

酵母の Nedd4 様ユビキチンリガーゼ Rsp5 のリン酸化による
アミノ酸パーミアーゼの活性制御機構の解析

佐々木 俊弥
奈良先端科学技術大学院大学
バイオサイエンス研究科
ストレス微生物科学研究室
(高木 博史 教授)

平成 25 年 8 月 13 日提出

目次

1. 序論	5
2. 材料と方法	11
2-1. 培地	11
2-2. 菌株	11
2-3. プラスミド	15
2-4. Rsp5 の HECT ドメインの三次元構造予測	20
2-5. 細胞内 AZC 含量の測定	20
2-6. 蛍光顕微鏡観察	20
2-7. Gap1 のウェスタンブロッティング	20
2-8. Gap1 の免疫沈降とユビキチン化検出	21
2-9. リン酸化 Rsp5 のウェスタンブロッティング	22
2-10. ドットブロット解析	22
2-11. Rsp5 の脱リン酸化処理	23
2-12. LC-MS による Rsp5 のリン酸化状態の解析	23
2-13. Gap1 と Bul1/2 の共免疫沈降	24
2-14. その他	25
3. 結果	26
3-1. <i>RSP5</i> ^{T357A/K764E} 発現株の Gap1-EGFP 局在観察	26
3-2. <i>RSP5</i> ^{T357A} アリルの表現型解析	26
3-3. 変異型 Rsp5 発現株の細胞内 AZC 含量	31
3-4. プロリンパーミアーゼ遺伝子破壊株と T357A 株の表現型	31
3-5. プロリンパーミアーゼの細胞内局在性	34
3-6. プロリンパーミアーゼの輸送経路の解析	36
3-7. T357A-Rsp5 による Gap1 のユビキチン化の解析	39
3-8. Rsp5-WW2 ドメイン内 Thr357 のリン酸化の検出	45
3-9. LC-MS による Rsp5 のリン酸化状態の検出	45
3-10. プロリン以外のパーミアーゼに対する T357A-Rsp5 の影響	45
3-11. Rsp5-WW2 ドメイン内 Thr357 のリン酸化の検出	49
3-12. アダプタータンパク質 Bul1, Bul2 と Rsp5 の相互作用解析	59

4. 考察	63
5. 総括	72
6. 謝辞	73
7. 参考文献	74

1. 序論

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、パン類や酒類などの発酵食品やバイオエタノールの生産に広く利用されている重要な微生物である。発酵生産環境は酵母にとって、高温、高濃度エタノール、高浸透圧、冷凍、乾燥など多様なストレスが複合的に負荷される環境であり、有用機能の発現(エタノールの生産、炭酸ガスの発生、味・風味成分の生成など)が制限されているが、細胞はこれらのストレスに対し、ある程度適応する機構を備えている。例えば、ストレス環境下では多くの細胞内タンパク質は変性し、異常タンパク質を生成するが、細胞はこれらを検知し、除去する仕組みを有している。しかしながら、より過酷なストレスはこの機構の破綻を招き、細胞内に異常タンパク質が蓄積することで生育が阻害され、やがて致死的状況に陥る。異常タンパク質の除去については、(1) ストレスタンパク質などの分子シャペロンによる修復、(2) ユビキチン-プロテアソーム系、液胞やオートファジーによる分解などが考えられるが、詳細な分子機構には不明な点が多い。

原形質膜上のパーミアアーゼやレセプタータンパク質の多くは、基質濃度など外界の環境変化に応答し、ユビキチン化とそれに続くエンドサイトーシスと分解によって制御されている (Risinger *et al.*, 2006; Shenoy, 2007)。多くの場合、ユビキチン化はアダプターなどの共役因子やインヒビター、タンパク質のリン酸化などによって制御されている (Léon & Haguenaer-Tsapis, 2009)。原形質膜上におけるレセプターのエンドサイトーシスは、リガンドが結合した際に生じるシグナル伝達を迅速に脱感作するのに必要である (Hicke & Riezman, 1996)。哺乳類の細胞においては、多種類のユビキチンリガーゼが多様な原形質膜上のタンパク質をユビキチン化するが、酵母 *S. cerevisiae* においては、これまで報告されたほとんどのエンドサイトーシスで、HECT 型ユビキチンリガーゼである Rsp5 がユビキチン化を行う (Dupre *et al.*, 2004; Wang & Dohlman, 2006)。

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。酵母の Rsp5 はユビキチンシステムにおいて重要な E3 の一つであり、生育に必須の酵素である (Figure 1) (Ciechanover *et al.*, 1984; Finley *et al.*, 1984)。Rsp5 は E2 に結合する HECT ドメイン、PY モチーフ (PXY) と呼ばれる短いペプチドを認識し、標的タンパク質と結合する WW ドメインをタンデムに3つ有しており、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 (Figure 1)

(Scheffner *et al.*, 1995; Lauwers *et al.*, 2010)。

Rsp5 は上記のドメイン構造を持つ Nedd4 ファミリーと呼ばれるタンパク質ファミリーに属し、ヒトにおいては9つのホモログが存在し、いずれも原形質膜上のイオンチャネル、レセプター、トランスポーターの活性を制御している (Rotin & Kumar, 2009)。Rsp5 は酵母 *S. cerevisiae* における唯一の Nedd4 ファミリータンパク質である。その役割の一つとして、全種類のアミノ酸の透過を行う Gap1 パーミアーゼのエンドサイトーシスに必須であることが知られている (De Craene *et al.*, 2001)。Gap1 のユビキチン化とエンドサイトーシスは、培地中に資化しにくい (poor) 窒素源のみ存在する環境に、資化しやすい (rich) 窒素源を加えた際や、タンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミドを添加した際に誘導される (Springael & André, 1998; Lin *et al.*, 2008)。ただし、対数増殖期の細胞を資化しやすい窒素源であるアンモニウムイオンを唯一の窒素源として含む培地で培養しても、急激な窒素源の変化を伴わない場合には、Gap1 は原形質膜上にも存在すると報告されている (Rubio-Teixeira & Kaiser, 2006)。

他の Nedd4 ファミリーと同様に、Rsp5 は基質と相互作用するためにアダプターを必要とする (Leon & Haguener-Tsapis, 2009; Novoselova *et al.*, 2012)。Rsp5 のアダプターである Bul1 と Bul2 は PY モチーフを持つタンパク質であり、Rsp5 と相互作用することが知られている (Yashiroda *et al.*, 1996)。栄養源に応じて、Bul1/2 は Rsp5 と共に Gap1 を含む幾つかの原形質膜上のタンパク質の輸送を制御していることがこれまで明らかにされており、ユビキチン鎖を伸長する因子ではないかと考えられている (Helliwell *et al.*, 2001)。最近では、target of rapamycin complex 1 (TORC1) 下流のタンパク質キナーゼである Npr1 が Bul1/2 を直接リン酸化することにより、Gap1 のユビキチン化を制御しているモデルが提唱されている (Merhi and André, 2012) (Figure 2)。このように、Rsp5 はユビキチン依存性のエンドサイトーシス研究のモデルとして重要であるが、WW ドメインによる基質認識を中心とした Rsp5 の活性制御機構について、未だに明らかにされていない。

これまでに当研究室では、アゼチジン-2-カルボン酸 (azetidine-2-carboxylic acid; AZC) に超感受性を示す変異株を分離した。AZC はプロリンの構造類似体 (アナログ) であり、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し、高温・エタノールストレスと同様の応答機構を誘導するため、ストレスのモデルとして使用している。この変異株では RSP5 遺伝子の 401 番目残基の Ala が Glu に置換 (*rsp5*^{A401E}) しており、AZC を取り込むパーミアーゼ Gap1 (Springael & André, 1998) がユビキチン化されず活性

を維持するため、AZC が細胞内に過剰流入し、高い感受性を示すことを明らかにした (Hoshikawa *et al.*, 2003)。

さらに興味深いことに、この *rsp5*^{A401E} 変異株 (A401E 株) は、高温、エタノール、塩化リチウム、過酸化水素などタンパク質が変性し、異常タンパク質の生成を誘導するストレスにも強い感受性を示した (Hoshikawa *et al.*, 2003)。これらの結果から、当研究室では Rsp5 がストレスで生じる異常タンパク質の除去 (修復・分解) に関与する可能性を提唱し、ストレス下におけるユビキチンシステムによる異常タンパク質の除去に関する分子機構の解明をめざしている。また、実験室酵母で得られた基盤的知見に基づき、強いストレス耐性を付与した産業酵母の育種に応用することにも取り組んでいる (高木, 2011)。

これまでに、Rsp5 変異株を用いた詳細な解析により、ストレス下における Rsp5 の役割について、以下の 2 点を明らかにしている。(1) Rsp5 がストレス関連転写因子 (Hsf1, Msn2/4) の転写後制御 (RNA の核外輸送) を介してストレスタンパク質の転写を調節し、異常タンパク質の修復に関与すること (Haitani & Takagi, 2008)、(2) プロテオーム解析によりストレス下で Rsp5 によりユビキチン化され、分解されるタンパク質 (Egd2, Pda1 など) を同定した (Hiraishi *et al.*, 2009b)。

このように当研究室では、異常タンパク質の除去に関与し、酵母のストレス適応に重要なユビキチンリガーゼ Rsp5 について、基礎科学的には異常タンパク質除去機構の分子レベルでの解明、および応用面では異常タンパク質除去能を強化した高機能型 Rsp5 への改変を目的に研究を進めている。これまでに、error-prone PCR 法でランダム変異を導入した *rsp5*^{A401E} 遺伝子を組み込んだ多コピープラスミドで A401E 株を形質転換し、AZC 含有培地で野生株よりも早く生育するコロニーのスクリーニングを行った。その結果、野生株に強い AZC 耐性を与える *rsp5*^{T357A/K764E} 遺伝子 (Thr357Ala/Lys764Glu の二重変異を有する Rsp5 (TK-Rsp5) をコード) を取得した (Haitani *et al.*, 2009)。

本研究では、まず、これまでに得られた TK-Rsp5 の 2 つのアミノ酸置換の内、どちらが AZC 耐性に寄与するのか、変異型 Rsp5 (*RSP5*^{T357A}) の過剰発現による表現型が遺伝子増幅効果によるものであるかどうかについて調べた。次に、この *RSP5*^{T357A} 発現株 (T357A 株) が AZC 耐性を示す分子機構について詳細に解析を行った。

さらに、本研究では変異株を用いて Rsp5 がどのような分子機構でプロリンパーミアーゼの活性を制御しているのかを明らかにすることを目的に実験を行った。その結果、Rsp5 の WW2 ドメイン内の置換 (Thr357Ala) は、Gap1 のユビキチン化状態を増加させ、液泡への恒常的な局在を誘導することを見出

した。また、Rsp5 の Thr357 がリン酸化されているということも確認した。これらの結果をもとに、Nedd4 ファミリーで高度に保存された残基である Thr357 のリン酸化を通して、Rsp5 の活性、特に Gap1 のユビキチン化活性、が制御されるモデルを提唱し、その検証を行った。

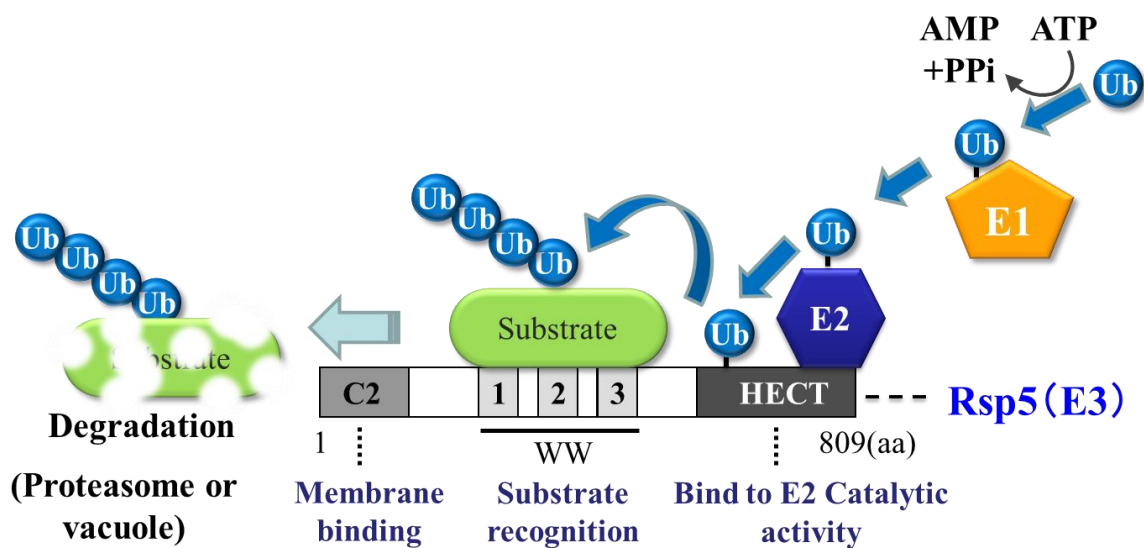


Figure 1. ユビキチン化反応の概略図

ユビキチン化反応は、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）酵素による一連のカスケードで、基質タンパク質に低分子のユビキチンタンパク質を付加する反応である。Ubiquitin ligase（E3）は基質を決定するという意味で重要な酵素である。ユビキチン化されたタンパク質は最終的に液胞（リソソーム）やプロテアソームで分解される。

Rsp5 は N 末端から、膜結合に関わる C2 ドメイン、中央に標的タンパク質と結合する WW ドメインをタンデムに 3 つ、E2 に結合し、触媒活性を持つ HECT ドメインを有している。WW ドメインは PY モチーフ（PXY）と呼ばれる短いペプチドを認識する。

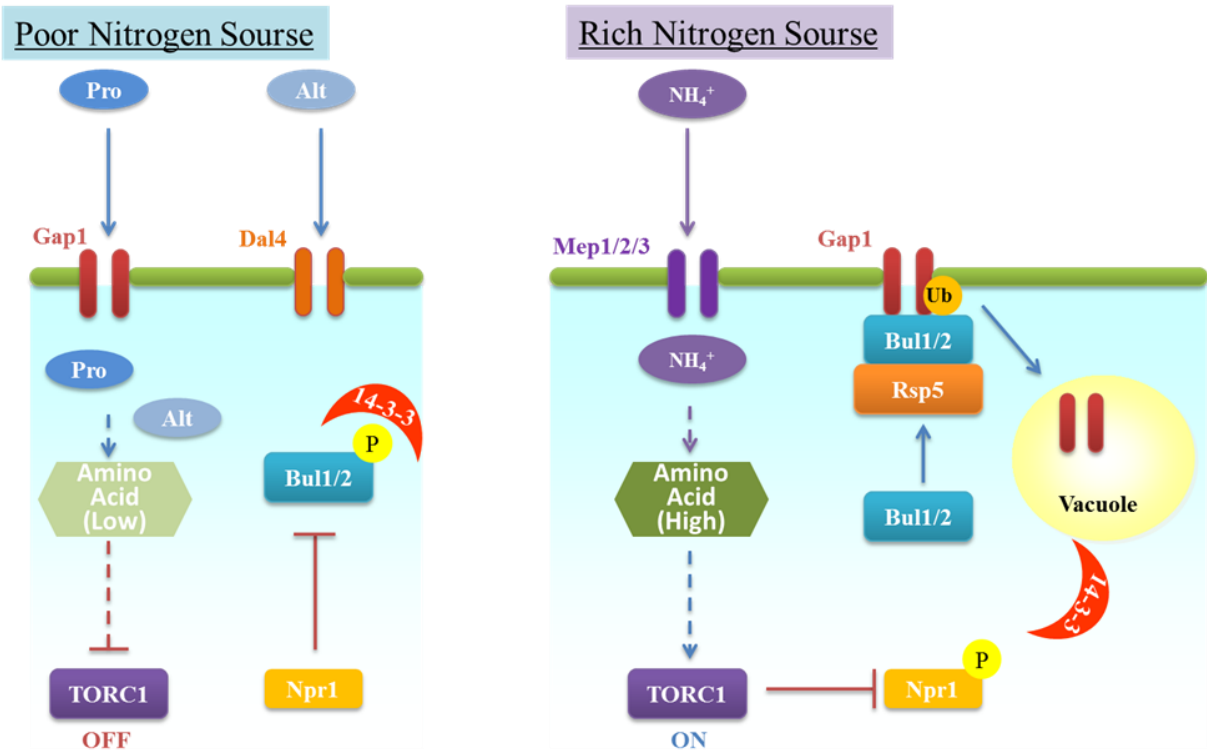


Figure 2. Gap1 の液胞分解経路の概略

酵母をプロリンのような難資化性窒素源で培養した場合（左図）、target of rapamycin complex 1 (TORC1) は活性化されず、下流のキナーゼである Npr1 が脱リン酸化状態となり活性化される。Npr1 により Rsp5 のアダプタータンパク質 Bul1/2 がリン酸化されると 14-3-3 タンパク質と結合し不活性化するため、結果的に Gap1 のエンドサイトーシスが阻害される。一方、アンモニウムイオンのような資化しやすい窒素源が添加されると（右図）、TORC1 は活性化され Npr1 をリン酸化する。これによって Npr1 は不活性型となり Bul1/2 に作用することができず、脱リン酸化状態となった Bul1/2 は 14-3-3 タンパク質と乖離し、Rsp5 のアダプターとして機能することで Gap1 のユビキチン化を促進する。

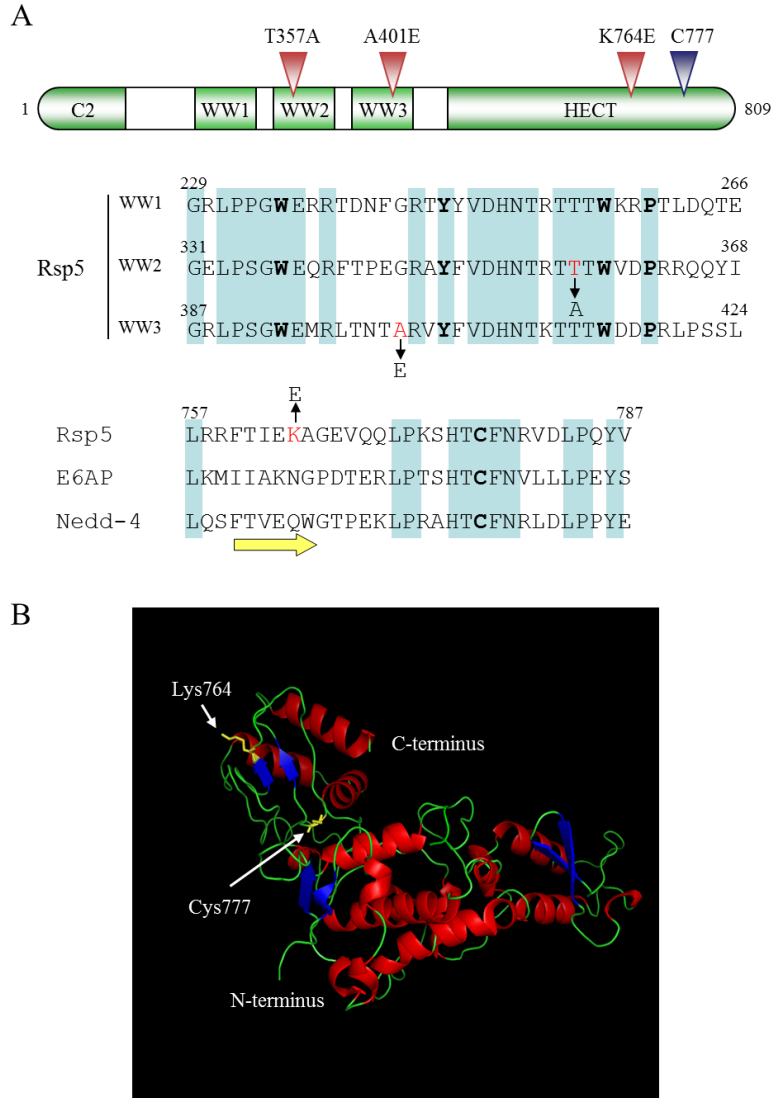


Figure 3. 酵母 Rsp5 の構造の特徴と変異点

(A) Rsp5 のドメイン構造 (上図) と、WW ドメイン (WW1-WW3) 及び HECT ドメイン (Rsp5, ヒト E6AP, ヒト Nedd-4) のアミノ酸配列アライメント (下図)。Cys777 とアミノ酸置換箇所はそれぞれピンクと紫色の矢印で示し、相同な配列は青色で示す。太字のアミノ酸は機能や活性に関与する高度に保存された残基を示す。赤字のアミノ酸の上下にある黒矢印はこれまでに当研究室で得られた変異である。HECT ドメインの下にある黄色の矢印は予測の β シート構造を示している。数字はアミノ酸残基の数字である。(B) Rsp5 の HECT ドメインの 3 次元立体構造予測はコンピュータプログラムである 3D-JIGSAW を用いて作成した。 α -ヘリックスを赤で、 β -シートを青でそれぞれ示している。HECT ドメイン内で変異した Lys764 と、活性中心である Cys777 は黄色で示した。

2. 材料と方法

2-1. 培地

酵母菌株の培養には合成最少 (SD+Am) 培地 (2% glucose, 0.67% Bacto Yeast Nitrogen Base without amino acids)、SD+Am 培地に各種アミノ酸(drop-out-mix) を加えた完全合成 (SC) 培地 (Rose *et al.*, 1990)、および合成最少培地において唯一の窒素源として硫酸アンモニウムの代わりにプロリン (SD+Pro)、またはアラントイン (SD+Alt) を用いた培地 (2% glucose, 0.17% Bacto Yeast Nitrogen Base without (NH₄)₂SO₄ and amino acids, 0.1% L-proline または 0.1% allantoin) を使用した。

また、過酸化水素、ツニカマイシン、エタノールを含有した SC 培地、AZC、カナバニン、5-メチル-DL-トリプトファン、DL-ノルロイシン、*o*-フルオロ-DL-フェニルアラニン、5-フルオロウラシルを含有した SD 培地も使用した。

大腸菌株の培養にはアンピシリン (100 µg/ml)、もしくはカナマイシン (50 µg/ml) 含有の Luria-Bertani (LB) 培地 (Sambrook & Russell, 2001) を使用した。必要に応じて、2% グルコースの代わりに 2% ガラクトースを使用し、また 2% 寒天を添加して固体培地とした。

2-2. 菌株

Per O. Ljungdahl 博士 (Stockholm University, Sweden) から Table 1 に示す *GAP1*, *PUT4*, *AGP1*, *GNP1* 各単独破壊株 (CAY132, CAY140, CAY178, CAY166)、多重破壊株 (CAY136, CAY172, CAY182, CAY191, CAY198, CAY200)、*ssy1* 破壊株 (CAY91) と親株 (CAY29) を分譲していただいた。

pRS406-rsp5^{T357A} pRS406-rsp5^{A401E} 上の *rsp5*^{T357A} 遺伝子を *HpaI* で一ヶ所切断した直鎖状プラスミドを野生株 CAY29 または BY4741 のゲノム上の *RSP5* 遺伝子座へ挿入した。その後、相同組換えによってベクター配列と野生型 *RSP5* 遺伝子配列を欠落させ、*URA3* 保持株が毒性を示す 5-FOA を用いたカウンターセクションによって、ゲノム上の *RSP5* 遺伝子座が *RSP5*^{T357A}、*rsp5*^{A401E} アリルに置換した株 (T357A 株、A401E 株) を選抜した。

二倍体株 BY4743 を元にした必須遺伝子破壊株ライブラリー (EUROSCARF) の *rsp5* ヘテロ破壊株 (*RSP5* +/-) のゲノムを鋳型に、ORF 前後 500bp 領域と kanMX4 を含む *RSP5* 破壊用断片を、プライマー *RSP5*-Fw と *RSP5*-Rv を用いて PCR にて作製した。作製した 2.8kb の *RSP5* 破壊用断片を予め p*RSP5* で形質転換した野生株に導入し、G418 含有 (100 µg/ml) YPD 培地で選択することで、ゲノム上の *RSP5* が破壊された株 (TSY288) を取得した。

オレイン酸合成酵素をコードする *OLE1* 遺伝子は転写因子 Spt23 により制御されている。Spt23 は Rsp5 によりユビキチン化され、プロテアソームによる部分分解を受けると活性化することが報告されている (Hoppe *et al.*, 2000)。そのため、*rsp5* 欠損株はオレイン酸合成を行えず生育できないが、*OLE1* 遺伝子を強制発現させることで回避できる (Hoppe *et al.*, 2000)。そこで、*rsp5* 欠損株を作製するため、TSY288 にプラスミド pAD4-OLE1 を導入し、5-FOA 培地において *URA3* マーカーで保持させていた pRSP5 (野生型 *RSP5* 遺伝子を含む) を脱落させることで、*rsp5* 欠損株 (TSY317) を作製した。

ゲノム上に *rsp5* 変異を導入した株 *rsp5*^{T357D} (T357D 株; TSY320), *rsp5*^{T255A} (T255A 株; TSY321), *rsp5*^{T413A} (T413A 株; TSY322), *rsp5*^{T255A/T357A/T413A} (3TA 株; TSY323), 3 × FLAG-*RSP5* (FLAG-*RSP5* 株; TSY327) の作製は pRS416-*rsp5*^{T357D}, pRS416-*rsp5*^{T255A}, pRS416-*rsp5*^{T413A}, pRS416-*rsp5*^{T255A/T357A/T413A}, p3 × FLAG-*RSP5* を鋳型にプライマー RSP5-Fw と RSP5-Rv を用いて得た PCR 断片で TSY288 株を形質転換し、5-FOA 含有培地で選択することで作製した。

野生株、T357A 株及び T357D 株を親株として、*bul1* 破壊株 (TSY262, TYS268 及び TSY325)、*bul2* 破壊株 (TSY263, TSY269 及び TSY326)、野生株、T357A 株を親株として *bul1*, *bul2* 二重破壊株 (TSY264 及び TSY270)、*end3* 破壊株 (TSY260 及び TSY266)、*vps1* 破壊株 (TSY261, TSY267)、*pep4* 破壊株 (TSY265 及び TSY271) については、PCR 断片を用いた遺伝子破壊法で作製した (Janke *et al.*, 2004)。具体的には、pFA6-*hphNT1* あるいは pFA6-*natNT2* を鋳型に、プライマー BUL1-S1 及び BUL1-S2、BUL2-S1 及び BUL2-S2、END3-S1 及び END3-S2、VPS1-S1 及び VPS1-S2、PEP4-S1 及び PEP4-S2 を用いて PCR で増幅した各遺伝子の破壊用断片で親株を形質転換することで作製した。各遺伝子破壊株は hygromycin B (100 µg/ml) あるいは clonNAT (100 µg/ml) を含んだ YPD 培地で選択した。*bul1*, *bul2* 二重破壊株は *bul1* 単独破壊株に *BUL2* 破壊用断片を導入して作製した。

すべての酵母株において、使用していない栄養要求性マーカーはプラスミドを導入することですべて相補させた。

大腸菌株については、DH5α [*F*^λΦ80*lacZ*Δ*M15* Δ*lacZYA* *argF*) U169 *deoR* *recA1* *endA1* *hsdR17*(*r_k*⁻*m_k*⁺) *supE44* *thi-1* *gyrA96*] をサブクローニング用に使用した。

Table 1. 使用酵母株リスト

菌株	遺伝子型	入手源または文献
BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	EUROSCARF
BY4742	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i>	EUROSCARF
TSY235	BY4741 <i>rsp5</i> ^{T357A}	本研究
TSY259	BY4741 <i>rsp5</i> ^{A401E}	本研究
TSY265	BY4741 <i>pep4Δ::hphNT1</i>	本研究
TSY271	BY4741 <i>rsp5</i> ^{T357A} <i>pep4Δ::hphNT1</i>	本研究
TSY288	BY4741 <i>rsp5Δ::kanMX4</i> pVV208-Rsp5	本研究
TSY317	BY4741 <i>rsp5Δ::kanMX4</i> pAD4- <i>OLE1</i>	本研究
TSY320	BY4741 <i>rsp5</i> ^{T357D}	本研究
TSY321	BY4741 <i>rsp5</i> ^{T255A}	本研究
TSY322	BY4741 <i>rsp5</i> ^{T413A}	本研究
TSY323	BY4741 <i>rsp5</i> ^{T255A/T357A/T413A}	本研究
TSY262	BY4741 <i>bul1Δ::hphNT1</i>	本研究
TSY263	BY4741 <i>bul2Δ::natNT2</i>	本研究
TSY264	BY4741 <i>bul1Δ::hphNT1 bul2Δ::natNT2</i>	本研究
TSY268	BY4741 <i>rsp5</i> ^{T357A} <i>bul1Δ::hphNT1</i>	本研究
TSY269	BY4741 <i>rsp5</i> ^{T357A} <i>bul2Δ::natNT2</i>	本研究
TSY270	BY4741 <i>rsp5</i> ^{T357A} <i>bul1Δ::hphNT1 bul2Δ::natNT2</i>	本研究
TSY325	BY4741 <i>rsp5</i> ^{T357D} <i>bul1Δ::hphNT1</i>	本研究
TSY326	BY4741 <i>rsp5</i> ^{T357D} <i>bul2Δ::natNT2</i>	本研究
TSY260	BY4741 <i>end3Δ::natNT2</i>	本研究
TSY261	BY4741 <i>vps1Δ::hphNT1</i>	本研究
TSY266	BY4741 <i>rsp5</i> ^{T357A} <i>end3Δ::natNT2</i>	本研究
TSY267	BY4741 <i>rsp5</i> ^{T357A} <i>vps1Δ::hphNT1</i>	本研究
TSY327	BY4741 3 × FLAG- <i>RSP5</i>	本研究
CAY29	<i>MATa ura3-52</i>	(Andréasson & Ljungdahl, 2002)
CAY91	CAY29 <i>Δssy1</i>	(Andréasson & Ljungdahl, 2002)
CAY132	CAY29 <i>Δgap1</i>	(Andréasson <i>et al.</i> , 2004)
CAY136	CAY29 <i>Δgap1 Δput4</i>	(Andréasson <i>et al.</i> ,

		2004)
CAY140	CAY29 $\Delta put4$	(Andréasson <i>et al.</i> , 2004)
CAY166	CAY29 $\Delta gnp1$	(Andréasson <i>et al.</i> , 2004)
CAY172	CAY29 $\Delta gap1 \Delta gnp1 \Delta put4$	(Andréasson <i>et al.</i> , 2004)
CAY178	CAY29 $\Delta agp1$	(Andréasson <i>et al.</i> , 2004)
CAY182	CAY29 $\Delta agp1 \Delta gap1 \Delta put4$	(Andréasson <i>et al.</i> , 2004)
CAY191	CAY29 $\Delta agp1 \Delta gap1 \Delta gnp1 \Delta put4$	(Andréasson <i>et al.</i> , 2004)
CAY198	CAY29 $\Delta agp1 \Delta gnp1$	(Andréasson <i>et al.</i> , 2004)
CAY200	CAY29 $\Delta agp1 \Delta gnp1 \Delta put4$	(Andréasson <i>et al.</i> , 2004)
TSY001	CAY29 $rsp5^{T357A}$	This study
CKY8	$MAT\alpha ura3-52 leu2-3, 112, RSP5$	Kaiser 博士より分譲
CHT81	$MAT\alpha ura3-52 leu2-3, 112, rsp5^{A401E}$	(Hoshikawa <i>et al.</i> , 2003)

2-3. プラスミド

pAD4 (北九州工業大学の仁川教授より分譲) は YEp 型のプラスミドで 2 μ DNA の複製起点と、酵母での選択用マーカー *LEU2* 遺伝子、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、マルチクロニングサイトの上流に *ADHI* プロモーター、下流に *ADHI* ターミナーが存在している。

pRS416 (Stratagene 社) は YCp 型のプラスミドで、酵母のセントロメア配列、および *URA3* 遺伝子の配列を含むため、染色体様に複製され低コピー数で、*ura3* 遺伝子欠損株において安定に保持される。また、大腸菌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。

pRS415 (Stratagene 社) は YCp 型のプラスミドで、上記 pRS416 の *URA3* 遺伝子配列の代わりに *LEU2* 遺伝子の配列を含み、*leu2* 遺伝子欠損株において安定に保持される。

pRS406 (Stratagene 社) は YIp 型のプラスミドで、上記 pRS416 の酵母セントロメア配列を含まないため、ゲノムに挿入された場合に安定に保持される。

pUG6 (Guldener *et al.*, 1996) は National BioResource Project (NBRP) から再配布されたプラスミドで、*loxP*-*kanMX4*-*loxP* 配列を含み、このプラスミドを鋳型に任意のプライマーで PCR を行うことで、遺伝子破壊用の断片を作製できる。

pBluescript SK+ (Toyobo Biochemicals 社) は酵母遺伝子のサブクロニング用に使用した。

pDONR221 (Invitrogen 社) は Gateway technology による相同組換えを利用したクロニング用のプラスミドで、*attP1*-*ccdB*-*Cm^R*-*attP2* 配列を持つ。

pAD4-RSP5, pAD4-RSP5^{TK} は研究室保有のものを使用した (Haitani *et al.*, 2009)。

pRS416-*ccdB*-yEGFP は yEGFP (Cormack *et al.*, 1997) の融合タンパク質発現用プラスミドとして以下の方法で構築した。pYM-N21 (Janke *et al.*, 2004) から *P_{TEF1}*-yEGFP 配列を *SacI*-*NotI* 処理断片として切り出し、pRS416 へ連結した。次に、pUG6 を鋳型にし、*TEF1*-term-Fw と *TEF1*-term-Rv をオリゴヌクレオチドプライマーとした PCR 反応によって増幅した *T_{TEF1}* 断片を、*NotI*-*KpnI* 処理によって pRS416-*P_{TEF1}*-yEGFP に連結した。pYM-N8 (Janke *et al.*, 2004) から *P_{ADHI}* 断片を *SacI*-*XbaI* 処理によって切り出し、pRS416-*P_{TEF1}*-yEGFP -*T_{TEF1}* の *P_{TEF1}* 配列と置き換えた。こうして構築した pRS416-*P_{ADHI}*-yEGFP -*T_{TEF1}* プラスミドの *P_{ADHI}*-yEGFP 間を *Bam*HI により一ヶ所切断し、その周辺領域と pVV215 (Van Mullem *et al.*, 2003) を鋳型とし、*ccdB*-Gateway-Fw と *ccdB*-Gateway-Rv

をオリゴヌクレオチドプライマーとした PCR 反応によって増幅した *attR1-Cm^R-ccdB-attR2* (以下 *ccdB* と省略) 断片のリンカー部位を、InFusion 反応 (Takara Bio 社) によって相同組換えさせ、pRS416-P_{ADH1}-*ccdB-yEGFP-T_{TEF1}* を構築し pRS416-*ccdB-yEGFP* とした。

pRS416-RSP5, pRS416-RSP5^{T357A}, pRS416-rsp5^{K764E}, pRS416-rsp5^{TK}, pRS416-rsp5^{T357D}, pRS416-rsp5^{T255A}, pRS416-rsp5^{T413A}, pRS416-rsp5^{T255A/T357A/T413}, pRS406-rsp5^{A401E}, pRS406-RSP5^{T357A} は、pBlue-RSP5 (Haitani *et al.*, 2006) または pRS416-RSP5 を鋳型に、アミノ酸置換を導入する残基に相当する塩基を置換したオリゴヌクレオチドプライマー Rsp5-T255A-Fw 及び Rsp5-T255A-Rv, Rsp5-T357A-Fw 及び Rsp5-T357A-Rv, Rsp5-T357D-Fw 及び Rsp5-T357D-Rv, Rsp5-A401E-Fw 及び Rsp5-A401E-Rv, Rsp5-T413A-Fw 及び Rsp5-T413A-Rv を用いて QuikChange Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene 社) の方法に準じて作製し、シスエレメントを含む *RSP5* 遺伝子 3.4-kb を *HindIII-EcoRI* 断片として切り出し、それぞれ pRS416, pRS406 に連結して作製した。

pAD4-OLE1 は酵母ゲノムを鋳型に OLE1-Fw と OLE1-Rv を用いて PCR を行い、PCR 断片及び pAD4 を *HindIII* と *PstI* で制限酵素処理した後に、ライゲーションさせることで構築した。pAD4-OLE1 において、*OLE1* は *ADH1* プロモーターによって恒常的に発現する。

Gateway entry プラスミド pDONR221-GAP1, pDONR221-PUT4, pDONR221-AGP1, pDONR221-GNP1, pDONR221-RSP5, pDONR221-BUL1 及び pDONR221-BUL2 は、BY4741 野生株ゲノムを鋳型に GAP1-Gateway-Fw 及び GAP1-Gateway-Rv, PUT4-Gateway-Fw 及び PUT4-Gateway-Rv, AGP1-Gateway-Fw 及び AGP1-Gateway-Rv, GNP1-Gateway-Fw 及び GNP1-Gateway-Rv, RSP5-Gateway-Fw 及び RSP5-Gateway-Rv, BUL1-Gateway-Fw 及び BUL1-Gateway-Rv, BUL2-Gateway-Fw 及び BUL2-Gateway-Rv のそれぞれのプライマーセットで PCR を行い、得られた断片を pDONR221 と BP 反応させることで構築した。

pDONR221-GAP1^{K9R/K16R} は pDONR221-GAP1 を鋳型にプライマー GAP1-K9R-Fw 及び GAP1-K9R-Rv, GAP1-K16R-Fw 及び GAP1-K16R-Rv を用い、QuikChange II XL Site-directed Mutagenesis Kit (Stratagene 社) によって部位特異的変異導入を行うことで構築した。

C 末端に GFP タグを付加したプロリンパーミアゼ発現プラスミド pGAP1-yEGFP, pGAP1^{K9R/K16R}-yEGFP, pPUT4-yEGFP, pAGP1-yEGFP 及び pGNP1-yEGFP は pRS416-*ccdB-yEGFP* と pDONR221-GAP1-yEGFP, pDONR221-GAP1^{K9R/K16R}-yEGFP, pDONR221-PUT4-yEGFP,

pDONR221-AGP1-yEGFP, pDONR221-GNP1-yEGFP を LR 反応させることで構築した。

pRSP5, pGAP1 及び pGAP1^{K9R/K16R} はセントロメア型プラスミド pVV208(URA3) (Trotter *et al.*, 2001) と pDONR221-RSP5、pDONR221-GAP1、pDONR221-GAP1^{K9R/K16R} を LR 反応させることで構築した。

pBUL1, pEGFP-BUL1, pBUL2 及び pEGFP-BUL2 は、pAG416GPD-ccdB (URA3) あるいは pAG416GPD-EGFP-ccdB (URA3) (Alberti *et al.*, 2007) に pDONR221-BUL1 及び pDONR221-BUL2 を LR 反応させることで構築した。

p3×FLAG-RSP5 の構築方法は以下の通りである。Dr. Huibregtse (University of Texas at Austin, USA) より分譲していただいた NTAP-RSP5 ゲノム挿入株 YK001 (Kee *et al.*, 2005) のゲノムを鋳型とし、ClaI-RSP5 と RSP5-XbaI をオリゴヌクレオチドプライマーとした PCR 反応によって増幅した RSP5 遺伝子断片を ClaI-XbaI 処理によって pRS416 に連結し pNTAP-RSP5 を構築した。BY4741 ゲノムを鋳型にし、8×HIS-RSP5 と RSP5-XbaI をオリゴヌクレオチドプライマーとした PCR 反応によって増幅した RSP5 遺伝子断片を、HindIII-XbaI 処理によって pNTAP-RSP5 に連結し pHIS-RSP5 を構築した。3×FLAG-Fw と 3×FLAG-Rv を 5 µg ずつ混合し、25 µl の系で、5 分間 95°C で変性させ、常温まで緩やかに戻した。T4 Polynucleotide Kinase (Takara 社) を使用してリン酸化した後、pHIS-RSP5 を HindIII-BglII 処理したものとライゲーション反応させることで His 配列と置き換え、p3×FLAG-RSP5 を構築した。

Table 2. 使用プライマーリスト

名称	オリゴヌクレオチド配列 (5'-3')
Rsp5-T255A-Fw	AACACAAGGACTGCCACTTGGAAAC
Rsp5-T255A-Rv	GTTTCCAAGTGGCAGTCCTTGTGTTATG
Rsp5-T357A-Fw	GACCATAATACTAGAACAGCCACTTGGGTGGATCCAAGGA
Rsp5-T357A-Rv	TCCTTGGATCCACCCAAGTGGCTGTTCTAGTATTATGGTC
Rsp5-K764E-Fw	AGAAGATTCACTATTGAAGAAGCTGGTGAAGTACAACAA
Rsp5-K764E-Rv	ATTGTTGTACTTCACCAGCTTCTCAATAGTGAATCTTCT
Rsp5-T357D-Fw	AATACTAGAACAGACACTTGGGTGGATC
Rsp5-T357D-Rv	ATCCACCCAAGTGTCTGTTCTAGTATTATG
Rsp5-A401E-Fw	ATGAGATTGACCAATACGGAACGTGTATATTTGTTGACC
Rsp5-A401E-Rv	GGTCAACGAAATATACACGTTCCGTATTGGTCAATCTCAT
Rsp5-T413A-Fw	CAATACAAAAACAGCGACCTGGGATG
Rsp5-T413A-Rv	CATCCAGGTCGCTGTTTTTGTATTG
TEF1-term-Fw	ATAAGAATGCGGCCGCGCCGCGTTCGACCTAATCAGTACTGACAATAAAAAGATTC
TEF1-term-Rv	GGGGTACCATTAAGGGTTCTCGAGTGCTCG
ccdB-Infusion-Fw	TAGAACTAGTGGATCCAACAAGTTTGTACAAAAAAGCTGAAC
ccdB-Infusion-Rv	ATTCCGGGGGGGATCCCAACCACTTTGTACAAGAAAAGCTG
GAP1-Gateway-Fw	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGAGTAATACTTCTTCGTACGAG
GAP1-Gateway-Rv	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAAGCTGGGTGACACCAGAAATTCAGATTCTATAC
PUT4-Gateway-Fw	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGGTAAATATACTGCCCTTCCAC
PUT4-Gateway-Rv	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAAGCTGGGTGCAACAAGGCGTCCAAGAACTTG
AGP1-Gateway-Fw	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGTCGTCGTCGAAGTCTCTATAC
AGP1-Gateway-Rv	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAAGCTGGGTGACACCAGAAGGCAACGACCC
GNP1-Gateway-Fw	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGACGCTTGGTAATAGACGCC
GNP1-Gateway-Rv	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAAGCTGGGTGACACCAGAAATCAAGAACTCTTTTCC
RSP5-Gateway-Fw	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGCCTTCATCCATATCCGTC
RSP5-Gateway-Rv	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAAGCTGGGTTCATTCTTGACCAAACCCTATGG
BUL1-Gateway-Fw	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGGCAAAGATTTGAACGATTC
BUL1-Gateway-Rv	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAAGCTGGGTGTTATTTTGTCACTTGCCCTAACAGAAATAG
BUL2-Gateway-Fw	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGACTTTTACATCTCCACTTCATC
BUL2-Gateway-Rv	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAAGCTGGGTCTAAATTTGTAACCTTTTTCACATCAACCGG
GAP1-K9R-Fw	CTTCGTACGAGAGAAAATAATCCAG
GAP1-K9R-Rv	CTGGATTATTTCTCTCGTACGAAG

GAP1-K16R-Fw	CCAGATAATCTGAGACACAATGGTATTAC
GAP1-K16R-Rv	GTAATACCATTGTGTCTCAGATTATCTGG
ClaI-RSP5	ACCATCGATAAAAAGACATACGCTTAACCA
RSP5-XbaI	AAGCTCTAGACGTTTCAAGTATGTACCTCA
8 × HIS-RSP5	CCCAAGCTTACCATGGCGCACCACCATCACCATCACCATCACAGATCTCCTTCATCCATATC
RSP5-XbaI	AAGCTCTAGACGTTTCAAGTATGTACCTCA
3 × FLAG-Fw	AGCTTATGGACTACAAAAGACCATGACGGTGATTATAAAGATCATGACATCGACTACAAGGATG ACGATGACAAGA
3 × FLAG-Rv	GATCTCTTGTTCATCGTCATCCTTGTAGTCGATGTCATGATCTTTATAATCACCGTCATGGTCTT TGTAGTCCAT
OLE1-Fw	GCCCAAGCTTTACAACAAAGATGCCAACTTCTGGAACTAC
OLE1-Rv	AAAAGTGCAGGTGATACTTAAAAGAAGTACCAGTTTCGT
RSP5-Fw	GCGGGGGAGGGGGCTTCTATCTCG
RSP5-Rv	CTGGCAAGAGAGGGATTGCCTAGT
BUL1-S1	GGGCGAAAAGAGACTGTTTCGTGTGTGTCAACAGGTATATCGTACGCTAAATGCGTACGCTGCA GGTCGAC
BUL1-S2	TCTATATCTATAAGAAAAGTAACGAGAATTTTTTCTAATGTTTTTTTAGCATAGGCCACTAGTG GATCTG
BUL2-S1	ACTGAAGCAGCAGATTTGAGATATATTCTGGGGAACAAAAGAAGTATTAATGCGTACGCTGCA GGTCGAC
BUL2-S2	TCAATTATTTGTAAAAGTGGCAGATTACTGTTAGTGTGTATGGTCTAGCATAGGCCACTAGT GGATCTG
END3-S1	TATTGGAAAGCCGGTAAAGATAACAGGGATCTCTGAAAACAGCTGAAGCTTCGTACGCTGC
END3-S2	AAATATTACACATTCATGTACATAAAATTAATTATCGGTGGCATAGGCCACTAGTGGATCTG
VPS1-S1	CCAAAATAAGGACCGTACGAAAAGTGCACATTTTATATTATCAGATATCATGCGTACGCTGCA GGTCGAC
VPS1-S2	ATACTCAAACCAAGCTTGAGTCGACCGGTATAGATGAGGAAAACCTAGCATAGGCCACTAGT GGATCTG
PEP4-S1	GACCTAGTATTTAATCAAATAAAATTCAAACAAAAACAAAACTAACCAGCTGAAGCTTCGT ACGCTGC
PEP4-S2	CTCTAGATGGCAGAAAAGGATAGGGCGGAGAAGTAAGAAAAGTTTAGCGCATAGGCCACTAG TGGATCTG

2-4. Rsp5 の HECT ドメインの三次元構造予測

Rsp5 の HECT ドメインの三次元立体構造予測は、構造既知のホモログタンパク質を利用して構造予測を自動的に行うコンピュータプログラム、3D-JIGSAW (<http://www.bmm.icnet.uk/~3djigsaw/>) を用いて行った。テンプレートの結晶構造解析は E6AP HECT ドメイン-UbcH7 複合体 [PDB code 1C4Z (Huang *et al.*, 1999)] を用いた。予測された構造データは PyMOL (v0.99) (<http://pymol.sourceforge.net/>) を用いて可視化した。

2-5. 細胞内 AZC 含量の測定

SD 培地を用い、25 °C で培養した対数増殖期の細胞に終濃度 5 mM の AZC を添加し、30 分間培養後に 3,000 rpm, 5 分の遠心分離で集菌した。上清を除き、滅菌水で 2 回洗浄後、500 μ l の滅菌水に懸濁し、100 °C, 20 分で熱水抽出を行った。12,000 rpm, 5 分間の遠心分離後、上清を 1 ml テルモシリッジとアドバンテック DISMIC13cp 0.20 mm フィルターを使用して濾過し、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。アミノ酸混合標準液（各アミノ酸 2.5 μ mol/ml）をフィルター滅菌したものをスタンダードとして用いた。

2-6. 蛍光顕微鏡観察

GFP 融合タンパクの細胞内局在性を観察する実験は、対数増殖期の細胞を集菌後、終濃度 40 μ M の FM4-64 色素を加え、10 分間室温でインキュベートし、氷冷した培地で 3 回洗浄してから、30 分間 25°C で培養することで液胞を染色してから観察を行った。蛍光顕微鏡は Axiovert 200M (Carl Zeiss 社製) を用い、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 5.0 (Adobe Systems 社製) を用いて画像解析を行った。

2-7. Gap1 のウェスタンブロッティング

野生株、*pep4* 破壊株、*rsp5*^{T357A} とそのバックグラウンドの *pep4* 破壊株を pGAP1-yEGFP または pGap1^{K9R/K16} でそれぞれ形質転換した株を SD+Alt 培地、25°C で培養した。対数増殖期で集菌した後、RIPA (25 mM Tris-HCl [pH 7.6], 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, and 0.1% SDS containing protease inhibitors) バッファーに懸濁し、マルチビーズショッカー（安井機械社製、MB601U）を用いて、菌体を破碎した（2,500 rpm, 30 sec on, 30 sec off, 7 cycles, 4°C）。3,000 \times g で 5 分間遠心分離し、上清に 5 倍濃度のサンプルバッファー

(Tris-HCl [pH 8.0], 2% SDS, 0.0125% BPB, 2.25% glycerol)を1倍になるように加え、37°Cで1時間インキュベートした。サンプルは10%のSDSポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行い、イムノブロットイングにはECL plus Western blotting Detection System (GE Healthcare 社)を用いた。EGFP-Bul1/2の検出には10,000倍希釈のanti-GFPマウス抗体 (Roche 社)を、内部標準であるグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH) の検出には10,000倍希釈のanti-GAPDHウサギ抗体をそれぞれ用いた。

2-8. Gap1の免疫沈降とユビキチン化検出

Gap1のユビキチン化状態を解析するために、Laney & Hochstraser (2002) と Risinger & Kaiser (2008) の方法を参考に、以下の方法で免疫沈降とウェスタンブロット解析を行った。

pep4 破壊株、または *rsp5*^{T357A} バックグラウンドの *pep4* 破壊株 (TSY265, TSY271) を pGAP1-yEGFP でそれぞれ形質転換した株を SD+Alt 培地、25 °C で培養した。ポジティブコントロールとして(NH₄)₂SO₄を最終濃度 50 mM となるよう添加し、Gap1のユビキチン化を誘導した。約 2 × 10⁸ 個の細胞を集菌し、200 µl SDS buffer (1 % SDS, 45 mM Na-HEPES, pH 7.5, and 50 mM NEM containing protease inhibitors) で懸濁後、マルチビーズショッカー (安井機械社製、MB601U) を用いて、菌体を破碎した (2,500 rpm, 30 sec on, 30 sec off, 7 cycles, 4°C)。破碎液に 700 µl の Triton buffer (1 % Triton X-100, 150 mM NaCl, 50 mM Na-HEPES, pH 7.5, 5 mM Na-EDTA, 10 mM NEM with protease inhibitors) を加え、十分に混合した後、14,000×g, 4 °C, 15 分遠心した。

上清に 5 µl の平衡化した anti-GFP 抗体結合磁気ビーズ (免疫生物学研究所) を混和させ、ローテーターを用いて 1 時間、4°C でインキュベーションした。PBS + 1 % Triton 100 でのビーズ洗浄を 5 回繰り返し、サンプルバッファーを加え、37°C で 1 時間インキュベート後、ビーズを除き、ウェスタンブロット解析用のサンプルとした。サンプルは 10%SDS ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行った。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 (500 mA, 100 V, 120 min)。メンブレンを Blocking buffer (1×TBS, 0.1 % Tween 20, 5 % スキムミルク) でブロッキングした (室温、60 min)。一次抗体には anti-GFP mouse 抗体、または anti-UB mouse 抗体 [P4D1] (Santa Cruz 社) を Blocking buffer でそれぞれ 2,000 倍希釈したものを、二次抗体には anti-mouse IgG HRP Conjugated (GE Healthcare 社) を Blocking buffer で 2,000

倍希釈して使用した。ECL plus Western blotting Detection System (GE Healthcare 社) を利用し、ルミノメーターLAS-4000 (Fujifilm 社製) で検出した。

2-9. リン酸化 Rsp5 のウェスタンブロットティング

Rsp5 のリン酸化の検出には野生株 *rsp5* 変異株を SD+Am か SD+Alt 培地、25°C で培養し、対数増殖期で集菌したものをを用いた。細胞由来の酵素による脱リン酸化を防ぐため、10%トリクロロ酢酸に懸濁し、マルチビーズショッカー (安井機械社製、MB601U) を用いて、菌体を破砕した (2,500 rpm, 30 sec on, 30 sec off, 7 cycles, 0 °C)。抽出物を 1,500×g で 10 分遠心し、沈殿にサンプルバッファー (Tris-HCl [pH 8.0], 2% SDS, 0.0125% BPB, and 2.25% glycerol) と 0.5 M Tris base を加え中和し、95°C, 5 分間の煮沸によって溶解した。サンプルは 40 μM phos-tag (ナード研究所) を含む、若しくは含まない 6% の SDS ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行い、イムノブロットティングには ECL plus Western blotting Detection System (GE Healthcare 社) を用いた。Rsp5 の検出には 10,000 倍希釈の anti-Rsp5 モノクローナル抗体 (Huibregtse 博士より分譲) (Huibregtse *et. al.*, 1997) を用いた。WW2 ドメインの Thr357 のリン酸化をより簡便に検出するために、Thr357 周辺配列を含む合成リン酸化ペプチド (351DHNTRT (pT) TWVDPRR364) を用いて、抗リン酸化ペプチド抗体を作製し抗体名を anti-WW-P とした。しかしながら、使用したペプチド配列は WW1, WW3 ドメインの同様の領域にも類似しているため、この抗体は Thr255 と Thr413 を認識している可能性がある

2-10. ドットプロット解析

Thr357 の抗リン酸化ペプチド抗体作製時に用いたリン酸化されているペプチドとされていないペプチドをそれぞれ 0.1 mg、BSA 0.5 mg に架橋した。架橋剤にはジメチルスベリミドを使用し、NaHCO₃ 溶液中で反応させた。その養液を 300 ng を最大量として 5 倍ずつ段階希釈し、メタノールで活性化後に乾燥させた PVDF 膜上にスポットした。スポット後の PVDF 膜は再度メタノールに数秒晒し、ブロッキングから後の工程はウェスタンブロットの方法に従った。一次抗体には anti-WW-P を Blocking buffer で 2,000 倍希釈して使用し、二次抗体には anti-mouse IgG HRP Conjugated (GE Healthcare 社) を Blocking buffer で 2,000 倍希釈して使用した。ECL plus Western blotting Detection System (GE Healthcare 社) を利用し、ルミノメーターLAS-4000 (Fujifilm 社製) で検出した。

2-11. Rsp5 の脱リン酸化処理

上記で使用した 10%TCA を用いた抽出産物を、還元剤を含まないサンプルバッファーと 0.5M トリス緩衝液で中和、溶解させた。サンプルは RIPA バッファーによって 10 倍に希釈し、合成ペプチド ($^{698}\text{DWKKHTDYRGYQESD}^{712}$) を用いて免疫したウサギの血清を、Protein G Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare 社) を用いて精製した anti-Rsp5 ポリクローナル抗体と 4°C で 1 時間インキュベートした。ビーズに結合したタンパク質は RIPA バッファーで 5 回洗浄し、lambda protein phosphatase (New England Biolabs 社) と 37°C で 30 分反応させた。必要に応じて、ホスファターゼインヒビター (10 mM Na_3VO_4 , 50 mM NaF, 50 mM β -glycerophosphate, 20 mM *p*-nitrophenylphosphate, 50 mM EDTA) を反応系に添加した。

2-12. 液体クロマトグラフ質量分析 (LC-MS/MS) による Rsp5 のリン酸化状態の解析

2-12-1. タンパク質の調製

BY4741 株を pRS416-RSP5-3xFLAG-RSP5, pRS415-cgHIS3-MET15 で形質転換した株を SD+Alt 培養液 1 L から 50 ml ずつに分け、遠心分離により細胞を回収した。その後 10% TCA を 1 ml ずつ添加し、遠心後、上清を捨てた。さらに、10% TCA を 0.4 ml ずつ加え懸濁した。懸濁液を ϕ 0.5 mm ガラスの入ったネジフタ付きエッペンチューブに入れ、マルチビーズショッカーで細胞を破碎した (2,700 rpm、ON TIME 30 秒間、OFF TIME 30 秒間、7 サイクル)。3,000 \times g、4°C の遠心分離により破碎液をプラスチック試験管に移し、ガラスビーズを取り除いた。上清を捨て、1 \times サンプルバッファー [2% SDS, 0.05 M Tris-HCl (pH 6.8), 2.25 % グリセロール, 0.0125% ブロモフェノールブルー] に懸濁した。マイクロチューブ 36 本に分注し、遠心した。懸濁液を新しいマイクロチューブに移し、100°C、10 分間煮沸した。サンプルを常温に戻し、RIPA バッファーで 1.5 ml にフィルアップした後、15,000 rpm、10 分間、25°C で遠心した。上清を新しいマイクロチューブに移し、上清を取って、1 つのマイクロチューブに 10 μ l ずつ α -FLAG ビーズ (SIGMA 社) を入れた。4°C で 1 時間回転させた後、カラムにビーズを回収した。10 ml の RIPA バッファーで洗浄し、1.5 ml の 2 \times サンプルバッファー [0.125 M Tris-HCl (pH 6.8), 10% 2-メルカプトエタノール, 4% SDS, 10% スクロース, 0.01% ブロモフェノールブルー] で溶出した。

2-12-2. トリプシン消化

400 μ l の 1% TCA-アセトン溶液をサンプルに添加して -80°C 、2 時間処理した。サンプルを遠心分離して上清を取り除き、ペレットを風乾燥させる。50 mM 炭酸アンモニウム溶液に再懸濁後、DTT (5 mM) を加えて 1 時間 60°C で還元処理を行った。トリプシン処理する前に 10 mM ヨードアセトアミドを加えて 1 時間室温でアルキル化処理を行った。その後、トリプシンを添加して一晩 37°C で反応させた。

2-12-3. LC-MS/MS

3xFLAG-Rsp5 をトリプシン処理した後に得られたペプチド断片について、質量分析機を用いて解析を行った。解析には LC-MS/MS を用いて以下の解析手順で行った。解析機器は Nexera UHPLC system を連結させた LCMS-8030 三連四重極型質量分析計 (SHIMADZU 社製) を用いた。クロマトグラフィーによる分離は ODS column, Mastro C18 (100mm x 2.0mm, 3 μ m) を用いた。サンプルは 2 成分勾配系を用いて 0.2mL/min で溶出して、極性によって解析した。

・ 解析条件

HPLC conditions (Nexera UHPLC system)

Column: Mastro C18 100mm x 2.0mm, 3 μ m (SHIMADZU)

Mobile phase A: 0.1% ギ酸, B: アセトニトリル

Flow rate: 0.2 mL/min

Time program:

B conc 15% (0 min) -50% (20 min) -90% (25-30min) -15% (30-35min)

Injection volume: 10 μ L

Column temperature: 40°C

MS conditions (LCMS-8040 triple quadrupole mass spectrometer)

Ionization: ESI, 正/負

DL temperature: 250°C

Nebulizer gas: 2.0 L/min

Heat block temperature: 400°C

Drying gas: 15 L/min

2-13. Gap1 と Bul1/2 の共免疫沈降

Rsp5 と Bul1/2 の結合を検出するには、yEGFP-Bul1/2 を Rsp5 と共免疫沈降に供し、ウェスタンブロッティングを行った。pEGFP-Bul1/2 を導入した株を

対数増殖期まで 25°C、SD+Alt 培地で生育させた。細胞を回収し、溶解用バッファー (20 mM Tris-HCl [pH8.0], 150 mM NaCl, 10% glycerol, 0.5% NP-40, protease inhibitors) に懸濁し、ガラスビーズを加え、ガラスビーズショッカーで細胞を破砕した。10 分間、3,000×g の遠心の後、上清に対し 5 倍濃度のサンプルバッファーを 1 倍濃度になるように加え 5 分間、95°C で煮沸した。

免疫沈降では、遠心上清を anti-GFP 抗体結合磁気ビーズ (免疫生物学研究所) と 4°C で 1 時間インキュベートした。ビーズは洗浄バッファー (50 mM Tris-HCl [pH8.0], 150 mM NaCl, 10% glycerol, and 0.1% NP-40) で 4 回洗浄を行った。沈降物はサンプルバッファーで 5 分間、95°C で煮沸することによって可溶化した。サンプルは 8%または 12%の SDS ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行い、イムノブロットイングには ECL plus Western blotting Detection System (GE Healthcare 社) を用いた。EGFP-Bul1/2 の検出には 2,000 倍希釈の anti-GFP マウス抗体を、Rsp5 の検出には 10,000 倍希釈の anti-Rsp5 モノクローナル抗体を、GAPDH の検出には 10,000 倍希釈の anti-GAPDH ウサギ抗体をそれぞれ用いた。

2-14. 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。

3. 結果

3-1. *RSP5*^{T357A/K764E} 発現株の Gap1-EGFP 局在観察

これまでに当研究室では、*RSP5* 遺伝子へのランダム変異導入によって取得した *RSP5*^{T357A/K764E} をマルチコピーで過剰発現させた株が AZC 耐性を示すことを報告している (Haitani *et al.*, 2009)。そこで、Gap1-EGFP 融合タンパク質発現用のプラスミドを作製し、空ベクター (pAD4)、野生型 *Rsp5* 発現プラスミド (pAD4-*RSP5*)、TK-*Rsp5* 発現プラスミド (pAD4-*RSP5*^{TK}) のいずれかを保持させた野生株 (CKY8) 及び A401E 株 (CHT81) に導入した。

得られた形質転換体を SD+Alt 培地において対数増殖期まで培養し、蛍光顕微鏡にて観察した (Figure 4)。その結果、TK-*Rsp5* 発現株ではいずれの場合においても Gap1-EGFP が液泡に局在していた。一方、pAD4, pAD4-*RSP5* を保持した野生株、A401E 株では Gap1-EGFP は原形質膜上に存在していた。

3-2. *RSP5*^{T357A} アリルの表現型解析。

2種類のアミノ酸置換 (T357A, K764E) のどちらが AZC 耐性に寄与しているのかを調べるため、各変異を独立に持つ *RSP5* アリルを作製し、マルチコピープラスミドで発現することによって、AZC 耐性を細胞に付与できるかを調べた。その結果、T357A 単独のアミノ酸置換によって AZC 耐性を示したが、K764E のみの置換では耐性を示さなかった (Figure 5)。

次に、A401E 株が様々なストレスに感受性を示すことから (Hoshikawa *et al.*, 2003)、*Rsp5* が酵母のストレス耐性に重要な役割を果たしていると考え、今回作製した *RSP5* アリルの過剰発現がストレス耐性に及ぼす影響を調べた。熱ショック (50°C、3 時間)、ツニカマイシン (2 µg/ml)、過酸化水素 (3 mM)、エタノール (13%)、高温 (37°C) の各ストレス条件下における生育を観察したが、T357A-*Rsp5* を過剰発現させた株のストレス耐性能の向上は見られなかった。また、過酸化水素やエタノールといったストレス種によっては若干の感受性が見られた (Figure 5)。

RSP5^{T357A} アリルの性質をさらに理解する目的で、シングルコピープラスミドでの発現解析を行った (Figure 6)。その結果、野生株、及び A401E 株で *RSP5*^{T357A} をシングルコピーで発現させた株のいずれの場合も、AZC 含有培地において野生株より生育が良く、AZC 耐性を示した。

次に、相同組換えを利用してゲノム上の *RSP5* 遺伝子を *RSP5*^{T357A} アリルに置換した株 (T357A 株) を作製し、同様の実験を行った (Figure 6)。その結果、

細胞内の Rsp5 がすべて T357A-Rsp5 に置き換わった場合でも AZC 耐性の表現型を示すことが分かった。また、T357A 株と野生株の一倍体どうしを掛け合わせ、ヘテロ二倍体を作製したところ、AZC 耐性を示したことから、AZC 耐性に関与する *RSP5*^{T357A} アリルは優性であると考えられた。

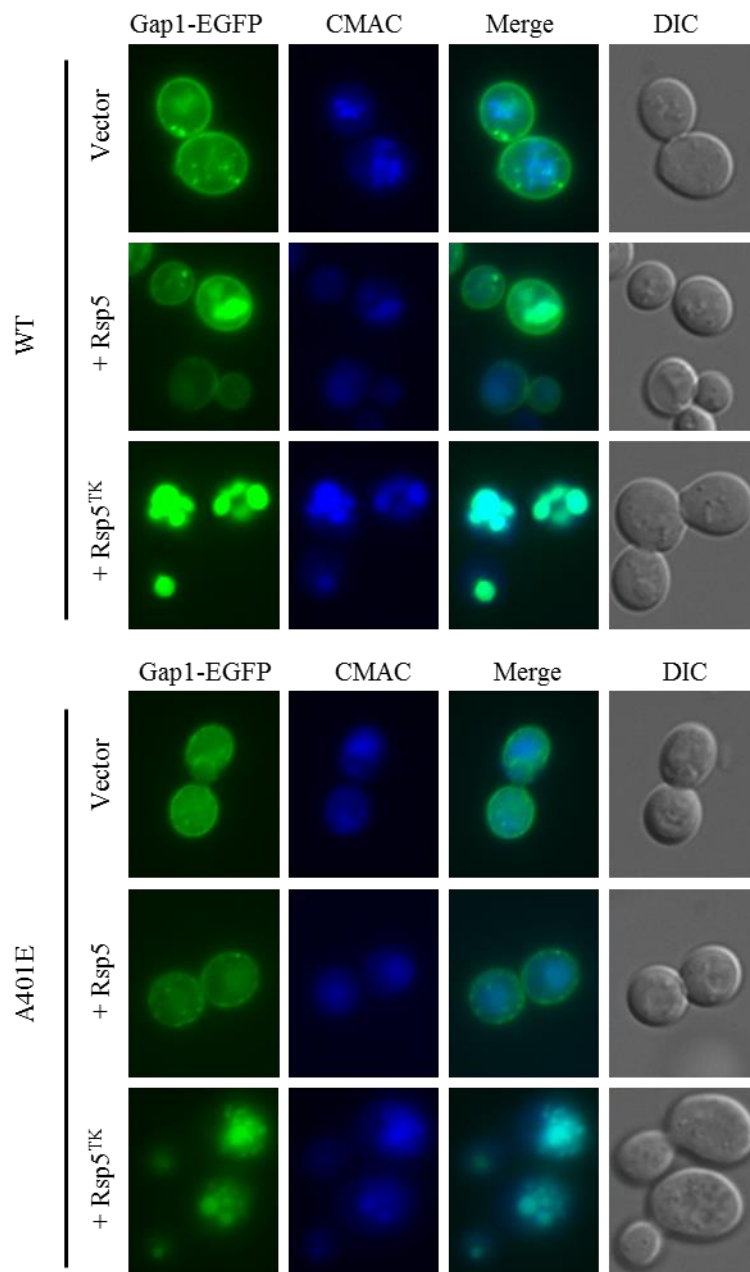


Figure 4. T357A/K764E 変異型 Rsp5 (TK-Rsp5) が Gap1 の細胞内局在性に及ぼす影響.

酵母 WT (CKY8) と A401E (CHT81) に Gap1-EGFP 発現ベクターを導入し、さらに空ベクターである pAD4 (Vector) または pAD4-RSP5 (+Rsp5)、pAD-RSP5^{TK} (+Rsp5^{TK}) のいずれかをそれぞれ導入した株を対数増殖期まで SD+Alt 培地で培養した。それらの細胞の Gap1-EGFP の局在を、蛍光顕微鏡を用いて観察した。細胞形態は微分干渉 (DIC) で観察し、液泡は CMAC で染色した。スケールバーは 5 μ m である。

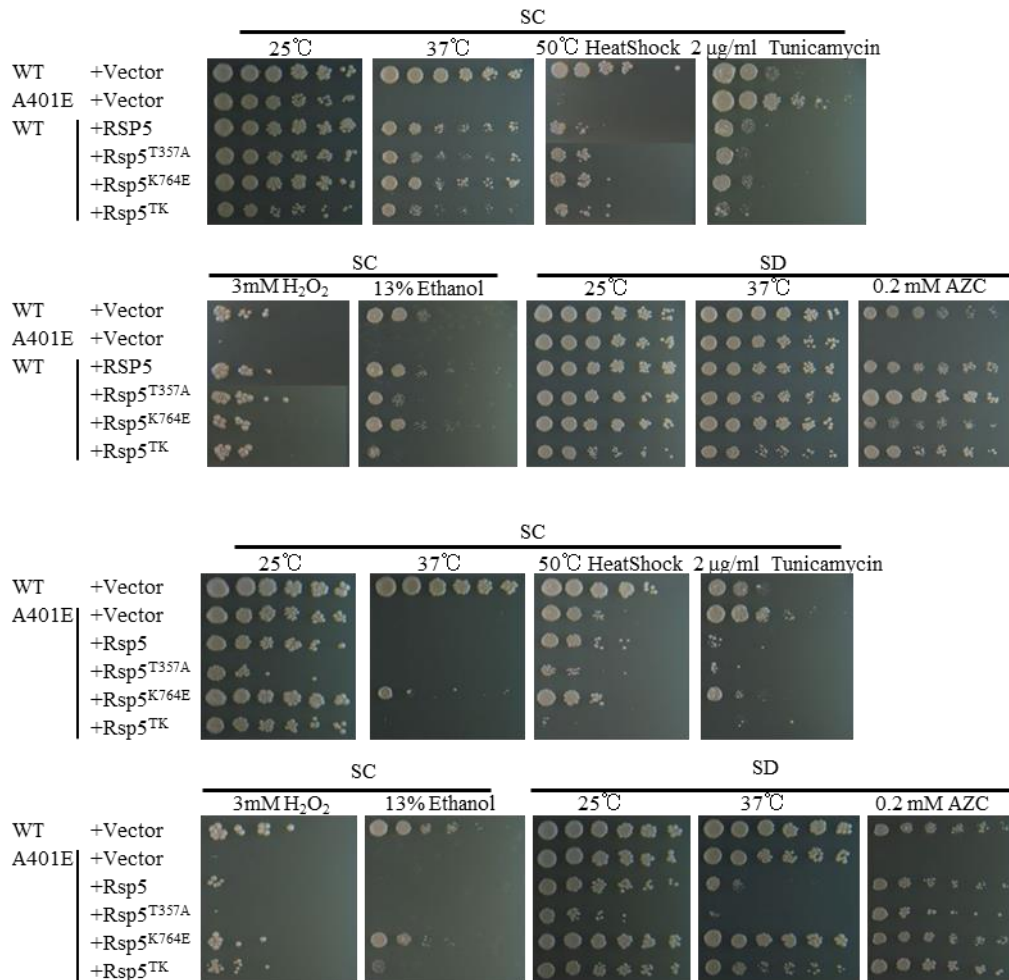


Figure 5. RSP5 アリル発現株の各種ストレス及び AZC 耐性

酵母の WT (CKY8) と A401E (CHT81) にマルチコピーの Rsp5 各種変異発現プラスミドを導入し、熱ショック (50°C、3 時間)、ツニカマイシン (2 µg/ml)、過酸化水素 (3 mM)、エタノール (13%)、高温 (37°C)、AZC (0.2 mM) の各種ストレス条件下でスポット試験を行った。細胞は対数増殖期まで完全合成培地で増殖させ、約 10⁶ 細胞/ml (OD₆₀₀=1) の培養液を 10⁰ から 10⁻⁵ まで希釈系列 (図中左から右) を作成し、スポットした。

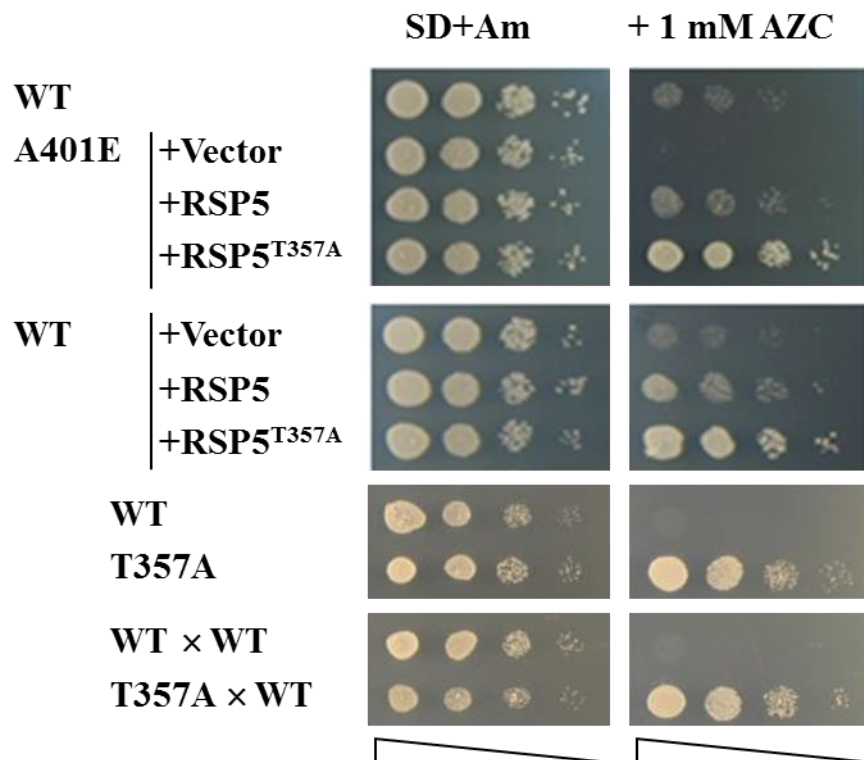


Figure 6. T357A 型 Rsp5 の AZC 培地における表現型

酵母の WT (BY4741) と A401E (TSY29) にセントロメア型のプラスミド pRS416 (+Vector), pRS416-RSP5 (+Rsp5), pRS416-RSP5^{T357A} (+Rsp5^{T357A}) をそれぞれ導入した株、T357A (TSY235)、野生株どうしを掛け合わせた二倍体株 (BY4741 × BY4742; WT × WT)、T357A 株と野生株を掛け合わせた二倍体株 (TSY235 × BY4742; T357A × WT) を SD+Am 培地において 25°C で 24 時間培養した。約 10⁶ 細胞/ml (OD₆₀₀=1) の培養液を 10⁰ から 10⁻³ まで希釈系列 (図中左から右) を作成し、1 mM の濃度で AZC を含む、または含まない SD+Am 寒天培地プレート上にスポットした。プレートは 25°C で 3 日間培養した。

3-3. T357A-Rsp5 発現株の細胞内 AZC 含量

A401E 株では、Rsp5 の Gap1 ユビキチン化活性が著しく低下しており、Gap1 が原形質膜上に安定的に存在し、活性を維持しているため、AZC が細胞内に過剰に流入し、AZC に高い感受性を示す (Hoshikawa *et al.*, 2003)。一方、T357A 株は強い AZC 耐性を示すことから、Gap1 が原形質膜上で機能していない可能性が考えられた。そこで、アミノ酸アナライザーを用いて各菌株の細胞内 AZC 含量を測定した。その結果、野生株 BY4741 の AZC 含量を 100% (細胞乾燥重量あたり 0.32% ± 0.04%) とした場合に対し、T357A 株の AZC 含量 30% (細胞乾燥重量あたり 0.09% ± 0.009%) 程度にまで低下していた (Figure 7)。このことから、T357A 株では AZC の取り込みが著しく減少していると考えられ、T357A-Rsp5 が Gap1 をはじめとするプロリンパーミアーゼの活性に何らかの影響を与えていることが示唆された。

3-4. プロリンパーミアーゼ遺伝子破壊株と T357A 株の表現型

Rsp5 は Gap1 だけでなく、Can1, Tat2, Fur4, Smf1/2, Mup2 など原形質膜上の多くのパーミアーゼのエンドサイトーシスについて、ユビキチン化を介して制御している。酵母において、プロリンや AZC は 4 種類のパーミアーゼによってほとんどが取り込まれる。具体的には、窒素源によって制御を受ける Gap1, Put4、及び外界のアミノ酸を感知する SPS センサーによって存在量が調節されている Agp1, Gnp1 である (Andréasson *et al.*, 2004)。そこで、4 種類のプロリンパーミアーゼと T357A-Rsp5 の関連性について解析を行った。

その結果、T357A 株は野生株に比べて顕著な AZC 耐性とプロリン資化能の低下を示すが、4 種類のパーミアーゼ遺伝子 (*GAP1*, *PUT4*, *AGP1*, *GNP1*) を単独または二重に破壊した株では、野生株に比べて AZC 耐性度やプロリン資化能に明瞭な差は見られなかった (Figure 8)。しかしながら、興味深いことにパーミアーゼ遺伝子の四重破壊株は T357A 株とまったく同じ表現型を示した (Figure 8)。これらの結果から、プロリンパーミアーゼの活性は T357A-Rsp5 によって不活性化されていると考えられる。

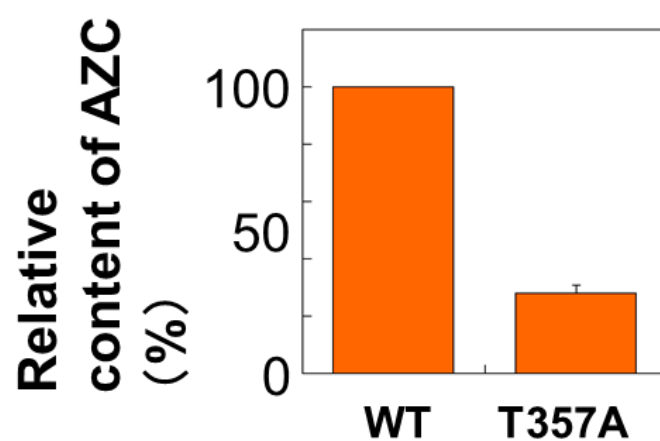


Figure 7. T357A 株の細胞内 AZC 含量

両菌株の細胞内 AZC 含量をアミノ酸アナライザーによって測定し、野生株 (WT) の AZC 含量を 100% として、T357A 株の AZC 含量を相対値で表した。

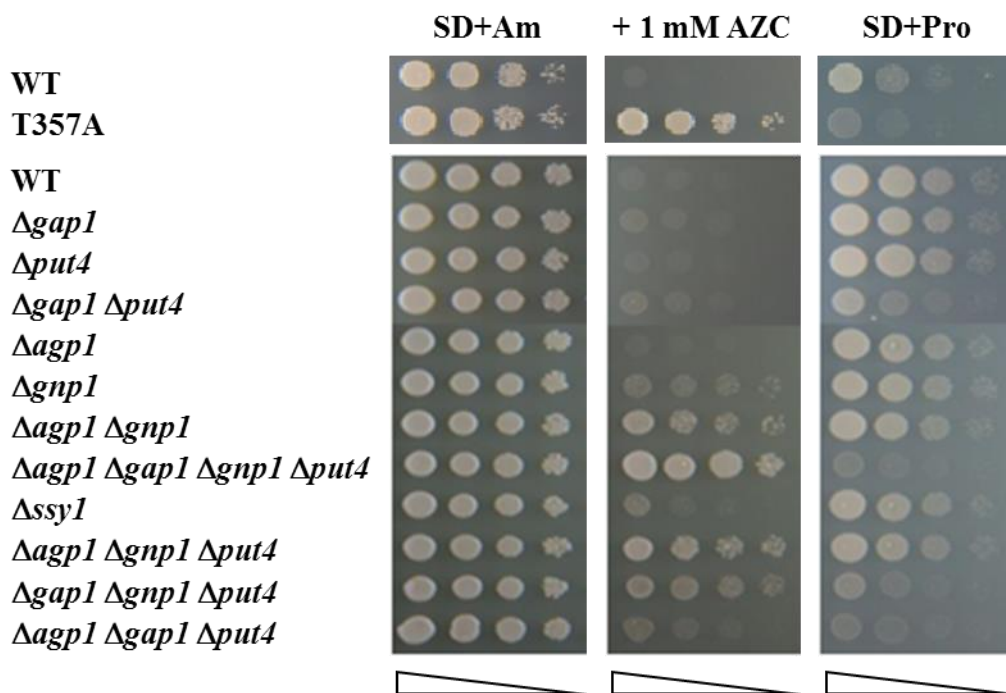


Figure 8. T357A 株とプロリンパーミアーゼ破壊株の AZC 耐性およびプロリン資化能

酵母 WT (CAY29), T357A (TSY001), $\Delta gap1$ (CAY132), $\Delta put4$ (CAY140), $\Delta gap1 \Delta put4$ (CAY136), $\Delta agp1$ (CAY178), $\Delta gnp1$ (CAY166), $\Delta agp1 \Delta gnp1$ (CAY198), $\Delta agp1 \Delta gap1 \Delta gnp1 \Delta put4$ (CAY191), $\Delta agp1 \Delta gnp1 \Delta put4$ (CAY200), $\Delta gap1 \Delta gnp1 \Delta put4$ (CAY172), $\Delta agp1 \Delta gap1 \Delta put4$ (CAY182) を SD+Am 培地において 25°C で 24 時間培養した。約 10^6 細胞/ml ($OD_{600}=1$) の培養液を 10^0 から 10^{-3} まで希釈系列 (図中左から右) を作成し、SD+Am 培地、1 mM AZC を含む SD+Am 培地、寒天培地プレート上にスポットした。プレートは 25°C で 3 日間培養した。

3-5. プロリンパーミアーゼの細胞内局在

Gap1, Put4 の窒素源に応答した不活性化は、Rsp5 によるユビキチン化を引き金にしたエンドサイトーシスと、後期エンドソームまたは液胞への輸送によって起こる。T357A 株において、プロリンパーミアーゼが不活性化している場合も同様の現象が起こると考えられた。そこで、各パーミアーゼ (Gap1, Put4, Agp1, Gnp1) の C 末端に yEGFP を融合したタンパク質を恒常的に発現するプラスミドを構築し、T357A 株に導入した。得られた形質転換体を用いて、プロリンパーミアーゼの細胞内局在を蛍光顕微鏡観察によって調べた (Figure 9)。液胞のマーカーには FM4-64 を使用し、培地の窒素源には Gap1 の分解を引き起こさないよう、アラントインを用いた。その結果、野生株ではすべてのプロリンパーミアーゼ-yEGFP 融合タンパク質が原形質膜上に存在していたのに対し、興味深いことに T357A 株ではすべて液胞に局在していることが分かった。このことから、T357A 株において、プロリンパーミアーゼは液胞へ輸送され、不活性化されていることが明らかになった。また、これらのパーミアーゼは T357A-Rsp5 によって恒常的にユビキチン化されている可能性が示唆された。

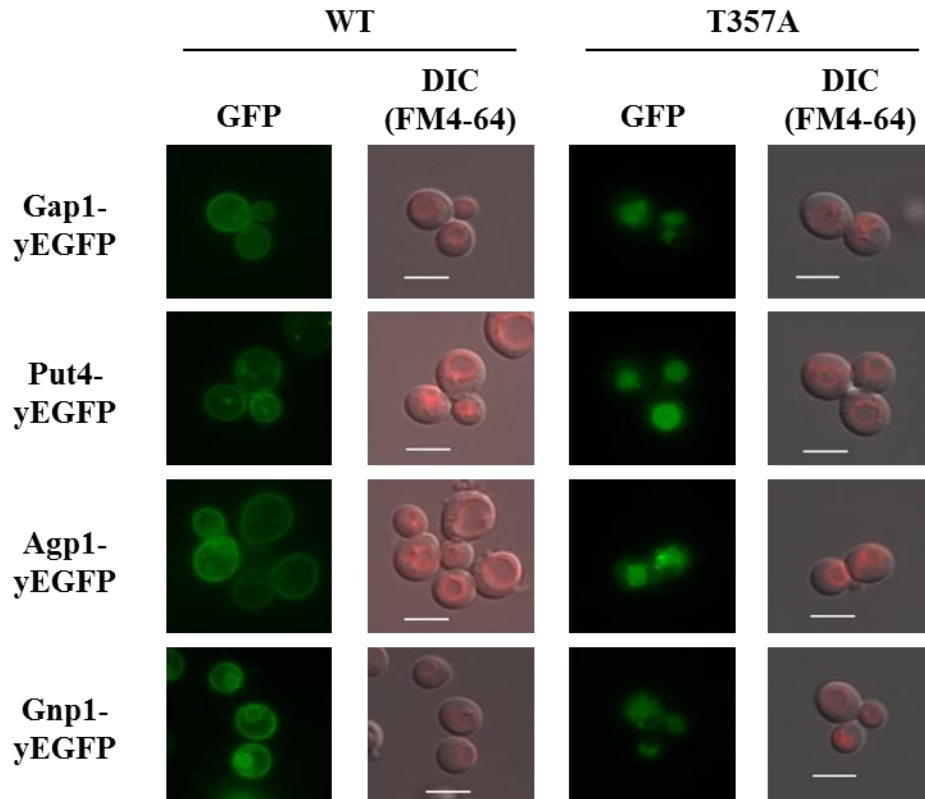


Figure 9. yEGFP タンパク質を融合した **Gap1, Put4, Agp1, Gnp1** の細胞内局在
 酵母 WT (BY4741) や T357A 株 (TSY235) において Gap1-yEGFP (pGAP1-yEGFP), Put4-yEGFP (pPUT4-yEGFP), Agp1-yEGFP (pAGP1-yEGFP), Gnp1-yEGFP (pGNP1-yEGFP) を発現させ、SD+Alt 液体培地、25°C で対数増殖期まで培養した。それらの細胞の Gap1-EGFP の局在を、蛍光顕微鏡を用いて観察した。細胞形態は微分干渉 (DIC) で観察し、液泡は FM4-64 で染色した。スケールバーは 5 μm である。

3-6. プロリンパーミアーゼの輸送経路の解析

通常、原形質膜上に到達した Gap1 はエンドサイトーシスを経て液泡へと輸送されるが、培地中に窒素源が豊富にある場合には、新規に合成された Gap1 はゴルジ体から直接、液泡へと輸送される (Roberg *et al.*, 1997)。また、その場合も Rsp5 によるユビキチン化が起こる (Risinger & Kaiser, 2008)。そのため、これまで明らかにしたプロリンパーミアーゼの液泡への局在は、エンドサイトーシス経路を介するものではなく、恒常的なユビキチン化によってゴルジ体から液泡への直接的な輸送が行われている可能性が考えられた。このように、二通り存在するパーミアーゼの液泡までの輸送経路のうち、T357A 株ではどちらの経路が使われているかを調べた。

END3 遺伝子や *VPS1* 遺伝子の破壊は、それぞれエンドサイトーシス、ゴルジ体から液泡へのタンパク質輸送を欠損させる (Roberg *et al.*, 1997)。しかしながら、T357A 株においてこれらの遺伝子を破壊しても、AZC 耐性の表現型は抑制されなかった (Figure 10)。次に、細胞内のプロリンパーミアーゼ-yEGFP 融合タンパク質を蛍光顕微鏡で観察した。その結果、T357A 株における *END3* 破壊では Gap1-yEGFP は液泡に局在したままであったが、他のパーミアーゼ Put4, Agp1, Gnp1 は原形質膜上に局在するようになった。また、T357A 株において *VPS1* 破壊は Gap1 や Put4 の液泡への局在には影響しなかった。しかしながら、Agp1 と Gnp1 の液泡への局在性は阻害された (Figure 11)。最近では *VPS1* の破壊がエンドサイトーシスを阻害するという報告もあり (Smaczynska-de Rooij *et al.*, 2010)、その影響で Agp1 と Gnp1 は細胞内局在が変化した可能性も考えられる。

これらの結果から、T357A 株において、プロリンパーミアーゼの中でも Gap1 だけが原形質膜を介さず、ゴルジ体から液泡へ直接輸送されることが示唆された。また、Put4, Agp1, Gnp1 の液泡局在はエンドサイトーシス経路のみ使用される可能性が高いことが明らかとなった。

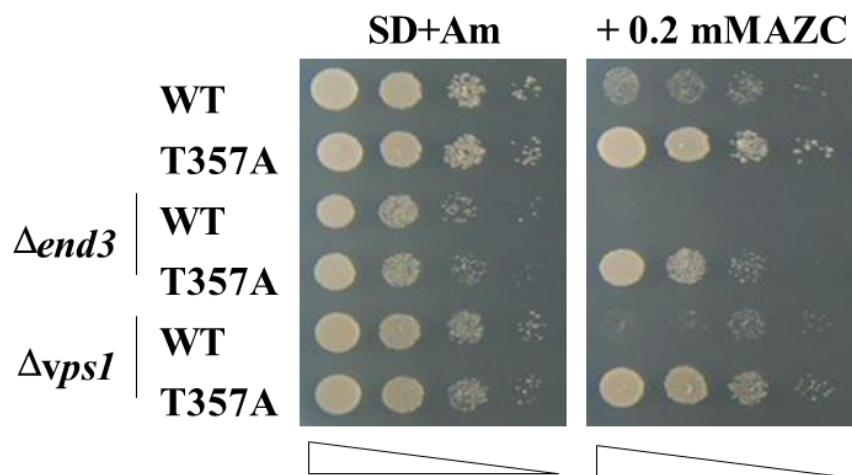


Figure 10. *END3* または *VPS1* を破壊した T357A 株の AZC に対する表現型
 酵母 WT (BY4741) とその $\Delta end3$ または $\Delta vps1$ (TSY260、TSY261)、及び T357A (TSY235) とその $\Delta end3$ または $\Delta vps1$ (TSY266、TSY267) を SD+Am 培地において 25°C で 24 時間培養した。約 10^6 細胞/ml ($OD_{600}=1$) の培養液を 10^0 から 10^{-3} まで希釈系列 (図中左から右) を作成し、SD+Am 培地、1 mM AZC を含む SD+Am 培地、寒天培地プレート上にスポットした。プレートは 25°C で 3 日間培養した。

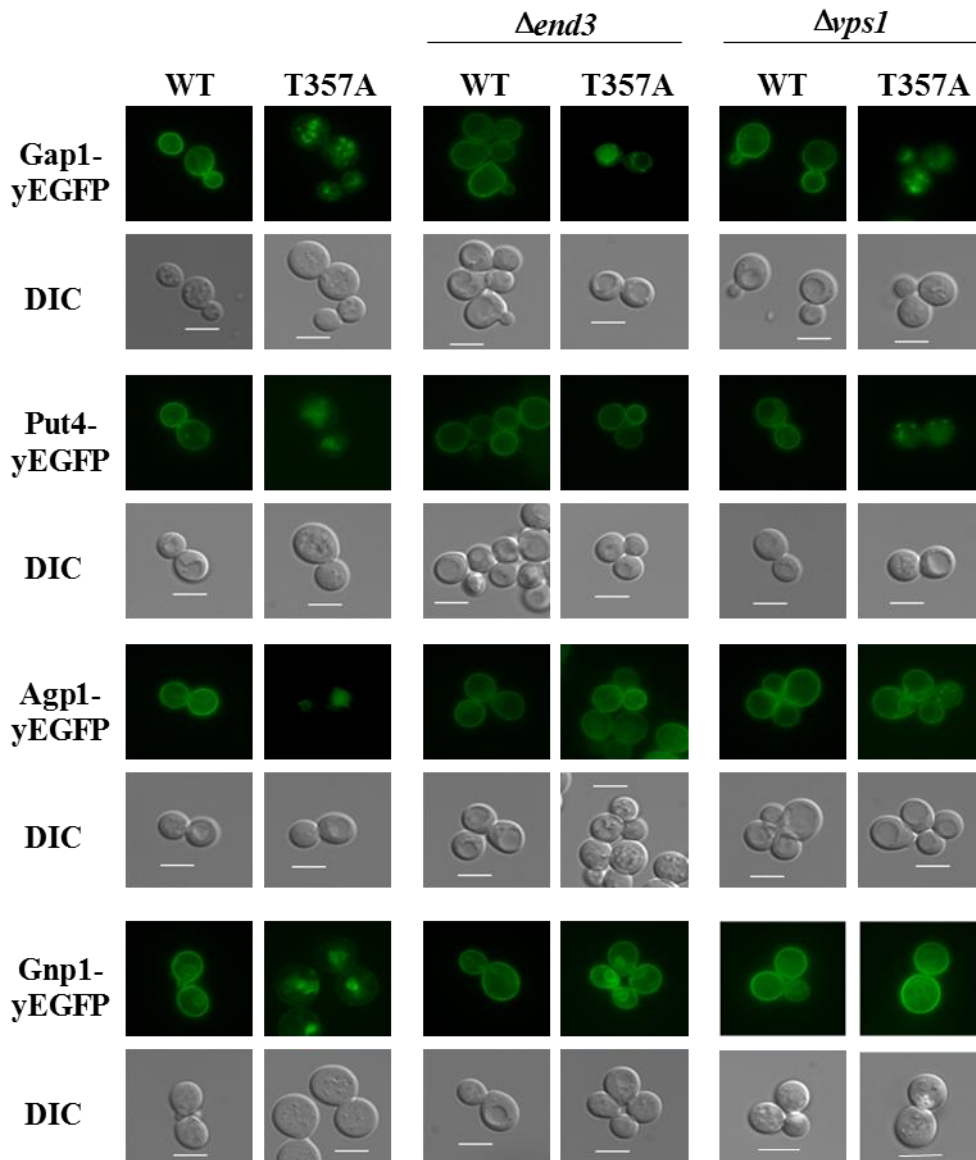


Figure 11. *end3* 破壊株または *vps1* 破壊株における yEGFP タンパク質を融合した Gap1, Put4, Agp1, Gnp1 の細胞内局在

酵母 WT (BY4741) とその $\Delta end3$ または $\Delta vps1$ (TSY260、TSY261)、及び T357A (TSY235) とその $\Delta end3$ または $\Delta vps1$ (TSY266、TSY267) において Gap1-yEGFP (pGAP1-yEGFP), Put4-yEGFP (pPUT4-yEGFP), Agp1-yEGFP (pAGP1-yEGFP), Gnp1-yEGFP (pGNP1-yEGFP) を発現させ、SD+Alt 液体培地、25°C で対数増殖期まで培養した。それらの細胞の Gap1-EGFP の局在を、蛍光顕微鏡を用いて観察した。細胞形態は微分干渉 (DIC) で観察し、液泡は FM4-64 で染色した。スケールバーは 5 μm である。

3-7. T357A-Rsp5 による Gap1 のユビキチン化の解析

Gap1 のユビキチン化は、難資化性の窒素源で培養している際に利用しやすい窒素源を加えた場合に生じる (Springael & André, 1998; Lin *et al.*, 2008)。また、Gap1 のユビキチン化部位は 9 番目と 16 番目の Lys 残基 (K9, K16) であることが明らかになっており、Lys 残基を Arg 残基に置換した非ユビキチン化型変異体 (Gap1^{K9R/K16R}) は、窒素源を資化しにくいものから資化しやすいものに変化させた場合においても原形質膜上に局在する (Soetens *et al.*, 2001)。そこで、T357A 株における Gap1 の液泡局在とユビキチン化の関係を明らかにする目的で、蛍光顕微鏡を用いて Gap1^{K9R/K16R}-yEGFP の細胞内局在を解析した。

その結果、興味深いことに、Gap1^{K9R/K16R} は T357A 株において原形質膜に局在した (Figure 12)。同様に、Gap1^{K9R/K16R} を T357A 株で発現させると AZC 耐性を示さなかった (Figure 13)。これらのことは、T357A 株では Gap1 のユビキチン化が誘導されており、その結果 Gap1 が液泡へ恒常的に局在していることを示唆している。

次に、Gap1-yEGFP タンパク質の分解を確かめる目的で、全細胞抽出液を調製し、anti-GFP 抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った (Figure 14)。その結果、完全長の Gap1-yEGFP のバンドに加えて、Gap1 から切断された遊離型 yEGFP タンパク質とその分解産物から成る幾つかのバンドが検出された。GFP タンパク質は他のタンパク質と比べると、プロテアーゼによって分解されにくい。これらは、野生株や T357A 株 (Figure 14 では WT, TA と表記) で確認できるが、完全長の Gap1-yEGFP タンパク質のバンドは野生株に比べて T357A 株では減少していた。さらに、Gap1^{K9R/K16R}-yEGFP 融合タンパク質 (KR) や液泡のタンパク質分解系のプロテアーゼをコードする遺伝子 *PEP4* の破壊株 ($\Delta pep4$) では遊離型の yEGFP が蓄積しないことが見出された。これらの結果は、T357A 株において Gap1-yEGFP がユビキチン化を受けた後、液泡に運ばれ速やかに分解されることを示唆している。

また、T357A 株で発現している Gap1-yEGFP を免疫沈降し、anti-ユビキチン化抗体を用いたウェスタンブロッティングによって Gap1 のユビキチン化状態の検出を試みた (Figure 15)。Soetens らの報告 (2001) によれば、poor な窒素源で培養した野生株 (WT) においては、アンモニウムイオンの添加によって Gap1 のユビキチン化を明瞭に検出することが可能である。この時観察されるユビキチン化は、非ユビキチン化型 Gap1^{K9R/K16R} (KR) では起こらない。

液泡内の主要なプロテアーゼである Pep4 の遺伝子破壊株 ($\Delta pep4$) で比較すると、T357A-Rsp5 発現株の場合、Rsp5 発現株に比べて Gap1 のユビキチン化量が著しく増加していた。野生株においては Gap1 のユビキチン化状態は検

出できなかったが、正常な細胞ではユビキチン化された **Gap1** が液泡において分解されているためであると考えられる。これらの結果をまとめると、**Rsp5** の 357 番目残基を **Thr** から **Ala** に置換すると、**Gap1** のユビキチン化が促進されることで常に液泡へと輸送され、液泡プロテアーゼにより分解されると考えられる。

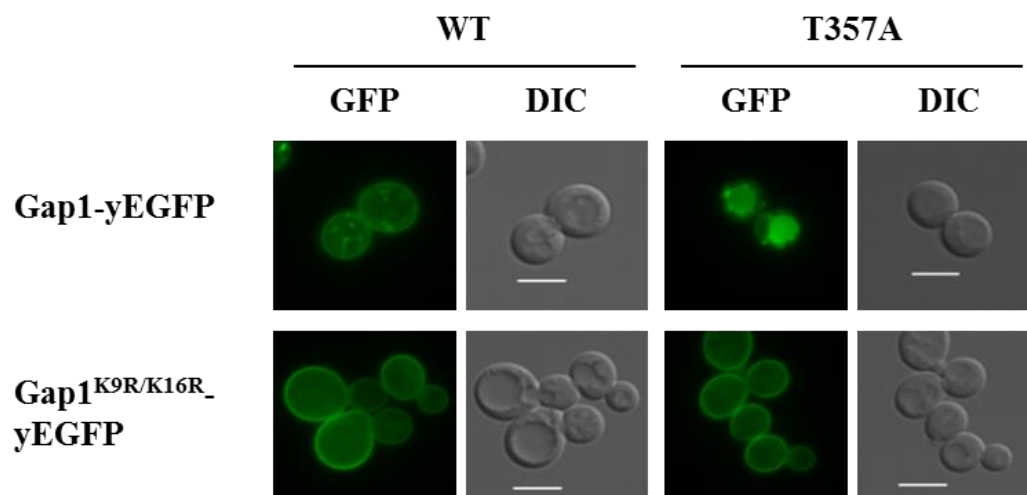


Figure 12. 非ユビキチン化型 Gap1-yEGFP 融合タンパク質の細胞内局在

酵母 WT (BY4741) と T357A (TSY235) において、Gap1-yEGFP (pGAP-yEGFP) または Gap1^{K9R/K16R}-yEGFP (pGAP1^{K9R/K16R}-yEGFP) を発現させ、25°C の SD+Alt 液体培地で対数増殖期まで培養した。これらの細胞の yEGFP 融合タンパク質の局在を、蛍光顕微鏡を用いて観察した。細胞形態は微分干渉 (DIC) で観察し、液泡は FM4-64 で染色した。スケールバーは 5 μm である。

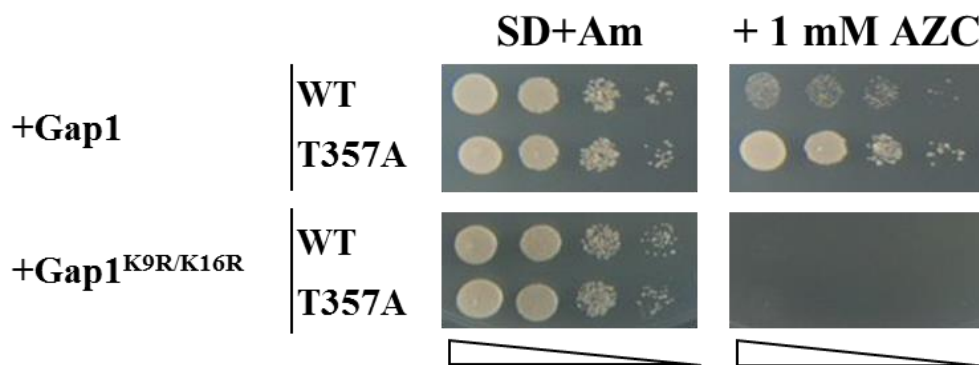


Figure 13. 非ユビキチン化型 Gap1 発現株の AZC 含有培地における生育

酵母 WT(BY4741)と T357A(TSY235)において、Gap1-yEGFP(pGAP-yEGFP)または Gap1^{K9R/K16R}-yEGFP(pGAP1^{K9R/K16R}-yEGFP)を発現させ、25°C の SD+Am 液体培地で対数増殖期まで培養した。約 10⁶ 細胞/ml (OD₆₀₀=1) の培養液を 10⁰ から 10⁻³ まで希釈系列 (図中左から右) を作成し、SD+Am 培地、1 mM AZC を含む SD+Am 培地、寒天培地プレート上にスポットした。プレートは 25°C で 3 日間培養した。

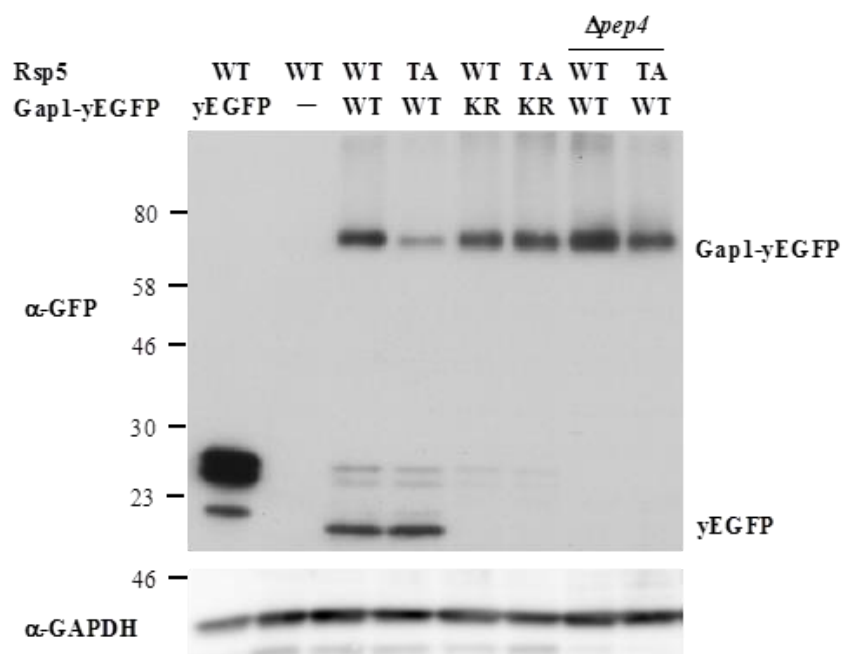


Figure 14. Gap1-yEGFP 融合タンパク質の分解を検出するためのウェスタンブロッティング

酵母 WT (BY4741), T357A (TSY235; TA), その $\Delta pep4$ 株における WT (TSY265), T357A (TSY271; TA) において、Gap1-yEGFP (pGAP-yEGFP; WT) または Gap1^{K9R/K16R}-yEGFP (pGAP1^{K9R/K16R}-yEGFP; KR) を発現させ、25°C の SD+Alt 液体培地で対数増殖期まで培養した。全細胞抽出液を調製し、anti-GFP 抗体 (α -GFP) と内部標準タンパク質検出に anti-GAPDH 抗体 (α -GAPDH) を用いて免疫ブロッティングに供した。分子量マーカーは kDa を単位として左端に示している。

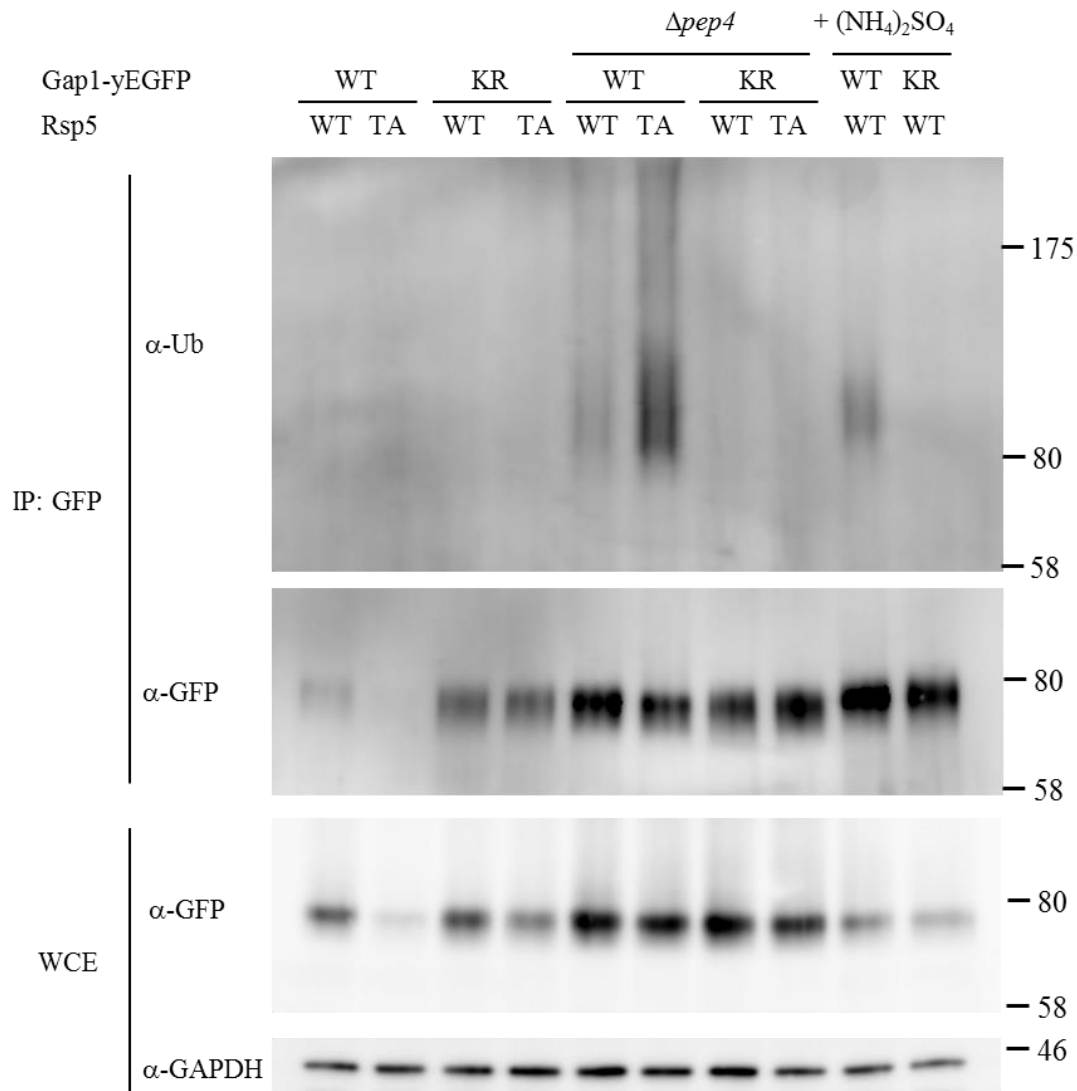


Figure 15. Gap1 とそのユビキチン化タンパク質のウェスタンブロッティング

酵母 WT (BY4741), T357A (TSY235; TA), $\Delta pep4$ (TSY265), $RSP5^{T357A} \Delta pep4$ (TSY271; TA) において、Gap1-yEGFP (pGAP-yEGFP; WT) または Gap1^{K9R/K16R}-yEGFP (pGAP1^{K9R/K16R}-yEGFP; KR) を発現させ、25°C の SD+Alt 液体培地で対数増殖期まで培養した。ポジティブコントロールとして WT (BY4741) における Gap1-yEGFP (pGAP1-yEGFP) のユビキチン化を、50 mM (NH₄)₂SO₄ を添加し 30 分インキュベートすることで誘導した。全細胞抽出液 (WCE) を調製し、anti-GFP 磁性ビーズを用いて免疫沈降を行った。それぞれのサンプルは anti-GFP 抗体 (α -GFP)、anti-Ub 抗体 (α -Ub)、anti-GAPDH 抗体を用いて、内部標準タンパク質検出には anti-GAPDH 抗体 (α -GAPDH) を用いてイムノブロッティングに供した。分子量マーカーは kDa を単位として左端に示している。

3-8. プロリンパーミアーゼのユビキチン化サイト予測

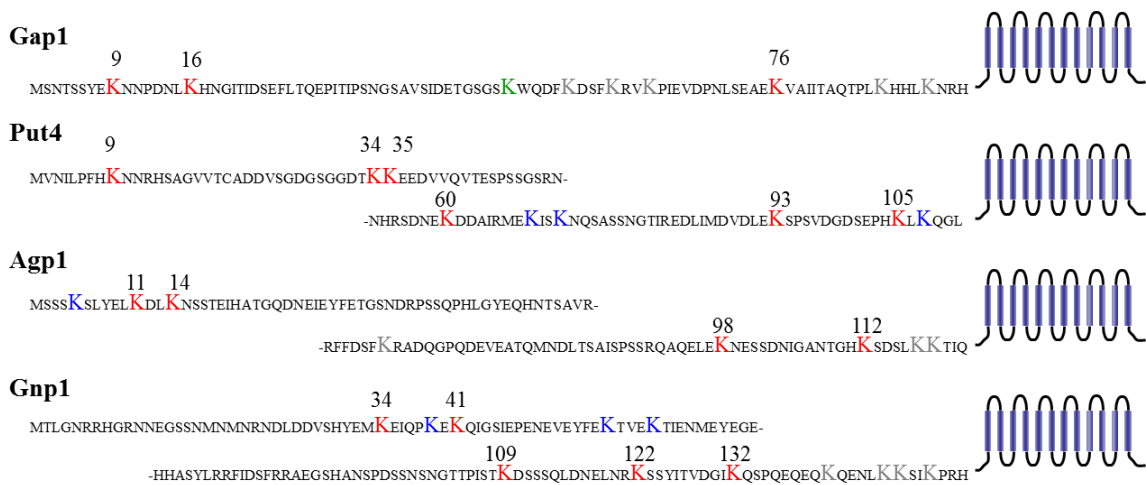
Gap1 の Lys 残基 (Lys9, Lys16) を Arg 残基に置換すると、資化しやすい窒素源を添加した場合でも Gap1^{K9R/K16R} は原形質膜上に安定的に存在する。また、T357A 株におけるプロリンパーミアーゼの液泡への局在は、Gap1 と同様にユビキチン化が原因である可能性が高く、それらはユビキチン化される部位を Arg に置換することで確かめられる。利用可能な Ubpred program (Radivojac *et al.*, 2010) (<http://www.ubpred.org/>) を用いてユビキチン化部位を検索したところ (Figure 16)、Gap1 は新たに Lys76 が、Put4 は Lys9, Lys34, Lys35, Lys60, Lys93, Lys105 が、Agp1 は Lys11, Lys14, Lys98, Lys112 が、Gnp1 は Lys34, Lys41, Lys109, Lys122, Lys132 がそれぞれ 84%以上の確率でユビキチン化される可能性があるとして予測された。これらについては各々のリジン残基をアルギニンに置換した変異体を作成することで、実際にユビキチン化される部位の特定が可能となる。

3-9. Agp1, Gnp1 のエンドサイトーシスを誘導する刺激の探索

4 種類のプロリンパーミアーゼのうち、これまで Agp1, Gnp1 が Rsp5 の基質であるという報告はなかった。本研究で見出した Rsp5 の変異体発現株である T357A 株において、Agp1, Gnp1 の細胞内局在も影響を受けていることから、これらのパーミアーゼも Rsp5 の制御下にあるのではないかと考えられた。そこでこれらのパーミアーゼにおいて、Gap1 で観察されるエンドサイトーシスの誘導と同様の現象が見られるかどうか幾つかの刺激を用いて実験を行った (Figure 17)。その結果、Agp1 において、カザミノ酸などでエンドサイトーシスを誘導することができた。これが Rsp5 のユビキチン化依存的に起こる現象なのかどうかについては、Rsp5 の活性低下型変異体などを用いて詳細に解析する必要がある。

3-10. プロリン以外のパーミアーゼに対する T357A-Rsp5 の影響

Rsp5 がユビキチン化すると報告されているパーミアーゼはトリプトファンパーミアーゼ Tat2、ウラシルパーミアーゼ Fur4、アルギニンパーミアーゼ Can1、メチオニンパーミアーゼ Mup1、マンガン透過するパーミアーゼ Smf1/2 などである。プロリンのパーミアーゼ以外に T357A-Rsp5 に影響を受ける可能性があるパーミアーゼを探索する目的で、種々のアナログとカドミウムを用いた耐性試験を行った (Figure 18)。その結果、T357A 株はトリプトファンの毒性アナログである 5-メチル-DL-トリプトファン、フェニルアラニンの毒性アナログである *o*-フルオロ-DL-フェニルアラニン、ウラシルの毒性アナログである 5-フルオロウラシルに耐性を示した。



Label	Score range	Sensitivity	Specificity
Low confidence	0.62 ≤ s ≤ 0.69	0.464	0.903
Medium confidence	0.69 ≤ s ≤ 0.84	0.346	0.950
High confidence	0.84 ≤ s ≤ 1.00	0.197	0.989

Figure 16. プロリンパーミアーゼにおけるユビキチン化部位の予測

Ubpred program を用いたユビキチン化部位予測の結果 (Radivojac *et al.*, 2010) (<http://www.ubpred.org/>)。

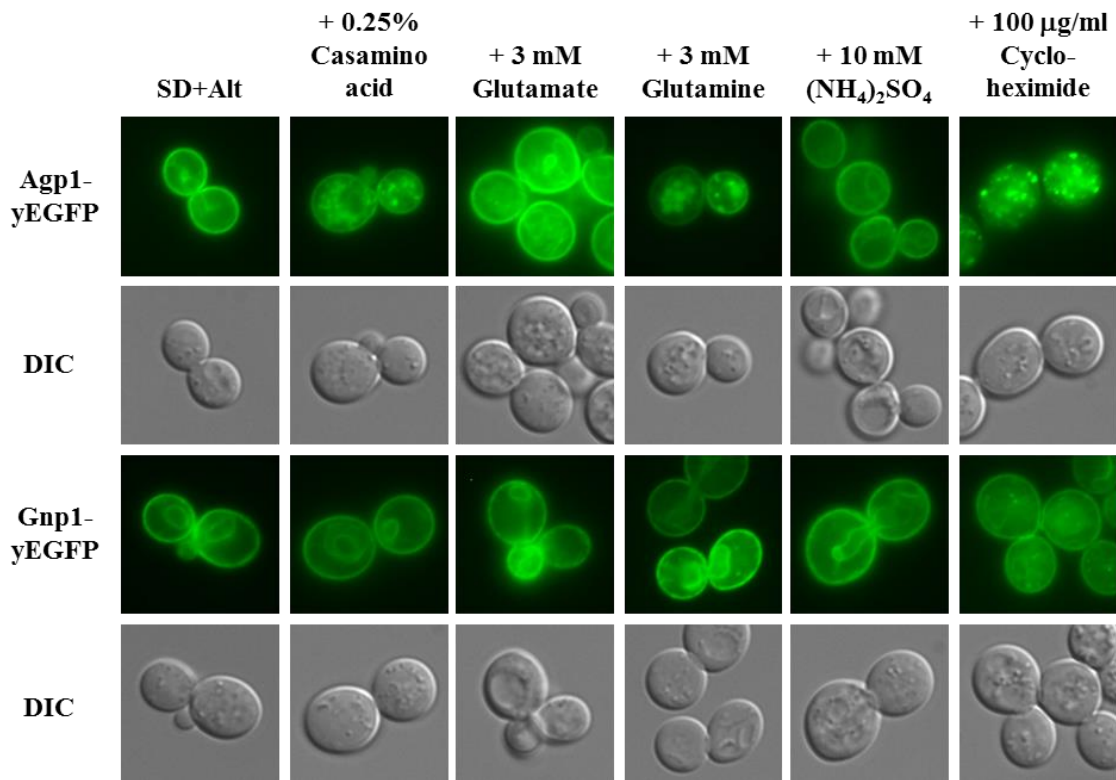


Figure 17. 様々な刺激に対する Agp1, Gnp1 の細胞内局在変化

酵母 WT (BY4741) において Agp1-yEGFP (pAGP1-yEGFP) , Gnp1-yEGFP (pGNP1-yEGFP) を発現させ、25°C の SD+Alt 液体培地で対数増殖期まで培養した。その後、0.25%カザミノ酸、3mM グルタミン酸、3mM グルタミン、10 mM (NH₄)₂SO₄、100 µg/ml シクロヘキシミドをそれぞれ添加し 1 時間後の yEGFP 融合タンパク質の局在を、蛍光顕微鏡を用いて観察した。

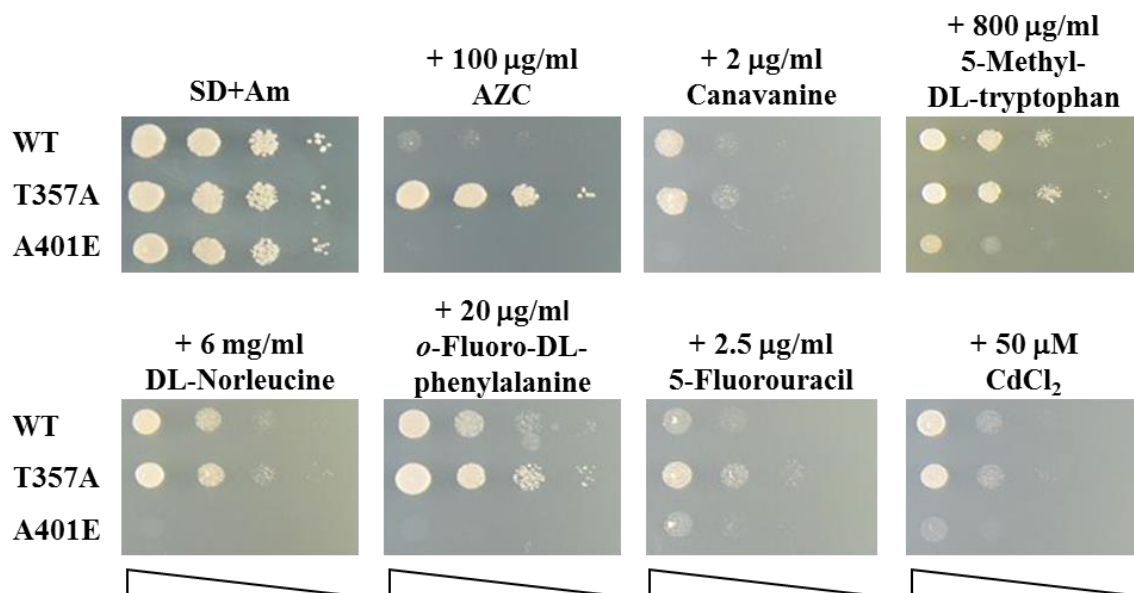


Figure 18. アミノ酸アナログ含有培地における T357A 株の生育

酵母 WT (BY4741) , T357A (TSY235) , A401E (TSY259) を 25°C の SD+Am 液体培地で対数増殖期まで培養した。約 10^6 細胞/ml ($OD_{600}=1$) の培養液を 10^0 から 10^{-3} まで希釈系列 (図中左から右) を作成し、SD+Am 培地、1 mM AZC、2 mg/ml カナバニン、800 mg/ml 5-メチル-DL-トリプトファン、6 mg/ml DL-ノルロイシン、20 mg/ml *o*-フルオロ-DL-フェニルアラニン、2.5 mg/ml 5-フルオロウラシル、50 mM $CdCl_2$ を含む SD+Am 培地、寒天培地プレート上にスポットした。プレートは 25°C で 3 日間培養した。

3-11. Rsp5-WW2 ドメイン内 Thr357 のリン酸化の検出

次に、Rsp5 の T357A 置換がどのようなメカニズムで Gap1 のユビキチン化を促進するのかについて検討を試みた。最近、Morales ら (2007) は、Nedd4 ファミリーに属するマウスの Rsp5 オーソログである Itch/AIP4 の WW3 ドメインの Thr30 がリン酸化されると、リガンドである PY モチーフを有するペプチドとの結合能が完全に失われることを報告している (Figure 19)。

この Thr 残基は Nedd4 ファミリーに共通して存在する WW ドメインで高度に保存されており、Rsp5 では WW2 ドメイン内の Thr357 が相当する残基である (Figure 20)。ヒトにおいて Nedd4 ファミリーは 9 個のメンバーが存在し、これらの WW ドメインのアミノ酸配列を比較すると、Rsp5 の Thr357 近傍では 27 個のアミノ酸残基が高度に保存されており、Thr 自体は 93%の同一性を示している (Figure 20) (Rotin & Kumar, 2009; Sudol *et al.*, 2012)。これらの情報から、Rsp5 の Thr357 はリン酸化されている可能性があり、T357A の置換が Rsp5 のリン酸化/脱リン酸化の変換を阻害しているものと考えられた。

この仮説を実証するために、Rsp5 の Thr357 を Asp 残基に置換することでリン酸化をミミックした変異体 (T357D 株) を構築し、AZC に対する表現型を調べた (Figure 21)。その結果、予想どおり、T357D 株は AZC に対して高い感受性を示した。このことは、リン酸化型の Rsp5 は非活性型であることを示唆している。

Gap1 のエンドサイトーシスは、難資化性の窒素源であるプロリンを唯一の窒素源とした培地に、資化しやすい窒素源であるアンモニウムイオンを加えるような、窒素源の急激な変化によって引き起こされる。今後、T357D 株における Gap1 の細胞内局在を観察するため、アンモニウムイオンを添加し、タイムコースを取る実験が必要である。

一般的に、タンパク質がリン酸化されるとその電気泳動度が変化することが知られている。Rsp5 の Thr357 がリン酸化された場合に予測される表現型を T357D 株がミミックしていたことから、電気泳動によって Rsp5 のリン酸化を示すバンドシフトを観察できるかどうか検討した。具体的には、Phos-tag と呼ばれるリン酸化結合タグを利用したウェスタンブロッティングによって、タンパク質の移動度をもとにリン酸化の検出を試みた。Mn²⁺-Phos-tag 分子は Ser, Thr, Tyr 残基にエステル結合したリン酸基を捉える性質を持つ。anti-Rsp5 抗体で免疫沈降した Rsp5 タンパク質を Phos-tag を含むポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動し、ウェスタンブロッティングに供した (Figure 22)。

その結果、移動度が遅くなった幾つかのバンドが観察され、これらがリン酸化状態の Rsp5 であると考えられた。また、免疫沈降後の Rsp5 をλプロテイン

ホスファターゼ (λ PPase) によって脱リン酸化処理すると、移動度の遅いバンドが消失し、脱リン酸化状態と考えられるメインバンドが増加した。一方で、この脱リン酸化反応をインヒビターで阻害すると、移動度の遅いバンドの消失やメインバンドの増加は見られなかった。これらの結果から、Rsp5 がリン酸化されていることが強く示唆された。

さらに興味深いことに、メインバンドの上には幾つかのバンドが見られたことから、例えば WW1 の Thr255 や WW3 の Thr413 など、Rsp5 内には他のリン酸化サイトが存在する可能性が考えられた。興味深いことに、Thr255 や Thr413 の Ala 置換体を発現する細胞は AZC に対して感受性を示した (Figure 21)。

また、本実験は Gap1 が原形質膜上に存在する条件で培養したにも関わらず、リン酸化型 Rsp5 は多くの非リン酸化型の Rsp5 と混在していた (Figure 22)。Rsp5 は細胞内において液泡以外の核を含めて全てのオルガネラに存在すると考えられている。このことは、少なくともリン酸化に関しては、Rsp5 が局在する場所によって翻訳後修飾の状態が異なり、各場所で適切な働きをするように、それぞれ制御されている可能性を示唆している。原形質膜からの輸送に関わる Rsp5 は全体のタンパク質量から考えるとそれほど多くないかも知れない。

Rsp5 のどの部位がリン酸化されているのかを確認するため、野生株を用いて LC-MS 解析を行った。SD+Alt 培地を用いて FLAG タグを融合させた Rsp5 を発現させ、精製したものを LC-MS 解析に供した (Figure 23) (株式会社島津製作所の分析計測事業部に依頼)。SD+Alt 培地などの poor な窒素源を含む培地で培養を行うと、野生株では Gap1 が原形質膜上に安定的に存在することが知られている (Springael *et al.*, 1999)。この時、Rsp5 は基質のユビキチン化を行わず、不活性化であると考えられるため、仮説通りに考えれば、Thr357 はリン酸化されているものと推測される。解析の結果、2 番目の WW ドメインに存在する Thr357 を含むトリプシン消化ペプチド内の Thr 残基がリン酸化されているということが判明した。このペプチドには Thr357 前後にも 2 つの Thr 残基が存在しており、厳密にリン酸化部位を同定することはできないが、Thr255 や Thr413 近傍の Thr は今回の条件ではリン酸化されていないということが明らかとなった。

ウェスタンブロッティングにより、簡便に Thr357 のリン酸化状態を検出するため、Thr357 とその周辺のアミノ酸配列を Thr357 リン酸化ペプチドとして化学合成し、ウサギに免疫することで抗リン酸化ペプチド抗体 (anti-WW-P) を作成した。この抗体を用いてウェスタンブロットを行った (Figure 24)。その結果、野生株ではサンプルとなる酵母を培養する最少培地の窒素源が硫酸アンモニウム、アラントインのいずれの場合においても、リン酸化 Rsp5 固有の

バンドを明確に検出することができた。

一方、硫酸アンモニウムを唯一の窒素源とした培地においては、T357A 株、3TA 株、*rsp5* 破壊株 (Δ *rsp5*) のいずれにおいてもリン酸化型は検出されなかった。このことから、アンモニウムイオンを唯一の窒素源とした場合、Rsp5 の Thr357 がリン酸化されているものと考えられる。しかしながら、アラントインを唯一の窒素源としたサンプルにおいては、T357A 株においても野生株と同様のリン酸化 Rsp5 のバンドが検出された。このことは、Thr357 の代わりに Thr255 や Thr413 がリン酸化され、anti-WW-P に認識されている可能性を示唆している。

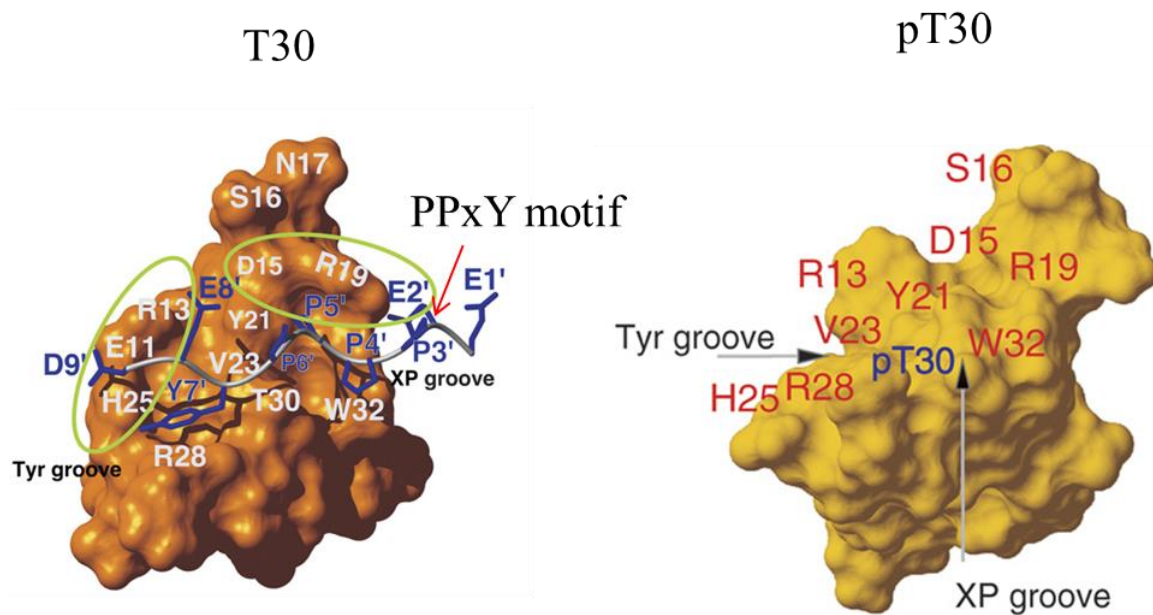


Figure 19. ItchWW3 ドメインの NMR による構造解析

Morales らが行った ItchWW3 ドメインの NMR 解析によれば、WW ドメインの Thr 残基をリン酸化すると、立体障害により PPxY モチーフとの結合能を完全に失う (Morales *et al.*, 2007)。

<i>Sc</i> Rsp5-WW1	246	YYVDHNTRTTTWKRPTL	262
<i>Sc</i> Rsp5-WW2	348	YFVDHNTRIT T TWVDPRR	364
<i>Sc</i> Rsp5-WW3	404	YFVDHNTKTTTWDDPRL	420
<i>Mm</i> NEDD4-WW1	266	YYVNHEsrRTQWKRPSp	282
<i>Mm</i> NEDD4-WW2	422	YYVDHNSKTTTWskPTM	438
<i>Mm</i> NEDD4-WW3	477	FF INHNiKKTQWEDPRL	493
<i>Mm</i> Itch-WW3	415	YFVNHNTRITQWEDPRS	431

Figure 20. WW ドメインのアミノ酸配列アライメント

酵母 Rsp5 のマウスオーソログである Nedd4, Itch, Rsp5 の WW ドメインのアミノ酸配列アライメントを European Bioinformatics Institute (EBI, <http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) が提供しているソフトウェア ClustalW を用いて作成した。高度に保存された残基である Rsp5 の Thr357 とそれに相当するスレオニン残基は太字で強調表示している。リン酸化されると予測した Rsp5 の Thr357 残基は四角で囲んでいる。

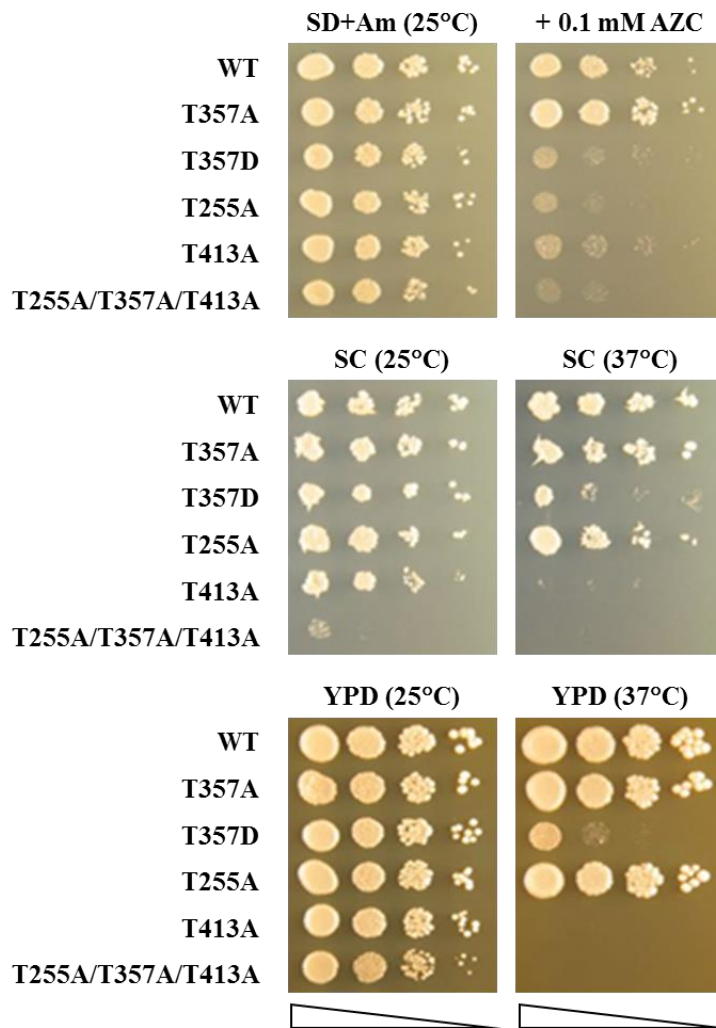


Figure 21. Rsp5 の WW ドメイン内 Thr 置換体の AZC、高温に対する表現型

酵母の WT (BY4741), T357A (TSY235), T357D (TSY320), T255A (TSY321), T413A (TSY322), T255A/T357A/T413A (TSY323) を SD+Alt 培地において 25°C で 24 時間培養した。約 10^6 細胞/ml ($OD_{600}=1$) の培養液を 10^0 から 10^{-3} まで希釈系列 (図中左から右) を作成し、SD+Am 培地、0.1 mM AZC を含む SD+Am 培地、SC、YPD 寒天培地プレート上にスポットした。プレートは 25°C と 37°C で 3 日間培養した。

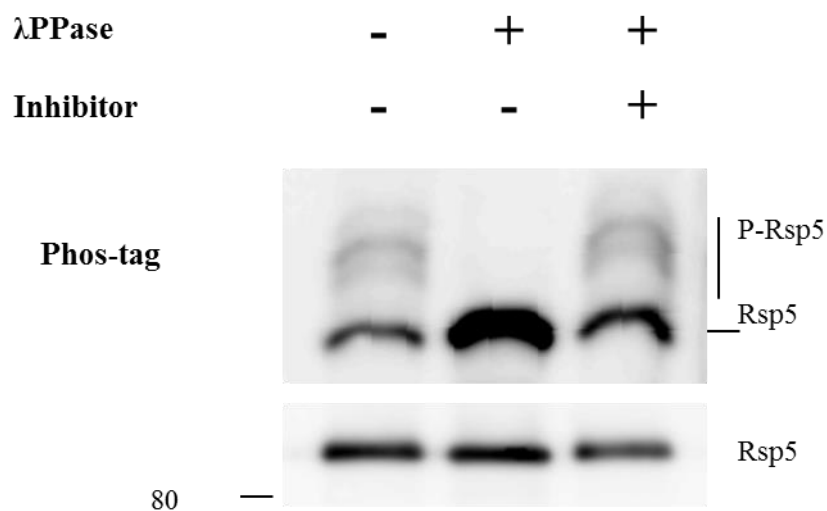
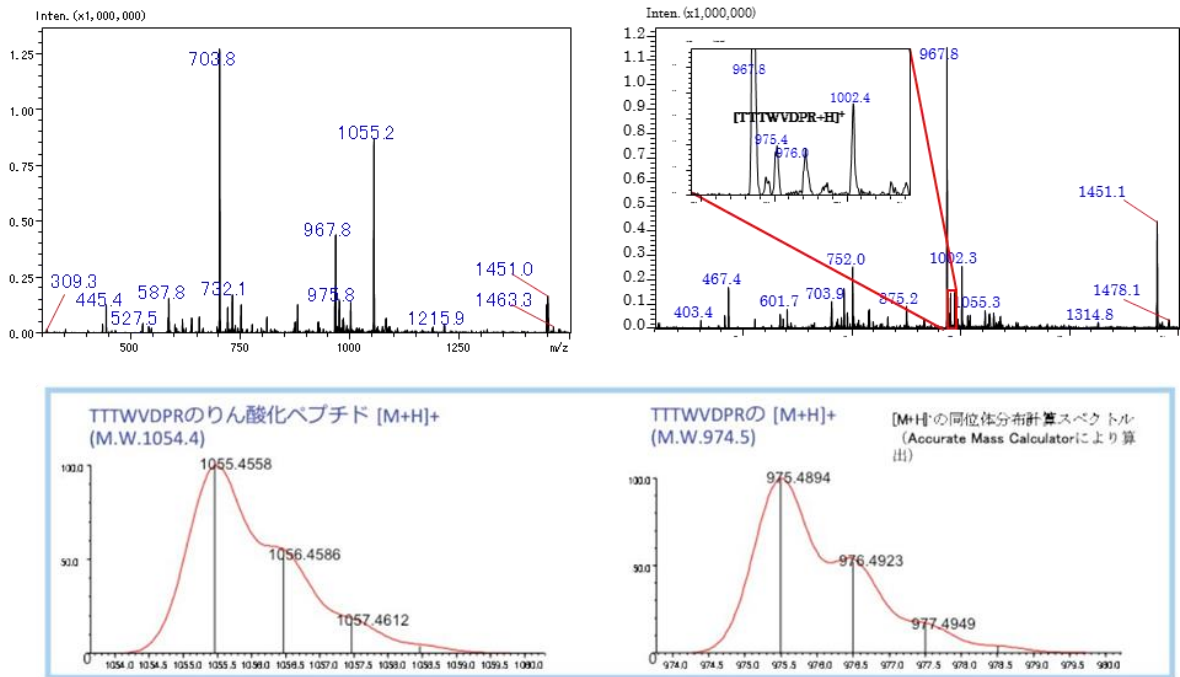


Figure 22. ウェスタンブロッティングによる **Rsp5** のバンドシフトの検出

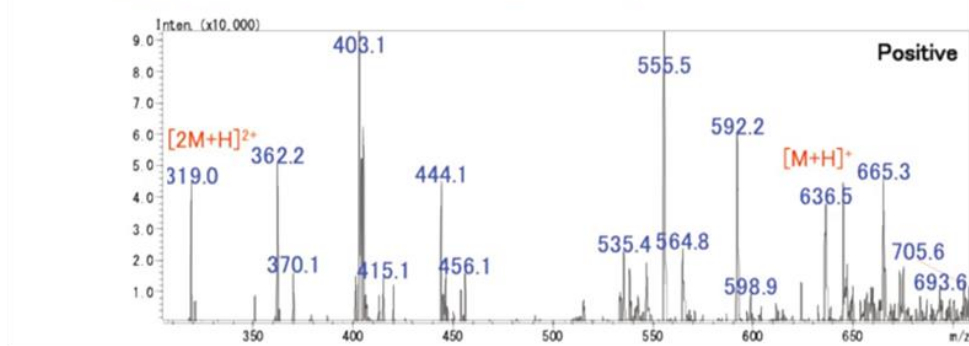
酵母の野生株 (BY4741) を 25°C の SD+Alt 培地において対数増殖期まで培養した。全細胞抽出液を anti-Rsp5 ラビット抗体で免疫沈降した後、ラムダプロテインホスファターゼ (λPPase) を阻害剤あり (+)、なし (-) で反応させた。Rsp5 のリン酸化を示すバンドシフト (P-Rsp5) を検出するため、anti-Rsp5 マウス抗体でウェスタンブロッティングを行った。サンプルは 6% SDS-ポリアクリルアミドゲルで分離し、40 μM Phos-tag を含むゲルは上、含まないゲルは下のパネルに示した。分子量マーカーは kDa を単位として左端に示している。

A



B

TTTWK (保持時間 9.7min) のスペクトル (M.W.635.7)



C

TTTWDDPR (保持時間 5.3min) のスペクトル (M.W.991.0)

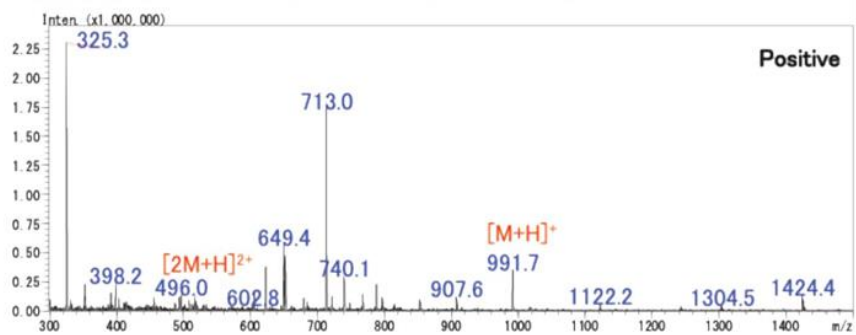


Figure 23. LC-MS による Rsp5 のリン酸化状態

(A) 酵母野生株 (BY4741) を SD+Alt で培養した際の Thr357 付近のリン酸化状態。精製した Rsp5 をトリプシン消化した際の Thr357 近傍の断片は TTTWVDPR となり、この断片ではリン酸化によるピークの変化が確認された。

(B) BY4741 株を SD+Alt で培養した際の Thr255 近傍のリン酸化状態。精製した Rsp5 をトリプシン消化した際の Thr255 近傍の断片は TTTWK となり、この断片ではリン酸化によるピークの変化は確認されなかった。(C) BY4741 株を SD+Alt で培養した際の Thr413 近傍のリン酸化状態。精製した Rsp5 をトリプシン消化した際の Thr413 近傍の断片は TTTWDDPR となり、この断片では、リン酸化によるピークの変化は確認されなかった。

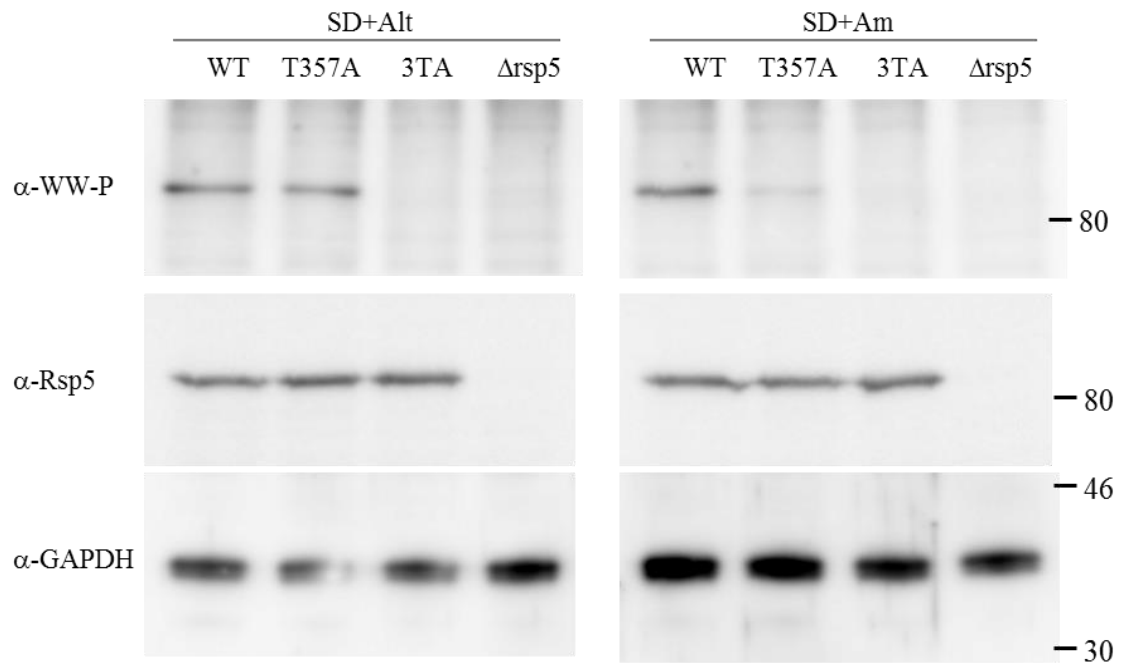


Figure 24. ウェスタンブロッティングによるリン酸化 Rsp5 の検出

酵母 WT (BY4741) , T357A (TSY235) , 3TA (TSY323) , Δ rsp5 (TSY317) を 25°C の SD+Alt 培地または SD+Am 培地において対数増殖期まで培養した。Rsp5 のリン酸化を検出するため、各株の全細胞抽出液を合成ペプチド (351 DHNTRT(pT)TWVDPRR 364) で調製した anti-WW-P ウサギ抗体 (α -WW-P)、と anti-Rsp5 モノクローナル抗体 (α -Rsp5) を用いてウェスタンブロッティングに供した。内部標準タンパク質検出に anti-GAPDH 抗体 (α -GAPDH) を用いてイムノブロッティングに供した。分子量マーカーは kDa を単位として右端に示している。

3-12. アダプタータンパク質 Bul1, Bul2 と Rsp5 の相互作用解析

Rsp5 のユビキチン化によって Gap1 のエンドサイトーシスと液泡での分解が誘導される際、Bul1 と Bul2 タンパク質が Rsp5 と Gap1 のアダプタータンパク質として機能する。Bul1 とその機能ホモログである Bul2 には、Rsp5 の WW ドメインと相互作用する PY モチーフが存在している。Bul1/2 は Rsp5 と共に作用することで、Gap1 が液泡に移行するためのシグナルであるポリユビキチン化を行う (Helliwell *et al.*, 2001)。T357A 株は Gap1 が恒常的に液泡に局在するため AZC 耐性を示すが、その機構に Bul1/2 が関与するかどうかを調べる目的で、野生株と T357A 株の *BUL1/2* 遺伝子の単独または二重破壊株を作成した。

興味深いことに、T357A 株において *BUL1*, *BUL2* の単独破壊では AZC 耐性を維持したが、*BUL1/2* の二重破壊株では AZC に感受性を示した。恐らく、Bul1 と Bul2 の間には遺伝的な冗長性があるためであると考えられる (Figure 25)。さらに、yEGFP 蛍光タンパク質標識による解析では、T357A 株の *BUL1/2* 破壊は野生株とその単独破壊株 (Δbul , $\Delta bul2$)、二重破壊株 ($\Delta bul1 \Delta bul2$) と同様に、Gap1-yEGFP が液泡に局在せず、原形質膜上に存在した (Figure 26)。これらの結果から、Bul1/2 タンパク質は Rsp5 の T357A 置換によって引き起こされる恒常的な Gap1 の不活性化に関与することが示唆された。

次に、Bul1/2 が *in vivo* で変異型 Rsp5 と結合するかどうかを調べる目的で、yEGFP-Bul1 または yEGFP-Bul2 を免疫沈降し、共沈する Rsp5 の検出を試みた (Figure 27)。pBUL1, pEGFP-BUL1, pBUL2, pEGFP-BUL2 はセントロメアタイプのプラスミドで、発現量の変動がほとんど見られない *TDH3* プロモーターで発現させた。しかしながら、Bul1/2 の発現レベルは *RSP5*, *RSP5*^{T357A}, *rsp5*^{T357D} の各アレル発現株によって異なっていた。特に、Bul1/2 は *RSP5*^{T357A} 発現株において、他の 2 株より速やかに分解されている傾向が見られたが、本実験の条件では Bul1/2 と変異型 Rsp5 の相互作用を定量的に明らかにすることは困難であった。しかしながら、Rsp5 の 357 番目残基の置換もしくはリン酸化によって、Bul1/2 との結合能が変化する可能性を見出すことができた。特に Bul2 については、T357A-Rsp5 との結合が Rsp5 よりも強い可能性が示唆された (Figure 27)。

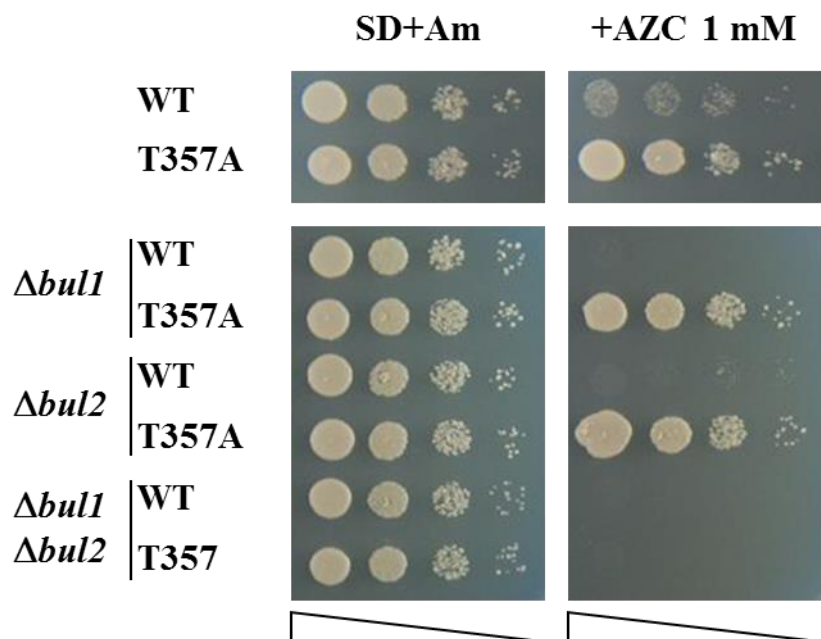


Figure 25. アダプタータンパク質 Bul1/2 の遺伝子破壊株の AZC 耐性

酵母 WT (BY4741)、T357A (TSY235)、 $\Delta bul1$ または $\Delta bul2$ 単独破壊株、 $\Delta bul1$ と $\Delta bul2$ の二重破壊株 (TSY262, TSY263, TSY264)、T357A 株の $\Delta bul1$ または $\Delta bul2$ 単独破壊株、 $\Delta bul1$ と $\Delta bul2$ の二重破壊株 (TSY268, TSY269, TSY270) を 25°C の SD+Am 液体培地で対数増殖期まで培養した。約 10^6 細胞/ml

($OD_{600}=1$) の培養液を 10^0 から 10^{-3} まで希釈系列 (図中左から右) を作成し、SD+Am 培地、1 mM AZC を含む SD+Am 培地、寒天培地プレート上にスポットした。プレートは 25°C で 3 日間培養した。

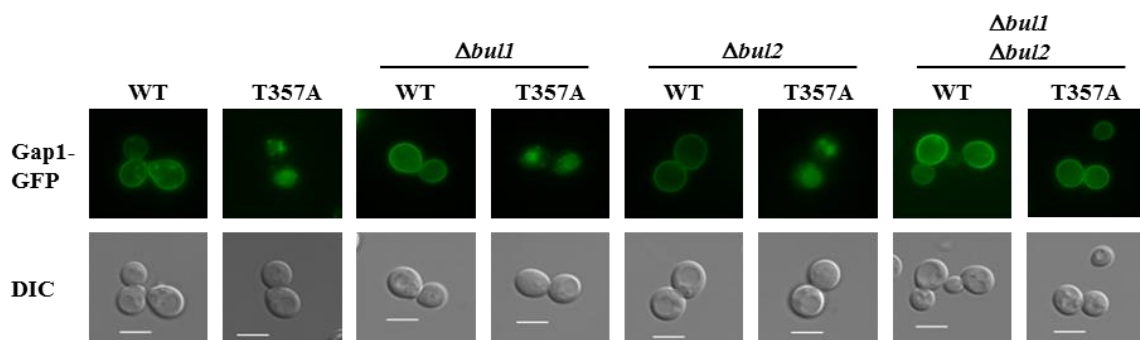


Figure 26. アダプタータンパク質 Bul1/2 の遺伝子破壊株における Gap1-yEGFP 融合タンパク質の細胞内局在

アダプタータンパク質 (Bul1/2) の遺伝子を単独破壊 (*Δbul1*, *Δbul2*) または二重破壊 (*Δbul1Δbul2*) した Rsp5 野生株 (TSY262, TSY263, TSY264; WT) と T357A 株 (TSY268, TSY269, TSY270; T357A) において Gap1-yEGFP (pGAP1-yEGFP) を発現させ、SD+Alt 液体培地、25°C で対数増殖期まで培養した。それらの細胞の Gap1-EGFP の局在を、蛍光顕微鏡を用いて観察した。細胞形態は微分干渉 (DIC) で観察し、液泡は FM4-64 で染色した。スケールバーは 5 μm である。

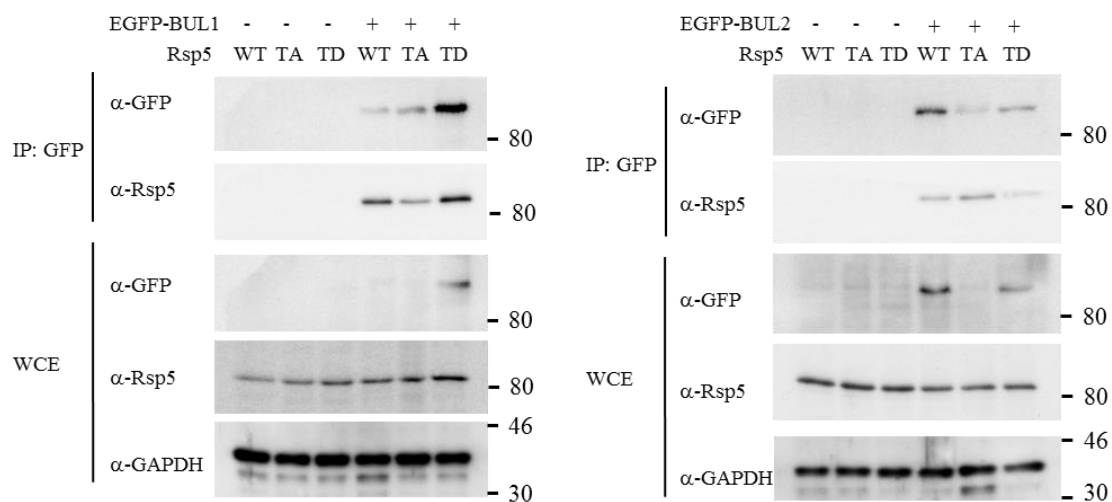


Figure 27. Bul1/2 と Rsp5 の共免疫沈降

BUL1 または *BUL2* を単独破壊した Rsp5 野生株 (TSY262, TSY263; WT)、T357A 株 (TSY268, TSY269; TA)、T357D 株 (TSY271, TSY272; TD) において、Bul1 (pBUL1; -) または yEGFP-Bul1 (pEGFP-BUL1; +) (左図)、Bul2 (pBUL2; -) または yEGFP-Bul2 (pEGFP-BUL2; +) (右図) を発現させた株を、25°C の SD+Alt 液体培地で対数増殖期まで培養した。全細胞抽出液を調製し、anti-GFP 抗体で免疫沈降を行い、EGFP-Bul1 または EGFP-Bul2 を Bait として Rsp5 を共沈させた。それぞれのサンプルは anti-GFP 抗体 (α -GFP)、anti-Rsp5 抗体 (α -Rsp5)、anti-GAPDH 抗体を用いて、内部標準タンパク質検出には anti-GAPDH 抗体 (α -GAPDH) を用いてイムノブロッティングに供した。分子量マーカーは kDa を単位として右端に示している。

4. 考察

Rsp5 の変異株はこれまでに様々な表現型を示すことが報告されてきた (Wang *et al.*, 1999; Abe & Iida, 2003; Hoshikawa *et al.*, 2003)。WW3 ドメインの A401E アミノ酸置換は Gap1 のユビキチン化能の低下によって、AZC 超感受性という表現型を示す (Hoshikawa *et al.*, 2003)。この表現型は同じ WW3 ドメインの変異株である T413A 株や、WW1 ドメインの変異である T255A 株でも見られた。一方で、WW2 ドメインの変異株である T357A 株は AZC に強い耐性を示す。これは他の 2 つの WW ドメインである WW1, 3 の変異である T255A 株や T413A 株と完全に逆の表現型である (Figure 21)。

WW1 ドメインについての報告はこれまでなかったものの、WW ドメイン内のアミノ酸置換によって Rsp5 と基質との親和性を大きく変化させることができる。今回の結果から、3 つの WW ドメインにはそれぞれ異なる役割があり、Rsp5 の多様な機能を生み出す原動力となっていると考えられる。また、WW ドメイン内の変異は高頻度で温度感受性を示し、WW3 ドメイン内に変異を持つ A401E 株では完全培地での高温培養やエタノール、過酸化水素といった種々のストレスに対して感受性を示す (Dunn & Hicke, 2001; Hoshikawa *et al.*, 2003)。

Rsp5 はオレイン酸の合成酵素をコードする *OLE1* 遺伝子の発現を、転写因子 Spt23 を介して制御するため、酵母の生存に必須のタンパク質である。Spt23 は Rsp5 によるユビキチン化の後、プロテアソームにより部分分解されることで活性化する (Hoppe *et al.*, 2000)。その他多くの研究により、ユビキチン化能を欠損した Rsp5 や、すべての WW ドメインを欠失した場合に細胞は生育できなくなることが明らかになっている。このように、これまでの Rsp5 変異株はその機能を低下させる「劣性変異」ばかりであったが、本研究で解析した T357A-Rsp5 は Gap1 のユビキチン化活性を増加させ、液泡での分解を促進させるものであった (Figure 12~15)。RSP5^{T357A} は恒常的に活性型を示す初めての「優性変異」である。

T357A-Rsp5 による AZC 耐性という表現型は、AZC を取り込む Gap1 の恒常的なダウンレギュレーションが原因であった。さらに、プロリン透過能があり、AZC も同様に透過すると考えられている他のパーミアーズ (Put4, Agp1, Gnp1) も、T357A-Rsp5 は同様にダウンレギュレートしていた (Figure 7, 8, 9)。このことから Gap1 のように、T357A-Rsp5 による Put4, Agp1, Gnp1 のユビキチン化も増加していると考えられ、それらはユビキチン化されると予測されたリジン

残基 (Figure 16) のユビキチン化を検出することで確かめられる。

Gap1 がゴルジ体での糖鎖修飾以降に通る経路は 2 つ存在する。原形質膜へ輸送される経路と、直接液泡へ運ばれる経路である。ゴルジ体から原形質膜への輸送には Rsp5 が必要ないことが報告されているため、Rsp5 のリン酸化によって制御されているのは、1) Gap1 のエンドサイトーシス、または 2) ゴルジ体から液泡への直接輸送のどちらか、あるいは両方である。

T357A-Rsp5 はエンドサイトーシス欠損株 ($\Delta end3$) においても AZC 耐性を細胞に付与した (Figure 10)。一方、T357A 株において Gap1 の非ユビキチン化型変異体である K9R/K16R-Gap1 を発現した場合、その GFP 融合タンパク質は原形質膜上に局在し、AZC に対して高い感受性を示すようになった。(Figure 12)。さらに、Rsp5 のリン酸化ミミック変異で、非活性型状態にあると考えられる T357D 株は AZC 感受性を示した (Figure 21)。

Gap1-yEGFP は T357A 株において *END3*, *VPS1* どちらの遺伝子を破壊しても液泡に局在した (Figure 10)。*VPS1* の破壊によってゴルジ体から液泡までの経路を遮断すると、Gap1 は原形質膜を経由して液泡へと移動すると考えられる。これらの二つの経路には冗長性があると思われるが、本研究の範囲では T357A 株においてどちらの経路が使われているかまでは特定できなかった。

また、 $\Delta end3$ と $\Delta vps1$ の二重破壊株については作成できず、二つの経路以外にも Gap1 の輸送経路があるかどうかについては証明できなかった。 $\Delta end4$ と $\Delta vps1$ の二重破壊は合成致死になることはすでに報告されているため (Nothwehr *et al.*, 1995)、 $\Delta end3$ と $\Delta vps1$ の二重破壊も合成致死になる可能性が高いと考えている。

Gap1 と Put4 が Rsp5 の基質であることはすでに知られていた (Grenson 1983; Helliwell *et al.*, 2001)。一方で、Agp1 と Gnp1 についてはユビキチン化を受ける可能性があることは報告されていたが (Hitchcock *et al.*, 2003; Peng *et al.*, 2003)、そのユビキチンリガーゼはまだ同定されていない。Rsp5 が Agp1 や Gnp1 の分解を担うユビキチンリガーゼであるかどうかは非常に興味深い。Agp1 については、グルタミン、カザミノ酸、シクロヘキシミドでエンドサイトーシスを誘導できることを明らかにした (Figure 17)。今後、このエンドサイトーシスの誘導が Rsp5 依存的であるかについて、RSP5 変異株を用いることで詳細に解析する予定である。

Rsp5 は Can1, Tat2, Mup1, Fur4, Smf1, Smf2 といった多くのパーミアーゼをユビキチン化することが報告されている (Nikko & Pelham, 2009)。T357A-Rsp5 がこれらのパーミアーゼの活性をプロリンパーミアーゼと同様に制御する可能性は高い。そこで、そのことを確かめる目的で、それぞれのパーミアーゼが

透過するアミノ酸や核酸のアナログ、カドミウムを含む培地での生育を調べた (Figure 18)。T357A-Rsp5 株はウラシルやフェニルアラニンアナログに対し、野生株よりも強い耐性を示した。このことは、T357A-Rsp5 はウラシルパーミアーゼである Fur4 やフェニルアラニンを透過するパーミアーゼをダウンレギュレートしている可能性を示している。

T357A-Rsp5 のような活性型の変異体を新たに得たことにより、その解析を通して Rsp5 の活性制御機構を解明していくことが可能となった。Rsp5 の活性制御機構を理解するためのヒントはマウスにおける Rsp5 オーソログである Itch の *in vitro* での実験から得られた。Itch の WW ドメイン内の Thr357 と同じ位置にある Thr 残基のリン酸化が基質との結合能を完全に妨げるというものである (Morales *et al.*, 2007)。端的に言えば、*in vivo* における Rsp5 の Thr357 のリン酸化は、少なくとも Gap1 のユビキチン化活性の On/Off スイッチとして機能する可能性があることを示している。

Nedd4 ファミリーの活性制御機構についてはこれまで幾つかの報告がある。例えば、Nedd-like (NEDD4L) タンパク質の Ser 残基のリン酸化は 14-3-3 タンパク質をそのリン酸化部位にリクルートすることが知られている。その結果、NEDD4L とその基質である、上皮ナトリウムチャネルである ENaC との結合を阻害する (Rotin & Kumar, 2009)。反対に、JNK1 (c-jun N-terminal kinase) による Itch のリン酸化は触媒活性を誘導する (Rotin & Kumar, 2009)。

Rsp5 の活性は脱ユビキチン化酵素である Ubp2 によっても拮抗的に制御されている (Kee *et al.*, 2005)。Ubp2 の欠損は Lys63 型のユビキチン鎖が蓄積する。Ubp2 欠損株はユビキチンに依存したマルチベシキュラーボディ (MVB) への輸送の欠損を示す。しかしながら、脱ユビキチン化酵素による制御機構は Nedd4 ファミリー内では保存されていないため、共通な活性制御機構を見出すことは難しいと考えられる。

本研究では、Rsp5 が複数箇所リン酸化される可能性を示し、少なくとも Thr357 がリン酸化されることを明らかにした (Figure 22, 23)。この残基は Nedd4 ファミリーに高度に保存された残基であり、リン酸化はこのファミリーに共通して起こりうることを考えられる。それらは Rsp5 に見られるように、新規の活性制御機構であるかもしれない。

anti-WW-P を用いたウェスタンブロットィングでは、アラントイン存在下では T357A 株においてリン酸化のシグナルが野生株と同程度見られたが、三つの WW ドメインの Thr 残基をすべて Ala に置換した株 (*rsp5*^{T255A/T357A/T413A}) においては、そのシグナルは見られなかった (Figure 24)。これは Thr357 の前後にある Thr356, Thr358 が代わりにリン酸化されている可能性と、WW1, 3 ド

メインに相当する 255 番目と 413 番目の二つの Thr 残基がリン酸化され、それらが検出されている可能性が考えられた。LC-MS 解析の結果からアラントインで培養した株の FLAG-Rsp5 からは Thr357 のリン酸化が検出されたが、Thr255, Thr413 のリン酸化は検出されなかった (Figure 23)。しかしながら、T357A 株では、T357A 変異が原因となり、通常では起こらない Thr255, Thr413 のリン酸化が起き、anti-WW-P 抗体がそれを検出している可能性は依然として残る。今後、T357A-Rsp5 の LC-MS 解析を行うことで明らかにしていきたい。さらに、Gap1 のエンドサイトーシスが急激な環境変化に応じて起こることから、窒素源の急激な変化など、Rsp5 のリン酸化状態が変化する環境が生理的に存在すると思われ、今後明らかにしていく必要があるだろう。

T357A 株において、Gap1 が恒常的に液泡に局在し AZC 耐性を示す表現型は、Rsp5 のアダプターとして機能する Bul1, Bul2 をコードする遺伝子のいずれかの単独破壊では抑制されず、二重破壊によって抑制され、*RSP5^{T357A} Δbul1 Δbul2* 株において、Gap1 は原形質膜上に局在する (Figure 26)。このことから、Gap1 のゴルジ体から液泡への輸送と、原形質膜から液泡への輸送のどちらも、Bul1/2 に依存し、Bul1/2 の間には冗長性があると考えられた。

Bul1/2 タンパク質 (Risinger *et al.*, 2006) に加え、arrestin (アレスチン)-related trafficking proteins (ARTs) も同様に、Rsp5 によるユビキチン化と原形質膜上のタンパク質のエンドサイトーシスを制御するアダプターとして機能することが報告されている (Lin *et al.*, 2008)。酵母 *S. cerevisiae* には 10 種類の ARTs があり、そのほとんどには PY モチーフが存在し、Rsp5 と結合することが知られている。このように、ARTs は原形質膜上の特異的な基質と Rsp5 の結合を仲介すると予想されている (Lin *et al.*, 2008; Nikko & Pelham, 2009)。しかしながら、T357A 株における Gap1 の細胞内輸送の制御に必須であったのは従来のアダプターである Bul1/2 タンパク質であった (Figure 26)。このことは、野生株において、窒素源が難資化性のものから資化しやすいものに変化した時に起こる Gap1 の Rsp5 によるユビキチン化と、その後起こる分解を T357A-Rsp5 がミミックしたことを示唆している。

Rsp5 のバリエーションが *in vivo* において Bul1/2 と結合しているか、また、野生型 Rsp5 と比較して結合能に違いがあるか実験を行った。yEGFP-Bul1、若しくは yEGFP-Bul2 を発現している酵母細胞を用いて、Rsp5 との共免疫沈降を行った (Figure 27)。Bul1/2 のシスエレメントには一定の発現量となるよう、*TDH3* プロモーターを使用した。しかしながら、発現量が翻訳後のタンパク質の翻訳・分解量のいずれが原因かは定かではないが、変異型 Rsp5 発現株における Bul1/2 のタンパク質量は減少していた。T357A 株においては Gap1 の分解に巻

き込まれる形で液泡分解されるか、あるいは Bul1/2 自体もユビキチン化と分解を受けている可能性もあり得ると考えられる。このことから、Rsp5 の野生型や変異型と Bul1/2 との結合について、明確に定量化を行い解析することは困難である。それでも、実験結果からは Rsp5 のリン酸化部位である Thr357 の置換によって、Bul1/2 との結合能が変化している可能性は示唆された。Rsp5 のリン酸化状態と Bul1/2 との結合について更なる知見を得るためには、酵母細胞内での Bul1/2 タンパク質量が Rsp5 によって影響を受けないように、WW ドメインのみを大腸菌で発現し、Bul1/2 をプル-ダウンする実験が効果的かも知れない。

Bul1/2 を介した Rsp5 のユビキチン化によってウラシルパーミアゼ (Fur4)、トリプトファンパーミアゼ (Tat2) の輸送も制御されているという報告がなされている (Lauwers *et al.*, 2010)。スポット試験の結果、Rsp5 の T357A 置換はウラシルアナログに対しては耐性を示したが、予想に反し、トリプトファンアナログに対しては耐性を付与しなかった (Figure 18)。最近、Novoselova ら (2012) は Bul1 のファミリーとして新たに Bul3 を同定した。興味深いことに、Bul3 は Rsp5 が担う Can1, Smf1 の原形質膜における輸送システムにおいて、アンタゴニストとして作用する。このことから Bul ファミリータンパク質は Rsp5 の活性制御に重要な役割を担っていると考えられる (Novoselova *et al.*, 2012)。スポットによる耐性試験の結果から判断すると、Bul3 や ARTs など、Bul1/2 以外のアダプタータンパク質と T357A-Rsp5 の結合能が変化した可能性は低いと考えられるが、T357A-Rsp5 と共免疫沈降するタンパク質を同定するなどの網羅的な解析が必要である。

Itch に関する報告 (Morales *et al.*, 2007) から考えると、Rsp5 と Bul1/2 の結合は T357A 置換によって強くなり、反対にリン酸化をミミックする Thr357 の Asp 残基への置換によって減少すると予測される。これは側鎖のアミノ酸にリン酸基が結合することで立体障害が生じ、Thr357 のリン酸化が Bul1/2 との結合能を変化させるスイッチのような役割を果たしているのではないかと考えている。また、ARTs のように、Bul1/2 以外にも PY モチーフを持つタンパク質が多数存在するため、これらと変異型 Rsp5 の結合の変化について調べることによって、新たな知見が得られるかもしれない (Hesselberth *et al.*, 2006)。

Figure 28 に、Rsp5 がユビキチン化を介して行う Gap1 のダウンレギュレーションが、Rsp5 の Thr357 のリン酸化/脱リン酸化によって制御されているというモデルを示す。Rsp5 の Thr357 がリン酸化された状態は非活性型であると考えられる。窒素源が難資化性のものから資化しやすいものへと急激に変わるような環境の変化が刺激となって、細胞内でシグナルが伝達され、「リン酸化

酵素の抑制化」、または「脱リン酸化酵素の活性化」のいずれか、またはどちらもが起き、リン酸基が遊離することで **Rsp5** が活性型となり、**Gap1** をユビキチン化すると考えられる。しかしながら、細胞が刺激をどのように感知し、どのようにカスケードの下流へシグナルを伝えているのかは不明である。

培養方法や培地組成の違いによってリン酸化状態が変化するかどうかを調べることは大変興味深い。野生株においては、唯一の窒素源としてアンモニウムイオン、アラントインのどちらを用いた場合においても **WW** ドメインのリン酸化状態に違いは見られなかった (Figure 24)。したがって、**Thr357** の脱リン酸化は、**Gap1** のエンドサイトーシスを引き起こすような突然の窒素源の変化によって起こるのではないかと考えている。一方で、アンモニウムイオンを窒素源とした培地においても、長期間培養した対数増殖期の細胞であれば、**Gap1** はその多くが原形質膜上に局在する (Rubio-Teixeira & Kaiser, 2006)。それ故に、硫酸アンモニウムを窒素源とした培地において培養したサンプルにおいても **Rsp5** のリン酸化は検出されたと考えられる (Figure 24)。本研究では **Rsp5** のリン酸化が実際に制御されていることを示すデータは得られなかった。しかしながら、硫酸アンモニウムやグルタミン酸を加えるといった、窒素源を急激に変えることで、**Rsp5** のリン酸化状態が変化する可能性がある。この仮説は、窒素源の変更に伴い、短い間隔のタイムコースでサンプリングしたタンパク質抽出物をウェスタンブロッティングに供し、**Rsp5** のリン酸化を検出することで確かめられるだろう。

Figure 28 に示したモデルをさらに発展させるためには、**Rsp5** の活性を制御するキナーゼ・ホスファターゼを同定する必要がある。栄養源によって制御されている **Npr1** は、**Gap1** の正の調節因子であると考えられている (De Craene *et al.*, 2001)。**Npr1** は **TORC1** の下流に位置するとされているが、直接の基質はほとんど明らかになってはいない。最近では、窒素源飢餓の際に **ARTs** の一つである **Aly2** が **Npr1** キナーゼによってリン酸化されることで、**Gap1** がクラスリン皮膜小胞へ取り込まれ、エンドソームからトランスゴルジネットワークへの輸送が促進されることが報告されている (O'Donnell *et al.*, 2010)。また、難資化性の窒素源で培養した酵母の細胞内では、**Npr1** によってリン酸化された **Bul1/2** は **14-3-3** プロテインと結合し、**Rsp5** と会合しないようにブロックされている。そこへ、アンモニウムイオンが添加されると、**Bul1/2** は **Sit4** ホスファターゼによって脱リン酸化され、**14-3-3** プロテインと乖離し、**Rsp5** による **Gap1** のユビキチン化を促進する、といった制御機構も報告されている (Merhi & André, 2012; Figure 2)。**Gap1** のユビキチン化が窒素源やアミノ酸によって引き起こされること、またアダプターである **Aly2** や **Bul1/2** のリン酸化という、

同様の制御を行なっていることから、TORC1 経路、特に Npr1 が Rsp5 のリン酸化を行なっている可能性が高い。すでに、酵母のキナーゼ・ホスファターゼ遺伝子破壊株を用いて、AZC 耐性と感受性を指標にスクリーニングを行った結果、Npr1, Sit4 を候補として取得した。今後は窒素源などの栄養源の変化やストレス環境下において、Rsp5 のリン酸化状態が変化するかどうかについて検討するとともに、Npr1, Sit4 が Rsp5 を直接リン酸化、脱リン酸化するかを解析していきたい。

本研究は、Nedd4 ファミリーに属し、酵母の生育に必須の HECT 型ユビキチンリガーゼである Rsp5 のリン酸化についての初めての報告である。酵母には、ヒトにまで高度に保存された重要な細胞内プロセスが数多く存在しており、高等真核生物の生命現象を理解する上で、有用な単細胞微生物である。ユビキチンリガーゼは神経疾患やガンなど多くの病気と関連しているため、今回の知見は Nedd4 ファミリーに関連した病気の治療法の開発に重要な示唆を与える可能性がある。一方で、Nedd4 ファミリーにおいて *in vivo* で Rsp5 の Thr357 に相当する残基がリン酸化されるという報告はまだ無く、今後の解析が期待される。仮に進化の過程で失われたのであれば、WW ドメインと PY モチーフ、Nedd4 ファミリーとアレスチンの関係における多様性と普遍性に迫れるであろう。

酵母にストレス耐性を付与する RSP5 バリエーションを開発する目的で行った RSP5 ランダム変異導入と AZC によるスクリーニングであったが、T357A-Rsp5 は残念ながら酵母のストレスへの耐性能を向上させるには至らなかった (Figure 5)。むしろ、T357A-Rsp5 発現株は過酸化水素やエタノールストレスに対して若干の感受性を示した。これは、原形質膜のタンパク質、少なくとも Gap1, Put4, Agp1, Gnp1 が恒常的に分解されることで、栄養源の取り込みが正常に行えないという理由が考えられる。また、T357A 株は長期的な冷蔵による保管では野生株よりも状態の劣化が早い。ガラクトースや酢酸を炭素源とした培地で成育が遅いため、ミトコンドリアの機能に何らかの異常をきたしている可能性も考えられるが、一方でガラクトースパーミアーズがダウンレギュレートされている可能性も残されている。今後の正確な評価には、ストレス処理の影響が緩和されてしまうという問題もあるが、完全培地では無く最少培地で試験し、生菌数を実測するなどの工夫が必要だろう。

WW ドメインのアミノ酸置換が Rsp5 の活性に大きく影響することから、当研究室では Rsp5 の WW ドメイン限定的な変異導入を進めてきた。その結果、これまでに過酸化水素に対して耐性を示す変異株の取得に成功している。異常タンパク質のモデルとして α -シヌクレインをこれらの株で過剰発現した結果、

過酸化水素に耐性を示した *RSP5* 変異株では野生株に比べて α -シヌクレインのユビキチン化が増加していた。このように、*Rsp5* の WW ドメイン特異的な機能改変によって酵母にストレス耐性を付与することに成功しており、さらなる解析を進めている。

今回、*Gap1* の液泡輸送ですでに知見がある窒素源に焦点を当て、細胞が外界の環境変化へ対応するために *Rsp5* が担う重要な役割について、一つの糸口を見出した。窒素源の変化による *Rsp5* の制御が実際に存在するかどうかは今後の課題ではあるが、タンパク質にダメージを与えるような酸化ストレスなどについても、窒素源の変化と同様のメカニズムが働く可能性があると考えている。当研究室ではすでに、エタノールストレス下で *Gap1* が *Rsp5* 依存的にユビキチン化されエンドサイトーシスを起こすことを報告している。この現象を阻害した変異株、例えば A401E 株、*end3* 破壊株、*bul1/2* 破壊株は、尽くストレス感受性を示す。このことから、原形質膜のタンパク質がストレスにより変性した場合、*Rsp5* によってユビキチン化され、速やかに分解されることが酵母の生存率に寄与すると仮説を立てている。膜タンパク質の変性を証明することは極めて難しいが、*Gap1* の現象をモデルにアイソトープラベルした基質の透過能を測定するなどの実験を駆使し、解析を進めている。これらのメカニズムを解明し、*Rsp5* 自体だけでなく、その上流の制御因子やアダプターの機能を改変することで、酵母にストレス耐性を付与する新たなアプローチが切り拓けると考えている。

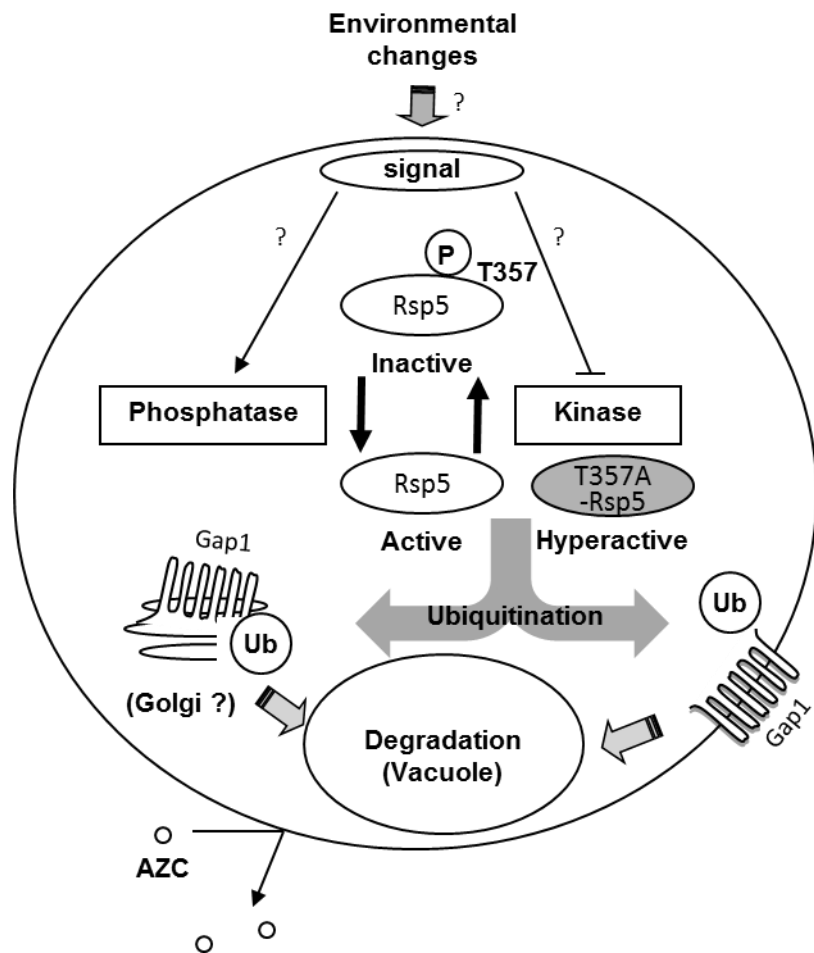


Figure 28. リン酸化依存的な Rsp5 の活性制御機構モデル

Rsp5 の活性は WW2 ドメインの Thr357 のリン酸化で抑制されており、窒素源の種類や濃度の変化など何らかの環境変化に応じて、Rsp5 を基質とするキナーゼが抑制され、ホスファターゼが活性化されるようなシグナル伝達が起こる。しかしながら、刺激をどのように細胞が感知し、シグナル伝達をどのように下流まで伝えているのかは不明である (?). Thr357 の脱リン酸化は Rsp5 の立体構造を局所的に変化させ、原形質膜かゴルジ体で基質 (Gap1) を認識し、ユビキチン化を行う。基質はその後、液泡へ輸送され分解される。興味深いことに、脱リン酸化状態をミミックする T357A-Rsp5 は高い Gap1 ユビキチン化活性を持つため、Thr35-Rsp5 を発現する細胞に AZC 耐性能を付与する。

5. 総括

- ・ 酵母のユビキチンリガーゼをコードする遺伝子 *RSP5* の初めての優性変異である *RSP5*^{T357A} を見出した。*RSP5*^{T357A} は酵母に AZC 耐性を付与する。
- ・ *RSP5*^{T357A} 株 (T357A 株) では、原形質膜上のプロリンパーミターゼである Gap1, Put4, Agp1, Gnp1 が液泡に局在することで AZC 耐性を示していた。
- ・ T357A 株では Put4, Agp1, Gnp1 がエンドサイトーシスを経由し、Gap1 だけがゴルジ体から液泡へ直接輸送される可能性があることを見出した。
- ・ T357A-Rsp5 はその変異によって Gap1 を恒常的にユビキチン化する活性を有しており、液泡に輸送された Gap1 は液泡プロテアーゼによる分解を受ける。Put4, Agp1, Gnp1 も同様にユビキチン化されている可能性が高い。
- ・ Rsp5 の Thr357 がリン酸化されることを明らかにし、プロリンパーミターゼに対するユビキチン化活性のスイッチとして機能する可能性を見出した。
- ・ Rsp5 のアダプタータンパク質 Bul1/2 が T357A-Rsp5 による Gap1 のユビキチン化に関与することを明らかにし、特に Bul2 は T357A-Rsp5 との結合が Rsp5 と比べ強い可能性が示唆された。

6. 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 ストレス微生物科学研究室の高木博史教授に厚くお礼申し上げます。

また、日頃より様々なご助言を下さった同研究室の吉田信行助教（現 静岡大学 工学部 准教授）、大津巖生助教、森ヶ崎 進博士（現 同大学院大学 細胞シグナル研究室 博士研究員）、平石裕之博士（現 米国カンザス州立大学生物学部 博士研究員）、灰谷豊博士（現 タナカ商事株式会社）、大城 聡氏、山下由貴氏（現 カルビー株式会社）をはじめ、一緒に研究生活を過ごした中で成長させていただき、ご討論して下さいました同研究室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。本当に有難うございました。

7. 参考文献

- Abe, F. & Iida, H. (2003) Pressure-induced differential regulation of the two tryptophan permeases Tat1 and Tat2 by ubiquitin ligase Rsp5 and its binding proteins, Bul1 and Bul2. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 7566-7584.
- Alberti, S., Gitler, A.D., & Lindquist, S. (2007) A suite of Gateway cloning vectors for high-throughput genetic analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **24**, 913-919.
- Andréasson, C. & Ljungdahl, P.O. (2002) Receptor-mediated endoproteolytic activation of two transcription factors in yeast. *Genes Dev.* **16**, 3158-3172.
- Andréasson, C., Neve, E.P., & Ljungdahl, P.O. (2004) Four permeases import proline and the toxic proline analogue azetidine-2-carboxylate into yeast. *Yeast* **21**, 193-199.
- De Craene, J.O., Soetens, O., & André, 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.
- Dupre, S., Urban-Grimal, D., & Haguener-Tsapis, R. (2004) Ubiquitin and endocytic internalization in yeast and animal cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1695**, 89-111.
- Grenson, M. (1983) Inactivation-reactivation process and repression of permease formation regulate several ammonia-sensitive permeases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **133**, 135-139.
- Guldener, U., Heck, S., Fielder, T., Beinhauer, J. & Hegemann, J.H. (1996) A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res.* **24**, 2519-2524.

Haitani, Y., Nakata, M., Sasaki, T., Uchida, A. & Takagi, H. (2009) Engineering of the yeast ubiquitin ligase Rsp5: isolation of a new variant that induces constitutive inactivation of the general amino acid permease Gap1. *FEMS Yeast Res.* **9**, 73-86.

Haitani, Y., Shimoi, H. & Takagi, H. (2006) Rsp5 regulates expression of stress proteins via post-translational modification of Hsf1 and Msn4 in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **580**, 3433-3438.

Haitani, Y. & Takagi, H. (2008) Rsp5 is required for the nuclear export of mRNA of HSF1 and *MSN2/4* under stress conditions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Cells* **13**, 105-116.

Helliwell, S.B., Losko, S. & Kaiser, C.A. (2001) Components of a ubiquitin ligase complex specify polyubiquitination and intracellular trafficking of the general amino acid permease. *J. Cell Biol.* **153**, 649-662.

Hesselberth, J.R., Miller, J.P., Golob, A., Stajich, J.E., Michaud, G.A. & Fields, S. (2006) Comparative analysis of *Saccharomyces cerevisiae* WW domains and their interacting proteins. *Genome Biol.* **7**, R30 doi:10.1186/gb-2006-7-4-r30.

Hicke, L. & Riezman, H. (1996) Ubiquitination of a yeast plasma membrane receptor signals its ligand-stimulated endocytosis. *Cell* **84**, 277-287.

Hiraishi, H., Shimada, T., Ohtsu, I., Sato, T. & Takagi, H. (2009) The yeast ubiquitin ligase Rsp5 downregulates the alpha subunit of nascent polypeptide-associated complex Egd2 under stress conditions. *FEBS J.* **276**, 5287-5297.

Hitchcock, A.L., Auld, K., Gygi, S.P. & Silver, P.A. (2003) A subset of membrane-associated proteins is ubiquitinated in response to mutations in the endoplasmic reticulum degradation machinery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 12735-12740.

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. U. S. A.* **100**, 11505-11510.

Huibregtse, J.M., Yang, J.C. & Beaudenon, S.L. (1997) The large subunit of RNA polymerase II is a substrate of the Rsp5 ubiquitin-protein ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 3656-3661.

Janke, C., Magiera, M.M., Rathfelder, N., Taxis, C., Reber, S., Maekawa, H., Moreno-Borchart, A., Doenges, G., Schwob, E., Schiebel, E. & Knop, M. (2004) A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast* **21**, 947-962.

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.

Kota, J. & Ljungdahl, P.O. (2005) Specialized membrane-localized chaperones prevent aggregation of polytopic proteins in the ER. *J. Cell Biol.* **168**, 79-88.

Laney, J.D. & Hochstrasser, M. (2002) Assaying protein ubiquitination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol.* **351**, 248-257.

Lauwers, E., Erpapazoglou, Z., Haguenaer-Tsapis, R. & André, B. (2010) The ubiquitin code of yeast permease trafficking. *Trends Cell Biol.* **20**, 196-204.

Léon, S. & Haguenaer-Tsapis, R. (2009) Ubiquitin ligase adaptors: regulators of ubiquitylation and endocytosis of plasma membrane proteins. *Exp. Cell Res.* **315**, 1574-1583.

Lin, C.H., MacGurn, J.A., Chu, T., Stefan, C.J. & Emr, S.D. (2008) Arrestin-related ubiquitin-ligase adaptors regulate endocytosis and protein turnover at the cell surface. *Cell* **135**, 714-725.

Merhi, A. & André, B. (2012) Internal amino acids promote Gap1 permease ubiquitylation via TORC1/Npr1/14-3-3-dependent control of the Bul arrestin-like adaptors. *Mol. Cell Biol.* **32**, 4510-4522.

Morales, B., Ramirez-Espain, X., Shaw, A.Z., Martin-Malpartida, P., Yraola, F., Sanchez-Tillo, E., Farrera, C., Celada, A., Royo, M. & Macias, M.J. (2007) NMR structural studies of the ItchWW3 domain reveal that phosphorylation at T30 inhibits the interaction with PPxY-containing ligands. *Structure* **15**, 473-483.

Nikko, E. & Pelham, H.R.B. (2009) Arrestin-mediated endocytosis of yeast plasma membrane transporters. *Traffic* **10**:1856-1867.

Nothwehr, S.F., Conibear, E. & Stevens, T.H. (1995) Golgi and vacuolar membrane proteins reach the vacuole in *vps1* mutant yeast cells via the plasma membrane. *J. Cell Biol.* **129**, 35-46.

Novoselova, T.V., Zahira, K., Rose, R.S. & Sullivan, J.A. (2012) Bul proteins, a non-redundant, antagonistic family of ubiquitin ligase regulatory proteins. *Eukaryot. Cell* **11**, 463-470.

O'Donnell, A.F., Apffel, A., Gardner, R.G. & Cyert, M.S. (2010) Alpha-arrestins Aly1 and Aly2 regulate intracellular trafficking in response to nutrient signaling. *Mol. Biol. Cell* **21**, 3552-3566.

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.* **21**, 921-926.

Risinger, A.L., Cain, N.E., Chen, E.J. & Kaiser, C.A. (2006) Activity-dependent reversible inactivation of the general amino acid permease. *Mol. Biol. Cell* **17**, 4411-4419.

Risinger, A.L. & Kaiser, C.A. (2008) Different ubiquitin signals act at the Golgi and plasma membrane to direct GAP1 trafficking. *Mol. Biol. Cell* **19**, 2962-2972.

Roerg, K.J., Bickel, S., Rowley, N. & Kaiser, C.A. (1997) Control of amino acid permease sorting in the late secretory pathway of *Saccharomyces cerevisiae* by *SEC13*, *LST4*, *LST7* and *LST8*. *Genetics* **147**, 1569-1584.

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.

Rotin, D. & Kumar, S. (2009) Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 398-409.

Rubio-Teixeira, M. & Kaiser, C.A. (2006) Amino acids regulate retrieval of the yeast general amino acid permease from the vacuolar targeting pathway. *Mol. Biol. Cell* **17**, 3031-3050.

Sambrook, J. & Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Shenoy, S.K. (2007) Seven-transmembrane receptors and ubiquitination. *Circ. Res.* **100**, 1142-1154.

Smaczynska-de Rooij, II., Allwood, E.G., Aghamohammadzadeh, S., Hettema, E.H., Goldberg, M.W. & Ayscough, K.R. (2010) A role for the dynamin-like protein Vps1 during endocytosis in yeast. *J. Cell Sci.* **123**, 3496-3506.

Soetens, O., De Craene, J.O. & André, B. (2001) Ubiquitin is required for sorting to the vacuole of the yeast general amino acid permease, Gap1. *J. Biol. Chem.* **276**, 43949-43957.

Sudol, M., McDonald, C.B. & Farooq, A. (2012) Molecular insights into the WW domain of the Golabi-Ito-Hall syndrome protein PQBP1. *FEBS Lett.* **586**, 2795-2799.

Springael, J.Y. & André, B. (1998) Nitrogen-regulated ubiquitination of the Gap1 permease of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **9**, 1253-1263.

Springael, J.Y., Galan, J.M., Haguenaer-Tsapis, R., and André, B. (1999) NH⁴⁺-induced down regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* Gap1p permease involves its ubiquitination with lysine-63-linked chains. *J. Cell Sci.* **112**, 1375-1383.

高木博史 (2011) ストレスにおける酵母のユビキチンリガーゼ Rsp5 の役割とその応用. *化学と生物*, **49**, 100-107.

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. U. S. A.* **98**, 7313-7318.

Van Mullem, V., Wery, M., De Bolle, X. & Vandenhaute, J. (2003) Construction of a set of *Saccharomyces cerevisiae* vectors designed for recombinational cloning. *Yeast* **20**, 739-746.

Yashiroda, H., Oguchi, T., Yasuda, Y., Toh-e, A. & Kikuchi, Y. (1996) Bul1, a new protein that binds to the Rsp5 ubiquitin ligase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 3255-3263.

Wang G. Yang J. & Huibregtse JM. (1999) Functional domains of the Rsp5 ubiquitin-protein ligase. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 342-352.

Wang, Y. & Dohlman, H.G. (2006). Regulation of G protein and mitogen-activated protein kinase signaling by ubiquitination: insights from model organisms. *Circ. Res.* **99**, 1305-1314.