

論文内容の要旨

申請者氏名 佐々木 俊弥

細胞は外界の様々な環境変化やストレスに応答し、適応するための機構を備えている。パーミアーゼやレセプター等の原形質膜上のタンパク質のエンドサイトーシスも外界の環境変化に対する応答であるが、真核生物ではユビキチン化が引き金になって行われることが多い。高等生物のモデルとして、またパン類や酒類、バイオエタノール等の製造に重要な酵母 *Saccharomyces cerevisiae* では、多くの場合 Nedd4 ファミリーに属するユビキチンリガーゼ Rsp5 が原形質膜タンパク質のユビキチン化を行っている。しかしながら、Rsp5 自身の活性が制御される機構については明らかになっていない。

当研究室ではこれまでに Rsp5 がストレス耐性に深く関与することを明らかにしている。ストレス下におけるユビキチンシステムの理解と強化をめざし、RSP5 遺伝子にランダム変異を導入したところ、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アゼチジン-2-カルボン酸 (AZC) に対して強い耐性を細胞に付与する変異型 Rsp5 (T357A-Rsp5) を取得した。本研究では、T357A-Rsp5 を発現する株 (T357A 株) の表現型である AZC 耐性に着目し、T357A-Rsp5 が AZC を細胞内に取り込むパーミアーゼの活性を制御する機構を解析した。また、T357A 株の解析を糸口に、「Rsp5 の活性制御機構」を明らかにすることを目的に研究を行った。

蛍光顕微鏡を用いた解析により、T357A 株では、原形質膜上のプロリンパーミアーゼ (Gap1, Put4, Agp1, Gnp1) が液泡に局在しており、Put4, Agp1, Gnp1 がエンドサイトーシスを経由して液泡へ、Gap1 のみがゴルジ体から直接液泡へ、それぞれ輸送される可能性が示された。また、ウェスタンブロッティングにより、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ていることが判明した。また、他のプロリンパーミアーゼも同様にユビキチン化されている可能性が高い。このように、T357A-Rsp5 はプロリンパーミアーゼの活性を恒常的に負に制御していることが明らかになった。

さらに、マウスの Rsp5 オルソログを用いた *in vitro* の実験から、Rsp5 の活性はリン酸化によって制御されていると予測された。そこで、LC-MS 解析と抗リン酸化ペプチド抗体を用いた解析を行ったところ、Rsp5 の基質認識に関わる WW2 ドメイン内の Thr357 がリン酸化されることが明らかになった。また、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しており、特に T357A-Rsp5 は Bul2 との結合が野生型 Rsp5 に比べて強くなっている可能性が示唆された。

以上の結果から、T357A-Rsp5 は恒常活性型変異体であり、Thr357 がリン酸化されることが判明した。また、T357A-Rsp5 は恒常的に Gap1 のユビキチン化活性を持つことから、Rsp5 は分子内のリン酸化状態が Bul1/2 との結合能に影響を与え、ユビキチン化活性の on/off スイッチとして働くことで活性が制御されている可能性が示された。

(別紙 2)

論文審査結果の要旨

申請者氏名 佐々木 俊弥

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は発酵生産環境において、エタノール、浸透圧、冷凍、高温、乾燥、酸化等のストレスを複合的に受けている。Nedd4 ファミリーに属する酵母のユビキチンリガーゼ Rsp5 は生育に必須であり、上記のストレス下において重要な役割を担っている。申請者はストレス下における Rsp5 の機能解析とその強化を目的に分離した変異株 (T357A-Rsp5) を解析し、以下に示す新たな結果や重要な知見を得た。

- 1) T357A-Rsp5 を発現する株 (T357A 株) は、原形質膜上のプロリンパーミアーゼである Gap1, Put4, Agp1, Gnp1 が液泡に局在することで、プロリンの毒性アナログ (AZC) の細胞内への取込みが減少し、強い耐性を示すことを明らかにした。
- 2) T357A 株では、原形質膜上のプロリンパーミアーゼ (Gap1, Put4, Agp1, Gnp1) が液泡に局在しており、Put4, Agp1, Gnp1 がエンドサイトーシスを経由して液泡へ、Gap1 のみがゴルジ体から直接液泡へ、それぞれ輸送される可能性を示した。
- 3) 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 が液泡プロテアーゼによる分解を受けていることを明らかにした。Put4, Agp1, Gnp1 も同様にユビキチン化されている可能性が高い。
- 4) LC-MS 解析と抗リン酸化ペプチド抗体を用いた解析を行い、Rsp5 の基質認識に関わる WW2 ドメイン内の Thr357 がリン酸化されることを明らかにした。
- 5) 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 T357A-Rsp5 は Bul2 との結合が野生型 Rsp5 に比べて強くなっている可能性を示した。

以上の結果から、Rsp5 は分子内のリン酸化状態が Bul1/2 との結合能に影響を与え、ユビキチン化活性の on/off スイッチとして働くことで活性が制御されているモデルを提唱した。本論文は、酵母で唯一の Nedd4 ファミリー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。リン酸化される Thr 残基は Nedd4 ファミリー型ユビキチンリガーゼの WW ドメインに高度に保存されており、高等生物においても同様の制御機構が存在する可能性も考えられる。ユビキチンリガーゼは神経変性疾患やガンなど多くの病気と関連しており、今回の知見は Nedd4 ファミリーに関連した疾病の原因や治療法の開発に重要な示唆を与え得る。また、WW ドメインの改変やリン酸化状態の制御によって、Rsp5 のユビキチン化活性を人為的に変化させることが期待できるため、ストレス下で生成する異常タンパク質の分解能を高めた変異型 Rsp5 の創製により、ストレス耐性の向上した産業酵母が育種できる可能性が示された。

以上のように、本論文は Rsp5 で初めて単離した恒常活性型変異体 (T357A-Rsp5) の分子機構を解析し、Rsp5 の活性制御機構の一端を明らかにしたものであり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士 (バイオサイエンス) の学位論文として価値あるものと認めた。