

ストレスにおける
酵母ユビキチンリガーゼ Rsp5 の機能解析

灰谷 豊

奈良先端科学技術大学院大学
バイオサイエンス研究科 細胞機能学講座
主指導教員：高木博史 教授
提出年月日：2007年8月16日

目次

序章	3
第1章 Rsp5 によるストレスタンパク質の発現制御機構	
1-1. 緒言	11
1-2. 実験方法	14
1-3. 結果	22
1-4. 考察	32
第2章 Rsp5 遺伝子へのランダム変異導入によるストレス耐性の向上	
2-1. 緒言	62
2-2. 実験方法	64
2-3. 結果	68
2-4. 考察	73
終章	87
参考文献	88
謝辞	95
報文目録	96

序章

ユビキチンは、76 個のアミノ酸からなる小さなタンパク質であり、進化的な保存性が高く、すべての真核生物でほとんど同じアミノ酸配列をもっているが、原核生物には存在しない。このタンパク質は、標的タンパク質に共有結合する翻訳後修飾分子として作用しており、同時にユビキチン間でも共有結合を繰り返してポリユビキチン鎖を形成することができる。そして、標的タンパク質に結合したユビキチンは、26S プロテアソームシステムを介した選択的タンパク質分解の目印となるため、細胞ストレス応答において必要不可欠である。

ユビキチン遺伝子には、ユビキチン・リボソームタンパク質の融合遺伝子と、10 数個のユビキチンが連続したポリユビキチン遺伝子が存在する。前者は、60S と 40S を構成する必須リボソームタンパク質をコードしており、後者は、一度の転写と翻訳で多数のユビキチン分子を生合成できる。興味深いことに、ポリユビキチン遺伝子はヒートショック応答遺伝子であり、細胞が環境ストレスに応答して大量のユビキチンを必要としていることを示唆している。これらの融合遺伝子産物が生合成されると、脱ユビキチン酵素によってプロセシングされて、リボソームタンパク質およびユビキチンに成熟する。

標的タンパク質へのユビキチン結合は、E1 (ユビキチン活性化酵素)、E2 (ユビキチン結合酵素)、E3 (ユビキチンリガーゼ) のカスケード反応 (ユビキチンシステム) によって起こる (Pickart, 2001) (Figure 1)。その共有結合様式は、ユビキチンの C 末端のカルボキシル基とタンパク質中の Lys 残基の ϵ -アミノ基が縮合したイソペプチド結合である。さらに、タンパク質にイソペプチド結合したユビキチン内の Lys 残基と、新しいユビキチン分子内の C 末端のカルボキシル基が、ユビキチンシステムによりイソペプチド結合する (Scheffner, 1995)。この縮合反応を繰り返すことによって、多数のユビキチン分子が鎖状に連なったポリユビキチン鎖を形成する。

E1 は、ATP 依存的なアデニル化を介して、E1 分子内の Cys 残基とユビキチンの C 末端 Gly 残基との間で高エネルギーチオエステル結合し、ユビキチンを活性化する。この反応は、アミノ酸がアミノアシル-tRNA 合成酵素で活性化される反応と類似している。ユビキチンを活性化する E1 は、すべての真核生物で 1 種類しか存在しない。

次に、E2 は E1 によって活性化されたユビキチンを Cys 残基に高エネルギーチオエステル結合として受け取り、標的タンパク質へ共有結合させる。また、E2 は単独でユビキチンを基質にイソペプチド結合させる反応を触媒することができるが、多くの場合 E3 を必要とする。酵母 *Saccharomyces cerevisiae* における E2 は 13 種存在しており (Ubc1-13 の中で必須遺伝子は Ubc3 と Ubc9)、その中の Ubc9 と

Ubc12 は他の修飾因子を活性化する酵素である。さらに、Ubc13 はユビキチン分子内の K63 ポリユビキチン化を触媒する働きをもつ。一般的に、E2 は E3 との対応で若干の特異性を示すが、その組み合わせは厳格である場合とそうでない場合がある。また、ユビキチン化反応において E2 と E3 の安定な物理的会合が必要な場合とそうでない場合がある。

引き続き、E3 は活性化したユビキチンと基質タンパク質の両者を捕捉し、基質の Lys 残基へユビキチンの受け渡しを触媒する酵素として作用する。したがって、E3 は標的識別に関わる酵素であり、ユビキチン修飾反応における最も重要な酵素と位置づけられている。E3 は高度に多様性をもっており、E2 結合部位である活性中心の構造から HECT (homologous to E6-AP carboxyl terminus) 型、RING (really interesting new gene) 型に大別できる (Figure 2)。HECT 型 E3 は、ユビキチンを E2 からいったん HECT ドメイン内の Cys 残基にチオエステル結合を介して転移後、基質タンパク質に受け渡す酵素である。一方、RING 型 E3 は、E2 からユビキチンを直接基質タンパク質に連結させる。多くの場合、ユビキチン自身の Lys 残基にさらにユビキチンが連結されてポリユビキチン鎖が形成される。

がん抑制遺伝子産物 p53 は、ヒトパピローマウイルス (HPV) 感染細胞内で速やかに分解される。それは、p53 とウイルス遺伝子にコードされた E6 タンパク質が結合して、p53 のユビキチン化とプロテアソームによる分解を促進するためである。E6 タンパク質と複合体を作る宿主細胞由来のタンパク質として同定された分子が E6-AP (E6-associated protein : E6 結合タンパク質) であり、E6 と E6-AP から成る複合体は、E2 からユビキチン分子を受け取り、p53 をポリユビキチン化する (Scheffner, *et al.*, 1993)。そして、E6-AP の E3 活性発現に必須な C 末端領域は、種を超えて広く保存されており、HECT ドメインと呼ばれている。

HECT ドメインは、ユビキチンとチオエステル結合する触媒部位と、E2 結合部位とを合わせ持っている。HECT 型 E3 は *S. cerevisiae* で 5 個 (Rsp5, Ufd4, Tom1, Hul4, Hul5)、ヒトで 40 種以上存在しており、そのうち、Nedd4/Rsp5 ファミリーは N 末端にリン脂質を結合する C2 ドメイン、中央部分に基質タンパク質を結合する WW ドメイン、および、C 末端に HECT ドメインをもつ (Figure 1)。*S. cerevisiae* の HECT 型 E3 の中で、Rsp5 は唯一の必須遺伝子である。

HECT ドメイン自身は約 350 アミノ酸残基で、常にユビキチンリガーゼの C 末端側でみつかっており、3 種類の HECT ドメインと、HECT-E2 複合体の構造が明らかになっている (Huang *et al.*, 1999; Ogunjimi *et al.*, 2005; Verdecia *et al.*, 2003)。HECT ドメイン内に存在する活性部位 Cys 残基から、標的タンパク質へユビキチンを転移させるのに重要なのは、多くの E3 に共通してみられる、C 末端側から 4 番目の Phe 残基であることが知られている (Salvat *et al.*, 1998)。しかしながら、E3 に

よるユビキチンイソペプチド結合の触媒作用、特に、ポリユビキチン鎖をどのような機構で形成するのかは、ほとんど特徴付けられていない。

RING フィンガードメインは、HECT ドメインに続く第 2 のユビキチンリガーゼ共通のドメインとして提唱され (Lorick *et al.*, 1999)、現在までに 60 種類を超える RING 型 E3 が見つかっている。このドメインは Zn^{2+} を配位した構造で、E2 結合ドメインとして働く。単量体で機能する RING 型 E3 として、N 末端アミノ酸の種類によってタンパク質の寿命が決まるという N 末端則で働く Ubr1 (Xie *et al.*, 2002)、小胞体でのタンパク質分解 (ERAD) で働く Hrd1 などが知られている (Haynes *et al.*, 2002)。一方、複合体をとる RING 型 E3 の代表的なものが SCF と APC/C である。SCF は細胞周期の G1/S 期の移行に、APC/C は M 期の進行に働く E3 である (Murray, 2004)。また、APC/C は約 12 個のサブユニットから構築され、活性化因子である Cdc20 や Cdh1 に制御されて細胞周期制御因子をユビキチン化する (Woodbury *et al.*, 2007)。

ユビキチン化されたタンパク質がプロテアソームにより分解されるシステムは、細胞内の不要なタンパク質を分解するというタンパク質の品質管理に重要であるばかりでなく、細胞内の様々な現象、例えば細胞周期の進行やシグナル伝達などに積極的に関わっている。このシステムの特徴として、ユビキチンによる標的タンパク質の修飾が、特異的にタイミングよく起こることが挙げられる (Pickart, 2004)。*S. cerevisiae* において、ユビキチン化される標的タンパク質は少なくとも 1,000 種類以上にも及び、全タンパク質の約 6 分の 1 にあたる (Peng *et al.*, 2003)。

ユビキチン分子内には全部で 7 種の Lys 残基 (K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63) がある。これらすべての Lys 残基から、ポリユビキチン鎖が枝状に伸長することが可能である。特に、48 番目の Lys にリンクしたポリユビキチン鎖は最も有名であり、タンパク質の分解マーカーとして、すなわち 26S プロテアソームへの標的シグナルとなる (Figure 3)。他方、63 番目の Lys を介して形成されたポリユビキチン鎖は、タンパク質分解に関係せず、DNA 修復、エンドサイトーシス、アミノ酸輸送、翻訳調節、さらにシグナル伝達など多彩な役割に参与している。

一方、ユビキチン分子内に存在する他の Lys 残基にリンクしたポリユビキチン鎖については、例えば K29 リンク型ポリユビキチン鎖がタンパク質分解に関係していることや、K6 リンク型ポリユビキチン鎖がタンパク質分解に関係しないことなどが示唆されているものの、その生理的意義を含め詳細は不明である。通常、ユビキチンは、タンパク質中の Lys 残基の ϵ -アミノ基とイソペプチド結合するが、最近、標的タンパク質の N 末端の α -アミノ基とイソペプチド結合 (N-terminal polyubiquitylation) して分解シグナルを形成する例も増加している。

ユビキチンは、タンパク質をモノユビキチン化することによっても様々なシグナル

になる。現在、モノユビキチン化の意義が最も明瞭になっているのは、エンドサイトーシスにおける役割で、細胞膜上の膜タンパク質（レセプターやトランスポーター）をリソソーム/液胞系へ誘導する機構に関与していることである。また細胞内の小胞輸送における選別においても、タンパク質のモノユビキチン化が必要であることが明らかになった (De Craene *et al.*, 2001)。

E3 によって形成された 2, 3 個の短いポリユビキチン鎖を伸長する因子として、E4 (ユビキチンポリマー延長化因子) が提唱されてきた。例えば、Rsp5 はゴルジ体膜上でアミノ酸パーミターゼ Gap1 をポリユビキチン化し、それを Rsp5 に結合している Bul1 と Bul2 がさらに伸長していく (Helliwell *et al.*, 2001)。Gap1 は、培地中の窒素源が乏しいとき、モノユビキチン化を受けて原形質膜へと選別される。しかし、アンモニウムイオンのような窒素源が豊富なとき、Rsp5 によってポリユビキチン化を受け、直接液胞へと輸送されて分解される (Figure 4)。このとき、Bul1, Bul2 は E4 として働き、Gap1 のポリユビキチン化と輸送を促進する (Soetens *et al.*, 2001)。

DUB (脱ユビキチン化酵素) は、ユビキチン化修飾されたタンパク質からユビキチンを解離させるプロテアーゼであり、ユビキチン・プロテアソーム経路において重要な役割を担っている。DUB と結合できる唯一の HECT 型 E3 として Rsp5 が報告されており、*S. cerevisiae* において 16 個存在する DUB のうち、Ubp2 と結合している (Kee *et al.*, 2005; Kee *et al.*, 2006)。また、この相互作用はユビキチン結合ドメインを認識する Rup1 を介して起こり、Ubp2 と Rup1 の結合は、Rsp5 の安定性に影響を与えない (Ren *et al.*, 2007)。多数の DUB が存在することは、ユビキチン化による翻訳後修飾が可逆的かつ多面的であることを強く示唆している。しかし、その生物学的意義の多くは未解明である。

一般的に、細胞内に蓄積した異常タンパク質の処理機構には、ユビキチン・プロテアソームシステムを介した異常タンパク質を分解する経路と、分子シャペロンによって修復する経路が存在する。そこで第一章では、ストレスで生じる異常タンパク質の修復機構に着目し、Rsp5 がヒートショックタンパク質など、分子シャペロンとして機能するストレスタンパク質の発現制御機構について解析した。また第二章では、Rsp5 遺伝子へのランダム変異導入により、さまざまなストレス耐性を向上させる変異型 Rsp5 を取得し、異常タンパク質を速やかに処理する機構の解明を目指した。

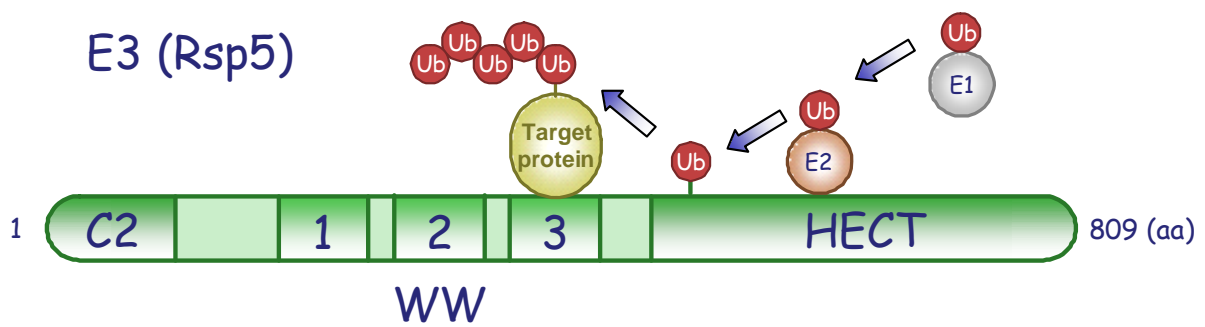


Figure 1 Modes of regulating or modulating the catalytic activities of C2-WW-HECT Rsp5. Rsp5 appears to be constitutively active and can be charged with ubiquitin in the presence of only ATP, E1 enzyme, and an appropriate E2 enzyme. The arrow indicates ubiquitin transfer (a transthiolation reaction) from the E2 active-site cysteine to the E3 active-site cysteine.

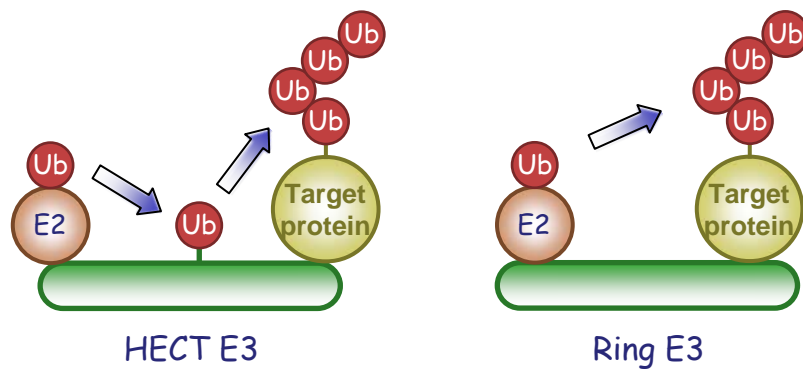


Figure 2 There are two main classes of E3 ubiquitin ligases, known as HECT and RING E3s. HECT E3 participates directly in the chemistry of ubiquitin conjugation by forming a covalent thioester intermediate with ubiquitin at an active site cysteine residue within the HECT domain, whereas RING E3 appears to function as docking surfaces for activated E2 and target protein.

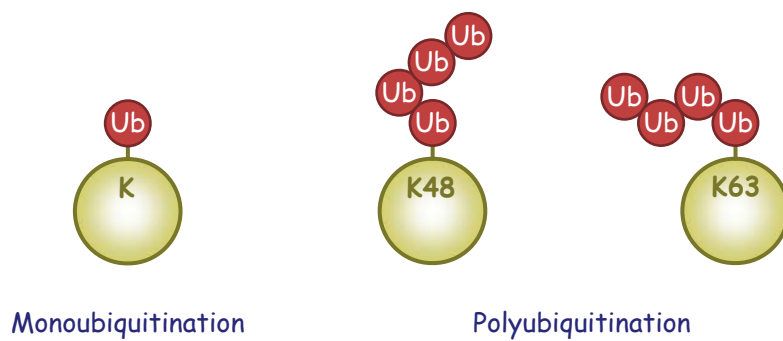


Figure 3 Ubiquitin contains seven lysine residues (K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63) that can potentially serve as acceptor sites for additional ubiquitin molecules to form polyubiquitin chains. K48-linked polyubiquitin chains are the primary signals for targeting to the 26S proteasome, whereas monoubiquitination and some other forms of polyubiquitin chains appear to mediate alternative functions. K63-linked chains serve non-proteolytic functions in DNA repair pathways, kinase activation, and receptor endocytosis, although they may also be capable of proteasome targeting.

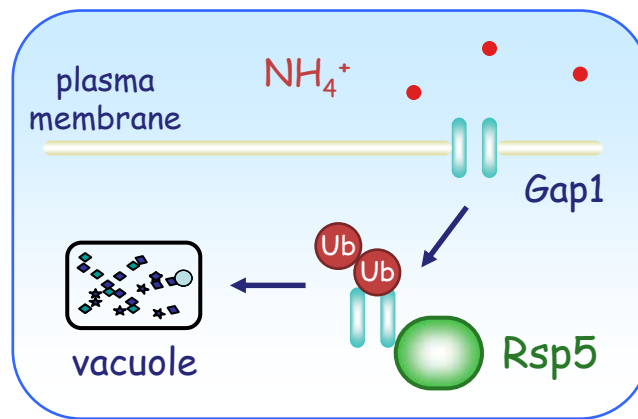


Figure 4 The addition of ammonium ions to yeast cells growing on L-proline as the sole nitrogen source induces rapid inactivation and degradation of the general amino acid permease Gap1 through a process requiring Rsp5.

第1章 Rsp5 によるストレスタンパク質の発現制御機構

1-1. 緒言

細胞は、様々な環境ストレス（高温、低温、乾燥、浸透圧、pH、エタノール、冷凍など）に応答して、ある程度適応する機構を備えている。しかしながら、過酷なストレス下では多くの細胞内タンパク質は変性し、正常な構造や機能が損なわれた「異常タンパク質」として蓄積するため、細胞は致命的ダメージを受けて生育阻害や細胞死を引き起こしてしまう。

一般的に、細胞内に蓄積した異常タンパク質の処理機構には、「分解系」と「修復系」が存在している。分解系の場合、真核生物では、異常タンパク質はユビキチンシステムによって目印となるユビキチンが付加され、液胞や 26S プロテアソームで分解される。また、修復系の場合、分子シャペロンとして機能するストレスタンパク質が異常タンパク質を認識し、リフォールディングすることで正常なタンパク質へと修復する。そこで、我々は高等生物のモデルとして、また発酵食品の製造において重要な酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を材料に、酵母の新しいストレス耐性機構を解析しており (Morita *et al.*, 2003; Hoshikawa *et al.*, 2003; Nomura & Takagi, 2004)、かつ得られた知見を実用酵母の育種に応用することも目指している。本研究では、ストレスで生じる異常タンパク質の検知・処理機構（修復・分解）に関与する、ユビキチンシステムのキーエンザイム、ユビキチンリガーゼ Rsp5 の新しい機能を解析した。

細胞はアミノ酸アナログの添加によって、ヒートショックストレスに匹敵するほどのダメージを受ける (Ananthan *et al.*, 1986; Hightower *et al.*, 1980)。プロリンの毒性アナログであるアゼチジン-2-カルボン酸 (AZC) は、新生タンパク質合成の際にプロリンと競合して取り込まれ、異常タンパク質を生成させる (Trotter *et al.*, 2001; Trotter *et al.*, 2002)。そのため、酵母においても AZC によって生成・蓄積した異常タンパク質が、生育阻害や細胞死を引き起こす。同じような結果は、動物細胞や細菌においても起こる (Mizzen & Welch, 1988; Yokota *et al.*, 2000)。

これまでに我々は、AZC に対して超感受性を示す変異株を分離した (Hoshikawa *et al.*, 2003)。この変異株では、酵母の HECT (homologous to E6-AP carboxyl terminus) 型 E3 の一つで、生育に必須であるユビキチンリガーゼ Rsp5 の遺伝子に変異が生じていた。真核生物のタンパク質品質管理機構に関与するユビキチンシステムにおいて、ユビキチンリガーゼは細胞内で不要になったタンパク質（基質）を認識し、ユビキチン化を行う重要な酵素である。解明されてきた Rsp5 の機能は多く、原形質膜のエンドサイトーシス (Vandenbol *et al.*, 1987; Galan *et al.*, 1996; Springael & André)、後期エンドソームにおける Multivesicular body (MVB) への輸送 (Katzmann *et al.*, 2004)、RNA ポリメラーゼ II の活性調節 (Huibregtse *et al.*,

1997)、胞子の形成や発芽 (Kanda, 1996)、転写調節因子の活性化 (Hoppe *et al.*, 2000)、小胞体関連分解 (ERAD) (Haynes *et al.*, 2002) などが挙げられる。そのため、Rsp5 の細胞内局在性は原形質膜、小胞体膜、エンドソーム膜、ゴルジ体、ミトコンドリア、細胞質にまで及ぶことが知られている。しかしながら、ミスフォールド化やアンフォールド化した異常タンパク質の選択的な認識や処理 (修復・分解) に関する知見はほとんどない。また、Rsp5 の特徴的な構造として、N 末端側に細胞膜のリン脂質と結合する C2 ドメイン、基質タンパク質と結合する WW ドメインと C 末端側に触媒活性部位を含む HECT ドメインが存在している。

Rsp5 変異株 (*rsp5*^{A401E}) における変異点は、標的タンパク質と結合する WW3 ドメイン内の Ala401 が Glu に置換しており (Figure 5)、パーミアアーゼ Gap1 がユビキチン化されずに細胞膜上で安定に活性を維持するため、過剰の AZC が細胞内に流入して超感受性になることが判明した (Dunn & Hicke, 2001; Shcherbik *et al.*, 2002)。また興味深いことに、この変異株は細胞内タンパク質のミスフォールディングを誘導し、異常タンパク質を生成するようなストレス (高温、エタノール、冷凍、ソルビトール、塩化リチウム、熱ショック、過酸化水素、アミノ酸アナログなど) に対しても著しい感受性を示した (Hoshikawa *et al.*, 2003) (Figure 6)。これらの結果から、Rsp5 の新しい役割として、ストレスで生じる異常タンパク質処理への関与が示唆された。ここで Figure 7 に、我々が提唱しているモデルとして、*rsp5*^{A401E} のストレス感受性メカニズム、特に分解への関与を示した。野生株では、ストレスによって細胞内のタンパク質が変性して異常タンパク質が生成すると、Rsp5 によってユビキチン化され、速やかにプロテアソームや液胞で分解されると考えられる。一方、*rsp5*^{A401E} では、おそらく異常タンパク質のユビキチン化に失敗し、その後分解されずに細胞内に蓄積するため、生育できなくなった可能性が考えられる。

一般的に、ストレスによって生じる異常タンパク質やミスフォールディングタンパク質の蓄積は、細胞にとって深刻な問題である。先にも述べたように、その解決策としては、ユビキチン・プロテアソームシステムを介した異常タンパク質の分解系と、分子シャペロンとして機能するストレスタンパク質が、ミスフォールディングタンパク質を修復する、2 通りの適応機構が備えられている。そこで、我々は異常タンパク質の処理に関与する Rsp5 が、修復経路に与える影響について注目した。

S. cerevisiae には、ストレスによって誘導されるストレスタンパク質の転写調節因子として、Hsf1 と Msn2、そのホモログである Msn4 の 3 つがよく知られている (Hashikawa & Sakurai, 2004; Ferguson *et al.*, 2005)。Hsf1 は Heat shock element (HSE) と呼ばれるモチーフに、Msn2/4 は Stress response element (STRE) と呼ばれるモチーフに結合して、HSP42 (Heat shock protein) や DDR2 (Multistress response protein) など、多くのストレスタンパク質遺伝子の転写を制御している。また、プロモ

一ター領域において、HSE と STRE の両配列を含んだ *HSP12* (Heat shock protein) や *HSP30* (Heat shock protein) なども存在する。

最近では、ストレスによって転写調節因子が活性化し、標的遺伝子の発現が誘導されてミスフォールディングタンパク質を修復することが報告されている (Amoros & Estruch, 2001; Kandrор *et al.*, 2004)。一方、温度感受性変異株 *rsp5-101* では、高温培養において HSE 配列をもつ遺伝子の転写量が劇的に減少することが明らかになった (Kaida *et al.*, 2003)。そのため、Rsp5 は HSE-関連遺伝子の発現に関わる、新しい機能を有する可能性が高い。そこで、我々が分離した *rsp5^{A401E}* では、おそらく異常タンパク質の分解機能が著しく低下しているため、ストレス応答機構である修復経路に何らかの影響を与えると予想し、分子シャペロンとして機能するストレスタンパク質の発現制御機構を解析した。

1-2. 実験方法

1-2-1. 菌株と培地

本研究で使用した酵母は、*Saccharomyces cerevisiae* S288C 系統株である (Table 1)。CKY8 は、C. Kaiser より分譲していただいた。CHT81 は、CKY8 株から EMS 変異処理により分離した AZC 超感受性変異株 (Rsp5 の Ala401 が Glu に置換) である (Hoshikawa *et al.*, 2003)。CYH01, CYH02, CYH03, CYH04, CYH05, CYH06 は PCR を用いた一段階遺伝子置換法 (Petracek & Longtine, 2002) により取得した株で、野生株と *rsp5*^{A401E} それぞれの *HSF1*, *MSN2/4* 遺伝子の C 末端側に GFP を融合させた。pFA6a-GFP-kan (supplied by S. Harashima) (Bahler *et al.*, 1998) を鋳型に、*HSF1*-GFP, *MSN2*-GFP, *MSN4*-GFP のカセットを、5'-AGA GTA CAA CGA TCA CCG CCT GCC CAA ACG AGC TAA GAA AGG TCG ACG GAT CCC CGG G-3', 5'-AAA TGA TTA TAT ACG CTA TTT AAT GAC CTT GCC CTG TGT AAT CGA TGA ATT CGA GCT CG-3', 5'-GTC GCA ACA CAT CAA GAC TCA TAA AAA ACA TGG AGA CAT TGG TCG ACG GAT CCC CGG G-3', 5'-TTA TGA AGA AAG ATC TAT CGA ATT AAA AAA ATG GGG TCT AAT CGA TGA ATT CGA GCT CG-3', 5'-ATC ACA ACA TCT AAA AAC TCA CAA AAA GCA CGG TGA TTT TGG TCG ACG GAT CCC CGG G-3', 5'-TAG CTT GTC TTG CTT TTA TTT GCT TTT GAC CTT ATT TTT TAT CGA TGA ATT CGA GCT CG-3' を用いて増幅した (Table 2)。これらの PCR 断片を野生株と *rsp5*^{A401E} へそれぞれ導入し、Genetycin 耐性を示した形質転換体 CYH01, CYH02, CYH03, CYH04, CYH05, CYH06 を取得した。GFP が挿入された位置を、それぞれ PCR によって確認した。*Escherichia coli* strain [*F*^λΦ80*lacZ*Δ*M15* Δ(*lacZYA argF*)]*U169 deoR recA1 endA1 hsdR17*(*r_k⁻m_k⁺*) *supE44 thi-1 gyrA96*] は、酵母遺伝子のサブクローニングに使用した。

培地には、yeast extract/peptone/dextrose (YPD) (2% glucose, 1% yeast extract, 2% peptone), synthetic complete (SC) (Rose *et al.*, 1990) consisting of 2% glucose, 0.67% Bacto Yeast Nitrogen Base with ammonium sulfate (Difco Laboratories 社), drop-out mix lacking leucine (SC-Leu), または lacking uracil (SC-Ura) を用いた。

1-2-2. プラスミド

酵母遺伝子のサブクローニングに、pBluescript II SK+ (Toyobo Biochemicals 社) と plasmid pKF3 (Takara Bio 社) を使用した。Plasmid pFA6a-3HA-kanMX6 (supplied by K. Kitamura) (Bahler *et al.*, 1998) は、Hemagglutinin (HA)-tagged *HSF1* の作製に利用した。

Plasmid pAD4 (supplied by J. Nikawa) は、YE_p 型のプラスミドで 2 μm DNA の複製起点と、酵母での選択用マーカー *LEU2*, および *E. coli* での複製起点と選択

マーカーのアンピシリン耐性遺伝子を含んでいる。また、マルチクローニングサイトの
上流に *ADHI* プロモーター、下流に *ADHI* ターミネーターが存在している。

pYES2 (Invitrogen 社) は、YE_p 型のプラスミドで 2 μm DNA の複製起点と酵
母での選択用マーカー *URA3*, および *E. coli* での複製起点と選択マーカーのアン
ピシリン耐性遺伝子を含んでいる。また、マルチクローニングサイトの上流に *GALI*
プロモーター、*CYCI* ターミネーターが存在している。

pRS415 (Stratagene 社) は、YC_p 型のプラスミドでセントロメアをもち、酵母で
の選択マーカー *LEU2*, および *E. coli* での複製起点と選択マーカーのアンピシリン
耐性遺伝子を含んでいる。

Plasmid p546 (supplied by S. Harashima) は、YC_p 型のプラスミドでセントロメア
をもち、酵母での選択用マーカー *URA3*, *lacZ*, および *E. coli* での複製起点と選択
マーカーのアンピシリン耐性遺伝子を含んでおり、レポーターアッセイに用いた。

Plasmid pAD-RSP5, pAD-HSP12, pAD-HSP42, pAD-DDR2 は、*ADHI* プロモ
ーター下で *RSP5*, *HSP12*, *HSP42*, *DDR2* を発現する。*RSP5* 遺伝子の DNA 断片
は、CKY8 のゲノム DNA から PCR によって増幅させた。使用したオリゴヌクレオ
チドプライマーは、5'-A ACC AAG CTT AAA AGA CAT ACG CTT AAC CA-3' と
5'-A CCG GAA TTC CGT TTC AAG TAT GTA CCT CA-3' である (下線はそれぞれ
HindIII と *EcoRI* の制限酵素部位を示している)。*RSP5* 遺伝子の上下流 0.5-kb を
含む 3.4-kb の断片を *HindIII* と *EcoRI* で制限酵素処理した後、pBluescript II SK+
へ連結して pBlue-RSP5 を構築した。続けて、pBlue-Rsp5 より *HindIII*-*SacI* 断片を
切り出し、pDA4 へ連結して pAD-RSP5 を構築した。

HSP12, *HSP42*, *DDR2* 遺伝子の断片は、5'-CCA AAA CTG CAG CAA AAC
AAA AAA AAC TAA ATA CAA CA-3', 5'-AAC CCC GAG CTC TAC AAA GAG
TTC CGA AAG AT-3', 5'-CCA AAA CTG CAG GAT CAT ACC AAG CCG AAG
CA-3', 5'-AAC CCC GAG CTC TGT GTG TAT AAA CAG ATA CG-3', 5'-CCA AAA
CTG CAG CAC GCT AAT TTA ATA TCG ATT TAA AC-3', 5'-AAC CCC GAG CTC
CAG TAA GCG GCG TTT TTC-3' を用いて増幅させた (下線はそれぞれ、*PstI* と
SacI の制限酵素部位を示している)。*HSP12* 遺伝子の 0.3-kb, *HSP42* 遺伝子の
1.1-kb, *DDR2* 遺伝子の 0.2-kb を *PstI* と *SacI* で制限酵素処理した後、pAD4 へ
連結して pAD-HSP12, pAD-HSP42, pAD-DDR2 を構築した。

HSF1, *MSN4* 遺伝子の断片は、5'-A CGC GTC GAC TAC TCC ACT AAG GCC
AGT AG-3', 5'-A TCC CCC GGG CCC* TTT CTT AGC TCG TTT GGG CA-3', 5'-A
CGC GTC GAC TAC GAA GCG GTT GGT AGC GA-3', 5'-A TCC CCC GGG CCC*
AAA ATC ACC GTG CTT TTT GT-3' を用いて増幅させた (下線はそれぞれ、*SaII*
と *SmaI* の制限酵素部位を示しており、アスタリスクは、両遺伝子の終止コドンが

Gly 残基に置換したことを示す)。 *HSF1* 遺伝子上流 0.7-kb を含む 3.2-kb の断片と *MSN4* 遺伝子上流 0.7-kb を含む 2.6-kb の断片を *SalI* と *SmaI* で制限酵素処理した後、HA-tag を付加する目的で pFA6a-3HA-kanMX6 へ連結して pFA-HSF1-HA と pFA-MSN4-HA を構築した。 pFA-HSF1-HA から得られた 3.3-kb *SalI*-*BglIII* の *HSF1-HA* 断片と、 pFA-MSN4-HA から得られた 2.7-kb *SalI*-*BglIII* の *MSN4-HA* 断片を、新しい制限酵素サイトを得るために pKF3 へ連結して pKF-HSF1-HA と pKF-MSN4-HA を構築した。

pKF-HSF1-HA と pKF-MSN4-HA から、5'-A TCG CTG CAG GC TGG AAG GGA AAG GAA ACA-3', 5'-GAA GGA CAC AAC CTC GAG GAA CAC TCT GTT-3', 5'-T AGC CT GCA G AAC GCC TTT ATC AGT TCG GC-3', 5'-GAA GGA CAC AAC CTC GAG GAA CAC TCT GTT-3' を用いて、*HSF1-HA* と *MSN4-HA* を増幅させた (下線はそれぞれ、*PstI* と *SacI* の制限酵素部位を示している)。 2.5-kb の *HSF1-HA* と 1.9-kb の *MSN4-HA* を *PstI* と *SacI* で制限酵素処理した後、pAD4 へ連結して pAD-HSF1 と pAD-MSN4 を構築した。

MSN2 遺伝子の断片は、5'-A AAA CTG CAG ATC TAA AAT GAC GGT CGA CC-3', 5'-T TCC CCC GGG ACC* AAT GTC TCC ATG TTT TTT AT-3' を用いて増幅させた (下線はそれぞれ、*PstI* と *SmaI* の制限酵素部位を示しており、アスタリスクは、両遺伝子の終止コドンが Gly 残基に置換したことを示す)。 *MSN2* 遺伝子の断片 2.1-kb を *PstI* と *SmaI* で制限酵素処理した後、pAD-HSF1 を *PstI* と *SmaI* で処理したプラスミドに連結して、HA-tag を C 末端側に融合した pAD-MSN2 を構築した。

OLE1 遺伝子の断片は、5'-G CCC AAG CTT TAC AAC AAA GAT GCC AAC TTC TGG AAC TAC-3', 5'-A AAA CTG CAG GTG ATA CTT AAA AGA ACT TAC CAG TTT CGT-3' を用いて増幅した (下線はそれぞれ、*HindIII* と *PstI* の制限酵素部位を示している)。 *OLE1* 遺伝子の断片 1.5-kb を *HindIII* と *PstI* で制限酵素処理した後、pAD4 を *HindIII* と *PstI* で処理したプラスミドに連結して、pAD-OLE1 を構築した。本研究でクローニングした遺伝子は、すべて DNA sequencing によって確認した。

1-2-3. β -ガラクトシダーゼ活性測定

Plasmid p546 (セントロメア型、*URA3*, *lacZ*) (supplied by S. Harashima) をレポーターアッセイに用いた。 *HSP42*, *HSP12*, *DDR2* 遺伝子上流 0.5-kb を、5'-GG CCC AAG CTT CTG GGG TTG GGT AAC AAG TGA-3', 5'-TT GGG GGA TCC ATT GCT TCG GCT TGG TAT GAT-3', 5'-GG CCC AAG CTT GGA CTA GAA GCC AAA AGC CAG-3', 5'-TT GGG GGA TCC ATT GTT GTA TTT AGT TTT TTT TGT TTT

G-3', 5'-GG CCC AAG CTT AAC GAA TTC AAG AAG CCA GAG-3', 5'-TT GGG GGA TCC ATG AGA CAA GAG AAG GAT TTT-3' を用いて増幅した (下線はそれぞれ、*Hind*III と *Bam*HI の制限酵素部位を示している)。各遺伝子上流 0.5-kb の断片を、*Hind*III と *Bam*HI で制限酵素処理した後、p546 へ連結して p546-HSP42, p546-HSP12, p546-DDR2 を構築した。

CKY8, CHT81 へ各 p546-HSP42, p546-HSP12, p546-DDR2 をそれぞれ導入した形質転換体を、6 ml SC-Ura, 25°C で対数増殖期 ($OD_{600} = 0.5$) まで培養後、ストレス (高温培養、ヒートショック、エタノール、ソルビトール) 処理を施した。各サンプルから経時的に 500 μ l ずつ抽出して遠心し、Z バッファー (16.1 g/L $Na_2HPO_4/7H_2O$, 5.5 g/L NaH_2PO_4/H_2O , 0.75 g/L KCl, 0.246 g/L $MgSO_4/7H_2O$) で洗浄後、100 μ l の Z バッファーに懸濁した。菌体を破碎するために、液体窒素に 15 sec 浸して凍結させ、37°C で 2 min インキュベートして融解させる作業を 2 回繰り返した。0.3% の β -メルカプトエタノールを含んだ 700 μ l の Z バッファーを、それぞれのサンプルに加えてインキュベート (30°C, 2 min) した。次に、160 μ l の *O*-nitrophenyl β -D-galactopyranoside (ONPG) (4 mg/ml) (Sigma 社) を添加してインキュベート (30°C, 12 min) し、400 μ l の 1 M Na_2CO_3 を加えて遠心後、420 nm で測定した。

1-2-4. ノーザンブロットング解析

ノーザンブロットング解析は、AlkPhos Direct Labelling Reagents and Detection system (Amersham Biosciences 社) を用いて行った。*S. cerevisiae* から、Köhler and Domdey (Köhler & Domdey, 1991) 法を用いて全 RNA を抽出し、1.0% アガロースゲルで分離した後、ナイロンメンブレンに転写した。DNA プローブを作製するため、*ACT1* (Actin) 遺伝子の断片を、5'-C CCG GAA TTC GGT TGC TGC TTT GGT TAT TG-3', 5'-A CGC GTC GAC GAA ACA CTT GTG GTG AAC GA-3' を用いて増幅させた (下線はそれぞれ、*Eco*RI と *Sal*I の制限酵素部位を示している)。*ACT1* 遺伝子の 1.4-kb を *Eco*RI と *Sal*I で制限酵素処理した後、pBluescript II SK+ へ連結して、pBlue-ACT1 を構築した。塩基配列を確認後、プラスミドから切り出して DNA プローブとした。

HSP12, *HSP42*, *DDR2*, *HSF1*, *MSN4* においても同様に、pAD-HSP12, pAD-HSP42, pAD-DDR2, pAD-HSF1, pAD-MSN4 から、*Pst*I と *Sac*I で切り出した断片を DNA プローブとした。それぞれの断片は、アガロースゲルで精製した後、煮沸して変性させてからラベリングした。

1-2-5. マイクロアレイ解析

全 RNA は、1-2-4 と同じ方法で抽出し、続けて RNeasy Mini Kit (QIAGEN 社)

で精製した。全 RNA サンプルの質を Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies 社) で確認した。今回の実験では、GeneChip Yeast Genome S98 Array (Affymetrix) を使用した。全 RNA は、GeneChip One-cycle Target Labeling と Control Reagents (Affymetrix) を用いてラベリングした。ラベルした全 RNA を DNA マイクロアレイにハイブリダイズし、スキャンは説明書に準じて行った。マイクロアレイ解析は、2 度の別々の実験より得られた全 RNA を用いて 2 回行った。マイクロアレイのデータは、GeneSpring 7 software (Silicon Genetics) を用いて解析した。

1-2-6. ウェスタンブロットング解析

CKY8, CHT81 へ各 pDA-HSF1, pAD-MSN2/4, pAD-RSP5 をそれぞれ導入した形質転換体を、SC-Leu, 25°C で対数増殖期 ($OD_{600} = 1.0$) まで培養した。実験によっては、シクロヘキシミド (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 存在下、非存在下において、高温シフト (37°C) やエタノール (10%) 処理を 10 min 行った。細胞を集菌して洗菌後、抽出バッファー (1 M Tris-HCl buffer (pH 7.5) containing 0.5 M EDTA, 1 M MgCl_2 , 1 M KCl, 5% glycerol, and 2% SDS) に懸濁してからガラスビーズで破碎し、細胞抽出液を得た (Sambrook & Russell, 2001)。遠心 (30 min at $20,000 \times g$) した後、上清 (50 μg 可溶性画分) を 5 min 煮沸し、7.5% SDS-ポリアクリルアミドゲルに供した。なお、Rsp5 には遠心をかけずに粗抽出液を用いた。

Hsf1-HA と Msn2/4-HA は、抗 HA (12CA5) モノクローナル抗体 (Roche 社) を 2,000 倍希釈、抗 Rsp5 モノクローナル抗体 (supplied by J. Huijbrechtse) を 1,000 倍希釈、抗 Pgk1 モノクローナル抗体 (Molecular Probes 社) を 1,000 倍希釈して、ECL plus Western blotting Detection System (Amersham Biosciences 社) により検出した。タンパク質濃度は、Bio-Rad dye staining kit (Bio-Rad 社) で測定した。

1-2-7. 免疫沈降法

酵母細胞より抽出した細胞抽出液 100 μl (5 mg/ml) と、1 μl 抗 HA (12CA5) モノクローナル抗体 (1 mg/ml) を混合し、4°C で一晩、ローテーターを用いてインキュベートした。抽出バッファー (1 M Tris-HCl buffer (pH 7.5) containing 0.5 M EDTA, 1 M MgCl_2 , 1 M KCl, 5% glycerol, and 2% SDS) を用いてあらかじめ 1 hr 平衡化した 20 μl プロテイン A (50%) と NP40 (1%) を細胞抽出液に加えた。続けて、4°C で 2 hr、ローテーターでインキュベートし、500 μl の RIPA バッファー (50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 150 mM NaCl, 1% NP40, 0.5% Sodium deoxycholate, 0.1% SDS) で 3 回洗浄した。そして、500 μl TBS で洗浄した後、上清を除いてから 40 μl サンプルバッファー (125 mM Tris-HCl (pH 6.8), 4% SDS, 20% glycerol, 2-mercaptoethanol, 0.04% Bromophenol Blue) を添加して 5 min 煮沸した。遠心 (1 min at 15,000 rpm) した後、20 μl を 7.5% SDS-ポリアクリルアミドゲルに供した。抗ユビキチン (PAD1) モノクロー

ーナル抗体 (200 µg/ml) (Santa Cruz Biotechnology 社) を 1,000 倍希釈して、ECL plus Western blotting Detection System により検出した。

1-2-8. リアルタイム PCR

酵母細胞を、SC-Leu, 25°C で対数増殖期 ($OD_{600} = 1.0$) まで培養した。続けて、高温シフト (37°C, 10 min)、または、10%エタノール処理 (10 min) を行い、RNeasy mini kits (QIAGEN 社) により全 RNA を抽出した。細胞破碎は、0.05 mm ガラスビーズで 2,500 rpm, 60 sec 破碎、60 sec 冷却を 5 回繰り返した。また、RNase-free DNase set (QIAGEN 社) を用いて DNase 処理を行った。

RNA から cDNA への逆転写は High-capacity cDNA reverse transcription kits (Applied Biosystems 社) を利用した。続いて、cDNA をテンプレートに、標的遺伝子に特異的なプライマー HSF1-F: 5'-GAT CCG CAG TCA GCA GCA T-3', HSF1-R: 5'-GTT TCC TTG AGT CAT GGA AAA AAG A-3', MSN2-F: 5'-TGC GTC CGT TAT TGC GAA A-3', MSN2-R: 5'-CCT CTG TCA AAA ATG GCA TAT CAT-3', MSN4-F: 5'-GTC GGC ATT CGA CAA TAA CGT A-3', MSN4-R: 5'-TCC TGA GCC GGA GAT GAC TT-3' を用いて、7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems 社製) により行った。また、内在性コントロールには、*ACT1* を使用した。リアルタイム PCR は、3 度の別々の実験より得られた全 RNA を用いて、3 回ずつ行った。

1-2-9. 蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH 法)

FISH 法は、Sarkar & Hopper (1998) に準じて行った。酵母細胞を、SC-Leu, 25°C で対数増殖期 ($OD_{600} = 1.0$) まで培養した。続けて、高温シフト (37°C, 10 min)、または、10%エタノール処理 (10 min) を行い、37% formaldehyde で固定した。30 min 後に集菌し、4% paraformaldehyde, 0.1 M KPO_4 (pH 6.5), 5 mM $MgCl_2$ に懸濁した。3 hr 後、細胞を Solution B (1.2 M sorbitol, 0.1 M KPO_4 , pH 6.5) で洗浄し、Solution B + 0.05% β -mercaptoethanol, 50 µl (2 mg/ml Zymolyase-100T (Seikagaku 社)) に懸濁した。スフェロプラストを 37°C で、20 min インキュベートし、Solution B で洗浄後、Solution B に懸濁した。細胞をスライドガラスに 0.1% poly-L-lysine で固定し、固定しなかった細胞をアスピレーションで除いた。細胞を 70, 90, 100% エタノールで 5 min ずつ処理し、デシケーターでスライドガラスを 5 min 静置した。

細胞をプレハイブリダイゼーションバッファー (2× SSC (1× SSC: 0.15 M NaCl, 0.015 M Na-citrate), 10% dextran sulfate, 0.2% BSA, 125 µg/ml *E. coli* tRNA (Sigma 社), 500 µg/ml denatured sonicated salmon sperm DNA (Roche 社)) でインキュベートし、ヒューミッドチャンバーで 37°C, 2 hr 静置した。プレハイブリダイゼーションバッファーに 450 pg/ml digoxigenin-labeled probes (mRNA (dT)₅₀, *HSF1* mRNA: 5'-GAT

CCG CAG TCA GCA GCA TCG CCG GTT CCT TCT TCC TCT TTT TTC CAT GAC TCA AGG AAA C-3', *MSN2* mRNA: 5'-TGC GTC CGT TAT TGC GAA AGT GGC GAC TAC AGG CTT GAG TAA TGA TAT GCC ATT TTT GAC AGA GG-3', *MSN4* mRNA: 5'-GTC GGC ATT CGA CAA TAA CGT AGA CCC CTT CAA CAT TCT CAA GTC ATC TCC GGC TCA GGA-3', mature-tRNA^{Ile}: 5'-GCG GGA TCG AAC CGC TGA TCC CCG CGT TAT TAG CAC GGT GCC TTA ACC AAC TGG GCC AAG-3', pre-tRNA^{Ile}: 5'-CGT TGC TTT TAA AGG CCT GTT TGA AAG GTC TTT GGC ACA GAA ACT TCG GAA ACC GAA TGT TGC TAT-3', tRNA^{Met}: 5'-CCA GGG GAG GTT CGA ACT CTC GAC CTT CAG ATT ATG AGA CTG ACG CTC TTC CTA CTG AGC-3') を加えて 37°C で一晩、ハイブリダイゼーションした。

各プローブの 3' 末端側を、digoxigenin-11-UTP でラベルしており、プレハイブリダイゼーションバッファーとハイブリダイゼーションバッファーの両方に、1 U/ μ l RNase Inhibitor (Applied Biosystems 社) を添加した。tRNA プローブを用いた細胞を 2 \times SSC, 45°C で、oligo (dT)₅₀ プローブを用いた細胞を 2 \times SSC, 37°C でそれぞれ洗浄した後、1 \times SSC, 10 min, 室温で洗浄した。細胞を 4 \times SSC + 1% Triton X-100 で洗浄し、ブロッキングを 4 \times SSC + 1% BSA, 2 hr 行った。Anti digoxigenin fluorescein Fab fragment (Roche 社) を 4 \times SSC + 1% BSA で 200 倍希釈し、細胞を 2 hr インキュベートして蛍光標識した。細胞を 4 \times SSC, 10 min 洗浄した後、続けて 2 回、4 \times SSC + 1% Triton X-100, 10 min 洗浄した。さらに、すばやく 2 回、4 \times SSC で洗浄し、核を 0.1 μ g/ml 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) で染色した。最後に、水ですばやく 2 回洗浄し、スライドグラスに 90% glycerol + 1 \times PBS + 1 mg/ml *p*-phenylenediamine を加えて、蛍光顕微鏡 (Carl Zeiss 社製) で観察した。

1-2-10. 蛍光顕微鏡観察

細胞は、蛍光顕微鏡 Axiovert 200M (Carl Zeiss 社製) を用いて観察した。画像を HBO 100 Microscope Illuminating System (Carl Zeiss 社製) デジタルカメラで取り込み、Adobe Photoshop Elements 2.0 (Adobe Systems 社製) を用いて画像解析を行った。Anti-digoxigenin-fluorescein, Fab fragments (Roche 社) で蛍光標識した mRNA や tRNA, さらに、GFP 融合タンパクの細胞内局在性を観察する実験では、すべてにおいて 3 回ずつ行った。

1-2-11. 四分子分析

CKY8 と ERX-17C, CHT81 と ERX-17C を、YPD プレート上で混合した後、25°C, 6 hr 培養して接合させた。作製した二倍体 CKY8/ERX-17C と

CHT81/ERX-17C を SD+Am プレートでシングルコロニー分離し、25°C, 2 days 培養した。次に、二倍体を YPD プレート, 25°C, 2 days 培養した後、前孢子形成培地 (0.3% polypeptone, 0.8% yeast extract, 10% glucose) で、25°C, 1 day 培養した。続いて、孢子形成培地 (1% potassium acetate, 0.025% glucose) で、25°C, 2 days 培養し、孢子を形成させた。孢子形成培地上の菌体をかき集め、200 μ l の滅菌水に懸濁後、10 μ l の 0.5 mg/ml Zymolyase-100T 溶液を添加して、25°C, 10 min インキュベートした。懸濁液を YPD プレートに塗布し、マイクロマニピュレーター (SINGER INSTRUMENTS 社製) で子嚢内の四分子を分離した。さらに、孢子形成率を YPD+ethyl ether プレートで調べた。

1-2-12. その他

大腸菌からのプラスミド調製は、アルカリ SDS 法をベースにした QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN 社) を用いて行った。その他、大腸菌の形質転換、DNA の制限酵素による切断、連結などの遺伝子操作は「バイオマニュアルシリーズ①遺伝子工学の基礎技術」(羊土社) および「バイオ実験イラストレイテッド」(秀潤社) に、酵母の取り扱いや遺伝子操作は「バイオマニュアルシリーズ⑩酵母による遺伝子実験法」(羊土社) および「生物化学実験法 39 酵母分子遺伝子実験法」(学会出版センター) に準じた。

1-3. 結果

1-3-1. *rsp5*^{A401E} における変異型 Rsp5^{A401E} の発現量と安定性

野生型 Rsp5 と変異型 Rsp5^{A401E} の特徴について、発現量と安定性、そして減数分裂後の胞子形成に関わる機能について解析した。これまでの報告によれば、Rsp5 における 3 つの WW ドメインの間でも保存性の高い、WW3 内に Trp415 と Pro418 のアミノ酸が置換した *rsp5*^{W415F/P418A} 株では、変異型 Rsp5^{W415F/P418A} の存在量が 37°C の熱処理を加えた場合、野生型 Rsp5 よりも不安定になり、著しく減少することが明らかにされている (Gajewska *et al.*, 2001)。我々が取得した *rsp5*^{A401E} 株における変異型 Rsp5^{A401E} についても、3 つの WW ドメインの間で保存性はないが (Figure 5)、WW3 ドメインに変異を有しているため、仮に熱処理を加えた場合、同様に不安定になる恐れがある。この可能性を検証するため、野生株と *rsp5*^{A401E} における Rsp5 の発現量と安定性を確認した (Figure 8)。

CKY8 と CHT81 を完全培地で対数増殖期まで培養し、37°C で 30 min 高温シフトした後、細胞抽出液を調製してウェスタン解析を行った。また、Rsp5 は N 末に存在する C2 ドメインが、原形質膜や小胞体膜と結合していると考えられているため、細胞抽出液と同時に、遠心をかけない粗抽出液も SDS-PAGE に供した。その結果、25°C における野生型 Rsp5 と変異型 Rsp5^{A401E} の存在量に、有意な差はみられなかった。さらに興味深いことに、37°C の熱処理を加えた後でも、変異型 Rsp5^{A401E} の存在量は安定していた。また、粗抽出液を用いた場合と細胞抽出液を調製したサンプルから、ほぼ等量の Rsp5 を検出した。

1-3-2. ユビキチンリガーゼ Rsp5 は胞子形成や発芽に関与している

これまでに、Rsp5 には温度感受性変異株のほかに、子嚢内に 4 個の胞子を形成しない変異株も報告されており (Kanda, 1996)、Rsp5 が減数分裂や胞子の生育に深く関与すると考えられている。そこで、Rsp5 の Ala401 の機能を解析するため、*rsp5*^{A401E} における胞子形成能および生存率を調べた。CKY8 (α 型) または *rsp5*^{A401E} (α 型) を ERX-17C 株 (a 型) と接合させて、各二倍体 CKY8/ERX-17C と CHT81/ERX-17C を取得後、胞子を形成させて四分子分析を行った。その結果、CHT81/ERX-17C における胞子形成能が、CKY8/ERX-17C のものと比較して著しく低下していた (Figure 9)。しかしながら、顕微鏡観察下では、両二倍体において 4 個の胞子を確認できたことから、おそらく Rsp5 は胞子形成ではなく、胞子発芽に関与していると予想される。さらに、一定時間後にその一部を希釈してエチルエーテル含有 YPD プレートに塗布し、25°C で生育したコロニー数を測定した (Table 3)。その結果、野生株では胞子形成後の細胞数はほとんど変化しなかったが、*rsp5*^{A401E} では培養時間に伴い生存率は低下し、60 hr 後には 84%にまで減少した。以上の結果より、

Rsp5 が減数分裂後における細胞の生存能力に関与していることを示唆した。

1-3-3. Rsp5 は様々なストレスにおけるストレスタンパク質の発現に必要である

これまでの研究で、我々は Rsp5 がストレスによって生じる異常タンパク質の選択的分解に関与することを提唱している (Hoshikawa *et al.*, 2003)。*rsp5^{A401E}* は、最少培地におけるアミノ酸アナログ、過酸化水素、ヒートショック、完全培地での高温培養など、種々のストレスに対して強い感受性を示す。そのため、おそらく *rsp5^{A401E}* では、ストレスによって生じた異常タンパク質を分解できず、細胞内に蓄積するため、生育阻害や細胞死を引き起こすことが考えられる。

高温、エタノール、冷凍、浸透圧、酸化ストレスは、正常なタンパク質を変性させて機能を失わせ、共通して細胞内に異常タンパク質の生成・蓄積を引き起こす。特に、高温ストレスはタンパク質を熱変性させ、エタノールや浸透圧ストレスは、細胞膜の流動性や透過性に影響を与えて、脱水作用を引き起こすのであろう。冷凍ストレスは、脱水作用とともに氷結晶が細胞組織を破壊し、酸化ストレスは DNA ダメージや活性酸素種 (ROS) を発生させて生育阻害を示すと考えられる。

一般的に、ストレスによって生じた異常タンパク質が、細胞内に蓄積することは深刻な問題である。これを解決するためには、2通りの戦略が考えられる。まずは、ユビキチンプロテアソームシステムを介した異常タンパク質の分解。もう一方は、分子シャペロンの機能を有する、ストレスタンパク質による異常タンパク質の修復である。*rsp5^{A401E}* では、おそらく異常タンパク質の分解機能が著しく低下していると予想されるため、ストレスに対する修復機構の活性化が野生株よりも強く、その活性を長時間維持している可能性がある。そこで、*rsp5^{A401E}* におけるストレスタンパク質の発現を解析するため、様々なストレス環境下で野生株と *rsp5^{A401E}* における、ストレスタンパク質 *HSP42*, *HSP12*, *DDR2* の転写量を解析した。

各遺伝子上流約 500 bp を β -ガラクトシダーゼ遺伝子に連結したプラスミド、p546-HSP42, p546-HSP12, p546-DDR2 (セントロメア型) を構築後、野生株と *rsp5^{A401E}* に導入した。各形質転換体を完全培地で培養後、種々のストレス (高温シフト、エタノール、ソルビトール、ヒートショック) に供してレポーターアッセイを行った (Figure 10)。その結果、ストレスなしの 25°C 培養では、*rsp5^{A401E}* におけるストレスタンパク質 *HSP42*, *HSP12*, *DDR2* の発現量が野生株に比べて著しく低下していた。さらに、高温、エタノール、ソルビトールストレスでは、野生株において各ストレスタンパク質の発現量が時間とともに急激に上昇したのに対して、*rsp5^{A401E}* では野生株並みの増加がみられなかった。特に、すべてのストレスに対して *HSP12* の発現量が顕著に高く、生成・蓄積しているであろう異常タンパク質の修復に大きく貢献していると予想される。また、ヒートショックでは、野生株における発現量の方が長時間持続していた。これらの結果より、Rsp5 がストレスタンパク質の転写誘導に関与していること、さ

らに、ストレス環境下での発現誘導に対しても影響を与えていることが判明した。

より詳細にストレスタンパク質の転写量を調べるため、同様の実験をノーザン解析にて行った (Figure 11)。野生株と *rsp5*^{A401E} を 25°C で対数増殖期まで培養後、種々のストレス (高温シフト、エタノール、ソルビトール) にさらした。高温シフトやエタノール処理における野生株では、*HSP12*, *HSP42*, *DDR2* の転写量が著しく増加した。高浸透圧ストレスのソルビトールでは、*HSP12* の mRNA レベルが顕著に増加し、*HSP42* と *DDR2* においても若干の増加がみられた。高温シフトやソルビトール処理に対する *HSP12* の転写誘導は 30 min で起こったのに対して、エタノール処理では 120 min 後に転写誘導が始まった。HSE-, STRE-, HSE/STRE-関連遺伝子における発現誘導の差異は、ストレスによって異なる転写調節因子の活性化の違いや異なるプロモーター配列、そしてストレスの種類などが影響している可能性がある。

一方、ノーザン解析においても興味深いことに、*rsp5*^{A401E} では様々なストレスにおけるストレスタンパク質の転写量が、野生株と比べて著しく低下していた。バンドの濃さを数値化した転写の相対量は、*rsp5*^{A401E} で約 50%減少していた。また、ストレスなしで培養する限り、両菌株におけるストレスタンパク質の転写誘導は見られなかった。これらの結果より、ストレス下での Rsp5 の新しい機能として、HSE-, STRE-, HSE/STRE-関連遺伝子の発現を制御することが示唆された。

1-3-4. *rsp5*^{A401E} では、Hsf1, Msn2/4 に依存した遺伝子の発現に欠陥がある

Figure 11 で示したように、ストレスにおけるストレスタンパク質遺伝子の転写誘導には、Rsp5 が重要な役割を担っている。さらに、他の遺伝子発現を網羅的に調べるため、10%エタノールストレスにおける DNA マイクロアレイ解析を行った (Table 4)。野生株と *rsp5*^{A401E} を完全培地で培養後、最終濃度が 10%になるようにエタノールを添加後 1 hr 培養し、全 RNA を抽出した。

ノーザン解析の結果と同様、マイクロアレイ解析においても、*rsp5*^{A401E} では *HSP12*, *HSP42*, *DDR2* の転写量が、野生株よりも著しく減少していた。さらに、同じような傾向が Hsf1, Msn2/4 に支配されている遺伝子からも得られた。HSE 配列を含む *HSP60*, *HSP82*, *HSP26* (Heat shock protein) や、STRE 配列を含む *CTT1* (Catalase), *TPS2* (Trehalose-6-phosphate phosphatase) 遺伝子の転写レベルは、野生株と比較して明確に *rsp5*^{A401E} で減少していた。これらの結果より、Rsp5 が多くのストレスタンパク質の転写に関わっていることを強く示唆した。

1-3-5. ストレス環境下では、Rsp5 とストレスタンパク質が協調的に働いており、細胞の生存に関与している

これまでの結果から、*rsp5*^{A401E} が様々なストレスに対して感受性を示す理由が

2 通り考えられる。第 1 に、 $rsp5^{A401E}$ では、基質タンパク質と結合してユビキチンを転移させるのに必要な WW ドメインが変異しているため、おそらく異常タンパク質を認識して結合することができない。そのため、ユビキチン化を介した液胞や 26S プロテアソームにおける異常タンパク質の分解ができず、細胞内に蓄積して生育阻害が引き起こされるという可能性。第 2 に、 $rsp5^{A401E}$ ではストレスタンパク質遺伝子の転写が十分に誘導されないため、異常タンパク質が修復されていないことが考えられる。後者の仮説を証明するために、まず *HSP12*, *HSP42*, *DDR2* を *ADH1* プロモーター下で強制的に過剰発現させる pAD-HSP12, pAD-HSP42, pAD-DDR2 (2 マイクロ型) を構築した。これらのプラスミドを $rsp5^{A401E}$ へ導入し、細胞内に異常タンパク質が生じる様々なストレス下で表現型を調べた (Figure 12)。

各形質転換体、CKY8 (pAD4), CHT81 (pAD4), CHT81 (pAD-Rsp5), CHT81 (pAD-HSP12), CHT81 (pAD-HSP42), CHT81 (pAD-DDR2) を、完全培地で 25°C 培養し、高温、エタノール (経験的に液体培地の方が寒天培地よりも大きなダメージを与えるため、最終濃度は液体 9-10%、寒天 12%で行った)、塩化リチウム、ソルビトールを含んだ完全培地にスポットした。その結果、高温、塩化リチウムストレスでは、ストレスタンパク質を過剰発現させたすべての形質転換体において、野生株と同程度にストレス感受性を相補することができた。 $rsp5^{A401E}$ における各タンパク質の発現量を解析できてはいないが、結果的にストレス感受性を相補できたことから正常に発現しているものと考えられる。また、 $rsp5^{A401E}$ で野生型 *RSP5* を発現させても、ストレス感受性相補が弱いのは、野生株に比べて $rsp5^{A401E}$ の生育が遅いためかもしれない。これらの結果より、ストレスタンパク質の過剰発現が、おそらく積極的な異常タンパク質の修復を促し、 $rsp5^{A401E}$ の様々なストレス感受性を相補することを示唆した。

1-3-6. Rsp5 は転写調節因子 Hsf1 と Msn4 の翻訳後修飾に関与している

これまでの結論として、様々なストレスにおける $rsp5^{A401E}$ では、異常タンパク質の修復に関わるストレスタンパク質の転写レベルが、著しく減少していることが判明した。しかし、ユビキチンリガーゼ Rsp5 が直接ストレスタンパク質の発現制御に関わることは考えにくい。そこで、ストレスタンパク質の転写調節因子である Hsf1 と Msn2, Msn4 に着目した。Rsp5 が転写調節因子をユビキチン化し、活性化することで、ストレスタンパク質の発現を制御しているのだろうか (Figure 13)。

最近、オレイン酸合成酵素をコードする *OLE1* 遺伝子の転写調節因子である Spt23 や、そのホモログタンパク質 Mga2 が、Rsp5 によってユビキチン化されて 26S プロテアソームによる部分分解を受けた後、核へと輸送されて *OLE1* の転写を活性化するという報告がある (Hoppe *et al.*, 2000; Shcherbik *et al.*, 2003) (Figure 14)。実際、Hsf1 は Rsp5 が基質と結合するのに重要な LPKY モチーフを有していた

(Shcherbik *et al.*, 2004)。そこでまず、Rsp5 が転写調節因子 *HSF1* や *MSN2/4* の発現に影響を及ぼすかを解析するため、野生株と *rsp5^{A401E}* における両因子の転写量を調べることにした。野生株と *rsp5^{A401E}* を完全培地で培養し、全 RNA を抽出してノーザン解析を行った結果、*rsp5^{A401E}* における *HSF1* と *MSN4* 遺伝子の転写レベルは、わずかに野生株よりも低かった (Figure 15A)。したがって、Rsp5 が *HSF1* と *MSN4* 遺伝子の転写制御に関わる可能性が示唆された。

次に、Hsf1 と Msn4 の存在量を解析するため、C 末端側に HA-tag を付加して、*HSF1*-HA と *MSN4*-HA を連結した pAD-HSF1, pAD-MSN4 を構築し、それぞれ野生株と *rsp5^{A401E}* へ導入した。取得した形質転換体を、完全培地で 25°C 培養し、細胞抽出液を調製してウェスタン解析を行った。Figure 15B で示すように、*rsp5^{A401E}* では Hsf1 と Msn4 の存在量が、野生株に比べて著しく減少していた。この結果は、主に Rsp5 が Hsf1 と Msn4 の翻訳後修飾に関与することを示唆している。同様に、セントロメア型のプラスミド pRS415 を用いて各タンパク質の存在量を確認したが、野生株に比べて *rsp5^{A401E}* における発現量が極端に少なかったため、検出することができなかった (Figure 16)。

実は、温度感受性変異株 *rsp5-101* (HECT ドメインに変異が存在しているらしいが詳細については情報公開されていない) では、37°C 高温シフトの前後における Hsf1 の存在量とリン酸化状態に関して、野生株との間に違いは見られないことが報告されている (Kaida *et al.*, 2003)。現時点でこの矛盾を説明することはできないが、おそらく菌株の違いや Rsp5 の変異点の違いによるものと考えられる。

1-3-7. ユビキチンリガーゼ Rsp5 が *HSF1* と *MSN2/4* の転写に関与している

酵母には、ストレスによって発現誘導される遺伝子を制御する転写調節因子として Hsf1 と Msn2/4 が存在する (Sorger & Pelham, 1987; Martinez-Pastor *et al.*, 1996)。Hsf1 は、主にヒートショック応答に関与することがよく知られており、タンパク質のフォールディングに関わる *HSP42*, *HSP82*, *HSP12* など、何百ものストレスタンパク質遺伝子の転写を制御している (Gasch *et al.*, 2000)。一方、Msn2 と Msn4 は、ヒートショック、浸透圧ストレス、酸化ストレス、低 pH、グルコース飢餓、高濃度エタノールストレスなどに応答し、*DDR2*, *CTT1*, *TPS2* など、約 200 のストレスタンパク質遺伝子の転写を制御している (Causton *et al.*, 2001)。

これまでに、完全培地での高温培養、エタノール、ソルビトールストレスにおいて、*rsp5^{A401E}* ではストレスタンパク質の発現に欠陥があることを示してきた (Haitani *et al.*, 2006)。したがって、*rsp5^{A401E}* が様々なストレスに対して感受性を示すのは、主にストレスタンパク質の転写誘導が減少したためであると考えられる。Rsp5 には、*HSF1* と *MSN2/4* の転写を制御することで、Hsf1, Msn2/4 依存的な遺伝子の発現を制御

するという新しい機能があるのかもしれない。そこで、ストレス環境下で、Rsp5 が転写調節因子の発現に与える影響を解析するため、野生株と *rsp5^{A401E}* における *HSF1* と *MSN2/4* の転写量を、リアルタイム PCR によって測定した (Figure 17)。野生株と *rsp5^{A401E}* を完全培地、25°C で対数増殖期まで培養後、37°C への高温シフト、または、10%エタノールにさらした。

高温シフト後の野生株における *HSF1* と *MSN4* の mRNA レベルは、25°C の場合と比較して約 50%増加した。エタノールストレスでは、*MSN4* の転写量がわずかに増加していた。一方、*rsp5^{A401E}* では興味深いことに、ストレスなしの状態でも各遺伝子の転写量が野生株よりも著しく減少していた。さらに、*rsp5^{A401E}* では、エタノール処理によって各遺伝子の発現が誘導されていた。これらの結果より、ストレスによって応答する経路は異なるようであるが、Rsp5 が *HSF1* や *MSN2/4* の転写に関与することが示唆された。

1-3-8. Rsp5 は Hsf1 と Msn2/4 の発現を転写後レベルで制御している

ストレス存在下で、Rsp5 は一体どのように Hsf1 と Msn2/4 の発現を制御しているのだろうか。前にも述べたように、Rsp5 が Hsf1 と Msn2/4 へのユビキチン化を介してストレスタンパク質の転写を制御するという、新規の機能を有している可能性がある。そこでまず、ストレス環境の Rsp5 が Hsf1 と Msn2/4 の転写量や存在量に与える影響を解析するため、Figure 15B で作製した pAD-HSF1, pAD-MSN4 に加えて、*MSN2* 遺伝子の C 末端側に HA タグを付加したマルチコピープラスミド、pAD-MSN2 を新たに構築した。そして、これらのプラスミドをそれぞれ野生型と *rsp5^{A401E}* へ導入し、得られた形質転換体を完全培地 25°C で培養後、高温シフトやエタノールストレスにさらした。

まず、*rsp5^{A401E}* が合成完全培地 (SC-Leu)、37°C で感受性を示すことを見出した (Figure 18A)。次に、*HSF1* と *MSN2/4* の mRNA レベルをリアルタイム PCR で解析したところ、野生株と Rsp5 変異株の間に、ストレスの影響を受けた有意な差はみられなかった (Figure 18B)。この結果は、今回構築したプラスミド上の各遺伝子が、構成的に発現する *ADHI* プロモーター依存的に発現したため、差異が生じなかったものと考えられる。実際に、マルチコピープラスミドにおける *HSF1* と *MSN2/4* の転写量は、野生株や *rsp5^{A401E}* 由来のゲノム 1 コピーの場合より、約 50 倍も増加していた (Figure 17)。

一方、抗 HA 抗体を用いたウェスタン解析では、高温シフトやエタノール添加後、野生株と *rsp5^{A401E}* の両方で Hsf1 と Msn2/4 の存在量が増加した (Figure 18C)。ここで注目すべきことは、mRNA レベルでストレスによる影響をほとんど受けなかったにも関わらず、ストレス処理後において転写調節因子が大量に存在していたという

ことである。さらに興味深いことに、*rsp5^{A401E}* はストレスなしの状態できえ、各転写調節因子の存在量が野生株よりも劇的に減少していた。

さらに我々は、タンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミド (CX) を用いて、*rsp5^{A401E}* における Hsf1, Msn2/4 の安定性を解析した (Figure 18C)。ストレスにおける *rsp5^{A401E}* の Hsf1 存在量は、CX を添加しても変化は見られなかった。一方、Msn2 と Msn4 の存在量はストレスのあり、なしに関わらず、CX を添加することで野生株、*rsp5^{A401E}* の両方において減少を確認した。

ここで、ストレス環境下での Rsp5 による転写調節因子へのユビキチン化が気になる。前述したように、Hsf1 は Rsp5 の基質結合ドメインと相互作用するのに必要な、LPKY モチーフと呼ばれる塩基配列を有しているため、互いに結合できる可能性が高い。しかしながら、*in vivo* における酵母ツーハイブリッドアッセイ (Matchmaker System) (CLONTECH 社) や、*in vitro* における抗 HA 抗体を利用した免疫沈降後の、抗ユビキチン抗体によるウェスタン解析を試みたところ、Rsp5 が Hsf1 や Msn2/4 と直接的に強い相互作用を示す結果は得られなかった (Figure 19)。

また、他のセントロメア型プラスミド pRS415 を用いて、*HSF1* と *MSN4* 遺伝子を自身のプロモーター下で発現させた場合でも (Figure 16)、Figure 18C と同様の結果を得たことから、*ADHI* プロモーターは Rsp5 によってほぼ影響を受けないようである。これらの結果より、Rsp5 は Hsf1 と Msn2/4 の転写後制御に関与しており、Rsp5 が直接 Hsf1 や Msn2/4 の発現や存在量、安定性に影響を与えている可能性が示唆された。

1-3-9. Hsf1 と Msn2/4 の過剰発現による、*rsp5^{A401E}* ストレス感受性の相補

これまでの結果より、*rsp5^{A401E}* が様々なストレスに対して感受性を示すのは、ストレスタンパク質遺伝子の転写が十分に誘導されていないため (Figure 11)、異常タンパク質が修復されず、細胞内に蓄積することが原因であると考えられる。このストレス応答機構は未だ推測であるが、おそらく *rsp5^{A401E}* における転写調節因子の存在量が著しく減少しているため (Figure 18C)、十分な誘導が得られないのではないだろうか。この仮説を証明するために、*rsp5^{A401E}* において *HSF1*, *MSN2*, *MSN4* を *ADHI* プロモーター下で強制的に過剰発現させることで、ストレス感受性の相補を目指した。pAD-HSF1, pAD-MSN2, pAD-MSN4 (2 マイクロ型) を、野生株と *rsp5^{A401E}* へ導入し、細胞内に異常タンパク質が生じるであろう様々なストレス下で、これらの形質転換体の表現型を調べた (Figure 20)。

各形質転換体、CKY8 (pAD4), CHT81 (pAD4), CHT81 (pAD-RSP5), CHT81 (pAD-HSF1), CHT81 (pAD-MSN2), CHT81 (pAD-MSN4) を、完全培地で 25°C 培養し、Pro の毒性アナログである AZC, Arg の毒性アナログであるカナバニン、高温、

エタノール、塩化リチウム、ソルビトール、過酸化水素を含んだ培地にスポットした。その結果、*rsp5^{A401E}* で *HSF1* を過剰発現させると、塩化リチウムストレスにおいて、*rsp5^{A401E}* よりもストレス感受性を緩和する効果がみられた。しかしながら、Figure 18C で示すように、*rsp5^{A401E}* における転写調節因子の存在量は依然として著しく減少しているため、ストレスの種類によって相補する表現型に若干の差異はあるものの、感受性を相補するまでには至らなかった。

1-3-10. *rsp5^{A401E}* のストレス感受性とオレイン酸の関係

Figure 14 で示すように、Rsp5 はオレイン酸の生合成に大きく関与している。これまでにも述べた通り、転写調節因子である Spt23 が Rsp5 によってユビキチン化され、26S プロテアソームによる部分分解を受けてプロセシングされた後、核へと輸送されてオレイン酸合成遺伝子 *OLE1* の転写を活性化する(Hoppe *et al.*, 2000; Shcherbik *et al.*, 2003)。

近年、*S. cerevisiae* において、オレイン酸合成酵素 Ole1 は、低温やエタノールストレス耐性に必要であることが明らかになってきた (Kajiwara *et al.*, 2000; You *et al.*, 2003)。エタノールストレスは、おそらく酵母細胞の原形質膜を変性させてダメージを与え、ストレス感受性の引き金になると予想されている。ここで仮に、*rsp5^{A401E}* における Rsp5 の機能が著しく低下しているとすれば、おそらくオレイン酸生合成に支障をきたしており、正常な細胞膜の形成ができずにストレス感受性を示す恐れがある。

そこでまず、*rsp5^{A401E}* における *OLE1* の転写量を、リアルタイム PCR により解析した (Figure 21)。その結果、予想に反して 25°C で培養した通常状態では、*rsp5^{A401E}* における *OLE1* の転写量が野生株よりも約 1.5 倍高かった。さらに、高温やエタノールストレス存在下では、*rsp5^{A401E}* における転写量が野生株よりも約 1.5-2.0 倍増加していた。したがって、*rsp5^{A401E}* では Rsp5 の機能低下による、*OLE1* の転写誘導に及ぼす影響はみられなかった。

次に、*rsp5^{A401E}* で *OLE1* を過剰発現させ、様々なストレスに対する感受性を相補するか調べた。pAD-OLE1 (2 μ 型) を構築した後、野生株と *rsp5^{A401E}* へ導入して、細胞内に異常タンパク質が生じるストレス (AZC, カナバニン、高温、エタノール、塩化リチウム、ソルビトール、過酸化水素) 存在下で、CKY8 (pAD4), CHT81 (pAD4), CHT81 (pAD-RSP5), CHT81 (pAD-OLE1) の形質転換体の表現型を調べた (Figure 22)。その結果、野生株並みに感受性を相補することはなかった。細胞内における Ole1 の存在量やオレイン酸含量を測定してはいないが、おそらく *rsp5^{A401E}* におけるオレイン酸生合成経路への影響はなさそうである。

1-3-11. *rsp5^{A401E}* では *HSF1*-, *MSN2/4*-mRNA の核外輸送に欠陥がある

Rsp5 は、RNA 分子 (mRNA, rRNA, tRNA など) の核外輸送や修飾において中心的な役割を担うことが明らかになってきた (Rodriguez *et al.*, 2003; Kwapisz *et al.*, 2005)。いくつかの mRNA 核外輸送因子におけるユビキチン化が、核外輸送経路の制御に寄与している。mRNA 輸送には、5' キャップ付加、スプライシング、ポリアデニル化など、新生 mRNAs 前駆体を経るいくつかのプロセッシングステップが必要である。その異なるステップにおける RNA タンパク質複合体は、RNA ポリメラーゼ II による転写機構と相互作用していることが明らかになってきた。

最近、*rsp5-3* 変異株 (T104A, E673G, Q716P) では、37°C の高温ストレスにおいて、mRNA や 60S サブユニットの核外輸送に大きな障害をきたすことが報告されている (Neumann *et al.*, 2003)。さらに、*rsp5-3* 変異株では、RNA 前駆体である pre-tRNA や pre-rRNA のプロセッシングが阻害されることで、tRNA や rRNA の核外輸送に異常をきたすことが示唆された。上記の報告より、*rsp5*^{A401E} において転写調節因子の存在量が減少している原因は、A401E に変異を有することで、各転写調節因子の mRNA が核外へ正常に輸送されていないためであると予想した (Figure 23)。そこで、*HSF1*-, *MSN2/4*-mRNA の細胞内局在性を解析するため、*in situ* ハイブリダイゼーション法 (FISH) を行った (Figure 24)。

まず、野生株と *rsp5*^{A401E} を完全培地 25°C で対数増殖期まで培養後、高温シフト、エタノールストレスにさらした。ストレスなしの状態では、野生株と *rsp5*^{A401E} の両方において、RNA Poly(A)⁺, tRNA^{Ile} (イントロンあり), tRNA^{Met} (イントロンなし) が、核から細胞質側に輸送されていた。興味深いことに、*rsp5*^{A401E} ではストレス添加後、*HSF1*, *MSN2/4* の mRNA が核内に蓄積しており、ストレスなしの状態ですら核での蓄積が観察された。さらに注目すべきことは、*rsp5*^{A401E} のストレス処理後において、大部分の mRNA と tRNA もまた、核外輸送されず蓄積していたことである。これらの結果より、Rsp5 が *HSF1*-, *MSN2/4*-mRNA の核外輸送に選択的に関与すること、そしてエタノールストレスにおいても、Rsp5 の機能が RNA 分子の核外輸送に必須であることを初めて明らかにした。

エタノールストレスは、高温ストレスと異なるメカニズムでタンパク質のフォールディングを阻害している (Piper, 1995)。したがって、*rsp5*^{A401E} ではエタノールストレスに対して、ストレスタンパク質の転写を誘導する適切な応答をすることができないのかもしれない。つまり、Rsp5 が *HSF1*-, *MSN2/4*-mRNA の核外輸送に関わる標的タンパク質のユビキチン化に失敗し、輸送機構に何らかの影響を与えている可能性を示唆している。

1-3-12. Rsp5 はストレス下で Hsf1 と Msn2/4 の核移行にほぼ影響を与えない

Hsf1 と Msn2/4 がどのようなストレスに対して応答し、どのような仕組みでスト

レスタンパク質の転写を誘導するのか、これまで明らかにされていることについて述べたい。Hsf1 は、ストレスタンパク質遺伝子のプロモーター上に保存された Heat shock element (HSE) モチーフを見つけ出し、ホモ三量体を形成して構成的かつ誘導的な形態で結合する。ストレスを与えていない細胞においても、Hsf1 は核内で常にリン酸化されている。また、アルカリ pH、酸化ストレス、熱ストレス、グルコース飢餓などの環境下では、過剰リン酸化されて活性型の形態をとり、ターゲット遺伝子の転写を誘導する働きをもつ (Hashikawa *et al.*, 2006)。

MSN2 の遺伝子は構成的に発現しており、*MSN4* の場合はストレス存在下で Msn2/4 依存的に起こっており、この二つのタンパク質には 41%の相同性がある (Estruch & Carlson, 1993)。*msn2Δ* と *msn4Δ* の単独破壊株に明らかな表現型の差異は見られないが、*msn2msn4Δ* の両破壊株では炭素源飢餓、ヒートショック、浸透圧ストレス、酸化ストレスにおいて超感受性を示す。ストレスなしの環境において、Msn2 と Msn4 は細胞質側に局在しており、ストレス存在下では過剰リン酸化を受けて核へ移行することが知られている (Gorner *et al.*, 1998)。

ストレス存在下において、Rsp5 が及ぼす Hsf1 と Msn2/4 の核輸送への影響を調べるため、細胞内局在性を解析した (Figure 25)。*HSF1*, *MSN2*, *MSN4* 各遺伝子の C 末端側に GFP を融合させたカセット DNA を作製し、野生株と *rsp5^{A401E}* へ導入して様々な組換え体 (CYH01-CYH06) を取得した。野生株 (CYH01, CYH02, CYH03) における Hsf1 は、主に核に局在していた。また、25°C での通常状態において、Msn2/4 は細胞内全体に分布していたが、高温シフト、エタノール処理後には、ある程度核に局在していた。特に、野生株では高温ストレスのときに Msn2 が核と細胞質の両方で多く検出され、エタノールストレスのときに Msn4 が核内で観察された。おそらく、ストレスに対しては主に Msn2 が応答しており、より厳しいストレス条件の場合において Msn2 がより多く生産され、安定的に存在しているためであると考えられる。

一方、*rsp5^{A401E}* (CYH04, CYH05, CYH06) における転写調節因子も、野生株の場合と同じような細胞内局在性を示した。つまり、mRNA の核外輸送には異常をきたすものの、わずかに翻訳されたタンパク質の核内輸送は、正常に機能することが判明した。これらの結果より、ストレスにおいて Rsp5 は、Hsf1 と Msn2/4 の核内輸送において、ほぼ影響を与えないことを示した。しかし、野生株と比較すると、タンパク質の存在量自体が著しく減少していた。これは、*rsp5^{A401E}* でストレスによって誘導された転写調節因子の存在量が、野生株に比べて減少していた結果 (Figure 18C) と一致している。

1-4. 考察

これまでに我々は、様々なストレス環境下で、*rsp5^{A401E}* における HSE-, STRE- 関連遺伝子の発現に欠陥があることを示し、Rsp5 が Hsf1 と Msn4 の翻訳後修飾を介したストレスタンパク質の発現制御をすることで、変性タンパク質のリフォールディングに関わることを提唱してきた (Haitani *et al.*, 2006)。37°C の高温ストレスにおける野生株での *HSF1* と *MSN4* の発現量は増加しており、エタノール添加によっても *MSN4* の発現量が増加した (Figure 17)。このように、転写調節因子の転写誘導は、おそらく環境ストレスへ適応する上で必要な機構である。しかしながら、高温やエタノールストレスに応答する *MSN2* の発現量は、野生株において減少していた。様々なストレスにおいて、Msn2/4 が *MSN4* の発現を制御しているが、主に *MSN4* の活性化がストレスタンパク質遺伝子の発現に影響を与えている可能性がある。

酵母においては、Hsf1 が高温ストレスに対して、Msn2/4 がエタノールストレスに対して応答して、多くのストレスタンパク質遺伝子を誘導することが知られている (Hashikawa & Sakurai, 2004; Ferguson *et al.*, 2005)。これら転写調節因子によるストレスタンパク質遺伝子の誘導メカニズムには不明な点が多いが、おそらくストレスや標的遺伝子の種類に影響していると考えられる。確かに Rsp5 は、*HSF1* や *MSN2/4* の転写誘導に何らかの影響を与えてはいるが、*rsp5^{A401E}* の強いストレス感受性は、主に *HSP12* など、ストレスタンパク質遺伝子の発現量が減少したためであると推測される (Figure 11)。

Rsp5 は様々な細胞内イベントに関与しているが、実際に *HSF1*, *MSN2/4* の転写量が減少したのは、ストレス感受性を示すからではなく、二次的な *rsp5^{A401E}* の影響ではないのだろうか。Figure 17 に示すように、ストレスなしの状態でも、*rsp5^{A401E}* における *HSF1*, *MSN2/4* の転写量はすでに、野生株の約半分にまで減少していた。つまり、*rsp5^{A401E}* の高温ストレス感受性が、直接的な転写量減少の原因ではないと言える。おそらく、*rsp5^{A401E}* における核外輸送機能の異常が関与している。補足すると、Figure 12 で示したように、たとえストレスタンパク質 *HSP12* を *rsp5^{A401E}* で過剰発現させても、*HSP12* 自体が *HSF1*, *MSN2/4* の下流に位置しているため、*HSF1* の転写量にはほぼ影響を与えないと考えられる。したがって、*rsp5^{A401E}* では高温ストレス感受性が原因で *HSF1*, *MSN2/4* の転写量が減少したのではなく、主に *HSF1*, *MSN2/4* の mRNA を核外へ正常に輸送できないことで、ストレス感受性を引き起こした可能性が高い。

最も興味深かったことは、野生株と *rsp5^{A401E}* における *HSF1* と *MSN2/4* の転写量を、過剰発現プラスミドを用いることでほぼ同程度に調節しても、ストレスの有無に関わらず変異株における Hsf1 と Msn2/4 の存在量が著しく減少していたことである (Figure 18)。そこで、タンパク質合成阻害剤シクロヘキシミド (CX) を用いて、

Hsf1, Msn2/4 の安定性を解析した(Figure 18C)。その結果、CX を添加してもストレスにおける *rsp5*^{A401E} の Hsf1 存在量に、変化は見られなかった。これは、*rsp5*^{A401E} において、おそらく *HSF1* の mRNA がほとんど核から輸送されておらず、わずかに翻訳されたためである。一方、Msn2 と Msn4 の存在量はストレスのあり、なしに関わらず、CX を添加することで野生株、*rsp5*^{A401E} の両方で減少していた。この場合、*MSN2*, *MSN4* の mRNA が若干核から輸送されており、その後翻訳された Msn2, Msn4 は、タンパク質分解経路を介して分解された可能性が考えられる。

酵母において、Hsf1 は HSE 配列に、Msn2/4 は STRE 配列にそれぞれ結合することが知られており、熱や酸化ストレスに応答して HSE-, STRE-関連遺伝子発現の引き金となる。しかしながら、Hsf1 と Msn2/4 がどのようにして核内へ輸送されるのかは不明である。この過程において、Rsp5 は Hsf1 や Msn2/4 へのユビキチン化を介して、安定性や核内への輸送を制御するという重要な役割を担っているのかもしれない。そこで我々は当初、*rsp5*^{A401E} において転写調節因子の存在量が減少している理由に、細胞質から核内への輸送に失敗した因子が、何らかのプロテアーゼによって分解されたのではないかと予想した。さらに、*rsp5*^{A401E} は、WW ドメイン内の 401 番目の Ala が Glu にアミノ酸置換しているため、転写調節因子を認識して結合できないという可能性も考えられた。様々な方法で、Rsp5 と Hsf1、または Msn2/4 との相互作用を解析したが、有力な証拠は得られなかった (Figure 19)。そのため、*rsp5*^{A401E} における Hsf1 Msn2/4 の細胞内局在性を解析したところ、ストレスのない通常の状態では細胞内全体に分布していたが、ストレス添加後は GFP 融合タンパク質の存在量は減少していたものの、局所的に核に存在していた (Figure 25)。

その他の興味深い点としては、高温やエタノールストレス処理後、野生株、*rsp5*^{A401E} において、*HSF1*, *MSN2/4* の mRNA は変化しないまま、Hsf1, Msn2/4 の存在量が増加したことである (Figure 18C)。これまでに、Hsf1 や Msn2/4 はストレス環境下でリン酸化や構造変化を受け、活性化や安定化した後、ストレスタンパク質遺伝子の転写を誘導することが報告されている (Hashikawa & Sakurai, 2004)。そのため、Hsf1 や Msn2/4 が安定化することで、急速なターンオーバーを免れた可能性、もしくは、ユビキチンを介したタンパク質分解による Hsf1, Msn2/4 の分解が停止した可能性が考えられる。

これらの結果とは対照的に、*rsp5*^{A401E} における RNA 分子の細胞内局在性が劇的に変化していた (Figure 24)。驚いたことに、ストレスなしの状態において、全 mRNA や tRNAs が正常に核外へ輸送されているにも関わらず、*HSF1* と *MSN2/4* の mRNA が核に蓄積していた。酵母においては、高温ストレスと同様にエタノールストレスが、選択的に mRNA の核外輸送を引き起こすことが知られている (Tani *et al.*, 1995; Saavedra *et al.*, 1996; Krebber *et al.*, 1999)。エタノールストレスを受けた細胞

が、核に全 mRNA を蓄積する一方で、ヒートショックタンパク質をコードする *SSA4* の mRNA が選択的に核から輸送されるのである。ゆえに、その転写調節因子である Hsf1 と Msn2/4 は、たとえストレスのない状態においても、構成的に発現されており、細胞質に存在している必要がある。そのため、Rsp5 は直接的、または間接的に *HSF1*, *MSN2/4* の pre-mRNA のプロセッシングや、mRNA の選択的核外輸送に関与しているのかもしれない。さらに我々は、高温やエタノールストレスにおいて、*rsp5^{A401E}* では *HSF1*, *MSN2/4* の mRNA が核に蓄積していることを明らかにした。全 mRNA, tRNAs の核外輸送についても、ストレス下では *rsp5^{A401E}* において強く妨げられていることを発見した。おそらく、mRNA 核外輸送受容体 Mex67 が (Gwizdek *et al.*, 2006)、THO/TREX (transcription/export) 複合体の構成因子である Hpr1 (Gwizdek *et al.*, 2005) を含んだ RNA 結合受容体を通して mRNA にリクルートされていない可能性と、Mex67 の機能が低下しているために起こる mRNA 核外輸送への障害が考えられる。

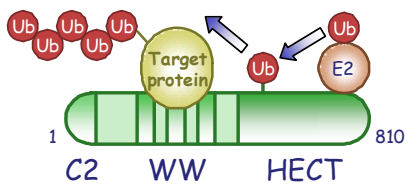
酵母において Rsp5 は、核外輸送因子 Hpr1 のユビキチン化と分解を介して mRNA の制御に一部関与しているが、その詳細なメカニズムは解明されていない。適切な RNA 分子の核外輸送は、Rsp5 の触媒部位に加えて、基質との結合に重要な 2 番目と 3 番目の WW ドメインによっても厳密にコントロールされている (Rodriguez *et al.*, 2003)。Rsp5 活性は、37°C での mRNA 核外輸送に対して必要だが、25°C では必要ない。しかしながら、*HSF1* と *MSN2/4* の mRNA はストレスの種類によって、核外へと選別されて輸送されている可能性がある。今後さらに、ストレス存在下、非存在下における *rsp5^{A401E}* で、ストレスタンパク質を含む他の遺伝子の mRNA についても、細胞内局在性を詳細に解析することが求められる。

ストレス存在下、非存在下で、野生株と *rsp5^{A401E}* における Pgc1 の存在量がほぼ同じであったにも関わらず、Hsf と Msn2/4 の存在量が *rsp5^{A401E}* では著しく減少していた (Figure 18C)。これらの結果は、ストレスのない状態でさえも *PGK1*-mRNA が非選択的に核外輸送されており、反対に *HSF1*, *MSN2/4* の mRNA が輸送されていないことを示唆している。さらに、酵母は高温やエタノールストレスに曝されている時間がわずか 10 min であり、ストレス処理前に存在していた Pgc1 が単に検出されただけかもしれない。

我々は Figure 12 に示すように、*rsp5^{A401E}* において *HSP12* を過剰発現させることで、様々なストレスに対する感受性を緩和できることを明らかにした (Haitani *et al.*, 2006)。そこで、*HSF1* や *MSN2/4* についても同様に、*rsp5^{A401E}* で *ADHI* プロモーターを利用して過剰発現させた (Figure 20)。しかしながら、転写調節因子の過剰発現は、異常タンパク質を生成するような様々なストレス (高温、エタノール、過酸化水素、毒性アミノ酸アナログなど) 下で、*rsp5^{A401E}* の生育を補うことはできなかった。

これらの結果は、*rsp5*^{A401E} において *HSF1*-, *MSN2/4*-mRNA の核外輸送に欠陥があることを示唆している。対照的に、*rsp5*^{A401E} においても *HSP12* は *SSA4* と同様、ストレスによって生じた異常タンパク質を修復するため、選択的に核外輸送されて翻訳されるメカニズムが存在する可能性が考えられる (Tani *et al.*, 1995; Saavedra *et al.*, 1996; Krebber *et al.*, 1999)。

重要な結論は、Rsp5 がストレスによって生じた異常タンパク質の修復と分解の、その両方に関与している可能性が高いということである。特に、高温やエタノールストレス環境下では Rsp5 による適切な RNA 分子の核外輸送を通して、ストレス応答に必要な転写調節因子の発現を制御していることを新たに発見した (Figure 26)。おそらく、Rsp5 依存的なユビキチン化が、直接的または間接的に RNA 分子の輸送に影響を与えている。したがって、Rsp5 による核外輸送因子のユビキチン化が、細胞内ストレス応答に必須であると考えられるため、*rsp5*^{A401E} では高濃度エタノールや高温において、非常に強い感受性を示すのであろう。その機構を解明すべく、野生株と *rsp5*^{A401E} における mRNA と tRNA の核外輸送についてさらなる解析が必要である。酵母において、Rsp5 はユビキチン化を通して大部分の RNA 生合成や輸送経路をコントロールしており、核外輸送に関わるであろう Rsp5 の基質を同定することが、今後の重要な挑戦である。第一章では、Rsp5 を介した RNA 分子の核外輸送機構の解明に向けた重要な知見を得ることができた。さらなるストレス応答機構が明らかとなり、新規のストレス耐性酵母育種への研究につながることを期待する。



Rsp5 1-810
 C2 4-103
 WW1 229-266
 WW2 331-368
 WW3 387-424
 HECT 474-809

C2 domain

binds membrane phospholipids in a Ca²⁺-regulated manner.

WW domain

are protein interaction modules that bind proline-rich ligands.

HECT domain

ligates ubiquitin in the process of target protein degradation.

WW1 domain	GRLPPG	W	ERRTDNF	G	RTYYVDHNTTRTT	W	KRPTLDQTE
WW2 domain	GELPSG	W	EQRFTPE	G	RAYFVDHNTTRTT	W	VDPRRQQYI
WW3 domain	GRLPSG	W	EMRLTNT	A	RVYFVDHNTKTTT	W	DDPRLPSSL

3rd WW domain:
 Ala401 (GCA)
 → Glu (GAA)

Figure 5 The *rsp5* mutation (Ala401Glu). Rsp5 is an essential E3 ubiquitin ligase containing the HECT-domain.

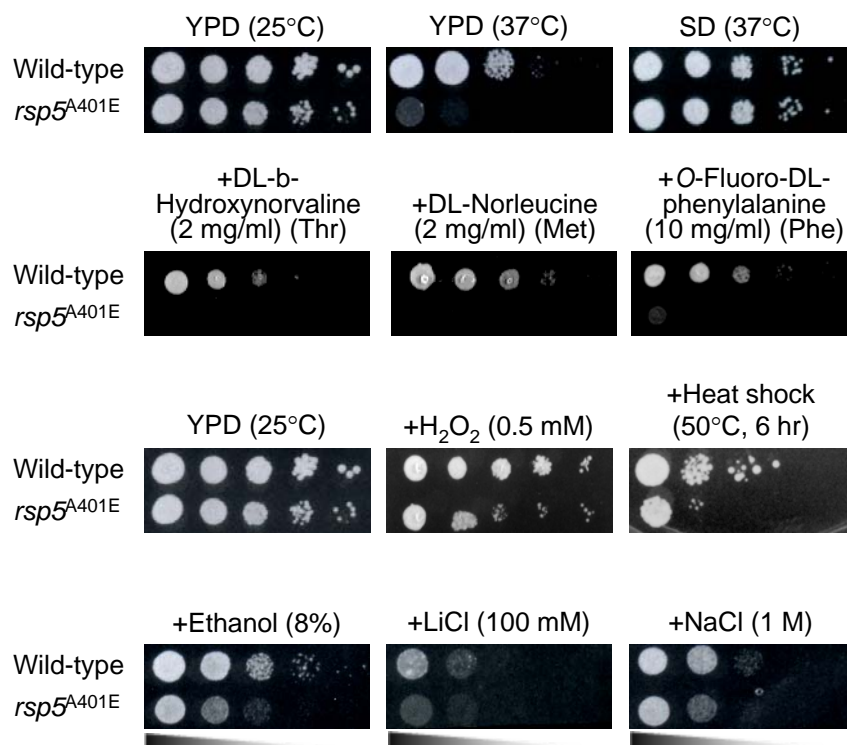


Figure 6 The *rsp5* mutant is hypersensitive to various stresses that generate abnormal proteins in the cell.

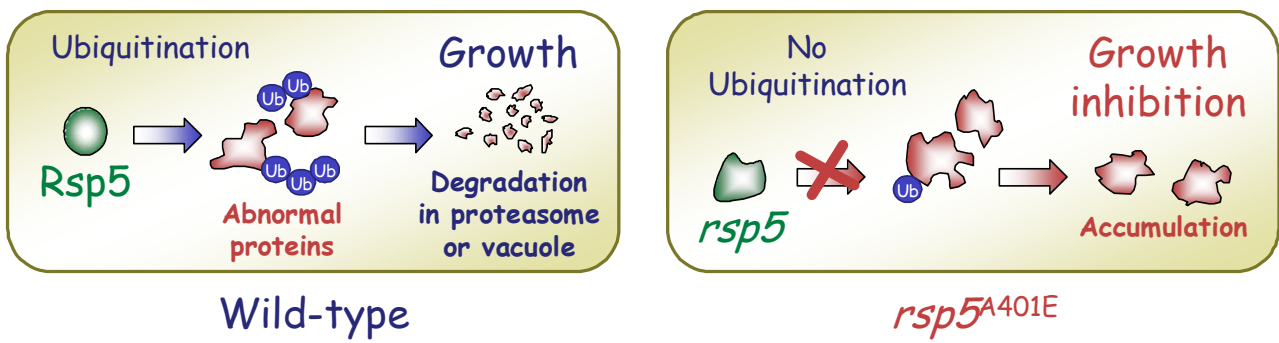


Figure 7 Mechanism of stress hypersensitivity of the *rsp5^{A401E}* cells. The *rsp5* mutant cannot recognize and bind to abnormal proteins via its WW domains to conjugate ubiquitin; thus, the ubiquitination-triggered degradation of target proteins in vacuole or in proteasome fails, causing growth inhibition.

Table 1 Yeast strains used in this study

Strain	Genotype	Background and/or description
CKY8	<i>MATα ura3-52 leu2-3 112 RSP5</i>	S288C, wild type
CHT81	<i>MATα ura3-52 leu2-3 112 <i>rsp5</i>^{FA401E}</i>	S288C, <i>rsp5</i> mutant
CHT82	<i>MATα ura3-52 leu2-3 112 <i>rsp5</i>^{FA401E} <i>gap1</i>Δ</i>	S288C, <i>rsp5</i> mutant
CYH01	<i>MATα ura3-52 leu2-3 112 RSP5 HSF1-GFP-Kan</i>	S288C, <i>HSF1</i> -GFP fusion
CYH02	<i>MATα ura3-52 leu2-3 112 RSP5 MSN2-GFP-Kan</i>	S288C, <i>MSN2</i> -GFP fusion
CYH03	<i>MATα ura3-52 leu2-3 112 RSP5 MSN4-GFP-Kan</i>	S288C, <i>MSN4</i> -GFP fusion
CYH04	<i>MATα ura3-52 leu2-3 112 <i>rsp5</i>^{FA401E} HSF1-GFP-Kan</i>	S288C, <i>rsp5</i> mutant <i>HSF1</i> -GFP fusion
CYH05	<i>MATα ura3-52 leu2-3 112 <i>rsp5</i>^{FA401E} MSN2-GFP-Kan</i>	S288C, <i>rsp5</i> mutant <i>MSN2</i> -GFP fusion
CYH06	<i>MATα ura3-52 leu2-3 112 <i>rsp5</i>^{FA401E} MSN4-GFP-Kan</i>	S288C, <i>rsp5</i> mutant <i>MSN4</i> -GFP fusion
ERX-17C	<i>MATα his4-N met4 ade8</i>	S288C, wild type

Table 2 Oligonucleotides used in this study

Name	Oligonucleotide sequence
RSP5-HindIII	5'-AACCA <u>AGCTT</u> AAAAGACATACGCTTAACCA-3'
RSP5-EcoRI	5'-ACCGGA <u>ATTCCGTTT</u> CAAGTATGTACCTCA-3'
p546-HSP12-HindIII	5'-GGCCCA <u>AGCTT</u> GGACTAGAAGCCAAAAGCCAG-3'
p546-HSP12-BamHI	5'-TTGGGGGATCCATTGTTGTATTAGTTTTTTTTGTTTTG-3'
p546-HSP42-HindIII	5'-GGCCCA <u>AGCTT</u> CTGGGGTTGGGTAACAAGTGA-3'
p546-HSP42-BamHI	5'-TTGGGGGATCCATTGCTTCGGCTTGGTATGAT-3'
p546-DDR2-HindIII	5'-CCGCTCA <u>AGCTT</u> TATTTCTCTGATGTAA-3'
p546-DDR2-BamHI	5'-TTGGGGGATCCATGTTTAAATCGATTTAAATTAGCGTG-3'
HSP12-PstI	5'-CCAAA <u>ACTGCAG</u> CAAAAACAAAAAACTAAATACASACA-3'
HSP12-SacI	5'-AACCCCGAGCTCTACAAAGAGTTCCGAAAGAT-3'
HSP42-PstI	5'-CCAAA <u>ACTGCAG</u> GATCATACCAAGCCGAAGCA-3'
HSP42-SacI	5'-AACCCCGAGCTCTGTGTATAAACAGATACG-3'
DDR2-PstI	5'-CCAAA <u>ACTGCAG</u> CACGCTAATTTAATATCGATTTAAAC-3'
DDR2-SacI	5'-AACCCCGAGCTCCAGTAAGCGGCGTTTTTC-3'
HSF1-Sall	5'-ACGCGT <u>CGACT</u> ACTCCACTAAGGCCAGTAG-3'
HSF1-SmaI	5'-ATCCCCCGGGCCC*TTTCTTAGCTCGTTTGGGCA-3'
MSN2-PstI	5'-AAA <u>ACTGCAG</u> ATCTAAAATGACGGTCGACC-3'
MSN2-SmaI	5'-TTCCCCCGGGACC*AATGTCTCCATGTTTTTTAT-3'
MSN4-Sall	5'-ACGCGT <u>CGACT</u> TACGAAGCGGTTGGTAGCGA-3'
MSN4-SmaI	5'-ATCCCCCGGGCCC*AAAATCACCGTGCTTTTTGT-3'
HSF1-HA-PstI	5'-ATCGT <u>GCAGG</u> CTGGAAGGAAAGGAAACA-3'
HSF1-HA-SacI	5'-GAAGGACACAAC <u>CTCGAG</u> GAACACTCTGTT-3'
MSN4-HA-PstI	5'-TAGCCT <u>GCAGA</u> ACGCCTTTATCAGTTCGGC-3'
MSN4-HA-SacI	5'-GAAGGACACAAC <u>CTCGAG</u> GAACACTCTGTT-3'
OLE1-HindIII	5'-GCCCA <u>AGCTT</u> TACAACAAAGATGCCAACTTCTGGAACACTAC-3'
OLE1-PstI	5'-AAA <u>ACTGCAG</u> GTGATACTTAAAGAAGCTTACCAGTTTCGT-3'
ACT1-EcoRI	5'-CCC <u>GAATT</u> CGGTTGCTGCTTTGGTTATTG-3'
ACT1-Sall	5'-ACGCGT <u>CGAC</u> GAAACACTTGTGGTGAACGA-3'
HSF1-F	5'-GATCCGCAGTCAGCAGCAT-3'
HSF1-R	5'-GTTTCCTTGAGTCATGGAAAAAGA-3'
MSN2-F	5'-TGCGTCCGTTATTGCGAAA-3'
MSN2-R	5'-CCTCTGTCAAAAATGGCATATCAT-3'
MSN4-F	5'-GTCGGCATTTCGACAATAACGTA-3'
MSN4-R	5'-TCCTGAGCCGGAGATGACTT-3'
mRNA-dT50	5'-TT-3'
mRNA-HSF1	5'-GATCCGCAGTCAGCAGCATCGCCGTTCTTCTTCTTTTTTCCATGACTCAAGGAAA-3'
mRNA-MSN2	5'-TGCGTCCGTTATTGCGAAAGTGGCGACTACAGGCTTGAGTAATGATATGCCATTTTTGAC-3'
mRNA-MSN4	5'-GTCGGCATTTCGACAATAACGTAGACCCCTTCAACATTCTCAAGTCATCTCCGGCTCAGGA-3'
tRNA-Ile-m	5'-GCGGGATCGAACCGCTGATCCCCGCTTATTAGCACGGTGCCTTAACCAACTGGGCCAAG-3'
tRNA-Ile-p	5'-CGTTGCTTTTAAAGGCCTGTTTGAAGGTCTTTGGCACAGAACTTCGAAACCGAATGT-3'
tRNA-Met	5'-CCAGGGGAGGTTCGAACTCTCGACCTTCAGATTATGAGACTGACGCTTCTTCTACTGAGC-3'
HSF1-GFP-F	5'-AGAGTACAACGATCACCGCCTGCCCAAACGAGCTAAGAAAGGTGACGGATCCCCGGG-3'
HSF1-GFP-R	5'-AAATGATTATATACGCTATTTAATGACCTTGCCCTGTGTAATCGATGAATTCGAGCTCG-3'
MSN2-GFP-F	5'-GTCGCAACACATCAAGACTCATAAAAAACATGGAGACATTGGTCGACGGATCCCCGGG-3'
MSN2-GFP-R	5'-TTATGAAGAAAGATCTATCGAATTAAAAAATGGGGTCTAATCGATGAATTCGAGCTCG-3'
MSN4-GFP-F	5'-ATCACAACATCTAAAACCTACAAAAAGCACGGTGATTTTGGTCGACGGATCCCCGGG-3'
MSN4-GFP-R	5'-TAGCTTGCTTGTCTTTATTTGCTTTTACCTTATTTTTATCGATGAATTCGAGCTCG-3'

The underlined sequences indicate the restriction site, and the asterisks show the replacement of the termination codon by glycine in *HSF1*, *MSN2*, and *MSN4*, respectively.

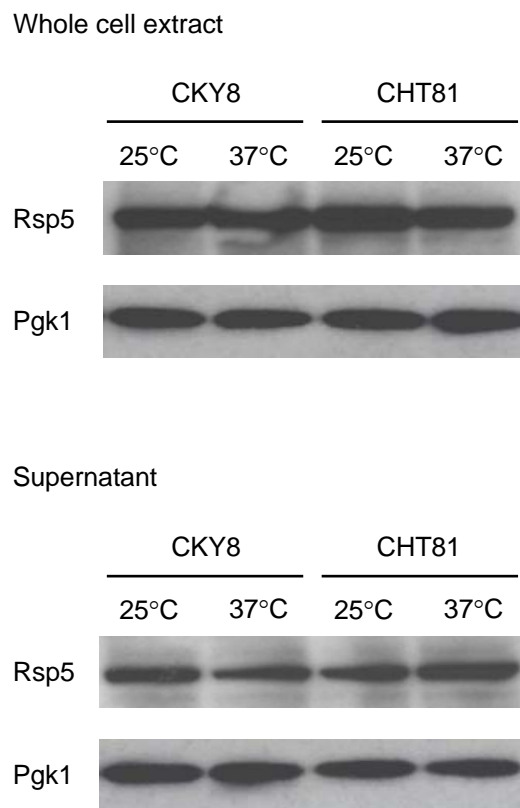


Figure 8 Expression and stability of Rsp5 in the *rsp5^{Δ401E}* cells. Strains CKY8 (wild-type) and CHT81 (*rsp5^{Δ401E}*) were grown to logarithmic phase on YPD medium at 25°C and subjected to temperature up-shift (from 25 to 37°C, 30 min). Whole cell extracts and supernatant (20,000 g) were prepared and analyzed by Western blot analysis using anti-Rsp5 monoclonal antibody. The 3-phosphoglycerate kinase Pgk1 was used as a protein-loading control.

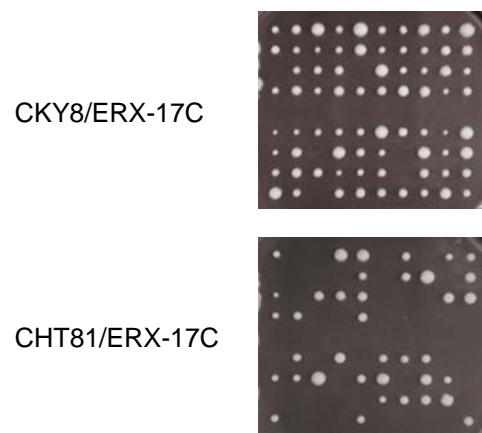


Figure 9 Tetrad analysis of CKY8/ERX-17C and CHT81/ERX-17C diploids on YPD agar plate.

Table 3 Survival analysis of the spore from CKY8/ERX-17C and CHT81/ERX-17C diploids.

	0	12	24	36	48	60	(hr)
CKY8/ERX-17C	182	352	245	262	252	243	(colony)
	100	193	135	144	138	136	(%)
CHT81/ERX-17C	160	224	218	204	188	134	(colony)
	100	140	136	128	118	84	(%)

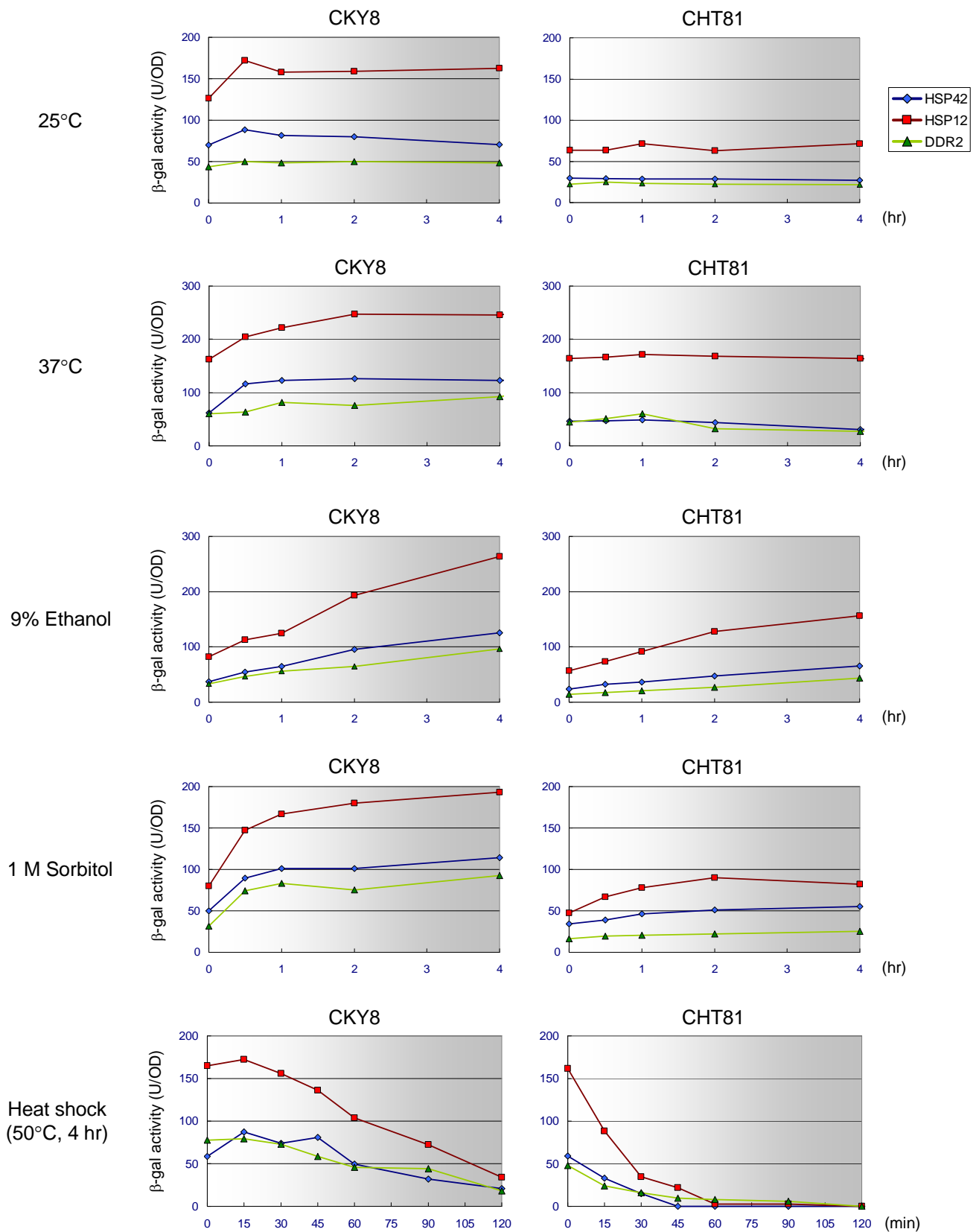


Figure 10 Expression of stress proteins was defective in the *rsp5* mutant under various stress conditions. Recombinant strains CKY8 (wild-type) harboring p546-HSP42 (diamond), p546-HSP12 (square), and p546-DDR2 (triangle), and CHT81 (*rsp5^{A401E}* mutant) harboring p546-HSP42 (diamond), p546-HSP12 (square), and p546-DDR2 (triangle) were grown to logarithmic phase on SC-Ura medium at 25°C and subjected to temperature up-shift (from 25 to 37°C), ethanol (9%), sorbitol (1 M), and heat shock (50°C, 4 hr). Cell extracts were prepared and the β -galactosidase activity was measured from at least three independent cultures.

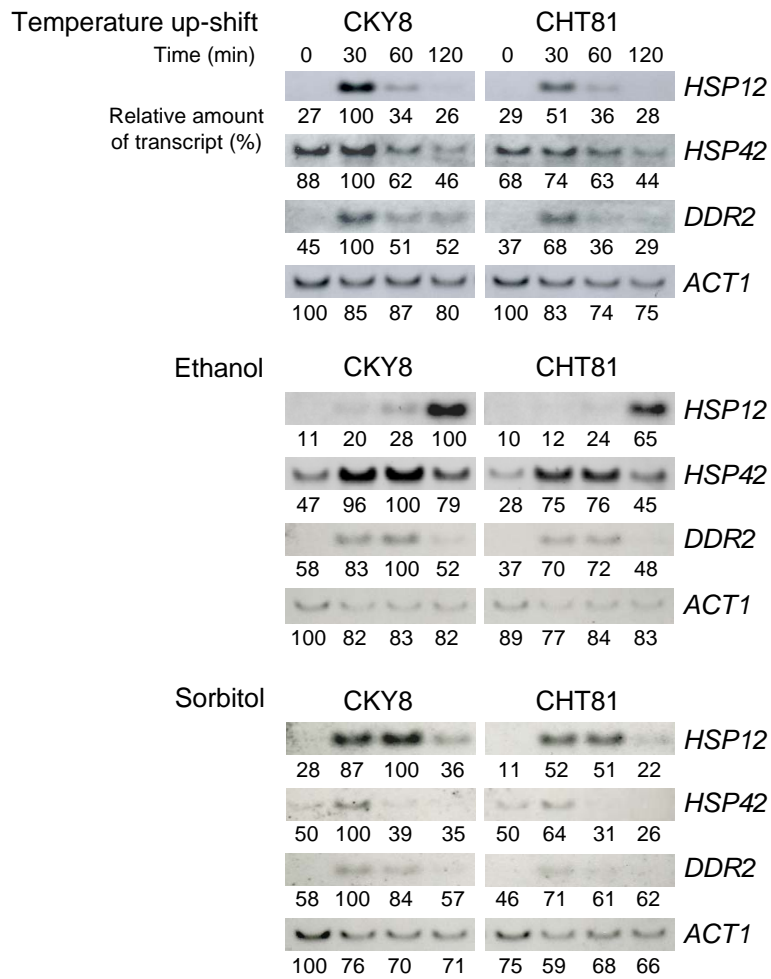


Figure 11 Expression of stress proteins was defective in the *rsp5* mutant under various stress conditions. Strains CKY8 and CHT81 cells were grown to logarithmic phase on YPD medium at 25°C and subjected to temperature up-shift (from 25 to 37°C), ethanol (9%), and sorbitol (1 M). Total RNA (10 mg) from each strain was prepared from samples collected before (time = 0) and at several times after temperature up-shift, and was hybridized to three stress protein genes (*HSP12*, *HSP42*, and *DDR2*). As an internal control, the level of *ACT1* encoding actin was also measured in the same blot.

Table 4 Selected results from microarray-derived expression changes of known genes after ethanol treatment for 1 hr.

Gene name	Protein function	Transcriptional rates after 1 hr		
		CKY8	CHT81	CKY8/CHT81
Containing HSEs		-fold	-fold	
<i>HSP42</i>	Heat shock protein	84.2	62.5	1.3
<i>HSP60</i>	Heat shock protein	2.7	2.0	1.3
<i>HSP82</i>	Heat shock protein	49.8	32.2	1.5
Containing STREs				
<i>DDR2</i>	DNA damage responsive	15.5	4.0	3.9
<i>CTT1</i>	Catalase T	6.8	3.4	2.0
<i>TPS1</i>	Trehalose-6-phosphate synthase	5.1	4.8	1.1
<i>TPS2</i>	Trehalose-6-phosphate phosphatase	8.4	3.6	2.3
Containing both HSEs and STREs				
<i>HSP12</i>	Heat shock protein	49.5	16.7	3.0
<i>HSP26</i>	Heat shock protein	202.3	135.7	1.5
<i>HSP104</i>	Heat shock protein	12.6	27.9	0.45

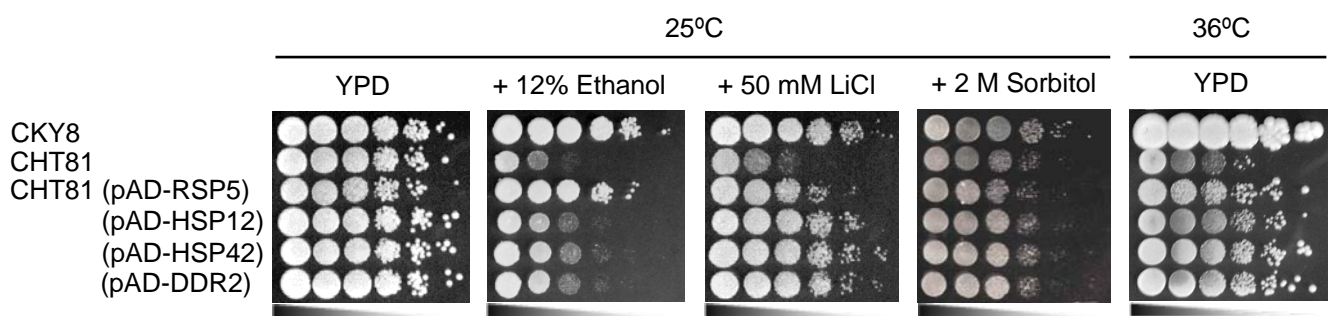


Figure 12 Overexpression of stress proteins complemented stress-hypersensitivity of the *rsp5* mutant under various stress conditions. The growth phenotypes of various strains were examined. Approximately 10^6 cells of each strain and serial dilutions of 10^{-1} to 10^{-5} (from left to right) were spotted and incubated onto YPD medium, YPD medium containing 12% ethanol or 50 mM LiCl at 25°C for 3 days, or onto YPD medium at 36°C for 4 days.

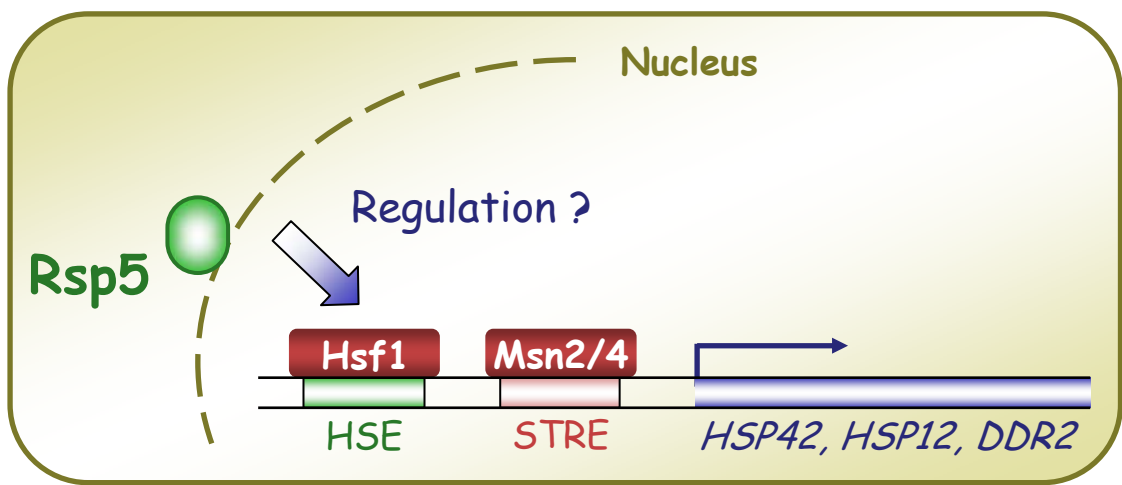


Figure 13 Does Rsp5 regulate expression of stress proteins via Hsf1 and Msn2/4?

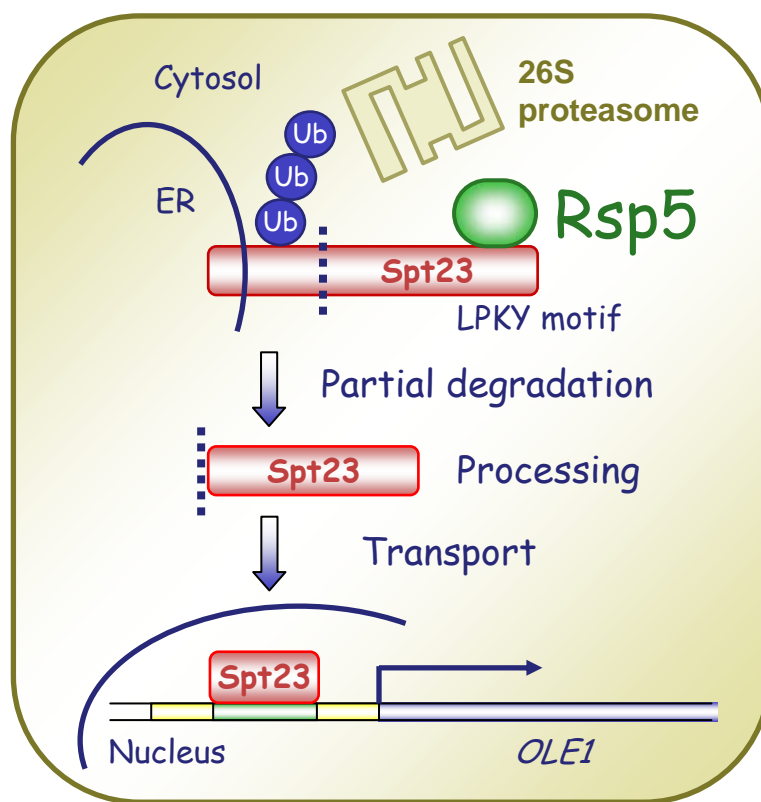


Figure 14 Two homologous transcription factors, Spt23 and Mga2, are ubiquitinated by Rsp5 and partially degraded by the cytosolic 26S proteasome, and the truncated forms are imported to the nucleus for the transcription of *OLE1* required for the oleic acid synthesis (Hoope *et al.*, 2000)

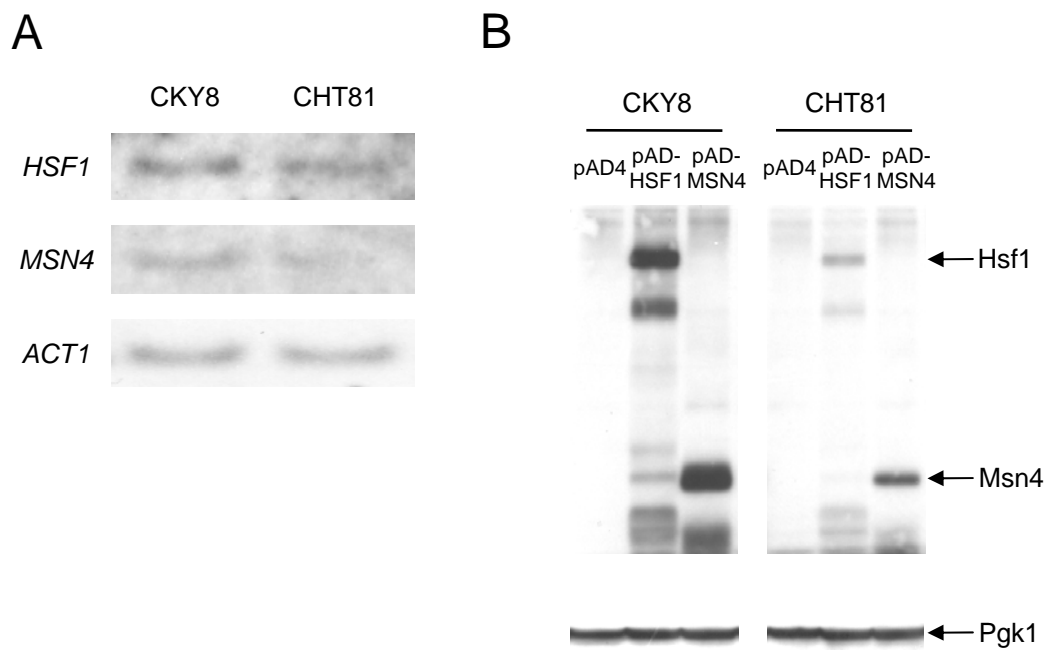


Figure 15 Expression of Hsf1 and Msn4 was defective in the *rsp5* mutant. A: Strains CKY8 and CHT81 cells were grown to logarithmic phase on SC medium at 25°C. Total RNA (10 mg) from each strain was prepared and hybridized to *HSF1*, *MSN4*, and *ACT1* probes. B: Recombinant strains CKY8 (pAD4), CKY8 (pAD-HSF1), CKY8 (pAD-MSN4), CHT81 (pAD4), CHT81 (pAD-HSF1), and CHT81 (pAD-MSN4) were grown to logarithmic phase on SC-Leu medium at 25°C. Whole cell extracts were prepared from a set of cultures and analyzed by Western blot analysis using anti-HA monoclonal antibody. The 3-phosphoglycerate kinase Pgk1 was used as a protein-loading control.

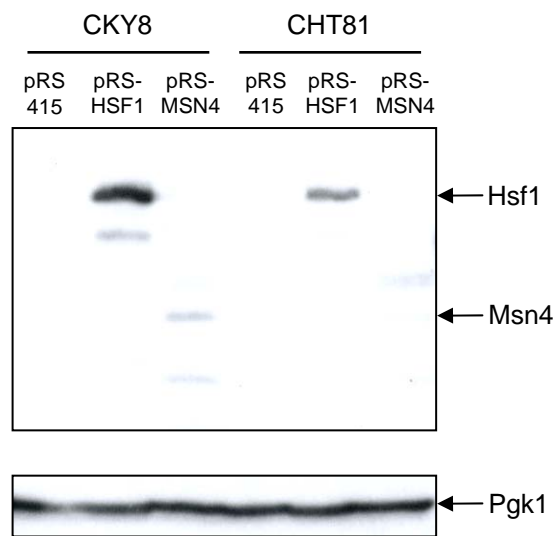


Figure 16 Expression of Hsf1 and Msn4 using centromere plasmid pRS415. Recombinant strains CKY8 (pRS415), CKY8 (pRS-HSF1), CKY8 (pRS-MSN4), CHT81 (pRS415), CHT81 (pRS415-HSF1), and CHT81 (pRS415-MSN4) were grown to logarithmic phase on SC-Leu medium at 25°C. Whole cell extracts were prepared from a set of cultures and analyzed by Western blot analysis using anti-HA monoclonal antibody. The 3-phosphoglycerate kinase Pgk1 was used as a protein-loading control.

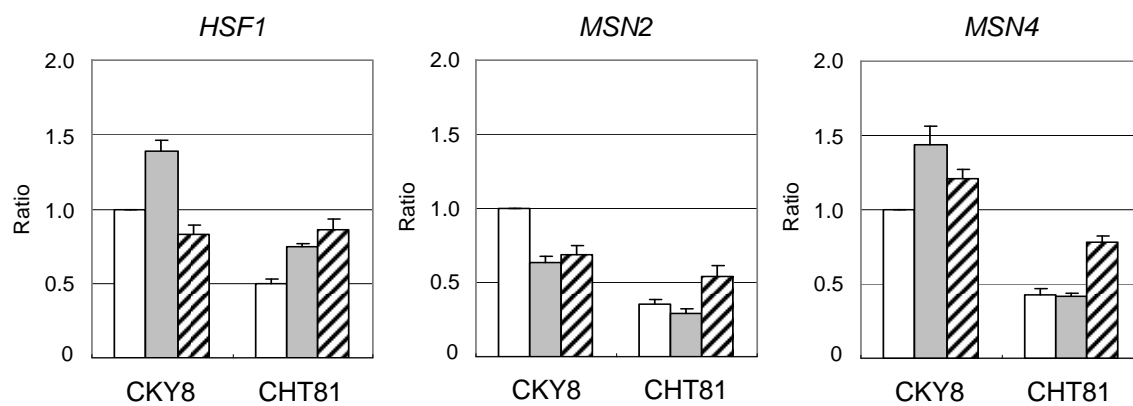


Figure 17 Rsp5 is involved in the transcription of *HSF1* and *MSN2/4*. Strains CKY8 (wild-type) and CHT81 (*rsp5^{A401E}* mutant) were cultured to the logarithmic growth phase in YPD medium and incubated for 10 min under the following conditions: at 25°C (opened bar) at 37°C (shaded bar) with ethanol (10%) at 25°C (hatched bar). Total RNA from each strain was prepared from samples collected before and after stress, and the transcription of *HSF1* and *MSN2/4* was assessed by real-time quantitative PCR. The mRNA level was normalized to that of *ACT1* in the same sample. Values represent the means and error bars indicate the standard deviations of three independent experiments.

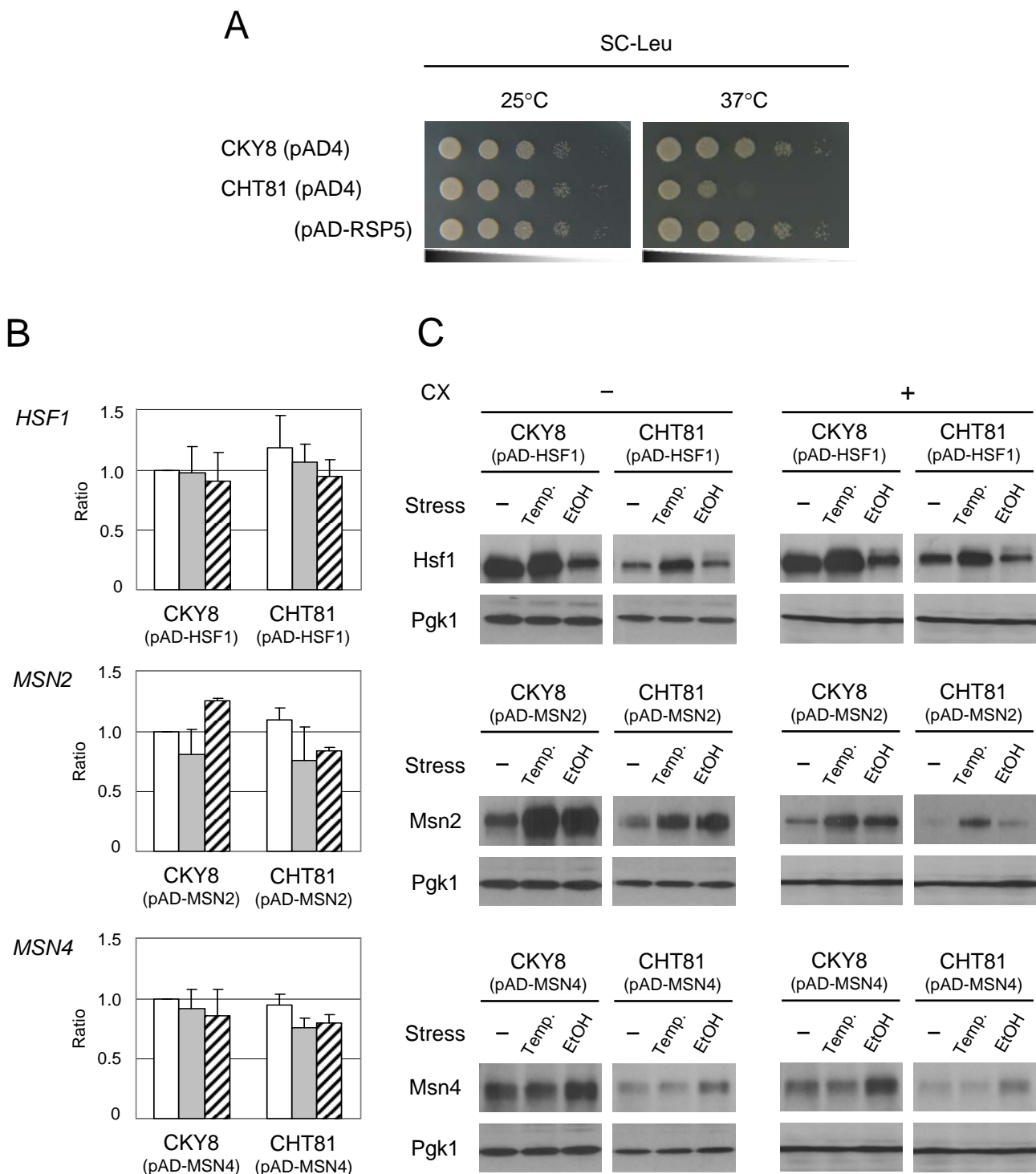


Figure 18 The protein levels of Hsf1 and Msn2/4 were defective in *rsp5^{A401E}* cells. (A) Strains CKY8 (wild-type) harboring empty vector (pAD4) and CHT81 (*rsp5^{A401E}* mutant) harboring empty vector (pAD4) or *RSP5* (pAD-RSP5). Approximately 10^6 cells of each strain and serial dilutions of 10^{-1} to 10^{-5} (from left to right) were spotted and incubated onto SC-Leu for 3 days. (B) Recombinant strains CKY8 (wild-type) harboring pAD-HSF1, pAD4-MSN2, and pAD-MSN4, and CHT81 (*rsp5^{A401E}* mutant) harboring pAD-HSF1, pAD4-MSN2, and pAD-MSN4 were cultured to the logarithmic growth phase in SC-Leu medium at 25°C and incubated for 10 min under the following conditions: at 25°C (opened bar) at 37°C (shaded bar) with 10% ethanol at 25°C (hatched bar). Total RNAs from each strain were prepared, and the transcription of *HSF1* and *MSN2/4* was assessed by real-time quantitative PCR, as shown in Fig.17. Values represent the means and error bars indicate the standard deviations of three independent experiments. (C) The above strains were cultured to the logarithmic growth phase in SC-Leu medium at 25°C and incubated in the absence (-) or presence (+) of 100 μ g/ml CX for 10 min under the following conditions: at 25°C (-) at 37°C (Temp.) with 10% ethanol at 25°C (EtOH). Whole cell extracts from each strain were analyzed by Western blot analysis using anti-HA monoclonal antibody. The 3-phosphoglycerate kinase Pgk1 was used as a protein-loading control.

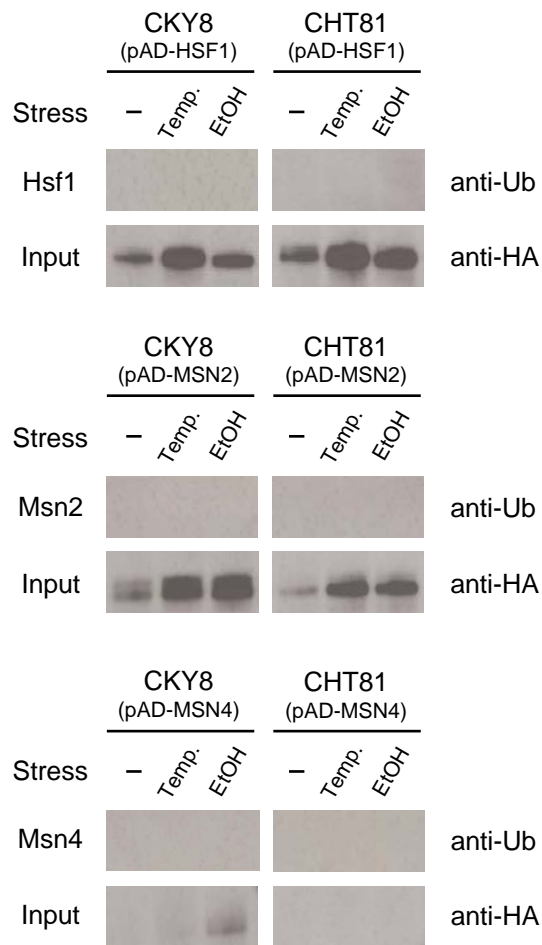


Figure 19 Ubiquitination of Hsf1 and Msn4. Recombinant strains CKY8 (pAD4), CKY8 (pAD-HSF1), CKY8 (pAD-MSN4), CHT81 (pAD4), CHT81 (pAD-HSF1), and CHT81 (pAD-MSN4) were grown to logarithmic phase on SC-Ura medium at 25°C. Whole cell extracts were immunoprecipitated by anti-HA antibody and analyzed by western blot analysis using anti-ubiquitin monoclonal antibody. Input was used as a protein-loading control.

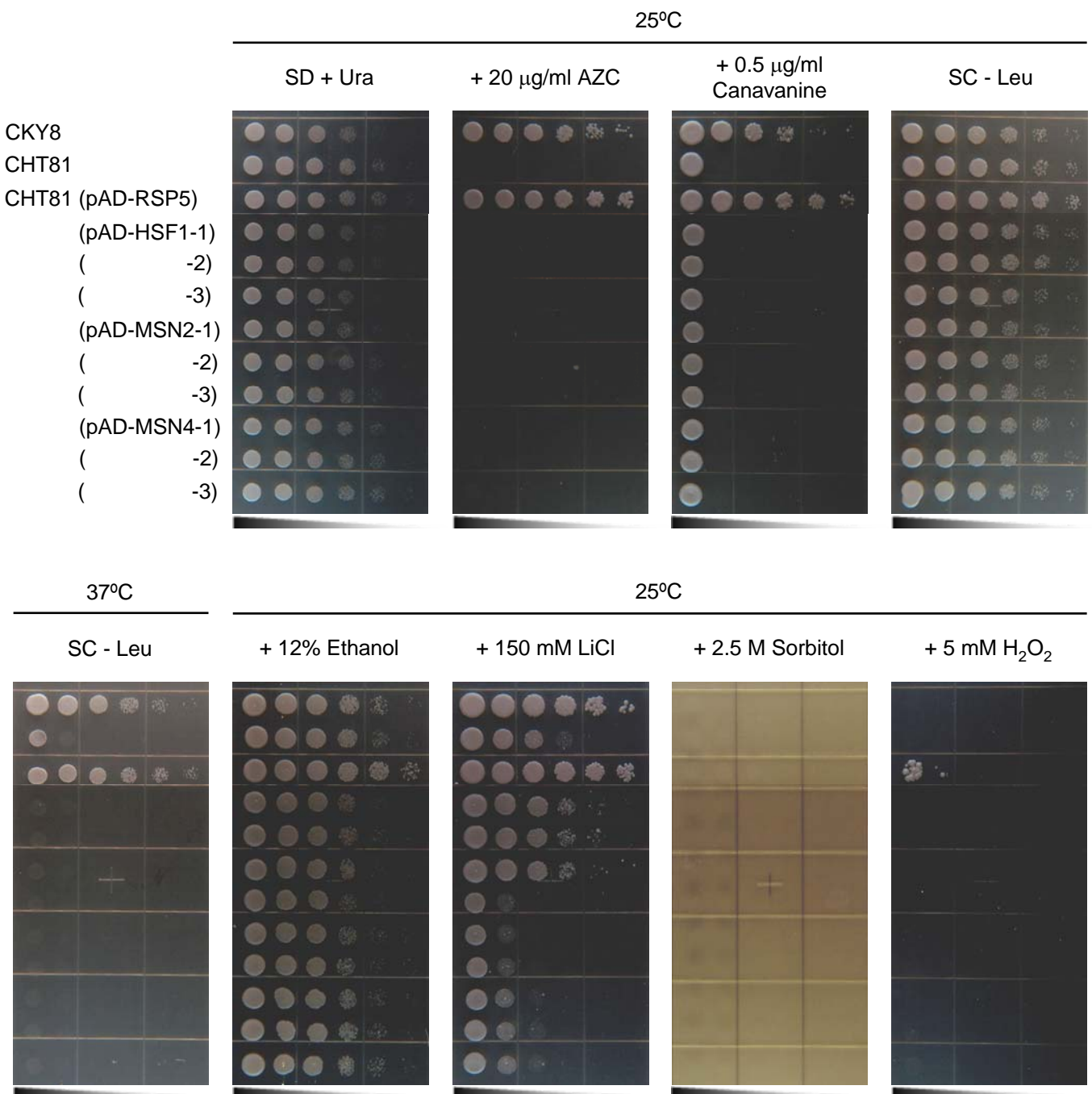


Figure 20 The effect of overexpression of *HSF1* and *MSN2/4* in the *rsp5^{A401E}* cells under various stress conditions. The growth phenotypes of various strains were examined. Approximately 10^6 cells of each strain and serial dilutions of 10^{-1} to 10^{-5} (from left to right) were spotted and incubated onto SD+Ura medium containing 20 µg/ml AZC, or 0.5 µg/ml Canavanine, or SC-Leu medium containing 12% ethanol, 150 mM LiCl, 2.5 M Sorbitol, or 5 mM H₂O₂ at 25°C for 3 days, or onto SC-Leu medium at 36°C for 4 days.

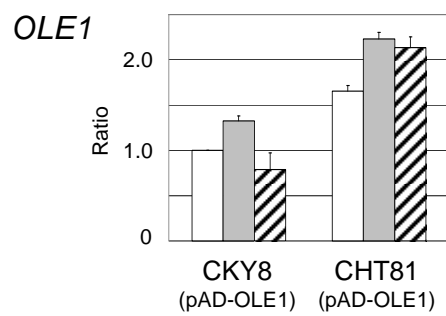


Figure 21 The transcription levels of *OLE1* was increased in *rsp5^{A401E}* cells. (A) Recombinant strains CKY8 (wild-type) harboring pAD-OLE1 and CHT81 (*rsp5^{A401E}* mutant) harboring pAD-OLE1 were cultured to the logarithmic growth phase in SC-Leu medium and incubated for 10 min under the following conditions: at 25°C (opened bar) at 37°C (shaded bar) with ethanol (10%) at 25°C (hatched bar). As shown in Fig. 17, the transcription of *OLE1* was assessed by real-time quantitative PCR. Values represent the means and error bars indicate the standard deviations of three independent experiments.

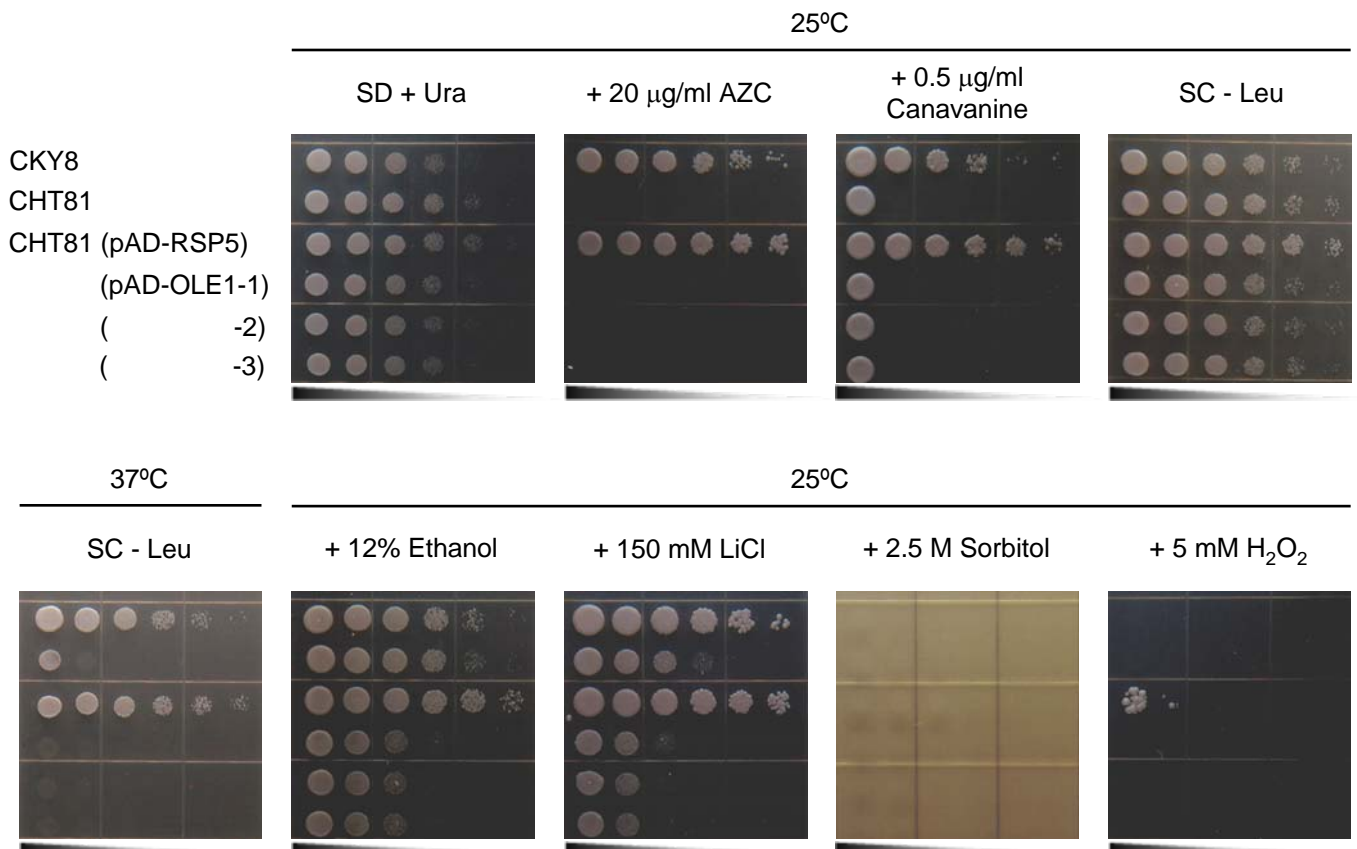


Figure 22 The effect of overexpression of *OLE1* in the *rsp5^{A401E}* cells under various stress conditions. The growth phenotypes of various strains were examined. Approximately 10^6 cells of each strain and serial dilutions of 10^{-1} to 10^{-5} (from left to right) were spotted and incubated onto SD+Ura medium containing 20 µg/ml AZC, or 0.5 µg/ml Canavanine, or SC-Leu medium containing 12% ethanol, 150 mM LiCl, 2.5 M Sorbitol, or 5 mM H₂O₂ at 25°C for 3 days, or onto SC-Leu medium at 36°C for 4 days.

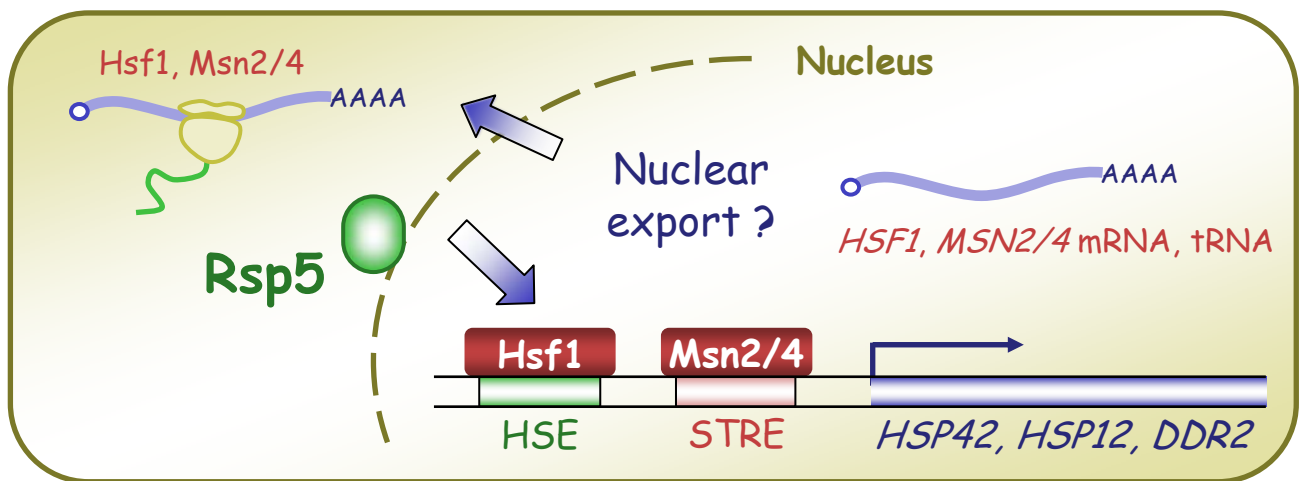


Figure 23 Is Rsp5 required for the nuclear export of mRNA of *HSF1* and *MSN2/4* under stress conditions ?

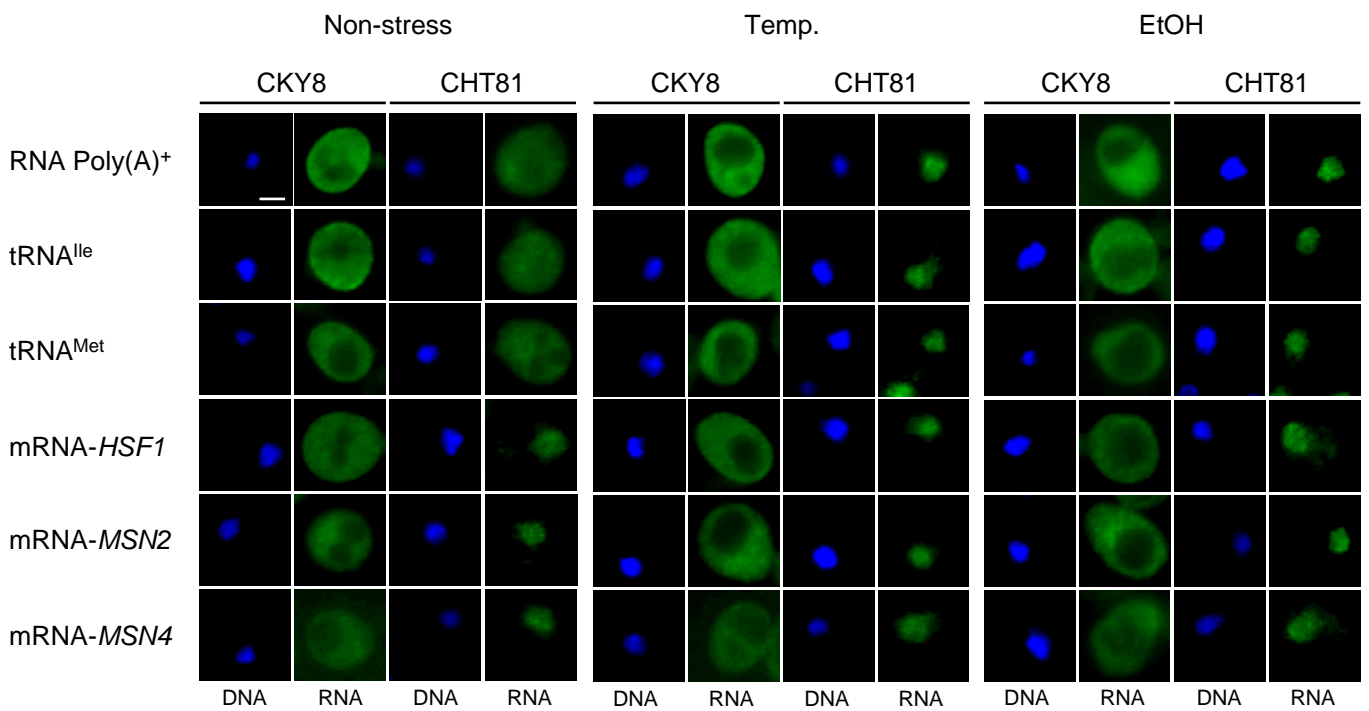


Figure 24 The nuclear export of *HSF1*- and *MSN2/4*-mRNA is inhibited in *rsp5^{A401E}* cells. Strains CKY8 (wild-type) and CHT81 (*rsp5^{A401E}* mutant) cells were shifted to 37°C (Temp.) or added 10% ethanol (EtOH) for 10 min. FISH was performed using specific digoxigenin-labeled probes recognizing intron-containing tRNA^{Ile} and intron-less tRNA^{Met}, and probes specific for poly(A)⁺, *HSF1*-, and *MSN2/4*-mRNA. DNA was stained with DAPI. Scale bars: 1 μm.

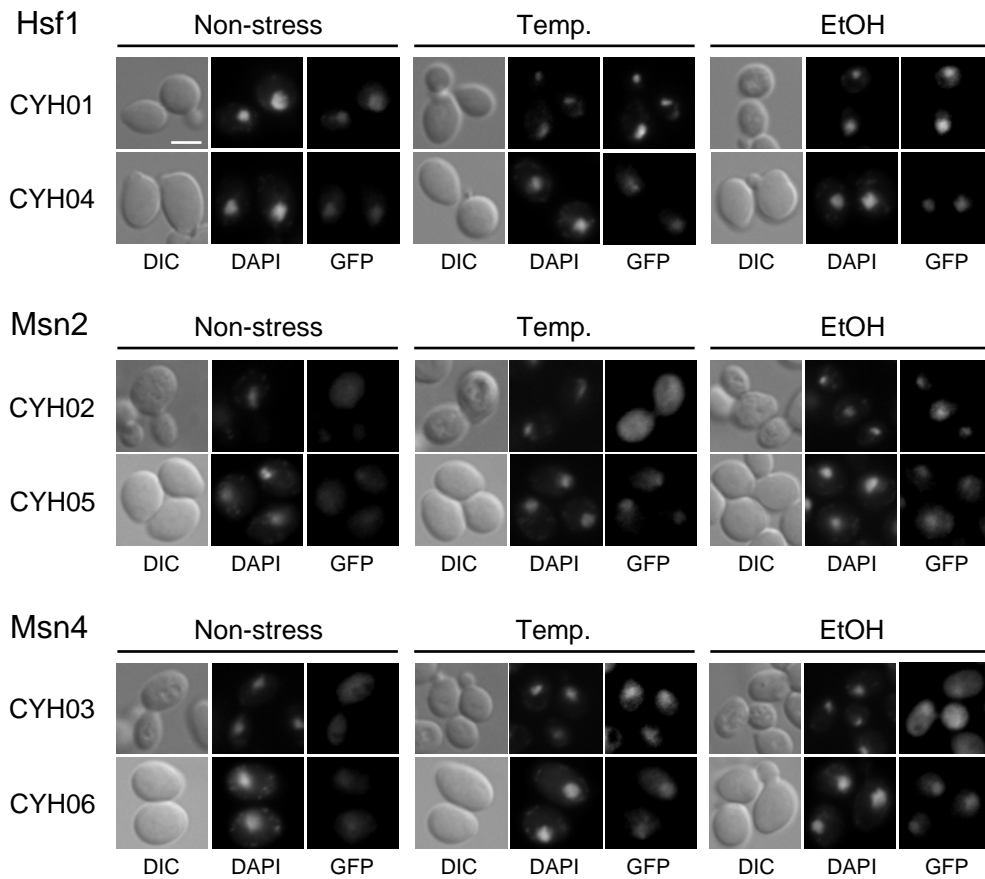


Figure 25 Hsf1 and Msn2/4 are mainly localized in the nucleus under stress conditions. Strains CYH01, CYH02, CYH03, CYH04, CYH05, and CYH06 were observed in the fluorescence microscope for the localization of Hsf1- or Msn2/4-GFP after shifting to 37°C (Temp.) or adding 10% ethanol (EtOH) for 10 min. Cell morphology was observed through differential interference contrast (DIC) and was also stained with DAPI to visualize nuclei. Scale bars: 5 μ m.

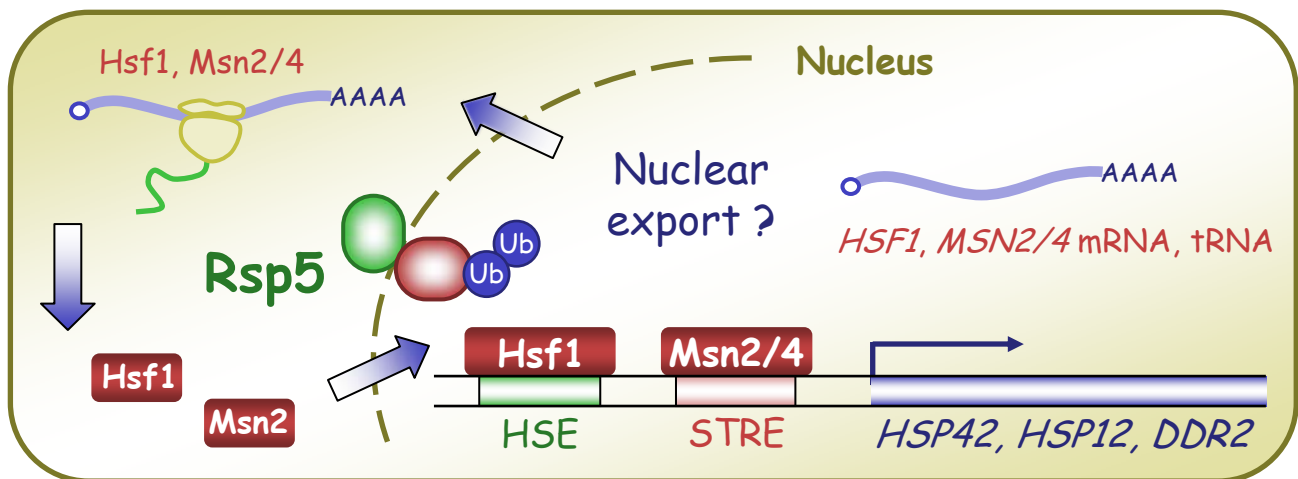


Figure 26 Rsp5 primarily regulates the expression of Hsf1 and Msn2/4 required for stress responses through the post-transcriptional event. The Rsp5 activity is required for proper mRNA export, indicating that the Rsp5-mediated ubiquitination acts directly or indirectly to affect the export of RNA molecules.

第2章 Rsp5 遺伝子へのランダム変異導入によるストレス耐性の向上

2-1. 緒言

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、製パンや醸造などの食品産業に広く利用されている重要な微生物である。発酵生産環境は産業酵母にとって、高温、高濃度アルコール、冷凍、高浸透圧、低温、乾燥など多様なストレスが負荷される「複合ストレス」環境であり、細胞内タンパク質が変性し、異常タンパク質を生成するため、有用機能の発現が制限される。

細胞内のタンパク質分解に関与するユビキチンシステムは、E1 (ユビキチン活性化酵素)、E2 (ユビキチン結合酵素)、E3 (ユビキチンリガーゼ) からなる酵素系で、ユビキチンの基質タンパク質への共有結合を触媒する (Figure 1)。ストレスにより細胞内に生じた異常タンパク質は、ユビキチンシステムによりユビキチン化後、プロテアソームや液胞で分解されることが考えられる。ユビキチンシステムにおいて重要な Rsp5 は E2 に結合する HECT ドメイン、標的タンパク質を認識し結合する WW ドメインを有しているが、E2 に結合した活性型ユビキチンを HECT ドメイン内の Cys777 に転移させた後、標的タンパク質に連結させる役割を担っている。Rsp5 のような HECT 型 E3 の場合、E2 はユビキチン転移酵素として機能する。

これまでに、タンパク質合成の際にプロリンと競合して取込まれ、異常タンパク質を生成するアゼチジン-2-カルボン酸 (AZC) に超感受性を示す変異株を分離した。この変異株では生育に必須のユビキチンリガーゼ Rsp5 の遺伝子に変異があり、401 番目のアミノ酸残基である Ala が Glu に置換していた。また、*rsp5*^{A401E} が、AZC の他にも異常タンパク質を生成するストレス (高温、エタノール、ソルビトール、過酸化水素、塩化リチウムなど) に感受性を示すことから、Rsp5 の新しい機能として「異常タンパク質分解への関与」を提唱している (Figure 7)。

本研究では、異常タンパク質の生成回避・検知処理に関与し、酵母のストレス適応機構において重要なタンパク質、ユビキチンリガーゼ Rsp5 について、タンパク質工学の手法を用いて活性や安定性の向上、基質特異性の改変などの高機能化を行い、ユビキチンシステム強化酵母などを作製し、ストレスへの有効性を実証する。

まず、Rsp5 遺伝子へのランダム変異導入により、ストレス耐性を向上させる変異型 Rsp5 を取得し、その機能を解析した。プラスミドに組み込んだ A401E 変異型 Rsp5 遺伝子に Error-prone PCR 法でランダム変異を導入後、*rsp5*^{A401E} を形質転換し、完全培地での高温培養で生育するクローンを分離した。得られた複数クローンの RSP5 遺伝子には、共通して Glu401 が Gly に置換していた (Figure 27)。この残基は、Rsp5 が基質タンパク質と結合してユビキチン化するのに重要な WW ドメインに存在し、WW1, WW2, WW3 ドメインで保存性が高いため、高機能化に関わ

ると推測された。そこで、 $rsp5^{A401E}$ 内で A401G 変異型 Rsp5 を発現させたところ、様々なストレス感受性（エタノール、ソルビトール、過酸化水素）を相補できた。しかし、野生型 Rsp5 に比べて、ストレス耐性に差は見られなかった。

次に、スクリーニング方法を変えて、AZC 含有培地でも生育可能な四重変異 (T357A/A401G/K764E/E767G) を有する高機能型 Rsp5 を取得した。この高機能型 Rsp5 を $rsp5^{A401E}$ で発現させると、AZC で野生株よりも強い耐性を示した。以上の結果をもとに、本研究では取得した四重変異型 Rsp5^{T357A/A401G/K764E/E767G} について、高機能化に関わる残基の特定、およびストレスにおける Rsp5 の機能解析を行った。

2-2. 実験方法

2-2-1. 菌株と培地

本研究で使用した酵母は、*S. cerevisiae* S288C 系統株である。CKY8 (*MAT α* *ura3-52 leu2-3, 112*) は、C. Kaiser より分譲していただいた。CHT81 (*rsp5^{A401E}*) は、CKY8 株から EMS 変異処理により分離した AZC 超感受性変異株 (Rsp5 の Ala401 が Glu に置換) である (Hoshikawa *et al.*, 2003)。*Escherichia coli* strain [*F λ \Phi80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA argF)*]*UI69 deoR recA1 endA1 hsdR17(r_k⁻m_k⁺) supE44 thi-1 gyrA96*] は、酵母遺伝子のサブクローニングに使用した。

培地には、yeast extract/peptone/dextrose (YPD) (2% glucose, 1% yeast extract, 2% peptone), synthetic complete (SC) (Rose *et al.*, 1990) consisting of 2% glucose, 0.67% Bacto Yeast Nitrogen Base with ammonium sulfate (Difco Laboratories 社), drop-out mix lacking leucine (SC-Leu) または lacking uracil (SC-Ura) を用いた。

2-2-2. プラスミド

pAD-*rsp5^{A401E}* プラスミドをテンプレートに error-prone PCR 法によって *RSP5* 遺伝子の ORF を増幅後、*Hind*III と *Sac*I で制限酵素処理した。その断片を、同様に制限酵素処理した pAD4 に連結し、*rsp5^{A401E}* ランダム変異導入ライブラリー、YH5 を構築した。

pAD4 (supplied by J. Nikawa) は、YE_p 型のプラスミドで 2 μ m DNA の複製起点と、酵母での選択用マーカー *LEU2*, および *E. coli* での複製起点と選択マーカーのアンピシリン耐性遺伝子を含んでいる。また、マルチクローニングサイトの上流に *ADH1* プロモーター、下流に *ADH1* ターミネーターが存在している。

pYES2 (Invitrogen 社) は、YE_p 型のプラスミドで 2 μ m DNA の複製起点と酵母での選択用マーカー *URA3*, および *E. coli* での複製起点と選択マーカーのアンピシリン耐性遺伝子を含んでいる。また、マルチクローニングサイトの上流に *GAL1* プロモーター、*CYC1* ターミネーターが存在している。

pRS415 (Stratagene 社) は、YC_p 型のプラスミドで、酵母での選択マーカー *LEU2*, および *E. coli* での複製起点と選択マーカーのアンピシリン耐性遺伝子を含んでいる。これらは、酵母遺伝子の発現に用いた。

RSP5 遺伝子の DNA 断片を PCR で増幅後、*Hind*III と *Sac*I で制限酵素処理した。その断片を、同様に制限酵素処理した pAD4, pYES2, pRS415 に連結し、pAD-RSP5, pYES-RSP5, pRS-RSP5 を構築した。

2-2-3. 部位特異変異

RSP5 遺伝子に変異導入する箇所を塩基置換させたプライマーを設計し、

pAD-RSP5 をテンプレートに用いて、Quik Change Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene 社) により部位特異変異を導入した。PCR 生産物を *DpnI* 制限酵素処理 (1 μ l, 37°C, 1 hr) して、メチル化されたプラスミドのみを切断した。次に、プラスミドを *E. coli* に導入して形質転換体を取得後、プラスミドを抽出して塩基配列を確認した。この方法を利用して、pAD-RSP5^{T357A/A401G/K764E/E767G}, pAD-RSP5^{T357A/K764E/E767G}, pAD-RSP5^{T357A/A401G/K764E}, pAD-RSP5^{T357A/K764E}, pAD-RSP5^{T357A}, pAD-RSP5^{K764E} を構築した。

2-2-4. リアルタイム PCR

SC-Leu 培地で OD₆₀₀ = 5.0 前後まで振とう培養した菌株を dH₂O で洗浄後、SD+Pro 培地に植菌し、25°C で OD₆₀₀ = 1.0 前後まで振とう培養した。(NH₄)₂SO₄ (10 mM) を添加後、0, 5, 10 min 後に集菌した。3,000 rpm, 5 min, 4°C で遠心後、1 ml の冷却滅菌水に細胞を懸濁し、遠心分離 (12,000 rpm, 1 min) を行った。続いて、細胞の破碎は 0.05 mm ガラスビーズを用いて、2,500 rpm で 60 sec の破碎と 60 sec の冷却を 6 回、繰り返して行い、RNeasy mini kits (QIAGEN 社) を用いて全 RNA を抽出した。キットに含まれる RNase-free DNase set (QIAGEN 社) を用いて、抽出と同時に DNase 処理も行った。

抽出した RNA は、緩衝液として MESA (20 mM morpholine propanesulfate (MOPS), 5 mM 酢酸, 1 mM EDTA; 10 × MASA 溶液 (pH 6.7 - 7.3)) (和光純薬社) を用い、1.2% アガロースゲルを使って 50 V の定電圧で 60 min 電気泳動した。RNA の存在量は MESA で 10,000 倍に希釈した Syber Gold 溶液 (Invitrogen 社) を用いて、ゲルを室温で 15 min 浸透しながら染色し、260 nm の吸光度を測定して確認した。RNA から cDNA への逆転写は High-capacity cDNA reverse transcription kits (Applied Biosystems 社) を用い、逆転写酵素を添加していない系をコントロールとして下記の通りに行った。

リアルタイム PCR は cDNA をテンプレートとし、Sybr Green PCR master mix (Applied Biosystems 社) を用いて行った。反応組成は 25 μ l (最終容量) の使用時の濃度の master mix 液 (\times 1 濃度液) に、最終で 100 nM の濃度になるようにプライマーと 20 ng cDNA を加えた。標的遺伝子に特異的なプライマーには、GAP1-F: 5'-TTG GTG CCT CCT CTG TGG AT-3', GAP1-R: 5'-CCG TGA GTC TTA ATG GCA ATG A-3' を用いた。内在性コントロールとしては *ACT1* (Actin) を用いた。リアルタイム PCR の産物は 1.2% アガロースゲルを用いて電気泳動し、10 mg/ml ethidium bromide 溶液で染色して、非特異的な増幅を確認した。リアルタイム PCR は、3 度の別々の実験より得られた全 RNA を用いて、3 回行った。

2-2-5. ウェスタンブロッティング解析 (膜タンパク質抽出液の調製)

各形質転換体を SC-Leu, 25°C で OD₆₀₀ = 5.0 前後まで培養後、SD+Pro 培地に植菌し、25°C で OD₆₀₀ = 1.0 前後まで培養した。(NH₄)₂SO₄ (10 mM) を添加後、30, 60 min 後に集菌した。遠心後 (3,000 rpm, 5 min, 4°C)、1 ml の冷却滅菌水に細胞を懸濁し、遠心 (12,000 rpm, 1 min) した。次に Inhibitor Cocktails (Sigma 社; 湿重量 20 g あたり 1 ml) を含んだ 450 µl 抽出バッファーで懸濁後、800 mg ガラスビーズを加えてマルチビーズショッカーにより細胞を破碎し、細胞抽出液を分離 (3,000 rpm, 3 min) した。

上清をさらに遠心分離後 (12,000 rpm, 45 min)、沈殿に 5 M urea 含有抽出バッファーを加えて攪拌後、氷上で 30 min 静置した。さらに遠心分離後 (12,000 rpm, 45 min)、沈殿に 2% SDS 含有抽出バッファーを添加し、10 min 煮沸した。遠心分離 (12,000 rpm, 10 min) によって得られた上清をタンパク質抽出液とした。

各膜タンパク質抽出液を 13 µg ずつ、7.5% SDS-PAGE に供した (200 V, 80 mA, 90 min)。Transfer buffer で満たしたトランスファーユニット (Bio-Rad 社製) で電気泳動後のゲルをメンブレン (Amersham Bioscience 社; Hybond-P) に転写した (250 mA, 100 V, 120 min)。メンブレンを Blocking buffer (1×TBS, 0.1% Tween 20, 5.0% スキムミルク) でブロッキングした (室温 40 min)。

一次抗体 (anti-Gap1 rabbit antibody) は Blocking buffer で 30,000 倍希釈し、二次抗体 (anti-rabbit Ig HRP Conjugated) は Blocking buffer で 60,000 倍希釈して使用した。ECL plus Western blotting Detection System (Amersham Biosciences 社) を利用し、X 線フィルム (Amersham Bioscience 社; Hyperfilm) で検出した。タンパク質濃度は、Dye staining kit (Bio-Rad 社) で測定した。

2-2-6. 細胞内 AZC 含量の測定

培養液の吸光度 (OD₆₀₀) を測定後、 $x=y/978.45$ の式 ($x=5$ ml あたりの乾燥重量 (g), $y=OD_{600}$) を用いて菌体の乾燥重量を算出した。各菌株を SD 培地で 30°C, 24 hr 培養後、AZC を最終濃度 0.5 mg/ml になるように添加した。一定時間後に 3,500 rpm, 10 min で集菌、洗浄後の菌体を 0.5 ml の滅菌水で懸濁し、100°C, 10 min で熱水処理した。遠心分離 (12,000 rpm, 5 min) 後の上清を HCL フィルター路過後バイアルに注入し、アミノ酸アナライザー (日本電子社製: JLC-500/V 全自動アミノ酸分析機) に供した。スタンダードには 1 ml のアミノ酸混合標準液 (各アミノ酸 2 nmol/µl) を同じくフィルターろ過したものを用いた。

2-2-7. その他

大腸菌からのプラスミド調製は、アルカリ SDS 法をベースにした QIAprep Spin

Miniprep Kit (QIAGEN 社) を用いて行った。その他、大腸菌の形質転換、DNA の制限酵素による切断、連結などの遺伝子操作は「バイオマニュアルシリーズ①遺伝子工学の基礎技術」(羊土社) および「バイオ実験イラストレイテッド」(秀潤社) に、酵母の取り扱いや遺伝子操作は「バイオマニュアルシリーズ⑩酵母による遺伝子実験法」(羊土社) および「生物化学実験法 39 酵母分子遺伝子実験法」(学会出版センター) に準じた。

2-3. 結果

2-3-1. 完全培地での高温感受性を相補する高機能型 Rsp5 の単離と機能解析

rsp5^{A401E} は、ユビキチン化能力が野生株と比較して著しく低下しており (Hoshikawa *et al.*, 2003)、おそらく様々なストレス環境下において異常タンパク質が生成・蓄積するため、生育阻害を引き起こすと考えられる。そこで、変異型 Rsp5^{A401E} にさらに変異処理を施すことで、野生型 Rsp5 よりもストレス耐性が向上する高機能型 Rsp5 の取得を目指す。

まず、*rsp5*^{A401E} 遺伝子を鋳型にしてランダム変異を導入し、YH5 ライブラリーを作製後、*rsp5*^{A401E} に導入した。次に、高温ストレス存在下で *rsp5*^{A401E} に野生型 Rsp5 を導入した形質転換体よりも早く生育する株をスクリーニングした。その結果、*rsp5*^{A401E} で高機能型 Rsp5 を保持している可能性のある候補株を 24 株取得した (Figure 27)。興味深いことに、すべての変異型 Rsp5 には共通して E401G の変異が入っていたため (変異点の Glu401 が野生型の Ala401 に復帰することなく Gly に置換していた)、このアミノ酸置換が重要であることが示唆された。そこで、pAD-RSP5^{A401G} を構築して、*rsp5*^{A401E} へ導入して AZC や塩化リチウムストレス感受性相補を調べたが、この単独変異による効果はみられなかった (Figure 28)。その後も同様に、高温ストレス感受性相補株を取得したが、野生株を凌ぐ耐性を獲得したクローンは得られず、またほとんどが、E401G 変異を有する変異型 Rsp5 であった。そこで、ストレスの種類を高温からエタノールに変更して、高機能型 Rsp5 の取得を目指した。しかし、エタノールは揮発性であるため、おそらく設定している濃度に誤差が生じてしまい、スクリーニング条件が定まらなかった。これまでに、エタノールは AZC をミミックすることが知られている (Trotter *et al.*, 2002)。そこで、濃度を一定に設定できる AZC を用いてスクリーニングを行い、エタノールストレス耐性を向上させる変異型 Rsp5 の取得を試みた。

2-3-2. AZC ストレス感受性を相補する高機能型 Rsp5 の単離と機能解析

次に、スクリーニング方法を変更して、*rsp5*^{A401E} に YH5 ライブラリーを導入した形質転換体から、Pro の毒性アナログである AZC ストレス存在下でも生育できる株を取得した。その結果、RSP5 遺伝子へのランダム変異導入により四重変異 (Thr357Ala / Ala401Gly / Lys764Glu / Glu767Gly) を有する変異型 Rsp5 を取得した。この四重変異型遺伝子を *rsp5*^{A401E} で発現させると、AZC や塩化リチウムに対して野生株よりも強い耐性を示した (Figure 28)。

2-3-3. Rsp5 の高機能化に関わる残基の特定

部位特異変異の導入により、4種の単独変異 (T357A, A401G, K764E, E767G)、

6種の二重変異（T357A/A401G, A401G/K764E, K764E/E767G, A401G/E767G, T357A/K764E, T357A/E767G）、4種の三重変異（T357A/A401G/K764E, A401G/K764E/E767G, T357A/K764E/E767G, T357A/A401G/E767G）を有する各遺伝子を構築し、*rsp5*^{A401E} に導入後、AZC に対する耐性を解析した。その結果、Ala401 または Glu767 のみを野生型に戻した三重変異（T357A/K764E/E767G, T357A/A401G/K764E）は四重変異と同等の AZC 耐性を示した（Figure 29）。興味深いことに、Ala401 と Glu767 を野生型に戻した二重変異（T357A/K764E）は四重変異よりも強い AZC 耐性を付与した。しかしながら、K764E, T357A の各単独変異では、全く AZC 耐性を示さなかった。したがって、401, 767 番目のアミノ酸は野生型のままで、基質との結合に重要な WW ドメインに位置する T357A と、活性中心 C777 の近傍に位置する K764E の二重変異が同時に入ることが、Rsp5 の高機能化には重要であることが示された。

2-3-4. AZC ストレス耐性を向上させる変異型 Rsp5^{T357A/K764E} におけるアミノ酸残基の位置と立体構造

S. cerevisiae において、Rsp5 の立体構造は未だ解明されていない。そのため、Rsp5 のような HECT 型の E3 (ユビキチンリガーゼ) の特徴であるように、E2 (ユビキチン結合酵素) が E3 に結合し、ユビキチンを一時的 E3 へ受け渡してから基質に転移させるとき、どのような構造変化が起こるのかが注目されている (Huang et al., 1999)。おそらく、Rsp5 に受け渡されたユビキチンの位置から、基質までの距離は近いはずである。

本研究で取得した Rsp5 における T357A の変異箇所は、Rsp5 が基質と結合するのに重要な WW1 ドメインに存在している。そのため、基質特異性が変化することによって異常タンパク質と結合できるようになり、細胞内への蓄積を防いでいるのかもしれない。また、K764E は、HECT ドメインの活性残基近傍 (Cys777) に存在しているため、酵素活性の向上に影響を与えた可能性も考えられる。

すでに報告されているヒトのユビキチンリガーゼ E6AP の HECT ドメインの構造に基づき、二重変異型 Rsp5^{T357A/K764E} のアミノ酸置換が起こった位置を予測した (Figure 30)。これまでの報告では、Rsp5 がユビキチンを標的タンパク質に転移させるとき、WW ドメインと HECT ドメインが近接することが予想されている。したがって、T357A と K764E の単独変異ではストレス耐性を示さなかったことから、2 残基が相互作用している可能性が高い。

2-3-5. 高機能型 Rsp5 による基質タンパク質分解能

Gap1 は酵母における主要なアミノ酸パーミアーゼである。Gap1 は、培地中の

唯一の窒素源が Pro の場合において原形質膜上に存在するが、アンモニウムイオンが添加されると不要になるため、Npr1 キナーゼによるリン酸化後、Rsp5 によってユビキチン化され、エンドサイトーシスを経て液胞で分解されることが知られている (Vandenbol *et al.*, 1987; Springael & Andre, 1998; Galan *et al.*, 1996; Soetens *et al.*, 2001; Helliwell *et al.*, 2001; Omura *et al.*, 2005)。

これまでに、二重変異型 Rsp5^{T357A/K764E} では、AZC に対するストレス耐性が向上することが判明した。耐性を獲得した理由として、次のことが考えられる。一つは、Rsp5 が Pro と AZC を取り込む Gap1 パーミターゼを速やかにユビキチン化して分解を促進するため、AZC の取り込みを防ぐ可能性である。もう一つは、Rsp5 が AZC の取り込みによって構造が異常になったタンパク質を速やかにユビキチン化し、分解を促進している可能性である。

そこでまず、前者の可能性を調べるため、CKY8 (pAD4), CHT81 (pAD4), CHT81 (pAD-RSP5), CHT81 (pAD-RSP5^{T357A/K764E}) を窒素源が Pro のみの SD+Pro 培地で対数増殖期まで培養後、Gap1 の分解を促すために硫酸アンモニウムを添加した。経時的に Gap1 の存在量を調べるために、0, 5, 10, 30, 60 min 後に抽出した各サンプルの膜画分を調製し、抗 Gap1 抗体を用いてウェスタン解析を行った。なお、実験のコントロールとして膜タンパク質 Pma1 を用いた。

これまでの知見と一致しており、野生株において Gap1 は速やかに分解されたが、*rsp5*^{A401} では基質をユビキチン化する能力が低下しているために、分解が遅延していた (Figure 31B)。また、コントロールとして *rsp5*^{A401} で野生型 Rsp5 を発現させると、Gap1 は時間と共に分解されていた。一方、興味深いことに、二重変異型 Rsp5^{T357A/K764E} 発現株では、すでにアンモニウムイオン添加前から Gap1 が分解されていた。おそらく、Gap1 を通して AZC がほとんど細胞内へ取り込まれないため、AZC 耐性を獲得したものと考えられた。

2-3-6. リアルタイム PCR による *GAP1* 転写量の比較

Figure 31B で示したように、変異型 Rsp5^{T357A/K764E} 発現株では、原形質膜上において Gap1 がほとんど存在していなかったことから、もともとの転写量が減少していた可能性が挙げられる。そこで、CKY8 (pAD4), CHT81 (pAD4), CHT81 (pAD-RSP5), CHT81 (pAD-RSP5^{T357A/K764E}) の *GAP1* 転写量をリアルタイム PCR により解析するため、これらの形質転換体を、プロリンを唯一の窒素源とした SD+Pro 培地で対数増殖期まで培養し、硫酸アンモニウムを添加後、全 RNA を抽出した。

興味深いことに、二重変異型 Rsp5^{T357A/K764E} 高発現株では、Gap1 の存在量がほとんど検出されなかったにも関わらず、*GAP1* の転写量は野生株と同程度であっ

た (Figure 31A)。したがって、変異型 Rsp5^{T357A/K764E} によって GAP1 の転写はほとんど制御されておらず、原形質膜上の Gap1 を速やかに分解して細胞内への AZC 流入を防ぎ、AZC 耐性を獲得したことが示唆された。また、野生株よりも、*rsp5*^{A401E} における GAP1 の転写量がわずかに増加していたため、Rsp5 による転写制御が存在する可能性も考えられる。

2-3-7. 細胞内 AZC 含量

これまでの結果より、変異型 Rsp5^{T357A/K764E} 発現株では、おそらく Gap1 を急速に分解しているために AZC が細胞内に取り込まれず、AZC ストレス耐性を獲得すると考えてきた。この仮説を証明するため、CKY8 (pAD4), CHT81 (pAD4), CHT81 (pAD-RSP5), CHT81 (pAD-RSP5^{T357A/K764E}) における細胞内 AZC 含量を測定した。

各形質転換体を硫酸アンモニウムと、プロリンを唯一の窒素源にした培地で培養し、対数増殖期に最終濃度 500 µg/ml AZC になるように加えた。添加後 0, 30 min で細胞を集めて熱水抽出し、細胞内 AZC 含量をアミノ酸アナライザーで測定した。その結果、今回の測定条件では Asn と AZC のピークが重なったため、各培養時間における濃度から、0 min の値を差し引いて細胞内 AZC 含量を算出した。

rsp5^{A401E} の細胞内 AZC 含量を 100 として相対値を算出すると、CHT81 (pAD-RSP5) の AZC 含量は、野生株の二倍に増加していた (Table 5)。これは、*rsp5*^{A401E} では Rsp5 の機能が低下しているため、Gap1 が原形質膜上に安定に存在しており、AZC を取り込み続けていることを示している。一方、CHT81 (pAD-RSP5^{T357A/K764E}) では、AZC がほとんど細胞内に存在していないことが判明した。したがって、高機能型 Rsp5 によって Gap1 が速やかに分解されたために、AZC の取り込みを防ぎ、AZC ストレス耐性を示したと考えられた。

2-3-8. *rsp5*^{A401E} における変異型 Rsp5^{T357A/K764E} の発現量と安定性

Figure 31 の実験で、変異型 Rsp5^{T357A/K764E} の発現量を解析した結果、正常に発現していることを確認できた (Figure 32)。粗抽出液を含む場合、マルチコピープラスミド (pAD-Rsp5^{T357A/K764E}) の影響によって過剰発現された、Rsp5 の存在量を確認したが、興味深いことに、可溶性画分ではプラスミドに依存した過剰量の Rsp5 が検出されなかった。原因は不明であるが、Rsp5 は過剰発現した分だけ、可溶性ではなく不溶性画分へと移行し、おそらく原形質膜や小胞体膜などと結合していると予想される。また、37°C, 30 min の熱処理を加えても、変異型 Rsp5^{T357A/K764E} の存在量は安定していた。

2-3-9. 高機能型 Rsp5 が $rsp5^{A401E}$ のストレス感受性に及ぼす影響

変異型 Rsp5^{T357A/K764E} を $rsp5^{A401E}$ で発現させ、様々なストレス（アミノ酸アナログ、ツニカマイシン、エタノール、塩化リチウム、ソルビトール、冷凍、過酸化水素など）に対する感受性を調べた。その結果、AZC, DL-Norleucine などのアミノ酸アナログストレスにおいて、野生株よりも強い耐性を獲得した（Figure 33）。また、ツニカマイシン、エタノール、過酸化水素などのストレスに対しては、期待された二重変異型 Rsp5^{T357A/K764E} による効果は見られなかった。

しかしながら、塩化リチウム、ソルビトール、冷凍ストレスでは、野生型 Rsp5 の高発現によって $rsp5^{A401E}$ の感受性相補や耐性の獲得が確認できた。そのため、これらのストレスを用いたスクリーニングを再度行うことで、より有用なストレス耐性能を持った高機能型 Rsp5 の取得が期待できる。これらの結果より、ストレスによって生成する異常タンパク質の分解に、Rsp5 が関与している可能性が考えられた。

2-3-10. AZC 含有培地における Gap1 破壊株の生育

これまでの結果より、変異型 Rsp5^{T357A/K764E} 発現株では原形質膜上の Gap1 を非常に速やかに分解することで、AZC 耐性を獲得することが示唆された。現在、我々は Rsp5 の新しい機能として、ストレスによって生じる異常タンパク質の分解に関与するというモデルを提唱している。そこで、変異型 Rsp5^{T357A/K764E} 発現株が獲得した AZC 耐性に異常タンパク質の分解が関わっていることを検証するため、 $rsp5^{A401E}$ から、さらに *GAP1* 遺伝子を破壊した CHT82 ($rsp5^{A401E} \Delta gap1$) を用いて、CHT82 (pAD4), CHT82 (pAD-RSP5), CHT82 (pAD-RSP5^{T357A/K764E}) の AZC 含有培地における生育を調べた。仮に、Gap1 の分解のみが、AZC ストレス耐性の付与に関与しているならば、Gap1 破壊株を用いることで強い AZC ストレス耐性を示さずである。

その結果、驚いたことに、CHT82 (pAD4) は AZC ストレス耐性が向上するどころか、CHT82 (Rsp5^{T357A/K764E}) では、CHT81 (Rsp5^{T357A/K764E}) よりも強い耐性を獲得した（Figure 34）。つまり、変異型 Rsp5 が、Gap1 の速やかな分解に加え、その他のパーミアアーゼから取り込まれた AZC によって生成した異常タンパク質の分解に関わっている可能性を示唆した（Figure 35）。また、別の可能性として、プロリンパーミアアーゼとして知られる Put4 などの、AZC を取り込める他のパーミアアーゼを変異型 Rsp5^{T357A/K764E} が積極的に分解していることも考えられる。

本研究における二重変異型 Rsp5^{T357A/K764E} の解析により、T357A と K764E の変異が Rsp5 の AZC ストレスに対する耐性の向上に関わっていることが判明した。今後は、T357A/K764E の高機能化メカニズムを解明するため、モデル基質（アミノ酸パーミアアーゼ Gap1、変異型 カルボキシペプチダーゼ Y など）を用いて基質と

の結合能、ユビキチン化効率などを解析する研究が興味深い。また、高機能型変異酵素を産業酵母（パン酵母、清酒酵母）の細胞内で発現させ、実用ストレス環境下（冷凍、エタノールなど）で有用性を発揮する可能性を示した。

2-4. 考察

酵母 *S. cerevisiae* のユビキチンリガーゼ $rsp5^{A401E}$ は、様々なストレスに対して強い感受性を示すが、本研究で取得した二重変異型 $Rsp5^{T357A/K764E}$ はそのストレス感受性を相補し、特に AZC ストレスでは $rsp5^{A401E}$ に変異型 $Rsp5^{T357A/K764E}$ を導入することによりストレス耐性を向上させた。

ユビキチンシステムにおいて重要な E3 の 1 つで、HECT 型に属する $Rsp5$ は、C2、WW、HECT の 3 つのドメインから構成される。本研究では、取得した四重変異型 $Rsp5$ を解析した結果、357 番目の Thr が Ala に、および 764 番目の Lys が Glu に置換することが $Rsp5$ の高機能化に重要であることが判明した (Figure 29)。また、WW3 ドメインに位置する Ala401 は、WW1、WW2 において Gly であり、他の生物においてもその保存性が高い。そのため、Ala401Gly の置換により $rsp5^{A401E}$ のストレス感受性が相補されると予想したが、興味深いことに $Rsp5^{A401G}$ 発現株は AZC 感受性を相補できなかった。この結果から、同じ HECT 型 E3 である $Rsp5$ の機能には WW3 の 401 番目は Gly ではなく Ala であることが重要であると考えられる。

一方、 $Rsp5$ の高機能化に関与する置換のうち、T357A は基質タンパク質を認識するために必要な WW2 ドメインに存在する。また、もう一つの置換である K764E は活性残基 Cys777 を有する HECT ドメイン内に存在している。 $Rsp5$ は基質タンパク質と結合すると、立体構造の局所的変化により WW ドメインと HECT ドメインが近接し、ユビキチンを受け渡すと予想されている (Huang *et al.*, 1999)。そこで、 $Rsp5$ と相同性が高いヒトのユビキチンリガーゼ E6AP の HECT ドメインの立体構造 (Huang *et al.*, 1999) に基づき、高機能型 $Rsp5$ の置換部位を表示した (Figure 30)。塩基性残基 (Lys) から酸性残基 (Glu) へと逆の荷電に変化した 764 番目は、活性残基 Cys777 の近傍に存在している。また、WW ドメイン内の置換である 357 番目は非荷電の極性残基 (Thr) が非極性の残基 (Ala) に置換している。現在のところ WW ドメインの立体構造は不明であるが、おそらく 764 番目と 357 番目の残基どうしも近接しており、高機能型 $Rsp5$ では Glu764 と Ala357 の相互作用が強くなり、例えば Gap1 パーミアーゼが選択的ユビキチン化の引き金である「リン酸化」される前に $Rsp5$ により認識され、結合することにより、ユビキチン化活性が向上した可能性が考えられる。また、この 2 残基は直接的な相互作用をするのか、それとも標的タンパク質を介して相互作用するのか、興味深い。そこで、T357, K764 を他の特徴的なアミノ酸へ置換することや、T357, K764 周辺部位でランダム変異を導入することで、様々なストレス耐性 (高温、エタノール、冷凍) が向上する新規の変異型 $Rsp5$ 取得の可能性、さらには、2 残基の相互作用の解明が期待できる。

現在、当研究室では $Rsp5$ の新しい機能として、ストレスで生じる異常タンパク

質の分解に関与するというモデルを提唱し、1) の可能性に関連した異常タンパク質基質の同定を試みている。そこで本実験では、2) の可能性として考えられるパーミアーゼの分解能力を調べるため、Rsp5 の基質タンパク質であり、Pro をはじめ 20 種類のアミノ酸のパーミアーゼである Gap1 の分解速度をウェスタンブロットングによって解析した (Figure 31)。その結果、変異型 Rsp5^{T357A/K764E} 発現株の Gap1 は、野生型 Rsp5 発現株と比較して Gap1 が非常に速やかに分解されていることが示された。驚いたことに、Gap1 はアンモニウム添加直前 (0 min) においても原形質膜にほとんど存在していないことから、小胞体から原形質膜に輸送される段階やアンモニウムイオン非存在下でも分解されている可能性が考えられる。しかしながら、本実験の前培養では生育を考慮し、硫酸アンモニウムを窒素源に用いたため、Pro を窒素源に用いた前培養での解析も行う必要がある。

Rsp5 はゴルジ体において Gap1 を原形質膜と液胞のどちらへ輸送するかの選別にも関わっている (De Craene *et al.*, 2001; Soetens *et al.*, 2001)。Figure 31 のとき、変異型 Rsp5^{T357A/K764E} 発現株で Gap1 が硫酸アンモニウム添加前より原形質膜画分で検出されなかった理由として、Gap1 がゴルジ体から直接液胞に輸送された可能性も考えられる。よって今後は、Rsp5 による基質の認識・結合、ユビキチン化の分子機構の解明を目的に、Gap1 分解経路の特定、野生型と高機能型の Rsp5 を用いて Gap1 のユビキチン化状態の違い (モノユビキチン化なのかポリユビキチン化なのか、基質とユビキチン分子内のどの Lys 残基を介した結合なのかなど) を詳細に調べる。分子生物学的には Gap1-GFP を構築して、細胞内局在性をライブで観察することも、Gap1 の挙動を追う上で有効な手法である。また、今回示した Rsp5 の高機能化は Gap1 特異的なのかどうかを明らかにする目的で、Gap1 以外の基質 (他のパーミアーゼなど) に対する特性を解析することも興味深い。

次に、*rsp5*^{A401E} における変異型 Rsp5^{T357A/K764E} の発現が、AZC 以外のストレスにおける生育に及ぼす影響を調べた (Figure 33)。その結果、AZC (Pro)、Canavanine (Arg)、DL-Norleucine (Met)、DL-β-Hydroxynorvaline (Thr) などの毒性のアミノ酸アナログストレス耐性が向上したことから、変異型 Rsp5 が異常タンパク質の処理に関与することを示唆しました。

また、ツニカマイシン (小胞体ストレス)、エタノール、塩化リチウム、ソルビトールストレスでは、変異型 Rsp5 の過剰発現によって *rsp5*^{A401E} の耐性を向上させることはできなかった。しかし、Canavanine, DL-Norleucine, DL-β-Hydroxynorvaline ストレスでは、野生型 Rsp5 を過剰発現しただけで耐性が向上したため、より有能な変異型 Rsp5 の取得が期待できる。

これらのストレスでは、異常タンパク質の分解経路がそれぞれ異なっていることが示唆されている (Davidson *et al.*, 1996; Stadtman 1993)。そのため、今回取得した変異

型 Rsp5^{T357A/K764E} はストレスの種類により耐性を向上させる場合とそうでない場合があり、アミノ酸置換により Rsp5 の機能やストレスで生成した異常タンパク質 (基質) との結合などが変化することが示唆された。また、AZC のように異常タンパク質を生成する毒性アミノ酸アナログに対して変異型 Rsp5^{T357A/K764E} 発現株では耐性が著しく向上していた。したがって、変異型 Rsp5^{T357A/K764E} を発現する細胞内では、1) アナログが取り込まれ生成した異常タンパク質の分解が促進されている可能性、または、2) アナログを細胞内に取り込むパーミアーゼの分解が促進されている可能性が示唆された。

以上の結果から、変異型 Rsp5^{T357A/K764E} を発現させた細胞では、Rsp5 が原形質膜上に存在する Gap1 を非常に速く認識・結合・ユビキチン化し、その後ユビキチン化された Gap1 は速やかにエンドサイトーシスを経て液胞で分解されるため、AZC が細胞内にほとんど流入されず、ストレス耐性が向上しているのではないかと考えられた。次に、この仮説を証明するために細胞内の AZC 含量を調べた (Table 5)。その結果、変異型 Rsp5^{T357A/K764E} 発現株は、野生株と比較しても、細胞内 AZC 含量が著しく低いことが明らかになった。また、Rsp5 は Gap1 の他にも、Trp や Ura のパーミアーゼ (Tat2, Fur4) もユビキチン化し、活性を制御していることが報告されている (Gala & Haguener-Tsapis, 1997; Beck *et al.*, 1999)。そのため、変異型 Rsp5^{T357A/K764E} 発現株で AZC 以外の毒性アミノ酸アナログに対する耐性が野生株と比較して強くなったことも、Rsp5 の迅速なユビキチン化によりパーミアーゼの分解が著しく促進されているためだと考えられた。

最後に、変異型 Rsp5^{T357A/K764E} 発現株が獲得した AZC 耐性に異常タンパク質の分解が関与していないかを確認するため、GAP1 遺伝子を破壊した CHT82 (pAD4)、CHT82 (pAD-RSP5)、CHT82 (pAD-RSP5^{T357A/K764E}) の AZC 含有培地での生育を調べた (Figure 34)。その結果、GAP1 を破壊した CHT82 (pAD-Rsp5^{T357A/K764E}) は、破壊していない CHT81 (pAD-Rsp5^{T357A/K764E}) よりも強い AZC 耐性を獲得した。よって、Gap1 が原形質膜上に安定して存在しないことが AZC 耐性にとって重要であることが裏付けられた。しかし、CHT82 (pAD4)、CHT82 (pAD-RSP5) では AZC 感受性を相補できなかった。そのため、変異型 Rsp5^{T357A/K764E} は、アナログを細胞内に取り込むパーミアーゼの分解を促進し、しかも、その他のパーミアーゼより取り込まれたアナログによって生成した異常タンパク質の分解も促進している可能性が考えられる (Figure 35)。

第二章では、Rsp5 のアミノ酸置換によって機能が変化することを示したことから、応用面においても AZC 以外のストレス (冷凍、エタノール、浸透圧ストレスなど) で生じる異常タンパク質分解に関わる高機能型 Rsp5 を新たに取得する可能性があるため、実用酵母のストレス耐性向上への応用につながることを期待したい。

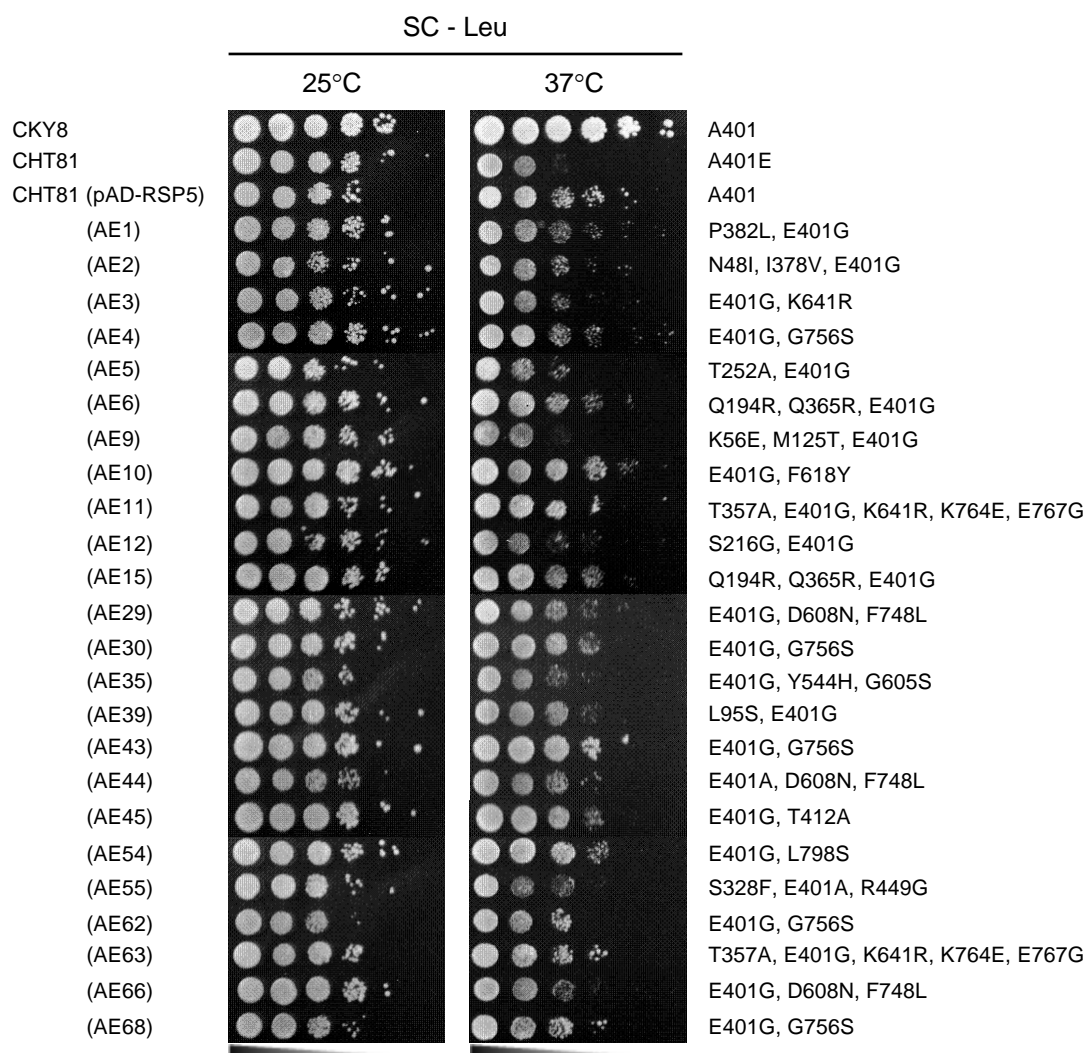


Figure 27 Isolation of high temperature-resistant mutant Rsp5. The growth phenotypes of various strains were examined. Approximately 10^6 cells of each strain and serial dilutions of 10^{-1} to 10^{-5} (from left to right) were spotted and incubated onto YPD medium at 25°C or 37°C for 3 days.

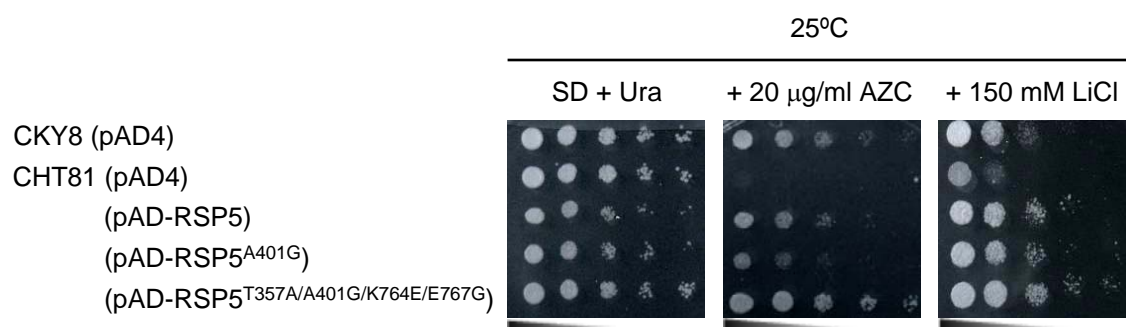


Figure 28 Isolation of an AZC- and LiCl-resistant mutant Rsp5^{T357A/A401G/K764E/E767G}. The growth phenotypes of various strains were examined. Approximately 10⁶ cells of each strain and serial dilutions of 10⁻¹ to 10⁻⁴ (from left to right) were spotted and incubated onto SD+Ura medium, SD+Ura medium containing 20 µg/ml or 150 mM LiCl at 25°C for 3 days.

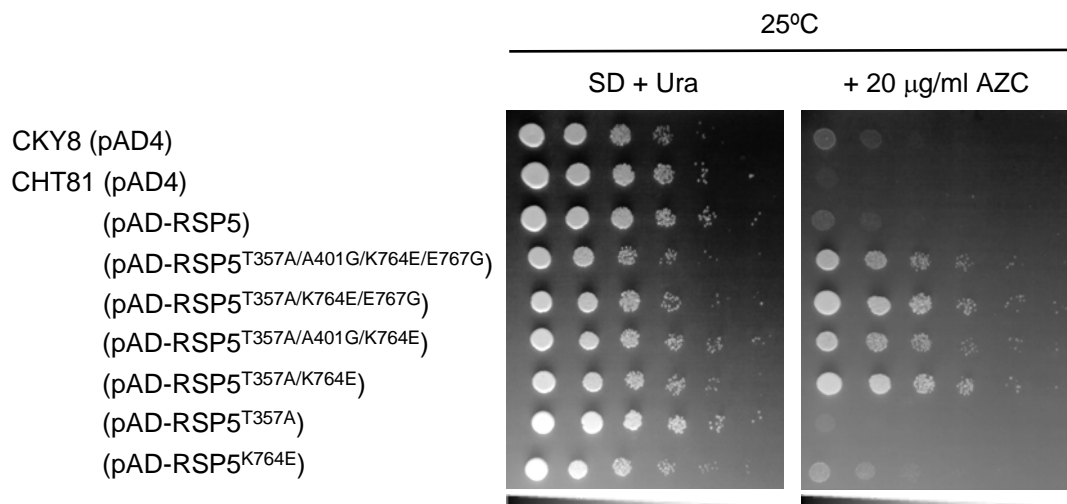


Figure 29 Determination of amino acid residue of mutant Rsp5 involving stress tolerance. The growth phenotypes of various strains were examined. Approximately 10^6 cells of each strain and serial dilutions of 10^{-1} to 10^{-5} (from left to right) were spotted and incubated onto SD+Ura medium, SD+Ura medium containing 20 µg/ml at 25°C for 3 days.

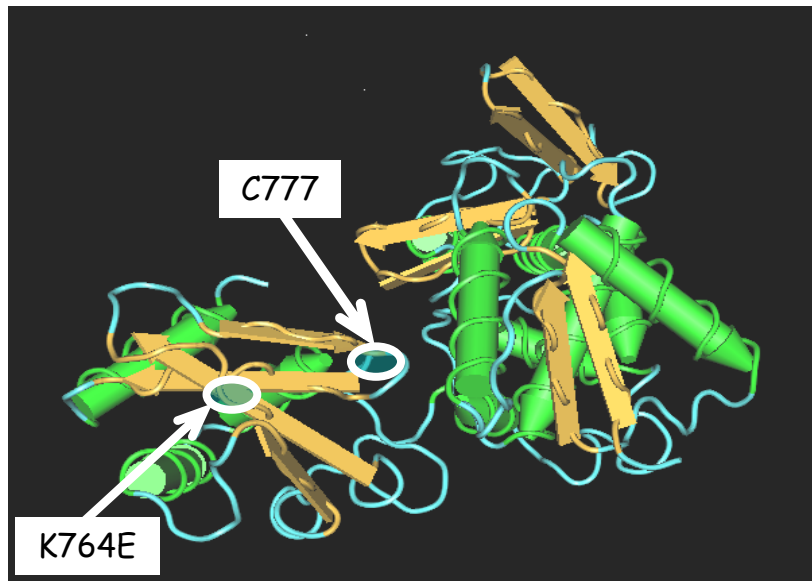
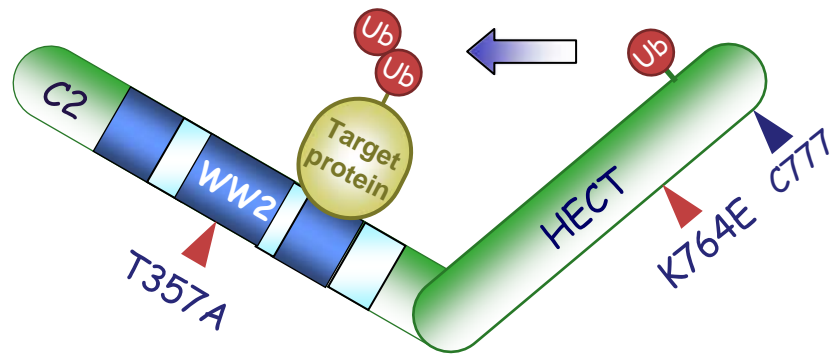
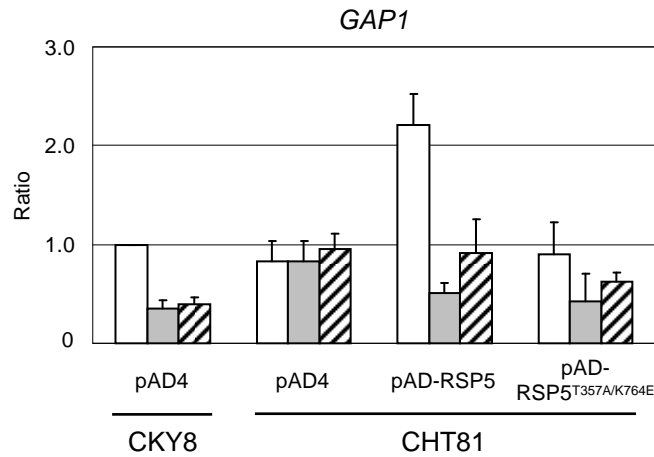


Figure 30 The T357A and K764E mutations were localized at the WW1 domain and the HECT-domain respectively. The 3D structure of human E6AP hect domain.

A



B

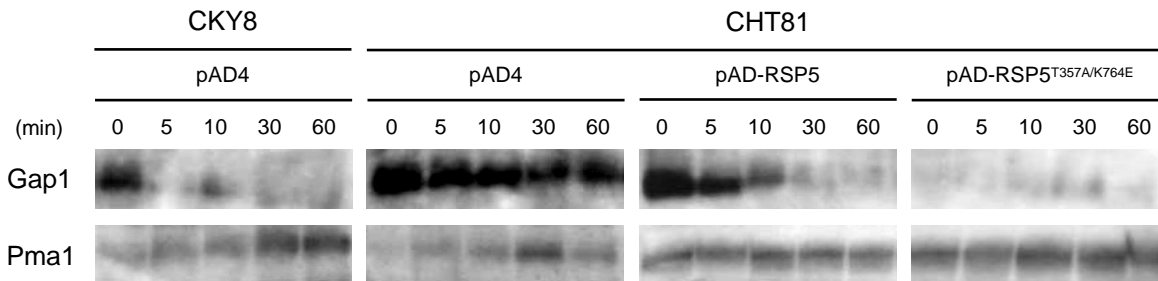


Figure 31 The mutant Rsp5 enhanced AZC-stress tolerance by rapid degradation of Gap1 permease. (A) Recombinant strains CKY8 (wild-type) harboring pAD4, and CHT81 (*rsp5^{A401E}* mutant) harboring pAD4, pAD-RSP5, and pAD-RSP5^{T357A/K764E} were cultured to the logarithmic growth phase in SD+Ura. Samples were prepared before (time = 0, opened bar) and at several times (5 min, shaded bar; 10 min, hatched bar) after addition of (NH₄)₂SO₄. Total RNA and whole cell extracts from each strain were prepared from samples were used in A and B, respectively. As shown in Fig. 17, the transcription of *GAP1* was assessed by real-time quantitative PCR. Values represent the means and error bars indicate the standard deviations of three independent experiments. (B) Whole cell extracts were analyzed by Western blot analysis using anti-HA monoclonal antibody. The 3-phosphoglycerate kinase Pgk1 was used as a protein-loading control.

Table 5 The intracellular AZC content was measured 30 min after addition of 5 mM AZC in SD medium

Strain	AZC content (% of dry wt)	Relative amount of AZC content (%)
CKY8 (pAD4)	1.7	100
CHT81 (pAD4)	3.9	217
(pAD-RSP5)	1.3	76
(pAD-RSP5 ^{T357A/K764E})	0.28	17

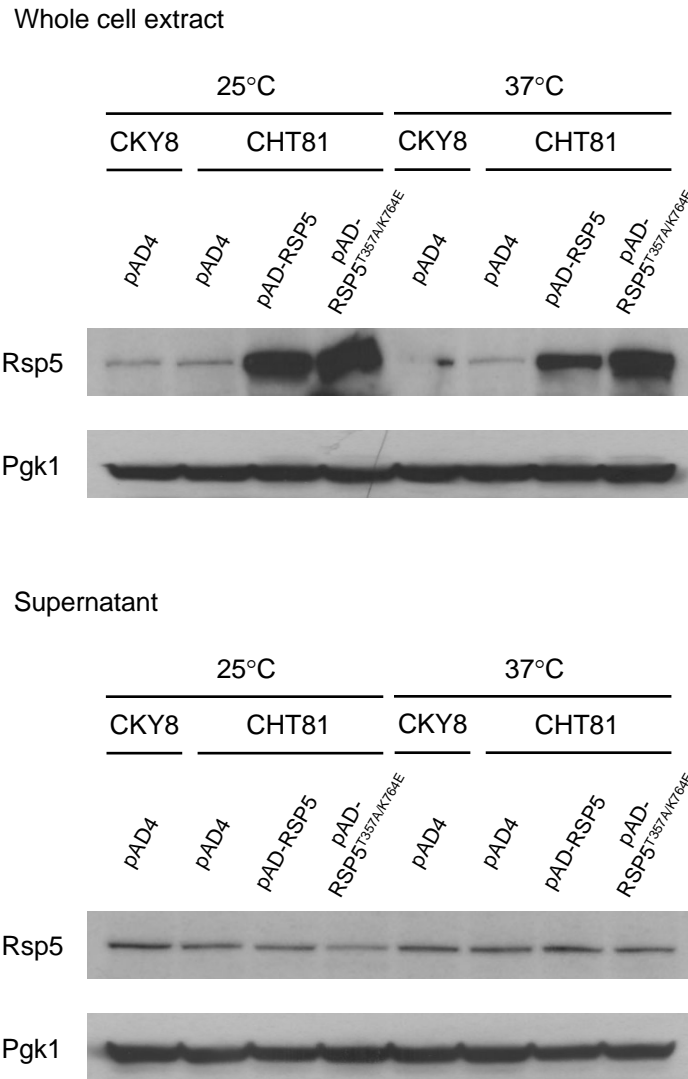


Figure 32 Expression and stability of Rsp5^{T357A/K764E} in the *rsp5^{A401E}* cells. Recombinant strains CKY8 (wild-type) harboring pAD4, and CHT81 (*rsp5^{A401E}* mutant) harboring pAD4, pAD-RSP5, and pAD-RSP5^{T357A/K764E} were cultured to the logarithmic growth phase in SD+Ura medium at 25°C and subjected to temperature up-shift (from 25 to 37°C, 30 min). Whole cell extracts and supernatant (20,000 g) were prepared and analyzed by Western blot analysis using anti-Rsp5 monoclonal antibody. The 3-phosphoglycerate kinase Pgk1 was used as a protein-loading control.

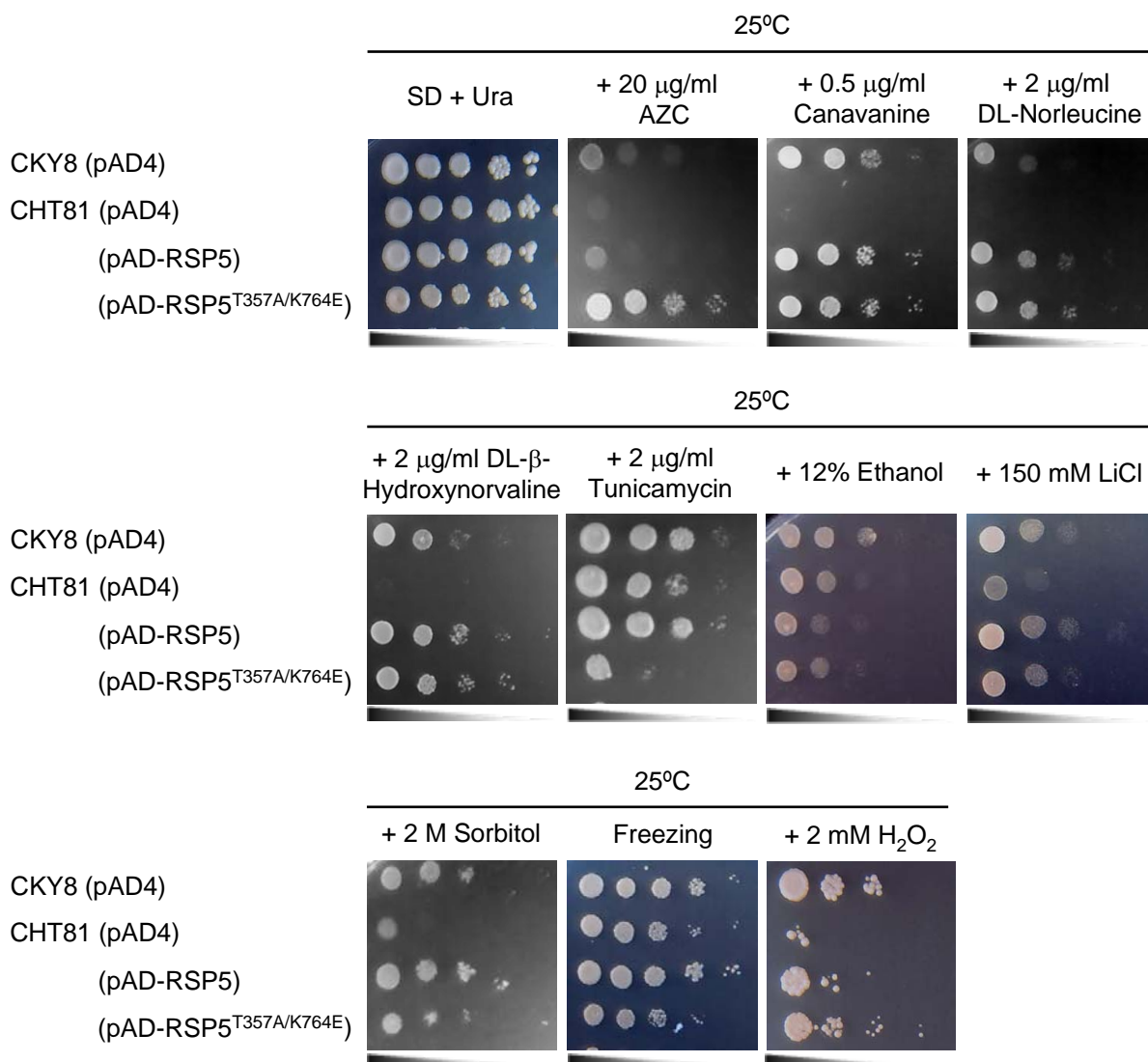


Figure 33 Overexpression of the mutant Rsp5^{T357A/K764E} in *rsp5^{A401E}* cells under various stress conditions. The growth phenotypes of various strains were examined. Approximately 10⁶ cells of each strain and serial dilutions of 10⁻¹ to 10⁻⁴ (from left to right) were spotted and incubated onto SD+Ura medium, SD+Ura medium containing 20 µg/ml AZC, 0.5 µg/ml canavanine, 2 µg/ml DL-norleucine, 2 µg/ml DL-β-hydroxynorvaline, 2 µg/ml tunicamycin, 12% Ethanol or 150 mM LiCl, 1 M sorbitol, Freezing (-20°C, 45 min), or 2 mM H₂O₂ at 25°C for 3 days.

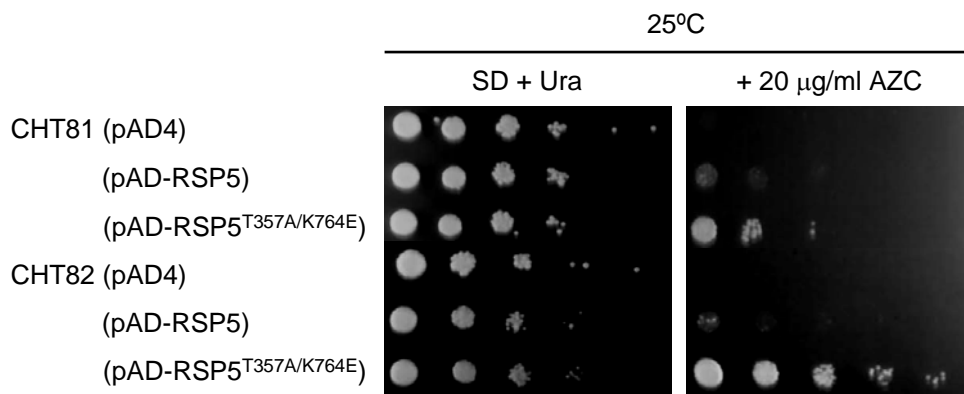


Figure 34 The effect of the mutant Rsp5^{T357A/K764E} in *rsp5^{A401E} gap1Δ* cells. The growth phenotypes of various strains were examined. Approximately 10⁶ cells of each strain and serial dilutions of 10⁻¹ to 10⁻⁴ (from left to right) were spotted and incubated onto SD+Ura medium, SD+Ura medium containing 20 µg/ml AZC at 25°C for 3 days.

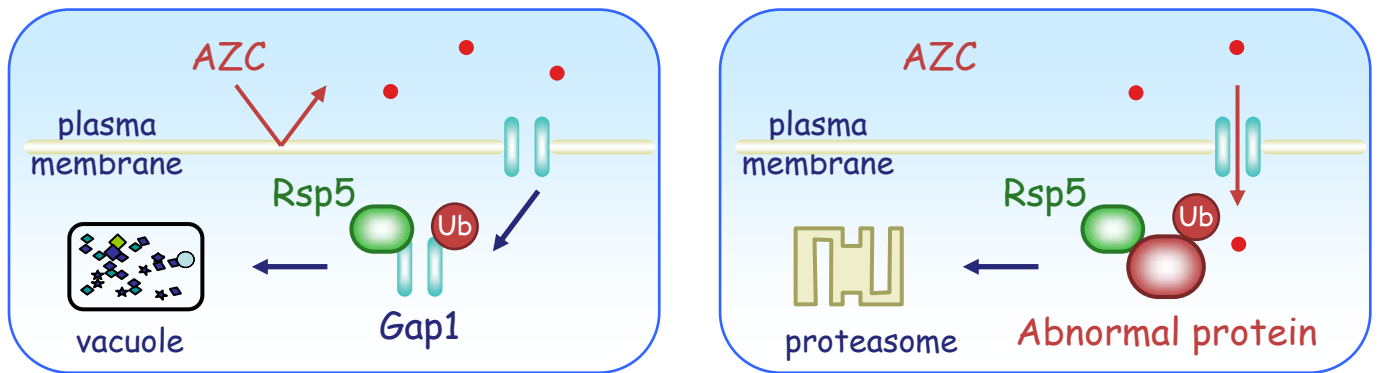


Figure 35 The mutant Rsp5^{T357A/K764E} was involved in rapid degradation of Gap1 and stress-induced abnormal proteins.

終章

真核生物のタンパク質品質管理機構に関与するユビキチンシステムにおいて、ユビキチンリガーゼは分解すべきタンパク質（基質）を認識し、ユビキチン化を行う重要な酵素である。酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の HECT 型ユビキチンリガーゼの1つで生育に必須である Rsp5 については、トランスポーターやレセプターを含む原形質膜のエンドサイトーシス、RNA ポリメラーゼ II の活性調節、不飽和脂肪酸合成遺伝子の転写調節因子の活性化、RNA 分子の核外輸送や成熟化、小胞体関連分解、胞子の形成や発芽など様々な細胞機能への関与が報告されているが、ミスフォールド化やアンフォールド化した異常タンパク質の選択的な認識や処理（修復、分解）に関する知見はほとんどない。そこで我々は、高等生物のモデルとして、また発酵食品の製造において重要な酵母を材料に、酵母のストレス耐性機構を解析しており、Rsp5 の新しい機能としてストレスで生じる異常タンパク質処理への関与を提唱している。我々はストレスにおける Rsp5 の機能に着目し、1) Rsp5 が異常タンパク質修復に関与するストレスタンパク質の発現を制御する機構、2) ランダム変異導入により分離した二重変異型 Rsp5 がストレス耐性を向上させる機構を解析し、以下の成果をあげた。

- 1) Rsp5 が転写調節因子 (Hsf1, Msn2/4) の転写後制御 (mRNA の核外輸送など) を介してストレスタンパク質 (Hsp12, Hsp42, Ddr2 など) の発現を調節し、異常タンパク質の修復に関与することを示した。Rsp5 が高温ストレスにおいて RNA 分子の核外輸送に関与することはすでに報告されているが、我々は Rsp5 が Hsf1 や Msn2/4 の mRNA の核外輸送に選択的に関与すること、およびエタノールストレスにおいても、Rsp5 が mRNA や tRNA の核外輸送に必須であることを見出し、核外輸送に関わる標的タンパク質の同定を含む Rsp5 を介した RNA 分子の核外輸送機構の解明に向けた重要な知見を得た。
- 2) ストレスのモデルとして毒性アミノ酸アナログを用いたスクリーニング法を確立し、ランダム変異ライブラリーからストレス耐性の向上した変異型 Rsp5 を分離し、その機能を解析した。得られた二重変異型 Rsp5 (T357A/K764E) 発現株では、パーミアアーゼ Gap1 が急速に分解されるため、アミノ酸アナログストレス耐性が向上したことを明らかにし、ストレスの種類により Rsp5 の基質は異なることも示した。

以上のように、本論文は酵母のユビキチンリガーゼ Rsp5 がストレスタンパク質の発現制御を介して異常タンパク質修復に関わることを明らかにするとともに、異常タンパク質分解能力を高めた変異型 Rsp5 の創製により、ストレス耐性の向上した実用酵母が育種できる可能性を示しており、学術上、応用上貢献するものである。

参考文献

- Amoros, M. & Estruch, F. (2001) Hsf1p and Msn2/4p cooperate in the expression of *Saccharomyces cerevisiae* genes *HSP26* and *HSP104* in a gene- and stress type-dependent manner. *Mol. Microbiol.*, **39**, 1523-1532.
- Ananthan, J., Goldberg, A.L. & Voellmy, R. (1986) Abnormal proteins serve as eukaryotic stress signals and trigger the activation of heat shock genes. *Science*, **232**, 522-524.
- Bahler, J., Wu, J.Q., Longtine, M.S., Shah, N.G., McKenzie, A. 3rd, Steever, A.B., Wach, A., Philippsen, P. & Pringle, J.R. (1998) Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast*, **14**, 943-951.
- Beck, T., Schmidt, A. & Hall, M.N. (1999) Starvation induces vacuolar targeting and degradation of the tryptophan permease in yeast. *J. Cell Biol.*, **146**, 1227-1237.
- Causton, H.C., Ren, B., Koh, S.S., Harbison, C.T., Kanin, E., Jennings, E.G., Lee, T.I., True, H.L., Lander, E.S. & Young, R.A. (2001) Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Mol. Biol. Cell*, **12**, 323-337.
- Davidson, J.F., Whyte, B., Bissinger, P.H. & Schiestl, R.H. (1996) Oxidative stress is involved in heat-induced cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 5116-5121.
- De Craene, J.O., Soetens, O. & Andre, B. (2001) The Npr1 kinase controls biosynthetic and endocytic sorting of the yeast Gap1 permease. *J. Biol. Chem.*, **276**, 43939-43948.
- Dunn, R. & Hicke, L. (2001) Domains of the Rsp5 ubiquitin-protein ligase required for receptor-mediated and fluid-phase endocytosis. *Mol. Biol. Cell*, **12**, 421-435.
- Estruch, F. & Carlson, M. (1993) Two homologous zinc finger genes identified by multicopy suppression in a SNF1 protein kinase mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 3872-3881.
- Ferguson, S.B., Anderson, E.S., Harshaw, R.B., Thate, T., Craig, N.L. & Nelson, H.C. (2005) Protein kinase A regulates constitutive expression of small heat-shock genes in an Msn2/4p-independent and Hsf1p-dependent manner in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **169**, 1203-1214.
- Gajewska, B., Kaminska, J., Jesionowska, A., Martin, N.C., Hopper, A.K., & Zoladek, T. (2001) WW domains of Rsp5p define different functions: determination of roles in fluid phase and uracil permease endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*.

- Genetics*, **157**, 91-101.
- Gala, J.M. & Haguenuer-Tsapis, R. (1997) Ubiquitin Lys63 is involved in ubiquitination of a yeast plasma membrane protein. *EMBO J.*, **16**, 5847–5854.
- Galan, J.M., Moreau, V., Andre, B., Volland, C. & Haguenuer-Tsapis, R. (1996) Ubiquitination mediated by the Npi1p/Rsp5p ubiquitin-protein ligase is required for endocytosis of the yeast uracil permease. *J. Biol. Chem.*, **271**, 10946-10952.
- Gasch, A.P., Spellman, P.T., Kao, C.M., Carmel-Harel, O., Eisen, M.B., Storz, G., Botstein, D. & Brown, P.O. (2000) Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol. Biol. Cell*, **11**, 4241-4257.
- Gwizdek, C., Hobeika, M., Kus, B., Ossareh-Nazari, B., Dargemont, C. & Rodriguez, M.S. (2005) The mRNA nuclear export factor Hpr1 is regulated by Rsp5-mediated ubiquitylation. *J. Biol. Chem.*, **280**, 13401-13405.
- Gwizdek, C., Iglesias, N., Rodriguez, M.S., Ossareh-Nazari, B., Hobeika, M., Divita, G., Stutz, F. & Dargemont, C. (2006) Ubiquitin-associated domain of Mex67 synchronizes recruitment of the mRNA export machinery with transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 16376-16381.
- Gorner, W., Durchschlag, E., Martinez-Pastor, M.T., Estruch, F., Ammerer, G., Hamilton, G., Ruis, H. & Schuller, C. (1998) Nuclear localization of the C2H2 zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity. *Genes Dev.*, **12**, 586-597.
- Haitani, Y., Shimoi, H. & Takagi, H. (2006) Rsp5 regulates expression of stress proteins via post-translational modification of Hsf1 and Msn4 in *Sassharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.*, **580**, 3433-3438.
- Hashikawa, N., Mizukami, Y. & Sakurai, H. (2006) Mutated yeast heat shock transcription factor activates transcription independently of hyperphosphorylation. *J. Biol. Chem.*, **281**, 3936-42.
- Hashikawa, N. & Sakurai, H. (2004) Phosphorylation of the yeast heat shock transcription factor is implicated in gene-specific activation dependent on the architecture of the heat shock element. *Mol. Cell. Biol.*, **24**, 3648-3659.
- Haynes, C.M., Caldwell, S. & Cooper A.A. (2002) An *HRD/DER*-independent ER quality control mechanism involves Rsp5p-dependent ubiquitination and ER-Golgi transport. *J. Cell Biol.*, **158**, 91-101.
- Helliwell, S.B., Losko, S. & Kaiser, C.A. (2001) Components of ubiquitin ligase complex specify polyubiquitination and intracellular trafficking of the general amino acid premease. *J. Cell Biol.*, **153**, 649-662.

- Hightower, L.E. (1980) Cultured animal cells exposed to amino acid analogues or puromycin rapidly synthesize several polypeptides. *J. Cell Physiol.*, **102**, 407-427.
- Hoppe, T., Matuschewski, K., Rape, M., Schlenker, S., Ulrich, H.D. & Jentsch, S. (2000) Activation of a membrane-bound transcription factor by regulated ubiquitin/proteasome-dependent processing. *Cell*, **102**, 577-586.
- Hoshikawa, C., Shichiri, M., Nakamori, S. & Takagi, H. (2003) A nonconserved Ala401 in the yeast Rsp5 ubiquitin ligase is involved in degradation of Gap1 permease and stress-induced abnormal proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 11505-11510.
- Huang, L., Kinnucan, E., Wang, G., Beaudenon, S., Howley, P.M., Huibregtse, J.M. & Pavletich, N.P. (1999) Structure of an E6AP-UbcH7 complex: insights into ubiquitination by the E2-E3 enzyme cascade. *Science*, **286**, 1321-1326.
- Huibregtse, J.M., Yang, J. & Beaudenon, S.L. (1997) The large subunit of RNA polymerase II is a substrate of the Rsp5 ubiquitin-protein ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 3656-3661.
- Kaida, D., Toh-e, A. & Kikuchi, Y. (2003) Rsp5-Bul1/2 complex is necessary for the HSE-mediated gene expression in budding yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **306**, 1037-1041.
- Kajiwara, S., Aritomi, T., Suga, K., Ohtaguchi, K. & Kobayashi, O. (2000) Overexpression of the *OLE1* gene enhances ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **53**, 568-574.
- Kanda, T. (1996) A ubiquitin-protein ligase (E3) mutation of *Saccharomyces cerevisiae* suppressed by co-overexpression of two ubiquitin-specific processing. *Genes. Genet. Syst.*, **71**, 75-83.
- Kandror, O., Bretschneider, N., Kreydin, E., Cavalieri, D. & Goldberg, A.L. (2004) Yeast adapt to near-freezing temperatures by STRE/Msn2,4-dependent induction of trehalose synthesis and certain molecular chaperones. *Mol. Cell*, **13**, 771-781.
- Katzmann, D.J., Sarkar, S., Chu, T., Audhya, A. & Emr, S.D. (2004) Multivesicular body sorting: ubiquitin ligase Rsp5 is required for the modification and sorting of carboxypeptidase S. *Mol. Biol. Cell*, **15**, 468-480.
- Kee, Y., Lyon, N. & Huibregtse, J.M. (2005) The Rsp5 ubiquitin ligase is coupled to and antagonized by the Ubp2 deubiquitinating enzyme. *EMBO J.*, **24**, 2414-2424.
- Kee, Y., Munoz, W., Lyon, N. & Huibregtse, J.M. (2006) The deubiquitinating enzyme Ubp2 modulates Rsp5-dependent Lys63-linked polyubiquitin conjugates in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **281**, 36724-36731.

- Kohrer, K. & Domdey, H. (1991) Preparation of high molecular weight RNA. *Methods Enzymol.*, **194**, 398-405.
- Krebber, H., Taura, T., Lee, M.S. & Silver, P.A. (1999) Uncoupling of hnRNP Npl3p from mRNAs during the stress-induced block in mRNA export. *Genes Dev.* **13**, 1994-2004.
- Kwapisz, M., Cholbinski, P., Hopper, A.K., Rousset, J.-P. & Zoladek, T. (2005) Rsp5 ubiquitin ligase modulates translation accuracy in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA*, **11**, 1710-1718.
- Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*, **25**, 402-408.
- Lorick, K.L., Jensen, J.P., Fang, S., Ong, A.M., Hatakeyama, S. & Weissman A.M. (1999) RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 11364-11369.
- Martinez-Pastor, M.T., Marchler, G., Schuller, C., Marchler-Bauer, A., Ruis, H. & Estruch, F. (1996) The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *EMBO J.*, **15**, 2227-2235.
- Mizzen, L.A. & Welch, W.J. (1988) Characterization of the thermotolerant cell. I. Effects on protein synthesis activity and the regulation of heat-shock protein 70 expression. *J. Cell Biol.*, **106**, 1105-1116.
- Morita, Y., Nakamori, S. & Takagi, H. (2003) L-Proline accumulation and freeze tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* are caused by a mutation in the *PRO1* gene encoding gamma-glutamyl kinase. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 212-219.
- Murray, A.W. (2004) Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell*, **116**, 221-234.
- Neumann, S., Petfalski, E., Brügger, B., Großhans, H., Wieland, F., Tollervey, D. & Hurt, E. (2003) Formation and nuclear export of tRNA, rRNA and mRNA is regulated by the ubiquitin ligase Rsp5p. *EMBO Rep.*, **4**, 1156-1162.
- Nomura, M. & Takagi, H. (2004) Role of the yeast acetyltransferase Mpr1 in oxidative stress: regulation of oxygen reactive species caused by a toxic proline catabolism intermediate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 12616-12621.
- Ogunjimi, A.A., Briant, D.J., Pece-Barbara, N., Le Roy, C., Di Guglielmo, G.M., Kavsak, P., Rasmussen, R.K., Seet, B.T., Sicheri, F. & Wrana, J.L. (2005) Regulation of Smurf2 ubiquitin ligase activity by anchoring the E2 to the HECT domain. *Mol. Cell*, **19**, 297-308.
- Omura, F., Fujita, A., Miyajima, K. & Fukui, N. (2005) Engineering of yeast Put4

- permease and its application to lager yeast for efficient proline assimilation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **69**, 1162-1171.
- Peng, J., Schwartz, D., Elias, J.E., Thoreen, C.C., Cheng, D., Marsischky, G., Roelofs, J., Finley, D., & Gygi, S.P. (2003) A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nat. Biotechnol.*, **8**, 921-926.
- Petracek, M.E. & Longtine, M.S. (2002) PCR-based engineering of yeast genome. *Methods Enzymol.*, **350**, 445-469.
- Piper, P.W. (1995) The heat shock and ethanol stress responses of yeast exhibit extensive similarity and functional overlap. *FEMS Microbiol. Lett.*, **134**, 121-127.
- Pickart, C.M. (2001) Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu. Rev. Biochem.*, **70**, 503-533.
- Pickart, C.M. (2004) Back to the future with ubiquitin. *Cell*, **116**, 181-190.
- Ren, J., Kee, Y., Huibregtse, J.M. & Piper, R.C. (2007) Hse1, a component of the yeast Hrs-STAM ubiquitin-sorting complex, associates with ubiquitin peptidases and a ligase to control sorting efficiency into multivesicular bodies. *Mol. Biol. Cell*, **18**, 324-335.
- Rodriguez, M.S., Gwizdek, C., Haguenauer-Tsapis, R. & Dargemont, C. (2003) The HECT ubiquitin ligase Rsp5p is required for proper nuclear export of mRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Traffic*, **4**, 566-575.
- Rose, M.D., Winston, F. & Hieter, P. (1990) *Methods in yeast genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Saavedra, C., Tung, K.S., Amberg, D.C., Hopper, A.K. & Cole, C.N. (1996) Regulation of mRNA export in response to stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* **10**, 1608-1620.
- Salvat, C., Jariel-Encontre, I., Acquaviva, C. & Omura, S. (1998) Differential directing of c-Fos and c-Jun proteins to the proteasome in serum-stimulated mouse embryo fibroblasts. *Oncogene*, **17**, 327-337.
- Sambrook, J. & Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sarkar, S. & Hopper, A.K. (1998) tRNA nuclear export in *Saccharomyces cerevisiae*: in situ hybridization analysis. *Mol. Biol. Cell*, **9**, 3041-3055.
- Scheffner, M., Huibregtse J.M., Vierstra, R.D. & Howley, P.M. (1993) The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell*, **75**, 495-505.

- Scheffner, M., Nuber, U., Huibregtse, J.M. (1995) Protein ubiquitination involving an E1-E2-E3 enzyme ubiquitin thioester cascade. *Nature*, **373**, 81-83.
- Shcherbik, N., Kee, Y., Lyon, N., Huibregtse, J.M. & Haines, D.S. (2004) A single PXY motif located within the carboxyl terminus of Spt23p and Mga2p mediates a physical and functional interaction with ubiquitin ligase Rsp5p. *J. Biol. Chem.*, **279**, 53892-53898.
- Shcherbik, N., Kumar, S. & Haines, D.S. (2002) Substrate proteolysis is inhibited by dominant-negative Nedd4 and Rsp5 mutants harboring alterations in WW domain 1. *J. Cell Sci.*, **115**, 1041-1048.
- Shcherbik, N., Zoladek, T., Nickels, J.T. & Haines, D.S. (2003) Rsp5p is required for ER bound Mga2p120 polyubiquitination and release of the processed/tethered transactivator Mga2p90. *Curr. Biol.*, **13**, 1227-1233.
- Soetens, O., De Craene, J.O. & Andre, B. (2001) Ubiquitin is required for sorting to the vacuole of the yeast general amino acid permease, Gap1. *J. Biol. Chem.*, **272**, 43949-43957.
- Sorger, P.K. & Pelham, H.R.B. (1987) Purification and characterization of a heat-shock element binding protein from yeast. *EMBO J.*, **6**, 3035-3041.
- Springael, J.Y. & Andre, B. (1998) Nitrogen-regulated ubiquitination of the Gap1 permease of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell*, **9**, 1253-1263.
- Stadtman, E.R. (1993) Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. *Annu. Rev. Biochem.*, **62**, 797-821
- Tani, T., Derby, R.J., Hiraoka, Y. & Spector, D.L. (1995) Nuclear accumulation of poly(A)⁺ RNA in heat-shocked yeast cells: implication of nucleolar involvement in mRNA transport. *Mol. Biol. Cell* **6**, 1515-1534.
- Trotter, E.W., Berenfeld, L., Krause, S.A., Petsko, G.A. & Gray, J.V. (2001) Protein misfolding and temperature up-shift cause G1 arrest via a common mechanism dependent on heat shock factor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 7313-7318.
- Trotter, E.W., Kao, C.M., Berenfeld, L., Botstein, D., Petsko, G.A. & Gray, J.V. (2002) Misfolded proteins are competent to mediate a subset of the responses to heat shock in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **277**, 44817-44825.
- Vandenbol, M., Jauniaux, J.C., Vissers, S. & Grenson, M. (1987) Isolation of the *NPR1* gene responsible for the reactivation of ammonia-sensitive amino-acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. RNA analysis and gene dosage effects. *Eur. J.*

- Biochem.*, **164**, 607-612.
- Verdecia, M.A., Joazeiro, C.A., Wells, N.J., Ferrer, J.L., Bowman, M.E., Hunter, T. & Noel, J.P. (2003) Conformational flexibility underlies ubiquitin ligation mediated by the WWP1 HECT domain E3 ligase. *Mol. Cell*, **11**, 249-259.
- Woodbury E.L. & Morgan, D.O. (2007) Cdk and APC activities limit the spindle-stabilizing function of Fin1 to anaphase. *Nat. Cell Biol.*, **9**, 106-112.
- Xie, Y. & Varshavsky, A. (2002) UFD4 lacking the proteasome-binding region catalyses ubiquitination but is impaired in proteolysis. *Nat. Cell Biol.*, **12**, 1003-1007.
- Yokota, S.I., Yanagi, H., Yura, T. & Kubota, H. (2000) Upregulation of cytosolic chaperonin CCT subunits during recovery from chemical stress that causes accumulation of unfolded proteins. *Eur. J. Biochem.*, **267**, 1658-1664.
- You, K.M., Rosenfield, C.L. & Knipple, D.C. (2003) Ethanol tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on cellular oleic acid content. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 1499-1503
- Younghoon, K. & Huibregtse, J.M. (2007) Regulation of catalytic activities of HECT ubiquitin ligases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **354**, 329-333.

謝辞

本研究の遂行ならびに論文の作製において直接ご指導下さいました、奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科細胞機能学講座の高木 博史教授に厚くお礼申し上げます。

微生物の研究に携わるきっかけをいただき、また本論文の大部分においてご支援いただきました福井県立大学大学院生物資源学研究科の中森 茂教授、高橋 正和講師、濱野 吉十助教に深く感謝いたします。そして、技術指導下さいました酒類総合研究所醸造技術基盤研究部門の下飯 仁主任研究員、金沢大学大学院医学系研究科の櫻井 博准教授、奈良女子大学大学院人間文化研究科の鍵和田 聡准教授にも大変お世話になりました。

日頃より様々なご助言を下された奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科の桂樹 徹准教授、小野寺 慶子助教、吉田 信行助教、大津 巖生助教、平石 裕之博士、戒能 智宏博士、小谷 哲也博士、一緒に研究生活を過ごした中で成長させてくれた出前 美佳氏、内田 晃子氏、中田 麻衣子氏、およびご討論して下さいました細胞機能学講座の皆様にお礼申し上げます。

最後に、これまで心身ともに支え続けてくれた両親に心から感謝の意を表します。有難うございました。

報文目録

1. Yutaka Haitani, Hitoshi Shimoi & Hiroshi Takagi (2006) Rsp5 regulates expression of stress proteins via post-translational modification of Hsf1 and Msn4 in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.*, **580** 3433-3438.
2. Mika Demae, Yoshinori Murata, Mirei Hisano, Yutaka Haitani, Jun Shima & Hiroshi Takagi (2007) Overexpression of two transcriptional factors, Kin28 and Pog1, suppresses the stress sensitivity caused by the *rsp5* mutation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.*, in press.