain length specificity of the polyamine transport system in ascites L1210 leukemia cells. *Cancer Res.* **44**, 126-128 (1984).
16. Rinehart, C.A. J., Chen, K.Y. Characterization of the polyamine transport system in mouse neuroblastoma cells. Effects of sodium and system A amino acids. *J. Biol. Chem.* **259**, 4750-4759 (1984).
17. Murakami, Y., Matsufuji, S., Kameji, T., Hayashi, S., Igarashi, K., Tamura, T., Tanaka, K., Ichihara,

- A. Ornithine decarboxylase is degraded by the 26S proteasome without ubiquitination. *Nature* **360**, 597-599 (1992).
18. Sakata, K., Kashiwagi, K., Igarashi, K. Properties of a polyamine transporter regulated by antizyme. *Biochem. J.* **347**, 297-303 (2000).
 19. Maruyama, T., Masuda, N., Kakinuma, Y., Igarashi, K. Polyamine-sensitive magnesium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1194**, 289-295 (1994).
 20. Kakinuma, Y., Masuda, N., Igarashi, K. Proton potential-dependent polyamine transport by vacuolar membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1107**, 126-130 (1992).
 21. Kakinuma, Y., Maruyama, T., Nozaki, T., Wada, Y., Ohsumi, Y., Igarashi, K. Cloning of the gene encoding a putative serine/threonine protein kinase which enhances spermine uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **216**, 985-992 (1995).
 22. Nozaki, T., Nishimura, K., Michael, A.J., Maruyama, T., Kakinuma, Y., Igarashi, K. A second gene encoding a putative serine/threonine protein kinase which enhances spermine uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **228**, 452-458 (1996).
 23. 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. Life with 6000 genes. *Science* **274**, 546, 563-567 (1996).
 24. Kaouass, M., Audette, M., Ramotar, D., Verma, S., De Montigny, D., Gamache, I., Torossian, K., Poulin, R. The STK2 gene, which encodes a putative Ser/Thr protein kinase, is required for high-affinity spermidine transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 2994-3004 (1997).
 25. Kaouass, M., Gamache, I., Ramotar, D., Audette, M., Poulin, R. The spermidine transport system is regulated by ligand inactivation, endocytosis, and by the Npr1p Ser/Thr protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **273**, 2109-2117 (1998).
 26. Sayers, J. R., Krekel, C., Eckstein, F. Rapid high-efficiency site-directed mutagenesis by the phosphorothioate approach. *Biotechniques* **13**, 592-596 (1992).
 27. Braman, J., Papworth, C., Greener, A. Site-directed mutagenesis using double-stranded plasmid DNA templates. *Methods Mol. Biol.* **57**, 31-44 (1996).
 28. Hanahan, D. *Techniques for Transformation of E.coli*. (IRL Press, 1985).
 29. Oliver, D.B., Beckwith, J. Regulation of a membrane component required for protein secretion in *Escherichia coli*. *Cell* **30**, 311-319 (1982).
 30. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275 (1951).
 31. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685 (1970).
 32. Kashiwagi, K., Kuraishi, A., Tomitori, H., Igarashi, A., Nishimura, K., Shirahata, A., Igarashi, K. Identification of the Putrescine Recognition Site on Polyamine Transport Protein PotE. *J. Biol. Chem.* **275**, 36007-36012 (2000).
 33. Woolridge, D.P., Vazquez-Laslop, N., Markham, P.N., Chevalier, M.S., Gerner, E.W., Neyfakh, A.A. Efflux of the natural polyamine spermidine facilitated by the *Bacillus subtilis* multidrug

- transporter *Bl. J. Biol. Chem.* **272**, 8864-8866 (1997).
34. Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673-4680 (1994).
 35. Saitou, N., Nei, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406-425 (1987).
 36. Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., Kimura, A. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* **153**, 163-168 (1983).
 37. Ohsumi, Y., Anraku, Y. 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 (1981).
 38. Kaiser, C., Michaelis, S., Mitchell, A. *Methods in Yeast Genetics* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1994).
 39. Kohrer, K., Domdey, H. *Preparation of High Molecular Weight RNA* (ed. Guthrie, C., and Fink, G.R.) Academic Press, San Diego, California (1991).
 40. Suzuki, T., Sadakata, Y., Kashiwagi, K., Hoshino, K., Kakinuma, Y., Shirahata, A., Igarashi, K. Overproduction of S-adenosylmethionine decarboxylase in ethylglyoxal-bis(guanyl-hydrazone)-resistant mouse FM3A cells. *Eur. J. Biochem.* **215**, 247-253 (1993).
 41. Joho, M., Ishikawa, Y., Kunikane, M., Inouhe, M., Tohoyama, H., Murayama, T. The subcellular distribution of nickel in Ni-sensitive and Ni-resistant strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbios.* **71**, 149-159 (1992).
 42. Igarashi, K., Kashiwagi, K., Hamasaki, H., Miura, A., Kakegawa, T., Hirose, S., Matsuzaki, S. Formation of a compensatory polyamine by *Escherichia coli* polyamine-requiring mutants during growth in the absence of polyamines. *J. Bacteriol.* **166**, 128-134 (1986).
 43. Goffeau, A., Park, J., Paulsen, I.T., Jonniaux, J.L., Dinh, T., Mordant, P., Saier, M.H.Jr. Multidrug-resistant transport proteins in yeast: complete inventory and phylogenetic characterization of yeast open reading frames with the major facilitator superfamily. *Yeast* **13**, 43-54 (1997).
 44. Igarashi, K., Morris, D.R. Physiological effects in bovine lymphocytes of inhibiting polyamine synthesis with ethylglyoxal-bis(guanylhydrazone). *Cancer Res.* **44**, 5332-5337 (1984).
 45. Igarashi, K., Porter, C.W., Morris, D.R. Comparison of specificity of inhibition of polyamine synthesis in bovine lymphocytes by ethylglyoxal-bis(guanylhydrazone) and methylglyoxal bis(guanylhydrazone). *Cancer Res.* **44**, 5326-5331 (1984).
 46. Bowman, E.J., Siebers, A., Altendorf, K. Bafilomycins: a class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**, 7972-7976 (1988).
 47. Messenguy, F., Colin, D., ten Have, J.P. Regulation of compartmentation of amino acid pools in *Saccharomyces cerevisiae* and its effects on metabolic control. *Eur. J. Biochem.* **108**, 439-447 (1980).
 48. Okorokov, L.A., Letrikevich, S.B., Lichko, L.P., Mel'nikova, E.V. Vacuolar pool of magnesium in cells of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biol. Bull. Acad. Sci. USSR.* **5**, 638-640 (1978).
 49. Okorokov, L.A., Lichko, L.P., Kulaev, I.S. Vacuoles: main compartments of potassium, magnesium,

- and phosphate ions in *Saccharomyces carlsbergensis* cells. *J. Bacteriol.* **144**, 661-665 (1980).
50. MacDiarmid, C.W., Gaither, L.A., Eide, D. Zinc transporters that regulate vacuolar zinc storage in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **19**, 2845-2855 (2000).
 51. Nishimura, K., Yasumura, K., Igarashi, K., Kakinuma, Y. Involvement of Spt7p in vacuolar polyphosphate level of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **257**, 835-838 (1999).
 52. Tabor, C.W. Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* deficient in polyamine biosynthesis: studies on the regulation of ornithine decarboxylase. *Med. Biol.* **59**, 272-278 (1981).
 53. Ficker, E., Tagliatela, M., Wible, B.A., Henley, C.M., Brown, A.M. Spermine and spermidine as gating molecules for inward rectifier K⁺ channels. *Science* **266**, 1068-1072 (1994).
 54. Janz, R., Goda, Y., Geppert, M., Missler, M., Sudhof, T.C. SV2A and SV2B function as redundant Ca²⁺ regulators in neurotransmitter release. *Neuron* **24**, 1003-1016 (1999).
 55. Crowder, K.M., Gunther, J.M., Jones, T.A., Hale, B.D., Zhang, H.Z., Peterson, M.R., Scheller, R.H., Chavkin, C., Bajjalieh, S.M. Abnormal neurotransmission in mice lacking synaptic vesicle protein 2A (SV2A). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 15268-15273 (1999).
 56. Kashiwagi, K., Shibuya, S., Tomitori, H., Kuraishi, A., Igarashi, K. Excretion and uptake of putrescine by the PotE protein in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **272**, 6318-6323 (1997).
 57. Janz, R., Hofmann, K., Sudhof, T.C. SVOP, an evolutionarily conserved synaptic vesicle protein, suggests novel transport functions of synaptic vesicles. *J. Neurosci.* **18**, 9269-9281 (1998).
 58. Kashiwagi, K., Miyamoto, S., Suzuki, F., Kobayashi, H., Igarashi, K. Excretion of putrescine by the putrescine-ornithine antiporter encoded by the potE gene of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 4529-4533 (1992).
 59. Erez, O., Kahana, C. Screening for modulators of spermine tolerance identifies skyl1, the SR protein kinase of *Saccharomyces cerevisiae*, as a regulator of polyamine transport and ion homeostasis. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 175-184 (2001).
 60. Goossens, A., de La Fuente, N., Forment, J., Serrano, R., Portillo, F. Regulation of yeast H(+)-ATPase by protein kinases belonging to a family dedicated to activation of plasma membrane transporters. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 7654-7661 (2000).
 61. Yun, C.Y., Fu, X.D. Conserved SR protein kinase functions in nuclear import and its action is counteracted by arginine methylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell. Biol.* **150**, 707-718 (2000).
 62. Yeakley, J.M., Tronchere, H., Olesen, J., Dyck, J.A., Wang, H.Y., Fu, X.D. Phosphorylation regulates in vivo interaction and molecular targeting of serine/arginine-rich pre-mRNA splicing factors. *J. Cell. Biol.* **145**, 447-455 (1999).
 63. Kincaid, R.L., Nightingale, M.S., Martin, B.M. Characterization of a cDNA clone encoding the calmodulin-binding domain of mouse brain calcineurin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**, 8983-8987 (1988).
 64. Rusnak, F., Mertz, P. Calcineurin: form and function. *Physiol. Rev.* **80**, 1483-1521 (2000).
 65. Cohen, P. The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu. Rev. Biochem.* **58**, 453-508 (1989).

要 旨

【序論】ポリアミン（プトレスシン、スペルミジン、スペルミン）は、大腸菌からヒトまで普遍的に存在する生理活性アミンである。その生理的役割は多岐にわたるが、主に核酸、特に RNA と強く相互作用することにより、蛋白質および核酸の合成を促進し、細胞増殖因子として機能することが知られている。ポリアミンの細胞内濃度は生合成、分解、外界からの取り込み、および排出により厳密に調節されている。大腸菌のポリアミン輸送系は現在までに 3 種類見つかっており、2 種類の取り込み系と 1 種類の排出系から構成されている。2 種類の取り込み系は共に ATP 加水分解によりポリアミンを輸送する ABC (ATP binding cassette) トランスポーターであり、スペルミジンを優先的に取り込む PotA, B, C, D およびプトレスシンを特異的に取り込む PotF, G, H, I より成り、共にオペロンを形成している。基質輸送の第一段階である基質認識において、これらの輸送系ではペリプラズムに存在する基質結合蛋白質 PotD, PotF が重要な役割を果たす。PotD については先立って行われた X 線結晶解析および変異蛋白質を用いた解析により、その基質認識部位の詳細が明らかとなった。一方、プトレスシンを特異的に認識する PotF についてはその基質特異性および基質認識部位等、不明な点が多く、特にその基質特異性については非常に興味深い研究対象であった。また、大腸菌のポリアミン排出蛋白質である PotE は 12 回膜貫通型の膜蛋白質であり、プトレスシン・オルニチンアンチポーター活性によるプトレスシン排出活性および膜電位依存性プトレスシン取り込み活性を併せ持つユニークな輸送蛋白質であるが、その基質認識部位および基質特異性については不明であった。そこで本研究では第一に PotF における基質認識部位、および X 線結晶構造解析による高次構造を解明し、PotD, PotF 両蛋白質における基質認識機構の差異について検討を行った。また、PotE の基質認識部位についても検討を行い、3 種のポリアミン輸送系におけるプトレスシン認識の違いについて論じた。

一方、真核細胞においてはポリアミン輸送系本体が同定されておらず、そのため原核細胞に比べ研究が遅れていた。本研究では第二に酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用い、真核細胞ポリアミン輸送系の同定を試みた。また、同定した輸送蛋白質の基質認識部位、基質特異性および輸送活性調節機構についても検討した。

【結果・考察】

1. 大腸菌ポリアミン輸送蛋白質の基質認識

PotD と PotF はアミノ酸配列上、35%の相同性があり、そのポリアミン認識部位も類似していると考えられた。そこで PotF のプトレスシン認識に関与すると思われるアミノ酸残基を変異させた変異蛋白質を作製し、これらを用いてプトレスシンに対する結合活性およびプトレスシン輸送活性を測定した。その結果、両活性共に 3 個の酸性アミノ酸残基 (E185, D247, D278) および 2 個のトリプトファン残基 (W37, W244) が重要であることが明らかとなった。また X 線結晶解析により、プトレスシン-PotF 複合体の高次構造が明らかとなり、変異蛋白質を用いた解析の結果を裏付けるものとなった。

予想された通り、PotD と PotF の主鎖構造は非常によく似ていたが、基質を認識するクレフトの部分はプトレスシンのみを認識する PotF のほうが大きく、スペルミジンを認識できるだけのスペースは十分にあると考えられた。ところが PotF のプトレスシン認識には 4 個の水分子が非常に重要であり、これらの水分子が強固な水素結合を形成していることがスペルミジンを認識しない理由のひとつと推測された。

PotE の基質認識部位および活性に必要なアミノ酸残基も PotF と同様、部位特異的変異導入法による変異蛋白質の作製、およびそれらを用いた輸送活性測定による解析の結果、PotD, PotF と同様に酸性アミノ酸残基と芳香族アミノ酸残基が輸送活性に必須であることが明らかとなった。

大腸菌ポリアミン輸送系はいずれもプトレスシンを基質として認識する。そこでこれらの輸送系における基質認識の相違を解明するため、数種類のプトレスシン誘導体を用い、各々の輸送系におけるプトレスシン輸送に対する阻害効果を検討した。その結果、PotE における基質認識が最も厳密であることが明らかとなった。

2. 酵母ポリアミン輸送蛋白質遺伝子の同定および機能解析

2-1. ポリアミン輸送蛋白質遺伝子の同定

枯草菌 *Bacillus subtilis* にはスペルミジン輸送活性を持つ多剤排出蛋白質 BIt が存在する。この蛋白質とアミノ酸配列上、相同性を持つ蛋白質を酵母 *Saccharomyces cerevisiae* genome database より検索し、8 個の候補遺伝子をマルチコピーベクターにクローニングした。そしてこれらを導入した株についてスペルミンに対する感受性を検討したところ、4 個の遺伝子 (*YLL028w*, *YGR138c*, *YPR156c*, *YOR273c*) を導入した株においてスペルミンに対する著しい耐性が見られた。

またこれらはポリアミンの誘導体である MGBG (methylglyoxal bis(guanylhydrazine)) に対してはスペルミンと同様、耐性を示したが、2 価の金属カチオンであるコバルトおよびニッケルに対しては耐性を示さなかったことから、これらを酵母ポリアミン輸送蛋白質遺伝子 *TPO1*, *TPO2*, *TPO3*, *TPO4* と命名した。

TPO 遺伝子導入株のポリアミン取り込み活性を測定したところ、これらはいずれも親株に比べ取り込み活性が約 3 倍に上昇していた。一方、これらの遺伝子を破壊した株は親株に比べ、スペルミンに対して感受性を示した。また、ポリアミン取り込み活性も親株に比べ低下しており、*TPO1* 破壊株では約 50% も活性の低下が見られた。

これらの輸送蛋白質の基質特異性を検討するため、*TPO* 遺伝子破壊株のスペルミジンに対する感受性を検討した結果、*TPO1*、および *TPO4* 破壊株では親株に比べ感受性を示したものの、*TPO2*、および *TPO3* 破壊株では変化が見られなかった。また、取り込み活性を測定した結果、*TPO1*、および *TPO4* 破壊株でのみ親株に比べ活性の低下が見られた。従って、*TPO1* および *TPO4* はスペルミン、スペルミジン共に基質として認識するのに対し、*TPO2* および *TPO3* はスペルミン特異的であることが示唆された。

また *TPO* 遺伝子導入株、および *TPO* 遺伝子破壊株をスペルミン存在下で生育させ、細胞内スペルミン含量を測定したところ、親株に比べ *TPO* 遺伝子導入株ではスペルミンの増加が、*TPO* 遺伝子破壊株ではスペルミンの減少が見られた。同時にスペルミンの細胞内分布を測定した結果、細胞質のスペルミン含量は親株、*TPO* 遺伝子導入株、および *TPO* 遺伝子破壊株のいずれにおいても殆ど変化が見られなかったのに対し、液胞のスペルミン含量は親株に比べ、*TPO* 遺伝子導入株では増加、*TPO* 遺伝子破壊株では減少していた。

以上の結果より、*TPO1*, 2, 3 および 4 はいずれも酵母の液胞膜に存在する輸送蛋白質であることが示唆された。そこで *TPO1* 遺伝子導入、または破壊株より液胞膜を調整し、ポリアミン取り込み活性を測定したところ、*TPO1* 遺伝子導入株より調整した液胞膜では取り込み活性の上昇が見られ、*TPO1* 遺伝子破壊株より調整した液胞膜では低下していることが確認された。従って、今回同定された酵母ポリアミン輸送蛋白質 *TPO1*, 2, 3 および 4 は液胞膜に存在し、細胞質の過剰なポリアミンを液胞内に取り込む輸送蛋白質であることが明らかとなった。

2-2. TPO1 の基質認識部位

大腸菌ポリアミン輸送蛋白質の基質認識には共通して酸性アミノ酸残基が必須であることを前項で明らかにした。TPO1 のアミノ酸配列より 2 次構造を構築したところ、PotE と同様 12 回膜貫通型の膜蛋白質であること、また、PotE の活性中心に相当する位置に酸性アミノ酸残基を持つことを見出した。そこで部位特異的変異導入法により、これらの酸性アミノ酸残基を変異させた変異 TPO1 E207Q, E323Q, E324Q, E323Q/E324Q および E574Q を作製し、これらを導入した株を用いてポリアミンに対する感受性を検討した。その結果、TPO1 E207Q, E323Q/E324Q および E574Q を導入した株では野生型 TPO1 の示すポリアミン耐性がほぼ完全に消失した。

また、これらの株を用いてポリアミンの取り込み活性を測定したところ、上記の結果を支持する結果が得られた。以上の結果より、TPO1 の基質認識には大腸菌ポリアミン輸送蛋白質と同様、酸性アミノ酸残基が必須であり、また、その配置も原核・真核細胞を通じて保存されていることが示唆された。なお、これら 3ヶ所の酸性アミノ酸残基は TPO2, 3 および 4 においても保存が認められた。

2-3. TPO1 の輸送活性調節

酵母のポリアミン輸送に関しては輸送蛋白質本体より以前に、輸送を調節するセリン・スレオニンリン酸化酵素が複数同定されており、ポリアミン輸送蛋白質をリン酸化することで輸送活性を調節していることが示唆されていた。今回同定されたポリアミン輸送蛋白質 TPO1 のアミノ末端領域は親水性に富み、複数のリン酸化モチーフが見られる。また、他の親水性ループと予想される領域にもリン酸化モチーフが見られることから、TPO1 はリン酸化によって輸送活性調節を受けている可能性が示唆された。そこでこれら 10ヶ所に及ぶリン酸化部位を、部位特異的変異導入法を用いて変異 TPO1 を作製した。そしてこれらを導入した株についてスペルミンに対する感受性、およびポリアミン取り込み活性を測定したところ、変異 TPO1 T85A のみ著しい活性の消失が見られた。さらにこの部位はモチーフ検索により、セリン・スレオニン脱リン酸化酵素であるカルシニューリンの脱リン酸化モチーフであることが確認されたことから、TPO1 はリン酸化・脱リン酸化により、その輸送活性を調節されていることが示唆された。

【総括】大腸菌ポリアミン輸送蛋白質における基質認識には、共通して酸性アミノ酸残基が必須であることを明らかにした。酵母ポリアミン輸送蛋白質遺伝子 TPO1, 2, 3 および 4 を同定し、基質認識にはやはり酸性アミノ酸残基が必須であることを証明した。また TPO1 のポリアミン輸送活性はリン酸化・脱リン酸化によって調節を受けていることが示唆された。

主論文目録

本学位論文は下記の発表論文による。

1. Kashiwagi, K., Shibuya, S., Tomitori, H., Kuraishi, A., and Igarashi, K.: Excretion and uptake of putrescine by the PotE protein in *Escherichia coli*. *J.Biol.Chem.* **272**, 6318-6323 (1997)
2. Vassilyev, D. G., Tomitori, H., Kashiwagi, K., Morikawa, K., and Igarashi, K.: Crystal structure and mutational analysis of the *Escherichia coli* putrescine receptor: structural basis for substrate specificity. *J.Biol.Chem.* **273**, 17604-17609 (1998)
3. Vassilyev, D. G., Kashiwagi, T., Tomitori, H., Kashiwagi, K., Igarashi, K., and Morikawa, K.: Crystallization and preliminary X-ray analysis of the periplasmic receptor (PotF) of the putrescine transport system in *Escherichia coli*. *Acta Crystallogr.* **D54**, 132-134 (1998)
4. Tomitori, H., Kashiwagi, K., Sakata, K., Kakinuma, Y., and Igarashi, K.: Identification of a gene for a polyamine transport protein in yeast. *J.Biol.Chem.* **274**, 3265-3267 (1999)
5. Kashiwagi, K., Kuraishi, A., Tomitori, H., Igarashi, A., Nishimura, K., Shirahata, A., and Igarashi, K.: Identification of putrescine recognition site on polyamine transport protein PotE. *J.Biol.Chem.* **275**, 36007-36012 (2000)
6. Tomitori, H., Kashiwagi, K., Asakawa, T., Kakinuma, Y., Michael, A. J., and Igarashi, K.: Multiple polyamine transport systems on the vacuolar membrane in yeast. *Biochem. J.* **353**, 681-688 (2001)

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、数々の御指導、御鞭撻を賜りました五十嵐一衛教授に深謝致します。終始、直接の御指導を頂きました柏木敬子助手に感謝致します。また、数々の貴重な御助言を頂きました柿沼喜己助教授、西村和洋氏に感謝致します。

X線結晶構造解析を行っていただいた森川耿右博士（生物工学研究所）、Dmitry G. Vassiryev博士（理化学研究所播磨研究所）に、この場を借りてお礼を申し上げます。また、ポリアミン誘導体を御供与下さいました城西大学薬学部 白幡昌教授に感謝致します。

尚、本研究の一部は澁谷早苗氏（現大正製薬）、倉石愛子氏（現大正製薬）によって行われました。この場を借りてお礼を申し上げます。

最後に、多大な御協力を下さいました臨床化学研究室の皆様にも心より感謝致します。

本学位論文の審査は千葉大学薬学研究科で指名された下記の審査委員により行われた。

主査	千葉大学教授（薬学部）	薬学博士	五十嵐一衛
副査	千葉大学教授（薬学部）	薬学博士	齋藤和季
副査	千葉大学教授（薬学部）	薬学博士	山口直人
副査	千葉大学教授（薬学部）	薬学博士 医学博士	山本友子
副査	千葉大学助教授（薬学部）	薬学博士	細川正清