

平成23年度科学研究費助成事業（科学研究費補助金）実績報告書（研究実績報告書）

1. 機関番号

1	4	6	0	3
---	---	---	---	---

 2. 研究機関名 奈良先端科学技術大学院大学
3. 研究種目名 特別研究員奨励費 4. 研究期間 平成23年度～平成24年度
5. 課題番号

	2	3	・	7	9	8	0
--	---	---	---	---	---	---	---
6. 研究課題名 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と機能解析
7. 研究代表者

研究者番号	研究代表者名	所属部局名	職名
	にしだ 西田	いくひさ 郁久	バイオサイエンス研究科 特別研究員 (DC2)

8. 研究分担者(所属研究機関名については、研究代表者の所属研究機関と異なる場合のみ記入すること。)

研究者番号	研究分担者名	所属研究機関名・部局名	職名

9. 研究実績の概要

下欄には、当該年度に実施した研究の成果について、その具体的内容、意義、重要性等を、交付申請書に記載した「研究の目的」、「研究実施計画」に照らし、600字～800字で、できるだけ分かりやすく記述すること。また、国立情報学研究所でデータベース化するため、図、グラフ等は記載しないこと。

プロリンは生物において、細胞内浸透圧調節やレドックス制御などに関わり、細胞保護機能を有する。またプロリンはミトコンドリアで分解されて炭素源・窒素源・エネルギー源になる。しかしながら、ミトコンドリアにおけるプロリン輸送機構や生理的意義は明らかではなく、本研究では酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いてトランスポーターの同定を試みた。まず野生株 (BY4741) のミトコンドリアのアミノ酸を解析したところ、プロリンが検出された。さらに、ミトコンドリアにプロリンを添加して反応後に分析した結果、プロリンの分解物であるグルタミン酸の生成が確認された。また、¹⁴Cプロリンを用いてミトコンドリアのプロリン輸送活性を測定したところ、時間依存的な放射性上昇が見られた。これらのことから、酵母においてトランスポーターを介したプロリンの輸送経路が存在している可能性が初めて示された。さらに、プロリン合成系および輸送系遺伝子の両方の欠損により低濃度 (50 μM) プロリン添加最少培地では生育できない大腸菌変異株を用い、酵母ミトコンドリアトランスポーター遺伝子を導入時の生育の回復を指標にスクリーニングを行った。その結果、複数の候補遺伝子を取得しており解析を進めている。

一方、プロリンが高濃度に存在する細胞では、液胞へのプロリン蓄積が示唆されており、液胞のプロリントランスポーターの同定も試みた。これまでのスクリーニングで、AVT7破壊株をプロリン添加培地で培養すると細胞内プロリン含量が野生株に比べて低下するという興味深い現象を発見しており、どのようにしてAvt7が細胞内プロリン含量を制御しているかの解析を行っている。現在までに、Avt7とGFPの融合タンパク質が小胞体様の膜で局在していることや、AVT7遺伝子の破壊がアミノ酸代謝遺伝子の発現に影響している可能性を示唆する結果を得た。

10. キーワード

(1) トランスポーター	(2) プロリン	(3) アミノ酸	(4) ミトコンドリア
(5) 液胞	(6) オルガネラ	(7) 酵母	(8) 細胞内輸送

11. 現在までの達成度

下欄には、交付申請書に記載した「研究の目的」の達成度について、以下の区分により自己点検による評価を行い、その理由を簡潔に記述すること。また、国立情報学研究所でデータベース化するため、図、グラフ等は記載しないこと。
 <区分>①当初の計画以上に進展している。 ②おおむね順調に進展している。 ③やや遅れている。 ④遅れている。

(区分) ②おおむね順調に進展している。
(理由) 本研究の目的は酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> の細胞内オルガネラにおけるプロリントランスポーター同定とその輸送機構の解明である。現在までに、ミトコンドリアにおけるプロリンの存在と分解能、輸送の3点を確認した点では進展があった。しかしながらトランスポーターの同定には至っていないためやや遅れている。また、プロリンの細胞内濃度制御に関わると考えられる <i>AVT7</i> をスクリーニングから取得しておりアミノ酸代謝酵素遺伝子の発現やプロリン輸送活性測定を候補遺伝子欠損株や過剰発現株等で解析中である。Avt7 については、局在性や機能がわかりつつあり、おおむね順調に進展している。

12. 今後の研究の推進方策

本研究課題の今後の推進方策について簡潔に記述すること。研究計画の変更あるいは研究を遂行する上での問題点があれば、その対応策なども記述すること。また、国立情報学研究所でデータベース化するため、図、グラフ等は記載しないこと。

1. 酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> におけるミトコンドリアの新規プロリントランスポーターの探索 大腸菌変異株、単離ミトコンドリア、プロテオリポソーム等を用いて輸送活性測定を行い、ミトコンドリアにおけるトランスポーターを介したプロリン輸送機構の解明を目指す。
2. 出芽酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Avt7 の機能解析 細胞破碎液を分画するなどして Avt7 の局在を詳細に明らかにする。また、プロリンが細胞内で減少する原因をプロリンやその周辺の他のアミノ酸代謝に着目し、転写レベル、酵素活性レベルで解析を行う予定である。また、プロリンの細胞内輸送低下を検証するために <i>AVT7</i> 破壊株におけるプロリンの取り込み活性も測定する。

13. 研究発表（平成23年度の研究成果）

※ 「13. 研究発表」欄及び「14. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況」欄において記入欄が不足する場合には、適宜記入欄を挿入し、それによりページ数が増加した場合は、左端を糊付けすること。

〔雑誌論文〕 計 (0) 件 うち査読付論文 計 (0) 件

著者名		論文標題				
雑誌名	査読の有無	巻	発行年			最初と最後の頁
掲載論文の DOI (デジタルオブジェクト識別子)						

著者名		論文標題				
雑誌名	査読の有無	巻	発行年			最初と最後の頁
掲載論文の DOI (デジタルオブジェクト識別子)						

著者名		論文標題				
雑誌名	査読の有無	巻	発行年			最初と最後の頁
掲載論文の DOI (デジタルオブジェクト識別子)						

【学会発表】計(4)件 うち招待講演 計(0)件

発表者名	発表標 題		
○西田 郁久、戒能 智宏、大津 厳生、高木 博史.	出芽酵母に存在するミトコンドリア局在性プロリントランスポーターの探索.		
学会等名	発表年月日	発表場 所	
酵母遺伝学フォーラム第44回研究報告会	2011年9月5日	九州大学 (博多)	

発表者名	発表標 題		
○立橋 祐樹、田坂 侑美、戒能 智宏、西田 郁久、高木 博史.	酵母グルタミルキナーゼにおけるC末端領域の機能解析.		
学会等名	発表年月日	発表場 所	
酵母遺伝学フォーラム第44回研究報告会	2011年9月5日	九州大学 (博多)	

発表者名	発表標 題		
○筒井 健史、西田 郁久、高木 博史	出芽酵母のプロリンオキシダーゼPut1過剰発現株は様々なストレス条件下において弱くなるか? (※口頭およびポスター発表の両方を行った。)		
学会等名	発表年月日	発表場 所	
第29回イーストワークショップ	2011年11月11日	徳島文理大学 (香川)	

発表者名	発表標 題		
○西田 郁久、戒能 智宏、大津 厳生、高木 博史.	酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> におけるミトコンドリアの新規プロリントランスポーターの探索.		
学会等名	発表年月日	発表場 所	
2012年度農芸化学会大会	2012年3月25日	京都女子大学 (京都)	

【図 書】 計(0)件

著 者 名	出 版 社			
書 名			発 行 年	総ページ数

14. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

【出 願】 計(0)件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	出願年月日	国内・外国の別

【取 得】 計(0)件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	取得年月日	国内・外国の別
				出願年月日	

15. 備考

※ 研究者又は所属研究機関が作成した研究内容又は研究成果に関するwebページがある場合は、URLを記載すること。

<http://bsw3.naist.jp/takagi/>