

# 酵母の耐塩性に必須な液胞膜陽イオンチャネルの機能解明

浜本 晋

東北大学大学院工学研究科

## 概要

### 1. 研究目的

多くの真核生物に保存されている TRP (transient receptor potential) チャネルは温度や浸透圧などの環境変化を感知するセンサータンパク質として生理的に重要な役割を担っている。出芽酵母は TRPY1 と呼ばれる1つの TRP チャネルのみが存在している。これまでの電気生理学的解析により, *trpy1* 欠損酵母では液胞膜における内在性電流が大幅に減少することから TRPY1 が酵母液胞膜の主要な陽イオン輸送体であると考えられている。本研究では, イノシトールリン脂質による TRPY1 の活性化機構の解明をめざした。

### 2. 研究方法

TRPY1 のチャネル活性を解析するために出芽酵母を巨大化培養した後に巨大化液胞を取り出し, 電気生理学的手法であるパッチクランプ法を用いて TRPY1 のチャネル電流を測定した。さらに, 出芽酵母においてイノシトールリン脂質のリン酸化酵素遺伝子と脱リン酸化酵素遺伝子の各欠損株にイクオリン遺伝子を導入して液胞内から細胞質内への  $\text{Ca}^{2+}$  流入におけるイノシトールリン脂質の役割を検討した。

### 3. 結果・考察

高浸透圧ストレスによって生じる TRPY1 を介した細胞質への  $\text{Ca}^{2+}$  の流入にはホスファチジルイノシトール二リン酸 ( $\text{PI}(3,5)\text{P}_2$ ) が必要であることが報告されている。イノシトールリン脂質による TRPY1 の制御機構を明らかにするために,  $\text{PI}(3,5)\text{P}_2$ , ホスファチジルイノシトールリン酸 ( $\text{PI}(3)\text{P}$ ), ホスファチジルイノシトール ( $\text{PI}$ ) をそれぞれ細胞質側バッファーに投与してパッチクランプ実験を行ったところ,  $\text{PI}(3)\text{P}$  を処理した液胞膜において TRPY1 電流が半分ほどに減少した。次に, 出芽酵母においてイノシトールリン脂質のリン酸化酵素遺伝子と脱リン酸化酵素遺伝子の各欠損株にイクオリン遺伝子を導入して細胞質内への  $\text{Ca}^{2+}$  の流入を調べたところ, イノシトールリン脂質を脱リン酸化する SAC1 を欠損した酵母において細胞質内への  $\text{Ca}^{2+}$  の流入が消失した。以上より,  $\text{PI}(3)\text{P}$  によって TRPY1 の活性化が抑制されることが示唆された。

### 1. 研究目的

Transient receptor potential (TRP) チャネルは, 植物以外の多くの真核生物に保存されており, 哺乳類では 29 種類の TRP チャネル遺伝子が確認されている<sup>(1)</sup>。哺乳類の TRP チャネルは,  $\text{Ca}^{2+}$ , 還元剤, 一酸化窒素, ニコチン酸アデニンジヌクレオチドリン酸 (NAADP) などの化学物質によって直接的に活性化される。また, pH, 機械刺激, 浸透圧, 温度変化などの環境変化によっても活性が制御されるため, TRP チャネルは細胞におけるセンサーとしての

役割を担っている<sup>(2, 3)</sup>。出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) は TRPY1 と呼ばれる1つの TRP チャネルのみが存在している。酵母 TRPY1 は, 液胞膜に発現する陽イオンチャネルであり, さらに細胞質の  $\text{Ca}^{2+}$ , 還元剤, 膜張力, リン脂質などによってチャネルの活性が制御されることが報告されている<sup>(4-8)</sup>。また, *trpy1* 欠損株では液胞膜における内在性の陽イオン電流が大幅に減少することから TRPY1 が酵母液胞膜の主要な陽イオン輸送体であると考えられている<sup>(4)</sup>。さらに, 出芽酵母が高浸透圧ストレスに晒

されると液胞から細胞質内へ  $\text{Ca}^{2+}$  が流入することが報告されている<sup>(9)</sup>。出芽酵母の液胞は、細胞体積の七割程度を占める大きな細胞内小器官であることから、TRPY1 は細胞内のイオン恒常性の制御、高浸透圧ストレス応答、 $\text{Ca}^{2+}$  シグナリングなどの重要な働きを担っていることが推察される<sup>(10)</sup>。しかし、TRPY1 チャネルの活性制御機構の詳細は未だ明らかになっていない。そこで本研究では、巨大化酵母の液胞膜を用いたパッチクランプ法による電気生理学的解析によって TRPY1 チャネルの  $\text{Ca}^{2+}$ 、還元剤、ホスファチジルイノシトールリン酸 (PIP) による活性制御機構の解析を行った。さらに、TRPY1 による高浸透圧応答性の細胞質への  $\text{Ca}^{2+}$  流入を出芽酵母にイクオリンを導入して検討した。

## 2. 研究方法

### 2.1 TRPY1 発現ベクターの構築

出芽酵母のゲノム DNA を鋳型にして Prime Star polymerase (Takara) を用いて TRPY1 を増幅する PCR 反応を行い、得られた PCR 産物を出芽酵母の発現ベクター pKT10 の XhoI, SalI サイトに挿入した。本ベクターを鋳型として C17S, C61S, C79S, C104S/C132S, C179S/C191S, C624S の変異 TRPY1 を、2 ステップ PCR を行うことにより作成した。イクオリン遺伝子はウィスコンシン大学の Masson 博士より分与された。

### 2.2 巨大化酵母の液胞膜を用いたパッチクランプ実験

巨大化酵母を用いたパッチクランプ実験は矢部らの方法を用いた<sup>(11-13)</sup>。パッチクランプ実験には野生株として BJ5458 株 (*MATa ura3-52 leu2Δ1 lys2-801 his3Δ200 pep4::HIS3 prb1Δ1.6R can1 trp1 GAL*) と *trpy1* 欠損株として SH1006 株 (BJ5458  $\Delta$ *trpy1::LEU2*) を使用した。Zymolyase 20T を用いて対数増殖期の出芽酵母の細胞壁を除去してスフェロプラストを調整した。スフェロプラストを、細胞壁合成阻害剤を添加した培地を用いて一晩培養し、酵母の巨大化操作を行った。BJ5458 と SH1006 は YPD+1M sorbitol 培地を使用した。プラスミドを導入した SH1006 株は AHCW (0.17% yeast nitrogen base w/o amino acids and ammonium sulfate, 0.5% ammonium sulfate, 1% casamino acid “DAIGO”, 40 mg/L adenine sulfate, 40 mg/L tryptophan, 50 mM K-phosphate buffer (pH 5.5), 2% glucose)+1M sorbitol 培地を使用した。巨大

化酵母を低浸透圧溶液に晒すことで細胞膜を破裂させて巨大化した液胞を取り出した。巨大化液胞にパッチピペットを接触させ、ZAP パルス (10 msec, 1.2V) を印加して whole-vacuole mode による測定を行った。

### 2.3 イクオリンを用いた細胞質の $\text{Ca}^{2+}$ の検出

出芽酵母 BY47471 株 (*MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*) と BY4741 株の PIP キナーゼ遺伝子または PIP ホスファターゼ遺伝子を破壊した酵母にイクオリン遺伝子を導入し、5  $\mu\text{M}$  セレンテラジンを含む培地を用いて培養した。培養後、出芽酵母懸濁液を OD<sub>600</sub>=5.0 に調整した。酵母懸濁液に 5 mM BAPTA を添加して細胞外の  $\text{Ca}^{2+}$  をキレートした後に等量の 2 M sorbitol を添加して高浸透圧処理を行った。イクオリン発光は発光検出器を搭載したマルチプレートリーダーで測定した。測定は 2 M sorbitol を添加する 10 秒前から行った。

### 2.4 FM4-64 を用いた酵母液胞の形態観察

BY4741 株、PIP キナーゼ遺伝子である *FAB1* 遺伝子欠損株、PIP ホスファターゼ遺伝子である *SAC1* 遺伝子欠損株を、脂質蛍光指示薬 FM4-64 を用いて染色し、共焦点レーザー顕微鏡 LSM780 (Zeiss) を用いて野生株と *trpy1*, *sac1*, *fab1* の各変異株の液胞の形状を観察した。

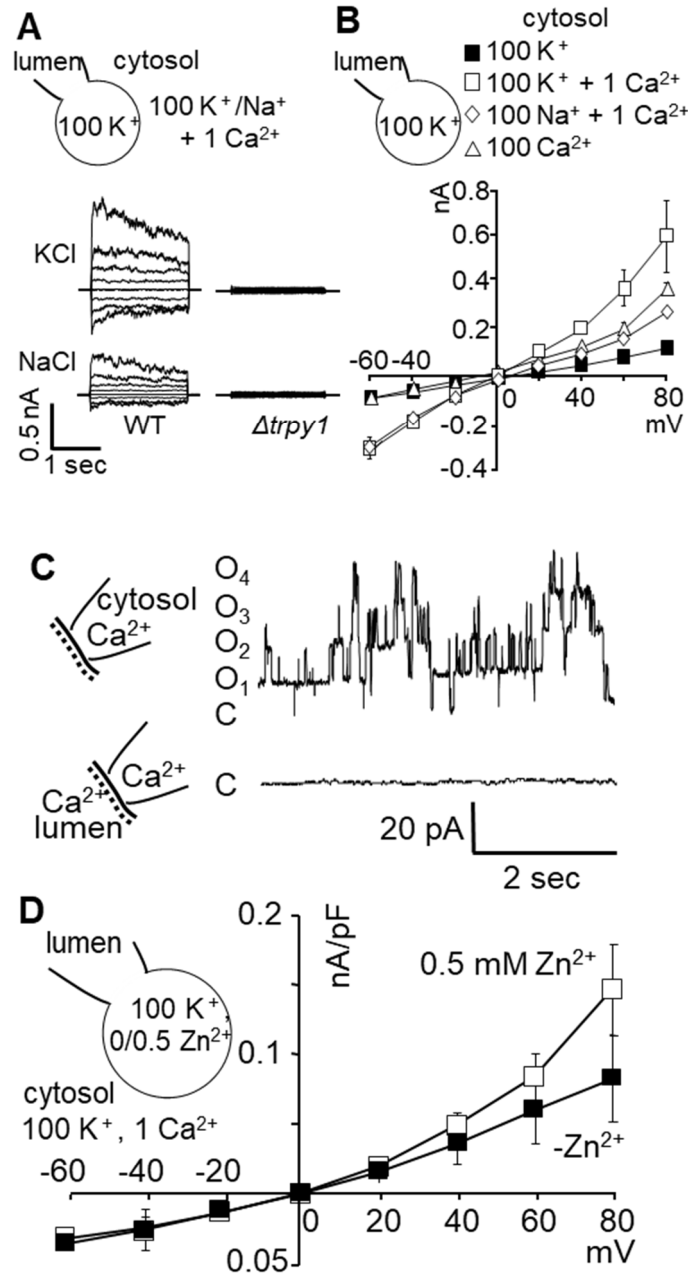
## 3. 研究結果と考察

### 3.1 液胞内の陽イオンによる TRPY1 の活性制御機構の解析

巨大化酵母の液胞膜を用いて whole-vacuole mode のパッチクランプ測定をバスバッファー (細胞質に該当) に 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  を加えて行ったところ、TRPY1 による  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  透過性の活性化電流が観察された (Fig. 1A, B)。次に、inside-out excised patch mode によりピペットバッファー (細胞質) に 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  が常に存在する条件で液胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  の有無による影響を検討したところ、TRPY1 のチャネル活性が消失した (Fig. 1C)。同様に液胞内に 1 mM  $\text{Zn}^{2+}$  を添加したところ、外向き電流 (細胞質から液胞内へのイオン輸送) のみが活性化した (Fig. 1D)。以上より TRPY1 は、細胞質の  $\text{Ca}^{2+}$  のみではなく液胞内の陽イオンによっても活性が制御されていることが示唆された。

### 3.2 還元剤による活性化機構の解析

TRPY1 の還元剤による活性化機構を検討するために、細胞質側に露出したシステイン (Cys) 残基をセリン (Ser)



**FIGURE 1.** Whole vacuole current elicited by a series of voltage step pulses (A, B) TRPY1 channel activity was regulated by luminal Ca<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> (C, D).

残基に置換した変異 TRPY1 チャンネルを作成して細胞質側に 1 mM Ca<sup>2+</sup>もしくは還元剤であるメルカプトエタノール (2ME)を添加して whole-vacuole mode によるチャンネル活性を測定した (Fig. 2A)。N 末端の細胞質領域に露出している Cys を Ser に置換してもチャンネル活性に変化は見られなかったが、C 末端の細胞質領域の Cys624 を Ser に置換した C624S を測定したところ 2ME による活性化が消失した (Fig. 2B-H)。一方、1 mM Ca<sup>2+</sup>による活性化は観察され

たことから C624S は還元剤による活性化機構のみに異常が生じたと考えられた。次に TRPY1 と C624S を excised patch mode によりチャンネルコンダクタンスを測定したところ、それぞれ 295 pS と 294 pS とほぼ同程度の値となった。しかし、C624S のチャンネル開口率が TRPY1 よりも大きく低下していた (Fig. 3A-C)。以上より、whole-vacuole mode において C624S のチャンネル活性が減少したのは開口率の低下が要因と考えられた。

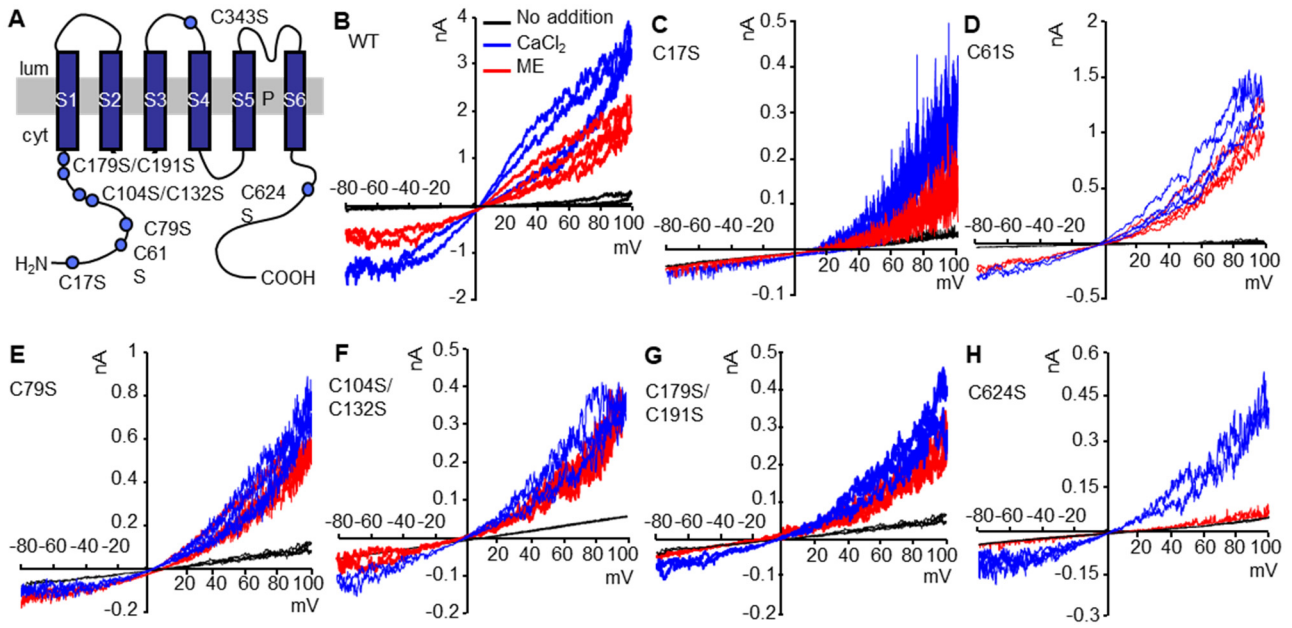


FIGURE 2. Mutation of a cysteine residue at C624 prevented channel activation by a reducing agent

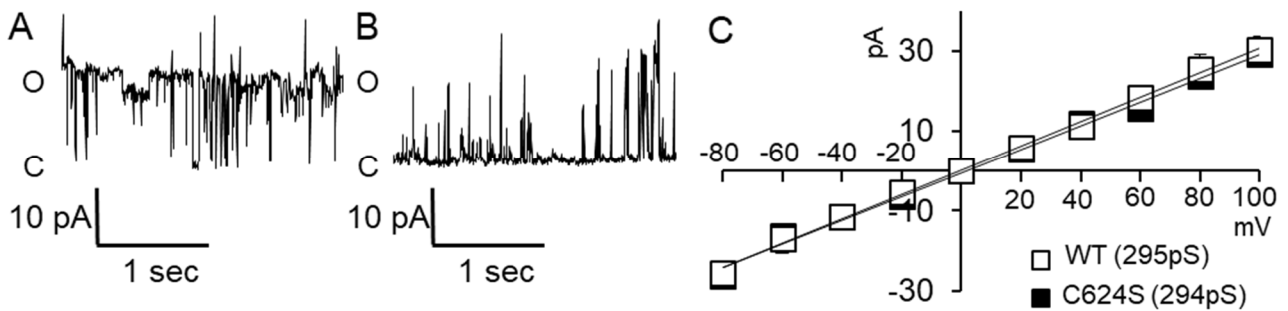


FIGURE 3. The C624S mutation did not alter single channel conductance after activation by cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$

### 3.3 ホスファチジルイノシトールリン酸による TRPY1 の 活性制御機構

TRPY1 の PIP による活性制御機構を検討したところ、ホスファチジルイノシトール (PI) とホスファチジルイノシトールニリン酸 (PI[3,5]P<sub>2</sub>) では活性に変化は見られなかったが、ホスファチジルイノシトールリン酸 (PI[3]P) の添加により、TRPY1 の活性化電流が半分ほどに減少した (Fig. 4)。次に、高浸透圧ストレスによって生じる TRPY1 を介した細胞質への  $\text{Ca}^{2+}$  流入における PIP の影響を検討するためにイノシトールリン脂質のリン酸化酵素遺伝子と脱リン酸化酵素遺伝子の各欠損株にイクオリン遺伝子を導入して細胞質への  $\text{Ca}^{2+}$  の流入を測定した。FABI 以外の脂質リン酸化酵素欠損株は野生株と同様の高浸透圧応答を示した

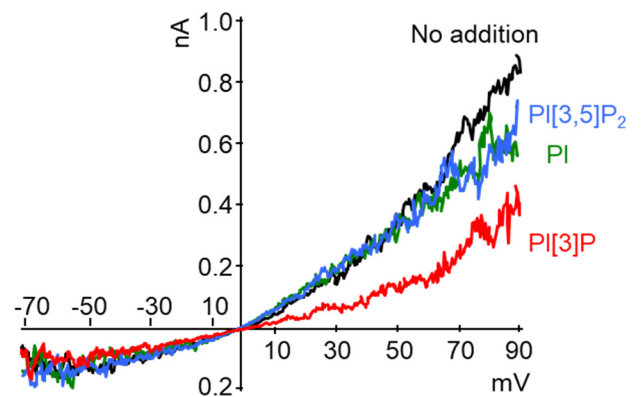


FIGURE 4. PI[3]P inhibited TRPY1 channel activity

が、PI[3]P、PI[4]P、PI[3,5]P<sub>2</sub>を脱リン酸化する *SAC1* を欠損した酵母において細胞質内への Ca<sup>2+</sup>の流入が消失した (Fig. 5A-C)。これまでに国外のグループによって PI[3]P をリン酸化して PI[3,5]P<sub>2</sub>を生合成するリン酸化酵素 FAB1 を欠失した変異株では TRPY1 を介した高浸透圧応答性の Ca<sup>2+</sup>流入が生じないことが報告されている<sup>(8)</sup>。以上より、PI[3]P の蓄積によって TRPY1 の活性化が抑制されることが示唆された。*fab1* 欠損株では野生株と比較して液胞が膨張することが報告されている<sup>(8, 14)</sup>。*fab1* 欠損株と同様に Ca<sup>2+</sup>流入が生じない *sac1* 欠損株の液胞を、蛍光色素 FM4-64 を用いて染色し、形態観察を行った。その結果、*sac1* 欠損株の液胞は小さく断片化されており、野生株と *fab1* 欠損株とも異なる形状であった (Fig. 6)。

### 3. 4 細胞骨格による高浸透圧応答への関与

高浸透圧応答性の液胞から細胞質への Ca<sup>2+</sup>の流入は、出芽酵母が高浸透圧環境に晒されてから 30~60 秒以内に生じる比較的早い応答である<sup>(9)</sup>。そのため、細胞膜において高浸透圧環境を感知して液胞膜へのシグナル伝達は遺伝子発現などではなく直接的な機械刺激であることが推察された。これまでに細胞膜と液胞膜がアクチン線維によって繋がっていることが報告されている<sup>(15)</sup>。高浸透圧シグナルが細胞骨格などによって伝達されている可能性を踏まえ、アクチン線維形成の阻害剤であるサイトカラシン D もしくは微小管形成の阻害剤であるノコダゾールで処理した出芽酵母の高浸透圧応答を観察した。その結果、ノコダゾール処理した出芽酵母では高浸透圧応答性の細胞質への Ca<sup>2+</sup>流入が低下したことを見出した (Fig. 7A-C)。したがって、出芽酵母における TRPY1 を介した高浸透圧応答に微小管が関与していることが示唆された。

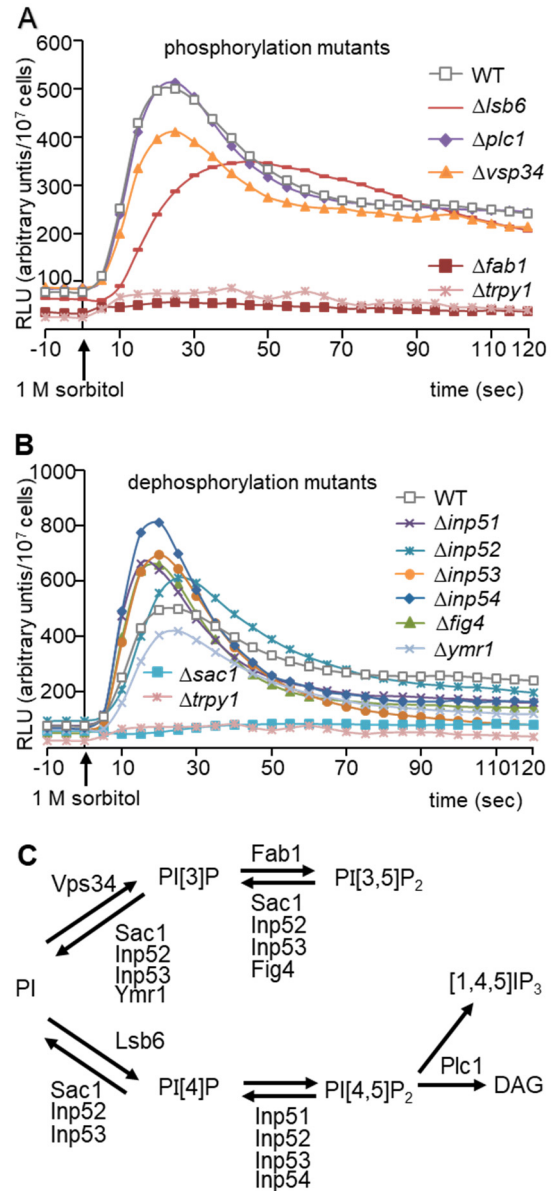


FIGURE 5. Hyper-osmotic stress-induced Ca<sup>2+</sup> increase in the cytosol was measured in yeast strains defective in phosphatidylinositol phosphate kinases or phosphatases and expressing the Ca<sup>2+</sup> sensor aequorin

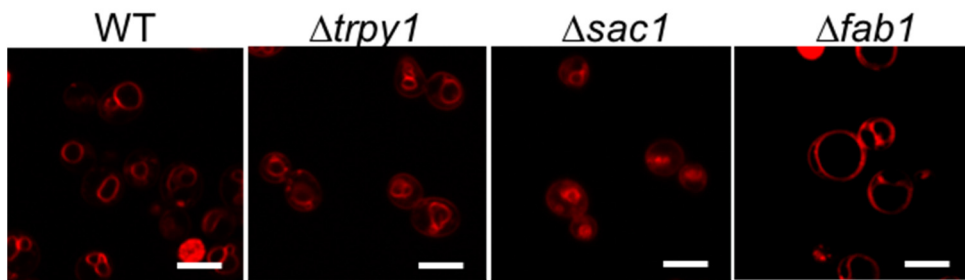
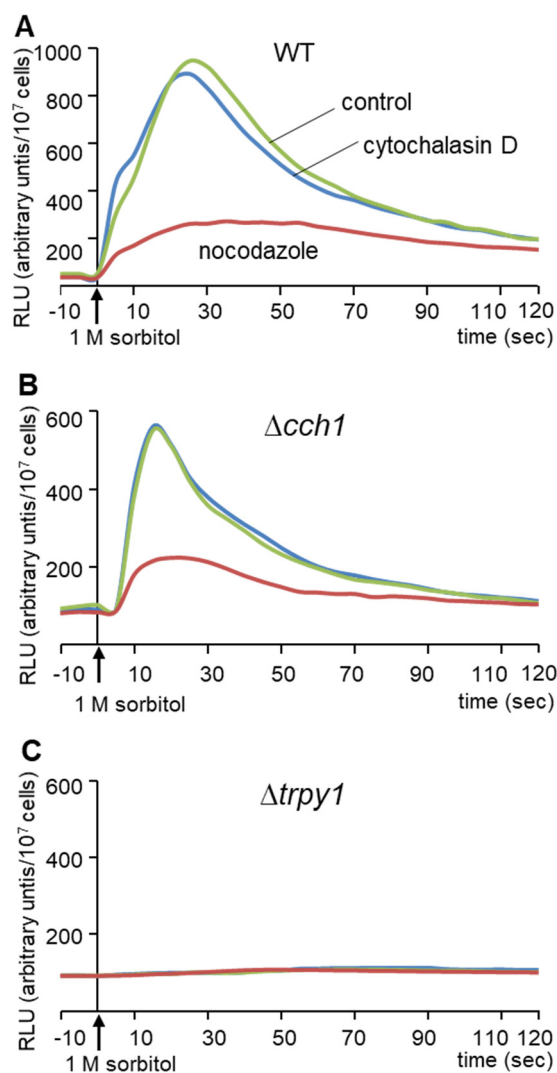


FIGURE 6. Morphological changes in vacuole morphology in WT,  $\Delta trpy1$ ,  $\Delta sac1$  and  $\Delta fab1$  strains



**FIGURE 7.** Microtubule polymerization was required for hyper-osmotic stress induced  $\text{Ca}^{2+}$  release

#### 4. 今後の課題

本研究において液胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  が TRPY1 の活性を抑制することを見出したが、 $\text{Ca}^{2+}$  による抑制の作用機序の解明が必要である。植物細胞の液胞膜に発現する  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルも同様に高濃度の液胞内  $\text{Ca}^{2+}$  によって活性が抑制されることが報告されている<sup>(16)</sup>。本阻害機構の解明は多くの生物種の  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル研究に寄与すると考えられる。

パッチクランプ実験において PI[3]P によって TRPY1 の活性が抑制され、また、PI[3]P の蓄積が推測される *sac1* 変異株において高浸透圧応答性の  $\text{Ca}^{2+}$  流入が消失した。*sac1* 変異株と同様に高浸透圧応答性が消失する *fab1* 変異株は液胞が巨大化するのに対して *sac1* 変異株では液

胞の巨大化は観察されず、むしろ液胞の断片化が確認された。このことから、液胞の形態と TRPY1 のチャンネル活性は関連していないと考えられる。これまでの研究においてカビの TRP チャンネルである TRPGz の C 末端領域に PI[3,5]P<sub>2</sub> が結合し、C 末端領域のコンフォメーション変化が TRPGz の活性に重要であることが見出されている<sup>(17)</sup>。TRPY1 においても PI[3]P の C 末端領域への結合が推測される。今後は生化学的な実験による PI[3]P の TRPY1 への結合解析が必要とされる。

微小管が関わる高浸透圧応答において、微小管が液胞膜と相互作用してシグナルを TRPY1 に伝達しているのか TRPY1 と直接相互作用しているのか不明である。今後は TRPY1 の活性化メカニズムのさらなる研究が必要である。

#### 5. 文献

1. Clapham, D. E. (2003) TRP channels as cellular sensors. *Nature*. **426**, 517–524
2. Gees, M., Colsoul, B., and Nilius, B. (2010) The role of transient receptor potential cation channels in  $\text{Ca}^{2+}$  signaling. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**, 1–31
3. Kozai, D., Ogawa, N., and Mori, Y. (2014) Redox regulation of transient receptor potential channels. *Antioxid. Redox Signal.* **21**, 971–86
4. Palmer, C. P., Zhou, X. L., Lin, J., Loukin, S. H., Kung, C., and Saimi, Y. (2001) A TRP homolog in *Saccharomyces cerevisiae* forms an intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable channel in the yeast vacuolar membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 7801–5
5. Chang, Y., Schlenstedt, G., Flockerzi, V., and Beck, A. (2010) Properties of the intracellular transient receptor potential (TRP) channel in yeast, Yvc1. *FEBS Lett.* **584**, 2028–32
6. Bertl, A., and Slayman, C. L. (1990) Cation-selective channels in the vacuolar membrane of *Saccharomyces*: Dependence on calcium, redox state, and voltage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **87**, 7824–7828
7. Wada, Y., Ohsumi, Y., and Tanifuji, M. (1987) Vacuolar ion channel of the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **1**, 17260–17263

8. Dong, X., Shen, D., Wang, X., Dawson, T., Li, X., Zhang, Q., Cheng, X., Zhang, Y., Weisman, L. S., Delling, M., and Xu, H. (2010) PI(3,5)P(2) controls membrane trafficking by direct activation of mucolipin Ca<sup>2+</sup> release channels in the endolysosome. *Nat. Commun.* **1**, 38
9. Haynes, W. J., Zhou, X.-L., Su, Z.-W., Loukin, S. H., and Kung, Y. S. and C. (2009) Indole and other aromatic compounds activate the yeast TRPY1 channel. *582*, 1514–1518
10. Su, Z., Zhou, X., Haynes, W. J., Loukin, S. H., Anishkin, A., Saimi, Y., and Kung, C. (2007) Yeast gain-of-function mutations reveal structure-function relationships conserved among different subfamilies of transient receptor potential channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 19607–19612
11. Yabe, I., Horiuchi, K., Nakahara, K., Hiyama, T., Yamanaka, T., Wang, P., Toda, K., Hirata, A., Ohsumi, Y., Hirata, R., Anraku, Y., and Kusaka, I. (1999) Patch Clamp Studies on V-type ATPase of Vacuolar Membrane of Haploid *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* **274**, 34903–34910
12. Nakanishi, Y., Yabe, I., and Maeshima, M. (2003) Patch Clamp Analysis of a H<sup>+</sup> Pump Heterologously Expressed in Giant Yeast Vacuoles. *J. Biochem.* **134**, 615–623
13. Hamamoto, S., Marui, J., Matsuoka, K., Higashi, K., Igarashi, K., Nakagawa, T., Kuroda, T., Mori, Y., Murata, Y., Nakanishi, Y., Maeshima, M., Yabe, I., and Uozumi, N. (2008) Characterization of a tobacco TPK-type K<sup>+</sup> channel as a novel tonoplast K<sup>+</sup> channel using yeast tonoplasts. *J. Biol. Chem.* **283**, 1911–20
14. Phelan, J. P., Millson, S. H., Parker, P. J., Piper, P. W., and Cooke, F. T. (2006) Fab1p and AP-1 are required for trafficking of endogenously ubiquitylated cargoes to the vacuole lumen in *S. cerevisiae*. *J. Cell Sci.* **119**, 4225–4234
15. Knoblach, B., and Rachubinski, R. a. (2015) Sharing the cell's bounty - organelle inheritance in yeast. *J. Cell Sci.* **128**, 621–630
16. Pei, Z.-M., Ward, J. M., and Schroeder, J. I. (1999) Magnesium Sensitizes Slow Vacuolar Channels to Physiological Cytosolic Calcium and Inhibits Fast Vacuolar Channels in Fava Bean Guard Cell Vacuoles. *Plant Physiol.* **121**, 977–986
17. Ihara, M., Hamamoto, S., Miyanoiri, Y., Takeda, M., Kainosho, M., Yabe, I., Uozumi, N., and Yamashita, A. (2013) Molecular bases of multimodal regulation of a fungal transient receptor potential (TRP) channel. *J. Biol. Chem.* **288**, 15303–15317

## Characterization of Yeast Vacuolar Cation Channel which Confers Salt Tolerance

Shin Hamamoto

Tohoku University

### Summary

Single copy of transient receptor potential (TRP) channel gene *TRPY1*, are conserved in *Saccharomyces cerevisiae* genome and the gene product localizes in the vacuolar membrane. TRP channel is widely conserved in most eukaryotic cells, except plants, and fungal TRP channel is considered as one of the ancestor TRP channels. Although knowledge of TRPY1 has increased, their property and their regulatory mechanism remains to be elucidated. Here we elucidate TRPY1 channel function in vitro and in vivo. Patch clamp recording on TRPY1 in yeast vacuole membrane shows that luminal  $\text{Ca}^{2+}$  inhibited TRPY1-mediated channel activity, whereas luminal  $\text{Z}^{2+}$  increased the currents. Among eight cysteines facing to cytosolic side, cysteine at position 624 are identified as a target residue for activation of the channel with mercaptoethanol, which is irrespective of the presence of cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$ . TRPY1 was activated by addition of phosphatidylinositol [3] phosphate (PI[3]P) in the cytosolic side but not by those of PI and PI[3,5]P. This was supported by measurement of transient  $\text{Ca}^{2+}$  increase due to upshock using several yeast mutants defect for phosphatidylinositol phosphate biogenesis, and by the observation of abnormal vacuole phenotype of the related mutants. The transient cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  increase was markedly eliminated by addition of tubulin inhibitors. Taken together, the data represents that tonoplast TRPY1 likely mediate perception of the cytosolic signals elicited by external hyperosmolarity changes and modulate cytosolic calcium signaling through the  $\text{Ca}^{2+}$  release from vacuole.