

酵母ユビキチンリガーゼ Rsp5 による
細胞膜タンパク質の品質管理機構

志賀 岳希

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 28 年 1 月 19 日提出

目次

1. 序論	4
2. 材料と方法	12
2-1. 培地	12
2-2. 菌株	12
2-3. プラスミド	15
2-4. Gap1 の免疫沈降とユビキチン化検出	19
2-5. 蛍光顕微鏡観察	20
2-6. スポットテストによるストレス耐性評価	20
2-7. Rsp5 とアダプタータンパク質の共免疫沈降	20
2-8. リアルタイム PCR	21
2-9. DNA マイクロアレイ解析	21
2-10. Snf1 のウェスタンブロッティング	22
2-11. 生育曲線	22
2-12. Art1 のウェスタンブロッティング	22
2-13. 発酵試験	23
2-14. その他	23
3. 結果	24
3-1. 細胞膜タンパク質の品質管理機構の解析	24
3-1-1. エタノールストレスによる Gap1 のユビキチン化	24
3-1-2. アダプタータンパク質 Bul1, Bul2, Bul3 が Gap1 の局在に 及ぼす影響	28
3-1-3. Bul1, Bul2 非依存的なユビキチン化が Gap1 の局在に 及ぼす影響	30
3-1-4. ストレス下での PMQC に関与する新規アダプター タンパク質の探索	32
3-1-5. アダプタータンパク質 Art1, Art3, Art6 が Gap1 の 局在性に及ぼす影響	35
3-1-6. エタノールストレス以外の環境ストレス下での Gap1 の局在	37
3-1-7. アダプタータンパク質 Bul1, Bul2, Art1 がエタノールストレス	

以外の環境ストレス下での <i>Gap1</i> の局在に及ぼす影響	39
3-1-8. <i>Rsp5</i> とアダプタータンパク質の相互作用解析	41
3-1-9. エタノールストレス下での各種細胞膜タンパク質の局在	45
3-2. <i>Art1</i> が関与する <i>PMQC</i> 以外のストレス応答機構	47
3-2-1. エンドサイトーシス欠損株での <i>ART1</i> 遺伝子破壊の影響	47
3-2-2. <i>Rsp5</i> およびアダプタータンパク質がストレス応答 遺伝子発現に及ぼす影響	49
3-2-3. <i>ART1</i> 遺伝子破壊株のトランスクリプトーム解析	53
3-2-4. <i>Snf1</i> の分解に対する <i>Art1</i> の影響	63
3-2-5. ストレス下における生育曲線	65
3-2-6. 酵母の発酵能に対する <i>Art1</i> の影響	68
4. 考察	71
5. 総括	82
6. 謝辞	83
7. 参考文献	84

1. 序論

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、高等真核生物のモデル生物として知られ、様々な基礎研究で用いられている微生物である。同時に、古くからパン類や酒類などの発酵食品の生産に用いられ、近年ではバイオエタノールの生産にも利用されている産業上重要な微生物でもある。酵母は発酵生産プロセスにおいて、高濃度エタノール、高温、冷凍、乾燥、高浸透圧などの複合的な環境ストレスに長期間曝されているため、有用機能の発現（エタノール生産、炭酸ガス発生、味・風味成分の生成など）が制限されている。一方、生物にはそのような環境ストレス下においても生存するための適応機構が存在し、酵母を含む多くの生物種で保存されている。例えば、環境ストレス下では多くの細胞内及び細胞表面のタンパク質が変性し、異常タンパク質が生成するが、細胞はこれに対して、熱ショックタンパク質などの分子シャペロンによる修復、ユビキチン-プロテアソーム系や液胞、オートファジーによる分解といった異常タンパク質の除去システムによって対処している（Hershko & Ciechanover, 1998; Teter & Klionsky, 2000）。しかしながら、その詳細な分子機構には未だ不明な点も多い。当研究室ではこれまで、酵母に見出した新しいストレス応答機構を解明し、得られた基礎的知見を優れたストレス耐性と発酵能を備えた産業酵母の育種へ応用することを目標に研究を行っており、ユビキチンシステムによる異常タンパク質の除去機構についても研究を進めている。

ユビキチンシステム

ユビキチンは真核生物に広く保存された 76 個のアミノ酸残基からなる小さなタンパク質であり、他のタンパク質に共有結合することで翻訳後修飾を行っている（Hershko & Ciechanover, 1998）。ユビキチン化は、多くの場合リソソーム（植物・酵母では液胞）やプロテアソームにおける基質タンパク質の分解を誘導するが、シグナル伝達やタンパク質の細胞内輸送にも関与している（Hershko & Ciechanover, 1998; Finley, 2001; Helliwell *et al.*, 2001）。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、これによって基質タンパク質へのユビキチンの共有結合が触媒される（Finley *et al.*, 2012）（Fig. 1-1）。ユビキチンは基質の Lys 残基に結合するが、その形式は様々で、1 つの Lys 残基にユビキチン 1 分子が結合するモノユビキチン化、複数の Lys 残基に 1 つずつユビキチン

が結合するマルチユビキチン化、1つの Lys 残基にユビキチンの多量体が結合し、ポリユビキチン鎖を形成するポリユビキチン化等がある (Fig. 1-1)。特にポリユビキチン鎖形成時には、ユビキチン単量体どうしが、ユビキチン分子内の7つの Lys 残基 (K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63) の内、どの Lys 残基に結合するかによって、ポリユビキチン化の果たす役割が異なっており、例えばプロテアソームによる基質の分解は、K48 を介したポリユビキチン化によって誘導されることが知られている (Peng *et al.*, 2003; Pickart & Fushman, 2004)。

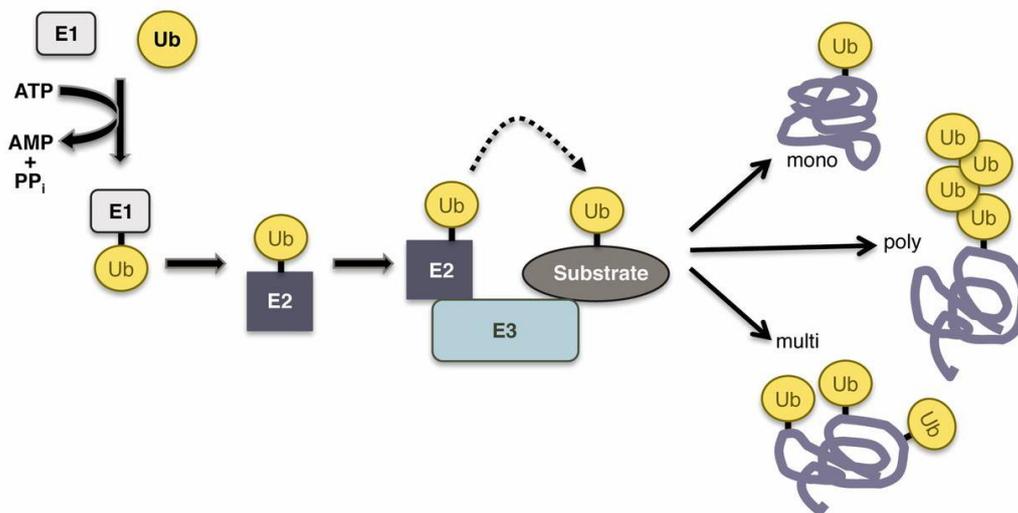


Figure 1-1. ユビキチン化の概略

まず始めに、E1 が ATP 依存的に自身の Cys 残基とユビキチン C 末端の Gly 残基との間で、高エネルギーチオエステル結合を形成しユビキチンを活性化する。続いて E2 が活性化ユビキチンを、自身の Cys 残基と高エネルギーチオエステル結合させることによって受け取る。最終的に E3 が E2 と結合したユビキチンを、基質の Lys 残基へと結合し、基質のユビキチン化が行われる (Finley *et al.*, 2012)。

ユビキチンリガーゼ Rsp5

ユビキチン化の反応プロセスにおいて、実際に基質にユビキチンを付加する役割を有しているのが E3 である。E3 は非常に多くの種類が報告されているが、大きく分類すると、E2 からユビキチンを自身の HECT ドメインに転移させた後、基質をユビキチン化する HECT 型と、E2 からユビキチンを直接基質に転移させるそれ以外 (RING 型、Ubox 型など) の型に分けることができる (Finley *et al.*, 2012)。Rsp5 は前者の HECT 型ユビキチンリガーゼであり、酵母においては唯一、Nedd4 ファミリーに属している。Nedd4 ファミリーは酵母からヒトまで広く保存されており、イオンチャネルやレセプターなどの細胞膜タンパク質をはじめ、様々なタンパク質のユビキチン化によって、タンパク質の輸送やシグナル伝達に関与している重要な E3 である (Rotin & Kumar, 2009)。出芽酵母の Rsp5 も、多くの細胞膜タンパク質をユビキチン化することが知られているほか (Nikko & Pelham, 2009)、生育に不可欠なオレイン酸合成に関わる脂肪酸不飽和化酵素をコードする *OLE1* 遺伝子の転写因子 Spt23 のユビキチン化と部分分解による活性化を誘導しており、酵母の生存に必須の E3 である (Hoppe *et al.*, 2000)。Nedd4 ファミリーの E3 は、上述の HECT ドメイン以外に、共通して 1~4 個の「WW ドメイン」と呼ばれる基質認識ドメインを有している (Shearwin-Whyatt *et al.*, 2006)。この WW ドメインは、基質中の PY (または PXY; X は任意のアミノ酸) モチーフと呼ばれる短いペプチド配列を認識、結合することができ、Rsp5 には 3 つ存在している (Fig. 1-2A)。また、Rsp5 が PY モチーフを持たない基質と相互作用する際には、アダプタータンパク質による仲介を必要とする (Leon & Haguener-Tsapis, 2009; Novoselova *et al.*, 2012) (Fig. 1-2B)。例えば、PY モチーフが存在する Bul1/Bul2 タンパク質は、Rsp5 と相互作用することが報告されており (Yashiroda *et al.*, 1996)、Rsp5 のアダプタータンパク質として、アミノ酸パーミアーゼ Gap1 のユビキチン化と輸送に関与している (Helliwell *et al.*, 2001; Soetens *et al.*, 2001)。他にも、arrestin-related trafficking adaptors (Arts) と呼ばれる 10 個のアレスチン様タンパク質 (Art1-10) が、それぞれ Rsp5 のアダプタータンパク質として様々な細胞膜タンパク質のユビキチン化とエンドサイトーシスに関与することが知られている (Lin *et al.*, 2008; Nikko & Pelham, 2009)。例えば、細胞膜上の酸性アミノ酸 (アスパラギン酸、グルタミン酸) トランスポーターとして知られる Dip5 のエンドサイトーシスは、カルシニューリン依存的に Art6 タンパク質が仲介していることが報告されている (O'Donnell *et al.*, 2013)。しかし各アダプタータンパク質の使い分けについては未だ解明には至っていない。

当研究室では過去に、アミノ酸のプロリンによる酵母のストレス耐性機構を研究する過程で、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 (azetidine-2-carboxylic acid; AZC) に高い感受性を示す変異株を取得した (Hoshikawa *et al.*, 2003)。AZC は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すると考えられている。解析の結果、この変異株には、Rsp5 をコードする遺伝子 (*RSP5*) に変異が入り、アミノ酸置換 (Ala401Glu) が生じていた。AZC は細胞膜上の主に Gap1 を介して酵母の細胞内に取り込まれるが (Hoshikawa *et al.*, 2003)、Rsp5 は Gap1 のユビキチン化とエンドサイトーシスに必要である (De Craene *et al.*, 2001; Springael & André, 1998; Lin *et al.*, 2008)。この Rsp5 変異株 (*rsp5*^{A401E} 変異株) では、Gap1 がユビキチン化されず、細胞膜上で安定に存在し続けるため、AZC が過剰に細胞内に流入し、高い感受性を示すことが明らかになった (Hoshikawa *et al.*, 2003)。また興味深いことに、*rsp5*^{A401E} 変異株は高温やエタノール、過酸化水素などタンパク質を変性させ、異常タンパク質の生成を誘導するストレスに対しても感受性を示した (Hoshikawa *et al.*, 2003)。これらのことから、当研究室では、Rsp5 がストレス下で生じた異常タンパク質の処理に関与しているとの仮説を提唱し、その詳細な分子機構の解明を目指している。また、その研究過程で得られた基礎的な知見を、強いストレス耐性を示し、かつ発酵能の高い産業酵母の育種に応用することも試みている (Ogata *et al.*, 2012)。

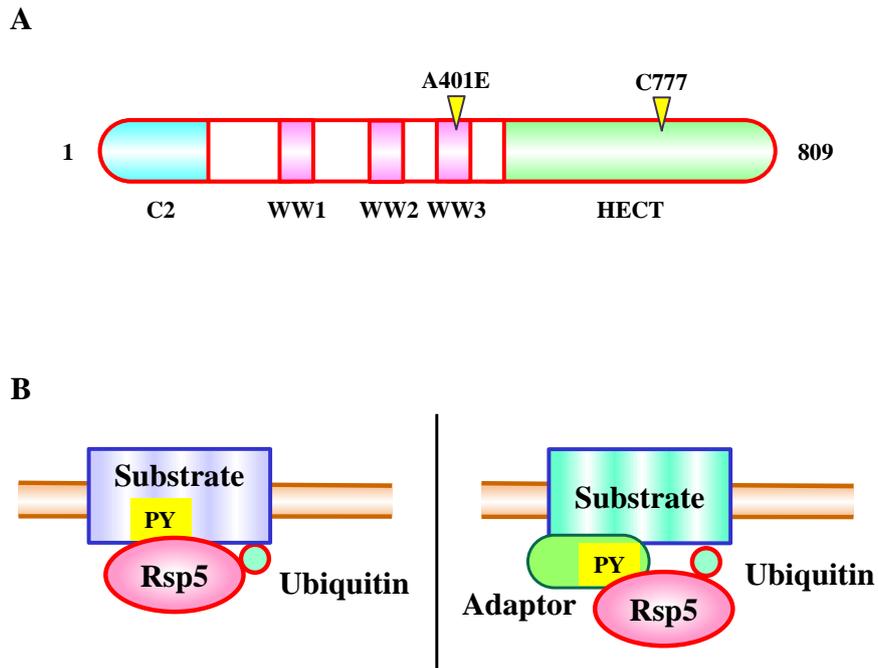


Figure 1-2. Rsp5 の構造及び基質認識の概略図

A) Rsp5 の構造。N 末端側にある C2 ドメインはリン脂質結合ドメインであり、膜結合に用いられると考えられているが、未だ詳細な機能解析はなされていない。WW ドメイン (WW1~3) は基質認識ドメインであり、基質中の PY モチーフとの結合に用いられる。*rsp5*^{A401E} 変異株ではこのうち WW3 ドメインにアミノ酸置換 (Ala401Glu) が生じている。C 末端の HECT ドメインは、E2 からユビキチンを Cys777 で受け取り、基質をユビキチン化する触媒ドメインである。B) Rsp5 による基質認識様式。基質中に PY モチーフが存在する場合、Rsp5 が直接基質と結合し、ユビキチン化を行うことができる (左)。基質に PY モチーフが存在しない場合、PY モチーフを有するアダプタータンパク質が Rsp5 と基質との相互作用を仲介することで、ユビキチン化を行う (右)。

細胞膜タンパク質の品質管理 (plasma membrane quality control; PMQC)

酵母が高温や酸化など細胞内に異常タンパク質の生成が誘導されるようなストレスに曝され、核や細胞質中のタンパク質が変性した場合、それらの異常タンパク質は San1 や Hul5 といった E3 によってユビキチン化され、プロテアソームによって分解される (Heck *et al.*, 2010; Fang *et al.*, 2011)。また、小胞体に

においてミスフォールド化したタンパク質は、小胞体関連分解（endoplasmic reticulum-associated degradation; ERAD）によってユビキチン-プロテアソーム系を介して分解される（Hirsch *et al.*, 2009; Ellgaard & Helenius, 2003）。このようなタンパク質の品質管理（protein quality control; PQC）機構が知られる一方、環境ストレスに対して最初に、かつ直接的に曝される細胞膜タンパク質の品質管理（PMQC）に関しては、近年になって少しずつ報告されてきた。異常タンパク質が ERAD を通過してそのまま細胞膜へと運ばれた場合、それらがユビキチン化され、エンドサイトーシスを経て除去されることは分かっているが（Li *et al.*, 1999; Okiyoneda *et al.*, 2010; Apaja *et al.*, 2010）、細胞膜上の異常タンパク質の認識機構等については、未だ詳細な分子機構に関する知見は乏しい（MacGurn, 2014）。シグナル伝達を担うレセプターなどの細胞膜タンパク質の変性は、下流のシグナル伝達経路の攪乱を招く恐れもあり、PMQC が正常に機能することは、正常な細胞機能の維持に不可欠であると考えられる。例えば、哺乳類の E3 である CHIP は、変性した嚢胞性線維症膜コンダクタンス制御因子（cystic fibrosis transmembrane conductance regulator; CFTR）のユビキチン化を介したエンドサイトーシスとリソソームでの分解を誘導することが報告されており、PMQC を担う E3 であると考えられている（Okiyoneda *et al.*, 2010）。そして、この CHIP の変異は、ヒトの小脳性運動失調との関連が報告されている（Shi *et al.*, 2013）。

酵母においては、多くの細胞膜タンパク質をユビキチン化している Rsp5 が、PMQC を担う E3 であることが示唆されている。例えば、高温ストレスや過酸化水素ストレス下において、Lyp1、Mup1 といったアミノ酸トランスポーターやウラシルのトランスポーター Fur4 が、Rsp5 の働きによってエンドサイトーシスを受け、液胞に輸送されることが示された（Keener & Babst, 2013; Zhao *et al.*, 2013）。当研究室においても、エタノールストレスによって Gap1 のエンドサイトーシスが誘導されることや、エンドサイトーシス経路欠損株が野生型株よりエタノールに対する感受性が高いこと、*rsp5*^{A401E} 変異株では硫酸アンモニウムやエタノールによって誘導される Gap1 のエンドサイトーシスが抑制され、かつストレス耐性が著しく低いことを見出している（Hoshikawa *et al.*, 2003; 鈴木, 2011）（Fig. 1-3）。これらの事実は、酵母細胞が正常な機能を維持する上で、Rsp5 と PMQC が重要な役割を担っていることを物語っている。

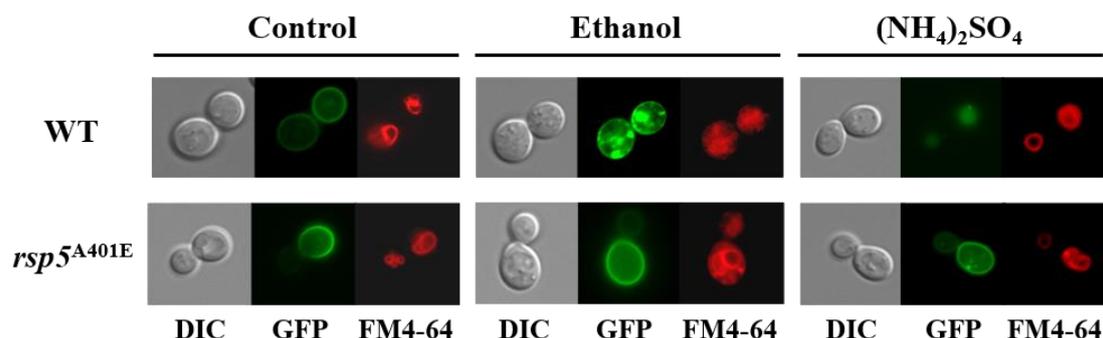


Figure 1-3. *rsp5*^{A401E} 変異株における Gap1 の局在

Gap1-yEGFP 融合タンパク質を発現させた野生型株と *rsp5*^{A401E} 変異株に対して、15% エタノールストレス、及び Gap1 のユビキチン化とエンドサイトーシスを誘導することが知られている硫酸アンモニウム (50 mM) を添加した。2 時間後、蛍光顕微鏡を用いて Gap1-yEGFP の局在を観察した。また、観察の際には液胞を FM4-64 によって染色した。野生型株では、エタノールストレス及び硫酸アンモニウムによって Gap1 がエンドサイトーシスされ、液胞に蓄積している様子が観察されるが、*rsp5*^{A401E} 変異株においては Gap1 が細胞膜上に維持され続けている (鈴木, 2011 を改変)。

酵母のストレス耐性と発酵能

酵母は、製パン、醸造、バイオ燃料生産などの発酵産業において広く利用されており、その発酵能を向上させるための研究が盛んに行われている。例えば、酵母に強いストレス耐性を付与することは有効な手法の一つである。酵母は発酵生産過程やドライイーストなどの製造過程において、高濃度エタノールや冷凍、乾燥、高浸透圧などの環境ストレスに曝されている (Attfield, 1997)。例えば、エタノールは酵母が発酵によって生成する産物である一方、細胞膜やタンパク質を損傷させ、酵母の生育、生存、発酵能を阻害する代表的な環境ストレスでもある (Attfield, 1997; Gibson *et al.*, 2007; Ma & Liu, 2010)。そのため、酵母のエタノール耐性を強化することで、発酵能を向上させる試みが行われており、当研究室でもプロリンの蓄積やストレス応答性転写因子 Msn2 の過剰発現によって、酵母のエタノール耐性と発酵能が向上することを報告している (Takagi *et al.*, 2005; Watanabe *et al.*, 2009)。また、Rsp5 の過剰発現も、エタノールや高温、高浸透圧ストレスなどに対する酵母の耐性を向上させることから

(Hiraishi et al., 2006; Ogata et al., 2012)、特に高温で行うことが好ましい同時糖化発酵によるバイオエタノール生産への応用が期待されている (Shahsavarani et al., 2012)。これまでに、*rsp5*^{A401E} 変異株において、Msn2 のパラログである Msn4 や、Hsf1 といったストレス応答性転写因子と、その下流の熱ショックタンパク質などのストレス応答遺伝子の発現が低下していることも明らかになっており (Haitani et al., 2006)、Rsp5 によるストレス応答機構と酵母の発酵能との関連性については、さらなる解析が望まれる。

以上のように、Rsp5 による PMQC は、その詳細な分子機構の解析が未だ十分に進んでいるとは言い難い状況であるが、酵母が過酷な環境で生存する上で重要なストレス応答機構である。また、Rsp5 が酵母のストレス耐性に深く関与することから、Rsp5 が酵母の発酵能にも寄与する可能性があり、ストレス下における Rsp5 の生理機能の解明は、基礎研究のみならず、産業応用の面からも意義深いものである。しかし、RSP5 の過剰発現によって酵母のストレス耐性は向上するものの (Shahsavarani et al., 2012)、実現可能な発現量に関しては、比較的低いコピー数 (約 6 コピー) で酵母の生育を阻害してしまうことが知られており (dosage-sensitive genes) (Makanae et al., 2013)、単純な過剰発現という方法では限界がある。そのため、Rsp5 そのものに加え、Rsp5 を介したストレス応答の全体像についても解析することが、より効果的かつ精密な制御が可能なストレス耐性、発酵能の向上技術の開発に不可欠であると考えられる。

本研究では、酵母の発酵生産環境における代表的なストレスであるエタノールを用い、ストレス下での Gap1 のユビキチン化とエンドサイトーシスを指標にして、PMQC の分子機構と、そこに関わる因子の解析を行った。また、その過程で、Rsp5 とアダプタータンパク質による転写レベルと翻訳後レベルからなる二重のタンパク質品質管理モデルを提唱し、その検証を行った。さらに、応用研究の一環として、アダプタータンパク質が酵母の発酵能に及ぼす影響についても解析した。

2. 材料と方法

2-1. 培地

酵母菌株の培養には YPD 培地 (2% glucose, 2% pepton, 1% yeast extract)、合成最少 (SD) 培地 (2% glucose, 0.17% Bacto yeast nitrogen base w/o amino acids and ammonium sulfate, 0.5% ammonium sulfate)、SD 培地に必要に応じて各種アミノ酸 (drop-out mix) を加えた完全合成 (SC) 培地 (Rose *et al.*, 1990)、SC 培地のグルコースの代わりにガラクトースを用いた SG 培地、および SD 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アラントインを用いた (SD-N+Alt) 培地 (2% glucose, 0.17% Bacto yeast nitrogen base w/o amino acids and ammonium sulfate, 0.1% allantoin)、SD-N+Alt 培地のグルコースをガラクトースと置き換えた SG-N+Alt 培地を使用した。必要に応じて YPD 培地に hygromycin B (100 µg/ml)、G418 二硫酸塩 (150 µg/ml)、nourseothricin (clonNAT, 100 µg/ml)、5-フルオロオロチン酸 (5-FOA, 1 mg/ml) を加え、選択培地として用いた。また、エタノール、過酸化水素、塩酸、水酸化カリウムを含有した YPD 培地も使用した。発酵試験には、SC-Leu 培地のグルコース濃度を 20% に変更したものを用いた。

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% 寒天を添加して固体培地とした。

2-2. 菌株

生物遺伝資源センター (NBRC) から分譲していただいた BY4741 (*MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*) 株を酵母 *S. cerevisiae* の野生型株として用いた。また、Open Biosystems 社が販売している BY4741 株の 1 遺伝子破壊ライブラリーである Yeast *MATa* collection (YSC1053, glycerol stock) から 1 遺伝子破壊株を必要に応じて用いた。

END3 破壊株と *END3*, *ART1* 二重破壊株は、野生型株を親株に、各々 pRS415-*CgHIS3*, *MET15*、pYM13 を鋳型として、プライマー対 end3D by *MET15 F* 及び end3D by *MET15 Rv*、art1D kanMX4 Fw 及び art1D kanMX4 Rv をそれぞれ用いて PCR で増幅した各遺伝子の破壊断片によって形質転換することで作製した。*BUL1*, *BUL2*, *ART1* 三重破壊株は、*BUL1*, *BUL2* 二重破壊株 (TSY264) を親株に、pYM13 を鋳型として、プライマー対 art1D kanMX4 Fw 及び art1D kanMX4 Rv を

用いて作製した破壊断片によって同様に作製した。*ART3*, *ART6* 二重破壊株は、*ART3* 破壊株 ($\Delta art3$) を親株に、pFA6-*natNT2* を鋳型に、プライマー対 dART6-*natNT2* Fw 及び dART6-*natNT2* Rv を用いて作製した破壊断片によって同様に作製した。*BUL1*, *BUL2*, *ART3*, *ART6* 四重破壊株は、先に作製した *ART3*, *ART6* 二重破壊株を親株に、pFA6-*hphNT1* を鋳型に、プライマー対 *BUL1*-S1 及び *BUL1*-S2 を用いて作製した破壊断片によって *BUL1* 遺伝子を破壊した後、さらに p3009 を鋳型に、プライマー対 dBUL2-*loxP* Fw2 及び dBUL2-*loxP* Rv2 を用いて作製した破壊断片によって *BUL2* 遺伝子を破壊し、Guldener らの手法 (Guldener *et al.*, 1996) に則って Cre/*loxP* システムを用い、*HIS3* 遺伝子を切り出して作製した。*END3* 破壊株は SC-Met 培地で、*END3*, *ART1* 二重破壊株と *BUL1*, *BUL2*, *ART1* 三重破壊株は G418 二硫酸塩 (150 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を含んだ YPD 培地で、*ART3*, *ART6* 二重破壊株は clonNAT (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を含んだ YPD 培地で、*BUL1*, *BUL2*, *ART3*, *ART6* 四重破壊株は hygromycin B (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) あるいは 5-FOA (1 mg/ml) を含んだ YPD 培地及び SC-His 培地で選択した。

ART1-HA 株は、pYM24 を鋳型に、プライマー *ART1*-S3 Fw 及び *ART1*-S2 Rv を用いて PCR で増幅した断片で野生型株を形質転換後、hygromycin B を含む YPD 培地で選択することで作製した。

大腸菌株については、DH5 α [*F* λ - Φ 80*lacZ* Δ *M15* Δ (*lacZYA argF*) *U169 deoR recA1 endA1 hsdR17*(*r_k⁻m_k⁺*) *supE44 thi-1 gyrA96 relA1*] 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>	NBRC
TSY259	BY4741 <i>rsp5^{A401E}</i>	(Sasaki & Takagi, 2013)
TSY262	BY4741 <i>bul1::hphNT1</i>	(Sasaki & Takagi, 2013)
TSY263	BY4741 <i>bul2::natNT2</i>	(Sasaki & Takagi, 2013)
TSY264	BY4741 <i>bul1::hphNT1 bul2::natNT2</i>	(Sasaki & Takagi, 2013)
YSY001	BY4741 <i>bul3::kanMX4</i>	(清水, 2013)
YSY002	BY4741 <i>bul1::hphNT1 bul3::kanMX4</i>	(清水, 2013)
YSY003	BY4741 <i>bul2::natNT2 bul3::kanMX4</i>	(清水, 2013)
$\Delta bul1/2/3$	BY4741 <i>bul1::hphNT1 bul2::natNT2 bul3::kanMX4</i>	(清水, 2013)
$\Delta art1$	BY4741 <i>art1::kanMX4</i>	Open Biosystems
$\Delta art2$	BY4741 <i>art2::kanMX4</i>	Open Biosystems
$\Delta art3$	BY4741 <i>art3::kanMX4</i>	Open Biosystems
$\Delta art4$	BY4741 <i>art4::kanMX4</i>	Open Biosystems
$\Delta art5$	BY4741 <i>art5::kanMX4</i>	Open Biosystems
$\Delta art6$	BY4741 <i>art6::kanMX4</i>	Open Biosystems
$\Delta art7$	BY4741 <i>art7::kanMX4</i>	Open Biosystems
$\Delta art8$	BY4741 <i>art8::kanMX4</i>	Open Biosystems
$\Delta art9$	BY4741 <i>art9::kanMX4</i>	Open Biosystems
$\Delta art10$	BY4741 <i>art10::kanMX4</i>	Open Biosystems
$\Delta bul1/2 \Delta art1$	BY4741 <i>bul1::hphNT1 bul2::natNT2 art1::kanMX4</i>	This study
$\Delta art3/6$	BY4741 <i>art3::kanMX4 art6::natNT2</i>	This study
$\Delta bul1/2 \Delta art3/6$	BY4741 <i>bul1::hphNT1 bul2::loxP art3::kanMX4 art6::natNT2</i>	This study
$\Delta end3$	BY4741 <i>end3::MET15</i>	This study
$\Delta art1 \Delta end3$	BY4741 <i>art1::kanMX4 end3::MET15</i>	This study
ART1-HA	BY4741 <i>ART1::ART1-3HA-hphNT1</i>	This study

2-3. プラスミド

pRS416 (Stratagene) 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) 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。

p3009 (Sugiyama *et al.*, 2005) は National BioResource Project (NBRP) から再配布されたプラスミドで、*loxP-HIS3-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。

pSH47 (Guldener *et al.*, 1996) は National BioResource Project (NBRP) から再配布されたプラスミドで、*GALI* プロモーターの下流に Cre 組換え酵素の遺伝子が挿入されている。発現した Cre 組換え酵素による *loxP* 配列間の組換え反応を利用し、*loxP* 配列に挟まれた遺伝子の切り出しに用いる。

pDONR221 (Invitrogen) は Gateway technology による相同組換えを利用したクローニング用のプラスミドで、*attP1-ccdB-Cm^R-attP2* 配列を持ち、BP 酵素を用いた *in vitro* 組換え反応に用いることができる。また大腸菌の複製起点および選択マーカーとしてカナマイシン耐性遺伝子を含む。

pAG415-*P_{GPD}-ccdB-T_{CYC1}*, pAG415-*P_{GPD}-ccdB-HA-T_{CYC1}*, pAG416-*P_{GALI}-ccdB-yEGFP-T_{CYC1}* (Addgene) は Gateway technology による相同組換えを利用したクローニングに使用するプラスミドで、*P_{GALI}-attR1-Cm^R-ccdB-attR2-yEGFP-T_{CYC1}* または *P_{GDP}-attR1-Cm^R-ccdB-attR2-T_{CYC1}* または *P_{GPD}-attR1-Cm^R-ccdB-attR2-HA-T_{CYC1}* 配列を有しており、LR 酵素を用いた *in vitro* 組換え反応に用いることができる。また、大腸菌の複製起点および選択マーカーとしてアンピシリン耐性遺伝子を含む。

pYM13 は G418 耐性遺伝子 *kanMX4* 配列を持ち、遺伝子破壊の際の鋳型として用いた。PCR-toolbox (Janke *et al.*, 2004) から用いた。

pYM24 は 3HA 配列と hygromycin B 耐性遺伝子 *hphNT1* 配列を持ち、標的遺伝子の C 末端側に 3HA 配列を付加する際に用いる。PCR-toolbox (Janke *et al.*, 2004) から用いた。

pFA6-*hphNT1* は hygromycin B 耐性遺伝子 *hphNT1* 配列を持ち、遺伝子破壊の際の鋳型として用いた。PCR-toolbox (Janke *et al.*, 2004) から用いた。

pFA6-*natNT2* は nourseothricin 耐性遺伝子 *natNT2* 配列を持ち、遺伝子破壊の

際の鋳型として用いた。PCR-toolbox (Janke *et al.*, 2004) から用いた。

pMK088 (Fujii *et al.*, 2009 ; 京都大学の北畠 真博士より分譲) は YEp 型のプラスミドで 2 μ DNA の複製起点と、酵母の選択マーカー *HIS3* 遺伝子、大腸菌の複製起点と選択マーカーのアンプシリン耐性遺伝子を含んでいる。P_{CUPI}-Myc-Ubi-T_{CYC1} 配列を有し、銅により Myc タグ融合ユビキチンの発現が誘導される。

pMK089 (Fujii *et al.*, 2009 ; 京都大学の北畠 真博士より分譲) は YEp 型のプラスミドで 2 μ DNA の複製起点と、酵母の選択マーカー *HIS3* 遺伝子、大腸菌の複製起点と選択マーカーのアンプシリン耐性遺伝子を含んでいる。P_{CUPI}-Ubi-T_{CYC1} 配列を有し、銅により (タグなし) ユビキチンの発現が誘導される。

pRS41MET15 (研究室保有) は pRS416 上の *URA3* 遺伝子を *MET15* 遺伝子に置換している。

pRS415-Cg*HIS3*, *MET15* (研究室保有) は pRS415 に *C. glabrata* 由来 *HIS3* 遺伝子と *MET15* 遺伝子が組み込まれている。

pRS416-P_{GALI}-*GAP1*-yEGFP-T_{TEF1}, pRS416-P_{GALI}-*gap1*^{K9R}-yEGFP-T_{TEF1}, pRS416-P_{GALI}-*gap*^{K16R}-yEGFP-T_{TEF1}, pRS416-P_{GALI}-*gap1*^{K9R/K16R}-yEGFP-T_{TEF1} (研究室保有) は *GALI* プロモーター (Frolova *et al.*, 1999) が組み込まれており、ガラクトースによって、各々 *GAP1*-yEGFP, *gap1*^{K9R}-yEGFP, *gap1*^{K16R}-yEGFP, *gap1*^{K9R/K16R}-yEGFP の発現を誘導できる。

pDONR221-*ART1* は本研究において、BP 酵素を用いた *in vitro* 組換え反応によって、pDONR221 上の attP1-*ccdB*-Cm^R-attP2 配列を、Yeast ORF collection (Open Biosystems) の BG1805-*ART1* が持つ attL1-*ART1*-attL2 配列に置換することで作製した。

pDONR221-*SNF1* は本研究において、BP 酵素を用いた *in vitro* 組換え反応によって、pDONR221 上の attP1-*ccdB*-Cm^R-attP2 配列を、Yeast ORF collection (Open Biosystems) の BG1805-*SNF1* が持つ attL1-*SNF1*-attL2 配列に置換することで作製した。

pAG415-P_{GPD}-*ART1*-T_{CYC1} は本研究において、pDONR221-*ART1* と pAG415-P_{GPD}-*ccdB*-T_{CYC1} の LR 酵素を用いた *in vitro* 組換え反応によって作製した。*ART1* 遺伝子の ORF 上流に GPD (*TDH3*) プロモーター、下流に *CYC1* ターミネーターが存在しており、恒常的に高発現を行うことができる。

pAG415-P_{GPD}-*ART1*-HA-T_{CYC1} は本研究において、pDONR221-*ART1* と pAG415-P_{GPD}-*ccdB*-HA-T_{CYC1} の LR 酵素を用いた *in vitro* 組換え反応によって作製した。*ART1*-HA 融合遺伝子の ORF 上流に GPD (*TDH3*) プロモーター、下流に *CYC1*

ターミネーターが存在しており、恒常的に高発現を行うことができる。

pAG415-P_{GPD}-yEGFP-BUL1-T_{CYCI}, pAG416-P_{GPD}-yEGFP-BUL2-T_{CYCI} (研究室保有) は yEGFP-BUL1 融合遺伝子または yEGFP-BUL2 融合遺伝子の ORF 上流に GPD (TDH3) プロモーターが組み込まれており、恒常的に高発現を行うことが出来る。

pAG416-P_{GALI}-SNF1-yEGFP-T_{CYCI} は本研究において、pDONR221-SNF1 と pAG416-P_{GALI}-ccdB- yEGFP-T_{CYCI} の LR 酵素を用いた *in vitro* 組換え反応によって作製した。SNF1 遺伝子の ORF 上流に GALI プロモーター、下流に CYCI ターミネーターが存在しており、ガラクトースによって SNF1-yEGFP の発現を誘導できる。

pAG416-P_{GALI}-AGPI-yEGFP-T_{CYCI}, pAG416-P_{GALI}-TAT2-yEGFP-T_{CYCI}, pAG416-P_{GALI}-GNPI-yEGFP-T_{CYCI} (研究室保有) は GALI プロモーター (Frolova *et al.*, 1999) が組み込まれており、ガラクトースによって、各々 AGPI-yEGFP, TAT2-yEGFP, GNPI-yEGFP の発現を誘導できる。

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')
art1D kanMX4 Fw	CTACTTAGTATACATTTCACTAAACAATACGTTTTACCGGCGCGCCACTT
art1D kanMX4 Rv	TATCTAAGATAAAAAATATATGGTAAATACCTTTAACGAATATTATAAAAT AGTTAGTGGGTATTGGAAAAGGCCGGTAAAGATAACAGGGATCTCTGAAAAAA
end3D by MET15 F	TCCAATTCTTCCAACATA
end3D by MET15 R	AACAAACAGTAAATATTACACATTCATGTACATAAAAATTAATTATCGGTGTAA CTAACATTTTTATCAAC
BUL1-S1	GGGCGAAAAGAGACTGTTTCGTGTGTGTCAACAGGTATATCGTACGCTAAATGC GTACGCTGCAGGTCGAC
BUL1-S2	TCTATATCTATAAGAAAAGTAACGAGAATTTTTCTAATGTTTTTTAGCATAG GCCACTAGTGGATCTG
dBUL2-loxP Fw2	GCAGATTTGAGATATATTCTGGGGAACAAAAGAAGTATTATGCAGGTCGACA ACCCTTAA
dBUL2-loxP Rv2	TATTTGTAAAAGTGGGAGATTACTGTTAGTGTGTATGGTGCCACTAGTGGAT CTGATATCACC
dART6-natNT2 Fw	CTGGAATCCCATAGAATATTGCTTGTTCCTCTATGACTACCGTACGCTGCAGG TCGAC
dART6-natNT2 Rv	AAATGGTAGCAATTCTGTTCGGAGAATGAAAATAATGTACATCGATGAATTCG AGCTCG
ART1-S3 Fw	AAACTTTTCCGATTTTCTAGATTCCAATAGAATAACCCAGCGTACGCTGCAGG TCGAC
ART1-S2 Rv	AATATATGGTAAATACCTTTAACGAATATTATAAAATCTAATCGATGAATTCG AGCTCG
RT HSP42 Fw	TGTTCTTGCGTTACCAGGTGC
RT HSP42 Rv	CAATGCCCACTCTGTCTTCGA
RT HSP12 Fw	ACATCACTGACAAGGCCGACA
RT HSP12 Rv	GCGTTATCCTTGCCTTTTTTCG
RT DDR2 Fw	TTCTGCCATCTCTGTCTTCGG
RT DDR2 Rv	TGACCATTTTGAGCGTGCAA
RT ALG9 Fw	CACGGATAGTGGCTTTGGTGAACAATTAC
RT ALG9 Rv	TATGATTATCTGGCAGCAGGAAAGAACTGGG

※名称が RT から始まるものはリアルタイム PCR 用。

2-4. Gap1 の免疫沈降とユビキチン化検出

野生型株 (BY4741) を pRS416 P_{GALI}-GAP1-yEGFP、pRS41MET15、pMK088 で形質転換した株を SD 培地、30 °C で前培養した。細胞を OD₆₀₀=0.1 になるように SG-N+Alt 培地に移し、25 °C で 24 時間培養した。対数増殖期の細胞を SD-N+Alt 培地に移し、CuSO₄ (終濃度 0.1mM) を添加し、2 時間ユビキチンを過剰発現させた。終濃度 10% または 15% のエタノールを添加し、0, 0.5, 1, 2, 4 時間培養した。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。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、MB601U) を用いて、菌体を破碎した (2,700 rpm, 30 sec on, 30 sec off, 10 cycles, 4°C)。破碎液に 700 µl の Triton buffer (1.5 % 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、2,000×g, 4 °C, 3 分遠心した。

上清に 10 µl の平衡化した抗 GFP マグネティックビーズ (免疫生物学研究所) を混和させ、ローテーターを用いて 1.5 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、Sample buffer (Tris-HCl [pH 8.0], 2% SDS, 0.0125% BPB, and 2.25% glycerol) を加え、65°C で 15 分インキュベート後、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 6% または 10.5% 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 transfer unit (Bio-Rad) で電気泳動後のゲルをメンブレン (Amersham Bioscience; Hybond-P) に転写した (400 mA, 115 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)。一次抗体として、Gap1-yEGFP の検出には 2,000 倍希釈の anti-GFP mouse 抗体 (Roche Diagnostics) を、ユビキチン化の検出には 1,000 倍希釈の anti-c-Myc mouse 抗体 (Santa Cruz Biotechnology) を、GAPDH の検出には 10,000 倍希釈の anti-GAPDH rabbit 抗体 (Nordic Immunology) をそれぞれ使用した。二次抗体には anti-mouse IgG HRP Conjugated (GE Healthcare) または anti-rabbit IgG HRP conjugated (Promega) を 2,000 倍希釈して使用した。各抗体は Can Get Signal (TOYOBO) で希釈した。ECL prime Western blotting detection system (GE Healthcare) を使用し、ルミノメーター LAS-4000 (Fujifilm) で検出した。

2-5. 蛍光顕微鏡観察

pRS416 P_{GALI}-GAP1-yEGFP と pRS415-CgHIS3, MET15 で形質転換した各株を 30°C の SD 培地で前培養し、室温で集菌後、滅菌水で洗浄した。OD₆₀₀=0.15 となるように SG-N+Alt 培地に酵母を懸濁し、25°C、24 時間の条件で振とう培養した。GALI プロモーターによって目的のタンパク質の発現を誘導後 (Frolova *et al.*, 1999)、室温で集菌した。終濃度 40 μM の FM4-64 色素を加え、10 分間室温でインキュベートし、SD-N+Alt 培地で 3 回洗浄後、細胞を OD₆₀₀=0.8 となるように SD-N+Alt 培地に懸濁し、25°C、2 時間振とう培養することで、液胞染色と同時に、目的のタンパク質の発現をオフの状態にした。各株を各ストレス条件下に置いた後に室温で集菌し、蛍光顕微鏡で観察した。ストレス条件については以下の通りである。エタノールストレスは、99.9% エタノールを終濃度 15% となるよう添加した。高温ストレスは、振とう恒温槽 (40°C) で培養した。LiCl ストレスは、1 M LiCl を終濃度 100 mM となるよう添加した。H₂O₂ ストレスは、30% (w/w) H₂O₂ から濃度 0.25 M の溶液を調製し、終濃度 0.25 mM となるように添加した。ネガティブコントロール用サンプルには、滅菌水を添加した。ポジティブコントロールとしては、1 M (NH₄)₂SO₄ を終濃度 50 mM となるよう添加した (Springael *et al.*, 1999)。蛍光顕微鏡は Axiovert 200M (Carl Zeiss) を用い、画像を HBO 100 Microscope Illuminating System (Carl Zeiss) デジタルカメラで取り込み、AxioVision Rel. 4.8 (Carl Zeiss) を用いて画像解析を行った。

2-6. スポットテストによるストレス耐性評価

各株を 30°C の YPD 培地で一晩培養した後、新しい YPD 培地に OD₆₀₀=0.3 に合わせて前培養液を添加して、本培養を行った。4-6 時間培養後、OD₆₀₀=1.0 に濁度を合わせて、10⁰ から 10⁻³ までの希釈系列を作製し、各ストレス培地に 2.5 μl ずつスポットして各条件下で適当な日数培養した。

2-7. Rsp5 とアダプタータンパク質の共免疫沈降

pAG415-P_{GPD}-yEGFP-BUL1-T_{CYC1}, pAG416-P_{GPD}-yEGFP-BUL2-T_{CYC1}, pAG415-P_{GPD}-ART1-HA-T_{CYC1} のいずれかで形質転換した各株を、対数増殖期まで 30°C、SC-Leu 培地または SC-Ura 培地で生育させた。滅菌水または終濃度 8% のエタノールを培地に加え、30 分及び 60 分後に細胞を回収し、Lysis buffer (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碎した。3 分間、2,000×g の遠心の後、上清に対し、全細胞抽出液用には 5 倍濃度の Sample

buffer を 1 倍濃度になるように加え 15 分間、65°C で煮沸した。

免疫沈降では、遠心上清を 10 μ l の抗 GFP マグネティックビーズ（免疫生物学研究所）または抗 HA マグネティックビーズ（免疫生物学研究所）と 4°C で 1.5 時間インキュベートした。ビーズは Wash buffer（50 mM Tris-HCl [pH8.0], 150 mM NaCl, 10% glycerol, and 0.1% NP-40）で 3 回洗浄を行った。沈降物は Sample buffer で 15 分間、65°C で煮沸することによって可溶化した。サンプルは 8% の SDS ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行い、イムノブロットングには ECL prime Western blotting detection system を用いた。yEGFP-Bul1、yEGFP-Bul2 の検出には 2,000 倍希釈の anti-GFP mouse 抗体を、Art1-HA の検出には 2,000 倍希釈の anti-HA mouse 抗体（Roche Diagnostics）を、Rsp5 の検出には 10,000 倍希釈の anti-Rsp5 rabbit 抗体（Huibregtse 博士より分譲）を、Pgk1 の検出には 10,000 倍希釈の anti-Pgk1 rabbit 抗体（Invitrogen）を用いた。二次抗体には anti-mouse IgG HRP Conjugated または anti-rabbit IgG HRP Conjugated（Promega）を 2,000 倍希釈して使用した。各抗体は Can Get Signal で希釈した。

2-8. リアルタイム PCR

各株を 25°C の YPD 培地で対数増殖期まで培養した後、滅菌水または終濃度 6% のエタノールを添加した。高温ストレスは、振とう恒温槽（38°C）で培養することで与えた。ストレス処理開始から 30 分後に集菌し、RNeasy mini kit（キアゲン）を用い、製品の取扱説明書に従って全 RNA を抽出した。Total RNA から cDNA の逆転写は High-capacity cDNA reverse transcription kits（Applied Biosystems）を用い、取扱説明書に従って行った。リアルタイム PCR は cDNA を鋳型とし、SYBR Green PCR master mix（Applied Biosystems）を用いて行った。反応液組成は、50 ng の cDNA、1×SYBR Green PCR master mix 液、プライマー溶液（終濃度 100 nM）から成り、最終容量を 25 μ l とした。それぞれの遺伝子に対するプライマーを Table 2. に示す。PCR 反応は LightCycler96（Roche Diagnostics）を用いて行い、反応条件は、50°C で 2 分間、95°C で 10 分間の加熱を行った後、95°C で 15 秒間と 60°C で 1 分間の加熱を 40 回繰り返した。その後、融解曲線作成のために、95°C で 15 秒間、60°C で 30 秒間、95°C で 15 秒間加熱した。各遺伝子の発現量は、内在性コントロールとして *ALG9* を用い、 $\Delta\Delta C_t$ 法で計算した。

2-9. DNA マイクロアレイ解析

各株の培養～全 RNA 抽出はリアルタイム PCR に準ずる。ただし、ストレス

は 6%エタノールのみ。DNA マイクロアレイ解析については、北海道システム・サイエンス株式会社に依頼した。遺伝子オントロジー (GO) 解析には、Saccharomyces Genome Database (SGD; <http://www.yeastgenome.org/>) の Gene Ontology Term Finder (<http://www.yeastgenome.org/cgi-bin/GO/goTermFinder.pl>) を用い、 p -value < 0.05 の GO term を抽出した。

2-10. Snf1 のウェスタンブロッティング

pAG416-*P_{GALI}-SNF1-yEGFP-T_{CYCI}* と pAG415-*P_{GPD}-ccdB-T_{CYCI}* で形質転換した各株を SC-Leu, Ura 培地で、30°C で一晩前培養して集菌後、滅菌水に懸濁し、OD₆₀₀=0.03 に合わせて SG-Leu, Ura 培地に菌液を添加した。30°C で 19 時間培養し、*GALI* プロモーターによって Snf1-yEGFP タンパク質の発現を誘導後、集菌した。OD₆₀₀=0.7 に合わせて SC-Leu, Ura 培地へ細胞を移し、30°C で培養しながら適宜集菌した。細胞を 10%トリクロロ酢酸 (TCA) に懸濁し、マルチビーズショッカーを用いて破碎した (2700rpm, 30sec on, 30 sec off, 15 cycles, 室温)。抽出物を 2,000×g で 3 分遠心し、沈殿に Sample buffer と 5N NaOH を加え中和し、100°C, 3 分間の煮沸によって溶解した。8%の SDS ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行い、イムノブロッティングには ECL prime Western blotting detection system を用いた。Snf1-yEGFP の検出には 2,000 倍希釈の anti-GFP mouse 抗体を、Pgk1 の検出には 10,000 倍希釈の anti-Pgk1 mouse 抗体を用い、二次抗体には 2,000 倍希釈の anti-mouse IgG HRP conjugated を用いた。各抗体は Can Get Signal で希釈した。検出されたタンパク質量は ImageJ を用いて解析した。

2-11. 生育曲線

pAG415-*P_{GPD}-ccdB-T_{CYCI}* または pAG415-*P_{GPD}-ART1-T_{CYCI}* で形質転換した各株を SC-Leu 培地で、30°C で一晩培養した後、OD₆₀₀=0.1 に合わせて新しい SC-Leu 培地に植菌し、25°C または各ストレス条件下で培養した。適宜分光光度計を用いて OD₆₀₀ を計測した。

2-12. Art1 のウェスタンブロッティング

pAG415-*P_{GPD}-ccdB-T_{CYCI}* または pAG415-*P_{GPD}-ART1-HA-T_{CYCI}* で形質転換した各株を SC-Leu 培地 30°C で対数増殖期まで培養し、細胞抽出液を Snf1 のウェスタンブロッティング同様に調製した。8%の SDS ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行い、イムノブロッティングには ECL prime Western blotting Detection System を用いた。Art1-HA の検出には 2,000 倍希釈の anti-HA mouse 抗体を、

Pgk1 の検出には 10,000 倍希釈の anti-Pgk1 mouse 抗体を用い、二次抗体には 2000 倍希釈の anti-mouse IgG HRP Conjugated を用いた。各抗体は Can Get Signal で希釈した。検出されたタンパク質量は ImageJ を用いて解析した。

2-13. 発酵試験

pAG415-P_{GPD}-ccdB-T_{CYCI} または pAG415-P_{GPD}-ARTI-T_{CYCI} で形質転換した各株を SC-Leu 培地 30°C で一晩全培養した後、OD₆₀₀=0.1 になるように SC-Leu20 培地 (グルコース濃度 20% の SC-Leu 培地) 50 ml に植菌し、各条件で培養した。酵母の発酵によって発生する炭酸ガス量を、AF-1101 ファーモグラフ II -W (ATTO) を用いて一定時間ごとに測定した。

発酵終了後、培地を採取して 10,000×g で 1 分遠心し、上清をエタノール濃度測定用のサンプルとした。エタノール測定用の内部標準としては 0.6% の 1-プロパノールを用い、検量線は 2.5%、5%、10% のエタノールを用いて作成した。

バイアル瓶に 0.6% の 1-プロパノールを 450 μl とサンプル 150 ml を混ぜ、瓶に中蓋 (ジーエルサイエンス) を、黄色い面を下にして置き、キャップで密閉した。バイアル瓶を 50°C のウォーターバスで 20 分加熱した。加熱後、バイアル瓶にシリンジを刺し、気化したガスを約 250 μl 採取して、ガスクロマトグラフィーのインジェクターに素早く注入し、測定を開始した。ガスクロマトグラフィーには、GC-14B (島津製作所) を用い、カラムは Agilent DB-WAX; 30m×0.25 mm を使用した。各ガスの二次圧において、水素ガスは 0.3 MPa、ヘリウムガスは 0.45 MPa で測定した。カラムは 80°C、インジェクターは 200°C、ディテクターは 250°C に設定して測定を行った。

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) を用いて行った。その他、大腸菌の形質転換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. 細胞膜タンパク質の品質管理機構の解析

Rsp5 は多くの細胞膜タンパク質をユビキチン化し、そのエンドサイトーシスを誘導することが知られている (Nikko & Pelham, 2009)。例えば、培地中にアラントインやプロリンなどの資化しにくい窒素源のみ存在する時に、硫酸アンモニウムのような資化し易い窒素源を添加することで、それ以上の窒素源の取込みが不要となり、それらを取り込むアミノ酸パーミアーゼ Gap1 のエンドサイトーシスと液胞への輸送が誘導される。このプロセスには Rsp5 による Gap1 のユビキチン化が必要であることが報告されている (Hein *et al.*, 1995; Springael & André 1998)。当研究室においても、Rsp5 の機能低下型変異株 (*rsp5*^{A401E} 株) では、硫酸アンモニウム存在下においても Gap1 がユビキチン化されず、細胞膜上に安定に存在することを明らかにしている (Hoshikawa *et al.*, 2003)。

このように、Rsp5 を介したユビキチン化とエンドサイトーシスは、細胞内の生理的条件に応じて不要になった細胞膜タンパク質を細胞内に輸送する上で必要なメカニズムである。一方で、細胞膜タンパク質に何らかの傷害が生じた場合にも、エンドサイトーシスを経た分解によって適切に除去されることが必要であると考えられる。その一例として、エタノールストレス下で野生型の Gap1 は細胞膜上からエンドサイトーシスされるのに対し、非ユビキチン化変異型 Gap1 は細胞膜上に存在し続けるが、シトルリンの取り込み活性が著しく低下し、細胞膜上で変性している可能性があることも見出している (鈴木, 2011)。したがって、Rsp5 はミスフォールド化した細胞膜タンパク質をユビキチン化し、細胞膜上から回収して分解、除去する、いわゆる細胞膜タンパク質の品質管理 (PMQC) にも必要であると考えられる。しかしながら PMQC に関する知見は未だ乏しく、その詳細な分子機構には不明な点が多い。

そこで本研究では、Rsp5 のモデル基質として Gap1 を、また細胞膜タンパク質の変性を誘導する環境ストレスのモデルとしてエタノールをそれぞれ用いて、エタノールストレス下における Gap1 のユビキチン化とエンドサイトーシス、およびその関連因子を解析することで、PMQC の分子機構の解明を試みた。

3-1-1. エタノールストレスによる Gap1 のユビキチン化

まず、以前に当研究室で見出されたエタノールストレス下での Gap1 のエンドサイトーシスも、硫酸アンモニウム添加時に起こる Gap1 のエンドサイトー

シスと同様に、ユビキチン化を介したものであるのかを検証した。Gap1 は資化しにくい窒素源存在下では、安定的に細胞膜上に保持される (Hein *et al.*, 1995; Springael & André 1998)。そこで、Gap1 のエンドサイトーシスを抑制するため、まず炭素源としてガラクトース、窒素源としてアラントインのみを含む SG-N+Alt 培地で酵母を培養し、ガラクトース誘導性の *GALI* プロモーターを用いて発現させた Gap1-yEGFP 融合タンパク質を細胞膜上に局在させた。また、新規に合成された Gap1 は、ゴルジ体から細胞膜へ輸送されるほか、細胞膜を中継せずにゴルジ体からエンドソームへと送られ、液胞に輸送されることもある (Risinger & Kaiser, 2008)。そこで、細胞を炭素源がグルコースである SD-N+Alt 培地に移して *GALI* プロモーターからの新規合成を一定の期間シャットオフすることで、本研究の対象である細胞膜からのエンドサイトーシス以外の要因による Gap1-yEGFP の液胞への輸送を排除した。こうして、大部分の Gap1-yEGFP が細胞膜上にもみ存在する状態を作り出し、細胞にエタノールストレスを加えた。ポジティブコントロールとしては硫酸アンモニウムを加えた。

その後、抗 GFP マグネティックビーズを用いて Gap1-yEGFP を免疫沈降し、そのユビキチン化の有無をウェスタンブロッティングによって解析した。その結果、硫酸アンモニウム添加時と同様に、エタノールストレス下でも Gap1 よりも移動度の低いスメアなバンドが検出され、Gap1-yEGFP がポリユビキチン化されていることが示唆された (Fig.3-1-1)。また、その際、バンドの位置が硫酸アンモニウム添加時よりも高分子量側で検出された。加えて、このバンドは時間とともに、より高分子量側へとシフトしていく様子が観察された。

Gap1 が硫酸アンモニウム添加時に Rsp5 によってユビキチン化を受ける際には、9 番目と 16 番目の Lys 残基がユビキチン化される (Soetens *et al.*, 2001)。しかし、この両 Lys 残基を Arg に置換することでユビキチン化されなくなった変異型 Gap1 (Gap1^{K9R/K16R}) は、硫酸アンモニウムやエタノールを培地に添加してもエンドサイトーシスを受けない (鈴木, 2011)。そこで、エタノールストレス下での Gap1 のユビキチン化にも同じ 2 つの Lys 残基が用いられるのかを明らかにするために、Lys 残基の変異型 Gap1 (Gap1^{K9R/K16R}-yEGFP) を発現させた細胞を用いて同様の実験を行った。その結果、エタノールストレス下において野生型 Gap1 発現株で見られたスメアなバンドが、Gap1^{K9R/K16R} 発現株では消失し、Gap1 のユビキチン化が起きていないことが示された (Fig.3-1-2)。以上の結果、およびエタノールストレス下での Gap1 のエンドサイトーシスには正常な Rsp5 の機能が必要であることから、エタノールストレスによって Rsp5 依存的に Gap1 の Lys9 と Lys16 がユビキチン化されることが示唆された。

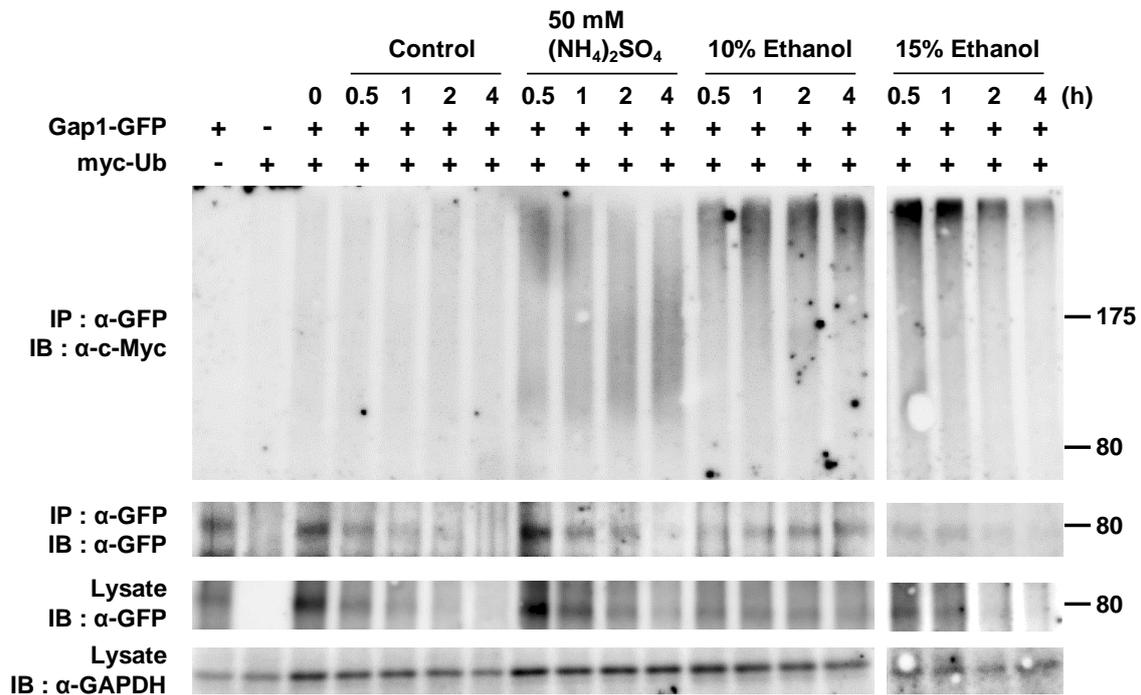


Figure 3-1-1. エタノールストレス存在下における Gap1 のユビキチン化

野生型株 (BY4741) を SG-N+Alt 培地で対数増殖期まで培養し、プラスミドで *GALI* プロモーターから Gap1-yEGFP を発現させた。その後、細胞を SD-N+Alt 培地に移して Gap1-yEGFP の発現を停止させた。さらに CuSO₄ (終濃度 0.1 μM) を添加することで、pMK088 プラスミドから、Myc タグを付加したユビキチンを *CUPI* プロモーターによって 2 時間過剰発現させた。10% または 15% エタノールで処理した細胞を、0, 0.5, 1, 2, 4 時間後に集菌し、全細胞抽出液を調製して抗 GFP マグネティックビーズで免疫沈降を行った。ポジティブコントロールとして、50 mM (NH₄)₂SO₄ を培地に添加した細胞を同様に調製した。また、空ベクター (pRS416; Gap1-GFP; -) もしくは Myc タグのないユビキチンを発現する pMK089 プラスミド (myc-Ub; -) を導入した株をネガティブコントロールとして用いた。それぞれのサンプルは抗 GFP 抗体 (α-GFP)、抗 c-Myc 抗体 (α-c-Myc)、抗 GAPDH 抗体 (α-GAPDH; 内部標準タンパク質) 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。

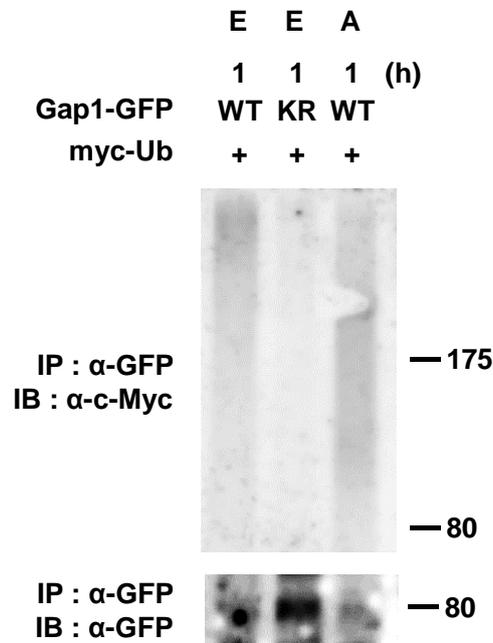


Figure 3-1-2. エタノールストレス存在下における Gap1^{K9R/K16R} のユビキチン化

Gap1-yEGFP (Gap1-GFP; WT) または Gap1^{K9R/K16R}-yEGFP (Gap1-GFP; KR) をプラスミドで *GALI* プロモーターから発現する株を Figure 3-1-1.と同じ条件で培養し、同様に Myc-Ub を発現させた。15%エタノールで1時間処理した細胞から全細胞抽出液を調製し、Figure 3-1-1.同様に免疫沈降を行った。ポジティブコントロールとして、50 mM (NH₄)₂SO₄ を培地に添加した細胞を同様に調製した。それぞれのサンプルは抗 GFP 抗体 (α -GFP)、抗 c-Myc 抗体 (α -c-Myc) 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。E; 15%エタノール A; 50 mM (NH₄)₂SO₄。

3-1-2. アダプタータンパク質 **Bul1, Bul2, Bul3** が **Gap1** の局在に及ぼす影響

Rsp5 が WW ドメインを介して基質と相互作用し、ユビキチン化を行う際には、その基質中に、PY モチーフと呼ばれる、PXY (X は任意のアミノ酸) という配列で Pro 残基と Tyr 残基が並ぶ短いペプチドが必要である (Chen & Sudol, 1995; Saeki *et al.*, 2005)。しかし **Gap1** にはこの PY モチーフが存在しないため、**Gap1** が Rsp5 によってユビキチン化される際には、PY モチーフを有し、両者を仲介できるアダプタータンパク質が必要である。例えば、資化し易い窒素源存在下で **Gap1** のユビキチン化とエンドサイトーシスが起こる際には、アレステン様アダプタータンパク質の **Bul1, Bul2** が Rsp5 と **Gap1** との相互作用を仲介することが知られている (Yashiroda *et al.*, 1996; Soetens *et al.*, 2001)。また、近年、**Bul1, Bul2** と相同性を有するアダプタータンパク質として、**Bul3** が同定された (Novoselova *et al.*, 2012)。そこで、エタノールストレス下での **Gap1** のエンドサイトーシスと、これらのアダプタータンパク質との関係について解析を行った。野生型株ならびに各アダプタータンパク質の遺伝子破壊株を用い、ユビキチン化の検出と同様に、**Gap1-yEGFP** 融合タンパク質が細胞膜上に保持された状態でエタノールを加え、**Gap1** の細胞内局在を蛍光顕微鏡によって観察した (Fig.3-1-3)。また、ポジティブコントロールとして硫酸アンモニウムを加えた。

その結果、**BUL1** および **BUL2** の単独遺伝子破壊株においては、エタノールストレス下において野生型株と同様に **Gap1** のエンドサイトーシスが誘導されることが確認された。また、硫酸アンモニウム添加時のエンドサイトーシスも、野生型株とほぼ同等に誘導されていたが、これは **Bul1** と **Bul2** に機能的冗長性があるためと考えられる。**BUL1, BUL2** 二重遺伝子破壊株においては、この硫酸アンモニウム添加による **Gap1** のエンドサイトーシスが大幅に抑制された。しかし完全には抑制されておらず、以前に報告されたように (Risinger & Kaiser, 2008)、**Bul1, Bul2** 非依存的な **Gap1** のユビキチン化が部分的に寄与しているものと思われる。一方、エタノールストレス下での **Gap1** のエンドサイトーシスは、**BUL1, BUL2** 二重遺伝子破壊株においても硫酸アンモニウム添加時ほど劇的には抑制されず、**Bul1, Bul2** 非依存的なユビキチン化の寄与がより大きいことが示唆された。また、**BUL3** の単独遺伝子破壊や、**BUL1, BUL2** の遺伝子破壊と **BUL3** の遺伝子破壊を組み合わせた場合、硫酸アンモニウム添加時やエタノール添加時のエンドサイトーシスに野生型株や **BUL1, BUL2** 遺伝子破壊株と比較して大きな変化は見られなかったが、コントロール条件下での **Gap1** のエンドサイトーシスが、**BUL3** 遺伝子の破壊により亢進している様子が観察された。

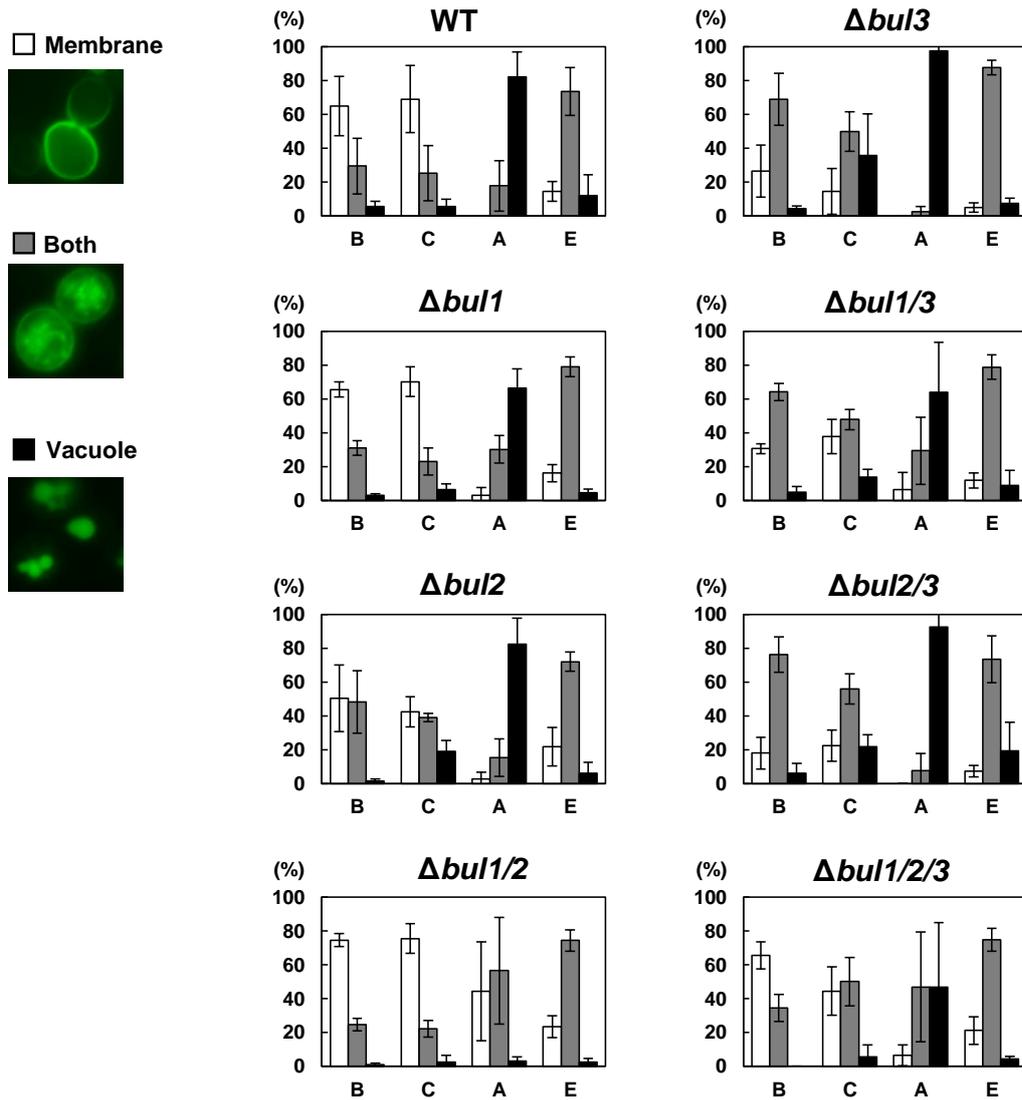


Figure 3-1-3. 各 Bul タンパク質の遺伝子破壊株における Gap1 の局在変化

野生型株 (BY4741)、*BUL1* 破壊株、*BUL2* 破壊株、*BUL3* 破壊株、*BUL1*, *BUL2* 二重破壊株、*BUL1*, *BUL3* 二重破壊株、*BUL2*, *BUL3* 二重破壊株、*BUL1*, *BUL2*, *BUL3* 三重破壊株を SG-N+Alt 培地で対数増殖期まで培養し、プラスミドで *GALI* プロモーターから Gap1-yEGFP を発現させた。その後、細胞を SD-N+Alt 培地に移して Gap1-yEGFP の発現を停止させた。発現停止後、滅菌水 (ネガティブコントロール)、50 mM (NH₄)₂SO₄ (ポジティブコントロール)、15%エタノールを加え、3 時間後に Gap1-yEGFP の局在を観察した。各条件で最低 100 個の細胞を観察した。白いグラフは Gap1 が細胞膜上にのみ局在した細胞の割合、灰色のグラフは細胞膜と液胞両方に局在した細胞の割合、黒いグラフは液胞にのみ局在した細胞の割合を表す。B; ストレス処理前、C; 滅菌水、A; 50 mM (NH₄)₂SO₄、E; 15%エタノール。結果は異なる 3 つのクローンの平均値で、エラーバーは標準偏差を表す。

3-1-3. Bul1, Bul2 非依存的なユビキチン化が Gap1 の局在に及ぼす影響

前章の解析により、エタノールストレス下での Gap1 のエンドサイトーシスには、Bul1, Bul2 非依存的な Gap1 のユビキチン化がより重要な役割を担うことが示唆された。このメカニズムは、既知の Gap1 のエンドサイトーシスとは異なり、PMQC に特異的なものではないかと推測されたため、Bul1, Bul2 非依存的なユビキチン化についてさらなる解析を行った。Rsp5 によるアダプタータンパク質 Bul1, Bul2 依存的な Gap1 のユビキチン化とエンドサイトーシスでは、Gap1 の Lys9 と Lys16 がユビキチン化され、Bul1, Bul2 非依存的なユビキチン化とエンドサイトーシスでは、Lys16 がユビキチン化されることが報告されている (Risinger & Kaiser, 2008)。そこで、*BUL1, BUL2* 二重遺伝子破壊株で観察されたエタノールストレス下での Gap1 のエンドサイトーシスにおける各 Lys 残基のユビキチン化の影響を明らかにするために、*BUL1, BUL2* 二重遺伝子破壊株で各 Lys 残基を Arg に置換した変異型 Gap1 (Gap1^{K9R}-yEGFP, Gap1^{K16R}-yEGFP, Gap1^{K9R/K16R}-yEGFP) を発現させ、その細胞内局在を観察した (Fig.3-1-4)。

その結果、エタノールストレス下における Gap1^{K9R}-yEGFP の局在は野生型株と明確な差異は見られなかったが、Gap1^{K16R}-yEGFP についてはより多くが細胞膜上に留まる様子が観察された。Gap1^{K9R/K16R}-yEGFP についてはそのほとんどが細胞膜上に保持され、エンドサイトーシスが大幅に阻害されていることが観察された。以上の結果から、エタノールストレスによる Bul1, Bul2 非依存的な Gap1 のエンドサイトーシスに関しても、Lys16 のユビキチン化による影響を大きく受けることが示された。

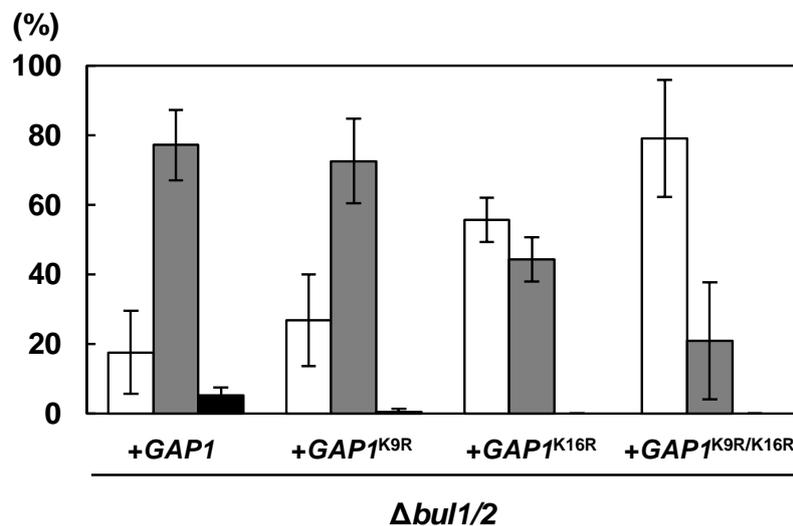


Figure 3-1-4. *BUL1*, *BUL2* 遺伝子破壊株における非ユビキチン化型 Gap1 の局在

Gap1-yEGFP (+GAP1), Gap1^{K9R}-yEGFP (+GAP1^{K9R}), Gap1^{K16R}-yEGFP (+GAP1^{K16R}), Gap1^{K9R/K16R}-yEGFP (+GAP1^{K9R/K16R}) をプラスミドで *GALI* プロモーターから発現する *BUL1*, *BUL2* 二重破壊株を Figure 3-1-3.と同じ条件で培養した。15%エタノール添加4時間後の各 Gap1 の局在を Figure 3-1-3.同様に観察し、集計した。結果は異なる3つのクローンの平均値で、エラーバーは標準偏差を表す。

3-1-4. ストレス下での PMQC に関与する新規アダプタータンパク質の探索

前章までの結果から、エタノールストレス下での Gap1 のエンドサイトーシスに特異的に関わる Bul1, Bul2 以外のアダプタータンパク質の存在が示唆されたため、その探索を行った。Rsp5 のアレスチン様アダプタータンパク質としては、上述の Bul タンパク質に加えて、arrestin related trafficking adaptors (ARTs) と呼ばれる 10 種のタンパク質が知られ、各々が様々な細胞膜タンパク質のユビキチン化とエンドサイトーシスに選択的に関与することが報告されている (Lin *et al.*, 2008; Nikko & Pelham, 2009)。これらのアダプタータンパク質の中に、ストレス下での PMQC に必要なアダプタータンパク質があれば、そのタンパク質をコードする遺伝子の破壊株においては PMQC が正常に機能せず、*rsp5*^{A401E} 株と同様にストレス感受性を示すことが予想される。そこで、各アダプタータンパク質の遺伝子破壊株について、エタノール (12.5%)、高温 (38°C)、酸 (pH 4.0)、アルカリ (pH 9.0) の各ストレス条件下における生育を観察した。

その結果、*BUL1*, *BUL2* 二重遺伝子破壊株に加えて、*ART1* 遺伝子破壊株が各種のストレス、特にエタノールと高温に対して顕著な感受性を示した (Fig.3-1-5)。なお、*BUL1* の単独遺伝子破壊株が、*BUL2* の単独遺伝子破壊株に比べてより強い高温感受性を示しており、ストレス下での PMQC については Bul1 の寄与がより大きいことが示唆された。また、*BUL1*, *BUL2* 二重破壊株と *BUL1*, *BUL2*, *BUL3* 三重破壊株とでは、ストレス感受性に大きな差が見られなかったことから、ストレス下での PMQC への Bul3 の寄与は小さいか、ほとんどないものと思われる。さらに、*BUL1*, *BUL2* と *ART1* の三重破壊株を作製し、そのストレス感受性を調べた結果、*BUL1*, *BUL2* 二重破壊株や *ART1* 単独破壊株と比べてさらに高いストレス感受性を示した (Fig.3-1-6)。特に、アルカリストレスに対しては顕著な相乗効果が観察され、酵母のストレス耐性に対するこれら 3 つのアダプタータンパク質の重要性を指し示す結果となった。以上より、ストレス条件下における PMQC には、Bul1, Bul2 ならびに Art1 が大きく関与していることが推測された。

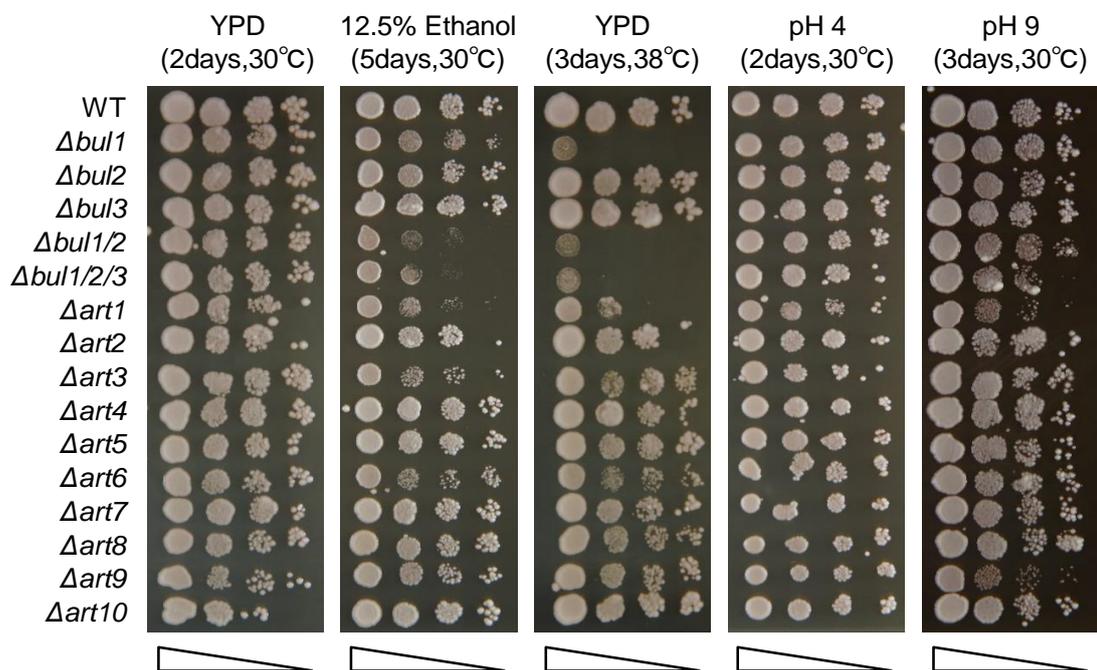


Figure 3-1-5. アダプタータンパク質破壊株のストレス耐性

野生型株、*BUL1* 破壊株、*BUL2* 破壊株、*BUL3* 破壊株、*BUL1*, *BUL2* 二重破壊株、*BUL1*, *BUL2*, *BUL3* 三重破壊株、*ART1* 破壊株、*ART2* 破壊株、*ART3* 破壊株、*ART4* 破壊株、*ART5* 破壊株、*ART6* 破壊株、*ART7* 破壊株、*ART8* 破壊株、*ART9* 破壊株、*ART10* 破壊株を対数増殖期まで培養した。OD₆₀₀ = 1.0 に細胞数を合わせてから 10⁰ から 10⁻³ までの希釈系列を製作し、YPD 培地、12.5%エタノールを含む YPD 培地、pH4 の YPD 培地、pH9 の YPD 培地に 2.5 μl ずつスポットして 30°C もしくは 38°C で培養した。

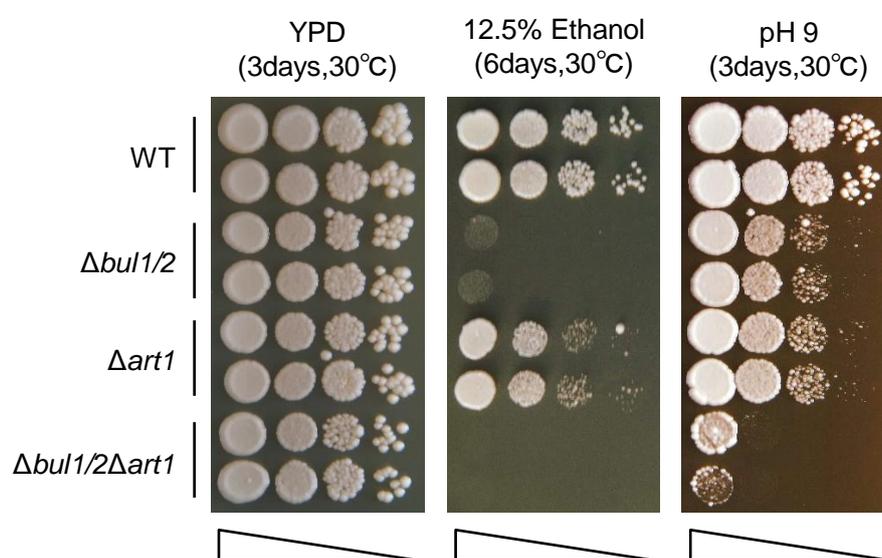


Figure 3-1-6. *BUL1*, *BUL2*, *ART1* 三重破壊株のストレス耐性

野生型株、*BUL1*, *BUL2* 二重破壊株、*ART1* 破壊株、*BUL1*, *BUL2*, *ART1* 破壊株を、Figure 3-1-5.同様に、YPD 培地、12.5%エタノールを含む YPD 培地、pH9 の YPD 培地に 2.5 μ l ずつスポットし、培養した。

3-1-5. アダプタータンパク質 Art1, Art3, Art6 が Gap1 の局在性に及ぼす影響

アダプタータンパク質 Bull, Bul2, Art1 の欠失により、酵母のストレス耐性が著しく低下したことから、ストレス条件下において、これらのアダプタータンパク質が Rsp5 とミスフォールド化した細胞膜タンパク質との相互作用を仲介し、PMQC を行っている可能性が示唆された。そこで、*BUL1, BUL2* 二重破壊株に加え、*ART1* 単独破壊株ならびに *BUL1, BUL2, ART1* 三重破壊株における Gap1-yEGFP の細胞内局在を、蛍光顕微鏡にて観察した (Fig.3-1-7)。しかし予想に反して、*ART1* 単独破壊株では、エタノールストレス下における Gap1 の細胞内局在に野生型株と明確な差が見られなかった。一方、*BUL1, BUL2, ART1* 三重破壊株では、エタノールストレス下で Gap1 のエンドサイトーシスが *BUL1, BUL2* 二重破壊株よりも顕著に抑制された。

最近になって、別のグループからストレス条件下における Gap1 のユビキチン化とエンドサイトーシスに Art3, Art6 の両アダプタータンパク質が相補的に関与していることが報告された (Crapeau *et al.*, 2014)。一方で Art3, Art6 は、エンドサイトーシスされた細胞膜タンパク質をエンドソームから細胞膜へ、ないしはエンドソームからゴルジ体を介して細胞膜へリサイクルする経路に関与しているとの報告もあり (O'Donnell *et al.*, 2010)、相反する機能が提唱されている。そこで本研究においても、*ART3, ART6* 二重破壊株と、*BUL1, BUL2, ART3, ART6* 四重破壊株を作製し、エタノールストレス下での Gap1 のエンドサイトーシスに対する Art3, Art6 の影響について解析を行った (Fig.3-1-7)。その結果、*ART3, ART6* 二重破壊株では野生型株や *ART1* 破壊株と同様に、エタノールストレス下で Gap1 のエンドサイトーシスが誘導されていたが、*BUL1, BUL2, ART3, ART6* 四重破壊株では著しい阻害を示した。その効果は、*BUL1, BUL2, ART1* 三重破壊と比較しても、強いものであった。これらの結果から、PMQC における Art1, Art3, Art6 の重要性が明らかになった。また、興味深いことに、硫酸アンモニウムによる Gap1 のエンドサイトーシスの誘導については、*BUL1, BUL2* 二重破壊株と *BUL1, BUL2, ART1* 三重破壊株の間に明確な差異は見られず、エタノールによる誘導のみが *ART1* 破壊による影響を受けた。一方で、*BUL1, BUL2, ART3, ART6* 四重破壊株では硫酸アンモニウムとエタノールどちらに起因するエンドサイトーシスも抑制されていた。このことから、Bull, Bul2 非依存的なメカニズムを担う ART タンパク質の中でも、Art1 の方がより PMQC における重要性が高いことが示唆された。

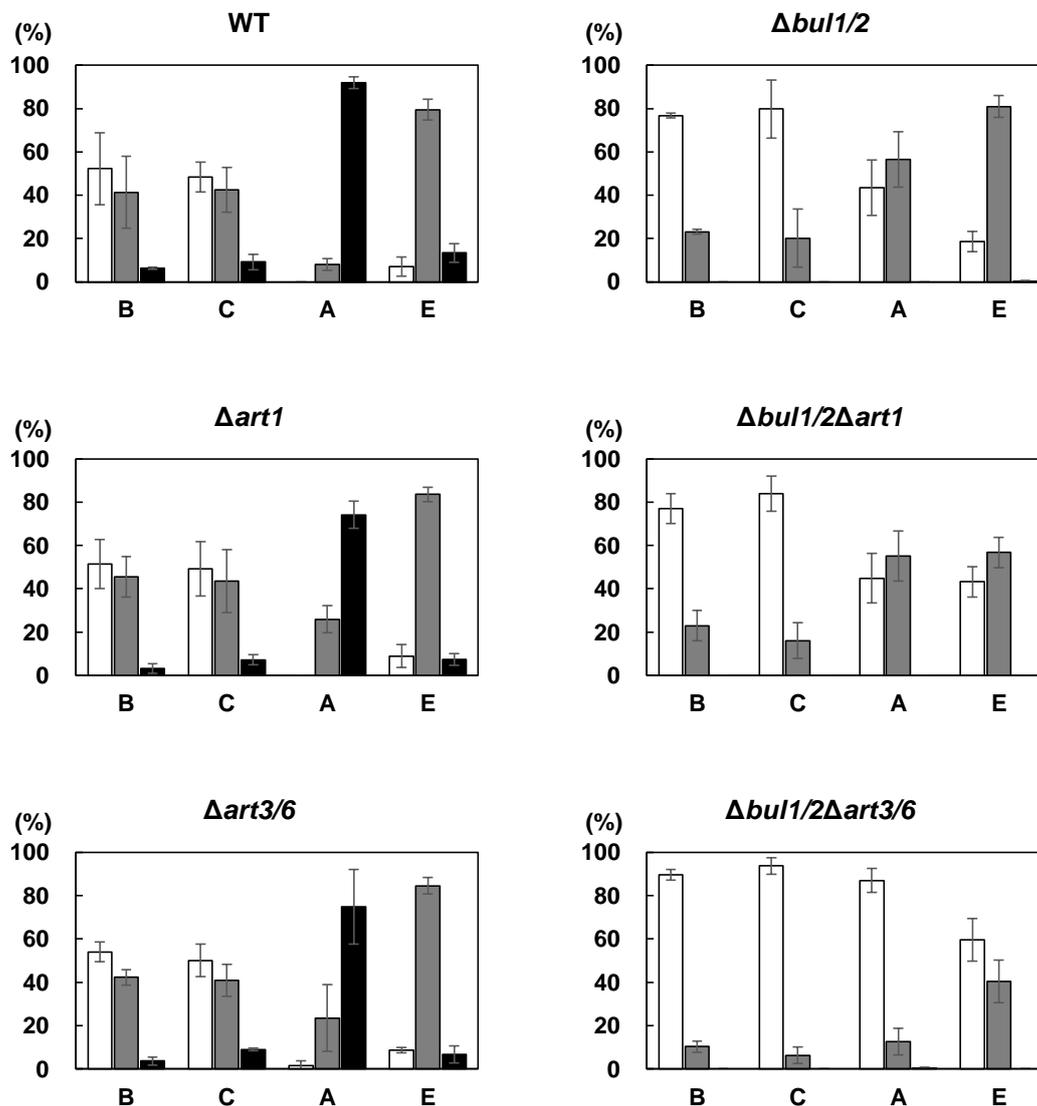


Figure 3-1-7. ART1, ART3, ART6 の破壊と Gap1 の局在性

プラスミドで *GALI* プロモーターから Gap1-yEGFP を発現する野生型株、*ART1* 破壊株、*ART3*, *ART6* 二重破壊株、*BUL1*, *BUL2* 二重破壊株、*BUL1*, *BUL2*, *ART1* 三重破壊株、*BUL1*, *BUL2*, *ART3*, *ART6* 四重破壊株を、Figure 3-1-3.と同じ条件で培養し、Gap1-yEGFP の局在を観察した。B; ストレス処理前、C; 滅菌水、A; 50mM (NH₄)₂SO₄、E; 15%エタノール。結果は異なる3つのクローンの平均値で、エラーバーは標準偏差を表す。

3-1-6. エタノールストレス以外の環境ストレス下での Gap1 の局在

これまで観察してきた Gap1 のエンドサイトーシスは、環境ストレス応答ではなく、エタノールに特異的な現象である可能性も考えられる。もしこれが PMQC によるものであれば、エタノール以外のストレスによっても同様に Gap1 のエンドサイトーシスが誘導されるはずである。そこで、この Gap1 のエンドサイトーシスが環境ストレスに対する応答であることを確認するために、エタノール以外のストレス条件下における Gap1-yEGFP の細胞内局在変化を観察した (Fig.3-1-8)。

その結果、高温、リチウム、過酸化水素のいずれのストレス条件下においても Gap1 のエンドサイトーシスと液胞への輸送が亢進している様子が観察され、これが様々な環境ストレスに対して一般的に起こる現象であることが示された。また、硫酸アンモニウム添加時には全ての Gap1 が迅速に液胞へ輸送されるのに対し、ストレス下で Gap1 が完全に液胞へ輸送されるためには、より長い時間を要した。しかし、全ての Gap1 が細胞膜上にのみ局在する細胞は、ストレス下においても急速に減少しており、エンドサイトーシスの誘導自体は迅速に起こることが示された。

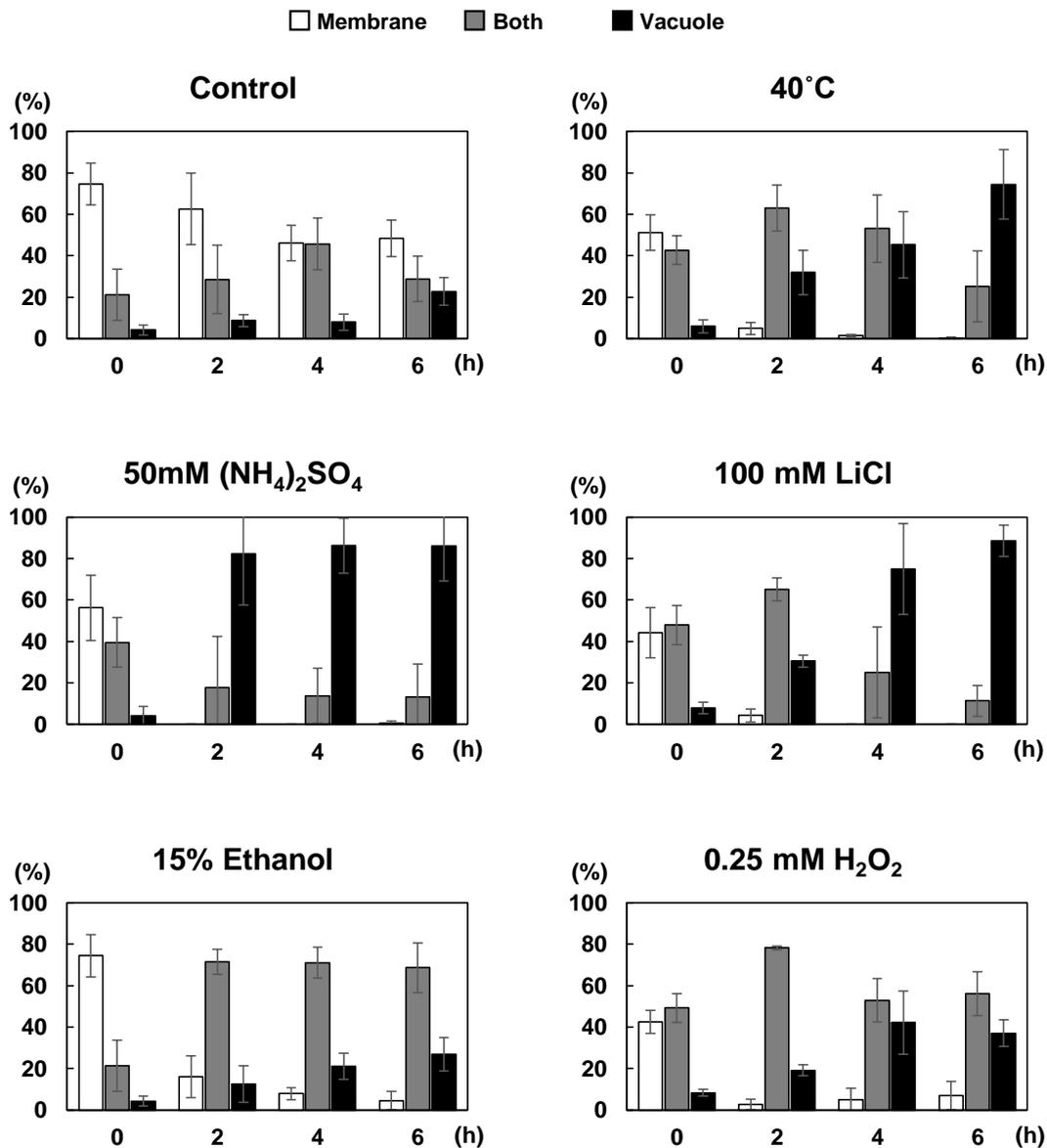


Figure 3-1-8. 様々な環境ストレス下における Gap1 の局在性

プラスミドで *GALI* プロモーターから Gap1-yEGFP を発現する野生型株を Figure 3-1-3. と同じ条件で培養した。滅菌水か 50 mM (NH₄)₂SO₄ を添加、もしくは 15% エタノール、高温 (40°C)、100mM LiCl、0.25mM H₂O₂ の各ストレスを与え、0、2、4、6 時間後の Gap1-yEGFP の局在を観察した。結果は異なる 3 つのクローンの平均値で、エラーバーは標準偏差を表す。

3-1-7. アダプタータンパク質 **Bul1, Bul2, Art1** がエタノールストレス以外の環境ストレス下での **Gap1** の局在に及ぼす影響

エタノールストレス下における **Gap1** のエンドサイトーシスは、**BUL1, BUL2, ART1** 三重破壊および **BUL1, BUL2, ART3, ART6** 四重破壊によって抑制された (Fig.3-1-7)。**BUL1, BUL2, ART3, ART6** の四重破壊株については、エタノールだけでなく高温や過酸化水素によって引き起こされる **Gap1** のエンドサイトーシスも抑制されることが報告されている (Crapeau *et al.*, 2014)。また、その際には、エタノールストレスの場合と同様に、**BUL1, BUL2** 二重破壊ならびに **ART3, ART6** 二重破壊だけでは **Gap1** のエンドサイトーシスは完全には抑制されなかった (Crapeau *et al.*, 2014)。そこで、**BUL1, BUL2, ART1** の三重破壊株において、エタノール以外のストレスによる **Gap1** のエンドサイトーシスが抑制されるのか調べるため、高温 (40°C) および過酸化水素ストレス下における **Gap1-yEGFP** の細胞内局在を蛍光顕微鏡によって観察した (Fig.3-1-9)。

その結果、高温ストレス条件下、過酸化水素ストレス条件下ともに、**BUL1, BUL2, ART1** 三重破壊株では、**Gap1** のエンドサイトーシスが著しく抑制されている様子が観察された。このことから、これらのアダプタータンパク質のいずれも、エタノールストレス以外のストレス下における **Gap1** のエンドサイトーシスにも広く関与していることが示唆された。

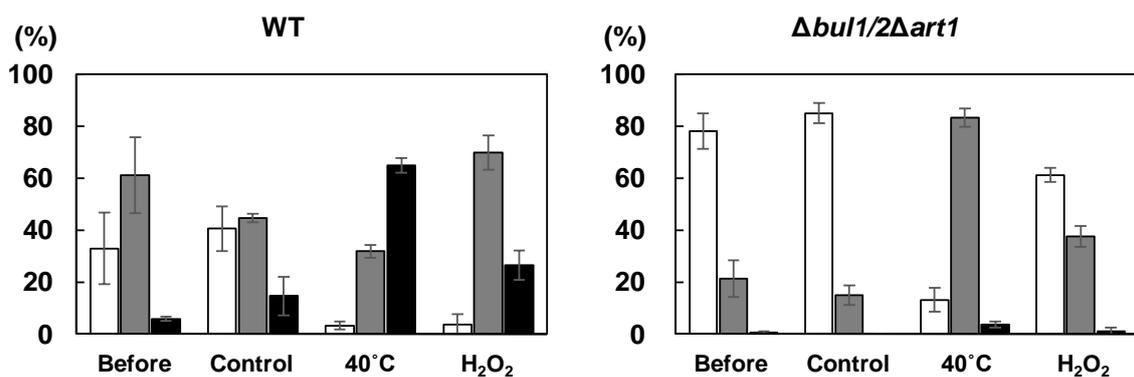


Figure 3-1-9. *BUL1*, *BUL2*, *ART1* 三重破壊株における高温、過酸化水素ストレス下での Gap1 の局在性

プラスミドで *GAL1* プロモーターから Gap1-yEGFP を発現する野生型株と *BUL1*, *BUL2*, *ART1* 三重破壊株を、Figure 3-1-3.と同じ条件で培養した。滅菌水か、高温 (40°C) または 0.25 mM H₂O₂ の各ストレスを与え、3 時間後の Gap1-yEGFP の局在を観察した。結果は異なる 3 つのクローンの平均値で、エラーバーは標準偏差を表す。

3-1-8. Rsp5 とアダプタータンパク質の相互作用解析

ストレス下での Gap1 のエンドサイトーシスには、Bul1, Bul2, Art1 が必要であったことから (Fig.3-1-7, 3-1-9)、ストレス下ではこれらのアダプタータンパク質と Rsp5 との相互作用が強くなっていることが予想される。また、Gap1 のユビキチン化とエンドサイトーシスが抑制されている *rsp5^{A401E}* 株では、Rsp5 の基質認識に関わる WW ドメインにアミノ酸置換が生じている (Hoshikawa *et al.*, 2003)。このことから、*rsp5^{A401E}* 株では基質認識に何らかの問題が起こっている可能性があるとして推測される。そこで、共免疫沈降法を用い、野生型株と *rsp5^{A401E}* 株それぞれで Rsp5 と各アダプタータンパク質 (Bul1, Bul2, Art1) との相互作用を検証した (Fig.3-1-10~12)。

対数増殖期の野生型株と *rsp5^{A401E}* 株の各細胞にエタノールストレスを加え、ストレスと Rsp5 の機能が Rsp5 と各アダプタータンパク質の相互作用に及ぼす影響を比較した。その結果、エタノールストレス下の *rsp5^{A401E}* 株では、非ストレス条件下と比べて Rsp5 と Bul1 の相互作用が弱まっている様子が観察された (Fig.3-1-10)。Bul2 と Rsp5 の相互作用については、野生型株においてもエタノールストレス下でやや弱まっていた (Fig.3-1-11)。さらに、Bul2 の場合、*rsp5^{A401E}* 株ではストレスの有無に関わらず、Rsp5 との相互作用がほとんどないことも分かった。また、Art1 と Rsp5 の相互作用についても Bul2 と同様に、野生型株ではエタノールストレス下で相互作用が弱くなり、*rsp5^{A401E}* 株ではほとんど相互作用が見られなかった (Fig.3-1-12)。これまで、*rsp5^{A401E}* 株では Rsp5 の機能が低下していることが示唆されていたが (Hoshikawa *et al.*, 2003)、その直接的な原因は不明であった。今回の結果は、*rsp5^{A401E}* 株における Rsp5 の機能低下が、Rsp5 の基質認識能力の低下に起因するものであることを強く示唆している。

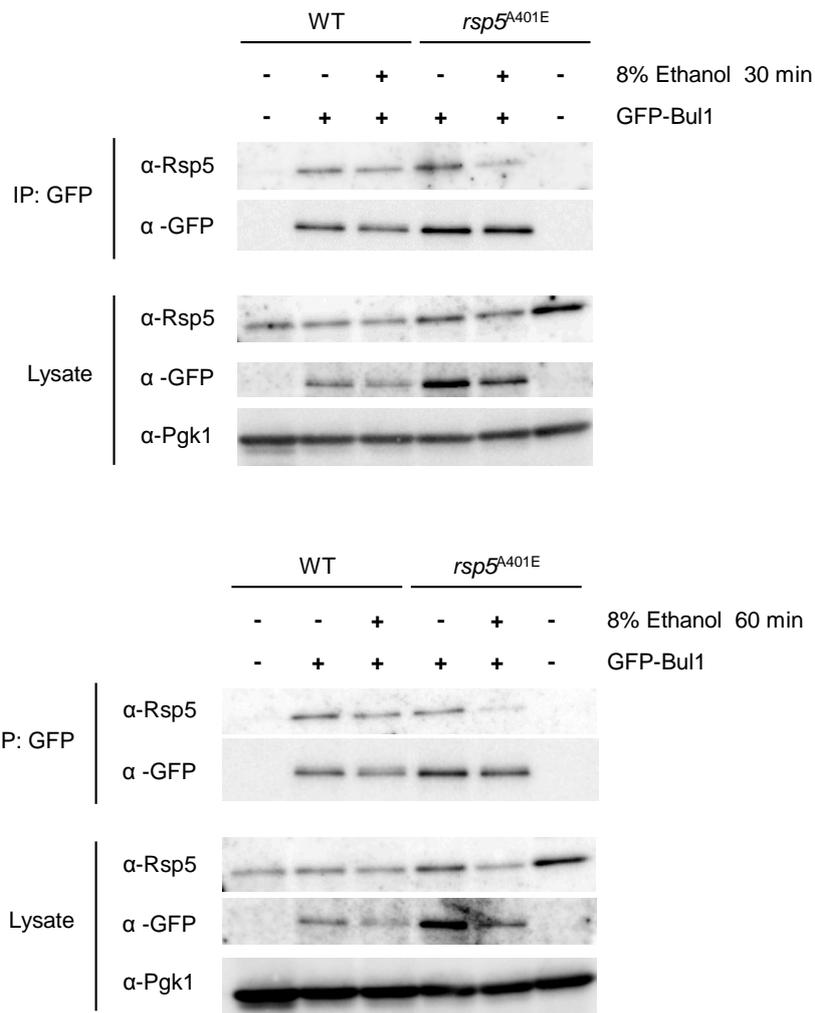


Figure 3-1-10. Rsp5 と Bul1 の相互作用

野生型株または *rsp5^{A401E}* 株において、yEGFP-Bul1 (GFP-Bul1; +) を発現させた株を SC-Leu 培地で対数増殖期まで培養した。8%エタノール (8% Ethanol; +) または滅菌水 (8% Ethanol; -) を添加し、30, 60 分後に集菌して全細胞抽出液を調製した。抗 GFP マグネティックビーズで免疫沈降を行い、EGFP-Bul1 を Bait として Rsp5 を共沈させた。空ベクター (GFP-Bul1; -) を導入した株をネガティブコントロールに用いた。各サンプルは抗 Rsp5 抗体 (α -Rsp5)、抗 GFP 抗体 (α -GFP)、抗 Pgk1 抗体 (α -Pgk1; 内部標準タンパク質) を用いてイムノブロッティングに供した。

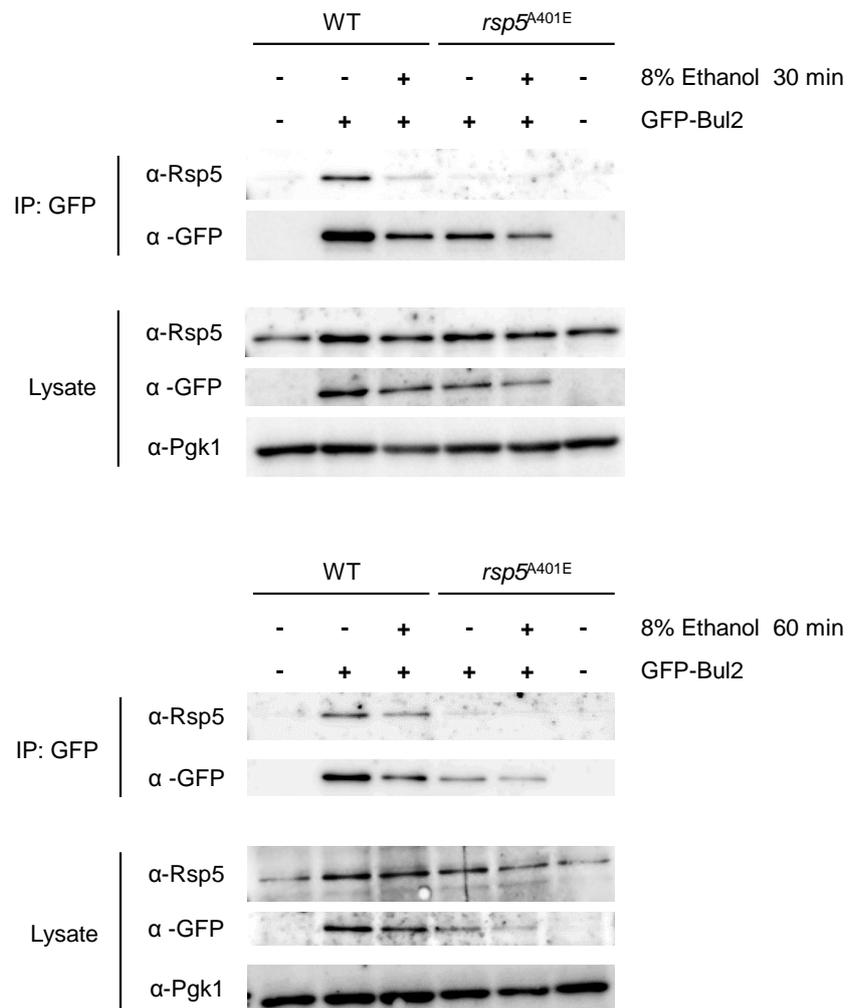


Figure 3-1-11. Rsp5 と Bul2 の相互作用

Figure 3-1-10.に準ずる。ただし、yEGFP-Bul2 を発現させた各株を SC-Ura 培地で培養し、EGFP-Bul2 を Bait として Rsp5 を共沈させた。

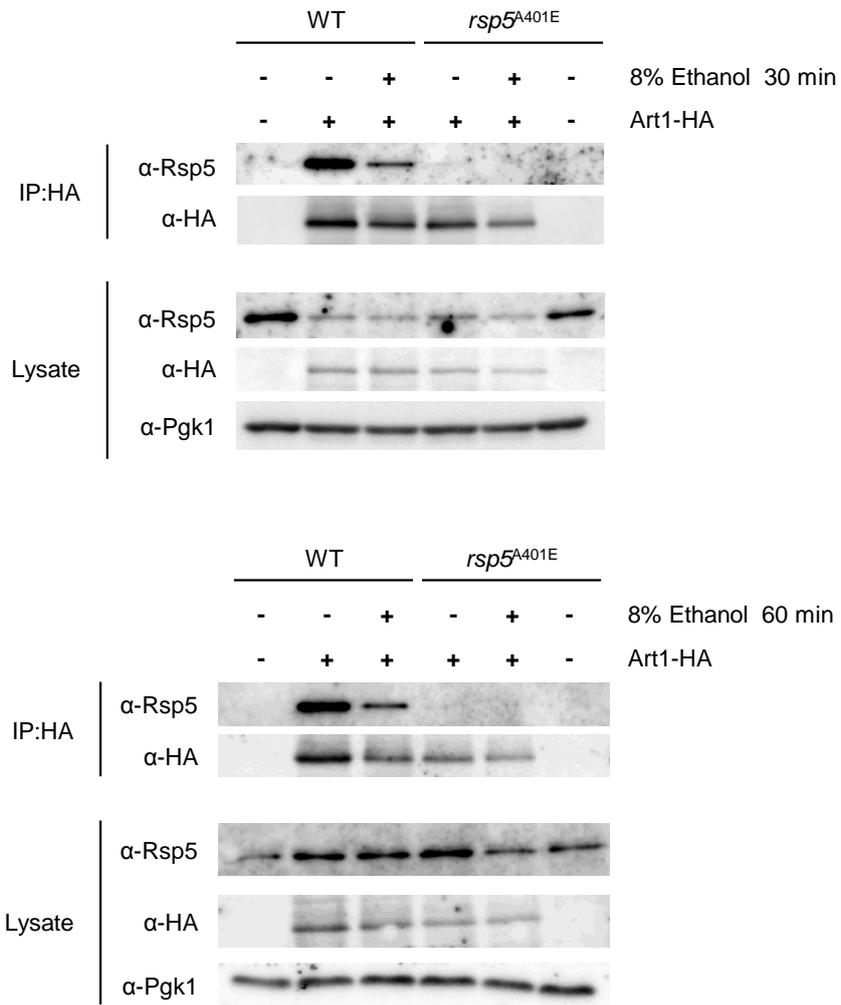


Figure 3-1-12. Rsp5 と Art1 の相互作用

Figure 3-1-10.に準ずる。ただし、Art1-HA を発現させた各株を SC-Leu 培地で培養した。Art1-HA を Bait に Rsp5 を共沈させ、Art1-HA は抗 HA 抗体 (α-HA) を用いて検出した。

3-1-9. エタノールストレス下での各種細胞膜タンパク質の局在

PMQC は、環境ストレス下で変性した細胞膜タンパク質全般に対して機能する品質管理システムであると想定している。そこで、Gap1 以外の細胞膜タンパク質もエタノールストレス下で Gap1 同様にエンドサイトーシスを受けるのかどうかを確認するため、様々な細胞膜タンパク質に yEGFP タグを付加した融合タンパク質の局在を、蛍光顕微鏡によって観察した。Agp1 (低アフィニティ広基質特異性アミノ酸パーミアーゼ)、Tat2 (トリプトファンパーミアーゼ)、Gnp1 (高アフィニティ広基質特異性アミノ酸パーミアーゼ)それぞれの yEGFP 融合タンパク質を発現させた野生型株にエタノールストレスを負荷したところ、これら全ての細胞膜タンパク質についてエンドサイトーシスと液胞への輸送が誘導された (Fig.3-1-13)。以上の結果から、ストレス下で変性した細胞膜タンパク質をエンドサイトーシスによって細胞膜上から除去し、液胞で分解する仕組みは、様々な細胞膜タンパク質において共通した異常タンパク質処理機構であることが示唆された。

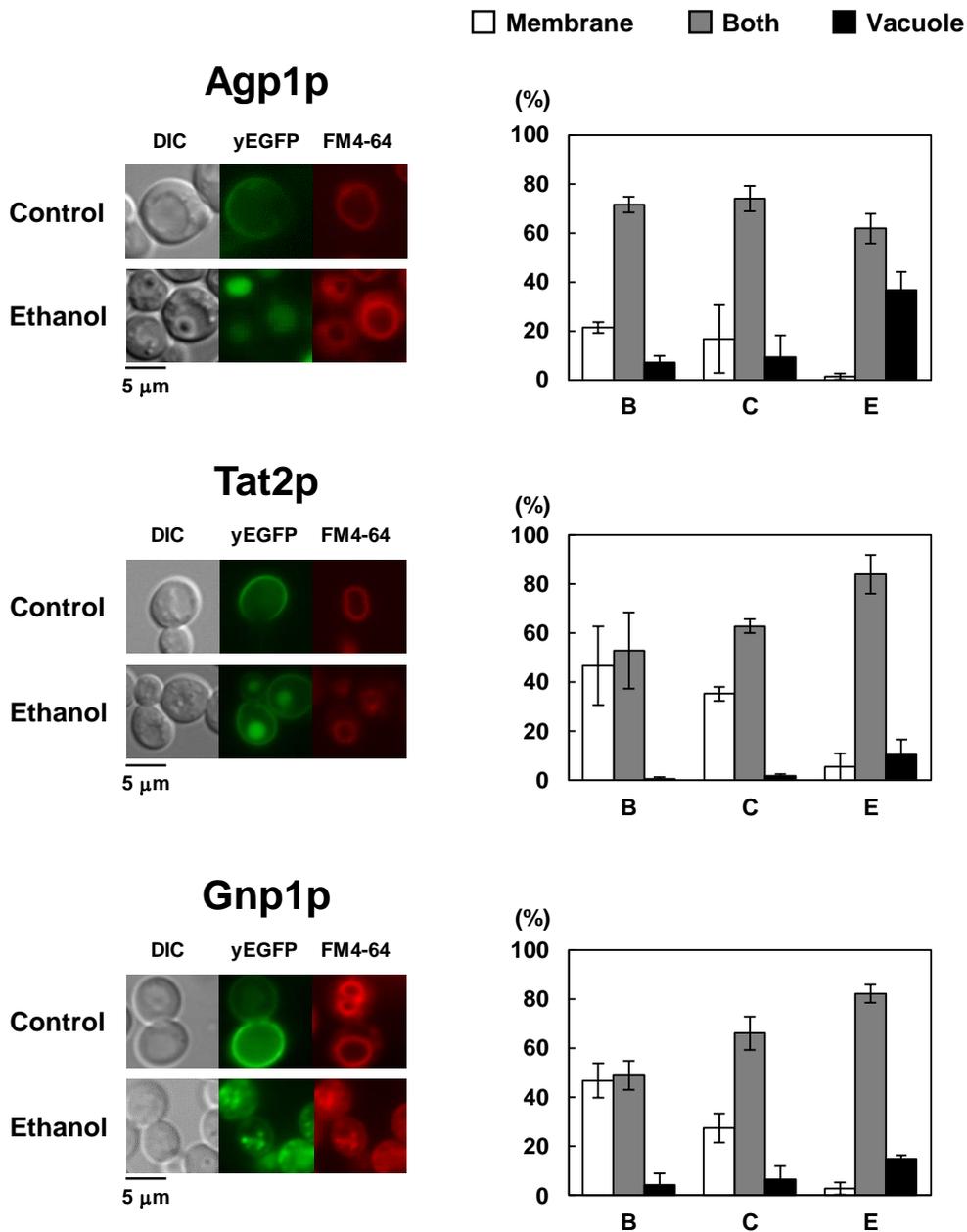


Figure 3-1-13. エタノールストレス下での様々な細胞膜タンパク質の局在性

プラスミドで *GALI* プロモーターから Agp1-yEGFP, Tat2-yEGFP, Gnp1-yEGFP を発現する野生型株を、Figure 3-1-3.と同じ条件で培養した。滅菌水か、15%エタノールを添加し、3時間後の各融合タンパク質の局在を観察した。B; ストレス処理前、C; 滅菌水、E; 15%エタノール。結果は異なる3つのクローンの平均値で、エラーバーは標準偏差を表す。写真は各条件における各細胞膜タンパク質の局在の代表例。液胞は FM4-64 で染色した。

3-2. Art1 が関与する PMQC 以外のストレス応答機構

ストレス環境下において PMQC が機能しない場合、変性した細胞膜タンパク質を効率的に除去することができない。そのため、異常タンパク質が細胞膜上に蓄積し、酵母の生育に悪影響が出ることが予想される。しかしながら、Rsp5 が多様な基質を認識し、ユビキチン化を行う活性を有していることを考えると、PMQC 以外のストレス応答機構にも関与している可能性が考えられる。前章までの実験によって、本研究において PMQC に関与するアダプタータンパク質として同定された Art1 の遺伝子破壊だけでは Gap1 のエンドサイトーシスに明瞭な影響を与えないが (Fig.3-1-7)、様々なストレスに対する耐性が著しく低下することを見出した (Fig.3-1-5)。これらの結果は、Art1 が PMQC によるストレス応答のみを仲介しているという単純なモデルでは十分に説明することができない。このことから、Art1 が PMQC 以外の未知のストレス応答機構にも関与している可能性があると考え、この現象についてさらに解析を行った。

3-2-1. エンドサイトーシス欠損株での ART1 遺伝子破壊の影響

まず、ART1 単独遺伝子破壊株のストレス耐性が低い一方で、Gap1 のエンドサイトーシスへの影響は見られない点について考察を行うため、Art1 とエンドサイトーシスが酵母のストレス耐性に及ぼす影響を検討した。PMQC は、細胞膜タンパク質をエンドサイトーシスによって除去する仕組みであるため、エンドサイトーシスの欠損が PMQC の機能不全に直結する。もし Art1 の機能が PMQC に特異的に関与するのであれば、酵母のエンドサイトーシスに必須な END3 遺伝子 (Bénédicti *et al.*, 1994) の破壊株で、さらに ART1 遺伝子を破壊しても、ストレス耐性に変化は見られないはずである。しかし、Art1 が PMQC 以外のストレス応答に関わる未知の機能を有していた場合、ART1 と END3 の二重遺伝子破壊株は、各々の単独遺伝子破壊株よりも高いストレス感受性を示すことが予想される。そこで、野生型株と ART1 遺伝子の単独破壊株、END3 遺伝子の単独破壊株、そして ART1 END3 二重破壊株の、エタノールストレス下における生育を検証した (Fig.3-2-1)。その結果、ART1, END3 二重破壊株は、各々の単独破壊株と比較して著しく高いストレス感受性を示したことから、Art1 が PMQC 以外のストレス応答機構にも関与している可能性が示された。

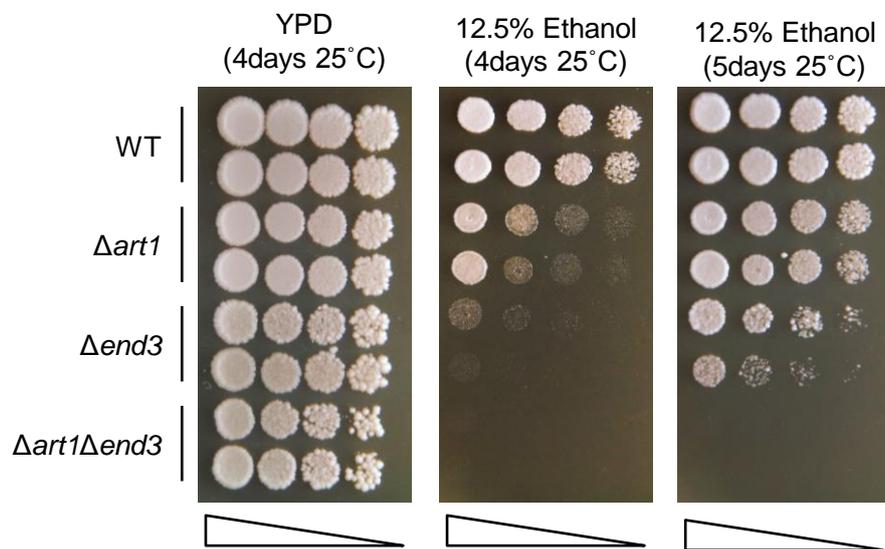


Figure 3-2-1. エンドサイトーシス欠損株における *ART1* 破壊の影響

野生型株、*ART1* 破壊株、*END3* 破壊株、*ART1*, *END3* 二重破壊株を、Figure 3-1-5.同様に、YPD 培地及び 12.5%エタノールを含む YPD 培地にスポットし、25°C で培養した。

3-2-2. Rsp5 およびアダプタータンパク質がストレス応答遺伝子発現に及ぼす影響

酵母がストレスに曝されると、ストレス応答転写因子である Hsf1 や Msn2/4 によってストレス応答遺伝子の転写が誘導される (Martínez-Pastor *et al.*, 1996; Santoro *et al.*, 1998; Boy-Marcotte *et al.*, 1999)。これらの転写因子は、ターゲットとなる熱ショックタンパク質や分子シャペロンなどのストレス応答遺伝子のプロモーター領域に存在する heat shock element (HSE) や stress response element (STRE) といった特定の配列にそれぞれ結合し、各遺伝子の転写を誘導する。

現在までに、Rsp5 の機能が HSE ならびに STRE 経由の遺伝子発現に必要とされており、HSE 経由の遺伝子発現にはアダプタータンパク質 Bul1, Bul2 も関わっていることが報告されている (Kaida *et al.*, 2003)。Art1 も同様に、HSE ないしは STRE を介した熱ショックタンパク質や分子シャペロンなどの遺伝子発現に関与しており、そのような転写レベルのタンパク質品質管理と、PMQC による翻訳後レベルのタンパク質品質管理という二重の品質管理機構を司る新規調節因子であるという仮説を立て (Fig.3-2-2)、Art1 とストレス応答遺伝子の転写との関係を検証することにした。

野生型株、*BUL1*, *BUL2* 二重遺伝子破壊株、*ART1* 遺伝子破壊株、*rsp5*^{A401E} 株に対し、高温ストレスまたはエタノールストレスを加え、代表的なストレス応答遺伝子の転写量の変化を定量リアルタイム PCR によって検出した (Fig.3-2-3)。解析対象の遺伝子としては、熱ショックタンパク質をコードする *HSP42* (HSE の制御下) および *HSP12* (HSE と STRE 両方の制御下)、様々なストレスで発現が誘導されるストレス応答遺伝子 *DDR2* (STRE の制御下) を選択した。当研究室では、ストレス下におけるこれらの遺伝子の発現が *rsp5*^{A401E} 株では野生型株よりも低下していることを既に報告しているが (Haitani *et al.*, 2006)、今回の検証においても同様に、*rsp5*^{A401E} 株でこれらの遺伝子の転写量が高温、エタノール両方のストレス下で有意に低下していた。*BUL1*, *BUL2* 遺伝子破壊株においても、両ストレス下での *HSP42* の転写量が有意に低下しており、これも以前の報告 (Haitani *et al.*, 2006) と一致する。興味深いことに、Kaida ら (2003) の報告とは異なり、STRE の制御下にある *DDR2* の転写量も *BUL1*, *BUL2* 遺伝子破壊株で有意に低下している様子が観察され、Bul1, Bul2 は HSE 経由と STRE 経由両方の遺伝子発現に関与していることが示唆された。一方、*ART1* 破壊株においては、いずれの条件下においても、3 遺伝子の転写量に有意な変化は見られなかった。しかし、今回解析した遺伝子以外のストレス応答遺伝子の転写量が増えている可能性は否定できない。また、*HSP12* については、全ての変異

株で野生型株と比較して有意な変化が見られず、Rsp5 とアダプタータンパク質によるストレス応答遺伝子の転写調節機構は、転写因子 Hsf1 または Msn2/4 による単純な活性調節だけでは説明できないことが示唆された。

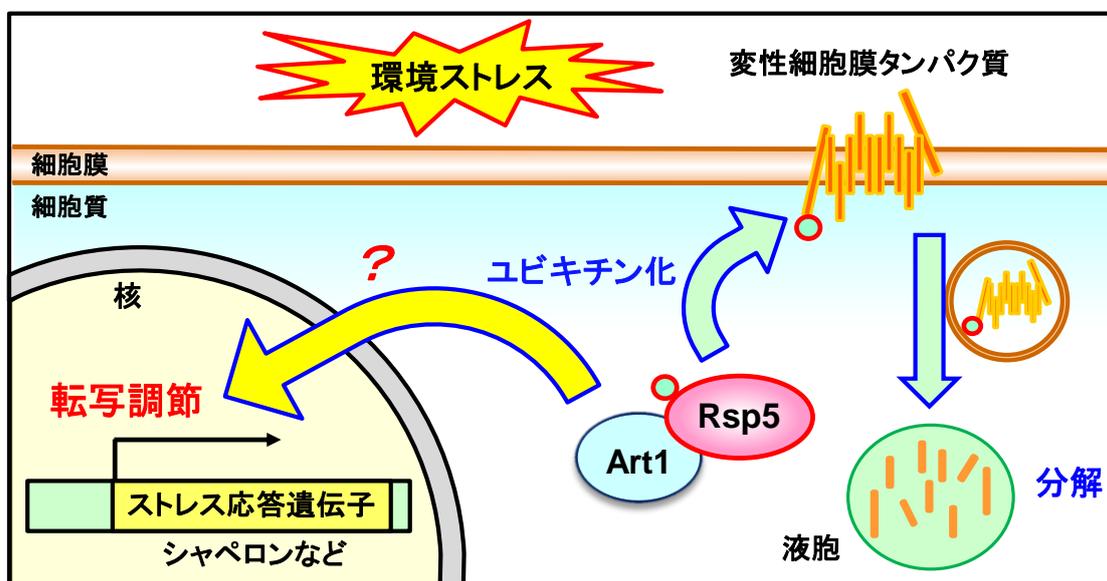


Figure 3-2-2. Rsp5 と Art1 による翻訳後レベルと転写レベルでのタンパク質品質管理モデル

Rsp5 と Art1 は、変性した細胞膜タンパク質をユビキチン化し、そのエンドサイトーシスと、続く液胞での分解を誘導している（翻訳後レベル）。一方、転写因子のユビキチン化と分解等の仕組みによって、直接または間接的に分子シャペロン等のストレス応答遺伝子の転写調節も行っていると予測した（転写レベル）。

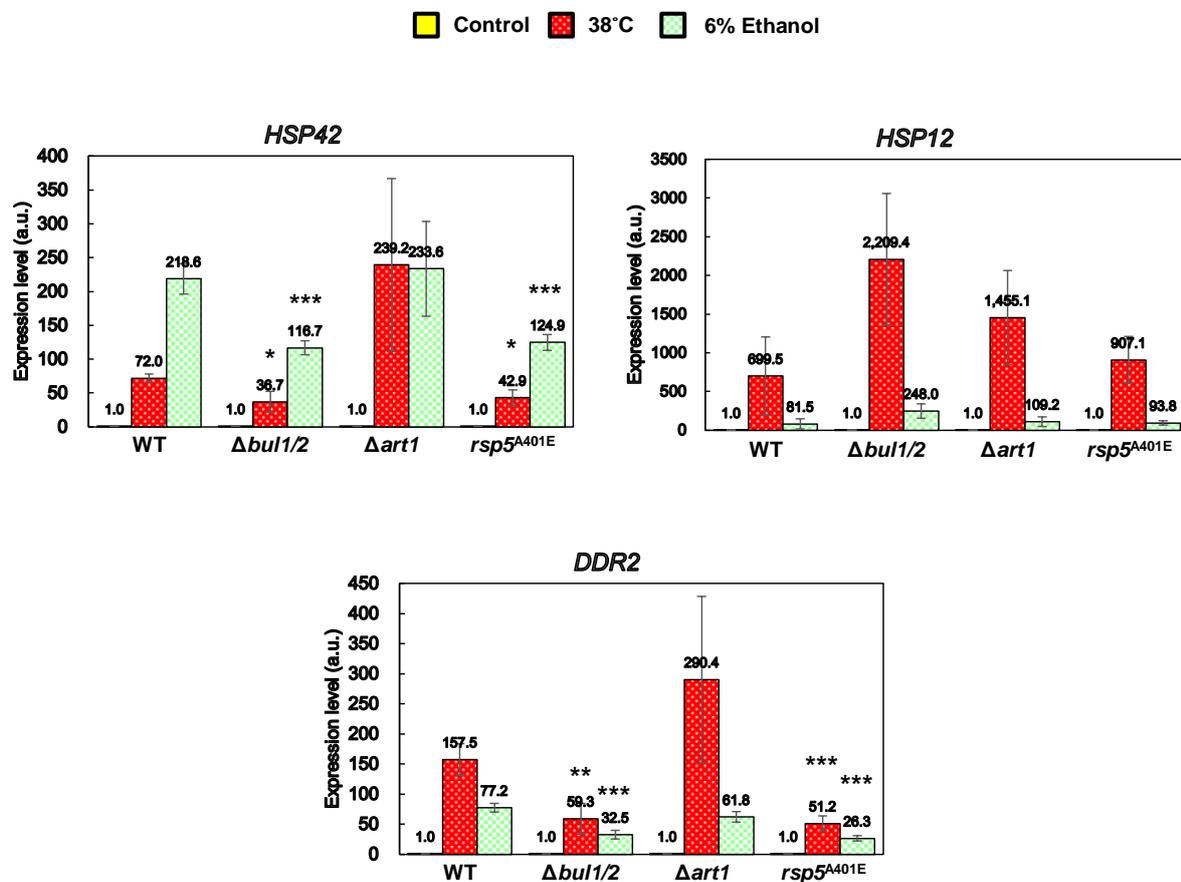


Figure 3-2-3. HSE 及び STRE 制御下の遺伝子発現と、Rsp5 及びアダプタータンパク質との関係

野生型株、*BUL1*, *BUL2* 二重破壊株、*ART1* 破壊株、*rsp5*^{A401E} 株を YPD 培地で対数増殖期まで培養し、滅菌水または、高温 (38°C)、6%エタノールの各ストレスを 30 分加えた。全 RNA を抽出して cDNA を逆転写し、リアルタイム PCR によって、*HSP42*, *HSP12*, *DDR2* の各遺伝子の発現量を測定した。内部標準として *ALG9* を用い、測定には $\Delta\Delta Ct$ 法を用いた。ストレス条件下での各遺伝子の発現量は、各株において、Control 条件下での発現量を 1 として算出した。結果は異なる 3 つのクローンの平均値で、エラーバーは標準偏差を表す。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.005$

3-2-3. *ART1* 遺伝子破壊株のトランスクリプトーム解析

上述の通り、*ART1* 遺伝子破壊株では、高温およびエタノールストレス下における *HSP42*, *HSP12*, *DDR2* の各遺伝子の転写量に野生型株との有意差は見られなかったことから、*Art1* は *PMQC* 以外のストレス応答機構に関与はしているものの、酵母の代表的なストレス応答転写因子である *Hsf1* や *Msn2/4* 以外の因子の調節に関係していることが推測された。しかしながら、これまでに *Art1* が *PMQC* 以外の機能を有するという報告はなく、具体的なターゲットは不明である。そこで、DNA マイクロアレイ解析を行い、エタノールストレス下での発現に *Art1* が影響を及ぼす遺伝子を網羅的に探索した。

その結果、*ART1* 遺伝子破壊株において、非ストレス条件下では野生型株と発現量に差が見られない一方、エタノールストレス下では野生型株の 50% 以下にまで発現が低下している遺伝子が 72 個見つかった (Table 3)。その中には、細胞質中に存在するストレス応答性アルデヒド脱水素酵素 *Ald3* や、カタラーゼ *Ctt1* をコードする遺伝子も含まれていた。また、非ストレス条件下とエタノールストレス下の両方で野生型株の 50% 以下にまで発現が低下している遺伝子も 56 個存在した (Table 5)。その中には、Fig.3-2-3 で検証した *HSP12* や *DDR2* も含まれていた。これは、Fig.3-2-3 では非ストレス条件下での転写量に対するストレス条件下での転写量の比を解析した結果、非ストレス下での転写量が低下してもこの比に大きな変化がなかった遺伝子については、*ART1* 破壊株における発現抑制を検出できなかったためと思われる。

さらに、それぞれの遺伝子群について遺伝子オントロジー (GO) 解析を行ったところ、Table 3 の遺伝子群では、主に孢子形成に関わる遺伝子が有意に多く含まれていることが分かった (Table 4)。しかしながら、本研究で用いている酵母は全て一倍体であるため、孢子形成関連遺伝子の変化が直接酵母のストレス耐性に関与している可能性は低いと考えられる。Table 5 の遺伝子群においては、グルタチオントランスポーターや、アミノ酸代謝に関わる遺伝子が有意に多く見られた。これらのデータからは *Art1* を介した遺伝子発現とストレス応答とを結びつけるターゲットを推測するのは困難であった。そこで、これらの遺伝子のうち、エタノールストレスに対する応答が低下または消失していると考えられる Table 3 の遺伝子群に着目し、これらの遺伝子の転写を誘導している転写因子を、Yeasttract (<http://www.yeasttract.com/index.php>) を用いて解析した。その結果、これらの遺伝子の多くの発現を調節する転写因子として、*Adr1*, *Hst3*, *Mig1*, *Mig3*, *Msi1*, *Msn2* の 6 個を見出した (Table 7, 8)。しかしこれらの転写因子をコードする遺伝子の発現には、野生型株と *ART1* 破壊株との間に大きな差

は見られず ($\Delta art1/WT = 0.77$ [*ADR1*], 0.97 [*HST3*], 0.71 [*MIG1*], 1.01 [*MIG3*], 1.17 [*MSI1*], 1.02 [*MSN2*])、転写因子自体の発現量の低下が Table 3 の遺伝子群の発現量低下の原因であるとは考えにくかった。そこで、これらの転写因子の共通点について調査した結果、6つの転写因子の内、*Adr1*, *Mig1*, *Mig3*, *Msn2* の4個までもが全て *Snf1* という AMP 活性化プロテインキナーゼ (AMPK) によって活性調節を受けていることが報告されていた (Treitel *et al.*, 1998; Dubacq *et al.*, 2004; De Wever *et al.*, 2005; Ratnakumar *et al.*, 2009)。興味深いことに、*ART1* 遺伝子破壊株における *SNF1* 遺伝子の発現量には野生型株と差が見られなかったことから ($\Delta art1/WT = 0.94$)、*Art1* が翻訳後レベルで *Snf1* に作用し、*Snf1* の下流にある転写因子の活性を間接的に調節することで、遺伝子発現に関与している可能性が見出された。

Table 3. *ART1* 破壊によってエタノールストレス特異的に発現が低下した遺伝子

Exp. rate (Control) <i>Δart1</i> /WT	Exp. rate (Ethanol) <i>Δart1</i> /WT	Genes	Description
0.887	0.200	<i>YOL131W</i>	Putative protein of unknown function
0.868	0.205	<i>YIL102C</i>	Putative protein of unknown function
0.955	0.208	<i>YGL262W</i>	Putative protein of unknown function
0.631	0.214	<i>YER188W</i>	Dubious open reading frame
1.506	0.220	<i>HXT6</i>	High-affinity glucose transporter
1.558	0.222	<i>HXT7</i>	High-affinity glucose transporter
0.886	0.252	<i>RIM4</i>	Putative RNA-binding protein
0.884	0.277	<i>ANS1</i>	Putative GPI protein
0.880	0.283	<i>PCH2</i>	Hexameric ring ATPase that remodels chromosome axis protein Hop1p
0.890	0.292	<i>PDC6</i>	Minor isoform of pyruvate decarboxylase
0.768	0.298	<i>ALD3</i>	Cytoplasmic aldehyde dehydrogenase
0.861	0.307	<i>THI13</i>	Protein involved in synthesis of the thiamine precursor HMP
0.884	0.317	<i>YJL127W-A</i>	Dubious open reading frame
1.219	0.320	<i>MCH2</i>	Protein with similarity to mammalian monocarboxylate permeases
#0.347	0.325	<i>PFS1</i>	Sporulation protein required for prospore membrane formation
0.651	0.330	<i>SSU1</i>	Plasma membrane sulfite pump involved in sulfite metabolism
0.786	0.331	<i>ISF1</i>	Serine-rich, hydrophilic protein
0.729	0.331	<i>HBT1</i>	Shmoo tip protein, substrate of Hub1p ubiquitin-like protein
1.601	0.349	<i>PDH1</i>	Putative 2-methylcitrate dehydratase
0.846	0.360	<i>SLZ1</i>	Sporulation-specific protein with a leucine zipper motif
0.886	0.361	<i>IRC18</i>	Protein involved in outer spore wall assembly
0.841	0.362	<i>MRK1</i>	Glycogen synthase kinase 3 (GSK-3) homolog
1.173	0.370	<i>YBR064W</i>	Dubious open reading frame
0.667	0.378	<i>SPS22</i>	Protein of unknown function
0.560	0.380	<i>GIP2</i>	Putative regulatory subunit of protein phosphatase Glc7p
0.962	0.380	<i>ACS1</i>	Acetyl-coA synthetase isoform
0.763	0.384	<i>CTT1</i>	Cytosolic catalase T
0.666	0.388	<i>SOL4</i>	6-phosphogluconolactonase
0.871	0.388	<i>YKL177W</i>	Dubious open reading frame
0.869	0.391	<i>ERR3</i>	Enolase, a phosphopyruvate hydratase
1.080	0.397	<i>YOR225W</i>	Dubious open reading frame
0.780	0.397	<i>YJL009W</i>	Dubious open reading frame
0.942	0.398	<i>YML089C</i>	Dubious open reading frame
0.637	0.399	<i>YEL073C</i>	Putative protein of unknown function
0.529	0.403	<i>YOR392W</i>	Dubious open reading frame

Table 3. 続き

0.740	0.408	<i>YNR034W-A</i>	Protein of unknown function
1.185	0.411	<i>YBR134W</i>	Dubious open reading frame
0.842	0.422	<i>YOR345C</i>	Dubious open reading frame
1.684	0.424	<i>MTH1</i>	Negative regulator of the glucose-sensing signal transduction pathway
0.890	0.427	<i>YMR135W-A</i>	Dubious open reading frame
0.872	0.428	<i>YFL052W</i>	Zinc cluster transcription factor that regulates respiratory growth
1.178	0.428	<i>YBL070C</i>	Dubious open reading frame
1.557	0.433	<i>GPM2</i>	Homolog of Gpm1p phosphoglycerate mutase
0.867	0.433	<i>SPR3</i>	Sporulation-specific homolog of the CDC3/10/11/12 family of genes
0.680	0.437	<i>YPR002C-A</i>	Dubious open reading frame
0.869	0.439	<i>YLR311C</i>	Dubious open reading frame
0.789	0.440	<i>CIT3</i>	Dual specificity mitochondrial citrate and methylcitrate synthase
0.639	0.442	<i>YDL114W</i>	Putative short-chain dehydrogenase/reductase
0.676	0.444	<i>CAT2</i>	Carnitine acetyl-CoA transferase
1.268	0.445	<i>ADH5</i>	Alcohol dehydrogenase isoenzyme V
0.818	0.446	<i>RTN2</i>	Reticulon protein; stabilizes membrane curvature
0.883	0.447	<i>PRR2</i>	Serine/threonine protein kinase
0.815	0.448	<i>CDA1</i>	Chitin deacetylase
0.519	0.453	<i>YER053C-A</i>	Protein of unknown function
0.880	0.458	<i>YHL037C</i>	Dubious open reading frame
0.797	0.460	<i>YPR197C</i>	Dubious open reading frame
0.690	0.460	<i>MAL32</i>	Maltase (alpha-D-glucosidase)
0.714	0.464	<i>YNL195C</i>	Protein of unknown function
0.672	0.466	<i>YGR287C</i>	Major isomaltase (alpha-1,6-glucosidase/alpha-methylglucosidase)
0.877	0.474	<i>YCL046W</i>	Dubious open reading frame
0.679	0.482	<i>BNA2</i>	Tryptophan 2,3-dioxygenase or indoleamine 2,3-dioxygenase
0.578	0.483	<i>DIT2</i>	N-formyltyrosine oxidase
0.661	0.485	<i>YAT1</i>	Outer mitochondrial carnitine acetyltransferase
0.656	0.485	<i>NQM1</i>	Transaldolase of unknown function
0.630	0.485	<i>GAS4</i>	1,3-beta-glucanosyltransferase
0.706	0.491	<i>UIP4</i>	Protein that interacts with Ulp1p
0.845	0.491	<i>DCS2</i>	m(7)GpppX pyrophosphatase regulator
0.779	0.492	<i>YNR071C</i>	Putative aldose 1-epimerase
0.983	0.494	<i>YMR196W</i>	Putative protein of unknown function
0.592	0.494	<i>BNA4</i>	Kynurenine 3-monooxygenase
0.885	0.496	<i>MCR1</i>	Mitochondrial NADH-cytochrome b5 reductase
0.712	0.499	<i>MAL12</i>	Maltase (alpha-D-glucosidase)

※Exp. rate は Control とエタノールストレス下それぞれの条件における *ART1* 破壊株と野生型株の遺伝子の発現量の比を表す。

バックグラウンドとの有意差なし。

Table 4. Table3.の遺伝子の GO 解析

GOID	GO_term	P-value
30476	ascospore wall assembly	0.003
42244	spore wall assembly	0.003
70590	spore wall biogenesis	0.003
70591	ascospore wall biogenesis	0.003
71940	fungus-type cell wall assembly	0.003
70726	cell wall assembly	0.004
48856	anatomical structure development	0.009
9653	anatomical structure morphogenesis	0.009
32989	cellular component morphogenesis	0.011
42402	cellular biogenic amine catabolic process	0.013
30435	sporulation resulting in formation of a cellular spore	0.014
43934	sporulation	0.017
48646	anatomical structure formation involved in morphogenesis	0.020
10927	cellular component assembly involved in morphogenesis	0.021
30437	ascospore formation	0.034
48468	cell development	0.034
9310	amine catabolic process	0.038
48869	cellular developmental process	0.039
9272	fungus-type cell wall biogenesis	0.040
34293	sexual sporulation	0.047
43935	sexual sporulation resulting in formation of a cellular spore	0.047

Table 5. *ART1* 破壊によって非ストレス条件下とエタノールストレス条件下共に発現が低下した遺伝子

Exp. rate (Control) <i>Δart1</i> /WT	Exp. rate (Ethanol) <i>Δart1</i> /WT	Genes	Description
0.054	0.437	<i>SPO22</i>	Meiosis-specific protein essential for chromosome synapsis
0.068	0.243	<i>YOL160W</i>	Dubious open reading frame
0.089	0.311	<i>YFR012W</i>	Protein of unknown function
0.094	0.332	<i>PES4</i>	Poly(A) binding protein, suppressor of DNA polymerase epsilon mutation
0.105	0.336	<i>STE3</i>	Receptor for a factor pheromone
0.125	0.386	<i>REC8</i>	Meiosis-specific component of the sister chromatid cohesion complex
0.135	0.415	<i>HSP12</i>	Plasma membrane protein involved in maintaining membrane organization
0.170	0.437	<i>DAL1</i>	Allantoinase
0.195	0.440	<i>YFR012W-A</i>	Putative protein of unknown function
0.214	0.309	<i>YOL162W</i>	Putative protein of unknown function
0.217	0.375	<i>MPC54</i>	Component of the meiotic outer plaque
0.223	0.481	<i>FMP48</i>	Putative protein of unknown function
0.250	0.256	<i>SEO1</i>	Putative permease
0.254	0.401	<i>THI1</i>	Protein involved in synthesis of the thiamine precursor HMP
0.257	0.405	<i>CHA1</i>	Catabolic L-serine (L-threonine) deaminase
0.261	0.301	<i>YOL163W</i>	Putative protein of unknown function
0.277	0.460	<i>YJR157W</i>	Dubious open reading frame
0.284	0.488	<i>MIP6</i>	Putative RNA-binding protein
0.312	0.493	<i>ADE17</i>	Enzyme of 'de novo' purine biosynthesis
0.319	0.496	<i>ARO10</i>	Phenylpyruvate decarboxylase
0.323	0.338	<i>YAR053W</i>	Dubious open reading frame
0.336	0.435	<i>YKR012C</i>	Dubious open reading frame
0.341	0.390	<i>THI2</i>	Transcriptional activator of thiamine biosynthetic genes
0.344	0.469	<i>YOR214C</i>	Putative spore wall protein
0.345	0.480	<i>DIT1</i>	Sporulation-specific enzyme required for spore wall maturation
0.348	0.462	<i>YAL064W</i>	Protein of unknown function
0.352	0.396	<i>GCV2</i>	P subunit of the mitochondrial glycine decarboxylase complex
0.363	0.407	<i>FRE7</i>	Putative ferric reductase with similarity to Fre2p
0.366	0.463	<i>SSP1</i>	Protein involved in the control of meiotic nuclear division
0.369	0.469	<i>DAL4</i>	Allantoin permease
0.381	0.462	<i>YNR073C</i>	Putative mannitol dehydrogenase
0.388	0.479	<i>TKL2</i>	Transketolase
0.396	0.417	<i>YBR124W</i>	Putative protein of unknown function
0.399	0.463	<i>DIA3</i>	Protein of unknown function
0.406	0.465	<i>ADE12</i>	Adenylosuccinate synthase

Table 5. 続き

0.407	0.479	<i>YBR116C</i>	Dubious open reading frame
0.409	0.359	<i>YKR106W</i>	Proton:glutathione antiporter
0.410	0.388	<i>YCL073C</i>	Proton:glutathione antiporter
0.412	0.455	<i>HPF1</i>	Haze-protective mannoprotein
0.414	0.387	<i>GCV1</i>	T subunit of the mitochondrial glycine decarboxylase complex
0.418	0.482	<i>SNO4</i>	Possible chaperone and cysteine protease
0.425	0.494	<i>YIL169C</i>	Putative protein of unknown function
0.430	0.495	<i>SNZ3</i>	Member of a stationary phase-induced gene family
0.434	0.493	<i>SPG4</i>	Protein required for high temperature survival during stationary phase
0.435	0.462	<i>YEL057C</i>	Protein of unknown function
0.439	0.407	<i>YMR244W</i>	Putative protein of unknown function
0.441	0.353	<i>YDR015C</i>	Dubious open reading frame
0.472	0.424	<i>DDR2</i>	Multi-stress response protein
0.474	0.474	<i>HFM1</i>	Meiosis specific DNA helicase
0.478	0.478	<i>YSW1</i>	Protein required for normal prospore membrane formation
0.479	0.482	<i>CRF1</i>	Transcriptional corepressor
0.479	0.500	<i>GPX1</i>	Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase
0.479	0.460	<i>SNZ2</i>	Member of a stationary phase-induced gene family
0.488	0.486	<i>YKL071W</i>	Putative protein of unknown function
0.488	0.391	<i>YGR067C</i>	Putative protein of unknown function
0.497	0.484	<i>HIM1</i>	Protein of unknown function involved in DNA repair

※Exp. rate は Control とエタノールストレス下それぞれの条件における *ART1* 破壊株と野生型株の遺伝子の発現量の比を表す。

Table 6. Table 5.の遺伝子の GO 解析

GOID	GO_term	P-value
9071	serine family amino acid catabolic process	0.002
1901565	organonitrogen compound catabolic process	0.012
34635	glutathione transport	0.014
34775	glutathione transmembrane transport	0.014
35443	tripeptide transmembrane transport	0.014
1901606	alpha-amino acid catabolic process	0.031

Table 7. Table 3.の遺伝子に共通した転写因子

Transcription factors	
Adr1	Mig3
Hst3	Msi1
Mig1	Msn2

Table 8. Table 3.の遺伝子と Table 7.の転写因子の関係

	Adr1	Hst3	Mig1	Mig3	Msi1	Msn2
<i>ACS1</i>						
<i>ADH5</i>						
<i>ALD3</i>						
<i>ANS1</i>						
<i>BNA2</i>						
<i>BNA4</i>						
<i>CAT2</i>						
<i>CDA1</i>						
<i>CIT3</i>						
<i>CTT1</i>						
<i>DCS2</i>						
<i>DIT2</i>						
<i>ERR3</i>						
<i>GAS4</i>						
<i>GIP2</i>						
<i>GPM2</i>						
<i>HBT1</i>						
<i>HXT6</i>						
<i>HXT7</i>						
<i>IRC18</i>						
<i>ISF1</i>						
<i>MAL12</i>						
<i>MAL32</i>						
<i>MCH2</i>						
<i>MCR1</i>						
<i>MRK1</i>						
<i>MTH1</i>						
<i>NQM1</i>						
<i>PCH2</i>						
<i>PDC6</i>						
<i>PDH1</i>						
<i>PFS1</i>						
<i>PRR2</i>						
<i>RIM4</i>						
<i>RTN2</i>						
<i>SLZ1</i>						
<i>SOL4</i>						
<i>SPR3</i>						
<i>SPS22</i>						
<i>SSU1</i>						
<i>THI13</i>						
<i>UIP4</i>						
<i>YAT1</i>						
<i>YBL070C</i>						
<i>YBR064W</i>						
<i>YBR134W</i>						
<i>YCL046W</i>						
<i>YDL114W</i>						
<i>YEL073C</i>						
<i>YER053C-A</i>						
<i>YER188W</i>						
<i>YFL052W</i>						
<i>YGL262W</i>						
<i>YGR287C</i>						
<i>YHL037C</i>						
<i>YIL102C</i>						
<i>YJL009W</i>						
<i>YJL127W-A</i>						
<i>YKL177W</i>						
<i>YLR311C</i>						
<i>YML089C</i>						
<i>YMR135W-A</i>						
<i>YMR196W</i>						
<i>YNL195C</i>						
<i>YNR034W-A</i>						
<i>YNR071C</i>						
<i>YOL131W</i>						
<i>YOR225W</i>						
<i>YOR345C</i>						
<i>YOR392W</i>						
<i>YPR002C-A</i>						
<i>YPR197C</i>						

※各遺伝子の開始コドン直前から 1000bp 上流の領域に、転写因子の認識配列が含まれていた場合に赤色のブロックで示す。

3-2-4. Snf1 の分解に対する Art1 の影響

Art1 による Snf1 の翻訳後調節の分子メカニズムとして、Snf1 と Rsp5 との相互作用を仲介することで Snf1 のユビキチン化と分解を誘導し、そのタンパク質量を調節している可能性が想定された。現在までに、Rsp5 が Snf1 によるリン酸化の基質の 1 つであることが報告されているが (Ptacek *et al.*, 2005)、実際にその活性が Snf1 によって調節されているかどうかは不明である。また、Rsp5 による Snf1 のユビキチン化に関する報告はなされていない。Snf1 には、Rsp5 が直接的に基質と結合する際に必要な PY モチーフが存在するため (²¹¹SCGSPPNYAAP²²⁰)、Rsp5 が Snf1 をユビキチン化する際には必ずしも Art1 のようなアダプタータンパク質を必要としない可能性もある。しかし、Tat2 のように、PY モチーフを持ちながらも、そのユビキチン化とエンドサイトーシスにアダプタータンパク質が必要とされる例も存在する (Abe & Iida, 2003)。そこで野生型株と ART1 破壊株とで、エタノールストレス下における Snf1 の分解速度に差が見られるのか比較した。GALI プロモーターを用いて Snf1 を一時的に発現させた後、その発現を止め、6%エタノールを培地に加えた。その結果、野生型株、ART1 破壊株の両者とも Snf1 が時間に伴って分解される様子が観察されたが、その分解速度に有意な差は見られなかった (Fig.3-2-4)。

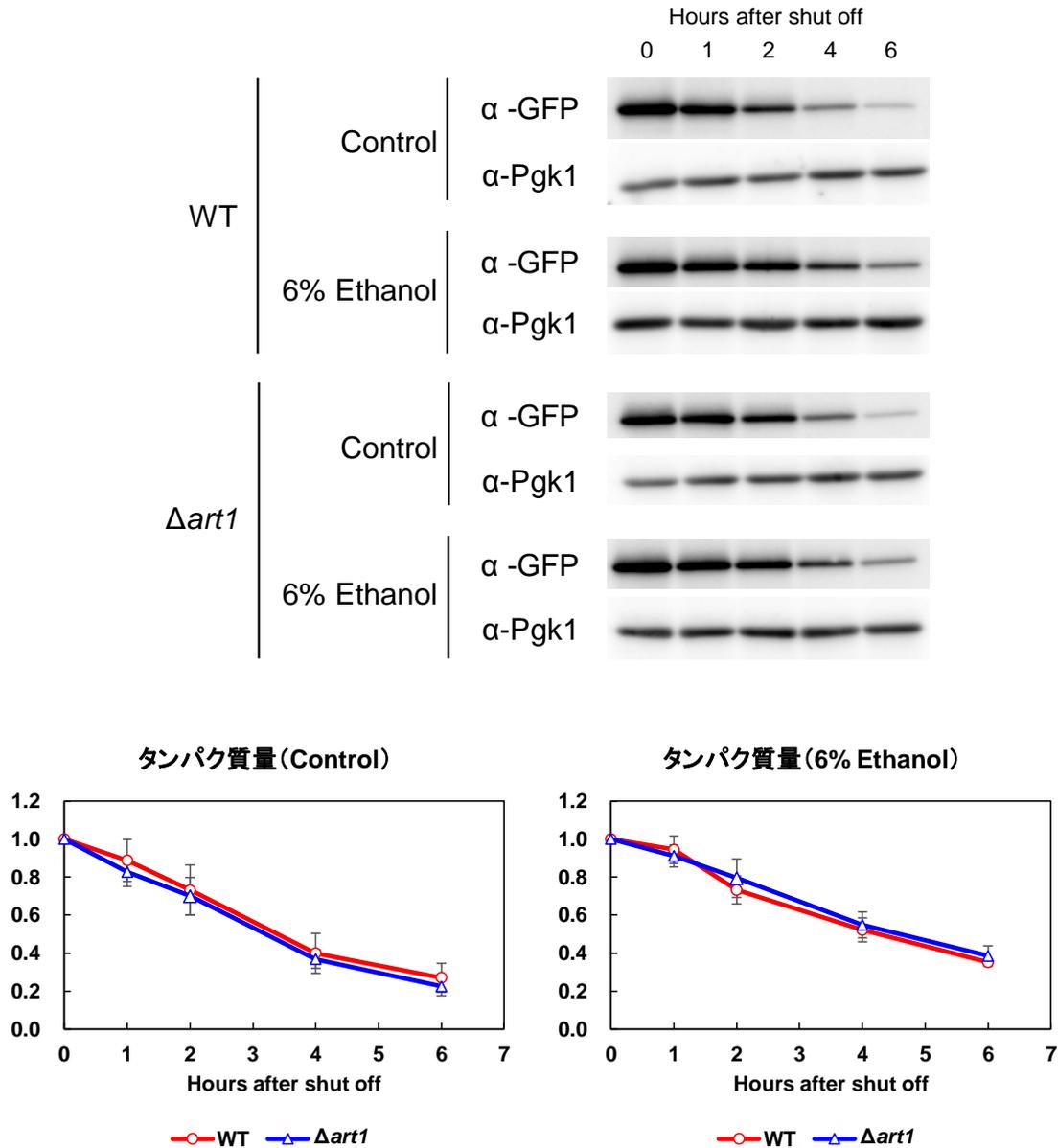


Figure 3-2-4. Snf1 の分解に対する *ART1* 破壊の影響

プラスミドで *GAL1* プロモーターから Snf1-yEGFP を発現する野生型株と、*ART1* 破壊株を SG-Leu, Ura 培地で対数増殖期まで培養し、Snf1-yEGFP を発現させた。その後、各細胞を SC-Leu, Ura 培地に移して発現を停止させた後、滅菌水または 6%エタノールを加え、0, 1, 2, 4, 6 時間後にサンプリングした。全細胞抽出液を調整し、抗 GFP 抗体 (α -GFP)、抗 Pgk1 抗体 (α -Pgk1) でイムノブロッティングに供した。タンパク質量は ImageJ で定量し、各株において発現停止後 0 時間の時点での Snf1-yEGFP/Pgk1 を 1 とした。グラフは異なる 3 つのクローンの平均値で、エラーバーは標準偏差を表す。

3-2-5. ストレス下における生育曲線

ART1 遺伝子の破壊によって、酵母が様々なストレスに対して高い感受性を示すようになったことから、*Art1* が酵母のストレス耐性に関与していることは明らかである。これまでも、*ART1* 遺伝子の破壊によって、短時間の熱ショックに対する酵母のストレス耐性が低下すること、逆に *ART1* を過剰発現することで熱ショック耐性が付与されることが報告されている (Zhao *et al.*, 2013)。しかし、実際の発酵生産環境におけるストレスは、一時的にではなく、慢性的に酵母に負荷され続けているものである。そこで、エタノールストレス下、及び高温ストレス下で野生型株、*ART1* 破壊株、*ART1* 過剰発現株 (ゲノムからの発現量の約 2.9 倍 : Fig.3-2-6) を培養してそれぞれの生育曲線を作製し、慢性的なストレス環境下での生育を解析した (Fig.3-2-5)。その結果、Fig.3-1-5 同様、エタノールストレス下と高温ストレス下において *ART1* 破壊株の生育が遅延している様子が観察された。一方で、*ART1* 過剰発現株の生育は、高温ストレス下では野生型株との差は見られず、エタノールストレス下では *ART1* 破壊株ほどではないものの、野生型株より悪化していた。

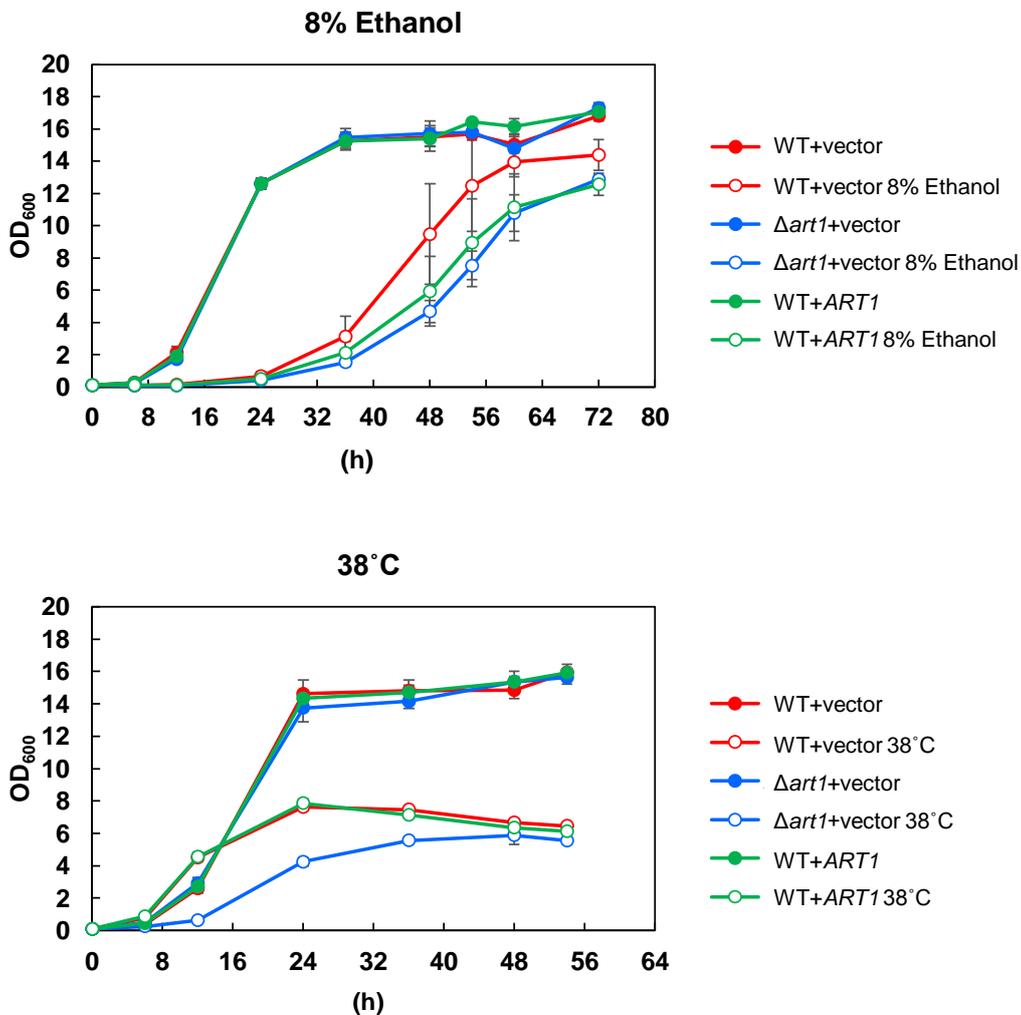


Figure 3-2-5. エタノールストレス、高温ストレス下での生育に対する *ART1* 破壊と *ART1* 過剰発現の影響

野生型株、*ART1* 破壊株、野生型株に pAG415-*P_{GPD}*-*ART1* を導入した *ART1* 過剰発現株 (WT+*ART1*) を OD₆₀₀=0.1 に合わせ、SC-Leu 培地で、25°C、25°C+8%エタノール、38°C の各条件で培養した。適宜培養液の OD₆₀₀ を測定した。グラフは異なる 3 つのクローンの平均値で、エラーバーは標準偏差を表す。

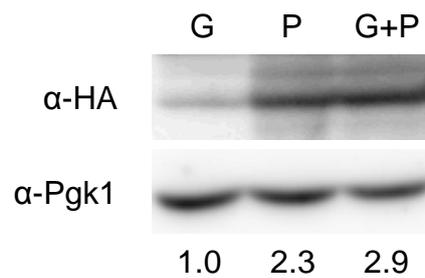


Figure 3-2-6. Art1 タンパク質の発現レベル

ゲノム上の *ART1* の C 末端に 3HA 配列を付加した ART1-HA 株、*ART1* 破壊株に pAG415-*P_{GPD}-ART1-HA* を導入した株、ART1-HA 株に pAG415-*P_{GPD}-ART1-HA* を導入した *ART1* 過剰発現株を SC-Leu 培地で対数増殖期まで培養し、全細胞抽出液を調製した。抗 HA 抗体 (α-HA)、抗 Pgk1 抗体 (α-Pgk1) を用いてイムノブロッティングに供した。タンパク質量は ImageJ を用いて定量し、ART1-HA 株の Art1/Pgk1 を 1 とした (下段の数字)。G; ART1-HA 株 P; *ART1* 破壊株+ pAG415-*P_{GPD}-ART1-HA* G+P; ART1-HA 株+ pAG415-*P_{GPD}-ART1-HA*

3-2-6. 酵母の発酵能に対する *Art1* の影響

環境ストレスによって酵母の生育が悪化すれば、酵母の発酵能も低下するものと思われる。その一方、酵母のストレス耐性と発酵能が必ずしも同じ傾向を示すとは限らない。例えば、実際に発酵産業で利用されている産業用酵母の中には、一部の清酒酵母のように、ストレス耐性が低いにも関わらず、高い発酵能力を有するものが報告されている (Watanabe *et al.*, 2012)。そこで、*ART1* の有無によって、酵母の発酵能にどのような影響が見られるのか、野生型株、*ART1* 破壊株、*ART1* 過剰発現株を用いて検証した。酵母の発酵能を示す指標として、発酵によって発生する二酸化炭素の生成量と生成速度をファーモグラフによって、また発酵終了時点における培地中のエタノール濃度をガスクロマトグラフィーによってそれぞれ測定した。まず 30°C で静置培養したところ、二酸化炭素の生成量と生成速度、エタノール濃度全てにおいて、各株間で差は見られなかった (Fig.3-2-7)。次に 38°C の高温環境下で静置培養を行った結果、*ART1* 破壊株で二酸化炭素の生成量と生成速度が低下している様子が観察された (Fig.3-2-8)。また、エタノール濃度も *ART1* 破壊株では野生型株より低く、その差は有意なものであった (Fig.3-2-8)。また、38°C における *ART1* 過剰発現株の二酸化炭素生成量は、*ART1* 破壊株よりは高いものの、野生型株よりは低下していた (Fig.3-2-8)。なお、エタノール濃度も野生型株より低下していたが、有意差は見られなかった (Fig.3-2-8)。以上より、*ART1* は破壊することで高温ストレス下における発酵能の低下を引き起こすが、単純な過剰発現では有意な発酵能の向上には繋がらないことが明らかになった。

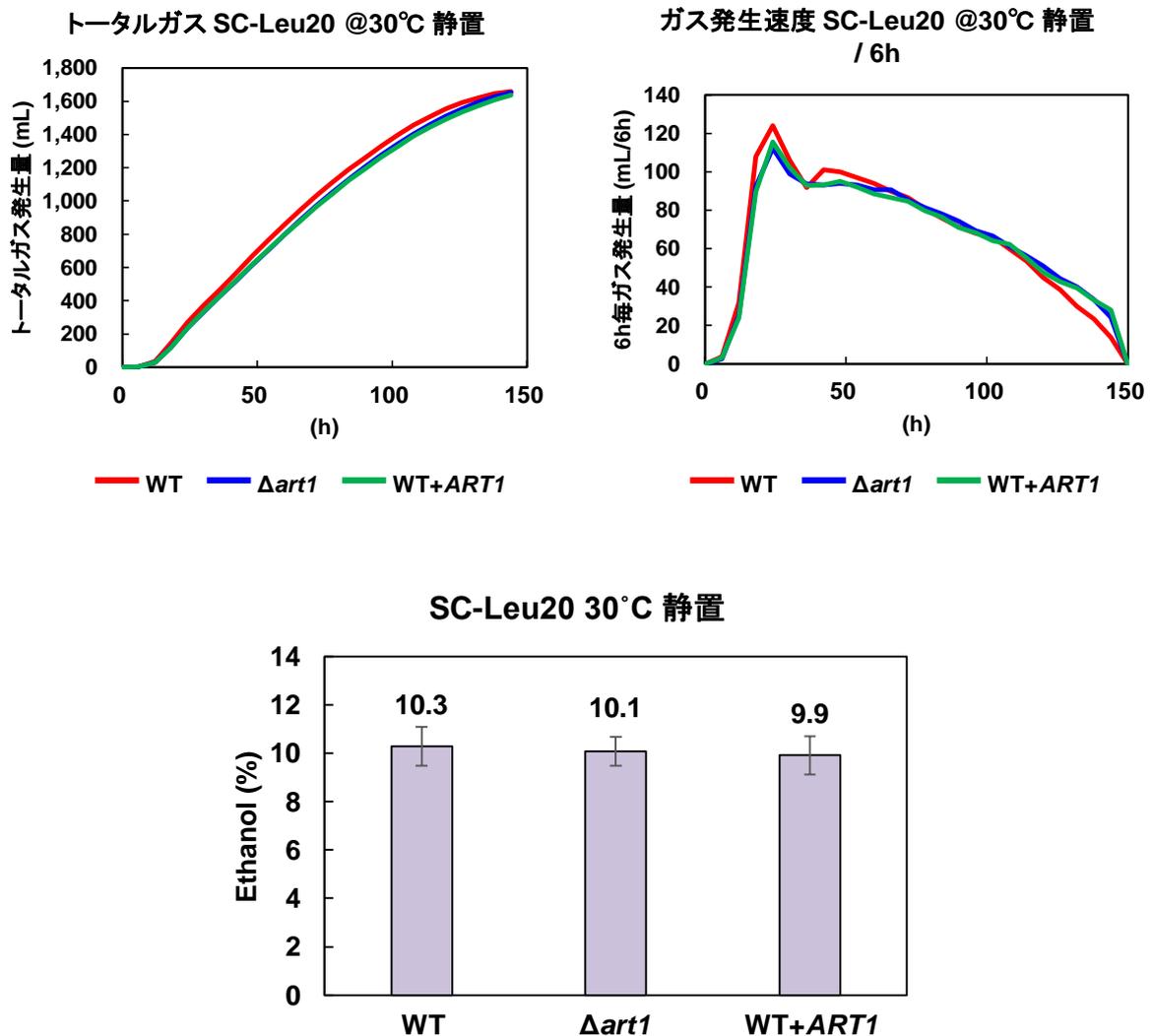


Figure 3-2-7. *ART1* 破壊と *ART1* 過剰発現による発酵能力への影響 (30°C 静置培養)

野生型株、*ART1* 破壊株、野生型株に pAG415-*P_{GPD}*-*ART1* を導入した *ART1* 過剰発現株を、OD₆₀₀=0.1 に合わせ、30°C の SC-Leu20 培地で培養した。総炭酸ガス発生量及びガス発生速度 (6 時間毎の炭酸ガス発生量) を、ファームグラフを用いて測定した。また、発酵終了時の培地のエタノール濃度を、ガスクロマトグラフィーを用いて測定した。結果は異なる 3 つのクローンの平均値で、エラーバーは標準偏差を表す。

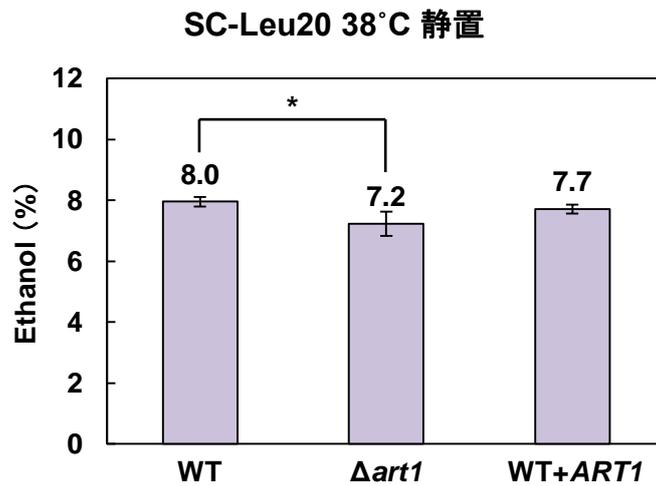
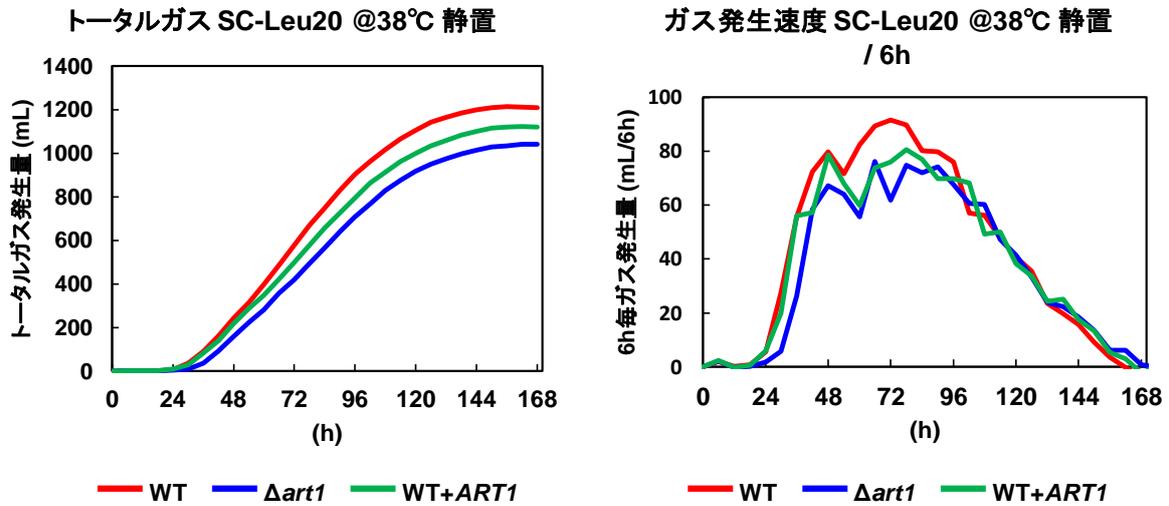


Figure 3-2-8. *ART1* 破壊と *ART1* 過剰発現による発酵能力への影響 (38°C 静置培養)

野生型株、*ART1* 破壊株、野生型株に pAG415-*P_{GPD}-ART1* を導入した *ART1* 過剰発現株を、OD₆₀₀=0.1 に合わせ、38°C の SC-Leu20 培地で培養した。総炭酸ガス発生量及びガス発生速度 (6 時間毎の炭酸ガス発生量) を、ファームグラフを用いて測定した。また、発酵終了時の培地のエタノール濃度を、ガスクロマトグラフィーを用いて測定した。結果は異なる 3 つのクローンの平均値で、エラーバーは標準偏差を表す。**P*<0.05

4. 考察

PMQC の存在を明らかにし、そのメカニズムを解明する試み自体はこれまでもなされており、Pma1 や Ste2, CFTR といったトランスポーターやレセプターの温度感受性変異株などを用いた研究が報告されている (Pizzirusso & Chang, 2004; Jenness *et al.*, 1997; Okiyoneda *et al.*, 2010)。しかしながら、これらの研究は主に、ERAD のような小胞体におけるタンパク質の品質管理機構を誤って通過した変性タンパク質を、細胞膜上で認識してユビキチン化し、エンドサイトーシスを経て液胞で分解、除去する仕組みに関するものである。これに対して近年、高温や酸化などの環境ストレスによって細胞膜上で変性したタンパク質が、Rsp5 によるユビキチン化とエンドサイトーシスによって細胞膜上から除去され、液胞で分解されるというモデルが提唱されている (Keener & Babst, 2013; Zhao *et al.*, 2013)。本研究では、酵母 *S. cerevisiae* を用いて、後者の環境ストレス下における細胞膜タンパク質のメカニズムについて解析を行った。

エタノールストレスによる Gap1 のユビキチン化

酵母のアミノ酸パーミアーゼ Gap1 は、硫酸アンモニウム添加によってユビキチン化され、エンドサイトーシスを受けることが報告されているが、当研究室で単離した Rsp5 の機能低下型変異株 *rsp5^{A401E}* 株ではそれらが抑制されている (Hoshikawa *et al.*, 2003)。加えて、エタノールストレスによっても Gap1 のエンドサイトーシスが誘導されることも見出しているが、Gap1 のユビキチン化との関係は不明であった (鈴木, 2011)。本研究では、まず硫酸アンモニウム添加時同様に、高濃度エタノールストレス下においても Gap1 が積極的にユビキチン化されることを見出した (Fig.3-1-1)。しかし、Rsp5 依存的にユビキチン化される 9 番目と 16 番目の Lys 残基 (Soetens *et al.*, 2001) をアミノ酸置換した変異型 Gap1 (Gap1^{K9R/K16R}) は、エタノールストレス下でユビキチン化されず、エタノールストレス下でも硫酸アンモニウム添加時同様、Rsp5 依存的に Lys9 か Lys16 もしくはその両方がユビキチン化されることが示された (Fig.3-1-2)。また、エタノールストレス下で検出された、Gap1 のポリユビキチン化を示すスメアなバンドは、硫酸アンモニウム添加時に検出されたものよりも高分子量側で見られ、時間に伴って急速により高分子量側へシフトしていった (Fig.3-1-1)。この原因としては、2つの可能性が考えられる。1つは、単純にエタノールストレスによって変性した Gap1 が凝集し、結果的に高分子量側で検出された可能

性である。もう 1 つは、エタノールストレス下では急速に **Gap1** のポリユビキチン化が進み、かつ形成されるポリユビキチン鎖は硫酸アンモニウム添加時に形成されるものよりも長い、もしくはより複雑な分岐鎖を形成している可能性である。ユビキチン化は、その形式によって異なる機能を発揮するが、エタノールのようなストレスに対する応答と、硫酸アンモニウムのような栄養源に対する応答とでユビキチン化の形式を使い分けることには、メリットがあると考えられる。エンドサイトーシスによって細胞質中に輸送された細胞膜タンパク質は、全てが液胞で分解されるわけではなく、分解されることなく再び細胞膜上へリサイクルされることもある (O'Donnell *et al.*, 2010; Becuwe & Léon, 2014)。栄養源に対する応答の一環として誘導されたエンドサイトーシスによって細胞膜から除去されたタンパク質であれば、そのまま再利用することには何ら問題はない。しかし、ストレス応答の一環として細胞膜から除去されたタンパク質は変性し、正常な機能を失っている可能性が高い。そのようなタンパク質は再利用されることなく、速やかに分解されることが好ましい。ストレス応答と栄養応答とで異なる形式のユビキチン化を行えば、エンドサイトーシスを受けたタンパク質が再利用可能か否かを区別することができ、異常タンパク質を再び細胞膜上に送り返す危険性を排除できるだろう。これら 2 つの可能性を検証する方法としては、尿素やグアニジン塩酸塩のような強力なタンパク質可溶化剤を、細胞を破碎する際の **Lysis Buffer**、または **SDS-PAGE** のポリアクリルアミドゲルに添加する方法が考えられる。この方法によって凝集した **Gap1** を可溶化できるため、単純に変性した **Gap1** が凝集しているのであれば、硫酸アンモニウム添加時とエタノール添加時で、同じようなユビキチン化 **Gap1** のバンドが見えるはずである。もし異なるバンドが検出されれば、次はユビキチンの各 **Lys** 残基を置換し、特定の **Lys** 残基を介したポリユビキチン鎖を形成できないようにすることで、ユビキチン化の形式を判別できるだろう。

Gap1 のエンドサイトーシスと **Rsp5** のアダプタータンパク質

Rsp5 のアダプタータンパク質についての解析では、硫酸アンモニウム添加時の **Gap1** のユビキチン化において主要な役割を果たしている **Bul1**, **Bul2** は、エタノールストレス下においては寄与が小さく、代わりに **Bul1**, **Bul2** 非依存的なメカニズムが大きく寄与していることが分かった (Fig.3-1-3)。これについては、**Bul1**, **Bul2** 非依存的な **Gap1** のユビキチン化の際に主にユビキチン化される **Gap1** の **Lys16** (Risinger & Kaiser, 2008) を **Arg** に置換した変異型 **Gap1** のエンドサイトーシスが、**BUL1**, **BUL2** 二重破壊株において、エタノールストレス下で

あっても大きく抑制されていたことから示された (Fig.3-1-4)。そして、Gap1 には Rsp5 によって直接認識される PY モチーフが存在しないため、Bul1, Bul2 以外の何らかのアダプタータンパク質が関与していることが考えられた。また、近年新たに Rsp5 のアダプタータンパク質として同定されたが、その機能についてはほとんど未解明であった Bul3 が、非ストレス条件下で、かつ資化しにくい窒素源しか存在しない状況では、Gap1 のエンドサイトーシスを未知の仕組みによって抑制していることが示唆された (Fig.3-1-3)。これは、おそらく良質な窒素源が得られない環境において、この仕組みによって Gap1 を安定的に細胞膜上に保持し、より多くの窒素源を取り込むことで、生育に必要な窒素源の不足を補っているのだと考えられる。しかし、Bul3 が具体的にどのプロセスをどのように阻害しているのかについては解明できなかった。今後、資化しにくい窒素源のみを含む培地中で、Bul3 の有無と Gap1 のユビキチン化との関係を解析し、また、窒素源の違いによって Bul3 と Rsp5 もしくは Bul1, Bul2 との相互作用に変化があるのかなどを解析することで、Bul3 の機能について新たな知見が得られるかもしれない。

続いて、酵母のストレス感受性を指標に、エタノールストレス下での Gap1 のユビキチン化とエンドサイトーシスに大きく寄与しているアダプタータンパク質を探索したところ、Art1 が有力な候補として浮上した (Fig.3-1-5, 6)。また、改めて Bul1, Bul2 の関与も強く示唆された (Fig.3-1-5, 6)。Art1 については近年、リジンパーミアーゼ Lyp1 や α ファクターレセプター Ste2 といった細胞膜タンパク質の品質管理に関与していることが報告されており (Zhao *et al.*, 2013; Alvaro *et al.*, 2014)、この結果はそれらの報告を支持するものである。なお、Art タンパク質の内、Art9 (Rim8) は酵母のアルカリストレス応答に必要なことが既に報告されているが (Boysen & Mitchell, 2006)、ART1 や BUL1, BUL2 破壊も酵母のアルカリ耐性を低下させることが、本実験によって新たに見出された (Fig.3-1-5, 6)。これらの結果をもとに行った BUL1, BUL2, ART1 三重破壊株を用いた蛍光顕微鏡観察によって、実際にエタノールストレス下での Gap1 のエンドサイトーシスに Art1 が関与していることが示された (Fig.3-1-7)。また、近年ストレス下での Gap1 のエンドサイトーシスに関与することが報告された Art3, Art6 についても (Crapeau *et al.*, 2014)、BUL1, BUL2, ART3, ART6 四重破壊株を用いた実験により、その関与が確認できた (Fig.3-1-7)。なお、ART1 の単独破壊や ART3, ART6 二重破壊では、Gap1 のエンドサイトーシスへの顕著な影響は見られず (Fig.3-1-7)、これらのアダプタータンパク質はどれか 1 つが必須というのではなく、機能的に冗長性があることも示唆された。しかし同時に、

BUL1, *BUL2*, *ART1* 三重破壊株と、*BUL1*, *BUL2*, *ART3*, *ART6* 四重破壊株とでは、硫酸アンモニウムへの応答に差が見られたことから (Fig.3-1-7)、アダプタータンパク質の機能には、各々の状況に応じて使い分けられる選択性もあることが示唆された。恐らくこの選択性の違いは、Rsp5 が構造やサイズが異なる様々な細胞膜タンパク質を認識し、ユビキチン化できる多様性にも寄与しているだろう。エタノールストレス下で観察された Gap1 のエンドサイトーシスは、高温や塩化リチウム、過酸化水素などのストレスによっても速やかに誘導され (Fig.3-1-8)、これが環境ストレスに対して一般的に起こる応答であることが示唆された。さらに、*BUL1*, *BUL2*, *ART1* 三重破壊株における Gap1 のエンドサイトーシスの抑制も、エタノールだけでなく、高温及び過酸化水素ストレス下でも観察された (Fig.3-1-9)。これは生育テストの結果とも合わせ、環境ストレス全般に対する応答に Bul1, Bul2 と Art1 が重要な役割を持っていることを示す結果と言える。

Rsp5 とアダプタータンパク質との相互作用

ストレス下での Gap1 のエンドサイトーシスにおける Bul1, Bul2, Art1 の重要性から、エタノールストレス下では Rsp5 と Bul1, Bul2, Art1 との相互作用が強化されていることが予想された。これまでも当研究室では、Gap1 の恒常的なユビキチン化とエンドサイトーシスを誘導する変異型 Rsp5 (Rsp5^{T357A}) と Bul2 との相互作用が、野生型 Rsp5 よりも強化されていることを見出している (Watanabe *et al.*, 2015)。しかし、予想に反して各アダプタータンパク質と Rsp5 との相互作用は、実際にはほとんど変化がないか、むしろ弱まっていた (Fig.3-1-10~12)。この結果は、Rsp5 とアダプタータンパク質の相互作用に加えて、それらのタンパク質の活性調節が、ユビキチン化とエンドサイトーシスの誘導に必要なことを示している可能性もある。例えば当研究室では、Gap1 のユビキチン化とエンドサイトーシスに、リン酸化による Rsp5 の活性調節が関わっていることを見出している (Sasaki & Takagi, 2013)。また、Bul1, Bul2 も以前は TORC1 の下流にあるキナーゼ Npr1 によってリン酸化され、14-3-3 タンパク質と結合することで活性が阻害されるモデルが提唱されていたが (Merhi & André, 2012)、近年になって、リン酸化された Bul1, Bul2 は活性を維持しており、ストレスによって TORC1 が抑制された際に 14-3-3 タンパク質とも結合したまま、Gap1 のユビキチン化とエンドサイトーシスを誘導しているとのモデルが新たに提唱された (Crapeau *et al.*, 2014)。一方、ストレス条件下で Art1 がどのように活性が調節されているのかは不明である。また、機能低下型の Rsp5^{A401E} と各アダプタ

アダプタータンパク質との相互作用は著しく低下していることが判明し、Rsp5^{A401E}の機能低下の原因が基質認識能の障害である可能性が初めて示された (Fig.3-1-10~12)。Fig.3-1-3において機能的に冗長性があることが示唆された Bul1 と Bul2 との間で、Rsp5^{A401E}との相互作用に差が見られた点も興味深い。機能向上型の Rsp5^{T357A}において、Bul2 との結合が強化されている一方、Bul1 との結合は特に強化されていなかったことから (Watanabe *et al.*, 2015)、Bul1 と Bul2 の機能は完全には同一でない可能性、または Rsp5 との結合様式が異なる可能性が考えられる。このように、Rsp5 とアダプタータンパク質の相互作用や活性調節機構については未だ不明な点が多く、さらなる解析が必要である。

以上の結果から、Rsp5 とアダプタータンパク質による Gap1 のユビキチン化とエンドサイトーシスについて、Fig.4-1 に示す全体像が明らかとなった。すなわち、窒素源に対する応答では、Rsp5 による Gap1 のユビキチン化とエンドサイトーシスを、主に Bul1, Bul2 と Art3, Art6 が仲介することで誘導しており、Bul3 がこれを抑制しているものと思われる。一方、環境ストレスに対する応答においては、Bul1, Bul2 と Art1, Art3, Art6 が Rsp5 と Gap1 との相互作用を仲介している。1つの基質に対して、機能的に冗長性を保ちつつも、異なる機能を有する複数のアダプタータンパク質が作用することで、細胞内外の様々な状況の変化に応じたユビキチン化制御が可能になっていると考えられる。また、ストレス条件下において、変性した細胞膜タンパク質をエンドサイトーシスによって細胞膜上から取り除き、液胞で分解するという PMQC の仕組みは Gap1 に限らず、様々な細胞膜タンパク質に共通した細胞の防御機構であることも示唆された (Fig.3-1-13)。なお、この機構において、Gap1 以外の細胞膜タンパク質と Rsp5 との相互作用についても、アダプタータンパク質による仲介が行われていることが予想されるが、本研究では他の細胞膜タンパク質に作用するアダプタータンパク質の同定には至らなかった。しかし、本研究で解析を行ったアダプタータンパク質の中でも、Art1 は PMQC において中心的な役割を担うアダプタータンパク質の最有力候補だろう。

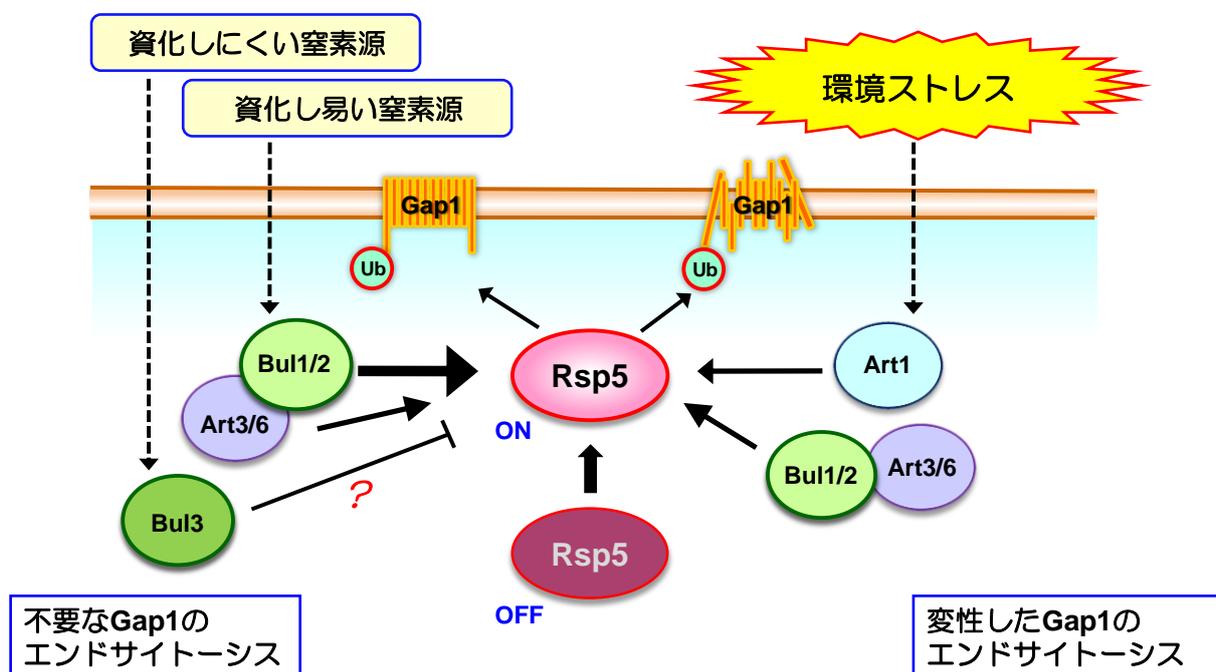


Figure 4-1. Rsp5 とアダプタータンパク質による Gap1 の制御の全体像

窒素源に対する応答では、Rsp5 による Gap1 のユビキチン化とエンドサイトーシスを、Bul1, Bul2, Art3, Art6 が正に、Bul3 が負に制御している。環境ストレスに対する応答では、Bul1, Bul2, Art1, Art3, Art6 が Rsp5 による変性 Gap1 のユビキチン化とエンドサイトーシスを正に制御している。

Art1 の持つ PMQC 以外の機能探索

本研究では、アダプタータンパク質 Art1 についてさらに詳細な解析を行った。PMQC の核であるエンドサイトーシスによる細胞膜タンパク質の除去が行えず、PMQC に障害のあるエンドサイトーシス欠損株では、*ART1* 遺伝子の破壊によってストレス耐性がさらに低下したことから、PMQC 以外のストレス応答に Art1 が関与している可能性が示唆された (Fig.3-2-1)。過去には、Rsp5 と Bul1, Bul2 が、ストレス応答遺伝子の転写調節に関与していることが報告されていることから (Kaida *et al.*, 2003)、Art1 も同様にストレス応答遺伝子の転写調節に関与することで、翻訳後レベルと転写後レベルからなる二重のタンパク質品質管理を行っているとの仮説を立てた (Fig.3-2-2)。そして、*ART1* 破壊株において、複数のストレス応答遺伝子の発現量の変化を検証したが、野生型株との間で有意な差は見られなかった (Fig.3-2-3)。そこで、エタノールストレス下における野生型株と *ART1* 破壊株の遺伝子発現の違いについて、DNA マイクロアレイによる網羅的な解析を行った。その結果、*ART1* 破壊株において、非ストレス条件下では野生型株と同程度の発現量だが、エタノールストレス下では野生型株の半分以下しか発現していない遺伝子を見出した (Table 3.)。そしてそれらの遺伝子の多くに共通した転写因子として、6 個の転写因子を同定したが (Table 7.)、それらの遺伝子の発現量は野生型株と *ART1* 破壊株とで大きな差は見られなかった。そこで、同定された転写因子のうち、Mig1, Mig3, Msn2 をリン酸化することでそれらの活性を負に調節している AMP 活性化プロテインキナーゼ Snf1 (Treitel *et al.*, 1998; Dubacq *et al.*, 2004; De Wever *et al.*, 2005) に着目した。*ART1* 破壊株ではエタノールストレス下での Snf1 の分解が抑制されており、それによって下流の転写因子の活性が抑制されると考えたが、野生型株と *ART1* 破壊株との間で Snf1 の分解速度に差は見られなかった (Fig.3-2-4)。したがって、Art1 が Snf1 の存在量の調節によって、その下流の遺伝子発現を制御している可能性は低いと思われる。それに代わる機構としては、Snf1 の活性調節への関与が考えられる (Fig.4-2)。Snf1 はキナーゼ Sak1, Tos3, Elm1 によってリン酸化されて活性化し (Elbing *et al.*, 2006)、Glc7 と Reg1 からなるプロテインホスファターゼ 1 (PP1) による脱リン酸化を受けて不活性化する (Sanz *et al.*, 2000)。近年、Snf1 が小胞体 (ER) ストレス応答を負に調節しており、*SNF1* 破壊株は ER ストレス耐性が高いことも報告されている (Mizuno *et al.*, 2015)。そのため、エタノールストレス下における Snf1 のリン酸化状態を野生型株と *ART1* 破壊株とで比較することで、その活性調節と Art1 との関係や、*ART1* 破壊株の高いストレス感受性の原因についても考察できるだろう。また、Snf1 は今回同定され

た転写因子の 1 つである *Adr1* の活性については正に調節しているため (Ratnakumar *et al.*, 2009)、*Adr1* の下流の遺伝子発現の低下については、*Snf1* を介した制御機構とは別のメカニズムが関与しているものと思われる。これについても、まずは *Adr1* がエタノールストレス下で *Art1* 依存的に分解されるかの検証が最初の足掛かりとなるだろう (Fig.4-2)。

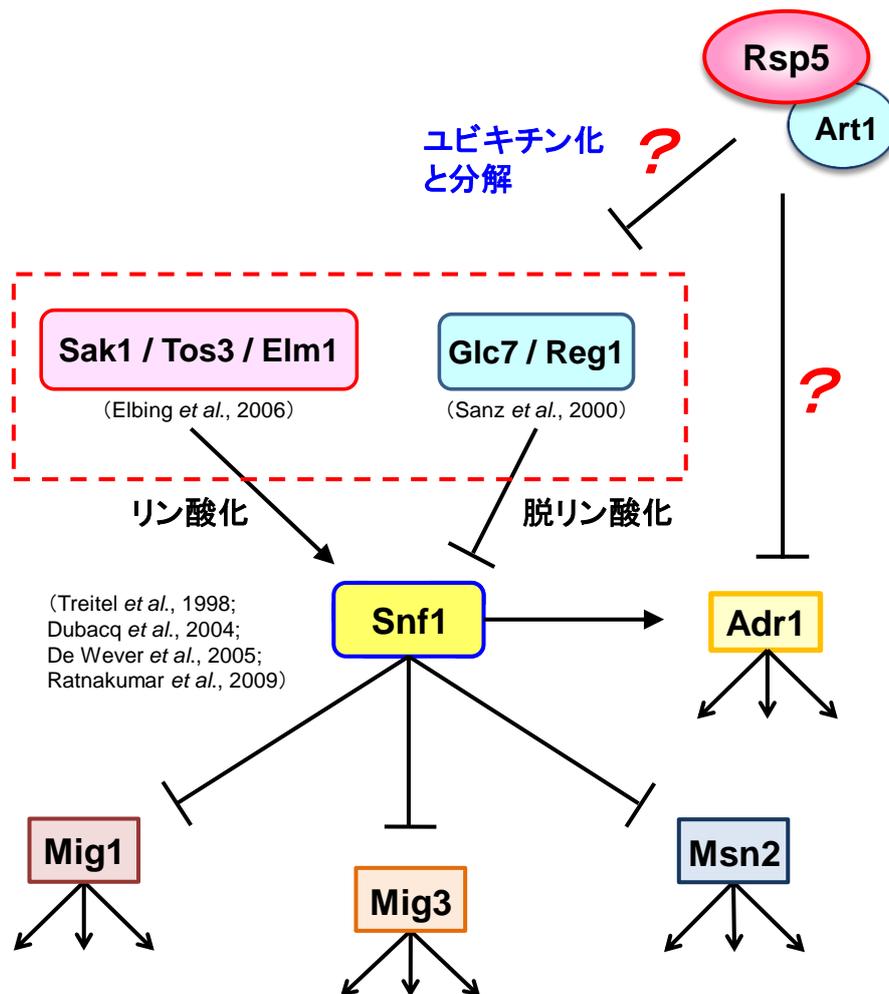


Figure 4-2. Rsp5 と Art1 による Snf1 と転写因子の制御モデル

Rsp5 と Art1 が、Snf1 の上流にあるキナーゼやホスファターゼをユビキチン化し、分解を促すことで Snf1 の活性調節を行う可能性が考えられる。また、*Adr1* を直接ユビキチン化し、分解を促すことで、その存在量を調節している可能性も推測できる。

Art1 と発酵能との関係

酵母において *ART1* 遺伝子の破壊は、熱ショックストレスのような短期的なストレスへの耐性を低下させることが報告されているが、慢性的な高温及びエタノールストレスに対する耐性も低下していることが確認できた (Fig.3-1-5, 3-2-5)。このことから、慢性的なストレス環境である発酵環境において、*ART1* 破壊株は野生株と比較してその有用機能の発揮に障害が生じている可能性が考えられた。しかし、意外なことに生育温度 30°C では、*ART1* 破壊株の発酵能に野生型株と比べて有意な差は見られなかった (Fig.3-2-7)。一方、38°C においては野生型株よりも有意に発酵能が低下していた (Fig.3-2-8)。また、*ART1* を過剰発現しても、慢性的なストレスに対する耐性の付与や、発酵能の向上といった効果は見られなかった (Fig.3-2-5, 7, 8)。ただ、本研究では *ART1* の過剰発現以外の手法は試しておらず、今後 *ART1* への変異導入等の手法を試す余地はまだ残されている。酵母のストレス耐性を強化することで、発酵能の向上を図るといふ戦略は一般的ではあるが、その一方で、ストレス耐性が低い細胞は必ず発酵能も低いとは限らない。事実、日本酒の醸造に用いられる一部の清酒酵母では、ストレス応答性転写因子 *Msn2*, *Msn4* を活性化するキナーゼをコードしている *RIM15* 遺伝子、ならびに *MSN4* 遺伝子に機能喪失型変異が入っており、ストレス耐性は実験室酵母よりも低いこと、そして、*RIM15* や *MSN2*, *MSN4* の破壊は、実験室酵母の発酵能を向上させることが報告されている (Watanabe *et al.*, 2011; 2012)。本研究においても、*ART1* 破壊株はストレス耐性が低く、かつ *Msn2* の下流にある遺伝子の発現量が低下していることが見出されたが、発酵能の向上には繋がらなかった。このように、一部重複したストレス応答経路の障害が見られ、ストレス耐性に関して類似の表現型を示しても、発酵能については全く逆の表現型が得られることは興味深い。ストレス応答の中にも、その経路の障害が酵母の発酵能の低下に繋がるもの、逆に向上に繋がるもの、そして全く影響を与えないものがあると考えられる。例えば、ストレス環境下では mRNA の選択的核外輸送や (Saavedra *et al.*, 1996; Stutz *et al.*, 1997)、p-body や stress granule と呼ばれる構造を形成することによる mRNA の翻訳制御が行われる (Kato *et al.*, 2011; Lavut & Raveh, 2012)。これは、ストレス応答に不要なタンパク質合成を抑制し、ストレス環境下での生存に必要な熱ショックタンパク質などの合成を優先できる合理的な仕組みではあるが、これによって発酵の過程で用いられるアルコール脱水素酵素などのタンパク質合成が抑制されてしまう可能性もある。今後、ストレス耐性を低下させるが、発酵能は向上する変異、ストレス耐性も発酵能も低下する変異それぞれについて網羅的な解析を行い、

発酵を阻害するストレス応答経路を解明することで、発酵能の向上に繋がるかも知れない。

今回、環境ストレス下における PMQC について、エタノールストレス下での Gap1 のユビキチン化とエンドサイトーシスを指標にして、そこに関わる Rsp5 とそのアダプタータンパク質の機能解析を行い、その分子機構を明らかにした。しかし、PMQC におけるアダプタータンパク質の汎用性については引き続き検証が必要である。また、環境ストレスによって変性した細胞膜タンパク質を Rsp5 やアダプタータンパク質がどのように認識しているのか、という問題も残されている。これまで当研究室において、新生タンパク質結合複合体サブユニットの Egd2 が、高温ストレス下で直接 Rsp5 によってユビキチン化されることを *in vitro* の実験系で見出している (Hiraishi *et al.*, 2009)。これはストレスによってシグナル伝達のような間接的な仕組みが働き、ユビキチン化が誘導されたのではなく、Rsp5 が直接変性タンパク質を認識し、ユビキチン化する能力があることを示唆している。また近年、ユビキチン化を受ける基質が変性することで、Rsp5 やアダプタータンパク質が特異的に結合する PY モチーフなどの特定の部位や構造が細胞質側に露出し、変性タンパク質が認識されやすくなるとの仮説が提唱された (Keener & Babst, 2013; Sommer *et al.*, 2014)。しかし、今のところ Bul1, Bul2 や Art1 が特異的に認識するモチーフなどは報告されていない。また、細胞外に露出した部位や細胞膜に埋め込まれた部位の変性を認識する機構は未だ不明である。酵母のストレス耐性への関与が報告され、細胞膜に埋め込まれた分子シャペロンであると推測される Hsp12 (Welker *et al.*, 2010) が、変性した細胞膜タンパク質を認識している可能性も考えられる。このように、PMQC の分子機構については未だ不明な点も多く、さらなる解析が必要である。

また本研究では、Art1 が PMQC 以外のストレス応答に関与することを示唆する知見が初めて得られた。Art1 の新規ターゲットを同定するまでには至らなかったが、今後も解析を続けることで、Rsp5 と Art1 をはじめとするアダプタータンパク質の新規な機能が発見されることが期待できる。近年、パーキンソン病の原因タンパク質とも言われるヒトの α -シヌクレインの毒性から、*N*-arylbenzimidazole (NAB) という薬剤が酵母や線虫、ラットの細胞を保護すること、そして NAB は Rsp5 によるタンパク質のエンドソームへの輸送を促進することが報告された (Tardiff *et al.*, 2013)。当研究室においても、 α -シヌクレインの分解能が高い変異型 Rsp5 を取得している (Wijayanti *et al.*, 2015)。したがって、Rsp5 とアダプタータンパク質の機能について解析を進めることで、PMQC

の分子機構の解明や、発酵能の向上だけでなく、神経変性疾患の治療に向けた基礎的な知見が得られる可能性も考えられる。本研究は Rsp5 とアダプタータンパク質の機能について、基礎研究のみならず、応用までも見据えた初めての研究であるが、今後も本研究のように、基礎研究を重視しつつ、応用面も意識した研究が進められ、その成果が社会に還元されていくことを望む。

5. 総括

- Rsp5 はエタノールストレス下で Gap1 を、Lys9 と Lys16 を介してポリユビキチン化し、エンドサイトーシスを誘導していた。
- Gap1 のエンドサイトーシスは様々な環境ストレスによって誘導され、環境ストレスに対する一般的な現象であることが示唆された。
- 環境ストレス下における Gap1 のエンドサイトーシスは、Rsp5 とそのアダプタータンパク質 (Bul1, Bul2, Art1, Art3, Art6) によって制御されていた。
- *rsp5^{A401E}* 株において、Rsp5 と Bul1, Bul2, Art1 との相互作用が減弱しており、当該変異株における Rsp5 の機能低下の原因が、基質認識能の低下である可能性を初めて見出した。
- エタノールストレス下における細胞膜タンパク質のエンドサイトーシス誘導は、Gap1 以外の細胞膜タンパク質でも観察され、PMQC について本研究で明らかにされたものと同様のメカニズムが、様々な細胞膜タンパク質に対しても機能している可能性が示された。
- エンドサイトーシス欠損株における *ART1* 遺伝子の破壊は酵母のストレス耐性を低下させた。加えて、エタノールストレス下において *ART1* 破壊株では、PMQC の障害だけでは説明できない様々な遺伝子の発現低下が見られ、Art1 が PMQC 以外のストレス応答に関与している可能性が示された。
- *ART1* の破壊によって、高温環境下での酵母の発酵能の低下が見られた。一方、*ART1* を過剰発現させても発酵能は向上しなかったことから、発酵能の向上には単純な過剰発現以外の手法を試す必要がある。

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 高木 博史教授に厚くお礼申し上げます。

また、本研究の全般にわたり実験、論文作製のご指導、ご助言を下さいました同研究室の渡辺 大輔助教に心よりお礼申し上げます。さらに、日頃より様々なご指導、ご助言を下さいました同研究室の吉田 信行助教（現・静岡大学 工学部 准教授）、大津 厳生助教、大城 聡博士（現・国立国際医療研究センター 研究所）をはじめ、共に研究生活を過ごした同研究室の皆様、下からのプレッシャーにより成長の機会を与えてくれた優秀な後輩達、先行研究において多くの財産を残して下さいました先輩方に厚くお礼を申し上げます。

東北大学大学院在籍時よりお世話になり、NAIST や高木研との出会いを導いて下さった、国際基督教大学 教養学部の布柴 達男教授に深く感謝致します。

最後に、苦楽を共にした微生物達には哀悼と感謝の意を、そしてこれまで心身ともに支え続けてくれた家族には心からの感謝の意を表します。本当にありがとうございました。

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.* **23**, 7566-84.

Alvaro CG, O'Donnell AF, Prosser DC, Augustine AA, Goldman A, Brodsky JL, Cyert MS, Wendland B, Thorner J. (2014) Specific α -arrestins negatively regulate *Saccharomyces cerevisiae* pheromone response by down-modulating the G-protein-coupled receptor Ste2. *Mol Cell Biol.* **34**, 2660-81.

Apaja PM, Xu H, Lukacs GL, (2010) Quality control for unfolded proteins at the plasma membrane. *J. Cell Biol.* **191**, 553-570.

Attfield PV. (1997) Stress tolerance: the key to effective strains of industrial baker's yeast. *Nat Biotechnol.* **15**, 1351-7.

Becuwe M, Léon S. (2014) Integrated control of transporter endocytosis and recycling by the arrestin-related protein Rod1 and the ubiquitin ligase Rsp5. *Elife.* **3**. e03307.

Bénédicti H, Raths S, Crausaz F, Riezman H. (1994) The END3 gene encodes a protein that is required for the internalization step of endocytosis and for actin cytoskeleton organization in yeast. *Mol Biol Cell.* **5**, 1023-37.

Boy-Marcotte E, Lagniel G, Perrot M, Bussereau F, Boudsocq A, Jacquet M, Labarre J. (1999) The heat shock response in yeast: differential regulations and contributions of the Msn2p/Msn4p and Hsf1p regulons. *Mol Microbiol.* **33**, 274-83.

Boysen JH, Mitchell AP. (2006) Control of Bro1-domain protein Rim20 localization by external pH, ESCRT machinery, and the *Saccharomyces cerevisiae* Rim101 pathway. *Mol Biol Cell.* **17**, 1344-53.

Chen HI, Sudol M. (1995) The WW domain of Yes-associated protein binds a proline-rich ligand that differs from the consensus established for Src homology 3-binding modules. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92**, 7819-23.

Crapeau, M., Merhi, A., and André, B. (2014). Stress conditions promote yeast Gap1 permease ubiquitylation and down-regulation via the arrestin-like Bul and Aly proteins. *J. Biol. Chem.*, **289**, 22103-22116.

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.

De Wever V, Reiter W, Ballarini A, Ammerer G, Brocard C. (2005) A dual role for PP1 in shaping the Msn2-dependent transcriptional response to glucose starvation. *EMBO J.* **24**, 4115-23.

Dubacq C, Chevalier A, Mann C. (2004) The protein kinase Snf1 is required for tolerance to the ribonucleotide reductase inhibitor hydroxyurea. *Mol Cell Biol.* **24**, 2560-72.

Elbing K, McCartney RR, Schmidt MC. (2006) Purification and characterization of the three Snf1-activating kinases of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J.* **393**, 797-805.

Ellgaard L, Helenius A, (2003) Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 181-191.

Fang NN, Ng AH, Measday V, Mayor T. (2011) Hul5 HECT ubiquitin ligase plays a major role in the ubiquitylation and turnover of cytosolic misfolded proteins. *Nat Cell Biol.* **13**, 1344-52.

Finley D, Ulrich HD, Sommer T, Kaiser P. (2012) The ubiquitin-proteasome system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* **192**, 319-60.

Finley D. (2001) Signal transduction. An alternative to destruction. *Nature* **412**, 283-286

Frolova E, Johnston M, Majors J, (1999) Binding of the glucose-dependent Mig1 repressor to the GAL1 and GAL4 promoters in vivo: regulation by glucose and chromatin structure. *Nucleic Acids Res.* **27**, 1350-1358.

- Fujii K, Kitabatake M, Sakata T, Miyata A, Ohno M. (2009) A role for ubiquitin in the clearance of nonfunctional rRNAs. *Genes Dev.* **23**, 963-74.
- Gibson BR, Lawrence SJ, Leclaire JP, Powell CD, Smart KA. (2007) Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. *FEMS Microbiol Rev.* **31**, 535-69.
- 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., 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.
- Heck JW, Cheung SK, Hampton RY. (2010) Cytoplasmic protein quality control degradation mediated by parallel actions of the E3 ubiquitin ligases Ubr1 and San1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **107**, 1106-11.
- Hein C, Springael JY, Volland C, Haguenaer-Tsapis R, André B. (1995) NP11, an essential yeast gene involved in induced degradation of Gap1 and Fur4 permeases, encodes the Rsp5 ubiquitin-protein ligase. *Mol Microbiol.* **18**, 77-87.
- Helliwell SB, Losko S, Kaiser CA. (2001) Components of a ubiquitin ligase complex specify polyubiquitination and intracellular trafficking of the general amino acid permease. *J Cell Biol.* **153**, 649-62.
- Hershko A, Ciechanover A. (1998) The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem.* **67**, 425-79.
- Hiraishi H, Mochizuki M, Takagi H. (2006) Enhancement of stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* by overexpression of ubiquitin ligase Rsp5 and ubiquitin-conjugating enzymes. *Biosci Biotechnol Biochem.* **70**, 2762-5.

- Hiraishi H, Shimada T, Ohtsu I, Sato TA, Takagi H. (2009) The yeast ubiquitin ligase Rsp5 downregulates the alpha subunit of nascent polypeptide-associated complex Egd2 under stress conditions. *FEBS J.* **276**, 5287-97.
- Hirsch C, Gauss R, Horn SC, Neuber O, Sommer T, (2009) The ubiquitylation machinery of the endoplasmic reticulum. *Nature* **458**, 453-460.
- 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.
- 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.
- Jenness DD, Li Y, Tipper C, Spatrick P. (1997) Elimination of defective alpha-factor pheromone receptors. *Mol Cell Biol.* **17**, 6236-45.
- 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**, 1037-41.
- Kato K, Yamamoto Y, Izawa S. (2011) Severe ethanol stress induces assembly of stress granules in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* **28**, 339-47.
- Keener JM, Babst M. (2013) Quality control and substrate-dependent downregulation of the nutrient transporter Fur4. *Traffic.* **14**, 412-27.
- Lavut A, Raveh D. (2012) Sequestration of highly expressed mRNAs in cytoplasmic granules, P-bodies, and stress granules enhances cell viability. *PLoS Genet.* **8**, e1002527.

- Léon, S. & Haguenaer-Tsapis, R. (2009) Ubiquitin ligase adaptors: regulators of ubiquitylation and endocytosis of plasma membrane proteins. *Exp. Cell Res.* **315**, 1574-1583.
- Li Y, Kane T, Tipper C, Spatrick P, Jenness DD, (1999) Yeast mutants affecting possible quality control of plasma membrane proteins. *Mol. Cell Biol.* **19**, 3588-3599.
- 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.
- Ma M, Liu ZL. (2010) Mechanisms of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **87**, 829–845.
- MacGurn JA. (2014) Garbage on, garbage off: new insights into plasma membrane protein quality control. *Curr Opin Cell Biol.* **29**, 92-8.
- Makanae K, Kintaka R, Makino T, Kitano H, Moriya H. (2013) Identification of dosage-sensitive genes in *Saccharomyces cerevisiae* using the genetic tug-of-war method. *Genome Res.* **23**, 300-11.
- Martínez-Pastor MT, Marchler G, Schüller 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**, 2227-35.
- 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.
- Mizuno T, Masuda Y, Irie K. (2015) The *Saccharomyces cerevisiae* AMPK, Snf1, Negatively Regulates the Hog1 MAPK Pathway in ER Stress Response. *PLoS Genet.* **11**, e1005491.
- Nikko E, Pelham HR. (2009) Arrestin-mediated endocytosis of yeast plasma membrane transporters. *Traffic.* **10**, 1856-67.

- 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 AF, Huang L, Thorner J, Cyert MS. (2013) A calcineurin-dependent switch controls the trafficking function of α -arrestin Aly1/Art6. *J Biol Chem.* **288**, 24063-80.
- 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.
- Ogata T, Yamagishi H, Ukibe K and Takagi H. (2012) Construction of bottom-fermenting yeasts that overexpress the ubiquitin ligase RSP5 gene and their effects on high-gravity fermentation. *J. Brew. Distill.*, **3**, 1-5.
- Okiyoneda T, Barrière H, Bagdány M, Rabeh WM, Du K, Höhfeld J, Young JC, Lukacs GL, (2010) Peripheral protein quality control removes unfolded CFTR from the plasma membrane. *Science* **329**, 805-810.
- Peng J, Schwartz D, Elias JE, Thoreen CC, Cheng D, Marsischky G, Roelofs J, Finley D, Gygi SP. (2003) A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nat Biotechnol.* **21**, 921-6.
- Pickart CM, Fushman D. (2004) Polyubiquitin chains: polymeric protein signals. *Curr Opin Chem Biol.* **8**, 610-6.
- Pizzirusso M, Chang A. (2004) Ubiquitin-mediated targeting of a mutant plasma membrane ATPase, Pma1-7, to the endosomal/vacuolar system in yeast. *Mol Biol Cell.* **15**, 2401-9.
- Ptacek J, Devgan G, Michaud G, Zhu H, Zhu X, Fasolo J, Guo H, Jona G, Breitkreutz A, Sopko R, McCartney RR, Schmidt MC, Rachidi N, Lee SJ, Mah AS, Meng L, Stark MJ, Stern DF, De Virgilio C, Tyers M, Andrews B, Gerstein M, Schweitzer B, Predki PF, Snyder M. (2005) Global analysis of protein phosphorylation in yeast. *Nature.* **438**, 679-84.

- Ratnakumar S, Kacherovsky N, Arms E, Young ET. (2009) Snf1 controls the activity of *adr1* through dephosphorylation of Ser230. *Genetics*. **182**, 735-45.
- 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.
- 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.
- Saavedra C, Tung KS, Amberg DC, Hopper AK, Cole CN. (1996) Regulation of mRNA export in response to stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev*. **10**, 1608-20.
- Saeki Y, Isono E, Toh-E A. (2005) Preparation of ubiquitinated substrates by the PY motif-insertion method for monitoring 26S proteasome activity. *Methods Enzymol*. **399**, 215-27.
- Sambrook, J. & Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edn*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Santoro N, Johansson N, Thiele DJ. (1998) Heat shock element architecture is an important determinant in the temperature and transactivation domain requirements for heat shock transcription factor. *Mol Cell Biol*. **18**, 6340-52.
- Sanz P, Alms GR, Haystead TA, Carlson M. (2000) Regulatory interactions between the Reg1-Glc7 protein phosphatase and the Snf1 protein kinase. *Mol Cell Biol*. **20**, 1321-8.
- Sasaki, T. and Takagi, H. (2013). Phosphorylation of a conserved Thr357 in yeast Nedd4-like ubiquitin ligase Rsp5 is involved in down-regulation of the general amino acid permease Gap1. *Genes Cells*. **18**, 459-475.
- Shahsavarani H, Sugiyama M, Kaneko Y, Chuenchit B, Harashima S. (2012) Superior thermotolerance of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient bioethanol fermentation can be achieved by overexpression of RSP5 ubiquitin ligase. *Biotechnol Adv*. **30**, 1289-300.

- Shearwin-Whyatt L, Dalton HE, Foot N, Kumar S. (2006) Regulation of functional diversity within the Nedd4 family by accessory and adaptor proteins. *Bioessays*. **28**, 617-28.
- Shi Y, Wang J, Li JD, Ren H, Guan W, He M, Yan W, Zhou Y, Hu Z, Zhang J, Xiao J, Su Z, Dai M, Wang J, Jiang H, Guo J, Zhou Y, Zhang F, Li N, Du J, Xu Q, Hu Y, Pan Q, Shen L, Wang G, Xia K, Zhang Z, Tang B. (2013) Identification of CHIP as a novel causative gene for autosomal recessive cerebellar ataxia. *PLoS One*. **8**, e81884.
- 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.
- Sommer T, Weber A, Jarosch E. (2014) Rsp5/Nedd4 clears cells of heat-damaged proteins. *Nat Cell Biol.* **16**, 1130-2.
- 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.
- Stutz F, Kantor J, Zhang D, McCarthy T, Neville M, Rosbash M. (1997) The yeast nucleoporin rip1p contributes to multiple export pathways with no essential role for its FG-repeat region. *Genes Dev.* **11**, 2857-68.
- Sugiyama M, Ikushima S, Nakazawa T, Kaneko Y, Harashima S. (2005) PCR-mediated repeated chromosome splitting in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechniques*. **38**, 909-14.
- Takagi H, Takaoka M, Kawaguchi A, Kubo Y. (2005) Effect of L-proline on sake brewing and ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol.* **71**, 8656-62.
- Tardiff DF, Jui NT, Khurana V, Tambe MA, Thompson ML, Chung CY, Kamadurai HB, Kim HT, Lancaster AK, Caldwell KA, Caldwell GA, Rochet JC, Buchwald SL, Lindquist

S. (2013) Yeast reveal a "druggable" Rsp5/Nedd4 network that ameliorates α -synuclein toxicity in neurons. *Science*. **342**, 979-83.

Teter SA, Klionsky DJ. (2000) Transport of proteins to the yeast vacuole: autophagy, cytoplasm-to-vacuole targeting, and role of the vacuole in degradation. *Semin Cell Dev Biol*. **11**, 173-9.

Treitel MA, Kuchin S, Carlson M. (1998) Snf1 protein kinase regulates phosphorylation of the Mig1 repressor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. **18**, 6273-80.

Watanabe D, Araki Y, Zhou Y, Maeya N, Akao T, Shimoi H. (2012) A loss-of-function mutation in the PAS kinase Rim15p is related to defective quiescence entry and high fermentation rates of *Saccharomyces cerevisiae* sake yeast strains. *Appl Environ Microbiol*. **78**, 4008-16.

Watanabe D, Murai H, Tanahashi R, Nakamura K, Sasaki T, Takagi H. (2015) Cooperative and selective roles of the WW domains of the yeast Nedd4-like ubiquitin ligase Rsp5 in the recognition of the arrestin-like adaptors Bul1 and Bul2. *Biochem Biophys Res Commun*. **463**, 76-81.

Watanabe D, Wu H, Noguchi C, Zhou Y, Akao T, Shimoi H. (2011) Enhancement of the initial rate of ethanol fermentation due to dysfunction of yeast stress response components Msn2p and/or Msn4p. *Appl Environ Microbiol*. **77**, 934-41.

Watanabe M, Watanabe D, Akao T, Shimoi H. (2009) Overexpression of MSN2 in a sake yeast strain promotes ethanol tolerance and increases ethanol production in sake brewing. *J Biosci Bioeng*. **107**, 516-8.

Welker S, Rudolph B, Frenzel E, Hagn F, Liebisch G, Schmitz G, Scheuring J, Kerth A, Blume A, Weinkauff S, Haslbeck M, Kessler H, Buchner J. (2010) Hsp12 is an intrinsically unstructured stress protein that folds upon membrane association and modulates membrane function. *Mol Cell*. **39**, 507-20.

Wijayanti I, Watanabe D, Oshiro S, Takagi H. (2015) Isolation and functional analysis of yeast ubiquitin ligase Rsp5 variants that alleviate the toxicity of human α -synuclein. *J Biochem.* **157**, 251-60.

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.

Zhao Y, Macgurn JA, Liu M, Emr S. (2013) The ART-Rsp5 ubiquitin ligase network comprises a plasma membrane quality control system that protects yeast cells from proteotoxic stress. *Elife.* **2**, e00459.

清水 優子, (2013) 酵母ユビキチンリガーゼ Rsp5 によるストレス下での原形質膜タンパク質の品質管理機構. 奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科修士論文

鈴木 悦子, (2011) 酵母ユビキチンリガーゼ Rsp5 によるエタノールストレス下での原形質膜タンパク質分解機構の解析. 奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科修士論文