

- 11) von Lintig J, Dreher A, Kiefer C, Wernet MF, Vogt K (2001) Analysis of the blind Drosophila mutant *ninaB* identifies the gene encoding the key enzyme for vitamin A formation *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 1130-1135
- 12) Lampert JM, Holzschuh J, Hessel S, Driever W, Vogt K, von Lintig J (2003) Provitamin A conversion to retinal via the, β -carotene-15,15'-oxygenase (*bcox*) is essential for pattern formation and differentiation during zebrafish embryogenesis. *Development* **130**, 2173-2186
- 13) Bachmann H, Desbarats A, Pattison P, Sedgewick M, Riss G, Wyss A, Cardinault N, Duszka C, Goralczyk R, Grolier P (2002) Feedback regulation of β , β -carotene 15,15'-monooxygenase by retinoic acid in rats and chickens. *J Nutr* **132**, 3616-3622
- 14) Boulanger A, McLemore P, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Yu SS, Gentleman S, Redmond TM (2003) Identification of beta-carotene 15, 15'-monooxygenase as a peroxisome proliferator-activated receptor target gene. *FASEB J* **17**, 1304-1306

出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中で見い出されたビタミン B₆輸送タンパク質

ビタミンは多くの生物にとって必須である。このうち、ほとんどの水溶性ビタミンもしくはその誘導体は各種酵素の補酵素として重要な役割を果たしている¹⁾。ビタミン B₆(B₆)の補酵素型であるピリドキサール 5'-リン酸 (PLP) は、アミノ酸等のアミノ化合物の代謝において中心的役割を果たしている。さらに、*Cercospora nicotianae*²⁾ 等のカビや酵母で、B₆そのものが一重項酸素のクエンチャーライズとして生理的に作用することが示された。また、化学的に B₆がビタミン C や E といったよく知られている抗酸化物質と同程度の効果をもつということも示されている³⁾。

酵母は B₆を獲得するために、2つの経路を利用している。1つは D-グルコースを変換し、B₆を合成する *de novo* 生合成経路、もう一つは細胞外からピリドキサール (PL)、ピリドキシン (PN)、ピリドキサミン (PM)を取り込む経路である。酵母の B₆生合成経路は大腸菌とは異なり、SNZ(あるいは *PDX*) 遺伝子と SNO(あるいは *PDX2*) 遺伝子が関与していることが明らかとなっている。

B₆の取り込みについては *Saccharomyces carlsbergensis* でよく研究されており、Shane と Snell らによると B₆に対して 2つの高親和性輸送経路があることが報告されている⁴⁾。また、分裂酵母にも PN 能動輸送系が存在する⁵⁾。これらの結果は、細胞外からの B₆の取り込みに関与するタンパク質の存在を示唆しているが B₆(PN)輸送に関わるタンパク質はこれまで証明されていなかった。最近、J. Stoltz と M. Vielreicher によって *Saccharomyces cerevisiae* に B₆輸送タンパク質の存在が示され、その構造と性質が明らかにされるとともに、そのタンパク質が原形質膜に存在することが示された⁶⁾。

J. Stoltz らは SNZ と SNO 遺伝子を欠損し、PN 要求性となった酵母をさらにメチルスルホン酸によって突然変異を起こさせた変異株の中から、低濃度の PN 存在下では増殖できない変異株をスクリーニングした。劣性変異株(*tppn1-1*)とアレル変異株(*tppn1-3*)が得られ、ともに野生株に比べ低い PN 取り込み活性しか示さなかった。アレル変異株をゲノムライブラリーを用いて相補させ、PN 輸送タンパク質をコードする遺伝子(*Tppn1*)を決定した(図 1)。*Tppn1* タンパク質(*Tppn1p*)は 12 の膜貫通ドメインを持つタンパク質で、ホモロジー検索の結果、*S. cerevisiae* 由来アデニン、グアニン、シトシン輸送タンパク質(*Fcy2p*)と 29 %、*Kluyveromyces marxianus* 由来機能未知タンパク質(*Pcp13p*)と 58 % の相同性を示す。

得られた 2つの PN 輸送変異株のうち、*tppn1-1* は 203 番目のグリシンがグルタミンに変異し、*tppn1-3* は 207 番目のバリンがメチオニンに変異していた。203 番目のグリシンは既知の purine-cytosine permease family で保存性の高いアミノ酸残基であり、この変異は本トランスポーターの活性を低下させたと考えられた。V207M の変異も同様に活性を低下させた。

Tpn1p	1	M-NRDNMDTTKRKEDHTKHTTDVIEFYEEGTAASSLNATEKANSSPSILRRIINRAA
Pcp13p	1	YNPNAESDIEIVSNLNSDSGRETKTELDVETNTEVEVKTHFDVGDSFFHSLVRTAREI
Fcy2pC	1	MLEEGNNVYEIQDLEKRSPVIGSSLNEKKVAASETFTATSEDDQOYIVESSEATKL
		SWF
Tpn1p	60	SKKVDAMGVESTGIORISPYERGTSK-KQFLHVAGLWFSATGGLSSMSSFLGPILLFGI
Pcp13p	61	SRKIDALGVETRGIORIEPYEREHQSSRQLLHIIGLWFSAASGLSSMSSYFLGPIIYELE
Fcy2pC	61	HKFFASLNAETKGVEPVTEDEKTDDS—ILNAASMMFSANMVIASYALGALGPINVFGLN
		II
Tpn1p	119	FRESVASSLISVTIGCLIAAYCSIMGPQSGCRQMVARYLFGMWVFVKLVALASIIGVMGW
Pcp13p	121	FROALTCGLISMWIGCFFAAYLATMGPQSGCRQVLVTARYLFGMWLVKFIGLMIAIIGMGW
Fcy2pC	118	FGQSVLVIIFNIMGLIFVFAFFSVFGAELGLRQMLILSRYLVGNVTARIFSLINVACVGM
		IV
Tpn1p	179	SVVNSVVGGENLAAISND—KVPLWVGIVIVTVCSFLVAIFGIKQVIVKVELSVPVLT
Pcp13p	181	SVVNCVWLAERCLQPLVYG—KIPIWIGIIIVTLVSFFVAIFGIKQVLRATELFSIPVLT
Fcy2pC	178	GIVNTSVSAQLLMMVNEGSGHVCPIWAGCLIIIGGTVLVTFGYSVIHAYEKWSWPNFA
		VI
Tpn1p	236	AFLLLYISSSDKYSFVNAYVSKGMNLDSSTRKGNNMSFFSLCYSITATWGSITADYYILFP
Pcp13p	239	SFLLLYISASDKFKYANDYKND—SLVSRTYTGYNLSSFLCYSITSTWGSITADYYILFP
Fcy2pC	238	VFLVIIAQLSRSGKFKGGEWVG—GATTAGSVLSFGSSIFGFAAGWTTYAADYTVYMP
		VII
Tpn1p	296	EDTPYIQLFCILFFFGLPTCFVGILGLLLASVAMSYPKWSVEYDSHGMGGLWAGFQR-
Pcp13p	298	EDTPKMQVFMITFLGIGIPATFVGVLGLLLASVAMSYPWMDLYDSYGMGGLHAGFER-
Fcy2pC	294	KSTINKYKIFFSLVAGLAFPLFFTMLGAASAMAALNDPTWKAYYDKNAMGGVIVAIVPN
		IX
Tpn1p	355	-WNGFGKFCVVVLVFSLVSNNIINTYSAAFSIQLSSVFCAKIPRMFWSVCTIICLVCAL
Pcp13p	357	-WGGFGKFCVVILVLSLISNNIINTYSAAFSIQLAGEILFKVPRMFWAIACTVFYFVCAL
Fcy2pC	354	SLNGFGQFCVLLALSTIANNIPNNMYTVALSAQALWAPLAKIPRVVWTMAGNAATLGISI
		X
Tpn1p	414	IGRNHFSTILGNFLPMIGYWISMYFILLFEEN-LVFRFFFHLHYTKEFPTVTGEINGPEL
Pcp13p	416	VGRNSFSDILGNFLPMIGYWMSLYFILOQVRREPYFQKAFSHLYTKEFPMVTKPAORWSL
Fcy2pC	414	PATYYFDGFMEFNIDSIGYIYIAISCSEHFFYRRSFSA
		XI
Tpn1p	473	V6SSKEVEKDAVTNHLLKRKHVKTHRYNMDKWEDEYEVLTGHYATFAFIVGVAGVVVG
Pcp13p	476	KN—IP—KRTHNNNNNNNDPNVITRGLAATAAFWIVGVVGAVMG
Fcy2pC	455	—Y—NIDDDDNWEHLP1GIAAGTAALIVGAFGVALG
		XII
Tpn1p	533	MAQAYWIGPIAAKFGEYGGDVAMMLSMASFSGVYPPORYLELRKFGR
Pcp13p	515	WCOTYYVGPISSKIGDNGGDIGSMGLGMAFACVYPPRLRYLELKKFGR
Fcy2pC	487	WCOTYWWGEIGRLIGKYGGDIGFELGASWAFIYNIILRPLELKYFGR

図1. ピリドキシン輸送タンパク質の一次構造とプリン-シトシントランスポーターのアライメント *S. cereviciae* 由来 B₆ トランスポーター Tpn1p, プリン-シトシントランスポーター Fcy2p と *K. marxianus* 由来 Tpn1p ホモログ Pcp13 の一次構造の比較. ローマ数字で示された領域は Tpn1p の膜貫通ドメインを示す(詳細は文献 6 を参照).

Tpn1p の PN 取り込み活性は pH 7.0 で 50 % 低下した. 酸性 pH(pH 4.0) で PN に対して高い親和性を示した($K_m = 0.55 \text{ mM}$). また, PL, PM, 4-デオキシリドキシン(4-DPN)は Tpn1p による PN の輸送を阻害した. これは Tpn1p が PN に加えて PL と PM の輸送にも関与していることを示唆している. また, Tpn1p と B₆ 生合成系の酵素を欠損している酵母は PN を添加しなくとも, 高濃度の PN を添加するか, PN と同じく高濃度の PL, あるいはそれよりもさらに 10 倍以上の高濃度の PM を添加すれば増殖した. この結果は, 本酵母には Tpn1p 以外の遊離型 B₆ トランスポーターは存在しないことを示唆している. Tpn1p による PN 輸送はプロトノフォアである CCCP(carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone) によって強く阻害されたことから, 本輸送タンパク質はプロトンシンポーター

であることが示唆された。TPN1 遺伝子は培地中の PN 濃度によって発現レベルが変化し、2 μM 以下の PN 存在下で最大に発現された。ただし、2 μM の PN 存在下でもわずかな発現は認められた。本報告以前の研究で、TPN1 遺伝子の発現が窒素源の枯渇やアミノ酸の欠乏、ヒスチジン生合成阻害剤である 3-amino-1,2,4-triazole(3-AT)などにより誘導されることや、定常期に誘導されることがわかっている⁷⁾。3-AT による誘導は転写因子 Gcn4p が関与していることが知られている⁸⁾、TPN1 遺伝子のプロモーター部位にこの Gcn4p 結合モチーフが存在していることがわかった。したがって、Tpn1p の発現をもこの Gcn4p による誘導を受けていることを示唆している。Gcn4p が SNZ1 遺伝子の発現も誘導することが知られており、アミノ酸欠乏において、アミノ酸代謝に必要とされる B₆ の細胞内レベルを上げることはアミノ酸を有效地に利用する上で必要なかもしない。

B₆ 輸送タンパク質の一次構造が同定され、B₆ 輸送様式についての詳細が明らかになることが期待される。しかしながら、Tpn1p の構造と機能が明らかになったとしても、①PN の能動輸送をおこなう分裂酵母(*S. pombe*)中に Tpn1p 類似遺伝子が見つからないこと、②*S. carlsbergensis* で報告されている PM トランスポーター⁴⁾が本論文で見いだされていないこと、③本論文と異なり、分裂酵母では対数増殖期前期に PN 輸送活性が最大になること⁵⁾は説明できない。したがって、今後、Tpn1p 以外のトランスポーターが、少なくとも酵母で発見される可能性が残されている。

Snell らによって B₆ 輸送タンパク質の存在が報告されて数十年たった今、その遺伝子が明らかとなり、B₆ 研究に新たな知見が追加された。今後、さらに研究が進み、細胞内外での B₆ の作用と動態についての解明が期待される。

(高知大農 生物資源 横地 奈菜、八木 年晴)

文献

- 1) John RA (1995) Pyridoxal phosphate-dependent enzymes. *Biochim Biophys Acta* **1248**, 81-96
- 2) Ehrenshaft M, Bilski P, Li MY, Chignell CF, Daub ME (1999) A highly conserved sequence is a novel gene involved in *de novo* vitamin B₆ biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci* **96**, 9374-9378
- 3) Bilski P, Li MY, Ehrenhaft M (2000) Vitamin B₆ (Pyridoxine) and its derivatives are efficient singlet oxygen quencher and potential fungal antioxidants. *Photochem Photobiol* **71**, 129-134
- 4) Shane B, Snell EE (1976) Transport and metabolism of vitamin B₆ in the yeast *Saccharomyces carlsbergensis* 4228. *J Biol Chem* **251**, 1042-1051
- 5) Yagi T, Tanouchi A, Hiraoka Y (1998) Growth phase-dependent active transport of pyridoxine in a fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Microbiology Letters* **161**, 145-150
- 6) Jurgen S, Martin V (2003) Tpn1p, the plasma membrane vitamin B₆ transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **278**, 18990-18996
- 7) Eddy AA, Hopkins P (1996) Cytosine accumulation as a measure of the proton electrochemical gradient acting on the overexpressed cytosine permease of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **142**, 449-457
- 8) Natarajan K, Meyer MR, Jakson BM, Slade D, Roberts C, Hinnebusch AG, Marton MJ (2001) Transcriptional profiling shows that Gcn4p is a master regulator of gene expression during amino acid starvation in yeast. *Mol Cell Biol* **13**, 4247-68